

L- α -lecithin 이중층막에서 Methylene Blue의 회합

李 弘 · 李厚燾†

원광대학교 자연과학대학 화학과

(1991. 5. 27 접수)

Aggregation of Methylene Blue on the L- α -lecithin Bilayer Membrane

Hong Lee and Hoo-Seol Lee†

Department of Chemistry, Wonkwang University, Iri 570-749, Korea

(Received May 27, 1991)

요 약. Sodium dodecyl sulfate(SDS), chondroitin sulfate 그리고 L- α -lecithin vesicle의 각각의 수용액에서 methylene blue(MB)의 metachromatic 성질을 18°C에서 52°C까지 흡수분광법으로 측정했다. MB는 지질이 고농도일 때 vesicle 매트릭스에 뭉치를 형성했다. MB의 metachromasy는 vesicle의 상전이 온도에 무관하게 나타났으며, 이것은 색소가 vesicle의 친수성 표면에서 회합함을 의미한다. Vesicle에서 MB의 metachromasy 현상은 hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB)를 첨가할 때보다 SDS를 첨가할 때 매우 약하게 관측되었다. 이것은 vesicle 표면에서 계면활성제들의 끼어드는 위치가 다른 것으로 보이며, CTAB가 SDS보다 색소뭉치 사이에 더욱 잘 끼어드는 것으로 사료된다.

ABSTRACT. Metachromatic behavior of methylene blue (MB) in solutions of aqueous sodium dodecyl sulfate (SDS), chondroitin sulfate and L- α -lecithin vesicle at 18~52°C has been studied by absorption spectroscopy. MB was clustered in the matrix of the vesicle with high concentration of L- α -lecithin. The metachromasy of MB was found to be independent of phase transition temperature of vesicles. These results suggest that the dyes were aggregated on the hydrophilic surfaces of vesicle. In the vesicular system, the metachromatic effect of MB was dramatically decreased in the presence of hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) than SDS. It is estimated that the intercalation site of these surfactants on vesicle surfaces was different, that is, the intercalation of CTAB was more effective than that of SDS.

서 론

유기색소 분자들은 수용액 중에서 분자 회합에 의해 색소의 농도가 증가함에 따라 장파장쪽의 α 흡수띠는 감소하고 단파장쪽의 β 흡수띠는 증가하며, 조건에 따라 더 짧은 파장쪽의 γ 및 J 흡수띠가 나타나며 이것은 trimer 이상의 다분자 회합체의 흡수대인 것으로 알려져 있다. 이러한 흡수띠의 변화현상을 metachromasy 현상이라 한다. 한 흡수띠에서 다른 흡수띠로의 변화는 색소의 농도의 변화, 미셀의 첨가여부, 고분자 전해질 또는 염의 첨가에 따라 단위체의 α 흡수띠는 줄어들면서 청색이동을 하여 이합체인 β 흡수띠가 새로이 나타난다. 이때

동흡광점이 존재하게 되는데 이것은 단위체와 이합체의 평형으로 알려져 있다. 더욱 진한 농도에서는 더욱 큰 청색이동에 의해 γ 흡수띠가 나타나며 이것도 색소 분자들의 회합체 형성을 의미한다. 수평 또는 수직 쌓임(stacking)을 하는 β 나 γ 흡수띠와는 다르게 J 흡수띠는 기울어진 쌓임으로 알려져 있다. Polyvinyl sulfate(PVS) polystyrene sulfate(PSS)와 같은 고분자 음이온 존재하에서 색소들의 metachromasy 현상에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다²³. 그러나 색소들의 분자회합의 분광학적인 metachromasy 현상에 대한 메카니즘 및 구조론적 입장에서 총괄적으로 설명할 수 있는 확고한 이론은

정립되지 않고 있으며, 지질이중층막에서의 metachromasy 현상에 관한 보고가 드물다^{4,5}. 양이온성 색소와 생화학적인 고분자들과의 상호작용에 관한 연구의 중요성은 생체조직을 염색하거나 actinomycin 등과 같은 항생제와 유사한 성질을 가지기 때문에 여러 생화학적인 분야에 많은 유용한 기초자료를 제공해 준다.

본 연구에서는 음이온성 고분자인 chondroitin sulfate 및 인지질이중층막에서 methylene blue (MB)의 metachromasy 현상을 고찰하고, 이중층막이 친수성 부분에서 MB의 회합현상에 대한 음이온성 및 양이온성 계면활성제의 하전효과를 알아보 고자 한다.

실 험

기구 및 시약. Methylene blue, L- α -lecithin(soy bean), hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate(SDS) 그리고 chondroitin sulfate는 Sigma사 제품을, NaOH, HCl, KCl 등은 Junsei사 제품을 더이상 정제하지 않고 사용했다. 자외부-가시부 분광기는 Pye Unicam사의 SP8-400 uv/vis spectrophotometer를 사용했고, pH

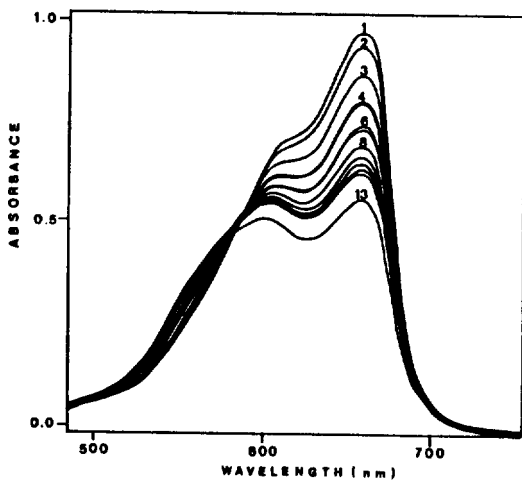


Fig. 1. Absorption spectra of $4.5 \times 10^{-5} M$ MB in L- α -lecithin vesicles at $18^\circ C$; 1: $X_1=0$, 2: $X_1=0.00442$, 3: $X_1=0.0088$, 4: $X_1=0.0132$, 5: $X_1=0.01754$, 6: $X_1=0.0217$, 7: $X_1=0.02660$, 8: $X_1=0.0426$, 9: $X_1=0.1180$, 10: $X_1=0.1820$, 11: $X_1=0.3080$, 12: $X_1=0.40000$, 13: $X_1=0.4160$, pH=7.4, $X_1=[\text{lecithin}]/([\text{lecithin}]+[\text{MB}])$.

미터는 Orion사의 model 611를 사용했다. 초음파기는 태금사의 20 KHz ultrasonicator를 사용하였고 항온조는 Hauke사 제품을 사용했다.

막의 제조 및 흡수곡선의 측정. Lecithin 이중층막은 20 ml chloroform 용액에 0.1 mmol L- α -lecithin을 녹인 후 Deamer 동과⁶ 같은 방법으로 만들어, 이 용액에 15분 동안 초음파를 처리하여 vesicle을 제조하였으며 $4^\circ C$ 이하로 보관했다. 이때 초음파 처리시 용액의 온도는 항온조를 사용하여 $4^\circ C$ 로 유지시켰다. MB의 보관용액을 1 mM로 만들었으며 차광하에서 사용했다. 이차 증류수를 사용하여 0.001 M tris-HCl 완충용액을 만들었으며, 이 수용액으로 다른 모든 색소용액을 제조했다. 모든 보관용액은 3일 이내에 사용했다. 색소의 스펙트럼은 α 및 β 흡수띠가 알맞게 나타나는 MB의 농도조건에 계면활성제 및 지질의 농도를 변화시키며 측정했다.

결과 및 고찰

L- α -lecithin vesicle 수용액에서 MB의 흡수스펙트럼들은 Fig. 1과 같다. MB의 농도를 $4.5 \times 10^{-5} M$ 로 유지하면서 지질의 농도를 변화시킬 때, 지질의 농도가 증가함에 따라 α 흡수띠의 흡광도는 줄어들고 β 흡수띠는 단파장으로 이동되었다. 지질의 몰분율에 대한 상대적인 흡광도비(α/β)를 Fig. 2에 나타냈다.

Fendler 등은⁷ 양이온성 dioctadecyldimethylammonium bromide(DODAB) vesicle과 음이온성

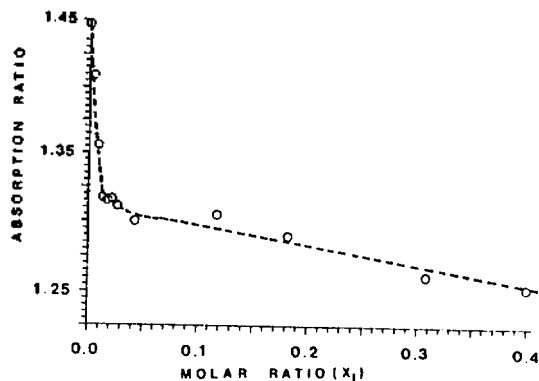


Fig. 2. Plot of absorption ratio (α/β) of MB as a function of mole fraction of L- α -lecithin at $18^\circ C$, pH=7.4, $X_1=[\text{lecithin}]/([\text{lecithin}]+[\text{MB}])$.

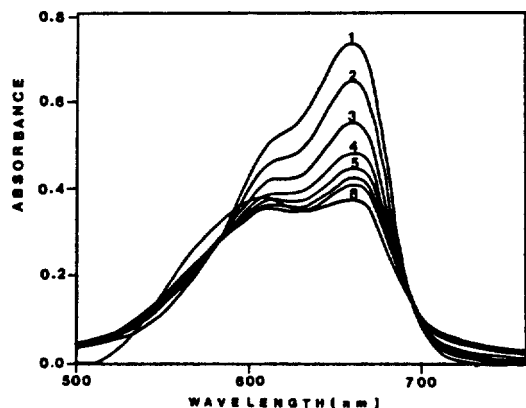


Fig. 3. Absorption spectra of $2 \times 10^{-5} M$ MB in the presence of SDS at $18^\circ C$; 1: S/D=0, 2: S/D=0.1, 3: S/D=0.2, 4: S/D=0.3, 5: S/D=0.4, 6: S/D=0.6, 7: S/D=0.7, 8: S/D=0.8, pH=7.4, S/D; surfactant (SDS) to dye (MB) ratio.

$[CH_2=CHC_6H_4CONH(CH_2)_{11}O][n-C_{16}H_{33}O]PO_2^-$ (VBAP) vesicle의 존재하에 양이온성 염료인 toluidine blue(TB)가 monomer, dimer 그리고 oligomer 회합을 하는 경우에 DODAB vesicle만이 존재할 때는 monomer만이 존재하나, TB와 반대 하전을 가지는 VBAP를 첨가하는 경우에는 세 가지의 회합이 모두 나타나며 이것은 vesicle에 포함된 VBAP는 TB와 coulmb힘이 작용되어 TB의 쌓임에 좋은 분위기를 제공한다고 보고했다. L- α -lecithin은 인지질과 다른 종류의 지질 그리고 유기산을 포함하므로 vesicle 표면의 전체 하전을 규정할 수 없으나, 양이온성 염료인 MB가 회합을 이루는데 회합자리를 제공해주는 것으로 본다⁸. Fig.1에서 vesicle의 농도가 진할수록 dimer가 증가하며, 물분율이 0.4 이상에서는 oligomer라 일컬어지는 γ 흡수띠가 약간 나타났다.

MB의 회합성을 음이온성 계면활성제에 의해 촉진이 되며⁹, 본 실험에서 MB 용액에 SDS($[SDS] = \sim 1.6 \times 10^{-5} M$)를 첨가했을 때 확인되었다(Fig. 3). 또한 농도비, $[SDS]/[MB]$, 가 0.8 부근에서 oligomer 형태인 γ 흡수띠가 나타났다. 이것도 동흡광점(585 nm)이 일치하지 않은 것으로 보아 α 및 β 가 γ 와 평형을 이루지 않은 것으로 농도비 0.8 부근에서는 새로운 형태의 MB회합체가 생성되는 것으로 생각된다.

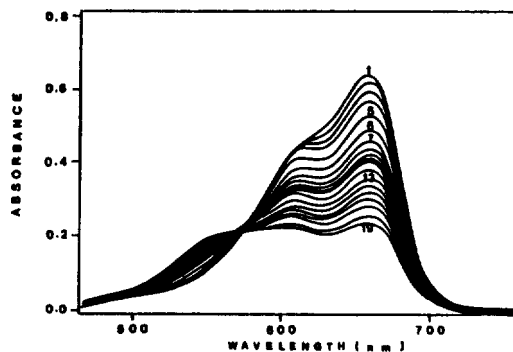


Fig. 4. Absorption spectra of $2 \times 10^{-5} M$ MB in the presence of chondroitin sulfate at $18^\circ C$; 1: P/D=0, 2: P/D=0.1, 3: P/D=0.2, 4: P/D=0.3, 5: P/D=0.4, 6: P/D=0.5, 7: P/D=0.6, 8: P/D=0.7, 9: P/D=0.8, 10: P/D=0.9, 11: P/D=1.0, 12: P/D=1.1, 13: P/D=1.2, 14: P/D=1.3, 15: P/D=1.4, 16: P/D=1.5, 17: P/D=1.6, 18: P/D=1.7, 19: P/D=1.8, P/D; polymer (CS) to dye (MB) ratio.

MB의 metachromasy는 주기적으로 음이온을 갖는 chondroitin sulfate 존재하에서도 나타났다(Fig. 4). 550 nm에서 보이는 γ 흡수띠는 고분자의 농도가 증가함에 따라 선형적으로 증가했고¹⁰, 570 nm 근처에서 동흡광점이 잘 나타났다. 이것은 Fig. 3의 SDS 수용액에서의 달리 고분자 chondroitin sulfate는 음이온 자리에 일정한 간격으로 MB가 배열하며 α 및 β 가 동시에 γ 와 평형을 이루는 것으로서 고분자의 음이온자리에 색소의 입체적인 수직배열에 관계되는 것으로 알려졌으며¹¹, 본 실험에서 $HgCl_2$ 를 사용한 경우에도 비슷한 결과가 나타났다.

Vesicle의 유동도 변화에 따른 MB의 회합형태의 변화는 온도가 상승됨에 따라 oligomer는 사라지고, 단위체의 흡광도가 이합체의 흡광도보다 더욱 크게 증가했다(Fig. 5). 온도가 상승하면 vesicle 이중층 막은 측면으로 팽창되고 표면적이 넓어지며, 유체상이 되면 표면의 친수성으로 감소한다¹². 고체상에서 이중층막은 지질 분자가 기울어진 형태의 L_β 이며, 상전이 온도에 이르면 과형을 이루는 액정상이 되고, 막 사이의 물질 이동도가 최대가 되며 이로 인해 큰 엔트로피의 증가에 의해 막의 소수성 부분에 있는 화합물의 반응성이나 입체적 배향에 큰 변화가 수반된다. 그리고 상전이 온도 이상에서는 아실기의 자유유동도 뿐만 아니라 지질 전체 분자의 회전에

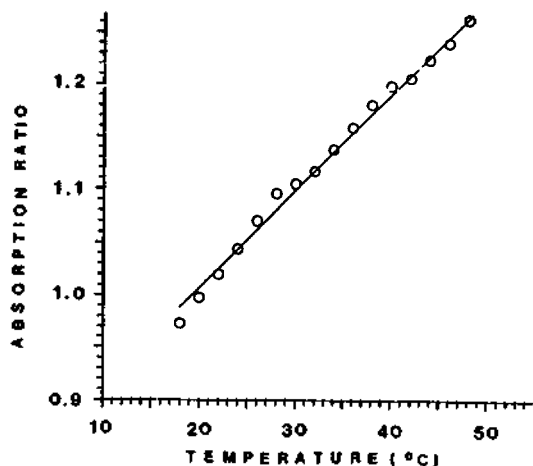


Fig. 5. Temperature dependence of absorption ratio (α/β) of $4.5 \times 10^{-5} M$ MB in the presence of $3.2 \times 10^{-5} M$ L- α -lecithin vesicle at pH=7.4.

의해 유체상인 L_{α} 형이 된다¹³. 따라서 온도가 상승됨에 따라 이중층막 표면의 친수도의 감소에 의해 막표면에서의 색소들간의 상호작용이 약화되며 색소와 색소 사이 그리고 지질과 색소 사이의 입체적인 배열이 달라지기 때문에 metachromasy가 소멸되는 것으로 본다. Lemin 등은¹³ methylene blue 2B[MB-2B] ($\sim 10^{-4} M$)의 온도에 따른 단위체의 흡광도 증가량이 비직선적이며, $80^{\circ}C$ 이상의 고온에서는 거의 회합하지 않는다고 보고했다. Fig. 4에서 α/β 가 온도에 대해 직선으로 나타난 것은 MB가 막의 소수성 부분에 존재하지 않기 때문에, MB의 온도상승에 따른 단위체 \rightarrow 이합체간의 평형이동에 지질의 아실사슬의 상전이 효과에 대해 큰 변화를 보이지 않는 것으로 본다.

Vesicle 표면의 하전 효과를 보기 위해 CTAB과 SDS를 첨가했다. 두 경우 계면활성제를 첨가함에 따라 β 및 γ 흡수띠가 감소했고 α 흡수띠는 증가했다. 양이온성인 CTAB는 매우 소량($[CTAB] = \sim 1 \times 10^{-7} M$)에 의해 γ 흡수띠의 감소와 α 흡수띠의 증가가 매우 빠르게 진행되었으나(Fig. 6), 음이온성인 SDS($[SDS] = \sim 2 \times 10^{-6} M$)는 CTAB에 비해 상당히 많은 양에서도 흡수띠가 안정했다(Fig. 7). 이것은 vesicle 표면에서 MB-MB간의 상호작용력을 감소시키는데 양이온성인 CTAB가 음이온성인 SDS보다 더욱 효과적으로 작용하며, 또한 매우 소

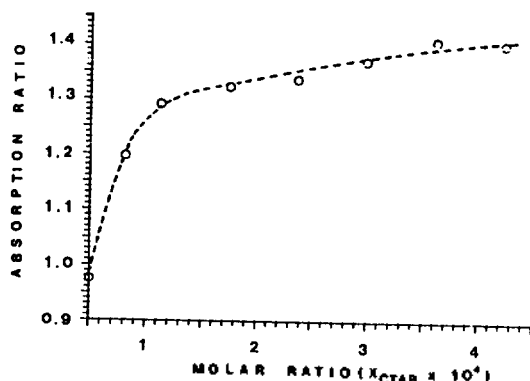


Fig. 6. Plot of absorption ratio (α/β) of $4.6 \times 10^{-4} M$ lecithin vesicle as a function of molar ratio of CTAB at pH=7.4, $18^{\circ}C$. $X_{CTAB} = [CTAB]/([lecithin] + [CTAB])$.

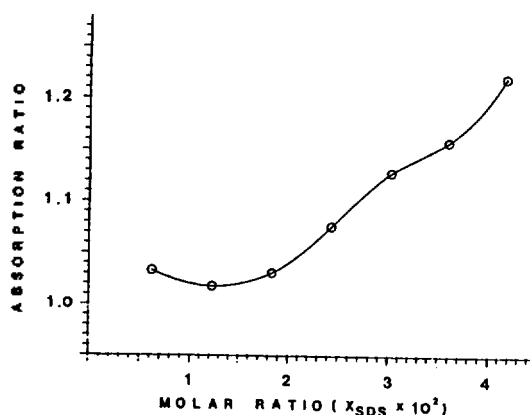


Fig. 7. Plot of absorption ratio (α/β) of $4.5 \times 10^{-5} M$ MB in the presence of $3.2 \times 10^{-5} M$ lecithin vesicle as a function of molar ratio of SDS at pH=7.4, $18^{\circ}C$. $X_{SDS} = [SDS]/([SDS] + [lecithin])$.

량의 CTAB에 의해 α 흡수띠가 증가하는 것으로 보아 CTAB는 MB-지질간의 상호작용효과마저도 감소시키는 것으로 사료된다. 본 실험의 계면활성제의 농도는 임계 미셀 농도보다 낮은 범위이었다.

결론

Metachromatic 색소 MB는 SDS와 chondroitin sulfate 그리고 L- α -lecithin vesicle 존재하에서 metachromasy 현상을 나타냈고, vesicle의 농도가 증가할수록 더욱 많은 oligomer를 형성했다. 또한 vesicle의 상전이에 무관한 것으로 보아 친수성부분에서 회합하는 것으로 본다. L- α -lecithin vesicle 수

용액에서 MB의 metachromasy 소멸효과는 SDS를 첨가할 때보다 매우 적은 양의 CTAB의 첨가에 의해 급격히 감소하였다. 이것은 양이온성 계면활성제(CTAB)가 음이온성 계면활성제(SDS)보다 vesicle 표면과 MB간의 상호작용력은 물론, MB회합체 사이에 끼어들어 MB-MB간의 상호작용력을 쉽게 약화시키는 것으로 생각된다.

인 용 문 헌

1. L. Michaelis and S. Granick, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1212 (1945).
2. R. E. Ballard and C. H. Park, *J. Chem. Soc. (A)*, 1340 (1970).
3. V. Vitagliano and L. Costantino, *Boll. Soc. Natur. Napoli*, **78**, 169 (1976).
4. G. Dodin and J. Dupont, *J. Phys. Chem.*, **91**, 6322 (1987).
5. A. S. Verkman and M. P. Frosh, *Biochemistry*, **24**, 7117-7122 (1985).
6. D. Deamer and A.D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, **443**, 629-634 (1976).
7. B. Lerebours, H. J. Watzke, and J. H. Fendler, *J. Phys. Chem.*, **94**(4), 1632-1641 (1990).
8. S. Mabrey, P. L. Mateo, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry*, **17**, 2464-2468 (1978).
9. H. Sato, M. Kawasaki, K. Kasatani, Y. Kusumoto, N. Nakasama, and K. Yoshihara, *Chem. Phys. Lett.*, 1529 (1980).
10. M. K. Pal and M. Schubert, *J. Phys. Chem.*, **67**, 1821 (1963).
11. K. Bergmann and C. T. O'Konski, *J. Phys. Chem.*, **67**, 2169 (1963).
12. K. W. Miller, W. D. M. Paton, and R. A. Smith, *Molopharmacol*, **8**, 131-143 (1973).
13. M. J. Janiak, D. M. Small, and G. G. Shipley, *Biochemistry*, **15**, 4575-4580 (1976).
14. D. R. Lemin and T. Vikerstaff, *Trans. Faraday Soc.*, **43**, 491 (1947).