



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) . Int. Cl.

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

(45) 공고일자

2007년05월16일

(11) 등록번호

10-0718953

(24) 등록일자

2007년05월10일

(21) 출원번호	10-2000-7010146	(65) 공개번호	10-2001-0041855
(22) 출원일자	2000년09월14일	(43) 공개일자	2001년05월25일
심사청구일자	2003년03월28일		
번역문 제출일자	2000년09월14일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/005290	(87) 국제공개번호	WO 1999/46600
국제출원일자	1999년03월11일	국제공개일자	1999년09월16일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 리히텐슈타인, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 캐나다, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리비아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 인도,

AP ARIPO특허 : 캐나다, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브وار, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장

09/037,960

1998년03월11일

미국(US)

(73) 특허권자

센서즈 포 메드슨 앤드 사이언스 인코포레이티드

미국 메릴랜드 20874 쟈먼타운 미들브룩 로드 12321 스위트 210

(72) 발명자

울맨에드원에프.

미국캘리포니아94027아더톤셀비레이135

니콜라이치크알렉산드러브이.

미국메릴랜드21212볼티모어홀리레이6311

다닐로프조지와이.

미국메릴랜드20878노쓰포토맥보니데일드라이브13401

파커 데이비드
영국더럼디에이치14큐엘클레이레인비치하우스

콜빈아더이.
미국메릴랜드21771마운틴에어리볼티모어내셔널파이크4155

칼리브레테노스아리스톨쥐.
미국메릴랜드21045콜롬비아래스팅라이트웨이7106

(74) 대리인 리엔목특허법인

(56) 선행기술조사문헌

JP 09169772 *

J. Am. Chem. Soc. 117(35):8982-87, 1995

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 표재호

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 형광성 란타니드 퀼레이트에 의한 검체의 분석

(57) 요약

본 발명은 형광성 란타니드 금속 퀼레이트 착물을 포함하는 인디케이터 분자에 샘플을 노출시킴으로써 샘플 내 검체의 존재 또는 농도를 측정하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 샘플 내 검체의 존재 또는 농도는 검체가 착물 내의 하나 또는 하나 이상의 인식 성분에 결합할 때 란타니드 금속 퀼레이트 착물에 의해 방출되는 형광 강도의 변화를 관찰 및/또는 측정함으로써 결정될 수 있다. 형광 인디케이터 분자는 여러가지 유형의 형광 감지 장치에서 이용될 수 있으며, 에너지, 의학, 및 농업을 포함하는 다양한 분야에서 유용하다.

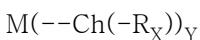
대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

다음 화학식을 갖는 형광성 란타니드 금속 퀼레이트 착물을 포함하는, 비표지된 검체의 농도를 검출하기 위한 인디케이터 분자:



상기 식에서,

M은 란타니드 금속 이온이고; Ch는 리간드를 포함하는 퀼레이터이고; R은 보로네이트기, 아르세나이트기 또는 저마네이트기 또는 그들의 혼합물을 포함하는 검체-특이적 인식 성분이고; X는 각 퀼레이터에 결합되는 인식 성분 R의 개수를 나타내고; X=0 내지 4이고, Y=1 내지 4이고; 하나 이상의 퀼레이터에 대해 X>0인 경우, 인식 성분 R의 개수는 같거나 다를 수 있고; 검체의 농도는, 검체가 인식 성분을 통해 착물의 하나 이상의 퀼레이터에 결합될 때 란타니드 금속 퀼레이트 착물에 의해 방출되는 형광의 변화를 측정함으로써 검출되고, 상기 하나 이상의 퀼레이트의 리간드는 β -디케톤 또는 그의 질

소 유사체, 사이클렌, 디히드록시, 카르복실 배위 헤테로사이클, 에놀, 매크로비사이클릭 크립탄드, 폴리아미노-폴리카르복실산, 페닐포스폰산, 1 내지 10 탄소 원자를 포함하는 알켄기, 질소, 황 또는 연결된 카르복실의 헤�테로사이클, 포스핀 옥사이드 또는 카르보사이클릭 모이어티 중 하나 이상을 포함하는 유기 리간드이고, 상기 하나 이상의 리간드는 상기에서 언급한 것들 이외에 상기 란타니드 금속 이온과 직접적으로 퀼레이트화 되지 않는 방향족 기를 포함하고, 상기 방향족 기는 5개 까지의 원자에 의해 상기 란타니드 금속 이온으로부터 분리되고, 상기 하나 이상의 퀼레이터는 음이온이고 상기 란타니드 금속 이온과 배위 결합할 수 있는 총 8개 부위를 포함한다.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 란타니드 금속 퀼레이트 착물의 M은 유로피움 이온 또는 테르븀 이온인 것을 특징으로 하는 인디케이터 분자.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 이상의 퀼레이터의 리간드는 β -디케톤 및 사이클렌으로 구성된 군에서 선택되는 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 인디케이터 분자.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 보로네이트기, 아르세나이트기 또는 저마네이트기는 방향족 모이어티에 결합된 것을 특징으로 하는 인디케이터 분자.

청구항 6.

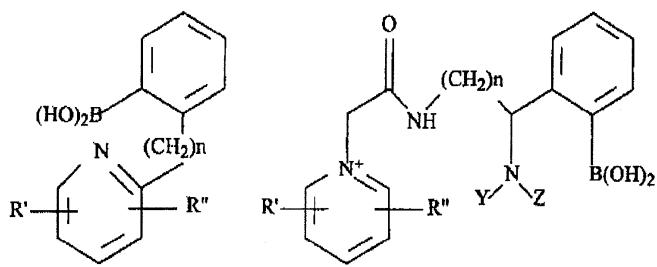
제 1 항에 있어서, 하나 이상의 퀼레이터는 퀼레이트 착물을 고체 지지체에 부착하기 위한 치환기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 인디케이터 분자.

청구항 7.

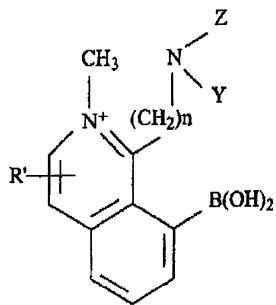
제 6 항에 있어서, 퀼레이트 착물을 고체 지지체에 부착하기 위한 치환기는 카르복실기, $-\text{NH}_2$ 기 또는 $-\text{OH}$ 기인 것을 특징으로 하는 인디케이터 분자.

청구항 8.

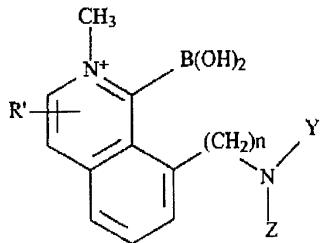
제 1 항에 있어서, 인식 성분은 다음의 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 인디케이터 분자:



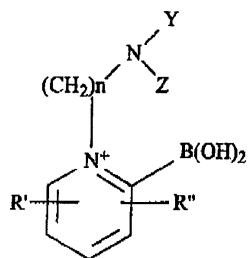
상기 식에서, n은 왼쪽 구조에서는 0 또는 1이고, 오른쪽 구조에서는 0, 1, 또는 2이다;



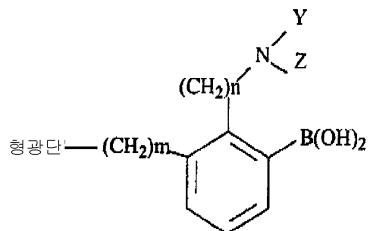
상기 식에서, n은 1이다;



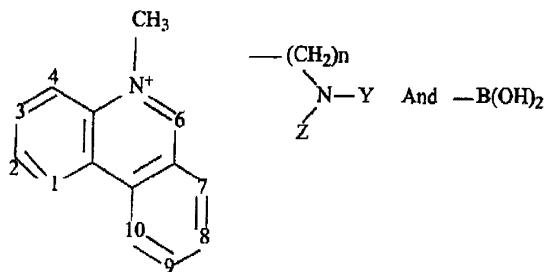
상기 식에서, n은 0 또는 1이다;



상기 식에서, n은 2이다;



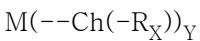
상기 식에서, m 은 0~5이고, n 은 1 또는 2이다; 및



상기 식에서, n 은 0 또는 1이고, 봉산 및 아민 치환기는 1 및 10 위치에, 3 및 4 위치에, 6 및 7 위치에, 7 및 8 위치에, 또는 9 및 10 위치에 쌍으로 위치하고; 그리고 적용가능한 모든 구조에서, R' 및 R'' 는 각각 독립적으로, 융합 아릴; 지방족; 일차, 이차, 또는 삼차 아민; 아미드; 카르복실; 케톤; 에스테르; 알콜; 또는 알데히드를 나타내고; 그리고 Y 및 Z 는 각각 독립적으로 지방족, 알콕시 또는 아릴 및 그 유도체를 나타낸다.

청구항 9.

다음 화학식을 갖는 비표지된 검체의 농도를 검출하기 위한 형광성 란타니드 금속 퀄레이트 착물:



상기 식에서,

M 은 란타니드 금속 이온이고; Ch 는 리간드를 포함하는 퀄레이터이고; R 은 보로네이트기, 아르세나이트기 또는 저마네이트기 또는 그들의 혼합물을 포함하는 검체-특이적 인식 성분이고; X 는 각 퀄레이터에 결합되는 인식 성분 R 의 개수를 나타내고; $X=0$ 내지 4이고, $Y=1$ 내지 4이고; 하나 이상의 퀄레이터에 대해 $X>0$ 인 경우, 인식 성분 R 의 개수는 같거나 다를 수 있고; 검체의 농도는, 검체가 인식 성분을 통해 착물의 하나 이상의 퀄레이터에 결합될 때 란타니드 금속 퀄레이트 착물에 의해 방출되는 형광의 변화를 측정함으로써 검출되고, 상기 하나 이상의 퀄레이트의 리간드는 β -디케톤 또는 그의 질소 유사체, 사이클렌, 디히드록시, 카르복실 배위 헤테로사이클, 애놀, 매크로비사이클릭 크립탄드, 폴리아미노-폴리카르복실산, 페닐포스폰산, 1 내지 10 탄소 원자를 포함하는 알켄기, 질소, 황 또는 연결된 카르복실의 헤테로사이클, 포스핀 옥사이드 또는 카르보사이클릭 모이어티 중 하나 이상을 포함하는 유기 리간드이고, 상기 하나 이상의 리간드는 상기에서 언급한 것들 이외에 상기 란타니드 금속 이온과 직접적으로 퀄레이트화 되지 않는 방향족 기를 포함하고, 상기 방향족기는 5개 까지의 원자에 의해 상기 란타니드 금속 이온으로부터 분리되고, 상기 하나 이상의 퀄레이터는 음이온이고 상기 란타니드 금속 이온과 배위 결합할 수 있는 총 8개 부위를 포함한다.

청구항 10.

제 9 항에 있어서, M 은 유로피움 이온 또는 테르븀 이온인 것을 특징으로 하는 형광성 란타니드 금속 퀄레이트 착물.

청구항 11.

삭제

청구항 12.

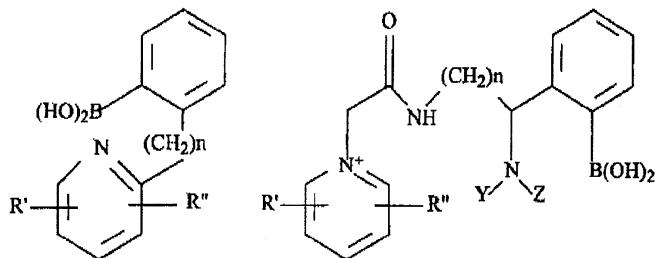
제 9 항에 있어서, 하나 이상의 칼레이터의 리간드는 β -디케톤 또는 시클렌을 포함하는 것을 특징으로 하는 형광성 란타니드 금속 칼레이트 착물.

청구항 13.

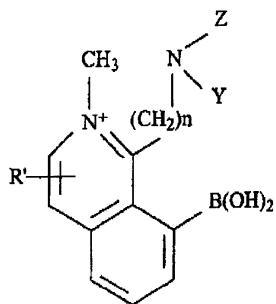
제 9 항에 있어서, 상기 보로네이트기, 아르세나이트기 또는 저마네이트기는 방향족 모이어티에 결합된 것을 특징으로 하는 형광성 란타니드 금속 칼레이트 착물.

청구항 14.

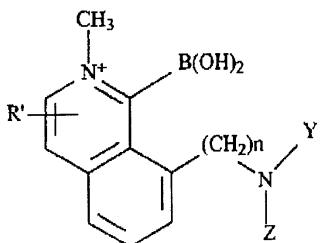
제 9 항에 있어서, 인식 성분은 다음의 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 형광성 란타니드 금속 칼레이트 착물:



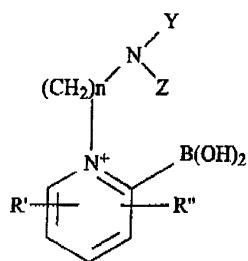
상기 식에서, n 은 왼쪽 구조에서는 0 또는 1이고, 오른쪽 구조에서는 0, 1, 또는 2이다;



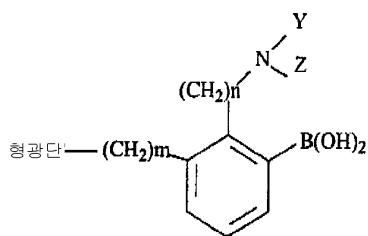
상기 식에서, n 은 1이다;



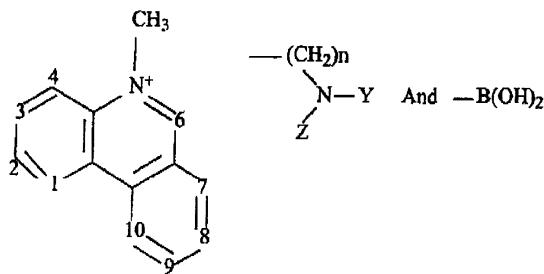
상기 식에서, n은 0 또는 1이다;



상기 식에서, n은 2이다;



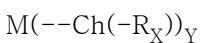
상기 식에서, m은 0-5이고, n은 1 또는 2이다; 및



상기 식에서, n은 0 또는 1이고, 봉산 및 아민 치환기는 1 및 10 위치에, 3 및 4 위치에, 6 및 7 위치에, 7 및 8 위치에, 또는 9 및 10 위치에 쌍으로 위치하고; 그리고 적용가능한 모든 구조에서, R' 및 R''는 각각 독립적으로, 융합 아릴; 지방족; 일차, 이차, 또는 삼차 아민; 아미드; 카르복실; 케톤; 에스테르; 알콜; 또는 알데히드를 나타내고; 그리고 Y 및 Z는 각각 독립적으로 지방족, 알콕시 또는 아릴 및 그 유도체를 나타낸다.

청구항 15.

a) 다음 화학식을 갖는 형광성 란타니드 금속 퀼레이트 착물을 포함하는 인디케이터 분자에 샘플을 노출시키는 단계:



상기 식에서,

M은 란타니드 금속 이온이고; Ch는 리간드를 포함하는 퀼레이터이고; R은 보로네이트기, 아르세나이트기 또는 저마네이트기 또는 그들의 혼합물을 포함하는 겸체-특이적 인식 성분이고; X는 각 퀼레이터에 결합되는 인식 성분 R의 개수를 나타내고; X=0 내지 4이고, Y=1 내지 4이고; 하나 이상의 퀼레이터에 대해 X>0인 경우, 인식 성분 R의 개수는 같거나 다를 수 있고; 겸체의 농도는, 겸체가 인식 성분을 통해 착물의 하나 이상의 퀼레이터에 결합될 때 란타니드 금속 퀼레이트 착물에 의해 방출되는 형광의 변화를 측정함으로써 겸출되고, 상기 하나 이상의 퀼레이터의 리간드는 β -디케톤 또는 그의 질

소 유사체, 사이클렌, 디히드록시, 카르복실 배위 헤테로사이클, 에놀, 매크로비사이클릭 크립탄드, 폴리아미노-폴리카르복실산, 페닐포스폰산, 1 내지 10 탄소 원자를 포함하는 알켄기, 질소, 황 또는 연결된 카르복실의 헤테로사이클, 포스핀옥사이드 또는 카르보사이클릭 모이어티 중 하나 이상을 포함하는 유기 리간드이고, 상기 하나 이상의 리간드는 상기에서 언급한 것들 이외에 상기 란타니드 금속 이온과 직접적으로 퀼레이트화 되지 않는 방향족 기를 포함하고, 상기 방향족기는 5개 까지의 원자에 의해 상기 란타니드 금속 이온으로부터 분리되고, 상기 하나 이상의 퀼레이터는 음이온이고 상기 란타니드 금속 이온과 배위 결합할 수 있는 총 8개 부위를 포함한다; 및

b) 검체가 검체-특이적 인식 성분을 통해 착물의 하나 이상의 퀼레이터에 결합될 때 란타니드 금속 퀼레이트 착물에 의해 방출되는 형광의 변화를 측정하여, 이로써 검체의 존재 또는 농도를 검출하는 단계;

를 포함하는 샘플 내 비표지된 검체의 농도를 검출하기 위한 방법.

청구항 16.

제 15 항에 있어서, 란타니드 금속 퀼레이트 착물의 M은 유로피움 이온 또는 테르븀 이온인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제 15 항에 있어서, 상기 보로네이트기, 아르세나이트기 또는 저마네이트기는 방향족 모이어티에 결합된 것을 특징으로 하는 형광성 란타니드 금속 퀼레이트 착물.

청구항 18.

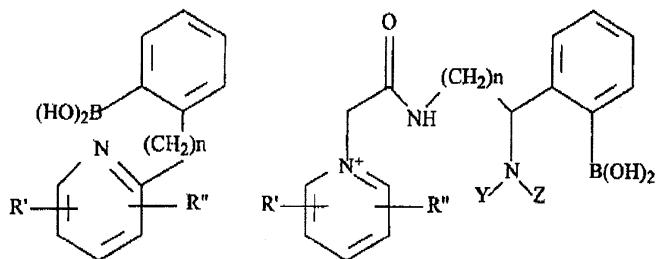
제 15 항에 있어서, 하나 이상의 퀼레이터의 리간드는 β -디케톤 또는 시클렌을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

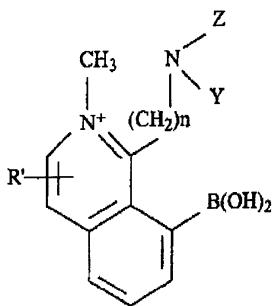
제 15 항에 있어서, 상기 검체는 글루코스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

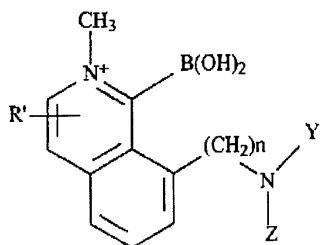
제 15 항에 있어서, 인식 성분은 다음의 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법:



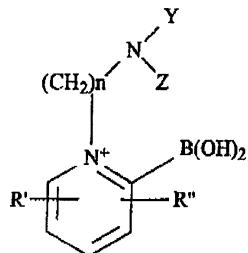
상기 식에서, n은 왼쪽 구조에서는 0 또는 1이고, 오른쪽 구조에서는 0, 1, 또는 2이다;



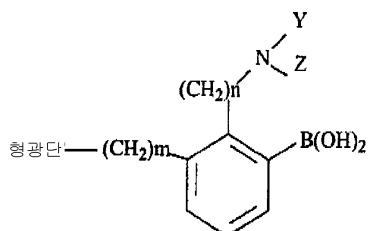
상기 식에서, n은 1이다;



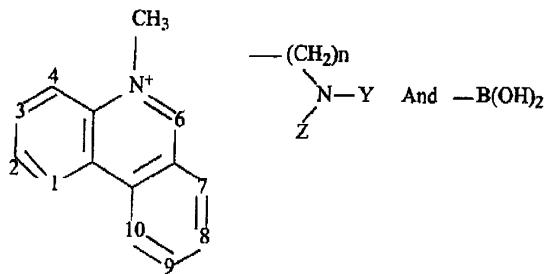
상기 식에서, n은 0 또는 1이다;



상기 식에서, n은 2이다;



상기 식에서, m은 0-5이고, n은 1 또는 2이다; 및



상기 식에서, n은 0 또는 1이고, 봉산 및 아민 치환기는 1 및 10 위치에, 3 및 4 위치에, 6 및 7 위치에, 7 및 8 위치에, 또는 9 및 10 위치에 쌍으로 위치하고; 그리고 적용가능한 모든 구조에서, R' 및 R"는 각각 독립적으로, 융합 아릴; 지방족; 일차, 이차, 또는 삼차 아민; 아미드; 카르복실; 케톤; 에스테르; 알콜; 또는 알데히드를 나타내고; 그리고 Y 및 Z는 각각 독립적으로 지방족, 알콕시 또는 아릴 및 그 유도체를 나타낸다.

명세서

기술분야

본 발명은 액체와 같은 매질 내 검체의 존재 및 농도를 검출하기 위한 인디케이터 분자로서 유용한 형광성 화합물 및 그러한 검출을 행하기 위한 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 치환된 리간드를 포함하는 형광성 란타니드 금속 퀄레이트 카탈리스트, 생물학적 유액과 같은 액체 매질을 포함하는 매질 내의 글루코스 또는 다른 시스-디올 등의 검체의 존재 및 농도를 검출하기 위한 인디케이터 분자로서의 그 이용에 관한 것이다.

배경기술

특정한 희토류 금속 퀄레이트는 자외선 및 다른 형태의 가시광선(예를 들어, 자색 또는 청색 광선)을 조사하면 가시 광선을 방출하는데, 그 방출은 퀄레이트 양이온에 의해 특징지워진다. 유로피움(Eu³⁺), 사마리움(Sm³⁺), 테르븀(Tb³⁺), 그리고 보다 약한 정도로는 디스프로슘(Dy³⁺), 및 네오디뮴(Nd³⁺)과 같은 일부 란타니드 이온은, 특히, 적당한 들뜸 에너지로 매개되어 유기 리간드에 퀄레이트될 때, 상기 이온에 의해 특징화되는 전형적인 형광을 나타낸다. 이들 화합물의 형광 특성--긴 스트로크 쉬프트, 좁은 밴드-타입 방출 선, 그리고 유별나게 긴 형광 수명--으로 인해, 이것들은 형광 면역 분석과 시간-분석(time-resolved) 형광측정 기술을 위한 매력적인 후보들이다.

이들 형광성 란타니드 퀄레이트의 주된 방출 선은, 초고감도(hypersensitive) 전이라고 불리는 전이로부터 형성되며, Eu³⁺는 613-615nm, Tb³⁺는 545(그리고 490)nm, Sm³⁺는 590-643nm, 그리고 Dy³⁺는 573nm 근처이다. Hemmila, Application of Fluorescence in Immunoassays, 140-42 (1991)을 보시오. 또한 Spectroscopy in Inorganic Chemistry, Vol. 2, 255-85(Academic Press 1971)을 보시오. 퀄레이트는 보통 유기 리간드의 특유 파장에서 방사선을 흡수하며, 방사선은 리간드로부터 중앙 금속 이온으로의 분자내 에너지 전이로 인해 금속 이온의 특유한 선 스펙트럼으로서 방출된다. 유기 리간드는 에너지를 흡수하여 싱글렛 바닥 상태, S₀로부터 첫 번째 싱글렛 들뜸 상태, S₁의 진동 멀티플렛 중 어느 하나로 자극되거나 여기되고, 여기서 여분의 진동 에너지를 빠르게 잃어버린다. 이러한 점에서, 두 가지의 가능성: S₁→S₀ 전이(리간드 형광)에 의한 이완, 또는 트리플렛 상태 중 하나인, T₁으로 가로지르는 내부시스템이 존재하게 된다. E. P. Diamandis 외, Analytical Chemistry 62:(22):1149A(1990)을 보시오. 또한 Spectroscopy in Inorganic Chemistry, vol. 2, 255-85(Academic Press 1971)을 보시오.

형광 유로피움 퀄레이트는, 들뜸 스펙트럼과 방출 스펙트럼의 중첩 없이 큰 스트로크 쉬프트(-290nm)를 나타내며, 615nm에서 아주 좁은(10-nm 밴드넓이) 방출 스펙트럼을 나타내는 것으로 알려져 있다. 덧붙여, 퀄레이트의 긴 형광 수명(종래의 형광단에 대해 측정가능했던 나노초 수명 대신에 마이크로초로 측정가능)은, 낮은 형광 수명을 갖는 다른 방해물과 잡음을 걸러내는 것을 돋는다. 긴 형광 수명은 따라서 마이크로초 시간-분석 형광 측정에 퀄레이트의 사용을 가능하게 하며, 이는 더 나아가 관찰된 바탕 신호를 감소시킨다. 유로피움 퀄레이트를 사용하는 또다른 이점에는, 유로피움 퀄레이트가 산소에 의해 소광(quenching)되지 않는다는 점이 포함된다.

두 가지의 유로피움(Eu) 퀄레이트, Eu-디벤조일메티드와 Eu-벤조일아세토네이트의 선 발광으로 인하여, 이 퀄레이트들은 레이저에서의 사용에 있어서 매력적인 후보들이다. H. Samuelson, 외 (*J. Chem. Physics* 39(1): 110-12 (1963))를 보시오. Samuelson, 외는 고체로서 그리고 용액으로서의 상기 두 가지 유로피움 퀄레이트의 형광 및 흡광을 연구하였다. Samuelson, 외는 다양한 조건 하에서의 유로피움 퀄레이트의 형광 수명을 다른 화합물 내에서의 유로피움 형광의 수명과 비교하였다. 이러한 비교에 기초하여, Samuelson 외는 두 그룹의 유로피움 화합물들 사이의 수명의 다양함은 유로피움 퀄레이트 내의 리간드-Eu 상호작용의 결과라는 것을 제안하였다. 구체적으로 말하면, Samuelson 외는 Eu-디벤조일메티드로부터의 다양한 방출 선은 다른 유로피움 화합물에서의 형광 수명보다 훨씬 큰 $480 +/- 50 \mu\text{s}$ 의 형광 수명을 나타내는 것이라고 규정하였다.

Crosby, 외, *J. Chem. Physics* 34:743 (1961)은 이미 유로피움 디벤조일메티드 및 유로피움 벤조일아세토네이트 퀄레이트를 포함하는 희토류 금속 퀄레이트로부터의 이온 방출 증감시의 분자 내 에너지 전이의 역할을 연구하였다. Whan 외, *J. Mol. Spectroscopy* 8: 315-27 (1962)는 란타니드 금속 이온 그룹(Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} 및 Sm^{3+})의 퀄레이트로부터의 방출은 개별적인 희토류 금속 이온 특유의 밝은 스펙트럼 선에 의해 지배되었다고 기록하였다. Whan, 외는 Eu^{3+} 및 Tb^{3+} 의 벤조일아세토네이트 및 디벤조일메티드 양자 모두가 특히 밝은 에미터라는 것과, 이들 퀄레이트로부터의 밝은 선 방출과 낮은 인광 수율은, 이들 퀄레이트의 리간드로부터 Eu^{3+} 및 Tb^{3+} 이온으로의 분자 내 에너지 전이가 효과적으로 일어나고 있다는 것을 나타내는 것임을 발견하였다. Whan 외, 324.

N. Filipescu, 외, *J. Physical Chem.* 68(11):3324 (1964)는 유로피움 및 테르븀 β -디케톤 퀄레이트의 형광 스펙트럼은, 이 퀄레이트의 유기 리간드 부분에서 치환기가 바뀌는 경우 변경된다고 보고하였다. Filipescu, 외는, 유로피움 및 테르븀 퀄레이트의 형광 선의 상대적 강도, 스펙트럼 분산, 쉬프팅, 및 스플리팅에 대하여, 치환기들의 성질, 그들의 위치, 분자 구조, 및 전체 분자 내 에너지 전이와 관련하여 논하였다. Filipescu, 외는, 이온 특유의 전체 형광 강도는 두 가지 요인: 즉, 1) 유기 트리플렛에서 이용가능한 에너지의 양 및 2) 이온으로의 에너지 전이의 효율에 따라 달라진다는 것을 발견하였다.

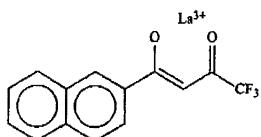
Filipescu, 외는 또한 상기 두 가지 요인이 치환기가 달라짐에 따라 변화한다는 것을 발견하였다. 예를 들면, 퀄레이트상의 메타 위치에 전자-공여체 메톡시기를 갖는 유로피움 디벤조일메티드 퀄레이트의 치환은 유로피움 이온의 형광 방출을 증대시킨다는 것이 발견되었으며, 반면에 파라메톡시 치환은 유로피움 형광을 감소시킨다는 것이 발견되었다. 부가적으로, 메톡시-일치환된 디벤조일메티드보다 이-치환에 대하여 더 큰 효과가 주장되었다. 반대로, 유로피움의 니트로-치환된 디벤조일메티드에 대해서는 반대의 효과가 관찰되었다. 파라 또는 메타 위치에 부착되는 전자-흡인성 니트로기는 유로피움의 총 이온 방출을 감소시키는 것으로 알려졌다. 부가적으로, 일치환된 디벤조일메티드보다 이-치환에 대하여 더 큰 효과가 주장되었다.

Filipescu, 외는, 유로피움 파라-페닐디벤조일메티드에 의해 방출되는 강한 이온 형광은, 방향성 계의 크기를 증가시키면 유로피움 이온으로 전이되는 에너지의 양이 증대된다는 것을 나타내는 것임을 더 발견하였다. 이러한 사실은, 디벤조일메티드 퀄레이트보다 실질적으로 높은 이온 방출을 갖는 것으로 발견된 나프탈-치환된 디케톤에 대해 얻어진 방출 결과에 의해 확인되었다. Filipescu, 외, 3328-29.

E. Diamandis, 외, *Analytical Chemistry* 62(22):1149A (1990)은, 유로피움 퀄레이트가 형광 면역분석과 DNA 하이브리디제이션 분석에서 어떻게 표지로서 사용될 수 있는지에 대해 기재하였다. 형광 면역분석에 관하여, 저자는 유로피움 퀄레이트가, 경쟁적 혹은 비경쟁적 분석을 포함하여 다양한 분석 형태에서 면역학적 표지로서 사용될 수 있다고 기재하였다.

U. S. Patent No. 4,374,120 (Soini, 외)는 마커로서 형광 란타니드 퀄레이트 촉물을 사용하여 물질을 검출하는 방법을 기재하고 있다. U. S. Patent No. 4,374,120은 또한 특정 란타니드 퀄레이트, 특히 유로피움 및 테르븀의 퀄레이트의 강한 형광 특성을 촉진시키기 위한 강화 리간드로서 β -디케톤의 사용을 기재하고 있다.

Wallac (Turku, Finland)은 면역분석 수행용 방사선 택(tag)을 대신하는, 다음의 구조를 갖는 란타니드 금속을 개발하였다.



Wallac 분자는 끓은 용액에서 매우 효율적으로 행동한다는 것이 밝혀졌다. Hemmila, Applications of Fluorescence in Immunoassays, P. 149 (1991)을 보시오.

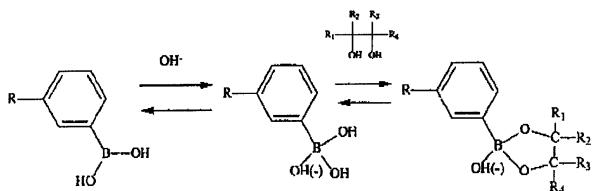
생물학적 유액과 같은 수용액 내에서 란타니드 금속 퀼레이트를 사용하기 위해서는 특정한 조건이 요구된다. 예를 들어, 첫째로 퀼레이트를 수용액에 용해시켜야한다는 것과, 둘째로 란타니드 이온의 빈 배위 사이트를 채우려는 경향이 있는 물 분자에 의해 퀼레이트가 소광되는 것을 피해야한다는 사실이 알려져 있다. 그러나, 포스핀, 포스핀 산화물 또는 질소 헤테로사이클과 같은 다양한 첨가제 또는 루이스 염기를 리간드 구조에 부가적으로 사용하여서 란타니온 주변에 "분리 시트" ("insulating sheet")를 형성하여 물 분자가 착물의 구 내부로 침투하는 것을 방지함으로써 형광성을 증대시켜왔다. 예를 들어, 수계에서의 란타니드 형광 측정(예를 들어, 면역분석)을 위해 개발된 용액은, 상승작용제를 형성하는 첨가제로서 β -디케톤 및 산화 트리옥틸포스핀("TOPO")과, 그리고, 미셀을 형성하고 배위 착물의 용해를 돋는 세제(예를 들어, Triton X100)를 포함한다. Applications of Fluorescence in Immunoassays, 146-47을 보시오.

란타니드 금속 퀼레이트 착물은, 글루코스 또는 다른 시스-디올을 검출하기 위한 보로네이트기와 같이, 구별되고 특정된 인식 성분 특징을 이용하여 퀼레이트 착물 내에 포함된 하나 또는 그 이상의 리간드를 통해 검체의 적극적 검출을 행할 목적으로 이전에 시험되거나 구성되어진 적이 없었다. 상기에서 논하여진 바와 같이, 란타니드 금속 퀼레이트는 주로 방사성 동위원소에 대한 치환 표지, 레이저 색소로서의 이용을 위하여, 그리고 면역분석의 표지로서 항체에의 부착을 위하여 주로 연구되었다. 란타니드 금속 퀼레이트는 또한 테트라시클린 검출을 위한 정성 분석 과정에 이용되어 왔다.

글루코스는 살아있는 생물체에 필수 불가결한 유기 화합물이고, 유기체 내에서 정보 전달, 에너지 대사 및 구조체 형성에 있어서 중요한 역할을 담당한다. 예를 들어, 글루코스 그리고 더 상세하게는 D-글루코스는, 여러 가지 세포에 있어서 다양한 조직 구성의 에너지원으로서 중요하다. 글루코스는 글리코겐으로 간에 저장되며, 이것은 에너지 소비를 위하여 필요할 때 체액 내에 방출된다. 글루코스의 생성 및 소비는 정상의 또는 건강한 인간의 체액내에서 균형을 잘 이루어서, 체액 내 글루코스 농도를 일정하게 유지한다. 따라서, 혈액 또는 소변 내 글루코스의 낮은-수준 또는 초과-수준의 검출은 당뇨 또는 부신 결핍(adrenal insufficiency)과 같은 질병의 진단에 가치있는 정보를 제공한다.

효소(예를 들어, Yellow Spring Instrument(YSI), Ohio에 의해 만든 것)를 사용하는 글루코스 센서가 가장 잘 알려진 글루코스 검출의 실용적인 측정법이다. 이 기술은 효소(글루코스 산화효소)로 글루코스를 분해하는 과정과, 적당한 수단을 통하여 분해함으로써(예를 들어, 전극에 의해서) 생성되는 과산화수소의 양을 측정하는 과정을 포함한다. 이 방법이 잘 확립되어 있음에도 불구하고, 생체로부터 유래된 효소의 질은 시간이 지나면 비가역적으로 변화되며, 재사용을 위하여 재활용될 수 없다. 덧붙여, 글루코스가 검출 반응에서 실제로 소비되기 때문에, 검체의 낮은 수준을 측정하기 위한 글루코스 센서의 본질적인 능력이 그로인해 제한된다.

봉산-함유 화합물이 글루코스에 결합한다는 사실은 공지되어 있다. 그 메카니즘은, 하기한 바와 같이, 글루코스의 인접한 히드록실기들이 보로네이트 모이어티의 히드록실기에 결합하는 것을 통해 일어나는 것으로 생각되어지고 있다.



글루코스를 포함하는 탄수화물과 페닐봉산과의 착물화는 오랜 기간 동안 공지된 것이며, 그 반응의 가역성은 설탕의 크로마토그래피 분리에 대한 원리로서의 역할을 해 왔다. 더 상세하게는, 1959년, Lorand 및 Edward는, 페닐봉산과 많은 포화 폴리올과의 수성 회합(association)에 대한 회합 상수를 보고하였다; 매우 약한(예를 들어, 에틸렌 글리콜, $K_d=360\text{mM}$)것부터 중간정도로 강한(예를 들어, 글루코스 $K_d=9.1\text{mM}$) 범위에 걸친 결합 상호작용. J. Yoon, 외, Bioorganic and Medicinal Chemistry 1(4):267-71 (1993)을 보시오.

U. S. Patent 5,503,770 (James, 외)는, 글루코스를 포함하는 당류에 결합하여 높은 강도의 형광을 방출하는 형광성 봉산-함유 화합물을 기재하고 있다. 형광 화합물은 형광단, 적어도 하나의 페닐 봉산 모이어티, 그리고 적어도 하나의 아민-공급 질소 원자를 포함하는 분자 구조를 갖는데, 여기서 질소 원자는 봉산과 분자 내 상호작용을 할 수 있도록 페닐 봉산 모

이어티에 근접하게 배치된다. 이러한 상호작용으로 인해, 화합물은 당류와 결합할 때 형광을 방출하게 된다. U. S. Patent 5,503,770은 당류를 검출하기에 적절한 화합물을 기재하고 있다. 또한 T. James, 외, *J. Am. Chem. Soc.* 117(35):8982-87 (1995)를 보시오.

부가적으로, 혈당을 검출하기 위해 안트릴봉산-함유 화합물을 사용하는 형광 센서는 업계에서 공지된 것이다. 예를 들어, J. Yoon, 외, *J. Am. Chem. Soc.* 114:5874-5875(1992)는 글루코스와 프럭토스의 결합을 포함하는 탄수화물 결합 신호용 형광 화학센서로서 안트릴봉산이 사용될 수 있음을 기재하고 있다.

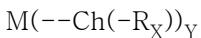
발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은, 검체가 검체-특이적 인식 성분을 통해 란타니드 금속 퀄레이트 착물을 하나 또는 하나 이상의 퀄레이터와 결합할 때 란타니드 금속 퀄레이트 착물에 의해 방출되는 형광의 어떠한 변화를 측정함으로써, 액체 또는 가스와 같은 매질 내의 검체의 존재 또는 농도를 검출하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 액체와 같은 매질 내의 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물과 같은 검체의 존재 또는 농도를 검출하기 위한 인디케이터 문자로서, 검체-특이적인, 인식 성분-함유 란타니드 금속 퀄레이트 착물을 제공하는 것이다.

발명의 요약

본 발명은 다음과 같은 화학식을 갖는 형광성 란타니드 금속 퀄레이트 착물을 포함하는, 검체의 존재 또는 농도를 검출하기 위한 인디케이터 문자에 관한 것이다.



상기 식 중:

M은 란타니드 금속 이온을 나타내고; Ch는 리간드, 바람직하게는, β -디케톤 또는 그것의 질소 유사체, 디히드록시, 카르복실 배위 헤테로사이클, 에놀, 매크로비시클릭 크립탄드(즉, 케이지-타입 리간드), 페닐포스폰산, 또는 폴리아미노-폴리카르복실산 중 어느 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있는 유기 리간드를 포함하는 퀄레이터를 나타낸다. Ch의 유기 리간드는 또한 질소의 헤테로사이클, 황, 그리고 연결된 카르복실 중 어느 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다. Ch의 유기 리간드는, 바람직하게는 벤질기, 나프틸기, 안트릴기, 폐난트릴기, 또는 테트라실기를 포함하는 방향성, 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 모이어티와, 1 내지 10 탄소 원자를 포함하는 알칸 또는 알켄기 중 어느 하나 또는 그 이상을 더 포함할 수 있다. 더욱이, M과 착물화된 하나 또는 그 이상의 퀄레이터는 같은 퀄레이터 또는 다른 퀄레이터들의 혼합물일 수 있다(소위 "혼합된 리간드 또는 "삼중 퀄레이트(ternary chelates)").

R은 검체-특이적 인식 성분을 나타내는데, 이중 하나 또는 하나 이상은 퀄레이트 착물의 하나 또는 하나 이상의 리간드에 결합하지만, 퀄레이트 착물의 모든 리간드에 결합될 필요는 없다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, R은 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물을 검출하기 위한 보로네이트기 또는 보로네이트기를 포함하는 화합물일 수 있다.

X는 하나 또는 하나 이상의 퀄레이터 각각에 결합되는 인식 성분 R의 개수를 나타낸다. X는 0에서 8까지의 정수 중 하나일 수 있고, 본 발명의 어떤 바람직한 구체예에서는, X=0 내지 4 또는 X=0 내지 2이다. 부가적으로, 하나 또는 하나 이상의 퀄레이터 각각에 결합되는 인식 성분 R의 개수는, 하나 또는 하나 이상의 퀄레이터에 대해 $X > 0$ 인 경우, 같을 수도 다를 수도 있다. Y는 M과 착물화된 퀄레이터의 개수를 나타내며, 1 내지 4의 정수 중 하나일 수 있다. 본 발명의 어떤 바람직한 실시예에서는, Y=1, Y=3, 또는 Y=4이다.

본 발명은 또한 상기와 같이 정의된 형광성 란타니드 금속 퀄레이트 착물에 관한 것이다.

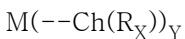
본 발명은 더 나아가 상기한 인디케이터 문자 및 형광성 란타니드 금속 퀄레이트 착물을 이용하여 검체의 존재 또는 농도를 검출하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 샘플을 상기에서 정의된 화학식을 갖는 형광성 란타니드 금속 퀄레이트 착물을 포함하는 인디케이터 문자에 노출시키는 단계, 그리고 란타니드 금속 퀄레이트 착물에 의해 방출되는 형광의 어떠한 변화를 측정함으로써 검체의 존재 및 농도를 검출하는 단계를 포함한다.

본 발명에서, 검체의 존재 및 농도는, 검체가 하나 또는 하나 이상의 검체-특이적 인식 성분을 통해 칼레이트 착물의 하나 또는 하나 이상의 칼레이터에 결합될 때 란타니드 금속 칼레이트 착물에 의해 방출되는 형광의 어떠한 변화를 측정함으로써 검출한다. 상세하게는, 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물과 같은 검체의 존재 및 농도는, 검체가 칼레이트의 검체-특이적 인식 성분(글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물을 검출하려고 할 때는 보로네이트-함유 인식 성분)에 결합할 때 형광성 금속 이온에 의해 방출되는 형광의 강도 또는 수명의 변화(즉, 형광은 파장에 따라 감쇄하거나 증대되거나 또는 시프트된다)를 관찰 및/또는 측정함으로써 결정한다.

본 발명은, 긴 스토크 시프트와 충분한 길이의 형광 수명(나노초 대신에 마이크로초로 측정가능)을 갖는 형광 인디케이터 분자를 이용하고, 그로써 검체 검출의 민감도를 감소시킬 수 있으며 소광되는 농도가 아닌 어떠한 배경 잡음 및 다른 방해 물의 영향을 감소시킴으로써, 액체 또는 가스와 같은 매질 내에서 검체-특이적 방법으로 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물과 같은 검체를 검출할 수 있다는 이점을 제공한다.

발명의 상세한 설명

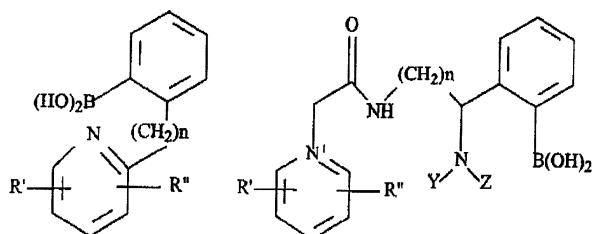
상기에서 서술한 바와 같이, 본 발명에서 검체의 존재 또는 농도는, 인디케이터 분자 내의 하나 또는 하나 이상의 검체-특이적 인식 성분을 통하여 검체에 결합한 후 형광 인디케이터 분자에 의해 방출되는 형광의 강도 또는 수명의 변화를 관찰 및/또는 측정함으로써 결정한다. 형광 인디케이터 분자는 다음과 같은 화학식을 갖는 란타니드 금속 칼레이트 착물을 포함한다.



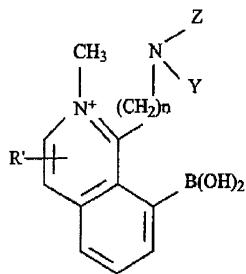
상기 식 중:

M은 란타니드 금속 이온을 나타내고; Ch는 리간드, 바람직하게는 β -디케톤 또는 그것의 질소 유사체, 디히드록시, 카르복실 배위 헤테로사이클, 에놀, 매크로비시클릭 크립탄드(즉, 케이지-타입 리간드), 폐닐포스폰산, 시클렌(테트라 지방족 카르복실레이트 또는 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸의 포스포네이트), 또는 폴리아미노-폴리카르복실산 중 어느 하나 또는 하나 이상을 포함할 수 있는 유기 리간드를 포함하는 칼레이터를 나타낸다. Ch의 유기 리간드는 또한 질소의 헤테로사이클, 황, 그리고 연결된 카르복실 중 어느 하나 또는 하나 이상을 포함할 수도 있다.

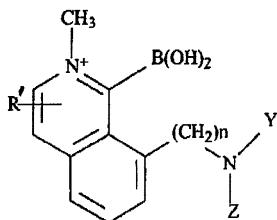
R은 검체-특이적 인식 성분을 나타내는데, 이 중 하나 또는 하나 이상은 칼레이트 착물의 하나 또는 하나 이상의 리간드에 결합하지만, 칼레이트 착물의 모든 리간드에 결합될 필요는 없다. 본 발명의 바람직한 구조예에서, R은 글루코스 또는 다른 시스-디올 또는 시스-디올로 행동하는 화합물을 검출하기 위한 기일 수 있다. 상기 기들은 보로네이트, 아르세나이트 및 저마네이트, 그리고 이들 기들을 포함하는 화합물을 포함한다. 대표적인 보로네이트-함유 화합물은 다음의 일반적인 구조(각 구조에서, R' 및 R"는 각각 독립적으로 융합 아릴; 지방족; 일차, 이차, 또는 3차 아민; 아미드; 카르복실; 케톤; 에스테르; 알콜; 또는 알데히드이고; 그리고 Y 및 Z는 각각 독립적으로 지방족, 알콕시 또는 아릴이다)를 갖는 것들을 포함한다:



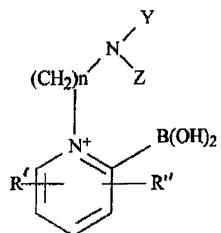
상기 식 중, n은 왼쪽 구조에서는 0 또는 1이고, 오른쪽 구조에서는 0, 1, 또는 2이고;



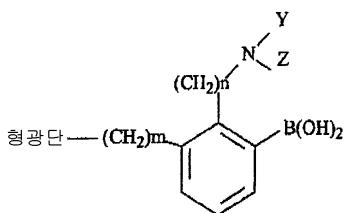
상기 식 중, n은 1이 고;



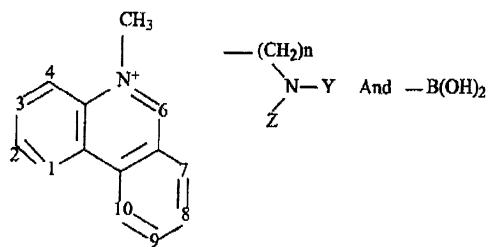
상기 식 중, n은 0 또는 1이 고;



상기 식 중, n은 2이 고;

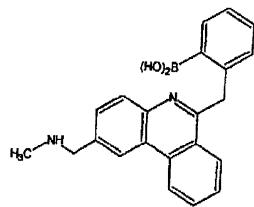


상기 식 중, m은 0-5이고, n은 1 또는 2이고; 그리고

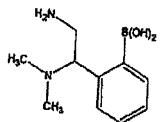


상기 식 중, n은 0 또는 1이고, 봉산 및 아민 치환기는 1 및 10 위치에, 3 및 4 위치에, 6 및 7 위치에, 7 및 8 위치에, 또는 9 및 10 위치에 쌍으로 위치한다.

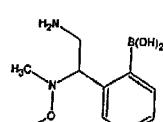
상세한 보로네이트-함유 화합물 중 일부는 다음을 포함한다:



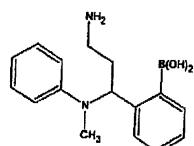
타겟 A



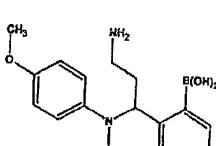
타겟 B



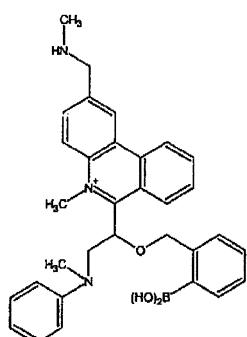
타겟 B-MeO



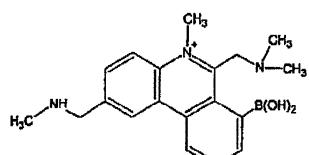
타겟 C



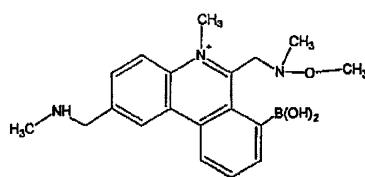
타겟 C-MeO



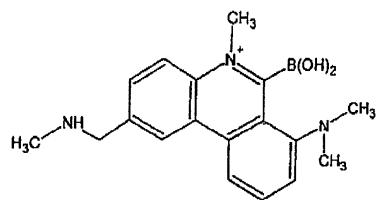
타겟 D



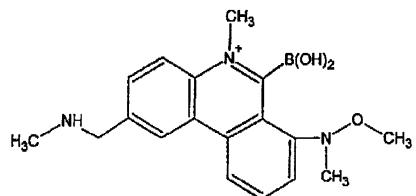
타겟 E



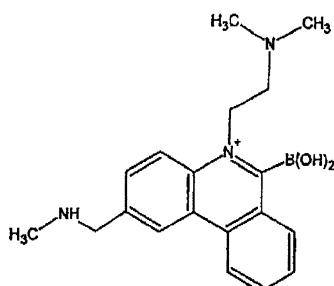
타겟 E-MeO



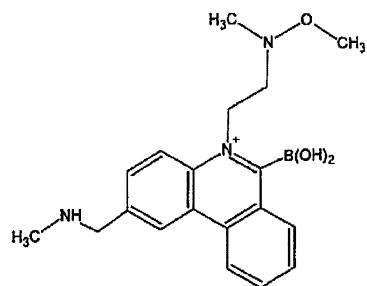
타겟 EE



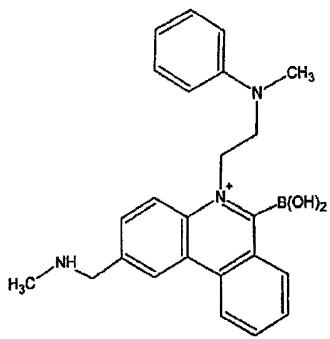
타겟 EE-MeO



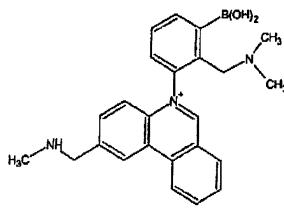
타겟 F



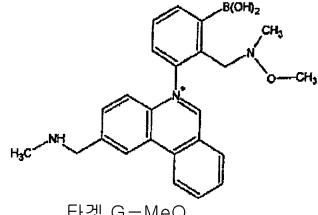
타겟 F-MeO



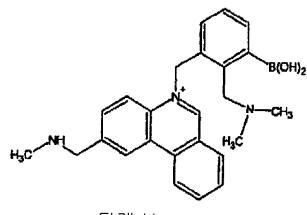
타겟 F-Phe



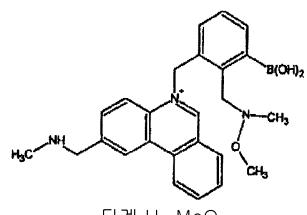
타겟 G



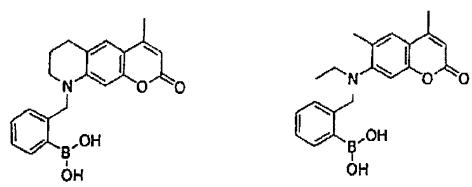
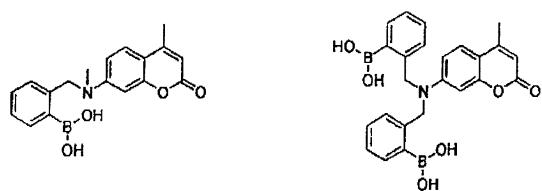
타겟 G-MeO



타겟 H



타겟 H-MeO



글루코스 외의 시스-디올 겸체 화합물의 예는 프리토스 및 글리세롤과 같은 다른 당을 포함한다. 도파민, 에피네프린 및 노르에피네프린과 같은 호르몬을 포함하여 카테콜(o-디히드록시벤젠) 및 카테콜아민은, 보로네이트 인식 성분과의 반응성에 관하여 시스-디올과 흡사한 인접하는 (오르토) 히드록실을 포함한다.

란타니드 금속 이온 M은 유로피움(Eu³⁺), 사마리움(Sm³⁺), 테르븀(Tb³⁺), 디스프로슘(Dy³⁺) 또는 네오디뮴(Nd³⁺)의 이온일 수 있고, 그리고 바람직하게는 유로피움(Eu³⁺), 또는 테르븀(Tb³⁺)의 이온이다.

킬레이터 Ch의 리간드는 또한, 벤질, 나프틸, 안트릴, 페난트릴 또는 테트라실기를 포함하는 방향족, 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 모이어티 뿐만 아니라, 바람직하게는 1 내지 10 탄소 원자를 포함하는 알кан 또는 알켄 기 중 어느 하나 또는 하나 이상을 포함하는 유기 리간드일 수 있다.

리간드는 또한 리간드가 검체-특이적 인식 성분 R이 결합될 수 있는 모이어티를 더 포함하는 한, 원한다면 $-CF_3$ 및 C_2F_5 와 같은 기들을 포함할 수도 있다. 부가적으로, 킬레이트 착물의 어떠한 리간드는 유기 리간드 대신 무기 리간드일 수도 있다.

X는 하나 또는 하나 이상의 킬레이터 각각에 결합된 인식 성분 R의 개수를 나타낸다. X는 0 내지 8의 정수 중 하나일 수 있고, 본 발명의 바람직한 특정 구체예에서는, X=0 내지 4 또는 X=0 내지 2이다. 부가적으로, 만약 하나 또는 하나 이상의 킬레이터에 대하여 $X > 0$ 이라면, 하나 또는 하나 이상의 킬레이터 각각에 결합되는 인식 성분 R의 개수는 같을 수도 있고 다를 수도 있다. Y는 M과 착물을 이루는 킬레이터의 수를 나타내며 이는 1 내지 4의 정수 중 하나일 수 있다. 본 발명의 바람직한 특정 구체예에서는, Y=1, Y=3 또는 Y=4이다.

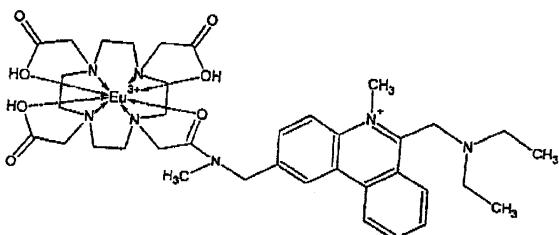
본 발명의 바람직한 특정 구체예에서, 란타니드 금속 킬레이트 착물은, 서로다른 킬레이터들로서 이중 하나 또는 하나 이상의 킬레이터는 검체-특이적 인식 성분 R을 함유하지 않는 킬레이터들의 혼합체를 포함할 수 있다. 삼중 리간드 킬레이트라고도 알려진 그러한 혼합된 리간드 킬레이트를 사용하는 이점에는, 폴리아미노-폴리카르복실산과 같은 일부 유기 리간드는 β -디케톤과 같이 다른 리간드보다 물에 더 잘 녹는다는 사실이 포함된다. 그러므로, 본 발명의 적어도 하나의 구체 예에서 란타니드 금속 킬레이트 착물은 첫째, 하나 또는 하나 이상의 검체-특이적 인식 성분을 함유하는 하나 또는 하나 이상의 β -디케톤, 그리고 둘째, 킬레이트 착물의 물 용해도를 촉진시키는, 폴리아미노-폴리카르복실산과 같은 하나 또는 하나 이상의 다른 리간드를 포함할 수 있다.

본 발명의 다른 구체예에서, 킬레이트 착물의 하나 또는 하나 이상의 킬레이터는 $-NH_2$ 또는 $-OH$ 기, 또는 킬레이트 착물이 폴리리신과 같은 폴리머나 링커에 공유적으로 부착될 수 있도록 하는 치환기, 또는 다른 고체 지지체를 더 포함할 수 있다.

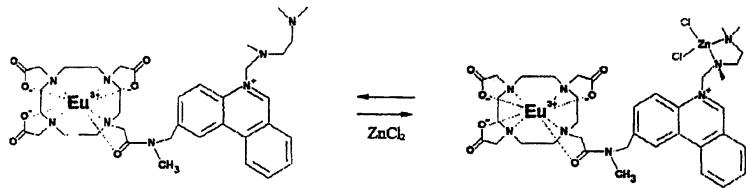
착물의 흡광 부분에서 란타니드 금속 이온으로의 에너지 전이를 실행하기 위하여, 흡광 부분의 트리플렛 상태 에너지는 바람직하게는 약 230kJ/mol 이상이다. 바람직한 흡광 부분은, 페난트리딘(258kJ/mol), 소랄렌(262kJ/mol), 페녹사진(261kJ/mol), 페난트렌(258kJ/mol), 트리페닐렌(280kJ/mol), 벤조페논(287kJ/mol), 카바졸(293kJ/mol) 및 쿠마린(258kJ/mol)을 포함한다.

본 발명의 란타니드 금속 킬레이트 착물의 형광은, 하나 또는 하나 이상의 인식 성분 R을 통하여 킬레이트 착물의 하나 또는 하나 이상의 킬레이터에 검체가 결합함으로써 검체-특이적 방법으로 조절된다.

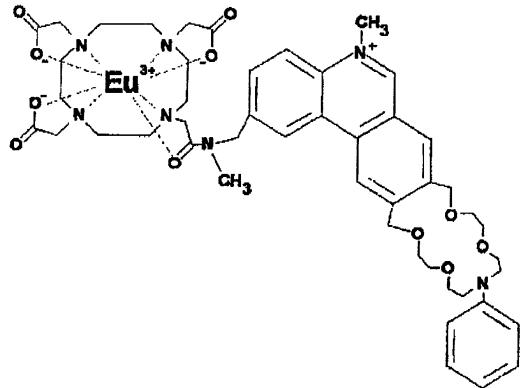
본 발명의 형광 인디케이터 분자는, 검체-특이적 인식 성분 R과 반응을 일으키며 그로인한 특정 방법으로 검출될 수 있는 여러 가지 가능한 다른 화학적 검체들을 검출하는 데 사용될 수 있다. 본 발명을 이용하여 검출되는 바람직한 검체는 글루코스, 프리토스 및 다른 시스-디올 화합물과 같은 검체들이다. 그러나, 인식 성분의 선택에 따라서는, 본 발명의 인디케이터 분자들은 다른 많은 검체들을 검출하는데에도 유용하다. 예를 들어, 다음의 분자는 pH 인디케이터로서 유용하도록 할 수 있는 인식 성분을 갖는다(Lippitsch, 외, Sensors and Actuators B 38-39 (1997) 96-102를 보시오):



부가적으로, 다음은 아연 검체에의 결합에 이용될 수 있는 인식 성분을 포함하는 많은 가능한 화합물 중 하나이다(예를 들어, Huston, 외, JACS 1988, 110, 4460을 보시오):



도시된 바와 같은 아연 결합은, 상기 인디케이터 분자의 형광 및 유사한 인식 성분을 포함하는 그와 비슷한 다른 화합물의 형광을 증가시킬 것이다. 더 나아가, 다음은 칼륨 검체의 검출에 이용될 수 있는 인식 성분을 포함하는 많은 가능한 화합물들 중 하나이다(예를 들어, Sousa, 외, ACS Symposium Series 538, 1992, pp. 10-24):



이 화합물에서, 칼륨 이온은 왕관 에테르 모이어티 내에 배위되어서 3차원 구조 변화를 일으켜, 분자의 아닐린 부분이 폐난트리딘 부분 위로 포개어 짐으로써 형광이 소광되는 결과를 낳는다.

본 발명의 인디케이터 분자를 이용하여 검출가능한 화학적 검체는 여러 가지 다양한 고체, 기체, 및 액체 형태로 존재할 수 있다. 부가적으로, 액체 및 기체 매질 모두를 포함하는 여러 가지 매질 내에서 본 발명의 인디케이터 분자를 이용하여 검체를 검출할 수 있다.

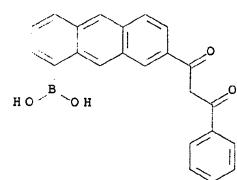
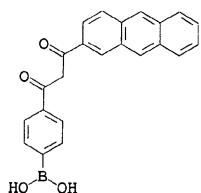
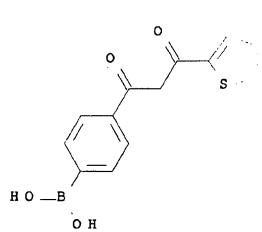
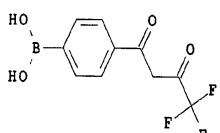
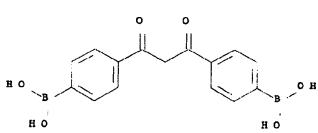
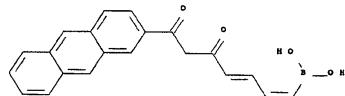
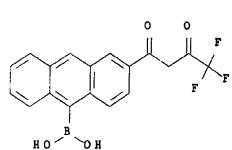
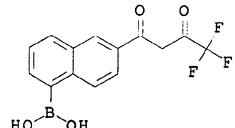
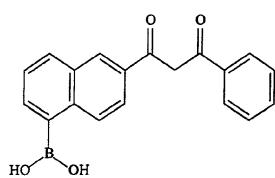
본 발명의 형광 화합물에 대해, 가능한 용도들이 다수 존재하는데, 여기에는 에너지, 의학, 및 농업의 분야에서 인디케이터 분자로서의 이용이 포함된다. 예를 들어, 형광 화합물은 혈액 또는 소변 내 글루코스의 낮은-수준 또는 초과-수준을 검출하기 위한 인디케이터 분자로 이용됨으로써, 당뇨 및 부신 결핍과 같은 질병을 진단하기 위한 가치있는 정보를 제공할 수 있다. 인간 치료의 적용을 위해 글루코스의 의학적/약학적 생성은 관찰되고 조절될 것이 요구된다. 본 발명의 농업에의 가능한 이용에는, 콩 및 다른 농업적 생산물 내에서 글루코스와 같은 검체의 수준을 검출하는 것 등이 있다. 포도주용 포도와 같이 고가의 생산물에 대한 중요한 수학 결정에 있어서, 글루코스는 주의깊게 측정되어야 한다. 글루코스는 발효 공정에서 가장 값비싼 탄소원이자 공급재료이므로, 최적의 반응기 공급을 조절을 위한 글루코스 관찰은 에너지원 알콜(power alcohol) 생산에서 중요하다. 생산에 거대한 양의 글루코스와 발효가능한 (시스-디올) 당을 모두 소모하는 소프트 드링크 및 발효 음료의 생산 동안에도 반응기 글루코스 농도의 혼합 및 조절은 품질 조절에 역시 중요하다.

다양한 검출 기술 또한 당업계에서 알려져 있는데, 거기에 본 발명의 형광 화합물을 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 형광 화합물은 형광 감지 장치(예를 들어, U. S. Patent No. 5,517,313)에 사용될 수 있고, 또는 눈으로 볼 수 있는 검사를 위한 테스트 종이와 같은 폴리머 물질에 결합될 수 있다. 후자의 기술은 예를 들어, 리트머스 종이의 탈색으로 pH를 측정하는 것과 유사한 방법으로 글루코스 측정을 할 수 있다. 여기에서 기술된 형광 분자는 또한 Shimadzu, Hitachi, Jasco, Beckman 및 그외 사람들에 의해 만들어진 분광형광계 또는 임상적인 분석기와 같은 표준 benchtop 분석 기구에서 간단한 시약으로 이용될 수도 있다. 이들 분자들은 또한 Ocean Optics (Clearwater, 플로리다), 또는 Oriel Optics에 의해 제조된 섬유 광학에 기초한 센서 및 분석 형광계에 있어서 검체 특이적 화학적/광학적 신호 변환을 제공한다.

본 발명의 바람직한 구체예에서, 하나 또는 그 이상이 란타니드 금속 이온과 촉물화할 수 있는 여러 가지 가능한 키팅레이터들은, 검체-특이적 인식기 R로서 거기에 부착된 하나 또는 하나 이상의 보로네이트기를 갖는 유기 리간드를 포함하며, 그 예는 아래에 나타낸다.

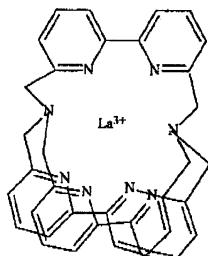
A. β-디케톤

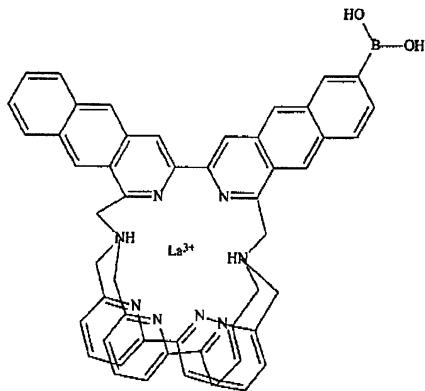
본 발명의 란타니드 금속 칼레이트 치약의 칼레이터 Ch는 β -디케톤에 기초한 리간드일 수 있다. 그 예는 아래와 같다.



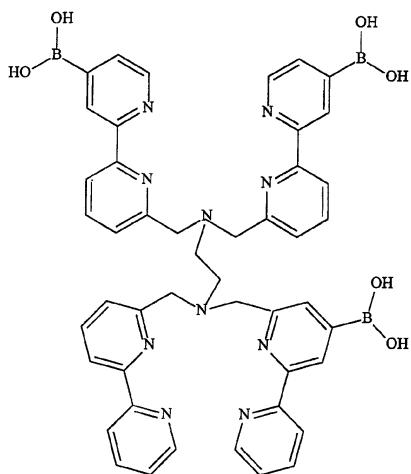
B. 매크로비시클릭 크립탄드(케이지-타입 리간드)

본 발명의 칼레이터 Ch의 또 다른 예는 매크로비시클릭 크립탄드(또는 케이지-타입 리간드)일 수 있으며, 그 예를 아래와 같고 다음과 같은 형태를 갖는다:



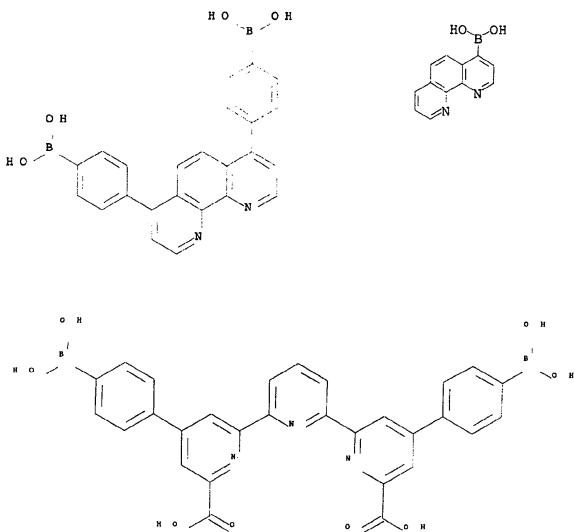


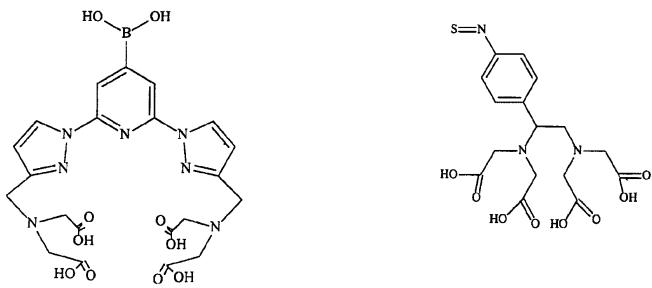
본 발명의 또 다른 구체예에서 퀼레이터 Ch는 다음과 같은 구조를 갖는 매크로비클릭 크립탄드일 수 있다.



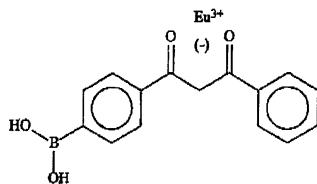
C. 질소 헤테로사이클 및 카르복실레이트 배위 리간드

본 발명의 란타니드 금속 퀼레이트 착물의 퀼레이터 Ch의 구체예는 또한 다음의 질소 헤테로사이클 및 카르복실레이트 배위 리간드를 포함한다.

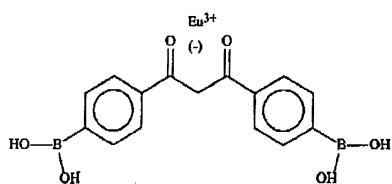




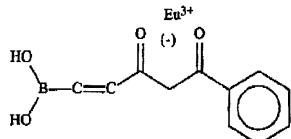
본 발명의 가장 바람직한 형광성 보로네이트 인식 성분-함유 란타니드 킬레이트의 일부는 다음과 같은 구조를 포함하는 다음의 유로피움 킬레이트(명확성을 위하여 하나의 리간드만을 갖는 것으로 도시하였다)를 포함한다:



유로피움-*p*-보로네이트디벤조일메탄(II)

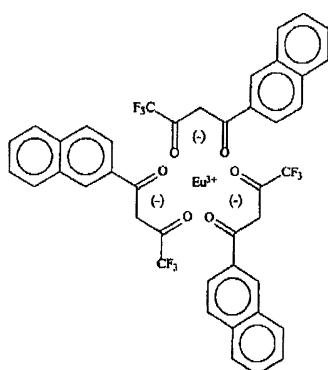


유로피움 디-*p*-보로네이트디벤조일메탄(III)

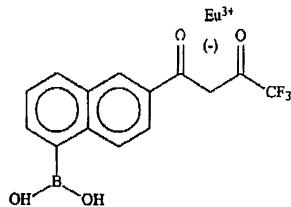


유로피움 벤조일에틸렌 메탄-2-보로네이트(IV)

본 발명의 바람직한 구체예에서, 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물에 대한 검체 특이성을 갖는 보로네이트-함유 인식 성분은 형광 유로피움 (테트라카이스) 베타-나프토일트리플루오로아세테이트 (Eu-bNTA) 킬레이트에 부착되었다. 킬레이트의 유기 리간드 부분은 아래에 도시한 바와 같이 란타니드 금속 이온(예를 들어, 유로피움) 주위로 껍데기를 형성하는 것으로 알려져 있다:

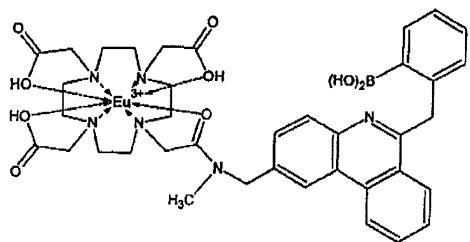


부가적으로, 용매가 달라짐에 따라 랜타니드 금속 이온의 형광 봉괴 시간에 영향을 미친다는 사실(예를 들어, 물은 유로피움 이온의 형광을 소광한다) 또한 알려져 있다. 따라서 검체-특이적 인식 성분(예를 들어, 보로네이트-함유 인식 성분)을 갖는 외부 겹데기의 유기 리간드를 변경하는 것이 유로피움 이온의 봉괴 시간을 눈에 띌 정도로 동요시킬 수 있을지가 연구되었다. 다음의 유로피움 칼레이트, 유로피움 (태트라키스) 나프토일트리플루오로메탄 (Eu-bNTA) 보로네이트를 합성하여 테스트하였다.

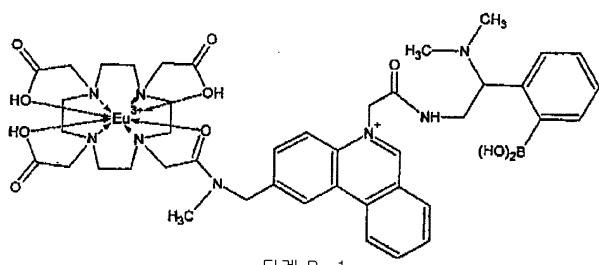


Eu-bNTA 보로네이트는 약 340nm의 둘째 파장과 다른 유로피움 칼레이트에 대해서와 같은 약 613nm의 방출 파장을 갖는 것으로 밝혀졌다.

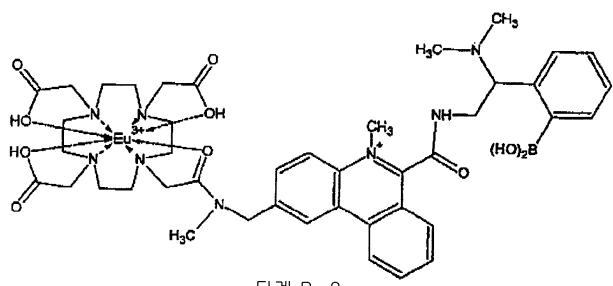
글루코스를 포함하는 시스-디올의 검출을 위한 다른 구체예 화합물은 다음의 것등이 있다.



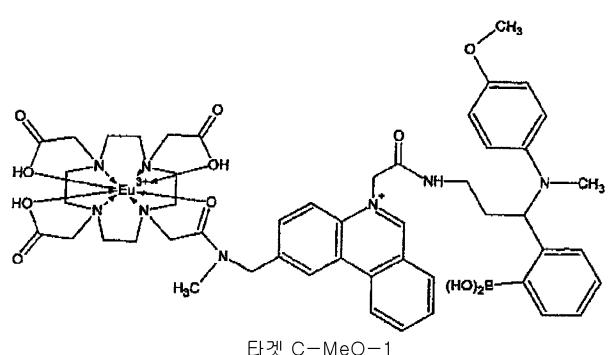
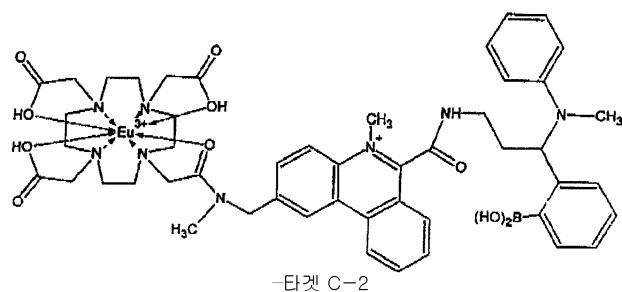
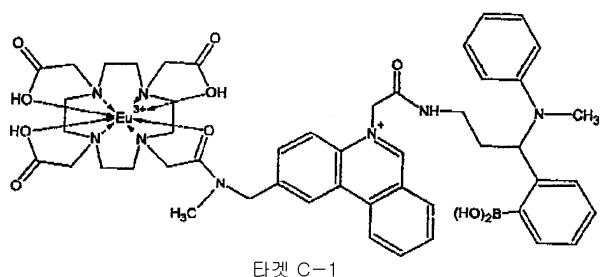
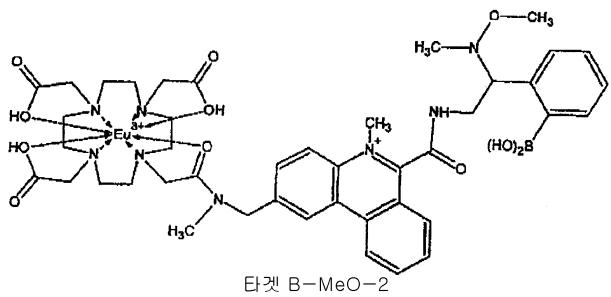
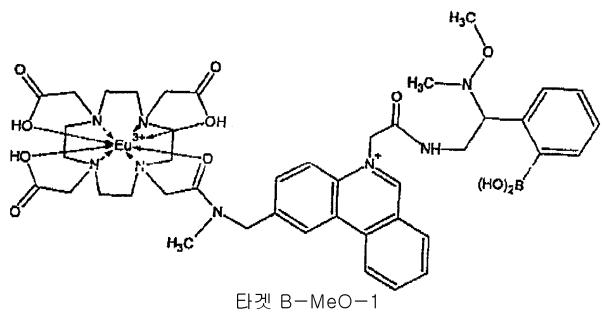
타겟 A

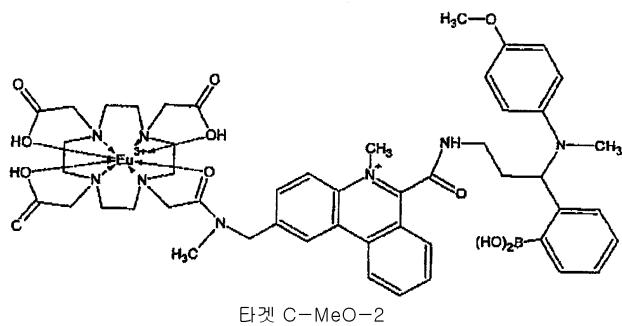


타겟 B-1

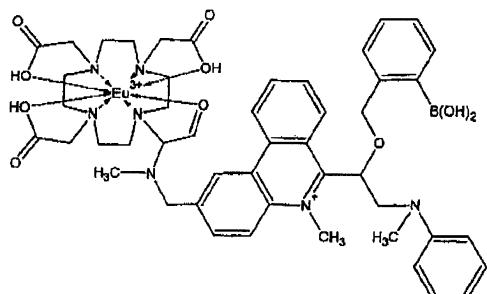


타겟 B-2

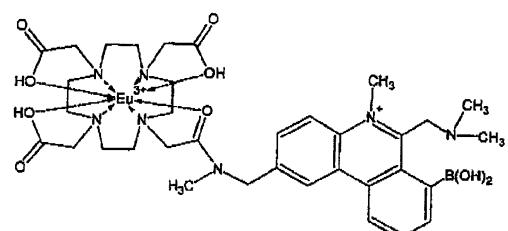




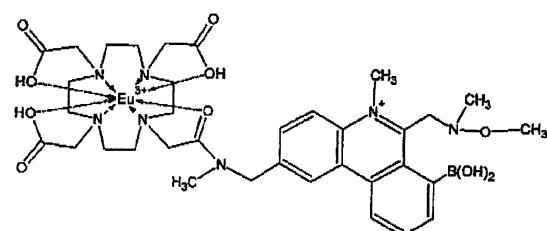
타겟 C-MeO-2



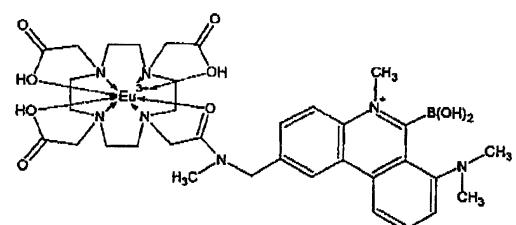
Target D



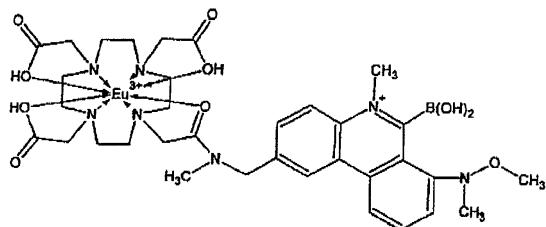
타겟 E



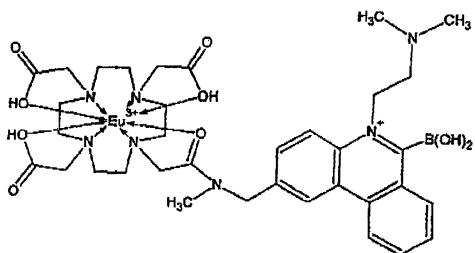
타겟 E-MeO



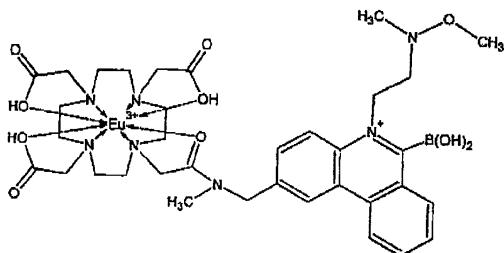
타겟 EE



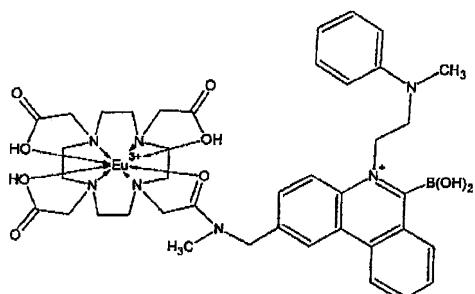
타겟 EE-MeO



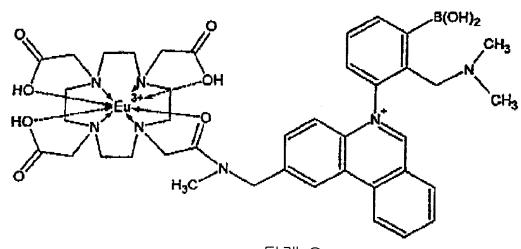
타겟 F



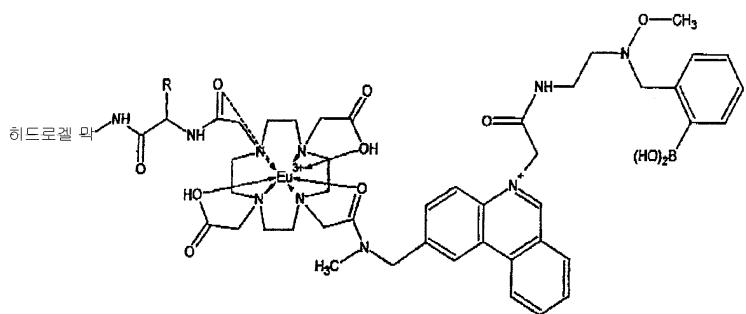
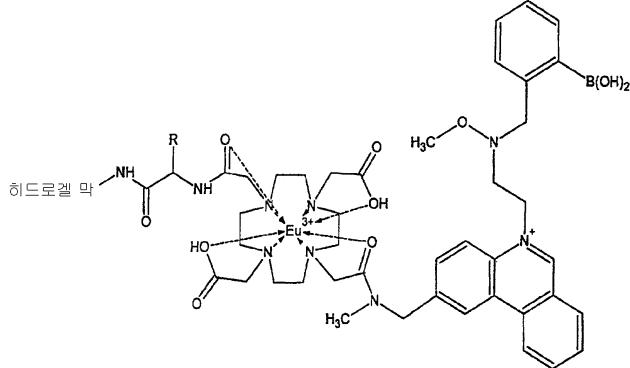
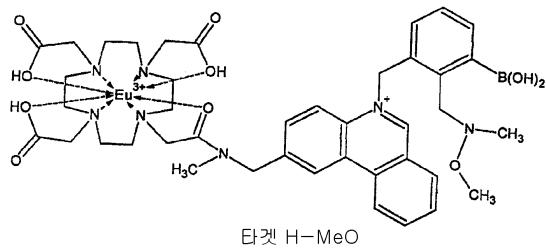
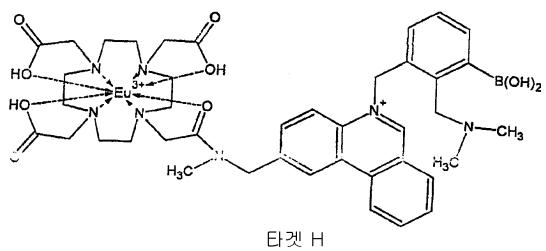
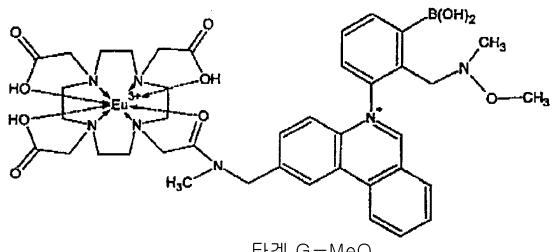
타겟 F-MeO

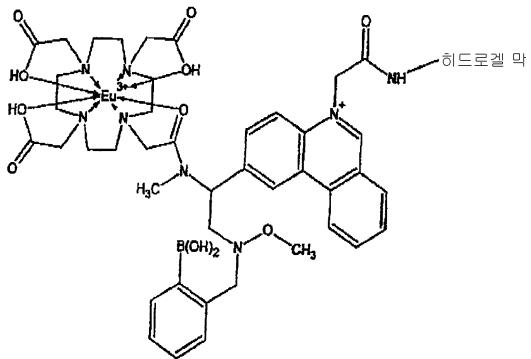


타겟 F-Phe



타겟 G





도 4 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 이점은 에탄올 용액 내에서 Eu-bNTA의 형광 강도 및 수명에 카테콜(*o*-디히드록시벤젠)이 미치는 영향을 측정함으로써 바람직한 구체예에 의해 설명되어 질 수 있다. Eu-bNTA의 존재 하의 에탄올 용액에 카테콜을 첨가한 후 검출되고 측정되어진 형광 강도의 변화를 도 5에 나타내었다. 보로네이트-함유 인식 성분이 없는 Eu-bNTA의 형광 수명은 $362\mu\text{s} \pm 1\mu\text{s}$ 인 반면, Eu-bNTA 보로네이트의 형광 수명은 $270\mu\text{s} \pm 4\mu\text{s}$ 로 감소하였다. Eu-bNTA 보로네이트를 카테콜에 노출시킨 후, 분자의 형광 수명은 $209\mu\text{s} \pm 15\mu\text{s}$ 로 더 감소하였다.

Eu-bNTA 보로네이트의 형광 강도 및 수명에 카테콜이 미치는 영향은 물에서도 측정하였는데, 킬레이트의 유로피움 이온의 형광을 소광하는 것으로 나타났다. 그 후, 산화 트리옥틸포스핀("TOPO")을 첨가함으로써 유로피움 킬레이트 착물의 내부 겹테기에 위치한 배위 사이트를 보호하여 물의 영향으로 소광되는 것을 방지하였다. Eu-bNTA 보로네이트를 함유하는 수용액에 TOPO를 첨가한 것은 도 3에 도시하였다.

Eu-NTA 보로네이트는 또한 메탄올 내에서 글루코스의 존재를 검출할 수 있었다. 더 상세하게는, Eu-NTA 보로네이트로써 글루코스 적정을 메탄올 내에서 행하였다. 글루코스 적정으로부터 얻어진 데이터는 도 6 내지 도 8에 나타내었다. 도 6은 글루코스의 농도 증가에 대한 Eu-NTA 보로네이트 적정을 도시하고 있다. 도 7에 나타난 결과는 Eu-NTA 보로네이트가 정상의 생리학적 수준인 대략 4.7 mMol 보다 훨씬 낮은 농도에서 글루코스의 존재를 검출할 수 있다는 것을 설명하고 있다. 도 7에 도시된 데이터로 나타난 바와 같이, 글루코스 농도의 차이는 약 0.5 mMol 미만의 생리학적 범위 내에서 식별될 수 있다. 0.001 mMol 글루코스 밑의 데이터 점들이 아주 근접하기 때문에 도 7이 글루코스 농도의 변화에 대한 Eu-bNTA 보로네이트의 민감한 하측 말단을 보여주지 못하지만, 도 8은 글루코스 농도 대 I/I_0 의 세미-로그 플롯으로서 도 7의 낮은 범위를 도시한다.

도 9는 메탄올 내 글루코스 및 프럭토스에 대해 유로피움 디벤조일메탄 (Eu(DBM)) 및 Eu(붕소화 DBM) 각각을 적정한 결과를 나타낸다. 상세하게는, 글루코스 및 프럭토스 농도는 $0.0005, 0.005, 0.05, 1, 5, 10$ 및 20 mM 로 변화시켰다. 도 9 내의 글루코스 B 및 프럭토스 B에 대한 데이터 플롯은 Eu(붕소화 DBM)의 글루코스 및 프럭토스 적정을 나타낸다. 붕소화 유로피움 디벤조일메탄의 형광 강도는 약 0.01 mM 이상의 글루코스 및 프럭토스 농도에 노출되었을 때 상당히 증가하는 반면, 붕소화되지 않은 Eu(DBM)의 형광 강도는 글루코스 및 프럭토스의 첨가시에도 눈에 띌 정도로 변화하지는 않는다는 것을 도 9의 결과로부터 금방 알 수 있다. 특이성을 갖는 인식 성분(예를 들어, 보로네이트)이 없으면, 란타니드 금속 킬레이트 착물은 글루코스, 프럭토스, 또는 다른 시스-디올 화합물의 존재에 대해 반응을 나타내지 않는다. 따라서, 검체-특이적 인식 성분(본 예에서는 보로네이트기)가 있을 때, 본 발명의 란타니드 킬레이트 착물은 글루코스, 프럭토스, 및 다른 시스-디올 화합물의 존재에 대해 반응을 나타내며 따라서 상기와 같은 그리고 다른 검체의 존재 및 농도를 검출하는데 이용될 수 있다.

도 10 내지 도 13은, 샘플 내 글루코스 및/또는 프럭토스의 존재 및 농도를 검출할 수 있는, 본 발명에 따른 란타니드 금속 킬레이트 착물의 능력을 더 설명하고 있다.

상기에서 서술한 바와 같이, 본 발명의 형광 인디케이터 분자는 수많은 상이한 유형의 형광 센서에 이용될 수 있다. 형광 인디케이터 분자는 생물학적 유액 및 더 상세하게는 인간의 액체를 포함하는 리간드 샘플과 같은 샘플 내의 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물과 같은 검체의 존재 또는 농도를 검출하는 센서에 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 형광 인디케이터 분자는 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물에 침투할 수 있는 폴리머 매트릭스에 분산될 수 있다. 그리고 나서 액체 매질과 같은 매질 내의 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물의 존재 또는 농도는, 하나 또는 하나 이상의 보로네이트-함유 인식 성분을 통하여 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물에 결합될 때 인디케이터 분자에 의해 방출되는 형광의 강도 또는 수명의 변화를 측정함으로써 결정될 수 있다.

U. S. Patent 5,517,313은 여기에서 그 내용이 참고 문헌으로서 포함되어 있는데, 액체 매질 내에서 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물과 같은 검체의 존재 또는 농도를 측정하기 위하여 본 발명의 형광 인디케이터 문자가 사용될 수 있는 형광 감지 장치를 기재하고 있다. 이 감지 장치는 형광 인디케이터 문자-함유 매트릭스(이하 "형광 매트릭스"라고 함), 고투과 필터 및 광검출기가 층상 배열되어 있는 것을 포함한다. 이 장치에서, 광원, 바람직하게는 광-방출 다이오드(LED)가 적어도 일부분은 인디케이터 물질 내에 위치해있기 때문에, 광원으로부터의 입사광은 인디케이터 문자가 형광을 내도록 한다. 고투과 필터는 방출된 빛이 광검출기에 도달하도록 하는 동시에 광원으로부터의 산란된 입사광을 걸러낸다.

U. S. Patent 5,517,313에 기재된 장치에 채용된 인디케이터 문자의 형광은 글루코스 또는 다른 시스-디올 화합물과 같은 검체의 부분적인 존재에 의해 감쇄하거나 증대되거나 하여 변화된다.

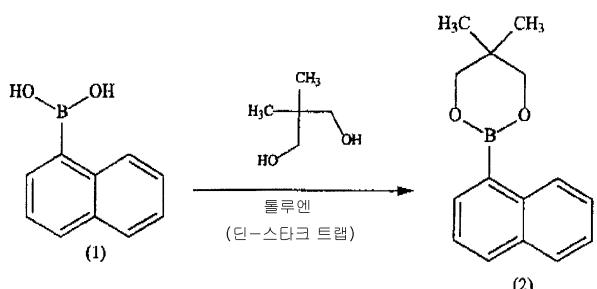
U. S. Patent 5,517,313에 기재된 센서에서, 인디케이터 문자를 가지고 있는 물질은 검체에 대해 투과성을 갖는다. 따라서, 검체는 둘러싸고 있는 테스트 매질로부터 그 물질내로 확산될 수 있으며, 그로써 인디케이터 문자에 의해 방출되는 형광에 영향을 미친다. 광원, 인디케이터 문자-함유 물질, 고투과 필터, 그리고 광검출기는 배열형성되어서, 인디케이터 문자에 의해 방출되는 형광의 적어도 일부가 광검출기에 영향을 주고, 둘러싸고 있는 매질 내에서의 검체(예를 들어, 클루코스)의 농도를 표시하는 전기적 신호를 생성한다.

본 발명의 형광 인디케이터 분자를 이용하는 다른 가능한 구체예에 따르면, 형광 감지 장치는 또한 공동-계류 중인 U. S. Patent Application Nos. 08/855,234, 08/855,235, 그리고 08/855,236에 기재되어 있으며, 이것들은 모두 참고문헌으로서 여기의 내용에 포함되어 있다.

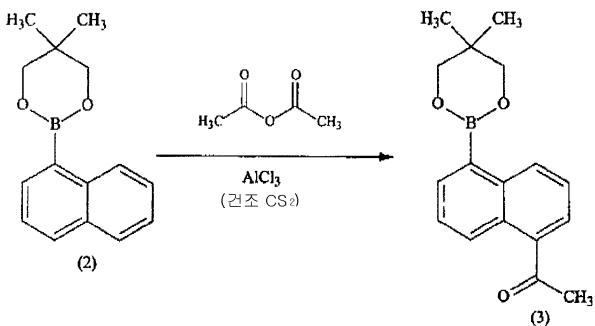
본 발명의 형광 인디케이터 문자는, 당해 기술분야의 숙련자라면 하기하는 통상의 과정에 따르는 반응 메카니즘을 포함하여 쉽게 알려진 반응 메카니즘 및 시약을 사용하여, 알맞은 양의 실험으로써 제조할 수 있다.

붕소화 유로피움 테트라키스 β -디케톤 착물의 제조

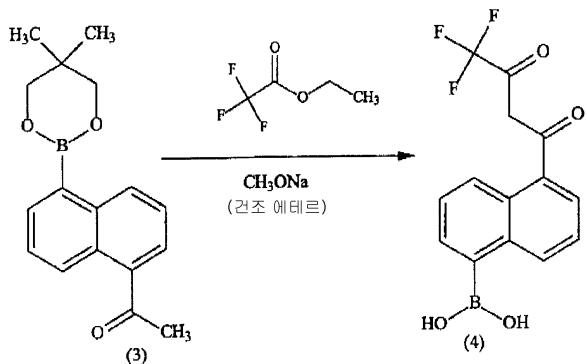
1. Frontier Scientific (Logan, Utah)로부터 입수 가능한 나프탈렌-1-붕산을 톨루엔에 용해시킨다.
 2. 우선, 붕산을 2,2-디메틸-1,3-프로판디올(Aldrich Chemical Company)과 반응시키고, 동시에 딘-스타크(Dean-Stark) 트랩에 의해 물을 공비적으로 제거함으로써 붕산을 보호하여(덮개를 씌운다), 2,2-디메틸프로판-1,3-디일 1-나프탈렌보로네이트를 하기와 같이 생성하도록 한다:



3. 그리고 나서, 상기의 덮개가 씌어진 봉산은, 봉산을 무수 이황화 탄소 내에서 무수 초산 및 삼염화 알루미늄과 반응시킴으로써 프리멜-크래프트 아세틸레이션에 의해 아세틸화하여 2,2-디메틸프로판-1,3-디일 5-아세틸-1-나프틸보로네이트를 생성할 수 있다. 점성 액체로 나타나는 반응 생성물은 일반적으로 대략 70%의 수율로 하기와 같이 얻어질 것이다:

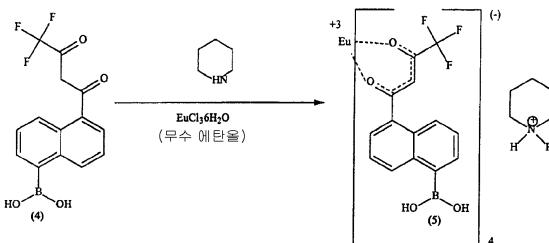


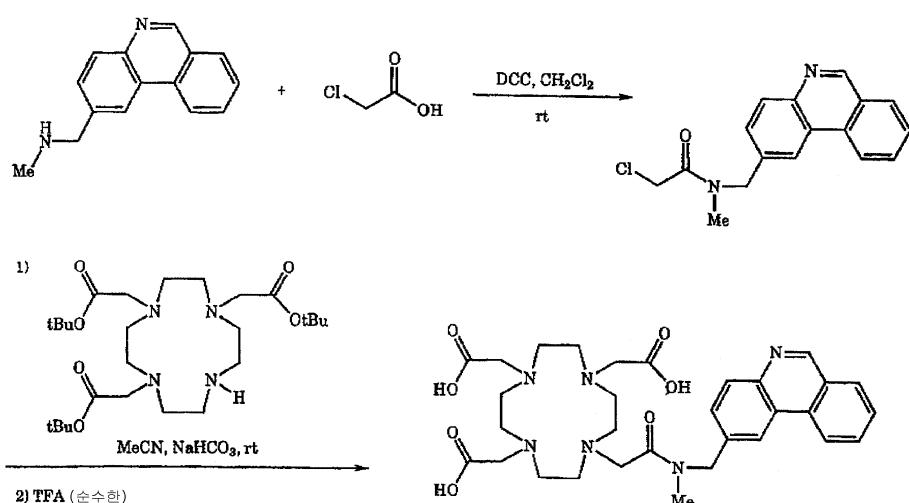
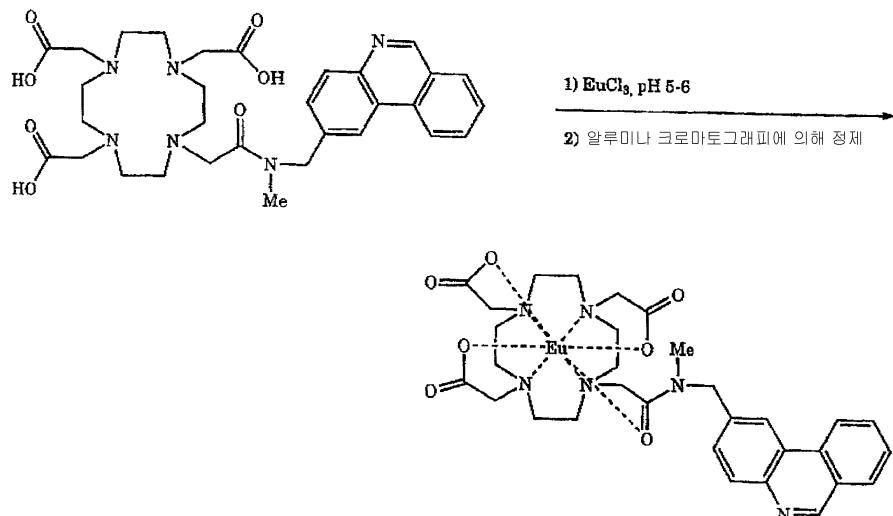
4. 그리고 나서, β -디케톤을 형성할 수 있으며, 보로네이트는 하기한 바와 같이 축합제로서 나트륨 메톡시드(건조 에테르 내의)를 사용하여 (3)과 삼불화초산 에틸(Aldrich) 사이의 클라이센 축합에 의해 덮개를 벗길 수 있다:



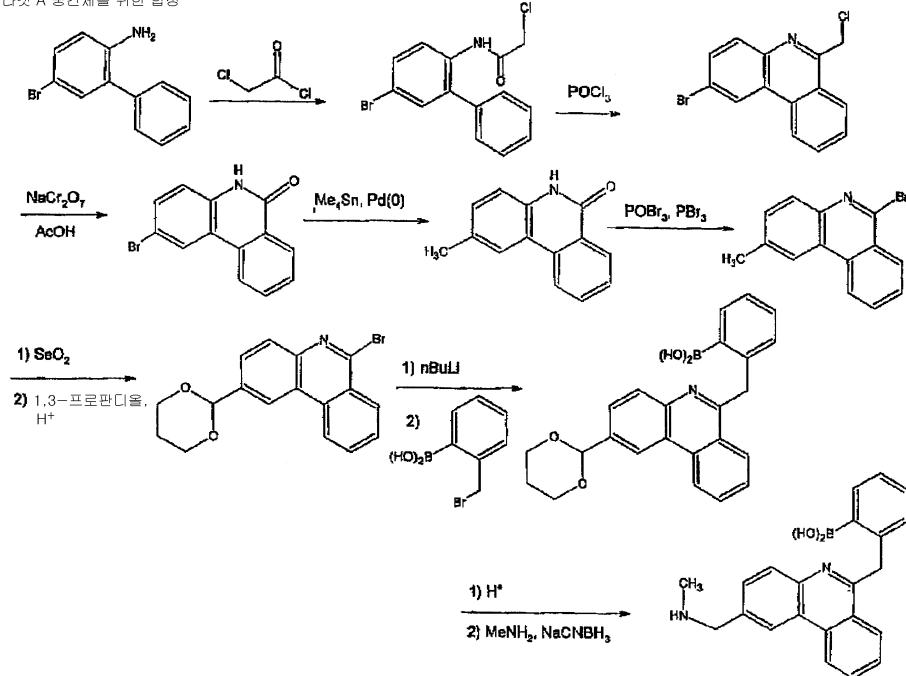
5. 그리고 나서, 중간 생성물 (4)의 5-나프토일-트리플루오로아세톤봉산은, 염화 메틸렌으로 용리하면서 준비된 실리카겔 TLC에 의해 정제할 수 있다. 적어도 하나의 제제에서 세 번째 밴드 용리($R_f = 0.70\text{--}0.85$)가 플레이트로부터 회수되었고, 프로톤 NMR에 의해 400MHz에서 분석되었다. 상기 NMR 스펙트럼은 β -디케톤의 예놀 형태의 특징적인 패턴을 보여주며, 더 상세하게 말하면 시그마 6.69(싱글렛) 및 시그마 15.28(브로드 싱글렛)에서 피크를 나타낸다.

6. β -디케톤 (4)을, 무수 에탄올 내의 유로피움 트리클로리드 헥사하이드레이트(Aldrich) 및 피페리딘과 반응시킴으로써, 하기와 같이 검체-특이적 인식 성분으로서 보로네이트기를 함유하는 최종적인 유로피움 테트라키스 인디케이터 착물을 생성한다:

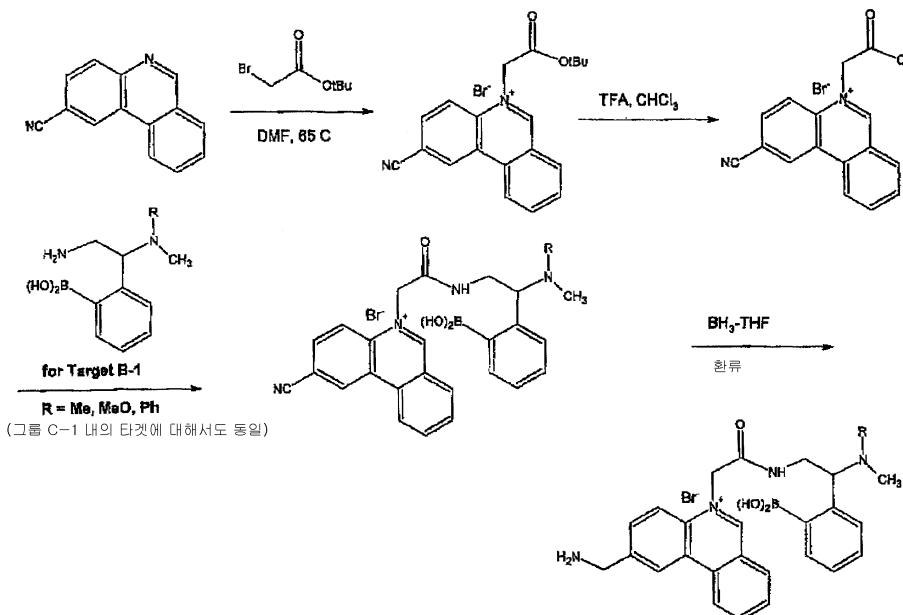




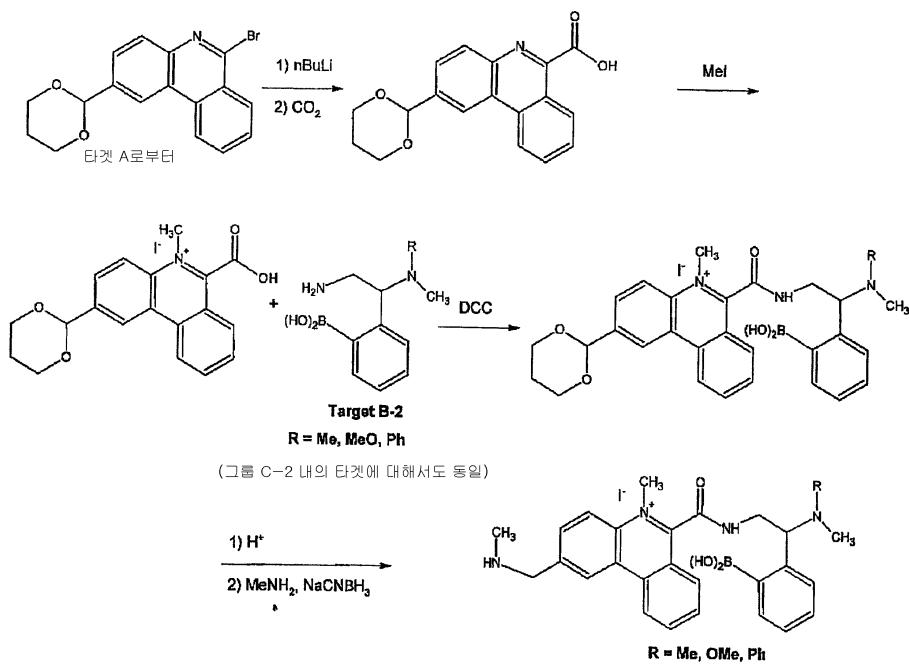
단계 A 중간체를 위한 합성



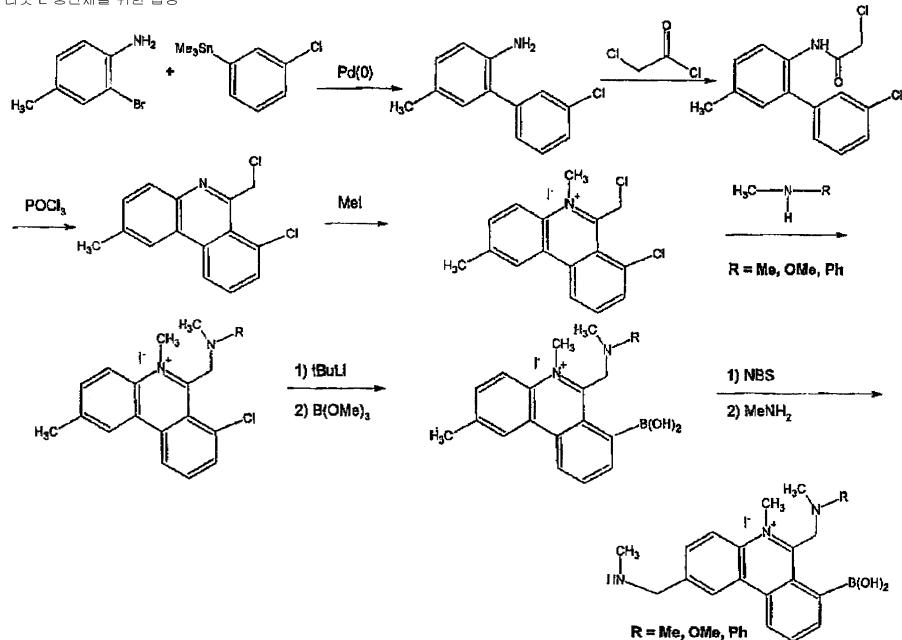
타겟 B-1, C-1 중간체를 위한 합성



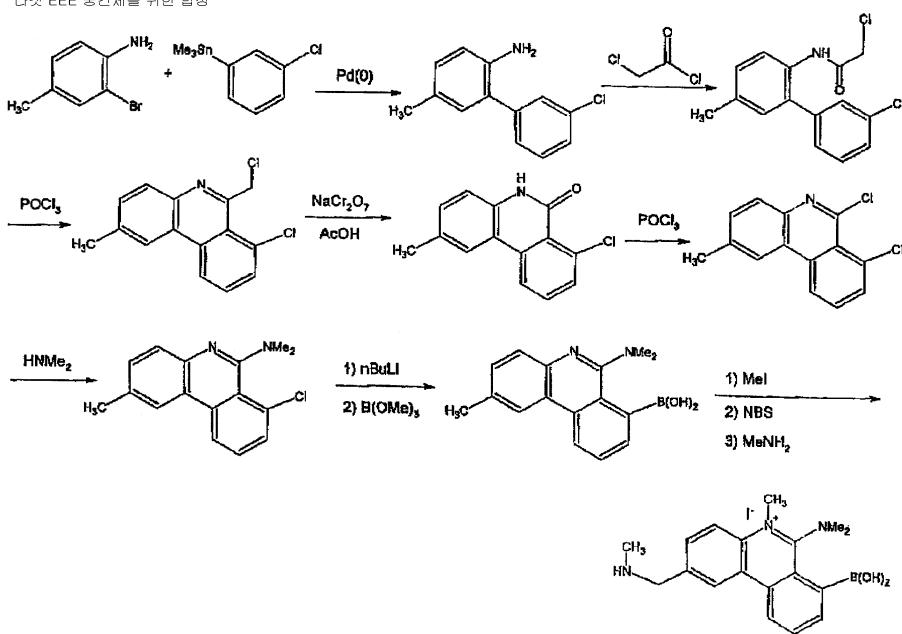
타겟 B-2, C-2 중간체를 위한 합성



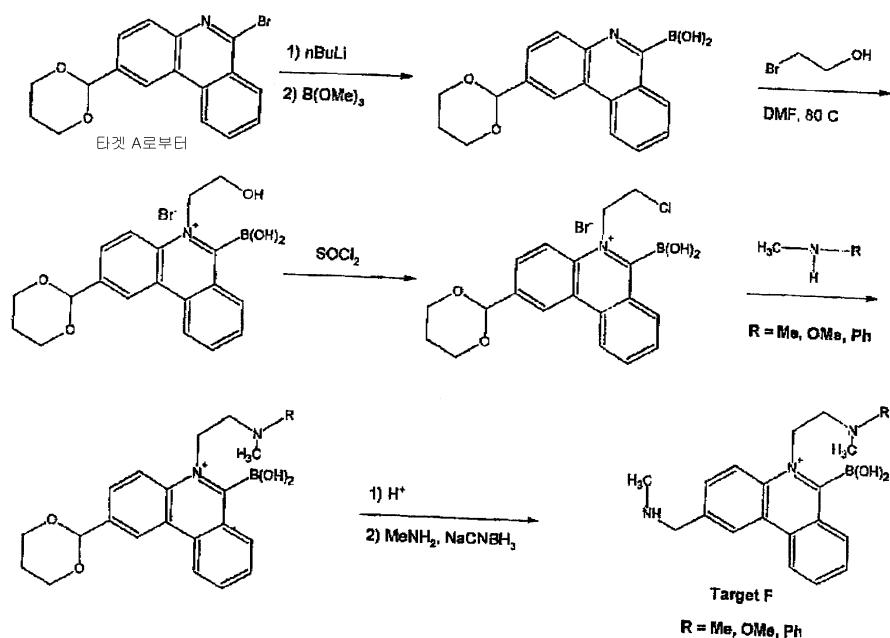
타겟 E 중간체를 위한 합성



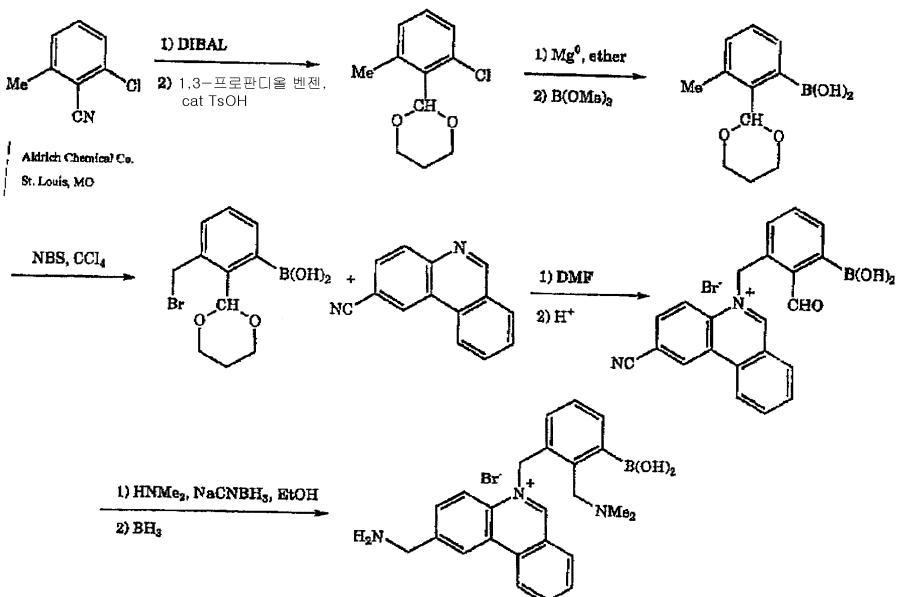
타겟 EEE 중간체를 위한 합성



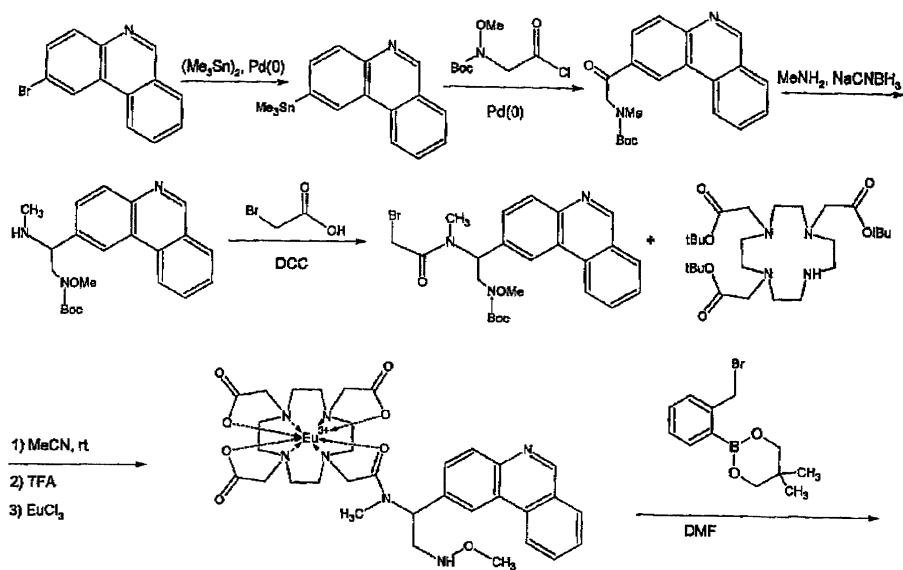
타겟 F 중간체를 위한 합성



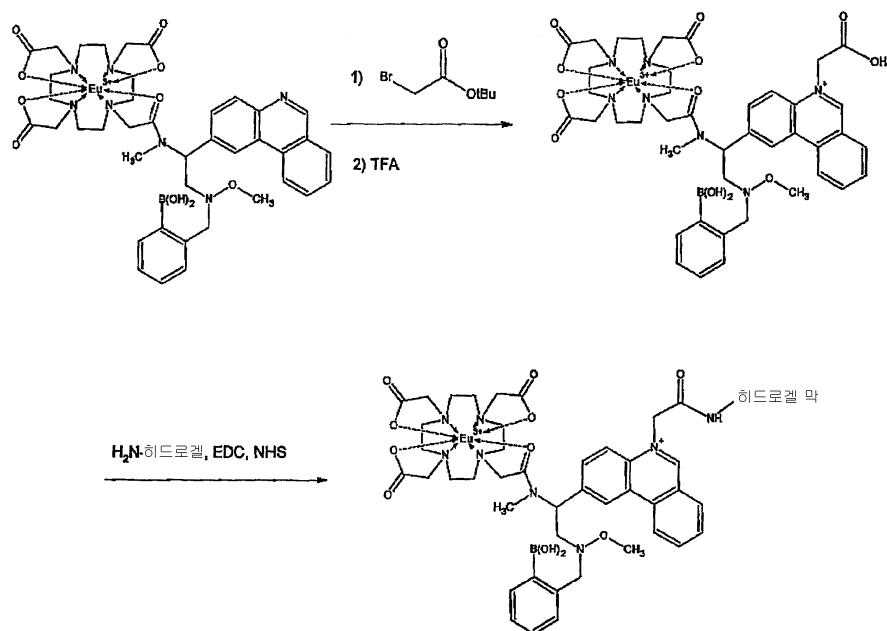
타겟 H 합성



어프로치 3을 위한 합성 개략도



어프로치 3을 위한 합성 개략도, 2쪽



상기에 도시된 합성 개략도의 내용과 관련하여 부가적인 더 상세한 사항에 대해서는, 참고문헌으로서 여기에 포함된 다음 간행물의 내용을 보시오:

1. Walls, L. P., *JCS*, (1934), 104-109
2. Reese, C. B., *JCS*, (1958), 895-901
3. Muth, C. W. et.al., *J. Medicinal Chem*, (1973), Vol 16, No. 3, 1973
4. Badger, G. M., et.al., *J.C.S.*, (1951), 3207-3211
5. Ishiyama, T., et.al., *J. Org. Chem.* (1995), 60, 7508-7510
6. Forrester, A. R., et.al., *J.C.S. Perkin I*, 612-615
7. Petterson, R. C., et.al., *J. Org. Chem.*, (1974), Vol. 39, No. 13, 1841-1845
8. Nagarajan, K., et.al., *Indian Journal of Chemistry*, Vol. 11, Feb. 1974, 112-114
9. Hollingsworth, B. L., et.al., *J. Chem. Soc.*, (1961), 3771-3773
10. Finkelstein, J., et.al., *J. Amer. Chem. Soc.*, (1951), Vol 73, 302-304
11. Parker, D., et.al., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1997) 1777-78
12. Stille, J. K., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (1986), Vol 25, 508-524
13. Sherry, A. D., et.al., *Inorganica Chimica Acta*, (1987), Vol. 139, 137-139
14. Bansal, N., et.al., *J. Magnetic resonance Imaging*, (1992) Vol. 2, 385-391
15. Sherry, A. D., et.al., *J. Magnetic Resonance*, (1988), Vol 76, 528-533

실시예

본 발명은 더 깊은 이해를 위하여 다음 실시예에 의해 설명하도록 한다.

실시예 1

Eu(4-디벤조일메탄봉산)을 이용한 글루코스 및 프럭토스의 검출

25 μ l의 6.5mM Eu(4-디벤조일메탄봉산)₄ PyCl을 525 μ l의 메탄올에 가하고 소용돌이 시켰다. 메탄올 재료 용액(4 μ M, 400 μ M, 4mM 및 40mM)으로부터, 글루코스 및 프럭토스 각각에 대해 0.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 1mM, 5mM, 10mM, 및 20mM의 농도로 샘플을 각각 준비하였다. 도 9에 나타난 결과인 613nm에서의 Eu 칼레이트 착물의 형광 방출 강도는, 요구되는 들뜸 파장인 365nm에서 Eu 칼레이트 착물을 여기시킨 후에, 글루코스 및 프럭토스의 분리된 샘플 각각에 대해 관찰하였다.

실시예 2

유로피움 테트라카스-5-나프토일-트리플루오로아세톤봉산의 합성

I. 2,2-디메틸프로판-1,3-디일-1-나프틸보로네이트(1)의 제조

다음의 과정에 따라, 유로피움 칼레이트 착물의 합성 동안에 수반되는 반응 환경에 의해 야기되는 어떠한 잠재적인 역효과로부터 전구물질의 보호네이트기를 보호하였다:

나프탈렌-1-봉산(15.2 그램, 0.0884 몰)과 2,2-디메틸-1,3-프로판디올(10.0그램, 0.0960 몰, 1.1 당량)을 톨루엔(200ml) 내에서 환류시키면서 딘-스타크 트랩을 사용하여 28시간 동안 물을 공비적으로 제거하였다. 그리고 나서 약 80°C의 온도에 도달할 때까지 2시간동안 가열하면서, 간단한 증류와 이어지는 흡기 압력 증류를 통하여 톨루엔을 증발시켰다. 그리고 나서, 1시간 동안 60°C까지 가열하면서, 반응하지 않은 2,2-디메틸-1,3-프로판디올을 진공 상태(0.5mm)에서 제거하였다. 흰 고체(20.94 그램, 99% 순도)의 2,2-디메틸프로판-1,3-디일-1-나프틸보로네이트를 얻었다.

그 생성물을 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz)에 의해 확인하였다.

II. 프리텔-크래프트 아세틸레이션 : 2,2-디메틸프로판-1,3-디일-5-아세틸-1-나프틸보로네이트(2)의 제조

다음의 과정에 따라, 전구물질의 방향성 구조에 아세틸기를 도입하여 디케톤을 형성하였다:

2,2-디메틸프로판-1,3-디일-1-나프틸보로네이트(1) (21.0 그램, 0.0878 몰)을, 얼음욕 안의 250ml 둥근 바닥 플라스크 내에서 교반하면서 150ml의 건조 이황화탄소에 용해시켰다. 삼염화 알루미늄의 분리된 일부(28.7 그램, 0.215 몰)를 2시간에 걸쳐서 가하였다. 그리고 나서 그 혼합물을 교반하고, 1시간에 걸쳐서 실온으로 천천히 데웠다. 플라스크 내부에 끈적끈적하고, 어두운 반고체가 침전되는 것이 보였다. 그 혼합물을 다시 얼음욕 안에서 냉각하고, 그 후 환류 냉각기를 플라스크에 가하였다. 그리고 나서 무수 초산 (8.93 그램, 0.0875 몰)을 2시간에 걸쳐서 가하였다. 그리고 나서 그 혼합물을 40°C까지 데워서 반응을 개시하였다. 무수 초산을 첨가하는 동안, 반응 중에 일어날 수도 있는 발열 반응을 제어하기 위하여 이따금씩 반응 혼합물을 교반(손으로 휘젓는다)할 필요가 있었다.

상기 반응 혼합물을 2시간 동안 실온에 놓아둔 후, 혼합물을 1시간에 걸쳐서 50°C까지 천천히 가열하고 그 온도에서 3시간 동안 유지시켰다. 어두운 색의 고체가 반응 혼합물 내에서 형성되는 것이 관찰되었다.

800ml의 얼음물, 15ml의 진한 염화 수소, 그리고 250ml의 염화 메틸렌을 같이 사용하여 반응 혼합물을 2개의 선명한 층으로 분해, 추출하였다. 그리고 나서 바닥의 유기층을 수집하여 황산 나트륨 위에서 건조시키고, 그리고 감압상태에서 3시간 동안 80°C까지로 증발시켜서, 반고체 형태의 디메틸프로판-1,3-디일-5-아세틸-1-나프틸보로네이트(2) 19.39g을 산출하였다, 수율은 78%였다.

III. 클라이센 축합 : 5-나프토일-트리플루오로아세톤붕산(3)의 제조

β -디케톤 리간드를 다음과 같이 형성하였다:

수산화 나트륨의 혼합물을 10ml의 건조 에테르 내의 2ml의 메탄올 (0.313 그램, 0.01302 몰)과 반응시켰다. 만들어진 용액을 감압 하에서 2시간 동안 100°C까지로 건조시켜서 고체 형태의 나트륨 메톡시드를 산출하였다. 그리고 나서 나트륨 메톡시드를 45ml의 건조 에테르로 처리하고 얼음욕 안에서 냉각시켰다. 그 후 삼불화초산에틸 (1.763 그램, 0.0124 몰)을 가하고, 이어서 10분 후에, 20ml의 건조 에테르 내의 디메틸프로판-1,3-디일-5-아세틸-1-나프틸보로네이트(2) (3.50 그램, 0.0124 몰) 용액을 가하되, 10분에 걸쳐서 한방울씩 가하였다. 그리고 나서 이 혼합물을 30분간 실온에서 교반하고, 70시간 동안 가열하여 환류시켰다. 얼음욕 내에서 상기 혼합물을 교반하면서, 25ml의 물과 8ml의 10% 염화 수소를 가하여 물층을 pH 1로 산성화하였다. 그 후 2개의 선명한 층이 플라스크 안에 나타났다.

그리고 나서 윗층의 에테르 층을 수집하여 황산 나트륨 위에서 건조시키고, 그리고 감압하에서 1시간 동안 60°C까지로 증발시켜서 어두운 색의 액체 형태(4.36 그램)의 β -디케톤을 산출하였다. 만들어진 β -디케톤을 준비된 실리카겔 TLC에 의해 염화 메틸렌으로 용리함으로써 정제하였다. TLC 플레이트로부터 25% 수율의 5-나프토일-트리플루오로아세톤붕산(3) (1.20 그램)으로서 세 번째 밴드($R_f = 0.70-0.85$)를 회수하였다.

이 생성물은 β -디케톤의 에놀 형태의 특징적인 패턴인 시그마 6.69 (싱글렛) 및 시그마 15.28 (브로드 싱글렛)에서의 피크를 갖는 프로톤 NMR(400MHz) 스펙트럼에 의해 확인하였다.

IV. 퀼레이션/착물화 : 유로피움-(베타-디케톤붕산) 테트라키스 착물(4)의 형성

그 후, 형광 인디케이터 분자로서 사용되는 란타니드 퀼레이트 착물을 다음과 같이 생산하였다:

0.5ml 무수 에탄올 내의 유로피움 트리클로리드 혼화하이드레이트(0.7 mg, 0.0019 mmole) 용액을 0.5ml 무수 에탄올 내의 5-나프토일-트리플루오로아세톤붕산(3) (2.2mg, 0.0058mmole) 및 피페리딘 (130mg) 용액에 가하였다. 이 혼합물을 2시간에 걸쳐서 70°C로 천천히 가열하고, 그 온도에서 추가로 약 3시간 동안 유지시켜서 유로피움 테트라키스 착물(4)을 형성하였다.

만들어진 용액은 휴대용, 장파장 자외선 광원으로 조사했을 때 오랜지-레드 방출 특성을 보였다. 부가적으로, 형광 스펙트럼은 Shimadzu 형광계로써 측정했을 때와 같이, 340nm의 피크 둘째 파장과 613nm의 유로피움 퀼레이트 착물의 특징적인 방출 패턴을 나타내었다.

본 발명은 특정한 바람직한 구체예와 연결되어서 설명되어졌다. 당해 기술 분야의 숙련자들은 본 발명의 정신과 범위 내에서 변경과 개선이 이루어질 수 있다는 것을 인식할 것이다.

도면의 간단한 설명

본 발명의 인디케이터 분자의 바람직한 구체예는 첨부되는 도면을 참조하여 설명될 것이다.

도 1은 본 발명에 따른 봉산-함유 유로피움 퀼레이트를 도시하고 있다(명확성을 위하여 하나의 리간드만을 갖는 것으로 도시하였다).

도 2는 또한 본 발명에 따른 봉산-함유 유로피움 퀼레이트를 도시하고 있다.

도 3은 산화 트리옥틸포스핀("TOPO")의 존재하의 수용액 내에서 복수의 봉산-함유 리간드를 포함하는 유로피움 퀼레이트 착물을 도시하고 있다.

도 4는 본 발명에 따른 봉산-함유 유로피움 퀼레이트를 포함하는 에탄올 용액에 카테콜을 첨가한 효과를 도시하고 있다.

도 5는 유로피움 β -나프토일트리플루오로아세테이트(Eu-bNTA)를 포함하는 에탄올 용액에 대한 카테콜 첨가의 영향을 도시하고 있다.

도 6-8은 메탄올 내의 글루코스에 대한 Eu-NTA-보로네이트 적정을 도시하고 있다.

도 9는 메탄올 내의 글루코스 및 프럭토스에 대한 유로피움 디벤조일메탄(Eu(DBM)) 적정과 Eu(봉소화된 DBM) 적정 사이의 비교를 도시하고 있다.

도 10은 메탄올 내의 글루코스에 대한 Eu-NTA 보로네이트 적정을 도시하고 있다.

도 11은 메탄올 내의 글루코스 및 프럭토스에 대한 Eu-NTA 보로네이트 적정을 도시하고 있다.

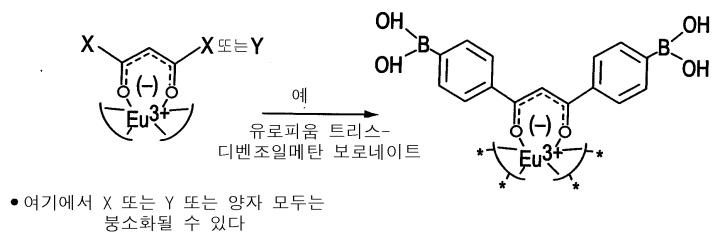
도 12는 메탄올 내의 글루코스 및 프럭토스에 대한 Eu(테오닐-4-벤조일메탄봉산) 적정을 도시하고 있다.

도 13은 메탄올 내의 글루코스 및 프럭토스에 대한 Eu(벤조일-트리플루오로메틸아세톤봉산) 적정을 도시하고 있다.

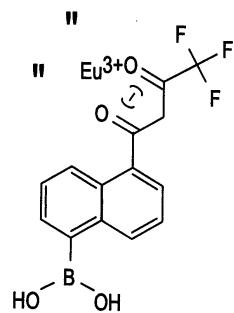
도면

도면1

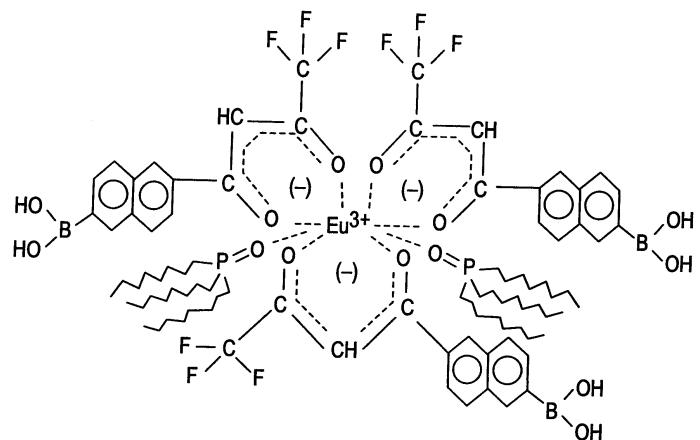
글루코스 검출을 위한 봉산-함유 유로피움 칼레이트



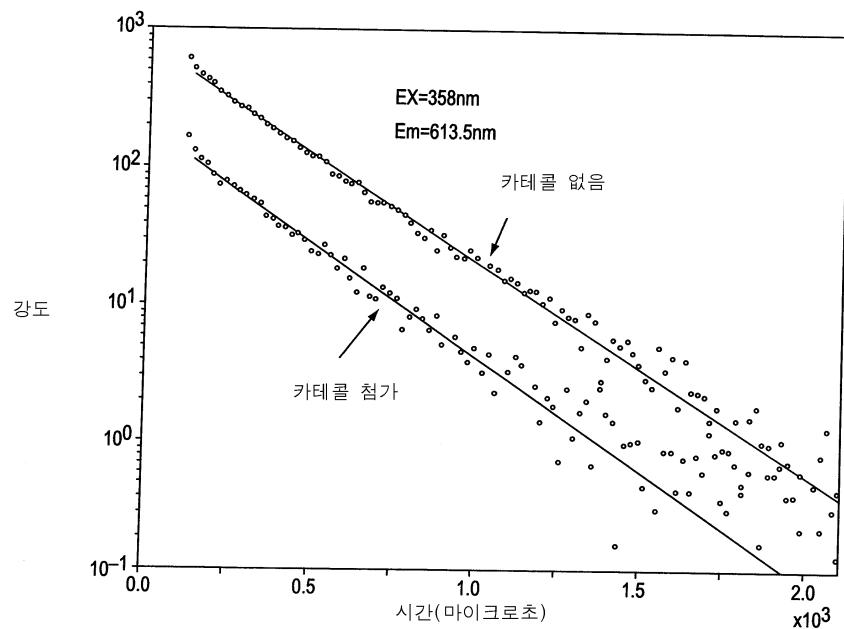
도면2



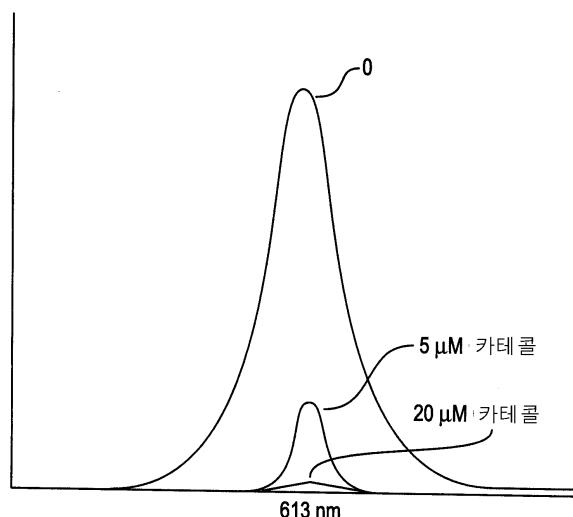
도면3



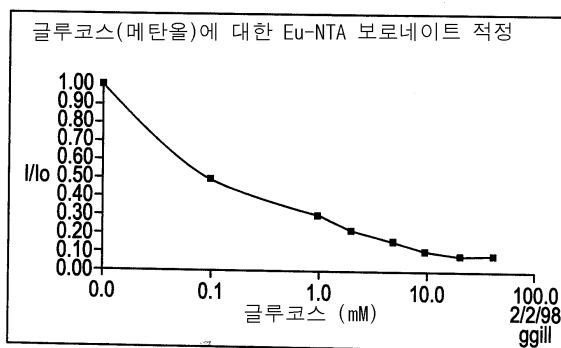
도면4



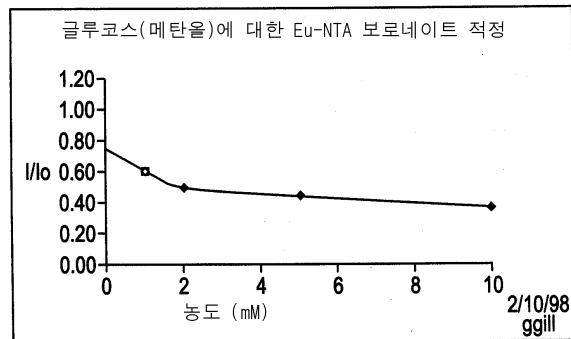
도면5



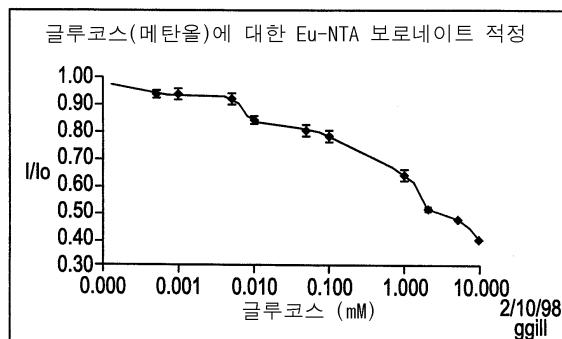
도면6



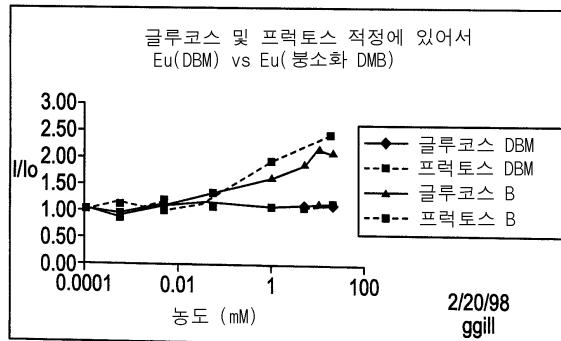
도면7



도면8

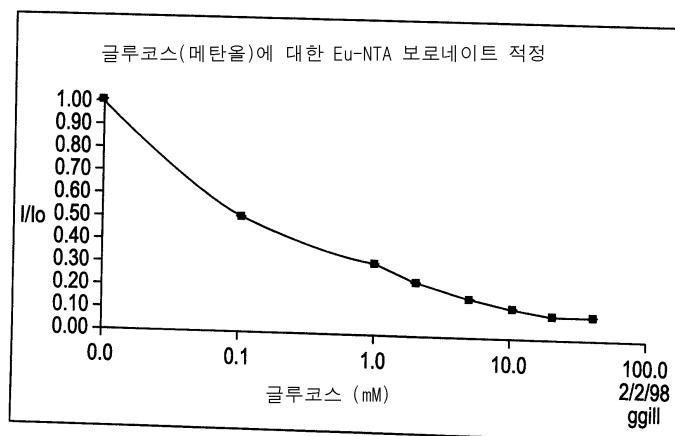
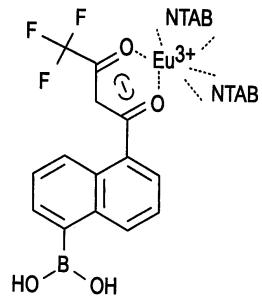


도면9



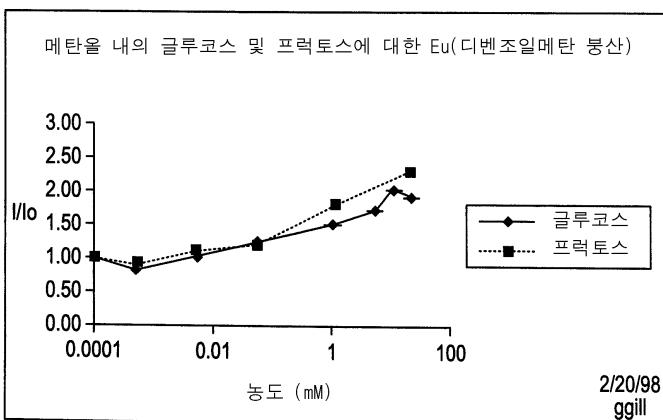
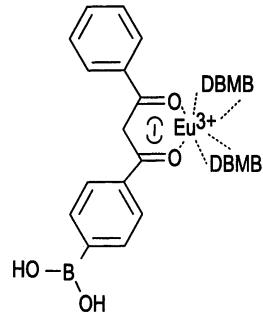
도면10

유로피움 베타-나프토일트리플루오로아세톤-보로네이트
(Eu-BNTAB)



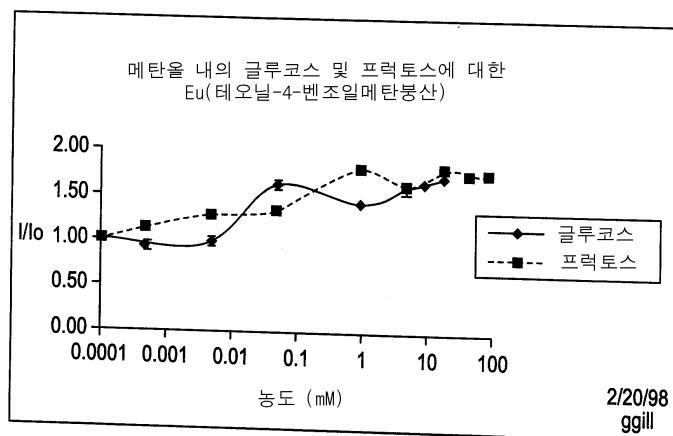
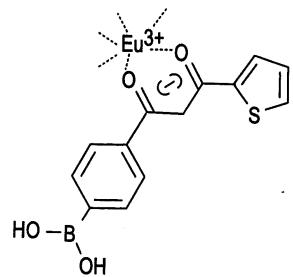
도면11

유로피움 디벤조일메탄 보로네이트 (Eu-DBMB)



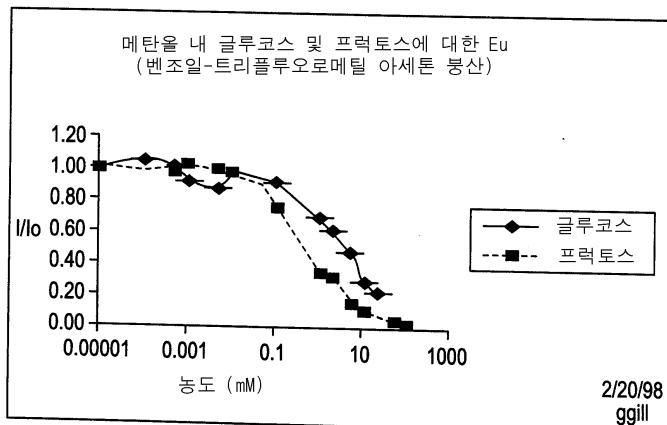
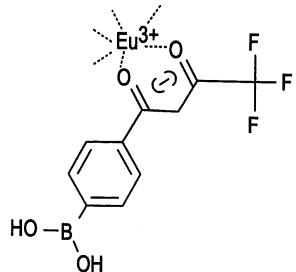
도면12

유로피움 테트라카이스 테오닐-4-벤조일 메탄 보로네이트



도면13

유로피움 트리스-벤조일 트리플루오로 아세톤 보로네이트
(Eu-BTAB)



$\text{Eu}(\text{4-벤조일-트리플루오로메틸아세톤봉산})_4 \text{PyCl}$ -글루코스 농도는 0, 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 1, 2, 5, 10 및 20mM로 변화한다. 프럭토스 농도는 0, 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 1, 2, 5, 10, 50, 및 100mM로 변화한다.