

수용액상에서 Cyclodextrin과 Congo Red 간의 복합체 형성

김창석* · 김동원* · 반우경**
충북대학교 사범대학 과학교육학부
*충북대학교 자연대학 화학과
**신갈 중학교
(2002. 1. 24 접수)

The Inclusion Complex Formation of Cyclodextrin and Congo Red in Aqueous Solution

Chang Suk Kim*, Dong Won Kim*, Woo Kyoung Bahn**
School of Science Education, Chungbuk National University, Cheongju 361-763
*Department of Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 361-763
**Singal Middle School, Kyoungkido
(Received Jan. 24, 2002)

요 약 : α 및 β -Cyclodextrin(CD)과 Congo red간의 복합체 형성에 관한 연구를 분광학적 방법으로 조사하였다. 이 결과 cavity 크기가 작은 α -CD는 Congo red의 입체적 장애 때문에 복합체를 형성하지 못하였다. 한편 가시광선 영역의 S-형 흡광도 증가 현상으로 볼 때 두 분자의 β -CD가 한 분자의 Congo red와 equatorial 형태로 복합체를 형성하는 것 같다. 등 흡수점은 346 nm과 478 nm 두 곳에서 나타났다. 온도에 따른 형성상수의 값으로부터 온도가 올라가면 binding energy의 감소로 형성상수가 감소하였다. 열역학적 parameter의 계산 결과 ΔH , ΔS 및 ΔG 는 각각 -50.73 kJ/mol, -108.96 J/K · mol 및 -18.24 kJ/mol 이었다. 따라서 큰 엔트로피 감소를 동반한 자발적 반응임을 알 수 있었다.

Abstract : The formation of inclusion complexes between cyclodextrin(CD) and Congo red was studied by spectrophotometric methods at various temperatures. The cavity sizes⁷ are 0.49 nm, 0.62 nm for α - and β -CD, respectively. Therefore, α -CD was not found to form an inclusion complex with Congo red due to steric hinderance. In the β -CD use two β -CD molecules formed an inclusion complex with one molecule of Congo red, from the slope of the S-shaped curve increased. Two prominent isosbestic points appear at 346 nm and 478 nm. The formation constants were decreased with the increasing temperatures, due to low binding energy between β -CD and Congo red. The thermodynamic parameters were calculated from the plot of $\ln K_f$ vs $1/T$. The ΔH , ΔS and ΔG were -50.73 kJ/mol, -108.96 J/K · mol and -18.26 kJ/mol, respectively.

Key words : host, guest, cyclodextrin, absorbance, inclusion complex, congo red.

1. 서 론

Villiers에 의하여 cyclodextrin(CD)이 발견¹된 이래 많

은 연구자들에 의하여 이 화합물의 착물 형성에 따른 약리 작용 등 다양한 물리, 화학적 성질 및 반응성에 대한 연구^{2,3}가 이루어졌다. CD는 cycloglucosyltransferase 존재하에 전분이 α -1,4-linkage로 고리가 된 화합물을 말한다. CD는 D(+)-glucopyranose의 수에 따라 α, β, γ 의 세 종류가 있으며 각각 동공의 내경 및 물리·화학적 성

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)43-261-2736 Fax : +82+(0)43-273-0526
E-mail : che-chsuk@hanmail.net

질²이 다르다. 즉, α -CD, β -CD 및 γ -CD는 glucose 단위의 수가 각각 6, 7, 8이며 동공의 반경은 0.49 nm, 0.62 nm 및 0.80 nm로서 γ -CD의 내경이 제일 큼을 알 수 있다. 물에 대한 용해도(25°C)는 α -CD가 0.1211 mol/L, β -CD가 0.0163 mol/L, γ -CD가 0.168 mol/L로서 β -CD의 용해도가 가장 낮다.

CD의 구조를 보면 외부는 친수성이며 내부는 소수성 동공을 가지는 원통형 구조이다. 따라서 이 동공에 특별한 외래 분자(guest molecules)를 포획하여 비 공유성 복합체(non-covalent inclusion complexes)를 형성하게 된다. 복합체의 형성 능력은 외래 분자의 크기에 따라 결정되는데 보통 동공과 비슷한 크기의 분자가 용이하게 복합체를 형성한다. 따라서 복합체 형성의 반응성은 CD의 동공의 크기와 외래 분자의 구조, 극성 등에 따라 결정된다. 일반적으로 물보다 극성이 작은 분자가 CD와 복합체를 형성할 수 있으며 강한 친수성 분자나 수화성 이온은 복합체 형성이 어려운 것으로 알려졌다. 보통 외래 분자는 CD와 1:1로 결합하지만 외래 분자의 크기가 작은 경우는 2 개의 분자 한 개의 CD와 결합하며, 큰 외래 분자의 경우에는 두 개의 CD가 외래 분자의 양쪽에 결합³되기도 한다. 복합체의 결합력은 수소 결합, van der Waals 힘 및 ring strain 등^{4,5}에 의한다. 한편 Cramer 등⁴은 CD와 외래 분자간에 복합체가 형성 될 때의 mechanism을 다음의 두 과정을 통한다고 제시하였다. 즉 첫 단계는 CD 주위로 수화된 외래 분자가 접근하면 CD 고리 속에 들어 있던 물분자들 사이의 결합이 파괴되어 약간의 물분자가 밖으로 빠져 나오며 동시에, 수화되어 있는 외래 분자중의 물분자도 결합이 파괴되어 용액 속으로 이동된다는 것이다. 다음으로 CD의 내부와 외래 분자 사이에는 수소 결합이나 van der Waals 힘 및 구조 변형에 의한 ring strain 등에 의한 CD와 외래 분자 사이의 힘에 의하여 복합체가 형성 될 것이라고 하였다.

이밖에도 많은 연구자들⁶⁻¹¹이 α -CD, β -CD 및 γ -CD와 외래 분자 사이의 복합체 형성에 관한 연구를 보고하고 있다. 최근에는 sulfates-CD가 AIDS 바이러스 HIV-1의 복제를 강력히 억제한다는 보고¹²와 thioureido- β -CD를 암 치료제인 Taxotere의 molecular carrier로 이용¹³할 수 있다는 보고 때문에 더욱 CD에 관심이 고조되고 있다. 또한 CD-Dye 복합체 중에서도 약리 작용을 하는 복합체가 알려지면서¹⁴⁻¹⁶ 이에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 특히 methylene blue와 같은 dye의 복합

체 연구¹⁷⁻¹⁹는 구체적으로 mechanism이 알려져, dye의 구조가 dimer에서 monomer로의 형태 전환에 따른 분광학적인 변화가 있음을 보고하고 있다. Harata 등²⁰은 1-substituted naphthalene과 2-substituted naphthalene을 CD와 반응시키면 1-substituted naphthalene은 axial로 CD의 고리 내에 포획되며, 2-substituted naphthalene은 equatorial로 포획된다고 하였다. 일반적으로 CD와 외래 분자간의 복합체 형성은 CD 원통 내부와 수직인 axial이 유리^{21,22}한 것으로 알려져 있다. 특히 내경이 가장 큰 γ -CD는 두 분자의 naphthalene과 axial 복합체를 형성하며 acridine과도 axial을 선호하는 것²³으로 알려졌다. 또한 CD와 염료가 복합체를 형성할 때 가시광선 영역과 자외선 영역에서의 흡광도의 차이를 보임으로서 복합체 형성에서의 구조 변화를 예측하게 하는 연구^{4,28}도 알려져 있다.

따라서 비교적 단순한 염료와 CD 간의 복합체 형성에 관한 이전의 연구 결과를 근거로하여 본 연구에서는 conjugated diazo dye인 Congo red를 이용하여 CD와 복합체를 형성시켜 온도 변화에 따른 형성 상수(K_f)를 가시광선 영역에서의 분광학적 방법을 통하여 조사해 보기로 하였다. 오래 전부터 염료로 사용해 오던 Congo red는 diazo로 연결되어 있으며 대칭적으로 양끝에 naphthalene ring을 포함하고 있으며 두 개의 azo 기를 가지고 있는 화합물이다. 특히 Congo red는 alzheimer 병의 치료제로도 가능성이 있어 현재 활발히 연구³⁰되고 있는 물질이다. 한편 형성 상수 K_f 의 계산은 Benesi-Hildebrand 식²⁴을 이용하였다. 즉 반응물이 $[C] + [S] \rightarrow [CS]$ 와 같이 복합체를 형성할 때 흡광도의 변화와 농도의 관계는 $[S]_0/\Delta A = 1/\Delta \epsilon + K_d/\Delta \epsilon [C]$ 로서, $[C]$ 는 cyclodextrin의 농도이며 $[S]_0$ 는 Congo red의 초기농도, ΔA 는 λ_{max} 에서의 흡광도의 변화이며 $\Delta \epsilon$ 는 몰 흡광 계수의 차이이다. 또한 K_d 는 분해 상수로서 이 값의 역수가 K_f 이다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

Cyclodextrin(CD)과 Congo red가 복합체를 형성할 때 복합체 형성 상수를 계산하기 위하여 실험에 사용한 시약은 다음과 같다. 즉 CD는 α -CD 및 β -CD로서 모두 Aldrich 사 제품이었으며 Congo red는 Shinyo사 제품을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 용매로 사

용한 물은 1차 증류수였다. 또한 형성 상수를 계산하기 위하여 흡광도를 측정하였는데 이때 사용한 UV-Visible Spectrophotometer는 Milton Roy Spectronic 3000 Array 이었다. 온도를 일정하게 유지하기 위하여 항온수조를 이용하였는데 이것은 Jeio Tech MC-07로써 온도의 오차 범위는 ± 0.05 °C이었다.

2.2. 실험방법

CD가 외래 분자인 Congo red와 복합체를 형성하면 Congo red의 흡광도가 변한다. 이 흡광도의 변화 값으로부터 형성 상수 K_f 를 계산한다.

다음에 β -CD와 Congo red 간의 반응에 대한 흡광도 측정실험은 다음과 같이 수행하였다. β -CD 0.454 g(0.4 mmol)을 100 mL 플라스크에 넣고 증류수를 가하여 4.0×10^{-3} M 용액을 만들었다. 또한 Congo red 0.0139 g(0.02 mmol)을 1 L 플라스크에 넣고 증류수를 가하여 2.0×10^{-5} M 용액을 만들었다. 이 용액을 20 °C로 유지된 항온조에 30 분 이상 방치하여 온도가 일정하게 유지되면, 각 용액을 혼합하여 Congo red는 1.00×10^{-5} M로 일정하게 유지하고 β -CD의 농도는 각각 0 M, 2.0×10^{-3} M, 1.0×10^{-3} M, 5.0×10^{-4} M, 2.50×10^{-4} M, 1.250×10^{-4} M이 되도록 하였다. 이 각각의 혼합 용액을 UV-Visible Spectrophotometer를 이용하여 20 °C에서 흡광도를 측정하였다. 측정 범위는 200~900 nm였다. 동일한 방법으로 25 °C, 30 °C와 35 °C 에서도 측정하였다. 또 α -CD를 이용하여서도 농도를 변화시키며 25 °C에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

Congo red의 λ_{max} 은 235 nm, 343 nm 및 498 nm 세 곳에서 나타났다. 여기서 가시광선 영역인 498 nm에서 가장 큰 흡수를 보였다. 그러나 CD와 복합체를 형성한 후의 λ_{max} 를 보면 약간씩 shift 되 235→237 nm, 343→339 nm 및 498→502 nm로 변화하였는데 이것은 Methylene blue와 같은 염료에서 보이는 것²⁵과 일치하였다. 그러나 Methyl orange의 pH에 따른 λ_{max} 을 보면²⁵ CD와 복합체를 형성하기 전 후의 변화가 전혀 없는 것으로 보고되었다. Congo red 수용액의 pH는 6.3으로서 약산성이다. 그런데 일반적으로 강산성에서는 CD가 염료와 복합체가 형성되어도 λ_{max} 의 변화가 없으나 약산성에서는 약간 shift³ 되는 것으로 알려져

있다. 또한 CD와 염료가 복합체를 형성할 때 CD의 농도 변화에 따른 흡광도의 조사에서 흡광도의 변화가 나타난다. 그런데 Fig. 1에서 α -CD와 Congo red와의

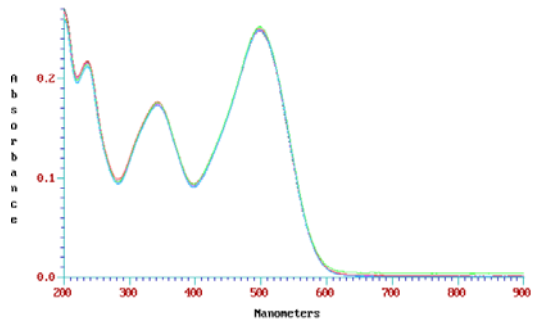


Fig. 1. Absorption spectrum of inclusion complexes for the Congo red with various concentrations of α -CD at 25 °C; [Congo red]= 1.0×10^{-5} M, [α -CD], (1) 0 (2) 1.25×10^{-4} (3) 2.50×10^{-4} (4) 5.0×10^{-4} (5) 1.0×10^{-3} (6) 2.0×10^{-3} M.

복합체 형성에 따른 자외선 및 가시광선 영역에서 흡광도의 변화는 전혀 나타나지 않는 것으로 보아 복합체가 형성되지 않음을 알 수 있었다. CD가 Congo red와 복합체를 형성한다면 가능한 방법은 두 가지가 있다. 즉, naphthalene ring이 CD의 cavity와 수평적(equatorial)으로 결합한다면가 아니면 수직적(axial)으로 결합하는 방법이다. 그런데 일반적으로 naphthalene ring을 포함하고 있는 화합물이 CD와 결합할 때, α -치환일 때는 수평적으로, β -치환일 때는 수직적으로 결합하는 것을 선호^{26,29}하는 것으로 알려졌다. 따라서 본 연구의 복합체도 axial로 결합될 것으로 생각되는데 Congo red는 5,8-치환 naphthalene ring으로서 비교적 작은 반경을 가지고 있는 α -CD와는 입체적인 장애 때문에 복합체 형성이 어려울 것으로 생각된다. 또한 만약 수평적으로 복합체를 형성한다 하더라도 7-치환 naphthalene ring을 가진 Congo red로서는 입체적 장애로 인하여 복합체 형성이 어려울 것이다. 따라서 흡광도의 변화가 없는 것으로 생각된다. 특히 CD는 CD-dye complex화 반응에서 대단히 큰 입체 선택성임이 알려진 사실^{7,27}로부터도 본 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다.

Fig. 2에는 20 °C에서, Congo red의 농도가 일정할 때 여러 농도에서 β -CD가 복합체를 형성할 때 흡광

도의 변화를 나타내었다. 그림은 S-곡선으로서 가시광선 영역인 502 nm에서 흡광도의 값이 증가하였다. 이것은 두 분자의 β-CD가 한 분자의 Congo red와 복합체를 형성함을 의미³한다. 즉 Congo red의 구조에서 naphthalene ring은 biphenyl을 중심으로 대칭적으로 연결되어 있는데 이 naphthalene ring은 β-CD와 axial로 복합체를 형성할 것이다(Scheme 1). 이것은 β-CD의 농도가 0~2.0×10⁻³ M로 변화했을 때 첫 번째 등 흡수점(isosbestic point)이 346 nm에서 나타나며 478 nm에서 두 번째 등 흡수점이 나타남으로서 확인할 수 있었다.

Fig. 3은 Fig. 2의 흡광도 변화 값을 Benesi-Hildebrand

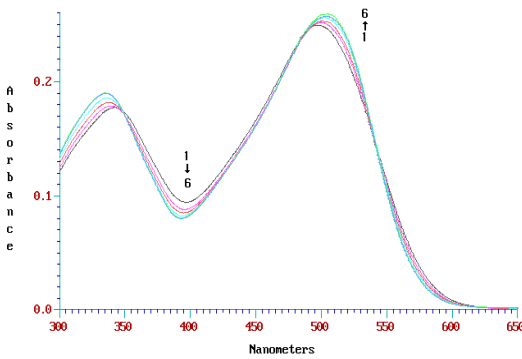


Fig. 2. Absorption Spectra of Congo Red at Various Concentrations of β-CD at 20 °C; [Congo Red]=1.00×10⁻⁵ M : [β-CD]; (1). 0 (2). 1.25×10⁻⁴ (3). 2.50×10⁻⁴ (4). 5.00×10⁻⁴ (5). 1.00×10⁻³ (6). 2.00×10⁻³ M.

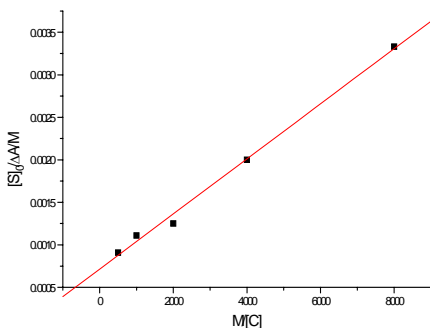


Fig. 3. The Benesi-Hildebrand plot of inclusion complex.

식, $[S]_0/\Delta A$ vs $1/[C]$ 의 관계를 plot한 것이다. 형성 상수 K_f 를 얻기 위하여서는 K_d 값을 계산하여야 하는데 이 값은 Fig. 3의 기울기에 해당한다. 그림에서 좋은 직선성 ($\gamma=0.9975$)을 보였다. K_d 를 계산하여 그 역수인 K_f 를 계산할 수 있는데 그 값을 계산하여 Table 1에 나타내었다.

Table 1. The dissociation constants(K_d) and formation constants(K_f) of inclusion complex for Congo red with β-CD at various temperatures

Temperature(°C)	K_d	K_f	$\ln K_f$
20	4.498×10^{-4}	2.223×10^3	7.707
25	6.193×10^{-4}	1.615×10^3	7.387
30	9.408×10^{-4}	1.063×10^3	6.969
35	1.205×10^{-3}	8.296×10^2	6.721

Table 1에서 형성상수 K_f 는 온도가 올라감에 따라 감소함을 보였다. 이것은 온도가 증가하면 β-CD와 Congo red 간의 binding energy가 감소하여 불안정한 복합체를 형성하기 때문일 것이다.

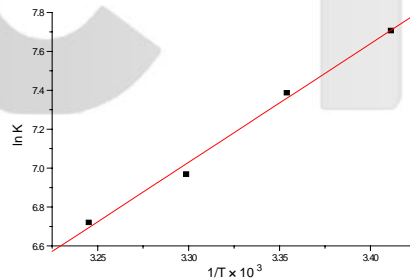


Fig. 4. The plot of $\ln K_f$ vs $1/T$ for the inclusion complex.

Fig. 4에는 이 반응의 열역학적인 관계를 알아보기 위하여 $\ln K_f$ 와 온도와의 관계를 plot 하였다. 좋은 직선성($\gamma=0.99631$)을 보였으며 이 직선으로부터 ΔH , ΔS 및 ΔG 를 계산하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 즉 ΔH , -50.73 kJ/mol, ΔS , -108.96 J/K · mol 및 ΔG 는 -18.24 kJ/mol이었다. 이 결과 반응은 자발적 반응이었으며 엔트로피는 예상한 대로 감소하는 결과를 얻을 수 있었다.

4. 결 론

이상의 연구 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다. Cyclodextrin과 염료인 Congo red와의 복합체 형성은 CD의 크기에 영향을 받았다. 즉 cavity 크기가 작은 α -CD는 Congo red의 naphthalene ring에 연결되어 있는 치환기의 입체 장애로 인하여 복합체를 형성하지 못하였다. 또한 β -CD는 한 분자의 Congo red에 두 분자의 β -CD가 equatorial로 복합체를 형성하는 것으로 생각되었다. 이 것은 자외선 영역의 S-형 흡광도가 증가하는 것으로부터 알 수 있다. 또 등 흡수점은 346 nm와 478 nm에서 나타났다. 온도가 증가하면 binding energy의 감소로 형성상수가 감소하였다. 열역학적인 parameter의 값으로부터 이 반응은 자발적 반응이지만 엔트로피는 감소함으로서 엔탈피에 관여된 반응으로 볼 수 있었다.

참고 문헌

1. J. Hernandez-Benito, S. Gonzalez-Mancebo, E. Calle, M. P. Garcia-Santos and J. Casado, *J. Chem. Educ.* **76**, 419(1999).
2. K. A. Connors, *Chem. Rev.* **97**, 1325(1997).
3. J. Szejtli, "Cyclodextrin Technology", Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands(1988).
4. F. Cramer, W. Saenger and H. Spatz, *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 14(1967).
5. A. Dan, I. Willner, N. S. Dixit and R. A. Mackay, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **3**, 455(1984).
6. K. A. Connors, *J. Pharm. Sci.* **85**, 796(1996).
7. P. K. Zarzycki and H. Lamparczyk, *J. Chem. Educ.* **73**, 459(1996).
8. H. J. Hwang, S. H. Lee and J. W. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.* **21**, 245(2000).
9. B. D. Wagner and P. J. MacDonald, *J. Chem. Soc.* **77**, 178(2000).
10. H. S. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.* **13**, 474(1992).
11. K. Kanto, N. Tanaka and H. Minamizono, *Mol. Reconn. Inclus.* 191(1998).
12. T. Moriya, H. Kurita and K. Matsumoto, *J. Am. Chem. Soc.* **34**, 2301(1991).
13. J. Defaye, C. O. Mellet, J. M. Garica and S. Maciejewski, *Mol. Reconn. Inclus.* 313(1998).
14. P. Karunanithi, P. Ramamurthy and V. T. Ramakrishnan, *J. Incl. Phenom.* **34**, 105(1999).
15. S. Hamai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **73**, 861(2000).
16. M. Ilanchelian, C. R. Raj and R. Ramaraj, *J. Incl. Phenom.* **36**, 9(2000).
17. W. West and S. Pearce, *J. Phy. Chem.* **69**, 1894(1965).
18. T. V. S. Rao, J. B. Huff and C. Bieniarz, *Tetrahedron*, **54**, 10627(1998).
19. H. S. Choi, K. S. Chung and H. T. Kim, *J. Kor. Chem. Soc.* **41**, 57(1997).
20. K. Harata and H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **48**, 375(1975).
21. H. Shimizu, A. Kaito and M. Hatano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **52**, 2678(1979).
22. H. Shimizu, A. Kaito and M. Hatano, *ibid.* **54**, 513(1981).
23. N. Kobayashi, Y. Hino, A. Ueno and T. Osa, *ibid.* **56**, 1849(1983).
24. H. A. Benesi and J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 2703(1949).
25. K. Ikeda, K. Uekama and M. Otagiri, *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 201(1975).
26. H. Shimizu, A. Kaito and N. Hatano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **54**, 513(1981).
27. D. Sybilska, *In Ordered Media in Chemical Separation*, Hinze, W. L. ; Armstrong, D. M. Eds. ; A. C. S. Symposium Series, 1987, Vol. **342**, Chapter 12.
28. F. Cramer and H. Hettler, *Naturwiss.* **54**, 625(1967).
29. K. Harata and H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **48**, 375(1975).
30. J. Sajid, A. Elhaddaoui and S. Turrell, *J. Mol. Struct.* **408**, 181(1996).