

## 폴리부타디엔 결합재를 이용하여 만든 탄소반죽전극의 전기화학적 특성에 관한 연구

윤길중★

청주대학교 이공대학 응용과학부  
(2006. 12. 18. 접수, 2007. 1. 22. 승인)

### Investigations with respect to the electrochemical properties of carbon paste electrode fabricated using polybutadiene binder

Kil-joong Yoon★

Division of Applied Sciences, Cheongju University, Cheongju, 360-764, Korea

(Received December 18, 2006; Accepted January 22, 2007)

**Abstract :** For the practical use as a biosensor, a rubber electrode bound by polybutadiene was newly devised for the determination of hydrogen peroxide. Then its electrochemical behaviors were investigated. The signal could be obtained at low electrode potential between 0.0 ~ -0.5 V (vs. Ag/AgCl) with a detection limit of  $1.4 \times 10^{-4}$  M and its potential dependence was linear in the experimental range. Especially its Lineweaver-Burk plot showed a very good linearity giving the evidence of a good enzyme immobilization on the surface of the electrode. And mechanical stability of the electrode resulted from using rubber binder presented a new possibility for the practical use of biosensor.

**Key words :** polybutadiene rubber, biosensor, enzyme electrode, hydrogen peroxide, peroxidase

### 1. 서 론

생화학적 산화-환원 과정을 전기적 신호로 변환시키는 바이오센서에 효소를 기능이 지속적으로 유지될 수 있도록 전극에 고정시키는 일은 대단히 중요하다. 센서가 생성하는 신호의 재현성이 효소의 안정도에 의존하기 때문에 효소의 고정 방식은 센서 기능의 성패에 핵심적이라 할 수 있다. 이를 위한 노력의 일환으로 과산화효소를 센서에 안정적으로 고정하려는 노

력이 많은 연구자들에 의하여 경주되어 왔다.<sup>1-3</sup> 과산화수소는 산업, 생화학, 의학 및 환경 분야에서 유용하게 사용되고 있는 중요한 물질이다.<sup>4</sup> 본 실험실에서는 동식물의 조직을 탄소반죽 전극에 혼입시켜, 조직이 포함하고 있는 과산화효소를 직접 이용하는 효소 전극을 제작하고, 그것의 전기화학적 특성을 관찰하여 그 결과를 수차례 보고한 바 있다.<sup>5,6</sup> 사용된 결합재는 실리콘 오일이었다. 효소의 전기화학적 성질을 관찰하고자 전극물질 성형 목적으로만 사용한다면 실리콘

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-229-8540 Fax : +82-(0)43-229-8535

E-mail: kjyoon@cju.ac.kr

오일은 대단히 유용한 결합제이다.<sup>7</sup> 그러나 실리콘 오일은 특성상 기계적 강도를 갖지 못하며 비휘발성이기 때문에 실용화는 절대적으로 불가능하다. 본 실험실에서는 실용화할 수 있는 탄소가루의 결합제를 탐색하던 중, 고무가 탄소전극 실용화의 필요조건을 충족시키는 것을 확인하였다. 여기에서 사용하는 폴리부타디엔 고무(polybutadiene rubber, BR)는 입체 규칙성을 가진 고무로서 가지(branch)가 없어 유연성이 좋고, 압출 성형성, 내마모성이 강한 것으로 알려져 있다. 또 고탄성으로 동적 성질이 우수하며 충전제들과 친화력이 좋아 다른 물질과의 상용성이 우수한 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup> 따라서 BR을 전극 물질의 결합제로 활용한다면 그것의 물리적, 기계적 특성은 반영구적으로 사용할 수 있는 바이오센서 제작에 필요한 여러 조건을 충족시킬 것으로 예측되었다. 이런 이유로 톨루엔에 녹인 BR을 사용하여 전극을 제작하고 그것의 전기화학적 거동을 살펴보았다. 여기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 2. 실험

### 1. 시약 및 기구

BR은 한국타이어(주)로부터 제공 받았으며, 톨루엔은 Sigma-Aldrich( $\geq 99.9\%$ ) 제품이었다. 흑연가루는 Fluka사 제품( $\leq 0.1$  mm)이었으며, 기질(abbr. S)로 Junsei(Japan)사의 과산화수소(EP, 35%)를 이용하였다. 전해질 용액은 0.1 M NaCl(99.5%, Shinyo) 수용액이었으며, 매개체로 사용된 페로센(ferrocene)은 Sigma사 제품을 사용하였다. 과산화효소(Horseradish peroxidase, HRP)는 고추냉이로부터 추출된 Sigma사 제품(E.C.1.11.1.7)을 이용하였다. 순환전압전류(BAS Model EPSILON, Bioanalytical System, Inc., U.S.A.) 그림을 제외한 모든 신호전류 측정에는 KIPP & ZONEN Xt(BD111, Holand) 기록계가 장착된 EG&G Model 362(Princeton Applied Reach, U.S.A.) 전압전류계를 사용하여 얻었다. 기준전극과 보조전극으로 Ag/AgCl(BAS MF2052)과 Pt 백금전극(BAS MW1032)을 각각 이용하였다. 전극 물질의 전도도 측정은 ALS 1116SLD(Japan) 4탐침 전도도 측정기를 이용하였고, 모든 계산에는 Origin 7을 사용하였다.

### 2. 전극의 제조

0.09 g 페로센(ferrocene)을 포함하고 있는  $\text{CHCl}_3$  20 mL와 흑연가루 0.91 g을 혼합하여 건조시킨다. 이 흑

연가루 1.0 g과 10.0 mg HRP가 포함된 증류수 1.0 g을 혼합하여 40°C 이하의 온도를 유지시키며 수분을 증발시킨다. 완전히 건조된 후, 5.0% BR을 포함하는 톨루엔 용액과 위 흑연가루를 0.8 : 1.0(wt/wt)의 비율로 혼합하여 내경 6.0 mm, 길이 1.0 mm의 오음 접촉을 가진 폴리에틸렌 튜브에 충전시키고 표면을 완전 평면으로 성형하여 작업전극으로 사용한다.

## 3. 결과 및 고찰

BR을 결합제로 사용하여 만든 고무전극의 기본적인 전기화학적 특성을 보여주는 순환전압전류도가 Fig. 1에 주어져 있다. A는 순수 전해질 용액에서, B는 10 mL의 전해질 용액에 1.0 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{L}$ 의 기질용액이 추가되었을 때 얻어진 것이다. 그리고 Fig. 1의 창에 신호의 잡음이 적은 -200~-500 mV 범위에서 음의 방향 전압 주사 시 얻어진 A와 B의 전류차를 도시하였다. A는 전극전위에 관계없이 일정한 크기의 환원전류가 흐르는 것을 보여주고 있다. 이 계는 물, 페로센, 과산화수소 그리고 BR 등, 전기화학 반응이 가능한 화학종들을 포함하고 있다. 물의 표준환원전위는 -0.828 V이다. 순수 유리탄소전극을 이용하여 본 계에서 얻어진 물의 환원 봉우리는 -0.85 V에서 형성되어 약 40  $\mu\text{A}$ 의 전류를 나타냈으며, 환원함수의 꼬리는 대략 -0.500 V까지 연장되어 있었다. 이 전류

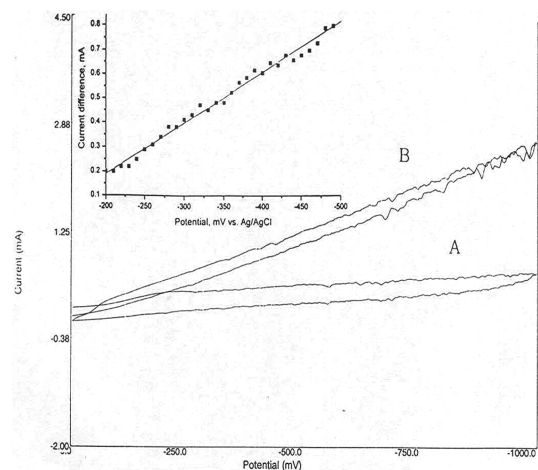


Fig. 1. Cyclic voltammograms of the carbon-paste biosensor with polybutadiene rubber binder. A and B were obtained before and after adding 100  $\mu\text{L}$  of 1.0 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0.1 M NaCl 10 mL respectively. Inset: current difference between A and B. Reference electrode, Ag/AgCl; scan rate, 10  $\text{mVs}^{-1}$ .

는 동일 전위에서 Fig. 1의 A가 보여주는 전류에 비하여 무시될 수 있는 크기이다. 그러므로 Fig. 1의 A가 보여주는 일정 크기의 환원전류는 물의 환원과 관련이 없는 것으로 볼 수 있다. 페리시늄(ferricinium) 이온의 표준환원전위는 +0.400 V이다. 페리시늄 이온의 환원함수를 음의 방향으로 0.5 V 이상 확장해도 실험영역에 미치지 못하므로 Fig. 1의 환원전류는 페리시늄의 환원과 무관한 것임을 알 수 있다. 한편 10 mL의 전해질 용액에 100  $\mu$ L의 1.0 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 기질용액을 가하고 유리탄소전극을 이용하여 CV를 얻었을 때, 물의 환원전위 부근에서 CV의 모양의 변화 없이 전류가 12.7  $\mu$ A 증가하는 것을 볼 수 있었다. 과산화수소의 표준환원전위는 +1.77 V이므로 이 전류 증가는 과산화수소의 환원과 무관한 것이다. 과산화수소는 순수한 물의 약 50배에 해당하는 전도도( $2.0 \times 10^{-6}$  cm, at 20°C)를 갖는다. 이 전류의 증가는 과산화수소 첨가로 인한 전해질의 전도도 증가에 기인한 것으로 볼 수 있을 것이다. 합성고무는 성분 구성 상 혼합물이다. Fig. 1에서 잔류전류의 형태로 나타나는 환원전류 A는 현 단계에서 확인이 힘든 고무성분의 페리데이 전류이거나, 아니면 전극계면의 충전전류로 볼 수 있을 것이다. Fig. 1의 창에 보여준 A와 B의 전류차는 전극전위에 대하여 직선성임을 보여주고 있다. -0.85 V에서 얻어진 전류차는 1.00 mA 이상으로 40  $\mu$ A나 12.7  $\mu$ A와는 비교할 수 없는 크기이다. 이와 같이 전류가 증가한 것은 계에서 효소의 촉매력이 발휘된 것으로 볼 수 있다. 또 기질 첨가 전후 잡음의 증가를 제외하면 CV의 모양에 주목할 만한 변화가 없으며, Fig. 1의 전류 A가 페리데이 전류이든 콘덴서 전류이든 A와 B에 공통적으로 적용될 것이므로 A와 B의 전류차를 신호로 간주해도 무방할 것이다. 전극에 고정된 효소가 촉매력을 발휘하는 과정을 보여주는 amperogram이 Fig. 2이다. 전위계단 인가 즉시 형성된 충전전류는 급격히 감소하며, 대략 1분이 지나면 바탕 수준에 도달한다. 이 계에서 신호로 간주되는 기질 첨가 후 전류차는 30여초 후 포화 상태에 이르게 되는데, 이는 본 실험실에서 실리콘 오일을 결합제로 사용하여 만든 전극의 13초 포화시간에 비하여 대단히 긴 것이다.<sup>9</sup> 실리콘 졸-겔법으로 만든 Wang 등<sup>10</sup>의 탄소전극은 매우 긴 감응시간을 보였는데, 기질이 실리콘의 그물구조 안에서 긴 확산 경로를 갖기 때문이라고 그 이유를 설명하고 있다. 이 전극에 사용된 고무 결합제도 고분자 물질이기 때문에 동일한 시각에서 그 이유를 찾을 수 있을 것이다. 그러나 Fig. 2가 보여

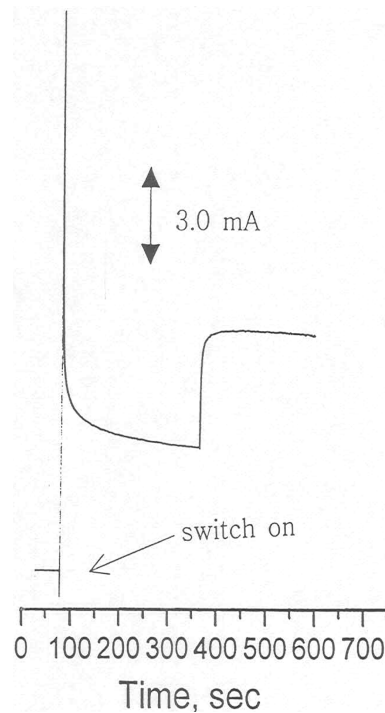


Fig. 2. Time profile of current for the experimental determination of the response signal and the saturation time. Applied potential, -0.200 V vs. Ag/AgCl; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>],  $1.0 \times 10^{-2}$  M.

주듯이 실리콘 오일 결합제 전극에 비하여 고무 결합제 전극이 큰 신호를 보이는 것은 후자가 효소의 특이성 유지에 보다 효율적인 것으로 볼 수 있으며, 이는 고무가 전극 실용화에 적합한 재료임을 말하여 주는 것이다. Fig. 3은 -0.20 V의 전극전위에서 환류상태의 전해질 용액 10 mL에 0.1 M 기질용액 100  $\mu$ L가 연속적으로 추가될 때 신호가 변화하는 것을 보여주는 hydrodynamic amperogram이다. 이 방법은 화학종의 질량 이동속도가 확산속도보다 빠르기 때문에 쉽게 포화상태에 이르며, 충전전류가 최소화되는 이점이 있다. 각 전류 계단에서 얻은 신호를 기질 농도에 대하여 도시한 것이 창에 주어 졌다. 김정곡선의 성격을 가진 이 도시의 두드러진 특징은 신호의 농도의존도가 묽은 농도에서도 쉽게 직선성으로부터 벗어나는 것이다. 이와 같은 경향성은 동식물 조직을 혼입시킨 전극들에서도 쉽게 볼 수 있는데,<sup>11</sup> 그 이유는 다음과 같다. 우선 과산화수소의 분해 반응이 여러 단계 반응일 수 있으며, HRP가 그 중 어느 특정 단계에만 관여할 수 있다. HRP는 두 동위효소로 구성되어있음이 이미 확인되었다.<sup>12</sup> 이 효소들이 각각 다른 속도로 과산화

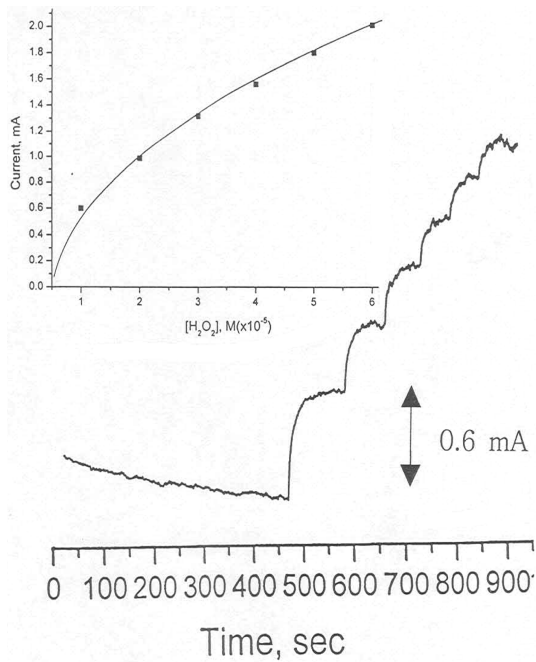


Fig. 3. Change of the amperogram with successive additions of 0.10 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ L to 10 mL supporting electrolyte solution. pH, 8.83; applied potential, -0.20 V. Inset: resulting calibration plot.

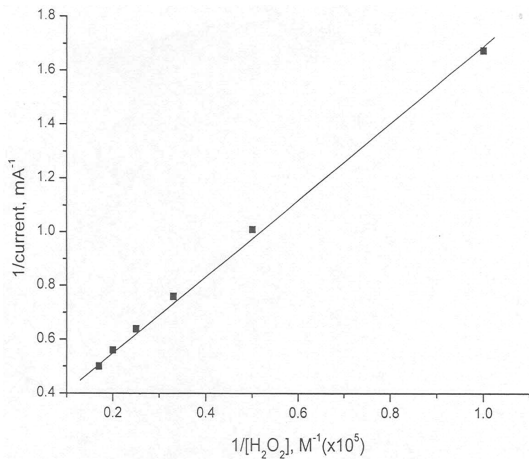


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of the same data as in Fig. 3.

수소 분해 반응에 참여할 가능성도 한 이유가 될 수 있다. 그리고 전극 표면의 활성자리가 제한되어 있으므로 쉽게 포화될 수 있으며, 반응 중간체가 전극표면에 흡착되어 기질의 접근을 효과적으로 방해할 가능성이 있다. 농도와 반응속도의 양역수 도시인 Lineweaver-Burk 도시가 직선을 보이면 이는 촉매에 의하여 반응속도가 조절됨을 뜻한다. Fig. 4는 Fig. 3의 창에 주어

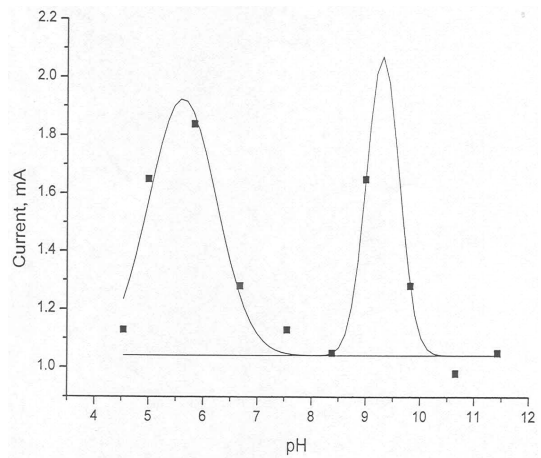


Fig. 5. pH-dependence and computer deconvolution of the signal at -0.200 V vs. Ag/AgCl. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], 1.5 $\times$ 10<sup>-3</sup> M.

진 데이터를 이용하여 얻은 것인데, 좋은 직선성을 보여주고 있다. 이는 BR에 의한 효소의 고정이 성공적으로 이루어져 그것의 기능이 정상적으로 발휘되고 있음을 보여주는 것이다. 이 때 얻어진  $i_{max}$ 와  $K_M$ 은 각각 3.45 mA와 4.38 이었다. 효소의 활성자리는 아미노 및 카르복시 말단이 입체적으로 구성된 것으로 용액 중에서 H<sup>+</sup>의 탈착은 그 구조를 변형시킬 수 있어 효소의 촉매력에 변화를 가져온다. Fig. 5는 전해질 용액의 산성도에 따라 신호의 크기가 변하는 것을 보여주고 있는데, 두 곳에서 봉우리를 보여주고 있다. 이는 이미 발표된 결과와 일치하는 것으로 두 종류의 동위효소가 존재함을 말하여 주고 있다. 과산화수소의 환원함수가 가우스분포일 것이며, Fig. 5가 보여주는 결과가 두 동위효소의 공동 기여일 것이라는 가정 하에 Origin 7을 이용하여 분해한 결과가 실선으로 표시되어 있다. 여기에서 얻어진 두 pH 극대값은 5.66과 9.33 으로 고무의 종류에 따라 다소 차이를 보인다.<sup>13</sup> Fig. 6은 기사용 중인 전극의 검출한계를 확인하기 위하여 10 mL의 전해질에 0.1 M 기질용액 14  $\mu$ L를 추가했을 때 얻어진 amperogram이다. 여기서 얻어진 검출한계는 1.4 $\times$ 10<sup>-4</sup> M이다. 이 값은 HRP를 사용하여 얻은 Diaz<sup>14</sup>의 6.7 $\times$ 10<sup>-4</sup> M과 크게 차이를 보이지 않으나, Miao<sup>15</sup>의 3.0 $\times$ 10<sup>-6</sup> M과는 다소 차이를 보인다. 신호의 크기에 영향을 주는 요인은 용액의 pH, 매개체 및 결합체의 종류, 온도 그리고 전극의 효소 함량 등 여러 가지가 있다. 최대 신호를 얻기 위하여 이들이 최적화된다면, 검출한계는 보다 향상될 것이다. 효소전극의 감도는 제작 후 시간 경과에 따라 감소하는

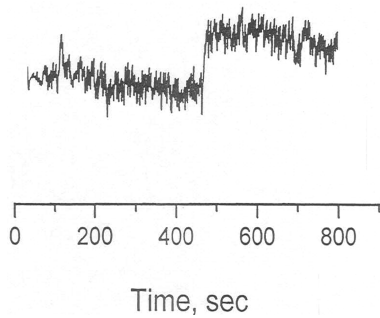


Fig. 6. Detection limit of the biosensor used in this work.  $[H_2O_2]$ ,  $1.4 \times 10^{-4}$  M; pH, 8.33; applied potential, -0.40 V vs. Ag/AgCl.

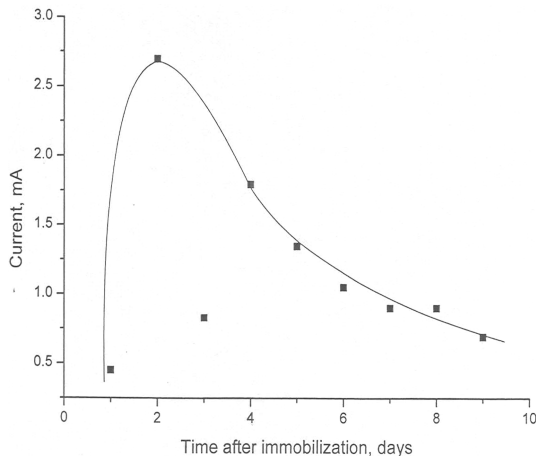


Fig. 7. Working stability of the biosensor stored at 4°C in the dark between measurements. 100  $\mu$ L of 1.0 M  $H_2O_2$  was added in 0.1 M NaCl 10 mL at -0.20 V.

것이 일반적이다. Fig. 7은 공기 중에 노출시켜 보관한 전극이 제작 후 시간 경과에 따라 감도가 변하는 것을 보여주고 있다. 단백질의 구조 변형에 필요한 에너지는 15~60 kJ/mol로 대단히 작아서 실온에서도 변성이 가능하다. cystine 이황화물 교차결합은 공기 중의 환원성 물질에 의하여 분해될 수 있으며, cysteine 잔기에 공기 중의 산소나 기질로 사용된 과산화수소가 산화제로 작용한다면 새로운 cystine을 형성할 수도 있다. 만약 미생물의 protease가 전극 표면에서 활성을 갖는다면 효소 단백질을 분해하여 활성자리의 구조가 변형될 수 있다. 이와 같은 요인들은 효소전극을 공기 중에 노출시켜 보관할 경우 효소의 변성을 가져와 전극의 감응능력을 약화시키는 요인이 된다. 그러나 Fig. 7은 예상된 경향성과 다른 것을 보여주고 있다. 시간 경과에 따라 감도가 증가한 영역이 그것이

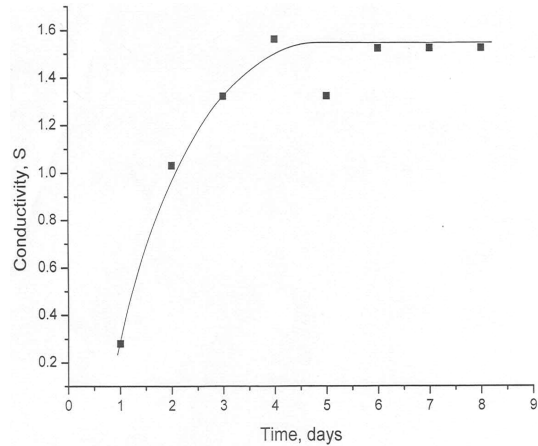


Fig. 8. Conductivity change of carbon paste with the storing time at 4°C in the dark. Carbon-paste: carbon powder, 50.5%; ferrocene, 5.0%; butadiene rubber, 2.86%; toluene, 42.2%.

다. 전극은 고무를 용해하기 위하여 사용된 휘발성이 심한 용제, 톨루엔을 포함하고 있어 사용 중이거나 공기 중에 노출될 경우 톨루엔이 전극 표면에서 유출되는 것은 필수적이다. Fig. 8은 전극 물질의 전도도 변화를 Fig. 7과 같은 조건에서 관찰한 것이다. 전도도는 제작 3일 후 최대치에 도달하는 것을 볼 수 있는데, 이 시점을 톨루엔의 유출이 완성되는 시점으로 보아도 무방할 것이다. 또 이 시점에서 전극 물질은 상당한 수축을 보이는데, 이는 유기용매가 차지하던 공간이 제거된 현상으로 볼 수 있다. 따라서 Fig. 7의 증가현상은 용매 유출에 의한 전극의 전도도 증가에 기인한 것이며, 실제적인 감도 증가로 볼 수 없다. 따라서 효소전극의 보관 방법은 대단히 중요하다.

#### 4. 결 론

바이오센서가 실용화되기 위하여 결합제가 가져야 할 필요조건은 기계적 안정성, 상용성, 전도성, 내마모성 그리고 화학적 안정성 등이다. BR을 결합제로 사용하여 만든 과산화수소 정량 바이오센서는 위 조건들을 고루 갖추고 있었다. 특히 전극이 보여주는 Lineweaver-Burk 도식의 직선성은 BR이 효소의 특이성과 촉매력이 전극 물질 내에서 정상적으로 유지되도록 HRP를 고정하고 있음을 보여 주었다. 또 고무를 결합제로 사용함으로써 실리콘 오일이 갖지 못했던 탄소전극의 기계적 안정성을 확보하게 되었다. 이것은 탄소전극의 결합제를 고무로 대체할 수 있는 가능성

을 얻 것이다. 그러나 효소전극 실용화의 또 다른 중요 조건인 감도의 지속성은 다른 경우와 마찬가지로 불만족스런 결과를 보였으므로 이에 대한 심층적 연구가 요구된다.

### 참고문헌

1. E. Crouch, D. C. Cowell, S. Hoskins, R. W. Pittson and J. P. Hart, *Anal. Biochem.*, **347**, 17-23(2005).
2. Y. Yang, M. Yang, H. Wang, J. Jiang, G. Shen and R. Yu, *Sens. Actuators B*, **102**, 162-168(2004).
3. I. R. W. Zwirtes de Oliveira and I. C. Vieira, *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 449-456(2006).
4. N. Irving Sax, "Hawley's Condensed Chemical Dictionary", 618, Van Nostrand Reinhold, New York, U. S. A., 1987.
5. H. S. Kwon, I. K. Park, K. J. Yoon and M. L. Seo, *J. Kor. Chem. Soc.*, **44**, 376-379(2000).
6. (b) K. J. Yoon, H. S. Kwon and B. G. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, **49**, 325-328(2005).
7. K. J. Yoon, *Anal. Sci. Technol.*, **16**, 504-508(2003).
8. J. A. Brydson, "Rubbery Materials and Their Compounds", 149, Elsevier Applied Science, London and New York, England, 1988.
9. K. J. Yoon, *J. Kor. Chem Soc.*, **48**(6), 654-658(2004).
10. B. Wang and S. Dong, *J. Electroanal. Chem.* **487**, 45-50(2000).
11. (a) S. Gáspár, X. Wang, H. Suzuki and E. Csregi, *Anal. Chim. Acta*, **525**, 75-82(2004). (b) M. E. Ghica and C. M. A. Brett, *Anal. Chim. Acta*, **532**, 145-151(2005).
12. K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.* **25**, 7, 997-1002(2004).
13. S. Y. Choi, K. J. Yoon, *Elastomer*, accepted(2006).
14. A. N. Díaz, M. C. R. Peinado and M. C. T. Minguez, *Anal. Chim. Acta*, **363**, 221-227(1998).
15. Y. Miao and S. N. Tan, *Anal. Chim. Acta*, **437**, 87-93(2001).