



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0134056
(43) 공개일자 2018년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/64 (2006.01) C07D 311/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/6428 (2013.01)
C07D 311/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0071457
(22) 출원일자 2017년06월08일
심사청구일자 2017년06월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김원영
서울특별시 마포구 손기정로 24, 5층
정효성
서울특별시 강남구 선릉로 221, 304동 1204호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

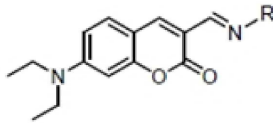
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 유기용매 내 수분 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 수분 검출 형광 센서

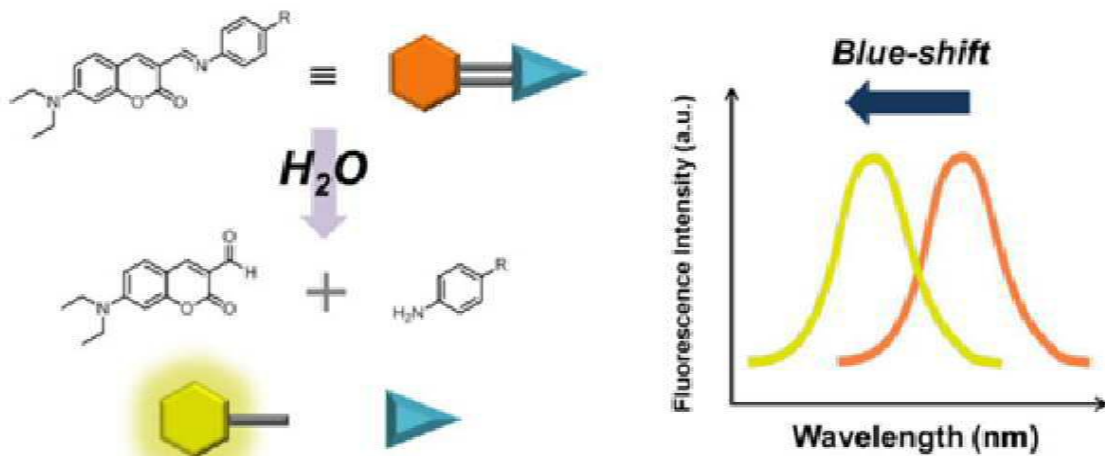
(57) 요약

본 발명은 하기 [화학식 I]로 표시되고, 유기용매 내 수분 검출용 형광 프로브 화합물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 쿠마린 골격에 가수분해에 의해서 해리가 가능한 시프-염기를 도입하여 수분의 형광 검출이 가능한 쿠마린계 프로브 화합물 및 이를 포함하는 형광 센서에 관한 것이다.

[화학식 I]



대표도 - 도1



(72) 발명자

피터 베르비스트

서울특별시 성북구 안암로 87, 202호

김중승

경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호

이진용

경기도 수원시 장안구 화산로 85, 119동 404호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016004821

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 [이지바로] 발광센서 재료 연구단

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015058789

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)학문후속세대양성_대통령 Post-Doc 펠로우십(이공)

연구과제명 차세대 항암치료를 위한 표적지향형 테라노스틱 광역학치료제 개발

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

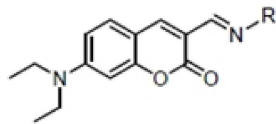
명세서

청구범위

청구항 1

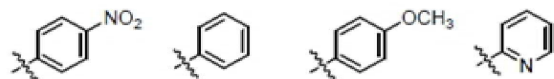
하기 [화학식 I]로 표시되는 유기용매 내 수분 검출용 형광 프로브 화합물:

[화학식 I]



상기 [화학식 I]에서, R은 하기 [구조식 1] 중에서 선택되는 어느 하나이다.

[구조식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R은 수분 존재 하에서 가수분해되어 [화학식 I] 화합물의 형광 이동(fluorescence shift)을 유도하여 형광발광을 일으키는 것을 특징으로 하는 유기용매 내 수분 검출용 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 유기용매 내 수분 검출용 형광 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유기용매 내 수분 검출용 형광 프로브 화합물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 쿠마린 골격에 가수분해에 의해서 해리가 가능한 시프-염기를 도입하여 수분의 형광 검출이 가능한 쿠마린계 프로브 화합물 및 이를 포함하는 형광 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 물은 대부분의 유기 용매에서 전형적인 오염물질이며, 대개 건조 공정이 보장되어야 하는 화학 반응 및 산업 생산 공정에서 방해물로 취급된다. 결정적으로, 화학 생산 공장의 공정 조건 하에서, 특히 정제 산업의 경우에 있어, 물은 금속 부식을 유도하고 금속계 시료를 퀀칭시키며, 촉매의 비활성화와 저하를 유발할 수 있다. 그렇기 때문에, 유기 매질에서의 물의 검출 및 정량화는 매우 중요한 사항이다.

[0003] 현재, 가스 스트림 또는 액상에서 물 함량의 정량화에 대한 전통적인 방법이 널리 알려져 있지만, 작업 및 장치 비용 그리고 이의 시간-소모적인 특성과 같은 많은 문제점들이 존재한다. 최근에, 물 함량을 검출하기 위한 광학 센서가 먼 거리 및 원위치 감지 그리고 비용-효율적인 제작으로 인해 지속적인 관심을 받고 있다.

[0004] 형광 지시체는 이의 높은 민감도로 인해 큰 주목을 받아왔으며, 광-유도 전자 전이, 분자내 전하 전이, 양성자 전이, 염료의 물-유도 탈착물, 물-유도 공중합체 π -적층 응집, 용매화 발색 현상 등과 같은 감지 메커니즘을 이용하여 형광 센서의 개발에 전념하고 있다.

[0005] 특히 흥미로운 부류의 수 친화성 화합물질은 시프 염기이다. 수성 환경에서 잘 알려진 시프 염기의 불안정성,

일반적으로 낮은 제조 비용 및 제조 용이성으로 인해, 이러한 타입의 결합을 포함하는 센서가 수 활성화 형광체의 설계에 있어서 주요 관심사항이 되고 있다. 그럼에도 불구하고, 지금까지 3,5-디클로로살리실알데하이드 시프 염기로 구성된 수-촉진 화학정량계(chemodosimeter)라는 유일한 예시만이 보고된 바 있으며, 이러한 부류의 수분 센서 활성화에 대해서 구조적 변경 영향을 조사하는 충분한 연구가 수행된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

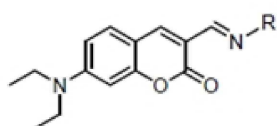
[0006] 따라서, 본 발명의 발명자들은 시프 염기를 함유한 쿠마린계 형광체의 소규모 라이브러리의 구조-활성 관계에 대하여 연구하였으며, 분자 설계에 있어, 쿠마린을 형광체 골격으로 사용하였고, 아닐린과 피리딘의 유도체들을 시프 염기로 도입한 결과, 이러한 유도체가 형광 이동(fluorescence shift)을 유도하는 콘쥬게이션을 확장시키고 형광 강도를 강화시킬 수 있다는 점을 확인하였다.

[0007] 따라서, 본 발명은 유기 용매 내에 수분이 존재시에 가수분해에 의해서 시프-염기의 해리를 일으켜 형광 관찰이 가능한 유기용매 내 수분 검출용 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 수분 검출 형광 센서를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서, 하기 [화학식 I]로 표시되는 유기용매 내 수분 검출용 형광 프로브 화합물을 제공한다.

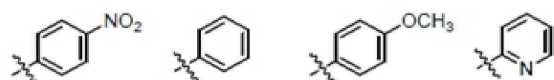
[0009] [화학식 I]



[0010]

[0011] 상기 [화학식 I]에서, R은 하기 [구조식 1] 중에서 선택되는 어느 하나이다.

[0012] [구조식 1]



[0013]

[0014] 본 발명에 따른 [화학식 I] 화합물에서, 상기 R은 수분 존재 하에서 가수분해되어 [화학식 I] 화합물의 형광 이동(fluorescence shift)을 유도하여 형광발광을 일으키는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명에 따른 [화학식 I] 화합물은 쿠마린을 형광체 골격으로 하면서, 아닐린과 피리딘의 유도체들을 시프 염기로 도입한 것을 특징으로 하고, 이러한 유도체가 형광 이동(fluorescence shift)을 유도하는 콘쥬게이션을 확장시키고 형광 강도를 강화시킨다.

[0016] 따라서, [화학식 I]로 표시되는 프로브 화합물을 함유하는 유기 용매 중의 물의 존재는 시프-염기의 해리를 일으켜 색 및 형광에서의 관찰가능한 변화를 유도한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 [화학식 I]에 따른 프로브 화합물을 포함하는 유기용매 내 수분 검출용 형광 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 쿠마린계 프로브 화합물은 가수분해 메커니즘에 의해서 해리되는 시프 염기(schiff base)를 도입하여 유기용매 내에 물 존재시 매우 우수한 감도로 형광 변화 관찰이 가능한 바, 다양한 유기 용매 내에서 수분의 존재를 정량적으로 검출할 수 있는 수 검출 형광센서로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명에 따른 유기용매 내의 수(물) 검출 프로브의 개념을 나타낸 개념도이다.
- 도 2a 내지 2f는 각각 본 발명의 합성에 1 내지 6에 따른 [화학식 1] 내지 [화학식 6] 화합물의 ^1H NMR 스펙트럼 (400 MHz, CDCl_3)이다.
- 도3a 내지 도 3b는 각각 본 발명의 합성에 5에 따른 [화학식 5] 화합물의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (400 MHz, CDCl_3) 및 ESI-MS 스펙트럼이다.
- 도4a 내지 도 4b는 각각 본 발명의 합성에 6에 따른 [화학식 6] 화합물의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (400 MHz, CDCl_3) 및 ESI-MS 스펙트럼이다.
- 도 5는 상온에서 수용액(2% DMSO) 중 수-검출 프로브 [3] 내지 [6] (10 μM)의 UV/Vis 흡수 스펙트럼이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 수-검출 프로브 [6]에 대한 가수분해 전후 ESI-MS 스펙트럼으로서, (a) [6]의 ESI-MS 스펙트럼이고, (b) 물을 첨가한 후 ESI-MS 스펙트럼이다.
- 도 7은 상온에서 여러 유기 용매(1% DMSO)에서의 프로브 [6] (10 μM)의 UV/Vis 스펙트럼 및 형광 방출 스펙트럼 ($\lambda_{\text{ex}} = 447 \text{ nm}$)이다.
- 도 8의 (a)는 상온에서 수용액(2% DMSO) 중 프로브들(10 μM)의 형광 스펙트럼($\lambda_{\text{ex}} = 402 \text{ nm}$ [3]; 456 nm [4]; 456 nm [5]; 447 nm [6])이고, (b)는 증류수 중에서 [4] 및 [6]의 가수분해에 대한 $\ln(I_{499,2} / I_{544,2} - I_{499})$ vs. 시간이며, (c)는 여러 버퍼 용액 중 [4] 및 [6]의 가수분해에 대한 속도 상수의 pH 의존을 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 본 발명에 따른 [4] 및 [6] 프로브의 결정구조((a) [4]; (b) [6])이다.
- 도 10은 산성, 중성 및 염기성 용액에서 본 발명에 따른 [4] (a) 및 [6] (b)의 가수 분해에 대한 에너지 프로파일이다(에너지는 kcal / mol 단위로 표시).
- 도 11의 (a) 0-10% (v/v)의 범위로 물 함량이 증가함에 따른 DMSO 중 [6]의 536 nm에서의 형광 강도를 기록한 그래프이고, (b)는 1.0% v/v 이하 범위의 선형 그래프($\lambda_{\text{ex}} = 459 \text{ nm}$, 평형 800s 후 기록된 데이터)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하에서는 본 발명에 따른 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다.

[0023] 실시예

- [0024] 가. 본 발명에 따른 쿠마린 유도체의 합성을 위한 모든 물질인, 4-(디에틸 아미노)살리실알데히드 (Aldrich), 디에틸말로네이트 (Aldrich), 피페리딘 (Aldrich), NaOH (Samchun), 아세트산 (Duksan), DMF (JTBaker), POCl_3 (Aldrich), 4-니트로아닐린 (Aldrich), p-아니시딘 (Aldrich) 및 2-아미노 피리딘 (Aldrich)을 각각 구입하여 별도의 정제없이 사용하였다.

- [0025] 또한, 모든 반응은 질소 분위기에서 수행되었으며, 실리카겔 60 (Merck, 0.063 ~ 0.2 mm)을 컬럼크로마토그래피를 고정상으로 사용하였고, 분석 박층크로마토그래피 Merk 60 F254 실리카겔 (0.25 mm 두께로 미리 코팅 된 시트)을 사용하여 수행하였다. ESI 질량 스펙트럼은 Shimadzu LC / MS-2020 시리즈 기기를 사용하였으며, ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian 300 및 400 MHz 분광기에서 CDCl_3 로 측정하였다. 또한, 화학적 이동은 TMS의 잔류 양성자 신호 피크를 내부 기준으로 사용하여 ppm 값으로 측정하였다.

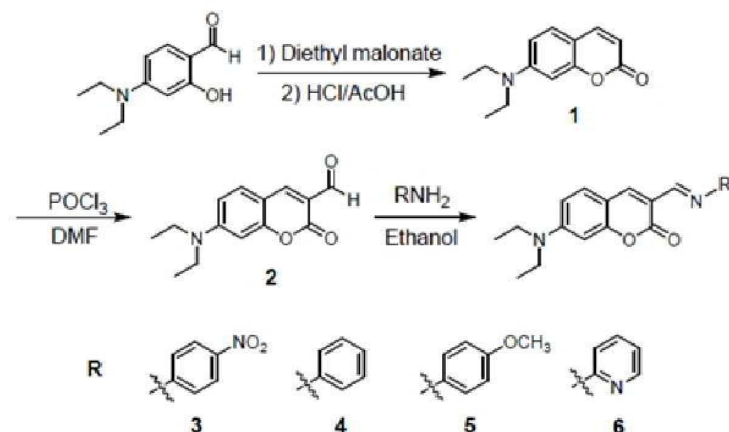
- [0027] **합성에 : 본 발명에 따른 수-검출 쿠마린 프로브의 합성**

- [0028] 본 발명에 따른 수-검출 쿠마린 프로브 [화학식 3] 내지 [화학식 6]은 하기 표시된 합성경로에 따라

합성하였다.

[0029]

먼저, 쿠마린 유도체 [1]을 4-(디에틸아미노)살리실알데하이드로부터 93%의 수율로 합성시키고, 이어서 빌스메이어-헤크(VilsmeierHaack) 조건을 사용하여 추가 반응이 가능할 수 있게 하는 알데하이드 작용기를 도입하여, 76%의 수율로 화합물 [2]를 제조하였다. 알데하이드기의 도입 후에, 무수 에탄올에서 화합물 [2]와 피리딘 유도체를 함유하는 아닐린과 아민을 반응시킴으로써 수분 민감성 이민 결합을 포함하는 프로브를 수득하였다.



[0030]

[0032] **합성예 1 : 7-디에틸아미노쿠마린 (7-diethylaminocoumarin) [1]의 합성**

[0033]

4-(디에틸아미노)살리실 알데히드 (1.0 당량, 1.93 g, 10 mmol)를 에탄올 40.0 mL에 용해시키고, 말론산디에틸 (2.0 당량, 3.12 mL, 20 mmol) 및 피 페리딘 (1.0 당량, 1 mL, 10 mmol)을 첨가한 후에, 반응 혼합물을 교반하고 밤새 가열 환류시켰다. 반응은 TLC로 모니터링 하였으며, 용매를 감압하에 제거한 후, 진한 HCl (20.0 mL) 및 빙초산 (20.0 mL)을 가수 분해를 위해 첨가한 후에 추가로 6 시간 동안 교반하였다. 용액을 냉각시키고 100 mL의 얼음물에 부은 후에 40 % NaOH 용액을 첨가하여 용액의 pH를 약 7로 조절 하였다. 30.0 mL의 디클로로메탄 용액에 첨가하고, 유기층을 물 (3 × 10.0 mL)로 세척하고, MgSO₄로 건조시킨 다음 진공 농축시켰다. 얻어진 생성물을 컬럼크로마토그래피 (에틸아세테이트/헥산=1 : 3)으로 정제하여 2.01 g (93 %)의 생성물을 수득하였다.

[0034]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.54 (d, J = 9.24 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 8.80 Hz, 1H), 6.56 (dd, J = 8.80, 2.52 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 2.52 Hz, 1H), 6.03 (d, J = 9.24 Hz, 1d), 3.41 (q, J = 7.08 Hz, 4H), 1.21(t, J = 7.08 Hz, 6H) ppm.

[0036]

합성예 2 : 7-디에틸아미노쿠마린-3-알데히드 (7-diethylaminocoumarin -3-aldehyde) [2]의 합성

[0037]

질소 분위기, 50 °C에서 건조된 DMF (3.00 당량, 2.14 mL, 27.79 mmol)를 POCl₃ (2.50 당량, 2.18 mL, 23.16 mmol)에 적가하고 30 분 동안 교반하여 적색 용액을 수득하였다. 상기 합성예 1에서 수득한 화합물 [1] (1.00 당량, 2.01 g, 9.26 mmol, 10.0 mL DMF에 용해됨)을 용액에 적가한 후에, 혼합물을 70 °C에서 12 시간 동안 교반한 후에 얼음물 100 mL에 부었다. 20 % NaOH 용액을 첨가하여 혼합물의 pH를 약 7로 조절하였다. 얻어진 생성물을 30.0 mL의 에틸아세테이트로 희석시키고, 유기층을 물 (3 × 10.0 mL)로 세척하고, MgSO₄로 건조시킨 후 진공 농축시킨 후에 생성물을 컬럼크로마토그래피 (에틸아세테이트/헥산=1 : 3)으로 정제하여 생성물 1.72 g (76 %)을 수득하였다.

[0038]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 10.12 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.41 (d, J = 9.04 Hz, 1H), 6.64 (dd, J = 9.04, 2.40 Hz, 1H), 6.48 (d, J = 2.40 Hz, 1H), 3.48 (q, J = 7.14 Hz, 4H), 1.26 (t, J = 7.14 Hz, 6H) ppm.

[0040]

합성예 3 : [화학식 3] 화합물의 합성

- [0041] 상기 합성예 2에서 수득한 화합물 [2] (1.00 당량, 150 mg, 0.61 mmol) 및 4-니트로아닐린 (1.20 당량, 102 mg, 0.74 mmol)을 건조된 에탄올 (5.0 mL)에서 혼합한 후 용액을 환류 조건하에 6 시간 동안 교반하였다. 용액을 냉각시키고 침전물을 여과하고, 에테르로 세척하고 에탄올을 이용하여 3 회 건조시켜 53.9 mg (24.11 %)을 얻었다.
- [0042] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.69 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.26 (d, J = 9.00 Hz, 2H), 7.43 (d, J = 9.00 Hz, 1H), 7.29 J = 5.76Hz, 2H), 6.66 (dd, J = 5.76, 2.34Hz, 1H), 6.52 (d, J = 2.34Hz, 1H), 3.48 (q, J = 7.16Hz, 4H), 1.26 t, J = 7.16Hz, 6H) ppm.
- [0044] **합성예 4 : [화학식 4] 화합물의 합성**
- [0045] 상기 합성예 2에서 수득한 화합물 [2] (1.00 당량, 153 mg, 0.62 mmol) 및 아닐린 (1.20 당량, 67.6 μL , 0.74 mmol)을 건조된 에탄올 (5.0 mL)에서 혼합한 후에 용액을 환류 조건하에 6 시간 동안 교반하였다. 용액을 냉각시키고 침전물을 여과하고, 에테르 및 건조 에탄올로 3 회 세척하여 생성물 104.4 mg (52.15 %)을 얻었다.
- [0046] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.72 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.39 (dd, J = 14.40, 8.50 Hz, 3H), 7.24 (d, J = 8.50 Hz, 3H) 6.63 (dd, J = 8.50, 2.52 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 2.52 Hz, 1H), 3.46 (q, J = 7.12 Hz, 4H), 1.25 (t, J = 7.12 Hz, 6H) ppm.
- [0048] **합성예 5 : [화학식 5] 화합물의 합성**
- [0049] 상기 합성예 2에서 수득한 화합물 [2] (1.00 당량, 143 mg, 0.58 mmol) 및 p-아니시딘 (1.26 당량, 90.4 mg, 0.73 mmol)을 건조된 에탄올 (5.0 mL)에서 혼합한 후에 용액을 환류 조건하에 6 시간 동안 교반하였다. 용액을 냉각시키고 침전물을 여과하고, 에테르 및 건조 에탄올로 3 회 세척하여 131.9 mg (64.56 %)의 생성물을 얻었다.
- [0050] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.72 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.40 (d, J = 8.84 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.84 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 8.84 Hz, 2H), 6.62 (d, J = 8.84 Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 3.45 (q, J = 7.20 Hz, 4H), 1.24 (t, J = 7.20 Hz, 6H) ppm.
- [0051] ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ 162.6, 158.5, 157.5, 152.7, 151.9, 144.8, 140.6, 130.9, 122.6, 115.7, 114.5, 109.7, 108.9, 97.3, 45.1, 12.6 ppm.
- [0052] ESI-MS : m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, 351.16; found 351.3
- [0054] **합성예 6 : [화학식 6] 화합물의 합성**
- [0055] 상기 합성예 2에서 수득한 화합물 [2] (1.00 당량, 549.9 mg, 2.24 mmol) 및 2-아미노피리딘 (1.00 당량, 207.0 mg, 2.20 mmol)을 건조된 에탄올 (20.0 mL)에서 혼합한 후에 용액을 환류 조건하에 6 시간 동안 교반하였다. 용액을 냉각시키고 침전물을 여과하고, 헥산 및 2-프로판올로 3 회 세척하여 생성물 123.2 mg (17.1 %)을 얻었다.
- [0056] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 9.25 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.49 (ddd, J = 4.83, 1.89, 0.78 Hz, 1H), 7.73 (dt, J = 7.92, 1.89 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 7.92 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.15 (dd, J = 7.92, 4.83, 1.05 Hz, 1H), 6.62 (dd, J = 7.92, 2.49 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 2.49 Hz, 1H), 3.46 (q, J = 7.14 Hz, 4H), 1.25 (t, J = 7.14 Hz, 6H) ppm.
- [0057] ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ 162.2, 161.9, 158.2, 158.1, 152.4, 149.2, 142.1, 138.2, 131.3, 121.6, 118.4, 115.0, 109.8, 108.9, 97.3, 45.2, 12.6 ppm.

[0058] ESI-MS : m/z calcd for $C_{19}H_{19}N_3O_2$ [M+H]⁺, 322.25; found 322.25.

[0060] 상기 합성에 1 내지 6에 따라 합성한 [화학식 1] 내지 [화학식 6]에 대한 1H NMR, ^{13}C NMR 및 ESI 질량분석을 하기 도 2 내지 도 4를 통하여 확인할 수 있다.

[0062] 실험예 1

[0063] 본 발명에 따른 수-검출 쿠마린 프로브 [화학식 3] 내지 [화학식 6]을 수성 DMSO 용액에서 시간-의존 비색분석 및 형광 분석하였다.

[0064] 프로브 [4] 내지 [6]의 최대 흡수도는 가수분해가 이루어지자 청색 이동을 나타내었고(적색 선에서 녹색 선으로 이동), 이와 대조적으로 프로브 [3]은 가수분해가 이루어지자 적색-이동을 나타내었다. 이민 결합의 완전한 분리 후에, 방출된 화합물 [2]는 436 nm에서 강한 흡수 강도를 보여주었다. 또한, 하기 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 프로브 [6]의 반응성은 다른 프로브들을 능가하였다. 프로브들의 형광 스펙트럼이 동일한 경향성을 나타냄에 따라 프로브 [6]을 수 감지 프로브(water-sensing probe)로서 추가 조사 및 평가 대상으로 선정하였고, 프로브 [6]의 가수분해를 추가로 ESI-MS로 분석하여 m/z 322.10에서 피크의 사라짐([6 + H]⁺와 상응)을 확인하였으며, m/z 246.05에서 새로운 피크가 나타났음([2 + H]⁺와 상응)을 확인하였다 (하기 도 6의 (a) 및 (b)).

[0066] 실험예 2

[0067] 다음으로, 다른 유기 용매에서 본 발명에 따른 수-검출 쿠마린 프로브 [화학식 6]의 UV 및 형광 스펙트럼을 조사하였다 (하기 도 7).

[0068] 하기 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 프로브 [6]의 흡수 영역은 약간의 용매 의존성만을 보여주었으나, 형광 스펙트럼은 파장 및 강도에 있어 극적인 변화를 보여주었다. UV/Vis 및 형광 스펙트럼으로 평가하였을 때 여러 유기 용매에서도 프로브의 안정성 우수하였으며, 이는 프로브 [6]이 다양한 유기 용매에서 수-검출 센서로 매우 유용하게 사용될 수 있음을 보여주는 것이다.

[0070] 실험예 3

[0071] 다음으로, 본 발명에 따른 수-검출 쿠마린 프로브 [3] 내지 [6]의 시간-의존 형광 강도를 모니터링하였고(하기 도 8), 미분학적 시간-의존 특성을 분석하고 수치화하기 위해 보다 상세하게 [4] 및 [6] 화합물에 대해서 조사하였다.

[0072] 시프 염기의 가수분해에 관한 동태는 유사-1차 운동 프로파일을 따른다고 알려져 있다. 이와 관련하여, 하기 식 (1)에 기재된 바와 같이, 반응물(R)의 가수분해 반응, 생성물(P)의 생성, 지수적으로 감소하는 반응물 농도의 1차 운동을 고려함과 동시에, 여기서 [R] 및 $[R]_0$ 는 반응물의 실제 농도 및 초기 농도값을 지닌다.

$$[R] = [R]_0 e^{-kt} \quad (1)$$

$$[R]_0 = [R] + [P] \quad (2)$$

$$I_\lambda = \epsilon_{\lambda,R}[R] + \epsilon_{\lambda,P}[P] \quad (3)$$

[0073]

[0075] 이러한 시스템은 이의 물질 수지에 의해 추가로 특징된다 (하기 식(2)). 이러한 시간 의존 반응에 있어, 특정 파장(λ) 및 특정 시간에서의 형광 강도 I_λ 는, 하기 식 (3)에 기재된 바와 같이 상대적 농도 및 방사율에 따른 반응물 및 생성물의 기여를 포함하여, 여기서 는 반응물과 생성물의 파장 의존 방사율이 된다.

[0076] 두 가지 상이한 파장(λ_1 및 λ_2)에서 특징지어지는 시스템에 있어, 주어진 시점에서 남아있는 반응물의 농도는 이러한 두 가지 파장에서 반응물과 생성물의 강도 및 방사율의 함수로 쓰여질 수 있다 (하기 식 (4)). 식 (4)와

식 (1)을 결합하여 식 (5)를 도출할 수 있는데, 시간 의존 형광도를 사용하는 비선형 회귀분석은 속도 상수(k)의 결정을 가능케 한다.

$$[R] = \frac{\epsilon_{\lambda 1, P} I_{\lambda 2} - \epsilon_{\lambda 2, P} I_{\lambda 1}}{\epsilon_{\lambda 1, P} \epsilon_{\lambda 2, R} - \epsilon_{\lambda 1, R} \epsilon_{\lambda 2, P}} \quad (4)$$

$$[R]_0 e^{-kt} = \frac{\epsilon_{\lambda 1, P} I_{\lambda 2} - \epsilon_{\lambda 2, P} I_{\lambda 1}}{\epsilon_{\lambda 1, P} \epsilon_{\lambda 2, R} - \epsilon_{\lambda 1, R} \epsilon_{\lambda 2, P}} \quad (5)$$

[0077]

[0079]

이러한 접근법을 이용하여, 프로브의 가수분해를 499 nm 및 544 nm에서 형광도를 관찰하였으며, 상기 파장들에서 프로브의 방사율은 $_{544,4} = 30.53$, $_{544,6} = 109.36$, $_{544,2} = 30.06$, $_{499,4} = 10.74$, $_{499,6} = 50.30$ 및 $_{499,2} = 97.64$ 로 측정되었다. 속도 상수를 측정하였으며, 증류수 중 [6] vs. [4]의 경우에 반응 속도에서 거의 2.6 배 이상 증가를 나타내었다.

[0081]

실험예 4

[0082]

또한, 본 발명에 따른 수-검출 프로브의 특성을 넓은 범위의 pH 값에서 추가로 평가하였으나, 산성 조건 하에서 프로브 [6]의 반응 속도가 정확한 측정값을 도출하기엔 너무 빨라서, 프로브 [6]의 속도 상수를 위한 pH 범위가 제한적이었고, 프로브 [4]에 반대되는 것을 이용하여 측정하였으며, 해당 속도 상수는 pH = 3 내지 13 범위에서 보고되었다 (하기 도 8의 (c)). 염기성 용액에서의 가수분해 속도는 빠르게 감소하였으나, [4] ($1.5 \sim 2$ 분⁻¹의 속도로)와 [6] (4분⁻¹ 초과의 측정 속도로) 둘 모두 산성 조건 하에서 크게 증가하였고, 이는 2-아미노티오펜올 시프 염기들의 pH 의존 가수분해 속도에 대해 이전에 알려진 경향성을 따른다.

[0083]

또한, 하기 도 9에 나타난 결정 구조에서 확인할 수 있는 바와 같이, 화합물 [4]는 쿠마린 모이어티와 수직의 방향족 고리를 보여주지만, [6]의 피리딘 고리는 쿠마린 형광체의 이민 결합과 평행하다. 이는 [6]의 피리딘 고리 상의 질소 원자가 수소 결합을 형성할 수 있고(도 9 (b)), 인접기 관여 효과(anchorimeric assistance)에 의해 이민 결합 가수분해에 영향을 미칠 수 있음을 의미하며, 이러한 인접기 관여 효과는 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸계 펩티드 커플링 시약의 반응 속도를 가속시킨다고 널리 알려져 있다.

[0085]

실험예 5

[0086]

본 발명의 발명자들은 pH 의존 반응 속도로의 보다 우수한 메커니즘적 확인과 인접기 관여 효과의 영향을 수치화하기 위하여, 산성, 중성 및 염기성 용액 조건에서 [6] 및 [4]와 물의 반응에 대한 DFT 및 TDDFT 계산을 수행하였다.

[0087]

초기 구조는 결정 구조로부터 선택되었다. 모든 계산들은 가우시안(Gaussian) 09 프로그램 모음을 사용하는 6-31G* 기초 세트와 함께 B3LYP 교환 범함수(exchange functional)로 수행되었다. 최적화된 구조에서, 쿠마린과 페닐/피리딘 고리 모이어티 간의 이면각은 12.2° [6]와 37.2° [4]인 것으로 계산되었으며, 결정에서의 조밀 효과(packing effect)로 인해 고체 상태에서 보다 강하게 나타날지라도, 이는 고체 상태 구조와 일치한다.

[0088]

[4], [6] 및 이의 생성물 [2]의 측정된 최대 흡수 파장은 427, 431 및 394 nm이며, 이는 각각 1.1848, 1.2420 및 0.8557의 진동자 강도(fab)의 450, 450 및 430 nm라는 실험값과 우수한 일치를 보여준다. [4], [6] 및 이의 생성물 [2]의 측정된 방출 파장은 각각, 1.1055, 1.4172 및 0.7805의 진동자 강도(fem)로 504, 476 및 408 nm였다. 형광 강도는, 흡수 및 방출의 진동자 강도의 생성물(fab×fem)과 비례해야 한다. 방출 최대 파장에서 [4], [6] 및 이의 생성물 [2]에 대한 fab×fem 값은 각각 1.3098, 1.7602 및 0.6679였다. 분자 방사율 값과 이러한 값을 비교함으로써, 분자 광물리 특성이 [4] 및 [6]의 용액에서는 유지되지만, [2]의 경우에는 일부 추가적인 용액 화학이 있음을 기대할 수 있다.

[0090]

실험예 6

[0091]

본 발명의 발명자들은 산성, 중성 및 염기성 용액 각각에서 본 발명에 따른 [4] 및 [6]의 가수분해에 대한 에너

지 프로파일을 계산하고 이를 하기 도 10에 나타내었다.

[0092] 반응 복합물(RC), 전이 상태(TS) 및 생성 복합물(PC) 모두가 주파수 계산 및 IRC 계산으로부터 확인되었다. 모든 경우에, 평형 과정(양자화 및 탈양자화)를 제외하고, 두 단계를 거쳐 가수분해가 진행된다. 제 1 단계는 이민 결합(C=N)으로의 물의 첨가이고, 제 2 단계는 알데하이드 및 아민으로의 헤미아미날(hemiaminal) 중간체의 해리이다. 산성 용액에서 제 2 해리 단계는 활성화 에너지가 불필요한 반면에, 제 1 물 첨가 단계는 염기성 용액에서 활성화 에너지가 불필요하다. 중성 용액에서, [4] 및 [6] 둘 모두에 있어, 수 첨가 단계가 속도결정단계이다. [6]의 가수분해를 위한 활성화 장벽은 [4]보다 낮은 것이 명백해 보이며, 이는 시간-의존 형광 변화로부터 얻은 동태 데이터와 일치한다.

[0093] 따라서, 비-촉매 반응이 염기성 용액에서 관찰된 반면에, 중성 용액과 비교하였을 때 크게 감소된 활성화 장벽으로부터 알 수 있듯이, 가수분해는 산성 용액에서 보다 향상될 수 있다고 결론지을 수 있다. 또한, 염기성 용액에서 실험적으로 관찰된 비-촉매 특성은 해리의 활성화 장벽 ([4] 및 [6] 각각 17.7 및 20.0 kcal/mol)이 중성 용액의 활성화 장벽 ([4] 및 [6] 각각 17.3 및 19.9 kcal/mol)과 사실상 동일하다는 사실로부터 지지된다. 가장 두드러진 특징은 가수분해가 산성 용액에서 훨씬 향상될 수 있다는 것과 [6]이 [4]보다 훨씬 빠르다는 것이다. 측정된 에너지 프로파일은 실험적으로 관찰된 pH 의존 동태와 우수한 일치도를 보여준다.

[0094] 따라서, 본 발명에 따른 프로브 [6]은 산성 용액에서의 수-검출 센서로서 가장 효과적으로 작동함을 알 수 있다.

[0096] 제 1 물 첨가 단계에서, [4]의 반응 복합물(RC)은 이민 결합과 수소 결합 네트워크에 관련된 두 개의 물 분자를 보여준다. [6]의 RC는 [4]와 유사하지만, 수소 결합을 통해 피리딘 고리의 질소 원자와 상호작용하는 추가 물 분자를 보여준다. [6]에서 추가 물 분자는 피리딘의 질소 원자가 수소 결합 네트워크를 파괴하지 않도록 차단기(blocking group)로서 역할을 수행한다. 이어서, 헤미아미날 중간체가 6원 고리를 함유하는 전이 상태(TS1)를 통해 형성된다. 최종적으로, 상기 중간체는 또한 6원 고리를 함유하는 전이 상태(TS2)를 거쳐 최종 생성물인 알데하이드와 아민으로 해리된다. 이민 결합 상의 자연적 결합 궤도(NBO) 개체군(전하)이 물 첨가 반응성에 대한 간단한 평가를 위해 사용될 수 있다. 이민 결합의 C와 N의 원자 전하는 각각 [4]에 대해서 0.106e 및 -0.481e이 되는 것으로 측정되었고, [6]에 대해서는 0.123e 및 -0.519e가 되는 것으로 측정되었다. 따라서, [6]의 보다 양성인 탄소에 대한 물 첨가가 [4]에 비해 보다 용이한 것으로 보인다. 산성 용액에서, 이민 결합의 질소 원자에서의 양자화는 이민 결합의 탄소 원자로부터 일부 전하 이동을 유발할 수 있으며, 이는 탄소를 보다 전자가 부족하게 만들어 이를 통해 물 첨가가 더 용이하게 해준다. 이러한 조건 하에서 이민 결합의 C 및 N의 원자 전하는 각각 [4]에 대해서 0.176e 및 -0.495e, 6에 대해서 0.184e 및 -0.519e인 것으로 측정되었다. 또한, 이민 결합의 N에서의 양자화는 물 첨가 후 질소 원자에서 축적되는 음전하를 안정화시킴으로써 장벽을 낮출 수 있다. 이러한 전하 재분배는 측정된 활성화 장벽과 일치한다.

[0098] 실험예 6

[0099] 본 발명의 발명자들은 최종적으로, DMSO 용액에서 물 함량의 측정에 있어 본 발명에 따른 프로브 [6]의 성능을 평가하였다.

[0100] 프로브 [6]을 DMSO 중 증가된 양의 물로 처리하였다. 459 nm에서 흥분되자, 536 nm에서 형광이 DMSO 중 010% v/v의 물 범위에서 감지되었다 (하기 도 11의 (a)). 프로브는 01% (v/v) 범위에서 우수한 선형 응답성을 보였고 (하기 도 11의 (b)), 이는 하기 식 (6) 및 식 (7)에서 정의된 검출 한계값(LOD) 및 정량 한계값(LOQ)의 측정이 가능케 하며, 식에서 σ 는 블랭크(blank)의 표준 편차이며, m은 검정 곡선의 기울기이다 (하기 도 11의 (b)).

$$\text{LOD} = \frac{3.3\sigma}{m} \quad (6)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{m} \quad (7)$$

[0101]

[0103] 따라서, DMSO 중 물에 대한 [6]의 LOD 및 LOQ는 0.18% 및 0.54% v/v인 것으로 측정되었으며, 이는 유기 용매에

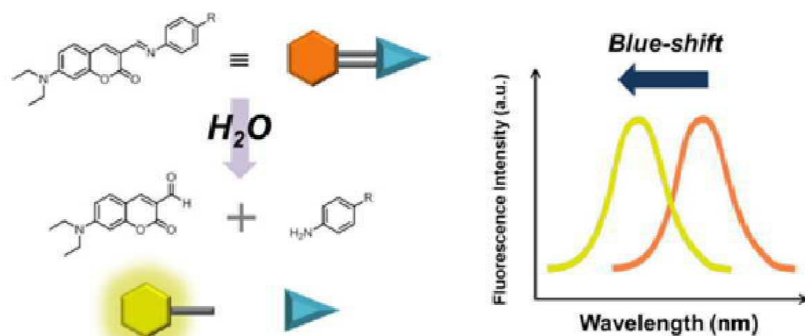
서 수분의 측정을 위한 형광체를 함유하는 이러한 타입의 시프 염기 중 매우 민감한 특성을 지님을 입증한다.

[0105] 결론적으로, 본 발명의 발명자들은 쿠마린계 수-검출 형광 센서용 화합물 프로브를 합성하였으며, 이들의 UV/Vis 및 형광 스펙트럼은 이러한 프로브들이 여러 유기 용매에서 안정적이고, 유기 용매 및 수용액에서 수분 함량에 민감하다는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명의 발명자들은 가장 효과적인 프로브 [4] 및 [6]에 대해 시간-의존 형광 변화를 관찰하였으며, 하나의 지수 감소라는 증거로부터 유사-1차 운동을 따른다는 점을 발견하였다. 여러 pH 수준에서 버퍼 용액 중 동태 실험은 [4] 및 [6]의 가수분해가 촉매효과를 나타내지 않는 염기성 용액에서와는 달리 산성 용액에서 현저하게 향상되었음을 밝혀냈다.

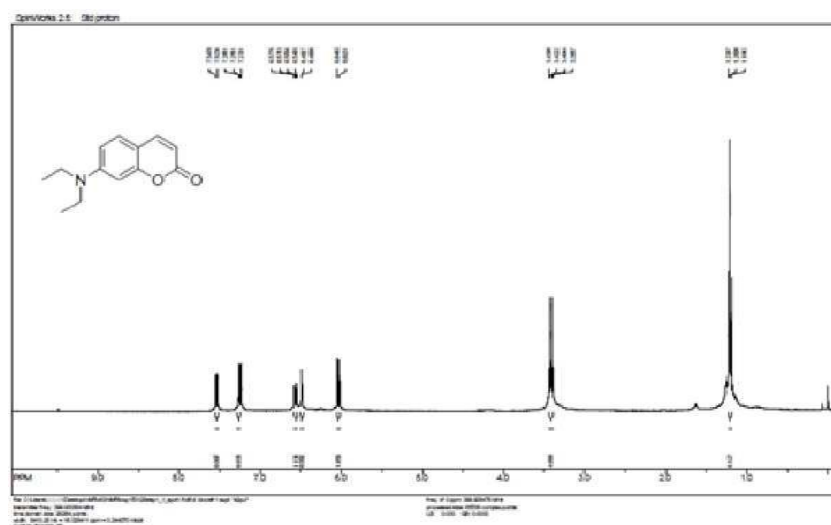
[0106] 따라서, 본 발명에 따른 프로브 [6]은 중성 또는 산성 pH에서 효과적인 잠재적 형광 수분 센서로 사용될 수 있음이 기대된다. 실험적으로 관찰된 동태는 결정 구조에서 고체 상태 형태의 분석 및 pH 의존에 관한 이론적 계산에 의해 타당한 결과를 보여주었다. 프로브가 DMSO 중 0.18% 및 0.54% v/v의 물 검출 한계(LOD) 및 정량 한계(LOQ)를 나타냄을 추가로 측정하였다. 이러한 결과들로부터, 가수분해 메커니즘을 통해 유기 용매에서 매우 민감한 수(물) 검출 센서로서, 형광체를 함유하는 시프 염기로의 뛰어난 가능성을 나타내고 있음을 확인할 수 있다.

도면

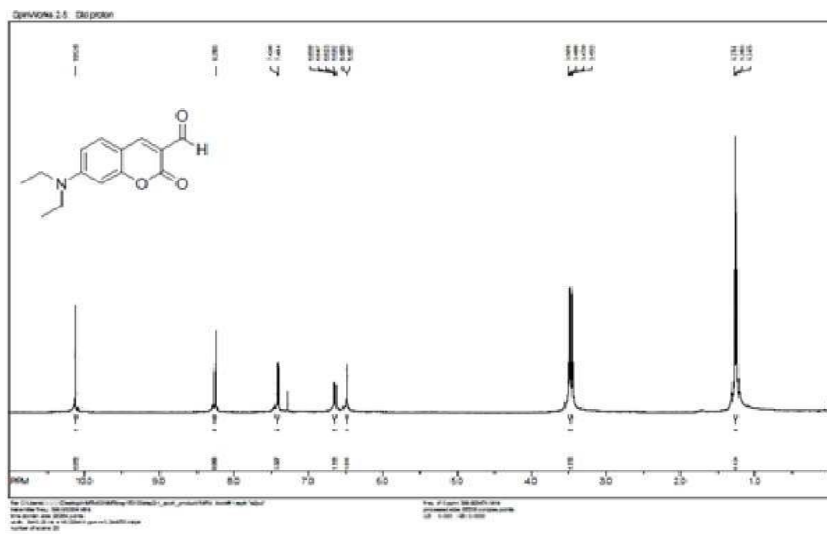
도면1



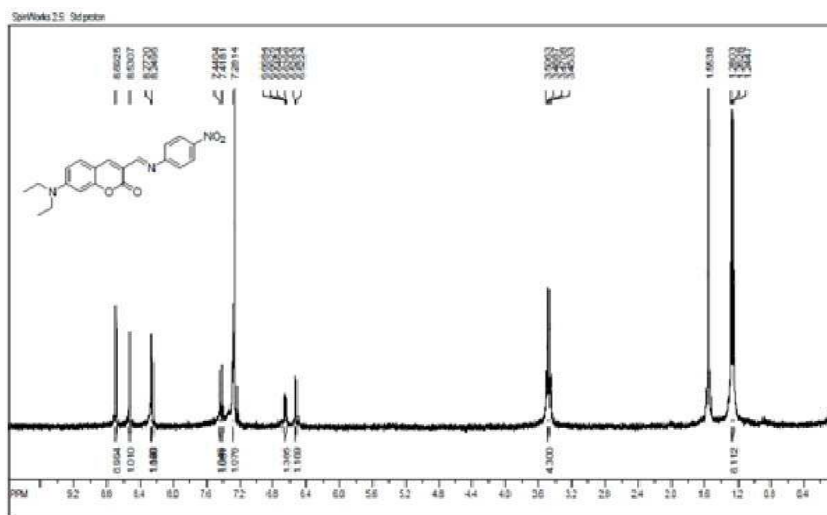
도면2a



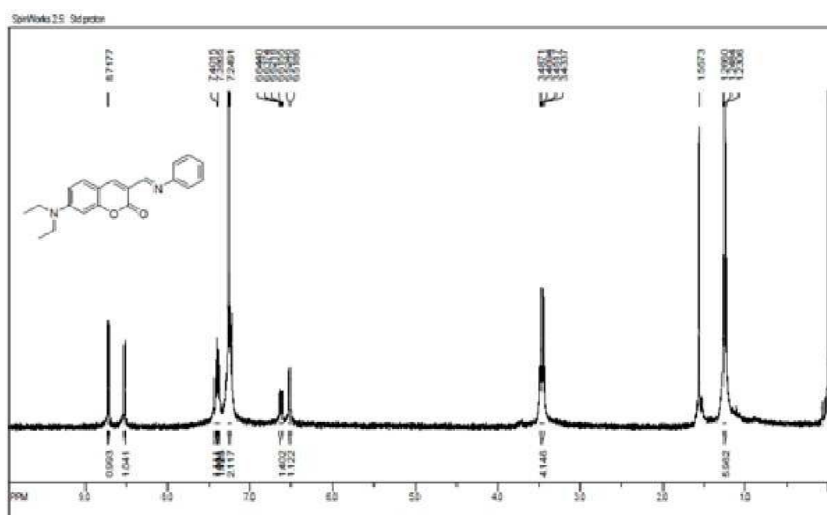
도면2b



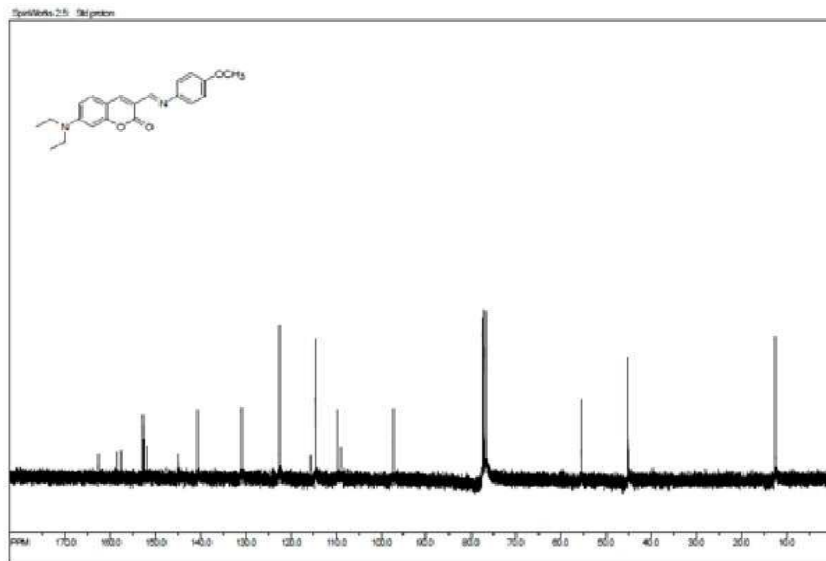
도면2c



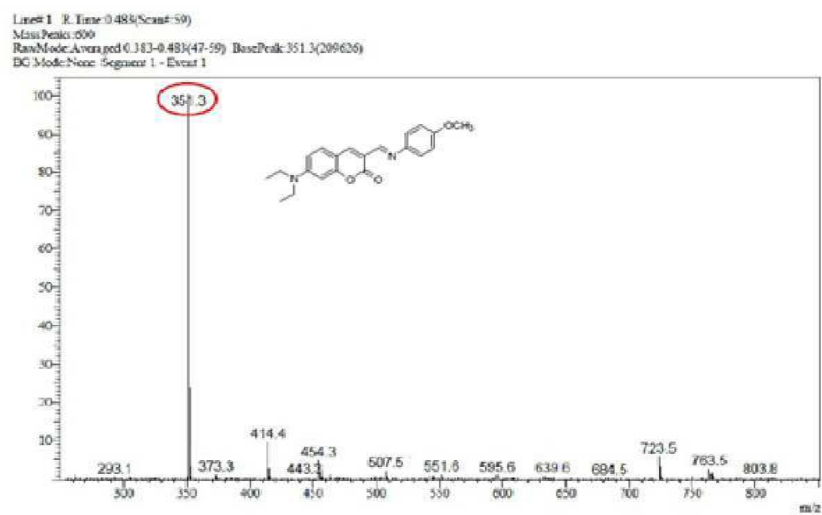
도면2d



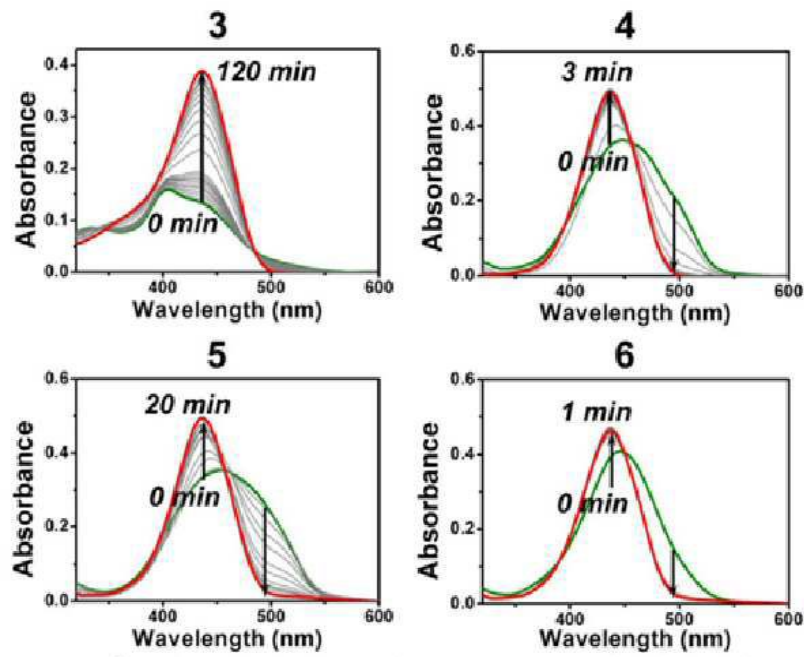
도면3a



도면3b

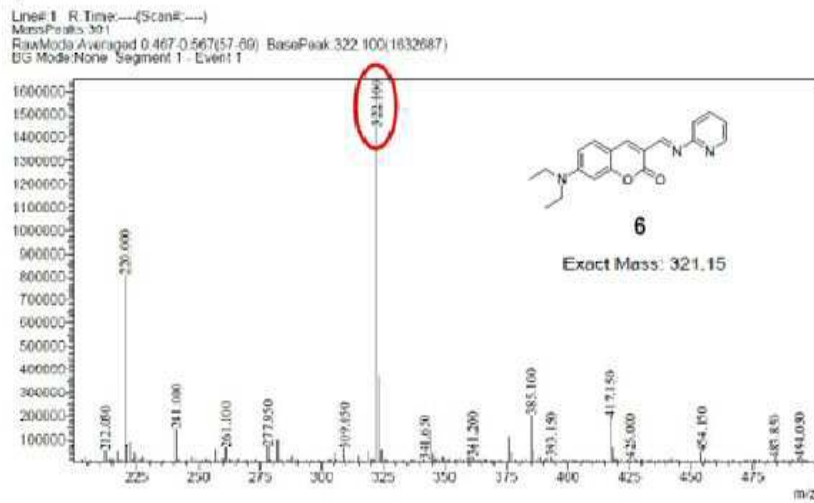


도면5

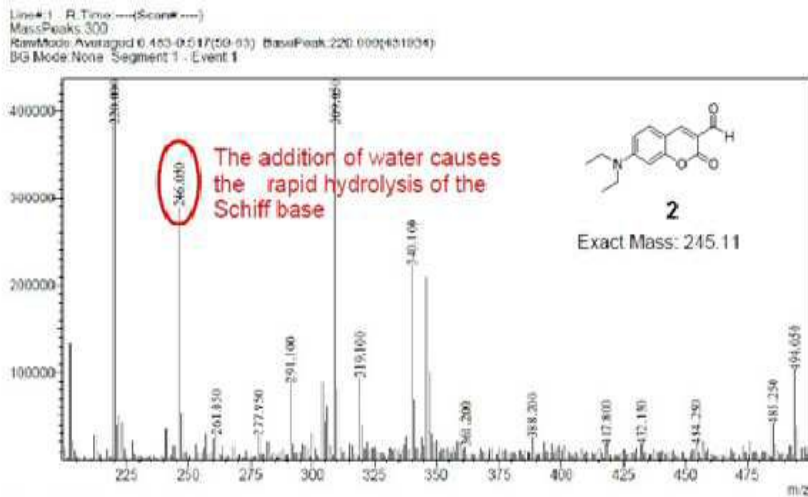


도면6

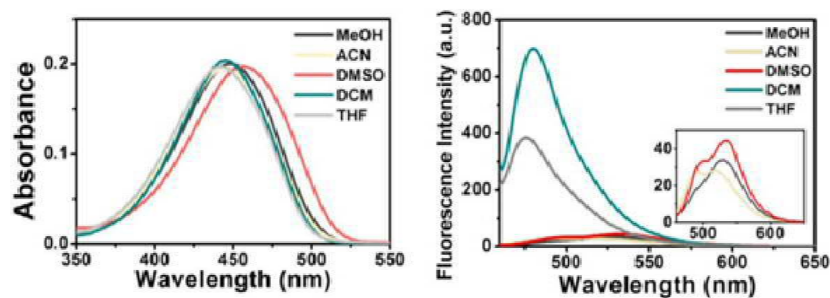
(a)



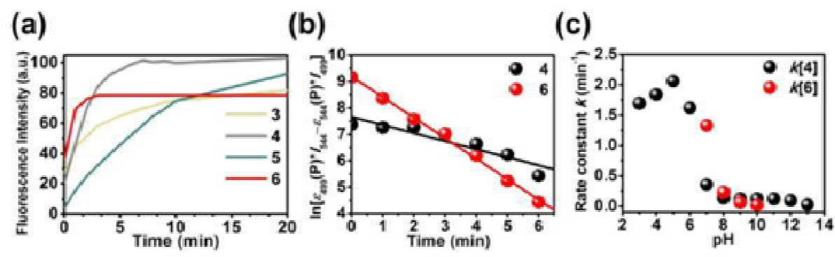
(b)



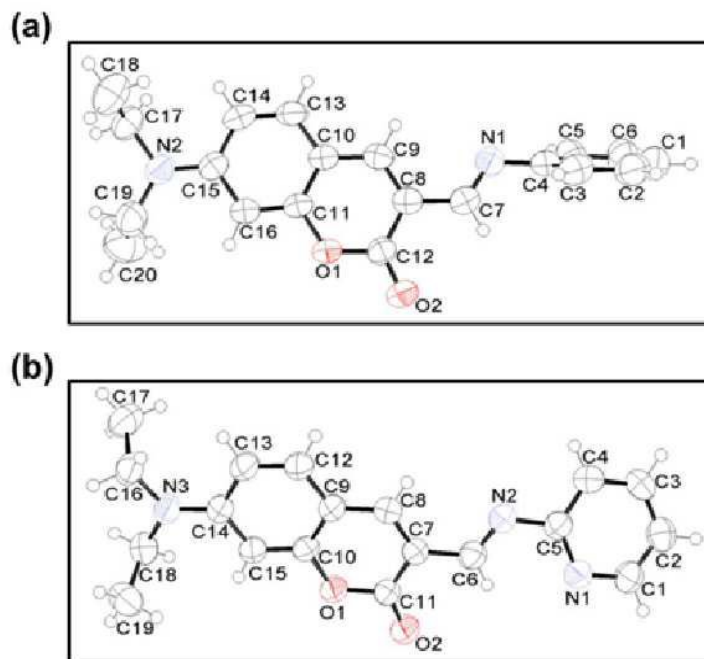
도면7



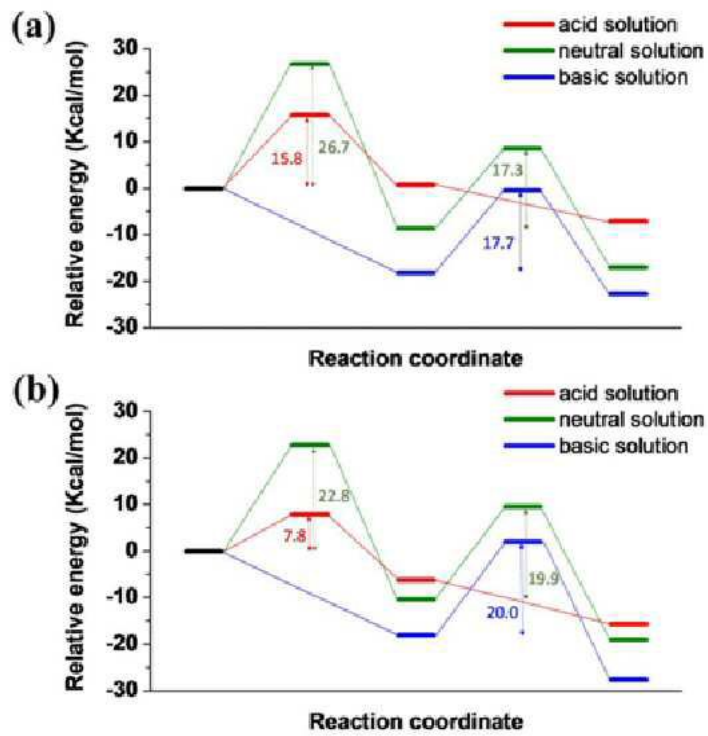
도면8



도면9



도면10



도면11

