Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 23, No. 5, 505-510, 2010

단 신

부타디엔 고무로 결합된 탄소반죽 바이오센서를 이용한 과산화수소의 전기화학적 정량

윤 길 중★
청주대학교 자연과학부 응용화학과
(2010. 7. 8. 접수, 2010. 9. 8. 승인)

Electrochemical determination of hydrogen peroxide using carbon paste biosensor bound with butadiene rubber

Kil-Joong Yoon★
Department of Applied Chemistry, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea
(Received July 8, 2010; Accepted September 8, 2010)

요 약: 톨루엔에 녹인 폴리부타디엔을 탄소가루의 결합재로 사용하였을 때, 탄소반죽은 전극 제작 후 용매 증발에 의하여 기계적 물성을 보였으며, 이 성질은 탄소반죽전극 실용화의 선행조건을 충족시키는 것이었다. 부타디엔 고무를 결합재로 사용하여 새로운 효소전극을 제작하고, 그것이 정량적인 전기화학적 행동을 보이는지 확인하기 위하여 여러 가지 전기화학 속도론적 파라메터 즉 대칭인자, 교환전류밀도, 이중층의 축전용량, 시간상수, 최대전류, Michaelis 상수 등을 구하였다. 이 결과들은 부타디엔 고무가 탄소반죽전극 실용화에 추천할 만한 위한 결합재임을 보여 주는 것이었다.

Abstract: When polybutadiene dissolved in toluene was a binder of carbon powder, the volatility of solvent just after electrode fabrication assured the mechanical solidity of the carbon paste electrode. This characteristic met the qualifications for practical use of carbon paste electrodes. A new enzyme electrode bound with butadiene rubber was constructed. In order to confirm whether it shows quantitative electrochemical behaviors or not, its electrochemical kinetic parameters, e.g. the symmetry factor, the exchange current density, the capacitance of double layer, the time constant, the maximum current, the Michaelis constant and other factors were investigated. These experimental facts showed that butadiene rubber is a recommendable binder for practical use of a carbon paste electrode.

Key words: carbon paste electrode, hydrogen peroxide, peroxidase, butadiene rubber

1. 서 론

효소의 특이성이 바이오센서의 표면에서 완전하게 유지되도록 고정하는 일은 대단히 중요하다. 반응속도를 백만 배 이상으로 추진할 수 있는 막대한 촉매력이 보존되어야 하기 때문이다. 바이오센서를 실용

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)43-229-8535 Fax : +82-(0)43-229-8535
E-mail : kjyoon@cju.ac.kr

화하고자 지금까지 많은 노력들이 경주되어 왔다. 효소의 물리적 흡착성을 이용하거나,[1] 기능성 고분자와의 공유결합,[2] 스크린프린팅,[3] 졸-겔에 효소원을 혼합하여 고정하는 방법 등 다양한 시도가 있었다.[4] 그러나 이런 방법들은 복잡한 물리적 및 화학적 과정을 거쳐야 하는 문제점들을 갖고 있기 때문에, 시간과 비용의 측면에서 경제적이지 못하다. 탄소반죽전극의 등장은 이런 비효율성의 우회를 배경으로 출발하였다. 본 실험실에서는 미네랄 오일을 결합재로 사용하여 만든 탄소반죽에 효소원을 혼입시켜 전극을 제작하고, 그것의 전기화학적 특성을 연구하여 왔다.[5] 이 방법은 작업성의 측면에서 볼 때, 저렴한 비용으로 단시간 내에 센서를 제작할 수 있는 효과적인 방법이다. 그리고 그 성능 또한 다른 방법들과 비교하여 전혀 손색을 보이지 않는다. 그러나 효소전극이 실용화되려면 전극의 영구성이 우선적으로 보장되어야 한다. 이런 측면을 고려한다면 미네랄 오일을 결합재로 사용한 전극은 연구용으로 적합할 수 있으나, 기계적 물성이 전혀 확보되지 않기 때문에 실용화의 가능성은 전무하다. 본 실험실에서는 미네랄 오일을 기계적 물성이 확보되는 결합재로 대체하고자 노력하였고, 톨루엔에 녹인 고무가 전극 제작 후 용매가 휘발되면 기계적 물성이 얻어지는 사실을 처음으로 확인하였다. 그 결과 ethylene propylene diene terpolymer,[6] chloroprene rubber,[7] natural rubber[8] 등 여러 종류의 고무를 결합재로 활용하여 전극을 제작하고, 그것들의 전기화학적 성질을 조사하여 보고한 바 있다.

여기에 소개되는 부타디엔 고무는 낮은 온도에서도 유연성과 되튐성이 뛰어나며, 충진제를 다량 받아들일 수 있는 성질을 가진 것으로 알려져 있다. 또 내마모성과 내크랙성이 우수하여 자동차의 타이어 제조에 널리 이용되고 있다.[9] 이런 특성이 탄소반죽전극 실용화의 선행 조건들을 충족시킬 것을 기대하며 이를 이용하여 효소전극을 제작하고, 그것의 전기화학적 및 속도론적 파라메터들을 구하여 실용화의 가능성을 살펴 보았다. 여기에 그 결과를 보고한다.

2. 실 험

2.1. 시약

부타디엔 고무(butadiene rubber, abbr. BDR, Kumho petrochemical, BR-01)가 결합재로 사용되었으며, 톨루엔과 탄소가루는 각각 Sigma-Aldrich (≥ 99.9%)사 및 Fluka (≤ 0.1 mm)사 제품을 사용하였다. 기질로 Junsei사의 과산화수소(EP, 35%), 전해질로 Shinyo pure Chem.의 NaCl (99.5%), 그리고 매개체로 Sigma사의 페로센(ferrocene)이 사용되었다. 효소원은 호모게나이저로 파쇄된 닭의 간조직이었고, 제조 후 1시간 이내에 탄소반죽에 혼입되었다.

2.2. 전극의 제작

클로로포름 10 mL에 0.09 g의 페로센을 녹인 후 0.91 g의 탄소가루를 혼합하여 건조시키고, 여기에 5.0% BDR 용액을 1:1 (wt/wt)로 완전히 혼합하여 반죽을 제조한다. 이 반죽 1.0 g에 0.065 g의 파쇄된 간조직을 가하여 수작업으로 완전히 혼합시킨 후, 오옴접촉이 있는 6.0 mm의 직경과 1.0 mm의 깊이의 폴리에틸렌 튜브에 충진시켜 스페튤라로 평면을 만들어 전극으로 활용한다.

2.3. 측정기구

선형훑기 전압전류그림(linear sweep voltammogram, abbr.:LSV)은 정지된 용액 중에서 효소전극을 BAS model EPSILON (Bioanalytical system, Inc/, U.S.A.)에 연결하여 얻었으며, 이외의 신호전류 측정은 교반 상태에서 Kipp & Zonen x-t 기록계(BD 111, Holland)가 연결된 EG&G Model 362 potentiostat (Princeton Applied Research, U.S.A.)을 이용하였다. 전위 인가 후 충분한 시간이 지나 잔류전류의 세기변화가 없을 때 기질이 가해졌고, 기질 추가 전후의 전류 차이를 기질 분해에 의한 신호로 간주하였다. Ag/AgCl (BAS MF 2052)과 Pt 전극(BAS MW 1032)이 각각 기준전극과 보조전극으로 사용되었다.

3. 결과 및 고찰

과산화수소의 정량을 위하여 본 계에서 사용할 효소전극은 전도성을 위한 탄소가루, 그것의 결합재 부타디엔 고무용액, 과산화효소원인 닭의 간 조직, 그리고 전극 전위의 안정을 위한 매개체, 페로센을 포함하고 있다. 전류측정에 의하여 물질을 분석하고자 할 때, 얻어진 신호가 부반응에 기인한 전류를 포함하고 있다면 그 측정은 무의미한 일이다. 때문에 낮은 전극전위에서 얻어지는 순수한 매개 전류의 거동을 살펴보고자 한다면 사용된 각 물질들의 전기화학적 성질 파악이 우선되어야 한다. 이를 위한 전극 구성물질의 조합이 *Table* 1에 주어져 있다. 전극A는 탄소가루와

Table 1. Structure materials used in electrode fabrication

Electrode	Each contains
A	gr(0.5) + bdr(0.5)
B	gr(0.5) + bdr(0.5) + tis(0.065)
C	gr(0.5) + bdr(0.5) + fer(0.09)
D	gr(0.5) + bdr(0.5) + tis(0.065) + fer(0.09)

bdr: butadiene rubber solution (5.0% in toluene); gr: graphite powder; tis: tissue; fer: ferrocene. unit in ( ): g

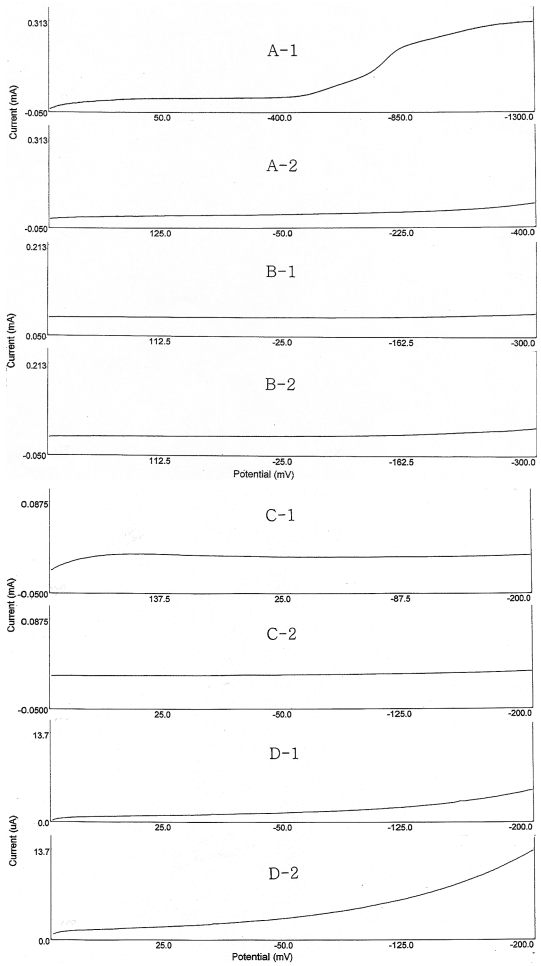

Fig. 1. LSV's for seeing through the electrochemical behaviors of each component in the carbon paste. 1: in the absence of substrate; 2: in the presence of 20 mM H_2O_2. Scan rate : 50 mV/s.

고무를 포함하고 있다. *Fig.* 1의 A-1은 기질이 없음에도 두 종류의 환원전류로 보이는 기울기가 다른, 큰 전류가 -400 mV 이상에서 나타나고 있다. 고무는 그 구성 성분의 종류와 양이 정확히 밝혀지기 힘든 혼합물이다. 따라서 고무에 전기화학적으로 활성인 물질이 구성 성분으로 포함되어 있다면, 그것들이 이 영역에서 환원될 가능성이 있다. 이 환원전류의 또 다른 생성원인으로 물의 환원을 고려할 수 있다. 물의 환원전위는 -836 mV (vs. SHE)이므로 물의 환원함수 꼬리가 -400 mV 까지 연장되었을 가능성을 배제할 수 없다. 실험 시 이 영역에서 전극 표면에 기포가 형성되는 것이 육안으로 관찰된다. 한편 +300 mV 이하에서 산화파가 관찰되고 있다. 이 영역들이 배제된 전위 영역에서 용액에 기질을 추가하고 얻은 LSV가 A-2이다. -300 mV 이상에서 약간의 환원파가 보이며, +300 mV 부근에 아직도 산화파의 경향성이 보이고 있다. 본 계에서 기질인 과산화수소가 환원되는 방법에는 두 가지가 있다. 높은 전극전위에 의한 직접 환원과 뒤에서 자세히 언급될 낮은 전극 전위에서 매개체의 매개작용에 의한 매개전류가 그것이다. A-2의 음전위에서 보이는 전류는 경험적으로 볼 때, 전자에 해당하는 것으로 보여진다. 위에서 언급된 부반응의 영향을 피하기 위하여 실험 전극전위 영역은 +250 ~ -300 mV로 재조정되었다. 이 영역에서 간 조직을 포함하고 있는 전극으로부터 얻은 LSV가 B-1이며, 대체로 간조직에 기인한 전기화학적 거동은 없는 것으로 볼 수 있다. 여기에 기질을 추가하고 얻은 LSV가 B-2이다. -200 mV와 -300 mV 사이에 약간의 환원파가 존재하는 것을 볼 수 있는데, 이것은 직접환원이 아직도 영향을 미치고 있는 것으로 보여진다. 여기에서 기질을 추가하고 얻은 LSV가 B-2이다. -200 mV 이상의 영역에서 환원파가 보이는데, 이것은 전류 축이 확대되었기 때문에 나타나는 직접 환원의 영향으로 볼 수 있다. 매개체로 사용된 페로센의 전기화학적 행동을 +250 ~ -200 mV 의 제한된 영역에서 살펴 보았다. 기질이 가해지지 않은 경우(C-1), +160 mV에서 페로센의 환원 봉우리가 나타나고, +250 mV 이하의 영역에서 산화전류가 나타나기 시작하는 것을 볼 수 있다. 백금전극에서 페로센의 산화환원전위는 +597 mV (vs. Ag/AgCl)이다. 고무 결합재 및 전해질의 저항으로 인한 과전압을 고려하면 이 봉우리는 페로센의 환원 봉우리로 보아도 무방할 것이다. 페로센의 영향을 피하기 위하여 실험 전위 영역을 +100 ~ -200으로 조정하고 기질을 가했을 때 얻은 LSV가 C-2이다. 신호의 특성이 상당히 단순화되었음을 볼 수 있다. 이 영역은 전극을 구성하는 물질들의 전기화학적 행동이 나타나지 않는 영역이라 할 수 있다. 전극 D는 본 실험에서 사용될 전극으로 앞서 전기화학적 활성이 확인된 모

든 물질을 포함하고 있다. 이 전극을 이용하여 기질을 포함하지 않은 경우와 포함한 경우에 얻어진 LSV가 각각 D-1과 D-2이다. 이 때 전류척도는 C-2와 비교하여 6.5 배 정도 확대되었다. D-1에서 작은 전류가 전극 전위에 의존하여 증가하는데, 이는 전기화학계에서 불가피한 충전전류로 보아야 할 것이다. 여기에 기질을 가했을 때 얻어진 LSV가 D-2이다. 실험 영역 내에서 전류가 크게 증가한 것을 볼 수 있는데, 이 전류증가의 원인은 기질의 존재 유무에만 의존하므로 그 차이를 기질의 매개 환원전류로 볼 수 있을 것이다. 전류차를 전극전위에 대하여 도시한 것이 *Fig.* 2이다. 전기화학반응이 확산지배일 경우 신호전류는 폴라로그래피 파처럼 S자형이다. 여기에서는 전극전위를 큰 음전위까지 확대할 수 없기 때문에 그 일부만을 나타낸 것이다. 이것을 Boltzmann 모델로 시뮬레이션한 전류-전압 관계식은

$$i=1.26+(129.97-1.26)/\{1+\exp(E-25.96)/3.36\}$$

로 주어진다. 여기서 $i(\mu A/cm^2)$는 신호전류, E(mV)는 인가전압이다. E가 음의 무한대로 갈 경우 i_{max}는 129.97 mA이며, 이것을 한계전류, $i_{l,c}$로 간주한다. 생체조직에서 일어나는 제일철이온과 과산화수소의 전자교환반응은 일 전자 전이반응,

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$$

로 알려져 있다.[10] 비가역계의 Tafel 영역에서 E에 대한 $\ln(i_{l,c}-i)/i$의 도시(*Fig.* 3)는 $-\ln(i_0/i_{l,c})$의 절편과 $\alpha nF/RT$의 기울기를 갖는다. 이 두 Tafel 상수로부터 계산된 대칭인자와 교환전류밀도는 각각 $\alpha = 0.25$ 및 $i_0 = 4.79\ \mu A/cm^2$이다. *Table* 2는 전위계단 실험(계단전위:-150 mV vs. Ag/AgCl) 시, 시간에 따른 전류의 변화에 관한 자료를 포함하고 있으며, 이것을 그래프로 나타낸 것이 *Fig.* 4이다. 용액이 전해질 외에 어떤 것도 포함하고 있을 때 얻어진 B는 이중층 충전을 위한 잔류전류의 변화이다. 이 전류는 자연대수에 대하여 1차로 감소한다. 두 곡선의 변화를 위 방식으로 시뮬레이션한 방정식은 다음과 같다.

$$i_A = 334.73\exp(-t/R_sC_d) + 103.31 \quad (1)$$
$$i_B = 366.35\exp(-t/R_sC_d) + 75.33$$

여기서 R_s와 C_d는 각각 용액 저항과 이중층의 축전 용량이다. t=0에서 얻어지는 각각의 최대전류는 위 방정식을 t=0로 외삽하여 구할 수 있으며, 이 때 얻어진 $i_{max,A}$와 $i_{max,B}$는 각각 438.04와 441.68 $\mu A/cm^2$이다. 또 이것으로부터 계산된 용액저항 $R_{s,A}$와 $R_{s,B}$는 각각 342 Ω과 340 Ω이다. 전류와 저항은 $i_{max,A} < i_{max,B}$와 $R_{s,A} > R_{s,B}$의

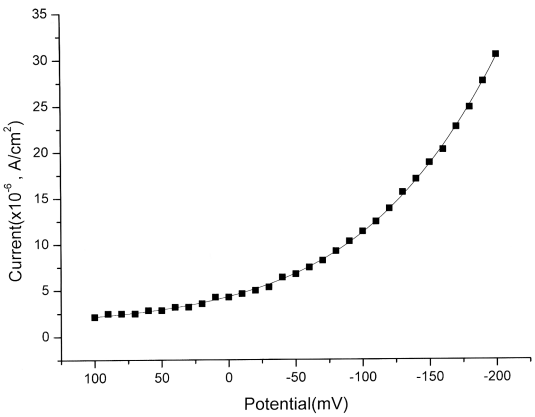

Fig. 2. Dependence of current difference between D-1 and D-2 in *Fig.* 1 on the electrode potential.

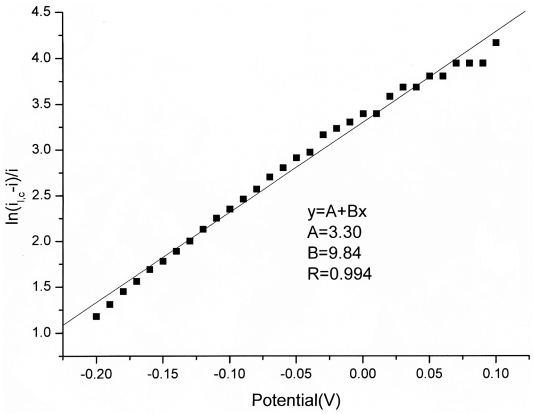

Fig. 3. Linear plot of $\ln(i_{l,c} - i)/i$ vs. E for the mediated reduction of 20 mM H_2O_2.

Table 2. Current transient (i vs. t) resulting from potential excitation. A and B were obtained in the presence of substrate (20.0 mM H_2O_2) and in the electrolytic solution (0.10 M NaCl) respectively. Excitation potential: -150 mV (vs. Ag/AgCl)

Time(sec)	A(mA)	B(mA)	A-B(mA)
0.01	285.63	284.97	0.66
0.02	192.93	178.83	14.10
0.03	153.64	141.25	12.39
0.04	135.23	116.11	19.12
0.05	123.55	100.18	23.37
0.06	115.40	92.04	23.36
0.07	109.39	83.54	25.85
0.08	105.14	77.88	27.26
0.09	100.18	72.92	27.26
0.10	98.77	71.15	27.62

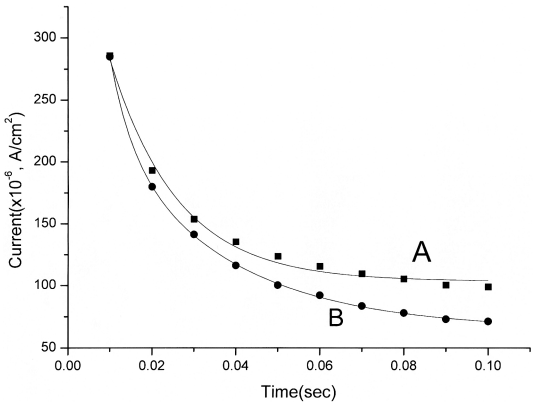

Fig. 4. Current flows versus time in *Table* 2.

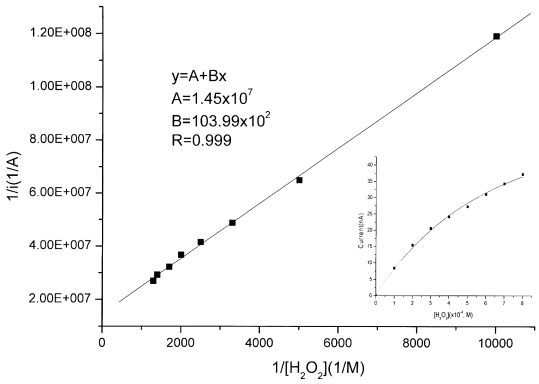

Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of the signal current and the substrate concentration. They were from the calibration curve(inset).

관계를 보이는데, t=0.00와 0.01 sec 사이에서 A와 B의 전류 크기가 교차함을 뜻한다. 그 이유는 t=0.00 sec에서 전해질의 이동이 기질에 의하여 방해를 받지만 시간이 경과함에 따라 기질의 확산전류가 추가되기 때문이다. 한편, 이 $i_{max,B}$를 이용하여 계산된 시간상수는 τ_B=0.025 sec 이며, 관계식, $\tau_B = R_sC_d$ 로부터 얻은 이중층의 축전용량은 7.35×10^{-5} F 이다. *Fig.* 4에서 충분히 시간이 지난 후 A의 전류가 B의 전류보다 크고, 0.08 sec 이후 대체로 일정해지는 것을 볼 수 있다. 이것은 확산층이 완성된 후 기질의 이동이 정류상태에 도달하여 전체 전류에 기질의 환원전류가 안정적으로 기여하고 있기 때문이다. *Fig.* 5의 창에 대류전류법(hydrodynamic amperometry)으로 얻은 검정곡선이 주어져 있다. 효소전극의 검정곡선 특성은 낮은 기질 농도에서도 쉽게 직선성으로부터 벗어나는 것이 일반적이다. 이와 같은 현상은 다음의 여러 가지로 설명될 수 있다. 우선 기질의 분해 반응이 다단계 반응으로 진행될 경우 효소는 여러 단계 중 어느 특정 단계에만 관여할 수 있다. 또 전극 표면의 활성자리 수가 제한되어 있기 때문에 기질 농도에 선형으로 감응할 수 없다. 만약 동위효소가 있다면 각각이 기질 분해에 다른 속도로 참여할 가능성도 한 이유가 될 수 있다.

Fig. 5는 검정곡선으로부터 도출된 신호 대 기질 농도의 양역수 도시 즉 Lineweaver-Burk 도시를 보여주고 있다. 이 도시가 직선성을 보이면 그 반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. *Fig.* 5의 도시는 R=0.999의 상관계수를 갖는 좋은 직선성을 보여주고 있는데, 이것은 과산화수소의 분해반응이 과산화효소의 촉매작용에 의한 것임을 말하여 준다. 여기서 얻어진 최대전류와 Michaelis 상수는 각각 6.90×10^{-8} A와 7.07×10^{-4} M이다. 이런 결과는 부타디엔 고무에 의하여 결합된 탄소반죽 속의 효소가 정상적으로 촉매력을 발휘하고 있음을 말하여 주는 것으로 부타디엔 고무로 결합된 탄소반죽전극이 실용화될 수 있음을 보여 주는 것이다.

4. 결 론

부타디엔 고무로 결합된 탄소반죽 전극은 탁월한 기계적 물성을 보여주었고, 반영구적으로 사용할 수 있었다. 그리고 이 전극을 이용하여 얻은 실험적 사실들은 전극에 고정된 간조직의 과산화효소가 전극 속에서 정성적 및 정량적으로 촉매력을 발휘하고 있음을 보여주는 것이다. 이 모든 사실들은 탄소반죽 전극의 실용화를 위하여 부타디엔 고무가 추천할 만한 결합재임을 증명하는 것이다. 일반적으로 전기화학적 방법은 분광학적 방법과 비교할 때, 검출한계 측면에 있어 우수하지 못하다. 또 효소의 삼차원 구조가 변형되는데 필요한 활성화 에너지는 16~60 kJ/mol로 대단히 낮다. 따라서 부타디엔 고무 전극이 가진 장점을 극대화하고 전압전류법이 공통적으로 갖는 검출한계 향상과 전극 보관 방법에 대한 연구가 병행된다면, 대량생산이 가능한 이 부타디엔 고무 결합 바이오센서는 물질의 분석에 유용한 도구가 될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2010 학년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구 추가과제)에 의하여 연구되었으며, 이에 깊이 감사 드립니다.

참고문헌

1. T. J. Cheng, T. M. Lin and H. C. Chang, *Anal. Chim. Acta* **462**, 261-273(2002).
2. J. J. Roy, T. E. Abraham, K. S. Abijith, P. V. S. Kumar and M. S. Thakur, *Biosensors & Bioelectronics* **21**, 206-211(2005).
3. A. S. Miguel, M. Arben and A. Salvador, *Sens. Acturator B* **69**, 153-163(2000).
4. (a) Y. C. Li, W. F. Bu, L. X. Wu and C. Q. Sun, *Sens. Acturator B* **107**, 921-928 (2005). (b) X. Chen, J. Z. Zhang, B. Q. Wang, G. C. Cheng and S. J. Dong, *Anal. Chim. Acta* **434**, 255-260(2001).
5. (a) K. J. Yoon, K. J. Kim and H. S. Kwon, *J. Kor. Chem. Soc.* **43,** 271-279(1999). (b) K. J. Yoon, *Anal. Sci. Tech.* **16**, 504-508(2003). (c) K. J. Yoon, *J. Kor. Chem. Soc.* **48**, 654-658(2004). (d) K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.* **25**, 997-1002(2004).
6. K. J. Yoon, *Elastomer* **42**, 112-118(2007).
7. K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.* **29**, 2264-2266(2008).
8. B. G. Lee, K B. Rhyu and K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.* **30**, 2457-2460(2009).
9. J. A. Brydson, 'Rubbery Materials and Compounds', Elsevier Applied Science, London and New York, 124, 1988.
10. A. Mansouri, D. P. M. Makris and P. Kepalas, *J. Pham. Biochem. Anal.* **39**, 22-26(2005).