

단 신

Dihexadecyl Phosphate Vesicle에서 양이온 색소분자의 회합

崔虎燮* · 金興斗†

군산대학교 자연과학대학 화학과

†서해대학 임상병리과

(1998. 6. 8 접수)

Aggregation of Cationic Dyes onto Dihexadecyl Phosphate Vesicle

Ho-Soeb Choi* and Heung-Tu Kim†

Department of Chemistry, KunSan National University, Kunsan 573-360, Korea

†Department of Clinical Pathology, So Hue Junior College, Kunsan 573-11, Korea

(Received June 8, 1998)

대부분의 유기색소들중에는 그들의 흡수스펙트라가 수용액에서 Lambert-Beer의 법칙에서 벗어나는 현상을 나타내는 것들이 많이 있다. 이러한 경우 순수 수용액하에서 색소의 농도가 증가함에 따라 단량체(monomer)의 흡수에 해당하는 α -band의 흡광도는 감소하고 동시에 이보다 파장장쪽에 β -band의 흡광도가 증가하는 현상이 나타나며 조건에 따라서 β -band보다 더 짧은 파장쪽에는 γ -band와 α -band보다 더 긴 파장쪽에 J-band 등으로 알려진 새로운 흡수대들이 나타나며 이러한 현상은 색소분자들 간의 상호작용 효과로 인한 분자회합에 기인하는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁵

α -및 β -band는 각각 단위체 및 이합체(dimer)의 흡수대이며 더 짧거나 긴 파장쪽의 것들은 삼합체(trimer)이상의 다분자 회합체의 흡수대임이 잘 알려져 있다. 또한 유기색소들은 고분자 전해질의 존재하에서 P/D값(고분자반복단위농도/색소농도)의 변화에 따라서 짧은 파장위치에 meta-band(metachromatic band)로 알려진 새로운 흡수대가 나타나는데 이 흡수대의 출현은 색소분자와 고분자 전해질 사이의 상호작용에 의하여 형성된 색소-고분자의 착화합물에서 결합된 색소들의 배열상태와 관계가 있으며, stacking 효과에 의하여 잘 설명된다.^{6,8}

유기색소 분자들의 흡수 스펙트럼의 특징적인 변화현상을 총괄하여 변색성(metachromasy)이라 한다.

첨가물질 Dihexadecyl phosphate(DHP)는 음이온을

띠고 있는 2가닥으로 된 사슬을 가지고 있으며 2분자막을 형성하는 유용성 계면활성제(surfactant)로 알려져 있다.^{9,15} 이러한 계면활성제와 색소사이의 상호작용을 살펴 보고자 한다. 이러한 계면활성제는 물에 분산 시켜서 초음파로 미세하게 교반하면 베지클(vesicle)이 생긴다. 베지클의 2분자층 두께는 30~50 Å, 전체의 지름은 약 100 Å이며 베지클 2분자막에는 여러 가지 물질을 가용화 시켜서 그성질을 바꿀수도 있다. 그리고 베지클은 미셀(micell)과 마찬가지로 화학반응의 촉매 작용을 하며 온도변화에 따라 상태가 변하기도 한다.

본 연구에서는 색소-베지클 간의 상호작용 효과를 연구하기위해 전형적인 변색성 염료로 알려진 Acridine Orange(AO), Toluidine Blue(TB), Pyronine G(PG)와 순수한 수용액에서는 거의 회합현상을 볼 수 없다고 알려진 Proflavine(PF)등의 4가지 유기색소를 선택하고 수용액하에서 베지클을 형성하는 Dihexadecyl phosphate(DHP)를 색소의 농도보다 높은 농도로 하여 이들 색소와 점차 반응시켜 나타나는 상호작용 효과를 흡수 및 형광 스펙트럼으로 측정하여 이들의 회합요인을 고찰하였다. 그리고 Robinson¹⁶과 Vitagliano¹⁷가 제안한 모델을 이용해서 회합 형성모델을 제시하고, 컴퓨터 program을 이용하여 열역학적인 회합평형상수를 구하였고 이 값을 이용하여 자유에너지를 계산하여 각각의 에너지 변화를 비교, 관찰하였다.

실 험

본 실험에서 사용한 분광 광도계는 SHIMADZU사의 UV-Visible Spectrophotometer model UV-2401-PC 와 PTI사의 Quanta Master™ Model QM-1 및 Ratio Master™ Model RCM fluorescence spectrophotometer 를 사용하였으며, 사용한 quartz cell들은 path length 가 1, 2, 5, 10 mm인 것을 사용하였다. 형광 측정시 excitation wavelength가 AO는 468 nm, PF는 445 nm, PG는 518 nm, TB는 600 nm로 고정시킨 조건하에서 형광 스펙트라를 측정하였다. 그리고 모든 스펙트라를 측정할 때마다 일정한 온도(20 ± 0.1 °C)를 유지하기 위하여 CPS-controller(240 A)를 부착하여 측정하였다.

또한 모든 시료는 Sartorius A 120S로 정밀하게 칭량하였고 원심분리기는 JISICO사의 Model C-CB4를 사용하였으며 Branson사의 Model 185 Ultra Sonifier 를 사용하였다.

AO, PF, PG, TB의 stock solution은 1.0×10^{-3} M 로 조제하였고 베지클(DHP)의 저장용액은 pH=8.0로 조정된 Tris buffer로 20 mM로 조제하고 베지클을 넣은 용기를 얼음으로 채운후 20분간 초음파 처리한 다음 20분간 원심분리하여 4 °C에 보관하였다. DHP 저장용액은 실험전 10분간 초음파처리한 다음 사용하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 PG-DHP계의 흡수 스펙트럼을 보여주고 있는데, DHP의 농도가 6.0×10^{-6} M에서 1.0×10^{-4} M

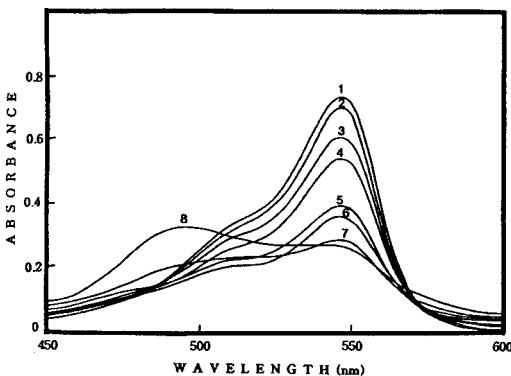


Fig. 1. The absorption spectra of PG-DHP system with the various concentration of DHP. [PG]= 2×10^{-5} M, 1) 0 M 2) 6.0×10^{-6} M 3) 8.0×10^{-6} M 4) 1.5×10^{-5} M 5) 2.4×10^{-5} M 6) 4.0×10^{-5} M, 7) 6.2×10^{-5} M 8) 1.0×10^{-4} M.

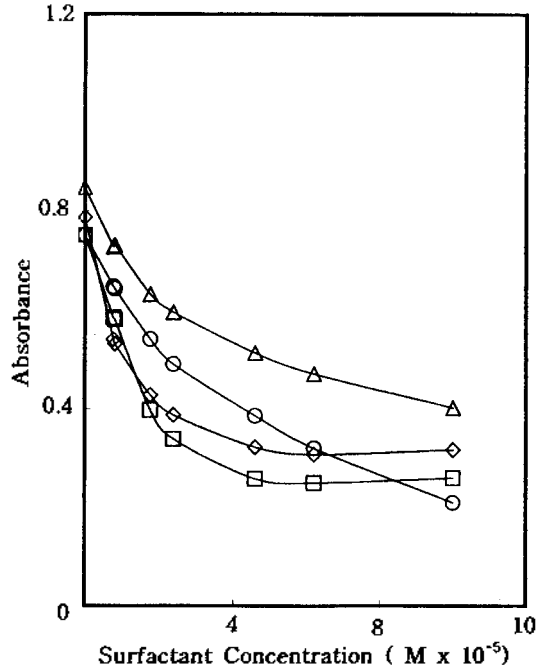


Fig. 2. Changes of the absorbance of α -band with the change of concentration of DHP. [Dye]= 2×10^{-5} M, (\diamond) AO-DHP system, (\triangle) PF-DHP system, (\square) PG-DHP system, (\circ) TB-DHP system.

M까지는 α -band(548 nm)에서의 흡수세기가 감소하고 6.2×10^{-4} M 일때 단파장쪽(495 nm부근)에서 새로운 흡수대가 나타나는데 이러한 단파장으로 이동된(blue shift) 새로운 흡수대는 보통 meta-band로서 알려져 있다. DHP의 농도 증가에 따르는 meta-band의 발생은 기본염료들이 베지클 분자의 표면에서 회합을 형성하는 것으로 해석할 수 있으며 Fig. 2는 AO, PF, PG 및 TB-DHP계의 α -band에서의 흡수세기 값을 도식한 것이다. 모든 색소가 거의 일정한 형태의 변화 양상을 나타내는 것을 볼 수 있다. 이와 같은 결과는 DHP가 모든 색소와 단량체 형태의 회합을 증진시키는 것으로 생각할 수 있다.

Fig. 3은 AO-DHP계의 형광 스펙트럼이며 낮은 농도의 DHP에서 형광세기의 감소현상이 나타나고 약간 높은농도(1.0×10^{-4} M)에서는 급격한 형광세기의 감소 현상을 살펴볼 수 있다. 이와 같은 현상은 PF, PG, TB도 거의 유사하고 여기에서도 형광세기의 감소 현상을 살펴볼 수 있으며 Fig. 4는 각각의 색소에 DHP를 첨가하였을 때의 형광세기 값을 도식한 것이다. 전체적인 변화 양상이 거의 유사하나

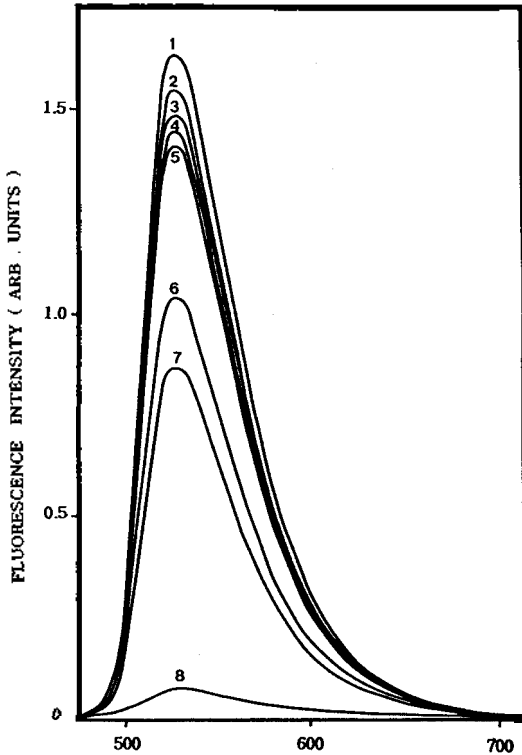


Fig. 3. The fluorescence spectra of AO with added DHP. $[AO]=2.0 \times 10^{-5}$ M, 1) 0 M 2) 6.0×10^{-6} M 3) 8.0×10^{-6} M 4) 1.2×10^{-5} M 5) 1.8×10^{-5} M 6) 2.2×10^{-5} M 7) 4.6×10^{-5} M 8) 1.0×10^{-4} M.

TB-DHP계의 형광세기값의 변화가 크게 나타남을 살펴볼 수 있다.

이상과 같은 실험 결과를 토대로 Newton-Raphson¹⁸ 계산법을 이용하여 상대적형광세기(relative fluorescence intensity; I/I_0)를 구하였다. 색소들의 농도는 일정하게 유지시키고 베지클의 농도를 조금씩 변화시켜서 얻은 상대적 형광세기의 값을 이론적 곡선에 적용시키고 실험을 통해서 얻은 AO, PF, PG, TB 색소들의 상대적 형광세기를 Fig. 5에 도시하였다.

Fig. 5의 Dye-DHP계에서는 TB의 I/I_0 가 가장 낮은 것을 볼 수 있는데 TB색소의 구조상 분자량이 크고 2가닥의 사슬을 가진 DHP와 결합을 잘 할 수 있는 색소분자 구조의 특성을 가지고 있기 때문으로 생각되어진다.

Robinson¹⁶과 Vitagliano¹⁷가 제안한 모델을 이용해서 Loadstandard와 Newton-Raphson법¹⁸을 적용한 식을 컴퓨터 program을 사용하여 작성한 모델에, 실험

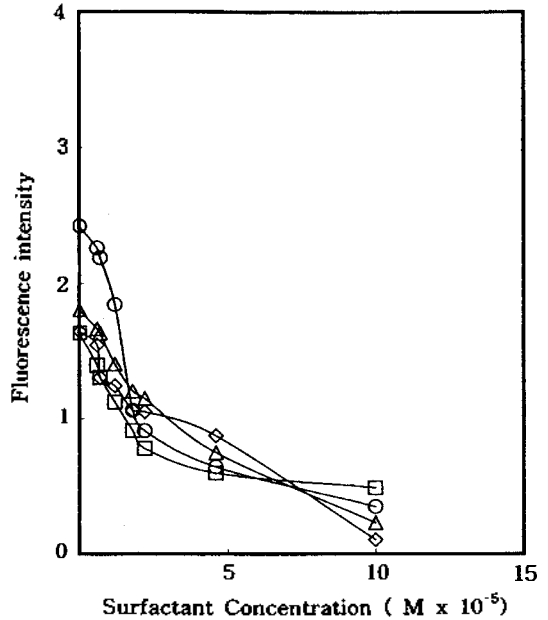


Fig. 4. Changes of the fluorescence intensity of λ_{max} with the change of concentration of DHP. $[Dye]=2 \times 10^{-5}$ M, (\diamond) AO-DHP system, (\triangle) PF-DHP system, (\square) PG-DHP system, (\circ) TB-DHP system.

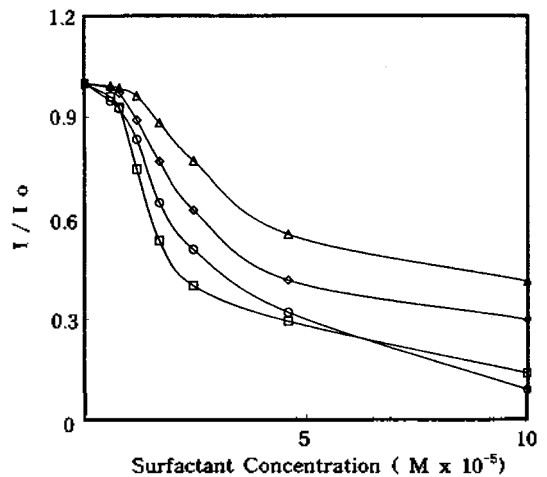


Fig. 5. Relative fluorescence intensity of dyes as a function of DHP concentration. (\diamond) AO-DHP system, (\triangle) PF-DHP system, (\square) TB-DHP system, (\circ) PG-DHP system.

에서 구한 상대적 형광세기를 적용하여 시행오차법(trial and error method)¹⁹으로 실험치에 K_O , K_S , K_D 값(equilibrium constants)의 변화를 주어(I/I_0)값과 가장 잘 일치하는 K_O , K_S , K_D 값들을 구하고 이 값을 이용하여 자유에너지를 계산하였으며 구한 값들을

Table 1. Equilibrium constants and free energies for dyes aggregation processes in the presence of DHP

system	Equilibrium constants			Free energies (kcal · mole ⁻¹)		
	K ₀	K _S	K _D	-ΔG ₀	-ΔG _S	-ΔG _D
AO/DHP	850	4.5 × 10 ³	3.5 × 10 ⁴	27.9	5.0	6.2
PF/DHP	820	5.3 × 10 ³	4.8 × 10 ⁴	24.7	5.1	6.4
PG/DHP	920	2.5 × 10 ³	5.5 × 10 ⁴	27.9	4.6	6.6
TB/DHP	930	5.5 × 10 ³	7.8 × 10 ⁴	27.2	5.1	6.9

Table 1에 제시하였다.

Table 1에서의 결과를 살펴보면 이온쌍 형성시의 평형상수값(K₀)과 회합체에 DHP 첨가시의 평형상수값(K_S)은 TB-DHP계가 가장 높게 나왔으며 이와 같은 결과는 TB가 DHP와 이온쌍형성시 작용하는 소수성에 원인이 있는 정전기적 상호작용이 크게 작용하는 것으로 사료된다. K_D의 평균편차는 약 2.5%로 나타났고 K₀는 8.0%의 편차가 있었으며 계산한 값들이 K₀나 K_S 변화에 거의 영향이 없음을 알 수 있었다. 이온쌍형성에서 정전기적 상호작용만 고려한다면 자유 에너지가 약 1 kcal · mol⁻¹보다 작은 값이나²⁰이 값들을 소수성인력(hydrophobic nature)이 존재함을 반영 시켜주면 2~3 kcal · mol⁻¹의 값과 같게 된다. 이와 같은 자유에너지에 편차가 생기는 것은 이온쌍이 형성되는 과정 동안에 용매인 물의 구조(water structure)변화와 엔트로피의 영향일 것이며 물의 구조변화로 돌릴 수 있다. 이러한 변화에 대한 영향은 아래의 Nagarajan과 Ruckenstein 법²¹으로 계산하였다.

$$\Delta G^{\circ}(\text{용매효과}) = (-0.536 \cdot n \cdot z) \cdot RT$$

이 식에서 n은 친양쪽성체(amphiphile)에서 CH₂기의 수이고, z는 사슬(chain)의 수이다. 식에 Table 1의 ΔG₀ 값들을 대입하여보면 n값이 12~16 사이의 값을 얻게 되는데 본 연구에서 사용한 두가닥의 사슬를 가진 DHP의 경우는 DHP의 표면에서 색소분자와 회합에 관여하는 사슬의 수는 15개 이므로 증가한 에너지들은 대체로 회합체의 소수성(hydrophobicity) 증가의 결과라고 생각할 수 있다. 수용액에서 AO의 회합평형상수(K_D)는 8,500~22,000사이의 값¹⁷이고, PF는 약 600, PG는 830 이라고 보고되어^{17,22}있는 바 본 연구의 색소분자용액의 회합에 대해서 소개한 평형상수값(K_D)들이 수용액에서보다 약 4~10배 큰 값을 갖게됨을 알 수 있었는데 이같은 현상은 소수성의 증가는 물론 음이온성인 DHP분자의 존재가 정전기

적 반발력의 감소때문에 더 높은 회합현상을 반영시켜 주는 것으로 간주할 수 있다.

결론

본 연구에서는 양이온 유기색소인 AO, PF, PG 및 TB를 선택하여 분자회합 현상에 따른 변색현상을 흡수 및 형광 분광학적인 방법으로 고찰하기위해 베지클을 형성하는 DHP와의 상호작용 효과를 모델로 사용하여 평형상수를 구하고 자유에너지를 계산하여 각각의 회합효과를 살펴 보았으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

AO, PF, PG 및 TB와 DHP와의 상호작용에 따르는 meta-band가 발견 되었으며 이러한 meta-band가 의미하는 바는 DHP표면에서 색소분자들이 회합을 형성하기 때문이며 회합체형성 과정에 대한 요인을 고찰할 목적으로 AO, PF, PG 및 TB에 DHP를 농도별로 첨가해본 결과 DHP의 첨가에 의한 회합효과의 증가는 DHP의 낮은 농도범위에서 발견 되었으며 이와 같은 결과를 가지고 회합에 대한 평형상수와 자유에너지를 계산하기 위해 양전하를 띤 색소분자들이 중심축을 따라서 평행하게 회합하고 그 주위에 음전하를 띤 DHP분자가 위치한 모델을 제안 하였다. 계산하는 과정을 처음에는 이온쌍(ion-pair)형성과 중성이나 양전하의 회합체에 DHP첨가시의 회합형성과 색소회합에 대한 평형상수값, 즉 K₀, K_S 및 K_D를 구하였고, 순수한 수용액에서 회합평형상수의 값(K_D=약 600~20,000)은 본 연구에서 계산한 Dye-DHP계의 평형상수 값(K_D=3.5~7.8 × 10⁴)보다는 훨씬 작게 나왔다.

DHP존재하에서 색소분자의 회합이 순수한 수용액에서보다 더 용이하게 이루어진 것으로 보아 이것은 음으로 하전된 DHP 존재가 양이온의 유기색소 분자 사이의 정전기적 반발력(repulsive electro static potential)의 가려막기(screening effect)효과로 사료되

며 앞에서 구한 회합평형 상수값을 이용하여 AO, PF, PG 및 TB와 DHP사이의 자유에너지 변화를 계산하여 보았다. 네가지 색소중 AO, PF, PG보다는 TB-DHP계의 자유에너지가(- ΔG_D) 가장낮게 나왔음을 알 수 있었으며 동일한 DHP존재하에서 각각의 색소분자들의 회합효과를 실험결과와 계산에 의해서 종합적으로 고찰한 결과 TB > PG > PF > AO의 순서로 나타났다. 이것은 색소분자의 소수성기의 차이와 관련이 있는것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Arbeloa, I. L.; Rohatgi-Mukerjee, K. K. *SpectrochimicaActa*. **1981**, 44A, 423.
- Clark, F. T.; Drickamer, H. G. *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 589.
- El-Mariah, A. A. R.; Kafafi, Z. H.; Moussa, E. A. *Indian J. Chem.* **1984**, 23A, 904.
- Perie, M.; Perie, J.; Chemla, M. *J. Sol. Chem.* **1988**, 17, 203.
- (a) Tinoco, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4785.
(b) Tinoco, I. *J. Chem. Phys.* **1961**, 34, 1067.
- Spencer, W.; Sutter, J. R. *ibid.* **1979**, 83, 1573.
- Mukerjee, P.; Ghosh, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6403, 6408, 6413, 6419.
- Ruprecht, J.; Baumgartel, H. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1984**, 88, 145.
- Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science*. **1972**, 175, 720.
- Courchemene, W. L. *J. Phys. Chem.* **1964**, 68, 1870.
- Mehreteab, A.; Straus, G. *Photochem. Photobio.* **1978**, 28, 369.
- Herz, A. H. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1977**, 8, 237.
- Handa, T.; Ichibashi, C.; Yamamoto, I.; Nakagaki, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, 56, 2548.
- Möbius, M. *Acc. Chem. Res.* **1981**, 14, 63.
- Reeves, R. L.; Maggio, M. S.; Hakaway, S. A. *ibid.* **1979**, 83, 2359.
- Robinson, B. H.; Loeffler, A.; Schwarz, G. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1973**, 69, 56.
- Vitagliano, V. in "Aggregation Processes in Solution"; Elsevier: Amsterdam. 1983; p. 241. 271.
- Dence, J. B. "Mathematical Techniques in Chemistry", Interscience: New York. 1975; p. 54.
- Choi, H. S.; Kim, H. T. *J. Kor. Chem. Soc.* **1995**, 39, 143.
- Tanford, C. T. "The hydrophobic Effect", Duke Univ, 1980; p. 113.
- Nagarajan, N.; Ruckenstein, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, 71, 580.
- Schwarz, G.; Balthasar, W. *Eur. J. Biochem.* **1970**, 12, 461.