Journal of the Korean Chemical Society
2003, *Vol. 47, No. 4*
Printed in the Republic of Korea

Methylene Blue를 이용한 역미셀에서 물의 세 가지 상태에 대한 분광학적 연구

박범영 · 정갑상 · 유수창 · 최호섭*
군산대학교 자연과학대학 화학과
(2003. 3. 21 접수)

Spectroscopic Study on Three States of Water in the Reverse Micelle Using Methylene Blue as a Probe

Bum Young Park, Kab Sang Jung, Soo-Chang Yu, and Ho Seob Choi*
Department of Chemistry, Kunsan National University, Jeonbuk 573-701, Korea
(Received March 21, 2003)

요 약. Cyclohexane에 녹아있는 Triton X-100/n-hexanol/water 계의 비이온성 역미셀(reverse micelle)에 대한 미세 환경정보를 알아보기 위해 methylene blue(MB)를 이용하여 흡광 및 형광 분광법으로 고찰하였다. 역미셀의 극성 중심(polar core)에서 물의 미세 상태에 대한 정보는 MB와 Triton X-100 사이의 착물형성과 용매화변색(solvatochromic) 거동을 조사해 봄으로써 얻을 수 있었으며, 역미셀의 안쪽 극성 중심에서 3가지 상태로 존재함을 알 수 있었다. 물의 세 가지 상태에 대한 W(=[H_2O]/[Surf])값은 0.71, 4.98, 7.26으로 측정되었으며, 그에 대한 MB의 형광수명은 15.45 ns± 0.56, 12.27 ns± 0.79, 그리고 8.28 ns± 0.82으로 나타났다.

주제어: MB, Triton X-100, 흡수, 형광, 역미셀, 형광수명

ABSTRACT. In order to find out the microscopic environmental information on the nonionic reverse micelle of Triton X-100/n-hexanol/water in cyclohexane, an absorption and fluorescence spectroscopic study has been conducted using a methylene blue(MB). The information on the microscopic states of water in the polar core of the reverse micelle has been found by investigating complex formation and solvatochromic behavior between MB and Triton X-100. As a result, it was found that there exist three states in the polar core of the reverse micelle. The measured values of W(=[H_2O]/[Surf]) for the three states of water are 0.71, 4.98, and 7.26, and the corresponding lifetimes of MB are 15.45 ns±0.56, 12.27 ns±0.79, and 8.28 ns±0.82, respectively.

Keywords: MB, Triton X-100, Absorption, Fluorescence, Reverse Micelle, Fluorescence Lifetime

서 론

역미셀은 유기용매 안에서 계면활성제에 의해 형성되는 나노 크기의 회합체이다. 역미셀은 그 크기가 수 나노미터 정도인 구상입자로써 그자체로서 나노입자를 제조하는데 사용될 수 있을 뿐 아니라, 이 안에 이온을 녹이면 촉매로도 이용될 수 있다. 최근 TiO_2 나노입자의 합성[1,2]과 CdS의 합성[3] 이 좋은 예이며 이밖에 유기, 생 · 유기 반응과 같은 분야에서도 이용된 예가 있다.[4-7] 역미셀의 촉매기능은 역미셀 안쪽의 친수성인 물이 일정한 공동(cavity)를 형성하기 때문이며, 단백질이나 효소 같은 다양한 생체분자들을 용해시킬 수 있는 능력을 가지고 있고, 물의 양에 따라 그 효과가 매우 다르게 나타난다. 따라서 역미셀의 안쪽 극성중심(polar core)에서 물의 특성을 알아내는 것은 매우 중요한 과제 중 하나이다.

역미셀내의 물의 특성을 분석하는데는 여러 방법들이 있으며 특히 비이온성 계면 활성제인 Triton X(TX)-100를 이용한 역미셀의 구조 연구에 ESR spin probe, 형광 probe method, NMR relaxation등의 여러 방법들이 이용되어왔다.[8] 이러한 분석 방법들은 나름대로 장단점이 존재하지만 역미셀내의 물의 특성을 연구하는데 가장 좋은 방법중의 하나는 염료조사제(dye probe)를 이용한 형광분석법이다. 이 방법은 염료조사제의 형광이 미세환경의 변화에 대해 민감한 반응을 보이기 때문에 역미셀내의 물의 미미한 변화를 알아보는데 어떠한 방법보다 적합하다. Kumar와 Balasubramanian에 의한 역미셀내의 물의 점도측정과 광학적 비등방성 연구가 대표적인 것이며,[9-11] 7-Azatryptophan 조사제의 형광특성을 이용한 역미셀 환경에 대한 Sengupta의 연구등도 좋은 예라할수 있다.[12] 이 밖에 이와 유사한 연구로서 수용액 환경에서 염료분자들과 유기매체들의 상호작용에 대한 형광특성 및 분광학적인 변화를 조사하는데 auramine-O 염료를 사용한 Warner[13] 및 근적외선 영역에서 pH에 따른 혼합 용액내 극성 측정 등에 근적외선을 흡수하는 형광단(near-IR-absorbing fluorophore)를 이용한 Gabor Patonay[14-17] 등을 들 수있다.

본 연구에서는 MB(methylene blue)라는 조사제를 이용하여 역미셀내의 물의 상태를 연구했다. 특히 MB는 2개의 진동모드가 주위 미세 환경에 따라 흡광 및 형광 밴드를 다르게 나타내므로 이를 이용하여 밴드의 변화를 관측함으로써 단량체(monomer)와 이합체(dimer)의 몰비율을 계산할 수 있기 때문에 역미셀에서 물의 상태 변화에 대한 정보를 연구하는데 적합하다.[8,18] Limin과 Jiming은 조사제로서 MB와 MO(methyl orange)를 사용하여 역미셀에서 물의 양에 따른 흡광과 형광스펙트럼의 변화를 측정하여 보고한 바 있다.[8] 하지만 직접적인 정보를 제공해줄 수 있는 시분해 형광(time-resolved fluorescence)과 같은 동역학적인 연구는 MB에 대해서 아직 발표되어 있지 않은 상태이다. 따라서 본 연구에서는 시분해 형광분광법을 이용하여 역미셀에서 실시간으로 변하는 물의 거동을 조사 하였다. 측정된 결과는 Limin과 Jiming[8]의 연구결과와 아주 잘 일치함을 알 수가 있었다.

재료 및 방법

비이온성 계면활성제(Nonionic surfactant) TX-100과 n-hexanol, cyclohexane은 전부 samchunychemical사의 extra pure 제품을 사용했고 모든 용매들은 별다른 증류과정 없이 바로 사용했다. TX-100/n-hexanol/water/cyclohexane을 이용한 역미셀을 만들기 위해서, TX-100과 n-hexanol을 4:1(v/v)로 섞어주고 잘 교반시켰다. 이렇게 교반된 용액은 다시 cyclohexane에 10%(v/v)에 해당하는 양만을 취해 섞어주었다. 이때 TX-100의 농도는 0.13 M 이 되었으며, 이 조건에서 TX-100 역미셀이 형성되고 물을 첨가하며 측정했다. 이때 첨가된 물의 몰농도를 계산하여 계면 활성제의 농도로 나누어 주면 W(=$[H_2O]$/[Surf])값을 구할 수 있었다. 조사제로 사용되는 MB의 표준용액은 1×10^{-3} M(in MeOH)로 만들었으며 이 실험에 필요한 양을 얻기 위해 용기(vial)에 필요한 양을 취한 후 50 °C이상에서 메탄올만을 건조 · 증발 한 후 사용했다. 역미셀에서 염료가 서서히 용해되기 때문에 실험 3일전에 만들어둔 용액을 사용했으며, 이때 물이 존재하지 않는 역미셀에서 용액의 색깔은 진한 핑크색 계열이었다. U·V-Visible 흡수 스펙트럼은 SHIMADZU사의 UVPC photometer UV-2401PC를 이용했고, 석영셀은 10 mm를 사용했으며 상온 25 °C에서 측정하였다.

형광 스펙트럼과 형광 수명, 시분해 형광은 PTI사의 QM-2003 series를 이용하였다. 정류상태(Steady-state) 형광 측정은 들뜸파장(excitation wavelength)을 올리고머(oligomer)와 단량체의 최대 흡수파장에 해당되는 470 nm와 620 nm를 각각 사용했으며, 형광 수명을 측정하기 위해서는 들뜸파장을 620 nm로 고정시킨 후 670 nm에서 형광을 측정하였다. 시분해 형광은 53 ns부터 58 ns까지 1 ns씩 늘려가며 500~750 nm 범위에서 측정하였다. 광원으로는 PTI사의 GL-3300 N_2 laser와 GL-302 Dye laser를 연결하여 사용하였다.

결과 및 고찰

Absorption spectra of MB in TX-100 Reverse micelles

TX-100/n-hexanol/water/cyclohexane으로 구성된 역미셀에서 물이 어떤 상태로 존재하는지를 조사하기 위해 조사제 MB를 이용하여 역미셀에서 첨가된 물의 양에 따른 MB의 흡광도 변화를 측정하여 *Fig*. 1에 나타내었다. *Fig*. 1에 보여진 MB의 흡수스펙트럼 거동은 전형적인 용매화변색(solvatochromic) 현상을 나타내는데, 흡수밴드는 단파장밴드(507 nm)와 중간밴드(600 nm), 그리고 장파장밴드(645 nm)로 구성되어 있다. 지금까지의 연구에 의하면 600 nm와 645 nm는 각각 이합체와

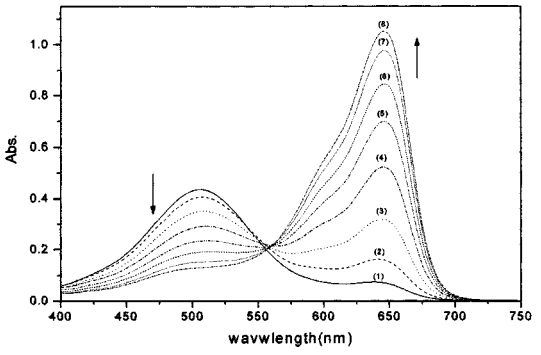

Fig. 1. Absorption spectra of MB in reverse micelle, [MB] 2×10^{-5}M, [water](1) 0.037 M, (2) 0.093 M, (3) 0.15 M, (4) 0.19 M, (5) 0.26 M, (6) 0.30 M, (7) 0.37 M, (8) 0.42 M.

단량체 밴드로 밝혀졌고 507 nm의 밴드는 삼합체(trimer) 또는 사합체(tetramer) 등 여러 개의 MB분자가 모여서 된 회합체로 밝혀졌다[18](이것을 '올리고머'라 명하겠다). 이합체와 올리고머가 단량체보다 단파장에서 나타나는 현상은 분자간의 stacking이론과 exciton 이론 등에 의해 잘 설명되어져 있다.[19]

올리고머는 일반적으로 농도가 상당히 진한경우나 그 외의 아주 특별한 환경에 의해서만 관찰될 수 있는데, 본 실험에선 2×10^{-5}M의 묽은 농도에서도 관찰되었다. 물의 농도에 따른 MB의 용매화변색 현상을 관찰할 수 있다는 것은 MB가 역미셀의 미세 환경에 대한 연구에 아주 적합하다는 것을 의미한다. 물의 거동을 조사하기 위해 측정한 흡광도 데이터를 deconvolution 하여 각 밴드의 몰분율(mole fraction)값을 얻었다. *Fig.* 2는 물이

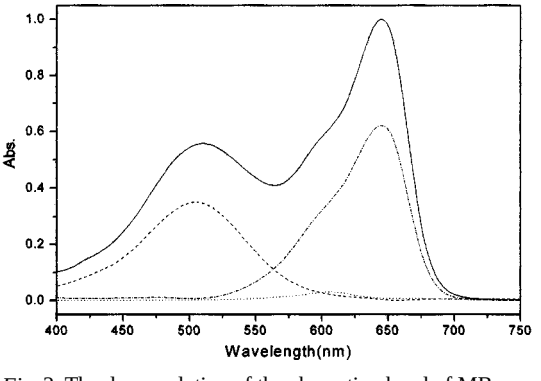

Fig. 2. The deconvolution of the absorption band of MB surrounded by 0.12 ml of water in reverse micelle. The dotted line corresponds to the deconvoluted dimer band, and the dashed line corresponds to the oligomer bands. The dotted and dashed line represents the deconvoluted monomer band.

0.12 ml 첨가되었을 때의 데이터를 deconvolution한 것이다. Deconvolute 된 단량체 밴드에 단파장쪽에 자그마한 밴드(shoulder)가 나타나 있는데, 이것은 단량체 흡수밴드가 2개의 진동밴드를 가지고 있기 때문이다.[18] Deconvolution하여 얻은 각 성분의 몰분율 값의 특징은 이합체밴드의 몰분율 값이 다른 성분밴드의 값보다 상당히 작았으며(<< 0.03%), 물농도가 증가하더라도 거의 변화가 없었다. 따라서 본 연구에서는 이합체의 존재에 대해서는 고려하지 않았다.

물의 양이 어느 정도 증가하면 더 이상 흡광도의 변화가 일어나지 않았으며 나중에는 상분리(phase separation)가 일어났다. 이러한 현상은 용액의 색깔 변화로도 알 수가 있었는데 물이 들어가기 전에는 진한 핑크색이었던 것이 물이 첨가됨에 따라 파란색 으로 변함이 관찰되었다. 이 용액에 TX-100을 좀더 첨가하면 용액의 색깔은 다시 핑크색으로 돌아갔는데 이런 색깔변화 현상과 *Fig.* 1에 나타난 557 nm 근방의 등흡광점으로 미루어 보아 위 반응이 가역반응임을 알 수 있었다.

Fig. 3은 deconvolution으로 얻은 단량체와 올리고머의 몰분율값을 W(=[H_2O]/[Sirf])값의 함수로 도시한 것이다. 그림을 살펴보면 W값이 증가함에 따라 단량체의 몰분율값은 증가한 반면 올리고머의 몰분율값은 감소하는데 W값이 4이상이 되면, 둘 사이의 분율이 일정하게 유지됨을 알 수 가 있다. 이와 같은 실험적 사실은 계면활성제의 상태가 물의 농도에 의존적임을 보여주고 있다.

Fig. 3의 단량체 몰분율 변화곡선을 살펴보면 W값에 대하여 MB의 변화구간이 세 구간으로 나누어진다는 것을 알 수 있는데, 이것은 Limin과 Fiming가 TX-100 역미셀에 물을 첨가 했을 때 물이 3가지 상태로 존재한

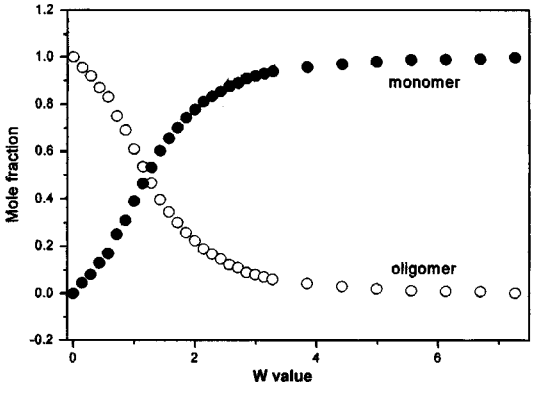

Fig. 3. Monomer and oligomer mole fractions of MB as a function of W.

다고 보고한 것과 아주 잘 일치하고 있다.[8] 따라서 MB의 변화는 역미셀의 안쪽 극성 중심(polar core)에서 물의 상태에 대한 정보를 잘 반영하고 있다. MB의 변화를 구간별로 살펴보면 첫 번째 상태는 물이 첨가되어도 MB의 변화가 거의 없는 구간으로 물은 TX-100의 친수그룹인 ethylene oxide(E · O)그룹과 상호작용하며 MB에는 별다른 영향을 미치지 못하는 구간이다. 두 번째 상태는 물의 농도에 따라 MB의 변화가 급격히 증가되는 구간으로 이것은 첨가된 물이 첫 번째 상태를 지나 MB와 상호작용하며 물풀(water pool)을 형성하는 단계이다. 세 번째 상태는 첨가된 물에 대해 더 이상 MB의 변화가 일어나지 않는 구간으로 첨가된 물은 어느 것과도 상호작용을 하지 않는 상태(free 상태)로 존재한다. 좀더 자세히 설명하면, 조사제 MB는 처음에 역미셀에서 TX-100과 1:1 착물을 형성하며 안쪽의 친수성쪽에 모여 올리고머상태로 존재한다. 이 상태에서 물은 TX-100과 MB의 층을 뚫고 들어가 TX-100의 E·O 그룹을 수화시킨다. 그 후 더 증가된 물은 물풀(water pool)을 형성하며 수소결합등의 상호작용을 통해 MB 분자를 단량체로 해리 시킨다. 결국엔 물은 free 상태가 되며 그 이상 물을 첨가시키면 상대적인 친수성이 커져서 상분리가 일어나게된다. Kumar는 그의 논문에서 TX-100 역미셀에 첨가된 물이 TX-100의 E · O 그룹과 수소결합을 한다고 주장한바 있다.[9] 본 연구에서 측정된 물의 첫번째 상태는 W값이 0.71, 두 번째 상태는 4.98, 그리고 세 번째 상태는 7.26이었다.

Fluorescence spectrum of MB in TX-100 Reverse Micelles

흡수스펙트럼에서 얻은 결과를 토대로 올리고머는 470 nm, 단량체는 620 nm에서 들뜨게 하여 형광스펙트럼을 얻어 *Fig.* 4에 나타내었다. 물의 양을 증가시키며 측정한 형광 스펙트럼도 흡수스펙트럼의 경향과 유사하게 나타났다. 즉, 올리고머에 해당되는 550 nm의 밴드는 감소하고 단량체에 해당되는 670 nm의 밴드는 증가하였다. 하지만 550 nm의 올리고머 형광밴드는 단량체의 형광밴드에 비해 감소경향이 일정하지 못하고 단파장이동과 함께 다시 형광강도가 증가하다 감소하는 경향이 관찰됐다. 이것은 TX-100 역미셀이 어느 일정량의 물과 섞이면 상변이 과정을 통해 액정을 형성한다는 Kumar의 발표와 같은 이유라고 사료된다.[9]

더욱 자세한 동력학적인 정보를 얻기 위해 W값이 1.7일때 나노초 범위에서 시분해 형광을 측정해 보았다. *Fig.* 5은 시분해 형광 스펙트럼이다.

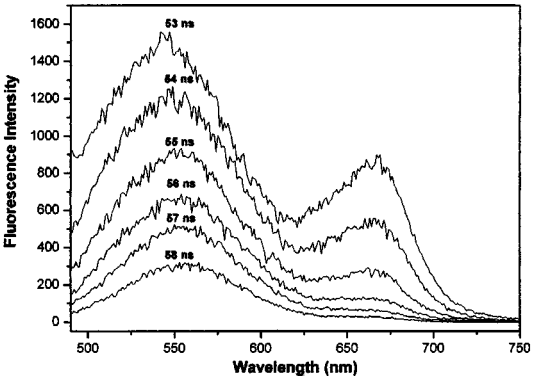

Fig. 5. Time-resolved fluorescence spectra of MB in reverse micelle, When W is 1.7; Excitation 470 nm. The time after the excitation is shown in the figure.

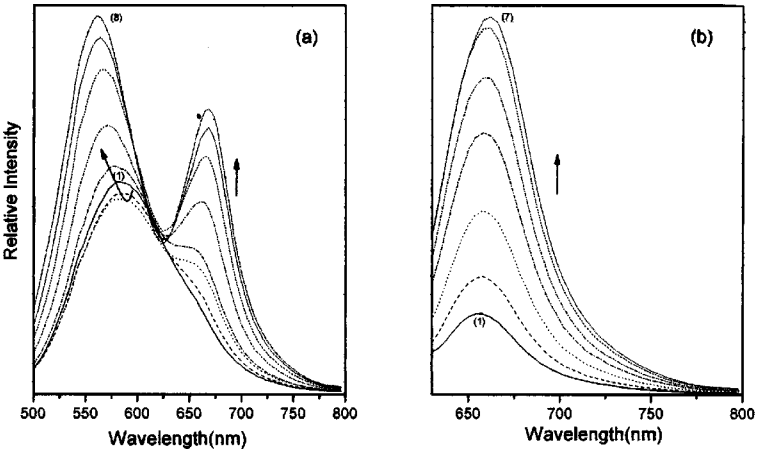

Fig. 4. Fluorescence spectra of MB with added water in reverse micelle, (a) Excitation 470 nm, (b) Excitation 620 nm.

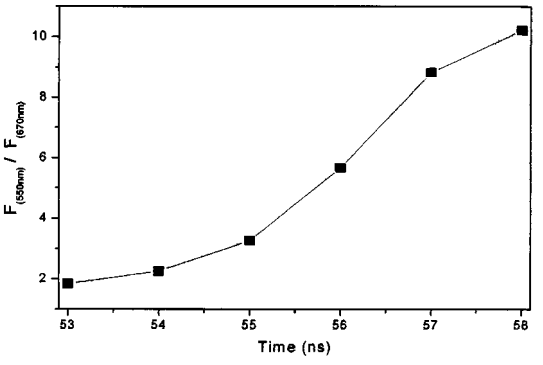

Fig. 6. The fluorescence intensity ratio as a function of time.

550 nm(올리고머)와 670 nm(단량체) 변화폭을 비교해 보았을 때, 후자의 변화폭이 크다는 사실을 *Fig*. 6의 시간에 따른 형광 강도비($F_{(550\ nm)}/F_{(670\ nm)}$)의 도시로 확인 할 수 있었다. 따라서 올리고머 형광보다는 첨가된 물에 의해 해리된 단량체의 형광이 빠르게 소광됨을 알 수 있다. 소광의 빠르기가 다르게 나타난 것은 역미셀의 극성중심에 있는 물의 상태에 따라 MB 단량체와의 수소결합, 유전상수의 변화에 의해 기인된 것으로 사료된다.

이 사실을 알아보기 위해 물의 농도에 따른 MB 단량체의 형광수명을 측정해 보았으며 그 결과를 *Fig*. 7에 나타냈다. *Fig*. 7에 나타낸 형광수명은 들뜸파장(excitation wavelength)을 620 nm, 형광파장(emission wavelength)을 680 nm로 고정하여 측정하였으며, 조사제로 사용한 MB 형광단(fluorophore)이 두 가지의 다른 미세 환경에 있다는 가정 하에 모든 형광수명(lifetime)을 biexponential

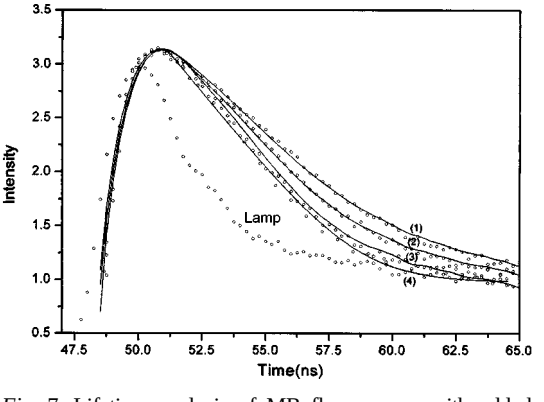

Fig. 7. Lifetime analysis of MB fluorescence with added water in reverse micelle, W is (1) 0(zero), (2) 1.7, (3) 6.1 (4) MB monomer in pure water.

Table 1. Various lifetimes of MB with added water in the reverse micelle

$W(=\frac{[H_2O]}{[Surf]})$	$_1$(ns)	$_2$(ns)
0~0.68	1.55	15.45
1.09~2.86	1.28	12.27
3.27~6.26	1.11	8.28
Monomer in pure water	1.51	7.97

함수로 fitting 하였다. 긴 형광수명 값은 올리고머 형광수명으로 첨가된 물이 MB 형광단을 수화 시키지 않고 계면 활성제의 친수성인 E · O 그룹을 수화 시켰기 때문으로 생각된다. 이와는 반대로 짧은 형광수명은 단량체에 대한 것으로 MB 형광단이 첨가된 물에 의해 수화되어 MB 형광단이 수소결합등 여러 가지의 소광(quenching) 경로를 통해 형광수명이 짧아지는 것으로 사료된다. 이에 대한 증거로서 순수한 물 용매에 희석된 MB의 형광수명을 들 수가 있는데 이 수명은 biexponential의 짧은것과 거의 일치하고 있다. 물이 인접한 계면활성제나 조사제 MB와 상호작용을 하지 않는 상태(free 상태)로 존재하는 농도 이상에선 형광수명의 변화는 없었다. 이것은 첨가된 물이 MB 형광단과 더 이상 상호작용을 하지 않음을 의미한다. 이때 물의 농도증가에 따라 fitting된 형광수명에 감소가 있었는데 그 값의 차이가 작은 것들은 같은 형광수명으로, 큰 차이가 나는 것은 다른 형광수명으로 간주하여, 그 값들을 *Table* 1에 나타내었다. 이 결과들을 살펴보면 물이 역미셀의 극성 중심에서 세 가지 상태로 존재한다는 사실을 아주 잘 알 수가 있다.

결 론

본 연구에서는 TX-100/n-hexanol/cyclohexane/water로 이루어진 시스템에서 비이온성 역미셀의 미세환경에 대해 조사하였다. 이를 위하여 조사제 염료물질로 MB를 사용했으며 MB의 흡광도뿐만 아니라 형광과 형광수명 그리고 시분해 형광을 측정하여 분석하였다. 물의 농도 증가에 따른 MB의 단량체와 올리고머의 몰분율 W(=$[H_2O]$/[Surf])값으로부터 역미셀 극성중심에서 물이 세 가지 상태로 존재함을 확인할 수 있었으며 이러한 실험결과는 흡광도 및 형광과 함께 형광 수명을 측정함으로써 보다 확신할 수 있었다.

인 용 문 헌

1. Elias, S.; Panagiotis, L. *Langmuir*. **2000**, *16*, 2398.
2. Stathatos, E.; Lianos, P.; Monte, F. D.; Levy, D.; Tsiourvas, D. *Langmuir*. **1997**, *13*, 4295.
3. Dutta, P.; Fendler, J. H. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *247*, 47.
4. Altamirano, M. S.; Borsarelli, C. D.; Cosa, J. J.; Previtali, C. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *205*, 390.
5. Rodriguez, R.; Vargas, S.; Fernandez-Velasco, D. A. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *197*, 21-28.
6. Fernandez-Velasco, D. A.; Rodriguez, R.; Vargas, S.; Tuena de Gomez-Puyou, M.; Gomez-Puyou, A. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *197*, 29-35.
7. Chen, D. H.; Wang, C. C.; Huang, T. C. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *210*, 123.
8. Qi, L.; Ma, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *197*, 36.
9. Kumar, C.; Balasubramanian, D. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *74*, 1.
10. Kumar, C.; Balasubramanian, D. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, *69*, 271.
11. Das, S. K.; Ganguly, B. N. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *192*, 184.
12. Guharay, J.; Sengupta, P. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 388.
13. Mwalupindi, A. G.; Rideau, A.; Agbaria, R. A.; Warner, I. M. *Talanta.* **1994**, *41*, 599.
14. Tarazi, L.; George, A.; Patonay, G.; Strekowski, L. *Talanta.* **1998**, *46*, 1413.
15. Evans, L.; Patonay, G. *Talanta*. 1999, *48*, 933.
16. Sophianopoulos, A. J.; Lipowski, J.; Narayanan, N.; Patonay, G. *Appl. Spectrose.* **1997**, *51*, 1551.
17. Zen, J. M.; Patonay, G. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2934.
18. Jacobs, K. Y.; Schoonheydt, R. A. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *220*, 103.
19. Ho-Soeb, Choi; Heung-Tu, Kim *J. Kor. Chem. Soc.*,. **1996**, *40*(4), 283.