

산성 용액에서의 pH 측정을 위한 푸시-풀 공액 형광염료

이상신[†] · 김형진^{*}

전남대학교, 화학공학부

[†]현 근무지: (주)한농화학

(접수 2022. 9. 2; 게재확정 2022. 10. 4)

A Push-Pull Conjugated Fluorophore for pH-Sensing in Acidic Solutions

Sang Shin Lee[†] and Hyung Jin Kim^{*}

School of Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea.

*E-mail: hyungkim@chonnam.ac.kr

[†]Current address: Hannong Chemical Inc. Gunsan 54008, Korea.

(Received September 2, 2022; Accepted October 4, 2022)

주제어: 푸시-풀 공액 염료, 형광 센서, pH 센서

Key words: Push-pull conjugated dye, Fluorescent sensor, pH sensor

정확한 pH 측정은 화학 및 생물 분석, 환경 모니터링, 화학 공정 제어, 식품 관련 분야를 비롯한 다양한 과학 및 산업 분야에서 사용되는 중요한 기술이다. 가장 널리 사용되는 pH 측정법은 유리 전극을 사용하는 일종의 전위차법인데, 형광염료를 이용한 광학적 pH 측정법은 기존의 전위차법에 비해서 고감도, 빠른 응답시간, 전기적 안전성, 미세한 세포내 pH 측정, 참조 전극이 필요하지 않는 장점 등을 갖고 있다.^{1,2} 이제까지 많은 형광염료에 기반한 광학 pH 센서가 보고되었지만 여기 파장 또는 방출 파장을 조절하거나 또는 측정 가능한 pH 범위를 변경하거나 확대하기 위하여 새로운 형광 염료의 설계 및 개발이 지속적으로 요구되고 있다.³⁻⁶ 이제까지 알려진 대부분의 형광pH센서는 생물학적 응용에 요구되는 중성 영역의 pH 측정에 적합한 것이 많은데 반해, 강산성 영역의 pH를 감지할 수 있는 형광염료는 그다지 많이 알려져 있지 않다.⁷⁻¹⁰

형광 염료를 사용하여 용액의 pH 값을 광학적으로 측정하려면 염료 분자의 흡광도 또는 발광 특성이 측정하고자 하는 pH 범위에서 변해야 하며 아울러 그러한 pH 범위에서 염료 분자 내에 가역적으로 양성자화-탈양성자화할 수 있는 pH 민감성 기능을 포함하고 있어야 한다. 따라서 염료 분자의 적절한 구조 변환을 통하여 pH 감지 범위를 조절할 수 있다.

그 동안 본 연구진은 전자 주개(D)와 전자 받개(A)가 π -결합으로 연결된 push-pull conjugated dye(푸시-풀 공액

염료, D- π -A 시스템)이 산성 영역의 pH를 측정할 수 있는 형광 pH센서로서 유용함을 보고한 바 있다.¹¹⁻¹³ 특히, Fig. 1에 나타난 형광 염료 DCMP의 pKa는 4.83이었고, pH 3.85-6.25 범위에서 형광세기가 선형적으로 증가함으로써 산성 영역의 수소이온 농도를 측정할 수 있는 형광 pH센서로서 유용함이 보고된 바 있다.¹³ DCMP에서의 malononitrile group이 전자 받개로 작용하여 DCMP 내 전자 주개인 NEt₂의 질소 원자의 염기성을 감소시킴으로써 산성 용액에서의 pH를 감지할 수 있는 형광pH센서로 작용하도록 하였다. 이와 같은 개념을 이번 연구에서도 적용하여 새로운 형광염료를 고안하였다. 우선 산성 수용액에서 형광염료의 용해도를 향상시키기 위하여 Fig. 1에서 보는 바와 같이 염료 분자 내에 친수기와 전자 주개의 구조는 그대로 유지하되, 전자 받개인 malononitrile 기가 두 개 결합된 pyridinylidene-indenylidene-dimalononitrile 유도

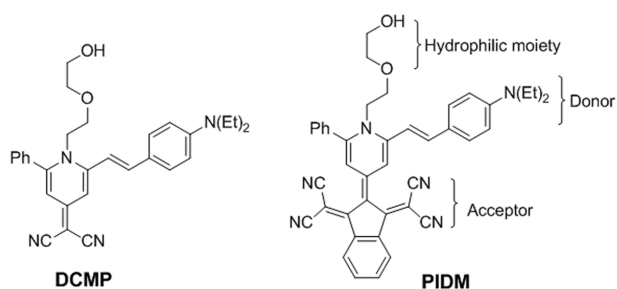
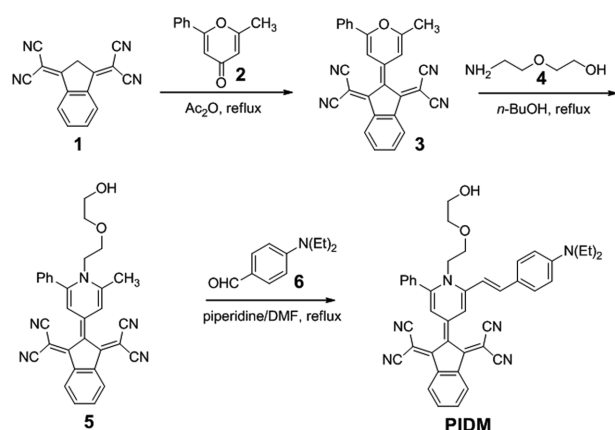


Figure 1. Chemical structures of DCMP and PIDM.



Scheme 1. Synthesis of PIDM.

체(PIDM)를 합성하였다. Malononitrile기가 두 개 결합되어 있기 때문에 PIDM의 pKa 값을 더욱 낮춤으로써 pH 감지 범위를 좀 더 산성 영역으로 치우치게 할 수 있을 것으로 기대하였다. 본 논문에서 pH 변화에 따른 PIDM의 분광학적 변화를 관찰한 결과를 보고하고자 한다.

염료의 합성

우선 PIDM의 합성은 Scheme 1에 요약한 바와 같이 수행하였다.

Indenylidene-dimalononitrile (1)¹⁴을 무수 초산 용매에서 2-methyl-6-phenyl-4H-pyran-4-one (2)⁹과 가열 반응시키면 탈수축합반응을 거쳐 pyranylidene-indenylidene-dimalononitrile (3)을 약 70%의 수율로 얻을 수 있었다.

중간체 Pyran 3은 과량의 2-(2-aminoethoxy)ethanol(4)과 *n*-BuOH에서 가열 반응시키면 첨가 및 제거 반응이 연속적으로 일어나서 dihydropyridine 유도체 (5)가 얻어졌다. 이것을 4-(diethylamino)benzaldehyde(6)와 DMF 용매에서 가열시키면 Knoevenagel 축합반응이 일어나서 pyridinylidene-indenylidene-dimalononitrile (PIDM)을 43% 수율로 얻을 수 있었다. 염료 PIDM의 생성은 고분해능 질량분석법(HRMS)을 통해 m/z 657.2976 (M+H)⁺의 분자 이온 피크에 의해 확인되었고, 아울러 ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼에서 각각 적절한 공명 피크의 존재에 의해 확인되었다.

pH 변화에 따른 스펙트럼의 변화

염료 PIDM은 테트라하이드로푸란, 아세톤, 아세트니트릴, 클로로포름, 에틸 아세테이트, *N,N*-다이메틸포름아마이드 및 메탄올과 같은 다양한 극성 유기용매에는 잘 녹았으나 순수한 물에는 제한적인 용해도를 보였다. 따라서 용액의 pH 변화에 따른 PIDM의 흡광도 변화를 알아보기 위하여 PIDM를 CH₃CN/buffer 혼합 용액(4:6, v/v)에 2 ×

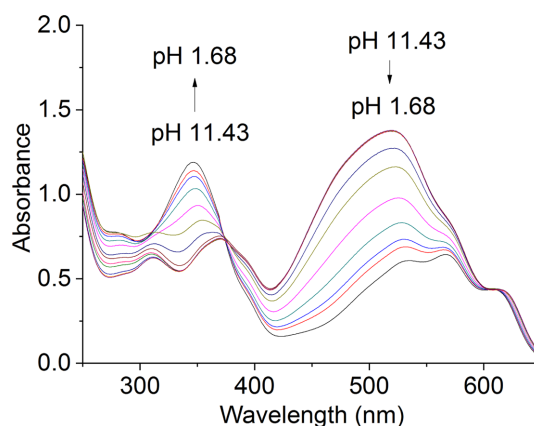


Figure 2. UV-Vis absorption spectra of PIDM (2.0×10^{-6} M) in CH₃CN/buffer (4:6, v/v) solution at various pH values: 1.44, 1.68, 2.08, 2.23, 2.50, 2.82, 3.28, 3.63, 4.75, 6.48, 7.89, 8.98, 10.01, and 11.43.

10⁻⁶ M 농도가 되도록 녹여서 다양한 pH 수준에서 흡광도를 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 370 nm에서 isosbestic point가 관찰되었다. pH 11.43부터 pH 4.75까지는 흡광도의 변화가 거의 없으나, pH 4.75 이하에서 pH가 낮아질수록 약 520 nm 부근에서의 흡광도가 감소하였으며 반대로 약 340 nm 부근에서는 흡광도가 증가하였다. 이러한 결과는 전형적인 푸시-풀 공액 염료의 intramolecular charge transfer (ICT) 과정에 의한 흡광도 변화로서 전자주개(NEt₂)에 분석 물질(H⁺)이 결합될 경우 흡수띠가 매우 크게 blue shift 되는 현상을 보여 주었다.¹⁵ 또한, 두개의 dimalononitrile 그룹의 강력한 전자끌기 현상에 의해서 PIDM의 말단 NEt₂ 그룹의 염기성이 감소됨에 따라 염료 분자는 강산성 수용액에서만 양성자화 되는 것으로 여겨진다. 이러한 NEt₂ 그룹의 양성자화는 염료 분자의 공명 불안정화를 유도하여 ICT 프로세스를 억제하게 된다(Fig. 3). 즉, 340 nm 부근에서의 흡수띠는 양성자화 된 PIDM (PIDMH⁺) 분자에 기인하며, 520 nm부근에서의 흡수띠는 PIDM분자에 기인한다. 따라서 용액의 pH가 점차 낮아짐에 따라 용액 내에 존재하는 염료 분자 중의 일부가 양성자화 되기 때문에 pH

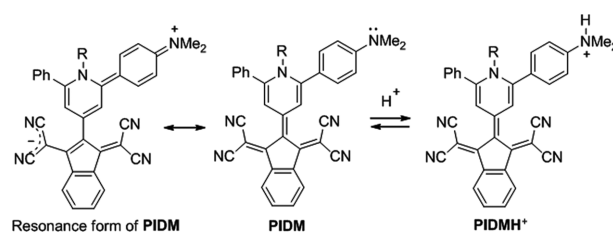


Figure 3. Inhibition of the formation of the resonance hybrid of PIDM by protonation.

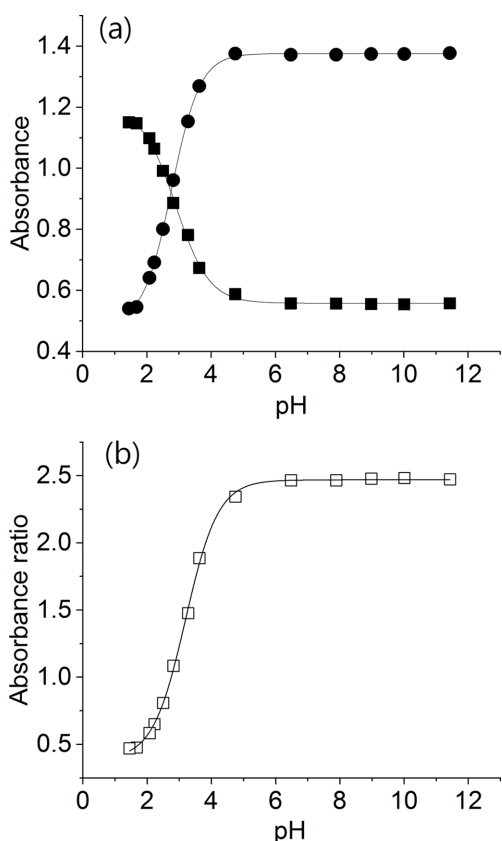


Figure 4. (a) pH-dependent absorption of PIDM (■ absorbance at 339, A_{339}); ● absorbance at 516 nm, A_{516}). (b) Absorbance intensity ratio (A_{516}/A_{339}) vs. pH.

변화에 따른 두 화학종의 존재 비율($\text{PIDM} \rightleftharpoons \text{PIDMH}^+$)에 따라 흡광도의 증가와 감소가 나타나게 된다.

Fig. 4a는 pH 변화에 따른 각각 339 nm와 516 nm에서의 PIDM의 흡광도 세기(A_{339} , A_{516})를 그래프로 각각 나타낸 것이다. A_{516} 의 변화 그래프의 변곡점으로부터 계산된 PIDM의 pK_a 는 2.82로서 DCMP에 비해서 더 약한 염기임을 알 수 있었다. 또한 339 nm와 516 nm에서의 흡광도 세기를 비율(A_{516}/A_{339})로 계산하여 그래프로 나타내면 Fig. 4b와 같이 표현되며 대략 pH 2-6 사이에서 pH가 증가함에 따라 흡광도 비율(A_{516}/A_{339})도 함께 증가함을 알 수 있다. 이러한 결과는 염료 PIDM은 산성 영역에서 흡광도를 이용한 비율적(ratiometric) pH 측정에 활용될 수 있음을 보여준다.

한편, 염료 PIDM을 CH_3CN 에 녹인 용액에 495 nm의 빛을 조사하였을 때 최대 형광 방출이 570 nm 부근에서 관찰 되었다. pH변화에 따른 형광스펙트럼의 변화를 알아보기 위하여 PIDM 염료를 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{buffer}$ 혼합 용액 (4:6, v/v)에 2×10^{-4} M 농도가 되도록 녹인 후 다양한 pH 수준에서 형광 스펙트럼을 측정하였고 그 결과를 Fig. 5a

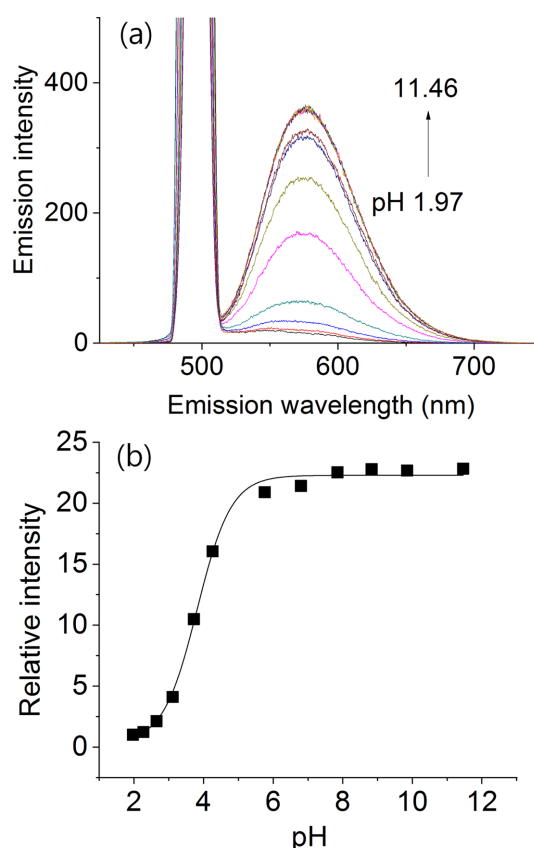


Figure 5. (a) Emission spectra (excitation at 495 nm) of PIDM (2.0×10^{-4} M) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{buffer}$ (4:6) solution at various pH values: 1.97, 2.27, 2.65, 3.11, 3.72, 4.26, 5.76, 6.80, 7.85, 8.83, 9.85, and 11.46. (b) Change of relative emission intensity (I/I_0) at 570 nm vs. pH. I_0 is the intensity of PIDM at pH 1.97.

나타내었다.

pH의 변화에 따라 570 nm에서의 상대적인 형광 세기(I/I_0)를 그래프로 나타내면 Fig. 5b와 같이 표현되며 산성 영역에서 pH가 증가함에 따라 형광 세기도 약 23배 정도 증가함을 보여 주었다. 따라서 이러한 관찰로부터 PIDM 염료는 산성 용액에서 형광 pH 센서로 유용함을 알 수 있었다. 한편, malonitrile group이 두개 결합되어 있음에도 불구하고 PIDM의 pH 감지 범위가 DCMP에 비해서 크게 산성 쪽으로 치우치지 않은 결과에 대해서는 아마도 PIDM에서 전자 주개와 전자받개 간의 컨쥬게이션 결합의 길이가 DCMP에 비해서 다소 길어져서 야기된 유발효과의 감소가 어느 정도 기여 했을 것으로 추측된다.

요약하면, 본 연구에는 전자 주개와 전자 받개가 서로 컨쥬게이션 되어 있는 구조를 지닌 형광 염료로서 1,4-dihydropyridine-indenylidene-dimalonitrile 유도체(PIDM)를 합성하였다. PIDM는 수소이온 농도의 변화에 대해서 ICT 프로세스에 의한 분광학적 거동을 보여 주었으며, 대략

pH 2-6 범위의 산성 영역에서 ratiometric absorbance를 보여주었다. 또한 PIDM의 형광 세기는 pH 2에서 pH 7까지 증가함에 따라 약 23배 정도 증가하였고, PIDM의 pKa는 2.82로 관찰되었다. 이러한 결과는 PIDM가 산성 용액의 pH를 광학적으로 측정할 수 있는 형광pH 센서로도 유용함을 보여주었다.

EXPERIMENTAL

시약 및 기기

시약은 Aldrich-Sigma에서 구입하여 정제하지 않고 사용하였다. 핵자기공명분석은 Bruker ARX-R300 spectrometer (300 MHz)을 이용하여 측정하였고, 질량분석은 Waters Synapt G2 High-Resolution mass spectrometer (ESI)를 사용하여 측정하였다. 흡광스펙트럼은 Jasco V-550 UV-vis spectrophotometer를 사용하여 측정하였고, 형광스펙트럼은 Hitachi F-4500 fluorescence spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

형광염료의 합성

2,2'-(2-(2-Methyl-6-phenyl-4H-pyran-4-ylidene)-1H-indene-1,3(2H)-diylidene)dimalononitrile(3): 2,2'-{1H-indene-1,3(2H)-diylidene)dimalononitrile (**1**, 312 mg, 1.274 mmol)과 2-methyl-6-phenyl-4H-pyran-4-one (**2**, 260 mg, 1.404 mmol)을 Ac₂O (50 mL)에 녹여 10시간 동안 환류 교반하였다. 반응 혼합물을 상온까지 식힌 후, 감압 증류하여 얻어진 고체를 차가운 EtOH로 씻어주고 건조하여 생성물로 밝은 갈색의 고체(364 mg, 수율 69.6%)를 얻었다. ¹H NMR(CDCl₃): δ 2.8 (s, 3H, -CH₃), 7.5 (m, 1H, -OCCH), 7.6 (m, 5H, -Ph), 8.0 (m, 2H), 8.4 (m, 1H, -OCCH); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 21.1, 62.3, 111.6, 115.9, 116.1, 117.3, 120.3, 124.3, 127.2, 129.5, 129.8, 132.4, 134.1, 138.2, 153.9, 158.9, 165.9, 168.3; HRMS for C₂₇H₁₄N₄O: calcd 411.1240 (M+H)⁺, found 411.1242 (M+H)⁺.

2,2'-(2-[1-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl)-2-methyl-6-phenylpyridin-4(1H)-ylidene]-1H-indene-1,3(2H)-diylidene)-dimalononitrile(5): 화합물 **3** (330 mg, 0.805 mmol)을 *n*-BuOH (25 mL)에 녹이고 2-aminoethoxy-2-ethanol (**4**, 180 mg, 0.732 mmol)을 첨가하여 6시간 동안 환류 교반하였다. 반응물을 상온까지 식히고 감압 증류하여 얻어진 잔류물을 차가운 EtOAc로 씻어주며 감압 여과하여 생성물로 갈색 고체 (245 mg, 수율 61.0%)를 얻었다. 녹는점 114-116 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.8 (br, 1H, OH), 2.8 (s, 3H, CH₃), 3.3 (t, *J*=4.0 Hz, -OCH₂), 3.4 (t, *J*=5.1 Hz, -NCH₂CH₂), 3.5 (t, 2H, *J*=4.0 Hz, -OCH₂CH₂), 4.4 (t, 2H, *J*=5.1 Hz, -NCH₂), 7.2 (m, 2H), 7.4 (s, 1H, -OCCH), 7.4 (m, 5H, -Ph), 7.5 (s, 1H, -OCCH), 8.2 (m,

2H); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 22.6, 52.6, 52.8, 61.4, 68.5, 73.0, 109.4, 117.5, 117.7, 123.3, 128.8, 129.5, 130.9, 131.1, 132.5, 132.6, 137.6, 152.6, 153.8, 154.2, 156.0; ESI-MS for C₃₁H₂₃N₅O₂: calcd 498.1925 (M+H)⁺, found 498.1926 (M+H)⁺.

(E)-2,2'-(2-[2-{4-(Diethylamino)styryl}-1-{2-(2-hydroxyethoxy)ethyl}-6-phenylpyridin-4(1H)-ylidene]-1H-indene-1,3(2H)-diylidene)dimalononitrile (PIDM): 화합물 **5** (230 mg, 0.462 mmol)을 DMF (10 mL)에 녹인 용액에 4-(diethylamino) benzaldehyde (**6**, 246 mg, 1.38 mmol)과 piperidine (0.5 mL)를 첨가하여 8시간 동안 환류 교반하였다. 반응 혼합물을 식힌 후 감압 증류하고 얻어진 잔류물을 컬럼크로마토그래피 (EtOAc:acetone = 2:1, v/v)로 정제하여 진한 회색의 고체 (129 mg, 수율 42.5%)를 얻었다. 녹는점 160-163 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.2 (s, 6H, 2CH₃), 2.9 (br, 1H, OH), 3.3 (m, 4H, CH₂NCH₂), 3.4 (t, *J*=4.0 Hz, -OCH₂), 3.5 (t, *J*=5.1 Hz, -NCH₂CH₂), 3.7 (t, 2H, *J*=4.0 Hz, -OCH₂CH₂), 4.6 (t, 2H, *J*=5.1 Hz, -NCH₂), 6.6 (d, 2H, *J*=9.0 Hz), 7.2 (d, 1H, *J*=18.1 Hz), 7.4 (s, 1H, -OCCH), 7.5(m, 4H), 7.5 (m, 6H), 7.9 (s, 1H, -OCCH), 8.3 (m, 2H); ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 0.0, 44.4, 52.2, 53.1, 60.9, 68.1, 73.0, 110.2, 111.3, 117.2, 118.2, 121.8, 122.6, 127.8, 129.0, 129.9, 130.1, 130.3, 130.5, 130.9, 133.2, 137.5, 144.8, 149.2, 150.0153.0153.4, 154.9; HRMS for C₄₂H₃₆N₆O₂: calcd 657.2973 (M+H)⁺, found 657.2976 (M+H)⁺.

분광 실험

CH₃CN과 phosphate buffer (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) 용액 (pH 7.0)이 4:6(v/v)의 비율로 섞여 있는 용액에 PIDM을 2.0 × 10⁻⁶ M과 2.0 × 10⁻⁴ M 이 되도록 녹여 모액을 각각 제조하였다. 여기에 HCl(1 M) 또는 NaOH(1 M)을 소량씩 첨가하여 시료 용액의 pH를 조절하면서 흡광 및 형광스펙트럼을 측정하였다.

Acknowledgments. This research was supported by Chonnam National University.

REFERENCES

1. Qi, J.; Liu, D.; Liu, X.; Guan, S.; Shi, F.; Chang, H.; He, H.; Yang, G. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5897.
2. Wang, X. Y.; Huang, D. W.; Niua, C. G.; Guo, L. J.; Cui, J. J.; Hu, L. Y.; Zeng, G. M. *Sens. Actuators B* **2016**, *234*, 593.
3. Tan, Y.; Yu, J.; Gao, J.; Cui, Y.; Wang, Z.; Yang, Y.; Qian, G. *RSC Advances* **2013**, *3*, 4872.
4. Su, M.; Liu, Y.; Ma, H.; Ma, Q.; Wang, Z.; Yang, J.; Wang, M. *Chem. Commun.* **2001**, 960.

5. Zheng, G.; Wang, Z.; Tang, L.; Lua, P.; Weber, W. P. *Sens. Actuators B* **2007**, *122*, 389.
 6. Qi, Z.; Chen, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 236.
 7. Li, Z.; Wu, S. Q.; Han, J. H.; Han, S. F. *Analyst* **2011**, *136*, 3698.
 8. Lee, H.; Akers, W.; Bhushan, K.; Bloch, S.; Sudlow, G.; Tang, R. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 777.
 9. Liu, Z. P.; Zhang, C. L.; He, W. J.; Qian, F.; Yang, X. L.; Gao, X. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 656.
 10. Best, Q. A.; Xu, R. S.; McCarroll, M. E.; Wang, L. C.; Dyer, D. J. *Org. Lett.* **201**, *12*, 3219.
 11. Kim, D. Y.; Kim, J. N.; Kim, H. J. *Spectrochim. Acta A* **2014**, *122*, 304.
 12. Hwang, D. I.; Kim, H. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2017**, *38*, 952.
 13. Kim, Y. H.; Kim, H.; Kim, H. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2016**, *37*, 494.
 14. Son, Y. A.; Kim, S. H. *Dyes Pigments*, **2005**, *64*, 153.
 15. Demchenko, A. P. In *Introduction to Fluorescence Sensing*; Springer Science & Business Media: Berlin, Germany, 2009; p 254.
-