

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0020454 (43) 공개일자 2011년03월03일
(51) Int. Cl. C07D 311/06 (2006.01) C07D 407/04 (2006.01) C07D 407/02 (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0078071 (22) 출원일자 2009년08월24일 심사청구일자 2009년08월24일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 김중승 경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운롯데아파트 130-2402 김현정 경기도 화성시 동탄면 반송리 시범한빛마을 금호 어울림 아파트 242동 304호 김자형 전라남도 광양시 금호동 장미아파트 24동 104호 (74) 대리인 특허법인충현	

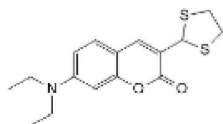
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 2가 수은 이온 선택성을 갖는 쿠마린 유도체, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 2가 수은 이온 검출 방법

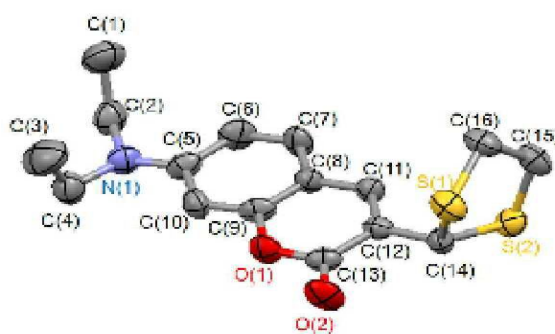
(57) 요약

본 발명은 2가 수은 이온 선택성을 갖는 하기 화학식 1의 쿠마린(coumarin) 유도체, 이를 제조하는 방법 및 이를 이용한 2가 수은 이온 검출 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 2가 수은 이온의 존재 하에서 쿠마린 유도체 중의 디티안기(dithiane group)가 수용액 중에서 알데히드 관능기로 변환되는 과정에서 발생하는 이중 발색 또는 형광 방출을 이용하여 2가 수은 이온을 검출할 수 있는 하기 화학식 1의 쿠마린(coumarin) 유도체, 이를 제조하는 방법 및 이를 이용한 2가 수은 이온 검출 방법에 관한 것이다.

[화학식 1]



대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090081566

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 리더연구자지원_창의연구

연구과제명 화학도시미터를 이용한 발광센서 기술 개발

기여율

주관기관 고려대학교

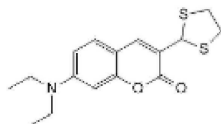
연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

2가 수은 이온 선택성을 갖는 하기 화학식 1로 표시되는 쿠마린 유도체:

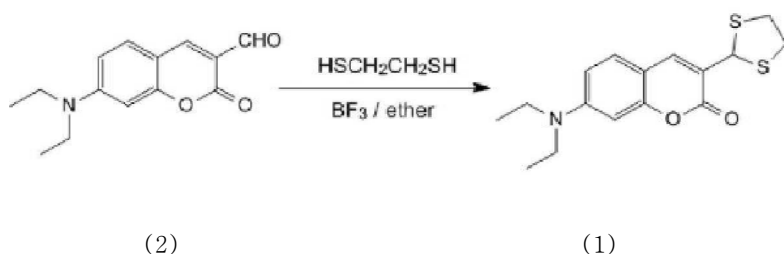
[화학식 1]



청구항 2

하기 화학식 2의 화합물과 1, 2-에탄디티올을 하기 반응식 1에 따라 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 쿠마린 유도체를 제조하는 방법:

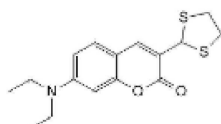
[반응식 1]



청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 쿠마린 유도체를 이용하여 시료 중에서 2가 수은 이온을 선택적으로 검출하는 방법:

[화학식 1]



청구항 4

제3항에 있어서, 상기 2가 수은 이온의 검출은 상기 2가 수은 이온 결합에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 쿠마린유도체의 자외선 흡광도 변화를 측정하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 2가 수은 이온을 선택적으로 검출하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 자외선 흡광도 변화 측정은 최대 자외선 흡광도를 나타내는 파장값의 변화를 측정하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 2가 수은 이온을 선택적으로 검출하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 2가 수은 이온의 검출은 형광 변화 측정에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 2가 수은 이온을 선택적으로 검출하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 형광 변화 측정은 상기 2가 수은 이온 결합에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 쿠마린유도체의 형광 방출감소를 측정하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 2가 수은 이온을 선택적으로 검출하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 2가 수은 이온 선택성을 갖는 쿠마린(coumarin) 유도체, 이를 제조하는 방법 및 이를 이용한 2가 수은 이온 검출 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 높은 수용성을 지니고, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 등과 같은 생체 활성 금속 이온들에 의해서 영향을 받지 않으며 Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} 및 Pb^{2+} 등과 같은 중금속 및 전이금속 양이온들을 함유하는 오염된 환경하에서도 2가 수은 이온에 대한 선택성이 높고, 수성 매체 및 실온 조건하의 낮은 2가 수은 이온 농도하에서도 높은 형광강도를 나타내므로 2가 수은 이온에 대한 감도가 높은 쿠마린(coumarin) 유도체, 이를 제조하는 방법 및 이를 이용한 2가 수은 이온 검출 방법에 관한 것이다.

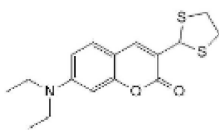
배경 기술

[0002] 수은, 카드뮴 및 납 등과 같은 중금속들은 생체 내 축적 및 함량 증가가 용이하고, 자연환경 중에서 지속적으로 존재한다는 점 때문에 이러한 중금속들에 대한 화학센서에 대해서 지속적인 관심을 유발하고 있다. 특히, 광학적 탐침을 이용한 수은 이온의 검출은 수은 이온의 생체 내 강한 독성 때문에 급속하게 성장하는 분야이다. 수은 염은 고농도의 수은 오염물을 발생시키는 전기 장치, 촉매, 페인트 및 광물 부산물 등과 같은 다양한 산업 물질들 중에 존재한다. 메틸수은의 경우 인체 내에 흡수되면 감각, 운동 및 신경계 손상으로부터 유래되는 여러 중증 질환들을 야기한다. 예를 들어, 임산부가 메틸수은을 섭취하면 흡수된 메틸수은이 태반을 통과하여 태아의 뇌 및 중추신경계로 이동하며, 태아의 발생과정을 지연시킬 수도 있다. 따라서, 수은 이온을 선택적으로 민감하게 검출할 수 있는 분석 방법에 대한 필요성이 시급한 실정이다.

[0003] 최근에 발광 탐침으로 응용될 수 있는 몇몇 화학센서들이 개발되었다. 이러한 화학센서들을 사용하는 방법 중에서 특히 유망한 것으로는 화학량계(chemodosimeter)의 사용으로서, 이는 선량계(dosimeter) 분자와 표적 물질과의 사이에서 발생하는 특정 화학 반응에 의해서 형광 또는 발색 물질이 형성되는 현상을 이용하는 방법이다. 이러한 분야에서 더욱 유망한 접근 방법은 표적 분석물에 의해서 유도되는 매우 선택적인 반응 (일반적으로 비가역적임)들을 사용하는 것이며, 반응 중 축적된 효과는 분석물의 농도에 직접적으로 연관된다. 2가 수은 이온에 대한 화학량계로는 티오아세탈기의 탈황화(desulfurization) 반응을 고려해 볼 수 있다. 현재까지 첨가제를 함유하는 중금속 또는 전이금속을 사용하는 다양한 탈황 방법들이 개발되었으며, 그 예로는 Ag^+/NBS 또는 NCS , AgNO_3/I_2 , CuCl_2/CuO , $\text{HgO}/\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$, 및 $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2/\text{CaCO}_3$ 등이 있다. 또한, 티오아세탈기의 탈황반응은 수성 MeCN 중 환류 조건 하에서 $\text{HgCl}_2/\text{HgO}/\text{LiBF}_4$ 와 함께 수행될 수도 있다. 비록 이러한 방법들이 2가 수은 이온에 대한 화학량계 관능성을 향상시켰지만, 그들의 생물학적 시료들에 대한 응용은, 화학량계의 낮은 수용성 및 감도, 단파장 흡수성 및 낮은 양자효율(low quantum yield) 등의 성질 때문에 문제점이 있었다.

[0004] 이에 본 발명자들은 환경 및 생물학 분야에서의 응용성을 증가시키기 위해서 티오아세탈화 쿠마린 ()의 신규 티오아세탈 유도체의 합성에 관한 연구를 수행하였으며, 수성 환경 하에서 발색 및 형광 변화의 관점에서 2가 수은 이온의 감도 높은 검출을 제공하기 위해서 그 화학량계 특성들을 연구하였다. 또한, 티오아세탈기의 탈황 반응은 온건하고 환경친화적인 조건 (수성 매체 및 실온)하에서는 성공적으로 수행되기가 어려운데, 이러한 조건들은 화학량계 검출 시스템에 필수적인 조건들이다. 따라서, 본 발명자들은 형광 및 색변화 관점에서 2가 수은 이온에 대한 화학식 1의 화합물의 화학량계 특성을 연구하였으며,

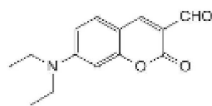
[0005] 화학식 1



[0006]

[0007] 이와 더불어 온건한 조건하에서 촉매 사용 없이 화학식 1을 갖는 쿠마린 티오아세탈을 화학식 2를 갖는 쿠마린 알데히드로 변환시키는 과정을 연구하였다:

[0008] 화학식 2



[0009]

발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 높은 수용성을 지니고, 생체 활성 금속 이온들에 의해서 영향을 받지 않으며 중금속 및 전이금속 양이온들을 함유하는 오염된 환경하에서도 2가 수은 이온에 대한 선택성이 높고, 수성 매체 및 실온 조건하에서도 2가 수은 이온에 대한 감도가 높은 쿠마린(coumarin) 유도체를 제공하는 것이다.

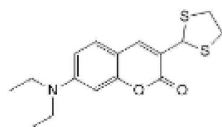
[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는 상기 2가 수은 이온 검출용 쿠마린 유도체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명이 해결하고자 하는 세 번째 과제는 상기 쿠마린 유도체를 이용하여 2가 수은 이온을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0013] 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 해결하기 위하여, 2가 수은 이온 선택성을 갖는 하기 화학식 1로 표시되는 쿠마린 유도체를 제공한다.

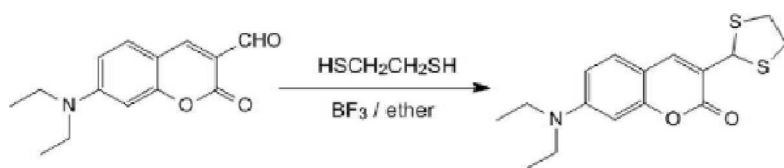
[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] 본 발명은 상기 두 번째 과제를 해결하기 위하여, 하기 화학식 2의 화합물과 1, 2-에탄디티올을 하기 반응식 1에 따라 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 쿠마린 유도체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0017] [반응식 1]



[0018]

[0019]

(2)

(1)

[0020] 본 발명은 상기 세 번째 과제를 해결하기 위하여, 상기 화학식 1로 표시되는 쿠마린 유도체를 이용하여 시료 중에서 2가 수은 이온을 선택적으로 검출하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 2가 수은 이온의 검출은 2가 수은 이온 결합에 따른 자외선 흡광도 변화를 측정하여 이루어지는 것일 수 있으며, 예를 들어 최대 자외선 흡광도를 나타내는 파장값의 변화를 측정하여 이루어질 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 2가 수은 이온의 검출은 형광 변화 측정에 의해 이루어지는 것일 수 있으며, 예를 들어 2가 수은 이온 결합에 따른 형광 방출 감소를 측정하여 이루어질 수 있다.

효과

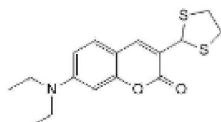
[0023] 본 발명에 따른 쿠마린 유도체는 높은 수용성을 지니고, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 등과 같은 생체 활성 금속 이온들에 의해서 영향을 받지 않으며 Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} 및 Pb^{2+} 등과 같은 중금속 및 전이금속 양이온들을 함유하는 오염된 환경하에서도 2가 수은 이온에 대한 선택성이 높고, 수성 매체 및 실온 조건하의 낮은 2가 수은 이온 농도하에서도 높은 형광강도를 나타내므로 2가 수은 이온에 대한 고감도 화학센서로서 매우 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0025] 본 발명에 따른 2가 수은 이온 선택성을 갖는 쿠마린(coumarin) 유도체는 하기 화학식 1을 갖는다.

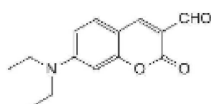
[0026] [화학식 1]



[0027]

[0028] 본 발명에 따른 쿠마린 유도체는 에테르 중의 트리플루오로보란 존재 하에서 하기 화학식 2를 갖는 화합물, 즉 7-디에틸아미노 쿠마린-3-알데히드와 1,2-에탄디티올을 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

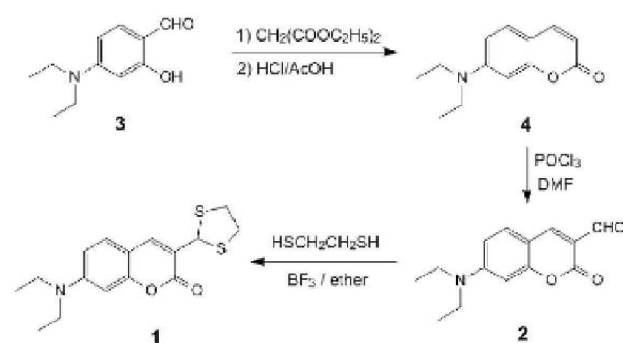
[0029] [화학식 2]



[0030]

[0031] 한편, 상기 화학식 2를 갖는 화합물은 공지의 방법 (Wu, J. S.; Liu, W. M.; Zhuang, X. Q.; Wang, F.; Wang, P. F.; Tao, S. L.; Zhang, X. H.; Wu, S. K.; Lee, S. T. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 33 및 Kim, T.-K.; Lee, D.-N.; Kim, H.-J. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4879 참조)에 의해서 제조될 수 있으며, 예를 들어 하기 반응식 2와 같은 과정에 의해서 제조될 수 있다.

[0032] 반응식 2



[0033]

[0034] 상기 방법에 의해서 제조된 화학식 1을 갖는 화합물에 대한 분자 구조는 ^1H - 및 ^{13}C -NMR, 질량 스펙트럼, 적외선 스펙트럼 및 X-선 단결정 구조 분석 등의 방법에 의해서 명확히 파악할 수 있으며, 도 1에 이를 도시하였다.

[0035] 한편, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 쿠마린 유도체를 이용하여 시료 중에서 2가 수은 이온을 선택적으로 검출하는 방법을 제공하며, 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 2가 수은 이온의 검출은 상기 2가 수은 이온 결합에 따른 자외선 흡광도 변화를 측정하여 이루어지는 것일 수 있으며, 예를 들어 최대 자외선 흡광도를 나타내는 파장값의 변화를 측정하여 이루어질 수 있고, 그 원리는 다음과 같다.

[0036] 도 2를 참조하면, 화합물 1의 UV/Vis 스펙트럼에서의 흡수 밴드는 30:70 MeOH:H₂O 용액 중에서 원래 393 nm ($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)에서 나타난다. 그러나, 실온에서 Hg^{2+} 이온이 첨가되면, 393 nm에서의 최대 흡수값은 점차 감소하는데 반해서, 443 nm에서의 새로운 최대 흡수값 ($\epsilon = 5.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)은 증가하고, 410 nm에서 등흡광

점 (isosbetic point)이 나타난다. 이러한 흡수 밴드의 전이는 10분 이내에 최대값에 도달하며, 이로부터 화합물 1이 급속하게 탈황화된다는 사실을 알 수 있다 (도 3 참조)

[0037] 화합물 1의 선택성을 조사해보기 위해서, Li^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} , 및 Pb^{2+} (총 17종)의 금속 이온 염들 (짝음이온으로서 염화이온)을 테스트하였다. 이들 중에서, Hg^{2+} 이온만이 UV-Vis 흡수 영역에서 393 nm로부터 443 nm로의 적색이동 (bathochromic shift)을 촉진시켰으며, 다른 금속 이온들은 동일한 조건하에서 다른 어떠한 현저한 변화도 야기하지 않았다 (도 4a 참조). 도 4b에는 화합물 1, 2 및 화합물 1 + Hg^{2+} 각각에 대한 흡수 스펙트럼을 도시하였다. 화합물 2 및 화합물 1 + Hg^{2+} 에 대한 흡수 스펙트럼은 거의 동일하였으며, 이는 화합물 1이 Hg^{2+} 에 의해서 짧은 반응 시간 내에 탈황화된다는 사실을 나타낸다.

[0038] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 2가 수은 이온의 검출은 형광 변화 측정에 의해 이루어지는 것일 수 있으며, 예를 들어 상기 2가 수은 이온 결합에 따른 형광 방출 감소를 측정하여 이루어질 수 있고, 그 원리는 다음과 같다.

[0039] Hg^{2+} 이온에 대한 화합물 1의 선택성은 형광 측정에 의해서도 관찰되는데, 481 nm 발광 파장 (em)에서의 형광 강도 (여기 파장 ex 393 nm)는 pH 7.4, 수성 메탄올 (메탄올:물 = 30:70 v/v), 50 mM HEPES 중에 10 당량의 2가 수은 이온 ($2.0 \mu\text{M}$)을 첨가함으로써 현저히 감소되는 것을 알 수 있다 (도 5 참조). 이러한 소광 현상은 2가 수은 이온의 첨가에 의해서 쿠마리닐 티오아세탈로부터 변환된 쿠마린 알데히드의 산소 원자가 광-유도 전자 수송 (Photo-induced Electron Transfer, PET) 현상을 야기하기 때문이다.

[0040] 양이온 경쟁 실험의 결과는 도 6에도 도시되어 있는데, 2가 수은 이온에 대한 화합물 1의 선택성 및 민감도는 고농도의 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 및 Mg^{2+} (100 당량)과 같은 생물학적 활성 금속 이온들에 의해서 영향을 받지 않는다. 또한, 도 6으로부터, 화합물 1의 이러한 2가 수은 이온 선택성의 화학량적 반응 (chemodosimetric response)은 Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , and Pb^{2+} 과 같은 중금속 및 전이금속 양이온들을 함유하는 오염된 조건 하에서도 유지됨을 알 수 있다.

[0041] 도 7을 참조하면, F_0/F (F_0 : 화합물 1만에 대한 481nm에서의 형광강도, F : 각각의 이온을 첨가한 후에 대한 481nm에서의 형광강도)로 표시되는, 2가 수은 이온에 대한 선택도는 약 4.5로 표시되는 반면에, 다른 금속 이온들에 대한 선택도는 약 1.1 미만임을 알 수 있다. 더 나아가, 도 8로부터 알 수 있는 바와 같이, 화합물 1은 2가 수은 이온에 대해서 육안으로 구별되는 발색 반응을 야기한다. 한편, 2가 수은 이온에 의해서 유도되는 화학량적 반응 기작을 알아보기 위해서, 화합물 1의 다른 친티오성 (thiophilic) 금속 이온들 (Cu^{2+} 및 Ag^+)에 대한 반응성도 조사하였다. 반응성은 481nm에서의 형광강도를 측정함으로써 조사하였으나, 어떠한 형광 변화도 관찰되지 않았다.

[0042] 본 발명에 따른 화합물의 2가 수은 이온 결합에 따른 형광 방출 감소는 형광 현미경을 사용해서도 측정가능한데 (여기 파장 밴드: 330 ~ 385nm, 방출 파장: 400nm), 도 9를 참조하면, 2가 수은 이온에 대해서만 현저한 형광 방출 감소가 관찰됨을 알 수 있으며, 대부분의 다른 금속 이온들은 어떠한 현저한 형광 변화도 야기하지 않는다는 사실을 알 수 있다.

[0043] 2가 수은 이온에 대한 화합물 1의 민감도를 알아보기 위해서, 형광강도 vs. $[\text{Hg}^{2+}]$ 에 대한 그래프를 도시하였으며, 이를 도 10에 표시하였다. 2가 수은 이온의 농도를 $4.0 \mu\text{M}$ 로부터 $200 \mu\text{M}$ 까지 변화시키게 되면, 최대 $10 \mu\text{M}$ 의 2가 수은 이온 첨가에 의해서, 완충 수성 메탄올 (30:70 메탄올:물, 50mM HEPES, pH 7.4) 중의 화합물 1의 형광이 완전히 소광된다는 사실을 알 수 있다. 더 나아가, 도 11로부터도 알 수 있는 바와 같이, 화합물 1의 형광 방출 감소는 육안으로도 확연히 식별 가능하다. 이러한 민감도 곡선으로부터 2.0 ppm 미만의 2가 수은 이온까지도 검출가능함을 알 수 있다. 이는 본 발명에 따른 화합물 1이 물에 존재하는 마이크로몰 농도의 2가 수은 이온까지도 분석하는데 사용될 수 있다는 것을 의미하며, 따라서 이를 어류 분석 및 음용수 분석 등에도 활용할 수 있다는 것을 의미한다.

[0044] 2가 수은 이온 검출용으로서 화합물 1의 활용도를 분석하기 위해서, 화합물 1을 함유하는 탈단백 인간 혈장 시료에 2가 수은 이온을 첨가하였다. 첨가와 거의 동시에, 화합물 1의 UV-vis 흡광도가 적색이동 현상을 나타내었

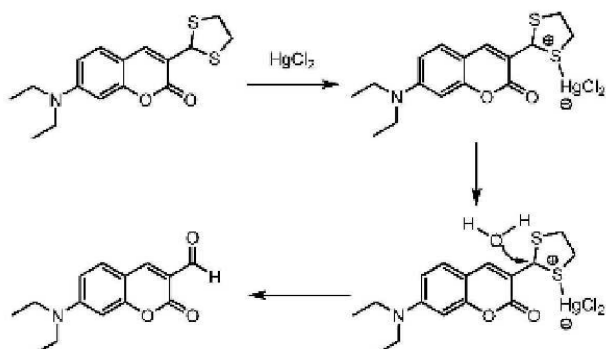
으며, 형광 강도가 감소하였다 (도 12a 및 12b 참조). 이러한 사실로부터, 본 발명에 따른 화합물 1이 생물학적 시료 중에서 Hg^{2+} 를 선택적으로 민감하게 검출하는데 있어서 유용한 화학량계로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0045] 실온에서 Hg^{2+} 가 존재하는 경우, 화합물 1이 화합물 2로 변환된다는 사실은 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 및 질량 스펙트럼 분석의 데이터 변화로도 확인 가능하다. 50:50 $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ 중에서, 화합물 1에 Hg^{2+} (3.0 당량)를 첨가하게 되면, d 5.92 ppm에서 1,3-디티안 메틴 양성자가 사라지며, 동시에 d 10.13ppm에서 새로운 피크가 나타나는데, 이는 화합물 2의 알데히드 양성자에 해당되는 피크이다. 화합물 1 + Hg^{2+} 의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 표준시료 2의 스펙트럼과 동일한 것이다 (도 13 참조). 추가적으로, 화합물 1과 Hg^{2+} 와의 반응으로부터 분리된 산물에 대한 질량 스펙트럼은 화합물 2의 질량 스펙트럼과 동일한데, 이는 실제로 화합물 1이 2가 수은 이온의 첨가에 의해서 화합물 2로 변환되었음을 나타내는 것이다.

[0046] 화합물 1의 Hg^{2+} 이온-매개 탈황반응에 대한 다른 킬레이팅 화합물들로부터의 간섭 현상 가능성을 알아보기 위해서 대표적인 킬레이팅 화합물인 EDTA를 화합물 1 및 Hg^{2+} 를 함유하는 용액에 첨가하였다. Hg^{2+} 에 의해서 야기된 화합물 1의 적색편이된 흡수밴드는 고농도의 EDTA (10mM)를 첨가하는 경우에도 변화가 없었으며, 이는 다른 화학센서들과는 달리 화합물 1이 Hg^{2+} 의 첨가에 의해서 비가역적 화학 반응을 겪게됨을 의미한다 (도 14 참조).

[0047] 하기 반응식 2에는 Hg^{2+} 에 의해서 촉진되는 탈황 반응에 대한 가능한 메커니즘을 나타내었다. 수은 이온의 친티오성 때문에 발생하는 황 원자와 HgCl_2 와의 배위결합은 티오아세탈의 탄소 원자를 활성화시키며, 이어서 이는 물에 의해서 가수분해되어 대응되는 알데히드기를 생성한다.

[0048] 반응식 3



[0049]

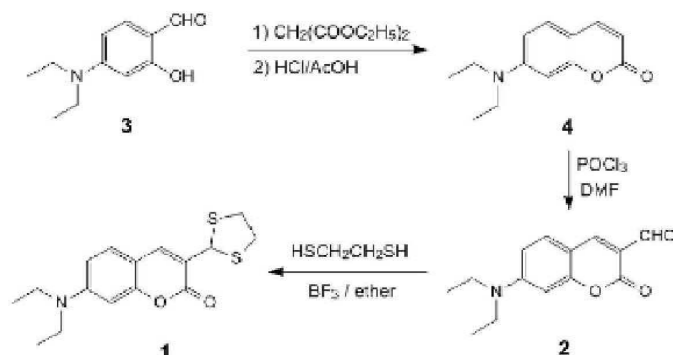
[0050] 본 발명에서는 전술한 화합물 1의 성질들을 활용하여, 상기 화합물 1을 이용하여 2가 수은 이온을 검출하기 위한 화학센서를 제공한다.

[0051] 화합물 1의 발색 변화 및 UV/vis 변화뿐만 아니라 형광 변화는 2가 수은 이온의 첨가에 의해서 야기되며, 이러한 현상을 이용하여 화합물 1을, 1분 이내의 반응시간으로 2ppm 정도까지의 검출 민감도를 가지는 우수한 수은 검출용 화학량계로 사용할 수 있음을 알 수 있다. 더 나아가, 화합물 1은 2가 수은 이온에 대해서 높은 선택성을 나타내며 다른 금속 이온들에 의해서도 간섭 현상이 야기되지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물 1이 수계 중에서 2가 수은 이온을 선택적이고 민감하게 검출해 내므로, 생물학 및 환경학적 응용면에서 넓은 활용도를 갖는 화학센서로 응용될 것이라는 점을 알 수 있다.

[0052] 실시예 1 : 화학식 1의 쿠마린 유도체 합성

[0053] 하기 반응식 2에 따라서 본 발명에 따른 화학식 1의 쿠마린 유도체를 합성하였다.

[0054] [반응식 2]



[0055]

[0056]

화합물 3은 상업적으로 구입가능하며, 화합물 2 및 화합물 4는 문헌에 공지된 방법에 따라서 합성하였다 (Wu, J. S.; Liu, W. M.; Zhuang, X. Q.; Wang, F.; Wang, P. F.; Tao, S. L.; Zhang, X. H.; Wu, S. K.; Lee, S. T. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 33. (b) Kim, T.-K.; Lee, D. -N.; Kim, H. -J. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4879).

[0057]

화학식 1의 쿠마린 유도체는 하기 과정에 따라서 합성하였다. 먼저, 5.0 mL의 에틸 에테르에 용해된 화합물 2의 500 mg (3.0 mmol) 용액에, 505 (6.0 mmol)의 1,3-에탄디티올 및 184 (1.5 mmol)의 보론 트리플루오라이드 에테레이트 (boron trifluoride etherate)를 적가하였다. 상기 용액을 물 및 CH_2Cl_2 로 2회 세척하였다. 무수 MgSO_4 상에서 유기층을 건조시킨 후에 여과, 증발 및 헥산으로부터 재결정화 과정을 거쳐서 250 mg의 화합물 1을 제조하였다 (황색 고체, 수득률 38%). 융점: 116 ~ 118 . $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): d 7.91 (s, 1H, ArH), 7.28 (s, 1H, ArH), 6.59-6.55 (dd, 1H, ArH, $J = 2.53$ Hz), 6.49-6.48 (d, 1H, ArH, $J = 2.49$ Hz), 5.73 (s, 1H, CH), 3.44-3.37 (q, 4H, CH_2CH_3), 3.32 (s, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1.22-1.17 (t, 6H, CH_2CH_3 , $J = 7.05$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 155.4, 139.3, 129.2, 121.7, 109.0, 97.2, 50.5, 45.0, 39.1, 12.6 ppm. FAB MS m/z (M^+): calcd, 321.09; found, 322.39. IR = 2969, 2926, 2356, 1706, 1606, 1528, 1421, 1363, 1271, 1235, 1185, 1135, 792 cm^{-1} .

[0058]

실시예 2: 인간 혈장 샘플의 제조

[0059]

혈장 제단백 (deproteinization)을 위해서, 혈장을 함유하고 있는 튜브에 10% 술포살리실산을 첨가하였다. 이어서, 튜브를 2 ~ 8 에서 15분 동안 원심분리하고, 분리된 제단백 혈장을 즉시 사용하였다.

[0060]

실험예 1 : 형광 분석

[0061]

형광 스펙트럼은 RF-5301PC 스펙트로플루오로포토미터를 이용하여 측정하였다. 염화금속염의 저장용액 (stock solution) (1.00mM)을 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (7:3, v/v)에 용해시켜 제조하였다. 화합물 1의 저장용액 (10mM) 또한 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (7:3, v/v)에 용해시켜 준비하였다. 모든 여기 슬릿 및 방출 슬릿의 폭은 3 nm로 하였으며, 393nm 파장으로 여기시켰다. 적정 실험들은 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (7:3, v/v) 중의 화합물 (1) 2.0 μM 용액 및 다양한 농도의 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (7:3, v/v) 중의 염화금속염으로 수행하였다. MeOH 용액들의 농도는 전체 부피를 4.0 mL로 고정시키고 변화시켰다. 혼합물을 교반한 이후에, 481 nm에서 형광 발산을 측정하였다.

[0062]

실험예 2: 형광 현미경 이미지

[0063]

화합물 1을 DMSO 중에 용해시켜서 10 mM 저장 용액을 제조하였으며, 이를 50 mM HEPES 완충용액 (pH 7.4)을 이용하여 최소 30 μM 농도의 화합물 1 용액까지 희석시켰다. 생물학적으로 활성을 가지는 전이 및 중금속 이온들 (각각 100 당량; Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+})을 화합물 1의 용액들에 첨가하였다. 형광 현미경 이미지들을 Olympus DP71 카메라가 구비된 Olympus IX71을 사용하여 얻었다.

도면의 간단한 설명

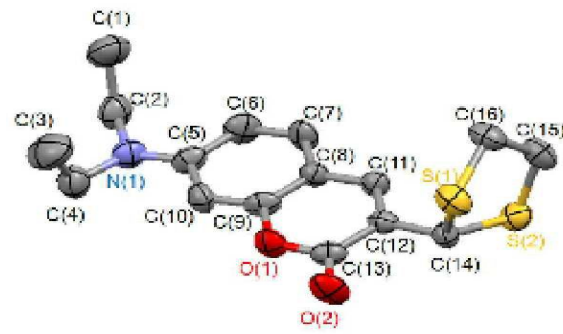
[0064]

도 1은 본 발명에 따라서 제조된 화학식 1을 갖는 화합물의 분자 구조에 대한 모식도이다.

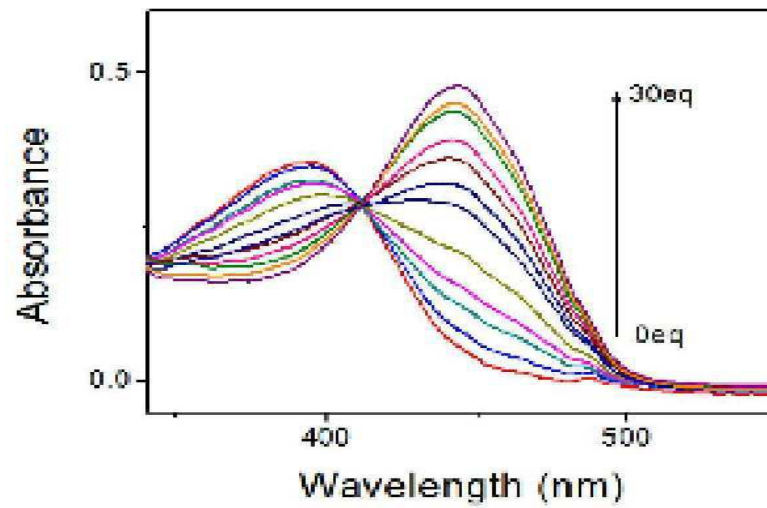
- [0065] 도 2는 30:70 MeOH:H₂O 용액 중의 다양한 농도의 Hg²⁺ 이온 농도에 대한 화합물 1 (10.0 μM)의 흡수 스펙트럼이다.
- [0066] 도 3은 화학식 1의 화합물 (10.0 μM)이 30:70 MeOH/H₂O 중의 Hg²⁺ (30 당량)로 처리된 경우에, 시간에 따른 흡수 강도 변화를 나타낸 그래프이다.
- [0067] 도 4a는 30:70 MeOH/H₂O 중의 화학식 1의 화합물 (10.0 μM)에 Li⁺, Na⁺, K⁺, Ag⁺, Cs⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Sr²⁺, Cd²⁺, Ba²⁺, Hg²⁺, 및 Pb²⁺ (각각 50 당량)를 첨가한 경우의 흡수 스펙트럼이고, 도 4b는 화학식 1의 화합물 (적색선), 화학식 2의 화합물 (흑색선) 및 화학식 1의 화합물 + 30 당량의 Hg²⁺ (청색선)에 대한 정규화된 흡수 스펙트럼이다.
- [0068] 도 5는 30:70 MeOH/H₂O 중에서 (50 mM HEPES pH 7.4), 다양한 금속들 (각각 100 당량, 단 Hg²⁺의 경우는 10 당량)의 첨가에 따른 화학식 1의 화합물 (2.0 μM)의 형광 스펙트럼 변화를 그래프로 나타낸 것이다 (발광 파장 (em): 481nm 및 여기 파장 (ex): 393 nm).
- [0069] 도 6은 경쟁적 금속 이온 선택성 측정 결과를 나타낸 그래프로써, 30:70 MeOH/H₂O 중의 (50 mM HEPES pH 7.4) 다양한 금속 이온들 (100 당량) 및 Hg²⁺ 이온 (10 당량)을 단계별로 첨가한 후에 화합물 1 (2.0 μM)의 형광 스펙트럼 변화를 나타낸 것이다 (여기 파장: 393 nm, F₀: 481 nm에서 화합물 1의 단독 형광 강도).
- [0070] 도 7은 30:70 MeOH/H₂O 중의 (50 mM HEPES pH 7.4) 다양한 금속들 (각각 100 당량, 단 Hg²⁺의 경우는 10 당량)에 대한 화합물 1 (2.0 μM)의 선택성을 도시한 그래프이다 (F₀: 발광 파장 481 nm (여기 파장 393 nm)에서 화합물 1의 초기 형광 강도, F: 각각의 금속 첨가 이후의 형광 강도).
- [0071] 도 8은 화합물 1이 담겨진 시약병 및 화합물 1 + Hg²⁺ 이온이 담겨진 시약병에 대한 사진으로서, 2가지 종류의 시약이 육안으로 식별될 정도로 다른 색상을 갖는다는 사실을 알 수 있다.
- [0072] 도 9는 다양한 금속들 (각각 100 당량) 존재 하에서, 본 발명에 따른 화합물 (30 μM, 50 mM HEPES pH 7.4)의 2가 수은 이온 결합에 따른 형광 방출 감소를 형광 현미경을 사용해서 측정한 결과를 색상표로 나타낸 것이다 (여기 파장 밴드: 330 ~ 385nm, 방출 파장: 400nm, 스케일 바: 50).
- [0073] 도 10은 30:70 메탄올:물 (50mM HEPES, pH 7.4) 중의 화합물 1 (2.0 μM)의 수은 이온 선택성을 도시한 그래프이다 (여기 파장: 393nm 및 발광 파장: 481 nm).
- [0074] 도 11은 화합물 1이 담겨진 시약병 및 화합물 1 + Hg²⁺ 이온이 담겨진 시약병의 형광 방출을 비교하기 위한 사진으로서, 2가지 종류의 시약이 육안으로 식별될 정도로 다른 강도의 형광을 방출한다는 사실을 알 수 있다.
- [0075] 도 12a 및 12b는 각각 50:50 MeOH/H₂O 중의 5.0% 인간 혈장 중에 2가 수은 이온이 존재하는 경우 (적색선, 각각 300 당량) 및 부존재하는 경우 (흑색선)에 화합물 1 (10.0 및 2.0 μM)에 대한 흡수 스펙트럼 (도 12a) 및 형광 스펙트럼 (도 12b)을 도시한 그래프이다.
- [0076] 도 13은 Hg²⁺의 첨가에 따른 화합물 1의 ¹H-NMR 스펙트럼 변화를 나타낸 데이터이다. 도 13에서, (A)는 화합물 2만 존재하는 경우, (B)는 화합물 1 및 3.0 당량의 2가 수은 이온이 존재하는 경우, (C)는 화합물 1만 존재하는 경우이다 (화합물 1의 농도: 50:50 CD₃CN:D₂O 중의 5mM).
- [0077] 도 14는 화합물 1 (흑색선), 화합물 1 + 30 당량의 2가 수은 이온 (녹색선) 및 화합물 1 + 30 당량의 2가 수은 이온 + 1000 당량의 EDTA (적색선) 각각에 대한 흡수 스펙트럼을 도시한 그래프이다.

도면

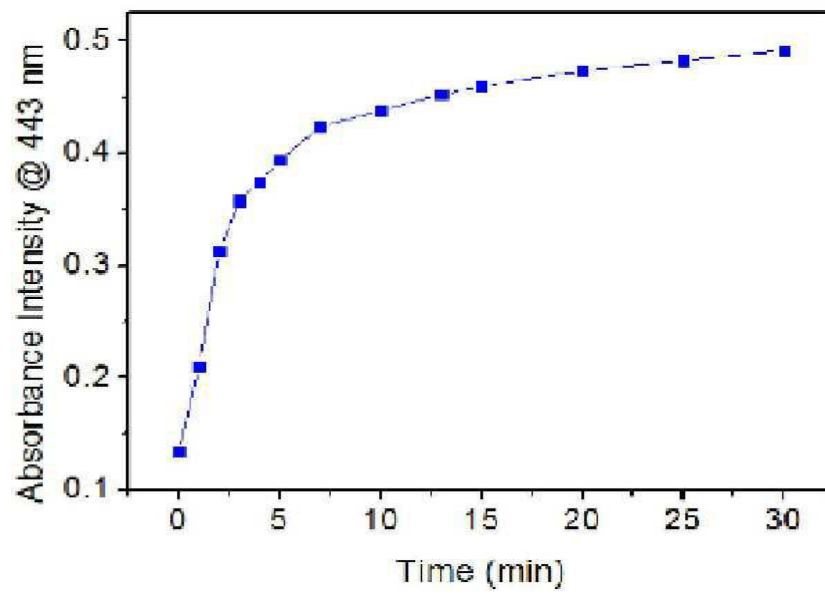
도면1



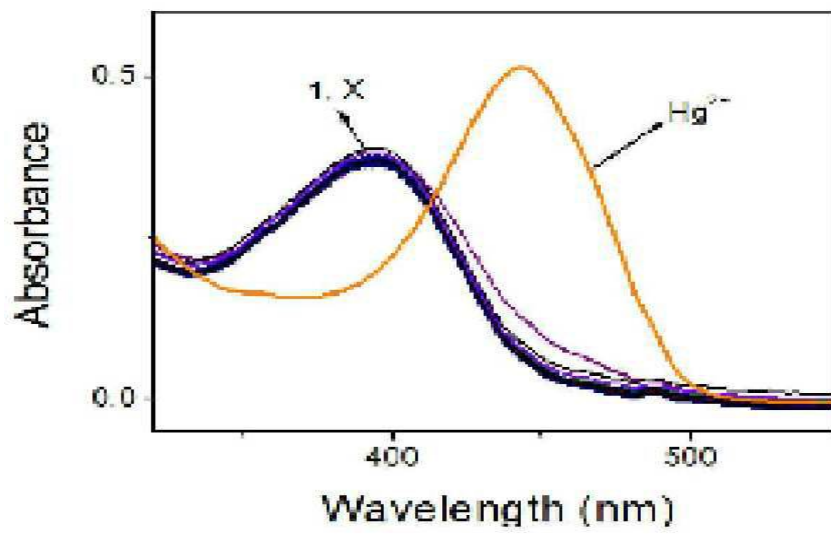
도면2



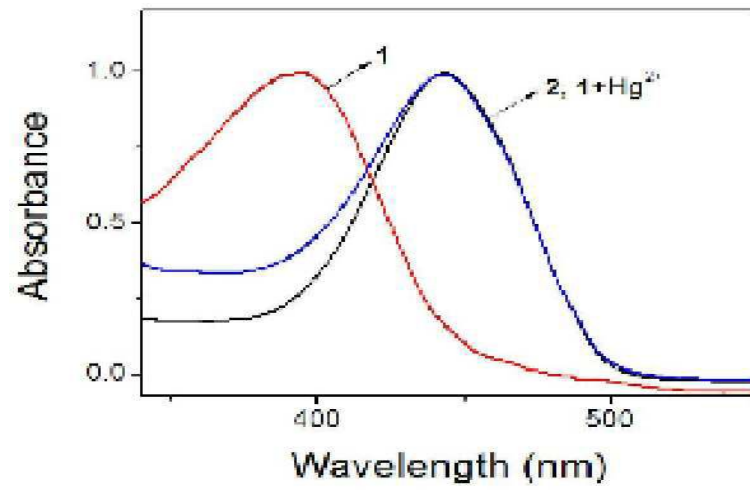
도면3



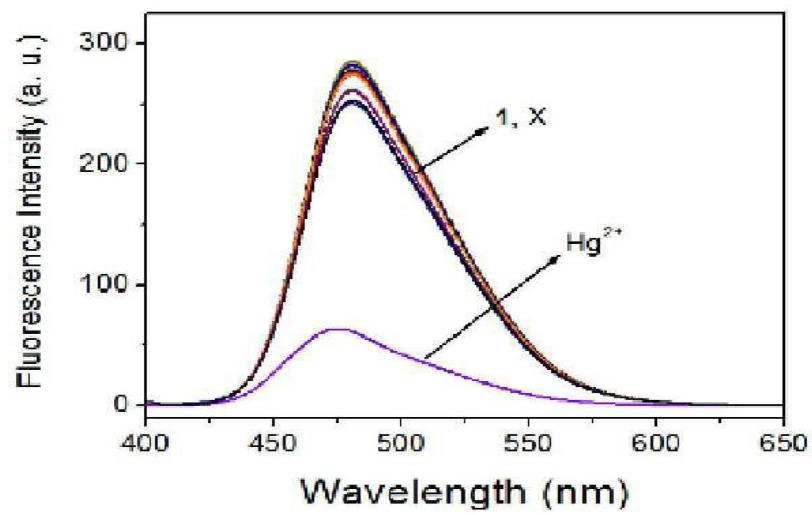
도면4a



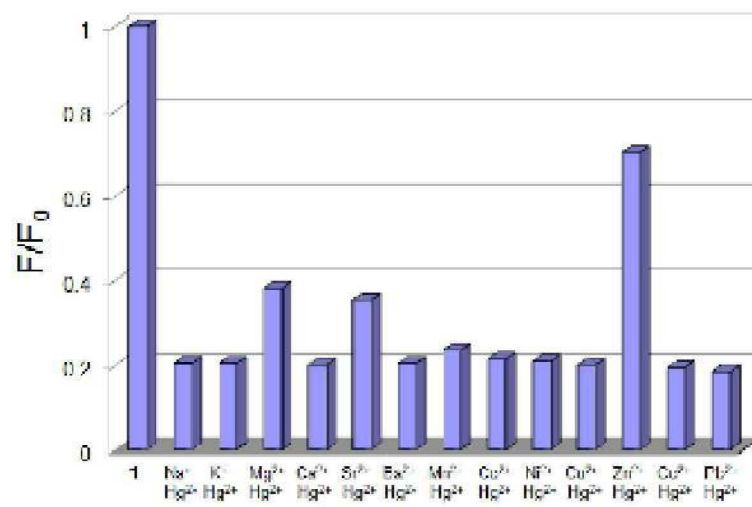
도면4b



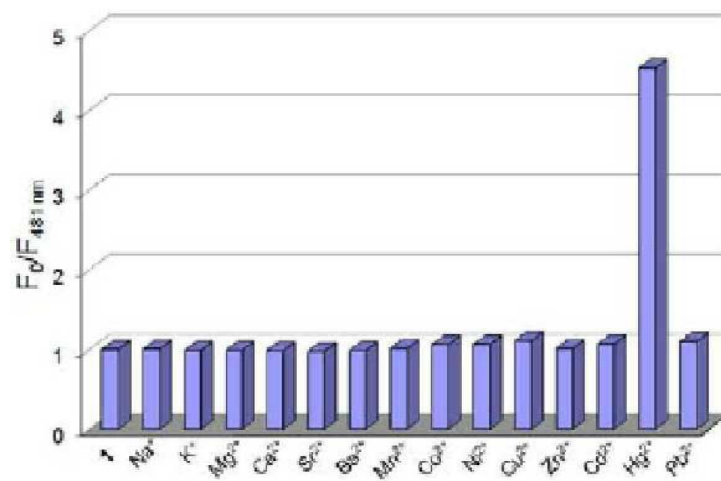
도면5



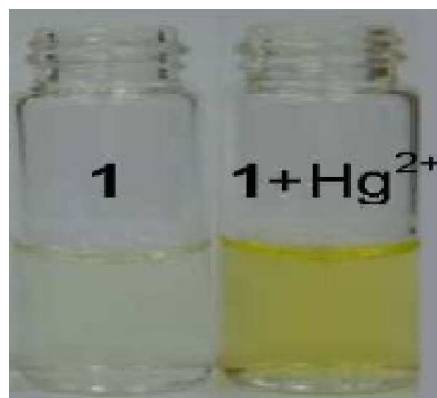
도면6



도면7



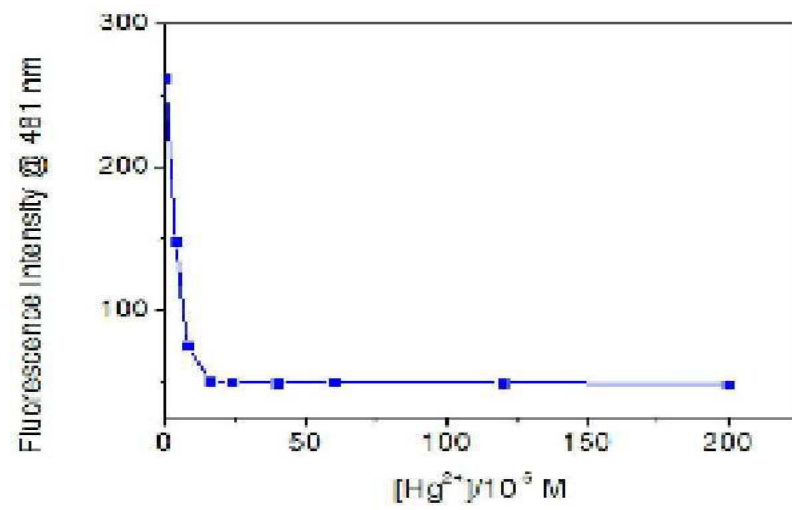
도면8



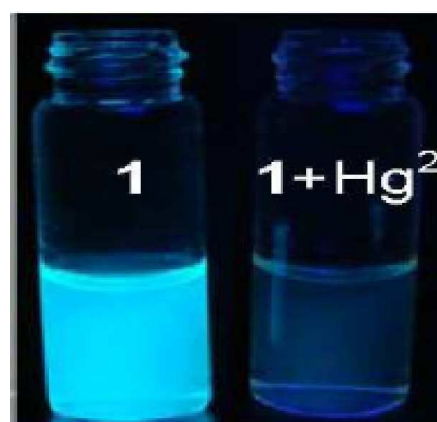
도면9

Host	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺
Ca ²⁺	Sr ²⁺	Ba ²⁺	Mn ²⁺
Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
Pd ²⁺	Ag ⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺

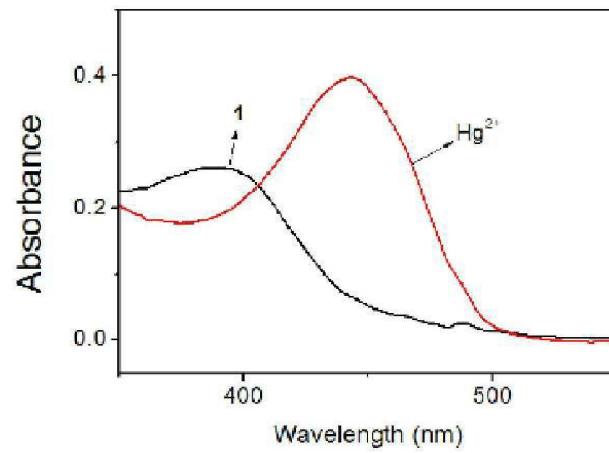
도면10



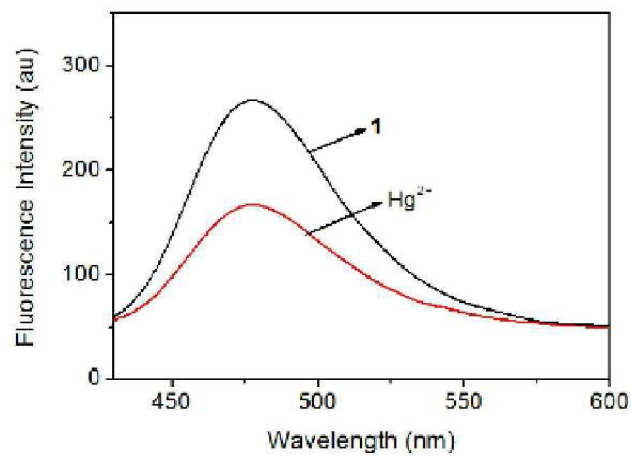
도면11



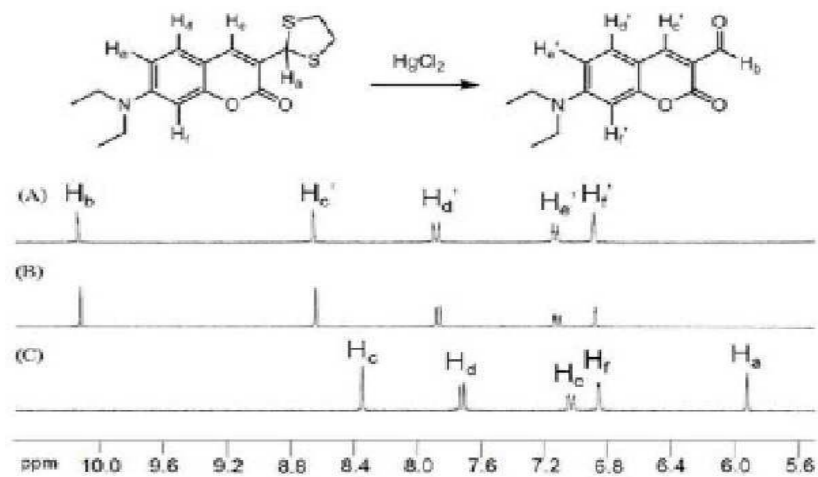
도면12a



도면12b



도면13



도면14

