

클로로프렌 고무로 결합된 동물조직 고정 탄소반죽 전극의 전기화학적 특성

유근배

청주대학교 자연과학부 응용화학과
(2010년 11월 15일 접수, 2010년 11월 19일 채택)

Electrochemical Characterization of Animal Tissue-Immobilized Carbon Paste Biosensor Bound with Chloroprene Rubber

Keun-Bae Rhyu

Department of Applied Chemistry, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea
(Received November 15, 2010; Accepted November 19, 2010)

미네랄 오일을 결합제로 사용하는 탄소반죽전극은 효소의 특성 연구 분야에서 효과적으로 활용되고 있으나 전극이 기계적 경도가 없으므로 실용화의 가능성은 없다. 본 실험실에서는 톨루엔에 녹인 고무 용액이 탄소가루의 결합제로 사용될 때 탄소반죽의 기계적 물성이 얻어지는 것을 확인하였다. 클로로프렌 고무 용액을 이용하여 만든 전극이 정량적인 전기화학적 행동을 보이는지 확인하기 위하여 여러 가지 속도론적 파라미터 즉 대칭인자(α , 0.28), 교환전류밀도(i_0 , $4.06 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), 이중층의 축전용량(C_d , $2.11 \times 10^{-3} \text{ F}$), Michaelis 상수(K_M , $2.45 \times 10^{-3} \text{ M}$), 시간상수(τ_B , 0.077 sec) 등을 구하였다. 이 실험적 사실들은 클로로프렌 고무가 탄소반죽전극의 실용화에 전망 좋은 결합제임을 입증하였다.

Even though the carbon paste electrode bound with mineral oil is useful for research about the characteristics of enzymes, it remains far from practical uses because the lack of mechanical hardness limits its practical use. When the rubber liquefied in toluene was used as a binder of carbon powder in lab, it is confirmed that the mechanical robustness of the electrode is guaranteed. In order to confirm whether it shows quantitative electrochemical behaviors or not, its kinetic parameters, e.g. the symmetry factor ($\alpha = 0.28$), the exchange current density ($i_0 = 4.06 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), the capacity of the double layer ($C_d = 2.11 \times 10^{-3} \text{ F}$), the Michaelis constant ($K_M = 2.45 \times 10^{-3} \text{ M}$), and the time constant ($\tau_B = 0.077 \text{ sec}$) were investigated. Our experimental observations prove that the chloroprene rubber is a promising binder for the practical use of a carbon paste electrode.

Keywords: carbon paste electrode, hydrogen peroxide, peroxidase, chloroprene rubber

1. 서 론

효소에 의하여 촉진되는 반응은 그렇지 않은 경우에 비하여 낮은 온도에서도 최소한 백만 배 이상의 촉매력을 발휘한다. 그러므로 산화-환원 반응에 의하여 진행되는 생화학적 계를 전기화학적 방법으로 관찰하고자 할 때, 바이오센서에 효소의 특이성과 재현성이 유지되도록 고정하는 일은 중요하다. 효소의 고정과 효소전극의 실용화를 위하여 지금까지 많은 노력이 경주되어 왔다. 효소의 물리적 흡착성[1] 또는 기능성 고분자와의 교차결합[2]을 이용하거나 전도성 고분자에 혼입시키는 방법[3] 등, 많은 방법들이 시도되었다. 또 전극물질에 효소를 직접 혼입시키는 졸-겔 법[4,5]과 스크린 프린팅 법[6]이 선호되기도 한다. 그러나 이와 같은 방법들은 전극의 제조과정이 복잡한 물리적, 화학적 과정을 요하기 때문에 실험실에서 가능하다 할지라도, 시간과 경제적 측면을 고려하면 실용화 및 대량생산에 적합하지 못하

다. 이와 같은 문제점들을 우회하기 위하여 탄소반죽 전극법[7,8]이 등장하였다. 이것은 탄소가루와 미네랄 오일의 혼합물 반죽에 효소나 효소원이 되는 물질을 직접 혼입시켜 전극 물질로 사용하는 방법으로, 그 과정이 매우 간단하여 효소의 특성 연구 분야에서 현재 널리 사용되고 있다. 본 연구실에서도 탄소반죽 전극의 제작 상 간편함과 빠른 감응성을 활용하여 효소의 전기화학적 특성을 연구하고 그 결과를 보고한 바 있다[9-12]. 그러나 이 전극은 미네랄오일이 비휘발성이므로 전극 제작 후 기계적 물성이 확보되지 않기 때문에 실용화의 가능성은 없다. 이런 난제를 극복하기 위하여 본 실험실에서는 기계적 안정성이 확보되는 탄소가루 결합제를 찾고자 노력하였으며, 그 결과로 톨루엔에 녹인 고무가 용매 휘발 후 전극에 기계적 물성을 가져오는 것을 발견하였다. 현재 그것의 응용성 확장에 연구력을 집중하고 있으며[13-15], 그 노력의 일환으로 클로로프렌 고무를 이용하여 전극을 제작하였다. 클로로프렌 고무는 2-클로로-1,3-부타디엔이 반복적으로 결합된 고분자로 내열성과 내후성이 강하며, 높은 인장강도와 내마모성을 갖는 것으로 알려져 있다[16]. 이런 물리적 특성이 탄소반죽전극

Table 1. Structure Materials Used in Electrode Fabrication

Electrode	Each electrode contains
A	gr (0.5) + cr (0.5)
B	gr (0.5) + cr (0.5) + tis (0.065)
C	gr (0.5) + cr (0.5) + fer (0.9)
D	gr (0.5) + cr (0.5) + tis (0.065) + fer (0.9)

cr : chlorprene rubber solution (5.0 % in toluene), gr : graphite powder; tis: tissue fer : ferrocene. Unit in () : g.

의 실용화를 위한 결합재의 특성을 충족시킬 것으로 기대하며, 전기 화학적 속도론적 특성을 살펴보았다. 그 결과를 여기에 보고한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

효소원은 호모게나이저로 파쇄된 닭의 간조직이었고, 제조 직후 탄소반죽에 혼합되었다. 결합재는 일본전기화학주식회사의 클로로프렌 고무(chlorprene rubber (CR), M-30, Denka)가 사용되었으며, 톨루엔과 탄소가루는 각각 Sigma-Aldrich (= 99.9%)사 및 Fluka (= 0.1 mm)사의 제품을 이용하였다. 기질로 Junsei사의 과산화수소(EP, 35%), 전해질로 Shinyo pure Chem.의 NaCl (= 99.5%), 그리고 매개체로 Sigma사의 페로센(ferrocene)이 사용되었다. Ag/AgCl (BAS MF 2052)과 Pt 전극(BAS MW 1032)이 각각 기준전극과 보조전극으로 사용되었다. LSV (linear sweep voltammogram)는 효소전극을 BAS model EPSILON (Bioanalytical system, Inc/, U.S.A.)에 연결하여 얻었고, 이외의 전기적 측정은 Kipp & Zonen x-t 기록계(BD 111, Holland)가 연결된 EG&G Model 362 potentiostat (Princeton Applied Research, U.S.A.)을 사용하여 얻었다.

2.2. 전극의 제작

클로로포름 10 mL에 0.09 g의 페로센을 녹인 후 0.91 g의 탄소가루를 혼합하여 건조시키고, 여기에 5.0% CR 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, 오목 접착이 있는 6.0 mm의 직경과 1.0 mm의 깊이의 폴리에틸렌 튜브에 충전시켜 스페큘라로 평면을 만들어 전극으로 활용한다. LSV는 정지된 용액 중에서 얻어졌으며, 이외의 전류 측정은 교반 중인 전해질 용액 10 mL에 전극을 위치시키고 계단 전압을 인가한 후 잔류전류의 감소 경향이 수평을 이룰 때 기질을 가하고, 첨가 후의 전류차를 기질의 분해전류로 간주하였다.

3. 결과 및 고찰

전기화학에서 측정되는 신호전류에 부반응 전류가 포함된다면 그 측정치는 무의미한 것이다. 효소의 활성자리는 단백질 표면으로부터 깊은 곳에 위치하기 때문에 산화형 효소를 환원시키기 위하여 높은 전극전위가 필요하다. 그러나 이 높은 전압은 부반응을 야기할 수 있으므로 전극의 전위를 낮게 유지하는 것이 필수적이다. 이를 화학적인 방법으로 해결하기 위하여 매개체를 사용한다[17,18]. 본 계에서 사용되는 전극은 탄소 외에 3종류의 성질이 다른 화합물로 구성되어 있다(Table 1). 전극의 전도성을 위하여 탄소가루를, 탄소가루의 결합재로 클로로프렌 고무를, 과산화효소원으로 닭의 간 조직을, 그리고 매개체로 페로센을 사용하였다. 우선 이들의 영향을 배제하기 위한

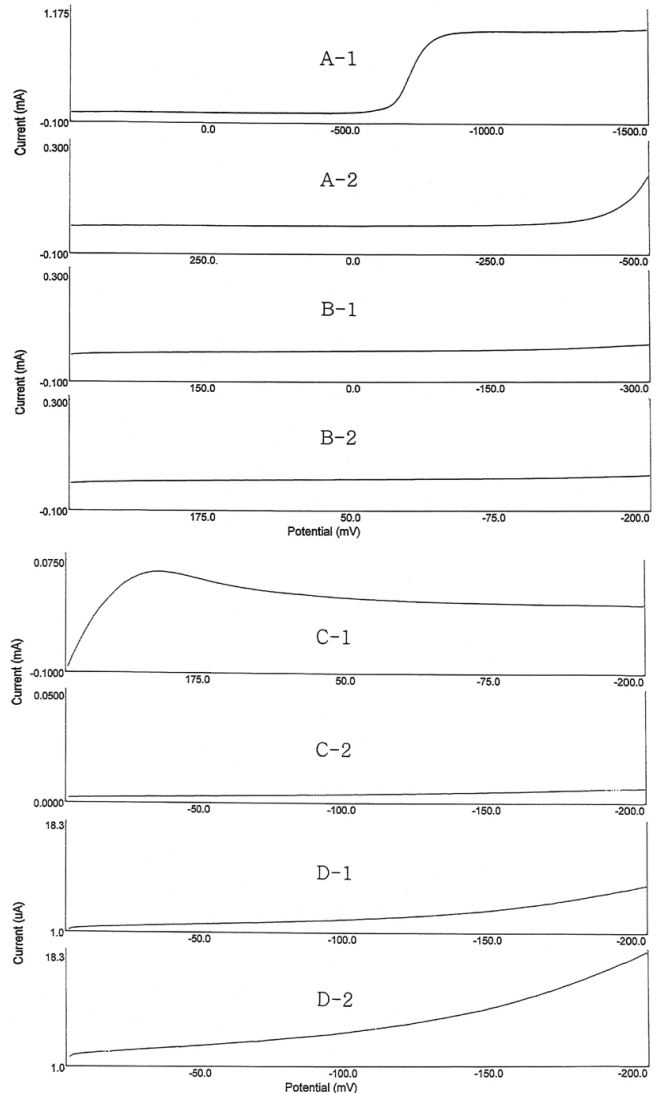


Figure 1. Electrochemical behavior of each structure material in electrode. 1 and 2 were obtained from the electrolytic solution without and with the substrate (0.02 M H₂O₂) respectively. Scan rate : 50 mV/sec.

실험 전위영역을 설정하는 작업이 우선되어야 한다. 0.1 M NaCl 용액 속에서 순수한 유리탄소 전극은 실험 전극전위 영역에서 어떤 반응도 없는 것으로 확인되었다[13]. 고무의 전기화학적 행동을 살펴보기 위하여 얻어진 LSV가 Figure 1의 A-1이다. 기질이 없음에도 불구하고 대략 -500 mV 이상에서 큰 환원전류를 보이고 있다. 이 전류의 생성은 크게 두 가지 원인을 추정될 수 있다. 물과 고무 구성 물질의 환원이 그것인데, 물의 환원전위는 -0.836 V (vs. SHE)이므로 -300 mV 이상에서 나타나는 전류는 물의 환원함수의 꼬리일 가능성이 있다. 전류 측정 시, 이 영역에서 전극 표면에 기포가 형성되는 것이 육안으로 관찰된다. 환원전류의 또 다른 생성원인으로 고무 성분의 환원을 고려할 수 있다. 고무는 구성 성분의 종류와 양이 정확히 밝혀지지 힘든 혼합물이다. 따라서 고무의 구성 성분 중에서 전기화학적으로 활성인 물질이 이 영역에서 환원될 가능성을 배제할 수 없다. 이 영역이 배제된 전위 영역에서 용액에 기질을 추가하였을 때 얻은 LSV가 A-2이다. 대략 -300 mV 이상에서 환원전류의 꼬리가 아직도 존재하는 것을 볼

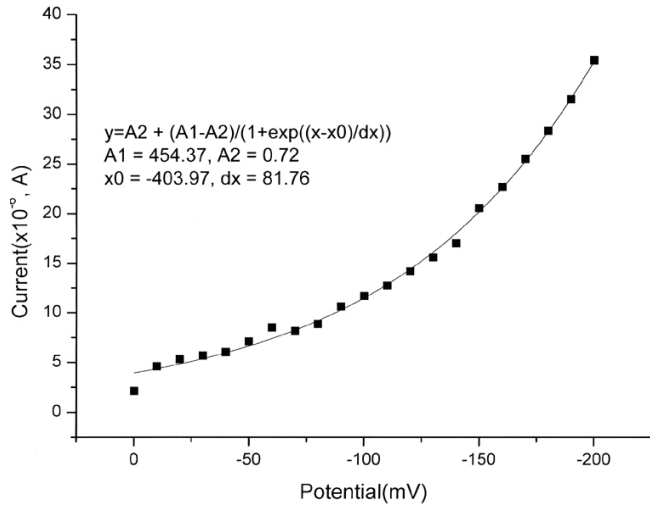


Figure 2. Potential dependence of the current difference between D-1 and D-2 in Figure 1.

수 있다. 뒤에서 자세히 언급되었지만 이것은 매개체의 매개작용에 의한 전류가 아닌, 전극 전위에 의한 기질의 직접 환원 전류로 볼 수 있다. 동일한 실험 영역에서 간 조직을 포함하고 있는 전극으로부터 얻은 LSV가 B-1이다. 기질이 없음에도 불구하고 -200 mV 이상에서 약간의 환원전류가 존재하는 것을 확인할 수 있다. 과쇄된 생체조직은 구성성분이 복잡한 혼합물이다. 계가 기질을 포함하고 있지 않음에도 불구하고 환원전류가 생성되는 것은 간 조직에 포함된 미지 성분이 이 전위 영역들에서 미세하게 전기적 활성임을 말하여 준다. 따라서 실험 전위영역은 다시 조정될 필요가 있다. +300~-200 mV로 범위를 좁히고 기질을 추가하여 얻은 LSV가 B-2이다. 비교적 고무나 간조직의 영향이 없음을 확인할 수 있다. 매개체로 사용된 페로센의 전기화학적 행동을 살펴보기 위하여 얻은 LSV가 C이다. 기질이 가해지지 않은 경우(C-1), +200 mV 부근에서 큰 환원파를 보이고 있다. 페로센의 산화환원전위는 597 mV (vs. Ag/AgCl)이다. 고무성분에 의한 과전압을 고려한다면 이 환원파는 페로센의 환원에 기인된 것으로 보아도 무방할 것이다. 이 환원파의 영향이 없는 0~-200 mV의 실험 영역에서 기질을 가하고 얻은 LSV가 C-2이다. 전극 D는 본 실험에서 사용될 전극으로 앞에서 전기화학적 활성이 확인된 모든 물질을 포함하고 있다. y축의 척도를 6배 정도 확대한 것이 D-1이다. 전극 전위에 따라 잔류전류가 증가하는 것을 확인할 수 있으며, 이 정도 크기의 잔류전류는 전기화학에서 불가피한 것으로 보지 않을 수 없다. 여기에 기질을 가하여 얻은 LSV가 D-2이다. 환원전류가 전체 영역에서 확연히 증가한 것을 볼 수 있다. D-1과 D-2의 전류차를 전극전위에 대하여 도시한 것이 Figure 2이다. 이것은 모든 조건이 동일한 상태에서 기질의 존재 유무에 의하여 결정된 것이므로 매개전류로 보아도 무방할 것이다. 전기화학반응이 확산지배일 경우 신호전류는 인가전위에 대하여 폴라로그래피 파처럼 S자형이다. 여기서는 전극전위를 큰 음전위까지 확대할 수 없기 때문에 그 일부만을 나타낸 것이다. 이것을 Boltzmann 모델로 시뮬레이션한 전류-전압 관계식은

$$i = 0.72 + (454.37 - 0.72) / \{1 + \exp(E + 403.97) / 81.76\}$$

으로 주어진다. 여기서 $I (\mu\text{A}/\text{cm}^2)$ 는 신호전류, $E (\text{mV})$ 는 인가된 전극 전위이다. E 가 음의 무한대로 증가할 경우 극한 전류는 $454.37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$

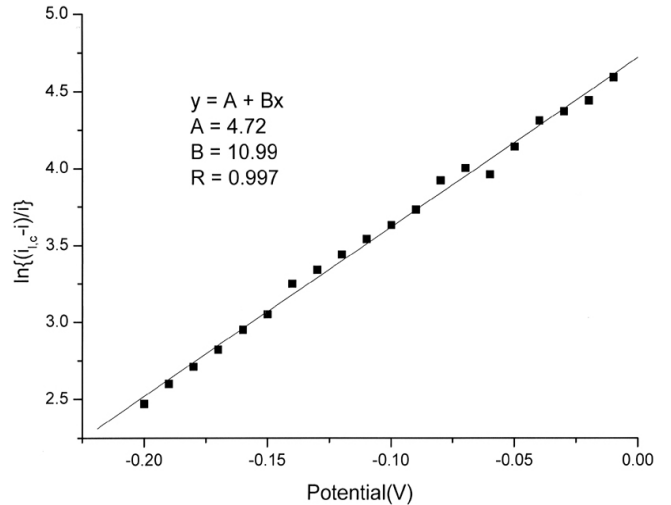


Figure 3. Wave slope plot for the reduction of 0.02 M H₂O₂ in 0.1 M NaCl.

Table 2. Current Transient Resulting from Potential Step Experiment. Step Potential : -150 mV (vs. Ag/AgCl). A and B were obtained in the presence of substrate (0.02 M H₂O₂) and in the electrolytic solution (0.10 M NaCl), respectively

Time (sec)	A (mA)	B (mA)	A-B (mA)
0.1	1.150	1.132	0.018
0.2	0.417	0.346	0.071
0.3	0.291	0.224	0.067
0.4	0.248	0.169	0.079
0.5	0.224	0.142	0.082
0.6	0.209	0.122	0.087
0.7	0.201	0.110	0.091
0.8	0.193	0.102	0.091
0.9	0.185	0.0984	0.087
1.0	0.177	0.0945	0.083

이며, 이것을 한계전류(i_{lc})로 간주한다. 생체조직에서 일어나는 제일 철이온과 과산화수소의 전자교환반응은 일 전자 전이반응($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^-$)으로 알려져 있다[19]. 비가역계의 Tafel 영역에서 E에 대한 $\ln(i_c - i) / i$ 의 도시(Figure 3)는 $-\ln i_0 / i_{lc}$ 의 절편과 $\alpha nF/RT$ 의 기울기를 갖는다. 이 두 Tafel 상수로부터 계산된 대칭 인자와 교환전류밀도는 각각 $\alpha = 0.28$ 와 $i_0 = 4.06 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 이었다. Table 2는 전위계단(계단전위 : -150 mV vs. Ag/AgCl) 실험 시, 시간에 따른 잔류전류의 변화에 관한 자료를 포함하고 있으며, 이것을 그래프로 나타낸 것이 Figure 4이다. 여기서 A의 전류가 B의 전류보다 큰 것을 볼 수 있는데, B는 이중층 충전전류의 단독 기여에 의한 것이지만, A는 충전전류와 과산화수소의 환원전류가 공동으로 기여하는 것이기 때문이다. 또 A와 B의 차이가 시간에 따라 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이 원인은 계단전압 인가 초기에는 기질 확산의 기여가 없으나, 시간이 경과함에 따라 확산된 기질의 환원전류가 추가되는 것으로 볼 수 있다. 전압 인가 0.4 s 후 그 값은 대체로 일정한 것을 볼 수 있는데, 이것은 0.4 s가 확산층이 완성되는데 필요한 시간임을 시사하고 있다. 잔류전류는 자연대수에 대하여 1차로 감소한다. 이 방식에 따라

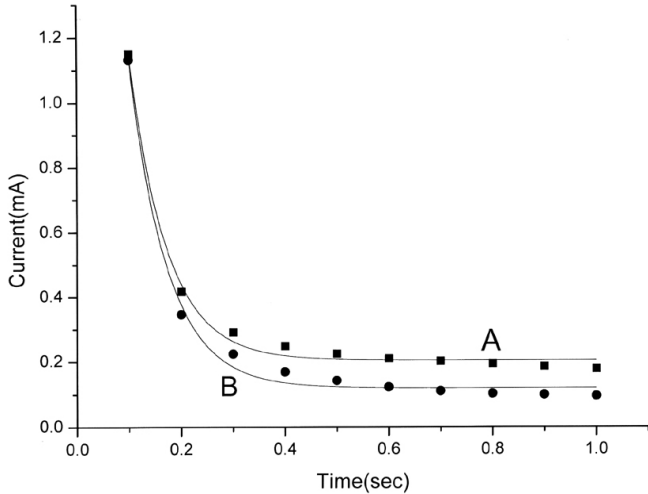


Figure 4. The decay of residual current over time. A and B were obtained from the solution with and without the substrate (0.02 M H₂O₂) respectively. Step potential : -150 mV (vs. Ag/AgCl).

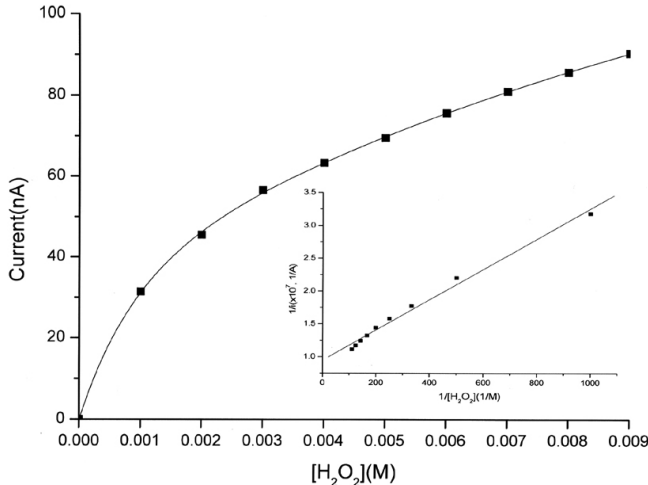


Figure 5. Calibration profile of the enzyme electrode at -150 mV. Inset : Lineweaver-Burk plot derived from the calibration profile.

시플레이션한 A와 B의 전류-시간(s) 관계는 다음과 같다.

$$i_A \text{ (mA)} = 3.81\exp(-t/0.072) + 0.20$$

$$i_B \text{ (mA)} = 3.99\exp(-t/0.073) + 0.12$$

여기서 얻어진 시간 상수, τ_A 와 τ_B 는 각각 0.079 s와 0.077 s로 유사한 값을 보이고 있다.

또 위 식으로부터 $t = 0$ 에서 i_A 와 i_B 는 각각 4.01 및 4.11 mA/cm²임을 알 수 있다. 이중층이 전혀 충전되지 않은 $t = 0$ 에서 흐르는 전류는 시간에 무관한 오음의 법칙에 의하여 지배되므로, 이로부터 계산된 용액의 저항은 $R_{s,A} = 37.4$ 및 $R_{s,B} = 36.5 \Omega$ 이다. 여기서 i_A 가 i_B 보다 작고, $R_{s,A}$ 가 $R_{s,B}$ 보다 큰 것은 전압 인가 초기에 전해질의 이동이 기질에 의하여 방해 받고 있음을 말하여 주는 것이다. 한편 위에서 얻어진 시간상수와 용액저항, 그리고 관계식, $\tau = R_s C_d$ 로부터 얻어진 이중층의 충전 용량, C_d 는 A와 B의 경우 동일한 값, $2.11 \times 10^{-3} F$ 을 보이는데, 이 결과는 합리적이라 할 수 있을 것이다. Figure 5에 유체전

류법(hydrodynamic amperometry)으로 얻은 검정곡선이 주어졌다. 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 단계를 촉매 할 수 있다. 또 전극 표면의 활성자리의 수가 제한되어 있기 때문에 기질 농도에 선형으로 감응할 수 없다. 한편 동위효소가 기질 분해에 다른 속도로 참여한다면 그것도 한 이유가 될 수 있다. Figure 5의 장에 검정곡선으로부터 계산된 신호 대 기질 농도의 양역수 도시를 보여주고 있다. 이 도시가 직선성을 보이면 반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. Figure 5의 도시는 $R = 0.994$ 의 상관계수를 갖는 좋은 직선성을 보여주고 있다. 이 직선관계는 과산화수소의 분해반응이 과산화효소의 촉매작용에 의한 것이라는 점과 클로로프렌 고무가 탄소반죽 바이오센서의 결합 재료 활용될 수 있다는 점을 동시에 말하여 준다. 여기서 얻어진 최대전류와 Michaelis 상수는 각각 $1.06 \times 10^{-7} A$ 와 $2.45 \times 10^{-3} M$ 이었다. 이것은 CR에 의하여 결합된 탄소반죽 속에 효소가 정상적으로 촉매력을 발휘하고 있음을 말하여 주는 것으로, CR로 결합된 탄소반죽 전극이 실용화될 수 있음을 보여주는 것이다. 한편 효소전극의 감응 기능은 시간 경과에 따라 감소하는 것이 일반적이다[9,13]. 이것은 효소 단백질의 삼차원 구조가 변형되기에 필요한 활성화 에너지가 16~60 kJ/mol로 대단히 낮기 때문이다. 따라서 탄소반죽을 포함한 효소전극의 보관 및 지속성 연장을 위한 연구가 병행되어야 할 것이다.

4. 결 론

CR로 결합된 전극은 제작상, 복잡한 물리적, 화학적 과정을 거치지 않기 때문에 제작비용과 제작시간의 측면에서 대단히 효율적인 방법이다. CR로 결합된 탄소반죽 전극은 탁월한 기계적 물성을 보여주었다. 이 전극을 이용하여 얻은 실험적 사실들은 전극에 고정된 간조직 함유 과산화효소가 전극표면에서 정성적, 정량적으로 촉매력을 발휘하고 있음을 보여주는 것이다. 이것은 탄소반죽 전극의 실용화를 위하여 CR이 추천할 만한 결합재임을 입증하는 것이다. 한편 전기화학적 방법은 분광학적 방법과 비교하여 검출한계 측면에 있어 근본적으로 우수하지 못하다. 따라서 CR전극이 가진 장점을 극대화하고 전압 전류법이 공통적으로 갖는 검출한계 향상에 대한 연구가 병행된다면, 대량생산이 가능한 이 바이오센서는 물질의 분석에 유용한 도구가 될 수 있을 것이다.

감 사

이 논문은 2010학년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술 연구조성비(특별연구 추가과제)에 의하여 연구되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. T. J. Cheng, T. M. Lin, and H. C. Chang, *Anal. Chim. Acta*, **462**, 261 (2002).
2. J. J. Roy, T. E. Abraham, K. S. Abhijith, P. V. S. Kumar, and M. S. Thakur, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 206 (2005).
3. Y. F. Yang, and S. L. Mu, *Biosens. & Bioelectron.*, **21**, 74 (2005).
4. Y. C. Li, W. F. Bu, L. X. Wu, and C. Q. Sun, *Sens. Actuators B*, **107**, 921 (2005).

5. X. Chen, J. Z. Zhang, B. Q. Wang, G. J. Cheng, and S. J. Dong, *Anal. Chim. Acta*, **434**, 255 (2001).
6. A. S. Miquel, M. Arben, and A. Salvador, *Sens. Actuators B*, **69**, 153 (2000).
7. S. Tingry, C. Innocent, S. Touil, A. Deratani, and P. Seta, *Mater. Sci. Eng. C*, **26**, 222 (2006).
8. J. Wang, J. W. Mo, S. F. Li, and J. Porter, *Anal. Chim. Acta*, **441**, 813 (2001).
9. K. J. Yoon, K. J. Kim, and H. S. Kwon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **43**, 271 (1999).
10. K. J. Yoon, *Anal. Sci. Tech.*, **16**, 504 (2003).
11. K. J. Yoon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **48**, 654 (2004).
12. K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **25**, 997 (2004).
13. K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **29**, 2264 (2008).
14. B. G. Lee, K. B. Rhyu, and K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **30**, 2457 (2009).
15. B. G. Lee, K. B. Rhyu, and K. J. Yoon, *J. Ind. Eng. Chem.*, **16**, 340 (2010).
16. Brydson, *Rubbery Materials and Their Compounds*, Elsevier Applied Science, London and New York, 206 (1988).
17. P. C. Pandey, S. Upadhyay, and B. Upadhyay, *Anal. Biochem.*, **252**, 136 (1997).
18. Q. Yao, S. C. Yabuki, and F. M. Mizutani, *Sens. Actuators B*, **65**, 147 (2000).
19. A. Mansouri, D. P. Makris, and P. Kefalas, *J. Pharm. Bio. Anal.*, **39**, 22 (2005).