

ORIGINAL ARTICLE

생체 세포내 미량 구리의 전기화학적 검출에 관한 연구

이 장 현*

평택대학교 교양학부

Electrochemical Detection of Trace Level Copper in *in vivo* Cell

Chang-Hyun Lee*

Division of General Education, Pyeongtaek University, Gyeonggi-do 405-701, Korea

Abstract

In order to measure the minute amount of Cu(II) in our environment, cyclic voltammetry (CV) and square-wave stripping voltammetry (SWSV) were performed for a trace copper assay using bismuth immobilized on a carbon nanotube paste electrode. An analytical working range of 30 to 240 $\mu\text{g/L}$ Cu(II) was obtained for CV and SWSV. The SWSV precision obtained was 0.47 % ($n = 15$) RSD in 30.0 $\mu\text{g/L}$ Cu(II). The detection limit obtained was 3.1 ng/L Cu(II) using SWSV, while the CV yielded the nano-range detection limit through the pre-concentration step. By using this research method, Cu(II) value could be determined in the urine of human sample and in the brain of fish sample. This research can be effectively applied to other cases of measuring minute amount of Cu(II) in living organisms.

Key Words : Bismuth, Carbon, Paste electrode, Urine, Brain

1. 서 론

인간의 편익을 위해 만들어진 화학물질들의 종류는 현재 10만종 이상이며 매년 수많은 새로운 화학물질이 만들어지고 있다. 그러나 이러한 물질들은 사용된 후에는 환경 속으로 배출되고 있으며, 이들 중 대부분은 생태계를 교란시키고 생물체에 영향을 미친다. 특히 산업체 공정과정에서 발생하는 폐수에 포함된 Pb, Cu, Zn, Hg, Cd, Cr^{6+} 등과 같은 중금속이 환경에 배출되어, 어·패류 등 여러 경로를 통해 인체에 미량이라도 유입될 경우 기관 및 장기조직에 치명적 손상을 일으키는 원인이 된다. 미량의 Hg이 체내에 축적될

경우 언어장애, 신경장애 및 뇌 세포에 영향을 미치며 (Augerl 등, 2005), Pb는 빈혈, 중추신경장애를 유발하고 있고(Taylor 등, 2001), Cd은 골연화증, 전립선암(Fahmy와 Fawzia, 2000), Cr^{6+} 은 복통, 궤양, 발암 등을 일으키는 물질로 알려져 있다(Beveridge 등, 2010). 또한 구리이온은 식물 성장에 필요한 대사물질이 되나(Tripathi 등, 2001), 사람의 경우에 있어서도 유아의 뼈 성장이나 당대사(Hardcastle 등, 2000)에 필요하지만 고농도의 구리이온이 몸속에 축적될 경우에는 알츠하이머병(Dieter 등, 2005; Ili 등, 2005), 파킨슨병, 근위축증(Haefner 등, 2005; Miller 등,

received 21 March, 2012; revised 29 May, 2012;

accepted 5 November, 2012

*Corresponding author : Chang-Hyun Lee, Division of General Education, Pyeongtaek University, Gyeonggi-do 405-701, Korea
Phone: +82-31-659-8384
E-mail: lch@ptu.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2005)등 심각한 질환을 일으킬 수 있는 원인으로 밝혀지고 있다.

이런 가운데 물질분석 뿐만 아니라 생태계 및 인체에 치명적인 영향을 미치는 물질들을 간편하고 신속하게 측정하는 방법들이 요구되고 있었다. 이러한 화학물질들의 검출방법으로는 플라로그래피, 질량분석기, X선 회절분석기, 원자흡수 분광 광도계(AAS)등의 분석 기기들을 사용하고 있다. 그러나 이 같은 장비들은 구입가격이 비싸고 부피가 크고 측정방법이 복잡할 뿐만 아니라 정밀한 측정을 위해서는 몇 가지를 복합적으로 사용해야 ppb~ppt 이하의 미량 분석이 가능하다.

그렇지만 전압전류법은 비교적 저가이면서도 정확성과 재현성이 뛰어나 물질의 분석에서 폭넓게 응용되고 있으며(Daniele 등, 2000; Wang, 2000), 전압전류법의 일종으로 감도가 좋고 상대적인 방해작용이 적은 벗김전압전류(SWSV, square-wave stripping voltammetry)법에 의해 ppb 혹은 그 이하의 농도까지 물질을 분석하는데 효과적으로 활용되고 있다(Vydra 등, 1976; Wang, 1985). 더욱이 최근에는 반응감도를 증가시키기 위해 전극에 변성제(modifier)를 도입하는 화학변성전극(CME, chemically modified electrode)를 사용한 벗김분석법이 많이 연구되고 있다(Aburuna, 1998; Janata 등, 1994; Murray, 1992; Wang, 1993).

전압전류법은 시료의 산화-환원 반응에 기초한 분석방법으로써 수질관리를 위한 분석(Esteban Casassas, 1994; Househam 등, 1987; Scheers 등, 2010)뿐만 아니라, 식품, 음료, 농업생산물, 의약품, 화장품, 도금조속의 유기화합물 분석(Boo 등, 2010; El-Maali, 2004; Lee와 Hahn, 2009; Ozkan 등, 2006; Shin과 Hahn, 2009; Vire 등, 1987)등 여러 분야에서도 응용되고 있다. 본 연구에서는 전압전류법으로 탄소 나노튜브에 독성이 없는 비스무스를 섞어서 제작한 변성전극을 이용하여 구리이온의 미량분석을 연구하였으며, 이 분석법을 응용하여 물고기 뇌와 사람의 소변 속에서 구리이온을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 기기

본 실험에서 사용한 기준전극(reference electrode)으로는 Ag/AgCl를, 상대전극(counter electrode)으로는 백금전극을 사용하였다. 작업전극(working electrode)인 비스무스 나노튜브 전극은 카본 나노튜브 분말(Hyperion Catalysis Inc., USA) 0.4 g에 미네랄 오일(Alfa Aesar Inc., USA)과 비스무스 분말(Sigma-Aldrich)를 막자사발에서 5분 동안 잘 섞은 후 제작하였다. 전극의 몸체는 1.5 mm 폴리에틸렌 주사기의 끝부분을 갈로 잘라서 사용하였으며, 몸체의 밑 부분으로 부터 5 cm 정도까지는 탄소반죽을 충전시켰다. 흑연전극은 결정형 graphite인 연필심을 그대로 사용하였다.

본 실험에서 사용한 용액은 두 번 증류한 물을 다시 초순수 제조기(HIQ-1, Core-tech. Korea)를 이용하여 18 Mohm, cm의 비저항까지 정제시켜 사용하였다. Cu(II)표준시약(Aldrich사, 특급시약)을 구입하였고, 지지 전해질로는 0.1 M 인산 암모늄(NH₄H₂PO₄) 완충용액을 사용하였다. 모든 실험은 25°C 상온조건에서 시행하였다. 전압전류법에 의한 전기화학실험은 전기화학분석기(CHI Instruments Inc. CHI mode-660H, USA)에 연결된 컴퓨터에 의해 자동으로 제어되고 수행되었다.

2.2. 실험방법

0.1 M 인산 암모늄 완충용액으로 pH를 7.13로 맞춘 지지 전해질 10.0 mL를 취하여 전극에 넣고 전기화학분석기에서 제공된 프로그램을 이용하여 벗김 전압전류(SWSV, square-wave stripping voltammetry) 곡선과 순환전류(CV, cyclic voltammetry) 곡선을 얻었다. 응용실험으로는 무게 250±10 g 내외의 물고기(잉어)를 샘플로 선택하여 구리를 탈 이온수에 녹여 매일 10 mg/L씩 3일 동안 경구 투여하였다. 3개의 전극을 직경 2 mm 치과용 드릴을 사용하여 마취된 물고기의 뇌에 심은 후 흡수된 구리의 함량을 분석하였다. 일부 대학생들의 소변을 샘플시료로 사용하였다. 실험 최적 조건으로 증폭의 영향(amplitude effect) 0.4 V, 주파수 변화(frequency effect) 300 Hz, 축적전위(deposition potential) -1.7 V, 전위차 증가(incremental potential) 0.01 V, 축적시간(accumulation time)

300/sec로 맞추어서 실험하였다

3. 결과 및 고찰

3.1. 순환전압전류(CV)곡선과 벗김 전압전류(SWSV)곡선을 사용한 전극비교

Cu(II)의 농도를 0~6 mg/L까지 변화시켜가면서 측정된 농도와 전류세기와의 관계를 Fig. 1에 나타내었으며, 감도가 좋은 작업전극을 얻기 위해 비스무스 나노트브 전극(BPE(1,2))과 흑연 전극(PE(3,4))을 비교하였다.

Fig. 1(a)는 구리(II)의 농도를 0, 2, 4, 6 mg/L로 달리하여 첨가한 경우의 전류값들을 나타낸 것이다. 구리(II)의 농도가 6 mg/L인 경우를 살펴보면, 비스무스 나노트브 전극(1,2)에서는 벗김 전압전류(SWSV) 값이 $7.19 \times 10^{-5} \text{A}$ (1), 순환 전압전류(CV) 곡선값은 $0.52 \times 10^{-5} \text{A}$ (2)였으며, 흑연 전극을 사용했을 때는 벗김 전압전류(SWSV) 곡선값이 $0.44 \times 10^{-5} \text{A}$ (3), 순환 전압전류(CV)곡선값은 $0.18 \times 10^{-5} \text{A}$ (4)를 보여주고 있는데, 이는 비스무스 나노트브 전극이 흑연 전극보다 5배 정도 감도가 좋은 것임을 나타내고 있다.

Fig. 1(b)에서 보면 구리(II)를 30~240 ng/L를 가하면서 순환 전압전류(CV)법으로 실험하여 얻은 전

류값이 $2.35 \times 10^{-7} \text{A}$ 에서 $31.02 \times 10^{-7} \text{A}$ 까지 매우 날카롭고 넓은 범위에서 나타났으며 기울기 비가 $\Delta y/\Delta x = 0.1328 (R^2 = 0.99)$ 로 나타났다.

3.2. 벗김 전압전류(SWSV)곡선의 최적화 및 전극의 안전성

Fig. 2(a)는 Cu(II)의 농도를 30~240 $\mu\text{g/L}$ 까지 변화시켜가면서 측정된 농도와 전류세기와의 관계를 산화 벗김 전압전류법(ASWSV, anodic stripping 전압전류법)과 환원 벗김 전압전류법(CSWSV, cathodic stripping 전압전류법)으로 얻은 전압전류 그림을 나타내고 있다. 산화 벗김 전압전류(ASWSV) 값이 $\Delta y/\Delta x = 0.046 (R^2 = 0.99)$ 로 높고 넓게 나타나고 있다. 측정의 감도를 알아보기 위해 최적조건에서 피크 높이의 변화를 조사하였다. 산화피크(anodic peak)는 $-0.6 \times 10^{-5} \text{A} \sim -1.4 \times 10^{-5} \text{A}$ 범위로 나타나서 검량선 감도가 0.8 ± 0.003 였고, 환원 피크(cathodic peak)는 $1.6 \times 10^{-5} \text{A} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{A}$ 범위에서 검량선 감도가 0.6 ± 0.003 으로 나타났다. 따라서 상대적인 감도에서 산화 벗김 전압전류(ASWSV)값이 환원 벗김 전압전류(CSWSV)값의 그림보다도 좋음을 볼 수 있다. Fig. 2(b)에서 첫번째 5개의 봉우리 전류값은 $0.82 \times 10^{-5} \text{A}$ 에서 $3.09 \times 10^{-5} \text{A}$ 까지는 시료용액의 구리이온이 비스무스 전극에 석출되는 양이 증가하여 전류값이 증가함으

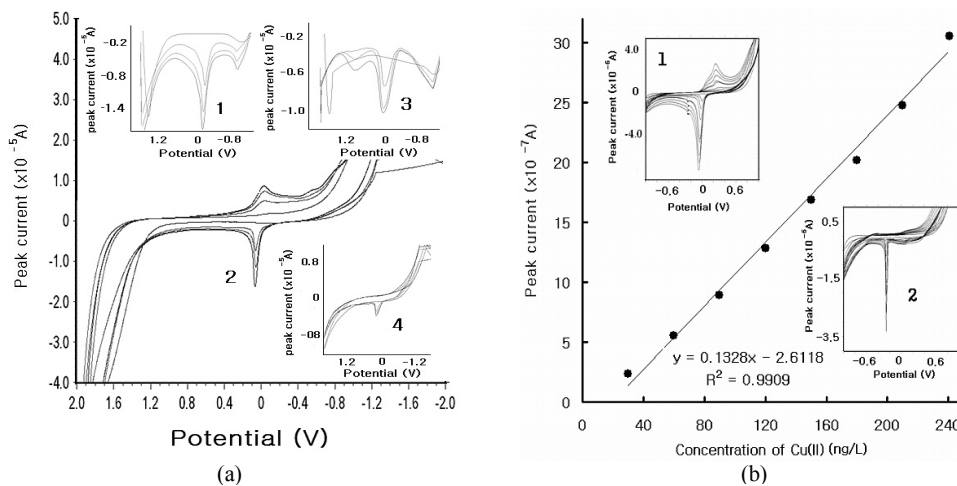


Fig. 1. (a) Cyclic voltammograms of comparison between BPE (1,2) and PE (3,4) added with 0, 2, 4, 6 mg/L Cu(II). (b) Cyclic voltammograms working ranges of BPE in (1) 30~240 $\mu\text{g/L}$ Cu(II) concentration, and (2) 30~240 ng/L Cu(II) concentration, -1.0 V initial potential, 1.0 V switching potential, 0.5 V/sec scan rate, and 7.13 pH strength in 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ electrolyte solution.

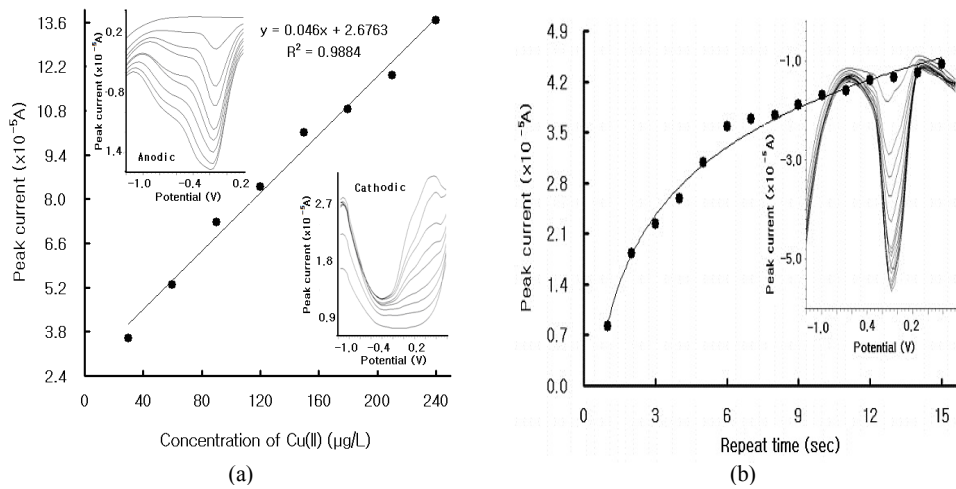


Fig. 2. (a) ASWSV and CSWSV voltammograms with 30~240 µg/L Cu(II) spikes. The linear equation is that of an anodic curve. (b) Electrode stability in 15 repeated measurements of a 30 µg/L Cu(II) spike, within a 100/sec accumulation time.

로써 피크가 점진적으로 증가하나, 다른 10개의 봉우리 전류값은 3.58×10^{-5} A에서 4.44×10^{-5} A까지로써 피크가 거의 직선적으로 나타나는 것은 전류가 일정하게 유지되고 있는 안정화 단계임을 알 수 있다.

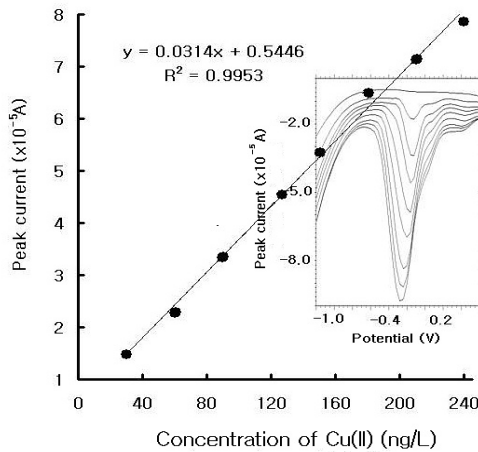


Fig. 3. ASWSV voltammograms for 30~240 ng/L Cu(II) concentration, 0.4 V amplitude, 300 Hz frequency, -1.7 V accumulation potential, quiet time of 0 sec, potential scope between -1.7 V and 1.2 V, 0.01 V increment potential, 300 sec accumulation time, and pH of 7.13.

Fig. 3은 산화 벗김 전압전류(ASWSV)법으로 Cu(II)을 30~240 ng/L가했을 때 나타난 전류값을 나타

낸 것으로, 1.47×10^{-5} A에서 7.85×10^{-5} A까지 값이 얻어졌으며, 선형식은 $Y=0.0314x+0.5446$ 이며, 결정계수(R^2)는 0.99였다. 산화 벗김 전압전류(ASWSV)법으로 30.0 µg/L에서 15번 반복 측정하여 0.47%의 상대표준 편차값(RSD)과 최적 분석조건에서 3.1 ng/L의 검출한계도 얻었다.

3.3. 생체 시료분석에서의 응용

본 연구에서는 변성전극인 비스무스 나노 전극을 개발하여 Cu(II)를 실험 연구하여 ppb까지의 검출한계를 얻었고, 그 기법을 활용하여 물고기 뇌(잉어), 사람의 소변 속에 극미량으로 존재하는 구리이온의 흔적을 분석하므로써 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 아래의 전압전류 그림에서 첫 번째 전류 값은 시료를 가하지 않았을 때 해당하는 값이고, 두 번째 봉우리 전류 값은 소변 0.2 mL을 가했을 때 나타난 전류 값으로써 0.238×10^{-5} A이었다. 검정곡선의 선형식은 $y=0.5313x+0.067(R^2=0.99)$ 이며, 결정계수(R^2)는 0.99이다. Olivares 등(1996)은 소변 중 평균 구리 배설량이 하루에 정상범위는 10~60 µg이라고 보고하였다. 대학생들의 소변을 샘플로 한 실험에서는 47 µg/L의 Cu(II)값을 얻었지만, Sung과 Yoon(2000)이 보고한 56 µg/day, Son과 Sung(1999)이 보고한 44 µg/day의 연구 결과보다는 다소 높게 나타났다. Fig. 4의 삽입된

그림은 물고기 뇌에서 얻어진 전류 값 그림이다. 전위 값이 0 V에서 -0.23 V 방향으로 약간 이동한 것은 실험 자료가 물고기 뇌라는 생체조직이었기 때문이었다. 생체 시료에서 얻어진 결과는 앞으로 생물학적으로 유용하게 활용될 수 있다. 그러나 그러한 결과는 사람의 혈장에서는 얻을 수 없고, in-vivo tissue에서만 가능하다.

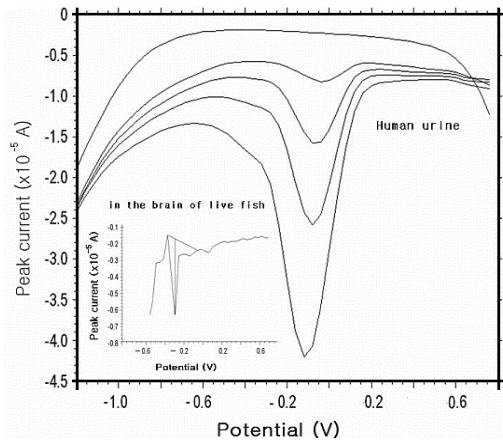


Fig. 4. Analytical applications involving human urine. The first curve is blank, and the second curve has a 0.2 mL urine spike, followed by 3, 6, and 9 µg/L Cu (II) standard spikes. The inserted curve shows the results of the in vivo test performed on the brain of the living fish. Other parameters were fixed at optimum conditions.

4. 결론

본 연구는 전압전류법을 이용하여 미량의 구리이온 분석법을 연구하였고 이 분석법의 응용으로써 물고기 뇌와 사람의 소변 같은 생체 세포내에서 미량 존재할 수 있는 구리를 검출할 수 있었다. 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 최적의 작업전극을 얻기 위해서 변성전극으로써 흑연전극과 비스무스 나노 전극을 만들어서 비교 분석한 결과 비스무스 나노전극이 우수함을 알 수 있었다.

2) 벗김 전압전류(SWSV) 법에 의한 방법이 감도가 좋았으며, 환원 벗김 전압전류(CSWSV)법보다 산화

벗김 전압전류(ASWSV) 법이 우수함을 알 수 있었다. 그리고 산화 벗김 전압전류(ASWSV)법으로 30.0 µg/L에서 15번 반복 측정하여 0.47%의 상대표준 편차 값을 얻었으며, 최적분석조건에서 3.1 ng/L의 검출한계도 얻었다. 따라서 ppb 수준의 흔적량을 얻는 실험에 이용될 수 있음을 알았다.

3) 물고기(잉어) 뇌와 사람의 소변 속에 미량 존재하는 구리의 흔적을 분석할 수 있었다. 따라서, 앞으로 이 연구 분석방법으로 환경, 생물, 식품, 공정 제어 등에서 극미량의 유해물질을 추적 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 생체 인식분야에서나 생체 진단분야에서도 유용하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고 문헌

Aburuna, H. D., 1988, Coordination chemistry in two dimensions: chemically modified electrodes, *Cord. Chem. Rev.*, 86, 135-189.

Augerl, N., Kofman, O., Kosatsky, T., Armstrong, B., 2005, Low-level methylmercury exposure as a risk factor for neurologic abnormalities in adults, *Neurotoxicology*, 26, 149-157.

Beveridg, R., Pintos, J., Parent, M. E., Asselin, J., Siemiatycki, J., 2010, Lung cancer risk associated with occupational exposure to nickel, chromium VI, and cadmium in two population based case control studies in montreal, *J. Amer. Ind. Med.*, 53, 476-486.

Boo, H. K., Song, Y. J., Park, S. J., Chung, T. D., 2010, Determination of fluoroquinolone antibacterial agents by square wave adsorptive stripping voltammetry, *J. Korean Electrochem. Soc.*, 13, 63-69.

Daniele, S., Carlo B., Antonietta, B. M., 2000, The use of a remote stripping sensor for the determination of copper and mercury in the lagoon of venice, *Analyst*, 125(4), 731-735.

Dieter, H. H., Bayer, T. A., Multhaupt, G., 2005, Environmental copper and manmoteanese in the pathophysiology of neurologic diseases (Alzheimer's disease and manganism), *Acta Hydroch. Hydrob.*, 33, 72-78.

El-Maali, N. A., 2004, Voltammetric analysis of drugs, *Bioelectrochem.*, 64(1), 99-107.

- Esteban, M., Casassas, E., 1994, Stripping electroanalytical techniques in environmental analysis, *Trends in Anal. Chem.*, 13(3), 110-117.
- Fahmy, M. A., Fawzia, A. E., 2000, In vivo and In vitro studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice, *J. Appl. Toxicol.*, 20, 231-238.
- Haefliger, F., Smith, D. G., Barnham, K. J., Bush, A. I., 2005, Model studies of cholesterol and ascorbate oxidation by copper complexes: Relevance to Alzheimer's disease amyloid metallochemistry, *J. Inorg. Biochem.*, 99, 2403-2422.
- Hardcastle, J. L., Murcott, G. G., Compton, R. G., 2000, Sono-electroanalysis: Ultrasonically facilitated liberation and determination of copper in whole blood, *Electroanal.*, 12, 559-563.
- Horwitz, W., 2005, Official methods of analysis, Vol. 1, 18th ed., Arlington, Va: AOAC International, 5, 14, 28, 39, 28, 977, 982.
- Househam, B. C., Vanden Berg, C. M., Riley, J. P., 1987, The determination of purines in fresh and sea water by cathodic stripping voltammetry after complexation with copper(I), *Anal. Chim. Acta*, 200, 291-303.
- Ili, F. E., Separovic, F., Barrow, C. J., Cherny, R. A., Fraser, F., Bush, A. I., Masters, C. L., Barnham, K. J., 2005, Methionine regulates copper/hydrogen peroxide oxidation products of Ab, *J. Pept. Sci.*, 11, 353-360.
- Janata, J., Josowicz, M., DeVaney, D. M., 1994, Chemical sensors, *Anal. Chem.*, 66, 207-228.
- Lee, S. J., Hahn, Y. H., 2009, Determination of cimetidine injection by square wave voltammetry, *Anal. Sci. Tech.*, 23, 68-73.
- Miller, L. M., Wang, Q., Telivala, T. P., Smith, R. J., Lanzirrotti, A., Miklossy, J., 2005, Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with amyloid deposits in Alzheimer disease, *J. Struct. Biol.*, 152, 204-212.
- Murray, R. W., 1992, Molecular design of electrode surface, Vol. 22, Wiley-Sons Inc., New York.
- Olivares, M., Uauy, R., 1996, Copper as an essential nutrient, *Am. J. Clin Nutr.*, 63(5), 791-796.
- Ozkan, S. A., Dogan, B., Uslu, B., 2006, Voltammetric analysis of the novel atypical antipsychotic drug quetiapine in human serum and urine, *Microchim. Acta*, 153, 27-35.
- Scheers, N., Andlid, T., Alming, M., Sanberg, A. S., 2010, Determination of Fe²⁺ and Fe³⁺ in aqueous solutions containing food chelators by differential pulse anodic stripping voltammetry, *Electroanal.*, 22(10), 1090-1096.
- Shin, S. H., Hahn, Y. H., 2009, Square wave voltammetric behaviors and determinations of ranitidine, HCl in the pharmaceutical tablets, *Anal. Sci. Tech.*, 22, 432-438.
- Son, S. M., Sung, S. I., 1999, Zinc and copper intake with food analysis and levels of zinc and copper in serum, hair and urine of female college students, *Korean Nutr. Soc.*, 32(6), 705-712.
- Sung, C. J., Yoon, Y. H., 2000, The study of Zn, Cu, Mn, Ni contents of serum, hair, nail and urine for female college students, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 29(1), 99-105.
- Tripathi, R. M., Raghunath, R., Mahapatra, S., Sadasivan, S., 2001, Blood lead and its effect on Cd, Cu, Zn, Fe and hemoglobin levels of children, *Sci. Total Environ.*, 277, 161-168.
- Vire, J. C., Kauffmann, J. M., Patriarche, G. J., Pharma, J., 1989, Adsorptive stripping voltammetry applied to drug analysis, *Biomed. Anal.*, 7(12), 1323-1335.
- Vydra, F., Stulik, K., Julakova, E., 1976, Electrochemical stripping analysis, Wiley-Sons Inc., New York, 219-223.
- Wang, J., 1985, Stripping analysis, principles, instrumentation and application, VCH Publishers Inc., Deerfield Beach, Florida.
- Wang, J., 1993, Electroanalysis and biosensors, *Anal. Chem.*, 65(12), 450-453.
- Wang, J., 2000, Analytical electrochemistry, 2nd ed., Wiley-Son Inc., New York, 53, 95, 207.