



등록특허 10-2455729



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월18일

(11) 등록번호 10-2455729

(24) 등록일자 2022년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/327 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
B82Y 15/00 (2017.01)
 (52) CPC특허분류
G01N 27/3277 (2013.01)
G01N 27/3272 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2021-0154365
 (22) 출원일자 2021년11월11일
 심사청구일자 2021년11월11일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020200110746 A
 KR1020170064403 A*
 Gen Liu et al., Journal of Analytical Methods
 in Chemistry, Vol. 2014, pp. 1- 10.*
 J. Lee et al., Analytica Chimica Acta, Vol.
 1069, 2019, pp. 47-56.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
 희대학교 국제캠퍼스내)
 (72) 발명자
 이기자
 서울특별시 노원구 성북로 232, 110동 909호 (하
 계동, 현대아파트, 우성아파트)
 한승현
 경기도 성남시 수정구 수정로 80, 1102호 (수
 진동, 우리빌)
 (74) 대리인
 특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 4 항

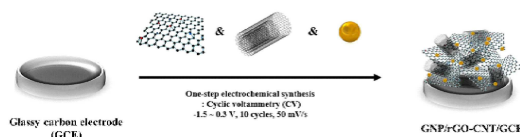
심사관 : 정아영

(54) 발명의 명칭 퓨린 대사체 검출 물질 및 이를 이용한 바이오센서

(57) 요약

퓨린 대사체 검출 물질로, 환원 그래핀산화물(rGO); 탄소나노튜브(CNT); 및 금 나노입자를 포함하며, 3차원 구조체인 퓨린 대사체 검출 물질이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 27/3278 (2013.01)

G01N 33/50 (2013.01)

B82Y 15/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137928
과제번호	KMDF_PR_20200901_0023, 1711137928
부처명	과학기술정보통신부, 산업통상자원부, 보건복지부, 식품의약품안전처
과제관리(전문)기관명	(재)범부처전주기료기기연구개발사업단
연구사업명	범부처전주기료기기연구개발사업
연구과제명	타액 기반의 현장형 전처리 모듈 및 구강 내 병원성 세균 신속 검사키트 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2020.09.01 ~ 2024.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137928
과제번호	20211096
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재단)범부처전주기료기기연구개발사업단
연구사업명	범부처전주기료기기연구개발사업
연구과제명	[범부처 2/5] 타액 기반의 현장형 전처리 모듈 및 구강 내 병원성 세균 신속 검사키트 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2020.09.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

퓨린 대사체 검출 물질로,

환원 그래핀산화물(rGO);

탄소나노튜브(CNT); 및

금 나노입자를 포함하며, 3차원 구조체인 퓨린 대사체 검출 물질로서,

상기 환원 그래핀산화물(rGO)과 탄소나노튜브(CNT)의 중량비는 9:1 내지 10:1이며, 상기 금 나노입자는 상기 퓨린 대사체 검출 물질 전체 중량의 8 내지 9 중량%이며, 상기 3차원 구조체인 퓨린 대사체 검출 물질은 pH 7 내지 8인 용액에서 요산과 잔틴을 동시 검출하는 것을 특징으로 하는, 3차원 구조체인 퓨린 대사체 검출 물질.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 따른 3차원 구조체인 퓨린 대사체 검출 물질을 포함하는, 바이오센서.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 바이오센서는 시료 내 요산과 잔틴을 pH는 7 내지 8인 용액에서 동시에 검출하는 전기화학 방식 바이오센서인 것을 특징으로 하는, 바이오센서.

청구항 9

퓨린 대사체 검출 물질을 이용한 검출 방법으로,

제 1항에 따른 3차원 구조체인 퓨린 대사체 검출 물질을 시료와 접촉시키는 단계;

상기 접촉 후 발생하는 상기 퓨린 대사체 검출 물질의 전기적 신호를 센싱하는 단계; 및

상기 센싱된 전기적 신호로부터 요산과 잔틴을 동시에 검출하는 단계를 포함하며, 상기 시료의 pH는 7 내지 8인 것을 특징으로 하는 퓨린 대사체 검출 물질을 이용한 검출 방법.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 퓨린 대사체 검출 물질 및 이를 이용한 바이오센서에 관한 것으로, 보다 상세하게는 체액 내 요산과 잔틴 같은 퓨린대사체를 정량적으로 검출하여 고요산혈증이나 통풍의 진단과 관리에 효과적으로 활용될 수 있는, 퓨린 대사체 검출 물질 및 이를 이용한 바이오센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 통풍은, 음식을 통해 섭취되는 퓨린(purine)이라는 물질을 인체가 대사하고 남은 산물인 요산이 혈액 내에 높은 농도로 존재하게 되면 요산염 결정이 관절의 연골, 힘줄, 주위 조직에 침착되는 질병이다. 이러한 현상은 관절의 염증을 유발하여 극심한 통증을 동반하는 재발성 발작을 일으키며, 요산염 결정에 의한 통풍결절(tophi)이 침착되면서 관절의 변형과 불구가 발생하게 된다. 관절의 이상 외에도 다양한 신장질환을 일으키고 요산에 의해 콩팥에 돌이 생기는 콩팥돌증(nephrolithiasis, 신석증)이 나타나기도 한다. 일반적으로 통풍의 치료는 잔틴 산화효소 억제제 (xanthine oxidase inhibitor)를 이용하여 혈액 내 요산 농도를 낮추는 방법이 이용되는데, 과다 복용으로 인해 요산 농도가 급격히 저하되면 오히려 파킨슨 병과 같은 신경계질환을 유발할 수 있으므로, 적절한 요산 농도 범위를 유지시키는 것이 필요하다. 또한 약물로 사용되는 잔틴 산화효소 억제제와 직접적인 관련이 있는 대사물질인 잔틴을 함께 측정하게 되면 통풍의 관리 및 약물 복용 순응도에 대한 보다 정확한 평가가 가능하다.

[0003] 기존 요산 테스트는 주로 혈액과 소변에서 이루어지는데, 우선 소변검사의 경우 24시간 소변을 받아 기준치(600 mg) 이상으로 요산이 배출되는지 확인하여 통풍 환자에서 결석 형성 여부를 관찰하거나 신장 기능을 확인한다. 하지만 24시간 소변을 모아야 하는 번거로움이 있어 일반인이 손쉽게 사용할 수 있는 관리 도구로서의 활용도가 떨어진다. 스트립 형태의 간단한 소변 요산 검사 도구도 사용되는데, 스트립에 소변을 묻혀 색 변화를 정성적으로 확인하기 때문에 정확한 평가가 이루어지기는 어렵다. 혈액 요산 검사의 경우 채혈의 불편함이 있을 뿐 아니라 병원 방문시에 이루어지기 때문에 일상생활 중 관리나 약물 복용 평가에 활용되기는 어렵다. 추가로, 잔틴 산화효소 억제제 (xanthine oxidase inhibitor) 약물에 대한 순응도 및 효능 평가를 위해 요산과 잔틴을 함께 측정하는 검사법은 개발되어 있지 않다. 따라서 통풍에 대한 효과적인 관리를 위한 간편하면서도 정확한 측정이 가능한 새로운 도구 개발이 필요하다.

[0004] 일반적으로 요산에 대한 정량 검출은 요산 분해효소와 과산화수소 분해효소를 이용하여 두 효소의 연속적인 반응을 통해 색 변화를 유도한 후 분광학적 방법으로 분석하며, 잔틴의 경우 잔틴 산화효소와 과산화수소 분해효소를 이용하여 분석한다. 이러한 방법은 시간과 과정이 오래 걸릴 뿐 아니라 효소의 안정성에 따라 측정값이 달라질 수 있고 2 종의 효소를 사용하기 때문에 가격도 비싸다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. CN 111829993
(특허문헌 0002) 2. US 2020-0100711
(특허문헌 0003) 3. CN 106556632

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 통풍의 관리 및 약물 순응도 평가를 위한 측정에 필요한 새로운 검

출 물질 및 장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 푸린 대사체 검출 물질로, 환원 그래핀산화물(rGO); 탄소나노튜브(CNT); 및 금 나노입자를 포함하며, 3차원 구조체인 푸린 대사체 검출 물질을 제공한다.
- [0008] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 환원 그래핀산화물(rGO)과 탄소나노튜브(CNT)의 중량비는 9:1 내지 10:1이다.
- [0009] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 금 나노입자는 상기 푸린 대사체 검출 물질 전체 중량의 5 내지 10 중량%이다.
- [0010] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 3차원 구조체인 푸린 대사체 검출 물질은 요산과 잔틴을 동시에 검출한다.
- [0011] 본 발명은 또한 상술한 3차원 구조체인 푸린 대사체 검출 물질의 제조방법으로, 탄소나노튜브, 금 전구체 그래핀 산화물을 용액 내 혼합하여 혼합용액을 제조하는 단계; 및 상기 혼합용액에 순환전압전류법을 시행하는 단계를 포함하며, 상기 순환전압전류법을 시행하는 단계에서 질소 가스를 주입하는 것을 특징으로 하는 3차원 구조체인 푸린 대사체 검출 물질 제조방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 푸린 대사체 검출 물질은 전극상에 도포된 후, 상기 순환전압전류법이 시행되어, 전기화학적 환원과 증착이 동시에 진행된다.
- [0013] 본 발명은 또한 상술한 푸린 대사체 검출 물질을 포함하는, 바이오센서를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 바이오센서는 시료 내 요산과 잔틴을 동시에 진단하는 전기화학 방식 바이오센서이다.
- [0015] 본 발명은 또한 푸린 대사체 검출 물질을 이용한 검출 방법으로, 상술한 3차원 구조체인 푸린 대사체 검출 물질을 시료와 접촉시키는 단계; 상기 접촉 후 발생하는 상기 푸린 대사체 검출 물질의 전기적 신호를 센싱하는 단계; 및 상기 센싱된 전기적 신호로부터 요산과 잔틴을 동시에 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 푸린 대사체 검출 물질을 이용한 검출방법을 제공하며, 상기 시료의 pH는 7 내지 8이다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에서는 환원된 산화그래핀과 탄소나노튜브, 금 나노입자를 이용하여 3차원의 다공성 나노복합체를 합성함으로써, 표면적을 높이고 분석 물질의 이동과 전자 전달이 용이하게 한 전기화학 검출 플랫폼을 개발하였다. 이로써 효소를 사용하지 않고도 요산과 잔틴을 동시에 검출 가능하게 하였다. 따라서, 전기화학 검출센서는 사용이 간편하고 소형화가 가능하여 통풍의 관리 및 약물 순응도 평가를 위한 측정 도구로서 활용 가능성이 높다. 또한 타액 뿐 아니라, 다른 체액 (눈물, 땀 등) 으로의 응용 가능하고, 의료용 이외에도, 식품 관리에도 응용 가능하다. 예를 들어 생선, 육류 등의 신선도 확인을 위한 센서로도 응용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 검출물질인 복합체 합성방법의 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 센서 구성도이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 GO : CNT 혼합비율 최적화 실험 결과이다.
- 도 4 및 5는 요산, 잔틴 검출을 위한 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 농도 최적화 실험결과 및 최종 수득된 복합체에서의 금 나노입자의 중량%를 알기 위한 EDX 분석결과이다.
- 도 6은 용액의 pH와 accumulation time 최적화 분석결과이다.
- 도 7은 3차원 다공성_GNP/rGO-CNT/GCE 의 특성 비교 분석 결과이다.
- 도 8은 요산, 잔틴 농도별 신호 (I_{pa}) 변화 - 민감도 평가 결과이다.
- 도 9는 요산, 잔틴 검출에 대한 선택성 평가 결과이다.

도 10은 요산, 잔틴 검출에 대한 재현성 평가 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0019] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 본 명세서에서 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 무조건 한정하여 해석되어서는 아니 되며, 본 발명의 발명자가 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해서 각종 용어의 개념을 적절하게 정의하여 사용할 수 있다.
- [0020] 더 나아가 이들 용어나 단어는 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야 함을 알아야 한다.
- [0021] 즉, 본 명세서에서 사용된 용어는 본 발명의 바람직한 실시예를 설명하기 위해서 사용되는 것일 뿐이고, 본 발명의 내용을 구체적으로 한정하려는 의도로 사용된 것이 아니다.
- [0022] 이들 용어는 본 발명의 여러 가지 가능성을 고려하여 정의된 용어임을 알아야 한다.
- [0023] 또한, 본 명세서에 있어서, 단수의 표현은 문맥상 명확하게 다른 의미로 지시하지 않는 이상, 복수의 표현을 포함할 수 있다.
- [0024] 또한, 유사하게 복수로 표현되어 있다고 하더라도 단수의 의미를 포함할 수 있음을 알아야 한다.
- [0025] 본 명세서의 전체에 걸쳐서 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소를 "포함"한다고 기재하는 경우에는, 특별히 반대되는 의미의 기재가 없는 한 임의의 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 임의의 다른 구성 요소를 더 포함할 수도 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0026] 더 나아가서, 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소의 "내부에 존재하거나, 연결되어 설치된다"고 기재한 경우에는, 이 구성 요소가 다른 구성 요소와 직접적으로 연결되어 있거나 접촉하여 설치되어 있을 수 있다.
- [0027] 또한, 일정한 거리를 두고 이격되어 설치되어 있을 수도 있으며, 일정한 거리를 두고 이격되어 설치되어 있는 경우에 대해서는 해당 구성 요소를 다른 구성 요소에 고정 내지 연결시키기 위한 제 3의 구성 요소 또는 수단이 존재할 수 있다.
- [0028] 한편, 상기 제 3의 구성 요소 또는 수단에 대한 설명은 생략될 수도 있음을 알아야 한다.
- [0029] 반면에, 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소에 "직접 연결"되어 있다거나, 또는 "직접 접속"되어 있다고 기재되는 경우에는, 제 3의 구성 요소 또는 수단이 존재하지 않는 것으로 이해하여야 한다.
- [0030] 마찬가지로, 각 구성 요소 간의 관계를 설명하는 다른 표현들, 즉 " ~ 사이에"와 "바로 ~ 사이에", 또는 " ~ 에 이웃하는"과 " ~ 에 직접 이웃하는" 등도 마찬가지로 취지를 가지고 있는 것으로 해석되어야 한다.
- [0031] 또한, 본 명세서에 있어서 "일면", "타면", "일측", "타측", "제 1", "제 2" 등의 용어는, 하나의 구성 요소에 대해서 이 하나의 구성 요소가 다른 구성 요소로부터 명확하게 구별될 수 있도록 하기 위해서 사용된다.
- [0032] 하지만, 이와 같은 용어에 의해서 해당 구성 요소의 의미가 제한적으로 사용되는 것은 아님을 알아야 한다.
- [0033] 또한, 본 명세서에서 "상", "하", "좌", "우" 등의 위치와 관련된 용어는, 사용된다면, 해당 구성 요소에 대해서 해당 도면에서의 상대적인 위치를 나타내고 있는 것으로 이해하여야 한다.
- [0034] 또한, 이들의 위치에 대해서 절대적인 위치를 특정하지 않는 이상은, 이들 위치 관련 용어가 절대적인 위치를 언급하고 있는 것으로 이해하여서는 아니 된다.
- [0035] 더욱이, 본 발명의 명세서에서는, "...부", "...기", "모듈", "장치" 등의 용어는, 사용된다면, 하나 이상의 기능이나 동작을 처리할 수 있는 단위를 의미한다.
- [0036] 이는 하드웨어 또는 소프트웨어, 또는 하드웨어와 소프트웨어의 결합으로 구현될 수 있음을 알아야 한다.
- [0037] 본 명세서에 첨부된 도면에서 본 발명을 구성하는 각 구성 요소의 크기, 위치, 결합 관계 등은 본 발명의 사상을 충분히 명확하게 전달할 수 있도록 하기 위해서 또는 설명의 편의를 위해서 일부 과장 또는 축소되거나 생략되어 기술되어 있을 수 있고, 따라서 그 비례나 축척은 엄밀하지 않을 수 있다.
- [0038] 또한, 이하에서, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 구성, 예

를 들어, 종래 기술을 포함하는 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략될 수도 있다.

- [0039] 본 발명은 요산과 잔틴을 동시에 검출할 수 있는 새로운 복합체를 제공한다. 본 발명의 일 실시예에 따른 검출 물질은 환원된 산화그래핀(rGO)과, 탄소나노튜브(CNT), 그리고 금(Au) 입자를 포함하는 3차원 구조의 나노복합체이다.
- [0040] 일반적으로 두 개 이상의 바이오 마커 측정을 위해서는 두 개 이상의 효소를 사용하여 선택성을 부여한다. 하지만 효소는 비쌌 뿐 아니라 외부온도나 조건에 따라 변성되기 쉬워 안정성이 떨어질 수 있다. 하지만 본 발명에 따른 3차원 나노 구조체는 넓은 표면적과 우수한 촉매 특성을 활용하여 효소 없이도 요산과 잔틴을 효과적으로 분리하여 검출할 수 있다. 이를 위한 본 발명의 검출물질은 3차원 구조로 rGO/CNT/Au 조성을 가지며, 3차원 구조에 따른 높은 비표면적과 우수한 타겟 특이성을 통하여 2종 이상의 바이오마커를 우수한 민감도로 검출할 수 있다.
- [0041] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 퓨린 대사체 검출물질인 3차원 나노복합체를 한 단계의 전기화학 방식으로 합성하는 방법과 검출결과에 대한 모식도이다.
- [0042] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따르면, One pot electrochemical deposition and reduction 방법을 통해서 상온에서 수용액조건으로 검출물질인 3차원 구조 복합체 합성이 가능하다. 즉, 세 종류의 물질을 혼합하여 한번에 3차원 나노복합체를 형성시킬 수 있다. 이것은 기존의 3차원 나노구조체를 제작하기 위해서는 hard 또는 soft template를 사용하거나 고온, 고압의 합성조건이 요구되어 쉽게 합성하기 어려운 기존 기술과는 구별되는 본 발명의 장점이다.
- [0043] 본 발명은 또한 상술한 검출 물질을 이용한 퓨린 대사체 검출 방법을 제공하는데, 이는 상기 3차원 구조체인 퓨린 대사체 검출 물질을 시료와 접촉시키는 단계; 상기 접촉 후 발생하는 상기 퓨린 대사체 검출 물질의 전기적 신호를 센싱하는 단계; 및 상기 센싱된 전기적 신호로부터 요산과 잔틴을 동시에 검출하는 단계를 포함한다.
- [0044] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0046] 실시예
- [0047] **복합체 합성**
- [0048] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 검출물질인 복합체 합성방법의 모식도이다.
- [0049] 도 1을 참조하면, 3차원 다공성 (macroporous) 구조를 가지는 금 나노입자가 혼입된 환원된 산화 그래핀 - 탄소 나노튜브 나노복합체 (gold nanoparticle-embedded reduced graphene oxide - carbon nanotube nanocomposites, 이하, GNP/rGO-CNT)는 전기화학적 환원 및 증착법을 통해 유리탄소전극 (glassy carbon electrode, GCE) 위에 one-step으로 합성하였다.
- [0050] 먼저, 탄소나노튜브 (multiwalled carbon nanotube, CNT) 파우더 2.25 mg을 9.37 mL의 phosphate buffer (PB, 0.067M, pH 7.4)에 첨가한 후 ultrasonic liquid processor (STH-500S; Sonictopia, Seoul, Republic)를 이용하여 300 W로 10 분간 처리하여 잘 분산시켰다. 분산된 CNT 용액은 진공펌프를 사용하여 lens paper로 여과시킨 후, 7 mL을 취하였다. 7 mL의 CNT 용액에, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (22.5 mg/mL) 1.4 μL 를 추가하고, 잘 분산시킨 산화 그래핀 (graphene oxide, GO) 용액 (4.0 mg/mL) 5.63 mL을 추가한 후 잘 섞어 주었다. 이 혼합 용액은 sonicator (135 W)에 넣고 1시간 동안 분산시켰다. 이때, 제조된 용액 내 GO, CNT, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 의 최종 농도는 각각 17.83 mg/mL, 1.33 mg/mL, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 이다 (GO : CNT (w/w)의 혼합 비율 = 약 9 : 1). 추가적으로, 용액 내 GO, CNT의 최종 농도를 각각 1.5 mg/mL과 0.15 mg/mL (GO : CNT (w/w)의 혼합 비율 = 10 : 1)로 하기 위해서는, 위와 동일한 양의 CNT가 분산된 CNT 용액 7 mL에, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4.0 mg/mL) 5.6 μL 를 추가하고, 잘 분산시킨 GO 용액 (4.0 mg/mL) 4.2 mL을 추가한 후 잘 섞고 동일하게 sonicator (135 W)에 넣고 1시간 동안 분산시켰다.
- [0051] 제조된 혼합용액은 질소 가스로 10분간 purging 하면서 용존 산소를 제거해 준 후, 깨끗하게 세척이 완료된 GCE를 작업전극 (working electrode), platinum wire를 상대전극 (counter electrode) 및 Ag/AgCl (saturated 1 M) 전극을 기준전극으로 하여 삼상전극계를 구성하였다. 혼합 용액을 다시 질소 가스로 purging - pressure gauge (0.04 mPa) 및 flow meter (300 cc / min)) - 하면서, potentiostat (CompactStat, Ivium, 네덜란드)를 사용하여 순환전압전류법 (cyclic voltammetry, CV)을 시행 (전압범위: +0.3 ~ -1.5V, scan rate: 50 mV/s, 10

회) 함으로써, GCE 전극 위에 전기화학적 환원 및 증착법을 통해 GNP/rGO-CNT 나노복합체를 합성하였다. GCE 위에 합성된 GNP/rGO-CNT 나노구조체 (GNP/rGO-CNT/GCE)는 증류수에 3 회 세척한 후 증류수에 담귀서 보관하였다.

[0053] **바이오 센서 구성**

[0054] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 센서 구성도이다.

[0055] 도 2를 참조하면, 합성된 GNP/rGO-CNT 나노복합체는 소량의 CNT (GO : CNT 혼합비율 (w/w) = 9 : 1 또는 10 : 1)가 첨가되어 rGO sheet 들 간의 aggregation을 방지하기 때문에 3차원의 다공성 구조를 만들 수 있다. 그로 인해 요산과 잔틴이 나노구조체 안쪽까지 효과적으로 잘 전달될 수 있을 뿐 아니라, 넓은 표면적으로 인해 rGO-CNT 복합체와 요산, 잔틴 간의 파이-파이 상호작용이 강화되면서 요산과 잔틴을 보다 효과적으로 산화시킬 수 있다. 또한 rGO-CNT 나노복합체의 우수한 전기전도도와 금 나노입자의 우수한 전기화학적 촉매 활성으로 인해 요산과 잔틴의 산화가 빠르게 일어날 뿐 아니라, 발생한 전자의 전달을 원활하게 하기 때문에 고감도의 요산, 잔틴 검출 센서가 될 수 있다.

[0056] 제작된 GNP/rGO-CNT/GCE를 이용하여 요산과 잔틴을 동시에 검출하기 위하여, GNP/rGO-CNT/GCE, platinum wire 와 Ag/AgCl (saturated 1 M) 기준 전극으로 삼상전극계를 구성한 후, 일정 농도의 요산과 잔틴이 모두 포함된 phosphate buffered saline (PBS, 0.1 M, pH 7.4) 용액 10 mL 에 담겼다. 4분 간 accumulation 한 후, 네모파 전압전류법 (square wave voltammetry, SWV)을 시행하였다. 이때 SWV의 조건은 전압 범위는 0.0 ~ 1.0 V 이고, pulse amplitude는 10 mV 이고, SQRWV frequency는 2 Hz 이고, E step은 10 mV 였다.

[0058] **실험예: 합성 조건 최적화**

[0059] **1) 3차원 나노구조체 합성을 위한 GO : CNT 혼합비율 최적화**

[0060] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 GO : CNT 혼합비율 최적화 실험 결과이다.

[0061] 도 3을 참조하면, 최적의 3차원 다공성 구조의 rGO-CNT 나노복합체를 합성하기 위해, GO와 CNT의 혼합비율 (w/w)을 각각 0: 10 (Only CNT), 1:9, 5:5, 9:1, 10:0 (Only GO)로 변화시키면서 혼합 용액을 제조한 후 위와 같은 방법으로 GCE 위에 rGO-CNT를 합성하였다. 또한, GO와 CNT의 혼합비율 (w/w)을 각각 0: 11 (Only CNT), 1:10, 4:7, 7:4, 10:1, 11:0 (Only GO)로 변화시키면서 혼합 용액을 제조한 후 동일한 방법으로 GCE 위에 rGO-CNT를 합성하였다. 각 혼합비율로 합성된 나노구조체의 전기화학적 특성 분석을 위해서 대표적인 전기화학 활성 종인 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 용액 (2 mM)을 사용하여 CV를 시행하였다. 이때, 전압범위는 -0.1 ~ 0.5 V 이고, scan rate는 50 mV/sec 였음.

[0062] 먼저, 도 3(A)에서 알 수 있듯이, CV 측정 결과 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 에 대한 산화피크전류값 (anodic peak current, I_{pa})을 기준으로 보았을 때 GO 만으로 합성된 RGO 구조체 ($221.8 \pm 1.8 \mu\text{A}$)에 비해 GO 와 CNT 혼합비율이 9:1 인 경우에서 I_{pa} 값이 증가 ($307.0 \pm 3.3 \mu\text{A}$) 하였다. 하지만 CNT 혼합비율이 더 증가하게 되면 I_{pa} 값이 감소 하여 CNT 만으로 합성된 구조체에서는 아주 낮은 I_{pa} 값 ($34.3 \pm 0.3 \mu\text{A}$)을 나타냈다. 마찬가지로, 도 3(B) 와 같이 GO와 CNT의 혼합비율이 10:1 일 경우 I_{pa} 값이 급격히 증가 ($292.1 \pm 2.2 \mu\text{A}$)하였고 CNT 혼합비율이 그 이상으로 증가하면 오히려 I_{pa} 값이 감소하였다. 결과적으로, GO와 CNT를 9:1 또는 10:1 비율로 혼합하였을 때 가장 높은 I_{pa} 값을 나타냈는데, 이는 소량의 CNT 가 첨가되면서 형성된 3차원 rGO-CNT 나노구조체로 인해 표면적 증가와 분석물질의 이동이 향상되어 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 의 산화로 인해 발생한 전자 전달이 빠르게 이루어 졌기 때문으로 생각되었다.

[0063] GO와 CNT를 9:1 또는 10:1 비율로 혼합하여 합성한 rGO-CNT 나노구조체의 형태를 확인하기 위해 scanning electron microscope (SEM) 분석을 시행해 본 결과, 도 3(C)에 나타난 바와 같이, CNT 가 첨가되지 않은 rGO 구조체는 10 : 0 과 11 : 0 비율 (GO : CNT) 모두 비교적 매끈한 필름 형태를 나타내는 반면, rGO-CNT 는 9:1 또는 10:1 비율 (GO : CNT) 로 합성된 경우 모두에서 pore를 가지는 3차원 구조체로 형성된 것을 확인할 수 있었다.

[0065] **2) 요산, 잔틴 검출을 위한 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 농도 최적화**

[0066] 도 4 및 5는 요산, 잔틴 검출을 위한 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 농도 최적화 실험결과 및 최종 수득된 복합체에서의 금 나노

입자의 중량%을 알기 위한 EDX 분석결과이다.

[0067] 도 4 및 5를 참조하면, 요산, 잔틴에 대한 검출 능력을 높이기 위하여, 전기화학적 촉매 특성이 우수한 금 나노입자가 혼입된 형태의 GNP/rGO-CNT 나노복합체를 합성하고자, GO와 CNT 혼합 용액에 첨가되는 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 최적화하였다. 우선, GO와 CNT를 9:1 비율로 혼합한 용액에 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 를 추가하여 각각 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 제조하였다. 제작된 혼합 용액은 앞과 동일한 방법으로 CV를 시행하여 GCE 위에 GNP/rGO-CNT를 합성하였다. 일반적인 전기화학 특성을 평가하기 위하여, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 용액 (2 mM)을 사용하여 동일한 전압 범위에 대해 CV를 시행하였다. 측정 결과, 도 4(A)에 나타난 바와 같이, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 농도가 2.5 ~ 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 전혀 추가하지 않은 rGO-CNT에 비해 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 에 대한 I_{pa} 가 증가하였으나, 점차 그 양이 증가할수록 오히려 감소하였다. 이는 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 에서 합성되는 금 나노입자는 오히려 rGO-CNT 기반의 나노복합체의 전자전달 특성을 방해할 뿐 아니라 3차원 구조체의 형성에도 방해를 주는 것으로 판단하였다. 따라서, 가장 높은 I_{pa} 를 나타내면서 표준편차도 가장 적은 2.5 $\mu\text{g/mL}$ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 농도로 1차 선정하였다.

[0068] 추가적으로, 요산과 잔틴에 대한 검출 성능을 평가하기 위하여, GO와 CNT를 9:1 비율로 혼합한 용액에 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 를 추가하여 각각 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 제조한 후 동일한 방법으로 CV를 시행하여 GCE 위에 GNP/rGO-CNT를 합성하였다. 100 μM 의 요산과 잔틴이 포함된 PBS (0.1 M, pH 7.4) 용액 10 mL에 담구고 바로 SWV를 시행하여 요산과 잔틴에 대한 I_{pa} 를 분석하였다. 그 결과, 도 4(B)와 같이 100 μM 요산에 대한 I_{pa} 는 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 농도 변화에 따라 유사하였으나, 도 4(C)와 같이 100 μM 잔틴에 대한 I_{pa} 는 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 를 이용한 분석에서 1차적으로 선정된 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 로 합성된 GNP/rGO-CNT/GCE에서 가장 크게 나타났다. 따라서, 소량의 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여 합성된 GNP/rGO-CNT/GCE는 잔틴의 산화 반응에 대한 전기화학적 촉매 특성이 향상되는 것을 알 수 있었으며, 이를 통해 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 농도는 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 선정하였다.

[0069] 이 경우 도 5에서 도시한 바와 같이 전체 복합체에서 금 나노입자의 중량%는 바람직하게는 5 내지 10 중량%, 보다 바람직하게는 8 내지 9 중량%이다.

[0071] 실험예

[0072] **GNP/rGO-CNT/GCE을 이용한 요산, 잔틴 검출 조건 - 용액의 pH와 accumulation time - 최적화**

[0073] 도 6은 용액의 pH와 accumulation time 최적화 분석결과이다.

[0074] 도 6을 참조하면, GNP/rGO-CNT/GCE을 이용한 요산과 잔틴 검출 조건을 최적화하기 위해, 먼저 요산과 잔틴 검출에 사용되는 PBS (0.1 M) 용액의 pH를 각각 5, 6, 7, 7.4, 8, 9로 변화시키면서 바로 SWV를 시행하여 요산과 잔틴에 대한 I_{pa} 를 분석하였다. 그 결과, 도 6(A)에서 알 수 있듯이, 요산에 대해서는 pH가 5에서 7.4로 증가할수록 I_{pa} 가 증가하다가 pH 8 이상에서 다시 감소하여 pH 7.4에서 가장 큰 I_{pa} 를 나타냈다. 또한 잔틴에 대해서는 도 6(B)에서와 같이 pH 5의 용액에서 가장 높은 I_{pa} 를 보이다가 감소하여 pH 7 이상에서는 모두 유사한 I_{pa} 를 보였다. 따라서, 요산에 대한 높은 산화전류와 생체 시료의 조건을 모두 고려하여 최적의 pH는 7 내지 8, 가장 바람직하게는 7.4이다.

[0075] 둘째, 요산과 잔틴을 고감도로 측정하기 위해서는 GNP/rGO-CNT/GCE와 요산, 잔틴 간의 interaction을 최적화할 필요가 있으므로, GNP/rGO-CNT/GCE를 100 μM 의 요산과 잔틴이 포함된 PBS (0.1 M, pH 7.4) 용액 10 mL에 넣고 accumulation time을 각각 1, 2, 3, 4, 5 분으로 변화시킨 후, SWV를 시행하여 요산과 잔틴에 대한 I_{pa} 를 분석하였다. 그 결과, 도 6(C)와 6(D)에서 알 수 있듯이, accumulation time이 증가할수록 요산과 잔틴에 대한 I_{pa} 값이 모두 증가하였으며, 4분 이상에서는 유사한 I_{pa} 값을 나타내었다. 따라서, accumulation time을 3 내지 5분, 가장 바람직하게는 4분으로 선정하였다.

[0077] 실험예

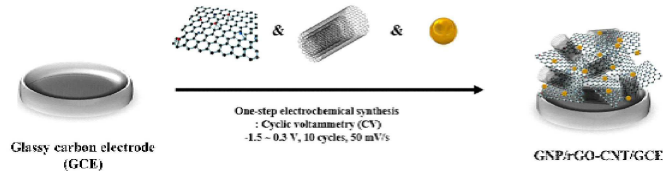
[0078] **3차원 다공성_GNP/rGO-CNT/GCE의 특성 비교 분석**

- [0079] 도 7은 3차원 다공성_GNP/rGO-CNT/GCE 의 특성 비교 분석 결과이다.
- [0080] 도 7을 참조하면, 3차원 다공성 구조를 가지는 GNP/rGO-CNT/GCE의 요산, 잔틴 검출 특성을 비교하기 위하여, bare GCE, rGO/GCE, rGO-CNT/GCE 및 GNP/rGO-CNT/GCE 에 대해 25 μM 의 요산과 잔틴이 포함된 PBS (0.1 M, pH 7.4) 용액 10 mL에 담구고 4분 간 accumulation 한 후, SWV를 시행하여 요산과 잔틴에 대한 I_{pa} 를 분석하였다.
- [0081] 그 결과, 도 7(A)에서 알 수 있듯이, bare GCE 에서는 요산과 잔틴에 의한 산화 피크가 거의 관찰되지 않았고, 나머지 전극들에서는 요산과 잔틴의 산화피크가 관찰되었다. 각 전극들에 대해 측정된 요산과 잔틴의 I_{pa} 값을 비교해본 결과, 도 7(B)와 7(C)에서 알 수 있듯이 rGO/GCE와 rGO-CNT/GCE에 비해 GNP/rGO-CNT/GCE 에서 요산과 잔틴 모두 가장 큰 I_{pa} 를 나타내었다. 이는 전기화학적 환원 및 증착법을 통해 one-step으로 합성된 GNP/rGO-CNT/GCE가, 3차원 다공성 구조를 형성하면서 표면적이 증가되었을 뿐 아니라 금 나노입자가 소량 혼입되면서 전기화학적 촉매 특성이 향상된 결과로 판단하였다. 따라서, 3차원 다공성의 GNP/rGO-CNT/GCE는 요산과 잔틴의 동시 검출에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0083] 실험예
- [0084] **GNP/rGO-CNT 나노복합체 기반의 요산, 잔틴 검출 센서의 성능 평가**
- [0085] **1) 요산, 잔틴 농도별 신호 (I_{pa}) 변화 - 민감도 평가**
- [0086] 도 8은 요산, 잔틴 농도별 신호 (I_{pa}) 변화 - 민감도 평가 결과이다.
- [0087] 도 8을 참조하면, GNP/rGO-CNT/GCE에 대하여, 요산과 잔틴 동시 검출용 센서로서의 민감도 평가를 위해 요산과 잔틴의 농도를 변화시키면서 SWV를 시행하여 요산과 잔틴에 대한 I_{pa} 를 분석하였다. 먼저, 잔틴을 포함하지 않은 요산 용액을 0 ~ 25 μM 로 변화시키면서 SWV의 I_{pa} 를 분석한 결과, 도 8(A)에 나타난 바와 같이 요산 농도에 따라 I_{pa} 가 선형적으로 변화하는 것을 알 수 있었으며 ($R^2 = 0.9968$), 1.56 ~ 25.0 μM 요산 농도 범위에서 5.40 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ 의 감도를 나타냈다. 또한, 6.25 μM 잔틴이 포함된 요산 용액을 동일한 농도로 변화시키면서 SWV의 I_{pa} 를 분석한 결과도 유사하여 1.56 ~ 25.0 μM 요산 농도 범위에서 5.60 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ 의 감도를 보이며 우수한 선형성 ($R^2 = 0.9944$)을 나타냈다. 다음으로는, 요산을 포함하지 않은 잔틴 용액을 0 ~ 25 μM 로 변화시키면서 SWV의 I_{pa} 를 분석한 결과, 도 8(B)에서와 같이 잔틴 농도에 따라 I_{pa} 가 선형적으로 변화하는 것을 알 수 있었으며 ($R^2 = 0.9935$), 3.13 ~ 25.0 μM 잔틴 농도 범위에서 2.78 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ 의 감도를 나타냈다. 또한, 12.5 μM 요산이 포함된 잔틴 용액을 동일한 농도로 변화시키면서 SWV의 I_{pa} 를 분석한 결과도 유사하여, 3.13 ~ 25 μM 요산 농도 범위에서 2.94 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ 의 감도를 보이며 우수한 선형성 ($R^2 = 0.9941$)을 나타냈다.
- [0089] **2) 요산, 잔틴 검출에 대한 선택성 평가**
- [0090] 도 9는 요산, 잔틴 검출에 대한 선택성 평가 결과이다.
- [0091] 도 9를 참조하면, GNP/rGO-CNT/GCE에 대하여 요산과 잔틴 동시 검출용 센서로서의 선택성을 평가하기 위해, 대표적인 간섭물질로 알려진 도파민 (dopamine, 5 μM), 구연산 (citric acid, 100 μM), 글루코스 (glucose, 100 μM), 비타민 C (ascorbic acid, 100 μM)를 각각 요산과 잔틴 25 μM 이 포함된 용액에 추가한 후 SWV를 시행하여 요산과 잔틴에 대한 I_{pa} 를 분석하였다. 분석 결과, 도 9에서와 같이 간섭물질이 전혀 들어있지 않고 요산과 잔틴만이 포함된 용액에서 측정된 I_{pa} 와 비교하였을 때 요산의 경우 96.3 ~ 99.2 %의 값을 보였고 잔틴의 경우 104.0 ~ 107.7 %의 신호 변화를 나타내어 간섭물질들에 의해 발생하는 요산과 잔틴의 신호 변화는 크지 않음을 확인하였다.
- [0093] **3) 요산, 잔틴 검출에 대한 재현성 평가**
- [0094] 도 10은 요산, 잔틴 검출에 대한 재현성 평가 결과이다.
- [0095] 도 10을 참조하면, 요산과 잔틴 동시 검출용 센서로서의 재현성을 평가하기 위해, 같은 날 제작된 10 개의 GNP/rGO-CNT/GCE 에 대하여 25 μM 의 요산과 잔틴이 포함된 용액에서 SWV를 시행하여 요산과 잔틴에 대한 I_{pa} 를 분석하였다. 그 결과, 도 10(A)와 같이 요산에 대해 2.1%, 잔틴에 대해 2.7%의 변동계수 (coefficient of

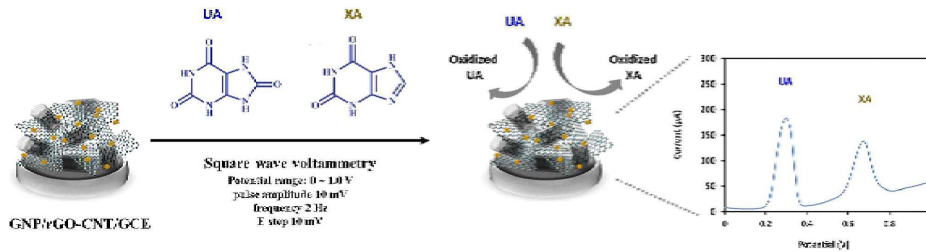
variation, CV)를 보여 재현성이 우수함을 알 수 있었다. 또한, 각기 다른 날 제작된 5 개의 GNP/rGO-CNT/GCE에 대해서도 25 μ M의 요산과 잔틴이 포함된 용액에서 SWV를 시행하여 요산과 잔틴에 대한 I_{pa} 를 분석해 본 결과, 도 9(B)와 같이 요산에 대해 2.0%, 잔틴에 대해 3.0%의 CV를 나타내어 마찬가지로 재현성이 우수함을 알 수 있었다.

도면

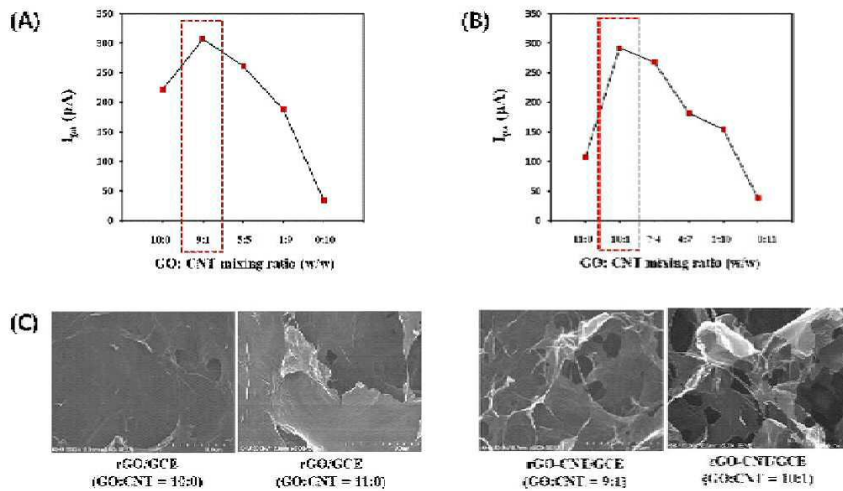
도면1



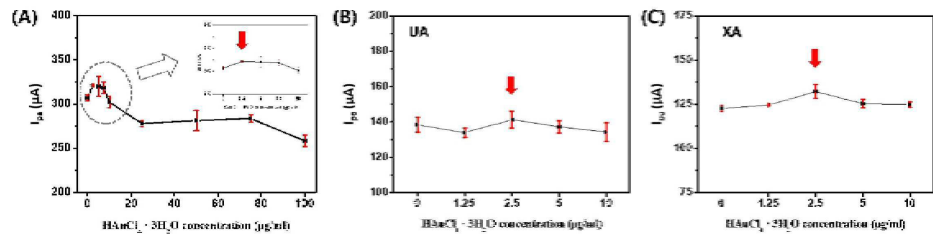
도면2



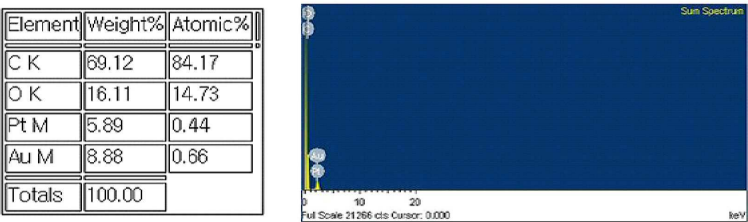
도면3



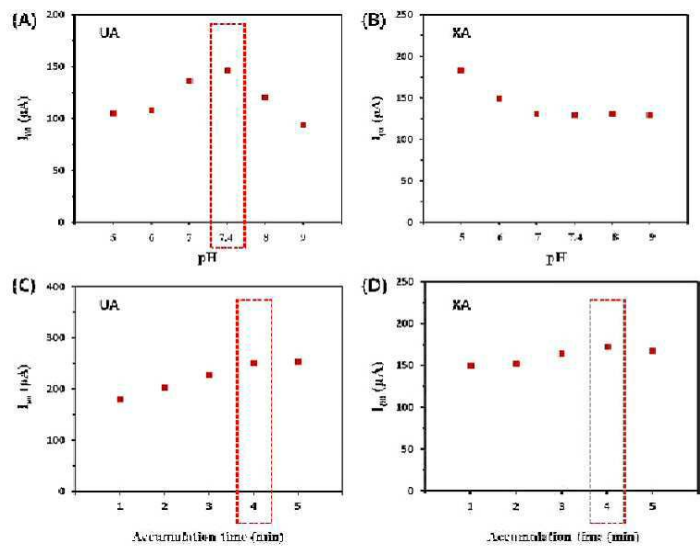
도면4



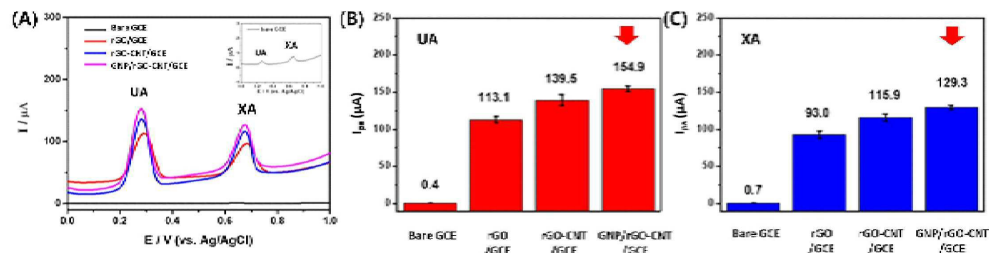
도면5



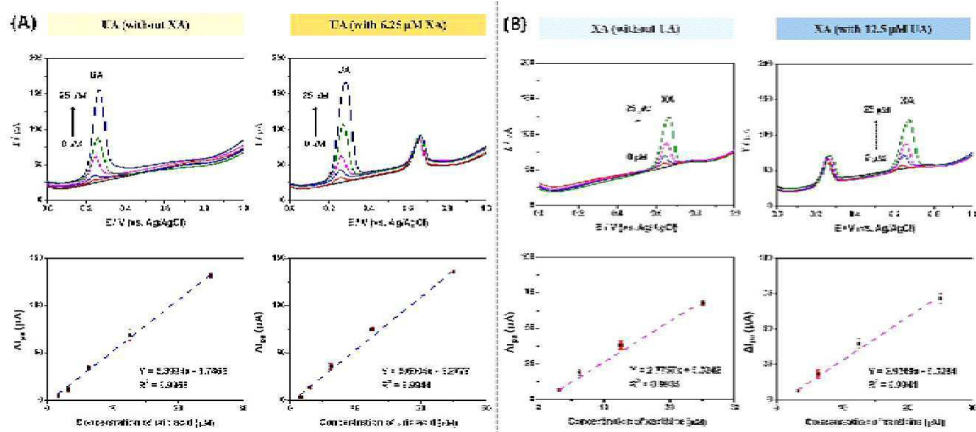
도면6



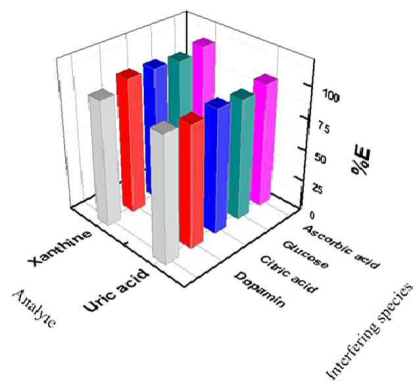
도면7



도면8



도면9



도면10

