

유기용매 중에서 Chlorophyll-*a* 의 흡광 및 형광 (제 1 보)

李重和 · 金炳秀* · 姜貞姬* · 朴冕用*†

세종대학교 화학과

건국대학교 문리과대학 화학과

(1981. 11. 3 접수)

The Absorbance and Fluorescence of Chlorophyll-*a* in Organic Solution (I)

Choong-Hwa Lee, Jung-Hee Kang*, Byong-Soo Kim* and Myon-Yong Park*

Department of Chemistry, King Sejong University, Seoul 133, Korea

*Department of Chemistry, Kon-Kuk University, Seoul 133, Korea

(Received Nov. 3, 1981)

요 약. chl-*a*는 $5.12 \times 10^{-6} M$ 이상의 농도와 건조된 ethyl ether, benzene, *iso*-octane 중에 소중합체로 존재하고 이 용매에 *n*-prOH를 소량씩 가할때 단위체로 변함을 확인하였다. 형광은 중합체인 경우에 세게 나타나지만 중합정도에 따라 변하며 단위체인 경우는 약하게 나타났다. 그리고 *n*-prOH를 용매에 가할때 흡광과 형광의 λ_{max} 은 모두 장파장쪽으로 이동하였다. solet/red band의 비는 흡광도가 감소할수록 작아졌으며 chl-*a*의 농도에 따른 흡광도는 $1.0 \times 10^{-6} M$ 정도의 용액에서 최대값을 나타냈다.

ABSTRACT. The absorbance and fluorescence yields of chl-*a* vs. concentration of *n*-prOH in diethyl ether, benzene and *iso*-octane were shown the characteristic point which chl-*a* structures are changed to monomer by the solvation of oligomer, and the spectral differences of fluorescence excitation between oligomer and monomer were identified by fluorimetry. All the maximum wavelength of absorbance, fluorescence excitation and fluorescence emission were shifted to longer wavelength. The ratios of solet/red band were depended on the band intensities and the polarities of solution in organic solvents mixed with *n*-prOH.

서 론

Chlorophyll-*a*(chl-*a*)는 동화작용의 안테나 뿐만 아니라 에너지 전이 및 쉐딩 연구 때문에 chlorophyll에 대한 *in vivo*와 *in vitro* 연구는 수백편의 논문이 발표되었다¹. 이러한 연구논문들을 모아 Vernan과 Seely는 1966년에 단행본으로 발간하였다¹.

chl은 네개의 pyrrole 원자단의 질소원자와 결합된 Mg 원자가 평면으로 배열되어 있고 수화물 중합체²⁻⁵와 chl-*a* 분자끼리의 중합체⁶⁻¹¹를 생

성하며 이들의 중합체는 670 nm 부근에 나타나는 shoulder의 스펙트럼을 이용하여 분광학적 방법^{3, 9, 12-15, 17}으로 확인하였다. 그러나 670 nm의 shoulder는 chl-*a*의 농도가 진할때 확실하게 나타나고 chl-*a*의 농도가 묽을때는 중합체가 생기더라도 기록된 스펙트럼으로 확인할 수 없다.

chl-*a* 중합체는 동화작용의 에너지 흡수에서 중요한 역할을 담당하므로 중합체의 존재 확인은 chl-*a* 연구에 대부분을 차지하여 왔다.

그러므로 이 연구에서는 chl-*a* 중합체의 존재를 확인하는 흡광도법과 형광법을 소개하고 이

방법의 실험에서 얻어진 스펙트럼의 용매효과 및 퍼나비의 변화에 대한 결과를 발표하고자 한다.

실험 및 결과

Chlorophyll은 신선한 시금치에서 추출정제¹⁶ 하여 1.0×10^{-6} mmHg 이상의 진공상태에서 건조시킨후 물혀 Vernon¹과 Boto¹⁷의 정량방법에 따라 정량한 다음 각 용매에 물혀 사용하였다.

실험기기는 Beckman ACTA IV UV/Visible Spectrophotometer와 Xe-lamp를 광원으로 사용하는 Hitachi Perkin-Elmer MPF 44 Fluorescence Spectrophotometer를 사용하였다. 형광광도계의 광전자증배관 광도를 보정하기 위하여 Rodamine G와 Methylene blue를 표준물질로 사용하여 보정하였으며¹⁸ 스펙트럼을 에너지로 환산하여¹⁵ λ_{max} 을 보정한 값은 0.2 nm 보다 작았다. 이 실험에서는 0.5 nm 까지만 측정할수 있으므로 λ_{max} 의 측정오차는 무시할 정도로 작았다.

형광은 Fluorescence emission(Fem)과 Fluorescence excitation(Fex)의 두가지를 측정하였다¹⁹. Fem은 형광광도계의 excitation monochromator를 chl-a의 흡광스펙트럼중에서 red-band의 λ_{max} 에 놓고 입구슬릿 6 nm와 출구슬릿 2 nm에서 emission monochromator에서 나오는 단색광으로 주사하였다. Fex은 형광광도계의 emission monochromator를 chl-a Fem의 λ_{max} 에 놓고 입구슬릿 6 nm와 출구슬릿 2 nm에서 excitation monochromator에서 나오는 빛으로 주사하였다. 진공장치는 회전펌프와 수은확산장치를 연결하여 사용하였으며 필요한 경우는 액체질소를 사용하였다. 용매의 취급과 시료의 용해 및 분광광도계에 의한 측정실험은 모두 대기를 제거한 진공상태 (1.0×10^{-6} mmHg 이상)에서 실험하였다. n-prOH는 CaH₂를 사용하여 탈수 건조하였고 나머지의 다른 용매는 LiAlH₄를 사용하여 탈수건조하였다. 그리고 chl-a는 1.0×10^{-6} mmHg 이상의 진공시스템에서 탈수 건조된 CCl₄를 진공시스템 중에서 chl-a에 소량씩 넣고 60°C에서 chl-a에 함유된 물과 함께 증류하는

조작을 네번씩 되풀이하여 탈수하였다.

chl-a를 5.12×10^{-6} M 되게 diethyl ether, Benzene, iso-octane의 탈수 건조된 유기용매에 녹인후 n-prOH를 14 M까지 여러 농도로 첨가하여 soret와 red band의 흡광도와 Fem 스펙트럼의 세기를 각기 측정한 결과는 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다. Fig. 1 및 Fig. 2의 실험에서 chl-a 용액중에 함유된 n-prOH의 농도에 따른 λ_{max} 이동은 Fig. 3에 나타냈고 가시광중에서 soret/red band의 흡광도 세기는 Fig. 4에 나타냈다. diethyl ether중에서 chl-a의 농도를 3.1×10^{-2} M부터 7.5×10^{-8} M까지 농도를 변화시킨 Fem과 Fex 세기는 Fig. 5에 나타냈으며 각 농도에 따른 스펙트럼의 변화는 Fig. 6에 각기 나타냈다.

결 토

LiAlH₄를 이용하여 각기 탈수건조된 benzene, iso-octane, diethyl ether에 14 M까지 CaH₂로

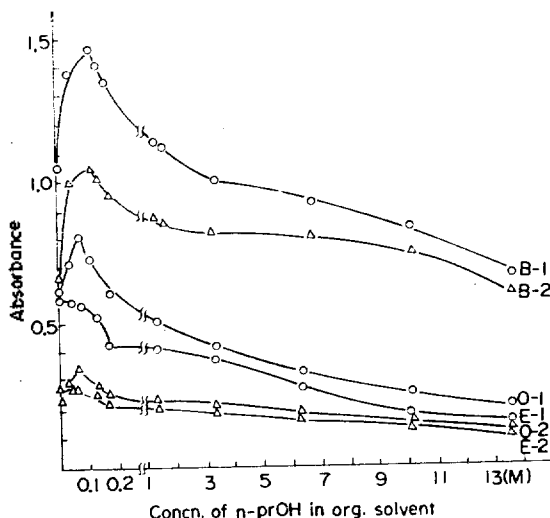


Fig. 1. The absorbance of chl-a (5.12×10^{-6} M) vs. the concn. of n-prOH in organic solvents.

Solvents	Absorbance band	
	Soret (λ_{max} , nm)	Red (λ_{max} , nm)
Benzene	B-1 (433)	B-2 (666)
iso-Octane	O-1 (430)	O-2 (663)
Diethyl ether	E-1 (428)	E-2 (658)

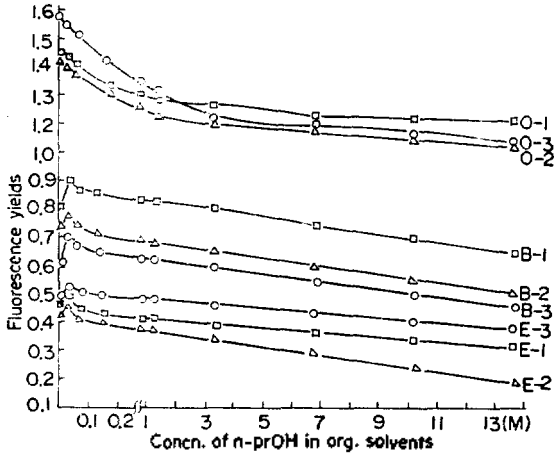


Fig. 2. The fluorescence yields of chl-a ($5.12 \times 10^{-6} M$) vs. the concentration of *n*-prOH in organic solvents. The values in () are nm at λ_{max} .

Fluorescences	<i>iso</i> -Octane	Benzene	Diethyl ether
Fluorescence emission	O-1(647)	B-1(672)	E-1(668)
Fluorescence excitation at red band	O-2(658)	B-2(665)	E-2(660)
Fluorescence excitation at soret band	O-3(430)	B-3(431)	E-3(426)

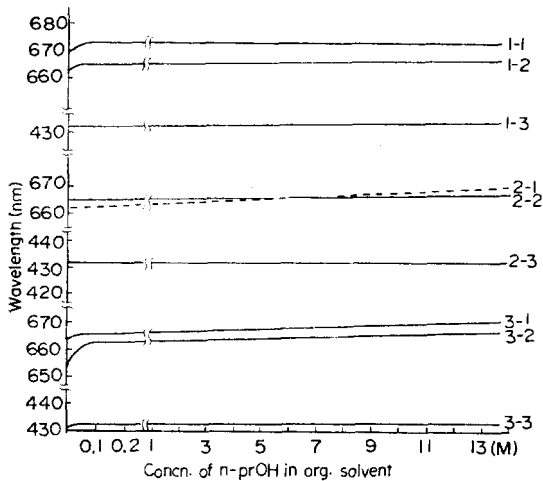


Fig. 3. The wavelength shift of chl-a ($5.12 \times 10^{-6} M$) on the absorbance and Fem vs. concentration of *n*-prOH in organic solvents.

Solvents	Fem	Absorbance bands	
		Soret	Red
Benzene	1-1	1-2	1-3
Diethyl ether	2-1	2-2	2-3
<i>iso</i> -Octane	3-1	3-2	3-3

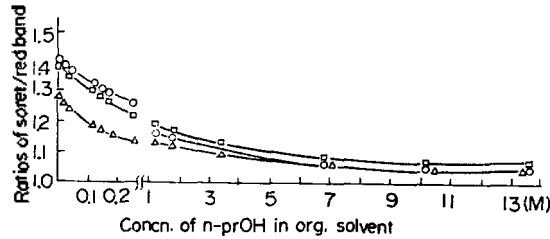


Fig. 4. The ratios of soret/red band on the absorbance of chl-a ($5.12 \times 10^{-6} M$) vs. the concentration of *n*-prOH in organic solvent. Δ : diethyl ether, \square : benzene, \circ : *iso*-octane. The wavelengths of soret and red are referred to Table 1.

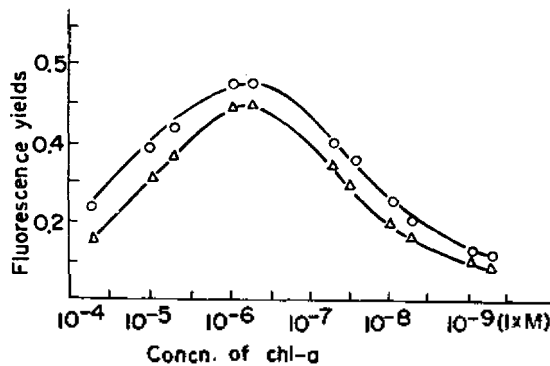


Fig. 5. The fluorescence emission and excitation yields vs. the concentration of chl-a ($5.12 \times 10^{-6} M$) in diethyl ether. \circ : fluorescence emission, Δ : fluorescence excitation at red band. The wavelengths of emission and excitation are referred to Table 1.

탈수건조된 *n*-prOH 를 첨가하면서 chl-*a* 를 녹인 용액의 가시광흡수 스펙트럼과 Fem 및 Fex의 세기를 점사한 결과는 Fig. 1 및 Fig. 2 와 같다.

n-prOH 는 다른 용매보다 chlorophyll 에 대한 용해도가 크므로 다른 용매에 녹아 있는 chl-*a* 용액에 *n*-prOH 를 가하면 (chl-*a*)₂ → 2chl-*a* 로 녹게 되므로 단위체와 소중합체의 존재를 확인할 수 있고 *n*-prOH 에 함유된 수분은 CaH₂ 에 의하여 쉽게 제거되므로 *n*-prOH 를 첨가제로 사용하였다. *n*-prOH 을 각 용매의 용액에 가하였을 때 Fig. 1 과 Fig. 2 에서는 0.1 M 부근까지 (ether 용액중에서는 0.102 M, benzene 과 *iso*-octance 중에서는 0.068 M) Fex 와 Fem 의 형광세기 및 가시광의 흡광도가 가장 큰 값을 나타냈지만 0.1

M 정도를 지나면 점점 감소하는 경향을 나타냈다.

Fig. 1에서 benzene 과 iso-octane 용액에 n-prOH 를 첨가함에 따라 흡광도가 증가하는 현상은 (chl-a)₂→2chl-a 의 상태로 변화되어 농도가 증가하므로 Lambert-Beer 법칙에 따라 흡광도가 증가하고 0.1 M 이상의 n-prOH 농도에서 감소되는 현상은 n-prOH 를 첨가함에 따라 chl-a 의 농도가 묽어지므로 감소한다. Diethyl ether 용매에 chl-a 를 녹인 용액은 n-prOH 을 첨가할때 benzene 이나 iso-octane 과 다른 현상이 나타난다. 이것은 chl-a 가 비극성 용매에 잘 녹지 않지만 극성용매에 잘 녹으며¹⁹⁻²³ 극성이 셀수록 chl-a·L < chl-a·L₂ < chl-a·L₃ 형태의 단위체로 존재할 가능성이 크므로 ether 중에서는 중합체

로 존재할 가능성은 작다.² 그러므로 Fig. 1의 ether 중에서 실험한 결과의 E-1 과 E-2 곡선은 꼭지점을 나타내지 않는다.

Fig. 2에는 Fem 과 Fex 의 solet 와 red band 의 세기를 점시하였다. benzene 과 diethyl ether 중에서는 Fig. 1 과 같은 결과를 나타냈지만 iso-octane 중에서는 곡선상에서 꼭지점을 나타내지 않는다. Fig. 2의 결과로 볼때 중합체에서는 형광이 세게 나타나고 단위체로 존재할때는 약하게 나타남을 알수 있다. 형광세기는 iso-octane, benzene, diethyl ether 의 순서로 감소하는데 이들의 유전상수값은 20 °C에서 각기 1.940, 2.284, 4.335 이다. 형광의 세기는 중합체가 생길수록 세게 나타나고^{9-13, 16, 24, 33} 친핵성용매일수록 단위체로 존재할 가능성이 증가하였으며¹⁹⁻²³ Fig. 2의 결과도 용매의 극성에 비례하여 나타났다. 그밖에 n-hexane(유전상수 1.890, 20 °C, 1,2-dichloro-benzene, 유전상수 9.93, 25 °C)의 용매중에서 실험하였을 경우에도 같은 경향성을 나타냈다. 흡광도는 형광세기와 반대로 극성이 셀수록 증가하였다. 그리고 흡광과 Fem 및 Fex 의 solet 와 red band 의 이동도는 용액에 n-prOH 을 첨가함에 따라 장파장쪽으로 Fig. 3 처럼 이동하고 띠의 너비는 넓어졌다. stokes shift 의 상세한 결과는 Table 1 과 같다.

Fig. 3 과 Table 1 에서 알수 있는 바와 같은 λ_{max} 의 장파장쪽 이동을 나타내는 경향은 극성이 약한 용매일수록 극성이센 n-prOH 를 혼합하여 용액의 극성을 변화시킬때 λ_{max} 의 이동은 크게 증가하였다.

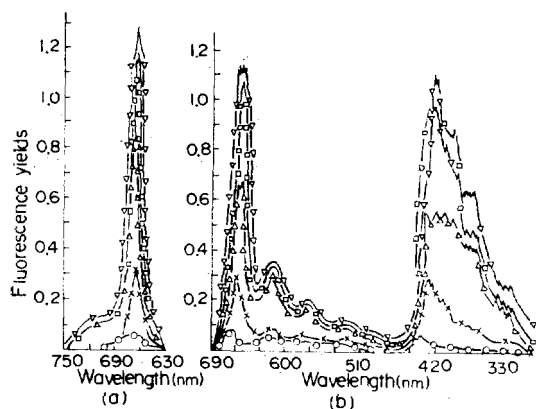


Fig. 6. The chl-a spectra of (a) fluorescence emission and fluorescence excitation. ○ : 3.1 × 10⁻²M, △ : 2.5 × 10⁻³M, □ : 5.2 × 10⁻⁴M, ▽ : 3.3 × 10⁻⁶M, × : 7.8 × 10⁻⁸M.

Table 1. The wavelength shift of chl-a on the absorbance, fluorescence excitation and fluorescence emission spectra.

Solvent	Absorbance		Fluorescence excitation		Fluorescence emission
	Soret	Red	Soret	Red	
Diethyl ether	432→433(1)	665→668(3)	431→433(2)	664→667(3)	672→673(1)
Benzene	431→433(2)	663→667(4)	429→435(6)	657→667(8)	662→671(6)
iso-Octane	427→432(5)	658→663(5)	426→433(7)	659→668(9)	664→682(18)

First figures are the wavelength (nm) which were appeared from the solvent of single component, and 2nd figures are the wavelength (nm) which were appeared from the solution of 14 M n-prOH mixed with a organic solvent. The figures in () are net values of wavelength shift between the 1st and 2nd figure.

그리고 본래부터 극성이 큰 용매 (ethyl ether) 에 *n*-prOH 을 섞은 경우는 이와 반대이다. 이러한 현상은 $n \rightarrow \pi^*$ 와 $\pi \rightarrow \pi^*$ 의 에너지 전이 때문이다.^{25~28} 이와 같은 경우 흡광 Fem 및 Fex 의 장파장쪽 λ_{max} 이동은 용매와 chl-*a* 간에 편극인력이 작용하기 때문이다.^{28~30} 그러므로 순수한 유기용매에 *n*-prOH 를 0.1 M 정도가 되도록 가할때까지는 파장의 이동 (Fig. 3)과 흡광이나 형광세기의 변화가 심하게 나타난다 (Fig. 1). 이때 soret와 red band의 흡광과 Fex 및 Fem band의 높이에 1/2 되는 부분의 나비를 14 M까지 첨가한 *n*-prOH 농도에 대하여 점시했을 경우에도 Fig. 1과 같은 경향을 나타냈다.

Fig. 3과 Table 1에서 각 soret와 red band는 *n*-prOH의 농도가 증가하고 λ_{max} 이동이 클수록 같은 농도의 chl-*a*로부터 나타나는 soret와 red band의 이동도는 다르고 soret와 red band의 간격은 용액의 극성이 클수록 넓게 나타났다.

Fig. 4는 순수한 용매에 *n*-prOH 를 섞은 chl-*a* 용액에 대한 soret/red band 세기의 비를 점시한 것으로 Fig. 1과 같이 용매의 극성이 클수록 비값은 크게 나타났다.

chl-*a*와 chl-*b*의 평형상수를 측정하기 위하여 여러 용매중에서 흡수띠의 나비를 연구한 결과³¹에 의하면 용액의 굴절률과 유전상수에 따라 변하며 80%의 아세톤용액중에서는 흡광도가 증가할수록 띠의 나비는 증가하였다.¹⁴ 그리고 soret/red band는 물이나 Me-OH를 포함한 용액중에서 1.11~1.20이고 건조된 diethyl ether에서는 1.31이었다.³² 이 실험에서도 Fig. 4처럼 soret/red band의 세기에 대한 비는 용매의 극성과 흡광도가 클수록 큰값을 나타냈다. 그리고 chl-*a* 용액에 *n*-prOH의 농도를 증가하여 극성을 증가시킬때 비값은 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 그러므로 비값은 용액에 함유된 극성 물질의 농도에 따라 변한다. Fig. 4의 iso-octane과 benzene 중에서는 이제까지 발표된 값^{14, 31, 32}보다 훨씬 더 큰 1.40과 1.39의 값을 나타냈으며 diethyl ether 중에서는 이미 발표된 문헌 값^{14, 31, 32}과 거의 같은 값을 나타냈다.

Fig. 5는 chl-*a*를 탐수건조된 순수한 diethyl ether에 각기 다른 농도를 만들어 Fex와 Fem의 세기를 측정한 결과이다. chl-*a*의 농도가 1.0×10^{-6} M 정도일때 세기는 최대값을 나타냈지만 농도가 진하면 감소되었고, 더 묽은 경우에도 감소되었다. 묽을때 감소되는 현상은 Beer 법칙에 따르기 때문에 당연하지만 진할때 감소되는 현상은 chl-*a*의 중합체 생성 때문이다.^{9~13, 15, 33}

Fig. 6에서 2.5×10^{-2} 및 5.2×10^{-4} M chl-*a* 용액은 soret와 red band에서 미세구조를 나타내었다. 이러한 특유의 스펙트럼은 chl-*a*의 중합체 때문에 나타나는 것이다. 같은 용액에 대한 가시흡광 스펙트럼에서는 675 nm에서 중합체의 특유한 shoulder의 스펙트럼을 나타냈다. Diethyl ether 중의 chl-*a*에 대한 흡광도는 Fig. 5와 같은 경향성의 결과를 나타냈다. 그러나 흡광스펙트럼의 모양은 농도에 따라 Fig. 6과 같이 변하지 않았고 다만 띠나비만이 Fig. 4처럼 변하였다. 그러므로 chl-*a*를 정량분석할때 용액의 극성, 용매의 성분, chl-*a*의 함량 및 중합체의 생성에 따라 큰 오차를 초래하므로 주의하여야 한다.

인용문헌

1. L. P. Vernon and G. R. Seely, The chlorophylls, Academic press New York and London, 1966.
2. K. Ballschmitter, T. M. Cotton, H. H. Strain and J. J. Katz, *Biochim. Biophys. Acta*, **180**, 347 (1969).
3. F. F. Fong, V. J. Koester and J. S. Polls, *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 6406 (1976).
4. F. F. Fong and V. J. Koester, *Biochim. Biophys. Acta*, **423**, 52 (1976).
5. G. Sherman and H. Linschitz, *Nature*, **215**, 511 (1967)
6. K. Ballschmitter, K. Trusdell and J. J. Katz, *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 604 (1969).
7. T. M. Cotton, A. D. Trifunae, K. Ballschmitter and J. J. Katz, *Biochim. Biophys. Acta*, **368**, 414 (1975).
8. T. A. Evans and J. J. Katz, *Biochim. Biophys. Acta*, **396**, 414 (1975).
9. V. J. Koester and F. F. Fong, *J. Phys. Chem.*,

- 60, 2310 (1976)
10. R. L. Amster, *Photochem. Photobiol.*, **9**, 331 (1977).
 11. C. Kratky and J. D. Danitz, *J. Biol.*, **113**, 431 (1977).
 12. L. L. Shipman, J. R. Norris and J. J. Katz, *J. Phys. Chem.*, **80**, 877 (1976).
 13. S. B. Broyde and S. S. Broyde, *J. Chem. Phys.*, **46**, 3334 (1967).
 14. M. S. Cresser and E. J. O'Neill, *Talanta*, **27**, 305 (1980).
 15. L. L. Shipman, T. M. Cotton, J. J. Norris and J. J. Katz, *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 8222 (1976).
 16. 박연웅, 이학논집 (전국대학교), **6**, 39 (1980).
 17. K. G. Boto and J. S. Bunt., *Anal. Chem.*, **50**, 392 (1978).
 18. J. A. Barltrop and J. D. Coyle, "Principle of Photochemistry," P. 71, John Wiley and Sons, New York, 1978.
 19. K. Sauer, J. R. Lindsay Smith and A. J. Schultz, *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 2681 (1966).
 20. R. Livingston, *Quart. Rev., Chem. Soc.*, **14**, 174 (1960).
 21. R. Livingston, W. F. Watston and McArdle, *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 1542 (1949).
 22. J. Fernandez and R. S. Becker, *J. Chem. Phys.*, **31**, 469 (1959).
 23. L. Lavorel, *J. Phys. Chem.*, **61**, 1600 (1957).
 24. H. C. Chow, R. Serlin and C. E. Strouse, *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 7230 (1975).
 25. M. Kasha, *Discussion Faraday Soc.*, **9**, 14 (1950).
 26. F. Halverson and R. C. Hirt, *J. Chem. Phys.*, **19**, 711 (1951).
 27. H. McConnel, *J. Chem. Phys.*, **20**, 700 (1952).
 28. E. M. Kosower, *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 3261 (1968).
 29. N. S. Bayliss and E. G. McRae, *J. Phys. Chem.*, **61**, 563 (1957) *Spectrochim. Acta*, **12**, 192 (1958).
 31. G. R. Seely, *Spectrochimica*, **21**, 1847 (1965).
 32. H. T. Perkin and D. W. A. Roberts, *Biochim. Biophys. Acta*, **79**, 20 (1964).
 33. T. M. Cotton, P. A. Loach J. J. Katz and K. Ballschmitter, *Biochem. Photobiol.*, **27**, 735 (1978).
 34. M. W. Melhuis, *J. Res. Nat. Bur. Standard (U. S.)*, **76 A**, 547 (1972).
 35. E. Ejdjer, *Opt. Soc. Amer.*, **59**, 223 (1969).