

유기 용매 속에서 L-Ascorbic Acid의 정량을 위한 바이오센서

권호식[†] · 이철규^{*}

충북대학교 사범대학 과학교육과

*청주대학교 이공대학 환경공학과

(1993. 11. 8. 접수)

Tissue-Based Amperometric Biosensor for Determination of L-Ascorbic Acid in Organic Media

Hyo-Shik Kwon[†], Cheal-Gyu Lee^{*}

Department of Science Education, College of Education, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

*Department of Environmental Engineering, Chongju University, Cheongju 360-764, Korea

(Received Nov. 8, 1993)

요약: Squash-조직을 graphite rod disk 전극에 고정하여 메탄올 용매 속에서 L-ascorbic acid(AA)를 정량할 수 있는 전류법 바이오센서를 만들었다. 전극의 검출한계는 2×10^{-6} M이었다. 순수한 ascorbate oxidase(AO)를 고정시켜 만든 전극에 비해 식물 조직에 들어 있는 효소로 만든 이 전극은 생촉매의 활성도가 높고 안정성이 좋았으며(1주간) 대단히 값싸게 만들 수 있었다.

Abstract: An amperometric sensor for L-ascorbic acid(AA) in methanol media has been made by immobilizing squash-tissues on a graphite rod disk. A detection limit of the electrode was 2×10^{-6} M L-ascorbic acid. In comparison with an isolated enzyme based ascorbate oxidase(AO) electrode, the plant-tissue electrode offered high biocatalytic stability and activity and extremely low cost. The electrode had a useful lifetime of 1 week.

Key words: Amperometric Biosensor, L-Ascorbic Acid(AA), Ascorbate oxidase(AO), Squash, Graphite rod disk

1. 서 론

Clark 등¹이 생물체를 전극에 접합시킨 최초의 효소 전극을 발표한 이래로 바이오센서에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 생체물질을 이용하는 바이오센서는 효소의 촉매작용으로 선택성과 감도가 좋아서 분자성 물질을 값싸고 빠르게 정량할 수 있는 장점이 있다.²⁻⁹ 전기화학 바이오센서(electrochemical biosensors)에 의한 정량은 사용하는 생물 요소와 전기화

학적 변환 장치에 따라 여러 가지로 나뉘어지고 있다. Kuriyama와 Rechnitz¹⁰는 전위차법에 의한 막전극으로 glutamate를 선택적으로 정량하는 방법을 보고하였으며, Sato 등¹¹은 parsley 잎을 촉매물질로 사용하여 amino acid와 urea를 선택적으로 정량하였다. Arnold 등¹²은 jack bean meal의 식물조직에 들어 있는 urease를 이용하여 urea를 정량하였다. Ihn 등은 미생물, 즉 박테리아를 암모니아 전극 또는 이산화탄소 전극에 고정한 센서를 사용하여 cytosine¹³, urea¹⁴,

sucros¹⁵, cytidine¹⁶을 정량하였으며 장미의 조직을 이용하여 글루타민¹⁷을 정량하였다. 전류법 바이오센서로 정량한 예로는 Schubert 등¹⁸이 사탕무우를 이용하여 tyrosine을 정량하였으며 Wang 등¹⁹은 banana의 조직과 흑연가루 및 Nujol oil을 혼합한 탄소 반죽 전극을 만들어 dopamine을 정량하였다. Navaratne 등²⁰은 eggplant의 조직을 이용하여 catechol을 정량하였다. Budantsev²¹는 쥐의 간 조직에 있는 monoamine oxidase를 전극에 고정된 바이오센서로 catecholamine을 정량하였으며, Hale 등²²은 산화-환원 폴리머와 매개체 (mediator)에 의한 전자이동을 바탕으로 한 glucose 바이오센서를 만들었다. 그러나 현재 바이오센서에 관한 연구는 수용액에 용해하여 생체요소와 상호작용하는 분석물에만 집중되고 있다. 관습적으로 생물학적인 상호작용을 하는 용매로서 물만을 사용하므로(다른 용매는 생체촉매를 변성시킨다는 생각 때문에) 이제까지는 물에 용해하는 화학물질들만 생체분석 (bioanalysis)에 이용되고 있다. 이와 같은 고정관념에 반하는 증거로서 생체촉매가 초임계유체²³나 유기용매²⁴⁻²⁶와 같은 환경하에서도 작용할 수 있다는 보고가 있었다.

일반적으로 유기용매에서 작용하는 식물조직 전극은 효소가 유기용매에 용해하지 않으므로 효소-조직을 간편하고, 쉽게 전극에 고정할 수 있으며 투석막을 사용하지 않아도 되며 반응물이 직접 전극과 접촉하므로 신호가 빨리 나타난다.²⁷ 본 연구에서는 squash의 조직을 흑연 막대 전극에 고정하여 바이오센서를 제조하고, 이 센서를 이용하여 아직까지 보고된 바 없는 메탄올 용매 속에서 AA를 정량하는 예를 보고하고자 한다.

II. 실험

1. 기기 및 과정

전류법 실험은 10ml의 작업부피를 갖는 BAS Model VC-2 Voltammetric Cell을 사용하였다. 이 Cell에 Teflon 마개를 달은 다음 작업 전극, 기준 전극[Ag/AgCl (3M NaCl), Model Re-1 BAS] 및 백금 보조전극을 마개의 구멍에 고정하고 각 전극을 voltammetric analyzer(EG & G PAR Model 264A, Princeton, NJ)에 연결하였다. 기록계는 Houston Omniscrite Strip-Chart Recorder를 사용하였다. 전류법 측정 동안 반응용액은 300rpm으로 저어 주었다. 식물조직-흑연

원판 전극은 다음과 같은 방법으로 만들었다. 6-mm 지름의 흑연 막대 원판(U50-2, Ultra Carbon Co.)의 표면을 silicone carbide paper(150 grit)로 문질러 표면을 거칠게 만들었다. 그 다음 squash의 조직이 전극의 표면에 달라 붙도록 약 2분간 일정한 속도로 문질렀다. 전극 주위에 붙은 식물조직은 부드러운 종이로 모두 제거한 후 약 20분간 건조시켰다. 또한 순수한 효소전극은 10 μ L의 인산염 완충용액(pH 7.4)에 0.5mg의 ascorbate oxidase를 용해시킨 다음 이것을 흑연 원판의 표면에 가한 후 약 20분간 건조시켰다. 일정량의 시료를 취하기 위한 micropipet은 독일산(Eppendorf)을 사용하였다. 모든 실험은 실온에서 측정하였다.

2. 시약

Ascorbic acid, glucose, dopamine, catechol, p-cresol, phenol 및 p-aminophenol, p-chlorophenol, glutathione은 Aldrich사의 시약을, 메탄올은 Fluka사의 것을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. Ascorbate oxidase(EC 1.10.3.3., 1500 units per mg)는 Sigma사의 것을 사용하였다. 실험은 지지 전해질인 0.10M tetraethylammonium p-toluenesulfonate (TEATS, Aldrich)의 메탄올 용액에서 하였다. 이 실험에서 사용한 squash는 시장에서 구입하였으며 사용하지 않을 때에는 5 $^{\circ}$ C로 유지된 냉장고에 보관하였다. AA의 표준용액(1.0 \times 10⁻²M)은 매일 새로 만들어 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

Fig. 1은 AA에 대한 전극의 감응을 나타낸 것이다. a는 식물-조직을 고정하지 않은 전극에 대한 것이며, b는 식물-조직을 고정시킨 전극에 대하여 기질의 농도를 증가시켰을 때 얻어진 전류-시간 감응을 기록한 것이다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 AA의 농도에 대한 squash-조직 센서의 전류 감응은 a에서와 같이 보통의 전극 표면에서는 기질에 대하여 전극이 감응하지 않음을 알 수 있다. 이와는 반대로 식물-조직을 고정한 전극에서는 기질 농도의 변화에 대하여 대략 9~12초 이내에 일정한 상태의 전류를 나타내어 매우 빨리 감응함을 알 수 있다. 이러한 감응속도는 chloroform 용매에서 phenol을 정량²⁶할 때와 거의 같게 나타났다.

Fig. 2는 AA에 대한 squash-조직 전극의 검정선을 나타낸 것으로, ascorbate oxidase를 사용하였을 때가

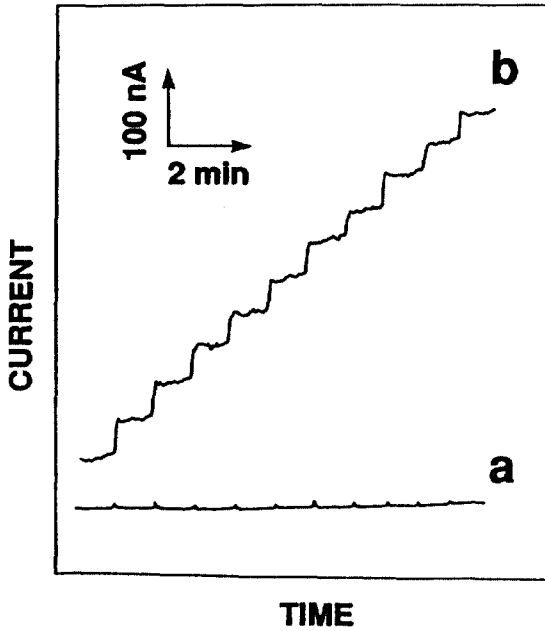


Fig. 1. Typical response curves of a biosensor at (a) the unmodified and (b) tissue-modified graphite electrodes on increasing the substrate concentration. Successive increments of 100 μL of 1.0×10^{-2} M AA. Operatig potential, +0.55V vs. Ag/AgCl electrode ; methanol solution ; electrolyte, 0.10M TEATS.

식물조직을 사용하였을 때보다 더 좋은 감응도를 나타냈다.

Fig. 2의 c와 d는 지지전해질의 농도를 각각 0.050M과 0.010M로 유지하였을 때의 ascorbic acid에 대한 전극의 감도를 나타낸 것이다. Squash-조직 전극의 표면에서 AA에 대한 감응은 7mM까지의 AA에 대해서는 좋은 직선성을 나타내었다(직선 부분의 상관계수는 0.998). 또한 AA에 대한 전극의 검출한계는 2×10^{-6} M이었다.

한편, 지지 전해질의 농도가 감소할수록 전류의 감소가 현저하게 나타났다. 따라서 메탄올 용매에서 분석할 때는 충분한 전해질을 가하여 전류의 감소를 극소화 해야 함을 알 수 있다.

전극의 재현성을 알아보기 위하여 0.010M AA 표준 용액 100 μL 를 한번 가하여 전류를 측정 한 후 반응용액을 버리고 새로운 용액으로 채운 후 같은 전극에 대하여 12시간에 걸쳐 15회의 반복 실험을 한 결과는 Fig.

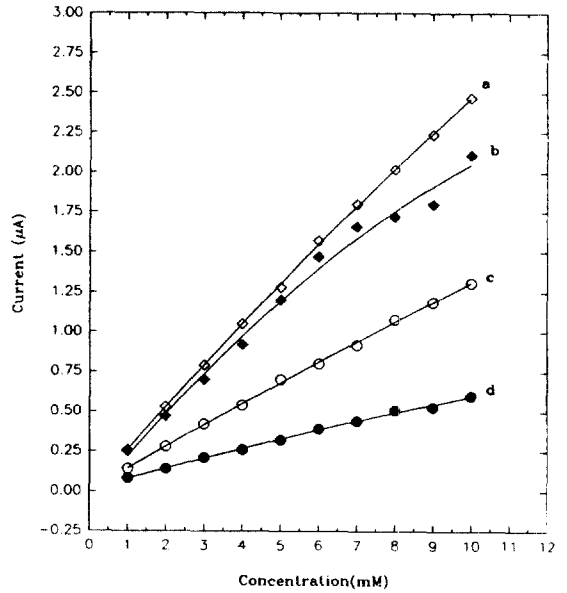


Fig. 2. Calibration plots for L-ascorbic acid in methanol at the ascorbate oxidase(a), and squash(b, c, d) electrode, using 0.10 (a, b) M, 0.050 (c) M, and 0.010 (d) M TEATS.

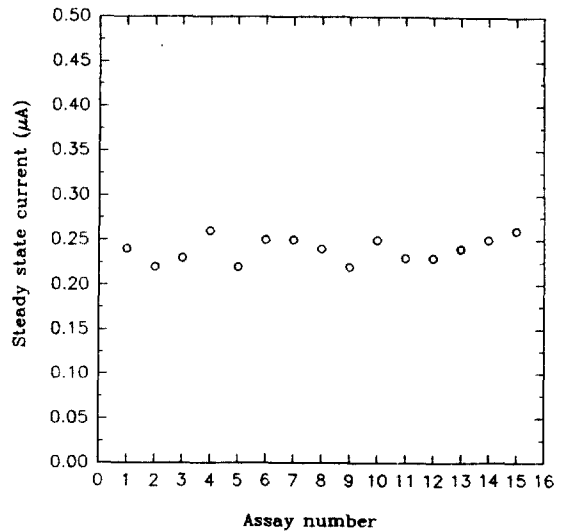


Fig. 3. Plot of electrode response to L-ascorbic acid(1mM) over replicate assays. Conditions are the same as in Fig. 1.

3에 나타내었다. 이 실험에서 표준편차는 0.026g이었고 상대 표준편차는 1.13%로 나타났다.

Squash-조직 바이오센서로서 AA를 정량할 때 이 센서의 감응에 방해물질을 하는 방해물질을 조사하였다. $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ AA의 수용액에 glucose 등의 물질을 같은 농도가 되도록 첨가하였을 때 AA에 대하여 신호대 방해물질에 대한 전류의 비를 Table 1에 나타내었다. 이 결과 dopamine, catechol, p-cresol, phenol, glutathione은 전혀 방해를 나타내지 않았으나 glucose는 AA에 대한 전류의 비가 0.18로서 약간의 방해를 하였다.

Table 1. Interferences expressed as the apparent change in L-ascorbic acid concentration(all at $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$)

Compounds	$i_p(\mu\text{A})$	$i_p(\text{int.})/i_p(\text{aa.})^a$
Ascorbic acid	0.25	1
Glucose	0.046	0.18
Dopamine	0	0
Catechol	0	0
p-Cresol	0	0
Phenol	0	0
p-Aminophenol	0	0
p-Chlorophenol	0	0
Glutathione	0	0

^a: $i_p(\text{int.})$ = steady-state current of each interferent ;
 $i_p(\text{aa.})$ = steady-state current of L-ascorbic acid

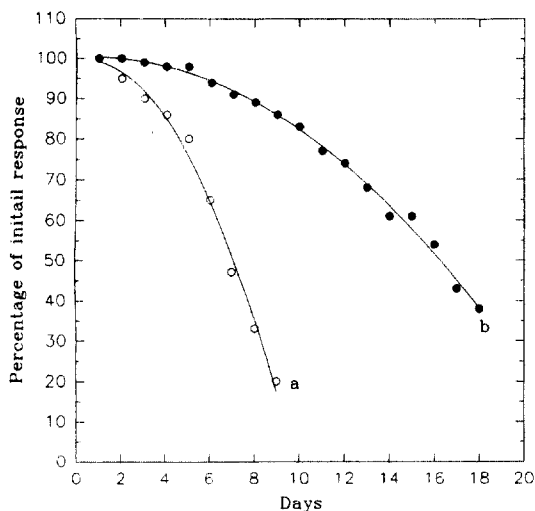


Fig. 4. Long term stability of an enzyme electrode. Conditions are the same as in Fig. 1.

본 연구에서 사용한 AA에 감응하는 바이오센서를 어느 기간까지 유용하게 사용할 수 있는지 알아보기 위하여, 18일 동안 전극의 감응을 시험하였다. 전극을 사용하지 않을 때는, 5°C에서 건조한 상태로 각각 보관한 후 전극의 감응도를 조사하였다. 실험결과는 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4의 a는 ascorbate oxidase를 사용한 것이고, b는 squash-조직을 사용한 것이다. 전극의 수명은 squash-조직을 사용한 것이 훨씬 오래 사용할 수 있었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 순수한 ascorbate oxidase를 사용한 전극은 1주일 후 전극의 신호는 처음의 30%의 감응으로 효소의 활성도가 급격히 감소하였으나 squash-조직을 사용한 전극은 1주일까지는 감응도가 거의 일정하게 나타났다.

IV. 결론

Squash의 조직을 이용한 바이오센서로 메탄올 용액에서 AA를 정량할 때의 최적 실험조건을 조사하였다. Squash-조직 바이오센서로 AA를 정량할 때 이 센서의 감응에 방해물질을 하는 방해물질을 조사한 결과 dopamine, catechol, p-cresol, phenol, glutathione 등은 전혀 방해를 나타내지 않았으나, glucose만이 약간의 방해를 하였다. 지지 전해질의 농도가 증가할수록 신호의 크기가 크게 나타났다. 또한 전극의 수명은 1주까지는 거의 일정하게 나타났다. 따라서 squash-조직 바이오센서를 이용하면 쉽고 값싸게 AA를 정량할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 충북대학교 학술재단의 지원으로 이루어졌으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

인용문헌

1. L. C. Clark Jr. and C. Lyons, *Ann. NY Acad. Sci.*, **102**, 29(1962).
2. R. K. Kobos, *Trends Anal. Chem.*, **2**, 154(1983).
3. M. A. Arnold and G. A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **25**, 1170(1980).
4. M. A. Arnold and G. A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **54**, 777(1982).
5. M. A. Arnold *Am. Lab.*, **15**(6), 34(1983).
6. S. Uchiyama and G. A. Rechnitz, *Anal. Lett.*, **20**, 451(1987).

7. L. Macholan and B. Chelikova, *Anal. Chim. Acta*, **185**, 187(1989).
8. J. Wang and M. S. Lin, *Electroanalysis*, **1**, 43(1989).
9. J. S. Sidwell and G. A. Rechnitz, *Biotechnol. Lett.*, **7**, 419(1985).
10. S. Kuriyama and G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta*, **131**, 91(1981).
11. Y. Sato, K. Chikyu and K. Kobayakawa, *Chem. Lett.*, 1305(1989).
12. M. A. Arnold and S. A. Glazier, *Biotech. Lett.*, **6**, 313(1984).
13. G. S. Ihn, B. W. Kim, M. J. Sohn and I. T. Kim, *J. Kor. Chem. Soc.*, **32**(4), 323(1988).
14. G. S. Ihn, B.W. Kim, *J. Kor. Chem. Soc.*, **32**(4), 333(1988).
15. G. S. Ihn, I. T. Kim and M. J. Sohn, *J. Kor. Soc. Anal. Sci.*, **3**(1), 67(1988).
16. G. S. Ihn, B. W. Kim and Y. G. Jeon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **34**(6), 622(1990).
17. G. S. Ihn, J. S. Kim, Y. G. Jeon and B. W. Kim, *J. Kor. Chem. Soc.*, **35**(1), 38(1988).
18. F. Schubert, U. Wollenberger and F. Scheller, *Biotechnol. Lett.*, **5**(4), 239(1983).
19. J. Wang and M. S. Lin, *Anal. Chem.*, **60**, 1545(1988).
20. A. Navaratne, M. S. Lin and G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 107(1992).
21. A. Y. Budantsev, *Anal. Chim. Acta*, **249**, 71(1991).
22. P. D. Hale, L. I. Boguslavsky, T. Inagaki, H. I. Karan, H. S. Lee and T. A. Skotheim, *Anal. Chem.*, **63**, 677(1991).
23. D. A. Hammond, M. Karel and A. M. Klibanov, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**, 393(1985).
24. A. M. Klibanov, *Chem. Tech.*, **16**, 354(1986).
25. A. Zaks and A. J. Russell, *J. Biotech.*, **8**, 259(1988).
26. J. Wang, N. Naser, H. S. Kwon and M. Y. Cho, *Anal. Chim. Acta*, **264**, 7(1992).
27. C. F. Hall, D. J. Best and A. P. F. Turner, *Anal. Chim. Acta*, **213**, 113(1988).