

Chlorophyll a/b Ratio as a Criterion for the Reliability of Absorbance Values Measured for the Determination of Chlorophyll Concentration

Guangxi Wu and Choon-Hwan Lee*

Department of Integrated Biological Science and Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received January 31, 2019 / Revised February 25, 2019 / Accepted May 15, 2019

The Beer-Lambert law states that absorbance is proportional to the concentration of a solute in a solution at a given wavelength. This linearity works for an ideal or a 'sufficiently diluted' solution, so this linearity is often used as a criterion for the fidelity of the absorbance value measured. In this study, we used a chlorophyll (Chl) solution, isolated from rice leaves with 80% acetone to test the use of the Chl a/b ratio as an additional criterion for checking the fidelity of measured values using four different absorption spectrophotometers: Cary4E, UV-1650PC, Versamax (a microplate reader), and NanoDrop 1,000(which can handle a 4 μ l aliquot). We used Chl solutions of varying concentrations from 0.2 μ g/ml to 200 μ g/ml to measure absorbance values at 645 nm and 663 nm and checked the linearity first. The results indicated that the range of Chl concentrations that we can rely on based on the linearity was similar to the range in which the calculated Chl concentrations based on the measured absorbance values agreed with the known concentrations. However, some border cases or cases with very low Chl concentrations inside the fidelity range of Chl concentrations did not agree with the criterion that the Chl a/b ratio should not change after dilution of the Chl in the solution. These results suggest that the Chl a/b ratio is a better criterion for the reliability of the absorbance values measured for the determination of chlorophyll concentration than the criterion based on the linearity suggested by the Beer-Lambert law.

Key words : Absorbance, chlorophyll, chlorophyll a/b ratio, Lambert-beer law

서 론

Beer-Lambert 법칙에 의하면, 주어진 파장에서 측정된 흡광도(absorbance) 값은 용액내의 용질의 농도에 비례한다. 이 정비례 관계를 갖기 위하여, 용액의 농도는 충분히 묽어야 한다고 요구되지만 '충분히 묽다'는 말은 학술적이지 않은 용어로써 보다 구체적인 기준이 필요하다.

분광분석기(spectrophotometer)를 사용할 때, 빛의 경로의 길이(light pathlength)가 1 cm인 큐벳을 사용하는 범용 분광분석기의 경우, 흡광도 값이 0.7~0.8 보다 높거나, 0.1 이하의 매우 낮은 값인 경우 측정자의 주의가 필요하다. 고농도에서 일반적으로 정비례 관계는 용액의 농도가 높을 때, 즉 충분히 묽지 않기 때문에 보다 낮은 농도에서 측정한 값에서 환산한 기대치에 비하여 낮은 값을 갖게 된다. 그러므로, 정비례 관계가 성립하기 위해 충분히 묽은 용액인지 아닌지는 대상 물질의 농도별 흡광도 그래프를 그려 보면 알 수 있다. 그리고,

매우 낮은 농도에서는 측정된 흡광도 값은 매우 낮아서, 기계에서 시료와 무관하게 나타나는 노이즈에 대한 신호의 크기(signal/noise 값)가 매우 낮게 되면 신뢰도가 떨어지게 된다.

식물 잎을 사용하는 연구에서 엽록소(chlorophyll) 농도는 잎 내의 엽록체(chloroplast)의 양 뿐만 아니라 잎에서 추출한 틸라코이드(thylakoid) 현탁액에 존재하는 여러 색소단백질 양의 기준으로 사용된다. 따라서 매우 빈번히 측정되는 흡광도 값이 용액내의 엽록소 농도와 정비례 관계를 나타내면서 신뢰할 수 있는 범위에 있는 지를 확인하기 어렵기 때문에, 본 연구에서는 그 기준이 될 수 있는 척도를 정립하기 위해 4가지 다른 분광분석기를 사용하여 척도의 유용성을 조사해 보고, 또 기기에 따른 차이를 구명하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

벼(*Oryza sativa*, 품종 '동진벼')를 온실에서 낮/밤(16 hr/8 hr) 광주기와 30°C/26°C의 온도 주기로 재배하였다. 식물 잎 재료는 4주간 재배한 식물체의 상위 부분의 성숙한 잎을 사용하였고, 잎 끝에서 1 cm를 제거한 후 각 잎당 최대 3 cm의 절편을 만들어 사용하였다.

흡광도 측정

엽록소 측정을 위하여 총 5 g의 잎절편을 액체질소에서 분

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2280, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : chlee@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

쇄하였다. 이 분말은 100% 아세톤 용액에서 색소를 추출한 후, 범용 원심분리기를 사용하여 4°C에서 13,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 상등액을 취하고 최종 80%(v/v) 아세톤 용액을 만들어 두고, 다양한 엽록소 농도로 희석하여 실험재료로 사용하였다. 엽록소 농도는 아래의 Porra 등[4]의 식을 사용하였고, 각 흡광도 측정치에서 750 nm의 측정된 흡광도 값을 뺀 후 사용하였다.

$$\begin{aligned} \text{Chl a } (\mu\text{g/ml}) &= 12.25(A_{663.6}) - 2.55(A_{646.6}) \\ \text{Chl b } (\mu\text{g/ml}) &= 20.31(A_{646.6}) - 4.91(A_{663.6}) \\ \text{Chl a + b } (\mu\text{g/ml}) &= 17.76(A_{646.6}) + 7.34(A_{663.6}) \end{aligned}$$

흡광도의 측정을 위하여 아래의 4가지 다른 분광분석기를 사용하였다. 비교적 고가장비로서 안정된 측정치를 제공하는 것으로 알려진 Cary 4E (Varian, 미국), 범용 장비로 널리 사용되는 UV-1650PC (Shimadzu, 일본), ELISA microplate reader로서 그 원리가 분광분석기와 같은 Versamax (Molecular Devices, 미국), 그리고 NanoDrop 1,000 (Thermo Fisher Scientific, 미국) 등 4가지의 분광 분석기를 사용하였다. Versamax는 96 well plate에 200 µl의 엽록소 용액을 넣어 측정하였다. NanoDrop 1,000의 경우, 80% 아세톤 용액은 장비가 요구하는 시료 용액의 물기등을 만들지 못하기 때문에 대신 70% 아세톤 용액을 사용하였으며, 큐벳을 사용하지 않고, 4 µl의 소량 액체를 직접 측정하였다. 아래 두 기기의 경우, 소수점 이하의 파장 값을 입력할 수 없기 때문에 646 nm와 663 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

고농도 엽록소 용액에서 흡광도 값의 정비례 구간

본 연구에서 엽록소 농도에 정비례하는 흡광도 구간을 조사하기 위하여, 벼 잎의 색소를 80% 아세톤 용액으로 추출한 후 같은 용액으로 희석하여 다양한 농도의 엽록소 용액을 측정 시료로 이용하였다. 고등식물의 엽록소 농도의 결정을 위하여, 4가지 다른 흡광분광분석기를 사용하여 646 nm (또는 646.6 nm)와 663 nm (또는 663.6 nm)의 두 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 차이는 4개의 분광분석기 중 2장비(Versamax, NanoDrop)를 사용할 때, 소수점 이하의 파장 값을 입력하지 못하였기 때문이며, 이하 파장을 언급할 때는 편의상 소수점 아래의 값을 생략하였다. 실제, Mackinney [3], Arnon [1], Lichtenthaler와 Wellburn [3], Porra 등 [4] 및 Porra [5]는 645.0~646.6 nm와 663.0~663.6 nm의 두 지역의 파장대에서 흡광도를 측정하여 엽록소 농도를 계산하는 방법을 이용하고 있다.

먼저 흡광도 실험은 고농도의 엽록소 용액과 상대적으로 저농도의 엽록소 용액을 사용하여 측정하였다. 먼저 Fig. 1은 고농도 용액을 사용한 실험결과를 나타내는 것으로, 고농도 실험은 전체 엽록소(엽록소 a + b)의 농도가 최대 100 µg/ml의

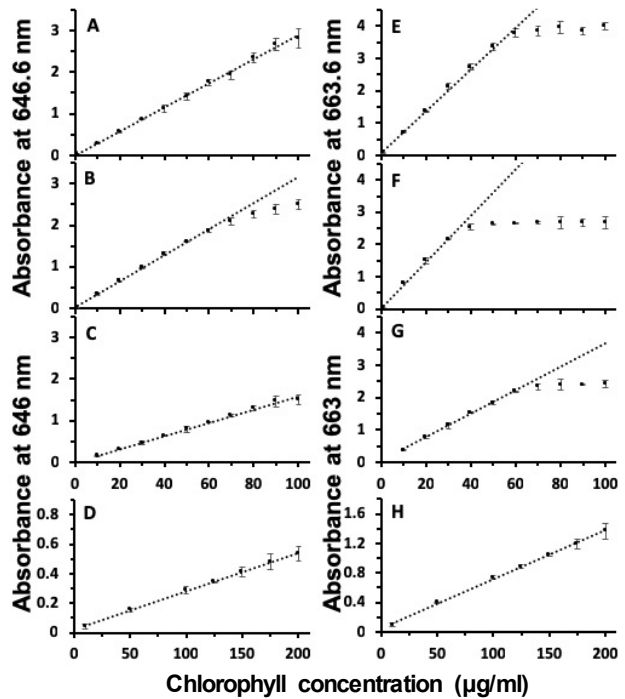


Fig. 1. Dependence of absorbance values on chlorophyll concentration using 80% acetone extracts in a relatively high chlorophyll concentration range from rice leaves. Absorbances were measured at 646.6 nm (A, B) or 646 nm (C, D) and at 663.6 nm (E, F) or 663 nm (G, H), using spectrophotometers: Cary4E (A, E), UV-1650PC (B, F), Versamax (C, G) and NanoDrop 1,000 (D, H). Experiments were repeated at least three times.

용액을 사용하였으며, NanoDrop3000은 최대 200 µg/ml의 용액을 사용하였다. Fig. 1A - Fig. 1D에서 646 nm에서의 흡광도 값 (A_{646})은 모든 고농도 용액의 범위 내에서 정비례 관계를 보였으나, UV-1650PC의 경우, 70 µg/ml 이상의 농도에서 흡광도 값이 기대치 보다 낮게 나왔다. 이때 흡광도 값이 이미 2.0 이상으로 일반적으로 신뢰하지 않는 구간이므로 실용성에는 문제가 있는 것은 아니며, 오히려 흡광도 값이 2 이상까지 정비례 관계가 유지되고 있음은 주목할 만한 사실이다. Fig. 1E - Fig. 1G에서 663 nm에서의 흡광도 값(A_{663})은 NanoDrop 1,000을 제외한 3가지 장비에서 높은 농도의 용액에서 흡광도 값이 기대치 보다 낮게 나왔다. Cary4E와 Versamax의 경우 60 µg/ml 이상의 농도에서, UV-1650PC의 경우 30 µg/ml 이상의 농도에서 흡광도 값이 기대치 보다 낮게 나왔다. 이 경우에도 흡광도 값이 이미 2.0 이상으로 앞서 언급한 바와 같이 실용성에 문제가 있는 것은 아니며, 3가지 장비에서 A_{646} 경우와 달리 A_{663} 값에서 정비례 관계가 성립하지 않는 경우가 많은 것은 엽록소의 A_{663} 이 A_{646} 보다 훨씬 크기 때문이다.

저농도의 엽록소 용액에서의 흡광도 실험결과(Fig. 2), Nano-drop 1,000을 제외한 3가지 장비에서 10 µg/ml과 1 µg/ml 사이의 용액의 경우 비교적 정비례 관계가 잘 관찰되었기 때

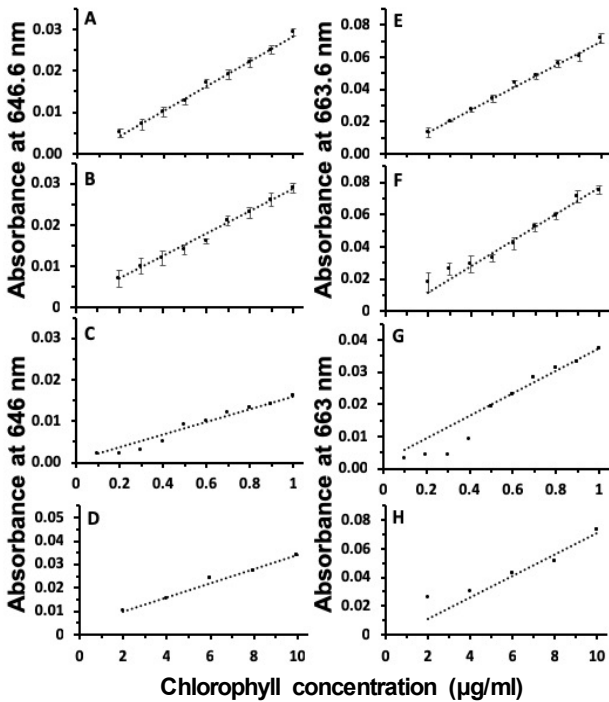


Fig. 2. Dependence of absorbance values on chlorophyll concentration using 80% acetone extracts in a relatively low chlorophyll concentration range from rice leaves. Absorbances were measured at 646.6 nm (A, B) or 646 nm (C, D) and at 663.6 nm (E, F) or 663 nm (G, H), using spectrophotometers: Cary4E (A, E), UV-1650PC (B, F), Versamax (C, G) and NanoDrop 1000 (D, H). Experiments were repeated at least three times except for C, D, G and H.

문에 저농도 실험은 1 µg/ml의 이하 농도에서 수행하였다. Nanodrop 1,000의 경우, 빛의 경로의 길이가 10 µm로 매우 짧기 때문에 위와 같은 저농도 실험에 적합하지 않기 때문에 10 µg/ml과 2 µg/ml 사이의 용액에 대하여 조사하였다. 그 결과, Cary4E는 A_{646} 과 A_{663} 에서 각각 흡광도 값이 0.005 및 0.01의 낮은 값까지 정비례 관계를 보여주었으며, 이는 고가 분석장비의 안정성 때문이라고 생각한다. UV-1650PC의 경우 A_{646} 은 이상이 없었으나, A_{663} 에서 0.4 µg/ml 이하의 농도에서 기대치 보다 높은 값을 보였다. Versamax의 경우 두 파장 모두에서 측정된 흡광도 값이 0.5 µg/ml 이하의 농도에서 기대치 보다 낮은 값을 보였으며, 이것은 이 장비의 빛 경로의 길이가 약 0.52 cm이며 용기 바닥의 빛 굴절 등의 이유로 매우 낮은 농도의 용액에서 오차를 보인 것으로 사료된다. NanoDrop 1,000은 A_{663} 값에서 2 µg/ml의 농도에서도 기대치 보다 큰 값을 보였다.

Fig. 3에서는 측정치로부터 계산한 엽록소 농도와 원래 희석할 때 실험자가 알고 있는 엽록소 농도와 일치하는 지 여부로 흡광도 측정치의 신뢰도를 비교해 보았다. Cary4E와 UV-1650PC의 경우, 흡광도 값에서 측정 시료의 농도와 정비례

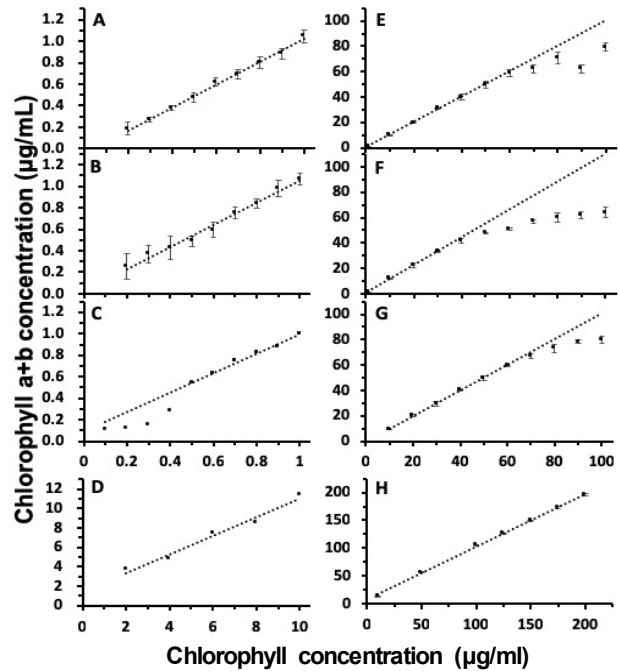


Fig. 3. Comparison of chlorophyll concentrations calculated based in the absorbance values measured with the known chlorophyll concentrations of solutions made by dilution of concentrated extracts. Chlorophyll concentrations calculated using solutions at a relatively low chlorophyll concentration range (A, B, C, D), and those calculated using solutions at a relatively high chlorophyll concentration range (E, F, G, H), using spectrophotometers: Cary4E (A, E), UV-1650PC (B, F), Versamax (C, G) and NanoDrop 1000 (D, H). Experiments were repeated at least three times except for C and D.

관계를 벗어난 고농도 경우를 제외하고는 기대치 농도와 측정치의 농도가 거의 일치하였다(Fig. 3A, Fig. 3B, Fig. 3E, Fig. 3F). Versamax의 경우, 흡광도 값에서 측정 시료의 농도와 정비례 관계를 벗어난 고농도 경우와 저농도 경우를 제외하고는 측정치와 기대치 농도가 거의 일치하였다(Fig. 3C, Fig. 3G). Fig. 3D과 3H에서 NanoDrop 1,000의 경우 모든 측정치에서 정비례관계를 보였으나, 이미 Fig. 2H에서 A_{663} 흡광도 값에서 정비례관계를 나타내지 않았고, 그 결과 Fig. 3D에서 8 µg/ml 이하의 농도에서 측정 흡광도에서 계산한 농도 값이 크게 나오는 오차를 보였다. 이상의 경우와 같이, 흡광도로부터 계산한 엽록소 농도를 이미 알고 있는 엽록소 농도 값과 비교해서 그 신뢰도를 판단해 보았으며, 그 신뢰도는 흡광도 자체의 정비례 관계를 근거로 판단한 신뢰도의 범위와 대체로 일치하였다.

엽록소 용액의 농도 결정을 위해 측정된 흡광도 값의 신뢰도를 판단할 수 있는 매우 좋은 판단기준은 엽록소 a/b 값이 용액의 희석에 따라 변하지 않아야 한다는 것이다. Cary4E의 경우 고농도 용액에서 흡광도 값이 정비례 관계를 보이지 않

는 범위를 제외하고, 대체로 매우 일정한 엽록소 a/b 값을 보였다(Fig. 4E). 그러나, 정비례 관계 범위 내에 있던 50-60 µg/ml의 경우 엽록소 a/b 값을 기준으로 판단할 때 이 측정치의 신뢰도가 의문시 되었다. 그리고, Fig. 2의 흡광도 조사에서와는 달리, 0.6 µg/ml 이하의 저농도에서 측정치는 기대치 보다 높은 값을 보였다. Fig. 4E에서 신뢰도가 의문시 되는 농도를 제외하고 4개의 신뢰도가 높은 농도에서 구한 엽록소 a/b 값의 평균값은 3.33(표준편차, 0.069)이었다. 따라서, Fig. 4의 각 그래프에 점선으로 이 값의 위치를 표시하여, 다른 모든 측정치의 유사도를 비교하여 볼 수 있도록 하였다.

UV-1650PC의 경우 고농도 용액에서 흡광도 값이 정비례 관계를 보이지 않는 범위를 제외하고, 대체로 일정한 엽록소 a/b 값을 보였다(Fig. 4F). 그러나, 20-40 µg/ml의 경우 엽록소 a/b 값을 기준으로 판단할 때 측정치의 신뢰도가 의문시 되었다. 그리고, Fig. 2의 흡광도 조사에서와는 달리, 1 µg/ml 이하

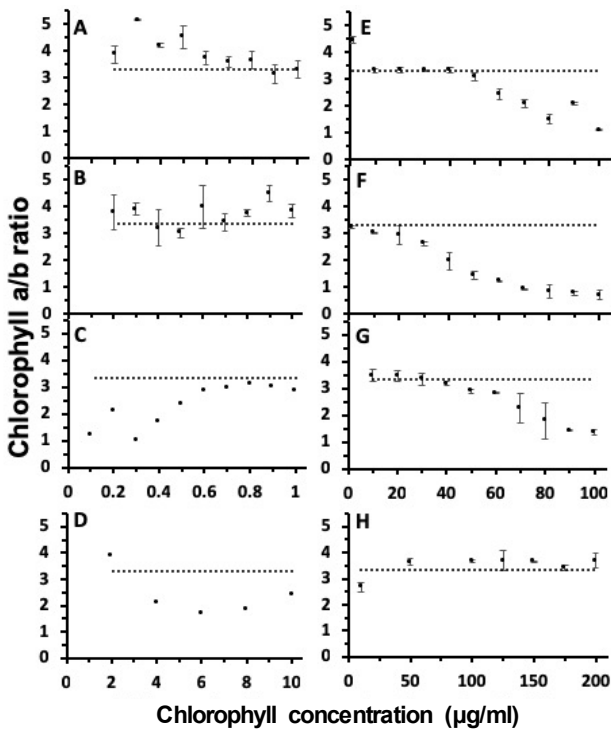


Fig. 4. Fidelity test based on the uniformity of chlorophyll a/b ratio in chlorophyll solutions diluted at various concentrations. Chlorophyll a/b ratios calculated using solutions at a relatively low chlorophyll concentration range (A, B, C, D), and those calculated using solutions at a relatively high chlorophyll concentration range (E, F, G, H), using spectrophotometers: Cary4E (A, E), UV-1650 PC (B, F), Versamax (C, G) and NanoDrop 1,000 (D, H). The dotted lines are given at 3.33 +/- 0.069, which is the average +/- standard deviation calculated using the 4 values from the 2nd to 5th chlorophyll a/b ratios from the left in E. Experiments were repeated at least three times except for C and D.

의 모든 저농도에서 측정치는 기대치에 비하여 큰 폭의 오차 범위를 보여, 그 신뢰도가 문제시 되었다. Versamax의 경우, 흡광도 값에서 측정 시료의 농도와 정비례 관계를 벗어난 고농도 경우와 저농도 경우를 제외하고는 대체로 일정한 엽록소 a/b 값을 보였다(Fig. 4G). 그러나, 40-70 µg/ml의 경우 엽록소 a/b 값을 기준으로 판단할 때 측정치의 신뢰도가 의문시 되었고, Fig. 3의 결론과 같이 0.6 µg/ml 이하의 모든 저농도에서 측정치는 기대하는 엽록소 a/b를 보여주지 못해 그 신뢰도가 문제시 되었다. 특히 1 µg/ml 이하의 경우 엽록소 a/b를 측정 한 값이 기대치 보다 다소 적게 나왔다. NanoDrop 1,000의 경우 엽록소 농도에서 판단한 신뢰도와 유사한 결과를 얻을 수 있었으나, 10 µg/ml을 포함한 저농도에서 측정한 값은 신뢰도가 낮다고 판단되었다.

이상의 연구에서 4가지 다른 분광분석기를 사용하여 농도를 모르는 엽록소 용액의 농도를 Porra 등[4]의 식으로부터 계산하여 측정하려 할 때, 그 신뢰도의 기준이 될 수 있는 척도를 비교하여 보았다. 우선 측정 대상 용액을 희석하여 흡광도 값을 비교한 결과, 희석비율과 흡광도 값이 정비례관계를 보이지 않을 때, 그 신뢰도를 의심할 수 있으며, 실제 알고 있는 농도의 용액과 비교하였을 때도 유사한 결론을 얻을 수 있었다. 그러나, 일부 경계구간에서 신뢰도는 엽록소 a/b의 값이 희석에 의해 변하지 않는다는 가정으로 판단하였을 때 측정 한 값의 신뢰도가 떨어짐을 알 수 있었다 즉, 실제 흡광도 측정을 통하여 엽록소 농도를 알려고 할 때, 그 측정치의 신뢰도는 희석에 의해 엽록소 a/b 값이 크게 변하지 않는 척도로 판단하는 것이 좋다는 결론을 낼 수 있었다. 4가지 다른 분광분석기를 비교한 결과, Cary4E는 흡광도 값이 4가지 되는 높은 농도(60 µg/ml) 범위에서도 흡광도와 정비례관계를 보이고, A663에서도 0.005의 낮은 값을 보이는 0.2 µg/ml까지 흡광도 값과 정비례관계를 보였으나, 엽록소 a/b의 기준으로 볼 때 고농도의 경계부분과 0.6 µg/ml 이하의 저농도에서 측정한 값은 신뢰할 수 없음을 보여 주었다. UV-1650PC 경우도 흡광도 값이 2.5까지 되는 높은 농도(60 µg/ml)에서부터 0.4 µg/ml까지 흡광도 값이 정비례관계를 보였으나, 고농도의 경계부분과 1 µg/ml 이하의 저농도에서 측정한 값은 신뢰도가 매우 떨어짐을 확인할 수 있었다. Versamax의 경우, 흡광도 값이 2까지 되는 높은 농도(200 µg/ml)에서부터 0.5 µg/ml까지 흡광도 값이 정비례관계를 보였으나, 고농도의 경계부분과 1 µg/ml 이하의 저농도에서 측정한 값은 신뢰도가 떨어짐을 확인할 수 있었다. NanoDrop 1,000의 경우, 고농도의 엽록소 용액에서는 높은 신뢰도를 보였으나, 10 µg/ml을 포함한 저농도에서 측정한 값은 신뢰도가 낮다고 판단되었다. 이상의 4가지 다른 분광 분석장비에 대한 결과는 각 기계의 특성을 판단한 결과로 보기 보다는, 여러 특성이 다른 분광분석기를 사용하는 모든 경우에서 엽록소 a/b 값이 흡광도 측정치의 신뢰도 판단에 유용한 지표임을 보여 주었다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음. 논문을 읽고 문제점을 지적해 주신 노일래(경상대) 박사님께 감사드린다.

References

1. Arnon, D. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, phytophenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1-15.
2. Lichenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 591-592.
3. Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **145**, 315-322.
4. Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedemann, P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 384-394.
5. Porra, R. J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosyn. Res.* **73**, 149-156.

초록 : 엽록소 농도 결정을 위하여 측정된 흡광도 값의 신뢰도 검정 지표로서 엽록소 a/b 비레치

오광석 · 이춘환*

(부산대학교 분자생물학과)

비어·람버트 법칙에 의하면 충분히 묽은 용액에서 주어진 파장에서 측정된 흡광도는 용질의 농도에 비례한다. 반대로 충분히 묽은 용액이란 측정된 흡광도 값이 용질의 농도에 비례관계를 가지는 범위에 있는 용액을 말하지만 실제 확인하기가 어렵다. 본 연구에서는 벼 잎에서 추출한 엽록소 80% 아세톤 용액을 사용하여, 측정된 흡광도 값의 신뢰도를 판단할 수 있는 기준으로 엽록소 a/b 비레치의 사용 가능성을 4가지 다른 흡광분광분석기 (Cary4E, UV-1650PC, Versamax, NanoDrop 100)을 사용하여 조사하였다: 우선 0.2 µg/ml의 매우 저농도에서 200 µg/ml까지의 다양하게 희석한 엽록소 용액을 사용하여, 645 nm와 663 nm에서 측정된 흡광도 값을 측정 후, 흡광도 값과 엽록소 농도의 비례관계를 조사하였다. 그 결과, 이 비례관계로 판단한 측정치의 신뢰 범위에서 흡광도로부터 계산한 용액에서의 엽록소 농도와 이미 알고 있는 엽록소 농도 비교적 일치하였다. 그러나, 비례관계의 한계치 안에 있어 신뢰도가 인정된 일부 고농도와 저농도에서의 일부 값이 엽록소 a/b 비레치가 용액의 희석에 변화하지 않을 것이라는 판단 기준에 있어 신뢰도가 떨어짐을 알 수 있었다. 그러므로, 본 연구결과는 엽록소 농도 결정을 위하여 측정된 흡광도 값의 신뢰 여부는 대상 용액을 희석하여 측정된 흡광도의 비례관계로 본 비어·람버트 법칙의 기준 보다는 엽록소 a/b 비레치가 변하지 않는다는 기준으로 측정치의 신뢰도를 판단하는 것이 더 좋다는 것을 확인할 수 있었다.