

세계의 오스뮴 고분자를 이용한 요산의 전기화학적 측정방법

전원용² · 최영봉^{1*}

¹단국대학교 자연과학대학 화학과

²단국대학교 나노바이오 의과학과

(2016년 3월 21일 접수 : 2016년 4월 11일 채택)

Electrochemical Detection of Uric Acid using Three Osmium Hydrogels

Won-Yong Jeon² and Young-Bong Choi^{1*}

¹Department of Chemistry, College of Natural Science, Dankook University, Anseo-dong, Cheonan, Chungnam, 330-714, Republic of Korea

²Department of Nanobiomedical Sciences and BK21 PLUS NBM Global Research Center for Regenerative Medicine, Dankook University, Anseo-Dong, Cheonan, Chungnam 330-714, Republic of Korea

(Received March 21, 2016 : Accepted April 11, 2016)

초 록

전기화학적 방법을 통한 요산 (Uric acid) 정량분석을 위해 수용성 고분자 (hydrogel polymer)를 배워시킨 오스뮴 고분자 화합물과 요산 산화효소 (Uricase), 가교를 위한 PEGDGE (poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)가 혼합된 용액을 스크린 프린팅된 탄소 전극 (SPCEs) 위에 흡착하여 측정하였다. 수용성 오스뮴 고분자의 전위를 조절하기 위해 리간드인 피리딘링의 4번 위치에 다른 전기음성도의 작용기를 갖는 오스뮴 고분자 화합물을 합성하였다. 합성된 오스뮴 고분자 화합물은 PAA-PVI (Poly(acrylic acid)-poly(vinyl imidazole)-[osmium(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺), PAA-PVI-[osmium(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺, PAA-PVI-[osmium(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺이다. 제작된 효소전극은 순환전압전류법 (cyclic voltammetry)을 통해 uric acid에 의한 오스뮴 고분자 화합물들의 산화 촉매 전류 (oxidation catalytic current)를 측정하여 uric acid의 농도를 정량적으로 분석할 수 있었다. 오스뮴 고분자 화합물들 중 0.215 V의 산화환원 전위를 갖는 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺ (PAA-PVI-osmium(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl)⁺²⁺ 화합물을 이용하여 대표적인 간섭물질인 아스코르브산 (AA)과 포도당 (glucose)의 산화 신호의 간섭효과를 피할 수 있었다. 이를 이용하여 제작된 전극은 0.33 V 전위에서 다양한 농도의 uric acid (1.0, 1.5, 2.0, and 5.0 mM)의 전류를 측정한 결과 $r^2 = 0.9986$ 의 좋은 선형성을 갖는 것을 확인하였다. 이는 복잡하지 않은 간단한 방법과 일회용의 전극을 사용하기 때문에 현장현시 검사 (point of care; POC)에 적합한 요산측정용 바이오센서로서의 가능성을 확인 할 수 있었다.

Abstract : Screen printed carbon electrodes (SPCEs) with immobilized osmium-based hydrogel redox polymer, uricase and PEGDGE can be used to apply uric acid electrochemical detecting. The osmium redox complexes were synthesized by the coordinating pyridine group having different functional group at 4-position with osmium compounds. The synthesized poly-osmium hydrogel complexes are described as PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺, PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺, PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺. The different concentrations of uric acid were measured by cyclic voltammetry technique using enzyme-immobilized SPCEs. The prepared

*E-mail: chem0404@dankook.ac.kr

SPCEs using PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]^{+/2+} showed no interference from common physiologic interferences such as ascorbic acid (AA) or glucose. The resulting electrical currents at 0.33 V vs. Ag/AgCl displayed a good linear response with uric acid concentrations from 1.0 to 5.0 mM. Therefore, this approach allowed the development of a simple, point of care in the medical field, disposable electrochemical uric acid biosensor.

Keywords : Uric acid, Electrochemical biosensor, Poly-osmium hydrogel complex, Uricase, Mediated electron transfer (MET)

1. 서 론

요산 (Uric acid; UA)은 탄소와 질소, 산소, 수소로 이루어진 화합물이고, 신장 (kidney)과 장관(intestinal tract)의 퓨린 대사물질로 배설되는 최종 산물이다.^{1,2)} Uric acid는 보통 혈청이나 소변과 같은 체액 안에서 발견되는 중요한 생물학적 분자로서 정상적인 사람들의 체내 uric acid 수치는 혈청에서 0.13-0.75 mM, 소변에서 1.49-4.46 mM 정도 존재한다고 밝혀져 있다.³⁻⁵⁾ 퓨린 생합성 및 이화작용과 관련된 장애 또는 문제로 인해 이 범위를 벗어나 비정상적인 uric acid의 수치가 지속되면 여러 가지 질병들이 발병한다. 대표적인 질병으로는 통풍, 고노산혈증, 레쉬-니한 증후군과 백혈병, 폐렴, 관절염, 당뇨병, 신장 및 심혈관 질환 등이 있다. 그러므로 정상범위를 벗어나는 uric acid의 수치는 생체지표로 활용될 수 있고, uric acid 수치를 지속적으로 측정하는 것은 위와 같은 질병의 예방 및 조기 발견에 있어 중요한 역할을 할 수 있다.⁶⁻⁸⁾

Uric acid의 수치를 측정하는 방법은 비색법, 화학발광, 형광, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), 분광광도법, 모세관 전기이동 등과 같이 다양한 방법이 사용 가능하다.^{5,9-13)} 그러나 위에 언급된 측정법들은 복잡한 과정, 장시간 (time-consuming), 소형화 문제 등으로 인해 사용이 불편하지만, 전기화학 방법을 이용한 uric acid의 측정은 빠르고, 간편하고, 경제적이며 높은 선택성과 감도를 갖는 바이오센서로서 제작하기가 쉬워 많은 연구가 되어지고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾

전기화학 방법을 이용한 uric acid의 측정은 다양한 전극 위에서 효소 없이 (무 효소, nonenzymatic) 측정되는 방법과 효소를 포함하여 (enzymatic) 측정하는 방식으로 나뉜다.⁴⁾ Uric acid는 전기화학적 활성 물질로써 수용액상에서 전극 표면에 자체 산화되기 때문에 효소 없이 전기화학 신호를 얻어낼 수 있다. 그러므로 다양한 전극; 금속 나노합금 (metal nanoalloy), 그래핀 (graphene), 전도성 고분자 (conducting polymer) 등을 제작하여 uric acid의 농도를 간단하고, 높은 감도로 측정하는 nonenzymatic 전기화학 방법이 많이 연구되어 졌다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 그러나 이러한 방법은 생체

내에 존재하는 아스코르브산 (ascorbic acid ; AA)이 산화되는 전위와 uric acid의 산화되는 전위가 근접하고 있어, 전기 신호가 겹쳐 측정의 선택성이 떨어지는 문제가 발생된다.²⁰⁾ 이러한 점을 극복하기 위해 전극 표면 위에 금속 나노입자 (metal nanoparticles)나 conducting polymer를 고정화하여 AA의 간섭효과를 막는 연구가 진행되었지만, 이로 인해 uric acid의 산화 전류가 감소하여 nonenzymatic 전기화학 방법은 여전히 문제점을 가지고 있다.²¹⁻²²⁾ 반면에 enzymatic 측정 방식은 높은 선택성과 감도를 갖기 때문에 위의 문제를 해결할 수 있는 장점을 가지고 있다. 효소를 이용하여 uric acid를 측정하는 방식은 uric acid가 요산 산화 효소 (uricase)에 의해 산화될 때 발생하는 과산화 수소 (H₂O₂)나 감소되는 산소 (O₂)의 농도를 전기적으로 측정하는 방법이 제안되었다.²³⁻²⁶⁾ 하지만 이 방법들은 과산화 수소의 산화 전위가 uric acid 자체의 산화 전위와 겹치는 문제와 산소 포화도의 영향에 의해 낮은 정확성의 문제점이 있다.^{27,28)} 이러한 문제점을 해결하기 위해 uric acid가 uricase에 의해 산화될 때 발생하는 전자를 인공적인 산화/환원 매개체 (redox mediator)가 전극으로 전달함으로써 redox mediator의 전기 신호를 상대적으로 측정하는 방법이 연구되어 졌다. Redox mediator를 이용한 방법 (Mediated electron transfer; MET)은 전기화학적 포도당 센서 (glucose sensor)에서 많이 사용되어진 방법으로 효소의 내부 혹은 외부에 위치하고 있는 활성 중심과 전극 사이 전자전달 반응을 빠르게 진행할 수 있다.^{29,30)} 또한 uric acid가 갖는 높은 산화 전위보다 더 낮은 산화 전위를 갖는 redox mediator를 이용하여 uric acid의 농도를 결정할 수 있어 생체 내에 존재하는 방해 물질로부터의 간섭을 피할 수 있고 높은 선택성과 감도를 얻을 수 있다.³⁰⁾ 현재까지 uric acid정량을 위한 MET 방법 중 redox mediator로서는 오스뮴 화합물 (osmium complexes), 페로센 (ferrocene), tetracyanoquinodimethane (TCNQ) 과 페리시아나이드 (ferricyanide)가 연구되어 왔다.³⁰⁻³³⁾ 그러나 작은 분자량의 redox mediator는 확산(diffusion)효과가 나타나고 효소와의 전자 전달 반응이 용이하지 못하며, 전극 표면 위에 고정화 하는 방

법이 매우 복잡한 과정을 지닌다는 단점을 가지고 있다.³¹⁾

본 논문에서는 이러한 단점을 보완하기 위하여 오스뮴에 수용성 고분자 (hydrogel polymer)를 배워시킨 오스뮴 고분자 화합물들을 합성하여 사용하였다. 사용된 오스뮴 고분자 화합물은 Poly(acrylic acid)-poly(vinyl imidazole)-[osmium(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺ (PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]), Poly(acrylic acid)-poly(vinyl imidazole)-[osmium(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺, (PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]), Poly(acrylic acid)-poly(vinyl imidazole)-[osmium(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺ (PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]) 이고, 고분자에 결합된 오스뮴 화합물은 피리딘링의 4번 위치에 전자를 끄는 치환기 (electron-withdrawing substituents)나 전자를 주는 치환기 (electron-donating substituents)를 배워하여 여러 위치의 전위에서 uric acid의 전기화학적 반응을 관찰할 수 있었다.^{34,35)} 합성된 오스뮴 고분자 화합물은 가교제 (cross-linking agent)와 uricase를 일정 비율로 섞어 일회용 (disposable)의 스크린 인쇄방법으로 만든 탄소전극 (screen printed carbon electrodes, SPCEs) 위에 고정화 하였다. 제작된 전극은 순환전압전류법 (cyclic voltammetry)을 통해 오스뮴 고분자 화합물들의 산화 촉매 전류 (oxidation catalytic current)를 측정하여 uric acid의 농도를 정량적으로 분석할 수 있었다. 또한, 오스뮴 고분자 화합물의 전위를 이용하여 대표적인 간섭물질인 AA와 포도당 (glucose)의 산화 신호의 간섭효과를 피할 수 있게 하였다. 이렇게 제작된 전극은 다른 방해 요소들의 간섭을 받지 않고 uric acid에만 선택적으로 감응한다는 것을 증명하였고, 복잡하지 않은 간단한 방법과 일회용의 전극을 사용하기 때문에 현장현시 검사 (point of care; POC)에 적합한 바이오센서로서의 가능성을 확인 할 수 있었다.

2. 실험 방법

2.1 시약 및 시료

실험에 사용된 시약인 ammonium hexachloroosmate(IV), 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine, 4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine, ammonium persulfate, sodium hydroxide, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, D-(+)-glucose, poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE), 는 Aldrich (Milwaukee, WI) 사의 분석시약 급 제품을 정제 없이 그대로 사용하였다. Uricase (from *Bacillus SP.* 5.39 U/mg) 효소는 일본의 Toyobo 회사에서 구매하였다. 모든 용액의 제조와 실험을 위하여 3차 증류수 (Millipore, Bedford, MA; 저항 18 M $\cdot\Omega$ cm,

distilled water ; DW)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 SPCEs (0.07065 cm²)를 사용하였고, 상대 전극과 기준 전극으로는 백금 (Platinum)선과 Ag/AgCl 전극 (ESA, EE009)을 사용하였다. 순환 전압 전류법 (Cyclic Voltammetry; CV)을 측정을 하는데 사용된 기기는 CH Instruments (Austin, TX, USA)의 model 660B Electrochemical workstation을 사용하였다.

2.2 수용성 mediator들의 합성

실험에 사용된 mediator들인 Poly(acrylic acid)-poly(vinyl imidazole)-[osmium(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺, PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺, Poly(acrylic acid)-poly(vinyl imidazole)-[osmium(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺, PAA-PVI-[Os(dmebpy)₂Cl]⁺²⁺, Poly(acrylic acid)-poly(vinyl imidazole)-[osmium(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺, PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺는 이전 논문들을 참조해 직접 합성하여 사용하였다.³⁶⁻³⁸⁾ 우선 1.0 L 등근바닥 플라스크에 24.0 g (0.333 mol)의 acrylic acid를 넣고 1-vinylimidazole을 7.0 mL (0.077 mol) 가량을 넣은 후 DW 150.0 mL를 첨가하여 40°C에서 교반 하며 녹였다. 여기에 0.69 mL (4.6 mmol)의 가교제 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine을 DW 50.0 mL에 녹인 혼합액과, 잘 건조된 개시제 ammonium persulfate (0.6 g (2.63 mmol) in DW of 150.0 mL) 용액을 함께 섞은 후에 30분간 교반 하며 폴리머 반응을 하였다. 반응이 끝난 후 4°C에서 2.0 L의 methanol에 천천히 떨어뜨리며 재침전하여 파우더를 얻었고 감압하여 수득하였다. 준비된 각각의 Os(dCl-bpy)₂Cl₂ (17.65 mg, 0.025 mmol), Os(dme-bpy)₂Cl₂ (15.73 mg, 0.025 mmol) 그리고 Os(dmo-bpy)₂Cl₂ (17.33 mg, 0.025 mmol)는 합성된 PAA-PVI (5.0 mg) 와 ethylene glycol (5.0 mL) 용액에 녹여 160°C에서 10 분간 합성 하여 PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺, PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺, 그리고 PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺ 를 각각 합성하였다. 반응 후 용액을 300 mL의 diethyl ether 용액에 천천히 떨어뜨려 재 침전 하였다. 재 침전 된 물질은 DW에 녹여 폴리머 필터 (10 kDa)를 이용하여 합성된 polymer만을 분리 하였다. 합성된 각각의 용액들은 1.0 mg/mL로 고정하여 사용하였다.

2.3 Uricase를 포함하는 효소전극의 제작

Uric acid의 산화를 위한 uricase (25.06 mg/mL

in PBS)와 redox mediator인 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺ (1.0 mg/mL in DW) 그리고 이 물질들의 가교 결합을 위한 PEGDGE (5.0 mg/mL in DW) 을 각각 4:4:1의 부피 비로 혼합하여 효소용액을 제조하였다.³⁹⁾ 제조된 효소용액 10.0 μ L를 스크린 프린팅된 SPCEs 위에 캐스팅 하여 12시간 동안 상온에서 건조하였다. 이때 전극 위에 흡착된 uricase는 0.6 unit 이다. 같은 방법으로 전위가 다른 PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺ (1.0 mg/mL in DW)와 PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺ (1.0 mg/mL in DW)를 포함하는 전극을 제작하여 실험에 사용하였다.

2.4 Uric acid 농도별 전기화학적 특성

Borate buffer (pH 8.5) 를 이용하여 다양한 농도의 uric acid (1.0, 1.5, 2.0, and 5.0 mM)를 준비하였다. Uric acid농도에 따라 제작된 효소전극 위에서 uric acid에 대한 산화 촉매 전류를 CV를 이용하여 측정하였다. 측정된 CV의 주사속도는 0.005 V/s 였으며, 전위의 범위는 -0.6~1.0 V 였다.

2.5 방해요소 안에서 Uric acid의 측정

전기화학반응을 이용한 측정에서 체내의 대표적 방해요소의 영향을 알아보기 위하여 borate buffer (pH 8.5)를 이용하여 uric acid (1.0, 1.5, 2.0, 5.0 mM) 제조 시 glucose 와 ascorbic acid 의 농도가 최종적

으로 각각 5.5 mM, 0.1 mM이 되게끔 넣어 준비하였다. Uric acid 농도에 따라 제작된 효소전극 위에서 uric acid에 대한 산화 촉매 전류를 CV를 이용하여 측정하였고, 이때 주사속도는 0.005 V/s 였으며, 전위의 범위는 -0.6~1.0 V 였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 수용성 오스뮴 고분자 화합물들의 전기화학적 신호 분석

합성된 수용성 오스뮴 고분자 화합물 PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺, PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺, 그리고 PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺를 확인하기 위하여 기준전극인 Ag/AgCl에 대비하여, 전위 -0.4~0.9 V까지 순환전압전류법으로 전기신호를 확인하였다. 이때의 조건은 각 오스뮴 고분자 화합물의 농도를 phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4)에 녹여 0.5 mg/mL로 측정하였고, 주사속도는 0.1 V/s 였다. Fig. 1의 결과를 통해 각 오스뮴 고분자 화합물의 산화/환원 전위를 측정한 결과 PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺ ($E^0 = 0.376$ V vs. Ag/AgCl), PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺ ($E^0 = 0.215$ V vs. Ag/AgCl) 그리고 PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺ ($E^0 = 0.096$ V vs. Ag/AgCl)를 나타내었다. PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺의 전위가 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺의 전위에 비

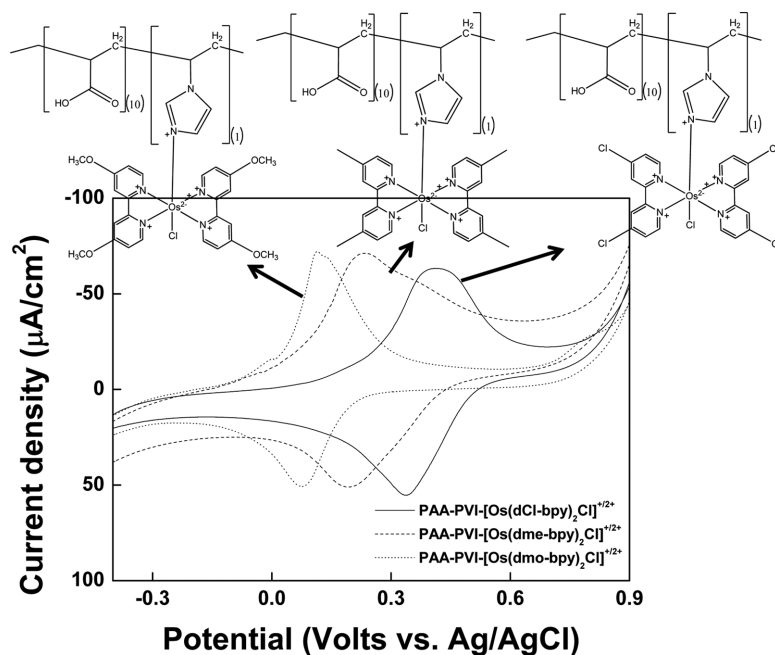


Fig. 1. Cyclic voltammograms of PAA-PVI-Os complexes (0.5 mg/mL in PBS) at a scan rate of 0.1 V/s on SPCEs.

해 약 0.16 V 양 전위 (positive potential)로 나타나는 이유는 전자 끌기 작용기인 pyridine-Cl 리간드의 영향이고, PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺의 전위가 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺의 전위에 비해 약 0.12 V 음 전위 (negative potential)로 나타나는 이유는 전자 주개 작용기인 pyridine-OCH₃ 리간드의 영향임을 확인할 수 있었다.⁴⁰⁾

3.2 효소전극에서의 각 수용성 오스뮴 고분자 화합물들의 산화촉매전류

Scheme. 1의 방법을 통하여 uricase, 합성된 수용성 오스뮴 고분자 그리고 가교제인 PEGDGE를 부피비 4:4:1의 비율로 혼합된 용액을 SPCEs 위에 떨어뜨려 상온에서 건조하여 효소전극을 제작하였다. 제작된 효소전극 위에 borate buffer (pH 8.5)를 40.0 μ L를 올리고, 순환전압전류법으로 측정하여 효소전극에 물리적으로 고정된 각 수용성 오스뮴 고분자 화합물의 산화/환원 신호를 측정하였다 (Fig. 2. dot). 또한 uric acid의 농도가 최종 2.0 mM이 되게 borate buffer (pH 8.5)를 통해 용액을 제조하고 전극표면 위에 올려 산화촉매전류를 확인하였다 (Fig. 2. line). 이때의 실험 조건은 전위 -0.6~1.0 V 까지 0.005 V/s의 주사속도로 측정되었다. Fig. 2 (a)의 결과를 보면 0.35 V 근처에서 PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺의 촉매전류가 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이는 uric acid가 uricase에 의해 산화될 때 발생하는 전자를 수용성 오

스뮴 고분자 mediator가 받아 poly-Os³⁺에서 poly-Os²⁺로 환원될 때 발생하는 전자를 전극이 받아 촉매 전류로 나타내는 결과이다 (eq. 1).

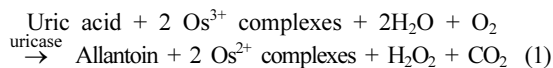
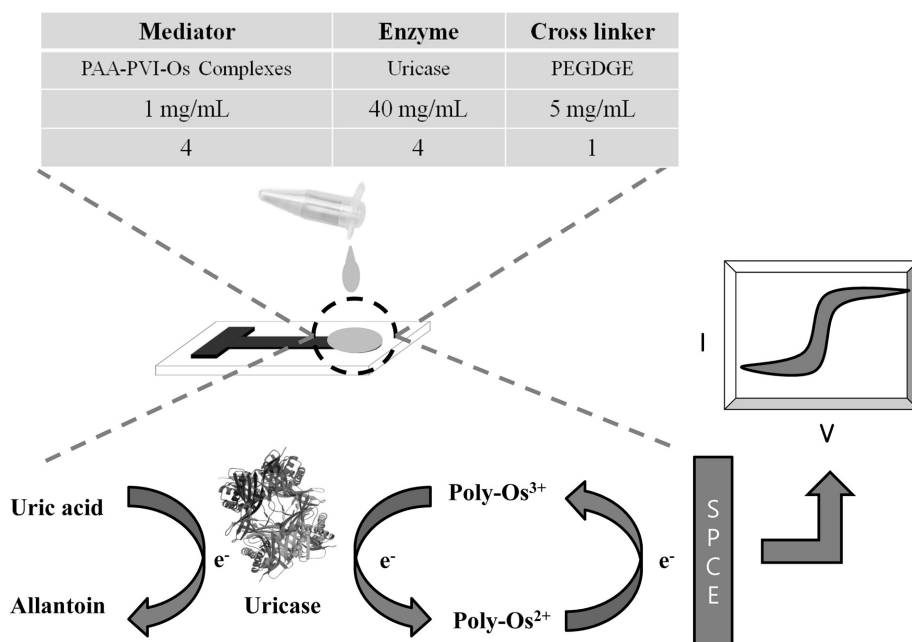


Fig. 2 (b)의 결과를 보면 0.2 V 근처에서 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺의 촉매전류가 나타나는 것을 확인할 수 있다. 0.6 V 이상에서 나타나는 약간의 봉우리는 uricase에 의해 uric acid가 산화할 때 발생하는 과산화 수소의 전기화학적 산화신호와 uric acid 자체의 산화신호의 영향이라 할 수 있다.⁴⁾ Fig. 2 (c)의 결과를 보면 PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺의 산화/환원 전위 위치인 0.09 V에서 산화 촉매 전류가 발견되지 않고, 0.2 V 근처에서 약간의 산화 촉매 전류와 0.6 V 이상에서 uric acid 자체의 산화신호가 발견됨을 확인할 수 있다. 이는 uric acid가 uricase에 의해 산화되는 전위의 위치보다 더 낮은 산화 전위를 갖는 수용성 오스뮴 고분자 mediator가 전자전달반응을 일으키기 쉽지 않기 때문에 나타나는 결과이다.

3.3 방해요소 안에서 uric acid의 산화촉매전류

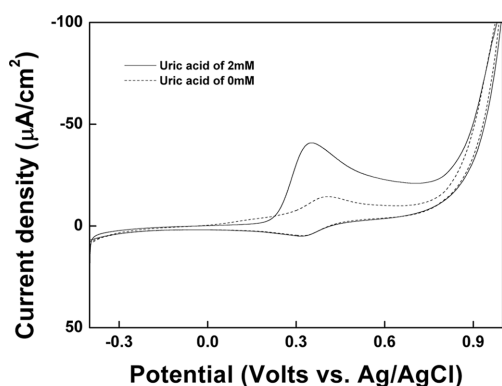
혈액이나 소변에서 uric acid의 검출에 있어 대표적인 방해물질인 glucose와 AA의 영향을 알아보기 위해 최종 농도가 glucose 5.5 mM, AA 0.1 mM 그리고



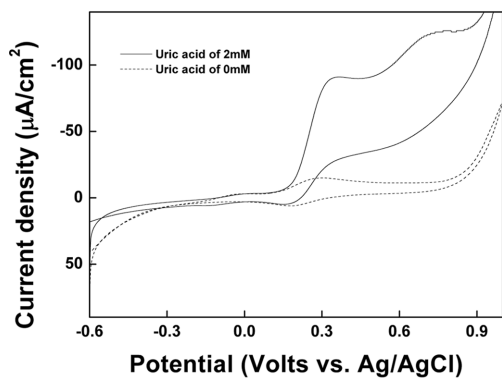
Scheme. 1. The schematic of fabrication procedures and measurement of uric acid.

uric acid 2.0 mM이 되게 borate buffer (pH 8.5)를 이용하여 용액을 제조하였다.⁴¹⁻⁴³⁾ 제작된 효소전극 위에 용액을 올려 전위 -0.6~1.0 V 까지 0.005 V/s의 주사속도로 측정하였다. Fig. 3 (a)의 결과를 보면 측정되

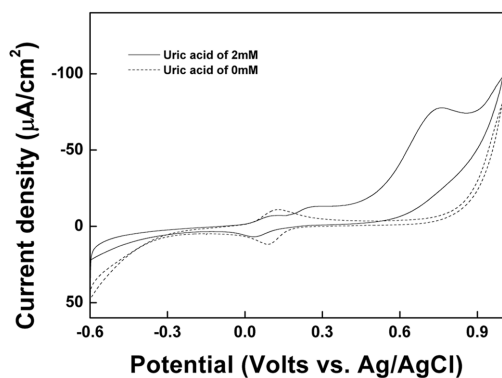
는 용액 안에 glucose와 AA가 있을 때, uric acid가 uricase에 의해 산화되는 신호가 증가됨을 확인할 수 있다. 이는 높은 산화 전위를 갖는 수용성 오스뮴 고



(a)

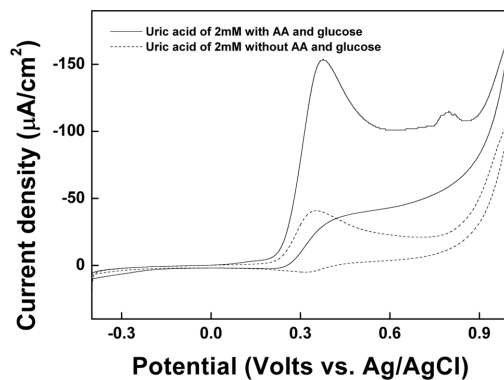


(b)

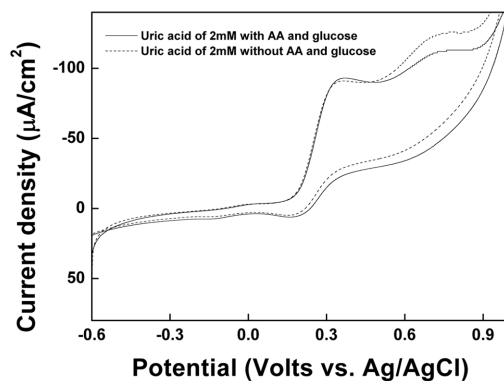


(c)

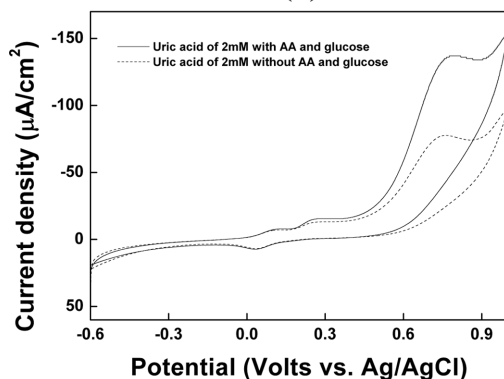
Fig. 2. Cyclic voltammograms of (a) PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺, (b) PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺, (c) PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺ (line) with and (dot) without uric acid (2.0 mM) at a scan rate of 0.005 V/s.



(a)



(b)



(c)

Fig. 3. Cyclic voltammograms of (a) PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺, (b) PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺, (c) PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺ in uric acid of 2.0 mM (line) with and (dot) without interferences (AA of 0.1 mM and glucose of 5.5 mM) at a scan rate of 0.005 V/s.

분자 PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺가 uric acid의 산화 반응에만 관여되지 않고 glucose와 AA의 산화에도 영향을 받는 것 확인할 수 있다. 이는 방해물질의 간섭 효과에 uric acid 측정 신호가 중첩 (overlap)되어 정확한 uric acid의 정량이 불가능하다는 것을 증명하여 준다. Fig. 3 (b)의 결과를 보면 측정되는 용액 안에 glucose와 AA가 존재할 때 0.6 V 이상에서 약간의 산화 촉매 전류가 증가함을 확인할 수 있다. 하지만 uric acid가 uricase에 의해 산화되어 발생하는 수용성 오스뮴 고분자 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺의 촉매전류 구간에서는 변화가 일어나지 않아 선택적으로 uric acid를 정량 할 수 있는 결과를 보여준다. Fig. 3 (c)의 결과를 보면 측정되는 용액 안에 glucose와 AA가 존재할 때와 존재하지 않을 때 둘

다 수용성 오스뮴 고분자 PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺의 촉매전류가 나타나지 않음을 알 수 있고, 0.6 V 이상에서 각 물질들의 자체 산화 신호만이 확인된다. 이는 앞서 서술한 것과 같이 낮은 산화 전위를 갖는 수용성 오스뮴 고분자 mediator가 전자전달 반응을 일으키기 쉽지 않기 때문에 나타나는 결과이다. 또한 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺ mediator가 포함된 효소전극에서 0.1 mM AA와 5.5 mM glucose만을 넣고 측정하였을 때 아무것도 넣지 않은 전극의 신호와 큰 차이가 없는 결과를 보여 본 연구에서는 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺를 mediator로써 사용하였다. (Fig. S1)

3.4 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺ mediator 효소전극에서 uric acid의 농도 별 산화촉매전류

PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺ mediator를 고정 한 효소전극 위에 5.5 mM의 glucose와 0.1 mM의 AA를 포함하는 borate buffer (pH 8.5) 용액에서 uric acid의 농도 (1.0~5.0 mM)별로 산화 촉매 전류를 측정하였다 (Fig. 4). 이 때 가해진 전위의 범위는 -0.6~0.9 V 이고, scan rate은 0.005 V/s 이었다. 촉매 전류가 나타나는 전위의 위치 중 전류 값이 일정하게 유지되는 한 지점을 0.33 V (versus Ag/AgCl)로 고정하고 검정곡선을 도시하여 uric acid의 농도 별로 발생하는 촉매전류의 상관관계를 확인 하였다 (Fig. 5). 그 결과 $R^2=0.9986$ 의 선형이 나타나는 것을 확인하였다. 또한 uric acid의 정량적 측정을 위한 검출 한계 (detection limit)는 0.5 mM 이었고, 이는 다른 전극으로 4회 실험하여 재현성 (reproducibility)을 얻을 수 있었다. ($N=4$, RSD (relative standard deviation) = 5.25%)

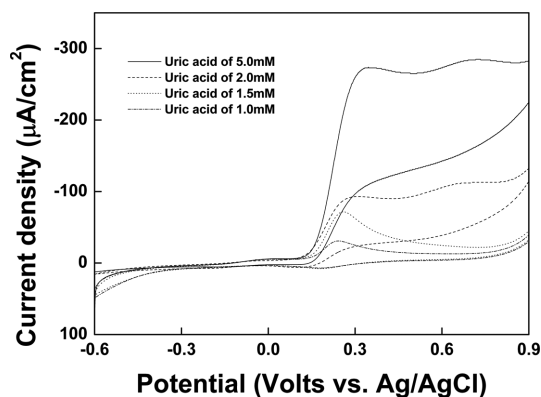


Fig. 4. Cyclic voltammograms of the difference uric acid (1.0, 1.5, 2.0, and 5.0 mM) in borate buffer (pH 8.5) containing 0.1 mM AA and 5.5 mM glucose at a scan rate of 0.005 V/s.

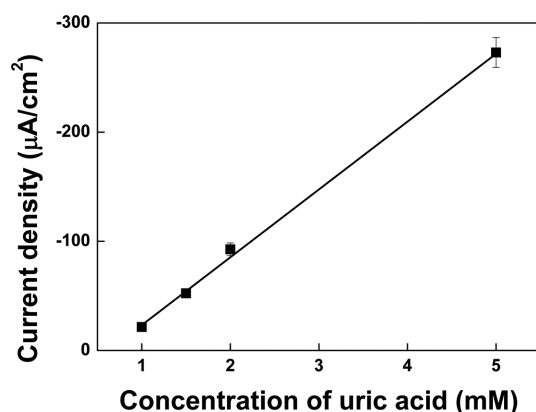


Fig. 5. Anode currents at 0.33 V versus Ag/AgCl as a function of uric acid concentration ranging between 1.0 and 5.0 mM.

4. 결 론

본 연구는 uric acid를 높은 선택성과 정량적으로 측정하기 위해 다양한 수용성 오스뮴 고분자 mediator를 SPCEs 위에 uricase와 고정하여 uric acid의 농도 별로 측정하였다. 합성된 mediator는 고분자를 이용하여 수용성을 띄며 SPCEs 위에 가교제를 통해 쉽게 고정화 할 수 있었다. 또한 오스뮴에 다양한 리간드를 배위시켜 전위의 위치를 조절할 수 있고, 이를 통해 uric acid가 uricase에 의해 산화될 때 발생하는 전자 전달의 유무를 확인할 수 있었다. 사용된 mediator 중 PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺는 uric acid가 산화될 때 발생하는 전자를 받아 산화 촉매 전류의 신호는 발생되지만 mediator의 높은 산화 전위로 인해 방해물질인 glucose와 AA의 영향을 받는 것을 확인할 수

있었다. 또한 PAA-PVI-[Os(dmo-bpy)₂Cl]⁺²⁺는 다른 mediator에 비해 상대적으로 낮은 산화 전위를 갖기 때문에 uric acid가 산화될 때 발생하는 전자를 전달 받지 못해 산화 촉매 전류가 나오지 않는다는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 반해 PAA-PVI-[Os(dme-bpy)₂Cl]⁺²⁺는 uric acid가 uricase에 의해 산화될 때 발생하는 전자를 받아 산화 촉매 전류 신호를 나타내고, PAA-PVI-[Os(dCl-bpy)₂Cl]⁺²⁺에 비해 상대적으로 낮은 산화 전위를 갖기 때문에 방해물질인 glucose와 AA의 영향을 받지 않는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 uric acid의 농도 별로 측정된 결과 선형 범위의 산화 촉매 전류를 얻을 수 있었다. 이는 간단한 방법의 일회용의 전극을 이용한 uric acid 바이오센서의 개발에 응용될 수 있을 것이라 예상된다.

참고문헌

1. W. Arneson and J. Brickell, 'Clinical Chemistry: A Laboratory Perspective' F. A. Davis Company, Philadelphia, USA, (2007).
2. I. Grabowska, M. Chudy, A. Dybko, and Z. Brzozka, 'Uric acid determination in a miniaturized flow system with dual optical detection' *Sens. Actuators B*, **130**, 508 (2008).
3. C. R. Raj and T. Ohsaka, 'Voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of heteroaromatic thiol' *J. Electroanal. Chem.*, **540**, 69 (2003).
4. P. E. Erden and E. Kulte, 'A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection' *Talanta*, **107**, 312 (2013).
5. J. Ballesta-Claver, R. Rodriguez-Gomez, and L. F. Capitan-Vallvey, 'Disposable biosensor based on cathodic electrochemiluminescence of tris(2,2-bipyridine) ruthenium(II) for uric acid determination' *Anal. Chim. Acta.*, **770**, 153 (2013).
6. C. R. Raj, F. Kitamura, and T. Ohsaka, 'Square wave voltammetric sensing of uric acid using the self-assembly of mercaptobenzimidazole' *Analyst*, **9**, 1155 (2002).
7. P. Kannan and S. A. John, 'Determination of nanomolar uric and ascorbic acids usingenlarged gold nanoparticles modified electrode' *Analytical Biochem.*, **386**, 65 (2009).
8. F. Arslan, 'An amperometric biosensor for uric acid determination preparedfrom uricase immobilized in polyaniline-polypyrrole film' *Sensors*, **8**, 5492 (2008).
9. A. K. Bhargava, H. Lal, and C. S. Pundir, 'Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase' *J. Biochem. Biophys. Methods*, **39**, 125 (1999).
10. J. Galba' n, Y. Andreu, M. J. Almenara, S. Marcos, and J. R. Castillo, 'Direct determination of uric acid in serum by a fluorometric-enzymatic method based on uricase' *Talanta*, **54**, 847 (2001).
11. J. Perello, P. Sanchis, and F. Grases, 'Determination of uric acid in urine, saliva and calcium oxalate renal calculi by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry' *J. Chromatogr. B.*, **824**, 175 (2005).
12. D. L. Rocha, and F. R. P. Rocha, 'A flow-based procedure with solenoid micro-pumps for the spectrophotometric determination of uric acid in urine' *Microchem. J.*, **94**, 53 (2010).
13. D.-K. Xu, L. Hua, Z.-M. Li, and H.-Y. Chen, 'Identification and quantitative determination of uric acid in human urine and plasma by capillary electrophoresis with amperometric detection' *J. Chromatogr. B.*, **694**, 461 (1997).
14. E. M. Strochkova, Ya. I. Turyan, I. Kuselman, and A. Shenhar, 'Simultaneous voltammetric determination of uric and ascorbic acids in urine' *Talanta*, **44**, 1923 (1997).
15. J. B. Jia, B. Q. Wang, A. G. Wu, G. G. Li, Z. Cheng, and S. J. Dong, 'A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network' *Anal. Chem.*, **74**, 2217 (2002).
16. A. L. Ghindilis, P. Atanasov, and E. Wilkins, 'Enzyme catalyzed direct electron transfer: fundamentals and analytical applications' *Electroanalysis*, **9**, 661 (1997).
17. R. M. A. Tehrani, and S. A. Ghani, 'Voltammetric analysis of uric acid by zinc-nickel nanoalloy coated composite graphite' *Sens. Actuators B*, **145**, 20 (2010).
18. S. B. Revin, and S. A. John, 'Electropolymerization of 3-amino-5-mercapto-1, 2, 4-triazole on glassy carbon electrode and its electrocatalytic activity towards uric acid' *Electrochim. Acta*, **56**, 8934 (2011).
19. Y. Li, G. Ran, W. J. Yi, H. Q. Luo, and N. B. Li, 'A glassy carbon electrode modified with graphene and poly (acridine red) for sensing uric acid' *Microchim. Acta*, **178**, 115 (2012).
20. S. A. John, 'Simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid using glassy carbon electrodes in acetate buffer solution' *J. Electroanal. Chem.*, **579**, 249 (2005).
21. Y. Cui, C. Yang, W. Pu, M. Oyama, and J. Zhang, 'The influence of gold nanoparticles on simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid' *Anal. Lett.*, **43**, 22 (2010).
22. F. Sekli-Belaidi, P. Temple-Boyer, and P. Gros, 'Voltammetric microsensor using PEDOT-modified gold electrode for the simultaneous assay of ascorbic and uric acids' *J. Electroanal. Chem.*, **647**, 159 (2010).
23. Y. Zhao, X. Yang, W. Lu, H. Liao, and F. Liao 'Uricase based methods for determination of uric acid in serum,' *Microchimica Acta*, **164**, 1 (2009).
24. T. Tatsuma and T. Watanabe, 'Oxidase:peroxidase bilayer-modified electrodes as sensors for lactate, pyruvate, cholesterol and uric acid,' *Anal. Chim. Acta*, **242**, 85 (1991).
25. M. Nanjo and G. G. Guilbault, 'Enzyme electrode sensing

- oxygen for uric acid in serum and urine' *Anal. Chem.*, **46**, 1769 (1974).
26. S. Uchiyama, H. Shimizu, and Y. Hasebe, 'Chemical amplification of uric acid sensor responses by dithiothreitol' *Anal. Chem.*, **66**, 1873 (1991).
 27. X. Wang, T. Hagiwara, and S. Uchiyama, 'Immobilization of uricase within polystyrene using polymaleimide-styrene as a stabilizer and its application to uric acid sensor' *Analytica Chimica Acta*, **587**, 41 (2007).
 28. K. Moore, N. Vizzard, C. Coleman, J. McMahon, R. Hayes, and C. J. Thompson, 'Extreme altitude mountaineering and type 1 diabetes: the diabetes federation of ireland kilimanjaro expedition' *Diabet Med.*, **18**, 749 (2001).
 29. B. A. Gregg and A. Heller, 'Redox polymer films containing enzymes. 2. Glucose oxidase containing enzyme electrodes' *J. Phys. Chem.*, **95**, 5976 (1991).
 30. S. Kuwabata, T. Nakaminami, S. Ito, and H. Yoneyama, 'Preparation and properties of amperometric uric acid sensors' *Sens. Actuators B*, **52**, 72 (1998).
 31. J. Motonaka, K. Miyata, and L. R. Faulkner, 'Micro enzyme-sensor with osmium complex and a porous carbon for measuring uric acid' *Analytical Letters*, **27**, 1 (1994).
 32. C. W. Liao, J. C. Chou, T. P. Sun, S. K. Hsiung, and J. H. Hsieh, 'Preliminary investigations on a new disposable potentiometric biosensor for uric acid' *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **53**, 1401 (2006).
 33. R. F. Dutra, K. A. Moreira, M. I. P. Oliveira, A. N. Araújo, M. C. B. S. Montenegro, J. L. L. Filho, and V. L. Silva, 'An inexpensive biosensor for uric acid determination in human serum by flow-injection analysis' *Electroanalysis*, **17**, 701 (2005).
 34. K. Yamamoto, H. Zeng, Y. Shen, M. M. Ahmed, and T. Kato, 'Evaluation of an amperometric glucose biosensor based on a ruthenium complex mediator of low redox potential' *Talanta*, **66**, 1175 (2005).
 35. P. E. A. Ribeiro, C. L. Donnici, and E. N. Santos, 'Cationic rhodium(I) complexes containing 4,4'-disubstituted 2,2'-bipyridines: A systematic variation on electron density over the metal centre' *J. Organometal. Chem.*, **691**, 2037 (2006).
 36. T. D. Lumley-Woodyear, P. Rocca, J. Lindsay, Y. Dror, A. Freeman, and A. Heller, 'Polyacrylamide-based redox polymer for connecting redox centers of enzymes to electrodes' *Anal. Chem.*, **67**, 1332 (1995).
 37. S. M. Zakeeruddin, D. M. Fraser, M. K. Nazeeruddin, and M. Grätzel, 'Towards mediator design: characterization of tris-(4,4'-substituted-2,2'-bipyridine) complexes of iron(II), ruthenium(II) and osmium(II) as mediators for glucose oxidase of aspergillus niger and other redox proteins' *J. Electroanal. Chem.*, **337**, 253 (1992).
 38. Y. B. Choi, J. M. Lee, and H. H. Kim, 'Synthesis of a new cathode redox polymer for high performance in biofuel cells' *Bull. Korean Chem. Soc.*, **35**, 2803 (2014).
 39. G. Binyamin, J. Cole, and A. Heller, 'Mechanical and electrochemical characteristics of composites of wired glucose oxidase and hydrophilic graphite' *J. of the Electrochemical Society*, **147**, 2780 (2000).
 40. H. H. Kim, Y. B. Choi, and G. S. Tae, 'Synthesis of several osmium redox complexes and their electrochemical characteristics in biosensor' *J. of the Korean Electrochemical Society*, **11**, 176 (2008).
 41. Y. Hu, F. He, A. Ben, and C. Chen, 'Synthesis of hollow Pt-Ni-graphene nanostructures for nonenzymatic glucose detection' *J. of Electroanalytical Chemistry*, **726**, 55 (2014).
 42. H. Guo, Z. Huang, Y. Zheng, and S. Weng, 'Electrodeposition of nickel nanoparticles modified glassy carbon electrode for nonenzymatic glucose biosensing' *Int. J. Electrochem. Sci.*, **10**, 10703 (2015).
 43. M. Li, X. Bo, Z. Mu, Y. Zhang, and L. Guo, 'Electrodeposition of nickel oxide and platinum nanoparticles on electrochemically reduced graphene oxide film as a nonenzymatic glucose sensor' *Sens. Actuators B*, **192**, 261 (2014).

SUPPLEMENT

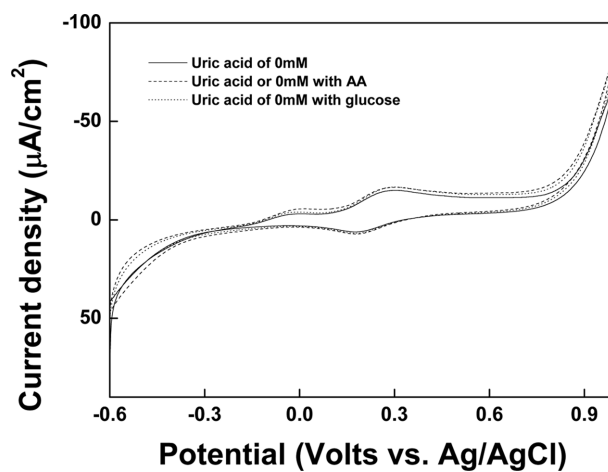


Fig. S1. Cyclic voltammograms of 0mM uric for (line) control electrode and containing (dot) 0.1 mM AA and (double dot) 5.5 mM glucose at a scan rate of 0.005 V/s.