

## 형광광도법에 의한 수용액중 수용성 폴리파라시클로판류의 결합부위의 극성 측정

전 인 구

동덕여자대학교 약학대학  
(1991년 7월 10일 접수)

### Quantitative Estimation of Binding Site Polarities of Water-Soluble Polyparacyclophanes in Aqueous Solution by Spectrofluorometry

In Koo Chun

College of Pharmacy, Dongduck Women's University, Seoul 136-714, Korea  
(Received July 10, 1991)

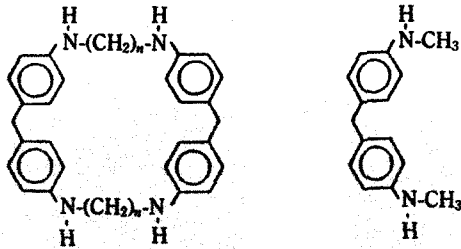
The fluorescence characteristics of 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate (ANS) and 2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate (TNS) made the dyes useful probes for the determination of the polarity at the binding sites of several water-soluble polyparacyclophanes. Polyparacyclophanes used were 1,6,20,25-tetraaza[6.1.6.1]paracyclophane (CPM 44), 1,7,21,27-tetraaza[7.1.7.1]paracyclophane (CPM 55), 1,7,21,27-tetraaza-14,34-dioxa[7.1.7.1]paracyclophane (CPE 55) and 1,8,22,29-tetraaza-15,36-dioxa[8.1.8.1]paracyclophane (CPE 66). The fluorescence quantum yield, emission maximum, and half bandwidth of ANS or TNS obtained in a variety of solvent systems were plotted as a function of four kinds of empirical solvent polarity scales such as dielectric constant ( $D$ ),  $(D-1)/(2D+1)$ ,  $Y$  and  $Z$  values. It was found that the  $Z$ -value-emission maximum ( $\bar{\nu}_f$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) profile showed the most reliable linearity. ANS and TNS interacted with CPM 44, CPM 55, CPE 55, CPE 66,  $\alpha$ -cyclodextrin (CyD) and  $\beta$ -CyD in the aqueous solution, and from the emission maxima the polarities ( $Z$ -value) of their binding sites were calculated to be 92.65, 87.50, 93.35, 84.52, 94.36 and 90.48 for ANS, respectively, and 91.07, 89.68, 85.44, 86.74 and 87.6 for TNS except for  $\alpha$ -CyD, respectively.

**Keywords**— water-soluble paracyclophane, polarity of binding site, 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate, 2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate, cyclodextrin, fluorescence, hydrophobic fluorescent probe.

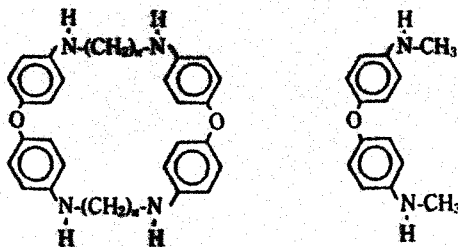
수용성 파라시클로판(CP)류가 수용액 중에서 소수성 기질을 포접한다는 사실이 몇몇 예에서 확인되었다.<sup>1-3)</sup> 저자 등은 약제학적 응용을 위한 새로운 host 화합물을 개발하고자 diphenyl ether을 골격으로 하는 수용성 파라시클로판류를 설계 합성하고<sup>4)</sup> diphenylmethane 골격의 파라시클로판류와 함께 수용액 중에서 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate(ANS) 및 2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate(TNS) 등

의 형광소수기질과의 상호작용을 형광법으로 검토하였다.<sup>5)</sup>

그 결과 내공의 크기가 큰 환화물은 ANS 또는 TNS와의 공존시 이들의 형광강도를 현저히 증대시켰으며 blue shift를 수반하였다. 또한 환화물 및 기질의 상호농도 증가로 형광강도가 농도 의존적으로 증대되었다. 이러한 변화는 종래의  $\alpha$ - 및  $\beta$ -시클로덱스트린(CyD) 보다도 현저히 컸다. 한편 내



**Chart 1**—Water-soluble polyparacyclophanes containing diphenylmethane skeletons, and their acyclic body.  
Key: n=3 (CPM 33), n=4 (CPM 44), n=5 (CPM 55) and acyclic body (ACM 11)



**Chart 2**—Water-soluble polyparacyclophanes containing diphenyl ether skeletons, and their acyclic body.  
Key: n=3 (CPE 33), n=4 (CPE 44), n=5 (CPE 55), n=6 (CPE 66) and acyclic body (CPE 11)

공의 크기가 큰 환화물과 형광소수기질과의 복합체 형성에 따른 해리정수를 산출하고 이에 미치는 온도, pH 및 이온강도의 영향을 검토하여 포집특성을 고찰하였다.<sup>6)</sup>

본 연구에서는 ANS 및 TNS가 이들 파라시클로판류들과 결합하는 소수결합부위의 소수적 환경을 정량적으로 비교 검토하고자 극성을 측정하였다.

**실험 방법**

**재료 및 시약**

수용성 파라시클로판류(Chart 1 및 2)로 1,5,19,23-tetraaza[5.1.5.1]paracyclophane(CPM 33), 1,6,20,25-tetraaza[6.1.6.1]paracyclophane(CPM 44), 1,7,21,27-tetraaza[7.1.7.1]paracyclophane(CPM 55)은 Soga 등<sup>7)</sup>의 방법에 따라 합성하여 질량분석기로 구조가 확인된 것을 썼으며, 1,5,19,23-tetraaza-12,30-dioxa[5.1.5.1]paracyclophane(CPE 33), 1,6,20,25-

tetraaza-13,32-dioxa[6.1.6.1]paracyclophane(CPE 44), 1,7,21,27-tetraaza-14,34-dioxa[7.1.7.1]paracyclophane(CPE 55) 및 1,8,22,29-tetraaza[8.1.8.1]paracyclophane(CPE 66)은 前報<sup>4)</sup>에서와 같은 방법으로 만든 것을 사용하였다. 비환상 유사체로 4,4'-dimethylaminodiphenylmethane(ACM 11) 및 4,4'-dimethylaminodiphenyl ether(ACE 11)은 前報<sup>5)</sup>에 준하여 만든 것을 썼다. α- 및 β-CyD는 Aldrich Chem. Co.의 특급품을 썼다. 소수형광기질로 ANS는 Tokyo Kasei Co.의 특급품을 TNS는 Aldrich Chem. Co.의 특급품을 각각 실온에서 48시간 진공건조(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)하여 냉소에 보존하면서 썼다. 황산퀴닌은 Wako Pure Chem Co.의 특급품을 썼고 시험에 쓴 물은 증류수를 Milli-Q™ water purification system을 통과시킨 것을 사용하였다. 기타 시약 및 용매류는 시판 특급품을 그대로 사용하였다.

**기기**

Hitachi 204-S 형광분광광도기를 써서 형광을 측정하고 QD-15 Hitachi 기록계로 형광스펙트럼을 기록하였다. 흡광도측정은 Varian Techtron UV-VIS 분광광도기(모델 635)를 썼으며 pH는 Fisher Accumet® 620 pH meter를 사용하여 측정하였다.

**형광스펙트라의 측정조건**

형광스펙트라의 기록은 response는 medium, slit는 여기 및 형광 모두 10 nm, P.M. gain은 3, sense range는 3 또는 1, 기록계 pen은 5 mV 또는 10 mV, scan speed는 120 nm/min, chart speed 40 nm/min의 조건에서 시행하였다.

ANS 및 TNS 형광특성의 용매극성의존성 시험 용매의 극성을 순차적으로 변화시키기 위하여 에탄올, 메탄올, 디옥산을 선택하고 각각의 용매를 물과 적절히 혼합하여 용매의 농도(v/v%)를 순차적으로 변화시켜 15종의 용매계를 제조하였다. 이들 용매계와 이소프로판올, 에틸렌글리콜, 디메틸포름아미드 및 아세톤 등의 단일용매를 써서 각각의 용매에 ANS 또는 TNS를 2×10<sup>-6</sup> M이 되도록 녹여 25℃를 유지하면서 여기파장 375 nm에서 형광스펙트라를 기록하였다. 30% 이상의 물을 함유하는 혼합용매에 대해서는 매 측정 전에 탈기하였다. 또 각 시료용액의 흡광도는 375 nm에서 측정하였다. 표준형광스펙트럼은 황산퀴닌의 0.5 N 황산용액을 사용

하여 동일조건에서 측정하였다. 얻은 스펙트라로부터 각각의 형광극대파장, 면적 및 피크 높이 등을 측정하여 다음의 (1) 및 (2)식에 따라 apparent quantum yield 및 effective half bandwidth를 각각 산출하였다.

$$\phi_s = \phi_q \cdot \frac{(\text{peak area})_s}{(\text{peak area})_q} \cdot \frac{(1-10^{-A_q})}{(1-10^{-A_s})} \quad (1)^{8,9)}$$

단,  $\phi_s$ : 시료의 apparent quantum yield,  $\phi_q$ : 표준형광물질 [황산퀴닌( $1 \times 10^{-5}$  M)의 0.5 N 황산용액]의 quantum yield(0.55),<sup>10)</sup>  $s$ : 시료,  $q$ : 표준황산퀴닌,  $A$ : 375 nm에서의 흡광도이다.

$$\Delta\bar{\nu}_F(\text{cm}^{-1}) = \frac{\text{peak area}(\text{cm}^2)}{\text{peak height}(\text{cm})} \cdot \frac{K(\text{nm/cm})}{\lambda_F^2(\text{nm})^2} \cdot 10^7(\text{nm/cm}) \quad (2)^{11)}$$

단,  $\Delta\bar{\nu}_F$ : effective half bandwidth,  $K$ : 파장축의 때 cm당 nm수,  $\lambda_F$ : 극대형광파장(nm)이다.

각기의 극성이 다른 용매계로부터 얻은 ANS 및 TNS의 형광특성(극대형광파장,  $\phi$  및  $\Delta\bar{\nu}_F$ )의 변화를 사용한 용매의 극성지수인 투전함수(D),<sup>12)</sup>  $(D-1)/(2D+1)$ ,<sup>13)</sup>  $Y^{14)}$  및  $Z^{15)}$  value에 대해 각각 플로트하여 형광특성의 극성의존성을 비교 검토하였다.

#### 결합부위의 극성 측정

형광소수기질 및 CP를 pH 1.95 KCl-HCl 완충액 ( $\mu=0.061$ )에 일정농도가 되도록 각각 녹여 섞고 위의 조건에서 기록한 형광스펙트라로부터  $\bar{\nu}_F$ ,  $\phi$  및  $\Delta\bar{\nu}_F$ 를 (1) 및 (2)식에 따라 산출하였다. 각 기질의 형광특성( $\bar{\nu}_F$ )과 용매의 극성(Z-value)과의 직선관계로부터 기질이 CP 내에 결합한 부위의 극성을 측정하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### ANS 및 TNS 형광의 용매극성 의존성

ANS 및 TNS는 생화학 및 약학영역에서 hydrophobic probe로 널리 사용되는 형광제로 이것을 수용액 중에서 우혈청 albumin 등의 단백질과 결합시키면 형광강도가 현저히 증대함과 동시에 극대

파장이 단파장측으로 shift한다.<sup>8,16-18)</sup> 이와 동일한 효과가 물보다도 극성이 낮은 용매에 녹인 경우에도 관찰되었기 때문에 이를 hydrophobic probe라고 부르게 되었다.<sup>8)</sup>

이와 같이 blue shift를 동반한 형광강도의 증대의 원인으로서는 주위환경의 극성의 저하,<sup>18)</sup> 주위의 환경 또는 probe 자신의 mobility의 저하,<sup>18)</sup> probe의 conformation의 변화 등<sup>19,20)</sup>도 고려되고 있다. 따라서 형광의 변화가 있다고 해서 단순히 소수적 환경으로의 이행으로만 관련시키는 것은 위험하다.

그러나 본 CP류는 그 비환상체 및 내공이 작은 CPM 33, CPE 33 및 CPE 44 등이 여러 측정조건(농도, pH 및 이온강도의 변화)에서도 형광의 성질에 유의성 있는 변화가 없었다는 점과 환의 소수내공이 큰 CPM 44, CPM 55, CPE 55 및 CPE 66 등만이 강력한 형광증대와 함께 blue shift를 동반한 점으로부터 볼 때 ANS 및 TNS는 소수성이 강한 환경으로 이행하였음을 시사하고 있다.<sup>5)</sup>

ANS 및 TNS는 소수성 부분과 친수성 부분( $-\text{SO}_3^-$ )의 양측을 겸비한 양친매성화합물인 점을 고려하면 이러한 소수성이 강한 환경이란 물에 가까이 위치하는 소수환경을 의미한다.

환화물과 기질이 결합되는 부위의 소수적 환경을 정량적으로 측정 비교하고자 Turner 등<sup>11)</sup>이 단백질 결합부위의 극성을 측정한 방법을 택하여 실험하였다. 이들은 ANS에 대하여 얻은 형광극대파장의 Z-value 의존성을 여기파장을 350 nm로 하여 얻었으므로 Table IV와 같이 일련의 동일실험조건인 375 nm에서 새로운 정보를 얻었다. 극성을 달리하는 용매계에서 ANS의 형광스펙트라를 측정하고 이로부터 극대형광파장, quantum yield, half bandwidth를 산출한 결과가 Table I이다. Solvent polarity가 감소할수록 ANS의 UV 흡수극대파장이 순차적으로 장파장측으로 bathochromic shift를 하였으며, 375 nm(여기파장)에서의 분자흡광계수도 순차적으로 증대하였다. 형광특성으로 형광극대파장은 blue shift 하였으며 quantum yield( $\phi$ )는 순차적으로 증대하였고, half bandwidth( $\Delta\bar{\nu}_F$ )는 감소하는 경향을 나타내었다.

이러한 형광특성의 증감의 변화(Table I)를 4종 empirical solvent polarity scale, 즉 dielectric constant(D),<sup>12)</sup>  $(D-1)/(2D+1)$ ,<sup>13)</sup>  $Y^{14)}$  및  $Z^{15)}$ 에 대해

Table I—Absorption and Fluorescence Measurements of ANS in Various Solvents and the Corresponding Values for Four Solvent Polarity Scales.

Solvent (%)	Absorption max., nm	Molar absorptivity $\epsilon$ ( $\times 10^5$ ) at 375 nm	Apparent quantum yield, $\phi$	Emission bandwidth $\Delta\bar{\nu}_F$ ( $\times 10^3$ $\text{cm}^{-1}$ )	Emission max., $\bar{\nu}_F$ ( $\times 10^4$ $\text{cm}^{-1}$ )	Emission max., $\lambda_F$ (nm)	Dielectric constant, $D^{12}$	$\frac{D-1}{2D+1}$	$Y^{14}$	$Z^{15}$
H <sub>2</sub> O	347	5.25	0.00078	4.401	1.961	510	80	0.491	3.493	94.6
Ethanol (20)	349	6.00	0.0033	4.000	1.972	507	69	0.489	3.051	92.6
Ethanol (40)	366	6.60	0.0107	3.899	2.008	498	58	0.487	2.196	90.5
Ethanol (60)	368	7.35	0.029	3.846	2.028	493	47	0.485	1.124	87.9
Ethanol (80)	370	7.70	0.0694	3.820	2.075	482	35	0.479	0.000	84.8
Ethanol (90)	372	7.80	0.1187	3.708	2.096	477	29	0.475	-0.747	82.5
Ethanol (100)	373	8.50	0.1944	3.614	2.125	470.5	24	0.471	-2.033	79.6
Methanol (50)	360	6.60	0.0109	3.955	2.000	500	58	0.487	1.972	90.9
Methanol (60)	367	7.45	0.042	3.859	2.049	488	42	0.482	0.381	87.3
Methanol (100)	372	8.00	0.103	3.780	2.096	477	33	0.477	-1.090	83.6
Dioxane (20)	350	6.50	0.0064	4.219	1.988	503	64	0.488	2.877	91.4
Dioxane (40)	364	6.85	0.0135	4.152	2.024	494	42	0.482	1.945	88.4
Dioxane (60)	369	7.50	0.0329	3.844	2.062	485	25	0.471	0.715	85.0
Dioxane (70)	370	7.70	0.0853	3.831	2.079	481	16	0.465	0.013	82.8
Dioxane (80)	371	7.85	0.0911	3.819	2.105	475	10	0.428	-0.833	80.2
Dioxane (100)	373	8.30	0.1045	3.813	2.137	468	2	0.200		
Isopropanol	375	8.60	0.2921	3.652	2.151	565	18	0.459	-2.73	76.3
Ethylene glycol	371	7.50	0.0771	3.696	2.062	485	38	0.481		85.1
Dimethylformamide	372	9.60	0.2861	3.556	2.146	466	37	0.480		68.5
Acetone	372	9.65	0.2304	3.683	2.165	462	21	0.465		65.7

여 각각 플로트하여 그 상관성을 검토한 바 Turner 등이 1,5-ANS, 1,7-ANS 및 1,8-ANS에 대해서 확인 하였던 바와 같이 Z-value를 polarity scale로 택하였을 때 가장 양호한 상관성이 얻어졌다. Solvent system의 Z-value에 대하여 quantum yield( $\phi$ ), emission half band width( $\Delta\bar{\nu}_F$ ) 및 transition energy( $\bar{\nu}_F$ )를 각각 플로트한 결과 Fig. 1에서와 같이  $\bar{\nu}_F$  ( $\text{cm}^{-1}$ )를 Z-value에 대하여 plot 하였을 때 메탄올, 에탄올, 디옥산 용매계로부터  $y = -110.7x + 30,056$  ( $r = -0.9884$ )의 양호한 직선관계를 얻었다.

또한 TNS의 경우는 McClure 등이 수종 단일 용매와 디옥산-물 의 혼합용매에서 형광특성을 측정 한 보고가 있으나 극성을 순차적으로 달리하는 polarity scale에 대하여 그의 데이터를 활용하기에는 많은 제한이 있고 또한 여기파장 366 nm에서 측정된 자료이므로 TNS에 대해서도 Table I에서와 같은 20종의 용매계를 써서 375 nm에서 여기하여 형광을

기록하였다. 이의 결과는 Table II와 같다. TNS의 형광극대파장( $\bar{\nu}_F$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )이 고파수로 이동함에 따라 apparent quantum yield( $\phi$ )는 sigmoid type으로 증대하였고, emission bandwidth( $\Delta\bar{\nu}_F$ )는 순차적으로 넓게 분포되어 감소되었다. 그러나 ANS의 경우 보다는 훨씬 일정한 방향성을 보여 주었다. Table II의 결과를 4종의 empirical solvent polarity scale에 대해서 plot 한 바 Z-value scale이 가장 양호하였으며, Z-value에 대하여  $\phi$ ,  $\Delta\bar{\nu}_F$  및  $\bar{\nu}_F$ 값을 각각 플로트한 결과 용매의 극성이 증대함에 따라  $\phi$ 이 sigmoid type로 증대하였으며  $\Delta\bar{\nu}_F$ 는 넓게 분포되어 감소하였으나 Fig. 2에서와 같이 Z-value에 대한  $\bar{\nu}_F$ 는 이소프로판올, 에틸렌글리콜, DMF 및 아세톤 등을 제외한 혼합용매계에서 양호한 직선식  $y = -221.72x + 421,023$  ( $r = -0.978$ )을 얻었다. 이러한 관계식은 ANS와 같이 단백질과 같은 결합부위의 극성측정에 유용하다고 생각된다. 각 동일용

**Table II**—Absorption and Fluorescence Measurements of TNS in Various Solvents and the Corresponding Values for Four Solvent Polarity Scales.

Solvent (%)	Molar absorption $\epsilon$ ( $\times 10^3$ )	Apparent quantum yield, $\phi$	Emission bandwidth $\Delta\bar{\nu}_F$ ( $\times 10^3$ cm $^{-1}$ )	Emission max., $\bar{\nu}_F$ ( $\times 10^4$ cm $^{-1}$ )	Emission max., $\lambda_F$ (nm)	Dielectric constant, $D^{(2)}$	$\frac{D-1}{2D+1}^{(13)}$	$Y^{(4)}$	$Z^{(5)}$
H <sub>2</sub> O	3.05	0.00077	5.932	2.000	500	80	0.491	3.493	94.6
Ethanol (20)	3.35	0.0039	5.343	2.070	483	69	0.489	3.051	92.6
Ethanol (40)	3.850	0.0179	5.130	2.110	474	58	0.487	2.196	90.5
Ethanol (60)	3.900	0.0656	4.998	2.155	464	47	0.485	1.124	87.9
Ethanol (80)	3.900	0.1806	4.635	2.237	447	35	0.479	0.000	84.8
Ethanol (90)	3.900	0.3284	4.369	2.280	439	29	0.475	-0.747	82.5
Ethanol (100)	4.050	0.4147	4.050	2.353	425	24	0.471	-2.033	79.6
Methanol (50)	3.900	0.0144	5.364	2.079	481	58	0.487	1.972	90.9
Methanol (80)	4.050	0.0887	4.771	2.193	456	42	0.482	0.381	87.3
Methanol (100)	4.100	0.2545	4.027	2.262	442	33	0.477	-1.090	83.6
Dioxane (20)	3.850	0.0122	5.210	2.024	494	64	0.488	2.877	91.4
Dioxane (40)	4.050	0.0408	4.602	2.146	466	42	0.482	1.945	88.4
Dioxane (60)	3.950	0.1417	4.442	2.237	447	25	0.471	0.715	85.0
Dioxane (70)	3.750	0.2386	4.439	2.262	442	16	0.465	0.013	82.8
Dioxane (80)	3.500	0.3210	4.150	2.278	439	10	0.428	-0.833	80.2
Dioxane (100)	2.800	0.4428	3.617	2.398	417	2	0.200		
Isopropanol	3.350	0.4169	3.529	2.364	423	18	0.459	-2.73	76.3
Ethylene glycol	3.000	0.2323	4.426	2.174	460	38	0.481		85.1
Dimethylformamide	3.500	0.5151	3.847	2.353	425	37	0.480		68.5
Acetone	2.650	0.0850	4.008	2.381	420	21	0.465		65.7

매계에서 ANS 및 TNS의  $\bar{\nu}_F$ 와 Z-value로부터 least square method에 의하여 직선식을 구한 결과는 Table III과 같다.

TNS가 디옥산-물 용매계에 존재할 때에는 저극성 영역에서 다소의 굴곡이 있었을 뿐 유기용매의 종류에 관계없이 거의 직선성이 양호하였다. 용매계에 따라 slope의 차이는 약간 있었다.

#### CP-ANS 및 CP-TNS 복합체의 형광 특성

ANS와 환화물을 pH 1.95 KCl-HCl 완충액에 일정 농도로 각각 녹여 섞고 측정된 형광스펙트라로부터  $\bar{\nu}_F$ ,  $\phi$  및  $\Delta\bar{\nu}_F$ 를 각각 산출하였으며 대조로  $\alpha$  및  $\beta$ -CyD와 ANS간의 형광특성도 비교 검토하였다. 그 결과는 Table IV와 같다. ANS의 농도는  $2 \times 10^{-5}$  M로 일정하게 유지하였으며 비환상체의 농도는 환상체 그것의 2배로 하였다. ACM 11, ACE 11, CPM 33, CPE 33 및 CPE 44의 존재시는 ANS 단독에 비하여  $\phi$ 의 증가가 거의 없었으나 CPM 44, CPM 55, CPE 55 및 CPE 66의 존재시는 ANS 자체의

$\phi$ 에 비하여 각각 10.1, 10.9, 1.55 및 4.2배 증가하였다. 한편  $\alpha$  및  $\beta$ -CD는 CP류 농도의 12.5배를 첨가시킨 경우에도 ANS 자체의  $\phi$ 에 비하여 각각 1.8 및 5.2배 밖에 증가하지 않았다. ANS의 경우  $\beta$ -CyD의 공존시 형광강도가 증대되는 것은 CyD 분자의 내공에 ANS가 포접되기 때문인 것으로 보고되었다.<sup>8,21)</sup>

또 환화물-TNS 계의 형광특성을 Table V와 같이 산출하였다. 도시는 하지 않았지만 ACM 11, ACE 11, CPM 33, CPE 33 및 CPE 44의 존재시에는 TNS 단독의  $\phi$ (Table II)에 비하여  $\phi$ 의 증가가 거의 없었으나 CPM 44, CPM 55, CPE 55 및 CPE 66의 존재시에는  $\phi$ 가 각각 18.7, 13.2, 3.5 및 28.1배 증가하였다. 한편 TNS- $\alpha$ -CyD계는  $\alpha$ -CyD 농도를 CP류 농도의 25배( $1 \times 10^{-2}$  M)를 공존시켜도 형광 극대파장을 나타내지 않았으며 TNS- $\beta$ -CyD계의  $\phi$ 는 TNS 단독의  $\phi$ 에 비하여 20.5배 증대하였다.

#### CP-ANS 및 CP-TNS계의 결합부위의 극성

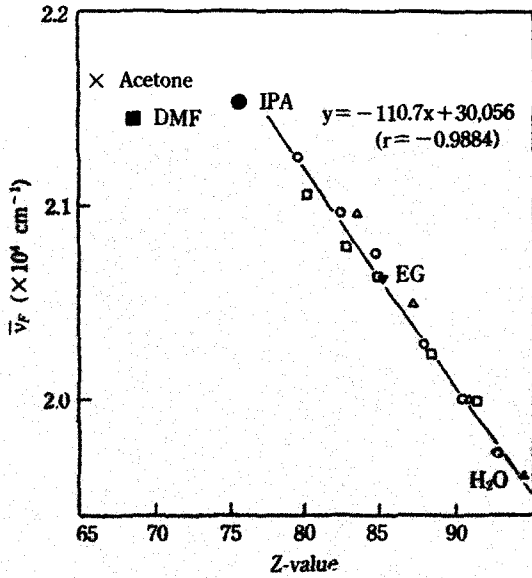


Figure 1—Plots of the transition energy of the fluorescence of ANS as a function of the empirical solvent polarity scale, Z.

The open points designate organic solvent-water mixtures, as follows: ethanol (○), methanol (△), and dioxane (□). Water is indicated by ▲. The data are taken from Table I.

Fig. 1 및 2의 ANS 및 TNS의 형광극대파장( $\bar{\nu}_f$ )의 Z-value 의존성(직선식)과 Table IV 및 Table V의 ANS-CP 및 TNS-CP complex system의 각 형광극대파장( $\bar{\nu}_f$ )으로부터 각 complex system에 대한 결합부위의 Z-value를 산출한 것이 Table VI 및 VII이다. ANS-CP complex의 Z-value는 ANS- $\alpha$ -CyD 및 ANS- $\beta$ -CyD의 그것과 동등 또는 보다 저극성 위치에 놓여 있음을 알 수 있다. TNS-CP complex의

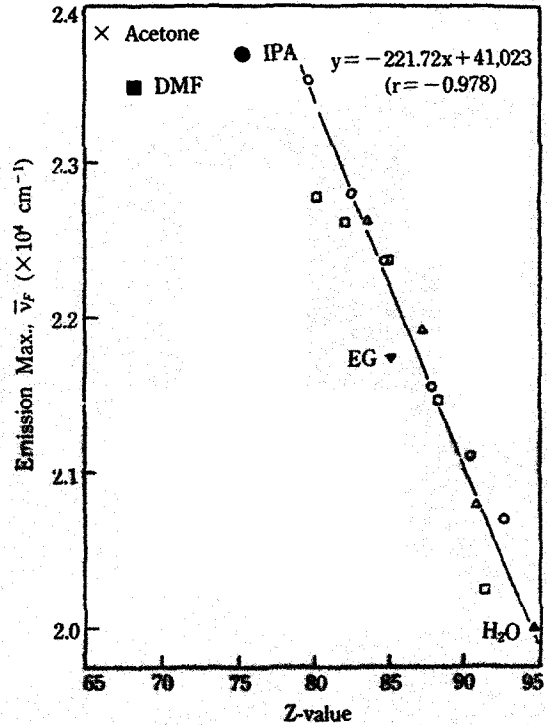


Figure 2—Plots of the transition energy of the fluorescence of TNS as a function of the empirical solvent polarity scale, Z.

The open points designate organic solvent-water mixtures, as follows: ethanol (○), methanol (△), and dioxane (□). Water is indicated by ▲. The data are taken from Table II.

Z-value도 TNS- $\beta$ -CyD제의 그것과 동등 또는 저극성 위치에 놓여 있다. 이러한 Z-value는 환원물의 내공이 상대적 크기와 포접되는 moiety의 크기와 관련하여 host 및 guest 분자의 밀접성과 주위의

Table III—Comparison of Linearity of Emission Max. ( $\text{cm}^{-1}$ ) of ANS and TNS Fluorescence with Different Solvent System by Least Square Method.

Hydrophobic probe	Solvent system	$y = ax + b$		Correlation coefficient (r)
		a (slope)	b (intercept)	
ANS <sup>a)</sup>	Ethanol-water	-113.96	30,350	-0.9963
	Methanol-water	-131.49	31,958	-0.9998
	Dioxane-water	-103.70	29,389	-0.9976
TNS <sup>b)</sup>	Ethanol-water	-227.96	41,653	-0.9978
	Methanol-water	-250.39	43,631	-0.9889
	Dioxane-water	-227.21	41,334	-0.9549

a) ANS; 1-anilinosaphthalene-8-sulfonic acid ammonium salt.

b) TNS; 2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonic acid potassium salt.

**Table IV**—Fluorescence Measurements of ANS-Cyclophane and ANS-Cyclodextrin Systems in pH 1.95 KCl-HCl Buffer ( $\mu=0.061$ ) and at 25°C.

Binary mixture	Conc. of host ( $\times 10^{-4}$ M)	Emission max. $\lambda_F$ (nm)	Emission max. $\bar{\nu}_F$ ( $\times 10^4$ cm $^{-1}$ )	Apparent quantum yield, $\phi$	Emission bandwidth, $\Delta\bar{\nu}_F$
ANS alone	—	515	1.942	0.00109	3,800
ANS-ACM 11	4	515	1.942	0.00109	3,550
ANS-CPM 33	2	515	1.942	0.00137	3,895
ANS-CPM 44	2	504	1.980	0.01101	3,768
ANS-CPM 55	2	491	2.037	0.01187	3,838
ANS-ACE 11	8	515	1.942	0.00120	4,190
ANS-CPE 33	4	515	1.942	0.00123	4,474
ANS-CPE 44	4	515	1.942	0.00142	4,131
ANS-CPE 55	4	507	1.972	0.00169	3,930
ANS-CPE 66	4	483	2.070	0.00454	3,959
ANS- $\alpha$ -CyD	50	510	1.961	0.00192	3,983
ANS- $\beta$ -CyD	50	499	2.004	0.00602	3,910

The concentration of ANS was constant at  $2 \times 10^{-5}$  M.

**Table V**—Fluorescence Measurements of TNS-Cyclophane and TNS-Cyclodextrin Systems in pH 1.95 KCl-HCl Buffer ( $\mu=0.061$ ) and at 25°C.

Complex system	Conc. of host ( $\times 10^{-4}$ M)	Emission max. $\lambda_F$ (nm)	Emission max. $\bar{\nu}_F$ ( $\times 10^4$ cm $^{-1}$ )	Apparent quantum yield, $\phi$	Emission bandwidth, $\Delta\bar{\nu}_F$
TNS $^{\beta}$ -CPM 44	2	480	2.083	0.0144	4,413
TNS-CPM 55	2	473	2.114	0.0102	4,697
TNS-CPE 55	4	453	2.208	0.0027	5,342
TNS-CPE 66	4	459	2.179	0.0216	3,788
TNS- $\alpha$ -CyD	100 <sup>b)</sup>	—	—	—	—
TNS- $\beta$ -CyD	4	463	2.160	0.0158	5,825

a) The concentration of TNS was constant at  $2 \times 10^{-5}$  M.

b) TNS- $\alpha$ -CyD did not show emission maximum even at the concentration of  $1 \times 10^{-2}$  M  $\alpha$ -CyD.

**Table VI**—Effective Z Values inside Cyclophanes and Cyclodextrins Corresponding to the Emission Max. (cm $^{-1}$ ) of ANS-Cyclophane and ANS-Cyclodextrin Complexes in pH 1.95 KCl-HCl Buffer ( $\mu=0.061$ ) and at 25°C.

Complex system	Conc. of host ( $\times 10^{-4}$ M)	Effective Z value <sup>a)</sup>
ANS $^{\beta}$ -CPM 44	2	92.65
ANS-CPM 55	2	87.50
ANS-CPE 55	4	93.35
ANS-CPE 66	4	84.52
ANS- $\alpha$ -CyD	50	94.36
ANS- $\beta$ -CyD	50	90.48

a) Effective Z values were estimated on the basis of different polarity scale corresponding to the emission max. (cm $^{-1}$ ) of ANS in Table I.

b) The concentration of ANS was constant at  $2 \times 10^{-5}$  M.

**Table VII**—Effective Z Values inside Cyclophanes and  $\beta$ -Cyclodextrin Corresponding to the Emission Max. (cm $^{-1}$ ) of TNS-Cyclophane and TNS- $\beta$ -Cyclodextrin Complexes in pH 1.95 KCl-HCl Buffer ( $\mu=0.061$ ) and at 25°C.

Complex system	Conc. of host ( $\times 10^{-4}$ M)	Effective Z value <sup>a)</sup>
TNS $^{\beta}$ -CPM 44	2	91.07
TNS-CPM 55	2	89.68
TNS-CPE 55	4	85.44
TNS-CPE 66	4	86.74
TNS- $\beta$ -CyD	4	87.60

a) Effective Z values were estimated on the basis of different polarity scale corresponding to the emission max. (cm $^{-1}$ ) of TNS in Table II.

b) The concentration of TNS was constant at  $2 \times 10^{-5}$  M.

물분자의 성질을 반영하는 것으로 생각된다. 또 이는 효소류의 작용부위의 polarity가 기질이나 cofactor의 결합이나 촉매작용에 있어서 중요하다라는 점을 고려할 때 어떤 반응 또는 상호작용에 있어서의 그 속도와 기전을 용매극성과 관련시킬 때에 요구되는 정보가 된다고 볼 수 있다. Table VI에서 보면 ANS-CP계의 Z-value는 약 93~84로 효소류<sup>11)</sup>의 단백질 합부위극성(Z-value 70~83) 보다는 다소 polar한 위치에 놓여 있으나 이는 이들 환화물이 상하로 개구되어 있는 구조를 취하기 때문인 것으로 보이며 이 자체로도 10~90% ethanol에 해당하여 극성이 낮은 영역에 든다.

한편 CyD류<sup>22,23)</sup> 및 대환상환화물<sup>24)</sup>이 효소 모델로 활용되는 점과 환화물의 결합부위의 극성이  $\beta$ -CyD와 동등 또는 저극성임을 고려할 때 본 CP류가 효소 모델로의 활용이나 약물과의 소수성 상호작용의 장을 제공할 수 있다고 생각된다.

## 결 론

1. 용매극성에 따른 ANS 및 TNS의 형광특성의 점프로 용매의 Z-value에 대한 ANS 및 TNS의 형광극대화장( $\bar{\nu}_p$ )의 변화가 양호한 직선관계를 보여 주었다.

2. CP류와 ANS간의 결합부위 극성은 Z-value가 약 94~83으로 10~90% 에탄올에 해당하는 소수적 환경을 나타내었으며 TNS와의 결합부위는  $\beta$ -CyD의 그것과 동등 또는 저극성 환경에 놓여 있었다.

3. 본 연구의 CP류는 그 내공이 소수적 환경을 부여함으로써 효소 모델로의 응용성이나 약물과의 소수성 상호작용에 의한 포접복합체 형성 가능성이 제시되었다.

## 문 헌

- 1) Y. Murakami, A. Nakano, R. Miyata and Y. Matsuda, Syntheses of macrocyclic enzyme models. Part 3, Preparation and properties of water-soluble azaparcyclophanes, *J.C.S. Perkin I*, 1669-1676 (1979).
- 2) I. Tabushi, Y. Kimura and K. Yamamura, Substrate specificity in ester hydrolysis by a

new water-soluble heterocyclophane, *J. Am. Chem. Soc.*, 103(21), 6486-6494 (1981).

- 3) K. Odashima, T. Soga and K. Koga, Substrate selective inclusion by a series of water-soluble paracyclophanes, Host-guest recognition of steric structure and charge, *Tetrahedron Lett.*, 22, 5311-5314 (1981).
- 4) I.K. Chun, M.H. Lee and S.K. Kim, Interactions between water-soluble polyparacyclophanes and drugs (I), Design and synthesis of water-soluble polyparacyclophanes containing diphenyl ether skeletons, *J. Kor. Pharm. Sci.*, 18(2), 89-97 (1988).
- 5) I.K. Chun, M.H. Lee and S.K. Kim, Interactions between water-soluble polyparacyclophanes and drugs (II), Interaction between water-soluble polyparacyclophanes and fluorescent hydrophobic naphthalene derivatives in aqueous solution, *J. Kor. Pharm. Sci.*, 18(3), 113-123 (1988).
- 6) I.K. Chun and M.H. Lee, Interactions between water-soluble polyparacyclophanes and drugs (III), Complex formation of water-soluble polyparacyclophanes with fluorescent hydrophobic naphthalene derivatives in aqueous solution, *J. Kor. Pharm. Sci.*, 19(2), 71-79 (1989).
- 7) T. Soga, K. Odashima and K. Koga, Modifications of hydrophobic cavity and their effects on the complex formation with a hydrophobic substrate, *Tetrahedron Lett.*, 21, 4351-4354 (1980).
- 8) W.O. McClure and G.M. Edelman, Fluorescent probes for conformational states of proteins. I. Mechanism of fluorescence of 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate, a hydrophobic probe, *Biochem.*, 5(6), 1908-1919 (1966).
- 9) H. Kondo, H. Nakatani and K. Hiromi, Interaction of cyclodextrins with fluorescent probes and its application to kinetic studies of amylase, *J. Biochem.*, 79(2), 393-405 (1976).
- 10) W.H. Melhuish, Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: Effect of solvent and concentration of the fluorescent solute, *J. Phys. Chem.*, 65, 229-235 (1961).
- 11) D.C. Turner and L. Brand, Quantitative estimation of protein binding site polarity. Fluoro-



- rescence of *N*-arylamino-naphthalenesulfonates, *Biochem.*, 7(10), 3381-3390 (1968).
- 12) a) Landolt-Börnstein, *Zahlenwerte und Funktionen*, 6th ed., Springer-Verlag Germany, 1959, p.613. b) G. Åkerlöf and O.A. Short, The dielectric constant of dioxane-water mixtures between 0 and 80°, *J. Am. Chem. Soc.*, 58, 1241-1243 (1936).
  - 13) J.G. Kirkwood, Theory of solutions of molecules containing widely separated charges with special application to zwitterions, *J. Chem. Phys.*, 2(7), 351-361 (1934).
  - 14) E. Grunwald and S. Winstein, The correlation of solvolysis rates, *J. Am. Chem. Soc.*, 10(2), 846-854 (1948).
  - 15) E.M. Kosower, The effect of solvent on spectra: I. A new empirical measure of solvent polarity: Z-values, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 3253-3260 (1958).
  - 16) L. Stryer, The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: A fluorescent probe of non-polar binding sites, *J. Mol. Biol.*, 13, 482-495 (1965).
  - 17) C.F. Beyer, L.C. Craig and W.A. Gibbons, Interaction of the fluorescent probe 2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate with peptides. Structural requirements for binding and fluorescent enhancement, *Biochem.*, 11(26), 4920-4926 (1972).
  - 18) L. Brand and J.R. Gohlke, Fluorescence probes for structure, *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 843-868 (1972).
  - 19) G.R. Penzer, 1-Anilinonaphthalene-8-sulfonate. The dependence of emission spectra on molecular conformation studied by fluorescence and proton-magnetic resonance, *Eur. J. Biochem.*, 25(2), 218-228 (1972).
  - 20) M. Kumbar and V.T. Maddaiah, A conformational study of *N*-phenyl-1-naphthylamine and 1-anilino-8-naphthalene sulfonate by the empirical method, *Biochim. Biophys. Acta*, 497, 707-718 (1977).
  - 21) J. Nishijo and M. Nagai, Inclusion complex of 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate with  $\beta$ -cyclodextrin, *J. Pharm. Sci.*, 80(1), 58-62 (1991).
  - 22) I. Tabushi, Y. Kuroda and K. Shimokawa, Duplex cyclodextrin, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 1614-1615 (1979).
  - 23) W. Saenger, Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19, 344-362 (1980).
  - 24) Y. Murakami, Y. Aoyama, and K. Dobashi, Macrocyclic enzyme model systems. Concurrent nucleophilic-electrostatic bifunctional catalysis by [20]paracyclophanes in deacylation of *p*-nitrophenyl carboxylates, *J.C.S. Perkin II*, 24-38 (1977).