

## 형광염료의 정량분석법에 대한 연구

A Study on the Quantitative Analysis of Fluorescent Whitening Agents  
in the Paper

이지영 · 임형우 · 윤혜정 · 이학래

서울대학교 환경재료과학전공

종이와 용수 내에 존재하는 형광물질을 분석하기 위하여 형광증백제를 이용하여 수초지와 수용액을 제조한 후 여러 분석 기법을 이용하여 정성 및 정량 분석을 실시하였다.

형광물질의 정성적 분석을 위해 UV-lamp를 이용하여 형광물질의 존재유무를 평가하였다. 수용액에 존재하는 형광증백제의 정량을 위해 형광광도기(spectrofluorometer)를 적용하였고 종이의 형광증백제 함량을 정량하기 위하여 형광광도기, 분광광도기(spectrophotometer) 및 형광현미경(image restoration microscopy)을 적용하였다. 또한 종이 내부에 존재하는 형광증백제의 분포를 분석하기 위해 다광자 공초점주사현미경(multi-photon imaging system)을 이용하여 이미지를 획득하였다. 이들 측정법들은 형광증백제의 특성을 고려한 것으로 자외선을 포함한 광원으로 인해 들뜬상태에서 기저상태로 이동하는 동안 방출하는 형광 emission을 측정하는 방법들이다. 이러한 측정법들은 재현성이 우수하고 측정시 복잡한 샘플의 전처리가 필요 없이 빠르고 편리하게 사용할 수 있는 장점이 있다. 각 분석법들의 기본 원리 및 적용법은 다음과 같다.

### 1. UV-viewing cabinet

형광증백제는 240-380 nm의 파장을 갖는 자외선을 흡수하여 파장 400-500 nm 인 파란색의 가시광선을 방출한다. 이러한 성질을 이용하여 특정 파장의 자외선을 방출하는 자외선램프를 이용하여 형광증백제의 존재 유무를 평가하였다. 자외선램프를 이용하기 위하여 Viber-Lourmat社의 UV-viewing cabinet를 이용하였고 이를 Fig.

1에 도시하였다. 이 장치에는 자외선을 방출하는 두 종류의 램프를 가지고 있었는데 각각 365, 312 nm의 파장을 갖는 것이었다. 또한 이미지를 저장하기 위하여 디지털 카메라를 이용하였다.

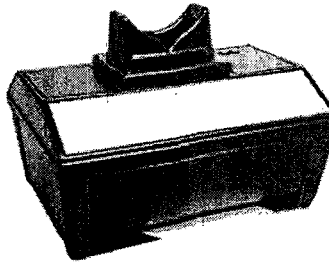


Fig. 1. UV viewing cabinet equipped with 365 and 312 nm UV lamps.

## 2. 형광광도기(spectrofluorometer)

빛의 흡수에 의해 들뜬 상태에 도달한 분자는 에너지를 잃고 다시 안정한 바닥상태로 되돌아온다. 이 에너지를 잃는 과정은, 분자의 충돌 등에 의해 열 또는 에너지를 방출하는 무방사 전이 또는 분자간 에너지 이동에 의한 것이 일반적이다. 그러나 어떤 일정한 구조를 갖는 분자에 있어서는 에너지를 다시 빛으로서 방출하는 방사과정을 갖는 경우가 있다. 이러한 전이가 같은 다중도 사이에서 일어날 경우, 이런 물질을 형광 물질이라 하고 방출된 빛을 형광이라 한다. 이 방사광의 스펙트럼 형태에 의해 각물질의 정성분석을, 또한 강도에 의해 정량분석을 할 수 있다. 형광광도법은 흡광광도법에 비해 응용범위는 제한되지만, 그 감도는 흡광광도법보다 한자리에서 세자리는 높기 때문에 극저농도 물질의 분석에 이용된다. 장치는 일반적으로 Arc Xenon 램프(UV-Vis)를 광원으로 하며 광원부, 들뜸광 모노크로메이터, 시료실, 형광모노크로메터, 광전자증배관을 이용한 검출부로 되어 있다. 일반적으로 용액의 형광측정은 들뜸광과 직각의 방향에서 측정하고, 고체시료는 표면에서의 반사형광을 들뜸광과 45° 혹은 90°의 방향에서 측정하는 방식이 이용된다.

본 연구에서는 Photon Technology International社의 QuantaMaster

spectrofluorometer를 이용하였다(Fig. 2). 측정시 광원과 검출기의 슬릿 slit은 액체 측정의 경우는 0.50 nm로 하였고 종이의 경우는 0.25nm로 하였다. 이는 측정범위 내에서 최대 형광 emission이 포화상태에 도달하지 않게 하기 위함이었다.

형광증백제가 수용액 내에서 용해상태와 종이의 내부에 존재하는 상태로 나뉘어 측정하였는데 특히 용해상태에서 일반적인 직육면체의 측정 셀을 사용할 경우 재현성이 떨어지는 문제가 발생하였다. 따라서 고체 측정의 경우에서 적용되는 표면에서 반사형광을 측정하는 방식을 액체 측정에 적용하기 위해 폭이 상당히 좁은 측정셀을 적용하여 입사광이 액체 표면에서 반사할 수 있게 하였다. 종이의 형광을 측정할 때는 시편을 15×45 mm의 규격으로 자른 후 측정하였다.

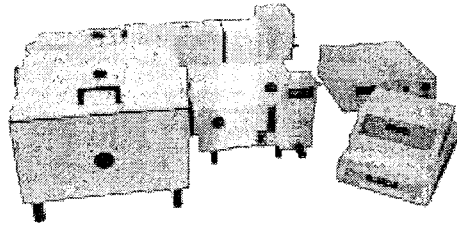


Fig. 2. QuantaMaster spectrofluorometer.

### 3. 분광광도기(spectrophotometer; Elrepho)

Elrepho 분광광도기는 종이의 백색도, 색도, 불투명도 및 화이트니스등의 광학적 특성을 측정하기 위하여 개발되었다. 램프로는 크세논 램프가 장착되어 있고 램프에서 부터 발산된 빛은 D65 filter를 통하여 태양의 직사광선과 같은 빛이 자외선을 포함하는 빛으로 걸러지게 된다. 또한 395, 420, 460 cut-off filter가 설치되어 있어 특정한 파장을 갖은 빛이 제거된 조건에서 종이의 광학적 특성을 평가할 수 있고 검출은 diffuse/0° 방식으로 반사되는 빛을 감지하는 검출기가 샘플 표면에 대하여 수직으로 위치하고 있다(Fig. 3). 광원으로는 D65, C, A가 있으며 이들은 자외선과 가시광선의 함유정도에 따라 나뉜다. Fig. 4에 광원에 따른 자외선과 가시광선의 상대 에너지를 도

시였는데 광원 D65는 세 광원 중에 가장 높은 자외선 에너지를 가지고 광원 C는 가시광선 중에 파장이 짧은 영역에서 가장 높은 에너지를 가지는 반면 광원 A는 파장이 증가함에 따라 에너지가 증가하는 경향을 보여주고 있다. 분광광도기에 의한 색의 측정 결과는 시편으로부터 반사된 빛의 특성에 의하여 좌우되며, 측정자 및 광원특성의 영향은 받지 않는다. 분광광도기는 근본적으로 단색광에 시편을 노출시켜 각 파장에서 반사된 모든 빛을 측정한다. 가시광선 내의 각 파장에서 시편에 의하여 반사된 모든 빛은 백색 표준판에 의하여 반사된 빛에 대한 백분율로 표시된다.

형광증백제의 증백효과를 평가하기 위하여 형광증백제를 함유하고 있는 종이의 화이트니스(CIE whiteness), 백색도(ISO brightness)를 측정하였다. 또한 형광증백제를 정량하기 위하여 형광증백제의 자외선 흡수 및 파란색의 가시광선 방출을 고려하여 측정된 광원 D65 조건에서 화이트니스와 420 nm cut-off filter로 자외선이 제거된 화이트니스의 차인 형광지수(CIE whiteness(Fluor)), 광원 C 조건에서 백색도와 400 nm cut-off filter를 사용하여 측정한 백색도의 차인 형광지수 (ISO brightness(Fluor))를 측정하였다. 따라서 이 두 측정항목들은 형광증백제의 함량을 반영하는 측정항목으로 판단하여 이 두 항목을 바탕으로 하여 형광증백제를 정량하고자 하였다.

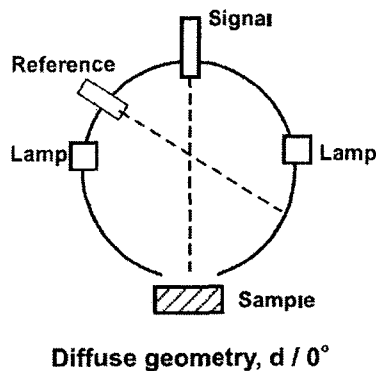


Fig. 4. Diffuse geometry of measurement.

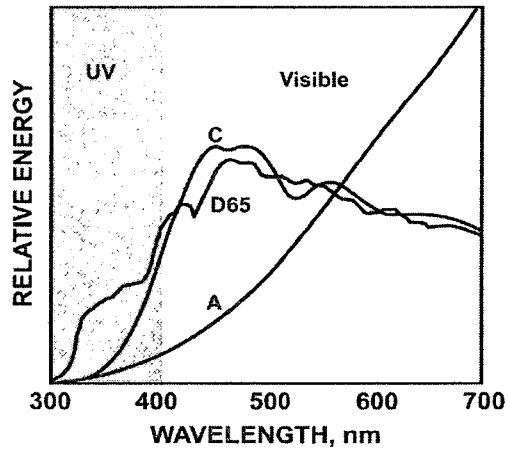


Fig. 5. Spectral energy distributions of standard illuminants D65, C and A.

#### 4. 다광자 공초점 주사현미경 (multi-photon imaging microscopy)

형광증백제의 형광분포를 육안으로 평가하기 위하여 multi-photon imaging microscopy (MP)를 이용하였다. MP는 형광증백제처럼 자외선으로 excitation이 되는 형광물질에 사용된다. 일반적으로 자외선을 물질에 조사하게 되면 물질의 구조나 성질이 변화하기 때문에 자외선 레이저가 아닌 적외선 레이저(IR laser)를 이용한다. 하지만 적외선은 자외선에 비해 에너지가 낮기 때문에 샘플 내부로의 침투가 용이하지 않다. 따라서 MP 시스템에서는 일반적인 CLSM 시스템과는 달리 한번의 레이저 조사에 의한 들뜸 상태를 유도하는 것이 아니라 상대적으로 약한 적외선 레이저를 이용하여 여러 번 조사함으로써 자외선에 의한 들뜸과 동일한 조건을 이끌어 낸다(Fig. 6). 이러한 작용들을 통해 자외선에 의한 물질의 형태 및 성질 변화를 방지하고 샘플 본연의 이미지를 얻을 수 있게 하는 것이다.

MP 시스템은 CLSM과 같이 한 시료의 넓은 영역에서 정보를 얻는 것이 아니라 좁은 초점 심도를 가지고 있고 광원인 레이저에 의한 샘플의 형광현상을 통해서 이미지를 얻게 된다. 또한 매우 한정된 영역의 정보만을 감지하기 때문에 이미지의 해상도가 매우 좋다. 그러나 MP 시스템은 적외선레이저를 광원으로 하고 레이저의 세기가 항상

일정하지 않기 때문에 형광물질의 정량에는 적합하지 않다. 따라서 본 연구에서는 Bio-Rad社의 Radiance 2000/MP(Fig. 6)를 이용하여 해상도가 높은 형광분포 이미지를 얻었다.

측정시에는 종이를 15×15 mm의 규격으로 자른 후 슬라이드 글라스에 양면테이프로 고정시켜 샘플을 준비하였다.

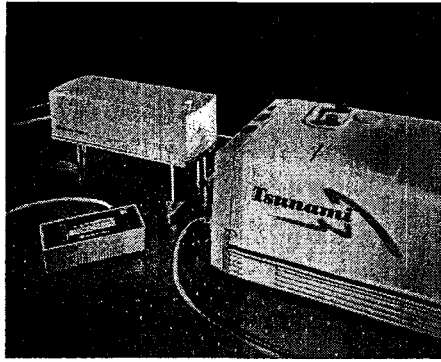


Fig. 6. Multi-photon fluorescence microscopy.

##### 5. 이미지 복원 현미경(image restoration microscopy)

MP시스템의 단점은 광원인 레이저가 일정한 에너지 세기를 갖지 못한다는 점이였다. 따라서 이미지 분석을 통한 형광물질의 정량화를 위해 이미지 복원 현미경을 사용하였다. 이미지 복원 현미경은 mercury arc lamp를 광원으로 하고 filter와 fiber optic를 이용하여 일정한 파장과 안정된 에너지 세기의 광원을 공급할 수 있다. 또한 시스템에 포함되는 각 현미경 대물렌즈의 특유한 PSF (point spread function)를 측정하여 고해상도의 이미지를 얻을 수 있다.

본 연구에서는 Applied-Precision社의 DeltaVision RT를 사용하여 이미지 분석을 실시하였다.

Filter로는 DAPI를 이용하여 excitation 파장을 360 nm로 고정하였고 457 nm에서 형광 emission 이미지를 200배의 확대비율로 얻었다. 얻어진 이미지는 이미지 복

원 현미경의 소프트웨어를 통하여 최대, 최소 및 평균 형광 emission을 구하였고 평균 형광 emission을 바탕으로 하여 형광증백제의 정량화를 실시하였다. 현미경 측정시의 샘플은 MP 시스템과 동일한 방식으로 준비하였다.

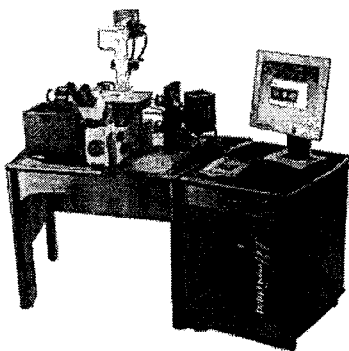


Fig. 7. Multi-photon fluorescence microscopy.

### 인용문헌

1. 신세건, 정의덕, 정영언, 기기분석화학, 형성출판사.
2. 이학래, 이복진, 신동소, 임기표, 서영범, 원종명, 손창만, 제지과학, 광일문화사.
3. 김철환, Confocal Microscopy의 원리 및 응용, 광일문화사.

### 사 사

본 연구는 환경부의 지원에 의해 수행되었음. 일부 BK21 핵심사업의 지원을 받았음.