



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0005871
(43) 공개일자 2022년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 255/10 (2006.01) C07C 253/02 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) G01N 31/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 255/10 (2013.01)
C07C 253/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0083566
(22) 출원일자 2020년07월07일
심사청구일자 2020년07월07일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
주식회사 엔테라퓨틱스
서울특별시 관악구 신림로 117(신림동)
(72) 발명자
김도경
서울특별시 성북구 화랑로 214, 113동 402호 (석관동, 래미안석관)
정유나
서울특별시 양천구 신정로7길 75, 104동 508호(신정동, 이든채)
(74) 대리인
유미특허법인

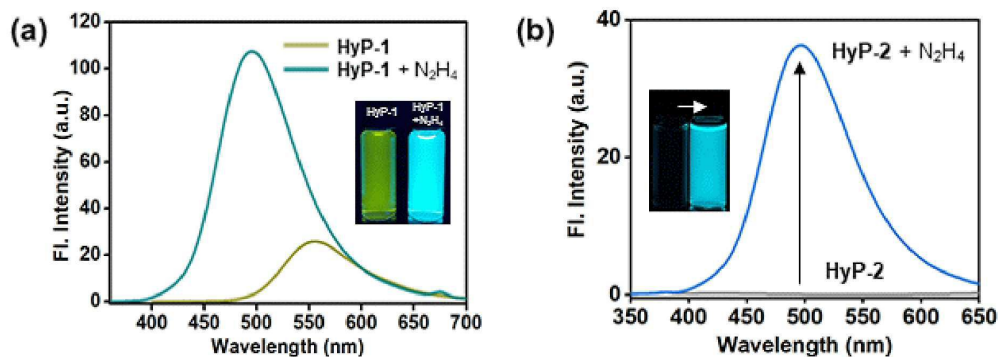
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 하이드라진 검출용 조성물 및 이를 이용한 하이드라진 검출방법

(57) 요약

본 발명은 하이드라진 검출용 조성물 및 하이드라진 검출 방법에 관한 것으로서, 더욱 자세하게는 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 하이드라진 검출용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 하이드라진 검출 방법을 제공하는 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 21/6428 (2013.01)

G01N 31/22 (2013.01)

G01N 2021/6439 (2013.01)

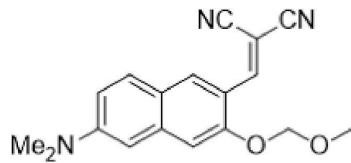
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물:

[화학식 1]



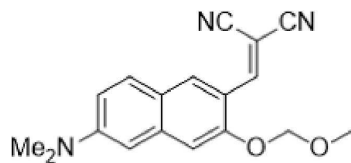
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물은 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하는 것인, 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물을 포함하는, 하이드라진 검출용 조성물:

[화학식 1]



청구항 4

제3항에 있어서, 상기 조성물은 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하는 것인, 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 조성물은 하이드라진과 접촉하여 청색의 형광을 발하는 것인, 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 조성물은 하이드라진에 의해 형광이 커지는 형광-켜짐 특성을 가지는 것인, 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 조성물은 물과 접촉하여 형광을 발하지 않고, 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하는 것인, 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 조성물은 하이드라진과 접촉하기 전 형광을 발하지 않고, 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하는 것인, 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 조성물은 0 초과 내지 10 ppb 이하 농도의 하이드라진을 검출 가능한 것인, 조성물.

청구항 10

제3항에 있어서, 상기 조성물은 물, 완충액, 다이메틸 설펍사이드 (dimethyl sulfoxide), 알코올, 에틸 에테르 (ethyl ether), 및 디에틸 에테르 (diethyl ether)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 11

제3항에 있어서, 상기 조성물은 pH 5 내지 12의 시료에서 하이드라진을 검출 가능한 것인, 조성물.

청구항 12

제3항에 있어서, 상기 조성물은 금속이온 및 아미노산으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 시료에서 하이드라진을 검출 가능한 것인, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 금속이온은 칼슘, 칼륨, 아연, 나트륨, 및 마그네슘으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 14

제3항에 있어서, 상기 조성물은 하이드라진과 접촉 후 UV광에 60분 노출 후의 형광 세기가, UV광 노출 0분일 때의 형광 세기 100% 기준으로 50% 이상인, 조성물.

청구항 15

제3항에 있어서, 상기 조성물은 액체 또는 기체 상태의 하이드라진을 검출 가능한 것인, 조성물.

청구항 16

제3항에 있어서, 상기 조성물은 토양 또는 채수 내에 포함된 하이드라진을 검출 가능한 것인, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 채수는 증류수, 하천수, 하수, 오수, 산업폐수, 축산폐수, 바닷물, 호수물, 강물, 수돗물, 및 식수로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 18

제3항 내지 제17항 중 어느 한 항의 조성물을 시료와 접촉하는 단계; 및
상기 접촉에 의한 형광을 확인하는 단계를 포함하는, 하이드라진을 검출하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 시료는 토양 또는 채수인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 채수는 증류수, 바닷물, 호수물, 강물, 수돗물, 및 식수로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 21

제3항 내지 제17항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 하이드라진 검출용 키트.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 키트는 종이 스트립인, 키트

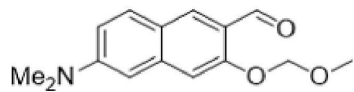
청구항 23

하기 화학식 2로 표시되는 화합물에 말로노나이트릴 (malononitrile)을 첨가하는 단계;

알코올을 첨가하여 교반하는 단계; 및

피페리딘 (piperidine)을 첨가하여 반응하는 단계를 포함하는, 하이드라진 검출용 화학 센서의 제조방법:

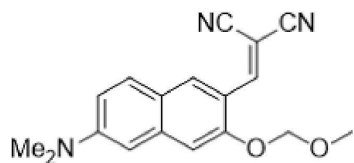
[화학식 2]



청구항 24

제23항에 있어서, 상기 하이드라진 검출용 화학 센서는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물을 포함하는 것인, 제조방법:

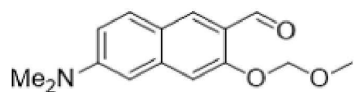
[화학식 1]



청구항 25

하기 화학식 2로 표시되는 화합물에 말로노나이트릴 (malononitrile)을 첨가하여 노베나겔 축합반응 (Knoevenagel condensation)하는 단계를 포함하는, 하이드라진 검출용 화학 센서의 제조방법:

[화학식 2]



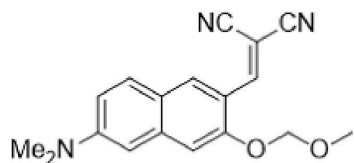
청구항 26

제25항에 있어서, 상기 노베나겔 축합반응은 촉매로서 피페리딘(piperidine)의 존재 하에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 하이드라진 검출용 화학 센서는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물을 포함하는 것인, 제조방법:

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 하이드라진을 선택적으로 검출할 수 있는 오르소-메톡시-메틸에테르(ortho-methoxyl-methyl ether) 구조를 포함하는 형광켜짐-기반 분자 프로브 2-((6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-2-일)메틸렌)말로노나이트릴 (2-((6-(dimethyl-amino)-3-(methoxymethoxy)naphthalen-2-yl)methylene)malono-nitrile) 및 이

를 이용하여 하이드라진을 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 하이드라진 (hydrazine, N_2H_4)은 수소에 공유결합 된 15족 원소에 해당하는 pnictogen hydride 계열로, 로켓의 연료, 고분자 중합체 (polymer)의 촉매와 같은 공업, 농업화학, 제약 등에서 다양하게 활용되고 있는 물질로 알려져 있으나, 물질의 높은 생체 독성과 불안정성 등으로 인해 미국 환경보호청에 의해 유해등급 B2에 해당하는 잠재적 발암물질로 분류되고 있으며, 하이드라진을 사용하는데 있어 강력한 규제가 동반되고 있다. 특히, 하이드라진에 장시간 노출되었을 때 생체 내 주요장기인 간, 폐, 그리고 신장의 기능부전 및 중추신경계 내의 DNA 손상을 야기할 수 있어, 하이드라진을 특이적으로 검출할 수 있는 소재의 개발이 요구되고 있다.
- [0003] 하이드라진의 유무를 판별하고 실시간으로 검출하기 위한 기술개발은 공중보건의 증진을 목적으로 하며, 알려진 기존의 분석법으로는 질량 분석법(mass-based spectrometric analysis), 전기화학적 접근법(electro chemical approach), 전기영동법(electrophoresis), 흡광 및 형광기반 분석법(colorimetric- and fluorometric analysis) 등이 있다. 하지만, 기존의 분석법은 복잡한 분석과정 및 해석, 고비용과 많은 분석시간이 소요된다는 단점을 가지는 반면, 형광을 기반으로 한 형광 프로브는 간편한 사용법과 합리적인 비용, 높은 민감도와 선택성(특이성), 분석물질에 대한 빠른 반응성 및 생체 내외 표본들에 대한 높은 적용성(응용성)을 가진다는 점에서 넓게 활용되고 있다.
- [0004] 특히, 분자 프로브를 이용한 기질 인식의 측면에서 하이드라진 형광 프로브에 높은 선택성과 민감성을 부여하는 새로운 화학 작용기를 도입하는 것은 중요하다. 현재까지 알려진 하이드라진 프로브의 작용기는 크게 두 종류로 분류된다. (i) 화학 반응 유도 작용기 절단 메커니즘: 아세트산(acetate), 비닐-말로노나이트릴(vinyl-malononitrile), 4-브로모-부티릴(4-bromobutryl, 나이트로-벤젠설포닐(nitro-benzensulfonyl), 나이트로-벤조익-에스터(nitro-benzoic-ester), 프탈이미드(phthalimide) 등, (ii) 화학 반응 유도 작용기 첨가 메커니즘: 베타-다이케톤(β -diketone), 케톤(ketone), 알데하이드(aldehyde), 레블린산(levulinate), 트리플루오로아세틸 아세트산(trifluoroacetyl acetate), 오르소-하이드록시 아로마틱 알데하이드(ortho-hydroxy aromatic aldehyde) 등이 이에 해당된다.
- [0005] 현재까지 개발된 하이드라진 형광 프로브는 (i) 순수한 유기용매나 유기용매를 포함한 수용액 조건, 특정한 산성도(pH) 조건 및 계면활성제 첨가 조건과 같은 제한된 환경에서의 응용 검출, (ii) 시험관 내, 종이스트립, 세포 영상화 등의 제한된 응용, (iii) 형광신호의 변화를 관찰하기 위한 특정 장비 및 전문가의 필요성 등의 제한점을 가진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

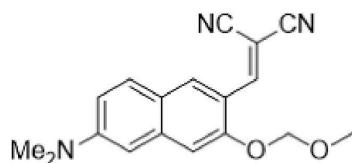
- [0006] 본 발명의 일 예는 6-다이메틸아미노-3-하이드록시-2-나프탈알데히드 (6-dimethylamino-3-hydroxy-2-naphthaldehyde)의 핵심골격에, 하이드라진과 반응하여 하이드라존(hydrazone) 작용기를 빠르게 형성하는 오르소-메톡시-메틸에테르(ortho-methoxyl-methyl ether) 구조를 도입하고, 형광소광(fluorescence quenching)기능의 다이시아노비닐(dicyanovinyl)기를 도입한, 하이드라진 검출을 위한 신규 화합물을 제공하기 위한 것이다. 상기 하이드라진 검출을 위한 신규 화합물은 하이드라진과 반응하여 레트로-아자-헨리반응(retro-aza-Henry reaction)이 유발되며, 이는 형광소광 작용기의 절단과 동시에 하이드라존 형성으로 이어져, 형광 켜짐 특성을 보인다.
- [0007] 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 형광 프로브는 생물학적 구성 물질을 포함한 수용성 또는 비수용성 등 다양한 환경 안에서 하이드라진을 특이적으로 민감하게 추적할 수 있다는 장점을 가진다. 나아가 토양 및 환경 샘플에서 하이드라진을 실시간으로 검출 가능함을 보였고, 여러 연구 분야에서의 활용성 및 환경적응가능성(in situ applicability)을 제시하였다. 또한, 하이드라진을 내포할 수 있는 흡, 또는 물을 포함한 여러 환경 및 생물학적 조건 내 및 실제 생활환경, 노출 조직의 하이드라진 감지 특성에 활용 가능함을 보임으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0009] 본 발명의 일 예는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물에 관한 것이다:

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0013] 본원 실시예에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 합성 및 동정을 수행하였고, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 HyP-2 로 명명하였다.

[0014] 상기 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물은 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하는 것일 수 있다. 상기 하이드라진은 분자식 N_2H_4 를 가지며, 수소에 공유결합 된 15족 원소에 해당하는 pnictogen hydride 계열로, 상온에서 투명한 액체이며, 물과 비슷한 녹는점, 끓는점, 및 밀도를 가져 검출이 육안으로 식별이 어렵고 검출하기 어려운 특성을 가진다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물은 상기 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하여, 하이드라진 검출을 위해 사용될 수 있다. 이에, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하이드라진 검출을 위한 형광 프로브 (probe)로 사용될 수 있다.

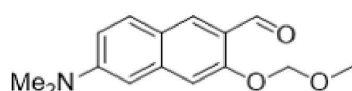
[0015] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물을 포함하는, 하이드라진 검출용 조성물에 관한 것이다. 상기 하이드라진 검출용 조성물은 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하는 것일 수 있으며, 상기 하이드라진은 액체 또는 기체 상태인 것일 수 있다.

[0016] 상기 하이드라진과 접촉하여 발하는 형광은 파장의 제한 없이 모든 형광이 포함될 수 있으나, 예를 들어 400 내지 650 nm, 450 내지 600 nm, 450 내지 550 nm, 460 내지 540 nm, 470 내지 530 nm, 480 내지 520 nm, 490 내지 510 nm, 또는 490 내지 500 nm 파장의 청색 형광일 수 있으며, 일 예로 495nm 파장에서 최대 형광파장을 가지는 청색의 형광일 수 있다. 이에 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물은 하이드라진과 접촉하여 청색의 형광을 발하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물은 하이드라진과 접촉하기 전에는 형광을 발하지 않으나, 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하는 것일 수 있다. 또는, 상기 하이드라진 검출용 조성물은 물과 접촉하여 형광을 발하지 않으나, 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 하이드라진 검출용 조성물은 하이드라진과 접촉하기 전 녹색 형광을 발하지 않으며, 하이드라진과 접촉하여 형광을 발하는 것일 수 있다. 이에, 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물은 하이드라진과 접촉하기 전에는 형광을 발하지 않고, 하이드라진과 접촉하여 형광이 켜지는 형광-켜짐 (fluorescence turn-on) 특성을 가지는, 형광-켜짐 기준 시스템일 수 있다.

[0018] 상기 “형광-켜짐” 특성은 검출 대상 물질과 접촉하기 전에는 형광을 발하지 않거나, 혹은 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 정도의 형광을 발하다가, 검출 대상 물질과 반응하여 형광을 발하는 특성을 의미한다. 상기 “형광-켜짐” 특성은 검출 대상 물질과 반응하기 전에는 형광을 발하지 않거나 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 정도의 형광을 발한다는 점에서 “형광-비율” 특성과 구별된다. 상기 “형광-비율” 특성은 검출 대상 물질과 접촉하기 전에도 특정 파장대의 형광을 발하고 있으며, 검출 대상 물질에 의해 형광의 색깔이 변화하는 특성을 의미한다. 구체적으로, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물은 하이드라진과 접촉하기 전 녹색의 형광을 발하다가, 하이드라진에 노출되었을 때 형광의 색상이 녹색에서 청색으로 이동하는 형광-비율 기반 특성을 가진다:

[0019] [화학식 2]



[0020]

[0022] 예를 들어, 상기 “형광-켜짐” 특성은 검출 대상 물질과 접촉하기 전에 발하던 형광 세기보다 적어도 10배 이상, 또는 15배 이상의 형광 세기를 검출 대상 물질과 접촉하여 발하는 것일 수 있다.

- [0023] 상기 “형광-켜짐” 기준 시스템은 “형광-비율” 기준 시스템의 단점을 보완할 수 있으며, 구체적으로 “형광-비율” 기준 시스템의 경우 기준이 되는 파장대를 설정하여 데이터를 수집 및 분석해야 하는 한계가 있으며, 형광이 연속적으로 변화하기 때문에 형광 변화를 시각적으로 추적하기 어려운 점이 있고, 예를 들어 HyP-1 화합물과 같이 하이드라진에 의한 형광 변화 전의 스펙트럼과 형광 변화 후의 스펙트럼이 중첩될 경우, 형광 변화의 폭이 크지 않아 형광 변화를 시각적으로 구분하기 어려운 한계가 있다. 반면, 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2 화합물과 같은 “형광-켜짐” 기준 시스템의 경우 형광이 존재하지 않거나, 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 형광만이 존재하다가, 검출 대상 물질에 의해 명확한 형광 (최소 10배 이상의 형광 세기 증가)이 발생하게 되므로, 검출 대상 물질의 검출여부를 시각적으로 명확히 판별할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물은 시료 내에 포함된 미량의 하이드라진을 검출할 수 있으며, 예를 들어 10 ppb 이하, 9 ppb 이하, 8 ppb 이하, 7 ppb 이하, 6 ppb 이하, 5 ppb 이하, 4 ppb 이하, 3 ppb 이하, 2 ppb 이하, 1 ppb 이하, 0.5 ppb 이하, 0.4 ppb 이하, 0.3 ppb 이하, 0.2 ppb 이하, 0.1 ppb 이하, 또는 0.05 ppb 이하의 하이드라진을 검출할 수 있어 높은 하이드라진 검출 민감성을 가지는 것을 특징으로 한다. 이때, 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물이 검출 가능한 시료 내에 포함된 하이드라진 농도의 하한값이 특정되지 않더라도, 시료 내 미량의 하이드라진을 검출 가능한 본 발명의 특징을 통상의 기술자가 명확하게 이해할 수 있을 것이나, 예를 들어 상기 하한값은 0 ppb 초과, 0.000001 ppb 이상, 0.00001 ppb 이상, 0.0001 ppb 이상, 0.001 ppb 이상, 또는 0.01 ppb 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물은 0 초과 내지 9 ppb 이하, 0 초과 내지 8 ppb 이하, 0 초과 내지 7 ppb 이하, 0 초과 내지 6 ppb 이하, 0 초과 내지 5 ppb 이하, 0 초과 내지 4 ppb 이하, 0 초과 내지 3 ppb 이하, 0 초과 내지 2 ppb 이하, 0 초과 내지 1 ppb 이하, 0 초과 내지 0.05 ppb 이하, 0.000001 내지 9 ppb, 0.000001 내지 8 ppb, 0.000001 내지 7 ppb, 0.000001 내지 6 ppb, 0.000001 내지 5 ppb, 0.000001 내지 4 ppb, 0.000001 내지 3 ppb, 0.000001 내지 2 ppb, 0.000001 내지 1 ppb, 0.000001 내지 0.05 ppb, 0.00001 내지 9 ppb, 0.00001 내지 8 ppb, 0.00001 내지 7 ppb, 0.00001 내지 6 ppb, 0.00001 내지 5 ppb, 0.00001 내지 4 ppb, 0.00001 내지 3 ppb, 0.00001 내지 2 ppb, 0.00001 내지 1 ppb, 0.00001 내지 0.05 ppb, 0.0001 내지 9 ppb, 0.0001 내지 8 ppb, 0.0001 내지 7 ppb, 0.0001 내지 6 ppb, 0.0001 내지 5 ppb, 0.0001 내지 4 ppb, 0.0001 내지 3 ppb, 0.0001 내지 2 ppb, 0.0001 내지 1 ppb, 0.0001 내지 0.05 ppb, 0.001 내지 9 ppb, 0.001 내지 8 ppb, 0.001 내지 7 ppb, 0.001 내지 6 ppb, 0.001 내지 5 ppb, 0.001 내지 4 ppb, 0.001 내지 3 ppb, 0.001 내지 2 ppb, 0.001 내지 1 ppb, 0.001 내지 0.05 ppb, 0.01 내지 9 ppb, 0.01 내지 8 ppb, 0.01 내지 7 ppb, 0.01 내지 6 ppb, 0.01 내지 5 ppb, 0.01 내지 4 ppb, 0.01 내지 3 ppb, 0.01 내지 2 ppb, 0.01 내지 1 ppb, 또는 0.01 내지 0.05 ppb 농도의 하이드라진을 검출 가능한 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물과 더불어 용매를 추가로 포함할 수 있다. 상기 용매는 물, 완충액, 다이메틸 설펡사이드 (dimethyl sulfoxide), 알코올 (에탄올, 메탄올 등), 에틸 에테르 (ethyl ether), 및 다이에틸 에테르 (diethyl ether) 로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물은 다양한 검출 대상 시료에서 하이드라진을 검출할 수 있으며, 다양한 pH 조건의 시료, 환경에 존재하는 다양한 시료 (토양시료, 채수(採水) 시료 등), 금속이온 또는 아미노산을 포함하고 있는 시료 등 다양한 환경 조건의 시료에서 하이드라진을 검출 가능한 것일 수 있다.
- [0027] 구체적으로, 상기 조성물은 생물학적 pH 를 포함한 다양한 pH 조건의 시료에서 하이드라진을 검출 가능한 것일 수 있으며, 예를 들어 pH 6 내지 9, pH 6 내지 8.5, pH 6 내지 8, pH 6 내지 7.5, pH 6.5 내지 9, pH 6.5 내지 8.5, pH 6.5 내지 8, pH 6.5 내지 7.5, pH 7 내지 9, pH 7 내지 8.5, pH 7 내지 8, 또는 pH 7 내지 7.5의 시료, 일 예로 pH 7.4의 시료에서 하이드라진을 검출 가능한 것일 수 있다.
- [0028] 구체적으로, 상기 조성물은 토양 또는 채수 내에 포함된 하이드라진을 검출 가능한 것일 수 있다. 상기 토양은 흙, 모래, 진흙, 또는 발흙 등이 포함될 수 있다. 상기 채수(採水, sampling of water)는 시험 대상이 되는 액체로서 채취된 물을 의미하며, 증류수, 하천수, 하수, 오수, 산업폐수, 축산폐수, 바닷물, 호수물, 강물, 수돗물, 또는 식수 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 구체적으로, 상기 조성물은 금속이온 및 아미노산으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 시료에서 하이드라진을 검출 가능한 것일 수 있다. 상기 금속이온은 칼슘, 칼륨, 아연, 나트륨, 및 마그네슘으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 상기 조성물은 광안정성을 가지는 것일 수 있으며, 하이드라진 감지 전후로 광안정성을 가지는 것일 수 있다.

구체적으로, 본원 실시예에서 상기 조성물의 광안정성을 알아보기 위해 상기 조성물과 하이드라진이 결합 후 자외선에 노출시켜 형광 세기 변화를 관찰하였으며, UV광 노출 0분일 때 형광 세기 100% 기준으로 형광 세기의 큰 변화를 보이지 않아, 하이드라진 감지 전후로 동등한 수준의 광안정성 (photostability)를 가지는 것을 알 수 있었다. 예를 들어, 상기 조성물은 하이드라진과 접촉 후 UV광에 60분 노출 후의 형광 세기가, UV광 노출 0분일 때의 형광 세기 100% 기준으로 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 또는 80% 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

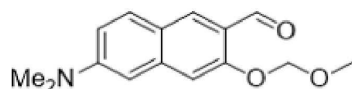
[0031] 본 발명의 또 다른 일 예는 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물을 시료와 접촉하는 단계; 및 상기 접촉에 의한 형광을 확인하는 단계를 포함하는, 하이드라진을 검출하는 방법에 관한 것이다. 상기 하이드라진 검출용 조성물은 전술한 바와 같다.

[0032] 상기 시료는 토양 시료, 채수 시료 등 환경에 존재하는 다양한 시료를 포함하며, 예를 들어 흙, 모래, 진흙, 발효, 증류수, 바닷물, 호수물, 강물, 수돗물, 또는 식수 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 하이드라진이 포함되어 있는지 여부의 확인이 필요한 시료는 모두 포함될 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 조성물은 하이드라진에 의한 형광-켜짐 특성을 가지기 때문에, 상기 접촉에 의한 형광은 파장의 제한 없이 모든 형광이 포함될 수 있으나, 예를 들어 400 내지 650 nm, 450 내지 600 nm, 450 내지 550 nm, 460 내지 540 nm, 470 내지 530 nm, 480 내지 520 nm, 490 내지 510 nm, 또는 490 내지 500 nm 파장의 청색 형광일 수 있으며, 일 예로 495nm 파장에서 최대 형광 파장을 가지는 청색의 형광일 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 일 예는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물에 다이시아노비닐 (dicyanovinyl)기를 도입하는 단계를 포함하는, 하이드라진 검출용 화학 센서의 제조방법에 관한 것이다:

[0035] [화학식 2]



[0036]

[0038] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 HyP-1으로 명명하였으며, 본원 실시예에서 상기 화학식 2로 표시되는 화합물로부터 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 합성을 수행하였다. 상기 하이드라진 검출용 화학 센서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물을 포함하는 것일 수 있다.

[0039] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 하이드라진과 접촉하기 전 녹색의 형광을 발하며, 구체적으로 파장 480 내지 700 nm, 500 내지 650 nm, 500 내지 600 nm, 530 내지 570 nm, 또는 550 내지 560 nm 파장의 녹색의 형광을 발할 수 있으며, 일 예로 556nm 파장에서 최대 형광 파장을 가지는 녹색의 형광일 수 있다. 상기 화학식 2로 표시되는 화합물에 다이시아노비닐기를 도입하는 단계는, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물의 녹색의 형광을 제거 또는 소광 (quenching) 하는 것일 수 있다.

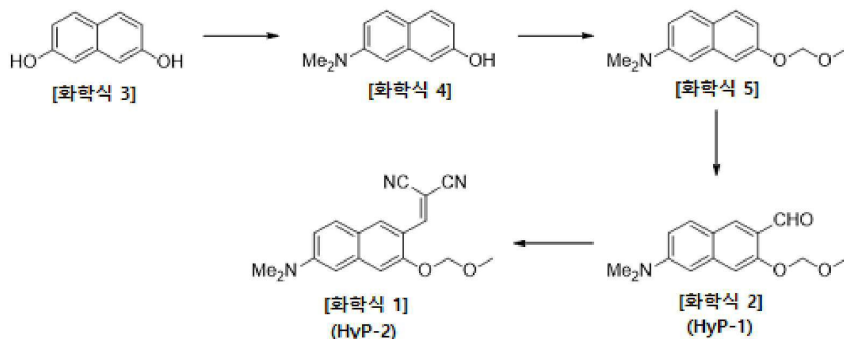
[0040] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 화학식 2로 표시되는 화합물에 말로노나이트릴을 첨가하는 노베나겔 축합반응 (Knoevenagel condensation) 단계를 포함하는, 하이드라진 검출용 화학 센서의 제조방법에 관한 것이다. 상기 축합반응은 화합물의 중간체(HyP-1)와 말로노나이트릴이 촉매인 피페리딘(piperidine)의 존재 하에 수행될 수 있으며, 상기 촉매는 에탄올을 용매로하는 반응조건에서 피페리딘 등을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물에 말로노나이트릴 (malononitrile)을 첨가하는 단계; 알코올을 첨가하여 교반하는 단계; 및 피페리딘 (piperidine)을 첨가하여 반응하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 하이드라진 검출용 화학 센서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 또는 이의 용매화물을 포함하는 것일 수 있다. 상기 알코올은 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 분지형 알코올일 수 있으며, 예를 들어 에탄올, 메탄올, 프로판올, 또는 부탄올 등일 수 있으며, 일 예로 에탄올일 수 있다.

[0041] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 하이드라진과 접촉하기 전 녹색의 형광을 발하나, 상기 하이드라진 검출용 화학 센서는 하이드라진과 접촉하기 전 형광을 발하지 않거나, 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 정도의 형광만을 발하는 것일 수 있다. 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물에 말로노나이트릴 (malononitrile)을 첨가하는 단계; 알코올을 첨가하여 교반하는 단계; 및 피페리딘 (piperidine)을 첨가하여 반응하는 단계로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 단계에 의해, 상기 녹색의 형광이 제거 또는 소

광되는 것일 수 있으며, 예를 들어 상기 말로노나이트릴을 첨가하는 단계에 의해 상기 녹색의 형광이 제거 또는 소광되는 것일 수 있다.

[0042] 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조방법을 하기 반응식 1을 예시로 들어 자세히 설명하고자 한다:

[0043] [반응식 1]



[0044]

[0045] 먼저, 소듐 메타바이설파이트 촉매 하에서 화학식 3의 2,7-다이하이드록시 나프탈렌을 다이메틸아민과 부헤리 반응 (Bucherer reaction)하여, 화학식 4를 갖는 7-(N,N-다이메틸아미노)나프탈렌-2-올을 제조할 수 있다.

[0046] 다음으로, 상기 화학식 4의 7-(N,N-다이메틸아미노)나프탈렌-2-올에 대해 메톡시 메틸에테르를 도입하는 보호 반응 (protection reaction)을 수행하여, 화학식 5를 갖는 7-(메톡시메톡시)-N,N-다이메틸나프탈렌-2-아민(7-(methoxymethoxy)-N,N-dimethyl naphthalen-2-amine)을 제조할 수 있다.

[0047] 다음으로, 상기 화학식 5의 7-(메톡시메톡시)-N,N-다이메틸나프탈렌-2-아민에 3차 부틸리튬하에서 알데하이드기를 첨가하는 반응 (addition reaction)을 수행하여, 화학식 2을 갖는 6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)-2-나프탈알데하이드 (6-(dimethylamino)-3-(methoxymethoxy)-2-naphthaldehyde)을 제조할 수 있다.

[0048] 마지막으로, 상기 화학식 2의 화합물에 대해, 말로노나이트릴(malononitrile)과 축합반응(condensation reaction)을 수행하여, 화학식 1을 갖는 2-((6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-2-일)메틸렌)말로노나이트릴 (2-((6-(dimethylamino)-3-(methoxymethoxy)naphthalen-2-yl)methylene)malononitrile)를 제조할 수 있다.

[0049] 본 발명의 또 다른 일 예는, 본 발명에 따른 하이드라진 검출용 조성물을 포함하는, 하이드라진 검출용 키트에 관한 것이다. 상기 키트는 종이 스트립일 수 있다.

[0050] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 화학식 2로 표시되는 화합물에 말로노나이트릴 (malononitrile)을 첨가하는 단계; 알코올을 첨가하여 교반하는 단계; 및 피페리딘 (piperidine)을 첨가하여 반응하는 단계를 포함하는, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물의 형광을 제거하는 방법에 관한 것이다. 상기 화학식 2로 표시되는 화합물의 형광은 녹색 형광일 수 있으며, 구체적으로 파장 480 내지 700 nm, 500 내지 650 nm, 500 내지 600 nm, 530 내지 570 nm, 또는 550 내지 560 nm 파장의 녹색의 형광을 발할 수 있으며, 일 예로 556nm 파장에서 최대 형광 파장을 가지는 녹색의 형광일 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 형광 프로브는 비교적 간단한 과정을 통해 합성이 가능하고, 생체 내외의 하이드라진을 폭넓게 검출할 수 있어, 생물학적 그리고 환경적 양 측면으로 모두 실용적인 최초의 소재라는 점에서 기술의 혁신성과 창의성을 가진다. 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 형광 프로브가 가지는 형광의 특성, 광안정성, 실용성 (휴대성, 실시간 검출 및 가시성), 환경 적용성 및 조직 영상화 연구 결과는 기술의 즉각적인 사업화가 가능함을 제시하였고, 기초연구에 활용 가능성이 매우 높기에, 향후 기술의 사업화 전망이 분명하다. 본 발명의 일 예에 따른 하이드라진 검출용 형광 프로브는 하이드라진과 관련된 환경 내의 동, 식물 관련 연구, 하이드라진의 생체 내 영향에 관련된 기작 연구, 하이드라진 응용과 관련된 공학 및 산업 내의 평가와 관련된 다양한 연구 혹은 산업 분야에서 적용이 가능하다. 또한, 높은 광안정성과 생체 내 pH 적합성을 가지고 있기 때문에 생물학적 연구를 위한 적용이 가능하며, 종이스트립을 이용한 고체상의 형광 프로브가 액체 및 기체상태 등 여러 성상의 하이드라진을 검출할 수 있고, 이러한 장점을 이용해 휴대가 가능하며 저가의

고효율을 가진 하이드라진 검출 도구의 상용화가 가능할 것으로 기대된다. 이와 더불어, 액상의 형광 프로브를 분사해 소량의 하이드라진을 감지할 수 있고, 다양한 종류의 흙이나 물에서도 하이드라진을 선택적으로 검출할 수 있다는 점을 미루어보아 환경적 목적으로의 응용 확대성을 기대할 수 있을 것으로 보인다.

도면의 간단한 설명

[0052]

도 1은 본 발명의 일 예에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 합성하는 과정을 나타낸 도면이다.

도 2는 HyP-1 및 HyP-2의 흡수 및 형광 그래프 (흡수 및 방출 스펙트럼)를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 예에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 하이드라진에 대한 검출 메커니즘과 특성을 나타낸 도면이다.

도 4는 HyP-1 및 HyP-2 를 각각 일정량의 하이드라진(1 mM)과 반응 전후로 흡광과 형광세기 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2 화합물의 하이드라진 농도에 따른 감지특성 및 민감도를 나타낸 형광 변화 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-2의 하이드라진에 대한 선택성 및 pH 의존도를 형광 측정하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2 화합물이 하이드라진과 결합하여 생성된 물질의 광안정성 평가 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2 화합물을 사용하여 종이스트립 상에서 하이드라진 검출 가부를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-2 가 증기상태의 하이드라진에 대한 선택적 검출능력이 있음을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10a는 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-2의 토양 내 존재하는 하이드라진 검출 특성을 확인하기 위해 사용된 세 종류의 흙(모래, 진흙, 발흙) 시료를 나타낸 도면이다.

도 10b는 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-1를 이용해 토양 내에 존재하는 하이드라진에 대한 검출능력을 확인한 결과이다.

도 10c는 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-2를 이용해 토양 내에 존재하는 하이드라진에 대한 검출 능력을 확인하기 위해 수행된 2가지 검출 실험방법을 나타낸 도면이다.

도 10d는 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-2를 파이펫을 이용하여 시료와 접촉할 경우 토양 내에 존재하는 하이드라진을 성공적으로 검출 가능한 것을 확인한 도면이다.

도 10e는 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-2를 스프레이 분사하여 시료와 접촉할 경우 토양 내에 존재하는 하이드라진을 성공적으로 검출 가능한 것을 확인한 도면이다.

도 11은 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-2를 이용해 환경 내에서 채수된 실제 샘플에서 하이드라진에 대한 검출능력을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053]

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0055]

실시예 1. 하이드라진 검출용 화합물의 합성 및 구조 분석

[0056]

본 발명자들은 하이드라진을 환경 내 혹은 생체 내의 유래물로부터 신속하고 간편하게 감지할 수 있는 형광 프로브를 개발하고자 하였으며, 화학식 2에 따른 HyP-1 화합물의 알데하이드기에 다이시아노비닐 (dicyanovinyl) 기를 도입하면 해당 작용기가 가지고 있는 분자 로터(molecular rotor)의 성질로부터 형광 소광(quenching)효과가 발생하게 되고, 형광이 꺼진 화합물이 하이드라진과 접촉했을 때 오르소(ortho)-메톡시(methoxy)-메틸에테르

(methyl ether)가 레트로-아자-헨리(retro-aza-Henry type)반응을 도와 하이드라존을 형성하게 되며 형광이 다시 켜질 (turn-on) 것이라는 가설에 착안하여 형광 프로브를 고안하였고, 반응식 1에 따라 본 발명에 따른 형광 켜짐-기준 화합물 (HyP-2)을 합성하였다. 반응식 1에 나타난 각 화합물의 구체적인 합성과정은 아래에 기재하였다.

[0058] (1) 7-(다이메틸아미노)나프탈렌-2-올 (7-(dimethylamino)naphthalen-2-ol)의 합성

[0059] 반응식 1에서 화학식 4의 7-(다이메틸아미노)나프탈렌-2-올 (7-(dimethylamino) naphthalen-2-ol)의 합성을 수행하였다.

[0060] 구체적으로, 합성 출발 물질인 반응식 1에서 화학식 3의 화합물 (3 g, 18.7 mmol, Sigma-aldrich, D116408)과 소듐 메타바이설파이트 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 7.11 g, 37.4 mmol)가 들어있는 밀폐용기(sealed-tube)에 물(H_2O , 8 mL)과 다이메틸아민 수용액(dimethylamine solution, 40% in H_2O , 10.5 mL, 93.5 mmol)을 첨가하고 용기를 막았다. 이 혼합물을 실리콘 오일 용기를 이용하여 150 °C에서 8 시간 교반하였다. 상온(25 °C)으로 반응물의 온도를 낮춘 후 용기를 열어 다이클로로메테인(dichloromethane, 100 mL), 물(100 mL), 포화 소금물(30 mL)을 넣고 분별 깔때기를 이용하여 유기층을 추출했다. 유기층을 무수황산나트륨 (Na_2SO_4 , 5 g)으로 건조하고, 흡기기(aspirator)를 이용(25 °C, 20~500 mmHg)하여 농축하였다. 이렇게 얻어지는 얼은 갈색의 고체 화합물은 실리카 겔(silica gel, Merck-silica gel 60, 230~400 mesh)을 이용한 컬럼 크로마토그래피(column chromatograph, 직경 6 cm, 높이 15 cm)를 이용하여 분리(전개 액: 20% EtOAc/Hexane)하여 흰색의 고체 화합물 (2.10 g, 60%)을 얻었다. 생성물은 박막 크로마토그래피(TLC, thin layer chromatography, silica gel 60F-254 glass plate, Merck)로 분석하면 R_f = 0.25 (20% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 가졌다.

[0061] 합성이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 핵자기공명 분석(NMR, Nuclear Magnetic Resonance) 및 고분해능 질량분석(HRMS, High Resolution Mass Spectrometry) 분석을 수행하였다. NMR 분석 및 HRMS 분석을 통해, 도 1에서 2번으로 표시된 화합물인 7-(다이메틸아미노)나프탈렌-2-올 (7-(dimethylamino) naphthalen-2-ol)이 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. NMR 분석 결과 및 HRMS 분석 결과는 다음과 같았다:

[0062] NMR 분석 결과

[0063] ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 293K): δ 7.66-7.59(m, 2H), 7.05-7.02(m, 1H), 6.96-6.95(d, 1H), 6.85-6.82(m, 1H), 6.78-6.77(d, 1H), 5.10(s, 1H), 3.05(s, 6H).

[0064] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz, 293K): δ 153.88, 149.17, 136.24, 129.39, 128.61, 122.44, 114.22, 113.80, 108.02, 105.32, 40.91.

[0065] HRMS 분석 결과

[0066] m/z calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}$ 187.0997 found 187.0999.

[0068] (2) 7-(메톡시메톡시)-N,N-다이메틸나프탈렌-2-아민(7-(methoxymethoxy)-N,N-dimethylnaphthalen-2-amine)의 합성

[0069] 반응식 1에서 화학식 5의 화합물인 7-(메톡시메톡시)-N,N-다이메틸나프탈렌-2-아민 (7-(methoxymethoxy)-N,N-dimethyl naphthalen-2-amine)의 합성을 수행하였다.

[0070] 구체적으로, 다이메틸포름아마이드(DMF, N, N-dimethylformamide, 5 mL) 용매에 반응식 1에서 화학식 4로 표시된 화합물 (1 g, 5.34 mmol)을 녹인 후, 이 혼합용액을 포화 소금물과 얼음을 이용하여 -15°C로 온도를 낮추고, 아르곤(argon) 풍선을 꽂아 아르곤 대기 조건 하에서 약 30분 교반시켜주었다. 온도가 낮아진 것을 확인한 뒤 소듐 하이드라이드(NaH , sodium hydride, 235 mg, 5.875 mmol)를 첨가하고, 이 과정에서 수소기체(H_2 gas)가 발생하게 되는데, 이것은 실리콘오일 트랩(silicon oil trap)을 거친 후 옥외로 배출시켰다. 동일한 온도에서 1시간 교반시킨 후, 트랩에서 수소기체가 더 이상 발생하지 않는 것을 확인하였다. 이어서, 클로로메틸 메틸에테르(chloromethyl methyl ether, 0.4 mL, 5.34 mmol)를 약 5분간 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 주입이 완료

되면, 온도를 상온 (25 °C)으로 바꾸어주고, 6시간 교반시켰다. 6시간 후, 물(100 mL)을 넣어주고, 에틸아세테이트(EtOAc, 200 mL)를 이용하여 추출을 수행하였다. 추출된 에틸 아세테이트 유기층은 무수황산나트륨(10 g)을 이용해 유기층 내의 잔존하는 물을 건조하였다. 건조된 에틸아세테이트 유기층은 흡기기를 이용해 농축하였다. 이렇게 얻어진 열은 갈색의 액체 화합물은 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피 방법을 통하여 분리(전개액: 5% EtOAc/Hexane)하였으며, 흰색의 고체 화합물(988 mg, 80%)을 얻었다. 상기 흰색의 고체 화합물은 박막 크로마토그래피로 분석하면 $R_f = 0.45$ (20% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개값을 가졌다.

[0071] 합성이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 핵자기공명 분석 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) 및 고분해능 질량분석 (HRMS, High Resolution Mass Spectrometry) 분석을 수행하였다. NMR 분석 및 HRMS 분석을 통해, 도 1에서 3번으로 표시된 화합물인 7-(메톡시메톡시)-N,N-다이메틸나프탈렌-2-아민 (7-(methoxymethoxy)-N,N-dimethyl naphthalen-2-amine)이 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. NMR 분석 결과 및 HRMS 분석 결과는 다음과 같았다:

[0072] NMR 분석 결과

[0073] ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 293K): δ 7.75(d, 1H), 7.72(d, 1H), 7.40-7.39(d, 1H), 7.15-7.08(m, 2H), 6.98-6.97(d, 1H), 5.39(s, 2H), 3.69(s, 3H), 3.11(s, 6H).

[0074] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz, 293K): δ 155.75, 149.16, 136.23, 129.11, 128.55, 123.00, 114.99, 114.58, 108.69, 105.96, 94.62, 56.07, 40.83.

[0075] HRMS 분석 결과

[0076] HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ 231.1259 found 231.1262.

[0078] (3) 6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)-2-나프탈알데하이드 (6-(dimethylamino)-3-(methoxymethoxy)-2-naphthaldehyde)의 합성

[0079] 반응식 1에서 화학식 2의 화합물인 6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)-2-나프탈알데하이드 (6-(dimethylamino)-3-(methoxymethoxy)-2-naphthaldehyde)의 합성을 수행하였다.

[0080] 구체적으로, 100 mL 라운드 바텀 플라스크(round-bottom flask)에 상기 실시예 1의 (2)에서 제조된 3번 화합물 (2.2606 g, 9.774 mmol)을 넣은 후, 아르곤 풍선을 꽂아주었다. 이어서 에틸 에테르(Et_2O , 50 mL)을 넣어주고, 포화된 소금물과 얼음을 이용하여 온도를 -20 °C로 낮추었다. 온도 확인 후, 3차 부틸리튬(tert-BuLi , 8.6 mL, 14.66 mmol)을 약 30분에 걸쳐 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 이때 색깔은 서서히 짙은 갈색으로 바뀌며, 주입이 완료되면 같은 온도에서 2시간을 교반시켰다. 2시간 교반 후, DMF(1.3 mL, 16.62 mmol)를 약 5분에 걸쳐 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 주입이 완료되면 동일한 온도에서 1시간을 교반하며, 이때 색깔은 점차 밝은 노란색으로 변했다. 1시간 교반 후, 4N HCl(10 mL)과 1차 증류수(10 mL)를 넣어주고 10분간 교반했다. 10분 후, 에틸 아세테이트 (EtOAc, 300 mL)와 포화 소금물(100 mL), 물(200 mL)를 이용하여 추출과정을 수행했다. 추출된 에틸 아세테이트 유기층은 무수황산나트륨(10 g)을 이용해 유기층 내의 잔존하는 물을 건조하였고, 흡기기를 이용하여 농축했다. 이렇게 얻어지는 밝은 노란색의 고체 화합물은 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리(전개액: 20% EtOAc/Hexane)하여 밝은 노란색의 고체 화합물 (도 1에서 HyP-1; 1.27 g, 50%)을 얻었다. 생성물은 박막 크로마토그래피로 분석하면 $R_f = 0.25$ (20% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 가졌다.

[0081] 합성이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 핵자기공명 분석 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) 및 고분해능 질량분석 (HRMS, High Resolution Mass Spectrometry) 분석을 수행하였다. NMR 분석 및 HRMS 분석을 통해, 도 1에서 4번으로 표시된 화합물인 6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)-2-나프탈알데하이드 (6-(dimethylamino)-3-(methoxymethoxy)-2-naphthaldehyde)이 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. NMR 분석 결과 및 HRMS 분석 결과는 다음과 같았다:

[0082] NMR 분석 결과

[0083] ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 293K): δ 10.49(s, 1H), 8.25(s, 1H), 7.75-7.73(d, 1H), 7.29-7.24(d, 1H), 7.05-7.03(dd, 1H), 6.77-6.76(d, 1H), 5.40(s, 2H), 3.59(s, 3H), 3.12(s, 6H).

[0084] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz, 293K): δ 189.61, 155.99, 150.71, 139.74, 131.16, 130.89, 122.26, 121.29, 114.76, 107.66, 104.30, 94.75, 56.39, 40.32.

[0085] HRMS 분석 결과

[0086] HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ 259.1208 found 259.1211.

[0088] (4) 2-((6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-2-일)메틸렌)말로노나이트릴 2-((6-(dimethylamino)-3-(methoxy-methoxy) naphthalen-2-yl)methylene)malononitrile의 합성

[0089] 반응식 1에서 화학식 1의 화합물인 2-((6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-2-일)메틸렌)말로노나이트릴 (2-((6-(dimethylamino)-3-(methoxymethoxy)naphthalen-2-yl)methylene)malononitrile)의 합성을 수행하였다.

[0090] 구체적으로, 10 mL 라운드 바텀 플라스크(round-bottom flask)에 화학식 2의 화합물(30 mg, 0.116 mmol)과 말로노나이트릴(malononitrile, 16.05 mg, 0.243 mmol)을 넣은 후, 아르곤 풍선을 꽂아주었다. 이어서 실온의 상태에서 에틸 알코올(EtOH, 1 mL)을 넣어주었다. 400 rpm으로 교반을 시켜주고, 피페리딘(piperidine, 105.9 μL , 1.07 mmol)을 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 이때 색깔은 갑작스럽게 붉은 색으로 변하였고, 주입이 완료되면 같은 온도에서 30분을 교반시켰다. 반응이 끝난 후, 에틸 아세테이트 (EtOAc, 100 mL)와 포화 소금물(50 mL), 물(100 mL)를 이용하여 추출과정을 수행했다. 추출된 에틸 아세테이트 유기층은 무수황산나트륨(10 g)을 이용해 유기층 내의 잔존하는 물을 건조하였고, 흡기기를 이용하여 농축했다. 이렇게 얻어지는 검붉은색의 고체 화합물은 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리(전개 액: 30% EtOAc/Hexane)하여 짙은 붉은색의 고체 화합물 (HyP-2; 25.3 mg, 71%)을 얻었다. 생성물은 박막 크로마토그래피로 분석하면 R_f = 0.3(30% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 가졌다.

[0091] 합성이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 핵자기공명 분석(NMR, Nuclear Magnetic Resonance) 및 고분해능 질량분석(HRMS, High Resolution Mass Spectrometry) 분석을 수행하였다. NMR 분석 및 HRMS 분석을 통해, 화학식 1의 화합물인 2-((6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-2-일)메틸렌)말로노나이트릴 (2-((6-(dimethylamino)-3-(methoxymethoxy)naphthalen-2-yl)methylene)malononitrile)이 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. NMR 분석 결과 및 HRMS 분석 결과는 다음과 같았다:

[0092] NMR 분석 결과

[0093] ^1H NMR (DMSO , 400MHz, 298K): δ 8.48(s, 1H), 8.40(s, 1H), 7.74-7.72(d, 1H), 7.24(s, 1H), 7.15-7.12(d, 1H), 6.83(s, 1H), 5.36(s, 2H), 3.44(s, 3H), 3.09(s, 6H).

[0094] ^{13}C NMR (DMSO , 100MHz, 298K): δ 154.585, 152.817, 151.204, 139.503, 130.877, 130.838, 120.428, 116.840, 115.397, 115.165, 114.372, 107.026, 103.741, 94.346, 76.424, 56.154.

[0095] HRMS 분석 결과

[0096] HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ 307.1323 found 307.1321.

[0098] 이때, 상기 제조된 화학식 2의 화합물을 HyP-1 라 명명하였고, 화학식 1의 화합물을 HyP-2 라 명명하였다.

[0100] 실시예 2. 흡수 및 형광 방출 특성 확인

[0101] 비교예로서 HyP-1 및 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2의 증류된 물의 조건하에서 흡광 및 형광 변화를 측정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

- [0102] 구체적으로, 물질의 흡수 및 방출 스펙트럼(absorption and emission spectra)을 분석하기 위해서 분광광도계(UV/Vis spectrophotometer; Agilent Technologies Cary 8454, USA)와 형광측정장비(spectrofluorophotometer; SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였다. 흡광과 형광 측정에 사용되는 유리큐벳(cuvette 혹은 cell)으로는 사면이 1 cm 두께를 가진 표준 석영 셀(standard quartz cell; interanal volume=0.1 cm, Hellma Analytics, Jena, Germany)을 이용하였다.
- [0103] 도 2는 용매가 순수한 물의 조건에서 HyP-1 과 HyP-2의 흡수 및 형광 그래프를 각각 나타낸 것으로, 해당조건에서 HyP-1은 도 2의 (a)와 같이 391 nm에서 최대 흡광도를 보였다. 도 2의 (b)에 나타난 HyP-1의 형광 스펙트럼의 경우 HyP-1의 최대 형광세기를 보이는 파장은 556 nm로 황색에 가까운 녹색의 형광을 보였다.
- [0104] 또한, HyP-2는 도 2의 (c)와 같이 459 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 도 2의 (d)와 같이 HyP-2는 형광을 전혀 보이지 않는 것을 확인하였다. 즉, HyP-1은 하이드라진과 반응하여 형광비율-기반 특성을 보였으나, 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2는 형광켜짐-기반 특성을 보였다. 구체적으로, 도 3에 나타난 바와 같이, 오르소 메톡시 메틸에테르(ortho-methoxy-methyl ether, o-OMOM) 작용기가 하이드라진과 만났을 때 하이드라존(hydrazone) 형성이 가속화되고, 하이드라진이 결합한 형태의 생성물이 생성되었다. 이 때, HyP-1은 초록의 형광(Green-emitting)을 나타내다가 하이드라진과 반응하여 초록색의 형광이 청색으로 변해가며, 최종적으로 청색의 형광(Blue-emitting)을 내는 물질을 생성하였다. 반면, HyP-2는 형광을 내지 않다가(Non-fluorescent), 하이드라진과 만날 경우 중간체(Intermediate)로 HyP-1을 거쳐 청색의 형광(blue-emitting)을 나타냈다.
- [0105] 따라서, 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2는 HyP-1 대비 형광켜짐-기반 특성을 가져, 형광-비율 기준 시스템의 단점을 보완할 수 있었다.
- [0107] **실시예 3. 하이드라진 검출 메커니즘과 반응성 확인**
- [0108] 비교예로서 HyP-1 및 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2의 하이드라진에 대한 검출 메커니즘과 반응성을 확인하기 위해서 일정량의 하이드라진(1 mM)의 반응 전후로 흡광과 형광세기 변화를 측정하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0109] 구체적으로, HyP-1 화합물 (10 μ M)을 하이드라진 용액이 포함된 증류수에 첨가한 뒤 흡수 및 형광 그래프를 측정하였다. HyP-1 화합물은 25℃ 실온조건에서 1시간 동안 하이드라진과 배양시켜주었고, 최종물질에 대한 분석은 흡수 분광광도계와 형광기를 사용하여 분석하였다. 이에 사용된 하이드라진 용액은 Sigma aldrich사의 제품으로 측정에 필요한 농도를 맞춰주기 위해 증류수에 희석하였다. 도 4의 (a) 그래프에서 HyP-1 화합물의 고유 형광세기와 하이드라진과 반응하였을 때 동반되는 형광의 특성을 각각의 형광색상과 동일하게 황색(반응 전 HyP-1)과 청녹색(하이드라진 반응 후 HyP-1)으로 나타내었다. 도 4의 (a) 안쪽의 사진은 HyP-1 화합물이 하이드라진과 반응하기 전후의 형광변화를 자외선(UV light, 365 nm, 60W)에 노출시켜 카메라로 촬영한 사진이다.
- [0110] 상기 HyP-1 화합물과 실질적으로 동일한 방법으로, HyP-2 화합물을 하이드라진 용액이 포함된 증류수에 첨가한 뒤 흡수 및 형광 그래프를 측정하였다. 도 4의 (b) 그래프는 HyP-2 화합물의 하이드라진에 대한 반응 전후의 형광분석결과로, 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2 화합물은 형광소광 작용기의 영향으로 형광이 소광된 상태로 존재하지만, 하이드라진과 반응하였을 때 하이드라존의 형성을 통해 형광이 회복되어 청색의 형광을 보이는 것을 도 4의 (b) 안쪽의 사진으로 나타내었다.
- [0111] 따라서, HyP-1 화합물은 하이드라진과 반응하였을 때 형광비율-기준의 광학적 특성을 가지나, 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2는 하이드라진과 반응하였을 때 형광켜짐-기준의 광학적 특성을 가져, 형광-비율 기준 시스템의 단점을 보완할 수 있다. 구체적으로, 종래의 형광-비율 기준 시스템을 사용할 경우 비율의 기준지표(파장대)를 정하여 데이터를 수집 및 분석하는 불편함이 존재하였고, 도 4의 a에 나타난 바와 같이 HyP-1 및 하이드라진이 반응하였을 때의 형광 그래프는 HyP-1 자체의 형광을 포함하여 넓은 폭으로 형광 그래프가 형성되어, 비율의 기준이 되는 형광 변화의 폭이 크지 않아 일정 농도 이하에서는 형광 변화를 시각으로 추적하기 어려운 점이 있었으나, HyP-2의 경우 형광-켜짐을 기반으로 하여 하이드라진에 의한 명확한 형광 증가(최소 10배 이상)를 보이기 때문에, 형광-비율 기준의 단점을 보완하여 더 높은 하이드라진 검출 민감도와 정확도를 보였다.
- [0113] **실시예 4. 하이드라진 검출 특성 및 민감도 확인**
- [0114] 증류수를 용매로 하는 조건에서 HyP-2의 하이드라진 양에 따른 감지특성 및 민감도를 물질의 형광세기 변화를

통해 확인하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

- [0115] 구체적으로, HyP-2가 하이드라진의 농도에 따른 형광변화 특성의 차이를 보이는지와, HyP-2가 얼마만큼의 극소량의 하이드라진을 검출해낼 수 있는지 확인하기 위하여, 각각의 농도조건에서 흡광 및 형광 변화를 분석하였다. 측정에 사용된 용매는 증류수이며, 하이드라진(0-1 mM)의 다양한 농도조건을 맞춰주기 위해서 증류수에 단계적으로 희석하여 사용하였다. 반응은 25℃의 실온조건에서 약 1시간동안 하이드라진을 HyP-2와 배양하는 것으로 이루어지며, HyP-2는 다이메틸 설펡사이드의 저장액(10 mM in DMSO)을 사용하여 해당 용매조건에서 각 분석물에 포함될 다이메틸 설펡사이드의 양이 균일하도록 통제하였다.
- [0116] 도 5의 (a)는 HyP-2가 고농도의 하이드라진(0-1 mM)과 반응했을 때의 형광 증가량을 보여주는 형광 방출 스펙트럼이며, 하이드라진의 양이 증가함에 따라 HyP-2의 형광 세기 또한 증가한다는 것을 보여준다. 도 5의 (a)의 형광 방출 스펙트럼 결과를 토대로, 시료 내 하이드라진 농도에 따른 HyP-2의 형광 세기를 도 5의 (b)에 나타내었다. 도 5의 (b)는 최대 형광 세기를 보이는 495 nm의 파장에서의 HyP-2의 형광 세기 (y축)를 시료 내 하이드라진 농도 (x축)에 따라 나타낸 그래프이다. 도 5의 (b)에 나타난 바와 같이, 시료 내의 하이드라진 농도가 증가함에 따라 HyP-2의 형광 세기가 증가하여, 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2는 시료 내 하이드라진의 존재 여부와 더불어 하이드라진의 농도를 정량적으로 검출 가능하였다. 도 5의 (c)는 HyP-2가 하이드라진을 검출할 수 있는 최소 농도에 대해 평가하고자 0 내지 0.1 μ M 농도까지의 형광을 측정한 결과이며, HyP-2는 0.05 ppb의 낮은 농도의 하이드라진을 감지할 수 있어, 하이드라진에 대해 우수한 민감도를 가지는 것을 알 수 있었다.
- [0118] **실시예 5. 하이드라진 선택성 및 pH의존도 확인**
- [0119] 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2 화합물의 하이드라진 검출 특이성 및 생물학적 pH를 포함한 다양한 pH를 가진 용매조건에서의 pH 의존도를 확인하였다.
- [0120] 구체적으로, HyP-2 화합물이 하이드라진에만 선택성을 가지고 결합하는지에 대한 사실을 확인하기 위해서 HyP-2 화합물과 반응할 수 있는 다양한 금속이온 (metal ion)과 생체분자 (biomolecule)을 이용하여 각각의 물질에 대한 HyP-2 화합물의 형광변화 여부를 확인하였다. 실험에 사용된 용매는 증류수(deionized water, DI H₂O)로 각 금속이온과 생체분자들은 Sigma (Sigma Aldrich Co Ltd), TCI (Tokyo chemical industry Co Ltd), Alfa (Thermo Fisher Scientific)사에서 판매되는 제품을 각각 사용하였다. HyP-2 화합물은 다이메틸 설펡사이드의 녹여 저장액(10 mM)의 형태로 사용되었으며, 최종적으로 분석이 이루어지는 용매에서 다이메틸 설펡사이드가 반응에 영향을 주지 않을 정도의 소량만을 포함하도록 통제하였다 (1% 미만).
- [0121] 도 6의 (a)는 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-2가 금속이온과 생체분자들 사이에서 하이드라진에 대한 선택성을 가지는지를 평가한 결과로, 이는 하이드라진과 반응한 HyP-2의 최종 생성물의 여기파장(338 nm)를 기준으로 방출되는 형광의 최대파장(495 nm)에서의 형광 증가량을 바 그래프로 나타낸 것이다. 해당 그래프는 각각의 금속이온과 생체분자와 반응하기 전 화합물 HyP-2에 대한 형광세기를 기준으로, 25℃의 조건에서 각 물질과 HyP-2를 1시간동안 반응을 시켰을 때의 형광세기의 변화를 나타낸 것이다. 이를 측정하기 위해 사용된 HyP-2의 최종 농도는 10 μ M이며, 각 금속이온 및 생체분자의 농도는 HyP-2의 농도를 기준으로 30당량에 해당되는 300 μ M로 고정하였다. 도 6의 (a)에 나타난 가로축의 생체분자 및 금속이온의 종류는 다음과 같으며, 이때 HyP-2는 도 6에서 HyP-2으로 표기하였다:
- [0122] (A) HyP-2;
- [0123] (B) HyP-2 with hydrazine;
- [0124] (C) HyP-2 with CaCl₂;
- [0125] (D) HyP-2 with CdCl₂;
- [0126] (E) HyP-2 with CuCl₂;
- [0127] (F) HyP-2 with FeCl₃;
- [0128] (G) HyP-2 with KCl;
- [0129] (H) HyP-2 with MgCl₂;

- [0130] (I) HyP-2 with NaCl;
- [0131] (J) HyP-2 with NaCl(anion);
- [0132] (K) HyP-2 with NaCN;
- [0133] (L) HyP-2 with NaHSO₃;
- [0134] (M) HyP-2 with NaN₃;
- [0135] (N) HyP-2 with NaOAc;
- [0136] (O) HyP-2 with NaOH;
- [0137] (P) HyP-2 with NaSH;
- [0138] (Q) HyP-2 with NiCl₂;
- [0139] (R) HyP-2 with ZnCl₂;
- [0140] (S) HyP-2 with L-glutamine;
- [0141] (T) HyP-2 with L-glutathione;
- [0142] (U) HyP-2 with L-lysine;
- [0143] (V) HyP-2 with L-cysteine;
- [0144] (w) HyP-2 with DL-homocysteine;
- [0145] (X) HyP-2 with L-aspartic acid;
- [0147] 도 6의 (b)는 pH 4-9까지의 완충액을 용매로 하여 산성과 알칼리성의 pH 조건에서의 HyP-2의 형광특성을 나타낸 결과로, HyP-2가 하이드라진을 검출하는데 필요한 최적의 pH조건이 생물학적 pH 7.4를 포함하는 pH 6-9임을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 일 예에 따른 화합물 HyP-2는 체내의 금속이온이나 생체분자의 간섭을 받지 않고, 생체 내 pH의 조건에서도 하이드라진을 감지하여 형광 변화를 보임을 알 수 있다.
- [0149] **실시예 6. 하이드라진 감지 전후의 광안정성 확인**
- [0150] HyP-2 화합물의 하이드라진 결합 전후의 광안정성을 평가하기 위해, 일정 시간 (1시간)동안 동일한 광량의 자외선을 조사해 형광 세기의 변화를 확인하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0151] 구체적으로, 증류수가 용매인 조건에서 하이드라진 (1 mM)이 첨가된 HyP-2 (10 μM)에 25℃ 조건에서 자외선 손전등(365 nm, 3W)에 60분간 노출시켜주었고, 10분 간격으로 형광 세기의 변화를 측정해주었다. 측정에 사용한 형광장치와 큐벳은 실시예 2에 제시한 조건과 동일하다.
- [0152] 도 7에 나타난 바와 같이, HyP-2는 하이드라진과 결합한 형태에서도 자외선 조사 전 기준의 형광 세기로부터 약 80%의 형광 세기를 유지하였다. 이는 HyP-2는 하이드라진을 감지한 전후로 동등한 수준의 광안정성 (photostability)를 가진다는 것을 의미한다.
- [0154] **실시예 7. 하이드라진 검출용 스트립**
- [0155] HyP-2를 내포한 종이스트립을 제작하여 해당 스트립이 하이드라진을 만났을 때 형광색상의 변화를 가시적으로 현장에서 확인할 수 있는지를 도 8의 (a)와 같이 평가하였고, 그 결과를 도 8의 (b)에 나타내었다.
- [0156] 구체적으로, 사용된 종이스트립은 시중에서 판매되는 셀룰로오스 여과지(cellulose filter paper)를 이용하였고, HyP-2 (30 μM)을 종이스트립에 처리 후 농도별 하이드라진에 25℃ 조건에서 1분 이내로 반응시켜 그 형광 세기의 변화를 확인하였다.

[0157] 도 8의 (b)는 HyP-2 (30 μ M)을 처리하여 건조한 후, 100 mM의 하이드라진에 순간적으로 노출시켜주었을 때의 결과이다. 이 때, 용매가 물인 상태의 HyP-2는 형광을 보이지 않지만, 다이메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide)와 같은 점성이 있는 용매에서는 분자 로터의 회전이 감소하여 종이스트립상의 HyP-2는 반고체상태로 약한 붉은색을 띠었다. 30 μ M 농도의 HyP-2 종이스트립은 하이드라진에 노출된 1분 이내에 밝은 청색의 형광이 켜지며 하이드라진을 성공적으로 검출하였다.

[0158] 이를 통해 HyP-2를 처리한 종이스트립이 리트머스종이와 같이 액상의 하이드라진의 검출을 가시화할 수 있는 휴대용 도구로 적합함을 알 수 있었다.

[0160] 실시예 8. 증기상태 하이드라진의 검출

[0161] HyP-2가 증기상태의 하이드라진을 다른 물질의 간섭 없이 검출이 가능한지 확인하기 위해, 실시예 7과 동일한 조건의 종이스트립 (30 μ M의 HyP-2를 처리하여 자연건조)을 20 mL 바이알 뚜껑에 부착시킨 후 유리 바이알 안쪽 바닥에 일정량의 유기물질들을 처리하였다. 각 물질들을 증기화하기 위해 핫플레이트로 온도를 100 $^{\circ}$ C로 가열하였고, 그 결과 3분 이내의 짧은 반응시간 동안 도 9와 같이 종이스트립의 형광이 변화함을 확인하였다. 도 9는 HyP-2가 처리된 종이스트립에 각 유기물질의 증기 노출 전후의 형광변화를 카메라로 촬영한 결과이다.

[0162] 구체적으로, 도 9에 나타난 바와 같이 HyP-2이 처리된 종이스트립이 하이드라진 증기와 반응하여 형광의 청색이동 현상을 보였고, 특히 반응성이 높은 포름알데하이드(formaldehyde)의 간섭에도 HyP-2와 하이드라진의 반응이 오르소(ortho)-메톡시(methoxy)-메틸에테르(methyl ether) 작용기에 의해 충분한 반응성을 가짐을 확인하였다. 염산 (HCl)조건에서는 HyP-2의 공여체 부분에 해당하는 아민기의 프로톤화 (protonation, 양자부가)에 의해 형광이 소광되었다. 다이메틸아민(dimethylamine)에서 녹색으로의 형광변화를 보인 결과는 나프타알데하이드 중간체인 HyP-1의 생성과 관련이 있을 것으로 보이며, 오직 하이드라진을 포함한 시료에서만 청색의 형광을 나타냈다. 따라서, HyP-2는 기체상태의 하이드라진도 선택적으로 검출이 가능함을 알 수 있었다.

[0164] 실시예 9. 토양 내 하이드라진 검출

[0165] 토양 내에 존재하는 하이드라진 검출 특성을 확인하기 위하여, 도 10a에 나타난 바와 같이 세 종류의 흙(모래, 진흙, 밭흙)을 이용해 형광 변화를 모니터링하였다.

[0167] (1) HyP-1을 이용한 토양 내 하이드라진 검출

[0168] 먼저 HyP-1 자체가 토양 내에 존재하는 미량의 물질들과 반응하는지를 확인하기 위해, 3종의 토양 시료 1 g에 100 μ M의 HyP-1을 3 mL 처리하여 형광 변화를 관찰하였다. 그 뒤 10 mM 농도의 하이드라진이 처리된 3종의 토양 시료에 동일한 조건으로 HyP-1을 처리하여 실온의 조건에서 10분 경과 후 형광 변화를 관찰하였다.

[0169] 도 10b에 나타난 바와 같이, HyP-1은 하이드라진을 포함하지 않는 토양 시료에서 녹색의 형광을 나타내었고, 하이드라진을 포함하는 토양 시료에서는 형광 색깔의 변화가 일부 있었으나, 하이드라진에 의한 형광 변화를 육안으로 구별하기 어려웠으며, 특히 진흙(clay soil)과 밭흙(field soil)의 경우 하이드라진에 의한 형광 변화를 맨눈으로 추적하기 어려웠다. 각 사진은 자외선 조건(365 nm)하에서 촬영되었다.

[0171] (2) HyP-2를 이용한 토양 내 하이드라진 검출

[0172] HyP-2를 이용하여 도 10c와 같이 두 가지 유형 (파이펫, 분사)의 토양 내 하이드라진 검출실험을 수행하였다.

[0173] 첫 번째 검출 방법으로 하이드라진 용액 (100 mM, 3 mL)을 처리한 1 g의 3종의 흙 (모래, 진흙, 밭흙)에 HyP-2 (30 μ M, 4 μ L)를 파이펫을 이용해 떨어준 후 자외선 손전등 (365 nm; 좌측 3W/우측 6W)을 이용해 즉시 형광 변화를 관찰한 결과, 도 10d와 같이 HyP-2가 퍼져나가며 반응한 곳에 청색의 형광이 켜지는 것을 확인하였다.

[0174] 두 번째 검출방법으로 마른 흙에 하이드라진 용액 (100 mM, 100 μ L)을 국소적으로 처리해준 다음, HyP-2 (30 μ M)을 포함한 분무액을 열 차례 분사 후 자외선 손전등 (365 nm; 우측 6W)을 이용해 즉시 형광 변화를 관찰한 결과, 도 10e와 같이 하이드라진이 처리된 위치에서만 청색의 형광이 켜짐을 확인하였다.

[0175] 도 10d 및 도 10e에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2는 실제 환경조건에서 하이드라진을 성공적으로 검출하였으며, 특히 HyP-2는 존재하지 않던 형광이 발생하는 형광-켜짐 기반 시스템 (turn-on system)이기 때문에, 실제 응용 실험에서 맨눈으로 쫓아가며 형광 변화를 구별하는 것이 불확실한 형광-비율 기반 HyP-1보다 드라마틱한 형광 변화를 나타내어 정확한 하이드라진 검출이 가능한 효과를 가졌다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 HyP-2는 토양 시료 내에 하이드라진이 존재할 때 파이펫으로 HyP-2를 떨어뜨리자마자 그 위치로부터 형광이 퍼져나가며 실시간 관찰이 가능하고, 토양 시료의 일부에 하이드라진이 포함되어 있는 경우에도 HyP-2의 스프레이 분사에 의해 충분한 세기의 형광 신호가 맨눈으로 확인 가능하여, 토양 시료 채취 후 검출용 조성물을 첨가하여 혼합하는 검출을 위한 과정 없이 하이드라진 검출이 가능하여, 하이드라진 검출을 위한 절차가 간소화되는 장점이 있었다.

[0177] 실시예 10. 실제 채수 샘플 내 하이드라진 검출

[0178] HyP-2를 이용해 실제 환경 내에 존재하는 채수 샘플을 용매로하여 하이드라진을 검출해낼 수 있는지 확인하기 위하여, 제시된 일곱 종류의 물 (증류수, 바닷물, 호수물, 강물, 수돗물, 식수1, 식수2)을 이용해 형광 변화를 모니터링하였다.

[0179] 구체적으로, HyP-2 자체가 각각의 채수된 물에 존재하는 미량의 물질들과 반응하는지 형광 변화를 통해 확인한 후, 서로 다른 종류의 물에 동일한 농도의 하이드라진 용액 (1 mM)을 처리한 뒤 형광 변화를 확인하였다 (도 11). 환경 내 물에서의 응용 여부를 보기 위해 사용된 HyP-2의 농도는 10 μ M로 도 11의 (a) 그래프에 나타난 바와 같이, 459 nm에서 보이던 HyP-2의 최대 흡광값이 하이드라진과 반응하자 336-338 nm에 해당하는 파장대로 피크(peak)가 이동하는 양상을 보였다. 형광이 없던 프로브는 도 11 (b) 그래프에서처럼 각각의 환경샘플에서 각기 다른 형광세기를 보이지만 결과적으로 하이드라진에 반응하여 청색의 형광이 커지는 것을 확인하였다. 도 11의 (c)는 자외선 손전등(365 nm)을 이용해 각각의 반응물을 측정된 결과 (상단: 하이드라진 반응 전, 하단: 하이드라진 반응 후)로, A-G에 해당되는 물의 종류는 다음과 같았다:

[0180] (A) HyP-2 with deionized water;

[0181] (B) HyP-2 with sea water;

[0182] (C) HyP-2 with lake water;

[0183] (D) HyP-2 with river water;

[0184] (E) HyP-2 with tap water;

[0185] (F) HyP-2 with bottled water1;

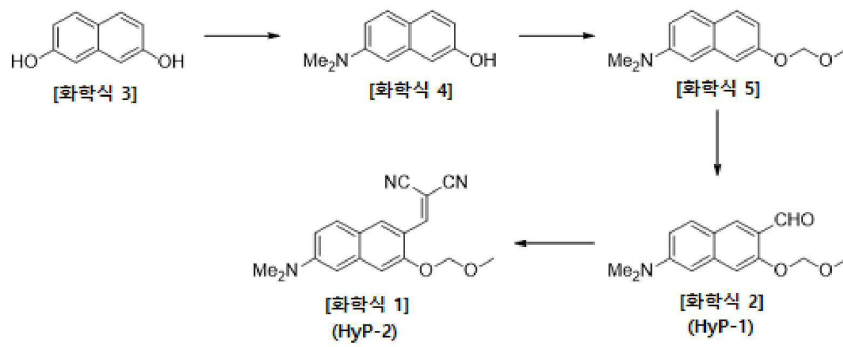
[0186] (G) HyP-2 with bottled water2.

[0188] 도 11의 그래프 (d)에서 막대바는, 도 11의 (c) 사진의 형광세기를 이미지J(미국국립보건원 제공) 프로그램을 이용해 분석한 결과로, 도 11의 (e)그래프 또한 이와 동일한 방법으로 분석하여 막대그래프로 나타내었다. 이때, 하이드라진의 농도는 (e)에 표기된 것과 같이 0-500 μ M로 연속희석법을 이용해 고농도에서 저농도까지의 하이드라진 검출여부를 평가한 결과이다. 따라서, 실제 환경 내에서 채수한 물을 용매로 했을 때, 환경 내에서 HyP-2의 하이드라진 검출 효능을 단편적으로 보여준 결과이다.

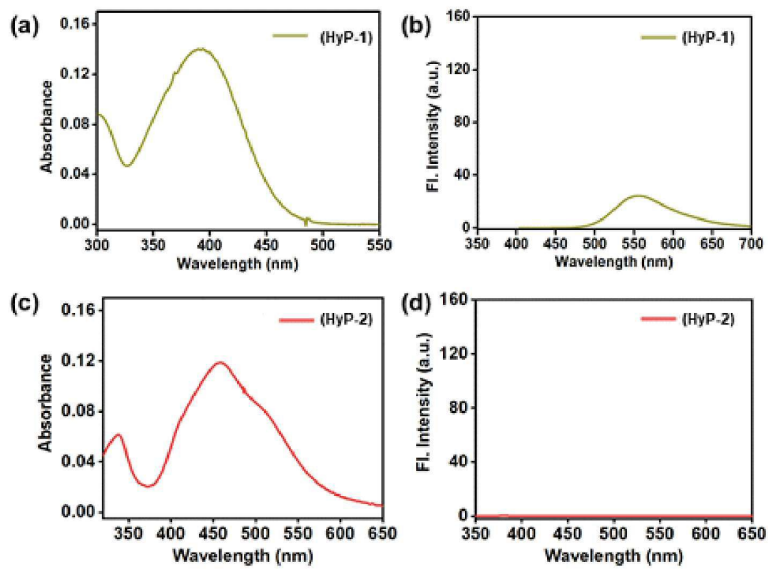
[0190] 기술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

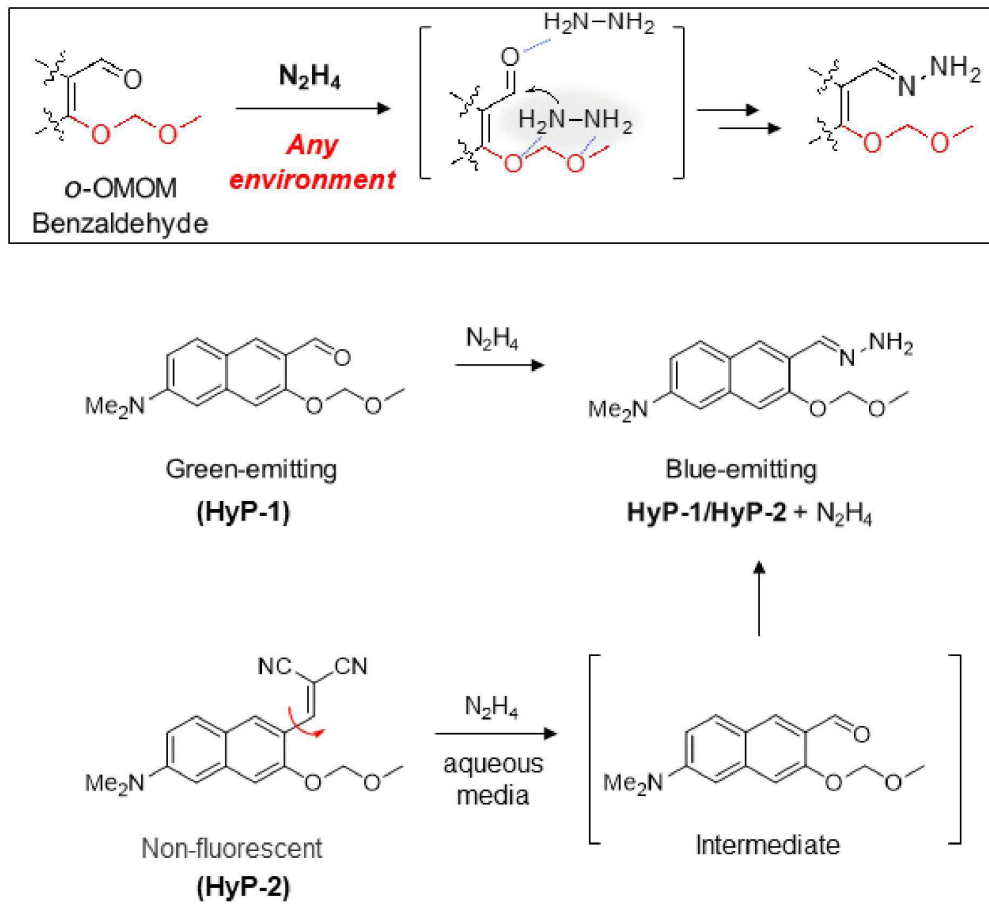
도면1



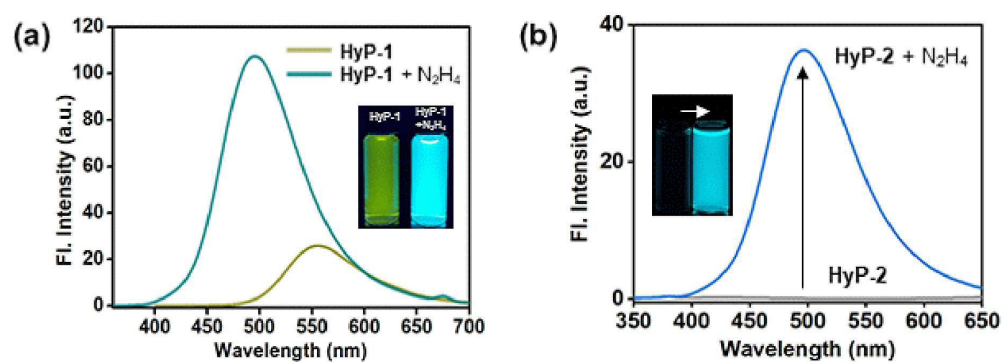
도면2



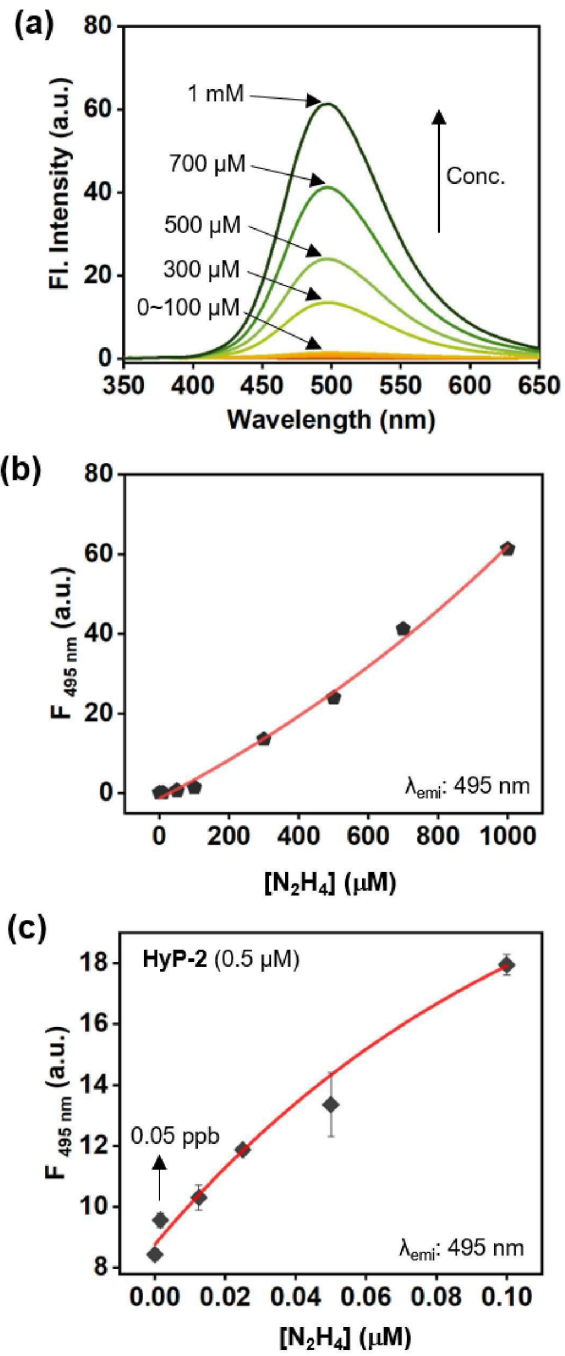
도면3



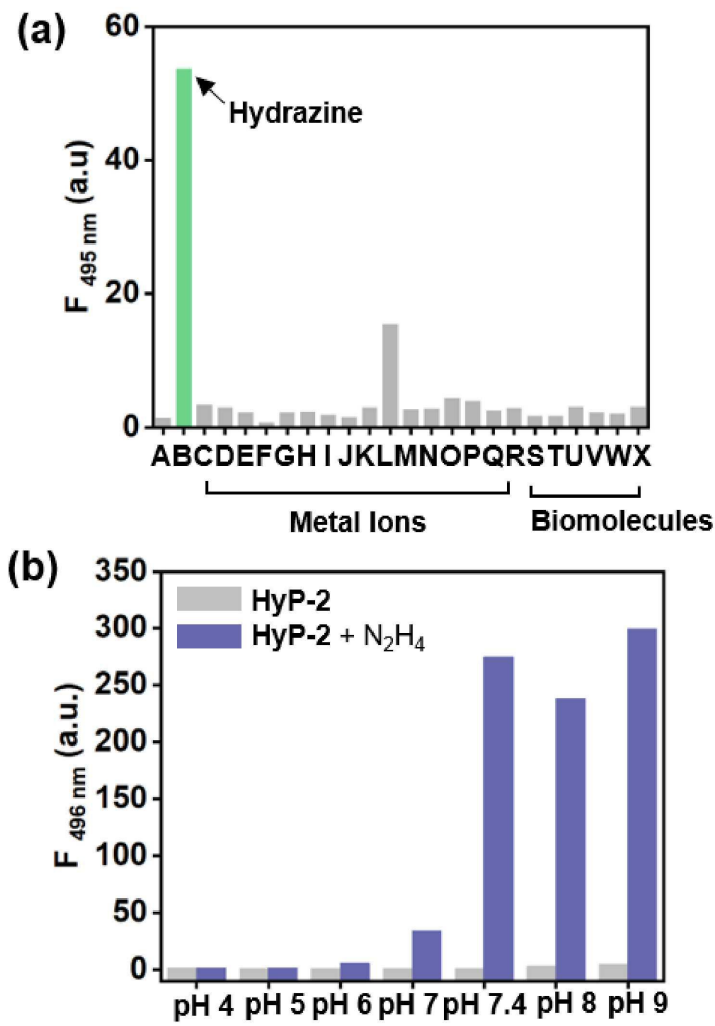
도면4



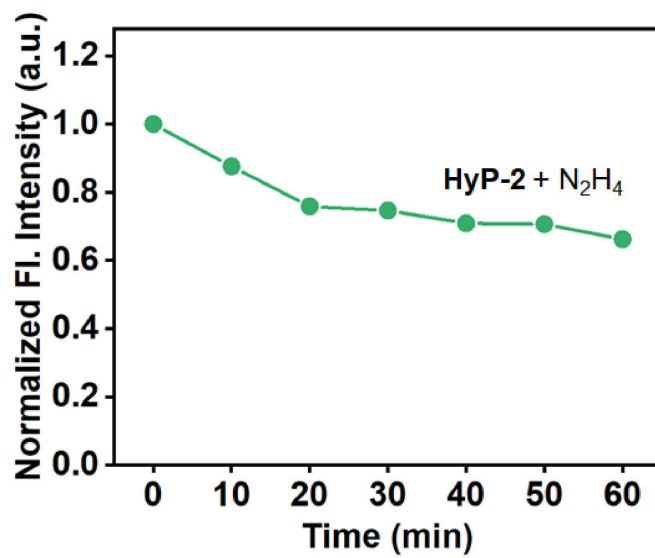
도면5



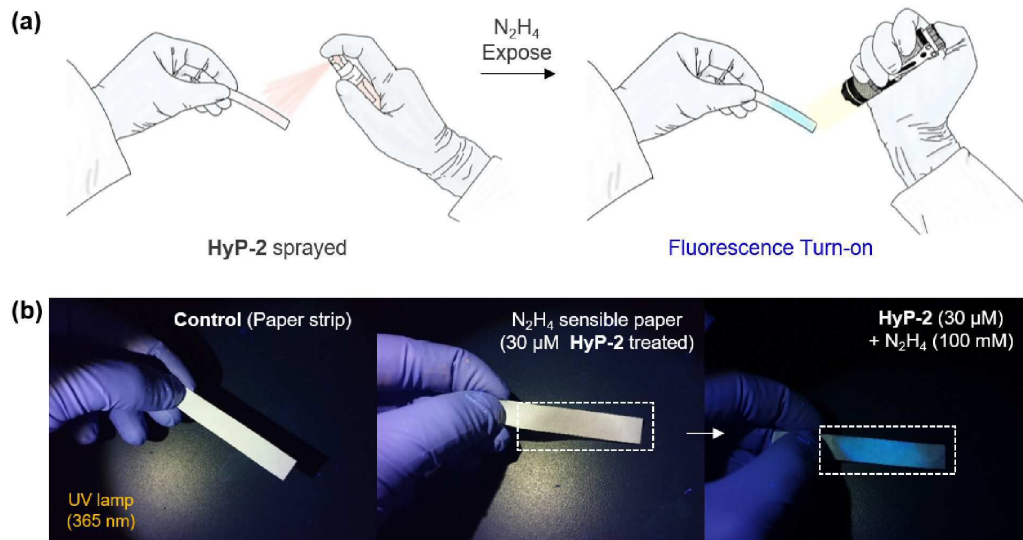
도면6



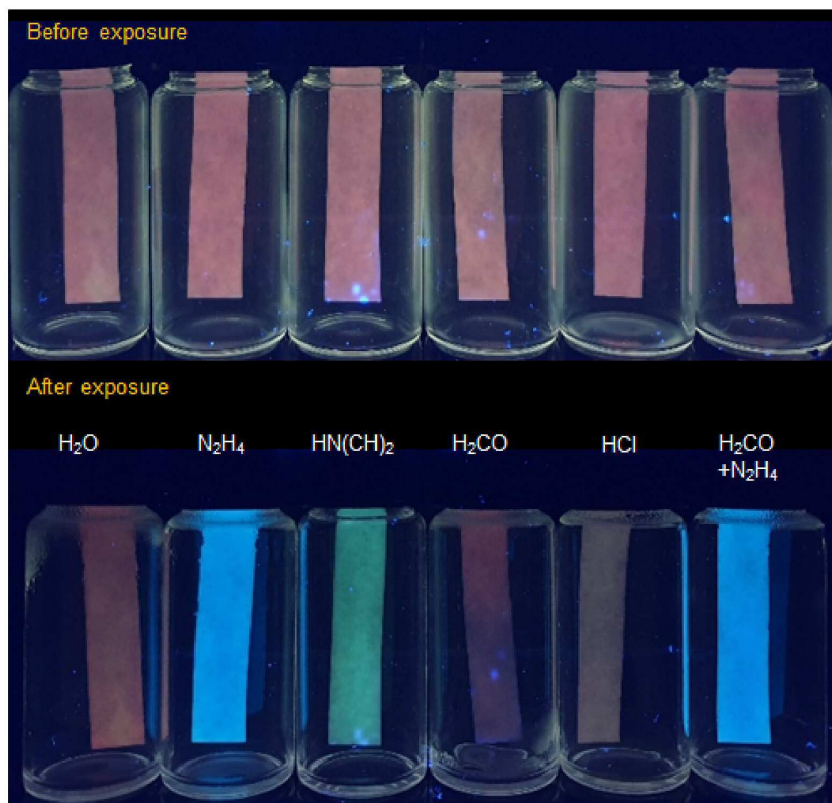
도면7



도면8



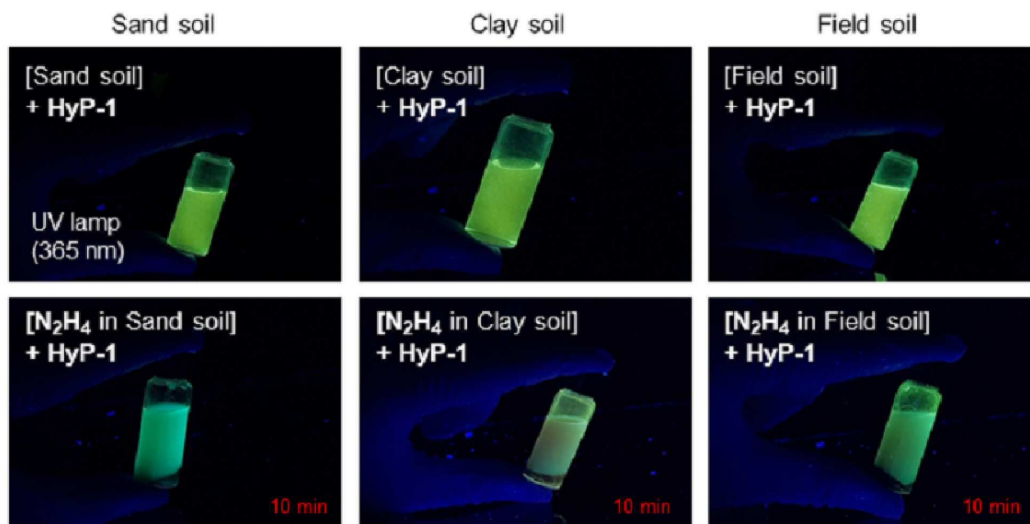
도면9



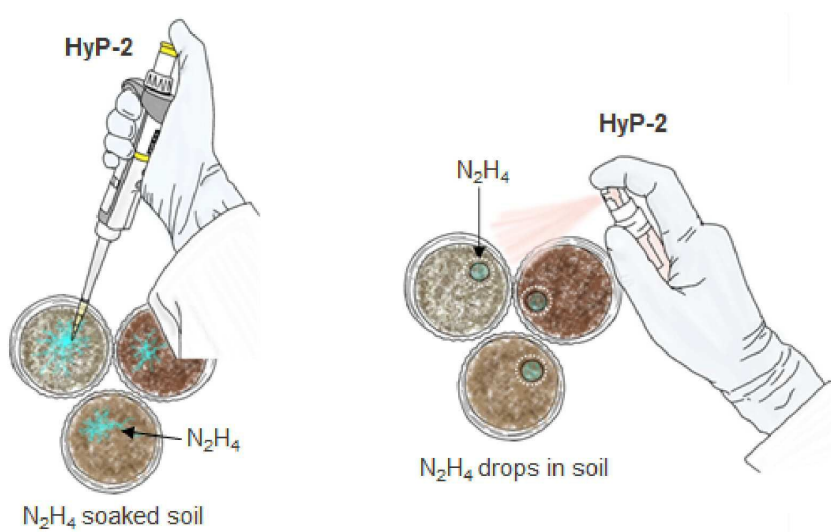
도면10a



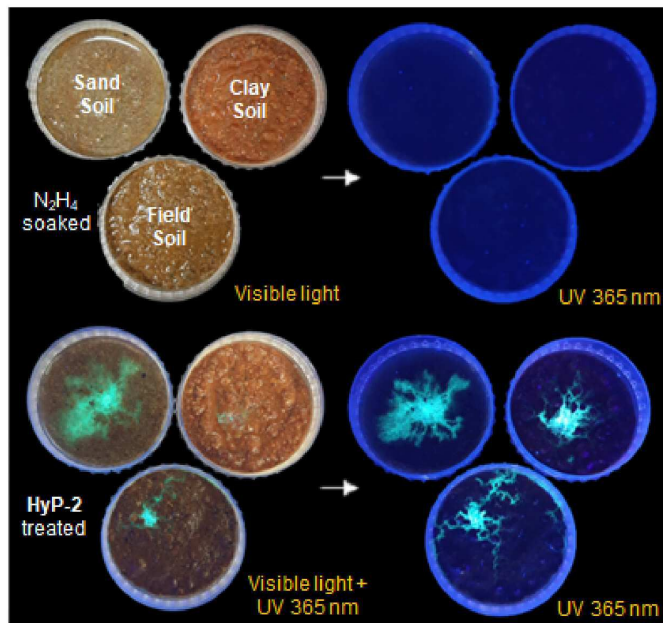
도면10b



도면10c



도면10d



도면10e



도면11

