

광유발 전자전이를 이용한 유해물질 인식 형광 화학센서의 개발

윤성호^{1,a}

¹ 국민대학교 생명나노화학과

Photo-induced Electron Transfer(PET) Based Luminescent Chemosensors Detecting Hazardous Substances

Sungho Yoon^{1,a}

¹ Department of Bio & Nano Chemistry, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

(Received July 5, 2012; Revised July 20, 2012; Accepted July 24, 2012)

Abstract: Based on both organic synthesis and theoretical calculations on the effects of molecular orbital energy levels of amines on the fluorescence properties of the fluorophore, fluorescent “turn-on” chemosensors detecting hazardous substances, including aldehyde chemicals and Hg²⁺ ion, were developed.

Keywords: Fluorescent chemosensor, Hazardous substances, Sensitivity, Selectivity, Photo-induced electron transfer

1. 서론

화학센서 (chemosensor)라는 용어는 화학물의 존재를 감지하는 시스템이나 화학적인 방법으로 제작된 검출시스템을 통칭하는 이중적인 의미로 쓰이고 있는데 본 논문에서는 사전적인 의미인 전자만을 이용하는 화학센서만을 의미한다. 센서는 검출 대상물질에 선택적인 인식·결합하는 분자인식체 부분과 결합현상을 신호로 나타내는 reporter 부분으로 크게 구성된다. 화학센서의 분자인식체로는 생물화학적 방법을 통하여 얻어진 단백질, DNA, RNA 등이 있으며 유기·무기 화학적인 방법을 통하여 합성된 화합물이 범용적으로 사용되고 있다. 분자인식체에 검출대상 화학분자의 결합을 신호로 나타내는 방법으로는 전기적, 기계적, 그리고 광학적인 방법들을 이용하고 있는데, 최근 들어, 세포 내와 같이 매우 협소한 공간에서의 화학물질의 농도 변화를 민감히 검출하는 방법으

로써 광학적 신호인 형광 (fluorescence)를 많이 이용하고 있다 [1,2].

어떠한 물질은 빛을 흡수하여 여기 (excited)되었을 때 그 보다 큰 파장 (wavelength)의 빛을 방출한다는 사실이 19세기 중반에 Gorge Stokes에 의하여 발표된 이후, 소위 “Stokes shift”로 불리는 이러한 흡광과 발광의 파장변화는 흡광에 근거하는 여러 분광검출법과 비교하여 고감도의 분석을 가능하게 하여 화학센서 개발에 널리 적용되고 있다 [3,4]. 일반적으로 형광분광법은 흡광분광법에 비하여 약 백만 배의 감도를 가지는 것으로 널리 알려져 있다. 형광 화학센서 개발에는 광유발전자전이 (photo-induced electron transfer, PET), 전자에너지전이 (electronic energy transfer, EET), 형광공명에너지전이 (förster resonance energy transfer, FRET) 등의 방법들이 이용되고 있는데 이 글에서는 PET에 근거한 유해물 검출 화학센서 개발에 국한하여 기술하고자 한다 [5].

a. Corresponding author; yoona@kookmin.ac.kr

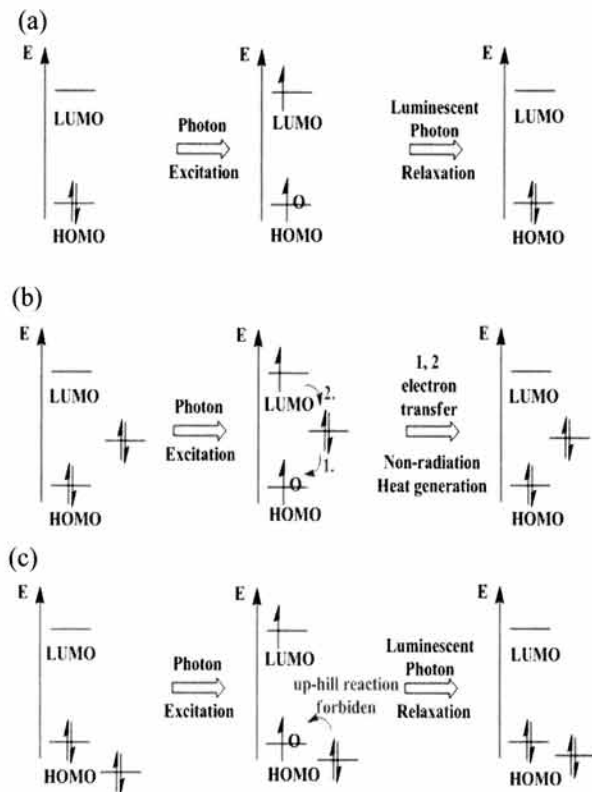


Fig. 1. Schematic mechanistic representations of the relaxation process in (a) fluorescent materials, (b) the fluorescent materials with an active quencher, and (c) the fluorescent materials with an improper quencher.

화학분자가 광자를 흡수하면 그림 1(a)와 같이 HOMO (highest occupied molecular orbital)로부터 LUMO (lowest unoccupied molecular orbital)로 전자 여기가 발생한다. 이때 LUMO에 존재하는 전자가 HOMO로 이동하며 차이에 해당하는 에너지를 빛, 화학반응, 그리고 열의 형태로 방출할 수 있는데, 빛으로 방출할 때 형광이나 인광인 발광이 나타난다. 하지만 만일 화학분자의 발광체 근처에 분자의 다른 부위나 외부의 물질의 오비탈이 그림 1(b)와 같이 HOMO와 LUMO의 중간에 위치할 경우, 빛을 흡수하여 HOMO에 hole이 생성되었을 때 외부의 orbital로부터 HOMO로의 전자전이가 일어날 수 있게 된다. 따라서 HOMO가 이미 채워져 있으므로 LUMO에 존재하는 여기된 전자는 열을 방출하며 외부 오비탈로 전이하게 된다. 대표적인 예가 형광발색단 (fluorophore)에 비공유 전자쌍을 가지는 아민과 같은 화학기능단 (functional group)이 결합되었을 경우로써 이러한 분

자는 형광이 매우 약하며 흡수한 빛에너지는 대부분 열로써 방출된다. 이렇게 잘 알려진 형광발색단의 형광이 관측되지 않는 현상을 PET (photo-induced electron transfer) 작용기작에 의한 quenching이라 한다. 만일 검출 대상물질이 외부의 orbital에 결합하여 그림 1(c)와 같이 외부 orbital의 위치를 HOMO의 아래로 이동시켰을 경우 빛의 흡수로 생성된 hole의 위치가 외부 orbital에 존재하는 전자의 에너지보다 위에 존재하여 전자전이가 일어나지 않게 되어 형광발색단은 형광을 방출할 수 있게 된다. 일반적으로 형광화학센서의 경우 분석하고자 하는 물질이 존재하지 않을 경우 형광이 quenching되어 발현되지 않다, 검출 대상물이 존재할 때 형광이 발현되는, 즉 백열등이 켜지는 것과 같은 turn-on 센서를 구성함으로써 검출을 용이하게 할 수 있다.

지난 4년 간 환경 및 인체에 악영향을 미치는 포름알데하이드, 암모니아, NO 및 수은 (Hg) 검출을 위하여 아민과 발광체의 유기적 연결을 통하여 PET 기반의 turn-on 형광화학센서를 성공적으로 개발하였으며 이 글에서는 이 중 알데하이드 검출 형광화학센서에 대한 [6-9] 연구 결과에 한하여 논하고자 한다.

2. 실험 방법

2.1 일반적인 실험방법

모든 용액은 광학용 용매를 이용하여 준비되었으며 그 밖의 화합물은 Aldrich(주)에서 구입하여 별도의 정제과정 없이 사용하였다. 모든 새로운 화합물은 NMR spectroscopy 및 Mass spectroscopy를 이용하여 순도와 특성을 분석하였다. Electronic absorption spectra는 Scinco UV-vis spectrophotometer S-3100을 이용하여 측정하였으며 형광은 GILDEN Photonics fluoroSENS spectrofluorometer를 이용하여 298 K에서 측정하였다. ^1H 와 ^{13}C NMR spectra는 VARIAN UNIT-INOVA 300과 500 MHz 분광계를 이용하여 298 K에서 측정하였으며 chemical shift는 용액중의 용매의 peak에 근거하여 확정하였다. LC-질량분석은 Agilent 6130 Quadrupole LC/MS spectrometer를 이용하였다.

2.2 센서 화합물의 합성방법

8-(4-amino)benzene-2,6-diethyl-4,4-difluoro-1,3,5,

7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-indacene (AnB), 8-aminomethyl-2,6-diethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-indacene (AB1), 8-ethanolaminomethyl-2,6-diethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-indacene (AB2), 8-diethanolaminomethyl-2,6-diethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-indacene (AB3)은 기존의 발표된 방법과 동일한 방법으로 합성하였다 [9].

2.3 계산화학적 방법

화학센서의 orbital energy는 B3LYP/6-31G level에서 Gaussian 03를 이용하여 계산되었다 [10]. 계산시간을 절약하기 위하여 aniline 부분은 BODIPY 부분과 별도로 계산하였다. PET의 발생효율은 Rhem-Weller equation을 이용하여 계산하였다 [11].

3. 결과 및 고찰

Formaldehyde를 포함하는 알데하이드계 화합물은 산업적으로 매우 중요한 화합물로서 매년 수백만 톤이 생산되며 건축자재 및 가전제품의 생산에 소모되고 있다. 또한 연소 및 다른 여러 자연적 대사 과정의 부산물이기도 하며 화학적 합성과정, 제약적 응용 그리고 과일, 채소, 육류에도 널리 존재한다. 하지만 음식물에 높은 농도로 존재하였을 경우, formaldehyde는 음식의 질을 떨어뜨리며 심지어 인체에 유해하다. 이는 IARC (the International Agency for Research on Cancer)에서는 항암제로 규정하였으며 NASA (The National Aeronautic Space Agency)에서는 항공기 내에서의 최대 허용치수로서 0.04 ppm을 규정한 내용이 인체유해성을 극명히 나타내고 있다 [12,13]. 따라서 낮은 농도에서의 aldehyde 검출은 매우 중요한 연구라 할 수 있다. Polarograph 방법, Volumetric 방법, Amperometric 방법, Potentiometric 방법 등이 이미 알려져 있으나 아직까지는 가역적으로 Aldehyde의 검출하는 형광에 근거한 센서는 알려져 있지 않다.

최근 본 연구진에 의하여 강한 형광물질인 4,4-difluoro-4-borata-3a-azonia-4a-aza-indacene (BOIPY)구조를 가지는 그림 2에 나타낸 것과 같은 일련의 화합물을 합성할 수 있었다 [9]. 이렇게 합성된 화합물의 365 nm 여기광에 의한 형광은 그림 3과 같이 나타냈다. 1차 아민인 AB1은 3차 아민인 AB3

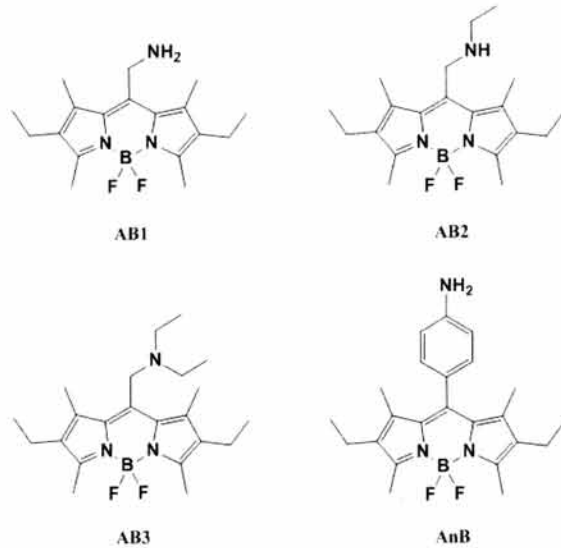


Fig. 2. Schematic representations of the aniline-substituted BODIPY fluorophores.

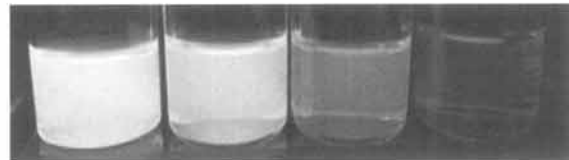


Fig. 3. Brightness of AB1, AB2, AB3, and AnB (left to right) (5 μ M) in CH_3OH under hand-held UV lamp ($\lambda_{max} = 365$ nm).

에 비하여 월등히 높은 형광을 나타냄을 알 수 있다. 기존의 발표된 BODIPY 형광물질의 경우, 아민이 fluorophore 근처에 존재할 때 형광이 사라진다는 것이 보고되어 있는데 이러한 결과에 비추어 보면 AB1이 강하게 형광을 나타낸다는 사실은 매우 놀라운 일이다.

이러한 경향성은 Gaussian 03을 통하여 각 화합물의 orbital energy를 구하여 각 화합물에 존재하는 amine의 비공유전자쌍과의 에너지 관계를 통하여 이해할 수 있었다. 그림 4에서 S-south로 표현된 부분은 BODIPY 부분을 나타내고 있는데 HOMO의 위치는 ca. -5.40 eV에 나타나며 LUMO는 이보다 약 2.93 eV위인 -2.47 eV에 존재하는 것을 알 수 있다. 같은 계산에서 methyl amine (CH_3NH_2)의 비공유전자쌍은 -5.60 eV의 orbital에 위치하며, 2차 아민인 dimethylamine($(CH_3)_2NH_2$)의 비공유전자쌍은 이보다

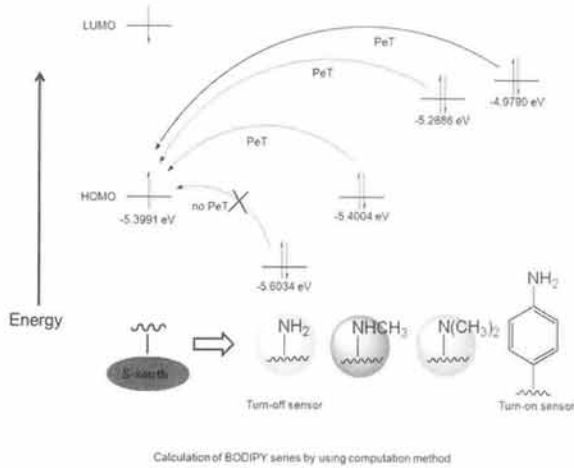


Fig. 4. Energy level diagram of amine substituted BODIPY fluorophores.

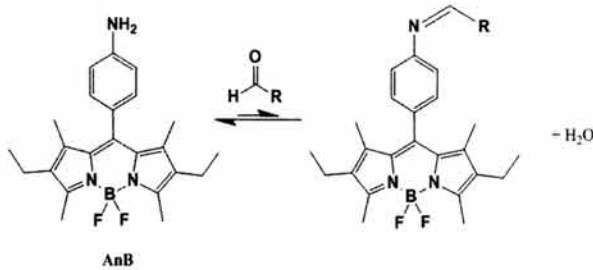


Fig. 5. Schematic reaction procedure between AnB and aldehyde.

높은 -5.40 eV에 나타나는 것으로 계산된다. 반면 3차 아민인 trimethylamine과 aniline에 존재하는 비공유 전자쌍은 -5.29 eV와 -5.22 eV의 에너지를 갖는 분자오비탈에 각각 위치하는 것으로 계산된다. 이러한 계산결과는 그림 4에 나타낸 것과 같이 1차 아민을 포함하는 AB1의 경우 비공유 전자쌍의 에너지가 fluorophore의 HOMO에 비하여 낮게 위치하여 PET가 발생하기 어렵다는 것을 나타낸다. 이러한 amine은 BODIPY 형광체의 quencher로 작동할 수 없으며 따라서 밝은 형광을 나타낼 것이다. 반면 aniline에 존재하는 비공유 전자쌍의 에너지는 fluorophore의 HOMO보다 위에 위치하게 되는데 이는 그림 1(b)에 해당하는 경우로써 PET 기작에 의하여 형광이 quenching되어 나타나게 된다 [9].

Aldehyde 화합물은 1, 2차 amine 화합종과 imine을 형성하며 가역적으로 반응하는 것으로 널리 알려져 있다.



Fig. 6. Photographic images of 5 μM in methanol (left) and upon addition of 104 equiv. formaldehyde (right) under hand-held UV lamp ($\lambda_{max} = 365$ nm).

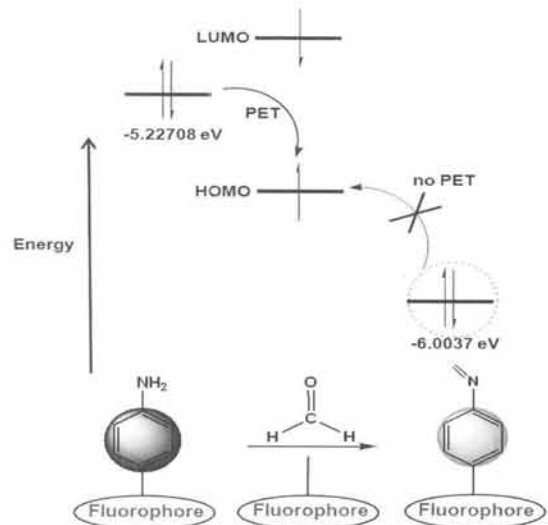


Fig. 7. Energy level diagram of AnB and imine formed upon reaction of AnB with formaldehyde [9].

만일 이러한 반응성을 이용하였을 경우 형성된 imine에 존재하는 비공유 전자쌍의 에너지가 amine과 많은 차이가 있을 시 fluorophore와 작용하는 PET에서 많은 차이를 보일 것으로 예상되며 이를 이용하면 가역적 aldehyde 센서를 개발할 수 있을 것으로 예측된다. 하지만 turn-on sensor를 개발하기 위하여서는 AB1과 AB2는 형광이 매우 높으므로 적당하지 않다 판단되어 이후의 aldehyde 검출 실험은 AnB만을 이용하여 진행하였다 (그림 5).

Formaldehyde를 AnB와 반응시키는 순간 강한 형광이 방출되는 것을 확인할 수 있었으며 이는 그림 6에 나타내었다 [9].

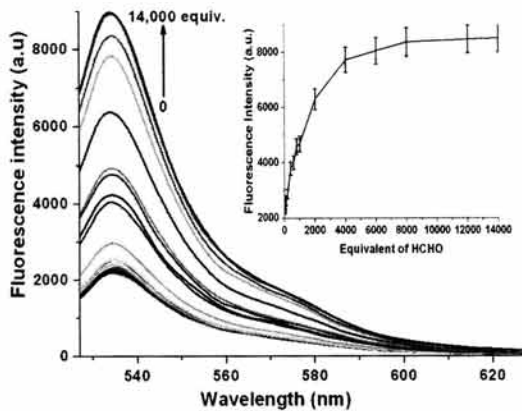


Fig. 8. Fluorescence emission intensity changes of AnB (5 μ M) upon addition of 37% formaldehyde in CH_3OH at pH 8 (excitation: 520 nm; slit width: 3 mm); fluorescence intensity changes upon addition of equivalents of formaldehyde in CH_3OH at pH 8 (inset) [9].

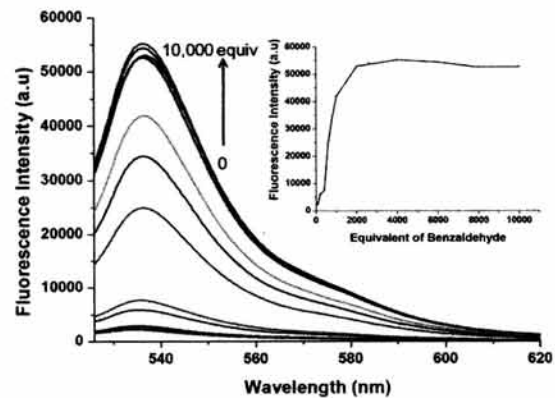


Fig. 9. Fluorescence emission intensity changes of AnB (5 μ M) upon addition of benzaldehyde in CH_3OH at pH 8 (excitation: 520 nm; slit width: 3 mm); fluorescence intensity changes upon addition of equivalents of benzaldehyde in CH_3OH at pH 8 (inset).

이러한 형광의 변화는 다시 계산화학을 통하여 이해 할 수 있었는데 생성될 것으로 예상되는 imine과 매우 흡사한 4-methyl-N-methylethaniline의 비공유 전자쌍은 -6.00 eV에 위치하는 것으로 나타나며 이는 fluorophore의 HOMO보다 아래에 존재하게 되어 PET가 발생할 수 없게 된다 (그림 7). 따라서 imine이 형성될 경우 우리는 강한 형광을 기대할 수 있으며 이는 실험결과에 매우 일치한다 할 수 있다 [9].

다음으로 AnB 센서의 formaldehyde와 benzaldehyde를 포함하는 aldehyde에 대한 검출성능을 정량적 측정하기 위하여 aldehyde 변화에 따른 형광변화를 측정하였다.

그림 8은 적가한 formaldehyde 당량에 따른 형광변화를 나타내는 것으로써 약 4,000 당량의 formaldehyde에서 형광변화가 포화를 나타내고 있는 것을 알 수 있다. 이는 아마도 그림 5에서 나타낸 것과 같이 amine과 aldehyde의 반응평형이 반응물 쪽에 치우쳐 있다는 사실에 근거한다 할 수 있다. 물론 용매인 메탄올로부터 수분을 완전히 제거하는 것은 매우 어려운 일임을 감안할 때, 용액중의 수분의 양 역시 정반응 쪽으로 반응의 진행을 막는 원인이 되었을 것이다. 5 μ M의 형광센서를 이용하였을 경우 검출한계 (detection limit, LOD)는 formaldehyde의 경우 165 nM로 계산되었다.

한편 benzaldehyde의 경우는 그림 9에 나타낸 것과 같이 약 1,000 당량 근처에서 형광변화의 포화지점이

존재하며 검출한계 역시 5 μ M의 형광센서를 이용하였을 경우 5.3 nM로 계산되었다. 이러한 현상의 이유는 2가지를 생각할 수 있는데, 첫째, 생성되는 imine의 종류의 차에 의하여 평행이 benzaldehyde의 경우 formaldehyde에 비하여 생성물에 치우쳐 있을 가능성이 있으며, 둘째 benzaldehyde의 경우, 생성되는 imine의 비공유전자쌍의 에너지가 formaldehyde의 경우와 비교하여 상대적으로 PET 기작의 발생효율을 더욱 저하시키는 방향으로 변화되어 형광 변화를 증가시켰을 가능성이 있다.

기술한 AnB 화합물은 PET기반으로 하여 aldehyde를 검출할 수 있는 형광센서이지만 검출한계가 수십 nM 수준으로 NASA에서 규정하는 허용 formaldehyde의 농도인 0.04 ppm을 검출하는 데는 충분한 민감도를 가지고 있지 못하다. 하지만 향후 반응의 평형을 imine 생성 쪽에 가지는 매우 밝은 (bright) 센서 화합물을 구성한다면 공기 내에서의 최대 허용지수를 감지할 수 있는 센서시스템의 구현이 가능하리라 예측한다.

4. 결론

최근 들어 유해성 물질인 산화질소, 암모니아, 알데하이드, 수은 이온들을 분자인식체를 기반으로 선택적으로 검출할 수 있는 형광센서의 개발이 이루어지

고 있다. 아직까지는 검출한계가 환경에 존재하는 검출대상의 농도에 미치지 못하고 있으나, 꾸준한 연구를 통하여 보다 밝고 검출반응의 평행이 생성물 방향에 치우쳐 있는 센서시스템을 이룩한다면 머지않아 우리 주위에서 상품화된 형광센서를 보게 될 것으로 기대한다.

감사의 글

이 연구는 지식경제부의 소재원천개발사업 (the Fundamental R&D program for Core Technology of Materials)의 지원을 통하여 이루어졌습니다.

REFERENCES

- [1] E. R. Goldman, I. L. Medintz, J. L. Whitley, A. Hayhurt, A. R. Clapp, H. Tetsuo Uyeda, J. R. Deschamps, M. E. Lassman, and H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 6744 (2005).
- [2] N. Shaner, P. Steinbach, and R. Tsien, *Nat. Methods*, 2, 905 (2005).
- [3] G. G. Stokes, *Philos. Trans. R. Soc. London*, A142, 463 (1852).
- [4] B. Valeur, and I. Leray, *Coord. Chem. Rev.*, 205, 3 (2000).
- [5] P. De Silva, H. Q. Gunaratne, T. Gunnalaugsson, A. J. M. Husley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, and T. E. Rice, *Chem. Rev.*, 97, 1515 (1997).
- [6] S. Yoon, A. E. Albers, A. P. Wong, and C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 16030 (2005).
- [7] S. Yoon, E. W. miller, Q. He, P. H. Do, and C. J. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 6658 (2007).
- [8] J. Kim, S. H. Lim, Y. Yoon, T. D. Thangadurai, and S. Yoon, *Tetrahedron Lett.*, 52, 2645 (2011).
- [9] H. Song, S. Rajendiran, N. Kim, S. K. Jeong, E. Koo, G. Park, T. D. Thangadurai, and S. Yoon, *Tetrahedron Lett.*, 53, 4913 (2012).
- [10] A. D. Becke *J. Chem. Phys.*, 98, 5648 (1993).
- [11] D. Rehm, and A. Weller, *Isr. J. Chem.*, 8, 259 (1970).
- [12] Y. Zhen, S. E. Wang, W. Xiao, H. Yuan, and D. Xiao *Microchim Acta*, 159, 305 (2007).
- [13] J. Z. Li, P. K. Dasgupta, G. F. Zhang, and M. A. Hutterli, *Field Anal. Chem. Technol.*, 5, 2 (2001).