

융합 바이오 이미징을 위한 염료 도핑 된 실리카 나노입자의 형광 특성에 관한 연구

김기출

목원대학교 신소재화학공학과 교수

A Study on the Fluorescence Characteristics of Dye-doped Silica Nanoparticles for Integrated Bio Imaging

Ki-Chul Kim

Professor, Department of Advanced Chemical Engineering, Mokwon University

요 약 형광 염료가 도핑 된 실리카 나노입자는 DNA 마이크로 에레이와 같은 바이오 라벨링 및 바이오 이미징에 활용되고 있으며, 높은 생체 적합성과 낮은 독성 및 높은 친수성의 특성을 가지고 있어 많은 주목을 받고 있는 기능성 나노소재이다. 본 논문에서는 형광 유기염료를 에탄올과 탈이온수에 각각 용해시킨 후 형광염료를 실리카 나노입자에 물리적으로 흡착시키는 방법과 화학적으로 도핑 시키는 방법으로 실리카 나노입자를 합성한 후 365 nm 파장의 자외선을 조사하여 형광특성을 분석하였다. 연구결과 형광 염료를 물리적으로 흡착시킨 실리카 나노입자보다 화학적으로 형광 염료를 도핑 시킨 실리카 나노입자의 형광특성이 우수하였으며, 도핑 된 형광 염료의 양이 많을수록 형광특성이 우수하였다. 형광 염료를 용해시키는 용매의 경우, 에탄올이 탈이온수와 비교하여 탁월한 형광 특성을 나타내었다. 또한 순수한 형광 염료와 형광 염료가 도핑 된 실리카 나노입자의 광안정성을 조사한 결과, 형광 염료가 도핑 된 실리카 나노입자의 광안정성이 보다 우수한 것으로 나타났다. 이러한 연구결과를 바탕으로 형광염료가 최적으로 도핑 된 실리카 나노입자를 바이오 이미징 에이전트로 사용하면 높은 광안정성과 형광특성으로 인하여 인체 내부의 생체 모니터링에 유용하게 활용될 것으로 전망된다.

주제어 : 실리카, 나노입자, 염료 도핑, 형광특성, 바이오 이미징

Abstract The functional nanomaterials of fluorescent dye-doped silica nanoparticles(NPs) are applied to bio applications such as bio-labeling of DNA micro-array, and bio-imaging. Organic dye-doped fluorescent silica NPs exhibit excellent bio-compatibility, non-toxic, and highly hydrophilic properties. In this study, organic fluorescent dyes were dissolved in ethanol, and deionized(DI) water. Organic fluorescent dyes were physically adsorbed to silica NPs and chemically doped to silica NPs. The fluorescence characteristics(FLC) was investigated by UV lamp irradiation of 365 nm wavelength. As results, the FLC of dye-doped silica NPs exhibits better than dye-adsorbed silica NPs and the FLC was improved with the increase of concentration of doped-dyes. The fluorescent organic dyes were well dissolved in ethanol than DI water. The photostability of dye-doped silica NPs was superior than pure fluorescent organic dye. The FLC of optimized dye-doped silica NPs would be applied to agent of non-invasive fluorescence bio-imaging in live cell and in vivo.

Key Words : Silica, Nanoparticles, Dye-Doped, Fluorescence Characteristics, Bio-Imaging

1. 서론

현대 의학에서 질병 진단을 위한 해부학적 영상은 주

로 X 선 및 γ 선을 이용하여 얻고 있다. 또한 높은 분해능의 자기공명영상을 얻기 위해서는 조영제를 사용해야 한다[1]. 하지만 X 선이나 조영제의 지나친 사용은 인체

*Corresponding Author : Ki-Chul Kim(kckim30@mokwon.ac.kr)

Received September 14, 2018

Accepted October 20, 2018

Revised September 28, 2018

Published October 31, 2018

에 유해하므로 질병 진단을 위하여 해부학적 영상을 얻는 것이 환자의 안전을 위협할 수도 있다. 따라서 인체에 무해한 방법으로 세포 및 세포 이하 수준의 해부학적 영상을 높은 분해능으로 획득하여 분자수준의 바이오 이미지를 획득하고 질병 진단에 활용하는 것은 아직도 의학 분야의 꿈으로 남아있다.

광학적으로 해부학적 영상을 획득하기 위해서 일반적으로 유기 형광염료가 가장 많이 사용된다. 하지만 유기 형광염료의 경우 형광 강도가 낮고, 광안정성이 낮아서 고감도 감지 및 실시간 모니터링에는 부적합하다[2]. 또한 유기 형광 염료와 바이오 물질과의 반응으로 인해서 형광 염료의 형광 특성이 급격히 저하되는 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 대안으로 지름 2nm ~ 10 nm 크기의 양자점(Quantum Dot)이 다양하게 연구되었다. 대표적인 양자점 나노소재는 CdSe, CdTe, CdS, ZnSe, PbS, PbTe와 같은 나노입자들로서, 유기염료보다 10~20배나 밝은 형광특성과 높은 광안정성 특성을 가지고 있어 광학적인 해부학적 영상을 얻는데 사용되고 있다. 하지만 양자점 나노소재도 깜박임(blinking) 현상의 단점이 있으며, 인체에 유해한 무거운 독성원소의 사용이 문제점으로 지적되고 있다 [3-5].

형광 염료의 광퇴색(photo-bleaching)과 제한된 감도 문제를 해결함은 물론 양자점이 갖고 있는 깜박임과 독

성문제를 해결할 수 있는 형광 염료가 도핑 된 실리카 나노입자는 높은 생체적합성, 낮은 독성 및 높은 친수성특성을 가지고 있어 많은 주목을 받고 있으며, 바이오 라벨링 및 해부학적 영상획득과 관련하여 많은 연구가 진행되고 있다[6-10].

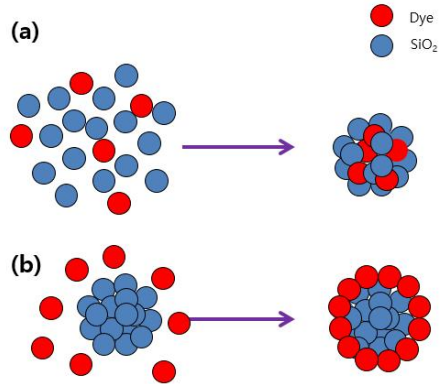


Fig. 1. Schematic diagram of synthesis method for (a) chemically dye-doped silica nanoparticles (NPs), and (b) physically dye-adsorbed silica NPs.

본 연구에서는 유기 형광염료를 에탄올 및 탈이온수에 용해시킨 후 실리카 나노입자에 물리적으로 흡착시킨 실리카 나노입자와, 화학적으로 형광 염료가 도핑 된 실

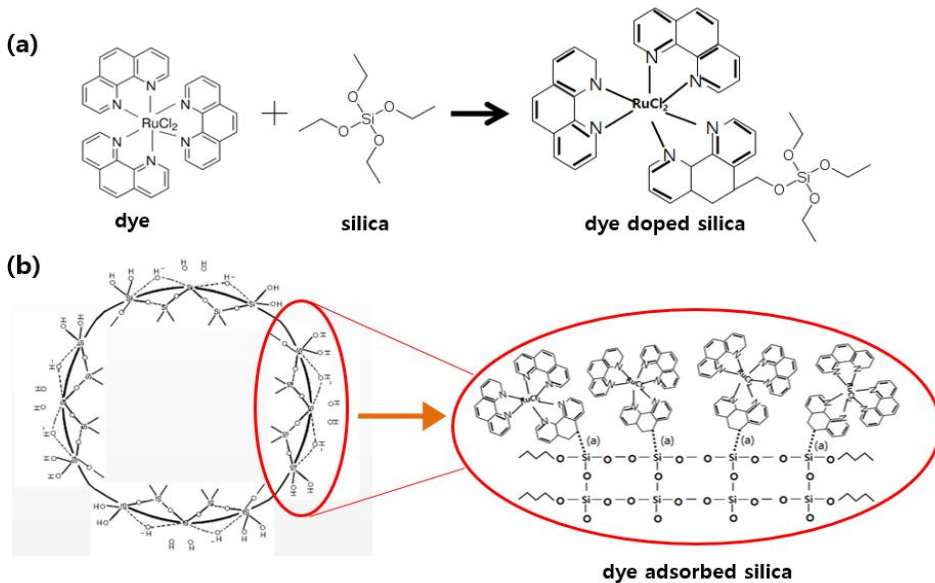


Fig. 2. Schematic illustration of bonding mechanism for (a) chemically dye-doped silica NPs, and (b) physically dye-adsorbed silica NPs.

리카 나노입자를 합성하여 형광특성을 평가하는 연구를 진행하였다. 특히 첨가되는 형광 염료의 양에 따른 실리카 나노입자의 형광 특성을 평가하였다.

2. 실험방법

광학적으로 해부학적 영상을 얻는데 주로 사용되는 형광 이미징의 파장은 가시광선 영역인 500 nm ~ 610 nm이다[3]. 따라서 본 연구에서는 Fig. 1과 Fig. 2에 나타난 것처럼, 585 nm 파장(밝은 주황색)에서 최대 형광 특성을 나타내는 Ru(phen)₃²⁺ 유기 형광염료를 에탄올과 탈이온수에 용해시킨 후 화학적으로 실리카 나노입자에 도핑 시키거나 물리적으로 흡착시키는 방법으로 실리카 나노입자를 합성하였다. 실리카 나노입자는 Sol-Gel 공정을 사용하는 Stöber 방법을 이용하여 합성하였으며 [11-13], 실험에 사용된 시약은 Ethanol(99.5%, Samchun), TEOS(95%, Samchun), Ammonium Hydrate (28% NH₃ in H₂O, 99.99%, Sigma-Aldrich), Dichlorotris(1,10-phenanthroline) ruthenium (II) dydrate ([Ru(phen)₃]Cl₂, 98%, Sigma-Aldrich), 탈이온수(Deionized water, >18.2 MΩ·cm)이다.

형광염료를 에탄올 및 탈이온수에 녹이는 실험을 우선 진행하였으며, Table 1에 나타난 것처럼, 용매 23.9 ml에 [Ru(phen)₃]Cl₂ 파우더를 11.95 mg ~ 47.8 mg을 첨가하여 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도로 용해된 형광염료 용액을 준비하였다.

형광염료가 도핑된 실리카 나노입자의 합성은 Ammonium Hydrate, Ethanol, [Ru(phen)₃]Cl₂ 형광염료가 농도별로 혼합된 용액을 세척된 비이커에 혼합한 후 40 °C에서 5분간 200 rpm으로 교반하였고, TEOS, Ethanol을 40 °C에서 5분간 200 rpm으로 교반한 다음, 두 용액을 혼합한 후 1시간동안 550 rpm으로 교반하였다. 이때 혼합하는 형광염료의 농도에 따라 각각 다른 양의 형광염료가 도핑된 실리카 나노입자가 합성된다. 반응이 끝난 용액을 2 ml씩 마이크로 튜브에 담아서 6000 rpm으로 원심분리 하였고, 침전물을 Ethanol로 2회에 걸쳐 린스한 후 대기 중에서 건조시키면 유기 형광염료가 화학적으로 도핑 된 실리카 나노입자 파우더가 얻어진다.

형광염료가 물리적으로 흡착된 실리카 나노입자는 우선 Ammonium Hydrate, Ethanol, DI water 혼합용액에

TEOS, Ethanol의 혼합용액을 계획된 크기의 실리카 나노입자의 합성에 적합한 량을 넣고 550 rpm으로 교반하면 실리카 나노입자가 합성된다. 이렇게 합성된 실리카 졸 용액에 [Ru(phen)₃]Cl₂ 형광염료가 녹은 용액을 넣어 주고 550 rpm으로 교반한 후 6000 rpm으로 원심분리 하고, 침전물을 Ethanol로 린스 후 건조시키면 유기 형광염료가 물리적으로 흡착된 실리카 나노입자 파우더가 얻어진다.

Table 1. Synthesis condition of silica nanoparticles.

solvent	contents of dye (mg/ml)	stirring speed (rpm)	centrifugation speed (rpm)
ethanol	0.5	550	6,000
	1.0	550	6,000
	1.5	550	6,000
	2.0	550	6,000
DI water	0.5	550	6,000
	1.0	550	6,000
	1.5	550	6,000
	2.0	550	6,000

위와 같은 과정으로 합성된 실리카 나노입자의 형광 특성을 분석하기 위하여 합성된 실리카 나노입자 파우더를 2 wt%의 농도로 Ethanol에 분산시킨 다음 1 cm × 1 cm 크기의 세척된 슬라이드 유리 기판 위에 1000 rpm으로 스핀 코팅 후, 시료를 공기 중에서 건조시킨 다음, Fig. 3과 같이 365 nm 파장의 UV 램프가 조사되는 암실에서 발광특성을 조사하였다.

실험에 사용되는 모든 비이커와 슬라이드 유리 기판은 아세톤, 에탄올 및 탈이온수로 5분씩 초음파 세척 후 다시 탈이온수로 린스한 후에 고순도 질소 gun으로 건조시켜서 사용하였다.

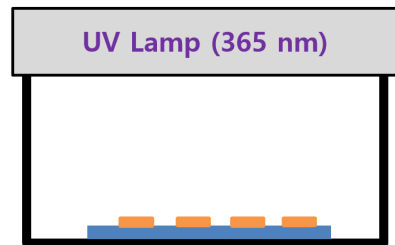


Fig. 3. Schematic diagram of fluorescence characterization for fluorescent silica NPs by ultra-violet light irradiation which has 365 nm wavelength.

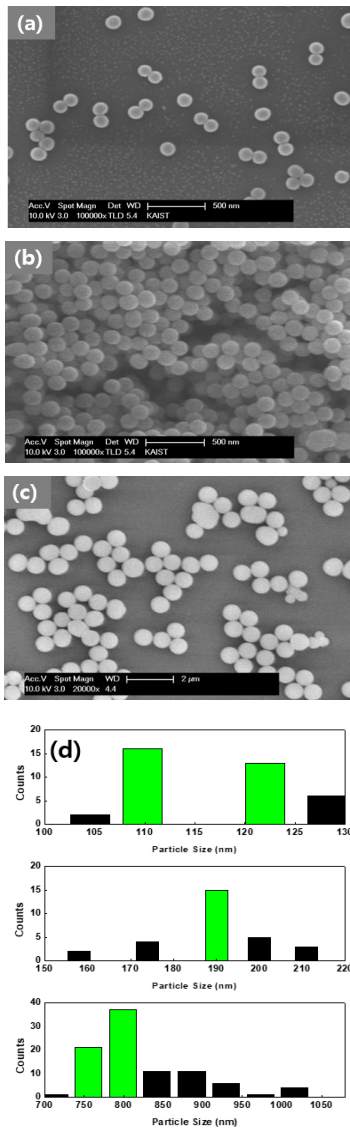


Fig. 4. FE-SEM images of as synthesized (a) dye-free silica NPs with average diameter (AvD) of 120 nm, (b) physically dye-adsorbed silica NPs with AvD of 190 nm, and (c) chemically dye-doped silica NPs with AvD of 800 nm. (d) statistical analysis result of particle size distribution for (a), (b), and (c), respectively.

형광염료가 물리적으로 흡착된 실리카 나노입자는 우선 Ammonium Hydrate, Ethanol, DI water 혼합용액에 TEOS, Ethanol의 혼합용액을 계획된 크기의 실리카 나노입자의 합성에 적합한 광을 넣고 550 rpm으로 교반하면 평균지름 120 nm의 실리카 나노입자가 합성된다. 이

렇게 합성된 실리카 졸 용액에 [Ru(phen)₃]Cl₂ 형광염료가 녹은 용액을 넣어주고 550 rpm으로 교반한 후 6000 rpm으로 원심분리 하고, 침전물을 Ethanol로 린스 후 건조시키면 유기 형광 염료가 물리적으로 흡착된 실리카 나노입자 파우더가 얻어진다.

위와 같은 과정으로 합성된 실리카 나노입자의 형광 특성을 분석하기 위하여 합성된 실리카 나노입자 파우더를 2 wt%의 농도로 Ethanol에 분산시킨 다음 1 cm × 1 cm 크기의 세척된 슬라이드 유리 기판 위에 1000 rpm으로 스핀 코팅 후, 시료를 공기 중에서 건조시킨 다음, Fig. 3과 같이 365 nm 파장의 UV 램프가 조사되는 암실에서 발광특성을 조사하였다.

3. 실험결과 및 고찰

일정한 크기를 갖는 실리카 나노입자를 합성하는데 보편적으로 사용되는 Stöber법으로 실리카 나노입자를 합성하였다[7,9]. 염료가 없는 순수한 실리카 나노입자, 물리적으로 형광 염료가 흡착된 실리카 나노입자 및 형광 염료가 화학적으로 도핑 된 실리카 나노입자를 각각 합성하였으며, 합성된 실리카 나노입자의 형태와 크기를 주사전자현미경 분석으로 조사하였고, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 분석결과, 거의 균일한 크기의 구형 나노입자가 합성된 것을 확인할 수 있다. 순수한 실리카 나노입자는 평균 지름 120 nm, 형광 염료가 흡착된 실리카 나노입자는 평균 지름 190 nm의 구형 나노입자로 크기가 약간 증가하였다. 하지만 형광 염료를 도핑 시킨 실리카 나노입자는 평균 800 nm의 지름을 가지고 있어 상대적으로 크게 합성되었다. 이것은 유기 형광염료를 실리카 관능기에 도핑 시키는 반응 과정에서 실리카 나노입자의 핵형성(seed nucleation) 및 재성장(regrowth)이 일어났기 때문인 것으로 추정된다[14].

Fig. 3에 나타낸 것과 같이 365 nm 파장의 UV 램프가 구비된 암실 내부에서 스핀 코팅된 시료의 형광특성을 조사하였다. 그 결과를 Fig. 5에 나타내었는데, 형광 염료가 전혀 없는 순수한 실리카 나노입자는 전혀 형광 특성이 나타나지 않았으며, 형광 염료가 물리적으로 흡착된 실리카 나노입자는 형광 특성이 다소 약하게 관찰되었다. 하지만 화학적으로 도핑 된 실리카 나노입자는 약간 어두운 노란색 톤의 상당히 밝은 형광 특성을 나타내었다.

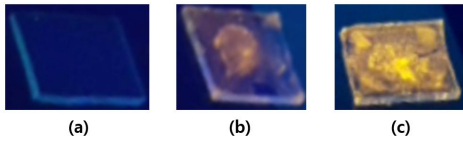


Fig. 5. Comparison of fluorescence characteristics for (a) dye-free silica NPs, (b) physically dye-adsorbed silica NPs, and (c) chemically dye-doped silica NPs.

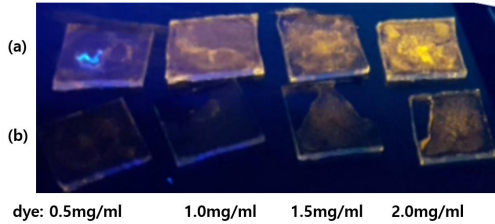


Fig. 6. Comparison of fluorescence characteristics on (a) dye dissolved with ethanol, and (b) dye dissolved with deionized water for different dye concentration.

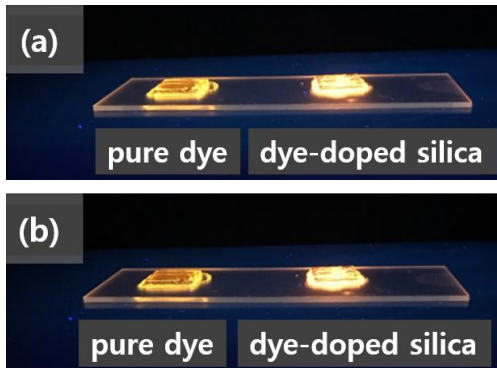


Fig. 7. Comparison of photostability after UV irradiation time of (a) 3 minutes and (b) 3 hours.

본 연구에서는 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ 형광염료를 녹이는 용매를 Ethanol과 탈이온수로 달리하여 용매에 따른 형광염료의 형광특성을 분석하였고, 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6 (a)는 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ 형광염료를 Ethanol에 각각 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도로 녹인 후 실리카 나노입자에 화학적으로 도핑시킨 실리카 나노입자의 형광특성을 분석한 결과이다. 염료의 도핑량이 증가할수록 우수한 형광특성이 나타나는 것을 알 수 있다. 하지만 Fig. 6 (b)처럼 탈이온수에 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ 형광염료를 녹인 후 실리카 나노입자에 도핑시킨 경우에는 형광 특성이 매우 좋지 않았다. 이

결과로부터 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ 형광염료를 Ethanol에 녹일 경우, 효과적으로 실리카 나노입자에 도핑 되는 것을 알 수 있으며, 탈이온수에 녹일 경우에는 형광염료의 농도가 클 경우에만 미미하게 도핑 되는 것을 알 수 있다. 특히 Fig. 5와 비교하면 2.0 mg/ml를 도핑 시킨 경우 형광염료를 물리적으로 흡착시킨 수준보다 다소 낮은 형광 특성을 나타내었다.

광학적 해부학 영상을 획득하는데 보편적으로 사용되는 형광염료는 광퇴색(photo-bleaching) 현상이 발생하여 인체 내에서 장시간 사용하는데 어려움이 있는 것으로 알려져 있다[2]. 따라서 형광 염료가 도핑 된 실리카 나노입자의 광안정성을 평가하기 위하여 Fig. 7과 같이 순수한 형광염료와 유기 형광 염료가 도핑 된 실리카 나노입자의 상대적인 광안정성을 조사하였다. 순수한 형광염료의 시료는 가장 우수한 형광 특성을 나타내는 2.0 mg/ml의 농도로 형광 염료가 도핑 된 실리카 나노입자 시료와 동일한 조건의 순수한 형광염료 용액을 Ethanol에 녹여서 준비하고, 세척된 슬라이드 유리 위에 2wt% 농도로 스핀 코팅한 후, 시료의 광안정성을 비교하였다. 광안정성은 11시간동안 연속으로 UV를 조사하면서 분석하였는데, 형광 염료가 도핑 된 실리카 나노입자 시료는 Fig. 7 (b)처럼 3시간 후에도 형광특성이 거의 변하지 않았지만, 순수한 형광 염료는 3시간이 지난 후에는 형광 특성이 다소 열화 되는 것을 관찰할 수 있었다.

4. 결론

본 논문에서는 광학적 해부학 영상을 획득하는데 사용되는 기능성 나노소재인 형광 염료가 도핑 된 실리카 나노입자를 Stöber 법으로 합성하였다. 유기 형광염료를 물리적으로 실리카 나노입자 표면에 흡착시킨 실리카 나노입자, 화학적으로 형광염료를 도핑 시킨 실리카 나노입자를 합성하였고, 365nm 파장의 UV Lamp가 조사되는 암실에서 형광특성을 조사하였으며, 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다.

1. 물리적으로 형광염료를 실리카 나노입자 표면에 흡착시킨 실리카 나노입자보다 유기 형광염료를 화학적으로 도핑 시킨 실리카 나노입자의 형광 특성이 우수한 것으로 나타났다.
2. 화학적으로 도핑 시킨 형광 염료의 농도가 증가할수록 실리카 나노입자의 형광 특성이 우수하였다.

3. 실리카 나노입자에 화학적으로 형광 염료를 도핑 시킨 경우에는 오랜 시간의 UV 조사에서도 우수한 형광 특성을 나타내었지만, 순수한 형광 염료는 3 시간 정도의 UV 조사에서 형광특성이 다소 열화되었다.

형광 염료를 화학적으로 도핑 시킨 실리카 나노입자는 광안정성이 우수하며, 형광 특성도 우수하여 형광 염료의 도핑량을 최적화 시키면 해상도가 높은 해부학 영상을 얻을 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 형광염료가 도핑 된 실리카 나노입자는 생체 내의 실시간 바이오 이미징 응용에도 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- [1] M. Mahmoudi, V. Serpooshan & S. Laurent. (2011). Engineered nanoparticles for biomolecular imaging. *Nanoscale*, 3, 3007-3026.
DOI : 10.1039/c1nr10326a
- [2] W-H. Zhang, X-X. Hu & X-B. Zhang (2016). Dye-Doped Fluorescent Silica Nanoparticles for Live Cell and In Vivo Bioimaging. *Nanomaterials*, 6, 81.
DOI : 10.3390/nano6050081
- [3] I. L. Medinz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman & H. Mattoussi. (2005). Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. *Nature Materials* 4, 435-446.
DOI : 10.1038/nmat1390
- [4] J. Yan, et al. (2007). Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. *Nanotoday*, 2(3), 44-50.
DOI : 10.1016/S1748-0132(07)70086-5
- [5] F. Enrichi, R. Ricco, A. Meneghello, R. Fierobon, F. Marinello & P. Schiavuta. (2009). Luminescent dye-doped or rare-earth-doped monodisperse silica nanospheres as efficient labels in DNA microarrays. *Proc. of SPIE*, 7393 73930MI-73930M-10.
DOI : 10.1117/12.828217
- [6] M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo & N. Zaccheroni (2014). Dye-doped silica nanoparticles as luminescent organized systems for nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 43, 4243-4268.
DOI : 10.1126/science.1102896
- [7] G. Canton, R. Ricco, F. Marinello, S. Carmignato & F. Enrichi. (2011). Modified Stöber synthesis of highly luminescent dye-doped silica nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 4349-4356.
DOI : 10.1007/s11051-011-0382-3
- [8] S. Bonacchi, et al. (2011). Luminescent Silica Nanoparticles: Extending the Frontiers of Brightness. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 4056-4066.
DOI : 10.1002/anie.201004996
- [9] J. Xu, J. Liang, J. Li & W. Yang. (2010). Multicolor Dye-Doped Silica Nanoparticles Independent FRET. *Langmuir*, 26(20), 15722-15725.
DOI : 10.1021/la1028492
- [10] F. Peng, Y. Su, Y. Zhong, C. Fan, S.-T. Lee & Y. He. (2014). Silicon Nanomaterials Platform for Bioimaging, Biosensing, and Cancer Therapy, *Accounts of Chemical Research*, 47(2), 612-623.
DOI : 10.1021/ar400221g
- [11] W. Stöber, A. Fink & E. Bohn. (1968). Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26, 62-69.
DOI : 10.1016/0021-9797(68)90272-5
- [12] L. M. Rossi, L. Shi, F. H. Quina & Z. Rosenzweig. (2005). Stöber Synthesis of Monodispersed Luminescent Silica Nanoparticles for Bioanalytical Assays. *Langmuir*, 21(10), 4277-4280.
DOI : 10.1021/la0504098
- [13] L. Wang & W. Tan. (2006). Multicolor FRET Silica Nanoparticles by Single Wavelength Excitation. *Nano Letters*, 6(1), 84-88.
DOI : 10.1021/nl052105b
- [14] K. D. Hartlen, A. P. T. Athanasopoulos & V. Kitaev. (2008). Facile Preparation of Highly Monodisperse Small Silica Spheres (15 to > 200 nm) Suitable for Colloidal Templating and Formation of Ordered Arrays. *Langmuir*, 24, 1714-1720.
DOI : 10.1021/la7025285

김기출(Ki-Chul Kim)

[정회원]



- 1993년 2월 : 아주대학교 물리학 과(이학사)
- 1996년 2월 : 아주대학교 물리학 과(이학석사)
- 2002년 2월 : 아주대학교 물리학 과(이학박사)

- 2002년 4월 ~ 2006년 3월 : 한국전자통신연구원 선임 연구원
- 2008년 3월 ~ 현재 : 목원대학교 신소재화학공학 교수
- 관심분야 : 기능성 나노소재, 기능성 박막, 가스센서, 에너지 관련 소재
- E-Mail : kckim30@mokwon.ac.kr