

반응성 염료를 이용한 2가 전이금속 측정용 광센서

김성배 · 이혁진 · 김진목 · 신두순* · 차근식 · 남학현

광운대학교 이과대학 화학과

*고려대학교 이과대학 화학과

(1998. 5. 7 접수)

An Optochemical Sensor for the Determination of Divalent Transition Metal Ions Based on a Reactive Dye

Sung Bae Kim, Hyuk Jin Lee, Jin Mog Kim, Doo Soon Shin*, Geun Sig Cha and Hakhyun Nam

Department of Chemistry, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea

*Department of Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received May 7, 1998)

요 약: 아민기를 함유한 Eriochrome Black T 유사체 염료에 cynaunic chloride를 반응시켜 합성한 반응성 염료를 셀룰로오스 막(cellulose membrane)에 화학적으로 고정시켜서 2가 전이금속을 검출할 수 있는 광센서를 구성하였다. 이 광센서는 용액상 Eriochrome Black T와 마찬가지로 전이금속의 농도에 민감하게 감응한다. 이 광센서는 대표적으로 Zn^{2+} 와 Co^{2+} 에 대해서 각각 6.3×10^{-5} mol/l와 2.5×10^{-4} mol/l의 검출한계를 나타냈다. 이 광센서는 또한 흐름용액의 pH가 계속해서 변하는 조건하에서도 상당 시간 동안 그 감응성이 감소하지 않았다.

Abstract: A reactive dye synthesized with an amine containing Eriochrome Black T derivative and cynaunic chloride was immobilized on a cellulose membrane to construct an optical sensor for the detection of divalent transition metal ions in aqueous solution. The response of this reactive dye-based optical sensor was as sensitive as that of Eriochrome Black T in solution phase. Its typical detection limits for Zn^{2+} and Co^{2+} were 6.3×10^{-5} mol/l and 2.5×10^{-4} mol/l, respectively. No loss in the sensitivity of reactive dye-based sensor was observed even the pH of flowing solutions continually varied for an extended period of time.

Key words: optical sensor, optode, reactive dye, cellulose membrane, Eriochrome Black T

1. 서 론

최근 고분자 지지체에 특정 분자나 이온을 인식하면 광학적 특성이 뚜렷하게 변하는 화합물을 고정시켜 흡광, 형광 또는 화학적 발광의 세기 정도를 측정할 수 있는 광센서에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.^{1,2} 이러한 광센서는 각종 전기화학적 센서나 이온선택성 막전극(ion selective membrane electrode; ISME)에 비해서, 기준전극이 불필요하여 소형화에 유리하고 값이 싸며, 검출이 빛에 의한 신호로 나타나므로 전기적 잡음에 무관할 뿐만 아니라 광섬유 등을 이

용하여 손쉽게 원격 분석에 응용할 수 있다는 장점이 있다.^{2,3} 그러나 이러한 광센서는 일반적으로 pH의 영향 및 다른 이온들의 방해작용을 크게 받는 경향이 있으며, 고분자 지지체에 고정시킨 감응물질이 쉽게 빠져 나오기 때문에 수명이 짧다는 단점이 있다.^{4,5}

고분자 지지체에 감응물질을 고정시키는 방법은 감응물질 분자와 지지체간의 정전기적 결합,^{2,6,7} 수소결합, 반데르발스 결합, 흡착, 혹은 물리적 유지(physical trapping)² 등 비특정적 결합(non-specific bonding)의 약한 결합에 의존하였다. 그러나 최근에는 고분자의 수산기 또는 아미노기를 화학적 활성이 큰 반

응기와 공유결합을 시키는 방법이 깊이 연구되고 있다.^{8,9} 여기서 감응물질 분자에 염화트리아진, 수산화에틸솔폰기 또는 에폭시기 등을 도입하여 지지체의 수산기 또는 아미노기와 쉽게 화학반응을 일으켜 결합할 수 있게 만드는 방법은 반응성 염료의 제조법에서 널리 사용하는 방법이다.¹ 또한 반응성 지시약을 도입하는 방법으로 cyanuric chloride를 이용하여 교차결합(cross-linkage)등의 고정화 방법으로 중금속 등에 감응성이 있는 센서를 구성할 수 있다는 사실이 알려져 있다.^{3,8,9,10} 막의 지지체로 셀룰로오스를 사용한 광센서의 경우에 센 산과 센 염기에도 센서의 광학적 성질이 변화되지 않기 때문에¹¹ 안정한 센서를 구성하기에 적합한 지지체로 고려할 수 있다. 일반적으로 반응성 염료로 염색된 친은 특정 공유결합(specific covalent bonding)이 형성되어 반복적인 세척 및 일광 노출에 대하여 안정성이 대단히 높은 것으로 알려져 있다. 만일 반응성 염료와 유사한 구조를 가진 감응물질 분자를 수산기가 함유된 셀룰로오스와 같은 지지체에 결합시킬 수 있다면 종래의 광센서들에 비하여 수명 및 감응 안정성이 대단히 향상된 광센서의 제작이 가능할 것으로 추정할 수 있다.

위에 언급한 사실들에 근거하여 본 연구에서는 2가 양이온에 선택적인 것으로 믿어지는 반응성 염료를 합성하고 이 염료를 cyanuric chloride를 사용하여 셀룰로오스 막(cellulose membrane)에 안정한 공유결합을 시키는 새로운 방법을 시도하였다. 이를 통하여 기존의 광센서의 장점이외에 막의 표면으로부터 이온 선택성 물질이나 발색물질이 빠져나오는 문제들을 해결함으로써 막의 수명을 크게 연장시키고, 기존의 광센서나 이온선택성 전극으로 측정하기 어려웠던 2가 전이금속들에 대한 감응성을 조사하였다.

2. 실험

2.1. 분석기기 및 장치

본 실험에서는 센서가 빨리 평형에 도달하게 하고, 광센서를 일정한 환경에서 측정하기 위하여 Fig. 1과 같은 형태의 흐름계(flowing system)를 구성하고 이를 다중이송연동펌프(multi-channel peristaltic pump; Cole-Parmer Instrument Co., No. L-07331-00)와 연결하여 실험하였다. 또한 각 pH와 전이금속 양이온들의 농도별 흡광도의 변화는 Shimadzu사의 UV-Vis.

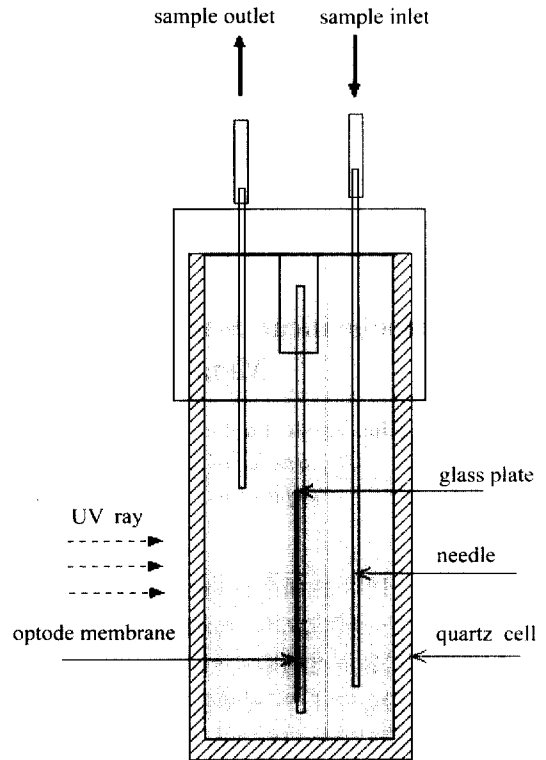


Fig. 1. The flow cell used in this experiment to measure the absorbance changes of optode membranes.

spectrophotometer(model: UV-240)를 사용하여 기록하였다.

2.2. 시 약

반응성 염료의 합성에 사용된 1-diazo-2-naphthol-6-nitro-4-sulfonic acid, 1-amino-4-hydroxy-6-naphthalene-sulfonic acid (J-acid), cyanuric chloride와 분산제인 sunmol은 (주)태흥산업에서 제공받았다. 셀룰로오스 막은 Sigma사에서 구입하였다. 그 밖에 사용된 시약들은 모두 특급시약을 사용하였다. 완충용액은 universal buffer(boric acid 11.4 mM, citric acid 6.7 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM) 및 TRIZMA[®] base buffer를 사용하였으며, HCl로 pH를 조정하여 사용하였다. 모든 시료의 제조에 사용된 물은 $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 의 탈이온화수를 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1 염료의 합성방법

염료합성은 Fig. 2와 같은 과정에 따라 합성하였다.

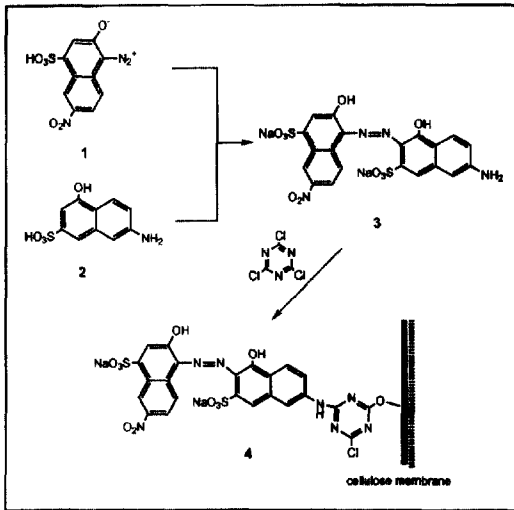


Fig. 2. Synthetic scheme for the *o,o'*-dihydroxy azo compound and its immobilization procedure on a cellulose membranes with cyanuric chloride: 1-diazo-2-naphthol-6-nitro-4-sulfonic acid (1), 1-amino-4-hydroxy-6-sulfonic acid (J-acid) (2), and *o,o'*-dihydroxyazo dye (3).

이를 위하여 비커에 5 ml의 탈이온화수로 1.25 g의 1-diazo-2-naphthol-6-nitro-4-sulfonic acid를 분산시킨 후 20°C를 유지시킨다. 여기에 40% NaOH를 서서히 가하여 pH 4 정도에 이르게 한다. 또다른 비커에 10 ml의 탈이온화수와 함께 J-acid를 0.93 g 넣고, 0.44 g의 NaOH(40%)수용액을 가하여 40°C로 승온시켜 녹인다. 여기에 다시 2 g의 NaCl을 넣고 30°C를 유지시킨다. 위에서 준비한 두 용액을 섞어 diazo coupling 반응을 진행시킨 다음 NaOH(40%)를 사용하여 pH 10을 유지시킨다. 합성된 염료는 silica gel을 충전시킨 컬럼(직경 4 cm×길이 43 cm)에 주입하고 CH₂Cl₂/CH₃OH(4:1 v/v)을 용리액으로 사용하여 분리하였다. 이 과정에서 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography; TLC)의 R_f 값으로 확인한 후 원하는 염료만을 분리하여 실험에 사용하였다. 또한 합성된 염료는 UV/Vis. 스펙트럼의 특징적인 띠(λ_{\max} =650 nm, 염기성 용액)로서 확인할 수 있었다.

2.3.2. 센서의 제조 및 측정방법

셀룰로오스에 반응성 염료를 염색시키기 위하여 탈이온화수에 cyanuric chloride를 넣고 sunmol로 분산시킨 후, 탈이온화수에 미리 수침시켜 두었던 셀룰로오스막을 넣고 약 3시간 가량 교반기 내에서 방치하고 나서 탈이온화수로 셀룰로오스 막을 깨끗이 씻어

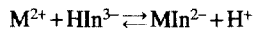
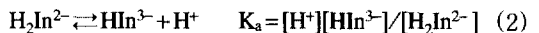
준 다음 미리 합성된 염료를 넣고 24시간 가량 방치하여 염색시킴으로써 해서 2가 전이금속 측정센서를 완성하였다. 염색된 셀룰로오스 막을 0.9 cm×2.5 cm의 슬라이드 글라스에 고착한 후 Fig. 1에 도시한 형태로 자체 제작한 장치에 장착한 다음 실험하였다. 이때, 주입한 시료 용액은 완충용액에 10⁻⁶~10⁻¹ M 범위의 전이금속 이온을 포함한 것들이며, 시료는 연동펌프(peristaltic pump)를 사용하여 대략 4 ml/min.의 흐름 속도로 이송시켰다.

3. 결과 및 고찰

셀룰로오스 막에 공유결합시킨 반응성 염료(또는 지시약 H₂In)는 2가 금속이온의 정량에 사용될 수 있다고 알려져 있는 Eriochrome Black T와 거의 유사한 구조이므로 화학적 감응특성 또한 유사할 것으로 볼 수 있다.¹² 즉, Eriochrome Black T에서와 마찬가지로 2가의 전이 금속(M²⁺)은 셀룰로오스 막의 *o,o'*-dihydroxy azo 화합물(Fig. 2참조)의 두 -OH기 사이에서 수소와 치환반응으로 결합하고 650 nm의 파장에서 현격한 흡광 스펙트럼의 변화를 수반한다. 이때 정규화(normalize)시킨 상대흡광도 α 는 염기성 수용액(pH 9) 중 2가 금속의 양에 대해 다음과 같은 관계식을 만족하게 된다.

$$\alpha = (1 + [H^+]/K_a) / (1 + [H^+]/K_a + [M^{2+}]/K) \quad (1)$$

여기서 K_a 및 K는 다음 평형반응의 평형상수이다.



$$K = [MIn^{2-}][H^+] / [M^{2+}][HIn^{3-}] \quad (3)$$

이 평형반응은 합성된 염료가 4개의 치환가능한 수소를 가지고 있다는 가정 하에서 성립한다. 이 중 2개는 낮은 pH에서 해리되는 술폰산의 수소이온이며, -OH기의 수소들은 대략 6-11정도의 pK_a값을 갖는 것으로 알려져 있다.

Fig. 3(A)는 pH 변화에 따른 셀룰로오스 광센서 막의 흡광도 변화이다. 스펙트럼에서 pH가 증가함에 따라 650 nm에서 흡광도가 증가하며, 540 nm에서는 감소하므로 등흡광점(isobestic point)가 존재한다. 이는 산-염기 반응이 식 (2)에 언급한 2가지 종의 평형 관계에 의존한다는 것을 의미한다. 특히 pH 5~8 사

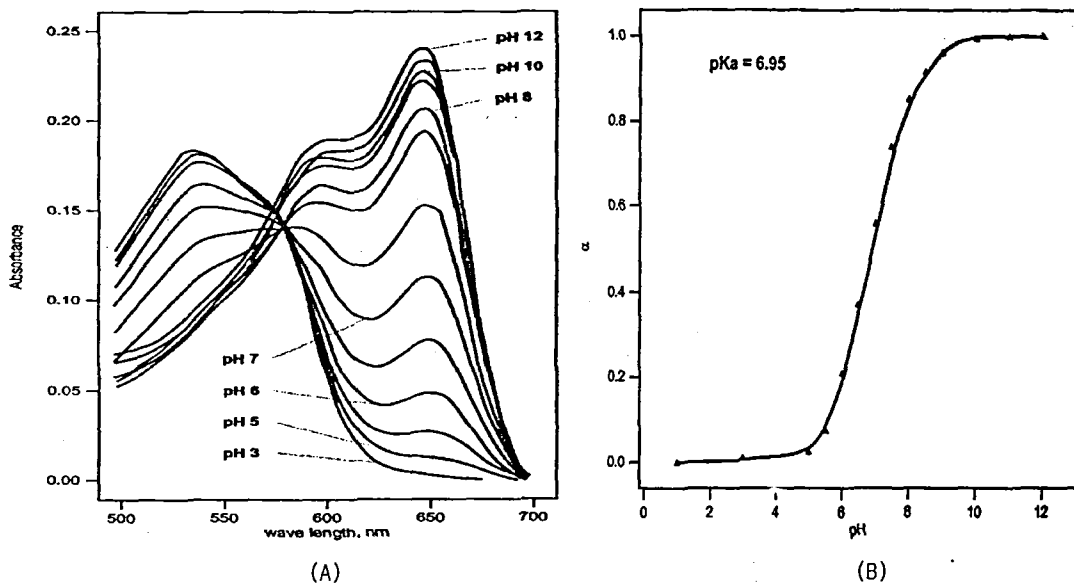


Fig. 3. (A) Absorbance spectra of o,o'-dihydroxyazo dye-based optode with varying pH values. (B) The calibration plots of (A) at 650 nm.

이에서는 급격한 흡광도의 변화를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 실제 중금속 시료를 측정할 때는 시료용액내의 pH를 8이상으로 두고 측정하는 것이 유리하며, 실험과정 중에는 일정한 pH를 유지시킬 필요성이 있음을 알 수 있었다. Fig. 3(B)는 Fig. 3(A)의 스펙트럼에 대한 검정곡선으로서, 식 (2)에서 상대 흡광도 α 가 막에 고정된 전체 지시약 양에 대하여 수소이온을 잃은 지시약의 비와 동일한 것으로 하여 계산한 식에 근거하여 작성한 것이다. 검정곡선을 실험값과 비교하여 맞춤으로써 막에 고정된 지시약의 pK_a 값을 예측할 수 있는데 본 실험에서 합성된 반응성 염료 지시약의 경우는 그 값이 6.95로 얻어졌다.

Fig. 4는 본 실험에서 제작한 광센서의 수소이온 농도 변화에 대한 재현성을 조사한 그래프이다. Universal buffer를 사용하여 pH가 4 또는 10의 용액을 약 5분 간격으로 교체하면서 3.5 ml/min. 흐름속

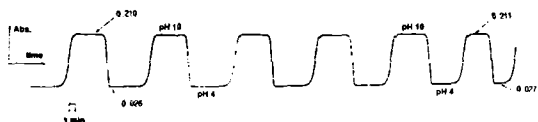


Fig. 4. Reproducibility of o,o'-dihydroxyazo dye-based optode under continuously varying pH condition between pH 4 and 10 ($\lambda=650$ nm; flow rate=3.5 ml/min).

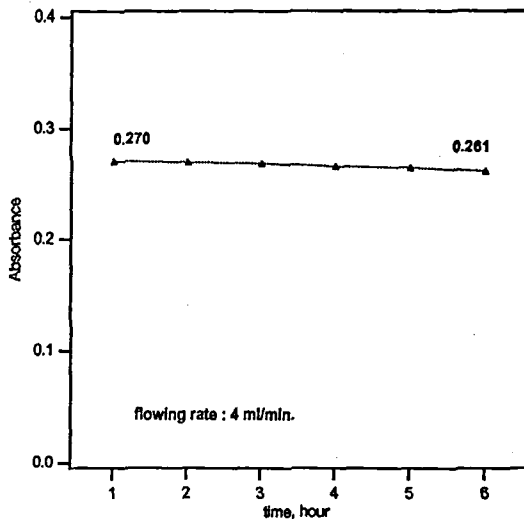


Fig. 5. Variations in the absorbance of o,o'-dihydroxyazo dye-based optode in flowing buffer solution (pH 8.5; flow rate=4 ml/min).

도로 흘러주면서 센서의 안정성을 검사해 보았다. 이때 650 nm지점에서 0.002이하의 흡광도 변화만을 관찰할 수 있었다. Fig. 5는 Tris-HCl 0.05 M, pH 8.5의 버퍼 조건에서 연동펌프(peristaltic pump)를 사용하여 용액을 6시간 동안 약 4 ml/min.의 흐름속도

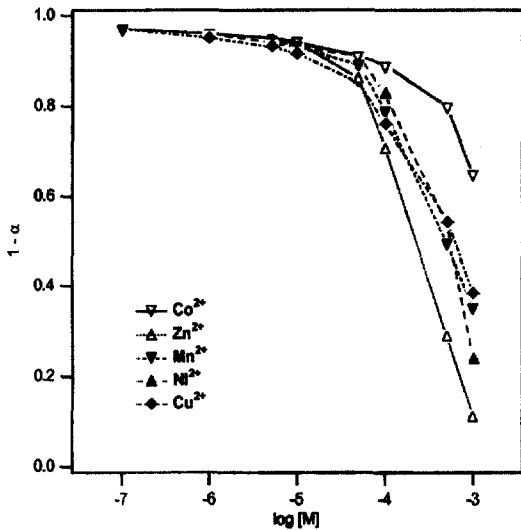


Fig. 6. Absorbance changes of the o,o'-dihydroxyazo dye-based optode to various divalent transition metal ions in 10^{-6} - 10^{-3} M range.

로 흘러주었을 때 λ_{\max} 인 650 nm지점에서 0.009 이하의 흡광도 변화만을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 반응성염료 지시약이 완전한 수용성 화합물임을 고려할 때 비특성 물리적 흡착(non-specific physical adsorption)과 같은 약한 결합으로 셀룰로오스 막에 분포되어 있는 것이 아니라 공유결합에 의해 막에 고정되어 있음을 입증하는 간접적 자료이다.

반응성염료 광센서의 전이금속에 대한 감응성을 조사하기 위하여 Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 와 Mn^{2+} 를 함유한 용액에 적용시켜 보았다. Fig. 6에 보인 바와 같이 이 광센서는 Co^{2+} 에 대해서는 비교적 적은 감응성을 나타내었으며, 그 이외의 금속들에 대하여서는 비슷한 선택성을 보였다. 감응한계는 약 6×10^{-5} M 정도이었다. 이 결과로 볼때 여러 가지 2가 전이이온금속들에 대한 감응이 비슷하므로 이 결과를 이용하여 전체 2가 전이금속 이온량을 측정하는 센서로 활용한다면가 선택성이 문제가 되지 않는 분석에서 활용될 수 있을 것이다. 이 광센서의 각 금속이온들에 대한 pK는 식 (1)에 앞에서 구한 pK_a 를 대입한 후 실험결과와 비교해 봄으로써 결정할 수 있는데 앞에 나열한 이온의 pK값은 각각 3.0, 3.3, 3.5, 3.6, 3.3이었다.

금속이온 선택성 광센서의 개발은 크게 PVC와 가소제를 혼합한 막에 이온감응성 물질과 수소이온교환 지시약을 첨가하는 방법과 본 실험에서와 같이 염료

성 지시약에 금속이온이 직접 결합함으로써 흡광 및 형광의 변화가 있도록 하는 방법이 주로 이용되고 있다. 그러나 전자의 경우에 문제점은 지시약 또는 이온 감응성 물질이 비교적 짧은 시간안에 막에서 빠져 나옴으로서 수명이 짧아지고 감응신호가 불안정한 단점이 있다. 반면 반응성 염료형 지시약을 사용한 본 실험의 결과는 실용성 여부를 떠나 Fig. 4와 5에서 보여 주듯이 수명이 연장되고 가역적이며 안정한 금속이온 선택성 광센서의 개발을 위한 방향을 제시해준다고 생각한다.

4. 결 론

본 연구를 통하여 전이금속에 민감하게 감응하는 Eriochrome Black T형의 반응성 염료를 광투과성 셀룰로오스 막에 공유결합으로 도입하여 2가 전이금속에 감응성이 있는 센서를 제작할 수 있었다. 이러한 형태의 센서는 pH변화에 대하여 가역적이고 안정된 신호를 나타내었을 뿐아니라 2가 전이금속 이온들에 대해서 분석화학적으로 유용한 감응신호를 나타내었다. 이러한 센서형태는 실제 용액내의 중금속을 측정하기 위해 여러 가지 형태로 응용될 수 있다고 생각한다. 이러한 기술 및 센서 형태를 바탕으로 하여 여러 가지 분자인지 화합물에 반응성 염료 기를 도입하여 분석화학적으로 유용한 센서들을 제작할 수 있을 것으로 예상된다.

감사의 글

이 논문은 교육부의 연구비(BSRI-97-3404)와 1998년도 광운대학교 학술연구비에 의하여 이루어졌음을 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 남학현, and 차근식, *화학세계*, **33**, 271 (1993).
2. O. S. Wolfbeis, "Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors Vol. I and II", CRC Press, Boca Ranton, U.S.A., 1991.
3. L. A. Saari and W. R. Seitz, *Analyst*, **109**, 655 (1985).
4. U. E. Spichiger, D. Freiner, E. Bakker, T. Rosatzin and W. Simon, *Sensors and Actuators. B*, **11**, 263 (1993).

5. O. Dinten, U. E. Spichiger, N. Chaniotakis, P. Gehrig, B. Rusterholz, W. E. Morf and W. Simon, *Anal. Chem.*, **63**, 596 (1991).
6. L. Chau and M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **62**, 1964 (1990).
7. A. Morales-Bahnik, R. Czolk, J. Reichert and H. J. Ache, *Sensors and Actuators B*, **13**, 424 (1993).
8. L. A. Saari and W. R. Seitz, *Anal. Chem.*, **55**, 667 (1983).
9. K. Wang, K. Seiler, B. Rusterholz and W. Simon, *Analyst*, **117**, 57 (1992).
10. Z. Zhujun, Y. Zhang, M. Wangbai, R. Russell, Z. M. Shakhsher, C. L. Grant, W. R. Seitz and D. C. Sundberg, *Anal. Chem.*, **61**, 202 (1989).
11. G. J. Mohr and O. S. Wolfbeis, *Analytica Chimica Acta*, **292**, 41 (1994).
12. I. M. Kolthoff, E. B. Sandell, E. J. Meehan, S. Bruckenstein, "Quantitative Chemical Analysis", 4th ED., p. 737, The Macmillan Company, New York, U.S.A., 1969.