



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0113388
(43) 공개일자 2010년10월21일

(51) Int. Cl.

C09K 11/07 (2006.01) C07F 1/08 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0031942

(22) 출원일자 2009년04월13일

심사청구일자 2009년04월13일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

윤주영

서울특별시 서초구 잠원동 50 롯데캐슬 207동
1703호

남성원

서울특별시 마포구 상암동 월드컵파크아파트
501-1803

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

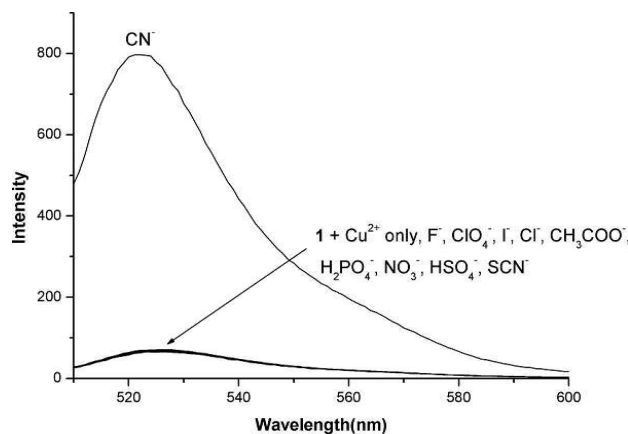
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인-구리(II) 복합체, 이의 제조방법 및 이를 이용한 시안화 이온 검출방법

(57) 요약

본 발명은 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인-구리(II) 복합체를 포함하는 형광 센서 및 이를 이용한 시안화 이온 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수용액 내에서 플루오레세인 유도체는 구리 이온과 결합하여 형광 소광(fluorescence quenching) 효과를 나타내며, 상기 복합체에 시안화 이온을 첨가할 경우 구리 이온이 유리되어 시안화 이온과 반응물을 형성하면서 형광이 재발광되어 시안화 이온을 효과적으로 감지할 수 있는 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인-구리(II) 복합체를 포함하는 형광 센서 및 이를 이용한 시안화 이온 검출방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박성수

서울특별시 영등포구 여의도동 수성아파트 A동
1305호

정소영

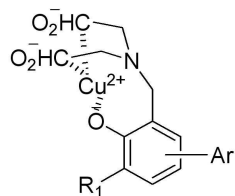
경기도 고양시 일산동구 마두1동 796번지

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 플루오레세인-구리(II) 복합체를 포함하는 시안화 이온 검출용 형광센서:

[화학식 1]



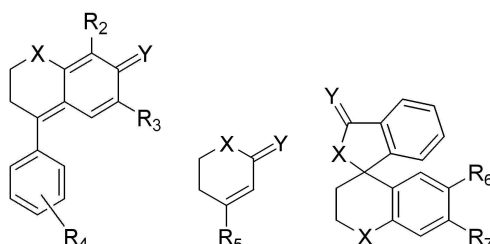
상기 식에서,

R₁은 수소, 할로젠 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내며,

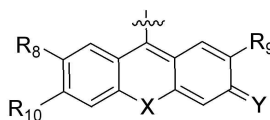
Ar은 구조 내에 형광단(fluorophore)을 포함하는 아릴기로서, 인접하는 페닐 환과 융합환을 이루거나, 상기 인접하는 페닐 환의 치환 가능한 탄소원자에 치환된다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

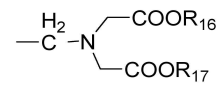


Ar이 페닐 환과 융합환을 이루는 경우, , , 을 나타내고,



Ar이 페닐 환의 치환 가능한 탄소원자에 치환되는 경우, 을 나타내며,

여기서 X 및 Y는 각각 독립적으로 산소 또는 황 원자를 나타내고,



R₂, R₃, R₅, R₆ 및 R₇은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 하이드록시, C₁₋₄ 알킬, 또는 내며,

R₄는 수소, 하이드록시, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, -COOR₁₁, -CON(R₁₂)(R₁₃) 또는 -N(R₁₄)(R₁₅)를 나타내고,

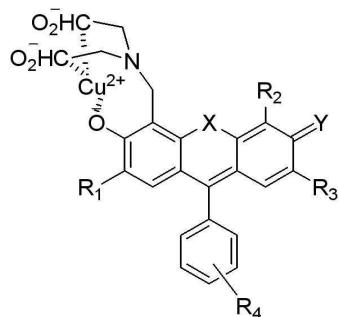
여기서, R₁₁ 내지 R₁₇는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내는 시안화 이온 검출용 형광센서.

청구항 3

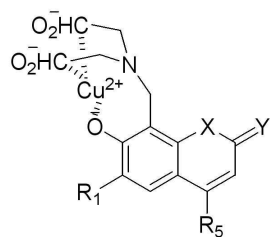
제2항에 있어서,

화학식 1의 플루오레세인-구리(II) 복합체가 하기 화학식 1a 내지 1d의 화합물 중 어느 하나인 시안화 이온 검출용 형광센서:

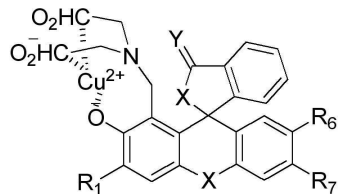
[화학식 1a]



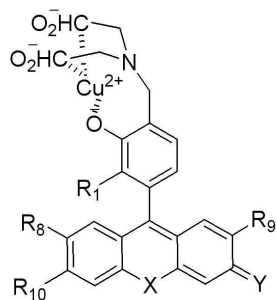
[화학식 1b]



[화학식 1c]



[화학식 1d]



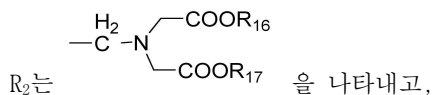
청구항 4

제 3 항에 있어서,

화학식 1a의 화합물은

X 및 Y는 각각 독립적으로 산소 원자를 나타내고,

R₁ 및 R₃은 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠을 나타내며,



R_4 는 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, $-\text{COOR}_{11}$, $-\text{CON}(\text{R}_{12})(\text{R}_{13})$ 또는 $-\text{N}(\text{R}_{14})(\text{R}_{15})$ 를 나타내고,

여기서, R_{11} 내지 R_{17} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 시안화 이온 검출용 형광센서.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

화학식 1b의 화합물은

X 및 Y 는 각각 독립적으로 산소 원자를 나타내고,

R_1 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 시안화 이온 검출용 형광센서.

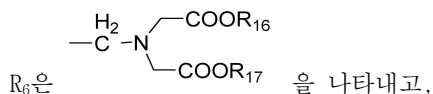
청구항 6

제 3 항에 있어서,

화학식 1c의 화합물은

X 및 Y 는 각각 독립적으로 산소 원자를 나타내고,

R_1 은 수소 또는 할로젠을 나타내며,



R_7 은 수소 또는 하이드록시를 나타내는 시안화 이온 검출용 형광센서.

청구항 7

제 3 항에 있어서,

화학식 1d의 화합물은

X 및 Y 는 각각 독립적으로 산소 원자를 나타내고,

R_1 은 수소 또는 할로젠을 나타내며,

R_8 및 R_9 는 각각 독립적으로 수소, 할로젠 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

R_{10} 은 수소 또는 하이드록시를 나타내는 시안화 이온 검출용 형광센서.

청구항 8

제1항의 플루오레세인-구리(II) 복합체와 시안화 이온을 반응시키는 단계를 포함하는 시안화 이온의 검출방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

반응은 pH 6.5 내지 8.5의 수용액에서 실시하는 시안화 이온의 검출방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

시안화 이온 검출은 플루오레세인-구리(II) 복합체 및 시안화 이온을 포함하는 배지에서 운동성 및 화학물질에 대한 민감성을 갖는 생명체를 공동배양하여 주화성 반응을 확인하는 것인 시안화 이온의 검출방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서,

운동성 및 화학물질에 대한 민감성을 갖는 생명체는 섬모충류(*Ciliate*), 짚신벌레(*Paramecium*), 스텐터(*Stentor*), 편모충류(*flagellate*), 선충류(*Nematode*) 및 세균으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 어느 하나인 시안화 이온의 검출방법.

청구항 12

로딩 채널, 미세채널을 포함하는 카오스 믹서(chaotic mixer) 및 형광 측정용 출구로 이루어지는 미세 유체 소자로서,

제1항 기재의 형광센서를 포함하는 미세 유체 소자.

청구항 13

제12항에 있어서,

미세채널의 벽면은 헤링 본(herring-bone) 형태로 되어 있는 미세 유체 소자.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인-구리(II) 복합체를 포함하는 형광 센서 및 이를 이용한 시안화 이온 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수용액 내에서 플루오레세인 유도체는 구리 이온과 결합하여 형광 소광(fluorescence quenching) 효과를 나타내며, 상기 복합체에 시안화 이온을 첨가할 경우 구리 이온이 유리되어 시안화 이온과 반응물을 형성하면서 형광이 재발광되어 시안화 이온을 효과적으로 감지할 수 있는 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인-구리(II) 복합체를 포함하는 형광 센서 및 이를 이용한 시안화 이온 검출방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 생물학적 및 환경적 과정에 대한 중요한 역할로 인해 최근 수십 년간 음이온에 대한 선택적 광학 신호 시스템의 개발이 두드러진 주목을 받아왔다. 특히, 시안화 이온은 생물 및 환경 분야에서 독성을 유발하는 해로운 음이온이다. 시안 이온은 포유동물에 매우 독성이 커서 구토를 유발하고, 의식을 잃게 하여 결국 죽음에 이르게 한다. 시안화 이온의 강한 독성 때문에 세계보건기구(WHO)에 따르면 음용수 내 농도가 22 mM를 넘을 수 없다.

[0003] 따라서, 최근 십 년간 다양한 비색 및 형광 프로브들이 활발하게 보고되어 왔다. 예를 들어, 일반적인 접근 방

법으로 시안화 이온 복합체를 이용하거나, 아연(II)-포르피린, Ru(II)-피리딘, 보론산 유도체 및 CdSe 양자점을 첨가하는 것이 있다. 또한, 수소 결합 반응을 이용할 수 있다. 시안화 이온을 감지하기 위한 세 번째 접근 방법으로, 불소 및 아세테이트와 같은 다른 음이온들에 의한 간섭을 최소화할 수 있는 시안화 이온의 친핵성기 첨가 방법이 적용되어 왔다. 예를 들어, 옥사진(oxazine), 피릴리움(pyrylium), 스쿠아란(squarane), 트리플루오로아세토펜(trifluoroacetophenone), 아크릴트리아젠(acyltriazen), 아크리디늄(acridinium) 및 살리실알데하이드(salicylaldehyde)에 시안화 이온의 친핵성기 첨가를 통해 시안화 이온을 감지하였다. 마지막으로, 시안화 이온 감지방법으로 구리-시안화 이온 친화도를 이용하는 방법이 최근에 보고되었다. 그러나, 수용액 내에서 작업하는 시안화 이온에 대한 "Off-On" 타입 형광 프로브의 예는 보고된 바 없다.

발명의 내용

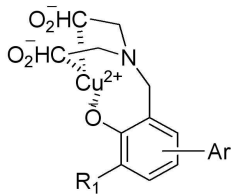
해결 하고자하는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 구리 이온을 선택적으로 검출할 수 있는 플루오레세인 유도체를 이용하여 시안화 이온을 선택적으로 감지할 수 있는 형광센서 및 이를 이용한 시안화 이온 검출방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 플루오레세인-구리(II) 복합체를 포함하는 시안화 이온 검출용 형광센서를 제공한다.

[0006] [화학식 1]



[0007]

[0008] 상기 식에서,

[0009] R₁은 수소, 할로젠 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내며,

[0010] Ar은 구조 내에 형광단(fluorophore)을 포함하는 아릴기로서, 인접하는 페닐 환과 융합환을 이루거나, 상기 인접하는 페닐 환의 치환 가능한 탄소원자에 치환된다.

[0011] 본 발명은 또한 상기의 플루오레세인-구리(II) 복합체와 시안화 이온을 반응시키는 단계를 포함하는 시안화 이온의 검출방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 로딩 채널, 미세채널을 포함하는 카오스 믹서(chaotic mixer) 및 형광 측정용 출구로 이루어지는 미세 유체 소자로서, 본 발명의 형광센서를 포함하는 미세 유체 소자를 제공한다.

효 과

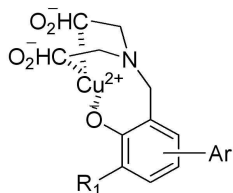
[0013] 본 발명의 플루오레세인-구리(II) 복합체는 100% 수용액 내에서 플루오레세인 유도체의 형광이 소광되나 시안화 이온을 첨가할 경우 구리-시안화 이온 반응물을 형성하면서 플루오레세인 유도체로 복귀되어 녹색형광을 재발광 하므로, "Off-On" 타입의 형광센서로 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0015] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 플루오레세인-구리(II) 복합체를 포함하는 시안화 이온 검출용 형광센서에 관한 것이다.

[0016] [화학식 1]



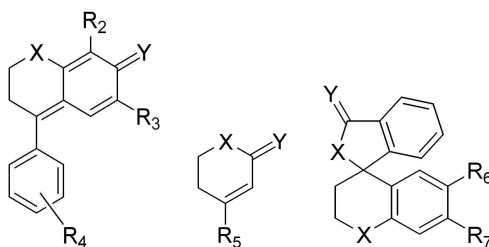
[0017]

[0018] 상기 식에서,

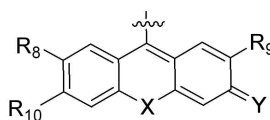
[0019] R₁은 수소, 할로젠 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내며,

[0020] Ar은 구조 내에 형광단(fluorophore)을 포함하는 아릴기로서, 인접하는 페닐 환과 융합환을 이루거나, 상기 인접하는 페닐 환의 치환 가능한 탄소원자에 치환된다.

[0021] 상기 화학식 1의 화합물은 예를 들어,

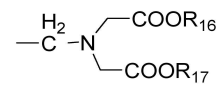


[0022] Ar이 페닐 환과 융합환을 이루는 경우, 을 나타내고,



[0023] Ar이 페닐 환의 치환 가능한 탄소원자에 치환되는 경우 을 나타내며,

[0024] 여기서 X 및 Y는 각각 독립적으로 산소 또는 황 원자를 나타내고,



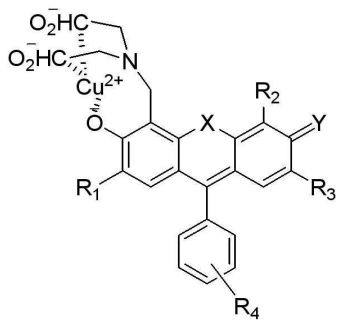
[0025] R₂, R₃, R₅, R₆ 및 R₇은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 하이드록시, C₁₋₄ 알킬, 또는 을 나타내며,

[0026] R₄는 수소, 하이드록시, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, -COOR₁₁, -CON(R₁₂)(R₁₃) 또는 -N(R₁₄)(R₁₅)를 나타내고,

[0027] 여기서, R₁₁ 내지 R₁₇는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내는 화합물을 포함한다.

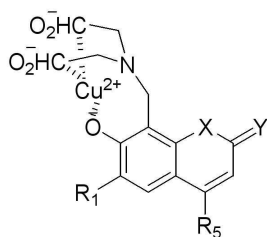
[0028] 보다 구체적으로 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 1a 내지 1d의 화합물 중 어느 하나를 포함한다.

[0029] [화학식 1a]



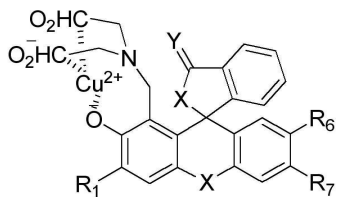
[0030]

[0031] [화학식 1b]



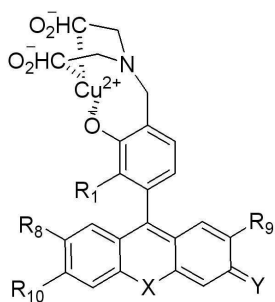
[0032]

[0033] [화학식 1c]



[0034]

[0035] [화학식 1d]



[0036]

[0037] 상기 화학식 1a의 화합물은 예를 들어

[0038] X 및 Y는 각각 독립적으로 산소 원자를 나타내고,

[0039] R₁ 및 R₃은 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠을 나타내며,

[0040] R₂는
$$\text{---C---N---COOR}_{16}$$

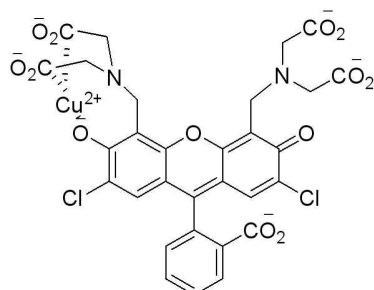
$$\text{---COOR}_{17}$$
 을 나타내고,

[0041] R_4 는 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, $-COOR_{11}$, $-CON(R_{12})(R_{13})$ 또는 $-N(R_{14})(R_{15})$ 를 나타내고,

[0042] 여기서, R_{11} 내지 R_{17} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물을 포함한다.

[0043] 일 예를 들어 상기 화학식 1a의 화합물은 하기 화학식 1a-1의 화합물을 포함한다.

[0044] [화학식 1a-1]



[0045]

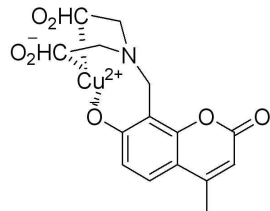
[0046] 또한 상기 화학식 1b의 화합물은 예를 들어

[0047] X 및 Y는 각각 독립적으로 산소 원자를 나타내고,

[0048] R_1 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물을 포함한다.

[0049] 일 예를 들어 상기 화학식 1b의 화합물은 하기 화학식 1b-1의 화합물을 포함한다.

[0050] [화학식 1b-1]



[0051]

[0052] 또한 상기 화학식 1c의 화합물은 예를 들어

[0053] X 및 Y는 각각 독립적으로 산소 원자를 나타내고,

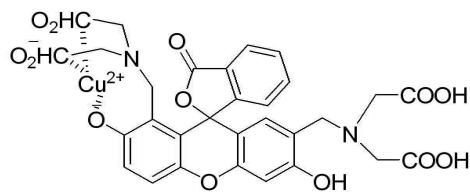
[0054] R_1 은 수소 또는 할로젠을 나타내며,

[0055] R_6 은 $\begin{array}{c} H_2 \\ | \\ -C-N- \\ | \quad | \\ COOR_{16} \quad COOR_{17} \end{array}$ 을 나타내고,

[0056] R_7 은 수소 또는 하이드록시를 나타내는 화합물을 포함한다.

[0057] 일 예를 들어 상기 화학식 1c의 화합물은 하기 화학식 1c-1의 화합물을 포함한다.

[0058] [화학식 1c-1]



[0059]

[0060] 또한 상기 화학식 1d의 화합물은 예를 들어

[0061] X 및 Y는 각각 독립적으로 산소 원자를 나타내고,

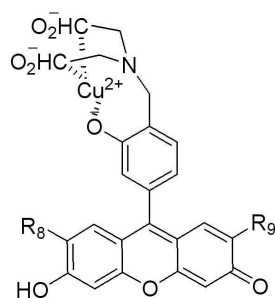
[0062] R₁은 수소 또는 할로젠을 나타내며,

[0063] R₈ 및 R₉는 각각 독립적으로 수소, 할로젠 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내고,

[0064] R₁₀은 수소 또는 하이드록시를 나타내는 화합물을 포함한다.

[0065] 일 예를 들어 상기 화학식 1d의 화합물은 하기 화학식 1d-1의 화합물을 포함한다.

[0066] [화학식 1d-1]



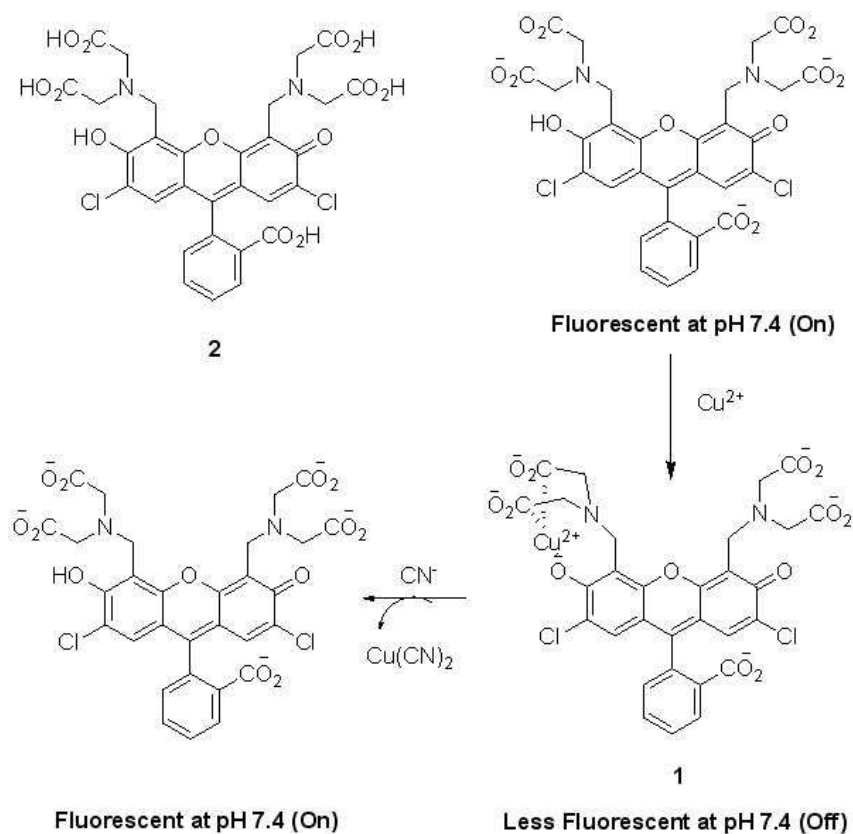
[0067]

[0068] R₈ 및 R₉는 수소, 플루오로, 클로로, 또는 메틸을 나타낸다.

[0069] 본 발명의 플루오레세인-구리(II) 복합체는 100% 수용액 내에서 시안화 이온에 대해 "Off-On" 타입의 형광 프로브로 사용할 수 있다.

[0070] 하기 반응식 1의 메커니즘에 따르면, 하기 화학식 2의 플루오레세인 유도체는 pH 6.5 내지 8.5의 100% 수용액 내에서 녹색 형광을 나타내며, 구리 이온과 결합하면 형광이 소광(quenching)되는 플루오레세인-구리(II) 복합체를 이루고, 상기 복합체에 시안화 이온을 첨가하면 구리 이온이 유리되어 시안화 이온과 반응하여 매우 안정한 Cu(CN)₂를 생성하면서 녹색 형광을 나타낸다.

[0071] [반응식 1]

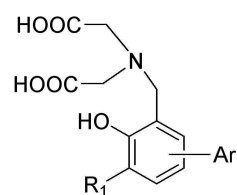


[0072]

[0073] 상기 시안화 이온은 특별히 제한하지는 않으나 시안화나트륨과 같은 시안화 알칼리 금속염으로부터 유도된 것일 수 있다.

[0074] 본 발명의 하기 화학식 1의 화합물은 또한 하기 화학식 2로 표시되는 화합물에 구리 염을 반응시켜 제조할 수 있다.

[0075] [화학식 2]



[0076]

[0077] 상기 식에서,

[0078] R_1 은 수소, 할로젠 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내며,

[0079] Ar은 구조 내에 형광단(fluorophore)을 포함하는 아릴기로서, 인접하는 페닐 환과 융합환을 이루거나, 상기 인접하는 페닐 환의 치환 가능한 탄소원자에 치환된다.

[0080] 상기 화학식 2의 화합물은 예를 들어 플루오레세인 유도체로서 대한민국 등록특허 제690,199호에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있으나, 이에 특별히 제한하지는 않는다.

[0081] 보다 구체적으로, 상기 화학식 2의 화합물은 하기 반응식 2에 따라 제조될 수 있는데,

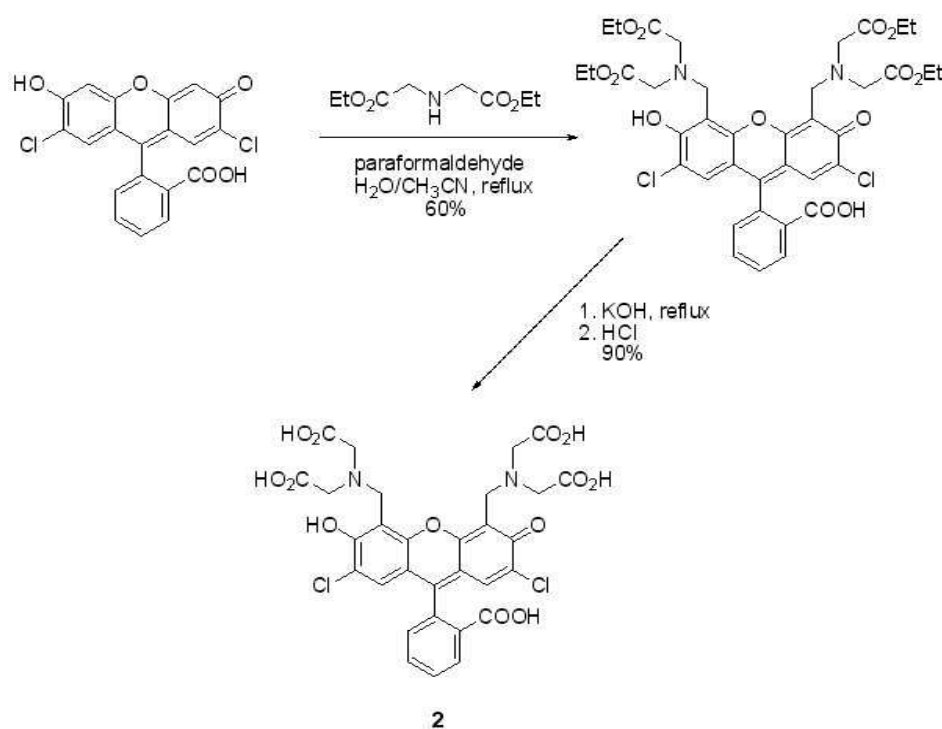
[0082] 1) 2',7'-디클로플루오레세인 (2',7'-dichlorofluorescein), 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 및 디알킬 이미노디아세테이트(dialkyl iminodiacetate)를 반응시켜 디알킬 이미노디아세테이트 플루오레세인 (dialkyliminodiacetate fluorescein)을 얻고,

[0083] 2) 상기 1)단계에서 얻어진 디알킬 이미노디아세테이트 플루오레세인을 염기로 가수분해하여 화학식 2의 화합물을 얻을 수 있다.

[0084] 상기 1)단계에서는 2',7'-디클로플루오레세인과, 파라포름알데히드 및 디에틸 이미노디아세테이트의 생성물의 이미늄 이온을 반응시켜 만니히 반응(Mannich reaction)을 통해 아미노메틸화된 디알킬 이미노디아세테이트 플루오레세인 (dialkyliminodiacetate fluorescein)의 화합물을 제조한다.

[0085] 상기 2)단계에서는 상기 디알킬 이미노디아세테이트 플루오레세인 (dialkyliminodiacetate fluorescein)을 KOH 로 가수분해하여 화학식 2의 화합물을 제조한다.

[0086] [반응식 2]



[0087]

[0088] 상기 단계에서 제조한 화학식 2의 화합물을 pH 6.5 내지 8.5의 100% 수용액에서 구리 염과 반응시켜 플루오레세인-구리(II) 복합체를 얻을 수 있다.

[0089] 상기 구리 염은 특별히 제한하지는 않으나 구리의 퍼클로레이트, 클로라이드, 또는 아세테이트 염을 사용할 수 있다.

[0090] 본 발명은 또한 상기의 플루오레세인-구리(II) 복합체와 시안화 이온을 반응시키는 단계를 포함하는 시안화 이온의 검출방법에 관한 것이다.

[0091] 본 발명에 따른 화학식 1의 플루오레세인-구리(II) 복합체는 pH 6.5 내지 8.5의 100% 수용액에서 CN⁻ 첨가에 따라 농도의존적으로 505 nm의 여기파장에서 선택적인 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내므로 상기 플루오레세인-구리(II) 복합체를 형광 프로브로 사용하여 시안화 이온을 검출할 수 있다.

[0092] 또한, 시안화 이온 검출은 비색 변화를 통해 측정할 수도 있다. 보다 구체적으로, 플루오레세인 유도체에 구리 이온을 첨가할 경우 페놀레이트가 형성되어, 밝은 노란색이 밝은 분홍색으로 변하며, 이 용액에 시안화 이온을 첨가하면 분홍색은 다시 노란색으로 바뀐다.

- [0093] 또한, 시안화 이온은 플루오레세인-구리(II) 복합체 및 시안화 이온을 포함하는 배지에서 운동성 및 화학물질에 대한 민감성을 갖는 생명체를 공동배양하여 주화성 반응을 확인하여 검출할 수 있다.
- [0094] 상기 운동성 및 화학물질에 대한 민감성을 갖는 생명체로는 섬모충류(*Ciliate*), 짚신벌레(*Paramecium*), 스텐터(*Stentor*), 편모충류(*flagellate*), 선충류(*Nematode*), 또는 세균 등을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)과 같은 선충류를 사용할 수 있다.
- [0095] 상기 주화성 반응은 실제경으로 실시간 관찰하여 확인할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0096] 본 발명은 또한 로딩 채널, 미세채널을 포함하는 카오스 믹서(chaotic mixer) 및 형광 측정용 출구로 이루어지는 미세 유체 소자로서,
- [0097] 본 발명의 형광센서를 포함하는 미세 유체 소자에 관한 것이다.
- [0098] 상기 미세 유체 소자(microfluidic device)는 미세 유체 공학 기술, 보다 구체적으로는 소프트 리소그래피를 이용하여 제조한 미세채널을 포함하고 있으며, 미세채널을 제조하는 재료로서는 유리, 실리카, 폴리카보네이트(Polycarbonate), 폴리(메틸메타크릴레이트)(Poly(methylmethacrylate)), 또는 폴리(디메틸실록산)(Poly(dimethylsiloxane), PDMS) 등을 사용할 수 있으나 이에 특별히 제한하지는 않는다.
- [0099] 상기 카오스 믹서 내 미세채널의 벽면은 카오스 이류(chaotic advection)를 유발하고, 층류(laminar flows)의 혼합을 향상시키기 위해 헤링-본(herring-bone) 형태로 형성될 수 있다.
- [0100] 또한, 상기 미세채널에는 시안화 이온을 검출할 수 있는 본 발명의 형광센서가 포함될 수 있다.
- [0101] 본 발명의 미세유체소자의 전체적인 크기는 가로 1.5 내지 2.5cm, 세로 0.5 내지 1cm 정도로 제작될 수 있고, 하나의 유리판에 이러한 소자를 하나 또는 두 개 이상 부착시켜 사용할 수 있다.
- [0102] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0103] <실시예 1> 화학식 2의 플루오레세인 유도체의 제조
- [0104] 디에틸 이미노디아세테이트(1.52mL, 8.68mmol) 및 파라포름알데히드(0.224g, 7.47mmol)를 20mL의 CH₃CN에 넣고, 30분 동안 환류시켰다. 30mL의 CH₃CN/H₂O(1:1) 내에 있는 2',7'-디클로로플루오레세인(1.00g, 2.49mmol)을 상기 용액에 가하고, 반응혼합물을 24시간 동안 환류시켰다. CH₃CN을 제거하고, 생성물과 잔류물을 30mL의 끓는 에탄올로 녹였다. 실온으로 냉각시킨 후, 5mL의 에테르를 상기 용액에 가하였다. 4℃에서 생성된 침전물을 걸러내어 디에틸 이미노디아세테이트 플루오레세인(1.21g, 61%)을 얻었다.
- [0105] ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.06 (d, 1H, J = 6.8Hz), 7.69 (quintet, 2H, J = 7.4 Hz), 7.20 (d, 1H, J = 6.2 Hz), 6.69 (s, 2H), 4.30-4.53 (d, 4H, J= 14 Hz), 4.21 (q, 8H, J = 7.1 Hz), 3.54 (s, 8H), 1.28 (t, 12H, J = 7.1 Hz);
- [0106] ¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.6, 169.0, 155.9, 151.6, 148.6, 135.6, 130.6, 128.3, 127.3, 125.8, 124.3, 117.9, 110.9, 109.9, 83.0, 61.6, 54.5, 49.1, 31.2, 14.4;
- [0107] HRMS (FAB) m/z = 825.1805 (M+H+Na)⁺, calc. for C₃₈H₄₀C₁₂N₂₀₁₃Na = 825.1805.
- [0108] 다음으로, 상기에서 제조한 디에틸 이미노디아세테이트 플루오레세인(500mg, 0.62mmol)을 증류수 25mL에 녹이고, 수산화칼륨(KOH)을 가하였다. 반응혼합물을 12시간 동안 환류시켰다. 반응혼합물을 실온으로 냉각시킨

후, 1M 염산을 첨가하여 pH 2~3으로 조절하였다. 석출되는 고체를 거르고, 찬 증류수(1mL)로 씻어주었다. 진공 펌프를 이용하여 90℃에서 건조시킨 후, 이미노디아세트산 플루오레세인(402mg, 90%의 수율)을 얻었다.

[0109] 녹는점(m.p.): 230 °C, dec.;

[0110] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO d 6) 8.03 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 7.80 (m, 2H), 7.37 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 6.63 (s, 2H), 4.30 (s, 4H), 3.55 (s, 8H);

[0111] $^{13}\text{C-NMR}$ (D₂O) 181.4, 173.1, 171.6, 170.1, 155.6, 133.7, 133.4, 132.2, 130.5, 130.2, 130.1, 129.9, 127.4, 111.9, 105.2, 56.7, 50.1;

[0112] MS (FAB) m/z = 691.09 (M+H)⁺, calc. for C₃₀H₂₅C₁₂N₂₀I₃ = 691.07

[0113] <실험예 1> 화학식 2의 플루오레세인 유도체를 이용한 시안화 이온 검출

[0114] 상기 실시예 1에서 제조한 화학식 2의 플루오레세인 유도체의 음이온 결합 성질을 알아보기 위하여, CN⁻, SCN⁻, H₂PO₄⁻, HSO₄⁻, NO₃⁻, CH₃CO₂⁻, F⁻, Cl⁻, Br⁻ 및 I⁻의 나트륨 염을 2차 증류수에 용해시켜 스톡 용액(1mM)을 제조하였다. 또한 2차 증류수로 호스트 스톡 용액(0.01mM)을 제조하였다.

[0115] 시험 용액은 화학식 2의 플루오레세인 유도체 스톡 용액 4-40μl를 테스트 튜브에 넣고, 2차 증류수로 제조한 1mM의 구리 퍼클로레이트 염(copper perchlorate salts) 용액 및 각 음이온 스톡 용액을 첨가하고, 0.02M HEPES 완충용액(pH 7.4)을 이용하여 상기 용액을 희석하여 4mL로 제조하였다. 상기 프로브의 최종 농도는 6μM 이 되도록 하였고, 구리 이온은 1 당량, 각 음이온은 100 당량이 첨가되도록 하였다.

[0116] 모든 형광 측정은 여기파장(excitation, 505 nm)에서 측정하였다. 여기와 방출의 슬릿폭 slit width)은 1.5nm 또는 3nm 중 어느 하나가 되도록 하였다.

[0117] 도 1에 도시된 바와 같이, 구리 이온을 첨가할 경우, 형광 소광이 나타나고, CN 이온을 첨가하면 구리와 결합하여 형광이 다시 나타났다. CN 이온을 제외하고 나머지 음이온들은 형광 변화가 없었다.

[0118] <실험예 2> 농도별 시안화 이온에 대한 형광 적정 시험

[0119] CN 이온을 5, 6, 10, 13, 16, 20, 30, 32, 38, 40, 50, 70, 100, 200 당량으로 첨가하여 형광변화를 관찰하고, 도 2에 그 결과를 나타내었다.

[0120] 또한, CN 이온의 농도 1 내지 10 μM에 대한 형광변화를 관찰하고, 도 3에 그 결과를 나타내었다. 이때 여기파장은 505nm, 방출파장은 522nm, 슬릿: 3nm/3nm)이다.

[0121] 도 2 및 도 3은 각각 1 당량 또는 0.5 당량의 구리 이온을 첨가하였을 때, CN 이온의 농도에 따른 형광 변화를 관찰한 것으로, 100% 수용액 내에서 μM 수준의 시안화 이온을 검출할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 구리 농도의 증가가 형광 변화에 영향을 주는 것은 아님을 알 수 있었다.

[0122] 또한, pH 의존적 반응 실험을 pH 6.5-8.5의 범위에서 실시할 경우에도 상기와 유사한 결과를 나타냈다(미도시됨)

[0123] 또한, 시안화 이온은 비색 변화를 통해 측정할 수도 있다. 구리 이온을 첨가할 경우, 밝은 노란색은 밝은 분홍색으로 변하며, 이 용액에 시안화 이온을 첨가하면 분홍색은 다시 노란색으로 바뀐다.

[0124] <제조예 1> 미세 유체 소자의 제조

[0125] 시안화 이온에 대한 본 발명의 플루오레세인-구리(II) 복합체의 화학적 분석을 위해 미세 유체 소자를 이용하여 *in situ* 분석을 실시하였다.

[0126] 미세 유체 소자는 대한민국 특허 제819,452호에 기재된 방법에 따라 소프트 리소리소그래피를 이용한

PDMS(polydimethylsiloxane)로 제작하였다. 상기 미세 유체 소자는 2개의 로딩 채널, 카오스 믹서(chaotic mixer) 및 형광 측정용 출구의 3개의 주요 구성부분으로 이루어져 있다. 각 로딩 채널에 있어서, 유입 포트는 로딩된 시료의 유속을 조절하는 시린지 펌프(PHD2000 Infusion, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)와 연결되어 있다. 카오스 믹서 내 미세채널은 헤링 본(herring-bone) 형태의 장애물이 벽쪽에 설치되어 있어 카오스 이류(chaotic advection)를 유발하고, 층류(laminar flows)의 혼합을 향상시킨다. 유출 채널은 형광 측정을 용이하게 하기 위한 플랫폼 월(flat wall)이 형성되어 있다.

[0127] 구체적으로, SU-8 2100 감광성 수지를 실리콘 웨이퍼 위에 입힌 후에 UV를 노출시켜 250 μm 높이의 미세 채널을 갖는 실리콘 마스터를 제작하였다. 이 실리콘 마스터를 트리데카플루오로-1,1,2,2-테트라히드록틸)-1-1-트리클로로실란[(tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl)-1-1-trichlorosilane]으로 표면처리한 후, PDMS 폴리머와 경화제를 섞어 기포를 빼낸 후 실리콘 마스터에 부어 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 열경화시켰다. 경화된 후에 경화시킨 고분자를 떼어내고 입구와 출구 부분에 구멍을 뚫어 산소 플라즈마 처리 후에 유리판에 부착시켰다. 유리판에 단단하게 고정시킨 후에 입구와 출구 부분에 미세관을 연결하였다. 상기 채널의 너비는 250 μm , 높이는 100 μm 이고, 미세 유체 소자의 전체 크기는 9.60 mm 길이, 2.48 mm 너비를 가지고 있다. 또한 로딩 채널 및 유출 채널은 직경이 600 μm 인 구멍(hole)으로 마무리되어 있다.

[0128] <실험예 3> 미세 유체 소자를 이용한 시안화 이온 검출

[0129] 상기 제조예 1에서 제조한 미세 유체 소자를 이용하여 센서의 시안화 이온 검출능을 실험하기 위해, 시안화 이온의 농도를 0.1, 1, 10 및 100 μM (1.24 μM 내지 1.24mM)으로 하고, 구리 염은 6.24 μM , 센서는 12.48 μM 의 농도로 첨가하며, 유속은 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 로 하여 형광강도를 측정하였다.

[0130] 형광 이미지는 Peltier-cooled CCD camera (SPOT INSIGHTTM Diagnostic instruments, Sterling Heights, MI, USA)이 구비된 형광 입체현미경 하에서 얻었으며, Java-based image processing program, IMAGE-J (NIH, Bethesda, USA)을 이용하여 추가로 분석하였다.

[0131] 도 4는 시안화 이온의 농도에 따른 형광강도를 측정한 것으로, (A)는 센서와 구리 염만 첨가한 것이고, (B) 내지 (E)는 센서, 구리 염과 시안화 이온의 농도 0.1, 1, 10 및 100 μM 를 첨가한 결과이다.

[0132] 도 4에 나타난 바와 같이, (A)의 경우 카오스 믹서 내 미세채널을 통과하면서 점차 형광이 소광되며, (B) 내지 (E)의 경우, 시안화 이온 농도 의존적으로 형광이 강하게 나타났다.

[0133] <실험예 4> 선충류를 이용한 시안화 이온 검출

[0134] 본 발명의 플루오레세인-구리(II) 복합체의 시안화 이온 검출능을 *in vivo* 로 확인하였다. 이를 위해 세균 섭식성 선충인 꼬마선충(*C. elegans*)을 사용하였다. 선충류는 토양 입자 사이의 간극수에서 살기 때문에 도시 및 산업 폐수와 같은 수용성 환경의 독성을 실험하기 위한 이상적인 생물로 고려되어 왔다.

[0135] 구체적으로, 꼬마선충(*C. elegans*) 야생형 균주 N2는 Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, USA)로부터 얻었다. 선충 12마리를 25 $^{\circ}\text{C}$ 온도 하에서 대장균(*Escherichia coli*) OP50이 배양된 NGM(nematode growth medium) 아가 플레이트(0.3% NaCl, 0.25% 펩톤, 2.5% 아가, 5mg/mL 콜레스테롤, 1mM CaCl_2 , 1mM MgSO_4 , 25mM KH_2PO_4)에서 알칼리-블리칭 방법에 따라 공동배양하였다. 꼬마선충(*C. elegans*) 하에서 형광센서(화학식 2의 플루오레세인 유도체)의 형광에 대한 구리 및 시안화 이온의 효과를 평가하기 위해, 화학식 2의 플루오레세인 유도체, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 및 NaCN를 포함하는 NGM 아가 플레이트를 준비하였다. 구체적으로, 플레이트에 선충을 접종하기 전에, NGM 완충용액에 용해시킨 12.48 μM 의 화학식 2의 플루오레세인 유도체 250 μL 을 NGM 아가 플레이트에 떨어뜨리고, 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 건조시켰다. 3시간 동안 센서에 노출시킨 후, 선충을 NGM 완충용액(0.3% NaCl, 5mg/mL 콜레스테롤, 1mM CaCl_2 , 1mM MgSO_4 , 25mM KH_2PO_4)으로 3회 세척하였다. 선충 절반을 수집하여 현미경 하에서 관찰하고, 나머지 절반은 6.24 μM $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 를 포함하는 NGM 플레이트에 접종하고 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 배양하였다. NGM 완충용액으로 세척한 후, 선충 절반은 현미경 관찰하였고, 나머지 절반은 12.48 μM NaCN이 포함된 NGM 플레이트에 접종하고 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 배양하였다. 배양 후, 선충은 NGM 완충용액으로 3회 세척한 다음 FaramountTM aqueous mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark)이 있는 유리 슬라이드에 놓았다.

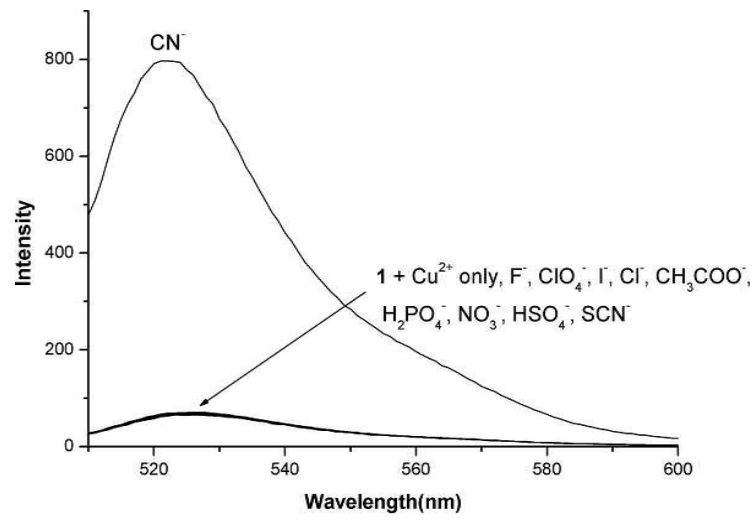
- [0136] 선충에 대한 형광 사진은 200배 확대하여 confocal laser scanning microscope(LSM510, Carl Zeiss)를 이용하여 관찰하였다.
- [0137] 도 5는 화학식 2의 플루오레세인 유도체를 첨가하지 않은 것(A)과 첨가한(B) 배지에서 배양한 꼬마선충의 형광 사진이고, 도 6은 구리 이온 및/또는 시안화 이온과 화학식 2의 플루오레세인 유도체에 노출된 꼬마선충의 형광 사진을 나타낸 것으로, (A)는 화학식 2의 플루오레세인 유도체를 포함한 배지에서 미리 배양한 꼬마선충에 구리 이온을 접종하여 얻은 결과이고, (B)는 순차적으로 화학식 2의 플루오레세인 유도체 및 구리 이온에 미리 노출된 꼬마선충을 시안화 이온($12.48\mu\text{M}$) 포함 배지에 접종하여 얻은 결과이고, (C)는 시안화 이온의 농도가 $124.8\mu\text{M}$ 인 것을 제외하고는 (B)와 동일한 실험을 통해 얻은 결과이다.
- [0138] 도 5에 나타난 바와 같이, 화학식 2의 플루오레세인 유도체와 미리 배양하지 않은 선충류는 어떠한 형광도 나타내지 않은 반면, 화학식 2의 플루오레세인 유도체에 미리 노출시킨 선충류는 강한 형광을 나타냈다.
- [0139] 도 6에 나타난 바와 같이, 선충류를 구리 이온을 포함하는 아가 플레이트에 접종하면 형광이 소광되었는데(도 6A), 이는 선충류 내부에 있는 화학식 2의 플루오레세인 유도체가 구리 이온과 반응하여 형광을 잃음을 알 수 있다. 또한, 선충류를 시안화 이온과 배양하면 형광이 다시 나타났으며, 이는 화학식 2의 플루오레세인 유도체가 시안화 이온의 *in vivo* 이미지에 매우 적합한 것임을 알 수 있다(도 6B, C).
- [0140] 결론적으로, 본 발명은 100% 수용액 내에서 시안화 이온을 감지할 수 간단한 방법을 제시하고 있는 것으로, 형광 프로브인 화학식 2의 플루오레세인 유도체는 구리 이온 첨가 시 형광 소광 효과를 나타냈고, 이 용액에 시안화 이온을 첨가하면 "Off-On" 타입의 형광 증가를 유도하였다. 이러한 센서 시스템을 미세 유체 소자에 적용할 경우, 화학식 2의 플루오레세인 유도체-구리(II) 복합체는 시안화 이온 첨가 시 녹색 형광을 나타냈고, 마지막으로 꼬마선충을 이용하여 최초로 *in vivo* 이미지를 얻을 수 있었다.

도면의 간단한 설명

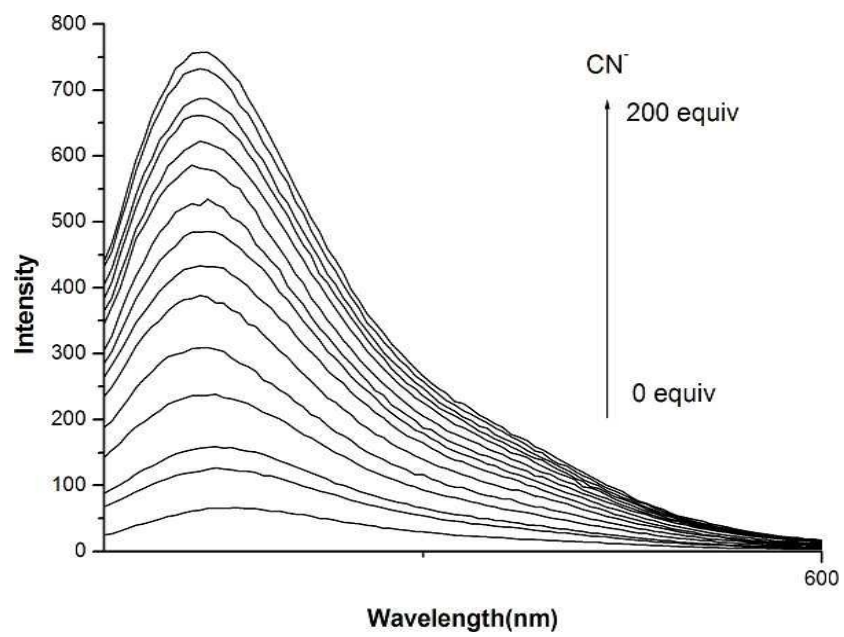
- [0141] 도 1은 화학식 2의 플루오레세인 유도체에 구리 이온 및 다양한 음이온을 첨가하여 형광 변화를 관찰한 것이다.
- [0142] 도 2는 pH 7.4 HEPES 완충용액에서 본 발명의 플루오레세인-구리(II) 복합체(구리 이온 1 당량)에 시안화 이온의 농도별(5 내지 200 당량) 첨가에 따른 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- [0143] 도 3은 pH 7.4 HEPES 완충용액에서 본 발명의 플루오레세인-구리(II) 복합체(구리 이온 0.5 당량)에 시안화 이온의 농도별(1 내지 $10\mu\text{M}$) 첨가에 따른 형광 강도를 나타낸 것이다.
- [0144] 도 4는 본 발명의 미세 유체 소자에서 본 발명의 플루오레세인-구리(II) 복합체에 시안화 이온을 농도별로 첨가하여 얻은 형광 사진을 나타낸 것이다.
- [0145] 도 5는 화학식 2의 플루오레세인 유도체를 포함하거나 그렇지 않은 배지에서 배양한 꼬마선충의 형광 사진을 나타낸 것이다.
- [0146] 도 6은 화학식 2의 플루오레세인 유도체와 구리 이온 및/또는 시안화 이온에 노출된 꼬마선충의 형광 사진을 나타낸 것이다.

도면

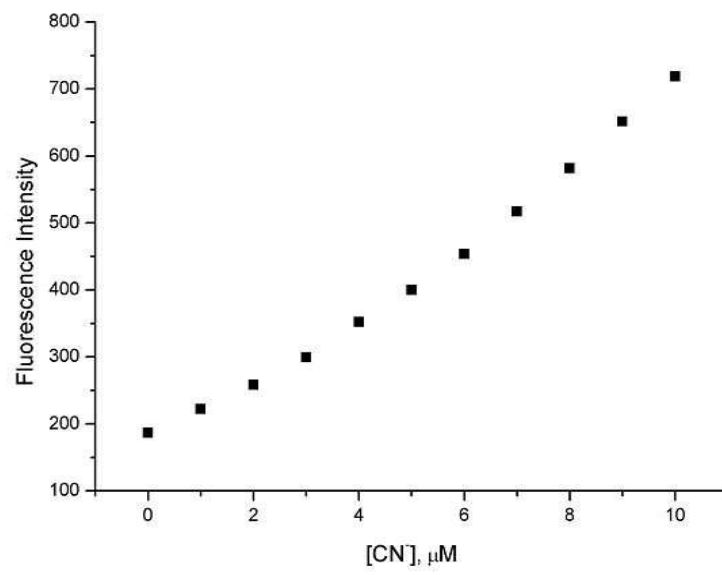
도면1



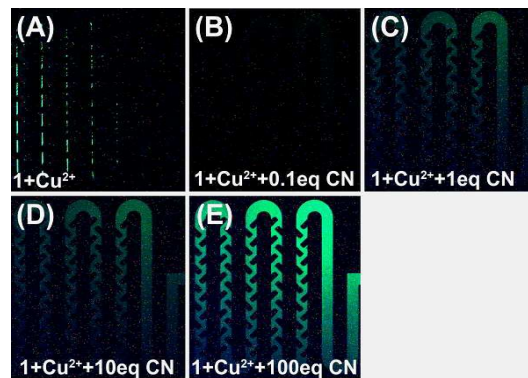
도면2



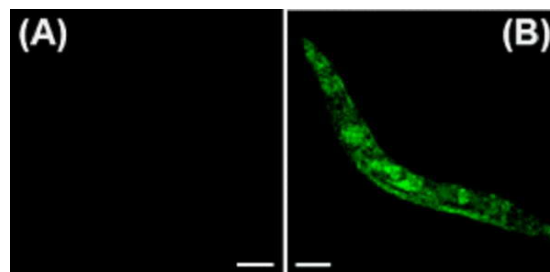
도면3



도면4



도면5



도면6

