



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월08일
(11) 등록번호 10-1713480
(24) 등록일자 2017년02월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/327 (2006.01) C12Q 1/00 (2017.01)
C12Q 1/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/3275 (2013.01)
C12Q 1/001 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0045649
(22) 출원일자 2016년04월14일
심사청구일자 2016년04월14일
(56) 선행기술조사문헌

- (73) 특허권자
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
김규원
인천광역시 연수구 청능대로 124 117동 104호 (동
춘동, 금호동아아파트)
(74) 대리인
차준용

Li Fu., "Preparation of β -Cyclodextrin
Functionalized Reduced Graphene-Silver
Nanocomposites: Application for Sensing of
Nitrite", IECSA, 2014

Yan et al., "A novel sandwich-type
noncompetitive immunoassay of
diethylstilbestrol using β -cyclodextrin
modified electrode and polymer-enzyme
labels", J of electroanalytical chemistry,
736, 2015

KR1020160004421 A

KR1020130121464 A

전체 청구항 수 : 총 17 항

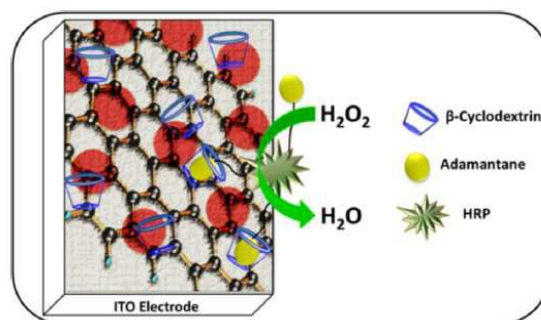
심사관 : 이경철

(54) 발명의 명칭 환원된 산화그래핀과 싸이클로덱스트린 나노컴포짓을 활용한 전기화학 센서

(57) 요약

본 발명은 환원된 산화그래핀(RGO)과 싸이클로덱스트린(CD) 나노컴포짓을 활용한 전기화학 센서에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 ITO 전극 위에 고체 지지체로서 금 나노입자가 임베딩된 실리케이트 졸-겔 매트릭스(TPDT-Au NPs)를 형성하고 그 위에 β -싸이클로덱스트린으로 기능화된 환원된 산화그래핀(RGO-CD) 나노시트를 형성한 후 초분자 회합(Supramolecular association)을 통해 HRP(Horseradish peroxidase)와 아다만탄 카복실산의 컨쥬게이트(HRP-ADA)를 고정화시켜 ITO/TPDT-Au NPs/RGO-CD/HRP-ADA의 구조로 전극 표면을 개질함으로써, 효소 고정화에 유리한 더욱 평탄한 플랫폼을 제공하고 계면 상호작용을 개선하여 전기적 전달을 증가시키며 효소 컨쥬게이트와 안정한 복합체를 형성할 수 있게 하고 그 결과 과산화수소(H_2O_2) 검출시 우수한 센서 특성을 나타낼 수 있는, 새로운 친화성 결합 나노복합체를 이용한 전기화학 센서에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 1/28 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

전극;

상기 전극 위에 형성된 고체 지지체로서, 금 나노입자가 임베딩된 실리케이트 졸-겔 매트릭스(TPDT-Au NPs);

상기 고체 지지체 위에 형성되어 상기 고체 지지체에 의해 지지되는 나노시트로서, β -싸이클로텍스트린으로 기능화된 환원된 산화그래핀(RGO-CD); 및

상기 RGO-CD 위에 초분자 회합(Supramolecular association)을 통해 고정된 효소 복합체로서, HRP(Horseradish peroxidase)와 아다만탄 카르복실산의 컨쥬게이트(HRP-ADA);를 포함하는,

환원된 산화그래핀과 싸이클로텍스트린 나노컴포짓(Nanocomposite)을 활용한 전기화학 센서.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 전극은 ITO(Indium tin oxide) 전극인 것을 특징으로 하는,

전기화학 센서.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 실리케이트 졸-겔 매트릭스는 N-(3-트리메톡시실릴프로필)디에틸렌트리아민을 실란 모노머로 하여 제조된 것임을 특징으로 하는,

전기화학 센서.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 RGO-CD와 HRP-ADA의 초분자 회합은 β -싸이클로텍스트린(CD)의 캐비티(Cavity) 내에 아다만탄 카르복실산(ADA)이 고정화되어 형성됨을 특징으로 하는,

전기화학 센서.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 전기화학 센서는 과산화수소(H_2O_2)의 검출에 사용되는 것을 특징으로 하는,

전기화학 센서.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 과산화수소(H_2O_2)의 검출은 하이드로퀴논(HQ)의 존재 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는,

전기화학 센서.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 금 나노입자(Au NPs)의 평균 입자 크기는 9 nm인 것을 특징으로 하는,

전기화학 센서.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 TPDT-Au NPs, RGO-CD 및 HRP-ADA로 이루어진 필름의 두께는 201 nm인 것을 특징으로 하는,

전기화학 센서.

청구항 9

Layer-by-Layer 드롭 캐스팅(Drop casting)을 이용한, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 전기화학 센서의 제조방법으로서,

a) ITO 전극을 세척하는 단계;

b) 세척된 ITO 전극 표면 상에 TPDT-Au NPs 용액을 드롭 캐스팅하여 ITO/TPDT-Au 전극을 제작하는 단계;

c) ITO/TPDT-Au 전극 위에 RGO-CD 용액을 드롭 캐스팅하여 ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극을 제작하는 단계; 및

d) ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극을 HRP-ADA를 함유하는 PBS(Phosphate buffer saline)에 침지하여 HRP-ADA를 고정화시켜 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극을 수득하는 단계;를 포함하는,

전기화학 센서의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 a) 단계는,

ITO 전극을 피라나 용액(Piranha solution)으로 세척한 후, 증류수로 세척한 다음, 질소(N_2) 가스 하에서 건조시키는 것임을 특징으로 하는,

전기화학 센서의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 b) 단계의 TPDT-Au NPs 용액은,

균일한 N-(3-트리메톡시실릴프로필)디에틸렌트리아민 실란 모노머 수용액에 $HAuCl_4$ 를 첨가 및 교반하여 합성되는

것을 특징으로 하는,
전기화학 센서의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,
상기 c) 단계의 RGO-CD 용액은,
환원된 산화그래핀(RGO) 분산액에 β -싸이클로덱스트린(CD) 수용액을 혼합 및 교반한 후, L-아스코르브산(AA)을 첨가 및 교반하여 합성되는 것을 특징으로 하는,
전기화학 센서의 제조방법.

청구항 13

제9항에 있어서,
상기 d) 단계의 HRP-ADA는,
N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDAC) 하에서 HRP(Horseradish peroxidase) 및 1-아다만탄 카르복실산(ADA)을 반응시켜 합성되는 것을 특징으로 하는,
전기화학 센서의 제조방법.

청구항 14

제9항에 있어서,
상기 d) 단계의 HRP-ADA를 함유하는 PBS는,
농도가 0.1 M, pH가 7.0인 것을 특징으로 하는,
전기화학 센서의 제조방법.

청구항 15

제9항에 있어서,
상기 d) 단계 이후,
e) ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극을 4℃ 및 pH 7.0 조건의 PBS로 린스한 후, 동일한 조건의 PBS 내에서 보관하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는,
전기화학 센서의 제조방법.

청구항 16

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 전기화학 센서의 전기화학적 성능을 확인하기 위한 방법으로서,
 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 종(Species)을 대상으로 순환전압전류법(CV)을 수행하여 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 종(Species)의 산화환원 거동을 분석하는 것을 특징으로 하는,

전기화학 센서의 성능 테스트방법.

청구항 17

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 전기화학 센서의 전극에,

과산화수소(H_2O_2) 및 하이드로퀴논(HQ) 용액을 접촉시켜 화학적 촉매반응을 일으키고, 순환전압전류법(CV)을 이용하여 표적 물질인 과산화수소(H_2O_2)를 검출해내는 것을 특징으로 하는,

전기화학적 표적 물질 검출법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 환원된 산화그래핀(RGO)과 사이클로텍스트린(CD) 나노컴포짓을 활용한 전기화학 센서에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 ITO 전극 위에 고체 지지체로서 금 나노입자가 임베딩된 실리케이트 졸-겔 매트릭스(TPDT-Au NPs)를 형성하고 그 위에 β -사이클로텍스트린으로 기능화된 환원된 산화그래핀(RGO-CD) 나노시트를 형성한 후 초분자 회합(Supramolecular association)을 통해 HRP(Horseradish peroxidase)와 아다만탄 카르복실산의 컨쥬게이트(HRP-ADA)를 고정화시켜 ITO/TPDT-Au NPs/RGO-CD/HRP-ADA의 구조로 전극 표면을 개질함으로써, 효소 고정화에 유리한 더욱 평탄한 플랫폼을 제공하고 계면 상호작용을 개선하여 전기적 전달을 증가시키며 효소 컨쥬게이트와 안정한 복합체를 형성할 수 있게 하고 그 결과 과산화수소(H_2O_2) 검출시 우수한 센서 특성을 나타낼 수 있는, 새로운 친화성 결합 나노복합체를 이용한 전기화학 센서에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] ITO(Indium tin oxide) 전극 위에 금속/산화그래핀/생체분자 기반의 어셈블리를 제작하는 기술은 바이오센싱 소자, 기능적인 나노 물질 및 활성 바이오 전기화학 촉매의 개발에 초점을 둔 현대적인 연구 분야이다.
- [0003] 그래핀(Graphene; GR) 및 산화그래핀(Graphene oxide; GO)은 그 독특한 전기·전자적 및 기계적 특성으로 인해 다양한 분야에서 많은 관심을 받고 있는 소재이며, 표면적이 넓어 전기화학에 있어 요구되는 활성 및 안정성을 구현하기 위한 우수한 탄소 지지체로 사용되고 있다.
- [0004] 최근의 연구는 GR/GO로 지지된 금속 나노입자(NPs)의 경우 전기화학적 촉매 성능이 향상된다고 보고한 바 있고, 이론적 연구 결과 금속 NPs 및 GR/GO 간의 상호작용이 금속 NPs 및 GR/GO 모두의 페르미 준위(Fermi level)를 변화시켜 촉매 활성의 향상에 유리하게 작용할 수 있다고 밝힌 바 있다.
- [0005] 다른 연구진은 *in-situ* 성장 및 *ex-situ* 어셈블리 방법을 이용해 GO로 지지된 금속 NPs의 제작을 시도한 바 있다. 그러나 이러한 두 가지 방법은 GO 표면에서 금속 나노구조의 크기 및 모폴로지를 조절하기 위해 여러가지 환원제 및 계면활성제를 사용해야 한다. 또한 비-공유결합적 상호작용 또는 화학적 결합을 통해 금속 NPs를 GO와 결합시키기 위해 NPs 표면을 개질하는 것이 필요한데, 이때 사용되는 화학약품들이 센서 실험 도중 관여하여 지장을 줄 수 있다. 아울러 금속 NPs와 분석 물질을 직접 접촉시키는 경우 센서 전극의 안정성이 감소하고 생체 적합성(Bio-compatibility)이 의문시될 수 있다.
- [0006] 따라서, GO로 지지된 금속 NPs 또는 금속 NPs로 지지된 GO를 더욱 쉽고 깨끗하게 합성할 수 있는 방안을 모색하는 것이 절실히 요구되고 있다.
- [0007] 금(Au) NPs는 그 특유의 크기 및 모양으로 인해 특이한 물리적 및 화학적 특성을 나타내며, 본래의 시스템에서의 산화환원 효소의 경우와 유사한 온화한 미세환경(Microenvironment)을 제공할 수 있다. 다만 콜로이드 Au

NPs는 막 형성능력이 열악하기 때문에 캡슐화와 관련된 매트릭스 지지체를 구비하는 것이 필요하다. 또한 개질되지 않은 Au NPs의 물리적 및 화학적 특성이 때로는 특정 적용예에 부적합한 경우도 있다.

[0008] 따라서, Au NPs를 적절하게 표면 개질해야만 가치있는 완제품을 제공할 수 있다.

[0009] β -사이클로덱스트린(CD)은 수용성이고 환경친화적인 고리형 올리고당으로서, 친수성의 외부 및 소수성의 내부 캐비티(Cavity)를 지니고 있다. CD의 소수성 캐비티에는 타겟 분자가 선택적 회합(Selective association)될 수 있어 센서 개발에 적용될 수 있으며, CD는 강한 수소결합을 통해 환원된 산화그래핀(Reduced graphene oxide; RGO) 시트 상에 기능화되어 RGO를 더욱 친수성으로 만들 수 있다.

[0010] 따라서, CD로 기능화된 RGO(RGO-CD)는 RGO 및 CD 각각의 독특한 특성을 나타낼 수 있고, CD의 캐비티에 적절한 생체분자를 고정시켜 전기화학적 바이오 센서를 구성할 수 있을 것으로 기대된다.

[0011] 다만, 효소를 고정화시켜 개질된 전극을 제작할 때 전극 표면은 효소의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않으면서 당해 효소와 정확하게 상호작용을 해야 한다. 효소가 적절히 고정되지 않으면 효소가 쉽게 불활성화되거나 전극 표면으로부터 분리된다.

[0012] 한편, 과산화수소(H_2O_2)는 생물학, 의학 및 화학에서 필수적 매개체일 뿐만 아니라 몇몇 산업 제품 및 폐기물에 있어 주요 오염 물질인바, 이를 고감도로 정확하게 정량화하는 것이 매우 중요하다. 또한 H_2O_2 는 바이오 센서 설계에 통상적으로 이용되는 고-선택성 산화효소의 부산물이기도 하다.

[0013] 이에, 금속 나노입자/그래핀계 소재/효소에 기반한 개질 전극 센서로서, 효소의 적절한 고정성, 센서의 안정성 및 생체적합성을 지니고 표적 물질(특히, H_2O_2)에 대해 우수한 전기화학적 검출 특성을 나타내는 새로운 어셈블리 구조의 전기화학 센서와, 이를 쉽게 친환경적으로 제작할 수 있는 방법에 대한 개발이 필요한 상황이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) H. Xu, H. Zhu, M. Sun, H. Yu, H. Li, F. Maa, S. Wang, Analyst, 2015, 140, 1678-1685.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자 한 것으로, 새로운 친화성 결합 초분자 어셈블리로서 Au NPs 및 RGO-CD 기반의 나노컴포짓 개질 전극을 이용한 전기화학 센서를 제공함을 기술적 과제로 한다.

[0016] 구체적으로, 본 발명자는 이러한 친화성 시스템은 CD 및 효소 켄주게이트 간의 초분자 회합에 기초한 것이며, Au NPs 및 RGO-CD 층 간의 계면 상호작용이 개선되어 Au NPs 및 RGO-CD 나노시트 각각을 독립적으로 사용한 경우 대비 H_2O_2 의 환원에 대해 더욱 상승적인 전기화학적 촉매 효과를 발휘함을 확인하고, 본 발명에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 새로운 친화성 결합(Affinity binding)을 이용한 나노컴포짓으로서, "전극기판/TPDT-Au NPs/RGO-CD/HRP-ADA"의 구조로 어셈블리 및 개질된 전극을 포함한 전기화학 센서를 제공한다.

- [0018] 구체적으로, 본 발명은
- [0019] 전극;
- [0020] 상기 전극 위에 형성된 고체 지지체로서, 금 나노입자가 임베딩된(Embedded) 실리케이트 매트릭스(예컨대, 실리케이트 졸-겔 매트릭스)(TPDT-Au NPs);
- [0021] 상기 고체 지지체 위에 형성되어 상기 고체 지지체에 의해 지지되는 나노시트로서, β -싸이클로텍스트린으로 기능화된 환원된 산화그래핀(RGO-CD); 및
- [0022] 상기 RGO-CD 위에 초분자 회합(Supramolecular association)을 통해 고정된 효소 복합체로서, HRP(Horseradish peroxidase)와 아다만탄 카르복실산의 컨쥬게이트(HRP-ADA);를 포함하는,
- [0023] 환원된 산화그래핀과 싸이클로텍스트린 나노컴포짓(Nanocomposite)을 활용한 전기화학 센서를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 전기화학 센서에서, 상기 전극(기판)으로는 유리, 수정, 글래스웨이퍼, 실리콘웨이퍼, 탄소기판, 탄소펠트, 사파이어, 질화실리콘, 화합물 반도체, GaAs 기판, GaInP 기판, 탄화실리콘, 티타늄 코팅기판, 세라믹, 금속합금, 플라스틱, SAM(Self-assembled monolayer)막, 양극산화기판, 섬유강화 투명 플라스틱, 단결정 실리콘, 폴리크리스탈린 실리콘, 마이크로 크리스탈린 실리콘, 박막 실리콘, CdTe 기판, 양자점 태양전지, GaP 기판, SiGe 기판, Si 기판, Ge 기판, InGaAsN 기판, Cu 기판, Al 기판, Au 기판, Ag 기판, Pt 기판, 용융 실리콘 기판, ITO 기판, 활성 탄소 기판 등을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, ITO(Indium tin oxide) 전극을 사용한다.
- [0025] 상기 금 나노입자가 임베딩된 실리케이트 졸-겔 매트릭스(이하, 본원에서 "TPDT-Au NPs" 또는 "TPDT-Au"로도 약칭함)는 β -싸이클로텍스트린으로 기능화된 환원된 산화그래핀(이하, 본원에서 "RGO-CD"로도 약칭함)에 대한 고체 지지체로 작용하여, RGO-CD 나노시트의 구겨짐 및 주름을 감소시키고 그 결과 효소 고정화에 유리한 더욱 평탄한 플랫폼을 조성해준다. 구체적으로 상기 실리케이트 졸-겔 매트릭스는 N-(3-트리메톡시실릴프로필)디에틸렌트리아민(TPDT)을 실란 모노머로 하여 제조된 것이다.
- [0026] RGO 및 RGO-CD를 이용한 개질 전극 제작에 있어서, RGO 및 RGO-CD 층의 친수성 성질을 계속 유지하게 할 수 있는 적절한 링커 분자/폴리머를 기판에 적용하는 것이 개질 전극의 성능을 결정하는 매우 중요한 요소가 된다. 이에 본 발명자는 RGO 및 RGO-CD에 대한 고체 지지체로서 TPDT 및 TPDT-Au NPs를 특별히 채택하였다.
- [0027] 또한, 상기 금 나노입자(이하, 본원에서 "Au NPs"로도 약칭함)는 작은 나노전극들로 작용하여, RGO-CD 나노시트와의 계면 상호작용을 개선하고 전기적 전달을 증가시켜 H_2O_2 환원(예컨대, 1 mM 하이드로퀴논 존재시)에 대한 상승적인 전기화학적 촉매 효과(Electrocatalytic effect)를 나타나게 한다. 구체적으로 Au NPs는 증가된 활성 표면적을 지닌 새로운 전극 표면으로 작용하고, 그 결과 하부의 전극 표면과 효과적인 전기적 교환이 이루어진다. 이는 Au NPs의 표면이 RGO-CD에 의해 잘 보호/커버되어 Au NPs 및 RGO-CD 간의 전기적 전달이 원활히 이루어짐을 의미한다.
- [0028] 아울러, 상기 TPDT는 RGO 및 RGO-CD 층과 기판의 부착을 원활하게 하는 역할도 수행한다.
- [0029] 본 발명의 경우, 상기 TPDT-Au NPs는 임의의 외부 환원제를 사용하지 않고 제조되는 것이며, 트리-아민으로 기능화된 TPDT는 환원제 및 Au NPs에 대한 안정제의 두 가지 기능을 동시에 수행한다. 특히 본 발명은 이러한 TPDT-Au NPs의 합성이 완전한 친환경적(Completely green) 조건에서 이루어지고, Au NPs-캡슐화 TPDT는 생체적합성(Bio-compatible)도 함께 지니는 장점이 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 실리케이트 졸-겔 매트릭스에 임베딩된 Au NPs의 합성 및 안정화가 단일 단계를 통해 이루어지고, 나노미터 크기의 Au NPs가 균일하게 분포되는 장점이 있다.
- [0031] 한편, 상기 Au NPs의 평균 입자 크기는 9 nm 정도가 적절하다.
- [0032] 상기 β -싸이클로텍스트린으로 기능화된 환원된 산화그래핀(RGO-CD)는 효소 컨쥬게이트와 안정한 초분자 포접 복합체(Inclusion complexes)를 형성하는 거대고리 호스트(Macrocyclic host)로 작용한다.

- [0033] TPDT-Au NPs 지지체에 의해 RGO-CD 층은 더욱 평평해지고, 이러한 평면 플랫폼은 분석 물질 및 전극 표면 간의 우수한 전기적 전달을 가능케 한다. 따라서 초분자 회합을 통한 효소 고정화에 대해 더욱더 실현가능한 미세환경(Microenvironment)을 제공할 수 있다.
- [0034] 한편, 상기 RGO는 GO에 N_2H_4 , NaOH 또는 $NaBH_4$ 환원제를 가한 뒤, 60~100℃로 2~6시간 동안 가열하여 환원시킴으로써 합성할 수 있다.
- [0035] 상기 HRP(Horseradish peroxidase)와 아다만탄 카르복실산의 컨쥬게이트(이하, 본원에서 "HRP-ADA"로도 약칭함)는 화학적으로 개질된 효소 컨쥬게이트(Conjugate)로서, RGO-CD와 초분자 회합하여 안정한 초분자 복합체를 형성한다.
- [0036] 구체적으로, RGO-CD와 HRP-ADA의 초분자 회합은 β -싸이클로덱스트린(CD)의 캐비티(Cavity) 내에 아다만탄 카르복실산(ADA)이 고정화되어 형성되며, 이러한 친화성 시스템은 생물학적 아비딘-비오틴 상호작용과 유사한 것이다.
- [0037] 또한, 본 발명은 HRP를 모델 효소로 사용하는바, 이는 HRP가 과산화수소(H_2O_2) 측정을 위한 바이오 센서 기술에서 특히 중요한 효소이기 때문이다.
- [0038] 아울러, 상기 RGO-CD와 HRP-ADA의 초분자 회합은 효소의 일시적 고정이 아닌 상당한 수준의 지속가능성 및 내구성을 지니는 것으로 확인되었다.
- [0039] 이처럼 개질된 본 발명의 전기화학 센서에 있어서, 상기 TPDT-Au NPs, RGO-CD 및 HRP-ADA로 이루어진 필름의 두께는 201 nm 정도인 것이 최적이다.
- [0040] 본 발명의 전기화학 센서는 과산화수소(H_2O_2)의 검출에 특히 적합하게 사용되며, 이때 과산화수소(H_2O_2)의 검출은 하이드로퀴논(HQ)의 존재 하에서 수행된다.
- [0041] 구체적으로, 본 발명의 전극 어셈블리는 Au NPs 및 RGO-CD를 각각 단독으로 사용한 경우 대비, 하이드로퀴논(HQ) 존재 하에서 과산화수소(H_2O_2) 환원에 대해 더욱 상승된 전기화학적 촉매 효과를 나타내었다.
- [0042] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 전극 기판에 Layer-by-Layer 드롭 캐스팅(Drop casting)을 수행한 후 HRP-ADA를 고정시켜서 상기 전기화학 센서를 제조하는 방법이 제공된다.
- [0043] 구체적으로, 본 발명은
- [0044] Layer-by-Layer 드롭 캐스팅(Drop casting)을 이용한, 전기화학 센서의 제조방법으로서,
- [0045] a) ITO 전극을 세척하는 단계;
- [0046] b) 세척된 ITO 전극 표면 상에 TPDT-Au NPs 용액을 드롭 캐스팅하여 ITO/TPDT-Au 전극을 제작하는 단계;
- [0047] c) ITO/TPDT-Au 전극 위에 RGO-CD 용액을 드롭 캐스팅하여 ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극을 제작하는 단계; 및
- [0048] d) ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극을 HRP-ADA를 함유하는 PBS(Phosphate buffer saline)에 침지하여 HRP-ADA를 고정화시켜 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극을 수득하는 단계;를 포함하는,
- [0049] 전기화학 센서의 제조방법을 제공한다(도 1 참조).
- [0050] 본 발명에 따른 전기화학 센서의 제조방법에 있어서, 상기 a) 단계는, ITO 전극을 피라나 용액(Piranha solution)으로 세척한 후, 증류수로 세척한 다음, 질소(N_2) 가스 하에서 건조시키는 것일 수 있다.
- [0051] 상기 b) 단계의 TPDT-Au NPs 용액은, 균일한 N-(3-트리메톡시실릴프로필)디에틸렌트리아민 실란 모노머 수용액에 $HAuCl_4$ 를 첨가 및 교반하여 합성되는 것일 수 있다.

- [0052] 상기 c) 단계의 RGO-CD 용액은, 환원된 산화그래핀(RGO) 분산액에 β -싸이클로덱스트린(CD) 수용액을 혼합 및 교반한 후, L-아스코르브산(AA)을 첨가 및 교반하여 합성되는 것일 수 있다.
- [0053] 상기 d) 단계의 HRP-ADA는, N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDAC) 하에서 HRP(Horseradish peroxidase) 및 1-아다만탄 카르복실산(ADA)을 반응시켜 합성되는 것일 수 있다.
- [0054] 상기 d) 단계의 HRP-ADA를 함유하는 PBS는, 농도가 0.1 M, pH가 7.0인 것일 수 있다.
- [0055] 또한, 상기 d) 단계 이후, e) ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극을 4°C 및 pH 7.0 조건의 PBS로 린스한 후, 동일한 조건의 PBS 내에서 보관하는 단계;가 추가적으로 수행될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 전술한 전기화학 센서의 전기화학적 성능을 확인하기 위한 방법으로, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 종(Species)을 대상으로 순환전압전류법(CV)을 수행하여 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 종(Species)의 산화환원 거동을 분석하는 것을 특징으로 하는, 전기화학 센서의 성능 테스트방법이 제공된다.
- [0057] 또한, 본 발명은 상기 전기화학 센서의 전극에, 과산화수소(H_2O_2) 및 하이드로퀴논(HQ) 용액을 접촉시켜 화학적 촉매반응을 일으키고, 순환전압전류법(CV)을 이용해 표적 물질인 과산화수소(H_2O_2)를 검출해내는 것을 특징으로 하는, 전기화학적 표적 물질 검출법을 제공한다.
- [0058] ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극에서 H_2O_2 의 환원과 관련된 전기화학적 촉매작용(Electrocatalysis)에 관한 개략도를 도 2에 나타내었다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명에 따른 전기화학 센서는 초분자 회합을 통해 효소 컨쥬게이트를 전극에 안정적, 지속적으로 고정시킬 수 있다.
- [0060] 또한, RGO-CD 나노시트의 구겨짐 및 주름을 감소시켜 효소 컨쥬게이트의 안정적 고정화에 유리한 더욱 평탄한 플랫폼을 제공할 수 있다.
- [0061] 또한, 계면 상호작용 개선을 통해 전기적 전달을 증가시키고, Au NPs 및 RGO-CD를 각각 단독으로 사용한 경우 대비 (H_2O_2 의 환원에 대해) 더욱 상승적인 전기화학적 촉매 효과(Synergistic electrocatalytic effect)를 구현할 수 있다.
- [0062] 아울러, 본 발명에 따른 전기화학 센서는 생체적합성을 지님과 더불어, 별도의 외부의 환원제 사용 없이 용이한 방법을 통해 친환경적으로 제조가 가능한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0063] 도 1은 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극의 제작 과정을 보여주는 개략도이다.
- 도 2는 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극에서 H_2O_2 의 환원과 관련된 전기화학적 촉매작용을 나타내는 개략도이다.
- 도 3은 (A) UV-Visible 흡수 스펙트럼[HRP (a), HRP-ADA (b), RGO-CD/HRP-ADA (c), TPDT-Au NPs (d)]; (B) XRD 패턴[GO (a), RGO (b), RGO-CD (c), TPDT-Au NPs (d)]; (C) 수용액 상의 사진 이미지[GO (a), RGO (b), RGO-CD (c), TPDT-Au NPs (d)]; (D) 라만 스펙트럼[GO (a), RGO (b), RGO-CD (c)]; (E) TPDT-Au NPs의 TEM 이미지;이다.
- 도 4는 개질 전극의 SEM 이미지[ITO/RGO (A), ITO/TPDT/RGO (B), ITO/RGO-CD (C), ITO/TPDT/RGO-CD (D)]이다.
- 도 5는 개질 전극의 SEM 이미지[ITO/TPDT (A), ITO/TPDT-Au (B), ITO/TPDT/RGO-CD (C), ITO/TPDT-Au/RGO-CD

(D)]이다.

도 6은 (A) 3 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 에 대해 각 전극에서 기록된 CVs(스캔 속도: 50 mVs^{-1} , 0.1 M KCl)[순수 ITO (a), ITO/TPDT (b), ITO/TPDT-Au (c), ITO/TPDT/RGO-CD (d), ITO/TPDT-Au/RGO-CD (e)]; (B) 각 전극에서 기록된 CVs(스캔 속도: 50 mVs^{-1} , pH 7.0의 0.1 M PBS)[ITO/TPDT-Au (a), ITO/TPDT-Au/RGO-CD (b)];이다.

도 7은 (A 및 B) HRP-ADA 컨쥬게이트 고정 후 ITO/TPDT-Au/RGO-CD 개질 전극의 SEM 이미지; (C) 단면도; (D) 개질 전극의 EDAX 스펙트럼;이다.

도 8은 (A) 1 mM H_2O_2 에 대해 각 전극에서 기록된 CVs(스캔 속도: 50 mVs^{-1} , 1.0 mM HQ를 함유하는 pH 7.0의 0.1 M PBS)[ITO/HRP-ADA (a), ITO/TPDT/HRP-ADA (b), ITO/TPDT-Au/HRP-ADA (c), ITO/TPDT/RGO-CD/HRP-ADA (d), ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA (e)]; (B) ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극에서 기록된 CVs(스캔 속도: 50 mVs^{-1} , pH 7.0의 0.1 M PBS)를 비교한 그래프[H_2O_2 부존재시 (a), 1 mM H_2O_2 (HRP-ADA 고정화 X) (b), 1.0 mM HQ + 1 mM H_2O_2 (HRP-ADA 고정화 O) (c)];이다.

도 9는 (A) H_2O_2 센서용 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극에서 기록된 CVs(스캔 속도: 50 mVs^{-1} , 1.0 mM HQ를 함유하는 pH 7.0의 0.1 M PBS)[H_2O_2 부존재시 (a), 0.25 mM H_2O_2 (b), 0.50 mM H_2O_2 (c), 0.75 mM H_2O_2 (d), 1.0 mM H_2O_2 (e)]; (B) 이에 상응하는 검정선(Calibration plot);이다.

도 10은 H_2O_2 센서용 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극에서 기록된 CVs(스캔 속도: 50 mVs^{-1} , 1.0 mM HQ를 함유하는 pH 7.0의 0.1 M PBS)[H_2O_2 부존재시 (a), 1.0 mM H_2O_2 (인큐베이션 전) (b), 1.0 mM H_2O_2 (포화된 ADA 용액에서 1일 동안 인큐베이션 후) (c), 1.0 mM H_2O_2 (pH 7.0의 0.1 M PBS에서 4°C 로 30일 동안 인큐베이션 후) (d)]이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0065] 실시예: ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극의 제조

[0066] (1) 재료 및 조건

[0067] 그래파이트(분말 < 20 μm), 금(III) 클로라이드 하이드레이트($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), β -싸이클로텍스트린(CD), N-(3-트리메톡시실릴프로필)디에틸렌트리아민(TPDT 졸-겔 매트릭스 제조에 사용되는 실란 모노머), L-아스코르브산(AA), 1-아다만탄 카르복실산(ADA), N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDAC), HRP(Horseradish peroxide; 분자량 44 kDa, 타입 VI (250~330 units/mg))를 Sigma-Aldrich로부터 입수하였다.

[0068] 하이드로퀴논(HQ) 및 과산화수소(H_2O_2 ; 30 wt% 수용액)를 DaeJung chemicals로부터 입수하였다.

[0069] ITO(크기 $2 \times 1 \text{ cm}$) 및 그 개질된 형태를 작업전극으로 사용하고, Pt 와이어를 상대전극으로, Ag/AgCl(3 M NaCl 용액)을 기준전극으로 사용하였다.

[0070] 모든 전기화학적 실험은 Ivium Technologies 전기화학 워크스테이션을 이용하여 단일구획 3전극 셀에서 수행하였다.

[0071] 각 실험에 앞서 질소 가스(N_2)를 30분 동안 버블링시켰다.

[0072] (2) TPDT-Au NPs의 합성

- [0073] 격렬한 교반 조건 하에서 1 M TPDT 실란 모노머 25 μ L를 수용액 5 mL에 첨가하여 균일한 TPDT 용액을 제조하고, 60분 동안 계속 교반하였다.
- [0074] 상기 TPDT 용액에 0.1 M HAuCl₄ 50 μ L를 첨가한 결과, 혼합물의 색깔이 다크 옐로우로 빠르게 변화하였는바, 이는 트리아민 기능화된 TPDT 및 AuCl₄⁻ 간에 암민-클로라이드 복합체가 형성되었기 때문이다.
- [0075] 이 혼합물을 48시간 동안 교반한 결과, 용액의 색깔이 다크 와인 레드로 변화하였는바, 이는 TPDT-Au NPs가 형성되었음을 확인시켜준다.
- [0076] (3) RGO-CD 나노시트의 합성
- [0077] 수정된 Hummers법에 따라 그래파이트로부터 GO를 제조하였다.
- [0078] GO(2 mg/mL) 20 mL를 2시간 동안 초음파 처리하여 황갈색 분산액을 얻은 후, CD 수용액(0.01 M) 20 mL를 GO 분산액과 혼합하고 1시간 동안 교반한 다음, 상기 반응 혼합물에 AA 80 mg을 첨가한 후, 혼합물을 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 얻어진 검정색 분산액을 원심분리하고, 물로 5회 세척한 후, 오븐에서 건조시켰다.
- [0079] RGO-CD의 상세한 합성 절차는 "D. Lu, S. Lin, L. Wang, X. Shi, C. Wang, Y. Zhang, *Electrochim. Acta*, **2012**, 85, 131-138."에서 확인할 수 있다.
- [0080] RGO는 CD가 없는 상태로 상기 절차를 따라 제조하였다.
- [0081] (4) HRP-ADA 컨쥬게이트의 제조
- [0082] 탈산소화된 50 mM PBS(Sodium phosphate buffer, pH 6.0) 5 mL에 용해된, HRP 2 mg, ADA 10 mg 및 EDAC 0.5 mg를 함유하는 반응 혼합물을 실온(25°C)에서 1시간, 4°C에서 24시간 동안 교반하였다.
- [0083] 얻어진 용액을 50 mM PBS(pH 7.0)에 대해 수회 투석하고, 4°C에서 보관하였다.
- [0084] 카르보다이미드-촉매반응을 통한 HRP-ADA 컨쥬게이트의 상세한 합성 절차는 "C. Camacho, B. Chico, R. Cao, J. C. Matias, J. Hernandez, I. Palchetti, B. K. Simpson, M. Mascini, R. Villalonga, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24 (7), 2028-2033."에서 확인할 수 있다.
- [0085] (5) ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극의 제조
- [0086] 초분자 회합을 통해 HRP-ADA가 고정화된 전극을 제작하기 위해, 순수 ITO 전극을 피라나 용액(3:1, H₂SO₄:H₂O₂)으로 세척한 후, 증류수로 다시 세척하고, N₂ 하에서 건조시켰다.
- [0087] 전극을 코팅하기 위해, TPDT-Au NPs 용액 100 μ L를 전극 표면에 드롭 캐스팅하고, 37°C에서 건조시켰다 (ITO/TPDT-Au 전극).
- [0088] 이어서, RGO-CD 용액(2 mg/mL) 100 μ L를 ITO/TPDT-Au 전극에 드롭 캐스팅하고, 37°C에서 건조시켰다 (ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극).
- [0089] 이어서, ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극을 HRP-ADA(2 mg/mL)를 함유하는 0.1 M PBS(pH 7.0)에 5시간 동안 침지하여 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극을 구성하였다.
- [0090] 제조된 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극을 4°C의 차가운 50 mM PBS(pH 7.0)로 린스하고, 사용 중이 아닐 때는 동일한 PBS에 4°C로 보관하였다.
- [0091] 실험예: 개질된 전극의 특성 평가
- [0092] (1) Au NPs 및 RGO-CD 나노킴포짓의 특성화
- [0093] 도 3A는 HRP (a), HRP-ADA (b), RGO-CD/HRP-ADA (c) 및 TPDT-Au NPs (d)의 UV-Visible 흡수 스펙트럼을 나타낸

다.

- [0094] HRP의 흡수 스펙트럼(도 3A(a))은 403 nm에서 그 특징적인 Soret 밴드를 나타내었다.
- [0095] ADA로 컨쥬게이션한 후, HRP는 403 nm에서 그 Soret 밴드를 유지하였는바(도 3A(b)), 이는 컨쥬게이션 후에도 HRP 본래의 구조가 유지됨을 명확히 의미한다.
- [0096] RGO-CD 층과의 호스트-게스트 화학(Host-guest chemistry)을 통한 상호작용 후 HRP-ADA의 안정성을 관찰하기 위해, 두 용액을 함께 혼합하고, 4℃에서 24시간 동안 보관한 다음, 흡수 스펙트럼을 기록하였다(도 3A(c)).
- [0097] 강도 감소는 나타났지만 HRP-ADA는 403 nm에서 그 Soret 밴드를 보유하고는바, 이는 RGO-CD 나노컴포짓이 HRP의 미세환경을 방해하지 않았음을 확인시켜준다.
- [0098] TPDT-Au NPs에 대해, 527 nm에서의 강한 밴드와 함께 특징적인 표면 플라스몬 공명(Surface Plasmon Resonance; SPR) 흡수 스펙트럼이 얻어졌다(도 3A(d)).
- [0099] 상기 TPDT-Au NPs는 어떠한 외부의 환원제도 존재하지 않는 상태로 제조되었고, 트리-아민으로 기능화된 TPDT는 Au NPs에 대한 환원제 및 안정제로 작용하였다. 또한 TPDT-Au NPs의 합성은 완전한 친환경적 조건으로 이루어졌고, Au NPs 캡슐화 TPDT는 생체적합성도 지녔다.
- [0100] 도 3E는 TPDT-Au NPs의 TEM 이미지를 나타낸다.
- [0101] NPs 상의 TPDT 캡슐화는 각각 명암의 대비 이미지로부터 명확하게 볼 수 있다. TEM 이미지로부터, Au NPs의 평균 입자 크기는 9 nm로 확인되었다.
- [0102] 도 3B는 GO (a), RGO (b), RGO-CD (c) 및 TPDT-Au NPs (d)의 XRD 프로파일을 요약한 것이다.
- [0103] GO의 XRD 패턴(도 3B(a))은 $2\theta=11.3^\circ$ 에서 강한 피크를 나타내었는바, 이는 특징적인 (002) 평면 및 약 *ca.* 0.78 nm의 층 간격(* 참고: 그래파이트의 경우는 0.34 nm)을 의미하며, GO 시트에 결합된 하이드록실, 에폭시 및 카르복실기와 같은 산소 작용기의 존재를 확인시켜준다. 수성 매질에서 이러한 작용기가 수화되어 GO 시트의 박리가 발생하는바, 이는 층 간격의 증가와도 일맥상통하는 것이다.
- [0104] 한편, RGO(도 3B(b)) 및 RGO-CD(도 3B(c))의 경우 모두 (002) 피크가 관찰되었고, 2θ 값(21.5°)이 크게 변하였으며, 37.6° 및 41.5° 에서 두 개의 피크가 더 나타나 (100) 및 (001) 평면에 속하였다.
- [0105] GO와 비교할 때, RGO (002) 피크는 피크 강도가 감소하고, RGO의 층 간격은 약 *ca.* 0.41 nm였다. 이는 환원 과정 중 에폭사이드의 개환으로 인해 상당한 양의 sp^2 탄소가 회복되었기 때문인 것으로 예상된다.
- [0106] 38.3° , 45.3° 및 78.2° 에서 나타난 XRD 피크(도 3B(d))는 각각 Au의 (111), (200) 및 (311) 평면에 속하였고, 면심입방(fcc) 결정 구조를 지녔다(JCPDS card number 4-0784). 또한 30.3° , 35.2° , 50.7° 및 60.4° 에서 나타난 피크(도 3B)는 ITO 상의 (121), (113), (140) 및 (421) 평면에 속하였는바(JCPDS card number 89-4599), 이는 ITO 전극이 샘플 제조용 기관으로 사용되었기 때문이다.
- [0107] 도 3C는 물 속에서 GO (a), RGO (b), RGO-CD (c) 및 TPDT-Au NPs (d)의 사진 이미지를 보여준다.
- [0108] 도 3D는 GO (a), RGO (b) 및 RGO-CD (c)의 라만 스펙트럼을 나타낸다.
- [0109] GO, RGO, RGO-CD 각각에 대해, 1349 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1445 cm^{-1} 및 1592 cm^{-1} 에서 D 및 G 피크가 관찰되었다.
- [0110] D 피크는 sp^2 고리의 결함-유도 브리딩 모드(Defect-induced breathing mode)로부터 스트림된다. 이는 모든 sp^2 탄소 격자에 공통적이며, C-C 결합의 스트레칭에 의해 발생한다. G 피크는 sp^2 탄소 원자의 E_{2g} 포논의 1차 산란(First order scattering)으로 인해 발생한다.
- [0111] GO와 비교했을 때, RGO 및 RGO-CD의 경우 D 피크 강도 및 D/G 강도 비율이 모두 증가하였다. 이러한 D 피크 강도의 증가는 평면 sp^2 도메인에서의 크기 감소와 연관되며, 이는 아마도 환원 과정 중의 광범위한 산화 및 초음파 박리로 인해 더욱 많은 sp^2 도메인이 생성되었음을 의미한다. 또한 두 개 피크의 상대적인 강도 비율(D/G)은 무질서도의 척도가 되며, sp^2 도메인의 평균 크기에 반비례한다.

- [0112] 도 3D에서 보듯이, RGO(1.01) 및 RGO-CD(1.005)의 경우 D/G 강도 비율이 GO(0.98)에 비해 약간 증가하였다. 이는 새로운(또는 더 많은) 흑연 도메인(Graphitic domain)이 형성되고, sp^2 클러스터 수가 증가하였음을 제시한다.
- [0113] 또한, RGO-CD의 경우 RGO와 비교했을 때 D/G 강도 비율이 아주 조금 감소하였는바, 이는 CD의 부착이 RGO sp^2 도메인의 평균 크기를 거의 변경시키지 않음을 의미한다.
- [0114] (2) SEM 분석
- [0115] RGO는 그 소수성 성질로 인해 수용액에서 잘 분산될 수 없어 정렬성이 좋지 않은 구조의 덩어리를 형성하는 경향이 있는 것으로 알려져 있다.
- [0116] 반면, RGO-CD 서스펜션은 2 mg/mL에 이르는 높은 농도에서도 적어도 2개월 동안 매우 균일한 및 안정한 형태를 보였는바(도 3C(c)), 이는 RGO 상의 CD에 의한 기능화가 안정성 및 분산성을 향상시켰음을 의미한다.
- [0117] 또한, RGO 및 RGO-CD를 이용한 개질 전극 제작에 있어서, RGO 및 RGO-CD 층의 친수성 성질을 계속 유지하게 할 수 있는 적절한 링커 분자/폴리머를 기관에 적용하는 것이 개질 전극의 성능을 결정하는 매우 중요한 요소가 된다. 이에 본 발명자는 RGO 및 RGO-CD에 대한 고체 지지체로서 TPDT 및 TPDT-Au NPs를 특별히 채택하였다.
- [0118] RGO 및 RGO-CD 층과의 부착에 관한 TPDT의 역할을 이해하기 위해, SEM 이미지를 확보하여 도 4에 요약하였다.
- [0119] 순수 ITO 표면 상의 RGO 드롭 캐스팅은 부착성이 부족하여 기관으로부터 벗겨져 나감을 명확히 확인할 수 있다(도 4A).
- [0120] 반면, ITO/TPDT 기관 상의 RGO 드롭 캐스팅은 우수한 부착성을 보였다(도 4B).
- [0121] 한편, RGO-CD는 순수 ITO 표면에서는 전형적인 구겨짐 및 주름진 시트 구조가 많이 나타났다(도 4C).
- [0122] 반면, TPDT로 지지된 RGO-CD 시트는 더욱 평평하게 형성되었다(도 4D).
- [0123] 도 5는 ITO/TPDT (A), ITO/TPDT-Au (B), ITO/TPDT/RGO-CD (C) 및 ITO/TPDT-Au/RGO-CD (D) 개질 전극의 SEM 이미지를 나타낸다.
- [0124] ITO/TPDT 전극은 TPDT에 대한 명확한 이미지를 보였다(도 5A).
- [0125] ITO/TPDT-Au 전극(도 5B)에서, TPDT에 임베딩된 Au NPs는 희부연/흐릿한 이미지로 보였고, 전극에 걸쳐 균일하게 분포되었다.
- [0126] RGO-CD에 대한 고체 지지체로서 TPDT-Au NPs는 ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극의 SEM 이미지를 통해 뚜렷하게 관찰할 수 있었다(도 5D).
- [0127] 또한, TPDT-Au NPs 지지체에서 RGO-CD 층은 더욱 평탄하게 되었는바, 그 결과 Au NPs 및 RGO-CD 간의 계면 상호작용을 개선하는 것으로 예상된다. 아울러 이러한 평면 플랫폼을 통해 분석 물질 및 전극 표면 간의 우수한 전기적 전달을 기대할 수 있다. 따라서 초분자 회합 통한 효소 고정화에 대해 한층 더 실현가능한 미세환경을 제공할 것으로 예상된다.
- [0128] 이러한 효과적인 상호작용은 (a) TPDT 및 RGO의 $-NH_2$, $-OH$ 기 간의 수소결합, (b) RGO 시트의 $-COOH$ 부분으로부터 양성자를 수용할 수 있어 산-염기 타입 정전기적 인력에 참여할 수 있는 N-함유 기본 기(Basic functionalities), (c) $AuCl_4^-$ 의 Au NPs로의 환원 후 TPDT의 $-NH_2$ 기가 양성자화($-NH_3^+$)되어 (-)로 하전된 RGO 시트가 TPDT 상에 정전기적으로 조립되는 점에 기인한 것일 수 있다.
- [0129] (3) 전기화학적 분석

- [0130] $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 의 산화환원 거동은 계면의 동적 장벽(Kinetic barrier)을 테스트하는 유용한 도구인데, 이는 용액 및 전극에서 종(Species) 간의 전자 전달은 장벽 또는 장벽의 결함/핀홀을 통한 터널링에 의해 일어나야 하기 때문이다.
- [0131] 도 6A는 순수 ITO (a), ITO/TPDT (b), ITO/TPDT-Au (c), ITO/TPDT/RGO-CD (d) 및 ITO/TPDT-Au/RGO-CD (e) 전극의 경우, 3 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 에 대해 기록된 순환전압전류법(CVs; 스캔 속도 50 mVs^{-1} , 0.1 M KCl에서) 결과를 보여준다.
- [0132] 순수 ITO 전극(도 6A(a))의 경우, 피크-to-피크 분리(ΔE_p)가 115 mV인 가역적 산화환원 피크가 관찰되었고, 이는 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 종의 하나의 전자 전기화학적 과정에 기인한 것이다.
- [0133] ITO/TPDT 전극(도 6A(b))의 경우, 준-가역적(Quasi-reversible) 순환전압전류 응답을 보였고, 피크 전류는 약간 증가하였으며, 피크-to-피크 분리는 136 mV이었다. 이러한 결과는 소량의 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 종이 TPDT의 핀홀을 통해 확산할 수 있었음을 의미한다. 스웰링 도중 TPDT에서 이러한 핀홀이 형성되는 것으로 여겨진다.
- [0134] ITO/TPDT-Au 전극(도 6A(c))의 경우, 준-가역적 순환전압전류 응답을 보였고, 피크 전류는 ITO/TPDT 전극의 경우보다 높았으며, 피크-to-피크 분리는 151.6 mV였다. 이러한 결과는 Au NPs가 증가된 활성 표면적을 지닌 새로운 전극 표면으로 작용하고, 그 하부의 전극 표면과 우수한 전기적 전달을 달성하는 점을 명확히 보여준다.
- [0135] ITO/TPDT/RGO-CD 전극(도 6A(d))의 경우, 준-가역적 순환전압전류 응답을 보였고, 피크 전류는 ITO/TPDT 전극(도 6A(b))의 경우와 거의 같았으며, 피크-to-피크 분리는 127 mV였다. RGO 상에 형성된 CD는 전기화학적으로 비활성이므로, CD에 있어 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 종에 대한 전기화학적 촉매 역할을 기대할 수는 없다. 따라서 RGO-CD는 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 종을 인식할 수 없는바, 산화환원 전류는 감소한다.
- [0136] 그러나, ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극(도 6A(e))의 경우, 산화환원 전류가 현저하게 증가하고 피크-to-피크 분리는 196 mV였는데, 이는 Au NPs 및 RGO-CD 간의 우수한 전기적 전달에 기인한 것이다.
- [0137] 한편, CD가 없는 ITO/TPDT-Au/RGO 전극에서 더욱 높은 산화환원 피크 전류가 관찰되었는데, 이는 CD 부존재시 RGO가 더욱 많은 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 종을 인식/사전-농축할 수 있기 때문으로 이해된다.
- [0138] 도 6B는 ITO/TPDT-Au (a) 및 ITO/TPDT-Au/RGO-CD (b) 전극에서 기록된 CVs(스캔 속도: 50 mVs^{-1} , pH 7.0의 0.1 M PBS)를 보여준다.
- [0139] ITO/TPDT-Au 전극(도 6B(a))의 경우, 0.9 V 근방에서 넓은 산화 피크와 0.28 V에서 특징적인 Au 산화물 환원 피크가 관찰되었는데, 이는 전극에 Au NPs가 존재함을 의미한다.
- [0140] 반면, ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극(도 6B(b))의 경우, 0.28 V 근방에서 특징적인 Au 산화물 환원 피크가 보이지 않았는데, 이는 Au NPs의 표면이 RGO-CD에 의해 잘 보호/커버되어 Au 산화환원 거동을 뚜렷하게 관찰할 수 없었기 때문일 수 있다.
- [0141] (4) HRP-ADA 고정화 분석
- [0142] HRP-ADA를 고정화하기 위해, 개질 전극을 HRP-ADA 용액(0.1 M PBS, pH 7.0) 2 mg/mL에 4°C에서 12시간 동안 딥핑하였다.
- [0143] 고정화 후 CVs(스캔 속도: 50 mVs^{-1} , pH 7.0의 0.1 M PBS)를 기록하여 효소 컨쥬게이트의 존재를 확인하였다.
- [0144] 개질 전극에서 HRP-ADA 컨쥬게이트의 ADA 부분은 안정한 비가역적 산화환원 거동을 나타내었다.
- [0145] 개질 전극들 중에서 ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극이 더욱 높은 피크 전류를 나타냈는데, 이는 호스트-게스트 회합을 통해 전극 표면에서 HRP-ADA의 활성이 존재하기 때문으로 여겨진다.
- [0146] 또한, ITO/TPDT-Au 전극에서 상당한 피크 전류가 관찰되었는데, 이는 TPDT-Au NPs와 HRP의 $-\text{NH}_2$ 기 간의 비-특

이적 상호작용 때문인 것으로 여겨진다.

- [0147] CD 부존재시 ITO/TPDT/RGO 전극이 HRP-ADA의 상당량을 인식하지 못함은 당연하다.
- [0148] 여러가지 스캔 속도에서 ITO/TPDT/RGO-CD/HRP-ADA 전극의 CVs(0.1 M PBS, pH 7.0)를 기록한 결과, 0 V 근방에서 포텐셜 스캔 속도가 증가함에 따라 양극 및 음극 피크 전류 모두가 뚜렷하게 증가하였다.
- [0149] 스캔 속도에 대한 양극 피크 전류(I_{pa}) 및 음극 피크 전류(I_{pc}) 검정선은 선형 관계를 나타내었고, 이는 개질 전극에서의 반응이 전형적인 표면-제한(Surface-confined) 과정임을 의미한다. 표면-제한 HRP-ADA로 인해 스캔 속도가 증가함에 따라 음극 피크 전류에 대한 양극 피크 전류의 비율(I_{pa}/I_{pc})이 증가하였다.
- [0150] 도 7은 HRP-ADA 고정 후 ITO/TPDT-Au/RGO-CD 개질 전극의 SEM 이미지를 나타낸다.
- [0151] HRP-ADA의 흐릿한 이미지 및 배치(Batches)로부터 고정화를 다시 한번 명확히 확인할 수 있다.
- [0152] 단면도 분석(도 7C)으로부터 측정된 필름 두께는 201 nm였으며, 이러한 필름 두께는 화학적으로 개질 전극에 있어 순수 전극 및 분석 물질 간의 우수한 전기적 접촉을 구현할 수 있는 최적의 두께이다.
- [0153] 개질 전극의 EDAX 스펙트럼(도 7D)은 Si, Au, C 및 Fe의 특징을 확인시켜준다.
- [0154] (5) ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극의 전기화학적 특성 평가
- [0155] 바이오 전기화학적 촉매 성능을 평가하기 위해, 여러가지 개질 전극에서 1 mM H_2O_2 에 대해 CVs(스캔 속도: 50 mVs^{-1} , 1.0 mM HQ를 함유하는 pH 7.0의 0.1 M PBS)를 기록하고, 그 결과를 도 8A에 요약하였다. 여기서 HQ는 확산 제어 과정을 통해 HRP에 대한 전자 전달 매개체로 작용한다.
- [0156] 1 mM H_2O_2 를 도입하는 동안, -0.15 V 부근에서 음극 피크 전류의 증가가 뚜렷하게 관찰되었는바, 이는 첨가된 H_2O_2 가 HRP 존재 하에서 HQ를 산화시킴을 의미한다. 그후 산화된 생성물인 벤조퀴논(BQ)은 전극 표면에서 환원된다.
- [0157] 여러가지 개질 전극 중 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극(도 8A(e))이 다른 개질 전극들 대비 더욱 우수한 전기화학적 활성을 나타내었다. 이는 Au NPs의 표면이 RGO-CD에 의해 잘 보호/커버되어 Au NPs 및 RGO-CD 간의 전기적 전달이 원활히 이루어져 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극에서 전류가 증가했기 때문으로 여겨진다. 또한 ITO/TPDT-Au/HRP-ADA 전극(도 8A(c))의 경우 ITO/TPDT-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극보다는 떨어지지만 나쁘지 않은 촉매 활성을 보였는바, 이는 Au NPs가 HRP 존재 하에서 H_2O_2 를 촉매하는 능력을 지님을 의미한다.
- [0158] 반면, ITO/TPDT/RGO-CD/HRP-ADA 전극(도 8A(d))의 경우, ITO/TPDT-Au/HRP-ADA 전극(도 8A(c)) 대비 환원 전류가 크게 감소하였다. 이는 RGO-CD가 비활성이거나 Au NPs보다 활성이 떨어짐을 의미하는 것은 아니며, 실제 이유는 ITO/TPDT/RGO-CD/HRP-ADA 전극에서 RGO-CD가 전기화학적으로 비활성인 TPDT 상에 지지되어 RGO-CD 및 순수 전극 간에 효과적인 전자 전달을 기대할 수 없기 때문이다.
- [0159] TPDT-Au NPs 및 RGO-CD를 함께 결합함에 따라, H_2O_2 에 대한 상승적인 전기화학적 촉매 효과가 나타났다(도 8A(e)). TPDT에 임베딩된 Au NPs이 작은 나노전극으로 작용하여 RGO-CD 및 순수 전극 간의 전기적 전달을 증가시켰다. 또한 Au NPs 및 RGO-CD 간의 계면 상호작용도 개선되어 이와 같은 H_2O_2 에 대한 상승적인 전기화학적 촉매 효과를 구현하며, 이는 Au NPs 및 RGO-CD 각각의 개별적인 전기화학적 촉매 효과 대비 더욱 우수한 것이다.
- [0160] 도 8B는 HRP-ADA 고정화 유무에 따라 ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극에서 기록된 CVs를 요약한 것이다.
- [0161] HRP-ADA 및 H_2O_2 가 둘다 없는 경우(도 8B(a)), 환원 피크가 관찰되지 않았다.
- [0162] HRP-ADA 고정화가 없는 경우(도 8B(b)), 1 mM H_2O_2 를 도입함에 따라 Au 및 RGO-CD의 전기화학적 촉매 활성으로 인해 환원 피크 전류가 상당히 증가하였다.
- [0163] 또한, HRP-ADA 고정화 및 1 mM H_2O_2 가 있는 경우(도 8B(c)), ITO/TPDT-Au/RGO-CD 전극에서 환원 피크 전류가 크

게 증가하였다. 이러한 결과는 RGO-CD가 높은 초분자 인식 능력을 지니고 있고, HRP-ADA와 포접 복합체 (Inclusion complexes)를 형성할 수 있음을 뚜렷하게 설명해준다.

[0164] 이러한 포접 작용은 TPDt-Au/RGO-CD 전극의 측정 효과를 더욱 향상시킬 수 있어서 개질 전극 계면에서 분석 물질(H_2O_2 및 BQ)의 농도를 증가시키고, 그 결과 피크 전류가 눈에 띄게 증가하였다. 따라서 ITO/TPDt-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극의 상대 반응성은 생리학적 pH에서 H_2O_2 의 전기화학적 센싱에 더욱 훌륭한 조건을 제공한다.

[0165] 1 mM HQ 존재시 ITO/TPDt-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극에 H_2O_2 를 0.25에서 1.0 mM의 농도로 첨가함에 따라, 환원 피크 전류가 상승하였고, 그 결과를 도 9에 요약하였다.

[0166] 검정선(도 9B)은 H_2O_2 농도에 대해 선형적인 응답을 보였다.

[0167] ITO/TPDt-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극에서 HRP-ADA 초분자 회합의 지속가능성(내구성)을 입증하기 위해, CVs를 기록하고 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0168] ITO/TPDt-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극을 ADA로 포화된 0.1 M PBS(pH 7.0)에서 4℃로 인큐베이트하였다.

[0169] CD-ADA는 CD-HRP-ADA보다 안정한 포접 복합체를 형성할 것인바 인큐베이션 중 ADA가 전극으로부터 모든 HRP-ADA를 대체할 것으로 예상할 수도 있다.

[0170] 그러나, 인큐베이션 1일 후 기록된 CVs 결과(도 10(c)), 거의 68%의 환원 피크 전류가 유지되었다. 이는 ADA에 의해 모든 HRP-ADA가 치환되는 것이 아님을 의미한다.

[0171] 또한, ITO/TPDt-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극을 0.1 M PBS(pH 7.0)에서 4℃로 30일 동안 인큐베이트하고, CVs를 기록하였다(도 10(d)).

[0172] 그 결과, 흥미롭게도 80%의 환원 피크 전류가 보유되었는바, 이는 본 발명에 따른 개질 전극의 우수한 지속가능성(내구성)을 의미한다.

[0173] 결과 검토

[0174] 본 발명자는 RGO-CD 나노시트에 대한 고체 지지체로서 Au NPs가 임베딩된 실리케이트 졸-겔 매트릭스를 사용하여, 새로운 친화성 결합 나노컴포짓을 개발하였다. 또한 초분자 회합을 통해 ITO/TPDt-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극을 구성하였다.

[0175] TPDt 지지체는 RGO-CD의 구겨지고 주름진 시트 구조를 감소시켜서, 효소 고정화를 위한 더욱 평탄한 평면 플랫폼을 제공할 수 있었다.

[0176] Au NPs는 작은 나노전극으로 작용하여, 전기적 전달 및 RGO-CD와의 계면 상호작용을 증대시켰다.

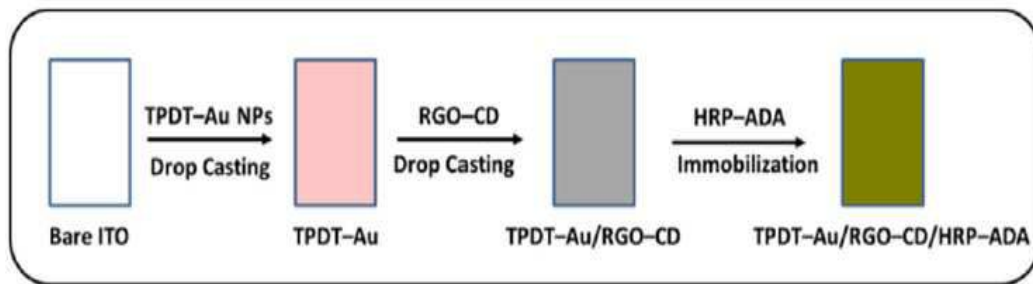
[0177] RGO-CD 및 HRP-ADA 간의 초분자 회합은 CVs 분석에 의해 확인되었다.

[0178] ITO/TPDt-Au/RGO-CD/HRP-ADA 전극은 Au NPs 및 RGO-CD 각각의 개별적인 촉매 효과 대비 H_2O_2 에 대한 상승적인 전기화학적 촉매 효과를 나타내었다.

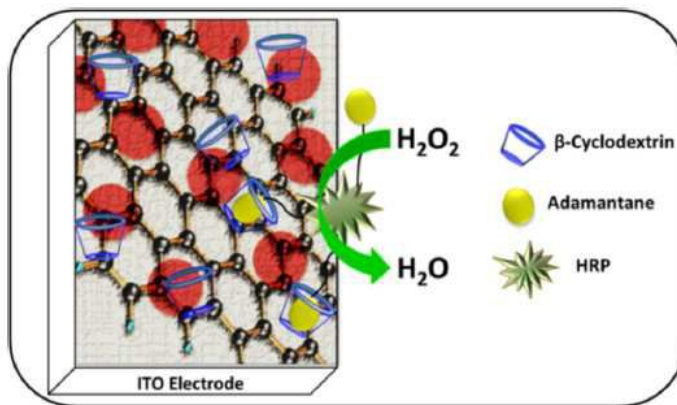
[0179] 본 발명에 따른 전기화학 센서 제작방법은 향후 금속 나노구조 및 RGO를 결합하여 바이오 센서 어셈블리용의 새로운 고체 지지체를 개발하는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

도면

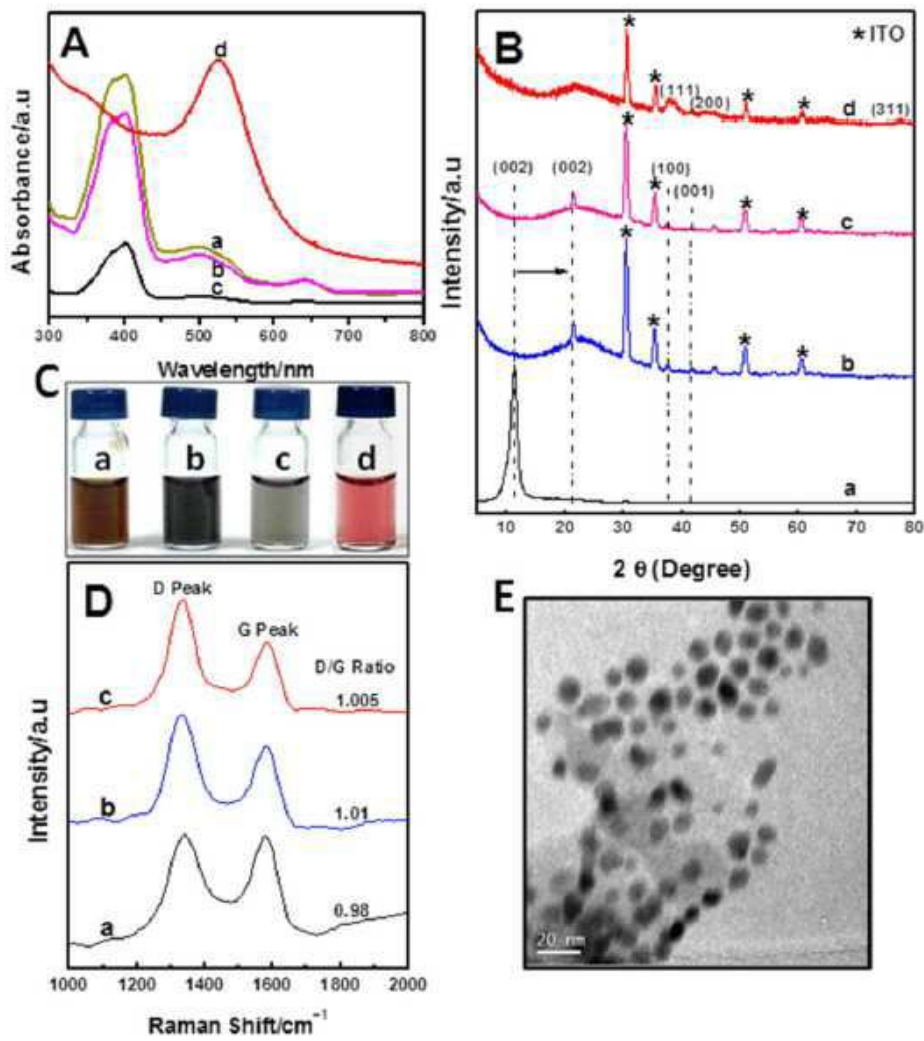
도면1



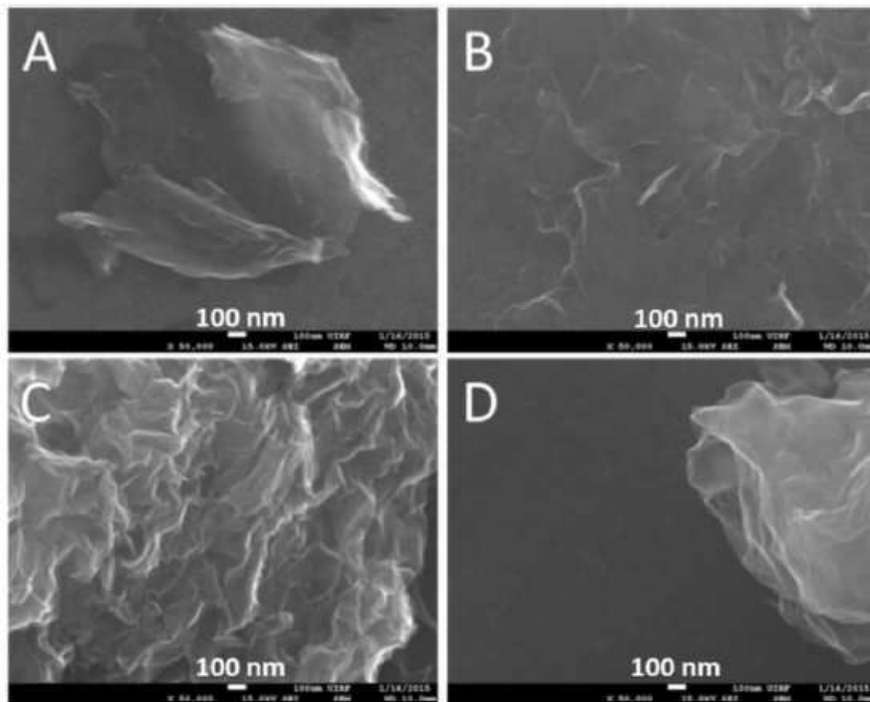
도면2



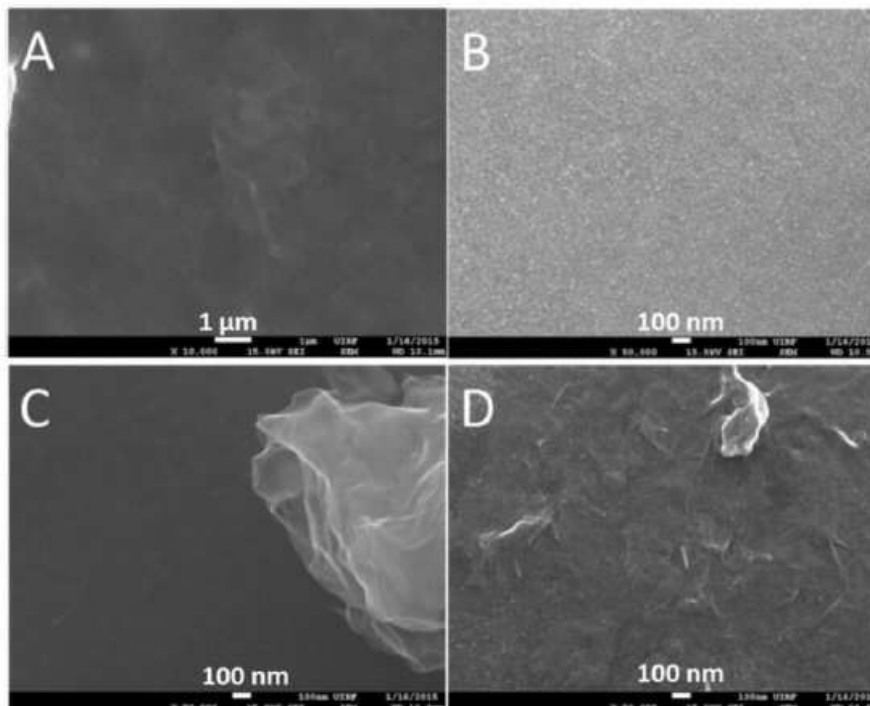
도면3



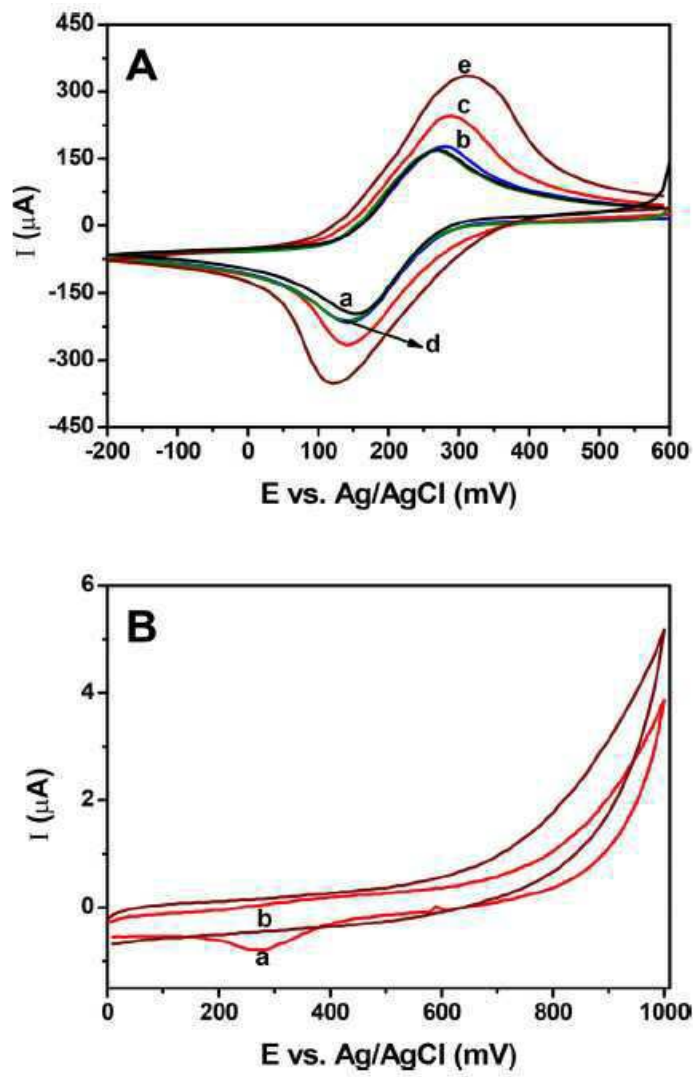
도면4



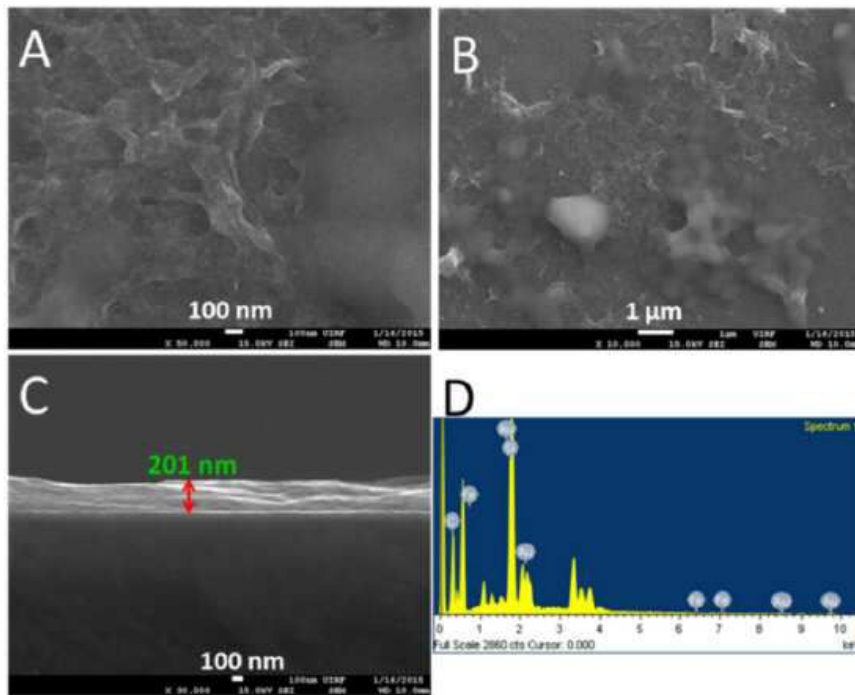
도면5



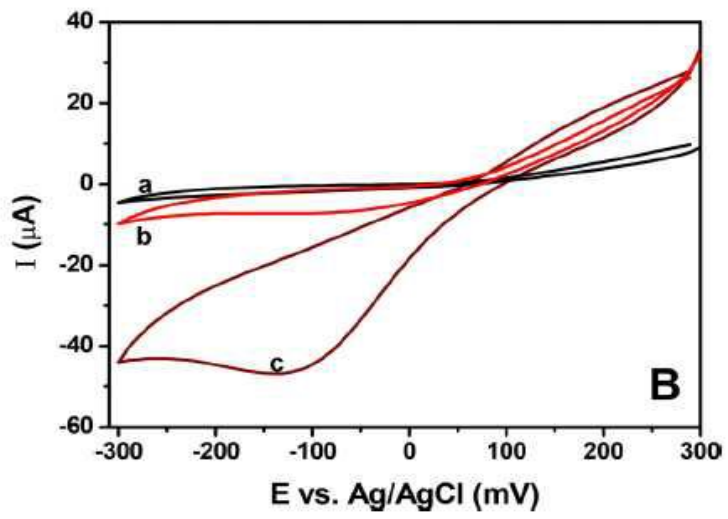
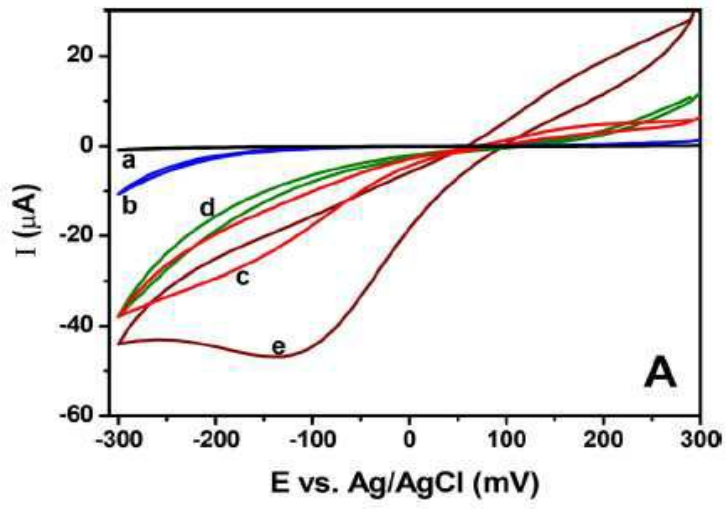
도면6



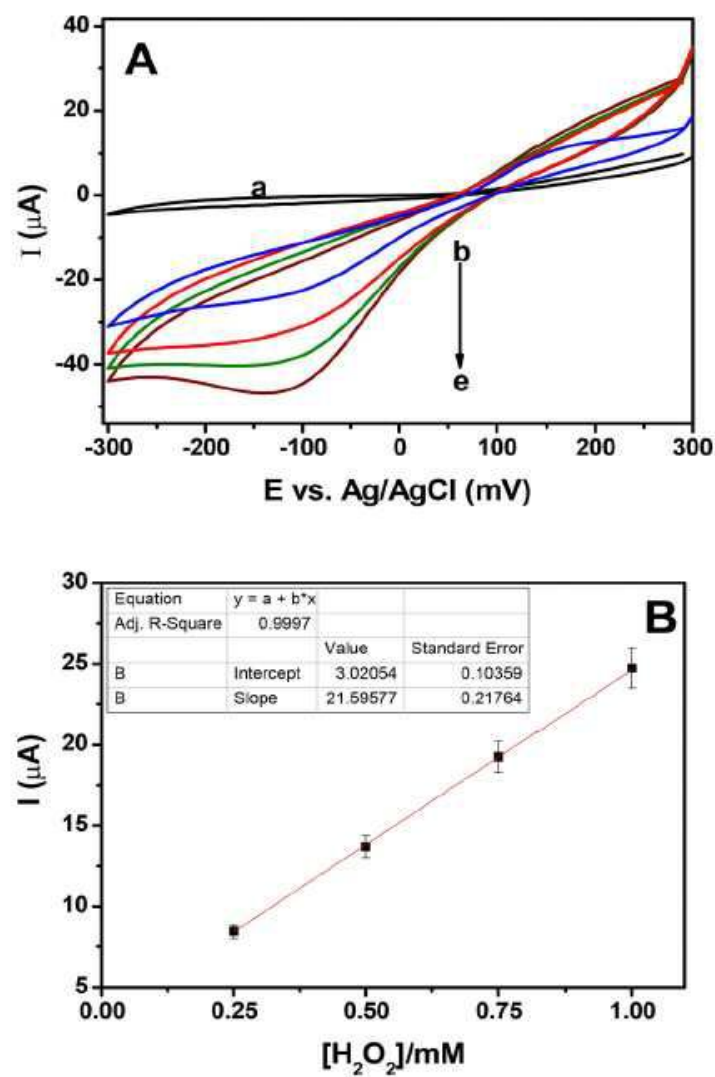
도면7



도면8



도면9



도면10

