(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0095475
(43) 공개일자 2021년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5308 (2013.01)
G01N 21/6428 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0009422
(22) 출원일자 2020년01월23일
심사청구일자 2020년01월23일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김도경
서울특별시 성북구 화랑로 214, 113동 402호(석관동, 래미안석관)
정유나
서울특별시 양천구 신정로7길 75, 104동 508호(신정동, 이든채)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

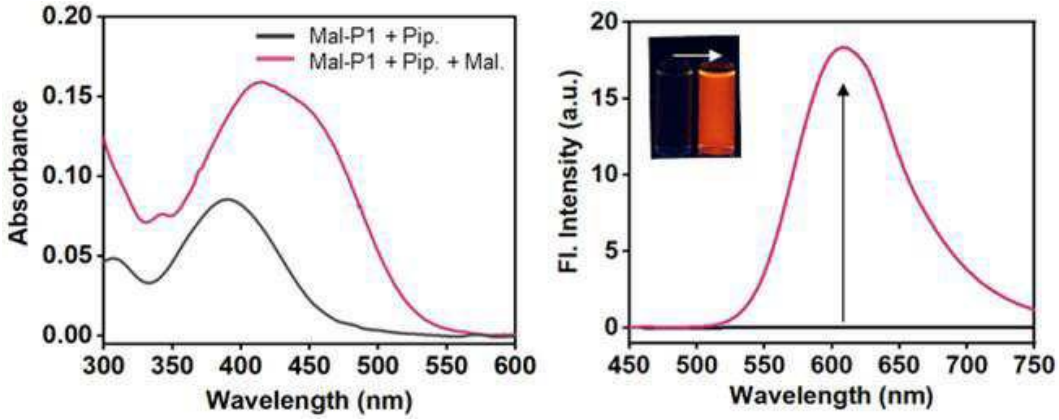
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **말로노나이트릴 검출용 형광 프로브 화합물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 6-다이메틸아미노-3-하이드록시-2-나프타알데하이드 구조를 포함하는 화합물을 이용하여 말로노나이트릴을 감지할 수 있는 형광 프로브 및 이의 용도에 대한 것이다. 본 발명에 의한 형광 프로브는 간단한 합성법을 통해 수득할 수 있으며, 말로노나이트릴에 대한 특이성이 높은 것을 특징으로 한다. 또한, 말로노나이트릴에 대한 높은 민감도(6.6 ppb)와 신속한 반응시간을 가지기 때문에 화합물을 이용한 환경적 활용의 폭이 넓다. 이와 더불어 인체에 높은 유해성을 가진 해당물질이 체내의 대사과정을 통해 또 다시 유해물질로 분해된다는 점에서 생체 내 환경에서의 활용가능성이 중요한데, 해당 프로브는 세포 내에서도 말로노나이트릴만을 선택적으로 감지하여 형광이 켜질 수 있다는 강점을 가지기 때문에 이와 관련된 모든 응용 연구 분야에서 가치 있게 사용될 수 있을 것으로 전망된다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
G01N 33/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345298131
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업/일반연구자지원사업
연구과제명 알츠하이머병 내 아밀로이드-베타 응집체 분해 기능의 나노입자 개발
기 여 율 80/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2018.06.01 ~ 2022.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20190480
부처명 한국연구재단(통합)
과제관리(전문)기관명 한국연구재단(학술진흥)
연구사업명 이공분야기초연구사업/중점연구소지원사업
연구과제명 이지바로[중점연구소(이공),2/3] 경희대학교 의과학 연구소 - 활성산소 조절을 통한 만성질병 예방 치료에 관한 연구
기 여 율 20/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2018.06.01 ~ 2021.02.28

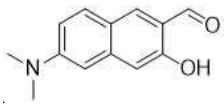
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물로 표시되는 말로노나이트릴(malononitrile) 검출용, 형광 프로브 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 말로노나이트릴과 노베나겔 축합반응에 의해 진행되는 6-디메틸아미노-3-히드록시-2-나프타알데히드 (6-dimethylamon-3-hydoxy-2-naphthaldehyde)의 분자 내에 고리화 반응을 통해 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이를 종결시키며 이미노벤조[g]쿠마린을 생성하며 붉은색의 형광을 나타내는 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제 1 항의 형광 프로브 화합물을 포함하는 말로노나이트릴 검출용 키트.

청구항 4

제 1 항의 형광 프로브 화합물을 이용한 말로노나이트릴 검출 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 검출 방법은 수용액의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 말로노나이트릴 검출 방법.

청구항 6

제 1 항의 형광 프로브 화합물을 세포 또는 조직에 처리하여 말로노나이트릴과의 반응에 의해 발생하는 형광을 측정하는 세포 또는 조직의 영상화(imaging) 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 말로노나이트릴 검출용 형광 프로브 화합물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 말로노나이트릴(malononitrile, $NCCH_2CN$)은 프로펜디나이트릴로도 불리며 알데히드(aldehydes)나 케톤(ketones)의 축합반응(condensation reaction)을 기반으로 하는 합성반응의 중간체로 주로 사용된다(Toxicol. Mech. Methods, 2003, 13, 241.; Pham. Res., 1995, 12, 380.; J. Heterocycl. Chem., 2007, 44, 419, Synth. Commun, 2002, 32, 3475.). 그 중에서도 말로노나이트릴의 노베나겔 축합반응(Knoevenagel condensation)은 제약에 사용되는 화합물의 중심골격(pharmaceutical core structure)이나 헤테로고리 시스템(heterocycle system), 솔바토크로믹 염색제(solvatochromic dyes) 등에 활용될 수 있기 때문에 산업적 가치를 가진다. 하지만 말로노타이트릴은 수용성의 맹독성을 가진 시안화수소(hydrogen cyanide, HCN)보다 더 유독성을 가진 것으로

알려져 있다. 또한, 말로노나이트릴은 동물의 조직 내 대사과정에서 시안화수소로 변환될 여지가 있을 뿐만 아니라 뇌 호흡(respiration of brain)을 막거나 신장(kidney) 및 간(liver), 호기성 해당과정(aerobic glycolysis)의 기능을 방해할 수 있기 때문에 이를 특이적으로 감지할 수 있는 시스템의 개발이 필요한 상황이다.

[0003] 현재까지는 시안화 이온(CN^-)을 감지할 수 있다고 알려진 형광 프로브가 다수 보고된 바는 있지만 말로노나이트릴만을 선택적으로 감지하는 프로브에 대해서는 그 중요성에도 불구하고 여전히 매우 도전적인 과제로 남아있으며, 보고된 바가 없다. 특히, 말로노나이트릴을 검출하기 위한 기존의 기술이 질량 기반의 분석방법(mass-based spectrometric analysis)만 주로 알려져 있다는 점과 해당 기술의 낮은 생물학적, 환경적 응용가능성을 비롯해 본다면 간편하고 신속하게 사용가능한 형광 프로브의 개발은 이 모든 단점을 개선할 수 있다는 점에서 산업적 가치를 가진다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 합성의 과정이 용이하고, 인체에 유독하며 체내의 대사과정에서조차 유독물질을 생산해낼 수 있는 말로노나이트릴(malononitrile)과 상호작용하여 형광을 발하고, 표적하는 물질만을 특이적으로 검출할 수 있는 형광 프로브를 개발하였다. 이 형광 프로브는 정량적으로 표적물질의 농도에 따른 형광변화를 나타내며, 생체 내외에서 간섭을 일으킬 수 있는 금속이온 및 생체분자를 뛰어넘은 말로노나이트릴 선택성을 가지기 때문에 그 활용성이 분야를 넘나들 것으로 기대된다. 또한 개발된 형광 프로브는 표적물질과의 빠른 반응시간(5분 이내)으로 환경 및 산업현장 내에서 실시간 검출 가능성을 보여주고 있으며, 나아가 생체 내의 조건에서도 이용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 양극성의 나프탈렌 구조를 갖는 6-디메틸아미노-3-하이드록시-2-나프타알데하이드 화합물을 이용하여 유독성 물질인 말로노나이트릴 선택적으로 감지하기 위한 형광 프로브 화합물을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 말로노나이트릴 검출 키트를 제공하는 것이다.

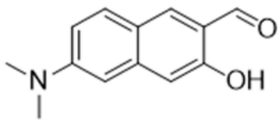
[0007] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형광 프로브 화합물을 이용한 말로노나이트릴 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물로 표시되는 말로노나이트릴(malononitrile) 검출용, 형광 프로브 화합물을 제공한다.

[0010] [화학식 1]

[0011] 

[0012] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 말로노나이트릴과 노베나겔 축합반응(Knoevenagel condensation)에 의해 진행되는 6-디메틸아미노-3-히드록시-2- 나프타알데히드 (6-dimethylamon-3-hydoxy-2-naphthaldehyde)의 분자 내에 고리화 반응을 통해 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이(ESIPT, excited-State Intramolecular Proton Transfer)를 종결시키며 이미노벤조[g]쿠마린 (iminobenzo[g]coumarin)을 생성하며 붉은색의 형광을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 말로노나이트릴 검출용 키트를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 이용한 말로노나이트릴 검출 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 검출 방법은 수용액의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 세포 또는 조직에 처리하여 말로노나이트릴과의 반응에 의해 발생하는 형광을 측정하는 세포 또는 조직의 영상화(imaging) 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 형광 프로브 화합물은 유독성 물질인 말로노나이트릴을 선택적으로 감지하여 형광 신호를 제공할 수 있다. 또한, 상기 형광 프로브 화합물을 이용하여 말로노나이트릴을 포함하고 있는 임의의 환경 내 분석물을 채취하여 실시간으로 분석할 수 있다.

[0018] 특히, 본 발명의 형광 프로브 화합물은 합성의 단계가 용이하며, 양극성의 나프탈렌의 구조적 특성에 의한 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이 현상을 가진다. 이와 같은 현상에 의해 말로노나이트릴과 특이적으로 형광이 발생하게 됨으로써, 기존의 낮은 선택성을 가지는 말로노나이트릴검출용 형광 프로브의 문제점을 극복할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 형광 프로브는 수 환경 조건에서도 말로노나이트릴을 검출할 수 있고, 휴대가 간편한 검출 키트의 형태로 제작될 수 있어, 현장에서 짧은 시간 내에 말로노나이트릴을 감지할 수 있는 새로운 방법을 제공하여 여러 분야에서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 특정 용매조건 하에서 본 발명에 따른 MalP-1의 흡광도를 측정한 결과이다.

도 2는 특정 용매조건 하에서 본 발명에 따른 MalP-1의 형광강도를 측정한 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 MalP-1이 말로노나이트릴 감지 시 흡광 및 형광 특성을 측정한 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 MalP-1의 말로노나이트릴 감지 반응 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 5는 다양한 농도의 말로노나이트릴과 반응한 본 발명에 따른 MalP-1의 흡광 및 형광 스펙트럼을 측정한 결과이다.

도 6은 각 농도에 따른 분석물에 대한 본 발명에 따른 MalP-1의 평균 형광세기를 선형의 상관관계 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 MalP-1이 가지는 말로노나이트릴에 대한 선택적 감지능력을 형광 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 8은 각각의 pH조건(pH 4-9)에서 본 발명에 따른 MalP-1의 말로노나이트릴 감지 특성을 분석한 결과이다.

도 9는 수 환경에서 채취한 샘플에 대해 본 발명에 따른 MalP-1을 이용한 말로노나이트릴의 검출 여부를 확인한 사진이다.

도 10은 수 환경에서 채취한 샘플에서 본 발명에 따른 MalP-1의 말로노나이트릴에 대한 형광 변화를 측정한 결과이다.

도 11은 수용액 샘플에 포함된 말로노나이트릴을 단계적 희석법(serial dilution)을 통해 형광 변화를 관측한 사진이다..

도 12는 도 11의 수용액 샘플을 형광 측정한 결과로 최대 형광파장인 610 nm의 값을 그래프로 나타낸 것이다

도 13은 검출 대상 물질인 말로노나이트릴을 함유하고 있는 최루탄의 합성방법을 나타낸 것이다.

도 14는 합성한 최루탄의 생성여부를 박막크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 이용해 확인한 결과이다.

도 15는 합성한 최루탄의 생성여부를 수소 핵자기공명장치(nuclear magnetic resonance)를 이용해 확인한 결과이다.

도 16은 최루탄의 농도에 따른 MalP-1의 형광변화를 나타낸 것이다.

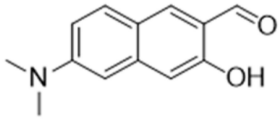
도 17은 본 발명에 따른 MalP-1의 생체 내 응용의 적합성 여부를 확인하기 위한 영상화 결과이다.

도 18은 본 발명에 따른 MalP-1이 생체 내에서 세포 독성을 가지는지 여부를 확인한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물로 표시되는 말로노나이트릴(malononitrile) 검출용, 형광 프로브 화합물을 제공한다.

[0022] [화학식 1]

[0023] 

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 말로노나이트릴과 노베나겔 축합반응에 의해 진행되는 6-디메틸아미노-3-히드록시-2-나프타알데히드의 분자 내에 고리화 반응을 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이를 종결시키며 이미노벤조[g]쿠마린을 생성하며 붉은색의 형광을 나타낼 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에서 개발된 상기 화학식 1의 화합물의 말로노나이트릴 감지 메커니즘을 규명하였으며(실시예 4), 말로노나이트릴을 선택적으로 감지할 수 있음을 확인하였다(실시예 5 및 6)

[0026] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 말로노나이트릴 검출용 키트를 제공한다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에서 개발된 상기 화학식 1의 화합물은 현장에서 사용할 수 있는 말로노나이트릴 검출용 키트로 활용될 수 있음을 확인하였다(실시예 7).

[0028] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 이용한 말로노나이트릴 검출 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 검출 방법은 액체 시료에 대하여 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에서 개발된 상기 화학식 1의 화합물은 수 환경에서도 말로노나이트릴을 유효하게 검출할 수 있음을 확인하였다(실시예 7).

[0031] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 세포 또는 조직에 처리하여 말로노나이트릴과의 반응에 의해 발생하는 형광을 측정하는 세포 또는 조직의 영상화(imaging) 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에서 개발된 상기 화학식 1의 화합물은 세포 또는 조직의 영상화에도 유효하게 활용될 수 있음을 확인하였다(실시예 9).

[0034] 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 말로노나이트릴에 대한 높은 민감도와 빠른 반응시간을 가지기 때문에 환경적 활용이 가능하며, 특히, 주어진 환경조건 하에서 실시간으로 말로노나이트릴의 검출을 모니터링 할 수 있다는 점에서 이와 관련된 연구분야에 유용하게 활용될 수 있다.

[0035] 또한, 세포 또는 조직 내에서도 말로노나이트릴에 대하여 선택적인 형광 특성을 나타내므로, 이와 관련된 세포 또는 조직의 영상화에도 유용하게 활용될 수 있다.

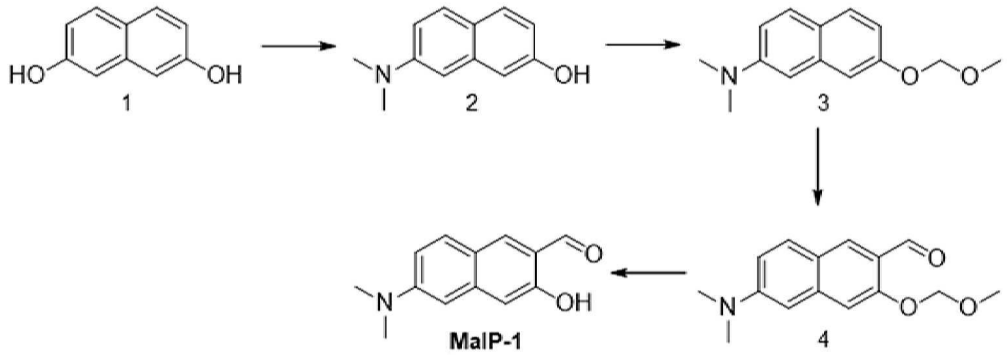
[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0039] **실시예 1. MalP-1의 합성 및 구조 분석**

[0040] 본 발명자들은 유독성의 말로노나이트릴을 선택적으로 감지할 수 있는 형광 프로브를 개발하고자 노력하였으며, 6-디메틸아미노-3-하이드록시-2-나프타알데히드(6-dimethylamino-3-hydroxy-2-naphthaldehyde)(하기 도식 1에서 MalP-1)가 노베나겔 축합반응을 통해 말로노나이트릴을 감지하며 수용액의 조건에서 분자내 고리화반응(inatramolecular cyclization)이 일어날 수 있는 것에 착안하여 본 발명의 형광 프로브(MalP-1)를 개발하였다.

[0041] 6-디메틸아미노-3-히드록시-2-나프타알데히드는 하기 도식 1에 따라 합성할 수 있다.

[0042] [도식 1]



[0043]

[0044] .

[0045] (1) 7-(디메틸아미노)나프탈렌-2-올(7-(dimethylamino)naphthalen-2-ol)의 합성

[0046] 본 발명자들은 7-(디메틸아미노)나프탈렌-2-올)(상기 도식 1에서 화합물 2)의 합성을 수행하였다. 합성 출발 물질인 상기 도식 1에서 화합물 1(1g, 6.243 mmol, Sigma-aldrich)과 소듐 메타바이설파이트(sodium metabisulfite, $Na_2S_2O_5$, 2.374 g, 12.486 mmol)가 들어있는 밀폐유리용기(sealed-tube)에 디메틸아민 수용액(dimethylamine solution, 40% in H_2O, 3.95 mL, 31.215 mmol)과 물(H_2O, 2.67 mL)을 첨가한 다음, 뚜껑과 테플론, 절연테이프를 이용해 용기의 입구를 막았다. 이 혼합물을 실리콘 오일 용기 상에서 150 ℃ 조건으로 약 4시간 동안 교반하였다. 반응을 종결시키기 위해 먼저 상온(25 ℃)으로 반응물의 온도를 낮춰준 후 용기를 열어 에틸 아세테이트(ethyl acetate, 100 mL), 물(100 mL) 및 포화 소금물(30 mL)을 넣고 분별 깔때기를 이용하여 유기층을 추출하였다. 유기층은 무수황산나트륨 (Na_2SO_4, 1 g)으로 건조하고, 흡기장비(aspirator)를 이용하여 농축하였다. 이렇게 얻어지는 옅은 갈색의 고체 화합물은 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피(column chromatograph)를 이용하여 분리(전개 액: 20% EtOAc/Hexane)하고, 흰색의 고체 화합물(상기 도식 1에서 화합물 2, 795.7 mg, 68.07%)를 수득하였다. 생성물을 박막 크로마토그래피(TLC, thin layer chromatography, silica gel 60F-254 glass plate, Merck)로 분석하면 R_f = 0.25(20% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 갖는다.

[0047] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, 293K): δ 7.66-7.59(m, 2H), 7.05-7.02(m, 1H), 6.96-6.95(d, 1H), 6.85-6.82(m, 1H), 6.78-6.77(d, 1H), 5.10(s, 1H), 3.05(s, 6H).

[0048] ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75MHz, 293K): δ153.88, 149.17, 136.24, 129.39, 128.61, 122.44, 114.22, 113.80, 108.02, 105.32, 40.91.

[0049] HRMS: m/z calcd. for $C_{12}H_{13}NO$ 187.0997 found 187.0999.

[0051] (2) 7-(메톡시메톡시)-*N,N*-디메틸나프탈렌-2-아민(7-(methoxymethoxy)-N,N-dimethylnaphthalen-2-amine)의 합성

[0052] 본 발명자들은 7-(메톡시메톡시)-*N,N*-디메틸나프탈렌-2-아민(상기 도식 1에서 화합물 3)의 합성을 수행하였다. 디메틸포름아마이드(DMF, *N,N*-dimethylformamide, 5 mL) 용매에 소듐 하이드라이드(sodium hydride, NaH, sodium hydride, 235 mg, 5.875 mmol)를 넣고 아르곤(argon) 풍선을 꽂아준 후, 포화 소금물과 얼음을 이용하여 -15 ℃로 온도를 낮추어 주었다. 이 혼합 용액에 상기 도식 1에서 화합물 2(1 g, 5.34 mmol)를 DMF(5 mL)에 녹인 후, 온도를 유지한 상태에서 약 5분간 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 이 때, 수소 가스(H_2 gas)가 발생하게 되는데, 이는 실리콘오일 트랩(silicon oil trap)을 거친 후 옥외로 배출시켰다. 동일한 온도에서 1시간 교반시킨 후, 트랩에서 가스 방울(H_2 gas)이 더 이상 발생하지 않는 것을 확인하였다. 이어서, 클로로메틸 메틸에터(chloromethyl methyl ether, 0.4 mL, 5.34 mmol)를 약 5분간 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 주입이 완료되면, 온도를 상온(25 ℃)으로 바꾸어주고, 6시간을 교반시켰다. 6시간 후, 물(100 mL)를 넣어주고, 에틸 아세

테이트(EtOAc, 200 mL)를 이용하여 추출하였다. 추출된 유기층은 무수황산나트륨(10 g)을 이용해 물을 건조하였다. 건조된 에틸아세테이트 유기층은 흡기장비를 이용해 농축하였다. 이렇게 얻어진 옅은 갈색의 액체 화합물은 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피 방법을 통하여 분리(전개 액: 5% EtOAc/Hexane)해주었고, 흰색 고체의 화합물(상기 도식 1에서 화합물 3, 1336.1 mg, 87.3%)을 얻었다. 생성물은 박막 크로마토그래피로 분석하면 R_f = 0.45(20% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 갖는다.

[0053] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, 293K): δ 7.75(d, 1H), 7.72(d, 1H), 7.40-7.39(d, 1H), 7.15-7.08(m, 2H), 6.98-6.97(d, 1H), 5.39(s, 2H), 3.69(s, 3H), 3.11(s, 6H).

[0054] ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75MHz, 293K): δ 155.75, 149.16, 136.23, 129.11, 128.55, 123.00, 114.99, 114.58, 108.69, 105.96, 94.62, 56.07, 40.83.

[0055] HRMS: m/z calcd. for $C_{14}H_{17}NO_2$ 231.1259 found 231.1262.

[0057] (3) 6-(디메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)-2-나프트알데히드(6-(dimethylamino)-3-(methoxymethoxy)-2-naphthaldehyde)의 합성

[0058] 본 발명자들은 6-(디메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)-2-나프트알데히드(상기 도식 1에서 화합물 4)의 합성을 수행하였다. 100 mL 둥근 바닥 플라스크(round-bottom flask)에 화합물 3(2.2606 g, 9.774 mmol)을 넣은 후, 아르곤 풍선을 꽂아주었다. 이어서 에틸 에터(ehthyl ether, Et_2O, 50 mL)을 넣어주고, 포화된 소금물과 얼음을 이용하여 온도를 -20 ℃로 낮추었다. 온도 확인 후, 3차 부틸리튬(tert-BuLi, 8.6 mL, 14.66 mmol)을 약 30분에 걸쳐 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 이때, 색상은 서서히 짙은 갈색으로 바뀌며, 주입이 완료되면 같은 온도에서 2시간 동안 교반시켰다. 2시간 교반 후, DMF(1.3 mL, 16.62 mmol)를 약 5분에 걸쳐 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 주입이 완료되면 동일한 온도에서 1시간을 교반하였다. 이때 색깔은 점차 밝은 노란색으로 변하였다. 1시간 교반 후, 4N HCl(10 mL)와 1차 증류수(10 mL)를 넣어주고 10분간 교반하였다. 10분 후, 에틸 아세테이트(300 mL)와 포화 소금물(100 mL) 및 물(200 mL)를 이용하여 추출과정을 수행하였다. 추출을 통해 얻어진 유기층을 무수황산나트륨(15 g)으로 물을 건조하였고, 흡기장비를 이용하여 농축해주었다. 수득된 고체 화합물은 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리(전개 액: 20% EtOAc/Hexane)하여 밝은 노란색 고체의 화합물(상기 도식 1에서 화합물 4, 1.27 g, 50%)을 얻었다. 생성물은 박막 크로마토그래피로 분석하면 R_f = 0.25(20% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 갖는다.

[0059] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, 293K): δ 10.49(s, 1H), 8.25(s, 1H), 7.75-7.73(d, 1H), 7.29-7.24(d, 1H), 7.05-7.03(dd, 1H), 6.77-6.76(d, 1H), 5.40(s, 2H), 3.59(s, 3H), 3.12(s, 6H).

[0060] ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75MHz, 293K): δ 189.61, 155.99, 150.71, 139.74, 131.16, 130.89, 122.26, 121.29, 114.76, 107.66, 104.30, 94.75, 56.39, 40.32.

[0061] HRMS: m/z calcd. for $C_{15}H_{17}NO_3$ 259.1208 found 259.1211.

[0063] (4) 6-(디메틸아미노)-3-하이드록시-2-나프트알데히드(6-(dimethylamino)-3-hydroxy-2-naphthaldehyde)의 합성

[0064] 본 발명자들은 6-(디메틸아미노)-3-히드록시-2-나프트알데히드(상기 도식 1에서 MalP-1)의 합성을 수행하였다. 25 mL 둥근 바닥 플라스크에 화합물 4(195 mg, 0.75 mmol)와 이소프로필 알콜(isopropyl alcohol, 10 mL), 5 M HCl (5 mL)를 넣어준 후 60 ℃에서 3시간 동안 교반시켰다. 3시간 후, 상온으로 플라스크를 식힌 후 아이소프로필 알콜은 흡기기에서 제거하고, 에틸 아세테이트(100 mL)와 물(100 mL)를 이용하여 추출과정을 수행하였다. 추출을 통해 얻어진 유기층(EtOAc)은 무수황산나트륨 (3 g)으로 유기층 내 존재하는 물을 건조하고, 흡기기를 이용하여 농축하였다. 이렇게 얻어지는 노란색의 고체 화합물은 실리카겔을 이용한 관 크로마토그래피방법을 이용하여 분리(전개 액: 20% EtOAc/Hexane)하여 노란색의 MalP-1(113 mg, 70%)을 얻었다. 생성물은 박막 크로마토그래피로 분석하면 R_f = 0.35(20% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 갖는다.

[0065] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 293K): δ 10.54(s, 1H), 9.89(s, 1H), 7.90(s, 1H), 7.70-7.67(d, 1H), 7.02-6.98(m, 2H), 6.66-6.65(d, 1H), 3.13(s, 6H).

[0066] ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 293K): δ 195.26, 156.83, 151.39, 140.62, 137.75, 130.87, 120.63, 119.03, 114.18, 108.73, 103.22, 40.26.

[0067] HRMS: m/z calcd. for $C_{13}H_{13}NO_2$ 215.0946 found 259.0946.

[0068] 이때, 본 발명에서 개발된 상기 화합물을 MalP-1이라 명명하였다.

[0070] **실시예 2. MalP-1의 흡수 및 형광 특성 확인**

[0071] 본 발명자들은 하기의 용매조건 하에서 MalP-1의 흡광도 및 형광강도를 측정하였다. 그 결과를 도 1 및 2에 나타내었다.

[0072] 물질의 흡광특성(absorbance)을 분석하기 위해서 흡수 분광광도계(UV/Vis spectrophotometer; Agilent Technologies Cary 8454, USA)를 사용하였고, 형광세기(fluorescence intensity)를 측정하기 위해서 형광 광도계(spectro-fluorophotometer; SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였다. 각각의 흡광 및 형광 스펙트럼을 측정할 때는 사면이 1 cm 두께를 가진 표준 석영셀(standard quartz cell; interanl volume= 0.1 cm, Hellma Analytics, Jena, Germany)인 유리 큐벳(cuvette)을 이용하였다.

[0073] 측정에 사용된 MalP-1은 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 용해된 저장액(10 mM)을 제시된 용매 내에서 최종농도가 10 uM이 되도록 희석하여, 실온의 조건에서 5분 이내에 측정하였다.

[0074] 도 1 및 2는 용매가 증류수(deionized water, 99.9%)와 피페리딘(piperidine, 0.1%)인 조건하에서 MalP-1의 흡광 스펙트럼(도 1)과 형광 스펙트럼(도 2)을 각각 나타낸 것이다. 해당 조건하에서 MalP-1은 흡광 스펙트럼(도 1)이 390 nm에서 최고 흡광 값을 갖는 것으로 나타났고, 형광 스펙트럼(도 2)에서 MalP-1은 형광을 나타내지 않았다.

[0076] **실시예 3. MalP-1의 말로노나이트릴 감지 여부 확인**

[0077] 본 발명자들은 MalP-1이 말로노나이트릴을 감지여부를 확인하였다. MalP-1(10 μM)이 주어진 용매조건(99.9% 증류수, 0.1% 피페리딘)내에서 말로노나이트릴을 감지하기 전과 후에 대한 흡광 및 형광 스펙트럼을 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0078] 도 3에서 좌측은 흡광 스펙트럼을 우측은 형광 스펙트럼을 측정한 것이다. 도 3에 나타난 바와 같이, 해당조건에서 MalP-1은 말로노나이트릴(100 μM)과 5분간 실온조건에서 반응하였을 때 붉은색의 형광이 켜짐(turn-on)되는 것을 확인하였다(도 3의 우측 그래프 안쪽의 사진).

[0079] 이 결과로부터 MalP-1이 말로노나이트릴에 즉각적으로 반응할 수 있으며 반응의 전후에 확연한 형광 변화를 보임을 알 수 있다.

[0081] **실시예 4. MalP-1의 말로노나이트릴 감지 반응 메커니즘**

[0082] 본 발명자들은 MalP-1이 말로노나이트릴을 감지했을 때 생성되는 반응물을 확인하기 위하여, 고해상도 질량분석기(High resolution mass spectra; JMS-700 spctrometer, JEOL, Tokyo, Japan)로 생성된 물질의 질량을 측정하였다.

[0083] 도 4의 (a)는 유독성의 말로노나이트릴이 동물의 조직 대사과정에서 시안화수소(hydrogen cyanide)로 변환되는지에 대한 반응의 메커니즘이며, 도 4의 (b)는 MalP-1이 말로노나이트릴을 만났을 때 형광이 턴-온(turn-on)되는 간략한 메커니즘을 함께 나타낸 모식도이다.

[0085] **실시예 5. MalP-1의 말로노나이트릴 감지 민감도 확인**

[0086] 본 발명자들은 주어진 용매조건(증류수 99.9%, 0.1% 피페리딘)에서 말로노나이트릴에 대한 MalP-1의 감지 특성 및 민감도를 평가하였다. MalP-1의 말로노나이트릴 감지 민감도를 평가하기 위하여 다양한 농도의 말로노나이트릴과 반응한 MalP-1의 형광 스펙트럼을 측정하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0087] 구체적으로, MalP-1의 말로노나이트릴의 양에 따른 형광변화 특성 및 검출이 가능한 최소 말로노나이트릴의 농도를 확인하기 위하여, 일정 당량의 말로노나이트릴을 이용해 고농도에서의 형광변화와 저농도에서의 형광 증가량을 평가하였다. 측정에 사용된 용매는 증류수(deionized water, 99.9%)과 반응의 촉매로 사용되는 피페리딘(piperidine, 0.1%)으로, 반응은 실온(25 ℃)의 조건에서 5분이내로 고정하여 측정하였다. MalP-1은 다이메틸 설폭사이드에 녹여서 사용하였으며, 최종으로 사용되는 용매조건에서 다이메틸 설폭사이드의 양이 동일하도록하여 10 uM의 농도조건에서 분석하였다.

[0088] 도 5에서 (a)와 (b)는 말로노나이트릴의 농도범위가 0-1 mM(0 uM, 10 uM, 50 uM, 100 uM, 300 uM, 500 uM, 700 uM, 1 mM)인 조건에서 MalP-1과 반응했을 때의 형광 증가 그래프와 최대 형광 파장대(610 nm)에서의 말로노나이트릴의 농도와 MalP-1의 형광세기 간의 상관관계를 각각 분석한 결과이다. 해당 스펙트럼은 표적하는 물질인 말로노나이트릴의 농도가 증가함에 따라 생성되는 물질(IBC)의 형광이 선형의 상관관계로 증가함을 보여주고 있다.

[0089] 또한, 말로노나이트릴의 농도가 낮은 상태일 때도 MalP-1이 가능한 감지의 범위를 확인하고자 주어진 각 농도에 따른 분석물을 3개씩으로 정하여 분석하였고, 그에 대한 평균 형광세기를 도 6에서와 같이 선형의 상관관계 그래프로 나타내었다.

[0090] 이 실험과정에서 MalP-1의 농도는 10 μM로 동일하게 고정하여 분석하였고, 모든 형광세기는 25 ℃에서의 5분이내로 반응시켜 형광 광도계로 측정하였다.

[0091] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 MalP-1이 말로노나이트릴에 대해 보이는 민감도가 6.6 ppb로 상당히 낮은 농도의 말로노나이트릴까지 감지 가능한 민감성을 가진다는 사실을 확인하였다.

[0093] **실시예 6. MalP-1의 말로노나이트릴 선택성 및 pH 조건 내 특성 확인**

[0094] 본 발명자들은 MalP-1이 가지는 말로노나이트릴에 대한 선택적 감지능력을 반응 전과 후의 형광 변화를 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0095] 구체적으로, MalP-1이 말로노나이트릴을 선택적으로 감지할 수 있는지 여부를 확인하기 위해서, 반응에 영향을 줄 수 있는 각종 금속이온 및 대표적인 생체분자들을 이용하여 각 물질에 대한 MalP-1의 형광특성 변화 여부를 확인하였다. 실험에 사용된 용매는 증류수(deionized water, 99.9%)와 피페리딘(piperidine, 0.1%)으로, 각 금속이온과 생체분자들은 Sigma Aldrich(USA), Alfa Aesar(USA), TCI(Japan)사의 제품을 사용하였다. MalP-1은 10 mM의 농도로 디메틸 설폭사이드 용액에 녹여서 사용하였으며, 최종 용매 조건에서 MalP-1의 농도는 10 μM로 디메틸 설폭사이드의 양이 각 물질 별로 동일하도록 통제하였다. 화합물의 농도는 10 μM로 고정하였으며, 각 유사체들의 농도는 100 μM로 통일하여 측정하였다. 이 결과는, 최대 형광을 보이는 611 nm에서의 형광 값을 정리한 것이다.

[0096] 도 7의 그래프의 가로축(A-X)에 표시된 금속이온과 생체분자의 종류는 다음과 같다:

[0097] (A) MalP-1;

[0098] (B) MalP-1 with malononitrile;

[0099] (C) MalP-1 with NaCN;

[0100] (D) MalP-1 with $NaHSO_3$;

[0101] (E) MalP-1 with NaOH;

[0102] (F) MalP-1 with NaOAc;

[0103] (G) MalP-1 with NaCl;

[0104] (H) MalP-1 with NaCl(anion);

[0105] (I) MalP-1 with NaF;

[0106] (J) MalP-1 with NaI;

[0107] (K) MalP-1 with $MgCl_2$;

[0108] (L) MalP-1 with KCl;

[0109] (M) MalP-1 with $CaCl_2$;

[0110] (N) MalP-1 with $FeCl_3$;

[0111] (O) MalP-1 with $NiCl_2$;

[0112] (P) MalP-1 with $CuCl_2$;

[0113] (Q) MalP-1 with $ZnCl_2$;

[0114] (R) MalP-1 with $CdCl_2$;

[0115] (S) MalP-1 with glutamine;

[0116] (T) MalP-1 with glutathione;

[0117] (U) MalP-1 with cysteine;

[0118] (V) MalP-1 with homocysteine;

[0119] (W) MalP-1 with lysine;

[0120] (X) MalP-1 with aspartic acid;

[0121] 도 7에 나타난 바와 같이, 각각의 금속이온과 생체분자와의 반응에서 MalP-1은 형광변화를 보이지 않았지만, B에 해당하는 말로노나이트릴과 반응하였을 때는 높은 형광세기가 측정되며 선택적으로 말로노나이트릴만을 감지함을 보였다.

[0122] 또한, 각각의 pH조건(pH 4-9)에서 MalP-1의 말로노나이트릴 감지 특성을 분석하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0123] 도 8에 나타난 바와 같이, 실험 결과 생체 내 pH조건인 pH 7.4와 알칼리성(akaline)성의 pH조건에서 반응의 생성물인 이미노벤조[g]쿠마린의 형광을 관찰할 수 있었다. 이는 MalP-1의 분자 내 고리화 반응에 의한 것으로 확인하였다.

[0124] 이 같은 결과들은 MalP-1이 다른 물질에 대한 간섭을 피해서 말로노나이트릴에만 특이적으로 반응할 수 있다는 사실을 명시해주고 있다. 또한, MalP-1은 생물학적 pH조건을 포함한 여러 pH조건에서 그 반응성을 보여 생체 내, 그리고 환경조건에서 활용될 수 있는 가능성을 확인시켜주었다.

[0126] **실시예 7. MalP-1을 이용한 수 환경 샘플 내 말로노나이트릴 감지 평가**

[0127] 본 발명자들은 수 환경에서 채취한 샘플들을 토대로 MalP-1을 이용한 말로노나이트릴의 검출 여부를 확인하기 위하여 총 일곱 종류의 물을 이용해 해당 환경에서의 형광변화를 평가하였다.

[0128] 구체적으로, 수용액 샘플을 용매로 하여 총 부피가 500 μL가 되도록 MalP-1 (10 μM)과 말로노나이트릴(100 μM)의 농도를 맞춰준 다음 실온의 조건에서 약 3분 간 반응시켰다. 채취된 수용액 샘플들은 각각 바닷물(sea water), 강물(river water), 호수물(lake water), 수돗물(tap water), 상업적으로 판매되는 식수(bottled drinking water)로, 반응 전과 후의 결과는 자외선(UV light, 365 nm)조건 하에서 형광변화를 사진 촬영하여 도 9에 나타내었다.

[0129] 또한, 상기와 같이 촬영된 형광변화는 형광장비를 이용해 측정하였으며 도 10에 최대 형광파장인 610 nm 기준으

로 정리하여 그래프화하였다. 도 10의 그래프의 가로축(A-G)에 표시된 수용액 샘플의 종류는 다음과 같다:

[0130] (A) MalP-1 without/with malononitrile in deionized water;

[0131] (B) MalP-1 without/with malononitrile in sea water;

[0132] (C) MalP-1 without/with malononitrile in lake water;

[0133] (D) MalP-1 without/with malononitrile in river water;

[0134] (E) MalP-1 without/with malononitrile in tap water;

[0135] (F) MalP-1 without/with malononitrile in bottled water1;

[0136] (G) MalP-1 without/with malononitrile in bottled water2;

[0137] 또한, 도 11에 나타난 바와 같이 B-G에 해당하는 수용액 샘플은 0-200 μM 농도의 말로노나이트릴을 단계적 희석법(serial dilution)을 통해 측정한 형광변화를 사진 촬영한 결과이다. 도 12는 도 11의 수용액 샘플을 형광 측정한 결과로 최대 형광파장인 610 nm의 값을 그래프로 나타낸 것이다.

[0138] 이러한 결과는, 도 11 및 12의 사진 및 그래프에서와 같이 MalP-1이 수 환경의 조건에서도 말로노나이트릴을 단시간 내에 민감하고 빠르게 검출이 가능하다는 것을 보여주는 것이며, 이로써, 본 발명에 따라 개발된 MalP-1이 수 환경 조건 내에서의 활용될 수 있음을 확인할 수 있다.

[0140] **실시예 8. MalP-1의 최루탄 내 미량 말로노나이트릴 검출 여부 확인**

[0141] 본 발명자들은 MalP-1을 이용한 말로노나이트릴의 실제 군사적, 산업적 용도에 있어서 활용가능성을 검증하였다. 구체적으로, 대량으로 합성하여 각국에서 군사적 훈련용도로 가장 많이 사용되는 최루탄(tear gas; CS riot gas)을 도 13과 같은 방법을 통해 합성하였다. 합성에 사용된 시작물질은 2-클로로벤즈알데하이드(2-chlorobenzaldehyde)로 촉매가 있는 조건 하에서 일정 당량의 말로노나이트릴과 반응하여 최루탄을 생성하게 된다. 도 14는 합성을 통해 수득 된 최루탄을 박막크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 이용해 254 nm조건에서 확인한 결과로 순수한 최루탄의 생성여부를 보여주고 있다.

[0142] 도 15는 도 13 및 14과 마찬가지로 합성한 최루탄의 생성여부를 수소 핵자기공명장치(nuclear magnetic resonance)를 이용해 확인한 결과이다. 해당 결과 내에서 미량의 말로노나이트릴이 남아있는 것을 보아 실제 공정에서 대량합성 되는 최루탄에서도 다음과 같은 특징을 보일 것이라 가정하였다. 즉, 이와 같은 논리로 합성에서 비롯된 최루탄 내의 잔여 말로노나이트릴을 감지할 수 있다면 산업적, 군사적 용도에 있어서 해당 표적물질이 제어가 가능하다고 보인다.

[0143] 도 16은 최루탄의 농도에 따른 MalP-1의 형광변화를 나타낸 것이다. 최루탄의 양이 증가함에 따라 그에 포함된 말로노나이트릴의 양도 비례하여 증가함을 확인할 수 있다. 이 결과를 통하여, MalP-1은 최루탄에 노출되었을 때 발생할 수 있는 유해물질과 그로부터 부수적으로 생성될 수 있는 시안화물(cyanide, 청산가리)의 감지 및 유독성의 말로노나이트릴을 복합적으로 감지해낼 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

[0145] **실시예 9. MalP-1을 이용한 세포 내 말로노나이트릴 영상화 방법**

[0146] 본 발명자들은 MalP-1을 이용해 세포 내에 존재하는 말로노나이트릴을 영상화하여 MalP-1의 생체 내 응용의 적합성 및 세포독성 여부를 확인하였다.

[0147] 구체적으로, MalP-1이 생체 내에서 말로노나이트릴에 대한 선택성을 가지고 반응함에 따라 형광의 특성이 변화하는지 여부와, MalP-1이 말로노나이트릴을 처리한 헬라 세포(HeLa cell, cervical cancer cells)로부터 말로노나이트릴을 감지할 수 있는지 여부 및 그에 대한 영상화 방법을 확인하였다.

[0148] 세포 내에서도 MalP-1이 말로노나이트릴에 대한 특이성을 가지고 영상화가 가능한지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 본 발명자들은 대조군으로 헬라세포를 사용하였고, 이 외에 세 개의 비교군(i: MalP-1, ii: MalP-1 with malononitrile, iii: MalP-1 with malononitrile including 0.1% piperidine)을 준비하여 각각의 조건에서 영상화를 시도하였다. 실험에 사용된 MalP-1의 농도는 30 μM로 2시간 동안 37 ℃, 5% 이산화탄소(CO$_2$)조건

에서 배양시켜준 다음, 말로노나이트릴(100 μM)을 처리하여 2시간 동안 추가로 배양시켜주었다. 그 결과를 도 17에 나타내었다.

[0149] 도 17에 나타난 바와 같이, 말로노나이트릴을 포함하지 않은 그룹에서는 전혀 형광을 보이지 않았지만 말로노나이트릴을 처리한 그룹에서는 붉은색의 형광이 켜짐을 확인할 수 있으며, 생체 내에서도 MalP-1이 말로노나이트릴에 대하여 선택성을 가짐을 확일할 수 있다. 이때, 영상화에 사용한 여기파장은 499 nm이며, 스케일바는 20 μm이다.

[0150] 또한, MalP-1이 생체 내에서 세포 독성을 가지는지 여부를 확인하였다. 구 결과는 도 18에 나타내었다.

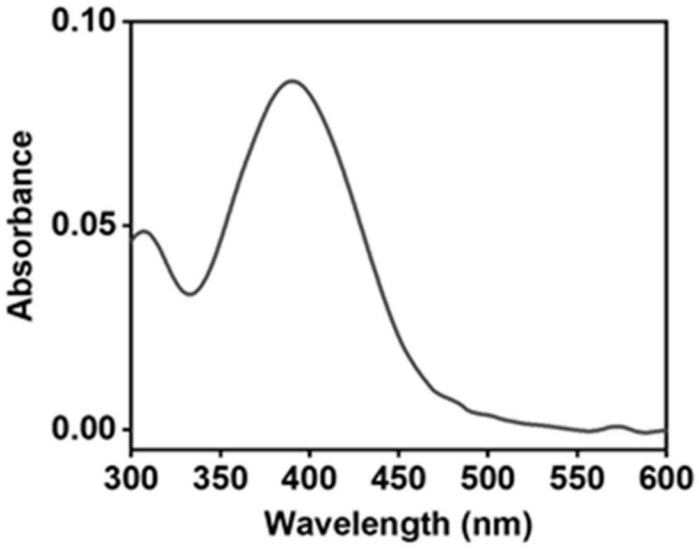
[0151] 구체적으로, 세포 독성 실험은 CCK-8 assay kit(dojindo molecular technologies, Inc., CatNO: CK04-13)를 사용하여 진행하였고, 해당 사에서 제공하는 프로토콜을 따라 진행하였다. 96 well plate (SPL, 30096)에 동일한 수의 세포를 분주한 뒤, 24 시간 동안 37 ℃와 5% CO_2를 유지하는 배양기(Thermo Scientific Forma Series3)에서 세포를 배양하였다. 그 다음, 배양액을 혈청이 없는 배양액으로 바꾸어 준 뒤 30분간 배양기에서 배양하였고, 이후 MalP-1을 주어진 농도별로 처리해주었다. MalP-1을 처리한 세포는 약 2시간 동안 배양기에서 추가로 배양하였다. 다음으로 배양액을 제거한 다음, 1X PBS를 이용해 1회의 세척과정을 거쳤다. 이후 혈청이 없는 배양액을 각 웰(well)에 90 μL로 분주해주었고, 10 μL의 CCK-8 용액(solution)을 각 웰에 처리해주었다. 마지막으로 2시간 동안 37 ℃와 5% CO_2조건의 배양기에서 배양하여 450 nm에서 흡광 값을 측정하였다. 흡광 값은 마이크로플레이트 리더기(Microplate reader, Multiskan FC, Thermo Fisher)로 측정하였으며, 세포 독성의 백분율은 (샘플의 흡광 값 *100)/(대조군의 흡광 값)으로 계산하였다. 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0152] 도 18에 나타난 바와 같이, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM에 해당하는 농도조건을 기준으로 각각 세포독성을 확인한 결과 100 μM에 해당하는 고농도까지도 낮은 독성을 나타냄을 확인할 수 있다.

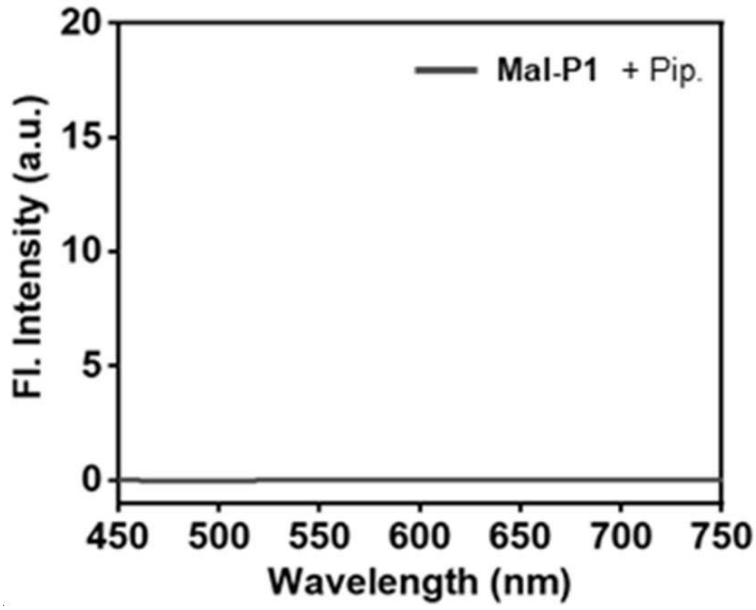
[0154] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

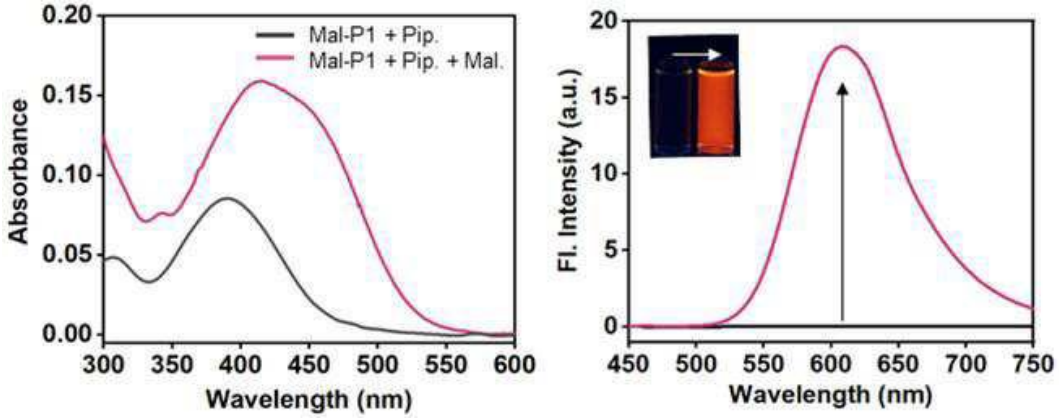
도면1



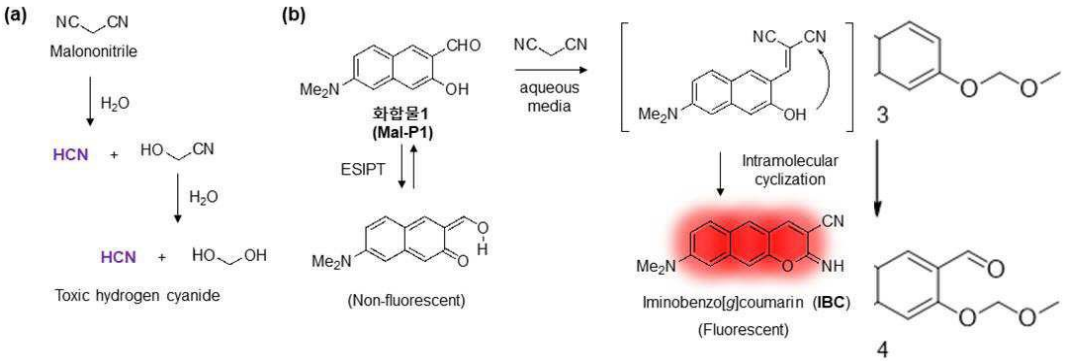
도면2


Mal-P1 + Pip.
Fl. Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)

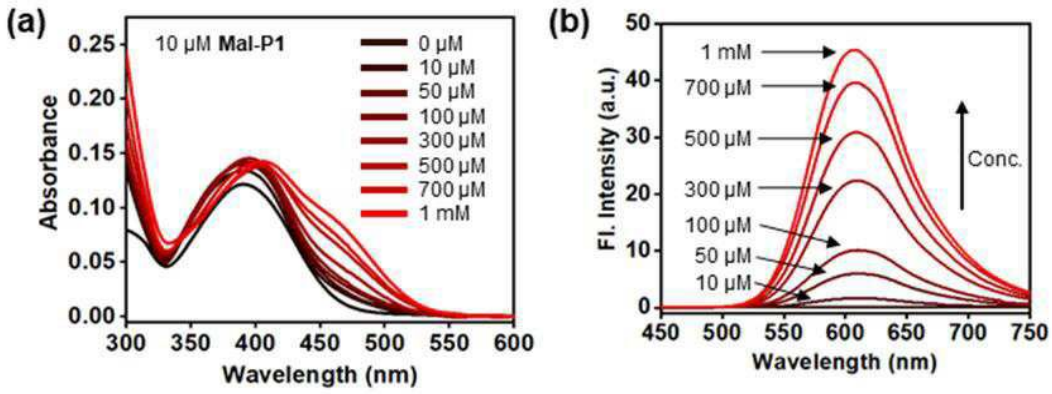
도면3


Mal-P1 + Pip.
Mal-P1 + Pip. + Mal.
Absorbance
Wavelength (nm)
Fl. Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)

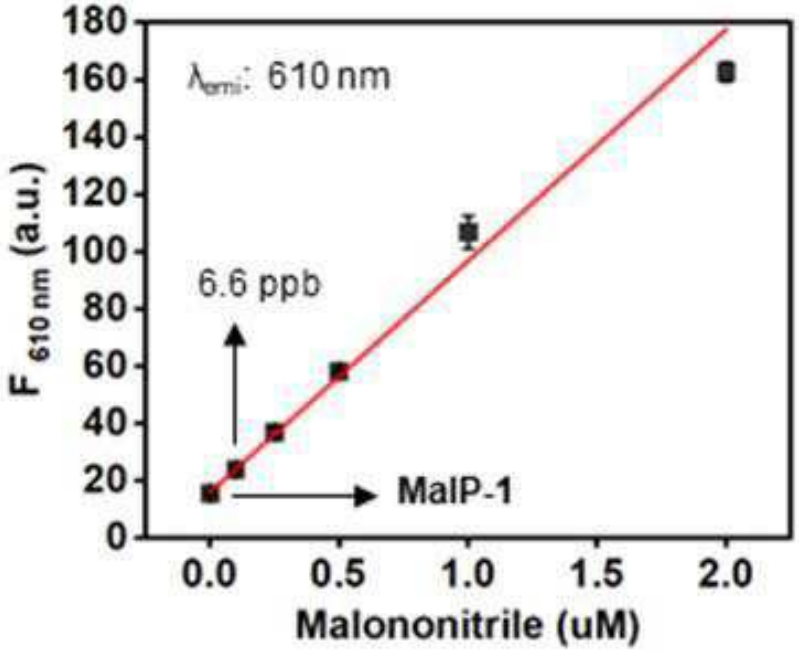
도면4


(a)
Malononitrile
Toxic hydrogen cyanide
(b)
화합물1
(Mal-P1)
ESIPT
(Non-fluorescent)
aqueous media
Intramolecular cyclization
Iminobenzo[g]coumarin (IBC)
(Fluorescent)
3
4

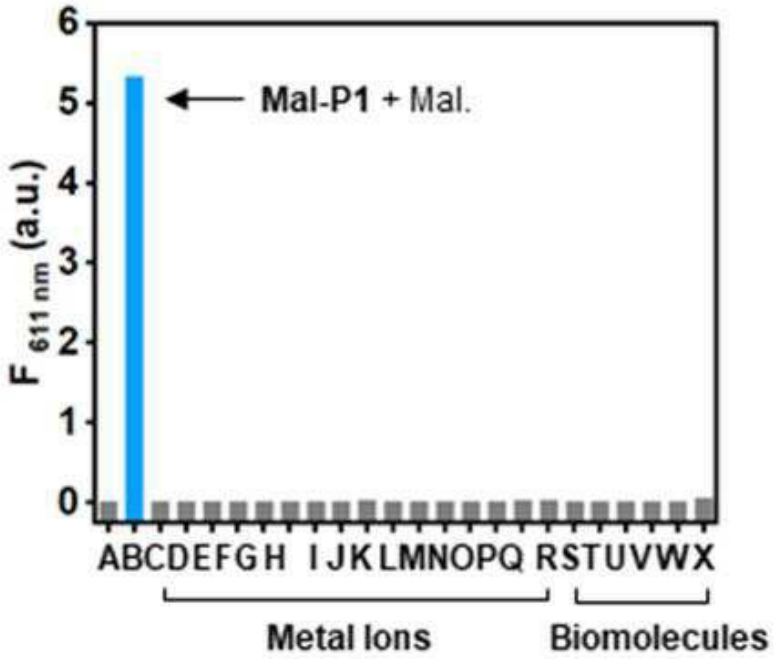
도면5


(a)
10 μM Mal-P1
0 μM
10 μM
50 μM
100 μM
300 μM
500 μM
700 μM
1 mM
Absorbance
Wavelength (nm)
(b)
1 mM
700 μM
500 μM
300 μM
100 μM
50 μM
10 μM
Conc.
Fl. Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)

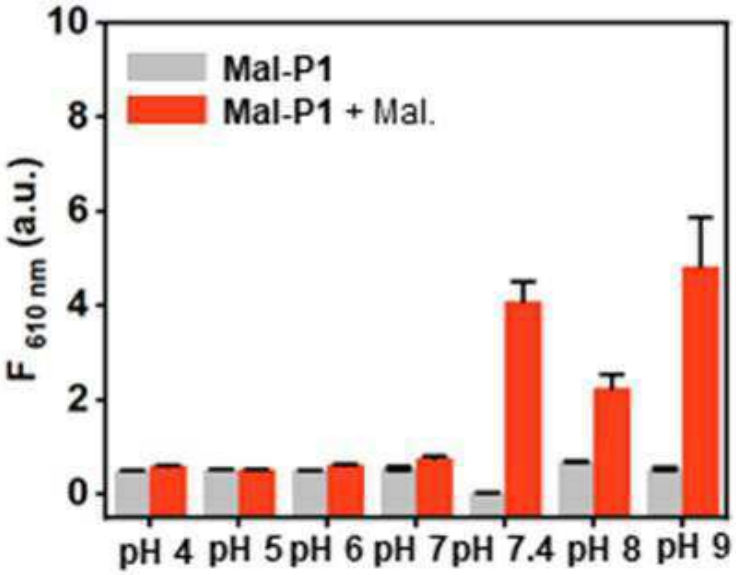
도면6


λemi: 610 nm
6.6 ppb
MalP-1
F 610 nm (a.u.)
Malononitrile (uM)

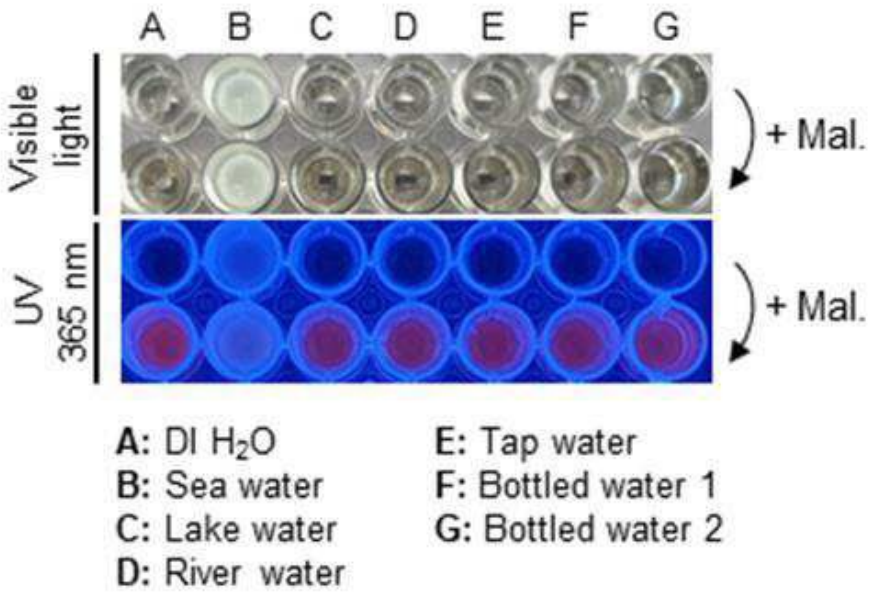
도면7


Mal-P1 + Mal.
F 611 nm (a.u.)
0
1
2
3
4
5
6
ABCDEFGH IJKLMNOPQ RSTUVWX
Metal Ions
Biomolecules

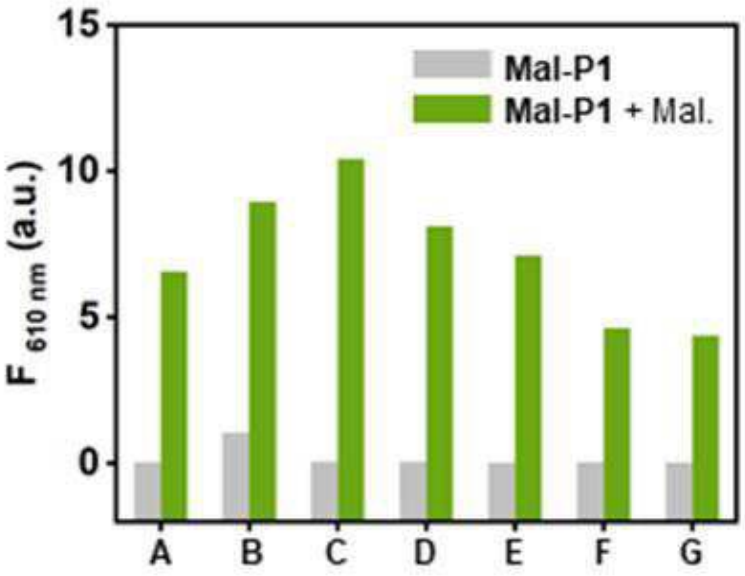
도면8


Mal-P1
Mal-P1 + Mal.
F 610 nm (a.u.)
0
2
4
6
8
10
pH 4
pH 5
pH 6
pH 7
pH 7.4
pH 8
pH 9

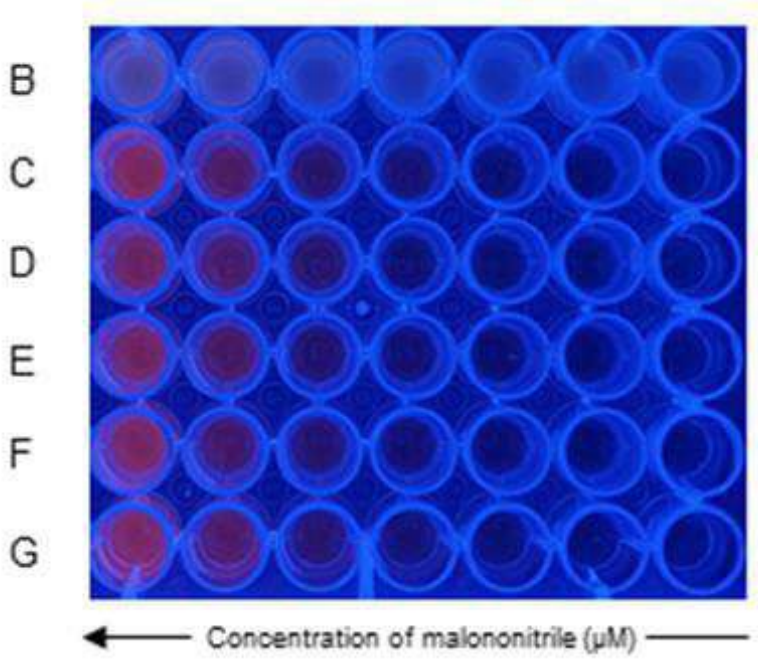
도면9


A B C D E F G
Visible light
+ Mal.
UV 365 nm
+ Mal.
A: DI H_2O
B: Sea water
C: Lake water
D: River water
E: Tap water
F: Bottled water 1
G: Bottled water 2

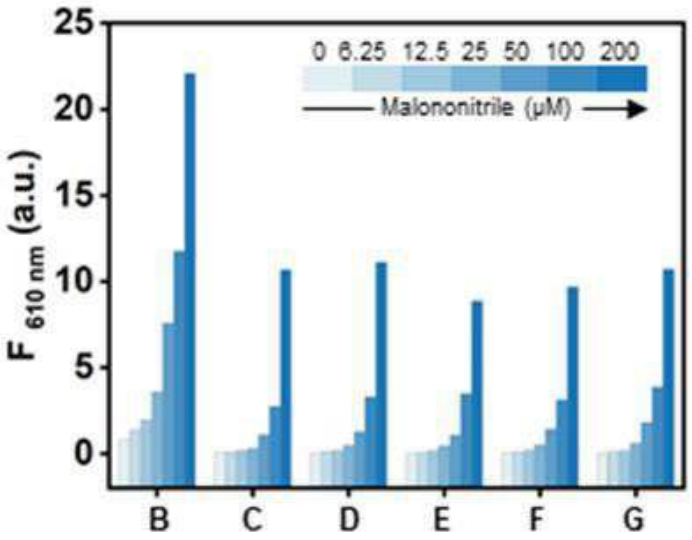
도면10


15
10
5
0
$F_{610\ nm}$ (a.u.)
Mal-P1
Mal-P1 + Mal.
A B C D E F G

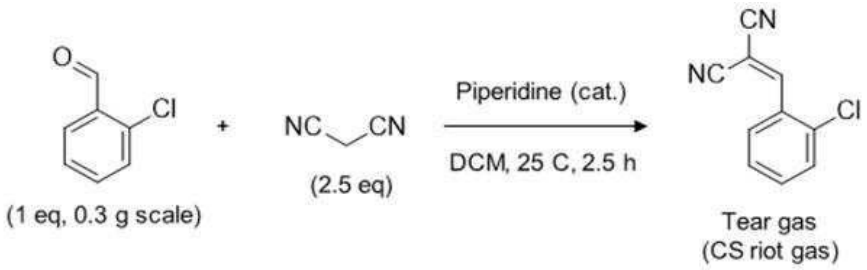
도면11



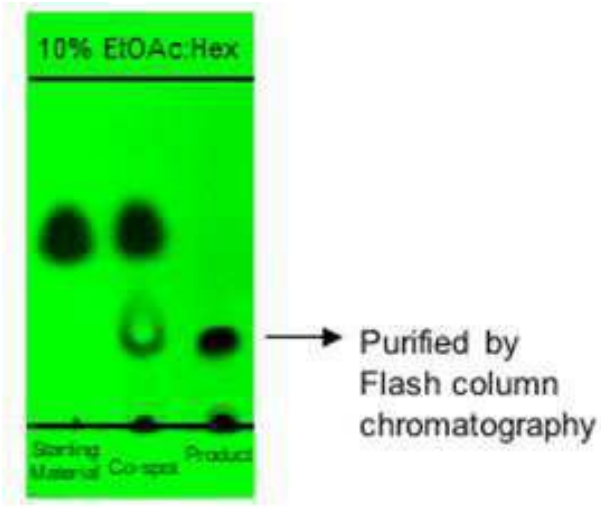
도면12



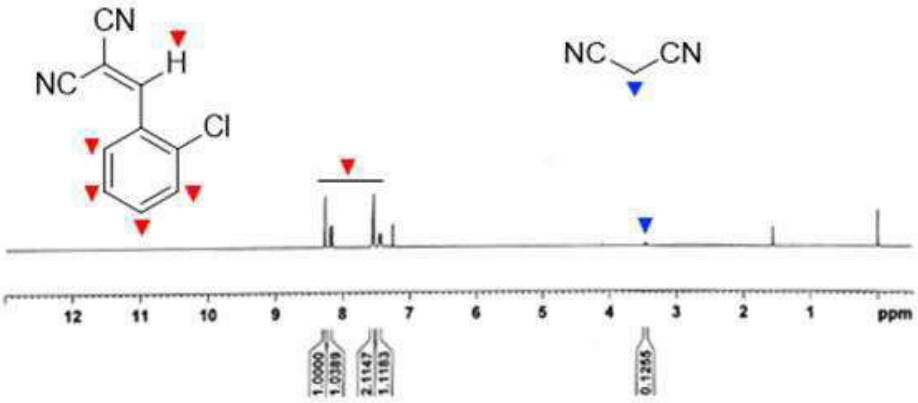
도면13



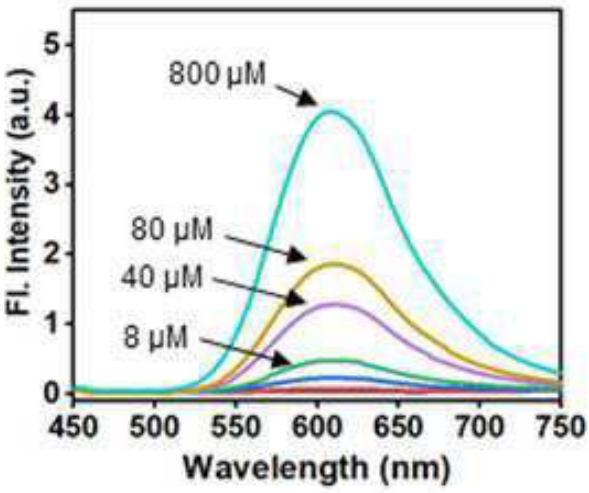
도면14



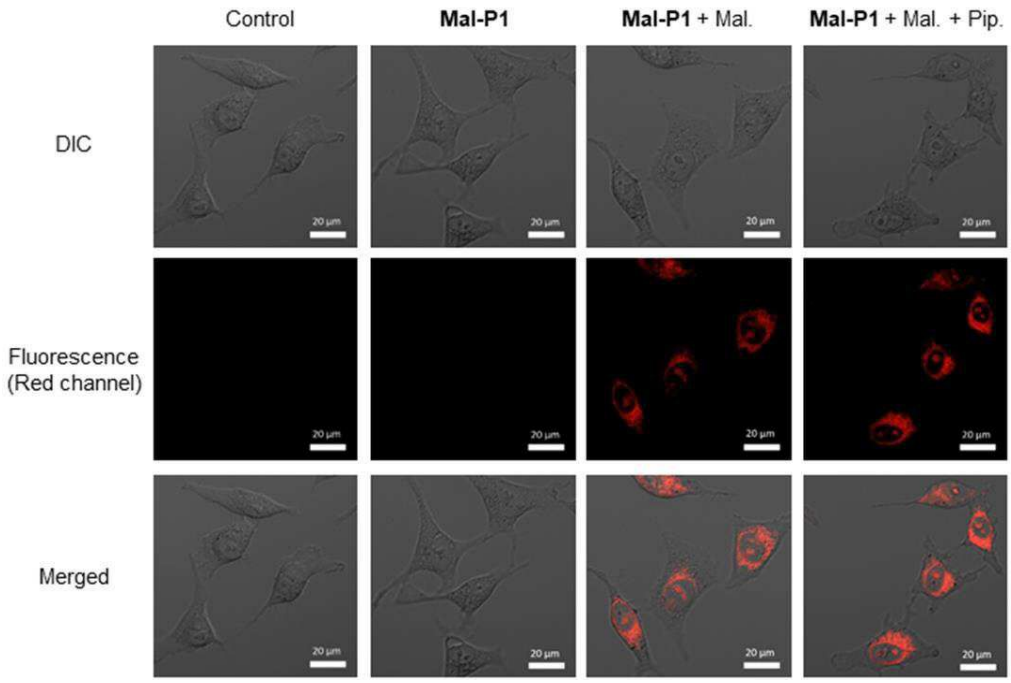
도면15



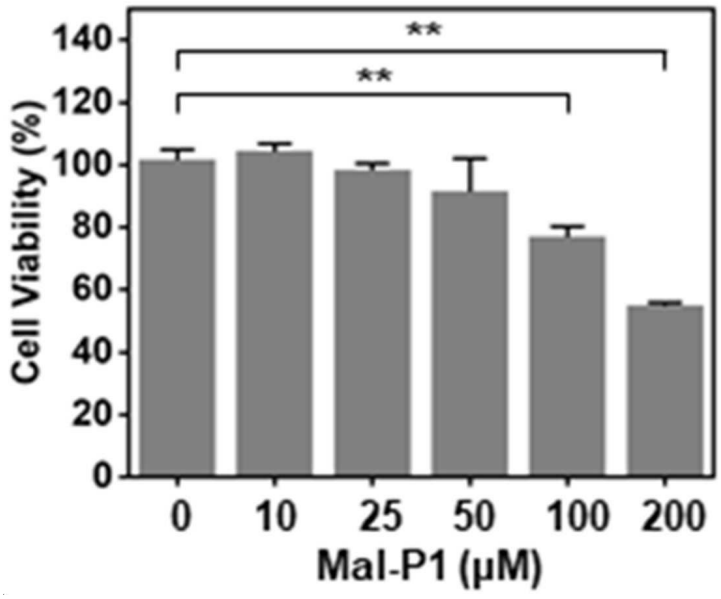
도면16



도면17


Control
Mal-P1
Mal-P1 + Mal.
Mal-P1 + Mal. + Pip.
DIC
Fluorescence
(Red channel)
Merged
20 μm

도면18


Cell Viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
0
10
25
50
100
200
Mal-P1 (μM)