

N-히드록시숙신이미드로 수식한 탄소반죽전극을 이용한 도파민의 전기화학적 측정

유재현 · 우병욱 · 김순신 · 엄정희 · 남학현 · 차근식[†]

광운대학교 화학과

(2001년 5월 7일 접수: 2001년 6월 4일 채택)

Voltammetric Determination of Dopamine with the N-Hydroxysuccinimide Modified Carbon Paste Electrode

Jae Hyun Yoo, Byung Wook Woo, Soon Shin Kim, Jung Hee Uhm, Hakhyun Nam and Geun Sig Cha[†]

Chemical Sensor Research Group, Department of Chemistry, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea

(Received May 7, 2001 : Accepted June 4, 2001)

초 록

활성화된 탄소반죽전극 표면을 N-히드록시숙신이미드(NHS) 층으로 수식한 후, 이 전극을 이용하여 square-wave voltammetry 방법으로 과량의 아스코빅산 존재 하에서 도파민을 측정하였다. 수식된 전극의 특성은 도파민과 아스코빅산 혼합용액에서 순환전압전류법을 이용하여 조사하였다. 도파민과 아스코빅산의 산화 피크의 분리는 시료용액의 pH 에 큰 영향을 받았으며, pH 4.0에서 최대의 피크분리(172 mV)를 보였다. 따라서 도파민을 정량하기 위한 square-wave voltammetry는 140 mM NaCl을 포함하는 100 mM phosphate buffered saline (PBS)의 pH 4.0 조건에서 수행하였다. NHS로 수식된 전극은 0.2 mM 아스코빅 산의 존재 하에서 도파민의 농도 $5.0 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ 까지 검출한계와 감응기울기 $6.1 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ 의 감도를 나타내었다. 반면 수식되지 않은 전극은 1.0 μM 의 검출한계와 $0.93 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ 기울기를 나타내어 표면에 수식된 N-히드록시숙신이미드가 도파민의 감응을 촉진함을 보여주었다.

Abstract : An activated carbon paste electrode was modified with the N-Hydroxysuccinimide(NHS) layer and applied to determine the dopamine in the presence of an excess ascorbic acid using square-wave voltammetry. The electrochemical properties of the modified electrode were examined in the solution containing dopamine/ascorbic acid using cyclic voltammetry(CV): the separation between the oxidation peaks of dopamine and ascorbic acid was largely dependent on the pH of the sample solution and became maximum at pH 4.0. Hence, the square-wave voltammetric determination of dopamine was carried out in a pH 4.0, 100 mM phosphate buffer saline(PBS) containing 140 mM NaCl. The detection limit and response slope were improved from 1.0 μM to $5.0 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ and from $0.93 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ to $6.1 \mu\text{A}/\mu\text{M}$, respectively, upon modification of the electrode surface by NHS.

Key words : Screen-printed carbon paste electrode, Dopamine, N-Hydroxysuccinimide, Square-wave voltammetry

1. 서 론

최근 일회용 센서를 이용하여 환자가 있는 곳에서 바로 질병의 지표물질들을 분석하여 검진에 사용하거나, 산업현장에서 시료를 실험실로 이송하지 않고 직접 측정하는 방법들에 관한 관심이 증대되고 있다.¹⁾ 일회용 센서로서는 경제성, 대량생산성, 재현성, 정확성, 소형화 및 사용의 편리성의 요건을 만족시키기 위해 적합한 것으로 세라믹 또는 플라스틱 기판 등에 스크린프린팅한 전극을 이용하여 전기화학적 방법을 사용하는 것이 유리한 것으로 보고되고 있다. 실제로 스크린프린팅형 전기화학적

센서들은 혈액 중의 당뇨, 콜레스테롤, 젖산 등의 양을 측정하는데 널리 쓰이고 있으며, 상업적으로도 대단히 큰 시장을 형성하고 있다.²⁾ 따라서 스크린프린팅형 전극의 전극재질에 따른 전기화학적 성질, 표면수식법, 전처리법 및 센서감응막층의 도입법 등에 관한 연구는 기초전기화학적 측면에서 그리고 산업적 측면에서 대단히 중요한 문제이다.³⁻⁵⁾

본 연구에서는 플라스틱 기판에 스크린프린팅한 탄소반죽 전극의 표면을 처리하는 새로운 방법을 보고한다. 탄소반죽 전극은 다양한 종류의 재질을 쉽게 상업적으로 구할 수 있고, 다루기가 편하며, 센서감응막 층의 도입이 용이하고 전기화학적 전위창(potential window)이 넓어 바이오센서의 제작에 널리 사용된다. 특히 탄소반죽 전극의 표면은 산소를 포함하는 기능기들(예:

[†]E-mail: gscha@daisy.kwangwoon.ac.kr

카르복실기, 퀴논 등)이 있어 표면의 수식이 비교적 용이하다.⁶⁾ 본 연구에서는 탄소반죽 전극의 표면을 N-Hydroxysuccinimide (NHS)로 수식한 후, 이 전극이 나타내는 특성을 살펴보았으며, 과량의 아스코빅산이 존재하는 시료에서 도파민의 정량에 응용하여 보았다.

도파민은 뇌 신경전달 물질로 임상학적으로 중요성이 크기 때문에 그 측정방법에 관한 연구가 활발하게 진행되었다. 그 중 전기화학적 방법은 신속하고 조작이 간편하며 높은 감도 등의 장점을 가지고 있어 특히 큰 관심을 끌었다.⁷⁻⁹⁾ 반면 전기화학적 정량법에서는 아스코빅산과 같이 산화전위가 도파민과 근접하고 그 존재량은 도파민의 100배 이상인 물질들의 방해로 받아 부정확해지기 쉬우므로 이러한 방해작용을 줄이기 위한 노력이 필요하다.¹⁰⁻¹²⁾ 현재까지 시도된 방법 중 몇 가지 예를 들면 polyphenol oxidase와 mediator를 전극 위에 고정화하여 일정한 전위를 일정시간 동안 걸어주어 측정하는 방법,^{14,15)} 전극 위에 thiocetic acid를 self-assembled monolayer하여 전극을 수식하는 방법,¹⁶⁾ 그리고 glassy carbon 전극위에 음이온을 띄는 polymer(예: polycarbazole, Nafion, poly malachite green)를 수식하여 사용하는 방법^{17,18)} 등이 사용되었다. 본 연구에서 NHS로 수식한 탄소반죽 전극을 이용하여 square-wave voltammetry의 방법으로 측정하였으며, 측정시간의 단축과 보다 효과적으로 방해물질인 아스코빅산의 영향을 제거할 수 있는 가능성을 보였다.

2. 실험

2.1. 시약

본 실험에서 사용한 ascorbic acid(AA)와 N-Hydroxysuccinimide (NHS)는 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A), 3-hydroxytyramine hydrochloride(dopamine; DA)는 Aldrich사(Milwaukee, U.S.A)의 제품을 사용하였다. 스트립 전극제작용 탄소반죽(TU-15ST)과 은반죽(LS-506J)은 Asahi사(Tokyo, Japan)의 제품을, 절연막 반죽(insulator paste; SCR-505G) 및 경화제는 (주)서울화학연구소(Seoul, Korea)의 제품을 각각 사용하였다. 이외의 표준용액이나 완충용액 등은 특급이나 분석시약등급의 시약들을 그대로 사용하였으며, 용액의 제조에는 탈이온수(18 M Ω ·cm)를 사용하였다.

2.2. 장치 및 전기화학실험

탄소반죽 전극은 반자동 스크린프린터(MSP 150S, 미농상사)를 사용하여 polyester 필름(한국 3M)위에 제작하였다. 사각파 전류법(square-wave voltammetry: SWV), 순환전류법(cyclic voltammetry: CV) 등의 전기화학 실험은 EG&G PAR 273A Potentiostat/Galvanostat(Princeton, NJ, U.S.A) 장치를 사용하여 수행하였고, 임피던스측정은 EG&G PAR 273A와 model 5210 lock-in-amplifier(Princeton, NJ, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 사각파실험에서 사용한 주파수는 100 Hz이며, 사각파의 진폭은 70 mV로 하여 사용하였다. 전극은 자체 제작한 셀에서 Au plate를 상대전극으로 사용하고 Ag/AgCl 전극을 기준전극으로 하여 포화 탄산나트륨 용액에서 전처리 한 후 사용하였다.

2.3. 일회용 탄소반죽 전극의 제작

전극제작을 위한 스크린프린팅 과정은 3단계로 진행된다. 첫 단계로는 PE필름 위에 전기적 연결부를 은반죽으로 프린팅 한 후 140°C에서 5분 동안 경화시켰다. 두 번째 단계로 은전극 위

에 탄소반죽을 사용하여 작동전극을 프린팅 한 후 140°C에서 15분 동안 경화시켰다. 작업전극의 크기는 2×2 mm²인 정사각형으로 제작되었다. 마지막 단계로는 전극 자리와 전기적 연결부 자리를 제외하고 절연막으로 모두 프린팅 한 후 140°C에서 5분 동안 경화시켰다. 노출된 Ag 전극의 표면은 0.3 M FeCl₃ 용액에서 10분간 산화시켜 Ag/AgCl 기준전극이 되도록 제작하였다. 제작된 Ag/AgCl 기준전극은 탈이온수로 세척한 후, 3 M KCl 용액에 30분간 안정화시킨 후 사용하였다. 제작된 탄소반죽 전극은 포화된 Na₂CO₃ 용액에서 1.2 V vs. Ag/AgCl의 전압을 가하여 5분 동안 산화시켜 활성화하였다. 활성화된 탄소반죽 전극 위에 NHS 수용액 15 μ l를 가한 후 건조하여 탄소반죽전극의 표면을 수식하였다. 표준용액 제조 및 탄소반죽 전극의 감응특성은 140 mM NaCl을 포함하는 100 mM phosphate buffered saline(PBS), pH 4.0 용액을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

탄소반죽 전극은 가격이 싸며, 낮은 바탕 전류값을 가질 뿐만 아니라, 넓은 전위창을 가지는 장점이 있지만 산화-환원 반응의 전자전달 속도가 탄소반죽의 종류에 따라 큰 차이를 나타내며, 비가역적일 때가 많다.⁴⁾ 이러한 문제점을 개선하기 위하여 본 연구에서 사용한 탄소반죽(Asahi사 TU-15ST)전극은 표면을 포화된 Na₂CO₃ 용액에서 산화 전처리 하여 사용하였다. 탄소반죽 전극의 산화전처리 방법과 효과에 대하여는 저자들의 다른 논문에서 상세히 다루고 있다.¹³⁾ 탄소반죽 전극의 활성화 후 1 mM [Fe(CN)₆]³⁻에 대한 CV를 측정한 결과는 E_{pa} = 274 mV, E_{pc} = 213 mV, ΔE_p = 61 mV, i_{pa}/i_{pc} = 0.97로 나타났다. 또한 10 mM [Fe(CN)₆]^{4-/3-} 용액에서 전극의 임피던스를 측정하고 그 결과를 이용하여 계산한 전극의 반응속도상수는 1.1×10⁻² cm/s, 커패시턴스는 29.7 μ F/cm²로 나타났다.

탄소반죽 전극은 활성화 과정을 통해 표면의 카르복실 작용기 양이 증가한다.⁶⁾ 전극 표면에 NHS 용액을 첨가하면 NHS는 카르복실 작용기들과 강한 친핵성 반응으로 NHS 수식층을 형성하게되며, NHS로 수식된 층은 도파민과 같이 아민기가 있는

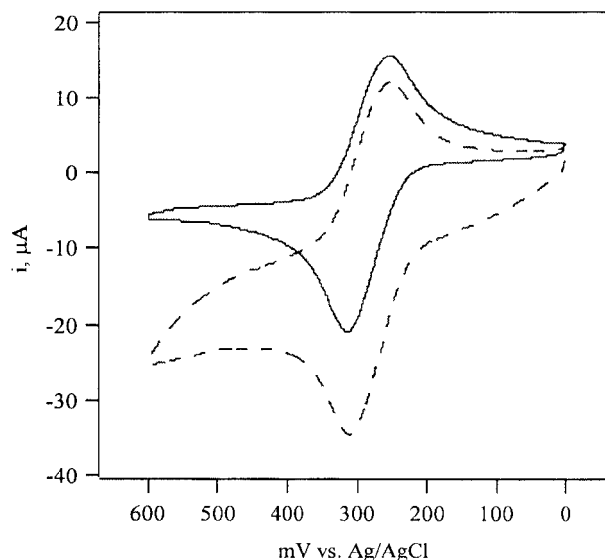


Fig. 1. Cyclic voltammograms for 5 mM dopamine using the unmodified (—) and NHS-modified carbon paste electrode (---): scan rate 100 mV/s in a 0.1 M pH 4.0 PBS with 140 mM NaCl.

화합물에 대하여 좋은 이탈기가 되므로 전극표면에 도파민의 농도를 진하게 하는 효과를 가져올 것으로 예상된다. Fig. 1은 탄소반죽 전극과 NHS로 수식된 탄소반죽전극의 도파민에 대한 CV이다. NHS로 수식된 전극에서 도파민의 산화 전류의 양은 약 20% 증가하였고, 충전전류 또한 증가하였다. 이 결과는 NHS 수식의 효과에 대한 예측이 적용되고 있음을 보여주는 것이다.

아스코빅산은 도파민과 산화전위가 비슷하고 임상시료 중 도파민보다 과량으로 존재하는 물질이다. 예를 들어 인체 내에서의 도파민은 $0.01\text{--}1\text{ }\mu\text{M}$ 범위, 아스코빅산은 $110\text{ }\mu\text{M}$ 가량 존재한다. 따라서 NHS로 수식된 전극으로 도파민을 정량할 때 아스코빅산의 방해로 적게 받을 수 있는 조건을 찾기 위하여 도파민과 아스코빅산이 1 mM 씩 포함된 PBS 용액에서 pH를 변화시키며 NHS로 수식된 전극의 CV를 기록하여 보았다. Fig. 2(a)는 pH 3.0 일 때와 7.0 일 때의 CV이며, Fig. 2(b)는 도파민과 아스코빅산 산화 피크(E_{pa})들의 전위 값을 pH의 함수로 그린 것이다. 도파민의 산화피크 전위는 pH가 증가함에 따라

53 mV/pH 씩 감소하였다. 반면 아스코빅산의 산화피크는 pH 4.0 이상에서는 거의 변화가 없었다. 그러므로 도파민과 아스코빅산의 산화피크 차이가 가장 크게 벌어질 때는 pH 4.0의 조건이 유지될 때이다. 이러한 이유로 도파민을 정량하기 위한 사각파전류법 실험은 pH 4.0의 조건에서 실행하였다.

Fig. 3은 아스코빅산이 0.2 mM 포함된 용액에서 도파민의 양을 $0\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$ 의 범위에서 변화시켰을 때 얻은 사각파전류법 실험의 결과이다. Fig. 3(a)는 NHS로 수식된 전극에서 얻은 결과이고, Fig. 3(b)는 수식되지 않은 전극에서 얻은 결과이다. 수식되지 않은 전극에서는 도파민에 대한 감응의 크기 및 감응기울기($0.93\text{ }\mu\text{A}/\mu\text{M}$)가 작을 뿐만 아니라 아스코빅산에 대한 감응이 크기 때문에 $1\text{ }\mu\text{M}$ 이하의 양은 검출이 어려웠다. 반면 NHS로 수식된 전극은 도파민에 대한 감응이 크게 증가하였고(감응기울기 = $6.1\text{ }\mu\text{A}/\mu\text{M}$) 아스코빅산의 영향도 현저히 줄어들어 $0.05\text{ }\mu\text{M}$ 의 양까지 검출이 가능하였다. Fig. 4는 Fig. 3의 결과를 검정곡선으로 그린 것이다. 탄소반죽 전극 표면을 NHS로 수식한 전극은 넓은 검출범위를 갖고 저농도의 도파민이 있는 범위에

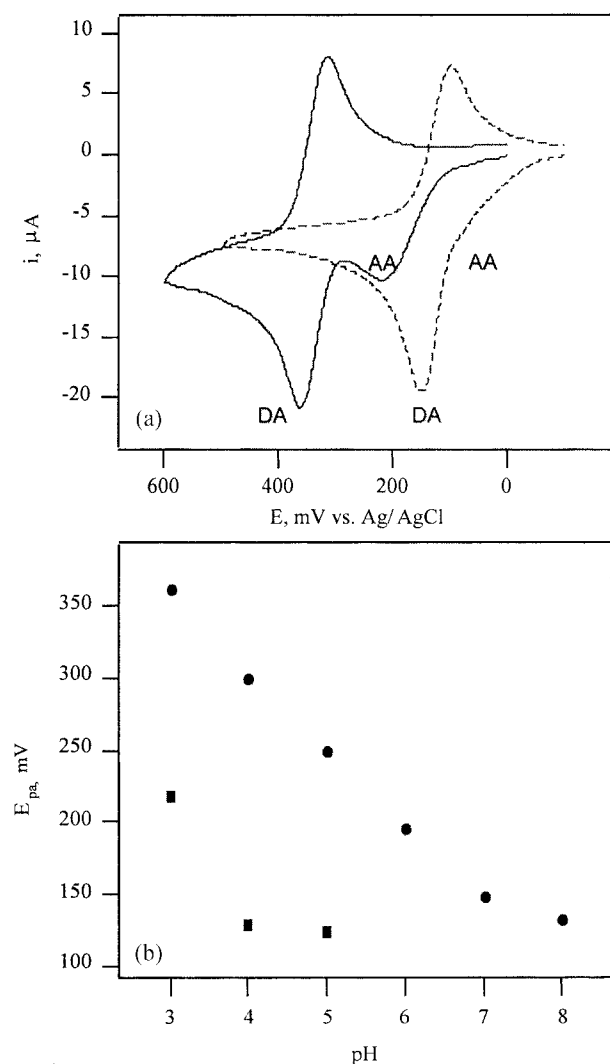


Fig. 2. The effect of pH on the E_{pa} values of dopamine and ascorbic acid: (a) CV for the 1 mM dopamine + 1 mM ascorbic solution at two different pH, 3 (—) and 7 (---); and (b) variation of the E_{pa} values as a function of pH (● dopamine ■ ascorbic acid); scan rate 50 mV/s in a 0.1 M PBS with 140 mM NaCl.

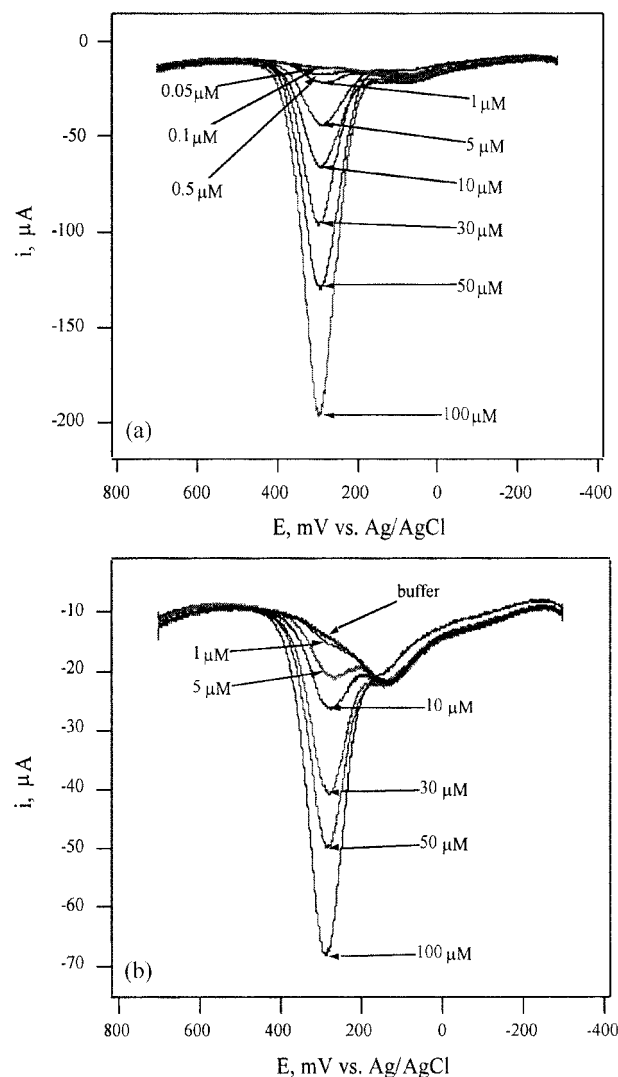


Fig. 3. Square-wave voltammograms for dopamine in the presence of 0.2 mM ascorbic acid at the (a) NHS-modified and (b) unmodified carbon paste electrodes. (amplitude : 70 mV ; frequency : 100 Hz ; buffer: 0.1 M pH 4.0 PBS with 140 mM NaCl.)

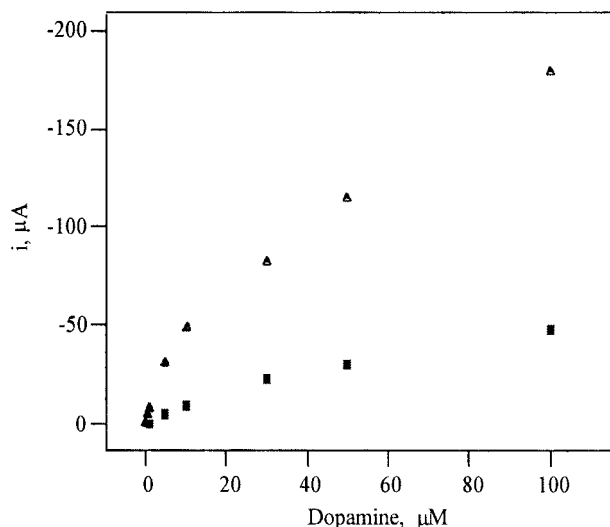


Fig. 4. Calibration plots from the square-wave voltammograms for dopamine in the presence of 0.2 mM ascorbic acid at the NHS-modified (▲) and unmodified (■) electrode.

서 특히 민감한 감응기울기를 가지고 있음을 볼 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 스크린프린팅법으로 제작된 탄소반죽 전극의 표면을 NHS로 수식한 후 전기화학적 특성을 검사하였으며, 이 전극을 이용하여 사각파전류법으로 과량의 아스코빅산이 존재하는 용액에 있는 도파민의 정량에 사용하여 보았다. NHS로 수식된 탄소반죽 전극은 도파민에 대한 감응도를 크게 높여 검출 한계를 20배 이상 낮추었고, 감응기울기도 6배 이상 크게 증가시켰다.

감사의 글

본 연구는 광운대학교 2000년도 학술연구비에 의해 진행되었

으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. E. Jungreis, "Spot Test Analysis; Clinical, Environmental, Forensic and Geochemical Applications", John Wiley & Sons, New York (1997).
2. T. P. Henning and D. D. Cunningham, "Commercial Biosensors; Applications to Clinical, Bioprocess, and Environmental Samples", G. Ramsay, ed., John Wiley & Sons, New York, **148**, 4 (1998).
3. J. Wang, G. Rivas, and M. Chicharro, *Electroanalysis*, **8**, 434 (1996).
4. J. Wang, B. Tian, V. B. Nascimento, and L. Angnes, *Electrochim. Acta*, **43**, 3459 (1998).
5. J. Wang, M. Pedrero, H. Sakslund, O. Hammerich, and J. Pingarron, *Analyst*, **121**, 345 (1996).
6. R. L. McCreery, "Electroanalytical Chemistry", A. J. Bard, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, **17**, 255 (1991).
7. C. Petit, A. Gonzalez-Cortes, and J.-M. Kauffman, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **41**, 101 (1996).
8. J. A. Stamford and J. B. Justice, *Anal. Chem.*, **69**, 359A (1996).
9. P. Capella, B. Ghasemzadeh, K. Michell, and R. N. Adams, *Electroanalysis*, **2**, 175 (1990).
10. H. B. Mark, Jr., N. Atta, Y. L. Ma, K. L. Petticrew, H. Zimmer, Y. Shi, S. K. Lunsford, J. F. Rubinson, and A. Gulal, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **38**, 229 (1995).
11. R. J. Whitley, A. W. Meikle, and N. B. Watts, "Tietz Textbook of Clinical Chemistry", C. A. Burtis and E. R. Ashwood, Eds., W. B. Saunders, Philadelphia, **2**, 1747 (1986).
12. P. B. Kacode and K. S. V. Santhanam, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **38**, 405 (1995).
13. G. Cui, J. H. Yoo, J. S. Lee, J. Yoo, J. H. Uhm, G. S. Cha, and H. Nam, *Analyst*, in press (2001).
14. E. S. Forzani, G. A. Rivas, V. M. Solis, *J. Electroanal. Chem.*, **435**, 77 (1997).
15. E. S. Forzani, G. A. Rivas, V. M. Solis, *J. Electroanal. Chem.*, **461**, 174 (1999).
16. A. Dalmia, C. C. Liu, R. F. Savinell, *J. Electroanal. Chem.*, **430**, 205 (1997).
17. C. Fang, X. Tang, X. Zhou, *Anal. Sciences*, **15**, 41 (1999).
18. J.-M. Zen and I.-L. Chen, *Electroanalysis*, **9**, 537 (1997).