(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0047720
(43) 공개일자 2015년05월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/00 (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0127504
(22) 출원일자 2013년10월25일
심사청구일자 2013년10월25일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
조봉래
서울 성동구 성수일로4길 26, 103동 504호 (성수동2가, 서울숲힐스테이트)
(74) 대리인
특허법인충현

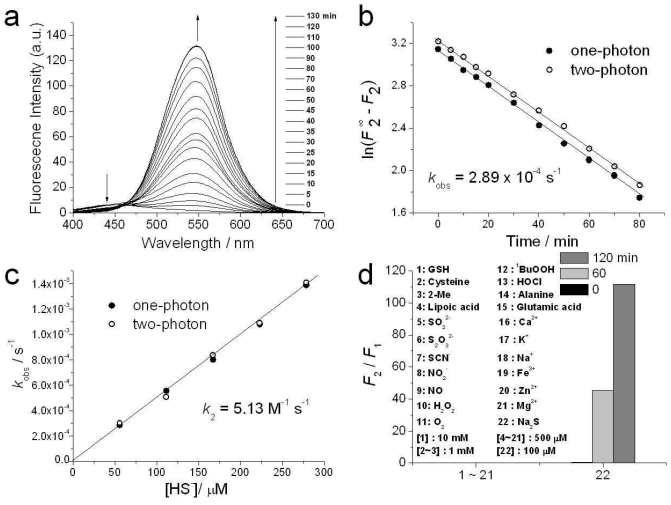
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료 및 이를 이용하여 생체 내 총 황화물의 농도를 정량화하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료 및 이를 이용하여 생체 내 총 황화물의 농도를 정량화하는 방법에 관한 것으로 [화학식 1]의 화합물을 포함함으로써, 생체 내에서 황화수소이온을 감지할 수 있으며 총 황화물을 영상화할 수 있을 뿐만 아니라 총 황화물의 농도를 정량화할 수 있다.

대 표 도 - 도1



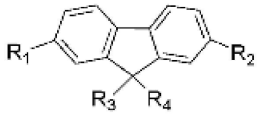
명 세 서

청구범위

청구항 1

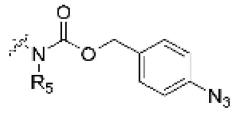
하기 [화학식 1]의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 생체 내 총 황화물($[H_2S]+[HS^-]$)의 영상화용 이광자 형광염료:

[화학식 1]



상기 [화학식 1]에서,

R_1은 치환 또는 비치환된 카르보닐기, 치환 또는 비치환된 벤조옥사졸기 및 치환 또는 비치환된 벤조티아졸기로 이루어진 군에서 선택되며,

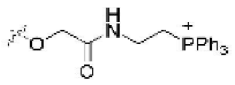
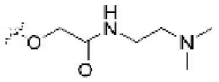
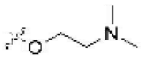
R_2는 아자이드기 또는  이고,

R_5는 중수소, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 헤테로아릴기로 이루어진 군에서 선택되며,

R_3 및 R_4는 중수소, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 1 내지 30의 탄소사슬 내에 적어도 하나 이상의 산소원소가 포함된 탄소사슬기로 이루어진 군에서 선택된다.

청구항 2

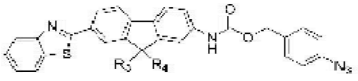
제1항에 있어서,

상기 R_1, R_3 내지 R_5는 각각 독립적으로 수소, 시아노기,  ,  ,  , 할로겐 원자, 히드록시기, 니트로기, 카르복시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 3 내지 40의 사이클로 알킬기, 탄소수 1 내지 40의 알콕시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬아미노기, 탄소수 6 내지 40의 아릴아미노기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴아미노기, 탄소수 1 내지 40의 알킬실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 탄소수 3 내지 40의 아릴옥시기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상으로 치환되는 것을 특징으로 하는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료.

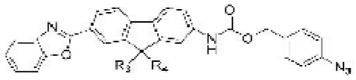
청구항 3

제1항에 있어서,

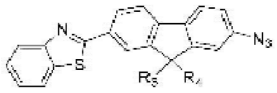
상기 [화학식 1]은 하기 [화학식 2] 내지 [화학식 9]로 표시된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료:



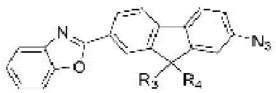
[화학식 2]



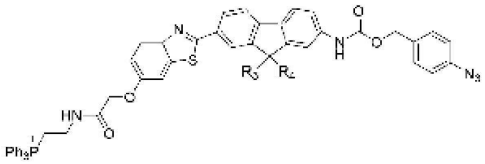
[화학식 3]



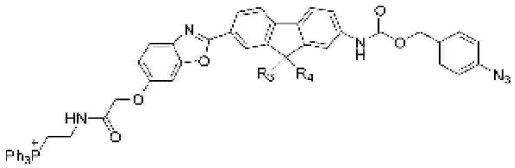
[화학식 4]



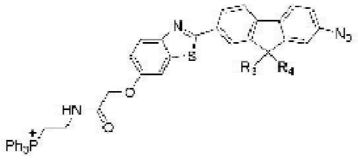
[화학식 5]



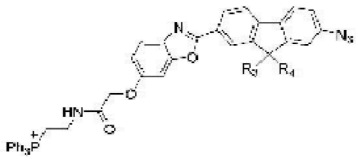
[화학식 6]



[화학식 7]



[화학식 8]



[화학식 9]

상기 [화학식 2] 내지 [화학식 9]에서, R_3 및 R_4는 상기 [화학식 1]에서의 정의와 동일하다.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 이광자 형광염료는 700 내지 800 nm 파장대의 펨토초 펄스(femtosecond pulses)에 의하여 여기되는 것을 특징으로 하는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 이광자 형광염료는 생체 내 100 ㎛ 이상의 투과깊이에서 황화수소이온(HS^-)을 감지하는 것을 특징으로 하는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 이광자 형광염료는 생체 내 100 ㎛ 이상의 투과깊이에서 총 황화물을 영상화하는 것을 특징으로 하는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 이광자 형광염료는 740 nm의 파장대에서 10 내지 30 GM의 이광자 동작 단면적($\Phi\delta_{max}$)을 갖는 것을 특징으로 하는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료.

청구항 8

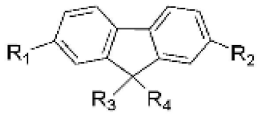
제1항에 있어서,

상기 이광자 형광염료는 단파장(F_1, ~350-550 nm) 및 장파장(F_2, 560-780 nm) 영역에서 측정된 발광 강도 비율(F_2/F_1)이 0.5 내지 1.0인 것을 특징으로 하는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료.

청구항 9

하기 [화학식 1]의 화합물과 생체 내에 존재하는 황화수소이온(HS^-)의 반응에 의해 얻어진 속도상수(k_{obs}), k_2 및 $[H_2S]/[HS^-]$의 농도비율을 이용하여 생체 내 총 황화물의 농도를 정량화하는 방법:

[화학식 1]



상기 R_1 내지 R_5는 청구항 제1항의 [화학식 1]에서의 정의와 동일하고,

상기 k_2는 속도상수(k_{obs}) 대 $[HS^-]$ 그래프의 기울기로부터 얻어짐.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체 내에서 황화수소 이온을 감지할 수 있으며 총 황화물을 영상화할 수 있는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료 및 이를 이용하여 생체 내 총 황화물의 농도를 정량화하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 황화수소(H_2S)는 새롭게 인식된 전달자로서, 시스타티오닌(cystathionine) β-신티아제(β-synthase, CBS) 및 시스타티오닌 γ-리아제(γ-lyase, CSE)와 같은 효소의 활동을 통해 시스테인(cysteine) 및 호모시스테인(homocysteine)으로부터 포유류의 조직에서 합성된다.

[0003] 이러한 황화수소(H_2S)는 상처로부터 위장 점막을 보호하고, 점막의 염증을 감소시키며, 조직 복구를 증가시킨다. 황화수소(H_2S) 항상성(homeostasis)의 기능 부전은 궤양성 대장염, 고혈압, 아테롬성 동맥 경화증, 심근증, 당뇨성 혈관장애 및 당뇨성 신증(diabetic nephropathy)과 연관되어 있다.

[0004] 최근에, 살아있는 세포 또는 조직에서 황화수소(H_2S)를 검출하는 방법으로는 가스 크로마토그래피, 전기화학 및 비색법 등이 있으나, 이러한 방법들은 조직 및 세포 용해물의 처리 및/또는 파괴를 필요로 한다. 현재로서는 세포 또는 조직을 파괴하지 않고 황화수소(H_2S)를 검출하는 방법은 없다.

[0005] 일광자 형광염료를 이용한 형광 이미지는 살아있는 세포의 비파괴 검출방법으로 알려져 있으나, 이러한 일광자 형광염료들을 일광자 현미경법에 사용할 때에는 단파장광(~350-550 nm)으로 여기시켜야 하며, 따라서 얕은 투과 깊이, 광탈색 (photobleaching) 및 세포 자가형광과 같은 문제점들이 발생된다. 이러한 문제점들을 극복하기 위해서는 이광자 현미경법(two-photon microscopy, TPM)에 의해서 생체 세포 및 조직 깊은 곳에서 원하는 물질을 검출할 수 있는 이광자 표지자가 필요하다.

[0006] 이광자 현미경법은 여기를 위해서 낮은 에너지를 갖는 2개의 광자를 사용하며, 장시간 동안 세포 깊은 곳을 온전히 영상화할 수 있는 새로운 기술이다 (Helmchen, F.; Denk, W. Nat. Methods 2005, 2, 932; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. Nat. Biotechnol. 2003, 2, 1369; Kim, H. M.; Cho, B. R. Acc. Chem. Res. 2009, 42, 863.; Kim, H. M.; Cho, B. R. Chem. Asian J. 2011, 6, 58).

[0007] 종래기술로서, 대한민국 공개특허번호 제2010-0000044호는 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료 및 이를 이용한 생체 내 산성 소포체의 영상화 방법을 개시하고 있는데, 이는 세포질에 존재하는 산성 소포체와 선택적으로 결합하여 이광자 여기 형광을 발산하는 이광자 염료에 관한 것이다.

[0008] 이와 같이 종래에는 이광자 형광염료를 이용하여 생체 내의 산성 소포체 등을 검출하는 방법 등은 있으나 황화수소(H_2S)를 검출하는 방법에 대해서는 연구된바 없다.

[0009] 따라서 세포 또는 조직을 파괴하지 않고 생체 내의 황화수소이온을 감지할 수 있으며 총 황화물을 영상화할 수 있는 비율계량 이광자 형광염료에 대한 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

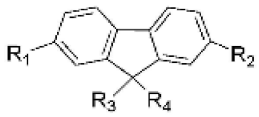
[0010] 본 발명의 목적은 생체 내에서 황화수소이온을 감지할 수 있으며 총 황화물을 영상화할 수 있는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료를 제공하는데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 이광자 형광염료를 이용하여 생체 내 총 황화물의 농도를 정량화하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

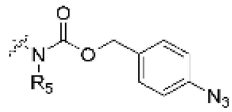
[0012] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 생체 내 총 황화물($[H_2S]+[HS^-]$)의 영상화용 이광자 형광염료는 하기 [화학식 1]의 화합물을 포함할 수 있다.

[0013] [화학식 1]

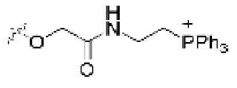
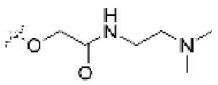
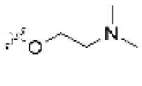
[0014] 

[0015] 상기 [화학식 1]에서,

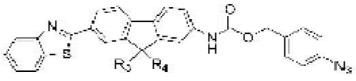
[0016] R_1은 치환 또는 비치환된 카르보닐기, 치환 또는 비치환된 벤조옥사졸기 및 치환 또는 비치환된 벤조티아졸기로 이루어진 군에서 선택되며,

[0017] R_2는 아자이드기 또는  이고, R_5는 중수소, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 헤테로아릴기로 이루어진 군에서 선택된다.

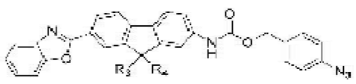
[0018] 또한, R_3 및 R_4는 중수소, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 1 내지 30의 탄소사슬 내에 적어도 하나 이상의 산소원소가 포함된 탄소사슬기로 이루어진 군에서 선택된다.

[0019] 상기 R_1, R_3 내지 R_5는 각각 독립적으로 수소, 시아노기,  ,  ,  , 할로겐 원자, 히드록시기, 니트로기, 카르복시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 3 내지 40의 사이클로 알킬기, 탄소수 1 내지 40의 알콕시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬아미노기, 탄소수 6 내지 40의 아릴아미노기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴아미노기, 탄소수 1 내지 40의 알킬실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 탄소수 3 내지 40의 아릴옥시기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상으로 치환될 수 있다.

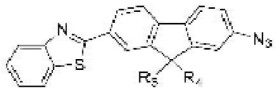
[0020] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 의하면, 상기 [화학식 1]은 하기 [화학식 2] 내지 [화학식 9]로 표시된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0021] 

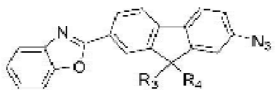
[0022] [화학식 2]



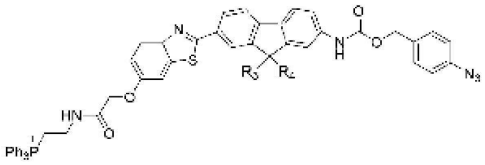
[화학식 3]

[0023] 

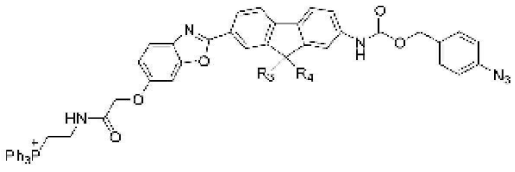
[0024] [화학식 4]



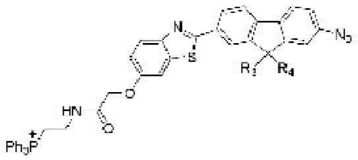
[화학식 5]

[0025] 

[0026] [화학식 6]

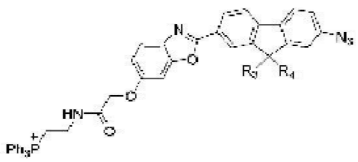
[0027] 

[0028] [화학식 7]



[0029]

[0030] [화학식 8] [화학식 9]



[0031] 상기 [화학식 2] 내지 [화학식 9]에서, R_3 및 R_4는 상기 [화학식 1]에서의 정의와 동일하다.

[0032] 본 발명에 따른 이광자 형광염료는 700 내지 800 nm 파장대의 펨토초 펄스(femtosecond pulses)에 의하여 여기될 수 있다.

[0033] 상기 이광자 형광염료는 생체 내 100 ㎛ 이상의 투과깊이에서 황화수소이온(HS^-)을 감지할 수 있으며, 생체 내 100 ㎛ 이상의 투과깊이에서 총 황화물을 영상화할 수 있다.

[0034] 상기 이광자 형광염료는 740 nm의 파장대에서 10 내지 15 GM의 이광자 동작 단면적($\Phi\delta_{max}$)을 갖을 수 있다.

[0035] 상기 이광자 형광염료는 단파장(F_1, ~350-550 nm) 및 장파장(F_2, 560-780 nm) 영역에서 측정된 발광 강도 비율(F_2/F_1)이 0.5 내지 1.0일 수 있다.

[0036] 상기 또 다른 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 생체 내 총 황화물의 농도를 정량화하는 방법은 [화학식 1]의 화합물과 생체 내에 존재하는 황화수소이온(HS^-)의 반응에 의해 얻어진 속도상수(k_{obs}), k_2 및 $[H_2S]/[HS^-]$의 농도비율을 이용하여 총 황화물의 농도를 정량화할 수 있다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료는 700 내지 800 nm 파장대의 펨토초 펄스(femtosecond pulses)에 의하여 여기되어 100 ㎛의 투과 깊이에 존재하는 총 황화물($[H_2S]+[HS^-]$)의 영상화할 수 있다. 또한, 중요한 이광자 동작 단면적, 높은 광안정성을 보이며, pH 또는 세포독성으로부터의 최소 간섭과 이광자 현미경법(TPM)에 의해 오랜 시간 동안 살아있는 세포 및 조직에서 총 황화물을 시각화할 수 있다. 특히, 본 발명의 이광자 형광염료는 HS^-와 반응 후 발광 강도 비율 110배 증가한다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1a는 시간(0-120 min)에 따른 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 [화학식 2-6] 화합물(5 uM)과 Na_2S(100 uM)의 반응에 대한 일광자 형광 반응을 나타낸 그래프이다.

도 1b는 일광자 및 이광자 프로세스에 의해 모니터된 [화학식 2-6] 화합물(5 uM)과 Na_2S(100 uM)의 반응을 위한 $\ln(F^{\infty}_2-F_2)$ 대 시간 t의 그래프이다. 여기서, F^{∞}_2 및 F_2는 각각 10 반감기 후 주어진 시간에서 측정된 형광강도이다.

도 1c는 k_{obs} 대 HS^- 농도의 그래프이다.

도 1d는 100 uM Na_2S에 대한 5 uM [화학식 2-6] 화합물의 형광 강도 및 다른 활성 황화물, 질소화합물, 산소

종, 아미노산 및 금속 이온에 대한 형광 강도 그래프이다. 0, 60, 및 120분에서 단파장(F_1) 및 장파장(F_2) 영역에서 측정된 통합 형광 비율(F_2/F_1)을 나타낸다. 모든 데이터는 HEPES 버퍼, 37 ℃에서 획득하며, 일광자 및 이광자 프로세스를 위한 여기된 파장은 각각 단파장으로 370 nm 및 장파장으로 750 nm이다.

도 2a는 HEPES 버퍼 및 HEPES/EtOH (1/1)에서 [화학식 2-6] 화합물 및 [화학식 2-5] 화합물(3 uM)에 대한 이광자 동작 단면적 그래프이다.

도 2b는 [화학식 2-6] 화합물 또는 [화학식 2-5] 화합물로 표지된 헬라세포의 이광자 여기 형광 인자(TPEF) 그래프이다. 100 uM Na_2S로 처리된 후 [화학식 2-6] 화합물로 표지된 헬라세포의 TPEF 스펙트럼을 넓은 곡선(●)으로 표시하며, 실선(-) 및 점선(--)은 각각 [화학식 2-6] 화합물(▲) 및 [화학식 2-5] 화합물(■)로 표지된 헬라세포의 TPEF 스펙트럼과 유사한 가우시안 기능으로 분해하였고, 여기된 파장은 750 nm이다.

도 3은 100-300 uM Na_2S, 시스테인 및 글루타티온으로 처리되기 전 및 후의 헬라세포에서의 평균 k_{obs} 및 황화물 농도를 나타낸 그래프이다. 오차막대(Error bars)는 30 k_{obs} 값을 기본으로 95% 신뢰구간을 나타냄.

도 4는 [화학식 2-6] 화합물(20 uM)로 표지된 쥐의 결장 조직의 비율계량 TPM이미지로서, 도 4a는 20× 배율로 90-170 ㎛ 정도의 깊이에서 8시간 동안 5-플루오로우라실로 처리하기 전(상단 열) 및 후(하단 열) 조직의 TPM이미지이다. Scale bar; 150 ㎛.

도 4b는 20× 배율로 90-170 ㎛ 정도의 깊이에서 8시간 동안 5-플루오로우라실로 처리하기 전(왼쪽 컬럼) 및 후(오른쪽 컬럼)에 얻어진 150 TPM 이미지로부터 생성된 결장 조직의 3차원 이미지이다(top, tilted, 및 side views). 하얀 상자는 100× 배율로서 선택된 영역(하얀 점선 박스)의 확장된 이미지이다.

도 4c는 점막, 점막근판 및 점막하 조직 층을 보여주는 그림이다.

도 4d는 5-플루오로우라실로 처리되기 전 및 후의 점막 및 점막하 조직을 [화학식 2-6] 화합물(20 uM)로 2시간 동안 배양 후 측정된 F_2/F_1 비율을 나타낸 그래프이다. 오차 막대(Error bars)는 각각 점막 및 점막하 조직에서 측정된 105 및 45 F_2/F_1 비율에 따라 95% 신뢰구간을 나타낸다.

도 4e는 5-플루오로우라실로 처리되기 전 및 후의 점막 및 점막하 조직에서 측정된 총 황화물 농도를 나타낸 그래프이다. 오차 막대(Error bars)는 각각 점막 및 점막하 조직에서 측정된 105 및 45 F_2/F_1 비율과, 112 및 48 k_{obs} 값에 따라 95% 신뢰구간을 나타낸다.

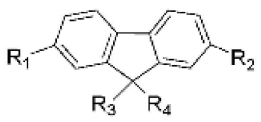
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명은 생체 내에서 황화수소이온을 감지할 수 있으며 총 황화물을 영상화할 수 있는 생체 내 총 황화물의 영상화용 이광자 형광염료 및 이를 이용하여 생체 내 총 황화물의 농도를 정량화하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명에 따른 이광자 형광염료는 황화수소이온에 대한 비율계량(ratiometric) 이광자 형광염료이므로 총 황화물의 농도를 정량적으로 측정할 수 있다.

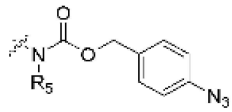
[0040] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0041] 본 발명의 하기 [화학식 1]의 화합물로 표시되는 이광자 형광염료는 생체 세포 및 조직 깊은 곳에서 황화수소이온(HS^-)과 선택적으로 반응하여 강한 형광을 나타낸다.

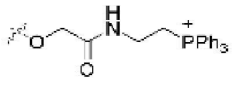
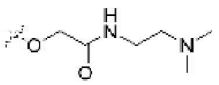
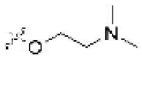
[0042] [화학식 1]

[0043] 

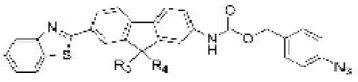
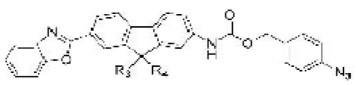
[0044] 상기 [화학식 1]에서, R_1은 치환 또는 비치환된 카르보닐기, 치환 또는 비치환된 벤조옥사졸기 및 치환 또는 비치환된 벤조티아졸기로 이루어진 군에서 선택된다.

[0045] R_2는 아자이드기 또는  이고, R_5는 중수소, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 헤테로아릴기로 이루어진 군에서 선택된다.

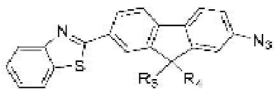
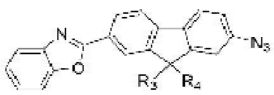
[0046] R_3 및 R_4는 중수소, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 1 내지 30의 탄소사슬 내에 적어도 하나 이상의 산소원소가 포함된 탄소사슬기로 이루어진 군에서 선택된다.

[0047] 이때, 상기 R_1, R_3 내지 R_5는 각각 독립적으로 수소, 시아노기,    , 할로겐 원자, 히드록시기, 니트로기, 카르복시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 3 내지 40의 사이클로 알킬기, 탄소수 1 내지 40의 알콕시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬아미노기, 탄소수 6 내지 40의 아릴아미노기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴아미노기, 탄소수 1 내지 40의 알킬실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 탄소수 3 내지 40의 아릴옥시기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상으로 치환될 수 있다.

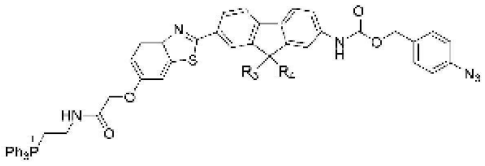
[0048] 상술한 바와 같은 구조를 갖는 상기 [화학식 1]에 대한 구체적인 예는 본 발명에서 제한되는 것은 아니지만, 구체적으로 하기 [화학식 2] 내지 [화학식 9]로 표시되는 화합물 중 어느 하나일 수 있다.

[0049]  

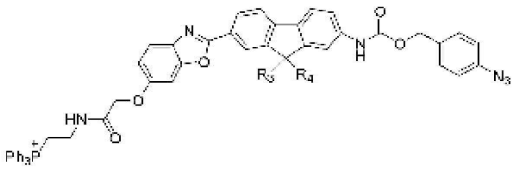
[0050] [화학식 2] [화학식 3]

[0051]  

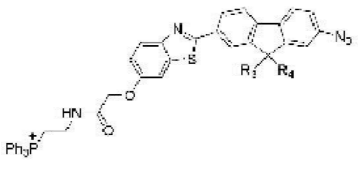
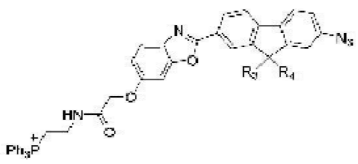
[0052] [화학식 4] [화학식 5]

[0053] 

[0054] [화학식 6]

[0055] 

[0056] [화학식 7]

[0057]  

[0058] [화학식 8] [화학식 9]

[0059] 상기 [화학식 2] 내지 [화학식 9]에서, R_3 및 R_4는 상기 [화학식 1]에서의 정의와 동일하다.

[0060] 본 발명에 따른 이광자 형광염료는 700 내지 800 nm 파장대의 펨토초 펄스(femtosecond pulses)에 의하여 여기될 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명에 따른 이광자 형광염료는 세포 또는 조직과 같은 생체 내 100 ㎛ 이상, 바람직하게는 100 내지 180 ㎛의 투과깊이에서 황화수소이온(HS^-)을 선택적으로 감지하며, 황화수소이온(HS^-)과의 반응으로 인하여 발광강도 비율(F_2/F_1)이 0.5 내지 1.0이 된다. 이는 [화학식 1]과 황화수소이온(HS^-)이 반응하기 전에 비하여 110배 증가한 것이다. 뿐만 아니라, H_2S 및 HS^-는 평형이 되므로 이광자 형광염료로 표지된 생체 내의 100 ㎛ 이상, 바람직하게는 100 내지 180 ㎛의 투과깊이에서 총 황화물($[H_2S]+[HS^-]$)을 이광자 현미경법(TPM)으로 실시간으로 영상화할 수 있다. 상기 이광자 현미경법(TPM) 이미지는 총 황화물의 정량적 분포를 반영한다.

[0062] 또한, 본 발명에 따른 이광자 형광염료는 740 nm의 파장대에서 10 내지 30 GM, 바람직하게는 10 내지 15 GM의 이광자 동작 단면적(cross section, $\Phi\delta_{max}$)을 갖는다. 이때, Φ 및 δ_{max}는 각각 형광 양자수율 및 최대 이광자 흡수 단면적을 의미한다.

[0063] 또한, 본 발명은 생체 내 총 황화물의 영상화 방법을 제공한다.

[0064] 생체 내 총 황화물을 영상화하는 방법은 상기 이광자 형광염료를 관찰 대상이 되는 세포질 내로 주입하는 단계; 및 상기 이광자 형광염료로부터 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계를 포함한다. 상기 생체 내 총 황화물의 영상화는 이광자 여기 형광 인자(Two-photon excited fluorescence, TPEF)의 변화에 의해 수행된다.

[0065] 본 발명에 따른 상기 영상화 방법은 종래의 기술에 비하여 표면으로부터 깊이 존재하는 세포의 영상까지 얻을 수 있고, 황화수소이온(HS^-)과의 반응으로 인하여 높은 형광강도로 이미지를 얻을 수 있으므로, 정확한 세포 모니터링이 가능하다는 장점을 갖는다.

[0066] 또한, 본 발명은 생체 내 총 황화물의 농도를 정량화하는 방법을 제공한다.

[0067] 생체 내 총 황화물의 농도는 동역학 방법을 이용하여 정량화할 수 있는데, 구체적으로 속도상수(k_{obs}, $k_{obs}=k_2[HS^-]$), k_2 및 $[H_2S]/[HS^-]$의 농도비율을 이용하여 정량화한다.

[0068] 상기 속도상수(k_{obs})는 [화학식 1]의 화합물과 생체 내에 존재하는 황화수소이온(HS^-)의 반응에 의해 얻어지며, k_2는 속도상수(k_{obs}) 대 $[HS^-]$ 그래프의 기울기로부터 얻고, $[H_2S]/[HS^-]$는 $[H_2S]/[HS^-]=[H^+]/K_a$에 의해 얻어진다.

[0069] 보다 구체적으로, [화학식 1]의 화합물과 생체 내에 존재하는 황화수소이온(HS^-)의 반응에 대한 속도 방정식은 하기와 같이 표현될 수 있다.

[0070] $-d[A]/dt=k_2[A][HS^-]$ (1)

[0071] 여기서, [A]는 시간 t에서 [화학식 1] 화합물의 농도이다.

[0072] $[HS^-]/[H_2S]$비율은 다음과 같이 표현될 수 있다.

[0073] $[HS^-]/[H_2S]=K_a/[H^+]$ (2)

[0074] 만약 $[HS^-]>>[A]$일 때, 통합된 속도 방정식은 다음과 같이 표현될 수 있다.

[0075] $-\ln[A]/[A]_0=k_{obs}t$ (3)

[0076] 여기서, $[A]_0$는 각각 t=0 및 $k_{obs}=k_2[HS^-]$에서 [화학식 1] 화합물의 농도이다.

[0077] 상기 식 (3)은 H_2S의 항상성이 유지되어 살아있는 세포와 조직에 적용할 수 있다. 측정하는 동안 H_2S농도를 일정하게 유지한다면, $[HS^-]/[H_2S]$ 비율 및 $[HS^-]$는 주어진 pH에서 일정해야 한다. 이러한 조건 하에서, $k_{obs}=k_2[HS^-]$ 및 속도 방정식은 식 (3)과 동일하다.

[0078] [화학식 1]의 화합물의 농도 및 경로 길이는 형광 강도가 [A]에 비례하도록 충분히 작게 가정되면, 주어진 시간에서 단파장 및 장파장 영역의 형광 강도는 다음과 같이 표현될 수 있다.

[0079] $F^0_2 = S_{A2}[A]_0$(4)

[0080] $F_1 = S_{A1}[A]+S_{B1}[B]$ (5)

[0081] $F_2 = S_{A2}[A]+S_{B2}[B]$

[0082] $= S_{A2}[A]+S_{B2}([A]_0-[A])$ (6)

[0083] $F^\infty_2 = S_{B2}[A]_0$(7)

[0084] 여기서, 첨자 1 및 2는 단파장 및 장파장 영역을 의미하며, F^∞_2, F_1, 및 F_2는 t=∞ 및 t에서의 형광 강도이고, [B]는 시간 t에서 [화학식 1]의 화합물과 황화수소이온(HS^-)의 반응에 의해 생성된 생성물의 농도이며, S_{A2}, S_{A1}, S_{B1}, 및 S_{B2}는 각각 주어진 파장영역에서 A 및 B의 비례계수(proportionality coefficients)이다.

[0085] 또한 $[A]/[A]_0$ 수율은 다음 방정식에 따른다.

[0086] $[A]/[A]_0=(F^\infty_2-F_2)/(F^\infty_2-F^0_2)$ (8)

[0087] $-\ln(F^\infty_2 - F_2)/(F^\infty_2 - F^0_2) = k_{obs}t$ (9)

[0088] 상기 식(9)는 $-\ln(F^\infty_2-F_2)$ 대 t의 그래프가 $-k_{obs}$의 기울기로써 선형(linear)일 것이라고 예측한다. 그러나 몇 시간 후 조직 샘플의 변형 때문에 이미지 상태에서 F^∞_2를 측정하기 어렵다.

[0089] $[A]_0=[A]+[B]$이므로, F^∞_1은 무시할 수 있는 정도이며(도 2b), A 및 B의 형광 강도는 농도에 비례한다. $F^0_1=F^\infty_2$일 때 F^∞_2는 식 (10)과 같이 표현될 수 있다.

[0090] $F^\infty_2 = F_1+F_2$(10)

[0091] 그러나 실제 시스템에서, $F^0_1 \neq F^\infty_2$ 및 식 (10)은 다음과 같이 수정되어야 한다.

[0092] $F^\infty_2= (S_{B2}/S_{A1})F_1+F_2$(11)

[0093] F^∞_2은 식 (11)을 사용하여 측정될 수 있다.

[0094] 상기 식 (9) 및 (11)은 $F^{\infty TP}_2$, F^{TP}_2, S_{B2}^{TP}, S_{A1}^{TP}, F^{TP}_1, F^{TP}_2 값을 이용하여 이광자(TP) 프로세스에 적용할 수 있다. 여기서 첨자 TP는 일 및 이광자 형광이 여기 모드를 제외하고 본질적으로 동일하기 때문에 TP모드에서 측정된 해당 값을 의미한다.

[0095] 상기 식 (11)을 사용하여 일광자 및 이광자에서 계산된 F^{∞}_{2}값을 비교한 결과, 두 값은 동일하였으며, 이로써 동역학 방법의 유효성을 확인하였다.

[0096] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

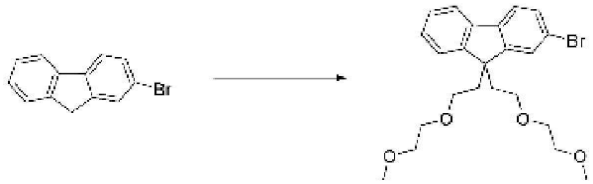
[0097] **<실시예>**

[0098] **합성예 1. [화학식 2-6]으로 표시되는 이광자 형광염료의 합성**

[0099] 1-1. [화학식 2-2]로 표시되는 화합물의 제조

[0100] 하기 [반응식 1]에 따라 [화학식 2-2]의 화합물을 제조하였다.

[0101] [반응식 1]

[0102] 

[0103] [화학식 2-1] [화학식 2-2]

[0104] [화학식 2-1] 10 g(40.8 mmol) 및 디에틸렌글리콜모노메틸에테르토실레이트 25.7 g(93.8 mmol)을 무수 DMSO 150 ㎖에 용해한 후 질소 풍선의 수축과 채워지는 반복으로 건조 질소로 정화되었다. 갓 제조된 무수 KOH분말 5.72 g(102 mmol)을 첨가하였으며, 그 결과 혼합물은 진공으로 되고, 다시 건조 질소로 정화된다. 혼합물을 25 ℃, 질소 분위기하에서 12시간 교반한 후 1N HCl 300 ㎖가 들어있는 비이커에 부은 다음 디에틸 에테르 200 ㎖을 첨가하여 5분 동안 격렬하게 교반하였다. 유기층을 분리하고 포화 Na_2CO_3 용액 100 ㎖, 소금물 100 ㎖, $MgSO_4$로 세척한 후 필터한 다음 농축하고 농축된 화합물을 컬럼크로마토그래피(30-50% ethyl acetate in n-hexane)로 정제하여 [화학식 2-2]로 표시되는 화합물 16.5 g(수율: 90.0%)을 얻었다.

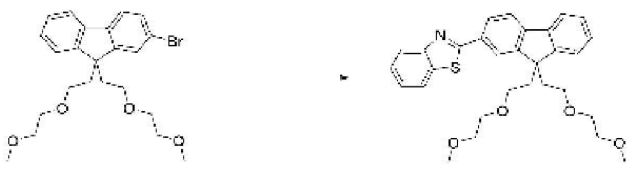
[0105] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.65-7.63 (m, 1H), 7.57-7.52 (m, 2H), 7.46-7.39 (m, 2H), 7.33-7.31(m, 2H), 3.29-3.15 (m, 14H), 2.78-2.74 (m, 4H), 2.41-2.37 (m, 4H);

[0106] ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 150.8, 148.2, 139.1, 139.0, 130.1, 127.5, 127.2, 126.3, 122.9, 120.9, 120.8, 119.6, 71.4, 69.6, 66.6, 58.7, 51.1, 39.2.

[0107] 1-2. [화학식 2-3]으로 표시되는 화합물의 제조

[0108] 하기 [반응식 2]에 따라 [화학식 2-3]의 화합물을 제조하였다.

[0109] [반응식 2]

[0110] 

[0111] [화학식 2-2] [화학식 2-3]

[0112] [화학식 2-2] 15.0 g(33.4 mmol) 및 벤조사이아졸 5.50 ㎖(50.4 mmol)을 무수 DMF 150 ㎖에 용해한 후 질소 풍선의 수축과 채워지는 반복으로 건조 질소로 정화되었다. 그런 후 Cs2CO3 16.5 g(50.6 mmol), $Pd(OAc)_2$ 1.12 g(5.0 mmol), CuI 952 mg(5.0 mmol), 및 t-Bu3P 15.0 ㎖(10 wt% in hexanes, 5.00 mmol)을 연속적으로 첨가한 다음 진공으로 되고, 다시 건조 질소로 정화되었다. 상기 혼합물을 145 ℃, 질소 분위기하에서 12시간 동안 격렬하게 교반한 후 필터하고 에틸아세테이트 300 ㎖로 세척하였다. 여과액을 1N HCL 100 ㎖, 소금물 100 ㎖, $MgSO_4$로 세척한 후 필터하고 에틸아세테이트 200 ㎖에 재용해한 검은 잔해물을 농축하였다. 용매는 제거되고 컬럼크로마토그래피(20-60% ethyl acetate in n-hexane)로 정제하며 에틸아세테이트-헥산으로 재결정하여 [화학식 2-3]으로 표시되는 노란색 고체화합물 14.5 g(수율: 86.0%)을 얻었다.

[0113] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.19 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.75-7.73 (m, 1H), 7.53-7.37 (m, 5H), 3.29-3.17 (m, 14H), 2.85-2.75 (m, 4H), 2.59-2.44 (m, 4H);

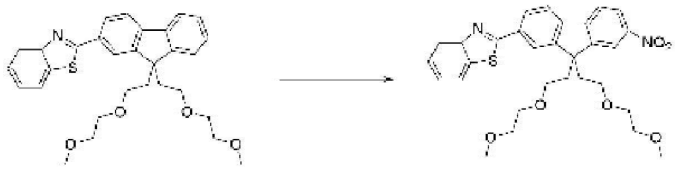
[0114] ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 168.1, 154.1, 149.7, 149.5, 143.3, 139.4, 134.9, 132.5, 128.4, 127.4, 127.2, 126.3, 125.1, 123.3, 123.0, 122.0, 121.6, 120.3, 120.2, 71.6, 69.8, 66.9, 58.9, 51.4, 39.5;

[0115] HRMS (FAB) Calcd. for $C_{30}H_{34}NO_4S$ [M+H]+: 504.2209. Found: 504.2209.

[0116] 1-3. [화학식 2-4]로 표시되는 화합물의 제조

[0117] 하기 [반응식 3]에 따라 [화학식 2-4]의 화합물을 제조하였다.

[0118] [반응식 3]

[0119] 

[0120] [화학식 2-3] [화학식 2-4]

[0121] AcOH 50 ㎖ 및 Ac_2O 50 ㎖에서 [화학식 2-3] 10.0 g(19.9 mmol)을 교반하고 93% HNO_3 1.7 ㎖(39.7 mmol)을 25 ℃에서 10분 동안 적가한 다음 출발물질이 완전히 소모될 때 까지(80~100분 이상) 반응을 관찰(TLC)하였다. 그 후 200 ㎖ 물이 들어있는 비이커에 부은 다음 에틸아세테이트 200 ㎖를 첨가하여 5분 동안 격렬히 교반하였다. 유기층을 분리하고 물 100 ㎖, 소금물 100 ㎖, $MgSO_4$로 세척한 후 필터하였다. 용매는 제거되고 컬럼크로마토그래피(20-50% ethyl acetate in n-hexane)로 정제하며 에틸아세테이트-헥산으로 재결정하여 [화학식 2-4]로 표시되는 노란색 고체화합물 9.15 g(수율: 84.0%)을 얻었다.

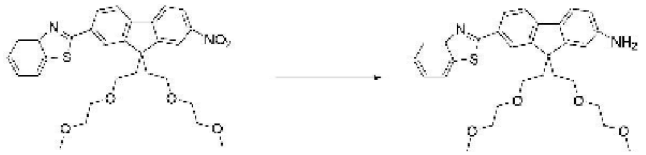
[0122] M.p.-80-181 ℃. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.38 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.30 (dd, *J* = 1.6, 8.4 Hz, 1H), 8.27(d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 0.8, 7.6 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.94 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.4, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.27-3.12 (m, 14H), 2.98-2.81 (m, 4H), 2.59-2.56 (m, 4H);

[0123] ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 166.5, 153.4, 151.1, 150.7, 146.8, 145.0, 140.2, 134.4, 133.6, 125.9, 124.8, 122.6, 121.6, 121.1, 121.0, 119.8, 118.5, 70.9, 69.2, 66.2, 58.1, 51.7, 38.5.

[0124] 1-4. [화학식 2-5]로 표시되는 화합물의 제조

[0125] 하기 [반응식 4]에 따라 [화학식 2-5]의 화합물을 제조하였다.

[0126] [반응식 4]



[0127]

[0128] [화학식 2-4] [화학식 2-5]

[0129] [화학식 2-4] 9.00 g(16.4 mmol), NH_4Cl 2.63 g(49.20 mmol)을 EtOH 150 ㎖ 및 H_2O 50 ㎖에 용해하고 Fe 4.60 g(82.4 mmol)을 첨가하여 질소분위기 하에서 2시간 동안 환류시켰다. 이 후 상온으로 냉각시키고 반응물을 셀라이트로 여과하고 잔여물을 에틸아세테이트 150 ㎖로 세척한 다음 여과액을 에틸에스테이트 200 ㎖ 및 물 100 ㎖에 재용해한 노란색 잔류물을 농축하였다. 유기층을 분리하고 소금물 100 ㎖, $MgSO_4$로 세척한 후 필터하였다. 용매는 제거되고 컬럼크로마토그래피(60-90% ethyl acetate in n-hexane)로 정제하며 에틸아세테이트-헥산으로 재결정하여 [화학식 2-5]로 표시되는 노란색 고체화합물 7.65 g(수율: 90.0%)을 얻었다.

[0130] M.p.-134-135 ℃. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.11 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 8.08-8.05 (m, 1H), 8.02 (dd, J = 1.6, 7.8 Hz, 1H), 7.93-7.86 (m, 1H), 7.60 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.52-7.46 (m, 2H), 7.40-7.35 (m, 1H), 6.76 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 2.1, 8.4 Hz, 1H), 3.90 (s, br, 2H), 3.32-3.20 (m, 14H), 2.83-2.78(m, 4H), 2.54-2.32 (m, 4H);

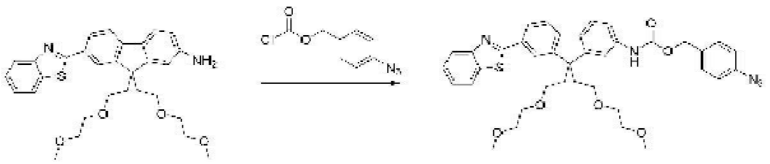
[0131] ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 168.2, 153.8, 151.3, 148.3, 147.3, 143.8, 134.5, 130.4, 129.6, 127.1, 125.9, 124.6, 122.5, 121.3, 121.25, 121.18, 118.4, 114.1, 109.1, 71.3, 69.5, 66.6, 58.6, 50.6, 39.5;

[0132] HRMS (FAB) Calcd. for $C_{30}H_{34}N_2O_4S$ [M+H]+: 519.2318. Found 519.2319.

[0133] 1-4. [화학식 2-6]으로 표시되는 화합물의 제조

[0134] 하기 [반응식 5]에 따라 [화학식 2-6]의 화합물을 제조하였다.

[0135] [반응식 5]



[0136]

[0137] [화학식 2-5] [화학식 2-6]

[0138] 건조된 디클로로메탄(CH_2Cl_2, 15 mL)에 트리플루오로아세트산(TFA, 0.50 g, 0.96 mmol) 및 무수 트리에틸아민(Et_3N, 0.28 mL, 2.0 mmol) 첨가된 혼합 용액을 아르곤 분위기 하 -10 ℃에서 건조된 디클로로메탄(CH_2Cl_2, 5 mL)에 트리포스젠(0.29 g,0.98 mmol)이 첨가된 용액에 한 방울씩 드롭방식으로 첨가한 후 동일한 온도에서 3시간 동안 교반한 다음 건조된 디클로로메탄(10 mL)에 4-아자이도벤질알코올(azidobenzyl alcohol, 0.23 g, 1.5 mmol)이 첨가된 용액을 상기 교반한 용액에 한 방울씩 천천히 첨가하여 반응물질을 제조하였다. 상기 반응물질 0.38 g과 [화학식 2-1] 0.52 g을 혼합하여 상온에서 오버나잇(overnight) 교반한 후 물(30 mL)로 반응을 끝내고(quenching)되고, 디클로로메탄(3x50 mL)으로 추출하여 유기층을 분리하고, 물(30 mL)로 씻은 다음 소금물로 세척(30 mL)하고, $MgSO_4$로 건조한 후 여과하였다. 이 후 용매는 감압으로 제거하고, 컬럼크로마토그래피(20-40% ethyl acetate in *n*-hexane)로 여과하여 밝은 노란색의 반고체 생성물인 [화학식 2-6] 화합물(0.346 g, 수율: 52%)을 얻었다.

[0139] ^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) : δ 8.15 (s, 1H), 8.07 (t, 2H, J=8.0Hz), 7.92(d, 1H, J=7.6Hz), 7.70(d, 1H,

J=8.0Hz), 7.66(d, 1H, *J*=8.0Hz), 7.52-7.37(m, 5H), 7.09(s, 1H), 7.04(s, 2H), 5.19(s, 2H), 3.30-3.17(m, 14H), 2.84-2.77(m, 4H), 2.54-2.41(m, 4H);

[0140] ^{13}C-NMR(100MHz, $CDCl_3$) : δ 168.2, 154.1, 153.1, 150.9, 149.5, 142.9, 140.1, 138.1, 134.83, 134.81, 132.7, 131.9, 129.9, 127.3, 126.3, 125.0, 122.9, 121.9, 121.5, 120.9, 119.7, 119.1, 71.6, 69.8, 66.8, 66.3, 58.8, 51.5, 39.5;

[0141] HRMS (FAB) Calcd. for $C_{38}H_{40}N_5O_6S$ $[M+H]^+$:694.2699. Found 694.2694.

[0142] 상기 합성된 [화학식 2-6] 화합물은 방출 최대치가 레드 이동(red-shifting)하고 이광자 동작 단면적이 증가한다.

[0143] **시험예 1. [화학식 2-6] 화합물의 광물리적 특성**

[0144] HEPES 버퍼(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid; 20 mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7.4)에서, [화학식 2-6] 화합물 및 [화학식 2-5] 화합물은 각각 444 nm(Φ=0.013) 및 548 nm(Φ=0.46)에서 방출 최대값(λ^{FI}_{max})과, 360 nm(ε =2.50×10^{4}M^{-1}cm^{-1}) 및 363 nm(ε =3.91×10^{4}M^{-1}cm^{-1})에서 흡수 최대값(λ_{max})을 보였다(표 1).

[0145] [화학식 2-6] 화합물의 흡수($\triangle\lambda_{max}$=8 nm) 및 방출 스펙트럼($\triangle\lambda^{FI}_{max}$=31 nm)은 용매의 극성에 상대적으로 둔감한 반면, [화학식 2-5] 화합물의 방출 스펙트럼은 1,4-dioxane < DMF < EtOH < HEPES/EtOH (1/1) < HEPES 버퍼 순으로 큰 레드-이동($\triangle\lambda^{FI}_{max}$=95 nm)을 보인다. [화학식 2-6] 화합물에 대해 관찰된 용매화 변색(solvatochromic) 효과는 작은 쌍극자 모멘트의 결과일 수 있다.

[0146] 헬라 세포(HeLa cells)에서, [화학식 2-6] 화합물 및 [화학식 2-5] 화합물은 각각 HEPES/EtOH(1/1)에서 측정된 것과 유사한 450 nm 및 520 nm에서 방출 최대값을 보인다(표 1). 이에 따라 HEPES/EtOH(1/1)는 세포 환경을 적절히 대표하는 극성을 갖는다는 것을 알 수 있다.

표 1

[0147]

	$\lambda^{(1)}_{max}$ [nm] (10^{-4} □)[a]		λ^{FI}_{max} [nm][a]		Φ[b]		$\lambda^{(2)}_{max}$ [nm] [c]		$\Phi\delta_{max}$[d][GM][e]	
	TFCA	TFA	TFCA	TFA	TFCA	TFA	TFCA	TFA	TFCA	TFA
EtOH	354 (4.27)	381 (4.81)	437	498	0.87	0.87	-	-	-	-
HEPES/EtOH (1/1)	352 (4.11)	368 (4.77)	440	530	0.41	0.81	740	750	12	94
HEPES	360 (2.50)	363 (3.91)	444	548	0.013	0.46	740	750	0.67	52
Cell	-	-	450	520	-	-	-	-	-	-

[0148] [a]일광자 흡수 및 방출 스펙트럼의 λ_{max}. [b]형광 양자 수율. [c]이광자 흡수 및 방출 스펙트럼의 λ_{max}. [d]추정의 불확실성, ±15%. [e]GM=10^{-50}cm^{4}s/photon.

[0149] **-분광측정**

[0150] 흡수 스펙트럼은 Hewlett-Packard 8453 diode array 분광광도계에 기록되며, 형광 스펙트럼은 1-cm 일반 석영 셀과 Amico-Bowman series 2 발광 분광계로 얻었다. 다양한 조건에서 얻어진 스펙트럼 데이터는 표 1에 나타내었다.

[0151] **시험예 2. 황화물을 검출하는 능력 측정**

[0152] 이광자(TP)모드에서 HS^-을 감지하는 [화학식 2-6] 화합물의 능력을 측정하였다.

[0153] HEPES 버퍼에서, [화학식 2-6] 화합물의 이광자 동작 단면적(ΦδΦδ)은 740 nm에서 1 GM인 반면, [화학식 2-5] 화합물의 값은 750 nm에서 52 GM이다.

[0154] 또한 HEPES/EtOH(1/1)의 용매에서, 동작 단면적(ΦδΦδ) 값은 [화학식 2-6] 화합물에 대해 12배 증가하고, [화학식 2-5] 화합물에 대해 약 2배 증가하였다(표 1). HEPES/EtOH (1/1)에서 측정된 큰 동작 단면적(ΦδΦδ) 값은 더 소수성 용매에서의 큰 형광 양자 수율(Φ)의 결과일 수 있다(표 1).

[0155] 또한, 일광자 또는 이광자 프로세스로 측정된 k_{obs} 및 k_2 값은 거의 동일하다(도 1b 및 1c). 이러한 결과는 [화학식 2-6] 화합물로 표지된 세포 및 조직의 이광자(TP)여기된 형광 강도를 모니터링 할 수 있다는 것을 의미한다.

[0156] 뿐만 아니라, 살아있는 세포에서 H_2S를 감지하는 [화학식 2-6] 화합물의 유용성을 테스트하였다.

[0157] 스캔 람다 모드(lambda mode)에서 750 nm TP 여기를 사용하여, 100 mM Na_2S로 처리된 [화학식 2-6] 화합물로 표지된 헬라세포는 각각 HEPES/EtOH(1/1)에서 측정된 [화학식 2-6] 화합물 및 [화학식 2-5] 화합물의 것과 유사한 방출 최대값 및 방출 강도 비율을 보이며 두 가우스 함수로 분해할 수 있는 넓은 스펙트럼을 보인다(도 2b). 이 결과로 다시 한번 HEPES/EtOH(1/1) 환경이 세포내 환경에 대해 좋은 모델이며, [화학식 2-6] 화합물이 TPM에 의해 HS^-를 감지할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0158] 또한, [화학식 2-6] 화합물 및 [화학식 2-5] 화합물의 이광자 여기 형광 인자(TPEF) 강도는 각각 390-450 nm(1) 및 525-650 nm(2)에서 검출창을 이용하여 서로 최소 간섭으로 감지될 수 있다.

[0159] 또한, TPM에 의해 [화학식 2-6] 화합물을 이용한 HS^-에 대한 생체(*in vitro*) 검출 한도는 0.086 uM로 발견되었다.

[0160] **-이광자 단면적 측정**

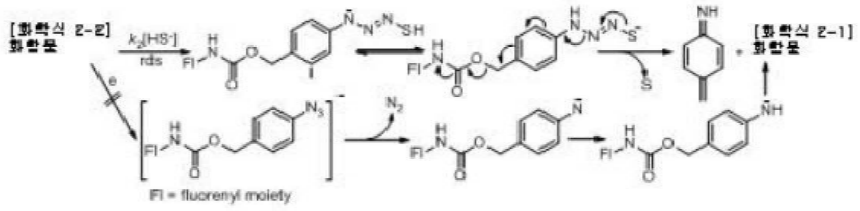
[0161] 이광자 단면적(δ)은 펨토초(fs) 형광 측정 기술을 이용하여 측정되었다.

[0162] [화학식 2-5] 화합물 및 [화학식 2-6] 화합물은 20 mM HEPES 버퍼(pH 7.2) 및 3.0×10^{-6} M의 HEPES/EtOH(1/1)에 용해된 후, 이광자에 의한 형광강도는 이광자 특성이 잘 특징된 Rhodamine 6G를 사용하여 740-940 nm에서 측정된다. 동일한 여기 파장에서 방출되는 대조군, [화학식 2-6] 화합물 및 [화학식 2-5] 화합물의 이광자에 의한 형광 강도를 결정하였다.

[0163] 이광자 단면적은 $\delta=\delta_r(S_s\Phi_r\Phi_r c_r)/(S_r\Phi_s\Phi_s c_s)$을 사용하여 측정된다. 상기 첨자 s 및 r은 대조군, [화학식 2-6] 화합물 및 [화학식 2-6] 화합물 분자에 대한 것이다. CCD 검출기에 의해 수집된 신호의 강도는 S로 표시되며, Φ는 형광 양자 수율(문헌 방법에 따라 Coumarin 307 및 Rhodamine B를 사용하여 측정)이고, Φ 는 실험장치의 전반적인 형광 집진 효율이며, 솔루션 분자의 밀도 수는 c로 표시된다. 또한, δ_r 은 대조군 분자의 이광자 단면적이다.

[0164] **시험예 3. [화학식 2-6] 화합물과 황화물의 반응 메카니즘**

[0165] [반응식 6]



[0166]

[0167] LC-MS 분석에 의해 모니터링된, HEPES 버퍼 및 HEPES/EtOH(1/1)에서 [화학식 2-6] 화합물(5 mM)과 NaHS(300 uM) 사이의 반응은 37 ℃에서 2시간 동안 실시하여 오직 주요 생산물로 [화학식 2-5] 화합물을 얻었다. 예컨대,

[화학식 2-5] 화합물을 이용하여 합성된 [화학식 2-6] 화합물은 HS^-의 반응으로 인하여 다시 [화학식 2-5] 화합물이 얻어진다. 또한, 황 또는 황화물의 침전물은 페닐 아자이드 및 Na_2S의 반응으로 보고된다.

[0168] Na_2S 100 mM이 37 ℃, HEPES 버퍼에서 [화학식 2-6] 화합물에 첨가될 때, [화학식 2-6] 화합물의 형광 강도는 390-450 nm에서 약간 감소되며 그로 인하여 525-650 nm에서 [화학식 2-5] 화합물의 형광 강도가 증가된다(도 1a). 이 과정은 $k_{obs}=2.89\times10^{-4}\ s^{-1}$로 1차 동역학을 따른다(도 1b).

[0169] H_2S의 pK_1 및 pK_2 값이 각각 6.96 및 12.90이기 때문에, H_2S 및 HS^-은 Na_2S, NaHS, 또는 H_2S가 황화물 도너(donor)로 사용된 여부에 관계없이 수용액 내에서 뚜렷한 황화물 종으로 사용된다. 또한, HS^-은 H_2S보다 더 친핵체이며, HS^-은 반응 조건에서 주요한 반응 종이다.

[0170] 더욱이, k_{obs} 대 $[HS^-]$의 그래프는 오리진(origin)을 통과하는 직선이며(도 1c), 반응은 HS^-에 대한 1차 반응 및 [화학식 2-6] 화합물에 대한 전체 1차, 2차 반응을 나타낸다. 상기 그래프의 기울기로부터 계산된 k_2 값은 5.13 $M^{-1}s^{-1}$이다(HEPES 버퍼에서 측정됨).

[0171] 상기와 유사한 결과는 390-450 nm에서 형광 강도가 이 용매 내의 [화학식 2-6] 화합물의 큰 양자 수율 때문에 더 크게 감소한다는 점을 제외하고 세포내 환경에 대해 좋은 모델인 HEPES/EtOH(1/1)에서 얻었다(표 1). HEPES/EtOH(1/1, pH = 7.2)에서 k_2 값은 $pK_a(H_2S)$=7.10을 사용하여 계산된 것으로서 $5.17M^{-1}s^{-1}$이다. 상기 k_2 값은 HEPES 버퍼에서 측정된 것과 매우 유사하다.

[0172] 또한, k_{obs}값은 전자 전송 메카니즘의 가능성 부정, 강한 전자 수용체, *p*-디나이트로벤젠의 첨가에 의해 영향을 받지 않는다. 이러한 결과는 [반응식 2]에서 표시된 부가 생성물(I)의 분해에 이은 HS^-의 속도-제한 공격에 의해 반응이 진행되는 것을 제안한다.

[0173] **- 37.0 ℃, HEPES/EtOH(1/1,pH 7.2)에서 H_2S의 pK_a 값**

[0174] HEPES/EtOH(1/1, pH 7.2)에서 H_2S의 pK_a 값은 아래 식을 사용하여 측정된다.

[0175]
$$HS^- + H_2O \rightleftharpoons H_2S + HO^- \quad K_1 = [H_2S][HO^-]/[HS^-] \quad (1)$$
$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + HO^- \quad K_w = [H^+][HO^-] \quad (2)$$
$$H_2S \rightleftharpoons H^+ + HS^- \quad K_a = [H^+][HS^-]/[H_2S] = K_w/K_1 \quad (3)$$

[0176] pH meter로 37.0 ℃, H_2O/EtOH(1/1)에서 10.0 mM NaSH을 포함하는 용액의 pH를 측정하였으며, 이때의 pH는 9.00이다.

[0177] K_1 값은 $[HS^-]_o$=10.0 mM 및 pH 9.00를 사용하여 식 (1)로 계산된다. 상기 값은 1.00×10^{-8} M이다.

[0178] HEPES/EtOH(1/1,pH 7.2)에서 H_2S의 pK_a 값은 $K_1=1.00\times10^{-8}$ M을 사용하여 식 (3)으로 계산된다. H_2O/EtOH(1/1)에서 보고된 값은 pK_w=15.10이지만, 본 발명에서 계산된 pK_a 값은 7.10이다.

[0179] **시험예 4. [화학식 2-6] 화합물을 이용하여 황화물에 대한 선택성 측정**

[0180] [화학식 2-6] 화합물이 다른 생물학 관련 종으로부터 선택적으로 HS^-을 감지할 수 있는지 테스트하기 위하여, 다양한 생물학 관련 종의 존재에서 [화학식 2-6] 화합물의 비율계량반응(ratiometric responses)을 결정하였다.

[0181] HEPES 버퍼에서, 100 mM Na_2S(55.7 mM HS^-)의 존재하에 [화학식 2-6] 화합물의 단파장(F_1, ~350-550 nm) 및 장

파장(F_2, 560-780 nm) 영역에서 측정된 상대 발광 강도 비율(F_2/F_1)은 [화학식 2-5] 화합물에 비해 110배 증가된 것으로 나타났다(도 1d). 이 결과는 [화학식 2-6] 화합물이 HS^-에 대한 비율계량 이광자 형광염료로 제공할 수 있다는 것을 의미한다.

[0182] 반면, [화학식 2-6] 화합물은 10 mM 글루타치온(GSH, 테스트된 H_2S 보다 100배 많은 양), 1 mM 시스테인(Cys) 및 1 mM 2-메르갑토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)뿐만 아니라, 다른 생물학적으로 관련한 반응성 황화물(sulfur species, RSS; lipoicacid, SO_3^{2-}, $S_2O_3^{2-}$, SCN^-), 반응성 질소화합물(nitrogen species, RNS; NO_2^-, NO), 반응성 산소(oxygen species, ROS; H_2O_2, O_2^-, *t*-BuOOH, HOCl), 사이올 그룹이 없는 아미노산(amino acids without thiol groups; ala, glu) 및 금속이온(Ca^{2+}, K^+, Na^+, Fe^{3+}, Zn^{2+}, Mg^{2+})에 대하여 반응성이 없는 것으로 나타났다(도 1d).

[0183] 도 1d에 도시된 바와 같이, 다른 아자이드 함유 프로브에 대한 것으로 상업적인 GSH를 향해 작은 반응을 보이지만, 정제된 GSH를 향해서는 반응을 보이지 않는다.

[0184] 또한, [반응식 2]에 나타낸 바와 같이, 이온화 HS와의 결합으로 중간체(I)를 형성할 수 없는 GSH, Cys, 및 2-ME의 반응은 추가 반응이 진행되지 않는다.

[0185] 또한, [화학식 2-6] 화합물 및 [화학식 2-5] 화합물은 생물학적 관련 pH범위에서 pH를 구분하며, 이러한 결과는 [화학식 2-6] 화합물이 다른 생물학적 관련 분석 종 및 pH 값으로부터 최소 간섭으로 세포 내의 HS^-을 감지할 수 있다는 것을 의미한다.

[0186] **시험예 5. 헬라세포(HeLa cells)에서 총 황화물 농도의 정량적 측정**

[0187] 살아있는 세포에서 총 황화물 농도를 정량적으로 측정하기 위하여, 20-30분 간격으로 Na_2S, 시스테인(Cys) 및 글루타티온(GSH)의 부재와 존재에서 [화학식 2-6] 화합물로 표지된 헬라세포의 TPEF 강도를 모니터하였다. [화학식 2-6] 화합물로 표지된 헬라세포의 TPEF 강도는 측정하는 동안, 즉 $k_{obs}=(0.0\pm0.1)\ s^{-1}$동안 거의 동일하게 남았다. 이 결과는 세포내 총 황화물 농도가 거의 제로인 것을 의미한다.

[0188] [화학식 2-6] 화합물로 표지되기 전 100 uM Na_2S 및 300 uM Na_2S로 전처리할 때, TPEF 강도가 각각 $k_{obs}=(2.6\pm0.9)\times10^{-6}$ 및 $(7.9\pm1.9)\times10^{-6}\ s^{-1}$로 천천히 증가되었다(도 3).

[0189] H_2S 및 HS^-는 HEPES/EtOH(1/1, pH=7.2)에서 평형이며 $[H_2S]/[HS^-]=[H^+]/K_a=0.794$이므로, 이것은 총 황화물 농도($[H_2S]+[HS^-]$)를 제시하기 위해 적절하다.

[0190] $k_{obs}=k_2[HS^-]$, $k_2=5.17M^{-1}s^{-1}$ 및 $[H_2S]/[HS^-]=0.794$를 사용하여 계산된 총 황화합물 농도는 각각 100 uM Na_2S 및 300 uM Na_2S로 전처리된 세포에서 0.90±0.32 uM 및 2.7±0.7 uM이었다. 이 결과는 세포막에 침투한 H_2S 또는 과도한 황화물의 작은 부분이 다양하게 격하된(degradative) 경로에 의해 세포 환경으로부터 빠르게 제거되었음을 나타낸다. H_2S은 세포막이 친유성이기 때문에 자유롭게 침투할 수 있는 일반적으로 용인된 견해에서 대비된 결과이다.

[0191] 세포가 500 uM Cys 또는 GSH로 처리될 때, k_{obs} 값은 총 황화물 농도가 각각 0.0±0.1 uM에서 0.50±0.23 uM, 2.2±0.6 uM로 증가하는 것에 일치되게 0.0에서 $(1.4\pm0.7)\times10^{-6}\ s^{-1}$, $(6.3\pm1.8)\times10^{-6}\ s^{-1}$로 증가되었다(도 3). 이러한 첨가제는 황화물을 생산하는 세포를 자극하지만, 효과는 보통으로 나타났다.

[0192] 또한, [화학식 2-6] 화합물은 60분 동안 에프에스-펄스(fs-pulses)의 연속 조사 후 [화학식 2-6] 화합물로 표지된 헬라세포의 특정지점에서의 TPEF 강도가 무시해도 될 정도의 감소를 나타낸 바와 같이 높은 광안정성을 보이는 것을 확인하였으며, CCK-8키트를 사용하여 무시할 정도의 독성을 보이는 것을 확인하였다. 이 결과는 [화학식 2-6] 화합물이 세포독성 및 광안정성으로부터 최소한의 간섭과 동역학 방법에 의해 살아있는 세포에서 총 황

화물 농도를 측정할 수 있다는 것을 의미한다.

[0193] **-동역학 방법의 개발**

[0194] HEPES 버퍼 또는 HEPES/EtOH(1/1, pH 7.2)에서 [화학식 2-6] 화합물(5 uM)과 Na_2S(100-500 uM)의 반응은 발광 분광계로 525-650 nm에서 [화학식 2-5] 화합물의 형광이 증가하는 것이 모니터되었다.

[0195] TP 모드에서 동역학 방법의 개발은 TPEF가 750 nm에서 여기 수집된 것을 제외하고는 동일한 방법으로 실시하였다.

[0196] 모든 경우에, $-\ln(F^{\infty}_2-F_2)$의 그래프 대 t는 우수한 연관성으로 선형(linear)이며, k_{obs} 값은 상기 그래프의 기울기로부터 얻고, K_2 값은 k_{obs} 대 $[HS^-]$의 그래프 기울기로부터 얻는다. $[HS^-]$은 모든 Na_2S가 HS^- 및 H_2S로 변형된, 즉 $[Na_2S]=[H_2S]+[HS^-]$를 가정하며, HEPES/EtOH(1/1, pH=7.2)에서 $[H_2S]/[HS^-]=[H^+]/K_a=0.794$인 관계를 이용하여 계산된다.

[0197] **시험예 6.**

[0198] 5주된 쥐 결장의 살아있는 조직에서 [화학식 2-6] 화합물의 유틸리티를 조사하였으며, 초기 단계의 종양이 장악하기 때문에 점막(mucosa), 점막근판(muscularis mucosae) 및 점막하 조직(submucosa)에 특히 관심이 있다(도 4c). 상기 조직들이 변형되면 조직을 염색하는데 오랜 시간이 걸리므로, 과량(20 uM)의 [화학식 2-6] 화합물이 용이한 염색을 위해 사용되었다.

[0199] 결장 조직의 구조가 서로 다르기 때문에, 전체 황화물 분포를 시각화하기 위해 두 검출창(1 및 2)을 이용하여 90-170 ㎛정도의 깊이에서 z-방향을 따라 150 섹션으로부터 TPEF 강도를 획득하였다.

[0200] 이광자 현미경법(TPM) 비율계량 이미지는 146 ㎛깊이까지 선명하게 볼 수 있다고 제시된 F_2/F_1 으로부터 생성되며, 더 깊은 깊이에서 시각화된 조직이 사라지기 시작했다(도 4a). 그러므로 두 지역으로 섹션을 나누며, 각각 점막(90-150 ㎛) 및 점막근판(151-170 ㎛)을 포함하는 점막하 조직으로 할당된다.

[0201] 이광자 현미경법(TPM) 비율계량 이미지는 기초 황화물 레벨이 각각 0.82±0.07(점막) 및 0.67±0.07(점막하 조직)의 평균 방출 비율로서 점막하 조직에 비해 점막에서 더 높은 것을 알 수 있다(도 4d).

[0202] 점막에서 측정된 큰 F_2/F_1 비율은 점막하 조직이 결합조직으로 구성되는 동안 점막이 원주상피세포(columnar epithelial cell)와 결합되기 때문에 예상된다.

[0203] 쥐가 5-플루오로우라실(5-fluorouracil, 5-FU)로 처리되었을 때, 조각된 조직의 방출 비율은 점막하 조직에서 0.84±0.05, 점막층에서 0.98±0.07이므로 점막층이 약간 높았다. 5-FU로 처리한 후 F_2/F_1 비율의 증가는 점막 염증을 유도하여 황화물 레벨을 높일 수 있는 제안과 일치한다. 또한, 상기 F_2/F_1 비율은 탈아자이드화(deazidation) 후 HEPES 버퍼에서 측정된 F_2/F_1=110보다 더 작으며, 이는 동역학 방법으로 측정된 작은 황화물 농도와 일치하는 결과이다. 그러나 상기 비율은 총 황화물 농도로 변환할 수 없다. 즉, 비율계량 측정은 질적인 데이터가 아니라 정량적인 정보를 제공한다.

[0204] 총 황화물 농도를 정량적으로 측정하기 위하여, [화학식 2-6] 화합물로 표지된 결장 조직에서 동역학 실험을 수행하였다.

[0205] 점막 및 점막하 조직에서 결정된 k_{obs}값은 각각 $(2.0\pm0.8)\times10^{-5}\ s^{-1}$ 및$(1.1\pm0.5)\times10^{-5}\ s^{-1}$이다.

[0206] 5-FU로 처리한 후의 k_{obs}값은 점막에서 $(4.0\pm0.7)\times10^{-5}\ s^{-1}$, 점막하 조직에서 $(2.3\pm0.6)\times10^{-5}\ s^{-1}$로서 약 두 배 증가하였다.

[0207] 점막 및 점막하 조직에서의 총 황화물 농도는 5-FU로 처리 전 각각 7.0±2.7 uM 및 3.8±1.4 uM이며, 처리 후 각각 14±3 uM 및 7.9±2.2 uM로서 5-FU 처리시 두 배로 증가하였다(도 4e). 5-FU로 처리한 후 증대된 총 황화

물 농도뿐만 아니라 점막하 조직에 비해 점막에서 높은 황화물 농도는 동일한 조건에서 측정된 큰 F_2/F_1 비율과 잘 일치한다. 그러나 이러한 값은 쥐의 뇌 조직에서 측정된 50-160 uM보다는 작다.

[0208] [화학식 2-6] 화합물은 동역학 방법을 이용하여 20-40 % 정확도로 쥐의 결장 조직의 다른 층에 총 황화물 농도를 정량적으로 측정할 수 있도록 확립하였다. 그러나 이 측정에 관련된 오류는 다른 쥐에서 가져온 조직 조각의 이질성으로 인한 것이며, 여기에 제시된 동역학 모델 때문은 아니다.

[0209] **-세포배양**

[0210] 헬라 인간 자궁 경부암 세포는 미국 ATCC(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 얻었으며, 세포는 열-비활성화된 10% FBS(WelGene), 페니실린(100 units/mL) 및 스트렙토마이신(100 mg/mL)으로 보충된 DMEM(WelGeneInc, Seoul, Korea)에서 배양되었다.

[0211] 모든 세포 주는 37 ℃에서 5% CO_2 및 95% 공기의 습한 환경에서 유지된다.

[0212] 이미징 이틀 전, 세포는 유리 바닥으로된 접시(MatTek)에 옮겨 배양하였다.

[0213] 표지의 경우, 성장 배지는 FBS가 없는 DMEN으로 제거 및 대체되었으며, 세포는 FBS가 없는 DMEN으로 3회 세척, 30분 동안 [화학식 2-6] 화합물(2 mM)과 배양되었다.

[0214] **-세포 생존능**

[0215] 추적자가 배양 조건에서 헬라세포의 생존에 영향을 미칠 수 없다는 것을 확인하기 위하여, CCK-8 키트(Cell Counting Kit-8, Dojindo, Japan)가 사용되었다.

[0216] **-이광자 현미경법 이미지.**

[0217] [화학식 2-6] 화합물로 표지된 세포 및 조직의 TPM 이미지는 각각 ×100(NA = 1.30 OIL) 및 ×40(NA = 0.75 DRY) 대물렌즈로 스펙트럼 공초점 및 다중광자 현미경으로 얻었다.

[0218] TPM 이미지는 초점면에서 약 2 mW의 평균 전력에 일치하는 출력 전력 1380 mW 및 파장 750 nm에서 모드 잠금된 티타늄-사파이어 레이저 소스(Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)와 여기된 프로브에 의해 DM IRE_2 현미경(Leica)으로 얻었다.

[0219] 비율계량 이미지를 얻기 위하여, 내부 PMTs는 400 Hz 스캔 속도에서 부호없는 8비트 512×512 픽셀로 390-450 nm 및 520-650 nm 영역에서 신호를 수집하는데 사용된다.

[0220] **-쥐의 결장 조각의 추출, 염색 및 비율계량 이미지**

[0221] 이 프로토콜은 동물의 관리 및 사용을 위하여 고려 대학교 안암병원(Seoul, Korea)의 동물 윤리 위원회에 의해 승인되었다.

[0222] 남성의 웅성 흰쥐(Sprague Dawley rats)(235-265 g)는 두 그룹(5-FU 및 대조구)으로 나뉜다. 5-FU 그룹에서, 5-FU를 쥐의 몸무게당 150 mg(150 mg/kg)으로 복강 내에 주입하였다(SoloPak Laboratories, Franklin Park, IL). 대조구 그룹에서, 대조구 쥐는 식염수를 주사하였다. 각 그룹은 4마리의 쥐로 구성되었다.

[0223] 모든 쥐는 오후 9시부터 밤 12시 사이에 주입하였으며, 음식과 물을 자유롭게 이용하였으며, 8시간 주기로 동일한 방에서 지냈다.

[0224] 복강 내 주사 8시간 후, 모든 쥐는 희생되었으며, 모든 쥐는 마취하여 개복술을 시행하였다.

[0225] 쥐의 결장에서 조각을 얻었으며, 결장 조각은 2 cm 긴 세그멘트로 자르고 세로 절개에 의해 개방한 후 dulbecco's 인산 버퍼(D-PBS; 200 mM KCl, 200 mM KH_2PO_4, 8 M NaCl, 2.16 M $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$)로 처리하였다.

[0226] 상기 결장 조각은 37 ℃에서 95% O_2 및 5% CO_2로 버블된 D-PBS에서 20 uM [화학식 2-6] 화합물로 배양되었다.

상기 결장 조각은 유리바닥 접시에 옮겨져 D-PBS로 3회 세척한 후 공초점 다광자 현미경으로 관찰한다.

[0227] TPEF 강도는 390-450 nm 및 520-650 nm의 검출창을 사용하여 90-150 ㎛(점막 층)의 깊이에서 110 섹션으로, 151-170 ㎛(점막하 조직 층)의 깊이에서 40 섹션으로 수집된다.

[0228] 비율계량 이미지는 상기 두 검출창으로부터 각 섹션에서 수집된 TPEF 강도로 구성된다. F_2/F_1 비율은 평균 ±SD로 표현되며, $p < 0.05$로 설정하였다.

[0229] **-세포 및 조직 조각에서 동역학 측정**

[0230] 헬라세포에서 동역학 실험은 [화학식 2-6] 화합물로 표지된 헬라세포로부터 TPEF 강도가 750 nm에서 여기에 따라 20-30분 간격으로 모니터된 것을 제외하고는 동일한 방법으로 수행하였다.

[0231] 주어진 시간 및 S_{B2}/S_{A1} 비율에서 평균 TPEF 강도는 헬라세포(도 1b)로 525-650 nm에서 [화학식 2-5] 화합물이 k_{obs} 계산에 사용된 것에 의해 390-450 nm에서 [화학식 2-6] 화합물의 TPEF 강도가 나뉘어 얻어진다. 상기 k_{obs}는 30 k_{obs} 값의 합계를 얻기 위하여 3가지 독립 세포 라인에서 관심의 10지역(ROI)을 측정하였다.

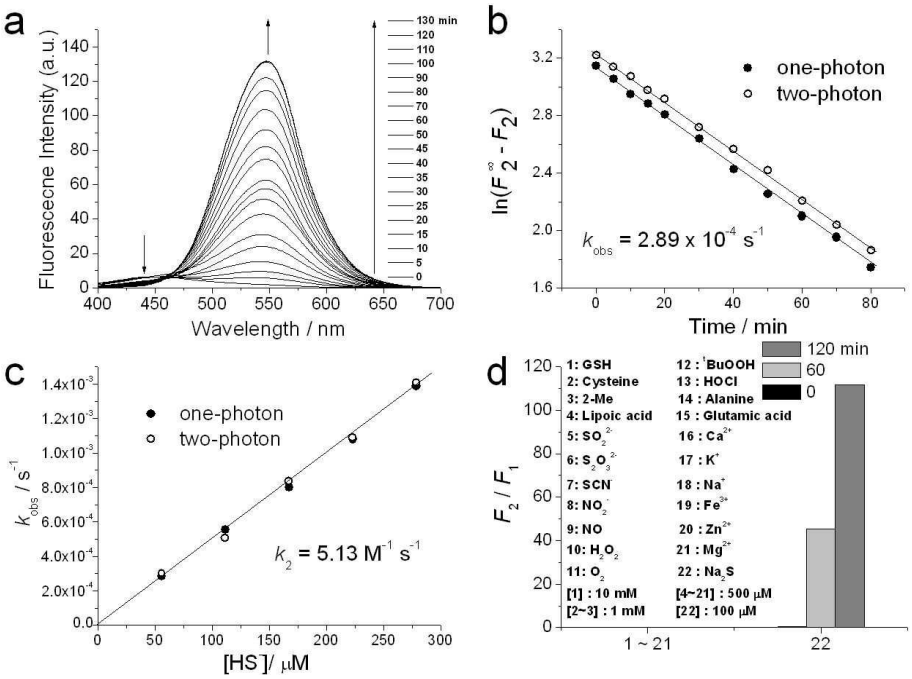
[0232] Na_2S, 시스테인 및 GSH의 효과를 평가하기 위하여, 헬라세포는 [화학식 2-6] 화합물(2 uM)로 배양되고, 30분 동안 Na_2S(100, 300 uM), 시스테인(500 uM) 및 GSH(500 uM)로 처리된다. 배양 후, 세포는 FBS없이 DMEM로 3회 세척되고 속도를 측정한다.

[0233] 쥐의 결장 조직에서 동역학 실험은 4마리 쥐로부터 4 결장 조각을 사용하여 수행되며, 동역학 실험의 두 세트는 각 조각에서 실시된다. 실험 중 한 세트에서, [화학식 2-6] 화합물로 표지된 결장 조직에서 90-150 ㎛(점막 층)의 깊이 및 151-170 ㎛(점막하 조직 층)의 깊이에 8 ROI's/섹션의 TPEF 강도가 주어진 시간 및 평균에서 수집된다.

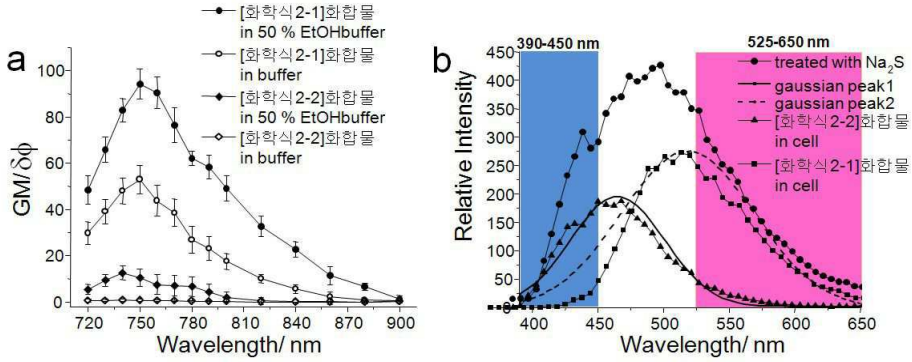
[0234] 속도(k_{obs})는 각 층에서 112 k_{obs} 및 48 k_{obs} 값의 합계를 얻기 위하여 각각 점막 및 점막하 조직에서 7 및 3 섹션으로 측정된다. 속도(k_{obs})는 평균 ±SD로 표현되며, $p < 0.05$로 설정하였다.

도면

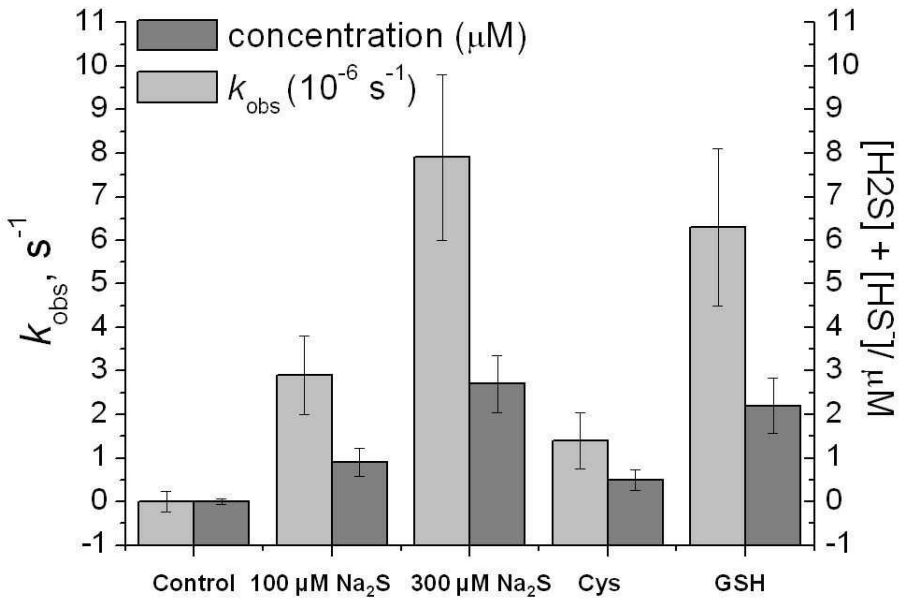
도면1


a
Fluorescecne Intensity (a.u.)
Wavelength / nm
130 min
120
110
100
90
80
70
60
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
b
one-photon
two-photon
k_{obs} = 2.89 x 10^{-4} s^{-1}
$\ln(F_2^{\infty} - F_2)$
Time / min
c
one-photon
two-photon
k_2 = 5.13 M^{-1} s^{-1}
k_{obs} / s^{-1}
[HS]/ μM
d
120 min
60
0
1: GSH
2: Cysteine
3: 2-Me
4: Lipoic acid
5: SO_2^{2-}
6: $S_2O_3^{2-}$
7: SCN
8: NO_2^-
9: NO
10: H_2O_2
11: O_2
12 : ^tBuOOH
13 : HOCl
14 : Alanine
15 : Glutamic acid
16 : Ca^{2+}
17 : K^+
18 : Na^+
19 : Fe^{3+}
20 : Zn^{2+}
21 : Mg^{2+}
22 : Na_2S
[1] : 10 mM
[2~3] : 1 mM
[4~21] : 500 μM
[22] : 100 μM
F_2 / F_1
1 ~ 21
22

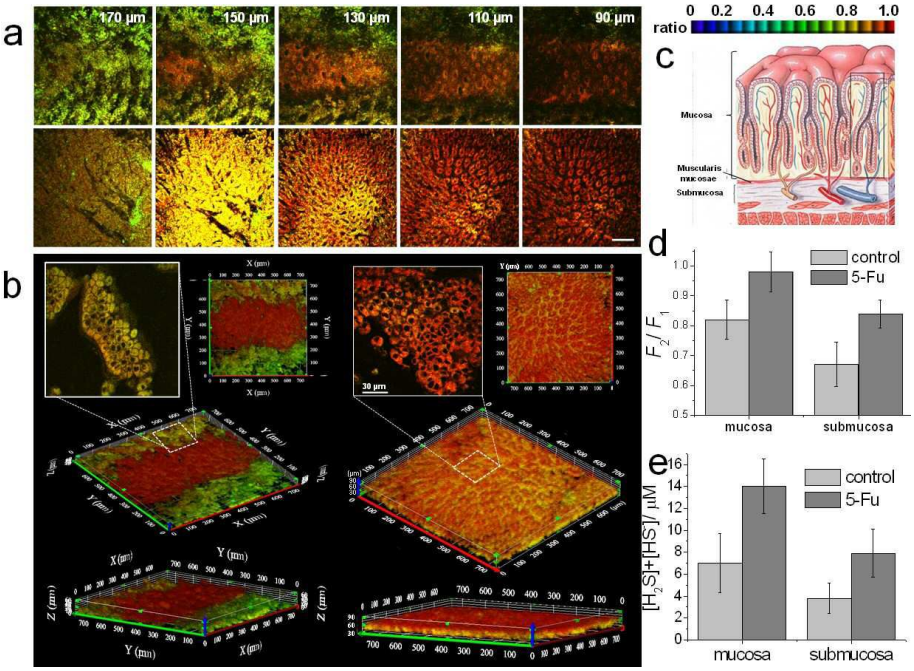
도면2


a
[화학식 2-1]화합물 in 50 % EtOHbuffer
[화학식 2-1]화합물 in buffer
[화학식 2-2]화합물 in 50 % EtOHbuffer
[화학식 2-2]화합물 in buffer
GM/δϕ
Wavelength/ nm
b
390-450 nm
525-650 nm
treated with Na_2S
gaussian peak1
gaussian peak2
[화학식 2-2]화합물 in cell
[화학식 2-1]화합물 in cell
Relative Intensity
Wavelength/ nm

도면3


concentration (μM)
k_{obs} (10^{-6} s^{-1})
k_{obs}, s^{-1}
[HS⁻] + [H2S] / μM
Control
100 μM Na_2S
300 μM Na_2S
Cys
GSH

도면4


a
170 μm
150 μm
130 μm
110 μm
90 μm
b
30 μm
c
ratio
0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
Mucosa
Muscularis mucosae
Submucosa
d
control
5-Fu
F_2 / F_1
mucosa
submucosa
e
control
5-Fu
$[H_2S]+[HS^-]$ / μM
mucosa
submucosa