

도파민으로 수식된 SAMs 전극에서 NADH의 전기촉매에 의한 산화

차 성 극*
경남대학교 화학과
(2003. 9. 17 접수)

Electrocatalytic Oxidation of NADH at Electrodes of Self-assembled Monolayers Modified with Dopamine

Seong-Keuck Cha*

Department of Chemistry, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

(Received September 17, 2003)

요 약. 금 전극 표면을 시스테인으로 수식한 자기조립 단층막(self-assembled monolayers: SAMs)을 만들고 이를 위한 작용기를 갖고 있는 도파민과 반응시킨 수식전극을 제작하였다. 이 전극을 에탄올 내에서 6시간 정도 침치하면 SAMs가 잘 성장 되어서 보다 개선된 형태의 순환전압전류법(cyclic voltammetry: CV)의 결과를 얻게 되었다. 그 결과 SAMs 말단에 o-퀴논의 산화-환원특성은 0.1 M 인산염 완충용액(pH=7.10)에서 형식전위 값이 0.28 V이고 피크 전위차이가 없는 가역성이 뛰어난 전극이 제작되었다. 이 전극으로 NADH의 정량을 위한 검정선을 제작하였으며, 5.0×10^{-4} M농도까지 정량이 가능한 0.993의 뛰어난 상관관계를 보였다.

주제어: 도파민, 시스테인, 자기조립단층막, NADH

Abstract The self-assembled monolayers(SAMs) were prepared with cysteine(cys) and subsequently coupled with dopamine(dopa) containing quinone functionality on the gold modified electrodes. The SAMs annealed in ethanol for 6 hours gave a better shaped cyclic voltammogram which had a 0.28 V of formal potential and same redox potential in 0.1M phosphate buffer(pH=7.10). The electrodes were employed to determine concentration of NADH with the result that calibration curve exhibited an excellent correlation(≥ 0.993) for the concentrations ranging up to 5.0×10^{-4} M.

Keywords: Dopamine, Cysteine, Self-assembled Monolayers, NADH

서 론

전기 화학 반응은 전극과 용액의 계면에서 일어나는 불균일 전하 전달(heterogeneous charge transfer) 과정이므로 용액의 내부(bulk)보다 전극-용액 계면(electrode-resolution interface)의 전기 이중 층이나 확산 층(diffusion layer)의 미세한 변화에 따라 전기 화학 반응은 크게 영향을 받는다. 따라서 전극-용액 계면에서의 반응성을 적절하게 조절하는 것은 전기화학 연구의 중요한 부분이다. 이 중 화학적 수식전극(chemical modified electrode: CME)분야는 미세한 수식을 통하여 계면의 특성을 조

사하고 조절하는 것을 목적으로 전극 표면의 흡착 현상에 근거를 두고 있다.¹ 이러한 화학적 수식 전극의 표면을 산화-환원 활성 물질로 수식하는 방법에는 여러 가지가 있다. 흡착에 의한 방법²으로서 올레핀류의 화학적 흡착법을 이용하여 초미세박막 제조에 이용되는 Langmuir-Blodgett(LB)막법³이나 thiol group을 포함하는 물질에 의한 self-assembled monolayer(SAM)법이 있다.^{4,5} 탄소 반죽 전극(carbon paste electrode)^{6,7}은 쉽게 만들 수 있는 장점도 있으나 유기용매에 적용하기 어려운 단점이 있다. 또한 공유결합법^{8,9}을 들 수 있다. 마지막으로 고분자막을 전극표면에 수식하는 방법이다.

이 때 사용된 고분자막의 종류에 따라 redox 고분자막¹⁰과 이온 교환막¹¹으로 구분한다. 또한, CME는 정량분석에도 이용할 수 있다.¹² 그것은 전이금속들이 CME에 대해 고유한 감도를 갖고 있고, 전극의 계면에 금속 반응물질이 다양하게 배위할 수 있도록 제작할 수 있다는 장점이 있기 때문이다.^{13,14} 이 때 사용되는 재료는 금속 이온에 친화력과 선택성이 높은 리간드를 포함하는 기능성 고분자막으로 한다.

본 연구에서는 금 전극과 cys.으로 SAMs를 만들고 이 전극을 전기화학적으로 활성을 갖는 퀴논 부분을 갖고 있는 dopa와 반응시켜 Au/cys-dopa형의 수식전극을 제작하였다. 이 전극을 사용하여 β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)를 전기화학 신호로 정량하고 수식된 전극의 전기화학 특성을 연구하였다.

실 험

기기 및 시약

전기화학적 실험은 EG & G 273A potentiostat/galvanostat에 270/250 소프트웨어를 설치하여 행하였다. CV는 50 mV/s의 주사속도로 염화나트륨으로 포화된 칼로멜전극(SSCE)을 기준전극으로 하여 측정하였다. 금 전극은 고순도의 Au선(diameter = 0.2 mm)을 propane/oxygen 불꽃으로 가열하여 끝부분에 작은 2 mm 정도의 알갱이를 만들고 이것을 연질유리 판에 삽입한 후 다시 가열하여 봉합하였다. 이것을 먼저 사포(CW=500)에 대략적인 연마, CW가 1000인 것에 미세 연마 그리고 다이아몬드족(Struers, Denmark; 1 μ m)에 초 미세 연마를 하였다. 이것을 진한 질산용액에서 10분간 가열한 다음 1 M H₂SO₄ 수용액에 -0.4~+1.5 V의 전압범위에서 2kV/s의 스캔 속도로 5분 동안 전기화학방법으로 표면정제를 행하여 금 전극에 대한 표준 CV가 얻어지면¹² 이를 SAM의 제작에 사용한다. 재사용 시에는 다이아몬드족으로 연마한 후 이세본과 물로 그리고 초음파 세척을 행한다. X-Y기록기는 Philips(model 8043)제품을 사용하였다. 모든 실험은 미세 다공성 유리로 칸막이가 된 온도조절이 가능한 셀에서 행하였다.

종류수는 1차 증류한 것을 Millipore Milli Q시스템으로 정제한 고순도 탈 이온수를 사용하였다. 0.1 M 인산염 완충용액(pH=7.10)과 0.1 M tris(hydroxymethyl) amino-methane/NO₃⁻(pH=7.10)을 사용하였으며, dopamine (Aldrich,USA)은 에탄올/물로 3회 재결정한 후 사용하

였고 NADH(Sigma, USA), 1-(3-dimethylamino)propyl-3-ethylcarbodiimide (EDC;Aldrich,USA) 및 cysteine (cys; Sigma,USA)는 특급시약을 정제 없이 사용하였다.

SAMs/Au 전극의 제작. 1 mM cysteathanol용액에 Au 전극을 담그어 120~150 분 정도 둔 다음 이를 에탄올로 세척하고 에탄올 내에서 6시간 동안 설치하여 SAMs의 정돈과정을 거친 후 에탄올과 물로 세척하고 1 mM dopa/water에 3 mM EDC/water용액에 3시간 정도 정치하여 수식된 전극을 scheme 1과 같은 과정에 따라 제작하였다.

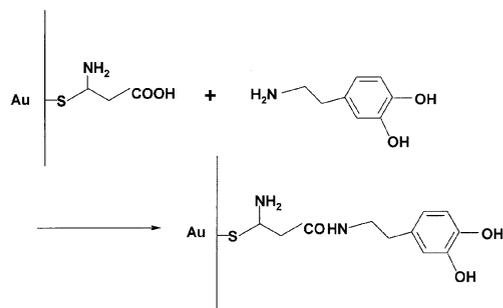
EQCM실험. 금 전극 상에 반응하여 SAMs의 형성에 관여한 cys의 양과 카를링 반응에 의하여 수식하는 과정에서 반응한 도파민의 양을 수정판 분석기(QCA; Seiko-EG & G model 917)로 관찰하였다. 또, 전극 상에 생성된 SAM 피막전극의 산화-환원 거동 및 이 과정에서 질량의 변화를 QCA-Au 전극으로 결정하였다. 이때 셀의 형태는 QCA(Au)/cys-dopa, phosphate buffer (pH=7.10)/Pt이며, QCA(Au), QCA(Au)/cys 및 QCA(Au)/cys-dopa형의 전극에 대한 주파수변화의 특성들을 비교하였다.

NADH의 정량

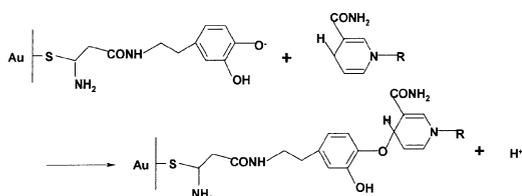
Scheme 2와 같이 SAMs의 표면에 퀴논 부분들이 탈수소화 하면서 생성된 라디칼과 NADH 라디칼이 반응하여 안정한 재 수식된 SAMs를 형성한다.¹¹ 이 전극 또한 전기화학적으로 활성을 갖으며 자유 NADH의 경우에는 E_o = -0.31 V vs NHE이다.¹⁶

결과 및 고찰

CV 결과. Fig. 1의 A에 나타난 CV는 0.1 M 인산염 완충용액에서 금 전극에 대한 결과이다. 이 금 전극에 cys를 반응시켜 만든 SAMs에 도파민과 짝지움 반응과



Scheme 1.



Scheme 2.

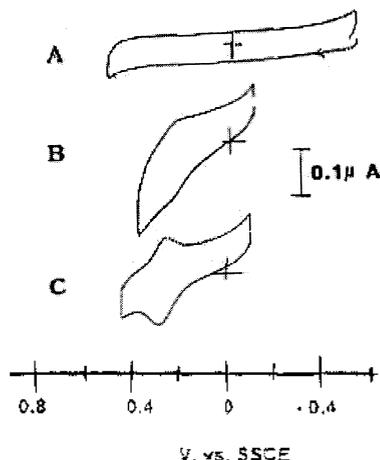


Fig. 1. Cyclic voltammograms for the electrode type of Au (A), Au/cys-dopa(B), and after 6 hrs annealed in ethanol for electrode B(C) at 0.1 M phosphate buffer(pH=7.10) and electrode area is $3.85 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$.

정을 통하여 제작한 Au/cys-dopamine형의 전극에 대한 CV결과가 B이다. CV의 산화피크가 0.22 V 그리고 이에 대응되는 환원피크가 0.22 V로 형식전위가 0.21 V이다. 이 전극을 에탄올에서 6시간동안 담구어 두면 SAMs의 가닥들이 잘 배열되며 이 결과로 C의 CV결과를 갖게 되었다. 이들은 SAMs상에 퀴논부분의 산화에 의한 것들이다. 스위치 전압을 0.45 V로 하였을 때의 결과에서 피크 전위의 차이가 없는 피막전극을 얻을 수 있었고 이 전극의 형식전위는 0.28 V였다. 이 전극의 잡음의 크기는 C에서처럼 0.01 μA 로 신호의 크기에 비해서 무시할 수 있는 범위에 있다. Fig. 2은 0.1 M 인산염 완충용액(pH=7.10)에서 Au/cys-dopa형의 전극으로 NADH의 농도를 각각 0.114, 0.339, 0.662, 1.08, 1.58, 2.06, 및 2.52 mM로 하였을 때 CV결과들이다. 이들로부터 제작된 검정선이 Fig. 3이다. NADH의 농도가 5.0×10^{-3} - 1.1×10^{-2} M 영역에서 상관계수는 0.993으로 나타내고 있다¹⁶. 그 이상의 농도에서는 포화되어서 한계 값에 이르게 된다. 이 전극은 20배의 진한 농도의 아스코빅 산

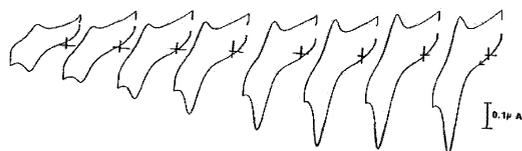


Fig. 2. CV responses at 10 mV/s for Au/cys-dopa electrode in 0.1 M phosphate buffer(pH=7.10) as a function of NADH concentration: none, 0.114, 0.337, 0.662, 1.08, 1.58, 2.06 and 2.52 mM.

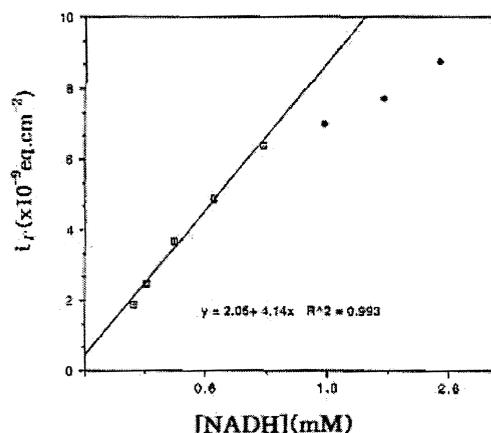


Fig. 3. The calibration curve from Fig. 2 data for the NADH concentration at the Au/cys-dopa electrode.

(비타민-C)에서도 간섭은 없었다.^{17,18}

EQCM 결과. 0.3 cm^2 의 QCA(Au)전극에 cys에 의한 SAM을 형성하였을 때 표면의 피복율은 Fig. 1C의 산화피크의 면적으로부터 계산하였을 때 $1.15 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ 이었다. Cys로 SAMs를 제작하였을 때 주파수의 변화는 406 Hz이고 여기에 도파민으로 개수식하였을 때 568 Hz의 주파수 변화가 나타났다. 이 결과를 Sauerbrey 식¹⁹

$$\Delta m = 9.10 \times 10^{-8} \text{ gHz}^{-1} \text{ cm}^2 \Delta f \quad (1)$$

에 따라 질량의 변화로 환산하면 각각 $1.11 \times 10^{-5} \text{ g}$ 과 $1.55 \times 10^{-5} \text{ g}$ 이다. 이는 각각 9.14×10^{-8} 과 8.18×10^{-8} 몰에 해당한다. 따라서 형성된 cys-SAM의 표면에 cys가 dopa와 89.5%정도 결합하였고 나머지는 미결합한 상태로 있음을 알 수 있다. 결합의 비율을 향상시키기 위하여 2-3회 dopa와의 반응과정을 반복하면 99%까지 가능하다. 산화-환원 과정에서 이 전극표면에서 나타나는 진동수의 변화가 Fig. 4이다. 위에 것은 Au/cys-dopa형의 전극을 0.1 M 인산염 완충용액에서 0 V-1.20 V의

전압범위로 CV(A)를 행할 때 것이고, 스위치 전압을 0.5 V로 하였을 때 결과가 아래 그림(B)이다. 위에 것은 80초까지가 그리고 아래 것은 45초까지가 산화과정이고 그 이후는 환원과정이다. 폭이 0-귀는기로 된 SAMs가 0.9~1.20 V 전압범위에서 54 Hz로 큰 주파수 변화를 보인 반면에 후자의 경우 11.5 Hz의 변화를 보였다. 이는 수화수의 차이에 기인된 결과이다. (1)식으로부터 계산된 수화수는: 적용 전압범위가 클 경우가 작을 때 보다 4.7배의 큰 값을 보였다. 이와 같이 높은 전압에서는 하이드로 퀴논에서 퀴논의 형태로 하전 된 상태에 있으므로 보다 큰 수화 수를 갖게된다. Fig. 4B에서 -0.3~+0.5 V의 전압범위에서 10 Hz 정도의 진동수 감소는 퀴논의 1차 산화에 의한 라디칼의 생성에 따라 나타나는 결과이다. 이와 같이 스위치 전압에 따라 산화상태와 용매화 거동을 조절할 수가 있다.

완충용액의 영향. Au/cys-dopa형의 전극 반응이 완충용액에 의한 영향을 본 결과로서, 0.1 M 인산염 완충용액(pH=7.10)에 대한 것이 Fig. 5이고 0.1 M tris/NO₃ 완충용액(pH=7.10)에 대한 것이 Fig. 6이다. 여기서 연속되는 4 CV동안에 주파수의 감소는 SAMs상에서 산화과정에 의한 퀴논의 음이온의 생성으로 인하여 나타나는 수화상태의 변화에 기인된다. 인산 염 완충용액의 경우 각 CV에서 진동수의 변화 폭이 크고 그 횟수에 따라서 진동수의 감소폭이 작다. 이것은 산화-환원과정에서 용매화가 용이하기 때문에 나타나는 결과로 볼 수 있다. 반면에 후자의 경우 산화과정이 시작되면서 60 Hz의 주파수 감소가 일어났으며 계속되는 CV동안에 그 변화 폭이 작다. 이는 전기화학적 활성을 갖는 퀴논부분에 질산이온이 인산이온보다 강하게 회합

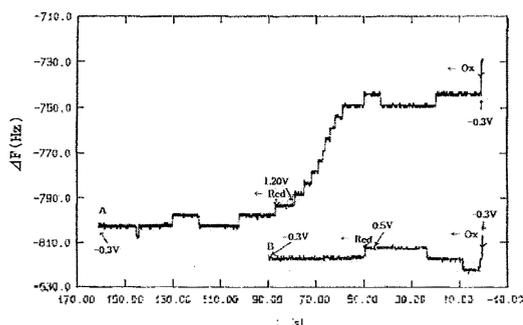


Fig. 4. Frequency-potential curves for the switching potential of 0.50 V(B) and 1.20 V(A) with the cell type of QCA(Au)/cys-dopa/0.1 M phosphate buffer(pH=7.10)/Pt.

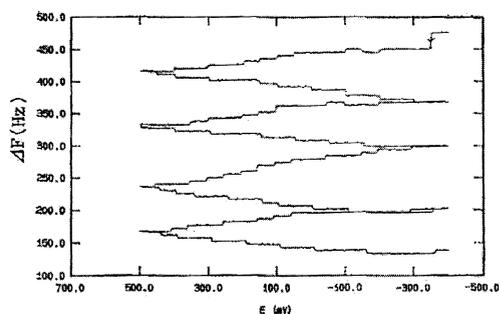


Fig. 5. Frequency-potential curves for the electrode type of QCA(Au)/cys-dopa in 0.1 M phosphate buffer(pH=7.10).

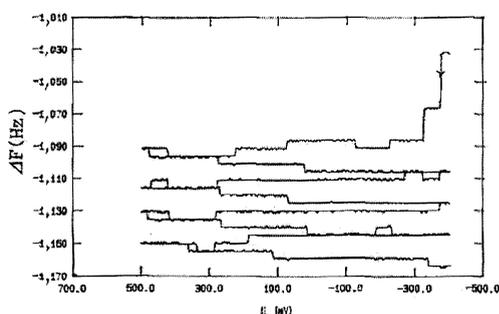


Fig. 6. Frequency-potential curves for the electrode type of QCA(Au)/cys-dopa in 0.1 M tris/NO₃- buffer(pH=7.10).

하여 산화-환원과정 동안에 이 이온 층의 회합/해리의 과정이 보다 어렵기 때문에 나타나는 결과로 보인다. 따라서 Tris/NO₃로된 완충용액은 이 전극의 전해질로서는 적절치 않다고 본다.

결론

아미노산중 하나인 시스테인을 금 전극에 수식한 SAMs를 제작하여 전기화학적으로 활성을 갖고 있는 도파민과 반응시킨 Au/cys-dopa형의 수식전극을 제작하였다. 이 전극의 형식전위 E⁰ 0.20 V이고 ΔE_p는 0.07 V로 가역성이 좋은 전극이며 이 전극을 에탄올 내에서 6시간 정도 보관하면 SAMs가막들이 재 정돈하여 산화-환원이 개선된 결과를 나타냈다. 이 전극은 tris/NO₃- (pH=7.10)완충용액에서 보다 0.1 M 인산염 완충용액에서 더 좋은 CV특성을 보였으므로 이 용액 내에서 모든 측정을 행하였다. 이 수식된 전극으로 조효소인 NADH의 정량에 이용하였다. 그 결과 0.5 mM 농도까지 0.993의 좋은 상관관계를 갖는 검정 선을 제작할 수 있었다.

따라서 이 수식전극은 NADH의 정량과 효소전극으로서의 가능성을 갖고 있다.

이 내용은 2003학년도 경남대학교의 재정적 지원에 의하여 이루어졌음.

인용 문헌

1. Pham, M. C.; Lacaze, P. C.; Dubois, J. F. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *99*, 91.
2. Diaz, A. F.; Logan, A. F. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *111*, 111.
3. Kanazawa, K. K.; Diaz, A. F.; Geiss, R. H.; Gill, W. D.; Kwak, J. F.; Logan, J. A.; Rabolt, J. F.; Street, G. B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 854.
4. Kim, I.Y.; Kang, H.; Kim, D.; Lee, C. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24*(5), 593.
5. Choi, S. J.; Park, S-M. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*(5), 699.
6. Denisevich, P.; Abruna, H. D.; Leidner, C. R.; Meyer, T. J.; Murry, R. W. *Inorg. Chem.* **82**, *21*, 2135.
7. Peerce, P. J.; Bard, A. J. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *114*, 6641.
8. Cha, S. K.; Abruna, H. D. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 274.
9. Degrand, C.; Miller, L. L. *J. Electroanal. Chem.* **1981**, *117*, 267.
10. Degrand, C.; Miller, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5728.
11. Degrand, C.; Miller, L. L. *J. Electroanal. Chem.* **1981**, *117*, 283.
12. Won, M-S; Yeom, J-S; Yoon, J-H; Jeong, F-D; Shim, Y-B. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24*(7), 948.
13. Sawyer, D. T.; Roberts, Jr. J. L. *Experimental Electrochemistry for Chemists*; John Wiley & Sons, USA, 1974; p66.
14. Priente, F.; Lorenzo, E.; Tobalina, F.; Abruna, H. D. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3936.
15. Schellenberg, K. A.; Helleman, I. *J. Biol. Chem.* **1958**, *231*, 547.
16. Pariente, F.; Lorenzo, E.; Abruna, H. D. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4337.
17. Lee, S. J.; Lee, S. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* 1990, *11-1*, 71.
18. Seo, M. L.; Kim, J. S.; Lee, S. S.; Bae, Z. U.; Lee, H. L.; Park, T. M. *J. Kor. Chem. Soc.* **1993**, *37*(11), 937.
19. Buttry, D. A.; Ward, M. D. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1355.