

과산화수소의 전류법적 정량을 위한 소나무 과산화효소의 활용

윤길중*

청주대학교 응용화학과

(접수 2013. 3. 25; 게재확정 2013. 4. 16)

Application of Pine Peroxidase to the Amperometric Determination of Hydrogen Peroxidase

Kil-Joong Yoon*

Department of Applied Chemistry, Cheongju University, Cheongju 360-764, Republic of Korea

*E-mail: kjyoon@cju.ac.kr

(Received March 25, 2013; Accepted April 16, 2013)

요약. 솔잎조직과 ferrocene을 각각 효소원 및 매개체로, CSM 고무를 흑연가루 결합재로 사용하여 전류법 과산화수소 정량 효소전극을 제작하고, 그것의 특성을 전기화학적인 방법으로 관찰하였다. 낮은 퍼텐셜 영역(-100 ~ -500 mV)에서 보여준 $\ln(i(1-e^{-nF\eta}))$ vs. η 및 Lineweaver-Burk 도식의 좋은 직선성은 신호전류의 생성이 효소의 촉매작용에 의한 것임을 확인하여 주었다. 이 때 얻어진 대칭인자(α , 0.17), 한계전류(i_l , 1.99 A/cm²), 교환전류밀도(i_0 , 5.86×10⁻⁵ A/cm²), 마이클 상수(K_M , 1.68×10⁻³ M) 및 기타 전극 파라미터들은 전극 표면에서 소나무 과산화효소가 정량적으로 성능을 발휘하고 있음을 보여 주었다. 이런 실험적 사실들은 솔잎조직이 상업용 과산화효소를 대체하여 실용 효소전극 제작에 사용될 수 있음을 보여 주었다.

주제어: 효소전극, 솔 과산화효소, 과산화수소, 매개체

ABSTRACT. A pine needle-embedded graphite enzyme electrode, of which bonding agent is CSM rubber, was newly designed and its electrochemistry was studied based on the amperometry. It involved a ground green leaves of pine tree as a zymogen together with electrochemical mediator, ferrocene within the paste. The plots of $\ln(i(1-e^{-nF\eta}))$ vs. η and Lineweaver-Burk at the low potential (-100 to -500 mV) showed good linearities indicating that the amperometric response is by the catalytic power of pine peroxidase. Electrochemical parameters obtained, symmetry factor (α , 0.17), limiting current (i_l , 1.99 A/cm²), exchange current density (i_0 , 5.86×10⁻⁵ A/cm²), Michaelis constant (K_M , 1.68×10⁻³ M) and many others showed that pine peroxidase discharges the role of catalyst quantitatively on the electrode surface. Those proved that the practical use of pine peroxidase is promising in place of the marketed.

Key words: Enzyme electrode, Pine peroxidase, Hydrogen peroxide, Mediator

서론

산업 분야에서 과산화수소를 신속하고 정확하게 분석하는 일은 대단히 중요하다. 그것은 과산화수소가 표백제, 소독제, 전기도금, 하수 처리 등 여러 분야에서 각종 화합물의 제조 시약 및 산화제로서 다양한 용도를 갖기 때문이다.¹ 현재 과산화수소의 정량에는 고전적인 방법보다 분광학적 방법이나 전기화학적 방법이 보다 널리 이용되고 있다. 분광법의 경우 대단히 낮은 검출한계를 보여주지만 분석과정에 소요되는 시간적 및 경제적 고비용은 산업현장에서 효율성의 문제를 야기한다.² 그러므로 특별히 극미량 분석이 요구되지 않는다면 효소의 기질 특이성을 이용하는 효소전극법으로 문제를 신속하면서도

경제적으로 해결할 수 있다.

효소전극법의 기본 원리를 간단히 요약하면 다음과 같다.³ 단백질 덩어리 속에 위치하는 효소의 3차원 구조 활성 위치는 전극으로부터 멀리 떨어져 있기 때문에 전기 분해에 의하여 산화-환원 반응을 행하고자 할 때 높은 전압이 요구되고, 이 높은 과전압은 다른 부반응을 유발할 수 있다. 이 부반응은 신호에 잡음으로 작용하여 신호의 순도를 악화시킬 수 있다. 그러나 낮은 전위에서 효소의 활성 부위까지 침투하여 전자를 전달하여 줄 수 있는 매개체를 이용한다면 계에서 부반응의 가능성이 제거되어 순도 높은 신호전류를 얻을 수 있다.

이런 원리에 근거하여 전극을 다양한 방법으로 제작하고 그것을 이용하여 과산화수소를 분석한 예는 여러 곳에서

찾아볼 수 있다. E. Casero 등은 매개체, *p*-benzoquinone을 과산화효소와 함께 유리탄소전극에 고정하고 nitric oxide를 반응 억제제로 사용하여 과산화수소를 정량하였고,⁴ B. Wang 등은 유리탄소전극의 표면에 얇은 sol-gel 필름을 입히고 여기에 tyrosinase를 고정하여 catechol, phenol 및 *p*-cresol에 감응하는 전극을 제작하였다.⁵ 스크린 프린팅법은 간단한 효소전극 제작법이다. 이 방법으로 H. Olschewski는 폴리우레탄에 L-lysine-(α)-oxidase를 녹여 L-lysine을 정량하였다.⁶ S. Gaspar 등은 전도성 고분자(Os-pyrrole complex)를 Pt 및 탄소전극에 피복하면서 그 속에 HRP 및 tobacco peroxidase 고정하여 과산화수소를 정량하였다.⁷ 이 방법은 고분자 두께와 전극의 기하형태 조절에 효율적이었다. 물리적 흡착도를 이용하는 방법도 효소전극 제작에 널리 이용되고 있다. Heparin을 정량하기 위하여 T. J. Cheng 등은 protamine의 친화도를 이용하여 바이오센서를 제작하였다.⁸ 이 방법은 무기물의 정량에도 이용된다. TiO₂ sol-gel 매트릭스에 CoW₁₁Co와 PVP를 고정하여 Y. C. Li 등은 BrO₃⁻ 및 IO₃⁻을 각각 $\sim 10^{-6}$ 및 $\sim 10^{-7}$ M에 이르는 높은 검출한계를 얻었다.⁹

식물 조직으로부터 추출하여 시판되는 과산화효소를 직접 사용하여 센서의 성능 향상을 꾀한 경우도 있다.¹⁰ 이 때 신호전류는 증대되어 안정하지만 추출효소의 비싼 가격은 효소전극의 범용화 및 대량 생산에 걸림돌이 된다.

지금까지 언급된 여러 사항들을 고려하여 본 연구실에서는 생활 주변에서 이용하기 쉬운 효소원을 찾고자 노력하였다.¹¹ 일차적으로 여러 종의 식물을 시험적으로 사용하여 활용 가능성을 시험하였다. 이 논문은 그런 노력의 일환으로 솔잎 조직을 이용하여 효소전극을 제작하고 그것의 전기화학적 정량 특성을 살펴 본 내용을 포함하고 있다. 결과는 만족스러운 것이었고 솔잎조직이 과산화수소 정량을 위한 실용 센서물질로 활용 가능함을 보고하고 있다.

실 험

시약 및 기구

솔잎조직을 호모게나이저로 완전히 파쇄하여 효소원으로 사용하였다. 흑연가루는 Fluka사 제품(≤ 0.1 mm)이었고, 결합재로 클로로술폰화 폴리에틸렌 고무(Chlorosulphonated polyethylene rubber, abbr.: CSM, Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha Mitsui C.)를 사용하였다. 기질로 Junsei사의 과산화수소(Junsei Chem. Co. Ltd., 35%)를, 매개체로 페로센(Ferrocene, Sigma)을, 전해질로 0.1 M NaCl(Shinyo pure Chem., $\geq 95.5\%$) 용액을, 그리고 고무의 용제로 톨루엔(Sigma-Aldrich, HPLC용, $\geq 99.9\%$)을 사용하였다.

신호 측정은 EG&G Model 362(Princeton Applied Research) 및 BAS Model EPSILON(Bioanalytical System, Inc., U.S. A.) 전압전류 측정기를 이용하여 얻어졌으며, 기준전극과 보조전극으로 Ag/AgCl(BAS MF 2052)와 Pt전극(BAS MW 1032)을 각각 사용하였다.

전극 제작

10 mL의 CHCl₃에 0.09 g의 페로센을 녹인 후 여기에 0.91 g의 흑연가루를 넣고 완전히 혼합시켜 실온에서 건조시킨다. 이 흑연가루와 1.5% CSM 고무용액을 1:1 (wt/wt)로 혼합하여 반죽을 만든 후 이 반죽 1.0 g에 파쇄된 솔잎조직 0.2 g을 합하여 완전히 혼합시킨다. 효소전극은 이 전극 물질을 오음 접촉을 갖는 깊이 1 mm, 직경 6.67 mm의 원형 폴리에틸렌 튜브에 충전시키고 전극표면을 완전 평면으로 성형하여 완성한다.^{11c} 모든 측정은 0.1 M NaCl 용액 3전극계에서 이루어졌다.

결과 및 고찰

솔잎전극의 전기화학적 특성을 보여주는 순환전압전류 창이 Fig. 1에 주어졌다. (a)는 기질을 포함하지 않은 전해질 용액 중에서 얻어진 것인데, 전극전위 증가에 따라 잔류전류가 증가하는 것을 볼 수 있다. 계는 전해질인 물, 흑연가루의 결합재, CSM 고무 및 매개체, 페로센을 포함하고 있다. 물의 표준환원전위(SHE)는 -828 mV이다. 본 계에서 전극전위가 -1000 mV 이상이 되면 전극 표면에 기포가 형성되는 것을 육안으로 관찰할 수 있는데, 과전압을 고려하면 이 기체는 물의 환원 생성물인 수소이다. 따라서 -500 mV 이하에서 (a)가 보여주는 잔류전류는

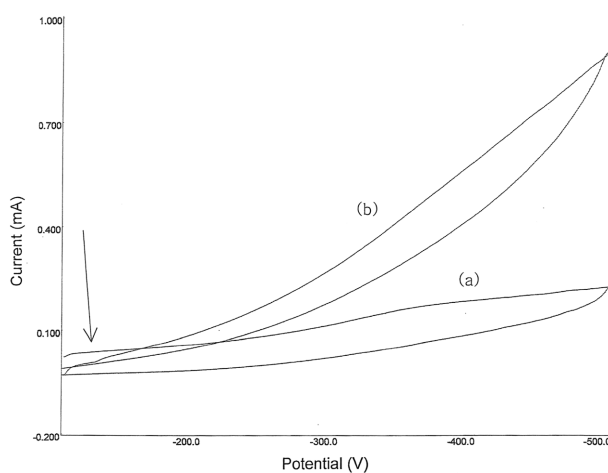


Figure 1. Cyclic voltammetric behavior of the biosensor in the absence of (a) and in the presence of (b) 2.0×10^{-2} M H₂O₂. Scan rate : 10 (mV/s). Arrow indicates the time of H₂O₂ addition.

물의 환원과 무관한 것이다. 매개체 페로센의 산화형, 페리시늄 이온의 표준환원전위는 +400 mV이다. 이 전위는 본 계에서 사용중인 Ag/AgCl에 대하여 +200 mV로 페리시늄 환원함수의 꼬리를 음의 방향으로 400 mV 이상 확장한다 해도 실험 전위 영역과 중첩될 가능성은 없다.¹² 즉 페리시늄의 환원은 본 실험의 전위 영역에 영향을 미치지 않는다. 그러므로 (a)의 바탕전류는 페리시늄 이온의 환원과 무관한 것이다.

결합재로 사용된 CSM 고무는 화학적 구성을 볼 때 Reed-Horn 반응에 의하여 생성된 혼합물이다.¹³ 바탕전류의 변화 경향성이 대체로 직선성임을 고려할 때 이것은 콘텐서 전류이거나 고무 구성성분 중의 전기화학 반응에 의한 것으로 볼 수 있다. (b)는 (a)와 동일한 조건에서 0.020 M 기질을 포함하고 있는 용액의 순환전압전류 그림이다. 기질 첨가 즉시 증가하는 전류계단(화살표)을 볼 수 있다. (b)는 이미 (a)의 바탕전류를 포함하고 있기 때문에 이 증가된 전류는 효소의 촉매작용에 의한 기질의 분해반응에 기인한 것으로 보아도 무방하다. 음전위 주사 시 (a)와 (b)의 신호차를 전극전위에 따라 도시한 것이 Fig. 2이다. 여기서 실험전위가 -100~-500 mV로 제한되어 있기 때문에 Fig. 2의 결과는 계가 확산지배일 경우 보여주는 S자 모양의 일부 부분으로 간주할 수 있다. 이 신호전류 i (mA)와 전극전위 $-E$ (V)의 관계를 시뮬레이션한 관계가 아래에 주어져 있다.

$$i = 0.00379 + 0.689/[1 + \exp\{(E+0.413)/0.103\}]$$

$E \rightarrow -\infty$ 일 때 얻어지는 전류, 0.693 mA는 본 계($A=0.349 \text{ cm}^2$, $n=1$, *vide infra*)가 생성하는 한계전류($i_{l,c}$)이다. 이것으로부터 도출된 솔잎전극의 질량 이동계수, m_c 와 질량 이동저항, $R_{m,c}$ 는 각각 $2.06 \times 10^{-5} \text{ cm/sec}$ 와 37.1Ω 이다.

과전압, η 와 $\ln(i/(1-\exp(nf\eta)))$ 의 관계는 Tafel 영역에서 기울기와 절편이 각각 $\alpha n f$ ($f = F/RT$) 및 $\ln i_0$ 인 선형이다.

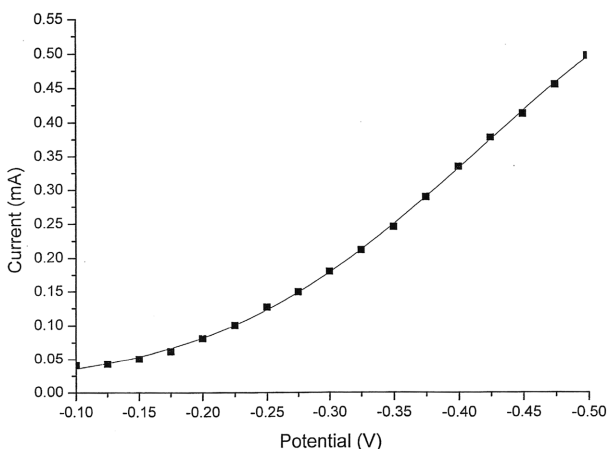


Figure 2. Signal difference between (a) and (b) in Fig. 1.

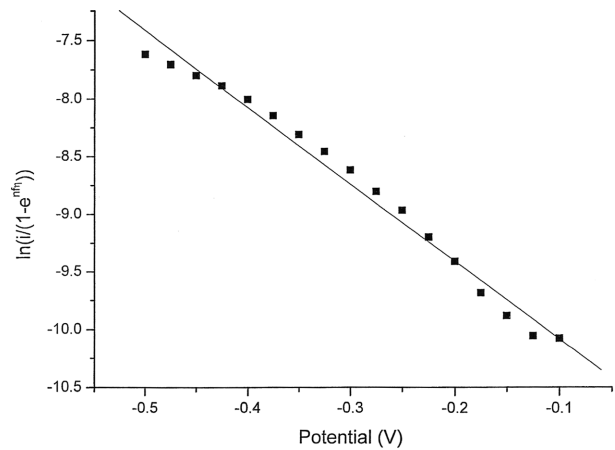


Figure 3. Tafel plot for the reduction current in the 0.02 M H₂O₂ solution.

Fig. 3의 도시는 좋은 직선성을 보여주고 있다. 생체 내에서 Fe²⁺ 이온과 과산화수소의 반응은 일 전자 전이반응 ($n=1$)으로 알려져 있다.¹⁴ 이 Fig. 3으로부터 얻어진 교환 전류 밀도(i_0)와 대칭인자(α)는 각각 $5.86 \times 10^{-5} \text{ A/cm}^2$ 및 0.17이다. 여기서 얻어진 대칭인자는 이중층의 에너지 장벽이 대칭인 경우의 0.5보다 작은 값이다. 이것은 기질의 환원반응속도가 전극전위 변화에 효율적으로 의존하고 있음을 말하여 주는 것이다.

전극의 계면 상태를 이해하기 위하여 기질을 포함하지 않은 전해질 용액 중에서 -450 mV의 계단전위를 인가하여 얻은 전류-시간 관계가 Fig. 4에 주어져 있다. 충전전류는 시간에 대하여 $i = E/R_s \exp(-t/R_s C_d)$ 의 함수 관계를 갖는다. 여기서 R_s 와 C_d 는 각각 용액의 저항 및 이중층의 커패시턴스이다. 콘덴서가 충전되어 있지 않을 경우 $t=0$ (sec)에서 $i = E/R_s$ 및 $\tau = R_s C_d$ 의 관계가 성립한다. 그림이 보여주

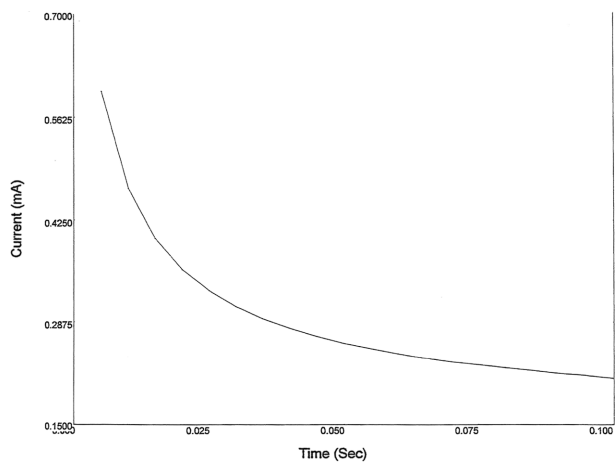


Figure 4. Current transient of the double-layer charging in 0.1 M NaCl electrolytic solution. Start potential: 0 mV; step potential: -450 mV.

Table 1. Time dependence of the double layer charging current at three different electrolyte concentrations. i (mA) = $A1 \cdot \exp(-t/t1) + i0$

$-\log[\text{NaCl}]$	A1	t1	$i0$
1	0.500	0.0121	0.260
2	0.222	0.0154	0.188
3	0.0432	0.0218	0.0859

듯 본 실험에 사용된 기기(BAS Model EPSILON)는 0.005 sec의 간격으로 디지털화되어 있기 때문에 $t=0$ 에서 전류를 측정하는 것은 불가능하다. 따라서 $t=0$ 에서 전류를 얻고자 한다면 전류의 경향성을 $t=0$ 로 외삽하는 방법을 취하여야 한다. 다른 세 전해질 농도에서 얻은 충전전류와 시간과의 관계가 Table 1에, 그리고 이로부터 도출된 $i_{t=0}$ 와 R_s 가 실측 시간상수, τ 와 함께 Table 2에 주어져 있다. 전해질 농도가 감소함에 따라 시간상수가 증가하는 것을 볼 수 있는데 이것은 용액저항 증가에 따른 이중층 형성의 지연에 기인하는 것으로 볼 수 있다.

시간상수와 용액 저항의 관계 $\tau=R_s C$ 로부터 계산된 축전용량은 전해질 농도가 묽어짐에 따라 증가하는 것을 보여주고 있다. A와 d를 축전기의 단면적 및 두께라고 할 때 축전기의 구조와 용량의 관계는 $C=\epsilon_0 \epsilon A/d$ 이다. 이와 같은 전해질 농도감소에 따른 축전용량의 증가 경향성은 전해질 이온의 농도 감소에 의한 용액의 유전률, ϵ 의 증가에 기인한 것으로 볼 수 있다.

한편 Gouy-Chapmann 이론에 의하면 확산 이중층(diffuse double layer)의 커패시턴스, C_d 는 $228\sqrt{c'} \cosh(19.47z\phi)$ 로 주어진다. 여기서 얻어진 값들은 수용액에서 일반적으로 얻어지는 값($10\text{--}30 \mu\text{F cm}^{-2}$)보다 크다. 이 증가는 흡연가루를 둘러싸고 있는 고무 결합재의 유전상수 증가에 기인하는 것으로 볼 수 있다. 한편 $C_d \gg C_i$ 관계는 본 계의 유효 커패시턴스가 내부 조밀층(inner compact double layer)에 의존함을 말하여 주고 있다.

Fig. 5의 (a)는 -450 mV 의 일정전극전위에서 환류상태의 10 mL 전해질 용액에 0.1 M H_2O_2 용액 50 μL 를 9회 연속적으로 추가하였을 신호가 변화하는 모습이다. 유체역학 전류측정법(hydrodynamic amperometry)이라고 하는 이 방법은 화학종의 질량이동이 환류와 관련되어 있으므로 질량이동 속도가 화학종의 확산속도보다 훨씬 크기 때문에

Table 2. Electrochemical parameters of the pine electrode at -450 mV

$-\log[\text{NaCl}]$	$i_{t=0}$, mA	R_s , Ω	τ , sec	C, F	C_d , F	C_i , F
1	0.760	5.92×10^2	0.040	6.76×10^{-5}	0.230	$\approx 6.76 \times 10^{-5}$
2	0.410	1.10×10^3	0.13	1.18×10^{-4}	0.0728	$\approx 1.18 \times 10^{-4}$
3	0.129	3.49×10^3	2.50	7.16×10^{-4}	0.0230	$\approx 7.16 \times 10^{-4}$

$i_{t=0}$: condenser current at $t=0$ sec; R_s : solution resistance; τ : time constant (obs); C: effective double layer capacitance; C_d : capacitance of the diffuse double layer; C_i : capacitance of the compact double layer.

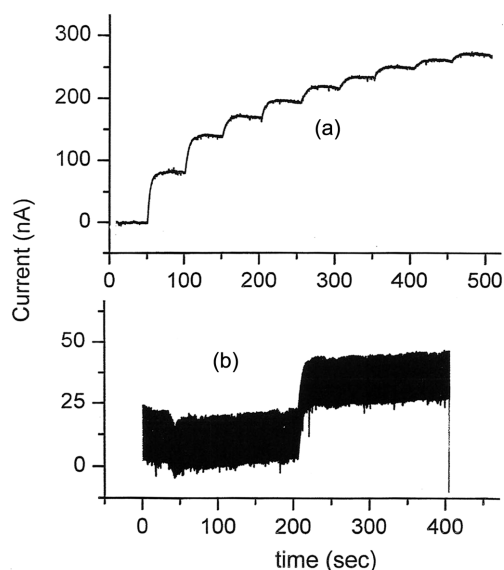


Figure 5. Signal current caused by the successive increments of 50 μL of 0.1 M H_2O_2 (a) and by an addition of 40 μL of 0.01 M H_2O_2 for the determination of detection limit (b) at -450 mV .

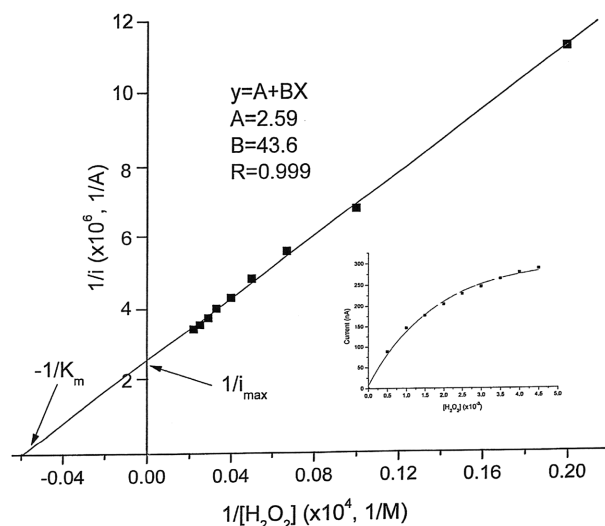


Figure 6. Lineweaver-Burk plot for the determination of K_M and i_{max} . Inset: the calibration curve elicited from Fig. 5 (a).

정류상태에 도달하는 시간이 최소화되는 장점을 갖고 있다. Fig. 6의 창에 (a)의 누적적 흡산 신호가 농도의 함수로 도시되어 있다. 검정곡선이 쉽게 직선성으로부터 벗어

나는 것을 볼 수 있다. 이 경향성은 모든 효소전극의 공통적 특성으로 전극표면의 활성자리수가 제한되어 있기 때문이다. 또 기질의 분해반응이 단단계 반응일 경우 효소가 어느 특정 단계만을 관여할 가능성과 솔잎전극의 과산화효소가 동위효소를 포함할 경우^{10a} 그들이 서로 다른 속도로 과산화수소 분해에 참여할 가능성도 있기 때문이다. -450 mV의 전극전위에서 10 mL 전해질 용액에 0.01 M H₂O₂ 40 μL를 투입하였을 때 얻어진 전류-시간 그림이 Fig. 5의 (b)이다. 여기서 얻어진 검출한계(S/N=2)는 4.0×10⁻⁵ M로 유사 효소전극들과 대체로 비슷한 값이다.¹⁵ Fig. 5의 (b)가 보여주는 잡음의 원인은 주로 자석 젓개에 의한 것이기 때문에 빠른 감응을 요구되지 않는다면 검출한계는 상당히 낮출 수 있을 것이다. 효소전극은 기질에 대한 감응시간이 대단히 짧은 것이 특징이다.¹⁶ Fig. 5의 (b)는 대략 10초 이내에 포화되는 것을 볼 수 있는데 이 시간은 자석 젓개의 회전 속도에 크게 의존한다.

Lineweaver-Burk 도사가 직선성을 보일 때 반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. Fig. 6의 도시는 Fig. 5(a)에서 기질 농도에 따라 누적적으로 합산된 신호로부터 도출된 것이다. R=0.999의 상관계수를 갖는 좋은 직선성을 보여주고 있다. 여기서 얻어진 직선성은 솔잎전극의 표면에서 일어나는 반응이 효소에 의하여 정상적으로 진행되고 있음을 말하여 준다. 이로부터 얻은 i_{max} 와 K_M 은 각각 1.11 μA/cm²와 1.68×10⁻³ M이다.

계의 전기화학적 가역성을 살펴보기 위하여 기질 농도 0.01 M에서 이중계단기법(double step technique)으로 얻은 전류-시간 그림이 Fig. 7에 주어져 있다. 첫 계단전위 -450 mV는 Fig. 1에서 보아 알 수 있듯이 기질이 전극전위에 의하여 충분히 환원되는, 그리고 두 번째 계단전위 0.00 mV는 실험 영역에서 충분히 벗어난 전위이다. Table 3에 그

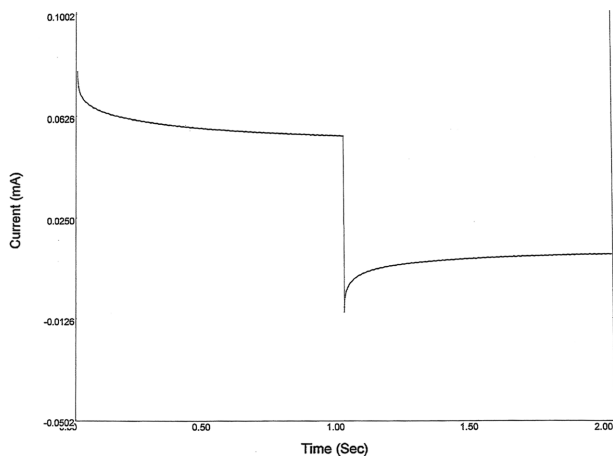


Figure 7. Chronoamperometric behavior resulted from the double step experiment. Start potential: 0 mV; first step E: -450 mV; second step E: 0 mV. [H₂O₂]: 0.01 M; [NaCl]: 1.0×10⁻³ M.

Table 3. Time dependence of $-i_r/i_f$ at t_f and t_r . $t_r = t_f - \tau$ ($\tau=1$)

t ($\times 10^{-3}$, sec)	$i_{r,f}$ (mA)	$i_{r,t-\tau}$ (mA)	$-i_r/i_f$
1.0	0.0787	-0.010	0.13
2.0	0.0760	-0.008	0.11
3.0	0.0744	-0.005	0.07
4.0	0.0740	-0.005	0.07
5.0	0.0728	-0.004	0.05
6.0	0.0724	-0.003	0.04
7.0	0.0724	-0.003	0.04
8.0	0.0721	-0.003	0.04
9.0	0.0713	-0.003	0.04
10.0	0.0713	-0.002	0.03

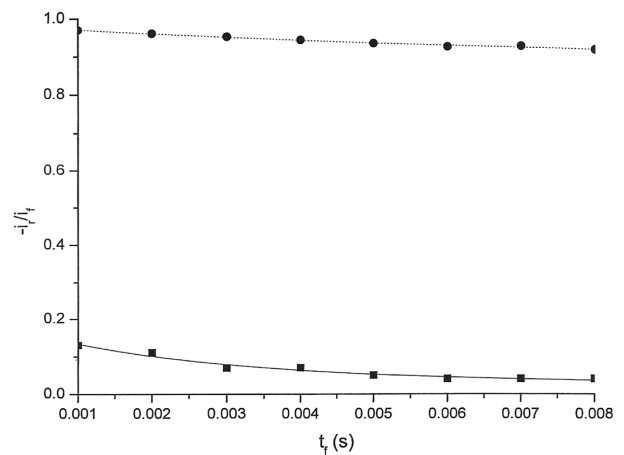


Figure 8. Working curve for $-i_r/i_f$ elicited from Fig. 7. The dotted: $1-(1-\tau/t_f)^{1/2}$.

림으로부터 얻은 첫 계단과 역전계단의 전류채취 시간, t_f 및 $t_f + \tau$ ($\tau=1$ sec)에서 측정된 전류, i_r 및 i_f 가 함께 주어져 있다. 기질의 환원 생성물은 전해질 용액의 용매인 물이다. 그러므로 계가 이상적인 가역이라면 $-i_r/i_f$ 은 $1-(1-\tau/t_f)^{1/2}$ 과 일치해야 한다. 그러나 이들은 Fig. 8에서와 같이 현격한 차이를 보여주고 있다. 우선 $t_f = 0$ ($t_f/\tau=1$)에서 $\{1-(1-\tau/t_f)^{1/2}\}/\{-i_r/i_f\}$ 은 0.13으로 작은 값을, 그리고 0.001-0.008의 t_f 구간에서 $-i_r/i_f$ 은 0.03-0.13 사이의 값을 보여주고 있다. 이것은 다음과 같이 해석될 수 있다. 본 계에서 전압이 역전될 때 얻어지는 신호전류가 컨덴서전류를 포함할 것을 예상하면 물의 산화반응은 없는 것으로 볼 수 있다. 따라서 실험전위 영역에서 기질 환원의 역반응은 비가역적이라고 할 수 있다.

결론

솔잎을 효소원으로 사용한 과산화수소 바이오센서의 전기화학적 특성에 관한 위의 내용들은 솔잎전극의 전기

화학적 거동이 정성적, 정량적임을 보여주었다. 이것은 솔잎전극이 실용전극으로 활용될 수 있음을 말하여 주는 것이다. 전극은 용매 증발 후 견고한 기계적 강도를 보이기 때문에 반영구적으로 사용할 수 있었다. 본 연구실에서 개발된 전극제작의 간편함과 저렴한 비용은 다른 분광법들에 비하여 대단히 우월하다. 다만 전극은 제작 후 시간 경과에 따라 감도가 감소하는 경향을 보이는데, 이것은 다른 효소전극과 공통적이다. 실험실 조건에서 일어나는 이 현상은 효소의 열역학적 변성에 기인한 것으로 보여진다. 따라서 솔잎전극이 실용전극으로서 완전하게 활용되려면 전극 속에서 일어나는 효소의 변성 특성에 관한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것이다.

Acknowledgments. 이 논문은 2012학년도 청주대학교가 지원하는 연구년으로 연구되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

REFERENCES

- (a) Irving Sax, N. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*; Van Nostrand Reinhold: New York, U.S.A., 1987; p 168. (b) Kirchner, J. R. *Encyclopedia of Chemical Technology*; Wiley-Interscience: New York, U.S.A., 1981; Vol. 13, p 12.
- (a) Wang, J.; Ye, H.; Jiang, Z.; Huang, J. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *508*, 171. (b) Tang, B.; Wang, Y. *Spectrochim. Acta, Part A* **2003**, *59*, 2867.
- (a) Gaspar, S.; Popescu, I. C.; Gazaryan, I. G.; Bautista A, G.; Sakharov, Y. I.; Mattisson, B.; Csöregi, E. *Electrochimica Acta* **2000**, *46*, 255.
- Casero, E.; Darder, M.; Pariente, F.; Lorenzo, E. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *403*, 1.
- Wang, B.; Zhang, J.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 397.
- Olschewski, H.; Erlenkötter, A.; Zaborosch, C.; Chemnitz, G. C. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 537.
- Gaspar, S.; Habermüller, K.; Csöregi, E.; Schuhmann, W. *Sens. Actuators B* **2001**, *72*, 63.
- Cheng, T. J.; Lin, T. M.; Chang, H. C. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *462*, 261.
- Li, Y. C.; Bu, W. F.; Wu, L. X.; Sun, C. Q. *Sens. Actuators, B* **2005**, *107*, 921.
- (a) Yoon, K. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 997. (b) Yoon, K. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2008**, *29*, 2264.
- (a) Yoon, K. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 2913. (b) Yoon, K. J.; Lee, B. G.; Kwon, H. S. *Anal. Sci. & Tech.* **2000**, *13*, 41. (c) Lee, B. G.; Yoon, K. J.; Kwon, H. S. *Anal. Sci. & Tech.* **2000**, *13*, 315. (d) Yoon, K. J. *J. Korean Chem. Soc.* **2004**, *48*, 654. (e) Yoon, K. J.; Kim, K. J.; Kwon, H. S. *J. Korean Chem. Soc.* **1999**, *43*, 271.
- Dho, H. S.; Yoon, K. J. *J. Ind. & Eng. Chem.* **2011**, *17*, 254.
- Brydson, J. A. *Rubbery Materials and their Compounds*; Elsevier Applied Science: London and New York, 1988; p 291.
- (a) Mansouri, A.; Markris, D. P. M.; Keflas, P. *J. Pharm. Biochem. Anal.* **2005**, *39*, 39. (b) Graft, E.; Mahoney, J. R.; Bryant, R. G.; Eaton, J. W. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 362.
- (a) Yang, Y. H.; Yang, M. H.; Wang, H.; Tang, L.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *509*, 151. (b) Li, Y. C.; Bu, W. F.; Wu, L. X.; Sun, C. Q. *Sens. Actuators, B* **2005**, *107*, 921.
- (a) Roy, J. J.; Abraham, T. E.; Abhijith, K. S.; Kumar, P. V. S.; Thakur, M. S. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 206. (b) Liu, B. H.; Cao, Y.; Chen, D. D.; Kong, J. L.; Deng, J. Q. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *478*, 59.