(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C07H 15/26
C07H 15/203

(45) 공고일자 1999년01월15일
(11) 등록번호 특0168864
(24) 등록일자 1998년10월08일

(21) 출원번호 특1992-011239
(22) 출원일자 1992년06월26일
(65) 공개번호 특1993-000530
(43) 공개일자 1993년01월15일

(30) 우선권주장 91-180473 1991년06월26일 일본(JP)

(73) 특허권자 깃꼬오망 가부시기 가이샤 나까노 고오자부로
일본국 지바껭 노다시 노다 339반지다이이찌 가가꾸 야꾸힝 가부시기 가이샤 오까노 아쓰지

일본국 도오교오도 쥬우오구 니혼바시 3쪼오메 13방 5고

(72) 발명자 도꾸다께 쇼오이찌
일본국 지바껭 노다시 노다 339반지 깃꼬오망 가부시기 가이샤 내
도미꾸라 다다시
일본국 지바껭 노다시 노다 339반지 깃꼬오망 가부시기 가이샤 내
고다니 가즈오
일본국 도오교오도 스미다구 나리히라 5쪼오메 5-12 다이이찌 가가꾸 야꾸힝 가부시기 가이샤 도오교오기쥬쓰센터 내
사이또오 가즈노리
일본국 도오교오도 스미다구 나리히라 5쪼오메 5-12 다이이찌 가가꾸 야꾸힝 가부시기 가이샤 도오교오기쥬쓰센터 내
고베 고오이찌로
일본국 지바껭 노다시 노다 339반지 세이싱 세이야꾸 가부시기 가이샤 내

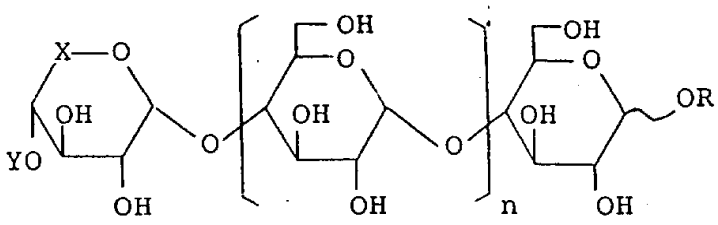
(74) 대리인 최재철, 김기종, 권동용

심사관 : 안소영

(54) 말토올리고시드 유도체, 이것을 유효 성분으로 함유하는 알파-아밀라아제 활성측정용 시약 및 이것을 사용한 알파-아밀라아제 활성의 측정방법

요약

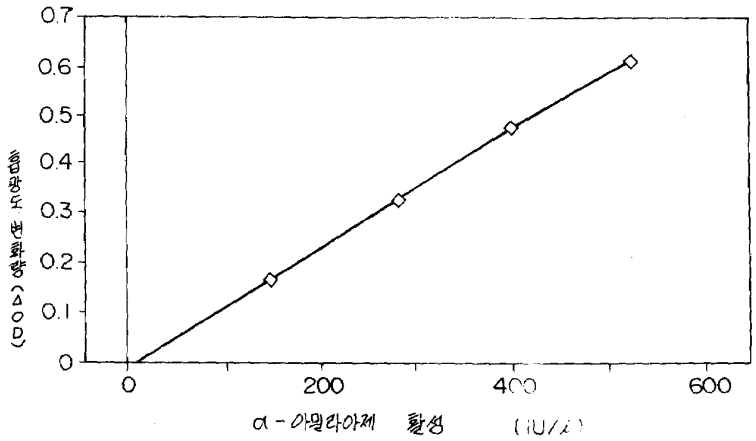
본 발명은 아래의 일반구조식으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체, 이것을 유효성분으로 함유하는 α-아밀라아제 활성 측정용 시약 및 α-아밀라아제 함유 시료에 말토올리고시드 유도체와 공액 효소를 가하여 효소 반응을시켜 유리하는 방향족 발색성 화합물을 정량하여 α-아밀라아제의 활성을 측정하는 방법을 제공한다.



(위의 식에서 n 은 3 ~ 5의 정수, R 은 방향족 발색성 그룹, X 는 $CHCH_2N_3$ 또는 $C=CH_2$, Y 는 수소원자, 치환 또는 비치환의 탄화수소 그룹이거나 알킬 - 또는 아릴술포닐 그룹이다).

본 발명의 신규 화합물은 α-아밀라아제의 활성 측정용 기질로서 극히 유용하고, α-아밀라아제 활성은 시료중에 함유된 기타 성분의 영향을 받는 일이 없이 시약을 사용하여 정확하게 단시간내에 쉽사리 측정할 수 있다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

말토올리고시드 유도체, 이것을 유효 성분으로 함유하는 α-아밀라아제 활성측정용 시약 및 이것을 사용한 α-아밀라아제 활성의 측정 방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 실시예5에 있어서, α-아밀라아제 활성의 측정에 사용된 검량선의 그래프.

제2도는 실시예 6에 있어서 α-아밀라아제 활성의 측정에 사용된 검량선의 그래프.

제3도는 실시예9에 있어서 본 발명의 기질과 대조 기질과의 측정계내에서의 안정성을 나타내는 그래프.

제4도는 실시예 10에 있어서 본 발명의 기질과 대조 기질과의 측정계내에서의 안정성을 나타내는 그래프.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 신규의 말토올리고시드 유도체, 이 유도체를 유효 성분으로 함유하는 α-아밀라아제 활성측정용 시약 및 이 유도체를 사용하여 α-아밀라아제의 활성을 효율적으로 정확히 측정하는 방법에 관한 것이다. 종래 혈청, 요(尿), 췌장액, 타액 등의 체액을 대상으로 α-아밀라아제 활성의 측정은 임상 진단상 극히 중요하고, 특히 급성 또은 만성 간염, 췌장염, 췌장암, 유행성 이하선염(Parotiditis) 등의 감별진단에 있어서는 필수적인 측정항목으로 되어 있다.

α-아밀라아제 활성의 측정 방법에 대해서는 종래부터 여러 가지 방법이 알려져 있는데 이들 중에는 근래에 와서 여러 가지 치환 페닐 말토올리고시드류의 비환원 말단 글로코오스가 각종 치환기로 수식(修飾) 된 물질[공액(共扼) 효소계에 의한 내(耐)가수 분해성(안정성)의 특징을 가짐]을 기질(基質)로 이용하는 방법이 널리 이용되고 있다.

이 방법은 α-아밀라아제에 의하여 화합물을 절단하고 절단된 생성물에 공액 효소계를 작용시킨 다음, 생성된 치환 페놀류를 그대로 직접 또는 필요에 따라서는 pH를 변화시킨 후, 또는 페놀류를 축합한 후에 비색(比色) 정량하는 방법이 널리 이용되어 왔다. 그런데 이와 같이 이용되는 기질에 대해서는 일반적으로 기질의 단일의 D-글루코시드 결합만이 가수분해되어야 하고, 두 개의 α-아밀라아제(아소자임) 에 따라 가수분해시의 작용 패턴과 가수분해율이 변하지 않아야 하며, 가수분해 생성물이 α-아밀라아제에 의하여 다시 더 가수분해 되지 않아야 하고, 기질은 α-아밀라아제에 대한 친화성이 크고(즉, Km값이 작을 것) 가수분해 속도가 빨라야 하며 기질의 수용성이 우수하여야 한다는 특성이 요구된다. 그러나 이들 요구 특성을 완전히 만족하는 비환원 말단을 수식한 기질은 아직까지 발견되어 있지 않다.

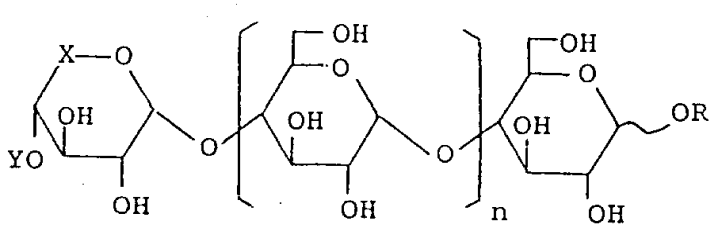
본 발명의 목적은 오일펌프와 같은 종래의 α-아밀라아제 활성의 측정시약과 이것을 사용하는 측정 방법이 가지고 있는 결점을 극복하여 α-아밀라아제 활성을 효율적이고도 정확히 측정할 수 있는 시약으로서 적당한 신규 화합물을 제공함과 아울러 이 화합물을 시약으로 사용하는 α-아밀라아제 활성의 신규의 측정방법을 제공함에 있다.

본 발명자들은 이러한 목적을 달성하기 위하여 여러 가지로 연구를 거듭한 결과 α-아밀라아제 활성 측정용 시약으로서 특정의 신규 말토올리고시드 유도체가 극히 적합하고 이것을 사용하여 α-아밀라아제 활성을 측정함으로써 그 목적을 달성할 수 있음을 발견하여 이에 따라 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

즉, 본 발명은 아래의 일반 구조식(I)으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체, 일반 구조식(I)의 화합물을 유효성분으로 함유하는 α-아밀라아제 활성 측정용 시약, α-아밀라아제 함유 시료에 일반 구조식(I)의 화합물의 α-아노머(anomer)와 α-글로코시다아제 또는 글루코 α-아밀라아제 혹은 이들의 혼합물을 첨가하여 효소 반응을 시켜 유리하는 방향족 발색성 화합물을 정량함을 특징으로 하는 α-아밀라아제 활성의 측정 방법 및 α-아밀라아제 함유 시료에 일반 구조식(I)의 화합물의 β-아노머 또는 α-아노머와 β-아노머와의 혼합물과 α-글루코시다아제 및, 또는 글루코아밀라아제와 β-글루코시다아제를 첨가하여 효소 반응을 시켜 유리하는 방향족 발색성 화합물을 정량함을 특징으로 하는 α-아밀라아제 활성의 측정방법을 제

공하는 것이다.

화학식 1



(I)

(위의 식에서 n 은 3 ~ 5의 정수, R 은 방향족 발색성 그룹, X 는 $CHCH_2N_3$ 또는 $C=CH_2$, Y 는 수소원자, 치환 또는 비치환의 탄화수소 그룹 또는 알킬 - 또는 아릴술포닐 그룹이다).

본 발명의 일반 구조식(I)으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체에 있어서, 말토올리고당 부분으로서는 α- 및 β-D-말토펜타오스로부터 α- 및 β-D-말토헵타오스 까지에 이르는 당류에 대응하는 것이 모두 사용된다.

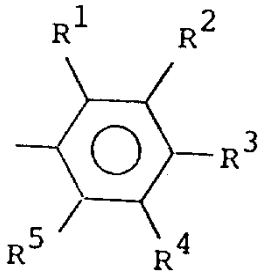
그리고 일반 구조식(I)있어서, X 는 $CHCH_2N_3$ 또는 $C=CH_2$인데 $CHCH_2N_3$ 에 있어서 CH 의 H 는 지면(紙面)에 대하여 아래쪽으로 결합한 구조를 가진다.

한편 Y 는 수소원자, 치환 또는 비치환의 탄화수소 그룹 또는 알킬 - 또는 아릴술포닐 그룹이다. 치환 또는 비치환의 탄화수소 그룹으로서는 예를 들자면 메틸, 에틸, 이소프로필, 부틸 또는 시클로헥실 등의 직쇄상 또는 측쇄 달린 또는 환상의 알킬 그룹, 벤질 등의 아랄킬 그룹, 페닐, 톨루일 및 나프틸 등의 아릴 그룹이 있다.

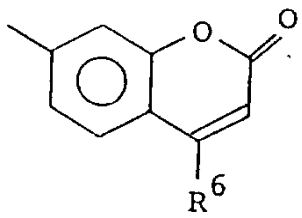
이들 알킬 그룹, 아랄킬 그룹 및 아릴 그룹은 아실, 알킬옥시, 카르복실, 니트로, 할로게노, 알킬실릴 및 술포닐 등의 관능기로 치환되어 있어도 좋고 알킬 그룹은 비닐, 알킬 등과 같은 불포화 그룹이어도 좋다.

위에 나온 알킬 - 또는 아릴술포닐 그룹의 예에 속하는 것으로는 메실 그룹, 토실 그룹 또는 퀴놀린술포닐 그룹이 있다.

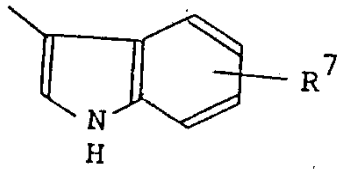
더욱이, 일반 구조식(I)으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체에 있어서, 환원성 말단 글루코오스의 1위치의 히드록실 그룹에서 치환되는 방향족 발색성 그룹 R 로서는 분광학적으로 검출될 수 있는 것이면 어떠한 것을 사용하여도 좋은데, 예를 들자면 아래에 나오는 일반 구조식들로 나타내어지는 그룹이 있다.



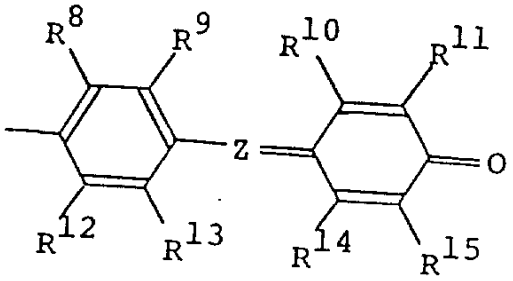
(위의 식에서 R^1 - R^5 는 수소원자, 할로겐 원자, 니트로 그룹, 알킬 그룹, 아릴그룹, 아랄킬 그룹, 아미노 그룹, 술폰산 그룹 또는 카르복실 그룹으로서 각각 같거나 상이하여도 좋고 또한 R^1 과 R^2 또는 R^2 와 R^3 는 각각 함께 결합하여 축합 방향족환을 형성하여도 좋다.)



(위의 식에서 R^6은 수소원자 또는 알킬 그룹)



(위의 식에서 R^7은 수소원자 또는 할로겐 원자)



(위의 식에서 R^8 - R^{15} 는 수소원자, 할로겐 원자, 니트로 그룹, 알킬 그룹, 아릴그룹, 아랄킬 그룹, 아미노 그룹, 술폰산 그룹 또는 카르복실 그룹으로서 각각 같거나 상이하여도 좋고 또한 R^8 과 R^9 또는 R^{10} 와 R^{11} 은 각각 함께 결합하여 축합 방향족환을 형성하여도 좋으며, R^9와 R^{10} 및, 또는 R^{13} 과 R^{14} 는 각각 공통의 산소 원자를 나타내어 축합 에테르환을 형성하여도 좋고 Z는 질소원자 또는 N→ O이다).

더욱이 일반 구조식(Ⅰ)의 말토올리고시드 유도체는 α-아노머(α-글리코시드, 즉 α-배당체) 또는 β-아노머(β-글리코시드 즉 β-배당체) 중 어느 것이어도 좋다.

이와 같은 일반구조식(I)으로 나타내어지는 혼합물의 예에 속하는 것들로서는 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시(deoxy)-β-D-말토펜타오시드, 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드, 2-클로로-4-니트로페닐 5^5-^{55777777755555677755}

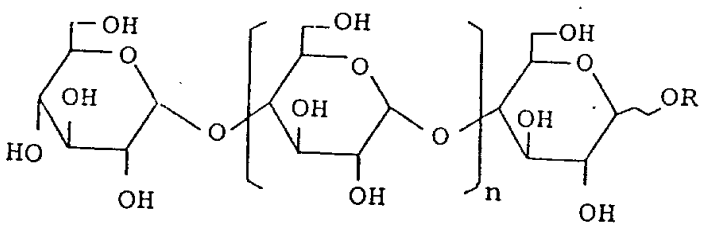
위와 관련하여 기호 6^5-, 6^7-, 4^5- 및 4^7- 등은 말토올리고당을 구성하는 글루코오스 단위의 환원성 말단쪽으로부터 5번째 및 7번째의 글루코오스(즉, 비환원성 말단의 글루코오스)의 6위치와 4 위치의 히드록실 그룹이 치환되어 있음을 나타낸다.

이제까지 말토트리오스의 비환원성 말단의 화학적 수식(chemical modefication)에 관한 연구에 있어서, 1, 6-안히드로(anhydro)-6-아지도-6-데옥시-β-말토트리오스 옥타아세테이트는 수식된 말토트리오스의 중간체로 알려져 있다[Carbotydrate Research 51, 73-84(1976)]. 이 화합물은 위의 일반구조식(I)에서 n이 1인 경우의 화합물에 상당하지만 이 공지의 화합물은 분자내 에테르 구조를 가지며 발색단을 가지지 아니하고 아세틸 유도체라는 점에서 상이하다. 더욱이 일반구조식(I)에서 n이 1인 경우의 화합물은 α-아밀라아제의 작용을 거의 받지 않기 때문에 α-아밀라아제 활성 측정용 기질로서는 적당하지 아니하여 본 발명의 목적에는 사용할 수 없다.

본 발명의 일반구조식(I)으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체는 문헌에 전혀 기재된 바 없는 신규의 화합물로서 그 제조방법에 대해서는 특히 제한없이 임의 방법을 사용하여 제조할 수 있는데, 예를 들자면 다음과 같은 방법에 따라 제조할 수 있다.

즉, 출발 원료로서 시판품 또는 공지의 방법으로 제조할 수 있는 아래 일반구조식(II)으로 타나내어지는 D-말토올로고시드, 예를 들자면 2-클로로-4-니트로 페닐 β-D-말토펜타오시드, 4-니트로페닐 α-D-말토헵타오시드 및 페놀인도-3'-클로로페닐 β-D-말토펜타오시드 등을 사용하여 여기에 아래 일반 구조식(III)으로 나타내어지는 카르보닐 화합물 또는 그 아세탈 또는 케탈을 작용시켜 아래 일반구조식(IV)으로 나타내어지는 4, 6-O-알콕시메틸리덴화 말토올리고시드 유도체, 예를 들자면 2-클로로-4-니트로페닐 4^5, 6^5-O-디메톡시메틸리덴-β-D-말토펜타오시드, 4-니트로페닐 4^7, 6^7-O-(1-메톡시)에틸리덴-α-D-말토헵타오시드 및 페놀인도-3'-클로로페닐 4^5, 6^5-O-(1-에톡시)에틸리덴-β-D-말토펜타오시드 등을 제조한다.

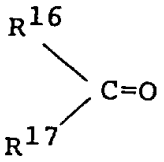
화학식 2



(II)

(위의 식에서 R과 n은 앞서 정의된 바와 같다)

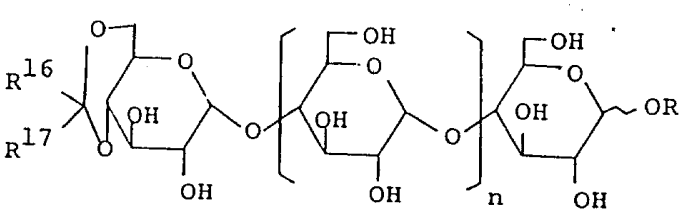
화학식 3



(III)

(위의 식에서 R^{16}은 수소원자, 메톡시 그룹, 에톡시 그룹, 알킬 그룹 또는 아릴 그룹이고, R^{17}은 메톡시 그룹 또는 에톡시 그룹이다)

화학식 4



(IV)

(R^{16} 과 R^{17}, R 및 n 은 앞서 정의된 바와 같다)

위의 일반구조식(III)으로 나타내어지는 카르보닐 화합물 또는 이들의 아세탈 혹은 케탈로서는 예컨대 테트라메톡시메탄, 트리에틸 오르토아세테이트 또는 트리메틸 오르토아세테이트 등이 있다.

일반구조식(IV)으로 나타내어지는 4, 6-O-알콕시메틸리덴화 말토올리고시드 유도체를 제조하는 반응은, 일반적으로 예컨대 N, N-디메틸포름아미드(DMF), N, N-디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸술폭시드(DMSO) 또는 헥사메틸포스포릭트리아미드(HMPA) 등과 같은 비양성자성 극성 용매중에서 간상성 이온 교환 수지와 p-톨루엔술폰산, 염화수소, 황산, 무수 염화아연, 등의 촉매 존재하에 실시한다.

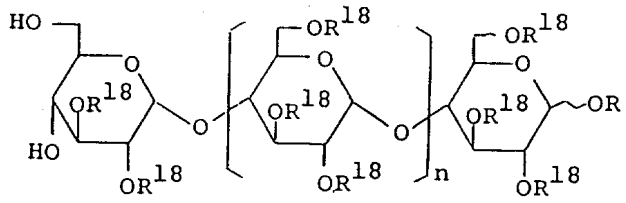
이와 같이 하여 수득한 일반구조식(IV)으로 나타내어지는 4, 6-O-알콕시메틸리덴화 말토올리고시드 유도체를 아실화하여 4, 6-O-알콕시메틸리덴화 아실말토올리고시드 유도체, 예를 들자면 2-클로로-4-니트로페닐 테트라데카-O-아세틸-4^5, 6^5-O-디메톡시메틸리덴-β-D-말토펜타오시드, 4-니트로페닐 에이코사-O-벤조일-4^7, 6^7-O-(1-메톡시)에틸리덴-α-D-말토헵타오시드 및 페닐인도-3'-클로로페닐테트라데카-O-부티릴-4^5, 6^5-O-(1-에톡시)에틸리덴-β-D-말토펜타오시드 등을 얻는다.

이 경우에 있어서, 아실화제로서는 예컨대 카르복실산 (예 ; 아세트산, 모노클로로아세트산, 프로피온산, n-부티르산, 벤조산 등) 또는 이들의 반응성 유도체(예 ; 산 무수물, 산 염화물 및 이들의 에스테르 등)를 사용한다. 아실화 반응 조건에 대해서는 특히 제한은 없으나 종래 아실화 반응에서 관용되고 있는 조건을 사용할 수 있다.

이어서 이와 같이 해서 수득한 4, 6-O-알콕시메틸리덴화 아실말토올리고시드 유도체를 탈알콜시메틸리덴화 반응을 시켜 일반구조식(V)로 나타내어지는 부분 아실화 말토올리고시드 유도체, 예를 들자면 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-α-D-글로코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 및 4-니트로페닐 O-(2, 3, -디-O-벤조일-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-펜타키스 [O-(2, 3, 6-트리-O-벤조일-α-D-글로코피라노실)-(1→4)]-2,

3, 6-트리-O-벤조일-α-D-글루코피라노시드 등을 제조한다.

화학식 5



(V)

(위의 식에서 R^{18}은 아실 그룹이고 R과 n은 앞서 정의된 바와 같다)

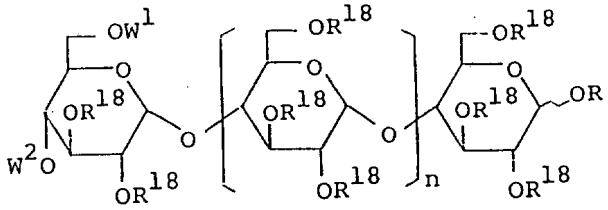
위의 탈알콕시메틸리덴화 반응 조건에 대해서는 특히 제한은 없고 공지의 방법,

예를 들자면 아세트산 또는 포름산을 4, 6- 알콕시메틸리덴화 아실말토올리고시드 유도체와 반응 시키는 방법 [예를 들자면 J. Am. Chem. Soc. , 84, 430 (1962)]을 사용하여 실시할 수 있다.

다음에는 이와 같이하여 수득한 일반구조식(V)의 부분 아실말토올리고시드 유도체에 예를 들자면 토실 클로라이드, 나트탈렌술포닐 클로라이드 등의 벌키(bulky)한 알킬-또는 아릴술포닐 클로라이드를 반응시켜 6 위치의 히드록실 그룹만을 알킬 - 또는 아릴술포닐화한 후, 다시 4 위치의 히드록실 그룹을 수식(modification) 하여 일반구조식(VI)으로 나타내어지는

아실술포닐말토올리고시드 유도체, 예를 들자면 2-클로로-4-니트로페닐 펜타데카-O-아세틸-6^5-O-토실-β-D- 말토펜타오시드, 4-니트로페닐 테트라데카-O-부티릴-45-O-아세틸-6^5-O-나프탈렌술포닐-α-D- 말토펜타오시드, 2-클로로-4-니트로페닐 에이코사-O-벤조일-4^7-O-메실-6^7-O-토실-β- 말토헵타오시드 및 페놀인도-3'-클로로페닐 테트라데카-O-클로로아세틸-6^5-O-(2, 4-디메틸)벤젠술포닐-4^5-O-메틸-β-D- 말토펜타오시드 등을 제조한다.

화학식 6



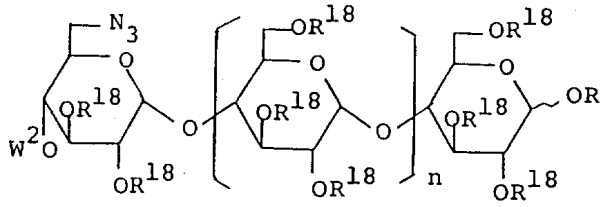
(VI)

(위의 식에서 n, R 및 R^{18}은 앞서 정의된 바와 같고, W^1 은 알킬 - 또는 아릴술포닐 그룹이며 W^2는 아실 그룹, 치환 또는 비치환의 탄화수소그룹이거나 알킬 - 또는 아릴술포닐 그룹이다). 위에 나온 6 위치의 히드록실 그룹의 알킬 - 또는 아릴술포닐화 반응 (W^1 의 도입) 의 조건에 대해서는 특히 제한은 없고 통상적으로 피리딘 중에서 또는 디클로로메탄, 톨루엔 등의 무극성 용매중에서 트리에틸아민, 디아자비시클로운데센(DBU) 등의 염기 존재하에 가열함이 없이 벌키한 알킬 - 또는 아릴술포닐 할라이드 3-30 몰 당량과 부분 아실화 말토올리고시드 유도체를 반응시킴으로써 실시한다.

더욱이 4위치의 히드록실 그룹에 치환기 W^2를 도입하자면 일반구조식(I)에서 Y가 수소원자인 경우는 아실화 반응을 시키고 기타의 경우는 필요에 따라 탄화수소 그룹의 도입, 예를 들자면 알킬화 반응 또는 아랄킬화 반응 또는 알킬 - 또는 아릴술포닐화 반응을 실시한다. 이들 반응은 아실화의 경우는 예컨대 위에서 예를 들은 방법, 알킬화의 경우는 예컨대 DMSO중에서 수산화 칼륨 존재하에 할로겐화 알킬을 작용시키는 방법 [예로서 Tetrahedron, 35, 2169 (1979)], 아랄킬화의 경우는 예컨대 벤젠중에서 수소화나트륨 존재하에 할로겐화 아랄킬을 작용시키는 방법 [예로서, J. Chem. Soc. , 88, 82(1966)], 알킬 - 또는 아릴술포닐화의 경우는 예컨대 피리딘 중에서 염화 술포닐을 작용시키는 방법 [예로서 Methods of Carbohydrate Chem. 63, 99(1918)] 등에 따라 실시하면 좋다. Y 가 알킬 - 또는 아릴술포닐 그룹인 경우는 예를 들자면 반응시간을 길게 한다거나 반응 온도를 높인다거나 메탄술포닐 클로라이드 등의 벌키하지 않는 알킬 - 또는 아릴술포닐화제를 반응 시약으로 사용하여 4 위치와 6 위치의 히드록실 그룹을 동시에 술포닐화 하여도 좋다. 이어서 6 위치 히드록실 그룹에 치환기 X를 도입하기 위해서는 X 가 $CHCH_2N_3$ 인 경우는 위와 같이하여 수득한 일반 구조식(VI)으로 나타내어지는 아실술포닐말토올리고시드 유도체에 요오드화 나트륨 또는 브롬화 나트륨을 작용시켜 6-요오드 또는 6-브로모 유도체를 얻은 다음 아지드화나트륨 등을 작용시켜 일반구조식(VII)으로 나타내어지는 아실아지도말토올로고시드 유도체, 예를 들자면 2-클로로-4-니트로페닐 펜타데카-O-아세틸-6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드, 4-니트로페닐 테트라데카-O-부티릴-4^5-O-아세틸-6^5-아지도-6^5-데옥시-α-D-말토펜타오시드, 2-클로로-4-니프로페닐 에이코사-O-벤조일-6^7-아지도-6^7-데옥시-4^7-

O-메실-β-D-말토펜타오시드 또는 페놀인도-3'-클로로페닐테트라데카-O-클로로아세틸-6^5-아지도-6^5-데옥시-4^5-O-메틸-β-D-말토펜타오시드 등을 제조한다.

화학식 7



(VII)

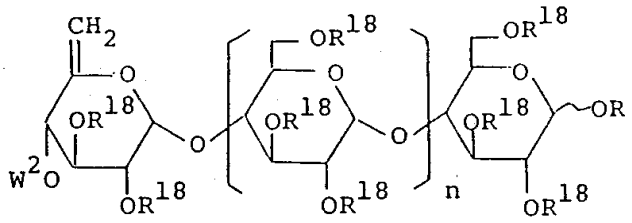
(위의 식에서 n, R, R^{18} 및 W^2는 앞서 정의된 바와 같다)

6위치의 히드록실 그룹의 요오드화, 브롬화 또는 이지드화 반응의 조건에 대해서는 특히 제한은 없고 통상은 DSMO, DMF, HMPA, 메틸 에틸 케톤 등의 비양성자성 극성 용매 중에서 아실술포닐말토올리고시드 유도체를 통상적으로 채용되는 온도로 가열하고 요오드화 나트륨, 브롬화 나트륨 또는 아지드화 나트륨을 5-50몰당량 작용시킴으로써 실시한다. 이 경우에 있어서, 단계적으로 요오드화 또는 브롬화 반응을 시켜 6-요오드 또는 6-브로모 유도체로 한 후에는 아지드화 반응을 실시할 필요는 없고, 동일 반응계내에서 연속적으로 반응을 실시하여도 좋다. 또한 6-브로모 유도체는 위에 나올 4, 6-O-알콕시메틸리덴화 아실말토올리고시드 유도체에 NBS를 작용시켜도 제조할 수가 있다.

이 경우에 있어서, W^2 는 아실 그룹이다.

그리고 X가 $C=CH_2$ 인 경우는 위와 같이 해서 수득한 일반구조식(VI)의 아실술포닐말토올리고시드 유도체에 요오드화 나트륨 또는 브롬화 나트륨을 작용시켜 6-요오드 또는 6-브로모 유도체로 한 후 플루오르화은 등의 탈할로겐화 수소제(dehydrohalogenation agent)를 작용시켜 아래의 일반구조식(VII')으로 나타내어지는 아실불포화 말토올리고시드 유도체, 예를 들자면 2-클로로-4-니트로페닐 테트라데카-O-아세틸-5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드, 4-니트로페닐 테트라데카-O-부티릴-4^5-O-아세틸-5^5-에노-α-D-말토펜타오시드, 2-클로로-4-니트로페닐 헨에이코사-O-벤조일-5^7-에노-β-D-말토헵타오시드 또는 페놀인도-3'-클로로페닐 테트라데카-O-클로로아세틸-5^5-에노-4^5-O-메틸-β-D-말토펜타오시드 등을 제조한다.

화학식 7a



(VII')

(위의 식에서 n, R, R^{18} 및 W^2 는 앞서 정의된 바와 같다)

위의 6 위치 히드록실 그룹의 요오드화 또는 브롬화 반응의 조건에 대해서는 특히 제한이 없고, 예컨대 앞서 나온바 있는 방법을 사용하여 실시할 수가 있다. 또한 위의 탈 할로겐화 수소 반응의 조건에 대해서도 특히 제한은 없으며 피리딘 중에서 위에 나온 6-요오드 또는 6-브로모 유도체에 2~20몰 당량의 플루오르화은을 통상적으로 채용되는 온도를 가열하여 작용시키거나 위에 나온 비양성자성 극성용매 중에서 가열하거나 가열하지 않고 DBU 등의 염기 5~50몰당량을 작용시켜 반응을 실시한다.

최후로 일반구조식(VII) 또는 (VII')로 나타내어지는 아실말토올리고시드 유도체를 탈아실화하면 W^2 가 아실 그룹일때는 Y 는 수소원자이고 W^2 가 치환 또는 비치환의 탄화수소 그룹이거나 알킬 - 또는 아릴술포닐 그룹일 때는 Y 는 W^2와 동일한 그룹인 일반구조식(I)으로 나타내어지는 목적 화합물인 말토올리고시드 유도체를 얻는다. 이러한 탈아실화 반응 조건에 대해서도 특히 제한은 없으며, 예를 들자면 아실말토올리고시드 유도체에 메탄올 등의 알코올류 중에서 탄산칼륨, 암모니아수, 시안화칼륨 등의 염기를 작용시키는 방법을 사용한다. [Protective Groups in Organic Synthesis, by Theodora W, Greene, pp. 50-55, 1980, JOHN WILEY SONS, New York 참조].

또한 일반구조식(I)으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체를 제조하는 또 다른 방법으로서는 예컨대 공지의 방법으로 제조한 6-아지도-6-데옥시시클로덱스트린[예로서 Carbohyd. Res. , 18, 29-37 (1971) 참조] 에 공지의 시클로덱스트리나아제(예로서 일본국의 특허 공개 평3-86701호 공보 참조)를 작용시킨 다

음 글루코-아밀라아제 등의 엑소형(exo-type) 당화 효소류를 작용시켜 비환원성 말단 글루코오스의 6 위치의 히드록실 그룹이 아지드 그룹으로 치환된 말토올리고당을 얻고 여기에 공지의 방법으로 방향족 발색성 그룹을 도입하여 (예로서 일본국의 특허 공개 소60-78994호 공보참조)제조하는 방법 또는 방향족 발색성 그룹을 아글리콘(aglycone)으로서 가지는 시판품 또는 공지의 글루코시드 앞서 나온 6-아지도-6-데옥시시클로덱스트린을 가하고 공지의 효소인 시클로덱스트린 글루카노트란스퍼라아제를 작용시킨 다음 글루코 아밀라아제 등의 엑소형 당화 효소류를 작용시켜 제조하는 방법 등이 있다.

이상과 같이 하여 수득한 일반구조식(I) 의 말토올리고시드 유도체는 α-아밀라아제 활성 측정에 극히 유용하므로 말토올리고시드 유도체를 사용하여 α-아밀라아제 활성을 측정할 수 있다.

앞서 나온 바와 같이 일반구조식(I)으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체에는 α-아노머와 β-아노머가 존재한다. α-아밀라아제 활성 측정시에 α-아노머만을 사용할 경우에는 공액효소계로서 α-글루코시다아제 또는 글루코아밀라아제 혹은 이들 두가지를 사용할 필요가 있고, β-아노머만을 사용하거나 α-아노머와 β-아노머의 혼합물을 사용할 경우에는 α-글루코시다아제 또는 글루코아밀라아제 혹은 이들 두가지 외에 β-글루코시다아제를 사용할 필요가 있는데, 필요에 따라서는 β-아밀라아제를 사용할 수도 있다. α-아밀라아제 활성을 측정하기 위한 유리한 계(system) 로서는 예를 들자면 일반구조식(I)으로 나타내어 지는 말토올리고시드 유도체 0.1～10mM 와 완충액 2～300mM를 함유하고 또한 공액효소계로서 α-글루코시다아제 및 또는, 글루코아밀라아제 각각을 5～1000단위/ml 와, 더욱이 β-글루코시다아제를 사용할 때에는 이를 0.5～30단위/ml을 함유하는 pH 4～10의 계(system)를 들 수 있다.

이러한 계에 사용되는 완충제의 예를 들자면 인산염, 아세트산염, 탄산염 굳즈완충제(Good's buffer), 붕산염, 시트르산염, 디메틸글루타르산염 등이 있다.

α-글루코시다아제는 동물, 식물, 미생물 등 어떠한 기원(起源)의 것을 사용하여도 좋은데, 예컨대 효모 유래의 것이 바람직하다. 또한 글루코아밀라아제도 어떠한 기원의 것을 사용하여도 좋은데 예컨대 리조푸스속(Rhizopus species)등에서 유래하는 것이 바람직하다. 더욱이 β-글루코시다아제도 어떠한 기원의 것을 사용하도 좋은데 예를 들자면 아몬드 종자(almond's seed)로부터 얻는 것을 사용한다.

β-아밀라아제도 어떠한 기원의 것을 사용해도 좋은데 예를 들자면 세균이나 식물 유래의 것을 사용할 수 있다. 이와 같은 계에 위에 나온 성분외에 본 발명의 목적을 해치지 아니하는 범위내에서 필요에 따라 종래의 각종 첨가 성분, 예를 들자면 용해 보조제, 안정화제로서 글리세린, 소 혈청 알부민, α-또는 β-시클로덱스트린, 트리톤(Triton) X-100등을 첨가할 수도 있다.

α-아밀라아제 활성화제로서 NaCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$, $CaCl_2$ 또는 $CaCl_2 \cdot H_2O$ 등의 형태로 사용되는 Cl-이온, Ca_2+ 이온 또는 Mg_2+ 이온 등을 첨가하여도 좋다. 이들 첨가 성분은 단독으로 사용하여도 좋고 두가지 이상을 조합하여 사용하여도 좋으며, 또한 앞서 나온 계(system) 제조시 적당한 단계에서 가할 수 있다. 본 발명의 시약은 건조물 또는 용액 형태로 사용하여도 좋고 박막상의 담체 형태, 예를 들자면 시이트(sheet), 함침성 종이 등에 이 시약을 함침시켜 사용하여도 좋다. 이와 같은 본 발명의 시약을 사용함으로써 각종 시료에 함유되는 α-아밀라아제 활성을 간단한 조작으로 정확하다고 고감도로 측정할 수 있다.

본 발명의 방법을 바람직한 실시 태양에 따라 설명한다.

먼저 α-아밀라아제를 함유한 시료에 공액효소로서의 α-글루코시다아제 또는 글루코아밀라아제 혹은 이들 두가지를 각각 5～1000단위/ml, 바람직하게는 10～500단위/ml 가한다. 일반구조식(I)으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체가 β-아노머를 함유할 경우에는 β-글루코시다아제 0.5～30단위/ml, 바람직하게는 1～15단위/ml를 가하고, 이와 동시에 또는 그 후에 말토올리고시드 유도체 0.1～10mM, 바람직하게는 0.3～5mM을 완충제와 함께 가한후, 온도 25～45℃ 바람직하게는 35～40℃, pH 4～10, 바람직하게는 6～8의 조건하에서 적어도 1분간, 바람직하게는 2～10분간 효소 반응시킨다. 생성한 방향족 발색성 화합물을 통상의 방법에 따라 그대로 또는 필요에 따라서는 pH를 조정한 후 또는 축합 반응을 시킨 후에 적당한 흡광파장에서 연속적으로 또는 단속적으로 흡광도 변화량을 측정하고, 미리 측정하여 둔 α-아밀라아제 표준 시료의 흡광도 변화량에 대비하여 시료중의 α-아밀라아제 활성을 산출한다. 또한 방향족 발색성 화합물의 분자 흡광 계수로부터 α-아밀라아제 활성을 산출할 수도 있다.

본 발명에서 사용되는 α-아밀라아제 함유 시료에 대해서는 α-아밀라아제 활성을 가진 것이면 좋고 특히 제한은 없으나 구체적으로는 미생물의 배양액, 식물의 추출액 또는 동물의 체액이나 조직 및 이들의 추출액 등을 사용할 수가 있다. α-아밀라아제 함유 시료가 고체인 경우에는 일단 정제수 또는 위에 나온바 있는 완충액에 용해 또는 현탁시키는 것이 바람직하다.

또한 필요에 따라서는 불용물(不溶物)을 여과 등의 조작으로 제거하여도 좋다.

본 발명의 일반구조식(I)으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체는 기질로서의 요구 특성을 모두 갖춘 신규의 화합물로서 α-아밀라아제 활성 측정용 시약으로서 극히 유용하고, 이것을 사용함으로써 시료중에 함유되어 있는 글루코오스, 말토오스, 빌리루빈, 헤모글로빈 등의 영향을 받는 일이 없이 α-아밀라아제 활성을 자동분석법, 수동조작법 등에 의하여 정확하게 단시간내에 용이하게 측정할 수가 있다.

또한 본 발명의 화합물은 장시간 안정하기 때문에 기질로서의 유용성을 한층 높일 수 있다는 이점도 가지고 있다.

이어서 본 발명을 실시예에 따라 상세하게 설명하나 이들 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 각 실시예에 있어서 흡수 극대 파장은 특히 명시되어 있지 않는 한 메탄올 중에서 측정한 값이고, 비선광도 25℃에서 D선으로 측정한 값이다.

[실시예 1]

2-클로로-4-니트로페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드 제조

(1)2-클로로-4-니트로페닐 4^5, 6^5-디메톡시메틸리덴-β-D-말토펜타오시드 제조

시판품인 2-클로로-4-니트로페닐 β-D-말토펜타오시드 15.0g(15.2mmol)을 무수 DMF 75ml에 용해하고, 테트라메톡시메탄 15.0ml (113mmol)과 Amberlyst (15E)(일본국의 Japan ORGANO 사제의 상표) 7.5g을 가하여 35℃에서 4시간 교반하면서 반응 시켰다. 이어서 이 반응액을 빙냉하에 100mM 인산염 완충액(pH = 7.0) 2.0ℓ중에 교반하면서 서서히 방울씩 가하였다. 이 혼합액을 ODS(옥타데실실리카 겔) 칼럼 크로마토그램피로 정제하고 아세토니트릴-물 혼합액(체적비 3 : 7)으로 용출시킨 목적 분획물을 농축하여 이소프로판올-메탄올에서 재결정함으로써 2-클로로-4-니트로페닐 4^5, 6^5-O-디메톡시메틸리덴-β-D-말토펜타오시드 10.7g (10.1mmol, 수율 66.5%)을 얻었다.

° 융점 (℃) : 93.0~95.0 (분해),

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 최대 파장 [λmax] (nm) = 295

(log ε = 3.95), 227(sh), 209 (log ε = 4.17)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3420, 2940, 1648, 1588, 1524, 1490, 1352,

1276, 1246, 1154, 1082, 1050, 1026, 930, 898

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm (DMSO-d_6) : 3.25-3.85(m), 3.23(3H, s),

3.30(3H, s), 3.89(1H, d, J=3.9Hz), 4.30-4.70(m), 5.04(2H, d, J=3.2Hz),

5.10(1H, d, J=3.7Hz), 5.12(1H, d, J=3.4Hz), 5.27(1H, d, J=7.6Hz), 5.25-5.70

(m), 7.47(1H, d, J=9.3Hz), 8.19(1H, dd, J=9.3Hz, 2.7Hz), 8.31(1H, d,

J=2.7Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [HPLC, 일본국 Nacalai Tesque (주) 제의

COSMOSIL C_{18} 칼럼 (4.6 mm ID × 250 mm), UV $_{280nm}$ 검출 , 용리액 : 아세토

니트릴/물 = 1:4 (v/v) , 유속 : 1.0 ml/min] : t_R = 10.2 min

° 비선광도 [α] : (c 0.50, 50 mM 인산염 완충액) : +86.7°

° 원소 분석 : $C_{39}H_{58}ClNO_{30}$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%)	44.35	5.53	1.33
실측치 (%)	44.55	5.43	1.34

(2) 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 제조

실시예 1의 (1)에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 4^5, 6^5-O-디메톡시메틸리덴-β-D-말토펜타오시드 3.00g(2.84mmol)을 피리딘 60ml에 용해하고 아세트산 무수물 30ml(384mmol)을 가하여 실온에서 2일간 교반하면서 반응시켰다. 이어서 반응액을 감압하에 농축하여 여기에 함유된 피리딘, 아세트산 무수물 및 아세트산을 제거하였다. 수득한 오일상의 아세틸 유도체를 정제하지 않고 아세트산 100ml 에 용해하고 물 25ml을 가하여 이 혼합액을 30℃에서 3일간 교반하면서 반응시켰다. 이 반응액을 빙수 600ml 중에 교반하면서 서서히 방울씩 가한 다음 이 혼합액을 디클로로 메탄 600ml 로 3회 추출하였다. 디클로로 메탄층을 물 600ml로 3회 세척하고 무수 황산 나트륨으로 건조시킨 다음 여과하고 여액을 감압하에 농축하여 디클로로 메탄을 제거하였다.

잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 에틸 아세테이트-메탄올-디클로로메탄 혼합액 (체적비 66 : 2.5 : 33)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축함으로써 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-1-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 2.08g(1.32mmol, 2 공정통산 수율 46.5%)을 얻었다.

° 융점 (℃) : 126.0～130.0

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax (CH_3CN 중] (nm)

= 282 (log ε = 3.94)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3480, 2970, 1752, 1588, 1530,1486, 1432,

1372, 1350, 1236, 1030, 944, 898.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 1.81-2.12 (ca. 40H, each s),

3.50-4.74(m), 5.05(m), 7.22(1H, d, J=9.0Hz), 8.09(1H, dd, J=9.0Hz,

2.7Hz), 8.22(1H, d, J=2.7Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국 Nacalai Tesque (주) 제의 COSMOSIL C_{18}

칼럼 (4.6 mm ID × 150 mm), UV_{280nm} 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 =

7 : 3(v/v), 유속 : 1.0 ml/min] : t_R = 4.2 min

° 비선광도 [α] : (c 0.25, 1,4-디옥산) : +88.0° .

(3) 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3-디-0-아세틸-4, 6-디-0-메실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 제조

실시예 1의 (2)와 마찬가지로 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3-디-0-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 11.0g (7.00mmol)을 피리딘 500ml 에 용해하고 이 용액에 메실 클로라이드 4.9ml(63.3mmol) 와 분자체 (molecular sieve) 20.0g을 가하고 이 혼합물을 실온에서 16 시간 교반하면서 반응시켰다. 이어서 반응 혼합물을 셀라이트 베드(celite bed)로 여과하고 여액중의 피리딘을 감압하에 제거하였다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 에틸아세테이트-메탄올-디클로로메탄 혼합액(체적비 100 : 1 : 200)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축하여 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3-디-0-아세틸-4, 6-디-0-메실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시 11.6g (0.67mmol, 수율 95.3%)을 얻었다.

° 융점 (℃) : 116.0～119.0

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 283

(log ε = 3.98), 226 (sh), 209 (log ε = 4.23)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 2950, 1752, 1586, 1528, 1368, 1350, 1238,

1176, 1032, 896, 826.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 2.00-2.19 (ca. 40H, each s), 3.08

(3H,s), 3.10(3H, s), 3.85-4.85(m), 5.15-5.50(m), 7.29(1H, d, J=9.2Hz),

8.16(1H, dd, J=9.2Hz, 2.7Hz), 8.29(1H, d, J=2.7Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Nacalai Tesque (주)제 COMOSIL

C_{18} 칼럼 (4.6 mm ID × 150 mm), UV_{280nm} 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 =

3:1 (v/v), 유속 : 1.0 ml/min] : t_R = 4.0 min.

° 비선광도 [α] : (c 0.674, 1,4-디옥산): +85.8°

° 원소 분석 : $C_{66}H_{86}ClNO_{46}S_2$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	45.85	5.01	0.81
실측치 (%) :	46.05	5.09	0.78

(4) 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3-디-0-아세틸-6-데옥시-6-요오드-4-0-메실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[0(2, 3 , 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 제조

실시예 1의(3)에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3-디-0-아세틸-4, 6-디-0-메실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노시드 11.6g (6.67mmol)을 메틸 에틸 케톤 1000ml에 용해하고 이 용액에 요오드화 나트륨 30.2g(201mmol)을 가한 다음 이 혼합물을 85℃에서 6시간 교반하면서 반응 시켰다.

이어서 반응 혼합물을 셀라이트 베드로 여과하고 여액중의 메틸 에틸 케톤을 감압하에 증발시켜 제거하였다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 에틸아세테이트-메탄올-디클로로메탄 혼합액(체적비 100 : 1 : 200)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축하여 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2,3-디-0-아세틸-6-데옥시-6-요오드-4-0-메실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 10.3g(58.5mmol, 수율 87.7%)을 얻었다.

° 융점 (℃) : 127.0 - 129.0

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 283

(log ε = 3.98), 227 (sh), 209 (log ε = 4.22)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3550, 2960, 1750, 1586, 1528, 1486, 1430,

1372, 1350, 1234, 1180, 1040, 960, 898, 828.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 2.00-2.19 (ca. 40H, each s), 3.06

(3H, s), 3.30(1H, dd, J=11.5Hz, 5.4Hz), 3.50(1H, dd, J=11.5Hz, 1.5Hz), 3.68(1H,

ddd, J= 8.8Hz, 5.4Hz, 1.5Hz), 3.85-4.85(m), 5.15-5.50 (m), 7.28(1H, d,

J=9.0Hz), 8.16(1H, dd, J=9.0Hz, 2.7Hz), 8.29(1H, d, J=2.7Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Nacalai Tesque (주) 제 COMSMOSIL

C_{18} 칼럼 (4.6 mm ID × 150 mm), UV_{280nm} 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 =

3 : 1 (v/v), 유속 : 1.0 ml/min] : t_R = 5.6 min.

° 비선광도 [α] : (c 0.674, 1,4-디옥산) : +80.7° .

° 원소 분석 : $C_{65}H_{83}ClINO_{43}S$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	44.34	4.75	0.80
실측치 (%) :	44.34	4.82	0.82

(5) 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3-디-0-아세틸-4-0-메실-α-D-크실로헥스-5-에노피라노실)-(1→4)-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 제조

실시예 1의 (4)에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2,3,-디-0-아세틸-6-데옥시-6-요도도-4-0-메실-α-D-글루코피라노실)-1-(→4)]-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 2.84g (1.61mmol)을 피리딘 170ml에 용해하고 이 용액에 플루오르화은 2.05g(16.1mmol), N, N-디메틸아미노피리딘 28.4mg(0.232mmol) 및 분자체 5.7g 을 가하여 25℃에서 15시간 교반하면서 반응 시켰다.

이 반응 혼합물을 셀라이트 베드로 여과하고 여액중의 피리딘을 감압하에 증발시켜 제거하였다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 에틸아세테이트-메탄올-디클로로메탄 혼합액(체적비 100 : 1 : 400)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축하여 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3-디-0-아세틸-4-0-메실-α-D-크실로헥스-5-에노피라노실)-(1→4)]-2,3,6-트리-[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 1.89g(1.16mmol, 수율 72.0%)을 얻었다.

° 융점 (℃) : 113.0 ~ 115.0

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 283

(log ε = 3.99), 227 (sh), 209 (log ε = 4.25)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3490, 2970, 2110, 1748, 1586, 1532, 1488,

1434, 1372, 1350, 1236, 1182, 1030, 896.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 1.99-2.18 (ca. 40H, each s),

3.10 (3H, s), 3.80-4.95(m), 5.05-5.50(m), 7.28(1H, d, J=9.0Hz), 8.16(1H, dd, J=9.0Hz, 2.7Hz), 8.29(1H, d, J=2.7Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Nacalai Tesque (주) 제 COSMOSIL C_{18} 칼럼 (4.6 mm ID × 150 mm), UV_{280nm} 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 = 3 : 1 (v/v), 유속 1.0 ml/min] : t_R = 4.5 min

° 비선광도 [α] : (c 0.504, 1,4-디옥산) : +75.3° .

° 원소 분석 : $C_{65}H_{82}ClNO_{43}S$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	47.81	5.06	0.86
실측치 (%) :	47.42	5.08	0.86

(6) 2-클로로-4-니트로페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드 제조

실시예 1의 (5)에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-4-O-메실-α-D-크실로헥스-5-에노피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 1.52g (0.931mmol)에 메탄올 150ml와 무수탄산칼슘 193mg(1.40mmol)을 가하고 이 혼합물을 25℃에서 15시간 교반하면서 반응 시켰다.

반응 혼합물을 감압하에 농축하여 혼합물 중에 함유된 메탄올을 제거하고 잔류물을 ODS칼럼 칼럼 크로마토그래피로 정제한 다음 아세토니트릴-물 혼합액(체적비 25 : 75)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축하고 동결 건조함으로써 2-클로로-4-니트로페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드 746mg(0.715mmol, 수율 76.8%)을 얻었다.

° 융점(℃) : 175.0 ~ 180.0 (분해)

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 289 (log ε = 4.01), 228 (sh), 209 (log ε = 4.43)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3400, 2930, 1644, 1584, 1520, 1486, 1350, 1274, 1250, 1152, 1078, 1020, 928, 890.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($DMSO-d_6$) : 3.25-3.85(m), 3.29(3H,s), 4.05(1H, br s), 4.30-4.60(m), 4.56(2H, d, J=2.0Hz), 5.05(2H, d, J=3.4Hz), 5.11(1H, d, J=3.7Hz), 5.19(1H, d, J=2.2Hz), 5.26(1H, d, J=7.3Hz), 5.25-5.65(m), 7.47(1H, d, J=9.3Hz), 8.18(1H, dd, J=9.3Hz, 2.7Hz), 8.29(1H, d, J=2.7Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Tosoh (주) 제 TSK gel Amide-80 칼럼 (4.6 mm ID × 250 mm), UV_{280nm} 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 = 3 : 1 (v/v), 유속 : 1.0 ml/min] : t_R = 5.2 min.

° 비선광도 [α] : (c 0.512, H_2O) : +84.5° .

° 원소 분석 : $C_{37}H_{54}ClNO_{29}S$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	42.55	5.21	1.34
실측치 (%) :	42.23	5.28	1.40

[실시예 2]

2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드 제조

(1) 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2,3)-디-O-아세틸-6-요오드-4-O-메실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 제조

실시예 1의 (4) 와 마찬가지 조작으로 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 1.50g(0.852mmol)을 DMSO 130ml 에 용해하고 이 용액에 아지드화 나트륨 831mg(12.8mmol)을 가하였다. 이 혼합물을 80℃에서 3 시간 동안 교반하면서 반응시킨 다음 이 반응 혼합물에 톨루엔 700ml을 가하고 3wt.%NaCl 수용액 각 300ml 로 3회 세척하였다. 이어서 톨루엔 층을 무수 황산 나트륨으로 건조시켜 면 플러그(cotton pluy)로 여과한 후 여액중의 톨루엔을 감압하에 제거하였다.

잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 에틸 아세테이트-메탄올-디클로로메탄 혼합액(체적비 100 : 1 : 400)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축함으로써 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3-디-아세틸-6-아지도-6-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 1.27g(0.758mmol, 수율 89.0%)을 얻었다.

° 융점 (℃) : 115.0 ~ 117.0

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax (CH_3CN)] (nm) =

283 (log ε = 3.97), 227 (sh), 209 (log ε = 4.22)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3490, 2960, 2110, 1754, 1532, 1372,

1350, 1236, 1188, 1032, 958, 898.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 2.00-2.19 (ca. 40H, each s), 3.04

(3H, s), 3.43-3.60(2H, AB like), 3.85-4.85(m), 5.15-5.50(m), 7.28(1H, d, J=

9.0Hz), 8.16(1H, dd, J=9.0Hz, 2.7Hz), 8.30(1H, d, J=2.7Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Nacalai Tesque (주) 제 COSMOSIL C_{18}

칼럼 (4.6 mm ID × 250 mm), UV280nm 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 = 3:1

(v/v), 유속 : 1.0 ml/min] : t_R 7.8 min.

° 비선광도 [α] : (c 0.500, 1.4-eldhrtks): +92.6° .

° 원소 분석 : $C_{65}H_{83}ClN_4O_{43}S$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	46.59	4.99	3.34
실측치 (%) :	46.43	5.01	3.38

(2) 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드 제조

실시예 2의 (1)에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2,3-디-O-아세틸-6-아지도-6-데옥시-4-O-메실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 1.22g(0.728mmol)을 원료로 사용한 것외에는 실시예 1의(6)의 방법을 반복하여 목적으로 하는 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드 687mg(0.632mmol, 수율 86.8%)을 얻었다.

° 융점(℃) : 170.0 ~ 172.0 (분해)

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 289 (log ε = 3.96), 227 (log ε = 3.98), 209 (log ε = 4.18)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3400, 2930, 2110, 1632, 1584, 1522, 1486, 1350, 1276, 1250, 1172, 1152, 1080, 1026, 958, 896.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm (DMSO-d_6) : 3.20-3.85(m), 3.24(3H, s), 3.85-3.95(1H, ddd like), 4.28(2H, br t, J=7.2Hz), 4.40-4.60(m), 5.05 (2H, d J=3.2Hz), 5.10(1H, d, J=5.4Hz), 5.25(1H, d, J=3.9Hz), 5.27(1H, d, J=7.3Hz), 5.30-5.70(m), 7.47(1H, d, J=9.3Hz), 8.19(1H, dd, J=9.0Hz, 2.7Hz), 8.31(1H, d, J=2.7Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Tosoh 주(제) TSK gel Amide-80 칼럼 (4.6 mm ID × 250 mm), UV_{280nm} 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 = 3 : 1 (v/v), 유속 : 1.0 ml/min] : t_R = 4.6 min.

° 비선광도 [α] : (c 0.516, H_2O) : +86.1° .

° 원소 분석 : $C_{37}H_{55}ClN_4O_{29}S$ 으로서,

	C	H	N
이론치 (%) :	40.87	5.10	5.15
실측치 (%) :	40.62	4.92	5.05

[실시예 3]

2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드 제조

(1) 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-6-O-토실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 제조

실시예 1의 (2)와 마찬가지 방법으로 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 11.6g(7.38mmol)을 피리딘 300ml에 용해하고 이 용액에 토실 클로라이드 21.1g(110mmol)을 가한 다음 이 혼합물을 실온에서 5시간 교반하면서 반응시켰다. 이어서 반응 혼합물 중에 함유된 피리딘을 감압하에 증발시켜 제거하였다.

잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 에틸 아세테이트-메탄올-디클로로메탄 혼합액(체적비 50 : 1 : 100)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축함으로써 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-6-O-토실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 6.43g(3.72mmol, 수율 50.5%)을 얻었다.

° 융점(℃) : 109.0~113.5

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax (CH_3CN)] (nm) = 281 (log ε = 3.95), 272 (sh).

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3490, 2970, 1752, 1586, 1528, 1486, 1430, 1372, 1350, 1240, 1178, 1034, 942.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 1.99-2.17(ca. 40H, each s), 2.45(3H, s), 3.50-4.80(m), 5.10-5.50 (m), 7.27(1H, d, J=9.0Hz), 7.33(2H, d, J=8.5Hz), 7.79(2H, d, J=8.5Hz), 8.15(1H, dd, J=9.0Hz, 2.7Hz), 8.29(1H, d, J=2.7Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Nacalai Tesque (주) 제 COSMOSIL C_{18} 칼럼 (4.6 mm ID × 150 mm), UV_{280nm} 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 = 7 : 3 (v/v) , 유속 1.0 ml/min] : t_R = 8.3 min.

° 비선광도 [α] : (c 0.650, 1,4-디옥산): +88.0° .

° 원소 분석 : $C_{71}H_{88}ClNO_{44}S$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	49.38	5.14	0.81
실측치 (%) :	49.14	5.10	0.79

(2) 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3, 4-트리-O-아세틸-6-O-토실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 제조

실시예 3의 (1)에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-6-O-토실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 4.24g(2.46mmol)을 피리딘 20ml에 용해하고 이 용액에 아세트산 무수물 10ml을 가한 다음 이 혼합물을 실온에서 15시간 교반하면서 반응시켰다. 이어서 반응 혼합물 중의 피리딘을 감압하에 증발시켜 제거하였다.

잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 에틸 아세테이트-메탄올-디클로로메탄 혼합액(체적비 40 : 1 : 100)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축함으로써 2-클로로-4-니트로페닐 O-(2, 3, 4-트리-O-아세틸-6-O-토실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-β-D-글루코피라노시드 2.90g(1.64 mmol, 수율 66.6%)을 얻었다.

° 융점(℃) : 116.5 ~ 118.0

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax (CH_3CN)] (nm) = 284 (log ε = 3.97), 226 (log ε = 4.34)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3490, 2960, 1754, 1584, 1528, 1486, 1432, 1372, 1352, 1238, 1180, 1040, 994, 940, 898.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 1.93-2.19 (ca. 40H, each s), 2.45(3H,s), 3.80-4.80 (m), 4.96(1H, t like), 5.10-5.50(m), 7.28(1H, d, J= 9.0Hz), 7.35(2H, d, J=8.2Hz), 7.78(2H, d, J=8.2Hz), 8.16(1H, dd, J=9.0Hz, 2.4Hz), 8.29(1H, d, J=2.4Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Nacalai Tesque (주)제 COSMOSIL C_{18} 칼럼 (4.6 mm ID × 150 mm), UV_{280nm} 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 = 3:1(v/v), 유속 : 1.0 ml/min] : t_R = 6.7 min.

° 비선광도 [α] : (c 0.692, 1,4-디옥산) : +92.6° .

° 원소 분석 : $C_{73}H_{90}ClNO_{45}S$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	49.56	5.13	0.79
실측치 (%) :	49.43	5.17	0.84

(3) 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3, 4-트리-0-아세틸-6-데옥시-6-요오드-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 제조

실시예 3의 (2)에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3, 4-트리-0-아세틸-6-0-토실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 2.00g(1.13mmol)을 원료로 사용한 것외에는 실시예 1의 (4)와 마찬가지 방법에 따라 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3, 4-트리-0-아세틸-6-데옥시-6-요오드-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 1.94g(1.13mmol, 수율 99.9%)을 얻었다.

° 융점(℃) : 127.0 ~ 129.0

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax (CH_3CN)] (nm) = 284 (log ε = 4.10), 227 (sh), 214 (log ε = 4.25)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3500, 2970, 1754, 1586, 1530, 1486, 1434, 1374, 1354, 1238, 1040, 946, 900.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 1.99-2.19(ca. 40H, each s), 3.13(1H, dd, J=11.2Hz, 6.2Hz), 3.28(1H, dd, J=11.2Hz, 1.5Hz), 3.68(1H, ddd, J=8.8Hz, 6.2Hz, 1.5Hz), 3.85-4.85(m), 5.15-5.50(m), 7.28(1H, d, J=9.2Hz), 8.16(1H, dd, J=9.2Hz, 2.8Hz), 8.29(1H, d, J=2.8Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Nacalai Tesque (주)제 COSMOSIL C_{18} 칼럼 (4.6 mm ID × 150 mm), UV_{280nm} 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 : 3 :1 (v/v),유속 1.0 ml/min : t_R = 6.0 min.

° 비선광도 [α] : (c 0.634, 1,4-디옥산) : +91.0° .

° 원소 분석 $C_{66}H_{83}ClINO_{42}$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	45.96	4.85	0.81
계산치 (%) :	45.87	4.84	0.68

(4) 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드 제조

실시예 3의 (3)에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 0-(2, 3, 4-트리-0-아세틸-6-데옥시-6-요오드-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-트리스[0-(2, 3, 6-트리-0-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-0-아세틸-β-D-글루코피라노시드 2.16g(1.26mmol)을 원료로 사용한 것 외에는 실시예 2의 (1)과 마찬가지 방법으로 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 펜타데카-0-아세틸-6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드 2.04g(1.20mmol, 수율 95.2%)을 원료로 하여 실시예 1의 (6)과 마찬가지로 조작을 함으로써 목적으로 하는 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드 876 mg(0.868mmol, 수율 72.3%)을 얻었다.

° 융점(℃) : 130.0 ~ 135.5 (분해)

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 : 흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 290 (log ε = 3.98), 227 (log ε = 3.99), 209 (log ε = 4.20)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3410, 2930, 2110, 1584, 1520, 1484, 1274, 1150, 1078, 1024.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm (DMSO-d_6) : 3.05- 3.90 (m), 4.20 - 4.55 (m), 4.74 (1H, br d, J=4.8 Hz), 4.96 (1H, br d, J=5.4 Hz), 5.05 (2H, d, J=3.7 Hz), 5.10 (2H, d, J=3.7 Hz), 5.25 (1H, d, J=7.6 Hz), 5.25 - 5.60 (m), 7.47 (1H, d, J=9.3 Hz), 8.19 (1H, dd, J=9.3 Hz, 2.7 Hz), 8.29 (1H, d, J=2.7 Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Tosoh (주) 제, TSK gel Amide-80 칼럼 (4.6 mm ID × 250 mm), UV_{280} nm 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 = 3 : 1 (v/v), 유속 : 1.0 mℓ/min] : t_R = 6.7 min.

° 비선광도 [α] : (c 0.516, H_2O) : +92.4 ° .

° 원소분석 : $C_{36}H_{53}ClN_4O_{27}$ 으로서

C	H	N

이론치 (%) : 42.84 5.29 5.55

실측치 (%) : 42.88 5.31 5.59

[실시예 4]

4-니트로페닐 5^7-에노-4^7-O-메톡시메틸-α-D-말토헵타오시드 제조

(1) 4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-펜타키스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노시드

시판품인 4-니트로페닐 α-D-말토헵타오시드 15.0g(11.8mmol)을 무수 DMF 75ml 에 용해하고, 이 용액에 테트라메톡시메탄 15.0ml(113mmol) 과 Amberlyst(15E) 7.5g을 가하여 35℃에서 4시간 교반하면서 반응시킨 다음, 반응 혼합물을 빙냉하에 100mM 인산염 완충액 (pH=7.0) 2.0ℓ 중에 교반하면서 서서히 방울씩 첨가하였다. 수득한 혼합물을 ODS(옥타데실실리카 겔) 칼럼 크로마토그래피로 정제하고, 아세토니트릴-물 혼합액(체적비 35 : 65)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축하였다. 이렇게 하여 수득한 오일상의 4-니트로페닐 4^7, 6^7-O-디메톡시메틸리덴-α-D-말토헵타오시드 10.0g(7.43mmol, 수율 63.0%)을 원료로 사용한 것 외에는 실시예 1의 (2)와 마찬가지 방법으로 조작을 하여 4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-펜타키스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노시드 6.70g(3.17mmol, 2 공정 통산 수율 42.6%)을 얻었다.

° 자외부-가시부 흡수 스펙트럼 :

흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 290 (log ε = 3.98), 227 (sh),

209 (log ε = 4.27).

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3640, 2970, 1752, 1612, 1594,

1526, 1496, 1432, 1370, 1350, 1236, 1038, 948, 898.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 2.00 - 2.20 (ca. 60H,

each s), 3.65 - 4.85 (m), 5.15 - 5.55 (m), 7.08 (2H, d, J=9.1 Hz),

8.22 (2H, d, J=9.1 Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Nacalai Tesque (주) 제,

COSMOSIL C_{18} 칼럼 (4.6 mm ID × 150 mm), UV_{280} nm 검출, 용리액 :

아세토니트릴/물 = 7 : 3 (v/v), 유속 : 1.0 mℓ/min] : t_R = 5.3 min.

(2) 4-니트로페닐 O-(2,3-디-O-아세틸-6-데옥시-6-요오도-4-O-메톡시메틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-펜타키스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노시드 제조

실시예 4의 (1)에서 제조한 4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-펜타키스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노시드 6.70g(3.17

mmol)을 원료로 사용한 것 외에는 실시예 3의 (1)과 마찬가지로 조작을 하여 4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-6-O-토실-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-펜타키스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노시드 5.57g(2.46mmol, 수율 77.6%)을 얻었다. 이 토실 유도체를 아세토니트릴 40ml 중에 용해하고 이 용액에 메톡시메틸클로라이드 1, 93g(24mmol) 와 N, N-디이소프로필-N-에틸아민 3.10g(24mmol)을 가한 후 3시간 환류하에 교반하면서 반응시켰다. 용매와 아민을 감압하에 증발시켜 제거하고 잔류물을 메틸 에틸 케톤 500ml 중에 용해한 다음, 이 용액에 요오드화 나트륨 15.1g(100mmol)을 가하였다.

이 혼합물을 85℃에서 6시간 교반하면서 반응시켰다. 이어서 반응 혼합물을 셀라이트 베드로 여과하고 여액중의 메틸 에틸 케톤을 감압하에 증발시켜 제거하였다.

잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하고 에틸 아세테이트-메탄올-디클로로메탄 혼합액(체적비 100 : 1 : 100)으로 용출하여 얻은 목적 분획물을 농축함으로써 오일상의 4-니트로페닐 O-(2, 3-디-O-아세틸-6-데옥시-6-요오도-4-O-메톡시메틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-펜타키스[O-2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노시드 3.58g(1.58mmol, 2공정통산 수율 64.2%)을 얻었다.

° 자외부-가시부 흡수 스펙트럼 :

흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 290 (log ε = 3.98), 227 (sh),

209 (log ε = 4.22).

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3630, 2960, 1750, 1610, 1592,

1526, 1494, 1430, 1370, 1350, 1234, 1040, 960, 898.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm ($CDCl_3$) : 2.00 - 2.19 (ca. 60H,

each s), 3.22 (1H, dd, J=11.0 Hz, 6.5 Hz), 3.36 (3H, s), 3.46

(1H, dd, J=11.0 Hz, 1.5 Hz), 3.68 (1H, ddd, J=8.8 Hz, 6.5 Hz,

1.5 Hz), 3.85 - 4.85 (m), 5.15 - 5.50 (m), 7.08 (2H, d, J=9.0 Hz),

8.22 (2H, d, J=2.7 Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Nacalai Tesque (주) 제,

COSMOSIL C_{18} 칼럼 (4.6 mm ID × 150 mm), UV_{280} nm 검출, 용리액 :

아세토니트릴/물 = 7 : 3 (v/v), 유속 : 1.0 mℓ/min] : t_R = 10.8 min.

° 원소분석 : $C_{90}H_{118}INO_{58}$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	47.64	5.24	0.62
실측치 (%) :	47.34	5.42	0.55

(3) 4-니트로페닐 5^7-에노-4^7-O-메톡시메틸-α-D-말토헵타오시드 제조

실시예 4의 (2)에서 제조한 4-니트로페닐 O-(2,3-디-아세틸-6-데옥시-6-요오도-4-O-메톡시메틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)-펜타키스[O-(2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노실)-(1→4)]-2, 3, 6-트리-O-아세틸-α-D-글루코피라노시드 3.64g(1.58mmol)을 원료로 사용한 것 외에는 실시예 1의 (5) 및 (6)과 마찬가지로 조작하여 4-니트로페닐 5^7-에노-4^7-O-메톡시메틸-α-D-말토헵타오시드 1.15(0.897 mmol. 2 공정 통산 수율 56.8%)을 얻었다.

° 자외부-가시부 흡수 스펙트럼 :

흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 289 (log ε = 4.01), 228 (sh),

209 (log ε = 4.25)

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3410, 2930, 1644, 1612, 1592,

1520, 1500, 1346, 1250, 1152, 1080, 1020, 934, 876.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm (DMSO-d_6) : 3.15 - 3.80 (m),

3.25 (3H, s), 4.25 - 4.60 (m), 4.56 (2H, d, J=2.0 Hz), 4.70 - 4,90

(m), 5.05 (2H, d, J=3.4 Hz), 5.11 (1H, d, J=3.7 Hz), 5.19 (3H, d, J=2.2 Hz), 5.23 (1H, d, J=3.4 Hz), 5.25 - 5.65 (m), 7.23 (2H, d, J=9.2 Hz), 8.23 (2H, d, J=9.2 Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Tosoh (주) 제, TSK gel Amide-80 칼럼 (4.6 mm ID × 250 mm), UV_{280} nm 검출, 용리액 : 아세토니트릴/물 = 65 : 35 (v/v), 유속 : 1.0 mℓ/min] : t_R = 8.8 min.

° 원소분석 : $C_{50}H_{77}NO_{37}$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	46.77	6.04	1.09
실측치 (%) :	46.50	6.28	1.01

[실시예 5]

α-아밀라아제 활성 측정 (1)

(1) 기질 용액 제조

실시예 1에서 제조한 2-클로로-4-니트릴페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드(분자량 : 1044)를 1.14mM 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유하는 50mM 인산염 완충액 (pH = 7.0)에 용해하였다.

(2) 공액 효소액 제조

효모 유래의 시판품인 α-글루코시다아제와 아몬드 유래의 시판품인 β-글루코시다아제를 각각 117 단위/ml 및 13단위/ml 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유하는 50mM 인산염 완충액 (pH = 7.0)에 혼합하여 용해하였다. 그리고, 이들 시판품인 α- 및 β-글루코시다아제는 일본국의 東洋紡績 (株) 의 제품을 사용하였다.

(3) 표준 α-아밀라아제 용액 제조

시판품인 인간 α-아밀라아제 (P : S = 1 : 1) 에 정제수를 가하여 각각 0, 148, 284, 401 및 525 IU/ℓ 의 농도로 용해하여 표준 α-아밀라아제 용액을 제조하였다.

그리고 시판품인 인간 α-아밀라아제는 일본국의 國際試藥 (株) 의 제품인 Calibzyme AMY를 사용하였다. 또한, α-아밀라아제 활성은 37℃에서 1분 동안 1μmol 의 2클로로-4-니트로페닐 β-D-말토펜타오시드(시판품)를 분해하는 효소량을 1 국제단위(IU : international unit)로 하여 정의하였다.

(4) 시료 용액 제조

α-아밀라아제 활성 측정용 시료가 액체인 경우에는 그대로 시료 용액으로 하였고, 고체인 경우에는 시료 500mg을 정확히 무게를 달아 정제수를 가하고, 전체량을 5ml 로 하여 시료 용액을 제조하였다. 필요에 따라서는 시료용액중의 불용물과 여과 등의 조작으로 제거한 다음 사용하였다.

(5) 검량선 (檢量線)의 작성

표준 α-아밀라아제 용액 250μℓ에 공액 효소액 1.0ml을 교반하면서 가하고, 이 혼합물을 37℃에서 1분간 가열한 다음 이 혼합물에 기질 요액 2.0ml을 교반하면서 가하고 37℃에서 2분간 가열한 후 400nm에서의 흡광도 변화량을 2분간 측정하였다. 각 표준 α-아밀라아제 용액의 활성과 흡광도 변화량 사이의 관계로부터 검량선을 작성하였다. 그 결과, 검량선의 식은 다음과 같이 되었다.

$$U = 8.34 \cdot \triangle A \times 10^3 + 11.2$$

위의 식에서, U : 효소 활성 (IU / ℓ)

△A : 1분당 흡광도의 변화량

검량선은 제1도에서 직선 그래프로 나타나 있다.

(6) 시료 용액중의 α-아밀라아제 활성 측정

시료 용액 250μℓ 에 공액 효소액 1.0ml을 가하여 교반하고 이 혼합물을 37℃에서 1분간 가열한 다음 기질 용액 2.0ml을 가하여 교반하고, 이 혼합물을 37℃에서 2분간 가열한 후 400nm 에서의 흡광도 변화량을 2분간 측정하였다. 이 측정치와 위의(5)에서 작성한 검량선으로부터 산출하여 시료 용액중의 α-아밀라아제

활성을 측정할 수 있다.

그리고 시료 용액중의 효소 활성의 값이 검량선의 적용 범위 (0~525 IU/ℓ)를 초과할 경우에는 정제수를 사용하여 시료 용액을 적당한 농도로 희석한 후 다시 측정한다.

[실시예 6]

α-아밀라아제 활성 측정 (2)

(1) 기질 용액 제조

실시예 3에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드(분자량 : 1009)를 2.28mM 의 농도가 되도록 40 mM NaCl과 2mM $MgCl_2$를 함유하는 50mM 인산염 완충액 (pH = 7.0)에 용해하였다.

(2) 공액 효소액 제조

(3) 표준 α-아밀라아제 용액 제조

(4) 시료 용액 제조

(5) 검량선의 작성

실시예5의 (2)~(5)와 동일한 조작으로 공액 효소액 제조, 표준 α-아밀라아제 용액 제조, 시료 용액 제조 및 검량선의 작성을 하였다. 그 결과 검량선의 식은 다음과 같이 되었다.

$U = 8.66 \cdot \triangle A \times 10^3 - 6.7$

검량선은 제2도에서 직선 그래프로 나타나 있다.

(6) 시료 용액중의 α-아밀라아제 활성 측정

실시예 5의(6)과 동일한 조작으로 시료 용액중의 α-아밀라아제 활성을 측정하였다.

[실시예 7]

앞서 나온 6^3-아지도-6^3-데옥시말토트리오시드 유도체와 본 발명의 신규 화합물인 6^5-아지도-6^5데옥시말토펜타오시드 유도체를 α-아밀라아제에 의한 가수분해 속도에 대하여 비교하였다.

(1) 2-클로로-4-니트로페닐 6^3-아지도-6^3-데옥시-β-D-말토트리오시드 제조

시판품인 2-클로로-4-니트로페닐 β-D-말토트리오시드 10.0g(15.2

oles) 원료로 사용한 것 외에는 실시예 3과 동일한 조작에 따라 2-클로로-4-니트로페닐 6^3-아지도-6^3-데옥시-β-D-말토트리오시드를 제조하였다. 6^3-아지도-6^3-데옥시-말토트리오시드의 수득량은 1.14g(1.67mmol, 8공정통산 수율 11.0%)이었고 다음과 같은 성질을 가지고 있다.

° 융점(℃) : 100.5~103.5

° 자외부, 가시부 흡수 스펙트럼 :

흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 290 (log ε = 3.99), 227 (log ε = 4.00),

209 (log ε = 4.22).

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3410, 2940, 2112, 1586, 1522,

1486, 1274, 1156, 1078, 1024, 924, 896.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm (DMSO-d_6) : 3.05 - 3.90 (m),

4.25 - 4.55 (m), 4.72 (1H, br d, J=5.0 Hz), 4.96 (1H, br d,

J=5.5 Hz), 5.08 (1H, d, J=3.1 Hz), 5.11 (1H, d, J=3.8 Hz), 5.26

(1H, d, J=7.6 Hz), 5.25 - 5.60 (m), 7.48 (1H, d, J=9.2 Hz), 8.20

(1H, dd, J=9.2 Hz, 2.7 Hz), 8.30 (1H, d, J=2.7 Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Tosoh (주) 제, TSK gel

Amide-80 칼럼 (4.6 mm ID × 250 mm), UV_{280} nm 검출, 용리액 : 아세토

니트릴/물 = 3 : 1 (v/v), 유속 : 1.0 mℓ/min] : t_R = 3.9 min.

° 원소분석 : $C_{24}H_{33}ClN_4O_{17}$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	42.08	4.86	8.18
실측치 (%) :	42.01	4.99	8.29

(2) 기질 용액 (a) 제조

실시예 3에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐- 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드(이하 본 발명의 기질 이라 한다)를 3.0mM 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유한 50mM인산염 완충액 (pH=7.0)에 용해 하여 기질 용액(a)를 제조하였다.

(3) 기질 용액 (b) 제조

위의 (1) 제조한 2-클로로-4-니트로페닐- 6^3-아지도-6^3-데옥시-β-D-말토트리오시드(분자량:984; 이하 대조 기질 이라 한다)를 3.0mM 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유한 50mM인산염 완충액 (pH=7.0)에 용해 하여 기질 용액(b)를 제조하였다.

(4) 공액 효소액 제조

실시예5의 (2)와 동일한 방법으로 공액 효소액을 제조하였다.

(5) α-아밀라아제 용액 제조

시판품인 α-아밀라아제 (P : S = 1 : 1)를 각각 0, 250 및 500 IU/ℓ의 농도가 되도록 정제수에 용해하여 실시예5의 (3)과 동일한 방법으로 α-아밀라아제 용액을 제조하였다.

(6) α-아밀라아제 가수분해 반응

α-아밀라아제 용액 250㎕ 에 공액 효소액 1.0ml을 교반하면서 가하고, 이 혼합물을 37℃에서 1분간 가열하였다. 이 혼합물에 기질 용액 각각을 2.0ml 의 양으로 교반하면서 가하고 37℃에서 2분간 가열한 후 400nm 에서의 흡광도 변화량을 2분간 측정하였다. 그 결과는 표1에 나와 있다.

[표 1]

α-아밀라아제 활성 (IU/ℓ)	2 분간의 흡광도 증가량 (α-아밀라아제 활성이 0 IU/ℓ 일 때의 값으로 보정)	
	기질 용액 (a) (본 발명의 기질 용액)	기질 용액 (b) (대조 기질 용액)
250	0.058	0.002
500	0.118	0.005

표 1로부터 알 수 있는 바와 같이, 대조 기질은 α-아밀라아제 의하여 거의 가수분해 되지 않는 반면, 본 발명의 기질은 α-아밀라아제 의하여 극히 만족스럽게 가수분해 되고 있다.

[실시예 8]

5-에노말토트리오시드 유도체와 본 발명의 5-에노말토펜타오시드 유도체를 α-아밀라아제에 의한 가수분해 속도에 대하여 비교하였다.

(1) 2-클로로-4-니트로페닐-5-에노-4-O-메실-β-D-말토트리오시드 제조

시판품인 2-클로로-4-니트로페닐 β-D-말토트리오시드 10.0g(15.2

mol) 원료로 사용한 것 외에는 실시예 1과 동일한 방법으로 말토트리오시드 유도체 1.23g(1.71mmol, 7 공정 통산 수율 11.3%)을 제조하였는데 다음과 같은 성질을 가지고 있다.

° 융점 (℃) : 142.0 ~ 145.0 (분해)

° 자외부-가시부 흡수 스펙트럼 :

흡수 극대 파장 [λmax] (nm) = 289 (log ε = 4.00), 228 (sh),

209 (log ε = 4.44).

° 적외선 흡수 스펙트럼 (cm^{-1}) : 3400, 2920, 1642, 1584, 1518,

1488, 1348, 1276, 1250, 1152, 1080, 1020, 928, 892.

° NMR 스펙트럼 (200 MHz) ppm (DMSO-d_6) : 3.25 - 3.85 (m),

3.30 (3H, s), 4.04 (1H, br s), 4.30 - 4.60 (m), 4.58 (2H, br d,

J=2.2 Hz), 5.11 (1H, d, J=3.8 Hz), 5.19 (1H, d, J=3.2 Hz), 5.26

(1H, d, J=7.4 Hz), 5.25 - 5.65 (m), 7.47 (1H, d, J=9.0 Hz), 8.18

(1H, dd, J=9.0 Hz, 2.7 Hz), 8.29 (1H, d, J=2.7 Hz).

° 고속 액체 크로마토그래피 [일본국의 Tosoh (주) 제, TSK gel

Amide-80 칼럼 (4.6 mm ID × 250 mm), UV_{280} nm 검출, 용리액 : 아세토

니트릴/물 = 4 : 1 (v/v), 유속 : 1.0 mℓ/min] : t_R = 4.6 min.

° 원소분석 : $C_{25}H_{34}ClNO_{19}S$ 으로서

	C	H	N
이론치 (%) :	41.70	4.76	1.95
실측치 (%) :	41.53	4.88	1.90

(2) 기질 용액 (a) 제조

실시예 1에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드(이하 본 발명의 기질이라 한다)를 3.0mM 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유한 50mM인산염 완충액 (pH=7.0)에 용해 하였다.

(3) 기질 용액 (b) 제조

위의 (1) 제조한 2-클로로-4-니트로페닐- 5^3-에노-4^3-O-메실-β-D-말토트리오시드(이하 대조기질 이라 한다)를 3.00mM 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유한 50mM인산염 완충액 (pH=7.0)에 용해 하였다.

(4) 공액 효소액 제조

실시예5의 (2)와 동일한 방법으로 공액 효소액을 제조하였다.

(5) α-아밀라아제 용액 제조

실시예 7의 (5)와 동일한 방법으로 α-아밀라아제 용액을 제조하였다.

(6) α-아밀라아제 가수분해 반응

실시예 7의 (6)과 동일한 방법으로 흡광도 변화량을 측정하였다.

그 결과는 표 2에 나와 있다.

[표 2]

α-아밀라아제 활성 (IU/ℓ)	2 분간의 흡광도 증가량 (α-아밀라아제 활성이 0 IU/ℓ 일 때의 값으로 보정)	
	기질 용액 (a) (본 발명의 기질 용액)	기질 용액 (b) (대조 기질 용액)
250	0.057	0.001
500	0.116	0.002

표 2로부터 알 수 있는 바와 같이, 대조 기질은 α-아밀라아제의하여 거의 가수분해 되지 않는 반면, 본 발명의 기질은 α-아밀라아제에 의하여 극히 순조롭게 가수분해 된다.

[실시예 9]

내(耐) 공액 효소 시험(1)

(1) 기질 용액 (a) 제조

실시예 1에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 5-에노-4-O-메실-β-D-말토펜타오시드(분자량 : 1044 ; 이하 본 발명의 기질 이라 한다)를 3.00mM 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM MgCl를 함유한 50mM인산염 완충액 (pH=7.0)에 용해 하였다.

(2) 기질 용액 (b) 제조

종래의 방법으로 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 β-D-말토펜타오시드(이하 대조기질 이라 한다)를 3.00mM 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM MgCl를 함유한 50mM인산염 완충액 (pH=7.0)에 용해 하였다.

(3) 공액 효소액 제조

효모 유래의 시판품인 α-글루코시다아제와 아몬드 유래의 시판품인 β-글루코시다아제를 각각 1053 단위/ml 및 15.5단위/ml 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM MgCl를 함유하는 50mM 인산염 완충액 (pH = 7.0)에 용해하여 공액 효소액을 제조하였다. 그리고, 이들 시판품인 α- 및 β-글루코시다아제는 일본국의 東洋紡績 (株) 의 제품을 사용하였다.

(4) 공액 효소 반응

공액효소액 1.0ml을 37℃에서 5분간 가열한 후, 본 발명의 기질 용액 또는 대조 기질 용액을 각각 2.0ml 가하고 충분히 혼합한 다음 37℃에서 3분간 가열하고 나서 파장 400nm에서의 흡광도 변화량을 5분간 측정하였다.

그 결과는 제3도에 나와 있는데, 제3도에서 ▽표시는 기질용액(a), □표시는 기질용액(b)를 각각 나타낸 것이다. 제3도에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 기질은 공액 효소에 의하여 가수분해 되지 아니하고 측정계 내에서 안정하게 존재하고 있다.

[실시예 10]

내(耐) 공액 효소 시험(2)

(1) 시약 제조

실시예 3에서 제조한 2-클로로-4-니트로페닐 6-아지도-6-데옥시-β-D-말토펜타오시드(분자량 : 1009 ; 이하 본 발명의 기질 이라 한다)를 원료로 사용한 것 외에는 실시예9와 동일한 방법으로 시험을 하였다.

그 결과는 제4도에 나와 있는데, 제4에서 ▽표시는 기질용액(a), □표시는 기질용액(b)를 각각 나타낸 것이다. 제4도로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 기질은 공액 효소에 의하여 가수분해 되지 아니하고 측정계 내에서 안정하게 존재하고 있다.

[실시예 11]

측정 시약 (1)

정제수에 아래의 각 성분을 각 해당되는 농도로 용해함으로써 시약을 각각 제조하였다.

성 분	농 도
2-클로로-4-니트로페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드	0.70 mM
α-글루코시다아제	40 단위/mℓ
β-글루코시다아제	5.0 단위/mℓ
β-글리세로인산염 완충액 (pH = 7.0)	20 mM
소혈청 알부민	0.05 %

(2) 측정법

측정용 시료가 액체인 경우에는 그대로 시료 용액으로 하여 사용하고, 고체인 경우에는 시료 500m, g을 정확히 무게를 달아 정제수를 가하고 전체량을 5.0ml로 해서 이것을 시료 용액으로 사용하였다. 시료 용액 250㎕에 미리 37℃에서 2분간 가열한 시약 3.0ml을 가하여 교반하고 37℃에서 2분간 가열한 다음 400nm 에서의 흡광도 변화량을 2분간 측정하였다. 이 측정치와 미리 작성된 검량선으로부터 산출하여 시료 용액중의 α-아밀라아제의 활성을 측정할 수 있다. 그리고, 시료 용액중의 효소 활성의 값이 검량선의 적용범위(0~525 IU/ℓ)를 초과할 경우에는 시료 용액에 정제수를 가하여 적당한 농도로 희석한 후 다시 측정한다.

[실시예 12]

측정 시약(2)

시약 제조 및 측정법

2-클로로-4-니트로페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드 대신에 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드를 사용하고, 2, 00mM의 농도에서 사용한 것 외에는 실시예 11과 마찬가지 조작을 이용하여 실시하였다.

[실험예]

실시예에서 제조한 본 발명의 기질인 2-클로로-4-니트로페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드(EMG5CNP) 및 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드 (ADG5CNP) 의 Km 값, 가수분해 속도, 수용성 및 가수분해 부위에 대하여 아래의 방법에 따라 조사하였다. 그 결과는 표3과 표4에 나와 있다. 그리고 대조 기질로서 시판품인 2-클로로-4-니트로페닐 β-D-말토펜타오시드(G5CNP)를 사용하였다.

(1) Km 값

(i) 기질 용액 (a) 의 제조

각 기질을 0.16, 0.32, 0.48, 0.64, 0.80 및 0.96mM 의 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유한 50mM 인산염 완충액(pH=7.0)에 용해하여 각 기질 용액을 제조하였다.

(ii) Km 값의 어림셈(rough calculation)

위의 (i)의 각 기질 용액에 대하여 아래에 나오는 가수분해 속도 측정의 경우와 동일한 방법에 따라 가수분해 속도를 측정하여 Lineweaver-Burk 의 역수 플로트(reciprocal plot)[일본국의 掘尾武一, 山下仁平編「蛋白質·酵素 實驗法」383 페이지, 南江堂]로 Km 값의 어림셈 값을 구하였다.

(iii)기질 용액 (b)의 제조

각 기질을 위의 (ii)의 어림셈 Km 값의 0.8~1.6 배의 범위에서 세가지 농도, 그리고 1.6~3.2 배의 범위에서 세가지 농도가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유하는 50mM인산염 완충액 (pH=7.0)에 용해하였다.

(iv) Km 값의 측정

위의 (ii)와 동일한 방법에 따라 Km 값을 산출하였다.

(2) 가수분해 속도

(i)기질 용액 제조

각 기질의 농도를 Km 값의 7~9배가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유하는 50mM인산염 완충액

(pH=7.0)에 용해하였다. 이 농도는 다음에 나오게 되는 α-아밀라아제 반응시에 있어서, 인간 α-아밀라아제에 대하여 Km값의 약 5배에 상당하기 때문에 최대 반응 속도에 도달하기 에는 충분한 기질의 양이다.

(ii)공액효소액 제조

실시예5의 (2)와 마찬가지 방법으로 제조하였다.

(iii) α-아밀라아제 용액 제조

실시예 5의 (3)과 마찬가지 방법으로 하여 약 500IU/ℓ의 농도를 가진 시판품인 인간 P형 및 S형 α-아밀라아제 용액을 제조하였다.

(iv)가수분해 속도 측정 (α-아밀라아제 반응)

위의 (iii)에서 제조한 α-아밀라아제 용액 250㎕에 공액효소액 1.0ml을 가하여 혼합하고, 이 혼합물을 37℃에서 1분간 가열한 다음 기질용액 2.0ml을 교반하면서 가한 후 37℃에서 2분간 가열하고 나서 400nm 에서의 흡광도 변화량을 2분간 측정하였다. 대조 기질인 3mM G5CNP을 사용했을 경우, 가수분해 속도, 즉 단위 시간당의 흡광도의 변화량을 10으로 하여 각 기질의 가수분해 속도를 상대치로 나타내었다.

(3) 수용성

물 100ml 에 기질 20g를 첨가하여 그 용해 상태를 관찰하였다.

(4) 가수분해 부위

각 기질의 농도를 0.5mM 가 되도록 40mM NaCl 과 2mM $MgCl_2$를 함유하는 50mM 인산염 완충액(pH=7.0)에 각 기질을 용해하고, 이 기질 용액 1.0ml 에 위의 가수분해 속도의 항인 (iii)에서 제조한 α-아밀라아제 용액 100㎕을 가하고, 잘 혼합한 후 37℃에서 20분간 반응 시켰다. 이 반응 혼합물을 고속 액체 크로마토그래피로 분석함으로써 가수분해 생성물을 정량하였다.

[표 3]

기 질	Am	Km 값 (mM)	가수분해 속도	수 용 성
EMG5CNP	P	0.13	10	양 호
	S	0.14	10	
ADG5CNP	P	0.17	10	양 호
	S	0.26	10	
G5CNP	P	0.29	10	양 호
	S	0.37	10	

[표 4]

기 질	Am	가 수 분 해 부 위 [가수분해 생성물 (mol %)]			
		G4CNP	G3CNP	G2CNP	GCNP
EMG5CNP	P	0	0	97	3
	S	0	0	97	3
ADG5CNP	P	0	3	97	0
	S	0	0	100	0
G5CNP	P	8	8	81	3
	S	4	11	83	2

(주) Am : 두가지의 인간 α-아밀라아제 (아이소자임)

P : 인간 췌장액 유래의 α-아밀라아제

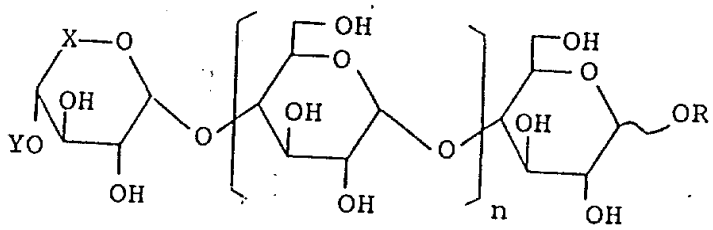
S : 인간 타액 유래의 α-아밀라아제

표3과 표4로부터 본 발명의 기질은 필수적으로 단일의 D-글루코시드 결합에서 가수분해가 일어나고 두가지 α-아밀라아제에 의한 가수분해 부위와 가수분해 속도가 동일하며, 또한 α-아밀라아제에 대한 친화성이 극히 강하고 가수분해 속도와 수용성도 양호하면, α-아밀라아제 활성 측정용 기질로서 극히 우수한 것임을 알 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

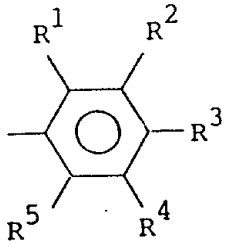
아래의 일반구조식으로 나타내어지는 말토올리고시드 유도체.



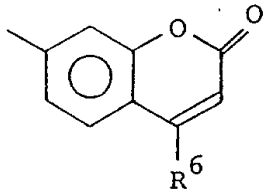
(위의 식에서 n 은 3 ~ 5의 정수, R 은 방향족 발색성 그룹, X 는 $CHCH_2N_3$ 또는 $C=CH_2$, Y 는 수소원자, 치환 또는 비치환의 탄화수소 그룹 또는 알킬 - 혹은 아릴술포닐 그룹이다).

청구항 2

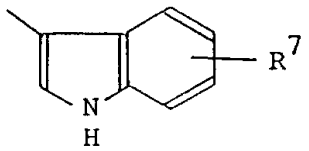
제1항에 있어서 방향족 발색성 그룹 R 은 아래의 일반 구조식들로 나타내어지는 것인 말토올리고시드 유도체.



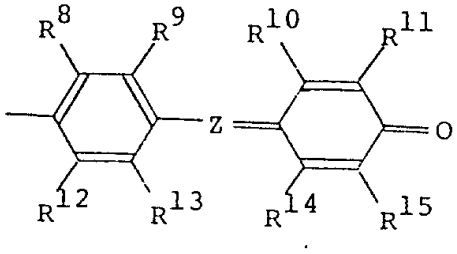
(위의 식에서 R^1 - R^5 는 같거나 상이하며, 수소원자, 할로겐 원자, 니트로 그룹, 알킬 그룹, 아릴그룹, 아랄킬 그룹, 아미노 그룹, 술폰산 그룹 또는 카르복실 그룹이고, 또는 R^1 과 R^2 혹은 R^2 와 R^3 은 함께 결합하여 축합 방향족환을 형성하여도 좋다.)



(위의 식에서 R^6은 수소원자 또는 알킬 그룹이다)



(위의 식에서 R^7은 수소원자 또는 할로겐 원자이다)



(위의 식에서 R^8 - R^{15} 는 같거나 상이하며, 수소원자, 할로겐 원자, 니트로 그룹, 알킬 그룹, 아릴그룹, 아랄킬 그룹, 아미노 그룹, 술폰산 그룹 또는 카르복실 그룹이고, R^8 과 R^9 혹은 R^{10} 와 R^{11} 은 함께 결합하여 축합 방향 족환을 형성하여도 좋으며, R^9와 R^{10} 및 또는 R13 과 R^{14} 는 각각 공통의 산소 원자가 되어 축합 에테르환을 형성하여도 좋고, Z는 질소원자 또는 N → O 이다).

청구항 3

제1항에 있어서, 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드, 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드, 2-클로로-4-니트로페닐 5^5-에노-β-D-말토펜타오시드, 2-클로로-4-니트로페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드, 4-니트로페닐 5^7-에노-4^7-O-메톡시메틸-α-D-말토펜타오시드, 4-니프로페닐 6^7-아지도-6^7-데옥시-α-D-말토헵타오시드, 2,4-디클로로페닐 6^7-아지도-6^7-데옥시-4^7-O-토실-β-D-말토헵타오시드, 페놀인도-3'-클로로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-4^5-O-메틸-β-D-말토펜타오시드, 4-메틸움벨리페로닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드, 레자주리닐 5^6-에노-α-D-말토헥사오시드, 루시페리닐 6^7-아지도-6^7-데옥시-4^7-O-알릴-β-D-말토헵타오시드 또는 페놀인도-3'-클로페닐 5^5-에노-4^5-O-(2-메톡시) 에톡시메틸-β-D-말토펜타오시드 유도체.

청구항 4

제1항에 있어서, 2-클로로-4-니트로페닐 6^5-아지도-6^5-데옥시-β-D-말토펜타오시드 또는 2-클로로-4-니트

로페닐 5^5-에노-4^5-O-메실-β-D-말토펜타오시드 유도체.

청구항 5

제1항에 의한 말토올리고시드 유도체를 유효성분으로 함유하는 α-아밀라아제 활성 측정용 시약.

청구항 6

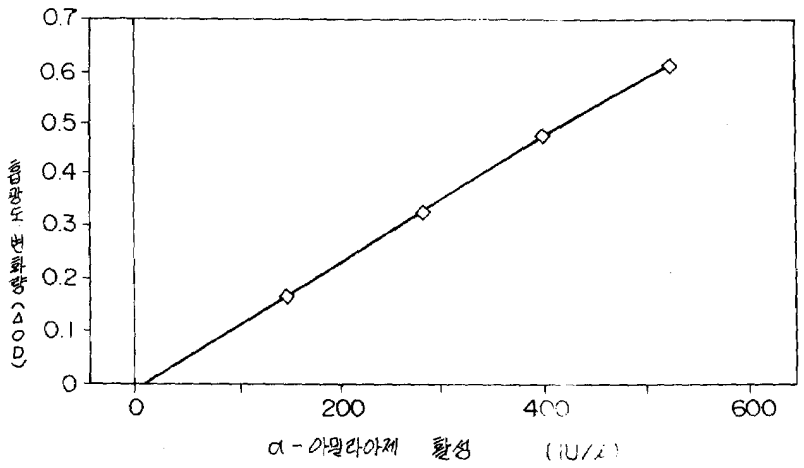
α-아밀라아제 함유 시료에 제1항에 의한 말토올리고시드 유도체의 α-아노머와 α-글루코시다아제 및/또는 글루코아밀라아제를 첨가하여 효소 반응을 시켜 유리하는 방향족 발색성 화합물을 정량함을 특징으로 하는 α-아밀라아제의 활성 측정 방법.

청구항 7

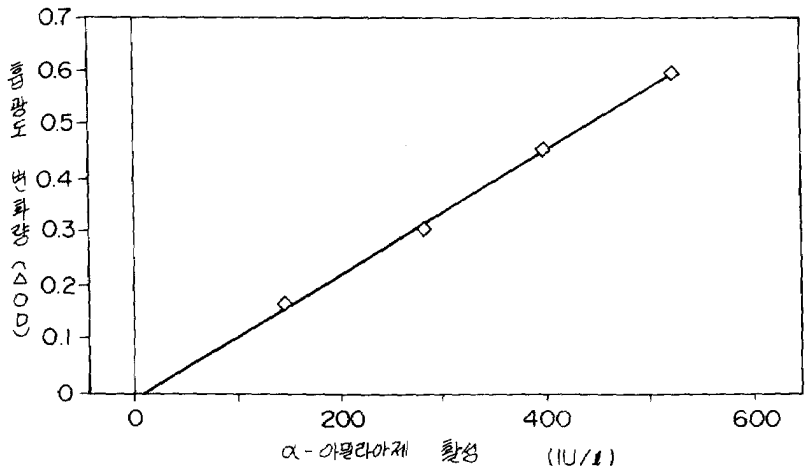
α-아밀라아제 함유 시료에 제1항에 의한 말토올리고시도 유도체의 β-아노머 또는 α-아노머와 β-아노머와의 혼합물과 α-글루코시다아제 및/또는 글루코아밀라아제 및 β-글루코시다아제를 첨가하여 효소 반응을 시켜 유리하는 방향족 발색성 화합물을 정량함을 특징으로 하는 α-아밀라아제의 활성 측정 방법.

도면

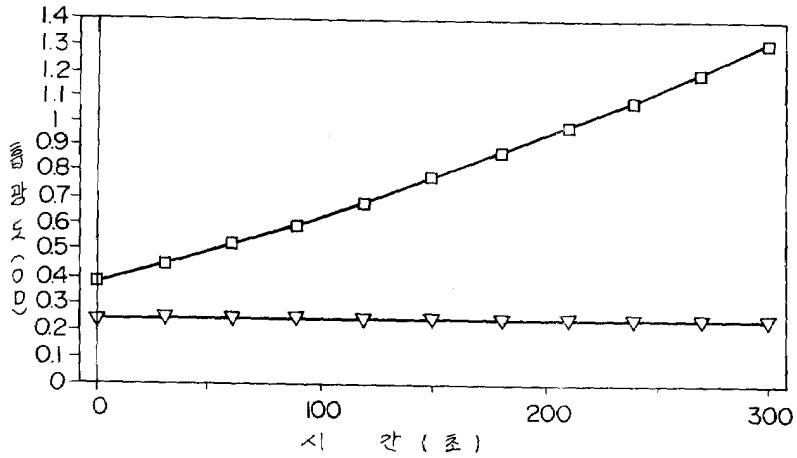
도면1



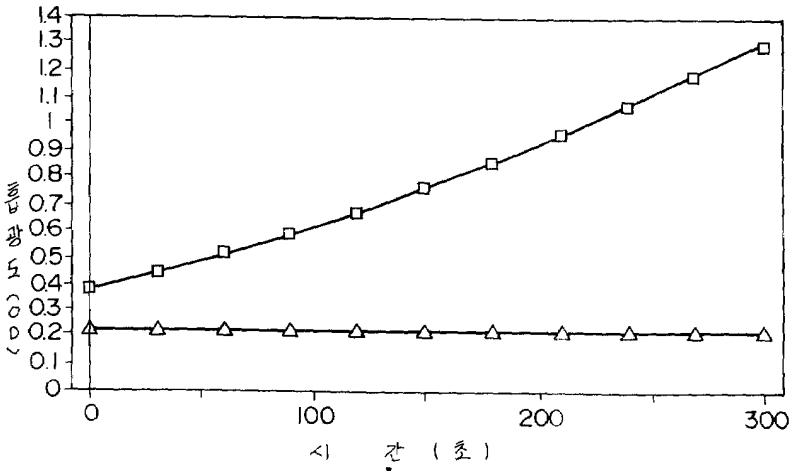
도면2



도면3


1.4
1.3
1.2
1.1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
흡광도(OD)
0
100
200
300
시 간 (초)

도면4


1.4
1.3
1.2
1.1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
흡광도(OD)
0
100
200
300
시 간 (초)