

## 클로로설펜화 폴리에틸렌으로 결합된 전류측정 탄소반죽 바이오센서

유근배 · 윤길중\*

청주대학교 자연과학부

(접수 2010. 10. 27; 수정 2010. 12. 7; 게재확정 2011. 2. 7)

### A New Amperometric Carbon Paste Biosensor Bound with Chlorosulphonated Polyethylene

Keun-Bae Rhyu and Kil-Joong Yoon\*

Division of Natural Sciences, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

(Received October 27, 2010; Revised December 7, 2010; Accepted February 7, 2011)

**주제어:** 과산화효소, 탄소반죽전극, 클로로설펜화 폴리에틸렌

**Keywords:** Peroxidase, Carbon paste electrode, Chlorosulphonated polyethylene

#### 서 론

미네랄 오일을 탄소가루의 결합재로 사용하여 효소전극을 제작하고 그것의 전기화학적 특성을 연구하는 방법은 시간과 비용의 측면을 고려할 때 매력적인 방법이다.<sup>1</sup> 또 다른 방법으로 만들어진 전극들과 비교할 때 바이오센서로서의 기능 또한 전혀 손색을 보이지 않는다.<sup>2</sup> 탄소반죽전극이 실용화되려면 우선 전극 물질의 기계적 물성이 확보되어야 한다.<sup>3</sup> 그러나 미네랄 오일로부터 기계적 물성을 기대할 수 없기 때문에 이 전극의 실용화 가능성은 기대할 수 없다. 본 실험실에서는 미네랄 오일의 이런 결점을 보완하기 위하여 기계적 물성이 확보되는 탄소가루 결합재를 찾고자 노력하였고, 그 결과 톨루엔에 녹인 고무가 전극 제작 후 용매가 휘발되면 기계적 물성이 얻어지는 것을 확인하였다. 지금까지 여러 종류의 고무를 결합재로 활용하여 전극을 제작하고, 그것들의 전기화학적 성질을 조사하여 보고한 바 있다.<sup>4</sup> 탄소반죽 전극이 실용화되기 위하여 기계적 물성과 병행하여 해결되어야 할 또 하나의 근본적인 문제는 전극이 정성적, 정량적으로 행동하여야 한다는 것이다.<sup>5,2c</sup> 온도가 낮은 경우에도 백만 배 이상의 속도로 반응을 추진할 수 있는 효소의 촉매력과 특이성이 완전하게 유지되도록 바이오센서에 고정되어야 하기 때문이다. 클로로설펜화 고무는 화학 물질에 대하여 내성이 강하고 특히 내후성이 좋은 것으로 알려져 있다.<sup>6</sup> 이런 성질들이 탄소반죽전극 실용화의 선행 조건들을 충족시킬 것을 기대하면서 과산화수소 정량 전극을 제작하고, 그것의 전기화학적 거동을 살펴 보았다. 여기에 그 결과를 보고한다.

#### 실 험

선형홀기 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. 호모게나이저로 파쇄된 닭의 간조직이 효소원으로 사용되었으며, 제조 직후 탄소반죽에 혼합되었다. 탄소가루 결합재로 클로로설펜화 폴리에틸렌 고무(Chlorosulphonated polyethylene, CSM rubber, Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha Mitsui Co.)를 사용하였으며, 톨루엔과 탄소가루는 각각 Sigma-Aldrich(99.9%) 및 Fluka(0.1 mm)의 제품을 사용하였다. 기질로 Junsei사의 과산화수소(EP, 35%), 전해질로 Shinyo pure Chem.의 NaCl(99.5%), 그리고 매개체로 페로센(ferrocene, Sigma)이 사용되었다. 페로센 0.09 g을 클로로포름 10 mL에 녹인 후 0.91 g의 탄소가루를 혼합하여 건조시키고, 여기에 1.5% CSM 용액을 1:1(wt/wt)로 완전히 혼합하여 반죽을 제조한다. 이 반죽 1.0 g에 0.065 g의 파쇄된 간조직을 가하여 수작업으로 완전히 혼합시킨다. 이 반죽을 오음 접촉을 갖는 직경 6.0 mm, 깊이 1.0 mm의 폴리에틸렌 튜브에 충전시키고 스펀지타로 전극 표면을 평면으로 성형하

여 전극으로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

매개전류의 전기화학적 거동을 살펴 보기 위하여 사용된 전극은 네 종류의 구성물질을 포함하고 있다. 전극을 구성하는 각 성분이 매개전류의 관찰에 미치는 영향을 파악하고, 이들의 전기화학적 섭동이 없는 전위 영역을 설정하기 위하여 성분이 다른 네 종류의 전극이 설계되었다. 각 전극의 구성이 Table 1에 주어졌고, 그 과정이 Fig. 1이다. Fig. 1에서 A-1은 기질이 없는 전해질 용액 중에서 전극 A를 이용하여 얻은 LSV이다. -400 mV 이상에서 대단히 큰 환원전류가 나타나는 것을 볼 수 있다. 동일한 실험 조건에서 유리탄소전극을 이용하여 얻은 LSV는 이 영역에서 어떤 전류도 보이지 않았다.<sup>7</sup> 전극 A는 탄소 가루와 CSM 고무만을 포함하고 있다. CSM 고무는 Reed-Horn 반응, 즉 이산화황, 염소 그리고 알킬기가 광촉매 작

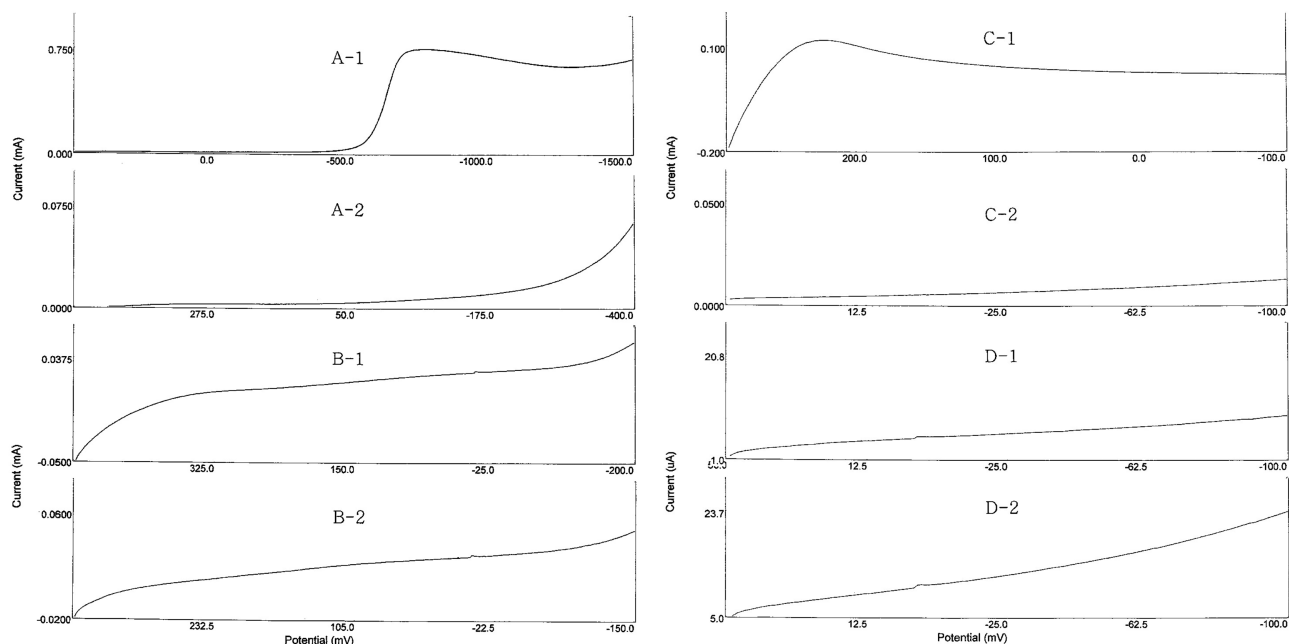
**Table 1.** Electrodes for evaluating the electrochemical properties of the structural materials

Electrode	Structural elements, ( ): g
A	cp(0.5) + CSM(0.5)
B	cp(0.5) + CSM(0.5) + tis(0.065)
C	cp(0.5) + CSM(0.5) + fer(0.045)
D	cp(0.5) + CSM(0.5) + tis(0.065) + fer(0.045)

cp: carbon powder; CSM: CSM rubber solution(1.5% in toluene); tis: chicken liver tissue; fer: ferrocene.

용에 의하여 클로로술폰화가 이루어진 라디칼 중합체이다.<sup>6</sup> 따라서 A-1에서 나타나는 환원파는 CSM 고무 성분의 전기화학적 활성에서 비롯된 것이라 할 수 있다. 위 환원파 영역이 배제된 전극전위에서 기질을 가하고 얻은 LSV가 A-2이다. 이 때 -200 mV 이상에서 큰 환원전류가 발생하는 것을 볼 수 있다. 이 전류는 A-1에서 나타나지 않았던 것이다. 본 계에서 기질은 두 과정에 의하여 환원된다. 즉 높은 전극전위에 의한 직접 환원과 낮은 전극전위에서 볼 수 있는 매개 환원이 그것이다. A-2에서 나타나는 환원전류는 전자에 해당하는 것으로, 여기서는 부반응 전류로 간주된다. 또 A-2의 y-축 스케일은 A-1과 비교하여 10배 정도 확대된 것이기 때문에 A-1에서 보았던 환원함수의 꼬리일 가능성도 배제할 수 없다. 본 실험에서 관찰하고자 하는 것은 매개전류이기 때문에 -200 mV 이상의 전극전위는 배제되어야 한다.

B-1은 CSM 고무의 영향과 기질의 직접 환원이 일어나지 않는 영역에서 간 조직의 영향을 살펴보고자 얻은 LSV이다. 기질이 없음에도 불구하고 -150 mV 이상에서 미세한 환원전류가, 그리고 +360 mV 이하에서 산화전류가 흐르는 것을 볼 수 있다. 간 조직은 그 구성을 밝히기 힘든 혼합물이며, 전기화학적으로 활성인 물질을 포함하고 있을 가능성이 있다. B-2는 B-1의 전극전위를 +360~150 mV로 제한하고 기질을 추가하여 얻은 LSV이다. 음전위와 양전위의 양 끝에서 환원 및 산화 전류가 나타나는 것을 볼 수 있다. 직접 환원에 의한 전위는 제외된 상



**Fig. 1.** Current-voltage characteristics for elucidating the electrochemical activity of each component in the electrode. '1' and '2' indicate the electrolytic solution without and with the substrate(0.02 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) respectively. Scan rate: 50 mV/sec.

황이므로 음 전위에서 나타나는 전류는 B-1에서 나타난 전류의 꼬리라고 볼 수 있으나, 양 전위에서 나타나는 전류의 원인을 설명할 근거는 아직 마련되어 있지 않다. 페로센은 가역성이 뛰어난 물질로 알려져 있다. 본 계에서 매개체로 사용되는 페로센의 전기화학적 거동을 살펴 보기 위하여 만든 전극이 C이다. 기질이 첨가되지 않은 C-1은 +50 mV 이하에서 페로센의 환원 봉우리 전류를 보이고 있다. 순수한 매개전류의 행동을 고찰하고자 한다면 이 영역을 배제되어야 할 것이다. +50~100 mV의 영역에서 기질을 추가하고 얻은 LSV가 C-2이다. 이 영역은 전극을 구성하는 물질들의 전기화학적 행동이 나타나지 않는 영역이라 할 수 있다. 이 영역에서 기질의 매개 환원현상을 관찰하고자 하는 것이다. 이를 보다 상세히 관찰하기 위하여 y-축 스케일을 2.5배로 확대고 전극 D를 사용하여 얻은 것이 D-1이다. 기질이 추가되지 않았으며, 전극 전위에 따라 거의 직선적으로 증가하는 전류를 볼 수 있다. 이중층 충전전류의 전극전위 의존도가 선형임을 고려한다면, D-1에서 나타나는 전류는 충전전류로 보아도 무방하다. D-1에 기질을 가하고 얻은 LSV가 D-2이다. 모든 구간에서 전류가 현격히 증가하였음을 볼 수 있다. 이 변화는 모든 전극 구성 물질의 영향이 배제된 상황에서, 기질의 첨가에 기인한 것이다. 한편 충전전류는 D-1과 D-2에 공통적으로 적용되기 때문에 D-2와 D-1의 차는 매개 반응에 의한 기질의 매개 환원전류로 간주할 수 있다. 그것이 Fig. 2에 도시되어 있다. 계가 확산 지배일 경우 환원전류의 전극전위 의존도는 폴라로그래피 파처럼 대체로 S자형이다.<sup>8,1b</sup> 그러나 Fig. 2는 전극 구성물질의 영향을 피하기 위하여 그 일부만을 나타낸 것이며, 이것을 Boltzmann 모델로 시뮬레이션한 전류-전압 관계식은

$$i = 7.86 + (190.39 - 7.86) / \{1 + \exp(E + 171.44) / 61.59\}, (R = 0.998)$$

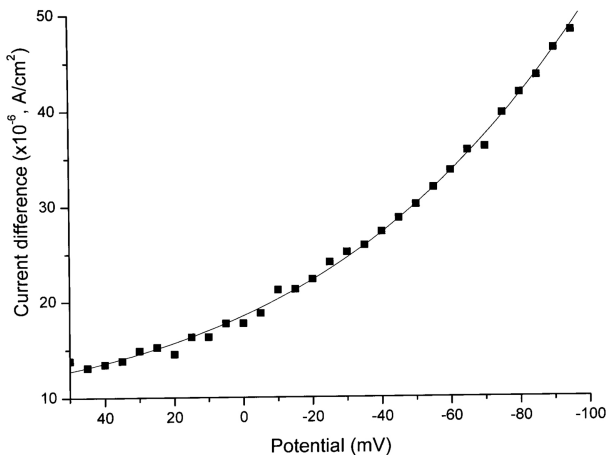


Fig. 2. Voltammetric behavior of the mediated current(difference between D-1 and D-2 in Fig. 1).

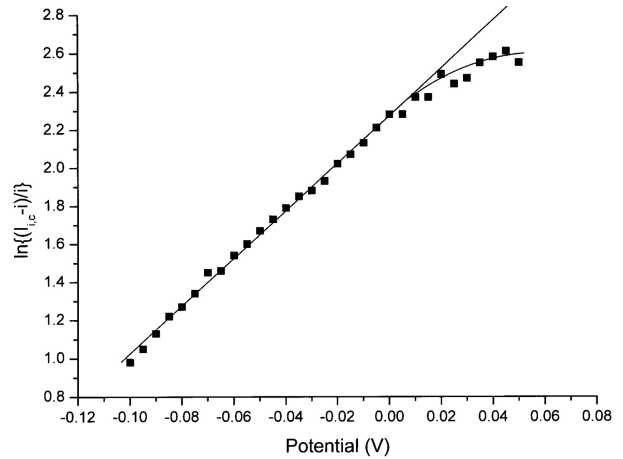


Fig. 3. Linear relationship between  $\ln\{(i_c-i)/i\}$  and electrode potential, E.

이다. 여기서  $i(\mu A)$ 는 신호전류,  $E(mV)$ 는 인가전압이다. E가 음의 무한대로 갈 경우 전류의 극한값은  $190.39 \mu A$ 이며, 이것을 한계전류( $i_{lc}$ )로 간주한다. 비가역계의 Tafel 영역에서 E에 대한  $\ln(i_c-i)/i$ 의 도시(Fig. 3)는  $-\ln i_0/i_c$ 의 절편과  $\alpha nF/RT$ 의 기울기를 갖는다. 생체조직에서 제일철이온과 과산화수소의 전자교환반응은 일 전자 전이반응( $n=1$ )으로 알려져 있고,<sup>9</sup> Fig. 3의 직선 방정식은  $y=2.28+12.56x$ 의 형태이다. 두 Tafel 상수로부터 계산된 대칭인자( $\alpha$ )와 교환전류밀도( $i_0$ )는 각각 0.32와  $19.47 \mu A/cm^2$ 이다. 여기서 얻어진 대칭인자는 다른 결합재를 사용한 경우보다 상대적으로 큰 값을 보이는데,<sup>4b,c</sup> 이것은 CSM 고무로 만든 전극의 전위 변화가 다른 고무로 만든 전극에 비하여 이중층에 형성된 활성화 에너지 봉우리의 높이 변화에 미치는 영향이 덜 효율적임을 뜻한다.

Fig. 4의 창에 hydrodynamic amperometry로 얻은 검정곡

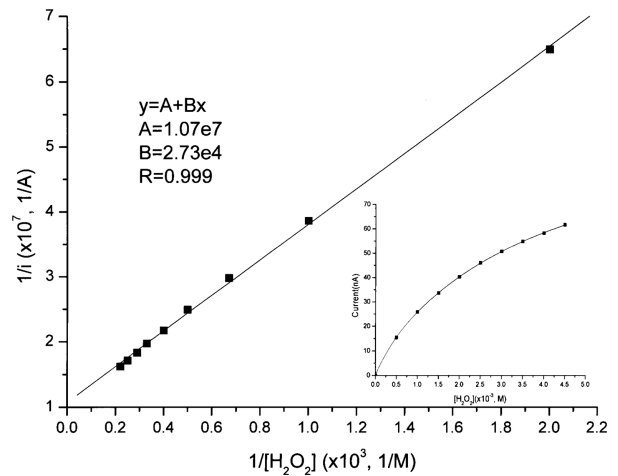


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot derived from the calibration profile(inset).

선이 주어져 있다. 효소전극의 검정곡선 특성은 낮은 기질 농도에서도 쉽게 직선성으로부터 벗어나는 것이 일반적이다.<sup>10</sup> 이와 같은 현상은 다음의 여러 가지로 설명될 수 있다. 우선 기질의 분해 반응이 다단계 반응으로 진행될 경우, 효소는 여러 단계 중 어느 특정 단계의 반응 속도에만 영향을 미친다. 또 전극 표면의 활성자리의 수는 제한되어 있기 때문에 기질 농도에 선형으로 평형을 이룰 수 없다. 또 동위효소<sup>1a</sup>가 기질 분해에 다른 속도로 참여할 가능성도 배제할 수 없다.

Fig. 4는 검정곡선으로부터 계산된 신호 대 기질 농도의 Lineweaver-Burk 도시를 보여주고 있다. 이 도시가 직선성을 보이면 그 반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. Fig. 4의 도시는  $R=0.999$ 의 상관계수를 갖는 좋은 직선성을 보여주고 있다. 이것은 과산화수소의 분해반응이 과산화효소의 촉매작용에 의한 것임을 말하여 준다. 여기서 얻어진 Michaelis 상수와 최대전류는 각각  $2.55 \times 10^{-3}$  M와  $9.35 \times 10^{-8}$  A였다. 이 실험적 사실들은 CSM 고무에 의하여 결합된 탄소반죽전극 표면에 효소가 정상적으로 고정되어 촉매력을 발휘하고 있음을 말하여 주는 것이다. 이것은 CSM 고무로 결합된 탄소반죽전극이 실용화될 수 있는 한 단면을 보여주는 것이다. Fig. 5는 전위계단(계단전위:  $-100$  mV vs. Ag/AgCl) 실험 시, 시간에 따른 전류의 변화를 그래프로 나타낸 것이다. B는 순수한 전해질로부터, 그리고 A는 여기에 기질이 가해졌을 때 얻어진 것이다. 이중층 충전전류는 이상적인 편극 전극계에서 자연대수에 대하여 1차로 감소하며, 용액저항( $R_s$ )과 이중층의 축전 용량( $C_d$ )은 직렬회로로 나타낼 수 있다. B의 경향성을 시뮬레이션한 전류와 시간 관계식은,  $i=0.7181 \exp(-t/$

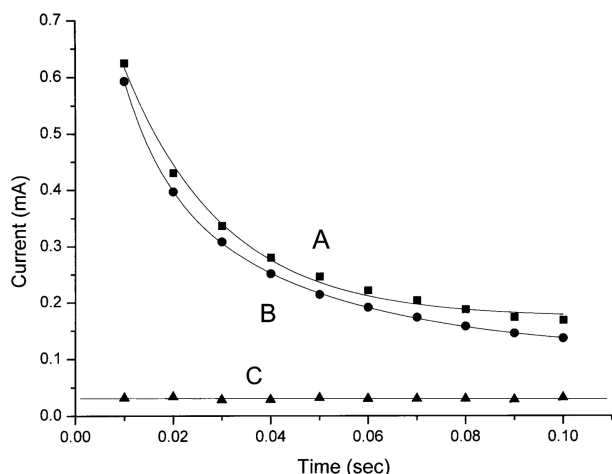


Fig. 5. The response of electrode D resulting from potential excitation ( $-100$  mV vs. Ag/AgCl) in an unstirred solution. A and B were obtained in the presence of and in the absence of the substrate ( $0.02$  M  $H_2O_2$ ) respectively. C: current difference between A and B.

$0.02059)+0.1427$ (mA)이다.  $t=0$ 에서의 전류값,  $i_{max,B}$ 는 실험적인 방법으로 구할 수 없으므로 위 식을  $t=0$ 로 외삽하여 구할 수 있다. 이 때 얻어진  $i_{max,B}$ 는  $860.8 \mu A/cm^2$ 이었으며, 이로부터 계산된 용액저항은  $11.62 \Omega$ 이다. 한편,  $i_{max,B}$ 를 이용하여 계산된 시간상수는  $\tau_B=0.029$  sec이었으며, 관계식,  $\tau_B=R_s C_d$ 로부터 얻은 이중층의 축전용량은  $2.5 \times 10^{-3}$  F이다. 위와 같은 방법으로 A에 대하여 얻은  $i_{max,A}$ 와  $\tau_A$ 는 각각  $897.1 \mu A/cm^2$ 과  $0.031$  sec이었다. 여기서  $i_{max,A} > i_{max,B}$  및  $\tau_A > \tau_B$  관계를 볼 수 있는데, 이는 계단 전압 초기에 기질의 확산전류가 추가되는 것으로 볼 수 있다. 전체적으로 A가 B보다 큰 것을 볼 수 있는데, B는 이중층 충전전류의 단독 기여이지만, A는 충전전류와 과산화수소의 확산에 의한 환원전류가 공동으로 기여하는 것이기 때문이다. 한편, A와 B의 차, C는 시간 상수 이전부터  $0.10$  sec에 이르기 까지 일정한 것을 볼 수 있는데, 이것은 시간 상수 이전에 확산층이 형성되었으며, 계가 확산지배임을 말하여 준다.

## 결론

위에서 살펴 본 탄소반죽 전극은 탁월한 기계적 물성을 보여주었고, 반영구적으로 사용할 수 있었다. 이 전극을 이용하여 얻은 실험적 사실들은 전극에 고정된 간조직 함유 과산화효소가 전극표면에서 정성적, 정량적으로 촉매력을 발휘하고 있음을 보여주었다. 이런 실험적 사실들은 탄소반죽 전극의 실용화를 위하여 CSM 고무가 추천할 만한 결합재임을 증명하는 것이다. CSM 고무로 결합된 전극은 제작상, 복잡한 물리적, 화학적 과정을 거치지 않기 때문에 제작비용과 제작시간의 측면에서 대단히 효율적이라고 할 수 있다. 그러나 잔류전류의 크기를 고려해야 하는 본 계의 전기화학적 검출한계 문제는 다른 분석 방법, 특히 분광학적 방법과 비교할 때 대단히 열등하다. 또 단백질의 삼차원 구조 변형에 소요되는 활성화 에너지는  $16-60$  kJ/mol로 대단히 낮기 때문에 CSM 고무 전극의 보관에 관한 문제도 제기된다. 그러므로 이 전극이 완전히 실용화하려면 위 문제점들도 반드시 병행하여 해결되어야 할 것이다.

## REFERENCES

1. a) Yoon, K. J. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2004**, *25*, 997. b) Yoon, K. J. *J. Kor. Chem. Soc.* **2004**, *48*, 654. c) Yoon, K. J.; Kwon, H. S.; Lee, B. G. *J. Kor. Chem. Soc.* **2005**, *49*, 325.
2. a) Cheng, T. J.; Lin, T. M.; Chang, H. C. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *462*, 261. b) Roy, J. J.; Abraham, T. E.

- Abhijith, K. S.; Kumar, P. V. S.; Thakur, M. S. *Biosens. & Bioelectron.* **2005**, *21*, 206. c) Li, Y. C.; Bu, W. F.; Wu, L. X.; Sun, C. Q. *Sens. Actuators B* **2005**, *107*, 921.
3. a) Miguel, A. S.; Arben, M.; Salvador, A. *Sens. Actuators B* **2000**, *69*, 153. b) Chen, X.; Zhang, J. Z.; Wang, B. Q.; Cheng, G. J.; Dong, S. J. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *434*, 255.
4. a) Yoon, K. J. *Elastomer* **2007**, *42*, 112. b) Lee, B. G.; Rhyu, K. B.; Yoon, K. J. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2009**, *30*, 2457. c) Lee, B. G.; Rhyu, K. B.; Yoon, K. J. *J. Ind. Eng. Chem.* **2010**, *16*, 340.
5. Wang, J.; Mo, J. W.; Li, S. F.; Porter, J. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *441*, 183.
6. Brydson, J. A. *Rubbery Materials and Their Compounds*, Elsevier Science Publishing Co.: New York, USA, 1988, p 167.
7. Yoon, K. J. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2008**, *29*, 2264.
8. Yoon, K. J.; Kim, K. J.; Kwon, H. S. *J. Kor. Chem. Soc.* 1999, *43*, 271.
9. Mansouri, A.; Makris, D. P. M.; Kefalas, P. *J. Pham. Bio. Anal.* **2005**, *39*, 22.
10. a) Miscoria, S. A.; Barrera, G. D.; Rivas, G. A. *Sens. Actuators B* **2006**, *115*, 205. b) Kafi, A. K. M.; Lee, D. Y.; Park, S. H.; Kwon, Y. S. *Thin Solid Films* **2008**, *516*, 2816.
-