(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0092180
(43) 공개일자 2013년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/533 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
C09K 11/07 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0013751
(22) 출원일자 2012년02월10일
심사청구일자 2012년02월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김종승
경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운롯데아파트 130-2402
강철훈
경기도 수원시 장안구 천천동 신안한일아파트 105동 704호
정효성
서울특별시 강남구 도곡동 도곡렉슬아파트 409동 1101
(74) 대리인
특허법인충현

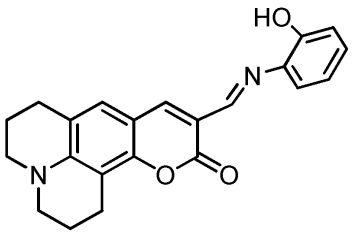
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **시아나이드 이온의 검출을 위한 쿠마린-구리 (Ⅱ) 화합계 화학선량계**

(57) 요 약

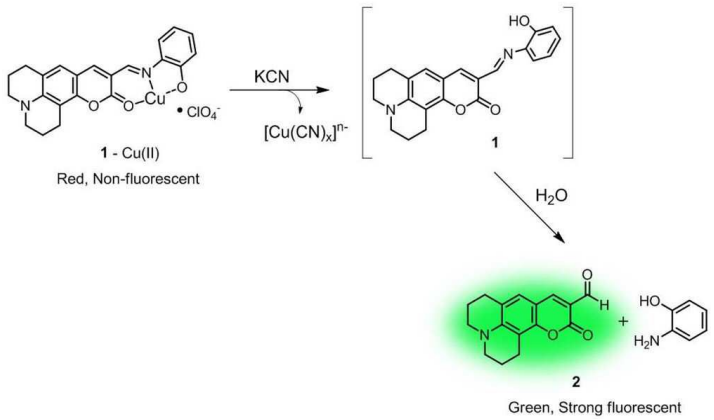
본 발명은 시아나이드 이온의 검출을 위한 형광 표지자에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 화학식 1의 시아나이드 이온의 검출을 위한 쿠마린-Cu(II) 화합계 화학선량계에 관한 것이다:

<화학식 1>



본 발명에 따른 쿠마린-Cu(II) 화합계 화학선량계는 수성 조건에서 기타 다른 음이온종에 비해 뚜렷한 형광증강을 나타내므로 수성 매질 중 시아나이드 이온을 선택적으로 탐침할 수 있으며, 형광성이 매우 강한 '비발광-발광형' 형광 메카니즘을 가지므로, 소량의 시아나이드 이온 탐지에도 매우 유용하고, 따라서 생체 세포 내에서 시아나이드를 선택적으로 검출할 수 있다.

대 표 도 - 도5

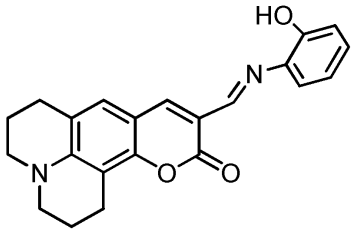


특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1의 시아나이드 이온의 검출을 위한 쿠마린-Cu(II) 화합계 화학선량계:

<화학식 1>



명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시아나이드 이온의 검출을 위한 형광 표지자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 시아나이드는 포유류에게는 극도로 독성이어서 비록 소량으로 존재하는 경우라도 구토, 의식불명을 일으키고 결국에는 사망에 이르게 된다. 그럼에도 불구하고 많은 산업공정에서 시아나이드가 대량으로 생산 및 사용되고 있어 심각한 환경오염 문제를 야기하고 있다. 관련하여, 세계보건기구는 음용수 내 시아나이드 이온의 농도를 2μM 미만으로 제한하고 있으며 (*Guidelines for Drinking-Water Quality*, World Health Organization, Geneva, 1996), 따라서 최근에는 형광 탐침과 같은 고감도의 시아나이드 검출법이 상당한 주목을 받고 있다

[0003] 적절한 화학센서를 통해 특정 음이온을 형광 감지하는 것은 감도가 높고 응답속도가 빠르며 실행하기가 용이한 가치 있는 기술로서, 체외 분석뿐 아니라 체내 영상화 연구를 위한 적용방법을 제공한다. 양이온류, 음이온류, 당류, 단백질류와 같은 다양한 생물학적 물질들에 대한 화학센서를 개발하려는 많은 노력에도 불구하고, 대부분의 형광센서는 양이온을 표적으로 하고, 생체 세포에서 이에 상응하는 생체 영상화 관련 연구들에 그 초점이 맞추어져 왔다 (Haugland, R. P. *Guide to Fluorescent Probes and Labeling Techniques*; Invitrogen: USA, 2005; Chapter 19 등). 반면에, 음이온에 대한 형광 화학센서의 생체 영상화 연구는 드물게 보고되고 있는데, 그 이유로는 수성 매질에서의 낮은 용해도, 낮은 선택성 및 낮은 감도 등과 같은 문제점들이 거론되고 있다 (O'Neil, E. J.; Smith, B. D. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3068 등).

[0004] 현재 시아나이드 이온을 검출하기 위해서 가장 널리 사용되는 방법들로는, 친핵체를 첨가하거나 (Kim, Y.-H.; Hong, J.-I. *Chem. Commun.* **2002**, 512 등), 수소결합 상호작용을 이용하거나 (Sun, S.-S.; Lees, A. J. *Chem. Commun.* **2000**, 1687 등), 시아나이드 착물을 첨가하거나 (Tomasulo, M.; Sortino, S.; White, A. J. P.; Raymo, F. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 744 등), 시아나이드에 의한 구리 이온의 배위결합 형성을 이용하는 등의 방법들이 있다. 그러나, 여전히 수성 또는 상기 방법들은 생체 환경에서 감도, 선택성 및 상용성에 있어 한계가 있다.

[0005] 또 다른 고려사항은, 다수의 보고서에서 테트라부틸암모늄 (TBA)이 상대 양이온으로서 통상적으로 사용되어 왔기 때문에 ((a) Kim, Y.-H.; Hong, J.-I. *Chem. Commun.* **2002**, 512 등), CN^- 검출을 위한 센서 시스템에서 양이온 효과를 고려하여야 한다는 점이다. KCN은 EPA 기준에 규정된 독성 화학종이므로 CN^- 검출의 실제 용도 관점에서 $(n\text{-Bu})_4N^+CN^-$의 검출보다는 KCN의 검출이 보다 큰 의미가 있을 것이다.

발명의 내용

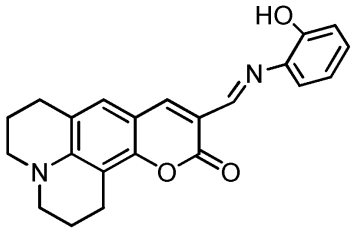
해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 CN^- 감지에 있어서 보고된 전술한 바와 같은 많은 단점을 고려하여, KCN에 대한 육안 검출뿐 아니라 '발광 (turn-on)' 형광 감지 방식으로 CN^-, 특히 KCN 이온을 선택적으로 고감도로 검출할 수 있는 쿠마린-Cu(II) 화합계 화학선량계를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 달성하기 위하여, 화학식 1의 시아나이드 이온의 검출을 위한 쿠마린-Cu(II) 화합계 화학선량계를 제공한다:

화학식 1

[0008] 

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 쿠마린-Cu(II) 화합계 화학선량계는 수성 조건에서 기타 다른 음이온종에 비해 뚜렷한 형광증강을 나타내므로 수성 매질 중 시아나이드 이온을 선택적으로 탐침할 수 있으며, 형광성이 매우 강한 '비발광-발광형' 형광 메카니즘을 가지므로, 소량의 시아나이드 이온 탐지에도 매우 유용하고, 따라서 생체 세포 내에서 시아나이드를 선택적으로 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1a 및 1b는 각각 16 당량의 시아나이드를 첨가한 경우에 수용액 (10 mM PBS 완충액, pH 7.4, 1.0% DMSO)에서 화합물 1-Cu(II) (5.0 μM)의 시간-의존적 UV-vis 스펙트럼 (도 1a) 및 형광 스펙트럼 (도 1b)을 도시한 도면이다 (도면들 중 삽입 그래프들은 각각 (a) A_{464}/A_{521} 대 시간 그래프 및 (b) 514 nm에서 방출 세기 대 시간 그래프를 나타낸다).

도 2a 및 2b는 다양한 음이온 첨가시 (16 당량) 수용액 (10 mM PBS 완충액, pH 7.4, 1.0% DMSO) 중 화합물 1-Cu(II) (5.0 μM)의 UV-vis 스펙트럼 (도 2a)과 형광 스펙트럼 (도 2b)을 도시한 도면이다 (20분 후 479 nm에서 여기; 슬릿 = 1.5/1.5).

도 3은 다양한 농도의 CN^-가 수성 용액 (10 mM PBS buffer, pH 7.4, 1.0% DMSO) 중에 존재하는 경우에 화합물 1-Cu(II) (5.0 μ)의 형광 반응을 도시한 도면이다 (여기 파장: 479 nm; slit=3/3).

도 4는 수성 용액 (10 mM PBS buffer, pH 7.4, 1.0% DMSO) 중에서 화합물 1-Cu(II) (5.0 μ) 및 대응되는 시아나이드 (16 당량)에 대한 pH-의존성 형광 프로파일을 도시한 도면이다 (여기 파장: 479 nm; 20분 경과; slit=3/3).

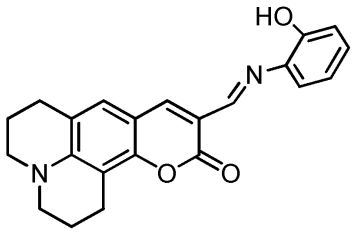
도 5는 화합물 1-Cu(II) 착물을 미리 넣은 세포를 다양한 양의 KCN으로 처리하여 세포들을 공초점 현미경으로 관찰한 결과를 도시한 도면이다.

도 6은 시아나이드에 대한 화합물 1-Cu(II)의 발광형 형광 감지 메커니즘에 대한 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 하기 화학식 1의 시아나이드 이온의 검출을 위한 쿠마린-Cu(II) 화합계 화학선량계를 제공한다:

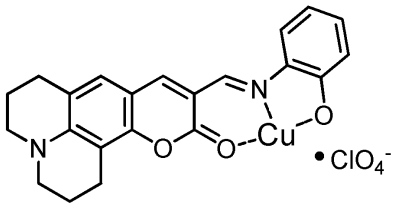
[0012] <화학식 1>

[0013] 

[0014] 상기 화학식 1의 화합물은 본 발명자들에 의해 이전에 보고된 바 있으며 (Jung, H. S.; Han, J. H.; Habata, Y.; Kang, C.; Kim, J. S. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5142), 본 발명자들은 상기 화학식 1의 화합물이 시아나이드 이온의 검출을 위한 우수한 특성을 갖는다는 점에 착안하여 본 발명을 완성하게 되었다.

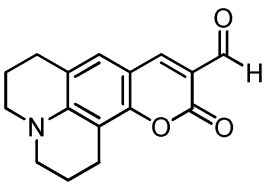
[0015] 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물과 Cu(II) 이온이 착물을 형성함으로써 이루어지는데:

화학식 2

[0016] 

[0017] 상기 화학식 2의 화합물은 수성 매질 중에서 쉽게 가수분해되어 매우 형광성이 강한 하기 화학식 3의 화합물을 형성하게 된다:

화학식 3

[0018] 

[0019] 그러나, 상기 화학식 2의 화합물은 Cu(II)이온과 착물을 형성하는 경우, 화합물 중의 *o*-OH기가 Cu(II) 이온 결합을 위한 추가 결합 부위로서 작용하여 MLCT-계 중금속 이온 효과로 추정되는 효과에 의해 형광이 감소되는 안정한 착물을 형성하게 된다. 따라서, 상기 화학식 1의 화합물로부터 Cu(II)를 제거하면 시프 염기가 생성되고, 이어서 이러한 시프 염기가 물에 의해 가수분해되어 발광을 유도할 수 있게 된다. 또한, 시아나이드 이온은 금속이온에 대해서 매우 강력한 결합능을 갖기 때문에, Cu(II) 이온과 결합하여 안정한 $[Cu(CN)_x]^{n-}$ 착물을 형성한다는 사실이 이미 기존에 알려져 잘 알려져 있다 (Kurmia, K.; Giles, D. E.; May, P. M.; Singh, P.; Hefter, G. T. *Talanta* **1996**, *43*, 2045). 결론적으로, 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 검출대상 시료 중에 시아나이드 이온이 존재하는 경우, 시아나이드 이온이 화합물 중의 Cu(II) 이온과 결합하여 시아나이드 이온-구리 이온 착물을 형성하게 되므로, 화학식 3의 화합물 형태로 변화하게 되고, 상기 화학식 3의 화합물은 강한 형광을 방출하여 검출대상 시료 중 시아나이드 이온의 존재 여부를 알려주게 되는 것이다.

[0020] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니며, 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 서술된 것이다.

[0021] 제조예. 화학식 1의 화합물 및 화학식 1의 화합물-Cu(II)의 제조

[0022] 화합물 1 및 화합물 1-Cu(II)는 종래문헌 (Jung, H. S.; Han, J. H.; Habata, Y.; Kang, C.; Kim, J. S. *Chem.*

Commun. **2011**, *47*, 5142)에 기재된 바에 따라서 제조하였다.

[0023] 화합물 1. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25℃, TMS): δ 8.68 (s, 1H; CH), 8.51 (s, 1H; CH), 7.35 (d, *J* = 8.37 Hz, 1H; CH), 7.16 (t, *J* = 7.70 Hz, 1H; CH), 7.03 (s, 1H; CH), 6.99 (d, *J* = 8.22 Hz, 1H; CH), 6.98 (t, *J* = 7.62 Hz, 1H; CH), 3.33 (q, *J* = 5.62 Hz, 4H; CH_2), 2.91 (t, *J* = 6.42 Hz, 2H; CH_2), 2.78 (t, *J* = 4.00 Hz, 2H; CH_2), 1.99 (m, 4H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl3): 163.0, 154.8, 152.9, 149.2, 147.8, 142.1, 134.5, 127.3, 126.6, 125.4, 124.3, 119.5, 118.0, 114.2, 109.0, 106.5, 50.5, 50.1, 27.7, 21.5, 20.6, 15.0. FAB-MS calc. for $C_{22}H_{20}N_2O_3$ $[M+H]^+$ 361.2, found 361.3.

[0024] 화합물 1-Cu(II). ESI-MS calc. for $C_{23}H_{23}CuN_2O_4$ $[M+CH_3OH-H]$ 454.1, found 454.2.

[0025] 재료 및 기기

[0026] 모든 형광 및 UV/vis 흡수 스펙트럼은 각각 Shimadzu RF-5301PC 및 Shinco S-3100 스펙트로미터를 사용하여 기록하였다. NMR 및 질량 스펙트럼은 Varian instrument (400 MHz) 및 JMS-700 MStation 질량 스펙트로미터를 사용하여 기록하였다. 모든 분석물들은 Aldrich사로부터 구입하여 그대로 사용하였다. 모든 용매들은 Duksan Pure Chemical Co., Ltd로부터 구입한 분석급 시약들이었다. 스펙트럼 검출을 위한 모든 DMSO는 HPLC 시약급으로서, 형광 불순물이 없는 것을 사용하였고, H_2O는 탈이온화시켜 사용하였다.

[0027] 스펙트럼 분석

[0028] 음이온 칼륨 염들의 스톡 용액들 (0.1 M)은 수용액 중에서 제조하였다. 화합물 1-Cu(II)의 스톡 용액들 (0.5 mM)은 DMSO 중에서 화합물 1 및 $Cu(ClO_4)_2$를 1:5의 비율로 혼합시킴으로써 제조하였다. 화합물 1 및 2의 스톡 용액들 (0.5 mM) 또한 DMSO 중에서 제조하였다. 모든 형광 스펙트럼의 측정을 위해서, 여기 파장으로는 479 nm를 사용하였으며, 여기 슬릿 폭은 1.5 nm였고, 발광 슬릿 폭 역시 1.5 nm였다. UV/vis 및 형광 적정 실험들은 수성 용액 중의 5 μM 화합물 1 및 2 (pH 7.4, 10 mM PBS buffer)를 사용하여 실온에서 음이온 칼륨 염들의 농도를 변화시켜 가며 수행하였다.

[0029] 세포 배양

[0030] 인간 간암 세포주 HepG2를, 10% 태아 우 혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 Dulbecco's Modified Eagle 배지 중에서, 37 ℃, 5% CO_2 및 95% 공기 환경 하에서 격일로 유지 및 서브-배양하였다. 세포들은 24-웰 플레이트 상에 파종하고 밤새도록 안정화시켰다.

[0031] 공초점 현미경

[0032] 500 μM의 화합물 1-Cu(II) 스톡 용액을 제조하기 위해서, 먼저, 화합물 1을 10 당량의 $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$/DMSO 용액 중에 현탁시키고 최종 농도를 DMSO로 조절하였다. 세포들을 1ml 의 PBS로 2회 간단히 세척한 후에, PBS 중의 1 μM 화합물 1-Cu(II)로 처리하였다. 40분 동안 배양한 후에, 배지 중의 잔여 화합물 1-Cu(II)를 PBS로 2회 세척함으로써 제거하고, 세포들을 적당량의 KCN을 함유하는 PBS 용액 1ml 중에 넣었다. 형광 이미지들은 488-nm 아르곤 레이저 및 505-nm 장경로 필터를 구비한 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Zeiss LSM 510, Zeiss, Oberko, Germany)을 사용하여 얻었다.

[0033] 도 1a 및 1b에는 각각 16 당량의 시아나이드를 첨가한 경우에 수용액 (10 mM PBS 완충액, pH 7.4, 1.0% DMSO)에서 화합물 1-Cu(II) (5.0 μM)의 시간-의존적 UV-vis 스펙트럼 (도 1a) 및 형광 스펙트럼 (도 1b)을 도시하였다 (도면들 중 삽입 그래프들은 각각 (a) A_{464}/A_{521} 대 시간 그래프 및 (b) 514 nm에서 방출 세기 대 시간 그래프를 나타낸다).

[0034] 도 1a 및 1b를 참조하면, 화합물 1-Cu(II)은 처음에는 비-형광성 (Φ_f = 0.02)을 나타냄을 알 수 있다. 그러나, 화합물 1-Cu(II)에 CN^- 이온을 첨가하면 521 nm에서 465 nm로 최대 흡수값이 57 nm 청색이동하며, 등적색에서 녹색으로 인식할만한 변색이 발생된다 (도 1a의 삽입 사진 참조). 또한, 도 1b에 나타낸 바와 같이 λ_{em}= 514에서 형광 세기가 시간함수로서 부수적으로 증강된다 (Φ_f = 0.65). 화합물 1-Cu(II)의 용액에 시아나이드 이온 첨가에 의해 새로이 형성된 방출 대역은 화합물 2의 방출 대역과 동일하였으며, 따라서 화합물 1-

Cu(II)의 용액 중 CN^-는 안정한 $Cu(CN)_x$를 형성하여 화합물 1을 유리시키고, 유리된 화합물 1이 다시 쉽게 가수분해되어 형광성이 강한 화합물 2를 제공한다는 사실을 알 수 있다.

[0035] 화합물 1-Cu(II)의 화합계 음이온 검출능과 생체 환경과의 상용성을 조사하기 위해서, 수용액 (10 mM PBS 완충액, pH 7.4, 1.0% DMSO) 중 화합물 1-Cu(II)의 흡수 및 방출 스펙트럼을 생체 매질에 일반적으로 존재하는 다양한 음이온에 대해 조사하였다. 도 2a 및 2b에는 다양한 음이온 첨가시 (16 당량) 수용액 (10 mM PBS 완충액, pH 7.4, 1.0% DMSO) 중 화합물 1-Cu(II) (5.0 μM)의 UV-vis 스펙트럼 (도 2a)과 형광 스펙트럼 (도 2b)을 도시하였다 (20분 후 479 nm에서 여기; 슬릿 = 1.5/1.5).

[0036] 실제로 도 2a 및 2b에 도시된 바와 같이, 화합물 1-Cu(II)는 CN^-가 존재할 때만 방출 세기가 현저하게 증강된 반면, 다른 음이온들 (F^-, Cl^-, Br^-, I^-, AcO^- ,$H_2PO_4^-$, HSO_4^-, NO_3^-, ClO_4^-, HCO_3^-, CO_3^{2-} OH^-, SCN^-)과는 눈에 띄는 변화가 관찰되지 않았다. 따라서, 도 2a 및 2b에 나타낸 경쟁 실험을 통해 화합물 1-Cu(II)는 다른 음이온이 존재하여도 CN^-에 대해 선택적인 반응을 보인다는 것을 알 수 있다

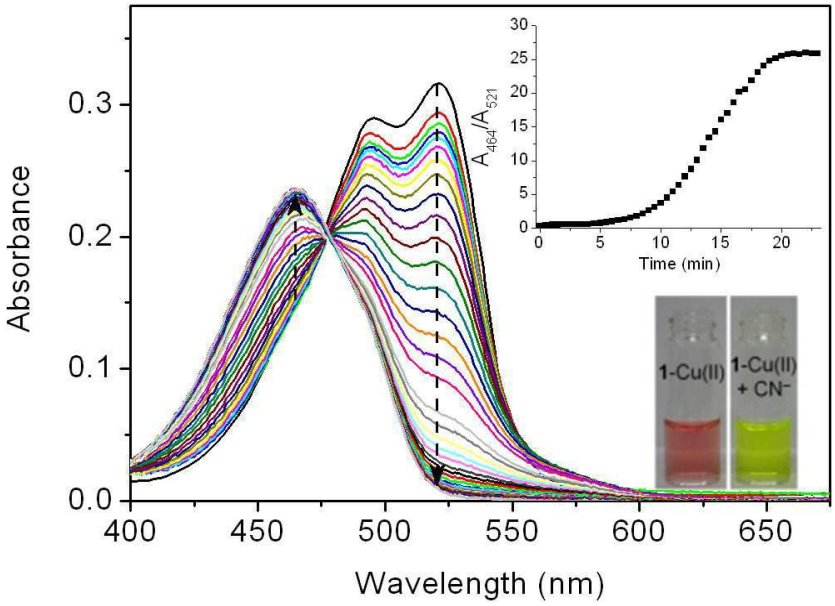
[0037] 도 3에는 다양한 농도의 CN^-가 수성 용액 (10 mM PBS buffer, pH 7.4, 1.0% DMSO) 중에 존재하는 경우에 화합물 1-Cu(II) (5.0 μ)의 형광 반응을 도시하였다 (여기 파장: 479 nm; slit=3/3). 도 3을 참조하면, 화합물 1-Cu(II)과 CN^-의 화학선량측정 반응은 선형적이고 수용액 중 10^{-8} M CN^- 이온을 검출하기에 충분히 감도가 높다는 것을 증명한다. 또한, 도 4에는 수성 용액 (10 mM PBS buffer, pH 7.4, 1.0% DMSO) 중에서 화합물 1-Cu(II) (5.0 μ) 및 대응되는 시아나이드 (16 당량)에 대한 pH-의존성 형광 프로파일을 도시하였다 (여기 파장: 479 nm; 20분 경과; slit=3/3). 이러한 pH 변동 시험에서, 본 발명에 따른 형광 '비발광-발광형' 시스템은 수용액 중 6 내지 10의 pH 범위에서 제대로 작동한다는 사실을 알 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물 1-Cu(II)은 단순하고, 신뢰성이 있으며, 선택적이고 생체친화적인 반응을 기반으로 하는 CN^- 센서로 기능할 수 있다.

[0038] 한편, 화합물 1-Cu(II)가 세포내 시아나이드 이온을 검출할 수 있다는 사실을 입증하기 위해서 화합물 1-Cu(II) 착물을 미리 넣은 세포를 다양한 양의 KCN으로 처리하였으며, 세포들을 공초점 현미경으로 관찰한 결과를 도 5에 도시하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, CN^- 농도가 증가함에 따라서 형광 세기 증가가 세포 내부에서 관찰되었다.

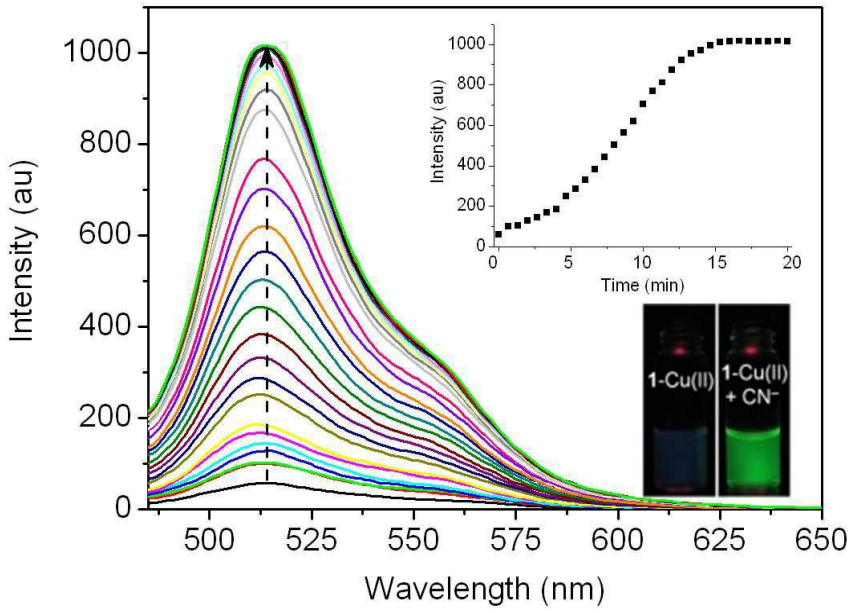
[0039] 요약하면, 본 발명에 따른 쿠마린-Cu(II) 화합계 화학선량계는 수성 조건에서 기타 다른 음이온종에 비해 뚜렷한 형광증강을 나타내며, 따라서 수성 매질 중에서 시아나이드 이온을 선택적으로 탐침할 수 있다. 또한, 도 6에 도시된 시아나이드에 대한 화합물 1-Cu(II)의 발광형 형광 감지 메커니즘의 개략도로부터도 알 수 있는 바와 같이, 이러한 '비발광-발광형' 형광 메커니즘은 비-형광성인 화합물 1로부터 Cu(II)의 탈착물화 반응과 이후 시프 염기의 가수분해 절단에 의해 형광성이 강한 쿠마린 알데히드인 화합물 2가 제조되는 것에 기인하는 것으로 판단된다.

도면

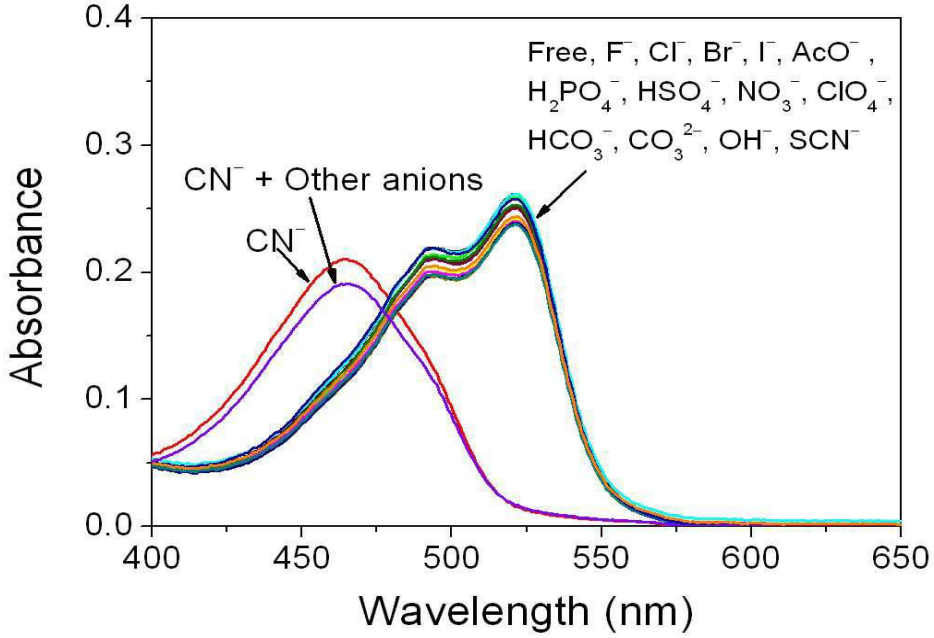
도면1a


Absorbance
Wavelength (nm)
A_{464}/A_{521}
Time (min)
1-Cu(II)
1-Cu(II) + CN⁻

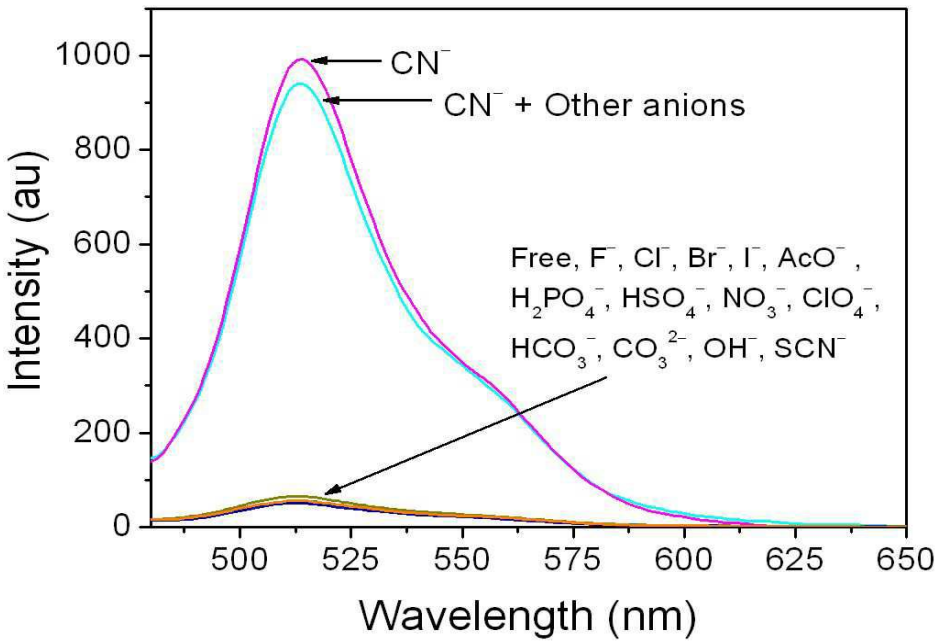
도면1b


Intensity (au)
Wavelength (nm)
Intensity (au)
Time (min)
1-Cu(II)
1-Cu(II) + CN⁻

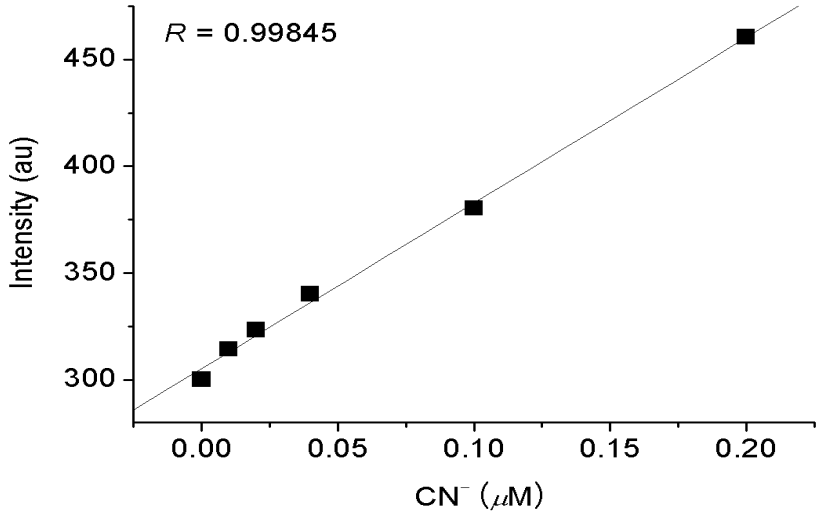
도면2a


Absorbance
Wavelength (nm)
Free, F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, AcO⁻ ,
H2PO4⁻, HSO4⁻, NO3⁻, ClO4⁻,
HCO3⁻, CO3²⁻, OH⁻, SCN⁻
CN⁻ + Other anions
CN⁻

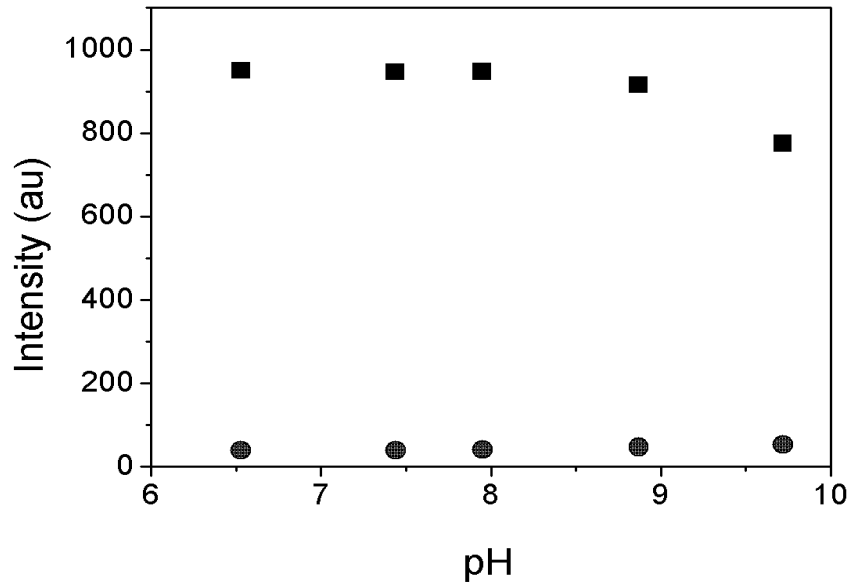
도면2b


Intensity (au)
Wavelength (nm)
CN⁻
CN⁻ + Other anions
Free, F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, AcO⁻ ,
H2PO4⁻, HSO4⁻, NO3⁻, ClO4⁻,
HCO3⁻, CO3²⁻, OH⁻, SCN⁻

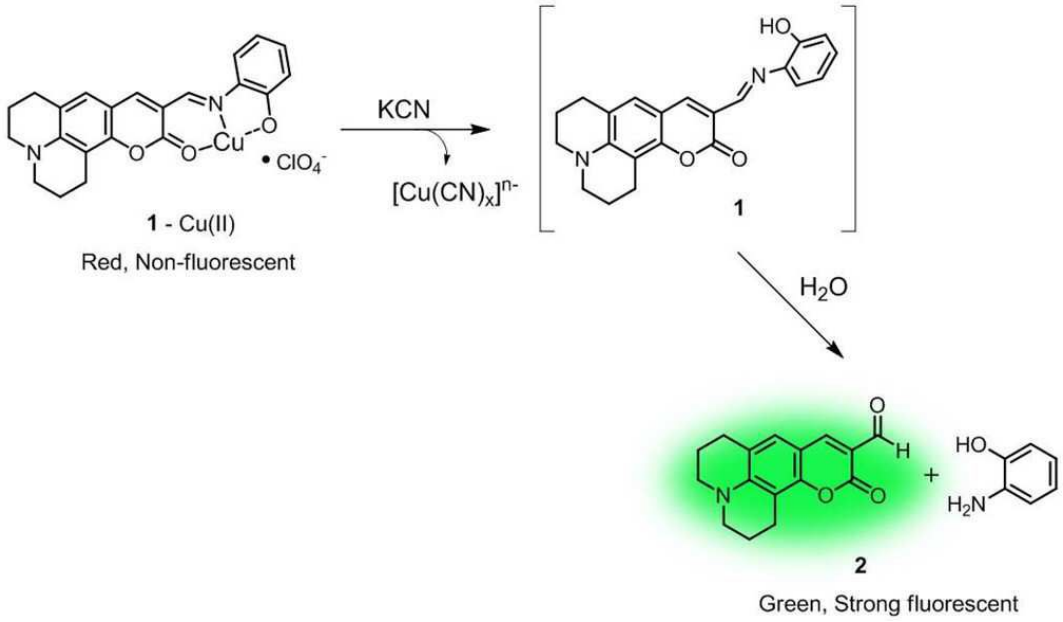
도면3


R = 0.99845
Intensity (au)
450
400
350
300
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
CN⁻ (μM)

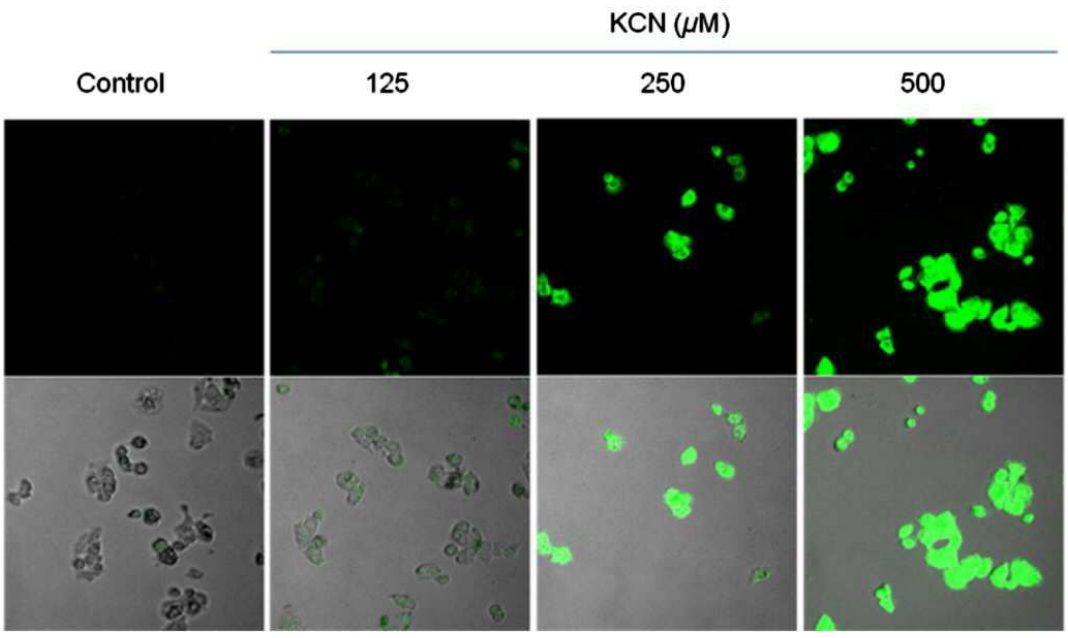
도면4


Intensity (au)
1000
800
600
400
200
0
6
7
8
9
10
pH

도면5


KCN
$[Cu(CN)_x]^{n-}$
$\bullet ClO_4^-$
1 - Cu(II)
Red, Non-fluorescent
1
H_2O
2
Green, Strong fluorescent

도면6


KCN (μM)
Control
125
250
500