Viologen 박막을 이용한 과산화수소의 전기화학적 검출 특성

論 文
57-11-18

Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide based on Viologen Monolayers

崔 元 碩* · 李 東 潤** · 朴 王目 玹*** · 朴 在 哲§ · 權 寧 守†
(Won-Suk Choi · Dong-Yun Lee · Sang-Hyun Park · Jae-Chul Park · Young-Soo Kwon)

Abstract - In this paper, we fabricated a biosensor for detecting hydrogen peroxide and investigated the sensing property. We prepared a viologen and hemoglobin modified gold electrode using self-assembly and layer by layer method. The electrochemical property of the viologen derivative was characterized in 0.1 M $NaClO_4$ electrolyte solution by cyclic voltammetry. The modified electrode showed reversible electrochemical properties and high stability. From the results, the viologen can act as a charge transfer mediator for access to the electrode surface. The catalytic characteristics of the designed sensor proved that hemoglobin has been kept in its natural structure and can retain its biological activity. The designed biosensor showed a fast amperometric response, excellent linearity and low detection limit. In addition, it had high sensitivity, good reproducibility and stability.

Key Words : Hydrogen peroxide, Viologen, Hemoglobin, Cyclic voltammetry, Detection limit

1. 서 론

최근 여러 종류의 바이오센서 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 다양한 분야에서 응용되고 있다. 특히, 고감도 및 반응 특이성을 실현시킬 수 있는 바이오센서에 대한 기술 개발은 매우 흥미로운 분야라 할 수 있다 [1]. 바이오센서는 혈당측정기와 같은 의료기기 분야에서도 중요시되고 있으며, 여러 환경오염물질을 검출하는 분야에서도 그 중요성이 점점 커지고 있다.

현대의 모든 생물들은 모두 산소를 이용하여 에너지 대사를 한다. 산소는 생물의 대사활동 중에서 에너지를 발생시키는 여러 가지 경로에서 꼭 필요한 요소이다. 이러한 대사활동의 부산물로 생성되는 대표적인 물질이 과산화수소이다. 일반적으로 과산화수소는 특별하게 과량이 유출되지 않는 한 환경에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 오히려 환경적으로는 쉽게 분해되며, 활성 산소를 발생시킴으로써 유기물과 세균을 분해하는 무공해 물질로 산업적으로 많이 이용되고 있다. 그러나 과산화수소의 농도 조절을 잘못할 경우 많은 문제점이 발생한다. 또한, 생물체 내에서 과산화수소의 제거는 특정 환경에 과산화수소가 있을 경우 발생하는 활성산소로 인한 생물조직의 손상으로부터 생물체를 보호하는 데 아주 중요한 것이다. 그렇기 때문에 산업적, 화학적, 생물학적, 임상학적으로 과산화수소의 농도를 정확하게 측정하는 것은 매우 중요하다 [2].

미소량의 과산화수소를 검출하는 방법에는 여러 가지가 있으나 측정방법이 간단하고 높은 감도의 선택성 등의 장점이 있는 전류법이 많이 이용되고 있다 [3]. 일반적으로 과산화 수소를 전기화학적으로 전극표면에서 직접 산화·환원시킬 수도 있으나 이런 경우 높은 전위가 필요하고 이로 인하여 여러 가지 방해물질도 함께 산화·환원이 되므로 감도와 선택성을 갖기 어렵다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 센서의 제작에 있어 효소를 전극 표면에 고정하여 선택성과 촉매 작용을 이용한 바이오센서가 주로 연구된다. 효소의 고정 방법에 따라 흡착 [4], 공유결합 [5] 등의 방법이 많이 연구 되었으나, 이러한 방법은 센서의 안정성이 떨어지고, 효소의 활동성이 낮아진다는 단점이 있다.

따라서, 본 연구에서는 환경오염물질의 하나인 과산화수소를 검출하기 위하여 효소 대신 전자전달 매개체로 많이 응용되는 Viologen 분자와 바이오 물질의 하나인 헤모글로빈 분자를 이용하여 전극을 제작하였으며, 제작된 전극을 센서로 활용 하여 과산화수소 검출센서로서의 응용가능성을 제시하고자 한다. 먼저 자기조립법(Self-Assembly)에 의해 Viologen 유도체를 수정진동자의 금 전극에 고정화시켰으며, 전기화학 수정진동자 측정법 [6] (electrochemical quartz crystal micro- balance, EQCM)을 이용하여 전자전달 매개체로서의 특성을 조사하였다. 또한, 제작된 전극 위에 헤모글로빈 분자를 수식하여 센서로 제작한 뒤, 센서로서의 안정조건 및 최적조건 등을 분석하였다.

† 교신저자, 正會員 : 東亞大學 電氣工學科 敎授 · 工學博士
E-mail : yskwon@dau.ac.kr
* 正 會 員 : 東亞大學 나노工學科 博士課程
** 正 會 員 : 東亞大學 電氣工學科 博士課程
*** 正 會 員 : 東亞大學 醫學科 碩士課程
§ 正 會 員 : 永進專門大學 電子情報系列 敎授 · 工學博士
接受日字 : 2008年 8月 14日
最終完了 : 2008年 9月 1日

2. 실험 방법

본 실험에는 자기조립이 가능하고 전하전달 매개체로서의 기능을 가지고 있는 Viologen 유도체(VC_8SH)를 사용하였으며, 분자구조는 그림 1에 나타내었다.

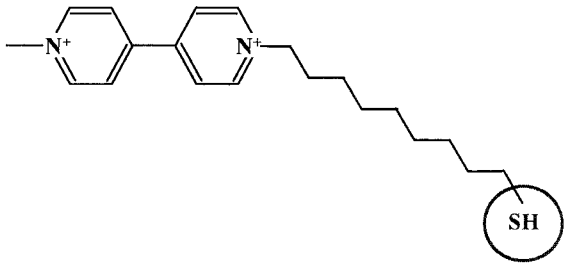


그림 1 Viologen (VC_8SH) 유도체의 분자구조도.
Fig. 1 The molecular structure of viologen derivative.

먼저 금 전극이 스퍼터링된 9 MHz의 At-Cut 수정진동자 전극 표면을 piranha 용액(H_2SO_4:H_2O_2=3:1)에 1분간 담근 후, 흐르는 물에 세척하여 전처리하였다. 이와 같이 전처리된 수정진동자는 Ar 가스에 잘 정제된 용매 (Ethaol:Acdtonitrile= 1:1)에 담가 실온에서 자기조립 하였으며, 이 때 Viologen 분자의 농도는 2 mM 이었다.

그림 2는 자기조립된 Viologen 박막의 전기화학적 특성을 측정하는 장치이다. QCA 922 (Seiko EG&G, Japan), Potentiostat 263A (PerkinElmer Instrument, USA) 장비를 사용하여 측정하였으며, 자기조립 박막은 작업전극 (Working Electrode, W.E.), Pt wire는 상대전극 (Counter Electrode, C.E.), KCl 용액을 완충용액으로 사용한 Ag/AgCl 전극은 기준전극 (Reference Electrode, R.E.)으로 각각 사용하였다. 본 연구에서는 0.1 M $NaClO_4$ 전해질 용액을 이용하여 0 V 에서 -1.0 V의 범위에서 5회 반복하여 측정하였다.

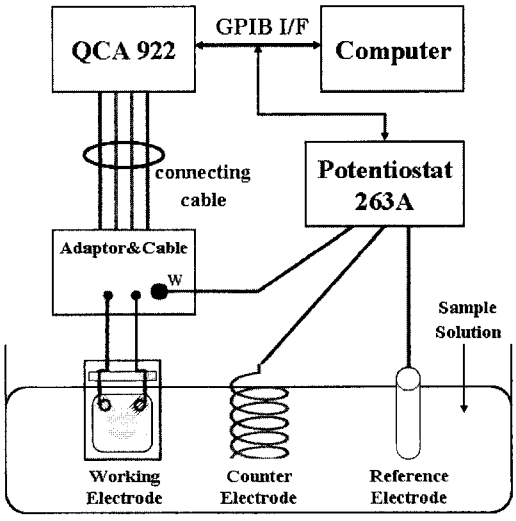
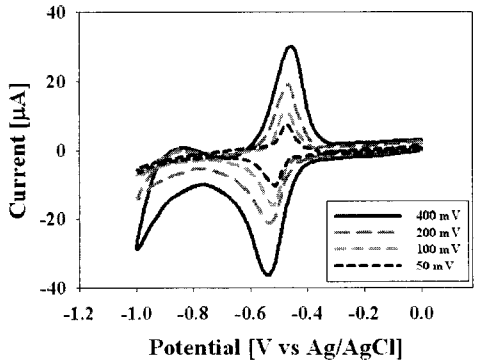


그림 2 수동진동자를 이용한 3전극 전기화학 실험장치.
Fig. 2 The 3-electrode setup electriochemical measurement system using QCM.

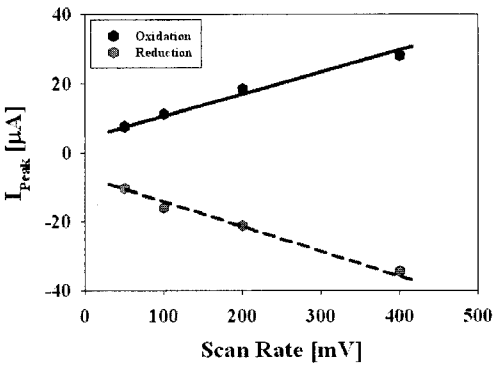
과산화수소 검출을 위한 전극은 헤모글로빈 분자를 Layer by Layer 방식으로 자기조립된 Viologen 박막에 수식하여 제작하였다. 제작된 전극은 순환전압전류법을 이용하여 Viologen 유도체만 수식된 전극과의 산화·환원반응을 비교하여 헤모글로빈 분자가 수식되어 있음을 증명하였다. 또한, 전극의 최적조건을 조사하기 위하여 pH 및 작업전위를 조사하였으며, 전류법을 이용하여 과산화수소를 주입하였을 때 변화하는 전류의 양을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

자기조립된 Viologen 박막은 0.1 M $NaClO_4$ 전해질 용액에서 순환전압전류 실험을 행하였다. 1전자 환원으로 얻어지는 양이온 라디칼에 대한 산화·환원 반응을 보기 위해서 전위범위를 0 ~ -1.0 V의 범위에서 실험을 진행하였다. 그림 3 (a)는 산화·환원반응을 (b)는 피크전류 대 주사속도와의 관계를 나타내고 있다. 산화·환원피크 전위는 각각 -0.46 V, -0.52 V에서 나타나고 있으며, 산화피크전류와 환원피크전류의 크기가 동등하고, 피크전류 대 주사속도의 관계가 선형적인 것으로 미루어 볼 때, $V^{2+} \rightarrow V^{\cdot+}$ 로 표현되는 1전자 환원에 의한 양이온 라디칼에 대한 산화·환원반응이 가역적으로 일어남을 알 수 있다 [7].



(a)



(b)

그림 3 자기조립된 Viologen 박막의 (a) 산화·환원반응과 (b) 주사속도 대 피크전류와의 관계.
Fig. 3 Cyclic voltammograms (a) and relationship between scan rate and peak current (b) of self-assembled viologen monolayers.

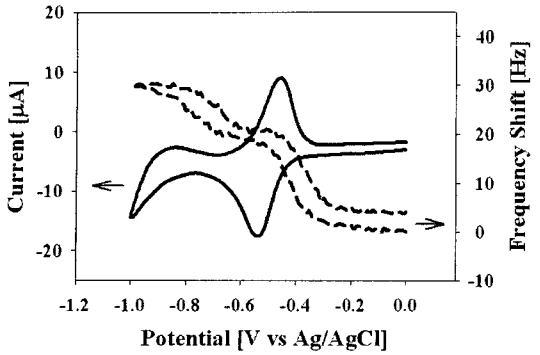


그림 4 EQCM 응답을 이용한 전하이동 특성.
Fig. 4 Charge Transfer property using EQCM response.

그림 4는 산화·환원반응시 동시에 측정된 수정진동자의 공진주파수 변화이다. 산화·환원반응이 나타남에 따라 주파수의 변화 역시 나타나고 있다. 산화·환원반응이 일어나는 동안 공진주파수의 변화는 18.1 Hz 였으며, Sauerbrey 식을 (1) 이용하여 반응이 일어나는 동안 이동한 전하의 양은 약 19.4 ng 이었다 [8]. 또한, 반응시 이동한 이온의 개수는 아보가드로수를 적용하면 2.33×10^{13} 개이었다 [9].

$$\Delta m = \frac{\Delta f \cdot A \cdot \sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}}{-2F_0^{\,2}} \qquad (1)$$

$$F_0 = 9\,[MHz],\ A = 0.196\,[cm^2],$$
$$\rho_q = 2.65\,[g/cm^3],\ \mu_q = 2.95\times10^{11}\,[dyn/cm^2]$$

한편, 산화·환원반응과 전하이동특성 등을 통하여 자기조립된 Viologen 박막이 전해질 용액에서 전자전달 매개체로서 역할을 하는 것을 조사하였다. 전자전달 매개체로서의 특성을 가지는 Viologen 박막과 헤모글로빈을 이용하여 과산화수소를 검출할 수 있는 전극을 제작하였다. 먼저 헤모글로빈이 수식되어 있는지를 확인하기 위하여 Viologen 분자만 수식되어 있는 전극의 산화·환원반응 특성을 비교하였다. 그림 5는 두 전극에 산화·환원반응의 그래프와 산화·환원 피크의 위치가 다르게 나타남을 알 수 있다. 또한, 헤모글로빈

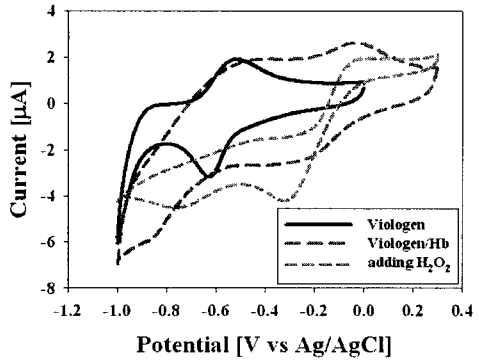


그림 5 Viologen-헤모글로빈을 수식한 전극의 산화·환원반응 특성.
Fig. 5 Redox reaction property of viologen-hemoglobin modified electrode.

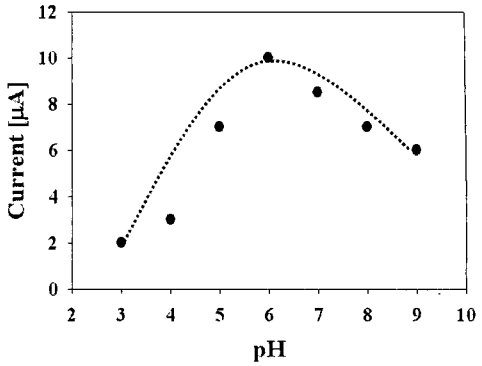
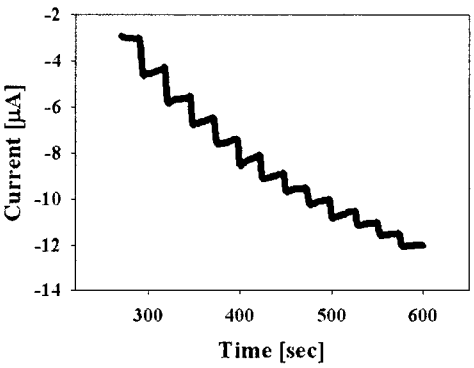


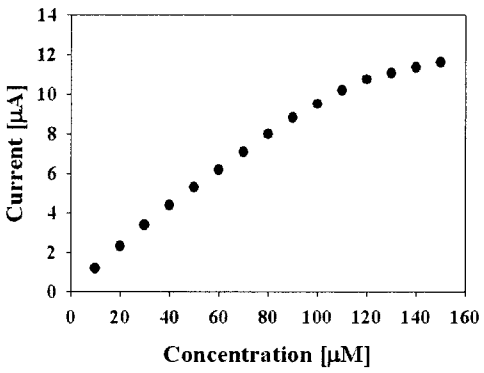
그림 6 pH 영향에 따른 센서의 감응 특성.
Fig. 6 Response property of the sensor by pH effect.

이 수식되어 있는 전극에 과산화수소를 주입하였을 때의 산화·환원반응 특성의 변화를 나타내고 있다. 이러한 결과는 과산화수소의 환원반응이 용이하게 발생한다는 것을 의미하는 것으로 생각된다.

센서의 활동성은 용액의 pH 값에 따라 영향을 받으므로 pH 영향에 대한 실험을 하였다. 그림 6은 제작된 센서의 최대 감응이 pH 6에서 나타나는 것을 보여준다. 전극에 수식된 바이오 물질의 종류에 따라 pH의 최적조건은 조금씩 차이를 보이게 되는데, 흡착시키는 경우는 약간 산성 쪽에서, 고정화시키는 경우에는 약간 염기성에서 최적조건은 보이는



(a)



(b)

그림 7 전류응답과 보정곡선 특성.
Fig. 7 Amperometric response and calibration plot of the sensor.

것이 일반적이다 [10]. 또한, 증류수에 녹인 0.5 M 과산화수소 용액을 가지고 -350 mV ~ -50 mV (vs. Ag/AgCl)의 전위 범위에서 센서의 감응을 살펴보았다. 그 결과 센서의 감응은 -350 mV에서 점차 증가하다가 -135 mV에서 최대를 이루고 전위가 더 증가하면 점차 감소하는 것을 알 수 있었다 [11].

그림 7 (a)는 제작된 센서에 연속적으로 과산화수소를 주입하였을 경우 어떻게 반응하는가를 나타내고 있다. 결과에 의하면 10번 이상 동일한 양을 주입하였음에도 재현성 있는 반응을 나타내었다. 그리고 과산화수소 용액을 주입할 때마다 10초 이내에 안정된 상태의 전류 특성을 나타낸다. 이러한 결과는 기존의 연구들보다 빠른 감응 시간을 나타내고 있다. 그림 7 (b)는 검출곡선을 나타내고 있다. 전극의 검출한계는 2.5×10^{7} M 이었다 (S/N=3) [12]. 센서의 안정성에 대한 실험결과는 30일까지 90% 이상의 성능을 유지하여 기존의 센서보다 안정성이 뛰어나다는 것을 확인하였으며 이러한 결과는 온도 및 보관에 어려움이 있는 효소보다 유리한 점이 많은 Viologen 유도체를 이용한 결과라고 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서는 환경오염을 일으키는 물질 중 하나인 과산화수소를 검출하기 위하여 검출센서를 제작하여 특성을 조사 하였다. 수정진동자의 금 전극에 자기조립법을 이용하여 Viologen 박막을 제작하였으며, 제작된 박막은 순환전압전류법을 이용하여 산화·환원반응을 조사하였으며, EQCM 측정을 통하여 전하이동 특성을 분석하였다.

또한, Viologen 박막 위에 헤모글로빈 분자를 수식하여 전극을 제작한 후, 순환전압전류법을 이용하여 제작된 전극의 산화·환원반응과 과산화수소를 주입하였을 때의 검출특성을 조사하였다. 제작된 전극의 pH 특성, 작업전위 특성 등을 조사하여 센서로서의 최적조건을 조사하였으며, 감응특성 및 안정성에 대해서도 측정하였다. 실제 측정된 결과로는 pH 6, -135 mV의 작업전위가 최적조건을 충족하였으며, 10초 이내의 빠른 감응특성과 30일 후에도 90% 이상의 특성이 나타나 안정성도 우수하다는 것도 확인하였다.

본 연구를 통해 개발된 센서를 실제 측정센서로 응용하기 위해서는 센서의 재현성, 선택성, 안정성 등이 좋게 나타나야 하고, 측정 장치도 소형화가 이루어져야 한다. 이러한 관점 에서 최근 활발히 연구되어지고 있는 나노기술을 이용한 연구가 이루어진다면 마이크로 단위보다 훨씬 넓은 접촉면적 확보가 가능해져 효율적인 검출이 가능한 바이오센서가 개발될 수 있을 것이라 기대된다.

감사의 글

이 논문은 동아대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

[1] A. Morrin, A. Guzman, A. J. Killard, J. M. Pingarron, M. R. Smyth, "Characterisation of horseradish peroxidase immobilisation on an electrochemical biosensor by colorimetric and amperometric techniques", Biosens. Bioelectron. 18, 715, 2003.

[2] Z. Tong, R. Yuan, Y. Chai, S. Chen, Y. Xie, "Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on Hemoglobin/DNA/Poly-2,6-pyridinediamine modified gold electrode", Thin Solid Films, 515, 8054, 2007.

[3] A.K.M. Kafi, F. Yin, H.-K. Shin, Y.-S. Kwon, "Hydrogen peroxide biosensor based on DNA-Hb modified gold electrode", Thin Solid Films 499, 420, 2006.

[4] C. Nistor, J. Emneus, L. Gorton, A. Ciusu, "Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds", Anal. Chim. Acta, 387, 309, 1999.

[5] G. F. Hall, D. J. Best, A. P. F. Turner, "The determination of p-cresol in chloroform with an enzyme electrode used in the organic phase", Anal. Chim. Acta, 213, 113, 1988.

[6] D. A. Buttry, M. D. Ward, "Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance", Chem. Rev., 92, 1355 (1992).

[7] D. Y. Lee, A.K.M. Kafi, S. H. Park, D. J. Qian, Y. S. Kwon, "Influence of Anions on Electrochemical Redox Reactions and Electrical Properties using a Viologen Derivative", Jpn. J. Appl. Phys., 45(4B), 3772, 2006.

[8] G. Sauerbrey, "The uses of a Quartz Crystal Vibrator from Weighting Thin Films on a Microbalance", Z. Phy., 155, 206 (1959).

[9] D. Y. Lee, A.K.M. Kafi, S. H. Park, Y. S. Kwon, "Charge Transfer Property of Self-Assembled Viologen Derivative by Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Response", J. Nanosci. Nanotechnol., 6, 3657, 2006.

[10] H. N Choi, M. A. Kim, W.-Y. Lee, "Amperometric glucose biosensor based on sol-gel-derived metal oxide/Nafion composite films", Analytica Chimica Acta, 537, 179, 2005.

[11] A.K.M. Kafi, D.-Y. Lee, S.-H. Park, Y.-S. Kwon, "Development of a peroxide biosensor made of a thiolated-viologen and hemoglobin-modified gold electrode", Microchemical J., 85, 308, 2007.

[12] L. Shang, Z. Sun, X. Wang, G. Li, "Enhanced Peroxidase Activity of Hemoglobin in a DNA Membrane and Its Application to an Unmediated Hydrogen Peroxide Biosensor", Anal. Sci. 19 (2003) 1537.

저 자 소 개

최 원 석 (崔 元 碩)

1964년 4월 23일생, 1991년 경일대 전자공학과 졸업, 1998년 영남대 대학원 정보통신학과 졸업(석사), 현재 동아대학교 나노공학과 박사과정.
Tel : (051) 200-6751
Fax : (051) 200-6753
E-mail : privia@donga.ac.kr

이 동 윤 (李 東 潤)

1977년 6월 7일생, 2004년 동아대 전기공학과 졸업, 2006년 동 대학원 전기공학과 졸업(석사), 현재 동 대학원 전기공학과 박사과정.
Tel : (051) 200-6949
Fax : (051) 200-7743
E-mail : dylee@donga.ac.kr

박 상 현 (朴 珦 玹)

1966년 8월 18일생, 1992년 조선대 전기공학과 졸업, 2006년 동아대 대학원 항만물류시스템학과 졸업(공박), 현재 동아인재대 응급구조과 교수.
Tel : (061) 470-1754
Fax : (061) 470-1754
E-Mail : nanopark@donga.ac.kr

박 재 철 (朴 在 哲)

1950년 11월 20일생, 1973년 영남대 전자공학과 졸업, 1995년 경남대 대학원 전기공학과 졸업(공박), 현재 영진전문대 전자정보계열 교수.
Tel : (053) 940-5253
Fax : (053) 940-5289
E-mail : jcpark@yjc.ac.kr

권 영 수 (權 寧 守)

1950년 1월 17일생, 1973년 영남대 전기공학과 졸업, 1988년 일본 동경공대 전자물리학과 졸업(공박), 현재 동아대 전기공학과 교수,
Tel : (051) 200-7738
Fax : (051) 200-7743
E-mail : yskwon@dau.ac.kr