

## 철 화합물을 이용한 당 탈수소화 효소-혈당센서의 연구

최영봉<sup>1</sup> · 이정민<sup>1</sup> · 김세영<sup>2</sup> · 김혁한<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>단국대학교 자연과학대학 화학과

<sup>2</sup>경기수원외국인학교

(2013년 12월 4일 접수 : 2014년 1월 8일 채택)

## Development of GDH-glucose Sensor using Ferrate Complex

Young-Bong Choi<sup>1</sup>, Jung-min Lee<sup>1</sup>, Samantha Saeyoung Kim<sup>2</sup>, and Hyug-Han Kim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of chemistry, College of Advanced Science, Dankook University, Anseo-dong, Cheonan, Chungnam 330-714, Republic of Korea

<sup>2</sup>Gyeonggi Suwon International School, 451 YoungTongRo, YoungTong-Gu, Suwon City, Gyeonggi-Do 443-808, Republic of Korea

(Received December 4, 2013 : Accepted January 8, 2013)

### 초 록

산화/환원 매개체는 혈당 센서의 구성에서 전극과 효소 반응의 전자 전달 매개체로서 중요한 역할을 담당한다. 본 연구에서는 기존의 산화/환원 매개체보다 전자 전달 반응이 용이하며, 높은 민감도를 위해 페레이트에 아닐린을 결합시켜, 1차 아민기를 갖는 Fe(CN)<sub>5</sub>-aminopyridine를 합성하였다. 합성된 Fe(CN)<sub>5</sub>-aminopyridine는 순환 전압 전류 법과 분광학적 방법을 이용하여 합성 결과를 확인하였다. 합성된 물질과 포도당을 측정하기 위한 당 탈 수소 효소를 ITO 전극 위에 고정시켜 효소전극을 제작하였고, 또한 신호 증폭을 위하여 금 나노 입자를 함께 고정시켰다. 금 나노 입자가 고정된 효소 전극은 그렇지 않은 전극에 비해 약 2배 가량의 전류 밀도가 증가함을 확인하였다. 만들어진 효소 전극에서 포도당의 농도 별 산화 촉매 전류를 순환 전압 전류 법으로 측정 한 결과 0.4 V (vs. Ag/AgCl)에서 전기적 신호가 발생되었으며, 포도당 0~10 mM의 농도 범위에서 전기적 신호가 선형 증가함을 확인할 수 있었다.

**Abstract :** Redox complexes to transport electrons from enzyme to electrodes are very important part in glucose sensor. Pentacyanoferrate-bound aniline (Fe(CN)<sub>5</sub>-aminopyridine), was prepared as a potential redox mediator in a glucose dehydrogenase (GDH)-glucose sensor. The synthesized pyridyl-NH<sub>2</sub> to pentacyanoferrate was characterized by the electrochemical and spectroscopic methods. A amperometric enzyme-linked electrode was developed based on GDH, which catalyses the oxidation of glucose. Glucose was detected using GDH that was co-immobilized with an Fe(CN)<sub>5</sub>-aminopyridine and gold nano-particles (AuNPs) on ITO electrodes. The Fe(CN)<sub>5</sub>-aminopyridine and AuNPs immobilized onto ITO electrodes provided about a two times higher electrochemical response compared to that of a bare ITO electrode. As glucose was catalyzed by wired GDH, the electrical signal was monitored at 0.4 V versus Ag/AgCl by cyclic voltammetry. The anode currents was linearly increased in proportion to the glucose concentration over the 0~10 mM range.

**Keywords :** Glucose sensor, Glucose dehydrogenase (GDH), Pentacyanoferrate, Gold nano-particles (AuNPs)

\*E-mail: hankim@dankook.ac.kr

## 1. 서 론

혈당 센서(glucose sensor)는 바이오센서(biosensor)의 일종으로 바이오센서란 생체 시료를 선택적으로 감지하는 부분과 감지한 시료를 알맞은 신호로 전환하는 부분으로 구성된 측정기기를 말한다. 이 신호를 변환하여 측정하는 방법은 형광, 발색, 전기화학, 열 센서 등 여러 가지 방법이 있는데 여러 가지 변환 방법 중에서 전기화학 신호 변환 방법은 특정한 정보를 직접 전기적 신호로 변환시켜 준다는 점에서 가장 간단한 방법이다. 이러한 장점을 바탕으로 전기화학방법을 이용한 바이오센서 측정기기는 낮은 비용으로 소형화시킬 수 있고, 정확한 측정을 할 수 있는 편리성 때문에 상업적으로 매우 선호되는 방법 중의 하나이다.<sup>1-3)</sup>

여러 가지 장점에도 불구하고 선택성(selectivity)이 부족하다는 문제점으로 전기화학방법을 바이오센서에 적용시키기가 힘들었지만 생체물질을 전극과 결합하여 선택성을 보완할 수 있게 되었다. 이러한 전기화학적 방법을 이용하는 대표적인 예가 효소전극(enzyme-linked electrode)이다. 효소란 특정한 생체물질만 선택적으로 결합, 반응을 유도하는 성질을 가지고 있으므로 효소를 전극 상에 고정하여 효소반응에 의해 발생하는 산화/환원 반응을 직접적으로 전기화학 측정기기를 이용하여 검출할 수 있다. 이 효소전극 중 가장 먼저 상용화에 성공한 예가 혈당 센서이다. 일반적인 혈당 센서에 사용되는 효소인 당 산화효소(glucose oxidase; GOx)는 선택적으로 포도당(glucose)을 산화시키고 값싸고 쉽게 구할 수 있으며, 다른 효소에 비해 안정하며 또한 화학적으로 고정화하였을 때 잘 견디는 이유 때문에 비교적 상업적으로 많이 사용되어 왔다.<sup>4-8)</sup>

이러한 장점을 가지는 반면에 당 산화효소는 산화기작이 일어날 때 산소의 영향을 많이 받으므로 고도가 높거나 기압이 낮은 지역에서 혈당체크를 하게 되면 그 결과가 실제 수치보다 적게는 6%에서 많게는 15%까지 높게 나오는 오차가 발생할 수 있다. 그렇지만 당 탈 수소 효소(glucose dehydrogenase; GDH)의 경우 산소의 영향에 관계없이 일정하게 혈당 수치를 측정할 수 있게 되며 또한 온도에 대해서도 당 산화효소 보다 더욱 안정함을 보여 혈당 수치를 측정함에 있어서 더 좋은 결과를 가져온다는 연구가 보고 되고 있다.<sup>9-14)</sup> 하지만 혈액이나 소변에 존재하는 포도당(glucose)이 효소에 의해 산화되어 발생하는 전자를 전극에 직접적으로 전달되기에는 효소의 활성중심(active center)과 거리가 너무 멀기 때문에 이러한 전자 전달 반응(electron transfer reaction)을 용이하게 할 산화/환원 매개체(redox mediator)가 필수적으로 있어야 한다.

산화/환원 매개체를 이용한 방법은 효소의 내부 혹은 외부에 위치하고 있는 활성 중심과 전극 사이 전자 전달 반응을 빠르게 진행하고, 선택하는 매개체의 전위에 따라 생체 내에 존재하는 방해물질로부터의 간섭을 피할 수 있어 높은 선택성과 감도를 얻을 수 있다. 현재까지 많이 사용되는 산화/환원 매개체로서 지금까지는 페리시아나이드(ferricyanide), 페로센(ferrocene)과 페로센의 유도체 같은 금속화합물, polyaniline과 polypyrrole 같은 전도성 폴리머, tetrathiafulvalene과 N-methylphenaziniumtetracyanoquinodimethane 같은 전도성 염 등이 매개체로 연구 되었는데, 최근에는 8 족 금속인 철(iron), 루테늄(ruthenium), 오스뮴(osmium) 착 화합물에 대한 많은 연구가 진행 되어졌다.<sup>8,15-19)</sup> 그 중 오스뮴에 수화 고분자(hydrogel polymer)를 배워시킨 오스뮴 고분자 화합물이 효소 활성 중심에서 전극으로의 전자 전달이 용이하고, 높은 안전성과 선택성으로 가장 각광을 받고 있다.<sup>20,21)</sup> 하지만 오스뮴의 값비싼 가격으로 인해 산업적인 측면에서는 사용하기 어렵다는 단점을 가지고 있다. 당 탈 수소 효소를 사용한 혈당 센서는 주로 열 안정성이 우수하고 산소의 영향을 받지 않는 FAD(Flavin Adenine Dinucleotide) 당 탈 수소 효소(FAD-dependent glucose dehydrogenases (FADGDH))를 사용한다.<sup>21)</sup> 그러나 FAD 표면의 정전기적 전위(electrostatic potential)는 음의 전하(negative charge)로 되어 있어, 산화/환원 매개체의 전하가 음의 전하를 이루면 정전기적 반발(electrostatic repulsion)로 인해 전자 전달 반응이 용이하지 못하다.<sup>22)</sup> 이로 인해 음의 전하를 갖는 페리시아나이드와 페레이트 화합물을 당 탈 수소 효소를 사용한 혈당 센서에 적용을 하지 못하는 문제점이 있다.

최근에 이러한 점을 착안하여 polymer를 페레이트 화합물에 결합하고 이중효소 시스템(bienzyme system)을 이용하여 효소와의 전자전달 반응을 원활하게 하는 연구가 되어 졌다.<sup>22)</sup> 하지만 이중효소 시스템은 매우 복잡하기 때문에 본 논문에서는 이러한 문제점을 해결하기 위해 페레이트(ferrate)에 아닐린(aniline)를 배워시켜 1차 아민(primary amine; NH<sub>2</sub>)기를 갖는 페레이트 화합물 [Fe(CN)<sub>5</sub>-aminopyridine]을 합성하였다. 합성된 페레이트 화합물은 1차 아민(primary amine; NH<sub>2</sub>)기의 역할로 전극 표면 위에서 효소와의 화학적 결합으로 고정되기 때문에 효소 근처에서 물리적으로 일어나는 정전기적 반발을 감소시키고, 전극으로의 전자 전달 반응을 증가시켰다. 또한 기존의 혈당센서에서 산화/환원 매개체로 사용되었던 페리시아나이드 보다 당 탈 수소 효소와의 전자전달 반응이 더욱 더 안정하며, 선택성이 있어 포도당이 산화될 때, 높은 전류 신호를 갖는 결과를 얻었다.

효소반응에서 발생하는 전자의 전기적 신호를 검출기에 전달할 수 있는 전극은 낮은 신호의 생물학적 물질을 측정할 수 있는 높은 전도성이 중요하다.<sup>8,23-25</sup> 이러한 점에서 기존에 사용되던 탄소, 백금전극 이외의 새로운 소재를 이용한 전극 제작 연구가 많이 진행되고 있는데, 그 중 금 나노 입자(gold nano-particles)를 이용하여 전극이 제작 되었을 때 전극의 선택성과 전기적 응답에 대해 좋은 효과를 나타냈다는 것이 연구되어 왔다.<sup>26,27</sup>

본 논문에서는 이러한 점을 착안하여 금 나노 입자에 1차 아민기를 형성하고, 합성된 페레이트 화합물, 당 탈 수소 효소를 가교제(cross-linker)인 PEGDGE (poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)를 이용하여 ITO (Indium tin oxide) 전극 위에 상온에서 고정하였다. 제작한 효소전극은 포도당의 농도에 따라 감응하며 높은 전류 밀도와 효소와의 좋은 선택성을 보이고, 높은 안정성을 나타내었다. 이를 통해 좀 더 개선된 혈당 센서에 관한 연구 결과를 확인 할 수 있었다.

## 2. 실험 방법

### 2.1 시약 및 시료

실험에 사용된 시약인 Ammonium disodium pentacyanoamminferrate dihydrate는 Fluka의 제품을 정제 없이 그대로 사용했으며, Gold chloride trihydrate, 4-Aminopyridine, trisodium citrate, cysteamine hydrochloride, D-(+)-Glucose Anhydrous, ferricyanide, PEGDGE는 Aldrich(Milwaukee, WI)사의 제품을 정제 없이 그대로 사용하였다. 용매로 사용된 Ethyl ether는 덕산 약품사의 시약을 정제 없이 그대로 사용하였다. 위에 사용된 모든 시약은 분석시약 급이었다. 전기화학 실험에서 전해질로는 4.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl을 포함하는 Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)을 사용하였고, 효소인 GDH(706 units/mg)는 Toyobo의 제품을 정제 없이 그대로 사용하였다. 모든 용액의 제조와 실험을 위하여 3차 증류수 (Millipore, Bedford, MA; 저항 18 M $\Omega$ cm)를 사용하였다.

전기화학 실험에서 순환 전압 전류법(Cyclic Voltammetry; CV)을 측정을 하는데 사용된 기기는 CH Instruments (Austin, TX, USA)의 model 660B Electrochemical workstation을 사용하였으며 합성된 물질의 분광학적 분석을 하는데 사용한 기기는 Shimadzu (Japan)의 UV-1601PC model을 사용하였다. 또한 전극 표면의 특징을 확인하는데 사용된 기기는 SEM(Scanning Electron Microscopy, TESCAN/USA)을 사용하였다.

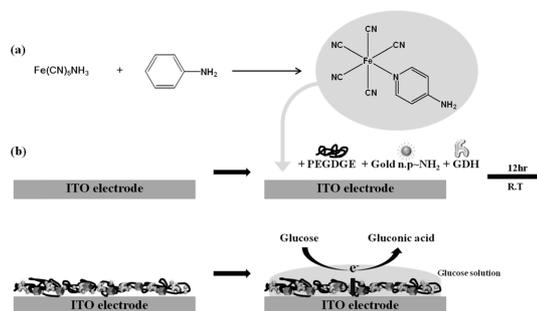


Fig. 1. (a) Synthesis of a redox mediator Fe(CN)<sub>5</sub>-aminopyridine. (b) Schematic fabrication procedures of the enzyme-linked electrode.

### 2.2 Fe(CN)<sub>5</sub>-aminopyridine의 합성

30 mL 등근 바닥 플라스크에 Ammonium disodium pentacyanoammin- ferrate dihydrate(0.5 g, 1.65 mmol)와 4-Aminopyridine(0.155 g, 1.65 mmol)을 증류수에 녹인 후 상온에서 30분 동안 반응하였다. 이 용액을 Ethyl ether에서 재침전하여 수득하였다. (Fig. 1(a)) 합성 물질의 확인은 순환전압 전류법과 UV-Visible spectroscopy 결과로 확인하였다.

### 2.3 금 나노 입자의 합성

Gold chloride trihydrate를 증류수에 0.01%로 묽힌 다음 이 용액이 균질한 상태가 되도록 잘 저어주면서 100 °C 로 끓여준다. 이 용액을 잘 저어주면서 1%의 trisodium citrate용액을 서서히 첨가하여준다. 이때 gold chloride trihydrate용액의 색 변화를 관찰하여 붉은색을 나타낼 때 까지 trisodium citrate를 가하여 40 nm크기를 가지는 붉은색 콜로이드 상태의 금 나노 입자를 수득하였다.<sup>28</sup> 수득한 금 나노 입자 콜로이드용액을 원심 분리 하여 상층 액을 제거하는 과정을 몇 차례 거친 후 100 mM의 cysteamine hydrochloride를 첨가하여 1 시간 동안 초음파 반응기로 반응하였다. 그 후 증류수로 세척을 하여 상층 액을 따라내어 금 나노 입자표면에 cysteamine hydrochloride가 처리된 60 nm 크기의 금 나노 입자를 수득 하였다.

### 2.4 효소 전극의 제작

Fe(CN)<sub>5</sub>-aminopyridine(10 mg/mL)와 당 탈 수소 효소(10 mg/mL)를 섞은 뒤 이 용액에 가교제로 PEGDGE (5 mg/mL)을 넣고 cysteamine hydrochloride를 처리한 금 나노 입자를 첨가하여 혼합물을 만들었다. 이때 양은 부피 비로 4:4:1:2 이었다.<sup>29,30</sup> 이 혼합액을 ITO 전극 위에 각각 20  $\mu$ L 씩 casting하고 24시간 건조하여 포도당 측정을 위한 전극을 제작하였다. (Fig. 1(b)) 산화/환원 매개체의 비교 분석을 위해 Fe(CN)<sub>5</sub>-

aminopyridine 대신  $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 를 동일 농도로 섞어  $\text{Fe}(\text{CN})_5$ 가 고정화된 전극도 제작하였다. 또한 금 나노 입자의 효과를 보기 위해 금 나노 입자가 포함되지 않은 전극도 제작하였다. 제작된 ITO전극 표면의 금 나노 입자의 입자 크기와 밀도는 FE-SEM을 통해 확인하였다.

### 2.5 효소 전극을 이용한 당의 측정

제작한 전극에 농도가 다른 포도당 용액(0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mM) 40  $\mu\text{L}$ 을 올려둔 후 30초간 반응한 후 순환전압 전류법을 이용하여 포도당의 농도에 따른 전기적 특성을 관찰하였다. 이때 포도당을 녹인 용매는 0.1 M의 Phosphate buffered saline이었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -aminopyridine의 합성

Ammonium disodium pentacyanoamminferrate dihydrate와 4-aminopyridine은 증류수를 용매로 피리딘

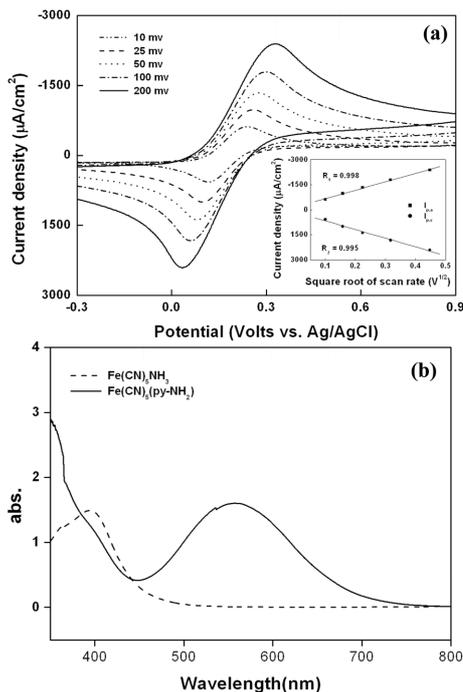


Fig. 2. (a) Cyclic voltammograms of 500 mM of  $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -aminopyridine dissolved in 0.1 M PBS buffer (pH 7.2) with 0.14 M NaCl on the ITO electrodes at different scan rates (0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.20  $\text{V s}^{-1}$ ). Inset: The variation of the peak currents density vs. the square root of the scan rate.  $R_1 = 0.998$  ( $I_{p,a}$ , square),  $R_2 = 0.995$  ( $I_{p,c}$ , dot). (b) UV-Vis spectrophotograms of  $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3$  and  $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -aminopyridine.

의 N 부분이 금속에 킬레이트 형성이 잘 되는 반응을 이용하여  $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -aminopyridine으로 합성하였다. 생성된 물질은 Ethyl ether를 이용해서 재침전하여 분말형태로 얻을 수 있었다.

먼저 순환 전압 전류법의 결과로  $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -aminopyridine이 Ag/AgCl 기준전극 (0.0 Volt)에 대하여 0.141 V에서 전위 값( $E_{1/2}$ )이 나오게 되고, 주사 속도 (scan-rate)에 따른 순환 전압 전류법의 그래프를 보면 정상 상태(Steady-state)의 산화/환원이 일어남을 확인할 수 있다(Fig. 2(a)). 또한 주사 속도에 제곱근 (square root)을 취한 값에 비례하여 산화 신호(anodic peaks;  $I_{p,a}$ )와 환원 신호(cathodic peaks;  $I_{p,c}$ )가 0.01–0.2 V/s의 범위에서 선형성(linearly)이 나오는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2(a) insert). 이 결과는 전극 위에서 전자 전달반응이 확산 반응(diffusion reaction)에 의해 조절되고 있음을 알려주며, 산화/환원 매개체로서의 성능이 우수함을 나타내준다.<sup>31)</sup> UV-Vis 결과에서는 초기물질인 Ammonium disodium pentacyanoamminferrate dihydrate의 흡광도가 400 nm정도에서 나오는 것과 비교하여 합성된  $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -aminopyridine은 150 nm정도 이동한 550 nm에서 흡광도가 나타나는 것을 통해 합성이 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2(b)).

### 3.2 효소 전극의 표면적 특성

ITO 전극 위에  $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -aminopyridine과 당 탈 수소 효소, 금 나노 입자를 PEGDGE를 이용하여 고정시킨 후 표면의 특성을 관찰하기 위해 FE-SEM을 측정하였다(Fig. 3).

Figure 3의 SEM이미지에 의한 전극표면의 형태를 보면 금 나노 입자가 고정되지 않은 ITO전극의 표면사진 (a), (b)와 금 나노 입자가 뚜렷하게 확인되는 (c), (d)를 비교하였을 때 명확하게 50 nm–80 nm 정도의 크기를 가지는 금 나노 입자가 PEGDGE의 고분자 백본(backbone)을 따라 입자몽치를 이루고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 금 나노 입자에 처리된 cysteamine chloride의 1차 아민, 페레이트 화합물의 피리딘-아민, 효소의 아민과 이 물질들을 고정하는데 사용된 PEGDGE의 알데하이드 작용기(aldehyde functions)가 Schiff bases 형성을 통해 doubly cross-link 를 형성하여 전극 위에 고정된 결과라고 볼 수 있다.<sup>32)</sup>

### 3.3 효소전극을 이용한 포도당의 측정

제작된 효소 전극 위에 포도당과 당 탈 수소 효소가 반응하여 나오는 전자를 산화/환원 매개체가 전극에 전자를 전달할 때 발생하는 촉매산화전류를 느린 순환 전압 전류법을 이용하여 포도당 농도 (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mM)별로 측정하였다. 이 때 가해진 전위의 범

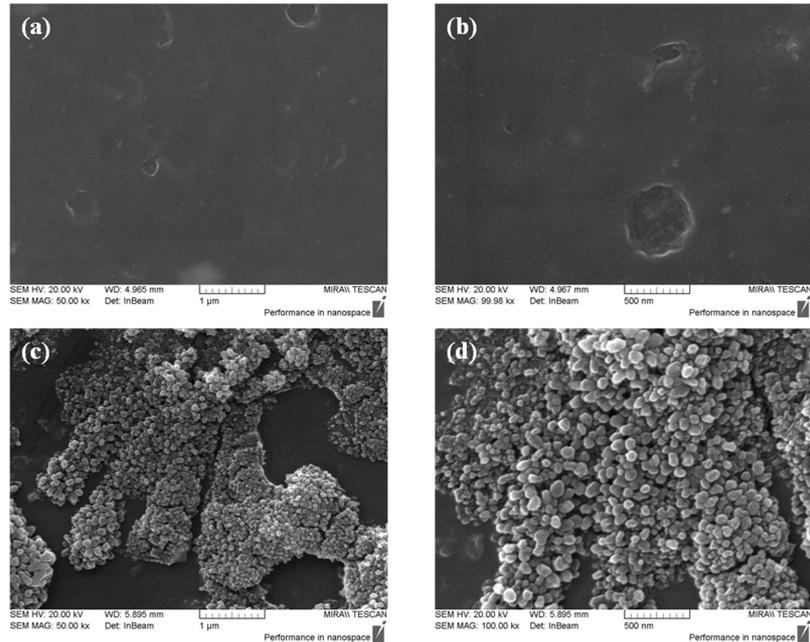


Fig. 3. FE-SEM images on bare ITO electrode of  $\times 50$  K (a),  $\times 100$  K (b), and gold deposited ITO electrode  $\times 50$  K (c),  $\times 100$  K (d).

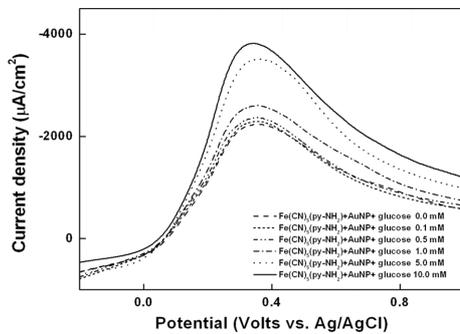


Fig. 4. Linear sweep voltammograms of the enzyme-linked electrodes in 0.1 M PBS buffer (pH 7.2) made by  $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -aminopyridine with (solid line) and without (dash line) glucose containing 10 mM at scan rate of 0.01 V/s.

위는 0.2~1.0 V 이고, scan rate은 0.01 V/s 이었다. 촉매 전류가 나타나는 전위의 위치 중 전류 값이 일정하게 유지되는 한 지점을 0.4 V (versus Ag/AgCl)로 고정하고 검정곡선을 도시하여 포도당 농도 별로 발생하는 촉매전류의 상관관계를 확인 하였다. 본 논문에서 산화/환원 매개체로 사용한  $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -aminopyridine 물질은 포도당의 농도 (10 mM)에 따른 촉매 전류밀도(current density)가 약  $4000 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 가 나오는 것을 알 수 있었고 (Fig. 4), 이는 금 나노 입자가 포함되지 않은 전극에 비

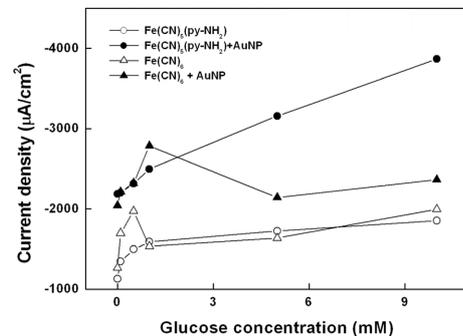


Fig. 5. Catalytic anodic currents as a function of the concentration of glucose between 0 and 10 mM. (enzyme-linked electrode conditions:  $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -aminopyridine with (black circle) and without (white circle) gold nanoparticles.  $\text{Fe}(\text{CN})_6$  with (black triangle) and without (white triangle) gold nano-particles).

해 약 2배 이상의 높은 전류밀도가 발생함을 알 수 있었다(Fig. 5). 반면에 산화환원 매개체로써 널리 사용되는  $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 는 ITO전극 위에 금 나노 입자를 섞지 않고 제작한 전극의 경우 당의 유무에 따라 감응하여 산화촉매전류가 나타나긴 했지만 다소 민감도가 떨어져 농도 별로 신호가 증가하는 것을 관찰할 수 없었고, 금 나노 입자를 혼합하여 고정시킨 전극의 경우에도 약간의 전류밀도가 증가함은 보였지만 포도당의 농도 별 전류밀

도의 재현성이 없어 오히려 금 나노 입자가 제 역할을 제대로 하지 못하는 것으로 보였다(Fig. 5).

이 결과는  $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 의 경우 PEGDGE 폴리머 백분과 반응할 1차 아민이 존재하지 않아 전극 위에 물리적으로 흡착하여 고정되므로 포도당을 반응시켜 측정할 경우 용매에 녹아 나와 전극과 거리가 다소 멀어지며 물질과 전극간의 전자전달 반응이 용이하지 못한 결과로 판단된다. 또한 효소에 활성 부분과의 거리도 멀어지고, 입체적인 구조가 작은  $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 가 효소에 접근하지 못하여 전기적인 촉매 반응이 잘 일어나지 못한다.<sup>22)</sup> 반면에  $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -aminopyridine은 합성된 피리딘기의 1차 아민이 PEGDGE의 알데하이드 기와 반응하여 효소와 금 나노 입자들과 함께 전극에 단단히 고정되어 물질과 전극간의 전자전달반응이 원활해지며 신호의 세기가 좋아지고 민감도 또한 증가되는 결과를 가져왔다. 또한 포도당의 정량적 측정을 위한 검출 한계(detection limit)는 0.05 mM 이었고, 이는 다른 전극으로 5회 실험하여 반복적인 재현성(reproducibility)을 얻을 수 있었다(N = 5).

#### 4. 결 론

본 연구는 혈당센서에서 사용되는 산화/환원 매개체를 합성하기 위하여 페레이트에 일차아민을 갖는 피리딘을 배위시켜  $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -aminopyridine을 합성하였다. 이 물질의 합성여부를 CV와 UV-Vis를 통해 확인하였고 기존의 혈당 센서에서 사용되었던 당 산화 효소의 단점을 보완하기 위해 당 탈 수소 효소를 이용해 ITO 전극 위에 효소 전극을 제작하였다. 또한 신호의 증폭을 위해 금 나노 입자에 1차 아민을 결합시켜 전극 위에 산화/환원 매개체, 효소를 함께 가교제인 PEGDGE를 이용하여 고정화 시켰다. 제작된 효소전극은 포도당의 농도 별 산화 촉매 전류가 금 나노 입자가 없을 때보다 2배 이상 증폭됨을 알 수 있었고, 기존의 혈당 센서의 산화/환원 매개체인  $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 보다 선택성과 민감성 그리고 안정성이 우수함을 알 수 있었다. 이는 고성능의 혈당 센서의 개발에 응용될 수 있을 것이라 예상된다.

#### Acknowledgment

본 연구는 2013년도 산학협력대학 LINC사업단 산학공동 기술 개발과제사업을 통하여 수행하였습니다.

#### 참고문헌

1. L. C. Clark Jr. and C. Lyons, 'Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery' *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
2. A. L. Crumbliss, H. A. O Hill, and D. J. Page, 'The electrochemistry of hexacyanoruthenate at carbon electrodes and the use of ruthenium compounds as mediators in the glucose/glucose oxidase system' *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **206**, 327 (1986).
3. M. A. Lange and J. Q. Chambers, 'Amperometric determination of glucose with a ferrocene-mediated glucose oxidase/polyacrylamide gel electrode' *Anal. Chim. Acta.*, **175**, 89 (1985).
4. D. A. Gough, J. Y. Lucisano, and P. H. S. Tse, 'Two-dimensional enzyme electrode sensor for glucose' *Anal. Chem.*, **57**, 2351 (1985).
5. A. P. F. Turner, 'Diabetes mellitus: biosensors for research and management' *World Biotech. Rep.*, **1**, 181 (1985).
6. K. Mckenna and A. Brajter-Toth, 'Tetrathiofulvalene tetracyanoquinodimethane xanthine oxidase amperometric electrode for the determination of biological purines' *Anal. Chem.*, **59**, 954 (1987).
7. P. D. Hale and T. A. Skotheim, 'Cyclic voltammetry at TCNQ and TTF-TCNQ modified platinum electrodes: A study of the glucose oxidase/glucose and galactose oxidase/ galactose systems' *Synth. Met.*, **28**, 853 (1989).
8. B. A. Gregg and A. Heller, 'Redox polymer films containing enzymes. 2. Glucose oxidase containing enzyme electrodes' *J. Phys. Chem.*, **95**, 5976 (1991).
9. B. P. Giordano, W. Thrash, L. Hollenbaugh, W. P. Dube, C. Hodges, A. Swain, C. R. Banion, G. L. Klingensmith, 'Performance of seven blood glucose testing systems at high altitude.' *Diabetes Educ.*, **15**, 444 (1989).
10. O. Pecchio, S. Maule, M. Migliardi, M. Trento, and M. Veglio, 'Effects of exposure at an altitude of 3,000 m on performance of glucose meters' *Diabetes Care.*, **23**, 129, (2000).
11. K. Moore, N. Vizzard, C. Coleman, J. McMahon, R. Hayes, and C. J. Thompson, 'Extreme altitude mountaineering and type 1 diabetes: the Diabetes Federation of Ireland Kilimanjaro Expedition' *Diabet Med.*, **18**, 749 (2001).
12. E. H. Piepmeier Jr., C. Hammett-Stabler, M. E. Price, G. B. Kemper, and M. G. Davis Jr., 'Atmospheric pressure effects on glucose monitoring devices' *Diabetes Care.*, **18**, 423 (1995).
13. J. F. Gautier, A. X. Bigard, P. Douce, A. Duvallat, and G. Cathelineau, 'Influence of simulated altitude on the performance of five blood glucose meters' *Diabetes Care.*, **19**, 1430 (1996).
14. C. Barnett, F. Ryan, and L. Ballonoff, 'Effect of altitude on the self-monitoring of blood-glucose' *Diabetes.*, **36** (Suppl. 1), 117A (1987).
15. M. S. Vreeke, K. T. Yong, and A. Heller, 'A Thermostable Hydrogen Peroxide Sensor Based on "Wiring" of Soybean Peroxidase' *Anal. Chem.*, **67**, 4247 (1995).
16. R. M. Ianiello, T. J. Lindsay, and A. M. Yacynych, 'Differential pulse voltammetric study of direct electron transfer in glucose oxidase chemically modified graphite electrodes' *Anal. Chem.*, **54**, 1098 (1982).

17. O. Miyawaki and L. B. Wingard, Jr., 'Electrochemical and enzymatic activity of flavin adenine dinucleotide and glucose oxidase immobilized by adsorption on carbon' *Biotech. Bioeng.*, **26**, 1364 (1984).
18. S. Anderson, E. C. Constable, K. R. Seddon, E. T. Turp, J. E. Baggott, and J. Pilling, 'Preparation and characterization of 2,2-bipyridine-4,4-disulphonic and-5-sulphonic acids and their ruthenium(II) complexes' *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2247 (1985).
19. C. Taylor, G. Kenausis, I. Katakis, and A. Heller, "'Wiring" of glucose oxidase within a hydrogel made with polyvinyl imidazole complexed with [(Os-4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)Cl]<sup>+2+</sup>' *J. Electroanal. Chem.*, **396**, 511 (1995).
20. T. J. ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller, 'Glucose electrodes based on cross-linked bis(2,2'-bipyridine) chloroosmium<sup>(+2+)</sup> complexed poly(1-vinylimidazole) films' *Anal. Chem.*, **65**, 3512 (1993).
21. M. N. Zafar, N. Beden, D. Leech, C. Sygmund, R. Ludwig, and L. Gorton, 'Characterization of different FAD-dependent glucose dehydrogenases for possible use in glucose-based biosensors and biofuel cells' *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 2069 (2012).
22. C. H. Nieh, S. Tsujimura, O. Shirai, and K. Kano, 'Electrostatic and steric interaction between redox polymers and some flavoenzymes in mediated bioelectrocatalysis' *J. Electroanal. Chem.*, **689**, 26 (2013)
23. M. V. Pishko, A. C. Michael, and Adam Heller, 'Amperometric glucose microelectrodes prepared through immobilization of glucose oxidase in redox hydrogels' *Anal. Chem.*, **63**, 2269 (1991).
24. H. Yang, T. D. Chung, Y. T. Kim, C. A. Choi, C. H. Jun, and H. C. Kim, 'Glucose sensor using a microfabricated electrode and electropolymerized bilayer films' *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 251 (2002).
25. T. J. Ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller, "'Wired' enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances' *Anal. Chem.*, **66**, 2451 (1994).
26. M. O. Finot, G. D. Braybrook, and M. T. McDermott, 'Characterization of electrochemically deposited gold nanocrystals on glassy carbon electrodes' *J. Electroanal. Chem.*, **466**, 234, (1999).
27. M. O. Finot and M. T. McDermott, 'Characterization of n-alkanethiolate monolayers adsorbed to electrochemically deposited gold nanocrystals on glassy carbon electrodes' *J. Electroanal. Chem.*, **488**, 125 (2000).
28. Asep Rohiman, Isa Anshori, Akhmadi Surawijaya, and Irman Idris, 'Study of Colloidal Gold Synthesis Using Turkevich Method' *AIP Conf. Proc.*, **1415**, 39 (2011).
29. G. Binyamin, J. Cole, and A. Heller, 'Mechanical and Electrochemical Characteristics of Composites of Wired Glucose Oxidase and Hydrophilic Graphite' *J. Electrochem. Soc.*, **147**, 2780 (2000).
30. G. Binyamin and A. Heller, 'Stabilization of Wired Glucose Oxidase Anodes Rotating at 1000 rpm at 37'. *J. Electrochem. Soc.*, **146**, 2965 (1999).
31. E. Steckhan and T. Kuwana, 'Spectrochemical study of mediators. I. Bipyridylum Salts and their electron transfer rates to cytochrome C.' *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **89**, 253 (1974).
32. P. Calvert, P. Patra, and D. Duggal, 'Epoxy hydrogels as sensors and actuators' *EAPAD.*, **6524**, 65240M (2007).