

## 항원인 마노산에 결합된 도파민을 이용한 전기화학적 면역 분석법

최영봉<sup>1</sup> · 전원용<sup>2</sup> · 김혁한<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>단국대학교 자연과학대학 화학과

<sup>2</sup>단국대학교 나노바이오의학과

(2014년 7월 16일 접수 : 2014년 8월 5일 채택)

## Electrochemical Immunoassay based on the Dopamine-antigen Conjugate for Detecting Hippuric Acid

Young-Bong Choi<sup>1</sup>, Won-Yong Jeon<sup>2</sup>, and Hyug-Han Kim<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>Department of Nanobiomedical Science & WCU Research Center, Dankook University,  
Cheonan 330-714, Republic of Korea

(Received July 16, 2014 : Accepted August 5, 2014)

### 초 록

이 논문에서는 체내에 존재하는 작은 유기물의 하나인 마노산을 빠르고 정량적으로 검출하기 위하여 전기화학적 면역분석법을 이용하였다. 마노산은 톨루엔이 인체에 노출되었을 때의 주된 신진 대사 물질로서 대표적인 생화학적 지표물질이다. 톨루엔 노출에 대한 신속하고 정확한 관찰은 산업현장에서 건강관리를 위하여 매우 중요하다. 그래서 마노산을 빠르고 정확하게 검출하기 위하여 전기화학적 면역분석법을 실시하였다. 본 연구에서 제시하는 새로운 면역분석방법은 전기화학적 활성물질의 하나인 도파민을 측정물질인 마노산과 직접 공유결합을 통하여 항원이 포함된 복합체를 합성하였다. 전기화학적 측면에서 도파민은 두 개의 하이드록시기를 가지고 있어 매우 뛰어난 산화/환원 신호를 보인다. 또한 도파민-마노산 복합물도 뛰어난 산화/환원 신호를 보이기 때문에 면역 분석에 적합하다. 도파민-마노산 복합물과 마노산의 항체와의 균질경쟁반응을 전기화학적 방법을 통하여 관찰하였다. 본 면역분석을 통하여 실시한 결과는 마노산의 농도가 0.010~2.500 mg/mL 까지 정량적으로 분석됨으로써 실제 면역 센서에 적용할 수 있음을 확인하였다.

**Abstract :** In this work, we describe an electrochemical immunosensor for simple, fast and quantitative detection of a urinary hippuric acid (HA). Urinary HA, of molecular weight 180 DA, is one of the major metabolites and biological indicators in toluene-exposed humans. Simple and ubiquitous monitoring of exposure to toluene is very important in occupational health care. We propose the electrochemical immunoassay based on the dopamine-antigen conjugate for detecting hippuric acid. Our electrochemical immunoassay system employs a conjugate of dopamine (DA) as an electrochemical active molecule and hippuric acid (HA) as an antigen. As an electrochemical aspect, dopamine (DA) containing two hydroxyl group can show excellent redox signal. Also, dopamine-tethered hippuric acid (DA-HA) shows the reversible redox signal in the immunoassay. The competition between HA and DA-HA generated electric signals

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

proportional to HA concentration. The electrochemical immunoassay was performed with DA-HA on the screen printed carbon electrodes (SPCEs), and then applies the mixture antigen (HA) and HA-antibody. The electrical signals were proportional to HA in the range of 0.010~2.500 mg/mL which is enough range to be used for the point-of-care.

**Keywords :** Hippuric acid, Dopamine, Electrochemical immunoassay

## 1. 서 론

전기화학 면역분석은 기존의 면역 분석과 달리 간단한 기기 구성, 상대적으로 낮은 가격, 소형화, 휴대성, 일회성 등의 장점을 지니고 있어 많은 연구가 되고 있다.<sup>1-3)</sup> 특히 sandwich-type의 전기화학 면역 분석은 높은 선택성과 신호의 증폭을 야기시켜 전기화학 면역 분석에 많이 응용되며 이 방법을 불균일 (Heterogeneous) 면역 분석법이라고 부른다.<sup>4,5)</sup> 불균일 전기화학 면역 분석법은 전극과 같은 고체 표면에 항원이나 항체를 고정시켜 준비 후 측정하고자 하는 항체나 항원에 전기 신호를 발생할 수 있는 산화/환원 매개체나 금속 나노 입자를 결합하고 전극 표면에서 고정시켜 신호를 발생하게 한다.<sup>6,7)</sup> 그러나 불균일 전기화학 면역 분석법은 고체 표면에 항원이나 항체 고정화에 대한 물리적 흡착과 공유결합이 임의의 경쟁성을 갖는다는 점과 낮은 특이성을 갖는다. 또한 불균일 전기화학 면역 분석법의 감도는 결합된 물질에 따라 다르고 전극 표면에 항원이나 항체를 고정하는 단계가 상당히 복잡하고 낮은 재현성을 가진다.<sup>8,9)</sup> 대조적으로, 항원과 항체를 액상에서 상호작용을 하는 균일 (Homogeneous) 전기화학 면역 분석법은 고체-액체 상 상호작용이 상당히 효율적이다. 또한 분균일 전기화학 면역 분석법과 비교하여 균일 전기화학 면역 분석법은 전극의 제작단계 및 세척단계가 없어 저렴하다.<sup>10,11)</sup> 하지만 감도면에서 균일 전기화학 면역 분석법이 불균일 전기화학 면역 분석법보다 대체적으로 작은 단점이 있어 비교적 높은 농도를 검출하는 면역 분석에 사용된다. 이러한 이유로 본 논문에서는 소변에서 비교적 높은 생리적 농도를 가지는 작은 유기분자인 마노산 (hippuric acid; HA)의 농도를 측정하기 위해 균일 전기화학 면역 분석법을 채택하였다.

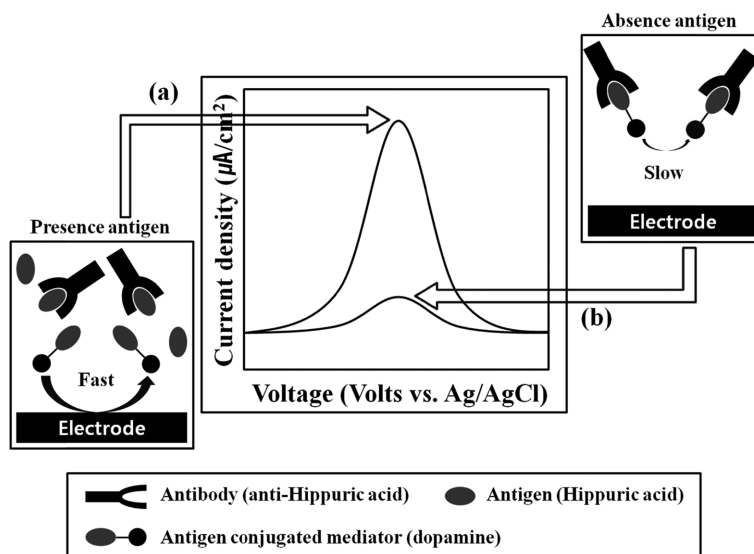
마노산은 톨루엔의 생체내 대사물질로 주된 오염원은 석유 정제과정, 코크스 오븐과정, 페인트, 잉크, 시너, 접착제, 화장품의 성분, 스티렌 등 화학물질의 생산 등에 의해 대기를 통하여 우리 몸에 노출 된다. 마노산은 톨루엔 노출 이외에도 딸기잼과 건포도뿐만 아니라 안식향산 나트륨과 같은 식품 첨가제가 함유된 음료수나 빵 등을 섭취하였을 때에도 소변으로 배출되기 때문에 톨루엔이 흡입되지 않은 정상인에서도

마노산이 어느 정도 검출 될 수 있다.<sup>12,13)</sup> 그렇기 때문에 존재 유무 측정이 아닌 일정 농도를 확인할 수 있는 정량적인 분석의 필요성이 대두 되었다.

균일 전기화학 면역 분석법을 시행하기 위해서는 우선 항원이나 항체에 전기화학적 신호 발생이 가능한 산화/환원 매개체를 결합 시켜야 한다. 지금까지 연구된 항원이나 항체에 결합된 물질은 페로센,<sup>14)</sup> 납 이온,<sup>15)</sup> 오스뮴<sup>16)</sup> 등이 있는데 대부분 금속 물질들로 가격이 비싸고, 결합하는 과정이 복잡하다는 단점이 있다. 이에 본 논문에서는 생물체 내에서 신경전달물질인 도파민 (dopamine; DA)을 사용하여 작은 유기 화합물 항원인 마노산과 간단한 펩타이드 공유결합 반응방법으로 결합하였고, dopamine-hippuric acid (DA-HA)의 분자량 또한 상대적으로 적어 적은 농도에서도 높은 전류 신호를 갖는 항원이 결합된 산화/환원 매개체를 합성하였다.

생물체 내에서 신경전달물질인 도파민은 파킨슨병, 정신 분열증 그리고 헌팅턴 질병과 같은 질병들과 관련된 물질로써 높은 전기화학적 활성을 갖는 물질이다. 도파민은 153.180 g/mol의 분자량을 갖는 작은 유기화합물이며 벤젠 고리에 하이드록사이드를 두개 가지고 있어 전자와 수소이온을 주고 받으며 산화/환원을 나타낸다. 또한 일차 아민기를 갖는 도파민은 카복실산을 갖는 분석 물질들과 쉽게 펩타이드 결합될 수 있어 전기 화학적 분석법에 쓰이기 위한 매개체로서 적합하다.<sup>17-20)</sup>

본 논문에서는 균일 전기화학 면역 분석법을 위해 항원이 결합된 DA-HA를 합성하였고, 이를 통해 경쟁 반응을 이용한 HA의 정량 분석을 시행할 수 있었다. 합성된 DA-HA의 고정된 농도와 HA의 농도 별 용액을 고정된 농도의 HA 항체(HA antibody; anti-HA)에 마이크로 튜브에서 일정 시간 동안 반응 시킨 후 스크린 프린트된 탄소 전극 (screen printed carbon electrodes; SPCEs)위에서 전기적 신호를 측정하였다. 이 때 HA의 농도가 증가하게 되면 경쟁적인 반응을 통해 anti-HA와 결합되고, 상대적으로 결합되지 못한 DA-HA가 증가하게 되어 자유로운 DA-HA의 전기 신호는 증가된다 (Scheme. 1(a)). 하지만 HA의 농도가 감소하게 되면 경쟁적인 반응을 통해 anti-HA에 DA-HA가 결합하게 되어 전극 표면에서 DA-HA의



**Scheme. 1.** Schematic illustrating the homogeneous electrochemical immunoassay. (a) In the presence of antigens, antibody is competitively combined with antigens (HA and DA-HA) expected high current. (b) In the absence of antigens, antibody is combined with the DA-HA expected low current.

신호는 큰 분자량의 anti-HA로 인해 원활하지 못한 확산 효과로 감소하게 된다 (Scheme. 1(b)). 즉, 용액 안에 존재하는 HA의 농도를 정량적으로 분석할 수 있었고, 이를 통해 항원의 농도를 정량적으로 분석할 수 있는 균일 전기화학 면역 분석법을 개발하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1 시약 및 기기

실험에 사용된 시약인 dopamine hydrochloride (DA), *N*-ethyl-*N'*-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), hippuric acid (HA), ethanol and sodium hippurate hydrate (NaHA)는 Aldrich(Milwaukee, WI)사의 제품을 정제 없이 그대로 사용하였고 위에 사용된 모든 시약은 분석시약 급이었다. 정제를 위한 TLC Silicagel plate (F254)와 Silica gel 60 (0.063~0.200 mm)은 Merck (Darmstadt, Germany)사의 제품을 사용하였다. Monoclonal HA antibody (anti-HA)와 immunochromatographic strip은 HBi (seoul, Korea)사에 의해 제공 받았다. 용액의 제조와 실험을 위하여 3차 증류수 (Millipore, Bedford, MA ; 저항 18 M·Ωcm)를 사용하였다.

전기화학 실험에서 작업 전극으로는, OHP(overhead projector film)위에 screen printing machine (BS-860AP, Bando, Korea)을 이용하여 탄소 잉크 (Electrodag, 423SS, Acheson, USA)를 인쇄하여 만든

screen printed carbon electrode (SPCE)를 사용하였고, 상대 전극과 기준 전극으로는 백금(Platinum)선과 Ag/AgCl 전극 (ESA, EE009)을 사용하였다.

순환 전압 전류법 (Cyclic Voltammetry; CV)과 시차 펄스 전압 전류법 (Differential pulse voltammetry; DPV) 측정을 하는데 사용된 기기는 CH Instruments (Austin, TX, USA)의 model 660B Electrochemical workstation을 사용하였다.

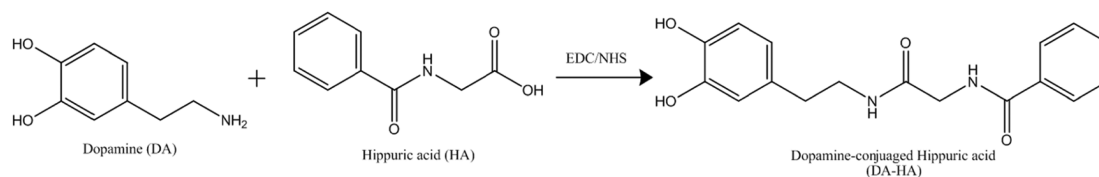
### 2.2 도파민이 결합된 마노산(DA-HA)의 합성

Dopamine hydrochloride (50.000 mg, 0.260 mmol)와 sodium hippuric hydrate (57.000 mg, 0.260 mmol)을 증류수 10 mL에 녹이고, EDC (101.000 mg, 0.520 mmol)와 NHS (60.200 mg, 0.520 mmol)를 첨가하여 1일 동안 질소 기체 하에 환류(refluxed) 시켰다. 반응 후 만들어진 생성물을 TLC를 이용하여 분리됨을 확인하였고, silica column을 이용하여 이동상으로 ethanol/ethyl acetate (5 : 5 wt %)을 이용하여 분리 정제 하였다.(Fig. 1)

합성된 DA-HA 생성물은 immunochromatographic strip, 그리고 순환 전압 전류법을 이용하여 확인하였다.

### 2.3 DA-HA와 anti-HA의 면역반응

Anti-HA와 합성된 DA-HA의 항원-항체 결합을 확인하기 위해, DA-HA의 농도를 1.000 mg/mL (in PBS, pH 7.4 containing 0.14 M NaCl)로 고정 한 20 μL와 다양한 농도의 anti-HA(0.000~10.000 mg/mL)



**Fig. 1. Preparation of dopamine-conjugated hippuric acid antigen (DA-HA).**

20  $\mu\text{L}$ 를 반응시켜 전극 위에서 시차 펄스 전압 전류법을 이용하여 측정하였다. 항원-항체 반응시간(incubation time)은 20 min이고, 이 조건은 기존의 논문을 참조하였다.<sup>16)</sup> 측정에 사용된 시차 펄스 전압 전류법의 조건은 전위의 범위가  $-0.200 \sim 0.120$  V, 진폭 변조 (modulation amplitude)는 0.050 V, 단계 전위 (step potential)는 0.004 V 그리고 scan rate은 0.100 V/sec였다.

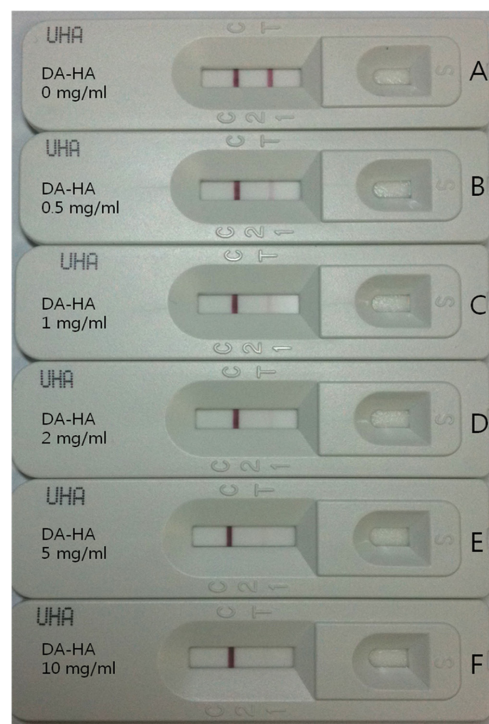
#### 2.4 DA-HA와 HA의 경쟁 반응

SPCE위에 최종 부피 40  $\mu\text{L}$ 에서 측정을 하기 위해 anti-HA 1.330 mg/mL, 15  $\mu\text{L}$  (최종 0.500 mg/mL), DA-HA 0.267 mg/mL, 15  $\mu\text{L}$  (최종 0.100 mg/mL)는 고정하고, HA의 농도를 다양하게 만들어 (10.000, 2.000, 1.000, 0.700, 0.300, 0.100, 0.000 mg/mL) 10  $\mu\text{L}$ 를 섞어 마이크로 튜브에서 20 min 간 반응시켰다. 반응에 참여한 HA의 최종 농도는 2.500, 0.500, 0.250, 0.175, 0.075, 0.025, 0.000 mg/mL 이다. 반응 후 SPCE위에 올려 시차 펄스 전압 전류법 (DPV)을 이용하여 측정하였다. 측정에 사용된 시차 펄스 전압 전류법의 조건은 전위의 범위가  $-0.200 \sim 0.100$  V, 진폭 변조 (modulation amplitude)는 0.050 V, 단계 전위 (step potential)는 0.004 V 그리고 scan rate은 0.100 V/sec였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 DA-HA의 합성 확인 및 전기화학적 특성

Fig. 2에서 immunochromatographic 검출 키트를 보면 DA-HA가 존재하면 검출 키트 test line(T)의 선이 없어지는 것을 볼 수 있다. immunochromatographic 검출 키트의 구조는 control line(C), test line(T), 검출 시료를 넣는 S로 구성되어 있다. 검출 시료를 넣는 S는 anti-HA에 골드 콜로이드 입자(anti-HA-Au)가 연결된 물질이 고정되어 있어, 용액을 들어 오면 용액에 녹아 들어가 T와 C의 방향으로 흘러 들어간다. 이때 T에는 HA 항원이 고정되어있어, 검출 시료 안에 HA가 존재하지 않으면 anti-HA-Au가 항원-항체 반응으로 결합 되 붉은 선이 나타나게 되고 검출 시료 안에 HA가 존재 하면 anti-HA-Au가 검출 시료 안의 HA와 선 결합 되 T line에 결합되지 않으므로 색이 보이지 않는다.<sup>13)</sup> 즉 검출 시료 안의 HA의



**Fig. 2. Immunochromatographic detection of DA-HA.** The PBS spiked with various concentrations of DA-HA were assayed. Analysis was completed within less than 2 minutes.

존재 유무를 확인할 수 있다. C line은 어떤 항체도 결합할 수 있는 이차 항체(second antibody)가 연결되어 있어 키트의 올바른 작동 여부를 알 수 있다. Fig. 2의 결과에서 보면 측정 시료 안에 DA-HA가 존재하지 않을 때는 T와 C의 붉은 색 선이 보이지만, (Fig. 2(A)) 0.500 mg/mL이상 에서는 T line이 점점 없어지는 것을 확인할 수 있고, (Fig. 2(B-F)) 이는 DA에 HA가 결합되어진 것을 입증 할 수 있다. 또한 이 키트의 검출 한계는 1.000 mg/mL의 HA임을 감안할 때, 합성된 DA-HA의 분자량이 HA 보다 대략 2배 가까이 커 2.000 mg/mL에서 확실히 T line이 없어지는 것으로 보아 반응 후 초기 물질의 정제 또한 된 것을 알 수 있었다.

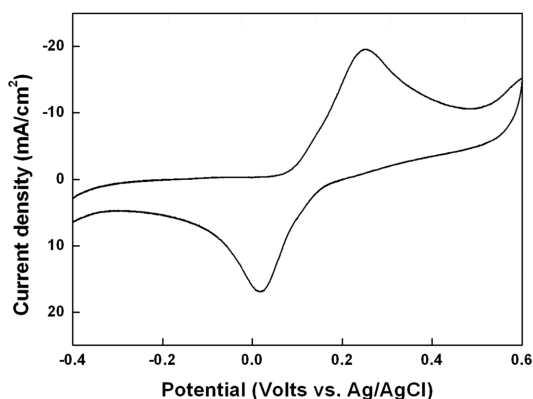


Fig. 3. Cyclic voltammograms of DA-HA (1.00 mg/mL) dissolved in 0.1 M PBS (pH 7.4) with 0.14 M NaCl at a scan rate of 0.100 V/s on SPCE.

Fig. 3은 순환 전압 전류법으로 측정된 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS ; pH 7.4 containing 0.14 M NaCl)에서 1.000 mg/mL의 DA-HA의 결과이다. DA-HA의 전기화학적 신호를 보면 0.253 V에서 산화 신호와 0.016 V에서 환원 신호가 나타남을 확인 할 수 있었고, 이는 DA-HA가 빠르고, quasi-reversible한 산화/환원 전자 전달체임을 알 수 있었다.

### 3.2 DA-HA와 anti-HA의 면역반응

Anti-HA와 결합된 DA-HA는 큰 분자량 (약 150,000 Da)의 anti-HA에 의해 확산 계수 (diffusion coefficient)가 작아지고 이로 인해 전극으로의 물질전달 (mass transfer)이 어려워져서 전류 신호가 작게 나온다. 이를 이용하여 anti-HA 농도 (0.000~10.000 mg/mL)를 달리하여 DA-HA 1.000 mg/mL과 튜브에서 반응 후 SPCEs에서 시작 펄스 전압 전류 신호 (DPV)를 측정하였다.

실제 농도는 anti-HA와 DA-HA가 20  $\mu$ L 씩 튜브에서 반응 하여 DA-HA의 농도는 0.500 mg/mL, anti-HA의 농도는 0.000~5.000 mg/mL 이었다. 이 때

가해진 전위의 범위는  $-0.200 \sim 0.120$  V이고, scan rate은 0.100 V/sec이었다.

Fig. 4(a)의 신호를 보면 anti-HA가 존재 하지 않을 때, DA-HA의 신호는 전극으로의 원활한 전자 전달 반응으로 본래의 환원 전류를 나타내지만 anti-HA와 반응하게 되면 상대적으로 큰 분자량을 갖는 anti-HA의 결합으로 인해 용액상에서의 확산이 느려지게 되고 또한 전극으로의 전자 전달을 방해 받게 된다. 확산이 느려지는 결과로 본래의 환원 신호가 0.016 V에서  $-0.030$  V로 치우침을 볼 수 있고, 항체의 농도가 5.000 mg/mL 이상에서는  $-0.065$  V까지 전위가 이동됨을 확인하였다. 여러 전극을 이용한 측정에서 측정 시 마다 발생하는 기준 오차를 제거하여 Fig. 4(b) 결과를 얻을 수 있었다. 이는 측정에 사용한 작업 전극인 제작된 SPCE가 전극 마다 약간의 저항 차이로 인해 모든 시작 전류(initial current)를  $0.000 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 으로 보정하였다.

Fig. 4(C)의 곡선은 Fig. 4(B)를 이용하여 각각의 anti-HA 농도에 따른 전위의 위치 중 전류 값이 최고 점인 지점으로 도식한 것이다. 이때 anti-HA의 농도가 0.500 mg/mL까지는 크게 감소하다가 이후로는 포화 (saturation) 상태가 되어 anti-HA가 DA-HA와 더 이상 결합할 수 없는 한계전류에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. 이 때의 anti-HA와의 incubation time은 20 min 이었고, 이는 다른 전극으로 4회 실험하여 반복적인 재현성 (reproducibility)을 얻을 수 있었다. ( $RSD = 4.56\%$ )

환원 전류를 기준으로 측정한 이유는 산화 전류의 위치가 0.250 V 이상이며 이때 실제 소변이나 혈액에서 측정을 하게 되면 ascorbic acid, uric acid, urea와 같은 방해 물질에 의한 간섭효과로 정확한 측정이 어렵기 때문에<sup>21)</sup> 환원 전류를 측정하였다.

### 3.3 경쟁 반응을 통한 HA의 정량 분석

DA-HA와 HA의 경쟁 반응을 통한 anti-HA와의 항

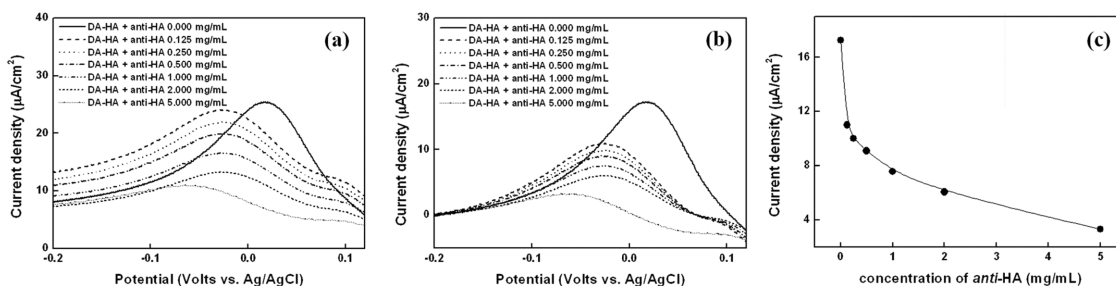


Fig. 4. (a) Differential pulse voltammograms (DPV) of DA-HA (0.500 mg/mL) with variable anti-HA concentration ranging from 0.000 to 5.000 mg/mL. (b) Rearranged DPV of (a). (c) Data of high current peaks of (b) were collected after arranging the base line.

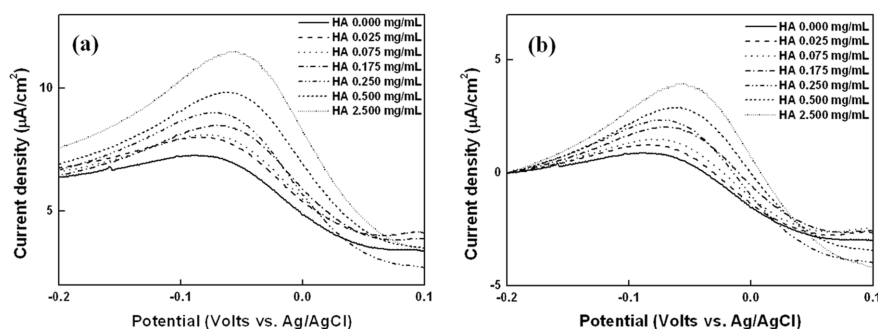


Fig. 5. (a) DPV of DA-HA (0.100 mg/mL) with variable HA concentration ranging from 0.010 to 2.500 mg/mL. (b) Rearranged DPV of (a). Reaction condition : fixed anti-HA concentration of 0.500 mg/mL, in 0.1 M PBS (pH 7.4 with 0.14 M NaCl).

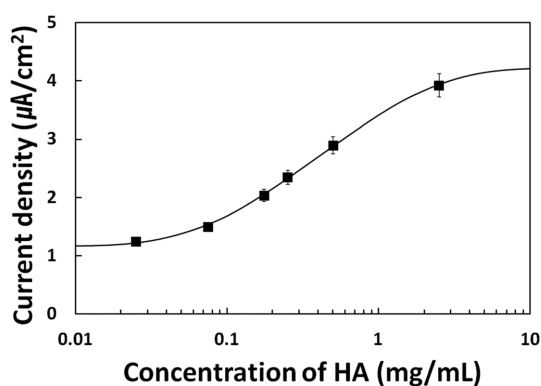


Fig. 6. Calibration curve of the anodic DPV peak current of 0.100 mg/mL of DA-HA versus logarithm of HA concentrations ranging from 0.010 to 2.500 mg/mL.

원-항체 결합을 통해 HA의 정량적 분석을 시행하였다. 고정된 농도의 anti-HA (0.500 mg/mL)와 DA-HA (0.100 mg/mL)에 다양한 농도의 HA를 튜브에 섞어 20 min간 반응시킨 후 SPCE 에서 측정하였다. Fig. 5(a)에서 HA가 존재하지 않을 때는 DA-HA와 anti-HA의 반응으로 전극으로의 전자 전달이 원활 하지 않아 신호가 감소하는 것을 확인 할 수 있는데, HA의 농도가 증가 할수록 DA-HA와의 경쟁적 반응으로 anti-HA에 결합하여 anti-HA에 결합되지 않는 DA-HA의 신호가 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 DA-HA가 anti-HA에 결합되지 않을수록 신호의 위치도 양의 전위(positive potential)로 이동됨을 알 수 있었다. 이 결과 또한 여러 전극으로 측정 시 발생하는 기준 오차를 제거하여 Fig. 5(b) 결과를 얻을 수 있었다. 이는 측정에 사용한 작업 전극인 제작된SPCE가 전극 마다 약간의 저항 차이로 인해 모든 시작 전류(initial current)를 0.000  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 으로 보정하였다. Anti-HA와의 면역반응에서는 0.500 mg/mL 농도의 DA-HA를 이용하여 실험하였지만 경쟁 반응을 더욱

원활히 하기 위해 이 실험에서는 DA-HA의 농도를 0.100 mg/mL으로 시행하였고, 이를 통해 더욱 민감한 면역 분석을 시행할 수 있었다. Fig. 6의 결과는 전류가 나타나는 전위의 위치 중 전류 값의 최고점인 지점을 고정하여 도식화한 것이다. 환원 전류의 증가는 검출 범위 0.010~2.500 mg/mL에서 HA 농도의 로그 값에 비례하였고, limit of detection(LOD)는 0.005 mg/mL이었다. ( $N=4$ ,  $R^2=0.9720$ ). 실제 사람의 소변 안에 존재하는 HA의 cutoff concentration이 2.000 mg/mL 을 감안할 때,<sup>13)</sup> 다음의 결과는 전기화학적 면역 분석의 성공적인 결과라 할 수 있다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 톨루엔 검출을 위한 체내 대사물질인 HA을 전기화학적 면역센서에 응용하였다. HA은 전기적 활성을 띄지 않는 물질이기 때문에 이를 전기화학적 방법을 통해 검출하기 위하여 아마이드 결합을 통해 DA을 배위시켜 DA-HA를 합성하였다. 합성된 DA-HA는 HA를 정성적으로 검출하는 immunochromatographic 검출 키트를 통해 확인하였고, 순환 전압 전류법을 이용하여 전기화학적 산화/환원 매개체로서의 우수한 성능을 확인하였다. 면역반응을 위하여 anti-HA와의 항원-항체 결합을 시켜 환원 전류 신호의 감소와 전위에 이동을 확인하였고, 균일한 방법으로 HA와의 경쟁반응을 통해 측정한 결과 HA의 농도가 증가함에 따라 전류 값도 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 환원 전류의 값이 Ag/AgCl 전극을 기준으로 0.016 V 근처에서 측정되기 때문에 소변이나 혈액에 존재하는 방해물질의 간섭을 피할 수 있었다. 이러한 결과는 다양한 전기화학적 분석에 적용할 수 있고, 이를 통해 건강 관리 분야 (healthcare area)에서 현장진단 (point-of-care)에 사용 될 수 있다고 사료된다.

## Acknowledgment

본 연구는 2014년도 산학협력대학 LINC사업단 산학 공동 기술 개발과제사업을 통하여 수행하였습니다.

## 참고문헌

1. X. M. Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Q. Liu, W. Q. Lai, and D. P. Tang, 'Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review' *Anal. Chim. Acta.*, **758**, 1 (2013).
2. Q. Gao, J. M. Han, and Z. F. Ma, 'Polyamidoamine dendrimers-capped carbon dots/Au nanocrystal nanocomposites and its application for electrochemical immunosensor' *Biosens. Bioelectron.*, **49**, 323 (2013).
3. A. Warsinke, A. Benkert, and F. W. Scheller, 'Electrochemical Immunoassay' *Anal. Chem.*, **366**, 622 (2000).
4. L. Ding, A. M. Bond, J. P. Zhai, and J. Zhang, 'Utilization of nanoparticle labels for signal amplification in ultrasensitive electrochemical affinity biosensors: A review' *Anal. Chim. Acta.*, **797**, 1 (2013).
5. L. J. Bai, R. Yuan, Y. Q. Chai, Y. Zhuo, Y. L. Yuan, and Y. Wang, 'Simultaneous electrochemical detection of multiple analytes based on dual signal amplification of single-walled carbon nanotubes and multi-labeled graphene sheets' *Biomaterials.*, **33**, 1090 (2012).
6. J. M. Fowler, D. K. Y. Wong, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Recent Developments in Electrochemical immunoassay and Immunosensors", 115, Elsevier, Oxford, (2008).
7. J. Yakovleva and J. Emneus, "Electrochemical Immunoassays", 377, Wiley, Chichester, (2008).
8. M. Dequaire, C. Degrand, and B. Limoges, 'An Immunomagnetic Electrochemical Sensor Based on a Perfluorosulfonate-Coated Screen-Printed Electrode for the Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid' *Anal. Chem.*, **71**, (1999).
9. L. J. Kricka, "Advantages and Disadvantages of Different Labels in Immunoassay", 37, American Chemical Society for Microbiology, Washington, DC, (1992).
10. K. Di Gleria, H. A. O. Hill, C. J. McNeil, and M. J. Green, 'Homogeneous ferrocene-mediated amperometric immunoassay' *Anal. Chem.*, **58**, 1203 (1986).
11. H. Funabashi, Y. Tanaka, Y. Imamura, M. Mie, T. Manabe, H. Tanaka, T. Takahashi, H. Handa, M. Aizawa, and E. Kobatake, 'Glucose oxidase assisted homogeneous electrochemical receptor binding assay for drug screening' *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1675 (2006).
12. E. M. Alvarez-Leite, A. Duarte, N. M. Barroca, and N. S. Silveira, 'Possible Effects of Drinking and Smoking Habits on Hippuric Acid Levels in Urine of Adults with No Occupational Toluene Exposure' *J. Occup. Health.*, **41**, 112 (1999).
13. H. M. Park, S. H. Lee, H. S. Chung, O. H. Kwon, K. Y. Yoo, H. H. Kim, S. C. Heo, J. S. Park, and G. S. Tae, 'Immunochromatographic Analysis of Hippuric Acid in Urine' *J. Anal. Toxicol.*, **31**, 347 (2007).
14. N. J. Forrow, N. C. Foulds, J. E. Frew, and J. T. Law, 'Synthesis, Characterization, and Evaluation of Ferrocene-Theophylline Conjugates for Use in Electrochemical Enzyme Immunoassay' *Bioconjugate Chem.*, **15**, 137 (2004).
15. I. A. Alam and G. D. Christian, 'Voltammetric Determination of Lead Labelled Albumin and of Albumin Antiserum by Immunoassay' *Anal. Lett.*, **15**, 1449 (1982).
16. W. Y. Jeon, Y. B. Choi, and H. H. Kim, 'Homogeneous Electrochemical Detection of Hippuric Acid in Urine Based on the Osmium-Antigen Conjugate' *ChempysChem.*, **14**, 2331 (2013).
17. D. Zhan, S. Mao, Q. Zhao, Z. Chen, H. Hu, P. Jing, M. Zhang, Z. Zhu, and Y. Shao, 'Electrochemical Investigation of Dopamine at the Water/1,2-Dichloro-ethane Interface' *Anal. Chem.*, **76**, 4128 (2004).
18. T. Łuczak, 'Preparation and characterization of the dopamine film electrochemically deposited on a gold template and its applications for dopamine sensing in aqueous solution' *Electrochimica Acta.*, **53**, 5725 (2008).
19. Z. Su, Y. Liu, Q. Xie, L. Chen, Y. Zhang, Y. Meng, Y. Li, Y. Fu, M. Ma, and S. Yao, 'Preparation of thiolated polymeric nanocomposite for sensitive electroanalysis of dopamine' *Biosens. Bioelectron.*, **36**, 154 (2012).
20. F. Shang, L. Zhou, K. A. Mahmoud, S. Hrapovic, Y. Liu, H. A. Moynihan, J. D. Glennon, and J. H. T. Luong, 'Selective Nanomolar Detection of Dopamine Using a Boron-Doped Diamond Electrode Modified with an Electropolymerized Sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin-Doped Poly(N-acetyltyramine) and Polypyrrole Composite Film' *Anal. Chem.*, **81**, 4089 (2009).
21. J. Wang, J. Llu, L. Chen, and F. Lu, 'Highly Selective Membrane-Free, Mediator-Free Glucose Biosensor' *Anal. Chem.*, **66**, 3600 (1994).