

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C09K 11/07

(45) 공고일자 1997년06월 14일

(11) 공고번호 특1997-0009599

(24) 등록일자 1997년06월 14일

(21) 출원번호 특1993-0005431

(65) 공개번호 특1994-0021117

(22) 출원일자 1993년03월31일

(43) 공개일자 1994년10월 17일

(73) 특허권자 국방과학연구소 김학옥  
대전광역시 유성우체국 사서함 35호  
(72) 발명자 오상곤  
대전광역시 대덕구 와동 주공아파트 114-506  
차승희  
대전광역시 대덕구 읍내동 영진아파트 105-701  
(74) 대리인 박장원

**심사관 : 송재욱 (책자공보 제5064호)**

**(54) 퍼옥시옥살레이트 시스템의 화학발광 반응용 촉매**

**요약**

내용 없음.

**대표도**

**도1**

**명세서**

[발명의 명칭]

퍼옥시옥살레이트 시스템의 화학발광 반응용 촉매

[도면의 간단한 설명]

제1도는 반응용액(Tris-HCl 완충용액 : 아세트니트릴=1 : 1(v/v)에서 본 발명의 소듐 아지드 촉매의 첨가농도에 따른 발광세기의 분석결과를 도시한 그래프.

제2도는 반응용액(Tris-HCl 완충용액 : 아세트니트릴=1 : 1(v/v)에서 1.0mM 소듐 아지드 및 0.2mM 트리 에틸아민의 첨가에 따른 발광 세기를 비교한 그래프.

제3도는 반응용액(디메틸프탈레이트)에서 0.5mM 소듐 아지드의 첨가시 시간에 따른 발광곡선(발광량)을 도시한 그래프.

[발명의 상세한 설명]

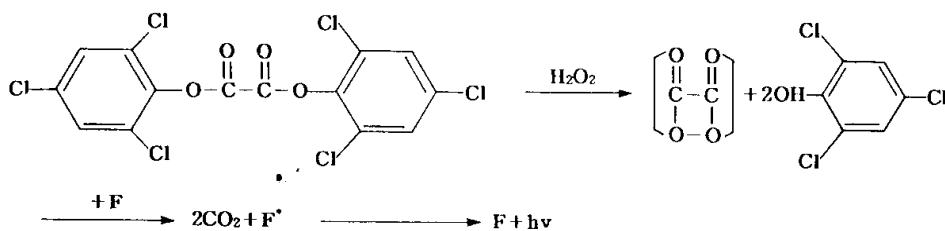
본 발명은 퍼옥시옥살레이트 시스템의 화학발광 반응(peroxyoxalate chemiluminescence reaction)을 위한 아지드(azide) 촉매에 관한 것이다.

화학발광 반응은 반응의 중간이나 마지막 단계에서 발광 반응에 관여하는 모든 물질의 정량분석이 가능하고 현재 화학적 분석방법중 분석감도가 가장 높아 실험실적 분석은 물론 분석장비의 탐지부(detector)에 널리 적용되는 등 그 응용성이 크게 주목받고 있다.

화학발광 반응에는 루미놀(luminol), 루시게닌(lucigenin), 퍼옥시옥살레이트(peroxyoxalate) 등이 관여하는 반응이 알려지고 있다. 그러나, 이들 방법중에 실제 분석에 널리 응용되는 것으로는 루미놀과 퍼옥시옥살레이트가 대표적이다.

그 중에서도 퍼옥시옥살레이트의 화학발광 반응이 가장 효율적인 반응으로 알려져 있다. 이러한 퍼옥시옥살레이트의 화학발광 반응의 일반적인 반응 경로는 다음과 같은 예가 있다.

## 반응식 1



(F=형광제, F\*=여기된 형광제)

한편, 퍼옥시옥살레이트의 화학발광 반응은 용매와 형광제 존재하에 옥살산 에스테르 화합물 및 이와 관련한 화합물을 과산화물과 반응시켜 중간체로서 1,4-디옥세탄 디온(1,4-dioxetane dione)을 생성시키고, 이것이 형광제에 의한 분해에 의해 화학발광이 발생하는 것이다. 이러한 화학발광 반응은 알칼리성에서는 물론 중성과 약산성 용액에서도 비교적 발광 효율이 높아 과산화수소 및 과산화수소 생성효소, 아미노산의 분석 등 각종 생물학적 시료의 분석시험에도 널리 적용되고 있다. 이외에도 이러한 화학발광 반응은 다른 분석방법들에 비하여 분석감도가 높고 반응시액의 유용성 등 다양한 장점 등을 갖고 있어 이를 이용한 각종 분석장비들로 개발되고 있는 실정이다. 또한, 이 화학발광 반응은 광원의 원리로도 적용되며 이를 이용한 수종의 광원이 개발되어 이미 사용되고 있다.

그러나, 옥살산 에스테르 화합물 및 이와 관련한 화합물을 이용한 이러한 화학발광 반응은 루미놀을 이용한 화학발광 반응과 달리, 옥살산 에스테르 화합물 등을 용해시키기 위하여 아세토니트릴(acetonitrile), 에테르(ether), 알코올류(alcohols) 등의 유기용매가 사용되어야 한다. 그러나, 이들 화합물은 각각의 용매에 대한 용해도가 극히 저조하고, 각 용매에서의 자연분해로 인한 안정성이 낮다는 문제점 등을 내포하고 있다.

또한, 적정 용매에 용해된 옥살산 에스테르 화합물일 경우에도 대부분의 분석시료의 함유 용액인 물과 혼합시에는 용해도가 낮아져 석출되는 현상이 일어나 완전한 반응 유도가 어렵다. 따라서, 이 화학발광 반응을 각종 크로마토그래피와 기타 분석장비에 적용시는 이와 같은 불완전 용해를 막고 용매의 혼합을 원활히 수행하기 위하여 별도의 혼합기(mixer) 등이 필요하며, 특히, 화학발광 분석법의 높은 분석감도에도 불구하고 시료의 물함량이 높은 경우는 이러한 문제점 때문에 이 분석법을 적용할 수 없다. 또한, 이 경우 발광효율이 크게 저하되는 문제점 등이 항상 내포되어 있다. 이러한 문제점으로 인해 각종 용도의 광원 개발에도 큰 장애가 되고 있다.

이에 대해 물에도 용해될 수 있는 새로운 화합물에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나 그 대부분이 불안정하거나 혹은 발광량 저하 등의 문제점이 대두되고 있다.

한편, 발광량과 발광효율의 증대를 위해서 수종의 촉매를 사용하는 것이 알려진 바 있으나, 이들의 대부분은 염기성 촉매로서 트리에틸아민과 이미다졸이 대표적인 촉매로 언급된 바 있다. 이러한 촉매들은 반응용액이 수소 이온 농도를 변화시킴으로서 반응속도를 증가시키는 것에 주요 역할을 나타낼 뿐이고 위에서 언급한 각종 단점들을 해결하지는 못했다. 염기성 촉매 이외에 금속이온 및 금속함유 단백질들이 반응 촉매로 알려져 있으나 이들의 촉매 활성은 극히 미진한 실정이다.

본 발명에서는 옥살산 에스테르 화합물 및 이와 관련한 물질을 이용한 화학발광 반응, 즉 퍼옥시옥살레이트 시스템의 화학발광 반응용 촉매로서 아지드 염을 비롯한 그의 유도체들을 사용하여 상기와 같은 문제점들을 해결할 수 있었다.

따라서, 본 발명의 목적은 용매와 형광제 존재하에 옥살산 에스테르 화합물 및 이와 관련한 물질과 과산화물을 반응시켜 중간체로서 1,4-디옥세탄 디온을 얻고, 이 중간체가 형광제의 촉매적 분해에 의해 화학발광되는, 퍼옥시옥살레이트 시스템의 화학발광 반응용 아지드 촉매를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 일 예에 따라, 상기의 퍼옥시옥살레이트 시스템의 화학발광반응을 이용한 분석장비에 있어서 촉매로서 본 발명의 아지드 화합물을 사용하여 그의 발광세기 및 발광량이 증대되며 따라서 분석장비의 감도가 크게 개선된 효율적인 분석장비가 제공될 수 있다.

본 발명의 추가의 일 예에 따라, 상기의 화학발광반응을 이용한 광원에 있어서는 본 발명에 따른 촉매를 사용함으로써 종래의 광원에 비해 발광지속시간 등이 월등히 증가함으로써 그의 응용성이 크게 개선될 수 있다.

본 발명의 또 다른 일 예에서 옥살산 에스테르 화합물 및 이와 관련한 화합물을 사용한, 퍼옥시옥살레이트 시스템의 화학발광 반응을 이용한 각종 반응시 아지드 유도체를 동일 목적으로 사용하는 각종 분석방법 및 반응을 포함한다.

본 발명을 구체적으로 말하자면, 본 발명은 퍼옥시옥살레이트 시스템의 화학발광 반응에 있어서, 상기의 염기성 촉매 대신에 아지드 화합물을 사용함으로써 출발물질인 옥살산 에스테르 화합물과 아지드 화합물의 반응이 수행되며 이 반응을 통해 중간체로서 아지드기가 1개 또는 2개 치환된 옥살산 에스테르 화합물이 얻어진다. 이 화합물들은 아지드기의 친수성으로 인해 수용성이 크며 각종 용매에 대한 용해도가 증대된다. 따라서 발광지속시간 및 발광의 세기등 발광효율이 크게 증대될 수 있으며, 물함량이 큰 경우에도 이들 중간체 화합물과 과산화물의 반응이 원활히 진행될 수 있으며 이러한 이유로 반응용액의 물함량이

95% 이상인 경우에도 반응물의 석출현상이 방지될 뿐만 아니라 별도의 혼합기가 필요하지 않다.

본 발명의 아지드 화합물로서는 소듐 아지드( $\text{NaN}_3$ ), 포타슘 아지드( $\text{KN}_3$ ) 및 칼슘 아지드( $\text{Ca}(\text{N}_3)_2$ ) 등과 같은 아지드의 금속염; 부틸 아지드 또는 클로로에틸 아지드와 같은 치환되거나 미치환된 지방족 아지드 화합물; 페닐 아지드, 2-아지도아닐린 및 아지도니트로벤젠과 같은 치환되거나 미치환된 방향족 아지드 화합물; 아지도시클로펜탄과 같은 지방족환식 아지드 화합물; 펜아실 아지드와 같은 방향족아실 아지드 화합물; 비닐 아지드 및 알릴 아지드 등의 다른 아지드 유기치환체; 및 시아노겐 아지드,  $\beta$ -요오드 아지드 등의 아지드 무기치환체를 들 수 있으나, 반응용액에서 자연적으로 또는 인위적으로 친핵성 아지드기를 형성할 수 있는 것은 어느 것이나 가능하다. 따라서 본 발명에서는 아지드화 수소 및 아지드 이온( $\text{N}_3^-$ )도 포함한다.

상기에 제시된 아지드 화합물중에서 아지드의 금속염이 바람직하나 그 중에서도 소듐 아지드가 가장 바람직하다.

본 발명에 따른 화학발광 반응에 사용되는 옥살산 에스테르 화합물로서는 무수 옥살산, 아마이드류, 0-아실-히드록시아민류 등 일반적으로 사용될 수 있는 화합물이 가능하며, 특히 삼염화페닐 옥살산 에스테르(bis-2,4,6-trichlorophenyl oxalate; TCP0)가 바람직하다.

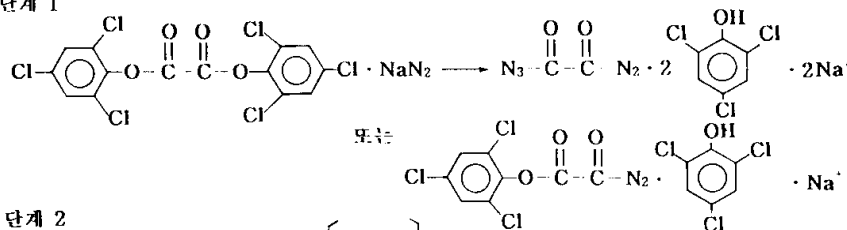
과산화수소로서는 과산화수소를 포함한 액체 및 고체의 과산화물이 있으나, 과산화수소가 바람직하다.

형광체는 퍼릴렌(perylene), 9,10-디페닐안트라센, 라이렌(pyrene) 및 DNS-아미노산, 폴리시클릭 방향족 탄화수소 및 아민 화합물 그리고 여러 가지의 방향족 탄화수소 등이 사용될 수 있으며, 본 발명에서는 9,10-디페닐안트라센과 파이렌이 바람직하다.

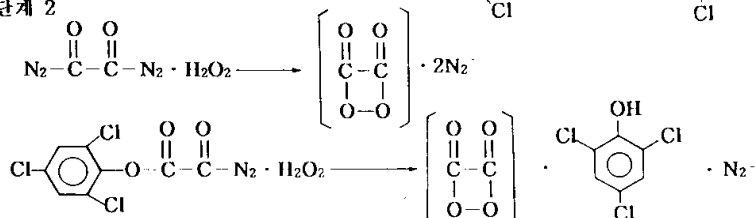
본 발명의 일 예에서 소듐 아지드를 촉매로 사용하여 옥살산 에스테르 화합물로서 TCP0를 동일 몰농도(M)로 아세토니트릴과 물, 알코올 등 각종 용매에 용해시켜 실온에서 1분간 반응시킨 후 반응 생성물을 액체 크로마토그래피로 분리 확인하고 분리된 반응 생성물을 적외선 스펙트럼, 자외선 스펙트럼, 수소핵자기 공명분석, 질량분석으로 시험한 결과 다음과 같이 그 반응식을 추정할 수 있다 :

## 반응식 2

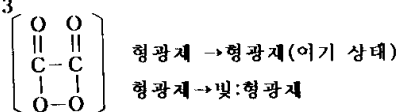
단계 1



단계 2



단계 3



그리고 본 발명에서는 발광량이 크게 증대되는 것으로 미루어 추정 반응식 단계 2에서 1,4-디옥세탄 디온 대신에 이보다 더 고에너지 화합물 형태의 중간물질이 생성될 수도 있음을 추정할 수 있었다.

다음의 실시예는 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하는 것이며 본 발명을 국한하는 것으로 의도되지 않는다.

### 실시예 1

소듐 아지드의 첨가농도에 따른 발광량 분석

TCP0 6mg/ml과 파이렌 0.1mg/ml을 아세토니트릴 용매에 용융시켰다. 소듐 아지드를 10  $\mu\text{M}$ 의 과산화수소가 함유된 완충용액에 0.1~10mM 농도로 각각 5ml의 유리용기에 첨가하여 상기의 아세토니트릴 용액과 동일량으로 혼합하였다. 혼합용액을 즉시 레코더가 부착되어 있는 광량 측정기(Photometer)에 넣어 발광되는 광량과 광의 세기를 측정하였으며 그 결과를 제1도에 도시하였다.

### 실시예 2

아지드 화합물의 종류에 따른 발광세기 분석

TCP0 6mg/ml과 파이렌 0.1mg/ml가 녹아 있는 아세토니트릴 용액에 각종의 아지드 화합물을 1mM 농도로 첨가하고 10  $\mu\text{M}$  과산화수소가 첨가된 완충 용액을 동일량 혼합하여 실시예 1에서와 같이 시험하였으며 그

결과를 다음의 표 1에 제시한다.

[표 1]

사용 화합물명	상대적 발광세기
$\text{NaN}_3$	100
$\text{KN}_3$	94.0
$\text{Ca}(\text{N}_3)_2$	96.0
부틸 아지드	14.4
클로로에틸 아지드	12.4
페닐 아지드	32.4
아지도시클로펜탄	12.1
페나실 아지드	10.8
시아노젠 아지드	64.2
아지도니트로벤젠	16.0
2-아지도아닐린	11.0
$\beta$ -요오도아지드	22.4

### 실시에 3

옥살산 에스테르 화합물과 아지드 화합물의 반응성 분석

TCP0와 소듐 아지드를 각각 6mg/ml와 3mg/ml의 농도로 아세토니트릴과 완충액에 동일량 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨후 박층 크로마토그래피법으로 반응산물을 분리하여 적외선 스펙트럼, 자외선 스펙트럼, 수소핵자기공명분석, 질량분석 시험을 실시하였다. 그 결과 2,4,6-트리클로로페놀이 생성되었음을 확인하였다.

또한, 상기 추정 반응식에서 2,4,6-트리클로로페놀 대신에 N기가 1개 또는 2개 치환된 화합물은 자외선 스펙트럼 및 고속액체 크로마토그래피법으로 확인될 수 있었다. 이때 상기의 TCP0와 소듐 아지드는 그 반응시간을 10초 이내로 하였다.

### 실시에 4

아지드 화합물의 촉매능 비교분석

촉매의 효율이 가장 높은 농도에서 본 발명에 따른 소듐 아지드(1.0mM) 및 대조군으로서 종래의 촉매인 트리에틸아민(0.2mM)을 실시예 1에서와 같은 방법으로 시험하였다. 그 결과를 제2도에 도시한다.

### 실시에 5

과산화수소의 정량분석에 미치는 아지드 화합물의 영향

완충용액에 첨가되는 과산화수소의 양을 10-10M까지로 하여 실시예 1에서와 같은 방법은 시험하였다. 다만, 대조군으로서는 소듐 아지드를 첨가하지 않았다. 그 결과를 다음의 표 2에 제시한다.

### 실시에 6

산화효소의 정량분석에 미치는 아지드 화합물의 영향

글루코스와 콜린 옥시다제를 각각 0.001M 인산염 완충용액과 0.1M 인산염 완충용액에 희석하여 첨가하였다. 두 용액에 글루코스와 아세틸콜린을 각각 0.5mM씩 첨가하여 35℃에서 10분간 반응시킨 후 각각의 용액에 생성된 과산화수소의 양에 따른 발광량을 실시예 5에서와 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과를 다음의 표 2에 제시한다.

[표 2]

과산화수소 및 산화효소의 정량분석에 미치는 아지드 화합물의 영향 비교

분석대상	분석검도	
	아지드 첨가(1.0mM)	아지드 무첨가
과산화수소	$10^{-9}\text{M}$	$10^{-7}\text{M}$
글루코스 산화효소	$2.6 \times 10^{-4}\text{unit}$	$5 \times 10^{-3}\text{unit}$
콜린 산화효소	$1.2 \times 10^{-3}\text{unit}$	$10^{-2}\text{unit}$

## 실시예 7

### 아지드 화합물의 첨가에 따른 발광효율 및 발광 지속시간 분석

소듐 아지드( $2.5 \times 10M$ )를 과산화수소( $1.25 \times 10M$ )와 함께 디메틸프탈레이트에 녹이고 TCP0 6mg/ml와 9,10-디페닐 안트라센 0.1mg/ml를 디메틸프탈레이트에 녹인 용액을 각각  $200\mu l$ 씩 동일량 혼합하여 실시예 1에서와 동일한 방법으로 발광량을 시험하였다. 그 결과를 제3도에 도시하였다.

첨부 도면에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 반응 촉매, 아지드 화합물은 화학발광 반응에 적용시 그 발광의 세기와 효율은 물론 발광 지속시간을 크게 증대시켜 각종 광원의 개발에 적용할 수 있다.

아울러 본 발명에서 제시한 아지드 화합물의 사용은 기존의 화학 발광 분석법에서 가장 큰 문제점중의 하나인 에스테르 화합물의 용해도를 크게 증가시킨다.

이상과 같은 본 발명의 효과는 각종 물질의 분석감도 증가는 물론 반응용액의 물함량 %가 95% 이상에서도 석출 현상이 일어나지 않아 보다 용이한 반응속도의 조절이 가능하고 따라서 관련 분석장비의 개발에 미치는 효과도 클 것으로 추정된다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1

용매와 형광제 존재하에 옥살산 에스테르 화합물 및 이와 관련한 물질과 과산화물을 반응시켜 중간체로 1,4-디옥세탄 디온을 얻고, 이 중간체가 형광제의 촉매적 분해에 의해 화학발광되는, 퍼옥시옥살레이트 시스템의 화학발광 반응용 아지드 촉매.

### 청구항 2

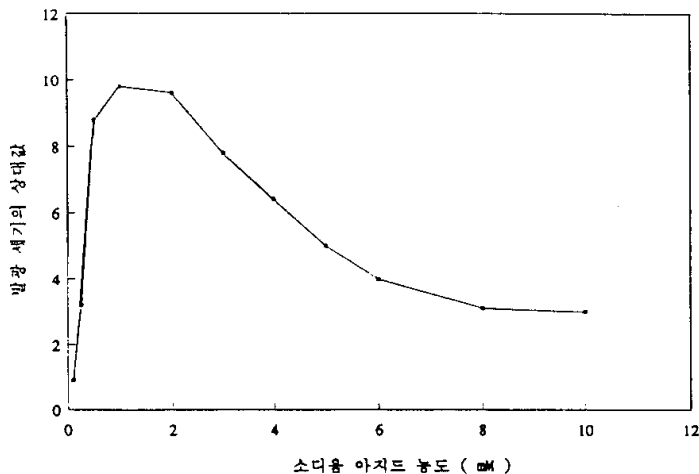
제1항에 있어서, 상기 아지드 촉매가 아지드 금속염인 것이 특징인 촉매.

### 청구항 3

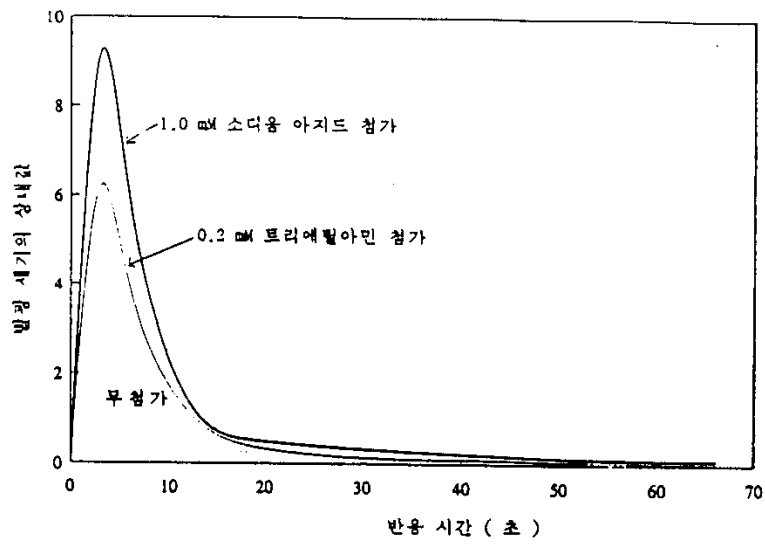
제2항에 있어서, 상기 아지드 금속염이 소듐 아지드인 것이 특징인 촉매.

## 도면

### 도면1



도면2



도면3

