

# 오스뮴 착물 합성과 전기화학적 방법을 이용한 바이오센서에 관한 연구

최영봉 · 김혁한\*

단국대학교 첨단과학대학 화학전공

(2007년 5월 10일 접수 : 2007년 5월 17일 채택)

## Synthesis of Osmium Redox Complex and Its Application for Biosensor Using an Electrochemical Method

Young-Bong Choi and Hyug-Han Kim\*

Department of Chemistry and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received May 10, 2007; Accepted May 17, 2007)

### 초 록

본 연구에서는 8족 금속 원소인 오스뮴을 중심금속으로 일차아민을 포함하고 있는 피리딘 (pyridine) 화합물을 배위시켜 착화합물을 합성하였다. 합성된 오스뮴 착화합물은  $[\text{Os}(\text{dme-bpy})_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2}$ 을 순환전압전류법을 포함한 다양한 전기화학분석법을 이용하여 전기적인 성질을 조사하였다. 또한 합성된 일차 아민을 갖는 오스뮴 착화합물을 이용하여 당 측정용 바이오센서를 제작하기 위하여 금 나노입자(Gold nano-particles)를 전기적 흡착방법을 이용하여 스크린 인쇄방법으로 만든 탄소반죽 전극 (Screen Printed Carbon Electrodes, SPEs) 위에 고정화를 시켰다. 당과 당 분해효소 (Glucose Oxidase, GOx)를 혼합하여 발생하는 산화촉매전류를 확인하였고, 당 농도에 따라 변화하는 산화촉매전류의 양도 확인하였다. 새롭게 만들어진 바이오센서는 1 mM 과 같은 낮은 농도에서 감응할 수 있는 바이오센서에 응용할 수 있음을 확인하였다.

**Abstract :** Redox complexes to transport electrodes from biomaterial to electrodes are very important part in commercial biosensor industry. A novel osmium redox complex was synthesized by the coordinating pyridine group with osmium metal. A novel osmium complex is described as  $[\text{Os}(\text{dme-bpy})_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2}$ . We have been studied the electrochemical characteristics of this osmium complex with electrochemical techniques such as cyclic voltammetry and chronoamperometry. In order to immobilize osmium redox complexes on the electrode, we deposited gold nanoparticles on screen printed carbon electrode(SPE). The electrical signal converts the osmium redox films into an electrocatalyst for glucose oxidation. The catalytic currents were monitored that the catalytic currents were linearly increased from 1 mM to 5 mM concentrations of glucose.

**Keywords :** Redox complexes, Biosensor, Electrocatalyst.

### 1. 서 론

바이오센서란 생체감지물질 (bioreceptor)과 신호 변환기 (signal transducer)로 구성되어 분석하고자 하는 물질을 선택적으로 감지할 수 있게 제작한 기구를 지칭한다. 생체감지물질로는 특정 물질과 선택적으로 반응 및 결합할 수 있는 효소, 항체, 항원, 렉틴, hormone-receptor 등이 쓰이고, 신호변환방법으로는 전기화학(electrochemical), 형광, 발색, SPR (surface plasmon resonance), FET (field-effect transistor), QCM (quartz crystal microbalance), 열 센서 등 다양한 물리화학적 방법을 사용하고 있다. 본 논문에 언급하는 전기화학 신호변환 방법은 특정한 정보를 곧바로 전기적 신호로 변환시켜준다는 점

에서 신호변환이 가장 간단한 방법이다. 이 방법은 분광학적인 방법처럼 일정한 공간이나 정교한 배치 (alignment)를 요구하지도 않고, 질량이나 기계적 변화를 재는 것처럼 외부 진동에 의한 영향이 극심하지도 않으면서 매우 넓은 농도 범위에서 높은 감도로 작동할 수 있다. 또한 전기화학 측정기기는 저비용으로 소형화, 집적화의 편리성 때문에 산업적으로 가장 선호되는 방식의 하나이다.

그러나 이런 훌륭한 장점에도 불구하고 선택성이 부족하다는 문제점 때문에 바이오센서에 적용이 힘들었지만, 생체물질을 전극과 결합시킴으로써 선택성을 보완할 수 있게 되었고, 그 대표적인 예가 효소전극(enzyme-linked electrode)이다. 생체 효소의 대부분은 특정한 기질에만 선택적으로 결합, 반응을 유도하는 성질을 가지고 있으므로 효소를 전극 상에 고정시키고 효소 반응에 의해 변화하는 화학적인 환경들을 간접적으로 측정함으로써

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

써 선택성의 문제를 해결할 수 있었다. 이런 효소전극을 기초로 하여 상용화된 전기화학적 바이오센서는 혈당센서(glucose sensor)이다. 혈당센서에 사용되는 효소인 당 산화효소(glucose oxidase)는 쉽고 값싸게 구할 수 있으며, 다른 효소보다 pH, 이온강도, 온도에 안정하며 또한 화학적인 고정화에 잘 견디고 상온에서 높은 회전율(turnover rate;  $\sim 10^3 \text{ s}^{-1}$ )을 갖는다는 이유 때문에 크게 상업적으로 성공했다고 볼 수 있다.

전기화학적 방법을 이용한 혈당센서의 역사는 40년 전 Clark와 Lyons에 의해 당 산화효소에 의하여 감소하는 산소의 농도 변화를 측정하는 방법, 과산화수소의 농도를 측정하는 방법과 산화환원매개체(redox mediator)를 이용하는 방법이 있다.<sup>1-8)</sup> 산화·환원매개체(redox mediator)의 중요한 역할은 효소의 활성 중심(active center)부터 전극으로 전자전달반응을 수행함으로써 혈당 검출에 있어서 전기적으로 산화되는 방해물질로부터의 간섭을 피할 수 있고, 이로 인해 높은 선택성(selectivity)과 감도(sensitivity)를 얻을 수 있다. 이러한 산화·환원매개체의 필수 조건은 효소의 활성중심(active center)에 쉽게 접근할 수 있게 작은 분자량을 갖는 산화·환원 쌍(redox couple)을 이뤄야 하며, 측정대상에 포함하고 있는 전기화학적 간섭물질보다 낮은 산화·환원 전위(redox potential)를 갖고, 빠른 전기적인 응답(electric response)을 보여야 한다. 현재까지 이러한 조건을 만족시키는 금속화합물들은 페로센(ferrocene), 페로센의 유도체, 퀴논, 퀴논의 유도체, 전도성 고분자인 폴리아닐린, 폴리피롤, potassium ferricyanide, tetrathiafulvalene(TTF)과 같은 전도성 염 등이 산화·환원매개체로 연구되었는데, 최근에는 8족 금속인 iron, ruthenium, osmium 착화합물에 관한 많은 연구가 진행되어지고 있다.<sup>9-13)</sup> 본 연구에서는 텍사스 주립대학의 A. Heller 박사와 연구원들에 의해 많이 진행된 폴리머와 결합된 수화 겔(Hydrogel) 형태의 오스뮴(Osmium) 착화물에 착안하여 자기조립막(Self-Assemble Monolayer)의 구조를 이룰 수 있는 새로운 오스뮴 착화물을 금 나노입자(Gold nano-particles)를 입힌 탄소반축 전극(Screen Printed Carbon Electrodes, SPEs) 위에 고정화 하여 적은 농도 (< 5 mM)의 당(glucose)에 감응할 수 있는 바이오센서를 관한 연구를 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 시약 및 시료

센서 스트립에 사용된 carbon paste (Electrodag 423SS)는 Acheson사 (Port Huron, MI)의 제품을 사용하였다. Potassium hexachloroosmate(IV), 4,4'-dimethyl-2,2'-dipyridyl, 1-(3-aminopropyl)-imidazole, sodium hydrosulfite (Aldrich Chem. Co.)는 정제 없이 분석시약 급을 그대로 사용하였다. 합성물 정제를 위하여 TLC는 aluminum oxide (60 F<sub>254</sub>, 0.2 mm, Merck)판을 이용 하였으며, 관 크로마토그래피 (column chromatography)에 이용된 aluminum oxide는 50-200  $\mu\text{m}$  (Acrose)를 사용하였다. 전극 표면에 조립 단분자막 (SAM)처리를 위하여 3-mercaptopropionic acid, potassium tetrachloroaurate(III), NHS (N-hydroxysuccinimide), EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)를 정제 없이 분석시약 급을 그대로 사용하였고, 전해질로는 0.1 M NaCl을 포함한 PBS (pH 7.0, Phosphate Buffered Saline)를 사용하였고, 모든 용액의 제조와 실험을 위하여 3차 증류수 (저항 18 M  $\cdot$   $\Omega\text{cm}$ )를 사용하였다.

### 2.2 [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>(aminopropyl-imidazole)Cl]<sup>+2+</sup>의 합성

Fig. 1과 같은 순서로 [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>2+/3+</sup>을 합성하기 위하여 100 ml 둥근바닥 플라스크에 potassium hexachloroosmate(IV) (100 mg, 0.21 mmol)와 4,4'-dimethyl-2,2'-dipyridyl (77 mg, 0.42 mmol)을 ethylene glycol (30 ml)에 녹여 넣은 후 환류냉각기에 플라스크를 연결하고, 1시간 30분 동안 160°C에서 반응시켰다. 반응 후 1 M의 sodium hydrosulfite (10 ml)를 첨가하여 생성된 침전물을 0°C에서 30분가량 식혔다. 침전물을 Nylon membrane filter (Whatman, 0.45  $\mu\text{m}$ )을 이용하여 여과하고, 차가운 증류수와 에테르를 사용하여 세척하여 수득하였다.

합성된 [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>2+/3+</sup> (50 mg, 0.069 mmol)와 1-(3-aminopropyl)-imidazole (8  $\mu\text{l}$ , 0.069 mmol)을 100 ml 둥근바닥 플라스크 안에서 ethylene glycol (20 ml)와 ethanol (30 ml)의 혼합물에 녹여 넣은 후 환류냉각기에 플라스크를 연결하고, 2시간 동안 반응을 시켰다. 반응 후 생성물을 전개 용매로 ethanol을 사용하여 관 크로마토그래피로 정제하고 다시 용매를 회전증발기를 이용하여 증발시켜 얻었다.<sup>14-19)</sup>

### 2.3 나노 금 전극 제조 및 전기화학 측정

Potassium tetrachloroaurate(III) (KAuCl<sub>4</sub> 7.56 mg, 0.02 mmol)을 1 M의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 ml)에 녹여 KAuCl<sub>4</sub> (2 mM)용액을 제조하였다. 작업 전극인 탄소반축전극 위에 KAuCl<sub>4</sub> 용액 (40  $\mu\text{l}$ )를 올리고, 기준전극 (Ag/AgCl)과 상대전극 (pt wire)을 용액에 접촉시킨 후, CHI 660B Electrochemical Workstation의 순환전압전류법을 이용하여 금을 흡착한 후 고정된 Au particles의 모양과 양을 JSM6700F FESEM II (JEOL) SEM을 통해 이미지를 얻었다. 조립 단분자막 (SAM)처리를 위하여 금 나노입자들이 흡착된 탄

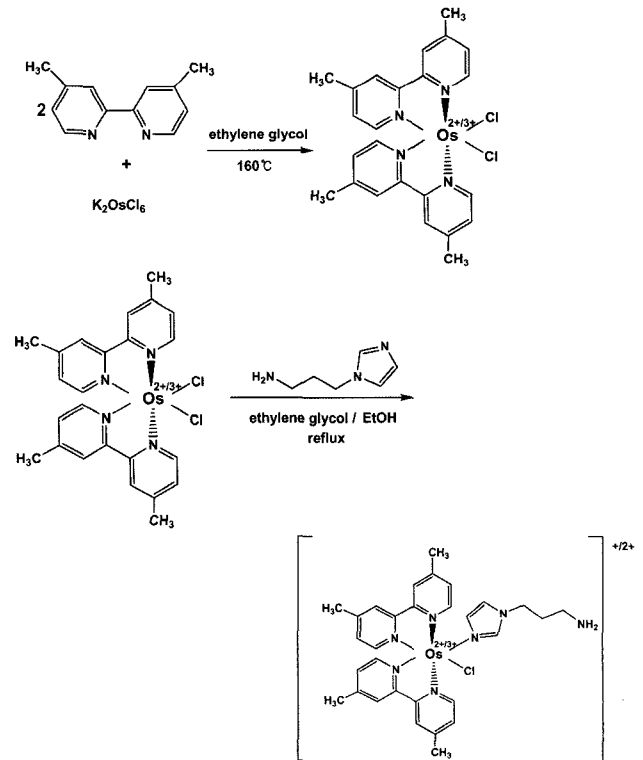


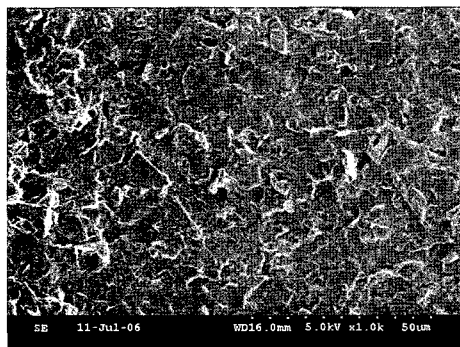
Fig. 1. The synthesis of [Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>(aminopropyl-imidazole)Cl]<sup>+2+</sup>.

소반죽전극 (SPEs) 위에 3-mercaptopropionic acid (1 mM, 40  $\mu$ l)를 올리고 상온에서 1시간동안 반응을 하였다. 반응 후 증류수로 탄소반죽전극 (SPEs) 표면을 세척하고 상온에서 말린 다음 EDC (20  $\mu$ l/ 50 mg in PBS 300  $\mu$ l)와 NHS (20  $\mu$ l/ 30 mg in PBS 300  $\mu$ l) 혼합액을 탄소반죽전극 (SPEs) 위에 올려 상온에서 1시간 반응하였다. 반응 후 다시 증류수로 탄소반죽전극 (SPEs) 표면을 세척하여 상온에서 말리고 일차아민을 포함하는 osmium complex (1 mmol)를 올리고 상온에서 1시간 반응하였다. 반응이 다 끝난 후 탄소반죽전극 (SPEs)를 증류수로 세척 하고 말린 다음 PBS (40  $\mu$ l)를 올리고 CHI 660B 순환전압전류법을 통해 osmium complex 고정화를 확인하였다. 바이오센서 실험을 위하여 고정된 농도의 당 산화효소 (glucose oxidase, 5 mg/ in PBS 1 ml)에 당의 농도를 (1 mM~30 mM)를 변화시키며 CHI 660B Electrochemical Workstation의 순환전압전류법을 통해 촉매 전류를 확인하였다.

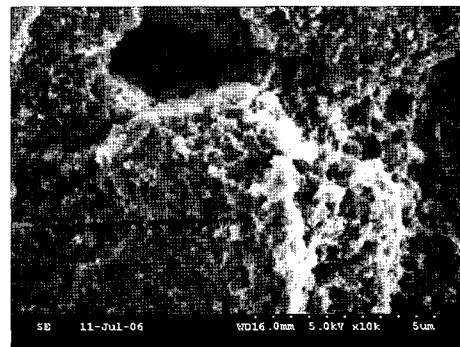
### 3. 결과 및 고찰

스크린 프린팅된 탄소반죽전극 (screen printed carbon electrodes; SPEs) 위에  $\text{KAuCl}_4$  (2 mM in 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 40  $\mu$ l)을 용액에 접촉시킨 후, Ag/AgCl을 기준전극으로 -0.6 V와 0.8 V 구간을 20회 반복하는 순환전압전류법 (CV)을 통하여 직경 3 nm

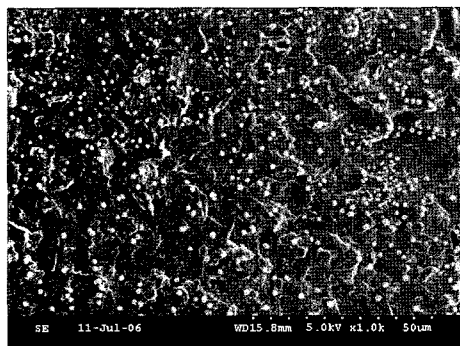
의 탄소반죽전극에 수백나노 크기를 갖는 Au를 전극 위에 흡착되었다. Fig. 2는 bare 탄소반죽전극과 나노 금을 흡착한 이후의 SEM 이미지를 비교한 사진이다. SEM 이미지에 의한 전극표면의 morphology를 보면 나노 금이 흡착이 되지 않은 bare 탄소전극의 표면 사진 (a), (b)와 나노 금이 흡착된 (c), (d)를 비교 할 때 명확하게 나노 Au particle의 흡착을 확인할 수 있었다. 약 200 nm size의 금 나노입자 (Au nano-particles)들이 상호회합을 통하여 1  $\mu$ m size의 입자 덩치들로 형성되는 것을 SEM을 통하여 확인 할 수 있었다. Fig. 3은 전기화학적 방법을 이용하여 합성된 4배위의  $[\text{Os}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine)}_2\text{Cl}_2]^{2+/3+}$ 와 결과물인 5배위의  $[\text{Os}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine)}_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2+}$ 을 확인하기 위하여 기준전극인 Ag/AgCl에 대하여 주사속도 0.1 V/sec이며, 전위구간은 -0.4 V~0.8 V에서 순환전압전류법 (CV)을 이용하여 간단하게 합성 유무를 확인할 수 있었다. CV에서 보여주는 것과 같이 4배위인  $[\text{Os}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine)}_2\text{Cl}_2]^{2+/3+}$  전위값이 -0.123 V (vs. Ag/AgCl)에서 나타나는데 전자주기 작용기인 Cl<sup>-</sup> 리간드와 치환된 전자받기 작용기인 imidazole 리간드에 의하여 전위가 약 200 mV 가량 증가하여 0.118 V (vs. Ag/AgCl)에서 5배위인  $[\text{Os}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine)}_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2+}$ 의 합성을 확인할 수 있었다. Fig. 4는 금 나노입자 (Au nanoparticles)가 흡착된 SPEs 위에 3-mercaptopropionic acid (1 mM, 40  $\mu$ l)를 이용하여 황과 금과 자기 조립 단분



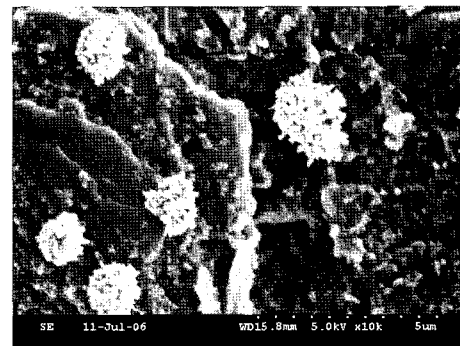
(a) 1 K



(b) 10 K



(c) 1 K



(d) 10 K

Fig. 2. SEM images of screen-printed carbon electrodes (a), (b) without gold and (c), (d) with gold nano-particles.

자막 (Self Assembled Monolayer; SAM) 의 형성을 한 후에 전극 위에 carboxylic acid group과 일차 아민을 포함하고 있는  $[\text{Os}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine})}_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2+}$ 을 고정화하는 방법을 나타내고 있다.

위와 같은 방법을 이용하여 고정된  $[\text{Os}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine})}_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2+}$ 을 Fig. 5의 CV를 통하여 확인하였다. 산화 전류와 환원 전류 값들은 peak를 적분하여 전기량을 구한 후에, 전극의 면적당 올라갈 수 있는 오스mium의 착화합물의 moles 수를 확인하였다. 계산 값은 단위면적당 (surface coverage) moles 수가  $\Gamma_0 = 3.7 \times 10^{-10} \sim 5.05 \times 10^{-10}$  mole/cm<sup>2</sup> 값을 얻었다. 이러한 결과를 통하여 매끈한 전극표면이 갖는 surface coverage는

$\Gamma_0 = 4.5 \times 10^{-11}$  mole/cm<sup>2</sup> 인데 비해 약 10배가량 surface coverage가 증가함을 알 수 있었다. 이에 대한 설명은 본 실험에 사용한 스크린 프린팅 카본반죽전극이 거친 표면 위에 구형 형태로 흡착된 나노 금들로 인하여 매끈한 표면을 갖는 전극보다 surface coverage가 많이 증가함을 확인 할 수 있었다. Fig. 6은 자기 조립 단분자막 (Self Assembled Monolayer; SAM) 방법을 통해  $[\text{Os}(\text{dme-bpy})_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2+}$ 를 고정화 시킨 탄소전극 위에 glucose와 glucose oxidase (5 mg/ in PBS 1 ml)가 반응하여 나오는 전자를 매개체인 osmium complex가 전극에 전달할 때 발생하는 산화 촉매전류를 순환전압전류법을 이용하여 여러 가지 다른 glucose 농도 (0 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 30 mM)별로 측정하였다. (그림 생략) 산화촉매전류가 나타나는 전위의 위치 중 산화전류 값이 일정하게 유지되는 산화전위인 0.6 V (versus Ag/AgCl)로

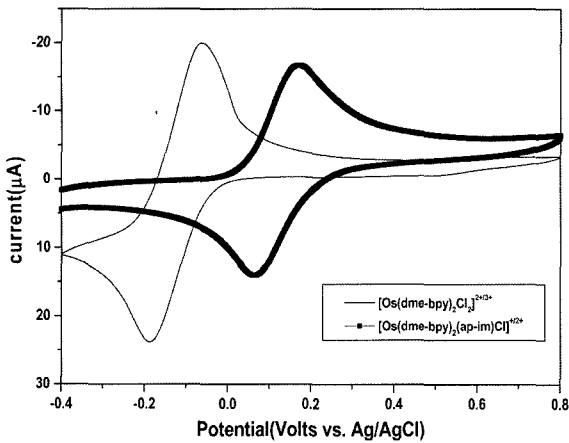


Fig. 3. Cyclic voltammograms of  $[\text{Os}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine})}_2\text{Cl}]^{2+/3+}$  and  $[\text{Os}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine})}_2(\text{aminopropyl-imidazole})\text{Cl}]^{+2+}$ .

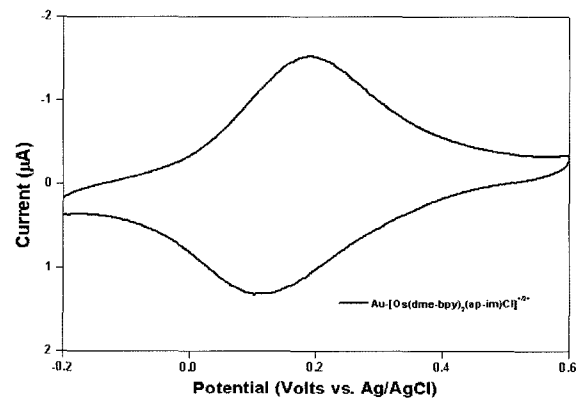


Fig. 5. Cyclic voltammograms of immobilized  $[\text{Os}(\text{dme-bpy})_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2+}$  on gold-deposited SPEs at the scan rate; 10 mV.

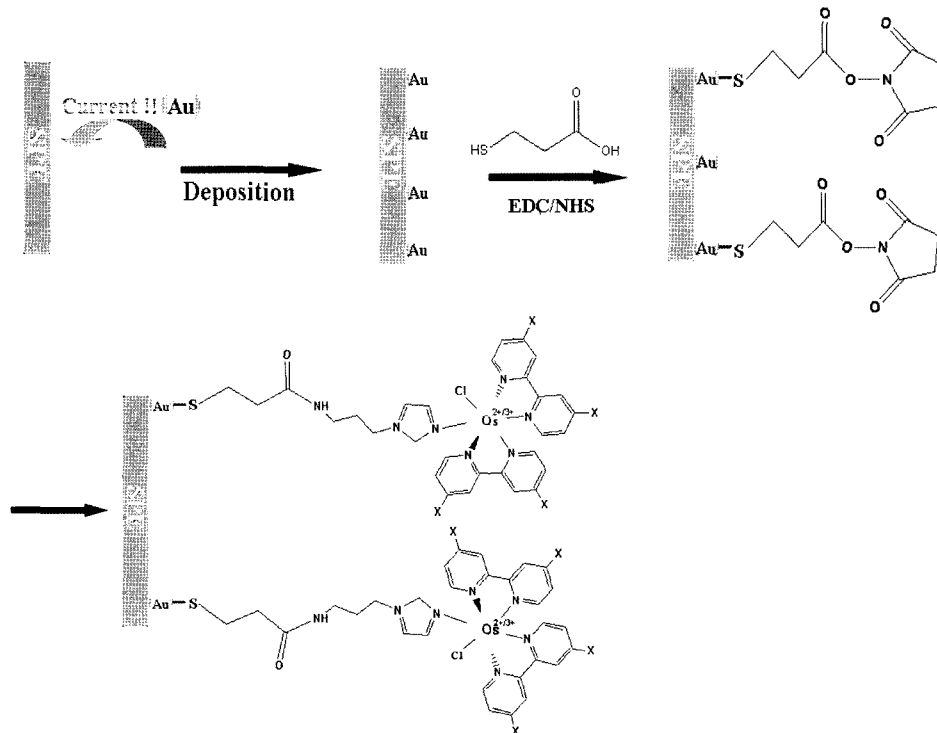


Fig. 4. Modification procedures on the gold-deposited SPEs.

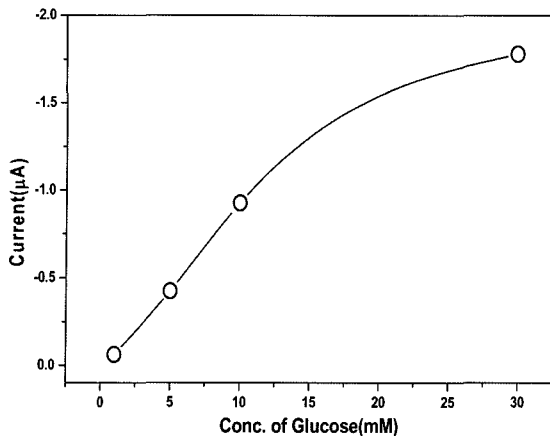


Fig. 6. The catalytic currents of different glucose concentrations at 0.6 V vs. Ag/AgCl,  $[\text{Os}(\text{dme-bpy})_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2+}$ .

고정하고 전기신호와 관련된 검정곡선을 도시하여 glucose의 농도별로 발생하는 당 산화촉매전류의 상관관계를 확인 하였다. glucose의 농도가 10 mM까지는 농도에 비례하여 일정한 전류의 양이 직선적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으나 10 mM 이상 일 때 전극 상에서 glucose가 산화되는 최대 값에 접근함에 따라, 즉 포화 (saturation)상태에 도달함으로써 전류의 증가폭이 점차 작아지면서 한계촉매전류에 도달하는 것을 확인할 수 있었다.

#### 4. 결 론

바이오센서로 생물소자를 검출할 때 전자를 운반하는 산화환원 매개체로 8족 금속원소인 오스뮴 금속을 이용하여 일차아민을 포함하고 있는 5배위인  $[\text{Os}(4,4\text{'-dimethyl-2,2\text{'-bipyridine})_2(\text{ap-im})\text{Cl}]^{+2+}$  착화합물을 합성하여 전기적 특성을 순환전압전류법을 통해 확인 할 수 있었다. 합성한 착화합물을 탄소반죽전극 위에 고정화하기 위하여 금 나노입자 (Au nanoparticle)를 시간 순환전압전류법을 이용한 전기적 흡착으로 올려 SEM을 통해 전극 위에 흡착된 금 나노입자 (Au nanoparticle)의 크기와 분포에 대해 확인 할 수 있었다. 전자전달 매개체인 osmium complex가 고정화된 전극을 통하여 glucose와 glucose oxidase와의 반응을 순환전압전류법을 통해 산화촉매전류가 발생됨을 확인하였고, 변화되는 glucose의 농도에 따라 일정하게 산화촉매전류가 변화함을 농도 검정곡선을 통하여 확인 할 수 있었다.

본 연구에서 합성한 osmium complex는 수용성이라는 장점을 갖고 있고, 또한 가역적인 전기화학 특성을 갖고 있기에 직접 측정하고자 하는 DNA, 항원, 항체와 같은 생물소자에 직접 결합하여 유용하게 쓰일 것으로 예상된다.

#### 감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 신진교수연구과제지원사업의 연구비 지원으로 인하여 이루어 졌기에 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. L. C. Clark Jr. and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery" *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29

- (1962).
2. A. L. Crumbliss, H. A. O Hill and D. J. Page, "The electrochemistry of hexacyanoruthenate at carbon electrodes and the use of ruthenium compounds as mediators in the glucose/glucose oxidase system" *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **206**, 327 (1986).
  3. M. A. Lange and J. Q. Chambers, "Amperometric determination of glucose with a ferrocene-mediated glucose oxidase/polyacrylamide gel electrode" *Anal. Chim. Acta.*, **175**, 89 (1985).
  4. D. A. Gough, J. Y. Lucisano and P. H. S. Tse, "Two-dimensional enzyme electrode sensor for glucose" *Anal. Chem.*, **57**, 2351 (1985).
  5. A. P. F. Turner, "Diabetes mellitus: biosensors for research and management" *World Biotech. Rep.*, **1**, 181 (1985).
  6. K. Mckenna and A. Brajter-Toth, "Tetrathiofulvalene tetracyanoquinodimethane xanthine oxidase amperometric electrode for the determination of biological purines" *Anal. Chem.*, **59**, 954 (1987).
  7. P. D. Hale and T. A. Skotheim, "Cyclic voltammetry at TCNQ and TTF-TCNQ modified platinum electrodes: A study of the glucose oxidase/glucose and galactose oxidase/galactose systems" *Synth. Met.*, **28**, 853 (1989).
  8. B. A. Gregg and A. Heller, "Redox polymer films containing enzymes. 2. Glucose oxidase containing enzyme electrodes" *J. Phys. Chem.*, **95**, 5976 (1991).
  9. M. S. Vreeke, K. T. Yong and A. Heller, "A Thermostable Hydrogen Peroxide Sensor Based on "Wiring" of Soybean Peroxidase" *Anal. Chem.*, **67**, 4247 (1995).
  10. R. M. Ianiello, T. J. Lindsay and A. M. Yacynych, "Differential pulse voltammetric study of direct electron transfer in glucose oxidase chemically modified graphite electrodes" *Anal. Chem.* **54**, 1098 (1982).
  11. O. Miyawaki and L. B. Wingard, Jr., "Electrochemical and enzymatic activity of flavin adenine dinucleotide and glucose oxidase immobilized by adsorption on carbon" *Biotech. Bioeng.* **26**, 1364 (1984).
  12. C. Taylor, G. Kenausis, I. Katakis and A. Heller, " "Wiring" of glucose oxidase within a hydrogel made with polyvinyl imidazole complexed with  $[(\text{Os}-4,4\text{'-dimethoxy-2,2\text{'-bipyridine})\text{Cl}]^{+2+}$ " *J. Electroanal. Chem.*, **396**, 511 (1995).
  13. 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).
  14. G. Kenausis, C. Taylor, R. Rajagopalan and A. Heller, " "Wiring" of glucose oxidase and lactate oxidase within a hydrogel made with poly(vinyl pyridine) complexed with  $[\text{Os}(4,4\text{'-dimethoxy-2,2\text{'-bipyridine})_2\text{Cl}]^{+2+}$ " *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **92**, 4131 (1996).
  15. G. Maerker and F. H. Case, "The Synthesis of Some 4,4'-Disubstituted 2,2'-Bipyridines" *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2745 (1958).
  16. S. M. Zakeeruddin, D. M. Fraser, M.-K. Nazeeruddin and M. Grtzel, "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).
  17. R. J. Forster and J. G. Vos, "Synthesis, Characterization, and Properties of a Series of Osmium- and Ruthenium-Containing Metallopolymers" *Macromolecule*, **23**, 4372 (1990).
  18. C. Taylor, G. Kenausis, I. Katakis and A. Heller, " "Wiring" of glucose oxidase within a hydrogel made with polyvinyl imidazole complexed with  $[(\text{Os}-4, 4\text{'-dimethoxy-2, 2\text{'-bipyridine})\text{Cl}]^{+2+}$ " *J. Electroanal. Chem.*, **396**, 511 (1995).
  19. A. Aoki, R. Rajagopalan and A. Heller, "Effect of Quaternization on Electron Diffusion Coefficients for Redox Hydrogels Based on Poly(4-vinylpyridine)" *J. Phys. Chem.*, **99**, 5102 (1995).