

신규 미니어레이어에 의한 폴리다이아세틸렌 패턴상의 생체유도결정화

이원덕 · 이길선 · 안동준[†]

고려대학교 화공생명공학과
136-713 서울시 성북구 안암동
(2009년 12월 17일 접수, 2010년 1월 31일 채택)

Biom mineralization on Polydiacetylene Patterns Deposited by Using a Novel Mini Arrayer

Won Doc Lee, Gil Sun Lee and Dong June Ahn[†]

Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-713, Korea
(Received 17 December 2009; accepted 31 January 2010)

요 약

자연계에는 유/무기 복합막 형성시 크기와 배열이 정교하게 제어되면서 여러 무기물 결정들이 성장한다. 이와 같은 자연계의 유/무기 복합막을 인공적으로 재현하기 위한 시도가 다각적으로 이루어지고 있다. 유/무기 계면에서 생체모방 결정화의 대표적인 물질 중의 하나가 바로 탄산칼슘 결정이다. 탄산칼슘은 생체 내의 골격을 이루는 주성분이고 성장방법이 비교적 간단하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 분자수준에서의 우수한 정돈 상태들을 지니고 있는 폴리다이아세틸렌(polydiacetylene: PDA)은 무기결정성장 상에 관하여 효과적인 template를 제공할 수 있다. 본 실험에서는 폴리다이아세틸렌의 패턴들을 고체기판에 동시에 증착시키기 위하여, 신규로 고안한 mini arrayer의 air/water의 계면을 이용하여 소수성 유리기판위에 PDA를 전이시켰다. 이 방법을 이용한 결정화 과정의 제어는 생체유도결정화의 매커니즘을 이해하는데 기여할 수 있을 것이다.

Abstract – In natural world various inorganic crystals are grown with controlled shape and size in hybrid forms with organics. Such natural processes have been attempted much to mimick artificially. One of the example is calcium carbonate which has been examined a lot in the field of biom mineralization. In this study, we utilize well-organized surface of polydiacetylene(PDA) films as the crystal-growing template. We devised a novel mini-arrayer device that transfers PDA films at air/water interfaces of each array well and deposit them to hydrophobized glass substrates. This technical improvement will contribute to facilitate better understandings of biom mineralization mechanism.

Key words: Biom mineralization, Polydiacetylene Patterns, Mini-Arrayer

1. 서 론

자연계에서는 유/무기 복합막의 형성이 자발적이면서 가장 정교하게 이루어지고 있다. 이러한 복합막은 각종 동식물과 곰팡이 체내에서 형성되며 복합막 위에는 carbonate를 비롯한 phosphate, halide, sulfate, silica, hematite 및 manganese oxide 등 여러 무기물 결정들의 크기와 배열이 정교하게 제어되면서 성장하고 있다. 이와 같은 자연계의 유/무기 복합막을 인공적으로 재현하기 위한 시도가 다각적으로 이루어져 왔으며 이를 통칭하여 생체유도결정화(biom mineralization)라고 한다[1,2]. 생체유도 결정화에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있음에도 불구하고 최근까지 유기표면에서 결정핵을 형성하는 조합합성에 관한 연구가 발표되지 않고 있는 상황이다.

생체유도결정화는 막을 구성하는 유기물과 무기물의 상호작용에 의해 결정이 성장하는 것이다. 이전에 행하여진 결과로부터 유기분자와 무기분자들 간의 분자 인식을 통해 특정한 형상과 배열을 갖는 무기물 결정들이 특정 유기막 위에 선택적으로 유도된다는 사실이 밝혀져 있다. 유/무기 계면에서 생체 모방 결정화의 대표적인 물질 중의 하나가 바로 탄산칼슘(CaCO_3) 결정이다. 탄산칼슘은 뼈의 주성분이며 성장방법이 비교적 간단하여 많은 연구가 수행되어 왔다[3-6]. 탄산칼슘 결정을 구성하는 성분인 calcium이온과 carbonate이온의 상대적인 배향 차이에 의하여 서로 상이한 결정이 존재하게 되며 형태에 따라 크게 3가지로 나뉘게 된다[7]. 자연상태에서 가장 안정한 결정을 이루는 calcite와 조개껍질 내에서 그 배열이 일정하게 성장하는 spindle 모양의 aragonite, 마지막으로 가장 불안정하여 자연상태에서 존재하기 어렵다고 알려진 꽃모양의 vaterite가 있다.

본 연구에서는 이전에 알려진 유/무기 복합막 위에서의 결정 성장

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ahn@korea.ac.kr

에 관한 데이터를 한번에 확인할 수 있는 표면을 개발하기 위하여 분자수준에서 우수한 정돈 상태들을 지니고 있으며 외부 자극을 받으면 푸른색에서 적색으로 변하는 색전이 현상 및 형광 발현을 일으켜 육안으로도 표면의 막을 확인할 수 있는 폴리다이아세틸렌(이하 PDA)을 사용하였다. 사용된 PDA는 한쪽은 친수성을 또 다른 쪽은 소수성을 가지는 양친매성 분자로서 외부 환경에 따라 자기조립되는 특징을 가지고 있다. 또한 이러한 PDA 단량체의 한쪽 말단에 특수한 기능기를 도입하면 특정 표적 물질을 감지할 수 있는 센서로 응용 가능하여 전세계적으로 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다[8-11].

본 연구에서는 이러한 형광발현 특성을 지닌 PDA를 이용하여 다양한 기능기를 가진 박막을 형성시킨 후에 탄산칼슘 결정을 성장시킴으로써 여러 기능기가 결정생성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 또한, 이를 통하여 결정화 과정의 제어 및 기능기에 따른 유기표면에서 무기물이 성장하는 메커니즘을 연구할 수 있는 라이브러리를 형성하고자 하였다.

2. 실험

2-1. 재료 및 시약

PDA를 증착하기 위한 소수성 기판의 제조를 위하여 Sigma-Aldrich사의 octadecyltrichlorosilane(OTS; 90%)와 toluene(99.8%)을 사용하였다.

CaCO_3 의 결정성장을 위하여 Sigma-Aldrich사의 ammonium carbonate와 Fluka사의 calcium chloride를 사용하였다.

사용된 PDA들은 PCDA(10,12-pentacosadynonic acid) 단량체의 한쪽 끝에 기능기를 도입하여 사용하였다. 기능기의 도입을 위해 리빙라디칼 중합법의 하나인 RAFT(Reversible Addition Fragmentation Transfer) 중합법을 이용하였다. RAFT 중합법을 통해 말단기가 동일하며 길이가 다른 PCDA-(COOH), PCDA-ABA-(COOH)와 말단기가 다른 PCDA-AEE(-OH), PCDA-EDEA(NH_2)를 제조하였으며 Fig. 1에 나타내었다. 이렇게 준비된 PDA는 tetrahydrofuran(THF, Sigma-

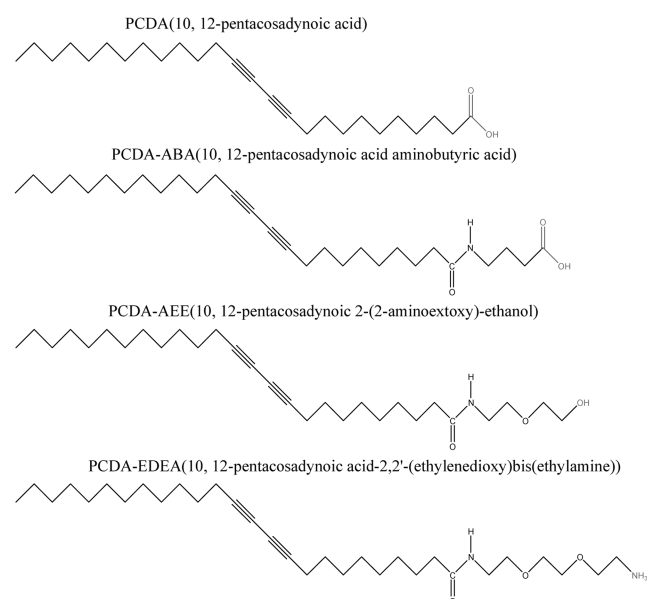


Fig. 1. Chemical structure of diacetylene derivatives.

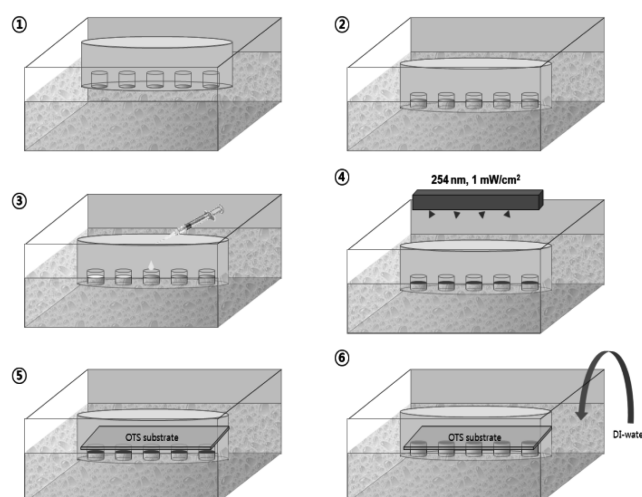


Fig. 2. Schematic of mini-arrayer LS film method.

Aldrich)에 녹여서 사용하였다.

2-2. 박막의 제조

본 실험에서는 유기박막의 제조를 위하여 슬라이드 유리(slide glass)를 사용하였다. 에탄올을 사용하여 slide glass의 표면을 깨끗이 한 후 N_2 로 건조시켰다. Slide glass를 10분간 오존(O_3)처리[12-14]하여 표면을 친수성으로 만들었다.

이 기판을 OTS 용액(OTS:toluene=1000:1)에 넣고 2시간 동안 교반시키면서 OTS가 glass에 자기조립되도록 하였다. 교반 후 2시간 동안 baking과정과 sonication을 통하여 자기조립되지 않은 OTS를 제거하였다.

2-3. Mini-arrayers Langmuir-Schaefer(LS) film의 제조

한 기판에 여러 종류의 PDA 물질을 전이시키기 위하여 직경과 높이가 5 mm인 위아래가 트인 관(tube)을 둥근 페트리디쉬 안쪽에 여러 개 정렬시켰다. 이를 통하여 관마다 한 종류의 PDA를 분산시킬 수 있으며 이를 mini-arrayer이라 명명하였다.

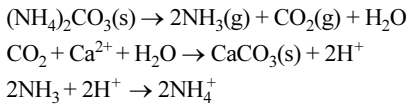
실험을 위해 mini-arrayer보다 크기가 큰 jar에 DI-water를 채운 후, DI-water 위에 mini-arrayer를 올려 Fig. 2-①과 같이 실험 준비를 하였다. 실험 준비가 끝나면 mini-arrayer가 있는 jar의 DI-water를 $\frac{1}{2}$ 정도를 제거하여 수면을 Fig. 2-②와 같이 평평하게 만들어준다. 그런 다음 Fig. 2-③번과 같이 평평한 수면 위에 THF에 녹인 PDA 단량체를 조심스럽게 분산시켜 준 후 Fig. 2-④번처럼 254 nm의 UV를 전체적으로 쬔 후 PDA를 고분자화시켜 준다. 그 다음으로 mini-arrayer 위에 OTS 기판을 놓고 수면의 변화를 최소화하기 위하여 jar 속의 DI-water를 micro-pump를 이용하여 천천히 증가시킨다(Fig. 2-⑤). Jar 속의 DI-water의 양이 늘어나면서 수면이 상승하여 수면 위에 고분자된 PDA가 OTS기판에 물리적으로 증착됨으로써 mini-arrayers LS film이 제조된다(Fig. 2-⑥).

사용된 PDA는 체인의 길이가 다른 PCDA, PCDA-ABA와 말단기가 다른 PCDA-AEE, PCDA-EDEA이다.

2-4. 생체유도결정화

Arrayer를 통해 여러가지 기능성 박막을 만들고 생성된 박막 위에

결정화를 시키기 위하여 기체 확산 방법으로 실험을 진행하였다. 건조기(desiccator) 속에 DI-water에 녹인 10 mM 염화칼슘(CaCl_2 , Fluka, 98%) 용액과 다른 용기에 담은 탄산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, Fluka, 30~33% as NH_3) 고체를 이용하여 염화칼슘 용액과 기능성 박막이 닿을 수 있도록 기판을 거꾸로 뒤집어 놓았다. 30분간 기체가 확산되면서 반응이 진행되어 탄산칼슘의 결정을 성장하게 된다. 모든 반응은 상온에서 진행하였으며 반응식은 다음과 같다[15].



탄산암모늄에서 발생한 이산화탄소가 수용액상의 칼슘이온과 반응하여 탄산칼슘 결정을 형성시킨다. 이 방법은 용액상에서 막과 반응이 진행됨으로 전체적으로 균일하게 결정을 성장시킬 수 있다.

2-5. 기기 및 분석

박막이 증착된 것에 대한 화학적 분석을 위해 FTIR(Perkin Elmer spectrum GX1)을 사용하였다. PDA가 pH[8,16], 압력[17~19], 온도[20~23] 등의 영향으로 색전이가 일어나면서 형광을 나타내는 특성을 확인하기 위하여 ArrayWorx Scanning system을 사용하여 형광 이미지를 측정하였다. 이렇게 확인된 박막 위에서의 기체 확산 방법에 의해 성장된 탄산칼슘 결정의 모양을 관찰하기 위하여 FE-SEM(Hitachi S-4300)을 사용하였다.

3. 결과 및 토론

3-1. 기능성 박막의 형성 및 분석

자기조립된 OTS 기판의 접촉각은 110° 였다. 이는 OTS가 slide glass에 단분자막을 잘 형성하였음을 보여준다.

Mini-arrayer은 tube안의 수면의 모양에 따라 막이 형성되는 것이 다르기 때문에 최대한 평평한 상태로 수면을 유지해준 상태에서 PDA가 OTS 기판에 증착되도록 유도하였다. FTIR로 mini-arrays LS film을 transmission($2,600\sim3,400\text{ cm}^{-1}$)과 near-normal external reflection($1,400\sim1,800\text{ cm}^{-1}$) 모드로 전이된 PDA 물질들을 분

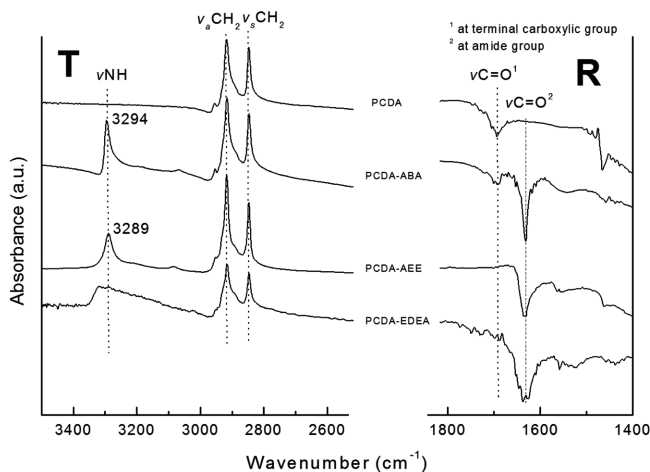


Fig. 3. Transmission (T) and near-normal external reflection (R) FTIR spectra of mini-arrays LS films of polymerized diacetylene derivatives deposited on glass.

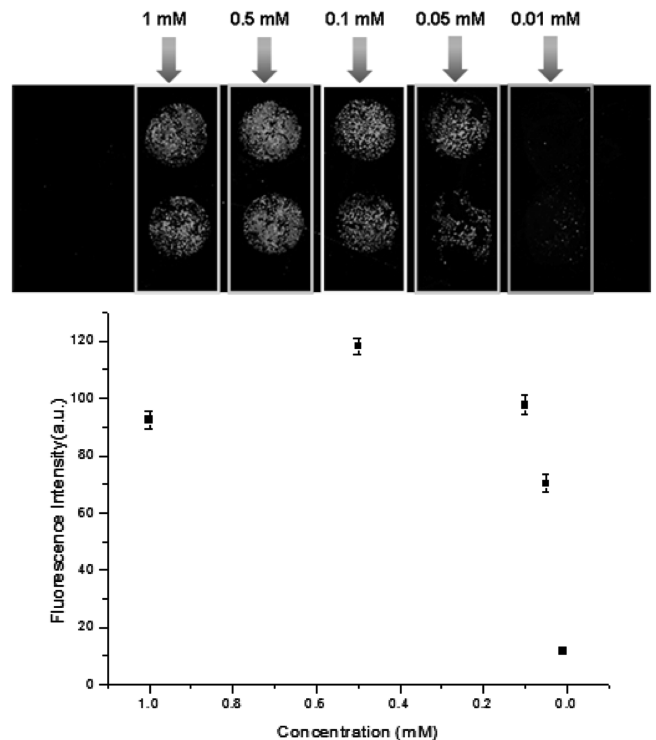


Fig. 4. Fluorescence image of mini-arrays LS film on concentration change.

석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 사용된 PDA 모두에서 비대칭 및 대칭 methylene stretching bands($2,916, 2,848\text{ cm}^{-1}$)를 확인할 수 있고 head group 쪽의 작용기들(terminal carbonyl hydrogen bond ($3,290\text{ cm}^{-1}$)와 amide-carbonyl hydrogen bonds(ca. $3,290, 1,630\text{ cm}^{-1}$))을 확인할 수 있었으며 이들 결과는 기존에 보고된 결과와 일치하였다[24]. 이러한 결과는 mini-arrays를 통하여 표면에 다양한 기능기를 지닌 PDA가 기판 위에서 막을 형성하였다는 것을 보여준다.

화학적 분석 이외에 막이 형성되는 것을 PDA의 특성 중 푸른색에서 자극을 받아 적색으로 변하면서 형광을 나타내는 색변이를 통하여 육안으로 막의 증착 여부를 확인할 수 있다. 이를 확인하기 위하여 110°C 오븐에 5분간 넣어서 인위적으로 색변이를 시킨 후 형광 이미지를 관찰하여 보았다. Fig. 4는 물질의 농도를 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 mM로 변화를 주어 형광의 세기를 측정된 결과이다. 농도에 따라 형광이 나타나는 것을 보고 물질이 전이되는 것을 확인할 수 있었다. 형광의 세기를 측정하여 본 결과 0.01 mM일 경우를 제외하고는 1~0.05 mM까지 안정적으로 막을 형성되는 것을 형광 세기를 통하여 확인할 수 있었다.

Fig. 5는 서로 다른 물질을 한번에 전이시킨 형광이미지를 나타낸 것이다. (a)의 경우 위아래를 동일한 물질을 전이시킨 결과 ①, ②의 경우 다른 물질에 비해 형광이 약하게 나타났다. 또한 Fig. 5(a)와 동일한 조건에서 물질이 전이되는 위치를 Fig. 5(b)처럼 윗줄과 아랫줄을 반대로 바꿔서 전이를 시킨 결과 위치가 바뀌어도 ①, ②의 형광이 약하게 나타나는 것을 볼 수 있었다. (a)와 (b)의 형광이미지로 볼 때 각각의 물질이 상대적으로 형광 강도의 차이가 나타나기는 하였지만 형광이 발현하는 것을 통하여 한 기판 위에 물질이 전이되었음을 확인할 수 있었다.

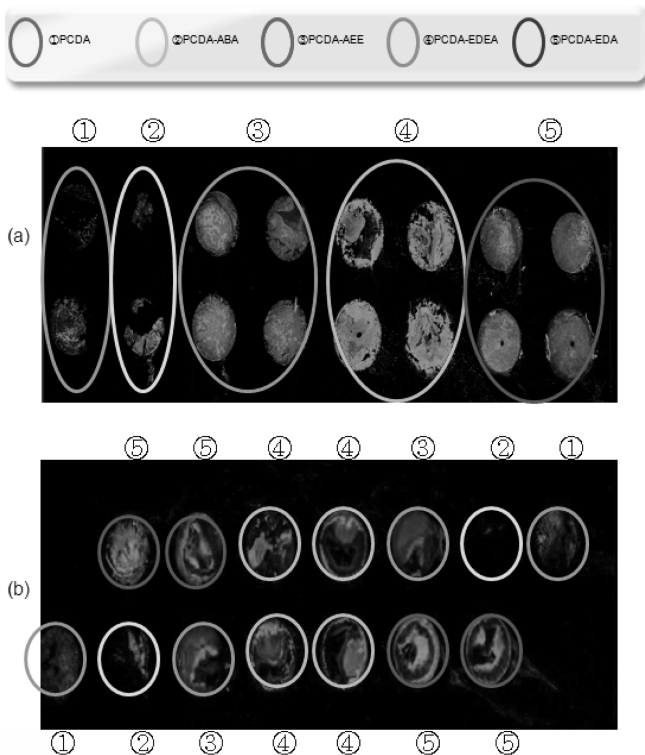


Fig. 5. Fluorescence image of mini-arrays LS film on various PDAs.

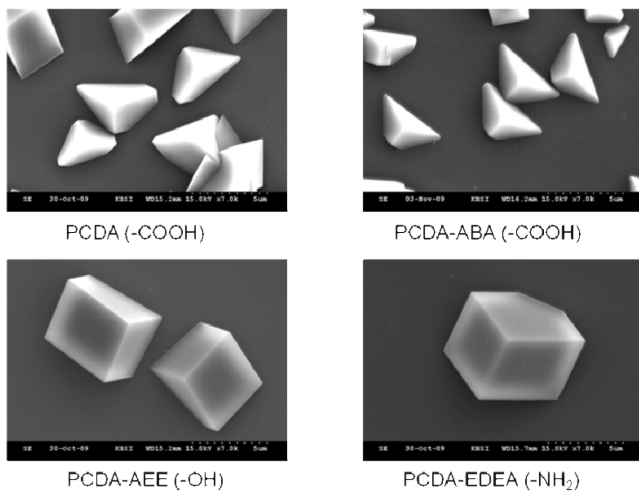


Fig. 6. FE-SEM image of biomineralization.

3-2. 기능성 박막 위의 결정성장

FTIR과 형광이미지를 통해 기능성 박막의 형성을 확인한 후, 기체 확산 방법을 거쳐 성장시킨 탄산칼슘 결정을 FE-SEM을 통하여 확인할 수 있었다. Fig. 6은 자연계에서 가장 안전한 calcite가 전이된 PDA 기판에 형성되었음을 보여준다. 기능기가 (-COOH)이면서 길이가 다른 PCDA, PCDA-ABA에서는 탄산칼슘 결정이 (012)결정 구조를 가지는 것을 볼 수 있고 기능기가 (-OH)로 끝나는 PCDA-AEE의 경우 (104)결정, (-NH₂)로 끝나는 PCDA-EDEA의 경우에 (1012) 결정면을 가지는 것을 볼 수 있다. 이러한 결과는 기존에 발표된 박막 위의 결정의 구조와 일치하는 것으로서, 한 기판 위에 다양한 기능성 박막이 형성되었다는 것을 보여준다.

4. 결 론

본 연구에서는 FTIR 스펙트럼과 형광을 관찰하여 OTS기판 위에 PDAs의 전이 여부를 확인하였다. PDAs의 전이를 확인하고 그 위에 탄산칼슘 결정을 성장시킨 결과 기존에 발표된 Langmuir though을 이용한 LS film과 LB film 위에서의 결정성장결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

지금까지는 한번에 하나의 기능기만을 가진 박막을 형성할 수 있었다. 하지만 이번 실험 결과를 통하여 한 기판에 여러 가지 기능기를 가진 박막을 동시에 형성시킬 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 PDA 단량체의 한쪽 말단에 새로운 기능기를 도입하여 기능기의 수를 늘리거나 array의 모양을 바꾸어가며 실험을 진행할 수 있다. 이를 통하여 결정화 과정의 제어와 다양한 기능기 표면에서의 무기물 결정을 한번에 성장시킬 수 있는 장점을 이용하면 지금까지 이루어진 생체 유도 결정화에 대한 연구결과들을 한자리에 모음으로써 생체 유도 결정화에 대한 라이브러리로서를 구축할 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

이 논문은 대한민국 정부(교육과학기술부)의 재원으로 시행하는 한국연구재단 국제협력사업(2007-00701)과 기초연구사업(2010-0016641)의 지원으로 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

- Lowenstam, H. A. and Weiner, S., On Biomimicry, Oxford Univ. Press, New York(1989).
- Fendler, J. H., *Membrane Mimetic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York(1982).
- Mann, S., Archibald, D. D., Didymus, J. M., Douglas, T., Heywood, B. R., Meldrum, F. C. and Reeves, N. J., "Crystallization at Inorganic-organic Interfaces: Biomimetics and Biomimetic Synthesis," *Science*, **261**, 1286-1292(1993).
- Ahn, D. J., Berman, A. and Charych, D., "Probing the Dynamics of Template-Directed Calcite Crystallization with in Situ FTIR," *J. Phys. Chem.*, **100**, 12455-12461(1996).
- Berman, A., Ahn, D. J., Lio, A., Salmeron, M., Reichert, A. and Charych, D., "Total Alignment of Calcite at Acidic Polydiacetylene Films: Cooperativity at the Organanic-Inorganic Interface," *Science*, **269**, 515-518(1995).
- Rajam, S., Heywood, B. R., Walker, J. B. A. and Mann, S., "Oriented Crystallization of CaCO₃ under Compressed Monolayers. Part2. Morphological Studies of Mature Crystals," *J. Chem. Soc. FARADAY TRANS.*, **87**, 727-734(1991).
- Mellow, L. W., *Acomprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry*, Longmans, London(1956).
- Kim, T. S. and Crooks, R. M., "Polymeric Self-assembling Monolayers. 1. Synthesis and Characterization of ω -functionalized n-alkanethiols Containing a Conjugated Diacetylene Group," *Tetrahedron Letter*, **35**, 9501-9504(1994).
- Cheng, Q. and Stevens, R. C., "Coupling of an Induced Fit Enzyme to Polydiacetylene Thin Films: Colorimetric Detection of Glucose," *Adv. Mater.*, **9**, 481-483(1997).

10. Charych, D. H., Cheng, Q., Reichert, A., Kuziemko, G., Stroh, M., Nagy, J. O., Spevak, W. and Stevens, R. C., "A Litmus Test for Molecular Recognition Using Artificial Membranes," *Chem. Biol.*, **3**, 113-120(1996).
11. Jonas, U., Shah, K., Norvez, S. and Charych, D. H., "Reversible Color Switching and Unusual Solution Polymerization of Hydrazide-Modified Diacetylene Lipids," *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4580-4588 (1990).
12. Yamauchi, J., Yamaoka, A., Ikemoto, K. and Matsui, T., "Graft Copolymerization of Methyl Methacrylate onto Polypropylene Oxidized with Ozone," *J. Appl. Polym. Sci.*, **43**, 1197-1203(1991).
13. Karlsson, J. O. and Gatenholm, P., "Preparation and Characterization of Cellulose-supported HEMA Hydrogels," *Polymer*, **38**, 4727-4731(1997).
14. Dasgupta, S., "Surface Modification of Polyolefins for Hydrophilicity and Bondability: Ozonization and Grafting Hydrophilic Monomers on Ozonized Polyolefins," *J. Appl. Polym. Sci.*, **41**, 233-248(1990).
15. Aizenberg, J., Black, A. J. and Whitesides, G. M., "Oriented Growth of Calcite Controlled by Self-Assembled Monolayers of Functionalized Alkanethiols Supported on Gold and Silver," *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4500-4509(1999).
16. Exarhos, G. J., Risen, W. M. and Bauhman, R. H., "Resonance Raman Study of the Thermochromic Phase Transition of a Polydiacetylene," *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 481-487(1976).
17. Spevak, W., Nagy, J. O., Charych, D. H., Schaefer, M. E., Gilbert, J. H. and Bednarski, M. D., "Polymerized liposomes Containing C-Glycosides of Sialic Acid: Potent Inhibitors of Influenza Virus in vitro Infectivity," *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1146-1147(1993).
18. Reichert, A., Nagy, J. O., Spevak, W. and Charych, D. H., "Polydiacetylene liposomes Functionalized with Sialic Acid Bind and Colorimetrically Detect Influenza Virus," *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 829-830(1995).
19. Pan, J. J. and Charych, D. H., "Molecular Recognition and Colorimetric Detection of Cholera Toxin by Poly(Diacetylene) liposomes Incorporating G(M1) Ganglioside," *Langmuir*, **13**, 1365-1367 (1997).
20. Chance, R. R., "Chromism in Poldiacetylene Solutions and Crystals," *Macromolecules*, **13**, 396-398(1980).
21. Chu, B. and Xu, R., "Chromatic Transition of Polydiacetylene in Solution," *Chem. Res.*, **24**, 384-389(1991).
22. Rubner, M. F., "Novel Optical Properties of Polyurethane-Diacetylene Segmented Copolymers," *Macromolecules*, **19**, 2129-2138 (1986).
23. Tashiro, K., Nishimura, H. and Kobayashi, M., "First Success in Direct Analysis of Microscopic Derformation Mechanism of Polydiacetylene Sing Crystal by the X-ray Imaging-Plate System," *Macromolecules*, **29**, 8188-8196(1996).
24. Kim, J. M., Lee, J. S., Choi, H., Sohn, D. W. and Ahn, D. J., "Rational Design and in-Situ FTIR Analyses of Colorimetrically Reversible Polydiacetylene Supramolecules," *Macromolecules*, **38**, 9366-9376(2005).