

형광분광분석법에 의한 Methylene Blue와 Thionine의 Metachromasy

이 후 설

대전대학교 화학공학과

Metachromasy of Methylene Blue and Thionine by Analytical Fluorescence Spectroscopy

Lee, Hoo-Seol

Dept. of Chemical Engineering, Dae-Jin University

(Received Jun., 17, 1997)

ABSTRACT

Metachromatic properties of admixture of methylene blue(MB) and thionine in aqueous solution has been studied by fluorescence spectroscopy. In spite of nonfluorescence character has been MB itself, mixing MB to monomeric concentration of thionine, new coaggregation band has been formed in shorter wave length than fluorescence of thionine because of MB was redistributed to thionine aggregate. It suggested that coaggregate of MB and thionine were more tightly formed than the each dye aggregate.

I. 서 론

Methylene blue(MB)와 thionine과 같은 유기 색소분자들은 그들 각각의 농도가 변함에 따라 흡수 파장의 위치나 흡광도의 세기가 변한다. Beer's-Lambert 법칙에서 벗어나는 이런 현상을 metachromasy라 하며, 색소분자들이 단분자 형태로 쌓여 있는 장파장쪽의 흡수띠를 α -흡수띠라 하고 이합체 형태로 쌓여 있는 단파장쪽의 흡수띠를 β -흡수띠라 한다. 또한 색소분자들이 다분자 형태로 쌓여 있을 때, 쌓인 모양에 따라 J 또는 H-흡수띠로 분류하기도 하나 회합체의 입체구조에 대한 이론적이거나 구조론적인 해석에 대한 연구가 활발하다^{1~3)}. 수용액에서 MB분자들의 단분자 형태와 이합

체 형태를 취하는 회합체들의 특성 흡수파장은 각각 668nm와 612nm 부근에서 관측된다. 또한 수용액에서 thionine분자들의 경우에는 각각 600nm와 566nm 부근에서 관측된다⁴⁾. MB와 thionine은 기본 골격구조가 유사하기 때문에 두 색소를 혼합시켰을 때 혼합회합체(coaggregate)를 형성할 것으로 예상되며, 흡수분광법으로 일정부분 확인되었다. 그러므로 여러 색소들의 농도에 따른 회합체 형성과정에서 각 색소분자들의 거동이나 분광학적인 기초자료와 그리고 여러 유기색소들이 혼합되었을 때 생성된 혼합회합체의 분광학적인 분석자료는 공학적인 필름 제조법에서와 생명공학분야의 생체조직의 염색이나 생체내에서 항생제로서의^{11~13)} 유기색소분자의 역할 등에 연관된 중요한 기초자료를^{14, 15)} 제공하리라 본다.

본 연구에서는 비형광성 색소로 알려진 MB와 형광성 색소인 thionine을 혼합시켰을 때, 각각의 색소들이 회합체를 형성할 때 나타나는 방출 스펙트럼들의 특성과 두 색소를 혼합하였을 때 형성되는 혼합회합체가 나타내는 분광학적인 특성을 흡수와 형광 스펙트럼으로 관찰하고자 한다.

II. 실험

1. 시약 및 기기

유기색소인 methylene blue(MB)와 thionine은 Sigma Co.의 특급시약을 사용했고, tris(hydroxymethyl)methylamine, KCl, NaOH 등은 Junsei Co.의 GR급을 사용했다. 기타 다른 시약들은 특급시약을 그대로 사용했다.

UV/VIS spectrophotometer는 Pye-Unicam Co.의 model SP8-400을 사용했고, spectrofluorophotometer는 Shimadzu Co.의 RF-500을 사용했다. pH meter는 Orion Co.의 model 611을 사용했으며, 색소보관용액 제조시 사용한 초음파기는 태금사의 20kHz ultrasonicator를 사용했다.

2. 흡수 및 형광스펙트럼의 측정

완충용액(0.01M-tris(hydroxymethyl)methylamine 수용액, pH=7.5)에 MB와 thionine 보관용액들을 초음파를 처리하여 1mM로 만들어 차광하에 냉장보관하였고 모든 색소용액은 3일 이내에 사용하였다. 일반 흡수스펙트럼은 reference cell에 완충용액을 넣고 측정하였으며, 혼합색소용액의 스펙트럼 측정은 혼합색소용액 중의 색소 각각의 농도를 일정하게 유지시켰다. 일반 형광스펙트럼은 여기광의 파장을 고정시키고 방출광을 전파장영역에 걸쳐 주사시켰다. 또한 복수 형광스펙트럼을 측정할 경우에 여기광의 파장선택은 여기광을 10nm씩 증가시키면서 연속적으로 반복 주사시켰다. 이 때 여기광과 방출광의 선폭과 시료셀의 크기 선택은 각 실험상의 측정조건에 알맞게 조절하여 진행하였다.

III. 결과 및 고찰

Tris-완충용액 중에서 여러 농도에서 MB의 흡수

스펙트럼을 Fig. 1(a)에 나타냈다⁵⁾. Fig. 1(b)는 MB와 thionine이 이합체를 상당량 형성할 수 있는 농도에서 각각의 색소와 두 색소가 혼합되었을 때 나타난 흡수스펙트럼이다⁴⁾. Fig. 2(a)와 (b)는 이합체가 상당량 존재하는 MB농도($[MB]=3.0 \times 10^{-5}M$)에서 668nm와 612nm에서 여기시켰을 때 나타나는 형광스펙트럼이다. MB는 감광제로는 자주 쓰이나 형광성은 없는 색소로 알려져 있다^{6~7)}. Fig. 2의 (a)와 (b)에서 단파장 영역인 334nm (Fig. 2(a))와 306nm(Fig. 2(b))에서 나타난 방출스펙트럼들은 여기파장인 668nm와 612nm의 절반 값으로서 주파수 2배가 방출띠로 생각된다⁸⁾. 이런 현상은 완충용액만이 포함된 시료셀(quartz cell)에서도 나타났으며, 높은 에너지쪽(단파장)으로 갈수록 방출세기가 지수함수적으로 증가하여 400nm 근처에서 최대의 세기를 나타냈다. 그러나 여기파장이 550nm까지 증가되었을 때 여기파장과 동일한 파장에서 나타난 방출스펙트럼의 세기는 거의 소멸됨이 관측되었다. 그러나 여기파장을 증가시켜 612nm와 668nm에서 여기시켰을 때에도 동일한 파장에서 방출광들이 나타났으며, 이 때의 방출스펙트럼은 MB 분자 회합체들에 의한 산란된 빛이거나 공명형광으로 생각되며 Cooke 등이 발표한 것과 일치하였다⁹⁾.

Fig. 3은 이합체가 상당량 존재하는 MB의 농도($[MB]=1.66 \times 10^{-4}M$)에서 여기광의 파장을 400nm에서 시작하여 10nm 간격으로 증가시키면서 550nm까지 측정한 방출스펙트럼이다. 이 때 여기와 방출스펙트럼의 선폭은 10nm이었고 시료셀의 크기(path length)는 5mm이었다. 이 영역에서 입사광의 파장이 490nm일 때 동일한 파장에서 나타난 방출광의 세기가 최대로 관측되었다. 흡수분광법의 결과에 의하면 이 파장 구간에서 MB분자는 흡수띠가 나타나지 않는 영역이므로¹⁰⁾ 관측된 방출스펙트럼은 시료셀과 MB분자에 의한 빛산란방출에 의한 것으로 생각되며, 450~550nm 구간의 스펙트럼은 MB 분자회합에 의한 빛산란으로 생각된다. Fig. 4는 Fig. 3과 동일한 농도의 MB수용액에 여기광의 파장을 600nm에서 조사하기 시작하여 850nm까지 10nm 간격으로 여기시켰을 때 나타나는 방출스펙트럼이다. 이 때 여기와 방출광의 선폭은 모두 20nm이었으며 시료셀의 크기는 5mm이었다. 여기광의 파

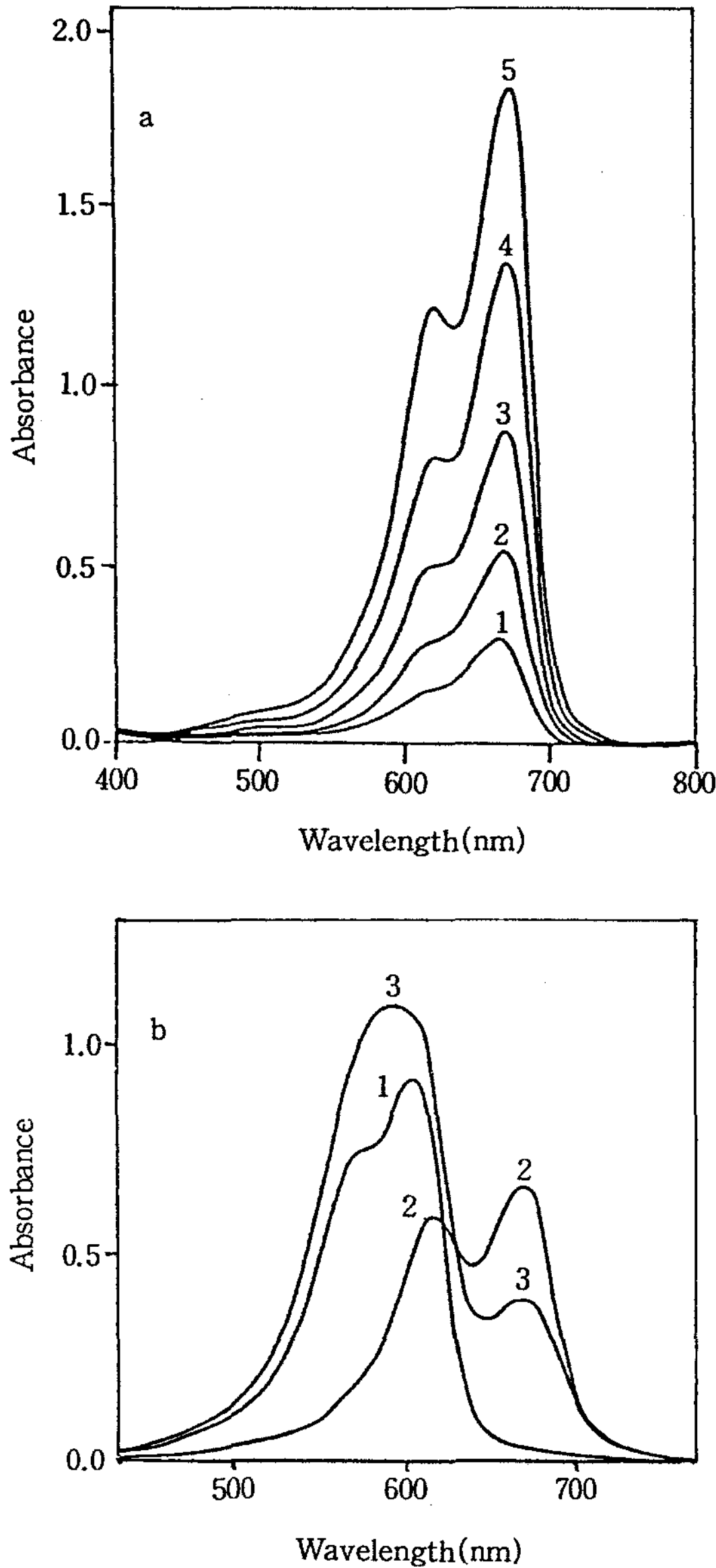


Fig. 1. a) : Absorption spectra of MB at 20°C : 1: [MB] = 3.24×10^{-6} M, 2: [MB] = 6.47×10^{-6} M, 3: [MB] = 1.29×10^{-5} M, 4: [MB] = 2.55×10^{-5} M, 5: [MB] = 3.79×10^{-5} M, path length = 10mm, 0.01M-tris buffer,
 b) : absorption spectra of MB and thionine at 25°C : 1: [thionine] = 2.70×10^{-4} M, 2: [MB] = 1.28×10^{-4} M, 3: mixture of MB and thionine, path length = 1mm : 0.01M-tris buffer(pH = 7.5).

장이 700nm일 때 430nm와 720nm 두 영역에서 방출광의 세기가 최대로 나타났다. Fig. 4의 스펙트럼 영역 a는 MB에 의한 주파수 2배가 산란으로 생각되며, 스펙트럼 영역 b는 시료셀(quartz cell)과 MB분자가 혼합된 증폭산란인 것으로 생각된다. 여기광이 850nm일 때 a영역의 산란광은 주파수 2배가 인 에너지에 해당되는 425nm에서 방출광이 나타났으며, 동시에 관측된 b영역에서의 스펙트럼은 560nm에서 방출광의 선폭이 넓고 약하게 관측됨과 동시에 c영역의 868nm 부근에서도 관측되었다. 스펙트럼 영역 c는 MB 회합체에 의한 $\nu' = \nu/2$ 인 산란공명방출로 생각된다. 입사광의 파장이 700nm일 때 b와 c스펙트럼 영역의 최대 방출스펙트럼 세기가 각각 430nm와 720nm로 나타난 것은 여기광에 의해 흡수된 MB분자 회합체의 빛에너지(ν)는 색소분자들 사이에서와 색소분자 주위의 용매에 에너지의 일부를 잃고 $\nu - \Delta\nu$ 와 $\nu' - \Delta\nu'$ 진동수를 갖는 공명형광이 방출되는 것으로 사료된다. c영역에서 640nm 부근에서 이합체성 MB분자의 방출광이 보이고 720nm 부근에서 단분자성 MB분자의 방출광이 가장 크게 관측되었다. 이것은 이합체 및 단분자성 MB분자 회합체에 대한 최대 흡수파장이 각각 612와 668nm인 것과 비교할 때 상당히 적은 에너지의 산란성 방출광 진동수이다.

Thionine은 MB와는 달리 형광성 색소이다. Fig. 5(a)와 (b)는 2.22×10^{-5} M-thionine용액을 시료셀의 크기가 1cm, 여기와 방출광의 선폭이 각각 10nm인 조건에서, 여기파장이 각각 500nm와 566nm이었을 때의 형광스펙트럼이다. Fig. 5(a)의 여기파장(500nm)은 이합체의 흡수파장인 566nm보다 짧다. 이 때 여기파장과 같은 영역에서 강한 공명방출스펙트럼과 615nm에서 형광스펙트럼이 나타났다. Fig. 5(b)는 여기파장을 이합체성 thionine의 흡수파장과 같은 566nm로 입사시킬 때 나타난 형광스펙트럼이다. 이 때 566nm의 빛산란의 세기는 현저히 감소했으며 615nm의 형광띠의 세기는 최대가 되었다. 그리고 여기광의 파장을 570nm보다 길게 했을 때에는 산란성 방출광은 MB의 경우와 마찬가지로 거의 소멸되었다. Fig. 6(a)는 여기파장을 450nm부터 570nm까지 10nm씩 증가시키면서 측정한 형광스펙트럼이다. 이 때 나머지 모든 실험조건은 Fig. 5에서

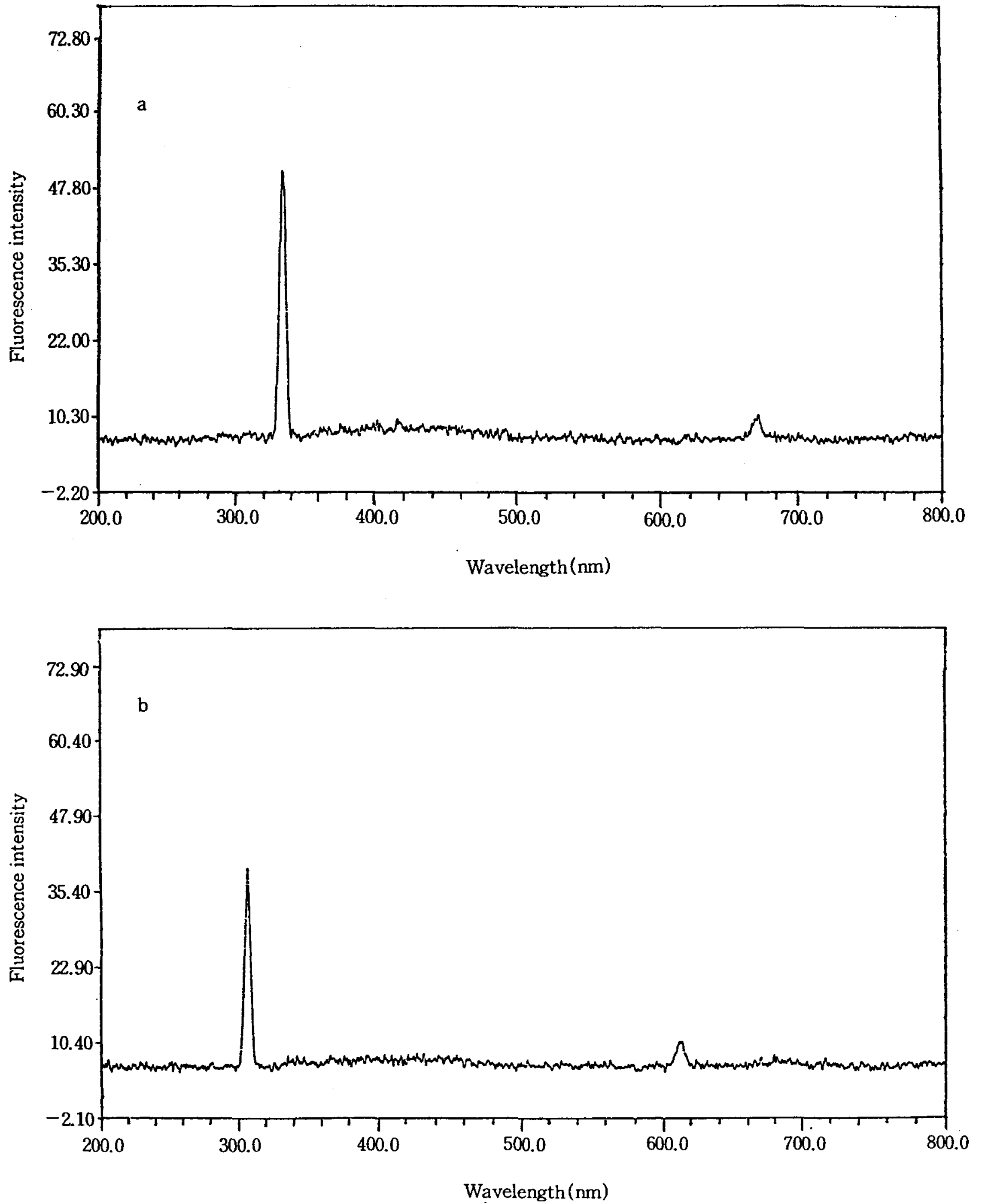


Fig. 2. Fluorescence emission spectrum of 3.08×10^{-5} M-MB at 20°C, path length = 10mm, excitation and emission band width were 10nm : a) : excitation wavelength = 668nm, b) : excitation wavelength = 612nm, 0.01M-tris buffer (pH = 7.5).

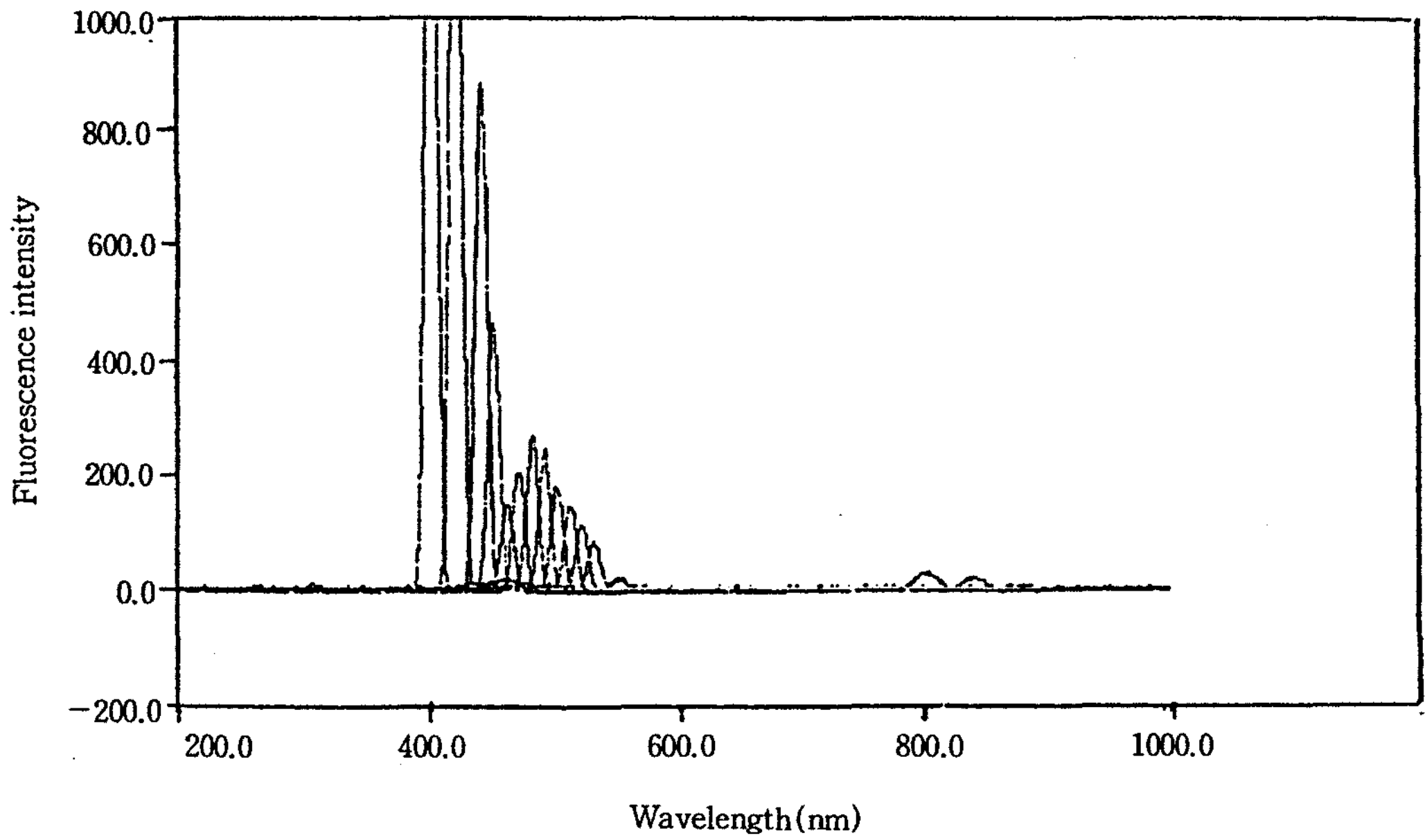


Fig. 3. Fluorescence emission spectra of 1.66×10^{-4} M-MB at 20°C, excited from 400nm to 550nm with 10nm division, path length = 5mm, excitation and emission band width = 20nm, 0.01 M-tris buffer(pH = 7.5).

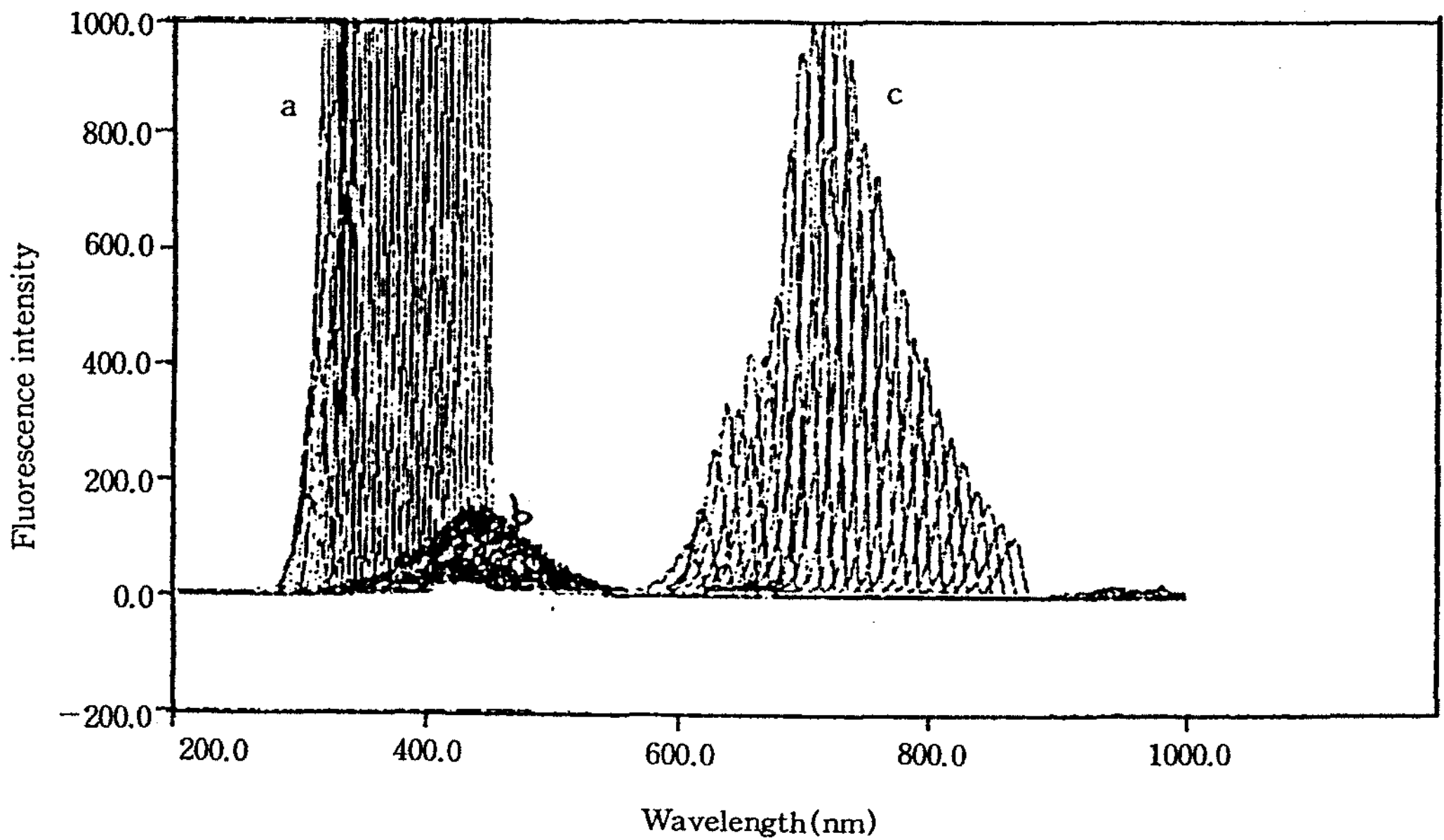


Fig. 4. Fluorescence emission spectra of 1.66×10^{-4} M-MB at 20°C, excited from 600nm to 850nm with 10nm division, path length = 5mm, excitation and emission band width = 20nm, 0.01 M-tris buffer(pH = 7.5).

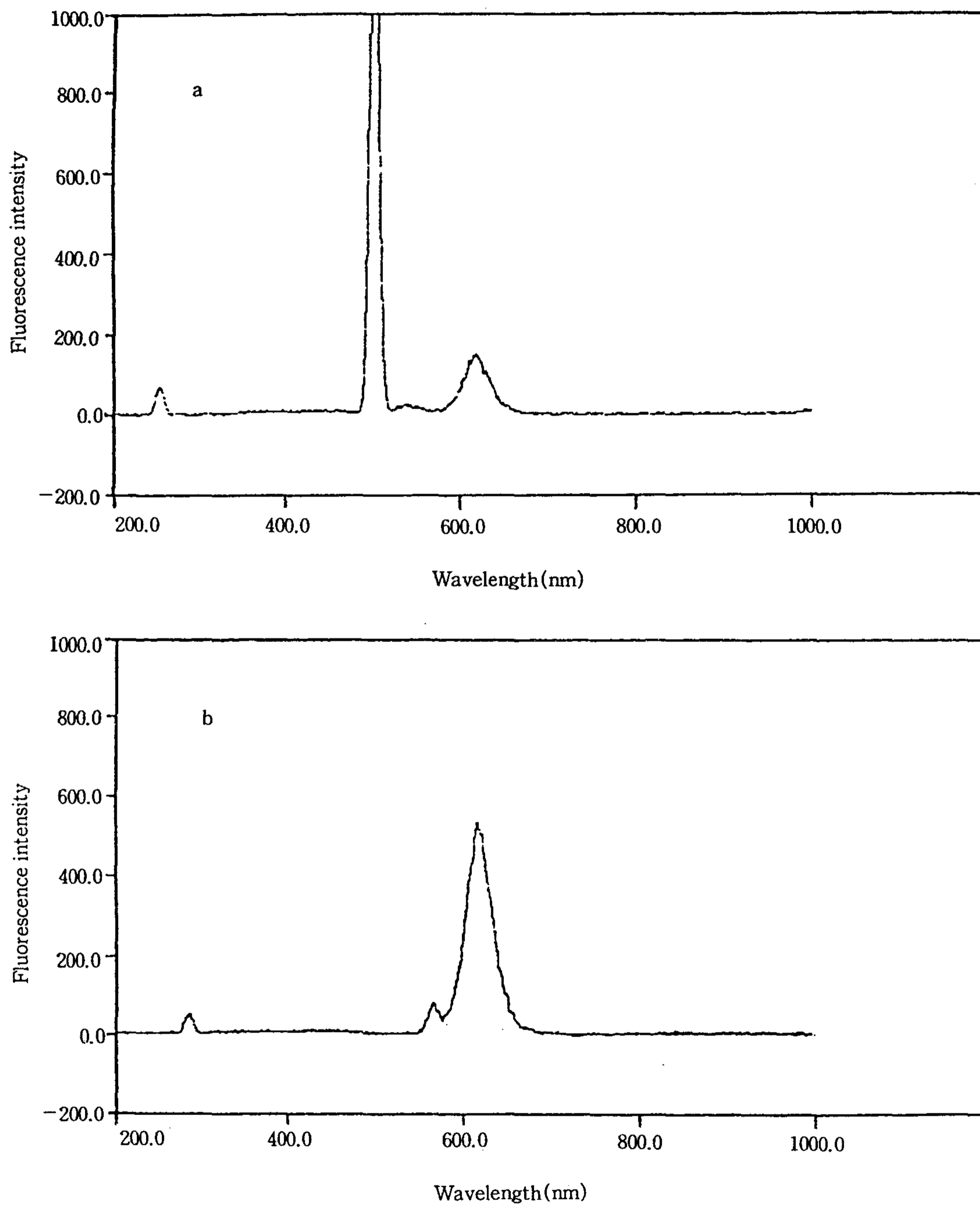


Fig. 5. Fluorescence emission spectra of 2.22×10^{-5} M-thionine at 20°C ; excitation and emission band width = 10nm, path length = 5mm; a) : excitation wavelength = 500nm, b) : excitation wavelength = 566nm, 0.01M-tris buffer(pH = 7.5).

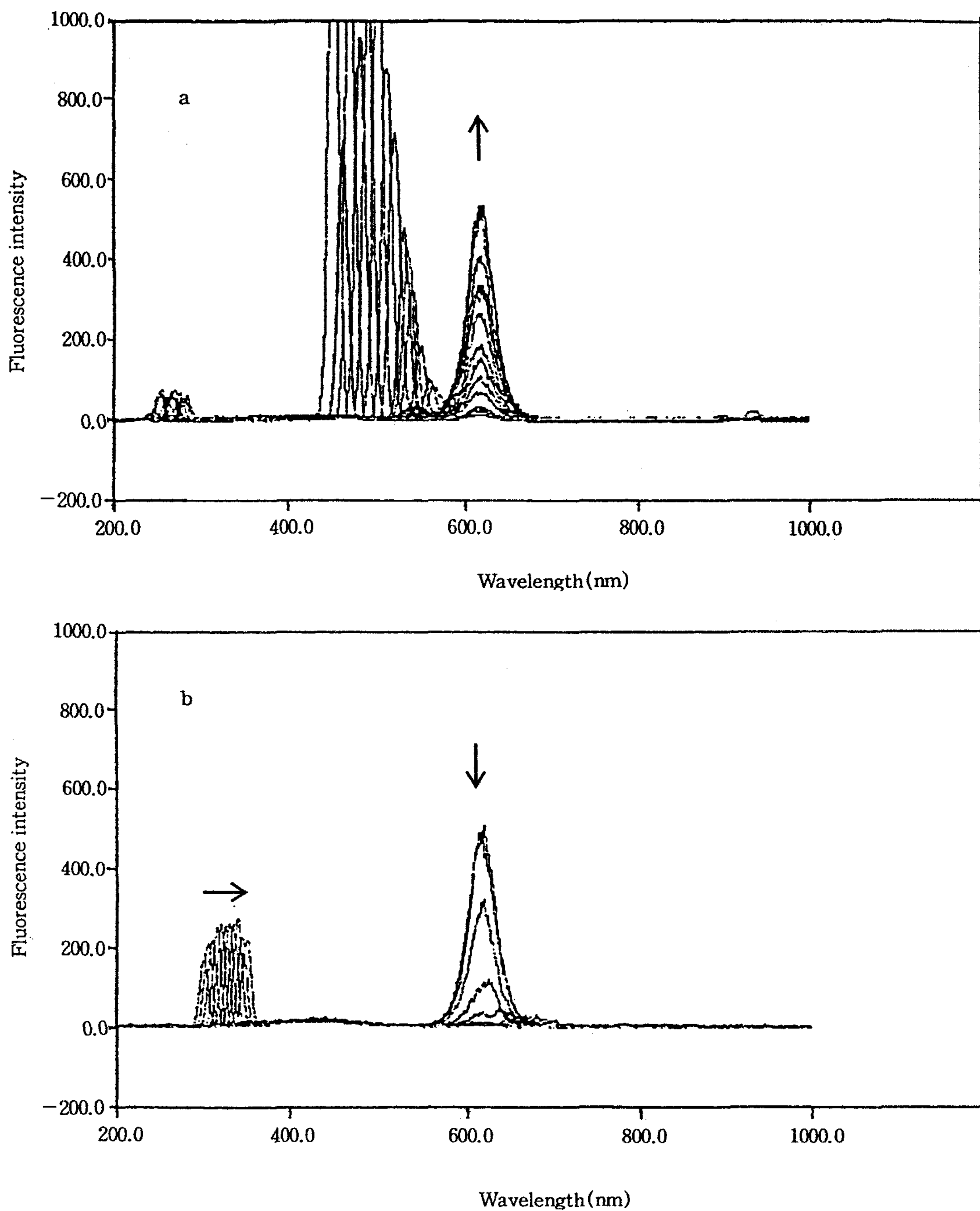


Fig. 6. Fluorescence emission spectra of 2.22×10^{-5} M-thionine at 20°C : a) : excited from 450nm to 566nm with 10nm division, b) : excited from 600nm to 700nm with 10nm division, path length = 10mm, excitation and emission band width = 10nm, 0.01M-tris buffer(pH = 7.5).

와 같게 하였다. 여기파장이 증가함에 따라 산란성 방출 스펙트럼은 장파장이동과 함께 세기가 점점 감소하여 여기광의 파장이 566nm일 때 최소가 되었다. 그러나 615nm 부근의 형광띠는 여기광의 파장이 450nm일 때 나타나기 시작하여 여기파장이 566nm일 때 최대 세기를 나타냈으며, 그리고 Fig. 6(b)에 보인 바와 같이 여기파장이 600nm 이상이 되면 615nm의 형광띠는 감소하기 시작하여 여기파장이 650nm일 때 거의 소멸됨이 관측되었다. 흡수분광법으로 관찰한 결과에 의하면 thionine분자는 MB분자에 비해 이합체를 잘 형성하지 않는다⁴⁾. 또한 thionine분자의 단분자 회합체와 이합체성 회합체 사이의 흡수파장의 간격(600-566=34nm)이 MB에서의 간격(668-612=56nm)보다 적기 때문에 두 회합체 사이의 여기파장의 선택성이 떨어진다. 그러므로 비교적 낮은 농도에서(Fig. 6) thionine회합체는 두 흡수띠 사이의 흡수영역인 560nm에서 600nm까지의 빛을 흡수하여 615nm 부근의 형광을 나타내는 것으로 생각된다.

MB와 thionine은 기본적인 골격구조의 유사성 때문에 그들이 혼합될 때 혼합회합체를 쉽게 형성한다. 두 색소의 농도가 모두 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 이하인 조건에서 혼합되었을 때 thionine 단분자성 회합체의 흡수띠(600nm)와 MB 이합체 흡수띠(612nm) 사이에서 새로운 혼합색소의 강한 흡수띠가 관측되었으나⁴⁾, 두 색소들이 각각 이합체를 상당량 형성하는 농도($[\text{MB}] = [\text{thionine}] \geq 10^{-5} \text{M}$)로 혼합되었을 때에는 혼합색소의 흡수띠는 선평이 넓고 강하게 단분자성 thionine의 흡수띠보다 단파장 영역에서 나타났다. Fig. 7(a), (b), (c)는 $[\text{MB}] = 3.08 \times 10^{-5} \text{M}$, $[\text{thionine}] = 2.220 \times 10^{-5} \text{M}$ 농도에서 파장을 각각 500nm, 540nm 그리고 580nm에서 여기시켰을 때 관측된 형광스펙트럼들이다. Fig. 7(a)의 500nm에서 나타난 스펙트럼은 공명성 방출띠이고, 542nm 근처의 스펙트럼은 MB와 thionine의 혼합회합체 스펙트럼이며, 612nm에서 나타난 스펙트럼은 thionine 단분자 회합체의 형광스펙트럼으로 간주된다. Fig. 7(b)에서 여기파장이 540nm로 되면 542nm와 615nm에서 센 방출띠가 나타났다. Fig. 7(c)에서 여기파장이 580nm가 되면 thionine만의 형광스펙트럼이 615nm에서 크게 나타났다. Fig. 8은

MB와 thionine의 농도가 각각 $3.08 \times 10^{-5} \text{M}$ 과 $2.22 \times 10^{-5} \text{M}$ 일 때 여기파장을 400nm에서부터 540nm까지 10nm 간격으로 증가시키면서 측정된 형광스펙트럼이다. 이 때 여기와 방출광의 선평은 10nm이었고, 시료셀의 크기가 1cm인 것을 사용했다. 여기파장이 400nm에서부터 증가함에 따라 542nm에서 나타난 방출띠와 thionine의 형광으로 보이는 615nm 형광띠의 세기가 모두 증가하였다. 이것은 이합체성 thionine 분자의 흡수파장보다 짧은 단파장 영역(566nm 이하)의 여기광은 단분자성 thionine분자의 형광(615nm) 뿐만 아니라 MB-thionine 혼합회합체의 형광성 방출(542nm)을 유발시키는 것으로 생각된다. 또한 흡수분광법으로 제시했던 것과 마찬가지로 MB분자는 thionine분자들과 혼합될 때 thionine분자들의 회합체형성을 촉진시킬 뿐만 아니라 MB분자 자신이 thionine분자와 회합하여 MB-thionine 회합체를 형성하는 것으로 사료된다. Fig. 9는 Fig. 8과 같은 실험조건에서 여기파장을 540nm로부터 570nm까지 10nm씩 증가시키면서 측정된 형광스펙트럼이다. 이 때에 여기파장이 증가함에 따라 혼합회합체의 방출파장인 542nm에서의 방출광의 세기는 현저히 감소되었으나 thionine만의 형광인 615nm에서의 형광세기는 큰 변화가 나타나지 않았다. 이것은 MB분자와 혼합회합체를 이룬 thionine분자는 thionine만의 회합체에서와 달리 566nm 이상의 여기광에 대해서는 비형광성을 나타냄을 의미한다. 즉 MB와 혼합회합체를 이룬 thionine분자의 회합력은 자체 thionine분자와의 회합력보다 크기 때문에 MB분자와의 쌍임이 조밀하게 되고, 따라서 높은 에너지의 빛에 의해서만 형광을 방출하는 것으로 생각된다. Fig. 10은 Fig. 8과 동일한 실험조건하에서 여기광의 파장을 580nm로부터 750nm까지 측정된 형광스펙트럼이다. 여기광의 파장이 증가함에 따라 615nm 방출띠의 세기가 감소하다가 여기파장이 650nm 이상이 되면 장파장이동을 하였으며 방출띠의 폭도 감소하였다. 615nm까지의 여기과정과 형광스펙트럼의 세기는 혼합회합체에 참여한 thionine분자에 의해 유발되었으나, 615nm 이상의 여기파장에 대해서는 MB분자에 의한 산란에 기인한 것으로 생각된다. 결과적으로 비형광성 색소인 MB는 thionine분자와 혼합회합체를

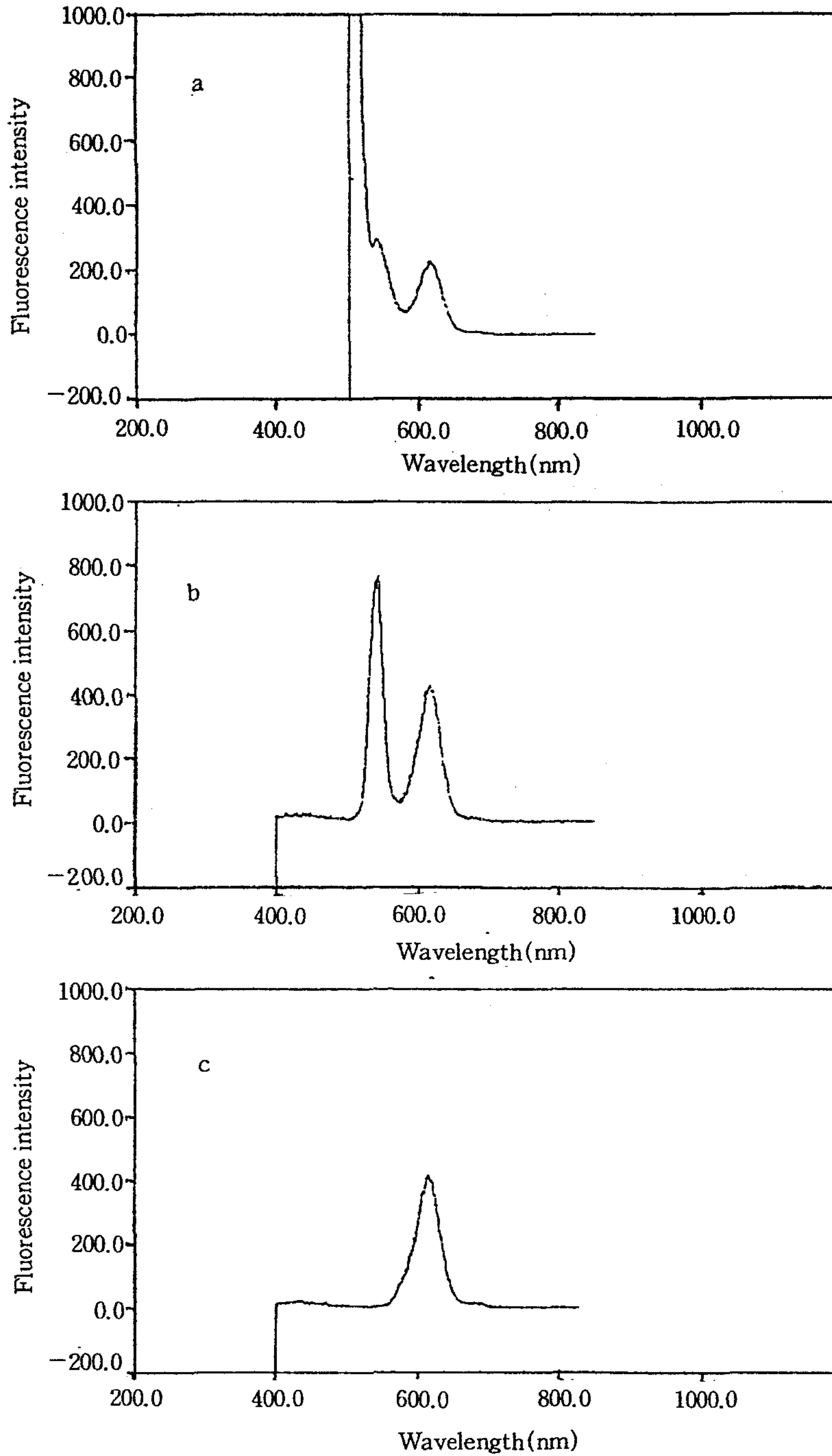


Fig. 7. Fluorescence emission spectra of 3.08×10^{-5} M-MB and 2.22×10^{-5} M-thionine at 20°C. excitation and emission band width = 15 nm, path length = 5 mm; a) : excitation wavelength = 500 nm, b) : excitation wavelength = 540 nm, c) : excitation wavelength 580 nm, 0.01 M-tris buffer (pH = 7.5).

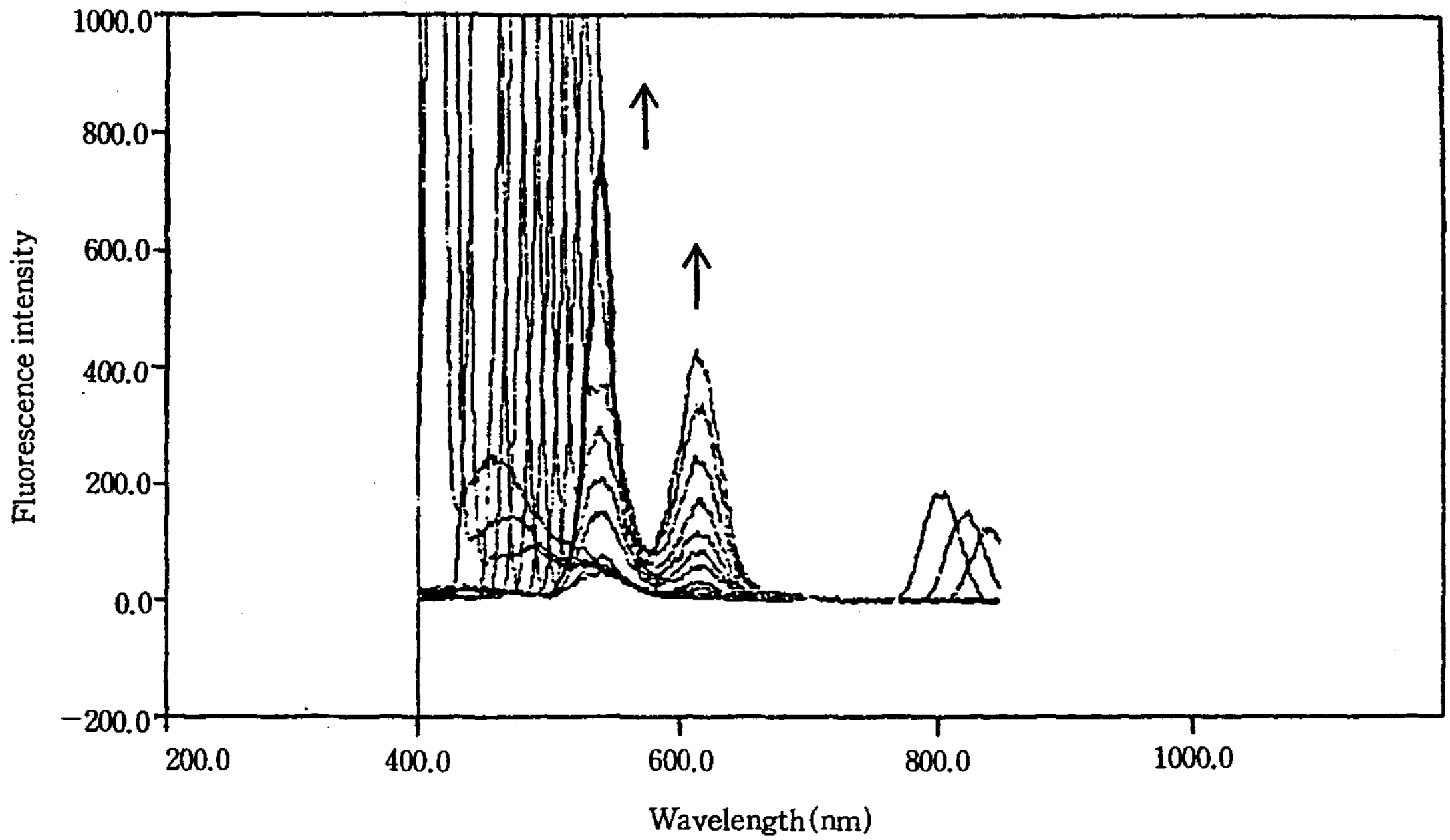


Fig. 8. Fluorescence emission spectra of 3.08×10^{-5} M-MB and 2.22×10^{-5} M-thionine at 20°C, excited from 400nm to 540nm with 10nm division, path length = 5mm, excitation and emission band width = 15nm, 0.01M-tris buffer(pH = 7.5).

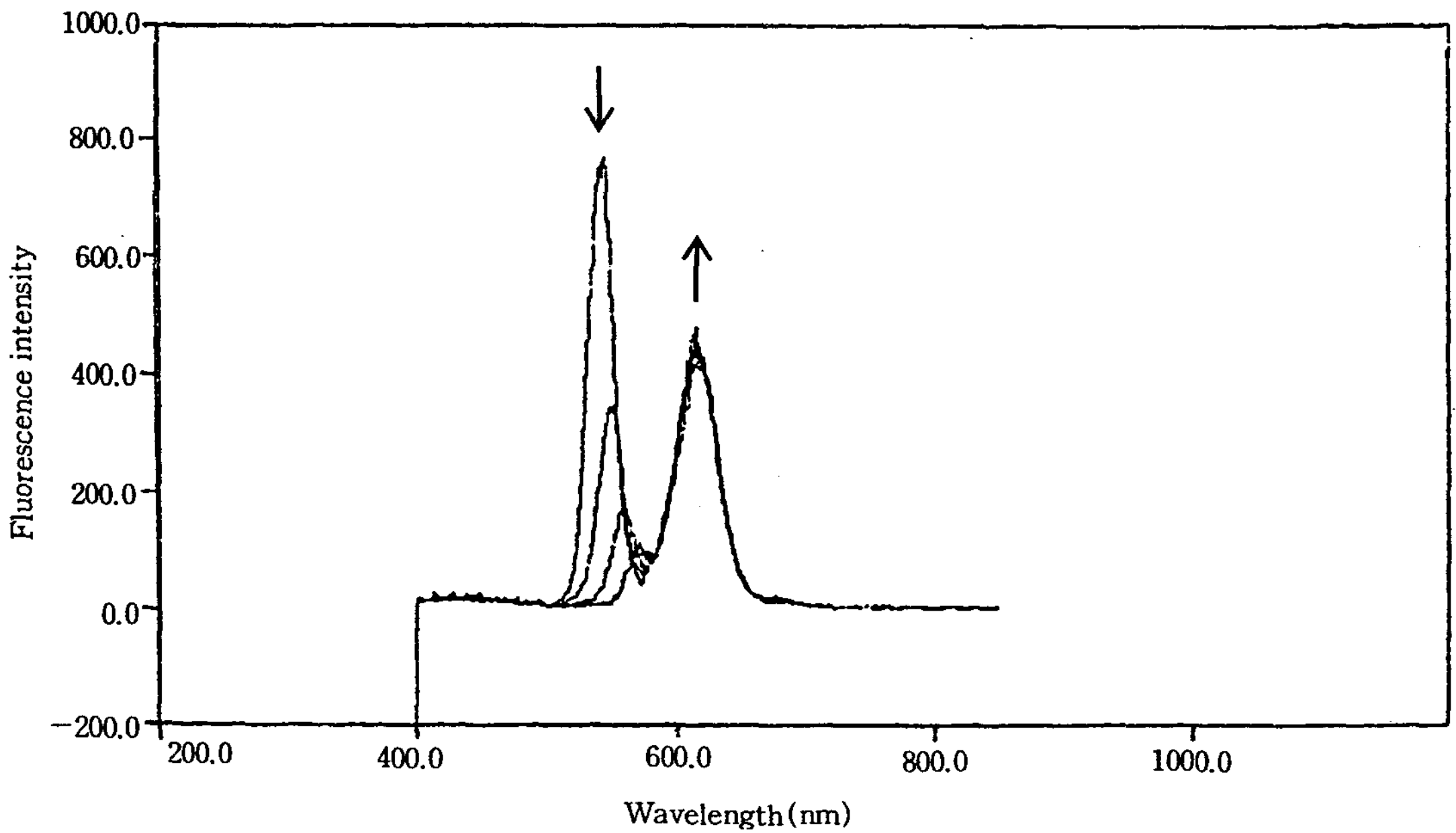


Fig. 9. Fluorescence emission spectra of 3.08×10^{-5} M-MB and 2.22×10^{-5} M-thionine at 20°C, excited from 540nm to 570nm with 10nm division, path length = 5mm, excitation and emission band width = 15nm, 0.01M-tris buffer(pH = 7.5).

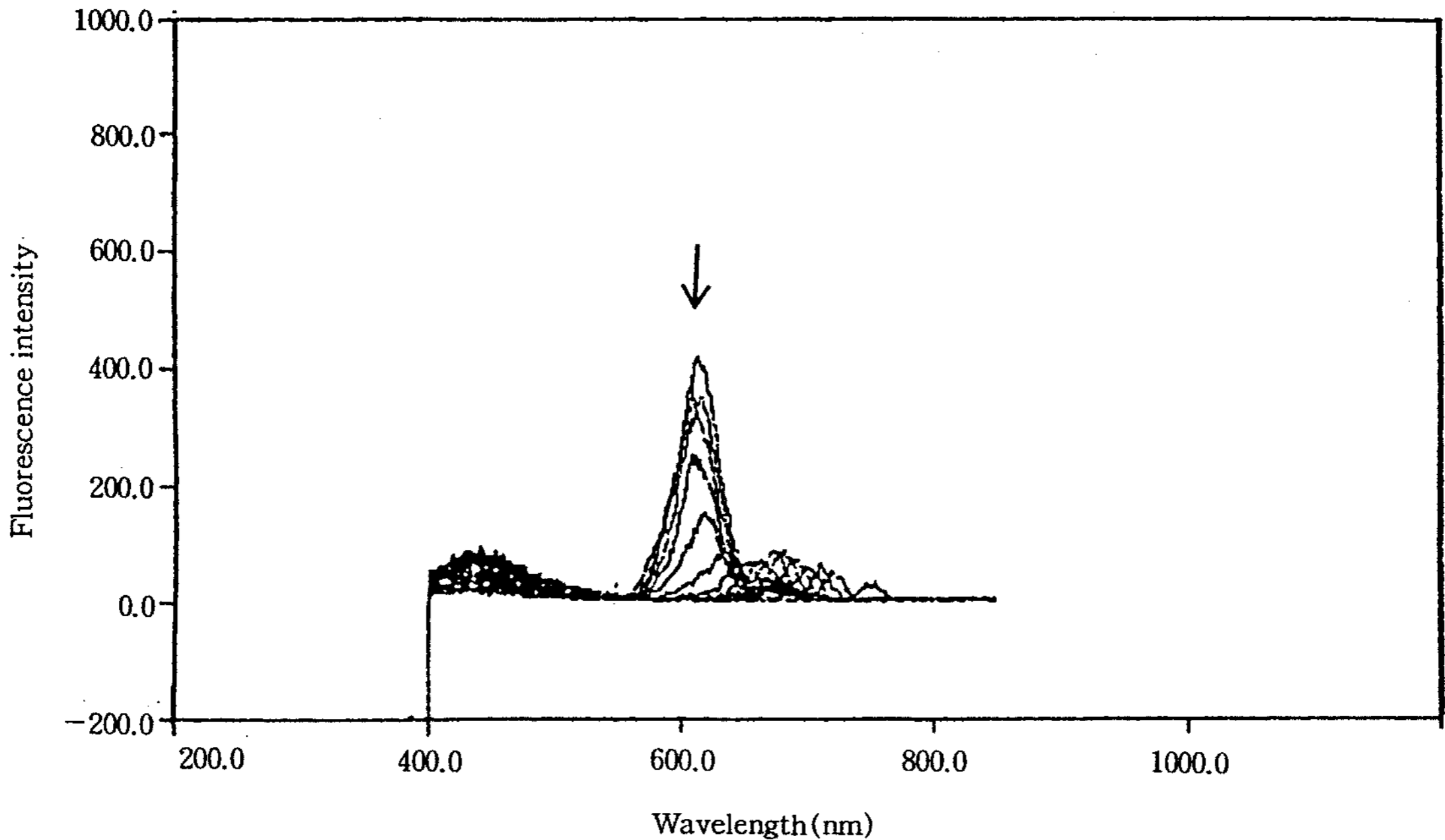


Fig. 10. Fluorescence emission spectra of 3.08×10^{-5} M-MB and 2.22×10^{-5} M-thionine at 20°C, excited from 580nm to 750nm with 10nm division, path length = 5mm, excitation and emission band width = 15nm, 0.01M-tris buffer(pH = 7.5).

매우 잘 형성하며 MB-thionine 회합체의 조밀도를 증가시킨다. 또한 MB분자 자신은 비형광성임에도 불구하고 thionine과 혼합회합체가 형성되면 thionine만의 회합체가 갖는 파장보다 짧은 파장영역에서 특성형광을 방출하는 것으로 생각된다.

IV. 결 론

비형광성인 MB와 형광성인 thionine이 수용액 중에 혼합되었을 때, 두 색소는 혼합회합체(coagregate)를 매우 잘 형성했다. 혼합색소용액의 형광띠는 단파장 영역의 여기광에 의해 두 부분의 형광띠가 관측되었으며 높은 에너지쪽의 형광띠는 MB-thionine의 혼합체의 방출띠이며, 낮은 에너지쪽의 형광띠는 thionine만의 방출띠임을 알았다. 또한 장파장 영역의 여기광에 의한 혼합색소용액의 형광띠는 단지 thionine만의 형광띠만 나타났다. 이것은 MB와 thionine이 혼합되면 MB분자가 thionine 회합체 사이로 끼어들어 혼합회합체의 쌓임의 조밀

도를 증가시키기 때문에 높은 에너지 영역에서 특성 형광스펙트럼이 나타나는 것으로 사료된다.

문 헌

1. L. Michaelis and S. Granick, *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 1212(1945).
2. E. T. Clark and H. G. Drickamer, *J. Phys., Chem.*, 90, 589(1986).
3. I. L. Arbeloa and K. K. Rohatgi-Mukerjee, *Spectrochimica Acta*, 44A, 423(1981).
4. K. J. Kim and H. S. Lee, *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, 13(3), pp.43~49(1996).
5. H. Lee, H. O. Pae, C. O. Lim, and H. S. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.* 36(4), pp.504~510 (1992).
6. T. Seki, T. Tamaki, T. Yamaguchi, and K. Ichimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 65, 657 (1992).

7. T. H. Paik and Y. G. Lee, *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, 4(2), 25(1987).
8. T. Takahara, E. Hamamura and R. Kubo, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 44, 728(1978).
9. T. F. Gallagher and W. E. Cooke, *Phys. Rev. Lett.*, 42, 835(1979).
10. H. Sato, M. Kawasaki, Y. Kusumoto, N. Nakasama, and K. Yoshihara, *Chem. Phys. Lett.*, 1529(1980).
11. S. Mabrey, P. L. Mateo, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry*, 17, pp.2464~2468(1978).
12. B. Lerebours, H. J. Watzke, and J. H. Fendler, *J. Phys. Chem.*, 94(4), pp.1632~1641(1990).
13. N. Nakashima and T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 4261(1982).
14. N. R. S. Reddy, R. Picorel, and G. J. Small, *J. Phys. Chem.*, 96, 6458(1992).
15. R. R. Birge, L. A. Finsen, and B. M. Pier, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, pp.5041~5043(1987).