



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

Pt Dendrite Oxide Probe에 코팅된
전도성 고분자를 기반으로 한 pH &
Glucose 센서 제작

濟州大學校 大學院

化 學 科

鄭 智 嬰

2013年 2月

Pt Dendrite Oxide Probe에
코팅된 전도성 고분자를 기반으로
한 pH & Glucose 센서 제작

指導教授 金 德 洙

鄭 智 嬰

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013年 2月

鄭智嬰의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委員 _____ (印)

委員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2013年 2月

pH and glucose sensors based on
a conducting polymer coated on
Pt dendrite oxide probe

Ji Young Jeong

(Supervised by professor Duk Soo Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Science

2013. 2

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of figures	iii
List of tables	vi
I. 서 론	1
II. 실험	8
II-1. 시약 및 용액 제조	8
II-2. 측정기기	9
II-3. 전극	9
II-4. Pt dendrite 전극의 제작	11
II-5. GOD/TTBA/Pt dendrite Ox 전극 제작	13
II-6. Potentiometric 검출 원리	16
III. 결과 및 고찰	18
III-1. Pt dendrite 형상 관찰 및 특성 분석	18
III-1-1. SEM 분석	18
III-1-2. XPS 분석	23
III-2. Pt dendrite, TTBA pH 반응 실험	26
III-3. 재현성 및 안정성 실험	31
III-4. 최적화 실험	33
III-5. Glucose 검정 곡선	37
III-6. 혈액 분석	40

IV. 결론	43
V. 참고 문헌	45
Abstract	49

List of Figures

Figure 1. Schematic diagrams of the enzyme glucose sensors belonging to (a) the first generation, (b) second generation, (c) third generation.	5
Figure 2. CV of Pt microelectrode was cleaned by cycling the potential between +1.5 V and -0.25 V for several times in a 0.5 M H ₂ SO ₄ solution.	10
Figure 3. Electrodeposition of Pt dendrite on Pt microelectrode. Chronoamperometry of Pt microelectrode in 5 mM H ₂ Cl ₆ Pt · 6H ₂ O (0.1 M Na ₂ SO ₄) at initial potential(IE): +1.0 V, V1: -0.3 V, elapsed time: 500 s for three times.	12
Figure 4. LSVs recorded for Pt dendrite oxidation in a 0.5 M H ₂ SO ₄ solution. The scan rate was 50.0 mV/s at IE: +0.3 V, V1: +1.5 V.	12
Figure 5. Schematic representation of the fabrication of a biosensor.	14
Figure 6. The poly-TTBA layer was formed on the Pt dendrite Ox/Pt by electropolymerization of 1.0 mM TTBA monomer in a 0.1 M TBAP/CH ₂ Cl ₂ solution by a three-time potential cycling from 0.0 V to +1.4 V at 1 V/s.	15
Figure 7. Scheme of (a) Potentiometer, (b) Potentiometric measurement in glucose solution.	16
Figure 8. SEM images of (a) a bare Pt microelectrode and (b)–(d) Pt particle grown and (e)–(g) Pt dendrite formation onto the Pt microelectrode through electrodeposition using chronoamperometry at	

(b) IE: +0.9 V, V1: -0.4 V, (c) IE: 0 V, V1: -0.45 V, (d) IE: 0 V, V1: -0.4 V, (e) IE: 0 V, V1: -0.3 V, (f) IE: -0.05 V, V1: -0.3 V and (g) IE: +1.0 V, V1: -0.3 V.	20
Figure 9. SEM images of (a) PtDDOx/Pt, (b) TTBA/PtDDOx/Pt electrode. Electrodeposition of Pt dendrite at IE: +1.0 V, V1: -0.3 V.	22
Figure 10. The XPS survey spectra spectrums obtained for (a) PtDDOx/Pt, (b) TTBA/PtDDOx/Pt, (c) GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt.	24
Figure 11. The XPS spectra spectrums of (A) C _{1s} , (B) N _{1s} , (C) Pt _{4f} , (D) S _{2p} obtained for (a) PtDDOx/Pt, (b) TTBA/PtDDOx/Pt, (c) GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt.	25
Figure 12. Response of the Pt dendrite oxide electrode to pH 3~13 buffer solution.	28
Figure 13. E vs. pH plots of (a) Pt & Pt Ox, (b) TTBA/Pt & TTBA/Pt Ox, (c) Pt dendrite/Pt & TTBA/Pt dendrite/Pt, (d) Pt dendrite Ox/Pt & TTBA/Pt dendrite Ox/Pt, (e) Pt particle/Pt & TTBA/Pt particle /Pt, (f) Pt particle Ox/Pt & TTBA/Pt particle Ox/Pt.	29
Figure 14. Effect of storage time of (a) TTBA/PtDD/Pt, (b) TTBA/PtDDOx/Pt electrode.	32
Figure 15. Potential-pH slope of PtDDOx/Pt electrode, optimization of the experimental parameters: effects of H ₂ Cl ₆ Pt · 6H ₂ O solution concentration and electrodeposition elapsed time. (a) 1 mM, (b) 5 mM, (c) 30 mM H ₂ Cl ₆ Pt · 6H ₂ O.	35
Figure 16. (a) Potential-[glucose(mM)] slope of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt, (b) Detection of glucose concentration, optimization of the experimental parameters: effects of GOD concentration.	36
Figure 17. (a) Response of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt electrode to	

pH 3~13 buffer solution. (b) E vs. pH plot of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt electrode.	38
Figure 18. Response of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt electrode to 0.5~10 mM glucose solution. (6 mg/ml GOD-FAD was immobilized on the p-TTBA)	39
Figure 19. E vs. [glucose(mM)] plot of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt electrode. (6 mg/ml GOD-FAD was immobilized on the p-TTBA)	39
Figure 20. The corresponding standard addition plot of potential.	41
Figure 21. Potentiometric detection of glucose in the human blood sample by standard addition method.	42

List of Tables

Table 1. Global technology development status for glucose sensor.	2
Table 2. E vs. pH slope of the modified electrode at pH buffer solution.	30

I. 서론

바이오센서란 생물체가 가지고 있는 센서를 이용하려고 하는 것으로 물질과 반응하여 식별하는 수용체(receptor) 부분과 반응 결과를 전기적 신호로 바꾸어 주는 변환기(transducer)로 구성되어 있다. 분자 식별 소자의 종류에 따라 효소 센서, 면역 센서, 효소 면역 센서, 미생물 센서 및 조직 센서 등으로 분류할 수 있다. 바이오센서는 효소, 미생물, 항원 항체 ligand receptor, DNA probe 등의 분자 식별 능력을 가진 생체 물질과 전기적, 물리, 화학적 소자를 결합시켜 극미량의 대상물을 측정하는 센서이다. 효소나 미생물 등 측정 물질과 직접 반응하는 생물 물질을 이용하므로 반응 특이성이 높고 측정 속도가 빠르며 재현성이 높은 장점이 있다. 바이오센서는 생물 소재에 대한 충분한 이해와 신호 변환 장치인 변환기의 이용에 관한 지식이 서로 접목되어야 한다는 점에서 생물 공학뿐만 아니라 생명 과학, 화학, 물리학, 의학 및 전자 공학 등에서 전문성과 긴밀한 상호 협조가 요구되는 분야이다. 광학적이거나 질량, 열적 센서와 비교하여 전기화학적인 센서는 뚜렷한 검출성, 간편성, 저렴성 때문에 특별히 현재 이용되는 센서들 중 주를 이루어 사용되며 의학, 산업, 환경이나 농업 등 넓은 분야의 분석에 적용할 수 있어 상업적으로도 이용되고 있다.¹⁾

의료용 바이오센서에는 혈당 센서와 DNA칩, 단백질 칩, 랩온어 칩과 같은 바이오 칩 센서가 있으며, 그 중 혈당 센서가 단일 품목으로 가장 큰 비중(약 90%)을 차지하고 있다. 이는 현대 사회가 발전하면서 세계적으로 문화병이라고 불리는 당뇨병 환자수가 사회가 선진화되고 사람들의 영양 수준이 높아지면서 많은 사람들에게서 발생하는 추세가 반영된 것이다. 당뇨병은 대표적인 성인병으로 성인뿐만 아니라 어린이나 청소년들에게서도 발생 빈도가 높아지면서 2012년 현재 3.4억 만 명 정도가 당뇨병을 앓고 있으며, 현재의 증가 추세를 반영하였을 때 당뇨병 환자의 수는 꾸준히 늘어 2025년에는 약 3.8억 만 명 정도가

당뇨병 환자일 것으로 예상되고 있고 혈당 센서의 시장은 계속적으로 확대될 것으로 예상된다.

혈당 센서(glucose sensor)는 당뇨병을 진단하기 위해 혈액이나 소변에 있는 포도당(glucose)을 측정하는 임상 모니터링 장치(clinical monitoring devices)이다. 당뇨병이 무서운 이유는 혈당이 상승하고 소변에서 당이 검출되는 것에 그치지 않고 여러 가지 만성 합병증을 일으킨다는 점에 있다. 인슐린의 분비가 부족하거나 인슐린의 작용이 저하되면 혈당이 높아지고, 혈당이 일정 농도 이상 증가하면 신장 기능의 한계를 넘어 소변으로 당이 배설된다. 이렇게 몸

Table 1. Global technology development status for glucose sensor.

구분	주요 기술개발 현황
해외	<ul style="list-style-type: none"> · [메드트로닉] 피부에 주입하여 인슐린 공급과 혈당 모니터링이 가능한 튜브형 혈당측정기인 ‘미니메드 패러다임’ 이라는 제품을 개발 판매 중 · [에코 세라퓨틱스] 경피부착형 혈당측정기인 ‘Symphony tGCM’ 를 개발(2008), 병원 임상실험 등을 거쳐 현재 미국 FDA 승인 준비 중 ※한독약품은 에코社와 한국 내 마케팅/영업 라이선스 계약 체결(2009.6) · [MIT연구소] 라만분광법을 이용한 초음파 무 채혈 혈당측정기 개발(2010.8)
국내	<ul style="list-style-type: none"> · [인포피아] 채혈 통증과 혈액량 채취를 최소화할 수 있는 반응속도 3초 혈당측정기 ‘Evolution’ 을 세계 최초로 개발, 미국 FDA 승인 획득(2008.3) ※ 2010년 지식경제부 주관 스마트 케어 시범서비스 사업자로 선정, SKT 컨소시엄(삼성전자, 인포피아, 인성정보, 경기고양시, 충북)에 편입 · [아이소텍] 통증체감, 지혈 필요가 없는 레이저채혈 측정기를 개발 (2008.3) · [에스디] 혈당측정기 ‘SD Check Gold’ 가 유럽 CE Mark 획득(2008.4)

에서 에너지로 이용되어야 하는 당이 소변으로 배설되므로, 혈당은 높지만 몸의 조직에서는 에너지원이 부족하게 된다. 즉, 많은 칼로리를 섭취하더라도 체내의 조직에서는 이를 에너지원으로 제대로 이용하지 못하기 때문에 대신 우리 몸에 저장된 지방 및 단백질을 에너지원으로 소모하게 되어 체중이 감소하고 허약해지게 되는 것이다. 또한, 혈당이 높으면 체내에서 단백질 합성이 이루어지지 않고 오히려 파괴가 일어나게 되므로 체내 조직의 회복이 저하되며 상처가 잘 낫지 않게 된다. 당뇨병 환자는 몸의 대사 활동이 정상적으로 이루어지지 않기 때문에 활동에 필요한 에너지가 제때에 만들어지지 못하므로 극도로 피곤한 상태에 빠지게 된다. 그 외에도 당뇨병성 신경 장애, 망막증, 동맥 경화를 유발하여 뇌졸중이나 심장병까지도 유발할 수 있는 것이 당뇨병이다. 당뇨병은 완치가 힘들고 지속적인 치료가 필요하기 때문에 이로 인해 환자들의 고통이 크다. 이와 같은 당뇨병 치료에는 혈당을 조절하여 신진 대사를 원활하게 하는 것이 가장 중요하다. 특히 당뇨병의 대표적인 치료법인 인슐린 투여는 효과는 크지만, 인슐린 투여를 결정하기 위해서는 반드시 혈액 내의 포도당 농도를 측정하는 과정을 거쳐야 한다. 일반적으로 혈액 내의 포도당 양의 측정은 혈액 시료를 채취한 다음에 복잡한 과정을 거친 후에야 그 정확한 양을 알 수 있다. 이러한 과정은 환자에게 많은 시간을 요구하게 되고 채혈이라는 고통과 불편감을 준다. 이러한 단점을 해결하기 위한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 휴대가 간편하고 적은 양을 채혈을 하는 휴대용 혈당 측정기도 나와 있고, 채혈을 하지 않는 측정기도 시중에 나와 있다. 전자는 채혈을 해야 한다는 점이 단점이고, 후자의 경우는 정확도 면에서 아직 한계가 있다. 그러므로 체내의 혈당을 측정하는 혈당 센서는 값이 싸고 대량 생산이 가능하여야 하며, 정확도가 매우 높아야 한다. 낮은 농도에서의 정확도를 증가시키기 위한 포도당 분석은 많은 방법을 통해 연구되고 있다. 최근에는 전기 분석법을 이용한 전기화학적인 바이오센서 실험은 값이 싼 장비와 빠른 응답 기술로 인해 강력한 기술로 많은 연구가 되고 있다.²⁾⁻⁵⁾ 혈당 센서에는 전기 분석법 중 amperometry(전류법)나 potentiometry(전위차법)을 이용하여 glucose를 검출한다. 아직까지는 전류법을 이용한 혈당 센서가 많이 제작되고 있어 전위차법을 이용한 혈당 센서의 연구는 많이 진행되고 있지 않다. 그러나 전위차법을 이용한 측정 방법은 검출 시간이 빠르고, 낮은 가격, 정

확한 분석을 한다는 점에서 이점이 있다.⁶⁾ 전위차법을 이용한 바이오센서는 전위를 추가적으로 가해줄 필요도 없어 간편성과 선택성에서 장점을 나타낸다는 점에서 본 연구에서는 전위차법을 이용하여 glucose를 검출하였다.

전기 분석법을 이용한 혈당 센서의 구조를 살펴보면 전기적인 신호 변환을 할 수 있는 전극(electrode)위에 당(glucose)을 산화시키는 효소인 GOD (Glucose Oxidase)와 전자 전달 반응(electron transfer reaction)을 용이하게 할 산화/환원 매개체(redox mediator)가 필수적으로 있어야 한다. Figure 1에서 나타나 있듯이 1세대 효소 센서는 산화/환원 매개체가 없이 산소가 전자 전달 매개체로 작용하며 효소가 기질 존재 하에서 산소를 감소시키고 과산화수소를 생성함으로써 반응에서 생성되는 전자를 전달하는 구조로 구성되었다. 이러한 구성으로 인해 1세대 효소 센서는 산소 의존적이며 산화-환원 활성 종의 방해를 받는다. 2세대 효소 센서는 별도로 전자 전달 매개체를 이용하여 1세대 효소 센서가 지닌 산소 의존성을 극복하고 효소와 전극 사이에서 전자를 빠르게 전달할 수 있게 되었다.⁷⁾⁸⁾ 2세대 효소 센서에 주로 사용되는 전자 전달 매개체로는 ferro/ferricyanide, hydroquinone, ferrocene 등이 이용 된다.⁸⁾ 최근에 이용되는 3세대 효소 센서는 전극에 전도성 고분자와 같은 물질을 전착시켜 이 물질과 효소를 공유 결합을 통하여 고정화 시키는 구조를 이루어져 있어 1세대, 2세대 효소 센서와는 달리 직접적으로 전극에 전자를 전달할 수 있게 구성되어 있다.⁹⁾¹⁰⁾

효소 반응에서 발생하는 전자의 전기적 신호를 detector에 전달할 수 있는 전극(electrode)은 낮은 신호의 생물학적 물질을 측정할 수 있는 높은 전도성이 중요하다. 전도성을 높이기 위해 최근에는 센서, 연료 전지, 배터리 등의 전극 반응에서 전기화학적 반응 면적을 증가시켜 결과적으로 더 좋은 감도를 얻기 위한 방법으로 나노 입자¹¹⁾, carbon nano tube (CNT)¹²⁾와 같은 구성들이 전극에 변조되어 사용되고 있다. 전기화학적 반응 면적의 증가를 위한 구성들에 대한 연구는 비교적 최근에 시작되었고, 많은 분야에서 실제로 응용되고 있다. 최근에는 전이 금속으로 구성된 나노 입자의 크기, 모양, 형태, 구성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹³⁾ 촉매 반응에 대한 활성 영역을 증가시키기 위해서는 dendrite와 같은 돌기 형태가 필수적이다. 이러한 형태는 비 평형 조건에서의 유·무기적

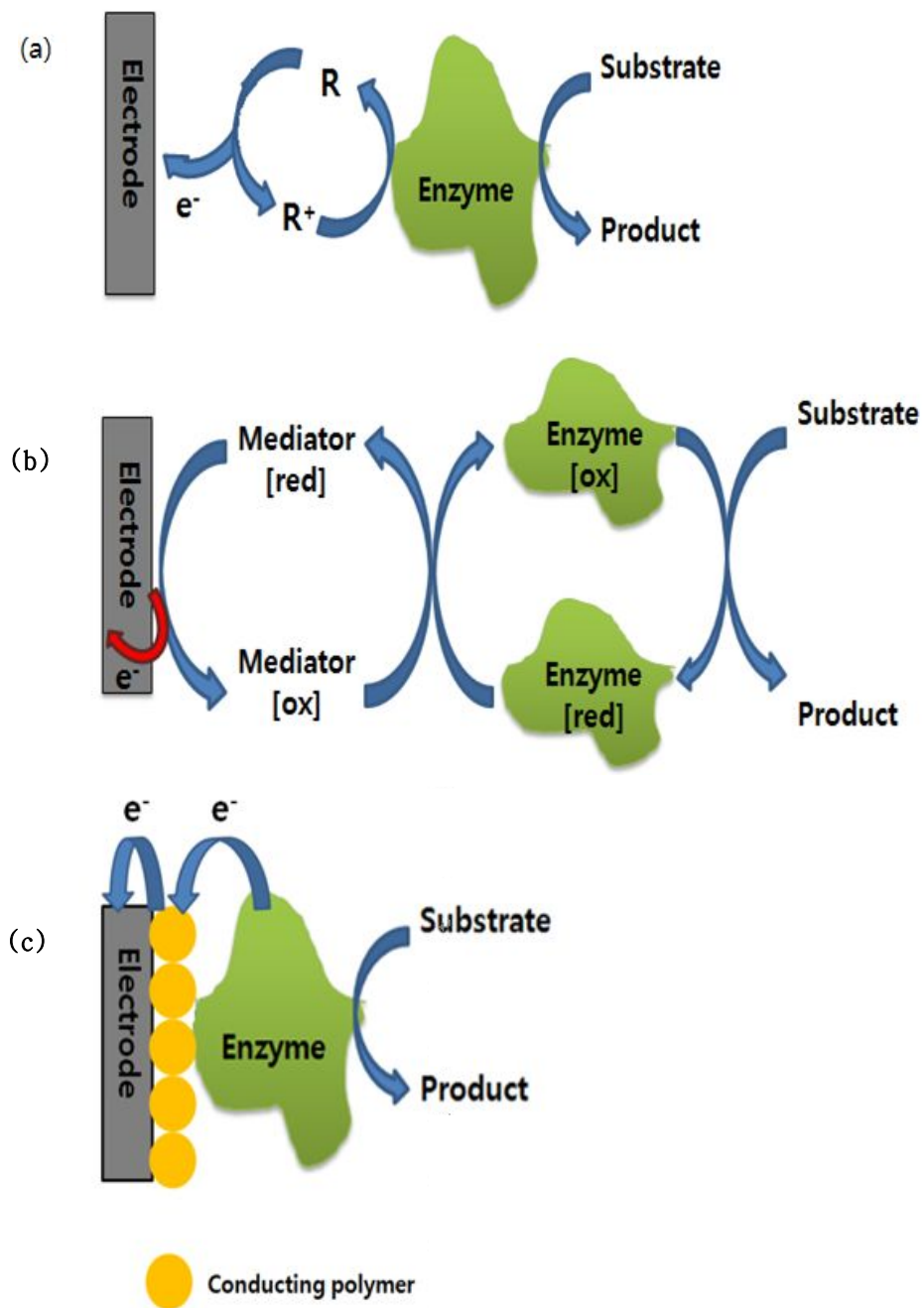


Figure 1 . Schematic diagrams of the enzyme glucose sensors belonging to (a) the first generation, (b) second generation, (c) third generation.

결정 성장에서 발견된다.¹⁴⁾ 이러한 돌기 형태는 성장하는 동안 중심 줄기에서 측면 가지로 구성된 계층 구조가 형성되면서 만들어진다.¹⁵⁾ 이러한 금속 dendrite 구조는 높은 표면 면적 대 부피 비율과 높은 연결성으로 인해서 매우 중요한 물질의 한 종류가 될 수 있다.¹⁶⁾ Ag, Cu, Au, Pt와 같은 단일 금속 dendrite 구조는 이미 많은 분야에서 연구되어 왔다.¹⁷⁾ Dendrite형태의 금속 촉매는 현재 연료 전지의 전극 촉매로 이용되거나 또는, glucose, dopamine과 같은 생체 물질의 전기화학적 신호를 보다 좋은 감도로 얻기 위한 촉매의 형태로 서도 이용되는 등 전기화학 분야에서 많은 연구가 이루어지고 있다.¹⁸⁾¹⁹⁾

혈당 센서를 제작함에 있어서 높은 전도성과 함께 중요시 되는 또 하나의 기술은 전극 표면 위에 산화/환원 매개체 및 효소의 고정화 기술이다. 고정화 기술로는 고분자 막을 이용한 방법, 자기 조립 단분자 막(Self-Assemble Monolayer, SAM), 금속 착물을 갖는 고분자를 이용한 전기화학적인 고정화 방법 등이 있다. 그 중 자기 조립 단분자 막은 주어진 기질의 표면에 자발적으로 입혀진 규칙적으로 잘 정렬된 유기 분자 막으로 기질과 이온 결합을 이루는 알칸산(alkanoic acid)으로 만들어진 SAMs, charge-transfer complex를 형성하는 유기황(organo-sulfur)으로 만들어진 SAMs, 그리고 순수한 공유 결합을 이루는 유기규소(organo-silicon)로 만들어진 SAMs가 있다. SAM은 아무런 기구를 필요로 하지 않으며 기질의 표면과 막을 이루게 되는 분자들 사이에 직접적인 화학 결합이 있는 경우가 많아서 매우 튼튼한 분자 막을 만들 수 있다. 그리고 기질의 모양이나 크기에 영향을 받지 않아 복잡한 모양의 기질 위에서도 제조가 가능하며 대면적화에도 용이하다. 이러한 단분자 막을 전극 위에 단량체(monomer)를 전기화학적인 방법을 이용한 고정화를 통하여 제작된 전극이 선택성과 전기적 응답에 대해 가장 좋은 효과를 나타낸다고 입증 되었다.^{20)–25)} 이러한 점에 있어서 기존에 사용된 탄소, 금, 백금 전극 위에 전도성 고분자(conducting polymer)를 전기적으로 중합하여 전극에 자기 조립 단분자 막을 형성하고 이 전도성 고분자와 GOD를 공유 결합을 통하여 고정화시킴으로써 GOD가 고정화된 전극을 제작할 수 있다.

본 연구에서는 Pt 마이크로 전극의 표면적을 넓히기 위해 Pt dendrite Ox층을 Pt 마이크로 전극 표면에 형성시켜 반응성을 증가시키고 dendrite oxide가

형성된 전극 표면에 전도성 고분자(conducting polymer)를 전기적으로 중합하여 전극에 자기 조립 단분자 막을 형성 전극에 형성된 전도성 고분자와 GOD를 공유 결합을 통하여 고정화시킴으로써 GOD가 고정화된 glucose sensor를 제작하였다.

II. 실험

2.1 시약 및 용액 제조

실험에서 사용된 물질은 전도성 고분자인 2,2' :5' :5''-terthiophene-3' '-benzoic acid(TTBA)는 합성하여 1 mM TTBA/0.1 M TBAP/CH₂Cl₂ 용액을 제조하여 사용하였다. Tetrabutylammonium perchlorate(TBAP)는 Sigma Aldrich 사에서 구입하여 일반적인 방법으로 정제한 후 1.33×10^{-3} 진공하에 보관하였다. 1-ethyl-3(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide(EDC), N-Hydroxy-succinimide(NHS), Dichloromethane(99.8 %, anhydrous, sealed under N₂ gas) Sigma Aldrich에서 구입하였다. Pt dendrite 전착에 사용되는 용액을 제조하기 위해서 사용되는 H₂Cl₆Pt · 6H₂O, Na₂SO₄ (99.99 +%)와 glucose detection 실험에 사용된 Glucose Oxidase(GOD), Flavin Adenine Dinucleotide(FAD), β-D-glucose는 Sigma Aldrich에서 구입하였다. 완충 용액 제조에 사용된 Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, KCl, NaOH는 Sigma Aldrich 사에서 Citric acid, Boric acid는 DC chemical에서 구입하였다. 모든 용액의 제조에는 Millipore 사의 milli-Q를 사용하여 얻은 탈 이온화된 3차 증류수(18 MΩ)을 사용하였다.

II-2. 측정기기

시간대전류법(Chronoamperometry), 순환 전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV), 선형 주사 전압전류법(Linear Sweep Voltammetry, LSV)을 이용한 전기화학적인 실험에서는 EG&G Princeton Applied Research, Model 273A Potentiostat/Galvanostat을 사용하였다. pH response와 glucose 산화 반응 실험에서는 8 channel pH/Ion meter model KST101A(Kosentech. Co., Korea)를 사용하였다. SEM(Scanning Electron Microscope) image는 Pt 마이크로 전극을 기판으로 하여 Pt dendrite를 전착시킨 뒤 HITACHI, Model S-3500N을 이용하여 표면 사진을 얻었고, XPS(X-ray photoelectron spectroscopy) spectrum은 SEM과 같은 방법으로 제작해서 울산과학기술대학교(UNIST)에서 XPS(Thermo Fisher, UK)를 이용하여 얻었다.

II-3. 전극

모든 전기화학적인 실험은 3 전극 법을 이용하여 측정하였다. 모든 실험에서의 작업 전극으로는 Pt 마이크로 전극 (dia. $26\ \mu\text{m}$)을 사용하였다. Pt 마이크로 전극은 $0.5\ \text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$ 용액에서 Cyclic Voltammetry method를 이용하여 $-0.25\ \text{V}$ 에서 $+1.5\ \text{V}$ 사이의 전위를 걸어주어 cycle 횟수를 20번 돌려 Pt 표면을 산화 환원시키면서 전극 표면에 불순물을 제거한 후 3차 증류수와 에탄올을 이용하여 전극 표면을 씻어낸 뒤, 찬바람으로 건조시켰다. 기준 전극으로는 염화 칼슘으로 포화된 은/염화은(Ag/AgCl (sat'd)) 전극을 사용하였다. 보조 전극으로는 백금 망 전극을 진한 질산으로 처리한 뒤, 증류수로 세척하고 불꽃으로 태워서 표면의 유기물을 충분히 제거한 뒤 사용하였다.

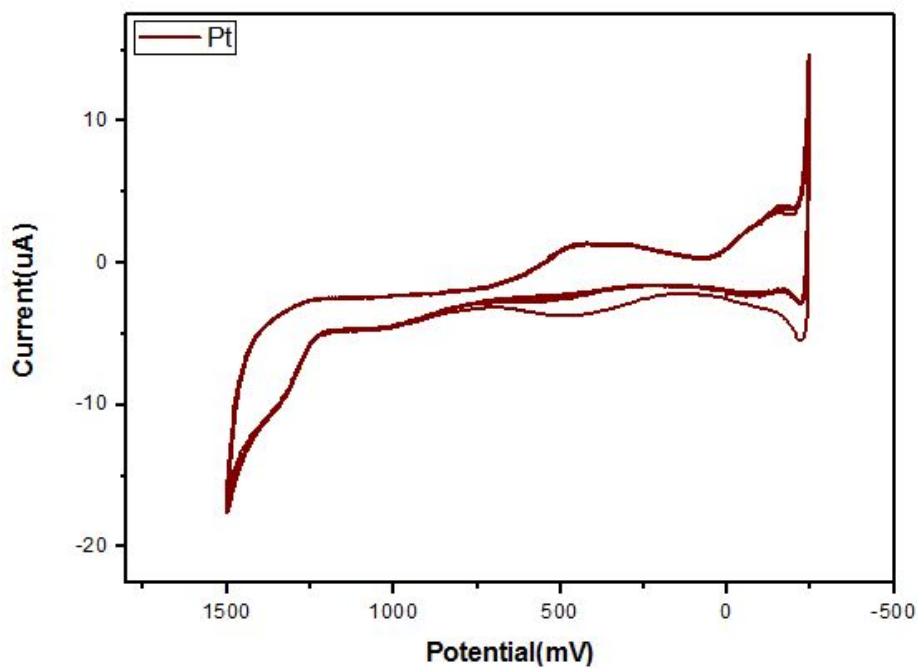


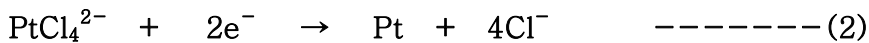
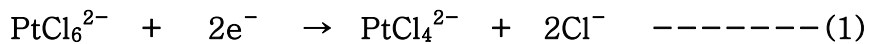
Figure 2. CV of Pt microelectrode was cleaned by cycling the potential between +1.5 V and -0.25 V for several times in a 0.5 M H_2SO_4 solution.

II-4. Pt dendrite 전극의 제작

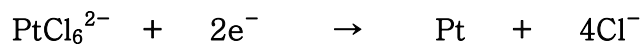
Pt 마이크로 전극의 표면적을 증가시키기 위하여 전극 표면에 Pt dendrite를 전착 시켰다. Dendrite를 전착시키기 위하여 0.1 M Na₂SO₄를 지지 전해질로 사용하여 5 mM H₂Cl₆Pt · 6H₂O이 포함된 용액을 사용하였다. 준비된 용액에 3 전극을 설치하여 Chronoamperometry method를 이용하여 500초간 -0.3 V의 전위를 걸어주었다. 이와 같은 방법을 3회 반복하여 총 1500초간 전위를 걸어주어 전극 표면에 Pt dendrite가 고르게 분포하게 전착시켰다. Figure 3을 보면 Pt 마이크로 전극 표면에 dendrite 형태의 형상이 생성되면서 시간이 지남에 따라 전류의 세기가 증가하는 것을 확인할 수 있다. Dendrite를 전착시킨 후, 에탄올, 3차 증류수에 각각 20초씩 전극을 담가서 전극 표면을 씻어낸 뒤, 찬바람으로 건조시켰다

전극에 Pt dendrite를 전착시킨 후 pH 변화에 보다 잘 반응하게 하기 위해 Pt dendrite를 산화시켜 실험에 사용하였다. Figure 4는 Pt dendrite의 산화 그래프를 나타낸 것이다. 전극에 형성된 Pt dendrite를 산화시키기 위하여 Linear Sweep Voltammetry method를 이용하여 Pt가 산화되는 전위인 +0.3 V에서 positive 방향으로 +1.5 V까지 전위를 주사하여 산화 전류가 일정해질 때까지 반복하여 Pt dendrite 표면을 산화시킨 후 3차 증류수와 에탄올을 이용하여 전극 표면을 씻어낸 뒤, 찬바람으로 건조시켰다.

[Chloroplatinic acid hexahydrate 용액에서 백금의 전착 반응식]



전체반응식



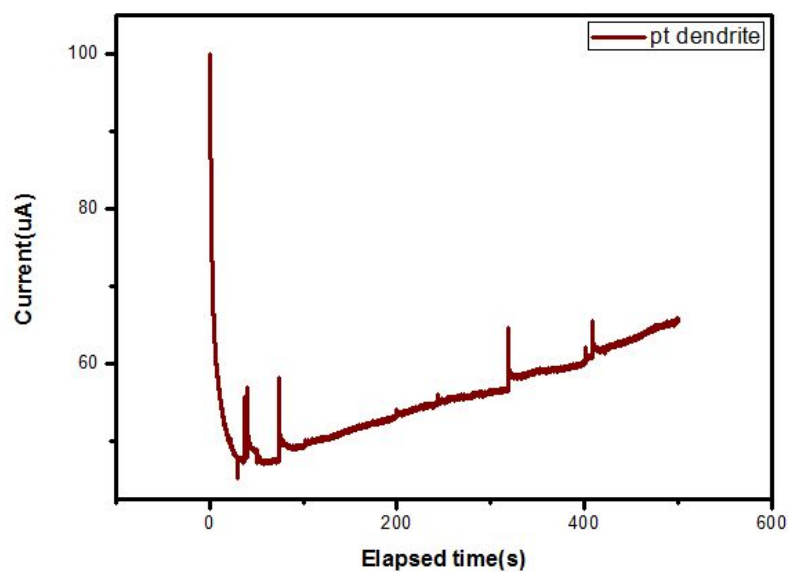


Figure 3. Electrodeposition of Pt dendrite on Pt microelectrode.

Chronoamperometry of Pt microelectrode in 5 mM $\text{H}_2\text{Cl}_6\text{Pt} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M Na_2SO_4) at initial potential(IE): +1.0 V, V1: -0.3 V, elapsed time: 500 s for three times.

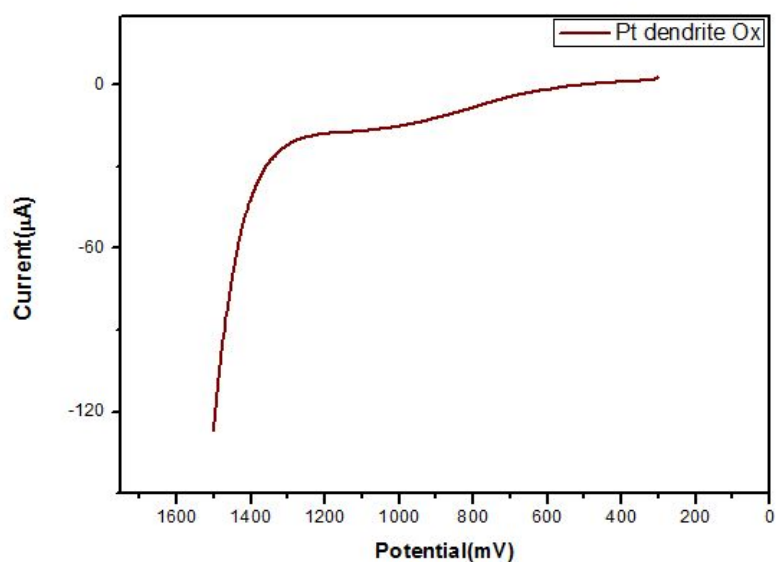


Figure 4. LSVs recorded for Pt dendrite oxidation in a 0.5 M H_2SO_4 solution. The scan rate was 50.0 mV/s at IE: +0.3 V, V1: +1.5 V.

II-5. GOD/TTBA/Pt dendrite Ox 전극 제작

Figure 5에 바이오센서의 전체 제작 과정 및 실험 과정을 나타내었다. Pt dendrite Ox 층은 위의 Pt dendrite oxide(PtDDOx) 전극 제작 방법에 나타낸 것과 동일한 방법으로 전극 위에 전착시켰다. PtDDOx/Pt 전극 위에 입힌 poly-TTBA의 막은 1.0 mM의 TTBA monomer를 0.1 M TBAP/CH₂Cl₂에 녹인 용액 상에서 electropolymerization 하였다.²⁶⁾ Figure 6에 나타난 것처럼 potential 범위는 0 V에서 + 1.4 V이고, scan rate는 1 V/s로, potential cycle 수는 3회 실시하였다.²⁷⁾ 처음 0 V~+1.4 V 까지 anodic scan을 할 때 TTBA monomer의 산화가 일어나는데 그 때 peak 위치는 +1.3 V이며, reverse scan인 cathodic scan 시 polymer의 환원 peak의 위치는 +1.0 V에서 나타난다. 이렇게 환원이 일어나면서 전극 위에 polymer 형태로 coating이 되며, 주사 횟수가 증가할수록 산화 환원 봉우리의 크기가 점점 증가하는 것을 통해 단위체가 고분자로 합성되고 있음을 알 수 있다. 전극 위에 polymer가 형성되지 않은 TTBA monomer를 제거하기 위해 CH₂Cl₂로 세척하였다. Poly-TTBA의 carboxylic acid group을 활성화하기 위해 전극(poly-TTBA/PtDDOx/Pt)을 10 mM EDC/NHS를 0.1 M phosphate buffer solution(pH 7.4)로 녹인 용액에 넣고 30 °C에서 6 시간 동안 반응시켰다. EDC 처리가 끝난 전극을 0.1 M PBS(pH 7.4)로 세척한 후 곧바로 Glucose Oxidase(GOD)-FAD 6 mg/ml 용액에 넣어서 4 °C에서 12 시간 동안 반응시켜 TTBA의 carboxylic acid group에 GOD를 amide bond 형태로 전극에 결합시켜 실험에 사용할 전극을 제작하였다.

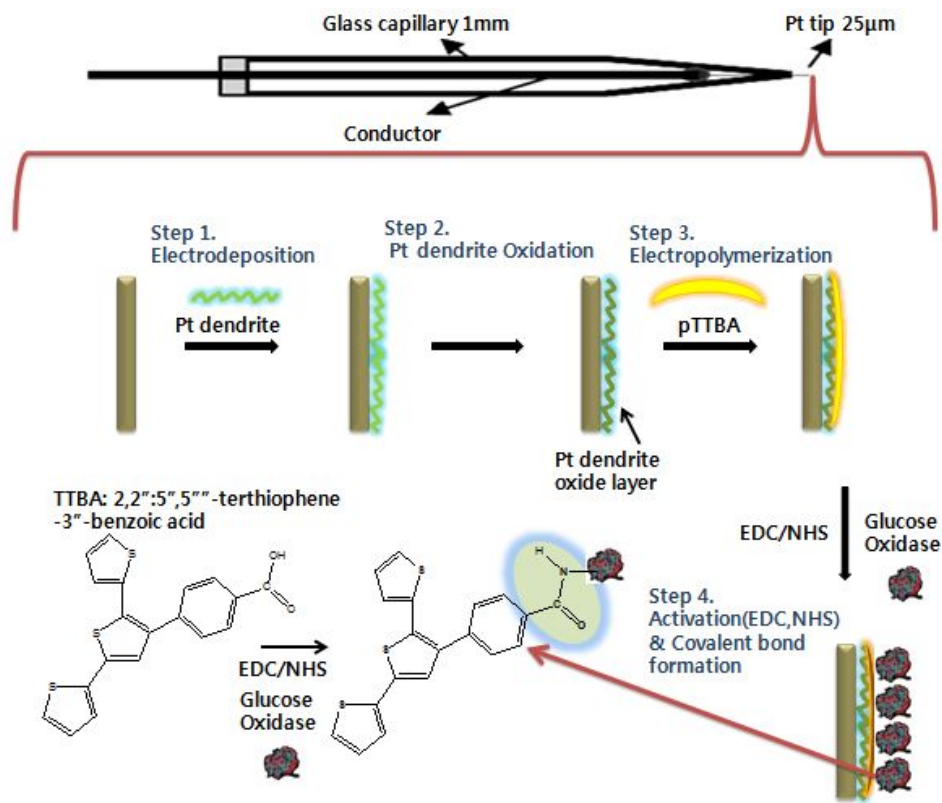


Figure 5. Schematic representation of the fabrication of a biosensor.

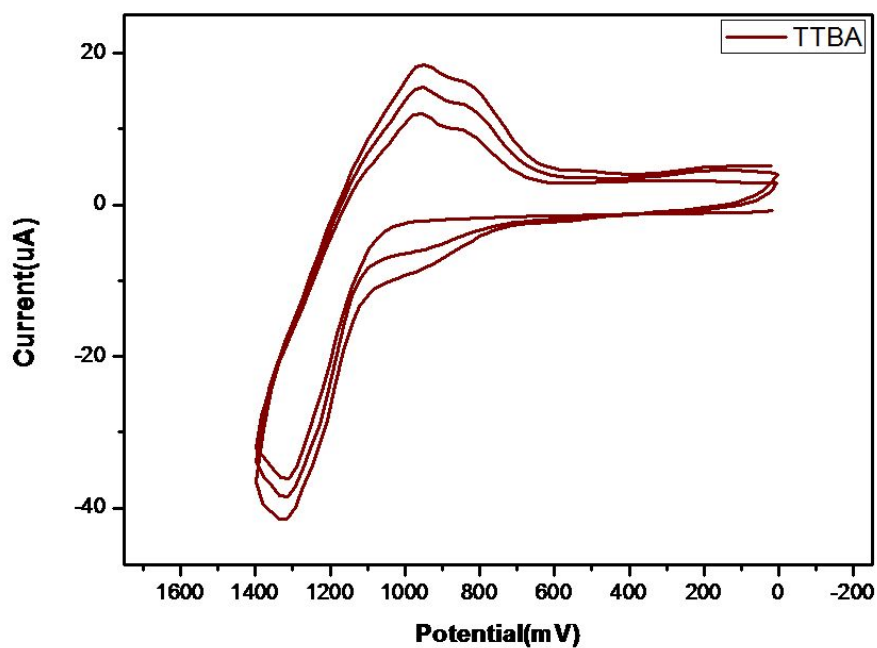
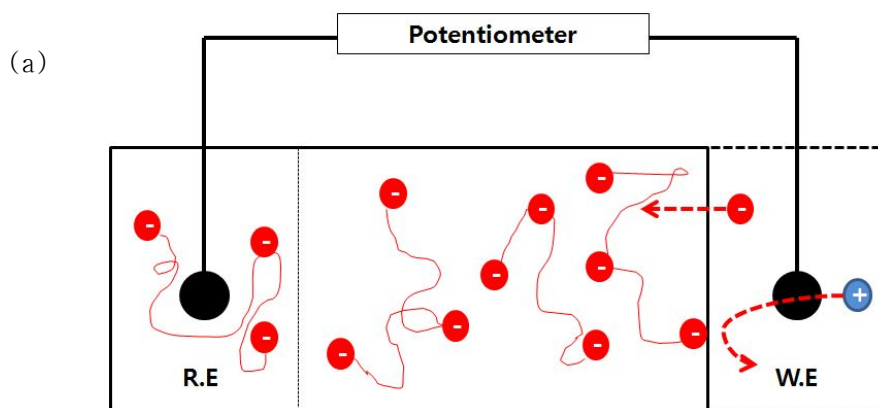
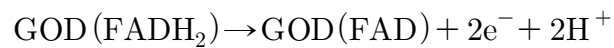
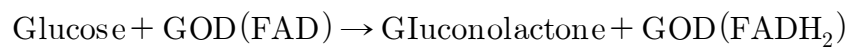


Figure 6. The poly-TTBA layer was formed on the Pt dendrite Ox/Pt by electropolymerization of 1.0 mM TTBA monomer in a 0.1 M TBAP/CH₂Cl₂ solution by a three time potential cycling from 0.0 V to +1.4 V at 1 V/s.

II-6. Potentiometric 검출 원리

전위차법(Potentiometry)은 주어진 전기화학적 셀에서 전위차(셀 전위, cell potential)의 발생 여부는 전극과 시료 용액 중 분석 대상 성분 사이의 상호감응 여부(주어진 전극이 시료 용액과 접촉함으로써 형성되는 전극/용액 계면에서 시료 용액 중 분석 대상 성분이 관련된 산화 또는 환원 반 반응이 일어나려는 경향성의 존재 여부)에 의하여 결정되며(정성 분석의 근거), 전기화학적 셀에서 발생하는 전위차(셀 전위)는 해당 산화 또는 환원 반 반응에 관련된 분석 대상 성분의 농도에 따라 변한다는 점을 채용한 분석 기법이다.

본 실험에서는 용액 속의 glucose가 전극 표면의 GOD-FAD와 반응하면 수소 이온(H^+)이 발생하는데 이 수소 이온을 Figure 7의 작업 전극(W. E)에 있는 Pt dendrite가 검출하였을 때 변화하는 potential을 측정함으로써 용액 속의 glucose 농도를 확인하였다.



(b)

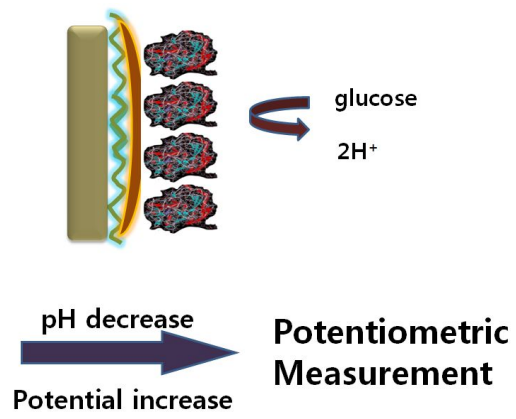


Figure 7. Scheme of (a) Potentiometer, (b) Potentiometric measurement in glucose solution.

Ⅲ. 결과 및 고찰

Ⅲ-1. Pt dendrite 형상관찰 및 특성 분석

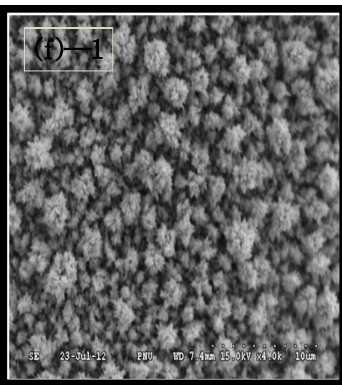
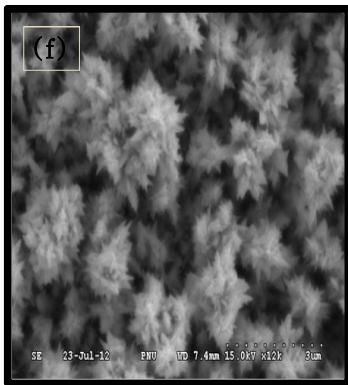
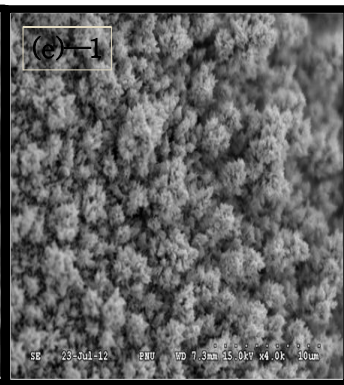
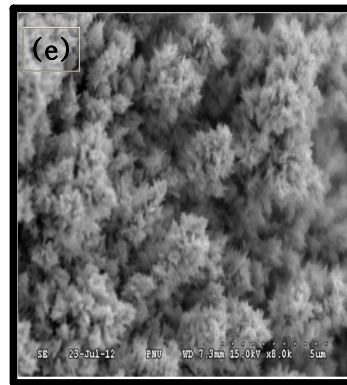
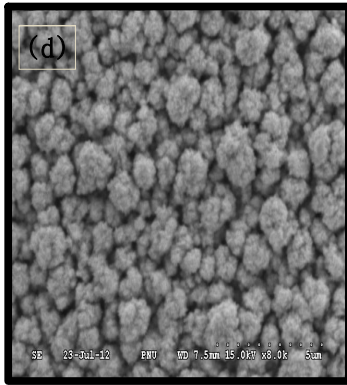
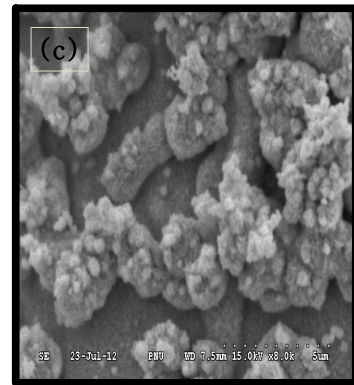
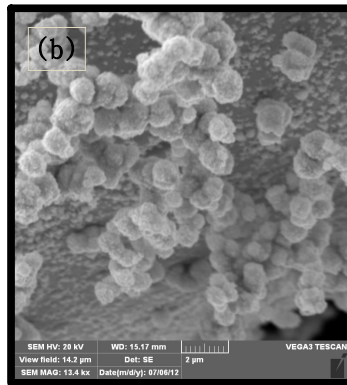
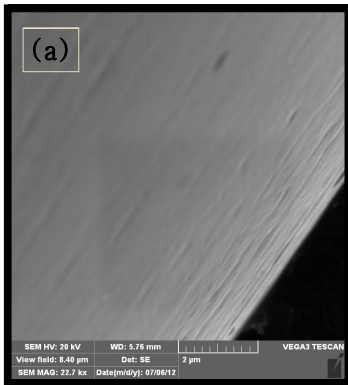
Pt 마이크로 전극 표면에 전착된 Pt dendrite 형상을 관찰하기 위해서 SEM을 이용하였다. 그리고 전극 표면에 GOD, TTBA, PtDDO_x가 제대로 형성되었는지를 확인하기 위하여 XPS 분석을 실행하였다.

Ⅲ-1-1. SEM 분석

Figure 8은 electrodeposition 시키는 조건 별로 전극에 형성된 Pt의 형태를 나타낸 SEM image이다. (a)는 bear Pt 마이크로 전극의 표면 image이고, (b)–(g) image 중 (b)–(d) image에서는 전극에 Pt particle이 형성되었고, (e)–(g) image에서는 전극에 dendrite가 형성된 것을 확인할 수 있었다. Particle로 형성된 (b)–(d) image를 보면 (d) image에서만 particle이 전극에 고르게 전착되어있음을 확인할 수 있다. (e)조건에서는 particle이 아닌 dendrite의 형상을 나타내기는 했지만 그 형태가 뚜렷하지 않은 것을 확인할 수 있었다. (f)조건에서는 dendrite가 전극에 고르게 형성은 되었으나 (f)와 (g) image, (f)–1과 (g)–1 image를 비교해 보았을 때 (g)조건에서 형성된 dendrite 보다 dendrite의 형상이 덜 선명하게 형성되었음을 확인할 수 있었다. (g)조건에서는 dendrite가 전극에 고르게 형성되었을 뿐만 아니라 dendrite의 형태 또한 큰 줄기에서 옆으로 뻗어나가는 가지 형태의 구조를 볼 수 있다. 뻗어나간 가지에서 다시 지속적으로 뻗어나가는 나무 가지 형상의 거친 구조를 확인할 수 있었다. SEM image를 통하여 dendrite가 가장 잘 형성된 (g) IE: 0 V, V1: -0.3 V 조건으로 dendrite를 형성시킨 전극을 본 실험에 사용하였다.

(g)조건으로 dendrite를 형성한 후 산화시킨 전극과 산화된 전극 위에

TTBA를 전착시킨 전극의 SEM image를 Figure 9에 나타내었다. Figure 8의 (g)와 Figure 9의 (a)를 비교해보면 PtDDOx/Pt 전극의 표면 상태가 PtDD/Pt 전극보다 dendrite의 형상이 큰 줄기에서 다시 가시가 뻗어나가 산화되기 전보다 더 거친 구조를 띠는 것을 확인할 수 있다. Figure 9의 (b)를 보면 dendrite Ox 위에 poly-TTBA가 dendrite가 형성되지 않고 비어있는 공간과 dendrite Ox 위에 전착되는 것을 확인할 수 있다. 이 SEM 분석 결과를 통하여 Pt dendrite를 산화시킨 전극 위에 poly-TTBA를 전착시킨 전극을 실험에 사용하였다.



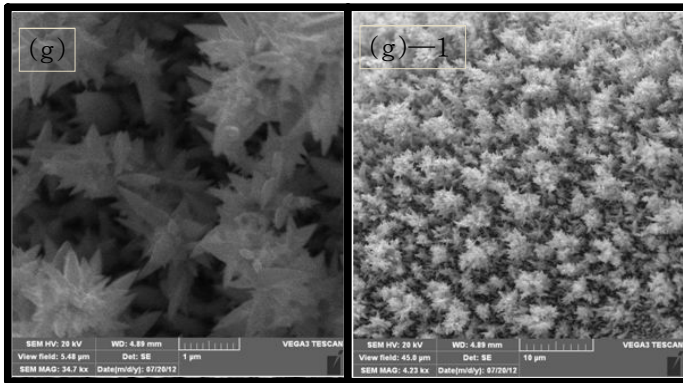


Figure 8. SEM images of (a) a bare Pt microelectrode and (b)—(d) Pt particle grown and (e)—(g) Pt dendrite formation onto the Pt microelectrodes through electrodeposition using chronoamperometry at (b) IE: +0.9 V, V1: -0.4 V, (c) IE: 0 V, V1: -0.45 V, (d) IE: 0 V, V1: -0.4 V, (e) IE: 0 V, V1: -0.3 V, (f) IE: -0.05 V, V1: -0.3 V and (g) IE: +1.0 V, V1: -0.3 V.

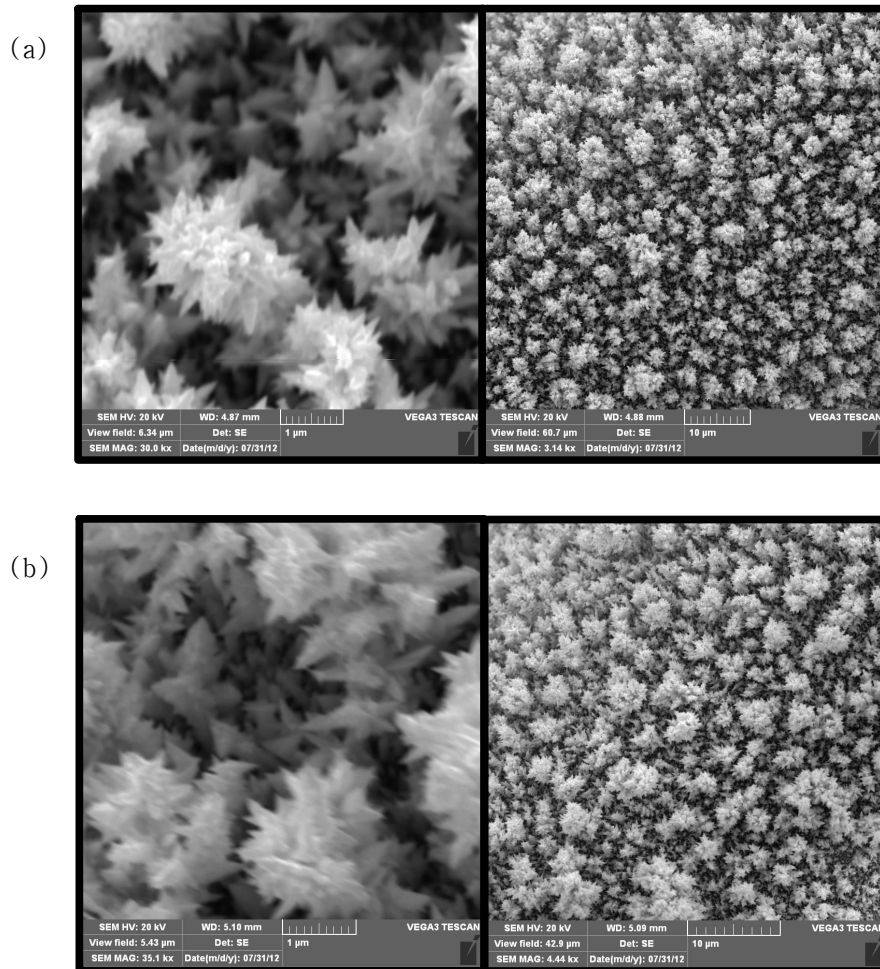


Figure 9. SEM images of (a) PtDDOx/Pt, (b) TTBA/PtDDOx/Pt electrode. Electrodeposition of Pt dendrite at IE: +1.0 V, V1: -0.3 V.

III-1-2. XPS 분석

Figure 10과 11은 제작된 바이오센서 표면 제작 과정을 XPS로 측정한 것이다. 모든 XPS spectra는 내부 표준물로 284.6 eV에서 C1s peak을 사용하여 calibration 하였다. Figure 10은 XPS survey spectra를 나타내었고, Figure 11은 원소 별 XPS spectra를 나타내었다. PtDDOx/Pt, TTBA/PtDDOx/Pt, GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt 전극에서는 C1s peak spectra와 O1s peak spectra를 공통적으로 관찰할 수 있다. 모든 표면에서 C-C와 C-H bond 때문에 284.6 eV에서 C1s peak이 나타난다. TTBA/PtDDOx/Pt, GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt 전극에서는 288.18 eV에서 C=O bond를 확인할 수 있다. 더욱이 Figure 11의 (A) 그래프의 (c)에서는 285.88 eV에서 새로운 C-N bond가 관찰되는데, 이는 GOD의 -NH₂ 그룹과 poly-TTBA의 -COOH 그룹이 공유 결합을 형성하여 성공적으로 전극에 결합된 것을 나타낸다. PtDDOx/Pt, TTBA/PtDDOx/Pt, GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt 전극에서 O1 spectra는 Pt dendrite가 oxide 형태로 전극에 존재하기 때문에 529.8 eV에서 peak가 관찰된다. 또, TTBA/PtDDOx/Pt 전극의 O1 spectra에서는 532.6 eV와 533.3 eV에서 peak가 관찰되는데 이 두 개의 peak는 각각 -COOH 그룹의 -COH bond와 O=C-O bond 때문에 나타난다. PtDDOx/Pt, TTBA/PtDDOx/Pt 전극에서는 N1s peak가 나타나지 않는 반면에 GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt 전극에서는 399.78 eV에서 N1s peak가 관찰된다. 이는 C-N bond의 peak로 GOD가 전극 표면에 immobilization 되었음을 증명한다. S2p spectra는 TTBA/PtDDOx/Pt 표면에서 163.88 eV에서 관찰되지만 GOD를 immobilization 한 후에 peak가 broad하게 되는 것을 확인할 수 있다. 이것은 GOD가 poly-TTBA의 표면에 immobilization됨으로 인해 S2p에 영향을 주었기 때문이라 볼 수 있다. 이러한 XPS 결과는 poly-TTBA composite 위에 GOD가 성공적으로 immobilization 되었음을 증명한다.

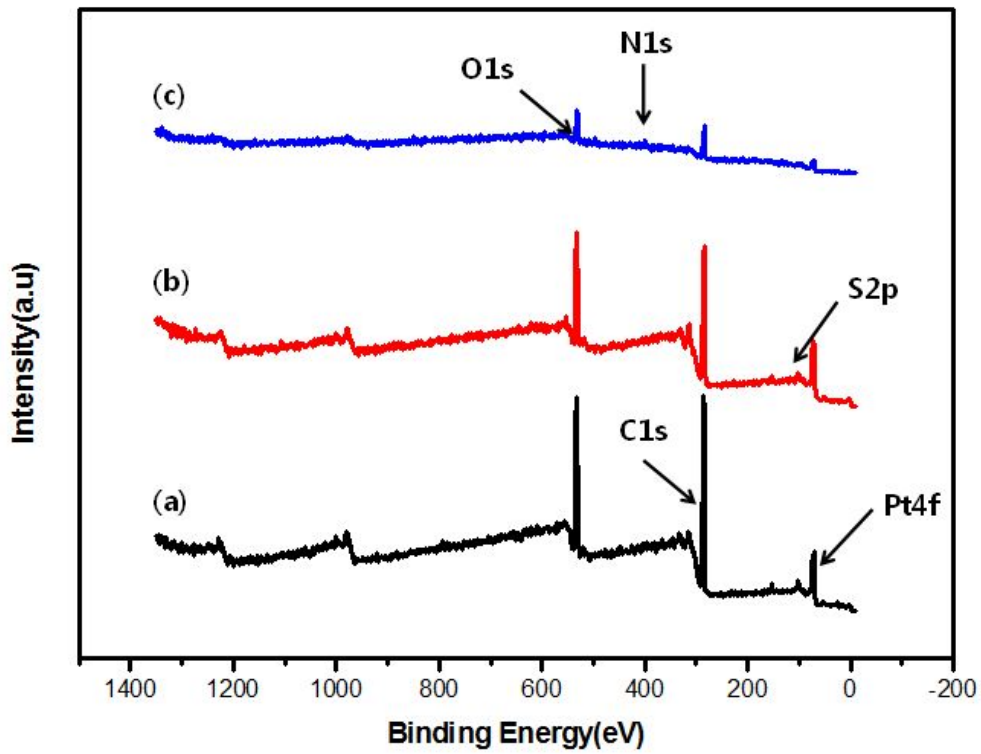


Figure 10. The XPS survey spectra spectrums obtained for (a) PtDDOx /Pt, (b) TTBA/PtDDOx/Pt, (c) GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt.

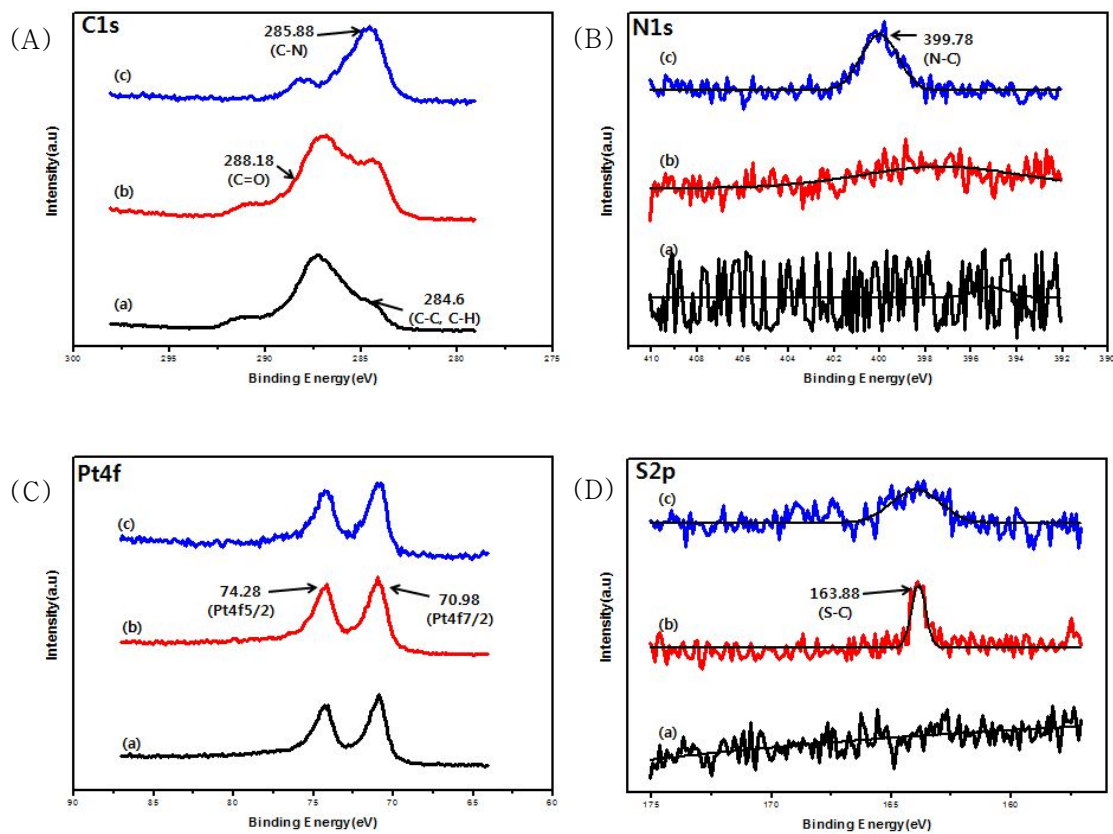


Figure 11. The XPS spectra spectrums of (A) C1s, (B) N1s, (C) Pt4f, (D) S2p obtained for (a) PtDDOx/Pt, (b) TTBA/PtDDOx/Pt, (c) GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt.

III-2. Pt dendrite, TTBA pH 반응 실험

Figure 12는 Multi meter를 사용하여 pH 3~13까지 buffer를 변환시키면서 pH response를 측정하였을 때의 potential vs. pH 그래프이다. 이 그래프는 이론적으로 다음의 Nernst equation에 따라 pH가 1 변할 때 potential이 59.2 mV 변해야 한다.

[Nernst equation]

$$\begin{aligned} \text{HA} &\rightarrow \text{H}^+ + \text{A}^- \\ E &= E^0 + \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}}\right) + \frac{RT}{F} \ln(a_{\text{H}^+}) \\ &= E^{0'} + \frac{RT}{F} \ln(a_{\text{H}^+}) \\ &= E^{0'} - 0.0592 \text{pH} \end{aligned}$$

Figure 12를 plot하여 그래프로 나타낸 것이 Figure 13으로 plot한 결과를 보면 Pt bear 전극(-45.88 mV/pH(± 0.2913))에 비해 Pt Ox 전극의 pH response slope가 -47.08 mV/pH(± 1.073)로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험은 Pt 마이크로 전극에 Pt dendrite를 전착시킴으로써 표면적을 넓혀 pH response를 증가시키는 목적으로 진행된 실험으로 buffer에 대한 pH response 실험 결과 Pt bear 전극보다는 전극 위에 Pt dendrite가 형성되었을 때 slope가 -45.88 mV/pH(± 0.2913)에서 -53.95 mV/pH(± 0.6163)로 증가하였고 또한 Pt dendrite 형태일 때 보다 산화 상태일 때의 slope가 -56.38 mV/pH(± 0.435)로 더 Nernst slope(-59.2 mV/pH)에 근접하게 나타났다. Bear 전극 위에 Pt가 전착되는 형태가 dendrite 경우와 particle일 경우의 pH response를 비교해 보았을 때 particle 형태로 전착되었을 경우의 slope가 -51.92 mV/pH(± 0.74)인 반면, dendrite 형태로 전착되었을 경우 slope가

-53.95 mV/pH(\pm 0.6163)로 나와 dendrite 형태로 전극에 전착될 경우가 전극의 표면적을 더 증가시켜 pH response가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 본 실험에서는 conducting polymer 유무에 따른 pH response 차이를 확인하는 실험을 진행하였는데 Figure 12에 나타나 있듯이 전극에 Pt dendrite만 전착시켰을 때 보다 Pt dendrite가 전착된 전극 표면에 conducting polymer를 추가적으로 전착시켰을 때 전반적으로 pH slope가 증가하게 나타났다. Modified 전극의 potential vs. pH slope는 Table 2에 정리되어있다.

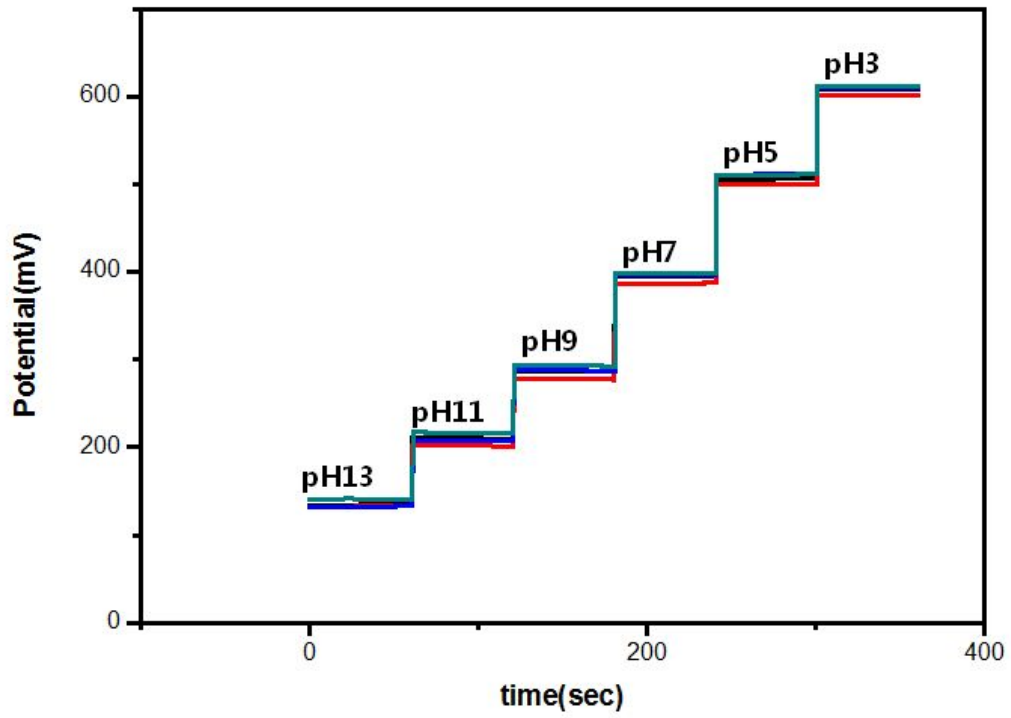


Figure 12. Response of the Pt dendrite oxide electrode to pH 3~13 buffer solution.

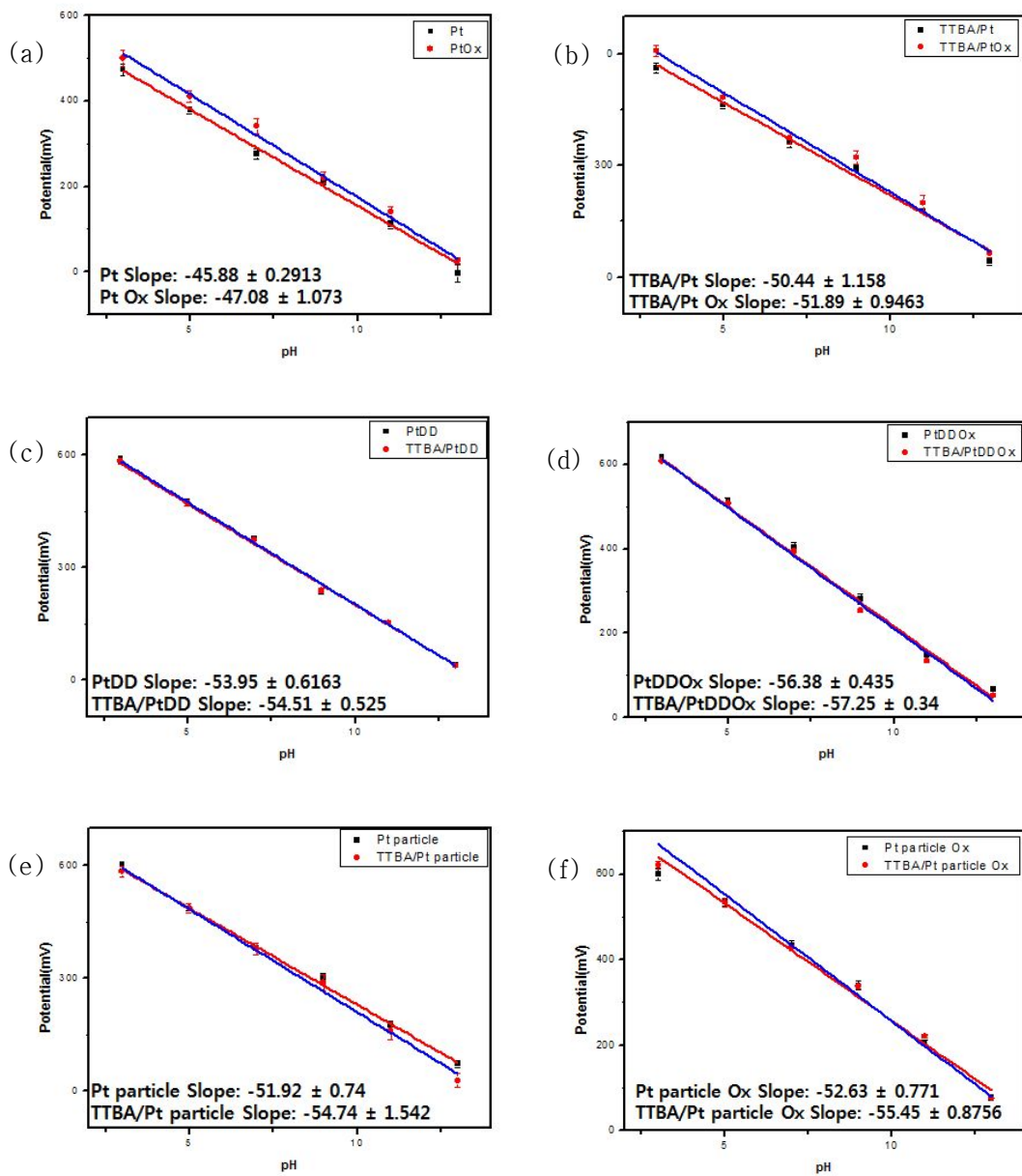


Figure 13. E vs. pH plots of (a) Pt & Pt Ox, (b) TTBA/Pt & TTBA/Pt Ox, (c) Pt dendrite/Pt & TTBA/Pt dendrite/Pt, (d) Pt dendrite Ox/Pt & TTBA/Pt dendrite Ox/Pt, (e) Pt particle/Pt & TTBA/Pt particle/Pt, (f) Pt particle Ox/Pt & TTBA/Pt particle Ox/Pt.

	Pt	Pt Ox	TTBA/ Pt	TTBA/ Pt Ox
Slope	-45.88 ± 0.2913	-47.08 ± 1.073	-50.44 ± 1.158	-51.89 ± 0.9463
R ²	0.9936	0.9965	0.9871	0.9912
	Pt dendrite	TTBA/ Pt dendrite	Pt dendrite Ox	TTBA/ Pt dendrite Ox
Slope	-53.95 ± 0.6163	-54.51 ± 0.0525	-56.38 ± 0.435	-57.25 ± 0.354
R ²	0.9785	0.9985	0.9990	0.9986
	Pt particle	TTBA/ Pt particle	Pt particle Ox	TTBA/ Pt particle Ox
Slope	-51.92 ± 0.74	-54.74 ± 1.542	-52.63 ± 0.771	-55.45 ± 0.8756
R ²	0.9968	0.9957	0.9888	0.9868

Table 2. E vs. pH slope of the modified electrode at pH buffer solution.

III-3. 재현성 및 안정성 실험

TTBA/PtDDOx/Pt 전극과 TTBA/PtDD/Pt 전극의 시간에 따른 long-term storage stability를 Figure 14에 나타내었다. 두 개의 전극을 7일마다 pH 3~13 buffer 용액에서 potentiometric response를 측정하여 전극의 long-term storage stability를 측정하였다. TTBA/PtDD/Pt 전극은 29일 동안 potential-pH slope가 50 mV/pH 이상을 유지했고, 29일이 지난 후에 slope가 50 mV/pH 이하로 감소하였다. TTBA/PtDDOx/Pt 전극의 경우는 50일 동안 50 mV/pH 이상을 유지했고, 50일 이후에는 slope가 50 mV/pH 이하로 급격히 감소하였다. TTBA/PtDDOx/Pt 전극은 TTBA/PtDD/Pt 전극에 비해 long-term storage stability가 장시간 유지되는 것을 통하여 Pt dendrite를 산화시킨 형태가 그렇지 않은 상태보다 보다 안정하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 dendrite 형태로 전착시켰을 때와 particle 형태로 전착시켰을 때의 long-term storage stability를 비교하기 위해 particle 형태의 전극의 long-term storage stability 실험을 진행하였다. 그 결과 TTBA/Pt particle/Pt 전극은 6일 이후에 pH response slope가 50 mV/pH 이하로 감소하였고, TTBA/Pt particle/Pt 전극의 경우는 30일 이후에 slope가 50 mV/pH 이하로 감소하였다. 이를 통하여 전극에 particle 형태로 전착시켰을 때보다 dendrite 형태로 전착되었을 때 전극이 장시간 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

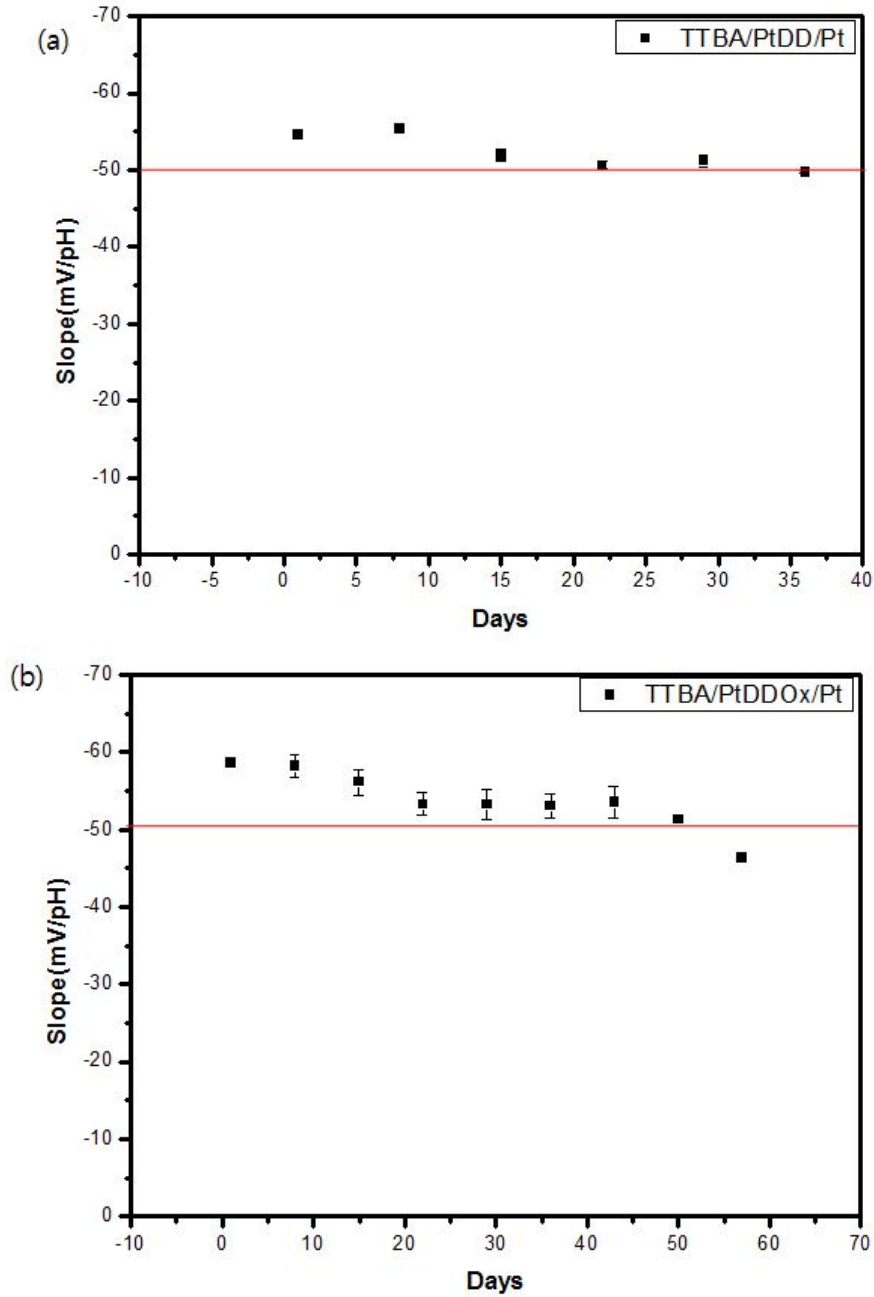


Figure 14. Effect of storage time of (a) TTBA/PtDD/Pt, (b) TTBA /PtDDOx/Pt electrode.

III-4. 최적화 실험

GOD와 PtDDOx를 이용한 센서 probe를 제작하기 위해 experiment parameters를 최적화하였다. Dendrite 형성과 GOD를 immobilization하기 위해 Pt를 전착시키는 용액의 농도와 GOD의 농도를 조절하였다. 먼저 전극 표면에 Pt dendrite를 형성시키기 위한 조건 중 $H_2Cl_6Pt \cdot 6H_2O$ 용액의 농도 별 elapsed time을 바꿔가면서 Pt dendrite를 전극에 전착시켰을 때의 E vs. pH slope를 통하여 적정 조건을 찾았다. Figure 15은 (a) 1 mM, (b) 5 mM, (c) 30 mM $H_2Cl_6Pt \cdot 6H_2O$ 용액에서 Pt의 환원 전위를 걸어주면서 dendrite를 전극에 전착시켰을 때의 elapsed time에 따른 pH response slope를 나타낸 그래프이다. 이를 통해 5 mM $H_2Cl_6Pt \cdot 6H_2O$ 용액에서 elapsed time에 따른 slope 차이가 다른 농도에 비해 별로 나타나지 않는 것을 통하여 5 mM 농도로 하여 dendrite를 전착시켰다. 이때, elapsed time은 300 s, 600 s, 1500 s 중 5 mM 농도에서 가장 slope가 좋게 나온 1500 s로 하여 실험을 진행하였다.

GOD를 immobilization 농도에 따른 효과는 4 mg/ml에서 7 mg/ml 사이의 범위에서 glucose 용액에서의 potential 변화를 통하여 확인하였다. 이때 GOD만 전극에 immobilization 시켰을 때는 glucose 용액에서 potential 변화가 일정하게 나타나지 않았으나, GOD와 FAD를 co-immobilization 시켰을 때 (GOD와 FAD 농도 비 = 1 : 2) glucose 용액에서 potential 변화가 일정하게 나타나 최적화 실험을 진행할 때는 GOD와 FAD를 co-immobilization 시킨 상태에서 potential-[glucose(mM)] slope와 최대로 검출할 수 있는 glucose 농도를 비교하였다. Figure 16의 (a)와 (b)를 통하여 4 mg/ml와 5 mg/ml로 하였을 때 potential-[glucose(mM)] slope는 크게 나왔으나 최대로 검출할 수 있는 glucose의 농도가 1 mM로 나와 실험에 사용할 농도로 적합하지 않은 것을 확인할 수 있었다. 7 mg/ml GOD-FAD를 immobilization 시켰을 때는 10 mM glucose까지 검출할 수 있는 것으로 나왔지만 potential-[glucose(mM)] slope가 1 mV/mM 정도로 나와 실험에 사용할 농도로 적합하지 않음을 확인할 수 있었다. 6 mg/ml GOD-FAD의 경우는 최대로 검출할 수 있는 glucose의 농도가 10 mM로 나오고 potential-[glucose(mM)] slope는 6 mV/mM 정도로

나왔다. 따라서 TTBA/PtDDOx/Pt 전극의 carboxylic acid group을 10 mM EDC/NHS로 활성화 한 다음 6 mg/ml GOD-FAD를 전극에 immobilization 하여 실험에 사용하였다.

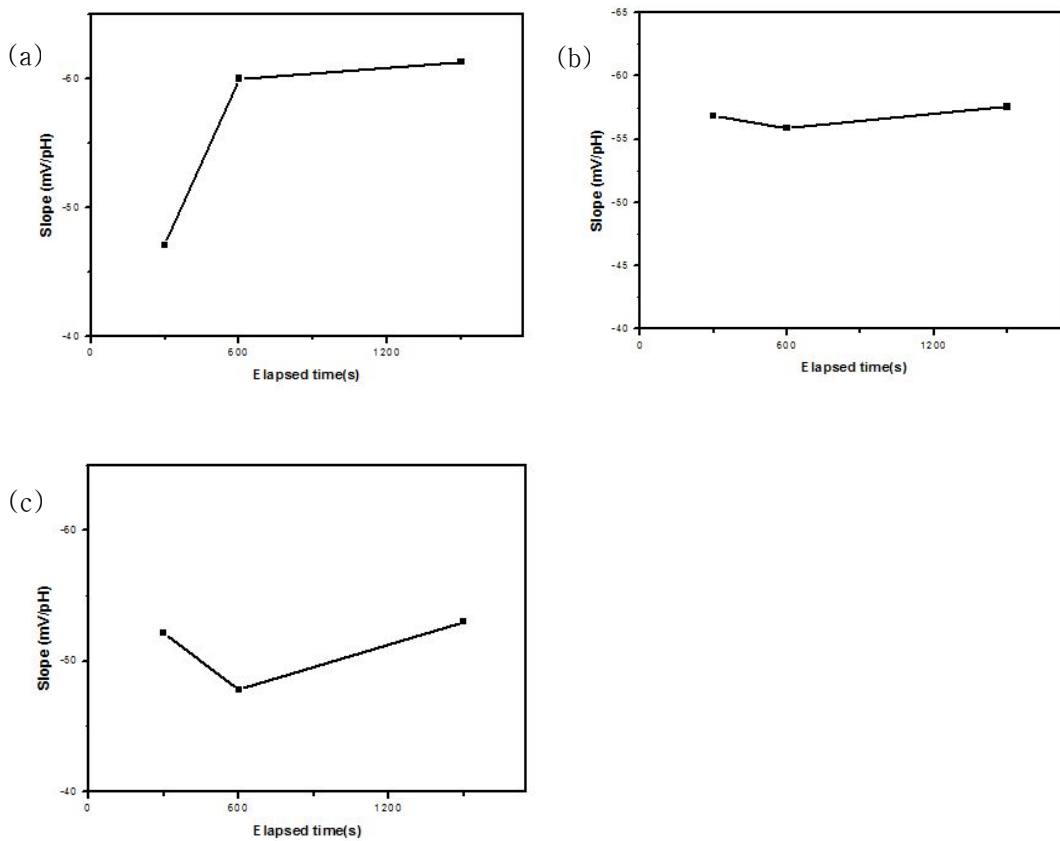


Figure 15. Potential-pH slope of PtDDOx/Pt electrode, optimization of the experimental parameters: effects of $\text{H}_2\text{Cl}_6\text{Pt} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution concentration and electrode position elapsed time. (a) 1 mM, (b) 5 mM, (c) 30 mM $\text{H}_2\text{Cl}_6\text{Pt} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

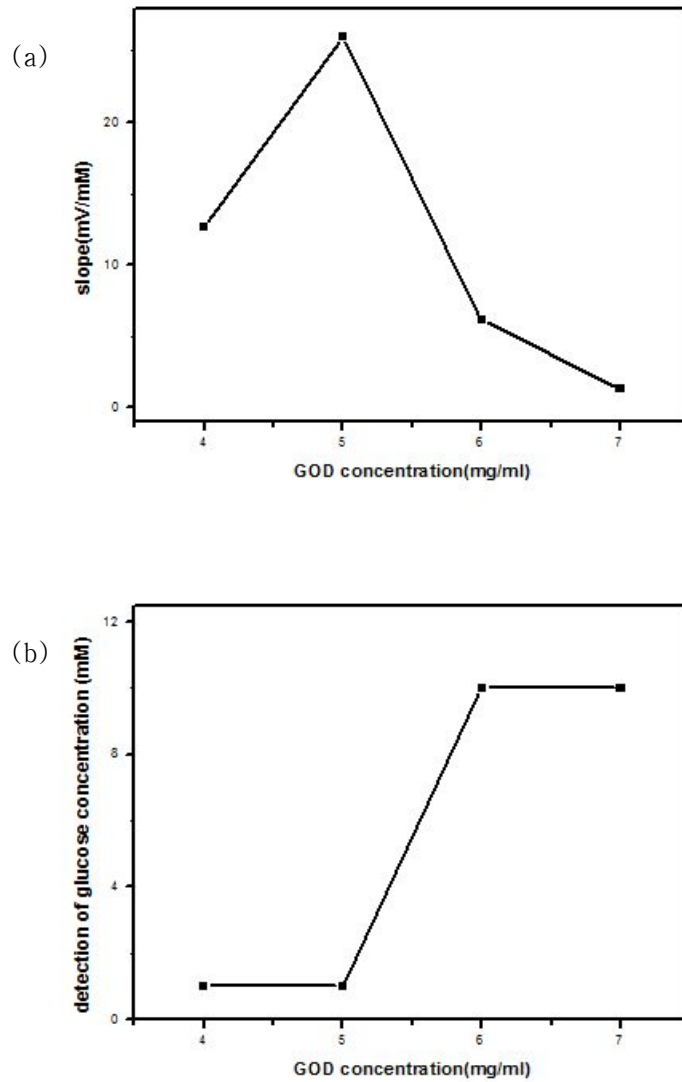


Figure 16. (a) Potential-[glucose(mM)] slope of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt, (b) Detection of glucose concentration, optimization of the experimental parameters: effects of GOD concentration.

III-5. glucose 검정 곡선

분석 시 영향을 주는 parameter의 최적화 실험 후에 GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt 센서의 potentiometric 측정을 진행하였다. Glucose 농도 변화에 따른 response를 측정하기 전에 센서가 pH 변화에 따른 response가 제대로 나타나는지를 확인하기 위해 Figure 17 (a)에 나타난 것처럼 pH 3~13 buffer 용액에서의 potential 변화를 측정하였다. 이 결과를 plot한 그래프를 Figure 17 (b)에 나타내었다. Figure 17 (b)에서 potential-pH slope가 -57.67 mV/pH (± 0.67)로 나와 conducting polymer까지 전착된 전극보다 (-57.45 mV/pH) slope가 감소하지 않는 것을 통해 GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt 전극이 potentiometric 센서로 작용할 수 있음을 확인하였다. pH slope가 제대로 나오는지 확인한 후 glucose 농도 변화에 따른 potential 변화를 측정하였다. Figure 18은 glucose 농도 변화에 따른 potential을 나타낸 그래프로 glucose 농도를 0.5~10 mM로 변화시키면서 potential을 측정하였다. 용액 속의 glucose와 전극 표면의 GOD-FAD가 반응하여 생성되는 수소 이온으로 인해 potential이 glucose의 농도가 증가할수록 비례하게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이를 plot 한 그래프가 Figure 19으로 0.5~10 mM glucose 용액에 대한 potential 변화 slope는 6.138 mV/mM (± 0.4348), 검출 한계는 $0.3869 \pm 0.0284 \text{ mM}$ 로 나왔다. 이는 mM 단위의 glucose 농도에서 potential-glucose slope인 4~8 mV/mM에 포함되는 것을 확인할 수 있었다.²⁸⁾²⁹⁾

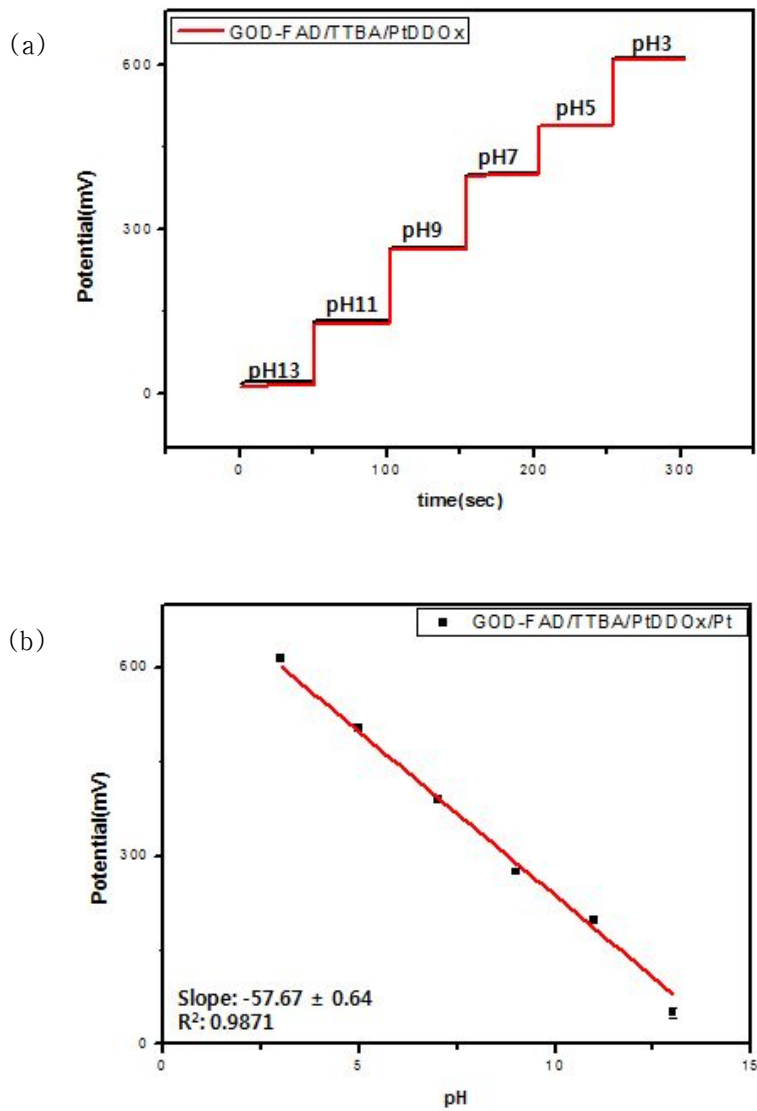


Figure 17. (a) Response of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt electrode to pH 3~13 buffer solution.

(b) E vs. pH plot of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt electrode.

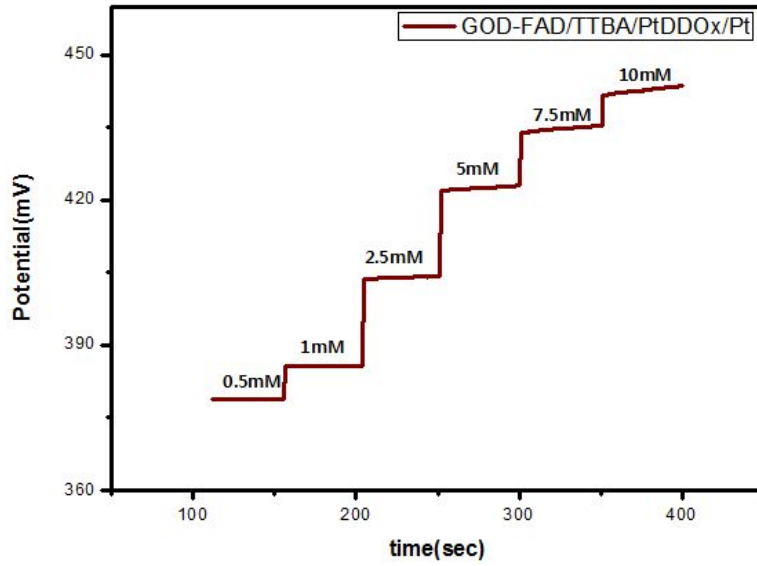


Figure 18. Response of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt electrode to 0.5~10 mM glucose solution. (6 mg/ml GOD-FAD was immobilized on the p-TTBA)

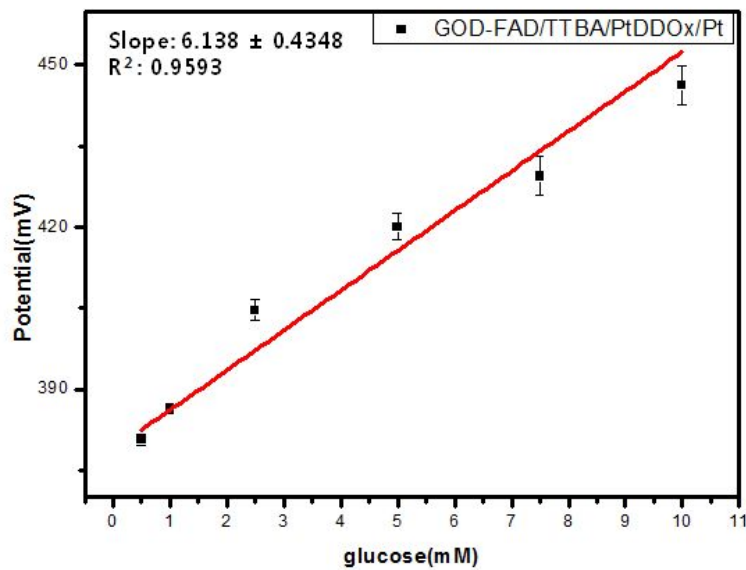


Figure 19. E vs. [glucose(mM)] plot of GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt electrode. (6 mg/ml GOD-FAD was immobilized on the p-TTBA)

Ⅲ-6. 혈액 분석

제안된 센서가 0.5~10 mM glucose 용액에서 response를 나타내었으므로 실제 사람의 혈액 샘플에 대한 glucose 농도 변화를 표준물 첨가법(standard addition method)으로 실험을 진행하였다. 혈액 샘플 2 ml에 농도가 다른 표준 용액을 차례로 첨가하면서 그에 따른 potential 변화를 측정하였다. Figure 20은 표준 용액이 첨가될 때 나타나는 potential 변화 그래프이다. Figure 21은 Figure 20의 결과를 plot한 그래프로 선형 회귀 방정식은 $y(\text{mV}) = 1.803(\pm 0.2298)x(\text{mM}) + 7.803(\pm 0.8851)$ 이고, 이때 $R^2 = 0.9412$ 로 나왔다. 실험에 사용한 혈액 샘플(n=6) 속의 glucose 농도가 4.901 ± 0.6338 mM로 측정되었다. 이 결과는 정상인의 혈액 속 glucose 농도인 4~7 mM³⁰⁾에 포함되는 농도로 이를 통하여 본 실험에서 제안된 센서의 실제 생물학적 샘플의 glucose 검출 가능성을 확인하였다.

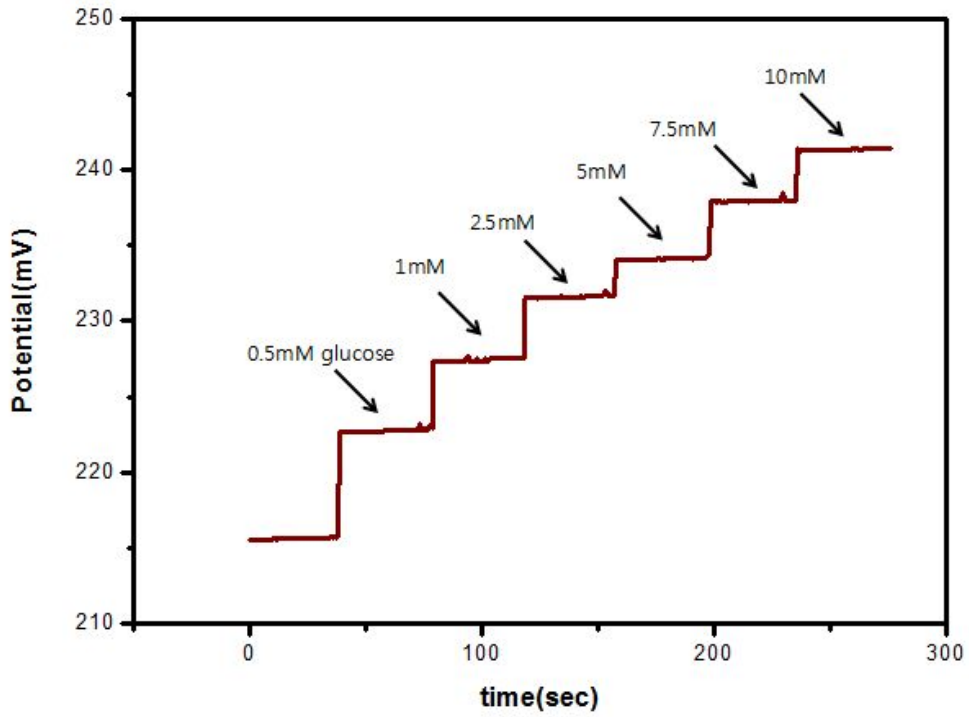


Figure 20. The corresponding standard addition plot of potential.

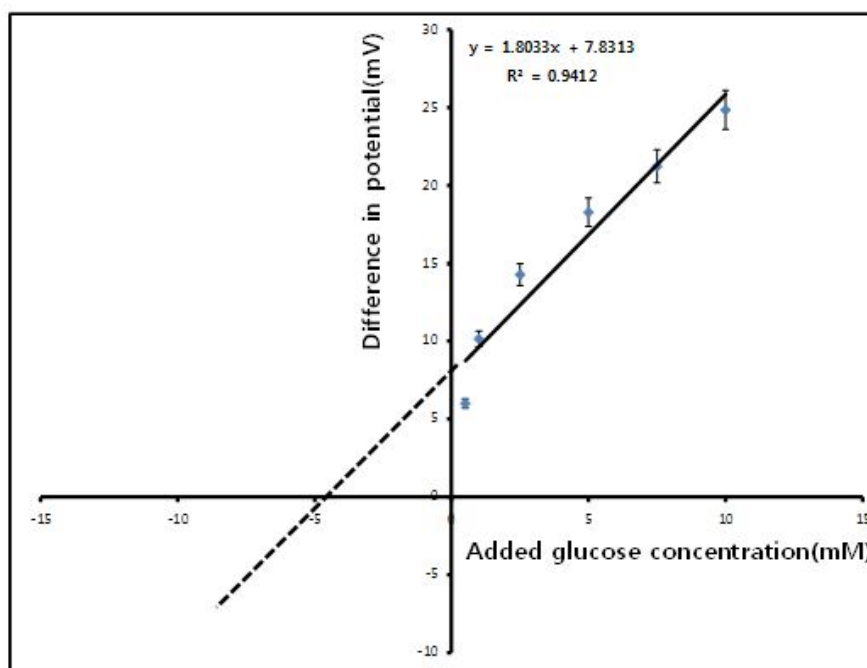


Figure 21. Potentiometric detection plot of glucose in the human blood sample by standard addition method.

IV. 결 론

본 연구에서는 Pt dendrite를 Pt 마이크로 전극에 전착시켜 pH response를 증가시키고 이 dendrite 층 위에 conducting polymer를 이용하여 glucose oxidase를 전극에 고정화시킨 당 센서를 제작하였다.

Pt 마이크로 전극 위에 Pt dendrite를 chronoamperometry를 이용하여 전기화학적으로 전착시킬 때, 5 mM $H_2Cl_6Pt \cdot 6H_2O$ 용액에서 IE: +1.0 V, VI: -0.3 V 전위를 1500초 동안 가하였을 때 Pt dendrite가 가장 잘 형성됨을 SEM image를 통하여 확인하였다. Pt bear, Pt Ox, Pt dendrite/Pt, Pt dendrite Ox/Pt, TTBA/Pt dendrite/Pt, TTBA/Pt dendrite Ox/Pt, Pt particle/Pt, TTBA/Pt particle/Pt, Pt particle Ox/Pt, TTBA/Pt particle Ox/Pt 전극의 pH 3~13까지의 buffer에 대한 potentiometric response 실험 결과, Pt 마이크로 전극 위에 dendrite, dendrite Ox, TTBA가 형성될수록 potential-pH slope (mV/pH)가 Nernst slope (59.2 mV/pH)에 가깝게 나타났다. 또한, TTBA/PtDDOx/Pt 전극 위에 GOD-FAD가 결합되었을 때도 pH response가 감소하지 않고 유지되는 것을 확인하였다.

Glucose를 검출하기 위한 바이오센서를 제작하는 최종 단계인 GOD-FAD를 poly-TTBA 표면 위에 결합시킨 후, XPS를 실시하였다. C1s, N1s, Pt4f, S2p, O1s peak 분석을 통해 각 단계의 전극 표면의 결합 상태를 확인하였으며, 이 XPS 분석을 통하여 전극에 conducting polymer에 GOD가 공유 결합을 통하여 immobilization 되었음을 확인하였다.

GOD와 glucose와의 potentiometric response를 확인하기 위해 먼저 GOD-FAD/TTBA/PtDDOx/Pt 전극의 0.1~10 mM glucose 용액(0.01 mM pH 7.4 PBS)에서의 potential 변화를 측정하였다. 이 결과 0.5~10 mM glucose 용액에 대한 potential 변화 slope가 6.138 mV/mM (± 0.4348)로 나왔다. 이

결과를 토대로 실제 샘플 즉, 혈액 샘플에 대한 potentiometric response를 표준물 첨가법을 이용하여 실시하였다. 그 결과 선형 회귀 방정식은 $y(\text{mV}) = 1.803(\pm 0.2298)x(\text{mM}) + 7.803(\pm 0.8851)$ 이고, 이 회귀 방정식에 따라 혈액 샘플(n=6) 속의 glucose 농도가 정상인의 혈액 속 glucose 농도인 4~7 mM에 포함되는 농도인 $4.901 \pm 0.6338 \text{ mM}$ 로 측정되었다.

따라서 본 연구에서 제작한 glucose 센서가 혈중 glucose 검출에 유용할 것이라고 판단된다.

V. 참고 문헌

1. Nelson R. stradiotto, maria Valnice B. Zanoi, J. Braz. Chem. Soc., 2003, 14, 2, 159–173
2. C. Locatelli and G. Torsi, ‘Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference’ J. Electroanal. Chem., 509, 80 (2001).
3. Z. Hu, C. J. Seliskar, and W. R. Heineman, ‘PANi corporated Nafion–modified petroscopic graphite electrodes for voltammetric stripping determination lead’ Anal. Chim. Acta., 369, 93 (1998).
4. Z. Chen, Z. Pourabedi, and D. B. Hibbert, ‘Stripping voltammetry of Pb(II), Cu(II), and Hg(II) at a Nafion–coated glassy carbon electrode modified by neutral ionophores’ Electroanalysis, 11, 964 (1999).
5. S. Maria da Silva, ‘Determination of lead in the absence of supporting electrolyte using carbon fiber ultramicroelectrode without mercury film’ Electroanalysis, 10, 722 (1998).
6. Xie, J.; Wang, S.; Aryasomayajula, L.; Varadan, V. K. *Nanotechnology*. 2007, 18, 065503–065512.

7. P. W. Carr, L. D. Browsers (Eds.), *Immobilized Enzyme in Analytical and Clinical Chemistry*, Wiley, New York, 1980.
8. A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V.
9. A. Heller, *Ace. Chem. Res.* 23 (1990) 128.
10. Y. Degani, A. Heller, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 1285.
11. M. Tominaga, Toshihiro Shimazoe, *Electrochemistry Communications* 7 (2005) 189
12. Pan Du, Ping Wu, Chenxin Cai, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 624 (2008) 21
13. R. Jin, Y. C. Cao, E. Hao, G. S. Metraux, G. C. Schatz, C. A. Mirkin, *Nature* 425 (2003) 487.
14. K. A. Dick, K. Deppert, M. W. Larsson, T. Martensson, W. Seifert, L. R. Wallenberg, L. Samuelson, *Nat. Mater.* 3 (2004) 380
15. P. K. Galenko, V. A. Zhuravlev, *Physics of Dendrites: Computational Experiments*, World Scientific, Singapore, 1994.
16. M. Sanles-Sobrido, M. A. Correa-Duarte, S. Carregal-Romero, B. Rodriguez-Gonzalez, R. A. Alvarez-Puebla, P. Herves, L. M. Liz-Marzan, *Chem. Mater.* 21 (2009) 1531.

17. J. K. Kawasaki, C. B. Arnold, C. B. Nano Lett. 11 (2011) 781.
18. Shaojun Guo, Shaojun Dong, and Erkang Wang, ACS nano, 4 (2010) 547
19. Nada F. Atta, Maher F. El-Kady, Sensors and Actuators B 145 (2010) 299
20. M. Josowicz and J. Janata, 'in Electroactive Polymers' ed. B. Scrosati, Chapman and Hall, New York, 1993, p. 310.
21. R. W. Murray, 'in Molecular Design of Electrode Surfaces' ed. R. W. Murray, Wiley, New York, 1992, p. 1.
22. A. Merz, 'Direct electrochemical redox of tyrosinase at silver electrodes' Top. Curr. Chem., 152, 49 (1990)
23. J. Heinze, 'Electronically conducting polymers' Top. Curr. Chem., 152, 1 (1990).
24. F. Bedioui, J. Devynck, and C. Bied-Charreton, 'Immobilization of metalloporphyrins in electropolymerized films: design and applications' Acc. Chem. Res., 28, 30 (1995).
25. Leonidas G. Bachas, Lawrence Cullen, Richard S. Hutchins and Donna L. Scott 'Synthesis, Characterization and electrochemical polymerization of eight transition-metal complexes of 5-amino-1,10-phenanthroline' J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1571 (1997).

26. Dong-Min Kim, Jang-Hee Yoon, Mi-Sook Won, Yoon-Bo Shim, 'Electrochemical characterization of newly synthesized polyterthiophene benzoate and its applications to an electrochromic device and a photovoltaic cell' *Electrochimica Acta*, Vol.67, (2012.04.15.), 201-207
27. Md. Aminur Rahman, Nak-Hyun Kwon, Mi-Sook Won, Eun Sang Choe, and Yoon-Bo Shim, 'Functionalized Conducting Polymer as an Enzyme-Immobilizing Substrate: An Amperometric Glutamate Microbiosensor for in Vivo Measurements' *Anal. Chem.*, 2005, 77 (15), 4854-4860
28. Tung-Ming Pan, Ming-De Huang. 'Development of high-HoTiO₃ sensing membrane for pH detection and glucose biosensing' *Sensors and Actuators B* 144 (2010), 139-145
29. Cheng-Wei Liao, Jung-Chuan Chou, Tai-Ping Sunc, 'Preliminary investigations on a glucose biosensor based on the potentiometric principle' *Sensors and Actuators B* 123 (2007), 720-726
30. Jinpeng Wang, Dan F. Thomas, Aicheng chen, 'Nonenzymatic Electrochemical Glucose sensor based on Nanoporous PtPb Networks' *Anal. Chem.* 80(2008), 997-1004

Abstract

We report pH and glucose sensors using the conducting polymer coated-Pt dendrite oxide probe. Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-ray photoelectron Spectroscopy (XPS) were employed to characterize the structural and morphological features of electrodeposited dendrite layer. The conductive polymer pH sensor was worked in the range of pH 3~13. The calibration plots exhibited a Nernst behavior (slope: -59.2 mV/pH) in the buffer solution. Additionally, the potentiometric analysis of glucose through monitoring pH change was performed, which was enzymatically generated on the sensor at the range from 0.5 mM to 10 mM with a sensitivity of $6.138 \pm 0.4348 \text{ mV/mM}$. In real blood sample analysis, the glucose concentration in human blood was found to be $4.901 \pm 0.6338 \text{ mM}$.