Journal of the Korean Electrochemical Society
Vol. 13, No. 1, 2010, 50-56

전기화학적인 방법을 이용한 탄소나노튜브 전극상의 오스뮴 착물의 고정화 및 혈당센서에 관한 응용

최영봉 · 전원용 · 김혁한*

단국대학교 첨단과학대학 화학과

(2010년 1월 28일 접수: 2010년 2월 1일 채택)

Electrochemical Immobilization of Osmium Complex onto the Carbon Nano-Tube Electrodes and its Application for Glucose sensor

Young-Bong Choi, Won-Yong Jeon, and Hyug-Han Kim*

Department of Chemistry, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received January 28, 2010 : Accepted February 1, 2010)

초 록

Multi-wall carbon nano-tube(MWCNT)를 이용해 screen printed carbon electrodes(SPCEs)을 제작하여 혈당센서의 선택성과 감도가 증가됨을 확인 할 수 있었다. 효소촉매반응을 위한 탄소전극으로의 전자이동의 매개체로 8족 금속 원소인 오스뮴을 중심금속으로 일차 아민을 포함하는 피리딘(pyridine) 리간드를 배위시켜 $[Os(dme\text{-}bpy)_2(4\text{-}aPy)Cl]^{+/2+}$를 합성하였다. 합성된 오스뮴 착물은 순환전압전류법을 포함한 다양한 전기화학분석방법을 이용하여 전기적 성질을 조사하였다. 전기적 흡착방법을 이용하여 일차 아민을 갖는 착화합물을 전극위에 고정화 하였다. 오스뮴이 고정화된 MWCNT-SPCEs는 일반적인 carbon electrode보다 약 100배가량의 오스뮴이 흡착됨을 확인 할 수 있었다. ($\Gamma_0 = 2.0 \times 10^{-9}$ mole/cm^2) 마지막으로 당(Glucose)과 당 분해효소(Glucose Oxidase, GOx)에 의한 촉매반응의 전류를 확인하였고, 당 농도에 따라 선형 변화하는 전류의 양도 확인하였다.

Abstract : The multi-wall carbon nano-tube composite mixed with carbon paste electrode presented more sensitive and selective amperometric signals in the oxidation of glucose than general screen-printed carbon electrodes(SPCEs). Redox mediators to transport electrodes from enzyme to electrodes are very important part in the biosensor. A novel osmium redox complex was synthesized by the coordinating pyridine group containing primary amines which were electrochemically immobilized onto the MWCNT-SPCEs surface. Electrochemical studies of osmium complexes were investigated by cyclic voltammetry, chronoamperometry. The surface coverage of osmium complexes on the modified carbon nano-tube electrodes were significantly increased at 100 time ($\Gamma_0 = 2.0 \times 10^{-9}$ moles/cm^2) compared to that of the unmodified carbon electrodes. It's practical application of the glucose biosensor demonstrated that it shows good linear response to the glucose concentration in the range of 0-10 mM.

Keywords : Glucose biosensor, Redox mediator, Osmium complexes

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

1. 서 론

혈당 센서 (glucose biosensor)는 당뇨병을 진단하기 위해 혈액이나 소변에 있는 포도당(glucose)을 측정하는 임상 모니터링 장치 (clinical monitoring devices)이다. 그러므로 값이 싸고 대량 생산이 가능하여야 하며, 정확도가 매우 높아야 한다. 정확도를 증가시키기 위한 낮은 농도에서의 포도당 분석은 많은 방법을 통해 연구되어지고 있다.[1-4] 최근에 전압 전류법을 이용한 전기화학적인 바이오센서 실험은 값이 싼 장비와 빠른 응답기술로 인해 강력한 기술로 많은 연구가 되고 있다.[5-8] 이러한 혈당센서의 구조를 살펴보면 전기적인 신호변환을 할 수 있는 전극 (electrode)위에 당(glucose)을 산화시키는 효소인 GOx (Glucose Oxidase)와 전자 전달반응 (electron transfer reaction)을 용이하게 할 산화/환원 매개체 (redox mediator)가 필수적으로 있어야 한다. 효소반응에서 발생되는 전자의 전기적 신호를 detector에 전달할 수 있는 전극 (electrode)은 낮은 신호의 생물학적 물질을 측정할 수 있는 높은 전도성이 중요하다.[9-12] 이러한 점에 있어서 기존에 사용된 탄소, 금, 백금 전극 이외의 새로운 소재를 이용한 전극 제작에 관한 많은 연구가 진행되어 지고 있다. 최근 연구 보고서에 따르면 탄소나노튜브(Carbon Nano-Tube CNT), Nanowires 그리고 나노입자를 기초로 하여 바이오센서의 성능을 향상시킨 높은 감도를 갖는 전극들이 보고되어지고 있다.[13-15] 탄소나노튜브(CNT)를 사용하여 전극에 적용하는 방법은 결합제(binder)의 유무에 따라 두 가지의 방법이 발전되었는데, 결합제가 존재하지 않는 전극은 탄소나노튜브(CNT)의 기계적, 전기적 성질이 유리되고, 결합제가 존재하는 전극은 전극에 불순물을 생성시키고, 전기화학적인 성질을 감소시킨다. 더욱이 양쪽 방법은 전극과 탄소나노튜브(CNT)사이에 높은 접촉 저항을 유발시키므로 바이오센서의 기능을 저하시킨다.[16-18] 이러한 점을 보완하기 위해 본 연구에서는 탄소나노튜브(CNT)와 탄소잉크를 분산 용매 안에서 잘 혼합하여 인쇄를 통해 전극을 제작하였다.

혈당센서를 제작함에 있어서 중요시되는 또 하나의 기술이 전극 표면위에 산화/환원매개체 및 효소의 고정화기술이다. 고정화 기술로는 고분자 막을 이용한 방법, 자기 조립 단분자막 (Self-Assemble Monolayer, SAM), 금속착물을 갖는 고분자를 이용한 전기화학적인 고정화 방법 등이 있다.[19-21] 그 중 전극위에 단량체(monomer)의 전기화학적인 방법을 이용한 고정화를 통하여 제작된 전극이 선택성과 전기적 응답에 대해 가장 좋은 효과를 나타낸다고 입증되었다.[22-26] 기존의 전극 위의 고분자 막은 polypyridyl을 리간드로 갖는 8족 금속(Ru, Os)의 전기화학적인 산화에 의한 고정화 방법이었다. 본 연구에 사용한 단량체를 이용한 전기화학적인 고정화는 일차 아민기를 갖는 다음의 리간드, 3-aminopyridine, 4-aminopyridine, 5-amino-1,10-phenanthroline를 이용하여 8족 금속(Ru, Os)과 착화합물을 형성시켜 전기화학적인 방법을 통해 전극 위에서 고정화 시킨 기존의 연구결과를 토대로 실행하였다.[27-30]

본 연구에서는 오스뮴에 일차 아민을 포함하고 있는 피리딘을 배위시켜 다음의 오스뮴 착물 [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$(4-aminopyridine)Cl]$^{+/2+}$을 합성하고, 탄소나노튜브(CNT)가 포함되어 인쇄된 탄소전극위에서 일정 전위간의 순환전압전류법(cyclic voltammetry, CV)의 반복을 통해 단량체 오스뮴 착물을 고정화하여 오스뮴 필름을 제작하였다. 전자전달매체인 오스뮴 착물이 고정화된 전극을 이용하여 당과 당 분해 산화효소 (GOx)의 반응을 촉매전류로 확인하고 당의 농도와 촉매전류 사이의 검정곡선을 얻었다.[33] 이를 통하여 전극에 고정된 오스뮴 필름막이 당과 당 분해 산화효소(GOx)의 반응에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였고, 낮은 농도의 당 농도를 측정할 수 있는 당 센서의 실용성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 시료

합성에 사용된 시약들은 potassium hexachloroosmate (IV), 4,4′-dimethyl-2,2′-dipyridyl, 4-aminopyridine, sodium hydrosulfite (Aldrich Chem. Co.)는 정제 없이 분석시약 급을 그대로 사용하였고, 용매로 사용한 황산, 아세트산 (glacial), 질산, 에틸렌 글라이콜 (Aldrich Chem. Co.) 또한 정제 없이 분석시약 급을 그대로 사용하였다. 에탄올, 메탄올, chloroform (Aldrich Chem. Co.)은 $MgSO_4$로 수분제거 후 사용하였고, 증류수는 3차 증류하여 사용하였다.

TLC(Thin Layer Chromatography)는 산화 알루미늄 (60 F_{254}, 0.2 mm, Merck)판을 이용 하였으며, 관 크로마토그래피 (column chromatography)에 이용된 산화 알루미늄은 50~200 μm (Acrose)이다.

전극 제작에는 carbon ink (electrodag 423 ss, Acheson), B.C.A 용액 (Acheson), MWCNT (Multi-walled carbon nanotube, carbon nano-material Tech. Co., Ltd.)가 사용되었다.

전기화학 실험에는 D-(+)-glucose, glucose oxidase (192,000 units/g) (Aldrich Chem. Co.)를 정제 없이 분석시약 급을 그대로 사용하였고, 전해질로는 0.1 M NaCl을 포함한 PBS (pH 7.0, Phosphate Buffered Saline)를 사용하였다.

구조 확인을 위한 핵자기 공명 스펙트럼은 Varian Mercury plus Spectrometer (400 MHz)를 사용하여 $CDCl_3$을 용매로 사용하였으며 전극 표면의 확인을 위한SEM (Scanning Electron Microscopy)으로는 S-4300 (Hitachi/일본)을 사용하였다. 전기화학 실험의 순환전압

전류법 (Cyclic Voltammetry)의 측정은 CH Instruments (미국, 텍사스)사의 model 660B Electrochemical Workstation을 사용하였다.

2.2. [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$(4-aminopyridine)Cl]$^{+/2+}$의 합성

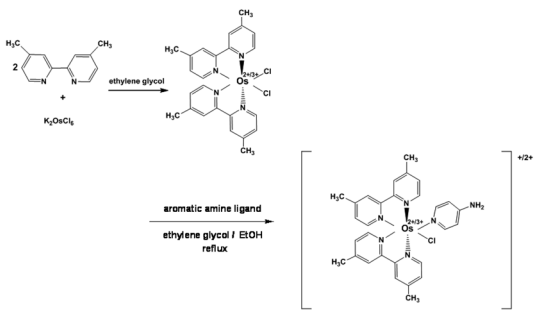
[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$(4-aminopyridine)Cl]$^{+/2+}$을 합성하기 위해 기존에 발표된 논문을 이용하여[31-33] 4배위의 오스뮴 착물과 4-aminopyridine을 1 : 1의 몰 비로 에틸렌 글라이콜과 에탄올의 혼합물에 녹여 넣은 후 36시간 동안 반응하였다. 생성물을 정제하기 위하여 전개용매로 에탄올을 사용하여 관 크로마토그래피로 정제하고 다시 용매를 회전증발기를 이용하여 증발시켜 얻었다 (Scheme 1). 합성물질의 확인은 400 MHz NMR과 원소분석 결과를 사용하였다.

2.3. MWCNT-carbon electrode 제조

MWCNT는 황산-질산 (v/v 3 : 1) 용액 안에서 120°C, 12 시간 동안 환류 시켜 정제한 후 사용되었다. Acheson 사에서 판매되는 잉크 분산 용매인 B.C.A에 정제된 MWCNT와 탄소 잉크를 일정 비율로 섞어 (carbon ink/MWCNT/B.C.A 90 : 5 : 5) 혼합 후 반도산업 (경기,한국) 사의 반자동인쇄기 model BS-860AP를 이용하여 SPCEs (screen printed carbon electrodes)를 제작 하였다. 제작된 MWCNT-탄소전극의 표면을 SEM을 통해 측정하였다.

2.4. Osmium redox complexes의 electropolymerization

MWCNT-carbon electrode 위에 PBS 용액 안에 1 mg/mL로 녹인 오스뮴 착물을 40 ul 올리고 660B Electrochemical Workstation의 순환전압전류법(cyclic voltammetry)을 통해 –0.6~1.0 mV 사이의 전위를 40cycles 반복시켜 oxidation electropolymerization을 하였다. 증류수로 SPCEs 표면을 세척하고 상온에서 말린 다음 PBS (40 μl)를 올리고 순환전압전류법을 통해 오스뮴 착물이 MWCNT-carbon electrode 위에 고정화 되었는지를 확인하였다.



Scheme 1. Synthesis of [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$Cl$_2$]$^{2+/3+}$ and [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$(4-aminopyridine)Cl]$^{+/2+}$.

2.5. 농도별 Glucose의 촉매전류 측정

Oxidation electropolymerization을 통해 오스뮴 착물을 고정화 시킨 MWCNT-carbon electrode 위에 glucose를 산화시키는 glucose oxidase (5 mg/ml in PBS)는 농도를 고정시켜놓은 후 glucose (1 mM~20 mM)를 변화해 가며 660B Electrochemical Workstation의 순환전압전류법을 통해 촉매 전류를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

합성된 4배위의 [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$Cl$_2$]$^{2+/3+}$와 최종 결과물인 5배위된 [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$(4-aminopyridine)Cl]$^{+/2+}$를 기준전극인 Ag/AgCl에 대해 전위구간은 –0.4 V~0.6 V에서 순환전압전류법 (CV)을 이용하여 간단하게 합성 유무를 확인 할 수 있었다. Fig. 1의 CV에서 보여주는 것과 같이 합성된 물질인 4배위된 [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$Cl$_2$]$^{2+/3+}$ 전위값이 –0.123 V (vs. Ag/AgCl)에서 나타나는데 전자주기 작용기인 Cl^- 리간드와 치환된 전자끌기 작용기인 피리딘 리간드에 의하여 전위가 약 230 mV 가량 증가하여 0.112 V (vs. Ag/AgCl) 에서 5배위인 [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$(4-aminopyridine)Cl]$^{+/2+}$의 합성을 확인 할 수 있었다.[34-35] MWCNT와 탄소 잉크의 혼합을 통해 제작된 전극은 SEM을 통하여 측정하였고, 그림에서와 같이 MWCNT가 전극 표면에 탄소와 함께 일정하게 분산되어 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2).

MWCNT-SPCEs 전극 위에 합성된 일차 아민을 포함

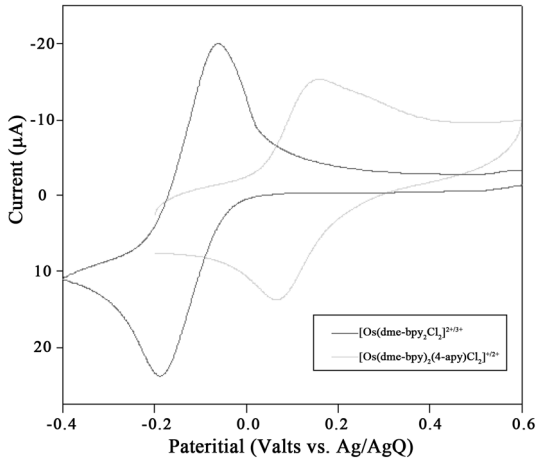


Fig. 1. Cyclic voltammograms of [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$Cl$_2$]$^{2+/3+}$ and [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)$_2$(4-aminopyridine)Cl]$^{+/2+}$.

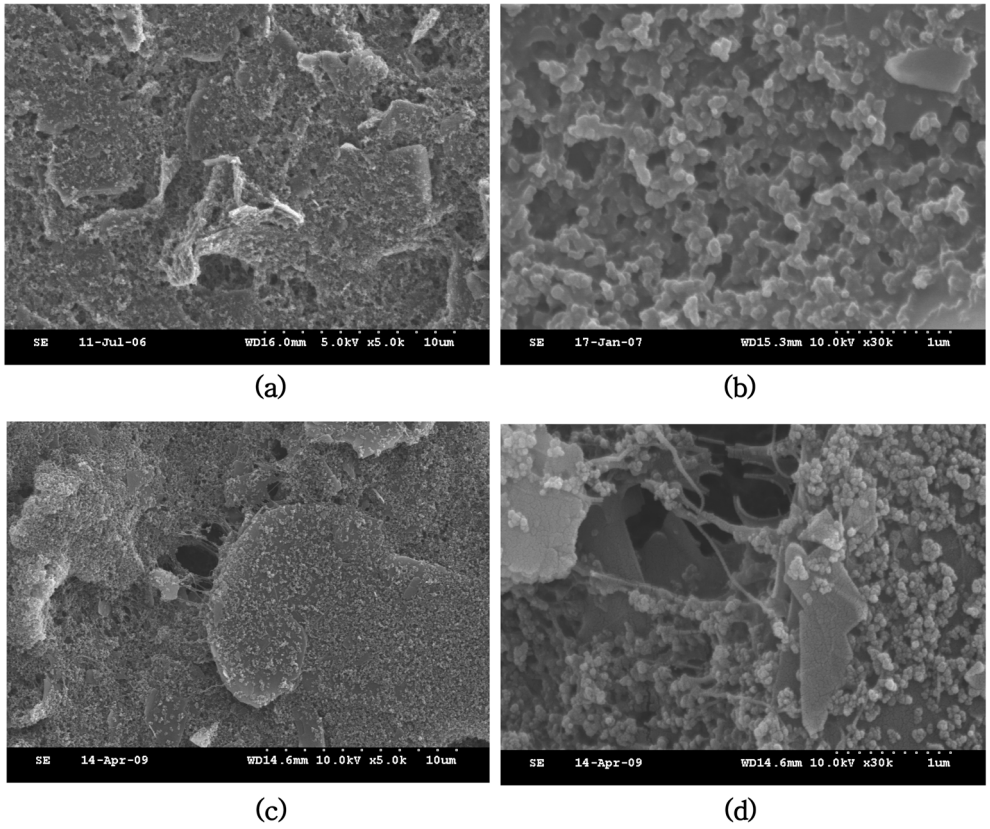


Fig. 2. SEM images of screen printed carbon electrodes (a), (b) and MWCNT-screen printed carbon electrodes (c), (d).

하는 오스뮴 착물 (1 mg/mL, 40 μl in PBS)을 올리고 순환전압전류법(cyclic voltammetry)을 통해 −0.6~1.0 mV 사이의 전위에서 40 cycles 반복시켜 전기화학적인 방법을 이용하여 고정화를 하였다. 또한 MWCNT-SPCEs의 오스뮴 착물의 고정화 정도를 비교하기 위해 일반적인 SPCEs위에서의 고정화와 비교하였다 (Fig 3). 단위면적당 (surface coverage) 오스뮴의 몰 수를 비교하기 위해 아래 식을 이용하여 계산 하였다.[23,26,30)]

$$G_{\Gamma}^{app} = Q_c/nFA$$

Q_c 값은 산화 환원 peak의 적분을 통해 얻었고, n은 전자의 이동수 (n = 1) F는 페러데이 상수값(96,485 C/mole) 그리고 A는 작업적극의 면적(0.07065 cm^2)이다. MWCNT-SPCEs는 약 $\Gamma_0 = 2.0 \times 10^{-9}$ mole/cm^2 값을 갖고, 일반적인 SPCEs에서는 약 $\Gamma_0 = 2.19 \times 10^{-11}$ mole/cm^2의 값을 얻었다. MWCNT-SPCEs 전극이 일반적인 SPCEs에 비해 약 100배가량의 오스뮴 착물이 고정화됨을 확인하였다 ($s = \pm 1.0 \times 10^{-10}$ mole/cm^2). 일차 아민을 포함하는 단량체 금속착물의 고분자화는 라디칼인 NH・에 의한 반응으로 알려져 있다.[26-30)] 이 금속착물의 고분자화는 NH・이 N-N, N=N의 공유결합이나 N = C의 공유결합을 통한 고정화 매커니즘으로 나타난다.[26,30)]

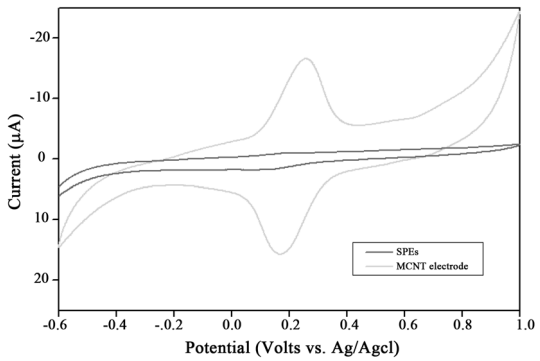


Fig. 3. Electropolymerization of osmium complex on the SPCEs and MWCNT-SPCEs.

전기화학적인 방법을 통한 오스뮴 착물을 고정화 시킨 MWCNT-SPCEs 전극 위에 당과 당 분해 산화효소 (5 mg

in PBS 1 ml)가 반응하여 나오는 전자를 산화/환원 매개체인 오스뮴 착물이 전극에 전자를 전달할 때 발생하는 촉매산화전류를 느린 순환전압전류법을 이용하여 여러 가지 당농도 (0 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM)별로 측정하였다. 이 때 가해준 전위의 범위는 −0.2~0.6 V 이고, scan rate은 5 mV/sec 이었다 (Fig 4). 촉매전류가 나타나는 전위의 위치 중 전류 값이 일정하게 유지되는 한 지점을 0.6 V (versus Ag/AgCl)로 고정하고 검정곡선을 도시하여 당 농도별로 발생하는 촉매전류의 상관관계를 확인 하였다 (Fig 5). 검정곡선에 의하여 당 농도가 10 mM까지는 농도에 비례하여 일정한 전류의 양이 직선적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으나 10 mM 이상이 반응하면 전극 상에서 당이 산화되는 최대 값에 접근함에 따라, 즉 포화 (saturation)상태에 도달함에 따라 전류의 증가폭이 점차 작아지면서 한계촉매전류(i_{max})에 도달하는 것을 확인할 수 있었다 (R : 0.99544). “일반적으로 건강한 사람의 평균 당 수치가 4.0~7.0 mM (70~128 mg/dL) 사이라고 할 때 고혈당이라 할 수 있는 당 수치는 약 8 mM 이상 저혈당은 3 mM 이하이다. 그러므로 본 실험에서 얻은 검정곡선의 당을 측정하는 농도의 범위는 0 mM~10 mM 사이에서 선형관계를 보여주고 있다. 종합하여 MWCNT-SPCEs에 고정된 오스뮴 착물을 이용한 본 실험의 당의 측정 검출한계(detection limit)는 0.1 mM를 얻을 수 있었고, Fig. 5 에서와 같이 최대 포화상태의 농도는 10 mM이상에서 11 μA의 한계촉매전류(i_{max})를 확인할 수 있었다.”

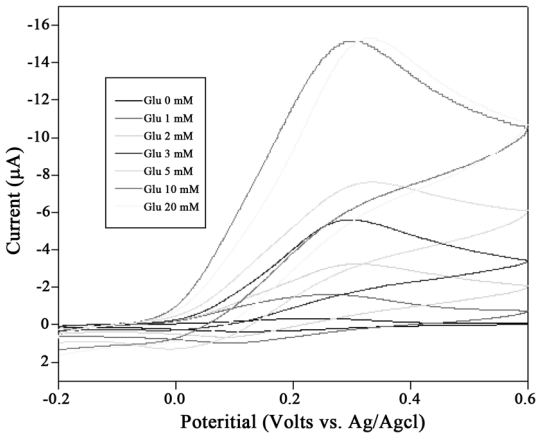


Fig. 4. Glucose concentration dependence of the catalytic anodic current. Conditions : 1 mg/mL GOx, pH 7 PBS containing 0.1 M NaCl. The scan rate was 5 mV/sec.

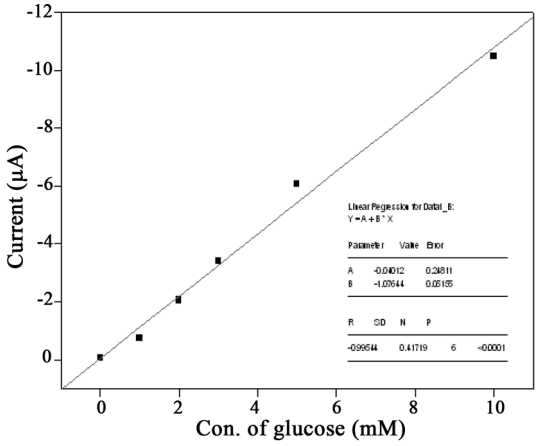


Fig. 5. Glucose concentration dependence of the current density at 0.6 V vs Ag/AgCl.

4. 결 론

본 연구는 전자를 운반하는 산화/환원 매개체인 8족 금속원소인 오스뮴에 일차 아민을 갖는 4-aminopyridine을 배위 결합시켜 5배위를 갖는 오스뮴 착물을 합성하였다. 합성한 오스뮴 착물의 전기적 특성을 순환전압전류법을 통해 확인 할 수 있었다. 제작된 MWCNT-SPCEs 전극은 SEM을 통해 잘 분산된 MWCNT의 분포를확인 할 수 있었다. 전기화학적인 방법을 이용하여 MWCNT-SPCEs 전극 위에 고정화된 오스뮴 착물을 순환전압전류법을 통해 확인하여 일반적인 SPCEs 보다 약 100배 이상의 오스뮴 착물이 전극위에 고정화되었음을 알 수 있었다. 전자전달 매개체인 오스뮴 착물이 고정된 전극을 통하여 당과 당분해 산화효소와의 반응을 통해 발생되는 촉매산화전류를 순환전압전류법을 통해 확인하였다. 당의 농도에 따라 일정하게 촉매산화전류가 변화함을 검정곡선을 통하여 확인 할 수 있었다. 앞으로 이들 특성평가 이외에도 안정도, lifetime, real sample (blood sample)등의 특성 평가가 필요하며 혈액 안에 과량 포함된 Ascorbic acid의 산화에 대한 방해요소도 생각해야 된다. 하지만 오스뮴 착물의 전위가 Ascorbic acid의 산화가 일어나는 전위보다 낮은 전위 이므로 당을 측정하는 센서로서 충분한 가능성을 보일 것이라 예상한다. 또한 기존에 발표된 논문[36]에서 보여주었던 SAM방식으로 오스뮴 착물을 고정한 SPCEs에서 측정된 당의 측정결과(glucose 10 mM 기준)보다 약 10배이상의 높은 전류 신호가 나타나는 것을 확인하였고, MWCNT를 이용하여 낮은 농도에서도 높은 전류신호를 보임으로써 감도가 향상된 당 센서로 이용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 단국대학교의 교내연구과제지원사업의 연구비 지원으로 이루어 졌기에 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Q. Chi and S. Dong, 'Amperometric biosensors based on the immobilization of oxidases in a Prussian blue film by electrochemical codepositio' *Anal. Chim. Acta*., **310**, 429 (1995).
2. H. Liu, H. Li, T. Ying, K. Sun, Y. Qin, and D. Qi, 'Amperometric biosensor sensitive to glucose and lactose based on co-immobilization of ferrocene, glucose oxidase, β-galactosidase and mutarotase in β-cyclodextrin polyme' *Anal. Chim. Acta*., **358**, 137 (1998).
3. C. L. Chuang, Y. J. Wang, and H. L. Lan, 'Amperometric glucose sensors based on ferrocene-containing B-polyethylenimine and immobilized glucose oxidase' *Anal. Chim. Acta*., **353**, 37 (1997).
4. I.-H. Yeo and D. C. Johnson, 'Electrochemical response of small organic molecules at nickel-copper alloy electrode' *J. Electroanal. Chem*., **495**, 110 (2001).
5. 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).
6. Z. Hu, C. J. Seliskar, and W. R. Heineman, 'PAN-incorporated Nafion-modified pectroscopic graphite electrodes for voltammetric stripping determination f lead' *Anal. Chim. Acta*., **369**, 93 (1998).
7. 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).
8. S. Maria da Silva, 'Determination of lead in the absence of supporting electrolyte using carbon fiber ultramicroelectrode without mercury film' *Electroanalysis*, **10**, 722 (1998).
9. M. V. Pishko, A. C. Michael, and Adam Heller, 'Amperometric glucose microelectrodes prepared through immobilization of glucose oxidase in redox hydrogels' *Anal. Chem*., **63**, 2269 (1991).
10. H. Yang, T. D. Chung, Y. T. Kim, C. A. Choi, C. H. Jun, and H.C. Kim, 'Glucose sensor using a microfabricated electrode and electropolymerized bilayer films' *Biosens. Bioelectron*., **17**, 251 (2002).
11. T. J. Ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller, ' 'Wired' enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances' *Anal. Chem*., **66**, 2451 (1994).
12. B. A. Gregg and A. Heller, 'Redox polymer films containing enzymes' *J. Phys. Chem*., **95**, 5976 (1991).
13. J. Wang, 'Present and future applications of carbon nanotubes to analytical science' *Electroanalysis*, **17**, 7-14 (2005).
14. A. Wei, X. W. Wei, J. X. Wang, Y. Lei, X. P. Cai, C. M. Li, Z. L. Dong, and W. Huang, 'Enzymatic glucose biosensor based on ZnO nanorod array grown by hydrothermal decomposition' *Appl. Phys. Lett*., **89**, 123902 (2006).
15. X. Luo, A Morrin, A. J. Killard, and M. R. Smyth, 'Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors' *Electroanalysis*, **18**, 319-326 (2006).
16. R. Ma, J. Liang, B. Wei, B. Zhang, and C. Xu, 'Electric double-layer capacitors using carbon nanotube electrodes and organic electrolyte' *Bull. Chem. Soc. Jpn*., **72**, 2563 (1999).
17. C. Niu, E. K. Sichel, R. Hoch, D. Moy, and H. Tennent, 'Carbon Nanotubes-the Route Toward Applications' *Appl. Phys. Lett*., **70**, 1480 (1997).
18. Shidong Fei, Jinhua Chen, Shouzhuo Yao, Guohong Deng, Lihua Nie and Yafei Kuang. 'Electroreduction of α-glucose on CNT/graphite electrode modified by Zn and Zn--Fe alloy' *J. Solid. State. Electrochem*., **9**, 498 (2005).
19. M. O. Finot, G. D. Braybrook, and M. T. McDermott, 'Characterization of electrochemically deposited gold nanocrystals on glassy carbon electrodes' *J. Electroanal. Chem*., **466**, 234 (1999).
20. M. O. Finot and M. T. McDermott, 'Characterization of n-alkanethiolate monolayers adsorbed to electrochemically deposited gold nanocrystals on glassy carbon electrodes' *J. Electroanal. Chem*., **488**, 125 (2000).
21. Y. Li and G. Shi, 'Electrochemical Growth of Two-Dimensional Gold Nanostructures on a Thin Polypyrrole Film Modified ITO Electrode' *J. Phys. Chem. B*, **109**, 23787 (2005).
22. M. Josowicz and J. Janata, 'in Electroactive Polymers' *ed. B. Scrosati, Chapman and Hall, New York*, 1993, p. 310.
23. R. W. Murray, 'in Molecular Design of Electrode Surfaces' *ed. R. W. Murray, Wiley, New York*, 1992, p. 1.
24. A. Merz, 'Direct electrochemical redox of tyrosinase at silver electrodes' *Top. Curr. Chem*., **152**, 49 (1990); J. Heinze, 'Electronically conducting polymers' *Top. Curr. Chem*., **152**, 1 (1990).
25. F. Bedioui, J. Devynck, and C. Bied-Charreton, 'Immobilization of metalloporphyrins in electropolymerized films: design and applications' *Acc. Chem. Res*., **28**, 30 (1995).
26. 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).
27. P. G. Pickup and R. A. Osteryoung, 'Electropolymerization of iron phenanthrolines and voltammetric response for pH and application on electrocatalytic sulfite oxidation' *Inorg. Chem*., **24**, 2707 (1985).
28. I. de Gregori, F. Bedioui, and J. Devynck, 'Electrooxidative and electroreductive polymerization of 5-amino-1, 10-phenanthroline ligand, iron and cobalt complexes in acetonitrile media' *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem*., **238**, 197 (1987).
29. F. W. M. Nyasulu and H. A. Mottola, 'Electrochemical behavior of 5-amino-1,10-phenanthroline and oxidative electropolymerization of tris[5-amino-1,10-phenanthroline] iron(II)' *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem*., **239**, 175 (1988).
30. C. D. Ellis, L. D. Margerum, R. W. Murray, and T. J. Meyer, 'Oxidative electropolymerization of polypyridyl complexes of ruthenium' *Inorg. Chem*., **22**, 1283 (1983).

31. C. Taylor, G. Kenausis, I. Katakis, and A. Heller, 'Wiring of glucose oxidase within a hydrogel made with polyvinyl imidazole complexed with [(Os-4,4′-dimethoxy-2,2′-bipyridine)$_2$Cl]$^{+/2+}$' *J. Electroanal. Chem*., **396**, 511 (1995).
32. S. Anderson, E. C. Constable, K. R. Seddon, E. T. Turp, J. E. Baggott, and J. Pilling, 'Preparation and characterization of 2,2-bipyridine-4,4-disulphonic and-5-sulphonic acids and their ruthenium(II) complexes' *J. Chem. Soc. Dalton Trans*., 2247 (1985).
33. D. M. Fraser, S. M. Zakeeruddin, and M. Gratzel, 'Towards mediator design II. Optimization of mediator global charge for the mediation of glucose oxidase of Aspergilus niger' *J. Electroanal. Chem*., **359**, 125 (1993).
34. E. S. Dodsworth, A. A. Vlcek, and A. B. P. Lever, 'Factorization of Ligand-Based Reduction Potentials' *Inorg. Chem*., **33**, 1045 (1994).
35. S. M. Zakeeruddin, D. M. Fraser, M-K Nazeeruddin, and M. Gratzel, 'Towards mediator design: characterization of tris-(4,4'-substituted-2,2'- bipyridine)complex of iron(II), ruthenium(II) and osmium(II) as mediators for glucose oxidase of Aspergilus niger and other redox proteins' *J. Electroanal. Chem*., **337**, 253 (1992).
36. Y.-B. Choi, and H.-H. Kim, 'Synthesis of osmium redox complex and its application for biosensor using an electrochemical method' *Journal of the Korean Electrochemical Society*., **10**, 152 (2007).