

## The pH Characteristics of Magnetic Nanoparticles in Acid-Neutral-Alkaline Solution Using ISFET Device

Myoung-Chone An

For U Co., Ltd, Wonju 26404, Korea

Jong-Gu Choi and Sang-Suk Lee\*

Department of Oriental Biomedical Engineering, Sangji University, Wonju 26339, Korea

(Received 19 February 2020, Received in final form 2 April 2020, Accepted 3 April 2020)

Magnetic nanoparticles have not only been required for biological DNA isolation, detection and purification, but also have been studied steadily until recently as medical chemical processing materials for drug delivery and release that can control cancer cells in the human body. Using a ion selective field effect transistor (ISFET) pH sensor, a pH value sensitive to the concentration of hydrogen ions ( $H^+$ ) dissolved in various liquid solutions was measured according to the behavior of magnetic nanoparticles in the external magnetic field. The magnetic nanoparticle solution of pH 7.1 was mixed with acidic, neutral, and alkaline buffer solution at a ratio of 3:1, and the acidic solution having a pH of 3.9 with respect to the change of magnetic particle distribution was found to have a change of 35 mV (0.65 pH), which is greater than the pH of the alkaline solution of pH 9.8. Some of the  $H^+$ -ions in the solution was bound to the magnetic nanoparticles and the concentration of ions was reduced near the  $Si_3N_4$  layer of the ion sensitive membrane, so that the change in pH value, the output voltage, was closely related to the distribution of the nanoparticles. The output voltage curves between the two terminal source and drain for the external magnetic field were symmetrical around 0 Oe, and the variation up to  $\pm 1000$  Oe was greater in acidic solutions than alkaline. Because a multi-reactive polymer nanoparticles containing drugs with a pH of about 7.2 for treatment of cancer cells with a pH of 6.8 move to targets, we suggest the therapy system in which the ring of nanoparticles is decomposed by high-frequency magnetic field therapy.

**Keywords :** ion selective field effect transistor (ISFET), reference electrode, buffer solution, pH sensor, hydrogen-ion concentration, ion sensitive membrane  $Si_3N_4$  layer, magnetic field stimuli

### ISFET 소자를 이용한 산성-중성-알칼리성 용액 내 자성나노입자 분포에 따른 pH 특성 연구

안명천

포유, 강원 원주시 한라대길 28, 26404

최종구 · 이상석\*

상지대학교 한방의료공학과, 강원 원주시 상지대길 84, 26339

(2020년 2월 19일 받음, 2020년 4월 2일 최종수정본 받음, 2020년 4월 3일 게재확정)

생물학적 DNA를 분리하고 감응하며 정제하기 위해서는 자성나노입자가 필요하다. 그 뿐만 아니라 인체의 암세포 통제가 가능한 약물 전달 및 방출을 위한 의료용 화학공정 재료로서 최근까지 지속적으로 연구되고 있다. 이온 선택 전계효과 트랜지스터 (ISFET) pH 센서를 이용하여 다양한 액체 용액에 녹아있는 수소이온( $H^+$ ) 농도에 민감한 pH 값을 외부 자기장에 변화하는 자성 나노입자들의 거동에 따라 측정하였다. 산성, 중성, 알칼리성 완충 용액에 pH 7.1의 자성나노입자 용액을 3:1의 비율로 혼합하여 자성입자 분포 변화에 대하여 pH 3.9의 산성 용액일 때가 pH 9.8의 알칼리성 용액 보다 크게 pH 값의 변화량은 35 mV의 출력

값으로 pH 0.65의 차이를 두고 있었다. 용액 내 존재하는 H<sup>+</sup>의 일부가 자성나노입자와 결합하여 이온 감응막인 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 층 근처에 이온 농도가 낮아지며 출력전압으로 pH 값의 변화가 나노입자 분포에 밀접하게 연관된 경향성을 나타내었다. 외부 자기장에 대하여 소스(S)와 드레인(D)의 두 단자 사이에 얻은 출력전압 곡선은 0 Oe 중심으로 대칭을 하며 ±1000 Oe까지 변화량은 알칼리성 보다 산성 용액에서 크게 나타내었다. pH 7.2의 암세포 치료용 약물을 담고 있는 나노입자가 pH 6.8 정도의 다중 반응성 고분자가 표적으로 이동하여 고주파 자기장 열요법 자극으로 나노입자의 고리가 분해되어 약물을 방출하는 치료 시스템으로 활용 가능성을 제시한다.

**주제어** : 이온 선택 전계효과 트랜지스터(ISFET), 기준 전극, 완충 용액, pH 센서, 수소이온 농도, 이온 감응막 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 층, 자기장 자극

## I. 서 론

최근 수십 년 동안 자성나노입자(magnetic nanoparticles, MNPs)는 표적 세포 및 생체분자의 감응 및 분리 가능한 약물 전달과 의료용 진단 및 치료 재료로 개발되었다[1-3]. 실현이 가능한 헬스케어용 화학공정 재료인 이런 입자들은 바이러스와 같이 보통 20~400 nm 크기이며 표면은 주로 고분자로 코팅되어 있다. 세포 내의 수소이온(H<sup>+</sup>) 농도를 나타내는 pH를 자극하거나 또는 외부에서 인가한 자기장 자극에 따라 녹거나 팽윤되거나 붕괴하도록 다양한 환경조건 하에서 감응형 고분자 나노입자가 개발되었다[1,2]. 세포 내 자극에 반응하는 나노입자는 약물의 방출이 세포 내에서 자동적으로 제어될 수 있으며 그에 비해 외부 자기장의 자극에 반응하는 자성나노입자의 경우에는 약물 방출을 유도하거나 멈출 수 있는 원거리 장비를 이용하여 시공간 및 용량의 정확한 제어가 가능하다는 장점이 있다. pH와 같은 외부 자극을 이용하여 나노입자를 순화된 조건(저온, 중성 등)에서 제조하기 위함과 자기장의 외부 자극을 이용하여 약물 방출을 유도하기 위하여 둘 또는 그 이상의 자극을 복합적으로 이용하고자 하는 이중 및 다중 자극형 고분자 나노입자를 사용한다[3,4].

액체 용액 내 수소이온 농도를 측정하는 센서는 반도체 기반의 이온 선택 전계효과 트랜지스터(ion selective field effect transistor, ISFET) 소자이다[5,6]. 소량 용액의 pH 값을 정확하게 알 수 있는 측정 프로브 소형화에 따른 소자가 개발되고 있는 실정이다[7]. 생체 적합성을 위해 의료용 실리콘으로 크기가 작고 유연하여 환자가 착용하는 과정이나 일상 생활시 느낄 수 있는 불편함이 상당히 개선되고 있다. 하나의 예로 ISFET 센서는 개인후두 역류증 진단에 가장 정확한 검사방법에 활용되고 있다. 인후두 역류증은 위산이나 위 내용물이 식도로 넘어와 후두와 인두로 역류하여 후두와 인두의 만성염증 또는 손상과 변화를 일으키는 질환이다. 측정 방법은 프로브를 코를 통해 인후두 부분에서 측정하는 것이다[8,9].

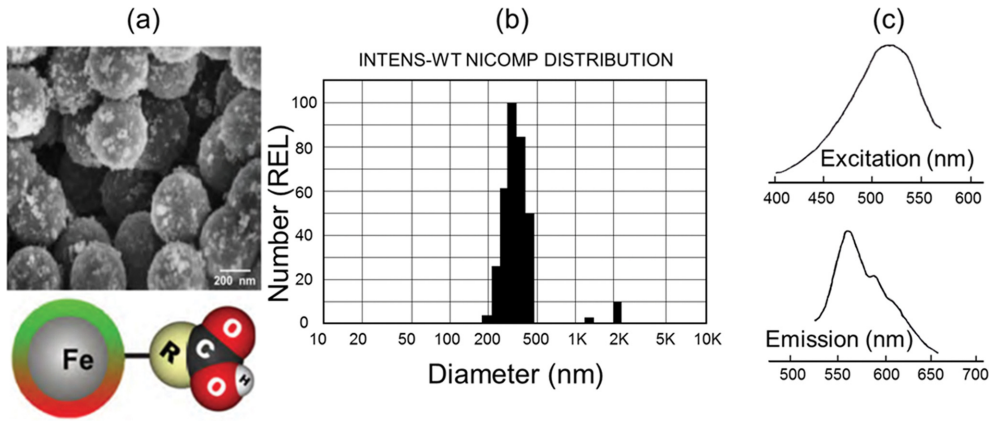
본 연구에서는 치료용 자성나노입자가 표적 위치로 유도는 pH 농도 기울기(concentration gradient)를 활용하고 외부 자극에 따른 약물 방출은 자기장으로 자극에 반응하여 변화를

살펴볼 수 있도록 사용하는 목적으로 pH 값이 다른 용액과 섞인 자성나노입자의 수소이온이 ISFET의 감응막 부근에 표면분포를 달리함에 있어서 외부 자기장에 따른 출력신호의 변화 특성을 조사하였다.

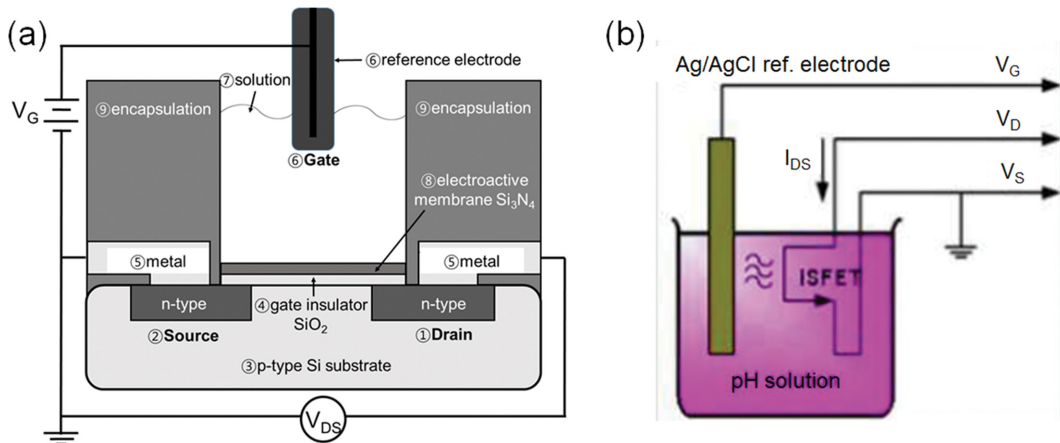
## II. 자성나노입자 구조와 pH 농도 측정을 위한 ISFET 소자 분석

본 연구의 실험에서 사용한 형광형 나노입자는 Spherotech (Illinois, USA)회사의 제품 모델 SPHERO™(FCM-0552-2H)로 카르복시기(Carboxyl, -COOH)가 붙어있는 자성을 띤 입자이다[10]. 자성나노입자를 SEM(scanning electron microscope)으로 촬영한 영상을 Fig. 1(a)에서 보였듯이 Fe 원자 하나를 포함하는 자성입자에 -COOH는 중심의 탄소 원자 1개에 산소 원자 2개가 이중 결합으로 연결되어 있다. 2.5 ml의 PBS 용액 내에 들어있는 자성나노입자의 농도는 0.5% w/v이며 사용된 버퍼(buffer)는 0.05%의 아지드화 나트륨(Sodium Azide)이 포함된 증류수이다[10,11]. Fig. 1(b)처럼 자성나노입자의 입도분석(INTENSE-WT NICOMP) 분포도에 의해 입자의 평균 직경은 약 350 nm로 나타내었다. 벤젠 고리에서 수소 1개를 비닐기(vinyl group)로 치환한 구조를 가진 방향족 탄화수소인 스티렌(styrene)의 염료 용액으로 찍은 Nile Blue 및 Sky Blue를 제외하였다. 자성나노입자들이 들어있는 현탁액에서 SPHERO™ 형광 입자들의 여기(excitation) 및 방출(emission) 스펙트럼을 보인 Fig. 1(c)에서 나일강 붉은색(Nile Red color)을 띠는 알 수 있다.

Fig. 2(a)는 이온 선택 전계효과 트랜지스터(ion-selective field effect transistor, ISFET) 구조이다. 각각의 번호에 따라 ①과 ②는 n-형 반도체인 소스(source, S)와 드레인(drain, D)이다. ③은 p-형 반도체 기반 기판(substrate)이다. ④는 10 nm 두께의 SiO<sub>2</sub>로 이루어진 절연층(insulator)이다. ⑤는 S와 D 단자에 연결된 금속 전극(metal contacts)에 해당한다. ⑥은 G인 기준 전극(reference electrode, RE)으로 유리관 내부에 포화된 KCl 용액 안에 Ag/AgCl 전극이 담겨져 있다. ⑦은 측정하고자 하는 용액이다. ⑧은 용액의 이온의 농도를 감응할 수 있도록 전기활성화 막으로 20 nm 두께의 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 층으



**Fig. 1.** (Color online) (a) SEM photo of magnetic nanoparticles (SPHERO™) with a concentration of 0.5% w/v, total liquid volume of 2 ml, and storage buffer of deionized water with 0.05% sodium azide. Structure of one fluorescent (Nile Red color) carboxyl (-OOH) magnetic particle composed of with one high Iron (Fe). (Dia. ≥ 100 nm). (b) The INTENSE-WT NICOMP distribution (x-axis: diameter (nm) versus y-axis: number (REL)) of magnetic nanoparticles having a mean size of 0.35 μm. (c) The excitation and emission spectra of SPHERO™ fluorescent particles in suspension of Nile Red color with the exception of Nile Blue and Sky Blue, which were taken with a solution of dye in styrene (Ref. [10,11]).



**Fig. 2.** (Color online) (a) Schematic diagram of a composite gate, dual dielectric ISFET. ① drain; ② source; ③ substrate; ④ insulator; ⑤ metal contacts; ⑥ reference electrode; ⑦ solution; ⑧ electroactive membrane or ion-sensing membrane; ⑨ encapsulation. (b) Drawing of the two-terminal ISFET (drain (D) and source (S)) and the associated external reference electrode (RE) acting as a gate terminal (G). The RE is made of Ag/AgCl contained in KCL solution with a ceramic salt bridge. Here, RE and ISFET pH sensor Kit used the product of WINSSENSE Co., Ltd. company (Ref. [12]).

로 되어 있다. ⑨는 소자를 캡슐화(encapsulation)하는 봉합재료이다[5]. Fig. 2(a)에서 보여준 ISFET 구조에서 용액 속에 담긴 기준 전극(RE)에 일정한 전압을 인가하고 용액 내 수소 이온 농도에 따라 이온 감응막과 인접한 반도체 채널로 전류가 흐르게 되어 S와 D 단자 간 출력신호가 발생하게 된다. 출력신호인  $V_{DS}$ 는 일반적으로 그 크기가 대응하는 이온 선택 전극과 동일한 방식으로 감응된 이온 활성 또는 농도의 로그 변화에 따라 전위차로 얻는다. Fig. 2(b)는 pH 용액을 담아 측정할 때 게이트(G) 단자의 역할을 하는 외부 RE와 ISFET의 S와 D로 연결한 두 단자를 표시하여 나타낸 것이다. RE는 세라믹 염 다리(salt bridge)를 갖는 KCL 용액 내에 함

유된 Ag/AgCl로 만들어진다. 본 연구의 실험에서 사용된 RE와 ISFET 소자는 Thailand 국가의 WINSSENSE Co., Ltd. 회사 제품인 ISFET pH Sensor Kit이다[10]. 본 연구의 실험에서 사용된 WINSSENSE Co., Ltd 회사의 제품인 ISFET pH 센서의 측정값은 산도측정 출력 데이터를 적용한 선형 회귀식(linear regression equation)으로 Eq. (1)을 사용하였다 [12].

$$V_{DS} \text{ (mV)} = 54.33333 \cdot \text{pH} + 455.00000 \quad (1)$$

회귀식 Eq. (1)의 평균제곱 오차인 결정계수(determination coefficient,  $R^2$ )의 값을 보면 0.99 이상으로 신뢰도가 높은

것을 알 수 있다. 이것은 박막센서로 측정하여 구한 선형의 회귀식으로 적용이 가능하였다.

ISFET 소자의 특징은 이온 감응막( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )이 있는 G 단자에 걸린 전압크기에 따라 S와 D의 부근에  $\text{H}^+$  이온이 축적되어 반도체 채널이 전기 전도체가 되고 전도성 정도에 따른 전해효과가 발생한다. pH가 낮을수록 S와 D에 축적되는  $\text{H}^+$  이온이 증가하여 S와 D 사이에 흐르는 전류도 증가된다. 그러나 측정액체와 센서 사이에 실제 이온의 이동은 없고, 화학반응과 전기측정은 구별된다. 수용액은 물에 녹아 있는 물질을 포함하고 있다. 어떤 수용액 내에서도 일부분의 물 분자들은 수소이온( $\text{H}^+$ )과 수산이온( $\text{OH}^-$ )으로 분리된다. 수용액 속  $\text{H}^+$  이온의 농도는 그 용액의 pH를 결정한다. pH는 용액의 산도를 나타낸 것이다. pH 척도는 산(0)에서부터 염기(14)까지 움직인다. pH 척도의 각 숫자는  $\text{H}^+$  이온 농도가 10배 단위로 변화하는 것을 나타낸 것이다. 산이란 물에 녹았을 때  $\text{H}^+$  이온을 내놓는 물질이다 산은 0에서 7 사이의 pH를 갖는다. 염기는 물에 녹았을 때 용액으로부터  $\text{H}^+$  이온을 제거하는 화학물질이다. 염기는 7에서 14 사이의 pH를 갖는다[13].

ISFET pH 센서를 이용하여 본 연구의 실험에서 사용할 분류별 용액의 pH 값을 측정하여 Table I에 나타냈다. 먼저 센서의 주요한 특징으로 pH에 따른 센서의 출력신호 감도는  $V_{GS} = 0.5 \text{ V}$ 와  $I_{DS} = 30 \mu\text{A}$  조건 하에서 52.8 mV/pH의 목표치를 설정하여 하한값의 40.4 mV/pH와 상한값의 65.2 mV/pH 범위 내에 있도록 하였다. 이러한 ISFET pH 센서로 10가지 다른 용액들에 대하여  $V_{GS} = 9.0 \text{ V}$ 와  $\text{Temp.} = 20^\circ\text{C}$ 의 조건과 환경에서 측정한 센서의 출력신호( $V_{DS}(\text{mV})$ )와 pH 값은 각각  $\pm 1.0 \text{ mV}$ 와 0.02의 오차범위로 유의성이 있게 나타

내었다. Table I에서 mV 단위의 출력신호를 pH 값으로 변환하여 산출된 결과는 Eq. (1)을 이용하여 계산하였다. 특히 각각 pH 2.0와 6.0 그리고 9.0의 표준 완충 용액(buffer solution)과 pH 7.58의 무이온 증류수(deionized distilled water, ddH<sub>2</sub>O)에 담긴 자성나노입자(MNPs) 용액을 고르게 혼합하여 산성과 중성 그리고 알칼리성 용액 내 자성나노입자의 분포에 따른 pH를 분석하고 그 특성을 조사하였다.

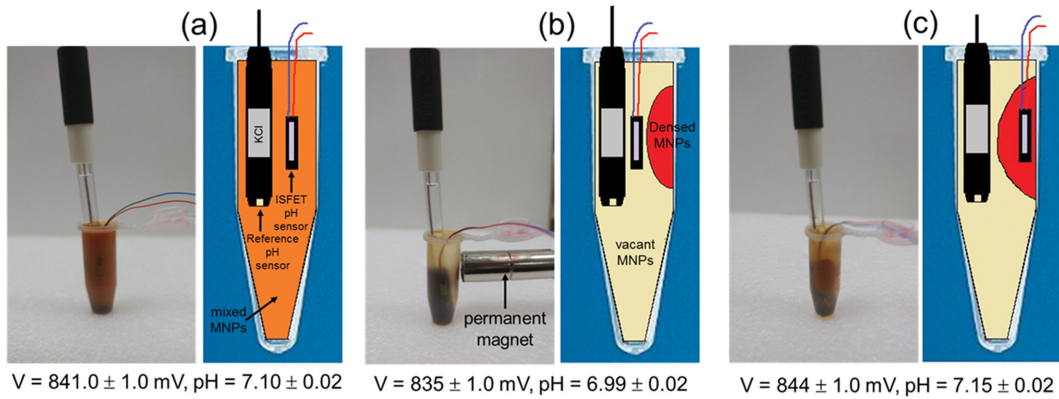
### III. 산성과 알칼리성 용액 내 자성나노입자의 분포에 따른 pH 특성

자성나노입자의 평균 직경은 약 0.35  $\mu\text{m}$ 이다. 자성입자의 코어에는 100 nm 크기의 Fe를 함유하고 있으며 2.0 ml의 ddH<sub>2</sub>O 내 고압 증기 멸균된 상태에서 0.5% w/v의 농도로 담겨져 있다[11]. Fig. 3(a)과 같이 정량 1.5 ml의 마이크로 튜브 내 1.0 ml의 자성나노입자 용액을 담았다. 시료 튜브를 충분히 흔들어 자성입자들이 용액 속에 균일하게 분산되어 있는 상태를 확인한 후 ISFET pH 센서를 담그어 측정한 출력신호는  $V_{out}(V_{DS}) = 841 \text{ mV}$ 로 해당하는 pH 값은 7.1이었다. 또한 Fig. 3(b)에서 보인 바와 같이 영구자석을 사용하여 튜브 오른쪽 바깥에 닿게 하여 자성입자들을 자기장이 강한 쪽으로 모이게 하였다[14]. 튜브 내 한쪽 가장자리에 영구자석으로 외부 자기장을 인가하면 자성입자들은 자기력에 의해 각각 영구자석과 가까운 위치로 끌려가게 되는 현상을 보여주고 있다.

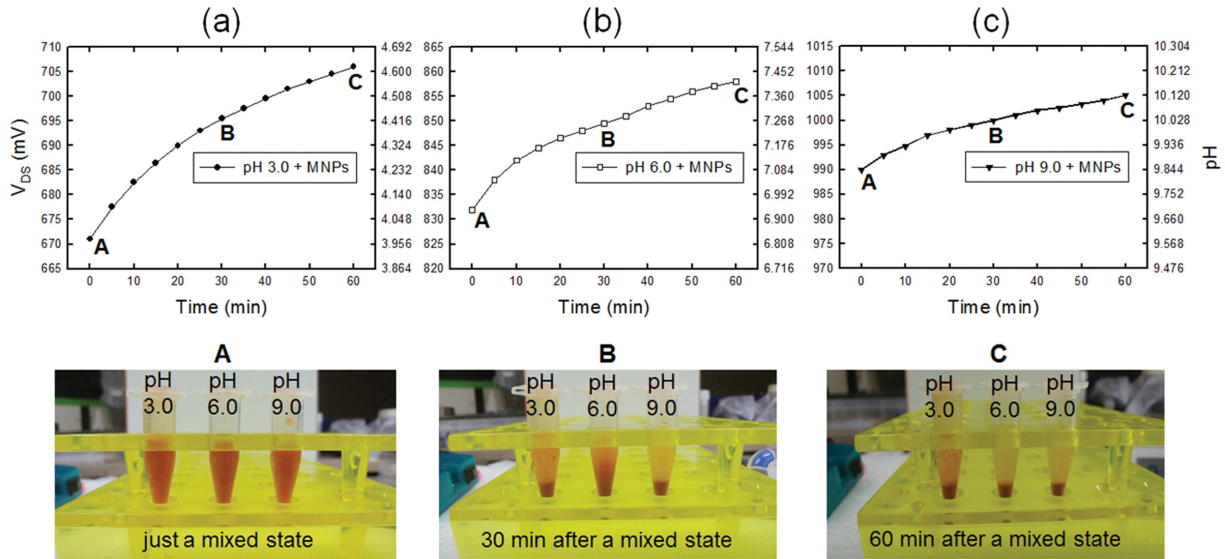
자성입자가 있는 곳과 없는 곳으로 분리하여 RE와 ISFET pH 센서를 이용한 Fig. 3(b)와 같이 자성입자들이 비어있는 붉은 용액에서 측정한 출력신호는  $V_{out}(V_{DS}) = 835 \text{ mV}$ 로 낮아

**Table I.** pH sensitivity,  $V_{DS}/\text{pH}$  specification, and pH values for several different solutions measured by the ISFET pH sensor Kit of WINSENSE Co., Ltd. company (Ref. [12]).

| Item        | pH sensitivity ( $V_{DS}/\text{pH}$ )                          |                       |                 | Remarks   |
|-------------|--|-----------------------|-----------------|---|
|             | Target   | Low limit             | Upper limit     |   |
| Sensitivity | 52.8 mV/pH   | 40.4 mV/pH            | 65.2 mV/pH      | $V_{GS} = 0.5 \text{ V}$ ,<br>$I_{DS} = 30 \mu\text{A}$ |
|             | Solutions  | $V_{DS} \text{ (mV)}$ | pH              | Remarks   |
|             | Standard buffer solution pH 3.0                                | $672.0 \pm 1.0$       | $3.99 \pm 0.02$ |   |
|             | Standard buffer solution pH 6.0                                | $845.0 \pm 1.0$       | $7.17 \pm 0.02$ |   |
|             | Standard buffer solution pH 9.0                                | $995.0 \pm 1.0$       | $9.93 \pm 0.02$ |   |
|             | Sterile distilled water  | $867.0 \pm 1.0$       | $7.58 \pm 0.02$ |   |
|             | Multi clean (1000 ml + NaCl (9 g))                             | $995.0 \pm 1.0$       | $9.93 \pm 0.02$ |   |
|             | Magnetic nanoparticles (MNPs) in ddH <sub>2</sub> O (0.5% w/v) | $841.0 \pm 1.0$       | $7.10 \pm 0.02$ | $V_{GS} = 9.0 \text{ V}$ ,<br>Temperature = 20 °C       |
|             | Alcian blue in PBS1 × (pH 7.4)                                 | $663.0 \pm 1.0$       | $3.82 \pm 0.02$ |   |
|             | Buffer solution pH 3.0 (0.6 ml) + MNPs (0.3 ml)                | $671.0 \pm 1.0$       | $3.97 \pm 0.02$ |   |
|             | Buffer solution pH 6.0 (0.6 ml) + MNPs (0.3 ml)                | $832.0 \pm 1.0$       | $6.93 \pm 0.02$ |   |
|             | Buffer solution pH 9.0 (0.6 ml) + MNPs (0.3 ml)                | $990.0 \pm 1.0$       | $9.84 \pm 0.02$ |   |



**Fig. 3.** (Color online) Photographs for three different measuring status of magnetic nanoparticles (MNPs) in ddH<sub>2</sub>O filled with in micro-tube. The values of  $V_{DS}$  and pH measured by (a) ISFET sensor in mixed MNPs evenly in all volume of tube, (b) ISFET sensor in vacant MNPs solution by a leaned MNPs near to permanent magnet, and (c) ISFET sensor sink MNPs to the right side of tube are  $841.0 \pm 1.0$  mV and  $7.10 \pm 0.02$ ,  $835.0 \pm 1.0$  mV and  $6.99 \pm 0.02$ , and  $844.0 \pm 1.0$  mV and  $7.15 \pm 0.02$ , respectively. Here, the p-value of all data is  $< 0.005$ .



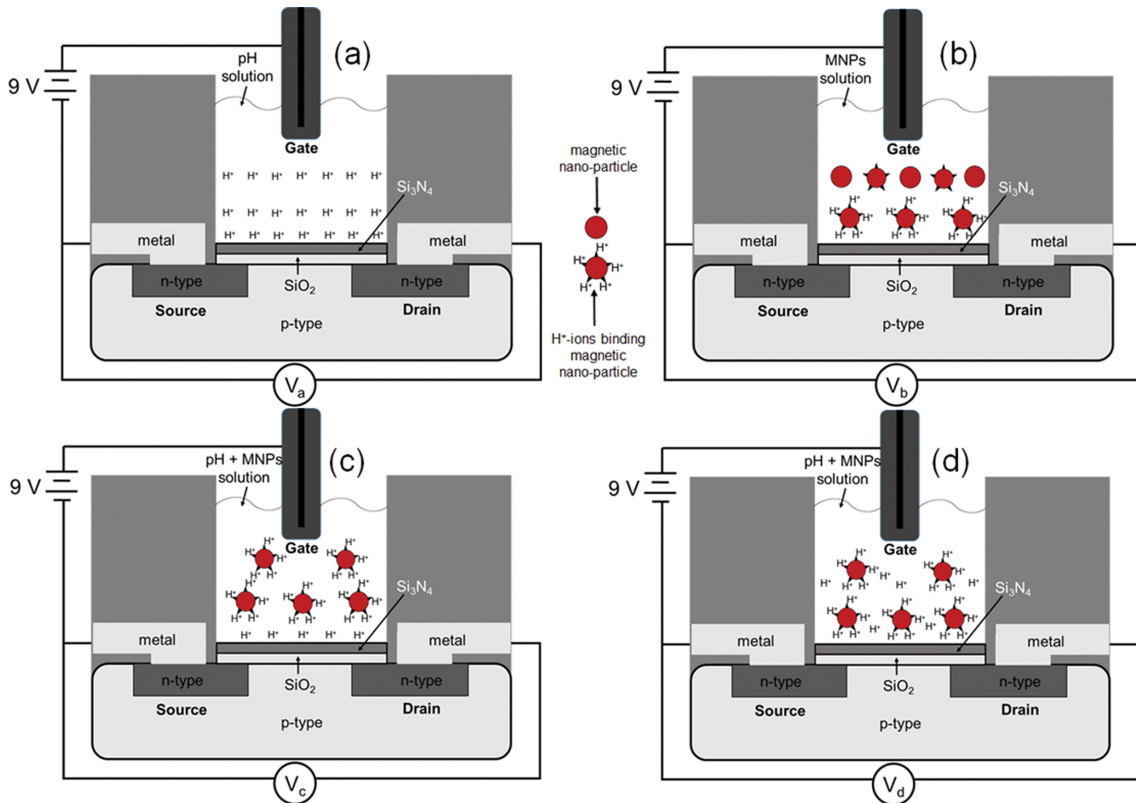
**Fig. 4.** (Color online) The variation curves of output voltage  $V(pH) = V_{DS}$  and pH value of ISFET pH sensor during the measurement time (0~60 min) for three samples consisted of (a) pH 3.0 (0.6 ml)+MNPs (3.0 ml), (b) pH 6.0 (0.6 ml)+MNPs (3.0 ml), and (c) pH 9.0 (0.6 ml)+MNPs (3.0 ml). The bottom photographs of A, B, and C are each solution state of three samples at just a mixed state, 30 min after a mixed state, and 60 min after a mixed state, respectively.

지고 pH 값은 6.99로 약간 산성화 되었음을 보여주었다. Fig. 3(c)에서와 같이 영구자석을 치우고 튜브 오른쪽 몰려있는 자성입자들을 있는 곳으로 ISFET pH 센서를 이동하였다. 즉 Fig. 3(c)와 같이 자성입자들이 진하게 뭉쳐있는 용액에서 측정된 출력신호는  $V_{out}(V_{DS}) = 844$  mV로 높아지므로 pH 값은 7.15로 약간 알칼리성화 되었음을 나타내고 있다. 이로써 자성나노입자들이 있는 곳이 없는 곳보다 pH가 높아져 알칼리화로 된 것은 S와 D로 흐르는 전류가 감소하여 전도 채널을 형성에 기여하는 H<sup>+</sup> 이온이 줄어들었기 때문이다. 이러한 현상에 근거하여 자성나노입자들이 분포에 따른 pH 값의 변화는 ISFET의 측정원리에 따라 Fig. 5에서 도시화된 그림으로

설명하고 있다.

1.5 ml의 마이크로 튜브를 3가지로 구분하여 각각 pH 3.0, 6.0, 9.0인 표준 완충 용액을 0.6 ml씩 담았다. 그 후 실험실 내 온도의 20 °C에서 pH 7.0로 ISFET 센서의 출력값이 841 mV인 자성입자 용액을 0.3 ml씩 동일하게 보충하였다. 튜브 내 물 속에 균일하게 분포하고 있는 자성입자들이 시간에 따라 중력의 영향으로 Fig. 4의 하단에 있는 사진 A에서 시작하여 서서히 사진 B와 사진 C와 같이 아래로 가라앉게 된다. 자성입자들이 균일하게 분산되어 있는 상태인 A를 유지하여 자성입자들이 거의 가라앉은 상태인 C까지 시간 60 min 동안 pH 농도를 결정하는 출력전압의 변화량을 조사하





**Fig. 5.** (Color online) Schematic diagram for the operational principle with  $H^+$ -ion concentration near to an electroactive and sensing  $Si_3N_4$  membrane of a ISFET pH sensor: (a) pH solution, (b) MNPs solution, (c) dilute pH + MNPs solution, and (d) dense pH + MNPs solution inside of encapsulation. Here, the magnitude of output voltages of ISFET pH sensor for four different solutions are  $V_a < V_b < V_c < V_d$  due to the difference of  $H^+$ -ion concentrations near to an electroactive and sensing  $Si_3N_4$  membrane.

였다.

Fig. 4(a)는 인위적으로 튜브를 상하로 반복하여 흔들어서 자성입자들을 혼합시킨 후 균일하게 분포된 pH 3.0(0.6 ml) + MNPs(3.0 ml) 용액을 시간에 따른 출력값( $V(pH) = V_{DS}$ )의 변화를 보여준 그래프이다. 3가지의 A, B, C 상태가 되었을 때 출력값들이 증가하고 있다. 이것은 pH 값이 증가되어 알칼리화 된다는 것을 나타내고 있다. A 상태와 C 상태의 차이인 60분 후 자성입자가 튜브 아래로 가라앉았을 때에 변화량은  $\Delta V(pH) = 35$  mV에 해당하는  $\Delta pH = 0.65$ 로 변화를 보여주었다. Fig. 4(b)는 Fig. 4(a)의 시료 처리과정을 동일하게 한 pH 6.0(0.6 ml) + MNPs(3.0 ml) 용액을 시간에 따른 출력값( $V(pH)$ )의 변화를 나타낸 그래프이다. A, B, C 상태가 되었을 때 출력값들이 증가하는 경향성은 Fig. 4(a)에 비해 약화되었다. A 상태와 C 상태의 차이를 보이는 변화량은  $\Delta V(pH) = 25$  mV에 해당하는  $\Delta pH = 0.46$  정도의 변화를 보였다. Fig. 4(c)는 완충 용액에서 pH가 높은 pH 9.0(0.6 ml) + MNPs(3.0 ml) 용액으로 시간에 따른 출력값( $V(pH)$ )의 변화를 보여준 그래프이다. 3가지의 A, B, C 상태가 되었을 때 출력값들이 완만하게 증가하고 있다. 이것은 pH 값이 완만하게 증가된다는

것을 나타내었다. A 상태와 C 상태의 차이인 60분 후 pH 9.0 용액에서 자성입자가 튜브 아래로 가라앉았을 때 변화량은  $\Delta V(pH) = 15$  mV에 해당하는  $\Delta H = 0.28$ 로 변화를 보여주었다.

시간에 따라 pH가 높은 상태로 갈수록 ISFET 소자에서 출력된 pH 값의 변화량이 감소함에 따라 용액 내 녹아있는 수소이온( $H^+$ )이 줄어들었기 때문에 일어난 현상으로 볼 수 있다. 또한 용액 내 자성나노입자의 역할은 단순히 밀도의 변화를 주는 것이 아니라 용액내의 수소이온과 결합된 상태로 존재하기 때문에  $H^+$  이온의 농도의 변화를 유도할 수 있을 것으로 보인다. Fig 5(a)는 순수한 pH 용액에 기준 전극인 G 단자에 9.0 V 전압을 인가하여 용액 내에 존재하는 수소이온이 +의 전위차에 의해 이온 감응막인  $Si_3N_4$  층 위로 쌓이게 됨을 ISFET pH 센서의 작동원리와 같이 도시하였다.  $Si_3N_4$  층 위로 쌓인 + 전하를 띤 수소이온의 농도에 따라 n-형 반도체의 채널 폭은 넓어져 S와 D 두 단자 사이에 전류  $I_{DS}$ 가 흐르게 되어 출력전압의  $V_{DS} = V_a$ 는 임의값을 갖게 된다.  $Si_3N_4$  층 근처에 수소이온 농도가 클 경우에는 pH가 작은 값을 갖는 산성 용액이므로 전류  $I_{DS}$ 가 크게 흐르게 되어 출력전압의  $V_{DS} = V_a$ 는 낮아진다. 반면으로  $Si_3N_4$  층 근처

에 수소이온 농도가 줄어들 경우에는 pH가 큰 값을 갖는 알칼리성 용액이므로 전류  $I_{DS}$ 가 작게 흐르게 되어 출력전압의  $V_{DS} = V_a$ 는 높게 나타난다.

본 연구의 실험에서 사용한 나일강색의 형광형 자성나노입자들은 Spherotech(Illinois, USA)회사의 제품 모델 SPHERO™(FCM-0552-2H)로 카르복시기(Carboxyl, -COOH)가 붙어있어서 불리며 음(-) 전하된 표면을 갖고 있다. 이로써 용액 내 존재하는 다수의 수소이온들을 끌려들어 결합하게 된다[10]. Fig. 5(a)와 Fig. 5(b) 중간에 빨간색 원을 자성나노입자 주위에 5개의 수소이온이 균일한 원 둘레에 결합한 모양을 보였다. Fig. 5(b)는 ISFET pH 소자 캡슐 안에 담긴 ddH<sub>2</sub>O 용액 내 수소이온(H<sup>+</sup>)으로 존재할 수 있는 수소이온과 결합된 자성나노입자들과 순수한 입자들의 이온 감응막인 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 근처에 G 단자에 인가된 전압의 크기에 의해 쌓일 수 있게 됨을 표시하였다. 이 때 ISFET pH 센서로 측정되는 출력전압의  $V_{DS} = V_b$ 이다. 여기서 Fig. 5(a)에서 나타낸 출력전압의  $V_{DS} = V_a$ 와 비교해 보면 S와 D의 두 단자 사이로 흐르는 전류는 줄어든 H<sup>+</sup> 이온 농도에 의해 감소하게 됨에 따라  $V_b$ 가  $V_a$  보다 큰 값으로 측정된다.

한편 Fig. 5(c)에서 보여주고 있는 바와 같이 표준 완충 용액의 pH 3.0(혹은 6.0, 9.0)에 MNPs 용액을 혼합했을 경우에는 수소이온의 일부가 자성나노입자와 결합하여 이온 감응막인 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 층 근처에 수소이온 농도가 줄어들어 ISFET pH 센서로 측정되는 출력전압의  $V_{DS} = V_c$ 는  $V_a$  보다 큰 값으로 측정되어 pH 값이 높게 나타내었다. Fig. 5(d)는 표준 완충 용액 내 수소이온의 일부가 자성나노입자와 결합하였지만 ISFET pH 센서가 자성나노입자들이 밀집되어 있는 공간일 경우이다. 이온 감응막인 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 층 근처에 수소이온과 결합된 자성나노입자가 농도가 늘어났지만 수소이온 농도는 줄어들어 ISFET pH 센서로 측정되는 출력전압인  $V_{DS} = V_d$ 는  $V_c$  보다 큰 값으로 측정되어 pH 값이 높게 나타내었다. 따라서 이러한 결과들은 Fig. 3와 Fig. 4에서 나타낸 측정값들의 경향성과 일치하게 된다.

#### IV. 자성나노입자 용액 내 외부 자기장의 세기에 따른 pH 분석과 활용

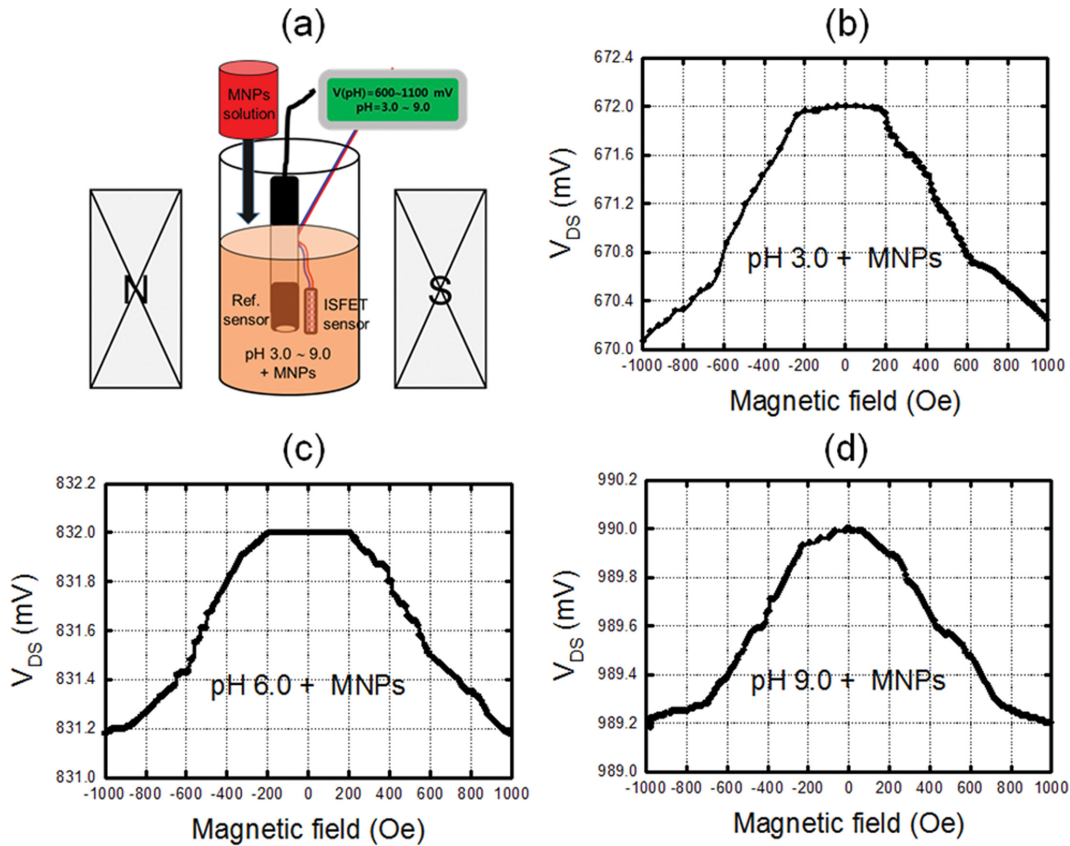
Fig. 5에 나타낸 ISFET pH 센서의 구조와 이온 농도에 따른 출력값의 변화된 특성을 기반으로 하여 자성나노입자 용액 내 외부 자기장의 세기에 따른 pH 분석을 하고 이의 활용을 논하고자 한다. 튜브 내 용액에서의 자성입자들은 ISFET pH 센서의 구조에서 pH 용액 내 존재하는 H<sup>+</sup> 이온이 감응막인 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 근처에서 수소이온 농도의 출력값이 다르게 된다. 즉 자기장에 따라 자성나노입자의 분포가 변화되는

특성을 나타내게 된다. 자성입자들이 이동함에 따라 변화되는 수소이온 농도로 얻은 ISFET pH 센서의 출력전압은 Fig. 6(a)에 도시한 것과 같이 자체 제작한 측정장비를 사용하였다. 여기서 기준 전극은 튜브 중앙에 놓고 ISFET pH 센서는 중앙에서 벗어나 오른쪽으로 조금 편향된 거리를 유지한 채로 고정하였다. Fig. 6(a)에서 pH 센서의 출력전압은 외부 자기장을 생성하는 전자석에 의해 자기장의 크기가 조절되어 용액 내 자성나노입자들의 분포에 따라 수소이온 농도의 차이에 의해 변하게 된다. 이 출력전압의 측정장비는 S와 D의 두 단자를 연결하여 센서의 전압을 측정할 수 있는 Keithley 197 Autoranging Microvolt DMM이다. 한편 외부 자기장 측정 범위는 Ryowa Electronics Co., Ltd.의 Model-9705 DC Power Supply으로 전자석에 DC와 AC의 전류를 공급할 수 있도록 하였다[14].

측정방법은 표준 완충 용액으로 3가지의 pH 3.0, pH 6.0, pH 9.0 용액에 각각 자성입자 용액을 2:1의 비율로 9 ml에 혼합하여 마이크로 튜브에 담았다. 외부 자기장의 크기에 의해 자성입자들의 이동함에 따라 변화되는 S와 D 단자 근처의 수소이온 농도의 분포에 의한 출력전압의 특성 곡선을 나타내며 Fig. 6(a)와 같이 균일하게 외부 자기장이 인가되도록 직경 150 mm의 전자석 코일을 배치하였다. 외부 자기장은 pH 값이 다른 3가지 용액에 일정한 부피로 혼합된 자성입자 용액이 담겨 있는 튜브를 수직으로 고정되게 하며 측정 범위는 major loop으로 ±1000 Oe이다. 주파수를 3.7 mHz로 고정된 상태에서 측정하여 출력전압 곡선과 대응되는 자기장에 따른 pH 변화의 특성을 조사하였다. 선택된 3.7 mHz는 sweeping 속도로 ±1000 Oe의 외부 자기장 범위 내 1 Oe에서 0.7 s 간격으로 출력값을 150초 동안 측정하기 때문에 나노입자들이 중력에 의해 가라앉지 않는 내에서 재현성이 있는 충분한 데이터를 확보할 수 있었다.

평균 크기 350 nm의 자성나노입자들은 초자성체로써 외부 자기장에 매우 민감하다. 마이크로 튜브 내 자성입자 용액을 초기에는 충분히 흔들어 고르게 섞이기 때문에 외부 자기장을 가하지 않고 있을 때 자성입자들이 균일하게 분포되어 있는 상태를 나타낸 것이다. 자기장을 가하고 있을 때 외부 자기장 세기는 Fig. 3(b)와 같이 양쪽으로 자기력을 따라 쏠리게 된다. 외부 자기장 세기에 따라 자성입자들이 양쪽으로 균집을 이루어 이동하며 분리된다. 이로써 마이크로 튜브 안에 있는 자성입자들이 양쪽으로 이동하며 분리됨으로써 용액 내 존재하는 수소이온 농도가 공간상에서 불균일하게 되어 이에 따라 ISFET 센서의 출력값이 변화되는 것이다.

Fig. 6(b)는 pH 3.0(0.6 ml) + MNPs(3.0 ml) 용액 시료를 외부 자기장에 따라 변화된 출력전압 곡선이다. ±1200 Oe의 외부 자기장 범위에서 S와 D의 두 단자로 연결한 상태에서



**Fig. 6.** (Color online) (a) The pH measurement method system according to the intensity of external magnetic field of magnetic nanoparticle solution. The output voltage  $V(\text{pH}) = V_{DS}$  curves of ISFET pH sensor versus the external applied magnetic field (+1000 Oe  $\rightarrow$  0 Oe  $\rightarrow$  -1000 Oe) during a measuring time of 2 min 30 s for three samples consisted of (b) pH 3.0 (0.6 ml) + MNPs (3.0 ml), (c) pH 6.0 (0.6 ml) + MNPs (3.0 ml), and (d) pH 9.0 (0.6 ml) + MNPs (3.0 ml).

은 곡선의 형태에서 중앙 0 Oe를 대칭되게 나타내었다. 이것은 자기장이 증가할 때 센서의 위치가 나노입자들에서 벗어나며 Fig. 6(a)의 경우와 같이 수소이온 농도가 크게 일어난 출력값이 672.0 mV에서 670.3 mV까지 약 0.25%의 1.7 mV로 차이를 두며 감소하였다. Fig. 6(c)는 pH 6.0(0.6 ml) + MNPs(3.0 ml) 용액 시료를 외부 자기장에 따라 변화된 출력 전압 곡선이다. 중앙 0 Oe를 대칭으로 특성이 Fig. 5(b)보다 높게 나타내었다. 외부 자기장에 따라 수소이온 농도별로 나타난 출력값이 0 Oe에서 832.0 mV가 1000 Oe에서 831.1 mV까지 약 0.11%의 0.9 mV로 차이를 두며 감소하였다. Fig. 6(d)는 pH 9.0(0.6 ml) + MNPs(3.0 ml) 용액 시료에 대한 외부 자기장에 대한 출력전압 곡선으로서 중앙 0 Oe를 대칭으로 특성이 오히려 낮아지며 Fig. 5(b)와 유사한 형태로 나타났다. 외부 자기장에 따른 수소이온 농도별로 출력값은 0 Oe에서 990.0 mV가 1000 Oe에서 989.1 mV까지 약 0.09%로 Fig. 5(c)의 결과와 동일하게 0.9 mV를 나타내며 감소하였다.

Fig. 6(b)와 6(c) 그리고 6(d)를 비교하여 살펴보았을 때

$\pm 1000$  Oe 영역 내 외부 자기장의 세기에 대한 출력전압 곡선은 Fig. 5에서 설명한 바와 같이 이온 감응막 부근에서 자성입자가 이동하여 밀도 분포에 따라 출력전압의 값이 변화하게 된다. 외부 자기장이 가하지 않는 영역으로 pH 센서 부근에는 골고루 분포된 자성입자들이 원충 용액 내 존재하는 수소이온 농도를 희석시킴에 따라 출력전압이 올라가게 된다. 한편 외부 자기장이 가하는 영역으로 자성입자들은 좌우로 외부 자기장의 세기에 따라 이동함으로 pH 센서 부근에는 용액에 녹아있는 수소이온 농도가 올라가며 출력전압이 내려가게 된다. 이러한 현상은 강한 산성 용액에서 알칼리성 용액보다 외부 자기장에 대하여 크게 출력전압의 차이를 두고 있음을 확인할 수 있었다.

자성나노입자는 표적 약물 전달, 자기 열치료(발열요법), 자기 공명 이미징(MRI), 단백질 및 세포의 분리 등의 다양한 분야에 적용이 가능하다는 점 때문에 생의학 분야에서 주목을 받아왔다. 특히 초상자성(superparamagnetic) magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )는 독특한 자기 특성과 생체적합성 덕분에 많이 연구된 물질이다. pH와 자기장에 반응하는 나노입자는 자성을 가진



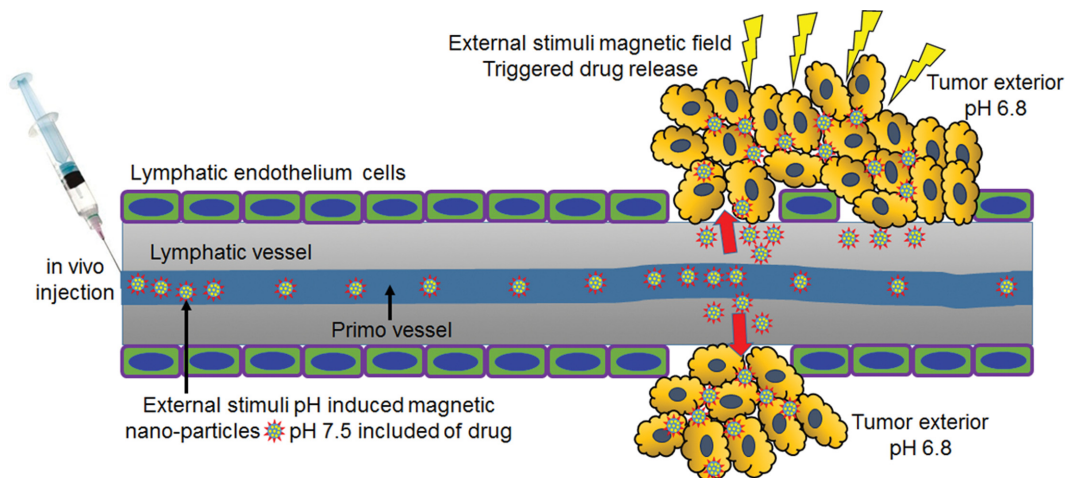
중심 코어에 Fe와 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>가 있는 나노 입자와 pH에 반응할 수 있는 고분자를 다양한 방법으로 결합하여 만들어진다. 이 입자는 외부 교류 자기장 하에서 높은 자화(magnetization)와 고열 요법 효과를 보이며 생리적 pH에서 많은 양의 로딩 (loading)이 가능하다. pH 3.0의 산성 조건에서 약물을 빨리 방출하는 특성을 나타내고 있으므로 화학적 항암치료와 함께 자성 고열 요법(magnetic hyperthermia therapy)을 병행할 수 있는 가능성을 보였다[15]. 또한 Fe 또는 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>를 코어로 하고 삼중합체를 셀처럼 코팅하여 만들어진 코어-셸 형태의 나노입자가 개발되어 중성 용액의 pH 7.4에서는 이온성 상호작용(ionic interaction)과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해 효율적으로 로딩(loading)될 수 있다. 산성 (pH 3.0) 조건에서는 이온성 상호작용이 약해지면서 약물이 효율적으로 방출되어 세포로 효과적으로 섭취되어 눈에 띄게 향상된 항암효과를 보여줄 수 있다. 인체에 맞는 생리적 pH에서는 반응이 거의 없었으나 pH 5.0~pH 6.0에서는 반응이 매우 빨랐으며 세포에 약물을 효과적으로 전달할 수 있음이 보고되고 있다.

본 연구의 실험결과를 바탕으로 pH와 자기장 그리고 수소 이온 농도 기울기에 따른 자성나노입자의 거동과 산성화된 표적을 향해 이동하게 된다. 손상된 타겟 세포의 치료용 약물을 담고 있는 중성 다중 반응성 고분자 나노입자를 pH 농도 기울기에 따라 이동하는 입자를 표적 위치에 머물게 한다. 그 후에 외부에서 자기장으로 국소적으로 자극에 반응하며 나노입자의 고리가 분해 또는 분리되어 치료 약물이 방출되게 하는 것이다. Fig. 7은 응용과 활용에 대한 하나의 예로 국소 영역에서 약물 전달을 위해 프로그램이 되어있는 이중 및 다

중 자극에 반응하는 고분자 자성나노입자로 구성된 이중 및 다중 반응형 고분자 나노입자의 설계 및 제조 원리를 도시한 것이다[1,4]. pH 7.5 근방의 중성을 띠는 약물이 포함된 다중 반응성 고분자 형태로 자성나노입자를 면역세포가 생성되어 질병 치료에 기여하는 림프관 내 새로운 프리모관에 in vivo 상태로 미세한 실린저로 주입시킨다[16]. 주입된 고분자 입자들의 무리가 pH가 6.6~7.2인 산성화 되어있는 암세포를 부근에 도달하면 pH의 환원 특성에 이끌리어 손상된 림프 내피 세포로 들어가게 된다. 이 때 pH 값의 차이로 두고 환원 특성으로 인해 다중 반응성 분자가 풀리게 되어 약물이 방출한다. 또한 외부에서 고주파 교류 자기장을 암세포 부근에 자극하여 입자의 반응이 유도되어 온도도 상승하고 다중 고리가 깨어지면서 약물이 방출되어 표적 위치에 있는 암세포가 치료가 되는 일련의 과정을 활용할 수 있게 된다. 체온이 1°C 낮아지면 신진대사는 12%, 면역력은 30%로 떨어지지만 체온이 1°C 상승하면 면역력은 3배에서 5배로 증가한다. 단지 1°C 상승하는 것만으로도 대부분의 질병 예방이 가능함을 알 수 있다[17]. 이로써 본 연구의 실험결과는 pH 값에 따라 자성나노입자의 거동 특성을 이용하고 표적 암세포 내 부나 외부에 존재하여 고주파 고열요법(high frequency hyperthermia therapy)으로 온도를 상승시켜서 의료용으로 활용할 수 있음을 보여주었다.

### V. 결 론

액체 용액에 녹아있는 수소이온(H<sup>+</sup>) 농도를 측정하는 ISFET pH 센서를 이용하여 외부 자기장에 따라 변화하는 자



**Fig. 7.** (Color online) Schematic of magnetic hyperthermia cancer treatment using by in vivo injection of polymeric magnetic nanoparticles as emerging controlled drug (pH > 7.5) release systems in primo vessel inside of lymphatic vessel. The stimuli are applied an external stimulus such as magnetic field to trigger drug release, which allows precision spatial, temporal as well as dose control over drug release at acidic tumor pH (6.5~7.2) through a remote apparatus.

성나노입자들의 거동을 살펴보면 pH 값의 차이를 두고 특성을 조사하였다. 무이온 증류수 안에 들어있는 나노입자는 평균 크기가 350 nm이고 코어에 Fe 원자가 있는 나일강색의 형광색을 띠고 있다. 다양한 용액에 담긴 기준 전극의 G에 9.0 V를 인가하여 ISFET 소자의 S와 D 단자를 연결하여 전압의 출력값을 pH 값으로 변환하였다. 마이크로 튜브에 각각 pH 3.0과 pH 6.0 그리고 pH 9.0의 완충 용액에 pH 값이 7.1인 자성나노입자 용액을 3:1의 비율로 혼합하여 1시간동안 입자의 무게에 의해 아래로 가라앉음으로 인해 자성입자 분포 변화에 대하여 pH 값의 변화를 관찰하였다. 산성 용액에서 알칼리성 용액보다 pH 값의 변화량은  $\Delta V(\text{pH}) = 35 \text{ mV}$ 에 해당하는  $\Delta \text{pH} = 0.65$ 로 가장 크게 보여주었다. MNPs 용액 내 존재하는 수소이온의 일부가 자성나노입자와 결합하여 이온 감응막인  $\text{Si}_3\text{N}_4$  층 근처에 수소이온 농도가 줄어들어 ISFET pH 센서로 측정되는 출력전압의 경향성은 용액 내 pH 값의 변화로 나노입자의 분포에 밀접하게 의존하고 있었다.  $\pm 1000 \text{ Oe}$  영역 범위에서 용액 시료를 외부 자기장에 따라 변화된 출력전압 곡선은 S와 D의 두 단자로 연결한 상태에서 산출한 곡선이다.  $+1000 \text{ Oe}$ 에서  $-1000 \text{ Oe}$ 까지 출력된 값은 0 Oe 중심으로 대칭을 하며 형태를 보이고 있었다. 그 변화량은 산성 용액에서 알칼리성 용액보다 크게 나타내었다. pH와 자기장 그리고 수소이온 농도 기울기에 따른 자성나노입자의 거동과 산성화된 표적을 향해 이동하는 실험적인 결과를 바탕으로 손상된 타겟 세포의 치료용 약물을 담고 있는 중성 다중 반응성 고분자 나노입자를 pH 농도 기울기에 따라 이동하는 입자를 표적 위치에 머물게 할 수 있다. 외부에서 자기장을 국소적으로 자극에 반응하여 나노입자의 고리가 분해 또는 분리되어 약물이 방출하는 치료 시스템의 실제로 그 활용 가능성을 제시하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2020년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의한 것입니다.

## References

- [1] R. Cheng, F. Meng, C. Deng, H. A. Klok, and Z. Zhong, *Biomaterials* **34**, 3647 (2013).
- [2] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2**, 751 (2007).
- [3] C. Sun, J. S. H. Lee, and M. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1252 (2008).
- [4] L. Y. Zhang, R. Guo, M. Yang, X. Q. Jiang, and B. R. Liu, *Adv. Mater.* **19**, 2988 (2007).
- [5] P. Bergveld, *Sensors Actuat. B-Chem.* **88**, 1 (2003).
- [6] T. Sakurai and Y. Husimi, *Anal. Chem.* **64**, 1996 (1992).
- [7] J. Yang, T. J. Kwak, X. Zhang, R. McClain, W. J. Chang, and S. Gunasekaran, *ACS Sens.* **1**, 1235 (2016).
- [8] J. S. Woo, *Korean J. Otorhinolaryngol-Head Neck Surg.* **52**, 394 (2009).
- [9] For U Co., Ltd., <http://www.for-u.co.kr/main>.
- [10] Fluorescent Magnetic-Spherotech, [https://www.spherotech.com/fluor\\_mag\\_par.htm](https://www.spherotech.com/fluor_mag_par.htm).
- [11] J. G. Choi, B. U. Kang, and S. S. Lee, *New Physics: Sae Mulli* **69**, 883 (2019).
- [12] ISFET pH sensor Kit, <http://winsense.co.th>.
- [13] E. J. Simon, *Biology: The Core*, Pearson Education, Inc., 2<sup>nd</sup> Ed. Chap. 2 (2016).
- [14] J. G. Choi, B. U. Kang, and S. S. Lee, *J. Korean Magn. Soc.* **29**, 123 (2019).
- [15] R. Hergt, S. Dutzl, and M. Roder, *J. Phys.: Condens. Matter* **20**, 385214 (2008).
- [16] J. Y. Shin, J. O. Ji, S. H. Choi, D. W. Choi, Y. J. An, J. H. Seo, J. G. Choi, M. S. Rho, J. Y. Lee, S. Yeo, and S. S. Lee, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1232**, 393 (2020).
- [17] Adipolaps Co., Ltd., <http://www.adipo.co.kr>.