



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0050447
(43) 공개일자 2017년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 31/22 (2006.01) C07D 265/38 (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 31/22 (2013.01)
C07D 265/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0151981
(22) 출원일자 2015년10월30일
심사청구일자 2015년10월30일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김중승
경기도 성남시 분당구 내정로 152 130-2402(수내동, 파크타운롯데아파트)
장주희
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 화학과 (안암동5가)
정효성
서울특별시 강남구 선릉로 221, 304동 1204호(도곡동, 도곡렉슬아파트)
(74) 대리인
정은열

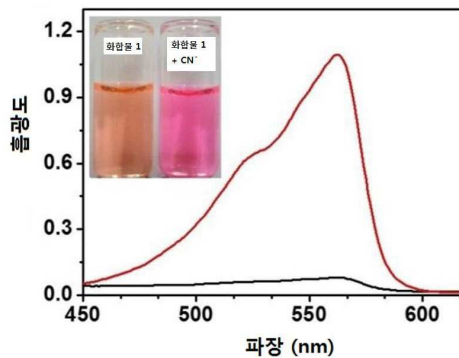
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 KCN 검출용 프로브 화합물 및 그 제조방법

(57) 요약

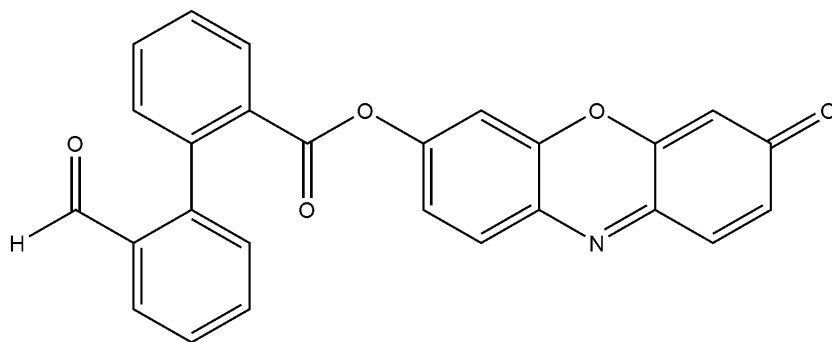
본 발명은 KCN 검출용 프로브 화합물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 하기 화학식 1로 표시되는 KCN 검출 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



용 화합물에 관한 것이다:

[화학식 1]



본 발명에 따른 KCN 검출용 화합물은 분자내 교차-벤조인 반응을 기반으로 수성 환경 내에서 매우 낮은 농도의 KCN도 매우 빠른 응답속도로 용이하게 검출할 수 있으며, 세포 환경 내 KCN의 추적도 가능하므로, 환경, 임상 및 약제학적 분야에서 매우 큰 효용성을 갖는다.

(52) CPC특허분류

G01N 21/77 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015001883

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 발광센서재료연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.28

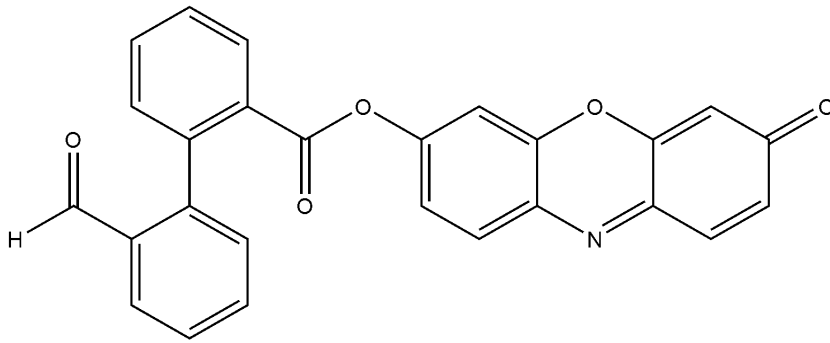
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 KCN 검출용 화합물:

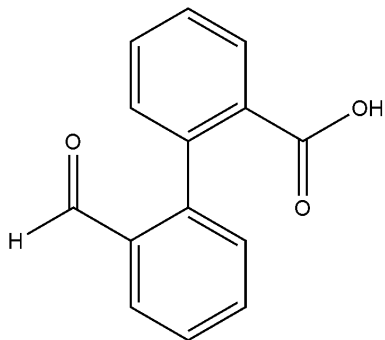
[화학식 1]



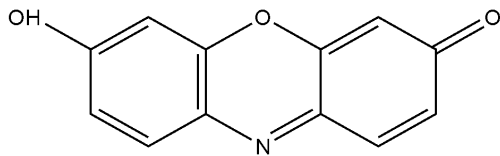
청구항 2

하기 화학식 2의 화합물과 하기 화학식 3의 화합물을 반응시킴으로써 하기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 KCN 검출용 화합물의 제조방법:

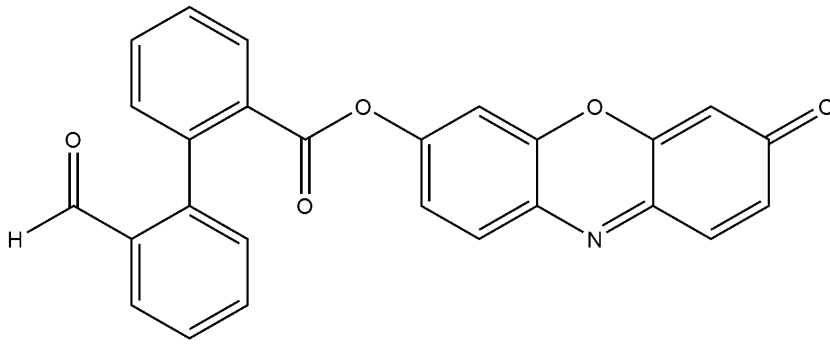
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 KCN 검출용 프로브 화합물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 형광 프로브는 변형이 쉽고 저렴하며 분석물에 대해 빠른 반응을 나타내기 때문에 생물학적 활성 분자, 치료제, 단백질과 이온을 검출하기 위해 널리 이용되고 있다. 그 중에서도, CN^- 감지용 형광 프로브는 CN^- 이온이 특히 강력한 이온 형태로서, 예를 들면 KCN과 NaCN으로 있을 때 인체 건강에 극히 유독하기 때문에 매우 중요하다. CN^- 이온은 시토크롬 c 옥시다아제의 기능을 방해함으로써 세포 호흡 과정을 저해하고, 또한 시토크롬 a_3 의 활성 부위에서 헴 단위와 안정한 착체를 형성한다.

[0003] 세포 환경에서 CN^- 이온은 세포내 칼슘 이온의 농도 증가를 유도하여 결국에는 인간의 산화적 면역 방어체계를 손상시키는 세포 활성 산소종 (ROS)을 증가시키는 다단계 효소반응을 일으킨다. 그럼에도 불구하고, CN^- 이온은 금은 추출, 제혁, 전기 도금 등을 위한 광업 등의 산업에서 널리 사용되고 있다. 게다가, CN^- 이온은 인간 사회에서 대량 파괴용으로 화학전에서 사용될 수 있다.

[0004] 이에 따라, 광학적 방법을 이용하여 수성 환경 내 CN^- 이온을 빠르고 확실하면서 선택적으로 검출하는 것이 매우 중요하다 하겠다. 종래에, H-결합 모티프, 옥사진 (비특허문헌 1), 양이온성 보란 유도체 (비특허문헌 2), 아크리디늄염 (비특허문헌 3), β -턴 모티프 (비특허문헌 4), 형광 양상블 (비특허문헌 5)과 반응 기반 화학도시미터 (비특허문헌 6)를 토대로 CN^- 센서를 개발하려는 노력이 있어 왔다. 이들 시스템 대부분은 색차나 형광 변화를 통해 응답하는 것으로, 몇 가지 경우에는 육안으로 관찰할 수 있는 색차와 형광 변화 모두를 나타내었다.

[0005] 그러나, 종래 보고된 CN^- 센서 대부분은 비수성 환경 내 NH_4CN 에 의해 작동하는 것으로서, 수성 환경 내 KCN 또는 NaCN 감지에 대한 연구는 거의 없었다. 한편, KCN과 NaCN은 NH_4CN 보다 더 큰 독성을 나타내므로, 수성 환경 내 KCN과 NaCN을 검출하는 형광 프로브를 개발하는 것은 매우 중요한 사항이다.

[0006] 관련하여, 특허문헌으로서, 수성 조건에서 다른 음이온 중에 비해서 시아나이드 이온을 선택적으로 검출하는 것이 가능한 쿠마린-Cu(II) 착화합물을 포함하는 시아나이드 이온 검출용 영상화 조성물 (특허문헌 1), 플루오레세인 알데하이드를 이용한 시안화 이온의 검출 방법 (특허문헌 2), 시아나이드 음이온의 선택적 검출이 가능한 보디피 계열의 형광 센서 (특허문헌 3) 및 수성 매질에서 Zn^{2+} 및 CN^- 이온을 각각 선택적으로 검출하는 것이 가능한 비피리딘 화합물 및 비피리딘-아연 착화합물 (특허문헌 4)을 개시한 문헌들이 존재한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 대한민국 공개특허공보 제2014-0057226호
(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 대한민국 공개특허공보 제2009-0110601호
(특허문헌 0003) 특허문헌 3: 대한민국 공개특허공보 제2013-0017879호

(특허문헌 0004) 특허문헌 4: 미국 공개특허공보 제2012/0231547 A1호

비특허문헌

[0008]

(비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: R. Badugu 등, Cyanide-sensitive fluorescent probes, *Dyes Pigm.*, 2005, 64, 49.

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: M. Tomasulo 등, Colorimetric Detection of Cyanide with a Chromogenic Oxazine, *Org. Lett.*, 2005, 7, 4633-4636.

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: T. W. Hudnall 등, Ammonium boranes for the selective complexation of cyanide or fluoride ions in water, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 11978.

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Y.-K. Yang 등, An Acridinium Salt-Based Fluorescent and Colorimetric Chemosensor for the Detection of Cyanide in Water, *Org. Lett.*, 2006, 8, 5721.

(비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: J. Jo 등, Turn-On Fluorescence Detection of Cyanide in Water: Activation of Latent Fluorophores through Remote Hydrogen Bonds That Mimic Peptide β -Turn Motif, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 16283.

(비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: R. Guliyev 등, Cyanide sensing via metal ion removal from a fluorogenic BODIPY complex, *Tetrahedron Lett.*, 2009, 50, 5139.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

이에, 본 발명에서는 분자내 교차-벤조인 반응을 기반으로 수성 환경 내에서 매우 낮은 농도의 KCN도 매우 빠른 응답속도로 용이하게 검출할 수 있고, 세포 환경 내 KCN의 추적도 가능하게 하는 KCN 검출용 프로브 화합물 및 그 제조방법을 제공하고자 한다.

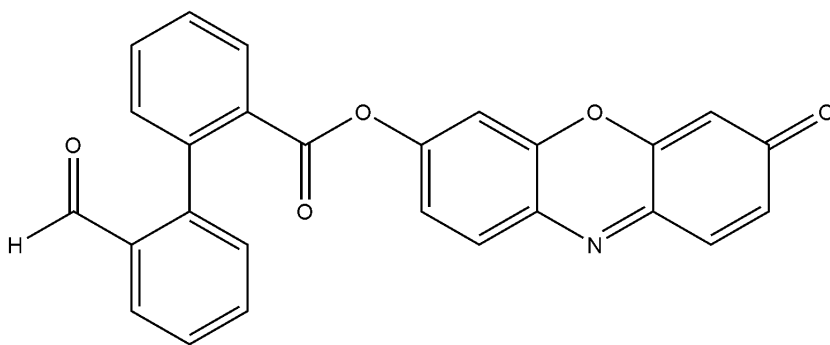
과제의 해결 수단

[0010]

본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서, 하기 화학식 1로 표시되는 KCN 검출용 화합물을 제공한다:

[0011]

[화학식 1]

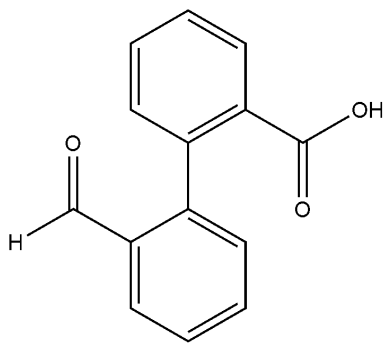


[0012]

[0013]

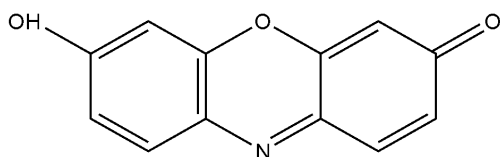
또한, 본 발명은 하기 화학식 2의 화합물과 하기 화학식 3의 화합물을 반응시킴으로써 상기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 글루타티온 검출용 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0014] [화학식 2]



[0015]

[0016] [화학식 3]



[0017]

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 KCN 검출용 화합물은 분자내 교차-벤조인 반응을 기반으로 수성 환경 내에서 매우 낮은 농도의 KCN도 매우 빠른 응답속도로 용이하게 검출할 수 있으며, 세포 환경 내 KCN의 추적도 가능하므로, 환경, 임상 및 약제학적 분야에서 매우 큰 효용성을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1a는 화합물 1 (10 μ M) 및 화합물 1 + 10 당량의 CN^- 에 대한 UV-visible 스펙트럼을 도시한 도면이며, 도 1b는 1% DMSO가 포함된 PBS 완충용액 (10 mM, pH 7.4) 중 565 nm에서 여기시 화합물 1 (10 μ M) 및 화합물 1 + 10 당량의 CN^- 에 대한 형광 스펙트럼을 도시한 도면이다 (슬릿폭: ex 1.5/em 1.5, 삽입 사진은 365 nm의 (a) 가시광선 램프 및 (b) UV 램프하에서 촬영한 화합물 1(10.0 μ M)의 사진과 10 당량의 CN^- 첨가시 화합물 1의 사진을 도시한 것이다).

도 2a는 다양한 CN^- 농도 (0-3 당량)에 따른 화합물 1 (10 μ M)의 형광 스펙트럼을 도시한 도면이고, 도 2b는 1% DMSO가 포함된 PBS 완충액 (10 mM, pH 7.4) 중 10 당량의 CN^- 의 존재 및 부재에 따른 화합물 1 (10 μ M)의 형광 세기의 시간에 따른 변화 (λ_{ex} = 565 nm, λ_{em} = 595 nm, 여기 및 방출 슬릿 폭: 1.5 nm)를 도시한 도면이며, 도 2c는 CN^- 부재 상태에서 최소 형광 세기 (그래프 상에는 1 nM로서 나타나 있음)와 최대 형광 세기 (1 μ M CN^-)에 대해 정규화한 프로브의 형광 세기를 도시한 도면이고, 도 2d는 다양한 음이온 (CN^- , 부재, F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CH_3CO_2^- , HPO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- , ClO_4^- , SCN^- , GSH, Cys, Hcy; 10 당량)으로 처리한 화합물 1 (10 μ M) 함유 시험지의 색변화를 나타낸 사진이다.

도 3a는 10 당량의 다양한 음이온과 티올이 존재하는 상태에서 화합물 1 (10 μ M)의 형광 스펙트럼을 도시한 도면이고, 도 3b는 다양한 음이온과 티올 첨가시 화합물 1의 방출 세기 (적색 막대) 및 다양한 금속 이온 (1: CN^- , 2: F^- , 3: Cl^- , 4: Br^- , 5: I^- , 6: CH_3CO_2^- , 7: HPO_4^{2-} , 8: HCO_3^- , 9: NO_3^- , 10: ClO_4^- , 11: SCN^- , 12: GSH, 13: Cys, 14: Hcy)을 첨가한 후 CN^- 이온이 존재하는 상태에서 방출 세기 (검정색 막대)를 나타낸 도면이다.

도 4는 1% DMSO가 포함된 PBS 완충액 (10 mM) 중 565 nm에서 여기 및 595 nm에서 방출시 다양한 pH 값 (pH 4-9)에서 화합물 1 (10 μ M) + 10 당량의 CN^- 의 형광 세기를 도시한 그래프이다 (슬릿폭: ex 1.5/em 1.5).

도 5는 화합물 1 (적색), 화합물 1 + CN^- (청색), 레소루핀 (녹색) 및 9,10-페난트렌퀴논 (검정색)에 대한 ^1H -

NMR 스펙트럼을 도기한 도면이다 (400 MHz, 10% D₂O가 포함된 DMSO-*d*₆, 삽입 사진: 365 nm의 UV 램프하에서 촬영한 화합물 1 (1), 화합물 1 (10 μM) + 10 당량의 CN (2) 및 레소루핀 (3)의 사진).

도 6은 본 발명에 따른 화합물에 있어서, 9,10-페난트렌퀴논을 생성하는 KCN 촉매화 분자내 교차-벤조인 반응에 대한 반응 개요도를 도기한 도면이다.

도 7은 HeLa 세포주에서 화합물 1을 세포와 함께 24 시간 동안 배양하고 MTT 분석을 통해 세포 생존율을 관찰한 결과를 도기한 도면이다.

도 8a는 화합물 1 (2 μM)로 처리한 HeLa 세포의 공초점 레이저 형광 현미경 사진이며 (다양한 농도 (0, 0.5 및 1.0 ppm)의 CN⁻를 함유한 배지와 함께 세포를 37℃에서 30분간 전배양. 각각 여기 파장 543 nm와 방출 파장 570-630 nm를 이용하여 세포 사진을 얻음. 녹색 신호), 도 8b는 HeLa 세포에서 실시한 공국재화 실험의 공초점 현미경 사진이다 (ii) 및 v): 20분 동안 화합물 1 (5 μM)이 함유된 HeLa 세포의 형광 사진으로서, 30분 동안 CN⁻ (0.5 ppm)를 함유한 배지와 함께 세포를 전배양. i) 10분 동안 Mito tracker green FM (0.5 μM). iii) i)과 ii)를 겹쳐놓은 합성사진. iv) 10분 동안 ER-tracker green (0.5 μM). vi) iv)와 v)를 겹쳐놓은 합성 사진. 상기 세포 사진은 각각 여기 파장 514 nm 및 543 nm와 대역통과 (520-550 nm, 녹색 신호)와 (570-630 nm, 적색 신호) 방출 필터를 이용하여 얻었다).

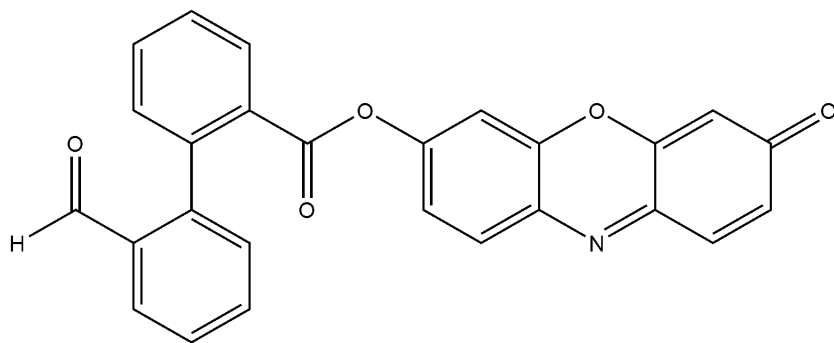
도 9a 내지 9d는 HeLa 세포에서 실시한 공국재화 실험의 공초점 현미경 사진 및 대상 영역의 형광 세기 변화를 나타낸 그래프로서, 도 9a는 Mito tracker green FM (0.5 μM) + 화합물 1 (5 μM)의 공초점 현미경 사진, 도 9c는 ER-tracker green (0.5 μM) + 화합물 1 (5 μM)의 공초점 현미경 사진이며, 도 9b 및 9d는 각각 9a 및 9c에서 대상 영역의 형광 세기 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

본 발명에서는 KCN 선택적 화학도시미터 (chemodosimeter)로서 하기 화학식 1로 표시되는 KCN 검출용 화합물을 제공한다:

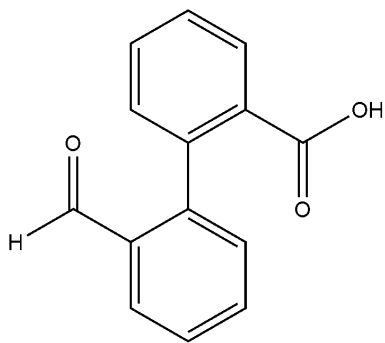
[화학식 1]



상기 화학식 1에 따른 화합물은 시료 중 다양한 다른 이온들이 존재하는 상태에서 유도 KCN에 대해서 높은 선택성을 나타내며, 낮은 수준의 세포 독성을 나타내는 바, 우수한 생체 적합성을 보유하며, 시료 내 KCN의 농도가 증가할수록 더욱 큰 형광 세기를 나타내므로 세포 내 KCN을 추적하는 데에도 용이하게 사용될 수 있다.

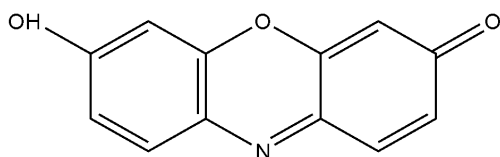
한편, 본 발명은 하기 화학식 2의 화합물과 하기 화학식 3의 화합물을 반응시킴으로써 상기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 KCN 검출용 화합물의 제조방법을 제공하며:

[0026] [화학식 2]



[0027]

[0028] [화학식 3]



[0029]

[0030] 예를 들어, 상기 반응은 상기 화학식 2의 화합물과 상기 화학식 3의 화합물을, HATU (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate), DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine) 및 DMF 존재 하에 실온에서 12 시간 정도 반응시킴으로써 수행될 수 있다.

[0031] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0032] 시료 및 기기

[0033] 레소루핀 (Aldrich), 2'-포르밀 [1,1'-비페닐]-2-카르복실산 (Aldrich), HATU (Alfa-aesar), DIPEA (Alfa-aesar), DMF (Aldrich), 에틸 아세테이트 (LobaChem, India)와 헥산 (s.d. Fine Chem, India) 및 황산나트륨 (s.d. Fine Chem, India)을 시중에서 구입하고 더 이상 정제하지 않고 사용하였다. 고정상으로서 실리카 겔 60(70-230 메쉬)을 이용하여 칼럼 크로마토그래피를 수행하였다. 실리카 겔 60 (코팅 전처리한 0.25 mm 두께의 시트)을 이용하여 분석용 박층 크로마토그래피를 수행하였다. IonSpecHiResESI 질량 분광계를 이용하여 질량 스펙트럼을 측정하였다. 400 MHz 분광계(Bruker, 독일)를 이용하여 NMR 스펙트럼을 측정하였다.

[0034] 화학식 1에 따른 화합물의 합성

[0035] 0 °C의 DMF (10 mL) 중 2'-포르밀 [1,1'-비페닐]-2-카르복실산 (226 mg, 1.0 mmol)의 용액에 DIPEA (0.2 mL, 1.12 mmol), 레소루핀 (213 mg, 1.0 mmol)과 HATU (400 mg, 1.05 mmol)를 첨가하였다. 상온까지 올려 12시간 동안 계속 반응시켰다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 물로 희석하였다. 유기 화합물을 에틸아세테이트로 추출하고 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 이 용액을 농축하여 용리액으로서 헥산 중 에틸아세테이트 (4:1)를 이용하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에 통과시키고, 건조하여 화합물 1을 얻은 황색 고체로서 수득하였다 (257 mg; 61.05%).

[0036] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.89 (s, 1H); 8.25 (d, $J=7.64$ Hz, 2H); 8.01 (d, $J=7.64$ Hz, 2H); 7.72 (m, 4H); 7.62 (m, 1H); 7.40 (m, 3H); 7.27 (s, 1H); 6.91 (m, 2H); 6.28 (s, 1H).

[0037] $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 191.47, 186.24, 164.38, 153.13, 149.31, 148.26, 144.33, 144.19, 140.34, 135.13, 134.76, 133.81, 133.46, 132.89, 131.88, 130.17, 128.97, 128.54, 128.45, 128.26, 118.94, 109.43, 107.19. ESI-MS m/z ($M+\text{Na}^+$): 계산치 444.080, 실측치 444.084.

[0038] 흡수 및 형광 실험

[0039] 모든 형광 스펙트럼과 UV/Vis 흡수 스펙트럼은 각각 RF-5301PC와 S-3100 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 칼륨 음이온 (CN , F , Cl , Br , I , CH_3CO_2 , HPO_4^{2-} , HCO_3 , NO_3 , ClO_4 , SCN)과 티올류의 모액 (1mM)을 탈이온수에서

제조하였다. 화합물 1의 모액은 DMSO에서 제조하였다. 각각 1.5 nm의 여기 및 발광 슬릿 폭으로 565 nm에서 여기시켰다. 1% DMSO가 포함된 PBS 완충액 (10 mM, pH 7.4) 중 화합물 1의 10 μ M 용액과 탈이온수 중 100 μ M의 다양한 음이온과 티올을 이용하여 상온에서 형광 실험을 수행하였다. KCN 용액 각각의 농도를 변화시키되, 총 부피는 3.0 mL로 고정하였다.

[0040] **NMR 적정 실험**

[0041] Varian 기기 (400 MHz)에서 NMR 실험을 수행하였다. 시료 용액 (화합물 1, CN⁻ 화합물 1, 레소루핀과 9,10-페난트렌퀴논)을 10% D₂O-DMSO-*d*₆에서 제조하였다. 적정 실험은 10% D₂O-DMSO-*d*₆ 중 화합물 1의 5 mM 용액과 D₂O 중 2.5 mM의 KCN으로 상온에서 수행하였다.

[0042] **세포 배양물 준비**

[0043] 인간 자궁경부 선암 상피세포 (KCLB, 서울, 한국)를 10% FBS (WelGene), 페니실린 (100 단위/ml)과 스트렙토마이신 (100 μ g/mL)이 첨가된 DMEM (WelGeneInc, 서울, 한국)에서 배양하였다. 영상화 이틀 전에, 세포를 계대 배양하여 유리 바닥 접시 (MatTek)에 도말하였다. 모든 세포를 5% CO₂/공기의 가습 분위기 하 37°C에서 유지하였다. 표지하기 위해서 성장 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM으로 바꿔 주었다. 세포를 5% CO₂ 하 37°C에서 프로브로 처리하여 함께 배양하였다. 세포를 인산 완충 생리식염수 (PBS; Gibco)로 3회 세척한 다음, 15분 동안 무색 무혈청 배지에서 더 배양한 후 영상화하였다. 세포를 24-웰 플레이트에 접종하고 밤새 안정화시켰다. 화합물 1을 세포에 도포하여 그 흡수를 모니터링하였다. 암세포주 (HeLa 세포)에 대한 화합물 1의 세포독성을 표준 MTT 분석법을 이용하여 개략적으로 계산하였다. 표준 매뉴얼에 따라 24시간 후 세포 증식을 체크하였다.

[0044] **세포 영상화**

[0045] 표지된 세포의 형광 현미경 사진은 개구수 (NA)=0.30, 0.75와 1.30인 $\times 10$, $\times 40$ 건조 및 $\times 100$ 오일 대물렌즈가 구비된 분광 공초점 현미경 (Leica TCS SP2)을 이용하여 얻었다. 570-630 nm 범위에서 사진을 얻기 위해서 내부 PMT를 이용하여 스캔 속도 800과 400 Hz에서 8 비트 무부호 512 $\times$ 512와 1024 $\times$ 1024 화소로 신호를 취합하였다.

[0046] **결과 및 검토**

[0047] 본 발명에서는 KCN이 존재하는 상태에서 벤조인형 반응을 통해 화합물 1의 알데히드 카르보닐에서 탄소 음이온이 발생할 것으로 판단하였다. 에스테르 카르보닐이 가까이 근접하면 강한 형광을 나타내는 유리 레소루핀의 방출과 함께 분자내 교차-결합이 가능해지게 된다.

[0048] 먼저, 화합물 1의 KCN 검출능을 결정하기 위해서, PBS 완충액 중 KCN의 존재 및 부재 상태에서 화합물 1의 UV 흡수 변화를 조사하였다.

[0049] 도 1a에는 화합물 1 (10 μ M) 및 화합물 1 + 10 당량의 CN⁻에 대한 UV-visible 스펙트럼을 도시하였으며, 도 1b에는 1% DMSO가 포함된 PBS 완충용액 (10 mM, pH 7.4) 중 565 nm에서 여기시 화합물 1 (10 μ M) 및 화합물 1 + 10 당량의 CN⁻에 대한 형광 스펙트럼을 도시하였다 (슬릿폭: ex 1.5/em 1.5, 삽입 사진은 365 nm의 (a) 가시광선 램프 및 (b) UV 램프하에서 촬영한 화합물 1(10.0 μ M)의 사진과 10 당량의 CN⁻ 첨가시 화합물 1의 사진을 도시한 것이다).

[0050] 도 1a를 참조하면, KCN (10 당량)이 존재하는 상태에서 옅은 오렌지색에서 짙은 분홍색으로 가시적인 변화와 함께 565 nm를 중심으로 UV 흡수가 20배 증가하였고, 도 1b를 참조하면, 565 nm에서 여기시 595 nm에서 새로운 방출 밴드가 나타났다.

[0051] 한편, CN⁻ 이온에 대한 화합물 1의 감도를 결정하기 위해서, 농도에 따른 형광 변화를 측정하였다. 도 2a에는 다양한 CN⁻ 농도 (0-3 당량)에 따른 화합물 1 (10 μ M)의 형광 스펙트럼을 도시하였다.

[0052] 도 2a를 참조하면, CN⁻의 농도가 증가함에 따라 (0-3 당량) λ_{em} = 595 nm에서 형광 세기는 점차 증가하는 것을 알 수 있다. 또한, 도 2c를 참조하면, 검출 하한이 세계보건기구 (WHO)가 규정한 음용수에서 허용되는 시아나이드 농도 (1.9 μ M) 보다 훨씬 낮은 4 nM이라는 것을 알 수 있다. 이러한 수치는 CN⁻ 이온 감지에 대해서 보

고된 가장 낮은 검출 한계라 할 수 있다. 흥미로운 점은, 화합물이 $\lambda_{em} = 595 \text{ nm}$ 에서의 형광 증강을 이용하여 인간의 혈청 내 50 nM 정도로 낮은 농도의 CN^- 이온을 검출할 수 있다는 점이며, 이러한 결과는 화합물 1이 생체 내 CN^- 이온을 검출하기 위해 사용될 수 있음을 암시하는 것이다.

[0053] CN^- 이온에 대한 검출시간은 실제 계 내에서 검출을 수행하기 위해서 중요하다. 따라서, PBS 완충액 중 KCN (10 당량)이 존재하는 상태에서 경시 변화 실험을 실시하였으며, 그 결과를 도 2b에 도시하였다. 도 2b를 참조하면, 10초 내에 레소루핀이 화합물 1로부터 완전히 방출되었고; 그 결과 형광 신호가 회복되어 포화에 도달하였다. 이러한 결과는 화합물 1이 CN^- 이온에 대해 매우 감도가 좋고 빠른 응답시간을 갖고 있음을 시사하는 것이다.

[0054] 한편, 다른 방해 음이온이 있는 상태에서 특정 분석물에 대한 화합물 1의 선택성은 매우 중요한 사항인 바, CN^- , F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CH_3CO_2^- , HPO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- , ClO_4^- , SCN^- 과 같은 다양한 음이온의 칼륨염과 Cys, Hcy와 GSH와 같은 일부 중성종이 존재하는 상태에서 화합물 1의 형광 변화를 측정하였으며, 그 결과를 도 3a 및 도 3b에 도시하였다. 도 3a 및 3b를 참조하면, 화합물 1은 CN^- 이온에 대한 선택성이 높다는 것이 관찰되었고; 다른 음이온이 존재하는 상태에서 형광 신호 변화는 크지 않았다. 도 2d는 다양한 분석물이 존재하는 상태에서 화합물 1을 함유한 시험지의 색 변화를 보여주고 있다. 흥미로운 점은, CN^- 이온만이 분홍색으로 색변화를 일으킨 반면에, 다른 음이온에 의해서는 색이 변하지 않았다는 점이며, 이러한 결과는 다른 이온이 존재하더라도 본 발명에 따른 화합물 1을 고정계에서 KCN을 높은 처리량으로 선별하기 위해 사용할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0055] KCN과 화합물 1 사이의 반응의 pH 감도는 595 nm 에서 형광 세기 변화를 다양한 pH 값 (4-9)에서 모니터링함으로써 결정하였다. 이러한 pH 범위에 걸쳐 형광 세기는 변화가 없었으나 (도 4 참조), 이는 화합물 1이 광범위한 pH 값 범위에 걸쳐 CN^- 이온을 감지하기 위해 사용할 수 있음을 의미한다.

[0056] 한편, CN^- 이온에 대한 화합물 1의 작용 메커니즘을 파악하고자, KCN이 존재하는 상태에서 다양한 시간 간격으로 $^1\text{H-NMR}$ 적정 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 5에 도시하였다.

[0057] 도 5를 참조하면, 5분 이내에 화합물 1에서 9.78 ppm (★)의 알데히드 양성자 피크가 완전히 사라지면서 동시에 $7.52\text{--}8.22 \text{ ppm}$ 에서 새로운 1 세트의 피크가 나타나는 것이 관찰됨을 알 수 있다. 이러한 새로운 양성자 피크 세트를 확인하기 위해서, 레소루핀과 9,10-페난트렌퀴논의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정하였으며, 그 결과, 레소루핀과 9,10-페난트렌퀴논에 대한 양성자 신호와 적분비가 KCN 처리 화합물 1의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 관찰된 것들과 정확히 일치한다는 점을 알 수 있었다.

[0058] 또한, 화합물 1에 대한 질량 스펙트럼 결과를 통해서도 9,10-페난트렌퀴논이 형성되었음을 알 수 있었고, KCN 처리 화합물 1의 TLC 형태 (도 5, 삽입 사진)는 각각 레소루핀과 9,10-페난트렌퀴논과 정확히 일치하였다. 상기 결과들은, 별도의 새로운 분자 9,10-페난트렌퀴논을 생성하는 KCN 촉매화 분자내 교차-벤조인 반응을 지지해주는 결과이며, 이러한 반응의 개요를 도 6에 도시하였다.

[0059] 다음으로, MTT 분석에 의해 화합물 1의 생체적합성을 평가하였으며, 그 결과를 도 7에 도시하였다. 도 7은 HeLa 세포주에서 화합물 1을 세포와 함께 24 시간 동안 배양하고 MTT 분석을 통해 세포 생존율을 관찰한 결과를 도시한 도면이며, 도 7을 참조하면, $20 \mu\text{M}$ 까지는 세포가 세포 생존율 변화 없이 건강한 상태에 있음을 알 수 있다. 이는 CN^- 이온의 존재를 평가하기 위해 화합물 1을 세포 수준에서 사용할 수 있음을 의미한다.

[0060] 화합물 1이 세포의 CN^- 이온에 의해 KCN 촉매화 분자내 교차-벤조인 반응을 나타내어 세포 사진을 제공할 수 있는지를 평가하였다. 도 8a에는 화합물 1 ($2 \mu\text{M}$)로 처리한 HeLa 세포의 공초점 레이저 형광 현미경 사진을 도시하였으며, 도 8a를 참조하면, KCN의 농도가 증가할수록 형광 세기가 점차 증가하는 것을 알 수 있다. 또한, 세포 내 KCN의 분포를 알아보고 화합물 1이 세포를 통해 KCN을 인식할 수 있는지 밝히기 위해 공국재화 (co-localization) 실험을 실시하였으며, 도 8b의 형광 사진을 통해서, 화합물 1 역시 mito-tracker 및 ERtracker와 공국재한다는 결론을 얻을 수 있었다.

[0061] 또한, HeLa 세포의 횡단면을 통해 Mito-tracker, ER-tracker 및 화합물 1에 대한 형광 특성을 연구하였다. 도

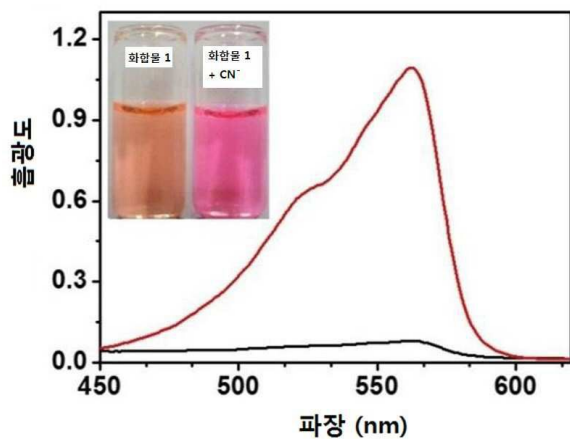
9a 내지 9d에는 HeLa 세포에서 실시한 공국재화 실험에 대한 공초점 현미경 사진 및 대상 영역의 형광 세기 변화 그래프를 도시하였으며, 도 9a 내지 9d를 참조하면, 화합물 1로 처리한 HeLa 세포의 형광 형태는 Mito-tracker 및 ER-tracker로 표지된 HeLa 세포의 형태와 정확히 일치함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해서 화합물 1이 세포내 소기관을 포함하는 세포 전체를 통해 KCN을 추적하는 효율적인 프로브라는 결론을 얻을 수 있다.

[0062]

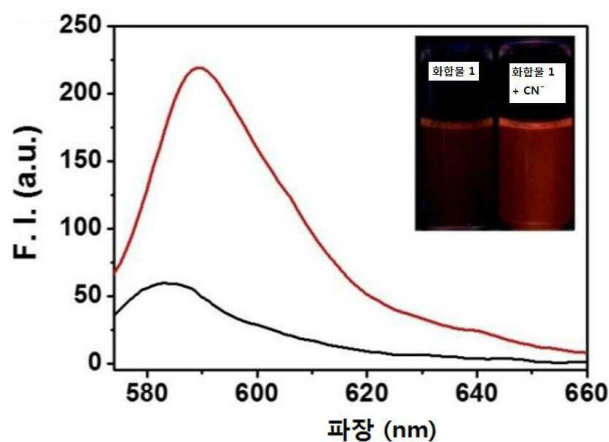
종합하면, 본 발명에서는 분자내 교차-벤조인 반응을 기반으로 수성 환경 내 KCN를 감지하기 위한 분자 프로브로서 화합물 1을 최초로 개발하였다. 이러한 턴-온 형광 화학도시미터형 프로브의 합성 과정은 매우 간단하였으며, 화합물 1은 2개의 모드, 즉 수성 및 생물 환경 내 KCN에 대한 발색 및 형광 센서로서 응답이 빠른 효율적인 프로브라는 사실을 알 수 있었다. 화합물 1은 종전 보고된 어느 시스템보다도 현저히 낮은 4 nM 정도의 낮은 KCN 농도에 대해 감도를 나타내었으며, 595 nm의 방출 신호를 증폭함으로써 혈청 내 50 nM 농도의 KCN을 검출할 수 있었다. 마지막으로, 세포 영상화와 공국재화 실험을 통해서 화합물 1을 이용하여 세포 환경 내 KCN을 추적할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

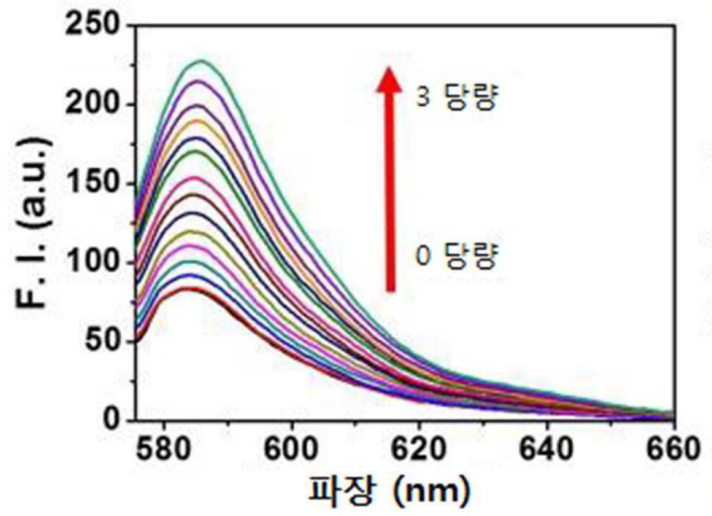
도면1a



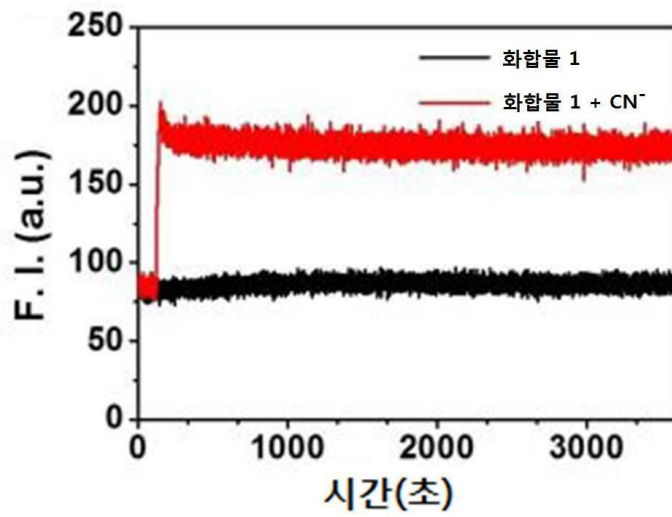
도면1b



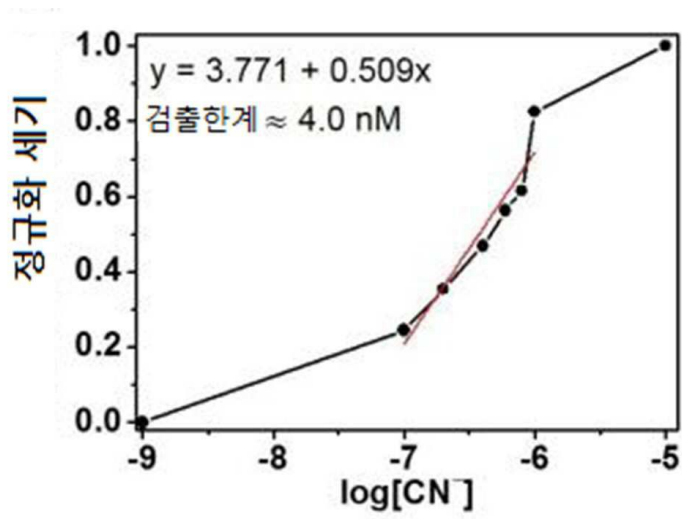
도면2a



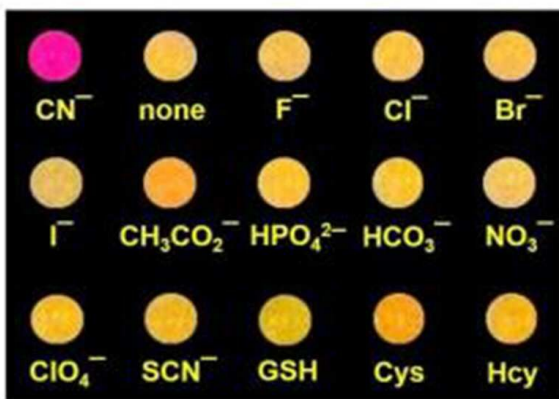
도면2b



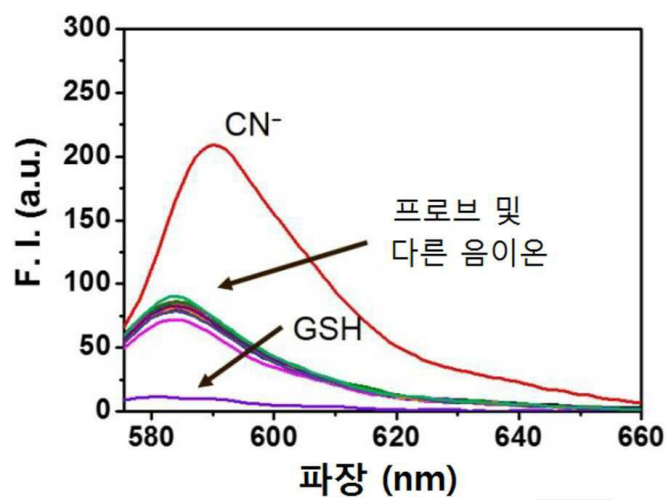
도면2c



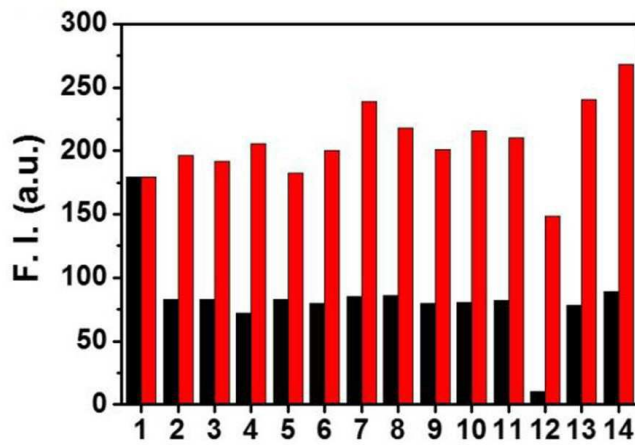
도면2d



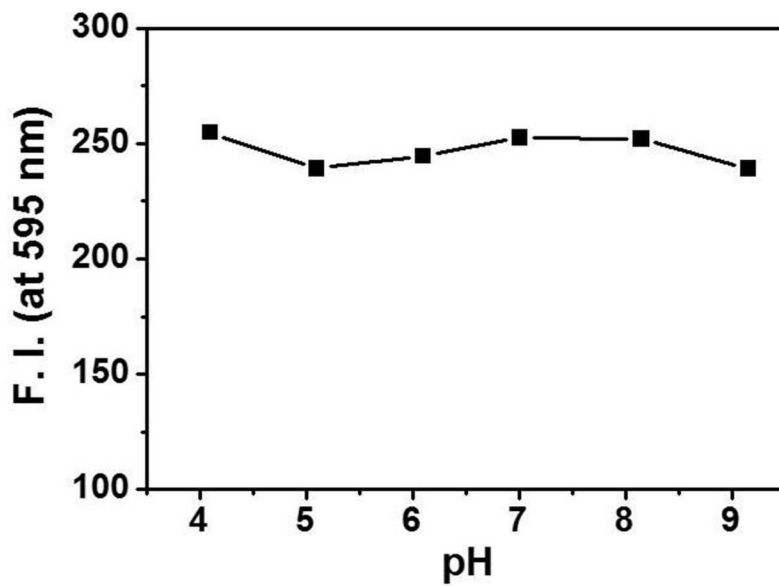
도면3a



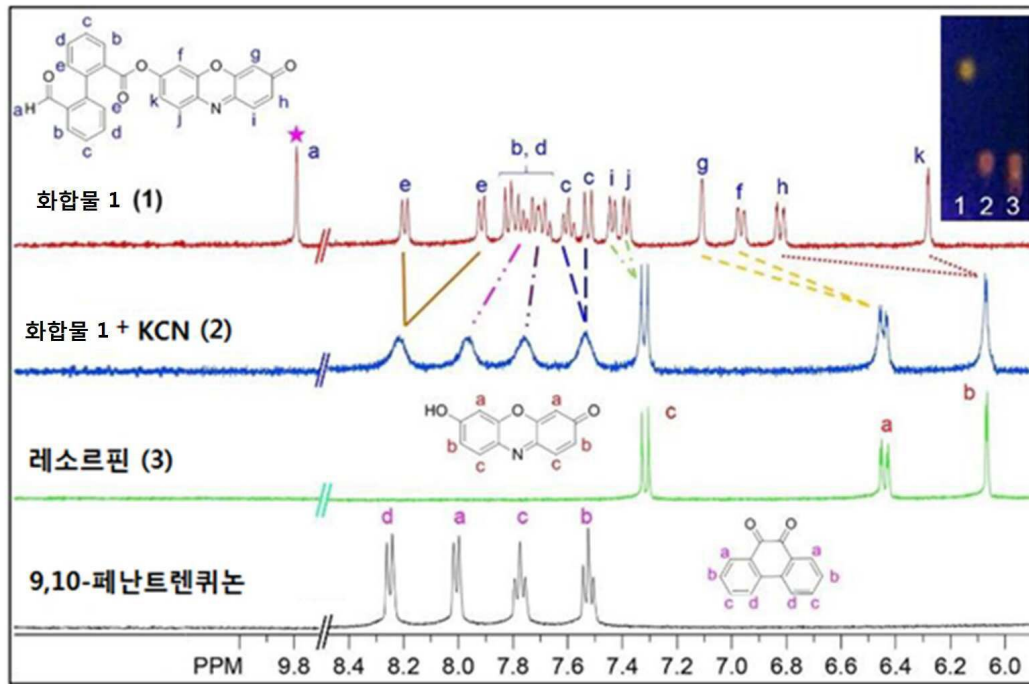
도면3b



도면4



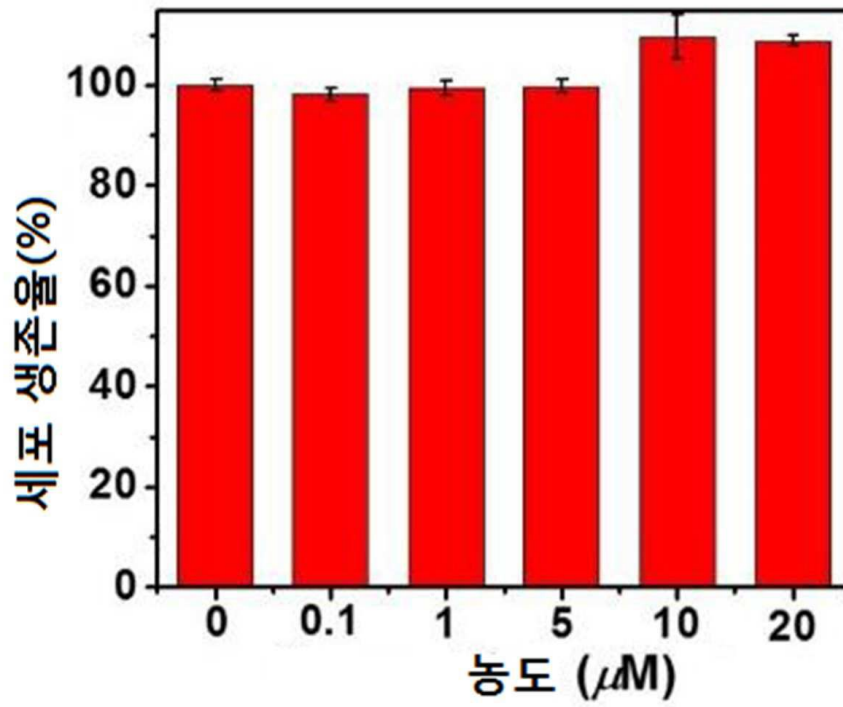
도면5



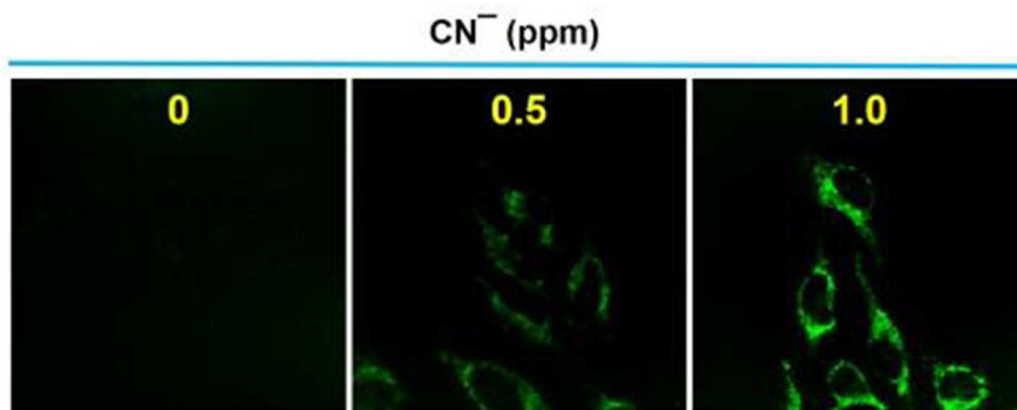
도면6



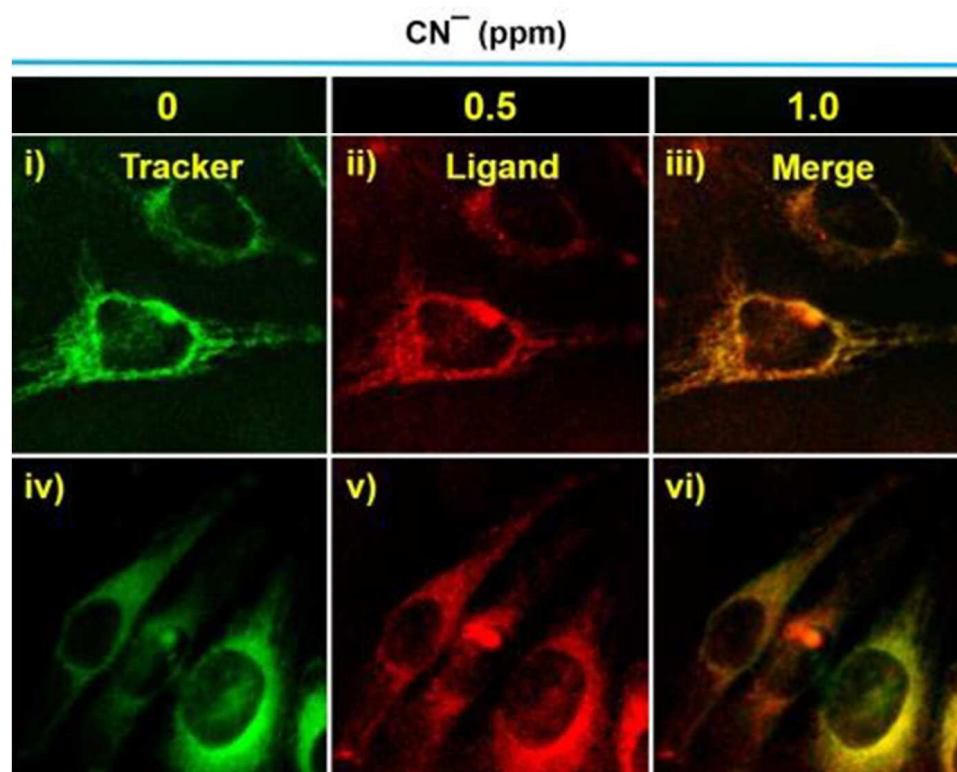
도면7



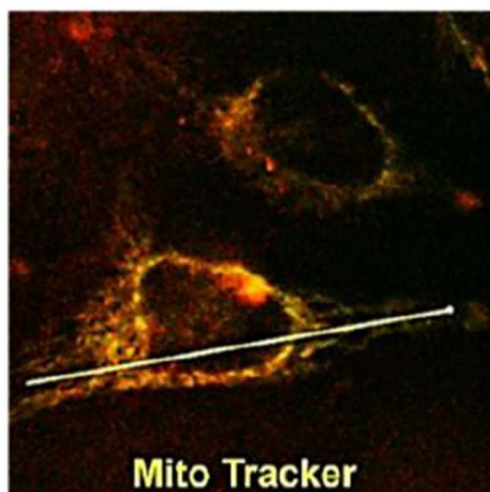
도면8a



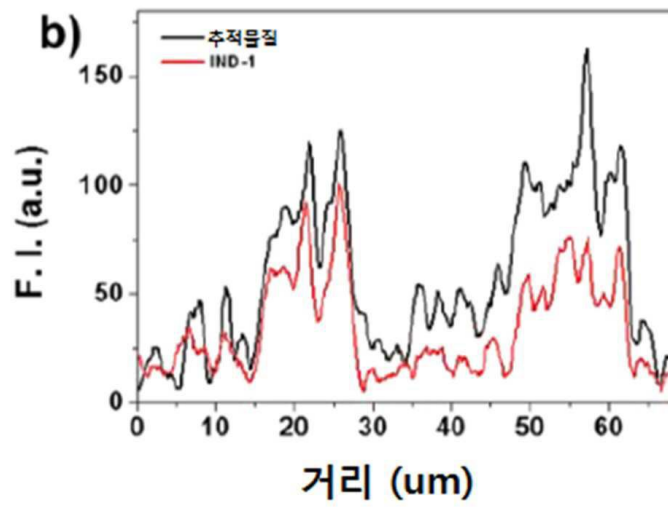
도면8b



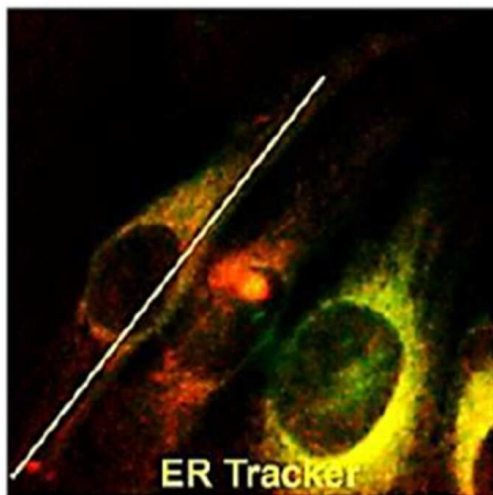
도면9a



도면9b



도면9c



도면9d

