



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월26일
 (11) 등록번호 10-1962162
 (24) 등록일자 2019년03월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/532 (2006.01) *C09K 11/02* (2006.01)
C09K 11/65 (2006.01) *G01N 27/327* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/84* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/532 (2013.01)
C09K 11/02 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0066478
- (22) 출원일자 2017년05월30일
 심사청구일자 2017년05월30일
- (65) 공개번호 10-2018-0130654
- (43) 공개일자 2018년12월10일
- (56) 선행기술조사문헌

- (73) 특허권자
 한국교통대학교산학협력단
 충청북도 충주시 대소원면 대학로 50
- (72) 발명자
 이용규
 충청북도 충주시 연수동산로 12, 101동 404호(연수동, 연수리슈빌아파트)
 리뷰라이 비슈누
 충청북도 충주시 대소원면 모단길 19-2 태흥원룸 109-110호
 모하메드 나피우짜만
 충청북도 충주시 대소원면 모단길 28-6, 205호
- (74) 대리인
 김정현

Pei Dong et al., 'Synthesis of white-light-emitting graphene quantum dots via a one-step reduction and their interfacial characteristics-dependent luminescence properties', *Inorg. Chem. Front.*, (2017.*
 Xu Yan et al., 'Graphene Quantum Dot-MnO₂ Nanosheet-Based Optical Sensing Platform: a Sensitive Fluorescence "Turn Off-On" Nanosensor for Glutathione Detection and Intracellular Imaging', *ACS Appl. Ma**
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **FRET 매개 바이오센싱을 위한 백색발광 그래핀 퀀텀닷 조성물 및 이의 제조방법**

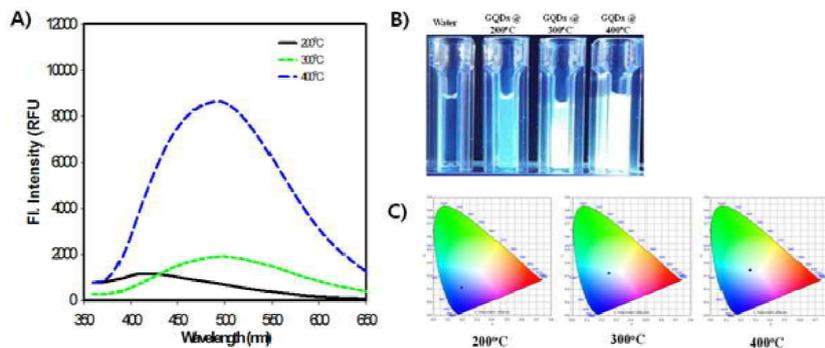
(57) 요약

본 발명은 FRET 매개 바이오센싱을 위한 백색발광 그래핀 퀀텀닷 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 단일물질만으로 백색광을 발현하며 그래핀 구조를 가져 광학조절성이 우수하며 세포독성이 미미하고 광안정성이 뛰어난 퀀텀닷으로서 열분해방법으로 제조하므로 종래의 제조방법에 비해

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



제조비용이 저렴하며 제조가 용이한 장점이 있다. 또한 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷 및 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 음전하의 표면전하를 가지고 있으며 20nm의 평균입경을 가지고 있어 생체안정성이 뛰어나고 세포막 투과성이 뛰어난 장점이 있다. 본 발명의 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 과산화수소 또는 글루타티온에 의해 환원되는 산화망간으로 피복하여 FRET 매개 형광 소광효과를 부여하므로 생체시료에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온을 감지 또는 농도수치를 산출 할 수 있는 효과가 있다. 상기 산화망간은 생체에 존재하는 단백질, 다당류, 아미노산등에 의해 환원되지 않고 과산화수소 또는 글루타티온에 의해서만 환원되는 특이성이 있으므로 생체시료내에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온에 선택적으로 형광을 발현하는 장점이 있다. 본 발명의 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷이 포함된 조성물은 종래의 라벨에 의한 과산화수소 또는 글루타티온의 검출방법에 대비하여 제조가 저렴하며 뛰어난 선택성을 가지고 있어 이를 대체할 수 있는 차세대 과산화수소 또는 글루타티온 검출 조성물로 사용될 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

C09K 11/65 (2013.01)

G01N 27/3277 (2013.01)

G01N 33/54373 (2013.01)

G01N 33/84 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016940730

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업(후속연구지원)

연구과제명 형광그래핀을 이용한 암 표적형 진단 및 치료기술개발

기여율 1/1

주관기관 한국교통대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 과산화수소(H₂O₂) 감지용 또는 수치 측정용 조성물에 있어서,

상기 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 육각형 패턴의 그래핀 구조를 가지며, 평균 -50 mV의 제타포텐셜(zeta potential)을 가지며, 평균 20nm의 입경을 가지는 것을 특징으로 하는 과산화수소(H₂O₂) 감지용 또는 수치 측정용 조성물

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 빛과장 345 내지 355nm에서 여기(excitation)하여 빛과장 475 내지 485nm에서 백색광을 방출(emission)하며 5 내지 6%의 광루미네선스(photoluminescence) 퀀텀수율을 보이는 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 산화망간은 상기 백색 발광 그래핀 퀀텀닷을 피복하여 FRET 매개 소광효과(fluorescence resonance energy transfer mediated quenching effect)를 보이는 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 5

제 1 항에 있어서, 과산화수소(H₂O₂)의 감지 또는 수치측정은 상기 과산화수소에 의해 상기 산화망간(MnO₂)이 망간이온(Mn²⁺)으로 환원되어 상기 백색 발광 그래핀 퀀텀닷의 백색 발광이 복원되는 현상을 이용하는 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 과산화수소(H₂O₂)의 수치측정은 0.001 내지 1.5mmol/L의 과산화수소 농도범위에서 수행되는 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 7

삭제

청구항 8

디옥시콜릭산(deoxycholic acid)을 히팅맨틀(heating mantle)에서 350 내지 450℃의 조건으로 5 내지 15분간 가열하여 백색발광 그래핀 퀀텀닷을 제조하는 단계;

과망간산칼륨(KMnO₄)을 수산화나트륨에 용해하여 산화망간(MnO₂)을 제조하는 단계; 및
 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷과 상기 산화망간을 각각 5 내지 20 : 1의 중량비로 혼합하여 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 제조하는 단계;
 를 포함하는 것을 특징으로 하는 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 과산화수소(H₂O₂) 감지용 또는 수치 측정용 조성물의 제조방법

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 조성물은 생체조직, 세포, 혈액, 소변, 체액 시료에 존재하는 세포의 용해를 방지하는 BSA, 다당류, 또는 아미노산을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 과산화수소(H₂O₂) 감지용 또는 수치 측정용 조성물의 제조방법

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 FRET 매개 바이오센싱을 위한 백색발광 그래핀 퀀텀닷(White Colored Emitting Graphene Quantum Dots) 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 상세하게는 열분해방법(pyrolysis)을 이용하여 제조한 백색발광 그래핀 퀀텀닷에 산화망간(MnO₂)을 피복하여 FRET 매개 형광 소광효과를 구현한 후 시료에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온(glutathione)에 의해 상기 피복된 산화망간이 선택적으로 환원되고 그로 인하여 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷의 백색형광효과가 복원되는 정도를 측정하므로 시료에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온을 감지하거나 농도수치를 산출할 수 있는 백색발광 그래핀 퀀텀닷, 이를 포함하는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 백색발광물질은 발광소자개발에 있어서 많은 가능성을 가지고 있기 때문에 센서, 광학 디스플레이 및 차세대 조명장치로의 응용 및 개발에 많은 기대가 되는 물질이다. 통상적으로 백색발광물질은 다른 종류의 기본적인 형광 물질(빨강, 녹색, 파랑) 또는 보완적인 형광물질(노랑, 터키옥색)을 혼합하여 제조한다. 최근 연구에 따르면, 백색발광물질을 제조하기 위해 유기분자, 희토류 금속, 고분자, 맹독성 퀀텀닷(양자점) 물질 및 유기뼈대(organic framework)를 이용하는 방법이 제시되었다. 그러나 상기 물질들은 독성이 있고 상대적으로 가격이 비싸 뿐만 아니라 각각의 형광물질로부터 발광하는 형광의 세기를 정량적으로 조절하기 어려워 결과적으로 백색발광을 오히려 저해하는 단점이 있다. 넓은 가시광선영역을 커버할 수 있는 단일 인광물질은 백색발광의 재료로서 각광받아 왔다. 나노사이즈이며 차원이 없고 결정 그래핀에 기반한 그래핀 퀀텀닷(Graphene Quantum Dots, GQDs)은 퀀텀닷의 제한, 크기의존 및 밴드 갭 매개에 의한 광학 조절성, 낮은 세포독성 및 향상된 광안정성으로 종래의 퀀텀닷을 뛰어넘는 편의성을 가지고 있어 그 응용이 주목된다. 특히 GQDs의 상기 독특한 특징들은 의학, 바이오센서 및 광전자 기기등 다양한 분야에 응용되기에 적합하다.

[0004] GQDs의 특징들 중 가장 흥미로운 하나는 조절 가능한 광루미네선스(Photoluminescence, PL)이다. 정확한 기작은 알려지지 않았으나 GQDs의 광루미네선스는 컨주게이션된 π-전자로 제한된 퀀텀에 의해 향상되는 것으로 이해되고 있으며 상기 퀀텀은 크기, 화학적 기능화, 형상, 이질원자도핑(heteroatom doping), 모서리 구성(edge configuration) 및 결함에 예민한 것으로 알려져 있다. 여러 선행연구에 의해 조절 가능한 GQDs의 여기 및 방출 특성이 보고되었으나 백색광을 제조하기 위한 GQDs의 응용에 관하여는 거의 알려진 바가 없다.

[0005] 선행연구에 의하면 백색발광 그래핀 퀀텀닷 (White light emitting GQDs, WGQDs)을 제조하기 위한 방법으로 휴머방법(hummer's method), 전기화학적 박리, 및 용제유도 자가결합방법 등이 제시되었다. 그 예로서, Sekiya 등은 GQDs를 제조하기 위하여 그래핀 파우더를 사용한 휴머방법을 이용하고 4-propynylxybenzylamine을 이용한 모서리 기능화를 수행하였으며; Luk 등은 GQD-환전 조성물 및 파란색 LED를 피복하는 방법을 이용하여 백색광을

제조한 바 있으며; Gosh 등은 산화 그래핀으로부터 산성가수분해 방법을 이용하여 백색발광 그래핀 산화물 퀀텀닷(Graphene oxide quantum dots, GOQDs)을 제조하였고; Joseph 등은 전기화학적 박리방법을 이용하여 WGQDs을 제조하였다. 그러나 상기 방법들은 화학적 변화를 유도하거나 가혹한 산처리, 또는 유기용제를 사용하기 때문에 고비용이 소모될 뿐 아니라 제조된 WGQDs을 분리하기 위해 많은 공정이 필요한 단점이 있다.

[0006] 폴리브루이트황화물(MoS₂), 황화텅스텐(WS₂) 및 이산화망간(MnO₂)과 같은 다층전환 금속산화물(Multi-layered transition metal oxide)은 부피 대비 향상된 표면적 및 에너지 수득 특성을 가지고 있다. 상기 금속산화물은 상기 특성으로 인하여 광촉매, 바이오센서 및 광열 치료분야에 적용이 가능하기 때문에 최근 들어 큰 관심을 받고 있다. 특히 상기 금속산화물은 빠른 전자이동 및 뛰어난 빛 흡수 특성을 가지고 있어 형광소멸자(fluorescence quencher) 및 FRET 매개 화학/바이오센싱 기술(Forster resonance energy transfer mediated chemo/biosensing technology)로서 광범위하게 고려되고 있다.

[0007] 글루타티온(Glutathione, GSH) 및 과산화수소(H₂O₂)는 질병의 진행을 판단하는 기초 바이오마커로서 고려되고 있다. 자연에 존재하는 항산화제인 글루타티온은 산화환원 항상성의 유지에 중요한 역할을 수행할 뿐 아니라 자유라디칼의 생산을 조절하는 중요한 역할을 수행한다. 생체 시스템에서 글루타티온 수준이 비정상적으로 측정되면 알츠하이머, 암 및 HIV를 포함한 다양한 질병이 발병했음을 의심할 수 있다. 과산화수소는 다양한 산업 및 생물학적 응용에 있어서 방부제 및 산화제로 사용되고 있으며 생체시스템의 경우 세포내 과산화수소의 농도상승은 암발생(tumorigenesis)을 판단하는 인자로서 인식될 수 있다. 그 뿐 아니라 방광에 존재하는 과산화수소의 농도는 몸 전체의 산화스트레스를 판단하는 인자로서 사용될 수 있다. 대부분의 바이오센싱 방법은 생물학적 효소, 유기 형광물질, 전기화학적 방법, 및 효소 면역 분석법을 이용하여 글루타티온 및 과산화수소를 정량적으로 분석하는 방법에 관한 것이다. 그러나 상기 방법들은 비용이 비싸며 분석을 위한 복잡한 기기가 필요한 단점이 있기 때문에 상기 바이오마커를 확인하기 위한 라벨 없는 검출방법의 개발이 절실한 실정이다.

[0008] 과산화수소 및 글루타티온이 존재하는 환경에서 산화망간(MnO₂) 및 망간이온(Mn²⁺)의 선택성 및 해리정도를 측정하는 방법은 바이오센싱 방법으로 응용되기에 충분하다. 상기와 같은 바이오센싱 방법의 예로서, Yuan 등은 NIR 흡수 상향변화나노입자(upconversion nanoparticles, UCNP)-산화망간 복합체를 과산화수소 수치의 판단에 사용한바 있으며; Deng 등은 UCNP-산화망간 복합체를 글루타티온 농도의 판단에 사용 한바 있다. 그러나 상기 UCNP는 상대적으로 낮은 퀀텀효율(quantum yield)을 가지고 있으며 NIR 흡수능 때문에 과열되는 경향이 있어 실제 응용되는데 한계가 있는 것으로 판단된다.

[0009] 열분해방법을 이용하면 WGQDs를 제조할 수 있다. 그러나 상기 열분해방법은 가해진 열에 의해 전구물질이 깨져 다중 색상 방출 QDs가 제조되는 단점이 있어 상기 방법으로 제조된 WGQDs 대부분이 일반적인 광전자 공학으로 응용될 뿐 생물학적 배지에서 사용하는 것과 같은 생물학에 대한 적용은 거의 알려져 있지 않다.

[0011] 본 명세서에서 언급된 특허문헌 및 참고문헌은 각각의 문헌이 참조에 의해 개별적이고 명확하게 특정된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참조로 삽입된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) Sekiya, R., Uemura, Y., Murakami, H., & Haino, T. (2014). White-Light-Emitting Edge-Functionalized Graphene Quantum Dots. *Angewandte Chemie*, 126(22), 57255729.
- (특허문헌 0002) Hirsch, R. (2004). *Exploring Colour Photography: A Complete Guide*, Laurence King, and ISBN 1-85669-420-8.
- (특허문헌 0003) Zhao, Y.-W., Zhang, F.-Q., & Zhang, X.-M. (2016). Single Component Lanthanide Hybrids Based on MetalOrganic Framework for Near-Ultraviolet White Light LED. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(36), 2412324130.
- (특허문헌 0004) Ying, L., Ho, C.-L., Wu, H., Cao, Y., & Wong, W.-Y. (2014). White polymer light-emitting devices for solid-state lighting: materials, devices, and recent progress. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 26(16), 245973.
- (특허문헌 0005) Wu, J., Zhang, H., & Du, S. (2016). Tunable luminescence and white light

emission of mixed lanthanide-organic frameworks based on polycarboxylate ligands. *Journal of Materials Chemistry C*, 4(16), 33643374.

(특허문헌 0006) Rahman, F., & Johnson, N. P. (2006). Generation of white light from optically pumped gallium nitride epilayers. *Applied Physics Letters*, 89(2), 25.

(특허문헌 0007) Nafiujjaman, M., Nurunnabi, M., Kang, S., Reeck, G. R., Khan, H. A., & Lee, Y. (2015). Ternary graphene quantum dot-polydopamine-Mn3O4 nanoparticles for optical imaging guided photodynamic therapy and T1-weighted magnetic resonance imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(28), 58155823.

(특허문헌 0008) Nafiujjaman, M., Revuri, V., Park, H.-K., Kwon, I. K., Cho, K.-J., & Lee, Y. (2016). Enhanced Photodynamic Properties of Graphene Quantum Dot Conjugated Ce6 Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy and Imaging. *Chemistry Letters*, 45(8), 997999.

(특허문헌 0009) Nurunnabi, M., Parvez, K., Nafiujjaman, M., Revuri, V., Khan, H. A., Feng, X., & Lee, Y. (2015). Bioapplication of graphene oxide derivatives: drug/gene delivery, imaging, polymeric modification, toxicology, therapeutics and challenges. *RSC Advances*, 5(52), 4214142161.

(특허문헌 0010) Kyu Kim, J., Bae, S., Yi, Y., Jin Park, M., Jin Kim, S., Myoung, N., Lee, C., Hee Hong, B., Hyeok Park, J. (2015). Origin of White Electroluminescence in Graphene Quantum Dots Embedded Host/Guest Polymer Light Emitting Diodes. *Scientific Reports*, 5, 11032.

(특허문헌 0011) Luk, C. M., Tang, L. B., Zhang, W. F., Yu, S. F., Teng, K. S., & Lau, S. P. (2012). An efficient and stable fluorescent graphene quantum dot-agar composite as a converting material in white light emitting diodes. *Journal of Materials Chemistry*, 22(42), 2237822381.

(특허문헌 0012) Ghosh, T. & Prasad, E. (2015) White-light emission from unmodified graphene oxide quantum dots. *J. Phys. Chem. C* 119, 27332742.

(특허문헌 0013) Mahesh, S., Lekshmi, C. L., Renuka, K. D., & Joseph, K. (2016). Simple and Cost-Effective Synthesis of Fluorescent Graphene Quantum Dots from Honey: Application as Stable Security Ink and White-Light Emission. *Particle & Particle Systems Characterization*, 33(2), 7074.

(특허문헌 0014) Merki, D., Fierro, S., Vrabel, H., & Hu, X. (2011). Amorphous molybdenum sulfide films as catalysts for electrochemical hydrogen production in water. *Chemical Science*, 2(7), 12621267.

(특허문헌 0015) Pumera, M., & Loo, A. H. (2014). Layered transition-metal dichalcogenides (MoS2 and WS2) for sensing and biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 61, 4953. Li, Q., Zhang, N., Yang, Y., Wang, G., & Ng, D. H. L. (2014). High Efficiency Photocatalysis for Pollutant Degradation with MoS2/C3N4 Heterostructures. *Langmuir*, 30(29), 89658972.

(특허문헌 0016) Liu, T., Wang, C., Gu, X., Gong, H., Cheng, L., Shi, X., ... Liu, Z. (2014). Drug delivery with PEGylated MoS2 nano-sheets for combined photothermal and chemotherapy of cancer. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 26(21), 343340.

(특허문헌 0017) Liu, T., Wang, C., Cui, W., Gong, H., Liang, C., Shi, X., ... Liu, Z. (2014). Combined photothermal and photodynamic therapy delivered by PEGylated MoS2 nanosheets. *Nanoscale*, 6(19), 1121911225.

(특허문헌 0018) Ju, J., Zhang, R., He, S., & Chen, W. (2014). Nitrogen-doped graphene quantum dots-based fluorescent probe for the sensitive turn-on detection of glutathione and its cellular imaging. *RSC Advances*, 4(94), 5258352589.

(특허문헌 0019) Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., & Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, 390(3), 191214.

- (특허문헌 0020) Jiang, Y., Li, Y., Li, Y., & Li, S. (2016). A sensitive enzyme-free hydrogen peroxide sensor based on a chitosan-graphene quantum dot/silver nanocube nanocomposite modified electrode. *Analytical Methods*, 8(11), 24482455.
- (특허문헌 0021) Roh, M., van der Meer, R., & Abdulkadir, S. A. (2012). Tumorigenic polyploid cells contain elevated ROS and ARE selectively targeted by antioxidant treatment. *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), 801812.
- (특허문헌 0022) Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88(4), 124376.
- (특허문헌 0023) Zhu, C., Yang, G., Li, H., Du, D., & Lin, Y. (2015). Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures. *Analytical Chemistry*, 87(1), 230249.
- (특허문헌 0024) Yuan, J., Cen, Y., Kong, X.-J., Wu, S., Liu, C.-L., Yu, R.-Q., & Chu, X. (2015). MnO₂-Nanosheet-Modified Upconversion Nanosystem for Sensitive Turn-On Fluorescence Detection of H₂O₂ and Glucose in Blood. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(19), 1054810555.
- (특허문헌 0025) Liu, Z., Cai, X., Lin, X., Zheng, Y., Wu, Y., Chen, P., Weng, S., Lin, L., & Lin, X. (2016). Signal-on fluorescent sensor based on GQDsMnO₂ composite for glutathione, *Analytical Methods*, 8, 2366-2374.
- (특허문헌 0026) Nurunnabi, M., Khatun, Z., Nafiujjaman, M., Dong-geun Lee, D. G., & Lee, Y. (2013). Surface Coating of Graphene Quantum Dots Using Mussel-Inspired Polydopamine for Biomedical Optical Imaging, *ACS applied materials & interfaces*, 5 (16), 82468253.
- (특허문헌 0027) Jiang, L., Li, X., Liu, L., & Zhang, Q. (2013). Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 8, 18251834.
- (특허문헌 0028) Nafiujjaman, M., Revuri, V., Nurunnabi, M., Cho, K. J., Lee, Y. (2015). Photosensitizer conjugated iron oxide nanoparticles for simultaneous in vitro magneto-fluorescent imaging guided photodynamic therapy, *Chemical Communications*, 51 (26), 5687-5690.
- (특허문헌 0029) Kim, J., Nafiujjaman, M., Nurunnabi, M., Lee, Y. K. & Park, H. K. (2016). Hemorheological characteristics of red blood cells exposed to surface functionalized graphene quantum dots, *Food and Chemical Toxicology*, 97, 346-353.
- (특허문헌 0030) Germain, M. E. & Knapp, M. J. (2008). Turn-on Fluorescence Detection of H₂O₂ and TATP, *Inorganic Chemistry*, 47 (21), 97489750.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명자들은 발광소자개발에 있어서 많은 가능성을 가지고 있으나 퀀텀효율이 낮고 세포독성이 있으며 가혹한 산처리와 유기용제의 사용으로 제조비용이 상승할 뿐 아니라 복잡한 정제과정을 필요로 하는 퀀텀닷(quantum dot, 양자점)을 디옥시콜릭산을 이용하여 열분해방법으로 제조하면 그래핀 구조를 가지고 백색광을 발광하는 특성을 가지며 향상된 퀀텀효율을 가지면서도 세포독성이 미미한 장점이 있는 백색발광 그래핀 퀀텀닷을 제조할 수 있으며 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷에 에너지 수득성능이 뛰어나며 FRET 매개 바이오센싱 기술에 응용이 가능한 산화망간(MnO₂)을 피복하면 바이오마커인 과산화수소(H₂O₂) 및 글루타티온(glutathione)을 감지하거나 과산화수소(H₂O₂) 및 글루타티온(glutathione)의 농도를 산출할 수 있다는 것을 실험적으로 증명하여 본 발명을 완성하였다.

[0015] 따라서 본 발명의 목적은 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene

quantum dot)을 포함하는 과산화수소(H₂O₂) 감지용 또는 수치 측정용 조성물을 제공하는데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 글루타티온(glutathione) 감지용 또는 수치 측정용 조성물을 제공하는데 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 과산화수소(H₂O₂) 감지용 또는 수치 측정용 조성물의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0019] 본 발명의 다른 목적 및 기술적 특징은 이하의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 구체적으로 제시된다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 과산화수소(H₂O₂) 감지용 또는 수치 측정용 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 글루타티온(glutathione) 감지용 또는 수치 측정용 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 육각형 패턴의 그래핀 구조를 가지며 평균 -50mV의 제타포텐셜(zeta potential)을 가지고 평균 20nm의 입경을 가지고 있다.

[0024] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 산화망간은 상기 백색 발광 그래핀 퀀텀닷을 피복하여 FRET 매개 소광효과(fluorescence resonance energy transfer mediated quenching effect)를 보이며 과산화수소 또는 글루타티온에 의해 상기 산화망간(MnO₂)이 망간이온(Mn²⁺)으로 환원되어 상기 백색 발광 그래핀 퀀텀닷의 백색발광이 복원되는 현상을 이용하여 시료내에 존재하는 상기 과산화수소 또는 글루타티온을 감지하거나 농도를 산출할 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 과산화수소(H₂O₂) 또는 글루타티온(glutathione) 감지용 또는 수치 측정용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0026] 제 1 단계) 디옥시콜릭산(deoxycholic acid)을 히팅맨틀(heating mantle)에서 350 내지 450℃의 조건으로 5 내지 15분간 가열하여 백색발광 그래핀 퀀텀닷을 제조하는 단계;

[0027] 제 2 단계) 과망간산칼륨(KMnO₄)을 수산화나트륨에 용해하여 산화망간(MnO₂)을 제조하는 단계; 및

[0028] 제 3 단계) 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷과 상기 산화망간을 각각 5 내지 20 : 1의 중량비로 혼합하여 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)를 제조하는 단계.

발명의 효과

[0030] 본 발명은 FRET 매개 바이오센싱을 위한 백색발광 그래핀 퀀텀닷 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0031] 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 단일물질만으로 백색광을 발현하며 그래핀 구조를 가져 광학조절성이 우수하며 세포독성이 미미하고 광안정성이 뛰어난 퀀텀닷으로서 열분해방법으로 제조하므로 종래의 제조방법에 비해 제조비용이 저렴하며 제조가 용이한 장점이 있다. 또한 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷 및 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 음전하의 표면전하를 가지고 있으며 20nm의 평균입경을 가지고 있어 생체안정성이 뛰어나고 세포막 투과성이 뛰어난 장점이 있다. 본 발명의 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 과산화수소 또는 글루타티온에 의해 환원되는 산화망간으로 피복하여 FRET 매개 형광 소광효과를 부여하므로 생체시료에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온을 감지 또는 농도수치를 산출할 수 있는 효과가 있다. 상기 산화망간은 생체에 존재하는 단백질, 다당류, 아미노산 등에 의해 환원되지 않고 과산화수소 또는 글루타티온에 의해서만 환원되는 특이성이 있으므로 생체시료내에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온에 선택적으로 형광을 발현하는 장점이 있다. 본 발명의 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷이 포함된 조성물은 종래의 라벨에 의한 과

산화수소 또는 글루타티온의 검출방법에 대비하여 제조가 저렴하며 뛰어난 선택성을 가지고 있어 이를 대체할 수 있는 차세대 과산화수소 또는 글루타티온 검출 조성물로 사용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0033]

도 1의 패널 A)는 상이한 합성온도에 제조한 WGQDs의 형광세기 차이를 보여준다. 패널 B)는 상이한 합성온도에서 제조된 WGQDs 5mg/ml에 대하여 UV 램프 365 nm 파장에서 촬영한 사진을 보여준다. 패널 C)는 온도의존성 WGQDs의 형광방출결과를 보여주는 CIE 1931 측색표준관측자를 나타낸다.

도 2의 패널 A)는 WGQDs의 FE-SEM 이미지(스케일 바: 100nm)를 보여준다. 패널 B)는 구형의 형태(붉은 점선)를 가지는 WGQDs의 FE-SEM 이미지를 보여준다. 패널 C)는 개발된 WGQDs의 AFM이미지를 보여준다. 패널 D)는 AFM 현미경을 이용하여 측정된 WGQDs의 크기프로파일을 보여준다.

도 3의 패널 A)는 WGQDs의 기본 구성물질을 확인한 EDS 스펙트럼을 보여준다. 패널 B)는 WGQDs의 FTIR 스펙트럼을 보여준다.

도 4는 WGQDs(1mg/ml)의 제타포텐셜 분석결과를 보여준다.

도 5의 패널 A)는 WGQDs(5mg/ml)의 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 보여준다. 패널 B)는 WGQDs의 여기와 방출 프로파일을 보여준다. 상기 방출 프로파일은 360nm에서 WGQDs의 여기에 의하여 기록된 것이다. 패널 C)는 WGQDs의 농도에 따른 광루미네선스 스펙트럼을 보여준다. 패널 D)는 각 330 내지 510nm의 다른 파장에서 WGQDs(5mg/ml)의 여기에 따른 형광방출을 보여준다.

도 6의 패널 A)는 532.01nm의 파장을 가지는 레이저에 의해 여기된 1357cm^{-1} 주위의 D 밴드 및 1520cm^{-1} 주위의 G 밴드를 나타내는 WGQDs의 전형적인 라만 스펙트럼을 보여준다. 패널 B)는 2860cm^{-1} 주위의 2D 밴드와 2953cm^{-1} 주위의 D+G 밴드를 보여주며 상기 밴드를 통해 본 발명의 그래핀 퀀텀닷이 성공적으로 합성된 것을 확인할 수 있다.

도 7은 4시간동안 WGQDs 0.5mg/ml를 처리한 KB 세포주의 공초점 레이저 현미경 이미지를 보여준다.

도 8의 패널 A)는 KB 세포주의 WGQDs 처리시간 및 농도에 따른 세포내 흡수결과를 보여준다. 패널 B)는 24시간 동안 다른 농도의 WGQDs를 처리한 KB 세포주의 독성학적 프로파일을 보여준다.

도 9의 패널 A)는 WGQDs의 농도에 따른 쥐혈액의 용혈활성을 보여준다. 패널 B)는 적혈구의 용해로 인해 방출된 헤모글로빈을 보여준다. 양성 대조군은 Triton X-100 0.3%를 사용하였고 음성대조군은 PBS를 사용하였다.

도 10의 패널 A)는 WGQD-MnO₂ 복합체의 FE-SEM 이미지를 보여준다. 내부 그림패널은 WGQD-MnO₂ 복합체 나노입자를 확대한 그림을 보여준다. 패널 B)는 과망간칼륨 및 WGQD-MnO₂ 복합체의 흡수 스펙트럼을 보여주며 패널 C) 및 D)는 각각 산화망간의 흡수스펙트럼과 360nm에서 여기된 WGQDs의 광루미네선스 스펙트럼을 보여준다.

도 11은 TGA 스펙트럼을 보여준다. 패널 A)는 WGQDs의 TGA 스펙트럼을 보여주며 패널 B)는 WGQD-MnO₂ 복합체 나노입자의 TGA 스펙트럼을 보여준다.

도 12의 패널 A)는 다양한 농도의 과망간산칼륨(mM)이 처리된 WGQDs의 광루미네선스 스펙트럼을 보여준다. 패널 B)는 WGQD-MnO₂ 복합체 나노입자에 첨가된 과산화수소에 의해 복원된 WGQDs의 형광세기를 보여준다. 패널 C)는 다양한 농도의 과산화수소에 의해 처리된 WGQD-MnO₂ 복합체 나노입자의 형광세기를 보여준다.

도 13은 WGQD-MnO₂ 복합체 나노입자에 GSH를 첨가한 후 회복된 WGQD의 형광세기를 보여주며 패널 C)는 WGQD-MnO₂ 복합체 나노입자에 다양한 농도의 GSH를 첨가한 후 측정된 형광세기를 보여주며 이를 통하여 다양한 간섭물질에 대한 WGQD-MnO₂ 복합체 나노입자의 선택성을 확인할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

본 발명의 일 양태에 따르면 본 발명은 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 과산화수소(H₂O₂) 감지용 또는 수치 측정용 조성물을 제공한다.

- [0035] 본 발명의 다른 양태에 따르면 본 발명은 산화망간(MnO_2)이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 포함하는 글루타티온(glutathione) 감지용 또는 수치 측정용 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 산화망간(MnO_2)이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷이 생체조직, 세포, 혈액, 소변, 체액에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온을 감지하거나 과산화수소 또는 글루타티온의 농도수치를 측정하여 산출한다.
- [0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 육각형 패턴의 그래핀 구조를 가지며 평균 $-50mV$ 의 제타포텐셜(zeta potential)을 가지고 평균 $20nm$ 의 입경을 가진다. 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 육각형 패턴의 그래핀 구조를 가지고 있어 광학조절성이 뛰어나고 세포독성이 낮으며 광안정성이 향상된 장점이 있다. 또한 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 음전하의 표면전하를 가지고 있어서 음전하를 가지는 단백질의 흡착을 예방하여 옹소닌작용(opsonization)을 저해하는 효과가 있다. 상기 옹소닌작용은 생체내에 투입되는 외부입자가 식세포에 의해 용이하게 섭취되어 제거되도록 하기 위하여 상기 외부입자를 수식하는 현상을 의미한다. 따라서 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 상기 옹소닌작용이 저해되므로 생체이용률이 향상된 장점이 있다. 상기 외부 입자의 표면전하가 평균 $-50mV$ 보다 커 음전하량이 적으면 생체내에 존재하는 단백질에 의해 수식되어 옹소닌작용 저해효과가 반감될 수 있다.
- [0038] 종래의 나노입자는 평균 $100nm$ 미만의 입경을 가지면 세포막을 자유롭게 통과하는 특성이 있는 것으로 알려졌다. 그러나 표면전하가 음전하를 띠는 나노물질의 경우 세포막의 표면전하가 음전하이므로 세포막과의 반발력으로 인해 더 작은 입경을 가져야 세포막을 통과할 수 있는 특성이 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 표면에 음전하를 가지고 있어 세포막에 대한 반발력이 존재함에도 불구하고 평균입경이 $20nm$ 에 불과하여 세포막을 효율적으로 통과하는 장점이 있다.
- [0039] 본 발명의 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 산화망간이 피복된 후에도 상기 표면전하 및 입경의 변화가 미미하여 피복되지 않은 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷과 동일한 물리적 성질을 가진다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 345 내지 $355nm$ 에서 여기(excitation)하여 475 내지 $485nm$ 에서 백색광을 방출(emission)하며 5 내지 6% 의 광루미네선스(photoluminescence) 퀀텀수율을 보인다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 디옥시콜릭산(deoxycholic acid)을 전구물질로 하여 사용하며 열분해방법(pyrolysis)을 통해 제조할 수 있다. 상기 열분해방법으로 제조된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 탄소 65 내지 75 중량% 및 산소 25 내지 35 중량%로 구성된다. 바람직하게는 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 탄소 68 내지 72 중량% 및 산소 28 내지 32 중량%로 구성되며 바람직하게는 탄소 70 중량% 및 산소 30 중량%로 구성된다. 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 열분해 방법에 따라 퀀텀닷의 형광 특성이 달라질 수 있다.
- [0042] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 디옥시콜릭산(deoxycholic acid)을 전구물질로 하여 $400^\circ C$ 에서 열처리를 수행하면 $480nm$ 에서 가장 큰 방출을 보여 백색광을 방출하나 상기 디옥시콜릭산(deoxycholic acid)을 전구물질로 하여 $200^\circ C$ 에서 열처리를 수행하면 $410nm$ 에서 가장 큰 방출을 보여 파란색의 광을 방출하는 것이 확인된다. 따라서 본 발명의 백색 발광 그래핀 퀀텀닷을 제조하기 위한 열처리는 350 내지 $450^\circ C$ 의 조건에서 수행되며 바람직하게는 380 내지 $420^\circ C$ 의 조건에서 수행되며 보다 바람직하게는 $400^\circ C$ 의 조건에서 수행된다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 5 내지 6% 의 광루미네선스(photoluminescence) 퀀텀수율을 보인다.
- [0044] 종래의 방법에 따르면 백색발광 퀀텀닷은 빨강, 녹색, 파랑색의 퀀텀닷을 혼합하여 제조한다. 그러나 상기 혼합 방법을 통해 백색광을 구현하는 것은 색상도의 조절이 어려워 백색광을 구현하기 매우 어렵다. 따라서 단일물질로 백색을 발광하는 물질의 수요가 증가하고 있는 실정이다. 본 발명의 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 백색광을 발현하는 단일물질이며 광루미네선스를 발현하는 퀀텀수율 또한 5 내지 6% 이어서 실제 산업상 응용에 적용이 가능한 장점이 있다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 산화망간을 이용하여 피복하므로 FRET 매개 소광효과(fluorescence resonance energy transfer mediated quenching effect)를 구현한다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 피복된 산화망간은 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷 100 중량%에

대하여 0.5 내지 1.5중량%로 피복된다. 바람직하게는 산화망간이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷 100중량%에 대하여 0.8 내지 1.2중량%로 피복되며 보다 바람직하게는 1중량%로 피복된다. 상기 산화망간은 다층전환 금속산화물(Multi-layered transition metal oxide)의 하나로 부피대비 향상된 표면적을 가지며 향상된 에너지 수득 특성을 가지는 장점이 있다. 또한 상기 다층전환 금속산화물은 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷을 피복하여 퀀텀닷의 여기 및 방출을 억제하는 FRET 매개 소광효과를 나타낸다. 따라서 상기 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 광루미네선스 특성을 가지지 않는다. 다층전환 금속산화물은 산화망간을 비롯하여 몰리브덴이황화물(MoS₂)과 황화텅스텐(WS₂)이 있으나 상기 몰리브덴이황화물(MoS₂)과 황화텅스텐(WS₂)은 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷을 피복하는 데는 부적절하다.

[0047] 본 발명의 산화망간이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 생물학적으로 응용되어 시료에 존재하는 과산화수소 및 글루타티온을 감지하거나 이의 농도수치를 산출하는데 이용된다. 상기 산화망간은 과산화수소 또는 글루타티온에 의해 망간이온과 산소로 환원된다(하기 화학식 1 내지 2 참조). 따라서 본 발명의 산화망간이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷이 시료에 첨가되어 시료에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온과 반응하게 되면 피복된 산화망간이 이온상태로 환원되어 산화망간 피복이 제거되므로 퀀텀닷의 광루미네선스 특성이 회복된다. 이 때 회복되는 광루미네선스의 양을 측정하고 그래프를 통해 분석하게 되면 시료내에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온을 감지하거나 이의 농도수치를 산출할 수 있다. 그러나 다른 다층전환 금속산화물인 몰리브덴이황화물과 황화텅스텐은 과산화수소 또는 글루타티온에 의해 환원되지 않는다. 따라서 상기 백색 발광 그래핀 퀀텀닷이 몰리브덴이황화물 또는 황화텅스텐에 의해 피복되면 시료내에 존재하는 과산화수소 또는 글루타티온에 의해 광루미네선스 특성을 회복되지 않으므로 상기 몰리브덴이황화물 또는 황화텅스텐을 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷의 피복재료로 사용하는 것은 부적절하다.

[0048] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 과산화수소의 존재여부를 감지할 뿐 아니라 0.01 내지 1.5mmol/L의 과산화수소 농도범위에서 과산화수소의 농도를 수치로 산출할 수 있다. 시료에 존재하는 과산화수소의 농도를 수치로 산출하기 위해서는 과산화수소에 의해 복원되는 광루미네선스(형광)의 양과 시료에 존재하는 과산화수소의 양이 1에 가까운 상관계수를 가지는 선형관계를 이루어야 한다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 산화망간이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 0.001 내지 1.5mmol/L의 과산화수소 농도범위에서 과산화수소의 농도를 수치로 산출할 수 있으며 바람직하게는 0.005 내지 1mmol/L의 과산화수소 농도범위에서 과산화수소의 농도를 수치로 산출할 수 있다. 보다 바람직하게는 본 발명의 산화망간이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 0.008 내지 0.5mmol/L의 과산화수소 농도범위에서 과산화수소의 농도를 수치로 산출할 수 있으며 이때 상관계수는 0.9905이다.

[0050] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 산화망간이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 글루타티온의 존재여부를 감지할 뿐 아니라 0.005 내지 0.7mmol/L의 글루타티온 농도범위에서 글루타티온의 농도를 수치로 산출할 수 있다. 바람직하게는 0.0065 내지 0.7mmol/L의 글루타티온 농도범위에서 글루타티온의 농도를 수치로 산출할 수 있다. 보다 바람직하게는 본 발명의 산화망간이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 0.007 내지 0.5mmol/L의 글루타티온 농도범위에서 글루타티온의 농도를 수치로 산출할 수 있으며 이때 상관계수는 0.9977이다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 백색 발광 그래핀 퀀텀닷 및 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 미미한 세포독성을 가지며 뛰어난 세포흡수능을 가지고 있다. 또한 본 발명의 백색발광 그래핀 퀀텀닷 및 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷은 단백질, 다당류 및 아미노산에 의해 산화망간 피복이 환원되지 않는다. 따라서 본 발명의 백색 발광 그래핀 퀀텀닷 및 산화망간이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷은 조직, 세포, 혈액, 소변, 체액을 시료로 사용함에 있어서 세포 및 조직의 보존성을 향상시키기 위한 BSA 단백질, 다당류 또는 아미노산이 추가적으로 포함된 조성물로서 제조될 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷을 포함하는 과산화수소 또는 글루타티온 감지용 또는 수치 측정용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0053] 제 1 단계: 디옥시콜릭산(deoxycholic acid)을 히팅맨틀(heating mantle)에서 350 내지 450℃의 조건으로 5 내지 15분간 가열하여 백색발광 그래핀 퀀텀닷을 제조하는 단계;

[0054] 제 2 단계: 과망간산칼륨(KMnO₄)을 수산화나트륨에 용해하여 산화망간(MnO₂)을 제조하는 단계; 및

[0055] 제 3 단계: 상기 백색발광 그래핀 퀀텀닷과 상기 산화망간을 각각 5 내지 20 : 1의 중량비로 혼합하여 산화망간(MnO₂)이 피복된 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dot)을 제조하는 단계.

- [0057] 상기 백색 발광 그래핀 퀴텡닷의 제조(제 1 단계)를 구분하여 상세히 살펴보면 다음과 같다.
- [0058] 1-1 단계) 디옥시콜릭산 0.3-0.7g을 흰색에서 갈색으로 변할 때까지 5-15분간 350-450℃ 히팅맨틀에서 가열하여 백색발광 그래핀 퀴텡닷을 제조한다. 바람직하게는 상기 디옥시콜릭산은 0.5g 디옥시콜릭산나트륨을 사용하며 370-420℃ 히팅맨틀에서 7-12분간 가열하며 보다 바람직하게는 0.5g 디옥시콜릭산나트륨을 사용하며 400℃ 히팅맨틀에서 10분간 가열한다.
- [0059] 1-2 단계) 상기 백색발광 그래핀 퀴텡닷에 증류수 40-60ml을 첨가하고 25-35분간 초음파 처리를 수행하여 백색 발광 그래핀 퀴텡닷 분산용액을 제조한다. 바람직하게는 상기 백색발광 그래핀 퀴텡닷에 증류수 50ml을 첨가하고 30분간 초음파 처리를 수행하여 백색발광 그래핀 퀴텡닷 분산용액을 제조한다.
- [0060] 1-3 단계) 상기 백색발광 그래핀 퀴텡닷 분산용액에 대하여 증류수를 이용하여 2일간 투석하여 잔존하는 디옥시콜릭산을 제거한다.
- [0061] 1-4 단계) 상기 투석이 끝난 백색발광 그래핀 퀴텡닷 분산용액을 동결건조하여 백색발광 그래핀 퀴텡닷 분말을 수득한다.
- [0063] 상기 백색발광 그래핀 퀴텡닷에 산화망간을 피복하는 과정(제 2 단계 및 제 3 단계)을 구분하여 상세히 살펴보면 다음과 같다.
- [0064] 2-1 단계) 과망간산칼륨(KMnO₄)을 1N 수산화나트륨(NaOH)에 용해시켜 1-3mg/ml의 산화망간용액을 제조한다. 바람직하게는 상기 과망간산칼륨(KMnO₄)을 1N 수산화나트륨(NaOH)에 용해시켜 2mg/ml의 산화망간용액을 제조한다.
- [0065] 2-2 단계) 상기 백색발광 그래핀 퀴텡닷 분말에 증류수를 첨가하여 4-6mg/ml의 백색발광 그래핀 퀴텡닷 용액을 제조한다. 바람직하게는 상기 백색발광 그래핀 퀴텡닷 분말에 증류수를 첨가하여 5mg/ml의 백색발광 그래핀 퀴텡닷 용액을 제조한다.
- [0066] 2-3 단계) 상기 산화망간용액과 상기 백색발광 그래핀 퀴텡닷 용액을 혼합하여 백색발광 그래핀 퀴텡닷 및 산화망간이 각각 0.5 내지 10mg 및 0.05 내지 0.2mg 포함된 백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 혼합용액을 제조한다. 바람직하게는 과산화수소 감지 및 수치측정용 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀴텡닷은 백색발광 그래핀 퀴텡닷 10mg 및 산화망간 0.2mg이 포함된 백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 혼합용액을 제조하며 글루타디온 감지 및 수치측정용 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀴텡닷은 백색발광 그래핀 퀴텡닷 0.5mg 및 산화망간 0.05mg이 포함된 백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 혼합용액을 제조한다.
- [0067] 2-4 단계) 상기 백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 혼합용액은 색이 핑크색에서 녹색으로 변화하고 최종적으로 갈색으로 변화할 때까지 5-15분간 상온에서 교반하여 백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 복합체를 합성한다.
- [0068] 2-5 단계) 상기 백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 복합체가 합성된 백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 혼합용액을 10,000g에서 10분간 원심분리하여 침전물(백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 복합체)을 수득하고 상기 침전물에 대하여 에탄올을 이용하여 2회 이상 세척한다.
- [0069] 2-6 단계) 상기 세척된 백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 복합체를 건조하여 분말형태로 수득한다.
- [0070] 상기 수득한 산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀴텡닷(백색발광 그래핀 퀴텡닷-산화망간 복합체)는 조직, 세포, 혈액, 소변, 체액을 시료로 사용함에 있어서 세포 및 조직의 보존성을 향상시키기 위한 BSA 단백질, 다당류 또는 아미노산이 추가적으로 포함된 조성물로서 제조될 수 있다.
- [0073] **실시예**
- [0075] **실험방법**
- [0076] **1) 백색발광 그래핀 퀴텡닷의 합성**
- [0077] 백색발광 그래핀 퀴텡닷(WGQDs)은 전구물질로서 디옥시콜릭산(Deoxycholic acid, DOCA)을 사용하였으며 열분해 방법(pyrolysis)을 통하여 제조하였다. WGQDs 및 온도의존성(Temperature dependent) WGQDs의 합성을 위하여 디옥시콜릭산(Deoxycholic acid)은 시그마-알드리치사(MO, USA)에서 구입하였다. 먼저 WGQDs의 합성을 위하여 상기 디옥시콜릭산 500mg을 유리병에 넣고 히팅맨틀(heating mantle)에서 400℃에서 10분간 가열하여 수행하였다. 가열 10분 후 디옥시콜릭산이 흰색에서 갈색의 변화면 증류수 50ml을 첨가하고 30분 동안 수조에서 30분간 초음파 처리를 수행하였다. 상기 용해된 WGQDs 용액은 2일간 증류수를 이용하여 투석하였으며 6시간 간격으로

증류수를 교체하였다. 투석된 샘플은 냉동건조하여 보관하였다.

[0078] 온도 의존성 WGQDs(Temperature dependent WGQDs)는 상기의 방법으로 제조하되 가열온도를 200 내지 300℃로 수행하였다. CIE 1931 측정표준 관측자는 색측정기 소프트웨어를 이용하여 기록하였다.

[0080] **2) WGQDs-산화망간(MnO₂) 복합체 나노입자의 합성**

[0081] WGQDs-산화망간 복합체 나노입자(산화망간이 피복된 백색발광 그래핀 퀀텀닷)는 상기 실시예 1에서 제조한 5mg/ml WGQDs 용액 2ml에 2mg/ml 산화망간(KMnO₄)용액 100μl을 첨가하여 제조하였다. 상기 산화망간용액은 15mg/ml 과망간산칼륨(KMnO₄) 30μl를 1N 수산화나트륨(NaOH) 5ml에 용해시켜 제조하였다. 상기 샘플은 상온에서 WGQDs 용액의 색이 어두운 갈색으로 바뀔 때 까지 10분간 교반하였다. 상기 용액의 색은 핑크색에서 녹색으로 변하며 최종적으로 갈색이 된다. 상기 샘플은 추후 분석에 사용하였다. 상기 샘플은 10분간 10,000g에서 원심 분리하였으며 에탄올을 이용하여 2회 세척하고 물을 이용하여 추가세척을 수행하였다.

[0083] **3) WGQDs의 물리적 및 화학적 특성 평가**

[0084] WGQDs 및 WGQDs-산화망간 복합체의 형태는 주사전자현미경(Transmission electron microscope, TEM, JEOL, Japan)을 이용하여 측정하였다. WGQDs의 형태 및 크기는 원자간력현미경(atomic force microscope, AFM, Digital instrument Nanoscope IV, Veeco, Santa Barbara, CA, USA)을 이용하였으며 상온에서 탭핑(tapping)모드를 통하여 측정하였다. WGQDs 및 WGQDs-산화망간 복합체의 형태는 JSM-7610F 전계방출형 주사전자현미경(field emission scanning electron microscope, FESEM; Jeol, Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 상기 JSM-7610F 전계방출형 주사전자현미경에 설치된 에너지분산형 X선 분광분석기(Energy-dispersive X-ray spectrometer, EDS, 51-XXM1034; Oxford Instruments, Abingdon, UK)를 5KV 전압 조건으로 WGQDs 및 WGQDs-산화망간에 존재하는 탄소, 질소, 및 망간의 상대적인 함량을 분석하였다. 푸리에 변환 적외선 스펙트럼은 FT-IR spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA)를 이용하여 획득하였다. WGQDs의 UV 흡수는 UV 분광기 (Mecasys Co. Ltd, South Korea)를 이용하여 측정하였다. WGQDs의 형광세기는 광루미네선스 분광기(Photoluminescence spectroscopy, Sinco, South Korea)를 이용하여 측정하였다. WGQDs 및 WGQDs-산화망간 복합체의 열안정성은 TA-Q50 열중량분석기(TA, DE)를 이용하였으며 질소분위기하에서 분당 10℃의 가열속도로 800℃까지 가열하여 측정하였다. WGQDs의 라만 스펙트럼은 라만 미니분광기(Jasco, NRS-3200)를 이용하였으며 514.5nm의 파장을 가지는 레이저를 이용하여 측정하였다.

[0086] **4) In vitro 세포흡수 평가**

[0087] WGQDs의 세포흡수는 KB 세포주와 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Zeiss LSM510, Germany)을 이용하였다. KB 세포주는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 제공받았다. 동결건조된 WGQDs를 깨끗한 RPMI 배양액에 용해시켜 WGQDs 용액(100μg/ml)을 제조하고 상기 WGQDs 용액을 KB 세포주가 배양되는 세포배양액에 첨가한 후 4시간동안 37℃, 5% CO₂ 분위기하에서 배양하였다. 4시간의 배양 후 세포를 수득한 후 PBS를 이용하여 2회 세척하고 4% 포름알데히드를 첨가하여 고정하였다. 상기 모든 과정은 빛이 차단된 상태에서 수행하였다. 세포이미지는 long-pass emission 필터(88543 nm)가 장착된 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 이용하여 수득하였고 세포내의 GQD를 시각화하였다. 시간 및 농도에 따른 세포흡수를 평가하였다. KB 세포주(1 x 10⁴ 세포/웰)를 96웰 플레이트에 접종하고 37℃ 5% CO₂분위기하에서 24시간동안 배양하였다. RPMI 배양액에 다양한 농도의 WGQDs를 용해시킨 후 세포배양액을 WGQDs가 용해된 배양액으로 교환하였다. 일정 시간 후 세포에 대하여 PBS를 이용하여 3회 세척하고 세포용해완충용액에서 세포를 용해시킨 후 동결건조하였다. 상기 동결건조된 세포에 대하여 다중모드 스캐너(Ex: 350 nm and Em: 480 nm)를 이용하여 광일루미네선스를 측정하였다.

[0089] **5) In vitro 세포독성평가**

[0090] KB 세포주를 96웰에 1 x 10⁶ 세포/웰로 접종한 후 24시간동안 배양하였다. WGQDs를 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 및 1mg/ml의 농도로 96웰에 첨가하였다. 세포배양액을 37℃이며 빛이 차단된 환경에서 24시간동안 더 배양하였다. MTT 액상 용액 50μl를 배양 20시간에 각각의 웰에 첨가하고 4시간을 더 배양한 후 상층액을 제거하였다. MTT 에세이 키트, 트립신-EDTA, 및 2,7-디클로로플루오레신디아세테이트(2,7-dichlorofluorescein diacetate, DMA)는 시그마-알드리치사(MO, USA)에서 구입하였다. MTT 용해 용액(100μl)을 각각의 웰에 첨가하고 파이페팅을 수행하여 포르마잔 크리스탈을 용해시켰다. 그 후 570nm의 파장에서 Varioskan flash (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 상기 흡광도결과는 표준곡선을 이용하여 세포활성도로 변환

하여 분석하였다. 세포활성도는 다음의 수식을 통해 산출하였다. 세포활성도(%)=(sample 세포의 흡광도/control 세포의 흡광도) X 100.

[0092] **6) In vitro 용혈에세이**

[0093] 용혈(Hemolysis) 에세이는 참조문헌 30에 따라 수행하였다. 생후 7주된 암컷 SD쥐로부터 선혈 2ml을 EDTA가 피복된 튜브를 이용하여 채취하고 4℃ 2500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 제거한 후 침전물을 PBS를 이용하여 3회 세척하였다. 그 후 침전물은 PBS 1ml을 이용하여 용해시킨 후 실험에 사용하였다. WGQDs가 존재하는 조건에서 적혈구 용해를 분석하기 위하여 다양한 농도의 WGQDs를 PBS 1ml에 용해시키고 상기 분리된 적혈구 50 μ l를 첨가하였다. Triton X100 0.3%와 PBS를 각각 양성 대조군과 음성대조군으로 하였다. 샘플은 37℃에서 60분간 배양하였으며 배양된 샘플은 4℃ 2500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 모아 Optical Density 540nm에서 적혈구의 용혈정도를 측정하였다.

[0095] **7) WGQD-산화망간 복합체 나노입자에 의한 과산화수소와 글루타티온의 감지**

[0096] WGQD-산화망간 복합체 나노입자의 과산화수소 감지에 대하여 확인하기 위하여 5mg/ml WGQDs 2ml을 2mg/ml 과망간산칼륨(KMnO₄) 100 μ l와 혼합하고 상온에서 10분간 인큐베이션 하였다. 그 후 다양한 농도의 과산화수소 용액을 첨가하고 광루미네선스 스펙트럼(Photoluminescence spectrum)을 측정하였다.

[0097] WGQD-산화망간 복합체 나노입자의 글루타티온(GSH) 감지능력을 확인하기 위하여 0.25mg/ml WGQDs 2ml에 산화망간 25 μ l를 첨가하고 혼합하였다. 상기 샘플을 상온에서 10분간 인큐베이션한 후 다양한 농도의 GSH용액을 첨가하였다. GSH가 첨가된 샘플의 광루미네선스 스펙트럼은 10분 후에 측정되었다. 모든 샘플의 광루미네선스 스펙트럼은 350nm에서 나노입자를 여기 시킨 후 기록되었다. WGQD-산화망간 나노입자의 GSH 및 과산화수소의 선택성을 판단하기 위해 상이한 종류의 간섭물질을 GSH 및 WGQDs와 유사한 농도로 WGQD-산화망간 용액에 첨가하고 350nm에서 나노입자를 여기 시킨 후 광루미네선스 스펙트럼을 측정하였다.

[0099] **2. 실험결과**

[0100] **1) WGQDs의 합성 및 특성평가 결과**

[0101] WGQDs는 탄소의 공급원으로서 디옥시콜릭산나트륨(sodium deoxycholic acid, DOCA)을 사용하였다. 상기 DOCA는 각각의 온도(200℃, 300℃ 및 400℃)에서 열분해를 수행하였으며 광루미네선스 분광학을 통하여 광루미네선스 특성이 평가하였다. 휴머(hummers) 방법 또는 용액유도 자가결합방법과 같은 종래의 WGQDs 제조방법은 산처리 또는 거친 화학처리를 필요로 한다. 그러나 본 발명의 열분해 방법은 간단하며 높은 수득율을 가지고 있어 효율적이고 한 시간 이하의 시간으로 WGQDs를 제조할 수 있는 장점이 있다.

[0102] 보통 열분해 방법은 파란색 GQDs가 제조되는 경우가 있다. 흥미롭게도 상기 제조된 WGQDs의 형광 특성은 온도 의존적이다. 도 1의 패널 A는 각기 다른 온도에서 제조된 GQDs의 광루미네선스 분광분석결과를 보여준다. 상기 결과에 따르면, 200℃에서 제조된 GQDs는 광루미네선스 스펙트럼에서 파란색 이동(blue shift)이 관찰되는 반면 400℃에서 제조된 GQDs는 480nm에서 가장 큰 방출(emission)을 보인다. 추가적으로 도 1의 패널 B에는 GQDs의 색이 온도 의존적으로 변화한다는 것을 보여준다. DOCA가 200℃에서 열분해되면 제조된 GQDs는 파란색을 나타낸다. 그러나 열분해 온도가 400℃가 되면 제조된 GQDs는 흰색(white-GQDs, WGQDs)을 가지게 된다. 도 1의 패널 C의 CIE 1931 측정표준관측자는 WGQDs의 합성온도가 증가함에 따라 GQDs의 CIE 좌표가 파란색에서 흰색으로 변동되는 것을 보여준다. 추가적으로 400℃에서 합성된 WGQDs의 CIE 좌표(0.26, 0.34)는 백색영역에 포함된다. 상기 결과는 하기 WGQDs의 합성에서 확인된다. 400℃에서 합성된 상기 WGQDs는 5.58%의 광루미네선스(photoluminescence) 퀀텀수율을 가진다. 상기 결과는 추후 더 확인된다.

[0103] WGQDs의 물리적 형태에 대하여 FE-SEM, FE-TEM 및 AFM 현미경을 이용하여 분석하였다. 도 2의 패널 A) 및 도 4의 패널 B)의 FE-SEM 및 FE-TEM 이미지는 0.275 \pm 0.035nm의 격자공간을 가지며 평균 입자 크기가 20nm인 구형형상의 WGQDs를 보여준다. 추가적으로 도 4의 패널 B)에 개시된 고속 푸리에 변화 패턴에 따르면 WGQDs는 육각형 패턴의 그래핀 구조를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 도 2의 패널 C) 및 패널 D)에 개시된 AFM이미지는 또한 그래핀 산화막 5 내지 6장의 두께와 유사한 2.8nm를 가진 WGQDs의 구형형상을 보여준다. EDS 스펙트럼의 기본적인 구성들은 WGQDs에 69.63%의 탄소 및 30.37%의 산소가 존재한다는 것을 보여준다(도 3의 패널 A 참조). 더 작은 크기의 나노입자들은 세망내피계(Reticulo endothelial system)를 통과할 수 있어 용이하게 타겟세포에서 기능을 수행할 수 있으므로 생체의학의 용도에 적합하다. 본 발명의 WGQDs은 평균 20nm의 크기를 가지고 있기 때문에 생체의학의 용도에 적합한 것으로 판단된다. FTIR을 이용하여 WGQDs 에 분포되어 있는 기능기(functional

group)을 확인하였다(도 3의 패널 C 참조). 3400cm^{-1} 에서 확인되는 강한 피크는 WGQDs에 존재하는 수소기를 나타내며 2863cm^{-1} 및 2963cm^{-1} 에서 확인되는 피크는 WGQDs의 C-H 스트레칭(C-H stretching)을 나타낸다. 또한 1043cm^{-1} 에서 확인되는 피크는 WGQDs의 C-O 스트레칭(C-O stretching)을 나타내며 1560cm^{-1} , 1406cm^{-1} 및 1656cm^{-1} 에서 확인되는 피크는 WGQDs에 존재하는 COO-기의 비대칭 및 대칭 스트레칭을 나타낸다. 본 실험을 통하여 본 발명의 WGQDs는 카르복실기 및 히드록실기가 넓은 범위에 걸쳐 분포되어 있다는 것이 확인되었으며 그에 따라 WGQDs가 음수의 표면제타포텐셜(surface zeta potential)을 가진다는 것이 확인되었다. 추가적으로 WGQDs의 표면전하에 대하여 분석하였다(도 4 참조). 분석결과 평균 -50mV 인 WGQDs 제타포텐셜은 생체의학 응용에 더 적합한 것으로 판단되는데 그 이유는 본 발명의 음수의 제타포텐셜을 가지는 WGQDs가 응집을 억제할 수 있기 때문이다. 또한 본 발명의 WGQDs는 생체내에 존재하는 음전하를 가지는 단백질의 흡착을 방지하여 옹소닌작용(opsonization)을 저해하기 때문에 생체내 순환시간을 향상시키는 장점이 있다. 상기 단백질의 흡착 및 옹소닌 작용은 면역체계의 활성화 및 생체시스템의 초기 나노입자 제거기작과 관련된 가장 일반적인 요소이다. 결과적으로 본 발명의 음전하를 가지는 WGQDs는 음전하를 가지는 단백질의 흡착을 방지하므로 WGQDs의 생체이용율을 향상시키는데 기여한다. 도 5의 패널 A)에 개시된 WGQDs의 흡수 스펙트럼에 따르면 WGQDs는 250nm 에서 강한 흡수정도를 보이는 것이 확인된다. 도 5의 패널 B)에 개시된 광투미네선스 여기 및 방출 스펙트럼에 따르면 WGQDs는 350nm 및 480nm 에서 각각 가장 큰 여기 및 방출을 보인다. 도 5의 패널 C)에 개시된 농도 의존성 방출 스펙트럼은 WGQDs의 농도가 줄어들수록 형광세기가 줄어드는 것을 보여준다. 본 발명의 GQDs는 종래의 GQDs와 유사한 여기에 따른 방출 프로파일을 보인다. 도 5의 패널 D)에 따르면, 상기 WGQDs는 여기파장이 350nm 에서 500nm 로 증가함에 따라 방출 파장이 적색이동($450\text{--}600\text{nm}$)하는 것이 확인된다. 상기 방출현상에 따른 여기특성은 다양한 생물학 및 생체의학의 응용에 유용하며 파란색 GQDs에 비교하여 더 깊은 조직까지 빛을 침투시킬 수 있다. WGQDs의 물리화학적 특성을 분석하기 위하여 라만 분광학을 이용하였다. 도 6의 패널 A)에 의하면 1357cm^{-1} 및 1520cm^{-1} 에서 관찰되는 두 개의 피크는 각각 GQDs의 방향적 도메인(domain)의 D밴드 및 G밴드를 의미한다. 추가적으로 도 6의 패널 B)에 의하면, 2860cm^{-1} 에서 확인되는 2D밴드는 WGQDs의 그래핀 퀴텀닷 구조를 보여준다. 흥미롭게도 WGQDs에 있어서 D' 밴드는 1600cm^{-1} 주변에서 확인되며 D+G밴드는 2960cm^{-1} 주변에서 확인된다. 선행연구에 따르면, D' 밴드 및 D+G밴드는 포논산란기작 때문에 관찰되는 것으로 알려져 있으며 그래핀 구조에서 비정렬된 상태로 확인되는 것이 알려졌다. 상기 결과는 탄소핵(carbon core)에서 다양한 방출위치가 분포하도록 할 뿐 아니라 백색 방출을 하도록 하는 것으로 하는 것으로 판단된다. 그러나 크기 분포 또는 방출 트랩(trap)위치와 같은 다른 기작들 또한 확인되어야 할 필요가 있다.

[0105] 2) WGQDs의 세포흡수 및 세포독성 평가결과

[0106] KB 세포주를 이용하여 WGQDs의 세포흡수를 분석하였다. 도 7에 의하면 WGQDs를 처리한 세포에서 밝은 형광이 확인된다. KB 세포주를 이용하여 시간에 따른 세포의 WGQDs 흡수정도를 확인하였다. 도 8의 패널 A)에 보는 바와 같이 세포의 WGQDs 흡수는 4시간 동안 처리하였을 경우 WGQDs 0.25mg/ml 의 농도로 처리한 것보다 WGQDs 1mg/ml 의 농도로 처리한 경우 세포흡수정도가 상승된 것이 확인되었다. 또한 시간에 따른 WGQDs의 세포흡수 실험을 수행한 결과 유사한 프로파일을 보이는 것이 확인되었다. WGQDs의 인큐베이션 시간을 증가시키기에 따라 세포의 WGQDs 흡수량이 증가하는 것이 확인되었다. 생체물질의 세포독성은 생체의학적 응용성을 판단하는 가장 중요한 기준이다. GQDs는 QDs의 높은 독성 때문에 종래의 퀴텀닷에 대한 대체제로서 제안되어야 한다. 본 발명에서는 WGQDs의 독성학적 프로파일을 분석하기 위하여 용혈분석 및 In vitro 세포독성을 분석하였다. KB 세포주에 대한 MTT 에세이 결과에 따르면 본 발명의 WGQDs는 1mg/ml 의 높은 농도로 처리하여도 미미한 독성 프로파일을 보이는 것으로 확인되었다. 도 9의 패널 A)에는 용혈분석 결과를 보여주며 혈액내의 WGQDs가 미미한 수준의 독성 프로파일을 보이는 것이 확인되었다. 도 9의 패널 B)에 의하면 적혈구의 파괴정도는 PBS를 처리한 혈액과 비슷한 수준인 것이 확인되었다. 또한 WGQDs를 처리한 혈액샘플과 PBS를 처리한 혈액샘플의 OD값을 비교한 결과 유사한 값을 가지는 것으로 보아 WGQDs의 독성이 미미한 것으로 판단된다.

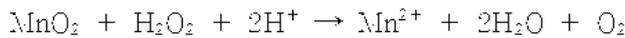
[0108] 3) WGQD-MnO2 복합체의 바이오센싱 응용

[0109] 본 발명의 WGQDs에 대한 생체의학적 응용을 위하여 WGQDs의 표면을 산화망간(MnO_2)으로 피복하였다(도 10의 패널 A 참조). 과망간산칼륨(KMnO_4)은 WGQD- MnO_2 복합체를 합성하기 위한 전구물질로서 사용되었다. 우선적으로 550nm 에서 과망간산칼륨의 피크가 확인되지 않은 것으로 보아 과망간산칼륨이 산화망간으로 변환되었다는 것을 알 수 있다(도 10의 패널 B). 도 10의 패널 A)에 도시된 FE-SEM 이미지는 WGQD- MnO_2 복합체의 입자크기가 WGQDs의

입자크기에 대비하여 약간 증가된 사실을 보여준다. 이미지를 확대하여 분석해보면 산화망간의 내부에 WGQDs의 퇴적물 또는 응집체가 위치하고 있는 것을 확인할 수 있다. 또한 WGQD-MnO₂ 복합체는 WGQDs에 대비하여 붕괴되는 경향이 더 적은 것으로 확인되는데 이는 WGQDs에 대한 산화망간의 피복에 의한 것으로 판단된다. 선행결과에 의하면 산화망간은 FRET 기작에 있어서 형광 소광물질(fluorescence quencher)로서 사용되는 것이 알려져 있다. WGQDs에 대한 산화망간의 피복은 WGQDs의 형광세기에 대한 소광(quenching)으로 이어진다. 도 10의 패널 C)에 의하면 산화망간의 흡수스펙트럼은 WGQDs의 방출스펙트럼과 겹쳐지는 것이 확인되는데 이는 산화망간이 WGQDs에 대하여 FRET 매개 형광 소광효과를 보인다는 것을 의미한다. WGQDs의 형광소광(fluorescence quenching) 효과는 첨가된 과망간산칼륨의 농도에 따라 결정된다. 도 12의 패널 A)에 따르면 소광효율은 과망간산칼륨의 농도에 증가에 따라 향상된다. 상기 과망간산칼륨 3mM을 사용한 경우 WGQDs에 대한 소광효율이 100%에 달한다. 산화망간을 피복한 후 제조된 WGQD-MnO₂ 복합체에 대하여 EDS 스펙트럼을 얻고 이를 분석한 결과 탄소 61.66%, 산소 29.21% 및 망간 0.98%가 포함된 것이 확인되었다(도 10의 패널 D 및 E 참조). 또한 WGQD-MnO₂ 복합체에 대하여 열분석(thermal analysis)을 수행한 결과 WGQDs가 390℃에서 분해가 시작된 것에 비하여 WGQD-MnO₂ 복합체는 400℃보다 높은 온도에서 분해가 시작된 것이 확인되었다(도 11의 패널 A 및 B 참조). WGQD-MnO₂ 복합체에 대한 EDS 스펙트럼 및 WGQD-MnO₂ 복합체를 구성하는 기존 구성물질을 보여준다. 본 발명에 따르면, 산화망간이 망간이온(Mn²⁺)으로 선택적 분해가 되는 것은 과산화수소 및 글루타티온(GSH)의 존재하에서 이루어질 수 있다. WGQDs의 산화망간 매개에 의한 형광소광은 과산화수소를 첨가함으로써 되돌릴 수 있다. WGQD-MnO₂ 복합체에 과산화수소를 첨가하면 산화망간은 망간이온으로 환원되고 이로 인하여 WGQDs의 형광은 복원(형광 ON 상태)된다(도 12의 패널 A) 참조). 과산화수소에 의해 산화망간이 망간이온으로 환원되는 기작은 하기 화학식 1로 설명된다.

화학식 1

[0110]

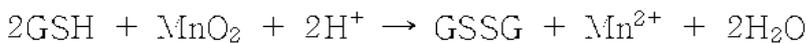


[0112]

도 12의 패널 B)에서 보는 바와 같이 WGQDs 형광의 복원은 과산화수소가 첨가된 후에 나타난다. 점증적인 WGQDs 형광세기의 복원은 첨가한 과산화수소의 농도에 비례하여 나타난다. 또한 0.9905의 상관계수를 보이는 선형관계(linear relation)는 0.5 내지 0.0078mmolL⁻¹의 범위에서 관찰된다(도 12의 패널 C) 참조). GSH에 의한 산화망간과 망간이온의 선택적 해리에 대하여 실험을 수행하였다. 비단백질 화학적 티올(thiol)로 구분되는 GSH는 산화망간과 선택적 상호관계를 이룰 수 있으며 상기 상호관계에 의하여 산화된 이황화물(oxidized disulfide, GSSG)이 형성될 수 있다. 하기 화학식 2는 산화망간과 GSH의 상호관계를 보여준다.

화학식 2

[0113]



[0115]

따라서, 산화망간이 피복된 WGQDs(WGQD-MnO₂ 복합체)는 GSH와 선택적으로 상호관계를 이루고 이로 인해 WGQD 형광의 복원을 야기하는 것으로 판단된다. WGQD-MnO₂ 복합체에 다양한 농도의 GSH를 첨가하고 광루미네선스 스펙트럼을 측정하여 형광세기의 복원효율을 분석하였다. 도 13의 패널 A)에서 보는 바와 같이 GSH의 농도가 증가함에 따라 WGQDs의 형광세기 또한 증가하는 것이 확인되었다. 또한 WGQDs는 0.0313 내지 1mmolL⁻¹의 범위에서 상관계수 0.9977을 보여 훌륭한 선형관계(linear relation)를 보이는 것이 확인되었다(도 13의 패널 B) 참조). 혈액 또는 소변에 존재하는 어떤 종류의 화학적 또는 생물학적 간섭물질들은 제거하기가 어렵거나 정제된 단일 바이오마커로서 수득하기 위하여 광범위한 정제방법이 동원되는 경우가 있다. 그러나 상기 방법들은 고비용이며 감지효율에 영향을 주는 경우가 있다. 따라서 바이오센서는 선택적이며 예민하게 원하는 바이오마커를 판별하여야 한다. 마지막으로 다양한 화학적 간섭물질 및 생물학적 간섭물질에 의한 WGQD-MnO₂ 형광 ON/OFF의 선택성을 확인하였다. 도 13의 패널 C)에 따르면, GSH 및 과산화수소의 WGQDs 선택성은 다른 간섭물질에 대비하여 뛰어난 것이 확인되었다. 더하여 BSA와 단백질, 프룩토오스(fructose)와 같은 다당류 및 아미노산에 의해 형광의 세기가 회복

되지 않는 것이 확인되었다. 상기 결과들에 따라 WGQD-MnO₂ 복합체를 GSH 및 과산화수소의 감지에 적용하는 것은 매우 효과적일 것으로 판단된다.

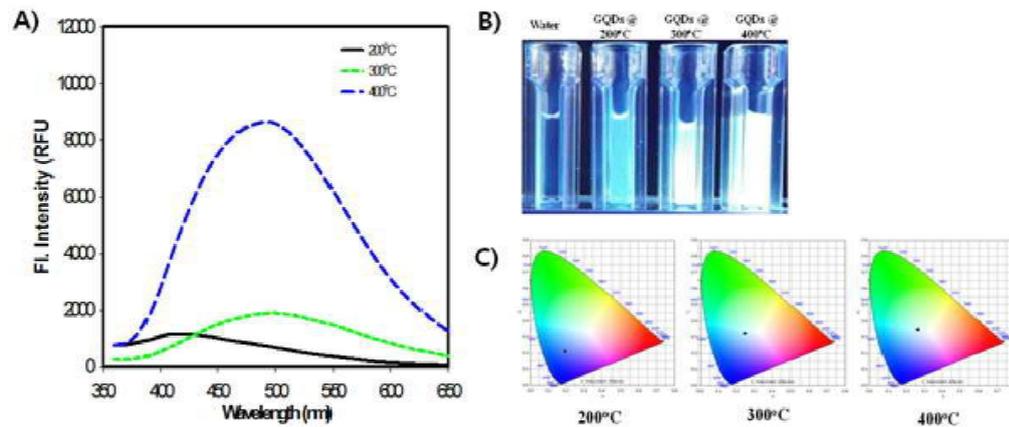
[0117] **3. 결론**

[0118] 본 발명에서는 저비용의 장점을 가진 열분해방법을 이용하여 신규한 백색 발광 그래핀 퀀텀닷(white colored emitting graphene quantum dots, WGQDs)을 합성하였다. 상기 합성된 WGQDs는 뛰어난 광루미네선스 특성을 가지면서도 미미한 세포독성을 가지는 것이 확인되었다. 본 발명에서는 WGQDs의 표면에 산화망간(MnO₂)을 코팅하여 WGQDs-MnO₂ 복합체 나노입자를 제조하고 상기 나노입자가 GSH 및 과산화수소 감지용 바이오센서로서 적용이 가능한지 여부에 대하여 확인하였다. 확인결과, 본 발명의 WGQDs-MnO₂ 복합체 나노입자는 GSH 및 과산화수소에 대하여 각각 0.0313 내지 1mmol/L 및 0.5 내지 0.0078 mmol/L 범위의 감지한계를 가지는 것이 확인되었다. 따라서 본 발명의 WGQDs는 생체의학 또는 바이오센서 플랫폼으로서의 GSH 및 과산화수소를 감지하는 다양한 응용이 가능할 것으로 판단된다.

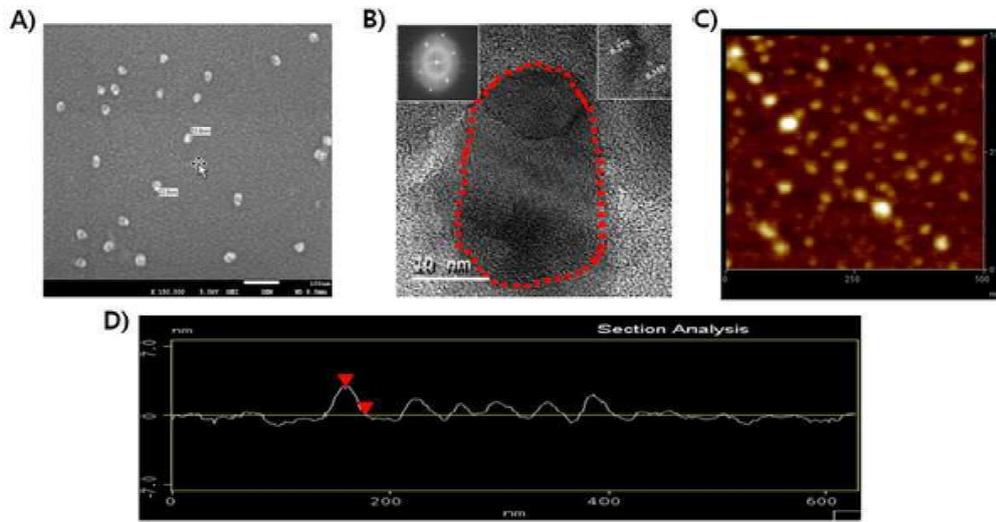
[0120] 본 명세서에서 설명된 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 구현에 또는 예시를 대표하는 의미이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되지는 않는다. 본 발명의 변형과 다른 용도가 본 명세서 특허청구범위에 기재된 발명의 범위로부터 벗어나지 않는다는 것은 당업자에게 명백하다.

도면

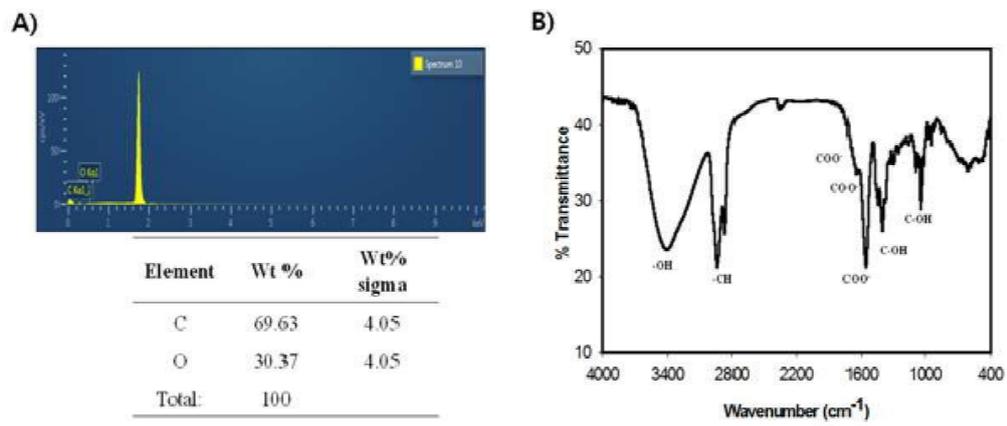
도면1



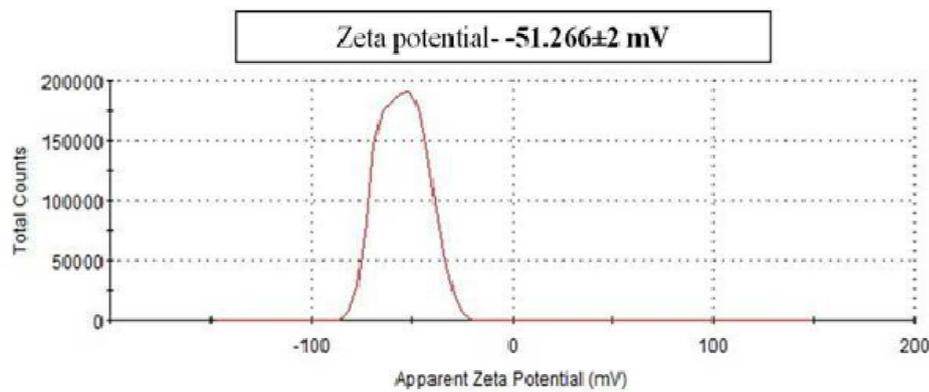
도면2



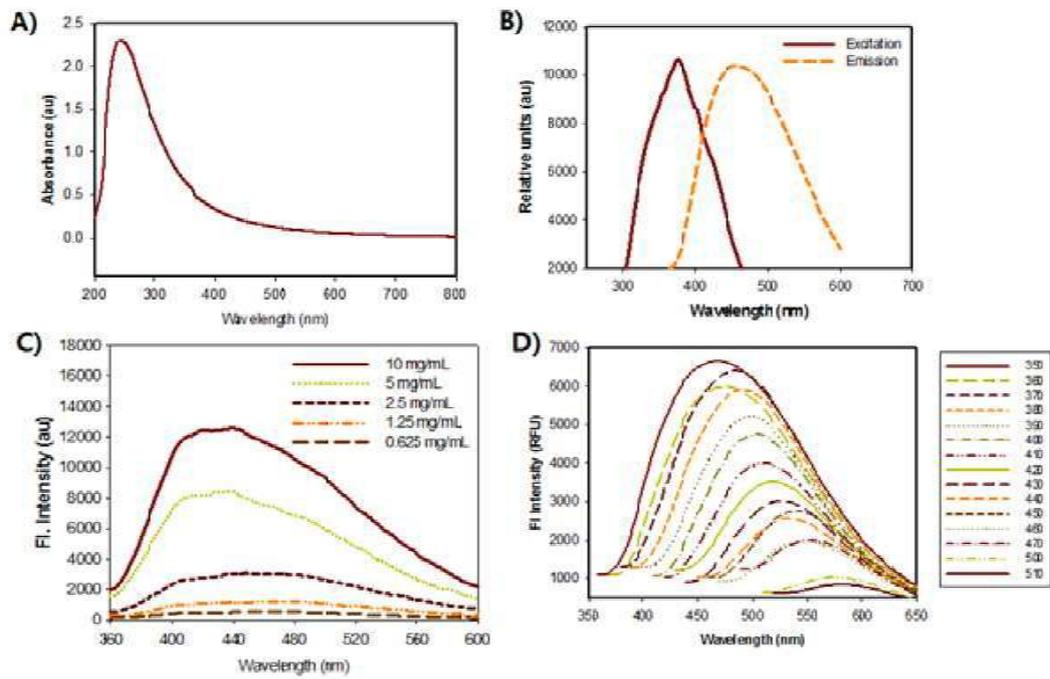
도면3



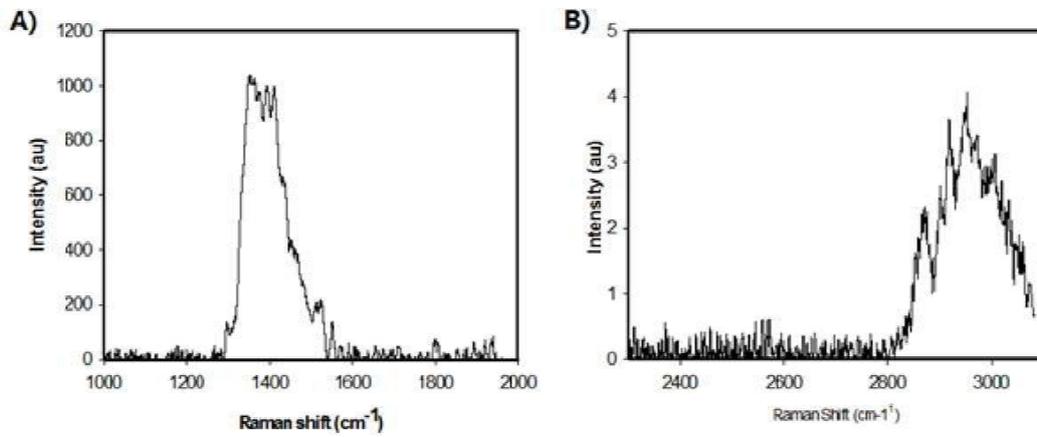
도면4



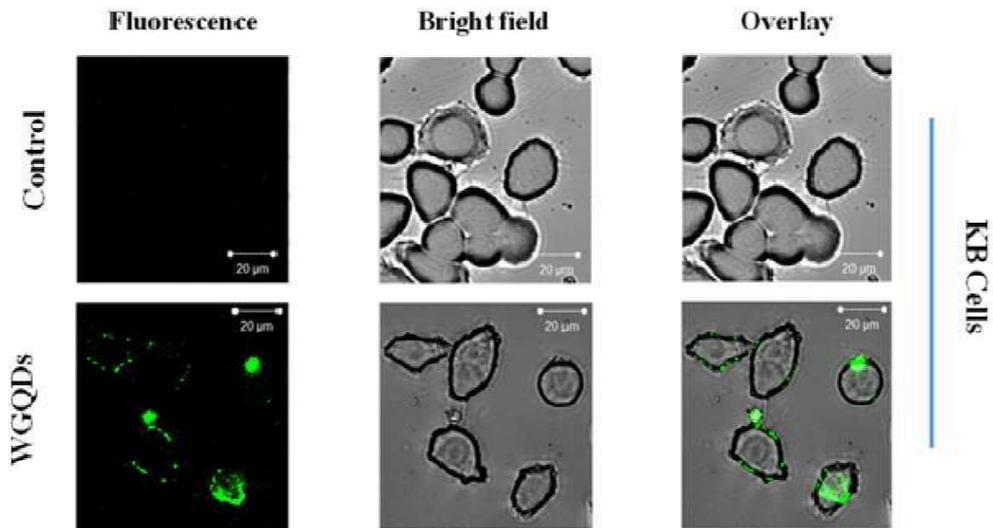
도면5



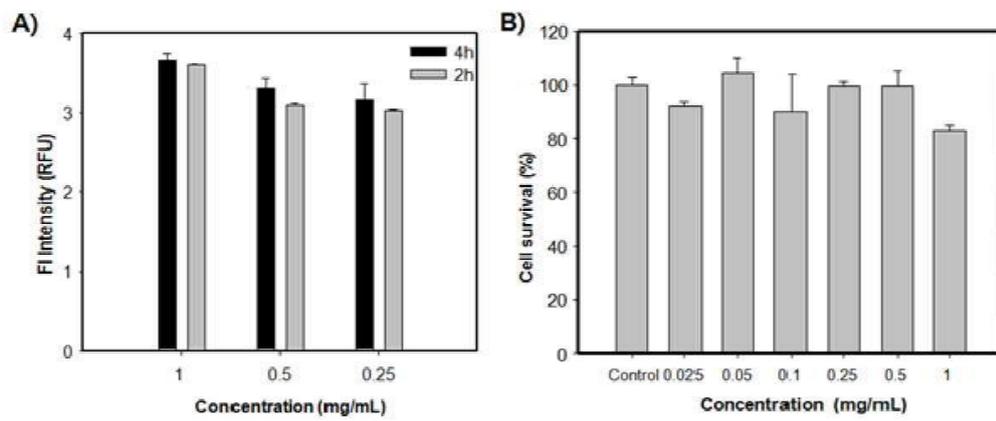
도면6



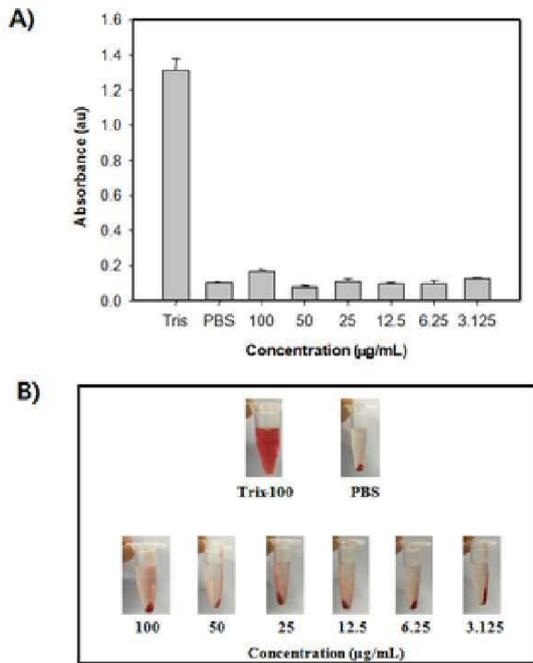
도면7



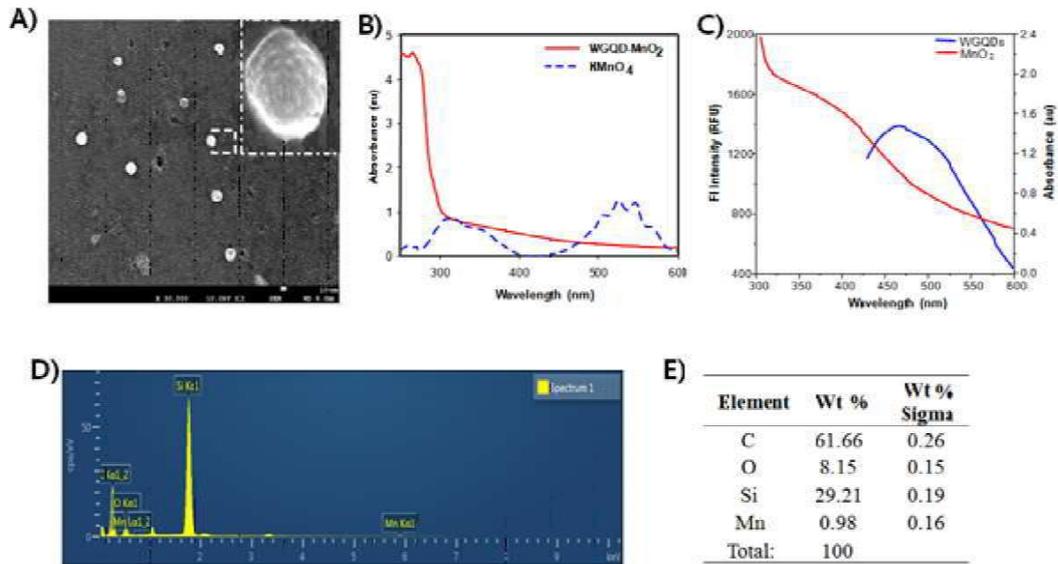
도면8



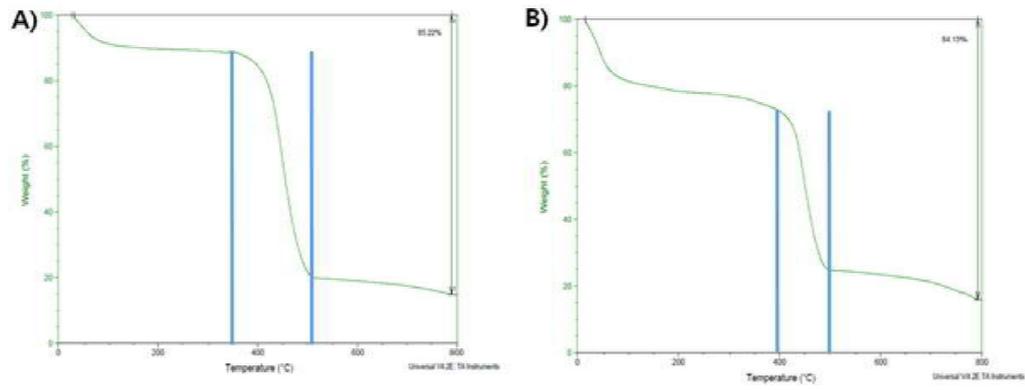
도면9



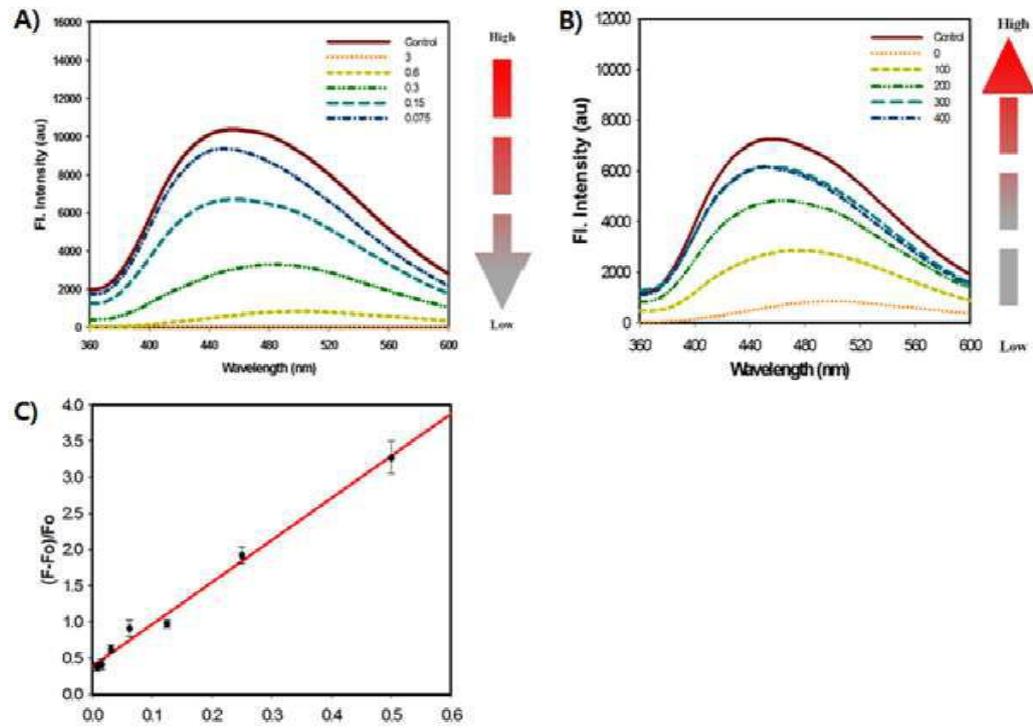
도면10



도면11



도면12



도면13

