

형광화학센서를 이용한 용출기반 토양 수은 오염조사

김경태 · 박준범*

서울대학교 건설환경공학부

Determination of Mercury Ion in Contaminated Soil by Rhodamine B Hydrazide

Kyungtae Kim · Junboun Park*

Department of Civil & Environmental Engineering, Seoul National University

ABSTRACT

Rhodamine B Hydrazide as a novel fluorescent and colorimetric probe exhibiting remarkably selective fluorescence enhancement toward Hg^{2+} ion over other 16 metal ions is herein introduced. The probe reacts with Hg^{2+} ion followed by its spirolactam ring-opening to give a remarkable enhancement of absorption maximum at 550 nm as well as an enhanced fluorescence intensity at 580 nm in aqueous media. Upon titration with Hg^{2+} ion in various concentration of 10~200 μM , we found that the probe shows a marked color change from colorless to pink, enabling naked-eye detection toward mercury ion. In addition, in the presence of Hg^{2+} ion, the probe gave rise to change from non-fluorescence to strong orange fluorescence (Off-On) with a good linearity of $R^2=0.97$. This preliminary results demonstrate that the fluorescent chemosensor we herein introduced can open a new strategy for marked selective and sensitive detection of mercury ions in contaminated soil containing various metal ions.

Key words : Mercury detection, Fluorescence chemosensor, Soil contamination, Extraction

1. 서 론

산업화가 급속히 진행되면서 유독성 물질이 생태계로 빈번히 누출되어 심각한 오염문제가 발생하고 있다. 국내 외적으로 토양환경관련 법을 제정하여 오염물질의 누출과 확산을 방지하고 오염여부를 명확히 하여 정화를 하고 있다. 우리나라는 1996년 토양환경보전법을 최초 시행한 이후 꾸준히 규제 오염물질을 늘려가고 있다(Ministry of Environment, 2009). 유독성 물질 중에서도 자연적으로 분해되지 않는 중금속은 토양뿐만 아니라 수계, 폐기물들에 다량 포함되어 생태계를 위협하고 있다.

중금속은 체내에 흡수되어 다양한 질병을 유발하는데, 그 질병이 발현되기까지 오랜 시간이 걸려 사전에 오염물질의 누출을 확인하는 것이 중요하다(Cui and Zhang, 2014). 중금속은 다른 오염물질과 다르게 무색, 무미, 무

취로 그 존재를 인간의 오감으로 판단할 수 없다.

일반적으로 센서는 인간의 오감으로 인지 할 수 없는 것에 대한 정보를 주는 것으로 다양한 분야에서 인간에게 각종 정보를 제공하기 위해 개발되어왔다. 형광화학센서(fluorescent chemosensor)는 다양한 형태의 알고자하는 원자 또는 분자와 선택적으로 반응해 광화학적 변화를 통해 시각적으로 판단 할 수 있는 정보를 제공한다. 특히 환경적 측면에서 중금속을 선택적으로 감지하는 형광화학 센서에 대한 연구가 세계적으로 많은 연구 팀에서 진행되어왔다(Yoon, 2009). 형광화학센서는 특정 물질에 대한 선택성과 민감성이 뛰어나 미량원소의 감지에 활용될 수 있어 환경, 의료분야에서 연구가 진행되어 왔으나, 토양오염 분야에서는 아직까지는 보편화되지 못했다. 본 기술을 토양오염조사 시 토양용출액과 지하수에 도입한다면 시료 채취지점 선정 및 오염도작성에 효율성을 높여줄 것으로

*Corresponding author : junbpark@snu.ac.kr

Received : 2016. 2. 1 Reviewed : 2016. 2. 23 Accepted : 2016. 3. 2

Discussion until : 2016. 8. 31

기대된다. 형광화학센서의 핵심 기술은 특정 중금속과 선택적으로 감응하고 그 감응도가 매우 뛰어나다는 것이다. 본 소고에서는 형광화학센서를 간략히 소개하였고, 실제 실험을 통하여 형광화학센서를 이용한 수은 오염도의 오염조사의 가능성을 제시하고자 하였다. 형광화학센서를 토양용출액에 적용하기 위하여 자외선-가시광선 분광광도계와 형광광도계를 이용해 토양용출액에 존재할 수 있는 다양한 양이온에 대해 광화학적 변화를 측정하여 센서의 수에 대한 선택성을 확인하였다. 또한 농도 정량을 위해 수에 대해 적정시험을 수행 해 본 결과, 반응이 포화되기 전까지 선형적 변화를 확인하였다. 본 실험 결과를 토대로 형광화학센서를 이용한 토양용출액 및 지하수에 존재하는 중금속의 정량이 가능할 것으로 사료된다.

2. 중금속 용출 특성

중금속으로 오염된 토양의 오염도를 측정하기 위해서는 중금속을 수용액 상태로 용출시키는 과정이 선행되어야 한다. 흙에 흡착된 중금속을 용출시키는 방법으로는 강산을 사용하는 방법부터 물로 용출시키는 방법까지 다양하다. 이때 중금속과 흙의 결합력에 따라 용출되는 양의 차이가 발생한다. 오염도양 내에서 중금속은 다양한 형태로 존재한다(Tessier et al., 1979). 국내 토양오염공정시험 기준은 2009년 이전까지는 염산에 의한 용출법으로 규정하였으나, 2009년 이후 왕수추출법을 이용한 전함량시험법으로 규정하고 있는데 이 방법은 토양 내 존재하는 모든 중금속을 이온화시켜 농도를 분석하는 시험법이다(National Institute of Environmental Research, 2005). 그러나 실제 용출되어 생물학적 이용이 가능한 형태의 중금속 농도를 평가하기에는 보수적인 평가방법이다. 이러한 관점에서 볼 때 적절한 산을 이용해 실제 용출가능한 중금속을 평가하는 방법이 필요하다.

3. 형광화학센서

형광화학센서는 Fig. 1에서 보는바와 같이 화학 반응 메커니즘에 따라 세 가지 형태로 구분될 수 있다. 첫 번째 메커니즘이 가장 보편적으로 이용되는 방법으로 오염물 즉 중금속 또는 특정분자가 센서의 인식부분과 결합해 형광체의 형광 변화가 발생하는 방식이다. 두 번째 메커니즘은 수용체와 지시약이 결합하고 있는 상태에서 검출물질이 수용체와 결합과 동시에 지시약의 결합이 끊어져 색변화 또는 형광변화를 보이는 경우이다. 마지막의 메커니

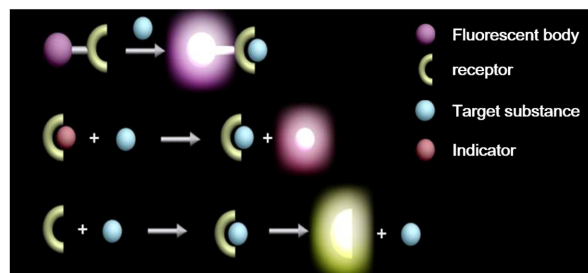


Fig. 1. Fluorescent chemosensing mechanism (Yoon, 2009).

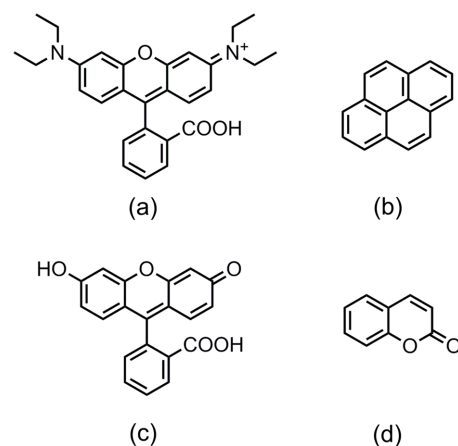


Fig. 2. (a) : Rhodamine B, (b) : Pyrene, (c) : Fluorescein, (d) : Coumarin.

니즘은 화학정량계(chemodosimeter)로 검체와 화학정량계가 반응해 정량계의 분자구조의 변형이 일어나면서 형광 변화 또는 색변화를 나타내는 것이다(Yoon, 2009).

일반적으로 알려진 형광체로는 Fig. 2의 Rhodamine B, Fluorescein, Pyrene, Coumarin등이 있다. 이 구조를 바탕으로 특정 중금속과 선택적으로 반응할 수 있도록 분자구조를 변형시킨 다양한 형광화학센서가 알려져 있다.

Darbha et al.(2007)은 Rhodamine B 유도체를 결합시킨 금나노입자(gold nano-particle)를 개발해 왕수로 용출한 토양용출액에서 수은 농도를 정량한 바 있으며, 유도 결합플라즈마 질량분석기를 이용한 분석값과 90~95% 일치하는 것으로 알려졌다. 또한 Long et al.(2013)은 DNA optical sensor를 이용해 현장에서 지하수의 수은 농도를 정량하고, 재이용 가능한 센서와 측정 장비를 개발했다.

본 소고에서 소개하고자하는 형광화학센서는 Rhodamine B Hydrazide으로 1997년 Dujols et. al.(1997)이 개발한 수에 선택성을 갖는 센서이다. Fig. 3과 같이 Rhodamine B Hydrazide는 Rhodamine B의 유도체로 Hydrazine Hydrate를 이용해 수에 선택성을 갖도록 합성한 센서이다. Rhodamine B는 spirolactam 고리열림반응으로 색과

형광의 변화를 보인다(Dujols et al., 1997). 이 B 유도체 (Fig. 3)는 다른 형광화학센서와 다르게 Off-On System으로 무색에서 붉은 계열 빛을 내는 센서로 가시광선 영역에서의 색변화와 형광변화를 모두 확인할 수 있는 센서로서 토양오염 조사에 적용하기에 적합한 센서로 판단된다. Fig. 4와 같이 Rhodamine B는 유기용매조건에서는 앞서 설명한 메커니즘 중 첫 번째 형태로 센서의 인식부분에 수은이 결합하여 형광변화를 나타낸다. 하지만 수용액조건에서는 Fig. 1의 세 번째 메커니즘인 화학정량계 (chemodosimeter)로 작용을 한다.

3.1. Selectivity Test

B가 수은에 선택적인 반응을 보이는지 여부를 판단하기 위해 다양한 양이온에 대해 선택성 실험을 수행하였다. 수용액 내 센서 농도는 $10\ \mu\text{M}$ 로 조성하고 각각의 양이온을 $100\ \mu\text{M}$ 로 조성하여 1시간 동안 반응시켰다. 일반적으로 형광 화학센서는 pH에 매우 민감한 특징이 있어 pH를 최적조건으로 맞추는 것이 가장 중요하다. B가 가장 잘 반응할 수 있는 조건을 조성하기 위해 HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 완충용액을 사용하여 pH를 7.4로 맞추어 실험하였다. 실험결과 Fig. 6과 같이 B가

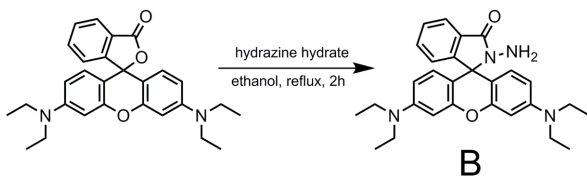


Fig. 3. Synthetic route of Rhodamine B Hydrazide (B).

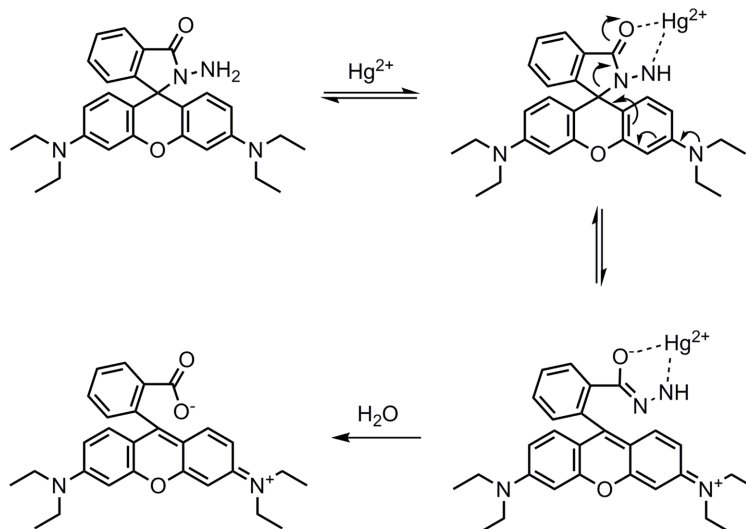


Fig. 4. Proposed binding mechanism of B for Hg^{2+} ion.

수은과 반응해 색과 형광의 변화를 확인할 수 있으며 수은을 제외한 양이온과는 반응하지 않는다. 자외선-가시광선 분광광도계의 스펙트럼을 측정한 결과 Fig. 5의 (a)와 같이 550 nm에서 최대 흡광을 보였으며, 형광 스펙트럼

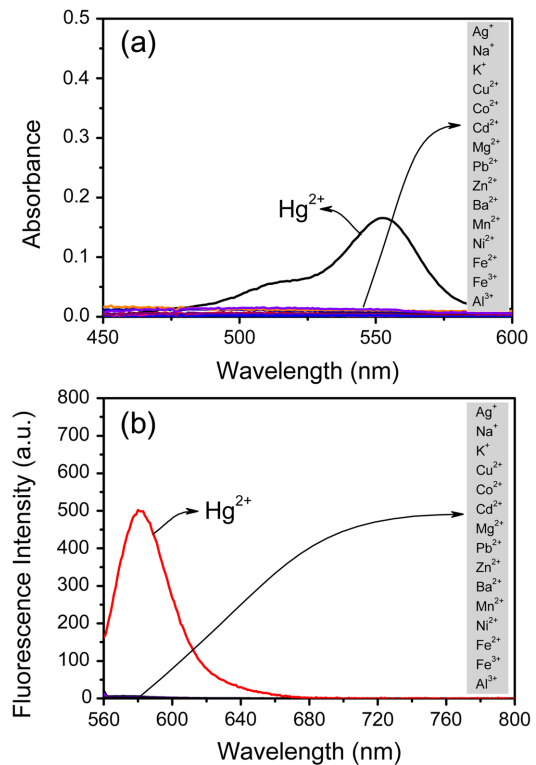


Fig. 5. (a): Absorption spectra of B for various cations in aqueous solution ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: HEPES buffer, 50 : 50, pH 7.4). (b): Fluorescence spectra of B for various cations in aqueous solution ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: HEPES buffer, 50 : 50, pH 7.4). Wavelength: excitation/emission = 550/580 nm. Slit: excitation/emission = 5.0/5.0 nm.

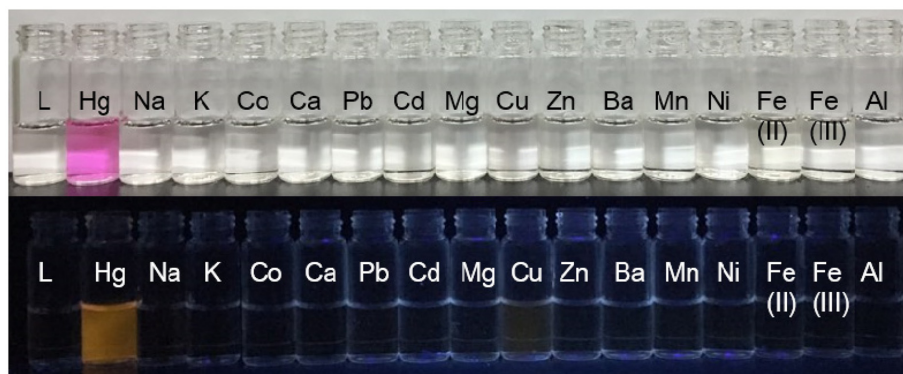


Fig. 6. Colormetric (above) and fluorimetric (bottom) response to various cations in aqueous solutions of pH 7.4, From left to right: Ligand, Hg (II), Na (I), K (I), Co (II), Ca (II), Pb (II), Cd (II), Mg (II), Cu (II), Zn (II), Ba (II), Mn (II), Ni (II), Fe (II), Fe (III), Al (III).

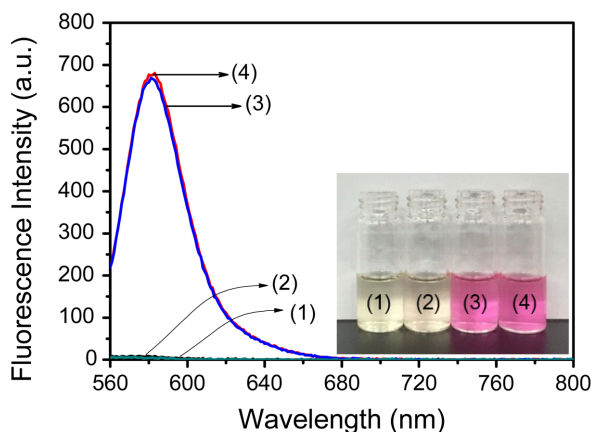


Fig. 7. Fluorescence spectra of B in the presence of different cations in aqueous solution (C_2H_5OH : HEPES buffer, 50 : 50, pH 7.4). Wavelength: excitation/emission = 550/580 nm. Slit: excitation/emission = 5.0/5.0 nm. (1): soup of Na (I), K (I), Co (II), Ca (II), Pb (II), Cd (II), Mg (II), Zn (II), Ba (II), Mn (II), Ni (II), Fe (II), Fe (III), Al (III), (2): (1) with Cu (II), (3): (1) with Hg (II), (4): (1) with Hg (II), Cu (II).

측정 결과 Fig. 5의 (b)과 같이 580 nm 파장에서 최대 형광강도가 측정되었다.

3.2. Competition Test

토양용출액은 실험조건과 다르게 다양한 양이온, 음이온, 유기물이 혼합되어있다. B가 수은이온과 반응 시 다른 양이온과의 경쟁성을 확인하기 위해 선택성 실험과 동일하게 다양한 양이온과 혼합해 경쟁성 실험을 수행하였다. 그 중에서 구리가 오랜 시간 반응할 경우 매우 작은 형광변화를 확인할 수 있어 총 네 가지 혼합액에 대해 형광화학센서의 경쟁성 실험을 수행하였다. Fig. 7은 다음과 같이 실험한 결과로, (1) 구리와 수은을 제외한 14가지 양이온, (2) 14가지 양이온과 구리이온 혼합액, (3) 14

가지 양이온과 수은이온 혼합액, (4) 14가지 양이온과 구리, 수은이온 혼합액으로 구성하였다. 각각의 양이온은 100 μM 로 동일한 농도로 구성하였으며, 반응시간은 선택성 조사와 같이 1시간으로 하였다. 실험결과 (1), (2)에서는 형광변화를 확인할 수 없었으나 (3), (4)는 확인한 형광변화를 확인할 수 있었다. 실험결과를 바탕으로 B가 다른 양이온과 수은이 혼합되어 있는 조건에서도 수은에 선택적이며, 구리 또한 포함되어있을 경우에도 형광강도의 차이가 없는 것을 보아, 수은이온에 선택적으로 반응함을 알 수 있었다.

3.3. Titration Test

형광화학센서를 이용한 토양용출액내의 수은이온 유무 판단뿐만 아니라 용출액과 센서가 반응했을 때 색변화 및 형광변화의 기기 측정을 통해 용출액의 수은이온 농도를 정량 할 수 있다. 수은농도가 증가함에 따라 Fig. 8과 같이 형광 및 색변화를 확인할 수 있으며, Fig. 9의 검정 곡선은 10 μM 의 센서에 수은 이온 수용액을 10 μM 부터 200 μM 까지 형광측정기를 통해 형광강도를 측정한 결과이다. 200 μM 이상의 농도에서는 비선형적 변화를 보인다. 각각의 실험의 반응시간은 1시간으로 규정했으며 $R^2=0.97$ 로 선형변화를 보인다.

4. 결 론

본 연구를 통해 토양오염조사시 시료채취지점 선정 및 오염지도 작성에 있어서 형광화학센서 기술을 도입하여 효과적인 중금속 오염도 측정이 가능할 것으로 판단된다. 다양한 연구팀에서 형광화학센서를 개발했으며 Darbha 연구팀에서 토양, 수용액, 어류를 대상으로 형광화학센서를



Fig. 8. Change in color (above) and fluorescence (bottom) of B in aqueous solution ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: HEPES buffer, 50 : 50, pH 7.4) in a function of different concentration of Hg^{2+} . From left to right: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200 μM of Hg^{2+} concentration.

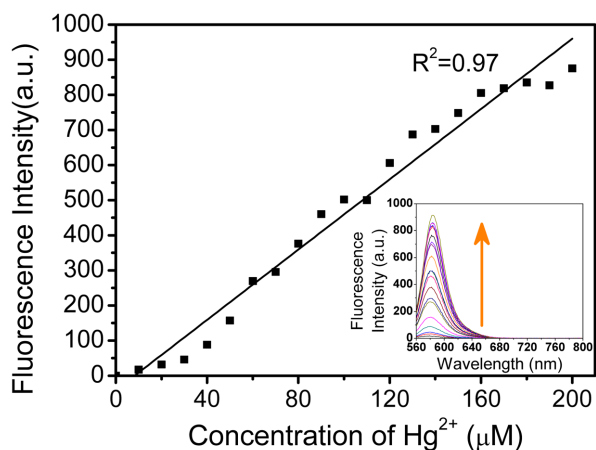


Fig. 9. Fluorimetric titration of B with Hg^{2+} in aqueous solution ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: HEPES buffer, 50 : 50, pH 7.4). Wavelength: excitation/emission = 550/580 nm. Slit: excitation/emission = 5.0/5.0 nm.

이용해 수은이온 농도를 정량했으며, 본 연구에서는 수은에 선택성을 보이는 센서(B)를 이용해 선택성과 경쟁성 실험을 수행한 결과 수은에 선택성을 보이는 것을 확인하였다. 적정시험결과 10 μM 에서 200 μM 의 수은이온 농도 범위에서 정량할 수 있음을 확인하였다. 형광측정기기의 슬릿 폭 조절을 통해 10 μM 보다 낮은 농도까지 정량할 수 있을 것으로 판단된다. 수행한 예비실험결과를 토대로 나노비드기반 합성을 통해 수은이온을 정량하고, 추가적으로 수은이온을 회수할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구

재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. NRF-2015R1D1A1A01061347).

References

- Cui, X. and Zhang, H.M., 2014, Study on the construction and performance of a $\text{Hg}(\text{II})$ -sensing system having an “off-on” probe derived from rhodamine and an up-conversion excitation core, *J. Lumin.*, **145**, 539-546.
- Darbha, G.K., Ray, A., and Ray, P.C., 2007, Gold nanoparticle-based miniaturized nanomaterial surface energy transfer probe for rapid and ultrasensitive detection of mercury in soil, water, and fish, *Acs Nano*, **1**(3), 208-214.
- Dujols, V., Ford, F., and Czarnik, A.W., 1997, A long-wavelength fluorescent chemodosimeter selective for $\text{Cu}(\text{II})$ ion in water, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**(31), 7386-7387.
- Long, F., Zhu, A., Shi, H., Wang, H., and Liu, J., 2013, Rapid on-site/in-situ detection of heavy metal ions in environmental water using a structure-switching DNA optical biosensor, *Sci. Rep.*, **3**.
- Ministry of Environment (MOE), 2009, Soil conservation basic Plan (#11-1480000-001048-01).
- National Institute of Environmental Research (NIER), 2005, Evaluation and establishment of the soil pollution standards (II) (#11-1480083-000268-10).
- Tessier, A., Campbell, P.G., and Bisson, M., 1979, Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals, *Anal. Chem.*, **51**(7), 844-851.
- Yoon, J., 2009, Fluorescent Chemosensors, *KBCS*, **4**(1), 3-6.