

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/58

G01N 33/533 G01N 33/66

C09K 11/06 C07F 5/02



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99805986.2

[45] 授权公告日 2004 年 7 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1159583C

[22] 申请日 1999.3.11 [21] 申请号 99805986.2

[30] 优先权

[32] 1998.3.11 [33] US [31] 09/037,960

[86] 国际申请 PCT/US1999/005290 1999.3.11

[87] 国际公布 WO1999/046600 英 1999.9.16

[85] 进入国家阶段日期 2000.11.9

[71] 专利权人 医药及科学传感器公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 埃德温·F·厄尔曼

亚历山大·V·尼古拉奇克

乔治·Y·丹尼洛夫 戴维·帕克

阿瑟·E·科尔文

阿里斯托尔·G·卡利弗雷滕诺斯

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

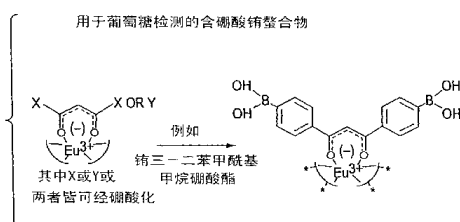
权利要求书 11 页 说明书 60 页 附图 11 页

[54] 发明名称 通过荧光镧系金属螯合物检测分析物

[57] 摘要

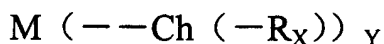
测定样品中分析物的存在或浓度所用的组合物和方法，其包括将该样品暴露于包括荧光镧系金属螯合复合物的指示剂分子。样品中分析物的存在或浓度是经由观察及/或测量分析物结合到该复合物中所含一个或多个辨识元素时由该镧系金属螯合复合物发散出的荧光强度变化而测定的。该荧光指示剂分子可用于各种类型的荧光感测装置中且可用于各种领域，包括能源，医学和农业之中。

用于葡萄糖检测的含硼酸铕螯合物



ISSN 1008-4274

1、一种用以检测未标示分析物的浓度的指示剂分子，其包括具有下式的荧光性镧系金属螯合复合物：



其中：

M 代表镧系金属离子；Ch 为包括一配体的螯合剂；R 为分析物一特定性辨识单元，包括硼酸基、亚砷酸基或锗酸基或它们的混合物且 X 表结合到每一螯合剂的辨识单元 R 的数目；X=0 至 4，且 Y=1 至 4；且该辨识单元 R 的数目可相同或相异，其限制条件为对于一个或多个螯合剂而言，X>0；且其中是经由测量在该分析物通过该辨识单元结合到该复合物所含一个或多个螯合剂时该镧系金属螯合复合物所发散的荧光的任何变化而检测该分析物的浓度，其中所述一个或多个螯合剂所含配体为包括下列任何一种或多种的有机配体：β-二酮或其氮类似物，1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷的四脂族羧酸盐或膦酸盐，二羟基，羧基配位杂环，烯醇，大双环穴状配体，多胺基多羧酸，苯膦酸，含 1 至 10 个碳原子的烯基、氮杂环、硫或键联的羧基、氧化膦或碳环部分体，且其中除了前述的基团单元外，至少一种配体包含没有直接螯合至镧系金属离子的芳基，该芳基与所述镧系金属离子隔离 5 个原子以下，且其中一个或多个螯合剂是阴离子的且总共含有能够与镧系金属离子配位的八个点。

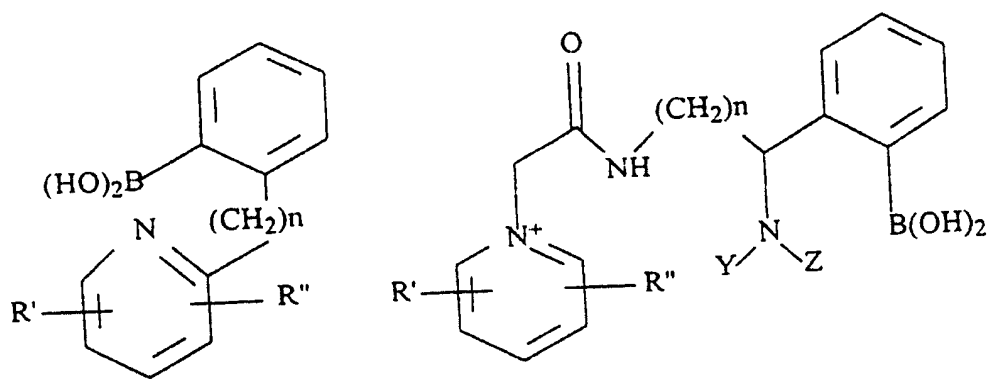
2、根据权利要求 1 所述的指示剂分子，其中所述镧系金属螯合复合物所含 M 为镧离子或铽离子。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的指示剂分子，其中所述一个或多个螯合剂所含配体包括选自于 β -二酮和 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷的四脂族羧酸盐或膦酸盐的部分部分体。

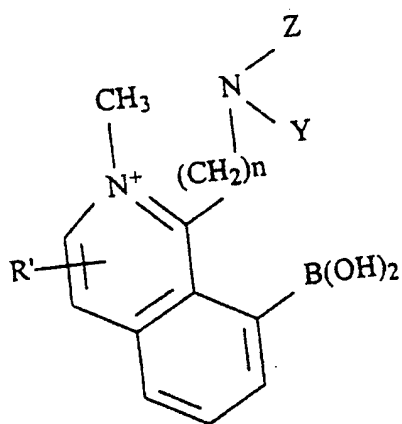
4、根据权利要求 1 所述的指示剂分子，其中所述一个或多个螯合剂还包括一取代基以将螯合复合物连接到一固体载体上。

5、根据权利要求 4 所述的指示剂分子，其中所述将螯合复合物连接到一固体载体所用的取代基为 $-\text{NH}_2$ 基或 $-\text{OH}$ 基。

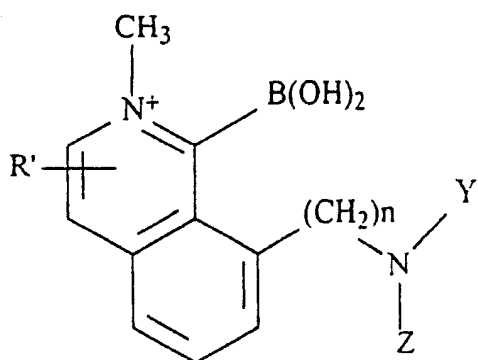
6、根据权利要求 1 所述的指示剂分子，其中所述辨识单元是选自下列物质：



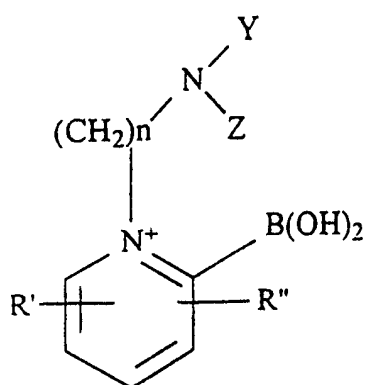
其中在右边结构中 n 为 0, 1, 或 2; 而在左边结构中 n 为 0 或 1;



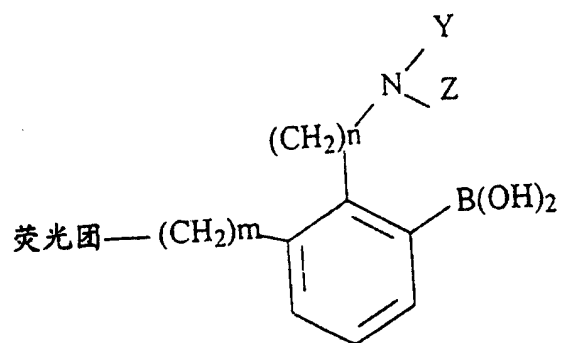
其中 n 为 1;



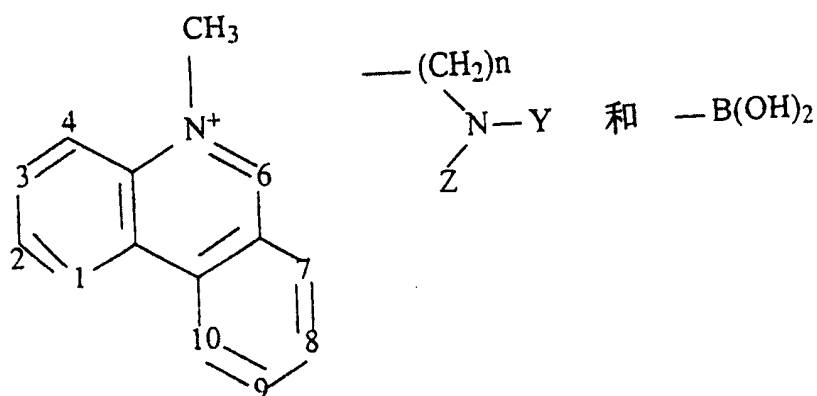
其中 n 为 0 或 1;



其中 n 为 2;

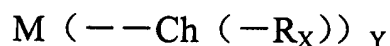


其中 m 为 0—5 且 n 为 1 或 2; 及



其中 n 为 0 或 1；且该硼酸和胺基取代基是以呈配对形式配置于位置 1 和 10，3 和 4，6 和 7，7 和 8，或 9 和 10；且对所有构造，于可用时， R' 和 R'' 独立地各为稠合芳基；脂族基；伯，仲或叔胺基；酰胺；羧基；酮；酯；醇；或醛；且 Y 和 Z 独立地各为脂族基，烷氧基或芳基；及它们的衍生物。

7、根据权利要求 1 所述的指示剂分子，其中硼酸基、亚砷酸基或锗酸基是连接至芳香部分体上。8、一种荧光性镧系金属螯合复合物，其是用以检测分析物的存在或浓度且其具有下式：



其中：

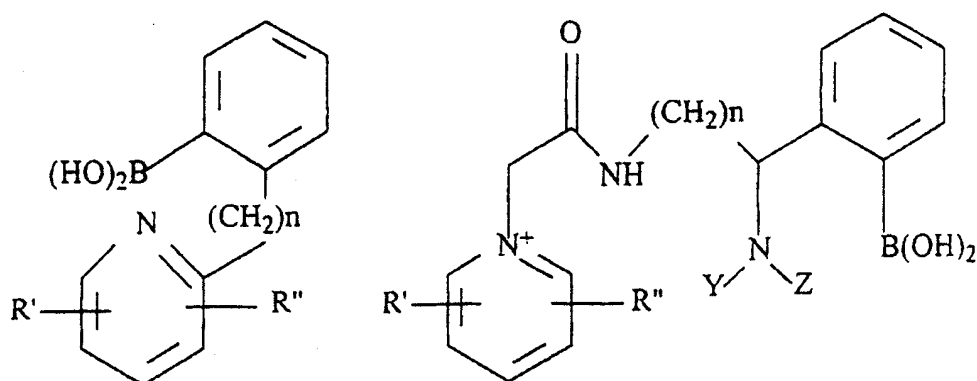
M 为镧系金属离子； Ch 为包括一配体的螯合剂； R 为分析物一特定性辨识单元，包括硼酸基、亚砷酸基或锗酸基或它们的混合物且 X 表结合到每一螯合剂的辨识单元 R 的数目； $X=0$ 至 4，且 $Y=1$ 至 4；且该辨识单元 R 的数目可相同或相异，其限制条件为对于一个或多个螯合剂， $X>0$ ；且其中是经由测量在该分析物通过该辨识单元结合到该复合物所含一个或多个螯合剂时该镧系金属螯合复合物所发散的荧光的任何变化而检测该分析物的浓度，其中所述一个或多个螯合剂所含配体为包括下

列任何一种或多种的有机配体： β -二酮或其氮类似物，1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷的四脂族羧酸盐或膦酸盐，二羟基，羧基配位杂环，烯醇，大双环穴状配体，多胺基多羧酸，苯膦酸，含1至10个碳原子的烯基、氮杂环、硫或键联的羧基、氧化膦或碳环部分体，且其中除了前述的基团单元外，至少一种配体包含没有直接螯合至镧系金属离子的芳基，该芳基与所述镧系金属离子隔离5个原子以下，且其中一种或多种螯合剂是阴离子的且总共含有能够与镧系金属离子配位的八个点。

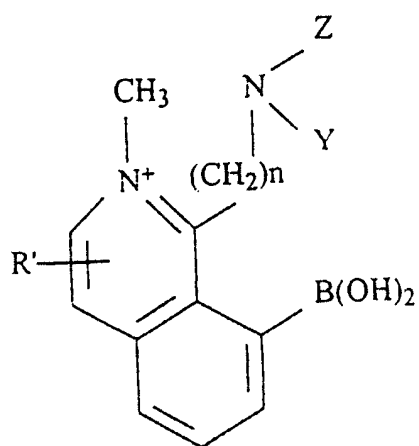
9、根据权利要求8所述的荧光性镧系金属螯合复合物，其中所述M为镧离子或铕离子。

10、根据权利要求8或9所述的荧光性镧系金属螯合复合物，其中所述一个或多个螯合剂所含配体包括 β -二酮或1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷的四脂族羧酸盐或膦酸盐。

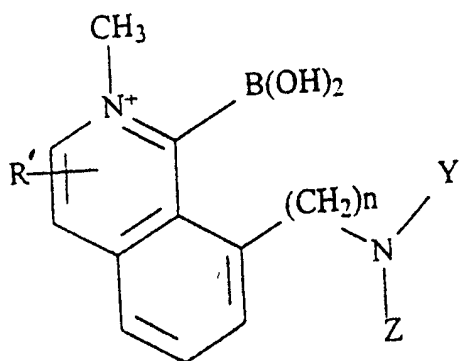
11、根据权利要求8所述的荧光性镧系金属螯合复合物，其中所述辨识单元是选自下列物质：



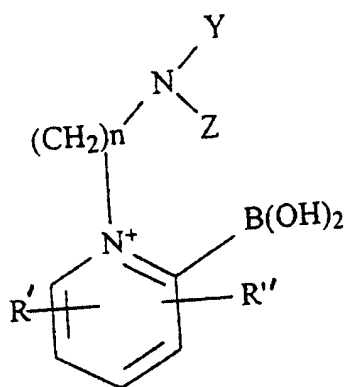
其中在右边结构中 n 为 0, 1, 或 2; 而在左边结构中 n 为 0 或 1;



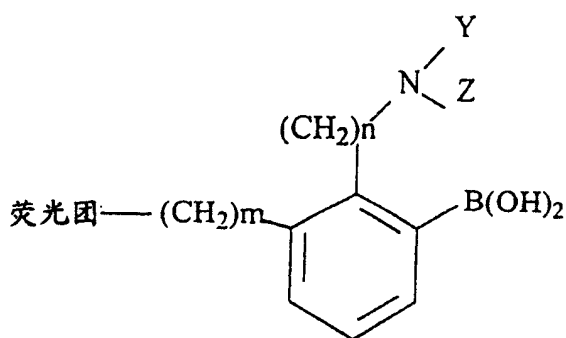
其中 n 为 1;



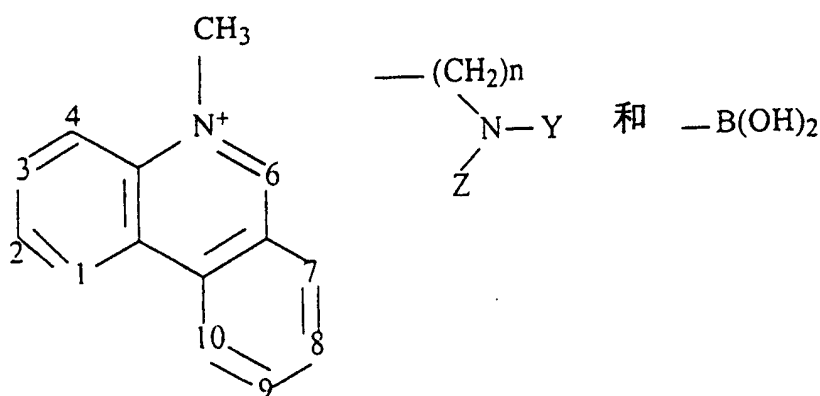
其中 n 为 0 或 1;



其中 n 为 2;



其中 m 为 0—5 且 n 为 1 或 2; 及

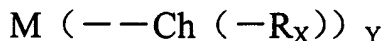


其中 n 为 0 或 1; 且该硼酸和胺基取代基是以呈配对形式配置于位置 1 和 10, 3 和 4, 6 和 7, 7 和 8, 或 9 和 10; 且对所有构造, 于可用时, R' 和 R'' 独立地各为稠合芳基; 脂族基; 伯, 仲或叔胺基; 酰胺; 羧基; 酮; 酯; 醇; 或醛; 且 Y 和 Z 独立地各为脂族基, 烷氧基或芳基; 及此等的衍生物。

12、根据权利要求 8 所述的荧光性镧系金属螯合复合物, 其中硼酸基、亚硼酸基或锗酸基是连接至芳香部分体上。

13、一种检测样品中未标示分析物的浓度的方法, 其包括下列诸步骤:

(a) 将样品暴露于一指示剂分子, 其包括具有下式的荧光性镧系金属螯合复合物:



其中:

M 为镧系金属离子; Ch 为包括一配体的螯合剂; R 为分析物一特定性辨识单元, 包括硼酸基、亚砷酸基或锗酸基或它们的混合物且 X 表结合到每一螯合剂的辨识单元 R 的数目; $X=0$ 至 4, 且 $Y=1$ 至 4; 且该辨识单元 R 的数目可相同或相异, 其限制条件为对于一个或多个螯合剂而言, $X>0$, 其中一个或多个螯合剂所含配体为包括下列任何一种或多种的有机配体: β -二酮或其氮类似物, 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷的四脂族羧酸盐或膦酸盐, 二羟基, 羧基配位杂环, 烯醇, 大双环穴状配体, 多胺基多羧酸, 苯膦酸, 含 1 至 10 个碳原子的烯基、氮杂环、硫或键联的羧基、氧化膦或碳环部分体, 且其中除了前述的基团单元外, 至少一种配体包含没有直接螯合至镧系金属离子的芳基, 该芳基与所述镧系金属离子隔离 5 个原子以下, 且其中一种或多种螯合剂是阴离子的且总共含有能够与镧系金属离子配位的八个点;

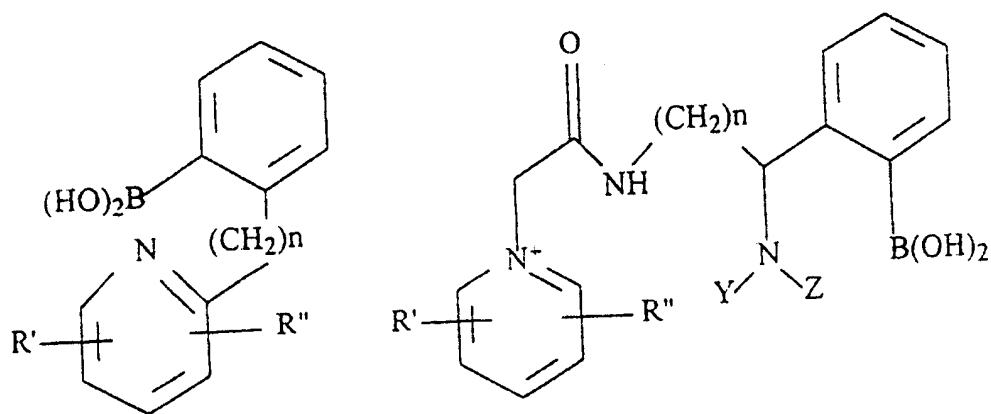
(b) 测量在该分析物通过该分析物特定性辨识单元结合到该复合物所含一个或多个螯合剂时, 该镧系金属螯合复合物所发散的荧光的任何变化, 由此检测该分析物的浓度。

14、根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述镧系金属螯合复合物所含 M 为铕离子或铽离子。

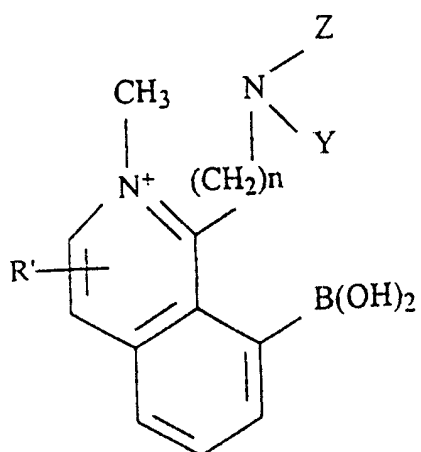
15、根据权利要求 13 或 14 所述的方法, 其中所述一个或多个螯合剂所含配体包括 β -二酮或 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷的四脂族羧酸盐或膦酸盐。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其中所述分析物为葡萄糖。

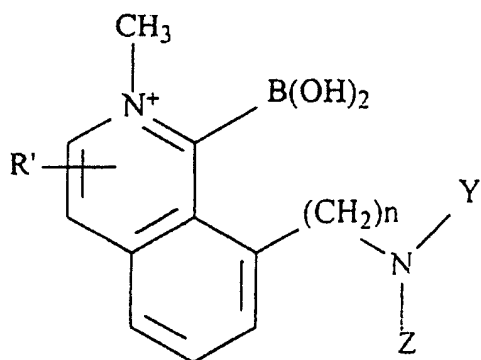
17、根据权利要求 13 所述的方法，其中所述辨识单元是选自下列物质：



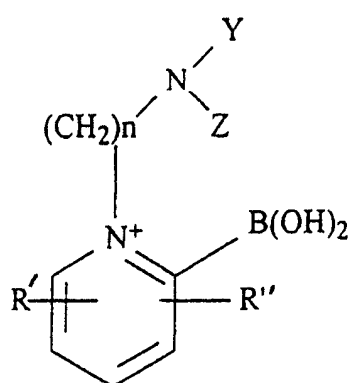
其中在右边结构中 n 为 0, 1, 或 2；而在左边结构中 n 为 0 或 1；



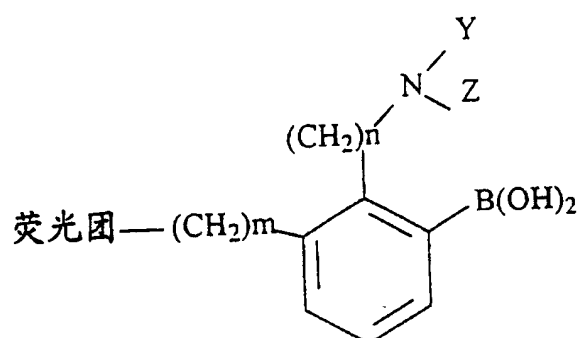
其中 n 为 1；



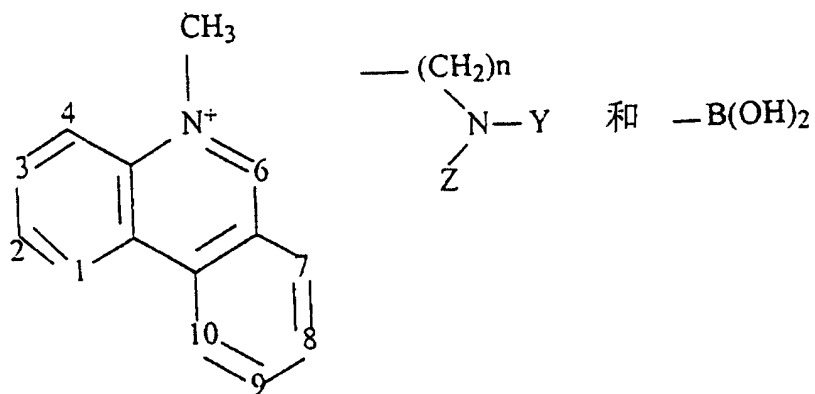
其中 n 为 0 或 1;



其中 n 为 2;



其中 m 为 0—5 且 n 为 1 或 2; 及



其中 n 为 0 或 1; 且该硼酸和胺基取代基是以呈配对形式配置于位

置 1 和 10, 3 和 4, 6 和 7, 7 和 8, 或 9 和 10; 且对所有构造, 于可用时, R'和 R''独立地各为稠合芳基; 脂族基; 伯, 仲或叔胺基; 酰胺; 羧基; 酮; 酯; 醇; 或醛; 且 Y 和 Z 独立地各为脂族基, 烷氧基或芳基; 及它们的衍生物。

18、根据权利要求 13 所述的方法, 其中硼酸基、亚砷酸基或锗酸基是连接至芳香部分体上。

通过荧光镧系金属螯合物检测分析物

相关申请案的对照

本申请案为 1998 年 3 月 11 日提出申请的申请案序号 09/037, 960 的部分后续申请。

有关联邦监督研究或发展的叙述不适宜。

发明背景

1、发明领域

本发明是有关可用为指示剂分子以检测介质例如液体中分析物的存在或浓度的荧光性化合物，及达到此等检测的方法。更具体地说，本发明是有关包含经取代配体的荧光镧系金属螯合复合物及此等作为指示剂分子以检测介质，包括液体介质例如生物液体中的分析物例如葡萄糖或其它顺式二醇化合物的存在或浓度的用途。

2、相关技艺的说明

某些稀土金属螯合物在用紫外光 and 不同形式的可见光（如，紫光或蓝光）予以照射时会发散出可见光，该发散是以经螯合的阳离子为其特性。某些镧系离子，例如铕（ Eu^{3+} ），钐（ Sm^{3+} ），铽（ Tb^{3+} ），及较佳为镝（ Dy^{3+} ），和钕（ Nd^{3+} ），展现出以该离子为特性的典型荧光，特别是在其螯合到适当的激发能量媒介有机配体之时。此等化合物的荧光性

质—长斯托克斯偏移 (Stokes shift), 窄谱带型发散谱线, 及异常的长荧光寿命—使它们成为荧光免疫检定和时间解析荧光测定技术的引人注目候选物。

此等荧光性镧系螯合物的主要发散谱线是由称为高敏性跃迁的跃迁所形成的且于 Eu^{3+} 是在 613—615nm, 于 Tb^{3+} 是在 545 (和 490) nm, 于 Sm^{3+} 是在 590 和 643nm, 而于 Dy^{3+} 是在 573nm。参看 Hemmila, *Application of Fluorescence in Immunoassays*, 140—42 (1991)。亦参看 *Spectroscopy in Inorganic Chemistry*, vol.2, 255—85 (Academic Press 1971)。辐射典型地是被螯合物以该有机配体的特性波长吸收起来及以该金属离子的特性线谱发散出来, 是因为在配体至中心金属离子有分子内能量转移之故。有机配体会吸收能量且从其单线基态, S_0 , 提升或激发到其第一单线激发态, S_1 , 的振动多线中的任一线, 于该处其快速失去其过多的振动能量。于此点会有两种可能性: $S_1 \rightarrow S_0$ 跃迁所致松弛现象 (配体荧光) 或系统间交叉到三线态之一, T_1 。参看 E.P. Diamandis et al., *Analytical Chemistry* 62: (22) 1149A (1990); 亦参看 *Spectroscopy in Inorganic Chemistry*, vol.2, 255—85 (Academic Press 1971)。

荧光铈螯合物是已知会展现出长斯托克斯偏移 ($\sim 290\text{nm}$) 而在激发光谱与发散光谱之间没有重叠且在 615nm 有非常窄 (10nm 谱宽) 发散光谱。此外, 该螯合物所具长荧光寿命 (可用微秒级次测量到而非传统荧光团的在毫微秒级次才可测得的寿命) 有助于滤掉噪音和具有低荧光寿命的其它干扰。长荧光寿命因而促成该螯合物对于微秒—时间解析性荧光测量, 其更可减少所测得的背景信号。使用铈螯合剂的其它优点

包括铕螯合物不会被氧所猝熄 (quenched)。

两种铕 (Eu) 螯合物, Eu-二苯甲酰基甲基化物和 Eu-苯甲酰基丙酮化物, 已使该等螯合物成为在激光中的用途的引人注目候选物。参看 H. Samuelson 等人, (J. Chem. Physics 39 (1): 110-12 (1963))。Samuelson 等人, 研究过上述两种铕螯合物于固体和于溶液中的荧光和吸光现象。Samuelson 等人比较过该等铕螯合物在各种条件下的荧光寿命与在其它化合物中的铕荧光寿命。基于此种比较, Samuelson 等人, 推测两组铕化合物之间的寿命变异是铕螯合物中配体-Eu 交互作用的结果。特别地, Samuelson 等人测定出来自 Eu-二苯甲酰基甲基化物的各发散谱线显示出 $480 \pm 50 \mu s$ 的荧光寿命, 其明显地大于在其它铕化合物中的荧光寿命。

Crosby 等人, J. Chem. Physics 34: 743 (1961) 先前已研究过分子内能量转移在稀土金属螯合物, 包括铕二苯甲酰基甲基化物和铕苯甲酰基丙酮化物螯合物, 的敏化离子发散中的角色。Whan 等人, J., Mol. Spectroscopy 8: 315-27 (1962) 报导过来自一组镧系金属离子 (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , 和 Sm^{3+}) 的螯合物的发散是由个别稀土金属离子的特性亮光谱线所支配。Whan 等人发现 Eu^{3+} 和 Tb^{3+} 的苯甲酰基丙酮化物和二苯甲酰基甲基化物两者皆为特别亮的发散体且此等螯合物的亮谱线发现及低磷光产率显示在此等螯合物内的配体至 Eu^{3+} 和 Tb^{3+} 离子的分子内能量转移可以有效率地发生。Whan 等人, 于 324 页。

N. Fillpescu 等人, J. Physical Chem. 68 (11): 3324 (1964) 报导铕和铽 β -二酮螯合物的荧光光谱于此等螯合物的有机配体部分中所

含取代基改变时会经调节。Filipescu 等人讨论过铈和铽螯合物荧光谱线的相对强度，光谱分布，偏移和分裂相对于取代基本质，其位置，分子组态，和整体分子内能量转移的关联性。Filipescu 等人也发现离子的特性整体荧光强度决定于两项因素：1) 在有机三谱线可取得的能量，及 2) 能量转移到离子的效率。

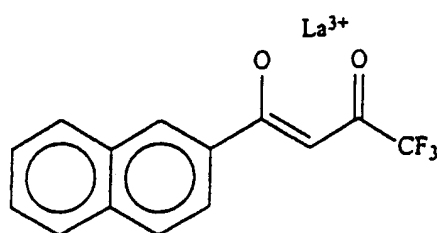
Filipescu 等人也发现上述两项因素会依不同取代基而变异。例如，用作为电子给予体的甲氧基在螯合物的间 (meta) 位取代铈二苯甲酰基甲基化物螯合物时，经发现可增强铈离子的荧光发散，而对位甲氧基取代则经发现会减低铈荧光。此外，对于二甲氧基取代二苯甲酰基甲基化物比对于一单甲氧基取代二苯甲酰基甲基化物有更显著的效应。相反地，对于经硝基取代的铈二苯甲酰基甲基化物则有相反的效应。经发现连接到对位或间位的电子吸取性硝基会减低铈的总离子发散。此外，该效应对对于二取代二苯甲酰基甲基化物比对一取代二苯甲酰基甲基化物更为显著。

Filipescu 等人还发现铈对一苯基二苯甲酰基甲基化物发散出的强离子荧光显示芳族系统的尺寸会增强转移到铈离子的能量。此事实由经蔡基取代二酮所得发散结果获得确定，其具有比二苯甲酰基甲基化物螯合物实质较高的离子发散。Filipescu 等人，3328-29。

E. Diamandis 等人，Analytical Chemistry 62 (22): 1149A (1990) 述及如何使用铈螯合物作为荧光免疫检定和 DNA 杂合检定中的标示物 (label)。有关荧光检定，这些作者述及铈螯合物可在各种检定组态，包括竞争性或非竞争性检定中用为免疫标示物。

美国专利第 4, 374, 120 号 (Soini 等人) 述及一种用荧光性镧系元素螯合物作为标记 (marker) 以检测物质的方法。美国专利第 4, 374, 120 号也述及使用 β -二酮类作为增强性配体以促进某些镧系元素螯合物, 尤其是铈和铽的螯合物的强荧光性质。

Wallac (Turku, Finland) 发展出一种镧系金属螯合物以取代辐射标签 (tags) 来进行免疫检定, 其具有下示构造:



Wallac 分子经发现在稀溶液中有非常有效的表现。参看, Hemmila, Applications of Fluorescence in Immunoassays, p. 149 (1991)。

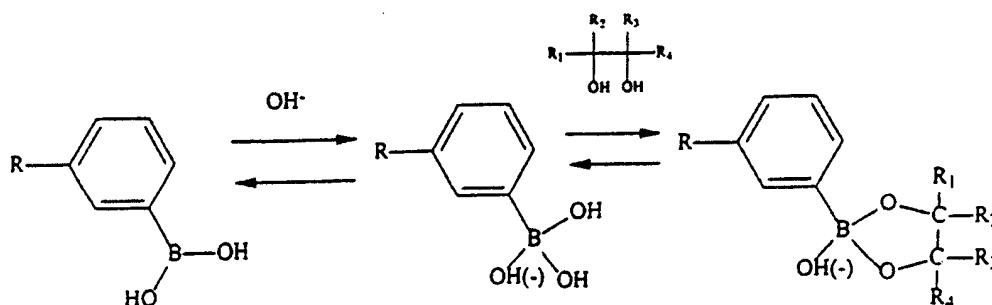
在水溶液, 例如生物流体中使用镧系金属螯合物需要某些条件。例如, 已知的是, 该等螯合物首先必须溶于水溶液中, 且其次必须避免被易于填补镧系离子空配位部位的水分子所猝熄。不过, 除了配体构造外已有各种加成物或路易斯碱, 例如膦类, 氧化膦, 或氮杂环, 被用来在镧系离子周围形成“隔离层” (insulating sheet), 经由阻止水分子穿透到复合物的内层而增强荧光。例如, 经发展出用来荧光测定水系统中的镧系元素的溶液 (如, 免疫检定) 即包括 β -二酮和氧化三辛基膦 (“TOPO”) 作为加成物形成性增效剂, 及一清洁剂 (如, Triton x100) 其形成胶团 (micelles) 且帮助溶解配位复合物。参看 Applications of Fluorescence in Immunoassays, p. 146—47。

镧系金属螯合复合物于先前尚未因为要利用独特且特异性辨识元素特征来对分析物进行活性检测的目的（例如用硼酸基检测葡萄糖和其它顺式二醇）而通过该螯合复合物中所含的一种或多种配体予以研讨或制成过。如上文讨论，镧系金属螯合物主要是为了用作激光染料，放射性同位素的替代标示物，及为了连接于抗体上作为免疫检定中的标示物而研究过。镧系金属螯合物也被用于检测四环素的定性分析程序中。

葡萄糖为活生物体不可缺少的有机化合物且于此等生物体的信息传递，能量新陈代谢和构造形成中有重要的作用。例如，葡萄糖，且更具体地说，D-葡萄糖对于构成各种器官的各种细胞而言为重要的能源。葡萄糖是以肝糖形式贮存于肝中，其在需要消耗能量时即释出到体液中。葡萄糖的产生和消费在正常或健康人的体液中有良好的平衡，保持体液中固定的葡萄糖浓度。因此，检测血液或尿液中有次水平或超水平的葡萄糖可提供有用的信息以诊断疾病例如糖尿病和肾功能不足。

使用酵素的葡萄糖感测器（例如，由 Yellow Springs Instruments (YSI), Ohio 制造）为最为熟知的检测葡萄糖所用实用手段。此种技术包括用酵素（葡萄糖氧化酶）分解葡萄糖及用恰当工具（例如电极）测量该分解所产生的过氧化氢量。虽则此种方法是颇为确定的，但源自活体的酵素，其品质会随时间而不可逆地变化且不能回收再使用。此外，因为葡萄糖在检测反应中被实际消耗掉，所以葡萄糖感测器测量低水平葡萄糖的固有能力受到限制。

含硼酸化合物结合葡萄糖是熟知的。其机制据信是经由葡萄糖上面的相邻羟基结合到硼酸部分体上的羟基而发生的，如下面所绘出：



糖类，包括葡萄糖，与苯基硼酸的复合是已知有一段长时间者且该交互作用的可逆性已被用为糖类层析分离的基础。特别地，于 1959 年，Lorand 和 Edwards 报导出苯硼酸与许多种饱和多元醇在水中缔合的缔合常数；其结合交互作用从非常弱（如，乙二醇为 $K_d=360\text{mM}$ ）至中等强（如，葡萄糖， $K_d=9.1\text{mM}$ ），参看，J. Yoon 等人，*Bioorganic and Medicinal Chemistry* 1 (4): 267–71 (1993)。

美国专利第 5, 503, 770 号 (James 等人) 述及一种荧光性含硼酸化合物，其在结合到糖类，包括葡萄糖时会发散出高强度的荧光。该荧光性化合物的分子构造包括一荧光团，至少一个苯基硼酸部分体及至少一个提供胺基的氮原子，其中该氮原子是配置在该苯基硼酸部分体的附近以使其与该硼酸发生分子内交互作用。此等交互作用由此促使该化合物在结合糖类时发散出荧光。美国专利第 5, 503, 770 号述及该化合物适合用来检测糖类。亦参看 T. James 等人，*J. Am. Chem. Soc.* 117 (35): 8982–87 (1995)。

此外，使用含硼酸化合物的荧光感测器来检测血糖亦为现有技术中已知的。例如，J. Yoon 等人，*J. Am. Chem. Soc.* 114: 5874–5875 (1992) 述及硼酸可用为荧光性化学感测剂以发放糖类结合信号，包括对葡萄糖和果糖的结合。

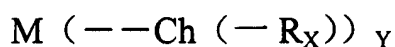
特开平 9-169772 中公开了一种用于制备可以控制荧光的波长和强度的荧光体的化合物，其是一种杯芳烃衍生物，其具有镧系金属和配位体形成的杯芳烃结构，和形成多元醇的羟基和配位体的硼酸部位，发生的荧光强度是通过添加多元醇而控制的。

本发明的一项目的为检测介质例如液体或气体中分析物的存在或浓度，其包括测量镧系金属螯合混合物在该分析物通过分析物特定性辨识单元而结合到该螯合复合物所含一个或多个螯合剂时所发散出的荧光的任何变化。

本发明的另一目的为提出一种分析物，即含特定性辨识单元的镧系金属螯合复合物作为指示剂分子以检测介质例如液体中所含分析物例如葡萄糖或其它顺式二醇化合物的存在或浓度。

发明概述

本发明是有关一种用以检测分析物存在或浓度的指示剂分子，其包括具有下式的荧光性镧系金属螯合复合物：



其中：

M 表镧系金属离子，Ch 表螯合剂其包括一配体，优选一有机配体，其可包括下列的任何一种或多种： β -二酮或其氮类似物，二羟基，含羧基杂环，烯醇，大二环穴状配体（亦即，笼状配体），苯硼酸，或多胺基-多元羧酸。Ch 的有机配体也可包括下列任何一种或多种：含氮杂环，硫，和键联的羧基。Ch 的有机配体更可包括下列任何一种或

多种：烷基或烯基，优选含有 1 至 10 个碳原子，以及芳族，碳环族或杂环族部分部分体，包括苄基，萘基，蒽基，菲基，或四环基。再者，一种或多种与 M 复合的螯合剂可为相同或不同螯合剂的混合物（所谓的“混合配体或三元螯合物”）。

R 代表分析物特定性辨识单元，其的一个或多个可结合到螯合复合物的一个或多个配体，但不需要键联到螯合复合物的每一配体。于本发明一较佳实施例中，R 可为硼酸基或含硼酸基的化合物以检测葡萄糖或其它顺式二醇化合物。

X 表分别接到一个或多个螯合剂的辨识单元 R 的数目。X 可为 0 至 8 的整数，且于本发明某些较佳实施例中， $X=0$ 至 4 或 $X=0$ 至 2。此外，分别接到一个或多个螯合剂的辨识单元 R 的数目可相同或不同，其限制条件为对于一个或多个螯合剂而言， $X>0$ 。Y 表与 M 复合的螯合剂数目，且可为 1 至 4 的整数。于本发明某些较佳实施例中， $Y=1$ ， $Y=3$ 或 $Y=4$ 。

本发明也有关如上文所定义的荧光性镧系金属螯合复合物。

本发明更有关利用上述指示剂分子和荧光性镧系金属螯合复合物检测分析物的存在或浓度的方法。该方法包括下述诸步骤：将样品暴露于包括具有上文所定义式子的荧光性镧系金属螯合复合物的指示剂分子，测量该镧系金属螯合复合物所发散的荧光的任何变化，及由此检测出分析物的存在或浓度。

于本发明中，分析物的存在或浓度是经由测量该镧系金属螯合复合物于该分析物通过一个或多个分析物—特定性辨识单元结合到该螯合

复合物所含一个或多个螯合剂时所发散出来的荧光的任何变化而检测的。具体地说，分析物，例如葡萄糖或其它顺式二醇化合物的存在或浓度是经由观察及/或测量分析物结合到螯合物所含分析物一特定性辨识单元（其用于检测葡萄糖或其它顺式二醇化合物时为含硼酸根辨识单元）时由该荧光性金属离子发散出的荧光所具强度或寿命的变化（亦即，该荧光经减弱，增强或其波长有偏移）而测定的。

本发明的优点在于能够利用以具有充分长度的荧光寿命（可在微秒而非毫微秒内测得）以及具有长斯托克斯偏移的荧光性指示剂分子以分析物特定性方式检测介质例如液体或气体中的分析物，例如葡萄糖或其它顺式二醇化合物，由是可减低任何背景噪音的影响以及可能减低分析物检测敏感度的其它干扰，且不会被浓缩消光（concentration quenched）。

附图的简略说明

本发明指示剂分子的较佳实施例要参照附图予以说明，其中：

图 1 显示出本发明含硼酸铕螯合物（为清晰起见，只显示出一配体）。

图 2 也显示出本发明含硼酸铕螯合物。

图 3 显示出在含有氧化三辛基磷（“TOPO”）的水溶液中的含多个含硼酸配体的铕螯合复合物。

图 4 显示出在含有本发明含硼酸铕螯合物的乙醇溶液中添加儿茶酚的影响。

图 5 显示出于含铕 β -萘甲酰基三氟丙酮化物（Eu-bNTA）的乙醇溶液中添加儿茶酚的影响。

图 6-8 显示出用葡萄糖在甲醇中滴定 Eu-NTA-硼酸酯的结果。

图 9 显示出用葡萄糖和果糖在甲醇中滴定铈二苯甲酰基甲烷 (Eu (DBM)) 和 Eu (硼酸化 DBM) 的比较。

图 10 显示出用葡萄糖在甲醇中滴定 Eu-NTA 硼酸酯的结果。

图 11 显示出用葡萄糖和果糖在甲醇中滴定 Eu-DBM 硼酸酯的结果。

图 12 显示出用葡萄糖和果糖在甲醇中滴定铈(噻吩甲酰基(Theonyl)-4-苯甲酰基甲烷硼酸)的结果。

图 13 显示出用葡萄糖和果糖在甲醇中滴定 Eu (苯甲酰基-三氟甲基丙酮硼酸) 的结果。

发明的详细说明

如上文所述,于本发明中是经由观察及/或测量在通过荧光性指示剂分子中所含一个或多个分析物-特定性辨识单元结合到分析物后该指示剂分子所发散的荧光所具强度或寿命的变化来测定分析物的存在或浓度。该荧光指示剂分子包括具有下式的镧系金属螯合复合物:

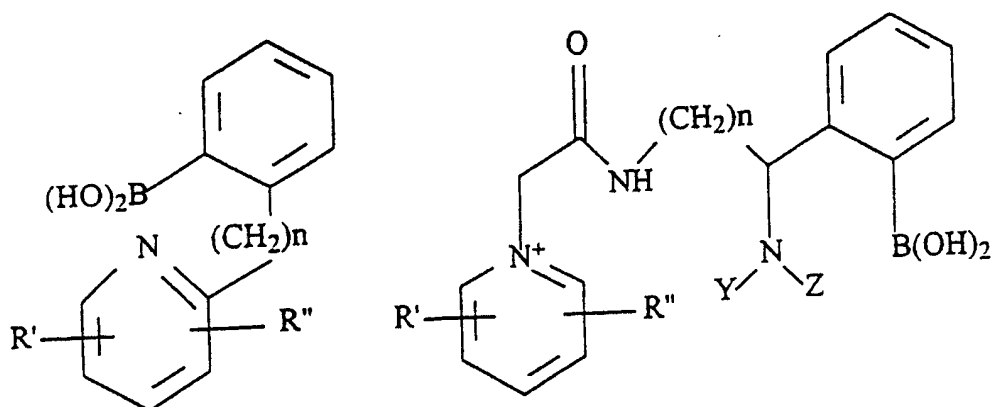


其中:

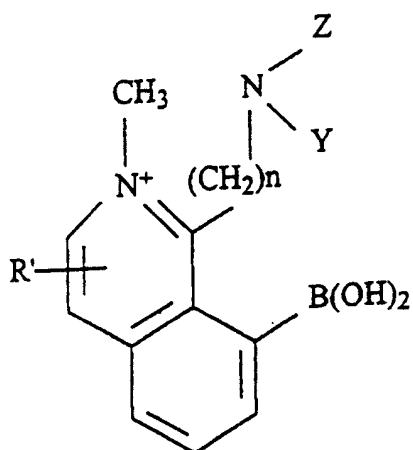
M 表镧系金属离子, Ch 表螯合剂其包括一配体, 优选一有机配体其可包括下列任何一种或多种: β -二酮或其氮类似物, 二羟基, 含羧基杂环, 烯醇, 大二环穴状配体 (cryptand) (亦即笼状配体), 苯硼酸, Cyclen (1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷的四脂族羧酸盐或膦酸盐) 或

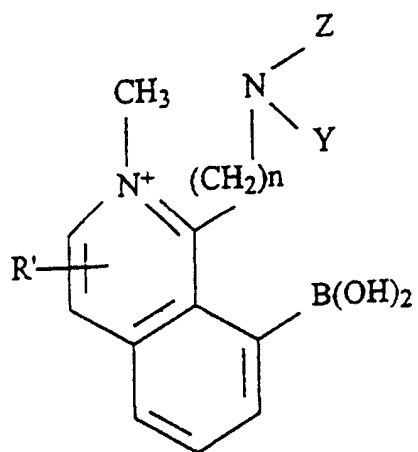
多胺基—多元羧酸。Ch 的有机配体也可包括下列任何一种或多种：含氮杂环，硫，和键联的羧基。

R 表分析物特定性辨识单元，其的一个或多个可结合到螯合复合物的一个或多个配体，但不需要键联到螯合复合物的每一配体。于本发明一较佳实施例中，R 可为用以检测葡萄糖或其它顺式二醇或顺式二醇作用性化合物的基团。此等基团包括硼酸基，亚砷酸基和锆酸基，及含有此等基团的化合物。代表性的含硼酸化合物包括具有下列通式的那些（于每一构造中，R' 和 R'' 各独立地为稠合芳基，脂族基，伯，仲或叔胺；酰胺；羧基；酮；酯；醇；或醛；且 Y 和 Z 各独立地为脂族基，烷氧基或芳基）：

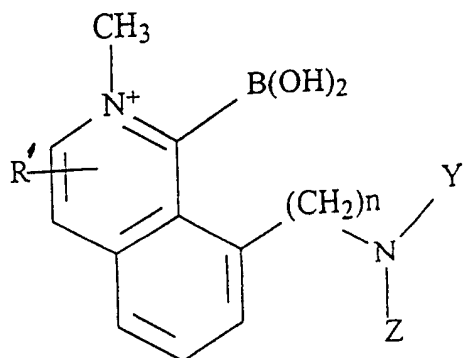


其中在右边结构中 n 为 0, 1 或 2；在左边结构中 n 为 0 或 1；

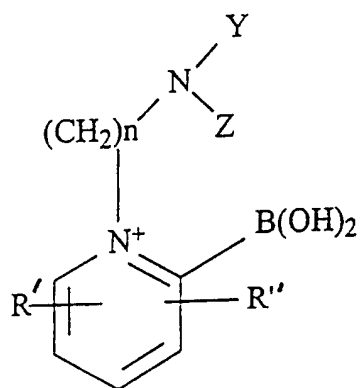




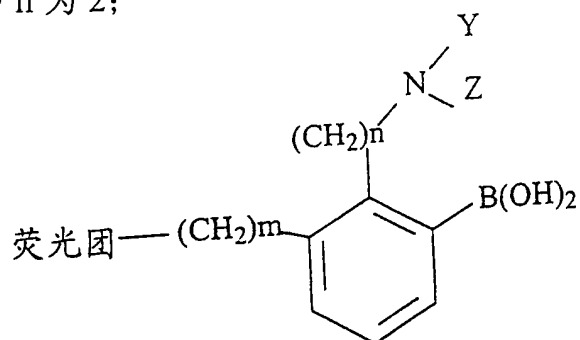
其中 n 为 1;



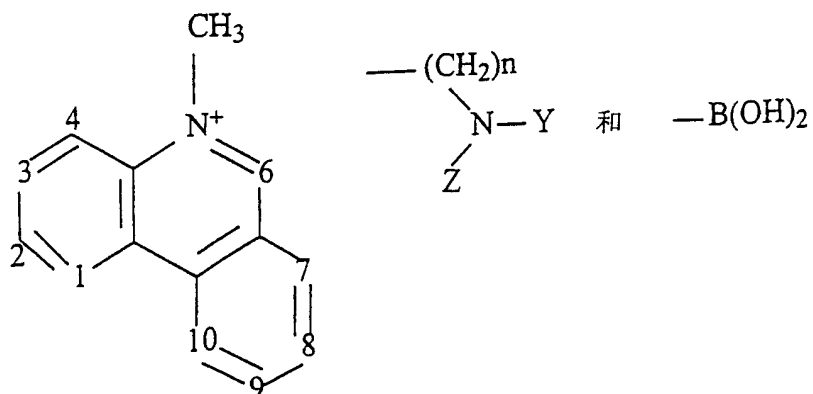
其中 n 为 0 或 1;



其中 n 为 2;

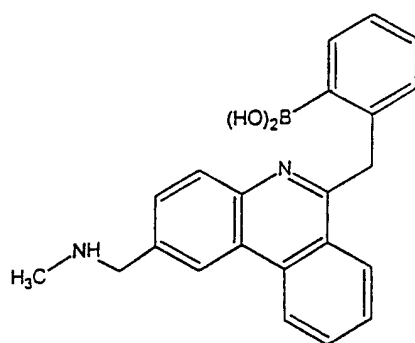


其中 m 为 0—5 且 n 为 1 或 2; 及

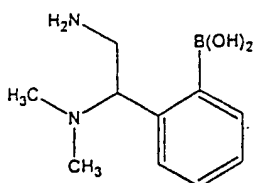


其中 n 为 0 或 1, 且硼酸和胺两取代基是以配对方式配置在位置 1 和 10, 3 和 4, 6 和 7, 7 和 8 或 9 和 10。

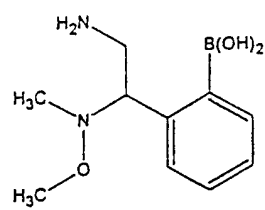
某些特殊的含硼酸根化合物包括:



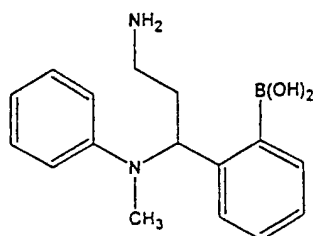
Target A



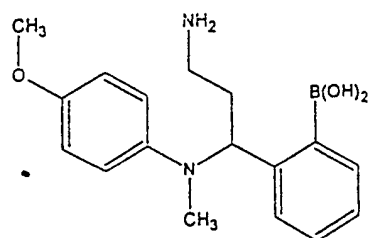
Target B



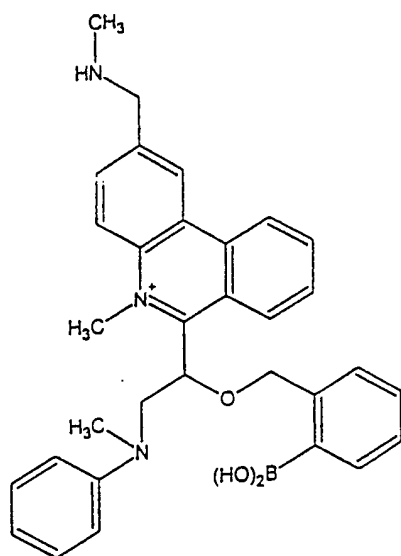
Target B-MeO



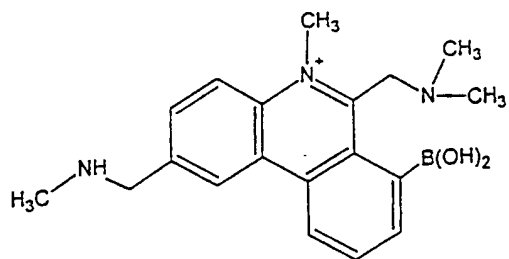
Target C



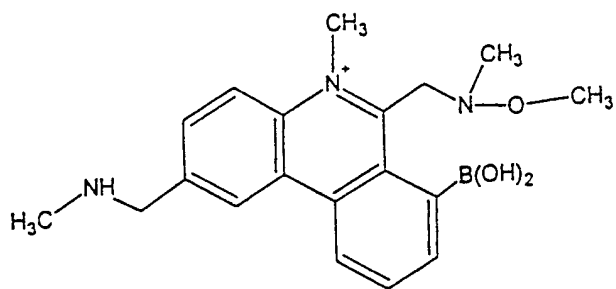
Target C-MeO



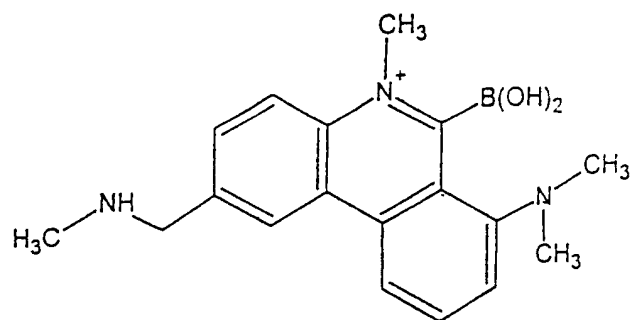
Target D



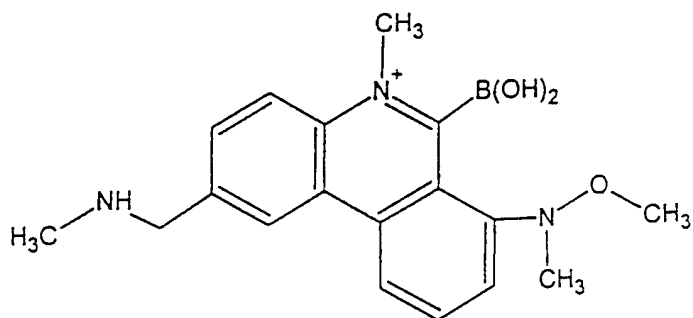
Target E



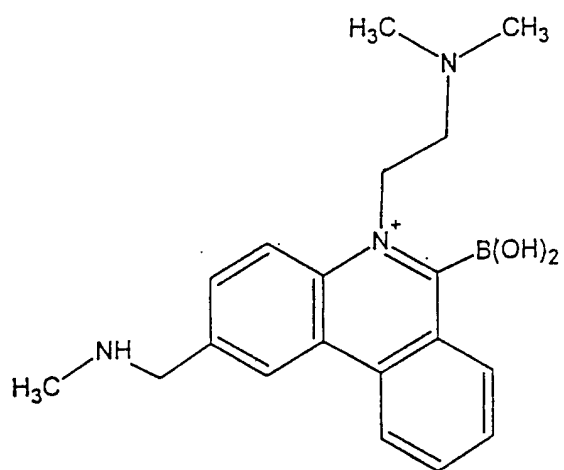
Target E-MeO



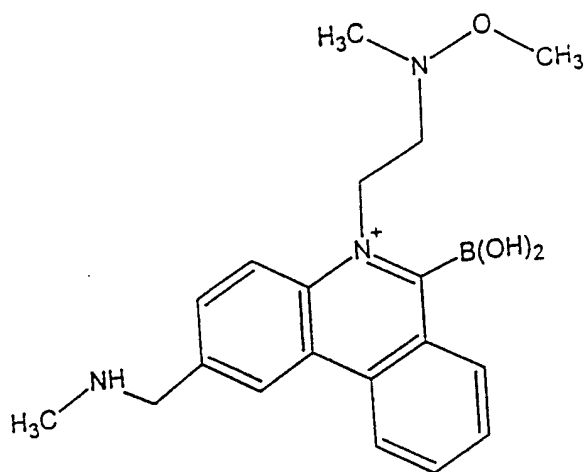
Target EE



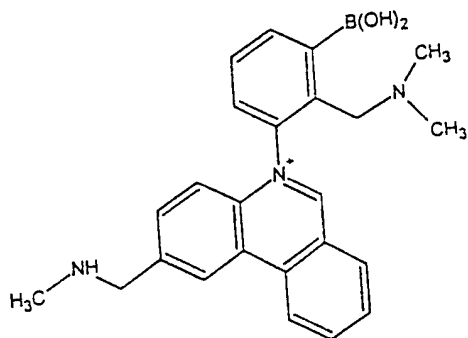
Target EE-MeO



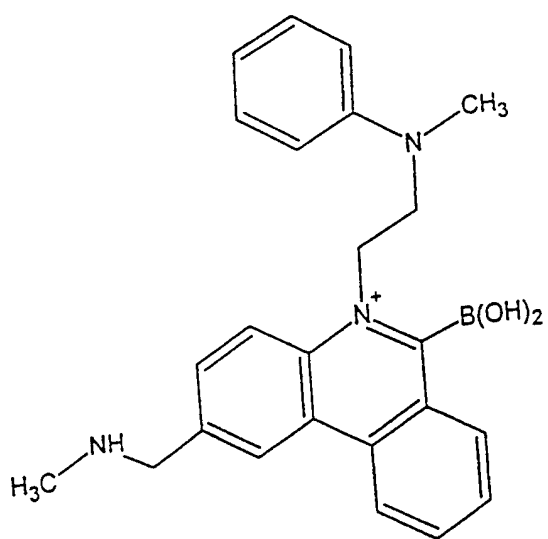
Target F



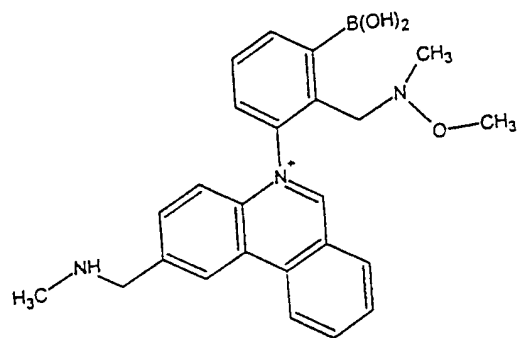
Target F-MeO



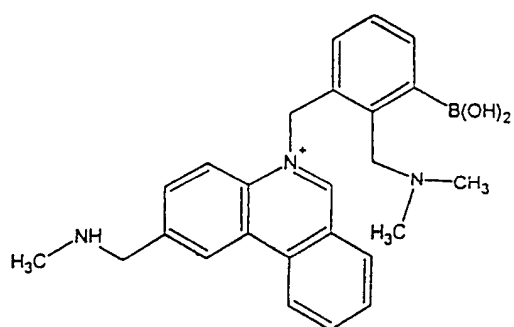
Target G



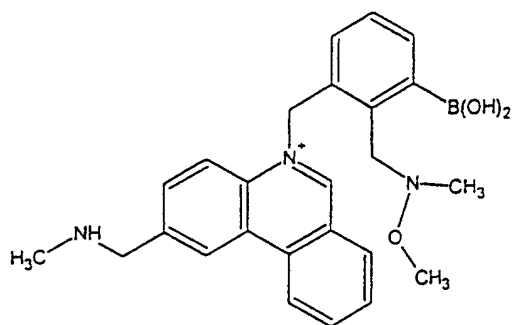
Target F-Phe



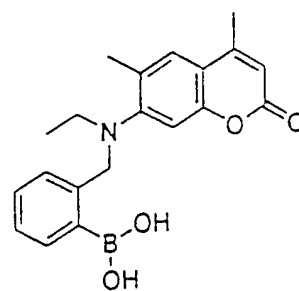
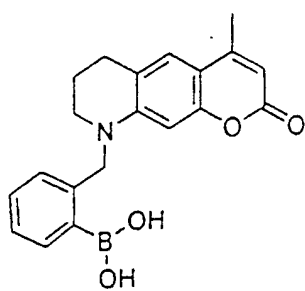
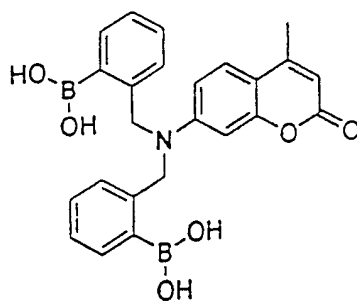
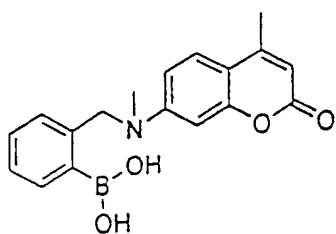
Target G-MeO



Target H



Target H-MeO



除了葡萄糖以外的顺式二醇分析物化合物的例子包括其它糖例如果糖及甘油。儿茶酚（邻一二羟基苯）和儿茶酚胺，包括激素例如多巴胺，肾上腺素和正肾上腺素，其含有相邻（邻位）羟基而就此等与硼酸酯辨识单元的反应性拟似顺式二醇。

镧系金属离子 M 可为铕 (Eu^{3+})，钐 (Sm^{3+})，铽 (Tb^{3+})，镝 (Dy^{3+}) 或钕 (Nd^{3+})，优选为铕 (Eu^{3+}) 或铽 (Tb^{3+}) 离子。

螯合剂 Ch 所含配体也可可为有机配体，包括下列中任何一种或多种：烷基或烯基，优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基或烯基，以及芳族，碳环族或杂环族部分体，包括苄基，萘基，蒽基，菲基，或四环基。该配体也可以包括下列基： $-\text{CF}_3$ 和 $-\text{C}_2\text{F}_5$ ，只要该配体更包括于需要时可以让分析物—特定性辨识单元结合的部分体即可。此外，螯合复合物的任何配体可为无机配体以代替有机配体。

X 表分别接到一个或多个螯合剂的辨识单元 R 的数目。X 可为 0 至 8 的整数，且于本发明某些较佳实施例中， $X=0$ 至 4 或 $X=0$ 至 2。此外，分别接到一个或多个螯合剂的辨识单元 R 的数目可相同或不同，其限制条件为对于一个或多个螯合剂而言， $X>0$ 。Y 表与 M 复合的螯合剂数目，且可为 1 至 4 的整数。于本发明某些较佳实施例中， $Y=1$ ， $Y=3$ 或 $Y=4$ 。

于本发明某些实施例中，该镧系金属螯合复合物可包括不同螯合剂的混合物，其中一个或多个该螯合剂不含分析物—特定性元件 R。使用此等亦称为三元配体螯合剂的混合配体螯合剂的优点，包括某些有机配体，例如多胺基多羧酸，比其它配体例如 β -二酮，更可溶于水中。所

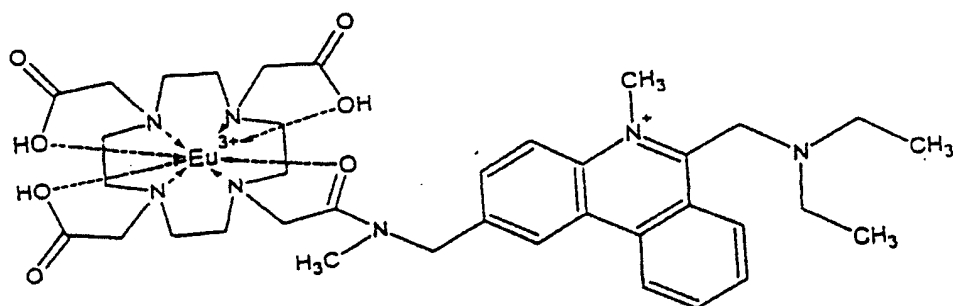
以, 于至少一本发明实施例中, 镧系金属螯合复合物可包括, 第一, 一个或多个含有一个或多个分析物—特定性辨识单元的 β -二酮, 与第二, 一种或多种其它配体例如多胺基—多羧酸, 其可促进螯合复合物的水溶性。

于本发明其它实施例中, 螯合复合物所含一个或多个螯合剂可更包括—NH₂或—OH基, 或任何其它取代基可使螯合复合物共价连接于链联物(Linker)或聚合物例如聚赖氨酸, 或其它固体载体。

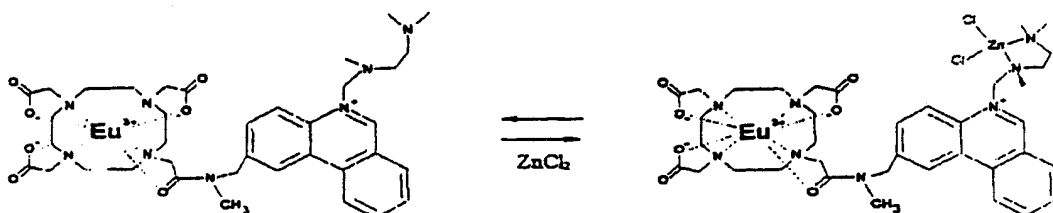
为了达到从复合物所含吸光部分到镧系金属离子的能量转移, 该吸光部分的三重线态能量优选要高于约 230 千焦耳/摩尔。较佳的吸光部分包括菲啉(258 千焦耳/摩尔), 补骨脂内脂(psoralen)(262 千焦耳/摩尔), 吩噻嗪(261 千焦耳/摩尔), 菲(258 千焦耳/摩尔), 三亚苯(280 千焦耳/摩尔), 二苯甲酮(287 千焦耳/摩尔), 卟啉(293 千焦耳/摩尔)和香豆素(258 千焦耳/摩尔)。

本发明镧系金属螯合复合物的荧光会经由将分析物通过一个或多个辨识单元 R 结合到螯合复合物所含一个或多个螯合剂而以分析物—特定性方式受到调制。

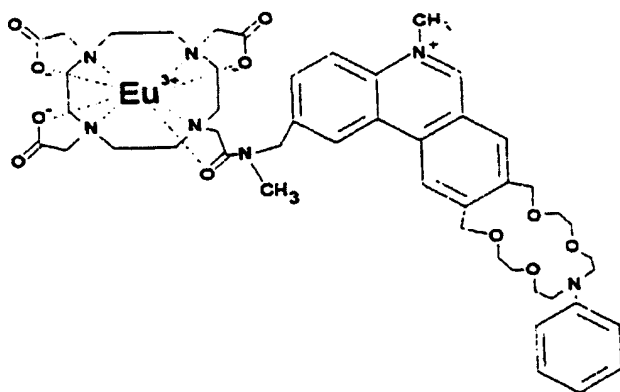
本发明荧光性指示剂分子可用来检测与此等具反应性的多种不同的可能化学分析物, 因而可经由分析物—特定性辨识单元 R 以特定方式予以检测。可用本发明检测的较佳分析物为下列分析物: 葡萄糖, 果糖和其它顺式二醇化合物。不过, 依辨识单元的选择, 本发明指示剂分子也可用来检测许多种其它的分析物。下示分子具有一辨识单元使其可用为 pH 指示剂: (参见 Lippitsch 等人, *Sensore and Actutors B* 38-39(1997) 96-102):



此外，下面所示为含有可用来结合锌分析物的辨识单元的许多可能化合物中的之一（参看，例如，Huston 等人，JACS 1988，110，4460）：



如所示的锌结合可增加该指示剂分子，及类似此含有一类似辨识单元的其它的荧光。此外，下面所示为含有可用来检测钾分析物的辨识单元的许多可能化合物中的之一（参看，例如，Sousa 等人，ACS Symposium Series 538，1992，pp. 10-24）：



于该化合物中，钾离子是经配位于冠醚部分体内，促成立体组态变化使得该分子的苯胺部分折回到菲啉部分上，导致荧光的消光。

使用本发明指示剂分子可检测的化学分析物可呈各种不同的固体，气体和液体形式存在著。此外，可在多种介质，包括液体和气体介质中使用本发明指示剂分子来检测分析物。

对于本发明荧光性化合物可存在许多可能的用途，包括作为指示剂分子用于能量，医学和农业诸领域中。例如，该荧光化合物可用为指示剂分子以检测在血液或尿液中的次水平或超水平葡萄糖，因而提供有用的资讯供诊断如糖尿病和肾功能不足等疾病所用。用于人类治疗应用的医/药葡萄糖生产需要加以监测和控制。本发明在农业中的可能用途包括检测分析物例如葡萄糖在大豆和其它农产品中的水平。对于如酿酒葡萄等高价值产品的关键收获决定中必须仔细地监测葡萄糖。由于葡萄糖为发酵程序中最贵的碳源和进料，因此用于最佳反应器进料速率控制的葡萄糖监测在动力醇生产中具有重要性。反应器混合和葡萄糖浓度控制也对无酒精饮料和发酵饮料的生产中的品质控制具关键性，因该生产在国际上都是消耗掉最大量的葡萄糖和可发酵（顺式二醇）糖之故。

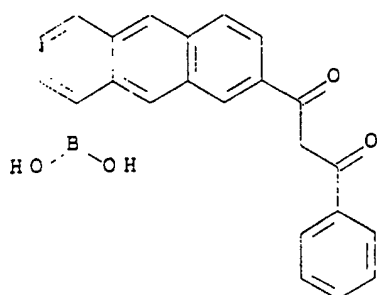
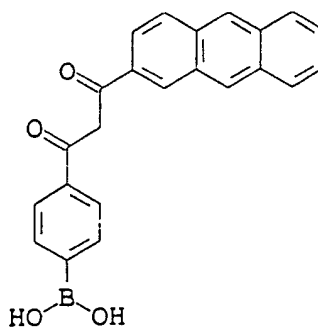
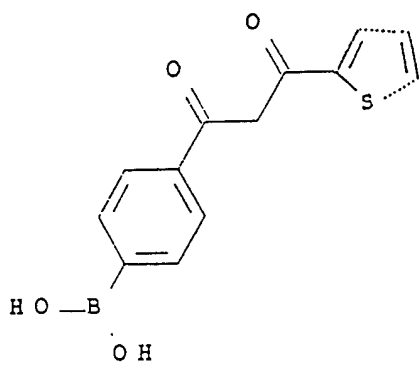
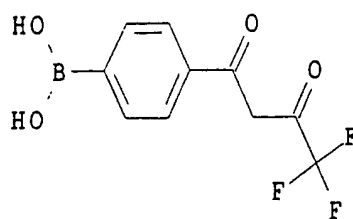
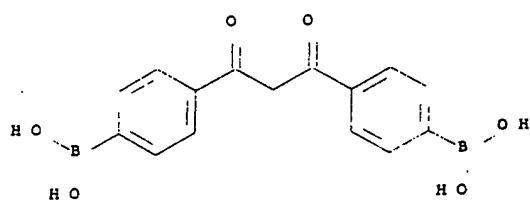
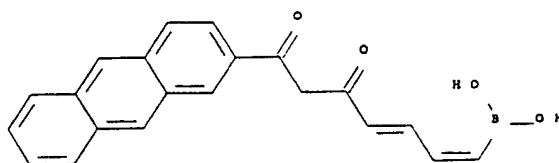
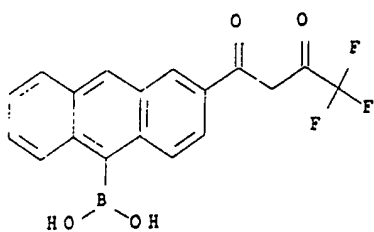
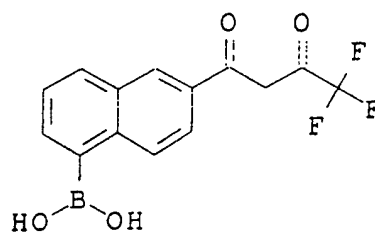
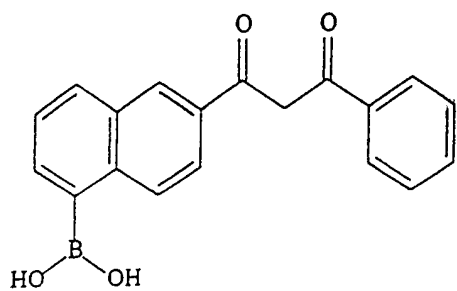
技艺中也有多种已知的检测技术可利用本发明荧光化合物。例如，本发明荧光化合物可用于荧光感测装置中（如，美国专利第 5, 517, 313 号）或可结合到聚合物材料例如试纸上供肉眼检查所用。该后述技术可促成，例如，以类似于用石蕊试纸条测定 pH 的方式进行葡萄糖测量。本文所述及的荧光分子也可以用于单纯的试剂供标准台面分析仪器所用例如分光荧光计或临床分析仪如 Shimadzu, Hitachi, Jasco, Beckman 和其它制造者所制造的那些。此等分子也可以提供分析物特定性化学/光学信号传导供以光纤为基的感测器和分析荧光计所用，例如 Ocean

Optics (佛罗里达州克利尔沃特), 或 Oriel Optics 所制造的那些。

于本发明一较佳实施例中, 有多种可能的螯合剂, 其一种或多种可与镧系金属离子复合, 且其可包括接有一个或多个作为分析物一特定性辨识基 R 的硼酸基的有机配体, 其例子为下文所示的那些。

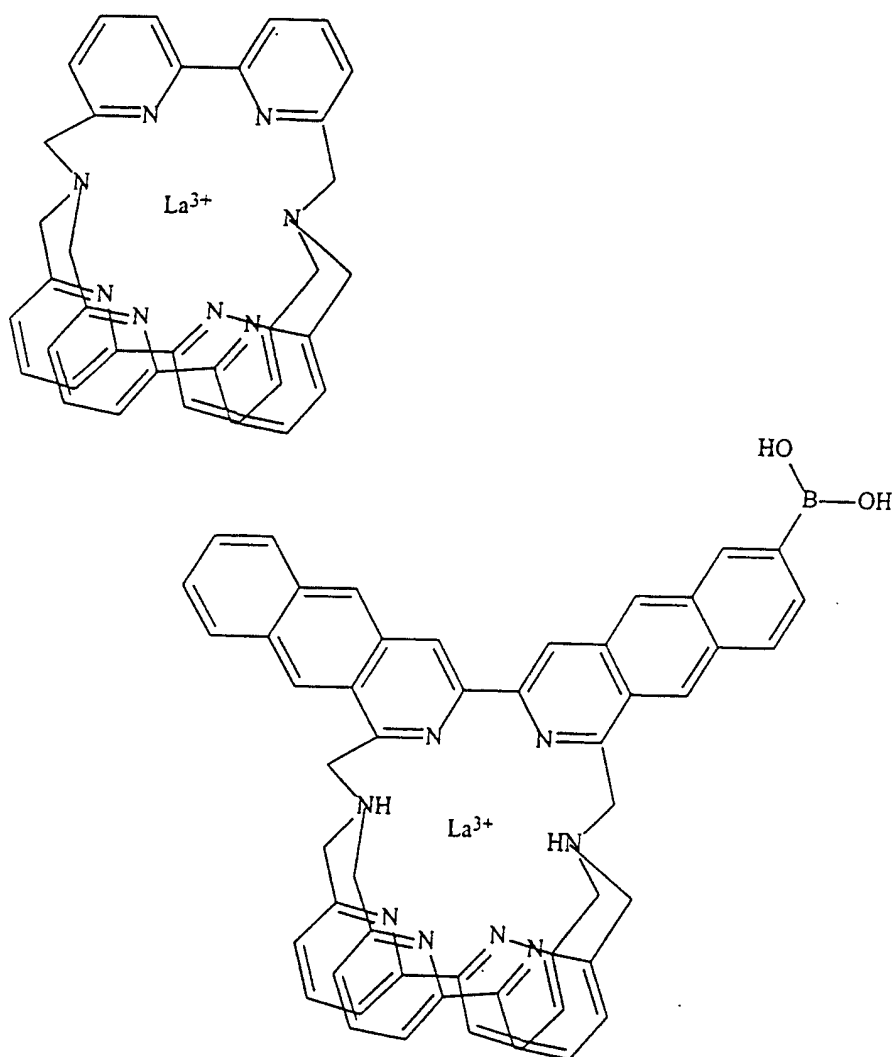
A. β - 二酮类

本发明镧系金属螯合复合物的螯合剂 Ch 可为以 β - 二酮为基的配体, 其例子有下面所述的那些。

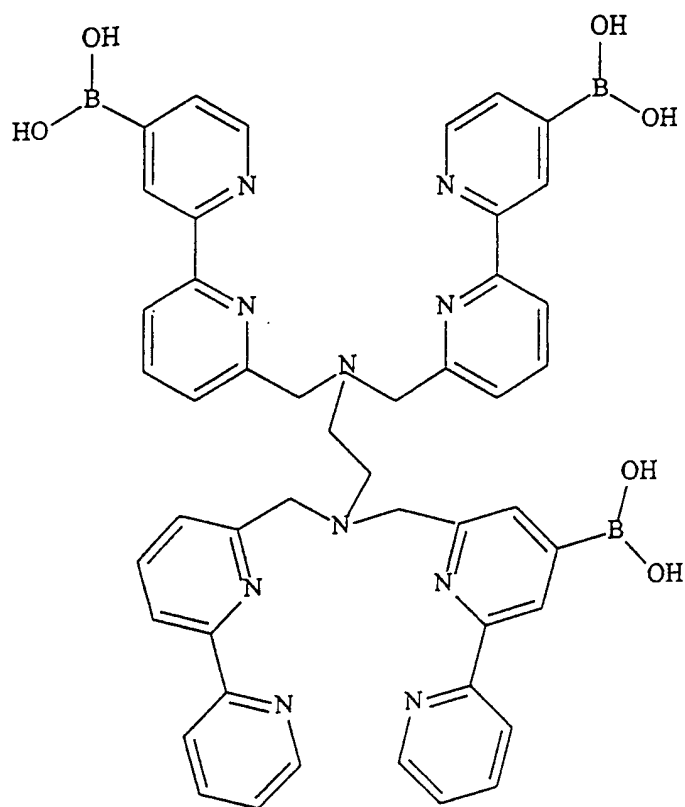


B.巨双环穴状配体（笼型配体）

于本发明其它实施例中的螯合剂 Ch 可为巨双环隐藏配体（或笼型配体），其一例子为具有下面所示形式者：

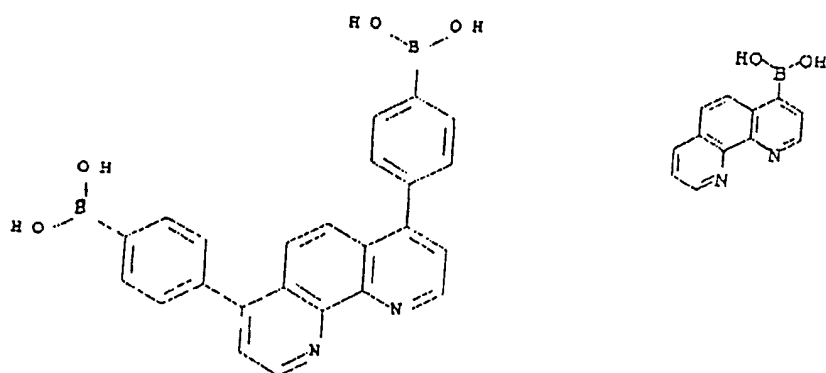


于本发明另一实施例中的螯合剂 Ch 可为具有下示构造的大双环穴状配体。

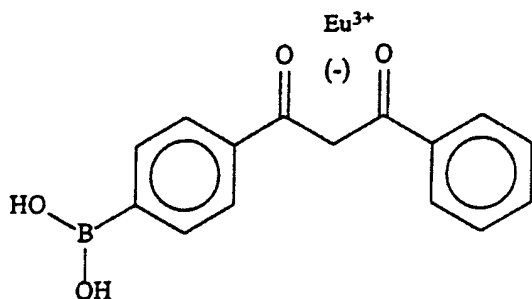


C. 氮杂环和羧酸根配位配体

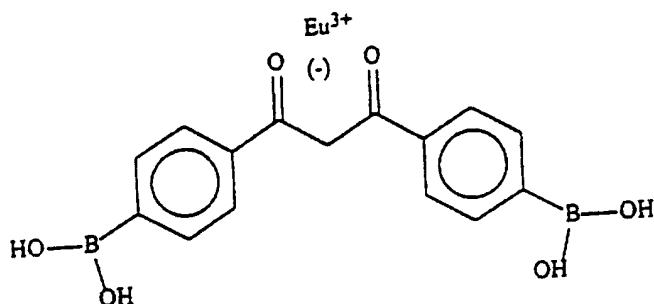
本发明镧系金属螯合复合物所含螯合剂 Ch 的实例也包括下列氮杂环和羧酸根配位配体。



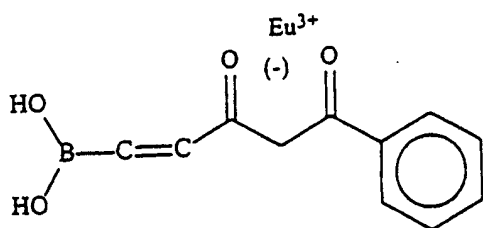
某些本发明最佳荧光性，含硼酸根辨识单元的镧系金属螯合剂包括下列镧螯合剂（为清晰起见，只示出具有—配体者），其具有下列构造：



（镧一对一硼酸化二苯甲酰基甲烷（II））

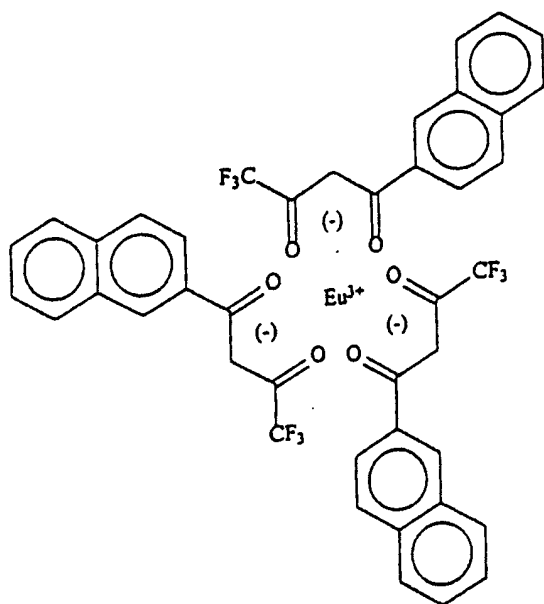


（镧二一对一硼酸化二苯甲酰基甲烷（III））



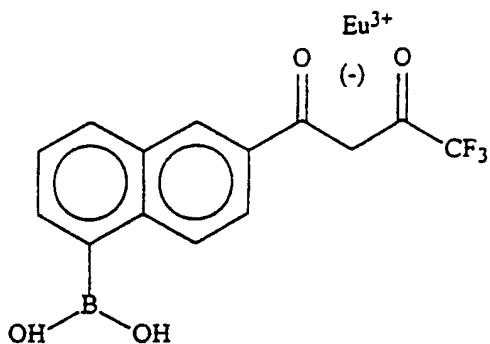
（镧苯甲酰基伸乙基甲烷—2—硼酸（IV））

于本发明一较佳实施例中，是在荧光性镧（四） β -萘甲酰基三氟乙酸（Eu-bNTA）螯合剂上连接对葡萄糖或其它顺式二醇化合物具有分析物—特定性的含硼酸辨识单元。该螯合剂的有机配体部分是已知可在镧系金属离子（如，镧）周围形成壳，如下所示：



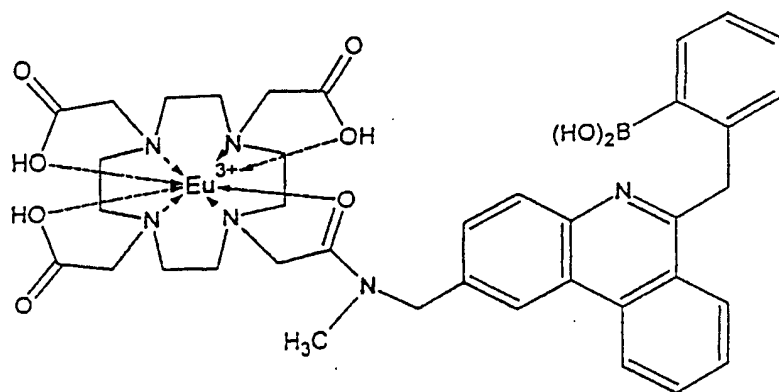
此外，也已知的是，不同的溶剂可影响镧系金属离子的荧光衰减时间（如，水可消减铕离子的荧光）。因此也研究用分析物一特定性辨识单元（如含硼酸辨识单元）改质外壳所含有机配体是否可微扰铕离子所具衰减时间到任何可察觉程度，因此乃合成且试验下面的铕螯合物，铕

（四）萘甲酰基三氟甲烷（Eu—bNTA）硼酸。

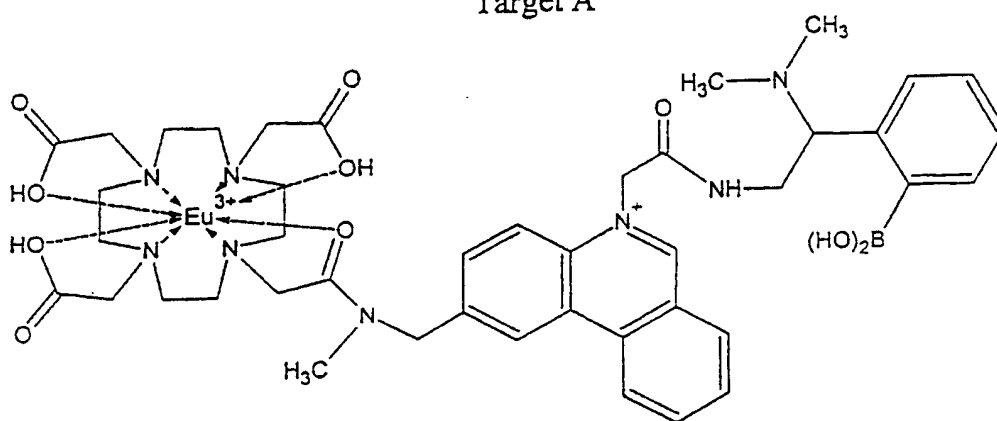


Eu—bNTA 硼酸经发现具有约 340nm 的激发波长和约 613nm，与其它铕螯合物具有相同的发散波长。

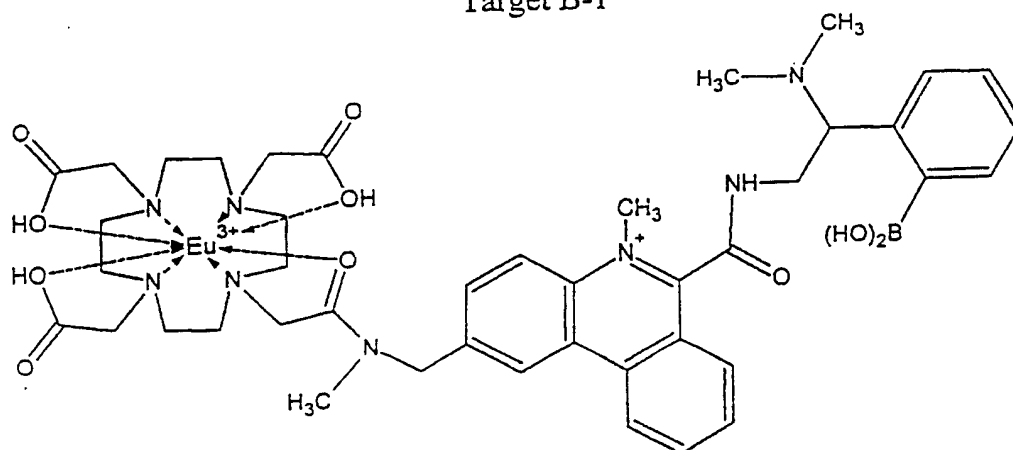
用以检测顺式二醇包括葡萄糖的其它较佳化合物包括下面所列者：



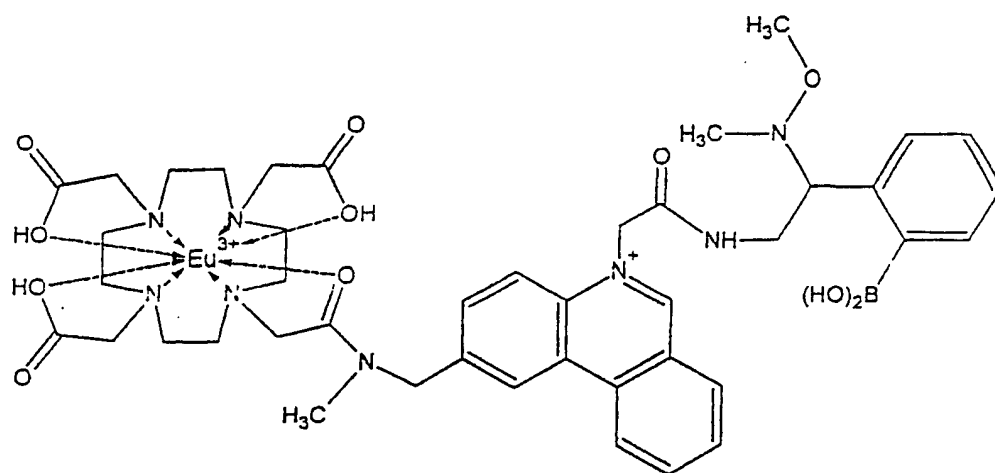
Target A



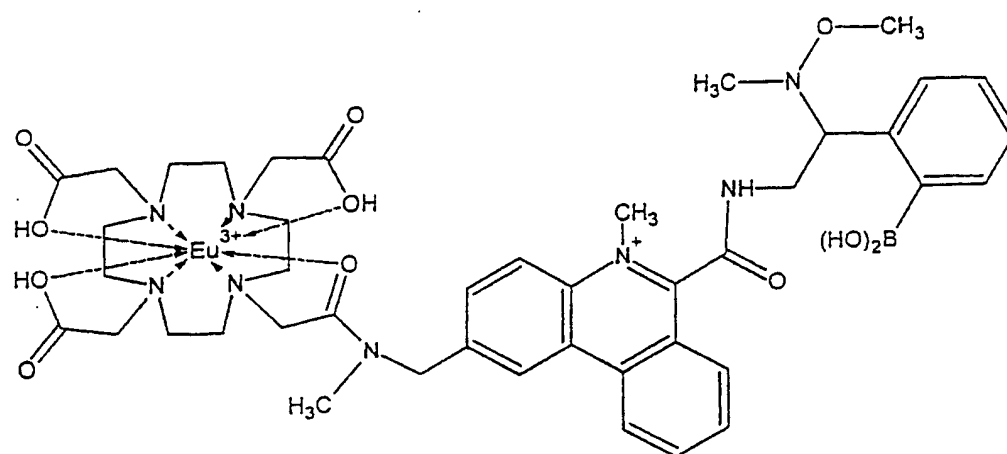
Target B-1



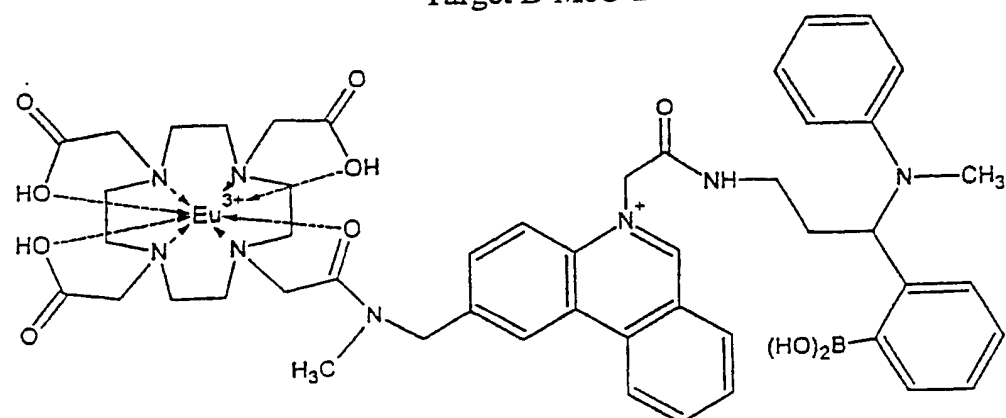
Target B-2



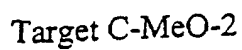
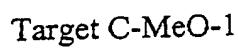
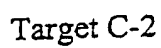
Target B-MeO-1

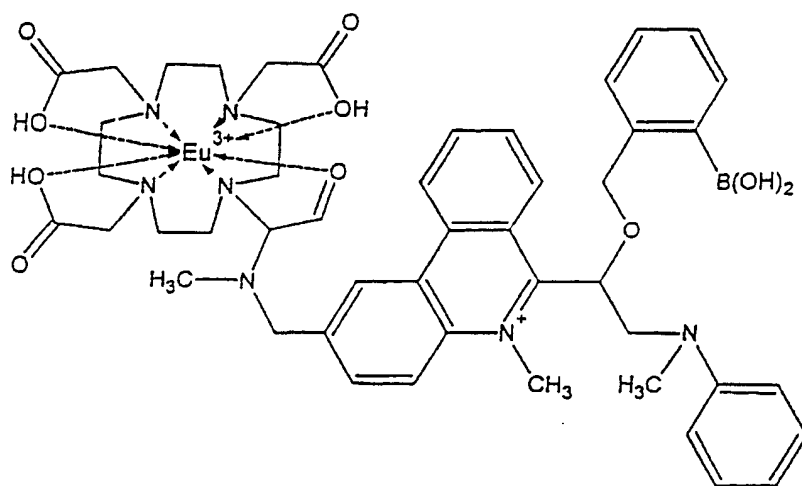


Target B-MeO-2

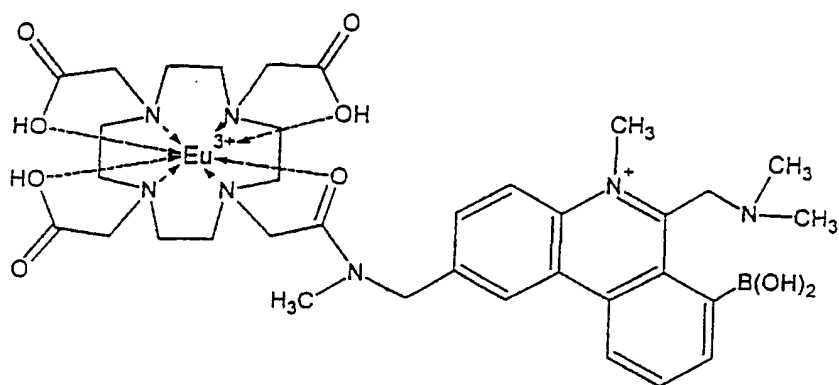


Target C-1

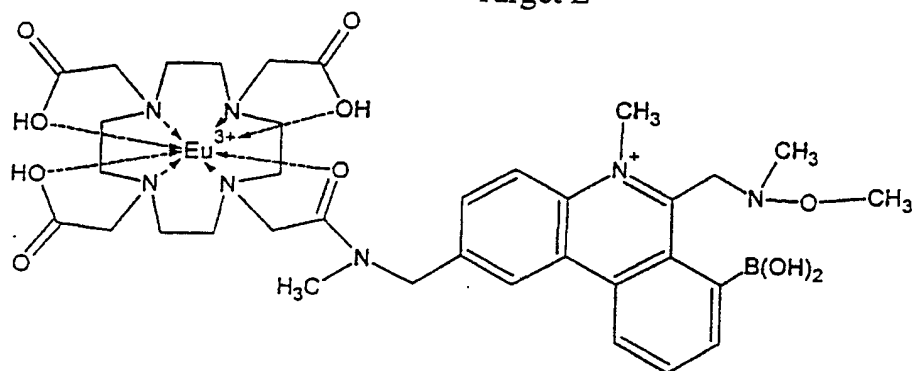




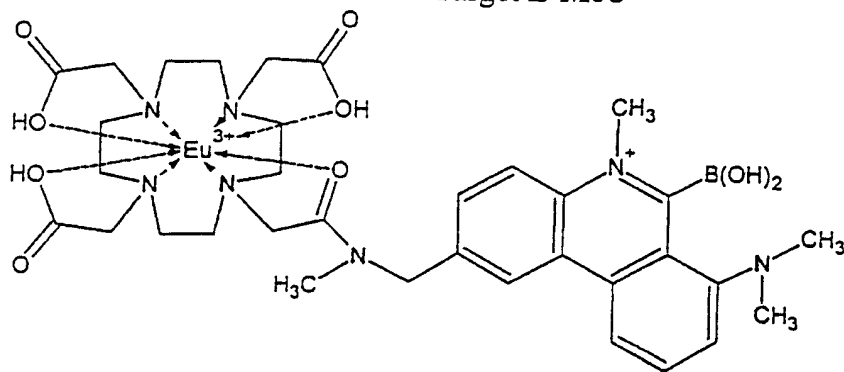
Target D



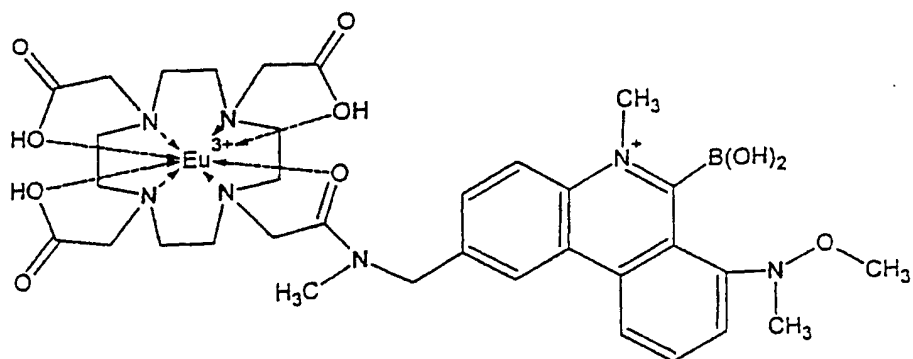
Target E



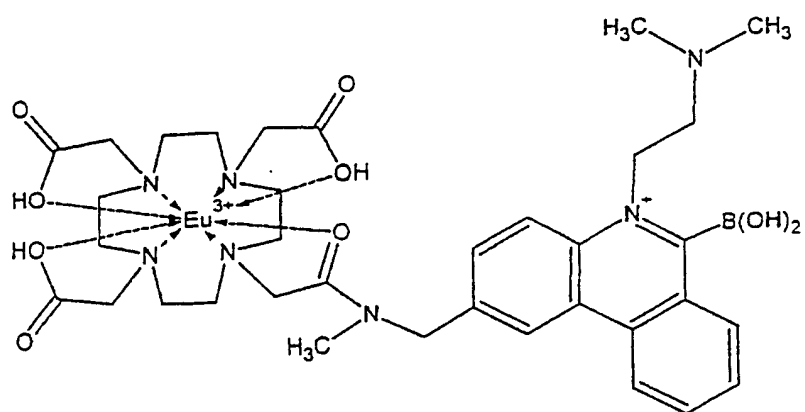
Target E-MeO



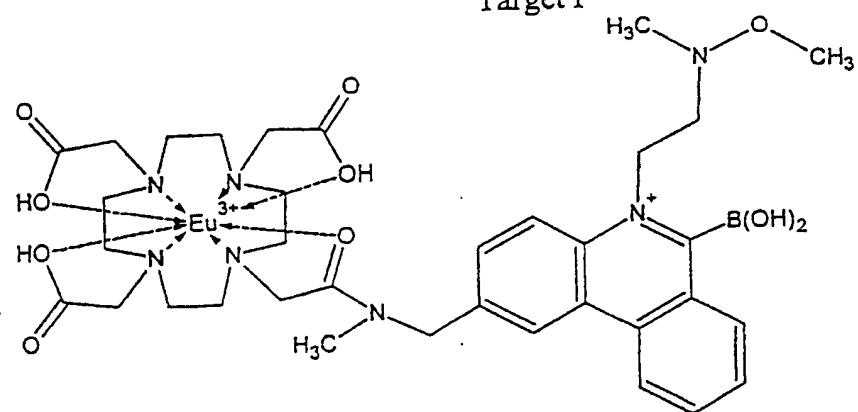
Target EE



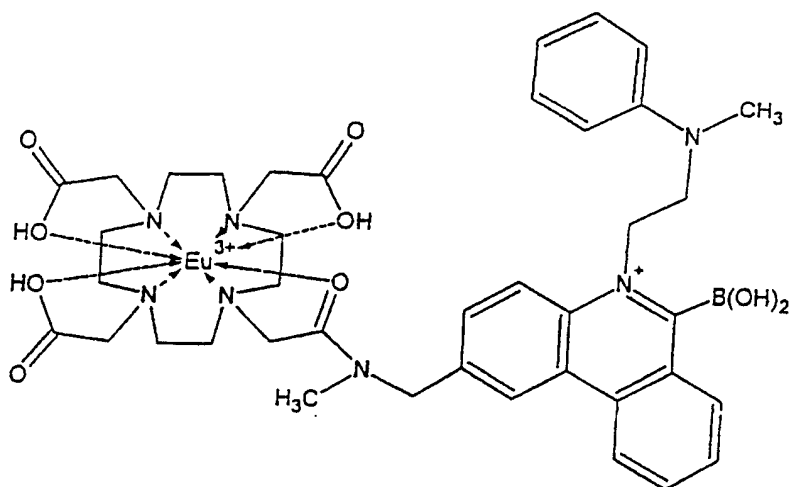
Target EE-MeO



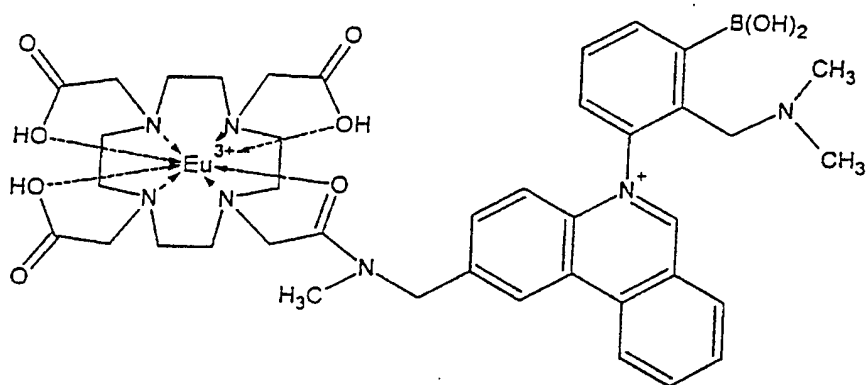
Target F



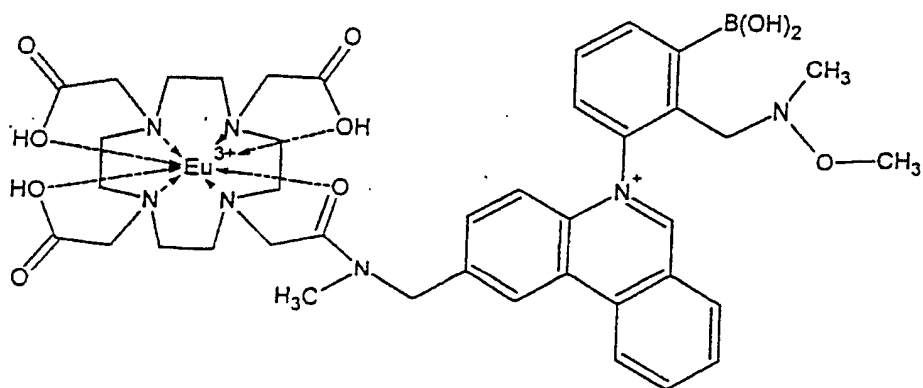
Target F-MeO



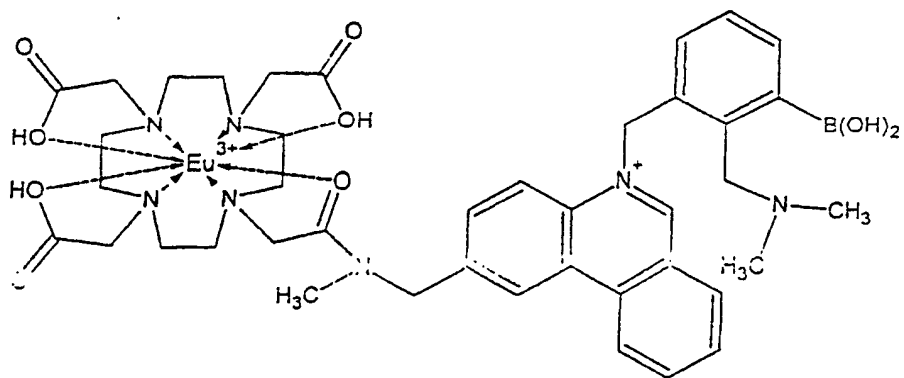
Target F-Phe



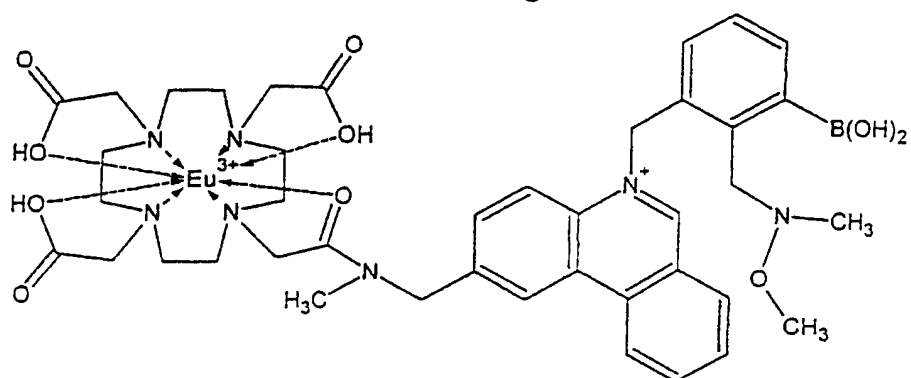
Target G



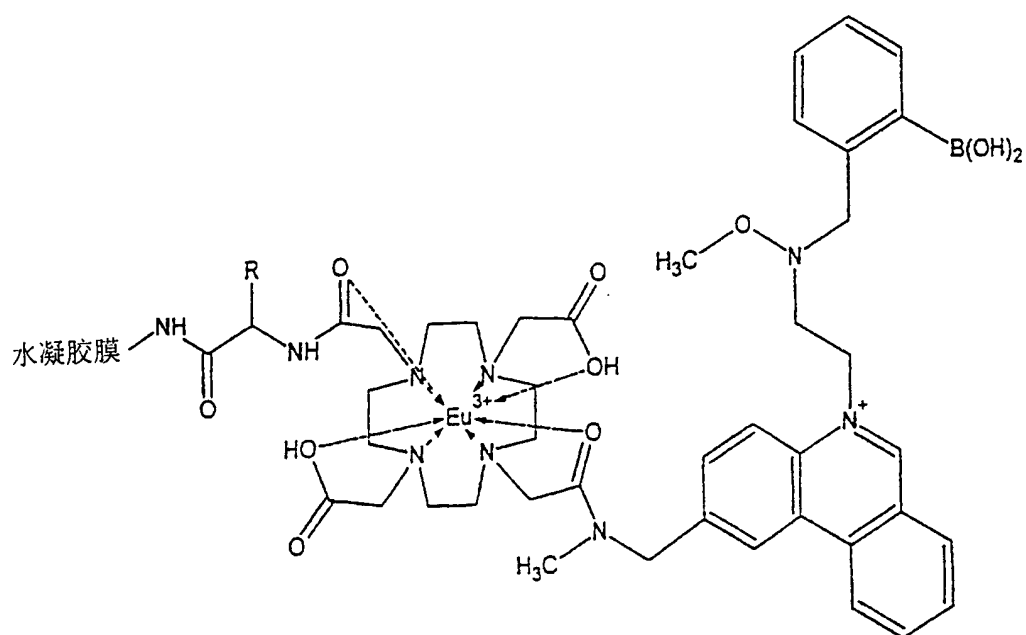
Target G-MeO

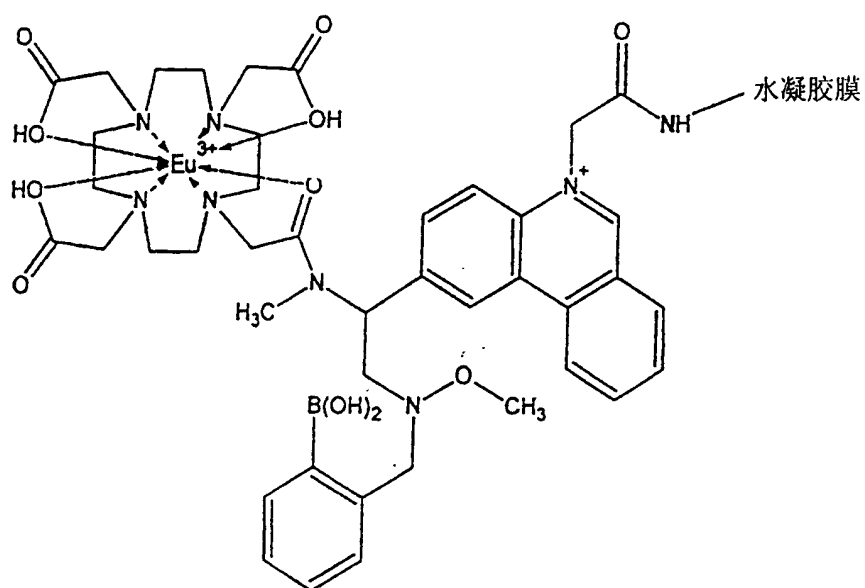
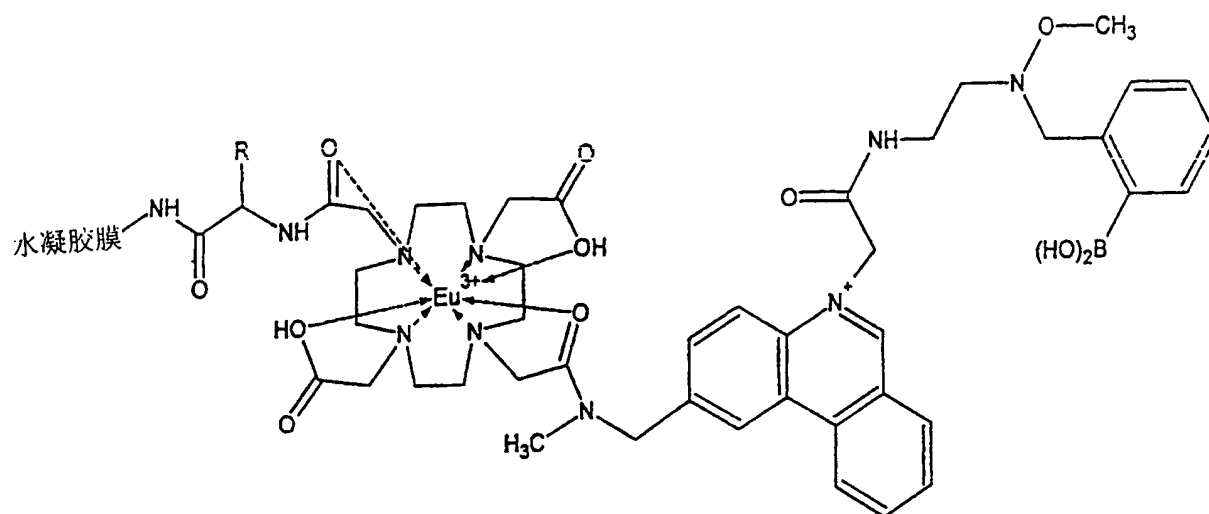


Target H



Target H-MeO





如图 4-5 中所示, 本发明优点以藉由测量儿茶酚(邻一二羟基苯)对 Eu-bNTA 在乙醇溶液中所具荧光强度和寿命的影响的较佳实施例予以证实。图 5 显示出在添加儿茶酚于含 Eu-bNTA 的乙醇溶液中之后所检测与测量到的荧光强度变化。不具有含硼酸根辨识单元的 Eu-bNTA 所具荧光寿命为 $362 \mu\text{s} \pm 1 \mu\text{s}$, 而 Eu-bNTA 硼酸的荧光寿命则减少到 $270 \mu\text{s} \pm 4 \mu\text{s}$ 。于将 Eu-bNTA 硼酸暴露于儿茶酚之后。该分子的荧光寿命更减短到 $209 \mu\text{s} \pm 15 \mu\text{s}$ 。

此外也在水中测量儿茶酚对 Eu-bNTA 硼酸所具荧光强度和寿命的影响且显示可消去螯合物所含镧离子的荧光。之后加入三辛基磷(“TOPO”)以保护位于镧螯合复合物内壳上的配位部位免于水的消光效应。图 3 绘出添加 TOPO 到含 Eu-bNTA 硼酸的水溶液中的情形。

Eu-NTA 硼酸也能够检验甲醇中所含的葡萄糖。具体地说, 是在甲醇中用 Eu-NTA 硼酸进行葡萄糖滴定。葡萄糖滴定所得数据示于图 6-8 中, 图 6 绘出相对于递增葡萄糖浓度的 Eu-NTA 硼酸滴定。图 7 绘出在图 6 中所示低范围数据点的扩展图。图 7 所示结果证实 Eu-NTA 硼酸盐可检测到颇低于约 4.7 mMol 正常生理水平的浓度的葡萄糖。如图 7 数据标绘所示, 可在低于约 0.5 mMol 生理范围内鉴别葡萄糖浓度差。虽然于图 7 中因为在 0.001 mMol 葡萄糖以下的数据点密切相近之故而不能显示出 Eu-bNTA 所具对葡萄糖浓度变化的低端敏感度, 图 8 则以葡萄糖浓度相对于 I/I_0 的半对数标绘图标绘出图 7 中的低范围。

图 9 显示出用葡萄糖和果糖分别在甲醇中滴定镧二苯甲酰基甲烷(Eu-(DBM))和 Eu(硼酸化 DBM)所得结果。具体地说, 葡萄糖

和果糖的浓度变异为 0.0005, 0.005, 0.05, 1, 5, 10 和 20mM。图 9 中对葡萄糖 B 和果糖 B 的数据标绘图代表 Eu(硼酸化 DBM)的葡萄糖滴定与果糖滴定。从图 9 的结果可以轻易看出在暴露于约 0.01mM 以上的葡萄糖和果糖浓度时, 硼酸化铕二苯甲酰基甲烷的荧光强度即明显地增加, 而未经硼酸化的 Eu(DBM)所具荧光强度在添加葡萄糖和果糖时都没有任何可察觉程度的变化。没有特定性辨识单元(如, 硼酸根)时, 镧系金属螯合复合物即对葡萄糖, 果糖或其它顺式二醇化合物的存在没有反应。因此, 有了分析物—特定性辨识单元, 于此例中为一硼酸根, 本发明镧系金属螯合复合物即对葡萄糖, 果糖和其它顺式二醇化合物的存在具敏感性, 因而可用来检测此等和其它分析物的存在或浓度。

图 10—13 进一步证实本发明镧系金属螯合复合物检测样品中葡萄糖及/或果糖的存在或浓度的能力。

如上文所述, 本发明荧光指示剂分子可用于许多不同类型的荧光感测器之中。该等荧光指示剂分子可用于感测器中以检测样品例如液体样品, 包括生物液体, 且更具体地说人类流体中的分析物例如葡萄糖或其它顺式二醇化合物的存在或浓度。例如, 可将本发明荧光指示剂分子分散在可让葡萄糖或其它顺式二醇化合物穿透的聚合物基质内。然后经由测量指示剂分子于通过一个或多个含硼酸根辨识单元结合到葡萄糖或其它顺式二醇化合物后发散出的荧光所具强度或寿命的变化即可测定介质例如液体介质中的葡萄糖或其它顺式二醇的存在或浓度。

美国专利第 5, 517, 313 号—其揭示内容并于本文作为参考—述及一种荧光感测装置于其中可以使用本发明荧光指示剂分子测定液体介

质中的分析物例如葡萄糖或其它顺式二醇化合物的存在或浓度。该感测装置包括一成层的含荧光指示剂分子基质行列(后文称为“荧光基质”),一高通滤光器及一光电检测器。于此装置中,于指示剂材料内至少部分配置着一光源,优选发光二极管 (“LED”),使得来自光源的入射光可促使指示剂分子发出荧光。高通滤光器使发散光到达该光电检测器,同时滤掉来自光源的散射入射光。

在美国专利第 5, 517, 313 号中所述装置中所采用的指示剂分子所发荧光是经分析物例如葡萄糖或其它顺式二醇化合物的局部存在而受到调制,如衰减或增强。

于美国专利第 5, 517, 313 号所述感测器中,含指示剂分子的材料是分析物可穿透的。如此,分析物可从周围试验介质扩散到材料内,由是影响指示剂分子所发散出的荧光。该光源,含指示剂分子的材料,高通滤光器及光电检测器是经组装成使指示剂分子所发散的荧光有至少一部分射到光电检测器,产生出显示出周围介质中的分析物所具浓度的电信号。

根据使用本发明荧光指示剂分子的另一可能实施例,也在申请中的美国专利申请第 08/855, 234, 08/855, 235 和 08/855, 236 号中述及荧光感测装置,一此等全部都并于本文作为参考。

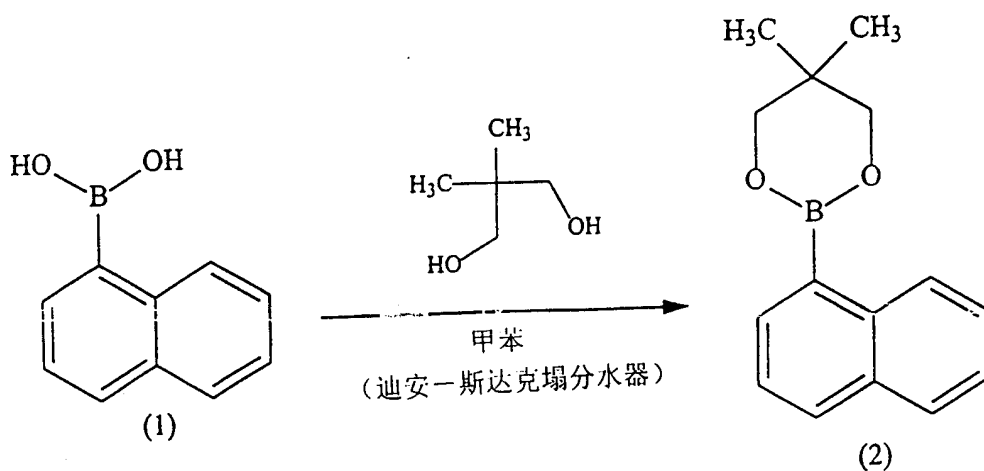
本发明荧光指示剂分子可由本领域熟练人员不必经过份量实验而使用已知的反应机制和药剂,包括与下文所述通用程序相一致的反应机制,

即可制得。

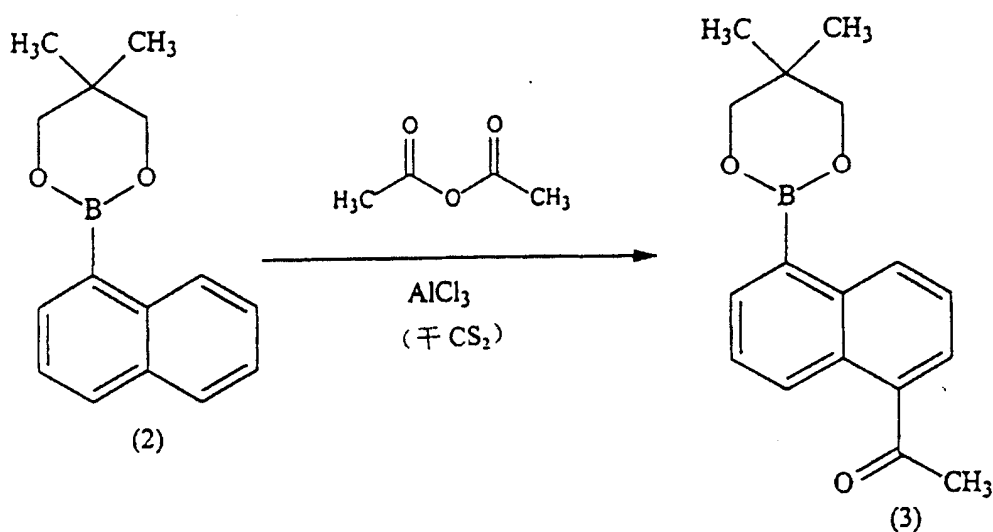
硼酸化铕四 β -二酮复合物的制备

1、将可得自 Frontier Scientific（犹他州洛根）的萘-1-硼酸溶于甲苯内。

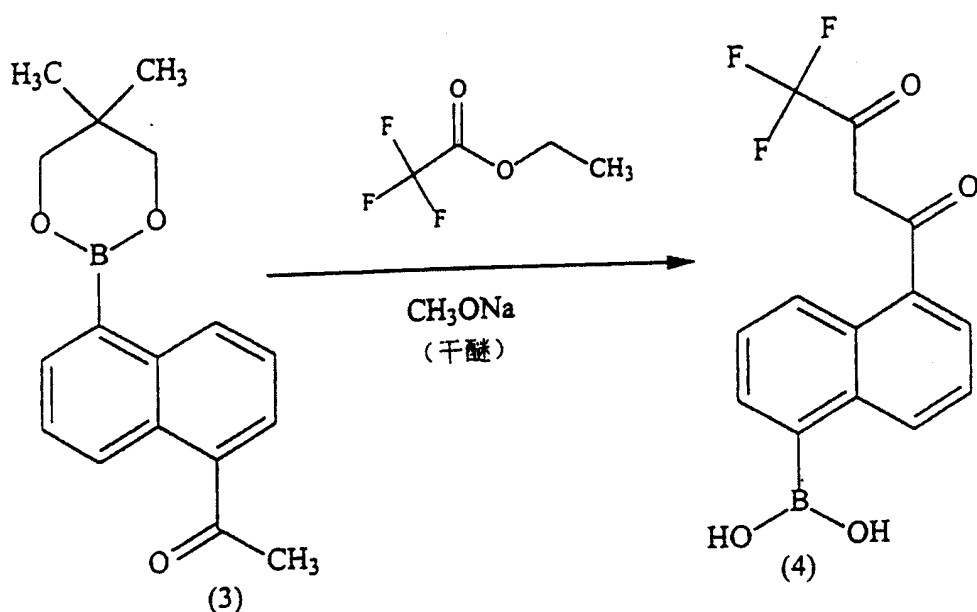
2、该硼酸必须先经由与 2,2-二甲基-1,3-丙二醇（Aldrich Chemical Company）反应同时使用迪安-斯达克塌分水器共沸脱除水予以保护（封盖）住而得 2,2-二甲基丙烷-1,3-二基 1-萘基硼酸酯，如下所示者：



3、然后将经封盖的硼酸经由将该硼酸与乙酸酐和三氯化铝在无水二硫化碳中反应进行氟瑞德-克赖福特乙酰化予以酰化制得 2,2-二甲基丙烷-1,3-二基 5-乙酰基-1-萘基硼酸酯，典型地可得约 70 %产率的反应产物，其呈现为粘稠液体，如下面所示者：



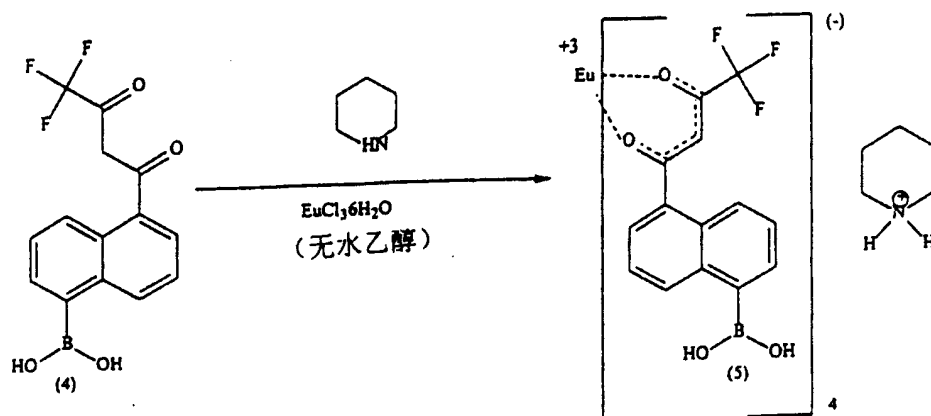
4、之后经由使用甲氧化钠作为缩合剂（于无水乙醚中）在（3）与三氟乙酸乙酯（Aldrich）之间进行克莱森缩合反应形成 β -二酮且去封盖，如下所示：



5、接着可以用制备型氧化矽凝胶 TLC 同时用二氯甲烷洗提纯化出中间产物（4），5-萘甲酰基-三氟丙酮硼酸。于至少一制备中，从板上收取第三谱带洗提物（ $R_f=0.70-0.85$ ）且用质子 NMR 在 400MHz 予以分析。NMR 光谱展现出 β -二酮的烯醇形式的特性样式，特别显

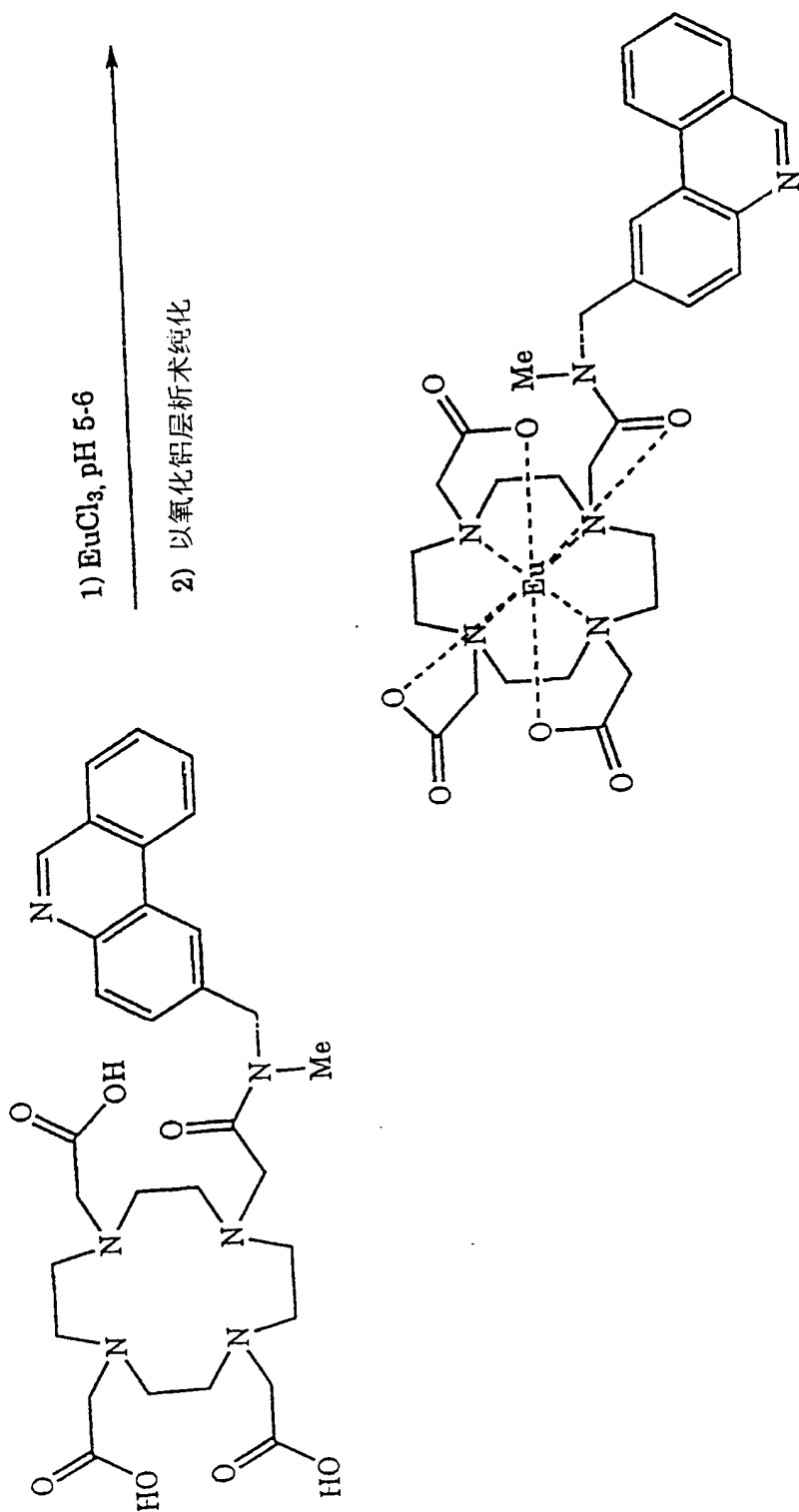
示出在 δ 6.69 (单线) 和 δ 15.28 (宽胖单线) 处的谱峰。

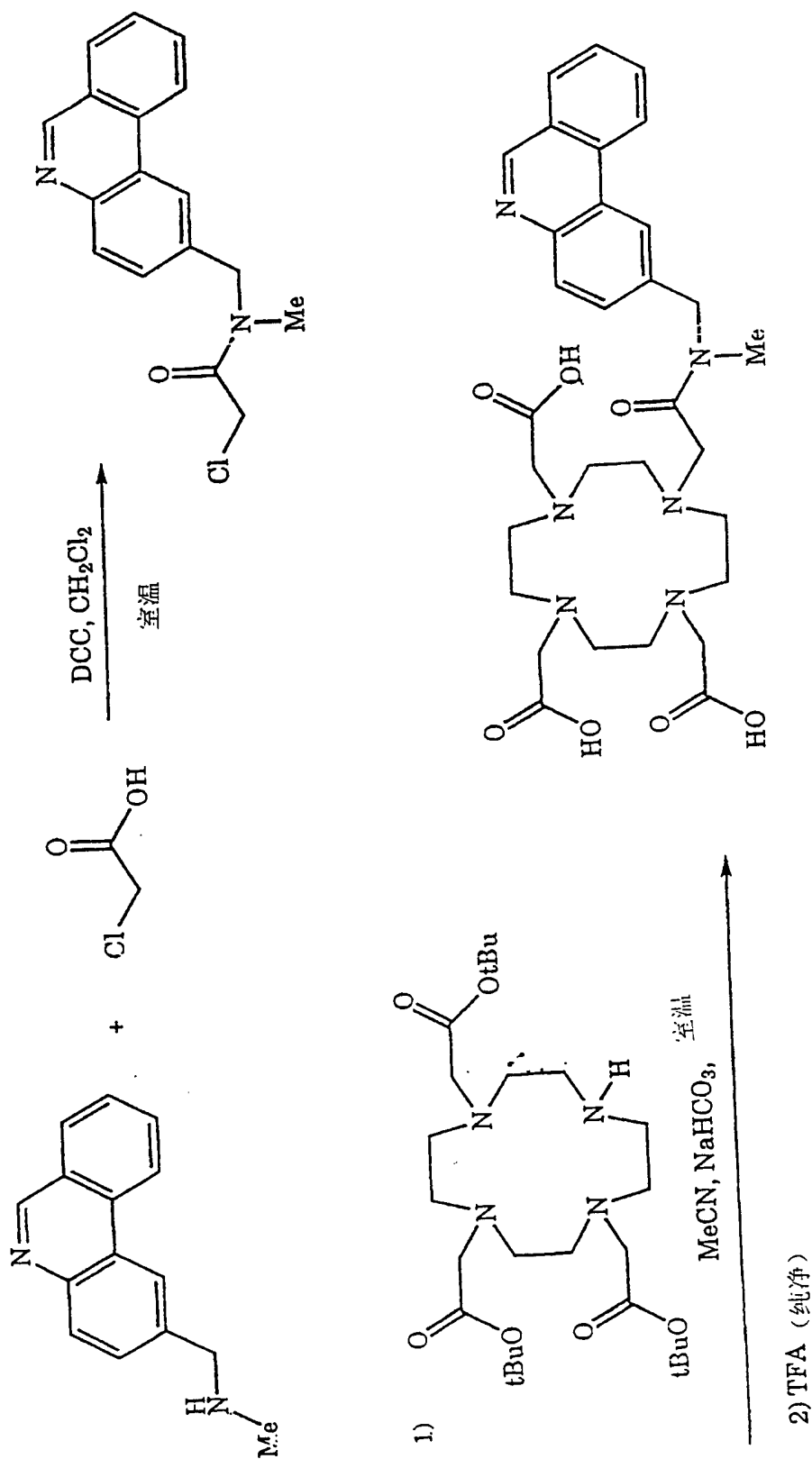
6、最后经由用该 β -二酮 (4) 与三氯化铕六水合物 (Aldrich) 和六氢吡啶在无水乙醇中反应制成含有硼酸根作为分析物—特定性辨识单元的铕四指示剂复合物, 如下所示:

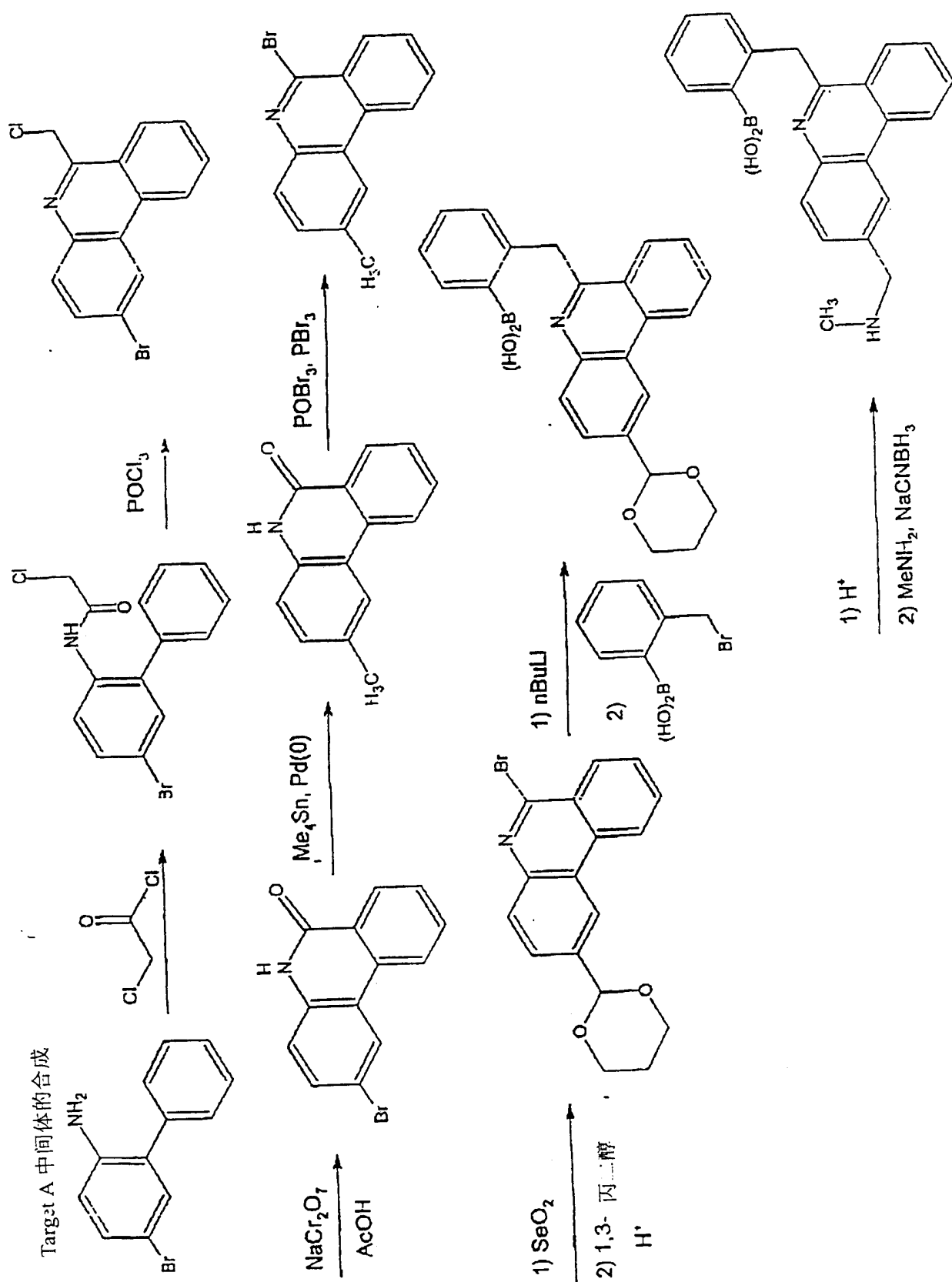


然后将该溶液加热到 70℃ 3 小时。加热后, 所得溶液在用手持长波 UV 光源照射时显示出特性橘红色发激光。此外, 用 Shimadzu 荧光计进行荧光扫描时显示出 340nm 的尖峰激发波长及 613nm 的铕复合物特性尖峰发散波长。

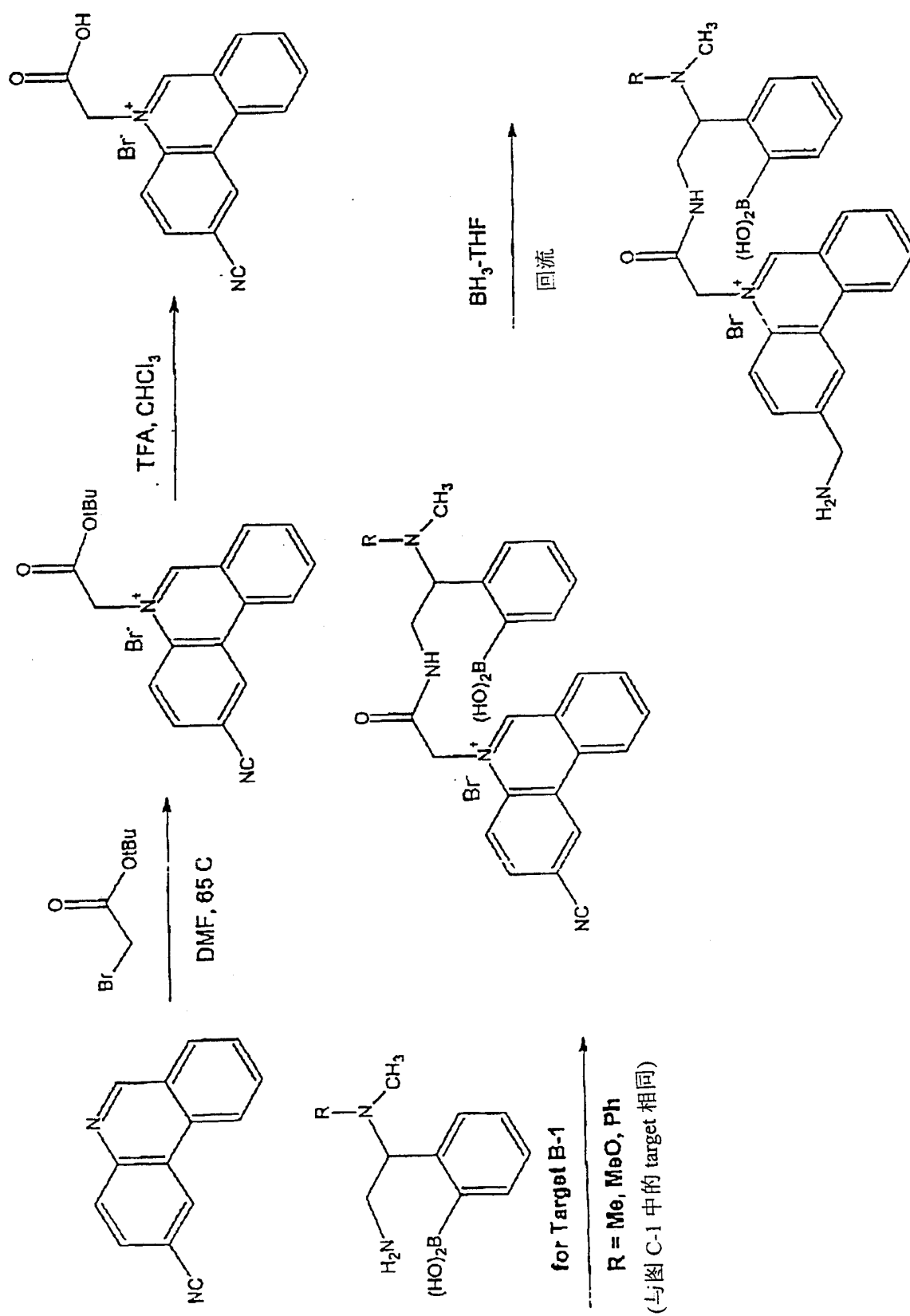
下面绘出可用来制备本发明化合物的其它合成程序。



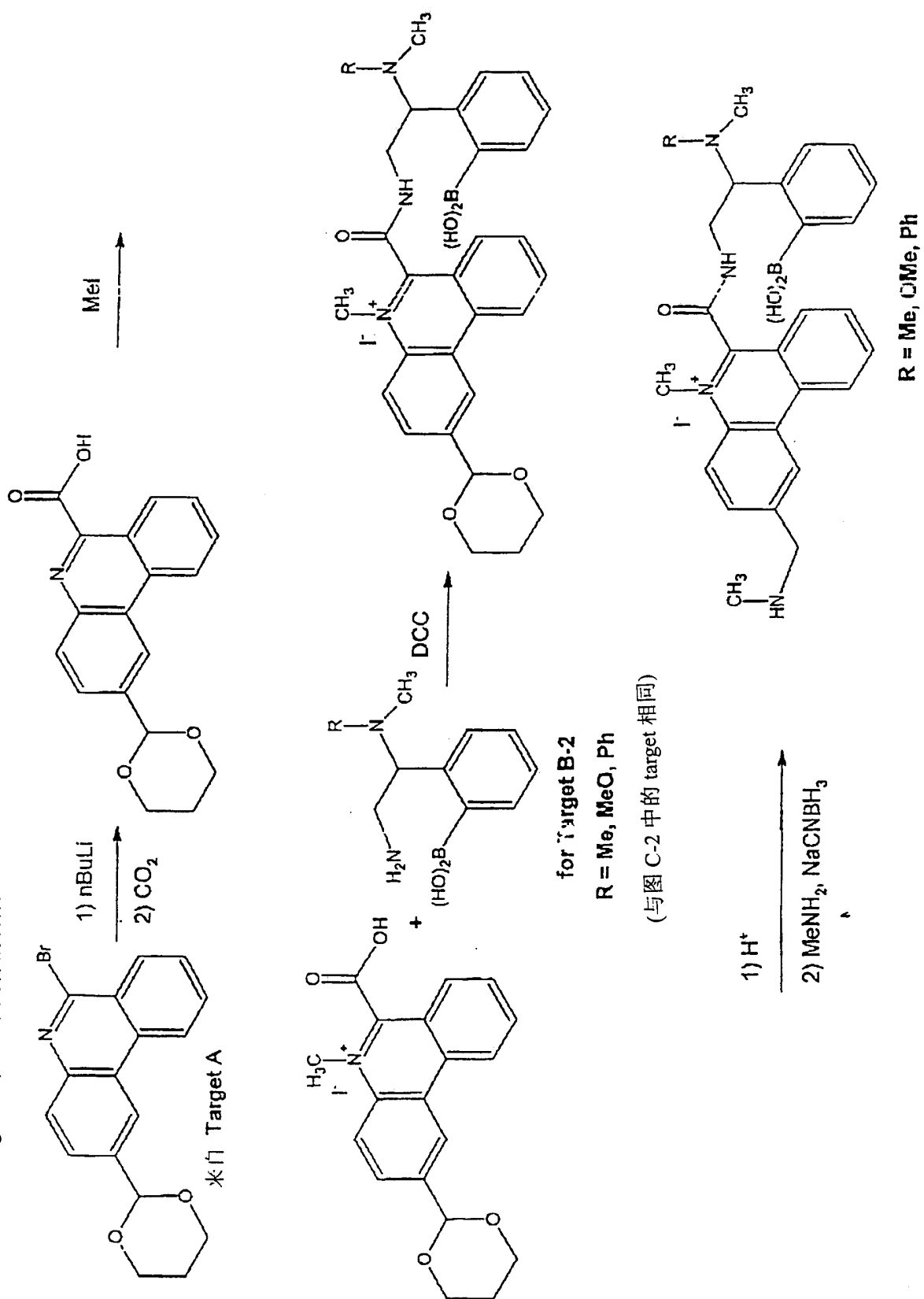


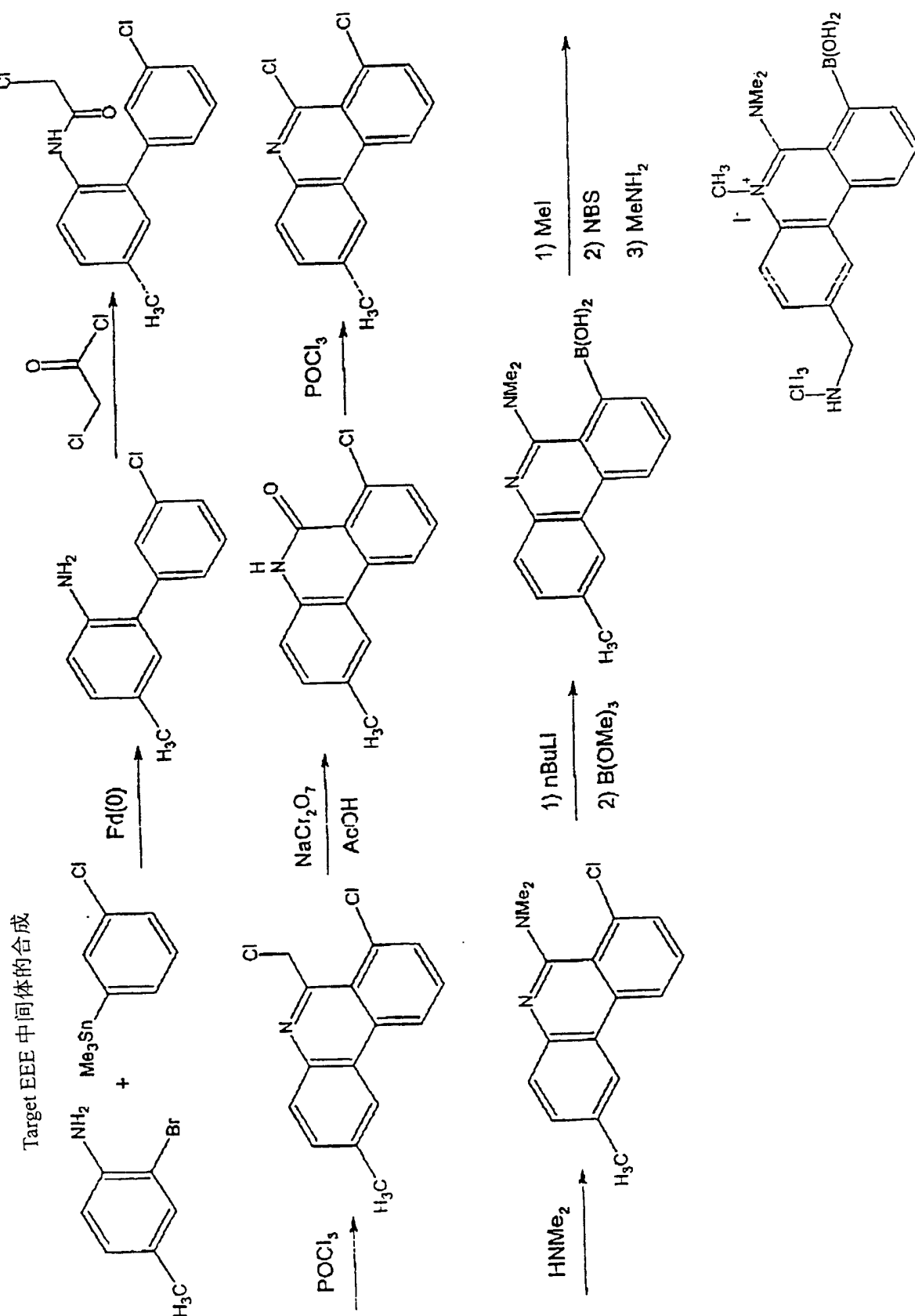


Target B-1, C-1 中间体的合成

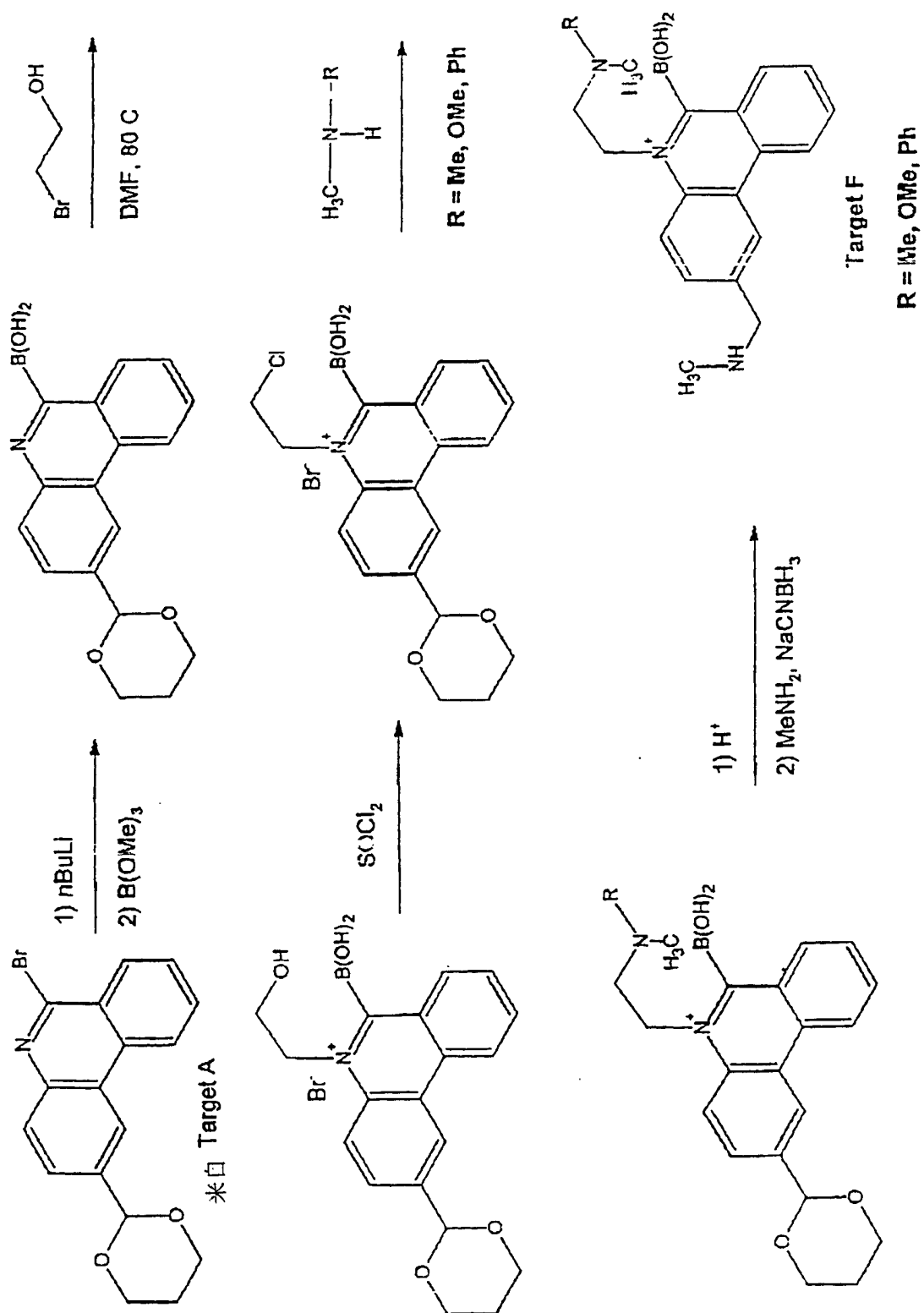


Target B-2, C-2 中间体的合成

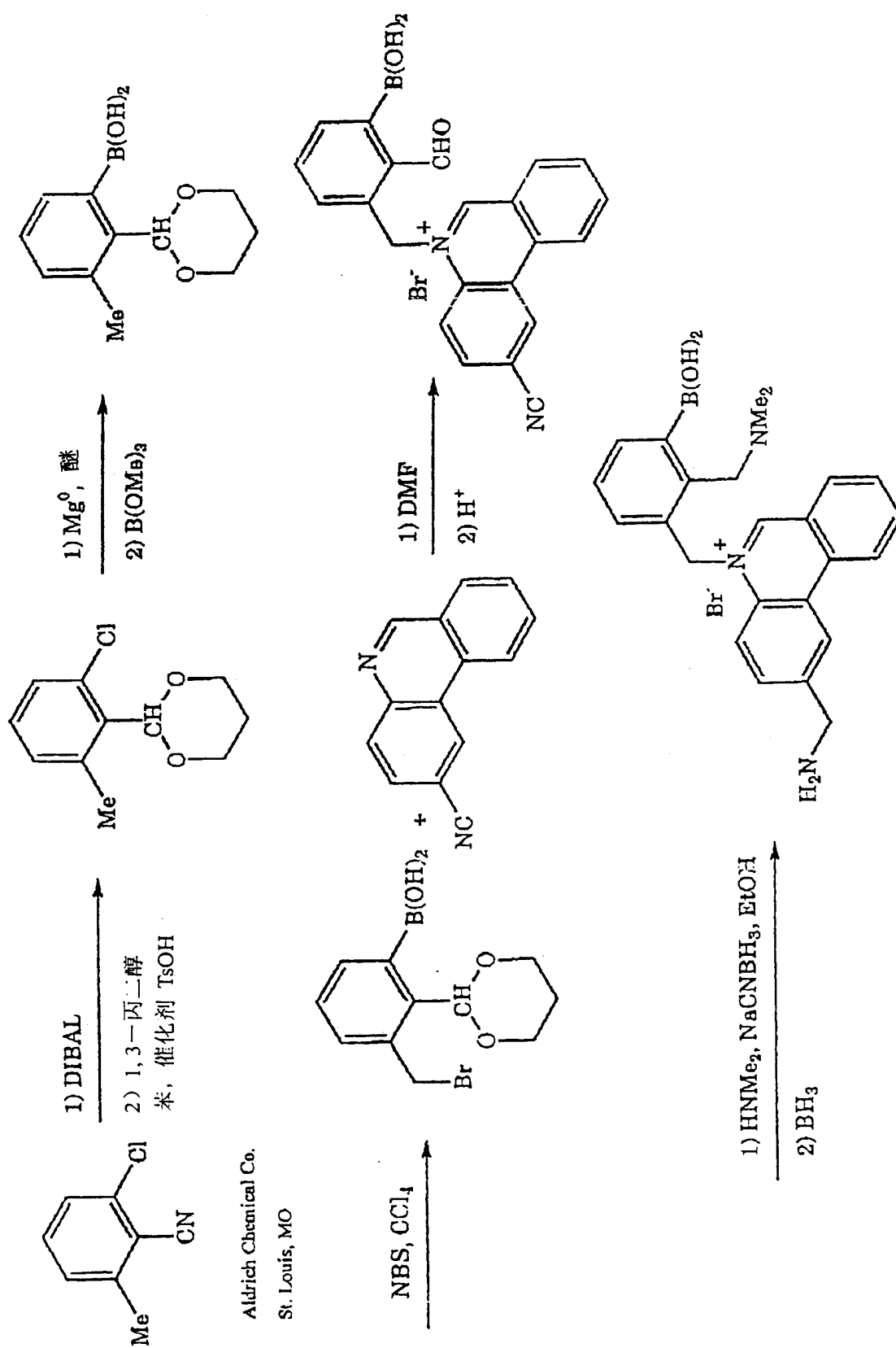




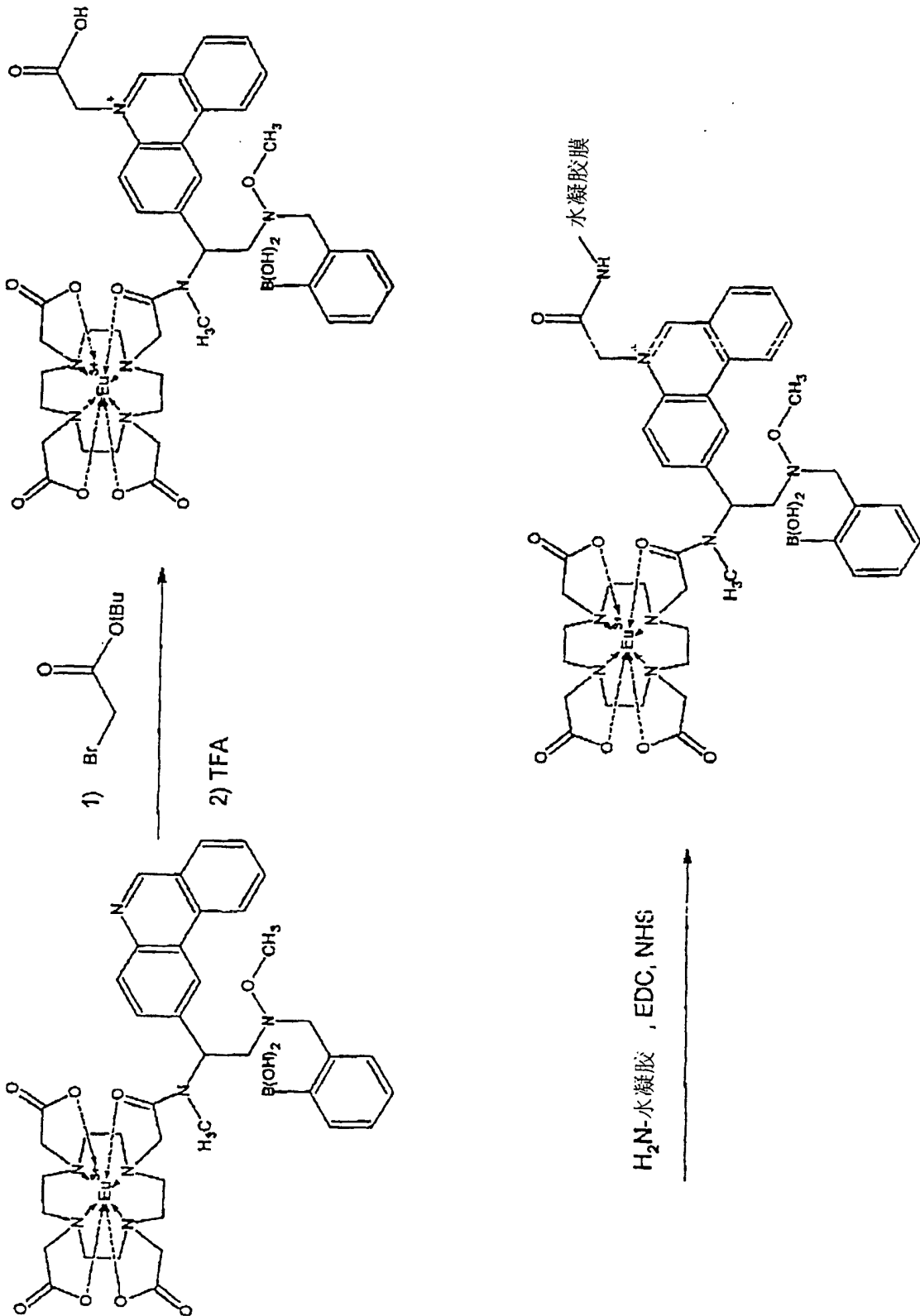
Target F 中间体的合成



Target H 合成



措施 3 的合成步骤第 2 页



有关上文所绘诸合成程序诸部分的其它细部，可参看下列文章，此等的内容皆并于本文作为参考：

- 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. Slille, 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

本发明要用下列实施例予以示范说明以对其进一步了解。

实施例 I

用 Eu (4—二苯甲酰基甲烷硼酸) 检测葡萄糖和果糖

将 25 微升的 6.5mM Eu (4—二苯甲酰基甲烷硼酸) /PyCl 加到 525 微升甲醇中并予以回转混合。从甲醇中的储液 (4 μ M, 400 μ M, 4mM 和 40mM), 对两种糖分别制备浓度为 0.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 1mM, 5mM, 10mM, 和 20mM 的葡萄糖和果糖样品。其结果示于图 9 中, 在 Eu 螯合复合物经于所需的 365nm 激发波长后对每一个别葡萄糖和果糖样品, 监测 Eu 螯合复合物在 613nm 的荧光发散强度。

实施例 II

销四—5—萘甲酰基—三氟丙酮硼酸的合成

I. 2, 2—二甲基丙烷—1, 3—二基—1—萘基硼酸酯 (1) 的制备

前体的硼酸根是根据下列程序予以保护住以在销螯合复合物的合成中避免由随后反应条件所引起的任何潜在不良影响:

将萘—1—硼酸 (15.2 克, 0.0884 摩尔) 与 2, 2—二甲基—1, 3—丙二醇 (10.0 克, 0.0960 摩尔, 1.1 当量) 置于甲苯 (200 毫升) 中回

流同时用迪安-斯达克塌分水器共沸脱水 28 小时。之后经由单纯的蒸馏蒸掉甲苯，接着于加热下以抽气机减压蒸馏至到达约 80℃温度为止。然后在真空（0.5mm）加热到高达 60℃下脱除未反应的 2, 2-二甲基-1, 3-丙二醇。得到白色固体（20.94 克，99%纯度）的 2, 2-二甲基丙烷-1, 3-二基-1-萘基硼酸酯。

该产物经 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) 验证过。

II. 氟瑞德-克赖福特乙酰化：2, 2-二甲基丙烷-1, 3-二基-5-乙酰基-1-萘基硼酸酯（2）的制备

根据下述程序将乙酰基导到前体所具芳族构造内以形成二酮：

将 2, 2-二甲基丙烷-1, 3-二基-1-萘基硼酸酯（1）（21.0 克，0.0878 摩尔）溶在 150 毫升无水二硫化碳中同时在置于冰水浴中的 250 毫升圆底烧瓶内搅拌。于两小时期间加入分成数份的三氯化铝（28.7 克，0.215 摩尔）。然于一小时期间搅拌混合物并使其慢慢温到室温。可看到沉积在烧瓶内的黏滞深色半固体。将该混合物再置于冰水浴内冷却，其后在烧瓶上加装回流冷凝器。于 2 小时期间加入乙酸酐（8.93 克，0.0875 摩尔）。然后将混合物热到 40℃以起始反应。于乙酸酐添加期间，需要偶合搅动反应混合物（经由手回转）以控制可能在反应中发生的任何放热反应。

于使反应混合物置于室温下 2 小时之后，再于一小时期间将混合物慢慢加热到 50℃。可观察到于反应混合物形成深色固体。

之后使用 800 毫升冰水，15 毫升浓氯化氢和 250 毫升二氯甲烷一起将反应混合物分解和萃取成清楚的两层。收集底部有机层，以硫酸钠脱

水,并在高达 80℃下减压蒸发三小时而成半固体形式,产率 78%的 19.39 克二甲基丙烷-1, 3-二基-5-乙酰基-萘基硼酸酯 (2)。

III. 克莱森缩合: 5-萘甲酰基-三氟丙酮硼酸 (3) 的制备形成 β -二酮配体, 如下所述:

用氢化钠混合物与 2 毫升甲醇 (0.313 克, 0.01302 摩尔) 在 10 毫升无水乙醚中反应。所得溶液于高达 100℃的减压下干燥二小时而得固体形式的甲氧化钠。之后用 45 毫升无水乙醚处理该甲氧化钠且在冰水浴中冷却。接着加入三氯乙酸乙酯 (1.763 克, 0.0124 摩尔), 10 分钟后, 于另一 10 分钟期间滴加二甲基丙烷-1, 3-二基-5-乙酰基-1-萘基硼酸酯 (2) (3.50 克, 0.0124 摩尔) /20 毫升无水乙醚溶液。在室温下搅拌混合物 30 分再加热回流 70 小时。将混合物置于冰水浴中搅拌之下, 加入 25 毫升水和 8 毫升 10%氯化氢以使水层酸化到 pH 1。其后在烧瓶内呈现出清楚的两层。

之后收集顶部乙醚层, 以硫酸钠脱水, 及在高达 60℃下减压蒸发一小时而得到呈黑色液体形式 (4.36 克) 的 β -二酮。用制备型氧化硅凝胶 TLC 以二氯甲烷洗提纯化所得 β -二酮。从 TLC 板收取第三带 ($R_f = 0.70-0.85$) 而得 25%产率的 5-萘甲酰基-三氟丙酮硼酸 (3) (1.20 克)。

该产物经质子 NMR (400MHz) 光谱验证为具有 β -二酮的烯醇形式特性样式, 具有于 δ 6.69 (单线) 和 δ 15.28 (宽胖三重线) 的谱峰。

IV. 螯合/复合: 铈 (β -二酮硼酸) 四复合物 (4) 的形成

其后依下文所述制造作为荧光指示剂分子所用的镧系金属螯合复

合物：

将三氯化铕六水合物（0.7 毫克，0.0019 毫摩尔）/0.5 毫升无水乙醇溶液加到 5-萘甲酰基-三氟丙酮硼酸（3）（2.2 毫克，.0058 毫摩尔）和六氢吡啶（130 毫克）在 0.5 毫升无水乙醇中的溶液内。于 2 小时期间将此混合物慢慢加热到 70℃并在该温度下再保持 3 小时以形成铕四复合物（4）。

所得溶液在用手持长波紫外光源照射下展现出特性橘红色发散光，此外，用 Shimadzu 荧光计测量所得荧光光谱显示出 340nm 尖峰激发波长及 613nm 铕螯合复合物特性发散样式。

本发明已就某些较佳实施例予以说明过。本领域一般技术人员皆承认可作出修饰和改良而不远离本发明旨意与范围。

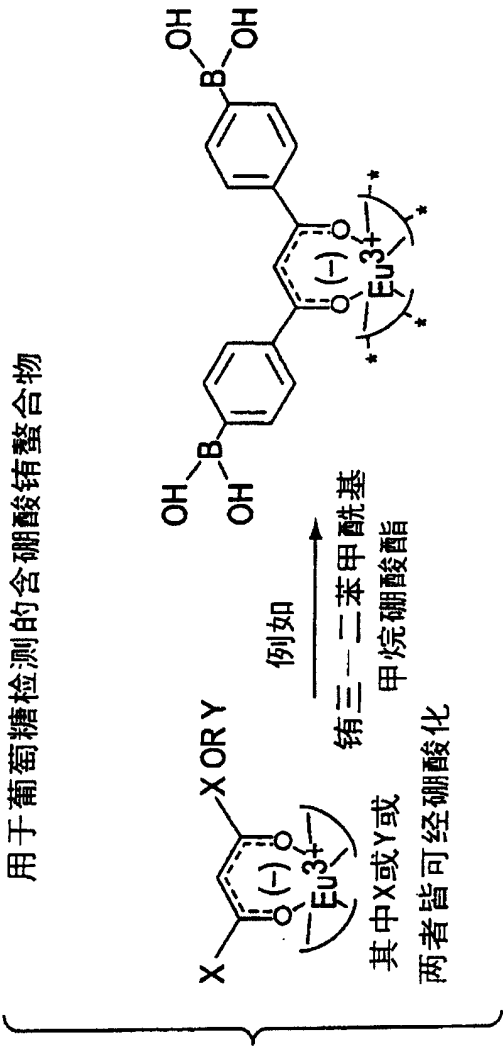


图1

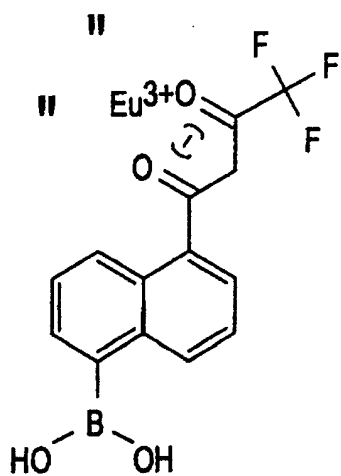


图2

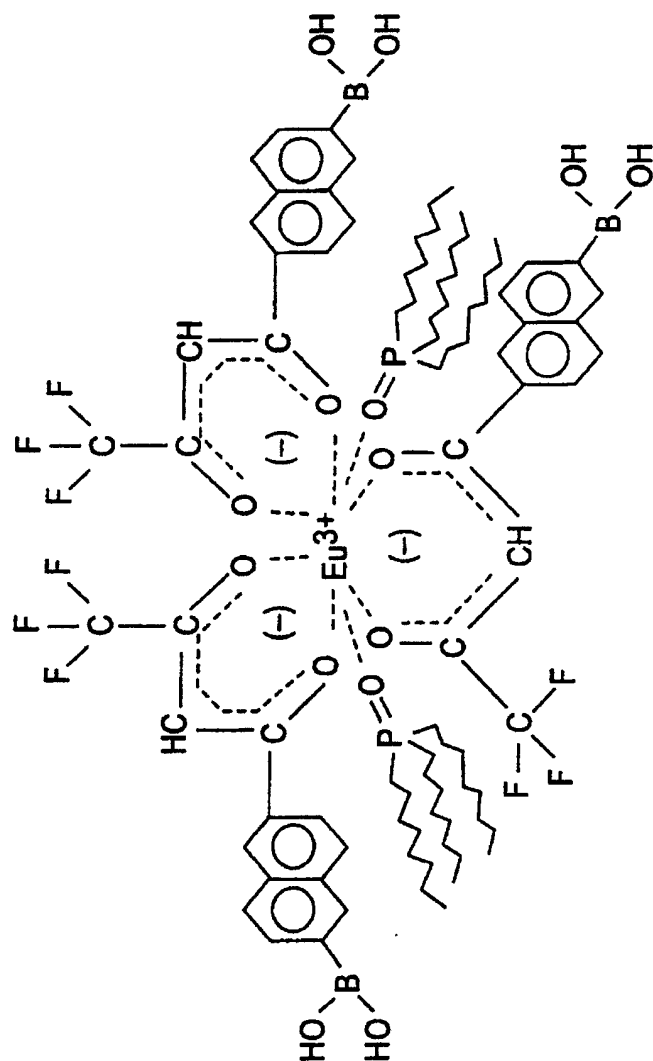


图3

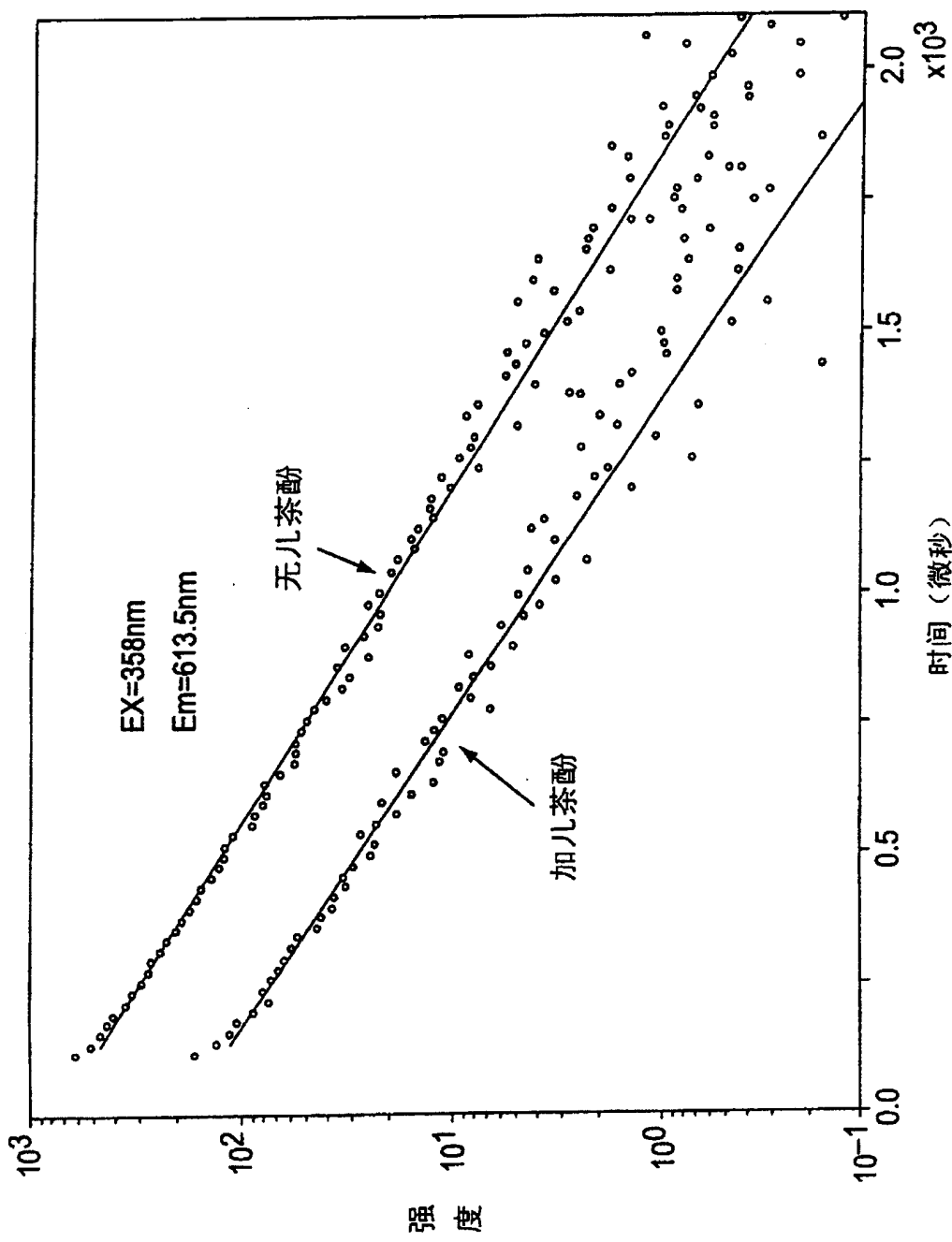


图4

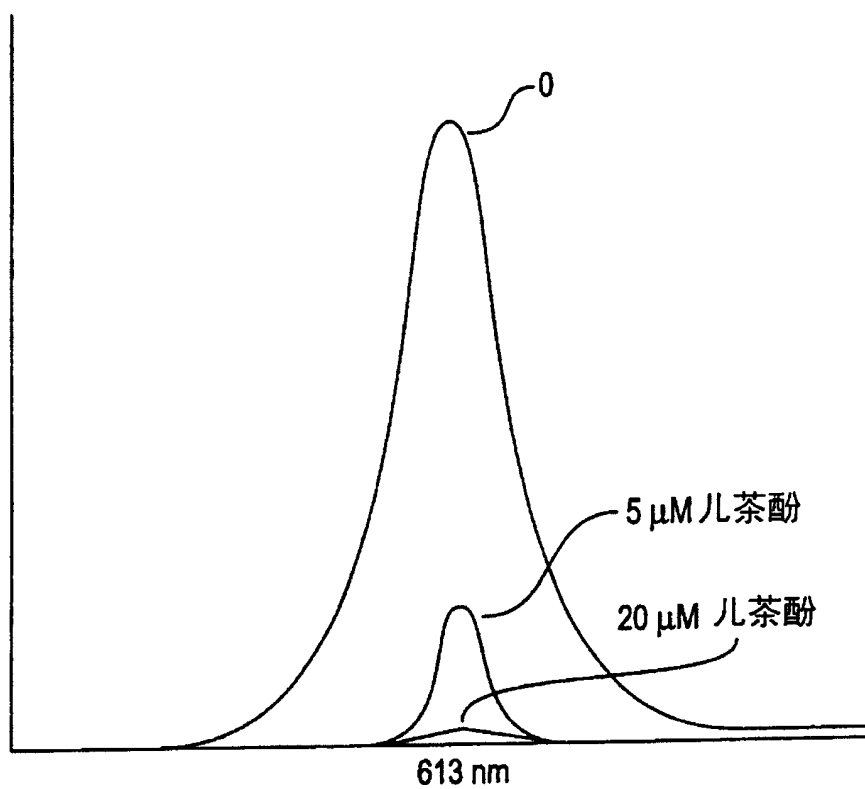


图5

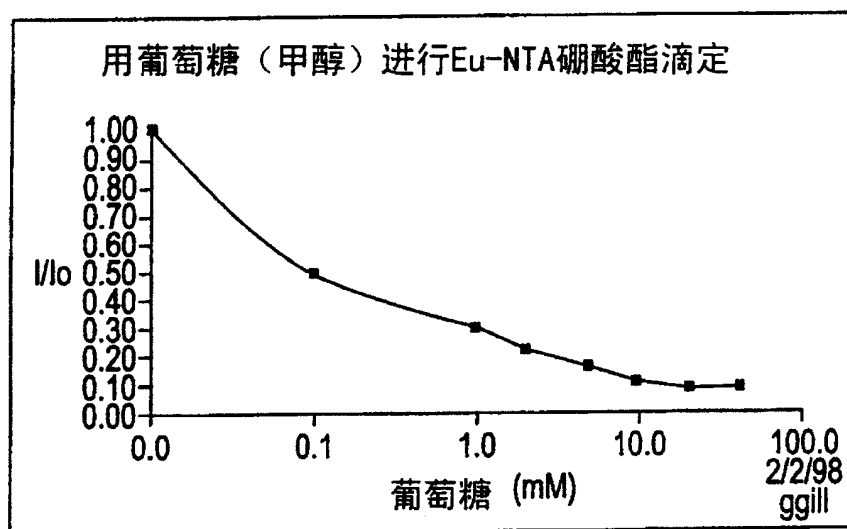


图6

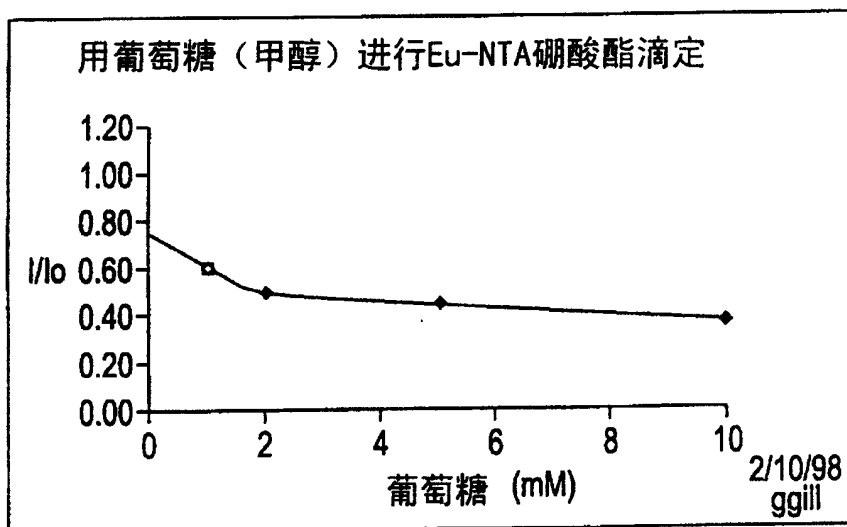


图7

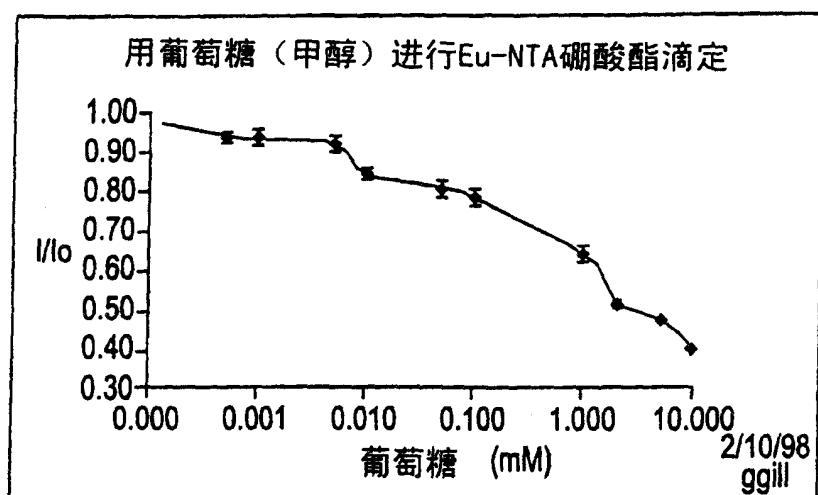


图8

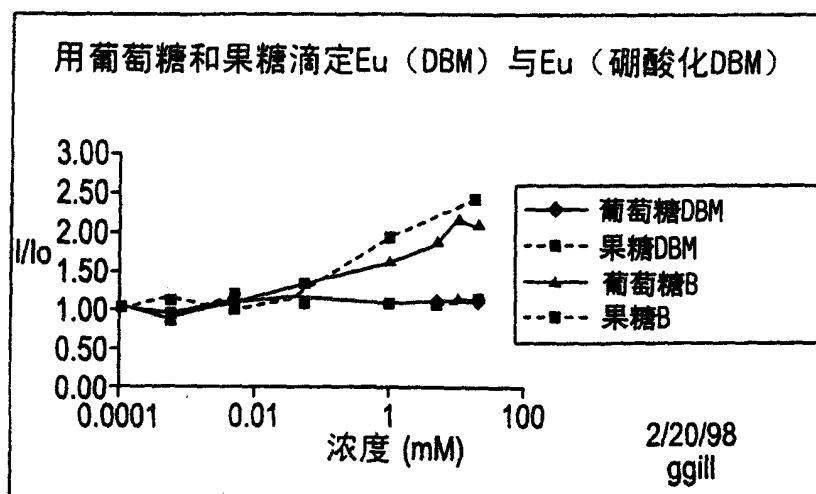


图9

铕 β -萘甲酰基三氟丙酮-硼酸酯 (Eu-BNTAB)

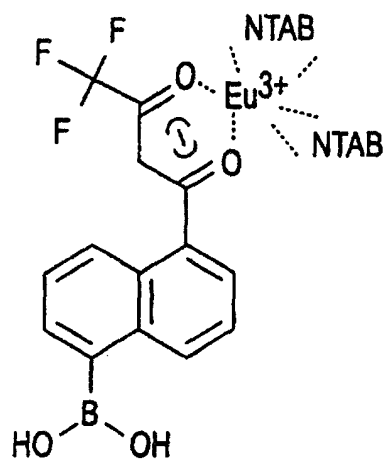


图 10A

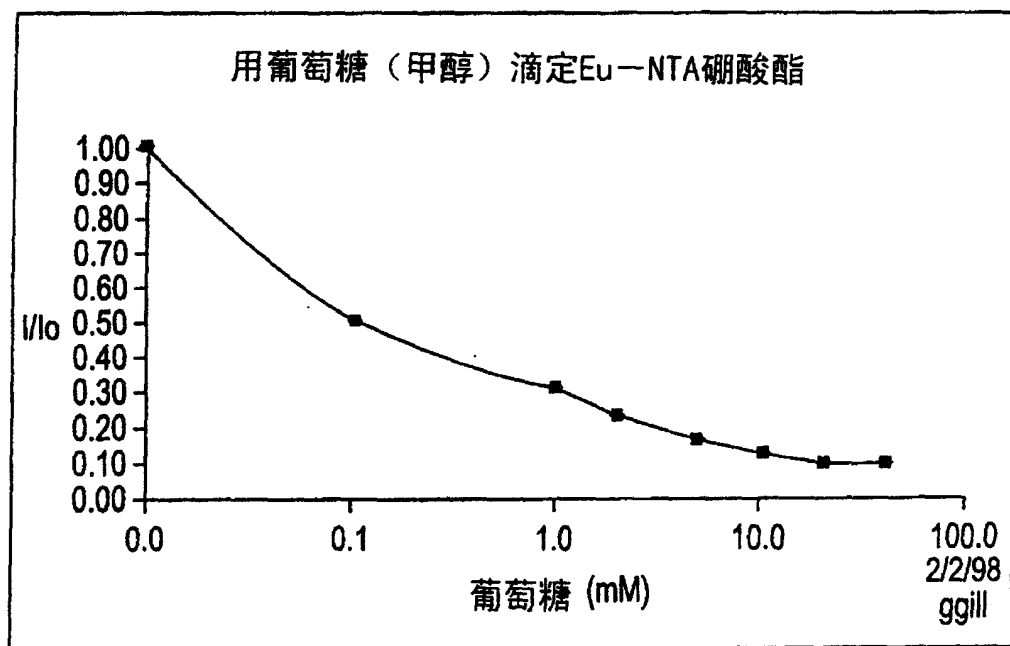


图 10B

铕二苯甲酰基甲烷硼酸酯 (Eu-DBMB)

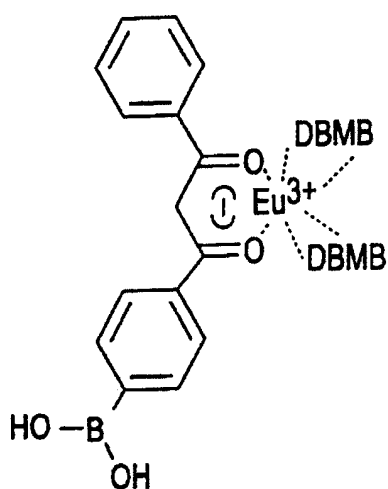


图11A

用葡萄糖和果糖在甲醇中滴定Eu (二苯甲酰基甲烷硼酸)

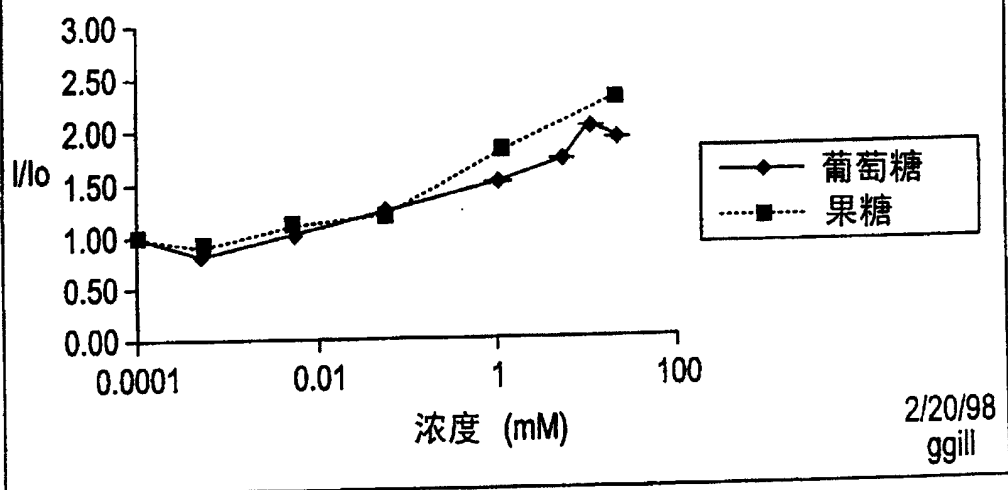


图11B

铕四(噻吩甲酰基-4-苯甲酰基甲烷硼酸酯)

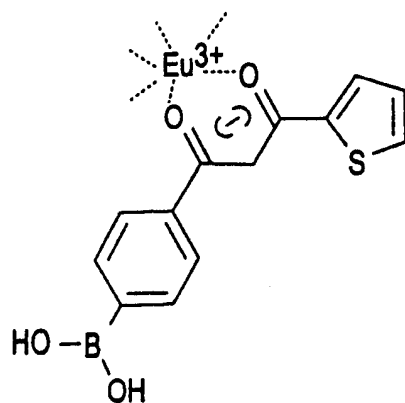


图12A

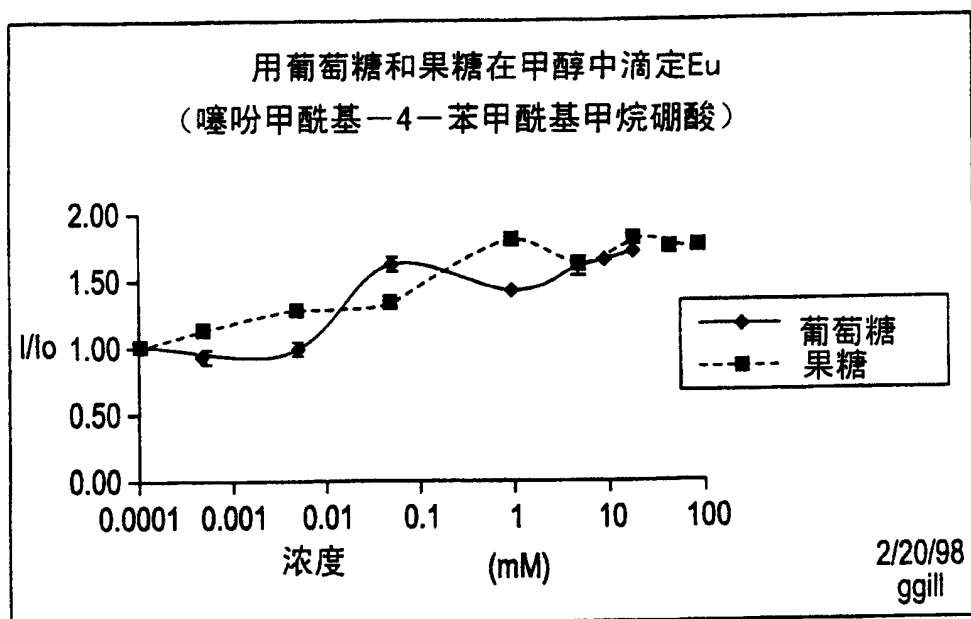


图12B

铕三(苯甲酰基三氟丙酮硼酸酯) (Eu-BTAB)

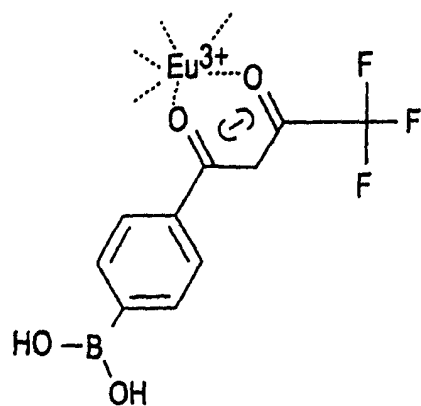


图13A

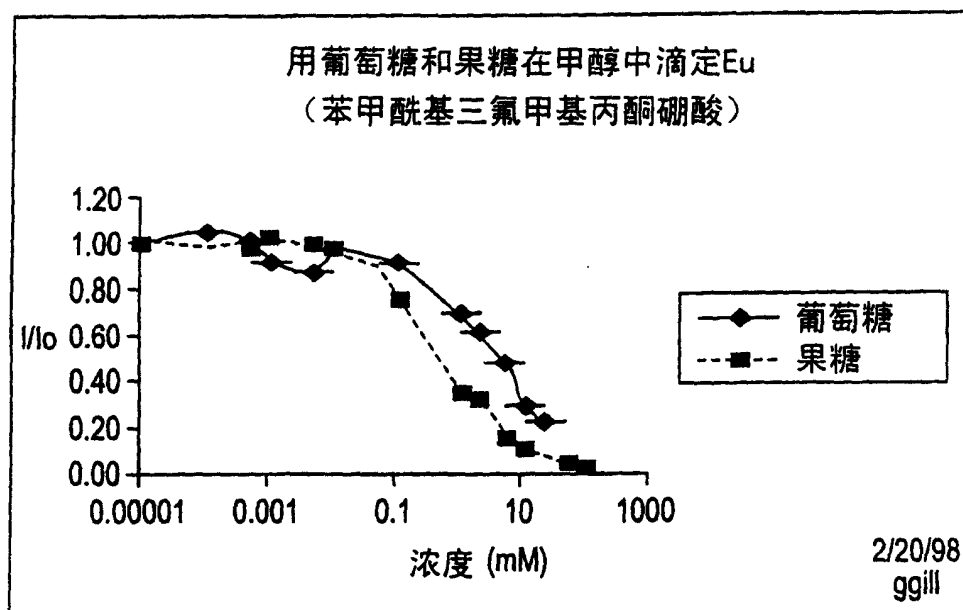


图13B