

## 생체분자 분리를 위한 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노입자의 표면수식과 분산 안정성 향상

김민정 · 안국환 · 임보라미 · 김희택 · 좌용호\*  
한양대학교 기능성나노소재연구실

### Functionalization of $\text{Fe}_3\text{O}_4$ Nanoparticles and Improvement of Dispersion Stability for Separation of Biomolecules

Min-Jung Kim, Guk-Hwan An, Borami Lim, Hee-Taik Kim and Yong-Ho Choa\*  
College of Engineering Sciences, Hanyang University, Gyeonggi 426-791, Korea  
(Received July 16, 2007; Accepted August 14, 2007)

**Abstract** The surface of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles prepared by coprecipitation method was modified by carboxylic acid group of poly(3-thiophenacetic acid (3TA)) and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA). Then the lysozyme protein was immobilized on the carboxylic acid group of the modification of the magnetite nanoparticles. The magnetite nanoparticles are spherical and the particle size is approximately 10 nm. We measured quantitative dispersion state by dispersion stability analyzer for each  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles with and without surface modification. The concentration of lysozyme on the modified magnetite nanoparticles was also investigated by a UV-Vis spectrometer and compared to that of magnetite nanoparticles without surface modification. The functionalized magnetite particles had higher enzymatic capacity and dispersion stability than non-functionalized magnetite nanoparticles.

**Keywords :** Magnetite nanoparticles, Functionalization, Dispersion stability

#### 1. 서 론

최근 많은 주목을 받고 있는 무기 나노입자는 주로 반도체, 자성, 금속 등의 물질로 이루어져 있다. 이들이 주목을 받고 있는 이유는 나노 크기에서 나타나는 양자적인 성질로 인해 벌크와 같은 물질에서 보이는 성질과는 다른 새로운 광학적, 전자기적 성질을 보이기 때문이다<sup>1,2</sup>. 특히  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노 입자는 초상자성(superparamagnetic properties)으로 인해 전자소자 및 저장 매체로의 응용<sup>3</sup>뿐만 아니라 생체 의료용으로 연구가 진행되고 있으며 이것은 자기장을 이용한 단백질의 분리 정제<sup>4,5</sup>, 약물 전달 시스템<sup>6</sup> 및 생체 이미징<sup>7,8</sup>에 대한 연구로 응용되고 있다. 그 중에서도  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자를 이용하여 단백질과 효소를 고정화하는 연구가 흥미를 끌고 있다.

그러나  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자들은 단위부피당 표면적이

크기 때문에 입자 응집과 침전이 쉽게 일어난다. 입자 응집과 침전이 일어나게 되면 수용액에 분산이 쉽지 않으며, 자체에 기능성이 없기 때문에 수용액에 기반으로 하는 DNA, 효소 등과 같은 생체분자에 응용하기가 어렵다는 문제점이 있다. 이런 문제를 해결하기 위해서는 생체 적합한 유기물을 코팅해야 한다. 최근 많이 사용되고 있는 코팅제로는 텍스트란, 텍스트란 유도체, 알부민, 폴리비닐 알코올(PVA) 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등이 있다<sup>9,10</sup>. 유기물로 코팅된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자들은 입체 반발을 통해 입자들의 접근이 차단되어 자성 유체의 콜로이드 안정성과 자성 쌍극자 인력을 감소시켜 응집과 침전을 막을 수가 있다<sup>7</sup>. 하지만 이렇게 코팅된 입자들은 일반적으로  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자가 분산된 유기 또는 무기 복합의 75~100  $\mu\text{m}$  크기를 갖는 microparticle이고, 그 크기로 인해 생화학 공정에 있어 적절히 사용되지 못하

\*Corresponding Author : [Tel : +82-31-400-5650; E-mail : choa15@hanyang.ac.kr]

고 있다.

본 연구에서는 단일 나노입자의 응용을 위해 카르복실기(-COOH)를 가지고 있는 단량체인 3TA(3-thiophenacetic acid)와 계면 안정제인 DMSA(meso-2,3-dimercaptosuccinic acid)를 각각 공침법으로 제조된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자의 표면에 중합과 리간드를 치환하는 방법으로 표면에 아주 얇은 코팅막이 형성될 수 있도록 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자의 표면을 개질하였다. 또한 3TA, DMSA로 코팅된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자들의 분산력과 입자 응집성을 검토하고, 코팅된 표면의 카르복실기(-COOH)의 기능기를 이용하여 효소인 lysozyme의 고정화에 응용하였다.

## 2. 실험방법

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자는 FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O(ferros chloride, 99%, Aldrich)와 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(ferros chloride, 98%, Aldrich) (Fe<sup>3+</sup>:Fe<sup>2+</sup>=1:2)을 탈이온수에 용해시켜 N<sub>2</sub> 분위기에서 80°C의 반응조에 교반시키고, NH<sub>4</sub>OH 를 첨가하여 400 rpm으로 30분간 교반시킨 후 과잉의 OH<sup>-</sup> 및 Cl<sup>-</sup> 등의 불순물을 제거하기 위해 10,000 rpm의 원심분리를 수회 실시하여 제조하였다. 이렇게 제조된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자들을 각각 3TA(3-thiophenacetic acid, 98%, Aldrich)과 DMSA (meso-2,3-dimercaptosuccinic acid, 98%, Aldrich)에 의해 표면처리 하였다. 3TA에 의한 표면 처리는 acetonitrile (Sigma, HPLC grade)에 3TA를 용해시킨 후 제조된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자를 첨가하여 80°C에서 교반을 실시하였다. 30분 후 KMnO<sub>4</sub>(Aldrich, first grade)를 첨가하여 다시 30분간 교반을 실시하고 ethanol을 첨가하여 수회 원심분리 후 자장(3 kG)을 걸어 표면처리된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자만을 회수하였다. DMSA에 의한 표면처리는 DMSO(dimethylsulfoxide, Aldrich, HPLC grade)에 DMSA를 용해시킨 후 제조된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자를 첨가하여 24시간 동안 실온에서 교반을 실시한 후 ethanol을 첨가하여 수회 원심분리 후에 자장(3 kG)을 걸어 표면처리된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자만을 회수하였다. 이렇게 표면처리된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자들은 0.5 ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride(EDC)에 담지한 다음 4시간 후 0.01M phosphate-buffered saline(PBS: 150 mM NaCl, 1.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) 용액에

세척하여 lysozyme(from chicken egg white, Fluka)을 이용하여 고정화를 유도하였다. 24시간 교반 후 자장을 이용하여 분리 정제하였다.

각 공정단계에서의 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>의 나노입자들은 SEM (JSM7000F, JEOL, Japan), FT-IR(FTS6000, BIO-RAD, USA), Dispersion Stability Analyzer(Turbiscan, Formulation, France)에 의해 표면처리된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자들의 특성을 관찰하였으며, 고정화된 lysozyme의 농도는 UV-Vis spectroscopy(Optizen 2120UV, Mecasys Co., Korea)를 이용하여 280 nm에서 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

그림 1은 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자(a)와 3TA(b), DMSA(c)로 표면처리된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다. (a), (b), (c) 모두 572 cm<sup>-1</sup>에서 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>의 고유한 피크인 spinel stretching vibration에 의한 흡수띠를 나타내며, (a)에서는 572 cm<sup>-1</sup> 흡수띠 외 다른 흡수띠는 나타나지 않았다. (b)와 (c)에서는 1650 cm<sup>-1</sup> 영역에서 카르복실기(-COOH) 신축운동에 의한 흡수띠를 관찰할 수 있다. 이것으로 두 시료 모두 3TA와 DMSA로 각각 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자에 코팅이 되었기 때문이다. 또한 1182 cm<sup>-1</sup>, 1495~1452 cm<sup>-1</sup>에서 각각 C-O-C기와 C=C의 흡수띠를 확인할 수 있었다.

그림 2는 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자의 SEM 사진을 보여주

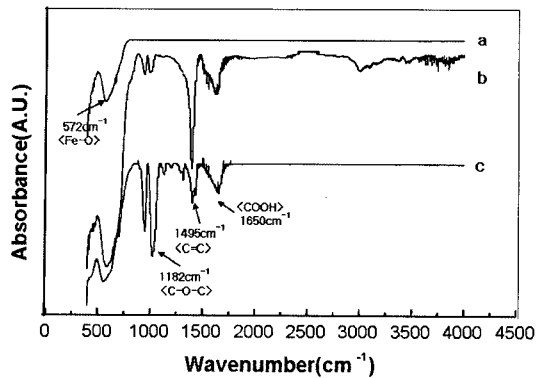


Fig. 1. FT-IR spectra of (a) non-functionalized magnetite particles, (b) 3TA-functionalized magnetite particles (0.8 mM), and (c) DMSA-functionalized magnetite particles (0.8 mM).

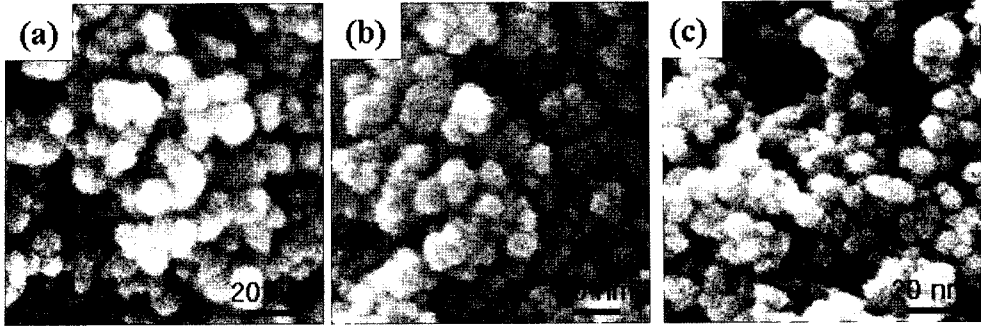


Fig. 2. SEM images of (a) non-functionalized magnetite particles, (b) 3TA-functionalized magnetite particles (0.8 mM) and (c) DMSA-functionalized magnetite particles (0.8 mM).

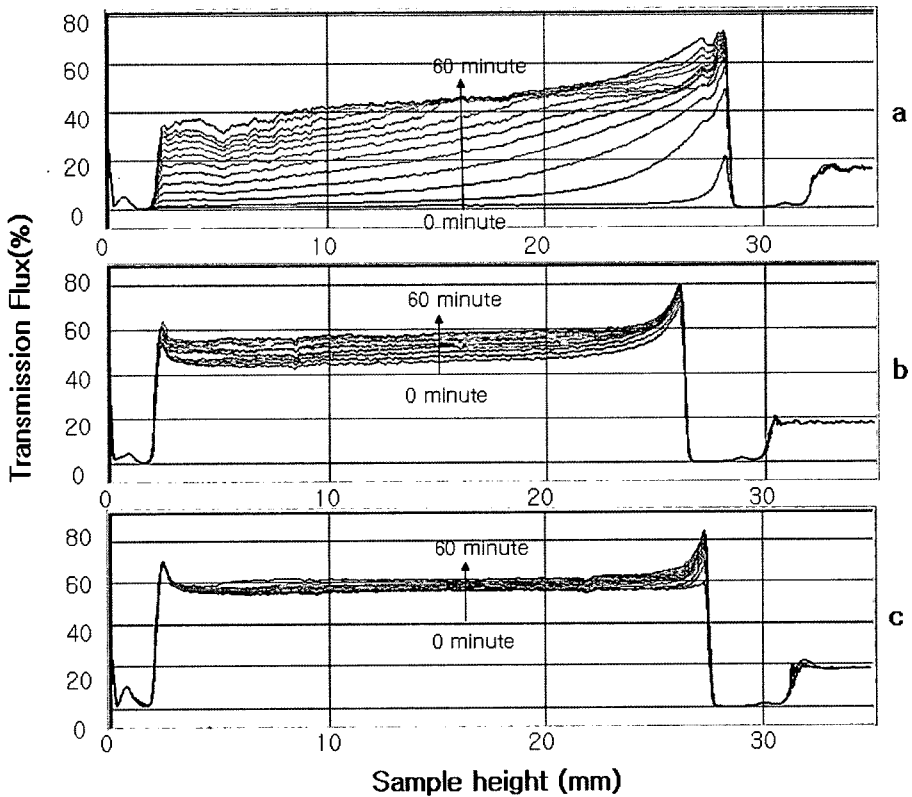


Fig. 3. Transmission Flux(%) of Turbiscan Lab. (a) non-functionalized magnetite particles, (b) 3TA-functionalized magnetite particles (0.8 mM) and (c) DMSA-functionalized magnetite particles (0.8 mM).

고 있다. (a)는 표면처리 하지 않은  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자로서 크기가 약 10 nm 정도의 균일한 크기를 갖는 구형의 입자를 확인하였으며, (b)와 (c) 역시 약 10 nm 정도의 균일한 크기를 갖는 구형의 코팅된 입자를 얻었음을 확인할 수 있었다. 이것은 3TA와 DMSA가  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자 주위에 수 분자 단위로 코팅된 것으로 사료된다.

그림 3은 분산도 측정 장비를 사용하여  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자와 각각 3TA, DMSA로 표면처리 된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자들을 1시간 동안 매 5분 간격으로 transmission flux(%)를 sample height에 따라 변화하는 양상을 scanning하여 분산 안정성의 변화를 측정된 결과이다. 3개의 시료 모두 정도의 차이는 있지만 Transmission Flux(%)가 구배를 가지고 증가하는 것

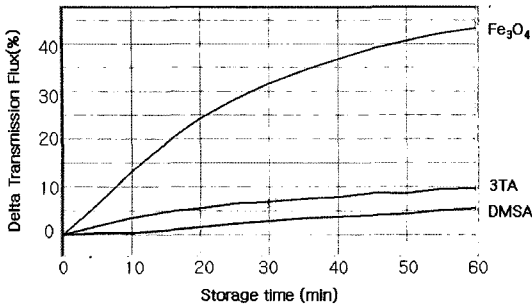


Fig. 4. Mean value kinetics for coalescence from delta transmission flux (%).

을 확인할 수 있는데, 이것은 전형적인 침전에 의해 분산 안정성이 저하된 것으로 판단된다. Transmission Flux(%)의 구배가 (b)와 (c)는 (a) 보다 훨씬 완만한 것을 확인할 수 있다. 이는 3TA, DMSA로 표면 수식된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자가 수식되지 않은 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자 보다 안정적으로 분산된 것으로 사료된다. 다음으로 3개의 시료의 분석 결과로부터 시간에 따른 Delta Transmission Flux(%)의 변화를 살펴보면 각 시료간의 분산안정성의 차이를 보다 쉽게 이해할 수 있다. 그림 4는 시료의 시간에 따른 Delta Trans-

mission Flux(%)를 mean value kinetics로 나타낸 결과이다. 이 결과 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자들에 비해 3TA, DMSA로 표면처리 된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자들이 침전이 덜 일어나는 안정한 시료임을 알 수 있었으며 3TA 보다 DMSA로 표면처리 된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자가 보다 안정성이 뛰어난 시료임을 확인할 수 있었다. 이는 DMSA의 경우 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>의 Fe<sup>+</sup> 이온과 chelate 반응에 의해 강한 화학결합을 하고 분자량이 작아 치밀하게 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 표면에 수식되어 있는 반면, 3TA의 경우 중합 반응에 의해 물리적으로 흡착된 형태에 기인된 것으로 사료된다.

그림 5는 lysozyme의 1.484~11.875 mg/ml 농도 범위에서 UV-Vis spectroscopy을 이용하여 표준곡선을 작성 결과이다. (a)에서 보는바와 같이 280 nm 영역에서 강한 흡광도와 농도별 변화량을 뚜렷이 확인할 수 있으며, 농도가 증가할수록 흡광도도 함께 증가하는 것을 확인하였다. Lysozyme의 농도와 내부 표준물질에 대한 시료의 peak area 값을 이용하여 표준곡선을 작성하였으며(b), R값은 0.9998로 좋은 직선성을 보여준다. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노 입자와 3TA, DMSA로 표면처리 된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노 입자에 lysozyme를 고정

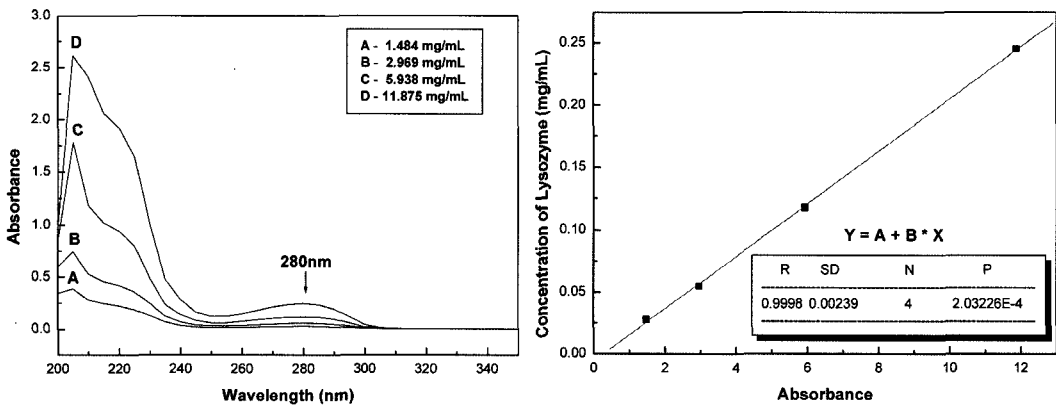


Fig. 5. UV-vis spectra of (a) lysozyme solution and the supernatants of sample after the magnetic separation, and (b) calibration standard line of lysozyme.

Table 1. The amount of lysozyme immobilized on non-functionalized magnetite particles and functionalized magnetite particles

Support	Weight (mg)	Protein content (mg/mL)	Protein immobilization (mg/mL)	Lysozyme/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (mg/g)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	10	0.475	0.054	5.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> +3TA(0.8 mM)	10	0.475	0.316	31.6
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> +DMSA(0.8 mM)	10	0.475	0.384	38.4

화시킨 후  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자 1g에 대한 lysozyme 고정량을 Table 1에 나타내었다. Lysozyme이 고정된 양은 3TA, DMSA로 표면처리된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자가 표면처리 되지 않은  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자에 비해 6-7배 향상된 것을 확인 할 수 있었다. 이것은 3TA, DMSA에 의해 표면처리된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자의 표면에 생성된 카르복실기(-COOH) 기능기에 lysozyme이 잘 결합되어진 것으로 사료되며, DMSA로 표면처리 된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자는 3TA로 표면처리된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자 보다 고정화율이 높는데, 이는 상기의 분산안정성 및 DMSA의 작은 분자량과  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 의  $\text{Fe}^+$  이온과 chelate 반응에 의한 강한 화학결합에서 기인된 것으로 사료된다.

#### 4. 결 론

3TA와 DMSA를 이용하여  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자에 표면처리를 하였다. 표면처리된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자들의 크기, 분산안정성 및 단백질 고정화 정도를 조사하였다. FT-IR로 3TA와 DMSA의 카르복실기(-COOH) 기능을 확인할 수 있었고,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자와 3TA, DMSA로 표면처리된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자 모두 약 10 nm의 크기로 수 분자 단위로 코팅된 것을 확인할 수 있었다. 분산안정성 분석 결과  $\text{Fe}_3\text{O}_4 < 3TA < \text{DMSA}$ 의 순으로 분산력이 뛰어난 것으로 나타났다. Lysozyme 고정량은 3TA, DMSA로 표면처리된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자들이 표면처리 하지 않은  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자 보다 6-7배 증가하였다. 따라서 본 연구에서 제조된 3TA, DMSA로 표면처리 된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자들은 생체분자

의 분리 정제에 충분히 응용이 가능할 것으로 기대된다.

#### 감사의 글

본 논문은 2007 2nd BK21 사업에 의해 지원되었음.

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 국가핵심연구센터사업(R15-2006-022-03001-0) 지원으로 수행되었음.

#### 참고문헌

1. C. B. Murray, D. J. Norris and M. G. Bawendi: J. Am. Chem. Soc., **115** (1993) 8706.
2. A. P. Alivisatos: J. Phys. Chem., **100** (1996) 13226.
3. P. L. Kronick, G. L. Campbell and K. Joseph: Science, **200** (1978) 1074.
4. S. Goodwin, C. Peterson, C. Hoh and C. J. Bittner: Magn. Magn. Mater., **194** (1999) 132.
5. P. K. Gupta, C. T. Hung, F. C. Lam and D. G. Perrier: J. Pharm., **43** (1998) 167.
6. G. M. Lanza, P. M. Winter, S. D. Caruthers, A. M. Morawski, A. H. Schmieder, K. C. Crowder and S. A. Wickline: J. Nucl. Cardiol., **11** (2004) 733.
7. J. Wouterghem, S. Morup, S. W. Charles, S. Wells and J. Villadsen: Phys. Rev. Lett., **55** (1985) 410.
8. Z. Li, H. Bao and M. Gao: J. Am. Chem. Soc., **16** (2004) 1391.
9. C. C. Berry, S. Wells, S. Charles and A. S. G. Curtis: Biomaterials, **24** (2003) 4551.
10. L. A. Harris, J. D. Goff, A. Y. Carmichael, J. S. Riffle, J. J. Harburn, T. G. St. Pierre and M. Saunders: Chem. Mater., **15** (2003) 1367.