



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0070860
(43) 공개일자 2009년07월01일

(51) Int. Cl.

C07D 498/18 (2006.01) C07D 513/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0139008

(22) 출원일자 2007년12월27일

심사청구일자 2007년12월27일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

윤주영

서울시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 나노과학부

이한나

서울시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 나노과학부

김하나

서울시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 나노과학부

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항

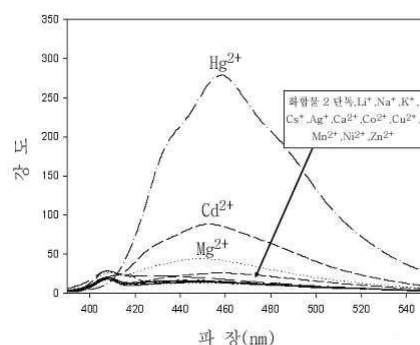
(54) 아크리딘 유도체, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 수은이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 아크리딘 유도체, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 아크리딘 유도체와 4,5-비스(브로모메틸)아크리딘과 염기를 용매에 녹인 용액에 아자크라운 화합물을 첨가하여 반응시키는 단계; 상기 단계의 반응 결과물을 실온에서 교반한 후 여과한 다음 용매를 증발시키는 단계; 및 상기 용매를 증발시킨 결과물에 대하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 정제하는 단계를 포함하는 아크리딘 유도체의 제조방법 및 이를 이용한 수용액 환경 또는 생체 내에 존재하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출방법을 제공한다.

본 발명에 따른 아크리딘 유도체는 수은 이온과 카드뮴 이온의 첨가에 대해서만 pH 7.4에서 큰 킬레이트 증폭 형광 효과가 관찰되었고, 또한 종래에는 주로 유기용매에서 중금속 이온을 검출할 수 있었던 반면, 본 발명에 따른 화합물은 수용액 환경에서 수은 이온과 카드뮴 이온을 검출할 수 있을뿐 아니라, 세포 내로 투과될 수 있어 세포 내 수은 이온과 카드뮴 이온을 검출할 수 있으므로 수은 이온과 카드뮴 이온에 선택적인 신규한 형광화학센서로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

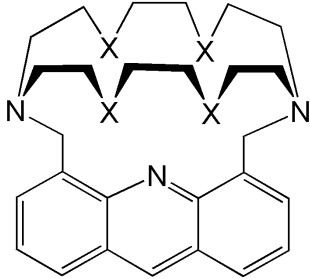


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 아크리딘 유도체.

[화학식 1]

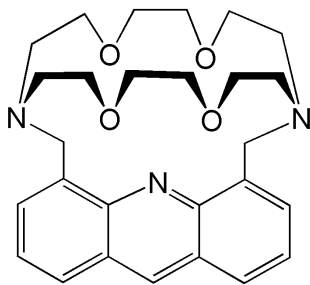


(상기 식에서, X는 O 또는 S이다)

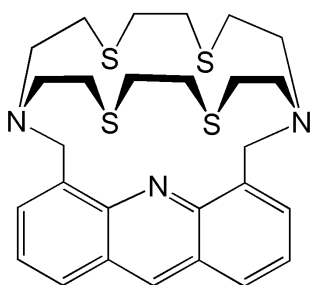
청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1의 아크리딘 유도체는 하기 화학식 2의 아자크라운-아크리딘 유도체 또는 화학식 3의 아자시아크라운-아크리딘 유도체인 것을 특징으로 하는 아크리딘 유도체.

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 3

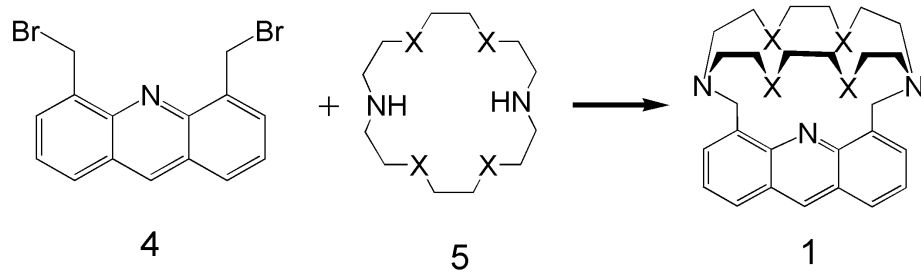
하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

화학식 4의 4,5-비스(브로모메틸)아크리딘과 염기를 용매에 녹인 용액에 화학식 5의 아자크라운 화합물을 첨가하여 반응시키는 단계 (단계 1);

상기 단계 1의 반응 결과물을 실온에서 교반한 후 여과한 다음 용매를 증발시키는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2의 반응 결과물에 대하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 정제하는 단계(단계 3)를 포함하는 제 1 항의 아크리딘 유도체의 제조방법.

[반응식 1]



(상기 식에서 X는 O 또는 S이다)

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 단계 1의 염기는 탄산칼륨, 트리에틸아민 및 탄산나트륨으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 아크리딘 유도체의 제조방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 단계 1의 용매는 클로로포름, 디클로로메탄 및 아세토나이트릴로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 아크리딘 유도체의 제조방법.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 단계 1의 화학식 5의 아자크라운 화합물은 4,13-디아자-18-크라운-6-에테르 또는 1,10-디아자-4,7,14,17-테트라시아사이클로옥타디칸인 것을 특징으로 하는 아크리딘 유도체의 제조방법.

청구항 7

청구항 1의 아크리딘 유도체를 이용한 수용액 환경 또는 생체 내에 존재하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 검출은 청구항 1의 아크리딘 유도체와 상기 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 복합체를 여기시켜 킬레이트 증폭 형광(CHEF) 효과를 확인함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 복합체의 증폭 형광 효과를 이미지화하여 세포 내에 존재하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온을 검출하는 것을 특징으로 하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 아크리딘 유도체, 보다 상세하게는 PH 7.4에서 수은 이온 및 카드뮴 이온을 효과적으로 인식하는 아크리딘 유도체, 즉 아자크라운 혹은 아자시아크라운 리간드가 아크리딘 형광체에 고정되어 수용액 또는 생체 내에서 수은 이온과 카드뮴 이온에 대해 선택적인 킬레이트 증폭 형광(chelate enhanced fluorescence; CHEF) 효과를 나타내는 아크리딘 유도체와 이의 제조방법 및 이를 이용한 수용액 환경 또는 생체 내에 존재하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 생체 내 주요물질과 이온들에 대한 새로운 센서의 설계와 연구는 그 동안 활발히 진행되어져 왔다. 최근 초분자

(supramolecule) 화학에 대한 이해와 연구는 선택적으로 이온 혹은 여러 가지 다른 종류의 게스트 화합물들과 결합할 수 있는 호스트 화합물의 설계에 큰 가능성을 보여왔으며, 최근 이러한 초분자 화합물을 형광물질에 연결시킴으로써, 게스트 화합물과의 선택적 결합을 형광변화를 이용하여 보다 손쉽게 관찰할 수 있는 형광화학센서(fluorescent chemosensor)의 개발에 대한 연구에 큰 도움을 주고 있다.

- <3> 형광이란 특정한 광파(여기 파장)를 갖는 광자가 표지 분자(indicator molecule)와 충돌하고, 그 충돌의 결과로 전자가 고에너지 준위로 여기(excitation)되면서 일어나는 광화학적 현상이다. 여러 분석 방법 중에서 형광을 이용하는 방법은 아주 뛰어난 감도로 인해 10^{-9} M 농도에서도 신호를 관찰할 수 있는 큰 장점을 가지고 있다. 최근에는 이러한 성질을 이용하여 양이온, 음이온 그리고 중성유기분자들에 대한 형광화학 센서에 대한 연구들이 발표된 바 있다.
- <4> 금속 이온의 생리적 조건에서의 높은 선택적 검출은 환경 및 생물학적 응용을 위한 형광화학센서 개발이라는 점에서 매우 중요하다[*Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecular Recognition*, Czarnik, A. W. Ed., American Chemical Society: Washington, DC, 1993.]. 특히, 수은 이온과 카드뮴 이온은 인간의 건강에 유해한 영향을 끼치기 때문에 생물학적으로 중요한 중금속이다. 대양과 화산에 의한 방출[Renzoni, A; Zino, F.; Franchi, E. *Environ. Res.* **1998**, *77*, 68.], 금 채광[Malm, O. *Environ. Res.* **1998**, *77*, 73.], 혹은 고체 폐기물 소각에 의한 수은 오염은 면역계, 유전자, 신경계에 대한 극심한 독성 때문에 큰 이슈가 되어왔다. 한편, 만성적인 카드뮴 노출은 신장 기능장애를 일으킬 수 있고 특정 암에 대한 발생 빈도를 높일 수 있다[*Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity*; Nordberg, G. F., Herber, R. F. M., Alessio, L., Eds.; Oxford University Press: Oxford, 1992]. 이와 같이 수은과 카드뮴은 매우 위험한 맹독성 오염물질이지만 불행하게도 우리 주변 환경 속에 많이 존재한다. 주변 환경 속에 존재하는 수은과 카드뮴은 먹이 사슬을 통해 축적된다. 먹이사슬의 상층에 위치할수록 축적도가 상승하기 때문에 음식물 섭취를 통해 인간에게 축적되는 오염물질의 수준도 높아진다. 수은과 카드뮴은 여러 가지 경로를 통해 물에 잘 용해되는 이온 형태(Hg^{2+} , Cd^{2+})로 전환되고 생선이나 다른 여러 음식물에 축적된다. 따라서 이들을 먹는 인간에게도 당연히 수은과 카드뮴의 축적이 일어난다. 그러므로 음식물에 존재하는 수은과 카드뮴의 함량을 잘 모니터링 하는 것은 인류의 건강을 지키는 중요한 활동 중 하나가 될 수 있다.
- <5> 따라서 상기 금속 이온에 대해 충분한 선택성을 갖는 새로운 형광화학센서의 개발에 큰 관심이 모아지고 있다. 수은 이온과 카드뮴 이온을 선택적으로 인식하는 많은 형광화학센서들이 보고되었으나, 수용액 내에서 수은 이온[K. S. Kim 등, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 907; X. Qian 등, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3721; S.-K. Chang 등, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3413; J.-G. Xu 등, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 859; Chang, S.-K 등, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 371; J. Tae 등, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16760; C. J. Chang 등, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10124; L. Jia 등, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2272; D. C. Magri 등, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8551]과 카드뮴 이온[X. Peng, 등, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1500; P. B. Savage 등, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1105; S.-K. Chang 등, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 125; R. Parkesh 등, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4065; J. Yoon 등, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24*, 1032; J. Soto 등, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 1769; J. Yoon 등, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3455]에 선택적으로 형광이 증가하는 형광화학센서의 예는 드물다.
- <6> 이에, 본 발명자들은 수은 이온 및 카드뮴 이온에 대해 선택적인 화합물에 대하여 연구하던 중, 아크리딘 유도체인 아자크라운 혹은 아자시아크라운을 도입하여 수용액 또는 세포 내에서 수은 이온과 카드뮴 이온을 검출할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명의 목적은 아크리딘 유도체를 제공하는데 있다.
- <8> 본 발명의 다른 목적은 아크리딘 유도체의 제조방법을 제공하는데 있다.
- <9> 본 발명의 또 다른 목적은 아크리딘 유도체를 이용한 수용액 환경 또는 생체 내에 존재하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<10> 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은 아크리딘 유도체를 제공한다.

<11> 또한 본 발명은 아크리딘 유도체의 제조방법을 제공한다.

<12> 나아가, 본 발명은 아크리딘 유도체를 이용한 수용액 환경 또는 생체 내에 존재하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출방법을 제공한다.

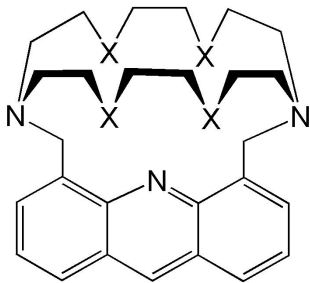
효 과

<13> 본 발명에 따른 아크리딘 유도체는 수은 이온과 카드뮴 이온의 첨가에 대해서만 pH 7.4에서 큰 킬레이트 증폭 형광 효과가 관찰되었고, 또한 종래에는 주로 유기용매에서 중금속 이온을 검출할 수 있었던 반면, 본 발명에 따른 화합물은 수용액 환경에서 수은 이온과 카드뮴 이온을 검출할 수 있을뿐 아니라, 세포 내로 투과될 수 있어 세포 내 수은 이온과 카드뮴 이온을 검출할 수 있으므로 수은 이온과 카드뮴 이온에 선택적인 신규한 형광화학센서로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<14> 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 아크리딘 유도체를 제공한다.

화학식 1

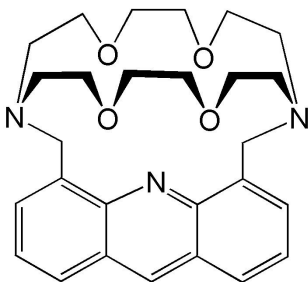


<15>

<16> 상기 화학식에서 X는 O 또는 S이다.

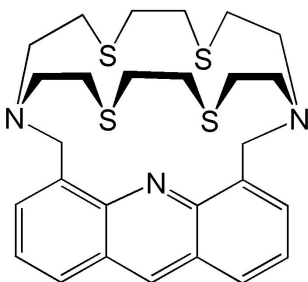
<17> 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 아크리딘 유도체는 하기 화학식 2의 아크리딘-아자크라운 유도체 또는 화학식 3의 아크리딘-아자시아크라운 유도체인 것이 바람직하다.

화학식 2



<18>

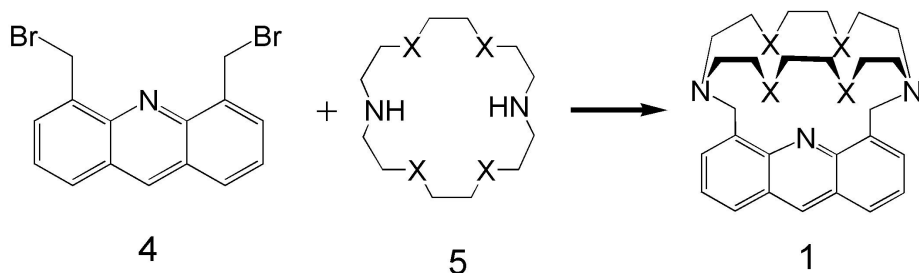
화학식 3



<19>

- <20> 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,
- <21> 화학식 4의 4,5-비스(브로모메틸)아크리딘과 염기를 용매에 녹인 용액에 화학식 5의 아자크라운 화합물을 첨가하여 반응시키는 단계(단계 1);
- <22> 상기 단계 1의 반응 결과물을 실온에서 교반한 후 여과한 다음 용매를 증발시키는 단계(단계 2); 및
- <23> 상기 단계 2의 반응 결과물에 대하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 정제하는 단계(단계 3)를 포함하는 아크리딘 유도체의 제조방법을 제공한다.

반응식 1



- <24>
- <25> (상기 반응식에서 X는 O 또는 S이다.)
- <26> 이하 본 발명을 단계별로 더욱 구체적으로 설명한다.
- <27> 본 발명에 따른 단계 1은 상기 화학식 4의 4,5-비스(브로모메틸)아크리딘과 염기를 용매에 녹인 용액에 상기 화학식 5의 아자크라운 화합물을 첨가하여 반응시키는 단계이다.
- <28> 본 발명에 따른 아크리딘 유도체는 상기 반응식 1에 나타낸 바와 같이 4,5-비스(브로모메틸)아크리딘을 출발물질로 사용하는 것이 바람직하며 상기 단계 1의 염기는 바람직하게는 탄산칼륨, 트리에틸아민, 탄산나트륨 등을 사용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 탄산칼륨을 사용할 수 있다.
- <29> 상기 단계 1의 용매는 클로로포름, 디클로로메탄, 아세토나이트릴 등을 사용할 수 있고, 바람직하게는 클로로포름을 사용할 수 있다.
- <30> 또한 상기 단계 1의 아자크라운 화합물은 4,13-디아자-18-크라운-6-에테르 또는 1,10-디아자-4,7,14,17-테트라시아사이클로옥타디칸을 사용할 수 있다.
- <31> 본 발명에 따른 단계 2는 상기 단계 1의 반응 결과물을 실온에서 교반한 후 여과한 다음 용매를 증발시키는 단계이다.
- <32> 상기 교반은 바람직하게는 24 시간 동안 수행할 수 있으며, 진공하에서 증발시킬 수 있다.
- <33> 본 발명에 따른 단계 3은 상기 단계 2의 반응 결과물에 대하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 정제하는 단계이다.
- <34> 상기 컬럼 크로마토그래피의 분리제로는 메틸클로라이드와 메탄올을 99:1로 혼합하여 사용할 수 있다.
- <35> 또한 본 발명은 상기 아크리딘 유도체를 이용한 수용액 환경 또는 생체 내에 존재하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 선택적 검출방법을 제공한다.
- <36> 상기 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 검출은 상기 아크리딘 유도체와 상기 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 복합체를 여기시켜 킬레이트 증폭 형광(CHEF) 효과를 확인함으로써 수행될 수 있으며, 이러한 증폭 형광 효과를 형광 이미지화함으로써 생체 내 또는 세포 내 존재하는 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온을 검출할 수 있다. 이 경우 상기 킬레이트 증폭을 위한 여기 파장은 356 nm인 것이 바람직하다.
- <37> 상기 이미지화는 본 발명에 따른 아자크라운-아크리딘 또는 아자시아크라운-아크리딘과 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온의 복합체를 이미지 복원 현미경(Image restoration microscope) 예를들면 DeltaVision 현미경을 사용하여 수행할 수 있다.
- <38> 이하, 본 발명을 실시예 및 도면을 참조하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는

것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<39> <실시예 1> 아자크라운-아크리딘의 제조

<40> 4,5-비스(브로모메틸)아크리딘(500 mg, 1.36 mmol) 및 탄산칼륨(751 mg, 5.4 mmol)의 반응 혼합물에 4, 13-디아자-18-크라운 6-에테르(360 mg, 1.36 mmol)를 첨가하였다.

<41> 상기 아자크라운을 첨가한 반응 혼합물을 실온에서 24시간동안 교반한 후 여과하여, 진공하에서 용매를 증발시켰다. 정제하지 않은 산물은 메틸클로라이드와 메탄올을 분리제로 사용하는 알루미나 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 연한 황색 기름상의 아자크라운-아크리딘(540 mg, 84%)을 수득하였다.

<42> $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) 8.71 (s, 1H), 7.87 (t, 4H, $J = 7.7$ Hz), 7.51 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 4.71 (s, 4H), 3.28-3.71 (m, 16H), 3.09 (t, 8H, $J = 6.1$ Hz);

<43> $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) 147.1, 139.5, 135.9, 130.7, 127.1, 126.3, 125.4, 70.4, 69.6, 55.1, 54.9;

<44> MS (FAB) $m/z = 466.2707$ (M+H) $^+$, calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_4 = 466.2706$.

<45> <실시예 2> 아자시아크라운-아크리딘의 제조

<46> 4,5-비스(브로모메틸)아크리딘 (500 mg, 1.36 mmol) 및 탄산칼륨(751 mg, 5.4 mmol)의 반응 혼합물에 1,10-디아자-4,7,14,17-테트라시아사이클로옥타디칸 (440 mg, 1.36mmol)을 첨가하였다.

<47> 상기 아자시아크라운을 첨가한 반응 혼합물을 실온에서 24시간동안 교반한 후 여과하여, 진공하에서 용매를 증발시켰다. 정제하지 않은 산물은 메틸클로라이드와 메탄올을 분리제로 사용하는 알루미나 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 연한 황색 기름상의 아자시아크라운-아크리딘(530 mg, 70%)을 수득하였다.

<48> $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) 8.69 (s, 1H), 7.89 (dd, 2H, $J = 8.5$ Hz & 1.2 Hz), 7.69 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz), 7.45 (dd, 2H, $J = 8.3$ Hz & 6.8 Hz), 4.57 (s, 4H), 3.03 (t, 8H, $J = 6.9$ Hz), 2.74 (m, 8H), 2.46 (m, 8H);

<49> $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) 147.2, 136.6, 134.7, 131.3, 127.9, 126.5, 125.3, 55.9, 53.2, 32.5, 29.4;

<50> MS (FAB) $m/z = 530.1786$ (M+H) $^+$, calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{S}_4 = 530.1792$.

<51> <실험예 1> 아자크라운-아크리딘과 중금속 이온들의 결합에 따른 형광 변화 관찰

<52> 1-1. 아자크라운-아크리딘과 중금속 이온들의 결합에 따른 형광 적정 실험

<53> 실험에는 Ag^+ , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cs^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} 및 Zn^{2+} 을 중금속 이온으로 사용하였다.

<54> 형광 금속 이온 적정 용액은, 금속 퍼클로레이트 염(metal perchlorate salts)의 저장액(stock solution)(1 mM)을 이중으로 증류한 탈염수(demineralized water)를 사용하여 제조하였으며 상기 실시예 1에서 제조한 아자크라운-아크리딘의 저장액(0.01 mM)은 다이메틸설폭사이드(DMSO)를 사용하여 제조하였다.

<55> 시험액은 40 μl 의 탐침 저장액을 시험관에 넣고, 각 금속 저장액의 적당량(0~400 μl , 예를들어 금속 1 당량의 경우 4 μl , 금속 10 당량의 경우 40 μl)을 가한 다음, 100 mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 용액을 4 mL로 희석시켜 제조하였다. 모든 형광변화는 여기과장(excitation, 356 nm)에서 측정하였다. 여기 및 방출의 슬릿폭 slit width)은 5 nm이었고 그 결과를 도 1에 나타내었다.

<56> 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 아자크라운-아크리딘은 pH 7.4에서 수은 이온과 카드뮴 이온의 첨가에 대해 독특한 방출 스펙트럼의 변화를 나타냈다. 즉, 수은 이온을 첨가하였을 때 큰 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내었고, 카드뮴 이온을 첨가하였을 때는 수소 이온을 첨가하였을 때 보다는 상대적으로 작은 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내었다. 반면, 100 당량의 다른 중금속 이온의 첨가에 대해서는 어떠한 의미 있는 변화도 나타나지 않았다. 이와 같이 아자크라운-아크리딘이 수소 이온과 카드뮴 이온에 대해서만 선택적으로 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내는 이유는 고정된 아자크라운 리간드와 아크리딘의 질소에 의한 것으로 판단된다. 따라

서 본 발명에 따른 아자크라운-아크리딘은 수은 이온과 카드뮴 이온에 매우 선택적으로 결합함을 알 수 있다.

<57> 1-2. 농도별 수은 이온에 대한 아자크라운-아크리딘의 형광 적정 실험

<58> 상기 아자크라운-아크리딘과 수은 이온 간의 결합 성질을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<59> 수은 이온의 저장 용액(10 mM)을 이중으로 증류한 탈염수를 사용하여 제조하였다. 또한, 상기 실시예 1에서 제조한 아자크라운-아크리딘의 저장액(0.01 mM)은 다이메틸설폭사이드(DMSO)를 사용하여 제조하였다.

<60> 시험액은 시험관 내로 탐침 저장 용액의 최종 농도가 3 μM 되도록 12 μl 담고, 수은 이온 저장 용액의 앨리쿼트(aliquot)를 0.5~20 당량이 되도록 1.5~60 μM 첨가한 후, 100mM HEPES 완충액 (pH 7.4)으로 용액을 4 ml로 희석시켜 제조하였다. 모든 형광변화는 여기과장(excitation, 356 nm)에서 측정하였다. 여기 및 방출의 슬릿폭 (slit width)은 5 nm이었고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<61> 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 아자크라운-아크리딘은 pH 7.4에서 최종 농도가 3 μM 일 때, 수은 이온의 첨가량이 0.5 당량에서 20 당량까지 늘어남에 따라 10배 이상의 총체적인 형광 증가를 나타냈다. 수은 이온과의 적정실험을 통해, 본 발명의 화합물과 수은 이온 복합체의 결합 상수는 $1.18 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 임을 알 수 있었다.

<62> 1-3. 농도별 카드뮴 이온에 대한 아자크라운-아크리딘의 형광 적정 실험

<63> 상기 아자크라운-아크리딘과 카드뮴 이온 간의 결합 성질을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<64> 카드뮴 이온의 저장 용액 (10mM)을 이중으로 증류한 탈염수를 사용하여 제조하였다. 또한, 상기 실시예 1에서 제조한 아자크라운-아크리딘의 저장액(0.01 mM)은 다이메틸설폭사이드(DMSO)를 사용하여 제조하였다. 상기 저장 액들은 제조 당일에 사용하였다.

<65> 시험 용액은, 시험관 내로 탐침 저장 용액 (본 발명의 아자크라운-아크리딘의 저장 용액)의 최종 농도가 3 μM 되도록 12 μl 담고, 카드뮴 이온 저장 용액의 앨리쿼트(aliquot)를 5~200 당량이 되도록 15~600 μM 첨가한 후, 100mM HEPES 완충액 (pH 7.4)으로 용액을 4 ml로 희석시켜 제조하였다. 모든 형광변화는 여기과장(excitation, 356 nm)에서 측정하였다. 여기 및 방출의 슬릿폭 (slit width)은 5 nm이었고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

<66> 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 아자크라운-아크리딘은 pH 7.4에서 최종 농도가 3 μM 일 때, 카드뮴 이온의 첨가량이 5 당량에서 200 당량까지 늘어남에 따라 5배 이상의 총체적인 형광 증가를 나타냈다. 카드뮴 이온과의 적정실험을 통해, 본 발명의 화합물과 카드뮴 이온 복합체의 결합 상수는 $4.48 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 임을 알 수 있었다.

<67> <실험예 2> 아자시아크라운-아크리딘과 중금속 이온들의 결합에 따른 형광 변화 관찰

<68> 2-1. 아자시아크라운-아크리딘과 중금속 이온들의 결합에 따른 형광 적정 실험

<69> 실험에는 Ag^+ , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cs^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} 및 Zn^{2+} 을 중금속 이온으로 사용 하였다.

<70> 형광 금속 이온 적정 용액은, 금속 퍼클로레이트 염(metal perchlorate salts)의 저장액(stock solution)(1 mM)을 이중으로 증류한 탈염수(demineralized water)를 사용하여 제조하였다. 또한, 상기 실시예 2에서 제조한 아자시아크라운-아크리딘의 저장액(0.01 mM)은 다이메틸설폭사이드(DMSO)를 사용하여 제조하였다.

<71> 시험액은 40 μl 의 탐침 저장액을 시험관에 넣고, 각 금속 저장액의 적당량(0~400 μl , 예를들어 금속 1당량의 경우 4 μl , 금속 10당량의 경우 40 μl)을 가한 다음, 100 mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 용액을 4 mL로 희석시켜 제조하였다. 모든 형광변화는 여기과장(excitation, 356 nm)에서 측정하였다. 여기 및 방출의 슬릿폭 (slit width)은 5 nm 이었고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<72> 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 아자시아크라운-아크리딘의 방출 스펙트럼은 pH 7.4에서 수은 이온과 카드뮴 이온의 첨가에 대해 독특한 변화를 나타냈다. 수은 이온을 첨가하였을 때 작은 킬레이트 증폭 형광 효과가 나타났지만 큰 선택성을 보였고 반면, 카드뮴 이온을 첨가하였을 때 수은 이온보다 선택성이 좋지 않았으나 큰 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내었다. 반면, 100 당량의 다른 음이온의 첨가에 대해서는 어떠한 의미 있는 변화도 나타나지 않았다. 이와 같이 아자시아크라운-아크리딘이 수소 이온과 카드뮴 이온에 대해서만 선택적으로 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내는 이유는 고정된 아자시아크라운 리간드와 아크리딘의 질소에 의한 것으

로 판단된다. 따라서, 본 발명에 따른 아자시아크라운-아크리딘은 수은 이온과 카드뮴 이온에 매우 선택적으로 결합함을 알 수 있다.

<73> 2-2. 농도별 수은 이온에 대한 아자시아크라운-아크리딘의 형광 적정 실험

<74> 상기 아자시아크라운-아크리딘과 수은 이온 간의 결합 성질을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<75> 수은 이온의 저장 용액(10mM)을 이중으로 증류한 탈염수를 사용하여 제조하였다. 또한, 상기 실시예 2에서 제조한 아자시아크라운-아크리딘의 저장액(0.01 mM)은 다이메틸설폭사이드(DMSO)를 사용하여 제조하였다.

<76> 시험액은, 시험관 내로 탐침 저장 용액의 최종 농도가 3 μM 되도록 12 μl 담고, 수은 이온 저장 용액의 앨리쿼트(aliquot)를 0.2~2 당량이 되도록 0.6~6 μM 첨가한 후, 100mM HEPES 완충액 (pH 7.4)으로 용액을 4 ml로 희석시켜 제조하였다. 모든 형광변화는 여기 파장(356nm)에서 측정하였다. 여기 및 방출의 슬릿폭은 5 nm로 측정하였고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

<77> 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 아자크라운-아크리딘은 pH 7.4에서 최종 농도가 3 μM 일 때, 수은 이온의 첨가량이 0.2 당량에서 2 당량까지 늘어남에 따라 4배 이상의 총체적인 형광 증가를 나타냈다. 수은 이온과의 적정실험을 통한, 본 발명의 화합물과 수은 이온 복합체의 결합 상수가 10^8 을 초과하는 것으로 보아 수은 이온에 매우 선택적임을 알 수 있었다.

<78> 2-3. 농도별 카드뮴 이온에 대한 아자시아크라운-아크리딘의 형광 적정 실험

<79> 상기 아자시아크라운-아크리딘과 카드뮴 이온 간의 결합 성질을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<80> 카드뮴 이온의 저장 용액 (10mM)을 이중으로 증류한 탈염수를 사용하여 제조하였다. 또한, 상기 실시예 2에서 제조한 아자시아크라운-아크리딘의 저장액(0.01 mM)은 다이메틸설폭사이드(DMSO)를 사용하여 제조하였다.

<81> 시험액은 시험관 내로 탐침 저장 용액의 최종 농도가 3 μM 되도록 12 μl 담고, 카드뮴 이온 저장 용액의 앨리쿼트(aliquot)를 1~300 당량이 되도록 3~900 μM 첨가한 후, 100mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 용액을 4 ml로 희석하여 제조하였다. 모든 형광변화는 여기 파장(356nm)에서 측정하였다. 여기 및 방출 슬릿폭은 5 nm이었고 그 결과를 도 6에 나타내었다.

<82> 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 아자크라운-아크리딘은 pH 7.4에서 최종 농도가 3 μM 일 때, 카드뮴 이온의 첨가량이 1 당량에서 300 당량까지 늘어남에 따라 6배 이상의 총체적인 형광 증가를 나타냈다. 카드뮴 이온과의 적정실험을 통해, 본 발명의 화합물과 카드뮴 이온 복합체의 결합 상수는 $3.28 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 임을 알 수 있었다.

<83> 분석

<84> 1. 아자크라운-아크리딘과 중금속 이온의 복합체의 형광 적정 결과 분석

<85> 아자크라운-아크리딘과 수은 이온 및 카드뮴 이온의 복합체 이외에 다른 중금속 이온과의 결합에 대해서는 미미한 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내었을 뿐, 어떠한 의미있는 변화도 관찰되지 않았다. 아자크라운-아크리딘과 수은 이온의 복합체에 대해서는 pH 7.4에서 최종 농도가 3 μM 일 때, 수은 이온의 첨가량이 0.5 당량에서 20 당량까지 늘어남에 따라 10 배 이상의 총체적인 형광 증가를 관찰할 수 있었다.

<86> 또한 아자크라운-아크리딘과 카드뮴 이온의 복합체에 대해서는 pH 7.4에서 최종 농도가 3 μM 일 때, 카드뮴 이온의 첨가량이 5 당량에서 200 당량까지늘어남에 따라 10 배 이상의 총체적인 형광 증가를 관찰할 수 있었다.

<87> 상기 결과로부터 본 발명에 따른 아자크라운-아크리딘은 수은 이온과 카드뮴 이온에 매우 선택적으로 결합함을 알 수 있다.

<88> 2. 아자시아크라운-아크리딘과 중금속 이온의 복합체의 형광 적정 결과 분석

<89> 상기 1과 같이, 아자시아크라운-아크리딘과 수은 이온 및 카드뮴 이온의 복합체 이외에 다른 중금속 이온과의 결합에 대해서는 미미한 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내었을 뿐, 어떠한 의미있는 변화도 관찰되지 않았다.

<90> 아자시아크라운-아크리딘과 수은 이온의 복합체에 대해서는 pH 7.4에서 최종 농도가 3 μM 일 때, 수은 이온의

첨가량이 0.5 당량에서 20 당량까지 늘어남에 따라 4 배 이상의 총체적인 형광 증가를 관찰할 수 있었다.

<91> 또한 아자시아크라운-아크리딘과 카드뮴 이온의 복합체에 대해서는 pH 7.4에서 최종 농도가 3 μM 일 때, 카드뮴 이온의 첨가량이 1 당량에서 200 당량까지 늘어남에 따라 6 배 이상의 총체적인 형광 증가를 관찰할 수 있었다.

<92> 상기 결과로부터 본 발명에 따른 아자시아크라운-아크리딘은 수은 이온과 카드뮴 이온에 매우 선택적으로 결합함을 알 수 있다.

<93> <실험예 3> NMR을 이용한 아자시아크라운-아크리딘과 수은 이온의 복합체 형성 여부 측정 실험

<94> 상기 아자시아크라운-아크리딘을 3 mM의 농도로 1 ml의 $\text{DMSO}-d_6$ 에 녹이고 수은 이온을 0.25 M의 농도로 $\text{DMSO}-d_6$ 를 사용하여 제조한다. 아자시아크라운-아크리딘을 녹인 용액 및 아자시아크라운-아크리딘에 수은 이온을 0.4 당량, 1 당량, 2 당량 첨가한 용액의 ^1H NMR을 측정하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 아자시아크라운-아크리딘(3 mM)만 녹인 $\text{DMSO}-d_6$ 용액의 경우에 비해 수은 이온을 첨가하였을 때 방향족 부근의 피크들이 왼쪽으로 이동하였다. 예컨대, 상기 아자시아크라운-아크리딘만 녹인 용액의 경우 9.09 ppm에서 H-9 피크를 관찰할 수 있었으며(도 7의 (a) 참조), 수은 이온을 2 당량 첨가하였을 때 용액은 9.49 ppm에서 H-9 피크를 관찰할 수 있었다(도 7의 (d) 참조). 상기의 결과는 아자시아크라운-아크리딘이 수은 이온과 결합 상태로 존재한다는 것을 나타내는 것으로 판단된다.

<95> <실험예 4> 아자크라운-아크리딘 및 아자시아크라운-아크리딘과 수은 이온, 카드뮴 이온의 복합체의 세포 내 작동 여부 측정 실험

<96> SK-N-SH 세포를 항온습도유지장치에서 배양용액(10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 units/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토미신이 포함된 MEM)에서 배양시켰다. 또한 세포주 HaCaT 인간 각질 세포와 세포주 HCT116 인간 대장암 세포를 100 units/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토미신, 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI 1640에서 배양시켰다. 하나의 칸 당 104 개의 세포 밀도로 24-칸 플레이트의 커버글라스 위에서 배양되었다. 24시간 후 세포에 50~200 μM 의 염화수은 혹은 염화카드뮴을 넣어 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 이산화탄소 환경의 배지에서 배양시킨 뒤, PBS(phosphate-buffered saline)로 세 번 세척한 후 잔류 수은 이온 또는 카드뮴 이온을 제거하였다. PBS로 세척한 후, 처리된 세포를 50 μM 의 상기 아자크라운-아크리딘 또는 아자시아크라운-아크리딘에 넣고 1시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 배지에서 배양하였다. PBS로 세 번 세척한 후 잔류 화합물을 제거하고, 세포를 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정시키고 PBS로 다시 행귀준 후, 커버 글라스를 슬라이드 글라스에 붙였다. 세포의 형광 이미지는 DeltaVision 현미경으로 관찰하였다. 모든 이미지는 노출 시간(0.1 sec), 밝기, 대조 등의 환경이 고정된 상태에서 측정되었고 그 결과를 도 8에 나타내었다.

<97> 도 8의 (a) 와 (c)는 각각 아자크라운-아크리딘과 아자시아크라운-아크리딘 단독을 DeltaVision 현미경으로 관찰한 결과를 나타내는 것으로 형광 이미지가 관찰되지 않았고, 도 8의 (b)는 아자크라운-아크리딘과 수은 이온의 복합체를 HaCaT 인간 각질 세포주 내에서 관찰한 것이고, (d)는 아자시아크라운-아크리딘과 카드뮴 이온의 복합체를 SK-N-SH 인간 신경아세포주 내에서 관찰한 것이며, (e)와 (f)는 각각 아자시아크라운-아크리딘과 카드뮴 이온의 복합체를 HCT-116 인간 대장암 세포주 내에서 관찰한 광학 이미지와 형광 이미지를 나타낸 것으로 아자크라운-아크리딘과 아자시아크라운-아크리딘은 수은 이온 및/또는 카드뮴 이온과 결합하여 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타냄을 관찰할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<98> 도 1은 pH 7.4(100mM HEPES 완충액)에서 아자크라운-아크리딘(3 μM)에 100 당량의 수은 이온, 카드뮴 이온 및 여러 금속 이온 (Ag^+ , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cs^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} 및 Zn^{2+})을 가하였을 때의 형광 변화를 나타낸 그래프이고,

<99> 도 2는 pH 7.4(100mM HEPES 완충액)에서 아자크라운-아크리딘(3 μM)에 수은 이온의 농도를 달리하여(0.5~20 당량) 가하였을 때의 형광 적정을 나타낸 그래프이고,

<100> 도 3은 pH 7.4(100mM HEPES 완충액)에서 아자크라운-아크리딘(3 μM)에 카드뮴의 농도를 달리하여(5~200 당량) 가하였을 때의 형광 적정을 나타낸 그래프이고,

<101> 도 4는 pH 7.4(100mM HEPES 완충액)에서 아자시아크라운-아크리딘(3 μM)에 100 당량의 수은 이온, 카드뮴 이온 및 여러 금속이온 (Ag^+ , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cs^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} 및 Zn^{2+})을 가하였을 때

의 형광 변화를 나타낸 그래프이고,

<102> 도 5는 pH 7.4(100mM HEPES 완충액)에서 아자시아크라운-아크리딘($3 \mu\text{M}$)에 수은의 농도를 달리하여(5~200 당량) 가하였을 때의 형광 적정을 나타낸 그래프이고,

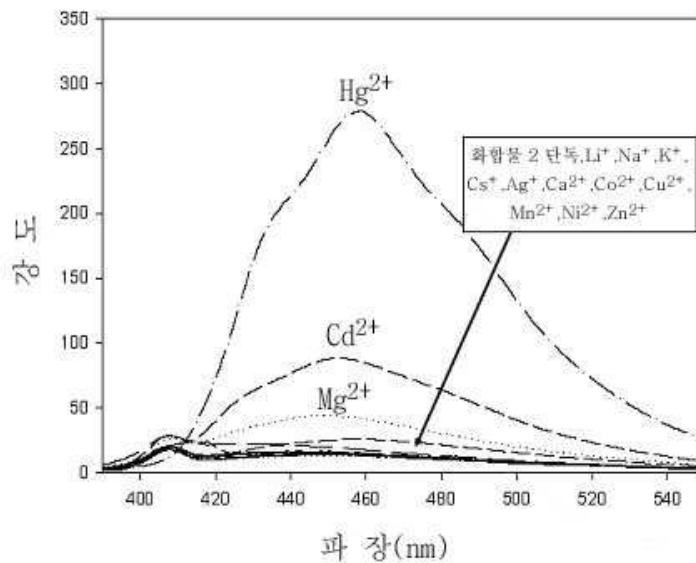
<103> 도 6는 pH 7.4(100mM HEPES 완충액)에서 아자시아크라운-아크리딘($3 \mu\text{M}$)에 카드뮴의 농도를 달리하여 (1 내지 300 당량) 가하였을 때의 형광 적정을 나타낸 도이며,

<104> 도 7은 아자크라운-아크리딘(3 mM, (a)) 및 다이메틸설폭사이드(DMSO)에서 수은 이온((b) : 0.4 당량, (c) : 1 당량, (d) : 2 당량)과 아자크라운-아크리딘(3 mM)간 복합체의 ^1H NMR 스펙트라를 나타낸 그래프이고,

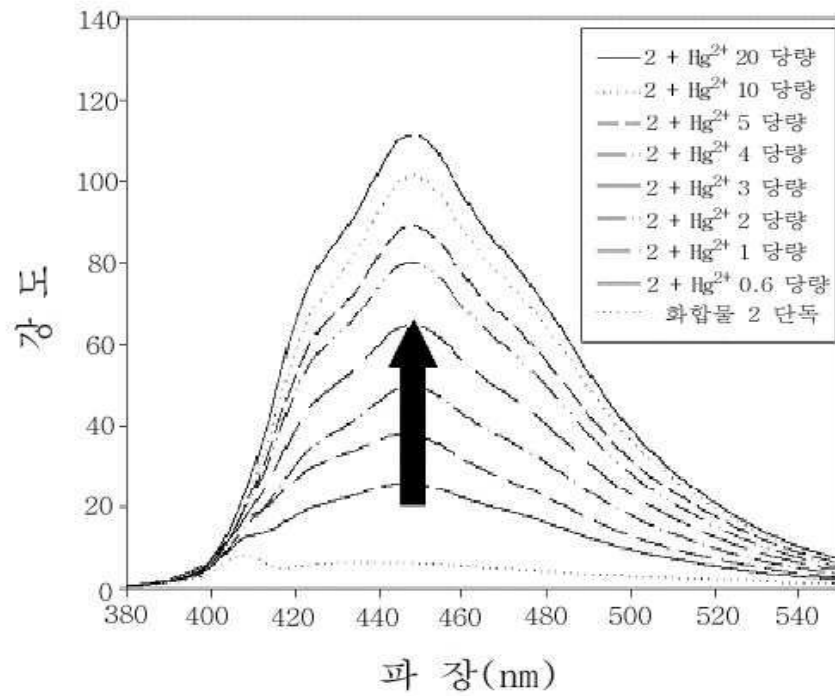
<105> 도 8은 아자크라운-아크리딘($50 \mu\text{M}$, (a)), 수은 이온($50 \mu\text{M}$)과 아자크라운-아크리딘의 복합체의 HaCaT 인간 각질 세포주 내에서의 형광 이미지(b), 아자시아크라운-아크리딘($50 \mu\text{M}$, (c)), 카드뮴 이온 ($50 \mu\text{M}$)과 아자시아크라운-아크리딘 간의 복합체의 SK-N-SH 인간 신경아세포주 내에서의 형광 이미지(d), 카드뮴 이온 ($50 \mu\text{M}$)과 아자시아크라운-아크리딘의 복합체의 HCT-116 인간 대장암 세포주 내에서의 광학 이미지(e) 및 카드뮴 이온 ($50 \mu\text{M}$)과 아자시아크라운-아크리딘의 복합체의 HCT-116 인간 대장암 세포주 내에서의 형광 이미지(f)를 나타낸 사진이다.

도면

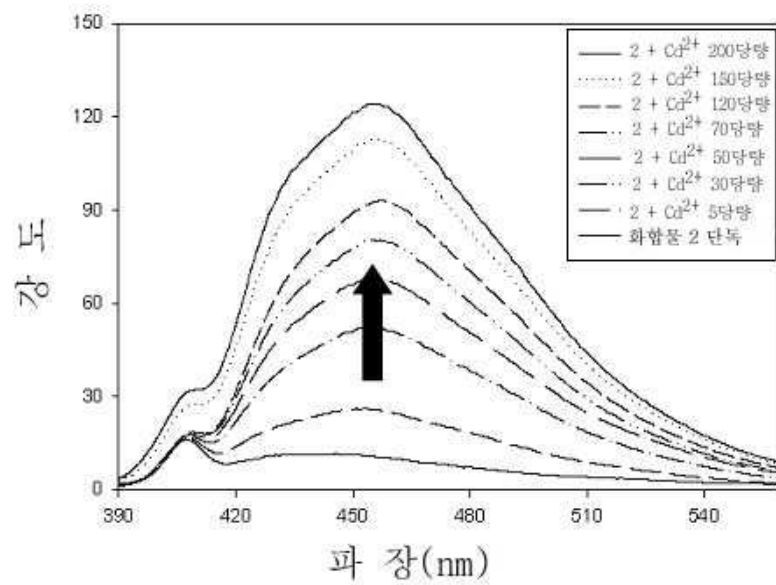
도면1



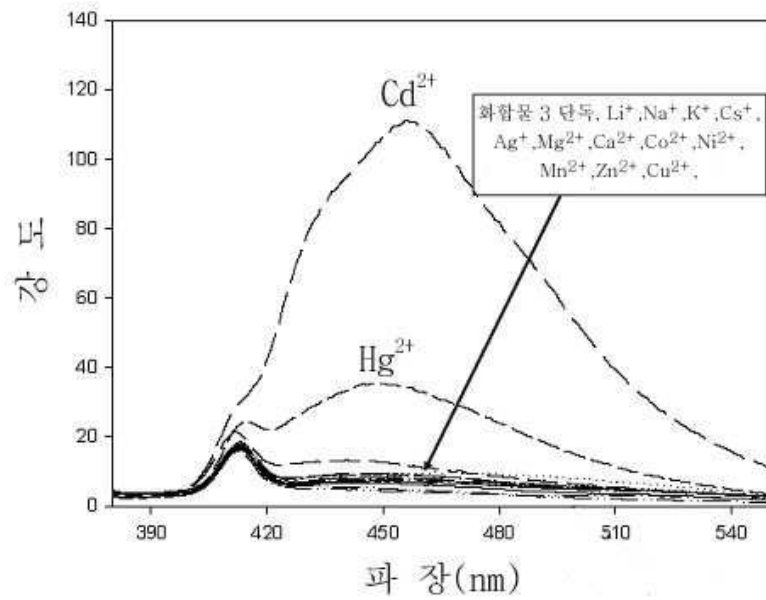
도면2



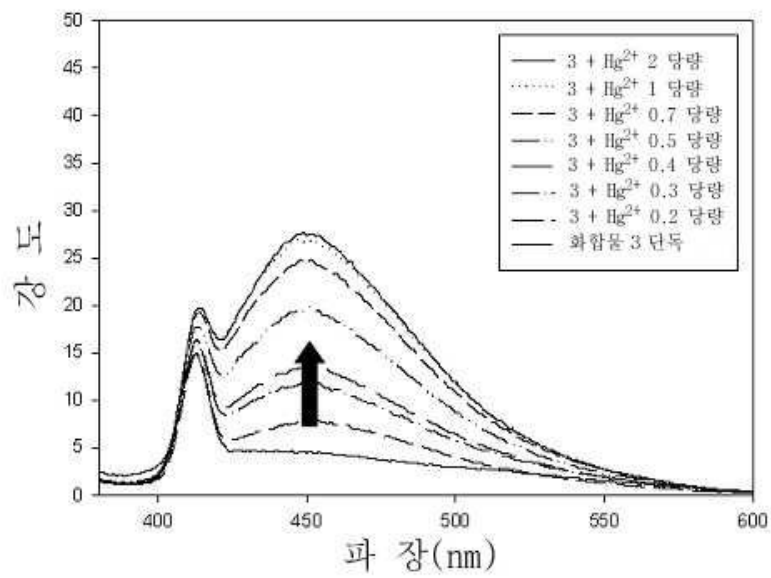
도면3



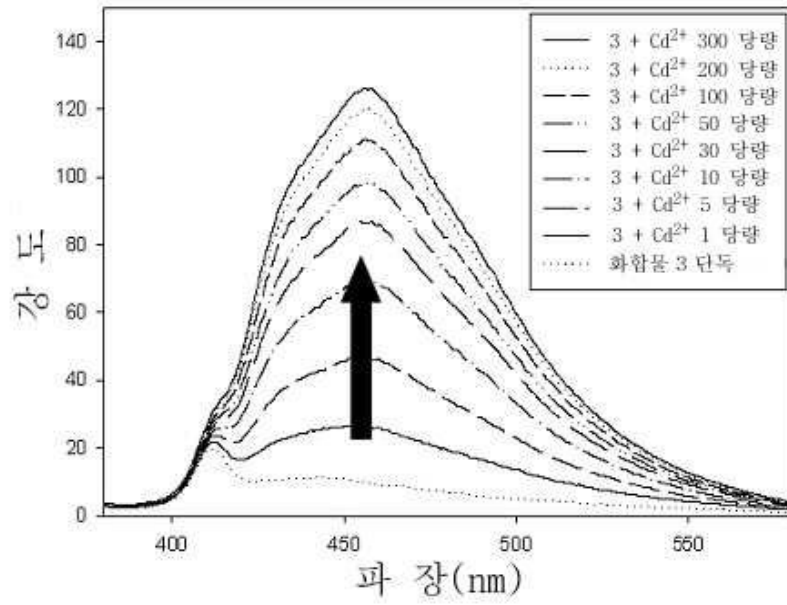
도면4



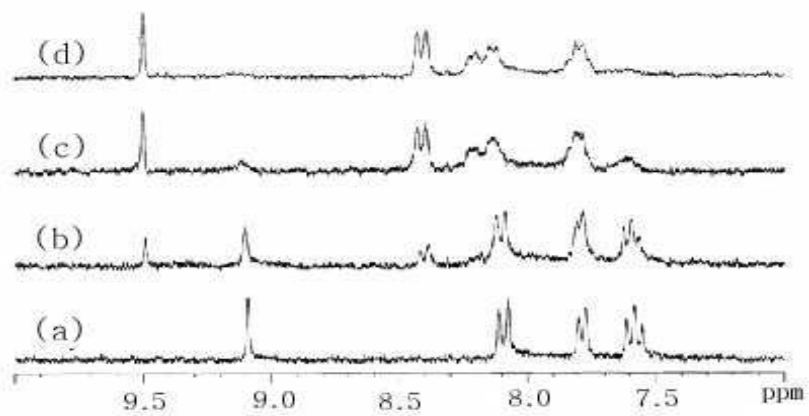
도면5



도면6



도면7



도면8

