



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월23일
(11) 등록번호 10-2513508
(24) 등록일자 2023년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09B 49/00 (2006.01) C09B 57/00 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) G01N 27/416 (2006.01)
G01N 33/84 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C09B 49/00 (2013.01)
C09B 57/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0003690
(22) 출원일자 2018년01월11일
심사청구일자 2020년10월21일
(65) 공개번호 10-2018-0083806
(43) 공개일자 2018년07월23일
(30) 우선권주장
1020170006461 2017년01월13일 대한민국(KR)

(73) 특허권자
에스에프씨 주식회사
충청북도 청주시 청원구 오창읍 과학산업5로 89
(72) 발명자
황문찬
경상남도 창원시 의창구 도계로 135, 105동 601호
(명서동, 두산위브아파트)
제중태
충청북도 청주시 상당구 중흥로 71, 106동 801호
(용암동, 건영아파트)
(74) 대리인
김형민

(56) 선행기술조사문헌
KR1020120028914 A*
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 10 항

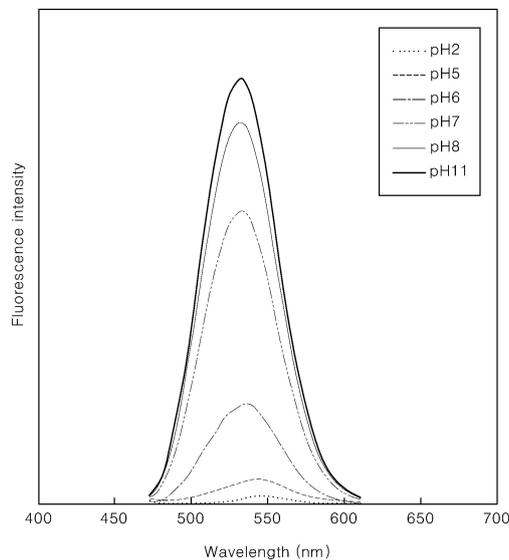
심사관 : 조호정

(54) 발명의 명칭 pH 검출용 염료 화합물, 이를 이용한 필름 및 키트

(57) 요약

본 발명은 술폰닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물; 및 상기 아릴 화합물의 술폰닐기(-SO₂)와 공유결합된 아가로스(agarose) 화합물을 포함하는 pH 검출용 염료 화합물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 21/6486 (2013.01)

G01N 27/4165 (2013.01)

G01N 33/84 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160079743 A*

US20130005583 A1*

WO2009118271 A1*

A.Mills et al, Analyst, 2016,141, pp.999-,
"Highly CO2 sensitive extruded fluorescent
plastic indicator film based on HPTS"*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

술포닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물; 및

하이드록시기 및 알콕시기로부터 선택되는 적어도 하나를 가지며,

상기 아릴 화합물의 술포닐기(-SO₂)와 공유결합된 아가로스(agarose) 화합물;

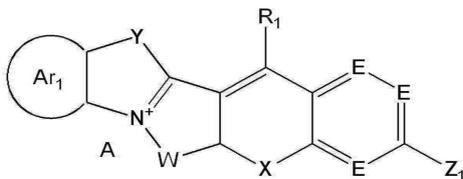
을 포함하며,

상기 술포닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물은 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖는 아릴 화합물로부터 유래되고, 상기 Ra는 음이온, 수소 또는 치환기이고,

상기 아릴 화합물과 상기 아가로스 화합물은 상기 아릴 화합물의 술포닐기에 포함된 황과 상기 아가로스 화합물의 하이드록시기 또는 알콕시기의 산소가 공유 결합하여 형성된 술포네이트(-SO₃)를 링커로 하고,

상기 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖는 아릴 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 pH 검출용 염료:

[화학식 2]



상기 화학식 2에서, 상기 Ar₁, Y, W, R₁, E, X 및 Z₁ 중 적어도 하나는 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖고, 상기 Ra는 음이온, 수소 또는 치환기일 수 있고,

상기 Ar₁은 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 20의 아릴이거나 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 20의 헤테로아릴이고,

상기 Ar₁은 각각 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 수소, 중수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 알케닐, 치환 또는 비치환된 알키닐, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 아릴알킬, 치환 또는 비치환된 아릴옥시, 치환 또는 비치환된 아릴옥시알킬, 치환 또는 비치환된 알콕시, 치환 또는 비치환된 알콕시알킬, 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설펜산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되는 어느 하나이고,

상기 1종 이상의 치환기가 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 아릴옥시, 아릴옥시알킬, 알콕시 및 알콕시알킬 중에서 선택되는 어느 하나인 경우 1종 이상의 치환기로 더 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설펜산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되고,

E는 CR₁ 또는 N이고,

Z₁은 NR₂R₃, OR₄, SR₅ 이고,

X는 O, S, NR₈R₉, SiR₁₀R₁₁, CR₁₂R₁₃ 또는 Se이며,

Y는 CR₁₄R₁₅, NR₁₆, O, S, Se, SiR₁₇R₁₈ 또는 CR₁₉R₂₀=CR₂₁R₂₂이고,

W는 CR₂₃R₂₄, CR₂₅R₂₆=CR₂₇R₂₈, O, -[CR₂₉R₃₀-CR₃₁R₃₂]- 또는 -[CR₃₃R₃₄-O]-이며,

상기 R₂₃ 내지 R₃₄은 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 중수소, 알킬 또는 아실옥시이고, 인접한 두 개는 서로 연결되어 지환족 탄화 수소를 형성할 수 있으며,

상기 R₁ 내지 R₃ 및 이와 인접한 치환기 중에서 선택되는 두 개는 서로 연결되어 지환족 탄화수소 고리, 단일환 또는 다환의 방향족 탄화수소 고리를 형성할 수 있고, 상기 형성된 지환족, 방향족 탄화수소 고리의 탄소원자는 N, S, O, Se, Te, Po, NR₃₅, SiR₃₆R₃₇, GeR₃₈R₃₉, PR₄₀, 및 BR₄₁ 중에서 선택되는 어느 하나로 치환될 수 있으며,

상기 R₁ 내지 R₂₂ 및 R₂₉ 내지 R₄₁은 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 중수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 알케닐, 치환 또는 비치환된 알키닐, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 아릴알킬, 치환 또는 비치환된 아릴옥시, 치환 또는 비치환된 아릴옥시알킬, 치환 또는 비치환된 알콕시, 치환 또는 비치환된 알콕시알킬, 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되는 어느 하나이며,

상기 R₁ 내지 R₂₂ 및 R₂₉ 내지 R₄₁이 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 아릴옥시, 아릴옥시알킬, 알콕시 및 알콕시알킬 중에서 선택되는 어느 하나인 경우 1종 이상의 치환기로 더 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되고,

A는 유기 또는 무기 이온으로서, 음이온 또는 양이온으로 존재 또는 비존재할 수 있다.

청구항 2

술포닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물; 및

하이드록시기 및 알콕시기로부터 선택되는 적어도 하나를 가지며,

상기 아릴 화합물의 술포닐기(-SO₂)와 공유결합된 아가로스(agarose) 화합물;

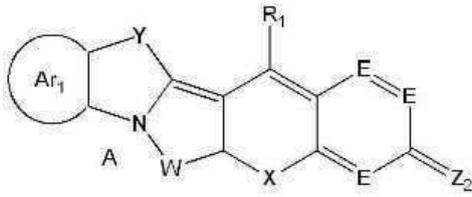
을 포함하며,

상기 술포닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물은 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖는 아릴 화합물로부터 유래되고, 상기 Ra는 음이온, 수소 또는 치환기이고,

상기 아릴 화합물과 상기 아가로스 화합물은 상기 아릴 화합물의 술포닐기에 포함된 황과 상기 아가로스 화합물의 하이드록시기 또는 알콕시기의 산소가 공유 결합하여 형성된 술포네이트(-SO₃)를 링커로 하고,

상기 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖는 아릴 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 포함하는 pH 검출용 염료:

[화학식 3]



상기 화학식 3에서, 상기 Ar₁, Y, W, R₁, E, X 및 Z₂ 중 적어도 하나가 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖고, 상기 Ra는 음이온, 수소 또는 치환기일 수 있고,

상기 Ar₁은 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 20의 아릴이거나 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 20의 헤테로아릴이고,

상기 Ar₁은 각각 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 수소, 중수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 알케닐, 치환 또는 비치환된 알키닐, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 아릴알킬, 치환 또는 비치환된 아릴옥시, 치환 또는 비치환된 아릴옥시알킬, 치환 또는 비치환된 알콕시, 치환 또는 비치환된 알콕시알킬, 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 셀레이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되는 어느 하나이고,

상기 1종 이상의 치환기가 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 아릴옥시, 아릴옥시알킬, 알콕시 및 알콕시알킬 중에서 선택되는 어느 하나인 경우 1종 이상의 치환기로 더 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 셀레이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되고,

E는 CR₁ 또는 N이고,

Z₂는 NR₆, O, S, O+R₇이고,

X는 O, S, NR₈R₉, SiR₁₀R₁₁, CR₁₂R₁₃ 또는 Se이며,

Y는 CR₁₄R₁₅, NR₁₆, O, S, Se, SiR₁₇R₁₈ 또는 CR₁₉R₂₀=CR₂₁R₂₂이고,

W는 CR₂₃R₂₄, CR₂₅R₂₆=CR₂₇R₂₈, O, -[CR₂₉R₃₀-CR₃₁R₃₂]- 또는 -[CR₃₃R₃₄-O]-이며,

상기 R₂₃ 내지 R₃₄은 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 중수소, 알킬 또는 아실옥시이고, 인접한 두 개는 서로 연결되어 치환족 탄화 수소 틀형성할 수 있으며,

상기 R₁ 내지 R₃ 및 이와 인접한 치환기 중에서 선택되는 두 개는 서로 연결되어 치환족 탄화수소 고리, 단일환 또는 다환의 방향족 탄화수소 고리를 형성할 수 있고, 상기 형성된 치환족, 방향족 탄화수소 고리의 탄소원자는 N, S, O, Se, Te, Po, NR₃₅, SiR₃₆R₃₇, GeR₃₈R₃₉, PR₄₀, 및 BR₄₁ 중에서 선택되는 어느 하나로 치환될 수 있으며,

상기 R₁ 내지 R₂₂ 및 R₂₉ 내지 R₄₁은 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 중수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 알케닐, 치환 또는 비치환된 알키닐, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 아릴알킬, 치환 또는 비치환된 아릴옥시, 치환 또는 비치환된 아릴옥시알킬, 치환 또는 비치환된 알콕시, 치환 또는 비치환된 알콕시알킬, 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 셀레이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보

닐, 아미노티오펜올, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되는 어느 하나이며,

상기 R₁ 내지 R₂₂ 및 R₂₉ 내지 R₄₁이 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 아릴옥시, 아릴옥시알킬, 알콕시 및 알콕시알킬 중에서 선택되는 어느 하나인 경우 1종 이상의 치환기로 더 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 할로겐, 시아노, 니트로, 할로겐, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술폰히드록시, 술폰닐, 술폰네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오펜올, 아미노티오펜올, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되고,

A는 유기 또는 무기 이온으로서, 음이온 또는 양이온으로 존재 또는 비존재할 수 있다.

청구항 3

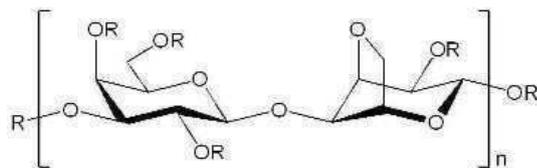
제1항에 있어서,

상기 아가로스 화합물은 하기 화학식 1의 구조이며,

상기 화학식 1에서 적어도 하나의 R이 상기 아릴 화합물의 술폰닐기(-SO₂)와 공유결합된 위치인,

pH 검출용 염료:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 n은 5 이상의 정수이다.

청구항 4

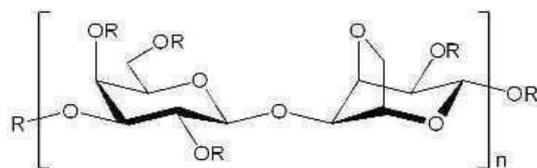
제2항에 있어서,

상기 아가로스 화합물은 하기 화학식 1의 구조이며,

상기 화학식 1에서 적어도 하나의 R이 상기 아릴 화합물의 술폰닐기(-SO₂)와 공유결합된 위치인,

pH 검출용 염료:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 n은 5 이상의 정수이다.

청구항 5

고분자 필름 상에 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 pH 검출용 염료를 포함하는 pH 검출용 필름.

청구항 6

고분자 필름 상에 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 pH 검출용 염료를 포함하는 필름; 및
 상기 pH 검출용 염료와 동일한 pH에서 상이한 파장대의 발광 특성을 나타내는 염료를 포함하는 필름;
 을 포함하는,
 pH 검출용 필름.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 pH 검출용 염료를 포함하는 pH 검출용 키트.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 pH 검출용 염료를 가열하여 용액화하는 단계; 및
 상기 용액을 플레이트(Plate)의 각 웰(well)에 떨어트린 후 겔화하는 단계;
 를 포함하는,
 염료를 플레이트(plate)에 코팅하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 pH 검출용 염료와 샘플을 접촉시키는 단계;
 상기 염료와 접촉된 상기 샘플을 배양(incubating)시켜 배양된 샘플을 형성하는 단계;
 배양된 상기 샘플에 빛을 조명하여 발광시키는 단계; 및
 상기 샘플로부터 형광 방출을 검출하는 단계;
 를 포함하는,
 샘플 내 pH 를 검출하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 pH 검출용 염료와 샘플을 접촉시키는 단계;
 상기 염료와 접촉된 상기 샘플을 배양(incubating)시켜 배양된 샘플을 형성하는 단계;
 배양된 상기 샘플에 빛을 조명하여 발광시키는 단계; 및
 상기 샘플로부터 형광 방출을 검출하는 단계;
 를 포함하는,
 샘플 내 질병을 검출하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 pH 검출용 염료 화합물, 이를 이용한 필름 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 형광은 생명 과학 분야에서 비파괴적으로 생물학적 분자를 추적 또는 분석하는데 가장 일반적으로 사용되는 기법이다. 자체 발광하거나 단백질(proteins), 핵산(nucleicacids), 지질(lipids), 작은 분자에 발광특성을 가지는 염료를 표지(labeling)하면, 광학적 추적 및 분석이 가능하다. 단순한 발광특성이나, 발광특성 변화를 이용한 영상화, 에너지 트랜스퍼, 주변 환경 변화에 따른 발광 특성변화, 화학 반응 또는 pH 변화에 따른 구조 변화에 의한 발광 특성 변화 등 다양한 화학적 광학적 특성들의 변화를 분석함으로써, 생명 과학 분야에 유용한 정보를 얻을 수 있다.

[0004] 이러한 현상 분석을 위한 장비로는 세포 관찰을 위한 형광현미경,공초점현미경, 유세포분석기, 마이크로어레이, 실시간 생체내 영상 장비, 진단 키트 및 진단 장비, 의료 영상 수술을 위한 내시경 장비 등의 진단 및 치료를 위한 장비, 최근에는 새로운 응용 분야 및 보다 정확하고 쉽게 분석 가능한 다양한 장비가 계속해서 개발되고 있다.

[0005] 세포 내(Intracellular) pH 나 시토졸(Cytosol) pH를 측정하면 세포의 기능을 확인하는데 매우 용이하며(Methods Mol Biol 637, 311 (2010); Nanotechnology 24,365 (2013)), 세포 내 pH 변화를 통해서 이온 항상성(ionic homeostasis), 반응 산소 종의 균형(reactive oxygen species balance), 아포토시스(apoptosis), 세포 주기(cell cycle), 세포 이동성(cellular mobility) 등의 세포 활동을 측정할 수 있다(Circulation 124, 1806 (2011); Yonsei Med J 6, 473 (1995); JBacteriol 185, 1190 (2003)). 또한, 세포 내 pH의 모니터링은 많은 물질대사 경로의 규명이나 질병의 진단 또는 치료에 중요한 역할을 한다.

[0006] pH 마커 또는 pH 검출 프로브(detecting probe) 등을 사용하여 세포 내 pH 등을 측정할 수 있다. 이 때, 상기 pH 마커 또는 pH 검출 프로브에 포함되는 염료 화합물로서 생물학적 시스템과 같은 중성 및 생리적인 관련 pH의 작은 변화에 대하여 고감도를 나타내고, 안정성을 갖춘 염료 화합물이 필요하다.

[0007] 또한, 소량의 샘플과 많은 수의 샘플 내의 pH 변화를 측정하기 위하여 pH 검출용 필름 또는 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)를 이용할 수 있다. 이 때, 상기 필름으로의 제조가 용이하고, pH 검출시에 상기 염료 화합물이 필름으로부터 용출되지 않는 등의 안정성을 가지고, 완충액에 대하여 내성을 갖는 염료 화합물이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상술한 기술적 배경 하에서 본 발명은 고감도의 pH 검출용 염료 화합물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 안정성을 가진 pH 검출용 염료 화합물을 포함하는 필름을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 안정적으로 염료 화합물을 플레이트(plate)에 코팅하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 샘플 내 pH 를 검출하는 방법 및 이로부터 샘플 내의 질병을 검출하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상술한 기술적 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 측면에 따르면, 술폰닐기(-SO2)를 갖는 아릴 화합물; 및 상기 아릴 화합물의 술폰닐기(-SO2)와 공유결합된 아가로스(agarose) 화합물을 포함하는 pH 검출용 염료 화합물을 제공한다.

- [0015] 또한, 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 pH 검출용 염료 화합물을 포함하는 필름을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 pH 검출용 염료 화합물을 포함하는 pH 검출용 키트를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 pH 검출용 염료 화합물을 가열하여 용액화하는 단계; 및 상기 용액을 플레이트(Plate)의 각 웰(well)에 떨어트린 후 질화하는 단계; 를 포함하는 염료 화합물을 플레이트(plate)에 코팅하는 방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 pH 검출용 염료 화합물과 샘플을 접촉시키는 단계; 상기 염료 화합물과 접촉된 상기 샘플을 배양(incubating)시켜 배양된 샘플을 형성하는 단계; 배양된 상기 샘플에 빛을 조명하여 발광시키는 단계; 및 상기 샘플로부터 형광 방출을 검출하는 단계;를 포함하는 샘플 내 pH 를 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 pH 검출용 염료 화합물은 pH 변화에 대하여 우수한 감도를 나타내어 생체 내 pH 검출에 적합하며, 완충 용액 등에 우수한 내성을 가지고 필름으로 제조시에 우수한 안정성을 나타내는 바, 이를 기반으로 본 발명에 따른 pH 검출용 염료 화합물은 이를 포함하는 pH 검출용 키트, 필름 등으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물의 pH 변화에 따른 방출 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2의 (a)는 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물의 pH 2 (좌측) 및 pH 10 (우측)에서의 형광을 나타낸 것이고, (b)는 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물의 pH 2 (좌측) 및 pH 10 (우측)에서 UV를 조사시 형광을 나타낸 것이다.
- 도 3은 실시예 1에 의해 제조된 필름의 10초마다 측정된 pH 감도를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 실시예 2에 의해 제조된 필름의 pH 변화에 따른 감도(밝기)를 나타낸 것이다.
- 도 5는 실시예 3에 의해 제조된 필름의 pH 변화에 따른 감도(밝기)를 나타낸 것이다.
- 도 6은 실시예 4에 의해 제조된 플레이트의 pH 변화에 따른 형광 세기를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 7은 실시예 4에 의해 제조된 플레이트의 pH 변화에 따른 감도(밝기)를 나타낸 것이다.
- 도 8은 실시예 5에 의해 제조된 플레이트의 pH 변화에 따른 형광 세기를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 9는 실시예 5에 의해 제조된 플레이트의 pH 변화에 따른 감도(밝기)를 나타낸 것이다.
- 도 10은 실시예 6에 의해 제조된 플레이트의 pH 변화에 따른 형광 세기를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 11은 실시예 6에 의해 제조된 플레이트의 pH 변화에 따른 감도(밝기)를 나타낸 것이다.
- 도 12는 제조예 12의 염료 화합물의 완충 용액에 대한 pH 감도(밝기)를 측정하여 나타낸 그래프이다.
- 도 13은 실시예 3에 의해 제조된 필름과 실시예 7에 의해 제조된 필름의 pH 변화에 따른 감도(밝기)를 나타낸 것이다.
- 도 14는 실시예 8에 의해 제조된 필름의 pH 변화에 따른 방출 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.
- 도 15는 실시예 8에 의해 제조된 필름의 pH 변화에 따른 감도(밝기) 및 ratio를 나타낸 것이다. 534는 534nm에서의 pH 변화에 따른 형광 세기이며, 600은 600nm에서의 pH 변화에 따른 형광세기이며, ratio는 534nm에서의 pH 변화에 따른 형광 세기/600nm에서의 pH 변화에 따른 형광세기로 계산된 값을 나타냄.
- 도 16은 실시예 8에 의해 제조된 필름의 pH 변화에 따른 감도(밝기) 및 ratio를 나타낸 것이다. 534는 534nm에서의 pH 변화에 따른 형광 세기이며, 650은 650nm에서의 pH 변화에 따른 형광세기이며, ratio는 534nm에서의 pH 변화에 따른 형광 세기/650nm에서의 pH 변화에 따른 형광세기로 계산된 값을 나타냄.
- 도 17은 실시예 8에 의해 제조된 필름의 pH 변화에 따른 감도(밝기) 및 ratio를 나타낸 것이다. 534는 534nm에서의 pH 변화에 따른 형광 세기이며, 700은 700nm에서의 pH 변화에 따른 형광세기이며, ratio는 534nm에서의 pH 변화에 따른 형광 세기/700nm에서의 pH 변화에 따른 형광세기로 계산된 값을 나타냄.

도 18은 실시예 8에 의해 제조된 필름의 pH 변화에 따른 감도(밝기) 및 ratio를 나타낸 것이다. 534는 534nm에서의 pH 변화에 따른 형광 세기이며, 750은 750nm에서의 pH 변화에 따른 형광세기이며, ratio는 534nm에서의 pH 변화에 따른 형광 세기/750nm에서의 pH 변화에 따른 형광세기로 계산된 값을 나타냄.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명을 더 쉽게 이해하기 위해 편의상 특정 용어를 본원에 정의한다. 본원에서 달리 정의하지 않는한, 본 발명에 사용된 과학 용어 및 기술 용어들은 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 수 있다.

[0024] 또한, 문맥상 특별히 지정하지 않는 한, 단수 형태의 용어는 그것의 복수 형태도 포함하는 것이며, 복수 형태의 용어는 그것의 단수 형태도 포함할 수 있다.

[0026] 염료 화합물

[0027] 본 발명의 일 측면에 따르면, 술폰닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물; 및 상기 아릴 화합물의 술폰닐기(-SO₂)와 공유결합된 아가로스(agarose) 화합물을 포함하는 pH 검출용 염료 화합물을 제공한다.

[0028] 상기 pH 검출용 염료 화합물은 술폰닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물 의 황이아가로스의 하이드록시기 또는 알콕시기의 산소와 직접 공유결합하여 형성된 염료 화합물이다. 즉, 상기 pH 검출용 염료 화합물은 술폰네이트기(-SO₃⁻)를 링커(linker)로 하여 상기 아릴 화합물과 아가로스(agarose) 화합물이 직접 공유결합되어 있는 화합물로서, pH 변화에 대하여 매우 높은 감도를 나타낼 수 있다.

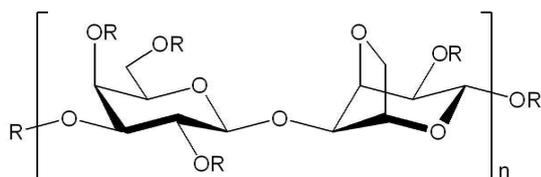
[0029] 상기 술폰닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물은 술폰네이트(-SO₃Ra)기를 갖는 아릴 화합물로부터 유래되고, 상기 Ra는 음이온, 수소 또는 치환기일 수 있다. 구체적으로, 상기 치환기는 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술폰히드록시, 술폰닐, 술폰네이트, 셀레이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설펜산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜, 치환된 알킬, 치환된 아릴 및 4차 암모늄 중에서 선택된 하나일 수 있다.

[0030] 상기 아릴 화합물은 상기 술폰닐기(-SO₂)를 1개 내지 3개 가질 수 있으며, 각각의 술폰닐기(-SO₂)는 아가로스와의 공유결합을 할 수 있다.

[0031] 술폰네이트기(-SO₃⁻)는 반응시 불안정한 작용기이나, 상기 염료 화합물의 아가로스와의 직접 공유 결합하여 안정적인 구조를 형성할 수 있다. 이에 따라, 상기 염료 화합물은 pH 검출용 센서로 유용하게 활용할 수 있다.

[0032] 상기 아가로스(agarose) 화합물은 D-갈락토스(D-galactose) 및 3,6-안하이드로-L-갈락토피라노스(3,6-anhydro-L-galactopyranose)가 교대로 α-1,3- 및 β-1,4-글리코시드 결합해 있는 선형의 폴리머로 하기 화학식 1의 구조를 가질 수 있다. 하기 화학식 1에서 적어도 하나의 R이 상기 아릴 화합물의 술폰닐기(-SO₂)와 공유결합된 위치일 수 있다.

[0034] [화학식 1]



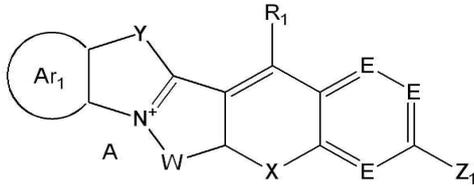
[0035] 상기 화학식 1에서 n은 5 이상의 정수일 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, n은 5이상 100만이하일 수 있다. 또는 80만 이하일 수 있다.

[0038] 상기 아가로스 화합물은 화학적으로 매우 안정하며, 독성이 없어 취급 등이 용이하며 세포를 변형시키지 않는 이점이 있다. 특히 상기 아가로스 화합물은 수용성으로 수용액에 대하여 매우 안정적이다. 상기 아가로스 화합물은 상기 아릴 화합물에 포함된 술폰닐기(-SO₂)와 공유결합하여, 상기 염료 화합물에서 불안정한 술폰네이트기

(-SO₃⁻)를 링커로하여 상기 아릴 화합물과 결합되어 있다. 상기 염료 화합물은 수용성 환경에서 안정적인 아가로스와 상기 아릴 화합물을 직접 공유결합하여 매우 안정한 구조를 형성할 수 있다.

[0039] 상기 pH 검출용 염료 화합물에 있어서, 상기 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖는 아릴 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0041] [화학식 2]



[0042] 상기 화학식 2에서 적어도 하나가 술포네이트(-SO₃Ra)기를 가질 수 있다. 예를 들어, 화학식 2의 Ar₁, Y, W, R₁, E, X 및 Z₁ 중에서 적어도 하나가 술포네이트(-SO₃Ra)기를 가질 수 있다. 상기 Ar₁은 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 20의 아릴이거나 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 20의 헤테로아릴이다.

[0045] 상기 Ar₁은 각각 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 수소, 중수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 알케닐, 치환 또는 비치환된 알키닐, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 아릴알킬, 치환 또는 비치환된 아릴옥시, 치환 또는 비치환된 아릴옥시알킬, 치환 또는 비치환된 알콕시, 치환 또는 비치환된 알콕시알킬, 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 셀레이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되는 어느 하나이다.

[0046] 또한, 상기 1종 이상의 치환기가 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 아릴옥시, 아릴옥시알킬, 알콕시 및 알콕시알킬 중에서 선택되는 어느 하나인 경우 1종 이상의 치환기로 더 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 셀레이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택된다.

[0047] E는 CR₁ 또는 N이고, Z₁은 NR₂R₃, OR₄, SR₅ 이고, X는 O, S, NR₆R₉, SiR₁₀R₁₁, CR₁₂R₁₃ 또는 Se이며, Y는 CR₁₄R₁₅, NR₁₆, O, S, Se, SiR₁₇R₁₈ 또는 CR₁₉R₂₀=CR₂₁R₂₂이고, W는 CR₂₃R₂₄, CR₂₅R₂₆=CR₂₇R₂₈, O, -[CR₂₉R₃₀-CR₃₁R₃₂]- 또는 -[CR₃₃R₃₄-O]-이다.

[0048] 상기 R₂₃ 내지 R₃₄은 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 중수소, 알킬 또는 아실옥시이고, 인접한 두 개는 서로 연결되어 치환족 탄화 수소를 형성할 수 있다.

[0049] 상기 R₁ 내지 R₃ 및 이와 인접한 치환기 중에서 선택되는 두 개는 서로 연결되어 치환족 탄화수소 고리, 단일환 또는 다환의 방향족 탄화수소 고리를 형성할 수 있으며, 상기 형성된 치환족, 방향족 탄화수소 고리의 탄소원자는 N, S, O, Se, Te, Po, NR₃₅, SiR₃₆R₃₇, GeR₃₈R₃₉, PR₄₀, 및 BR₄₁ 중에서 선택되는 어느 하나로 치환될 수 있다.

[0050] 상기 R₁ 내지 R₂₂ 및 R₂₉ 내지 R₄₁은 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 중수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 알케닐, 치환 또는 비치환된 알키닐, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 아릴알킬, 치환 또는 비치환된 아릴옥시, 치환 또는 비치환된 아릴옥시알킬, 치환 또는 비치환된 알콕시, 치환 또는 비치환된 알콕시알킬, 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 셀레이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알

킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되는 어느 하나이다.

[0051] 상기 R₁ 내지 R₂₂ 및 R₂₉ 내지 R₄₁이 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 아릴옥시, 아릴옥시알킬, 알콕시 및 알콕시알킬 중에서 선택되는 어느 하나인 경우 1종 이상의 치환기로 더 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술폰히드록시, 술폰닐, 술폰네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설펡산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택된다.

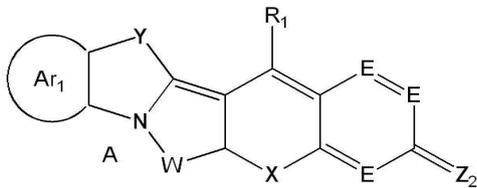
[0052] A는 유기 또는 무기 이온으로서, 특별히 제한되지 않으며, 용도에 따라 유기용제 내에서 본 발명에 따른 염료의 용해성이나, 안정성의 관점에서 적절하게 선택하면 되고, 음이온 또는 양이온으로 존재하거나, 비존재할 수 있다.

[0053] 일반적으로 포스포릭산옥플루오라이드이온, 할로젠이온, 포스포릭산이온, 과염소산이온, 과요오드산이온, 안티몬옥플루오라이드이온, 주석산 옥플루오라이드이온, 플루오로보릭산이온, 사플루오르이온 등과 같은 무기산 음이온이 될 수도 있고, 티오시아산이온, 벤젠술폰산이온, 나프탈렌술폰산이온, p-톨루엔술폰산이온, 알킬술폰산이온, 벤젠카르복실릭산이온, 알킬카르복실릭산이온, 삼할로알킬카르복실릭산이온, 알킬술폰산이온, 삼할로알킬술폰산이온, 니코틴산이온 등과 같은 유기산 이온이 될 수도 있으며, 비스페닐디톨, 티오비스페닐킬레이트, 비스디올-α-디켄톤 등과 같은 금속화합물 이온일 수도 있다. 또한, 소듐 및 포타슘 등과 같은 금속 이온과 4차 암모늄이온일 수도 있다.

[0054] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 할로젠이온, -SO₄²⁻, -S₂O₃²⁻, -SO₃³⁻, ClO₄⁴⁻, -BF₄⁴⁻, -PF₆⁶⁻, -SbF₆⁶⁻, -BiCl₅⁵⁻, -AsF₆⁶⁻, -SbCl₆⁶⁻, -SnCl₆⁶⁻, -COO⁻, -HSO₄⁴⁻, -SO₃CH₃³⁻, Na⁺, K⁺, 4차암모늄이온, 아세테이트, 프로피오네이트 및 사이아네이트 중에서 선택되는 1종 이상 일수 있으며, 양이온과 치환된 음이온의 수에 따라서 A는 존재 또는 비존재할수있다.

[0055] 또한, 상기 pH 검출용 염료 화합물에 있어서, 상기 술폰네이트(-SO₃Ra)기를 갖는 아릴 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0057] [화학식 3]



[0058] [0060] 상기 화학식 3에서 적어도 하나가 술폰네이트(-SO₃Ra)기를 가질 수 있다. 예를 들어, 화학식 3의 Ar₁, Y, W, R₁, E, X 및 Z₁ 중에서 적어도 하나가 술폰네이트(-SO₃Ra)기를 가질 수 있다. 상기 Ar₁은 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 20의 아릴이거나 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 20의 헤테로아릴이다.

[0061] 상기 Ar₁은 각각 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 수소, 중수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 알케닐, 치환 또는 비치환된 알키닐, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 아릴알킬, 치환 또는 비치환된 아릴옥시, 치환 또는 비치환된 아릴옥시알킬, 치환 또는 비치환된 알콕시, 치환 또는 비치환된 알콕시알킬, 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술폰히드록시, 술폰닐, 술폰네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설펡산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되는 어느 하나이다.

[0062] 또한, 상기 1종 이상의 치환기가 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 아릴옥시, 아릴옥시알킬, 알콕시 및 알콕시알킬 중에서 선택되는 어느 하나인 경우 1종 이상의 치환기로 더 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술폰히드록시, 술폰닐, 술폰네이트, 설페

이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택된다.

[0063] E는 CR₁ 또는 N이고, Z₁은 NR₂R₃, OR₄, SR₅ 이고, X는 O, S, NR₈R₉, SiR₁₀R₁₁, CR₁₂R₁₃ 또는 Se이며, Y는 CR₁₄R₁₅, NR₁₆, O, S, Se, SiR₁₇R₁₈ 또는 CR₁₉R₂₀=CR₂₁R₂₂이고, W는 CR₂₃R₂₄, CR₂₅R₂₆=CR₂₇R₂₈, O, -[CR₂₉R₃₀-CR₃₁R₃₂]- 또는 -[CR₃₃R₃₄-O]- 이다.

[0064] 상기 R₂₃ 내지 R₃₄은 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 중수소, 알킬 또는 아실옥시이고, 인접한 두 개는 서로 연결되어 지환족 탄화 수소를 형성할 수 있다.

[0065] 상기 R₁ 내지 R₃ 및 이와 인접한 치환기 중에서 선택되는 두 개는 서로 연결되어 지환족 탄화수소 고리, 단일환 또는 다환의 방향족 탄화수소 고리를 형성할 수 있으며, 상기 형성된 지환족, 방향족 탄화수소 고리의 탄소원자는 N, S, O, Se, Te, Po, NR₃₅, SiR₃₆R₃₇, GeR₃₈R₃₉, PR₄₀, 및 BR₄₁ 중에서 선택되는 어느 하나로 치환될 수 있다.

[0066] 상기 R₁ 내지 R₂₂ 및 R₂₉ 내지 R₄₁은 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 중수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 알케닐, 치환 또는 비치환된 알키닐, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 아릴알킬, 치환 또는 비치환된 아릴옥시, 치환 또는 비치환된 아릴옥시알킬, 치환 또는 비치환된 알콕시, 치환 또는 비치환된 알콕시알킬, 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술폰히드록시, 술폰, 술폰네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택되는 어느 하나이다.

[0067] 상기 R₁ 내지 R₂₂ 및 R₂₉ 내지 R₄₁이 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬, 아릴옥시, 아릴옥시알킬, 알콕시 및 알콕시알킬 중에서 선택되는 어느 하나인 경우 1종 이상의 치환기로 더 치환될 수 있으며, 상기 1종 이상의 치환기는 할로젠, 시아노, 니트로, 할로젠, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술폰히드록시, 술폰, 술폰네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 설프산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택된다.

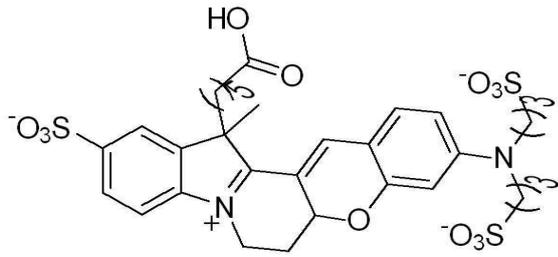
[0068] A는 유기 또는 무기 이온으로서, 특별히 제한되지 않으며, 용도에 따라 유기용제 내에서 본 발명에 따른 염료의 용해성이나, 안정성의 관점에서 적절하게 선택하면 되고, 음이온 또는 양이온으로 존재하거나, 비존재할 수 있다.

[0069] 일반적으로 포스포릭산플루오라이드이온, 할로젠이온, 포스포릭산이온, 과염소산이온, 과요오드산이온, 안티몬플루오라이드이온, 주석산 플루오라이드이온, 플루오로보릭산이온, 사플루오르이온 등과 같은 무기산 음이온이 될 수도 있고, 티오시안산이온, 벤젠술폰산이온, 나프탈렌술폰산이온, p-톨루엔술폰산이온, 알킬술폰산이온, 벤젠카르복실산이온, 알킬카르복실산이온, 삼할로알킬카르복실산이온, 알킬술폰산이온, 삼할로알킬술폰산이온, 니코틴산이온 등과 같은 유기산 이온이 될 수도 있으며, 비스페닐디올, 티오비스페놀 킬레이트, 비스디올- α -디켄톤 등과 같은 금속화합물 이온일 수도 있다. 또한, 소듐 및 포타슘 등과 같은 금속 이온과 4차암모늄이온일 수도 있다.

[0070] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 할로젠이온, -SO₄²⁻, -S₂O₃²⁻, -SO₃³⁻, ClO₄⁴⁻, -BF₄⁴⁻, -PF₆⁶⁻, -SbF₆⁶⁻, -BiCl₅⁵⁻, -AsF₆⁶⁻, -SbCl₆⁶⁻, -SnCl₆⁶⁻, -COO⁻, -HSO₄⁴⁻, -SO₃CH₃³⁻, Na⁺, K⁺, 4차암모늄이온, 아세테이트, 프로피오네이트 및 사이아네이트 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 양이온과 치환된 음이온의 수에 따라서 A⁻는 존재 또는 비존재 할 수 있다.

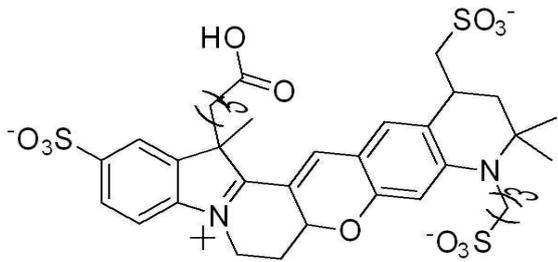
[0071] 한편, 상기 [화학식 2] 및 [화학식 3]의 염료 화합물은 표지 대상 물질과 결합할 수 있도록 반응성 치환기를 포함 할 수 있으며, 염료간의 상호작용과 염료와 다양한 표지인자 간의 원하지 않는 표지발생을 방지하기 위해서 극성과 전하를 가지는 치환기를 포함할 수 있다.

- [0072] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 의하면, 치환기 중에서 적어도 하나는 아민, 티올, 알코올, 알데하이드, 케톤 등의 치환기를 갖는 표지 대상 물질과 컨쥬게이션(conjugation)할 수 있다.
- [0073] 상기 표지 대상 물질은 생체분자, 나노입자 또는 유기화합물 등으로서, 특별히 제한되지 않지만, 항체(antibody); 항원(antigen); 지질(lipid); 단백질(protein); 펩타이드(peptide); 탄수화물(carbohydrate); 덱스트란(dextran); 지방산(fatty acid); 인지질(phospholipid); 리포다당류(lipopoly saccharide); 아미노기, 설프하이드릴기, 카르보닐기, 하이드록실기, 카르복실기, 티올기, 인산기 및 티오인산기 중에서 하나 이상을 포함하거나, 또는 포함하도록 유도화된 뉴클레오타이드(nucleotides) 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide); 아미노기, 설프하이드릴기, 카르보닐기, 하이드록실기, 카르복실기, 티올기, 포스페이트기 및 티오포스페이트기 중에서 하나 이상을 포함하거나, 또는 포함하도록 유도화된 옥시폴리핵산(oxypolynuceotide) 또는 데옥시폴리핵산(deoxypolynuceotide); 미생물; 약물; 호르몬; 세포; 세포막; 및 독소(toxins);로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느하나 이상일 수 있다.
- [0074] 구체적으로, 본 발명에 따른 반응성 치환기는 활성화에스테르(activated esters), 카르복실(carboxyl), 아마이드(amide), 아크릴아마이드(acrylamides), 아자이드(azide), 아실아자이드(acyl azides), 아실할라이드(acylhalides), 알카인(alkyne), 아민(amine), 알데하이드(aldehydes), 케톤(ketones), 알킬할라이드(alkyl halides), 알킬설포네이트(alkyl sulfonates), 아릴할라이드(aryl halides), 아지리딘(aziridines), 보로네이트(boronates), 다이아조알칸(diazoalkanes), 에폭사이드(epoxides), 할로플래티네이트(할로백금염, haloplatinate), 할로트리아진(halotriazines), 이미도에스테르(imido esters), 이소시아네이트(isocyanates), 실릴할라이드(silyl halides), 설포네이트에스테르(sulfonate esters), 설포닐할라이드(sulfonyl halides), 숙신이미딜에스테르(succinimidyl ester), 설포-숙신이미딜에스테르(sulpho-succinimidyl ester), 무수물(anhydrides), 산할로겐화물(산 할라이드, acid halides), 이소티오시아네이트(isothiocyanate), 비닐설포닐(vinylsulphone), 디클로로트리아진(dichlorotriazines), 할로아세트아미드(haloacetamides), 말레이미드(maleimides), 카르보다이이미드(carbodiimide), 포스포라미다이트(phosphoramidites), 하이드라진(hydrazines), 하이드라자이드(hydrazide) 등일 수 있고, 바람직하게는 카르복실산의 숙신이미딜에스테르, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 할로아세트아미드 등일 수 있다.
- [0075] 상기 활성화에스테르는 본 발명이 속하는 기술분야에서, 치환반응에서 우수한 이탈 그룹기인 R'을 갖는 구조식 -COR"로서, 상기 R"은 예를 들면, 숙신이미딜옥시(succinimidyloxy, -OC₄H₄O₂), 술포숙신이미딜옥시(sulfosuccinimidyloxy, -OC₄H₃O₂-SO₃H), 또는 -1-옥시벤조벤조트리아졸일(-1-oxybenzotriazolyl, -OC₆H₄N₃)이거나; 아릴옥시 또는 전자끌기 그룹에 속하는 니트로, 할로젠, 시아노, 할로겐알킬등을 1종 이상 포함하는 아릴옥시이거나; 무수물(anhydrides, -OCOR_a 또는 -OCNR_aNHR_b)을 구성하는 카르보다이이미드(carbodiimide)에 의해서 활성화된 카르복실산(carboxylic acid)일 수 있고, 상기 R_a 또는 R_b는 탄소수 1 내지 6의 알킬, 탄소수 1 내지 6의 알콕시, 시클로헥실, 3-디메틸아미노프로필, N-모폴리노에틸등이다.
- [0076] 또한, 본 발명에 따른 반응성 치환기(RX)는 다양한 링커(L)에 공유결합으로 연결되어, RX-L- 구조일 수 있다.
- [0077] 이러한 링커는 단일결합이거나, 또는 바람직하게 탄소(C), 질소(N), 산소(O) 및 황(S) 원자로 구성되는 군에서 선택된 원자가 1 내지 20개 연결된 직쇄또는 분지쇄의 사슬일 수 있고, 지방족 탄화수소 고리, 방향족 탄화수소 고리, 지방족 헤테로 고리 또는 방향족 헤테로 고리일 수도 있다. 또한, 이러한 링커는 +또는 - 전하를 가질 수 있다.
- [0078] 본 발명에 따르면, 상기 [화학식 2] 및 [화학식 3]으로 표시되는 염료 화합물은 하기 화합물 1 내지 화합물 51 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 예를 들어, 화합물 1 내지 화합물 34, 화합물 47 및 화합물 50 내지 화합물 51은 화학식 2로 표시되는 염료 화합물에 포함되고, 화합물 35 내지 화합물 46 및 화합물 48 내지 화합물 49는 화학식 3으로 표시되는 염료 화합물에 포함된다. 한편, 이에 따라 본 발명의 [화학식 2] 및 [화학식 3]의 범위가 한정되는 것은 아니다.



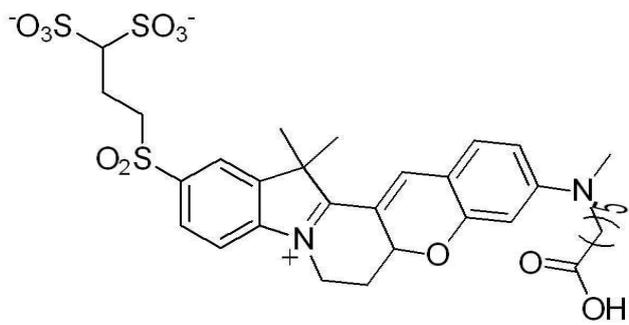
1

[0080]



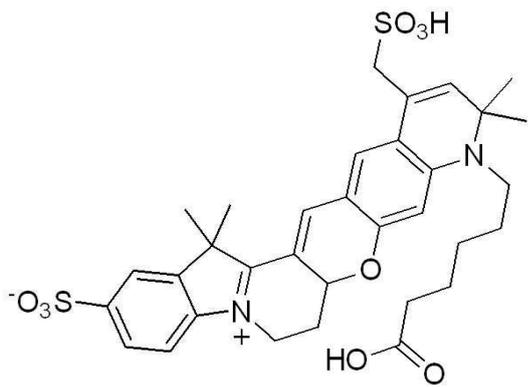
2

[0081]



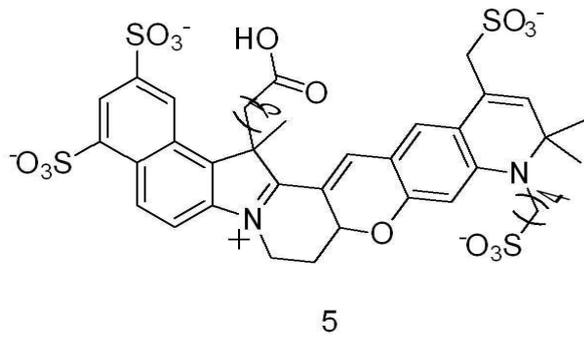
3

[0082]

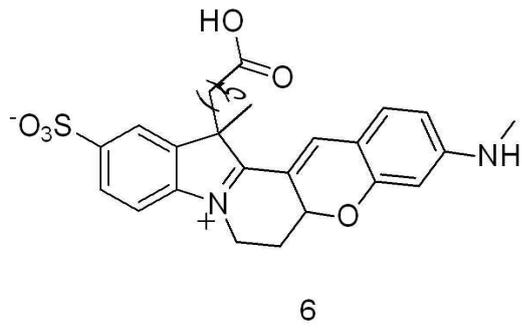


4

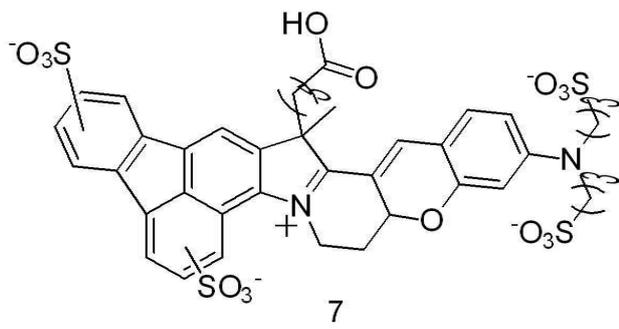
[0083]



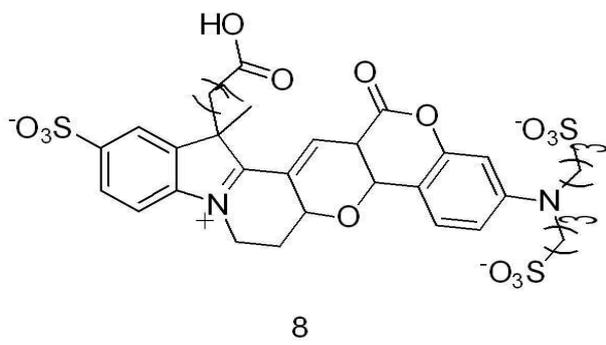
[0084]



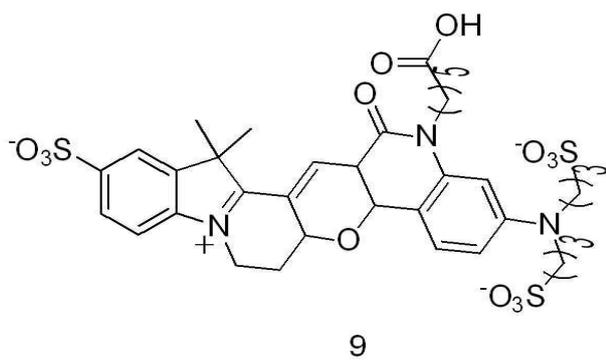
[0085]



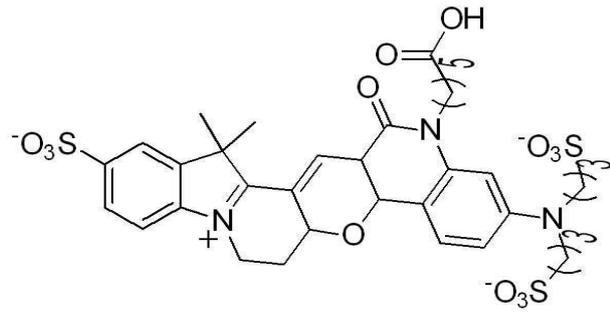
[0086]



[0087]

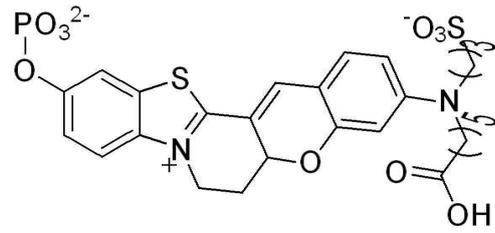


[0088]



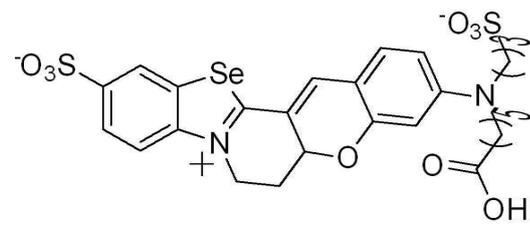
10

[0089]



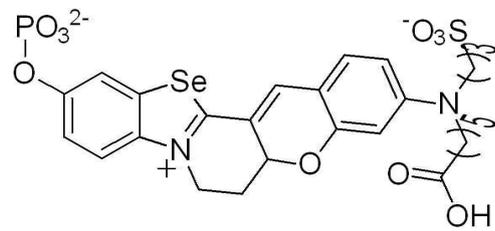
11

[0090]



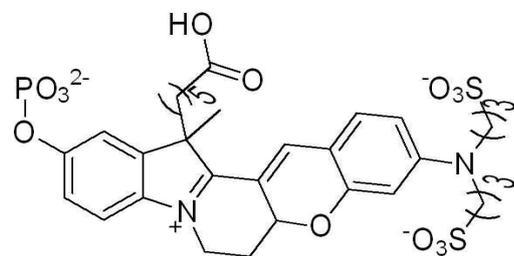
12

[0091]



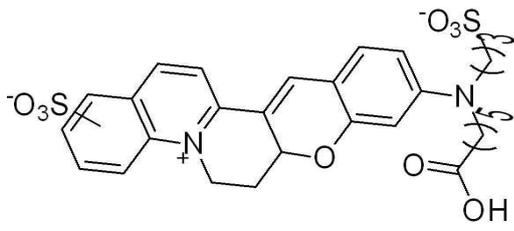
13

[0092]



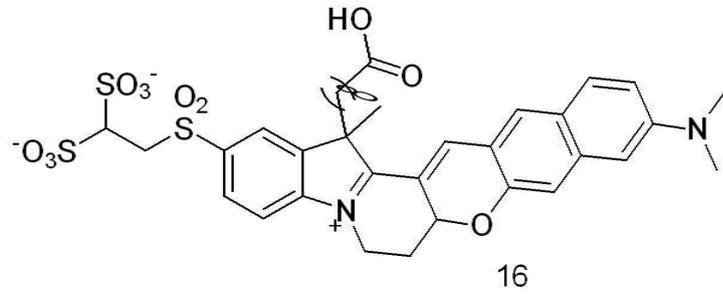
14

[0093]



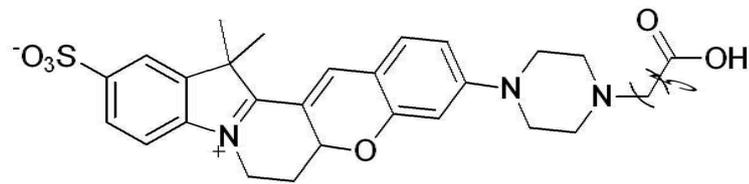
15

[0094]



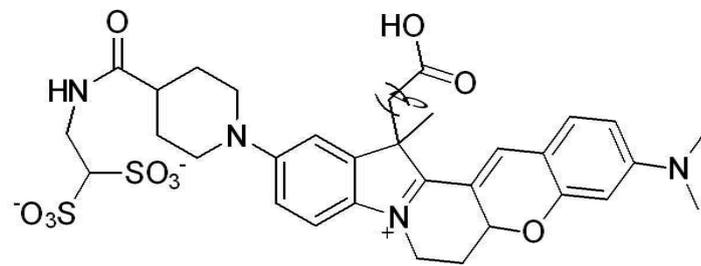
16

[0095]



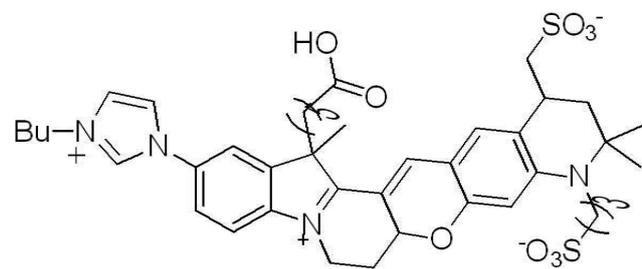
17

[0096]



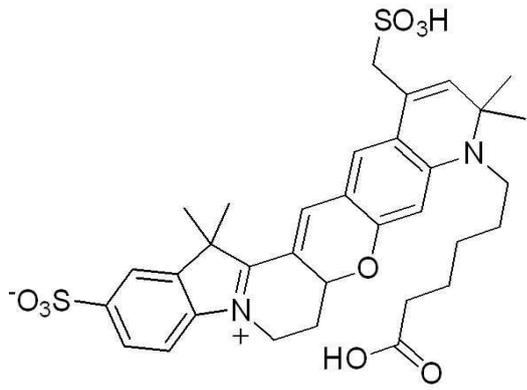
18

[0097]



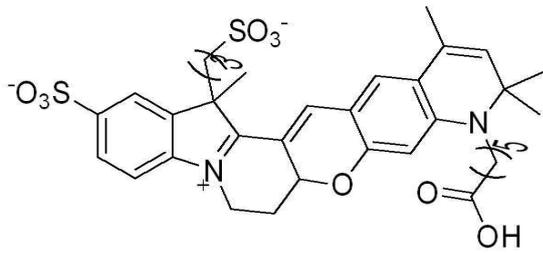
19

[0098]



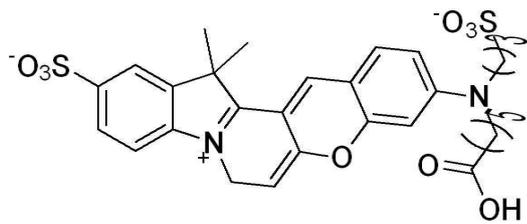
20

[0099]



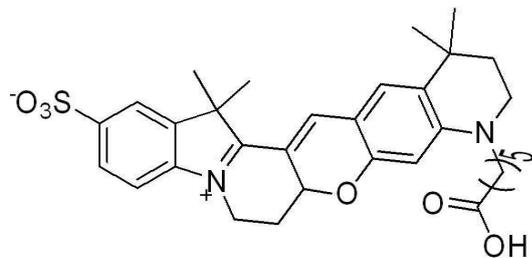
21

[0100]



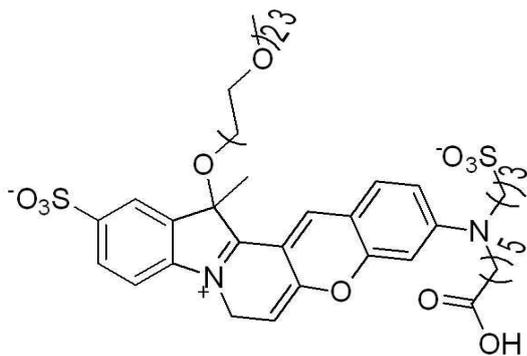
22

[0101]



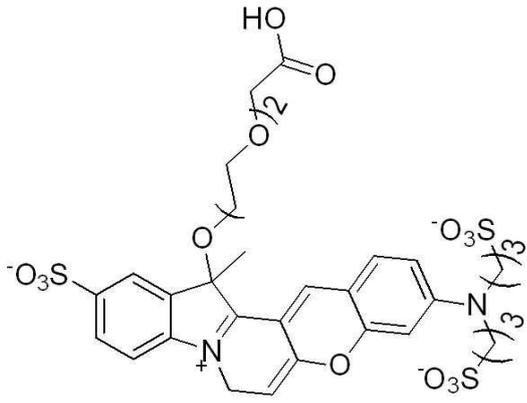
23

[0102]



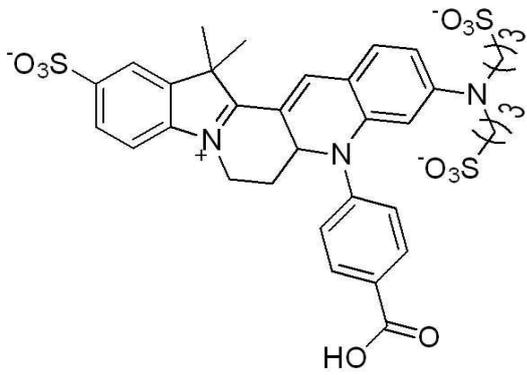
24

[0103]



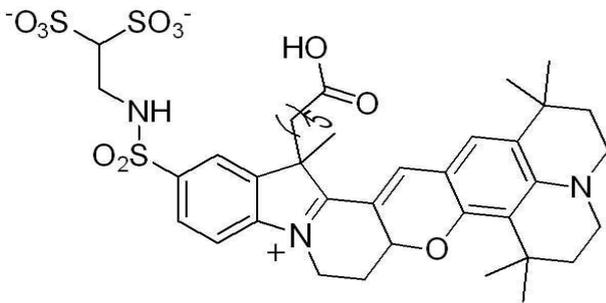
25

[0104]



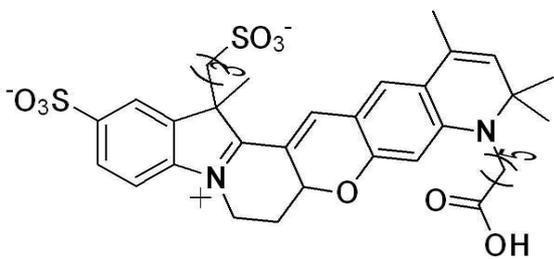
26

[0105]



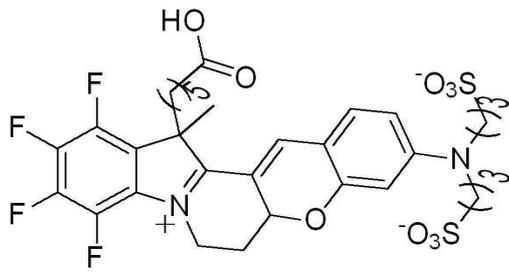
27

[0106]



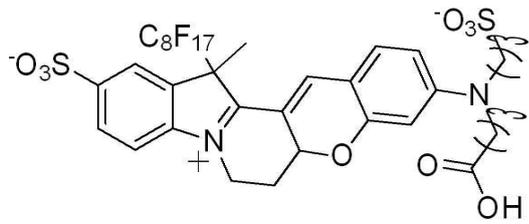
28

[0107]



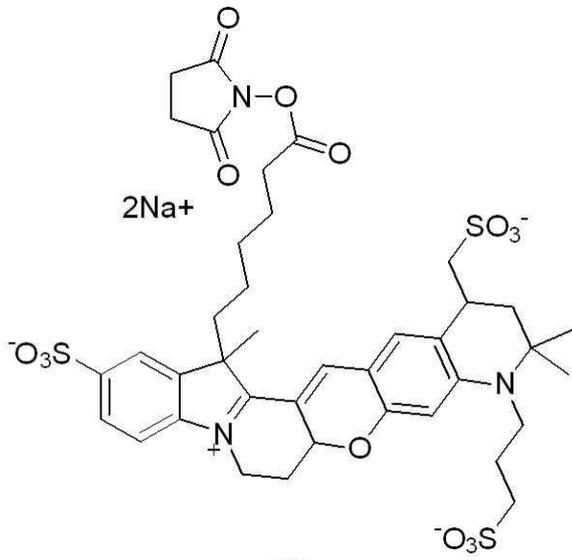
29

[0108]



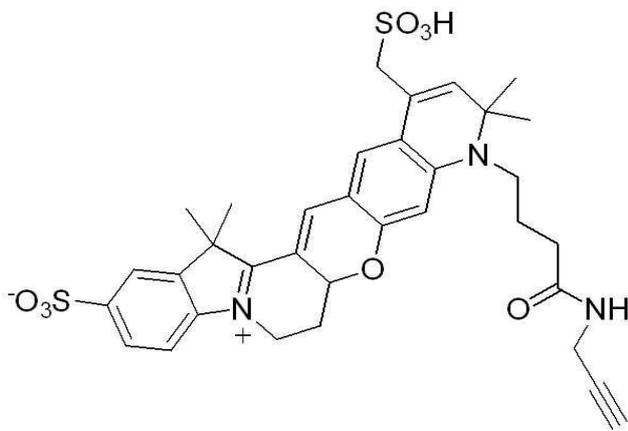
30

[0109]



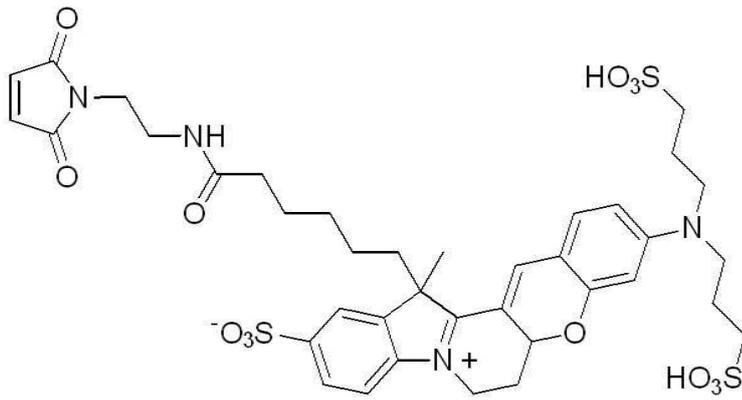
31

[0110]



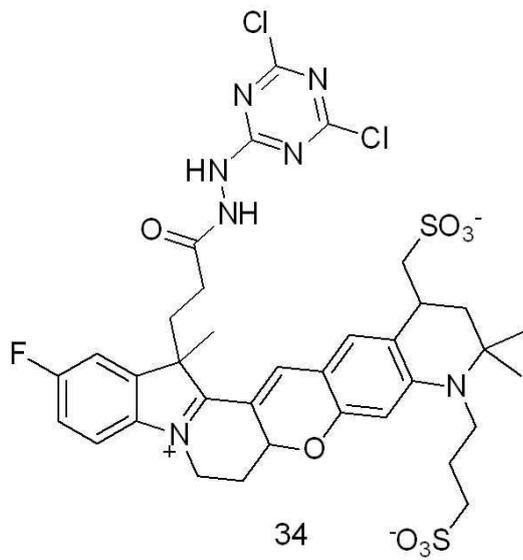
32

[0111]



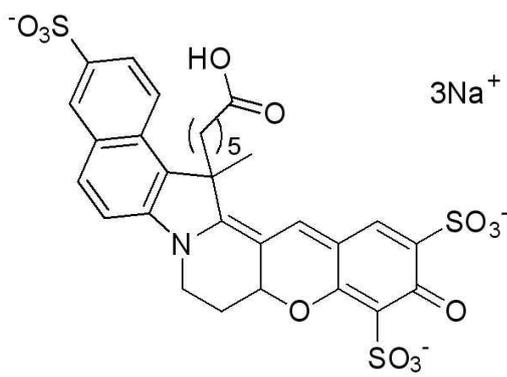
33

[0112]



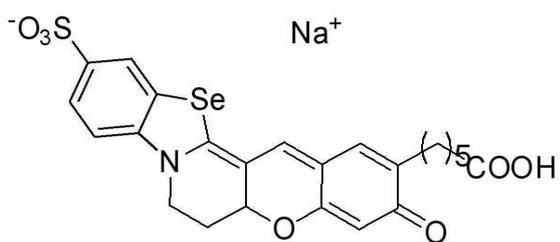
34

[0113]



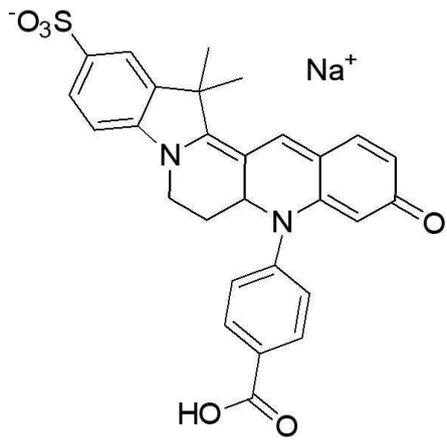
35

[0114]



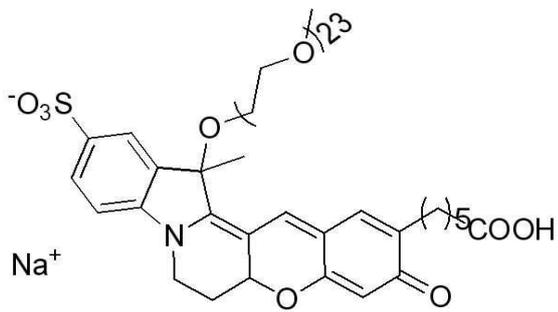
36

[0115]



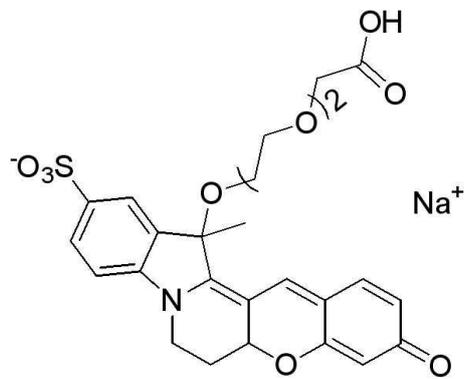
37

[0116]



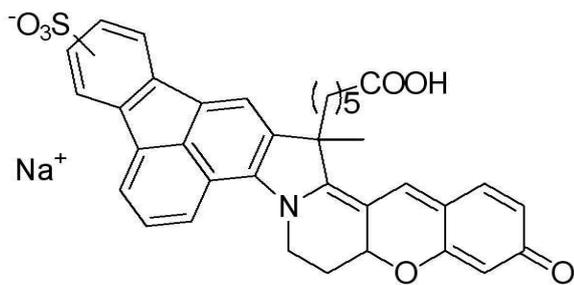
38

[0117]



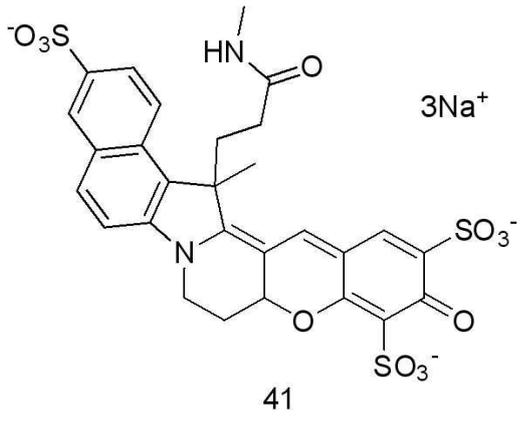
39

[0118]

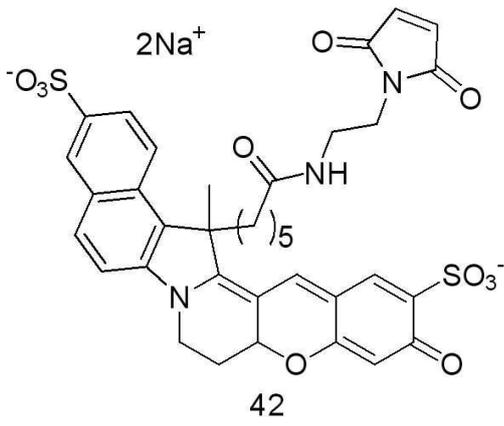


40

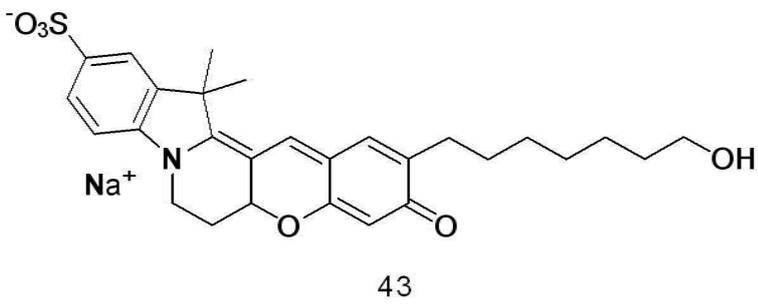
[0119]



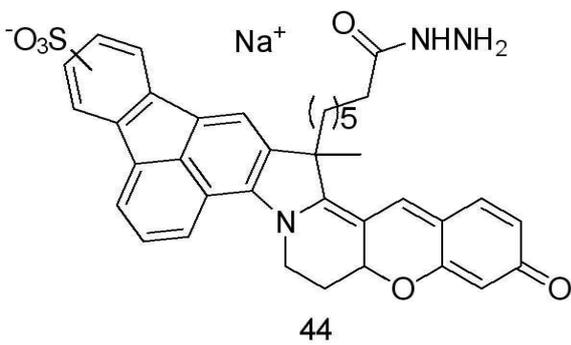
[0120]



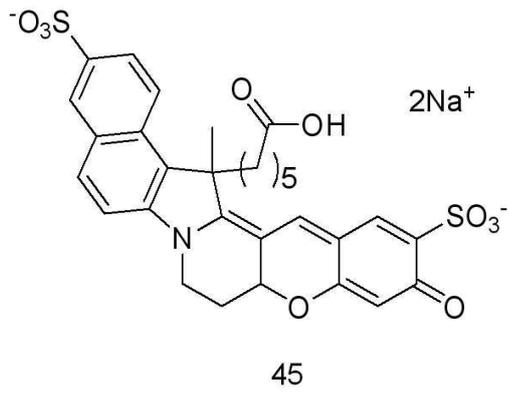
[0121]



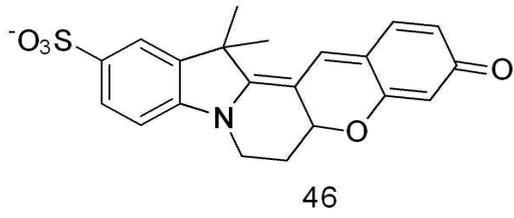
[0122]



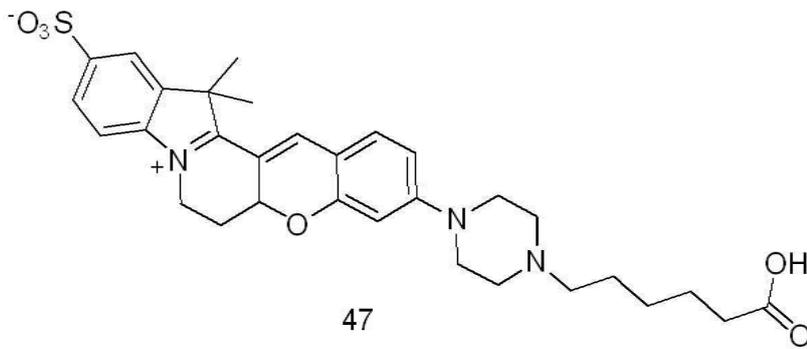
[0123]



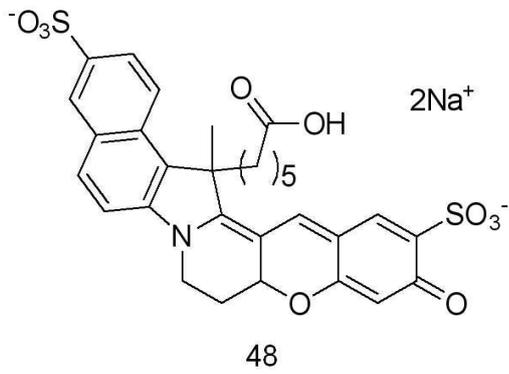
[0124]



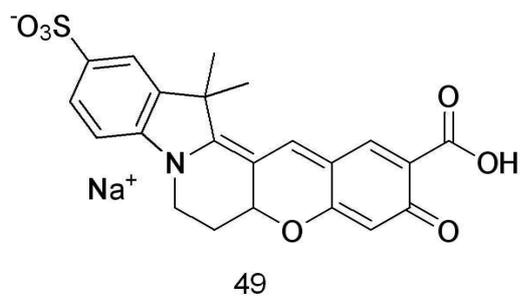
[0125]



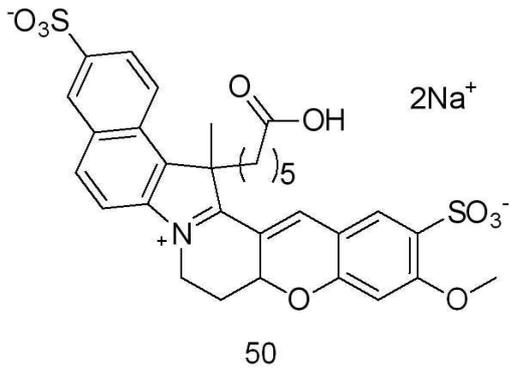
[0126]



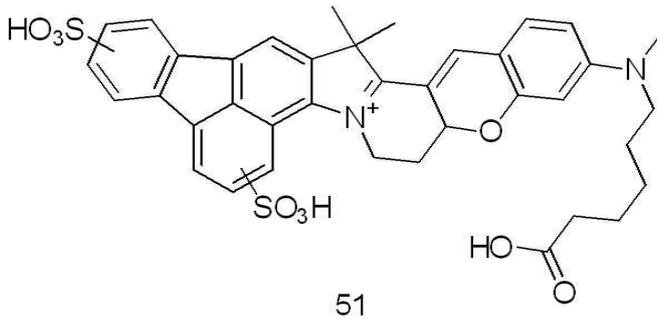
[0127]



[0128]



[0129]



[0130]

[0132] 또한, 본 발명에 따른 상기 염료 화합물은 다양한 파장의 형광으로 설계할 수 있기 때문에 사용자가 원하는 파장을 선택하여 활용할 수 있을 수 있다. 이에 따라, 좁은 밴드갭을 가진 다양한 형광 파장으로 선택적으로 설계할 수 있어, 다른 프로브(Probe)들과 형광의 파장이 겹치지 않게 할 수 있다. 따라서, 복수의 검출이 가능할 수 있다.

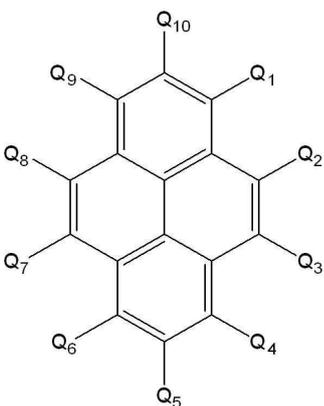
[0133] 또한, 본 발명에 따른 상기 염료 화합물은 세포 내 pH의 변화에 따라 형광의 세기가 변하는 것을 특징으로 하는 바, 이에 따라 살아있는 세포의 pH를 확인할 수 있는 pH 프로브, 나아가 이를 포함하는 세포 내 pH 측정 센서 등에 활용될 수 있다.

[0134] 특히, 본 발명에 따른 염료 화합물은 사용 목적에 따라 pH 2 내지 6사이의 산성 조건에서 강한 형광을 내는 타입으로, 또는 pH 8 내지 12사이에 염기성 조건에서 강한 형광을 내도록 선택하여 사용할 수 있어 pH 프로브로 더욱 유용하게 활용할 수 있다.

[0135] 또한, 살아 있는 세포의 염색을 통해 pH 측정하는 방법 외에, 최근에는 plate reader를 통해 세포의 pH를 측정하는 방법이 활용되고 있는데, 본 발명에 따른 염료 화합물은 이에도 적용이 가능하여 pH를 측정하고자 하는 여러 적용분야에 다양하게 이용할 수 있다.

[0136] 또한, 상기 pH 검출용 염료 화합물에 있어서, 상기 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖는 아릴 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다.

[0138] [화학식 4]



[0139]

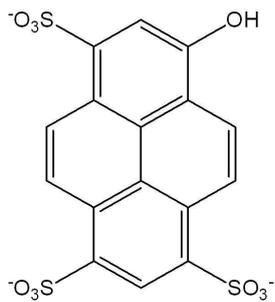
[0141] 상기 화학식 4에서, Q1 내지 Q10 중 적어도 하나가 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖고, 술포네이트(-SO₃Ra)기를 갖지 않는 Q1 내지 Q10 중 적어도 하나는 히드록시기(-OH)를 갖고, 술포네이트(-SO₃Ra)기, 히드록시기(-OH)를 갖지 않는 Q1 내지 Q10은 수소, 중수소 또는 치환기일 수 있다. 상기 치환기는 할로겐, 시아노, 니트로, 할로겐, 아민, 하이드록시, 알데하이드, 아미노, 아마이드, 히드라진, 티올, 아세탈, 케탈, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 술포히드록시, 술포닐, 술포네이트, 설페이트, 카르복실레이트, 아마이드, 아지도, 구아니디움, 카르보닐, 티오카르보닐, 아미노티오카르보닐, 카르복실, 카르복실산, 케톤, 설프하이드릴, 아실클로라이드, 실론산, 에스터, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 4차 암모늄 중에서 선택된 하나일 수 있다.

[0142] 일 예로서, 상기 화학식 4의 화합물은 3개의 술포네이트(-SO₃)기를 가질 수 있으며, 상기 술포네이트(-SO₃)중에서 술포닐기(-SO₂)의 황은 아가로스의 하이드록시기 또는 알콕시기의 산소와 직접 공유결합하여 염료 화합물을 형성할 수 있다. 즉, 상기 염료 화합물은 술포네이트기(-SO₃⁻)를 링커(linker)로 하여 상기 아릴 화합물과 아가로스(agarose) 화합물이 직접 공유결합되어 있는 화합물로서, pH 변화에 대하여 매우 높은 감도를 나타낼 수 있다.

[0143] 상기 아릴 화합물은 상기 술포닐기(-SO₂)를 1개 내지 3개 가질 수 있으며, 각각의 술포닐기(-SO₂)는 아가로스와 각각 공유결합을 할 수 있다.

[0144] 구체적인 일 예로서, 상기 화학식 4는 화학식 5의 화합물일 수 있다.

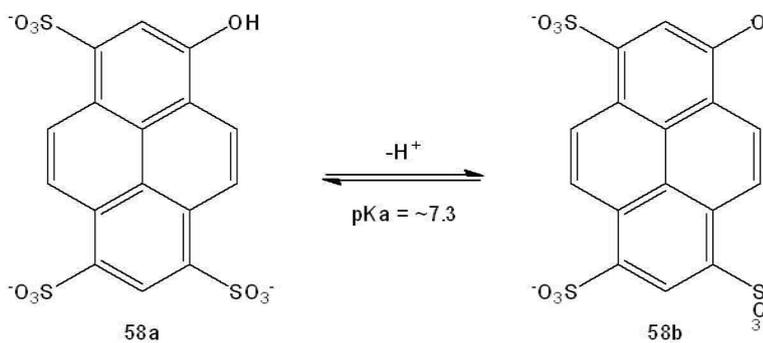
[0146] [화학식 5]



[0147] 상기 화학식 5의 화합물은 HPTS(8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt)에서 유도된 화합물일 수 있다.

[0150] 상기 화학식 5의 화합물은 pH 변화에 따라 하기 반응식 1과 같이 변화하고, 이에 따라 pH를 검출할 수 있다.

[0152] [반응식 1]



[0153] 상기 화학식 5의 화합물은 가시광선 영역에서 다양한 흡수 및 방출 스펙트럼 대역을 가진다. 상기 화학식 5의 화합물은 산성 조건에서는 수소가 결합(protonated)된 58a의 구조를 가지고, 염기성 조건에서는 수소가 분해(deprotonated)된 58b의 구조를 가질 수 있다. 이 때, 상기 58a 및 58b의 화합물은 각각 두 가지 파장 즉, 405nm와 465nm의 파장에서 각각 최대 흡수파장을 가지고 흡광도가 증가하였다가 감소하고, 514nm의 형광을 방출하는 특성을 가진다. 따라서, 상기 화학식 5의 화합물을 포함하는 염료 화합물은 pH 검출용으로 유용하다.

[0156] 또한, 상기 화학식 5와 같은 세 개 또는 네 개의 음이온 염료는 생리적인 pH 값을 갖는 생 세포 내부에서 잘 유

지되는 바, 생체 내 세포 pH 검출에 더욱 적합할 수 있다.

- [0157] 본 발명에 따른 염료 화합물을 이용하여 세포 내(Intracellular) pH 나 시토졸(Cytosol) pH를 측정하면 이온 항상성(ionic homeostasis), 반응 산소 종의 균형(reactive oxygen species balance), 아포토시스(apoptosis), 세포 주기(cell cycle), 세포 이동성(cellular mobility) 등의 세포 활동을 직/간접적으로 측정할 수 있다.
- [0158] 또한, 살아 있는 세포의 염색을 통해 pH 측정하는 방법 외에, 최근에는 plate reader를 통해 세포의 pH를 측정하는 방법이 활용되고 있는데, 본 발명에 따른 염료 화합물은 이에도 적용이 가능하여 pH를 측정하고자 하는 여러 적용분야에 다양하게 이용할 수 있다.
- [0160] **필름 및 키트**
- [0161] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 pH 검출용 염료 화합물로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 필름 및 키트를 제공한다.
- [0162] 우선, 본 발명의 필름은 전술한 pH 검출용 염료 화합물로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하여 pH 검출용 센서로서 사용할 수 있다.
- [0163] 종래 pH 검출용 염료 화합물의 경우, 물에 대한 용해도가 낮아 필름화되지 못하는 문제가 있었다. 또한, 설사 종래 pH 검출용 염료 화합물을 이용하여 필름의 형태로 제조하더라도, 분석물을 포함하는 용액에 상기 필름을 투입하는 경우, 필름 안에 포함된 염료 화합물이 필름 내에 안정적으로 있지 못하고, 밖으로 용출되어 분석물 내의 pH를 정확하게 측정하는 것이 곤란한 문제가 있었다.
- [0164] 본 발명의 필름은 전술한 pH 검출용 염료 화합물로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함한다. 구체적으로, 상기 필름은 술폰닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물; 및 상기 아릴 화합물의 술폰닐기(-SO₂)와 공유결합된 아가로스(agarose) 화합물을 포함한 화합물을 포함한다.
- [0165] 상기 술폰닐기(-SO₂)를 갖는 아릴 화합물은 술폰네이트(-SO₃Ra)기를 갖는 아릴 화합물로부터 유래되고, 상기 Ra는 음이온, 수소 또는 치환기일 수 있다. 상기 아릴 화합물은 상기 술폰닐기(-SO₂)를 1개 내지 3개 가질 수 있으며, 각각의 술폰닐기(-SO₂)는 아가로스와의 공유결합을 할 수 있다.
- [0166] 술폰네이트기(-SO₃⁻)는 반응시 불안정한 작용기이나, 상기 염료 화합물의 아가로스와의 직접 공유 결합하여 안정적인 구조를 형성할 수 있다. 이에 따라, 상기 염료 화합물은 pH 검출용 센서로 유용하게 활용할 수 있다.
- [0167] 구체적으로, 상기 아가로스 화합물은 화학적으로 매우 안정하며, 독성이 없어 취급 등이 용이하며 세포를 변형시키지 않는 이점이 있다. 특히 상기 아가로스 화합물은 수용성으로 수용액에 대하여 매우 안정적이다. 상기 아가로스 화합물은 상기 아릴 화합물에 포함된 술폰닐기(-SO₂)와 공유결합하여, 상기 염료 화합물에서 불안정한 술폰네이트기(-SO₃⁻)를 링커로하여 상기 아릴 화합물과 결합되어 있다. 상기 염료 화합물은 수용성 환경에서 안정적인 아가로스와의 공유결합을 직접 공유결합하여 매우 안정한 구조를 형성할 수 있다.
- [0168] 이에 따라, 분석물을 포함하는 용액 내의 pH를 측정하는 과정에서 상기 염료 화합물이 필름 밖으로 용출되어 나오지 않고, 상기 화합물이 갖는 pH에 대한 고감도 특성을 그대로 유지할 수 있다. 즉, 상기 필름을 이용하여 샘플의 pH를 고감도로 측정할 수 있다.
- [0169] 상기 필름은 파우더 형태의 상기 pH 검출용 염료 화합물을 용액화한 후에 겔화하고, 이를 폴리머 필름 위에 압착하여 제조할 수 있다.
- [0170] 구체적으로, 상기 필름은 파우더 형태의 상기 pH 검출용 염료 화합물을 증류수에 넣고 80 내지 100에서 가열하여 상기 염료 화합물이 완전히 녹을 때까지 교반하여 용액화한다. 그리고, 상기 용액을 원하는 틀에 담고, 상온에서 방치하여 겔화시킨다. 상기 겔을 폴리머 필름 위에 압착하고, 건조시켜 필름을 제조할 수 있다. 상기 필름은 예를 들어, 패취 등의 형태일 수 있다.
- [0171] 또한, 상기 염료 화합물이 용액화된 용액 내로 폴리머 필름을 함침시킨 후 증류수로 세척하여 폴리머 필름에 코팅되지 않은 염료 화합물을 제거한 후 건조시켜 필름을 제조할 수 있다.
- [0172] 상기 폴리머 필름은 발명이 속하는 분야에서 통상적으로 사용하는 것이면 어느 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리머 필름으로는 셀룰로오스, 나이트로 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 나이론, 폴리에테르

설폰, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리플루오르화바이닐리덴, 폴리프로필렌 필름 또는 폴리스티렌이 지지된 지지체일 수 있다.

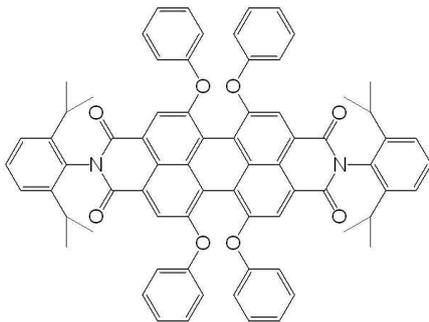
[0173] 또한, 본 발명에 따른 필름은 TiO₂ 층과 부착된 형태로 제공될 수 있다. 여기서, TiO₂ 층은 반사막으로서 역할하여 형광 강도 및 밝기 등의 향상에 기여할 수 있다. TiO₂ 층은 예를 들어, 상술한 방법으로 염료 화합물이 코팅된 폴리머 필름 상에 부착된 형태로 제공될 수 있다.

[0174] 또한, TiO₂ 층은 TiO₂ 졸-겔 형태의 필름으로 제공되어 폴리머 필름 상에 부착될 수 있다. TiO₂ 졸-겔 형태의 필름이란 투명한 폴리머 필름 상에 TiO₂ 입자가 분산된 폴리머를 코팅하여 형성된 필름을 의미한다. TiO₂ 층을 폴리머 필름 상에 부착하기 위해서 폴리머 필름과 TiO₂ 층 사이에 투명한 접착층이 개재될 수 있다.

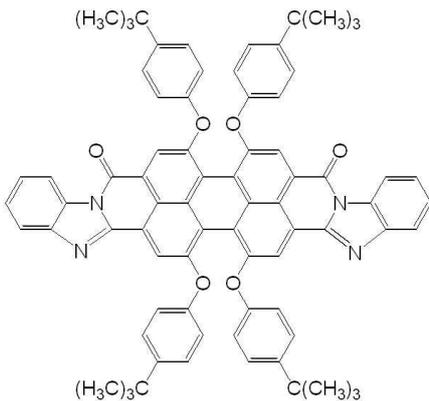
[0175] 또한, 본 발명에 따른 필름은 본 발명에 따른 염료 화합물과 상이한 발광 특성을 나타내는 염료 화합물(레퍼런스 염료 화합물)이 코팅된 폴리머 필름(레퍼런스 필름)과 부착된 형태로 제공될 수 있다. 이를 위해, 본 발명에 따른 염료 화합물이 코팅된 폴리머 필름과 레퍼런스 필름 사이에는 투명한 접착층이 개재될 수 있다.

[0176] 여기서, 본 발명에 따른 염료 화합물과 상이한 발광 특성을 나타내는 레퍼런스 염료 화합물이란 본 발명에 따른 염료 화합물과 동일한 pH에서 상이한 파장대의 발광 특성을 나타내거나 pH의 변화에 따른 감응성이 없는 물질인 것이 바람직하다. 즉, 레퍼런스 염료 화합물은 pH에 감응하지 않고 일정한 형광 세기를 나타내는 물질인 것이 바람직하다. 또한, 레퍼런스 염료 화합물은 본 발명에 따른 염료 화합물과 흡수 파장 겹침이 적어야 하며, 본 발명에 따른 염료 화합물과 동일한 방출 파장을 가져야 하므로 스톡크 쉬프트(stock shift)가 큰 물질인 것이 바람직하다.

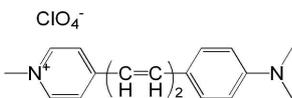
[0177] 이러한 레퍼런스 염료 화합물로는 다음과 같은 물질들이 사용될 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.



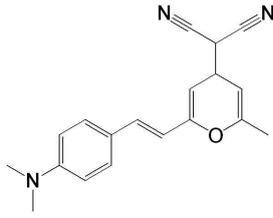
[0179]



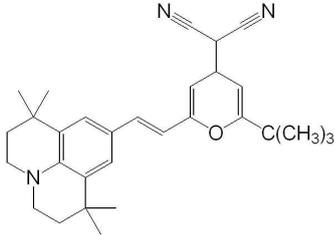
[0181]



[0183]



[0185]



[0187]

[0189] 본 발명에 따른 필름은 레퍼런스 필름과 부착된 형태로 제공됨으로써 레퍼런스 필름 대비 형광 세기를 측정함으로써 검정(calibration) 작업 없이도 정확하게 pH에 따른 형광 세기를 판독하는 것이 가능하다.

[0190] 또한, 본 발명은 상기 pH 검출용 염료 화합물을 포함하는 pH 검출용 키트를 제공한다.

[0191] 이 때, 상기 키트는 필요에 따라, 생체 분자, 용매(완충액 등) 및 기타 시약 등을 더 포함할 수 있다. 여기서 용매로는 포스페이트 완충액, 카보네이트 완충액 및 트리스 완충액으로 구성된 군에서 선택되는 완충액, 다이메틸설폭사이드, 다이메틸포름아미드, 다이클로로메탄, 메탄올, 에탄올 및 아세토나이트릴로부터 선택되는 유기 용매 또는 물 등이 사용될 수 있으며, 용매의 종류에 따라 시아닌계 화합물에 다양한 작용기를 도입함으로써 용해도를 조절하는 것이 가능하다.

[0192] 또한, 상기 키트는 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0194] **플레이트(plate)에 코팅하는 방법**

[0195] 살아 있는 세포의 염색을 통해 pH 측정하는 방법 외에, 최근에는 plate reader를 통해 세포의 pH를 측정하는 방법이 활용되고 있다.

[0196] 일 예로서, 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)는 초고속 검출(HTS, High-Throughput Screening), 효소-면역측정 분석이나 독성 시험에 널리 사용되어왔다. 마이크로타이터 플레이트는 소량의 샘플과 많은 수의 샘플을 동시에 측정할 수 있는 장점을 가지고 있다. 많은 수의 샘플을 동시에 측정하기 때문에 흡광도나 형광의 변화를 빠르게 검출할 수 있는 마이크로플레이트 리더(microplate reader)는 많은 분야에서 널리 사용되기 시작하였다. 더욱이, 마이크로플레이트 리더는 효소활성 측정이나 세포의 호흡뿐만 아니라, 생물- 및 화학발광 복합된 정량적인 측정과 같은 다른 기능에도 적용되어 왔다. 마이크로타이터 플레이트에서, 효소나 대사물과 단백질과 같은 분석물(analytes)은 액체 배지나 웰 바닥의 얇은 층에 일부 지시제(indicators)와 함께 결합될 수 있다. 선택된 표적 상의 그들의 결합은 분석물의 실체와 농도와 관련되는 발산되는 빛의 정량적 평가를 가능하게 한다.

[0197] 종래에는 플레이트에 염료 화합물을 코팅하기 위하여, 플레이트에 우선 코팅필름을 부착하고, 상기 코팅필름 위에 염료 화합물을 포함하는 필름을 부착하였다. 이 때, 플레이트에 담지된 분석물의 pH를 측정하는 과정에서, 상기 코팅필름과 염료 화합물을 포함하는 필름이 분리되는 현상이 발생하고, 이에 따라, 정확한 pH를 측정하는 것이 곤란한 문제가 있었다.

[0198] 본 발명은 상기 다양한 실시예에 따른 염료 화합물을 플레이트(plate)에 안정적으로 코팅하여 pH 측정과정에서 코팅필름과 분리되는 것을 방지할 수 있으며, 이에 따라, 플레이트에 담지된 분석물의 pH를 고감도로 측정할 수 있다.

[0199] 구체적으로, 본 발명은 상기 pH 검출용 염료 화합물을 가열하여 용액화하는 단계; 및 상기 용액을 플레이트(Plate)의 각 웰(well)에 떨어트린 후 겔화하는 단계; 를 포함하는 염료 화합물을 플레이트(plate)에 코팅하는 방법을 제공한다.

[0200] 보다 구체적으로, 본 발명은 파우더 형태의 상기 pH 검출용 염료 화합물에 증류수에 넣고 80 내지 100에서 가열하여 상기 염료 화합물이 완전히 녹을 때까지 교반하여 용액화하는 단계를 포함한다.

- [0201] 그리고, 상기 용액을 60 내지 80로 유지하여 플레이트에 코팅되기 전에 겔화되는 것을 방지하고, 플레이트의 각 웰(well)에 상기 용액을 떨어트린 후, 상온에서 겔화시키고 건조시켜 코팅하는 단계를 포함한다.
- [0202] 상기 pH 검출용 염료 화합물의 용액은 플레이트의 웰에서 겔화 및 건조 됨으로써 웰의 표면과 안정적으로 결합하면서 겔화된다. 즉, 본 발명의 상기 코팅은 별도의 코팅필름 없이도, 플레이트와 잘 부착되면서, 동시에 분리되지 않을 수 있다. 그리하여, 분석물의 pH 등을 검출하는 과정에서 상기 코팅이 상기 플레이트와 분리되는 현상을 방지할 수 있다.
- [0203] 상기 pH 검출용 염료 화합물은 pH 변화에 대하여 고감도의 특성을 갖고, 화학적으로 안정하여 생체 내 pH 변화를 따라, 형광 신호를 발생시킴으로써, 생체 내의 pH의 변화를 쉽게 결정할 수 있다.
- [0204] 상기 형광 신호는 예를 들어 플레이트 리더, 현미경, 플루오로미터, 양자 카운터 및 유세포분류기와 같은 각종 기기 또는 육안을 통해 검출될 수 있다.
- [0206] **pH 를 검출하는 방법**
- [0207] 본 발명의 상기 염료 화합물은 pH의 변화와 관련하여 특정 세포 변화를 직/간접적으로 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 세포에 의해 일어난 환경에서의 pH의 변화와 생 세포 또는 세포 컴파트먼트(cell compartment)의 pH를 결정하기 위하여 사용될 수 있다. 상기 세포 컴파트먼트(cell compartment)는 세포질(cell cytoplasm)에 떠 있는 (suspended)세포기관 중 하나를 의미한다.
- [0208] 본 발명의 또 다른 구현에는 상기 pH 검출용 염료 화합물과 샘플을 접촉시키는 단계; 상기 염료 화합물과 접촉된 상기 샘플을 배양(incubating)시켜 배양된 샘플을 형성하는 단계; 배양된 상기 샘플에 빛을 조명하여 발광시키는 단계; 및 상기 샘플로부터 형광 방출을 검출하는 단계;를 포함하는 샘플 내 pH 를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0209] 구체적으로, 상기 pH 검출용 염료 화합물은 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation) 및 스카프로딩(scrape loading) 등의 방법을 통하여 생 세포 내로 로딩할 수 있다. 그리하여 상기 화합물과 샘플을 접촉시킬 수 있다.
- [0210] 상기 샘플은 생 세포, 세포내액(intracellular fluids), 세포외액(extracellular fluids), 생물학적 용액(biological fluids), 세라(sera), 배양액(biological fermentation media), 완충 용액(buffer solutions), 혈액 세포(blood cells), 면역 세포(immune cells), 근육조직(muscle tissue), 뉴런(neurons), 세포외 소포(extracellular vesicles), 관다발 조직(vascular tissue), 혈액(blood fluids), 소변(urine), 약(pharmaceuticals) 등일 수 있다.
- [0211] 본 발명의 샘플 내 pH 를 검출하는 방법은 상기 염료 화합물과 접촉된 상기 샘플을 배양(incubating)시켜 배양된 샘플을 형성하는 단계를 포함한다. 상기 배양을 통하여 상기 염료 화합물이 세포 내로 침투되게 할 수 있다.
- [0212] 상기 염료 화합물은 전술한 바와 같이, 세포 내 등의 pH 에 따라 형광 방출하는바, 상기 샘플로부터 방출된 형광의 세기 등을 검출하여 샘플 내의 pH 를 검출할 수 있다.
- [0213] 구체적으로, 본 발명이 속하는 분야에 통상에 알려진 방법으로, 측정된 형광 세기로부터 pH를 결정할 수 있다. 예를 들어, 상기 측정된 형광의 세기로부터 알려진 표준, 예를 들어 pH에 대한 형광 세기의 칼리브레이션 곡선(calibration curve)과 비교하여 결정할 수 있다. 또는, 통상의 형광 반응을 측정하기 위한 장비를 사용할 수 있다.
- [0214] 또한, 상기 방법 등을 통하여, 세포 내 등의 pH 변화를 모니터링할 수 있고, 이에 따라, pH 변화와 직/간접적으로 관련된 일들을 발견할 수 있다. 예를 들어, 세포 내의 pH 변화를 모니터링하여 세포 내 프로세스를 알 수 있다.
- [0215] 또한, 본 발명은 상기 pH 검출용 염료 화합물과 질병을 객체로부터 얻어진 샘플을 접촉시키는 단계; 상기 염료 화합물과 접촉된 상기 샘플을 배양(incubating)시켜 배양된 샘플을 형성하는 단계; 배양된 상기 샘플에 빛을 조명하여 발광시키는 단계; 및 상기 샘플로부터 형광 방출을 검출하는 단계;를 포함하는 샘플 내 질병을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0216] 예를 들어, 상기 질병이 알츠하이머(Alzheimer's disease (AD))와 같은 중추신경계 질병인 경우, 상기 pH 검출용 염료 화합물이 상기 질병과 관련된 캐리어 분자(carrier molecule)와 결합하여 샘플 내 질병을 검출할 수 있다

다.

[0217] 또 다른 예로서, 본 발명의 상기 pH 검출용 염료 화합물을 이용하여 산화 스트레스(oxidative stress)와 관련된 질병을 검출할 수 있다. 구체적으로, 산화 스트레스는 세포 내의 Na^+/H^+ 및 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 등의 변화를 유도할 수 있다. 이에 따라, 세포 내의 pH가 변화하는바, 상기 pH 검출을 통해 샘플 내의 질병을 검출할 수 있다.

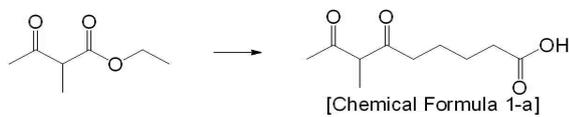
[0218] 또한, 본 발명의 상기 pH 검출용 염료 화합물을 이용하여 샘플 내의 질환 뿐만 아니라, 상기 질환에 효과적인 약물을 검출할 수 있다. 예를 들어, 특정 질환에 효과적인 약물의 경우, 질병을 가진 세포에 상기 약물을 투여하여 세포내 pH를 변화시킬 수 있다. 이에 따라, 특정 질환에 효과를 갖는 신약을 검출할 수 있다.

[0220] 이하에서는 본 발명의 구체적인 실시예들을 제시한다. 다만, 하기에 기재된 실시예들은 본 발명을 구체적으로 예시하거나 설명하기 위한 것에 불과하며, 이로서 본 발명이 제한되어서는 아니된다.

[0222] **제조예**

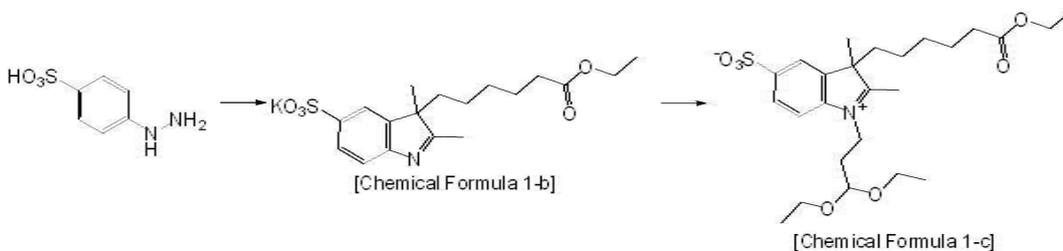
[0223] **제조예 1. 화합물 1의 합성**

[0224] (1) [Chemical Formula 1-a]로 표시되는 화합물의 합성



[0226] 에틸 2-메틸아세토아세테이트 (Ethyl 2-methylacetoacetate) (23.5g, 163 mmol) 와 에틸 6-브로모헥사노에이트 (Ethyl 6-bromohexanoate) (40.0 g, 179 mmol)를 에탄올 200ml에 넣고, 교반하였다. 액체 소듐에톡사이드를 적가하였다. 80에서 10시간 교반하였다. 반응 종료 후 고체는 여과하고 여과된 용액을 감압 증류하였다. 다이클로로메탄과 2 N 염산 수용액으로 추출하였다. 유기층을 건조된 소듐술페이트 처리 후 필터하여 감압 증류하였다 (47.7g). 용매가 제거되면 수용액 300ml를 첨가하여 10시간 환류교반하였다. 반응 종료 후 다이클로로메탄으로 추출 후 소듐술페이트 처리하여 여과하고 감압 증류하여 [Chemical Formula 1-a]로 표시되는 화합물을 수득하였다(25 g, 71%). LC-MS : m/z= 185.84[M⁺]

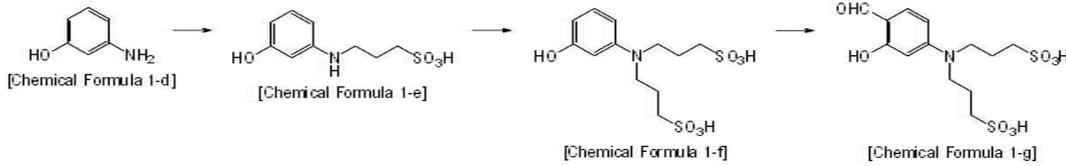
[0230] (2) [Chemical Formula 1-b] 및 [Chemical Formula 1-c]로 표시되는 화합물의 합성



[0231] p-히드라지노벤젠술포산 (p-Hydrazinobenzenesulfonic acid) (20 g, 106 mmol)과 [Chemical Formula 1-a]로 표시되는 화합물 (59.4 g, 319mmol)을 6 N 염산 수용액 30ml/에탄올 60ml에 가한 후, 12시간 동안 환류 교반하였다. 상온으로 냉각시키고, 생성된 고체를 여과하였다. 에틸아세테이트로 세정후 감압 건조하였다. 수산화칼륨 (1.4 g, 25.4 mmol)을 프로판올 35ml에 용해시키고, 여과된 고체 (5.1 g, 21.2 mmol) 를 메탄올 35ml에 용해시키고 적가 후, 상온에서 12시간 교반하였다. 고체를 여과 후 건조하였다. 이어서, C18 역상 크로마토그래피를 이용하여 물/메탄올로 정제하여 [Chemical Formula 1-b]로 표시되는 화합물을 수득하였다(11.1 g, 30%). LC-MS : m/z= 404.86[M⁺]

[0234] [Chemical Formula 1-b]로 표시되는 화합물(3.0 g, 7.4 mmol)을 상온, 질소 기류하에서 에탄올과 함께 교반하고, 48% 염산 수용액 (10.0ml)을 적가하였다. 1시간 후 반응액을 감압 증류하였다. 감압 증류된 반응기에 아세트나이트릴(120.0ml), 아세트산 (3.0ml)와 아크롤레닌 다이에틸아세탈(17.3 g, 133.0 mmol)을 첨가하였다. 70 °C에서 2시간 반응하였다. 반응액을 감압 증류하고 HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μm 컬럼, 물/아세트나이트릴 (0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60 분 동안 10~100%까지 20ml/min으로 정제하여 [Chemical Formula 1-c]로 표시되는 화합물을 수득하였다(1.2 g, 30%). LC-MS : m/z= 496.96[M⁺]

[0236] (4) [Chemical Formula 1-d] 내지 [Chemical Formula 1-g]로 표시되는 화합물의 합성



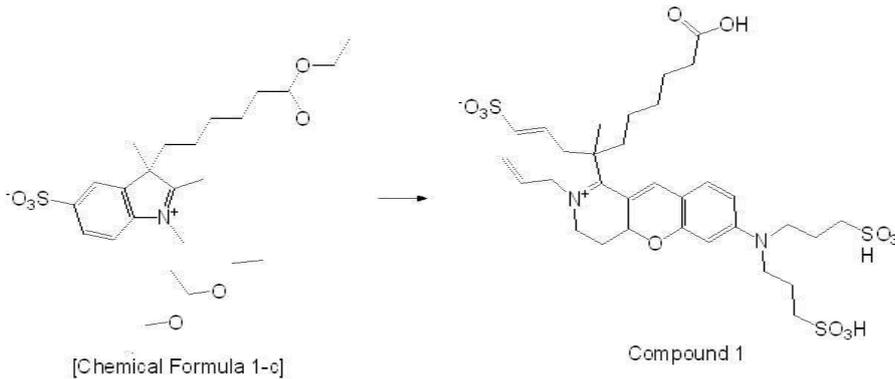
[0238]

[0240] 3-아미노페놀(3-Aminophenol) (5.0 g, 4.5 mmol)과 1,3-프로판설통(1,3-propanesultone) (0.56 g, 4.6 mmol)을 n-부탄올에 넣고 30 분간 환류 교반하였다. 반응액을 상온으로 냉각 후 일야교반하였다. 반응액을 여과하여 회색 고체를 분리한 후 메탄올로 세척하여 [Chemical Formula 1-d]로 표시되는 화합물을 수득하였다(0.8 g, 80%). LC-MS : m/z= 231.30[M+]

[0241] [Chemical Formula 1-d]로 표시되는 화합물 (1g, 4.3 mmol)과 1,3-propane sultone (0.54 g, 4.4 mmol)을 N,N-다이메틸포름아미드 5ml에 넣은 후 130에서 2시간 교반하였다. 상온으로 냉각한 후 반응액을 감압 증류하고, 역상 크로마토그래피로 정제하여 [Chemical Formula 1-e]로 표시되는 화합물을 수득하였다(1.48 g, 95%). LC-MS : m/z= 353.19[M+]

[0242] [Chemical Formula 1-e]로 표시되는 화합물(3.0 g, 8.0 mmol)을 N,N-다이메틸포름아미드 (1.3 g, 8.0 mmol)이 담긴 반응기에 투입하였다. 50에서 12시간 반응하였다. 반응 종료 후 물로 희석 후 증화하였다. 용매제거 후 역상 크로마토그래피로 정제하여 [Chemical Formula 1-f]로 표시되는 화합물을 수득하였다(0.8 g, 25%). LC-MS : m/z= 380.84[M+]

[0244] (7) 화합물 1의 합성

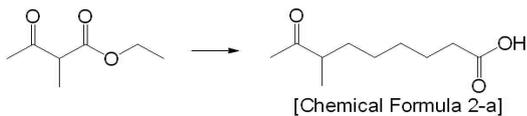


[0246]

[0248] [Chemical Formula 1-c]로 표시되는 화합물(1.0 g, 1.9 mmol)과 [Chemical Formula 1-f]로 표시되는 화합물 (0.8 g, 1.9 mmol) 을 에탄올 20ml에 녹인 후 80에서 8시간 교반하였다. 반응 종료 후 감압농축으로 용매를 제거하였다. 농축된 반응물을 클로로포름 50ml에 녹인 후 50% 황산 1ml을 적가하였다. 다이클로로메탄으로 희석하여 물로 추출하였다. 유기층 감압농축 후 HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μm 컬럼, 물/아세트나이트릴 (0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60 분 동안 10~100%까지 20ml/min으로 정제하여 화합물 1을 합성하였다(0.4 g, 51%). LC-MS : m/z= 739.79[M+]

[0250] 제조예 2. 화합물 2의 합성

[0251] (1) [Chemical Formula 2-a]로 표시되는 화합물의 합성

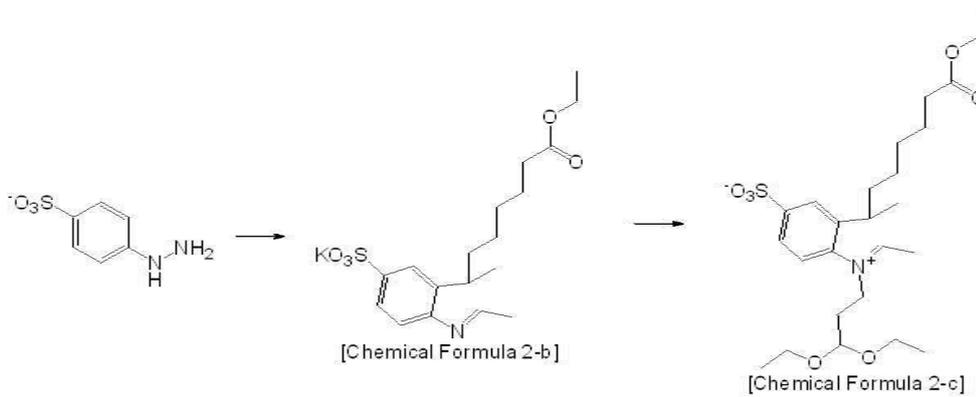


[0253]

[0255] 에틸 2-메틸아세토아세테이트 (Ethyl 2-methylacetoacetate) (23.5g, 163 mmol) 와 에틸 6-브로모헥사노에이트 (Ethyl 6-bromohexanoate) (40.0 g, 179 mmol)를 에탄올 200ml에 넣고, 교반하였다. 액체 소듐에톡사이드를 적가하였다. 80에서 10시간 교반하였다. 반응 종료 후 고체는 여과하고 여과된 용액을 감압 증류하였다. 다이클로로메탄과 2 N 염산 수용액으로 추출하였다. 유기층 건조 된 소듐술페이트 처리 후 필터하여 감압 증류하였다 (47.7g). 용매가 제거되면 수용액 300ml를 첨가하여 10시간 환류교반하였다. 반응 종료 후 다이클로로메탄으로 추출 후 소듐술페이트 처리하여 필터하고 감압 증류하여 [Chemical Formula 2-a]로 표시되는 화합물을 수득하였

다(25 g, 71%). LC-MS : m/z= 185.84[M+]

[0257] (2) [Chemical Formula 2-b] 및 [Chemical Formula 2-c]로 표시되는 화합물의 합성

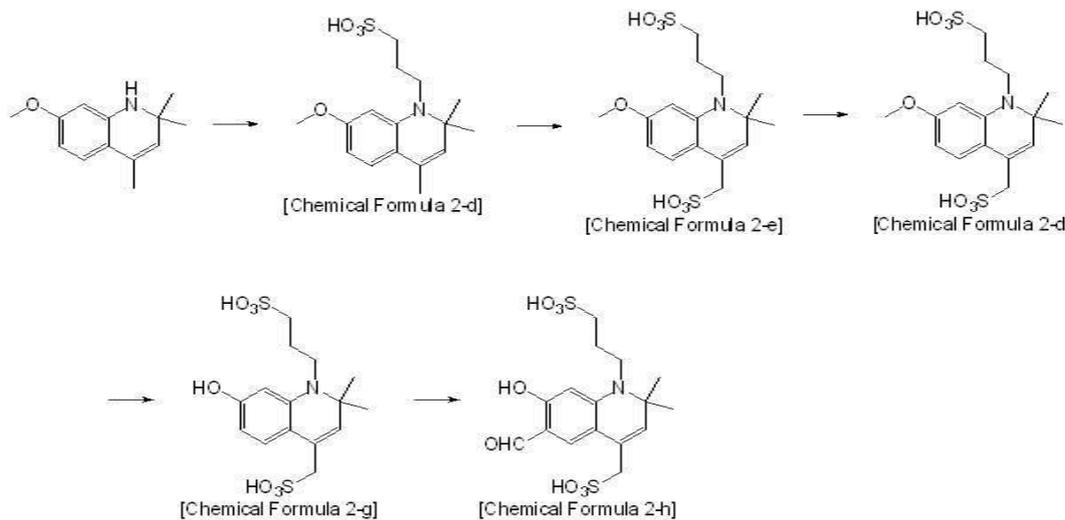


[0259]

[0261] p-히드라지노벤젠설포산 (p-Hydrazinobenzenesulfonic acid) (20 g, 106 mmol)과 [Chemical Formula 2-a]로 표시되는 화합물(59.4 g, 319mmol)을 6 N 염산 수용액 30ml/에탄올 60ml에 가한 후, 12시간 동안 환류 교반하였다. 상온으로 냉각시키고, 생성된 고체를 여과하였다. 에틸아세테이트로 세정후 감압 건조하였다. 수산 화칼륨 (1.4 g, 25.4 mmol)을 프로판올 35ml에 용해시키고, 여과된 고체 (5.1 g, 21.2 mmol)를 메탄올 35ml에 용해시키고 적가 후, 상온에서 12시간 교반하였다. 고체를 필터 후 건조하였다. C18 역상 크로마토그래피를 이용하여 물/메탄올로 정제하여 [Chemical Formula 2-b]로 표시되는 화합물을 수득하였다(11.1 g, 30%). LC-MS : m/z= 404.86[M+]

[0262] [Chemical Formula 2-b]로 표시되는 화합물(3.0 g, 7.4 mmol)을 상온, 질소 기류 하에서 에탄올과 함께 교반하고, 48% 염산 수용액(10.0ml)을 적가하였다. 1시간 후 반응액을 감압 증류하였다. 감압 증류된 반응기에 아세트나이트릴(120.0ml), 아세트산(3.0ml)과 아크롤레닌 다이에틸아세탈(17.3 g, 133.0 mmol)을 첨가하였다. 70에서 2시간 반응하였다. 반응액을 감압 증류하고 HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μm 컬럼, 물/아세트나이트릴(0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60 분 동안 10~100%까지 20ml/min으로 정제하여 [Chemical Formula 2-c]로 표시되는 화합물을 수득하였다(1.2 g, 30%). LC-MS : m/z= 496.96[M+]

[0264] (4) [Chemical Formula 2-d] 내지 [Chemical Formula 2-h]로 표시되는 화합물의 합성



[0266] [0268] 7-메톡시-2,2,4-트리메틸-1,2-하이드로퀴놀린 (10.0 g, 49 mmol)과 1,3-프로판 설포 (6.6 g, 54 mmol) 을 145에서 3시간 교반하였다. 반응 종료 후 컬럼 정제하여 [Chemical Formula 2-d]로 표시되는 화합물을 수득하였다 (10.0 g, 63%). LC-MS : m/z= 325.01[M+]

[0269] [Chemical Formula 2-d]로 표시되는 화합물(10.0 g, 31 mmol)이 담긴 반응기에 설포산(9.8ml)를 적가하였다. 30 분 교반 후 0에서 20.0% oleum을 3.9ml를 적가하여 48시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 저온상태의 물에 투입하였다. NaOH로 중화한 후 에탄올로 재결정하여 [Chemical Formula 2-e]로 표시되는 화합물을 수득하였다

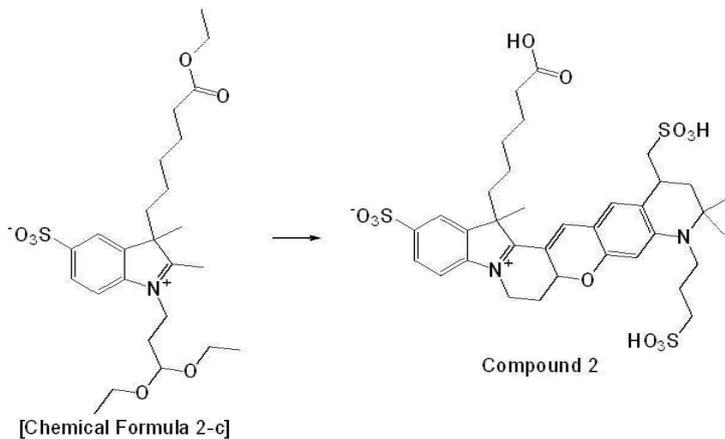
(11.0 g, 88%). LC-MS : m/z= 404.88[M⁺]

[0271] [Chemical Formula 2-e]로 표시되는 화합물(12.0 g, 30.0 mmol)과 10 % Pd/C (0.9 g), 메탄올 120ml를 넣고 수소 분위기 하에서 상온 교반하였다. 12시간 교반 후 고체 여과하였다. 여과된 용액을 감압 증류하고 에탄올로 재결정하여 [Chemical Formula 2-f]로 표시되는 화합물을 수득하였다(11.5 g, 95%). LC-MS : m/z= 406.78[M⁺]

[0272] [Chemical Formula 2-f]로 표시되는 화합물(12.0 g, 29.0 mmol)과 NaI (11.0 g, 74.0 mmol), HBr (72.0 g, 174.0 mmol)를 반응기에 넣고, 105에서 12시간 교반시킨다. 반응 종료 후 소듐바이카보네이트 수용액을 이용하여 중화시킨다. 용매를 제거하고 물/아세톤/에탄올을 이용하여 결정을 생성시킨다. 메탄올/아세톤을 이용하여 재결정하고 아세톤으로 세척하여 [Chemical Formula 2-g]로 표시되는 화합물을 수득하였다(3.0 g, 27%). LC-MS : m/z= 392.93[M⁺]

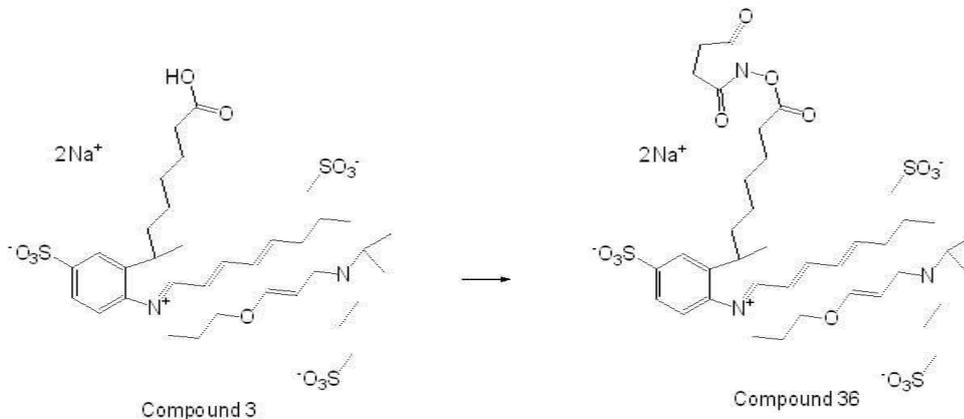
[0273] [Chemical Formula 2-g]로 표시되는 화합물(3.0 g, 8.0 mmol)을 N,N-다이메틸포름아미드(1.3 g, 8.0 mmol)가 담긴 반응기에 투입하였다. 50에서 12시간 반응하였다. 반응 종료 후 물로 희석 후 중화하였다. 용매 제거 후 메탄올/아세톤을 이용하여 결정을 생성하였다. 에탄올로 재결정하여 [Chemical Formula 2-h]로 표시되는 화합물을 수득하였다(0.8 g, 25%). LC-MS : m/z= 420.74[M⁺]

[0275] (9) 화합물 2의 합성



[0279] [Chemical Formula 2-c]로 표시되는 화합물(1.0 g, 1.9 mmol)과 [Chemical Formula 2-h]로 표시되는 화합물(0.8 g, 1.9 mmol)을 에탄올 20ml에 녹인 후 80에서 8시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 감압농축으로 용매를 제거하였다. 농축된 반응물을 클로로포름 50ml에 녹인 후 50% 황산 1ml을 적가하였다. 다이클로로메탄으로 희석하여 물로 추출하였다. 유기층 감압농축 후 HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μm 컬럼, 물/아세트나이트릴(0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60 분 동안 10~100%까지 20mL/min으로 정제하여 화합물 2를 합성하였다(0.4 g, 51%). LC-MS : m/z= 780.01[M⁺]

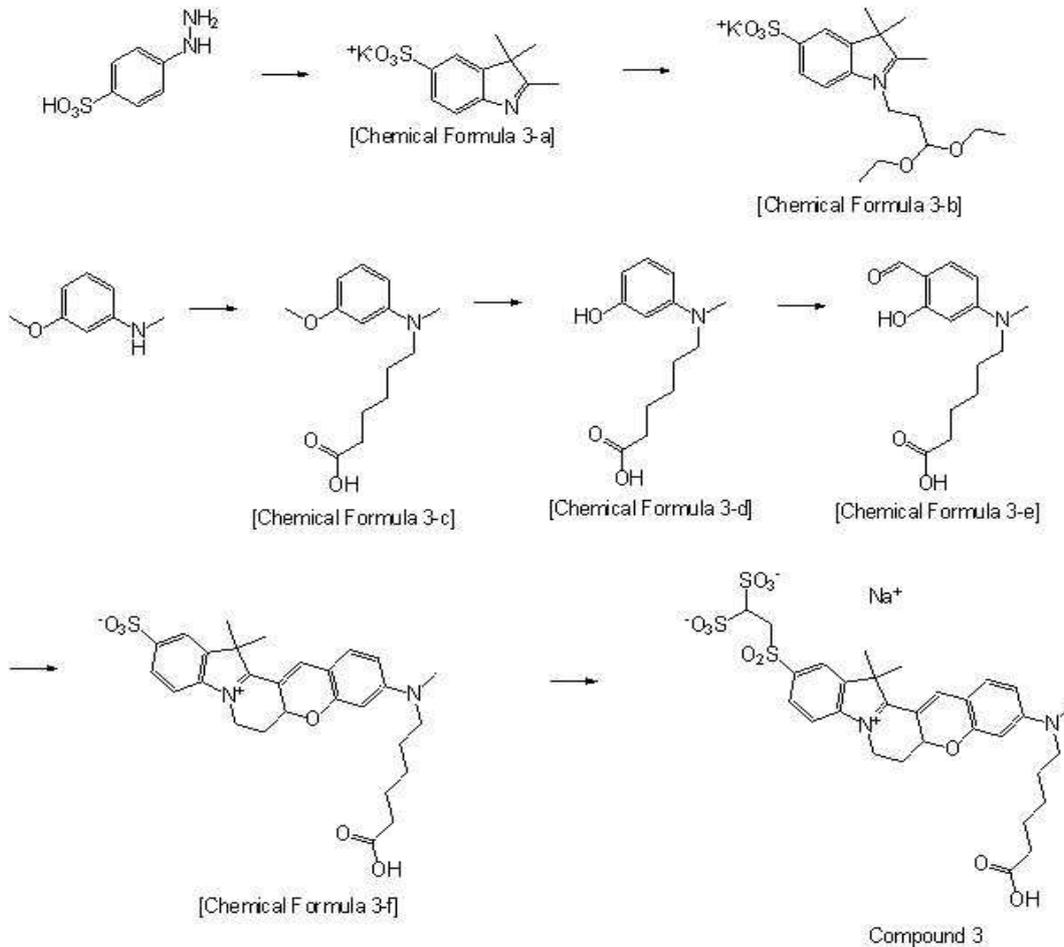
[0281] (10) 화합물 36의 합성



[0285] 화합물 2 (0.24 g, 0.5 mmol), N-하이드록시 숙신이미드(0.03 g, 0.03 mmol), N,N-다이사이클로헥실 카보다이미드 (0.054 g, 0.03 mmol)를 N,N-다이메틸포름아이드 1ml에 녹여서 1시간 동안 상온교반하였다. 반응 종료 후 HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μm컬럼, 물/ 아세트나이트릴(0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60분동안

10~100%까지 20ml/min으로 정제하여 화합물 36을 합성하였다(0.15 g, 56.6 %).

[0287] 제조예 3. 화합물 3의 합성



[0289]

[0291] P-히드라지노벤젠설포산 (p-hydrazinobenzenesulfonic acid) (20 g, 106mmol)과 3-메틸-2-부타논 (27.48 g, 319 mmol)을 이용하여 [Chemical Formula 3-a]로 표시되는 화합물을 수득하였다(11.1 g, 30%). LC-MS : m/z= 277.02[M+]

[0292] 이어서, [Chemical Formula 3-a]로 표시되는 화합물로부터 [Chemical Formula 3-b]로 표시되는 화합물을 수득하였다(5.0 g, 34.0%). LC-MS : m/z= 408.12[M+]

[0293] 3-메톡시-N,N-메틸아닐린 (10.0 g, 73.0 mmol)과 6-브로모헥사노익에시드 (17.1 g, 87.5 mmol), N,N-다이메틸포름아미드 100ml 환류 교반하였다. 반응 종료 후 컬럼 정제하여 [Chemical Formula 3-c]로 표시되는 화합물을 수득하였다(13.6 g, 74.3%). LC-MS : m/z= 252.15[M+]

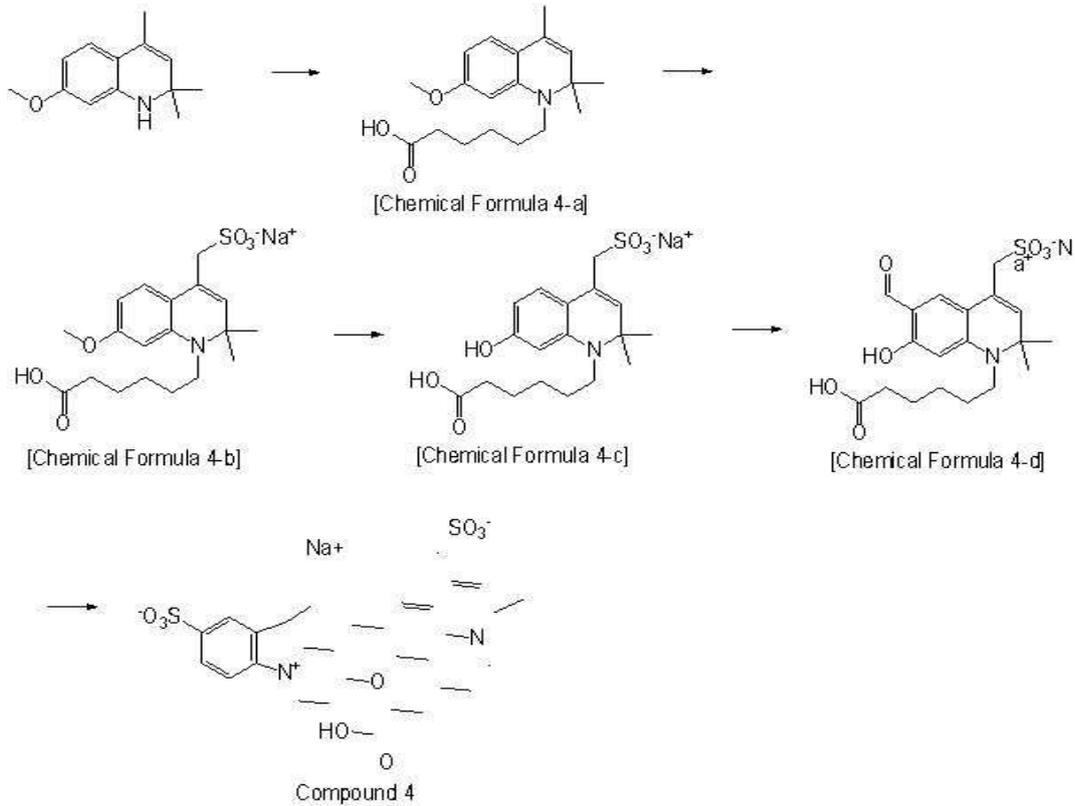
[0294] 이어서, [Chemical Formula 2-g]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 3-c]로 표시되는 화합물을 이용하여 [Chemical Formula 3-d]로 표시되는 화합물을 수득하였다(5.1 g, 45.6 %). LC-MS : m/z= 238.14[M+]

[0295] [Chemical Formula 1-f]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 3-d]로 표시되는 화합물을 이용하여 [Chemical Formula 3-e]로 표시되는 화합물을 수득하였다(2.0 g, 35.1 %). LC-MS : m/z= 266.13[M+]

[0296] 화합물 1을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 3-b]로 표시되는 화합물과 [Chemical Formula 3-e]로 표시되는 화합물을 이용하여 합성하였다(0.46 g, 23.5 %). LC-MS : m/z= 525.20[M+]

[0297] [Chemical Formula 3-b]로 표시되는 화합물(1.0g, 1.9 mmol)을 N,N-다이메틸포름아미드 1.0ml 에 녹인 후, 염화포스포닐 0.5ml를 첨가하여 가열하였다. 2-아미노에탄-1,1-다이설포산을 투입한 후 상온에서 교반하였다. 이어서, 컬럼 정제하여 화합물 3을 합성하였다(0.2 g, 15.2 %). LC-MS : m/z= 696.14[M+]

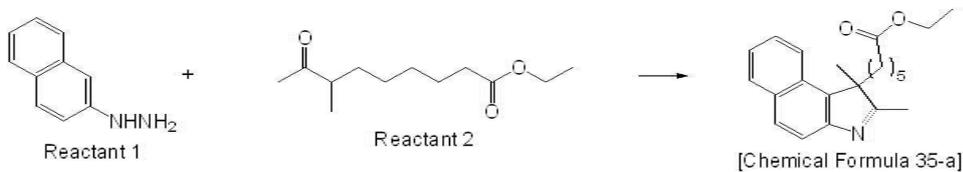
[0299] 제조예 4. 화합물 4의 합성



- [0301]
- [0303] [Chemical Formula 3-c]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 7-메톡시-2,2,4-트리메틸-1,2-다이하이드로 퀸놀린을 이용하여 [Chemical Formula 4-a]로 표시되는 화합물을 수득하였다(15.0 g, 52.6%). LC-MS : m/z= 318.20[M+]
- [0304] [Chemical Formula 2-e]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 4-a]로 표시되는 화합물을 이용하여 [Chemical Formula 4-b]로 표시되는 화합물을 수득하였다(13.0 g, 65.0%). LC-MS : m/z= 420.14[M+]
- [0305] [Chemical Formula 2-g]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 4-b]로 표시되는 화합물을 이용하여 [Chemical Formula 4-c]로 표시되는 화합물을 수득하였다(7.2 g, 56.0%). LC-MS : m/z= 406.12[M+]
- [0306] [Chemical Formula 2-h]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 4-c]로 표시되는 화합물을 이용하여 [Chemical Formula 4-d]로 표시되는 화합물을 수득하였다(2.5 g, 30%). LC-MS : m/z= 434.12[M+]
- [0307] [Chemical Formula 3-f]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 3-b]로 표시되는 화합물과 [Chemical Formula 4-d]로 표시되는 화합물을 사용하여 화합물 4를 합성하였다(0.51 g, 32.0%). LC-MS : m/z= 693.18[M+]

[0309] 제조예 5. 화합물 35의 합성

[0310] (1) [Chemical Formula 35-a]로 표시되는 화합물의 합성

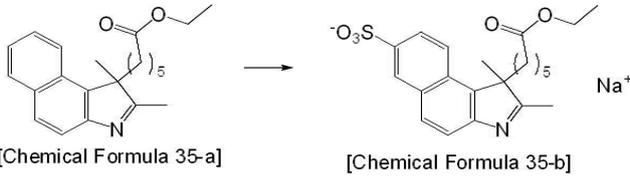


- [0312]
- [0314] 반응물 1 과 반응물 2를 에탄올 86ml에 넣고 염산 21.5ml를 가한 후, 12시간 동안 환류 교반하였다. 상온으로 냉각시키고, 에틸 아세테이트 50ml를 첨가하고 생성된 고체를 여과하였다, 에틸아세테이트로 세정 후 감압 건조

하였다. 다이클로로메탄과 2 N 수산화나트륨 수용액으로 추출한 후 유기층을 감압 건조하고 실리카 컬럼정제하여 [Chemical Formula 35-a]로 표시되는 화합물을 수득하였다 (8.5g, 40%).

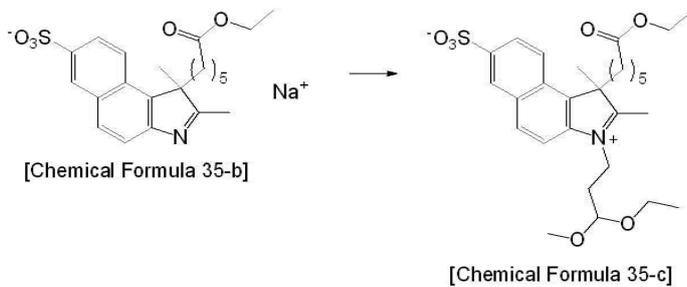
[0315] H NMR (400MHz, CDC13): δ = 7.92(2H, dd), 7.81(1H, d), 7.76(1H, d), 7.49(1H, t), 7.39(1H, t), 4.01(2H, q), 2.38(1H, m) 2.32(3H, s), 2.04(2H, t), 1.97(1H, m), 1.47(3H, s), 1.35(2H, m), 1.16(3H, t), 1.07(2H, m), 0.58(1H, m), 0.39(1H, m)

[0317] (2) [Chemical Formula 35-b]로 표시되는 화합물의 합성



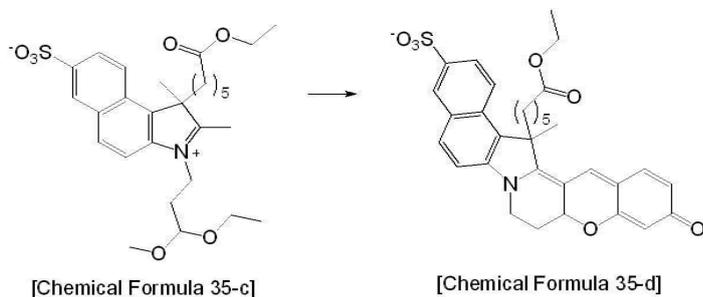
[0319] [Chemical Formula 35-a]로 표시되는 화합물 10g (30mmol)과 황산 용액 5ml을 넣고 180에서 가열 교반하였다. 두시간 후 상온으로 냉각하고 얼음에 반응액을 부어주었다. 50% 수산화나트륨 용액 5ml를 천천히 적가하였다. 상온에서 24시간 동안 교반 후, 생성된 침전물은 필터하고 여액에 포화 소듐설페이트 수용액 5ml를 첨가하였다. 생성된 침전물을 필터하고 고체를 물에서 두번 재결정하였다. 얻어진 고체를 진공 건조하여 [Chemical Formula 35-b]로 표시되는 화합물을 수득하였다(8g, 60%).

[0323] (3) [Chemical Formula 35-c]로 표시되는 화합물의 합성



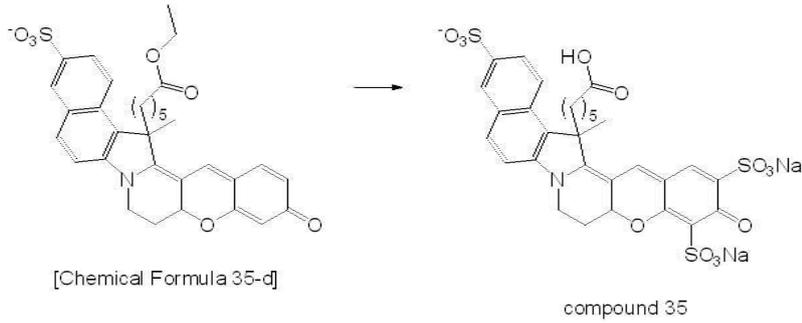
[0325] [Chemical Formula 35-b]로 표시되는 화합물 8g (28 mmol)을 상온, 질소 기류하에서 에탄올 400ml과 함께 교반하고, 48% 염산 수용액(80ml)을 적가하였다. 1시간 후 반응액을 감압 증류하였다. 감압 증류된 반응기에 아세토나이트릴(320ml), 아세트산(8ml)와 아크롤레닌 다이에틸 아세탈(65.72 g, 505 mmol)을 첨가한 후 70에서 2시간 동안 반응하였다. 반응액을 감압 증류하고 HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μ m 컬럼, 물/아세토나이트릴(0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60분 동안 10~100%까지 20ml/min으로 정제하여 [Chemical Formula 35-c]로 표시되는 화합물을 수득하였다.

[0328] (4) [Chemical Formula 35-d]로 표시되는 화합물의 합성



[0330] [Chemical Formula 35-c]로 표시되는 화합물 2g (4.7mmol)과 2,4-다이하이드록시 벤즈알데하이드 0.58g (4.7mmol)을 에탄올 20ml에 넣고 3h 동안 환류, 교반하였다. 상온으로 냉각하여 감압 증류 후 실리카 컬럼정제하였다. 정제한 물질에 클로로포름 10ml와 50% 황산 수용액 1ml를 넣고 상온에서 20분 교반하였다. 2노르말 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH를 7-8로 맞추고 메틸렌 클로라이드로 추출하였다. 감압 증류 후 실리카 컬럼 정제하여 [Chemical Formula 35-d]로 표시되는 화합물을 수득하였다(0.3g, 15%).

[0334] (5) 화합물 35의 합성



[0336]

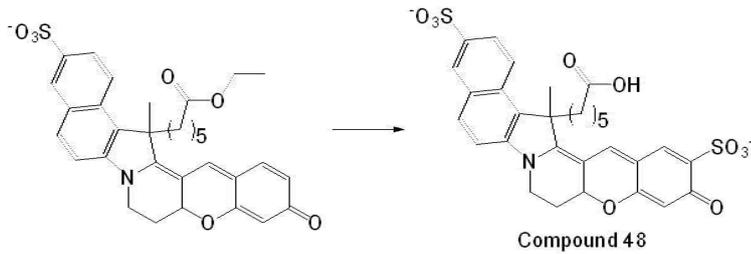
[0338] [Chemical Formula 35-d]로 표시되는 화합물 0.3g (30mmol)과 황산 용액 1ml을 넣고 40에서 가열 교반하였다. 두시간 후 상온으로 냉각하고 얼음에 반응액을 부어주었다. 50% 수산화나트륨 용액을 천천히 적가하여 중성을 맞췄다. HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μm 컬럼, 물/ 아세트나이트릴(0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60분동안 10~100%까지 20ml/min으로 정제하여 화합물 35를 합성하였다.

[0339]

¹H NMR (400MHz, MeOD): δ = 8.13(2H, m), 7.97(3h, m), 7.72(2H, m), 5.48(1H, m), 4.65(1H, m) 4.43(1H, m), 2.98(1H, m), 2.61(1H, m), 2.44(1H, m), 2.24(1H, m), 1.77(3H, d), 1.70(2H, m), 0.85(4H, m) 0.46(1H, m), -0.01(1H, m)

[0341] 제조예 6. 화합물 48의 합성

[0342] 화합물 35를 합성하는 반응과 같이 화합물 48을 합성하였다.



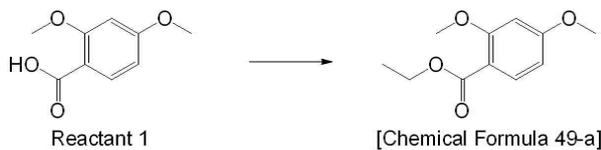
[0344]

[0346]

¹H NMR (400MHz, DMSO): δ = 8.62(1H, s), 8.40(1H, m), 8.31(1H, m), 8.37(1H, d), 7.99(1H, dd), 7.92(1H, d), 8.05(1H, s), 6.43(1H, s), 5.48(1H, m), 4.84(1H, m), 4.42(1H, m), 2.80(5H, m), 2.58(1H, m), 1.98(3H, s), 1.95(2H, t), 1.20(1H, m), 1.04(1H, m), 0.76(1H, m), 0.25(1H, m)

[0348] 제조예 7. 화합물 49의 합성

[0349] (1) [Chemical Formula 49-a]으로 표시되는 화합물의 합성



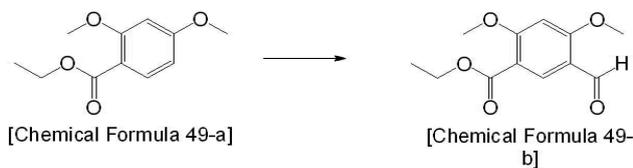
[0351]

[0353]

에탄올 100ml를 0로 냉각하고 염화티오닐 7ml를 천천히 적가하고 10분 동안 교반하였다. 반응물 1로 표시되는 화합물 10g (0.05mole)을 에탄올에 녹여 천천히 적가하고 상온에서 교반하였다. 감압 농축 후 건조하여 [Chemical Formula 49-a]로 표시되는 화합물을 수득하였다.

[0355]

(2) [Chemical Formula 49-b]으로 표시되는 화합물의 합성



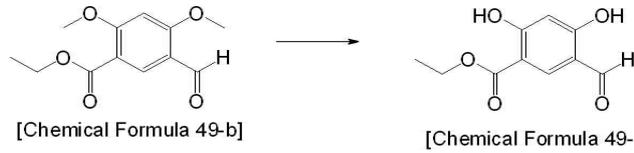
[0357]

[0359]

염화 포스포릴 4.01ml (26mmole)에 디메톡시포름아미드 4.78ml(65.4mmole)을 천천히 적하하고 상온에서 2시간 동

안 교반하였다. [Chemical Formula 49-a]로 표시되는 화합물 5g (24mmole)를 디메톡시포름아미드 12.5ml에 녹여 반응액에 천천히 적가하고 24시간 동안 교반하였다. 반응액을 과량의 물에 천천히 적가하였다. 석출된 고체를 감압여과하고 실리카 컬럼으로 정제하여 [Chemical Formula 49-b]으로 표시되는 화합물을 수득하였다.

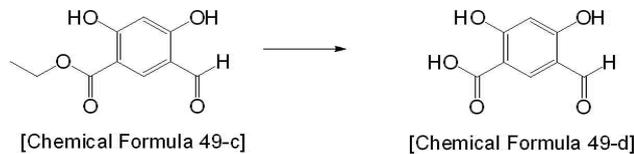
[0361] (3) [Chemical Formula 49-c]으로 표시되는 화합물의 합성



[0363]

[0365] [Chemical Formula 49-b]로 표시되는 화합물 8g (34mmole)을 다이클로로 메탄 200ml에 넣고 교반하였다. 알루미늄 클로라이드 13.44g (101mmole)를 천천히 적가하고 40에서 24시간 가열 교반하였다. 상온 냉각 후 6N 염산 수용액 100ml를 적가하고 추출한 다음 실리카 컬럼으로 정제하여 [Chemical Formula 49-c]로 표시되는 화합물을 수득하였다(4.3g, 59%).

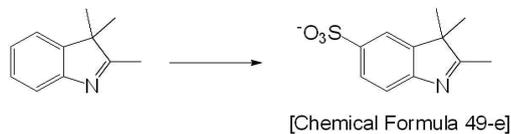
[0367] (4) [Chemical Formula 49-d]으로 표시되는 화합물의 합성



[0369]

[0371] [Chemical Formula 49-c]로 표시되는 화합물 0.6g (1mmole)을 메탄올, 테트라하이드로퓨란, 물이 각각 11ml씩 혼합된 용매에 넣고 교반하였다. 리튬 하이드록사이드 모노하이드레이트 3.8g (9mmole)를 첨가하고 24시간 동안 교반하였다. 1N 염산 수용액을 사용하여 pH 4 이하로 낮추고 메틸렌클로라이드로 추출하였다. 감압 증류 후 실리카 컬럼으로 정제하여 [Chemical Formula 49-d]로 표시되는 화합물을 수득하였다.

[0373] (5) [Chemical Formula 49-e]로 표시되는 화합물의 합성

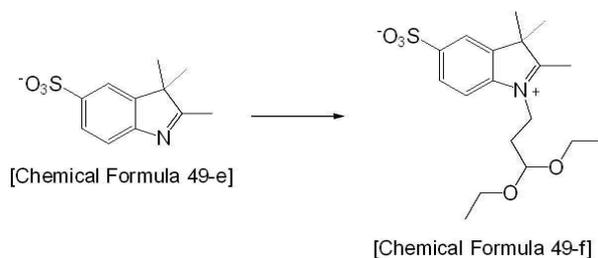


[0375]

[0377] [Chemical Formula 35-c]으로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 49-e]로 표시되는 화합물을 합성하였다.

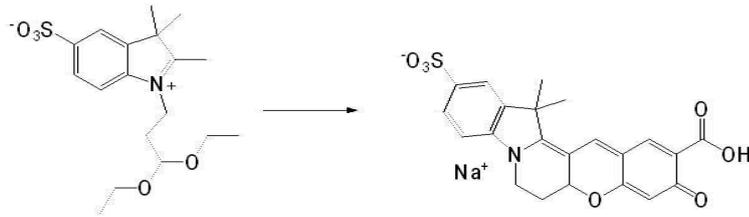
[0379] (6) [Chemical Formula 49-f]으로 표시되는 화합물의 합성

[0380] [Chemical Formula 35-d]으로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 49-f]로 표시되는 화합물을 합성하였다.



[0382]

[0384] (7) 화합물 49의 합성



[Chemical Formula 49-f]

Compound 49

[0385]

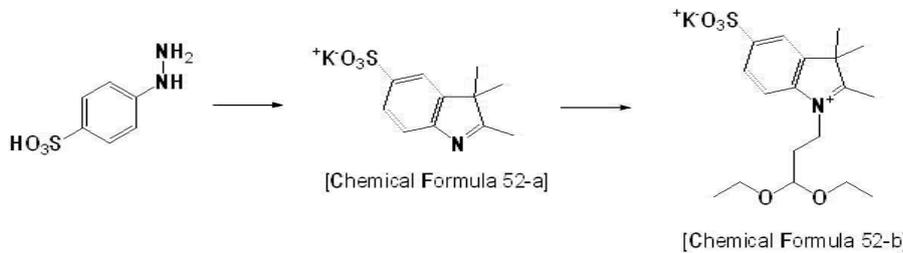
[Chemical Formula 49-f]로 표시되는 화합물 2g (4.7mmol)과 2,4-다이하이드록시 벤즈알데하이드 0.58g (4.7mmol)을 에탄올 20ml에 넣고 3h 동안 환류, 교반하였다. 상온으로 냉각하여 감압 증류 후 실리카 컬럼 정제하였다. 정제한 물질에 클로로포름 10ml와 50% 황산 수용액 1ml를 넣고 상온에서 20분 교반하였다. 2노르말 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH를 7-8로 맞추고 메틸렌클로라이드로 추출하였다. 감압 증류 후 실리카 컬럼 정제하여 화합물 49를 합성하였다.

[0389]

제조예 8. 화합물 52의 합성

[0390]

(1) [Chemical Formula 52-a]로 표시되는 화합물의 합성



[0392]

[0394]

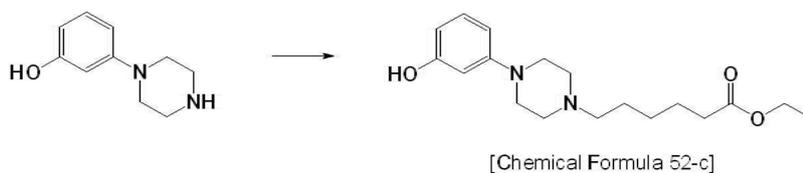
p-히드라지노벤젠설포산(p-Hydrazinobenzenesulfonic acid) (20 g, 106 mmol)과 3-메틸-2-부타논(27.48 g, 319 mmol)을 6 N 염산 수용액 30ml/에탄올 60ml에 가한 후, 12시간 동안 환류 교반하였다. 상온으로 냉각시키고, 생성된 고체를 여과하였다. 에틸아세테이트로 세정후 감압 건조하였다. 수산화칼륨(1.4 g, 25.4 mmol)을 프로판올 35ml에 용해시키고, 여과된 고체(5.1 g, 21.2 mmol)를 메탄올 35ml에 용해시키고 적가 후, 상온에서 12시간 교반하였다. 고체를 여과 후 건조하였다. C18 역상 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 [Chemical Formula 52-a]로 표시되는 화합물을 수득하였다(11.1 g, 30%).

[0395]

[Chemical Formula 52-a]로 표시되는 화합물(2.0 g, 7.4 mmol)을 상온, 질소 기류하에서 에탄올과 함께 교반하고, 48% 염산 수용액(10.0ml)을 적가하였다. 1시간 후 반응액을 감압 증류하였다. 감압 증류된 반응기에 아세트나이트릴(120.0ml), 아세트산(3.0ml)와 아크롤레닌 다이에틸아세탈(17.3 g, 133.0 mmol)을 첨가한 후 70에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응액을 감압 증류하고 HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μm 컬럼, 물/아세트나이트릴(0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60 분 동안 10~100%까지 20ml/min으로 정제하여 [Chemical Formula 52-a]로 표시되는 화합물을 수득하였다(0.9 g, 30%).

[0397]

(2) [Chemical Formula 52-c]로 표시되는 화합물의 합성

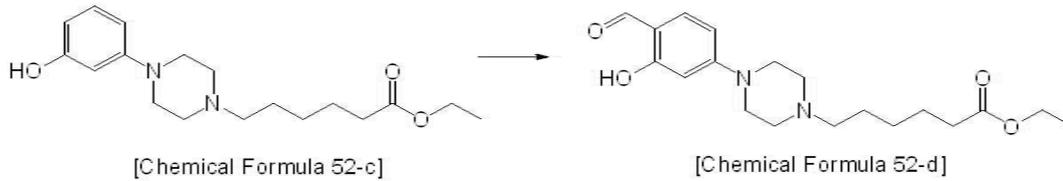


[0399]

[0401]

3-(1-Piperazinyl)phenol (10 g, 0.056 mol), 6-bromohexanoate (12.5 g, 0.056 mol) 및 diisopropylethylamine (14.5 g, 0.112 mol)을 아세트나이트릴 100ml에 넣고 60에서 교반한다. 24시간 동안 반응시킨 후 상온에서 냉각하였다. 물에 반응물을 붓고 메틸렌클로라이드로 추출하였다. 마그네슘설페이트로 수분을 제거하고 고체를 필터한 뒤 여과액을 농축하고 컬럼정제하였다(13 g, 72%)

[0403] (3) [Chemical Formula 52-d]로 표시되는 화합물의 합성

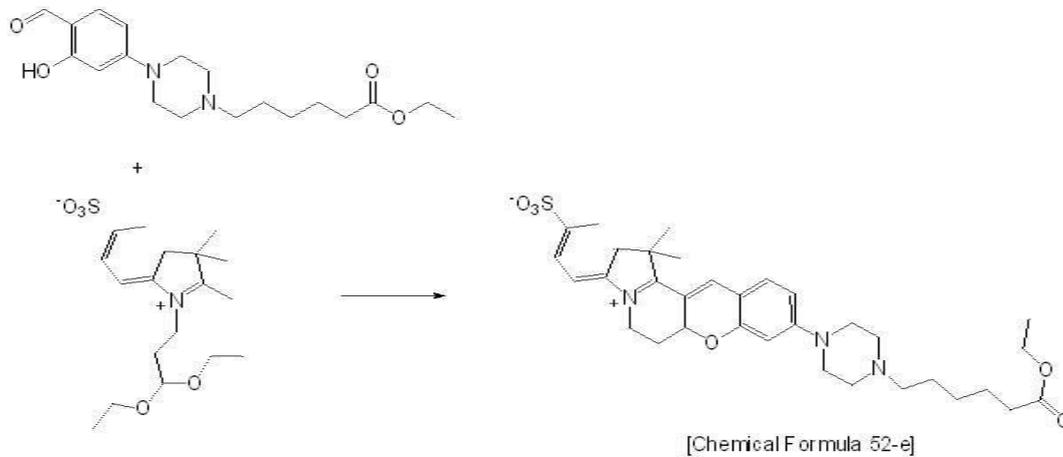


[0405]

[0407] 반응기에 엔-디메틸포름아마이드 50ml를 담고 0℃로 냉각한 뒤 포스포르스옥시클로라이드(2.6 g, 0.017mol)를 적가하였다. 10분 동안 교반하고 [화학식 1]로 표시되는 화합물(5 g, 0.016 mol)을 엔-디메틸포름아마이드에 희석하여 적가하였다. 50℃에서 12시간 반응 후 상온냉각하였다. 반응물을 얼음물에 붓고 1M 소듐하이드록사이드 수용액으로 중화한 뒤 에틸아세테이트로 추출하였다. 용액을 감압농축 하고 실리카 컬럼 정제하였다(4.59 g, 85%)

[0409]

(4) [Chemical Formula 52-e]의 화합물의 합성

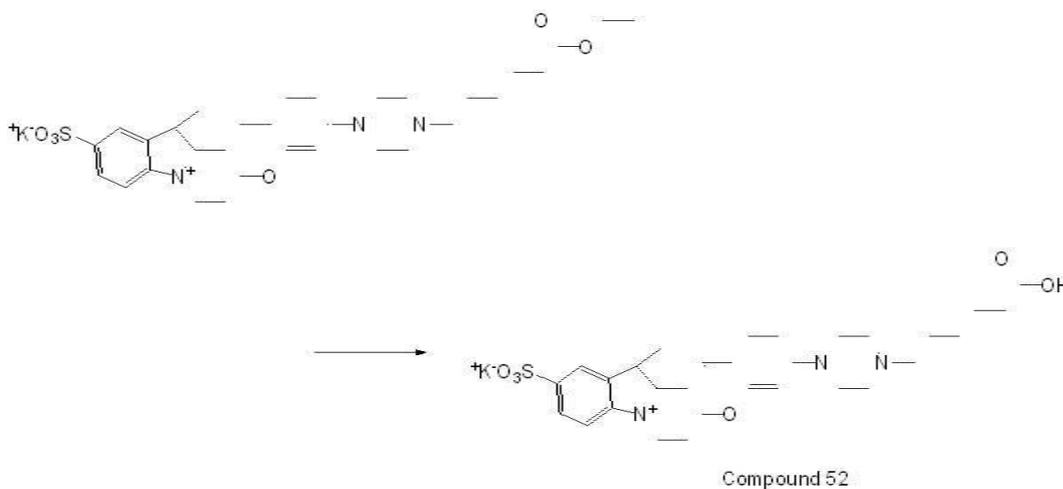


[0411]

[0413] [Chemical Formula 52-b]로 표시되는 화합물(0.8g, 1.9mmol)과 [Chemical Formula 52-d]로 표시되는 화합물(0.7g, 1.9mmol)을 에탄올 20ml에 녹인 후 80에서 8시간 교반하였다. 반응 종료 후 감압농축으로 용매를 제거하였다. 농축된 반응물을 클로로포름 50ml에 녹인 후 50% 황산 1ml을 적가하였다. 다이클로로메탄으로 희석하여 물로 추출하였다. 유기층 감압농축 후 HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μm 컬럼, 물/아세트나이트릴(0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60분 동안 10~100%까지 20ml/min으로 정제하였다(0.4 g, 51%). LC-MS : m/z= 579.24[M+]

[0415]

(5) 화합물 52의 합성



[0417]

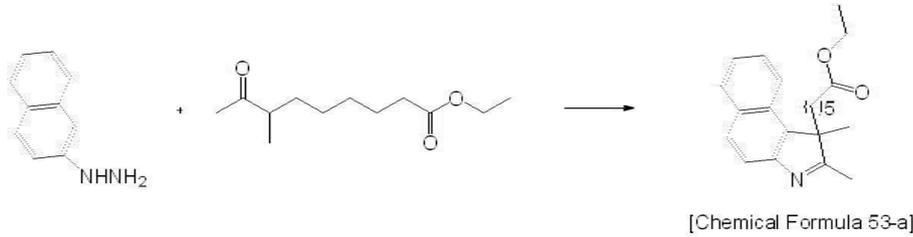
[0419] 반응기에 [Chemical Formula 52-e]로 표시되는 화합물(0.5 g, 0.0008 mol)과 메탄올 10ml를 담고 상온에서 교반하였다. 포타슘하이드록사이드(0.09g, 0.0016mol)과 물 5ml를 혼합하여 용액을 만들고 반응기에 주입한 뒤 55

℃에서 2시간동안 반응시킨 후 상온에서 냉각하였다. 2N HCl 수용액으로 pH 6~7로 중화하고 메틸렌클로라이드로 추출한 후 용매를 제거하고 걸름 정제하였다(0.45g, 98%). LC-MS : m/z= 618.20[M+]

[0421] 제조예 9 및 10. 화합물 53 및 화합물 54의 합성

[0422] (1) [Chemical Formula 53-a]로 표시되는 화합물의 합성

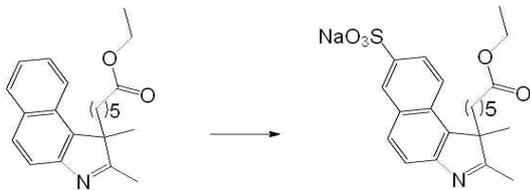
[0423] [Chemical Formula 35-a]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 53-a]로 표시되는 화합물을 수득하였다.



[0425]

[0427] H NMR (400MHz, CDC13): δ = 7.92(2H, dd), 7.81(1H, d), 7.76(1H, d), 7.49(1H, t), 7.39(1H, t), 4.01(2H, q), 2.38(1H, m), 2.32(3H, s), 2.04(2H, t), 1.97(1H, m), 1.47(3H, s), 1.35(2H, m), 1.16(3H, t), 1.07(2H, m), 0.58(1H, m), 0.39(1H, m)

[0429] (2) [Chemical Formula 53-b]로 표시되는 화합물의 합성

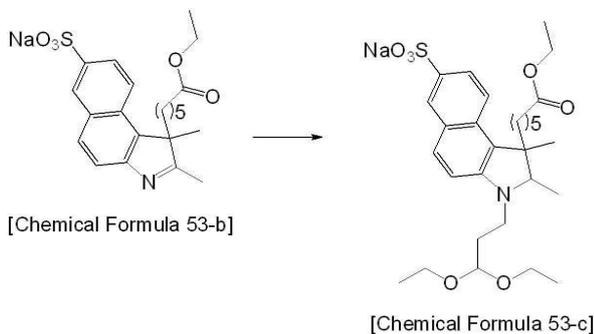


[0431]

[0433] [Chemical Formula 53-a]로 표시되는 화합물 10g (30mmol)과 황산 용액 5ml을 넣고 180에서 가열 교반하였다. 두시간 후 상온으로 냉각하고 얼음에 반응액을 부어주었다. 50% 수산화나트륨 용액 5ml를 천천히 적가하였다. 상온에서 24시간 동안 교반 후, 생성된 침전물은 필터하고 여액에 포화 소듐설페이트 수용액 5ml를 첨가하였다. 생성된 침전물을 필터하고 고체를 물에서 두번 재결정한 후 얻어진 고체를 진공건조하였다(8g, 60%).

[0435] (3) [Chemical Formula 53-c]로 표시되는 화합물의 합성

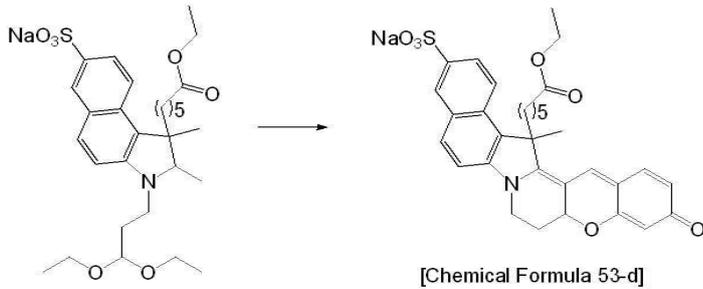
[0436] [Chemical Formula 35-c]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 53-c]로 표시되는 화합물을 수득하였다.



[0438]

[0440] (4) [Chemical Formula 53-d]으로 표시되는 화합물의 합성

[0441] [Chemical Formula 35-d]로 표시되는 화합물을 합성하는 반응과 같이 [Chemical Formula 53-d]로 표시되는 화합물을 수득하였다.

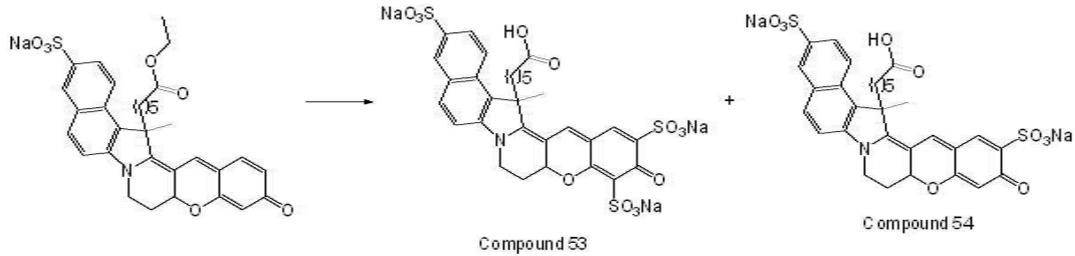


[0443]

[0445]

[Chemical Formula 53-c]

(5) 화합물 53 및 54의 합성



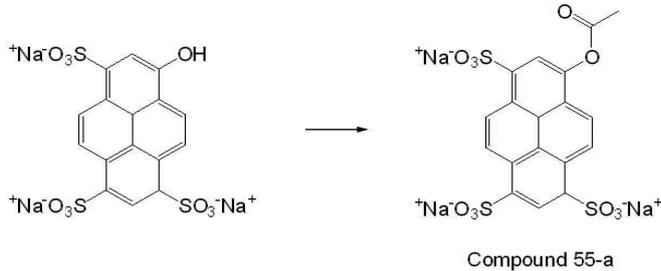
[0447]

[0449]

[Chemical Formula 53-d]로 표시되는 화합물 0.3g (30mmol)과 황산 용액 1ml을 넣고 40에서 가열 교반하였다. 두시간 후 상온으로 냉각하고 얼음에 반응액을 부어주었다. 50% 수산화나트륨 용액을 천천히 적가하여 중성을 맞추었다. 컬럼으로 화합물 53 및 화합물 54를 분리 후, HPLC Rainin Dynamax C18, 8 μm 컬럼, 물/ 아세트나이트릴(0.1% 트리플루오로아세트산)의 전개액으로 60분동안 10~100까지 20ml/min으로 정제하였다. LC-MS : 화합물 53의 m/z= 773.03 [M+], 화합물 54의 m/z= 671.09 [M+]

[0451]

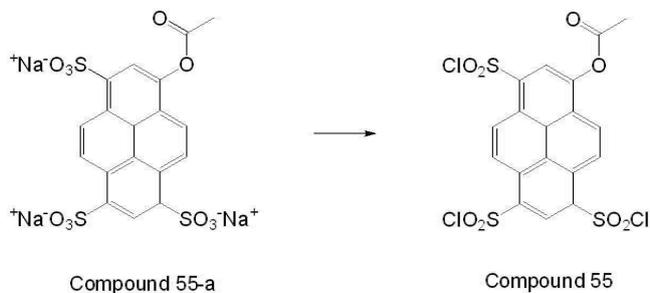
제조예 11. 화합물 55의 제조방법



[0453]

[0455]

HPTS (8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt) (10 g, 0.019 mol), sodium acetate (1.64 g, 0.02 mol) 그리고 acetic anhydride 100ml를 반응기에 담고 상온 교반시켰다. 확실히 분산되고 나서 승온하여 35시간 동안 환류교반하였다. 반응 확인 후 상온냉각하고 테트라하이드로퓨란에 희석하여 필터하고 고체를 씻어주었다. 아세톤으로 한번서 고체를 세척하고 건조시켰다. 회색 파우더 (8.2 g, 76%)

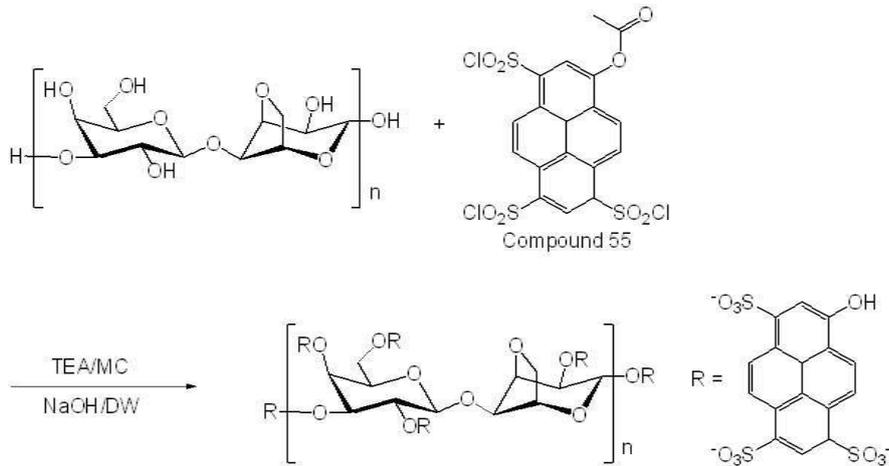


[0457]

[0459]

화합물 55-a (8 g, 0.014 mol)과 thionyl chloride 80ml를 반응기에 담고 상온 교반하였다. Dimethylformamide (0.216 g, 0.003 mol)을 반응기에 주입하고 5시간동안 환류 교반하였다. 반응을 확인하고 상온냉각한 뒤 얼음물에 반응물을 서서히 붓는다. 생성된 고체를 필터하고 물로 여러 번 세척하였다. 세척 완료된 고체를 건조시켜 화합물 55를 수득하였다(7g, 90 %).

[0461] 제조예 12. pH 검출용 염료 화합물

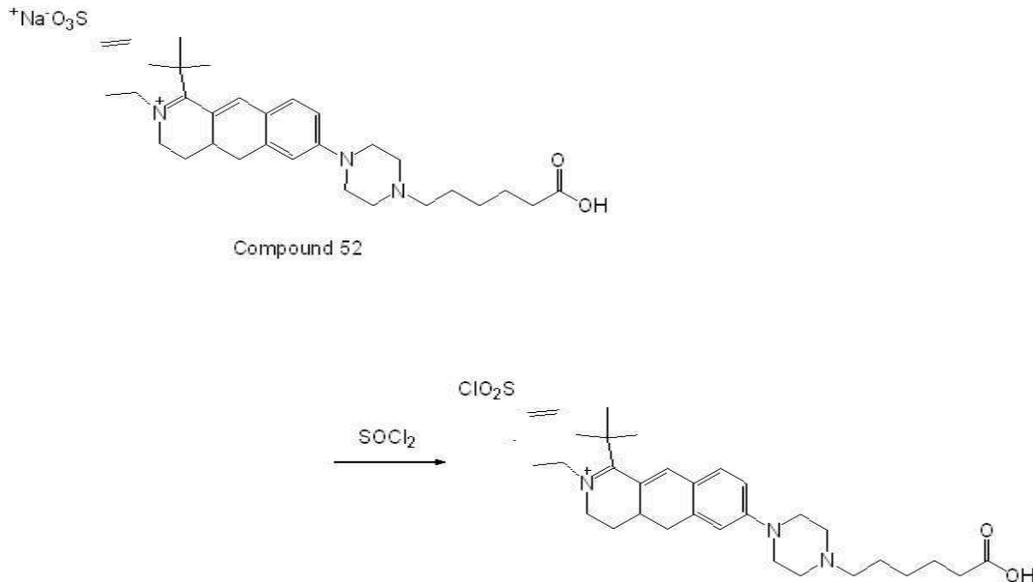


[0463]

[0465] 아가로스 1g을 메틸렌클로라이드(MC) 5ml에 분산시키고 트라이에틸아민(TEA) 1g을 넣은 뒤 상온에서 30분 교반하였다. 그 후 온도를 0로 낮추고 화합물 55 0.5g을 투입하였다. 이 때, 상기 용액은 주황색에서 갈색으로 변화하였다. 상기 용액을 상온에서 2시간 반응시킨 후, 반응물을 필터하고 메틸렌클로라이드로 충분히 세척하고, 건조시켜, 갈색 파우더를 얻었다.

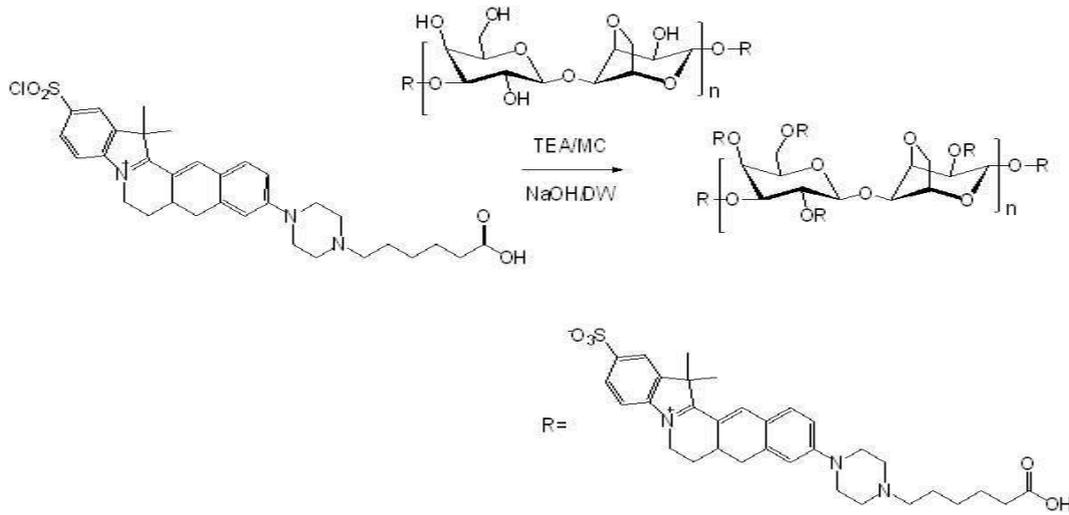
[0466] 상기 갈색 파우더를 반응용기에 담고 물로 분산시킨 후, 상기 용액을 NaOH 수용액으로 약 pH 8 ~ 10의 염기성 용액으로 만들었다. 상기 용액을 상온에서 2시간반응시켜 형광주황색의 파우더를 얻었다.상기 파우더 고체를 필터하고 물로 충분히 세척하고 건조시킨 후, 상기 고체를 소량 물에 녹여 gel로 만들었다.

[0468] 제조예 13. pH 검출용 염료 화합물



[0470]

[0472] 화합물 52 (2g, 0.003mol)를 thionyl chloride 10ml에 분산시켰다. DMF (0.05g, 0.0007mol)을 투입하고 5시간 동안 환류, 교반하며 반응시켰다. TLC로 반응을 확인하고 상온으로 냉각시켰다. 얼음에 반응물을 서서히 부으며 교반시켰다. 온도변화가 없을 때 까지 기다렸다가 고체를 필터한다. 물로 충분히 씻어주고 고체를 건조시켰다 (1.4g, yield: 70%).



[0474]

[0476]

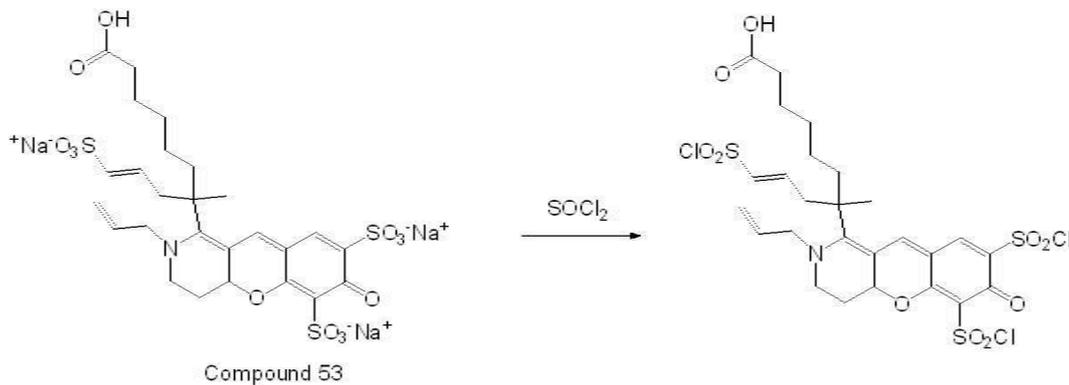
아가로스 1g을 메틸렌클로라이드(MC) 5ml에 분산시키고 트리에틸아민(TEA) 1g을 넣은 뒤 상온에서 30분 교반하였다. 그 후 온도를 0로 낮추고 화합물 12-a 0.5g을 투입하였다. 상기 용액을 상온에서 2시간 반응시킨 후, 반응물을 필터하고 메틸렌클로라이드로 충분히 세척하고, 건조시켜, 갈색 파우더를 얻었다.

[0477]

상기 갈색 파우더를 반응용기에 담고 물로 분산시킨 후, 상기 용액을 NaOH 수용액으로 약 pH 8 ~ 10의 염기성 용액으로 만들었다. 상기 용액을 상온에서 2시간 반응시켜 형광붉은색의 파우더를 얻었다. 상기 파우더 고체를 필터하고 물로 충분히 세척하고 건조시킨 후, 상기 고체를 소량 물에 녹여 gel로 만들었다.

[0479]

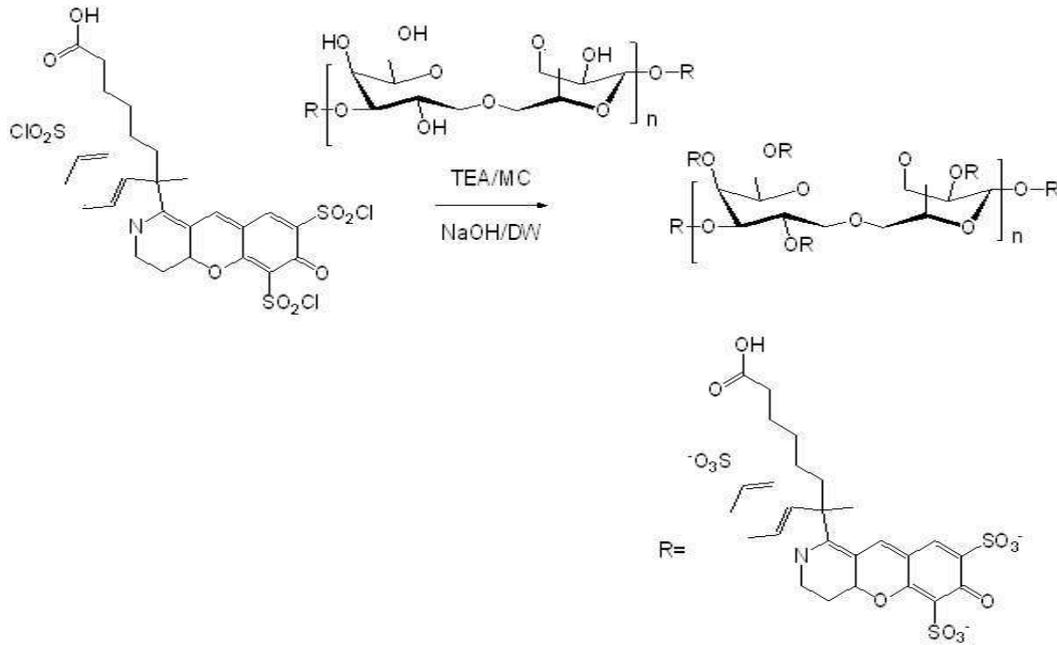
제조예 14. pH 검출용 염료 화합물



[0481]

[0483]

화합물 53 (1.8g, 0.0025mol)을 thionyl chloride 9ml에 분산시켰다. DMF (0.038g, 0.0005mol)을 투입하고 5시간 동안 환류, 교반하며 반응시켰다. TLC로 반응을 확인하고 상온으로 냉각시켰다. 얼음에 반응물을 서서히 부으며 교반시키고, 온도변화가 없을 때 까지 기다렸다가 고체를 필터하였다. 물로 충분히 씻어주고 고체를 건조시켰다(1.2g, yield: 67%).



[0485]

[0487] 아가로스 1g을 메틸렌클로라이드(MC) 5ml에 분산시키고 트라이에틸아민(TEA) 1g을 넣은 뒤 상온에서 30분 교반하였다. 그 후 온도를 0로 낮추고 13-a 0.5g을 투입하였다. 상기 용액을 상온에서 2시간 반응시킨 후, 반응물을 필터하고 메틸렌클로라이드로 충분히 세척하고, 건조시켜, 갈색 파우더를 얻었다.

[0488] 상기 갈색 파우더를 반응용기에 담고 물로 분산시킨 후, 상기 용액을 NaOH 수용액으로 약 pH 8 ~ 10의 염기성 용액으로 만들었다. 상기 용액을 상온에서 2시간 반응시켜 형광분홍색의 파우더를 얻었다. 상기 파우더 고체를 필터하고 물로 충분히 세척하고 건조시킨 후, 상기 고체를 소량 물에 녹여 gel로 만들었다.

[0490] **실시예 1. 염료 화합물을 포함하는 필름 제조**

[0491] 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물 0.2g을 증류수(DW) 9.8g에 넣어 혼합 용액을 준비하였다. 혼합 용액을 포함하는 반응 용기를 hot plate에 올리고 200rpm으로 교반시키고, 100℃도로 가열하며 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물이 완전히 녹을 때까지 교반시켰다. 이어서, 혼합 용액을 원하는 틀에 담고 상온에서 약 30분간 방치하여 겔화시켜 노란색의 겔을 얻었다. 얻어진 겔을 폴리에틸렌 프탈레이트 필름 위에 올리고 압착하였다. 그 후, 약 60℃ 오븐에서 5시간 동안 건조시켜 필름을 얻었다.

[0493] **실시예 2. 염료 화합물을 포함하는 필름 제조**

[0494] 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물을 증류수에 1 wt%로 용해시킨 혼합 용액을 나이트로 셀룰로오스 멤브레인 상에 코팅한 후 상온에서 12시간 동안 건조시켜 염료 화합물이 코팅된 필름을 제조하였다.

[0496] **실시예 3. 염료 화합물을 포함하는 필름 제조**

[0497] 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물을 증류수에 1 wt%로 용해시킨 혼합 용액 내 나이트로 셀룰로오스 멤브레인을 침지시킨 후 60℃에서 12시간 동안 방치하였다. 염료 화합물이 침지된 나이트로 셀룰로오스 멤브레인을 꺼내 증류수로 표면에 침지되지 않은 염료 화합물을 세척한 후 상온에서 12시간 동안 건조시켜 염료 화합물이 코팅된 필름을 제조하였다.

[0499] **실시예 4. 염료 화합물이 코팅된 플레이트**

[0500] 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물 0.2g을 증류수(DW) 9.8g에 넣어 혼합 용액을 준비하였다. 혼합 용액을 포함하는 반응 용기를 hot plate에 올리고 200rpm으로 교반시키고, 100℃로 가열하여 염료 화합물이 완전히 녹을 때까지 교반시켰다. 이어서, 혼합 용액을 80로 유지하여 혼합 용액이 겔화되지 않도록 하였다.

[0501] 그 후, 플레이트의 각 웰(well)에 혼합 용액을 5ul씩 원하는 위치에 떨어뜨리고, 상온에서 10분간 겔화시킨 후 60℃ 오븐에서 5시간 동안 건조시켜 플레이트에 코팅을 완료하였다.

[0503] **실시예 5. 염료 화합물이 코팅된 플레이트**

[0504] 제조예 13에 따라 제조된 염료 화합물을 사용한 것을 제외하고 실시예 2와 동일한 방법으로 플레이트에 염료 화

합물을 코팅하였다.

[0506] **실시예 6. 염료 화합물이 코팅된 플레이트**

[0507] 제조예 14에 따라 제조된 염료 화합물을 사용한 것을 제외하고 실시예 2와 동일한 방법으로 플레이트에 염료 화합물을 코팅하였다.

[0509] **실시예 7. TiO₂ 반사층이 도입된 필름**

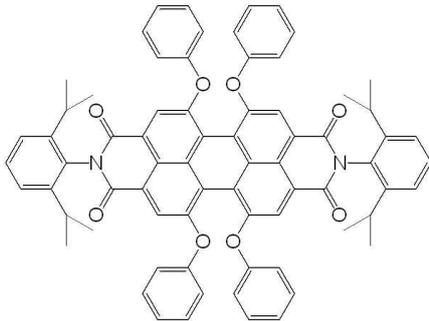
[0510] (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane 3ml와 methyltrimethoxysilane 3ml를 넣었다. 이어서, 증류수 1ml를 넣은 후 5분 동안 sonication으로 교반하여 TiO₂를 고르게 분산시켰다. 36% HCl 1ml를 적가한 후 50℃에서 1.5 시간 동안 반응시킨 후 폴리에틸렌 프탈레이트 필름 상에 bar coating하였다. 상온에서 12시간 동안 건조시킨 후 60℃ 오븐에서 3시간 동안 건조하여 TiO₂ 반사층이 마련된 폴리머 필름을 준비하였다.

[0511] 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물을 증류수에 1 wt%로 용해시킨 혼합 용액 내 나이트로 셀룰로오스 멤브레인을 침지시킨 후 60℃에서 12시간 동안 방치하였다. 염료 화합물이 침지된 나이트로 셀룰로오스 멤브레인을 꺼내 증류수로 표면에 침지되지 않은 염료 화합물을 세척한 후 상온에서 12시간 동안 건조시켜 염료 화합물이 코팅된 필름을 제조하였다.

[0512] 이어서, 염료 화합물이 코팅된 필름 상에 투명 접착제를 바른 후 TiO₂ 반사층이 마련된 폴리머 필름을 부착시켜 TiO₂ 반사층이 도입된 필름을 제조하였다.

[0514] **실시예 8. 레퍼런스 염료 화합물을 포함하는 필름 제조**

[0515] Acrylate resin 30% solid 와 하기의 화학식을 가지는 레퍼런스 염료 화합물 0.1~1%를 24시간 동안 혼합하여 투명 폴리머 필름(폴리에틸렌 프탈레이트, 폴리스타이렌 등) 상에 bar coating하고 건조시켜 레퍼런스 염료 화합물이 코팅된 필름을 제조하였다.



[0517] 이어서, 레퍼런스 염료 화합물이 코팅된 필름 상에 (접착제)를 도포하고 실시예 3에 따라 제조된 필름을 부착한 후 12시간 동안 건조하여 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물을 포함하는 필름과 레퍼런스 염료 화합물을 포함하는 필름이 적층된 필름을 제조하였다.

[0521] **실험예 1. 염료 화합물의 형광 특성 평가**

[0522] 대조군으로서 HPTS 화합물과 제조예 8 내지 제조예 10에 따라 제조된 화합물 52 내지 화합물 54의 흡수 스펙트럼(λ_{abs}), 발광 스펙트럼(λ_{em}), 및 양자 효율을 측정하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

| 구분 | 용매 | λ_{abs} (nm) | λ_{em} (nm) | 양자효율 |
|--------|-------------|----------------------|---------------------|------|
| HPTS | acid buffer | 411 | 533 | 1.0 |
| | base buffer | 466 | 533 | 1.0 |
| 화합물 52 | acid buffer | 549 | 596 | 0.53 |
| | base buffer | 562 | 596 | 0.53 |
| 화합물 53 | acid buffer | 475 | 585 | 0.72 |
| | base buffer | 564 | 585 | 0.72 |
| 화합물 54 | acid buffer | 474 | 583 | 0.68 |
| | base buffer | 563 | 583 | 0.68 |

- [0526] 상기 염료 화합물은 양자 효율 측면에서도 상당히 우수하므로, 보다 강한 형광을 나타내어 광학 영상이 필요한 다양한 생물학적 시스템에 대한 프로브 등으로 광범위한 분야에 유용하게 활용할 수 있다.
- [0527] 또한, 제조예 12 염료 화합물의 pH 검출에 대한 감도를 확인하기 위하여, 0.1M의 인산 완충 용액에 1N의 염산 또는 수산화나트륨 용액을 가하여 pH 2 내지 11의 인산 완충 용액을 제조하였다.
- [0528] 상기 pH 2 내지 11 의 인산 완충 용액에서의 상기 염료 화합물의 형광 세기를 측정하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0529] 도 2의 (a)는 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물의 pH 2 (좌측) 및 pH 10 (우측)에서의 형광을 나타낸 것이고, (b)는 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물의 pH 2 (좌측) 및 pH 10 (우측)에서 UV를 조사시 형광을 나타낸 것이다.
- [0530] 도 2를 참조하면, 상기 염료 화합물은 pH 변화에 대하여 형광의 세기가 변하는 것을 확인할 수 있다. 특히, 염기성 조건에서 보다 강한 형광세기를 가지는 것을 확인할 수 있다.
- [0531] 특히, 상기 염료 화합물은 pH 4 내지 9의 범위에서, 형광 세기의 변화가 현저히 커지는 것을 알 수 있다. 상기 pH 범위는 생체 내 세포 등의 pH 범위와 유사하다. 따라서, 상기 염료 화합물은 생체 내 pH 검출 및 생체 내 세포의 변화 및 프로세스를 확인하는 데 유용하게 활용할 수 있다.
- [0533] **실험예 2. 염료 화합물을 포함하는 필름의 형광 특성 평가**
- [0534] 실시예 1에 따라 제조된 필름의 pH 검출에 대한 감도 및 필름의 안정성을 조사하기 위하여, 0.1M의 인산 완충 용액에 1N의 염산 또는 수산화나트륨 용액을 가하여 pH 4 내지 8 의 인산 완충 용액을 제조하였다.
- [0535] 그리고, 실시예 1에 따라 제조된 필름을 플레이트의 96 개의 웰에 담지하고, 웰에 pH 4 내지 8의 인산 완충 용액을 이용하여 여기파장 454 nm, 방출파장 520 nm에서 발생하는 형광 값을 측정하였다.
- [0536] 이 때, 상기 형광 값은 Thermo Scientific VariosKan[®] Flash을 이용하여 10 초 후 20번 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0537] 상기 도면에 나타난 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따라 제작된 상기 필름은 상기 pH 의 범위에서 형광 밝기의 차이가 현저한 것을 알 수 있다. 즉, 상기 필름은 본 발명의 염료 화합물이 가지는 pH 의 범위에 따른 형광 밝기와 유사한 수치를 나타내는 바, 이를 포함하는 필름도 pH 변화에 대하여 높은 감도를 그대로 유지하고, 안정적인 것을 알 수 있다.
- [0538] 또한, 상기 필름은 10초 만에도 pH 변화에 따라, 형광 밝기가 현저히 차이가 나는 바, 감도가 매우 우수한 것을 알 수 있다. 게다가, 상기 필름은 20번 측정할 때마다 동일한 형광 값을 나타내는 바, 상기 필름 안의 염료 화합물은 필름 내에서 매우 안정적으로 유지되는 것을 확인할 수 있다.
- [0539] 또한, 실시예 2 및 실시예 3에 따라 제조된 필름의 pH 검출에 대한 감도 및 필름의 안정성을 조사하기 위하여, 0.1M의 인산 완충 용액에 1N의 염산 또는 수산화나트륨 용액을 가하여 pH 4 내지 9의 인산 완충 용액을 제조하였다.
- [0540] 그리고, 실시예 2 및 실시예 3에 따라 제조된 필름을 각각 플레이트의 웰에 담지하고, 웰에 pH 4 내지 9의 인산 완충 용액을 이용하여 여기파장 454 nm, 방출파장 520 nm에서 발생하는 형광 값을 측정하였으며, 그 결과를 표 2 (실시예 2), 표 3 (실시예 3), 도 4 (실시예 2) 및 도 5 (실시예 3)에 나타내었다.
- [0541] 표 2, 표 3, 도 4 및 도 5의 결과를 참조하면, 나이트로 셀룰로오스 멤브레인 표면에 염료 화합물을 코팅하는 방식에 따라 형광 특성이 다소 다른 것을 확인할 수 있으나, 각 웰의 편차가 실시예 2의 경우 ±15% 이하, 실시예 3의 경우 ±5% 이하인 것으로 확인되었다.

표 2

[0543]

| 구분 | 형광 강도 | | | | | |
|--------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|
| | pH 4 | pH 5 | pH 6 | pH 7 | pH 8 | pH 9 |
| well-1 | 263.17 | 483.78 | 2027.74 | 7097.48 | 9249.37 | 10873.00 |
| well-2 | 232.05 | 404.21 | 1781.65 | 6070.75 | 8237.87 | 9332.00 |

| | | | | | | |
|--------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|
| well-3 | 288.98 | 516.51 | 2180.23 | 7449.86 | 9789.89 | 11212.00 |
| 평균 | 261.40 | 468.17 | 1996.54 | 6872.70 | 9092.38 | 10472.33 |
| 최소 편차 | -9.54 | -9.36 | -8.43 | -7.75 | -7.12 | -6.60 |
| 최대 편차 | 12.65 | 15.82 | 12.06 | 13.21 | 10.37 | 12.22 |

표 3

| 구분 | 형광 강도 | | | | | |
|--------|-------|-------|--------|---------|---------|---------|
| | pH 4 | pH 5 | pH 6 | pH 7 | pH 8 | pH 9 |
| well-1 | 48.73 | 82.10 | 328.54 | 1170.17 | 1587.07 | 1824.70 |
| well-2 | 48.82 | 86.49 | 350.90 | 1243.18 | 1699.78 | 1927.92 |
| well-3 | 46.99 | 82.15 | 332.20 | 1196.20 | 1646.81 | 1887.39 |
| Well-4 | 48.14 | 88.81 | 355.40 | 1223.98 | 1676.56 | 1899.04 |
| 평균 | 48.17 | 84.89 | 341.76 | 1208.38 | 1652.56 | 1884.76 |
| 최소 편차 | -1.33 | -4.41 | -3.84 | -2.80 | -2.78 | -2.24 |
| 최대 편차 | 2.50 | 3.40 | 4.03 | 3.27 | 4.13 | 3.29 |

[0545]

따라서, 본 발명에 따른 염료 화합물은 필름의 형태로 복수 개의 샘플의 pH를 동시에 측정하는 데 유용하게 활용할 수 있다.

[0549]

실험예 3. 염료 화합물이 코팅된 플레이트의 형광 특성 평가

[0550]

실시에 4에 따라 제조된 플레이트의 pH 검출에 대한 감도 및 코팅의 안정성을 조사하기 위하여, 0.1M의 인산 완충 용액에 1N의 염산 또는 수산화나트륨 용액을 가하여 pH 4 내지 8의 인산 완충 용액을 제조하였다.

[0551]

그리고, 실시에 4에 따라 제조된 플레이트의 96개 웰에 상기 pH 4~8의 인산 완충 용액을 이용하여 여기파장 454 nm, 방출파장 520 nm에서 발생하는 형광 값을 reader 기(Thermo Scientific VariosKan[®] Flash)를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 형광 값(밝기)은 2초 간격으로 총 20회 측정되었으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0552]

상기 측정된 형광은 필름과 유사하게, 상기 생체 내 pH 범위에서 형광 밝기의 차이가 현저하게 나타났다. 또한, 상기 형광 값은 20번 측정할 때마다 동일, 유사한 형광 값을 나타내는 바, 상기 염료 화합물이 매우 안정적으로 코팅된 것을 확인할 수 있다.

[0553]

또한, 상기 염료 화합물의 코팅은 별도의 코팅 필름이 없음에도 불구하고, 흐트러짐 없이 플레이트에 결합된 상태로 남아 있는 것을 확인할 수 있다. 또한, 상기 염료 화합물이 갖는 pH 변화에 대한 고감도를 그대로 유지하는 것을 확인할 수 있다.

[0554]

따라서, 상기 염료 화합물은 생 세포에 침투하여 pH 측정하는 방법 외에, plate reader를 통해 세포의 pH를 측정하는 방법에도 사용할 수 있으며, pH를 측정하고자 하는 여러 적용분야에 다양하게 이용할 수 있다.

[0555]

또한, 실시에 4에 따라 제조된 플레이트 대신 실시에 5 및 실시에 6에 따라 제조된 플레이트에 대하여도 동일한 방법으로 여기파장 454 nm, 방출파장 520 nm에서 발생하는 형광 값을 reader 기(Thermo Scientific VariosKan[®] Flash)를 이용하여 측정하였다.

[0556]

실시에 5에 따라 제조된 플레이트에 대한 결과는 도 8 및 도 9에 나타내었으며, 실시에 6에 따라 제조된 플레이트에 대한 결과는 도 10 및 도 11에 나타내었다.

[0558]

실험예 4. 염료 화합물의 완충액에 대한 내성 평가

[0559]

제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물의 완충액에 대한 내성을 확인하기 위하여, 플레이트의 하나의 웰에 상기 염료 화합물을 5 μ l 담지하고, 60 $^{\circ}$ C에서 건조하였다.

[0560]

그리고, 상기 웰에 pH 4 내지 8 의 인산 완충 용액을 담지하고, 이를 이용하여 여기파장 454 nm, 방출파장 520 nm에서 발생하는 형광 값을 측정하였다. 이 때, 상기 형광 값은 reader 기(Thermo Scientific VariosKan[®] Flash)를 이용하여 2초 간격으로 총 20회 측정되었다.

[0561] 이 때, 상기 인산 완충 용액은 하나의 웰에 pH 4의 완충 용액을 담지하고 측정 후, 증류수로 5회 세척하고, 다시 pH 5의 완충 용액을 담지하여 측정하는 등의 순차적인 방법을 통하여 측정하였으며, 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0562] 도 12를 참조하면, 본 발명에 따라 제작된 상기 염료 화합물은 상기 pH의 범위에서 형광 밝기의 차이가 현저한 것을 알 수 있다. 상기 pH 범위는 생체 내 pH 범위에 대응되는 바, 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물은 생체 내 pH 변화 검출에 적절한 것을 알 수 있다.

[0563] 또한, 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물은 하나의 웰에서 측정하였음에도 불구하고, 각각의 pH에 따라 일정한 형광 값을 나타내는 바, 완충 용액에 대하여 매우 안정적인 것을 확인할 수 있다.

[0565] **실험예 5. TiO₂ 반사층을 포함하는 필름의 형광 특성 평가**

[0566] 실시예 3에 따라 제조된 필름과 실시예 7에 따라 제조된 필름의 pH 감도 평가 결과를 나타낸 표 4 및 도 13을 참조하면, TiO₂ 반사층을 포함하는 경우 형광 강도가 약 20~30% 향상되는 것을 확인할 수 있다.

표 4

| 구분 | 형광 강도 | | | | | |
|-------|-------|--------|--------|---------|---------|---------|
| | pH 4 | pH 5 | pH 6 | pH 7 | pH 8 | pH 9 |
| 실시예 6 | 79.41 | 131.31 | 485.73 | 1630.33 | 2279.26 | 2576.68 |
| 실시예 3 | 48.14 | 88.81 | 355.40 | 1223.98 | 1676.56 | 1899.04 |

[0570] **실험예 6. 레퍼런스 염료 화합물을 포함하는 필름의 특성 평가**

[0571] 실시예 8에 의해 제조된 필름에서 레퍼런스 염료 화합물이 코팅된 필름이 light source를 향하도록 plate에 접촉한 후 pH 4 내지 9의 인산 완충 용액을 이용하여 reader 기(Thermo Scientific Varioskan[®] Flash)에 넣어 460nm로 여기하여 방출 스펙트럼을 측정한 것을 도 14에 나타내었다.

[0572] 534nm, 600nm, 650nm, 700nm, 750nm 파장에서의 pH 변화에 따른 방출 스펙트럼 값을 도시하여 pH 변화에 따른 감도(밝기)를 도 15 내지 도 18에 나타내었다. 또한 534nm에서의 pH 변화에 따른 형광 세기/각 파장(600,650,700,750nm)에서의 pH 변화에 따른 형광세기로 계산된 값(ratio)을 도 15 내지 도 18에 나타내었다.

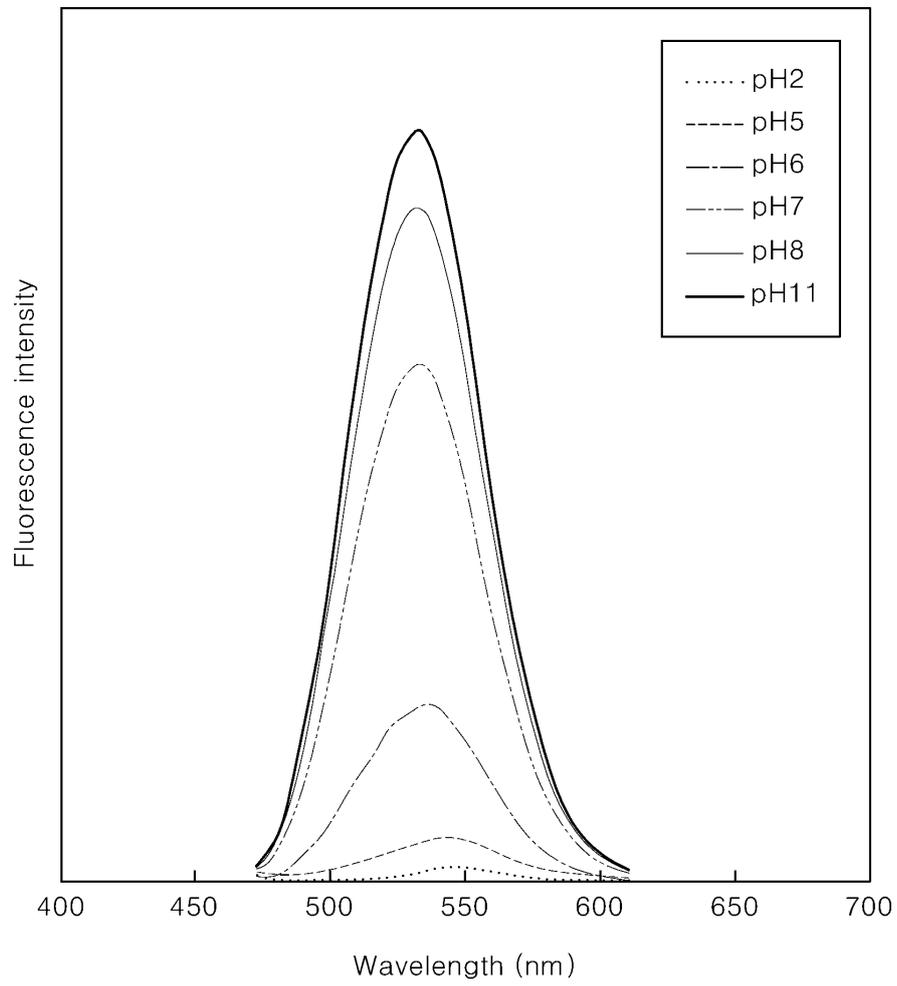
[0573] (참고로 534nm는 제조예 12에 따라 제조된 염료 화합물의 발광 파장이며, 600nm는 실시예 8에서 사용한 레퍼런스 염료 화합물의 발광 파장이며, 파장 겹침이 적어지는 순으로 650, 700, 750nm까지 각각 나타내었다)

[0574] 도 15 내지 도 18에서 ratio 값은 각각 다르게 나타나지만 실시예 8에 의해 제조된 필름의 형광세기 변화와 거의 일정한 패턴으로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 따라서 일정한 패턴의 ratio 값을 알고 있으면 pH에 따른 형광도 검정(calibration) 작업 없이도 바로 정확한 측정 데이터를 얻을 수 있으므로 측정준비 시간이나 데이터의 정확성, 신뢰성 등에서 많은 이점을 가질 수 있다.

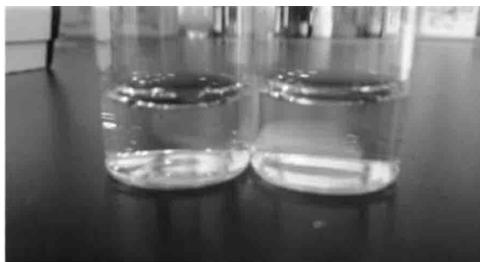
[0576] 이상, 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2

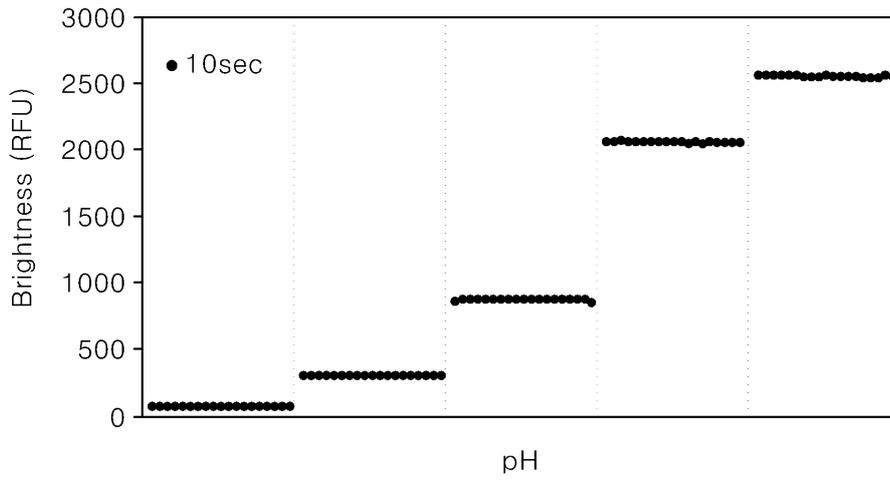


(a)

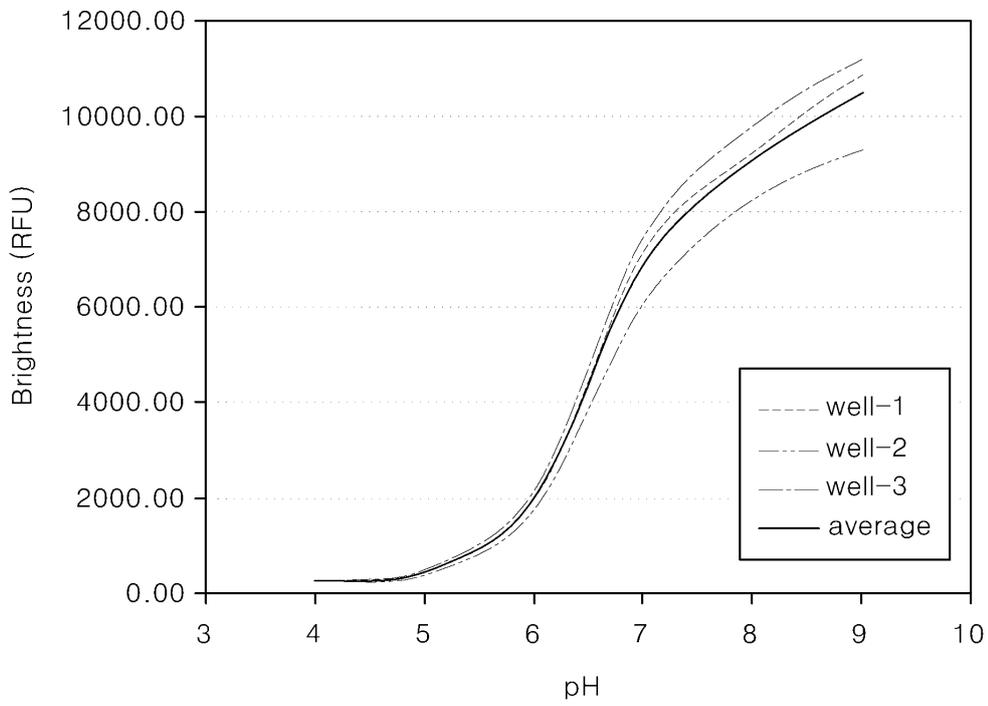


(b)

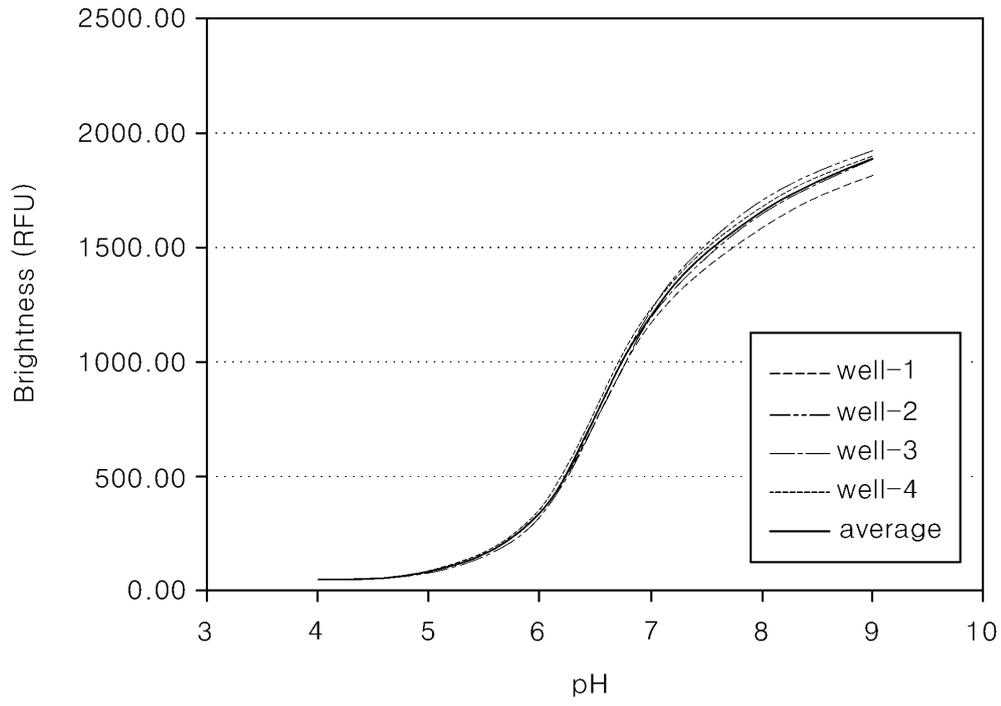
도면3



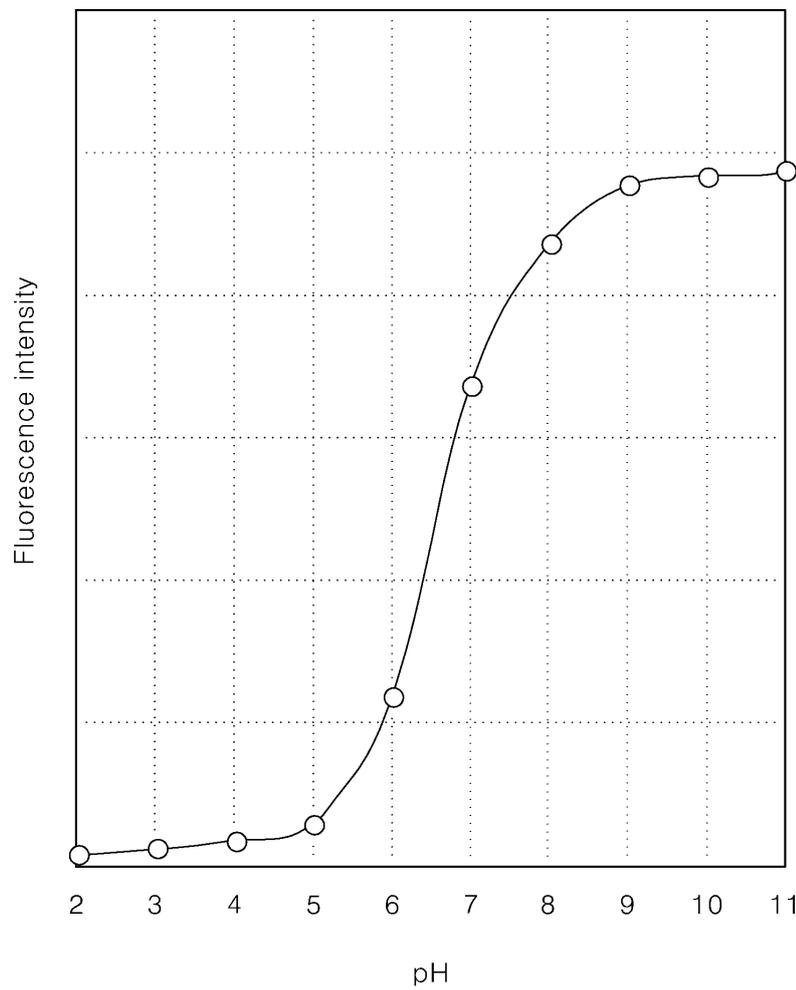
도면4



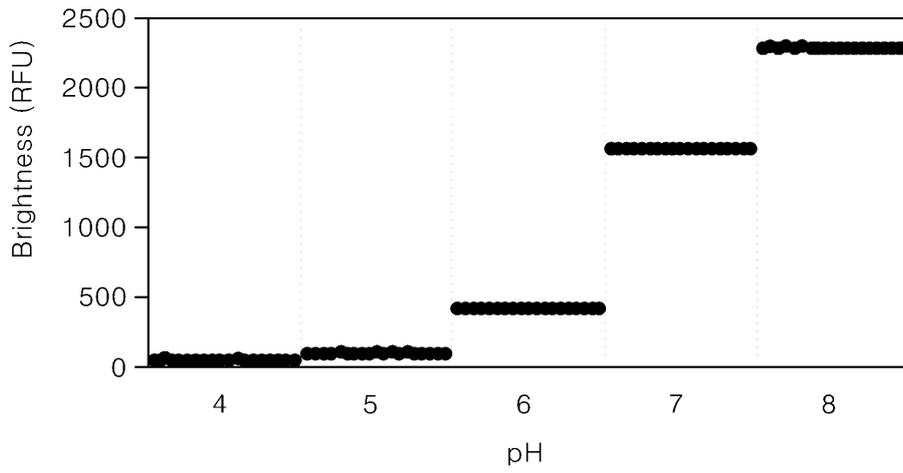
도면5



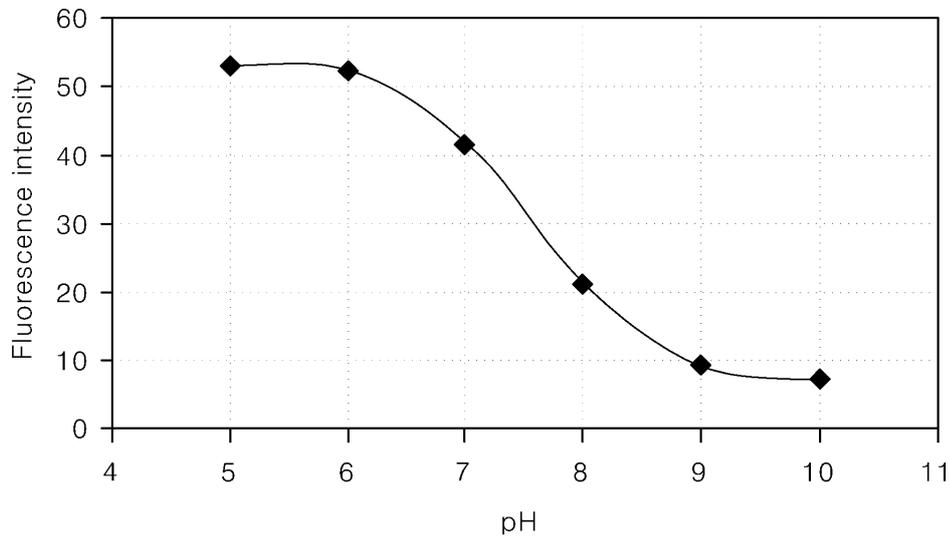
도면6



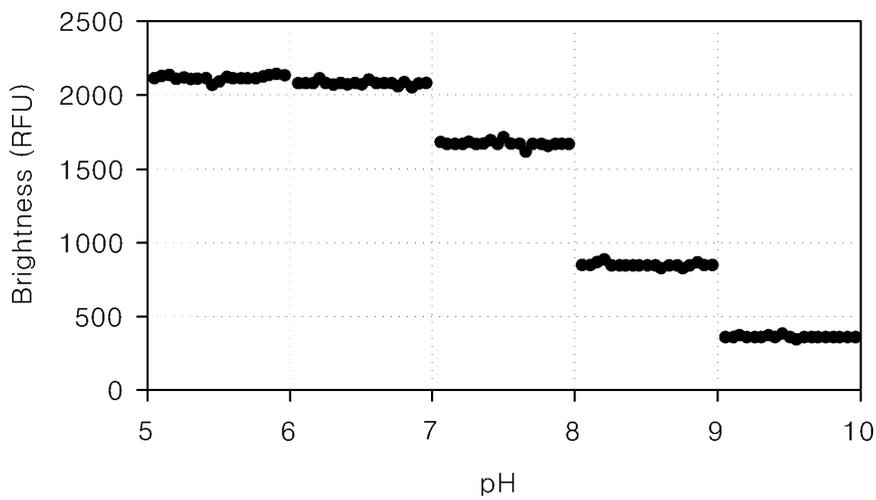
도면7



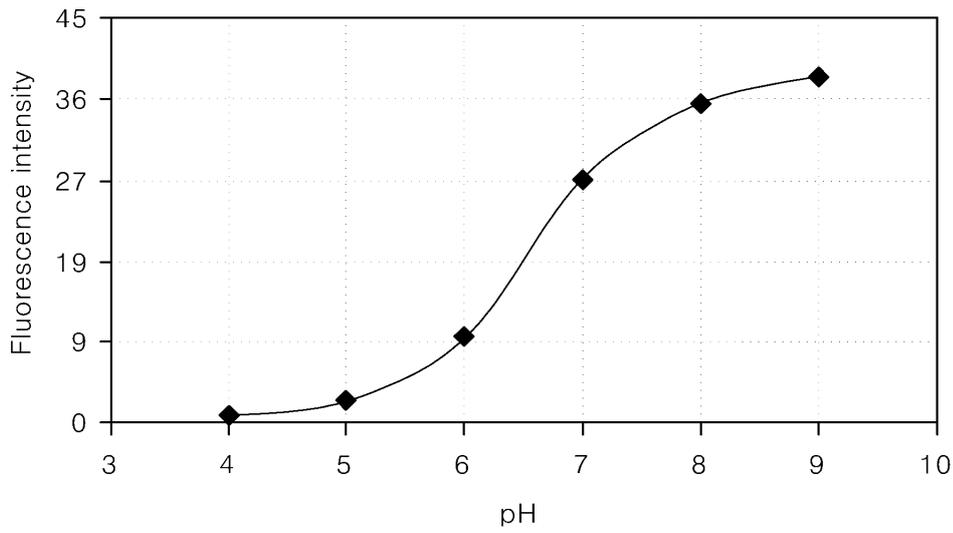
도면8



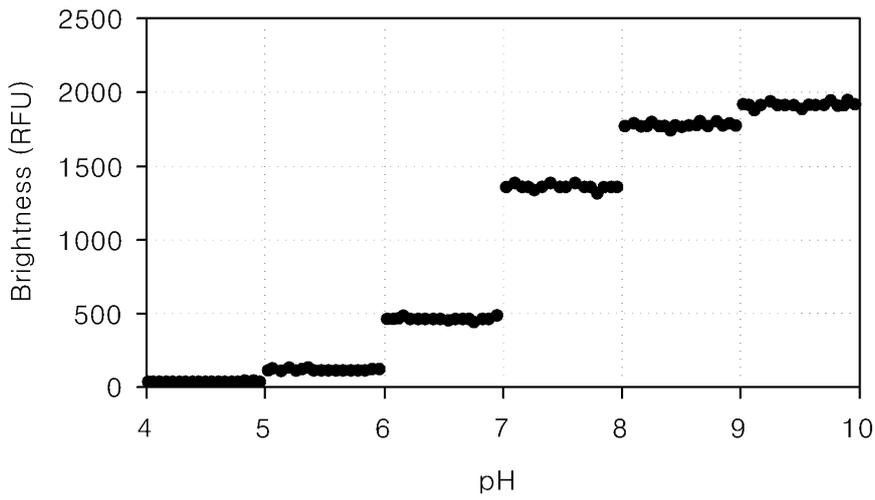
도면9



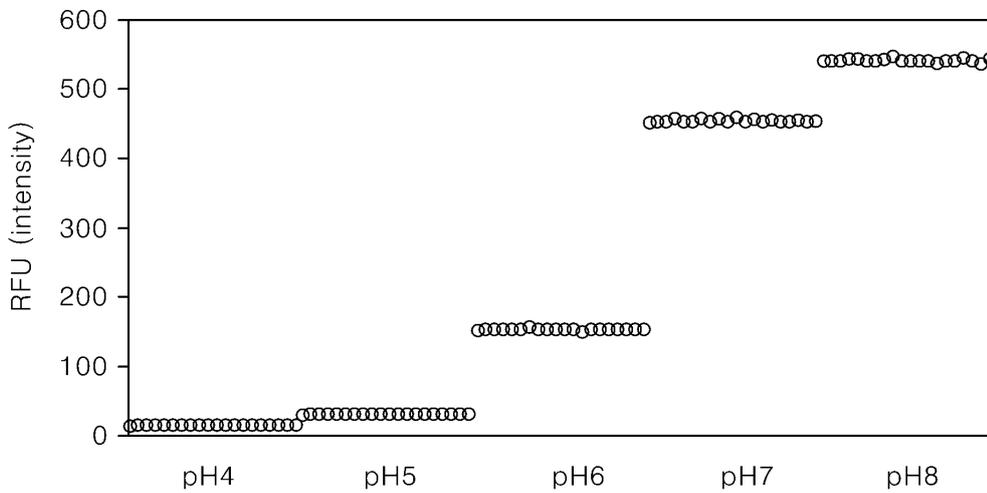
도면10



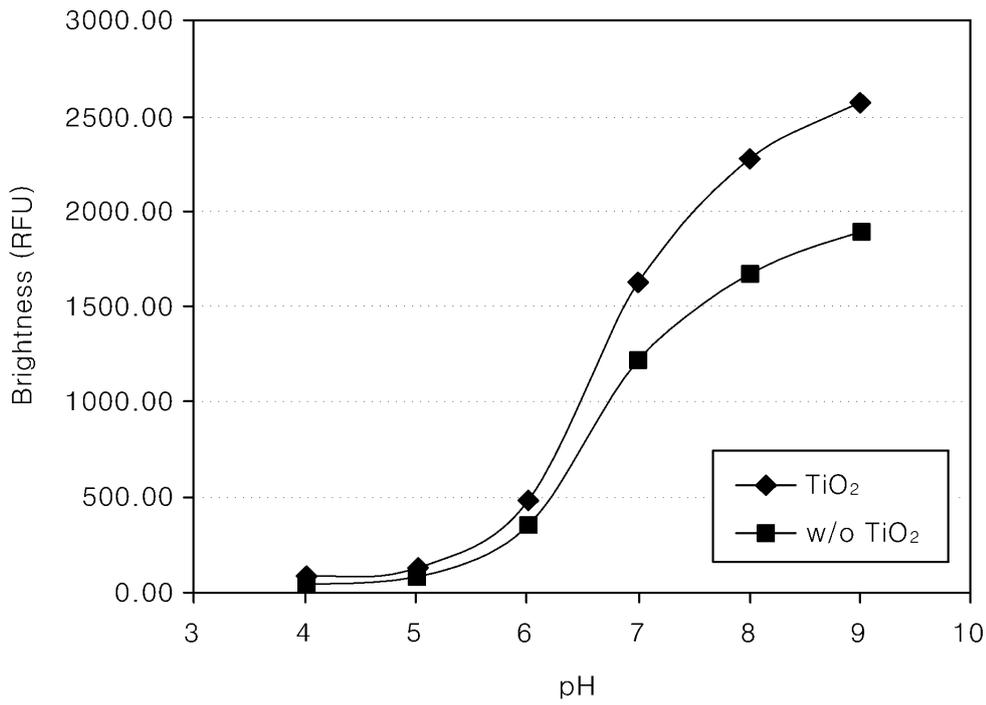
도면11



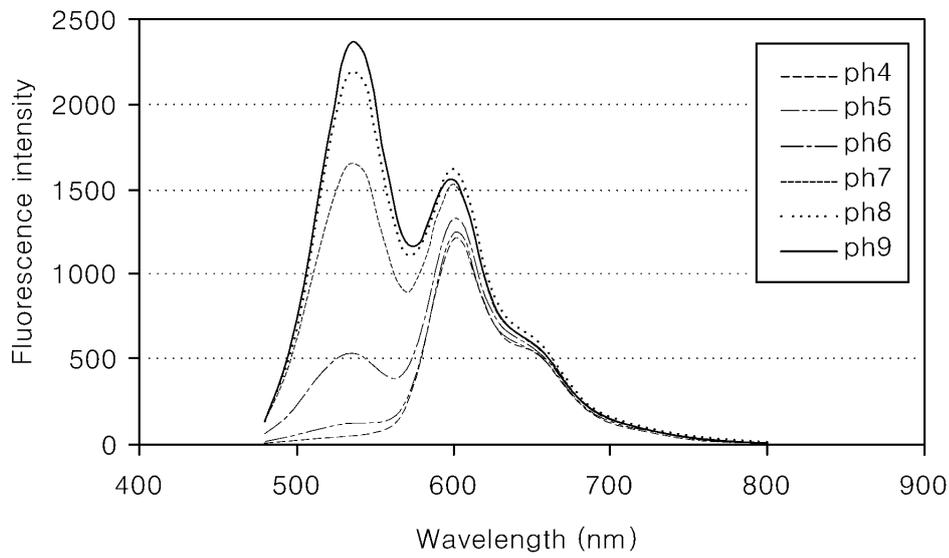
도면12



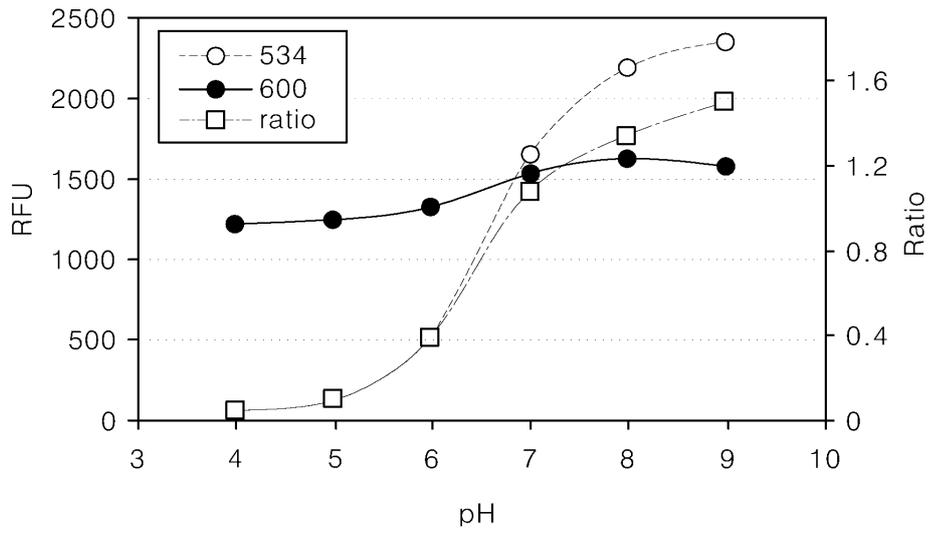
도면13



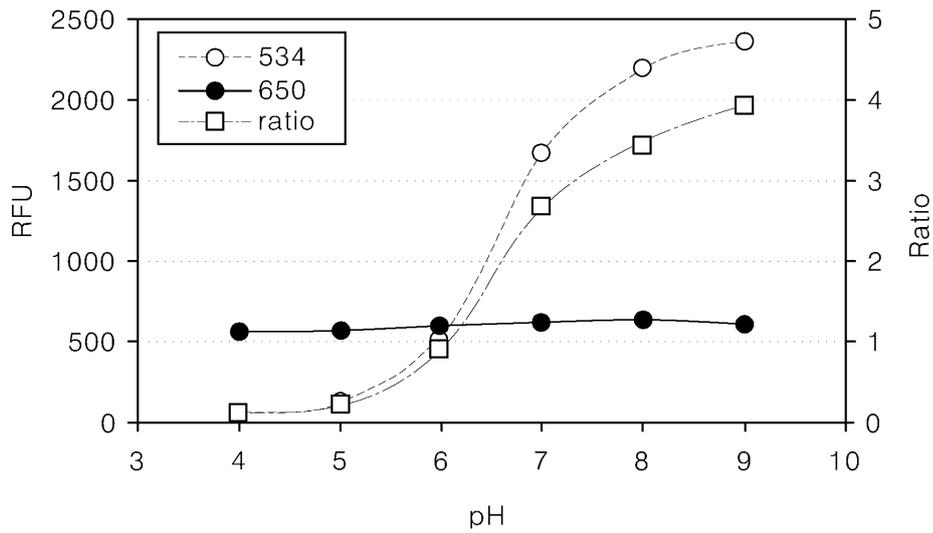
도면14



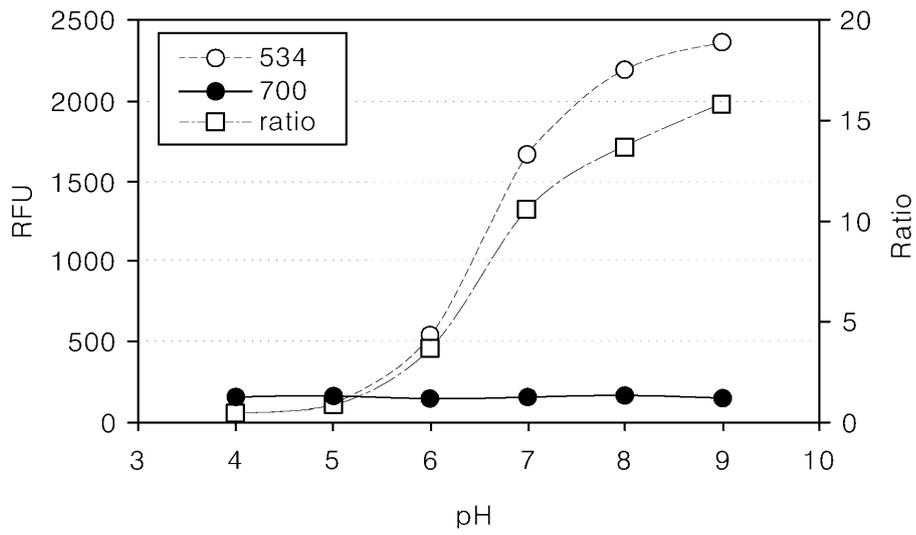
도면15



도면16



도면17



도면18

