



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월07일

(11) 등록번호 10-2131302

(24) 등록일자 2020년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07F 9/576 (2006.01) C09K 11/06 (2006.01)  
G01N 21/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C07F 9/5765 (2013.01)  
C09K 11/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0002993

(22) 출원일자 2019년01월09일

심사청구일자 2019년01월09일

(56) 선행기술조사문헌

CN107090002 A\*

KR101471527 B1

2: Ultra-sensitive and selective Hg<sup>2+</sup>  
chemosensors derived from substituted  
8-hydroxyquinoline analogues, New J. Chem.,  
38, 1072-1078(2013.12.16.)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이  
화여자대학교)

(72) 발명자

윤주영

서울특별시 용산구 이촌로 347, 2동 501호(서빙고  
동, 신동아아파트)

첸리옌

서울특별시 서대문구 이화여대길 52(대현동)

(74) 대리인

리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항

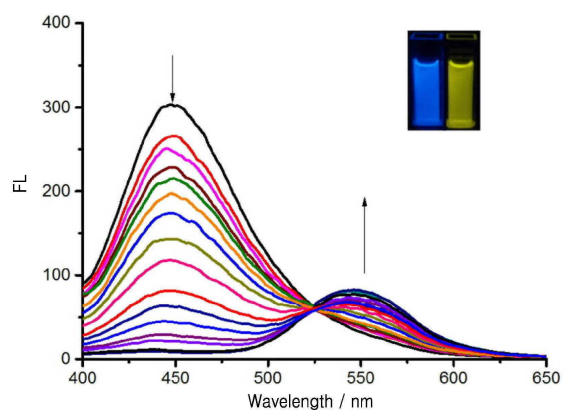
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 화합물, 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브 조성물, 상기 형광 프로브 조성물을 이용한 수  
은 이온 검출방법

### (57) 요약

화합물, 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브 조성물, 상기 형광 프로브 조성물을 이용한 수은 이온 검출방법을  
개시한다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

**G01N 21/64** (2013.01)

**G01N 33/52** (2013.01)

**C09K 2211/1022** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2-2012-1795-000-7

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구

연구과제명 다차원 유기소재연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2018.07.01 ~ 2019.04.30

공지예외적용 : 있음

---

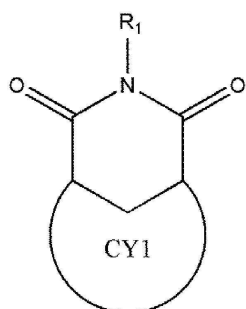
## 명세서

### 청구범위

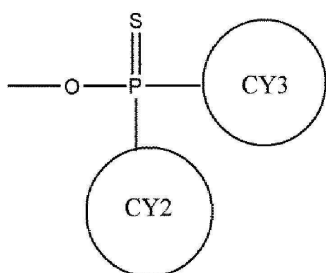
#### 청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

<화학식 1>



<화학식 2>



상기 화학식 1에서,

CY1은 상기 화학식 2로 표시되는 치환기를 적어도 하나 포함하는 나프탈렌 또는 안트라센 고리이며;

R<sub>1</sub>은 수소, 중수소, 또는 C1 내지 C40의 알킬기, C2 내지 C40의 알케닐기, C2 내지 C40의 알키닐기, C3 내지 C40의 시클로알킬기, C3 내지 C40의 시클로알케닐기, 또는 C7 내지 C40의 아릴기로 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기이며;

상기 화학식 2에서,

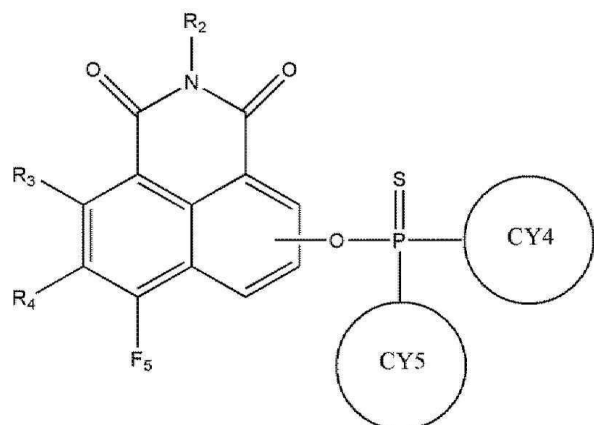
CY2 및 CY3은 서로 독립적으로 페닐 또는 나프탈렌 고리이다.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물이 하기 화학식 3 내지 화학식 5로 표시되는 화합물로부터 선택된 것인 화합물:

<화학식 3>



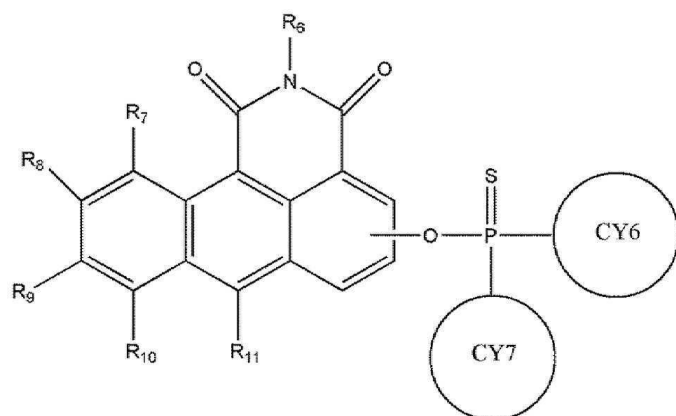
상기 화학식 3에서,

CY4 및 CY5는 서로 독립적으로 페닐 또는 나프탈렌 고리이며;

R<sub>2</sub>는 C1 내지 C40의 알킬기, C2 내지 C40의 알케닐기, C2 내지 C40의 알키닐기, C3 내지 C40의 시클로알킬기, C3 내지 C40의 시클로알케닐기, 또는 C7 내지 C40의 아릴기로 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기이며;

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>는 서로 독립적으로 수소 또는 중수소이다.

<화학식 4>



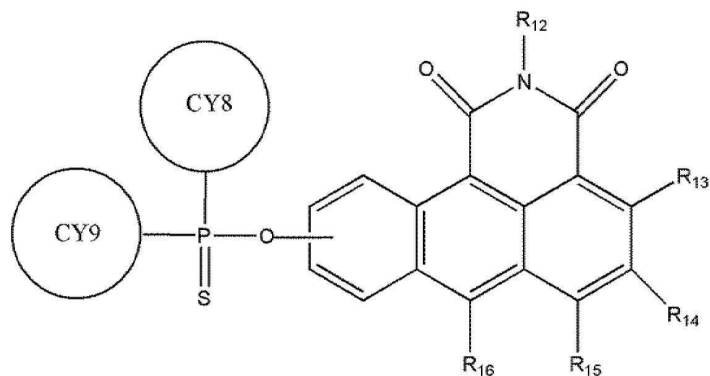
상기 화학식 4에서,

상기 CY6 및 CY7은 서로 독립적으로 페닐 또는 나프탈렌 고리이며;

R<sub>6</sub>은 C1 내지 C40의 알킬기, C2 내지 C40의 알케닐기, C2 내지 C40의 알키닐기, C3 내지 C40의 시클로알킬기, C3 내지 C40의 시클로알케닐기, 또는 C7 내지 C40의 아릴기로 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기이며;

R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>은 서로 독립적으로 수소 또는 중수소이다.

<화학식 5>



상기 화학식 5에서,

상기 CY8 및 CY9는 서로 독립적으로 페닐 또는 나프탈렌 고리이며;

R<sub>12</sub>는 C1 내지 C40의 알킬기, C2 내지 C40의 알케닐기, C2 내지 C40의 알키닐기, C3 내지 C40의 시클로알킬기, C3 내지 C40의 시클로알케닐기, 또는 C7 내지 C40의 아릴기로 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기이며;

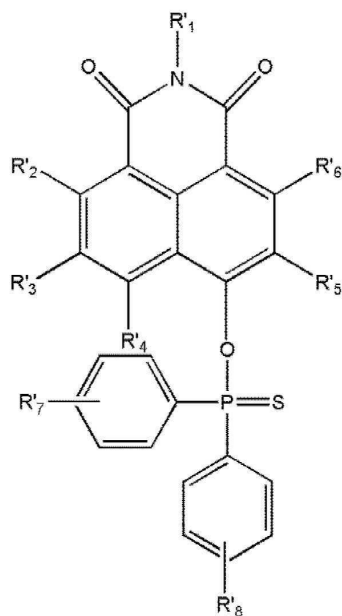
R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>은 서로 독립적으로 수소 또는 중수소이다.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물이 하기 화학식 6으로 표시되는 화합물:

<화학식 6>



상기 화학식 6에서,

R'<sub>1</sub>은 C1 내지 C40의 알킬기, C2 내지 C40의 알케닐기, C2 내지 C40의 알키닐기, C3 내지 C40의 시클로알킬기, C3 내지 C40의 시클로알케닐기, 또는 C7 내지 C40의 아릴기로 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기이며;

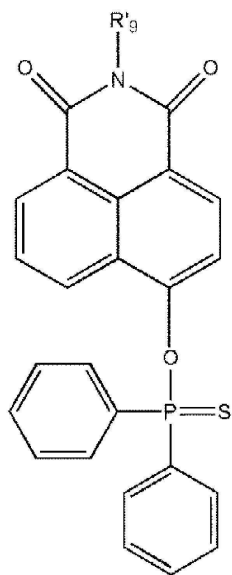
R'<sub>2</sub>, R'<sub>3</sub>, R'<sub>4</sub>, R'<sub>5</sub>, R'<sub>6</sub>, R'<sub>7</sub>, R'<sub>8</sub>은 서로 독립적으로 수소 또는 중수소이다.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화합물이 하기 화학식 7로 표시되는 화합물:

<화학식 7>



상기 화학식 7에서,

R'<sub>9</sub>는 C1 내지 C40의 알킬기, C2 내지 C40의 알케닐기, C2 내지 C40의 알키닐기, C3 내지 C40의 시클로알킬기, C3 내지 C40의 시클로알케닐기, 또는 C7 내지 C40의 아릴기로 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기이다.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 형광 프로브 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 형광 프로브 조성물은 고상 또는 액상인 형광 프로브 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 액상 형광 프로브 조성물은 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 형광 프로브 조성물.

#### 청구항 8

제5항에 있어서,

상기 형광 프로브 조성물은 이광자 현미경(two photon microscopy)용 형광 프로브 조성물.

#### 청구항 9

제5항에 있어서,

상기 형광 프로브 조성물은 생체 세포 및 생체 조직에서 수은 이온 검출용 색변환(colorimetric) 및 비율계량적(ratiometric) 센서인 형광 프로브 조성물.

#### 청구항 10

제5항에 따른 형광 프로브 조성물을 생체 세포 또는 생체 조직과 접촉시키는 단계;

상기 형광 프로브 조성물에 함유된 모이어티의 P-O 결합이 상기 생체 세포 및 생체 조직 내에 존재하는 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )에 의해 절단되어 반응 생성물을 발생하는 단계; 및

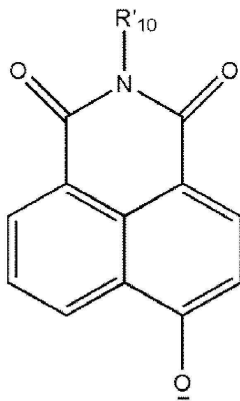
상기 반응 생성물이 나타내는 형광 신호를 측정하여 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )을 선택적으로, 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )의 농도를 비울계량적으로 감응하여 검출하는 단계;를 포함하는 수은 이온 검출방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 반응 생성물은 하기 화학식 8로 표시되는 형광단(fluorophore)인 수은 이온 검출방법:

<화학식 8>



상기 화학식 8에서,

$\text{R}'_{10}$ 은 C1 내지 C40의 알킬기, C2 내지 C40의 알케닐기, C2 내지 C40의 알키닐기, C3 내지 C40의 시클로알킬기, C3 내지 C40의 시클로알케닐기, 또는 C7 내지 C40의 아릴기로 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기이다.

#### 청구항 12

제10항에 있어서,

상기 형광 신호는 이광자 현미경에 의해 관측 가능한 수은 이온 검출방법.

#### 청구항 13

제10항에 있어서,

상기 수은 이온은 생체 세포 및 50 ~ 220  $\mu\text{m}$  깊이의 생체 조직 내에서 검출되는 수은 이온 검출방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 화합물, 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브 조성물, 상기 형광 프로브 조성물을 이용한 수은 이온 검출방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 수은은 화학산업에서 널리 응용되지만 독성이 강하기 때문에 인간의 건강과 환경에 위험하고 아주 흔한 위협이 되고 있다. 수은의 독성은 효소와 단백질에서 티올기에 대한 친화력이 강하기 때문에 인간에게 회복할 수 없는 심각한 피해를 입힐 수 있다.

[0003] 그러나 일반적인 전자 분광법, 가스 크로마토그래피, 질량 분광법, 전압전류법, 및 원자 흡수/방출 분광

법과 같은 방법은 순간 응답 시간, 조작의 단순성, 선택도 및 민감도 등의 측면에서 인간과 환경의 요구에 대해 부응하지 못하고 있다.

[0004] 따라서 환경 및 살아있는 종에서 수은을 선택적으로, 빠르게, 그리고 민감하게 검출하기 위한 새로운 전략 개발이 요구되고 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0005] 일 측면은 신규한 화합물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 측면은 상기 화합물을 포함하고 생체 세포 및 생체 조직에서 수은 이온 검출용 색변환(colorimetric) 및 비율계량적(ratiometric) 센서로서 기능하는 형광 프로브 조성물을 제공하는 것이다.

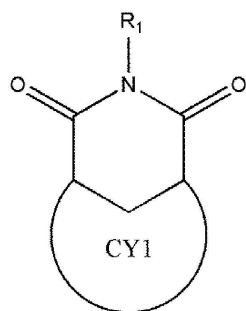
[0007] 또다른 측면은 상기 형광 프로브 조성물을 이용하여 수은 이온을 검출하는 수은 이온 검출방법을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0008] 일 측면에 따라,

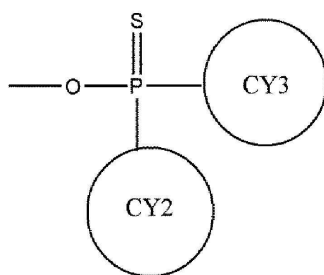
[0009] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 제공된다:

[0010] <화학식 1>



[0011]

[0012] <화학식 2>



[0013]

[0014] 상기 화학식 1에서,

[0015] CY1은 상기 화학식 2로 표시되는 치환기를 적어도 하나 포함하는 나프탈렌 또는 안트라센 고리일 수 있으며;

[0016] R1은 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알키닐기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

[0017] 상기 화학식 2에서,

[0018] CY2 및 CY3은 서로 독립적으로 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 방향족 고리일 수 있다.



- [0019] 다른 측면에 따라,
- [0020] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 형광 프로브 조성물이 제공된다.
- [0021] 또다른 측면에 따라,
- [0022] 전술한 형광 프로브 조성물을 생체 세포 또는 생체 조직과 접촉시키는 단계;
- [0023] 상기 형광 프로브 조성물에 함유된 모이어티의 P-O 결합이 상기 생체 세포 및 생체 조직 내에 존재하는 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )에 의해 절단되어 반응 생성물을 발생하는 단계; 및
- [0024] 상기 반응 생성물이 나타내는 형광 신호를 측정하여 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )을 선택적으로, 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )의 농도를 비율계량적으로 감응하여 검출하는 단계;를 포함하는 수은 이온 검출방법이 제공된다.

### 발명의 효과

- [0025] 일 측면에 따른 화합물은 형광 프로브 화합물을 제공한다. 또한 상기 형광 프로브 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 형광 프로브 조성물은 생체 세포 및 생체 조직에서 수은 이온 검출용 색변환(colorimetric) 및 비율계량적(ratiometric) 센서로 기능할 수 있다. 따라서 상기 형광 프로브 화합물을 이용하여 생체 세포 또는/및 생체 조직에서 수은 이온을 검출할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1a는 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 10  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물에 과염소산수은(II) 0-30  $\mu\text{M}$ 을 첨가한 혼합한 조성물에 대한 UV 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 1b는 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 10  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물에 과염소산수은(II) 0-30  $\mu\text{M}$ 을 첨가한 혼합한 조성물에 대한 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 2a 및 도 2b는 각각 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 10  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물 및 여기에  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , 및  $\text{Hg}^{2+}$ 의 금속 이온을 각각 200  $\mu\text{M}$  농도로 첨가한 혼합 조성물에 대한 형광 스펙트럼 및 형광 강도비( $F_{550}/F_{450}$ )를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3a는 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 10  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물과, 상기 NAP-PS 프로브 조성물에 과염소산수은(II) 20  $\mu\text{M}$ 을 첨가한 혼합 조성물에 대하여 시간에 따른 형광 강도비( $F_{550}/F_{450}$ )를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3b는 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 10  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물에 과염소산수은(II)을 0-6  $\mu\text{M}$ 을 첨가한 혼합 조성물에 대하여 유사 1차 역학 반응식(pseudo first order kinetics equation)에 기초한 플롯을 나타낸 것이다.
- 도 4A)는 합성에 1에 따라 합성된 고상 NAP-PS 프로브의 사진을 나타낸 것이며; 도 4B)는 상기 고상 NAP-PS 프로브에 소량의 과염소산수은(II)을 첨가하고 그라인딩한 혼합물에 대한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 5(a)는 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 5  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물로 30분간 배양한 HeLa 셀의 TPM을 이용한 형광 이미지이며; 도 5(b)는 30 분간 과염소산수은(II) 25  $\mu\text{M}$ 로 예비처리한 HeLa 셀의 TPM을 이용한 형광 이미지이며; 도 5(c)는 공지된 수은 킬레이트제인 TPEN (N, N, N', N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine)을 상기 과염소산수은(II)로 예비처리한 HeLa셀에 도입한 HeLa셀의 TPM을 이용한 형광 이미지이며; 도 5(d)는 염료 5  $\mu\text{M}$ 로 30분간 배양한 HeLa 셀의 TPM을 이용한 형광 이미지이며; 도 5(e)는 상기 도 5(a) 내지 도 5(d)의 HeLa 셀에 대하여 740 nm에서 여기 및 400-450 nm 방출 윈도우(청색)와 500-600 nm 방출 윈도우(노란색)를 이용한 평균 방출비( $F_{\text{yellow}}/F_{\text{blue}}$ )를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6(a)는 과염소산수은(II) 250  $\mu\text{M}$ 로 1 시간 예비처리하기 전에 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성

예 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 50  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물로 1 시간 배양한 쥐 간 슬라이스 형광 이미지이며; 도 6(b)는 과염소산수(II) 250  $\mu\text{M}$ 로 1 시간 예비처리한 후에 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 50  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물로 1 시간 배양한 쥐 간 슬라이스 형광 이미지이며; 도 6(c)는 상기 도 6(a) 및 도 6(b)의 쥐 간 슬라이스에 대하여 740 nm에서 여기 및 400-450 nm 방출 윈도우(청색)와 500-600 nm 방출 윈도우(노란색)를 이용한 평균 방출비( $F_{\text{yellow}}/F_{\text{blue}}$ )를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

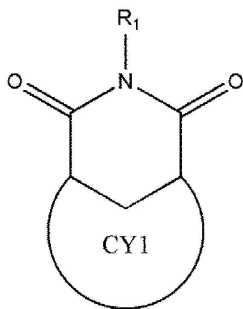
이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 일 구현예에 따른 화합물, 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브 조성물, 상기 형광 프로브 조성물을 이용한 수은 이온 검출방법에 관하여 상세히 설명하기로 한다. 이하는, 예시로서 제시되는 것으로서 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술할 특허청구범위의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

본 명세서에서 "포함"이라는 용어는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 추가 또는/및 개재할 수 있음을 나타내도록 사용된다.

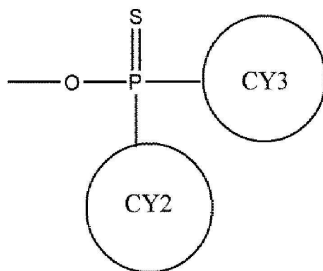
본 명세서에서 "이들의 조합"이라는 용어는 기재된 구성요소들 하나 이상과의 혼합 또는 조합을 의미한다.

일 구현예에 따른 화합물은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

<화학식 1>



<화학식 2>



상기 화학식 1에서,

CY1은 상기 화학식 2로 표시되는 치환기를 적어도 하나 포함하는 나프탈렌 또는 안트라센 고리일 수 있으며;

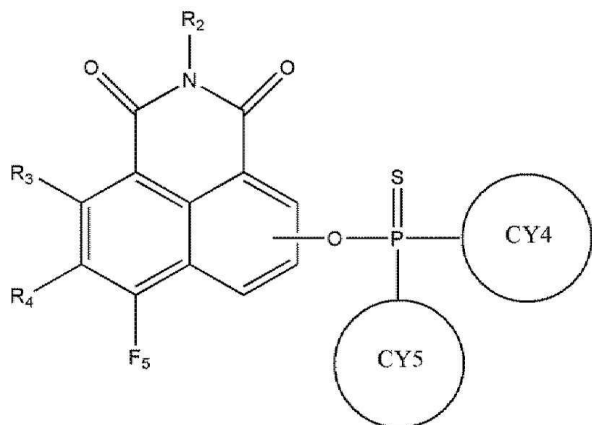
R<sub>1</sub>은 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알키닐기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

상기 화학식 2에서,

CY2 및 CY3은 서로 독립적으로 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 방향족 고리일 수 있다.

예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 3 내지 화학식 5로 표시되는 화합물로부터 선택된 것일 수 있다:

[0041] <화학식 3>



[0042]

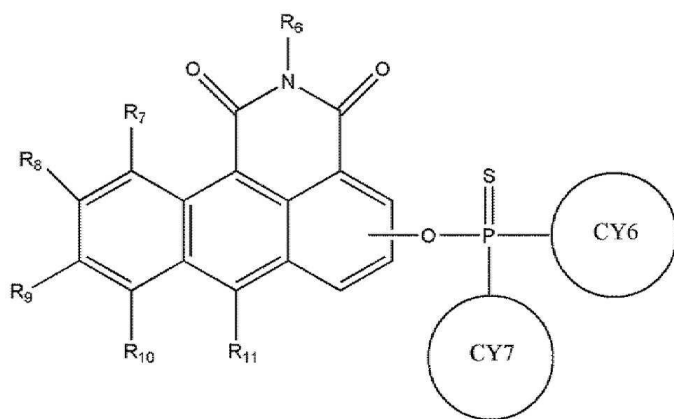
[0043] 상기 화학식 3에서,

[0044] CY4 및 CY5는 서로 독립적으로 치환 또는 비치환된 페닐 또는 나프탈렌 고리일 수 있으며;

[0045] R<sub>2</sub>는 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아마디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알킬닐기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

[0046] R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>는 서로 독립적으로 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아마디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알킬닐기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0047] <화학식 4>



[0048]

[0049] 상기 화학식 4에서,

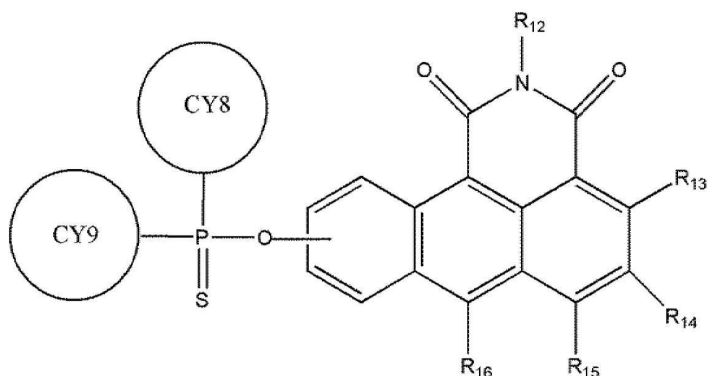
[0050] 상기 CY6 및 CY7은 서로 독립적으로 치환 또는 비치환된 페닐 또는 나프탈렌 고리일 수 있으며;

[0051] R<sub>6</sub>는 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아마디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알킬닐기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

[0052] R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>은 서로 독립적으로 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아마디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알킬닐기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 헤테로아

릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0053] <화학식 5>



[0054]

[0055] 상기 화학식 5에서,

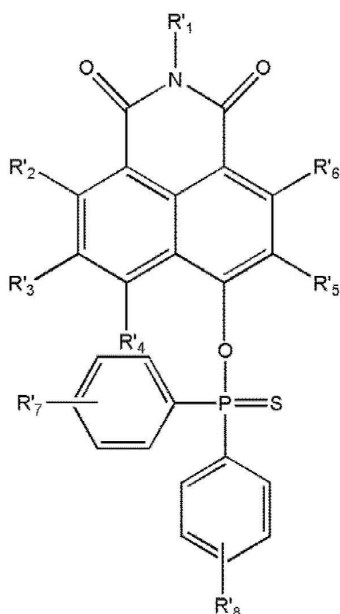
[0056] 상기 CY8 및 CY9는 서로 독립적으로 치환 또는 비치환된 페닐 또는 나프탈렌 고리일 수 있으며;

[0057] R<sub>12</sub>는 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알키닐기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

[0058] R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>은 서로 독립적으로 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알키닐기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0059] 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 6으로 표시될 수 있다:

[0060] <화학식 6>



[0061]

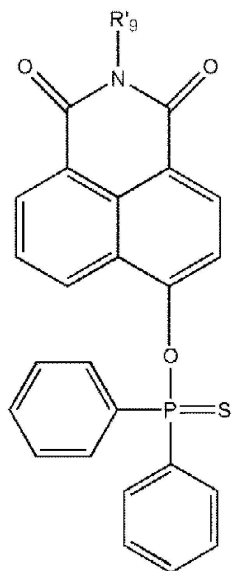
[0062] 상기 화학식 6에서,

[0063] R'<sub>1</sub>은 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알키닐기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

[0064]  $R'_2, R'_3, R'_4, R'_5, R'_6, R'_7, R'_8$ 은 서로 독립적으로 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록시기, 아미노기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C20의 알킬닐기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C20의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0065] 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 7로 표시될 수 있다:

[0066] <화학식 7>



[0067]

[0068] 상기 화학식 7에서,

[0069]  $R'_9$ 는 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기일 수 있다.

[0070] 상기 화학식 1 및 화학식 3 내지 화학식 7로 표시되는 화합물은 두 개의 C6 내지 C20의 방향족 고리로 연결된 포스피노티올(phosphinothioyl) 모이어티를 함유하는 나프탈이미드계 또는 안트라센이미드계 화합물일 수 있다. 상기 나프탈이미드계 또는 안트라센이미드계 화합물은 용액 및 살아있는 종의 세포 또는/및 조직에서 수은 이온을 선택적으로 검출할 수 있다. 상기 나프탈이미드계 또는 안트라센이미드계 화합물은 생체 세포 또는/및 생체 조직에서 세포 내의 수은 이온을 이광자 현미경을 이용한 색변환(colorimetric) 및 비율계량적(ratiometric)인 방법의 검출능을 갖고 있다.

[0071] 다른 일 구현예에 따른 형광 프로브 조성물은 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. 상기 형광 프로브 조성물은 고상 또는 액상일 수 있다. 상기 액상 형광 프로브 조성물은 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 액상 형광 프로브 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 액상 형광 프로브 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 액상 형광 프로브 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 상기 용매는 물, THF, 메탄올, 에탄올, HI 수용액, N,N-디메틸포름아미드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또는 상기 액상 형광 프로브 조성물은 시료(sample)와 혼합될 수 있다. 상기 시료는 미생물(microorganism), 세포(cell), 및 조직(tissue) 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 생물학적 시료일 수 있으나, 반드시 이들로 한정되지 않으며 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

[0072] 상기 형광 프로브 조성물은 이광자 현미경(two photon microscopy)용일 수 있다. 상기 형광 프로브 조성물은 광손상방지와 같은 광 안정성 및 심부 조직에 대한 이미징 능력이 우수하다.

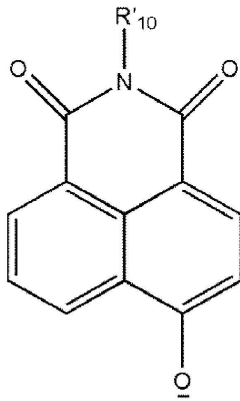
[0073] 상기 형광 프로브 조성물은 생체 세포 및 생체 조직에서 수은 이온 검출용 색변환(colorimetric) 및 비율계량적(ratiometric) 센서일 수 있다.

[0074] 또다른 일 구현예에 따른 수은 이온 검출방법은 전술한 형광 프로브 조성물을 생체 세포 또는 생체 조직과 접촉시키는 단계; 상기 형광 프로브 조성물에 함유된 모이어티의 P-O 결합이 상기 생체 세포 및 생체 조직 내에 존재하는 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )에 의해 절단되어 반응 생성물을 발생하는 단계; 및 상기 반응 생성물이 나타내는 형광 신호를 측정하여 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )을 선택적으로, 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )의 농도를 비율계량적으로 감응하여 검출하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0075] 상기 형광 프로브 조성물을 생체 세포 또는 생체 조직과 접촉시키면 상기 형광 프로브 조성물에 함유된 티오포스피네이트 모이어티의 P-O 결합이 상기 생체 세포 및 생체 조직 내에 존재하는 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )에 의해 절단되어 반응 생성물을 발생하게 된다.

[0076] 예를 들어, 상기 반응 생성물은 하기 화학식 8로 표시되는 형광단(fluorophore)일 수 있다:

[0077] <화학식 8>



[0078]

[0079] 상기 화학식 8에서,

[0080]  $\text{R}'_{10}$ 은 치환 또는 비치환된 C1 내지 C20의 알킬기일 수 있고, 예를 들어 치환 또는 비치환된 C1 내지 C15의 알킬기일 수 있고, 예를 들어 치환 또는 비치환된 C1 내지 C10의 알킬기일 수 있다. 상기 반응 생성물은 고해상도 질량 스펙트럼을 이용하여 확인할 수 있다.

[0081] 상기 형광 신호는 이광자 현미경에 의해 관측 가능하다.

[0082] 상기 수은 이온은 생체 세포 및 50 ~ 220  $\mu\text{m}$  깊이의 생체 조직 내에서 검출될 수 있다.

[0084] 본 명세서에서, 치환기는 치환되지 않는 모그룹(mother group)에서 하나 이상의 수소가 다른 원자나 작용기를 교환됨에 의하여 유도된다. 다르게 기재하지 않으면, 어떠한 작용기가 "치환된" 것으로 여겨질 때, 그것은 상기 작용기가 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 2 내지 40의 알케닐기, 탄소수 2 내지 40의 알키닐기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알킬기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알케닐기, 탄소수 7 내지 40의 아릴기에서 선택된 하나 이상의 치환기로 치환됨을 의미한다. 작용기가 "선택적으로 치환된다"고 기재되는 경우에, 상기 작용기가 상술한 치환기로 치환될 수 있다는 것을 의미한다.

[0085] 본 명세서에서, "탄소수 a 내지 b"의 a 및 b는 특정 작용기(group)의 탄소수를 의미한다. 즉, 상기 작용기는 a 부터 b까지의 탄소원자를 포함할 수 있다. 예를 들어, "탄소수 1 내지 4의 알킬기"는 1 내지 4의 탄소를 가지는 알킬기, 즉,  $\text{CH}_3-$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2-$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$ 를 의미한다.

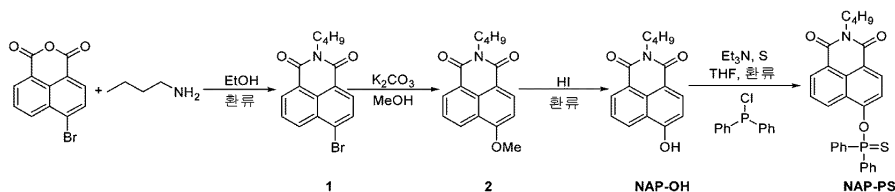
[0086] 본 명세서에서, "알킬"이라는 용어는 분지된 또는 분지되지 않은 지방족 탄화수소를 의미한다. 일 구현예에서 알킬기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 알킬기는 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, 펜틸기, 헥실기, 시클로프로필기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기, 시클로헵틸기 등을 포함하나 반드시 이들로 한정되지 않으며, 이들 각각은 선택적으로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 일 구현예에서 알킬기는 1 내지 6의 탄소원자를 가질 수 있다. 예를 들어, 탄소수 1 내지 6의 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소-부틸, sec-부틸, 펜틸, 3-펜틸, 헥실 등일 수 있으나 반드시 이들로 한정되지 않는다.



- [0087] 본 명세서에서, "알콕시"라는 용어는 각각 산소 원자에 결합된 알킬 또는 아릴을 의미한다.
- [0088] 본 명세서에서, "알케닐"이라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 말한다. 알케닐기의 비제한적인 예로는 비닐, 알릴, 부틸, 이소프로페닐, 또는 이소부틸 등을 들 수 있다.
- [0089] 본 명세서에서, "알키닐"이라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 말한다. 알키닐기의 비제한적인 예로는 에틸, 부틸, 이소부틸, 이소프로피닐 등을 들 수 있다.
- [0090] 본 명세서에서, "아릴"이라는 용어는 고리 골격이 오직 탄소만을 포함하는 방향족 고리, 고리 시스템(즉, 2개의 인접하는 탄소 원자들을 공유하는 2 이상의 융합된(fused) 고리), 또는 복수의 방향족 고리가 단일결합, -O-, -S-, -C(=O)-, -S(=O)<sub>2</sub>-, -Si(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)-(R<sub>a</sub> 및 R<sub>b</sub>는 서로 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기), 할로겐으로 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기, 또는 -C(=O)-NH-에 의하여 서로 연결된 고리를 의미한다. 아릴기가 고리 시스템이면, 상기 시스템에서 각각의 고리는 방향족이다. 예를 들어, 아릴기는 페닐기, 비페닐기, 나프틸기, 페날트레닐기(phenanthrenyl), 나프타세닐기(naphacenyl) 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 상기 아릴기는 치환되거나 비치환될 수 있다.
- [0091] 본 명세서에서, "헤테로아릴"이라는 용어는 N, O, P 또는 S 중에서 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 나머지 고리원자가 탄소인 모노시클릭(monocyclic) 또는 바이시클릭(bicyclic) 유기 화합물을 의미한다. 상기 헤테로아릴기는 예를 들어 1-5개의 헤테로원자를 포함할 수 있고, 5-10 고리 멤버(ring member)를 포함할 수 있다. 상기 S 또는 N은 산화되어 여러가지 산화 상태를 가질 수 있다.
- [0092] "헤테로아릴"의 비제한적인 예로는, 티에닐, 푸릴, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 1,2,3-옥사디아졸릴, 1,2,4-옥사디아졸릴, 1,2,5-옥사디아졸릴, 1,3,4-옥사디아졸릴, 1,2,3-티아디아졸릴, 1,2,4-티아디아졸릴, 1,2,5-티아디아졸릴, 1,3,4-티아디아졸릴, 이소티아졸-3-일, 이소티아졸-4-일, 이소티아졸-5-일, 옥사졸-2-일, 옥사졸-4-일, 옥사졸-5-일, 이소옥사졸-3-일, 이소옥사졸-4-일, 이소옥사졸-5-일, 1,2,4-트리아졸-3-일, 1,2,4-트리아졸-5-일, 1,2,3-트리아졸-4-일, 1,2,3-트리아졸-5-일, 테트라졸릴, 피리드-2-일, 피리드-3-일, 2-피라진-2일, 피라진-4-일, 피라진-5-일, 2- 피리미딘-2-일, 4- 피리미딘-2-일, 또는 5-피리미딘-2-일 등을 들 수 있다.
- [0093] 본 명세서에서, "히드록시기"는 -OH이다.
- [0094] 본 명세서에서, "아미노기"는 -NH<sub>2</sub>이다.
- [0095] 본 명세서에서, "카르복시기"는 -COOH이다.
- [0096] 본 명세서에서, "시아노기"는 -CN이다.
- [0097] 본 명세서에서, "니트로기"는 -NO<sub>2</sub>이다.
- [0098] 본 명세서에서, "아미디노기"는 -C(=NH)(NH<sub>2</sub>)이다.
- [0099] 본 명세서에서, "히드라지노기"는 -NHNH<sub>2</sub>이다.
- [0100] 본 명세서에서, "히드라조노기"는 =NHNH<sub>2</sub>이다.
- [0102] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 일 실시예일뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0104] [실시예]
- [0105] 달리 명시하지 않는 한, 하기 합성에 및 분석예에 사용된 재료들은 상업적 공급처로부터 구입하였고 추가 정제 없이 사용하였다. 모든 용매는 일반적인 방법에 따라 처리하였다. <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼은 Bruker AVANCE III 300 분광기(spectrometer, 300 MHz)를 이용하여 측정하였다. <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 75 MHz에서 프로톤 완전 디커플링법에 의해 기록하였다. 고해상도 질량 스펙트럼(High-resolution mass spectra; HRMS)은 Bruker Ultraflex Xtreme MALDI-TOF/TOF 질량 분광기(ESI사 제조)를 이용하여 측정하였다. 형광방출스펙트럼(Fluorescence emission spectra)은 RF-5301/PC 분광형광 광도계(spectrofluorophotometer)(Shimadzu사 제조)를 이용하여 얻

었다. UV 흡수 스펙트럼은 실온에서 1 cm 광학 경로 길이 셀을 이용하여 Scinco S-3100상에서 수행하였다.

# **합성예 1: NAP-PS 프로브 합성**



<반응스킴 1>

## **합성예 1-1: 화합물 1 합성**

화합물 1 (수율: 69%)을 다음과 같은 방법으로 합성하였다.

4-브로모-1,8-나프탈산 무수물 1.1 g (4.0 mmol, 1.0 eq) 및 n-부틸아민 0.5 mL (4.8 mmol, 1.2 eq)을 무수 에탄올 30 mL에 용해시키고 환류로 열처리하였다. TLC에 의해 전체 반응이 끝났는지 여부를 모니터링 한 후, 혼합물을 냉각시키고 점성 용액으로부터 천천히 고체를 침전시켰다. 결과물을 여과시키고 냉각 에탄올로 세척하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.73 - 8.63 (1 H, m), 8.63 - 8.55 (1 H, m), 8.43 (1 H, d,  $J = 7.9$ ), 8.06 (1 H, d,  $J = 7.9$ ), 7.90 - 7.80 (1 H, m), 4.19 (2H, dd,  $J = 8.5, 6.7$ ), 1.83 - 1.64 (2 H, m), 1.47 (2 H, dq,  $J = 14.7, 7.3$ ), 1.00 (3 H, t,  $J = 7.3$ )

## **합성예 1-2: 화합물 2 합성**

화합물 2 (수율: 67%)을 다음과 같은 방법으로 합성하였다.

화합물 1, 665 mg (2.0 mmol, 1.0 eq) 및  $\text{K}_2\text{CO}_3$  1.40 g (10.0 mmol, 5.0 eq)를 무수 메탄올 30 mL에 용해시켰다. 혼합물을 환류로 열처리하고 밤새 교반하였다. (TLC에 의해 모니터링한) 화합물 1을 전체 소모한 이후, 반응물을 냉각시켰다. 침전된 고체를 여과시키고 증류수로 여러 번 세척하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO): 8.57 - 8.54 (1 H, m), 8.53 - 8.50 (1 H, m), 8.49 - 8.43 (1 H, m), 7.85 - 7.75 (1 H, m), 7.33 (1 H, d,  $J = 8.4$ ), 4.13 (3H, s), 4.09 - 3.86 (2 H, m), 1.67-1.52 (2 H, m), 1.35 (2H, dq,  $J = 14.4, 7.3$ ), 0.90 (3 H, dt,  $J = 18.4, 7.2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO): 165.94, 164.29, 163.66, 161.05, 134.02, 131.77, 128.98, 127.14, 123.50, 122.65, 114.99, 107.03, 79.88, 57.35, 30.43, 20.51, 14.42

## **합성예 1-3: 화합물 NAP-OH 합성**

화합물 NAP-OH (수율: 63%)을 다음과 같은 방법으로 합성하였다.

화합물 2, 283 mg (1.0 mmol)을 농축 HI 수용액(57%) 20 mL에 용해시켰다. 혼합물을 환류로 열처리하고 밤새 교반하였다. 상기 혼합물을 냉각시킨 후, 상기 혼합물에 NaOH 수용액 (10%)을 pH가 거의 중성이 될 때까지 첨가하고 이후 천천히 고체를 침전시켰다. 상기 침전물을 여과시키고 물로 세척하여 화합물 NAP-OH를 얻었다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO): 11.87 (1 H, s), 8.58 - 8.51 (1 H, m), 8.50 - 8.44 (1 H, m), 8.3 (1 H, d,  $J = 8.2$ ), 7.83 - 7.70 (1H, m), 7.25 - 7.10 (1H, m), 4.26 - 3.73 (2 H, m), 1.58 (2H, dd,  $J = 14.9, 7.6$ ), 1.34 (2H, dd,  $J = 14.9, 7.4$ ), 0.92 (3 H, t,  $J = 7.3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO): 164.38, 163.71, 160.97, 134.26, 131.83, 129.90, 129.59, 126.32, 123.11, 122.54, 113.32, 110.69, 30.46, 20.52, 14.43

## **합성예 1-4: 화합물 NAP-PS 프로브 합성**

화합물 NAP-PS 프로브 (수율: 71%)을 다음과 같은 방법으로 합성하였다.

화합물 NAP-OH, 135 mg (0.5 mmol, 1.0 eq)을 아르곤 분위기 하에 무수 THF 20 mL에 용해시킨 반응물을 수득하였다. THF 5 mL에 용해시킨  $\text{PhPCl}_2$  0.36 mL (2.0 mmol, 4.0 eq) 및 트리에틸아민 0.5 mL을 5분간 상기 반응물에



적하하였다. 상기 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 이후 5 mL THF에 용해시킨 황 원소 65 mg (2.0 mmol, 4.0 eq)을 아르곤 분위기 하에 실온에서 상기 혼합물에 적하하였다. 상기 혼합물을 환류로 열처리하고 TLC 플레이트에 의해 모니터링하였다. 화합물 NAP-OH의 전체 소모 후에, 용매를 제거하고 알루미늄 클로라이드 중성 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0129]  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO): 8.65 - 8.55 (m, 1 H), 8.45 - 8.33 (m, 2H), 8.14 - 7.99 (m, 4H), 7.75 - 7.65 (m, 1H), 7.65 - 7.49 (m, 6H), 7.4 - 7.3 (m, 1H), 4.21 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.69 (dq,  $J$  = 15.0, 8.5, 6.4 Hz, 2H), 1.43 (dq,  $J$  = 14.7, 7.3 Hz, 2H), 0.96 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 164.35, 163.74, 134.31, 133.43, 132.93, 132.01, 131.92, 131.61, 131.52, 129.76, 129.21, 129.10, 128.90, 127.10, 126.21, 126.17, 123.05, 119.25, 117.53, 117.48, 40.46, 30.44, 20.61, 14.07; HRMS (ESI)  $m/z$  = 486.1302, calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{NO}_3\text{PS}$  = 486.1293

[0131] **분석예 1: 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )에 대한 NAP-PS 프로브의 분광 특성 - UV 흡수 스펙트럼 및 형광 스펙트럼 분석**

[0132] HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성예 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 10  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물에 과염소산수은(II) 0-30  $\mu\text{M}$ 을 첨가한 혼합 조성물에 대하여 UV 흡수 스펙트럼 분석을 하였고, 상기 NAP-PS 프로브 조성물에 과염소산수은(II) 0-65  $\mu\text{M}$ 을 첨가한 혼합 조성물에 대하여 형광 스펙트럼 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 1a 및 도 1b에 각각 나타내었다.

[0133] 상기 UV 흡수 스펙트럼 및 형광 스펙트럼은 각각 40분 동안 과염소산수은(II)을 상기와 같은 범위의 농도로 첨가하고 인큐베이션한 후 기록되었다.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 380 nm,  $\lambda_{\text{em1}}$  = 440 nm,  $\lambda_{\text{em2}}$  = 550 nm, Slits: 3/5 nm

[0134] 도 1a를 참조하면, 과염소산수은(II)을 첨가하기 전(0  $\mu\text{M}$ ) NAP-PS 프로브 조성물은 무색이었으며, 370 nm를 중심으로 하는 흡수 밴드를 나타내었다. 과염소산수은(II)이 30  $\mu\text{M}$  농도까지 첨가되는 동안 혼합 조성물은 무색에서 노란색으로 색이 변하였고(도 1a의 삽입 그림 참조), 흡수 피크가 450 nm로 점차 변하였다.

[0135] 도 1b를 참조하면, 과염소산수은(II)이 60  $\mu\text{M}$  초과 농도로 첨가될 때 혼합 조성물의 형광 강도비( $F_{550}/F_{450}$ )이 최대로 나타났으며, 수동 UV 램프 (365 nm) 하에 청색에서 녹색으로 점진적인 형광 방출 반응이 육안에 의해 관찰되었다(도 1b의 삽입 그림 참조).

[0137] **분석예 2: 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )에 대한 NAP-PS 프로브의 (비율계량적) 선택성 - 형광 스펙트럼 분석**

[0138] HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성예 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 10  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물 및 여기에  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , 및  $\text{Hg}^{2+}$ 의 금속 이온을 각각 200  $\mu\text{M}$  농도로 첨가한 혼합 조성물에 대하여 형광 스펙트럼 및 형광 강도비( $F_{550}/F_{450}$ ) 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 각각 나타내었다.

[0139] 도 2a를 참조하면, NAP-PS 프로브 조성물에  $\text{Hg}^{2+}$  금속 이온을 첨가한 혼합 조성물에 대해서만 450 nm에서 550 nm로 적색 편이된 형광 최대값을 갖는 상당한 비율계량적 응답을 유도하였다.

[0140] 도 2b를 참조하면, 형광 강도비( $F_{550}/F_{450}$ ) 분석을 살펴볼 때 NAP-PS 프로브 조성물에  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , 및  $\text{Ag}^+$ 의 금속 이온을 첨가한 혼합 조성물과 비교하여  $\text{Hg}^{2+}$ 의 금속 이온을 첨가한 혼합 조성물에 대한 선택성이 뚜렷하게 나타났다.

[0142] **분석예 3: 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )에 대한 NAP-PS 프로브 반응율(reaction rate) - 형광 스펙트럼 분석 등**

[0143] HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성예 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 10  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물과, 상기 NAP-PS 프로브 조성물에 과염소산수은(II) 20  $\mu\text{M}$ 을 첨가한 혼합 조성물에 대하여 시간에 따른 형광 강도비( $F_{550}/F_{450}$ ) 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 3a에 나타내었다.

[0144] 시간에 따른 형광 강도비( $F_{550}/F_{450}$ ) 분석은  $\lambda_{\text{ex}}$  = 380 nm, Slits: 3/5 nm로 수행하였다.

- [0145] 도 3a를 참조하면, NAP-PS 프로브 조성물은 550 nm에서 우수한 광 안정성을 나타내며 희미한 형광 강도가 나타났다. 상기 NAP-PS 프로브 조성물에 과염소산수(II) 20  $\mu$ M을 첨가한 혼합 조성물은 550 nm에서 방출강도가 시간에 따라 증가하며 20분 후에 최대 방출강도에 도달하였다.
- [0146] 또한 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 10  $\mu$ M을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물에 과염소산수(II)를 0-6  $\mu$ M을 첨가한 혼합 조성물에 대하여 유사 1차 역학 반응식(pseudo first order kinetics equation)에 기초한 플롯을 기록하였다. 그 결과를 도 3b에 나타내었다.
- [0147] 도 3b를 참조하면, 상기 혼합 조성물은 25°C에서 반응속도상수(rate constant)가  $9.9 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었다.
- [0149] **분석예 4: 고상 NAP-PS 프로브의 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ ) 검출능 - 사진 분석**
- [0150] 합성에 1에 따라 합성된 고상 NAP-PS 프로브(A)와, 상기 고상 NAP-PS 프로브에 소량의 과염소산수(II)를 첨가하고 그라인딩한 혼합물(B)에 대하여 사진을 찍었다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0151] 도 4를 참조하면, 합성에 1에 따라 합성된 고상 NAP-PS 프로브(A)는 흰색 분말이었고, 상기 고상 NAP-PS 프로브에 소량의 과염소산수(II)를 첨가하고 그라인딩한 혼합물(B)은 점차 노란색으로 변하였다.
- [0152] 이로부터, 고상 NAP-PS 프로브도 수은 이온( $\text{Hg}^{2+}$ )에 대한 검출능이 우수함을 확인할 수 있다.
- [0154] **분석예 5: NAP-PS 프로브의 바이오 이미징 - 이광자 형광현미경(two-photon fluorescence microscopy) 분석**
- [0155] 이광자 형광현미경(TPM) 이미지는  $\times 40$  배율을 갖는 Leica TCS SP8 MP 다광자 현미경에 의해 얻었다. NAP-PS 프로브는 Mai Tai HP 모드잠금(mode-locked) 펄스초(femtosecond) 티타늄: 사파이어 레이저 소스에 의해 740 nm에서 여기되고 2.49 W의 출력을 가지며 초점면에서 평균 전력  $7.57 \times 10^5 \text{ W cm}^{-2}$ 이었다.
- [0156] HeLa 셀은 10 % FBS(Fetal Bovine Serum), 스트렙토마이신( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) 및 페니실린( $100 \text{ units mL}^{-1}$ )을 함유하는 MEM (WelGene사 제조)을 사용하여 20 % 유리 바닥 접시(NEST사 제조) 위에서 5 %  $\text{CO}_2$ , 37°C 및 가습 분위기 하에 2일 동안 배양하였다. TPM 이미징 전에, 배양 배지를 무혈청 MEM으로 바꾼 다음, 처리한 NAP-PS 프로브(5  $\mu$ M)를 첨가하고 30 분동안 배양하여 준비하였다.
- [0157] 쥐 간 슬라이스는 14 일된 수컷 SD(Sprague Dawley) 쥐의 간으로부터 준비하였고, DPBS(Gibco사 제조) 내의 진동블레이드 마이크로톰(vibrating-blade microtome)을 사용하여 800  $\mu\text{m}$  두께로 절단하였다. 절단된 슬라이스들을 NAP-PS 프로브 50  $\mu$ M와 함께 5 %  $\text{CO}_2$ , 37°C 및 가습 분위기 하에 1 시간 동안 배양하였다. 그런 다음 상기 슬라이스들을 DPBS로 2 번 세척하고 유리 바닥 접시로 옮겨 준비하였다. TPM 이미지는 약 50-220  $\mu\text{m}$  깊이에서 얻었다.
- [0159] **분석예 5-1: 셀 이미징**
- [0160] 준비한 HeLa 셀을 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 5  $\mu$ M을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물(a) 또는 염료 5  $\mu$ M(d)로 30 분간 배양하였다. 또한 준비한 HeLa 셀을 과염소산수(II) 25  $\mu$ M로 30 분간 예비처리(b)하고, 상기 과염소산수(II)과 TPEN (N, N, N', N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine) 1 mM로 30분간 예비처리(c)한 후 NAP-PS 프로브 조성물로 표지하였다. 상기 배양한 HeLa셀들에 대하여 TPM을 이용하여 형광 이미지를 각각 관찰하였다. 그 결과를 도 5(a) 내지 도 5(e)에 나타내었다.
- [0161] 이 때, TPM에서 HeLa 셀의 평균 방출비( $F_{\text{yellow}}/F_{\text{blue}}$ )는 740 nm에서 여기 및 400-450 nm 방출 윈도우(청색)과 500-600 nm 방출 윈도우(노란색)를 이용하여 얻었다(Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ ).
- [0162] 도 5(a) 및 도 5(d)를 참조하면, 30 분간 NAP-PS 프로브 조성물로 배양한 HeLa 셀(a)과 염료 5  $\mu$ M로 배양한 HeLa 셀(d)은 청색과 노란색의 형광을 각각 방출하였다. 도 5(b) 및 도 5(c)를 참조하면, 30 분간 과염소산수(II) 25  $\mu$ M로 예비처리한 HeLa 셀(b)과 공지된 수은 킬레이트제인 TPEN (N, N, N', N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine)을 상기 과염소산수(II)으로 예비처리한 HeLa셀에 도입한 HeLa셀(c)은 노란색과 녹색의 형광, 및 흐린 청색의 형광을 각각 방출하였다.
- [0163] 도 5(e)를 참조하면, 30 분간 NAP-PS 프로브 조성물로 배양한 HeLa 셀(a) ("Control"로 표시)과 염료 5  $\mu$ M로

배양한 HeLa 셀(d)("Dye"로 표시)의 평균 방출비( $F_{\text{yellow}}/F_{\text{blue}}$ )는 각각 0.39 및 4.01이었다. 30 분간 과염소산수 은(II) 25  $\mu\text{M}$ 로 예비처리한 HeLa 셀(b)("Hg<sup>2+</sup>"로 표시)의 평균 방출비( $F_{\text{yellow}}/F_{\text{blue}}$ )는 1.40으로 증가하였다. 공지된 수은 킬레이트제인 TPEN (N, N, N', N' -tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine)을 과염소산수 은(II)로 예비처리한 HeLa셀에 도입한 HeLa 셀(c)("Hg<sup>2+</sup> + TPEN"으로 표시)의 평균 방출비( $F_{\text{yellow}}/F_{\text{blue}}$ )는 0.43으로 감소하였다.

[0164] 이로부터, 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브는 TPM를 이용하여 생체 세포내에서 수은을 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0166] 분석예 5-2: 쥐 간 슬라이스 이미징

[0167] 준비한 쥐 간 슬라이스를 과염소산수은(II) 250  $\mu\text{M}$ 로 1 시간 예비처리하기 전(a) · 후(b)에 각각 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 50  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물로 1 시간 배양하였다. 상기 배양한 쥐 간 슬라이스들에 대하여 TPM을 이용하여 형광 이미지를 관찰하였다. 그 결과를 도 6(a) 내지 도 6(c)에 나타내었다.

[0168] 이 때, TPM에서 쥐 간 슬라이스의 평균 방출비( $F_{\text{yellow}}/F_{\text{blue}}$ )는 740 nm에서 여기 및 400-450 nm 방출 윈도우(청색)와 500-600 nm 방출 윈도우(노란색)를 이용하여 얻었다(Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ ).

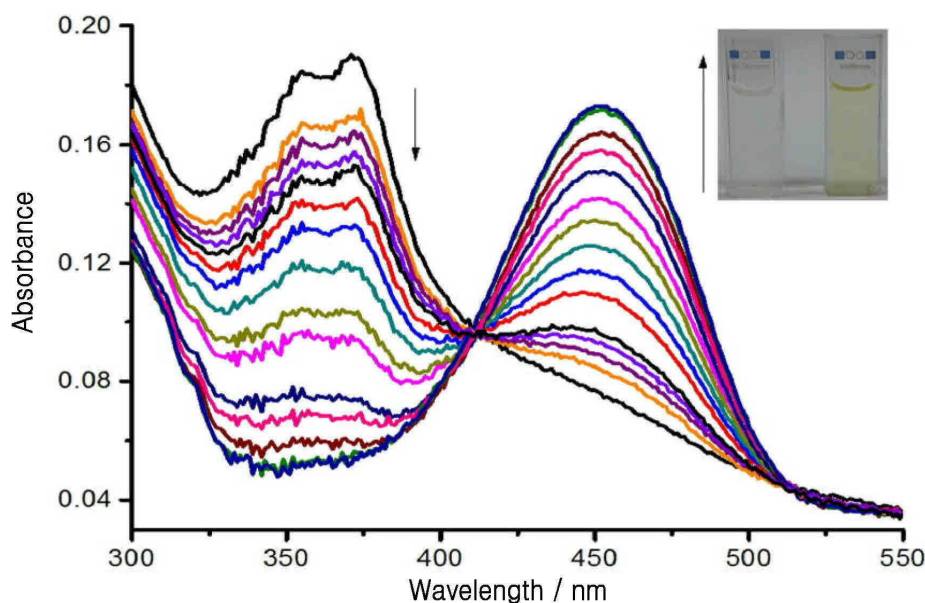
[0169] 도 6(a) 및 도 6(b)를 참조하면, 과염소산수은(II) 250  $\mu\text{M}$ 로 1 시간 예비처리하기 전(a) · 후(b)에 각각 HEPES 버퍼 용액 1.0 mM (pH = 7.4)에 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브 50  $\mu\text{M}$ 을 용해시킨 NAP-PS 프로브 조성물로 1 시간 배양한 쥐 간 슬라이스는 청녹색, 및 노란색과 청색의 형광을 각각 방출하였다.

[0170] 도 6(c)를 참조하면, 과염소산수은(II) 250  $\mu\text{M}$ 로 1 시간 예비처리하기 전(a)("Control"로 표시) · 후(b)("Hg<sup>2+</sup>"로 표시)에 1 시간 NAP-PS 프로브 조성물로 배양한 쥐 간 슬라이스 의 평균 방출비( $F_{\text{yellow}}/F_{\text{blue}}$ )는 각각 0.77 및 1.70이었다.

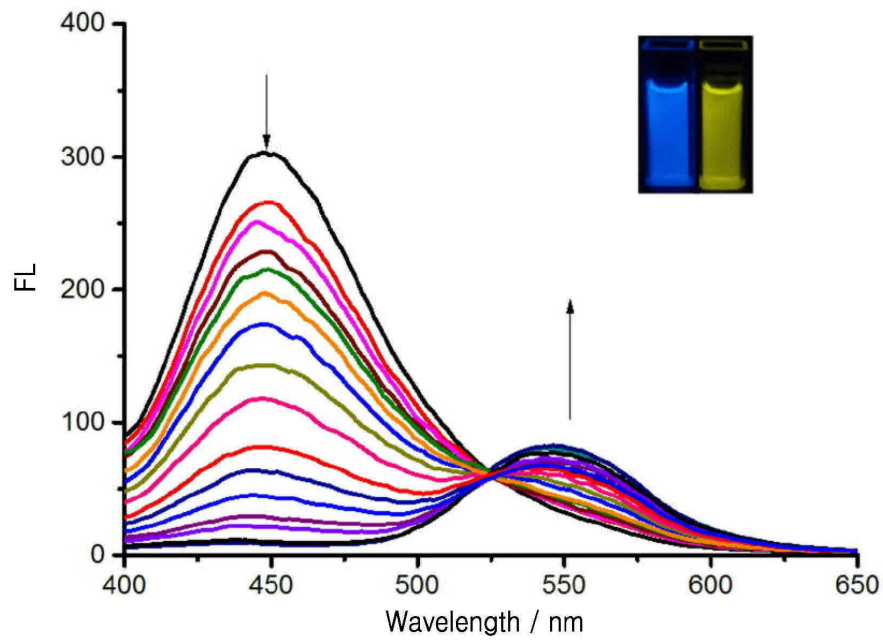
[0171] 이로부터, 합성에 1에 따라 합성된 NAP-PS 프로브는 TPM를 이용하여 생체 조직내에서 수은을 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.

## 도면

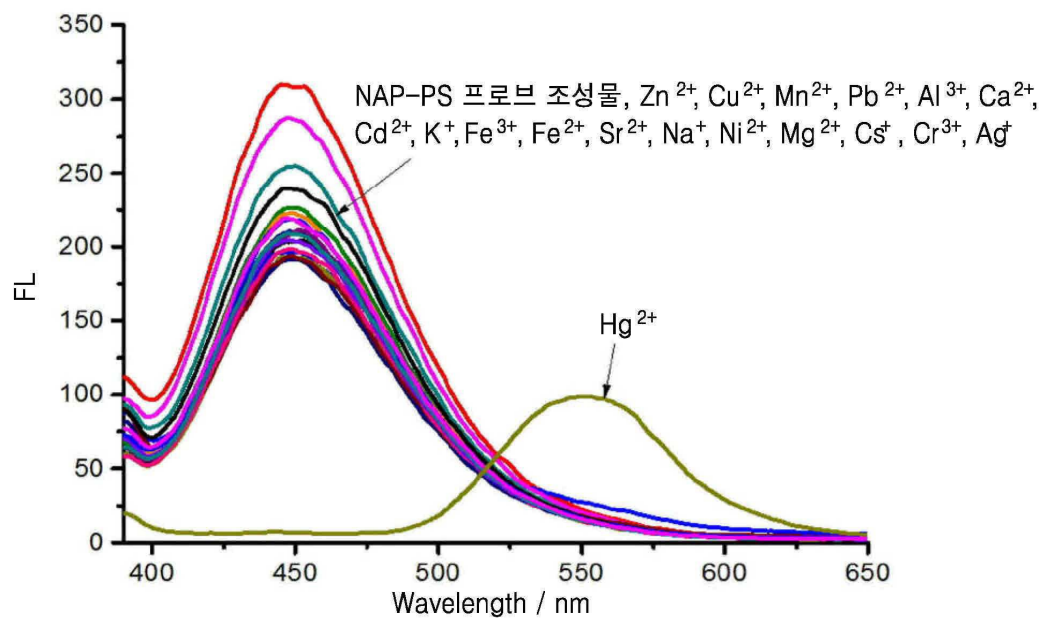
### 도면1a



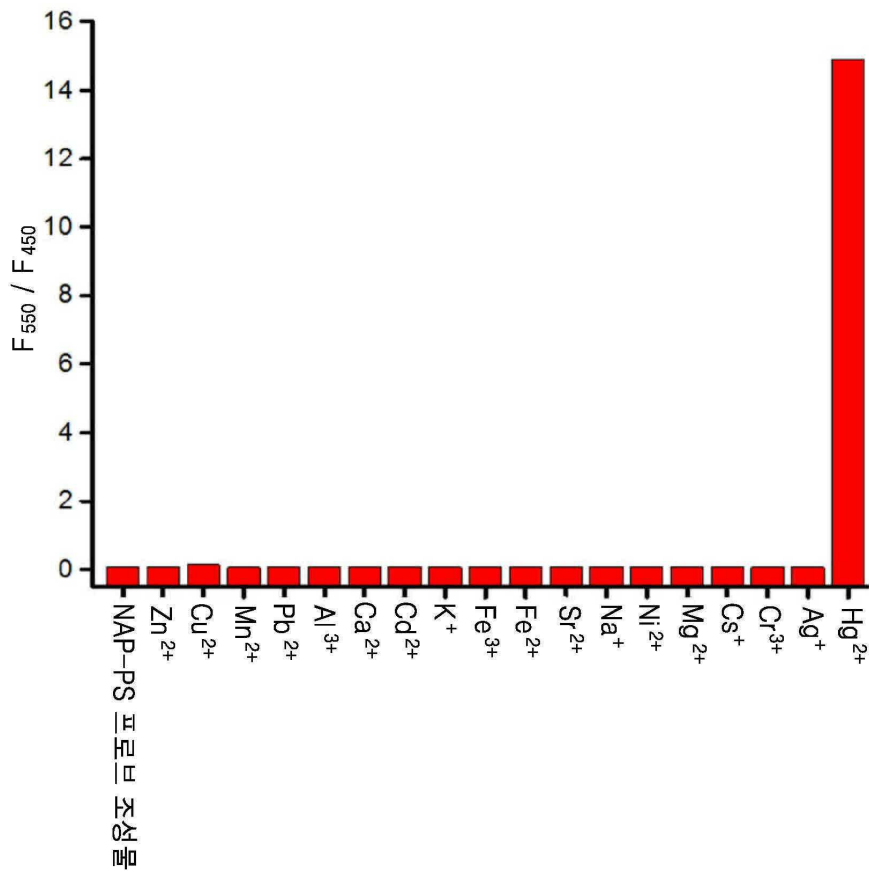
도면1b



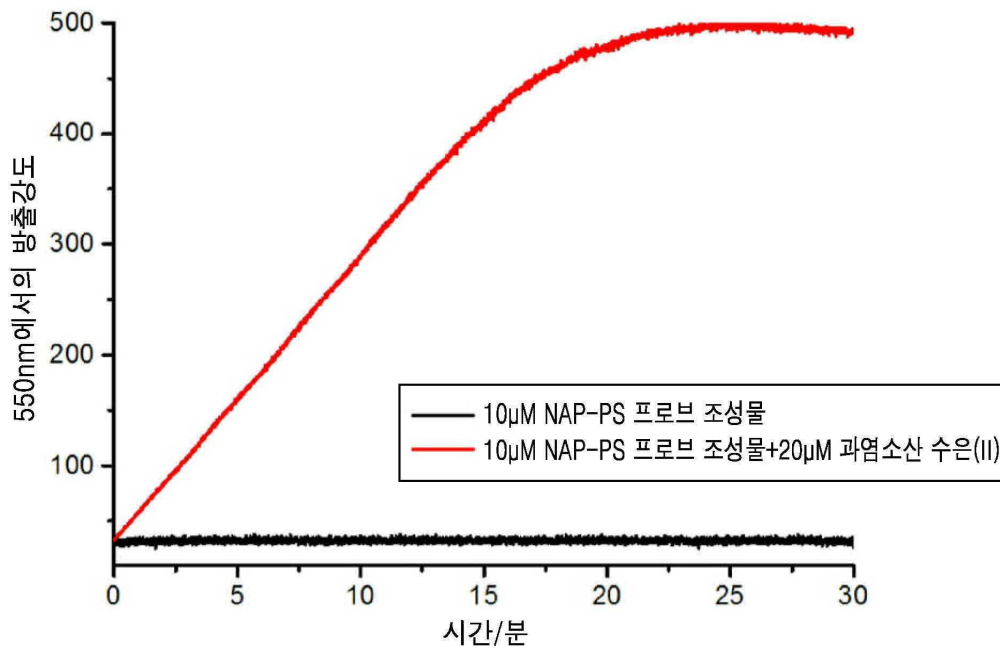
도면2a



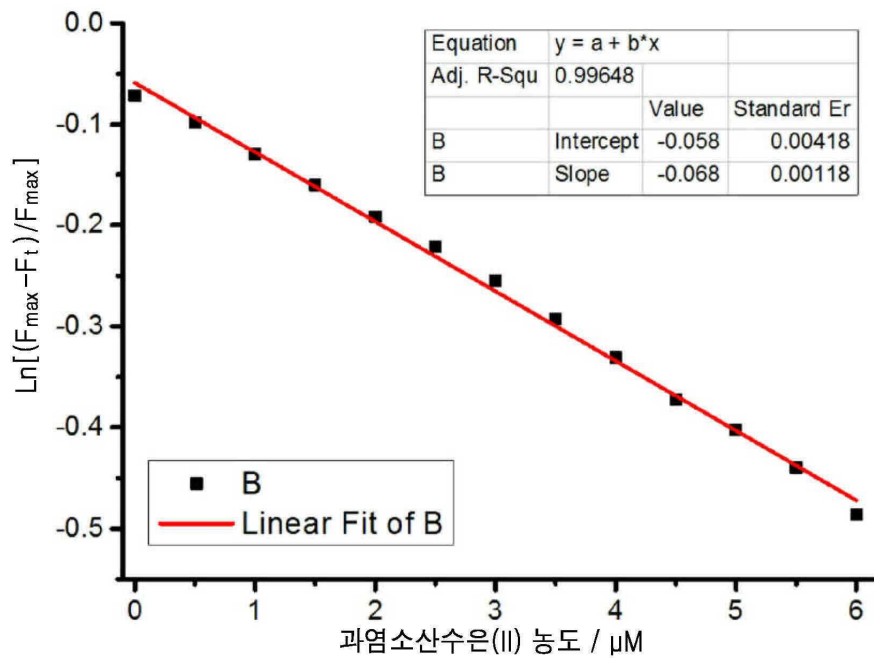
도면2b



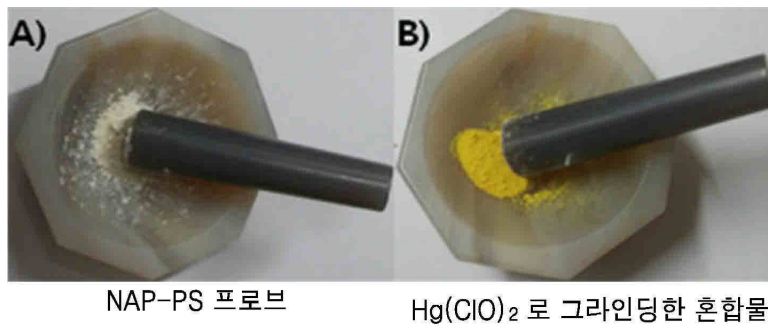
도면3a



도면3b

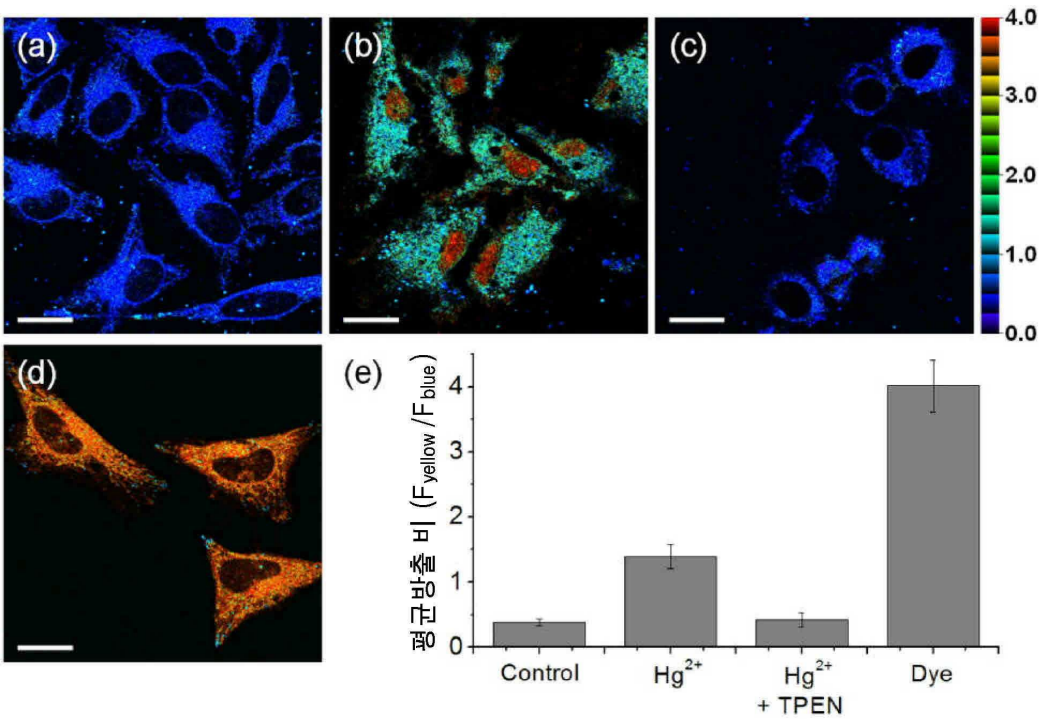


도면4





도면5



도면6

