

Amperometric detection of hydrogen peroxide at an azalea peroxidase embedded enzyme electrode

Kil Joong Yoon*

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

(Received March 7, 2014; Revised July 11, 2014; Accepted July 11, 2014)

진달래 과산화효소 고정 효소전극을 이용한 과산화수소의 전류법적 검출

윤길중*

청주대학교 응용화학과

(2014. 3. 7. 접수, 2014. 7. 11. 수정, 2014. 7. 11. 승인)

1. 서 론

과산화수소는 세포 신진대사에 의하여 생체 내에서 생성되기도 하며 산업분야에서 각종 화합물의 제조시 약 및 산화제로서 다양한 용도를 갖는 물질이다.¹ 과산화수소의 정량에는 고전적인 방법이나 분광학적 방법보다 효소전극을 이용하는 전기화학법이 보다 널리 이용되고 있다.² 전기화학적 방법이 정량분석에 소요되는 비용과 시간을 최소화할 수 있는 이점이 있기 때문이다.³ 효소전극 제작 시 효소를 전극에 고정하는 방법에는 흡착법,⁴ 스크린 프린팅법,⁵ 졸-겔법,⁶ 전도성 고분자를 이용하는 법⁷ 등 다양한 방법들이 있다. 이들 중 탄소가루의 결합재로 미네랄 오일을 사용하는 탄소반죽법은 전극제작이 신속하고 용이하다는 면에서 가장 우수한 방법이라 할 수 있다.⁸ 그러나 이것이 효소의 특성연구에 최적의 방법이라 할 수 있을지라도 반죽이 기계적 물성을 갖지 않기 때문에 바이오센서로서 실용화 가능성은 전무하다.⁹

대부분의 고무는 톨루엔에 용해되고 용매는 휘발성이 강하여 쉽게 탄소반죽으로부터 제거될 수 있다. 이

점에 착안하여 본 연구실에서는 고무용액을 탄소가루의 결합재로 사용하여 반죽을 성형하였으며 용매가 휘발된 후 얻어진 전극물질의 기계적 견고성은 탄소반죽전극 실용화의 새로운 계기가 되었다.¹⁰

전극 제작 시 시판 추출효소를 사용하면 전극의 신호가 보다 안정적이고 증대되는 효과를 얻을 수 있다.¹¹ 그러나 전극 제작의 고비용은 그것의 범용 및 양산에 저해요인이 된다. 최근 효소전극의 제작에 상업용 효소를 이용하는 대신 식물 또는 동물조직을 효소원으로 사용하면 저렴한 가격, 긴 수명, 높은 촉매력 등 많은 이점이 있다는 사실이 입증되었다.¹²

지금까지 언급된 사항들을 종합하여 본 연구실에서는 고무용액을 결합재로 사용하고 시판 효소를 생활 주변에서 얻기 쉬운 효소원으로 대치하고자 노력하였으며 여러 종의 동식물 조직을 사용하여 활용 가능성을 시험하고 그 결과를 수차례 보고한 바 있다.¹³ 이 논문은 이런 노력의 일환이며 진달래 조직을 이용하여 효소전극을 제작하고 그것의 전기화학적 정량 특성을 살펴 본 내용을 포함하고 있다. 결과는 만족스러운 것이었으며 진달래 조직이 과산화수소 정량을 위

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-229-8535 Fax : +82-(0)43-229-8535

E-mail : kjoyoon@cju.ac.kr

한 실용 효소전극 물질로 활용될 수 있음을 보여 주었다. 이 논문은 그 내용을 보고하고 있다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

효소원은 호모게나이저로 완전히 파쇄된 진달래잎 조직을, 전극물질로 Fluka의 흑연가루(Anal N. 378326/1 21698, ≤ 0.1 mm)를, 결합재(binder)로 클로로술폰화 폴리에틸렌 고무(chlorosulphonated polyethylene rubber, CSM, Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha Mitsui C.)를 사용하였다. Junsei의 과산화수소(Junsei Chem. Co. Ltd., 35%)를 기질로, 매개체로 페로센(dicyclopentadienyliron, Sigma, F-3375)을, 전해질로 NaCl(Shinyo pure Chem. $\geq 95.5\%$)을 사용하였다. Sigma-Aldrich의 톨루엔(HPLC용, $\geq 99.9\%$)이 고무의 용제로 사용되었다. CV 및 LSV는 기준전극과 보조전극으로 Ag/AgCl(BAS MF 2052)과 Pt전극(BAS MW 1032)을 BAS Model EPSILON (Bioanalytical System, Inc., U.S.A.) 전압전류계에 연결하여 얻었으며, 이외의 신호 측정은 EG&G Model 362 (Princeton Applied Research)를 사용하였다.

2.2. 전극 제작

0.09 g의 페로센을 포함하고 있는 CHCl_3 10 mL에 0.91 g의 흑연가루를 넣어 완전히 혼합시키고 실온에서 건조하였다. 이 가루와 1.5% CSM 고무용액을 1:1 (wt/wt)로 혼합하여 반죽을 만든 후 이 반죽 1.0 g에 파쇄된 진달래 조직 0.2 g을 합하여 완전히 혼합시켰다. 오음 접촉을 갖는 길이 1 mm, 직경 6.67 mm의 원형 폴리에틸렌 튜브에 위 반죽을 채우고 표면을 스페큘라를 이용하여 완전평면으로 성형한 후 작업전극으로 사용하였다.¹⁴

3. 결과 및 고찰

전기화학측정에서 순환전압전류곡선은 전극표면에서 일어나는 반응의 특성을 파악할 수 있는 화학적 초기진단법으로 널리 활용된다. 수용액 중에서 과산화수소를 검출하기 위하여 제작된 진달래 과산화효소 고정 효소전극의 전기화학적 특성을 보여주는 순환전압전류곡선이 Fig. 1에 주어져 있다. 환류상태의 0.1 M NaCl 전해질 용액 중에서 얻은 이 그림은 a, b, c, d의 네 전압-전류 곡선으로 구성되어 있고, a와 b는

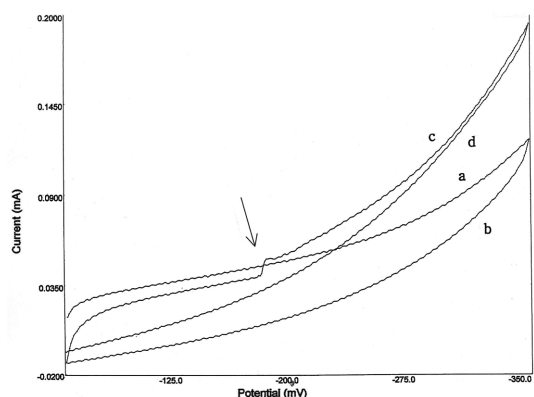


Fig. 1. Hydrodynamic 4-segment cyclic voltammogram showing the electrochemical behavior of the azalea electrode. (a) and (b): in the absence of substrate; (c) and (d): in the presence of 2.0×10^{-2} M H_2O_2 . Scan rate: 25 (mV/s). Arrow indicates the time of H_2O_2 addition.

기질을 가하기 전, c와 d는 기질을 가한 후 얻은 것이다. a는 전극전위가 증가함에 따라 바탕전류가 증가하는 것을 보여준다. 실험 전위영역에서 매개체인 페로센은 이미 환원된 상태이며 전해질 용액의 산화-환원 전류가 여기에 포함되지 않는다는 사실은 이미 확인된 바 있다.¹⁵ 따라서 이 신호를 구성하는 가능한 전류는 이중층 충전전류, 결합재로 사용된 고무 및 효소 원으로 사용된 진달래 조직이 포함하고 있는 물질의 산화-환원 전류 등이 예상된다.

Reed-Horn 반응의 혼합 생성물인 결합재 CSM 고무와¹⁶ 진달래 조직의 구성 성분을 여기에서 확인할 수 없으나 이들의 산화-환원 전류가 있다면 이들의 바탕전류에 대한 기여는 충전전류와 더불어 a와 c 및 b와 d에 공통적일 것이다. 그러므로 기질 첨가 전후의 전류차를 신호로 간주하는 본 계에서 이들의 존재는 문제되지 않는다.

c를 얻을 때 -200 mV 이하에서 볼 수 있는 전류계단(화살표)은 기질 추가 시 신호가 급변하는 것을 보여주고 있다. 이 변화는 실험 조건의 변화 없이 기질 추가에 기인한 것이므로 순수한 기질의 분해전류로 볼 수 있다.

기질의 확산에 의한 전극감응의 거동을 살펴보기 위하여 Fig. 1과 동일한 실험이 정지된 용액 중에서 행하여졌고, 이로부터 Fig. 1의 c와 a에 해당하는 것의 전류차를 전극전위에 따라 도시한 것이 Fig. 2이다. 전극반응이 확산에 의존할 경우 전압-전류 그림은 폴라로그래피파처럼 S자 형이다. 여기서 전체 파형을 확

인할 수 없는 것은 실험 전극전위가 -0.35 V로 제한되어 있기 때문으로, Fig. 2는 S자 형의 일부분에 해당한다. 신호전류와 전극전위 사이의 관계를 볼츠만 방식으로 시뮬레이션한 함수식은 아래 식과 같다.

$$i = -0.00017 + 0.768/[1 + \exp\{(E + 0.506)/0.0793\}]$$

여기서 신호전류 i (mA)는 유효면적이 0.316 cm^2 인 전극으로부터 얻은 것이며 E 는 전극전위(V)이다. 위 식으로부터 음전위의 극한치($E \rightarrow -\infty$)에서 얻어지는 전류는 0.768 mA 로 본 계($n=1$)가 생성하는 한계전류(i_{lc})로 간주할 수 있다.¹⁷ 이것으로부터 도출되는 전달래 전극계의 질량이동계수(mass transfer coefficient), m_0 와 질량이동저항(mass transfer resistance), R_{m0} 는 각각 $1.26 \times 10^{-3} \text{ cm/sec}$ 와 33.5Ω 이다.

Fig. 2로부터 도출한 Tafel 도시[$\ln i/(1-\exp(nf\eta))$] vs. η]가 Fig. 3에 주어져 있다. 좋은 직선성을 보여주고

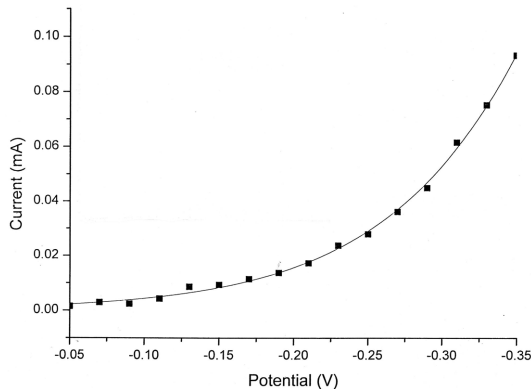


Fig. 2. Current difference between (c) and (a) in a static solution. Other conditions are the same as in Fig. 1.

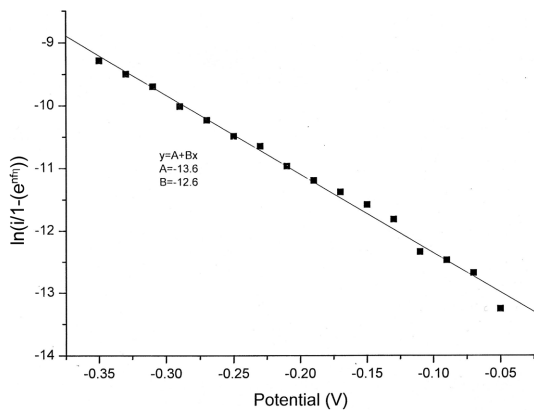


Fig. 3. Wave slope plot for the reduction of $2.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ H_2O_2 in 0.1 M NaCl .

있으며 기울기 $-\alpha n f$ 와 절편 $\ln i_0$ 은 각각 -12.6 및 -13.6이다. 생체 내에서 Fe^{2+} 이온과 과산화수소의 반응은 일 전자 전이반응($n=1$)으로 알려져 있다.¹⁷ 여기서 얻어지는 대칭인자(α)와 교환전류밀도(i_0)는 각각 0.35 및 $1.06 \times 10^{-5} \text{ A/cm}^2$ 이다. 대칭인자는 장미전극의 0.34와 대체로 유사한 반면 교환전류밀도(i_0)는 $9.19 \times 10^{-7} \text{ A}$ 와 차이가 있는데 이는 전극 물질의 건조 정도에 따른 전극저항에 의한 오차로 보여진다.¹⁸

전극전위가 반응속도에 미치는 영향은 대칭인자가 0.5보다 큰 경우 전극전위 변화에 대하여 작은 기울기를 가지며 0.5보다 작은 경우는 그 반대이다. 식물조직 함유 효소전극의 대칭인자는 0.5보다 작은 경우가 일반적인데 여기서 전달래 전극이 0.35의 작은 값을 보여주는 것은 바이오센서의 감응속도가 전극전위 변화에 민감한 것을 말하여 준다.

Fig. 4는 환류상태의 전해질 용액 중에서 0.1 M H_2O_2 용액 $50 \mu\text{L}$ 를 순차적으로 8회 가했을 때 기질

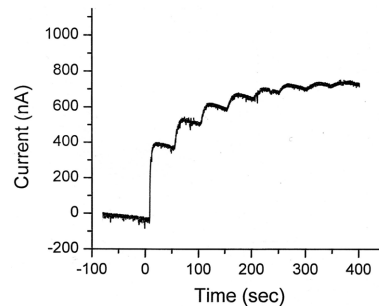


Fig. 4. Amperometric response for successive $50 \mu\text{L}$ additions of 0.1 M substrate solution to the 10 mL of electrolytic solution at -350 mV .

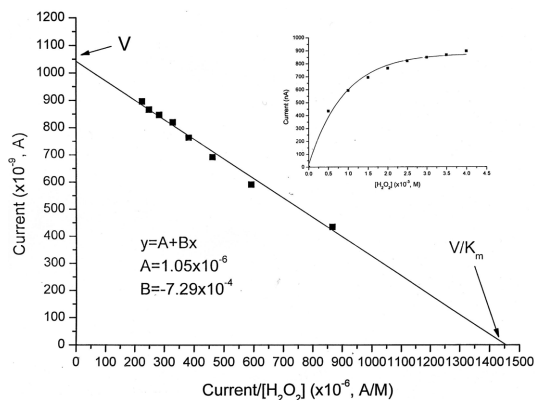


Fig. 5. Eadie plot of the signal current and the substrate concentration.

농도가 증가함에 따라 신호전류가 증가하는 것을 보여주고 있다. 이 방법은 화학종의 질량이동이 환류에 의존하므로 질량이동 속도가 화학종의 확산속도보다 훨씬 커서 정류상태에 도달하는 시간이 최소화된다. 반응속도를 기질농도에 따른 반응속도의 변화율에 대하여 도시한 것이 Eadie 도시이며, 이것이 직선일 때 화학반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. 이 도시는 기질농도가 큰 경우 작은 오차를 발생하는 장점이 있다. Fig. 5의 창에 농도변화에 따른 신호의 누적 합산 크기를 도시한 검정곡선이 주어지고 있다. 이것으로부터 도출된 Eadie 도시, Fig. 5는 좋은 직선성을 보여주고 있는데, 이것은 과산화수소의 분해가 진달래 전극에 함유된 과산화효소의 촉매작용에 의한 것임을 말하여 주고 있다. 여기서 얻은 계의 최대속도(V)와 Michaelis 상수(K_m)는 각각 1.05×10^{-6} A와 7.29×10^{-4} M이다.

전극과 용액의 계면은 반대 전하를 띤 두 전기층이 마주보고 있는 커패시터 구조이며 여기에 관하여 Bockris, Devanathan 및 Miller에 의하여 제시된 모형이 현재 널리 용인되고 있다. 그들은 전극 표면으로부터 외부 Helmholtz 층까지를 내부 조밀 전기이중층(inner compact double layer), 그 밖의 층을 확산 전기이중층(diffuse double layer)으로 구분한다.

R_s 와 C를 각각 용액의 저항 및 이중층의 커패시턴스라고 할 때 충전전류는 시간(t)에 대하여 $i = E/R_s \exp(-t/R_s C)$ 의 관계를 가지며 커패시터가 충전되어 있지 않을 경우($t = 0$) $i = E/R_s$ 및 $\tau = R_s C$ 의 관계가 성립한다. 순수 전해질 용액(0.1 M NaCl) 중에서 -350 mV의 계단전위를 인가하여 얻은 전류-시간 그림이

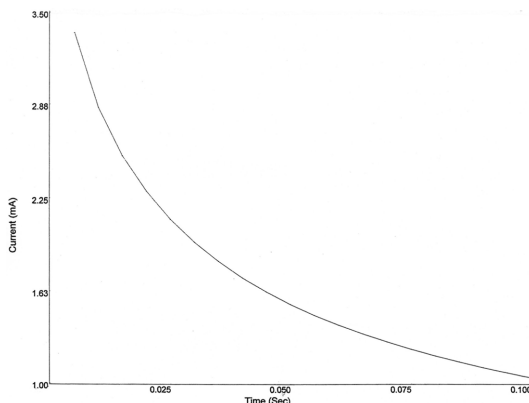


Fig. 6. Time profile of the double-layer charging current for a potential step in the electrolytic solution (0.1 M NaCl). Start potential : 0 (mV); step potential : -350 (mV).

Fig. 6에 주어지고 있다. 그림이 보여주듯 측정기기는 0.005 sec로 디지털화되어 있기 때문에 $t = 0$ 에서 전류를 측정하는 것은 불가능하므로 초기($t = 0$)의 순간전류를 얻고자 한다면 전류의 경향성을 시뮬레이션하여 $t = 0$ 으로 외삽하는 방법을 취하여야 한다. 0.01 및 0.001 M 용액에서 동일 방법으로 얻은 시간-전류가 함께 Table 1에, 그리고 이들의 함수 관계식이 Table 2에 주어지고 있다. Table 3은 이것으로부터 도출된 $i_{t=0}$, R_s , C, C_d , C_i 및 실측 시간상수 τ 를 포함하고 있다. 전해질 농도가 감소함에 따라 시간상수가 증가하는 것을 볼 수 있는데 이것은 용액저항 증가에 따른 이중층 형성의 지연에 기인하는 것으로 볼 수 있다. 또 $\tau = R_s C$ 로부터 계산된 충전용량은 전해질 농도가 묽어짐에 따라 증가하는 것을 보여주는데 전해질 이온의 농도 감소에 의한 용액의 유전률의 증가로 설명될 수 있다.

Gouy-Chapmann 이론에 의하면 확산 이중층(diffuse double layer)의 커패시턴스, C_d 는 $228 \sqrt{c} \cosh(19.47z\phi)$ 로 주어지는데 본 계에서 얻은 값들은 수용액에서 일반적으로 얻어지는 값($10\text{--}30 \text{ F cm}^{-2}$)보다 크다. 이 증가는 흑연가루를 둘러싸고 있는 고무 결합체의 유전상수 증가에 기인하는 것으로 볼 수 있다. 한편 $C_d \gg C_i$ 의 관계는 계의 유효 커패시턴스가 내부 조밀층의 커패시턴스, C_i 에 의존함을 뜻한다.

Table 1. Time-dependence of the double-layer charging current at three different electrolyte concentrations at -350 mV (vs. Ag/AgCl)

Time, s	i, mA		
	0.1 M	0.01 M	0.001 M
0.005	3.36	0.792	0.117
0.010	2.85	0.761	0.115
0.015	2.53	0.736	0.114
0.020	2.29	0.720	0.113
0.025	2.11	0.705	0.111
0.030	1.95	0.694	0.110
0.035	1.83	0.681	0.109
0.040	1.72	0.672	0.109
0.045	1.61	0.663	0.108
0.050	1.54	0.655	0.107

Table 2. Relationships between condenser current and charging time in Table 1, i (mA) = $A_1 \times \exp(-t/t_1) + i_0$

$-\log[\text{NaCl}]$	A_1	t_1	i_0
1	2.52	0.020	1.35
2	0.20	0.030	0.63
3	0.017	0.042	0.10

Table 3. Electrode parameters of the azalea embedded biosensor

$-\log[\text{NaCl}]$	$i_{t=0}$, mA	R_s , Ω	τ , sec	C, F	C_d , F	C_i , F
1	3.87	90.4	0.060	6.6×10^{-4}	3.2×10^{-2}	$\approx 6.6 \times 10^{-4}$
2	0.82	429	0.78	1.8×10^{-3}	1.0×10^{-2}	$\approx 1.8 \times 10^{-3}$
3	0.12	2920	$10 \ll$	-	3.3×10^{-3}	-

$i_{t=0}$: 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 inner compact double layer

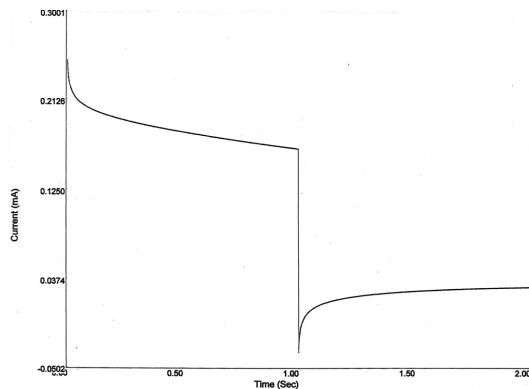


Fig. 7. Current transient resulting from the double step technique. Start potential: 0 (mV); first step E : -350 (mV); second step E: 0 (mV). [NaCl]: 0.002 M.

Fig. 1에서 c와 d의 형태가 유사한 사실로부터 기질의 분해반응이 비가역적임을 정성적으로 예측할 수 있었다. 반응의 가역성을 정량적으로 판단하는 기준에는 여러 가지가 있으나 이중전위계단법(double potential step technology)이 간단하고 효율적이다. Fig. 7은 0.01 M H_2O_2 용액으로부터 이중계단기법으로 얻은 전류-시간 그림을 보여주고 있다. 기질의 환원생성물은 물이다. 선택된 제1계단 전위 -350 mV와 제2계단 전위 0 mV(vs. Ag/AgCl)는 Fig. 1을 고려할 때 각각 기질의 환원과 산화가 일어날 수 있는 전위이다. 각 계단의 전류채취 시간 t_r 와 $t_r + \tau$ ($\tau = 1$ sec)에서 측정된 전류, i_r 와 i_s 가 Table 4에 함께 주어져 있다. 그리고 실험으로부터 얻은 $-i_r/i_s$ 와 완전가역일 경우의 이론치 $1 - (1 - \tau/t_r)^{1/2}$ 이 Fig. 8에 함께 도시되어 있다. 계가 이상적인 완전가역계라면 $-i_r/i_s$ 은 $1 - (1 - \tau/t_r)^{1/2}$ 과 일치해야 하나 이들은 현격한 차이를 보여주고 있다. 우선 $t_r = 0.001$ sec에서 $-i_r/i_s$ 은 0.14이며 0.002-0.008 sec의 전 구간에서 0.14보다 작은 값을 보여주고 있다. 전압이 역전될 때 신호전류에 잔류전류와 충전전류가 포함되어 있으므로

Table 4. Ratio of i_r to i_s as a function of time for eight values of t_r . $1 - (1 - \tau/t_r)^{1/2}$ is calculated for the totally reversible system

Time, s	i_r , mA	i_s , mA	$1 - (1 - \tau/t_r)^{1/2}$	$-i_r/i_s$
0.001	0.2512	-0.034	0.97	0.14
0.002	0.2433	-0.027	0.96	0.11
0.003	0.2394	-0.023	0.95	0.10
0.004	0.2370	-0.020	0.94	0.08
0.005	0.2346	-0.018	0.93	0.08
0.006	0.2323	-0.016	0.92	0.07
0.007	0.2307	-0.015	0.92	0.07
0.008	0.2291	-0.014	0.91	0.06

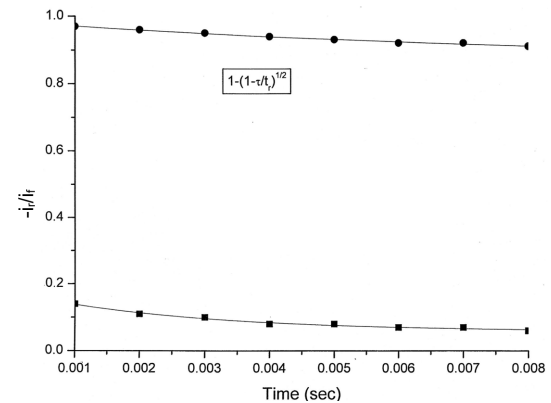


Fig. 8. Working curve for $-i_r/i_s$ elicited from Fig. 7.

로 이것을 고려하면 실험전위 영역에서 물의 산화반응은 없는 것으로 볼 수 있다. 따라서 본 계에서 기질 분해의 역반응은 비가역적이라고 할 수 있다.

4. 결 론

진달래 전극 표면에서 일어나는 과산화수소 분해반응에 대하여 지금까지 보여준 정량적 감응과 이로부터

터 얻은 여러 전기화학적 파라미터들은 진달래 조직이 함유하고 있는 과산화수소 분해효소가 과산화수소의 정량분석에 활용될 수 있음을 보여주는 것이다. 한편 진달래 조직은 생활주변에서 쉽게 얻을 수 있는 것이므로 시중에서 고가로 유통되는 서양 고추냉이로부터 추출된 과산화효소를 대체할 수 있는 가능성을 얻 것이다. 아울러 탄소가루 결합재로써 본 실험실에서 시도한 고무용액의 활용은 성공적이었으나 효소전극에서 공통적으로 나타나는 시간경과에 따른 감응능력의 감소 현상은 본 계에서도 여전히 숙제로 남아있다. 따라서 진달래 전극이 실용적 바이오센서로 활용되고자 한다면 효소전극의 장기 저장성에 관한 연구도 병행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2013~2014 학년도에 청주대학교 산업과학연구소가 지원하는 학술연구조성비(특별연구 추가과제)에 의하여 연구되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

Reference

1. J. R. Kirchner, 'Encyclopedia of Chemical Technology', Vol. 13, p. 12, Wiley-Interscience, New York, 1981.
2. E. Casero, M. Darder, F. Pariente and E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta*, **403**, 1-9 (2000).
3. B. Q. Wang and S. J. Dong, *J. Electroanal. Chem.*, **487**, 45-50 (2000).
4. T. J. Cheng, T. M. Lin and H. C. Chang, *Anal. Chim. Acta*, **462**, 261-273 (2002).
5. D. Ogoczyk, Ł. Tymecki, I. R. Koncki and S. Głąb, *Sens. Actuators B*, **106**, 450-454 (2005).
6. A. Lobnik and M. Čajlaković, *Sens. Actuators B*, **74**, 194-199 (2001).
7. F. M. Tian, B. Xu, L. D. Zhu and G. Y. Zhu, *Anal. Chim. Acta*, **443**, 9-16 (2001).
8. S. Tingry, C. Innocent, S. Touli, A. Deratani and P. Seta, *Mater. Sci. Eng. C*, **26**, 222-226 (2006).
9. Y. Miao and S. N. Tan, *Anal. Chim. Acta*, **437**, 87-93 (2001).
10. B. G. Lee, K. B. Rhu and K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **30**(10), 2457-2460 (2009).
11. K. J. Yoon, *Anal. Sci. & Tech.*, **16**(6), 504-508 (2003).
12. H. S. Kwon, E. H. Jin, K. J. Yoon, and Y. N. Pak, *J. Kor. Chem. Soc.*, **49**(2), 224-228 (2005).
13. (a) B. G. Lee, S. W. Park and K. J. Yoon, *Anal. Sci. & Tech.*, **19**(1), 58-64 (2006). (b) B. G. Lee, H. S. Kwon, K. E. Kim and K. J. Yoon, *Anal. Sci. & Tech.*, **14**(3), 286-289 (2001).
14. K. J. Yoon, S. Y. Pyun, and H. S. Kwon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **41**(7), 343-350 (1997).
15. K. B. Rhyu and K. J. Yoon, *Anal. Sci. & Tech.*, **24**(2), 113-118 (2011).
16. J. A. Brydson, 'Rubbery materials and their compounds', p. 291, Elsevier Applied Science, London and New York, 1998.
17. (a) A. Mansouri, D. P. Makris and P. Keflas, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 22-26 (2005). (b) R. F. P. Nogueira, M. C. Oliveira and W. C. Paterlin, *Talanta*, **66**, 86-91 (2005).
18. K. B. Rhyu, *Appl. Chem. Eng.*, 2014, in press.