

Research Article

Open Access

N,N-Dimethylformamide와 Dimethylsulfoxide를 이용한 감귤 잎의 엽록소 측정방법 확립

한승갑,^{1*} 강석범,¹ 문영일,¹ 박재호,¹ 박경진,¹ 최영훈¹

¹국립원예특작과학원 감귤시험장

Establishment of Analytical Method for Chlorophyll Using the *N,N*-Dimethylformamide and Dimethylsulfoxide in Citrus Leaves

Seung-Gab Han,^{1*} Seok-Beom Kang,¹ Young-Il Moon,¹ Jae-Ho Park,¹ Kyung-Jin Park,¹ and Young-Hun Choi¹
(¹Citrus Research Station, NIHHS, RDA, Jeju 697-943, Korea)

Received: 15 July 2014 / Revised: 31 August 2014 / Accepted: 4 November 2014

Copyright © 2014 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

Abstract

BACKGROUND: Purpose of the study was to establish the extinction coefficients of chlorophyll a and b in *N,N*-dimethylformamide(DMF) and Dimethylsulfoxide(DMSO) solvents and to find out the conditions of optimal extraction temperature and time in citrus leaves.

METHODS AND RESULTS: Chlorophyll a and b standards were dissolved in DMF and DMSO. Extinction coefficients of chlorophyll pigments were determined and their contents were quantified using spectrophotometer. Chlorophyllous pigments of citrus(*Citrus unshiu* Marc. cv. Okitsu wase) leaves were extracted at 25, 40, 60 and 80°C for 4, 6, 8, 24 and 48 hours to determine the optimal extraction condition.

CONCLUSION: The extinction coefficients of chlorophyll a(Chl a) and chlorophyll b(Chl b) of DMF extracts for high extinction wavelength were 663.8 and 647.2 nm. Similarly, the high extinction wavelength of DMSO extracts were 665.8 and 649.0 nm for chl a and b respectively. Chl a, Chl

b and total chlorophyll content of DMF extracts were $\text{Chl a} = 12.10A_{663.8} - 2.74A_{647.2}$, $\text{Chl b} = 21.94A_{647.2} - 5.06A_{663.8}$ and total Chl = $19.193A_{647.2} + 7.04A_{663.8}$. Similarly, Chl a, Chl b and total Chl of DMSO extracts were $\text{Chl a} = 14.53A_{665.8} - 5.40A_{649.0}$, $\text{Chl b} = 26.98A_{649.0} - 7.11A_{665.8}$ and total Chl = $21.58A_{649.0} + 7.43A_{665.8}$. The chlorophyll extracts of DMF and DMSO were very stable in dark. High chlorophyll contents of citrus leaves were found at 80°C extraction for 6 hours in DMF and at 80°C extraction for 24 hours in DMSO. However, the chlorophyll content was decreased significantly after 8 hours in DMF extraction while it was remained up to 30 hours in DMSO extraction.

Key words: Analysis, Nutrition, Pigment, Solvent

서론

엽록체의 그라나 속에서 빛에너지와 이산화탄소를 이용하여 탄수화물을 합성하는데 중요한 역할을 하는 엽록소의 추출은 80% acetone 용액을 이용하였으나(Mackinney, 1941), 과도한 시료 전처리 노력과 추출된 엽록소의 안정성의 문제로(Knudson *et al.*, 1977) 신속하고 간편한 비파괴적 추출방법이 개발되었다. 주로 유기용매인 Dimethylsulfoxide(DMSO,

*교신저자(corresponding author): Seung-Gab Han
Phone: +82-64-730-4172; Fax: +82-64-730-4111;
E-mail: skhan@korea.kr

Shoaf and Lium, 1976)와 *N,N*-dimethylformamide (DMF, Moran and Porath, 1980)를 이용하였으며, 이들 용매로 추출한 엽록소는 빛에도 안정적인 특성을 보였다 (Inskeep and Bloom, 1985; Barnes *et al.*, 1992).

엽록소 총 함량의 환산에 이용되는 측정파장과 흡광계수는 추출용매에 따라 달라진다. 80% acetone 추출시는 $20.0A_{645}+8.02A_{663}$ (Arnon, 1949), DMF는 $17.9A_{647}+8.08A_{664.5}$ 의 환산식을 사용한다 (Inskeep and Bloom, 1985). 그러나 DMSO로 추출할 경우에는 80% acetone 추출 방법과 같은 환산식을 이용하고 있으므로 이에 대한 검토가 필요하다. 또한 낙엽과수 (Park *et al.*, 1996), 솔잎 (Hiscox and Israelstam, 1979), 잣나무 (Seo *et al.*, 2005) 등 작물 잎의 특성에 따라 적절한 추출 온도와 시간이 달라지므로 큐티클층이 매우 발달된 감귤 잎의 효율적인 추출 조건과 용매별 환산식을 설정하고자 수행하였다.

재료 및 방법

엽록소 a, b의 최고 파장 검색

엽록소 a와 b의 표준시료 (Sigma Aldrich Co.)를 DMF

와 DMSO에 녹인 후 직경 1 cm의 석영 셀에 넣고 자외선-가시광선 분광광도계 (Cary 100, Varian, Australia)로 600~700 nm 범위에서 0.2 nm 간격으로 측정하였다.

총 엽록소 함량 계산식 측정

흡광계수(e)를 측정하기 위해 엽록소 a와 b의 흡광도가 0.1~1.0 범위에 포함되도록 각각 10~20 mg/L을 DMSO와 DMF 용매에 녹이고, 빛에 의해 분해되는 것을 방지하기 위하여 갈색의 50 mL volumetric flask에 보관하여 사용하였다.

흡광계수(e)는 미리 조제된 표준용액 엽록소 a(10, 10.5 mg/L)와 b(10, 11 mg/L)를 설정된 최고 파장에서 흡광도(A)를 측정하여 아래 공식 (1)에 의해 계산하였다.

$$e(\text{L/g} \cdot \text{cm}) = A/C(\text{mg/L})/b(\text{cm}) \times 1000 \quad (\text{Eq. 1})$$

여기서, e : extinction coefficient

A : absorbance

C : concentration(mg/L)

b : path length(cm)

그리고 계산된 흡광계수를 이용하여 엽록소 a와 b 그리고

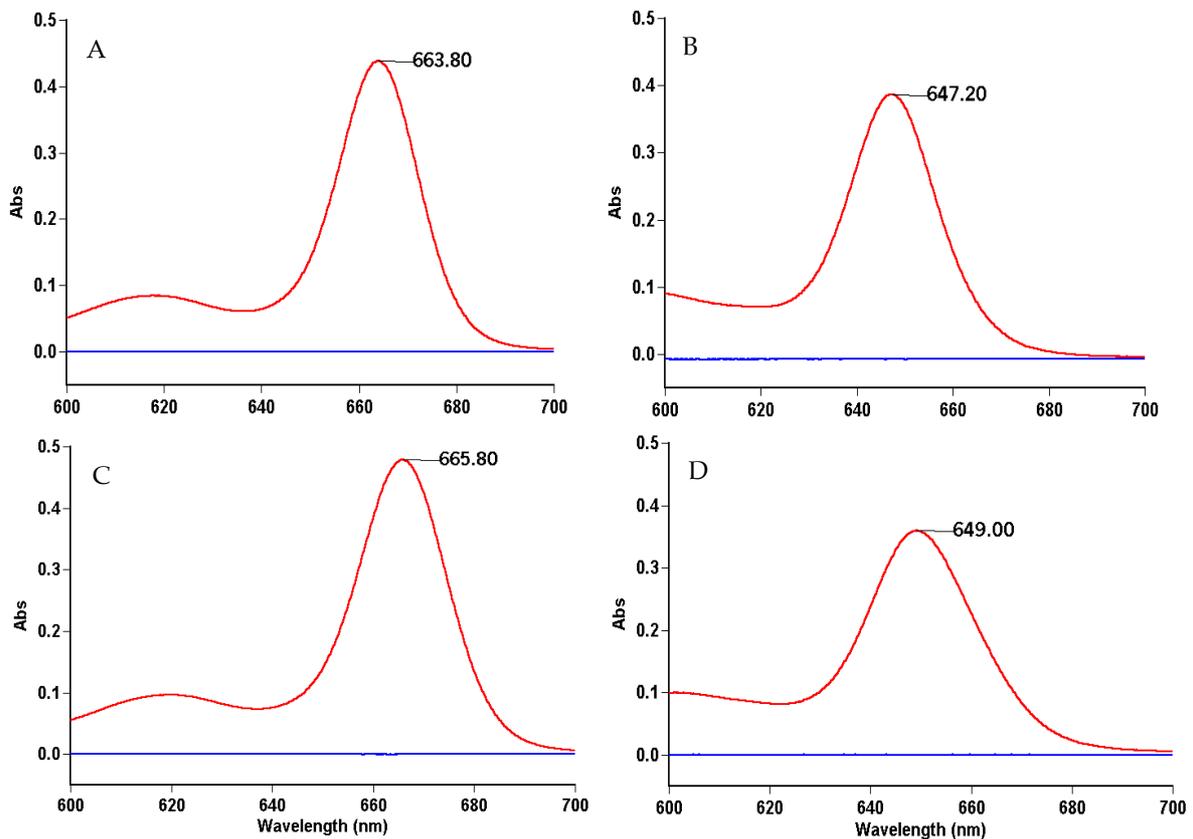


Fig. 1. Absorbance spectra of chlorophyll a and b in a solvents, in a *N,N*-dimethylformamide, chlorophyll a has approximate absorbance maxima of 663.8 nm(A), while chlorophyll b has approximate of 647.2 nm(B). In a Dimethylsulfoxide, chlorophyll a has approximate absorbance maxima 665.2 nm(C), while chlorophyll b has approximate of maxima of 649.0 nm(D).

Table 1. Calculated extinction coefficients for chlorophyll a and b dissolved in *N,N*-dimethylformamide and Dimethylsulfoxide

Chlorophyll		DMF		DMSO	
		647.2 (nm)	663.8 (nm)	649.0 (nm)	665.8 (nm)
Chl a	Concn. (mg/L)	10	10	10.5	10.5
	Absorbance	0.201	0.872	0.211	0.801
	e (L/g · cm)	20.1	87.2	20.1	76.3
Chl b	Concn.(mg/L)	10	10	11	11
	Absorbance	0.481	0.109	0.452	0.168
	e (L/g · cm)	48.1	10.9	41.1	15.3

Chl a, chlorophyll a (Sigma chemical); Chl b, chlorophyll b (Sigma chemical).

DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMSO, Dimethylsulfoxide

Table 2. Simultaneous equations for quantifying chlorophyll from measured absorbance dissolved in *N,N*-dimethylformamide and Dimethylsulfoxide

DMF	DMSO
Chl a=12.10A _{663.8} ^y -2.74A _{647.2}	Chl a=14.53A _{665.8} -5.40A ₆₄₉
Chl b=21.94A _{647.2} -5.06A _{663.8}	Chl b=26.98A ₆₄₉ -7.11A _{665.8}
Total Chl=19.19A _{647.2} +7.04A _{663.8}	Total Chl=21.58A ₆₄₉ +7.43A _{665.8}

DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMSO, Dimethylsulfoxide.

A_{663.8} : absorbance at 663.8 nm(maxium for Chl a in DMF)

총 함량을 계산하였고, 엽록소 a를 측정할 경우 단파장의 흡광계수를 e_1 , 장파장은 e_2 그리고 엽록소 b인 경우는 각각 e_1' , e_2' 라 하였으며, 단파장의 흡광도는 A_1 , 장파장은 A_2 로 하여 다음 과정에 따라 산출하였다.

$$A_1 = e_1' \cdot Chl b + e_1 \cdot Chl a, \quad A_2 = e_2' \cdot Chl b + e_2 \cdot Chl a \quad (\text{Eq. 2})$$

공식 (2)을 행렬의 방정식으로 다시 정리하면 아래와 같이 상수 R을 계산할 수 있고, 엽록소 a와 b 그리고 엽록소 총 함량을 유도할 수 있다.

$$\begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} e_1' & e_1 \\ e_2' & e_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} Chl b \\ Chl a \end{pmatrix} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\begin{pmatrix} Chl b \\ Chl a \end{pmatrix} = \frac{1}{(e_1' \cdot e_2) - (e_1 \cdot e_2')} \begin{pmatrix} e_2 & -e_1 \\ -e_2' & e_1' \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \end{pmatrix} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\frac{1}{(e_1' \cdot e_2) - (e_1 \cdot e_2')} = R(\text{constant})$$

$$Chl b = R \cdot e_2 \cdot A_1 - R \cdot e_1 \cdot A_2$$

$$Chl a = -R \cdot e_2' \cdot A_1 + R \cdot e_1' \cdot A_2$$

$$\text{Total Chl} = R(e_2 - e_2')A_1 + R(e_1' - e_1)A_2$$

용매 및 광조건별 엽록소의 안정도

엽록소는 빛에 의해 쉽게 분해되는 특성이 있기 때문에 미리 조제된 표준 용액 엽록소 a와 b를 DMSO와 DMF 용매로 흡광도가 0.1~1.0 범위 내 저, 중, 고농도의 시료를 준비

한 후 명조건에서 1, 2, 3, 24시간 후, 그리고 빛이 차단된 갈색 volumetric flask의 암조건에서 24시간 후에 흡광도 변화를 조사하였다.

유기용매에서 감귤 잎의 엽록소 추출 조건

감귤 잎의 엽록소 추출 조건을 설정하기 위하여 20년생 조생온주(*Citrus unshiu* Marc. cv. Okitsu Wase) 감귤나무의 봄 잎을 채취하였다. 한 잎 당 사무용 펀치로 8개의 원형조각(0.283cm²/disk)을 도려내어 용매 2종류, 온도 4처리를 위해 8개의 100 mL volumetric flask에 한 개씩 나눠 넣었으며, flask당 20개의 잎 disk가 들어가도록 하였다. 여기에 DMSO와 DMF를 각각 50 mL씩 채워 넣었고, 20반복을 실시하였다. 엽록소 추출 중 공기 차단을 위해 마개로 잘 밀봉한 후 각각 25, 40, 60, 80°C로 설정된 암조건의 항온기에 분리하여 넣고 4, 6, 8, 24, 48시간 후에 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

DMF에 녹인 Chl a와 b의 scan 결과 663.8과 647.2 nm(Fig. 1)에서 가장 높은 흡광도를 보였다. 이는 Inskeep과 Bloom(1985)이 조사한 파장 664.5와 647.0 nm와 큰 차이가 없었다.

DMSO를 이용할 경우 Chl a는 665.8 nm, Chl b는 649.0 nm(Fig. 1)에서 최고 흡광도를 보여 DMF 용매로 추출할 경우보다 1.3~2.0 nm의 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 acetone 용매를 사용할 경우의 663과 645 nm (Mackinney, 1941)의 파장보다 약 2.8~4.0 nm의 차이가

Table 3. Time-lapsed changes in the concentration of chlorophyll extracted by *N,N*-dimethylformamide and Dimethylsulfoxide in the light condition at 25°C

Hours after extraction (hr)	DMF				DMSO			
	Chl a(663.8 nm)		Chl b (647.2 nm)		Chl a (665.8 nm)		Chl b (649.0 nm)	
	A.	Rate (%)	A.	Rate (%)	A.	Rate (%)	A.	Rate (%)
0	0.54	100	0.29	100	0.71	100	0.63	100
1	0.50	91.4	0.26	91.0	0.65	92.6	0.58	90.3
2	0.46	84.6	0.24	81.9	0.62	88.3	0.56	86.4
3	0.42	78.8	0.22	75.4	0.58	83.4	0.55	83.9
24	0.33	61.7	0.17	57.2	0.46	65.7	0.45	66.9

DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMSO, Dimethylsulfoxide.

Chl a, chlorophyll a (Sigma chemical); Chl b, chlorophyll b (Sigma chemical)

Table 4. Time-lapsed changes in the concentration of chlorophyll extracted by *N,N*-dimethylformamide and Dimethylsulfoxide in the dark condition

Hours after extraction	DMF				DMSO			
	Chl a ^y (663.8 nm)		Chl b (647.2 nm)		Chl a (665.8 nm)		Chl b (649.0 nm)	
	A.	Rate (%)	A.	Rate (%)	A.	Rate (%)	A.	Rate (%)
0	0.44	100	0.39	100	0.48	100	0.36	100
24	0.42	95.9	0.37	96.6	0.46	95.8	0.34	94.4

DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMSO, Dimethylsulfoxide.

Chl a, chlorophyll a (sigma chemical); Chl b, chlorophyll b (sigma chemical)

나는 것으로 조사되었다.

DMF와 DMSO 용매에 적당량의 Chl a와 Chl b를 녹인 후 최고 정점에서 흡광도를 측정하여 계산된 흡광계수는 Table 1과 같다. DMF 용매를 사용할 경우 663.8 nm에서 Chl a의 흡광계수는 87.2 L/g·cm로 Inskeep과 Bloom (1985)이 664.5 nm에서 측정된 82.8과 80% acetone (Mackinney, 1941)을 이용시 663 nm에서 측정된 82.0와 다소 차이가 있는 것으로 조사되었다. Chl b의 경우도 비슷한 값을 나타내었다. DMSO 용매인 경우 649.0와 665.8 nm에서 흡광계수를 구할 수 있었다. 구해진 흡광계수를 이용하여 식(1)에 대입하여 Chl a, Chl b 및 Total Chl 함량을 구할 수 있었다(Table 2). DMF 용매로 추출할 경우의 Total Chl = 19.19A_{647.2} + 7.04A_{663.8}로 Inskeep과 Bloom(1985)이 보고한 Total Chl = 17.9A₆₄₇ + 8.08A_{664.5}의 식과 유사하였다.

반면 DMSO 용매 추출시 649.0nm와 665.8 nm에서 최대 흡광도를 보였다. Eq. 1에 의해 Chl a와 Chl b의 흡광계수(e)를 구하였으며(Table 1), Eq. 4에 적용하여 Total Chl = 21.58A₆₄₉ + 7.43A_{665.8}의 식을 구할 수 있었다. 80% acetone으로 추출시 이용하였던 Total Chl = 20.0A₆₄₅ + 8.02A₆₆₃(Arnon, 1949; Mackinney, 1941)와는 측정과정 및 엽록소 함량을 측정하는데 있어서 차이가 있는 것으로 나타났다.

엽록소는 빛에 쉽게 파괴되는 특성이 있어 DMF, DMSO 용매별 실온에서 명조건과 암조건을 달리하여 안정성을 조사하였다(Table 3, 4). 명조건에서의 흡광도는 한 시간 경과가

지 두 용매 모두에서 추출 직후 보다 약 10% 가량 낮아졌으며 시간이 경과될수록 감소폭은 증가하였다(Table 3). 반면 실온의 암조건에서는 두 용매 모두 24 시간이 경과해도 흡광도의 변화가 약 5% 미만으로 매우 안정적이었다. 따라서 정확한 chlorophyll 을 측정하기 위해 우선적으로 빛을 차단시킬 필요가 있었다(Table 4).

큐티클 층이 잘 발달된 감귤 잎의 용매별 추출 온도를 달리하여 시간대별 흡광도를 조사한 결과(Fig. 2) 두 용매 모두 80°C에서 추출량이 많았으며 DMF 용에서는 6시간, DMSO에서는 24시간 후 추출이 잘 되는 것으로 나타났다. 이는 채소, 낙엽과수(Park *et al.*,1996)의 한두 시간, 술잎 4시간 (Hiscox and Israelstam, 1979)에 비해 추출시간이 많이 소요되었다. 또한 흡광도가 약 0.2~0.6로 사용하는 시료량은 온도가 낮은 조건에서는 시간이 경과하더라도 추출 효율이 떨어졌다. 그리고 DMF 용매인 경우 80°C에서 DMSO 용매에 비해 추출 시간이 짧았으나 일정 시간이 경과되면 chlorophyll 함량이 급격히 감소되었다. 반면 DMSO에서는 지속적으로 안정함을 보였다. 또한 DMF 용매에서 6시간, DMSO 용매에서 24시간 경과한 시점에서의 Table 2의 식에 의해 total Chl 함량을 비교한 결과 2% 이내의 차이를 보여 추출량은 두 용매 모두에서 비슷하였다.

결론

본 연구는 DMF와 DMSO를 이용하여 chlorophyll을 추출 시 흡광계수와 환산식을 구하였고, 이들 용매를 이용하여

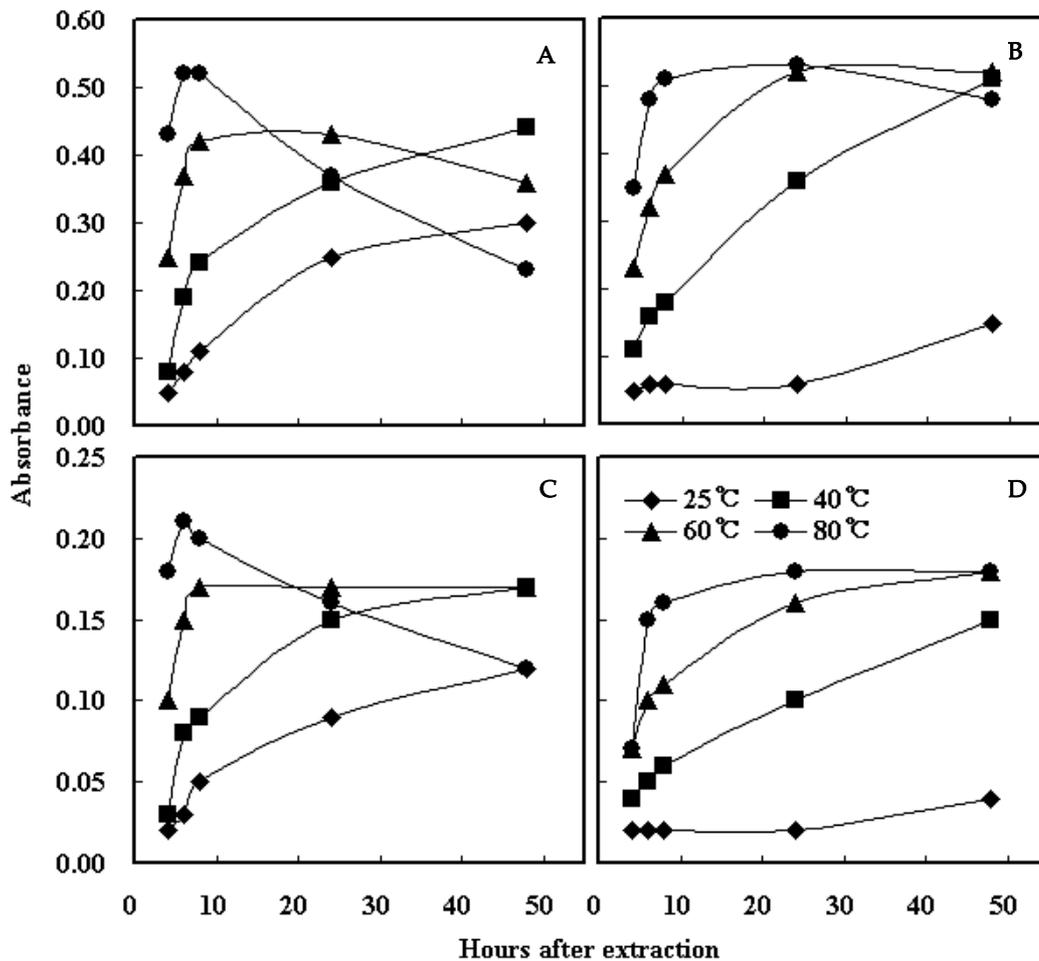


Fig. 2. Effects of heat treatments and solvents on the contents of chlorophyll in citrus leaves. A; 663.8 nm readings of chlorophyll a extracted by *N,N*-dimethylformamide, B; 649.0 nm readings of chlorophyll a extracted by Dimethylsulfoxide, C; 647.2 nm readings chlorophyll b extracted by *N,N*-dimethylformamide, D; 665.8 nm readings of chlorophyll b extracted by Dimethylsulfoxide.

감귤 잎의 chlorophyll을 추출할 경우의 적정 온도 조건과 추출시간을 구명하였다. DMF 용매를 이용할 경우 chlorophyll a와 b의 최고 흡광 파장은 663.8과 647.2 nm, DMSO는 665.8과 649.0 nm로 나타났다. 이 파장을 기준으로 흡광 상수를 구하고 DMF와 DMSO 용매를 사용할 경우 chlorophyll 함량식은 각각 $\text{Total Chl} = 19.193A_{647.2} + 7.04A_{663.8}$, $\text{Total Chl} = 21.58A_{649} + 7.43A_{665.8}$ 이었다. DMF와 DMSO에 녹인 Chl a, b의 변화는 암조건에서 매우 안정적인 것으로 조사되었다. 감귤 잎의 chlorophyll을 신속히 추출하기 위해서 80°C 조건하에서 DMF 용매로는 6시간, DMSO는 24시간 후 측정하는 것이 최대의 흡광도를 나타내었다.

References

- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxides in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elivira, S., Davison, A.W., 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants, *Environ. Exp. Bot.* 32, 85-100.
- Hiscox, J.D., Israelstam, G.F., 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration, *Can. J. Bot.* 57, 1332-1334.
- Inskip, W.P., Bloom, P.R., 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in *N,N*-dimethylformamide and 80% acetone, *Plant physiol.* 77, 483-485.
- Knudson, L.L., Tibbitts, T.W., Edwards, G.E., 1977. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration, *Plant Physiol.* 60, 606-608.
- Mackinney, G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions, *J. Biol. Chem.* 140, 315-322.
- Moran, R., Porath, D., 1980. Chlorophyll determination in intact tissues using *N,N*-dimethylformamide, *Plant Physiol.* 65, 478-479.

- Park, J.M., Ro, H.M., Kim, Y.M., Seong, K.C., 1996. Chlorophyll determination in horticultural crops using dimethyl sulphoxide, *RDA. J. Agri. Sci.* 38, 552-557.
- Seo, K.Y., Yi, M.J., Son, Y.H., Koo, J.W., Noh, N.J., Yi, M.J., 2005. Extraction and Determination of Chlorophyll Contents of Korean Pine Needles Using Acetone and DMSO(Dimethylsulfoxide), *J. Korean For. Soc.* 94, 264-268.
- Shoaf, T.W.T., Lium, B.W., 1976. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using demethylsulfoxide, *Limnol. Oceanogr.* 21, 926-928.