

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2009-0095879 2009년09월10일
(51)	Int. Cl.	(71)	출원인 고려대학교 산학협력단
	C07D 405/12 (2006.01) C07D 311/12 (2006.01)		서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(21)	출원번호	(72)	발명자
(22)	출원일자		김중승
	심사청구일자		경기 성남시 분당구 수내동 파크타운롯데아파트 130동 2402호
	2008년03월06일		정효성
	2008년03월06일		서울 강남구 도곡동 도곡렉슬아파트 409동 1101호
			이정원
			경북 문경시 점촌동 260-4
		(74)	대리인
			조현석

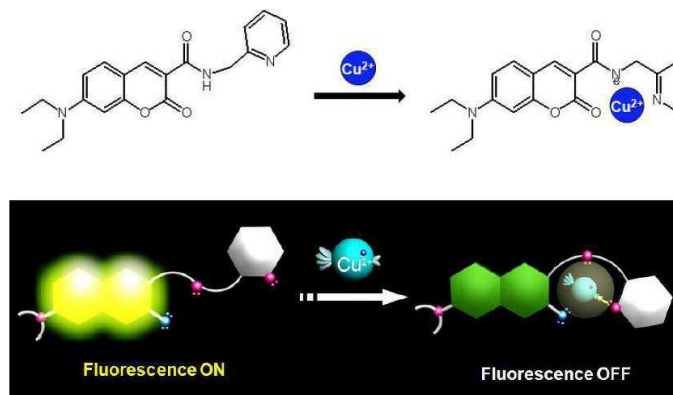
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 구리 이온의 선택적 이용이 가능한 쿠마린 유도체 및 그제조 방법

(57) 요약

본 발명은 새로운 형광 쿠마린 유도체 화합물에 관한 것이다. 또한, 본 발명에 따른 화합물에 구리 이온을 첨가할 때 발생하는 형광 변화를 이용함으로써, 구리 이온의 존재 여부 및/또는 구리 이온의 양을 감지할 수 있으며, 감응제, 바이오 센서 등으로 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물은 구리 이온에 대한 선택성이 다른 금속 이온의 경우보다 월등히 뛰어나고, 적용 가능한 pH 범위가 pH 4-10으로 매우 넓은 특징이 있다.

대표도 - 도1

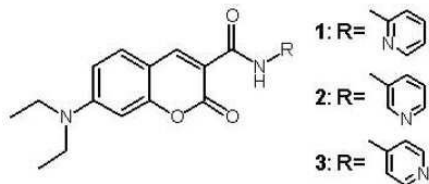


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 형광성 쿠마린 유도체 화합물.

[화학식 1]



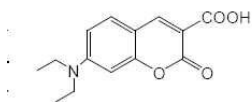
청구항 2

유기 용매에서, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 2-(aminomethyl)pyridine 및 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP)이 혼합되어 교반되는 제1단계; 및

상기 교반되는 혼합물이 여과, 세척, 건조 및 정제되는 제2단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 형광성 쿠마린 유도체 화합물의 제조 방법.

[화학식 2]



청구항 3

유기 용매에서, 화학식 2로 표시되는 화합물, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 3-(aminomethyl)pyridine 및 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP)이 혼합되어 교반되는 제1단계; 및

상기 교반되는 혼합물이 여과, 세척, 건조 및 정제되는 제2단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 형광성 쿠마린 유도체 화합물의 제조 방법.

청구항 4

유기 용매에서, 화학식 2로 표시되는 화합물, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-(aminomethyl)pyridine 및 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP)이 혼합되어 교반되는 제1단계; 및

상기 교반되는 혼합물이 여과, 세척, 건조 및 정제되는 제2단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 형광성 쿠마린 유도체 화합물의 제조 방법.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 교반은 5 ~ 7 시간 하는 것을 특징으로 하는 형광성 쿠마린 유도체 화합물의 제조 방법.

청구항 6

상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 구리 이온을 첨가할 때 발생하는 형광 변화를 이용함으로써, 구리 이온의 존재 여부, 구리 이온의 양, 또는 이들 모두를 감지하는 것을 특징으로 하는 형광성 쿠마린 유도체 화합물의 이용 방법.

청구항 7

상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 구리 이온을 첨가할 때 발생하는 형광 변화를 이용함으로써, 구리 이온의 존재 여부, 구리 이온의 양, 또는 이들 모두를 감지하는데 사용되는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 감응제.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 금속 이온을 이용한 형광성 화합물, 그 제조 방법 및 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 구리 이온을 선택적으로 이용하는 쿠마린 유도체, 그 제조 방법 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 중금속의 높은 독성으로 인하여, 수은(II), 납(II), 구리(II) 등의 중금속 이온을 선택적으로 감지하는 기술에 대한 필요성이 증가하고 있다. 특히, 인체에서 철(II) 이온 및 아연(II) 이온 다음으로 많은 양이 들어 있는 구리 이온은 여러 생물학적 프로세스에서 중요한 역할을 한다(이하, 특별한 설명이 없는 한, 금속 이온의 예는 모두 2가임). 하지만, 구리 이온의 농도가 높을 경우, 생명체에 유해한 영향을 준다. 예를 들어, 간이나 신장에 구리가 축적될 경우, 위장염, 저혈당증, 난독증(難讀症) 등의 병을 일으키고, 유아에게는 윌슨씨 병 등과 같은 치명적인 질병을 일으킬 수도 있다. 따라서, 생명체에서의 구리 이온의 감지 및 그 양을 측정하는 기술은 매우 중요하다. 나아가, 구리 이온의 감지 및 제거 기술은 구리 이온을 수용하는 화합물에 의존한다.
- <3> 한편, 최근 생물학적 프로세스를 모니터링하기 위한 고해상도 이미지에 적합하고, 선택성과 민감성을 모두 보이는 형광성 화학 센서를 합성하기 위하여 많은 연구 개발이 이루어지고 있다. 특히, 구리 이온을 선택적으로 감지하는 형광성 화학 센서들이 많이 개발되고 있다.
- <4> 그러나, 대부분의 화학 센서들은 특정 금속 이온에 대한 배타적 선택성 결여, 저용해성, 좁은 pH 범위, 저반응성, 수용체에서의 저형광성, 리간드의 세포 독성 등의 문제점을 가지고 있다.
- <5> 따라서, 본 발명자는 상술한 문제점을 극복하기 위하여, 구리 이온에 대한 배타적 선택성이 매우 뛰어나고 넓은 pH 범위에 걸쳐 적용 가능한 화합물을 만들게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <6> 본 발명의 목적은 구리 이온에 배타적 선택성이 매우 뛰어나고, 넓은 pH 범위에 걸쳐 적용 가능한 형광성 화합물을 제공하기 위한 것이다.
- <7> 본 발명의 다른 목적은 구리 이온에 배타적 선택성이 매우 뛰어나고, 넓은 pH 범위에 걸쳐 적용 가능한 형광성 화합물의 제조 방법을 제공하기 위한 것이다.
- <8> 본 발명의 또 다른 목적은 구리 이온에 배타적 선택성이 매우 뛰어나고, 넓은 pH 범위에 걸쳐 적용 가능한 형광성 화합물을 이용하는 용도를 제공하기 위한 것이다.
- <9> 본 발명의 상기 및 기타 목적들은 상세히 설명되는 본 발명에 의하여 모두 달성될 수 있다.

과제 해결수단

- <10> 본 발명에 따른 쿠마린 유도체 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법은 유기 용매에서, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), (aminomethyl)pyridine 및 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP)이 혼합되어 교반되는 제1단계, 및 상기 교반되는 혼합물이 여과, 세척, 건조 및 정제되는 제2단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <11> 본 발명에 따른 쿠마린 유도체 화합물의 이용 방법은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물에 구리 이온을 첨가할 때 발생하는 형광 변화를 이용함으로써, 구리 이온의 존재 여부, 구리 이온의 양, 또는 이들 모두를 감지하는

것을 특징으로 한다.

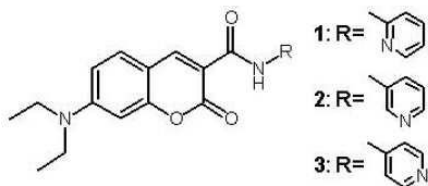
효 과

- <12> 본 발명은 구리 이온에 대한 선택성이 다른 금속 이온의 경우보다 월등히 뛰어나고, 적용 가능한 pH 범위가 pH 4~10으로 매우 넓은 형광성 화합물, 그 제조 방법 및 용도를 제공하는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <13> 본 발명에 따른 쿠마린(coumarin) 유도체는 하기 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물(이하 화합물 1 내지 3)이다. 이때, 쿠마린 부 및 금속 결합을 위한 2-피코틸 부를 포함한다.

- <14> [화학식 1]

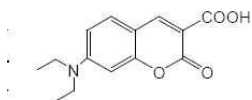


- <15>
- <16> 본 발명에 따른 화합물 1은 생물학적으로 유독한 다른 금속 이온들보다 Cu(II) 이온(이하, 구리 이온)에 뛰어난 선택성을 보이고, 제1도에 도시된 것처럼, 구리 이온의 결합에 따라 형광성이 온-오프되는 특성도 보인다. 특히, 제9도에 도시된 것처럼, 90 %의 수용액에서 pH 4~10의 범위에서 구리 이온을 감지할 수 있고, 이는 생물학적 분석에 적합함을 뜻한다. 따라서, NCTC 클론 1469, LLC-MK2 세포 등의 적당한 세포에서, 본 발명에 따른 쿠마린 유도체 화합물을 이용한 구리 이온 분석을 수행함으로써, 그 적합함을 확인하였다.

- <17> 본 발명에 따른 화합물 1 내지 3은 3 단계를 거쳐 합성된다. 쿠마린 유도체의 결합 부위를 조사하기 위하여, 쿠마린 아미드에 다양한 화합물들이 부가되었고, 본 발명에 따른 화합물 1 내지 3은 ^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR 및 FAB-MS를 통하여 확인된다. (제15도 내지 제26도 참고) FT-IR 스펙트럼은 Nicolet 380 FT-IR 스펙트로미터로 측정되었고, FAB-MS 데이터는 JEOL-JMS-HX 110A/110A High Resolution Tandem Mass Spectrometry로 Korean Basic Science Institute에서 측정되었다. ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼은 CDCl_3 , TMS에서 VARIAN (200 MHz for ^1H NMR, 50 MHz for ^{13}C NMR) 스펙트로미터로 측정되었다.

- <18> 본 발명에 따른 화합물 1의 제조 방법은 유기 용매에서, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 2-(aminomethyl)pyridine 및 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP)이 혼합되어 교반되는 제1단계, 및 상기 교반되는 혼합물이 여과, 세척, 건조 및 정제되는 제2단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- <19> [화학식 2]



- <20>
- <21> 상기 화학식 2로 표시되는 화합물, DCC 및 DMAP는 공지의 화합물로서 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 제조될 수 있다. 상기 유기 용매는 클로로포름 등이 사용될 수 있고, 특별히 이에 한정되지 않는다. 상기 교반은 5 ~ 7 시간 하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 6 시간 하는 것이 특징이다. 상기 여과, 세척, 건조, 정제하는 방법은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있다.
- <22> 또한, 본 발명에 따른 화합물 2 및 3의 제조 방법은 2-(aminomethyl)pyridine을 사용하는 대신 3-(aminomethyl)pyridine 및 4-(aminomethyl)pyridine를 각각 사용하는 것 외에는 상술한 화합물 1의 제조 방법과 동일하다.

- <23> 본 발명에 따른 화합물 1은 화합물 2 및 3보다 매우 뛰어난 구리 이온에 대한 리간드이다. 제2도에 도시된 것처럼, 화합물 1과 구리 이온의 결합 모드는 X 레이 결정학에 의하여 정해진다. 상기 화합물 1 및 구리 이온의 복합체는 1:1로 결합하며, 화합물 1은 트리덴테이트(N_3O) 리간드로서 작용한다.
- <24> 제3도는 구리 이온의 부가에 따른 화합물 1의 10 % DMSO 수용액의 흡수 및 형광 변화를 나타낸 것이다. 구리 이온 10 당량을 부가하였을 때, 흡수 최고점은 15 nm 적색 변이를 나타내고, 이는 노랑에서 어두운 노랑으로의 변색을 뜻하고, 형광성은 거의 없어졌다. 제4도 내지 제7도에 도시된 것처럼, 화합물 2 및 3은 구리 이온의 부가에 따른 흡수 및 형광 변화가 거의 없다. 형광 적정 데이터를 이용하여, 10% DMSO 용액에서 화합물 1과 구리 이온의 결합 상수를 결정할 수 있고, 이 결합 상수는 $(1.17 \pm 0.29) \times 10^5$ 이고, 화합물 2와 구리 이온의 결합 상수는 $(9.72 \pm 0.56) \times 10^2$ 이다. 결합 상수는 Elsevier-BIOSOFT사의 ENZFITTER 프로그램으로 계산되었고, 평형 상수는 10% DMSO 용액, 25℃, 20 μ M 이온 강도에서 결정되었다. 나아가, 상세한 형광 변화는 제7도를 통하여 확인할 수 있다.
- <25> 본 발명에 따른 흡수 및 형광 스펙트럼 측정에 있어서, UV/Vis 및 형광 스펙트럼들은 S-3100 및 RF-5301PC 스펙트로포토미터가 각각 사용되었다. 금속 염화염의 수용액 1.00 mM은 물로 제조되었고, 20 μ M의 화합물 1은 수용액($H_2O:DMSO=9:1$, v/v)(0.01 M HEPES)에서 제조되었다. 또한 모든 형광 스펙트럼 측정은 430 nm의 들뜸 및 방출 슬릿 폭 3.0 nm에서 이루어졌다. UV/Vis 및 형광 적정 실험은 수용액($H_2O:DMSO=9:1$, v/v)(0.01 M HEPES)에서 금속염화염들의 다양한 농도에 따른 20 μ M의 화합물 1을 이용함으로써 이루어졌다.
- <26> 제4도는 수용액($H_2O:DMSO=9:1$, v/v)(0.01 M HEPES)에서 Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ag^+ , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} 의 염화염 10 당량 부가에 따른 화합물 1(20 μ M)의 430 nm 들뜸에서 흡수 및 형광 스펙트럼들을 나타낸 것이다.
- <27> 제5도는 수용액($H_2O:DMSO=9:1$, v/v)(0.01 M HEPES)에서 Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ag^+ , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} 의 염화염 10 당량 부가에 따른 화합물 2(20 μ M)의 430 nm 들뜸에서 흡수 및 형광 스펙트럼들을 나타낸 것이다.
- <28> 제6도는 수용액($H_2O:DMSO=9:1$, v/v)(0.01 M HEPES)에서 Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ag^+ , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} 의 염화염 10 당량 부가에 따른 화합물 3(20 μ M)의 430 nm 들뜸에서 흡수 및 형광 스펙트럼들을 나타낸 것이다.
- <29> 제7a도는 수용액($H_2O:DMSO=9:1$, v/v)(0.01 M HEPES)에서 $CuCl_2$ 10 당량 부가에 따른 화합물 1 내지 3(각각 20 μ M)의 430 nm 들뜸에서 형광 스펙트럼들을 나타낸 것이다. 제7b도는 수용액($H_2O:DMSO=9:1$, v/v)(0.01 M HEPES), 430 nm 들뜸에서, 흰색 막대는 화합물 1 내지 3(각각 20 μ M)의 479 nm에서의 형광 강도를 나타낸 것이고, 검정 막대는 $CuCl_2$ 10 당량 부가에 따른 화합물 1 내지 3(각각 20 μ M)의 479 nm에서의 형광 강도를 나타낸 것이다.
- <30> Photophysical 데이터는 아래 표 1과 같으며, F_{479} 는 479 nm에서의 형광 강도(a.u.)을 나타내고, Φ_f 는 형광 양자량(Fluorescence Quantum Yield)을 나타내고, 참조 자료로 0.1 N NaOH에서 플루오레세인(fluorescein)의 Φ_f 는 0.85이다.

표 1

<31>

L+ 금속 이온	F_{479}	Φ_f (%)
화합물 1	852.79	16.54
화합물 2	875.65	19.82
화합물 3	849.09	18.86
화합물 1 + 구리이온	13.99	2.38
화합물 2 + 구리이온	733.56	13.19
화합물 3 + 구리이온	794.70	16.74

- <32> 제8도에 도시된 것처럼, 화합물 1의 구리 이온에 대한 탁월한 선택성을 확인할 수 있다. 제8도는 다양한 금속 양이온에 대한 본 발명에 따른 화합물 1의 선택성을 나타내는 것으로서, 430 nm 들뜬 상태에서 479 nm의 형광 방출을 통하여 형광 비율을 나타낸다. 수용액(H₂O:DMSO=9:1, v/v)(0.01 M HEPES)에서, 20 μM의 화합물 1에 다양한 금속 이온의 염화염들 10 당량이 각각 단독으로 추가되었고, 또한 구리이온 및 다른 금속 이온 10 당량이 함께 추가되었다. 구리 외의 다른 금속 양이온들에 대하여 뚜렷한 형광 변화가 없는데 반하여, 구리 이온에 대하여는 형광 감소가 많이 발생하였다. 이러한 형광 변화는 제9도에 도시된 것처럼 넓은 pH 범위 (4~10)에서 관찰되고, 이는 넓은 범위의 생리학적 상태에서 적용된다는 것을 의미한다. 제9도는 수용액(H₂O:DMSO=9:1, v/v)(0.01 M HEPES)에서, 구리 이온 10 당량이 있을 때 또는 없을 때, pH의 변화에 따른 20 μM의 화합물 1의 479 nm에서의 형광 스펙트럼의 변화를 표시한 것이다. 형광 증가(즉, CHEF 효과, (a) Kim, J. S.; Quang, D. T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3780. (b) Qi, X.; Jun, E. J.; Xu, L.; Kim, S.-J.; Joong Hong, J. S.; Yoon, Y. J.; Yoon, J.J. *Org. Chem.* **2006**, *71*, 2881)가 형광단에 의한 금속 이온 겹화의 결과일 수 있고, 구리, 카드뮴, 수은 및 납 이온처럼 특정 금속 이온이 전자 및/또는 에너지 전이 프로세스를 통하여 효율적으로 발광 감소가 발생한다는 것은 공지의 사실이다.
- <33> 제10도는 수용액(H₂O:DMSO=9:1, v/v)(0.01 M HEPES)에서, UV 램프를 이용하여 430 nm에서 들뜬 금속 양이온 200 μM의 부가에 따른 20 μM의 화합물 1의 형광 변화를 표시한 것이다.
- <34> 본 발명에 따른 화합물 1에 대한 구리 이온의 형광 감소 작용에 대하여, 프론티어 오비탈(frontier orbitals)의 점유 이론에 의하여 계산하면 다음과 같다.
- <35> HOMO → LUMO+4 및 HOMO → LUMO+6의 들뜬은 형광 상태가 되는 것으로 최저 에너지 들뜸에 대하여 각각 18 % 및 11 % 기여한 것으로 계산되었다. 이러한 들뜬은 들뜬 쿠마린 부로부터 구리 이온 중심부로의 전자 전이에 상응하는 것이고, 들뜬 상태의 비방사성 비활성에 대한 통로를 제공하는 것이다.
- <36> 제11도는 형광 감소와 관련하여, 화합물 1 및 구리 이온의 프론티어 분자 오비탈을 나타낸 것이다. 제12도는 B3LYP/6-31G에 의해 계산된 화합물 1과 화합물 1 및 구리 이온의 결합체의 분자 오비탈을 나타낸 것이다. 상기 계산은 Gaussian 03 프로그램을 사용하는 B3LYP(Lee-Yang-Parr three parameterized exchange functionals)를 6-31G와 함께 이용하여 Density Functional Theory에 의하여 Ab Initio 계산으로 수행되었다. 화합물 1과 화합물 1 및 구리이온의 결합체 모두에 대하여, HOMO, LUMO 및 LUMO+3는 전자들이 쿠마린 고리 위에 분배되어 있는 것을 보여주고, LUMO+1 및 LUMO+2는 피리딘 고리 위의 밀도를 보여준다. 화합물 1의 LUMO+4는 화합물 1에 대한 쿠마린 고리의 밀도를 나타내고, 화합물 1 및 구리 이온의 결합체의 LUMO+4는 구리 이온의 밀도를 나타낸다. 이러한 오비탈들은 복합체 상의 화합물 1의 형광 작용과 관련이 있다. 화합물 1과 화합물 1 및 구리이온의 결합체 각각의 프론티어 분자 오비탈(HOMO-5부터 LUMO+6까지)을 비교하면, 상기 결합체의 LUMO+4 및 LUMO+6는 가장 구분되는 오비탈이다. 상기 복합체가 HOMO-LUMO+4 또는 HOMO-LUMO+6 에너지 차이에 따른 빛을 흡수한다면, 전자 밀도의 형태는 HOMO에서 LUMO+4 또는 LUMO+6으로 변한다. 이는 전자 전이가 쿠마린 고리로부터 구리이온으로 발생하였음을 의미한다. 이러한 메커니즘은 구리 이온의 부가에 따른 화합물 1의 형광 감소를 일으킨다.
- <37> 하기 표 2는 최저 에너지 전이(바닥 상태에서부터 제1 들뜬 상태로의 전이)에 대한 각각의 전자 진동 (오비탈 전이)의 기여도를 나타낸 것이다.

표 2

Electronic oscillators	화합물 1	Electronic oscillators	화합물 1 및 구리이온의 결합체
HOMO-5→LUMO	10.78%	HOMO→LUMO	58.06%
HOMO-5→LUMO+4	10.46%	HOMO→LUMO+1	13.71%
HOMO-2→LUMO+2	11.33%	HOMO→LUMO+4	17.69%
HOMO→LUMO	67.43%	HOMO→LUMO+6	10.54%

- <39> 상기 결합체의 LUMO+4 및 LUMO+6의 기여도를 확인하기 위하여, HF(Hartree-Fock) 과동 기능을 이용한 CIS 방법으로 들뜬 상태를 계산하였다. 상기 표 2에서 HOMO→LUMO+4 및 HOMO→LUMO+6 전이에 대한 전자 진동은 각각 약 18% 및 11%로 계산되었다. 이 둘을 더한 수치인 29% 정도의 밀도 변화는 상기 결합체가 형광 상태로 전이하는

것을 방지할 것이다. 따라서, 형광 감소 작용은 쿠마린 고리로부터 구리 이온의 전자 전이를 보여주는 상기 결합체의 LUMO+4 및 LUMO+6으로 인한 것이다.

<40> 간과 신장에서 구리 이온의 농도 조절이 대단히 중요하기 때문에, 화합물 1이 설치류의 간 세포(NCTC 클론 1469 세포)에서 구리 이온의 농도를 관찰하였다. 제13b도에 도시된 것처럼, 화합물 1은 상기 세포에 의하여 흡수되었고, 세포 구조의 밝은 형광 이미지를 제공하는데 이용될 수 있다. 제13c도에 도시된 것처럼, 구리 이온과 함께 배양된 상기 세포들은 완전한 형광 감소를 보여주고, 이는 금속 이온이 세포를 통하여 투과한 것을 의미한다. LLC-MK2 세포에 대하여 비슷한 결과가 제13d도 내지 제13f도에 도시되어 있다.

<41> 제13도는 NCTC 클론 1469(a 내지 c) 및 LLC-MK2(d 내지 f)에서 구리 이온의 공초점 이미지(λ_{ex} 430 nm, λ_{em} 479 nm)를 나타낸 것이다. 제13a도는 25 μ M의 화합물 1과 배양된 NCTC 세포들의 밝은 필드 전송 이미지이고, 제13b도는 25 μ M의 화합물 1과 배양된 NCTC 세포들의 형광 이미지이고, 제13c도는 10 당량의 $CuCl_2$ 와 배양된 NCTC 세포들의 이미지이다. 제13d도는 25 μ M의 화합물 1과 배양된 LLC-MK2 세포들의 밝은 필드 전송 이미지이고, 제13e도는 25 μ M의 화합물 1과 배양된 LLC-MK2 세포들의 형광 이미지이고, 제13f도는 10 당량의 $CuCl_2$ 와 배양된 LLC-MK2 세포들의 이미지이다.

<42> 제14도에 도시된 것처럼, 생물학적으로 화합물 1의 독성을 알아보기 위하여, MTT 시험을 하였다. 구리 이온이 부가된 NCTC 클론 1469 세포 및 LLC-MK2 세포에서 많은 양의 세포가 죽었다는 것을 알 수 있다. 반면, 비독성인 화합물 1의 부가는 구리 이온이 부가된 세포의 독성을 감소시켰다. 따라서 화합물 1은 생명체에서 구리 이온에 대한 효율적인 형광 바이오 센서로 이용될 수 있다.

<43> 제14도는 NCTC 클론 1469 세포 및 LLC-MK2 세포의 세포 생존율을 나타낸 것이다. 화합물 1, 구리 이온 및 결합체에 대한 처리과정이 진행되었고, 650 nm의 레이저가 조사되었다. 참조 데이터로, 100% 생존한 세포로서, 조사되었지만 처리과정이 진행되지 않은 세포가 이용되었다.

<44> 결국, 본 발명에 따른 화합물 1은 형광 감소를 통한 구리 이온의 센서로서 이용이 가능하고, 2-피코릴아미드(2-picolylamide) 대체물의 도입은 다른 보통의 또는 유독한 금속 이온의 효율적인 트리텐테이트 결합을 가능하게 한다. 화합물 1의 물에의 용해성, 막 투과성, 비독성은 간세포에서 구리 이온의 감지에 이용될 수 있다는 것을 뜻한다.

<45> 본 발명에 따른 이용 방법은 화학식 1로 표시되는 화합물에 구리 이온을 첨가할 때 발생하는 형광 변화를 이용함으로써, 구리 이온의 존재 여부, 구리 이온의 양, 또는 이들 모두를 감지하는 것을 특징으로 한다. 상술한 것처럼, 본 발명은 구리 이온에 대하여 매우 뛰어난 선택성을 보여준다. 형광 변화를 이용한 금속 이온의 감지 기술 및 그에 따른 금속 이온 양의 측정 기술 자체는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있다.

<46> 또한, 화학식 1로 표시되는 화합물은 감응제로 이용될 수 있으며, 감응제의 제조 방법 자체는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있다. 나아가, 화학식 1로 표시되는 화합물은 바이오 센서로도 이용될 수 있다.

<47> 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 더 잘 이해될 수 있으며, 하기의 실시예는 본 발명의 예시 목적을 위한 것이며 첨부된 특허청구범위에 의하여 한정되는 보호범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

<48> 실시예

<49> 실시예 1: 화합물 1의 제조

<50> 화학식 2로 표시되는 화합물(2.34 g, 10 mmol)의 서스펜션이 교반되는 중에 클로로포름(chloroform, 100 mL)에서 dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (2.3 g, 11 mmol), 2-(aminomethyl)pyridine (1.32 g, 11 mmol), 및 catalytic amount of 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) (50 mg)이 부가되었다. 상기 혼합물은 6 시간동안 교반되었고, 흰색 침전물 N,N'-dicyclohexylurea (DCU)가 노랑 용액에서 여과되었다. 상기 여과물은 물(3×50 mL)에서 세척되었고, anhydrous sodium sulfate를 통하여 건조되었고, 용제가 진공 상에서 제거되었다. 상기 생성물은 칼럼 크로마토그래피(alumina B-10 (eluant: ethyl acetate:dichloromethane, 1:5 v/v))를 통하여 정제되었고, 황색 고체 2.12 g이 60% 수득률로 생성되었다.

<51> mp 170 ° C; 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 1.21- 1.28 (m, 6H), 3.44- 3.48 (m, 4H), 4.80 (d, 2H), 6.5 (d,

1H), 6.65 (d, 1H) 7.18 (m, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.65 (m, 1H), 8.60 (d, 1H), 8.74 (s, 1H) 9.53 (s, 1H). ¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ 12.42, 28.76, 45.07, 45.32, 96.66, 100.00, 108.41, 109.92, 110.33, 121.57, 122.09, 128.20, 131.14, 136.64, 148.24, 149.37, 152.59, 157.68, 157.74, 163.40, FAB-MS calc. for C₂₀H₂₁N₃O₃ [M+H]⁺ 351.41, found 351.0.

<52> **실시예 2: 화합물 2의 제조**

<53> 2-(aminomethyl)pyridine 대신 3-(aminomethyl)pyridine이 사용된 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 화합물 2가 2.24g, 64%의 수득률로 제조되었다.

<54> mp 190-192° C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.21- 1.28 (m, 6H), 3.44- 3.48 (m, 4H), 4.80 (d, 2H), 6.5 (d, 1H), 6.65 (d, 1H) 7.25 (m, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.72 (d, 1H), 8.51 (d, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.74 (s, 1H) 9.23 (s, 1H). ¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ 12.42, 34.12, 45.07, 96.48, 108.28, 109.62, 110.00, 123.46, 128.14, 131.19, 134.17, 135.38, 148.41, 148.63, 149.22, 152.65, 157.67, 162.75, 163.45, 177.86, FAB-MS calc. for C₂₀H₂₁N₃O₃ [M+H]⁺ 351.41, found 351.0.

<55> **실시예 3: 화합물 3의 제조**

<56> 2-(aminomethyl)pyridine 대신 4-(aminomethyl)pyridine이 사용된 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 화합물 3이 2.00g, 57%의 수득률로 제조되었다.

<57> mp 210-212 ° C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.21- 1.28 (m, 6H), 3.44- 3.48 (m, 4H), 4.68 (d, 2H), 6.53 (d, 1H), 6.68 (d, 1H) 7.19 (m, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.43 (d, 1H), 8.56 (d, 2H), 8.74 (s, 1H), 9.30 (s, 1H). ¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ 12.38, 33.93, 45.10, 96.53, 108.32, 109.52, 110.08, 122.20, 122.21, 131.27, 139.95, 147.63, 148.56, 148.56, 149.96, 149.97, 152.74, 157.74, 162.87, 163.63, FAB-MS calc. for C₂₀H₂₁N₃O₃ [M+H]⁺ 351.41, found 351.0.

<58> 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면의 간단한 설명

<59> 제1도는 본 발명에 따른 화합물과 구리 이온의 반응을 나타내는 것이다.

<60> 제2도는 화합물 1과 구리 이온의 결합체의 결정 구조를 나타내는 것이다.

<61> 제3도는 화합물 1과 구리 이온의 결합체의 흡수 스펙트럼 및 형광 강도를 나타내는 것이다.

<62> 제4도 내지 제6도는 염화염 부가에 따른 화합물 1 내지 3의 흡수 및 형광 스펙트럼들을 나타낸 것이다.

<63> 제7도는 CuCl₂ 부가에 따른 화합물 1 내지 3의 형광 스펙트럼 및 형광 강도를 나타낸 것이다.

<64> 제8도는 다양한 금속 양이온에 대한 본 발명에 따른 화합물 1의 선택성을 나타내는 것이다.

<65> 제9도는 구리 이온이 있을 때 또는 없을 때, pH의 변화에 따른 화합물 1의 형광 스펙트럼의 변화를 표시한 것이다.

<66> 제10도는 금속 양이온의 부가에 따른 화합물 1의 형광 변화를 표시한 것이다.

<67> 제11도는 화합물 1 및 구리 이온의 프론티어 분자 오비탈을 나타낸 것이다.

<68> 제12도는 화합물 1과 화합물 1 및 구리 이온의 결합체의 분자 오비탈을 나타낸 것이다.

<69> 제13도는 NCTC 클론 1469(a 내지 c) 및 LLC-MK2(d 내지 f)에서 구리 이온의 공초점 이미지를 나타낸 것이다.

<70> 제14도는 NCTC 클론 1469 세포 및 LLC-MK2 세포의 세포 생존율을 나타낸 것이다.

<71> 제15도는 화합물 1(a) 및 CuCl₂ 10 당량이 부가된 화합물 2(b)의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

<72> 제16도는 화합물 2(a) 및 화합물 3(b)의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

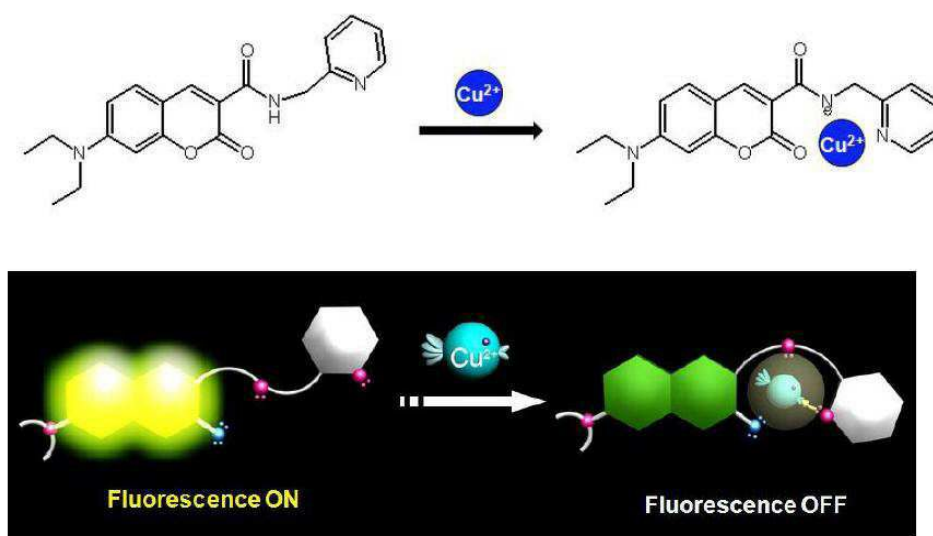
<73> 제17도 내지 제20도는 화합물 1, 2, 3, 및 화합물 1과 구리 이온의 결합체 각각의 FAB-MS를 나타낸 것이다.

<74> 제21도, 제23도 및 제25도는 CDCl_3 에서 화합물 1, 2, 3 각각 10 mM의 ^1H -NMR 스펙트럼(200 MHz)을 나타낸 것이다.

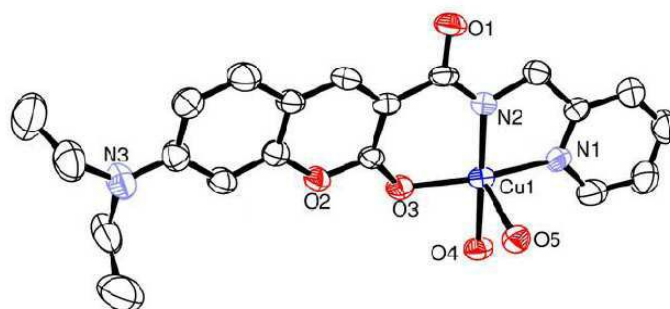
<75> 제22도, 제24도 및 제26도는 CDCl_3 에서 화합물 1, 2, 3 각각의 ^{13}C -NMR 스펙트럼(50 MHz)을 나타낸 것이다.

도면

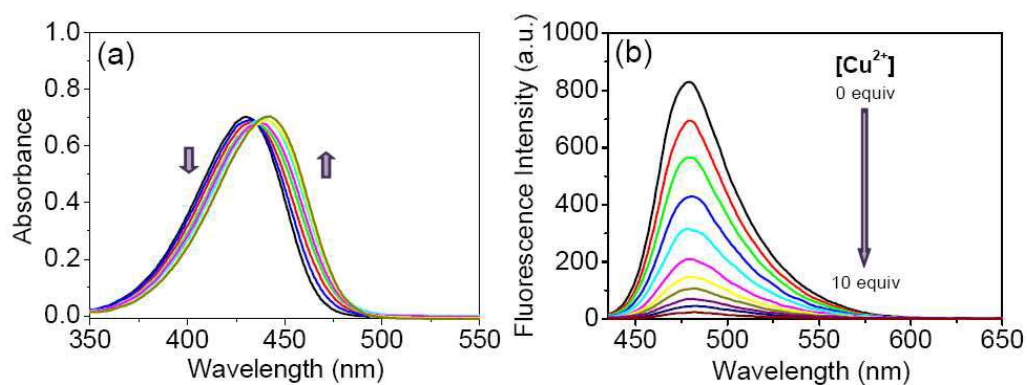
도면1



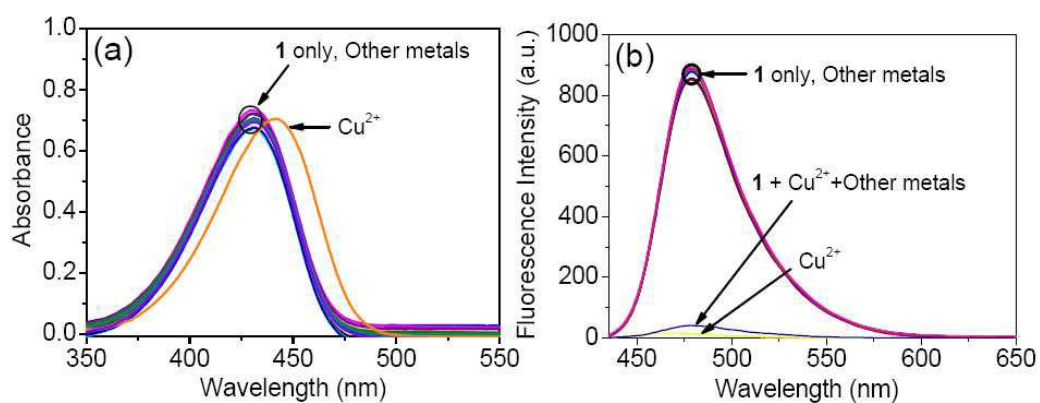
도면2



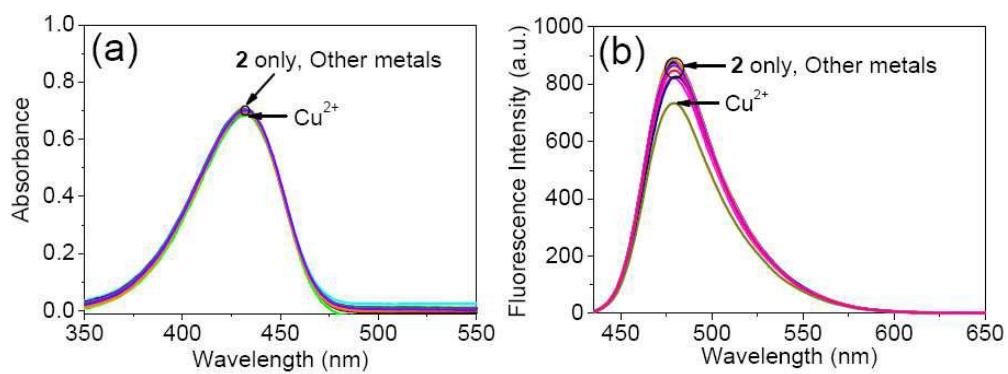
도면3



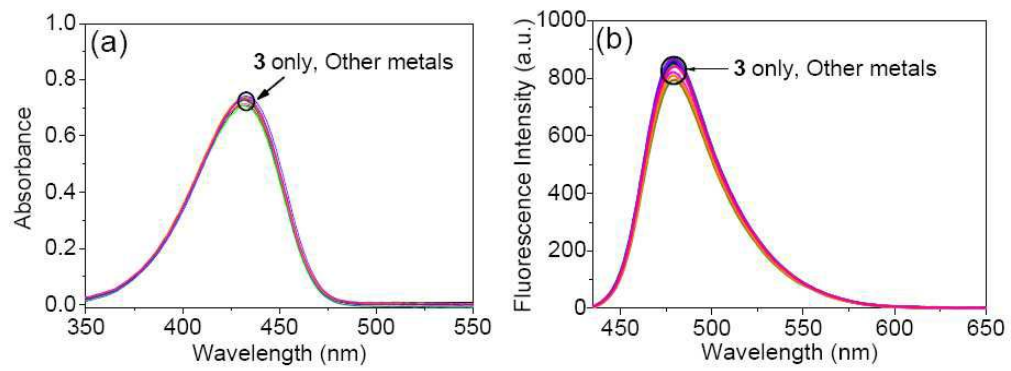
도면4



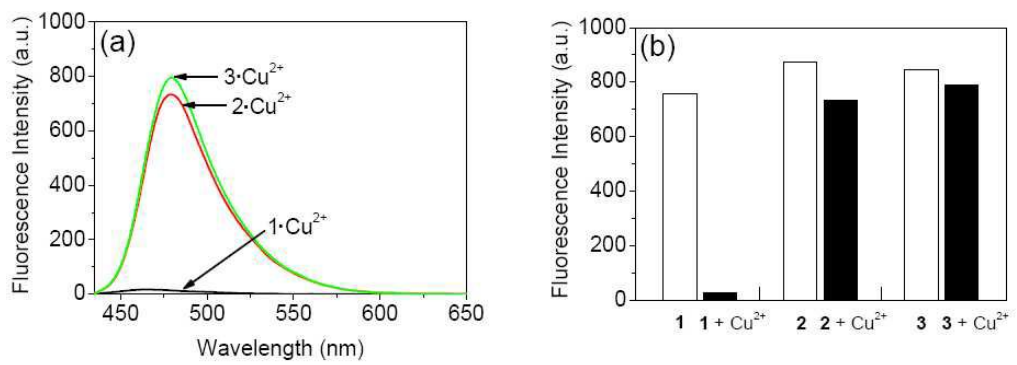
도면5



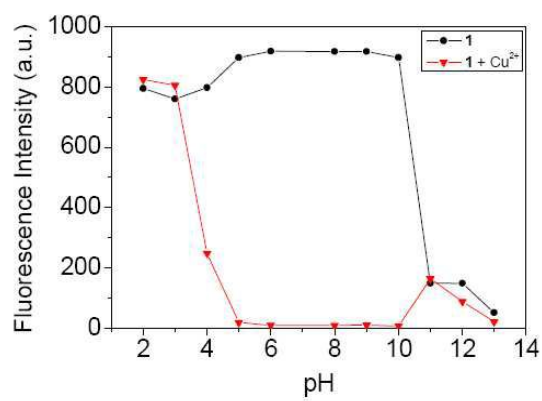
도면6



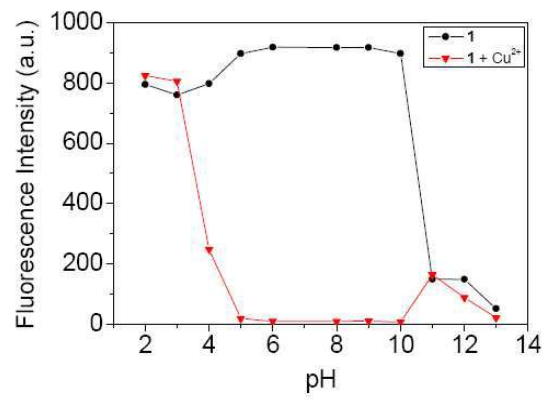
도면7



도면8



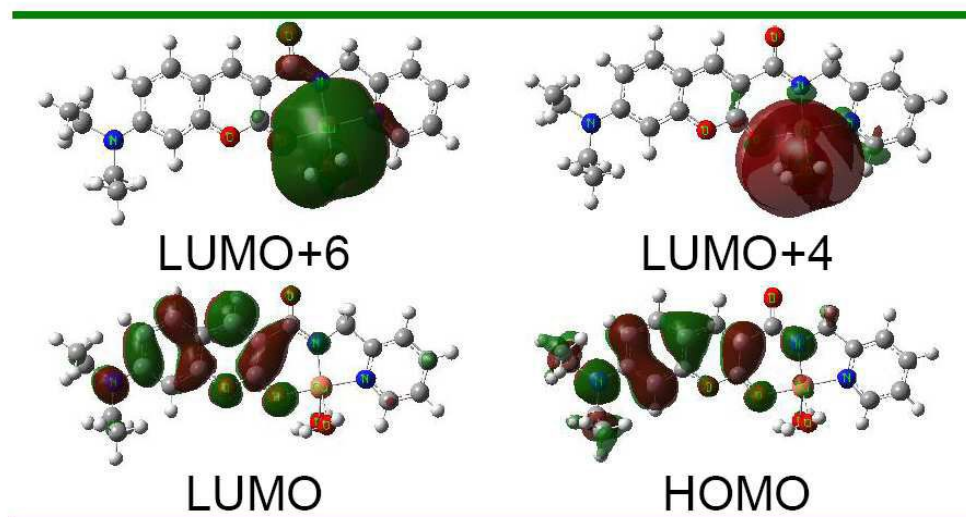
도면9



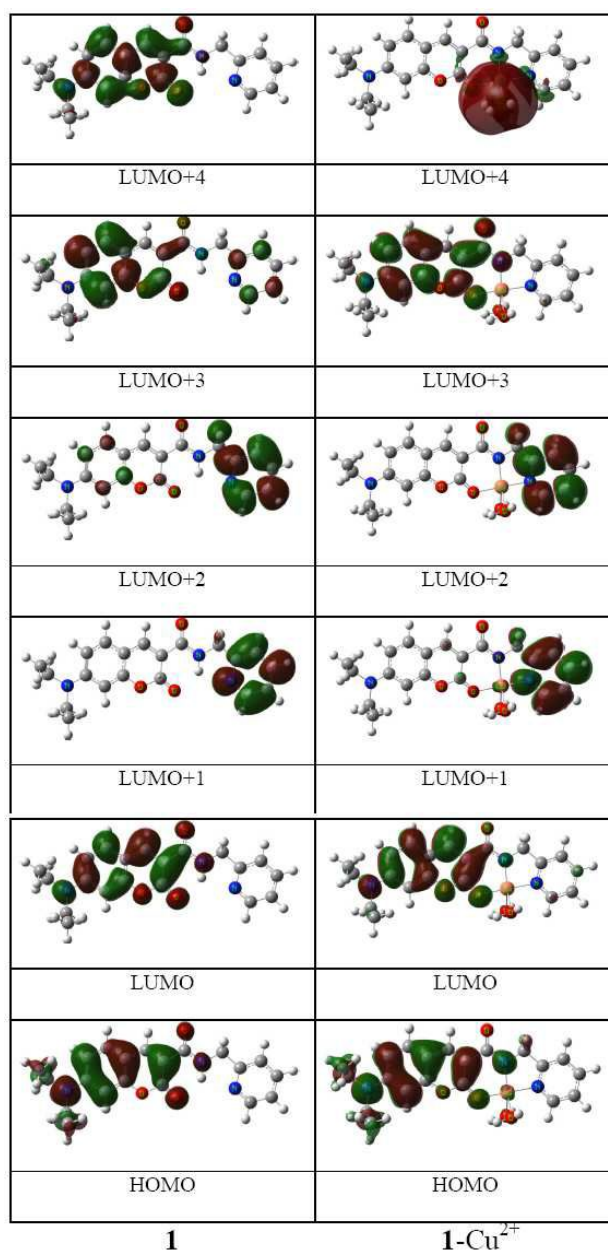
도면10



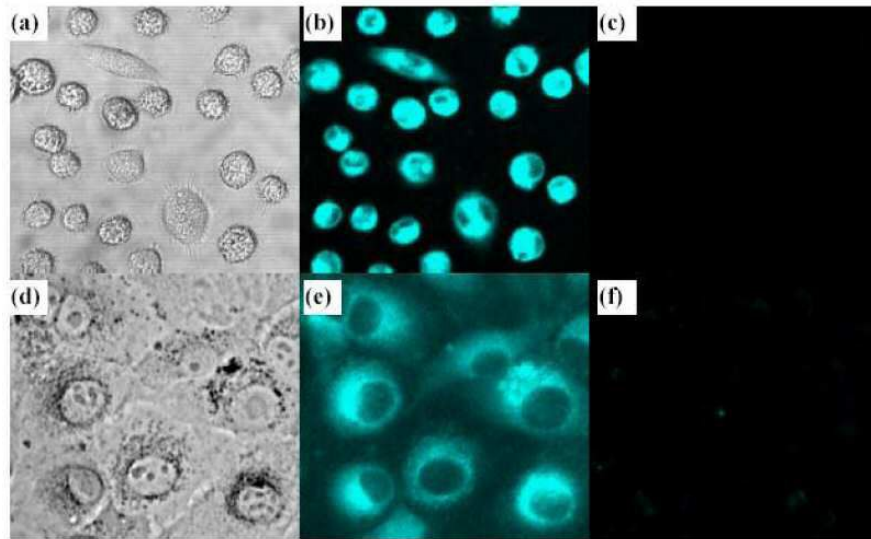
도면11



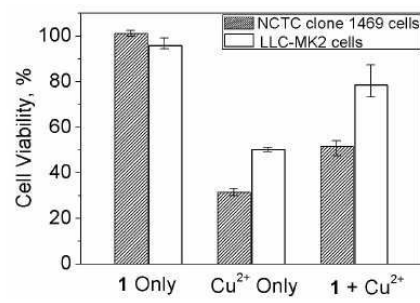
도면12



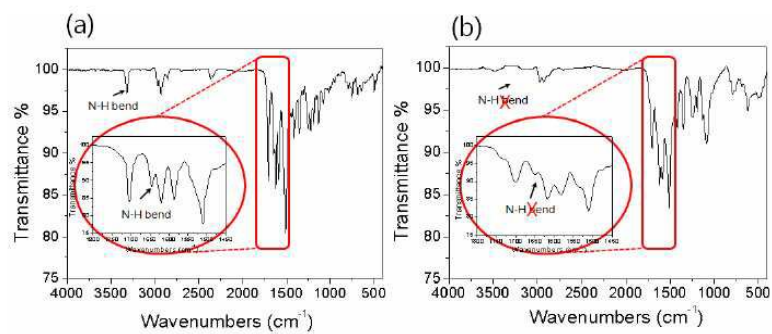
도면13



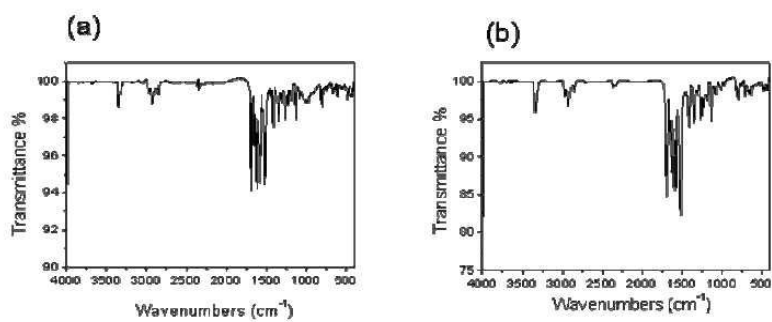
도면14



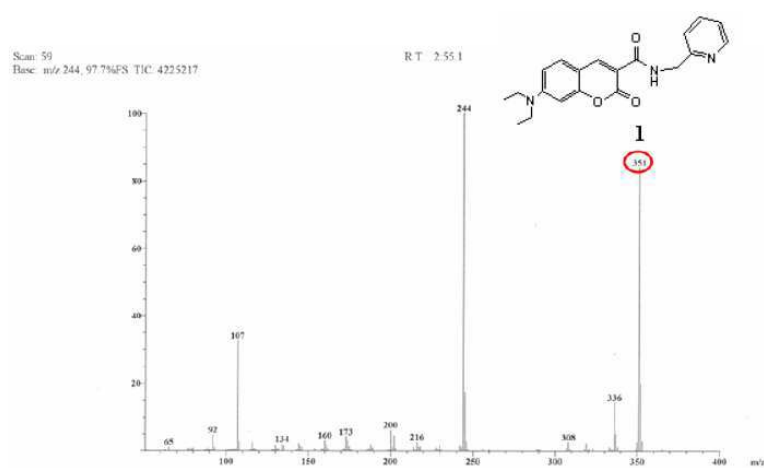
도면15



도면16



도면17



도면18

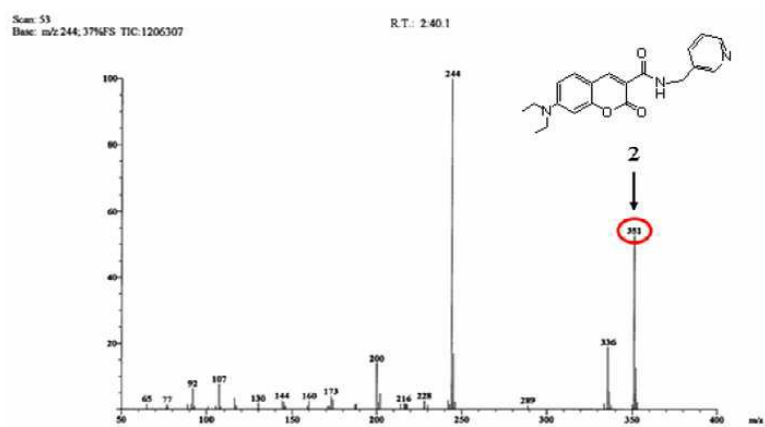
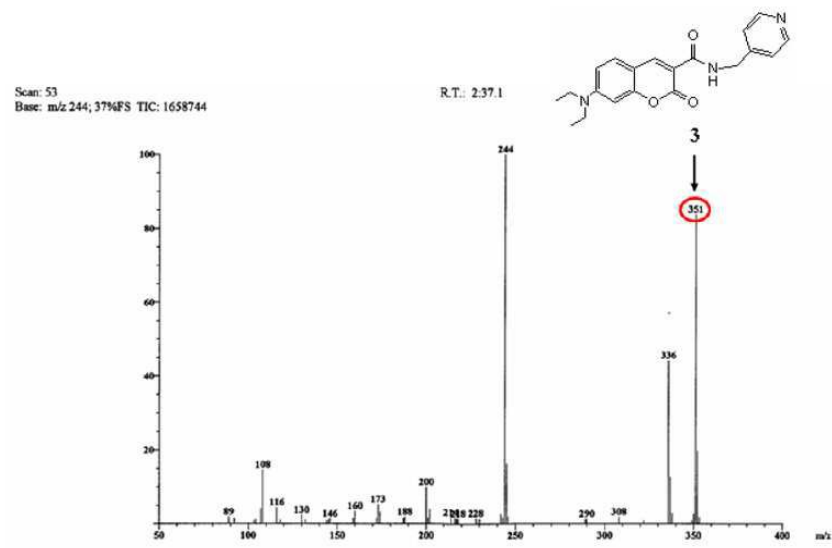
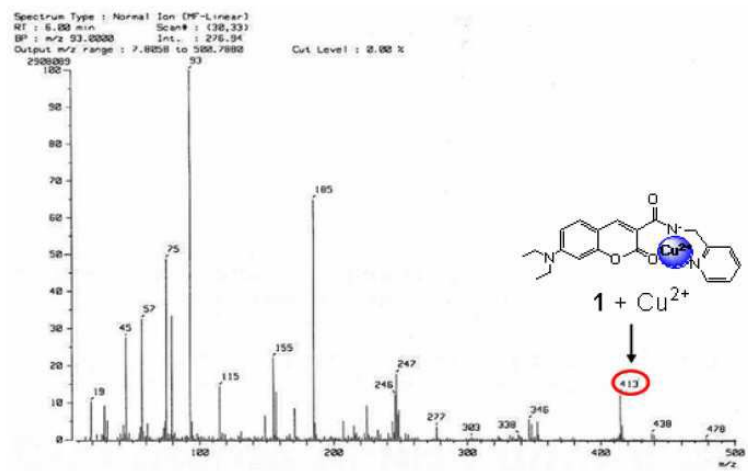


Figure S12. FAB-MS of 2.

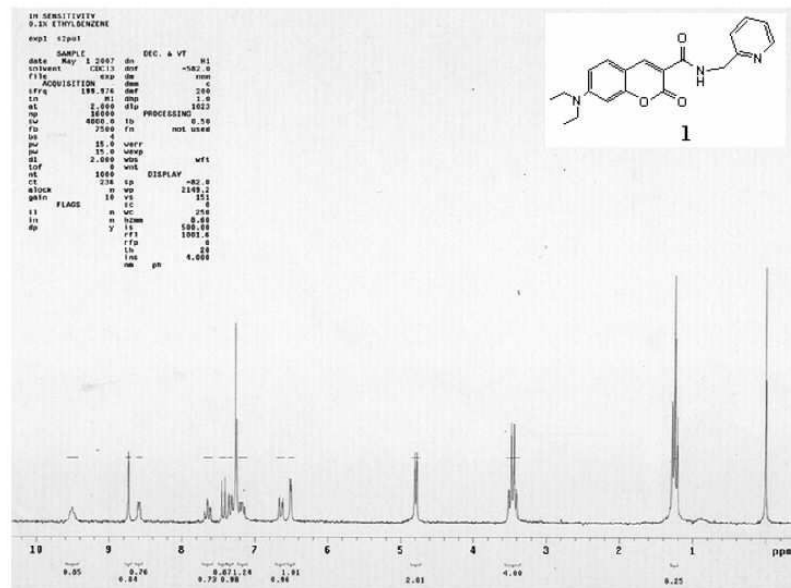
도면19



도면20



도면21



도면22

