DAEHAN HWAHAK HWOEJEE
(*Journal of the Korean Chemical Society*)
Vol. 26, No. 4, 1982
Printed in the Republic of Korea

유기용매중에서 Chlorophyll-*b*의 흡광 및 형광 (제 2 보)

李重和 · 金明淑* · 鄭求春* · 朴晃用*†
세종대학교 화학과
*건국대학교 문리과대학 화학과
(1981. 11. 3 접수)

The Absorbance and Fluorescence of Chlorophyll-*b* in Organic Solvents (II)

Choong-Hwa Lee, Myong-Suk Kim* Koo-Chun Chung* 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-*b*를 소중합체로서 용매에 녹였을때 친핵성 *n*-prOH를 첨가함에 따라 흡광도와 Fluorescence emission의 세기는 증가하였지만 단위체로 녹은 다음에는 *n*-prOH의 농도증가에 따라 점차 감소하였다. chl-*b*는 소중합체의 생성때문에 Beer 법칙에 따르지 않았으며 용매의 극성변화에 따라 stockes shift를 나타냈다. 이러한 경향성은 chl-*b*의 정량에 고려하여야될 점이다.

ABSTRACT. The wavelength of chlorophyll-*b* on the absorbance and fluorescence emission were shifted to the longer depending on the increasing of solvent polarities but fluorescence excitation spectra were not. The presence of chl-*b* oligomers and monomers were identified by the specra of fluorescence emission, fluorescence excitation, absorbance and the measurement of its intesities *vs.* the concentration of *n*-prOH added to chl-*b* solution. The calibration curve of chl-*b* solution were not obeyed to Beer's law in the range of concentrated soln. because of the presence as the oligomers.

서 론

식물이나 조류(algae)의 에너지 흡수 안테나로 이용되는 chlorophyll-*a*(chl-*a*)와 chlorophyll-*b* (chl-*b*)는 대단히 많이 연구되어 있다. 특히 chl-*b*에 대한 연구는 1966년에 Vernon과 Seely[1]에 의하여 단행본으로 출판되었으며 그 이후 chl-*b*에 대한 수화물 생선[2], 소중합체 확인[3], 소중합체와 단위체간의 형광관계[5], 스펙트럼의 띠나비, 용매효과[6], 정량방법[7], 평형상수[8], 이제까지의 연구개요[9]등에 대한 결과가 발표되어 있다.

그러나 chl-*b*는 가시광 및 형광의 스펙트럼을 이용하여 소중합체의 존재를 확인하거나 그들의 세기를 측정하여 확인하는 방법은 아직 연구된 결과가 없다.

이 연구에서는 중합체가 생성되었을때 그것을 단위체로 변화시키는 *n*-prOH를 가하여 가시광과 형광의 세기를 측정하므로서 친핵성 용매의 첨가에 의한 chl-*b* 소중합체의 확인, 흡광도와 형광의 세기에 미치는 용매의 극성영향과 파장이동에 대하여 연구한 결과를 발표하고자 한다.

실험 및 결과

chl-*b*는 신선한 시금치에서 추출 분리하여 정제[10]한 후 건조된 상태로 보관하였고 사용할 때마다 각 용매에 묽혀 정량[1,7]한 다음 사용하였

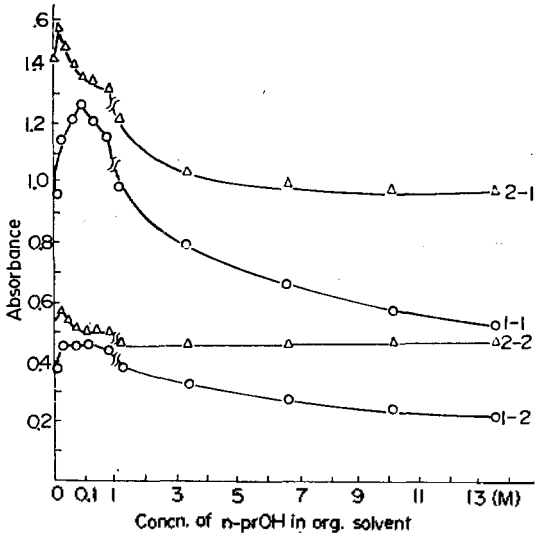

Fig. 1. The absorbance of chl-*b* ($3.9\times10^{-6}M$) at soret and red band *vs.* the concentration of *n*-prOH in organic solvent.

solvents	absorbance band soret (λ_{max}, nm.)	red (λ_{max}, nm.)
Diethyl ether	1~1 (455)	1~2 (644)
Benzene	2~1 (461)	2~2 (648)

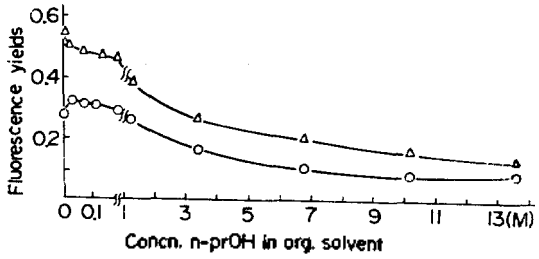

Fig. 2. The fluorescence emission yields of chl-*b* ($3.9\times10^{-6}M$) *vs.* the concentration of *n*-prOH in organic solvent. □ : λ_{max} at 644nm in diethylether; △ : λ_{max} at 648nm in benzene.

다.

형광광도계의 보정과 에너지환산, 형광의 측정, chl-*b*의 탈수정제, 용매와 정제등은 전보와 같다[11].

chl-*b*를 benzene, diethyl ether 용매에 $3.9\times10^{-6}M$되게 녹여 극성이 큰 *n*-prOH를 14 *M*까지 각 용매에 가하여 흡광도를 측정한 결과는 *Fig.* 1, 같은 용액의 Fem을 측정한 결과는

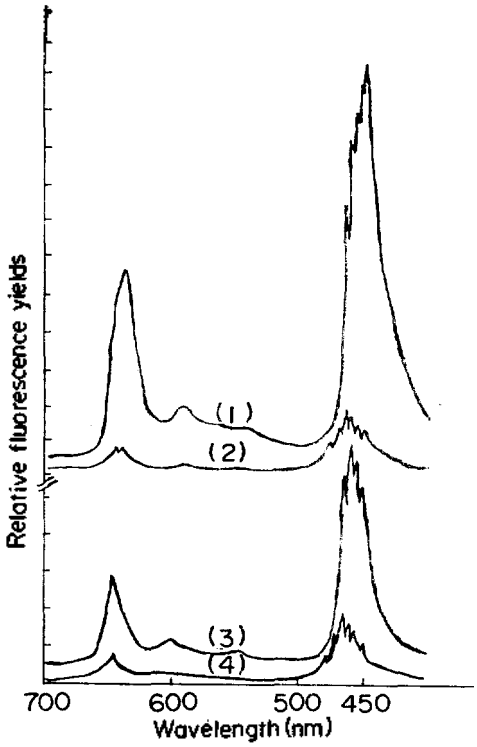

Fig. 3. The fluorescence excitation spectra of chl-*b* ($3.9\times10^{-6}M$). (1) Diethyl ether, (2) 14 *M* *n*-prOH in dieithyl ether, (3) benzene, (4) 14 *M* *n*-prOH in benzene.

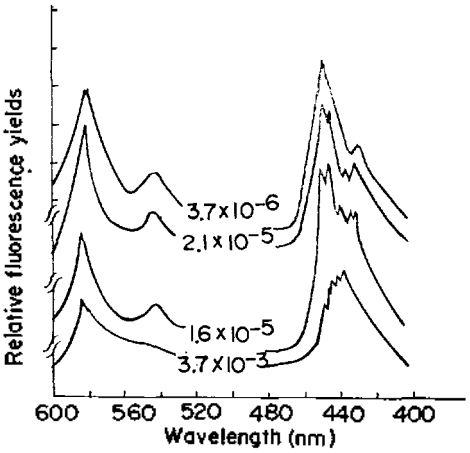

Fig. 4. The fluorescence excitation spectra of chl-*b* in benzene (concentration unit; mole/*l*)

Fig. 2, 순수한 diethyl ether과 benzene 용매, 그리고 이 용매에 14*M*의 *n*-prOH를 가했을때의

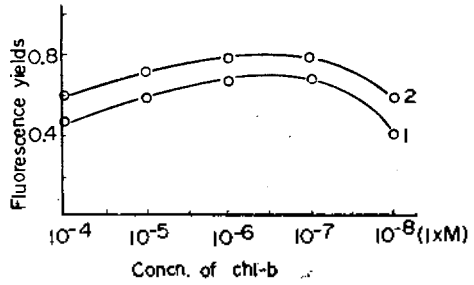

Fig. 5. The fluorescene excitation and emission yields *vs.* the concentration of chl-*b* in benzene. Each wavelength refers to *Table* 1. (1) Flurescence emission, (2) Fluorescence excitation at red band.

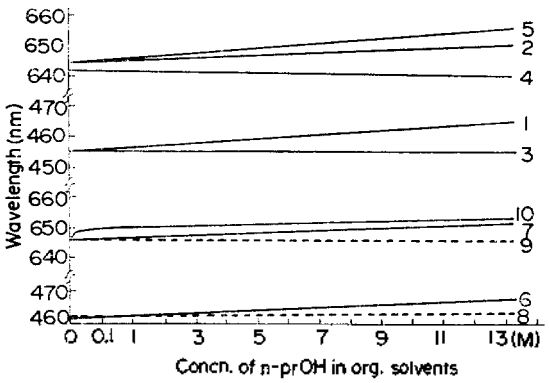

Fig. 6. The wavelength shift of chl-*b* ($3.9\times10^{-6}M$) on absorbance, fluorescence excitation and emission in diethyl ether and benzene.

Solvents	Absorbance Soret band	Absorbance Red band	Fluorescence excitation Soret band	Fluorescence excitation Red band	Fluorescence emission
Diethyl ether	1	2	3	4	5
Benzene	6	7	8	9	10

서로 다른 스펙트럼은 *Fig.* 3, 그리고 benzene에 녹인 여러가지 농도의 chl-*b* 용액에 대한 스펙트럼은 *Fig.* 4, benzene에 녹인 여러가지 농도의 chl-*b* 용액에 대한 Fex와 Fem의 세기는 *Fig.* 5, 그리고 diethyl ether와 benzene에 *n*-prOH를 14 *M*까지 가할때, 그리고 Fem의 파장이동은 *Fig.* 6에 각기 나타냈다.

검 토

chl-*b*는 *iso*-octane 중에서 용해도가 작으므로[10] diethyl ether와 benzene만을 용매로 사용하였다. chl-*b*의 흡광도와 Fem의 세기를 측정한 결과(*Fig.* 1과 2)는 *n*-prOH를 diethyl ether에 0.018 *M*되게 그리고 benzene에 0.1 *M*되게 가할때 극대의 세기를 나타냈지만 더 이상의 농도로 *n*-prOH를 가하면 점점 감소되는 경향을 나타냈다.

Fig. 1의 흡광도 증가는 소중합체가 녹아 단위체로 변하여 chl-*b* 분자의 농도가 증가하기 때문에 흡광도가 증가하는 것이고 흡광도의 감소는 일정한 농도에 *n*-prOH를 첨가할때 마다 chl-*b*의 용액이 묽어지기 때문이다. *Fig.* 2에서 diethyl ether에 chl-*b*를 녹인 Fem의 측정값은 benzene 용액과 다르게 꼭지점을 나타내지 않고 점차 감소하는 경향을 나타냈는데 그 이유는 처음에 chl-*b*를 diethyl ether에 녹여 용액을 만들때 chl-*b*의 Mg원자(전자받게)에 케토원자단이 결합하여 소중합체를 생성하려는 경향과 Mg원자에 케토원자단 대신에 diethyl ether이 결합하려는 경쟁적 반응에서 diethyl ether (유전상수 4.34, 20° C) 이 우세하므로 benzene (유전상수 2.23, 20°C) 용액처럼 소중합체가 생기지 않기 때문이다. 소중합체는 유전상수값이 작은 용액일수록 잘생긴다[2]. chl-*b* 분자의 다섯번째고리의 9번째 자리에 있는 케토(C=O)가 주기 역할을 하여 또 다른 chl-b 분자의 Mg원자와 결합하여 이합체[12]와 다합체[13]를 생성한다. 이러한 용액에 *n*-prOH를 가하면 chl-*b*의 Mg 원자에 대하여 케토원자단과 경쟁적 반응에 의하여 케토원자단대신에 *n*-prOH가 결합하여 단위체로 변하기 때문이다. 이러한 결과는 소중합체가 센 형광을 나타낸다는 이론[5,14,15]과 일치되지만 한편으로는 생성된 소중합체의 정도에 따라 형광세기가 변한다는 사실을 나타내고 있다. 순수한 diethyl ether와 berzene에 chl-*b*를 녹인 용액과 이 용액에 14 *M*되게 *n*-prOH를 가하였을 때의 Fex 스펙트럼은 *Fig.* 3과 같다. Soret band는 용액에 따라 약간씩 서로 다른 모양을 나타

Table 1. The wavelength shift of chl-*b* ($3.9\times10^{-6}M$) on the absorbance, fluorescence excitation and emission spectra.

Solvent	Dieletric const. at 20°C	Absorbace band		Fluore. excitn.		Fluore. em.
		Soret	Red	Soret	Red	
Benzene	2.284	461~467(6)	646~652(6)	456~456(0)	641~641(0)	648~653(5)
Diethyl ether	4.335	455~465(10)	644~651(7)	462~462(0)	646~646(0)	644~657(13)

The 1st figures in table are the wavelength(nm) which were appeared from the solvent of single component, and the 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.

내고 *n*-prOH를 가함에 따라 세기는 크게 감소되었다. 그리고 같은 용액이라도 *n*-prOH의 함유량에 따라 서로 다른 스펙트라의 모양을 나타냈으며 특히 benzene 용액에서는 *Fig.* 4처럼 크게 다르게 나타났다. 그 이유는 chl-*b* 분자의 $\pi\rightarrow\pi^*$와 $n\rightarrow\pi^*$ 단일항상태[16,17]의 흡수 때문이다[14,18]. 그리고 diethyl ether와 benzene 용액에 14*M*까지 chl-*b*를 첨가할때 430 nm 부근에 상당하는 chl-*b*의 흡광띠는 점점 없어지는 대신에 415nm 부근에서 새로운 흡광띠가 나타났고 그밖의 스펙트라의 모양은 변하지 않았다. 그러므로 첫째는 *Fig.* 1과 *Fig.* 2처럼 chl-*b* 용액에 친핵성 *n*-prOH를 가하여 chl-*b*의 소중합체와 단위체생성에 따르는 형광이나 흡광도를 측정하여 확인할수 있고 둘째는 *Fig.* 3과 *Fig.* 4처럼 soret band의 모양을 비교하여 소중합체의 생성 여부를 확인할수 있고 셋째 *Fig.* 5처럼 농도가 진할수록 형광의 세기가 감소하는 경향으로 확인할수 있었다. 농도변화에 따른 Fex 스펙트럼의 모양과 세기는 *Fig.* 4와 같다. 농도에 따라 소중합체의 생성이 다르므로[2,12,13] 들뜨는 상태도 다르다. 그러므로 스펙트럼도 각기 다르게 나타난다[5]. soret band 부근에서 나타나는 Fex 스펙트라는 농도가 묽은 경우($3.7\times10^{-6}M$) 두개의 스펙트럼을 나타내지만 농도가 진하면(1.6×10^{-4}~$2.1\times10^{-5}M$) 4~5개로, 그리고 더 농도가 진하면($3.7\times10^{-3}M$) 각 스펙트라의 세기가 반대순서로 변하면서 430 nm의 스펙트럼은 나타내지 않았다. 그밖의 스펙트라모양은 변하지 않았다. 그러므로 430 nm의 흡광띠는 *n*-prOH를 14 *M* 되게 첨가할수록 점점 약해지면서 나타나지 않고 Fex에서는 430 nm의 스펙트럼이 chl-*b*의 농도가 진할수록 약해지면서 나타나지 않았다.

chl-b의 농도변화에 따르는 Fem과 Fex의 red band의 세기는 *Fig.* 5와 같다. 여러가지로 농도를 변화시킨 chl-*b* 용액의 흡광도를 측정한 결과도 같은 경향을 나타냈다.

Benzene과 diethyl ether 중에서 soret 및 red band와 Fem band의 λ_{max} 이동은 *Fig.* 6과 같다. diethyl ether와 benzene의 두가지 용액중에서 Fex의 soret band와 red band는 *n*-prOH의 농도를 변화시켜도 λ_{max} 이동은 없고 일정한 값을 유지하였다. 그러나 흡광과 Fem의 λ_{max}은 장파장쪽으로 이동하였으며 그중에서도 Fem의 λ_{max}이 가장 크게 이동하였는데 *n*-prOH을 14 *M*까지 점점 더 첨가할수록 장파장쪽으로 더 많이 이동하였다 (*Table* 1). 그리고 diethyl ether와 benzene의 두 용매중 극성이 큰 diethyl ether 중에서 더 많은 장파장쪽 이동을 나타냈다. chl-*a*의 경우는 유기용매에 *n*-prOH을 가할때 0.2 *M* 이내에서 가장 큰 λ_{max}의 이동을 나타냈는데 chl-*b*의 경우는 0.018 *M* 이내에서 benzene 중에서만 급격한 이동을 나타냈고 그밖에는 *n*-prOH의 농도에 직선적으로 비례하는 경향을 나타낸 것이 chl-*a*와 chl-*b* 사이의 차이점이다. λ_{max}의 이동은 용액의 극성이 클 수록 더 많이 이동하였다.

chl-*b*는 혼합된 용매, chl-*b*의 농도, 용액의 성분과 극성에 따라 흡광, Fem, Fex의 세기와 λ_{max} 이 변화되므로 정량할때 주의하여야 할 점이다.

인 용 문 헌

1. L.P. Vernon and G.R. Seely, "The chlorophylls", Academic Press New York, 1966)
2. K. Ballschmiter, T.M. Cotton, M.H. Strain and J.J. Katz, *Biochim. Biophys. Acta*, **180**, 347 (1969).
3. K. Ballschmiter, K. Trusdell and J.J. Katz, *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 604 (1969).
4. M. S. Cresser and E. J. O'Neill, *Talanta*, **27**, 305 (1980).
5. R. L. Amster, *Photochem. Photobiol.*, **9**, 331 (1969)
6. A. M. North, R.A. Pethrick, M. Kryszewski and B. Nadolski, *Acta physica Polonica*, **A54**, 797 (1978).
7. K. G. Boto and J. S. Bunt, *Anal. Chem.*, **50**, 392 (1978).
8. G. R. Seely, *Specrochim. Acta*, **21**, 1847 (1965).
9. J.S. Brown, *Photochem and Photobiol.*, **26**, 319 (1977).
10. 박면용, 이학논집(건국대학교) **6**, 39 (1980).
11. C.H. Lee, J.H. Kang, B.S. Kim and M.Y. Park, *J. Korean Chem. Soc.*, **26**, 218 (1982).
12. G.L. Class, J.J. Katz and F.C. Pennington, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.*, **70**, 261 (1950).
13. K. Ballschmiter and J.J. Katz, *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**. 283 (1968); *Angew. Chem. (Intern. Ed. Engl.)*, **7**, 286 (1968).
14. S.B. Broyde and S.S. Broyde, *J. Chem. Phys.*, **46**, 3334 (1976).
15. T.M. Cotton, P.A. Loach, J.J. Katz and K. Ballschmiter, *Biochem. Photobiol*, **27**, 735(1978)
16. R.L. Amster and G. Porter, *Proc. Roy. Soc.*, **298**, 38 (1966).
17. K. Sauer, J.R.L. Smith and A.J. Schultz, *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 2681 (1966).
18. R. Livingston, *Quart. Rev.*, **14**, 174 (1960).