

## 수용액에서 유기색소와 Cyclodextrins과의 상호작용 효과에 대한 연구

崔虎燮\* · 鄭甲相 · 金興斗†

군산대학교 자연과학대학 화학과

†군산전문대학 임상병리과

(1996. 10. 8 접수)

## The Spectroscopic Studies on the Interaction between Organic Dye and Cyclodextrins in Aqueous Solution

Ho-Soeb Choi\*, Kab-Sang Chung, and Heung-Tu Kim†

Department of Chemistry, KunSan National University, Kunsan 573-360, Korea

†Department of Clinical Pathology, KunSan Junior College, Kunsan 573-11, Korea

(Received October 8, 1996)

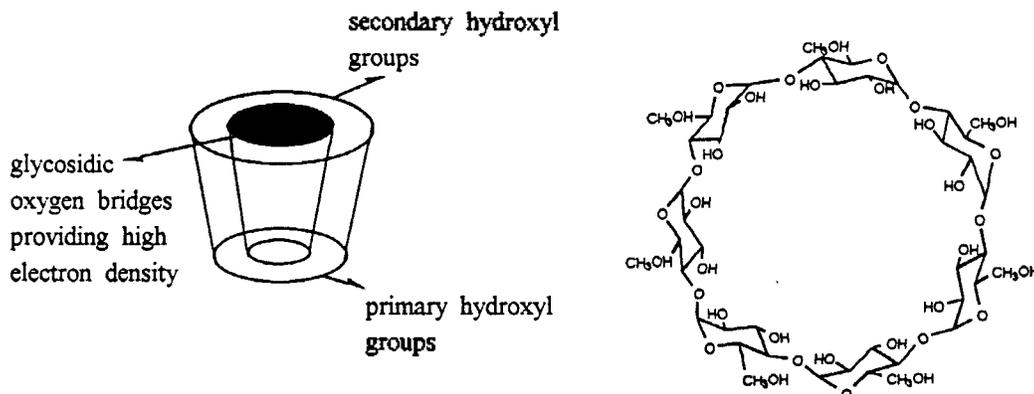
유기색소인 methylene blue는 Quinone-Imine Dyes 중 Thiazines계 염료로서 수용액에서 유기색소의 농도변화에 따라서 분자회합체를 형성하는 것으로 알려져 있으며 일반적으로 널리 이용되어지고 있다.<sup>1-7</sup> Methylene blue와 cyanine 색소들은 photographic 과정, Laser 성분, photographic 여과층, 그리고 chemotherapy(화학요법)에서 중요한 감광약제로서 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 최근에는 이들 색소들은 광화학 태양에너지 전환계에서 감광약제로서 또한 널리 연구되어 왔다.<sup>8-10</sup> 특히 methylene blue는 이합체나 혹은 회합체를 형성하며 평형상태에서 단위체와 회합체의 존재를 다음과 같이 나타낼 수 있다.<sup>11-13</sup>



수용액 내에서 색소들의 농도 변화는 회합체 형성에 큰 영향을 미치며 단량체 형태는 낮은 농도에서 우세하게 존재하고 반면에 회합체형성은 비교적 높은 농도에서 우세하다. 이와 같이 색소들의 흡수 spectra와 형광 spectra의 특성들은 색소들의 회합 상태에 기인한다. 특히 색소들의 회합력인 소수성 분산력과 정전기적 힘은 여러 가지 환경적 요소인 dye-dye 상호작용에 영향을 미치며 계면활성제 micelle들은 monomer형태로 deaggregation을 촉진시킨다고 알려졌다.<sup>14,15</sup>

Micellar microenvironment의 deaggregation 반응과는 대조적으로 고전해질 물질들은 종종 회합을 일으키는 것으로 알려져 있으며<sup>16</sup> 농도 증가에 따라 단과장쪽의 dimer band의 흡수는 감소하고 장과장쪽의 monomer band의 흡수가 증가하며 이때 isosbestic point가 발견되며 따라서 유기물의 농도 증가 효과는 2분자 회합 평형의 위치를 monomer의 농도가 증가하는 방향으로 이동시켜 주는 것으로 나타내고 있다. 유기물질의 존재가 색소분자의 수용액 내에서의 회합을 억제한다는 사실은 여러 가지 회합력의 요인을 검토함으로써 설명될 수 있는데 Mukerjee와 Ghosh<sup>17</sup>에 의하여 이미 발견된 바 있으며 물의 계면장력의 감소가 초래하는 소수성(hydrophobic) 결합의 특성이라고 설명하였다.

CD(cyclodextrin)는 1~4 glycoside 결합에 의해서 연결된 glucose 단위들로 구성된 cyclic oligosaccharide 형태의 polysugar이다. 이들 원통형 poly sugar들은 그들의 cyclic 구조내에 유기치환체의 결합에 필요한 소수성 공동을 포함하고 있다. 가장 일반적인 것은 6, 7, 8 단위의 sugar수에 관계있는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD이다. 이들 화합물들은 적당한 크기와 극성을 가진 여러 분자들과 non-covalent inclusion complex를 형성하는 것으로 알려졌다.<sup>18</sup> Inclusion complex에 기여하는 결합력은 hydrogen bonding, van der Waals 인력 그리고 소수성 작용과 같은 약한 상

Fig. 1. Structure of  $\beta$ -cyclodextrin.Table 1. Characteristics of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Number of glucose units	6	7	8
Molecular weight(g)	972	1135	1297
Cavity diameter( $\text{\AA}$ )	4.7-5.7	6.5-7.8	8.3-9.5
Height of outer periphery( $\text{\AA}$ )	$7.9 \pm 0.1$	$7.9 \pm 0.1$	$7.9 \pm 0.1$
Approx. cavity volume in 1 mol CD(mL)	104	1257	427
and in 1 g CD(mL)	0.10	0.14	0.20
Crystal forms (from water)	hexagonal plates	monoclinic parallelograms	quadratic prisms
Solubility in water (g/100 mL)	14.5	1.85	23.2

호작용 힘으로 볼 수 있다.<sup>19</sup>

Inclusion complex 평형들은 CD공동에서 물의 전환에 의한 엔탈피변화와 착물화에 따르는 CD의 변형 에너지가 지배적이며 CD의 소수성 공동으로 색소의 본질적인 분광학적 성질이 변하고 이러한 변화들은 단량체 형태의 선택적 inclusion에 의해서 다량체 색소들의 탈회합의 결과로서 발생한다고 알려져 있다.<sup>19</sup>

CD의 결합성은 자연효소의 substrate-receptor 상호작용의 모델로서 이용되고 있으며<sup>20</sup> CD cavity의 dimension들은 cyclic구조내에 연결된 sugar수에 의존하며 Fig. 1에  $\beta$ -CD의 구조를 보여주고 있다.  $\alpha$ -CD에 대한 cavity 높이는 7.8 $\text{\AA}$ 에 해당하는 반면에 직경은 5.7 $\text{\AA}$ 이며  $\beta$ -CD는 높이와 직경이 7.8 $\text{\AA}$  정도이다. Table 1에 CD의 특성을 제시하였으며<sup>21</sup> 비교적 작은 유기분자들 즉 벤젠 고리들이나 분자형태의 부

분들은 CD의 공동내로 들어갈 수 있으며 확실히 CD공동들의 dimension들은 분자회합체들의 회합의 가능성을 배제하며 수용액내에서 dye monomer들과 회합체들의 평형은 오직 monomeric 색소형태에 결합하는 CD들의 도입에 이동되어질 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 MB와 CD사이의 상호작용 즉 회합과 탈회합과정을 흡수 및 형광분광학적으로 연구하였으며 회합평형상수와 결합상수를 구하여 비교 연구하였다.

## 실 험

본 실험에서 사용한 양이온 유기색소인 methylene blue(MB)는 BDH사의 제품을 사용하였고  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -cyclodextrins는 Aldrich사 제품을 구입하여 정제없이 사용하였다. UV-visible absorption spectra 측정에는 Gilford사의 spectrophotometer를 사용하였으며 사용한 cell의 pathlength는 0.1 cm에서 1.0 cm까지의 quartz cell를 사용하였다. 형광 spectra 측정은 PII사의 model QM-1과 RC-M spectrofluorimeter를 사용하였고 1.0 cm의 matched quartz cell를 사용하였다. MB의 stock solution은  $1.0 \times 10^{-3}$  M로 조제한 후 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -cyclodextrins의 stock solution은  $1.0 \times 10^{-2}$  M로 조제한 후 순차적으로 원하는 농도로 희석하여 사용하였으며 사용한 증류수는 일차증류수를 이온교환시스템을 통과시켜 사용하였으며 형광스펙트럼 측정시 여기파장(excitation wavelength)은 흡수 스펙트럼에서 발견된 등흡광점으로 고정시킨 조건에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

Fig. 2는  $5 \times 10^{-6}$  M의 MB수용액의 고정농도에  $\beta$ -CD를 농도별로 첨가하여 얻은 흡수 spectra이다. CD의 농도증가에 따라서  $\alpha$ -band(monomer)의 흡수대가 증가하고  $\beta$ -band의 흡수대가 감소하며 628 nm에서 등흡광점이 관찰된다. 이 흡수 spectra가 의미하는 바는 CD의 농도 증가에 따라서 MB의 dimer가 monomer 형태로 변화하는 것으로 본다.

Fig. 3은 비교적 MB의 dimer가 우세하게 존재하는 MB의 농도  $5 \times 10^{-5}$  M에서의 CD의 농도 변화에 따른 흡수 spectra를 보여주고 있으며 spectra의 변화양상은 Fig. 2와 유사하다. 즉 CD의 농도에 따라서 단위체에 해당하는  $\alpha$ -band가 선명히 증가하고  $\beta$ -band의 흡수대가 감소되는 것을 발견할 수가 있다. 그리고 628 nm와 685 nm에서 등흡광점이 발견되는 것으로 보아 이 실험 조건에서 MB는 CD의 첨가에 따라서 다음과 같은 반응을 가지는 것으로 사료된다.

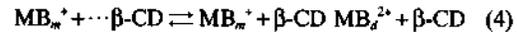


이들 반응식에서  $K(K_{\text{ass}})$  값은 Cramer<sup>22</sup>의 관계식에 의한 흡광도 값들을 도시험으로써 얻어질 수 있다.

$$\frac{[\text{MB}^0] \cdot [\text{CD}^0]}{\Delta A} = \frac{1}{K_{\text{ass}} \cdot \Delta \epsilon} + \frac{1}{\Delta \epsilon} [\text{MB}^0 + \text{CD}^0] \quad (3)$$

여기에서  $[\text{MB}^0]$ 와  $[\text{CD}^0]$ 는 본 실험에서 사용한 MB

와 CD의 각각의 농도이며  $\Delta A$ 는 CD첨가에 따른 흡광도의 차,  $\Delta \epsilon$ 는 회합과 free dye의 몰흡광계수차이다. (3)식을 컴퓨터 program을 작성하여 계산한 평형상수 값들은  $\beta$ -CD의 경우는  $K_{\text{ass}}=1.14 \times 10^{-2}$  M이며  $\alpha$ -CD와  $\gamma$ -CD의 경우는 각각  $K_{\text{ass}}=7.9 \times 10^{-2}$  M과  $K_{\text{ass}}=4.3 \times 10^{-2}$  M이 나왔으며 이러한 값들은 MB와 CD의 monomer-dimer 평형에 영향을 미칠 것으로 사료된다. MB와  $\beta$ -CD의 회합은 MB가 고농도임에도 불구하고 monomer spectra가 출현하는데 MB에  $\alpha$ ,  $\gamma$ -CD를 첨가하였을 때에도 거의 유사하게 나타났으나 흡광도의 증가가 일시적으로 나타나다가 다시 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다. 즉, 다시말하면 MB에  $\beta$ -CD의 첨가는 monomer에서 흡광도의 증가를 수반하며 연속적으로 dimer의 감소를 볼 수 있는데 이러한 결과는  $\beta$ -CD의 소수성 공동에 monomer MB의 회합에 기인한 것으로 간주할 수 있다. 결론적으로 수용액에서 free dye의 농도가 감소하고 평형상태는 다음 (4)식과 같이 monomer형태로의 전환이 일어나게 된다.



즉 MB에  $\beta$ -CD 첨가시의 회합은 고농도 임에도 불구하고 monomer가 출현하게 되었으며  $\alpha$ ,  $\beta$ -CD도 거의 유사한 결과를 보이니  $\beta$ -CD와 비교할 때 낮은 회합상수 때문에 monomer 형태로의 dimer 회합전환이 요구되어졌다.

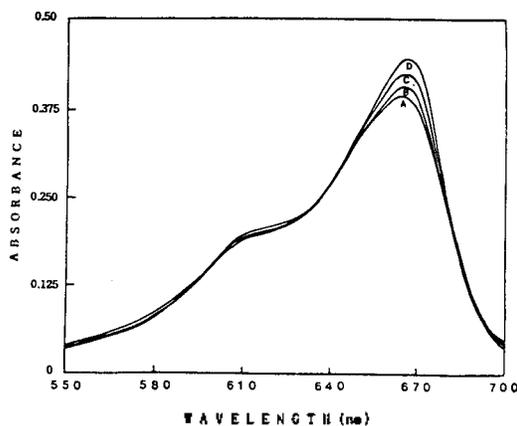


Fig. 2. Absorption spectra of methylene blue at various concentration of  $\beta$ -CD;  $[\text{MB}] = 5 \times 10^{-6}$  M; A,  $[\beta\text{-CD}] = 0$  M; B,  $[\beta\text{-CD}] = 4 \times 10^{-4}$  M; C,  $[\beta\text{-CD}] = 1.2 \times 10^{-3}$  M; D,  $[\beta\text{-CD}] = 2.5 \times 10^{-3}$  M.

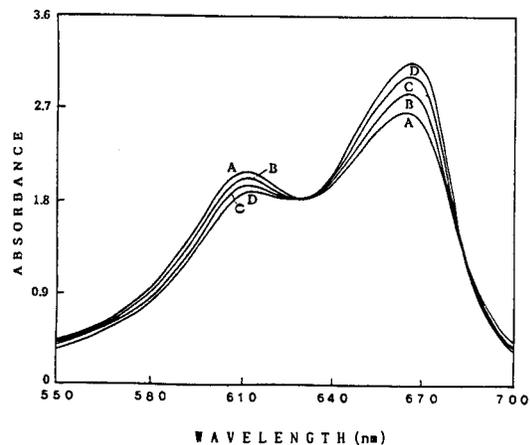


Fig. 3. Effect of  $\beta$ -CD on the aggregation of methylene blue;  $[\text{MB}] = 8 \times 10^{-5}$  M; A,  $[\beta\text{-CD}] = 0$  M; B,  $[\beta\text{-CD}] = 6 \times 10^{-4}$  M; C,  $[\beta\text{-CD}] = 1.5 \times 10^{-3}$  M; D,  $[\beta\text{-CD}] = 2.5 \times 10^{-3}$  M.

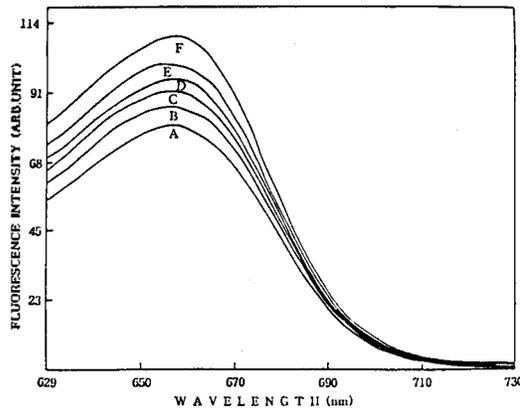


Fig. 4. Effect of  $\beta$ -CD on the fluorescence spectra of methylene blue;  $[MB]=5 \times 10^{-6} M$ ; A,  $[\beta\text{-CD}]=0 M$ ; B,  $[\beta\text{-CD}]=2 \times 10^{-4} M$ ; C,  $[\beta\text{-CD}]=4 \times 10^{-4} M$ ; D,  $[\beta\text{-CD}]=8 \times 10^{-4} M$ ; E,  $[\beta\text{-CD}]=1.2 \times 10^{-3} M$ ; F,  $[\beta\text{-CD}]=1.8 \times 10^{-3} M$ .

MB와  $\beta$ -CD의 결합상수(binding constant,  $K_f$ )를 구하기 위해서는 Fig. 3의  $\lambda=664 \text{ nm}$ 에서의 가장 낮은  $\beta$ -CD의 농도로부터 흡광도의 증가가 없는 최대의  $\beta$ -CD의 농도까지의 여러 개의 흡광도를 측정하여  $\text{Dye} + \text{CD} \rightleftharpoons \text{Dye} \cdot \text{CD}$ 로부터 유도된

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{(A_\infty - A_0)K_f} \times \frac{1}{[C]} + \frac{1}{A_\infty - A_0} \quad (5)$$

(5)식을 컴퓨터 program을 작성하여 도시함으로써 결합상수( $K_f$ ) 값을 구할 수 있다. 구한 결합상수값은  $\beta$ -CD는  $2.2 \times 10^{-4} M$ 로써  $\alpha$ -CD  $5.0 \times 10^{-5} M$ 과  $\gamma$ -CD  $1.49 \times 10^{-4} M$ 보다 높은 값을 보여주고 있다. 이로써  $\beta$ -CD의 공동내로 색소분자가 가장 알맞게 도입되는 것으로 간주할 수 있다. 색소분자의 회합체 형성은 흡수 spectra의 변화뿐만 아니라 형광소광 현상도 나타난다. 그러므로 일정한 MB의 농도에 CD를 농도별로 첨가하여 얻은 형광 spectra는 단위체형성에 기인하는 형광 증가현상이 나타날 것이다. Fig. 4는 MB에  $\beta$ -CD 첨가시의 형광 spectra를 보여주고 있는데  $\beta$ -CD의 첨가시  $\lambda=656 \text{ nm}$ 에서 형광강도세기가 증가하는 것을 볼 수 있는데 이것은 CD의 존재 하에서 MB의 단위체 형성이 촉진되는 것으로 볼 수 있다.

## 결 론

본 연구에서는 색소의 회합현상을 methylene blue

에  $\alpha$ ,  $\beta$ -CD와  $\gamma$ -CD를 첨가하였을 때의 효과를 흡수 및 형광분광학적으로 조사하였다.  $\alpha$ ,  $\gamma$ -CD의 첨가보다는  $\beta$ -CD 첨가시 monomer형의 선택적 회합이 색소의 deaggregation를 유도하고 CD는 소수성 공동을 가지는 물질임을 알았다. 같은 농도의 색소에 여러 농도의 CD를 첨가했을 때의 평형상수 값을 계산한 바  $\beta$ -CD첨가시 가장 적은 값을 얻었으며 결합상수 값은 크게 나타나는데 이것은  $\beta$ -CD의 공동내로 색소 분자가 가장 알맞게 도입되어지는 것으로 볼 수 있다. 그리고 MB에 CD첨가시 형광성에도 영향을 미치는데  $\alpha$ ,  $\beta$ -CD 첨가보다  $\beta$ -CD 첨가시 형광강도 세기의 증가현상을 보였으며 결국 이러한 결과가 MB에  $\beta$ -CD 첨가가 광전자화학에서 광화학 전환(quantum yields)의 증가에 응용되어질 것으로 기대되어진다.

## 인 용 문 헌

- Bergmann, K.; C.T.O ' Kanski, *ibid.* **1963**, *67*, 2169.
- Tinoco, Jr., I. J. *Chem. Phys.* **1961**, *34*, 1067.
- DeVoe, H. J. *Chem. Phys.* **1964**, *41*, 393.
- Haugen, G. R.; Melhuich, W. H. *Trans. Faraday Soc.* **1964**, *60*, 386.
- West, W.; Pearce, S. J. *Chem. Phys.* **1965**, *69*, 1894.
- Chambers, R. W.; Kearns, D. R.; Kajiwarra, T. J. *Chem. Phys.* **1974**, *80*, 380.
- Spencer, W.; Sutter, J. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, *83*, 1573.
- Hamer, F. M. *The Cyanine Dyes and Related Compounds*; Wiley: New York, 1964; p 250.
- Arden, W.; Fromherz, P. *J. Electrochem. Soc.* **1980**, *127*, 372.
- Schafer, F. P., ed. *Dye Lasers*; Springer-Verlag: Berlin, 1973; p 78.
- Albery, W. J.; Foulds, A. W. *J. Photochem.* **1979**, *10*, 41.
- Clark, W. D. K.; Eckert, J. A. *Sol. Energy.* **1975**, *17*, 147.
- Herz, A. H. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1977**, *8*, 237.
- Williamson, C.; Corwin, A. J. *Colloid. Interface Sci.* **1972**, *38*, 567.
- Herzfeld, S.; Corrin, A.; Harkins, W. J. *Phys. Chem.* **1950**, *54*, 217.
- Quadrifoglio, F.; Crescenzi, V. *J. Colloid. In-*

- terface Sci.* **1971**, *35*, 447.
17. Mukerjee, P.; Ghosh, A. K. *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 193.
18. Sjetli, J. *Cyclodextrins; Inclusion Complexes*; Academiai Kiado: Budapest, 1982; p 338.
19. Dan, A.; Willner, I.; Dixit, N. S.; Mackay, R. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1984**, *3*, 455.
20. Breslow, R. *Science*. **1982**, *218*, 532.
21. Szejtli, J.; Heinz, K. *Cyclodextrins in Pharmacy*; Kluwer Academic Publi: Netherlands, 1994; p 6.
22. Cramer, F.; Saenger, W.; Spatz, H. *Ch. J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 14.