

폴리다이아세틸렌 베시클을 이용한 킬레이트제의 색전이 검출

박무경 · 김경우 · 안동준 · 오민규[†]

고려대학교 화공생명공학과
136-713 서울시 성북구 안암동 5가
(2010년 11월 10일 접수, 2010년 12월 27일 채택)

Colorimetric Detection of Chelating Agents Using Polydiacetylene Vesicles

Moo-Kyung Park, Kyung-Woo Kim, Dong June Ahn and Min-Kyu Oh[†]

Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, 5-ga, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-713, Korea
(Received 10 November 2010; accepted 27 December 2010)

요 약

본 연구에서는 폴리다이아세틸렌(polydiacetylene, PDA) 베시클을 이용하여 여러 가지 킬레이트제(chelating agent)를 쉽게 검출할 수 있는 센서 시스템을 개발하였다. 다른 센서들과 비교하여 PDA기반 센서는 많은 장점이 있다. 첫째로, 형광물질의 부착이 필요 없는 무표지 검출(label-free detection)이 가능하여 실험 절차가 간단하고 빠르다. 둘째로, PDA는 청색에서 외부 자극에 의해 적색으로 변화하는 색전이를 일으키므로 육안으로 쉽게 검출을 확인할 수 있었다. 끝으로, 특정 파장에서의 colorimetric response를 측정하여 각각의 킬레이트제의 농도에 따른 정량검출도 가능하다. 본 연구에서는 5가지 종류의 킬레이트제, 즉 EDTA, EGTA, NTA, DCTA, DTPA를 PDA 베시클과 반응시켰으며, 이 중에서 EDTA, DCTA는 특히 강한 반응으로 PDA의 색전이를 유도함을 알 수 있었다. 본 연구를 통하여 PDA 베시클을 사용하여 어떠한 기계나 동력을 사용하지 않고 색전이를 이용하여 킬레이트를 성공적으로 검출할 수 있음을 보여주었다.

Abstract – In this research, we developed a sensor system which can easily detect several chelating agents using polydiacetylene(PDA) vesicles. In comparison to other sensors, PDA based sensor has several advantages. First, detection method is much simpler and faster because it does not require any labeling step in the experiment procedure. Second, significant color-transition from blue to red based upon external stimulus allows us the detection by naked eyes. Finally, it is also possible to perform quantitative analysis of the concentration of the chelating agent by measuring the colorimetric response. In this paper, five types of chelating agents were used, including EDTA, EGTA, NTA, DCTA and DTPA. Among them, EDTA and DCTA triggered especially strong color-transition. In conclusion, this study has led to a successful development of a color transition-based PDA sensor system for easy and rapid detection of chelating agents.

Key words: Label-Free, Sensor, Polydiacetylene, Colorimetric Detection, Chelating Agent

1. 서 론

센서는 화학적, 생물학적 요소를 이용하여 측정 대상물의 정보를 색, 형광, 전기적 신호 등과 같은 인식 가능한 신호로 변환시켜 인간의 판단을 가능하게 한다. 이러한 센서 시스템은 의학적 진단, 약학, 식품 안전성 검사, 약품 분석, 환경 감시 등과 같은 여러 분야에 적용되어 사용되고 있다. 최근에 폴리다이아세틸렌(이하 PDA)은 화학 및 바이오 센서로서 많은 연구가 진행되어 왔다.

PDA는 수용액 상태에서 이중층을 지니는 리포솜(liposome)의 형태의 안정적인 구조를 형성하게 되며 이를 폴리다이아세틸렌 베시클(PDA vesicle)이라고 칭한다. PDA가 센서소재로서 많은 관심을 이

끌게 된 가장 큰 이유는 이 구조가 외부적 자극에 의한 푸른색에서 붉은색으로 색전이 현상을 보여주기 때문이다[1]. 이러한 특성을 이용하면 PDA 베시클 표면의 작용기를 이용하거나 특이적 말단 작용기를 부착하여 다양한 센서로서의 사용이 용이하게 된다[2].

10,12-pentacosadiynoic acid(PCDA)와 같은 다이아세틸렌 단량체들은 수용액상에서 비극성결합에 의해 충분히 가까운 거리를 유지하게 된다. 이 때 254 nm의 자외선 노광 하에서 삼중 결합이 이중 결합으로 바뀌며 다른 단량체들과 고분자 주쇄(backbone)의 특정부분들이 결합을 하여 고분자화(polymerization) 된다[3-8]. 자외선을 노광하기 전 무색인 PDA는 고분자화 후 최대흡수파장이 640 nm인 청색을 띄게 된다. 온도, pH, 용매, 분자 인식 등 외부적인 자극에 의하여 최대흡수파장이 540 nm인 적색으로 색전이가 일어난다[9,10]. 이러한 독특한 특징을 갖는 PDA를 기반으로한 센서 시스템은 다양한 대상물을 검출하는데 적용되어 왔다. 인플루엔자 바이러스를 시작으

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

[‡]이 논문은 고려대학교 홍석인 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

로 양이온, 단백질, 미생물 독소, 박테리아(bacteria), DNA, 글루코스(glucose), 지질다당체, 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 등이 있다[11-19].

또한, 본 실험실의 선행연구에서 인지질 성분의 1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-phosphocholine(DMPC)를 PDA 베시클 합성 시 첨가하면 검출에 필요한 반응시간을 줄일 수 있음이 알려진 바 있다. FT-IR spectrometer의 분석 결과를 통해 베시클내의 수소결합들이 약해지면서, 외부 자극에 대한 전달이 좀 더 신속하게 이루어져 색전이가 더욱 빠르게 이루어진 것으로 확인하였다[20].

본 연구에서 검출 대상인 킬레이트제는 공업용, 식품용 및 환경적인 측면 등 광범위한 수요를 갖는 물질이다. 물에 함유된 금속이온에 의해 발생하는 다양한 문제들을 미연에 방지하기 위해 사용되므로 물을 취급하는 곳에서는 반드시 킬레이트제를 사용한다. 최근에는 킬레이트제를 이용한 생산공정을 통해 물의 품질을 향상시키고자 하는 수요가 늘고 있다. 뿐만 아니라 식품이 변질되는 것을 막기 위한 산화방지제로 사용되는데 섭취 허용량을 넘어서는 경우 인체에 해를 끼칠 수 있고 중금속 오염이나 생물 성장이 영향을 받을 수 있는 유해한 환경의 개선에도 사용된다[21,22]. 따라서 본 연구에서는 PDA를 기반으로 하는 킬레이트제 센서 시스템을 구축하여 다양한 킬레이트제를 보다 간단한 방법으로 쉽게 육안식별이 가능한 색전이 검출을 가능하게 하고자 하였다.

2. 실험

2-1. 재료 및 시약

PDA를 합성하기 위해서 Fluka사의 10,12-pentacosadiynoic acid(PCDA)와 Sigma-Aldrich사의 1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-phosphocholine(DMPC)를 사용하였다. 본 실험에 사용된 킬레이트제인 Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), Ethyleneglycoltetraacetic acid(EGTA), Nitrilotriacetic acid(NTA), Diethylenetriaminepentaacetic acid(DTPA), Diaminocyclohexanedinitrilotetraacetic acid(DCTA)는 Sigma-Aldrich사의 제품을 사용하였다. 이렇게 준비된 킬레이트제는 증류수(DI-water)에 녹여서 사용하였고 NaOH를 이용하여 pH 8로 조정하였다. 검출 대상인 킬레이트제는 Fig. 1에 나타내었다.

2-2. PDA 베시클의 제조

본 실험에서는 PCDA와 DMPC를 7:3의 비율로 사용하여 제조하였다. PCDA(13.11 mg)와 DMPC(10.17 mg)를 클로로포름 3 ml에 녹인 후 purging을 하기 위해 질소가스(N₂)를 사용하였다. 리포솜의 최종농도를 1 mM로 만들기 위해 증류수를 첨가하였고 80 °C 항온

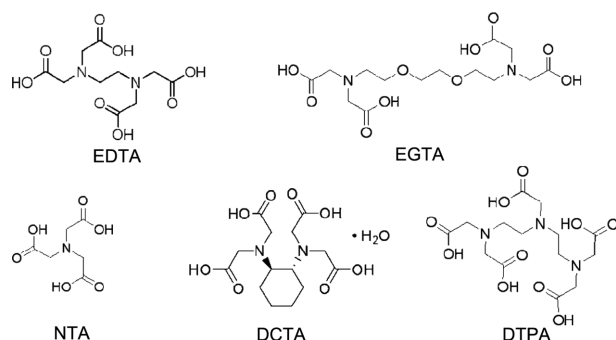


Fig. 1. The structures of Chelating agents used in this study.

조 안에서 15분 동안 교반시켰다. 이 과정이 끝난 용액을 microtip probe sonicator(Bandelin, Germany)를 이용하여 15~17%의 강도(550 W)로 15분간 초음파 분해(sonication)를 시켜주고 0.8 μm의 필터로 여과시켰다. 완성된 최종 용액은 4 °C에서 12시간 이상 냉장 보관하였다.

2-3. 킬레이트제의 검출 및 분석

제조된 PDA 베시클은 모두 동일하게 254 nm(1 mW/cm²)의 자외선을 7분간 노광하여 고분자화를 시켜주었다. 고분자화된 0.8 ml의 용액에 각각 0.2 ml의 킬레이트제를 첨가하여 전체볼륨을 1 ml로 맞추었다. 각 킬레이트제의 검출 정도를 비교하기 위해 특정농도에서 30분간 반응시켜 이를 분석하였다. 그 외에 추가적으로 각 개별 물질마다 다양한 농도(0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mM)에 따른 자극의 영향을 알아보기 위해 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다.

PDA 베시클이 킬레이트제의 영향으로 색전이를 일으키는 특성을 확인하기 위해 UV-Vis spectroscopy(UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 540 nm(적색)와 640 nm(청색)에서의 흡광도를 측정하고 이를 colorimetric response(CR) 방정식으로 계산하였다. 모든 측정은 10 mm의 optical light path cuvettes(Kartell, Italy)를 사용하였다. 독립적인 실험을 반복하여 표준편차를 표시하였고 그 평균값을 기준으로 오차막대를 나타내었다. 또한, 전체적인 spectroscopic response의 변화를 확인하기 위해 파장 400~800 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 토론

3-1. 킬레이트제의 색전이 비교 분석

본 실험에서 사용된 대조군은 증류수에 NaOH를 첨가하여 pH 8로 조정하여 사용하였다. PDA 베시클에 영향을 주는 것이 pH에 의한 것이 아닌 킬레이트제라는 것을 증명하기 위해서 실험군과 동일한 pH로 대조군을 설정하였다. Fig. 2는 상온에서 각 100 mM의 용액을 30분 동안 반응시킨 결과를 나타내었다. Fig. 2(a)는 색전이 정도를 정량화 하기 위해서 CR 방정식으로 계산된 결과를 나타내었다. 선행연구에서 많이 사용한 바 있는 CR 방정식은 외부자극을 받기 전(PB₀)의 고분자화 상태에서 540 nm(적색의 파장)와 640 nm(청색의 파장)에서 흡광도를 측정하고 외부자극을 받은 후에 동일한 두 파장에서 흡광도를 측정하여 계산한다. 사용된 공식은 다음과 같다[23,24].

$$CR(\%) = \left[\frac{(PB_0 - PB_1)}{PB_0} \right] \times 100$$

$$PB = A_{640nm} / (A_{640nm} + A_{540nm})$$

CR값이 높다는 것은 청색에서 적색으로 색전이가 더 많이 일어났다는 것을 뜻한다[25]. Fig. 2(a)에는 대조군은 반응에 의한 색변화 없이 희석효과 만을 내기 때문에 CR값이 음수값으로 나옴을 확인하였다. 반면에 EDTA를 넣은 샘플에서는 CR의 평균값은 28.43%로 가장 높은 값을 나타내었다. 선행연구에 따르면 CR값이 10% 이상이면 쉽게 사람이 직접 눈으로 식별이 가능하다고 하였다[26]. NTA(15.77%)와 DCTA(16.63%)도 마찬가지로 눈으로 식별이 용이했고 DTPA(9.17%)와 EGTA(8.57%) 또한 10%에 조금 미치지 못한 수치이지만 자극이 전달되어 색변화가 일어났음을 확인할 수 있었다.

Fig. 2(b)는 파장 400~800 nm의 구간에서의 흡광도를 나타낸 것으로 CR값이 높게 나온 물질일수록 640 nm의 흡광도는 줄어들고 540 nm

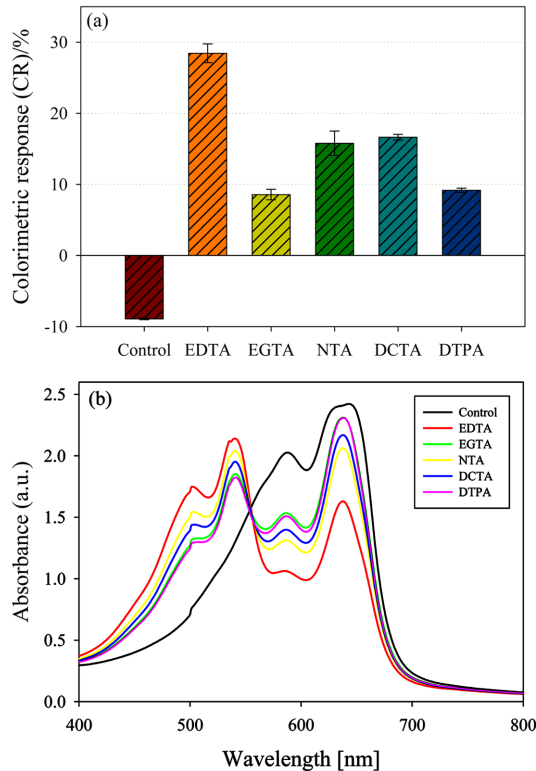


Fig. 2. The colorimetric responses (CR) of PDA sensor after incubation with 100 mM chelating agents at room temperature for 30 min (a) and their spectroscopic responses (b).

에서의 흡광도가 높아진 것을 확인할 수 있었다. 대조군의 경우에는 540 nm에서의 흡광도는 변화를 보이지 않고 640 nm에서만 높은 흡광도를 보이는 것을 확인하였다.

3-2. 킬레이트제의 정량검출과 분석

Fig. 3은 대조군부터 500 mM까지의 킬레이트제의 다양한 농도에 따른 PDA 색전이를 나타내었다. 앞의 실험과 동일한 방식으로 진행되었고 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. Fig. 3(a)는 가장 색전이 뚜렷하게 나타난 EDTA의 농도 변화에 따른 색전이 양상을 보여준다. 사진에서와 같이 EDTA에 의한 색전이는 육안으로도 쉽게 확인할 수 있었으며, 육안에 의한 색전이 검출한계(LOD)는 약 10 mM로 평가되었다.

Fig. 3(b)는 각각의 킬레이트제를 다양한 농도에서의 CR값을 이용해 도식화한 그래프이다. EDTA는 다른 킬레이트제에 비해 낮은 농도에서도 검출이 가능하였고 상대적으로 높은 CR값을 보여주었다. 농도가 높아짐에 따라 EDTA와 DCTA는 특히 강한 반응으로 PDA의 색전이를 유도했다. CR값을 기준으로 한 검출한계는 EDTA의 경우는 10 mM, DCTA와 NTA는 25 mM, EGTA와 DTPA는 50 mM로 평가되었다.

PDA의 색전이 현상에 대한 메커니즘(mechanism)은 아직 완전하게 밝혀지지 않았지만 이는 반응물이 폴리머(polymer) 주쇄에 주는 압력이 π -conjugated 폴리머 시스템의 전자 구조에 변화를 주어 색전이가 유도된다고 알려져 있다[27]. 본 실험에 사용된 킬레이트제 중 특히 EDTA와 DCTA는 분자구조가 가장 비슷하다. EDTA와 DCTA는 질소 원자사이에 2개 탄소가 연결되어 있으며, DCTA 이 두개의 탄소가 cyclohexane 링에 포함되어 있다는 점만 다르다. 따라서, 이 구조가 PDA의 단량체들과 가장 큰 반응성을 보인다고 추

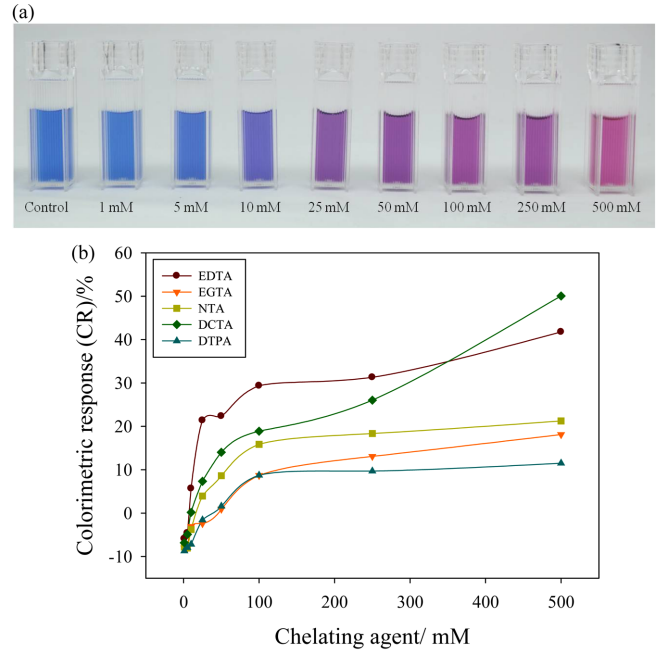


Fig. 3. Color transition of PDA sensor after 1 hr incubation with EDTA at various concentrations (a) and the colorimetric response as a function of concentrations of five chelating agents (b).

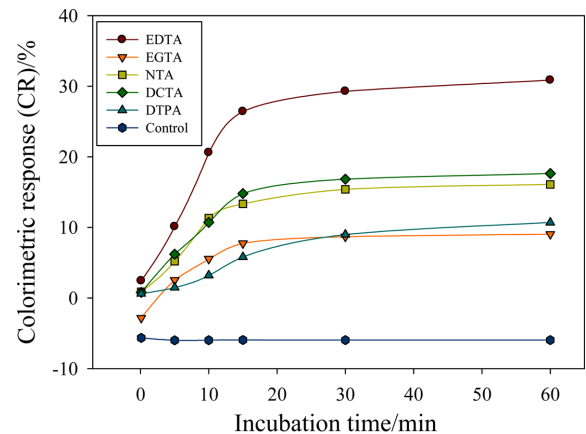


Fig. 4. The colorimetric response as a function of incubation time in the presence of chelating agents (100 mM) at room temperature.

측할 수 있다. 하지만, 비슷한 구조를 가진 DTPA의 경우 그 색전이가 이들보다 훨씬 낮았으며, 따라서 색전이를 일으키는 자극에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

Fig. 4는 각각의 킬레이트제 100 mM의 농도에 반응시간에 따른 CR값을 계산해 도식화한 그래프이다. 반응은 상온에서 이루어졌고 0, 5, 10, 15, 30, 60분에서 측정하였다. 여기서 말하는 0분은 반응을 시작하자마자 최대한 빠르게 측정했을 때의 값을 말한다. 대조군은 60분까지 반응시켜도 아무런 자극이 가지 않는 것을 확인할 수 있었다. 그 외의 모든 킬레이트제의 결과들은 20분 전후에서 최고값에 도달하는 것을 보여주는데, 이는 PDA 베시클에 의해 빠르고 손쉬운 검출이 가능하다는 것을 보여준다.

4. 결 론

본 연구에서는 폴리다이아세틸렌 베시클의 색전이 특성을 이용하

여 칼레이트제를 검출하는데 성공하였다. UV-Vis spectroscopy를 이용하여 특정 파장에서의 흡광도를 측정하여 colorimetric response를 계산하였다. 이 방정식을 이용하여 다섯 가지 칼레이트제 마다 정량적인 검출이 가능하였다. 최대흡수파장의 이동도 스펙트럼을 통해 확인하였고 육안으로도 쉽게 농도에 따른 색 변화를 확인할 수 있었다. 이처럼 우리가 구축한 PDA 베시클 기반 칼레이트제 센서는 다른 형광물질의 부착이 필요 없는 무표지 검출(label-free detection)로 실험 방법이 간단하고 빠르며 색전이 검출이 육안으로 가능했으며, 정량검출이 가능하였다. 하지만 칼레이트제가 PDA 베시클에 영향을 주는 정확한 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았으며, 이를 좀 더 보완하는 연구가 진행된다면 앞으로도 더욱 다양한 목적 대상물을 진단하고 검출하는 센서를 개발할 수 있을 것이다.

감 사

이 논문은 2010년도 서울시 산학연 협력사업(10920)과 교육과학기술부 한국연구재단(2010-0016641, 2010-0017825, 2009K001614)의 지원으로 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. Lee, N. Y., Jung, Y. K. and Park, H. G., "On-chip Colorimetric Biosensor Based on Polydiacetylene(PDA) Embedded in Photopolymerized Poly(Ethylene glycol) Diacrylate(PEG-DA) Hydrogel," *Biochem. Eng. J.*, **29**, 103-108(2006).
2. Ahn, D. J. and Kim, J. M., "Fluorogenic Polydiacetylene Supramolecules: Immobilization, Micropatterning, and Application to Label-Free Chemosensors," *Accounts. Chem. Res.*, **41**, 805-816(2008).
3. Jelinek, R. and Kolusheva, S., "Biomolecular Sensing with Colorimetric Vesicles," *Top. Curr. Chem.*, **277**, 155-180(2007).
4. Ji, E. K., Ahn, D. J. and Kim, J. M., "The Fluorescent Polydiacetylene Liposome," *B. Kor. Chem. Soc.*, **24**, 667-670(2003).
5. Kim, J. M., Ji, E. K., Woo, S. M., Lee, H. W. and Ahn, D. J., "Immobilized Polydiacetylene Vesicles on Solid Substrates for Use as Chemosensors," *Adv Mater* **15**, 1118-1121(2003).
6. Lee, S. S., Chae, E. H., Ahn, D. J., Ahn, K. H. and Yeo, J. K., "Shear-Induced Color Transition of PDA (Polydiacetylene) Liposome in Polymeric Solutions," *Korea-Aust Rheol. J.*, **19**, 43-47(2007).
7. Su, Y. L., Li, J. R. and Jiang, L., "A Study on the Interactions of Surfactants with Phospholipid/Polydiacetylene Vesicles in Aqueous Solutions," *Colloid. Surface. A.*, **257-58**, 25-30(2005).
8. Yoon, B., Lee, S. and Kim, J. M., "Recent Conceptual and Technological Advances in Polydiacetylene-Based Supramolecular Chemosensors," *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 1958-1968(2009).
9. Cheng, Q. and Stevens, R. C., "Charge-Induced Chromatic Transition of Amino Acid-Derivatized Polydiacetylene Liposomes," *Langmuir*, **14**, 1974-1976(1998).
10. Jung, Y. K., Park, H. G. and Kim, J. M., "Polydiacetylene (PDA)-Based Colorimetric Detection of Biotin-Streptavidin Interactions," *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1536-1544(2006).
11. Ahn, D. J., Chae, E. H., Lee, G. S., Shim, H. Y., Chang, T. E., Ahn, K. D. and Kim, J. M., "Colorimetric Reversibility of Polydiacetylene Supramolecules Having Enhanced Hydrogen-Bonding under Thermal and pH Stimuli," *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8976-8977(2003).
12. Chen, X. Q., Lee, J., Jou, M. J., Kim, J. M. and Yoon, J., "Colorimetric and Fluorometric Detection of Cationic Surfactants Based on Conjugated Polydiacetylene Supramolecules," *Chem Commun*, **23**, 3434-3436(2009).
13. Jung, Y. K., Kim, T. W., Kim, J., Kim, J. M. and Park, H. G., "Universal Colorimetric Detection of Nucleic Acids Based on Polydiacetylene(PDA) Liposomes," *Adv. Funct. Mater.*, **18**, 701-708(2008).
14. Kim, J. M., Lee, J. S., Lee, J. S., Woo, S. Y. and Ahn, D. J., "Unique Effects of Cyclodextrins on the Formation and Colorimetric Transition of Polydiacetylene Vesicles," *Macromol Chem Phys* **206**, 2299-2306(2005).
15. Lee, J., Jun, H. and Kim, J., "Polydiacetylene-Liposome Microarrays for Selective and Sensitive Mercury(II) Detection," *Adv Mater* **21**, 3674-3677(2009).
16. Lee, J., Kim, H. J. and Kim, J., "Polydiacetylene Liposome Arrays for Selective Potassium Detection," *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 5010-5011(2008).
17. Pan, J. J. and Charych, D., "Molecular Recognition and Colorimetric Detection of Cholera Toxin by Poly(Diacetylene) Liposomes Incorporating G(M1) Ganglioside," *Langmuir* **13**, 1365-1367(1997).
18. Rangin, M. and Basu, A., "Lipopolysaccharide Identification with Functionalized Polydiacetylene Liposome Sensors," *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 5038-5039(2004).
19. Ryu, S., Yoo, I., Song, S., Yoon, B. and Kim, J. M., "A Thermoresponsive Fluorogenic Conjugated Polymer for a Temperature Sensor in Microfluidic Devices," *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3800-3801(2009).
20. Kim, K. W., Choi, H., Lee, G. S., Ahn, D. J. and Oh, M. K., "Effect of Phospholipid Insertion on Arrayed Polydiacetylene Biosensors," *Colloids Surf B Biointerfaces* **66**, 213-217(2008).
21. Kennedy, K. J., Andras, E., Elliott, C. M. and Methven, B., "Effect of a Chelating Agent (DTPA) on Anaerobic Waste-Water Treatment in an Upflow Sludge Blanket Filter," *Can. J. Civil. Eng.*, **18**, 53-57(1991).
22. Dubrovskii, I. Y., Tretyakov, Y. M., Loshkarev, V. A., Batalina, L. N. and Bulavko, A. Y., "Effect of Adding Chelating Agent on Behavior of Water under Supercritical Conditions in Contact with Magnetite," *Therm Eng.*, **25**, 68-69(1978).
23. Jung, Y., Kim, T., Park, H. and Soh, H., "Specific Colorimetric Detection of Proteins Using Bidentate Aptamer Conjugated Polydiacetylene (PDA) Liposomes," *Adv. Funct. Mater.*, **20**, 3092-3097(2010).
24. Xia, Y. T., Deng, J. L. and Jiang, L., "Simple and Highly Sensitive Detection of Hepatotoxin Microcystin-Lr via Colorimetric Variation Based on Polydiacetylene Vesicles," *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **145**, 713-719(2010).
25. Seo, D. and Kim, J., "Effect of the Molecular Size of Analytes on Polydiacetylene Chromism," *Adv. Funct. Mater.*, **20**, 1397-1403(2010).
26. Su, Y., Li, J. and Jiang, L., "Effect of Amphiphilic Molecules upon Chromatic Transitions of Polydiacetylene Vesicles in Aqueous Solutions," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **39**, 113-118(2004).
27. Ahn, D. J., Lee, S. and Kim, J. M., "Rational Design of Conjugated Polymer Supramolecules with Tunable Colorimetric Responses," *Adv. Funct. Mater.*, **19**, 1483-1496(2009).