코티솔 각인 고분자가 도입된 3차원 환원된 산화그래핀 나노복합체의 전기화학적 합성 최적화 연구

장혜민[1], 이기자[1,2,*]

[1]경희대학교 일반대학원 생체의과학 협동과정, [2]경희대학교 의과대학 의공학교실

Optimization of the electrochemical synthesis of cortisol imprinted polymer coated on 3D reduced graphene oxide nanocomposites

Hye Min Jang[1], Gi-Ja Lee[1,2,*]

[1] Department of Medical Engineering, Graduate School, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

[2] Department of Biomedical Engineering, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

[*] gjlee@khu.ac.kr

Abstract

Cortisol is a type of steroid hormone that is secreted adrenal glands in response to stress. In order to diagnose and prevent various mental diseases caused by chronic stress, it is necessary to develop a technology to detect cortisol sensitively. We are developing an ultrasensitive electrochemical cortisol sensor utilizing molecularly imprinted polypyrrole(MIPPy) and 3D reduced graphene oxide-carbon nanotube nanocomposites. For the best sensing performance, we optimized the synthetic conditions for MIPPy such as electropolymerization and extraction cycles, as well as monomer and cortisol concentrations.

1. 연구 배경

Molecularly imprinted polymer (MIP)란 검출하고자 하는 물질과 단량체를 함께 중합하여 제작할 수 있는데, 단량체와 주형 분자 사이의 상호작용을 통해 입체 특이적인 인식 부분이 만들어진다. 이렇게 생성된 인식부위에 타겟 물질이 재결합을 할 수 있게 됨으로써 선택적으로 검출할 수 있게 되는 원리이다. MIP는 약물, 식품, 환경 등의 다양한 분야에서 물질을 인식하는데 활용될 수 있다 [1].

스테로이드 호르몬의 한 종류인 코티솔은, 인체에서 심리적, 환경적 스트레스에 대한 반응으로 부신에서 분비되어 신체의 스트레스 반응과 생리학적 대사 및 면역반응 조절에 중요한 작용을 한다 [2,3]. 적절하게 유지될 경우에는 긍정적인 영향을 주지만 높은 코티솔 수치에 장기간 노출되면 만성 스트레스가 유발되는데, 이는 불안, 우울증, 심혈관 질환 및 면역반응 약화를 일으킬 수 있는 위험이 있다 [4]. 따라서 스트레스로 인한 여러 문제들을 예방하고 효과적으로 정신 건강을 관리하기 위해 주기적인 코티솔 검출이 필요하다.

코티솔은 타액, 땀 등의 체액에서도 검출되는데 Russell 등에 의하면 땀에서의 코티솔 농도는 8.16 ~ 141.7 ng/ml(낮 기준)이며 [5], 타액 내 코티솔은 0.05 ~ 0.5 μg/dL로 보고되었다 [6]. 따라서 체액 내 낮은 농도로 존재하는 코티솔을 간편하고 효율적으로 검출하기 위해서는 고감도 검출 기술이 요구된다. 코티솔을 검출하는 방법으로는 ELISA, 크로마토그래피 및 효소, 항체 등의 생체분자를 이용한 광학적, 전기화학 센서가 있다 [7]. 하지만 이러한 생체분자를 사용한 검출 방법은 선택성은 좋지만, 비용이 많이 들고 pH, 온도 등의 환경에 불안정하다는 단점이 있다. 이런 단점을 보완하고자 외부 환경에 비교적 안정적이고 우수한 선택성을 가진 분자 각인 고분자(molecular imprinted polymer, MIP) 기반의 인공 수용체 연구가 활발히 이루어지고 있다.

따라서 본 연구팀은 코티솔에 대한 고감도 검출을 위하여 3차원 다공성의 환원된 산화 그래핀 (reduced graphene oxide, rGO) - 탄소 나노 튜브(carbon nanotube, CNT) 나노복합체(rGO-CNT)와 생체적합성과 화학적 안정성이 우수한 폴리피롤(polypyrrole, PPy)을 이용하여 MIP 센서를 제작하고자 한다. 효율적으로 코티솔을 검출하기 하기 위해, MIP 합성에 필요한 여러 조건들을 최적화해야 한다. 그러므로 본 연구에서는 단량체와 주형분자의 농도 비율, 전기화학적 중합 사이클, 추출 조건 등을 변화시키면서 검출 신호에 미치는 영향을 확인하였다.

2. 연구 방법

스크린 프린팅 탄소전극(Screen printed carbon electrode, SPCE)을 산화 그래핀(graphene oxide, GO)과 CNT가 잘 분산되어 있는 용액에 담근 후 +0.3 ~ –1.5 V의 범위에서 순환전압전류법(cyclic voltammetry, CV)를 3 cycles 동안 시행하여 원스텝 전기화학적 환원/증착을 통해 3차원 다공성의 rGO-CNT 나노 복합체를 합성하였다. 이후, 2.5 mM의 코티솔과 15 mM의 pyrrole이 포함된 용액에서 CV를 이용하여 0 ~ 0.9 V 범위에서 전기화학적으로 중합시켜 폴리피롤(MIPPy)를 제작하였다. 마지막으로, 0.1 M NaOH 용액에서 코티솔을 추출하여 분자각인 폴리피롤(MIPPy)를 완성하였다. 대조군으로는 주형분자만 제외하고 위와 동일한 방법으로 non-imprinted polypyrrole(NIPPy)를 제작하여 비교하였다 모든 전기화학적 합성과 분석은 Ivium potentiostat(Netherland)을 이용하였다. 코티솔 검출용 MIPPy의 제작과정은 그림 1과 같다.

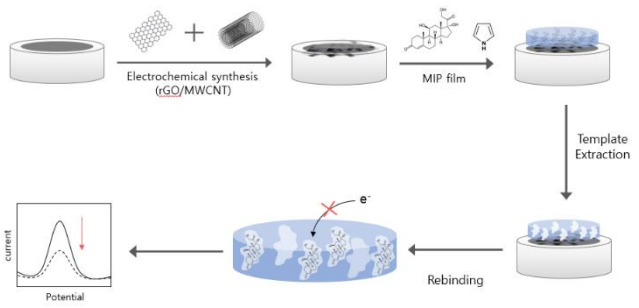

그림 1. rGO-CNT 나노복합체 기반의 MIPPy 제작과정 및 코티솔 검출 원리에 대한 개략도

3. 연구 결과

먼저, 코티솔 검출의 민감도를 높이기 위해 SPCE 위에 3차원 다공성의 rGO-CNT 나노 복합체를 도입하였다. 나노 복합체 제작 조건을 최적화하기 위하여 중합 cycle을 변화시켜 합성한 결과, 중합 cycle이 증가할수록 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$에 대한 최대 산화전류값(anodic peak current, I_{pa})이 커지지만 4 cycles 이상이 되면 형성된 나노 복합체의 안정성이 감소하였다. 따라서, I_{pa} 값이 가장 크고 안정적으로 형성되는 3 중합 cycles을 선택하였다. 또한 그림 3의 SEM 이미지에서 볼 수 있듯이 나노 복합체를 도입한 전극에서 표면적이 넓어진 것을 가시적으로 확인할 수 있었다.

다음으로, MIPPy 제작을 위하여 다양한 파라미터들을 변화시켰다. 첫째, 단량체인 피롤의 농도에 따른 변화를 확인하기 위해 주형분자인 코티솔의 농도를 2.5 mM로 고정시키고 피롤의 농도를 각각 10, 15, 20, 25, 30 mM 로 달리하여 합성하였다. 피롤 농도에 따라 cross-linking 되는 정도가 달라지게 되는데 코티솔과의 농도 비율에 따라 생성되는 인식 부위에 영향을 주게 된다. 인식 부위가 잘 형성될수록 전자전달의 차이로 인해 MIPPy와 NIPPy 에서의 신호 차이가 증가하게 된다. $Fe(CN)_6^{3-/4-}$를 이용한 측정 결과, 15 mM 피롤을 사용하여 합성한 경우에서 MIPPy와 NIPPy의 I_{pa} 차이가 가장 크게 나타나 최적의 피롤 농도로 선택하였다 (그림 2(A)).

둘째, 피롤의 중합 cycle에 따른 변화를 살펴보았다. 형성되는 MIPPy의 두께(thickness)가 얇으면 인식부위가 제대로 형성되지 않아 타겟 물질을 인식하기 어렵고, 너무 두꺼우면 주형분자가 빠져나오기 힘들어 pore 형성이 어렵게 된다. 중합 cycle 수를 5 ~ 30 회로 변화시켜서 측정해본 결과, 그림 2(B)와 같이 15 cycles에서 MIPPy와 NIPPy의 I_{pa} 차이가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다.

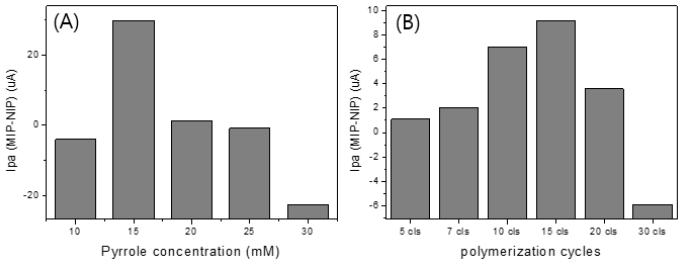

그림 2. (A) 단량체인 피롤의 농도와 (B) 중합 사이클에 따른 MIPPy 와 NIPPy의 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$에 대한 I_{pa} 차이

셋째, 주형분자를 추출하는 조건 또한 중요한 요소 중 하나이다. 주형분자를 충분이 잘 제거해야 인식부위들이 잘 형성되어 우수한 민감도를 가질 수 있기 때문이다. 추출 cycle 을 변화시켜 본 결과, 그림 3 과 같이 추출 cycle 이 증가할수록 MIPPy 에서의 I_{pa} 가 점점 증가하여 인식부위가 더 많이 형성되는 것으로 판단되었다. 하지만 15 cycles 이상으로 증가하면 오히려 전류가 감소하게 되는데 이는 과도한 추출로 인해 MIPPy 나노 복합체에 영향을 준 것으로 생각되었다. 따라서, 추출 cycle 은 10 회로 선택하였다. 결과적으로, MIPPy 가 도입된 rGO-CNT 나노복합체는 그림 3 과 같이 3 차원의 다공성 구조를 보여 타겟 물질의 이동이 원활할 수 있고 표면적 증가로 인해 전자 전달이 향상되어 보다 민감하게 코티솔을 검출할 수 있을 것으로 판단된다 (그림 3).

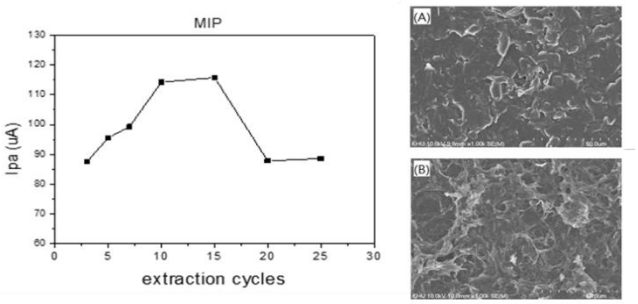

그림 3. 추출 cycle에 따른 MIPPy의 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$에 대한 I_{pa} 차이와, 제작된 (A)MIPPy/SPCE 및 (B)MIPPy/rGO-CNT/SPCE 에 대한 SEM 이미지

4. Acknowledgements

본 연구는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. NRF-2021R1A2C1093825).

5. 참고 문헌

[1] Minu Singh and Shiv Singh. et al. **"**Recent advancement of carbon nanomaterials engrained molecular imprinted polymer for environmental matrix", *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, Vol 27, e00092, 2020

[2] W.T., L.Y., J.R.S., J.-M.M., and H.T. "Touch-Based Stressless Cortisol Sensing" *Advanced materials*, Vol 33, Issue 18, 2021

[3] M. Zea and F.G. Bellagambi. et al. "Electrochemical sensors for cortisol detections: Almost there", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Vol 132, p.116058, 2020

[4] Laura Manenschijn and Jan W. Koper. et al. "Evaluation of a method to measure long term cortisol levels" *Steroids*, Volume 76, Issues 10–11, Pages 1032-1036, 2011

[5] Russell and Evan MSc. et al. "The Detection of Cortisol in Human Sweat Implications for Measurement of Cortisol in Hair", *Therapeutic Drug Monitoring*, Vol 36, p.30-34, 2014

[6] Ajeet Kaushik and Abhay Vasudev. et al. "Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol 53, p.499-512, 2014

[7] Nidhi Dhull and Gurpreet Kaur. et al "Highly sensitive and non-invasive electrochemical immunosensor for salivary cortisol detection", *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol 293, p. 281-288, 2019