



등록특허 10-2267067



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월21일

(11) 등록번호 10-2267067

(24) 등록일자 2021년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 31/22 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 31/22 (2013.01)

G01N 21/643 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0005909

(22) 출원일자 2020년01월16일

심사청구일자 2020년01월16일

(56) 선행기술조사문헌

US20160116455 A1*

KR1020180106005 A

US20040076979 A1

US20140377791 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김도경

서울특별시 마포구 창전로 26, 101동 1602호(신정동, 서강GS아파트)

정유나

서울특별시 양천구 신정로7길 75, 104동 508호(신정동, 이든채)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 5 항

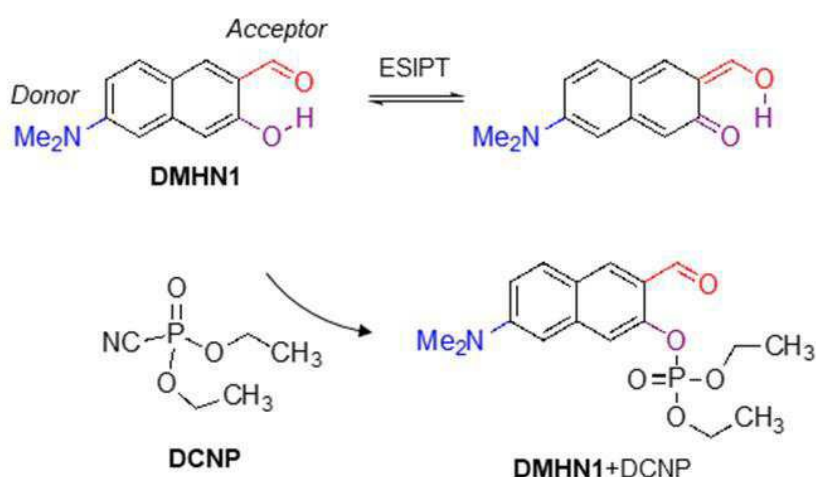
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출용 형광 프로브 화합물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출용 형광 프로브 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 형광 프로브 화합물은 다이에틸싸이아노포스포네이트에 대한 높은 민감도와 빠른 반응시간을 가지기 때문에 화합물을 이용한 환경적 활용이 가능하며, 특히, 주어진 환경조건 하에서 실시간으로 다이에틸싸이아노포스포네이트의 검출을 모니터링 할 수 있다는 점에서 신경작용제의 환경 내 유무확인 및 이와 관련된 모든 응용 연구분야에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 2021/6439 (2013.01)

G01N 2430/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345298131
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업/일반연구자지원사업
연구과제명	알츠하이머병 내 아밀로이드-베타 응집체 분해 기능의 나노입자 개발
기 여 율	70/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20190480
부처명	한국연구재단(통합)
과제관리(전문)기관명	한국연구재단(학술진흥)
연구사업명	이공분야기초연구사업/중점연구소지원사업
연구과제명	이지바로[중점연구소(이공),2/3] 경희대학교 의과학 연구소 - 활성산소 조절을 통한
만성질환 예방 치료에 관한 연구	
기 여 율	30/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.02.28

공지예외적용 : 있음

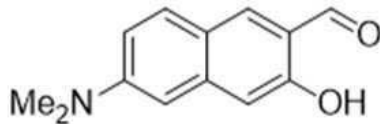
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물을 포함하는, 다이에틸싸이아노포스포네이트 (diethylcyanophosphate) 검출용 형광 프로브:

[화학식 1]



청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 화합물 내에 오쏘(ortho)-히드록시(hydroxy)-벤즈알데하이드(benzaldehyde) 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는, 형광 프로브.

청구항 3

◆청구항 3은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

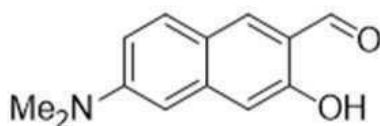
제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 다이에틸싸이아노포스포네이트와의 친핵성 치환 반응을 통해 오쏘-히드록시-벤즈알데하이드의 구조 내 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이(Excited-State Intramolecular Proton Transfer)에 의한 퀀칭(quenching) 효과가 깨어질 때 형광을 나타내는 것을 특징으로 하는, 형광 프로브.

청구항 4

하기 화학식 1의 화합물을 포함하는 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출용 키트:

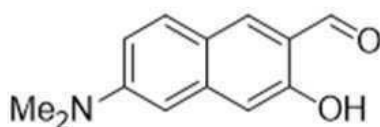
[화학식 1]



청구항 5

하기 화학식 1의 화합물을 이용한 다이에틸싸이아노포스포네이트의 검출 방법:

[화학식 1]



청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 검출 방법은,

상기 화학식 1의 화합물에 다이에틸싸이아노포스포네이트를 포함하는 시료를 첨가하고, UV 광을 조사하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 다이에틸싸이아노포스의 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출용 형광 프로브 화합물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경작용제는 유기화합물의 일종으로 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine)을 조절할 수 있는 효소인 아세틸콜린에스테레이스(AChE)를 차단함으로써 중추신경계의 균형을 파괴한다. 그 중에서도 G-시리즈의 유기인산화합물 유도체(organophosphonate derivatives, $R^1O(P=O)R_2 OR_3$)인 사린(GB), 소만(GD), 타분(GA)는 극도로 낮은 농도에서도 높은 독성을 나타내기 때문에 인체유해물질로 알려져 있다. 이러한 이유로 인해, 신경작용제를 선택적이고 민감하게 감지할 수 있는 여러 분석 기술이 개발되고 있으며 이를 이용한 방어체계, 해독 및 안전관리법들이 꾸준히 개발되고 있다(Chem. Soc. Rev. 2013, 42, 9251; Chem. Soc. Rev. 2008, 37, 470; Chem. Soc. Rev. 2017, 46, 3357).

[0003] 신경작용제의 대표적인 분석방법으로는 질량분석법(mass spectrometry), 이온이동성분광법(ion mobility spectrometry), 광자결정(photonic crystal) 등의 장비기반 분석기술들이 알려져 있다. 하지만 기존 분석 방법의 경우 낮은 민감도와 선택성, 복잡한 기기 사용법과 추가적인 전처리 과정, 값비싼 분석비용과 더불어 큰 부피로 인해 휴대가 어려워 현장에서 실시간 검출 방법으로 사용되기에는 제한이 있다는 점에 문제점이 있다.

[0004] 이에, 이러한 문제점을 획기적으로 개선할 수 있는 방법으로 형광 프로브를 이용하여 신경작용제를 검출하는 기술의 개발이 활발하게 이루어지고 있다(Chem. Soc. Rev. 2015, 115, 7893; Chem. Soc. Rev. 2015, 115, 7944).

[0005] 현재까지 다이에틸싸이아노포스포네이트(DNCP, diethylcyanophosphonate)를 특이적으로 감지할 수 있다고 알려진 형광 프로브 시스템은 (i) 다이에틸싸이오노포스포네이트에 의한 피리딘(pyridine), 알킬-알코올(alkyl-alcohol), 페놀릭-알코올(phenolic-alcohol), 아민(amine)과 같은 작용기의 인산화 반응에 따른 형광 변화, (ii) 다이에틸싸이오노포스포네이트에 의한 하이드록시-이민(hydroxy-imine) 작용기의 나이트릴(nitrile)로 치환되는 반응에 따른 형광 변화와 같은 화학 반응 기반의 작동 메커니즘을 가진다.

[0006] 하지만, 다이에틸싸이아노포스포네이트에 대한 높은 민감도와 선택성을 가지는 것과 동시에 환경 내 실시간 검출을 할 수 있는 형광 프로브는 그 중요성에도 불구하고 아직까지 개발된 바 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 합성의 과정이 용이하고, 인체에 높은 독성을 가지는 다이에틸싸이아노포스포네이트와 상호작용하여 형광을 발하고, 표적물질만을 특이적으로 검출할 수 있는 형광 프로브 화합물을 개발하였다. 이 형광 프로브 화합물은 정량적으로 표적물질의 양에 따른 형광세기의 증가를 보이며, 알려진 다른 신경작용제들과 다이에틸싸이아노포스포네이트를 구분하여 감지할 수 있는 선택성을 가진다. 또한 개발된 형광 프로브 화합물은 표적물질과의 빠른 반응시간으로 현장에서 실시간으로 활용이 가능한 검출 키트로 이용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 오쏘(ortho)-히드록시(hydroxy)-벤즈알데하이드(benzaldehyde) 나프탈렌 기반 화합물을 이용하여 신경작용제 타분(Tabun, GA)의 유사체인 다이에틸싸이아노포스포네이트(DNCP, diethylcyanophosphonate)를 선택적으로 감지하기 위한 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출 키트를

제공하는 것이다.

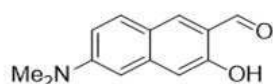
[0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형광 프로브 화합물을 이용한 다이에틸싸이아노포스포네이트의 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 다이에틸싸이아노포스포네이트 (diethylcyanophosphonate) 검출용 형광 프로브 화합물을 제공한다:

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 프로브 화합물은 화합물 내에 오쏘(ortho)-히드록시(hydroxy)-벤즈알데하이드(benzaldehyde) 구조를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 형광 프로브 화합물은 다이에틸싸이아노포스포네이트와의 친핵성 치환 반응을 통해 오쏘-히드록시-벤즈알데하이드의 구조 내 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이(Excited-State Intramolecular Proton Transfer)에 의한 퀀칭(quenching) 효과가 깨어질 때 형광을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출용 키트를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 이용한 다이에틸싸이아노포스포네이트의 검출 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 검출 방법은 형광 프로브 화합물에 다이에틸싸이아노포스포네이트를 포함하는 시료를 첨가하고, UV 광을 조사하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 형광 프로브 화합물은 신경작용제 타분(Tabun, GA)의 유사체인 다이에틸싸이아노포스포네이트를 선택적으로 감지하여 형광 신호를 제공할 수 있다. 또한, 상기 형광 프로브 화합물을 이용하여 다이에틸싸이아노포스포네이트를 포함하고 있는 임의의 환경 내 분석물을 채취하여 실시간으로 분석할 수 있다.

[0020] 특히, 본 발명의 형광 프로브 화합물은 합성의 단계가 용이하며, 양극성의 나프탈렌 구조인 오쏘(ortho)-히드록시(hydroxy)-벤즈알데하이드(benzaldehyde) 화합물의 구조적 특성에 의한 들뜬 상태 분자내 양성자 전이(ESIPT, Excited-State Intramolecular Proton Transfer) 현상을 가진다. 신경작용제인 다이에틸싸이아노포스포네이트는 화합물의 구조 내의 들뜬 상태 분자내 양성자 전이현상을 억제시키며 분자 프로브 화합물의 형광을 켜짐(turn-on)하게 되며, 이는 유사한 구조의 G-시리즈인 신경작용제들의 간섭 없이 특이적으로 형광의 증가를 보인다는 점에서 기존의 낮은 선택성을 가지는 형광 프로브의 문제점을 극복하였다.

[0021] 또한, 본 발명의 형광 프로브 화합물은 토양과 같은 환경조건에서도 다이에틸싸이아노포스포네이트를 감지할 수 있고, 휴대가 간편한 검출 키트의 형태로 제 자리에서 짧은 시간 내에 다이에틸싸이아노포스포네이트의 감지가 가능한 새로운 방법을 제공하여 실제 군사적 용도(전쟁)나 대테러 예방 도구, 환경 내 분포여부와 같은 여러 분야에서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)의 흡수 및 형광 그래프를 주어진 용매조건 하에서 측정한 결과를 나타낸 것이다.

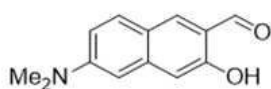
도 2는 고해상도 질량분석기(High resolution mass spectra; JMS-700 spectrometer, JEOL, Tokyo, Japan)를 이용하여 반응이 종료된 생성물의 질량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

- 도 3은 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)의 다이에틸싸이아노포스포네이트에 대한 반응 메커니즘을 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)과 다이에틸싸이아노포스포네이트를 반응시켰을 때 다이에틸싸이아노포스포네이트 농도에 따른 형광의 증가 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 최대 형광 파장대에서의 다이에틸싸이아노포스포네이트의 농도(0 내지 1 mM)에 대한 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)의 형광세기의 상관관계 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 낮은 농도에서의 다이에틸싸이아노포스포네이트(0 내지 10 μ M)에 대한 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)의 형광세기의 상관관계 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)의 다이에틸싸이아노포스포네이트에 대한 선택성을 형광 변화를 통해 확인한 결과이다.
- 도 8은 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)과 다이에틸싸이아노포스포네이트의 반응이 3분간 진행되었을 때의 최대 형광파장(486 nm)을 기준으로 형광세기의 증가량을 분석한 결과이다.
- 도 9는 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)의 토양 조건 하에서 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출여부를 확인한 결과를 사진으로 나타낸 것이다.
- 도 10은 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)의 토양 조건 하에서 다이에틸싸이아노포스포네이트와의 반응시간에 따른 형광세기의 변화를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 11은 다이에틸싸이아노포스포네이트를 포함하는 각 흙의 종류에 따른 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)의 시간별 형광세기 변화를 사진으로 나타낸 것이다.
- 도 12는 다이에틸싸이아노포스포네이트를 포함하는 각 흙의 종류에 따른 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)의 시간별 형광세기 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 13은 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)을 이용한 다이에틸싸이아노포스포네이트의 실시간 현장검출 과정을 나타낸 것이다.
- 도 14는 본 발명에 따른 화합물(DMHN1)을 현장검출 키트로 제작하여 다이에틸싸이아노포스포네이트를 실시간으로 검출한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 다이에틸싸이아노포스포네이트 (DNCP, diethylcyanophosphonate) 검출용 형광 프로브 화합물을 제공한다.

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] 본 발명의 상기 형광 프로브 화합물은 오쏘(ortho)-히드록시(hydroxy)-벤즈알데하이드 (benzaldehyde) 구조를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 또한, 상기 형광 프로브 화합물은 다이에틸싸이아노포스포네이트와의 친핵성 치환 반응을 통해 오쏘-히드록시-벤즈알데하이드의 구조 내 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이(ESIPT, Excited-State Intramolecular Proton Transfer)에 의한 퀸칭(quenching) 효과가 깨어질 때 형광을 나타낼 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에서 개발된 상기 화학식 1의 화합물의 DMHN1의 감지 메커니즘을 규명하였으며, 이는 DMHN1과 다이에틸싸이아노포스포네이트 사이의 친핵성 치환 반응 (nucleophilic substitutions)을 통해 오쏘-하이드록시-벤즈알데하이드의 구조 내 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이(ESIPT, Excited-State Intramolecular Proton Transfer)에 의한 퀸칭(quenching)효과가 깨어지면서 형광을 나타내는 것임을 확인하였다(실시예 3).

[0029] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에서 개발된 상기 화학식 1의 화합물을 형광 프로브로 이용하여 형광 특성 확인 등을 수행 하였으며, 이를 통해 본 발명의 화학식 1의 화합물이 다이에틸싸이아노포스포네이트를 포함하는

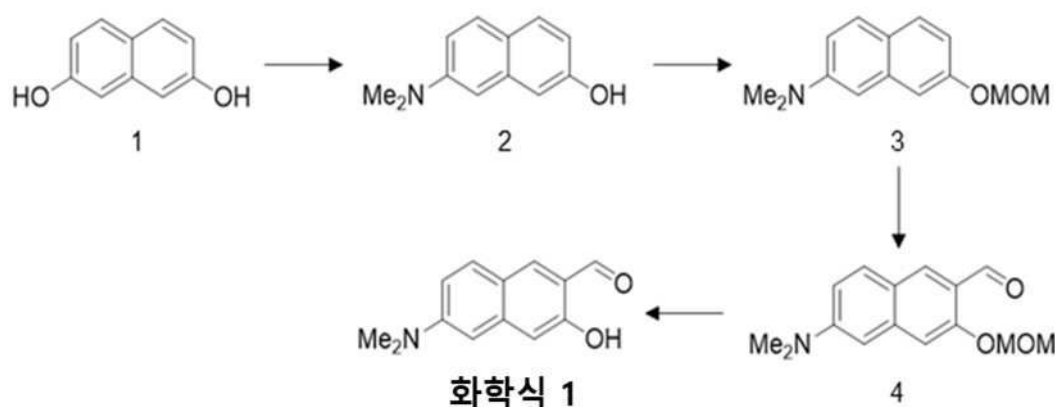
시료에 대하여 선택적으로 형광 켜짐 현상(fluorescence turn-on)을 나타냄을 확인하였다(실시예 5).

- [0030] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출용 키트를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에서 개발된 상기 화학식 1의 화합물에 토양시료를 첨가하여 토양시료에 포함된 다이에틸싸이아노포스포네이트를 검출할 수 있음을 확인함으로써, 실시간 현장검출 키트로의 적용할 수 있음을 확인하였다(실시예 6 및 7).
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 이용한 다이에틸싸이아노포스포네이트의 검출 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 상기 검출 방법은 형광 프로브 화합물에 다이에틸싸이아노포스포네이트를 포함하는 시료를 첨가하고, UV 광을 조사하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 화학식 1의 화합물의 다이에틸싸이아노포스포네이트의 검출 방법이 유효함을 확인하였다(실시예 7).
- [0036] 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 다이에틸싸이아노포스포네이트에 대한 높은 민감도와 빠른 반응시간을 가지기 때문에 화합물을 이용한 환경적 활용이 가능하며, 특히, 주어진 환경조건 하에서 실시간으로 다이에틸싸이아노포스포네이트의 검출을 모니터링 할 수 있다는 점에서 신경작용제의 환경 내 유무확인 및 이와 관련된 모든 응용 연구분야에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0040] **실시예 1. 형광 프로브 화합물(DMHN1)의 합성 및 구조 분석**

[0041] 본 발명자들은 나프톨(naphtol)이 다이에틸싸이아노와 친핵성 치환 반응을 통해 형광 프로브 내의 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이를 종결시킨다는데 착안하여, 다이에틸싸이아노포스포네이트와 친핵성 치환 반응을 할 때 광학적 성질에 변화를 가져올 수 있는 형광 프로브를 개발하기 위하여, 하기 도식 1에 따라 화학식1의 화합물을 합성하게 되었다.

[0042] [도식 1]



- [0043]
- [0045] (1) 7-(다이메틸아미노)나프탈렌-2-올 (7-(dimethylamino)naphthalen-2-ol)(상기 도식 1에서 1번 화합물)의 합성
- [0046] 7-(다이메틸아미노)나프탈렌-2-올; 7-(dimethylamino) naphthalen-2-ol 의 합성을 수행하였다.
- [0047] 구체적으로, 합성 출발 물질인 상기 도식 1에서 1번 화합물(1 g, 6.243 mmol, Sigma-aldrich, D116408)과 소듐 메타바이설페이트($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 2.374 g, 12.486 mmol)가 들어있는 밀폐유리용기(sealed-tube)에 다이메틸아민 수용액(dimethylamine solution, 40 % in H_2O , 3.95 mL, 31.215 mmol)과 물(H_2O , 2.67 mL)을 첨가한 다음 뚜껑, 테플론 및 절연테이프를 이용해 용기의 입구를 막았다. 이 혼합물을 실리콘 오일 용기를 이용하여 150 °C에서 4 시간 동안 교반시켰다. 반응을 종결시키기 위해 먼저 상온(25 °C)으로 반응물의 온도를 낮춘 후 용기를 열어 에틸 아세테이트(ethylacetate, 100 mL), 물(100 mL), 포화 소금물(30 mL)을 넣고 분별 깔때기를 이용하여 유기층을 추출하였다. 추출을 통해 얻어진 에틸아세테이트 유기층 내 존재하는 물을 무수황산나트륨(Na_2SO_4 , 1 g)의

로 건조하고, 흡기기(evaporator)를 이용하여 농축하였다. 이렇게 얻어지는 열은 갈색의 고체 화합물을 실리카 겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피(column chromatograph)를 이용하여 분리(전개 액: 20 % EtOAc/Hexane)하여 흰색 고체의 상기 도식 1에서 2번 화합물(710 mg, 60 %)을 얻었다. 생성된 화합물을 박막 크로마토그래피(TLC, thin layer chromatography, silical gel 60F-254 glass plate, Merck)로 분석하면 $R_f = 0.25$ (20 % EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 갖는다.

[0048] ^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).

[0049] ^{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.

[0050] HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}$ 187.0997 found 187.0999.

[0052] (2) 7-(메톡시메톡시)-*N,N*-다이메틸나프탈렌-2-아민(7-(methoxymethoxy)-*N,N*-dimethyl naphthalen-2-amine)의 합성

[0053] 7-(메톡시메톡시)-*N,N*-다이메틸나프탈렌-2-아민(상기 도식 1에서 2번 화합물)의 합성을 수행하였다.

[0054] 구체적으로, 다이메틸포름아마이드(DMF, *N,N*-dimethylformamide, 5 mL) 용매에 소듐 하이드라이드(NaH, sodium hydride, 235 mg, 5.875 mmol)를 넣고 아르곤(argon) 풍선을 꽂아 준 후, 포화 소금물과 얼음을 이용하여 -15 °C로 온도를 낮추어 주었다. 이 혼합 용액에 2번 화합물(1 g, 5.34 mmol)을 DMF (5 mL)에 녹인 후, 온도를 유지한 상태에서 약 5분간 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 이 과정에서 수소 기체(H_2 gas)가 발생하게 되는 데, 이를 실리콘오일 트랩(silicon oil trap)을 거치게 하여 옥외로 배출시켰다. 동일한 온도에서 1시간 교반시킨 후, 트랩에서 방출(H_2 gas)이 더 이상 발생하지 않는 것을 확인하였다. 이어서, 클로로메틸 메틸 에테르(chloromethyl methyl ether, 0.4 mL, 5.34 mmol)를 약 5분간 서서히 한 방울씩 넣어주었다. 주입이 완료되면, 온도를 상온 (25 °C)으로 바꾸어주고, 6시간을 교반시켰다. 6시간 후, 물(100 mL)를 넣어주고, 에틸아세테이트(EtOAc, 200 mL)를 이용하여 추출을 수행하였다. 추출을 통해 얻어진 에틸아세테이트 유기층 내 존재하는 물을 무수황산나트륨(10 g)으로 건조하고, 건조된 에틸아세테이트 유기층을 흡기기를 이용해 농축하였다. 이렇게 얻어진 열은 갈색의 액체 화합물은 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피 방법을 통하여 분리(전개 액: 5 % EtOAc/Hexane)하며, 흰색의 고체 화합물(상기 도식 1에서 3번 화합물)(988 mg, 80 %)을 얻었다. 생성된 화합물을 박막 크로마토그래피로 분석하면 $R_f = 0.45$ (20% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 갖는다.

[0055] ^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).

[0056] ^{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.

[0057] HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ 231.1259 found 231.1262.

[0059] (3) 6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)-2-나프탈알데하이드(6-(dimethylamino)-3-(methoxymethoxy)-2-naphthaldehyde)의 합성

[0060] 6-(다이메틸아미노)-3-(메톡시메톡시)-2-나프탈알데하이드(상기 도식 1에서 3번 화합물)의 합성을 수행하였다.

[0061] 구체적으로, 100 mL 라운드 바텀 플라스크(round-bottom flask)에 3번 화합물(2.2606 g, 9.774 mmol)을 넣은 후, 아르곤 풍선을 꽂아주었다. 이어서 다이에틸 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 교반하였다. 이때 색깔은 점차 밝은 노란색으로 변하였다. 1시간 교반 후, 4N HCl(10 mL)와 1차 증류수(10 mL)를 넣어주고 10분간 교반하였다. 10분 후, 에틸아세테이트(300 mL)와 포화 소금물(100 mL), 물(200 mL)를 이용하여 추출과정을 수행하였다. 추출을 통해 얻어진 에틸아세테이트

유기층 내 존재하는 물을 무수황산나트륨(15 g)으로 건조하고, 흡기기를 이용하여 농축하였다. 이렇게 얻어지는 밝은 노란색의 고체 화합물은 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리(전개 액: 20 % EtOAc/Hexane)하여 밝은 노란색의 고체 상기 도식 1에서 4번 화합물(1.27 g, 50 %)을 얻었다. 생성된 화합물을 박막 크로마토그래피로 분석하면 $R_f = 0.25$ (20% EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 갖는다.

[0062] ^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).

[0063] ^{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.

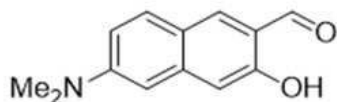
[0064] HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ 259.1208 found 259.1211.

[0066] (4) 6-(다이메틸아미노)-3-하이드록시-2-나프탈알데하이드(6-(dimethylamino)-3-hydroxy-2-naphthaldehyde)(화학식 1의 화합물)의 합성

[0067] 6-(다이메틸아미노)-3-하이드록시-2-나프탈알데하이드의 합성을 수행하였다.

[0068] 구체적으로, 25 mL 라운드 바텀 플라스크에 상기 도식 1에서 4번 화합물(195 mg, 0.75 mmol)과 아이소프로필 알콜(isopropyl alcohol, 10 mL), 5M HCl (5 mL)를 넣어준 후 60 °C에서 3시간을 교반하였다. 3시간 후, 상온으로 플라스크를 식힌 후 아이소프로필 알콜은 흡기기에서 제거하고, 에틸 아세테이트(100 mL)와 물(100 mL)를 이용하여 추출과정을 수행하였다. 추출을 통해 얻어진 에틸아세테이트 유기층 내 존재하는 물을 무수황산나트륨(3 g)으로 건조하고, 흡기기를 이용하여 농축하였다. 이렇게 얻어지는 노란색의 고체 화합물을 실리카겔을 이용한 관 크로마토그래피방법을 이용하여 분리(전개 액: 20 % EtOAc/Hexane)하여 노란색의 하기 화학식 1의 화합물(113 mg, 70%)을 얻었다.

[0069] [화학식 1]



[0070]

[0071] 상기 화학식 1의 화합물을 박막 크로마토그래피로 분석하면 $R_f = 0.35$ (20 % EtOAc/Hexane - 1회 전개)의 전개 값을 갖는다.

[0072] ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 293K): δ 10.54(s, 1H), 9.89(s, 1H), 7.90(s, 1H), 7.70-7.67(d, 1H), 7.02-6.98(m, 2H), 6.66-6.65(d, 1H), 3.13(s, 6H).

[0073] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 293K): δ 195.26, 156.83, 151.39, 140.62, 137.75, 130.87, 120.63, 119.03, 114.18, 108.73, 103.22, 40.26.

[0074] HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ 215.0946 found 259.0946.

[0075] 이때, 본 발명에서 개발된 상기 화학식 1의 화합물을 DMHN1이라 명명하였다.

[0077] 실시예 2. 형광 프로브 화합물(DMHN1)의 흡수 및 형광 특성 확인

[0078] 아래의 주어진 용매조건 하에서 DMHN1의 흡수 및 형광 그래프를 측정하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0079] 물질의 흡광특성(absorbance)을 분석하기 위해서 흡수 분광광도계 (UV/Vis spectrophotometer; Agilent Technologies Cary 8454, USA)를 사용하였고, 형광세기(fluorescence intensity)를 측정하기 위해서 형광기 (spectro-fluorophotometer; SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였다. 흡광과 형광 스펙트럼 측정 시에 사용되는 유리 큐벳(cuvette)으로는 사면이 1 cm 두께를 가진 표준 석영셀 (standard quartz cell; interanl volume= 0.1 cm, Hellma Analytics, Jena, Germany)을 이용하였다.

[0080] 도 1의 그래프는 용매가 아세토나이트릴 (acetonitrile, 99%)과 트리에틸아민(triethylamine, 1 %)인 조건하에

서 DMHN1의 흡수 및 형광 그래프를 각각 나타낸 것으로, 해당 조건하에서 DMHN1은 흡수 스펙트럼(도 1에서 (a)) 390 nm에서 최고 흡수 값을 나타내었다. 하지만, 형광 스펙트럼(도 1에서 (b))에서 DMHN1은 매우 낮은 형광을 나타내었다.

[0082] 실시예 3. 형광 프로브 화합물(DMHN1)의 다이에틸싸이아노포스포네이트 반응 메커니즘

[0083] DMHN1의 다이에틸싸이아노포스포네이트에 대한 반응 메커니즘을 확인하기 위하여, 고해상도 질량분석기(High resolution mass spectra; JMS-700 spectrometer, JEOL, Tokyo, Japan)로 반응이 종료된 생성물의 질량을 측정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 또한, 도 3에 DMHN1의 다이에틸싸이아노포스포네이트에 대한 반응 메커니즘을 나타내었다.

[0084] 이 결과를 통해 DMHN1의 감지 메커니즘을 규명하였으며, 이는 DMHN1과 다이에틸싸이아노포스포네이트 사이의 친핵성 치환 반응(nucleophilic substitutions)을 통해 오쏘-하이드록시-벤즈알데하이드의 구조 내 들뜬 상태 분자 내 양성자 전이(ESIPT, Excited-State Intramolecular Proton Transfer)에 의한 퀸칭(quenching)효과가 깨어지면서 형광을 나타내는 것임을 확인하였다.

[0086] 실시예 4. 형광 프로브 화합물(DMHN1)의 다이에틸싸이아노포스포네이트 감지 민감도 확인

[0087] 주어진 용매조건에서 DMHN1의 다이에틸싸이아노포스포네이트 감지 특성 및 민감도를 형광 변화 관찰을 기반으로 분석하였으며, 그 결과를 도 4 내지 6에 나타내었다.

[0088] 구체적으로, DMHN1이 다이에틸싸이아노포스포네이트의 양에 따른 형광변화를 보이는지, 그리고 미량의 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출이 가능한지 여부를 확인하기 위하여, 일정 당량의 다이에틸싸이아노포스포네이트를 이용해 고농도에서의 형광 변화와 낮은 농도에서의 형광 변화 정도를 확인하였다. 측정에 사용된 용매는 아세토나이트릴(acetonitrile, 99 %)과 트리에틸아민(triethylamine, 1 %)으로, 실온(25 °C)에서 반응시간은 3분 미만으로 고정하여 분석하였다. DMHN1은 10 mM로 다이메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 녹여서 사용하였으며, 최종으로 사용되는 용매조건에서 다이메틸 설폭사이드의 양이 동일하도록 제어하였다.

[0089] 도 4의 그래프를 통하여 다이에틸싸이아노포스포네이트의 농도(0 내지 1 mM 고농도 범위)가 증가하는 경우 DMHN1의 형광이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 도 5는 최대 형광 파장대에서의 다이에틸싸이아노포스포네이트의 농도와 DMHN1의 형광 세기 간의 상관관계 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 4 및 5의 그래프를 통하여 표적물질(다이에틸싸이아노포스포네이트)의 농도가 증가함에 따라 선형적으로 형광의 세기가 증가함을 확인할 수 있다.

[0090] 낮은 농도에서의 다이에틸싸이아노포스포네이트(0 내지 10 μM) 감지 가능여부를 확인하기 위해 각 농도에 따른 분석물의 수를 3 개씩 늘려서 평균값으로 상관관계 그래프를 확인하였다. 모든 실험에서 DMHN1의 농도는 10 μM로 동일하게 고정하여 분석하였고, 모든 형광세기는 25 °C에서 3분 미만으로 반응시켜 형광기로 측정하였다. 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, DMHN1의 다이에틸싸이아노포스포네이트에 대한 민감도는 8.16 ppm에 해당함을 확인하였다.

[0092] 실시예 5. 형광 프로브 화합물(DMHN1)의 다이에틸싸이아노포스포네이트 선택성 확인

[0093] DMHN1의 다이에틸싸이아노포스포네이트에 대한 선택성을 형광 변화를 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 7 및 8에 나타내었다.

[0094] 구체적으로, DMHN1이 다이에틸싸이아노포스포네이트에 선택적으로 결합하는지의 여부를 확인하기 위하여, 반응에 영향을 줄 수 있는 산성 물질과 다이에틸싸이아노포스포네이트와 유사한 기능을 가진 신경작용제들을 이용하여 각 물질에 대한 DMHN1의 형광 변화 여부를 확인하였다. 실험에 사용된 용매는 아세토나이트릴(acetonitrile, 99 %)과 트리에틸아민(triethylamine, 1 %)으로, 각 신경작용제 유사체들은 TCI(Tokyo chemical industry Co., Ltd)사의 제품을 사용하였다. DMHN1은 10 mM의 농도로 다이메틸 설폭사이드 용액에 녹여서 사용되었으며, 최종적으로 사용되는 용매 조건에서 DMHN1의 농도는 10 μM로 다이메틸 설폭사이드의 양이 각 물질별로 동일할 수 있도록 통제하였다.

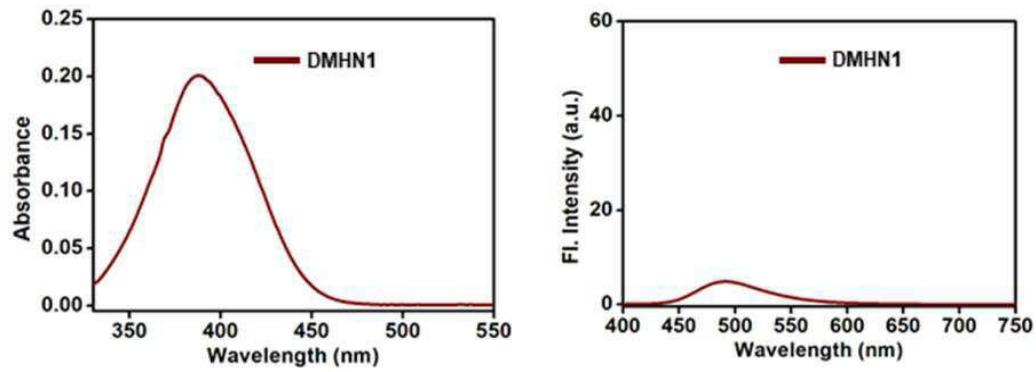
[0095] 도 7에서 왼쪽의 사진은 365 nm 파장대를 가지는 형광장비 안에서 카메라로 촬영한 사진으로, DMHN1(사진의 좌측)은 형광이 거의 발하지 않음을 보여준다. 하지만 DMHN1을 다이에틸싸이아노포스포네이트(1 mM)이 포함된 아세토나이트릴(acetonitrile, 99 %)과 트리에틸아민(triethylamine, 1 %) 혼합용매에 넣어주고 25 °C에서 약 3분간 반응시켜주었을 때 강한 청색의 형광이 커짐을 확인할 수 있다.

- [0096] 도 8은 DMHN1과 다이에틸싸이아노포스포네이트의 반응이 3분간 진행되었을 때의 최대 형광파장(486 nm)을 기준으로 형광세기의 증가량을 분석한 결과이다. 도 8에서 DMHN1과 반응하지 않은 신경작용제 유사체들의 형광 세기는 모두 그래프의 하단에 모여서 나타났으며, 다이에틸싸이아노포스포네이트와 반응한 물질의 경우(붉은선) 형광이 증가함을 보였다. DMHN1의 농도는 10 μ M로 고정하였으며, 각 유사체들의 농도는 1 mM로 동일하여 측정하였다. 도 8에 나타난 그래프의 가로축에 표시된 신경작용제 유사체들의 종류는 다음과 같다.
- [0097] (A) DMHN1 (화학식 1의 화합물);
- [0098] (B) DMHN1 with diethylcyanophosphonate;
- [0099] (C) DMHN1 with diethyl chlorophosphate
- [0100] (D) DMHN1 with dimethyl methylphosphate;
- [0101] (E) DMHN1 with triphenylphosphate;
- [0102] (F) DMHN1 with triethylphosphate;
- [0103] (G) DMHN1 with acetic acid;
- [0104] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 DMHN1은 다이에틸싸이아노포스포네이트가 존재하는 조건에서만 형광이 선택적으로 증가됨을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 DMHN1은 다이에틸싸이아노포스포네이트에서만 선택적으로 반응성을 가짐을 알 수 있다.
- [0106] **실시예 6. 토양 조건 하에서 다이에틸싸이아노포스포네이트 검출여부 확인**
- [0107] DMHN1의 토양 조건 하에서 다이에틸싸이아노포스포네이트의 검출 여부를 확인하기 위하여 세 종류의 흙을 이용해 해당 환경에서의 DMHN1의 형광변화를 확인하였다.
- [0108] 구체적으로, 1 g의 모래(Sand), 진흙(Clay), 밭흙(Field)을 알루미늄 접시에 덜어준 다음 아세토나이트릴에 분산된 100 mM의 다이에틸싸이아노포스포네이트를 처리해주었다. 마지막으로 다이에틸싸이아노포스포네이트가 처리된 각 종류의 흙 (1 g)을 아세토나이트릴 (acetonitrile, 99 %)과 트리에틸아민(triethylamine, 1 %) 혼합용매에 10 μ M의 농도로 포함된 DMHN1(3 mL)에 첨가해준 후 형광 변화를 관찰하였다. 반응물은 25 $^{\circ}$ C 조건에서 60 분 동안 형광의 변화를 관찰하였으며, 다이에틸싸이아노포스포네이트와의 반응이 10분이 지난 후 365 nm 형광기 안에서 사진을 촬영하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0109] 또한 상기 언급한 바와 같이 다이에틸싸이아노포스포네이트와 DMHN1의 반응시간에 따른 형광세기의 변화를 측정하여 도 10에 나타내었다. 도 9 및 도 10에 나타난 바와 같이, 상기 실험을 통하여 해당 환경에서 다이에틸싸이아노포스포네이트 존재시 DMHN1의 형광변화를 나타냄을 확인할 수 있다.
- [0110] 도 11에는 각 흙의 종류에 따른 시간별 형광세기 변화를 사진으로 나타내었다. 또한, 도 12에는 각 흙의 종류에 따른 시간별 형광세기 변화를 그래프로 나타내었다. 도 11 및 도 12에 나타난 바와 같이, DMHN1이 토양 조건 하에서도 다이에틸싸이아노포스포네이트를 단 시간 내에 빠르게 검출할 수 있다는 것을 확인할 수 있다.
- [0111] 상기와 같은 결과를 통하여 본 발명에 따른 DMHN1이 환경조건 내에서 활용 가능함을 확인할 수 있다.
- [0113] **실시예 7. 다이에틸싸이아노포스포네이트 실시간 현장검출 키트로의 적용**
- [0114] DMHN1을 이용한 다이에틸싸이아노포스포네이트의 실시간 현장검출 키트로의 개발가능성을 간소화된 키트를 제작하여 검증하였다.
- [0115] 다이에틸싸이아노포스포네이트의 실시간 현장검출 과정은 도 13에 나타내었다. 구체적으로, 휴대성에 대한 평가를 위해 시중에서 실제로 판매되고 있는 자외선 손전등(UV light, 365 nm, 3W)을 준비하였고, 10 μ M의 DMHN1이 용해된 세토나이트릴(acetonitrile, 99 %)과 트리에틸아민(triethylamine, 1 %) 혼합용매 1 mL을 고해상도 액체크로마토그래피 바이알(2 mL 사이즈)에 준비하였다. 키트의 구성은 DMHN1을 포함한 바이알과 모세관(캐필러리), 자외선 손전등으로 구성된다. 모세관으로 다이에틸싸이아노포스포네이트 원액(약 20 μ L)채취하여 DMHN1을 포함한 바이알에 꽂아주었다. 실험 결과는 도 14에 나타내었다.
- [0116] 도 14에 나타난 바와 같이, 30초 이내의 단 시간에 DMHN1의 형광변화를 확인할 수 있다.
- [0118] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을

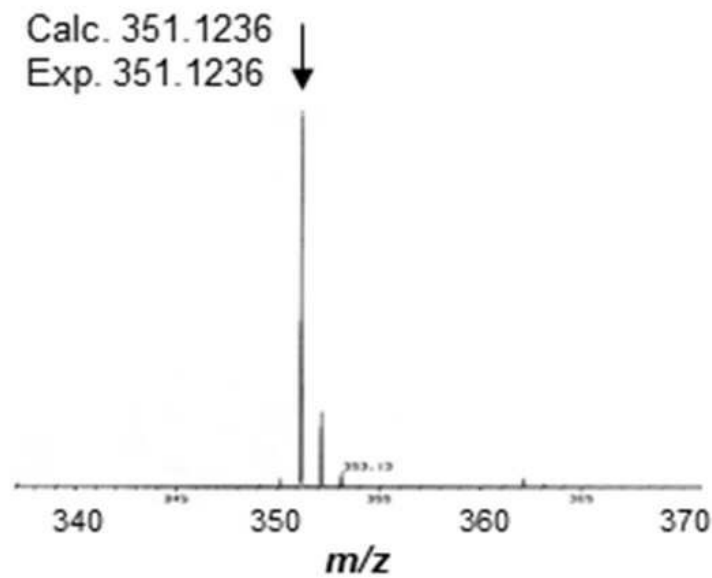
이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

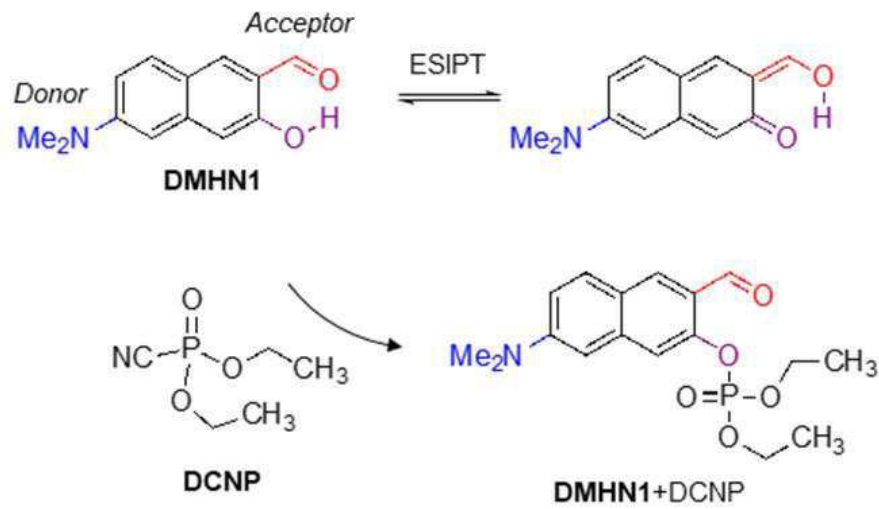
도면1



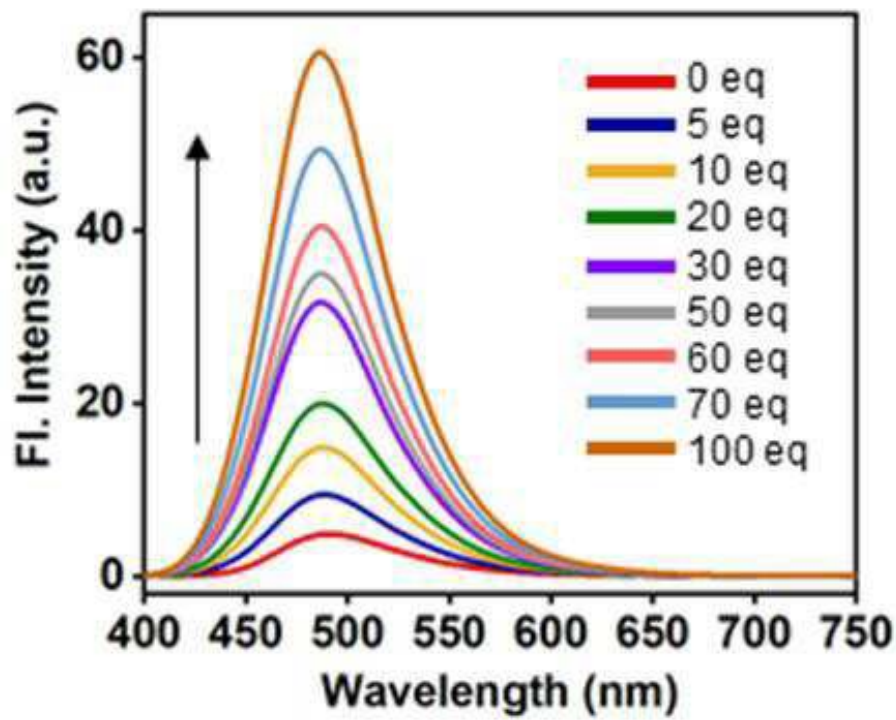
도면2



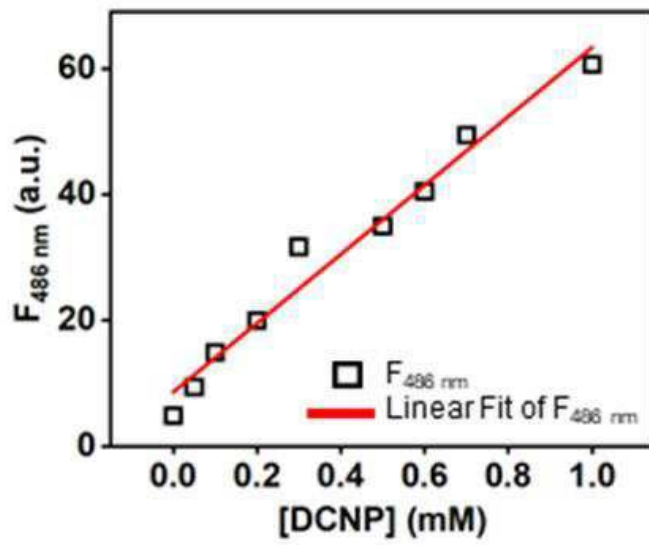
도면3



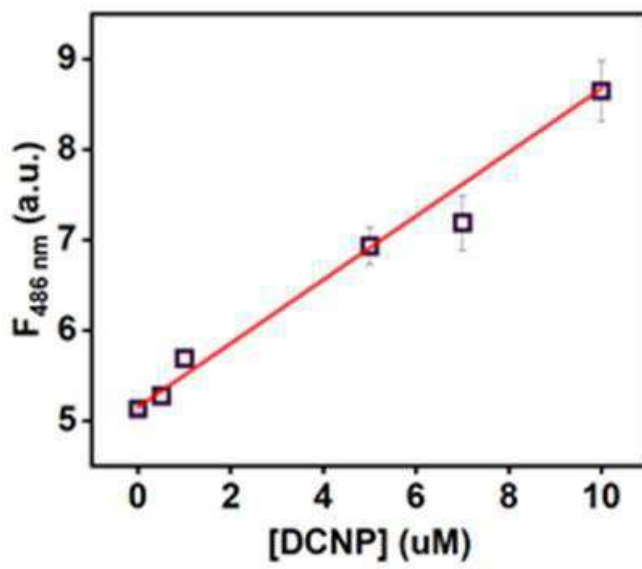
도면4



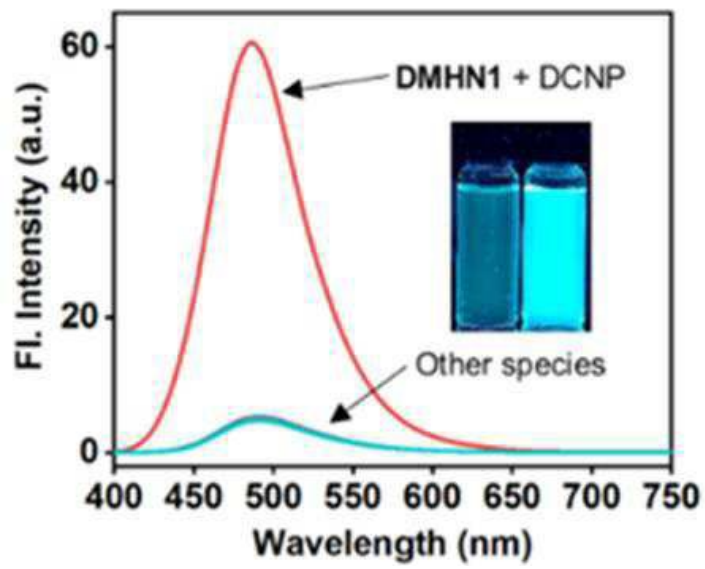
도면5



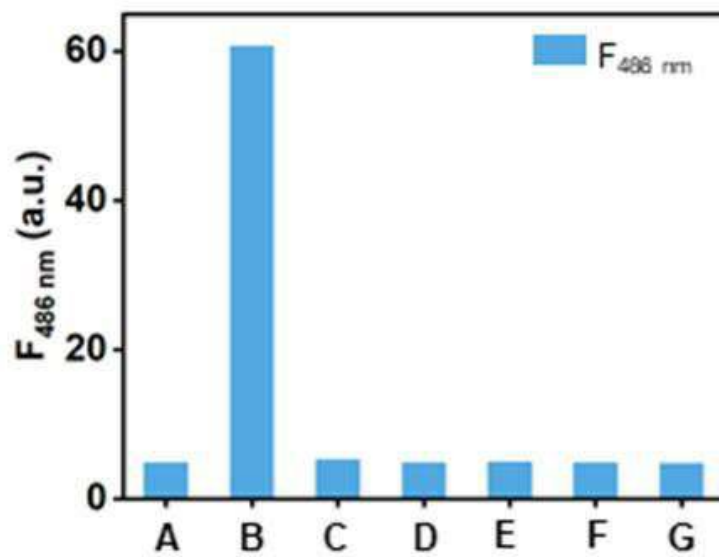
도면6



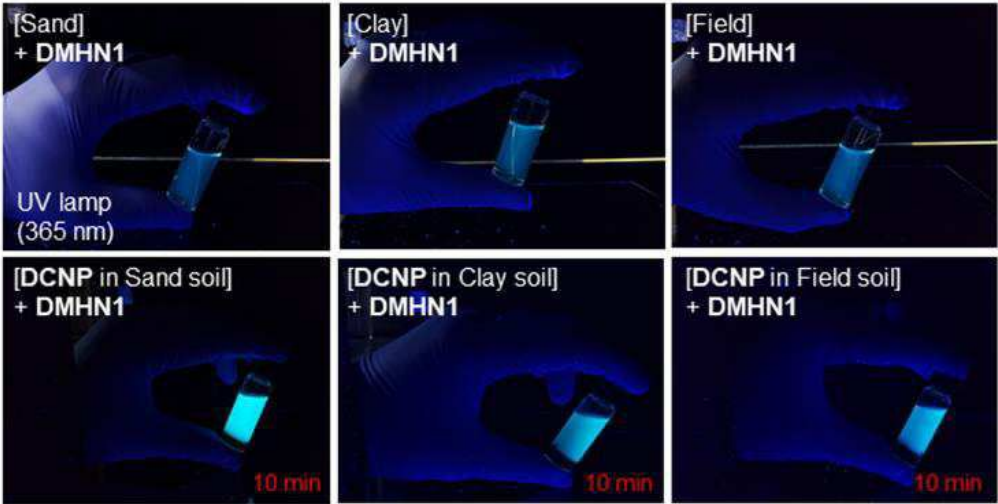
도면7



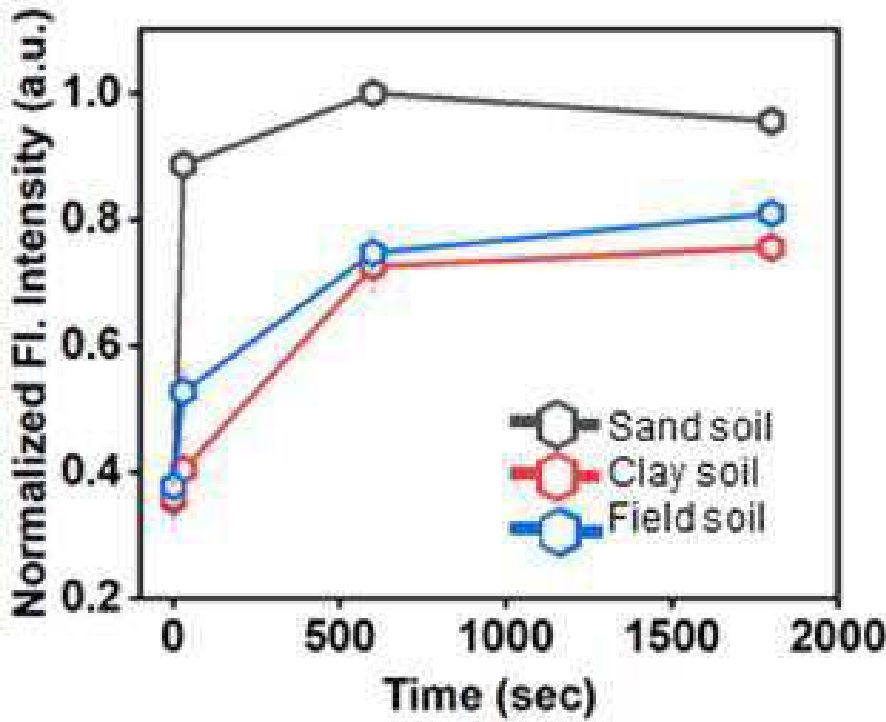
도면8



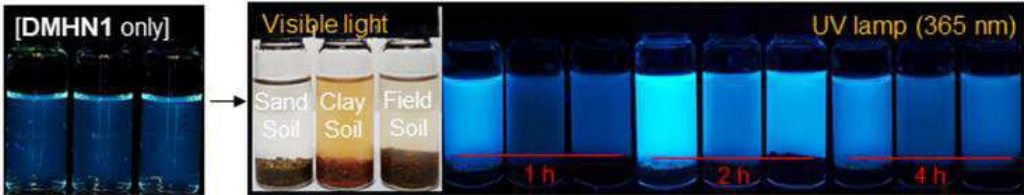
도면9



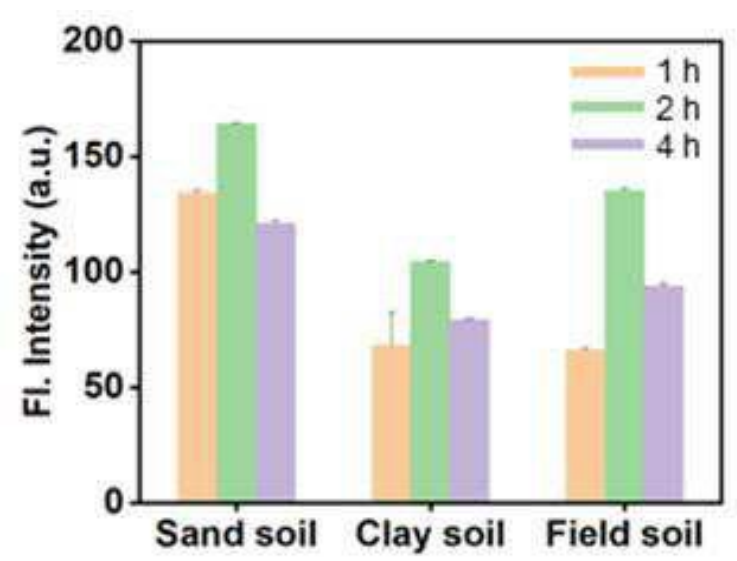
도면10



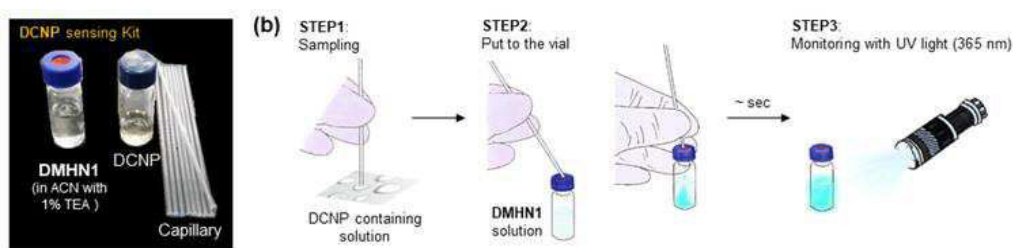
도면11



도면12



도면13



도면14

