Journal of Radiation Industry 6 (2) : 139~145 (2012)

분자영상용 방사성 금 나노입자 합성

손민주[1,2] · 노종국[1] · 이주상[1] · 장범수[1] · 박상현[1,*]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소,
[2]과학기술연합대학원대학교 방사선동위원소 응용 및 생명공학과

Synthesis of ^{125}I-Labeled Gold Nanoparticles for a Molecular Imaging

Min Ju Son[1,2], Jong Kook Rho[1], Joo-Sang Lee[1], Beom-Su Jang[1] and Sang Hyun Park[1,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea*
[2]*Department of Radiation Biotechnology and Applied Radioisotope Science, University of Science and Technology, Daejeon 305-350, Korea*

Abstract - Gold nanoparticles (GNPs) have led to the development of a new field in the diagnosis and treatment of diseases such as cancer. An efficient synthesis of gold nanoparticles within the range of 8～57 nm was established by γ-ray irradiation. The good point of a radiation-based method is the production of gold nanoparticles with a higher concentration and narrower size distribution compared with conventional methods. The size of gold nanoparticles was controlled using two methods. : (i) varying the γ-ray irradiation dose of 10 to 25 kGy and (ii) varying the concentration of $HAuCl_4$ solution from 4 to 40 mM. In addition, the GNPs were radiolabeled using [^{125}I]NaI in a simple and fast manner with high yields. The produced gold nanoparticles were characterized using a transmission electron microscopy (TEM), a UV-visible spectrophotometer, and a radio-TLC imaging scanner. From these results, these radiolabeled GNPs can be applicable for a radioisotope tag of biomolecules.

Key words : ^{125}I-Labeled gold nanoparticles, γ-ray irradiation, Gold nanoparticles (GNPs)

서 론

나노란 10억분의 1미터를 나타내는 초미세 단위이며 나노물질은 1～100 nm의 크기를 가지는 물질이다. 큰 물체가 나노미터 크기로 작아지게 되면 비표면적(specific area)이 커지게 되므로 이로 인해 독특한 광학적, 물리화학적 특성이 나타난다(강 등 2002).

금 나노입자는 생체 친화적이며, 표면 플라스몬 공명(Surface plasmon resonance, SPR) 특징을 가져 500～600 nm 사이의 가시광선을 강하게 흡수함으로써 진한 포도주색을 띠며 광학적 성질로서 빛에 대한 강한 흡수와 산란을 가지므로 영상화제(imaging agent)로 많이 응용된다.

금 나노입자의 제조법에는 기상법, 액상법, 그리고 고

* Corresponding author: Sang Hyun Park, Tel. +82-63-570-3370, Fax. +82-63-570-3371, E-mail. parksh@kaeri.re.kr

상법이 있으며, 최근에는 감마선 조사에 의한 금 나노입자의 환원 방법이 보고되고 있다(정 등 2007; Salah *et al*. 2009; Anh *et al*. 2010; Naghavi *et al*. 2010; Shahriari *et al*. 2010).

금 나노입자의 제조에 감마선 조사를 이용한 방법은 다음과 같은 장점이 있다. 첫째, 불순물에 의한 오염이나 인체에 유해한 환원제 사용 없이 환원 과정이 수행될 수 있어 환경 친화적이다. 둘째, 감마선을 넓은 범위에 균일하게 조사할 수 있어 용액 안의 환원 반응을 균일하게 발생시킬 수 있으며 균일한 입자를 얻을 수 있다. 셋째, 조사 실험이 간편하여 대량생산을 할 수 있다.

구체적으로 금 나노입자를 응용할 수 있는 분야로는 바이오센싱, 약물전달 및 분자영상 등이 있다(Laromaine *et al*. 2007; 김 등 2009). 암, 자가사멸세포 등 다양한 표적지향성을 가지는 리간드를 금 나노입자의 표면에 도입하면 질병의 진단 및 치료를 위한 플랫폼으로 활용할 수 있다.

분자영상에 이용되고 있는 금 나노입자는 형광물질 또는 방사성동위원소 등을 표지하여 분자영상에 이용된다. 특히 방사성동위원소는 검출감도와 투과력이 형광물질 보다 높기 때문에 진단 및 치료용 영상화제에 응용되고 있으며 이러한 분야에서 방사성동위원소가 표지된 나노입자가 각광받고 있다.

나노입자의 광학적, 물리화학적 성질들은 나노입자 크기와 표면개질에 따라 달라지므로 영상평가를 위한 영상화제로 사용하기 위해 입자의 크기를 정확히 조절하는 것과 나노입자 표면개질의 안정성이 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 감마선 조사에 의해 생성되는 금 나노입자를 개발하였으며 흡수선량 및 농도에 의해 금 나노입자의 형성 및 크기의 제어가 가능한지 여부를 검토하였다. 또한, 합성된 금 나노입자에 방사성동위원소(^{125}I)를 표지한 후 표지 효율 및 방사화학적 순도를 검토하여 SPECT/CT 등을 위한 영상화제로의 응용 가능 여부를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Polyvinylpyrrolidone (PVP, MW=10,000), isopropanol, gold (III) chloride ($HAuCl_4$) 용액과 methanol (gradient grade, for HPLC, ≥99.9%)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 고 순도의 3차 증류수(deionized water, 18.2 MΩ, Millipore, USA)와 질소가스 순도 99.5%를 사용하였다.

TEM Carbon Grid는 200 Mesh. Th, Cu로 우명교역(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, [^{125}I]NaI는 Perkin Elmer (Massachusetts, USA)에서 구입하였으며, radio-TLC용 plate (ITLC^{TM} SG, 20 cm × 20 cm)는 Pall corporation (Port Washington, New York, USA)에서 구입하였다.

2. 금 나노입자 제조

금 나노입자 제조에 사용된 250 ml polypropylene (PP) 용기는 초음파 세척기를 이용하여 3차 증류수로 세척한 후 사용하였다. $HAuCl_4$ 용액에 polyvinylpyrrolidone (PVP)과 isopropanol를 첨가하고 3차 증류수로 나노입자 제조 용액의 최종 용량을 맞춘 후 10분간 질소 주입하여 반응 용기 내 산소를 제거하였다.

금 나노입자 제조를 위한 $HAuCl_4$ 용액의 농도별 조건은 아래 Table 1과 같다.

농도를 달리한 $HAuCl_4$ 용액의 감마선 조사는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 내 ^{60}Co 감마선 조사 시설(150 TBq of capacity, ACEL, Canada)을 이용하였다. 각 시료들의 감마선 흡수선량을 각각 10, 15, 20, 25 kGy의 선량으로 조사하였으며, 흡수선량율은 10 kGyhr^{-1}이다. 또한 $HAuCl_4$ 용액 농도를 4, 10, 20, 40 mM로 달리하여 상온에서 10 kGyhr^{-1}의 흡수선량율로 총 10 kGy의 선량을 조사하였다(Table 1).

Table 1. Experimental conditions to prepare gold nanoparticles by γ-ray irradiation

Au-PVP samples	$HAuCl_4$ concentration (M)	IPA[a] (ml)	PVP (g)	γ-ray[b] absorbed dose (kGy)	Total volume (ml)
GNP[c] 4 A	4×10^{-3}	22	1.12	10	200
GNP 10 A	10×10^{-3}	20	1	10	180
GNP 10 B	10×10^{-3}	20	1	15	180
GNP 10 C	10×10^{-3}	20	1	20	180
GNP 10 D	10×10^{-3}	20	1	25	180
GNP 20 A	20×10^{-3}	20	1	10	180
GNP 40 A	40×10^{-3}	20	1	10	180

[a]Isopropanol, [b]Absorbed doses of 10 kGyhr^{-1}, [c]Gold nanoparticle

3. 금 나노입자의 ^{125}I 표지

3차 증류수에 분산되어 있는 100 µl의 GNP 20 A (O.D. 1.24)를 원심분리 튜브 (1.5 ml)에 가하고 50 µl (25 µCi, 0.925 MBq)의 [^{125}I]NaI와 3시간 동안 상온에서 교반하여 반응시켰다. 이 혼합물을 13,000 rpm의 속도로 40분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 생리식염수 50 µl에 현탁시켜 13,000 rpm, 20분씩 2회 원심분리 하였다.

세척한 혼합물을 생리식염수 50 µl에 현탁시킨 후 새 튜브에 옮겨 방사능을 측정하였다. 방사능 측정 후 radio-TLC (Radio-thin layer chromatography) 측정은 radio-TLC imaging scanner (Bioscan, Washington, D.C. USA)를 이용하여 혼합물의 방사화학적 수율을 측정하였다. Radio-TLC plate에 1 µl의 ^{125}I가 표지된 GNP 20 A (O.D. 1.24)을 점적하고 이동상은 메탄올-물 (8 : 2) 용액으로 하여 크로마토그래피를 수행하였다. 그 후 radio-TLC용 plate를 건조시킨 후 radio-TLC imaging scanner 위에 올려놓은 후 검출되는 방사능을 2분간 계수하여 크로마토그램을 얻었다 (Fig. 6).

4. 금 나노입자의 특성 분석

금 나노입자의 형태와 크기를 확인하기 위하여 투과전자현미경 (Transmission electron micrograph, TEM)은 120 kV가 인가된 HITACH H-7650 (Hitachi High-Technologies Corporation, ToKyo, Japan)을 이용하여 HR (high resolution) 모드에서 관측하였다. 제조된 금 나노입자의 PVP를 제거하기 위해 3차 증류수로 현탁시킨 후 초고속 원심분리기 (Optima L-90K ultracentrifuge, Beckman, Canada)를 이용하여 25,000 rpm, 10 min, 4°C 조건으로 원심분리 하였다. 세척한 금 나노입자를 carbon-coated Cu grid에 올려 하루 동안 건조한 후 분석하였다. 금 나노입자의 광학적 특성 분석은 UV-visible spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)를 이용하였다.

결과 및 논의

1. 감마선의 조사에 의한 금 나노입자 형성

금 나노입자는 John (1951) 등에 의하여 시트르산 (citric acid)을 이용하여 금 이온을 물속에서 환원시켜 제조하였다. 이후 다양한 환원제를 이용하여 금 이온을 환원시켜 금 나노입자를 제작하는 방법이 보고되었다 (강 등 2002). 본 연구에서는 금 이온을 환원시키기 위해 감마선 조사를 이용하여 물속에서 라디칼 반응에 의해 금 이온을 환원시켰다. 방사선에 의한 금속 이온의 환원되는 원리는 다음과 같다 (Li *et al*. 2007).

$$H_2O \xrightarrow{\text{Radiation}} e_{aq}^-, H_3O^+, H\cdot, H_2, \cdot OH, H_2O_2$$

$$e_{aq}^- + M^{m+} \rightarrow M^{(m-1)+}$$

$$e_{aq}^- + M^{m+} \rightarrow M^0$$

$$nM^0 \rightarrow M_2 \rightarrow \cdots M_n \cdots \rightarrow M_{aggregate}$$

감마선 조사에 의해 생성된 수산화 라디칼 (·OH)은 금 이온을 환원시키며 isopropanol은 수산화 라디칼 (·OH)을 제거하므로 생성된 금 나노입자가 다시 환원되는 것을 막아주는 역할을 한다.

고분자 PVP는 나노 와이어 제조에 사용되는 물질로

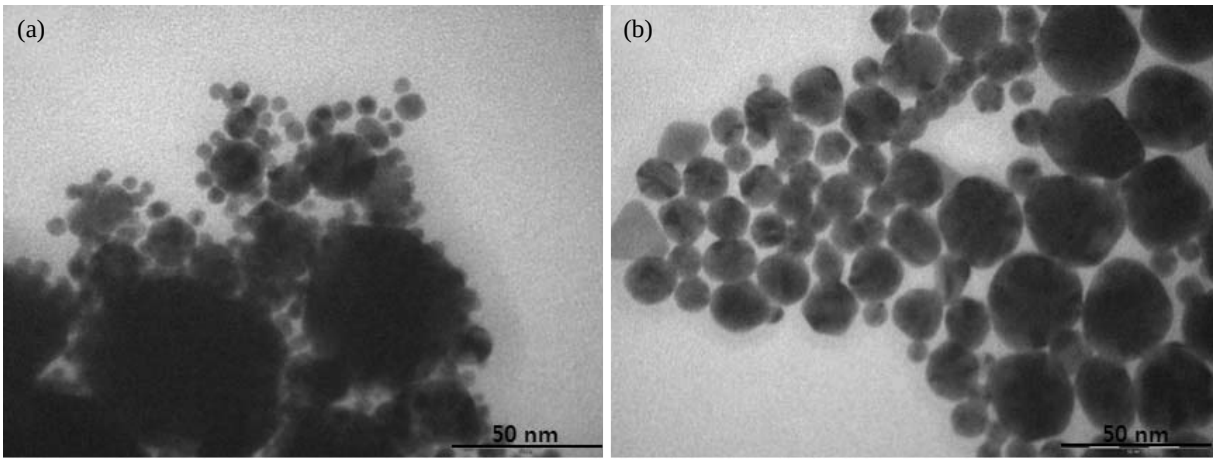

Fig. 1. TEM images of gold nanoparticles (GNP 10 B, O.D. 0.92) (a) before and (b) after washout of PVP with deionized water.

금속 표면을 마치 넝쿨처럼 감싸면서 성장을 촉진한다. 또한 안정화제 역할을 하며 생체적합성이 우수한 고분자로 알려져 있다(김 등 2002; Sun *et al*. 2002). 본 연구에서도 PVP를 안정화제로 사용하여 금 나노입자를 제조하고 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 시료들을 분석하였다(Fig. 1). 안정화제인 PVP로 만든 나노입자 제조에서는 PVP의 분자량이 클수록 나노입자의 크기가 커지는 경향이 나타났다. 만들어진 나노입자의 표면은 PVP에 의해서 서로 뭉쳐진다고 보고되어져 있다(Shin *et al*. 2004). Fig. 1의 (a)는 Shin (2004) 등에 의해 보고된

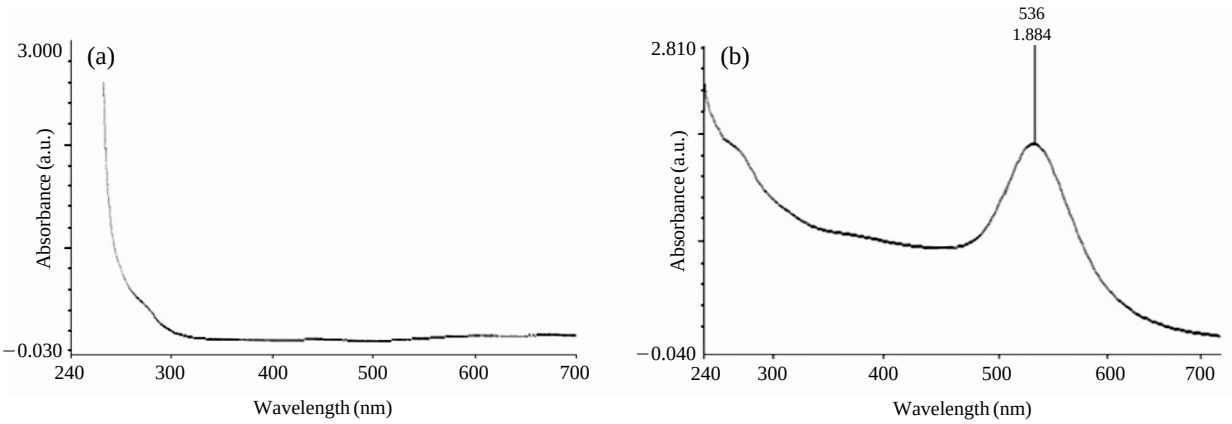

Fig. 2. The UV-vis absorption spectra of gold nanoparticles solution containing 10 mM $HAuCl_4$ (a) before synthesized and (b) after synthesized by 10 kGy γ-ray irradiation.

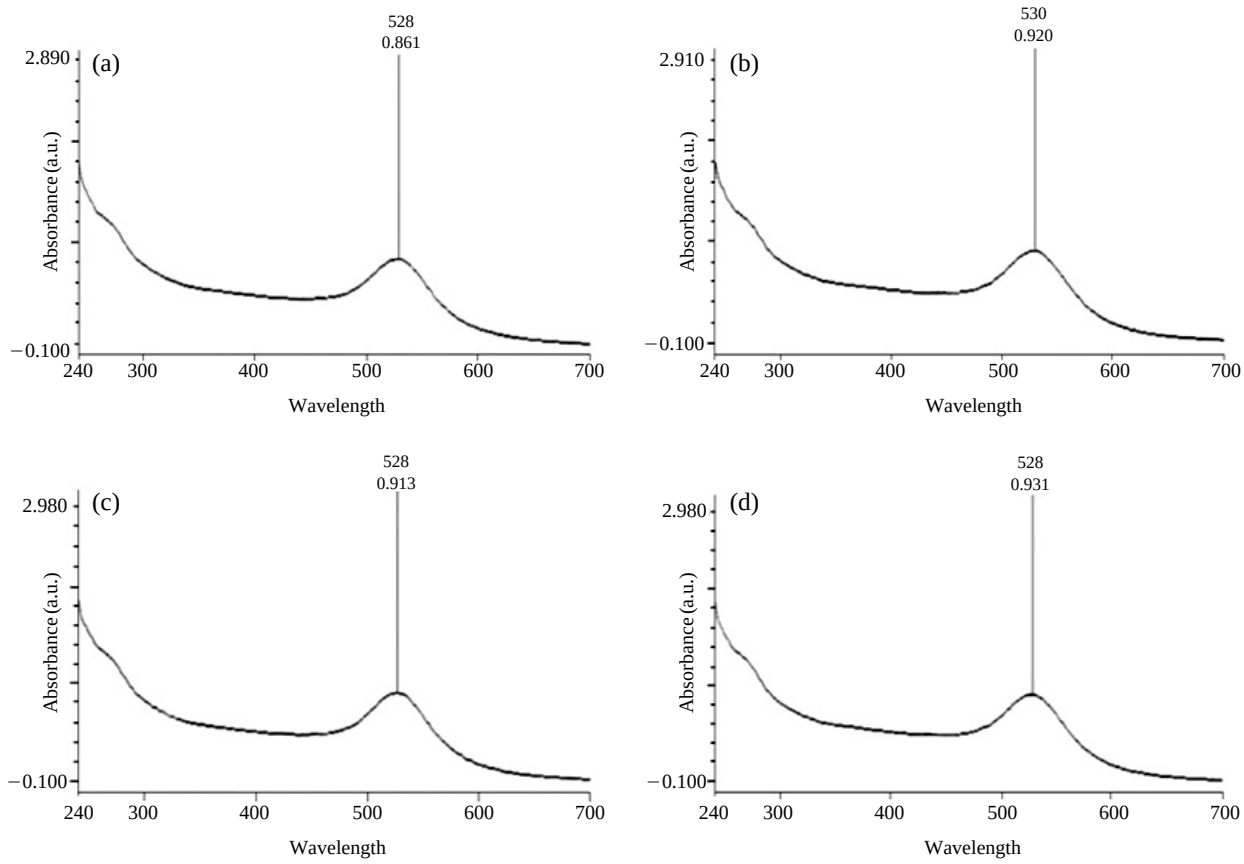

Fig. 3. Effect of absorbed dose on the UV-vis absorption spectra of gold nanoparticles solution containing 10 mM $HAuCl_4$. (a) 10 kGy, (b) 15 kGy, (c) 20 kGy, and (d) 25 kGy.

것과 같이 방사선 조사 후 시료에 남아있는 과량의 PVP에 의해 금 나노입자들이 크게 뭉쳐져 있음을 볼 수 있다. 제조된 금 나노입자로부터 과량의 PVP를 제거함으로써 각각의 금 나노입자를 확인할 수 있었다(Fig. 1b).

2. 금 나노입자의 광학적 특성

금 이온이 나노입자로 환원이 되면 가시광선에서 강한 흡수 현상을 보이게 되는데 이를 플라스몬 밴드라고 한다(이 2009). 대체로 금 나노입자의 플라스몬 흡수는 금 나노입자 표면에 존재하는 전도대의 6s 궤도 전자들이 입사되는 전자기장과 작용에 의해 형성되는데, 금 나노입자 크기가 작아지면 특정한 진동주파수에 의해 파장이 가시광선 영역인 520～540 nm 근처에서 강하게 흡수되며 진한 붉은 색을 갖게 된다.

본 연구에서 제조된 금 나노입자에서 고유의 가시광선 영역에서의 흡수 스펙트럼(UV-visible absorbance spectra)을 확인하였다(Fig. 2). 제조된 금 나노입자는 가시광선영역인 536 nm에서 강한 흡수를 하였다. 또한 10 mM $HAuCl_4$ 용액(GNP 10 A, GNP 10 B, GNP 10 C, GNP 10 D)들에 대한 감마선 흡수선량에 따른 흡수 스펙트럼 변화를 확인하였다(Fig. 3). 감마선 흡수선량이 증가할수록 흡광도 값이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. GNP 10 A의 흡광도 값은 528 nm에서 0.86이며 GNP 10 D의 흡광도 값은 0.93으로 증가하였다. 이는 흡수선량이 증가할수록 금 이온의 환원반응이 활발히 일어나 금 나노입자의 수가 증가하기 때문에 흡광도 값이 증가하는 경향을 나타내는 것으로 판단된다.

3. 감마선의 흡수선량에 따른 금 나노입자의 크기 변화

감마선 흡수선량에 따른 금 나노입자 형태 및 크기의 변화를 알아보았다. 10 mM $HAuCl_4$ 용액을 각각 10, 15, 20, 25 kGy로 조사하여 제조된 금 나노입자들을 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 이미지를 얻었다(Fig. 4). 금 나노입자의 크기는 감마선 흡수선량이 10에서 25 kGy로 증가할수록 작아지는 경향을 보였다. 이는 흡수선량이 증가할수록 물속에서 생성되는 전자와 isopropanol 라디칼의 수를 증가시킨다. 따라서 금 이온의 환원속도가 증가하여 핵생성은 빠르지만 성장하기까지의 시간이 상대적으로 부족하여 나노입자의 크기가 작아지게 되므로 흡수선량에 따른 금 나노입자의 크기는 27±3 nm (GNP 10 A, O.D. 0.86)에서 10±3 nm (GNP 10 D, O.D. 0.93)로 감소하였다(Table 2).

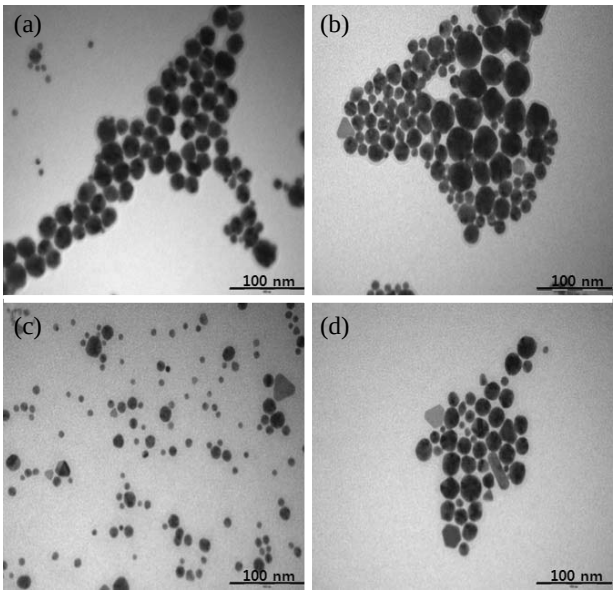

Fig. 4. TEM images of gold nanoparticles synthesized by increasing γ-ray irradiation at containing 10 mM $HAuCl_4$. (a) 10 kGy, (b) 15 kGy, (c) 20 kGy, and (d) 25 kGy.

Table 2. Gold nanoparticles size by varying irradiation dose

Absorbed dose rate (kGy)	Average size (nm)
10	27±3
15	19±6
20	17±6
25	10±3

4. $HAuCl_4$ 용액 농도에 따른 금 나노입자의 크기 변화

감마선을 10 kGy (흡수선량률 10 $kGyhr^{-1}$)의 선량으로 일정하게 조사하고 $HAuCl_4$ 용액 농도를 달리하여 제조한 금 나노입자들을 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 이미지를 획득하고 분석하였다(Fig. 5). $HAuCl_4$ 용액 농도가 4 mM에서 40 mM로 증가할수록 금 나노입자의 크기가 커지는 경향이 나타났다. 이는 금 이온의 농도가 증가하여 금 나노입자의 환원속도가 증가하고 환원이 된 금 나노입자의 확산 및 고착에 의해 입자의 크기가 커지기 때문이다. 본 연구에서는 $HAuCl_4$ 용액 농도가 증가할수록 금 나노입자의 크기는 8±2 nm (Fig. 5a)에서 57±3 nm (Fig. 5d)로 증가하였다.

5. 금 나노입자의 ^{125}I 표지 및 Radio-TLC 분석

PVP 코팅된 금 나노입자의 방사성동위원소 표지 효율을 측정하기 위하여 실리카겔이 코팅된 유리섬유 TLC

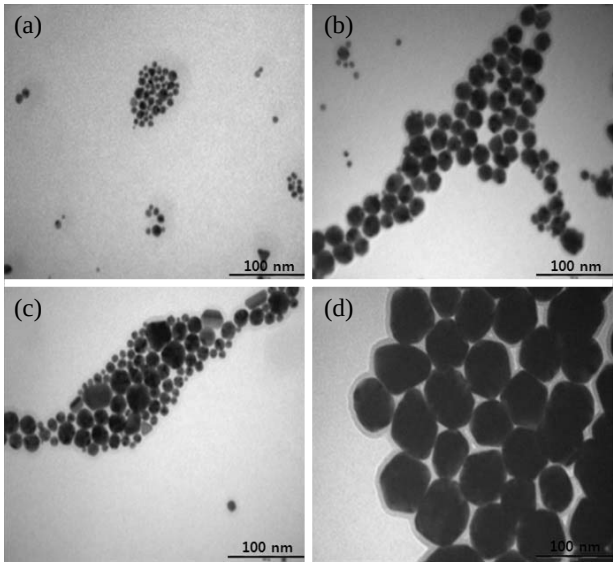

Fig. 5. TEM image of gold nanoparticles synthesized by 10 kGy γ-ray irradiation with increasing the $HAuCl_4$ concentration. (a) 4 mM, (b) 10 mM, (c) 20 mM, and (d) 40 mM.

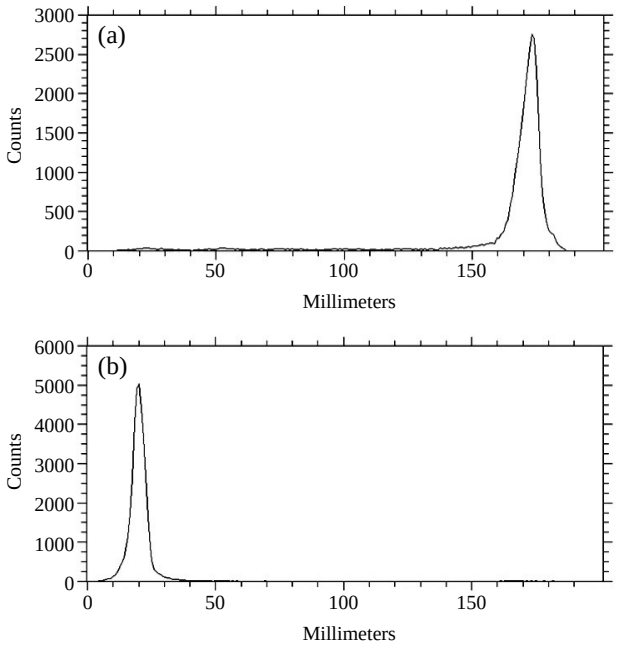

Fig. 6. Radio-Thin layer chromatogram of ^{125}I labeled PVP coated gold nanoparticles (GNP 20 A, O.D. 1.24). (a) Free ^{125}I radioisotope and (b) ^{125}I labeled PVP coated GNP 20 A.

plate에 free ^{125}I 동위원소와 ^{125}I가 표지된 금 나노입자 용액을 각각 1 μl씩 점적하여 크로마토그래피를 수행한 다음 radio-TLC 기기를 이용하여 분석하였다(Fig. 6).

PVP 코팅된 GNP 20 A (O.D. 1.24) 100 μl은 ^{125}I 용액 50 μl에서 3시간 반응시켰을 때 radio-TLC 분석결과 방사화학적 순도는 99% 이상으로 나타났다(Fig. 6b). PVP 코팅된 금 나노입자의 방사성동위원소 표지효율 시험 결과를 통해 실험에 사용한 ^{125}I가 금 나노입자에 흡착성이 큰 것을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 감마선을 이용하여 수산화 라디칼(·OH) 생성을 유도함으로써 금 이온을 환원하여 금 나노입자를 제조하였으며 다른 기존의 금 나노입자 제조 방법들 보다 쉽게 제조할 수 있음을 확인하였다. 감마선 흡수선량이 증가할수록 금 나노입자 크기는 감소하는 경향과 $HAuCl_4$ 용액의 농도가 증가할수록 금 나노입자 크기는 커지는 경향이 나타났다.

따라서 본 연구에서의 감마선을 이용한 금 나노입자의 제조 방법은 신속하고 정확하게 금 나노입자의 크기 조절이 가능하여 금 나노입자의 광학적, 물리화학적 특성 조절이 용이하다. 또한 PVP 코팅된 금 나노입자의 방사성 동위원소 표지효율 평가를 통하여 ^{123}I, ^{124}I, ^{131}I 등 다양한 요오드 방사성동위원소를 흡착제 및 캐리어(carrier)로 활용 가능함을 확인하였다. 나아가 PVP 코팅된 금 나노입자가 표적지향성을 가지는 영상화제로의 응용을 위한 플랫폼으로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한, 금 친화성 단백질(gold binding protein)과 결합시키면 다양한 생리활성물질의 영상화가 가능할 것으로 기대된다.

사 사

이 연구는 교육과학기술부에서 시행하는 방사선기술개발사업의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

강성구, 차순우, 윤창연, 이종협. 2002. 금 나노입자의 제조와 모양의 제어. 화학공학의 이론과 응용. **8**(1):1865-1868.

강성구, 차순우, 윤창연, 정경원, 강민수, 이종협. 2002. 금 나노 입자의 제조와 수율의 향상. 화학공학의 이론과 응용. **8**(2):4786-4789.

김도균, 박태정, 이상엽. 2009. 국소 표면 플라즈몬 공명(LSPR) 기반 비표지 바이오칩 제작 및 바이오센서로의 응용. 한국생명공학회지. **24**:1-8.

김형태, 설용건, 문제권, 정종헌, 이일희. 2002. PVP 첨가에

의한 유무기 복합흡착제의 성능개선. 화학공학의 이론과 응용. **8**(2):4477-4480.

이준웅. 2009. 기능성 금 나노입자. 한국군사과학기술학회지. **12**(6):739-749.

정경숙, 배광수, 김병준, 유성구, 서길수. 2007. PVA 매트릭스 내에 Silver 나노 입자의 제조와 특성에 관한 연구. 한국공업화학회지. **18**(2):173-177.

Anh NT, Phu DV, Duy NN, Du BD and Hien NQ. 2010. Synthesis of alginate stabilized gold nanoparticles by γ-irradiation with controllable size using different Au^{3+} concentration and seed particles enlargement. *Radiat. Phys. Chem.* **79**:405-408.

Laromaine A, Koh L, Murugesan M, Ulijin RV and Stevens MM. 2007. Protease-triggered dispersion of nanoparticle assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **129**:4156-4157.

Li T, Park HG and Choi SH. 2007. γ-Irradiation-induced preparation of Ag and Au nanoparticles and their characterizations. *Mater. Chem. Phys.* **105**:325-330.

Naghavi K, Saion E, Rezaee K and Yunus WMM. 2010. Influence of dose on particle size of colloidal silver nanoparticles synthesized by gamma radiation. *Radiat. Phys. Chem.* **79**: 1203-1208.

Salah N, Habib SS, Khan ZH, Al-Hamedi S and Djouider F. 2009. Functionalization of gold and carbon nano structured materials using gamma-ray irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* **78**:910-913.

Shahriari E, Yunus WMM, Naghavi K and Talib ZA. 2010. Effect of concentration and particle size on nonlinearity of Au nano-fluid prepared by γ(^{60}Co) radiation. *Opt. Commun.* **283**:1929-1932.

Shin HS, Yang HJ, Kim SB and Lee MS. 2004. Mechanism of growth of colloidal silver nanoparticles stabilized by polyvinlylpyrrolidon in γ-irradiated silver nitrate solution. *J. Colloid Interface Sci.* **274**:89-94.

Sun Y and Xia Y. 2002. Large-scale synthesis of uniform sliver nanowires through a soft, self-seeding. Polyol Process. *Adv. Mater.* **14**:833-837.

Turkevich J, Stevenson PC and Hillier J. 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**:55-75.

Manuscript Received: March 20, 2012
Revised: April 5, 2012
Revision Accepted: April 30, 2012