

# 다중벽 탄소 나노 튜브, 전도성고분자 및 티로시나아제 효소로 구성된 나노복합체를 이용한 비스페놀A 맞춤형의 전기화학적 검출법

구나영 · 변아영 · 이혜진<sup>†</sup>

경북대학교 자연과학대학 화학과  
(2021년 11월 10일 접수, 2021년 11월 22일 수정, 2021년 11월 22일 채택)

## Electrochemical Determination of Bisphenol A Concentrations using Nanocomposites Featuring Multi-walled Carbon Nanotube, Polyelectrolyte and Tyrosinase

Nayeong Ku, Ayeong Byeon and Hye Jin Lee<sup>†</sup>

Department of Chemistry, Kyungpook National University, 80 Daehakro, Buk-gu, Daegu 41566, Republic of Korea  
(Received November 10, 2021; Revised November 22, 2021; Accepted November 22, 2021)

### 초 록

본 논문에서는 경제적이며 일회용 센서칩으로 제작 가능한 스크린프린팅한 탄소칩 전극[screen printed carbon electrode (SPCE)]에 다중벽 탄소 나노 튜브, 전도성고분자 및 티로시나아제를 융합하여 제작된 나노복합체를 도포한 센서를 개발하고 이를 내분비 저하 물질이면서, 비만, 당뇨병 및 심혈관질환 등의 만성질환 및 성조숙증, 여성 생식 질환, 불임 등과 관련성이 입증된 비스페놀A 농도 분석에 적용하고자 하였다. 다중벽 탄소 나노 튜브를 산화시켜 음전하를 띠게 한 후 양전하를 띠는 전도성고분자인 polydiallyldimethylammonium (PDDA)로 감싸준 후 용액의 pH를 조절하여 음전하를 띠게 한 티로시나아제를 첨가하여 최종적으로 산화된 다중벽 탄소 나노 튜브-PDDA-티로시나아제 나노복합체를 형성하였다. 상기 나노복합체를 물리적으로 흡착시킨 센서칩 표면을 비스페놀A 용액에 접촉시키고, 비스페놀A가 티로시나아제와 2단계의 효소-기질반응을 할 수 있는 충분한 시간(3분)을 주면, 생성물[4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone)]이 생성된다. 이 때 순환전압전류법과 시차펄스전압전류법을 이용하여 생성물[4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone)]을 환원(-0.08V vs. Ag/AgCl)하였을 때 얻어진 전류값 변화를 측정하여 비스페놀A의 농도를 정량적으로 분석하였다. 추가적으로 개발한 센서 전극표면에 비스페놀A와 유사한 비스페놀S 방해물질을 비스페놀A와 함께 접촉하였을 때 비스페놀A에 대한 우수한 선택성을 확인하였다. 최종적으로 제작한 센서를 실험실에서 제작한 환경 시료 안에 비스페놀A의 농도를 분석하는 데 적용함으로써 실제 현장에서 활용될 수 있는 가능성을 시사하였다.

### Abstract

In this paper, we develop a cost effective and disposable voltammetric sensing platform involving screen-printed carbon electrode (SPCE) modified with the nanocomposites composed of multi-walled carbon nanotubes, polyelectrolyte, and tyrosinase for bisphenol A. This is known as an endocrine disruptor which is also related to chronic diseases such as obesity, diabetes, cardiovascular and female reproductive diseases, precocious puberty, and infertility. A negatively charged oxidized multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) wrapped with a positively charged polyelectrolyte, e.g., polydiallyldimethylammonium, was first wrapped with a negatively charged tyrosinase layer via electrostatic interaction and assembled onto oxygen plasma treated SPCE. The nanocomposite modified SPCE was then immersed into different concentrations of bisphenol A for a given time where the tyrosinase reacted with OH group in the bisphenol A to produce the product, 4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone). Cyclic and differential pulse voltammetries at the potential of -0.08 V vs. Ag/AgCl was employed and peak current changes responsible to the reduction of 4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone) were measured which linearly increased with respect to the bisphenol A concentration. In addition, the SPCE based sensor showed excellent selectivity toward an interferent agent, bisphenol S, which has a very similar structure. Finally, the sensor was applied to the analysis of bisphenol A present in an environmental sample solution prepared in our laboratory.

**Keywords:** Bisphenol A, Electrochemical biosensor, Screen printed carbon electrode, Tyrosinase, Multi-walled carbon nanotube, Polyelectrolyte

<sup>†</sup> Corresponding Author: Kyungpook National University  
Department of Chemistry, Daegu 41566, Republic of Korea  
Tel: +82-53-950-5336 e-mail: hiejinlee@knu.ac.kr

## 1. 서 론

최근 포스트코로나 시대에 접어들어 따라 많은 사람들이 외부에서 식사를 하는 대신 배달이나 레토르트 식품을 이용하는 추세가 급격히 증가하였다[1]. 이러한 배달 및 레토르트 식품에 사용되는 플라스틱은 대부분 폴리카보네이트 및 에폭시 수지로 이루어져 있으며 이들을 합성 시 비스페놀A (Bisphenol A, BPA)를 가소제로 사용한다[2-4]. BPA는 내분비 저해 화합물 중 하나로 비만, 당뇨병 및 심혈관질환 등의 만성질환, 여성 및 남성의 불임, 성조숙증, 다낭성난소증후군, 자궁내막증, 장궁근증 등의 여성생식질환, 잠복 고환 및 요도 기형 등 선천성 결함, 고환 암, 유방암, 자궁내막암, 난소 암 등과의 관련성이 입증되어 있다[5-14]. 내분비 저해 화합물로 알려져 있는 BPA의 양을 빠르고 간편하게 측정할 수 있는 방법이 절실한 상황이다.

많은 연구자들이 크로마토그래피 분석법 및 질량분석법을 이용하여 BPA를 분석하여 왔다[15-17]. 이러한 방법들은 우수한 민감성 및 정확도를 가지지만 많은 시간과 비용이 소요되고, 고도로 훈련된 기술자가 필요하다. 간편하고, 이동성이 좋으며, 사용도 편리한 효소면역측정법, 비색법, 형광 및 전기화학기반의 바이오센서 역시 개발되어 왔다[18-23]. 이 중 전기화학 기반의 센서의 경우 분석물에 대해 감응하는 다양한 신호(전류, 전압, 저항 등)를 측정할 수 있으며, 이를 통해 정성 및 정량이 가능하여 광범위한 응용이 가능하다는 추가적인 장점을 갖고 있다[24]. 전기화학을 기반으로 한 BPA검출용 바이오센서는 전형적으로 페놀기와 특이적으로 반응하는 티로시나아제(Tyrosinase, Tyr)와 전기전도성이 우수한 다양한 물질 예를 들어 금속성입자[25,26], 금속유기골격체[27,28], 탄소 소재[29] 등을 융합한 플랫폼으로 많은 연구가 추진되어 왔다. 그 중에서도 환경 친화적이고, 적은 비용이 드는 탄소 나노 튜브를 기반으로 한 BPA 농도 분석용 센서 역시 많은 연구가 되어왔으며[30,31], 이러한 센서에 선택성 증대를 위해 BPA의 페놀기와 특이적으로 효소기질반응을 하는 Tyr를 공유 결합적으로 고정된 센서도 보고되었다[32,33].

본 연구에서는 간편하고 신속하게 다중벽 탄소 나노 튜브(multi-walled carbon nanotube, MWCNT), 전도성고분자(예: polydiallyldimethylammonium, PDDA), Tyr를 정전기적인 인력에 의해 물리적 흡착방법으로 일회용의 스크린프린팅한 탄소전극 칩에 고정하여 BPA에 특이적으로 정량 가능한 전기화학적 바이오센서를 개발하였다. 이러한 물리적인 흡착방법을 이용하여 Tyr 효소를 전극 센서 표면에 고정하는 경우 기존에 보고된 공유적인 방법을 이용한 경우[32,33]보다 실험과정이 비교적 쉽고, 실험 시간이 짧으며, 간편하다는 장점이 있다. 탄소 소재 기반의 나노복합체를 접목한 본 센서는 BPA용액과 접촉하였을 때 센서 표면에 Tyr 효소와 선택적인 반응에 의해 생성된 생성물인 4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone)을 시차펄스전압전류법(differential pulse voltammetry, DPV)을 이용하여 환원시킬 때 흐른 전류를 측정하는 방법이다. BPA의 정량분석을 위한 직선성과 민감도를 확보하였으며, 방해물질로 유사한 구조를 가진 비스페놀 S (bisphenol S, BPS)에 대해 BPA만을 선택적으로 분석 가능함을 확인하였다. 최종적으로 개발한 센서를 실험실에서 준비한 환경샘플(예: 영수증 종이)에서 BPA의 양을 정량적으로 분석하는 데 적용하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 재료

Bisphenol A ( $C_{15}H_{16}O_2$ , Sigma-Aldrich), Bisphenol S ( $C_{12}H_{10}O_4S$ ,

Sigma-Aldrich), nitric acid ( $HNO_3$ , 60%, Sigma-Aldrich), sulfuric acid ( $H_2SO_4$ , 95%, OCI), sodium chloride (NaCl, Sigma-Aldrich), tyrosinase (Tyr) from mushroom (7164 U/mg, isoelectric point of 4.7, Sigma-Aldrich), poly(diallyldimethylammonium chloride) solution (PDDA, 35 wt.% in  $H_2O$ , Sigma-Aldrich), dimethyl Sulfoxide (DMSO, > 99.0%, TCI), methanol (99.9%, Merck)를 사용하였다. 인산완충생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)의 경우, 10x PBS (pH 7.4, Thermo Fisher)을 물로 10배 희석한 후 pH 7.0에 맞추어 나노복합체 제작 및 전기화학측정에 사용하였다. 모든 수용액은 Millipore사 필터를 이용하여 정제한 물을 사용하여 제조하였다.

### 2.2. *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체 제작

*o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체를 만들기 위해 먼저 황산과 질산을 3대 1비율로 혼합한 용액에 탄소 나노 튜브를 넣고 3시간동안 강하게 초음파로 분쇄하여 산화시킴으로써 음이온을 띠게 한다. 위 용액을 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 정제한 물을 넣어주고 이 과정을 상기 용액의 pH 범위가 6-7이 될 때까지 반복한다. 그 후, 용매를 완전히 날려서 산화된 탄소 나노 튜브를 회수한 후 PBS 용액(pH 7.0)에 분산하였다. PBS용액(pH 7.0) 1 mL에 각 성분의 최종농도가 0.1 mg/mL *o*-MWCNT, 0.25% PDDA 및 0.1 M NaCl이 되도록 혼합하였다. 이를 약30분간 초음파를 이용하여 분산한 후 과량의 PDDA를 제거하기 위해 원심분리하여 상층 액을 제거한 후 PBS용액(pH 7.0)으로 채워준다. 위의 혼합물에 Tyr가 총 3 mg/mL 가 될 수 있게 추가한 후 30분간 초음파 분산한다. 최종적으로 Tyr로 코팅된 탄소 나노 튜브 나노복합체는 4 °C에서 보관하였다. 만들어진 나노복합체의 크기 및 형태는 바이오 투과전자현미경(bio transmission electron microscope, Bio-TEM, HT 7700, Hitachi 사)을 이용하여 관찰하였다.

### 2.3. 비스페놀A 측정용 전압전류법 센서 제작 및 측정방법

전압전류법으로 BPA의 농도를 정량 분석하기 위한 센서를 제작하기 위해 먼저 작업 및 보조전극으로 탄소인크를, 기준전극으로 Ag/AgCl 인크를 스크린프린팅 기술로 제작한 SPCE 칩(Daeyoungsilks Co. Ltd)를 산소플라즈마 장비를 이용하여 표면을 클리닝하였다[34]. *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체를 20  $\mu$ L 올려준 후 30 °C에서 인큐베이션한 후 바로 사용하였다. 순환전압전류법(cyclic voltammetry, CV)과 시차펄스전압전류법(differential pulse voltammetry, DPV)은 GPES (version 4.9)과 연계된 Autolab사의 전위차계(potentiostat, PGSTAT128N)를 사용하였으며, 3전극 시스템으로 측정하였으며, 실온에서 수행하였다. CV의 경우 스캔 속도는 50 mV  $s^{-1}$ 이었으며, DPV의 경우 스텝 전위값은 10 mV, 진폭변조는 50 mV, 변조시간은 50 ms, 시간 간격은 0.5 s이었다. 모든 반응은 PBS 완충용액(pH 7.0)에서 수행하였다. 제작한 센서 칩의 표면의 특성은 Hitach사의 전계방사형 주사전자현미경(field emission scanning electron microscope, FE-SEM, SU8220)을 이용하여 조사하였다

### 2.4. 환경샘플 준비

환경샘플의 경우 시중의 영수증 중 'BPA free'가 적혀있지 않은 용지들을 모아 진행하였다. 영수증 0.1 g을 잘게 분쇄하여 메탄올 5 mL 안에서 30분간 초음파 분해한 후 상기 용액을 원심분리한 후 상층액을 수거하여 용매를 메탄올에서 5% (v/v) DMSO수용액으로 교체하였다[35]. 실린지 필터(1.0  $\mu$ m)를 이용하여 부유물을 제거한 후 최종적으로 만들어진 용액을 10분의 1로 희석하여 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체의 형태 및 나노복합체 융합형센서 표면 조사

*o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체는 음전하를 띠는 산화된 다중벽 탄소 나노 튜브(*o*-MWCNT)에 양전하를 갖는 PDDA로 감싼 후 PBS 용액(pH 7.0)에서 음전하를 갖는 Tyr 효소로 최종적으로 정전기적인 인력에 의해 감싸도록 하였다. 각 과정을 TEM으로 확인하였으며, 먼저 약 800 nm 크기의 산화된 다중벽 탄소 나노 튜브가 무질서하게 퍼져있는 것을 Fig 1(i)에서 관찰할 수 있었으며, PDDA 및 Tyr 효소로 감쌌을 때 *o*-MWCNT의 두께가 점차 증가하는 것을 볼 수 있었으며, (i)과 (ii)가 TEM 측정 시 30.0 k로 같은 배율로 촬영한 이미지를 고려해 볼 때 정전기적 인력을 통해 *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체가 형성되었음을 예측할 수 있다. 상기 *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체를 SPCE의 탄소 작업전극 표면위에 drop 캐스팅 방법으로 물리적으로 흡착 고정하였으며, SEM을 이용하여 나노복합체를 올리기 전과 후의 사진을 촬영한 결과 아무것도 고정되지 않은 경우 작업 전극 표면인 카본블랙(carbon black)의 작은 구형태를 관찰하였다. 반면에 *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체를 고정한 후의 경우에는 Figure 1(iv)의 다중벽 탄소 나노 소재의 특유의 행태인 긴 가지 모양이 관찰되는 것을 통해 나노복합체가 작업전극 위에 고정되어 있음을 확인할 수 있었다.

#### 3.2. 티로시나아제와 비스페놀A의 효소-기질 반응

*o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체를 융합한SPCE 기반의 바이오센서를 BPA농도 정량분석에 활용하기 전에, BPA와 Tyr의 효소-기질반응을 확인하는 실험을 수행하였다. 아무것도 고정하지 않은 (i), Tyr 효소만 고정한 (ii), 그리고 *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체(iii)로 고정한 SPCE 전극을 각각 5 μM BPA 용액에 담근 후 순환전압전류법을 이용하여 얻은 전압전류 곡선 데이터와 추가적으로 *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체(iv, v)로 고정한 SPCE 전극을 10과 15 μM BPA용액에 각각 담근 후 순환전압전류법을 이용하여 얻은 전압전류 곡선 데이터를 Figure 2에 함께 나타내었다. 아무것도 고정하지 않은 SPCE의 경우 +0.56 V (vs. Ag/AgCl)에서 BPA가 직접 산화과정을 통해 전자를 내놓으며 피크 전류가 나타나는 것을 확인하였다(Figure 2b (I)에 BPA가 4-[2-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl]cyclohexan-1-one이 되는 경로 참조). 반면에, Tyr가 고정된 전극의 경우는 BPA가 Tyr와 2단계 효소-기질반응을 하여 4,4'-isopropylidenebiscatechol 중간체를 거쳐 생성물인 4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone)이 된다(Figure 2b(II)에서 실선으로 나타낸 과정). 이후 -0.08 V (vs. Ag/AgCl)에서 환원반응을 통해 전자를 받아 4,4'-isopropylidenebiscatechol가 되면서 피크전류값을 나타낸다(Figure 2b(II)에서 점선으로 나타낸 과정). *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체로 고정한 SPCE의 경우, Tyr 효소만 있는 경우와 마찬가지로 -0.08 V (vs. Ag/AgCl)에서 4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone) 생성물의 환원반응에 의한 전류값의 변화를 관찰할 수 있었다. 무엇보다도 *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체로 고정된 전극이 Tyr 효소로만 고정된 전극보다 같은 농도의 BPA에 대한 환원전류 값의 변화가 더 크다는 것을 알 수 있으며, 이는 *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체로 고정된 SPCE 센서의 경우 *o*-MWCNT와 PDDA가 우수한 전도성 및 넓은 활성표면적을 제공함으로써 BPA 분석에 좀 더 민감하게 감응한다는 것을 암시한다. 또한 BPA의 농도가 증가(5 -15 μM)함에 따라 -0.08 V (vs. Ag/AgCl)에서

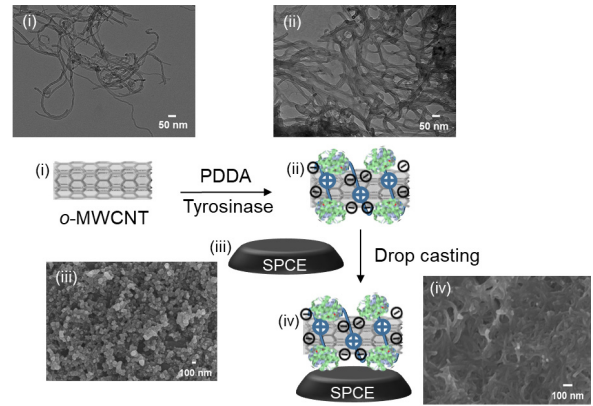


Figure 1. Fabrication procedure for *o*-MWCNT-PDDA-Tyr nanocomposite. Representative TEM image of (i) *o*-MWCNT, (ii) *o*-MWCNT-PDDA-Tyr nanocomposite. Creation of BPA specific electrochemical biosensor SPCE was modified with the *o*-MWCNT-PDDA-Tyr nanocomposite. Representative SEM images of (iii) bare SPCE and (iv) *o*-MWCNT-PDDA-tyrosinase nanocomposites physisorbed on SPCE.

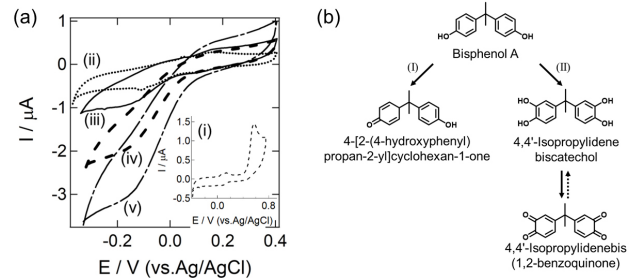


Figure 2. Representative cyclic voltammograms for 5 μM BPA in 10 μM PBS buffer (pH 7.0) using (i) bare and (ii) Tyr modified and (iii-v) *o*-MWCNT-PDDA-Tyr nanocomposite SPCEs. BPA concentrations were varied from (iii) 5, (iv) 10 and (v) 15 μM. Scan rate = 50 mV/s. (b) Scheme showing (I) direct oxidation of BPA and (II) enzyme-substrate reaction of tyrosinase and BPA.

*o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체로 고정된 SPCE 센서의 피크전류 값이 증가하는 것을 관찰함으로써 정량분석의 가능성을 확인할 수 있었다.

#### 3.3. 비스페놀A의 정량 분석 및 선택성 조사

개발한 *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 융합형 센서를 이용하여 BPA를 효소-기질반응에 의해 선택적으로 환원하는 반응을 이용하여 BPA를 정량 분석하기 위해 시차펄스전압전류법을 사용하였다. 시차펄스전압전류법은 주로 용량성 전류(capacity current)를 최소화하여 바탕신호를 줄일 수 있어 기존에도 많은 전기화학기반의 센서를 개발하는데 많이 사용되어왔다[36]. Figure 3(a)는 2 μM에서 15 μM까지 BPA의 농도 (PBS pH 7.0 용액)를 변화시키면서 얻은 각 시차펄스전압전류곡선을 바탕신호를 제거하여 처리한 결과이다. 순환전압전류법에서 나타난 곡선과 동일하게 BPA가 Tyr와 2단계 효소-기질반응으로 생성된 생성물인 4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone)의 환원과정에 의한 전류값의 변화 -0.08 V (vs. Ag/AgCl)에서 관찰할 수 있었다. Figure 3(b)에서는 Figure 3(a)에서 얻은 BPA의 농도에 따라 전류값(Ip)의 변화를 선형방정식을 이용하여 fittings한 결과(Ip (nA) = -30.35 C (μM) +

12.3 ( $R^2 = 0.99$ )이다. 여기서 C는 BPA의 농도이다. 2  $\mu\text{M}$ 에서 15  $\mu\text{M}$  BPA 농도영역에서 우수한 직선성을 나타내었으며, 상기 농도범위는 0.5~20  $\mu\text{M}$  농도까지 1  $\mu\text{M}$  단위로 증가시키면서 환원반응에 의한 전류값의 크기를 DPV를 이용하여 측정하여 정하였으며, 그 결과 실험적으로 측정할 수 있는 최소 분석농도는 2  $\mu\text{M}$ 이었다. 민감도는  $-30.35\text{nA}/\mu\text{M}$ 이며, 정량한계 농도값은 1.99  $\mu\text{M}$ 이고, 정성한계 농도값은 0.59  $\mu\text{M}$ 이었다. 정량한계 농도 값은 '10sb/m'의 식을, 정성한계 농도 값은 '3 sb/m'을 이용하여 구하였다[37]. 여기서 sb는 분석물을 첨가하지 않은 전류값의 표준편차를 의미하고, m은 BPA의 농도변화에 따른 전류값 변화의 선형방정식의 기울기를 의미한다.

개발한 센서의 실제 시료의 적용에 앞서 BPA와 상당히 비슷한 구조를 가진 BPS를 방해물질로 선정하고 BPA의 양을 3  $\mu\text{M}$ 로 고정된 상태에서 BPS 농도를 BPA 대비 10 및 100 과량으로 증가시키면서 DPV 데이터를 얻었다. 약 10배 이상 BPS가 존재할 때, BPA와 Tyr 반응 후 나타나는 생성물에 의한 특징적인 환원(-0.08 V vs. Ag/AgCl) 전류 값이 거의 변하지 않았으며, BPS의 양을 100배 이상까지 증가시킴에도 불구하고, 매트릭스 효과에 의한 오차에 기인하는 정도인 약 7.6%정도 만 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히, BPA 검출 시 방해물질인 BPS에 대한 선택성 계수( $k_{ij}^{\text{amp}}$ )를 식 (1)[38]과 Figure 4의 데이터 값을 이용하여 계산하였으며 -3.12가 나왔다.

$$k_{ij}^{\text{amp}} = (I_i - I_j)C_j / I_j C_i \quad (1)$$

여기서  $I_i$ 는 분석물과 방해물질이 함께 있을 때 전류값(nA),  $I_j$ 는 분석물만 있을 때 전류값(nA),  $C_i$ 는 분석물의 농도( $\mu\text{M}$ ),  $C_j$ 는 방해물질의 농도( $\mu\text{M}$ )이다. 이를 통해 본 연구에서 개발한 o-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체 융합형의 바이오센서가 BPA에 선택적으로 감응한다고 할 수 있겠다. 또한 BPS만 존재할 때[Fig 4(ii)] 비록 BPS가 BPA와 마찬가지로 페놀기를 가지지만 Tyr와 특이적 효소-기질반응을 하지 않아서 -0.08 V에서 환원 반응을 통한 전류값의 변화가 일어나지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 Tyr를 이용하여 개발한 o-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체 융합형 센서가 좋은 선택성을 가지고 실제 시료에 적용가능성을 확인하였다.

### 3.4. 실제환경시료 분석에 적용

최종적으로 제작한 BPA맞춤형 센서를 실제 환경시료 분석에 적용 가능한지 알아보기 위해 실험실에서 BPA-free가 아닌 영수증 종이들을 모아서 분쇄한 후 환경시료 용액을 제조하고 o-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체가 융합된 바이오센서로 측정하였다. 10배 희석한 환경시료와 이에 알고 있는 여러 농도의 BPA를 순차적으로 첨가하여 DPV 데이터를 얻었으며, 이를 Figure 5에 나타내었다. 시료안에 BPA와 바이오센서 표면에 코팅된 Tyr 사이의 효소-기질반응에 의해 생성된 생성물인 4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone)의 환원반응은 약 -0.22 V (vs.Ag/AgCl)에서 일어났으며, 이 때 피크 전류값이 첨가한 BPA 농도가 증가함에 따라 커짐을 확인하였다. 하지만, 완충용액에서 피크전류값이 얻어진 환원 전위값보다 약 -0.14 V만큼 좀 더 음으로 이동한 전위에서 환원반응이 일어나는 것을 볼 수 있는데 이는 환경 샘플의 매트릭스 영향인 것으로 사료된다. Figure 5(a)에서 얻은 BPA 농도 변화에 따른 DPV 피크 전류값( $I_p$ ) 데이터 포인트를 선형방정식에 피팅하여 Figure 5(b)에 나타내었으며 이를 통해 얻은 선형방정식은  $I_p$  (nA) =  $-28.7 C$  ( $\mu\text{M}$ ) - 85.3 ( $R^2 = 0.96$ )이었다. 여기서 C는 BPA의 농도이다. 표준물 첨가 시 얻은 위의 검정곡선 피팅 결과를 통

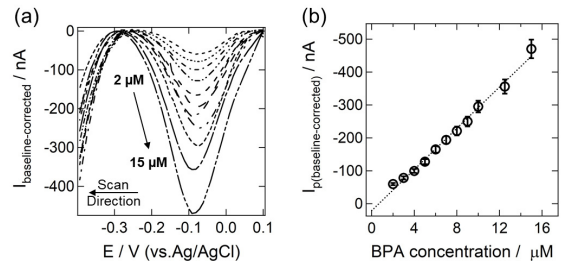


Figure 3. (a) DPV data of different concentration of BPA from 2 to 15  $\mu\text{M}$  detection using o-MWCNT-PDDA-Tyr nanocomposites on SPCE. BPA reacted with Tyr in 10mM PBS buffer (pH 7.0). DPV parameters are as follows: step potential = 15 mV, modulation amplitude = 50 mV, modulation time = 0.05 s, and interval time = 0.5 s. (b) A plot of DPV peak current versus BPA concentration.

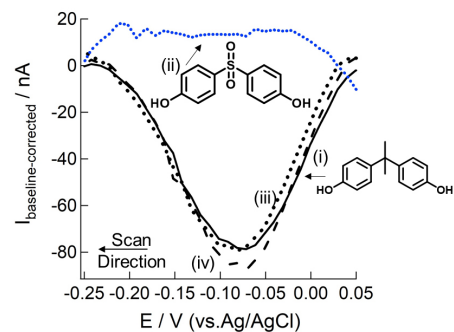


Figure 4. A series of DPV data for (i) 3  $\mu\text{M}$  BPA only, (ii) 3  $\mu\text{M}$  BPS only, (iii) a mixture of 3  $\mu\text{M}$  BPA and 30  $\mu\text{M}$  BPS, and (iv) a mixture of 3  $\mu\text{M}$  BPA and 300  $\mu\text{M}$  BPS. Each solution was prepared in 10 mM PBS buffer (pH 7.0). Inset shows the molecular structure of (i) BPA and (ii) BPS.

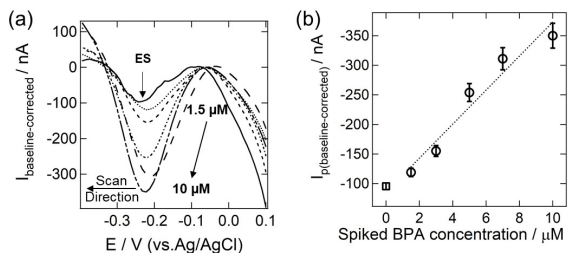


Figure 5. (a) A set of DPV data for 10 x diluted environmental sample (ES) using o-MWCNT-PDDA-Tyr nanocomposites on SPCE. The sample was diluted using PBS buffer (pH 7.0). The known concentration of BPA added to each ES solution was varied from 1.5, 3, 5, 7 to 10  $\mu\text{M}$ . (b) A plot of DPV peak current versus spiked BPA concentration. The solid marker ( $\square$ ) is the diluted environmental sample only without spiking of BPA.

해 실험실에서 제작한 10배 희석한 영수증 환경 시료 내에는 약 2.97  $\mu\text{M}$ 의 BPA가 존재함을 계산하였고, 환경시료 그 자체에는 29.7  $\mu\text{M}$  정도의 BPA가 있다는 것을 예측할 수 있었다.

## 4. 결 론

본 논문에서는 내분비 저해 화합물 중 하나인 BPA를 분석하기 위

해 *o*-MWCNT-PDDA-Tyr 나노복합체를 정전기적 인력에 의한 간단한 물리적 흡착 방법으로 제작하고 SPCE 기반에 도입한 전기화학센서를 개발하였다. Tyr 효소와 분석물인 BPA의 특이적 효소-기질반응을 통해 만들어진 생성물인 4,4'-isopropylidenebis(1,2-benzoquinone)의 환원반응을 통한 전류값의 변화를 측정하는 것에 기반을 둔 센서로 특히 방해물질 중에 하나인 BPS에 대해 우수한 선택성을 갖는 것으로 확인되었다. 또한 상기 바이오센서는 시차펄스전압전류법을 이용할 경우 2에서 15  $\mu\text{M}$ 까지 우수한 직선성을 나타내었으며, 정량한계 농도값은 1.99  $\mu\text{M}$ 였다. 실험실에서 직접 만든 실제 환경샘플에서 BPA의 농도를 성공적으로 검출할 수 있음을 확인하였으며, 이를 통해 본 연구에서 개발한 바이오센서는 실제 환경오염물질 내에 존재하는 BPA의 농도를 분석하는 데 유용하게 활용 가능하다는 점을 시사하였다.

### Acknowledgment

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (Ministry of Science and ICT, MSIT) (Grant number: NRF-2019R1A2C1002710).

### References

1. Y.-J. Lee and G.-J. Kim, Exploratory study of post- COVID-19 changes in eating behaviors: focused on behavior of restaurant visit, home eating behavior and delivery food purchase behavior, *Culinary Science & Hospitality Research*, **27**, 133-142 (2021).
2. J. S. LAKIND and D. Q. NAIMAN, Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 national health and nutrition examination survey, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, **21**, 272-279 (2011).
3. K. L. Howdeshell, P. H. Peterman, B. M. Judy, J. A. Taylor, C. E. Orazio, R. L. Ruhlen, F. S. Vom Saal, and W. V. Welshons, Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature, *Environ. Health Perspect.*, **111**, 1180-1187 (2003).
4. W. A. DARK, E. C. CONRAD, and J. L. W. CROSSMAN, Liquid chromatographic analysis of epoxy resins, *J. Chromatogr. A*, **91**, 247-260 (1974).
5. H. Segner, K. Caroll, M. Fenske, C. R. Janssen, G. Maack, D. Pascoe, C. Schafers, G. F. Vandenberg, M. Watts, and A. Wenzel, Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the european IDEA project, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **54**, 302-314 (2003).
6. E. C. Dodds, and W. Lawson, Molecular structure in relation to oestrogenic activity. compounds without a phenanthrene nucleus, *Proc. Royal Soc. B*, **125**, 222-232 (1938).
7. P. Sohoni, and J. P. Sumpter, Several environmental oestrogens are also anti-androgens, *J. Endocrinol.*, **158**, 327-339 (1998).
8. J. R. Rochester, Bisphenol A and human health: a review of the literature, *Reprod. Toxicol.*, **42**, 132-155 (2013).
9. F. S. vom Saal and C. Hughes, An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol a shows the need for a new risk assessment, *Environ. Health Perspect.*, **113**, 926-933 (2005).
10. M. Sugiura-Ogasawara, Y. Ozaki, S. Sonta, T. Makino, and K. Suzumori, Exposure to bisphenol a is associated with recurrent miscarriage, *Hum. Reprod.*, **20**, 2325-2329 (2005).
11. Y. B. Wetherill, C. E. Petre, K. R. Monk, A. Puga, and K. E. Knudsen, The xenoestrogen bisphenol a induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells, *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 515-524 (2002).
12. O. S. Anderson, M. S. Nahar, C. Faulk, T. R. Jones, C. Liao, K. Kannan, C. Weinhouse, L. S. Rozek, and D. C. Dolinoy, Epigenetic responses following maternal dietary exposure to physiologically relevant levels of bisphenol a, *Environ. Mol. Mutagen.*, **53**, 334-342 (2012).
13. M. Kundakovic and F. A. Champagne, Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol a, *Brain Behav. Immun.*, **25**, 1084-1093 (2011).
14. R. A. Keri, S. M. Ho, P. A. Hunt, K. E. Knudsen, A. M. Soto, and G. S. Prins, An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol a, *Reprod. Toxicol.*, **24**, 240-252 (2007).
15. A. Tsalbouris, N. P. Kalogiouri, A. Kabir, K. G. Furton, and V. F. Samanidou, Bisphenol a migration to alcoholic and non-alcoholic beverages—an improved molecular imprinted solid phase extraction method prior to detection with HPLC-DAD, *Microchem. J.*, **162**, 105846-105852 (2021).
16. R. Mercogliano, and S. Santonicola, Investigation on bisphenol a levels in human milk and dairy supply chain: a review, *Food Chem. Toxicol.*, **114**, 98-107 (2018).
17. D.-x. Wang, X.-c. Wang, Q.-j. Hu, C.-x. Zhang, F. Li, F.-l. Wang, and Q.-f. Feng, Salting-out Assisted liquid-liquid extraction coupled to dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of bisphenol a and six analogs (B, E, F, S, BADGE, BFDGE) in canned coffee drinks by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Anal. Methods*, **14**, 441-452 (2020).
18. M. Jia, S. Chen, T. Shi, C. Li, Y. Wang, and H. Zhang, Competitive plasmonic biomimetic enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive detection of bisphenol a, *Food Chem.*, **344**, 128602-128610 (2021).
19. E. H. Lee, S. K. Lee, M. J. Kim, and S. W. Lee, Simple and rapid detection of bisphenol a using a gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor, *Food Chem.*, **287**, 205-213 (2019).
20. D. Kim, and B. Lee, Fluorescence detection of bisphenol a in aqueous solution using magnetite core-shell material with gold nanoclusters prepared by molecular imprinting technique, *Korean J. Chem. Eng.*, **36**, 1509-1517 (2019).
21. Y. Lu, Q. Wang, C. Zhang, S. Li, S. Feng, and S. Wang, The development of a photothermal immunochromatographic lateral flow strip for rapid and sensitive detection of bisphenol a in food samples, *Food Anal. Methods*, **14**, 127-135 (2020).
22. Sarikokba, D. Tiwari, S. K. Prasad, D. J. Kim, S. S. Choi, and S.-M. Lee, Bio-composite materials precursor to chitosan in the development of electrochemical sensors: a critical overview of its use with micro-pollutants and heavy metals detection, *Appl. Chem. Eng.*, **31**, 237-257 (2020).
23. S. Moon, J. Kim, H.-K. Choi, M.-G. Kim, Y.-S. Lee, and K. Lee, Electrochemical Synthesis of Metal-organic Framework, *Appl. Chem. Eng.*, **32**, 229-236 (2021).
24. J. Li, Y. Si, and H. J. Lee, Recent research trend of biosensors for colorectal cancer specific protein biomarkers, *Appl. Chem. Eng.*, **32**, 253-259 (2021).
25. Y. Liu, L. Yao, L. He, N. Liu, and Y. Piao, Electrochemical enzyme biosensor bearing biochar nanoparticle as signal enhancer for

- bisphenol a detection in water, *Sensors*, **19**, 1619-1622 (2019).
26. L. Wu, H. Yan, J. Wang, G. Liu, and W. Xie, Tyrosinase incorporated with Au-Pt@SiO<sub>2</sub> nanospheres for electrochemical detection of bisphenol a, *J. Electrochem. Soc.*, **166**, B562-B568 (2019).
  27. X. Wang, X. Lu, L. Wu, and J. Chen, 3D metal-organic framework as highly efficient biosensing platform for ultrasensitive and rapid detection of bisphenol A, *Biosens. Bioelectron.*, **65**, 295-301 (2015).
  28. X. Lu, X. Wang, L. Wu, L. Wu, Dhanjai, L. Fu, Y. Gao, and J. Chen, Response characteristics of bisphenols on a metal-organic framework-based tyrosinase nanosensor, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**, 16533-16539 (2016).
  29. J. Zhao, L. Cong, Z. Ding, X. Zhu, Y. Zhang, S. Li, J. Liu, X. Chen, H. Hou, Z. Fan, and M. Guo, Enantioselective electrochemical sensor of tyrosine isomers based on macroporous carbon embedded with sulfato- $\beta$ -cyclodextrin, *Microchem. J.*, **159**, 105439-105446 (2020).
  30. M. Han, Y. Qu, S. Chen, Y. Wang, Z. Zhang, M. Ma, Z. Wang, G. Zhan, and C. Li, Amperometric biosensor for bisphenol A based on a glassy carbon electrode modified with a nanocomposite made from polylysine, single walled carbon nanotubes and tyrosinase, *Microchim. Acta*, **180**, 989-996 (2013).
  31. N. Zehani, P. Fortgang, M. Saddek Lachgar, A. Baraket, M. Arab, S. V. Dzyadevych, R. Kherrat, and N. Jaffrezic-Renault, Highly sensitive electrochemical biosensor for bisphenol a detection based on a diazonium-functionalized boron-doped diamond electrode modified with a multi-walled carbon nanotube-tyrosinase hybrid film, *Biosens. Bioelectron.*, **74**, 830-835 (2015).
  32. Y. Wee, S. Park, Y. H. Kwon, Y. Ju, K. M. Yeon, and J. Kim, Tyrosinase-immobilized CNT based biosensor for highly-sensitive detection of phenolic compounds, *Biosens. Bioelectron.*, **132**, 279-285 (2019).
  33. Y. Piao, Z. Jin, D. Lee, H. J. Lee, H. B. Na, T. Hyeon, M. K. Oh, J. Kim, and H. S. Kim, Sensitive and high-fidelity electrochemical immunoassay using carbon nanotubes coated with enzymes and magnetic nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 3192-3199 (2011).
  34. J. Li, Y. Si, D. T. Nde, and H. J. Lee, Development of Voltammetric Nanobio-incorporated Analytical Method for Protein Biomarker Specific to Early Diagnosis of Lung Cancer, *Appl. Chem. Eng.*, **32**, 461-466 (2021).
  35. T. Mendum, E. Stoler, H. VanBenschoten, and J. C. Warner, Concentration of bisphenol a in thermal paper, *Green Chem. Lett. Rev.*, **4**, 81-86 (2011).
  36. O. de Oliveira Jr, L. Ferreira, G. Marystela, F. de Lima Leite, and A. L. Da Róz, *Nanoscience and its Applications*, William Andrew, (2016).
  37. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Fundamentals of analytical chemistry*, Cengage learning, (2013).
  38. C. Macca, and J. Wang, Experimental procedures for the determination of amperometric selectivity coefficients, *Anal. Chim. Acta* **303**, 265-274 (1995).

#### Authors

Nayeong Ku; B.Sc., Graduate Student, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; skdud3823@gmail.com  
 Ayeong Byeon; Undergraduated course., Undergraduate Student, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; bay1217\_@naver.com  
 Hye Jin Lee; Ph.D., Professor, Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; hyejinlee@knu.ac.kr