

탄닌산을 이용한 나노입자 표면 개질 및 분석

이주연 · 김형준[†]

금오공과대학교 화학생명공학과

(2022년 05월 12일 접수, 2022년 05월 31일 수정, 2022년 06월 14일 채택)

Tannic acid Mediated Surface Modification of Mesoporous Silica Nanoparticles

Juyeon Lee, Hyungjun Kim[†]

Department of Chemistry and Bioscience, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 39248, Korea

(Received May 12, 2022; Revised May 31, 2022; Accepted June, 2022)

요약: 탄닌산은 식물 유래 폴리페놀 중 하나로, 대부분의 생체고분자와 분자간결합을 할 수 있어서 분자적 접착제로서 연구가 되어 왔으며, 표면 개질, 에너지 저장 및 발생 장치, 의료용 제재로서 활용이 되고 있다. 본 연구에서는 약물 전달과 바이오이미징 등 의생명공학 분야에서 다양하게 활용되는 다공성 실리카 나노입자를 합성하고, 탄닌산을 이용하여 다공성 실리카 나노입자의 표면을 개질 한 뒤, 나노입자의 표면을 분석하였다.

Abstract: Tannic acid, one of plant-derived polyphenols, has been studied as a molecular adhesive, surface modification, energy storage and generating device, and biomedical application as it can interact with biopolymers. In this study, we synthesized porous silica nanoparticles that are widely used in biomedical engineering fields such as drug delivery and bioimaging, and then analyzed tannic acid mediated surface modification of mesoporous silica nanoparticles.

Keywords: Tannic acid, Mesoporous silica nanoparticle, Surface coating, Delivery platform

[†] Corresponding author: Hyungjun Kim (hyungjun@kumoh.ac.kr)

1. 서론

탄닌산(tannic acid)는 식물 유래 폴리페놀(polyphenol) 중 하나로, 5개의 카테콜기(catechol group)와 5개의 갈롤기(galloyl group)를 가지고 있어 물질의 표면 개질 및 접착력에 대한 연구에 사용되어 왔다 [1,2]. 탄닌산은 수소 결합(hydrogen bonding) 및 소수성 결합(hydrophobic interaction)을 통해 다양한 분자들과 견고한 비공유결합을 형성할 수 있고, 생리학적 pH 또는 약한 염기성 환경에서 티올기(thiol group) 또는 아민기(amine group)와 공유결합을 할 수 있다 [3]. 탄닌산의 갈롤기에 의해 탄닌산으로 코팅된 물질의 표면은 중성 pH에서 음전하를 띠게 되어, 양전하를 띠는 물질과 서로 정전기적 인력(electrostatic interaction)을 형성할 수 있다 [4]. 게다가, 탄닌산은 많은 수의 aromatic ring을 가지고 있어 소수성 물질들과 서로 상호작용을 할 수 있다. 이러한 특성으로 인해서 탄닌산은 의생명공학 분야에서 다양하게 활용이 되고 있다. 예로, 콜라겐(collagen)의 안정성을 높이기 위해, 수소결합 및 소수성 결합을 이용하여 콜라겐의 표면을 탄닌산으로 코팅하여 분해효소(enzymatic degradation)로부터 콜라겐 구조를 보호하는 역할을 할 수 있다 [5-7]. 또한 DNA의 인산기(phosphate group)와의 상호작용 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과의 수소결합을 통해 생분해성 하이드로젤을 형성할 수 있다 [8,9].

본 연구에서는 약물 전달 및 바이오 이미징 분야에서 활용되고 있는 다공성 실리콘 나노 입자(MSN)를 합성하고, 나노입자 표면에 형광 프로브(probe)인 cyanine5.5 (cy5.5)를 컨쥬게이션하여 MSN-cy5.5를 제작한 뒤, 탄닌산으로 MSN-cy5.5의 표면을 코팅하였다. 탄닌산으로 코팅된 MSN-cy5.5의 크기는 탄닌산 층으로 인해서 증가를 하였고, 표면 전하는 탄닌산의 galloyl (trihydroxyphenyl) groups에 의해 강한 음전하를 띠었다. 또한 탄닌산 코팅 층으로 인해 형광의 세기가 감소함을 확인할 수 있었다. 탄닌산은 나노입자 표면에 저분자(small molecule), 고분자(synthetic polymer), 단백질(protein), 다당류(polysaccharide) 등의 물질과 비공유결합 및 공유결합을 할 수 있는 기회를 제공하므로, 본 연구를 통해 다양한 기능성 나노입자 제작을 기대해 본다.

2. 실험 방법

MSN^a에 cy5.5를 컨쥬게이션하여 MSNa-cy5.5를 제작하고, MSN^a-cy5.5에 탄닌산을 코팅하는 전체적인 모식도를 Fig. 1에서 보여주고 있다. 먼저, MSN 합성은 실리카 전구체로서 테트라에톡시실란(tetraethyl orthosilicate, TEOS)를 사용하였고, 주형물질로서

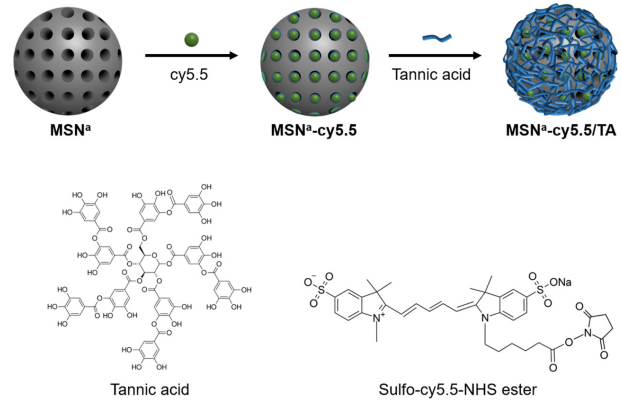


Figure 1. A schematic illustration of synthesis of MSN^a-cy5.5/TA.

Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC)을 사용하여 졸-겔(sol-gel) 방법을 이용하여 MSN을 합성하였다. 먼저, CTAC (25%, 5 mL)을 증류수(DI water) 15 mL에 첨가를 한 뒤, 300 rpm으로 15분 동안 75 °C에서 반응을 시킨다. 그 다음 10% triethanolamine (0.8 mL)을 첨가하여 15분 동안 75 °C에서 반응을 하여 CTAC/triethanolamine micelles을 형성시킨다. TEOS (1.5 mL)을 천천히 첨가를 하면서 1시간 동안 300 rpm으로 80 °C에서 교반을 시켜 micelle clusters에 silica 층을 형성시킨다. 그 다음, CTAC을 제거하기 위해 methanol과 HCl (500:19, v/v) 용액에서 24 시간동안 환류(reflux)를 시키면서 교반을 진행한다. 마지막으로 제거된 CTAC과 MSN을 분리하기 위하여 20000 rcf에서 20분동안 원심분리를 증류수를 첨가하여 3번 진행을 해준다. MSN에 cy5.5를 컨쥬게이션하기 위한 모식도는 Fig. 2에서 보여주고 있다. (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)를 이용하여 MSN 표면을 silanol group에서 amine group으로 치환(MSN^a)을 해줘야 한다. MSN (50 mg/mL)에 APTES를 첨가한 뒤 24시간 동안 교반 하면서 반응을 진행시킨 후, 20000 rcf에서 20분동안 원심분리를 증류수를 첨가하여 3번 진행을 해준다. 다음으로 MSN^a에 형광 프로브를 컨쥬게이션 하기 위해 MSN^a 와 sulfo-cy5.5-NHS ester를 반응시켜준다 (MSNa-cy5.5). MSN^a (25 mg)을 anhydrous dimethylformamide (DMF) 8 mL에 분산시킨 다음, sulfo-cy5.5-NHS ester (1 mg)와 triethylamine (80 μL)를 첨가하고 24시간 동안 교반 하여 반응을 진행한 후에 20000 rcf에서 20분동안 원심분리를 증류수를 첨가하여 3번 진행을 해준다. MSN^a-cy5.5의 표면에 탄닌산을 코팅하기 위해, MSN^a-cy5.5 (0.5 mg/mL in bicine buffer, 100 mM, pH 7.4)을 탄닌산 0.07 mg/mL에 첨가를 해준 후 3시간 동안 교반하면서 반응을 진행한 후,

20000 rcf에서 20분동안 원심분리를 증류수를 첨가하여 1번 진행을 해준다.

각각의 나노입자(MSN, MSN^a, MSN^a-cy5.5, MSN^a-cy5.5/TA)를 dynamic light scattering (DLS), Zeta potential, Transmission Electron Microscope (TEM)으로 크기, 모양, 표면 전하를 각각 분석을 진행하였다.

3. 결과 및 고찰

각각의 나노 입자를 합성한 뒤, DLS 및 zeta potential을 이용하여 각각의 나노 입자를 phosphate buffered 용액에 분산을 시킨 다음, 나노 입자의 크기 및 표면 전하를 측정하였다(Fig. 3). MSN의 크기는 228.4 ± 2.0 nm로 측정이 되었다. 나노입자의 표면 전하는 zeta potential을 이용하여 측정을 할 수 있는데 -17.2 ± 2.0 를 나타냈다. MSN 표면에 있는 silanol group이 물에서 deprotonation 됨으로 인해 음전하를 띄게 된다. Silylation reaction을 통하여 MSN의 silanol group과 APTES가 반응하고 MSN의 silanol group을 amine group으로 치환을 하여 MSN^a를 합성하였다. MSN^a의 크기는 230.1 ± 1.0 nm로 MSN과 크게 차이가 나지 않았으나, MSN^a의 표면 전하가 amine group으로 인해서 20.2 ± 1.4 를 나타냈다. MSN^a의 amine group은 DSL 측정 용액인 phosphate buffered 용액(pH 7.4)에서 protonated ($-\text{NH}^{3+}$) 되어 양전하를 띄게 된다. pH를 조

절함으로 인해서 amine group이 양전하를 띄게 되면 음전하를 띄는 DNA 또는 RNA와 같은 핵산(nucleic acid)들과 정전기적 인력으로 상호작용할 수 있으며 [10], pH를 8 이상으로 조절하여 amine group과 카르복실기(carboxyl group)와 같은 반응기와 컨쥬게이션을 하여 다양한 물질을 MSN 표면에 결합할 수 있다. MSN을 바이오 이미징 probe로 사용하기 위하여 sulfo-cy5.5-NHS ester를 형광 프로브로 사용을 하였다 [11]. Sulfo-cy5.5-NHS ester의 sulfonate로 인해서 cy5.5가 친수성(hydrophilic)을 띄게 되어 MSN과 컨쥬게이션 되었을 시 물에 잘 분산됨을 확인할 수 있었다. Sulfonate가 없는 cy5.5를 사용하여 MSN^a에 컨쥬게이션한 경우 소수성 효과(hydrophobic effect)에 의해 MSN^a-cy5.5들이 서로 aggregation되는 현상을 보여 DLS 측정 시 크기가 크게 측정이 된다(Fig. 4). MSN^a에 sulfo-cy5.5-NHS ester를 컨쥬게이션한 후 DLS로 측정을 한 결과 233.4 ± 5.0 nm의 크기로 측정이 되었으며, 표면 전하는 -6.9 ± 1.2 로 MSN^a의 양전하에서 음전하로 바뀜을 확인하였다. 탄닌산은 중성 pH 및 낮은 탄닌산 농도(0.07 mg/mL)에서도 탄닌산끼리 서로 반응하여 oligomerization이 되어 쉽게 표면 개질에 사용이 될 수 있다 [12]. 또한 탄닌산의 oligomerization에서 Fe^{3+} 를 사용하게 되면 Fe^{3+} 가 cross-linker로 작용을 하여 효과적으로 탄닌산의 코팅 효율을 높일 수 있지만 [13], 탄닌산-Fe 복합체는 어두운 색을 띄기 때문에 형광 세기에 영향을 줄 수 있으므로 본 실험에서는 사용하지 않았다. MSN^a-cy5.5에 탄닌산을 코팅한 MSN^a-cy5.5/TA의 크기를 측정 해본 결과 246.6 ± 6.5 nm로 입자 표면에 코팅된 탄닌산 층에 의해 크기가 약 13 nm 커졌음을 확인하였다. MSN^a-cy5.5/TA의 표면 전하는 -24.8 ± 1.1 로 측정이 되었는데, 이는 탄닌산의 galloyl

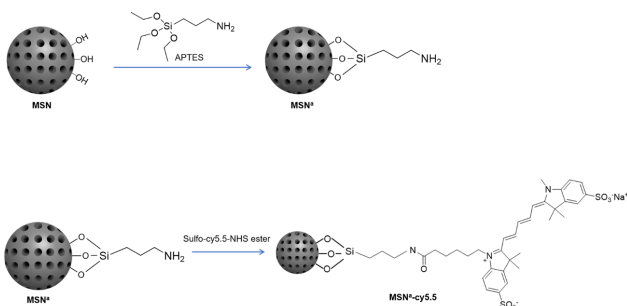


Figure 2. A schematic illustration of synthesis of MSN^a and MSN^a-cy5.5.

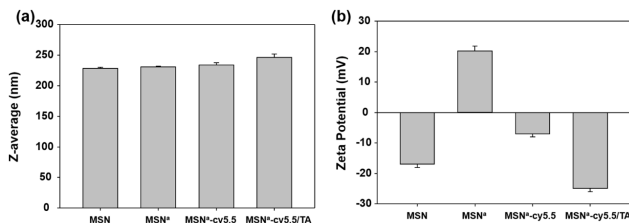


Figure 3. (a) DLS and (b) zeta potential of MSN^a-cy5.5/TA and precursors. (n = 3 independently and identically prepared batches, mean ± SD).

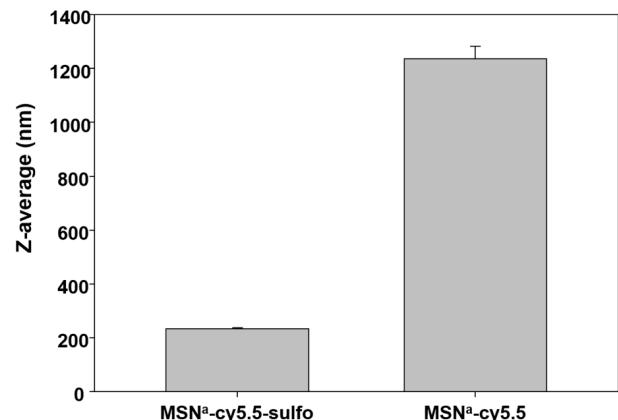


Figure 4. (a) DLS of MSN^a-cy5.5-sulfo and MSN^a-cy5.5. (n = 3 independently and identically prepared batches, mean ± SD).

(trihydroxyphenyl) groups에 의해 강한 음전하를 띠었다.

각각의 나노입자의 크기 및 표면 전하를 측정 후, TEM을 이용하여 각각의 나노입자의 모양을 분석하였다(Fig. 5). TEM 이미지에서 MSN의 다공성 구조를 확인할 수 있었으며, MSNa, MSN^a-cy5.5의 구조는 MSN과 크게 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 탄닌산을 코팅한 MSN^a-cy5.5/TA에서는 탄닌산의 코팅층을 확인할 수 있었으며, 13 - 15 nm 정도의 탄닌산 층 두께를 확인하였다.

식물 유래 폴리페놀 중 폴리도파민(polydopamine)이라는 물질이 있는데, 폴리도파민 또한 탄닌산과 비슷한 특성으로 알칼리 pH에서 도파민의 polymerization을 통해 다양한 물질의 표면을 코팅 할 수 있으며, 다양한 물질과 표면과의 비공유결합 및 공유결합의 기회를 제공한다 [14]. 하지만 폴리도파민의 단점 중 하나는, 폴리도파민이 코팅된 물질은 검은색을 띠기 때문에 형광 프로브와 상호작용시, 형광의 세기를 감소시키는 경향이 있어 형광 프로브의 코팅에는 적합하지 않다 [15,16]. 그래서 탄닌산으로 코팅된 MSN^a-cy5.5/TA의 형광 세기를 측정하여 탄닌산 코팅 층의 형광 방해 유무를 확인해 보았다(Fig. 6). MSN^a-cy5.5와 MSN^a-cy5.5/TA의 형광을 육안으로 관찰시 약간의 색깔 변화를 확인할 수 있었으며, 각각의 형광의 세기를 측정 해 본 결과 탄닌산으로 코팅된 입자의 형광 세기가 탄닌산으로 코팅하지 않은 입자보다 약 13 % 줄었음을 확인하였다. 이러한 탄닌산으로 코팅된 입자의 표면은

단백질(알부민) 및 고분자(저분자 키토산)의 amine group과 상호작용할 수 있어 다양한 표면 특이성을 제공할 수 있으며, 방향족 고리를 포함한 항암제(독소루비신)와의 상호작용을 통해 약물전달체의 기능도 수행할 수 있어 다양한 분야에 적용 가능하다 [17].

4. 결론

본 연구에서는 약물 전달 및 바이오이미징 등 다양한 분야에서 활용되는 MSN을 합성하고, 다양한 물질과 비공유결합 및 공유결합 할 수 있는 탄닌산을 이용하여 MSN의 표면을 코팅 한 뒤, 각각의 나노입자의 표면을 분석하였다. MSN^a 표면에 cy5.5를 컨주게이션 하여 바이오 이미징에 사용될 수 있는 형광 프로브를 합성하였고, 탄닌산을 코팅함으로써 MSN^a-cy5.5 표면에 다양한 물질과 상호작용할 수 있도록 하였다. 또한 탄닌산의 코팅은 형광의 세기에 크게 영향을 주지 않기 때문에 바이오 이미징과 관련된 여러 분야에 응용 가능할 것이라 여겨진다.

감사의 글

이 연구는 금오공과대학교 대학 학술연구비로 지원되었음(2021)

References

1. S. Hong, J. Yeom, I. T. Song, S. M. Kang, H. Lee, H. Lee, *Adv. Mater. Interfaces*, **1** (2014).
2. J. E. Chung, S. Tan, S. J. Gao, N. Yongvongsoontorn, S. H. Kim, J. H. Lee, H. S. Choi, H. Yano, L. Zhuo, M. Kurisawa, J. Y. Ying, *Nat. Nanotechnol.*, **9**, 1 (2014).
3. H. Liang, Y. Pei, J. Li, W. Xiong, Y. He, S. Liu, Y. Li, B. Li, *RSC Adv.*, **6**, 37 (2016).
4. S. Ogasawara, H. Asami, Y. Kimura, S. Kuroiwa, *Sen'i Gakkaishi*, **37**, 6 (1981).
5. V. Natarajan, N. Krithica, B. Madhan, P. K. Sehgal, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, **101**, 4 (2013).
6. F. H. Heijmen, J. S. duPont, E. Middelkoop, R. W. Kreis, M. J. Hoekstra, *Biomaterials*, **18**, 10 (1997).
7. J. K. Jackson, J. Zhao, W. Wong, H. M. Burt, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **21**, 5 (2010).
8. M. Shin, J. H. Ryu, J. P. Park, K. Kim, J. W. Yang, H. Lee, *Adv. Funct. Mater.*, **25**, 8 (2015).
9. M. Shin, K. Kim, W. Shim, J. W. Yang, H. Lee, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2**, 4 (2016).
10. H. Kim, S. Yuk, A. Dieterly, S. Kwon, J. Park, F. Meng, H. Gadalla, M. Cadena, L. Lyle, Y. Yeo,

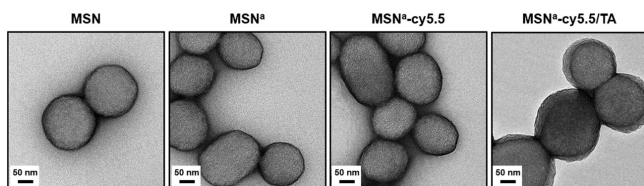


Figure 5. TEM images of MSN^a-cy5.5/TA and precursors; visualized by negative staining with 1% uranyl acetate. Scale bars: 50 nm.

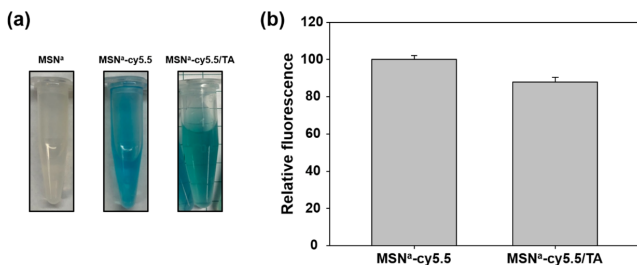


Figure 6. (a) Photo images and (b) fluorescence intensity of MSN^a, MSN-cy5.5, and MSN^a-cy5.5/TA.

- ACS Nano*, **15**, 3 (2021).
11. M. Yilmaz, *Carbohydr. Polym.*, **1**, 146 (2016).
 12. T. S. Sileika, D. G. Barrett, R. Zhang, K. H. A. Lau, P. B. Messersmith, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **52**, 41 (2013).
 13. H. Ejima, J. Richardson, K. Liang, P. Best, P. Koeverden, K. Such, J. Cui, F. Caruso, *Science*, **341**, 6142 (2013).
 14. H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, P. B. Messersmith, *Science*, **318** 5849 (2007).
 15. W. Qiang, W. Li, X. Li, X. Chen, D. Xu, *Chem. Sci.* **5**, 8 (2014).
 16. S. Quignard, M. d'Ischia, Y. Chen, J. Fattaccioli, *ChemPlusChem*, **79**, 9 (2014).
 17. S. Abouelmagd, F. Meng, B. Kim, H. Hyun, Y. Yeo, *ACS Biomater Sci Eng.*, **2**, 12 (2016).