



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0101292
(43) 공개일자 2013년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 27/30 (2006.01) *B82B 3/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0022320

(22) 출원일자 2012년03월05일

심사청구일자 2012년03월05일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김주훈

서울특별시 서초구 방배3동 레미안타워 201동 1105호

주희영

서울특별시 성북구 석관동 168-73

(74) 대리인

최덕규, 임상엽, 고영갑, 김성태, 권정기

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 덴드리머로 캡슐화된 나노입자로 표면개질된 탄소전극 및 표면개질 방법

(57) 요약

본 발명은 덴드리머로 캡슐화된 나노입자로 표면개질하여 전기화학적 활성과 생화학적 활성을 동시에 확보할 수 있고, 다양한 생활성 물질과 결합 가능한 탄소전극 및 탄소전극의 표면개질 방법으로서, 하기 화학식 1로 표시되는 덴드리머로 캡슐화된 나노입자에 의해 표면개질된 탄소전극을 제공하며, X-DENs를 합성하는 단계; 상기 X-DENs를 탄소전극 표면에 고정화하는 단계; 및 생활성 물질을 상기 X-DENs에 고정화하는 단계를 포함하는 탄소전극의 표면개질 방법을 제공한다.

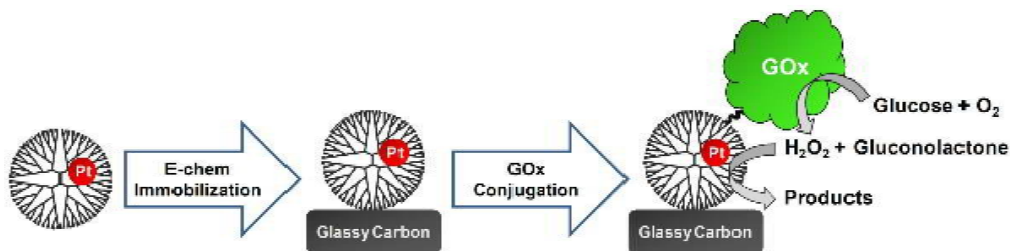
[화학식 1]

X-DENs

(상기 화학식 1에서,

X는 단원소 나노입자, 알로이 나노입자 또는 코어-셸 구조의 나노입자이다).

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110027269

부처명 한국연구재단

연구사업명 일반 연구자 지원사업

연구과제명 유전자 마이크로어레이를 이용한 주문형 단백질 마이크로어레이의 제조

주관기관 경희대 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 덴드리머로 캡슐화된 나노입자에 의해 표면개질된 탄소전극:

[화학식 1]

X-DENs

(상기 화학식 1에서,

X는 단원소 나노입자, 얼로이 나노입자 또는 코어-셸 구조의 나노입자이다).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 X는 Pt, Au, Pd, Ni, Fe, 및 Cu로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단원소 나노입자인 탄소전극.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 X-DENs의 덴드리머 말단기는 아민기이고 탄소전극 표면과 공유결합에 의해 직접 고정화된 탄소전극.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 X-DENs의 덴드리머 말단기와 생활성 물질이 화학적으로 결합된 탄소전극.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 덴드리머 말단기와 생활성 물질은 연결화합물에 의하여 공유결합된 탄소전극.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 생활성 물질은 효소(enzymes), 항체(antibodies), 디옥시리보자임(deoxyribozymes), 리보자임(ribozymes) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 탄소전극.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 연결화합물은 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 에스테르-비오틴/스트렙타비딘, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노트로필)카보디이미드(EDC)/N-하이드록시숙신이미드(NHS), 글루타르알데히드, 글루타르무수물, 및 N,N'-디숙시니미딜 카보네이트(N,N'-DSC)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 탄소전극.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 탄소전극은 유리탄소, 흑연, 다이아몬드, 탄소나노튜브, 또는 그래핀 전극인 탄소전극.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 X-DENs의 평균입경은 5nm 이하인 것을 특징으로 하는 탄소전극.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 X-DENs는 상기 탄소전극에 단일층으로 고정화되는 탄소전극.

청구항 11

X-DENs를 합성하는 단계;

상기 X-DENs를 탄소전극 표면에 고정화하는 단계; 및

생활성 물질을 상기 X-DENs에 고정화하는 단계를 포함하는 탄소전극의 표면개질 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 X-DENs는 탄소전극 표면에 전기화학적으로 고정화되고, 상기 생활성 물질과 상기 X-DENs는 공유결합에 의하여 고정화되는 탄소전극의 표면개질 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 X-DENs의 합성단계는,

덴드리머와 나노입자의 전구체 금속 이온이 혼합된 덴드리머 수용액을 준비하는 단계; 및

상기 덴드리머 수용액에 환원제를 투입하여 이온 상태의 금속 이온을 환원시켜 덴드리머 내부에 나노입자 X를 캡슐화시킴으로써 X-DENs를 합성하는 단계를 포함하는, 탄소전극의 표면개질 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 X-DENs가 탄소전극 표면에 전기화학적으로 고정화되는 것은, 덴드리머의 말단기에 의하여 탄소전극 표면에 직접 고정화되는 것을 특징으로 하는 탄소전극의 표면개질 방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 X-DENs와 상기 생활성 물질의 공유결합에 의한 고정화는, 연결화합물에 의한 공유결합에 의한 고정화인, 탄소전극의 표면개질 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 공유결합은 아민 커플링(amine coupling)방법, 티올 커플링 방법 또는 아비딘-비오틴 커플링 방법에 의하여 이루어지는 탄소전극의 표면개질 방법.

청구항 17

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 탄소전극을 포함하는 바이오센서.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 표면개질된 탄소전극 및 표면개질 방법에 관한 것이다. 탄소전극을 표면개질함으로써 전기화학적 활성 및 생화학적 활성을 동시에 확보할 수 있으며, 다양한 종류의 덴드리머로 캡슐화된 나노입자들과 생활성 물질들에 적용 가능하므로 다기능성의 구현이 가능하다.

배경기술

- [0002] 덴드리머는 특유적 구조 및 관능기로 인하여 심도 깊게 연구되어 왔다. 다수의 관능기를 갖는 고도로 분지된 덴드리머는 매우 많은 의료적 용도를 가질 수 있으며, 바이오센서의 생체감지부분으로 유용하게 사용될 수 있기 때문이다.
- [0003] 바이오센서나 진단키트에 사용되는 탄소전극의 표면개질과 관련하여, 나노입자가 관능화된 덴드리머 분자에 의해 연결되어 있는 나노입자 망상 조직으로 형성된 센서 필름을 포함하는 화학 센서가 알려져 있으나, 덴드리머 분자를 금속 입자 또는 반도체 입자 표면에 부착하기 위하여 별도의 스페이서 사용이 불가피하다는 문제가 있고, 나노입자의 표면에 덴드리머가 흡착하여 안정된 구조를 가지기 때문에 덴드리머를 전극에 직접 고정화하는 것이 용이하지 않다는 한계를 가지고 있었다. 그 외에, 덴드리머를 사용하여 금속, 유리 또는 실리콘 표면에 항체 단분자막을 형성하는 방법이 알려져 있으나, 항원, 항체 반응의 센서로만 사용할 수 있다는 점에서 응용범위가 좁다는 한계를 가지고 있다.
- [0004] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자는 항체뿐만 아니라 다양한 생화학적 활성을 가지는 물질을 고정화시킬 수 있는 다양한 관능기를 가지며, 반응성이 우수한 탄소전극을 개발하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 덴드리머로 캡슐화된 나노입자를 도입하여 전기화학적 활성과 생화학적 활성을 동시에 확보할 수 있는 표면개질된 탄소전극 및 표면개질 방법을 제공하기 위함이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 덴드리머로 캡슐화된 나노입자를 도입하여 다양한 생활성 물질과 결합할 수 있는 다관능

기를 가진 표면개질된 탄소전극 및 표면개질 방법을 제공하기 위함이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 덴드리머로 캡슐화된 나노입자로 표면개질된 탄소전극을 포함하는 바이오센서 또는 진단키트를 제공하기 위함이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0009] 본 발명은 일 구체예로서, 하기 화학식 1로 표시되는 덴드리머로 캡슐화된 나노입자에 의해 표면개질된 탄소전극을 제공한다.

[0010] [화학식 1]

[0011] X-DENs

[0012] (상기 화학식 1에서,

[0013] X는 단원소 나노입자, 알로이 나노입자 또는 코어-셸 구조의 나노입자이다).

[0014] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 식에서 X는 Pt, Au, Pd, Ni, Fe, 및 Cu로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단원소 나노입자일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 X-DENs의 덴드리머 말단기는 아민기이고, 공유결합에 의해 탄소전극에 고정화될 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 X-DENs의 덴드리머 말단기와 생활성 물질이 화학적으로 결합될 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 덴드리머 말단기와 생활성 물질은 연결화합물에 의하여 공유결합될 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 생활성 물질은 효소(enzymes), 항체(antibodies), 디옥시리보자임(deoxyribozymes), 리보자임(ribozymes) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 연결화합물은 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 에스테르-비오틴/스트렙타비딘, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노트로필)카보다이미드(EDC)/N-하이드록시숙신이미드(NHS), 글루타르알데히드, 글루타르무수물, 및 N,N'-디숙시니미딜카보네이트(N,N'-DSC)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 X-DENs는 상기 탄소전극에 단일층으로 고정화될 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 과제를 해결하기 위하여,

[0022] 본 발명은 일 구체예로서, X-DENs를 합성하는 단계; 상기 X-DENs를 탄소전극 표면에 고정화하는 단계; 및 생활성 물질을 상기 X-DENs에 고정화하는 단계를 포함하는 탄소전극의 표면개질 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 X-DENs는 탄소전극 표면에 전기화학적으로 고정화되고, 상기 생활성 물질과 상기 X-DENs는 공유결합에 의하여 고정화될 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 X-DENs의 합성단계는, 덴드리머와 나노입자의 전구체 금속 이온이 혼합된 덴드리머 수용액을 준비하는 단계; 및 상기 덴드리머 수용액에 환원제를 투입하여 이온 상태의 금속 이온을 환원시켜 덴드리머 내부에 나노입자 X를 캡슐화시킴으로써 X-DENs를 합성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 X-DENs가 탄소전극 표면에 전기화학적으로 고정화되는 것은, 덴드리머의 말단기 및 캡슐화된 나노입자에 의하여 탄소전극 표면에 고정화될 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 X-DENs와 상기 생활성 물질의 공유결합에 의한 고정화는 연결화합물에 의한 공유결합일 수 있으며, 상기 공유결합은 아민 커플링(amine coupling)방법, 티올 커플링 방법 또는 아비딘-비오틴 커플링 방법에 의하여 이루어질 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명에 따른 다양한 종류의 덴드리머로 캡슐화된 나노입자들로 표면개질된 탄소전극은, 전기화학적 활성과 생화학적 활성을 동시에 확보할 수 있으며, 다양한 생활성 물질과 결합할 수 있는 다기능성 탄소전극으로, 항체 뿐만 아니라 다양한 생화학적 활성을 가지는 물질을 고정화시킬 수 있는 다양한 관능기를 가지며, 반응성이 우수하고, 탄소전극 표면에 고정화가 용이하다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 Pt-DENs로 탄소전극 표면을 개질하는 원리를 개략적으로 도시한 개념도이다.
- 도 2의 (a)는 실시예 1 따라 합성된 Pt-DENs의 TEM 사진이고, (b)는 합성한 Pt-DENs의 입경 분포를 나타내는 그래프이다.
- 도 3의 (a)는 Pt-DENs가 고정화되는 과정의 탄소전극을 순환 전압전류 곡선으로 나타낸 것이고, (b)는 고정화된 탄소전극의 XPS 스펙트라를 도시한 것이다.
- 도 4는 Pt-DENs와 GOx로 개질된 탄소전극에서 백금입자의 촉매활성을 확인하기 위하여 순환 전압전류 곡선상의 과산화수소에 대한 산화피크를 도시한 그래프이다.
- 도 5는 Pt-DENs와 GOx로 개질된 탄소전극 표면에서 글루코스에 대한 효소반응을 확인하기 위하여 순환 전압전류 곡선상의 과산화수소에 대한 산화피크를 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 덴드리머란 중심 분자로부터 나뭇가지 모양의 단위구조가 반복적으로 뻗어 나오는 구형에 가까운 구조를 가진 거대분자 화합물로서 덴드리머의 최외각에 존재하는 말단기는 덴드리머의 표면성질 및 용해도 등에 중요한 역할을 한다. 일반적으로 덴드리머는 코어 물질로부터 생성되는데, 상기 코어물질과 덴드리머 아암(arm) 전구체를 반응시켜 1세대 덴드리머를 생성하고 상기 1세대 덴드리머는 코어에 부착된 하나 이상의 "가지(branch)"를 가질 수 있다. 2세대 덴드리머는 동일하거나 상이한 덴드리머 아암 전구체를 상기 1세대 덴드리머와 반응시켜 생성할 수 있으며, 유사한 반응 반응을 수행하여 3, 4, 5세대 등을 생성할 수 있다.
- [0030] 상기 코어물질과 덴드리머 아암 전구체는 링커에 의하여 연결될 수 있다. 일 구체예로서, 상기 링커는 적어도 하나의 반응성 기를 포함하는 알킬렌기, 에테르기, 방향족기, 펩티드기, 티오에테르기, 또는 이미노기를 포함할 수 있다. 링커는 하나 이상의 반응성 기를 보유할 수 있으며, 상기 반응성 기는 덴드리머 아암 전구체 상에 존재하는 관능기와 반응할 때 공유 결합을 형성할 수 있는 기이다. 반응성 기가 각각의 링커 상에서 동일하거나 상이할 수 있으며, 반응성 기는 친전자성 기 또는 친핵성 기일 수 있다. 당업계에 공지된 기술을 사용하여 친전자성 기를 친핵성 기로 전환시킬 수 있고, 또한 그 반대로 전환시킬 수 있다. 다른 구체예로서, 상기 링커는 히드록실기, 티올기, 또는 치환된 또는 비치환된 아민을 포함하는 하나 이상의 친핵성 기를 포함할 수 있다. 또한, 상기 링커는 하나 이상의 친전자성 기를 포함할 수 있으며, 상기 친전자성 기로는 할로젠, 카르복실기, 에스테르기, 아실 할라이드기, 술포네이트기, 또는 에테르기 등을 포함할 수 있다.
- [0031] 상기에서 전술한 덴드리머는 다관능성을 가질 수 있기 때문에, 바이오센서나 진단키트로서 탄소전극 등에 응용하여 사용이 가능하다. 그러나, 탄소전극 등은 촉매활성이 제한되고 이종 화합물에 대한 본연의 저항성을 가지므로 표면개질이 필연적으로 요구된다.
- [0032] 본 발명은 전극 표면을 개질하기 위하여, 전기화학적 활성을 가지는 덴드리머로 캡슐화된 나노입자(dendrimer encapsulate nanoparticles : DENs)를 도입하였다. 상기 덴드리머로 캡슐화된 나노입자는 안정성이 뛰어나고 입자크기가 균일한 특징을 갖는다. 상기와 같은 특징으로 인하여, 전극표면이 충분한 촉매활성을 확보할 수 있고, 전극표면에 용이하게 고정화할 수 있다. 또한, 상기 덴드리머로 캡슐화된 나노입자는 덴드리머 말단의 관능기와 효소 등의 생활성 물질이 결합할 수 있으므로 전기화학적 물성 뿐만 아니라 생물학적 활성도 동시에 가질 수 있다.

[0033] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기로 한다.

[0034] 가. 표면개질된 탄소전극

[0035] 탄소전극에 고정화되는 본 발명의 덴드리머로 캡슐화된 나노입자(dendrimer encapsulate nanoparticles : DENs)는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다. ‘캡슐화’란 나노입자 X가 규칙적인 분지구조를 가진 덴드리머의 분지들에 의하여 둘러쌓여진 것을 의미하는 것이며, X-DENs는 나노입자 X 및 나노입자를 캡슐화시키는 덴드리머 일체를 포함하는 의미를 가진다.

[0036] [화학식 1]

[0037] X-DENs

[0038] 상기 식에서, X는 덴드리머(dendrimer)에 캡슐화된 나노입자로, Pt, Au, Pd, Ni, Fe 또는 Cu 와 같은 단원소 나노입자 및 합금, 또는 코어-셸 구조의 나노입자일 수 있다. 일 예로서, Pt-DENs는 덴드리머로 캡슐화된 백금 나노입자를 표시하는 것이며, Au-DENs는 덴드리머로 캡슐화된 금나노입자를 표시하는 것이다.

[0039] 또한, 본 발명에서 사용되는 탄소전극은 그 종류에 제한 없이 사용할 수 있으며, 유리탄소, 흑연, 다이아몬드, 탄소나노튜브, 또는 그래핀 등이 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명에서는 나노입자는 덴드리머의 최외곽 아암에 위치한 말단기와 결합되지 않고, 덴드리머 내부에서 균일한 분포로 합성, 즉 덴드리머로 캡슐화될 수 있다.상기와 같이 덴드리머 내부에 캡슐화됨으로서, 전극 표면에 상기 X-DENs의 최외곽 아암에 위치한 말단기를 이용하여 별도의 스페이서 없이도 직접 고정화가 가능하며, 덴드리머 내부에 작고 균일하게 나노입자가 분포됨으로서 우수한 촉매활성과 전기적 안정성을 확보할 수 있다.

[0041] 도 1은 Pt-DENs로 탄소전극 표면을 개질하는 원리를 개략적으로 도시한 개념도이다. 도 1을 참고하면, 덴드리머로 캡슐화된 나노입자가 백금입자로서(Pt-DENs), 유리탄소전극(glassy carbon)에 덴드리머 말단의 아민기를 이용하여 탄소전극표면에 전기화학적으로 고정화(E-chem Immobilization)된 것을 알 수 있다.

[0042] 상기 합성된 X-DENs의 나노입자의 평균입경은 5nm이하일 수 있다. 일 구체예로서, 합성된 Pt-DENs의 백금나노입자의 평균입경은 $1.89 \pm 0.19\text{nm}$ 으로서, 이론적으로 계산되는 백금나노입자의 입경인 1.83nm보다 근소하게 큰 것을 알 수 있다. 도 2의 (a)는 실시예 1에 따라 합성된 Pt-DENs의 TEM 사진이고, (b)는 합성한 Pt-DENs의 입경 분포를 나타내는 그래프이다. 도 2 (b)를 참조하면, 합성된 Pt-DENs의 입경이 $1.4\mu\text{m}$ 내지 $2.4\mu\text{m}$ 범위에서 균일하게 분포된 것을 확인할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 탄소전극에 상기 X-DENs와 생활성 물질을 함께 단일층으로 고정화하여 다기능을 갖는 표면개질된 탄소전극을 제공할 수 있다. 상기 생활성 물질은 생물학적 활성을 갖는다면 그 종류에 제한 없이 사용할 수 있으나, 대표적인 예로서, 효소 (enzymes), 항체(antibodies), 디옥시리보자임(deoxyribozymes), 리보자임(ribozymes) 또는 앵타머(aptamer) 등을 예시할 수 있다. 상기 생활성을 나타내는 물질은 X-DENs의 덴드리머 말단기와 공유결합을 통하여 탄소전극에 고정화될 수 있으며, 상기 X-DENs와 생활성 물질이 가지는 관능기의 종류에 따라 연결화합물을 사용하여 고정화시킬 수 있다. 상기 연결화합물은 X-DENs 및 생활성 물질과 공유결합을 이루는데, 상기 공유 결합은 아민 커플링 방법, 티올 커플링 방법, 아비딘-비오틴 커플링 방법, 또는 알데히드 커플링 방법 등과 같이 당업계에서 공지된 방법에 의해서 수행될 수 있다. 이 중, 아민 커플링 방법을 예로 들면, 덴드리머 말단의 아민기와 1-에틸-3-(3-디메틸아미노트로필)카보디이미드(EDC) 또는 N-히드록시숙신이미드(NHS) 등의 연결화합물이 커플링 반응함으로서 이루어질 수 있다. 상기 아민 커플링 방법에 사용되는 연결화합물로는, 일 구체예로서, N-하이드록시숙신이미드(NHS) 에스테르-비오틴/스트렙타비딘, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노트로필)카보디이미드(EDC)/N-하이드록시숙신이미드(NHS), 글루타르알데히드, 글루타르무수물, 또는 N,N'-디숙시니미딜카보네이트(N,N'-DSC) 등을 예시할 수 있으며, 이들을 혼합하거나 염 형태로 사용할 수 있다.

[0044] 도 1을 다시 참조하면, 유리탄소전극(glassy carbon)에 고정화된 Pt-DENs의 덴드리머 말단기인 아민기와 생활성 물질인 당 산화효소(GOx)가 연결화합물인 NHS 에스테르-비오틴/스트렙타비딘에 의하여 고정화 된 것을 알 수 있다.

[0045] 나. X-DENs를 이용하여 탄소전극의 표면을 개질하는 방법

- [0046] 본 발명의 X-DENs를 이용하여 탄소전극의 표면을 개질하는 방법은, X-DENs를 합성하는 단계; 탄소전극 표면에 상기 X-DENs를 고정화하는 단계; 및 생활성 물질을 X-DENs에 고정화하는 단계;를 포함한다.
- [0047] **X-DENs의 합성단계**
- [0048] 수용액상에서 나노입자 X의 전구체 금속이온이 다관능기를 가지는 덴드리머의 내부에 배위결합을 이루고, 상기 이온상태의 X 금속이온이 환원되도록 환원제를 투입하여 나노입자 X가 덴드리머 내부에 고정, 즉, 캡슐화 함으로서 X-DENs가 합성될 수 있다. 특히, 덴드리머는 그 구조적 특징에 기인하여 세대수가 증가할수록 덴드리머 내부에 위치한 관능기의 수가 기하급수적으로 증가할 수 있다. 따라서, 덴드리머의 세대 수나 덴드리머의 관능기 수에 따라, 덴드리머 : X 금속이온의 당량비를 조절하여 다양한 X-DENs를 합성하는 것이 가능하다. 일 구체예로서, 6세대 폴리아미도아민 덴드리머(G6-NH₂ PAMAM dendrimers)를 사용하는 경우, 백금나노입자가 캡슐화된 Pt-DENs의 합성은 덴드리머와 Pt 이온의 당량비가 1 : 210이 되도록 덴드리머 수용액을 준비하여 Pt-DENs를 합성할 수 있으며, 금나노입자가 캡슐화된 Au-DENs의 합성은 덴드리머와 Au 이온의 당량비가 1 : 147이 되도록 덴드리머 수용액을 준비하여 Au-DENs를 합성할 수 있다.
- [0049] 상기 환원제로는 금속이온을 환원시키는 통상의 환원제로서, N₂H₄, LiAlBH₄, NaBH₄, 또는 산화에틸렌 등을 예시할 수 있다.
- [0050] **탄소전극 표면에 상기 X-DENs를 고정화하는 단계**
- [0051] 상기 합성된 X-DENs 수용액에 탄소전극을 침지시킨 후, 순환전류법 등의 방법에 의하여 전기화학적으로 X-DENs를 탄소전극 표면에 고정화시킬 수 있다. 일반적으로 캡슐화된 나노입자를 포함하지 않는 공지의 덴드리머 분자 역시 탄소전극에 고정화될 수는 있으나, 본 발명의 X-DENs는 덴드리머 말단기가 탄소전극 표면에 직접적으로 고정화되는 과정에서 캡슐화된 나노입자가 전기적 촉매성을 부여하므로 공지의 덴드리머 분자에 비하여 보다 효율적으로 고정화가 이루어질 수 있다.
- [0052] **생활성 물질을 X-DENs에 고정화하는 단계**
- [0053] X-DENs로 표면개질된 탄소전극에 연결화합물 등으로 표면처리 후 당 산화효소(GOx)와 같은 생활성 물질을 공유결합 등의 방법으로 고정화시킬 수 있다. 일 구체예로서 상기 연결화합물은 아민커플링 방법, 티올 커플링 방법, 또는 아비딘-비오틴 커플링 방법에 의하여 X-DENs 또는 생활성 물질과 공유결합을 이룰 수 있다.
- [0054] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 기재한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 일 실시예일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0055] **[실시예]**
- [0056] **실시예 1 내지 3 - X-DEN를 이용한 탄소전극의 표면개질**
- [0057] **실시예 1 : Pt-DENs 의 합성**
- [0058] 덴드리머는 아민 말단기를 가진 6세대 폴리아미도아민 덴드리머(G6-NH₂ PAMAM dendrimers)를 사용하였고, Pt-DENs의 합성 반응은 수용액에서 이루어졌다. 수용액상 최종 덴드리머의 농도는 10 μM 로 맞추었다. 덴드리머와 Pt 이온의 당량비가 1 : 210 이 되도록 Pt를 투입하였으며, 환원제인 NaBH₄ 로 상기 Pt 이온을 환원시켰다. 불순물을 제거해주기 위하여 24 시간 합성된 용액을 투석하였다. 상기 반응에서 합성된 Pt-DENs 의 TEM 사진을 도 2에 나타내었다.
- [0059] **실시예 2 : 유리탄소전극 표면에 Pt-DENs를 전기화학적으로 고정화**
- [0060] 유리탄소전극을 상기 Pt-DENs 용액에 넣고 퍼텐쇼스텝(CH Instruments Model 440)을 사용하여 순환전류법에 의하여 전기화학적으로 Pt-DENs를 탄소전극 표면에 고정화하였다(기준전극: Ag/AgCl, 보조전극: 백금전극; 스캔속도: 10 mVs⁻¹).
- [0061] 도 3의 (a)는 Pt-DENs가 고정화되는 과정의 탄소전극을 관찰한 순환 전압전류 곡선이고, (b)는 XPS 스펙트라를 도시한 것이다. 도3 (a)를 참조하면, 첫 번째 순환 시 Pt-DENs 이 고정화되고, 순환이 진행되는 동안 고정화되는 양이 줄어들어 산화전류도 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 도3 (b)를 참조하면, Pt 와 N 의 피크가 Pt-DENs

이 고정화된 탄소전극에서만 나타나는 것으로부터 Pt-DENs가 탄소전극에 전기화학적으로 고정되었다는 것을 확인할 수 있다.

[0062] 실시예 3 : 생활성 물질 GOx를 X-DENs에 고정화하는 단계

[0063] Pt-DENs가 고정화된 탄소전극에 10 mM NHS 에스테르-비오틴 용액을 떨어뜨려 2 시간동안 반응시켜 덴드리머 말단의 아민기와 NHS 에스테르가 반응하도록 하였다. 전극을 증류수로 헹구고 질소로 말린 후에 1 mg/mL 스트렙타비딘-GOx 용액(in 50 mM PBS 완충액, pH 7.4)을 전극 위에 떨어뜨려 2시간 반응시켜 탄소전극에 고정화된 비오틴과 스트렙타비딘이 결합하여 글루코스 산화효소(GOx)를 탄소전극에 고정화하였다. 상기 Pt-DENs로 고정화된 탄소전극 표면에서 덴드리머와 생활성 물질인 GOx가 연결화합물인 NHS 에스테르-비오틴/스트렙타비딘의 화학적 반응을 통하여 고정화되었다.

[0064] 실시예 4 내지 5 - 표면개질된 탄소전극의 전기화학적 촉매반응 및 효소반응의 확인

[0065] 실시예 4 : GOx/Pt-DENs/탄소전극 표면에서의 과산화수소에 대한 전기화학적 촉매 반응

[0066] Pt-DENs와 GOx로 개질된 탄소전극을 과산화수소 용액에 넣어 순환전류법에 의해 전기화학적으로 분석하였다(기준전극: Ag/AgCl, 보조전극: 백금전극; 스캔속도: 100 mVs^{-1}). 도 4는 Pt-DENs와 GOx로 개질된 탄소전극에서 백금입자의 촉매활성을 확인하기 위하여 순환 전압전류 곡선상의 과산화수소에 대한 산화피크를 도시한 그래프이다. 도 4를 참조하면, Pt-DENs와 GOx로 개질된 탄소전극에서만 과산화수소에 대한 산화피크를 볼 수 있다. 이로부터 백금 나노입자가 과산화수소 산화에 전기화학적 촉매로서 작용했음을 확인할 수 있다.

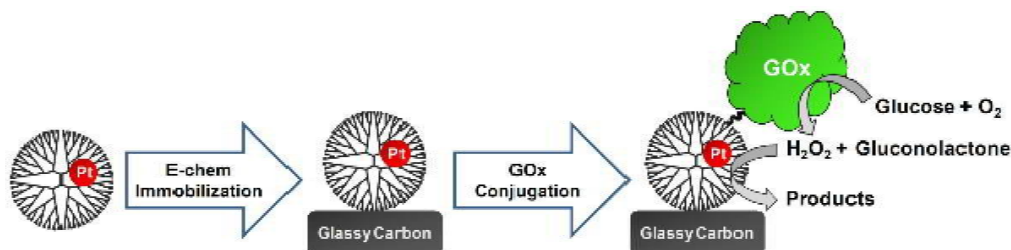
[0067] 실시예 5 : GOx/Pt-DENs/탄소전극 표면에서의 글루코스(glucos)에 대한 효소 반응

[0068] Pt-DENs와 GOx로 개질된 탄소전극을 산소로 포화된 글루코스 용액에 넣어 순환전류법에 의해 전기화학적으로 분석하였다(기준전극: Ag/AgCl, 보조전극: 백금전극; 스캔속도: 50 mVs^{-1}). 도 5는 Pt-DENs와 GOx로 개질된 탄소전극 표면에서 글루코스에 대한 효소반응을 확인하기 위하여 순환 전압전류 곡선상의 과산화수소에 대한 산화피크를 도시한 그래프이다. 도 5를 참조하면, Pt-DENs와 GOx로 개질된 탄소전극에서만 산화피크를 볼 수 있다. 이는 GOx에 의해 글루코스가 산화되어 발생된 과산화수소가 백금 나노입자에 의해 산화되어 나오는 것으로 GOx가 글루코스에 대한 효소로서 작용했음을 보여준다.

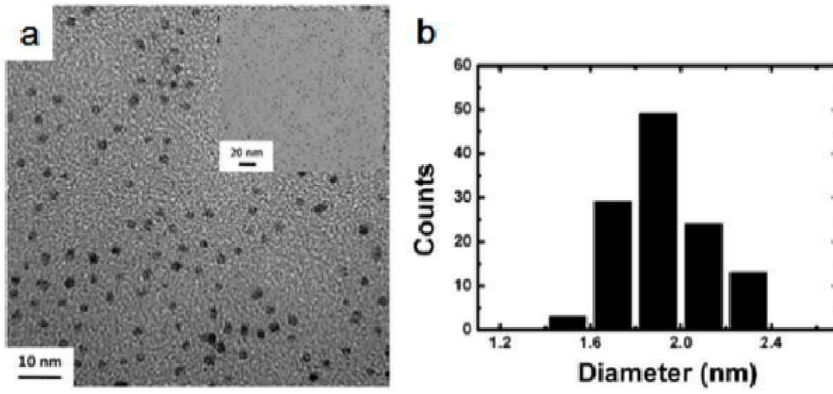
[0069] 상기 실시예를 통하여 본 발명의 표면개질된 탄소전극은 캡슐화된 나노입자가 전기화학적 촉매로서 작용했음과 아울러 덴드리머와 결합된 생활성 물질에 의하여 효소반응 등의 생물학적 활성도 보유하고 있음을 확인하였다. 상기 특징에 기인하여 본 발명의 표면개질된 탄소전극은 단백질 칩, 진단키트, 바이오센서 등의 다양한 어플리케이션에 응용하여 적용이 가능하다.

도면

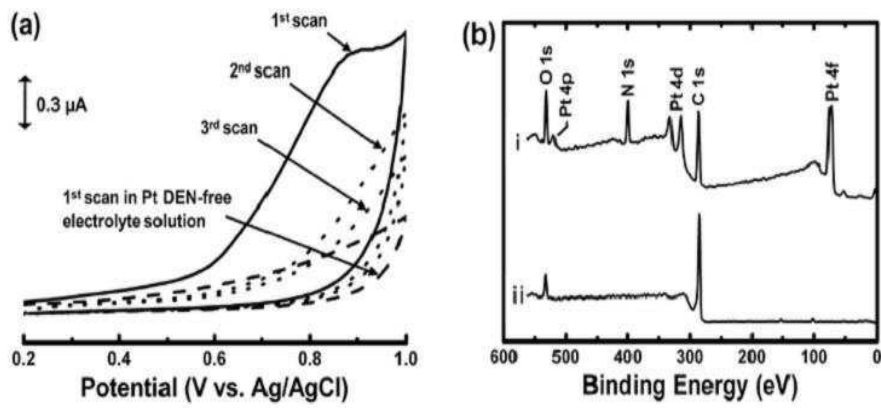
도면1



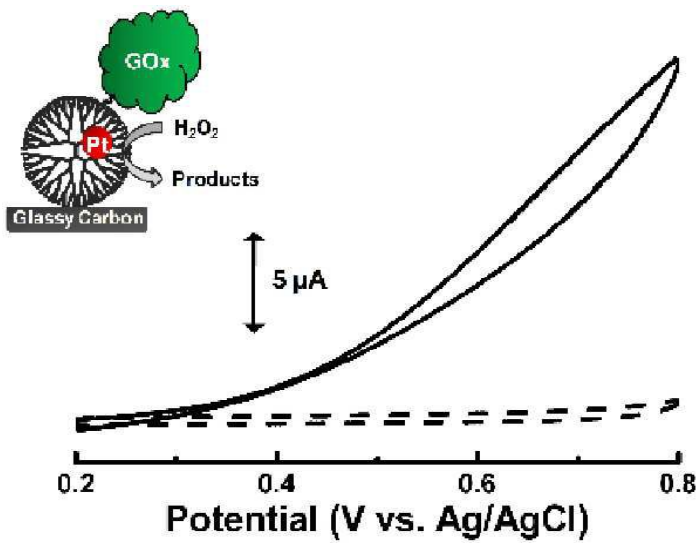
도면2



도면3



도면4



도면5

