(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
G01N 27/416
G01N 27/48

(11) 공개번호 10-2004-0073500
(43) 공개일자 2004년08월19일

(21) 출원번호 10-2004-7009727
(22) 출원일자 2004년06월18일
번역문 제출일자 2004년06월18일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2002/013287
(87) 국제공개번호 WO 2003/054536
(86) 국제출원출원일자 2002년12월19일
(87) 국제공개일자 2003년07월03일

(30) 우선권주장 JP-P-2001-00387899 2001년12월20일 일본(JP)

(71) 출원인
유아사 마코토
일본국 사이타마켄 소카시 테시로쵸 50-134

아베 마사히코
일본국 치바켄 노다시 오토노이 58-71

타케바야시 히토시
일본국 이바라키켄 쯔쿠바시 우메조노 2쵸메 28반 37

(72) 발명자
유아사 마코토
일본국 사이타마켄 소카시 테시로쵸 50-134

아베 마사히코
일본국 치바켄 노다시 오토노이 58-71

야마구치아리토모
일본국 카나가와켄 요코하마시 아오바쿠 카츠라다이 2쵸메 12반 32고

시오자와아사코
일본국 사이타마켄 사이타마시 하치오지 5-11-16호 301

이시카와마스히데
일본국 사이타마켄 카조시 다이몬쵸 3-36

에구치카쯔야
일본국 도쿄토 히가시쿠루메시 츄오쵸 3-17-11

키도시게루
일본국 도쿄토 시부야쿠 시부야 3쵸메 8반 11고, 가부시키가이샤 니혼보론 내

(74) 대리인
특허법인아주

심사청구 : 없음

# (54) 활성 산소종용 전극 및 상기 전극을 이용한 센서

요약

도전성부재의 표면에 금속 폴피린착물의 중합막을 형성하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 활성산소종용전극에 관한 것이다.

이러한 활성산소종용전극은, 생체외(in vitro) 및 생체내(in vivo)의 어느 하나의 환경에 있어서도, 슈퍼옥시드음이온라디칼, 과산화수소, ·OH 등의 활성산소종이나, 다른 라디칼활성종 (NO, $ONOO^-$ 등)의 검출을 행할 수 있고, 각종 질병의 특정이나, 식품내의 활성산소종의 존재 또는 수돗물, 하수 등의 수중의 활성산소종의 존재를 조사할 수 있다.

## 대표도

도 5

## 색인어

활성산소종, 슈퍼옥시드음이온라디칼, 활성산소종용전극, 도전성부재, 금속폴피린착물, 대극, 참조전극, 센서

## 명세서

### 기술분야

본 발명은 생체내의 수퍼 옥시드 음이온 라디칼($O_2^{-}\cdot$) 등의 활성 산소종(active oxygen species)용 전극 및 이의 농도 측정용 전극을 사용하는 활성 산소종의 농도측정용 센서에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 생체내(in vivo)에서도 적용할 수 있으면서도, 다량의 효소를 필요로하지 않고, 사용되는 효소의 활성저하의 문제도 없이 활성 산소종용 전극 및 활성 산소종의 농도 측정용 센서에 관한 것이다.

### 배경기술

활성 산소종인 수퍼 옥시드 음이온 라디칼($O_2^{-}\cdot$)은, 크산틴 · 크산틴 산화효소(XOD)에 의한 크산틴, 하이포크산틴 등의 요산으로의 산화 및 산소의 헤모글로빈에 의한 환원 등에 의해 생성되며, 생체내에서 생리활성 물질의 합성, 살균작용, 노화현상 등에 관련하여 중요한 역할을 하고 있다. 한편, 수퍼 옥시드 음이온 라디 칼로 부터 파생되는 다양한 활성 산소종은 암 등의 각종 질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 생체 내의 수퍼 옥시드 음이온 라디칼을 함유하는 활성 산소종의 측정 농도는, 상기 각종 질환을 특정하기 위해서도 중요한 것으로 알려져 있다.

이러한 수퍼 옥시드 음이온 라디칼은, 기질이 존재하지 않는 경우에는, 식 (1)에 나타난 바와 같이 불균화 반응에 의해 과산화수소($H_2O_2$)와 산소분자($O_2$)로 된다. 이러한 불균화 반응은, 수퍼 옥시드 음이온 라디칼에로의 프로톤 첨가에 의한 $HO_2\cdot$의 생성, $HO_2\cdot$와 산소 분자의 반응에 의한 과산화수소와 산소 분자의 생성, 및 $HO_2\cdot$라디칼의 충돌에 의한 과산화수소와 산소 분자의 생성으로 이루어지는 것이다(식(1) - 식(4)).

$$2H^+ + 2O_2^{-}\cdot \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (1)$$

$$H^+ + O_2^{-}\cdot \rightarrow HO_2\cdot \quad (2)$$

$$HO_2\cdot + O_2^{-}\cdot + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (3)$$

$$HO_2\cdot + HO_2\cdot \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (4)$$

이러한 반응계에 있어서는, 수퍼옥시드음이온라디칼은 전자수용체(산화제), 전자공여제(환원제) 및 수소 이온의 수용체(염기)로서 작용하지만, 이 중에서 앞의 2개의 성질을 이용하여 수퍼 옥시드 음이온 라디칼의 농도 측정이 이루어지고 있 다. 예를들면, 페리치토크롬 c (3가)로부터 페로치토크롬 c (2가)로의 변환반응이나, 니트로블루 테트라졸리움(NBT)으로 부터 블루포르마잔의 생성 반응 및 테트라니트로메탄(TNM)의 환원 반응을 이용하여, 수퍼옥시드음이온라디칼의 농도가 측정되어지고 있지만, 이들은 모두 체외(in vitro)에서의 측정 방법이었다.

한편, 생체내(in vivo)의 수퍼옥시드음이온라디칼의 농도를 정량적으로 검출하는 방법에 대한 검사도 행하여지고 있다. 예를들면, 맥네일(McNail) 등, 타리오브(Tariov) 등, 쿠퍼(Cooper) 등은 금이나 백금 전극의 표면을 효소인 N-아세틸시스테인으로 변형시키고, 그 위에 헴이라 불리는 철착물(iron complex)를 산화환원 중심으로 한 금속 단백질인

치토크롬 c 등의 단백질을 S-Au 결합으로 고정화된 효소전극(치토크롬 c 고정화 전극)을 제작하고, 이들에 의해 수퍼옥시드음이온라디칼의 농도를 전기화학적으로 검출할 수 있다고 보고하고 있다(문헌명: C.J. McNail et al. Free Radical Res. Commun., 7, 89(1989); M. J. Tariov et al. J. Am. Chem. Soc. 113, 1847(1991); J. M. Cooper, K. R. Greenough and C.J. McNail, J. Electroanal. Chem., 347, 267 (1993)).

이의 검출방법의 측정 원리는 이하와 같다. 즉, 치토크롬c(3가)(cyt.c($Fe^{3+}$))는, 수퍼옥시드음이온라디칼과 식(5)와 같이 반응하여, 식(6)과 같이, $O_2^-$에 의해 환원된 치토크롬c(2가)를 전기화학적으로 재산화하고, 이 때의 산화 전류를 측정함으로써, 간접적으로 수퍼옥시드음이온라디칼의 농도를 정량적으로 검출하는 것이다.

cyt.c ($Fe^{3+}$) + $O_2^-$ ---> cyt.c ($Fe^{2+}$) + $O_2$ ..... (5)

cyt.c ($Fe^{2+}$) ---> cyt.c ($Fe^{3+}$) + $e^-$ ..... (6)

그러나, 치토크롬c는, 생체 세포내의 미토콘트리아의 막 위에 존재하는 전자 전달 단백질이므로, 상기 측정으로 충분한 량의 치토크롬c를 고정화 한 전극을 제작하는데는, $10^5$ - $10^6$ 개 정도 되는 다량의 세포가 필요하며, 또한, 사용하는 효소가 수일 간에 활성을 잃게 되는 문제가 있다. 따라서, 다량의 효소를 필요로하지 않으면서도, 사용되는 효소의 활성을 잃게 되는 문제가 없는 수퍼옥시드음이온라디칼 등의 활성산소종을 검출할 수 있는 전극의 개발이 요구되어진다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 개시

본 발명의 발명자들은 상기의 실정을 감안하여, 수퍼옥시드음이온라디칼 등의 활성산소종을, 산화환원 반응으로부터 검출 가능한 전극을 얻고자 예의 검토한 결과, 폴피린(porphyrin)화합물의 중심에 금속원자를 도입한 금속 폴피린착물의 중합막을 도전성부재의 표면 위에 형성시킨 전극은, 다량의 효소를 요구하지 않고, 또한, 활성을 잃게되는 문제도 없이 활성산소종의 존재나 농도의 검출에 이용될 수 있음을 알아내어, 본 발명을 완성하였다.

즉, 본 발명은, 도전성부재의 표면에 금속 폴피린착물의 중합막을 형성하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 활성산소종용 전극을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은, 전도성부재의 표면에 금속 폴피린착물의 중합막을 형성하여 이루어지는 활성산소종용 전극, 대(counter)전극 및 참조전극을 포함하는 활성 산소종 농도측정용 센서를 제공하기 위한 것이다.

또한, 본 발명은, 금속 폴피린 중합막에서의 금속과 활성산소종의 중간에서 발생한 전류를 상기 센서에서 측정하는 것을 특징으로 하는 시료중의 활성산소종의 검출 방법을 제공하는 것이다.

## 도면의 간단한 설명

도 1은, 본 발명의 전극을 제조하기 위하여 사용되는 3전극식 셀의 일례를 나타낸 도면이다.

도 2는, 본 발명의 전극을 제조하기 위하여 사용되는 2실형 3전극식 셀의 일례를 나타낸 도면이다.

도 3은, 본 발명의 전극을 제조하기 위하여 사용되는 니들형의 전극 및 2실형 3 전극식 셀의 일례를 나타낸 도면이다. 식 중, (A)는 2실형3전극식 셀, (B)는 니들형의 전극 전체를, (C)는 니들형 전극의 선단 부분을 나타낸다.

도 4는, 본 발명의 전극을 제조하기 위하여 사용되는 개량/니들형의 전극을 나타낸 도면이다. 본 전극은 도 3의 니들형의 전극을 개량한 것이다. 식 중, (A)는 개량/니들형의 전극 전체를, (B)는 개량/니들형 전극의 선단 부분을 나타낸다.

도 5는, 활성산소종의 측정용으로 사용되는 측정 장치의 일례를 나타낸 도면 이다.

도 6는, 활성산소종의 측정용으로 사용되는 측정 장치의 일례를 나타낸 도면이다.

도 7은, $H_2$T3ThP(도 중의 (a)) 및 FeT3ThP(동 (b))의 UV-visible 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 8은, $H_2$T2AmP(도 중의 (a)) 및 FeT2AmP(동 (b))의 UV-visible 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 9는, FeT3ThP의 전해중합시의 CV 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 10은, FeT2AmP의 전극 제작에 있어서의 전해중합시의 CV 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 11은, 비교품 1의 XOD 첨가시의 산화 전류의 경시 변화를 나타낸 그래프이다.

도 12는, 본 발명품 1 의 XOD 첨가시의 산화 전류의 경시 변화를 나타낸 그래프이다.

도 13은, 본 발명품 1 및 비교품 1의 (XOD 활성도) $^{1/2}$ 와 전류 증가량과의 관계를 나타낸 그래프이다.

도 14는, 본 발명품 4의 XOD를 100mU/ml 가 되도록 첨가한 경우의 전류의 경시 변화를 나타낸 도면이다.

도 15는, 수퍼 옥시드 음이온 라디칼 량과 전류량 변화의 관계를 나타낸 도 면이다.

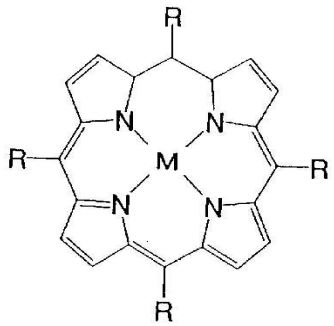
## 실시예

### 발명을 실시하기 위한 최량의 형태

본 발명의 활성산소종용 전극(이하, '전극'이라 한다.)은, 도전성 부재의 표면에 금속 폴피린착물의 중합막을 형성하여 이루어진다.

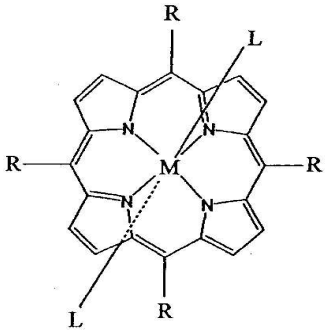
본 발명의 전극을 구성하는 도전성 부재로서는, 일반적으로 전극용으로서 사용되는 부재라면 특별한 제한없이 사용할 수 있으며, 예를들면, 글라시카본(Glassy Carbon:GC), 그라파이트, 파이로리틱그라파이트(PG), 고배향 파이로리틱그라파이트(HOPG), 활성탄 등의 카본류, 또는 백금, 금, 은 등의 귀금속, 또는 $In_2O_3/SnO_2$ (ITO) 등을 사용할 수 있지만, 특히 경제성, 가공성, 경량성 등을 고려하여, 글라시카본을 이용하는 것이 바람직하다. 또한, 전도성 부재의 형상은, 전극으로서 사용할 수 있는 형상인 것은 특별한 제한없이, 원주상, 각주상, 니들상, 섬유상 등의 각종 형상으로 할 수 있지만, 예를들면, 생체내에서의 활성 산소종 농도를 측정하기 위해서는, 니들상의 형상인 것이 바람직하다.

본 발명에서는, 상기의 전도성부재의 표면에 금속 폴피린착물의 중합막을 형성하지만, 이 금속 폴피린착물의 중합막의 형상에 사용되는 금속 폴피린착물의 예로서는, 하기의 식 (I) 또는 (II)로 표시되는 것을 예로들 수 있다.




(I)

(식중, M은, 철, 망간, 코발트, 크롬, 이리듐에서 선택되는 금속을 나타내고, 4개의 R중 적어도 1개는, 티오푸릴기, 피롤릴기, 푸릴기, 멜캅토페닐기, 아미노페닐기, 히드록시페닐기에서 선택되는 어느 하나의 기이고, 다른 R은, 상기 어느 하나의 기 또는 알킬기, 아릴기 또는 수소를 나타낸다)



(II)

(식 중 M 및 R은 상기한 바와 같으며, 2개의 L중 적어도 1개는, 이미다졸 및 그 유도체, 피리딘 및 그 유도체, 아닐린 및 그 유도체, 히스티딘 및 그 유도체, 트리메틸아민 및 그 유도체 등의 질소계 축배위자, 티오페놀 및 그 유도체, 시스틴 및 그 유도체, 메티오닌 및 그 유도체 등의 유황계 축배위자, 안식향산 및 그 유도 체, 초산 및 그 유도체, 페놀 및 그 유도체, 지방족알콜 및 그 유도체, 물 등의 산소계 축배위자이고, 다른 L은, 상기 중 하나의 축배위자 또는 배위자가 없는 것을 나타낸다)

상기식 (I) 또는 (II)로 표시된 금속 폴피린착물은, 폴피린 화합물에 금속 원자를 배위시킨 착화합물이다. 또한, 이 폴피린화합물은, 4개의 피롤환이 α위치에서 4개의 메틴기의 상호 결합된 환상 화합물이며, 4개의 질소 원자가 중심으로 마주 향하여져 형성되어 있다. 이 중심부에 금속 원자를 도입시킴으로써 착화합물(금속 폴피린착물)을 형성할 수 있다. 상기 착화합물 형성에서는, 통상 사용되는 금속착물의 형성방법, 예를들면, 메탈레이션 등의 방법을 이용하여, 금속원자를 폴피린의 중심에 도입하는 것이 좋다. 본 발명에 있어서, 폴피린 화합물의 중심에 도입할 수 있는 금속으로서는, 철, 망간, 코발트, 크롬, 이리듐 등의 각종 금속을 이용할 수 있다.

또한, 이 금속 원자는 측정 대상의 활성산소종의 종류에 따라 선택되어질 수 있다. 예를들면, 수퍼 옥시드 음이온 라디칼을 측정대상으로 하는 경우에는, 철, 망간, 코발트 등을, 분자상 산소를 측정 대상으로 하는 경우에는 철, 코발트, 망간, 크롬, 이리듐 등을, 과산화수소를 측정 대상으로 하는 경우에는 망간 등을, 또한, ·OH, NO, $ONOO^-$ 등을 측정 대상으로 하는 경우에는, 철, 망간 등을 각각 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명에서 사용되는 폴피린 화합물은, 무치환체인 폴피린에 대하여, IUPAC 명명법에 의한 위치번호의 5, 10, 15, 20의 4 위치 중에 적어도 1 위치를, 티오푸릴기, 피롤릴기, 푸릴기, 멜캅토페닐기, 아미노페닐기, 히드록시페닐기 등의 어느하나의 기로 치환된 것이며, 또한, 다른 위치를, 상기의 치환기 또는 알킬기, 아릴기 또는 수소로 된 것을 사용하는 것이 바람직하다. 이의 구체적이 예로서는, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-티오푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-티오푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-피롤릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-피롤릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-멜캅토페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-멜캅토페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(4-멜캅토페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-아미노페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-아미노페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(4-아미노페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-히드록시페닐)폴피린,5, 10, 15, 20-테트라키스(3-히드록시페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(4-히드록시페닐)폴피린, [5, 10, 15-트리스(2-티오푸릴)-20-모노(페닐)]폴피린, [5, 10, 15-트리스(3-티오푸릴)-20-모노(페닐)]폴리핀, [5, 10-비스(2-티오푸릴)-15,20-디(페닐)]폴피린, [5, 10-비스(3-티오푸릴)-15,20-디(페닐)]폴피린, [5,15-비스(2-티오푸릴)-10,20-디(페닐)]폴피린, [5, 15-비스(3-티오푸릴)-10,20-디(페닐)]폴피린, [5-모노(2-티오푸릴)-10,15,20-트리(페닐)]폴피린 및 [5-모노(3-티오푸릴)-10,15,20-트리(페닐)]폴피린 등을 예로들 수 있다.

또한, 식 (II)로 표시된 화합물의 L로 표시된 배위자 중에서, 이미다졸의 유 도체의 예로서는, 메틸이미다졸, 에틸이미다졸, 프로필이미다졸, 디메틸이미다졸, 벤즈이미다졸 등을, 피리딘의 유도체의 예로서는, 메틸피리딘, 메틸피리딜아세테이트, 니코틴아미드, 피리다진, 피리미딘, 피라진, 트리아진 등을, 아닐린의 유도체의 예로서는, 아미노페닐, 디아미노벤젠 등을, 히스티딘의 유도체의 예로서는, 히스티딘메틸에스테르, 히스타민, 히퓨릴-히스티딜-류신 등을, 트리메틸아민의 유도쳬의 예로서는, 트리에틸아민, 트리프로필아민 등을, 티오페놀의 유도체의 예로서는, 티오크레졸, 멜캅토페놀, 멜캅토안식향산, 아미노티오페놀, 벤젠디티올, 메틸벤젠디티올 등을, 시스틴의 유도체의 예로서는, 시스틴메틸에스테르, 시스틴에틸에스테르 등을, 메티오닌의 유도체의 예로서는, 메티오닌메틸에스테르, 메티오닌에틸에스테르 등을, 안식향산의 유도체의 예로서는, 살리실산, 프탈산, 이소프탈산, 테레프탈산 등을, 초산의 유도체의 예로서는, 트리플루오로초산, 멜캅토초산, 프로피온산, 낙산 등을, 페놀의 유도체의 예로서는, 크레졸, 디히드록시벤젠 등을, 지방족 알코올의 유도체의 예로서는, 에틸알콜, 프로필알콜 등을 예로들 수 있다.

본 발명에 있어서 도전성부재의 표면에 상기 금속 폴피린 착물의 중합막을 형성시키는 것으로는, 전해중합법, 용액중합법, 불균일중합법등의 각종 중합법을 사용할 수 있다. 이 중 전해중합법을 사용하여 중합막을 형성하는 것이 바람직하고, 구체적으로 디클로로메탄, 크로로포름, 사염화탄소등의 유기용매중, 테트라부틸암모늄퍼클로레이트(TBAP: $Bu_4NClO_4$), 테트라프로필암모늄퍼클로레이트 (TPAP: $Pr_4NClO_4$), 테트라에틸암모늄퍼클로레이트(TEAP:

$Et_4NClO_4$) 등 적당한 지지전해질을 c 첨가하고, 도전성부재를 작용염, 백금(Pt) 전극등의 귀금속전극, 티탄전극, 카본류전극, 스테인레스망전극 등의 불용성전극을 대극, 포화 카로멜전극(SCE), 은-염화은전극 등을 참조극으로서, 2전극(작용극-대극)식의 전해, 또는 3전극(작용극-대극-참조극)식의 정전위, 정전류, 가역전위소인, 펄스식의 전해 등을 행하고, 중합시킴으로서 도전성부재의 표면에 금속폴피린 중합막을 형성시킬 수 있다.

이 전해중합은 예를 들어, 도1에 나타낸 바와 같이 3전극식 셀을 사용하여, 가역전위소인전해법 등에 의해 행하는 것이 바람직하다. 도1 중, 1은 셀용기, 2는 도전성부재, 3은 대극, 4는 참조극, 5는 금속 폴피린착물 용액, 6은 potentiostat, 7은 X-Y 레코더를 나타낸다.

또, 금속 폴피린착물 용액으로서 고농도인 것을 사용하는 경우는, 예를들면, 도 2에 나타난 바와 같이 2실형3전극식 셀을 사용해도 좋다. 도 2에 있어서, 1에서7은 도 1과 같은 것을 의미하고, 8은 전해질용액, 9는 샘플 바이얼을 나타낸다.

또, 생체내측정, 복합화측정, 임상에서의 진단 · 치료 등을 고려하고 단순화한 활성산소종용전극(니들형전극)을 제작하는 경우는, 예를들어 도 3(A) 및 (B)에 나타낸 바와 같이 니들형 전극10 및 3전극식 셀을 사용하여도 좋다. 도 3에 있어서, 1은 셀용기, 4는 참조극, 5는 금속 폴피린착물 용액, 6은 potentiostat, 7은 X-Y 레코더를 나타내고, 8은 전해질용액, 9는샘플 바이얼, 10은 니들형전극, 11은 대극부분, 12는 도전부재 단부(금속폴피린 중합막 형성부분), 13은 전기절연성 재 료, 14는 대극용 배선이다.

이 전극은, 도 3(C)에 나타낸 바와 같이 전기절연성 재료13에서 조제된 세관중에 도전성부재를 넣고, 또 이 세관의 외측을 대극으로 하는 금속 등의 재료로 피복하여, 대극부분 11로 한 것이다. 그리고, 도전성 부재단면12 상에 금속폴피린 중합막을 형성시킴로서, 니들형 전극으로서 사용가능하게 된다.

또, 금속폴피린착물의 중합막의 두께는, 전극 및 금속폴피린착물의 종류 및 측정하는 활성산소의 종류 등에 의해서 적당히 결정되나, 전극활성, 수식안정성 등의 점에서 1㎛이하인 것이 바람직하다.

또한, 불필요한 생체내 전류, 전류노이즈 등의 제거, 감도, 시그널/노이즈비(S/N비)등의 향상을 목표로 도 3의 단순화한 활성산소종용전극(니들형의 전극)을 개량한 단순화한 활성산소종용전극(개량/니들형의 전극)을 제작하는 경우는, 예를들어 도 4(A)에 나타낸 바와 같이 개량/니들형의 전극15 및 도 3(A)에 나타난 3전극식 셀을 사용해도 좋다. 도 4에 있어서, 11은 대극부분 12는 도전부재 단부(금속폴피린 중합막형성부분), 13은 전기절연성재료, 14는 대극용배선, 15는 개량/니들형 전극, 16은 아스 부분, 17은 아스용 배선이다.

이 전극은, 도 4(B)에 나타낸 바와 같이 도전성부재를 전기절연성재료13 중에 넣어(2층구조), 이들을 대극용재료11 안에 넣어(3층구조), 또한 그것들을 전기절연성재료13 안에 넣고(4층구조), 최종적으로 이 세관의 외측을 아스가 되는 금속등의 재료로 피복(5층구조)하여, 아스부분 16으로 한 것이다. 그리고, 도전성부재단면12 상에 금속폴피린 중합막을 형성시킴으로써, 개량한 단순화한 활성산소종용 전극(개량/니들형전극)으로서 사용 가능해 진다.

또, 금속 폴피린착물의 중합막의 두께는, 전극 및 금속폴피린착물의 종류 및 측정하는 활성산소의 종류등에 의해서 적절히 결정되지만, 전극활성, 수식안전성 등이라는 점에서 1㎛이하인 것이 바람직하다. 또, 이 개량/니들형의 전극은 복합화측정 등에도 사용하기 때문에, 10수층 정도까지의 다층구조가 가능하다. 또 아스의 구성재료로서는, 백금, 금, 은 등의 귀금속, 티탄, 스테인레스강, 철크롬합금 등의 내식성합금, 카본류 등의 재료를 사용할 수 있으나, 아스는 생체 내에 들어가는 일이 많기 때문에, 안정성이 높은 재료(예를 들어, 백금, 금, 은 등의 귀금속, 티탄, 스테인레스강, 카본류 등)등으로 구성하는 것이 바람직하다.

본 발명의 전극을 활성산소종의 측정, 특히 그 농도의 측정에 사용하기에는, 이 전극에 ①대극과 참조극(3전극식) 또는 ②대극(2전극식)을 조합시키는 것이 바람직하다. 이 대극의 구성재료로서는, 백금, 금, 은 등의 귀금속, 티탄, 스테인레스강, 철-크롬합금 등의 내식성합금, 카본류 등의 재료를 사용할 수 있으나, 대극은 생체내에 들어가는 일이 많기 때문에 안전성이 높은 재료(예를 들어, 백금, 금, 은 등의 귀금속, 티탄, 스테인레스강, 카본류 등)로 구성하는 것이 바람직하다.

또, 참조전극으로서는, 통상, 은/염화은전극, 수은/염화제이수은 등의 각종참조전극을 사용할 수 있고, 또 고체의 기준전극을 사용할 수도 있다.

구체적으로, 활성산소종의 측정용으로 사용할 수 있는 측정장치의 한 예를 나타내면 도 5에 나타난 바와 같다. 도 5 중, 1, 3, 4, 6 및 7은 도 1과 같은 것을 의미하고, 18은 측정전극(작용극), 19는 마이크로시린지, 20은 측정용액, 21은 마 그네틱스터러, 22는 교반자를 각각 나타낸다.

또, 구체적으로 활성산소종을 측정용으로 사용할 수 있는 측정장치의 다른 일례를 도 6에 나타나 있다. 도 6중의 1, 6,

7, 19에서 22는 도 4와 같은 것을 의미하고, 10은 니들형 전극이다.

본 발명의 활성산소종용 전극은, 상기와 같은 장치로 슈퍼옥시드음이온라디칼 등의 활성산소종을 검출하기 위한 전극으로서 사용할 수 있으나, ①대극과 참조극(3전극식) 또는 ②대극(2전극식) 과 함께 사용함으로서, 활성산탄소종 농도측정용 센서로 할 수 있다. 상기의 구성의 활성산소농도 측정용센서를, 예를들어 슈퍼옥시드음이온라디칼이 존재하는 측정계로 사용하면, 중합막을 형성하는 금속폴피린착물 중의 금속이 슈퍼옥시드음이온라디칼에 의해 환원된다. 예를들면, 해당 금속이 철이면, 슈퍼옥시드음이온라디칼에 의해 $Fe^{3+}$ 에서$Fe^{2+}$ 로 환원된다(식(7)).

그리고, 슈퍼옥시드음이온라디칼에 의해 환원된 $Fe^{2+}$ 를, 산화될 수 있는 정도로 농도측정 전극의 전위(①의 3전극식의 경우) 또는 전압(②의 2전극식의 경우)를 유지한 상태로 전기화학적으로 재산화하고(식(8)), 이 때 흐르는 전류(산화전류)를 측정하면, 그 전류치는 슈퍼옥시드음이온라디칼 농도와 대응하기 때문에, 해당 산화전류로부터 시료용액중에 용해되어 있는 슈퍼옥시드음이온라디칼의 농도를 정량적으로 검출할 수 있다. 즉, 상기한 식(5) 및 식(6)과 같은 원리에 의해, 슈퍼옥시드음이온라디칼의 농도 측정이 가능하게 되는 것이다. 또, 이것과 같은 원리에 의해, 과산화수소, ·OH 등의 활성산소종이나 NO 나 $ONOO^-$ 등의 다른 라다칼 활성종 등 에 대해서도 동일하게 정량적으로 검출할 수 있다.

$$Por(Fe^{3+}) + O_2^- \cdot \rightarrow Por(Fe^{2+}) + O_2 \cdots\cdots(7)$$

$$Por(Fe^{2+}) \rightarrow Por(Fe^{3+}) + e^- \cdots\cdots(8)$$

(식(7) 및 식(8) 중, 「Por」은 폴피린을 의미한다)

본 발명의 활성산소종용전극은, 금속폴피린착물의 중합막을 도전성부재의 표면에 형성해서 이루어지는 것이기 때문에, 종래의 치토크롬c를 고정한 전극에 비해서, 강도가 격단으로 높고, 전극의 실활의 문제도 없는 것이다. 또, 금속폴피린의 중합막의 형성도 전해중합법 등을 사용해서 이루어지기 때문에, 종래의 전극에 비해서, 그 조제도 매우 용이하고, 특히 생체내에서 사용하기 쉬운 형상, 예를들면 니들상으로도 할 수 있다.

이와 같이, 본 발명의 활성산소종용전극은, 생체외(in vitro)는 물론, 생체내(in vivo)의 환원에 있어서도, 슈퍼옥시드음이온라디칼, 과산화수소, ·OH등의 활성산소종이나, 다른 라디칼활성종(NO,$ONOO^-$ 등)의 검출이나, 대극이나 참조전극과 조합시킴으로서, 이들 활성산소종 등을 정량 측정할 수 있기 때문에, 각종 분야에서 넓게 이용할 수 있다.

즉, 생체내(in vivo)에서는, 각종 질병은 생체내의 활성효소종이나 다른 라디칼활성종에 의해 특정할 수 있기 때문에, 예를들어 혈액 중의 활성산소종의 농도를 측정함으로서, 암 등의 질환의 특정을 행하는 것이 가능해진다.

한편, 생체외(in vitro)에서도, 식품외의 활성산소종이나 그 농도를 측정함으로서, 해당 식품의 부패 상태를 관찰할 수 있다. 또, 수돗물이나, 하수 등의 수중의 활성산소종이나 그 농도를 측정함으로써, 수질오염의 상태를 관찰할 수 있다.

또한, 슈퍼옥시드음이온라디칼 및 해당 음이온을 소거하는 작용을 가지는 효소인 슈퍼옥시드디스뮤타제(Superoxide Dismutase:이하, 「SOD」로 한다)의 농도도, SOD를 포함하는 시료를 첨가했을 때의 슈퍼옥시드음이온라디칼의 소실정도를 측정함으로써, 측정하는 것이 가능하다.

실시예

이하에 참고예, 실시예 및 시험예를 들어서 본 발명을 더욱 상세하게 설명하나, 본 발명은 이것에 어떠한 제약이 되는 것은 아니다.

참고예 1

5, 10, 15, 20-테트라키스(3-티오페닐)폴피린($H_2$T3ThP)의 합성:

용량100ml의 환저 플라스크 안에 프로피온산 50ml, 3-티오펜카르발데히드2.0ml 및 피롤 1.4ml을 넣고, 교반하면서 160℃에서 1시간 환류하였다. 환류후, 이 반응물을 온실까지 방냉하고, 또 빙냉하여, 200ml의 냉 메탄올 안에 가하였다. 다음으로 흡인여과를 행하고, 잔류물을 메탄올에서 세정후, 실리카겔크로마토그라피(전개용매:크로로포름)에 의해 정제, 건고, 재결정, 감압전조 하고, H2T3ThP를 흑색 분말결정으로서 얻었다. (수량:0.63g 수율:19%). 생성물은 UV-visible 스펙트럼(uv-2100:(주)시마츠제작소제) 및 $^1$H-NMR측정에 의해 동정하였다. 동정결과를 표1 및 표2에 나타낸다.

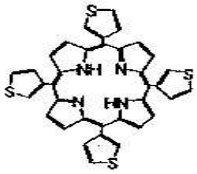
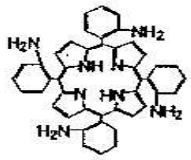
참고예2

5, 10, 15, 20-테트라키스(2-아미노페닐)폴피린($H_2T2AmP$)의 합성:

환류냉각기를 구비한 용량 2L의 4개목-플라스크 안에 프로피온산 500ml을 넣고, 그 안에 2-니트로벤즈알데히드 25g을 가하여, 교반하면서 110℃에서 환류가열하고, 피롤 12ml을 가하고, 30분간 비점 환류하였다. 그 후, 클로로포름 50ml을 가하고, 빙냉, 흡인여과하였다. 이 여과물에 클로로포름 400ml을 더하고, 세정해서 잔류물을 감압건조(100℃, 6시간, 0.1kPa)하고 , 전구체인 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-니트로페닐)폴피린($H_2T2NO_2P$)를 흑자색 결정으로 얻었다(수량:5.0g 수율:14%).

2L의 4개목-플라스크에 12N의 HCl를 300ml 넣고, 그 안에 위에서 합성한 5, 10, 15, 20- 테트라키스(2-니트로페닐)폴피린($H_2T2NO_2P$) 5.0g와 염화주석(II)이수화물 20.0g을 더하고, 65 70℃에서 30분간 가열하였다. 그 후, 암모니아수를 서서히 가하고, 흡입여과, 감압건조하였다. 이 혼합물을 2L 비이커에 넣고, 아세톤 10L로 추출하여 증발기(evaporator)로 증발건고 하였다. 이 건고물을 클로로포름 2L에 용해시켜서, 암모니아수, 이온교환수로 세정하고, 무수황산나트륨으로 탈수 후, 증발 기에 의해 증발건고, 재결정, 감압건조하여, 자색결정의 $H_2T2AmP$를 얻었다(수량:4.0g, 수율 90%). 이 생성물을, 참고예 1과 같이, 생성물을 UV-visible 스펙트럼(UV-2100:(주)시마츠제작소제) 및 $^1H$-NMR측정에 의해 동정하였다. 동정결과를 표1, 표2에 나타낸다. 또, 도 7(a)에 $H_2T3ThP$의 UV-visible 스펙트럼을, 도 8의 (a)에 $H_2T2AmP$의 UV-visible 스펙트럼을 각각 나타낸다.

(동정결과)

| Porphyrin | $\delta_H$(CDCl₃/TMS, ppm) |
|---|---|
|  $H_2T3ThP$ | -2.7(s,2H,pyrrole-NH) |
| | 7.7(t,4H,thiophene-H) |
| | 8.0(m,8H,thiophene-H) |
| | 8.9(s,8H,pyrrole-β-H) |
|  $H_2T2AmP$ | -2.7(s,2H,pyrrole-NH) |
| | 4.0(s,8H,amino-H) |
| | 7.0-7.7(m,16H,phenyl-H) |
| | 8.9(s,8H,pyrrole-β-H) |

< 표 1 >

(동정결과)

< 표 2 >

| | $\lambda_{max}$(nm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Porphyrin | Soret band | Q band | | | |
| $H_2T3ThP$ | 422 | 519 | 556 | 594 | 651 |
| FeT3ThP | 425 | 516 | | | |
| $H_2T2AmP$ | 420 | 516 | 549 | 590 | 652 |
| FeT2AmP | 425 | 493 | | | |

표 1의 동정결과에 의해, $H_2T3ThP$ 및 $H_2T2AmP$에 대해서, 각각 폴피린환을 형성하고 있는 프로톤의 피크 및 각각에 대해서 폴피린화합물 특유의 피크를 확인하였다. 또, $H_2T2AmP$에 대해서는, 아미노기를 형성하는 프로톤의 피크인 것으로 생각되는 4.0ppm에서 피크를 확인하였다. 또, 표 2, 도 7(a) 및 도 8(a)의 동정결과에 의해, $H_2T3ThP$ 및 $H_2T2AmP$에 기초하는 UV-visible 스펙트럼을 확인하였다. 이상과 같이, 참고예 1 및 2에 의해 $H_2T3ThP$ 및 $H_2T2AmP$가 합성되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

참고예 3

금속폴피린착물의 합성(1)(메탈레이션에 의한 $H_2T3ThP$로의 중심금속(Fe)의 도 입):

용량50ml의 3개목-플라스크에 48% 취화수소산 10ml를 넣고, 30분간 질소가스를 불어넣고, 또 환원철 100mg을 가하여, 100℃에서 환원철이 용해할 때까지 교반하였다. 교반 후, 용액을 감압하에서 건고시키고, 백색분말의 취화철무수화물을 얻었다.

이 생성물 중에 참고예 1에서 조제한 폴피린($H_2T3ThP$) 250mg과, 미리 질소가스를 30분간 불어넣은 디메틸포름아미드(DMP) 200ml을 더하여, 질소하에서 4시간 반응시켰다. 반응종료후, 반응물에 클로로포름 200ml을 더하고, 또 이온교환수로 세정하고, 무수황산나트륨으로 탈수, 여과, 증발기에 의해 증발건고하였다. 건고후, 알루미나컬럼크로마토그라피(전개용매:클로로포름/메타놀=20/1)로 정제하였다. 용출액에 48% 취화수소산을 가하고, 무수황산나트륨으로 탈수, 여과, 증발기에 의해 증발건고 하고, 재결정 후, 감압건조해서 금속폴피린(중심에 Fe를 포함하는 H2T3ThP;이하「FeT3ThP」라고 한다)의 흑색결정을 얻었다(수량:230mg 수율:84%).

참고예4

금속폴피린착물의 합성(2)(메탈레이션에 의한 $H_2T2AmP$로의 중심금속(Fe)의 도입):

폴피린화합물로서 $H_2T2AmP$(참고예 2에서 얻은 것) 250mg을 사용하는 것 이외는, 참고예 3과 같은 방법을 사용하여, $H_2T2AmP$의 중심에 Fe를 포함하는 금속폴피린 착물(이하「FeT2AmP」라고 함)의 흑색결정을 얻었다(수량:224mg 수율:83%). 참고예3 및 4의 생성물에 대해서, UV-visible 스펙트럼에 의해 동정하였다. 결과를 도 7, 도 8 및 표 2로 나타낸다.

도 7의 (a)에 $H_2T3ThP$의 UV-visible스팩트럼을 , 도 7의 (b)에 FeT3ThP의 UV-visible 스팩트럼을 각각 나타낸다. 또 도8의 (a)에 $H_2T2AmP$의 UV-visible 스팩트럼을, 도7의 (b)에 FeT2AmP의 UV-visible스팩트럼을 나타낸다. 또한 표3에 UV-visible 스팩트럼 측정결과를 나타낸다.

중심에 금속이 배위하고 있지 않은 폴피린화합물($H_2T3ThP$ 및 $H_2T2AmP$)에서는, 400nm 근방에 공역환에 기초하는 피크가 나타나고, 그 분자흡광계수는 3.6 6.0 $\times 10^5$ $M^{-1}$ $cm^{-1}$ 이 되고, 이것은 Soret 대로 불리워지고 있는 것이다.

또, 가시부에 분자흡광계수가 $10^4$ $M^{-1}$ $cm^{-1}$ 의 Q대 라고 불리는 4개의 피크를 가진다. 금속도입의 확인에는, Q대의 스팩트럼 변화가 범용되나, 도 7 및 표 2(a) 및 (b)를 비교하면, (a)에서는 Q대의 피크가 4개 존재하는 것에 대해서, (b)에서는 1개로 감소하고 있다. 이것은 폴피린이 금속착물화를 형성했을 때의 일반적인 거동에 일치하고 있고, 이것에 의해 폴피린이 철착물화 되고, 금속 폴피린착물이 합성되어 있는 것이 확인할 수 있었다.

참고예 5

금속폴피린착물의 합성(3)(메탈레이션에 의한 $H_2T3ThP$로의 중심금속(Mn)의 도입):

상부에 아르곤 풍선을 부착한 환류냉각기를 구비하고, 유욕 및 마그네틱스터러에 의한 교반을 가능하게 한 용량 300ml의 4개목-플라스크 안에 초산망간 0.5g 및 참고예 1에서 얻은 $H_2T3ThP$ 0.5g을 포함하는 100ml의 DMF를 더한 후, 아르곤으로 포화하고, 140℃에서 1시간 환류하였다.

얻어진 용액을 분액로트에 옮기고, 클로로포름과 이온교환수로 세정하였다. 무수황산마그네슘을 넣고, 1시간 탈수한 후, 여과하고, 여액을 증발기에 의해 건고하였다.

이 건고물을 컬럼크로마토그라피[충진제:염기성알루미나, 용리액:클로로포름/메탄올(20:1)]에 의해 분리정제하였다. 여과후, 여액을 증말기에 의해 건고한 후, 감압건조(0.1kPa, 100℃)하고, 흑자색결정의 MnT3ThP를 얻었다(수량:0.36g).

금속도입의 확인으로서 자외 · 가시흡수스팩트럼 측정을 행하였다. MnT3hP의 흡수피크는 380, 405, 480, 533, 583, 623nm에 생기고, 상기 H2T3ThP와는 다른 흡수피크가 되고, 금속도입을 확인하였다.

참고예6

축배위자를 가지는 금속폴피린착물의 합성(1)(1-메틸이미다졸이 배위한 FeT3ThP의 합성):

참고예 3에서 얻은 FeT3ThP(0.018g)과 1-메틸이미다졸(2 100㎕, FeT3ThP: 1-메틸이미다졸=1 50(몰비))을 디클로로메탄 0.5ml에 가하여, 초음욕(15W) 조사 하에서 교반(5분) 또는 초음파비조사 하에서 교반(6시간 이상)하였다.

배위자부여의 확인으로서 자외 · 가시흡수스팩트럼 측정을 행하였다. FeT3ThP에 1-메틸이미다졸이 배위한 착물의 흡수피크는 421nm에 생기고, 상기 FeT3ThP와는 다른 흡수피프가 되고, 배위자부여를 확인하였다.

이것을 증발기에서 건고하여 보존, 또는 활성산소종용 전극의 제작에 기여하였다.

실시예1

활성산소종용전극의 제작(1):

글라시카본(GC) 전극(직경1.0mm)(비에이에스(주)제)를 알루미나염마제(0.05㎛)에서 연마하고, 이것을 물로 세정 후, 다시 메탄올로 세정하였다. 이 전극의 표면에 대하여, 하기의 전해용액 및 조작수순을 사용하여, 전해중합법에 의해 표면에 FeT3ThP의 중합막이 형성된 글라시카본 전극(본 발명품1) 및 표면에 FeT2AmP의 중합막이 형성된 글라시카본전극(본 발명품2)를 제작하였다.

(시료용액)

금속폴피린착물로서는, 참고예 3 또는 4에서 합성한 FeT3ThP 또는 FeT2AmP를, 0.05M의 농도로 사용하였다. 용매는 지지전해질로서 0.1M의 과염소산테트라부 틸암모늄($Bu_4NClO_4$/TBAP)를 포함하는 디클로로메탄(무수)를 사용하였다. 또, 용매중의 용재산소는 아르곤가스에 의해 제거하였다.

(조작수순)

전해중합은 도 1에 나타낸 구성의 3전극식 셀(작용전극:GC, 대극: Pt선, 참조전극:SCE)에 의해 가역전위소인전해법으로 행하였다. 소인범위는 FeT3ThP를 사용한 활성산소종용전극을 조제하는 경우는, SCE에 대해서, 0 2.0V이고, FeT2AmP를 사용한 활성산소종용전극을 조제하는 경우는, SCE에 대해서, -0.2 1.4V였다. 또, 소인속도는, 어떠한 것도 0.05V/s이고, 소인회수는 FeT3ThP의 경우는 1회소인, FeT2AmP의 경우는 3회소인 하였다. 또, 이 전해조작에 있어서 얻어진 사이클릭볼타모그람(CV곡선)은, X-Y레코더(이연전자제)에서 기록하였다. 결과를 도 9 및 도 10에 나타낸다.

도 9에서, 금속 폴피린착물로서 FeT3ThP를 사용해서 전극을 제작했을 때의 전해중합시의 CV곡선을 나타낸다. 이 곡선으로부터, +1.74V(대 SCE)에서 티오펜의 양이온라디칼이 생성된다고 생각된다. 또한, 전위스위프를 반전시키면, 양이온라디칼의 환원에 의한 캐소드 전류는 거의 흐르지 않기 때문에, 생성한 양이온라디칼이 용액안에서 바로 중합된다고 생각된다. 또, 0.6V(대 SCE)부근에 환원 피크가 보이나, 이것은 폴리머의 레독스 반응이라고 생각된다. 이 결과에 의해, GC전극의 표면에 금속폴피린착물(FeT3ThP)의 중합막이 형성되어 있는 것이 확인할 수 있다.

또, 도 10에 금속 폴피린착물로서 FeT2AmP를 사용해서 전극을 제작했을 때의 전해중합시의 CV곡선을 나타낸다. 이 곡선으로부터, +1.02V(대 SCE)에서 아닐린(아미노벤젠)의 양이온라디칼이 생성된다고 생각된다. 또 전위스위프를 반전시키면, 양이온라디칼의 환원에 의한 캐소드전류는 거의 흐르지 않으므로, 생성한 양이온라디칼이 용액 중에서 바로 중합하고 있다고 생각된다. 또 0.1V(대SCE)부근에 환원 피크가 보이나, 이것은 폴리머의 레독스 반응이라고 생각된다. 또, 제 2회의 소인에 있어서 같은 피크가 보이고, 중합반응이 또한 진행하고 있다는 것이 확인되었다. 또 0.23V(대SCE)부근에 보이는 산화 피크는 중합된 폴리머의 레독스 반응이라고 생각된다. 이 결과에 의해, GC전극의 표면에 금속 폴피린착물(FeT2AmP) 중합막이 형성되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 2

활성산소종용전극의 제작(2):

주위를 폴리에틸에테르케톤(PEEK)로 둘러싸고, 단부만이 노출된 글라시카본(GC)전극(PEEK는 3mmø, GC는 1mmø, 단부면적은 0.0079cm $^{2}$ /역측단부는 충진제)의 GC 측단부를 6μm연마용 다이아몬드 및 1μm 연마용 다이아몬드로 순차 연마한 후, 알루미나연마 패드 위에서 알루미나 연마제(0.05μm)로 마무리 연마하고, 이온교환수와 아세톤으로 세정하였다.

한편, 참고예 4에서 얻은 FeT2AmP 0.0037g과 TBAP 0.171g을 5ml용 메스플라스크에 넣고, 아세트니트릴로 5ml까지 채워 시료용액으로 하였다.

이 시료용액을, 셀 바이얼에 넣고, GC전극을 작용전극으로서 도 1에 나타낸 3전극식 전기화학 셀을 조립하고 아르곤 치환하였다.

전위소인범위를, Ag/Ag $^{+}$ 에 대해서 -0.3V에서+1.0V, 소인속도200m/sec로 3회 전위소인을 행하였다. 소인개시전위 및 종료전위는, Ag/Ag $^{+}$ 에 대해 0V로 하고, 비방향으로의 소인에서 개시하였다. 소인종료후, 아세트니트릴, 이온교환수로 순차세정하고, 표면에 FeT2AmP의 중합막이 형성된 글라시카본전극(본 발명품3)을 제작하였다.

실시예 3

활성산소종용전극의 제작(3):

TBAP 0.171g을 5ml용 메스플라스크에 취하고, 디클로로메탄으로 5ml 까지 채워 전해질용액으로 하였다.

선단을 바이콜글라스로 봉한 샘플바이얼의 선단부를 상기 전해질용액에 담그면서, 이 샘플바이얼 안에 참고예 4에서 얻은 FeT2AmP 0.0182g, TBAP 0.0171g 및 디클로로메탄 0.5ml을 가하였다.

도 2에 나타난 바와 같이, 이 샘플바이얼 중에, Pt 대극과 실시예 2와 같은 GC전극을 넣고, 샘플바이얼의 외측에 Ag/Ag+전극을 설치하고, 2실형3전극식 전기화학셀을 조립하였다. 이 2실은 모두 아르곤 치환하였다.

전위소인범위를, Ag/Ag $^{+}$ 에 대해서 -0.3V에서 +2.5V, 소인속도50mV/sec에서 3 회 전위소인을 행하였다. 소인개시전위는, Ag/Ag+에 대해서 0V, 소인종료전위는 Ag/Ag $^{+}$ 에 대해서 -0.3V로 하였다. 소인은, 비방향으로의 소인에서 개시하였다. 소인종료후, 디클로로메탄, 이온교환수로 순차세정하고, 표면에 FeT2AmP의 중합막이 형성된 글라시카본전극(본 발명품4)를 제작하였다.

실시예 4

활성산소종용전극의 제작(4)

글라시카본(0.28  0.30mmø)의 선재를 글라스캐필러리(내경0.3mmø) 안에 도입하고, 또한 이것들을 니들(백금제, 스테인레스강제 등, 길이는 예를들어 주사용 니들로 18G정도)에 도입하였다. 이들 사이를 에폭시계 접착제, 아크릴계 접착제, 매니큐어 등으로 접착, 고정하고, 다음으로 글라시카본 및 외측의 니들을 각각 백금선, 스테인레스선, 동선 등으로 은페이스트, 카본페이스트 등의 도전성 접착제로 접합시키고, 또 선단을 글라인더 등으로 연마하여 도 3에 나타난 바와 같은 3층구조의 니들형의 전극을 제작하였다(글라시카본은 작용극용전극부, 중측의 글라스캐필러리가 작용극과 대극의 절연부, 외측의 니들은 대극용전극부가 된다.)

실시예 3과 같이 조제한 전해질용액(5ml)을 셀용기에 넣었다. 선단부를 바이콜글라스로 봉한 샘플바이얼의 선단부를 상기의 전해질 용액에 담구면서, 이 샘플바이얼 중에 TBAP 0.0171g을 포함하는 참고예 6에서 얻은 1-메틸이미다졸이 배위된 FeT3ThP의 디클로로메탄 용액을 가하였다.

도 3에 나타난 바와 같이, 이 샘플바이얼 중에 상기에서 제작한 니들형의 전극(작용극 및 대극)을 넣고, 샘플바이얼의 외측에 Ag/Ag $^{+}$ 전극을 설치하고, 2실형3전극식 전기화학셀을 조립하였다.

이 셀을 사용해서, 가역전위소인법(전위소인범위:Ag/Ag $^{+}$ 에 대해서 -0.1V에서 +2.0V, 전위소인속도 10에서 500mV/sec) 및 정전위법(전위:Ag/Ag $^{+}$ 에 대해서 +2.0V)에 의해 전해중합을 5분에서 120분간 행하였다. 전해중합종료 후, 디클로로메탄, 이온교환수에서 순차세정하고, 표면에 1-메틸이미다졸이 배위한 FeT3ThP의 중합막이 형성된 글라시카본전극을 포함하는 3층구조의 니들형의 전극(글라시카본 상에 중합막을 수식한 것이 작용극용 전극부, 중측의 글라스캐필러리가 작용극과 대극의 절연부 및 외측의 니들은 대극용 전극부이다; 본 발명품5)를 제작하였다.

비교예 1

치토크롬c 고정화 금전극의 제작:

본 발명품의 전극의 비교품으로서, 슈퍼옥시드음이온라디칼의 농도측정용 전극인 치토크롬c 고정화전극을 하기의 방법으로 제작하였다.

금전극(직경1.6mm)(비에이에스(주)제)를 알루미나연마제(0.05㎛)로 연마하고, 물로 세정하였다. 또 1M의 $H_2SO_4$ 중에서 전기화학적 처리를 행하고, 물로 세정하였다. 다음으로 10mM의 3-멜캅토프로피온산(3-mercaptopropionic acid:이후 MPA 로 약칭한다)(Aldrich사제)(용매:10mM 인산완충용액(pH 7.0))에서 24시간 침적하고, MPA수식 금전극을 제작하였다. 이것을 물에서 세정하고, 0.48mM 치토크롬c(type IV from Horse Heart:Sigma사 제)(용매:10mM 인산완충용액(pH=7.0)) 중에서 30분간 전위소인한(소인범위:-0.4 0.4V(대 Ag/AgCl), 소인속도:0.05V/s). 여기에, 종농도가 0.5M이 되도록 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide:EDC)(PRERCE CHEMICAL사제)를 가하여 2시간 침적하고, 최후에 인산완충용액으로 세정하여 치트크롬c 고정화 금전극(비교품 1)을 얻었다. 또, 상기 인산완충용액은, 인산수소이나트륨과 인산이수소나트륨의 혼합용액이고, 시료용액을 조정할 때에 사용한 물은 1회 증류한 것이다.

시험예 1

슈퍼옥시드음이온라디칼 양의 측정시험(1):

본 발명품 1 및 비교품 1의 전극을 사용하여, 슈퍼옥시드음이온라디칼 양의 측정을 행하였다.

먼저, 본 발명품1 또는 비교품1의 전극을 작용극, Pt선을 대극으로 하여 셀용기안에 설정하고, 참조전극으로서 은/염화은전극(Ag/AgCl)을 사용하여, 시험용3 전극식 셀을 구성하였다. 이 시험용3전극식 셀을 중심으로, 도 5에 나타낸 바와 같은 장치를 준비하였다. 실험에 있어서, 전위소인범위는, 비교품 1의 전극에서 -0.2 0.25V(대 Ag/AgCl), 본 발명품1의 전극에서 -0.5 0.5V(대 Ag/AgCl)로 설정하였다. 또 소인속도는 여러종류로 측정하였다.

한편, 14.4mM 크산틴(Sigma 사제)를 포함하는 2mM수산화칼륨 수용액 및 10mM염화칼륨을 포함하는 10mM염화칼륨을 포함하는 10mM 트리스 완충용액(pH7.5)를 조제하고, 전자를 0.365ml, 후자를 14.635ml 분취하고, 이들을 혼합하여, 0.35mM 크산틴용액을 조제하고, 측정용액으로 하였다. 이 측정용액중의 용재산소를 고순도 아르곤 가스로 제거하였다.

다음으로 상기 측정용액을, 각각 시험용3전극식 셀에 넣고, 각 전극의 산화환원전위보다 충분한 전위인 0.2V(대Ag/AgCl)을 인가하였다. 이 측정용액 중에, 종농도가 0 100mU/ml가 되도록 크산틴옥시다아제(Xanthin oxidase:XOD)(Grade III from buttermilk: Sigma사제)를 첨가하고, 그 때 산화전류의 경시변화를 기록하였다. 본 발명품 1에 대한 결과를 도 12에, 비교품 1에 대한 결과를 도 11에 나타낸다. 또 XOD는 사용전에 10ml인산완충용액(pH=7.0)으로 투석하였다. 또 측정은 모두 실온하에서 행하였다.

크산틴에 대하여, XOD를 첨가함으로써, 용량 의존적으로 슈퍼옥시드음이온라디칼이 발생하나, 대상인 비교품 1의 XOD 첨가시의 산화전류의 경시변화를 나타내는 도 11에서는 산화전류는 XOD를 첨가한 직후에 급격히 증가하고, 그 후 거의 일정치가 되는 것이 나타나 있다. 한편 본 발명품 1에 대하여, XOD 첨가시의 산화전류의 경시변화를 나타내는 도 12도, 도 11과 같이 산화전류는 XOD를 첨가한 직후에 급격히 증가하나, 그 후 일단 감소한 후 거의 일정치가 되고, 이 전류치는 XOD의 농도 즉 슈퍼옥시드음이온라디칼의 양에 의존하는 것이 나타나있다.

또, 도 13에는, 본 발명품 1 및 비교품의 (XOD활성도) $^{1/2}$ 와, XOD를 첨가했을 때의 전류증가량과의 관계를 나타내는 그래프이다. 이 XOD활성도는, 프리도비치(Fridovich)들, 및 쿠퍼(Cooper)들의 문헌치 (J.M.McCord and I.Fridovich, J.Boil.chem.,243,5753,(1968), J.M.McCord and I.Fridovich, J.Boil.chem.,244, 6049,(1969), I.Fridovich, J.Boil.chem.,245,4053,(1970) 및 J.M.Cooper, K.R. greenough, and C.J.MCNeil,J.Electroanal.Chem., 347,267,(1993))을 참고로 해서 정하였다.

이 결과에서, 본 발명품 1의 전류증가량은, 대조인 비교품 1과 마찬가지로 (XOD활성도) $^{1/2}$ 에 비례하여, 직선관계를 얻을 수 있었다. 이들에 의해서 본 발명의 활성산소종용전극으로, 슈퍼옥시드음이온라디칼의 농도측정이 가능한 것을 확인할 수 있었다.

실험예 2

슈퍼옥시드음이온라디칼 양의 측정시험(2):

본 발명품 5의 전극을 사용하여, 슈퍼옥시드음이온라디칼 양의 측정을 행하였다.

본 발명품 5의 전극, 즉, 3층구조의 니들형 전극(글라시카본상에 중합막을 수식한 것이 작용극용전극부, 중측의 글라스카필러리가 작용극과 대극의 절연부 및 외측의 니들은 대극용전극부, 본발명품 5)를 사용하여, 2전극식으로 측정하였다. 측정용액으로서는, 0.15mM 크산틴을 포함하는 Tris완충용액(pH7.5)를 사용하여, 0에서 100mU/ml이 되는 양의 XOD를 첨가하였다. 또, 인가전압은 0에서 1.0V로 하였다.

인가전압 +0.5V에서 XOD를 100mU/ml가 되도록 첨가한 경우의 전류의 경시변화를 도 14에, 피크의 전류치를 원래대로 작성한 슈퍼옥시드음이온라디칼 양과 전류량 변화의 관계 그래프를 도 15에 나타낸다.

도 15에서 구한, 슈퍼옥시드음이온라디칼 양과 전류량 변화의 사이의 상관계수는, 0.995이며, 본 발명 전극은 슈퍼옥시드음이온라디칼 량의 측정에 유효하게 사용할 수 있는 것이 나타나있다.

## 산업상 이용 가능성

본 발명의 활성산소종용전극은, 생체외(in vitro) 및 생체내(in vivo) 중 어느 하나의 환경에서도, 슈퍼옥시드음이온라디칼, 과산화수소, ·OH 등의 활성산소종이나, 다른 라디칼활성종 (NO, $ONOO^-$ 등)의 검출을 행할 수 있다. 또한, 대극이나, 참조전극과 조합시킴으로써, 이것들 활성산소종 등을 정량 측정할 수 있기 때문에, 각종 분야에서 널리 이용할 수 있는 것이다.

예를들면, 생체내(in vivo)에서의 사용에 의해, 생체내의 활성효소종이나 다른 라디칼활성종으로 부터 각종 질병을 특정할 수가 있다.

한편, 생체외(in vitro)에서의 사용에 의해서, 예를들어 식품내의 활성산소 종이나 그 농도를 측정할 수 있고, 해당 식품의 부패상태를 판단하는 것이 가능해진다. 또, 수돗물이나 하수 등의 수중의 활성산소종이나 그 농도를 측정함으로써, 수질오염의 상태를 관찰할 수 있다.

## (57) 청구의 범위

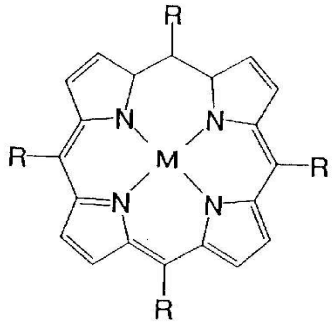
### 청구항 1.

도전성부재의 표면에 금속 폴피린착물의 중합막을 형성하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 활성산소종용전극.

### 청구항 2.

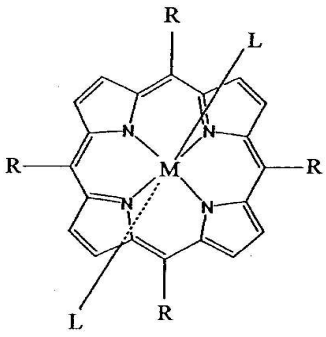
제 1항에 있어서,

상기 금속 폴피린착물은 하기 (Ⅰ) 또는 (Ⅱ)




(Ⅰ)

(식중, M은, 철, 망간, 코발트, 크롬, 이리듐에서 선택되는 금속을 나타내고, 4개의 R중 적어도 1개는, 티오푸릴기, 피롤릴기, 푸릴기, 멜캅토페닐기, 아미노페닐기, 히드록시페닐기에서 선택되는 어느 하나의 기이고, 다른 R은, 상기 어느 하나의 기 또는 알킬기, 아릴기 혹은 수소를 나타낸다)



(II)

(식 중 M 및 R은 상기한 바와 같으며, 2개의 L중 적어도 1개는, 이미다졸 및 그 유도체, 피리딘 및 그 유도체, 아닐린 및 그 유도체, 히스티딘 및 그 유도체, 트리메틸아민 및 그 유도체 등의 질소계 축배위자, 티오페놀 및 그 유도체, 시스틴 및 그 유도체, 메티오닌 및 그 유도체 등의 유황계 축배위자, 안식향산 및 그 유도체, 초산 및 그 유도체, 페놀 및 그 유도체, 지방족알콜 및 그 유도체, 물 등의 산소계 축배위자이고, 다른 L은, 상기 중 어느 하나의 축배위자 또는 배위자가 없는 것을 나타낸다)

로서 표시되는 전극.

## 청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 금속 폴피린착물를 형성하는 폴피린 화합물은, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-티오푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-티오푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-피롤릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-피롤릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-푸릴)폴피 린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-멜캅토페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-멜캅토페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(4-멜캅토페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-아미노페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-아미노페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(4-아미노페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-히드록시페닐)폴피린,5, 10, 15, 20-테트라키스(3-히드록시페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(4-히드록시페닐)폴피린, [5, 10, 15-트리스(2-티오푸릴)-20-모노(페닐)]폴피린, [5, 10, 15-트리스(3-티오푸릴)-20-모노(페닐)]폴리핀, [5, 10-비스(2-티오푸릴)-15,20-디(페닐)]폴피린, [5, 10-비스(3-티오푸릴)-15,20-디(페닐)]폴피린, [5,15-비스(2-티오푸릴)-10,20-디(페닐)]폴피린, [5, 15-비스(3-티오푸릴)-10,20-디(페닐)]폴피린, [5-모노(2-티오푸릴)-10,15,20-트리(페닐)]폴피린 및 [5-모노(3-티오푸릴)-10,15,20-트리(페닐)]폴피린으로 이루어지는 군에서 선택되어지는 전극.

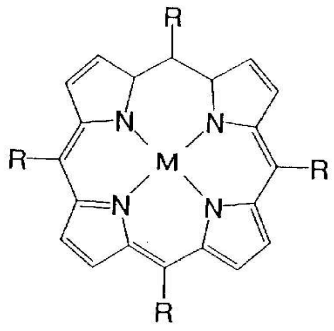
## 청구항 4.

도전성부재의 표면에 금속 폴피린착물의 중합막을 형성하여 이루어지는 활성산소종용전극, 대극 및 참조전극을 포함하는 활성산소종 농도측정용 센서.

## 청구항 5.

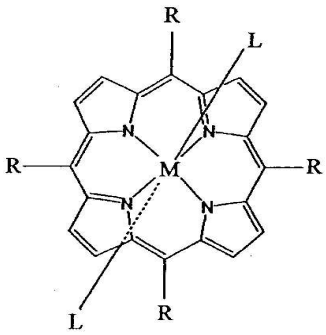
제4항에 있어서,

상기 금속 폴피린착물은 하기(Ⅰ) 또는 (Ⅱ)



(I)

(식중, M은, 철, 망간, 코발트, 크롬, 이리듐에서 선택되는 금속을 나타내고, 4개의 R중 적어도 1개는, 티오푸릴기, 피롤릴기, 푸릴기, 멜캅토페닐기, 아미노페닐기, 히드록시페닐기에서 선택되는 어느 하나의 기이고, 다른 R은, 상기 어느 하나의 기 또는 알킬기, 아릴기 혹은 수소를 나타낸다)



(II)

(식 중 M 및 R은 상기한 바와 같으며, 2개의 L중 적어도 1개는, 이미다졸 및 그 유도체, 피리딘 및 그 유도체, 아닐린 및 그 유도체, 히스티딘 및 그 유도체, 트리메틸아민 및 그 유도체 등의 질소계 축배위자, 티오페놀 및 그 유도체, 시스틴 및 그 유도체, 메티오닌 및 그 유도체 등의 유황계 축배위자, 안식향산 및 그 유도체, 초산 및 그 유도체, 페놀 및 그 유도체, 지방족알콜 및 그 유도체, 물 등의 산소계 축배위자이고, 다른 L은, 상기 중 어느 하나의 축배위자 또는 배위자가 없는 것을 나타낸다)

로 표시되는 센서.

## 청구항 6.

제4항 또는 제5항에 있어서,

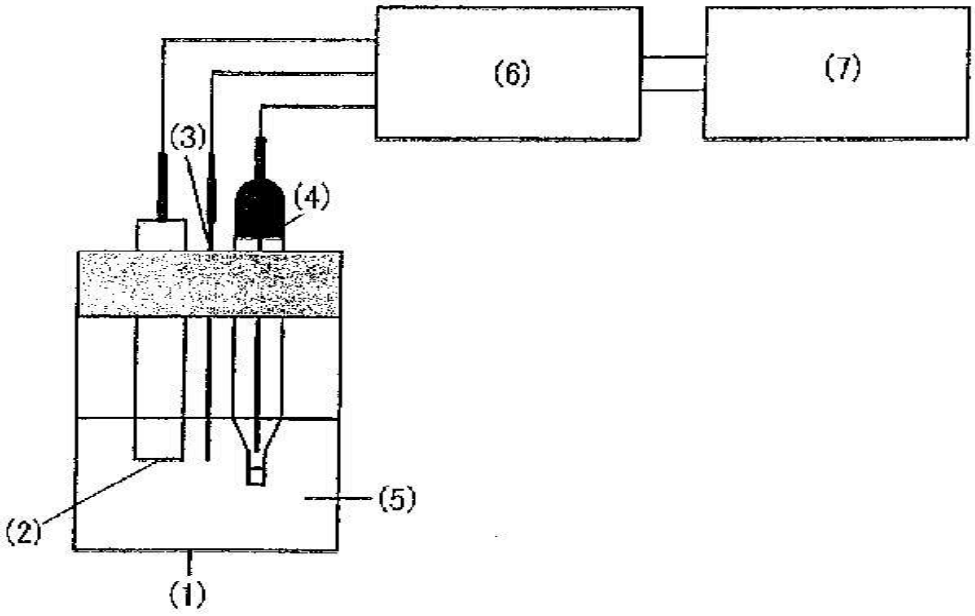
상기 금속 폴피린착물를 형성하는 폴피린 화합물은, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-티오푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-티오푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-피롤릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-피롤릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-푸릴)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-멜캅토페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-멜캅토페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(4-멜캅토페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-아미노페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(3-아미노페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(4-아미노페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(2-히드록시페닐)폴피린,5, 10, 15, 20-테트라키스(3-히드록시페닐)폴피린, 5, 10, 15, 20-테트라키스(4-히드록시페닐)폴피린, [5, 10, 15-트리스(2-티오푸릴)-20-모노(페닐)]폴피린, [5, 10, 15-트리스(3-티오푸릴)-20-모노(페닐)]폴리핀, [5, 10-비스(2-티오푸릴)-15,20-디(페닐)]폴피린, [5, 10-비스(3-티오푸릴)-15,20-디(페닐)]폴피린, [5,15-비스(2-티오푸릴)-10,20-디(페닐)]폴피린, [5, 15-비스(3-티오푸릴)-10,20-디(페닐)]폴피린, [5-모노(2-티오푸릴)-10,15,20-트리(페닐)]폴피린 및 [5-모노(3-티오푸릴)-10,15,20-트리(페닐)]폴피린으로 이루어지는 군에서 선택되는 센서.

## 청구항 7.

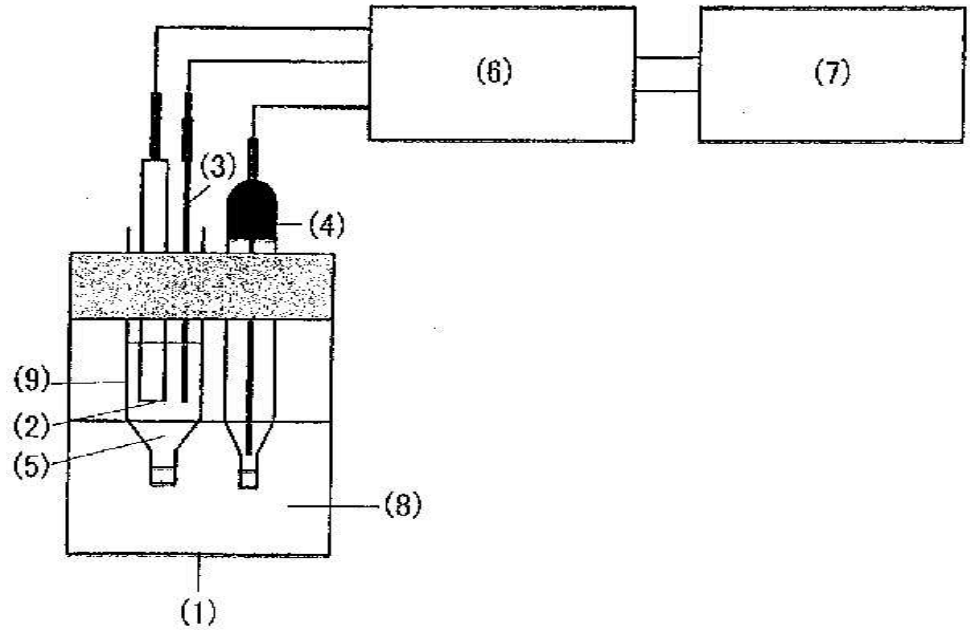
금속 폴피린중합막 중 금속과 활성산소종과의 사이의 산화환원반응에서 생기는 전류를, 청구항 제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항의 센서로 측정하는 것을 특징으로 하는 시료중의 활성산소종의 검출방법.

도면

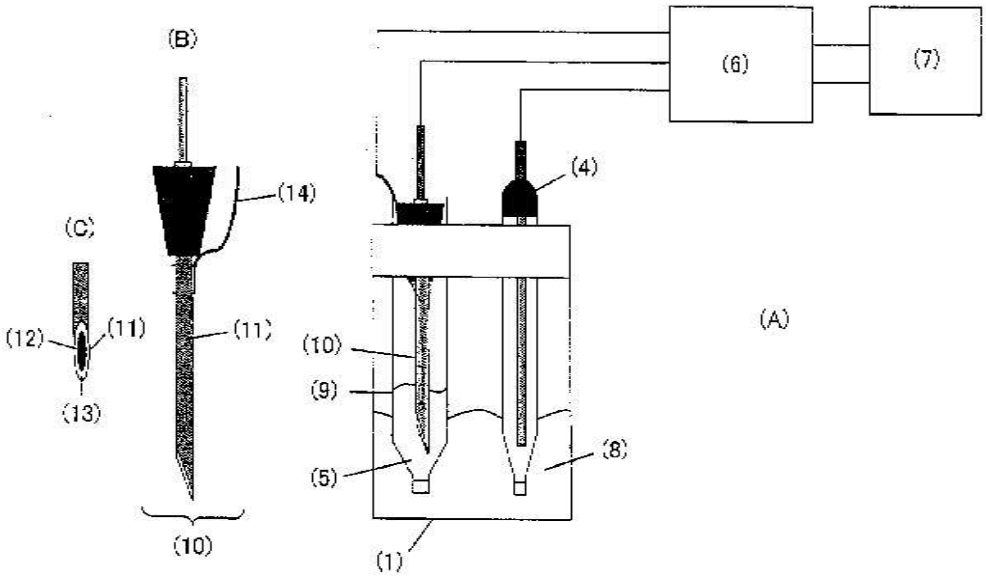
도면1



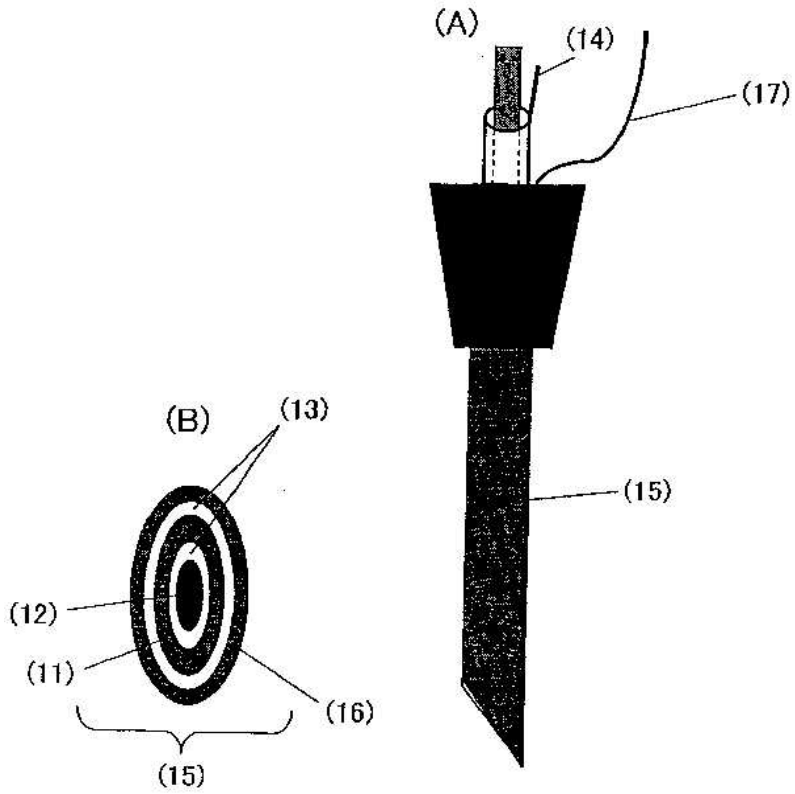

도면2



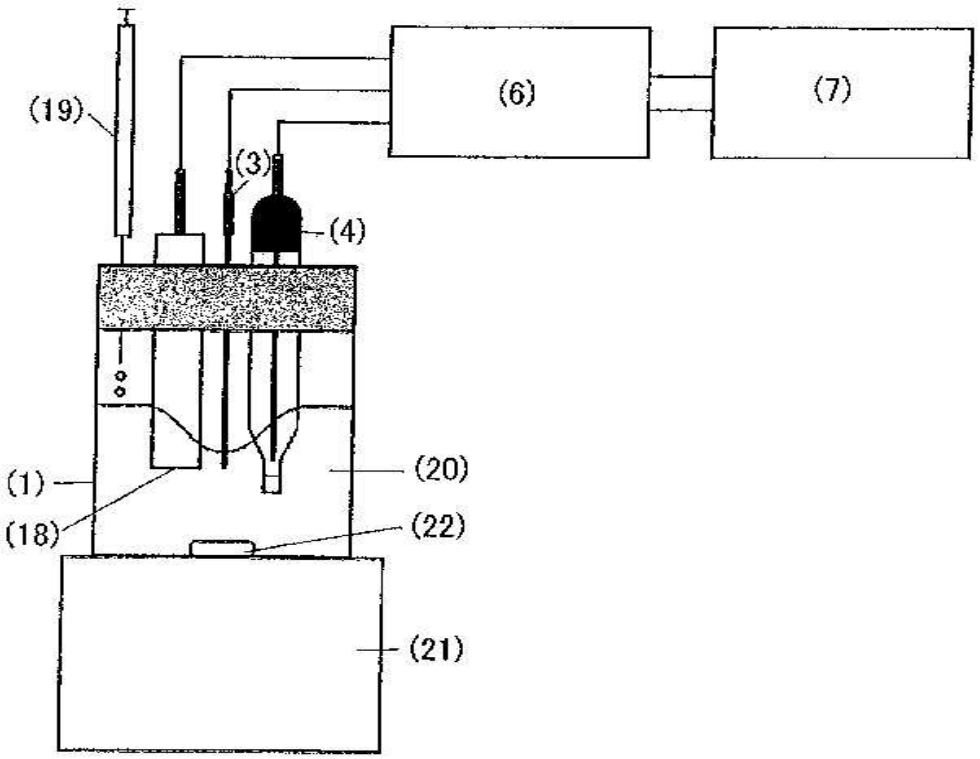
도면3



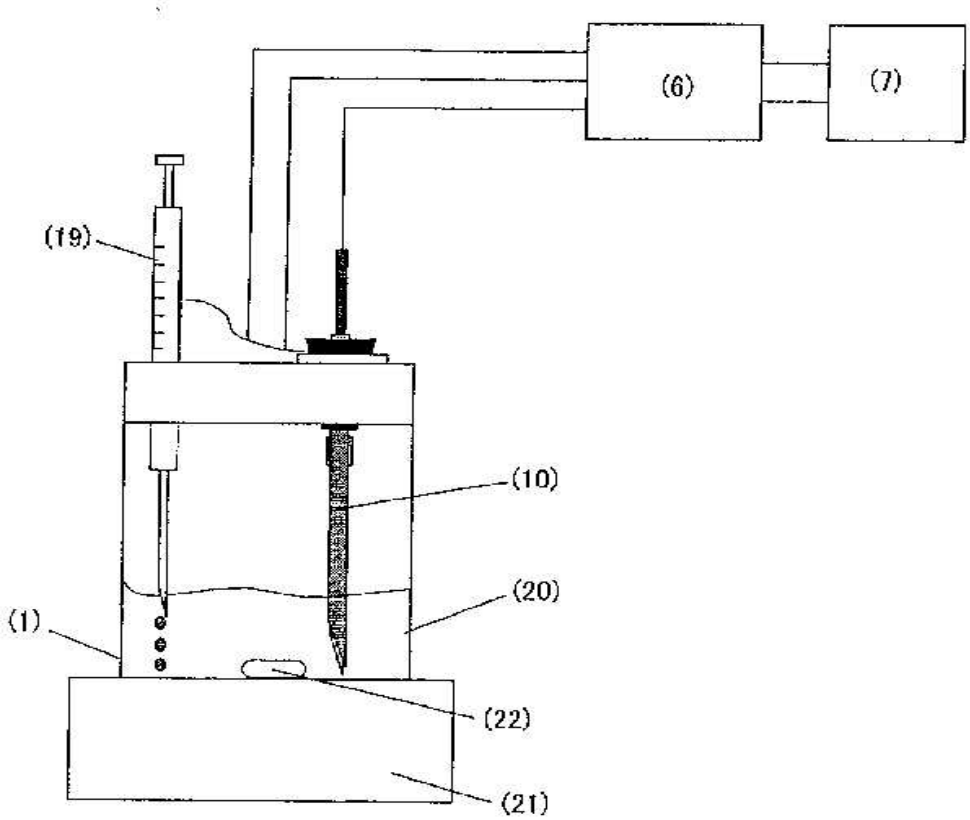

도면4



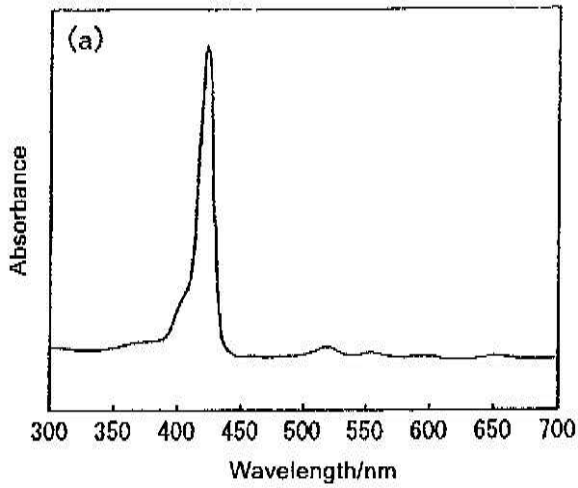
도면5

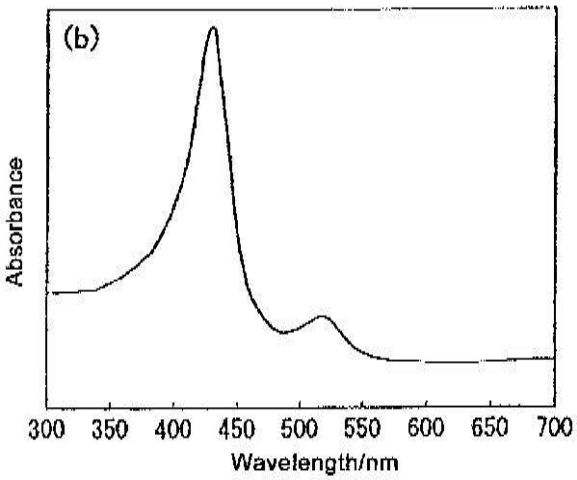



도면6

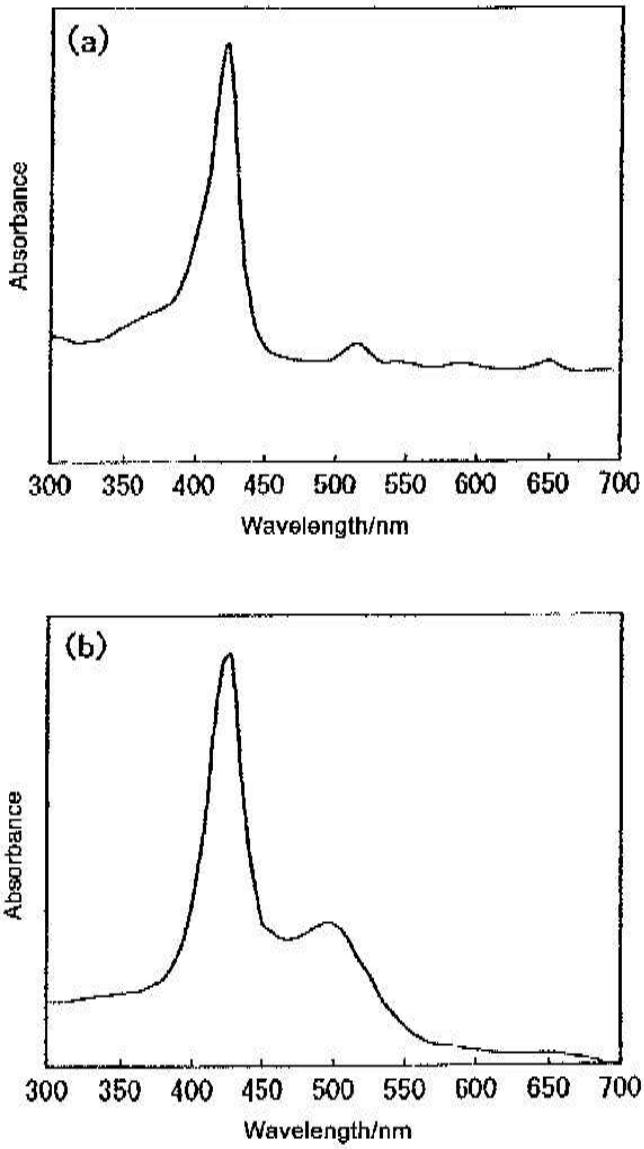


도면7

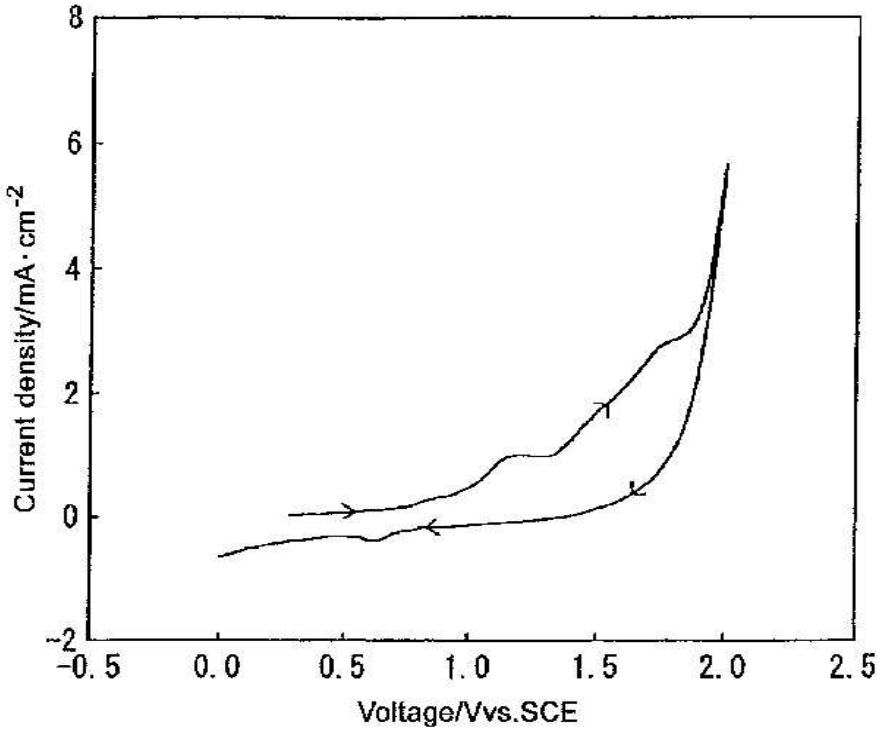

(a)
Absorbance
300 350 400 450 500 550 600 650 700
Wavelength/nm


(b)
Absorbance
300 350 400 450 500 550 600 650 700
Wavelength/nm

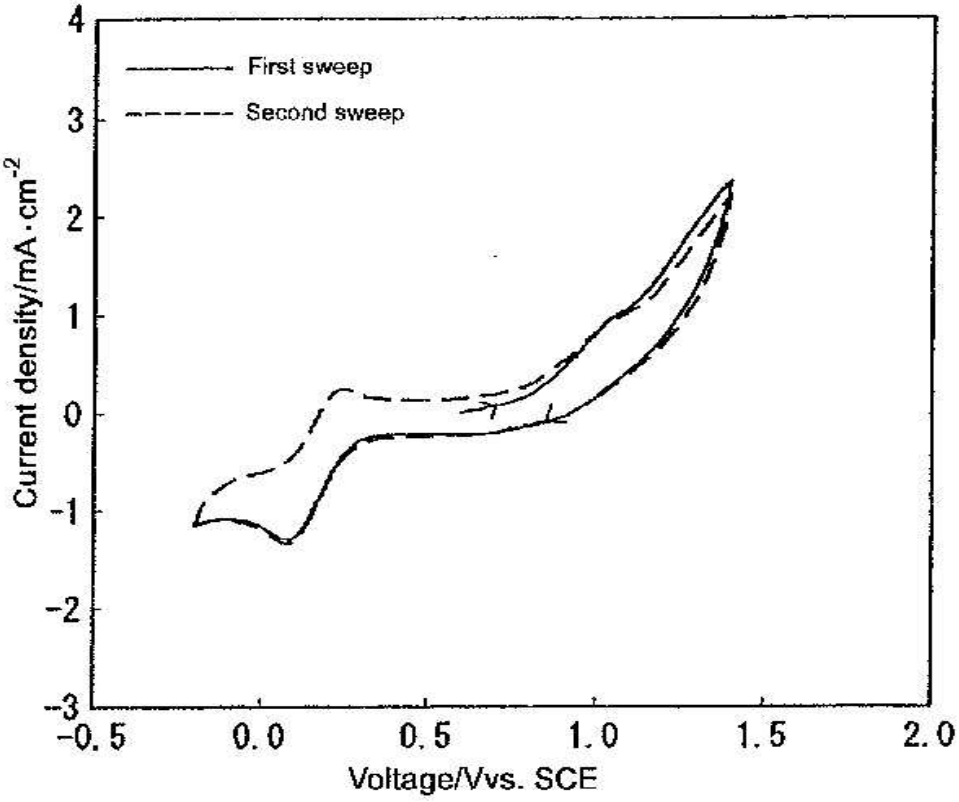
도면8


(a)
Absorbance
300 350 400 450 500 550 600 650 700
Wavelength/nm
(b)
Absorbance
300 350 400 450 500 550 600 650 700
Wavelength/nm

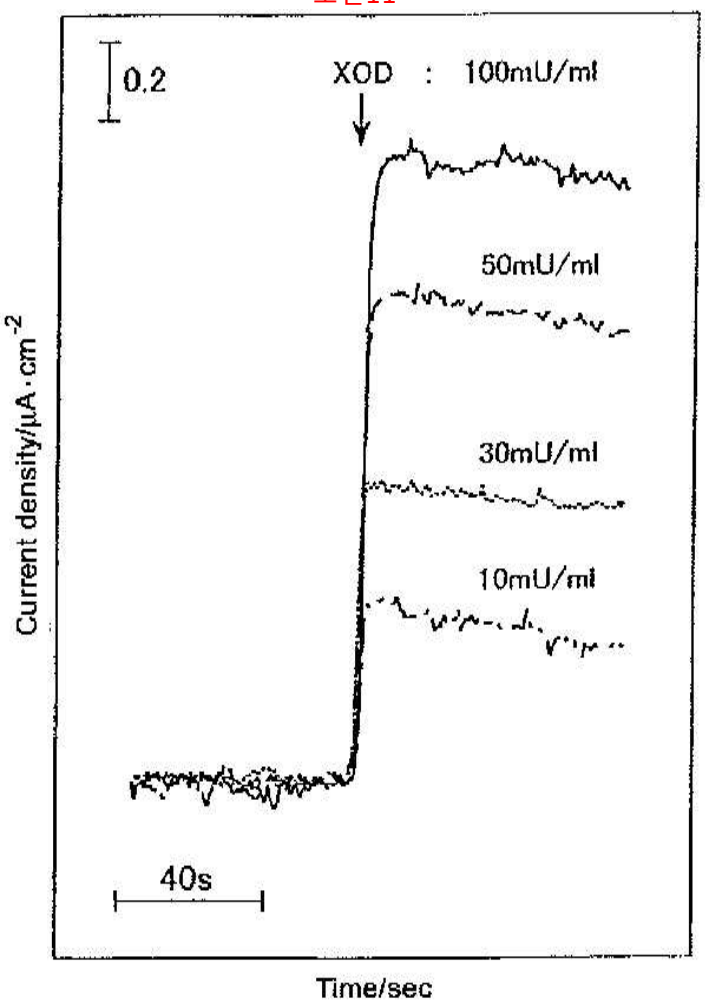
도면9


Current density/mA·cm$^{-2}$
Voltage/Vvs.SCE
8
6
4
2
0
-2
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5

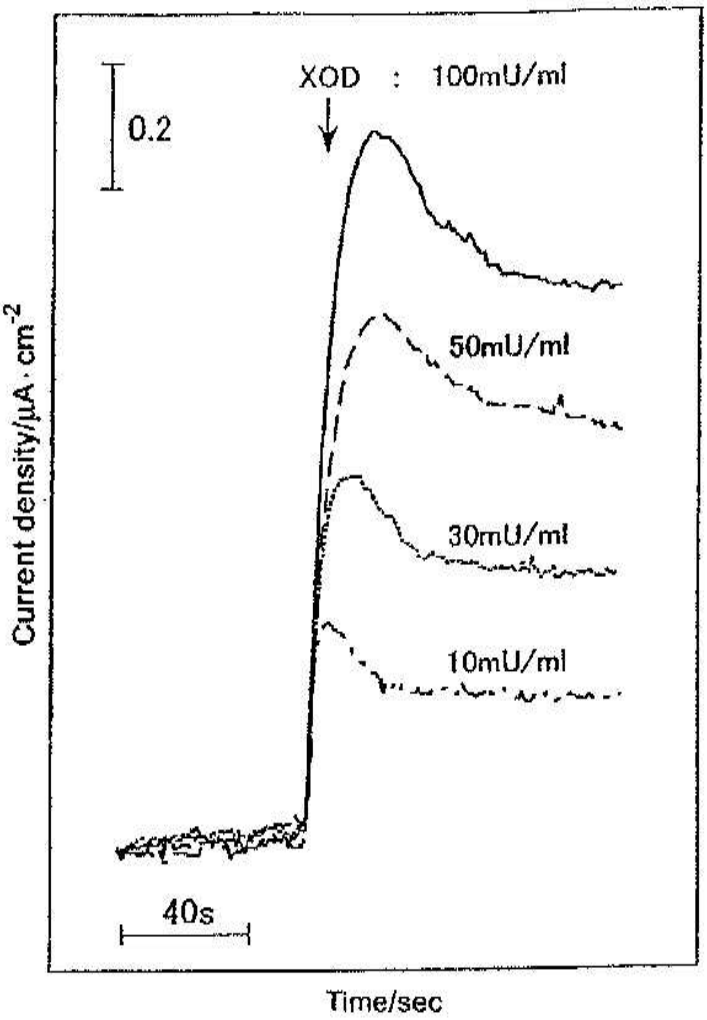
도면10


First sweep
Second sweep
Current density/mA·cm$^{-2}$
Voltage/Vvs. SCE
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0

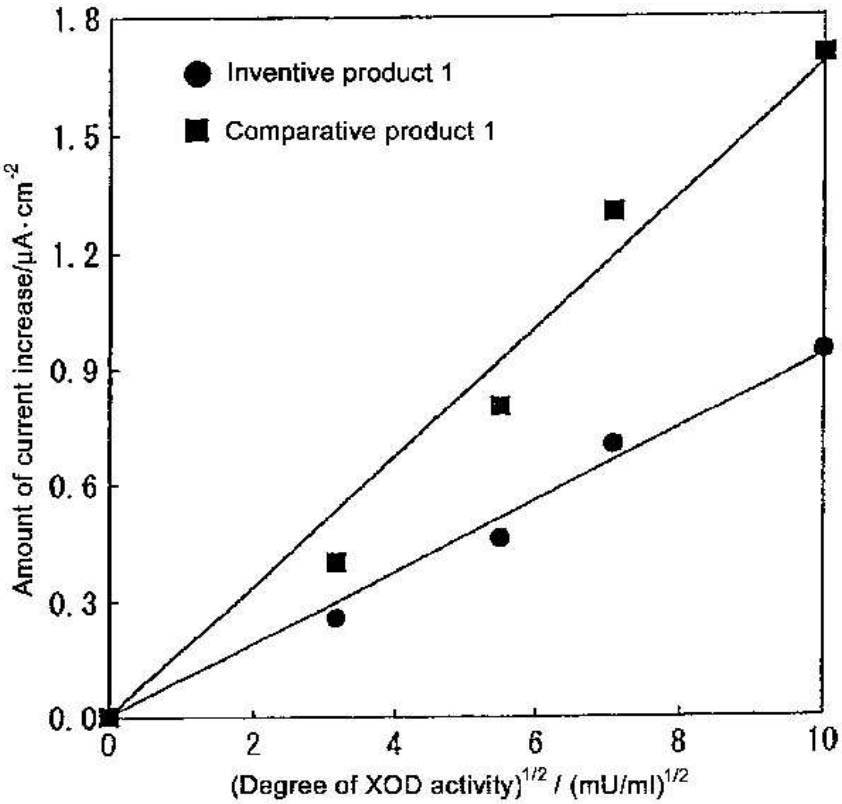
도면11


0.2
XOD : 100mU/ml
50mU/ml
30mU/ml
10mU/ml
40s
Current density/μA·cm-2
Time/sec

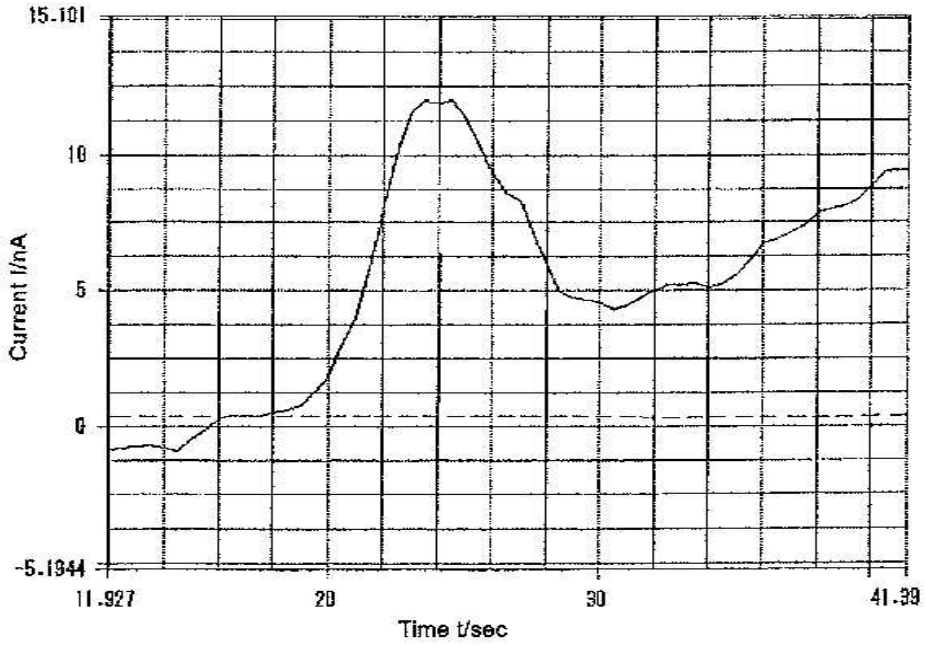
도면12


XOD : 100mU/ml
0.2
50mU/ml
30mU/ml
10mU/ml
40s
Current density/μA·cm-2
Time/sec

도면13

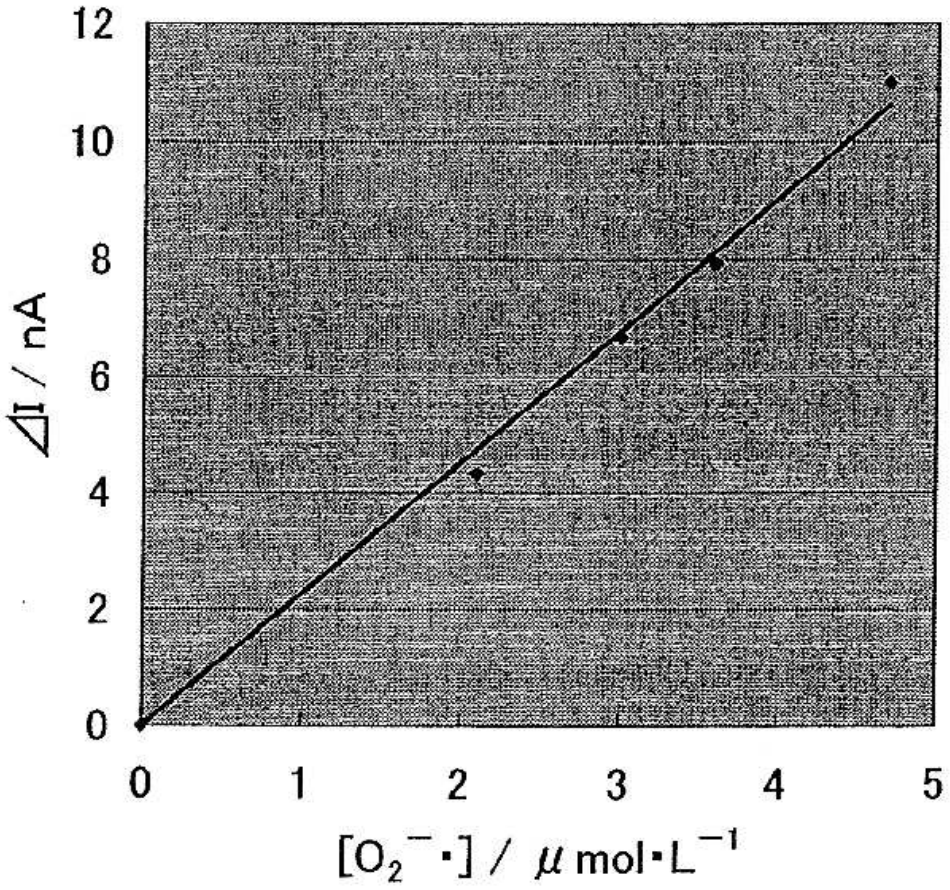

Inventive product 1
Comparative product 1
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
0
2
4
6
8
10
Amount of current increase/μA·cm-2
(Degree of XOD activity)1/2 / (mU/ml)1/2

도면14




ΔX 0.053420second ΔY 10.995nA

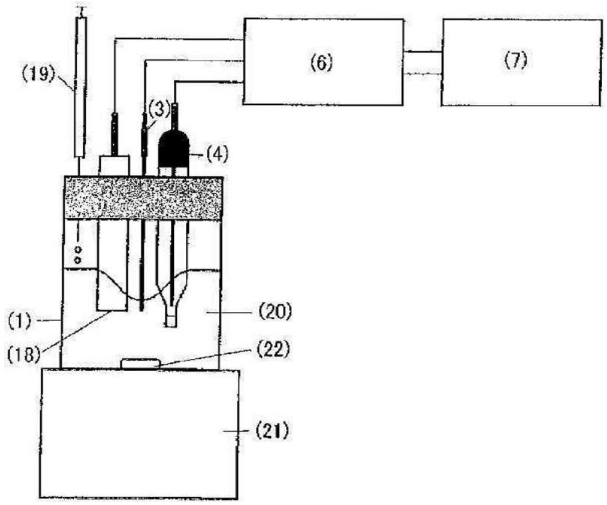
도면15



| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 活性氧物种电极和使用该电极的传感器 | | |
| 公开(公告)号 | KR1020040073500A | 公开(公告)日 | 2004-08-19 |
| 申请号 | KR1020047009727 | 申请日 | 2002-12-19 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 幼儿在鼻子吐<br>竹林仁<br>齐塔花道夜市<br>ABE正彦<br>安倍晋三正彦 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 幼儿买马鼻托<br>齐塔花道夜市<br>阿贝买地的鼻子. | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 幼儿买马鼻托<br>齐塔花道夜市<br>阿贝买地的鼻子. | | |
| [标]发明人 | YUASA MAKOTO<br>유아사마코토<br>ABE MASAHIKO<br>아베마사히코<br>YAMAGUCHI ARITOMO<br>야마구치아리토모<br>SHIOZAWA ASAKO<br>ISHIKAWA MASUHIDE<br>이시카와마스히데<br>EGUCHI KATSUYA<br>에구치카쯔야<br>KIDO SHIGERU<br>키도시게루 | | |
| 发明人 | 유아사마코토<br>아베마사히코<br>야마구치아리토모<br>시오자와아사코<br>이시카와마스히데<br>에구치카쯔야<br>키도시게루 | | |
| IPC分类号 | C11D3/20 G01N27/30 C11D3/50 G01N33/49 C08G73/06 G01N27/416 C08G61/12 A61B5/00 G01N27/48 G01N27/49 C11D3/00 | | |
| CPC分类号 | G01N27/30 G01N33/4925 C11D3/0015 G01N27/49 A61B5/1473 C11D3/50 G01N27/3271 G01N27/3335 C11D3/2093 | | |
| 优先权 | 2001387899 2001-12-20 JP | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |


摘要(译)

并且在导电构件的表面上形成金属聚吡啶络合物的聚合物膜。 这种活性氧物质电极既可以在体外或体内环境中使用，也可以在活性氧物质中使用，例如超氧阴离子自由基，过氧化氢或OH，或其他自由基活性物质。可以检测NO，ONOO-等，并且可以检查水中活性氧物质的存在，例如食物，自来水，污水等中活性氧物质的存在。 五 指数方面 活性氧，超氧阴离子自由基，活性氧电极，导电元件，金属聚吡啶复合物，对电极，参比电极，传感器


(19)
(6)
(7)
(3)
(4)
(1)
(18)
(20)
(22)
(21)