

## Horseradish peroxidase가 변성된 탄소복합 바이오센서 개발 및 전기화학적 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>분석

박 덕 수\*

부산대학교 바이오피지오센서연구소  
(접수 2012. 7. 24; 게재확정 2012. 7. 30)

### Development of HRP-modified Carbon Composite Biosensor and Electrochemical Analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Deog-Su Park\*

Institute of BioPhysio Sensor Technology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea  
\*E-mail: dsupark@pusan.ac.kr

(Received July 24, 2012; Accepted July 30, 2012)

**요 약.** Horseradish peroxidase (HRP), alkoxy silane인 TEOS의 겔 용액과 graphite를 혼합하여, 전기전도성을 나타내고 재사용이 가능하며 안정성을 향상시킨 carbon composite electrodes (CCEs) 바이오센서를 제작하였다. TEOS의 졸-겔 전이반응을 이용하여 HRP를 silicate gel network포획시킨 바이오센서는 -0.2 V에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 환원이 시작되었으며, HRP의 함량과 pH를 변화시켜 최적 분석 조건을 구하였다. 분석 최적 조건에서 검량선 및 검출한계를 구한 결과, 0.2~2.2 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도 범위에서 직선적인 감응을 나타내며 검출한계는 0.035 mM이었다. ascorbic acid, acetaminophene, uric acid의 방해작용을 조사한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 전기화학적 분석에 영향을 주지 않았다.

**주제어:** 졸-겔, 탄소복합, Horseradish peroxide, 바이오센서, 과산화수소

**ABSTRACT.** A sol-gel derived carbon composite electrodes (CCEs) were fabricated by mixing horseradish peroxidase (HRP), sol of tetraethoxysilane (TESO), and graphite powder. The HRP solution was added to the sol solution of TEOS, and then graphite powder was added to this mixture. The resulting carbon ceramic network effectively encapsulated HRP and shows a catalytic reduction starting at -0.2 V for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The optimum conditions for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determination have been characterized with respect to the enzyme loading ratio and pH. The linear range and detection limit of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection were from 0.2 mM to 2.2 mM and 0.035 mM, respectively. The common electroactive interferences such as ascorbic acid, acetaminophene, and uric acid were not affected upon the response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the HRP biosensor due to low detection potential.

**Key words:** Sol-gel, Carbon composite, Horseradish peroxidase, Biosensor, Hydrogen peroxide

## 서 론

과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)는 염색, 펄프, 수질처리, 추진제, 의약 등의 산업분야에서 다양하게 사용되고 있을 뿐 아니라, 생체 내에서 대사과정에 직접 관여하거나 대사과정의 부산물(side product)로 생성된다. 특히 각종 효소반응의 결과로 체액 또는 세포내외에서 발생하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 특정 질병진단을 위한 중요 생체대사물로 활용되고 있다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 참여하는 대표적인 효소로는 glucose를 산화시키는 glucose oxidase (GOx)가 있으며, 이외에 alcohol oxidase (AOx), lactate oxidase (LOx), cholesterol oxidase (ChOx) 등 여러 가지 효소가 있다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분석하는 기기적인 방법은

fluorimetry, chemiluminescence, fluorescence, spectrophotometry가 사용되고 있으나,<sup>1,4</sup> 분석과정이 복잡하고 선택성이 떨어지는 단점이 있어 전기화학적 분석법이 많이 연구되고 있다. 전기화학적 방법은 전극에 전압을 가하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화/환원 시 흐르는 전류를 측정하는 원리를 사용하며 전류법 센서 형태로 제작하여 구조가 간단하고, 반도체기술과 미세가공 공정을 통하여 집적화/소형화시킬 수 있으며, 전기적 신호를 직접 측정하므로 감도 및 비용 측면에서 유리하다.<sup>5</sup>

전류법 센서 제작 시 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 감도와 선택성을 향상시키기 위해 metal hexacyanoferrate, carbon nanotube, graphene, metal, metal oxide, 및 macrocyclic metal complex

등이 사용되고 있으나,<sup>6-11</sup> 선택성 측면에서 heme moiety를 가지고 있는 metalloprotein인 horseradish peroxidase (HRP)를 probe로 사용한 전기화학적 biosensor가 가장 많이 사용되고 있다.<sup>12-16</sup> 바이오센서(biosensor)는 센서표면에 분석대상 물질과 선택적으로 감응하는 probe인 생체수용체(bio receptor)를 효과적이고 안정적으로 고정시키는 것이 중요하며, HRP를 바이오센서표면에 고정시키기 위해 silica sol-gel, conducting polymer, ionic liquid, self-assembly monolayer, layer-by-layer assembly가 일반적으로 사용되고 있다.<sup>17-21</sup> 이들 방법 중 silica sol-gel법은 alkoxy silane의 다공성 겔 지지체 내에 HRP를 포획(entrapment)시켜 바이오센서 표면에 고정시키는 방법으로, HRP 고정 시 편의성과 안정성을 동시에 확보할 수 있어 많이 연구되고 있다.<sup>22-25</sup> Alkoxy silane의 졸-겔 전이반응은 alkoxy silane, 촉매(산 또는 염기), co-solvent인 알콜과 물을 적당한 몰비로 혼합하여 저어주는 단순한 과정으로 간단하게 겔로 전이되어 silicate 유리 network를 형성한다.<sup>26,27</sup> Alkoxy silane의 졸-겔 전이는 hydrolysis와 condensation 과정을 거쳐 상온에서도 일어나 열에 의한 생체수용체의 변성을 최소화할 수 있고, alkoxy silane의 silicate 유리는 열적으로 안정할 뿐 아니라 전기화학적으로 비활성이기 때문에 생체수용체의 고정이 용이하고 응용성이 매우 크다.

Alkoxy silane의 silica gel은 전기전도성을 가지지 않으므로 alkoxy silane의 silica gel에 포획된 HRP 바이오센서는 주로 전도성 고체(glassy carbon, Pt, Au, ITO glass, carbon paste) 표면에 얇은 막 형태로 gel을 입혀 사용하고 있다.<sup>28-32</sup> 얇은 막에 고정된 HRP 바이오센서는 막의 안정성을 향상시키기 위해 전도성고분자, chitosan 등을 혼합하여 사용하고 있으나 장기적인 안정성이 떨어져 재사용이 어려운 단점이 있다. 이를 보완하기 위해 alkoxy silane의 gel 용액과 graphite를 혼합하여, 전기전도성을 나타내고 재사용이 가능하고 안정성을 향상시킨 carbon composite electrodes (CCEs)가 연구되고 있다. CCEs는 효소가 포획된 silica gel과 graphite가 잉크형태로 균일하게 반죽을 형성하여, 전도성 고체 표면에 막 형태로 입혀진 silica gel보다 안정성이 향상되어 바이오센서 전극재료로 적합하다. Lev에 의해 개발된 CCEs는 전극의 전도성 유지와 변성제(modifier)의 포획을 동시에 할 수 있어, 전기화학의 지시전극, 전기화학적 방법을 이용한 화학/바이오센서 연구에 응용되고 있다.<sup>33-36</sup>

본 연구에서는 alkoxy silane인 tetraethoxysilane(TEOS)을 사용한 졸-겔 전이반응을 통하여 HRP를 silicate 유리 network에 포획시킨 후, graphite와 혼합하여 CCEs 형태의 HRP 바이오센서를 제작하였다. 제작한 HRP 바이오센서의 전기화학적 특성을 조사하고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 검출 시 HRP의 함

량, pH, 방해작용 등에 따른 분석 최적조건을 조사하고 검량선을 작성하였다.

## 실 험

### 시약 및 기기

탄소가루(graphite powder)는 Fisher Scientific의 No. 38을 사용하였다. 완충용액 제조 시 사용된 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 효소인 horse radish oxidase(HRP, EC 1.1.3.4. from *Aspergillus niger*, 150 Units/mg), tetraethoxysilane(TEOS, 99%), HCl, ethanol, ascorbic acid, uric acid, acetaminophene, 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 Aldrich Co.(99% 이상)를 이용하였다. 모든 용액의 제조에는 Millipore사의 milli-Q를 사용하여 얻은 탈 이온화된 3차 증류수를 사용하였다. 전기화학 실험은 삼전극법을 이용하였다. 작업전극은 HRP가 포획된 CCE를 사용하였고, 기준전극은 Ag/AgCl(3 M NaCl), 보조전극은 백금선을 각각 사용하였다. 전위조절 및 전류측정을 위해 potentiostat (BAS 100B/W)를 사용하였으며, 전류법을 이용한 전류 측정 시 용액은 magnetic stirrer를 이용하여 300 rpm의 속도로 저어 주었다.

### HRP-carbon composite 바이오센서 제조

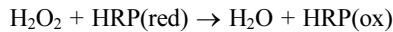
1.0 mL TEOS, 0.2 mL 증류수, 10.0 μL 1.0 M HCl과 0.2 mL의 에탄올을 혼합하여 저어주면서 1시간 동안 반응시켜 겔 용액을 만든다. 완충용액에 녹인 200.0 μL의 HRP 용액을 미리 제조한 0.2 mL 겔 용액에 넣고 10분 동안 sonication시킨 후, 0.16 g의 graphite를 HRP가 포획된 겔 용액에 넣고 유리막대로 골고루 저어주면서 HRP가 포획된 graphite 반죽을 제조한다. graphite 반죽을 유리관(지름 3 mm, 길이 50 mm) 한쪽 면에 1 cm의 높이로 채운 후, 유리관의 다른 면으로 구리선을 graphite 반죽에 삽입하여 potentiostat를 CCE와 연결하였다. 유리관에 채운 CCE는 상온에서 24시간 동안 건조하였으며, 측정 전에 유산지(weighing paper)로 표면을 처리하여 사용하였다. HRP의 함량은 graphite 대 고체 HRP의 질량 퍼센트(wt%)로 환산하여 0.4~2.4 wt%로 변화시켰다.

## 결과 및 고찰

### HRP 바이오센서의 전기화학적 특성 및 분석조건

TEOS는 물의 가수분해(hydrolysis)에 의해 silanol groups (Si-OH)이 생기고, 축합반응(condensation)을 통해 siloxane (-Si-O-Si-) 고분자 형태의 3차원 silicate 유리 gel network가 생성된다. HRP는 silicate 유리 network 내에 포획되어 고정된다. 포획되어 있는 HRP의 촉매작용에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

는 다음과 같이 반응한다.



TEOS 겔 network는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같이 작은 분자들을 통과시킬 수 있으며, 겔 network에 고정되어 있는 HRP에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 H<sub>2</sub>O로 환원이 일어나며, 이때 전류가 흐르게 된다. 환원 시 흐르는 전류는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 증가하면 커지게 된다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 환원에 대한 HRP 바이오센서의 특성을 알아보기 위해, 순환전압전류법(cyclic voltammetry) 및 전류법(amperometry)을 이용하여 전기화학적 특성을 조사하였다. phosphate 완충용액(0.1 M, pH 7.0)에 들어 있는 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 대해, HRP가 고정되지 않은 bare CCE와 HRP가 고정된 HRP-CCE 바이오센서를 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 전압전류 곡선(cyclic voltammogram)을 얻었다(Fig. 1). Bare CCE에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 환원전류가 흐르지 않았으나, HRP-CCE 바이오센서의 경우 -0.2 V에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 환원이 시작되어 환원전위가 증가하면 전류도 증가하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 환원 여부를 확인하기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 증가시킨 결과, 농도가 증가하면 환원 전류도 증가하여 -0.2 V의 전위에서 흐르기 시작하는 전류는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 환원에 의한 전류임을 확인하였다. 환원전위가 증가하면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 환원 전류도 증가하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분석 시 감도도 좋아지나, 용액 내 용존산소와 같은 환원성 물질들의 환원에 의한 방해작용을 최소화하기 위해 -0.3 V를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 전류법 분석 시 바이오센서에 가하는 전위로 선택하였다.

HRP-CCE 바이오센서를 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 전기화학적 으로 분석할 경우, HRP-CCE 바이오센서의 전극조성과 측정용액의 조건에 따라 바이오센서의 감도가 영향을 받는다. Graphite 대 고체 HRP의 질량퍼센트(wt%), 측정용

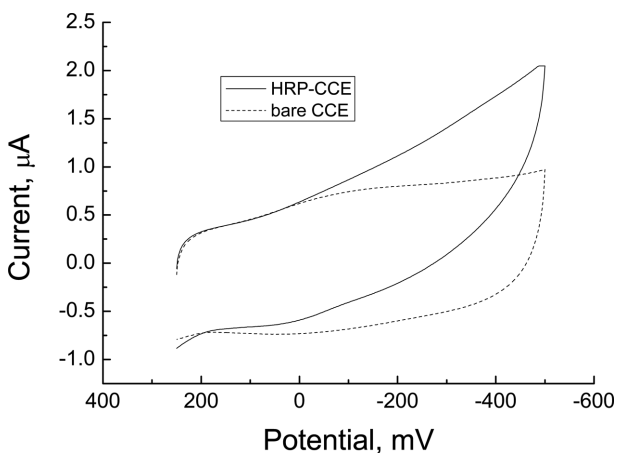


Fig. 1. Cyclic voltammograms for 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at bare CCE (---) and HRP-CCE biosensor (—). Phosphate buffer solution (pH 7.0, 0.1 M); Scan rate, 50 mV/sec.

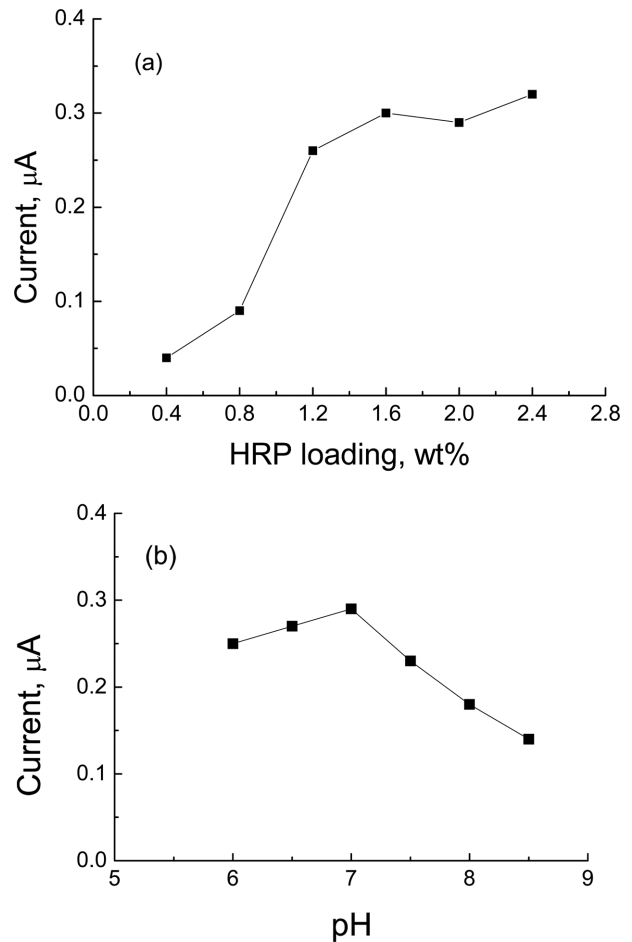


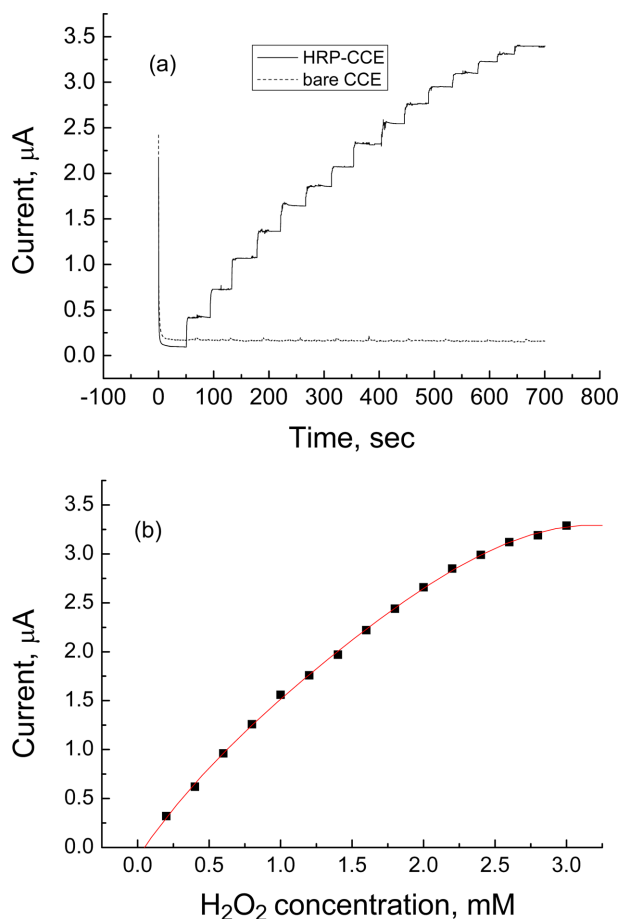
Fig. 2. (a) The effect of HRP loading for 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at HRP-CCE containing different HRP loading of 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 and 2.4 wt%, respectively. Applied potential, -0.3 V; phosphate buffer solution (pH 7.0, 0.1 M); stirring rate, 300 rpm. (b) The effect of pH for 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at HRP-CCE biosensor. Applied potential, -0.3 V; HRP loading, 1.6 wt%; stirring rate, 300 rpm.

액의 pH 변화에 따른 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 검출 최적조건을 전류법으로 조사하였다(Fig. 2). Fig. 1의 전압전류곡선 결과로부터 전류법 측정 시 HRP-CCE 바이오센서에 가하는 전위는 -0.3 V로 하였으며, 측정 동안 300 rpm의 속도로 용액을 저어 주었다. Fig. 2(a)는 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액(phosphate 완충용액, 0.1 M, pH 7.0)에 대해, graphite 대 고체 HRP의 질량 퍼센트(wt%)를 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 및 2.4%로 변화시키면서 전류크기를 조사하였다. HRP의 함량이 증가함에 따라 전류도 증가하였으며, HRP의 함량이 0.8%에서 1.2%로 증가하면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 환원전류가 크게 증가하고, 1.6% 이상의 HRP 함량에서 일정한 전류를 나타내었다. Fig. 2(b)는 pH 6.0~8.5 범위에서 pH를 변화시킬 때, pH 변화에 따른 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 전류변화를 측정전압 -0.3 V에서 1.6 wt% HRP-CCE 바이오센서를 이용하여 조사하였다. pH 6.0에서 7.0

으로 높아지면 환원전류는 증가하여 pH 7.0에서 최대 전류에 도달하고, 이후의 pH에서는 전류가 감소한다. HRP가 최적의 활성을 나타내는 pH는 7.0로 알려져 있으며, HRP-CCE 바이오센서의 최대전류가 pH 7.0에서 관찰되므로 포획된 HRP의 활성이 변하지 않고 유지되어 CCE가 HRP의 고정에 효과적임을 알 수 있다. 이상의 전류법 결과로부터 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분석할 경우 측정전압 -0.30 V, HRP의 함량 1.6% 및 pH 7.0을 최적조건으로 하여 전류를 측정하였다.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분석 검량선 작성 및 방해작용

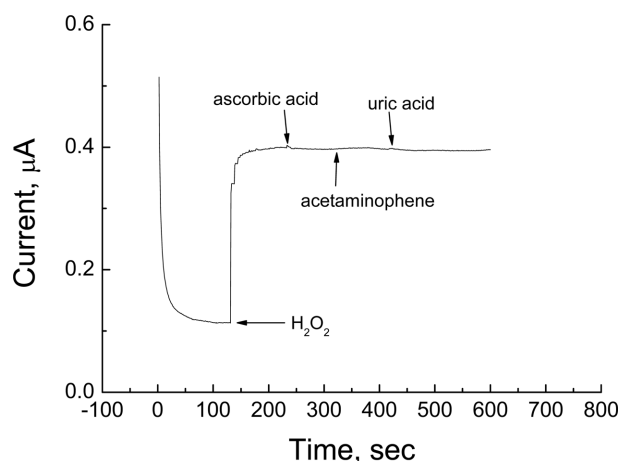
Fig. 3에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에 따른 HRP-CCE 바이오센서의 전류변화를 전류법(amperometry)으로 조사하여 검량선을 나타내었다. Fig. 2에서 구한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분석 최적조건(측정전압: -0.3 V, HRP 함량: 1.6 wt%, pH 7.0)에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 0.2 mM 단위씩 변화시키면서 시간에 따른 HRP-CCE 바



**Fig. 3.** (a) Amperometric response of HRP-CCE biosensor for successive addition of 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (b) Calibration plot of HRP-CCE biosensor. Applied potential, -0.3 V; phosphate buffer solution (pH 7.0, 0.1 M); stirring rate, 300 rpm; HRP loading, 1.6 wt%.

이오센서의 전류를 측정하였다(Fig. 3(a)). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 증가함에 따라 전류도 증가하며, 각 농도에 대하여 센서의 전류는 25초 이내에 최대 전류에 도달하였다. Fig. 3(a)의 시간 vs. 전류 변화를 농도 vs. 전류 변화로 나타내어 검량선을 작성하였다(Fig. 3(b)). 0.2~2.2 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도 범위에서 직선적인 감응을 나타내며, 2.4 mM 이상의 고농도에서는 직선에서 벗어나는 경향을 나타내었다. 직선 감응 농도범위에서 검량선의 직선식은  $y(\mu\text{A})=1.2536(\text{mM})+0.1884$ 이며,  $R^2=0.9922$ 인 우수한 직선성을 나타내었다. 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에서 5회 반복 측정하여 구한 센서신호의 상대표준편차는 4.9%였으며, 최적분석조건에서 구한 검출한계는 0.035 mM이었다. HRP-CCE 바이오센서의 분석 특성을 검증하기 위해 pH 7.0 완충용액에 10 mL에 최종 농도가 0.2 mM이 되도록 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 최적조건에서 recovery test를 실시하였다. 검량선을 이용하여 농도를 측정한 결과, 0.191 mM에 해당하는 전류신호를 나타내어 95.5%의 recovery 효율을 나타내었다. HRP-CCE 바이오센서의 안정성을 확인하기 위해 2일에 한번씩 최적분석 조건에서 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 표준용액을 이용하여 전류신호를 측정하였다. 3달 동안 조사한 결과 처음 전류신호의 78%가 유지되어 HRP-CCE 바이오센서에서 HRP의 활성이 안정적으로 유지되었다.

전기화학적으로 생체시료(혈액, 소변 세포 등)에 들어 있는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 검출할 경우 산화성 물질들의 산화에 의한 방해 작용이 분석의 결과에 영향을 미치며, 대표적인 방해물질들은 ascorbic acid, acetaminophene, uric acid 등이 있다. 일반적으로 대사과정에 의해 발생하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 +0.6 V보다 큰 전위에서 산화가 일어나며, 산화전위를 가하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분석할 경우 ascorbic acid, acetaminophene, uric acid 등도 동시에 산화가 일어나 방해작용을 일으킨다. 본 연구에서 사용한 HRP-CCE 바이오센서는 방해물질들의 산화가 일어나지 않는 전위에서 HRP의 촉매작용에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 환원 시 흐르는 전류를 측정하므로 방해물질들의 산화에 의한 영향을 최소화 할 수 있다. Fig. 1의 전압전류 곡선의 결과로부터 HRP-CCE 바이오센서는 ascorbic acid, acetaminophene, uric acid의 산화가 일어나지 않는 -0.3 V의 전위에서 촉매 환원전류를 측정하여, 이들 물질들의 방해작용을 전류법으로 조사하였다. Fig. 4에 분석 최적조건에서 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 0.1 mM의 ascorbic acid, acetaminophene, uric acid를 각각 첨가한 결과를 나타내었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 존재할 경우의 전류크기를 100%로 하여 환산하였을 경우, ascorbic acid, acetaminophene, uric acid를 첨가하였을 때 각각 99.2%, 101.1% 및 99.0%의 전류 값을 나타내어 세 물질의 방해작용이 거의 일어나지 않음을 확인하였다.



**Fig. 4.** Interference effect of HRP-CCE biosensor for successive addition of 0.1 mM ascorbic acid, acetaminophene, and uric acid. Applied potential, -0.3 V; phosphate buffer solution (pH 7.0, 0.1 M); stirring rate, 300 rpm; HRP loading, 1.6 wt%.

## 결론

본 연구에서는 Horseradish peroxidase (HRP), alkoxy silane 인 TEOS의 겔 용액과 graphite를 혼합하여 전기전도성을 나타내고 재사용이 가능하며 안정성을 향상시킨 carbon composite electrodes (CCEs) 바이오센서를 제작하였다. TEOS의 졸-겔 전이반응을 이용하여 HRP를 silicate gel network 포획시킨 후, graphite와 혼합하여 유리관에 채운 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 전기화학적으로 검출하였다. 전압전류법 및 전류법을 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 바이오센서의 전기화학적 특성과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분석 최적 조건 및 방해작용을 조사하였다. silicate gel network에 포획된 HRP의 촉매작용에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 -0.2 V부터 환원전류가 나타났으며, HRP의 함량 및 pH에 따른 바이오센서의 감응 특성을 조사하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분석 최적 조건을 구하고 검량선 및 검출한계를 구하였다. 전류법으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분석할 경우 측정전압 -0.30 V, HRP의 함량 1.6 wt% 및 pH 7.0을 최적조건으로 하여 전류를 측정하였고, 0.2 mM~2.2 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도 범위에서 직선적인 감응을 나타내며 최적조건에서 검출한계는 0.035 mM 이었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 표준물을 이용하여 recovery test를 실시하여 바이오센서의 성능을 평가하고, ascorbic acid, acetaminophene, uric acid의 방해작용을 조사한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 전기화학적 분석에 영향을 주지 않았다.

**Acknowledgments.** 이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2009-0090157).

## REFERENCES

- Lee, J. H.; Tang, I. N.; Weinstein-Lloyd, J. B. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2381.
- Hanaoka, S. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *426*, 57.
- Fernandes, E.; Gomes, A.; Lima, J. L. F. C. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2005**, *65*, 45.
- Nogueira, R. F. P.; Oliveria, M. C.; Paterlini, W. C. *Talanta* **2005**, *66*, 86.
- Wang, J. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1887.
- Karyakin, A. A. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 813.
- Wang, J.; Musameh, M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2075.
- Dong, S. J.; Zhou, M.; Zhai, Y. M. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5603.
- Miscoria, S. A.; Barrera, G. D.; Rivas, G. A. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 981.
- Lin, Y. H.; Cui, X. L.; Li, L. Y. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 166.
- Wang, K.; Xu J.-J.; Chen, H.-Y. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1388.
- Wang, Y.; Ma, X.; Wen, Y.; Xing, Y.; Zhang, Z.; Yang, H. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2442.
- Tang, B.; Li, F.; Feng, Y.; Wang, Z.; Yang L. M.; Zhuo, L. H. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2244.
- Sun, L. X.; Xiang, C.; Zou, Y.; Xu, F. *Sens. Actuators, B* **2009**, *136*, 158.
- Xu, J.; Shang, F.; Luong, J. H. T.; Razeeb, K. M.; Glennon, J. D. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1313.
- Xian, Y. Z.; Wu, F. H.; Xu, J. J.; Tian, Y.; Hu, Z. C.; Wang L. W.; Jin, L. T. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 198.
- Bi, S. P.; Di, J. W.; Zhang, M.; Yao, K. A. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 247.
- Kong, Y. T.; Boopathi, M.; Shim, Y. B. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 227.
- Safavi, A.; Maleki, N.; Moradlou, O.; Sorouri, M. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 420.
- Razeeb, K. M.; Xu, J.; Shang, F. J.; Luong, J. H. T.; Glennon, J. D. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1313.
- Feng, J. J.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1618.
- Tian, F.; Xu, B.; Zhu, L.; Zhu, G. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *443*, 9.
- Li, F.; Chen, W.; Tang, C.; Zhang, S. *Talanta* **2009**, *77*, 1304.
- Chen, H.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1811.
- Smith, K.; Silvernail, N. J.; Rodgers, K. R.; Elgren, T. E.; Castro, M.; Parker, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4247.
- Brinker, C. J.; Scherer, G.W. *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*; Academic Press: New York, 1990.
- Klein, L. C. *Sol-Gel Technology for Thin Films, Fibers, Performs, Electronics and Specialty Shapes*; Noyes Publications: Park Ridge, NY, 1988.
- Shi, A. W.; Qu, F. L.; Yang, M. H.; Shen, G. L.; Yu, R. Q.

- Sens. Actuators, B.* **2008**, *129*, 779.
29. Li, W.; Yuan, R.; Chai, Y.; Zhou, L.; Chen, S.; Li, N. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2008**, *70*, 830.
30. Yuan, S.; Yuan R.; Chai, Y.; Zhuo, Y.; Yang, X.; Yuan, Y. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *162*, 2189.
31. Kuma, A.; Malhotra, R.; Malhotra, B. D.; Grover, S. K. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *414*, 43.
32. Li, J.; Tan, S. N.; Ge, H. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *335*, 137.
33. Tsionsky, M.; Gun, G.; Glezer, V.; Lev, O. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1747.
34. Wang, J.; Pamidi, P. V. A.; Pararado, C.; Park, D. S.; Pingarron, J. *Electroanalysis* **1997**, *9*, 908.
35. Cabello-Carramolino, G.; Petit-Dominguez, M. D. *Microchim. Acta* **2009**, *164*, 405.
36. Barbadillo, M.; Casero, E.; Petit-Dominguez, M. D.; Vazquez, L.; Pariente, F.; Lorenzo, E. *Talanta* **2009**, *80*, 797.
-