



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월26일

(11) 등록번호 10-1642406

(24) 등록일자 2016년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 31/22 (2006.01) C07D 491/052 (2006.01)

C07D 491/10 (2006.01) G01N 21/76 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 31/22 (2013.01)

C07D 491/052 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0085209

(22) 출원일자 2015년06월16일

심사청구일자 2015년06월16일

(56) 선행기술조사문헌

textile coloration and finishing Vol.24, No.3
158-164(2012)

Bull.Korean Chem.Soc. 2012, Vol. 33, No.7
2359

J Fluoresc(2014)24:67-74

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

손영아

대전광역시 유성구 지족로 343 반석마을아파트,
211동 201호

안구사티시쿠마

대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 공과대
학 1호관 238호

(74) 대리인

특허법인충정

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김도현

(54) 발명의 명칭 수용액에서의 수은 이온 검출용 신규 로다민계 화학센서 및 이의 제조방법

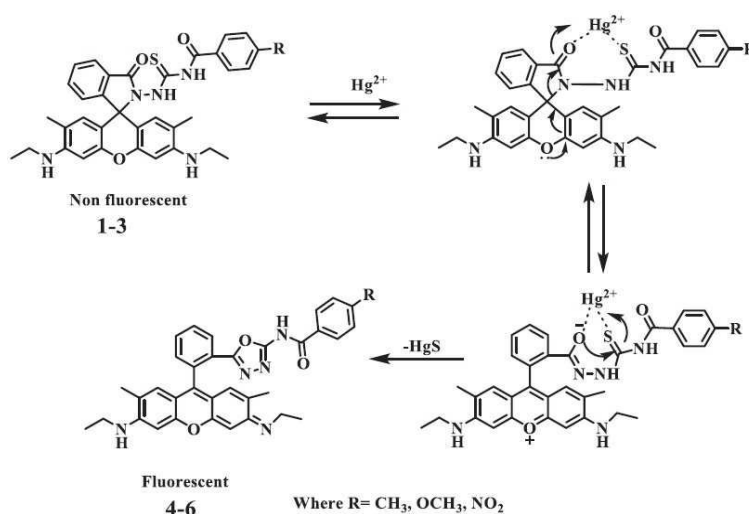
(57) 요약

본 발명은 수용액 속에 존재하는 유해한 수은 이온에 대하여 높은 민감도 및 선택성을 갖는 신규한 로다민계 화학센서 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 수용액속의 수은 이온에 대하여 선택적으로 검출할 수 있는 신규한 로다민 유도체 및 이의 합성방법이 확인되었다. 특히 로다민 유도체의 치환체 효과를 이용하여 분자 구조를 최적화함으로써 수용액 속의 수은 이온을 빠르고, 넓은 pH 범위에서 높은 민감도로 검출할 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 신규한 로다민 유도체 화학센서는 수은 이온 존재 여부를 육안으로도 확인할 수 있어 보다 빠르고 간단하게 비색 또는 형광 신호를 확인함으로써 수용성 샘플에서의 수은 이온을 검출할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07D 491/10 (2013.01)

G01N 21/76 (2013.01)

G01N 21/78 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

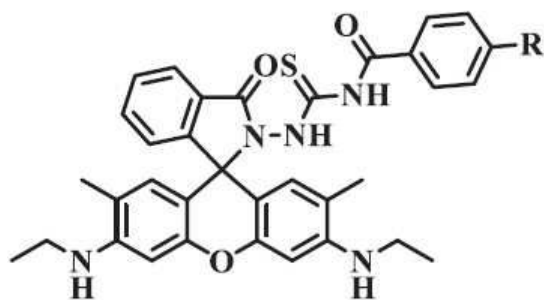
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 로다민 유도체:

(화학식 1)



상기 식에서, R은 메틸기(-CH₃), 메톡시기(-OCH₃), 나이트로기(-NO₂), 수소기(-H), 할로젠(-F, -Br, -Cl 및 -I), 시아노기(-CN), 페닐기(-Ph), 에틸기(-CH₂CH₃), 뷰틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₃), 펜틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 헥실기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 헵틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 옥틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 데실기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), t-뷰틸기(-t-Butyl), 디 메틸 아미노기(CH₃-N-CH₃), 트리플루오로메틸기(-CF₃), 트리플루오로메톡시기(-OCF₃), 에톡시기(-OCH₂CH₃), 뷰톡시기(-OCH₂CH₂CH₂CH₃) 및 펜틸록실기(-OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나를 나타낸다.

청구항 2

하기 단계를 포함하는 로다민 유도체의 합성방법:

- 아세토나이트릴(acetonitrile)에 메틸기, 메톡시기, 나이트로기, 수소기, 할로젠, 시아노기, 페닐기, 에틸기, 뷰틸기, 펜틸기, 헥실기, 헵틸기, 옥틸기, 데실기, t-뷰틸기, 디 메틸 아미노기, 트리플루오로메틸기, 트리플루오로메톡시기, 에톡시기, 뷰톡시기 및 펜틸록실기로 구성된 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 화합물을 첨가한 용액을 제조하는 단계;
- 상기 a) 단계의 용액에, 무수 아세토나이트릴(anhydrous acetonitrile)에 포타슘 싸이오시아네이트(potassium thiocyanate)를 첨가한 서스펜션을 혼합하여 반응시키는 단계;
- 상기 b) 단계의 반응 혼합물을 환류(reflux)시킨 후 상온으로 냉각시키는 단계;
- 상기 c) 단계에서 냉각시킨 반응 혼합물에, 아세토나이트릴에 로다민 6G 하이드라자이드(Rhodamine 6G hydrazide)를 넣은 용액을 첨가하여 혼합하는 단계;
- 상기 d) 단계에서 얻은 혼합물을 환류 시킨 후 상온으로 냉각시키는 단계; 및
- 상기 e) 단계에서 냉각시킨 혼합물을 감압 필터하여 수득한 고체를 아세토나이트릴로 세척한 후 건조시켜 화학식 1의 화합물을 얻는 단계.

청구항 3

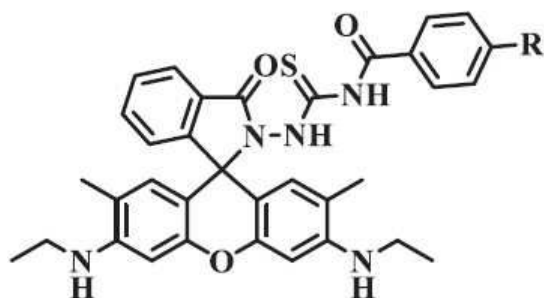
제2항에 있어서, 상기 a) 단계의 화합물은 *p*-톨루오일클로라이드(*p*-toluoylchloride), *p*-메톡시벤조일(*p*-methoxybenzoyl), *p*-나이트로벤조일(*p*-nitrobenzoyl), 벤조일 클로라이드(Benzoyl chloride), *p*-플루오로벤조일 클로라이드(*p*-Fluorobenzoyl chloride), *p*-브로모벤조일 클로라이드(*p*-Bromobenzoyl chloride), *p*-클로로벤조일 클로라이드(*p*-Chlorobenzoyl chloride), *p*-아이오도벤조일 클로라이드(*p*-Iodobenzoyl chloride), *p*-사이아노벤조일 클로라이드(*p*-Cyanobenzoyl chloride), 비페닐-4-카르보닐 클로라이드(Biphenyl-4-carbonyl

chloride), *p*-에틸벤조일 클로라이드(*p*-Ethylbenzoyl chloride), *p*-부틸벤조일 클로라이드(*p*-Butylbenzoyl chloride), *p*-펜틸벤조일 클로라이드(*p*-Pentylbenzoyl chloride), *p*-헥실벤조일 클로라이드(*p*-Hexylbenzoyl chloride), *p*-헵틸벤조일 클로라이드(*p*-Heptylbenzoyl chloride), *p*-옥틸벤조일 클로라이드(*p*-octylbenzoyl chloride), *p*-데실벤조일 클로라이드(*p*-Decylbenzoyl chloride), *p*-tert-부틸벤조일 클로라이드(*p*-tert-Butylbenzoyl chloride), *p*-(디메틸아미노)벤조일 클로라이드(*p*-(Dimethylamino)benzoyl chloride), *p*-(트리플루오로메틸)벤조일 클로라이드(*p*-(Trifluoromethyl)benzoyl chloride), *p*-(트리플루오로메톡시)벤조일 클로라이드(*p*-(Trifluoromethoxy)benzoyl chloride), *p*-에톡시벤조일 클로라이드(*p*-Ethoxybenzoyl chloride), *p*-부톡시벤조일 클로라이드(*p*-Butoxybenzoyl chloride) 및 *p*-N-펜틸록시벤조일 클로라이드(*p*-N-Pentyloxybenzoyl chloride)로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 합성방법.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 로다민 유도체를 포함하는 수은 이온 검출용 화학센서:

(화학식 1)



상기 식에서, R은 메틸기(-CH₃), 메톡시기(-OCH₃), 나이트로기(-NO₂), 수소기(-H), 할로젠(-F, -Br, -Cl 및 -I), 시아노기(-CN), 페닐기(-Ph), 에틸기(-CH₂CH₃), 부틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₃), 펜틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 헥실기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 헵틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 옥틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 데실기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), t-부틸기(-t-Butyl), 디 메틸 아미노기(CH₃-N-CH₃), 트리플루오로메틸기(-CF₃), 트리플루오로메톡시기(-OCF₃), 에톡시기(-OCH₂CH₃), 부톡시기(-OCH₂CH₂CH₂CH₃) 및 펜틸록실기(-OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나를 나타낸다.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화학식 1의 로다민 유도체는 수은 이온에 의해 스피로락탐 고리열림(spirolactam ring opening)이 일어나는 것을 특징으로 하는 화학센서.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 화학식 1의 로다민 유도체는 pH 4.0-10.0에서 수은 이온 검출이 가능한 것을 특징으로 하는 화학센서.

청구항 7

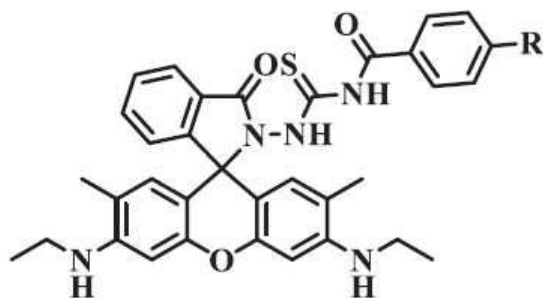
제4항의 화학센서를 포함하는 수은이용 검출용 시험지.

청구항 8

하기 단계를 포함하는 수은 이온 검출방법:

A) 하기 화학식 1의 로다민 유도체를 포함하는 화학센서를 검출하고자 하는 시료에 첨가하는 단계;

(화학식 1)



상기 식에서, R은 메틸기(-CH₃), 메톡시기(-OCH₃), 나이트로기(-NO₂), 수소기(-H), 할로젠(-F, -Br, -Cl 및 -I), 시아노기(-CN), 페닐기(-Ph), 에틸기(-CH₂CH₃), 뷰틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₃), 펜틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 헥실기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 헵틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 옥틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 데실기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), t-뷰틸기(-t-Butyl), 디 메틸 아미노기(CH₃-N-CH₃), 트리플루오로메틸기(-CF₃), 트리플루오로메톡시기(-OCF₃), 에톡시기(-OCH₂CH₃), 뷰톡시기(-OCH₂CH₂CH₂CH₃) 및 펜틸록실기(-OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나를 나타낸다.

B) 상기 A) 단계의 시료에 존재하는 수은 이온과 화학센서가 반응하여 발생하는 비색(colorimetric) 또는 형광(fluorescence) 신호를 검출하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 A) 단계의 시료는 수용성 시료인 것을 특징으로 하는 수은 이온 검출방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 A) 단계의 로다민 유도체는 DMF와 물이 4:1 - 2:3(v/v)의 비율로 혼합된 용액에 용해되어 있는 것을 특징으로 하는 수은 이온 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 수용액 속에 존재하는 유해한 수은 이온에 대하여 높은 민감도 및 선택성을 갖는 신규한 로다민계 화학센서에 관한 것으로, 구체적으로 수은 이온으로 인하여 싸이오세미카바자이드 형태에서 옥사다이졸 형태로의 전환반응이 일어나 수용액 속의 수은 이온의 비색 또는 형광 검출이 가능한 화학센서 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

로다민 유도체는 훌륭한 발색단(chromophre) 또는 형광단(fluorophore)이고, 긴 흡수 및 방출 파장, 큰 흡광 계수 및 높은 형광 양자 수율(fluorescence quantum yield)과 같은 매우 훌륭한 광 물리적(photophysical) 성질로 인하여 많은 관심의 대상이 되고 있다(R.W. Ramette *et al.*, *Chem. Soc.* 78(1956), 4872-4878; A.W. Czarnik, *American Chemical Society*, 1993; J.R. Lakowicz, *Springer*, 2006 pp 67-69).

[0003]

스피롤락탐(spirolactam) 구조의 로다민 유도체는 형광을 나타내지 않으나, 스피롤락탐 고리의 열림이 일어나면 강한 형광 방출을 일으킨다(H.N. Kim *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* 37(2008) 1465-1472). 로다민 골격(frame work)은 독특한 구조적 특징으로 인하여, 오프-온(off-on) 형광성 또는 비색성 화학센서를 설계하는 데에 특히 적합하다(H.N. Kim *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* 37(2008) 1465-1472; M.Beija *et al.*, *Chem. So. Rev.* 38(2009) 2410-2433). 다양한 로다민-변형된(modified) 화학센서는 최근에서야 중금속 및 전이 금속 이온을 검출하기 위해 발전되어 왔는데, 이는 이러한 금속 이온들이 널리 사용되고 이들이 환경 및 인간의 건강에 해로운 영향을 끼치기 때문이다(B. Valeur *et al.*, *coord. Chem. Rev.* 205(2000) 3-40; V. Amendola *et al.*, *coord. Chem.*

Rev. 250(2006) 273-299). 여러 양이온 중에 Hg^{2+} 이온의 높은 독성으로 인하여, 손쉽게 다룰 수 있고 높은 민감도 및 선택성을 가진 새로운 Hg^{2+} 화학센서를 개발하기 위한 많은 노력이 기울어져 왔다.

[0004]

독성물질 및 질병 등기 기관(Agency for Toxic Substances and disease Registry, ATSDR)의 목록에 의하면, Hg^{2+} 는 세 번째로 흔하게 발견되고, 두 번째로 높은 독성을 나타내는 중금속이다(L. Patrick, *Altern. Med. Rev.* 7(2002) 456-471; US EPA, *Research triangle Park* (2005)). 수은 오염은 예를 들면 화산분출, 금 채광 및 화석 연료 연소와 같은 다양한 자연적 및 인위적 요인으로 인하여 발생 할 수 있다. 수은 유도체의 매우 강한 독성은 수은의 단백질 및 효소의 싸이올 그룹에 대한 높은 친화성이 원인인데, 이는 세포의 기능장애를 유발하고, 그 결과 태아기 뇌손상, 심각한 인지 문제, 운동 장애 및 미나마타병과 같은 건강상의 문제를 야기한다(P. Grandjean *et al.*, *Environ. Res.* 77(1998); 165-172, T. Takeuchi *et al.*, *Acta Neuropathol.* 2(1962) 40-57; M. Harada *et al.*, *Toxicol.* 25(1995) 1-25). 그러므로 수은노출과 관련된 건강 문제는 생물학적 및 환경적 샘플에서 선택적이고 효과적인 수은 모니터링 방법의 연구 동기가 되어왔다.

[0005]

분광광도법(Z. Marczenko, *Ellis horwood*, 1986, pp.151-160), 중성자 방사화 분석법(neutron activation analysis)(J.C.Yu *et al.*, *Anal. Chim* 154(1983) 307-312), 양극 벗김 전압전류법(anodic stripping voltammetry, ASV)(P.Ugo *et al.*, *Electroanalysis* 10(1998) 1017-1021), X-선 형광 분석법(L. Bennun *et al.*, *Spectrochim.* B52(1997) 1195-1200), 유도 결합 플라즈마 질량분석법(inductively coupled plasma mass spectrometry)(M.J.Powell *et al.*, *Anal. Chem* 64(1992) 2253-2257), 전열 원자 흡수분석법(electrothermal atomic absorption spectrometry)(C.Burrini *et al.*, *Talanta* 44(1997) 1219-1223), 원자 형광 분광분석법(A. Shafawi *et al.*, *analyst* 124(1999) 185-189) 및 냉증기화원자흡수법(cold vapor atomic absorption spectrometry, CVAAS)(Y. Yamini *et al.*, *Anal. Chim Acta* 355(1997) 69-74)과 같은 다양한 분석 기술이 수은 검출이 가능하다. 그러나 이러한 방법은 고가의 장비가 필요하고, 많은 시간이 소비되며, 훈련된 전문가만이 수행할 수 있는 힘든 과정이 포함된다. 반면 비색/형광 검출은 조작적 간단함, 저 비용, 실시간 모니터링 및 높은 선택성 때문에 Hg^{2+} 이온 검출에 유용하다(A.W.Czarnik, *ACS Symposium Series* 538(1993); J. S. Kim *et al.*, *Chem. Rev* 107(2007) 3780-3799; E.M. Nolan *et al.*, *Chem. Rev.* 108(2008) 3443-3480). 수십년 이상 전부터 '턴-온(turn-on)'형 비색 및 형광 센서의 개발을 위해 다양한 노력이 시도되어왔는데, 이는 Hg^{2+} -유도된 형광 소멸 반응을 나타내는 것보다 시험지 및 바이오 이미징(bioimaging)으로의 적용에 더 적합하다.

[0006]

문헌 조사 결과, 크산톤(xanthone)-기반의 유도체는 현저한 고리-열림 반응을 나타내고, 이러한 유도체는 '턴-온' 화학센서 프로브(probe)의 설계를 위한 이상적인 플랫폼이라는 것을 밝혀냈다. 많은 이러한 프로브는 과거 수십년동안 다양한 이온 검출을 위해 발전되어 왔으나(H.N. Kim *et al.*, *Chem. soc. Rev.* 37(2008), 1465-1472; Y.Zhao *et al.*, *Anal. Chem.* 81(2009), 7022-7030; A. Chatterjee *et al.*, *Chem. Soc.* 131(2009), 2040-2041; O.A. Egorova *et al.*, *Org. Lett.* 12(2010), 401-403; Z.X.Han *et al.*, *Anal. Chem.* 82(2010)3108-3113), Hg^{2+} 이온을 위하여 설계된 프로브는 많지 않았다. Hg^{2+} 이온을 검출하기 위한 프로브는 주로 다음의 두 가지 타입의 접근에 의한다; (i) Hg^{2+} 의 배위(coordination)로 인한 스피로락탐 형태(비형광성) 및 고리-열림 아마이드 형태(형광성)의 평형화를 이루는 간단한 가역성 화학센서(M. Wang *et al.*, *Actuators B* 192(2014), 512-521; Y.Shiraishi *et al.*, *J.Org.Chem.* 73(2008), 8571-8574; A.B. Pthman *et al.*, *J. Org. Chem.* 72(2007), 7634-7640), 및 (ii) Hg^{2+} 이온의 강한 호황성(thiophilic)에 기인한 가수분해, 고리화 및 제거 반응을 포함 하는, 비가역적 수은-촉진된 탈황 반응에 기초하는 화학정량계(R.P. Haugland, *Handbook of Fluorescent probes and research products*, ninthed, 2002, M. Santra *et al.*, *Chem. Commun*(2009), 2115-2117; B. Liu *et al.*, *Chem. Commun*(2005), 3156-3158; W.Y.Liua *et al.*, *Chim Acta* 791(2013), 65-71; F. Song *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 130(2008), 16460).

[0007]

한국 등록특허 제10-1105381호 "수은 선택적 형광감응성 화합물 및 이를 포함하는 수은 선택적 형광감응성 화학센서"등과 같이 많은 연구자들이 요소(J.H. Soh *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 48(2007), 5966), 나프탈나프탈리미드(naphthalimide)(M. Kumar *et al.*, *Org. Lett.* 13(2011), 1422-1425), 터페닐(terphenyl)(V.Bhalla *et al.*, *Actuators B* 151(2010), 180-185), 쿠퍼린(coumarin)(Q.J. Maa *et al.*, *Anal. Chem Acta* 663(2010), 85-90), 칼릭스(calix)(H.N. Kim *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* 37(2008), 1465-1472) 및 아렌(arene)(A.B. Pthman *et al.*, *Org. Chem.* 72(2007), 7634-7640)의 친핵성에 기인한 결합하는 기능들로 인하여 이들을 함유하는 화학센서(타입 i)를 개발해 왔다. 그러나 많은 이러한 센서들은 pH에 민감하여 생리적 환경에서 Hg^{2+} 친화력의 저하를

초래할 수 있었다. 예를들면, Das과 동료들이 개발한 pH 7의 물-메탄올(1:1. v/v) 용액에서 Hg^{2+} 와 Cu^{2+} 를 검출하기 위한 로다민-기반의 화학센서가 있다(M. Suresh *et al.*, *Org. Lett.* 11(2009), 2740-2743). Tang과 동료들은 각각 비색 및 형광 방법으로 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 를 모두 검출할 수 있는 새로운 로다민 B 유도체를 개발했다(L. Tant *et al.*, *Acta A* 78 (2011) 1168-1172).

[0008] 반면 비가역성의 화학정량계(타입 ii)는 게스트(guest)와 호스트(host) 중 사이의 특정 화학 반응을 사용하기 때문에 다른 감지 방법들보다 나은 선택성과 민감성을 갖도록 개선되어오고 있다(M.E. Jun *et al.*, *Commun.* 47(2011), 7583-7601). 현재까지 개발된 Hg^{2+} -유발된 싸이오세미카바자이드 형태에서 1,3,4-옥사다이졸 형태로의 비가역적 전환반응을 활용한 Hg^{2+} 를 위한 형광 화학정량계 분자들은 아주 적으나, 이들은 Hg^{2+} 를 위한 새로운 화학정량계의 토대 역할을 하고 있다. Tae와 동료들은 로다민 6G-기반의 싸이오세미카바자이드 시스템의 Hg^{2+} 이온-감지 특성에 대하여 조사했다(Y.-K. yang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 127(2005) 16760-16761; Y.-K. Yang *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* 7(2009), 4590-453). 그 결과 화학 센서의 감지 특성은 주로 아닐린 고리의 치환체에 의존한다는 것을 확인 하였다. Shang과 동료들은 Hg^{2+} 이온을 위한 화학정량계적 접근을 활용한 FRET(Fluorescence resonance energy transfer)-기반의 화학센서를 합성하였다(G.-Q. Shang *et al.*, *J. Fluoresc.* 18(2008), 1187-1192). 이와 유사하게, Wei Guo와 동료들은 나프탈리미드-부가된 로다민 유도체를 FRET 프로세스에 기초한 Hg^{2+} 를 위한 비가역적 화학 센서로 개발했다(Y. Liu *et al.*, *Dyes Pigments* 92(2012) 909-915). 이들 중, 몇몇의 연구자들은 Hg^{2+} 를 선택적으로 감지하기 위한 황-기능화된(sulfur functionalized)은 나노 입자를 개발했다(B. Yudhajit *et al.*, *Chem. Eng.* 2 (2014), 2149-2154; C. Indranath *et al.*, *J. Hazard. Mater.* 211 (2012), 396-403).

[0009] 모든 Hg^{2+} -유도된 고리화 반응은 $Hg-S$ 복합체 및 탈황생성물의 순차적인 중간생성물의 형성을 통하여 발생하고, 반응 속도는 'S(황)'와 유입되는(incoming) Hg^{2+} 사이의 배위의 용의성에 의존한다. 그러므로, 'S'의 배위 위치 염기도는 Hg^{2+} -유발된 옥사다이졸 형성 감지 메커니즘의 좀 더 나은 과약을 위하여 다양한 치환체를 사용하여 조정되어 오고 있다.

[0010] 따라서 본 발명자들은 만약 전자효과를 사용하여 배위 위치의 염기도를 최적화 할 수 있다면 더 효과적인 로다민-기반의 화학정량계를 얻을 수 있을 것이라고 예상하고, 방향 고리의 치환체를 수용액-유기 미디엄에서 선택적으로 Hg^{2+} 이온을 감지하도록 다양하게 함으로써 결합단위 'S'의 전자구름(염기도)를 조정하고자 실험을 거듭하였다. 그 결과 수용성 샘플에서 높은 민감도로 Hg^{2+} 이온을 검출해 낼 수 있는 안정적이고 새로운 싸이오세미카바자이드-기반의 로다민 유도체 화학정량계를 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

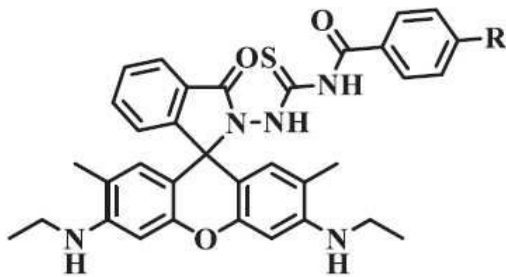
[0011] 따라서 본 발명은 수용액에서 수은 이온을 높은 민감도로 선택적으로 검출해 낼 수 있는 '턴-온-형' 신규 로다민계 화학센서 및 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 화학센서를 활용하여 수은 이온을 비색 또는 형광 신호를 확인함으로써 신속하고 간단하게 검출할 수 있는 방법 및 검출용 시험지를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 로다민 유도체를 제공한다.

화학식 1



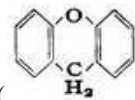
[0014]

[0015]

상기 식에서, R은 메틸기(-CH₃), 메톡시기(-OCH₃), 나이트로기(-NO₂), 수소기(-H), 할로겐(-F, -Br, -Cl 및 -I), 시아노기(-CN), 페닐기(-Ph), 에틸기(-CH₂CH₃), 뷰틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₃), 펜틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 헥실기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 헵틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 옥틸기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 데실기(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), t-뷰틸기(-t-Butyl), 디 메틸 아미노기(CH₃-N-CH₃), 트리플루오로메틸기(-CF₃), 트리플루오로메톡시기(-OCF₃), 에톡시기(-OCH₂CH₃), 뷰톡시기(-OCH₂CH₂CH₂CH₃) 및 펜틸록실기(-OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나를 나타낸다.

[0016]

본 발명에 있어서, 상기 로다민은 크산텐(xanthene)계열의 염료 중 하나로, 크산텐 계열의 염료는 다섯 개의 탄

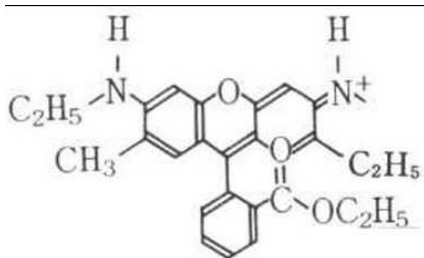


소 원자와 한 개의 산소원자로 구성된 포화 고리화합물인 피란고리()에 2개의 벤젠고리가 축합하여 생긴 3원고리의 화합물을 총칭하는 것이다. 이 중 로다민 B는 금속 광택이 나는 녹색의 작은 결정 또는 적자색 가루이고, 로다민 B의 유도체로는 로다민 B토너, 로다민 B레이크, 로다민 6G 토너, 로다민 6레이크 등 유리 안료와 로다민 G, 로다민 6GCP등의 염기성 염료가 있다.

[0017]

본 발명에서 상기 로다민 유도체는 레이저용 색소 중 하나인 아래 화학식2의 로다민 6G로부터 유래될 수 있다.

화학식 2



[0018]

[0019]

또한, 본 발명은 a) 아세토나이트릴(acetonitrile)에 메틸기, 메톡시기, 나이트로기, 수소기, 할로겐, 시아노기, 페닐기, 에틸기, 뷰틸기, 펜틸기, 헥실기, 헵틸기, 옥틸기, 데실기, t-뷰틸기, 디 메틸 아미노기, 트리플루오로메틸기, 트리플루오로메톡시기, 에톡시기, 뷰톡시기 및 펜틸록실기로 구성된 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 화합물을 첨가한 용액을 제조하는 단계; b) 상기 a) 단계의 용액에, 무수 아세토나이트릴(anhydrous acetonitrile)에 포타슘 싸이오시아나이트(potassium thiocyanate)를 첨가한 서스펜션을 혼합하여 반응시키는 단계; c) 상기 b) 단계의 반응 혼합물을 환류(reflux)시킨 후 상온으로 냉각시키는 단계; d) 상기 c) 단계에서 냉각시킨 반응 혼합물에, 아세토나이트릴에 로다민 6G 하이드라자이드(Rhodamine 6G hydrazide)를 넣은 용액을 첨가하여 혼합하는 단계; e) 상기 d) 단계에서 얻은 혼합물을 환류 시킨 후 상온으로 냉각시키는 단계; 및 f) 상기 e) 단계에서 냉각시킨 혼합물을 감압 필터하여 수득한 고체를 아세토나이트릴로 세척한 후 건조시켜 화학식 1의 화합물을 얻는 단계를 포함하는 로다민 유도체의 합성방법을 제공한다.

- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 c) 단계 및 e) 단계의 환류는 화합물을 용매에 녹여 가열하면서 반응시킬 때, 증기가 되어 반응 용기에서 휘산하는 용매를 냉각하여 다시 반응 용기 중에 흘러오도록 하는 조작을 의미하는 것으로, 바람직하게는 1시간동안 이루어 질 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 a) 단계의 화합물은 *p*-톨루오일클로라이드(*p*-toluoylchloride), *p*-메톡시벤조일(*p*-methoxybenzoyl), *p*-나이트로벤조일(*p*-nitrobenzoyl), 벤조일 클로라이드(Benzoyl chloride), *p*-플루오로벤조일 클로라이드(*p*-Fluorobenzoyl chloride), *p*-브로모벤조일 클로라이드(*p*-Bromobenzoyl chloride), *p*-클로로벤조일 클로라이드(*p*-Chlorobenzoyl chloride), *p*-아이오도벤조일 클로라이드(*p*-Iodobenzoyl chloride), *p*-사이아노벤조일 클로라이드(*p*-Cyanobenzoyl chloride), 비페닐-4-카르보닐 클로라이드(Biphenyl-4-carbonyl chloride), *p*-에틸벤조일 클로라이드(*p*-Ethylbenzoyl chloride), *p*-부틸벤조일 클로라이드(*p*-Butylbenzoyl chloride), *p*-펜틸벤조일 클로라이드(*p*-Pentylbenzoyl chloride), *p*-헥실벤조일 클로라이드(*p*-Hexylbenzoyl chloride), *p*-헵틸벤조일 클로라이드(*p*-Heptylbenzoyl chloride), *p*-옥틸벤조일 클로라이드(*p*-octylbenzoyl chloride), *p*-데실벤조일 클로라이드(*p*-Decylbenzoyl chloride), *p*-tert-부틸벤조일 클로라이드(*p*-tert-Butylbenzoyl chloride), *p*-(디메틸아미노)벤조일 클로라이드(*p*-(Dimethylamino)benzoyl chloride), *p*-(트리플루오로메틸)벤조일 클로라이드(*p*-(Trifluoromethyl)benzoyl chloride), *p*-(트리플루오로메톡시)벤조일 클로라이드(*p*-(Trifluoromethoxy)benzoyl chloride), *p*-에톡시벤조일 클로라이드(*p*-Ethoxybenzoyl chloride), *p*-부톡시벤조일 클로라이드(*p*-Butoxybenzoyl chloride) 및 *p*-N-펜틸록시벤조일 클로라이드(*p*-N-Pentyloxybenzoyl chloride)로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 로다민 유도체를 포함하는 수은 이온 검출용 화학센서를 제공한다.
- [0023] 수은 이온 검출용 화학센서에는 크게 가역성 화학센서와 비가역적 화학정량계의 두 가지 방식이 있는데, 우선 가역성 화학센서는 Hg^{2+} 의 스피로락탐 형태와 고리-열림 아마이드 형태의 평형을 이용한 것이고(타입 i), 비가역적 화학정량계는 Hg^{2+} 의 강한 호환성에 기인한 탈황반응을 이용한 것이다(타입 ii). 상기 본 발명의 화학센서는 구체적으로 타입 ii의 비가역적 화학정량계에 해당된다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화학센서는 수은 이온에 의해 스피로락탐 고리열림(spirolactam ring opening)이 일어나는 것일 수 있다. 구체적으로, 로다민 유도체가 스피로락탐 구조를 취하고 있을 때는 형광을 나타내지 않으나 금속이온 등의 이유로 스피로락탐 고리 열림이 일어나면 강한 형광방출을 일으키게 된다(H.N. Kim *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* 37 1465-1472).
- [0025] 본 발명에서 상기 수은 이온에 의한 스피로락탐 고리 열림 반응은 Hg-S 복합체 및 탈황생성물의 중간생성물의 형성을 통하여 발생하고, 반응속도는 황과 유입되는 Hg^{2+} 이온 사이의 배위 용의성에 의존한다. 이에 본 발명에서는 메틸기, 메톡시기 및 나이트로기와 같은 치환체를 사용하여 배위 위치의 염기도를 최적화 시킨 화학센서를 개발하였다(실시예 3.3 및 도 17 참조).
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화학식 1의 로다민 유도체는 pH 4.0-10.0에서 수은 이온 검출이 가능한 것일 수 있다. 수은이온이 존재하지 않을 경우 본원발명의 화학센서는 pH 5.0이하의 산성조건에서만 형광을 나타냈으나, 수은이온이 첨가될 경우 비교적 넓은 범위인 pH5.0-9.4에서 형광을 나타냈다. 즉, 본발명에 따른 화학센서는 중성에 가까운 pH 조건에서 사용될 수 있으므로 다양한 생물학적 샘플에서의 수은 이온 검출이 가능하다(실시예 3.5 및 도 19 내지 21 참조).
- [0027] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 로다민 유도체를 포함하는 화학센서를 포함하는 수은이용 검출용 시험지를 제공한다.
- [0028] 본 발명에 있어서 상기 시험지는 본 발명에 의해 합성된 화학센서를 포함하고 있는 것으로, 시험지를 수은 이온의 유무를 확인하고자 하는 시료에 적신 후 육안 및 UV 램프를 조사하여 색 변화를 확인함으로써 특별한 장비 없이 빠르고 간단한 수은 이온의 유무를 확인할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 A) 화학식 1의 로다민 유도체를 포함하는 화학센서를 검출하고자 하는 시료에 첨가하는 단계; B) 상기 A) 단계의 시료에 존재하는 수은 이온과 화학센서가 반응하여 발생하는 비색(colorimetric) 또는 형광

(fluorescence) 신호를 검출하는 단계를 포함하는 수은 이온 검출방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 A) 단계의 시료는 생물학적 또는 화학적 수용성 시료일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 A) 단계의 로다민 유도체는 DMF와 물이 4:1 - 2:3(v/v)의 비율로 혼합된 용액에 용해될 수 있으나 바람직하게는 DMF와 물이 1:1(v/v)의 비율로 혼합된 용액에 용해될 수 있다. 화학정량계의 Hg^{2+} 이온 선택성은 용액에 의하여 영향을 받으므로 물과 DMF가 적정 비율로 혼합되어 있는 것이 중요하다(실시예 3.3 및 도 10, 11 참조).

발명의 효과

[0032] 본 발명에 따르면 수용액속의 수은 이온에 대하여 선택적으로 검출할 수 있는 신규한 로다민 유도체 및 이의 합성방법이 확인되었다. 특히 로다민 유도체의 치환체 효과를 이용하여 분자 구조를 최적화함으로써 수용액 속의 수은 이온을 빠르고, 넓은 pH 범위에서 높은 민감도로 검출할 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명에 따른 신규한 로다민 유도체 화학센서를 이용하면, 수은 이온 존재 여부를 육안으로도 확인할 수 있어 보다 빠르고 간단하게 비색 또는 형광 신호를 확인함으로써 수용성 샘플에서의 수은 이온을 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명에 따른 화학센서의 합성방법을 개략적으로 나타내는 그림이다.

도 2는 본 발명에 따른 화학센서가 수은 이온을 감지하는 매커니즘을 나타내는 그림이다.

도 3은 본 발명에 따른 화학센서(1)의 수용액 속의 수은 검출 능력을 나타내는 것으로, $50\mu\text{M}$ 의 양이온과 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 의 화학센서(1)가 존재할 때 반응 결과를 육안(도 3 위) 및 UV 램프($\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm}$)를 비추어(도 3 아래) 확인한 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 화학센서(2)의 수용액 속의 수은 검출 능력을 나타내는 것으로, $50\mu\text{M}$ 의 양이온과 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 의 화학센서(2)가 존재할 때 반응 결과를 육안(도 4 위) 및 UV 램프($\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm}$)를 비추어(도 4 아래) 확인한 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 화학센서(3)의 수용액 속의 수은 검출 능력을 나타내는 것으로, $50\mu\text{M}$ 의 양이온과 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 의 화학센서(3)가 존재할 때 반응 결과를 육안(도 5 위) 및 UV 램프($\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm}$)를 비추어(도 5 아래) 확인한 것이다.

도 6은 Hg^{2+} 및 다른 금속 이온을 포함하는 용액에 대한 본 발명에 따른 화학센서(1)의 UV-Vis 흡수 스펙트럼 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 Hg^{2+} 농도의 증가($0-100\mu\text{M}$)에 따른 본 발명의 화학센서의 UV-Vis 스펙트럼의 변화를 나타내는 것이다. 도 7의 a, b, 및 c는 각각 본 발명에 따른 화학센서 (1), (2) 및 (3)의 스펙트럼 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 본 발명에 따른 화학센서(1-3)와 Hg^{2+} 의 job's plot을 나타내는 그래프이다.

도 9는 각각 화학센서(1)과 Hg (도 9 a), 화학센서(2)과 Hg (도 9 b) 및 화학센서(3)과 Hg (도 9 c)의 B-H 그래프이다.

도 10은 본 발명에 따른 화학센서 1($5 \times 10^{-5}\text{M}$)과 Hg^{2+} ($100\mu\text{M}$)의 다양한 유기 용매에서의 형광 방출 스펙트럼 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 본 발명에 따른 화학센서 1($5 \times 10^{-5}\text{M}$)과 Hg^{2+} ($100\mu\text{M}$)의 DMF-물 혼합물에서의 형광 방출 스펙트럼 결과를

나타내는 그래프이다.

도 12는 Hg^{2+} 및 기타 양이온이 있을 때, 본 발명에 따른 화학센서 1의 형광 스펙트럼 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13는 Hg^{2+} 및 기타 양이온이 있을 때, 본 발명에 따른 화학센서 2의 형광 스펙트럼 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 Hg^{2+} 및 기타 양이온이 있을 때, 본 발명에 따른 화학센서 3의 형광 스펙트럼 결과를 나타내는 그래프이다.

도 15는 Hg^{2+} 농도의 증가(0-100 μM)에 따른 본 발명의 화학센서의 형광 스펙트럼의 변화를 나타내는 것이다. 도 15의 a, b, 및 c는 각각 본 발명에 따른 화학센서 (1), (2) 및 (3)의 스펙트럼 결과를 나타내는 그래프이다.

도 16은 각각 화학센서(1)과 Hg (도 16 a), 화학센서(2)과 Hg (도 16 b) 및 화학센서(3)과 Hg (도 16 c)의 1:1 결합모드에서의 B-H 그래프이다.

도 17은 본 발명에 따른 화학센서 1-3($5 \times 10^{-5} M$)의 Hg^{2+} 농도($0-2 \times 10^{-5} M$)에 따른 형광 강도를 나타내는 그래프이다. 도 17의 a, b, 및 c는 각각 본 발명에 따른 화학센서 (1), (2) 및 (3)에 대한 것이다.

도 18은 발명에 따른 화학센서 3, 3 + Hg^{2+} 및 6의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 결과 이다.

도 19는 본 발명에 따른 화학센서 1의 금속 이온 선택성을 나타내는 그래프이다.

도 20은 본 발명에 따른 화학센서 2의 금속 이온 선택성을 나타내는 그래프이다.

도 21은 본 발명에 따른 화학센서 3의 금속 이온 선택성을 나타내는 그래프이다.

도 22는 Hg^{2+} 가 있을 때(A) 또는 없을 때(B) 본 발명에 따른 화학센서 1-3의 pH에 따른 형광 광도를 나타낸 그래프이다.

도 23은 Hg^{2+} 농도(1-100 μM)에 따른 시험지(화학센서 1 $1.0 \times 10^{-4} M$)를 가시광선 아래(도 23 A) 및 UV 램프($\lambda_{ex}=360nm$)를 비추었을 때의 색 변화를 나타내는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0036] <실시예 1> 로다민 유도체의 합성

[0037] 로다민 6G 하이드라자이드(Rhodamine 6G hydrazide)는 공지된 문헌에 개시된 과정에 따라 합성되었다(S.LEE *et al.*, *Actuators B* 196 388-397). 모든 기타 시료들, 양이온 및 용액은 시판중인 제품을 구입하였고, 추가적인 정제 과정 없이 사용하였다.

[0038] 1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 각각 300 및 75 MHz로 Bruker 300 분광계를 사용하여 측정하고 기록되었다. FAB-MS 스펙트럼은 JEOLJMS 700 질량 분석기를 사용하여 확인하였다. FT-IR 스펙트럼은 ALPHA-P 분광계를 사용하여 기록되었고, 녹는점은 반스데드 전열 장비(UK)를 사용하여 확인되었다.

[0039] 1.1 N-((3',6'-bis(에틸아미노)-2',7'-디메틸-3-옥소스피로[아이소인돌린-1,9'-크산텐]-2-일)카바모싸이오일)-4-메틸벤자마이드(1)의 합성

[0040] N-((3',6'-bis(에틸아미노)-2',7'-디메틸-3-옥소스피로[아이소인돌린-1,9'-크산텐]-2-일)카바모싸이오일)-4-메틸벤자마이드(N-((3',6'-bis(ethylamino)-2',7'-dimethyl-3-oxospiro[isindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)carbamothioyl)-4-methylbenzamide, 이하 1이라 한다)의 합성은 다음과 같은 과정으로 합성되었다. 아세트

나이트릴(acetonitrile) 25mL에 *p*-톨루오일클로라이드(*p*-toluoylchloride) 1.0g(6.4mmol)을 넣은 용액을, 무수 아세트나이트릴(anhydrous acetonitrile) 25mL에 포타슘 싸이오시아네이트 0.628g(6.4mmol)을 넣은 서스펜션에 한 방울씩 첨가되었다. 반응 혼합물은 1시간 동안 환류된 후 상온으로 냉각되었다. 이후 아세트나이트릴에 로다민 6G 하이드라자이드 2.4g(6.4mmol)을 넣은 용액을 첨가하여 혼합하고, 혼합물은 1시간 동안 환류된 후 상온으로 냉각되었다. 감압 필터 한 후, 고체는 차가운 아세트나이트릴로 세척되었고 정제되지 않은(crude) **1**은 밝은 분홍색의 고체가 될 때 까지 건조되었다. 정제되지 않은 고체는 순백색의 정제된 고체를 얻기 위하여 230-400 메쉬 플래시 컬럼(flash column)과 10%의 메탄올이 클로로포름(chloroform)에 첨가된 용액을 사용하여 정제되었다(수득물 69%).

[0041] 합성된 **1**의 물리적 성질은 다음과 같다. MP 202-204°C; FT-IR(KBr), γ cm^{-1} : 3431, 3249, 2981, 2931, 2863, 1717, 1618, 1514, 1338, 1195, 1079, 728. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300MHz), δ (ppm): 1.20(t, 6H, J=6.9Hz), 1.88(s, 6H), 2.3 (s, 3H), 3.11 (m, 4H), 5.08 (t, 2H, J=8.1Hz), 7.56-7.61(m, 2H), 7.72(d, 2H, J=8.4Hz), 7.87-7.90 (m, 1H), 11.48(s, 1H), 11.79 (s, 1H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 75MHz), δ (ppm): 182.3, 163.4, 152.17, 151.9, 148.4, 144.2, 134.1, 129.4, 129.3, 129.1, 129.0, 128.4, 124.3, 123.4, 103.2, 96.0, 66.4, 31.4, 21.5, 17.5, 14.6, 14.4; FAB-MS(m/z) calcd. 305.7, found 606.0 $[\text{M}]^+$.

[0042] 1.2 N-((3',6' -bis(에틸아미노)-2',7' -디메틸-3-옥소스피로[아이소인돌린-1,9' -크산텐]-2-일)카바모싸이오일)-4-메톡시벤자마이드(**2**)의 합성

[0043] N-((3',6' -bis(에틸아미노)-2',7' -디메틸-3-옥소스피로[아이소인돌린-1,9' -크산텐]-2-일)카바모싸이오일)-4-메톡시벤자마이드(N-((3',6' -bis(ethylamino)-2',7' -dimethyl-3-oxospiro[isindoline-1,9' -xanthen]-2-yl)carbamothioyl)-4-methoxybenzamide, 이하 **2**라 한다)는 상기 **1**의 합성과 동일한 과정을 따라 *p*-메톡시벤조일 클로라이드(*p*-methoxybenzoyl chloride), 포타슘 싸이오시아네이트 및 로다민 6G 하이드라자이드를 같은 몰 비율로 사용하여 합성되었다. 감압 필터한 후, 정제되지 않은 고체는 차가운 아세트나이트릴로 세척되었고, 연한 분홍색의 정제된 생성물을 얻도록 건조되었다(수득물 77%).

[0044] 합성된 **2**의 물리적 성질은 다음과 같다. MP 222-224°C; FT-IR(KBr), γ cm^{-1} : 3438, 3264, 2973, 1714, 1604, 1506, 1179; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300MHz), δ (ppm): 1.20(t, 6H, J=7.2Hz), 1.88(s, 6H), 3.06-3.15 (m, 4H), 3.81 (s, 3H), 5.10 (t, 2H, J=5.4Hz), 6.22 (s, 2H), 6.40 (s, 2H), 6.96-7.04 m, 3H), 7.53-7.62(m, 2H), 7.82-7.90 (m, 3H), 11.38 (s, 1H), 11.83(s, 1H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 75MHz), δ (ppm): 182.5, 167.7, 163.7, 163.4, 152.1, 151.9, 148.4, 134.1, 131.5, 129.1, 128.4, 124.3, 123.6, 123.4, 114.2, 103.2, 66.4, 56.0, 37.9, 17.5, 14.6; FAB-MS(m/z) calcd. 621.7, found 623.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0045] 1.3 N-((3',6' -bis(에틸아미노)-2',7' -디메틸-3-옥소스피로[아이소인돌린-1,9' -크산텐]-2-일)카바모싸이오일)-4-나이트로벤자마이드(**3**)의 합성

[0046] N-((3',6' -bis(에틸아미노)-2',7' -디메틸-3-옥소스피로[아이소인돌린-1,9' -크산텐]-2-일)카바모싸이오일)-4-나이트로벤자마이드(N-((3',6' -bis(ethylamino)-2',7' -dimethyl-3-oxospiro[isindoline-1,9' -xanthen]-2-yl)carbamothioyl)-4-nitrobenzamide, 이하 **3**이라 한다)는 상기 (**1**)의 합성과 동일한 과정을 따라 *p*-나이트로벤조일 클로라이드(*p*-nitrobenzoyl chloride), 포타슘 싸이오시아네이트 및 로다민 6G 하이드라자이드를 같은 몰 비율로 사용하여 합성되었다. 감압 필터한 후, 정제되지 않은 고체는 차가운 아세트나이트릴로 세척되었고, 연한 주황색의 정제된 생성물을 얻도록 건조되었다(수득물 79%).

[0047] 합성된 **3**의 물리적 성질은 다음과 같다. MP 206-209°C; IR(KBr), γ cm^{-1} : 3431, 3221, 2931, 2870, 1708, 1618, 1514, 1338, 1195, 728. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300MHz), δ (ppm): 1.20(t, 6H, J=7.2Hz), 1.88(s, 6H), 3.07-3.16 (m, 4H), 5.09 (t, 2H, J=8.7Hz), 11.59(s, 1H), 11.99 9s, 1H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 75MHz), δ (ppm): 183.0, 167.1, 163.4, 152.2, 151.9, 150.2, 148.42, 137.9, 134.2, 130.8, 129.1, 128.2, 124.3,

123.6, 123.5, 114.2, 103.1, 96.0, 66.4, 37.9, 17.5, 14.6; FAB-MS(m/z) calcd. 636.2, found 637.0 [M+H]⁺.

[0048] <실시예 2> 로다민 유도체 화학센서의 수은 검출

[0049] 상기 실시예 1에서 합성한 로다민 유도체 **1-3**을 수은 이온을 포함하고 있는 용액에서 반응시키고 반응 후 생성된 화합물을 확인하였다.

[0050]

[0051] 2.1 N-(5-(2-(6-(에틸아미노)-3-(에틸리미노)-2,7-디메틸-3H-크잔텐-9-일)페닐)-1,3,4-옥사다이졸-2-일)-4-메틸벤즈아마이드(**4**).

[0052] 화학센서 **1** 50mg(0.08mmol)을 아세트나이트릴 4.0mL에 넣은 용액은 교반 되었고, 이후 Hg(ClO₄)₂ 수화물 0.032g(0.08mmol)이 첨가되었다. 반응 혼합물은 상온에서 5분 동안 교반되었다. 용액이 감압 조건 하에서 증발된 후에 정제되지 않은 생성물은 실리카겔과 20%의 메탄올이 클로로포름(chloroform)에 첨가된 용액을 사용한 플래시 컬럼 크로마토그래피로 43mg의 화합물 **4**를 얻도록 정제되었다(수득률 90%). 물리적 성질을 확인해 본 결과 다음과 같다. MP 226-229℃; IR(KBr), γ cm⁻¹: 3248, 1604, 1496, 1301, 1237, 1183, 1019, 769. ¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz), δ (ppm): 1.25(t, 6H, J=6.9Hz), 2.09(s, 6H), 2.34(s, 3H), 3.46-3.53 (m, 4H), 6.86 (s, 2H), 6.93 (s, 2H), 7.21 (d, 2H, J=7.5Hz), 7.79-7.90(m, 3H), 7.49(d, 1H, J=7.2Hz), 7.97(d, 1H, J=8.4Hz), 8.17(d, 1H, J=7.8Hz), 10.23(s, 1H). ¹³C NMR(DMSO-d₆, 75MHz), δ (ppm): 157.5, 156.2, 131.1, 129.1, 128.9, 128.8, 126.0, 113.6, 94.1, 38.3, 21.5, 18.1, 14.0; FAB-MS(m/z) calcd. 571.6, found 573.0 [M+H]⁺.

[0053] 2.1 N-(5-(2-(6-(에틸아미노)-3-(에틸리미노)-2,7-디메틸-3H-크잔텐-9-일)페닐)-1,3,4-옥사다이졸-2-일)-4-메톡시벤즈아마이드(**5**).

[0054] 상기 2.1에서 설명한 바와 같은 과정에 따라 화합물 **5** 43mg은 484mg(1mmol)의 **2**화합물 및 5mL의 아세트나이트릴에 377mg(1.0mmol)의 Hg(ClO₄)₂를 첨가한 용액으로부터 91%의 수득률로 얻어졌다: 물리적 성질을 확인해 본 결과 다음과 같다. MP 218-220℃; IR(KBr), γ cm⁻¹: 3338, 1607, 1500, 1314, 1258, 1175, 1023; ¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz), δ (ppm): 1.23(t, 6H, J=6.9Hz), 2.07(s, 6H), 3.43-3.510 (t, 4H), 6.87 (s, 2H), 6.93 (s, 2H), 7.82 (t, 1H, J=7.8Hz), 8.20(s, 3H), 10.21(s, 1H) (Fig. S12, ESI); ¹³C NMR(DMSO-d₆, 75MHz), δ (ppm): 163.4, 157.5, 156.2, 151.9, 148.4, 131.6, 130.8, 129.2, 128.8, 125.9, 124.4, 114.3, 114.1, 113.7, 94.1, 56.0, 38.4, 17.8, 14.0; FAB-MS(m/z) calcd. 587.6, found 589 [M+H]⁺.

[0055] 2.3 N-(5-(2-(6-(에틸아미노)-3-(에틸리미노)-2,7-디메틸-3H-크잔텐-9-일)페닐)-1,3,4-옥사다이졸-2-일)-4-나이트로벤즈아마이드(**6**)

[0056] 상기 2.1에서 설명한 바와 같은 과정에 따라 화합물 **6** 42mg은 484mg(1mmol)의 **3**화합물 및 5mL의 아세트나이트릴에 377mg(1.0mmol)의 Hg(ClO₄)₂를 첨가한 용액으로부터 90%의 수득률로 얻어졌다: 물리적 성질을 확인해 본 결과 다음과 같다. MP 222-221℃; IR(KBr), γ cm⁻¹: 3380, 1605, 1494, 1300, 1069. ¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz), δ (ppm): 1.23(t, 6H, J=6.9Hz), 2.07(s, 6H), 3.43-3.50 (m, 4H), 6.87 (s, 2H), 6.93 (s, 2H), 7.45 (d, 1H, J=7.8Hz), 7.68(t, 2H, J=5.1Hz), 7.77 (t, 1H, J=7.2Hz), 7.82(t, 1H, J=7.8Hz), 8.20(s, 3H), 10.21 (s, 1H); ¹³C NMR(DMSO-d₆, 75MHz), δ (ppm): 163.5, 157.4, 156.4, 165.2, 131.0, 130.6, 130.0, 128.9, 128.4, 125.8, 124.2, 123.4, 113.6, 94.1, 38.4, 17.9, 14.0; FAB-MS(m/z) calcd. 602.7, found 603.0 [M]⁺.

[0057] <실시예 3> 로다민 유도체 화학센서의 수은 검출 특성 확인

[0058] 본 발명에서는 세 개의 신규한 싸이오세미카바자이드-첨가된 로다민-기반의 Hg^{2+} 화학정량계 1-3을 합성하였고 (도 1 및 실시예 1 참조), 보다 자세한 검출 메커니즘을 확인 하기 위하여 아래와 같은 실험을 수행하였다.

[0059] 3.1 수은 이온에 대한 선택성 확인

[0060] Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} 및 Fe^{3+} , 과염소산염으로써의 Hg^{2+} 와 같은 다양한 양이온에 대한 1-3 화학정량계의 비색 또는 형광 선택성은 DMF- H_2O (1:1, v:v, pH 7.2) 미디 엄에서 일광사용 및 UV 램프(360nm)를 조사하여 확인하였다. 도 3 내지 도 5에서 보는 바와 같이, 1 및 2의 용 액은 Hg^{2+} 가 존재할 경우 무색에서 분홍색으로 변화하였고, 3의 용액은 무색에서 짙은 주황색으로 변화하였다. 1-3의 형광색은 Hg^{2+} 이온이 첨가됨에 따라 파란색에서 밝은 노란색으로 변화했다. 그러나 조사대상의 다른 양이 온을 첨가했을 때는 색깔이 변하지 않았다. 따라서 1-3은 Hg^{2+} 이온에 대하여 선택적이라는 것을 확인할 수 있었 다(S. Hee-Soo *et al.*, *Actuators B* 202 (2014) 779-787).

[0061] 3.2 UV-Vis 스펙트럼 분석

[0062] 1의 다양한 금속 양이온 Hg^{2+} 에 대한 선택성에 대한 UV-Vis 스펙트럼은 도 6과 같다. $1(5 \times 10^{-5} \text{ M})$ 의 DMF- H_2O (1:1, v:v, pH 7.2)용액에서 전자 흡수 스펙트럼은 500nm 이상에서 유의적인 피크를 나타나지 않았는데, 이는 1의 고 리-닫힌 형태 때문일 것이다(J.S. Wu *et al.*, *Org. Lett.* 9(2007), 907-910). 1의 용액에 1 equiv.의 Hg^{2+} 를 첨 가할 경우, 용액이 무색에서 분홍색으로 색 변화가 이루어졌고, 556 nm에서 강한 강도의 새로운 흡수 피크가 나타났다. 그러나 다른 금속 이온들(예를 들면, Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} 및 Fe^{3+})을 첨가할 경우 스펙트럼의 변화가 관찰되지 않았다.

[0063] 추가로 1-3의 감지 성질을 좀 더 자세하게 알아보기 위하여, Hg^{2+} 이온을 사용하여 Uv-Vis 적정 조사를 수행하였 다. 도 7은 다양한 농도의 Hg^{2+} 에 대한 1-3의 UV-Vis 스펙트럼의 변화를 나타낸다. 1-3의 용액에 첨가되는 Hg^{2+} 이온의 양이 증가할 경우, 약 530-540nm에서 새로운 피크가 점차적으로 나타났다(도 7 참조). 도 7a에서, 붉은 스펙트럼은 생성물 4에 대응되고, 이러한 결과는 상온에서 옥사다리아졸 부분을 형성하기 위하여 Hg-유도된 고 리-열림 반응이 급격하게 일어남을 암시한다.

[0064] Hg-리간드(1-3) 복합체의 화학량론을 결정하기 위하여, 흡수 측정을 위한 Job의 연속 변이법(continuous variation method)이 적용되었다(M. Wang *et al.*, *Actuators B* 192 (2014), 512-521). Hg^{2+} 및 1-3의 초기 농 도의 합은 10^{-5} M 로 유지된 반면, Hg^{2+} 의 몰 비율은 0.1부터 1까지 다양하도록 하였다. Hg^{2+} 의 몰분율의 함수인 흡 수 강도의 플롯(plot)은 도 8에 나타내었다. 세 경우 모두, 0.5의 몰분율일 때 최대값을 나타내었고, 이는 1:1 복합체를 형성한다는 것을 나타내었다. 1:1 결합 모드에 따라, Hg^{2+} 이온에 대한 1-3의 결합 상수(K_a)는 베네시-힐데브란트 방정식(Benesi-Hildebrand equation)을 사용하여 계산되었다(도 9참조, F. Yan *et al.*, *Actuators B* 202 (2014), 779-787). 결합상수는 아래 표 1과 같다.

표 1

Entry	System	Binding constant (M^{-1})		LOD (M)
		K_a	K_f	
1	1-Hg	8.4223×10^4	1.2134×10^8	1.46×10^{-8}
2	2-Hg	5.4363×10^4	1.1674×10^8	1.69×10^{-8}
3	3-Hg	1.4929×10^3	1.0884×10^6	1.64×10^{-7}

[0065]

[0066]

3.3 형광 분석

[0067]

도 10 및 도 11에 나타난 결과로부터 DMF-물(1:1, v/v)이 이번 연구에서 다른 상용 용액과 비교했을 때 가장 유용한 용액임을 확인하였다. 화학정량계의 Hg^{2+} 이온에 대한 선택성에서 물 비율에 의한 효과는 중요하므로, 1과 DMF-물 혼합물의 형광 방출 스펙트럼이 측정되었다(도 11 참조). 그 결과, 예상대로 미디엄에서 물 함량이 증가할수록 용액의 방출 강도와 동시에 최대 방출에서의 청색이동(blue shift)은 감소하였다.

[0068]

추가로 화학정량계(1-3)가 Hg^{2+} 에 대하여 높은 선택성을 갖는 프로프로 사용 가능한지 알아보기 위하여, 1, 2 및 3과 선택된 양이온 사이의 상호작용에 대한 형광 응답이 각각 535, 536 및 539nm의 여기파장(excitation wavelengths)에서 기록되었다. 도 12 내지 도 14에서와 같이 Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} 및 Fe^{3+} 와 같은 다양한 양이온을 첨가할 경우 λ_{em} 에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 Hg^{2+} 를 화학정량계 1-3에 첨가할 경우, 약 560-570nm에서 강한 방출 피크를 나타내었다. 이러한 결과는 UV-Vis 흡수 결과와 일치하는 결과이다.

[0069]

Hg^{2+} 와 1-3사이의 상호작용에 대하여 더 알아보기 위하여, 형광 적정 실험이 수행되었다. 화학정량계(1-3)를 함유하는 용액에 더 많은 양의 Hg^{2+} 이온의 양을 첨가할 경우, 약 565nm에서 새로운 넓은 방출 피크가 나타났다(도 15참조). 약 565nm에서 Hg^{2+} 농도 증가에 비례하여 1-3의 형광광도가 증가 하였고 동시에 파란색에서 노란색으로의 형광 변화가 관찰되었다. 1-3의 Hg^{2+} 에 대한 결합 상수(K_f)가 1:1 결합 모드로 형광 적정 데이터로부터 B-H 방정식을 사용하여 계산되었고 그 결과는 표 1과 같다(도 16 참조).

[0070]

비색 및 형광 분광 분석 모두 결합상수의 순서는 1>2>3이었는데 이는 화학정량계 1 및 2의 Hg^{2+} 이온과의 결합성이 3보다 상대적으로 강하다는 것을 나타내었다. 화학정량계 1 및 2의 상대적으로 높은 K값은 벤젠 고리의 전자-공여성 치환체 때문일 것이다. 1 및 2에서, '황' 원자(배위 부위)의 염기도는 전자-공여성 치환체(메틸/메톡시)로 인하여 높다. 이에 반해, 3의 상대적으로 낮은 K 값은 벤젠 고리의 전자-끌기 치환체 때문일 것이고, 그러므로 'S'의 염기도는 약간 감소하는데, 이는 수 수용체의 배위 강도를 감소시킨다. 이러한 결과로부터 1-3의 복합체형성 및 감지 성질은 주로 벤젠고리에 존재하는 치환체의 성질에 의존한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0071]

화학정량계 1-3과 Hg^{2+} 에 대한 형광 적정 실험에 따르면, 2.5×10^{-2} - 2.0×10^{-5} M의 범위의 Hg^{2+} 이온 농도에서 형광 강도와 수은 이온 농도가 비례함을 확인하였다(도 17 참조). 형광변화를 위한 검출 한계는 $3\delta/k$ 에 기초하여(δ 는 바탕용액(blank solution)의 표준 편차이고 k는 눈금측정 플롯(calibration plot)의 기울기 이다) 계산되어 표 1에 나타내었는데, 이는 다양한 화학적 및 생물학적 시스템에서 Hg^{2+} 이온을 검출하기에 충분히 낮은 값이었다.

[0072]

3.4 ^{13}C NMR 적정

[0073] 전자 및 형광 스펙트럼 연구 결과는 화학정량계 **1-3**이 Hg^{2+} 이온을 Hg^{2+} -유발된 고리화를 통하여 감지한다는 것을 나타내었다. ^{13}C NMR 스펙트럼 연관성은 전자 효과 및 배위 부위의 염기도를 확인하기 위해 조사하였다. 그 결과 **3**에서, C=S의 시그널이 $\delta=183.05\text{ppm}$ 에서 나타난 반면, **1** 및 **2**에서는 182.39 및 182.50 ppm에서 나타났다. 이러한 결과는 **3**에서 'S'는 **1** 및 **2**보다 상대적으로 염기 성질이 적다는 것을 나타냈다.

[0074] 도 2의 감지 메커니즘을 확인하기 위하여, **3** 및 **3**과 Hg^{2+} (0.5 및 1 equiv)의 ^{13}C NMR 스펙트럼이 기록되었고 생성물**6**과 비교되었다(도 18). 도 18에서, δ 183.05, 167.17 및 69.49ppm에서의 시그널은 각각 C=S, 고리 C=O 및 스피로 탄소에 대응되었다. **3**의 용액에 Hg^{2+} 를 첨가한 후, δ 183.05 및 167.17에서의 피크는 사라졌고 66.49에서의 피크는 156.49로 바뀌었는데, 이는 Hg^{2+} -유발된 싸이오세미카바자이드에서 옥사다이졸 형태로의 변환 반응 때문이다(Y.-K. Yang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 127(2005) 16760-16761; Y.-K. Yang *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 4590-4593; Y. Liu *et al.*, *Dyes Pigments* 92 (2012) 909-915; X. Lu *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4 (2012) 3657-3662). 그러므로, 이러한 화학정량계에 의한 수은 이온의 감지를 위한 메커니즘은 탈황반응에 뒤이은 고리화를 통하여 일어남을 확인할 수 있었다.

[0075] 3.5 **1-3**의 Hg^{2+} 에 대한 내성

[0076] 화학정량계(**1-3**)의 목표 중 하나는 다양한 경쟁 종이 존재할 때 Hg^{2+} 만을 검출해내는 것이다. 그러므로 형광 실험을 통하여 **1-3**의 다른 금속이온으로 인한 간섭 가능성을 확인하였다. **1-3**의 형광변화는 1 equiv.의 Hg^{2+} 이온을 이용하여 Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} 및 Fe^{3+} (도 19 내지 도 21)와 같은 다른 간섭 금속 이온이 1 equiv. 존재하거나 존재하지 않은 상태에서 측정되었다. 그 결과 **1-3**의 방출은 이러한 금속 유무와 상관없이 Hg^{2+} 에 의하여 효과적으로 향상된다는 것이 증명되었다. 이를 통하여 **1-3**의 Hg^{2+} 선택적인 시그널링은 다른 금속이온의 존재에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다.

[0077] 3.6 pH에 따른 수은 이온 검출 확인

[0078] Hg^{2+} (1.0 equiv.)이 존재하거나(도 22A) 존재하지 않을 때(도 22B) 용액(**1-3**)의 pH에 따른 방출을 확인하였다. 산성 조건에서는(pH<5.0), 강한 양성자 부가(protonation)가 **1-3**의 고리 열림을 일으켰으나, pH 5.0-12.0에서 **1-3**의 용액에서 방출이 확인되지 않았다. 이로부터 **1-3**은 이러한 pH 5.0-12.0에서는 비활성화되고, 여전히 스피로락탐 구조가 선호된다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, Hg^{2+} 가 첨가될 경우 비교적 넓은 pH 범위(5.0-9.4)에서 형광을 나타냈고, 이는 로다민 고리의 열림으로부터 기인하였다. 따라서 **1-3**은 중성에 가까운 pH 조건에서 Hg^{2+} 를 위한 형광 화학정량계라는 것을 확인할 수 있었다.

[0079] <실시예 4> 수은 이온 검출용 시험지의 제조

[0080] 4.1 시험지의 제조

[0081] Hg^{2+} 이온을 위한 다양한 비색적 및 형광적 화학센서가 생체 내 및 생체의 기술에서 적용되어 오고 있다. 그러나 이러한 방법들은 사용자가 실제로 Hg^{2+} 이온 검출에 사용하기 어려웠다. 이에 pH 검사지와 같이 보다 용이한 화학정량계의 사용을 위하여, 수용성 미디어에서 Hg^{2+} 이온의 검출을 위한 시험지를 개발하였다. 시험지는 여과지를 $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$ 의 **1**-DMF 용액에 침전시키고, 이어 공기 중에서 건조시켜 제조하였다.

[0082]

[0083] 4.2 시험지를 이용한 Hg^{2+} 검출

[0084] 서로 다른 시험지가 Hg^{2+} 이온을 함유하는 수용액에 1분 동안 침전되었다. 도 23은 다양한 Hg^{2+} 이온 농도에서 시험지의 색깔 및 형광 변화를 나타낸다. 도 23에 나타난 바와 같이 시험지가 Hg^{2+} -물 용액에 침전되었을 경우, 색깔은 무색에서 진한 핑크색으로 변화하였고 UV 램프 조명 아래에서 강한 주황색의 형광을 나타내었다. 그러므로 비색/형광 시험지는 pH 검사지와 같이 간단한 방법으로 수용성 샘플에서의 Hg^{2+} 이온을 검출할 수 있다.

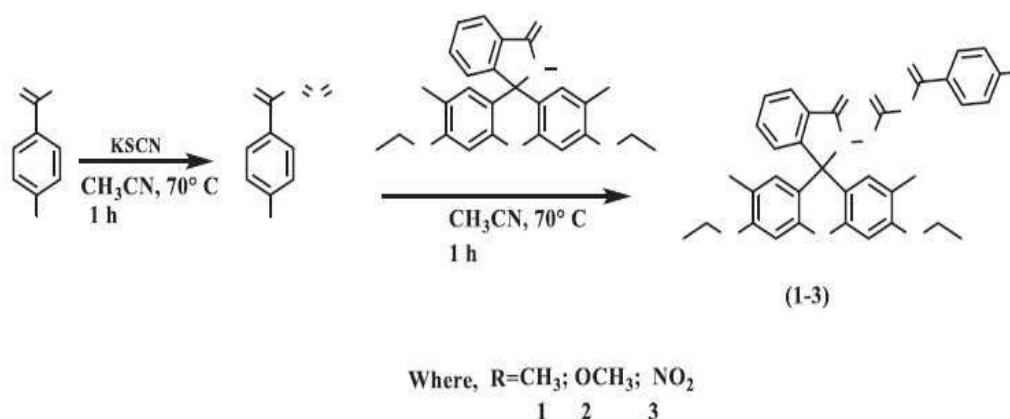
[0085] 즉, 본 발명의 화학센서는 수용성 샘플에서 Hg^{2+} 이온의 검출을 위한 비가역적 화학정량계로, Hg^{2+} 이온에 의해 싸이오세미카바자이드의 고리 열림 반응이 촉진된다는 사실에 기초한다(도 2, 도18 및 실시예 3.4 참조). 특히 본 발명에서 합성한 화학센서 **1-3**은 벤젠 고리의 전자-공여성 치환체로 인하여 배위 위치인 'S' 원자에서 높은 염기도가 형성되어 탈황반응이 잘 이루어지도록 하고, 그 결과 우수한 수은 이온 검출 효과를 나타낸다(실시예 3.3 및 도 17 참조).

[0086] 구체적으로, 본 발명에서 합성한 화학센서 **1-3**은 수용액 샘플의 수은 이온과 선택적으로 반응하여 비색 또는 형광 검출이 가능하고(실시예 3.1 내지 3.3 및 도 3 내지 16 참조), 수은 이온 이외의 다른 이온에 간섭을 받지 않으며(실시예 3.5 및 도19 내지 21 참조), 넓은 pH 범위에서 수은 이온 검출이 가능하다(실시예3.6 및 도 22 참조). 또한 합성된 화학센서를 활용하여 수은 검출용 시험지를 제조함으로써 보다 간편하고 빠르게 수은 이온 검출이 가능하도록 할 수 있다(실시예 4 및 도 23 참조).

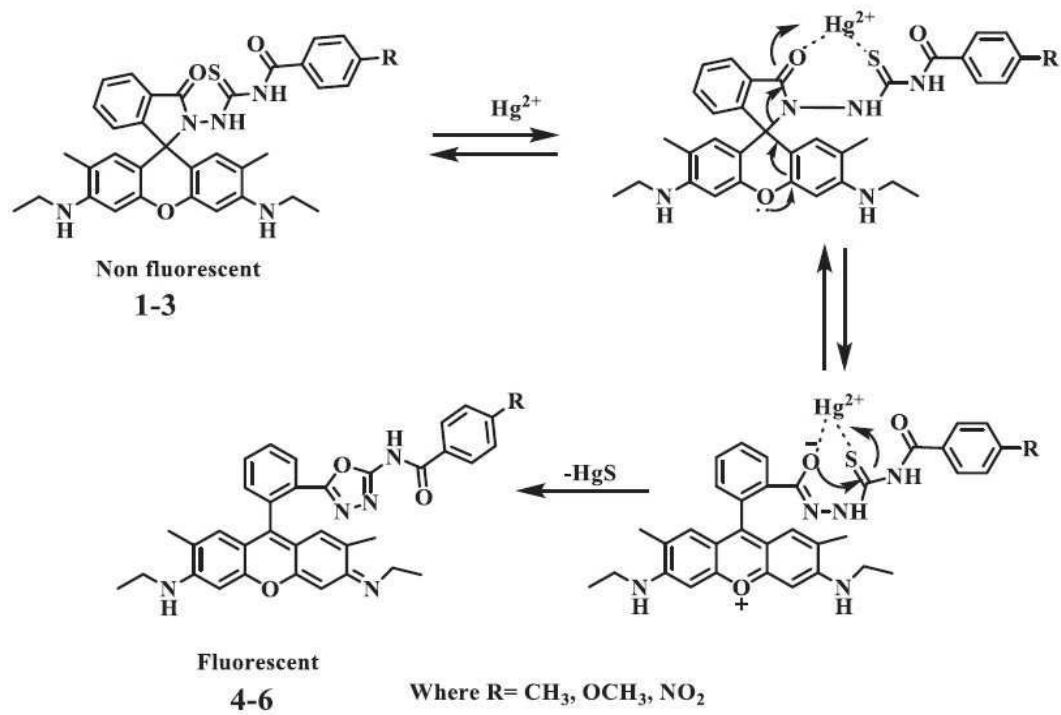
[0087] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

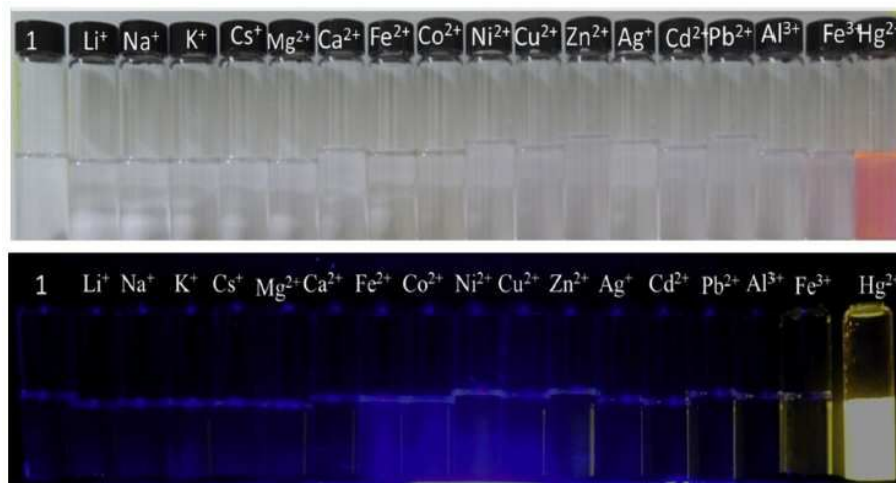
도면1



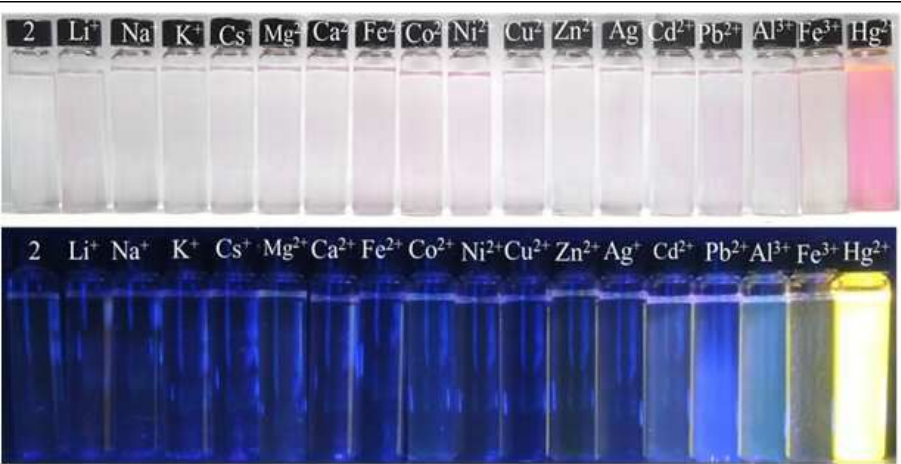
도면2



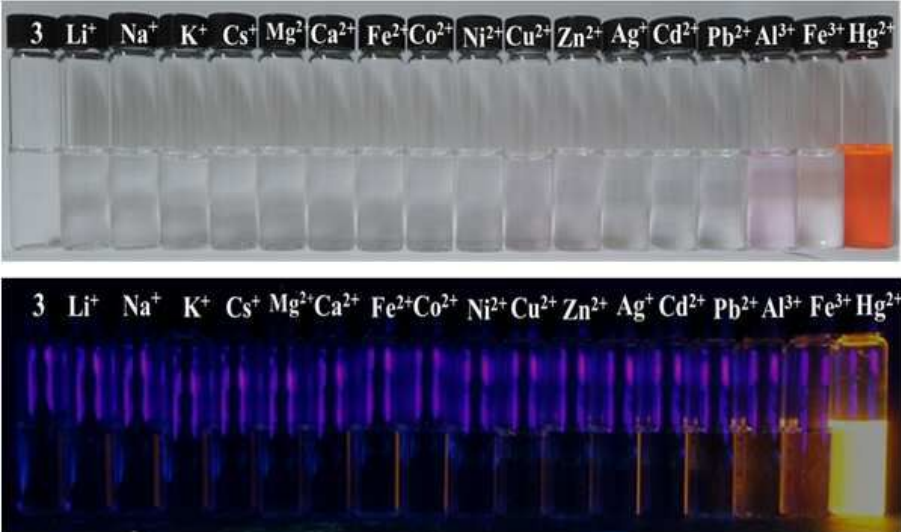
도면3



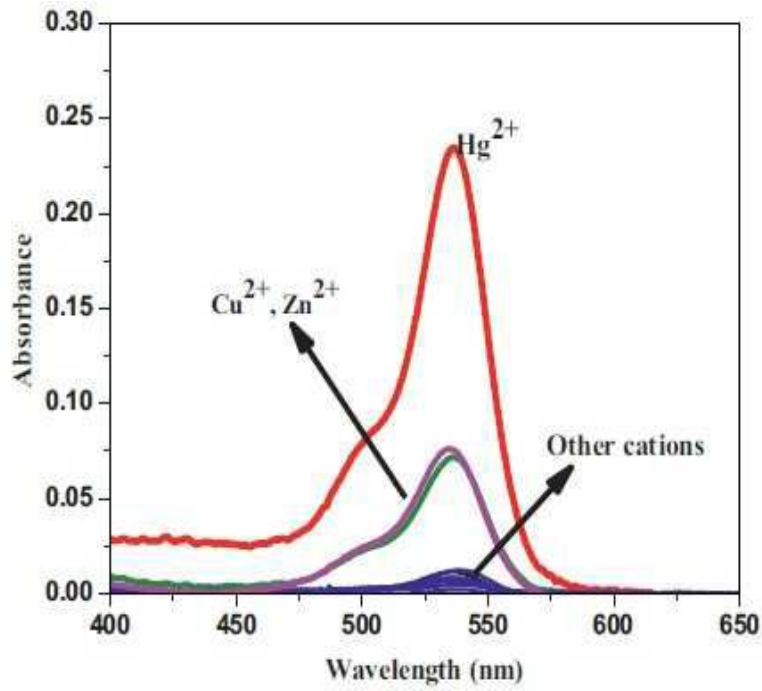
도면4



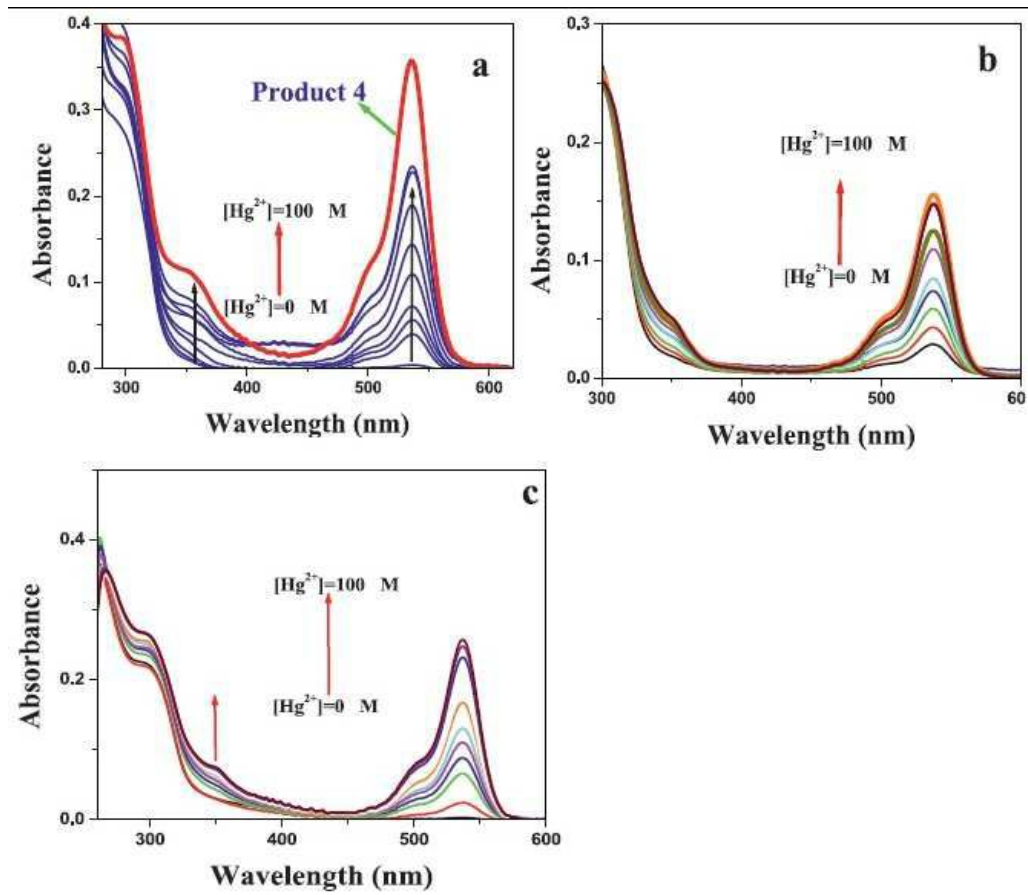
도면5



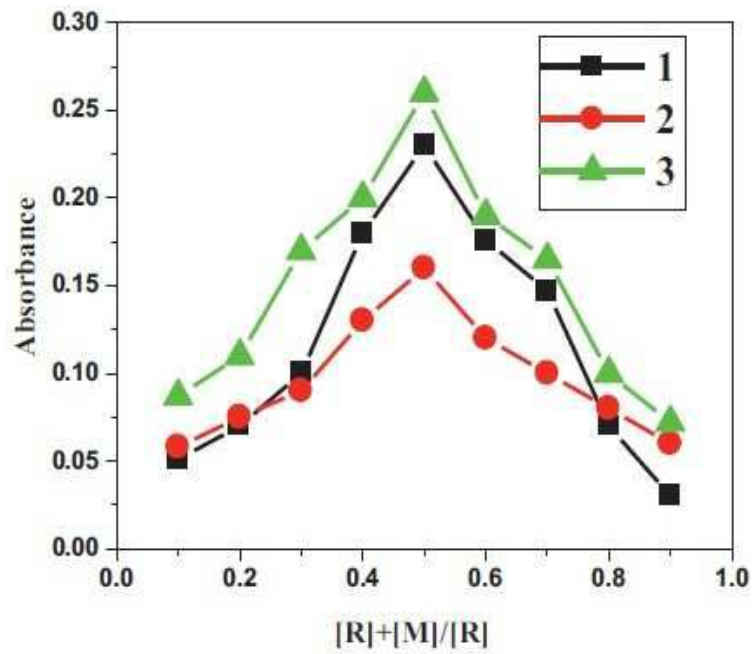
도면6



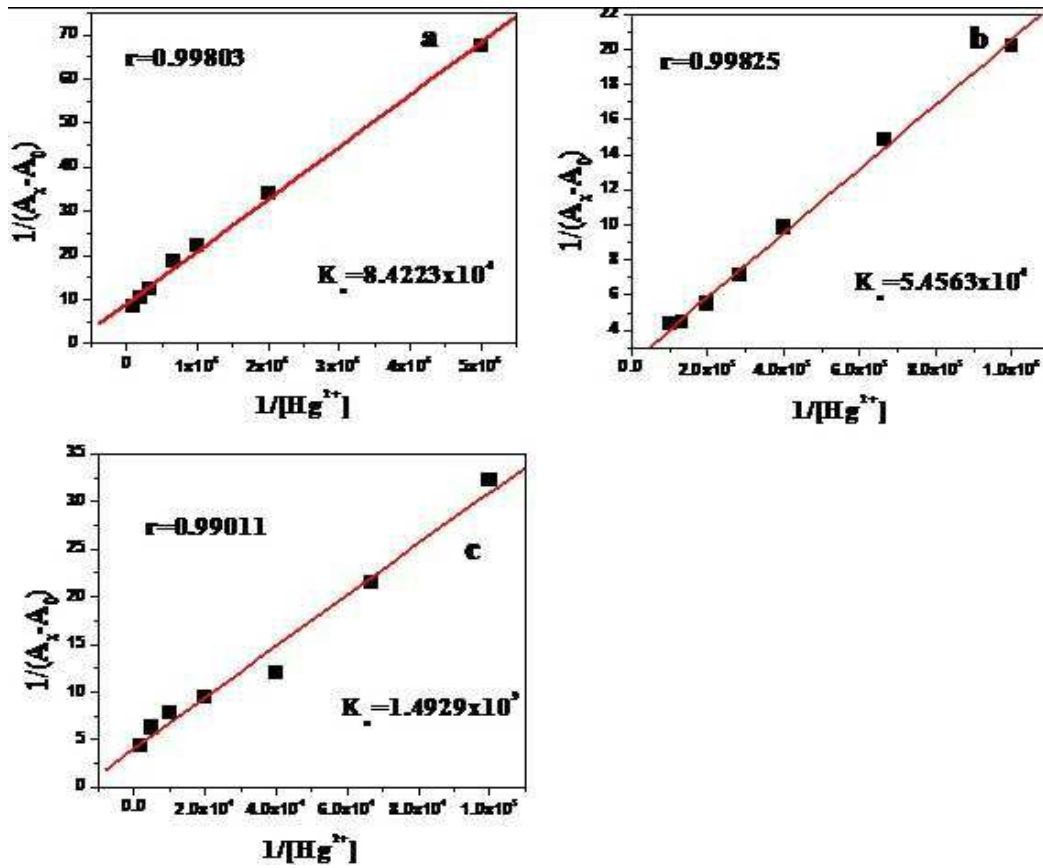
도면7



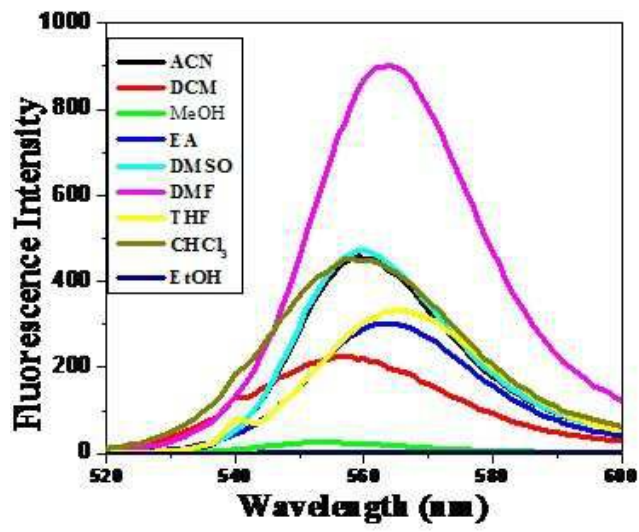
도면8



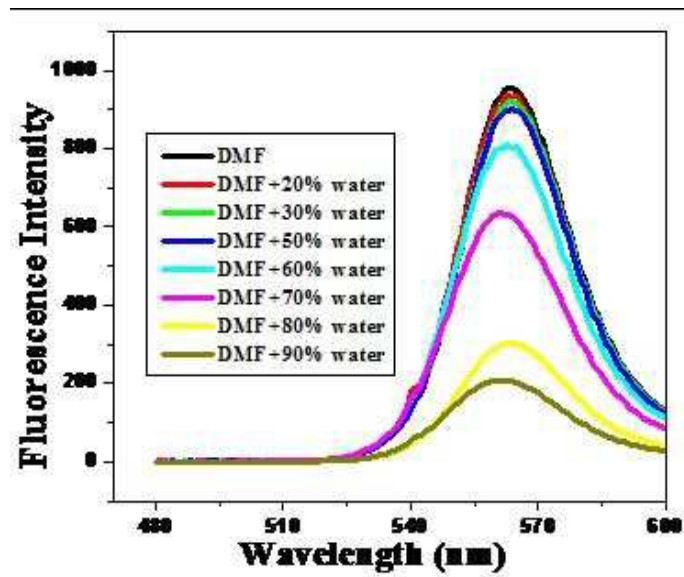
도면9



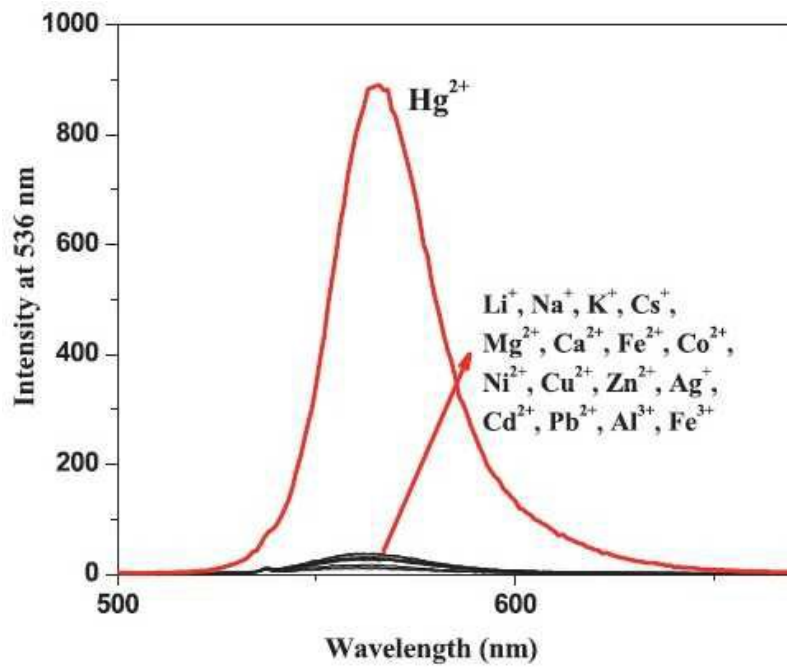
도면10



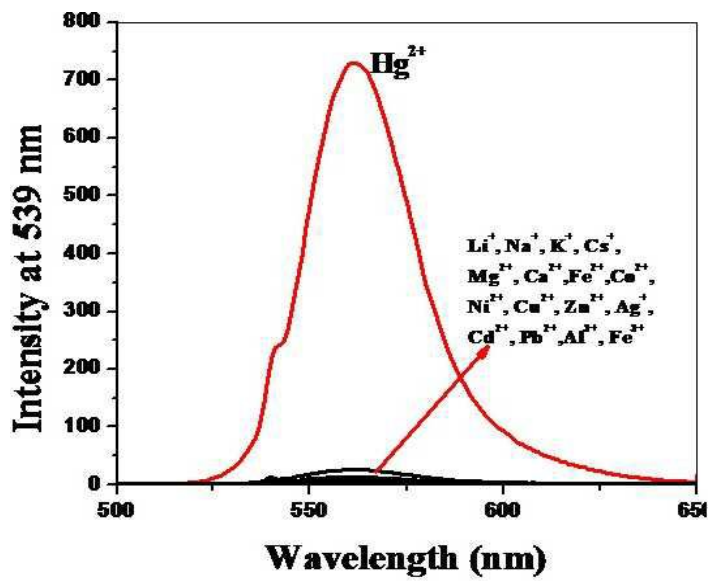
도면11



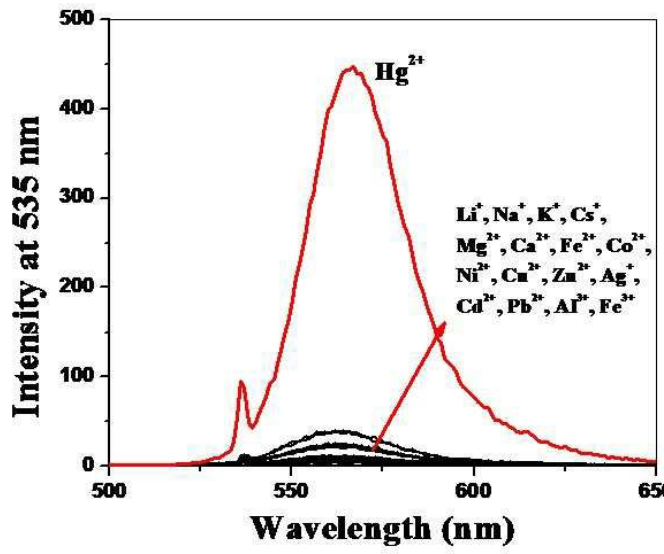
도면12



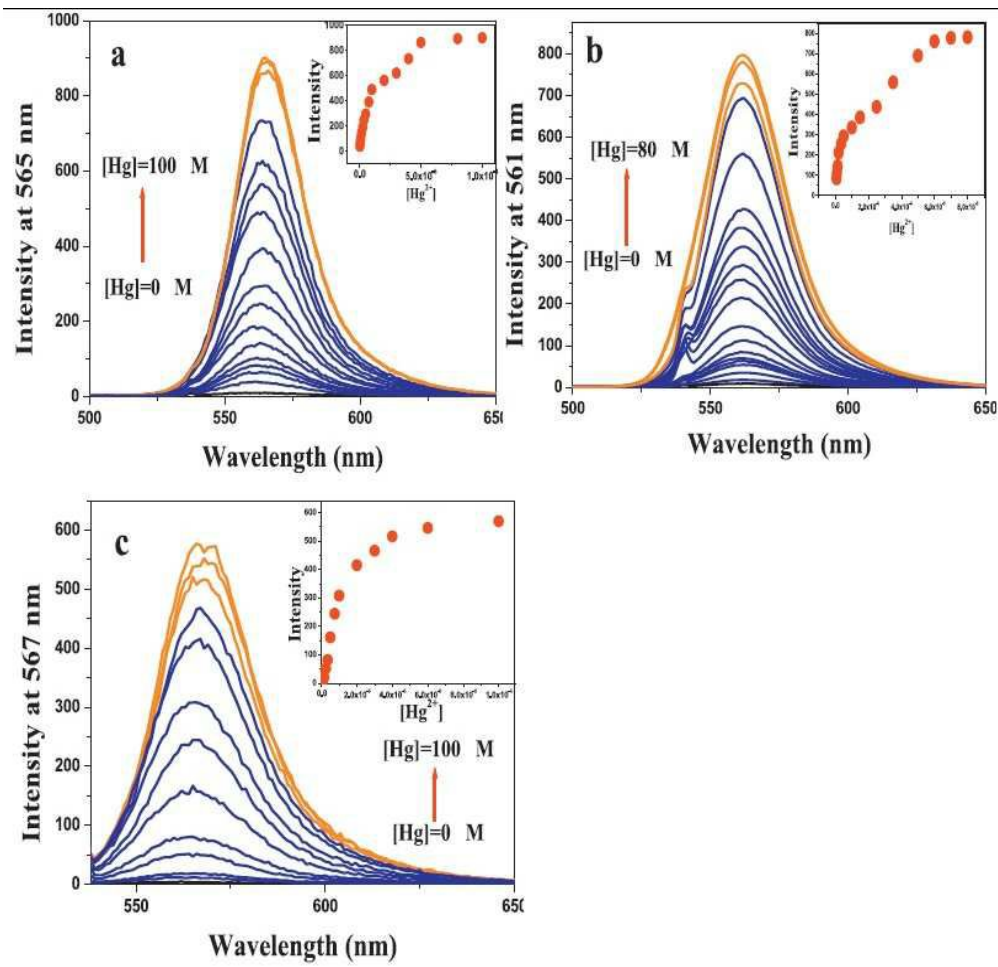
도면13



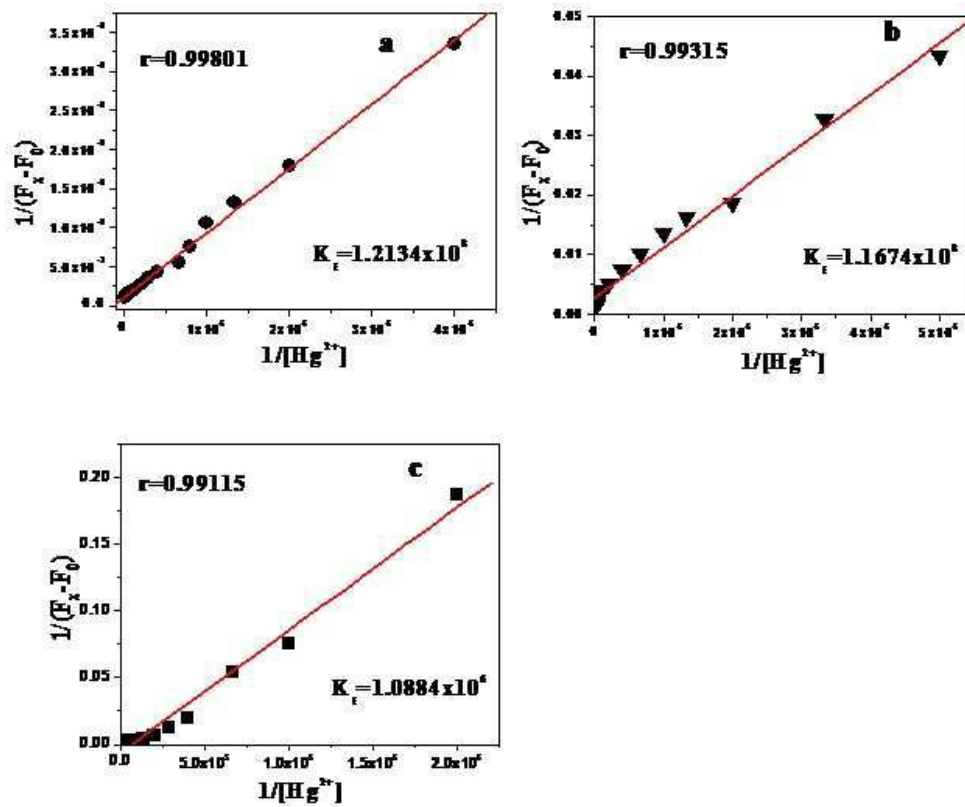
도면14



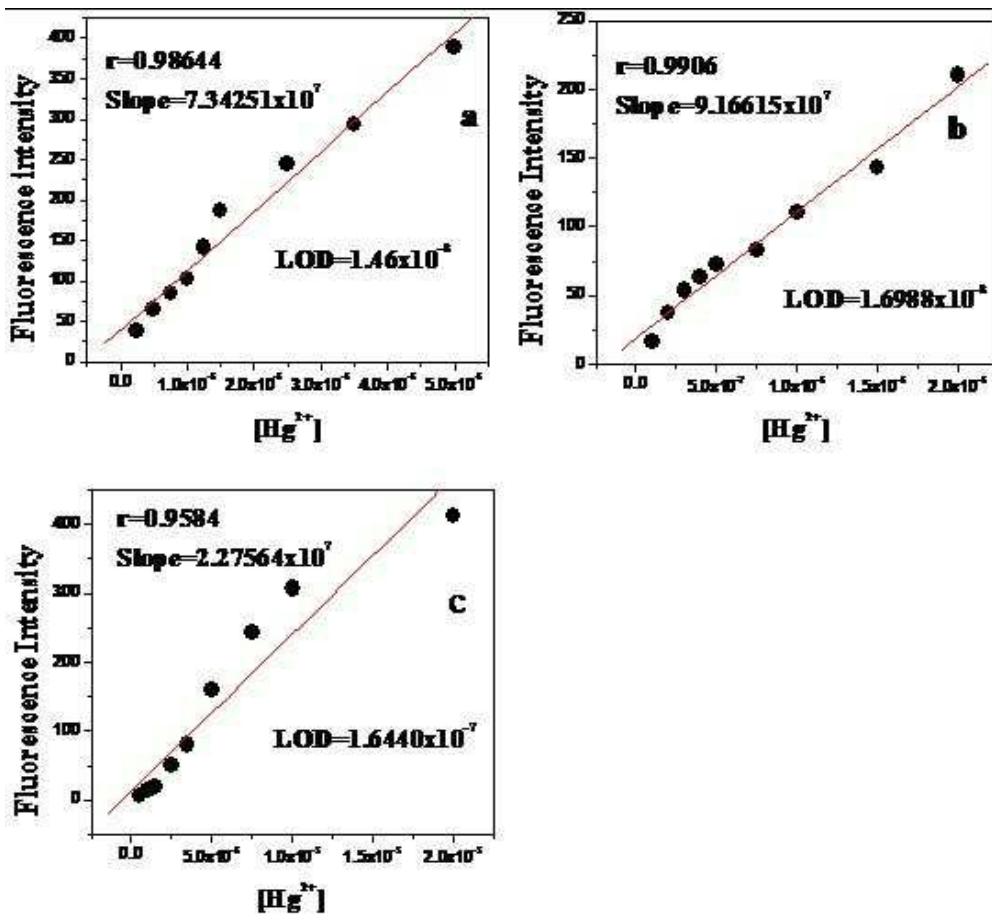
도면15



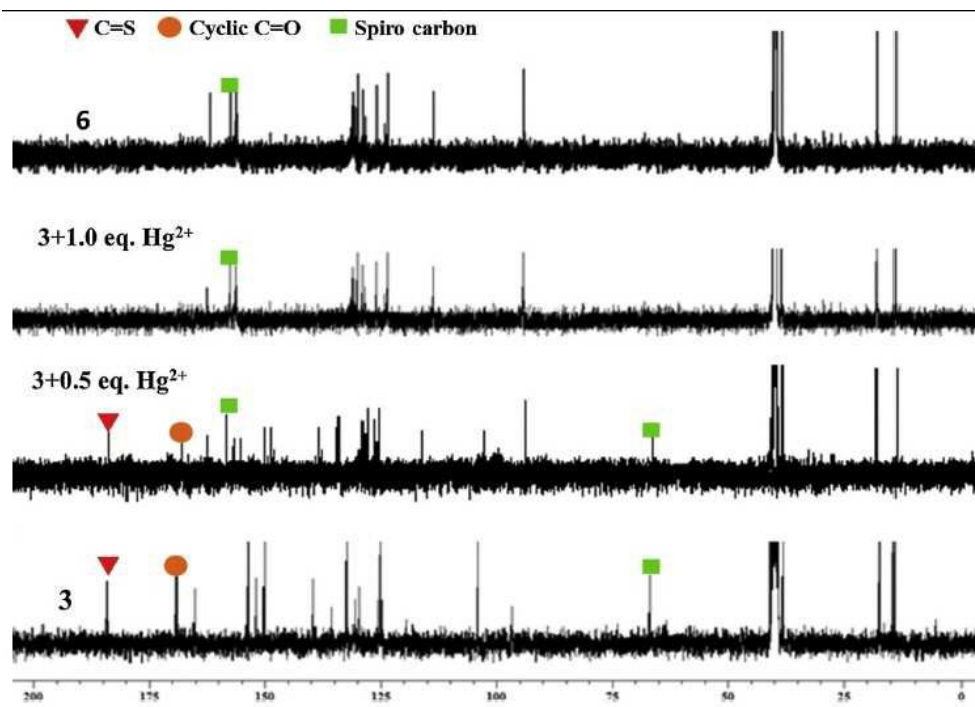
도면16



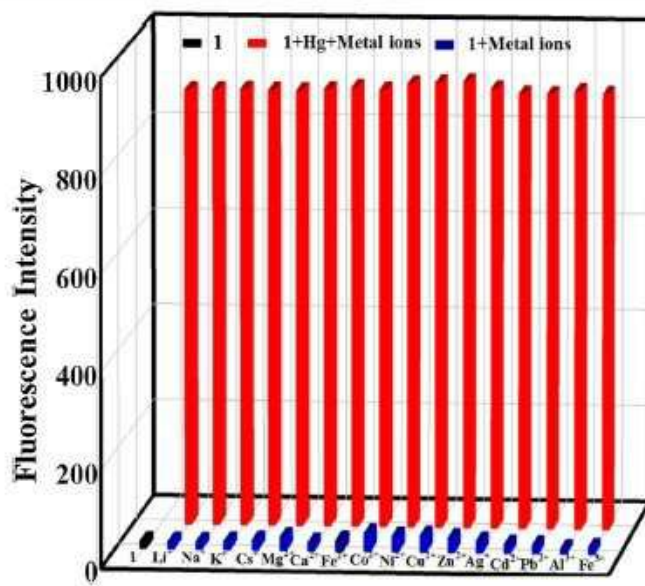
도면17



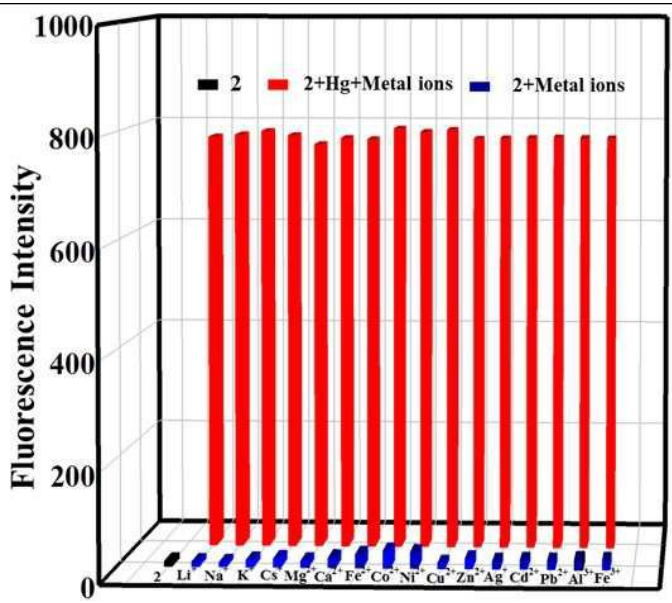
도면18



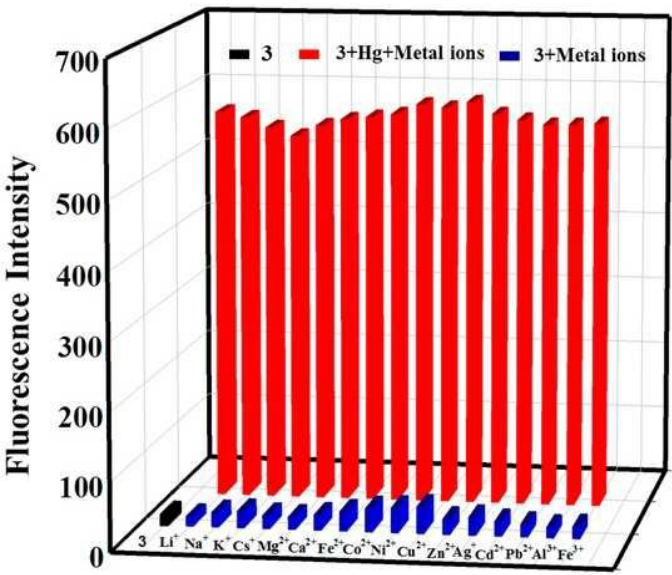
도면19



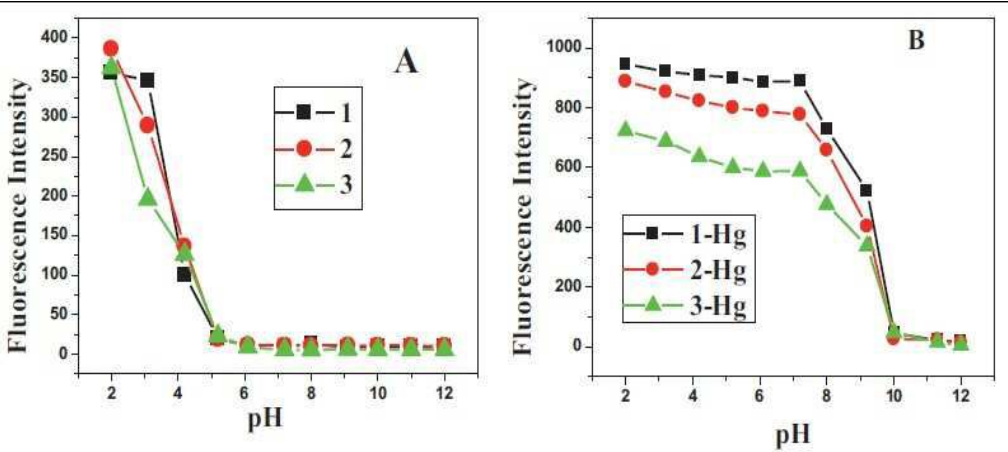
도면20



도면21



도면22



도면23

