

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵

G01N 31/22

G01N 33/50

C12Q 1/28

(45) 공고일자 1990년05월21일

(11) 공고번호 90-003541

| | | | |
|-------------|---------------------------------|-----------|---------------|
| (21) 출원번호 | 특1984-0001742 | (65) 공개번호 | 특1985-0002325 |
| (22) 출원일자 | 1984년03월31일 | (43) 공개일자 | 1985년05월10일 |
| (30) 우선권 주장 | 56652 1983년03월31일 일본(JP) | | |
| (71) 출원인 | 교오와 메덱스 가부시끼가이샤 와끼시 시게도시 | | |
| | 일본국 도오쿄도 지요다구 오오테마찌 1쵸오메 6반 1고오 | | |

| | |
|----------|---|
| (72) 발명자 | 아오야마 노리히토 |
| | 일본국 시즈오카켄 슌푸운?나가이즈미쵸오 시모토가리 1188 |
| | 미이케 아끼라 |
| | 일본국 시즈오카켄 슌푸운?나가이즈미쵸오 나메리 410-1 |
| | 시미즈 요시아끼 |
| | 일본국 시즈오카켄 슌푸운?나가이즈미쵸오 시모나가 구보 이케다 127-5 |
| | 다따노 도시오 |
| | 일본국 시즈오카켄 누마쓰시 오오오까 2297-6 |
| (74) 대리인 | 장용식 |

심사관 : 정순성 (책자공보 제1880호)

(54) 과산화수소의 측정방법 및 시험조성물

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

과산화수소의 측정방법 및 시험조성물

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 과산화수소 측정에 대한 방법 및 시험조성물에 관한 것으로 좀더 상세히는, 과산화수소를 과산화효소의 존재하에 수소공여체로서 신규한 색원체와 반응시키고, 형성된 색소의 정도를 측정함으로써 과산화수소를 측정하는 방법에 관한 것이다.

본 방법은 또한 측정수행에 적합한 시험조성물에도 관한 것이다.

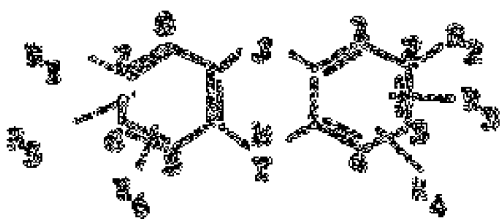
지금까지는, 기질의 측정이 일반적으로 산화제의 작용에 의하여 기질을 산화하고 형성된 과산화수소를 측정함으로써 수행된다. 예를들면, 콜레스테롤은 콜레스테롤 산화제에 의하여 산화되어 과산화수소를 형성한다. 다음에 과산화효소의 존재하에 과산화수소를 색원체와 반응시키고 가시광선 영역내의 색소의 형성에 의하여 착색된 반응용액의 흡광도를 측정함으로써 과산화수소를 측정한다.

이러한 과정에서 4-아미노안티피린(이후부터는 4AA로서 칭한다)과 페놀, 4AA와 N,N-디메틸아닐린, 4AA와 N-에틸-N-(β-히드록시에틸)-m-톨루이딘, 3-메틸벤조티아졸린 히드라존과 N,N-디에틸아닐린, 4AA와 N-에틸-N-(3-메틸페닐)-N'-아세틸에틸렌디아민(이후부터는 "EMAE"로 칭한다) 따위가 일반적으로 색원체로서 사용된다.

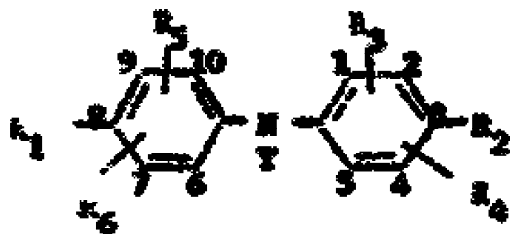
공지의 방법들을 이용할 수 있기는 하나, 감도가 우세하고 헤모글로빈, 빌리루빈, 요산과 같은 체내 성분들에 의하여 영향을 받지 않는 색원체가 요구되고 있다.

본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다. 다음 일반식(I) 또는 (II)중 하나로 표시되는 화합물이 색원체로서 탁월하다는 것이 발견되었다.

[일반식 1]



[일반식 2]



상기식에서 Y는 수소 또는 $\begin{array}{c} -C=Z \\ | \\ X \end{array}$ 를 나타내고, Z는 산소원자 또는 황원자를 나타낸다.

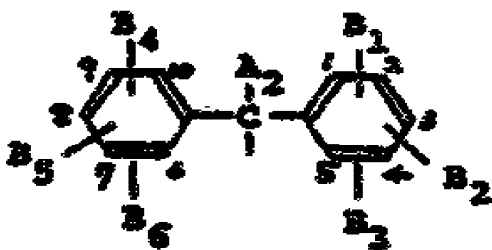
X는 수소, 알킬, 알케닐, 아릴, 아르알킬, 아미노 또는 치환된 아미노를 나타내며, R₁은 히드록시, 아미노 또는 치환된 아미노를 나타내고, R₂는 수소, 히드록시, 알킬, 알콕시, 아릴, 아르알킬, 알케닐, 아미노 또는 치환된 아미노를 나타내고, R₃는 이후에 기술할 일반식(III), (IV), (V), (VI) 또는 (VII)로 나타낸 군을 나타낸다.

R₄, R₅ 또는 R₆는 동일 또는 상이한 것으로, 수소, 알킬, 알케닐, 아실, 아릴, 아르알킬, 할로겐원자, 니트로, 술포, 카르복시, 히드록시, 알콕시 또는 일반식(III), (IV), (V), (VI) 또는 (VII)으로 표시되는 군을 나타낸다.

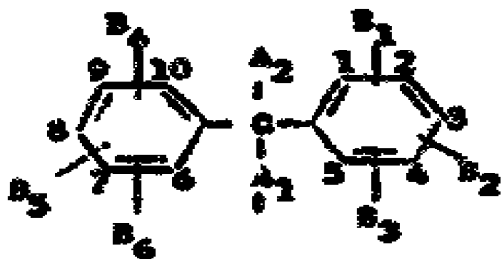


J는-S-, -O-일반식 또는 $\begin{array}{c} R_7 \quad R_8 \\ \diagdown \quad \diagup \\ -C- \end{array}$ 또는 $\begin{array}{c} R_7 \\ | \\ -N- \end{array}$ 를 나타내며, R₇과 R₈은 동일 또는 상이한 것으로 수소, 알킬 또는 알케닐을 나타내고 R₅와 R₆는 알케닐렌을 형성한다.

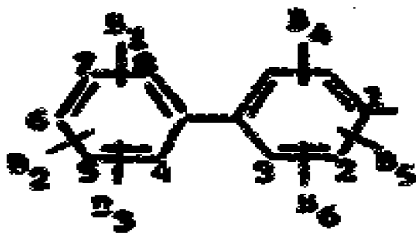
[일반식 3]



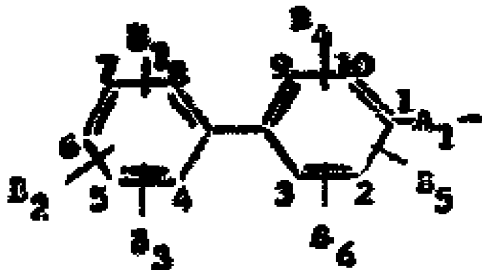
[일반식 4]



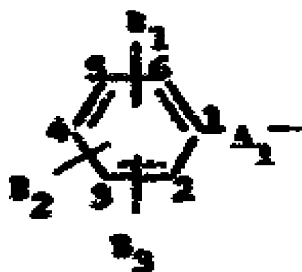
[일반식 5]



[일반식 6]



[일반식 7]



일반식에서 A₁은 알킬렌을 나타내고 A₂는 R₂와 같은 것을 의미한다.

B₁, B₂, B₃, B₄, B₅ 또는 B₆는 동일 또는 상이한 것으로 수소, 알킬, 알케닐, 아실, 아릴, 아르알킬, 할로겐원자, 니트로, 술포, 카르복시, 히드록시, 알콕시 또는 히드록시알킬을 나타낸다.

R₁과 R₂의 정의에서 치환된 아미노의 치환체로는 알킬, 알케닐, 아릴, 히드록시알킬, 시클로알킬, 아실, 아르알킬, 아실알킬, 카르복시, 알콕시, 술포, 술포알킬 등을 들 수 있다.

여기에 사용된 바로는 알킬은 메틸, 에틸, 프로필, 부틸과 같은 1 내지 5개의 탄소원자로 된 알킬을 포함하고 알케닐은 비닐, 프로필렌, 부틸렌과 같은 2 내지 5개의 탄소원자로 된 알케닐을 포함하며 알콕시는 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 부톡시와 같은 1 내지 5개의 탄소원자를 갖는 알콕시를 포함하고, 아릴은 페닐, 나프틸, 치환된 페닐을 포함하며, 치환된 페닐의 치환체는 1 내지 4개의 탄소원자로 된 알킬, 클로로원자, 브로모원자와 같은 할로겐, 아미노, 알콕시 카르보닐 아미노, 알콕시카르보닐 아미노알콕시, 알콕시, 아실을 포함한다.

치환된 페닐은 1 내지 5개의 치환체를 가질 수 있다. 아르알킬은 벤질과 같은 7 내지 10개의 탄소원자를 갖는 아르알킬을 포함하고 아실은 아세틸, 프로피오닐, 부티릴과 같은 2 내지 5탄소원자로 된 아실을 포함하며 할로겐은 플루오르 원자, 클로로원자, 브롬원자를 포함한다. 알케닐렌은 -CH=CH-CH=CH-, -CH=CH-CH₂-등과 같은 3-4 탄소원자를 갖는 알케닐렌을 포함한다.

본 발명에 따르면, 시료중 과산화수소는 과산화수소가 화합물(I) 또는 (II)와 반응하고 가시광선 또는 근자외선 영역의 색소의 최대 흡수파장에서 색소의 형성에 의하여 착색된 반응용액의 흡광도를 측정함으로써 측정할 수 있다.

본 발명의 원리는 과산화수소의 본 색원체와의 반응이 화학량론적으로 진행하여 색소를 형성하고 형성된 색소의 양은 시료중의 과산화수소의 양에 비례하는 사실을 근거로 한다.

본 발명을 수행할 때에는 화합물(I)이나 (II) 및 과산화수소는 과산화수소를 함유하는 시료나 또는 과산화 수소가 생성된 계(이후부터는 "H₂O₂-생성계"라 칭한다)에 가한다. 색소의 형성에 의하여 착색된 반응용액의 흡광도는 가시선 또는 적외선부근 영역, 600-900nm에서 측정한다.

한편 과산화수소의 양과 흡광도 사이의 관계를 나타내는 표준곡선은 시료로서 표준 과산화수소를 사용함으로써 별도로 작성한다. 시료내의 과산화수소의 양은 얻어진 흡광도를 표준곡선에 응용함으로써 산출한다.

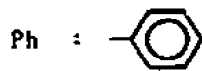
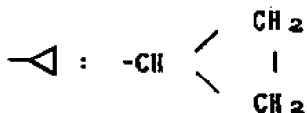
이 반응은 일반적으로 5-50℃의 온도, 바람직하게는 25-40℃의 온도에서 pH 2-10인 완충용액내에서 수행되며, 수분이 걸린후에 종결된다.

색원체는 과산화수소와 동량으로 또는 보다 과량으로, 바람직하게는 10-1000몰 당량으로 사용된다. 과산화효소는 0.1-1000 IU/ml의 농도로 사용된다.

완충제로서는 Good 완충제인, 산염 완충제, 트리스-HCl 완충제, 숙신산염 완충제, 구연산염 완충제, 아세트산염 완충제 등이 0.005-2몰/l의 농도로 사용될 수 있다. 과산화효소를 활성화시키거나 또는 안료형성 반응을 촉진하기 위하여 소량의 페놀이나 EMAE를 반응계에 가할 수 있다.

본 발명에서 사용된 색원체의 예가 표1과 2에 기재되어 있는바, 여기에서 기호는 다음과 같은 의미를 갖는다.

P : 화합물의 구조, D : $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, M : CH_3 , α_1 : $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, E : C_2H_5 , α_2 : $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$.



화합물에서 R_4 , R_6 , B_2 , B_3 , B_5 , B_6 은 수소를 표시한다. 표1에서 Y는 H를 뜻하고 표2에서는 ---C(=O)--- 를 뜻한다. 화합물 No. 18, 19에서 J는-S-를 뜻한다.

[표 1]

| 화합물번호 | P | R_1 | R_2 | R_3 | R_4 | A_1 | A_2 | B_1 | B_2 |
|-------|----|-----------------|-----------------|-------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|
| 1 | II | NM ₂ | NM ₂ | III | III | - | H | Cl | H |
| 2 | " | " | " | " | " | - | " | F | " |
| 3 | " | " | " | " | " | - | " | H | " |
| 4 | " | " | " | " | " | - | " | OM | OM |
| 5 | " | " | " | " | " | - | " | Cl | Cl |
| 6 | " | " | " | " | " | - | " | F | F |
| 7 | " | " | " | " | " | - | " | NM ₂ | NM ₂ |
| 8 | " | " | " | " | H | - | " | Cl | Cl |
| 9 | " | NH ₂ | NH ₂ | " | III | - | " | H | H |
| 10 | " | NM ₂ | NM ₂ | IV | H | CH ₂ | H | Cl | Cl |
| 11 | " | " | " | " | " | " | M | " | " |
| 12 | " | " | " | VI | VI | " | - | H | H |
| 13 | " | " | " | III | H | - | \triangle | " | " |
| 14 | " | " | " | " | " | - | α_1 | " | " |
| 15 | " | " | " | VII | " | α_1 | - | " | - |
| 16 | " | " | " | " | VII | CH ₂ | - | Cl | - |
| 17 | " | " | " | " | " | " | - | BY | - |
| 18 | I | " | " | III | H | - | H | Cl | Cl |
| 19 | " | " | " | " | NO ₂ | - | " | " | " |
| 20 | II | NH ₂ | OH | " | H | - | " | " | " |
| 21 | " | " | OM | " | " | - | " | " | " |
| 22 | " | " | " | " | " | - | " | F | F |
| 23 | II | NH ₂ | OH | III | H | - | H | F | F |
| 24 | " | " | NH ₂ | " | III | - | " | Cl | Cl |
| 25 | " | " | " | " | " | - | " | F | F |
| 26 | " | " | " | " | " | - | " | H | Cl |
| 27 | " | " | " | " | " | - | " | " | F |
| 31 | " | ND ₂ | ND ₂ | " | " | - | " | H | H |
| 32 | " | " | " | " | " | - | " | Cl | Cl |
| 33 | " | NHD | NHD | " | " | - | " | H | H |
| 34 | " | " | " | " | " | - | " | Cl | Cl |

[표 2]

| 화합물번호 | P | J | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | A ₂ | B ₁ | B ₄ |
|-------|----|---|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 28 | II | - | NM ₁ | NM ₂ | III | III | H | Cl | Cl |
| 29 | I | S | // | // | // | H | // | // | // |
| 30 | I | O | NE ₁ | NE ₂ | // | // | // | // | // |

일반식(II)로서 표시되는 색원체내의 R₃과 R₅는 각각 2-위치와 9-위치에 위치한다. 일반식(I)로 표시되는 색원체중의 R₃과 R₅는 각각 1-위치와 8-위치에 위치한다.

화합물 No.16과 No.17에서 B₁은 4-위치에 위치하고, 기타 색원체에서 B₁은 H를 나타내지 않는 경우에는 3-위치에 위치하고, B₄는 H를 나타내지 않는 경우 8-위치에 위치한다.

표1 및 2에 표시된 화합물과 색현상도에 관한 공지된 화합물등과의 사이의 비교시험은 다음 방법에 따라서 행하여진다.

10U/ml 과산화효소를 함유하는 Good 완충용액 (pH 6.5), 0.001mg/ml 페놀, 0.1mg/ml 트리톤 X-00, 0.1mg/ml 화합물(I) 또는 (II)를 준비한다. 3ml 용액을 20μl의 10.33mg/dl H₂O₂ 용액에 첨가하여 이 혼합물을 반응시킨다.

λ_{max}에서 반응용액의 OD값을 측정한다. 그 결과는 표3에 표시되어 있으며 4AA-EMAE를 100으로 사용함에 의해 얻어진 OD값을 규정하는 것이다. 빌리루빈, 시스테인 및 요산과 같은 혈청속의 성분의 효과는 샘플속에 20μg/3ml 빌리루빈, 20μg/3ml 시스테인 또는 10μg/3ml 요산이 있는 상태로 측정한다. 부호"±"는 효과가 3 내지 6%, "+"는 효과가 6 내지 20%, "++"는 효과가 20%이상, "-"는 효과가 3%이하를 의미한다.

시약이 없는 색현상도는 대표적인 로이코빈트 쉘러의 로이코 빈트쉘러 그린(Leuco Bindschedler, s Green : LBG)을 색원체로서 사용함에 의해 얻어진 색현상도와 비교하여 표시된다.

"AA"는 색현상도가 매우 낮은 것을 의미한다. "A"는 색현상도가 낮은 것을, "B"는 LBG의 색현상도와 동일한 것을 의미한다.

감도가 높고, 시약이 없는 색현상도가 낮기 때문에 수소공여체로서의 색원체는 더욱 좋으며, 성분의 흔적량도 색원체를 사용함에 의해 측정할 수 있다.

[표 3]

| 화합물번호 | λ_{\max} (nm) | S | F | | | RB |
|-----------------|-----------------------|-----|----|----|----|----|
| | | | B | CY | U | |
| 1 | 747 | 390 | ± | ± | ± | A |
| 2 | 740 | 395 | ± | ± | ± | A |
| 3 | 735 | 380 | — | — | — | AA |
| 4 | 700 | 150 | + | + | ± | AA |
| 5 | 755 | 400 | — | — | — | AA |
| 6 | 745 | 400 | — | — | — | AA |
| 7 | 520 | 360 | ± | ± | ± | AA |
| 8 | 750 | 350 | // | // | ± | A |
| 9 | 720 | 200 | // | + | + | A |
| 10 | 728 | 400 | // | + | + | A |
| 11 | 690 | 200 | // | + | + | A |
| 12 | 733 | 410 | // | + | ± | AA |
| 13 | 728 | 370 | // | + | // | A |
| 14 | 725 | 360 | // | + | // | A |
| 15 | 747 | 390 | // | ± | // | B |
| 16 | 737 | 380 | // | + | // | A |
| 17 | 735 | 370 | ± | ± | ± | A |
| 18 | 680 | 700 | // | // | // | B |
| 19 | 670 | 400 | // | // | // | B |
| 20 | 700 | 200 | // | // | // | A |
| 21 | 690 | 160 | // | // | // | A |
| 22 | 723 | 310 | // | // | // | A |
| 23 | 715 | 150 | // | // | // | A |
| 24 | 708 | 270 | — | — | — | AA |
| 25 | 700 | 270 | — | — | — | AA |
| 26 | 710 | 250 | — | ± | — | AA |
| 27 | 715 | 260 | — | ± | — | AA |
| 28 | 755 | 395 | ± | ± | ± | AA |
| 29 | 680 | 700 | ± | ± | ± | B |
| 30 | 685 | 690 | ± | ± | ± | B |
| 31 | 760 | 350 | — | — | — | AA |
| 32 | 770 | 350 | — | — | — | AA |
| 33 | 710 | 320 | — | — | — | A |
| 34 | 720 | 320 | — | — | — | A |
| RE ₁ | 728 | 410 | + | + | + | B |
| RE ₂ | 555 | 100 | ++ | +- | ++ | A |

RE₁ : LBG, RE₂ : 4AA-EMAE, S : 강도, F : 혈청에서 어떤 성분의 효과, B : 빌리루빈, CY : 시스테인, U : 요산, RB : 시약이 없을때의 색현상도.

본 발명에 쓰이는 색원체는 황산 첨가하에서 디페닐아민, 티아진 색소나 옥사진 색소와 벤즈히드롤과의 환원반응에 의해 얻어지는 류코 염기의 축합반응에 의해 얻어진다. 축합반응은 30-100℃에서 1-100시간동안 수행한다. 반응혼합물을 n-옥타놀과 같은 소량의 색원체를 결정화할 수 있는 유기용제에 첨가한다. 조(粗)결정을 메탄올과 같은 유기용제에 용해하고, 그 용액은 실리카겔을 사용하여 칼럼 크로마토그래피로 처리하여 원하는 화합물을 회수한다.

표1 및 2에 나타난 화합물의 생성방법을 아래에 설명한다. (1) 화합물 No.(1-7, 12, 16 및 17)의 생성.

빈트체들러스 그린 류코염기 [4,4'-비스(디메틸 아미노)다이페닐아민] 과 (이하부터 "BGLB"로 언급될것임)과 하기 각 화합물을 1 : 2의 몰비로 류코염기를 기본으로 하여 5배의 양으로 60% 황산에 가

한다.

이 혼합물을 교반하면서 2-3시간동안 80℃에서 반응시킨다. 반응혼합물을 n-옥탄올에 가하여 원하는 생성물을 결정시키고, 조결정을 소량의 메탄올에 용해시킨다. 메탄올은 실리카겔을 사용하여 칼럼 크로마토그래피처리를 한다. 용리는 클로로포름/n-헥산=2/1로 수행한다. 원하는 화합물을 함유하는 분별물들은 수집하여, 농축 건조시켜서 원하는 화합물을 얻는다.

| 화합물번호 | 용점(℃) | 반 응 물 |
|-------|---------|------------------|
| 1 | 102-105 | 4-클로로벤조히드롤 |
| 2 | 98-101 | 4-플루오로벤조히드롤 |
| 3 | 120-123 | 벤조히드롤 |
| 4 | 152-155 | 4,4'-디메톡시벤조히드롤 |
| 5 | 184-187 | 4,4'-디클로로벤조히드롤 |
| 6 | 111-114 | 4,4'-디플루오로벤조히드롤 |
| 7 | 89- 92 | 4,4'-디에틸아미노벤조히드롤 |
| 12 | 108-111 | 4-비페닐에탄올 |
| 16 | 95- 98 | P-클로로벤질알코올 |
| 17 | 104-107 | P-브로모벤질알코올 |

(2) 화합물 No.8, 10, 11 및 13-15의 생성.

BGLB와 다음 화합물을 10 : 1의 몰비율로 50℃에서 반응시키는 것을 제외하고는 상기(1)항에 기술된 것과 동일한 과정을 반복한다.

| 화합물번호 | 용점(℃) | 반 응 물 |
|-------|---------|-----------------------|
| 8 | 78- 81 | 4,4'-디클로로벤조히드롤 |
| 10 | 131-133 | 2,2'-비스(P-클로로페닐)-에탄올 |
| 11 | 128-131 | 2,2'-비스(P-클로로페닐)-프로판올 |
| 13 | 82- 85 | 시클로프로필-벤조히드롤 |
| 14 | 84- 87 | 1,1'-디페닐부탄올 |
| 15 | 172-175 | 1-페닐부탄올 |

(3) 화합물 No.9와 24-27의 생성.

4,4'-디아미노-디페닐아민의 황산염이 디페닐메탄올, 4,4'-디클로로벤조히드롤, 4,4'-디플루오로벤조히드롤, 4-클로로벤조히드롤 혹은 4-플루오로벤조히드롤과 반응되는 것을 제외하고는 상기 (1)에서 기술한 동일한 과정을 반복하여 각기 158-16℃, 173-175℃, 82-92℃, 155-158℃ 및 104-106℃의 용점을 갖는 원하는 화합물을 얻었다.

(4) 화합물 No.18과 19의 생성.

메틸렌 블루(C.I 52015) 혹은 메틸렌 그린(C.I 52020)의 환원반응에 의해 얻어지는 화합물들과 4,4'-디클로로벤조히드롤과의 반응이 10 : 1의 몰비율로 50℃에서 수행되는 것을 제외하고는 상기 (1)에서 기술한 것과 동일한 과정을 수행하여 용점이 각각 179-180℃ 및 148-151℃인 원하는 화합물을 얻는다.

(5) 화합물 No.29의 생성.

벤조일 류코 메틸렌 블루와 4,4'-디클로로벤조히드롤과의 반응이 10 : 1의 몰비율로 50℃에서 수행되는 것을 제외하고는 상기(1)에서 기술되어 있는 것과 같은 과정을 반복하여 화합물 No.29(용점 212-215℃)를 얻는다.

(6) 화합물 No.28의 생성.

화합물 No.5와 페닐 이소-시아네이트와의 반응을 디메틸 포름아미드(DMF)내에서 50℃온도로 3일간 행하는 것 이외에는 상기 (1)항과 같은 과정을 반복하여 화합물 No.28(용점 196-200℃)을 얻는다.

(7) 화합물 No.30의 생성.

몰비 10 : 1로 소듐 보로하이드라이드와 4,4'-디클로로벤조히드롤을 사용하여 베이식 블루(Basic Blue, C.I. 51004)를 환원함에 의해 얻어진 화합물을 60% 황산에 가한다. 이 혼합물을 50℃ 온도에서 반응시키고 상기(1)항과 같은 정제방법을 반복한다. 얻어진 화합물과 이소-시아나산을 등몰량으로 DMF에 가하고 이혼합물은 50℃ 온도에서 3일간 반응시킨다. 상기(1)항과 동일한 정제방법을 반복하여 화합물 No.30(용점 118-120℃)을 얻는다.

(8) 화합물 No.20과 No.23의 생성.

P-(P-아미노 아닐리노)-페놀을 4,4'-디클로로벤조하이드롤(No.20) 혹은 4,4'-디플루오로벤조하이드롤(No.23)과 10 : 1의 몰비로 온도 50℃에서 60% 황산용액에서 반응시키는 것 이외에는 상기(1)항과 같은 과정을 반복하여 각각 화합물 No.20(용점 89-91℃)나 또는 화합물 No.23(용점 121-123℃)을 얻는다.

(9) 화합물 No.21과 No.22의 생성.

바리아민블루 하이드로클로라이드를 4,4'-디클로로벤조하이드롤(No.21) 혹은 4,4'-디플루오로벤조하이드롤(No.22)과 10 : 1의 몰비로 온도 50℃에서 60% 황산용액에서 반응시키는 것 이외에는 상기(1)항과 같은 과정을 반복하여 각각 화합물 No.21(용점 118-120℃)나 또는 화합물 No.22(용점 121-123℃)을 얻는다.

드롤(No.22)과 함께 10 : 1의 몰비로 온도 50℃에서 60% 황산용액에서 반응시키는 것 이외에는 상기 (1)항과 같은 과정을 반복하여 각각 화합물 No.21(융점 163-165℃)와 화합물 No.22(융점 158-160℃)를 얻는다.

(10) 화합물 No.31-34의 생성.

4,4'-디아미노-디페닐아민 설페이트와 프로판 술포를 1 : 20의 몰비율로 클로로포름에 가하고, 이 혼합물을 온도 50℃에서 5-7일 동안 교반하면서 반응시킨다.

반응혼합물과 동일한 양의 증류수를 반응혼합물에 가한다.

격렬히 교반한 후 물층을 분리하여 농축 건조시킨다. 이 건조된 물질과 벤즈히드롤(No.31,33) 혹은 4,4'-디클로로벤즈하드롤(No.32,34)을 2 : 1의 중량비율로 60% 황산용액에 가한다. 이 혼합물을 80℃ 온도에서 2 내지 3시간동안 교반하면서 반응시킨다. 극성이 다른 용제를 사용하는 것 이외는 상기(1)항과 같은 정제과정을 반복한다. 클로로포름으로부터 용리가 시작된다. 화합물 No.33 혹은 No.34는 저극성의 용제가 사용될때 얻어진다. 그 다음 화합물 No.31 혹은 No.32가 얻어진다.

융점 화합물 No.31

93-95℃

화합물 No.32

78-82℃

화합물 No.33

62-65℃

화합물 No.34

45-48℃

본 방법은 H₂O₂-생성시스템에서 반응물 또는 효소활성의 측정에 이용될 수 있다.

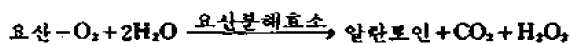
특히 시스템이 효소반응일때, H₂O₂-생성시스템과 색소가 생성되는 시스템(이후부터는 색소-생성시스템으로 칭한다)이 같은 시스템에서 동시에 진행되고 그렇기 때문에 이 방법은 간단하며 편리하다.

이러한 효소반응은 산화효소와 그 기질과의 결합을 포함하며, 그 결합의 예로는 요산-요산분해효소, 콜레스테롤-콜레스테롤 산화효소, 콜레스테롤 에스테르-콜레스테롤 에스테라제와 콜레스테롤 산화효소, 크산틴, 히폭산틴 또는 구아닌-크산틴 산화효소, 포스폴리파제 디-레시틴-콜린 산화효소, 콜린-콜린산화효소피루브산-피루브산 산화효소-인산, 트리글리세리드-리포프로테인 리파제-ATP-글리세린 키나제-글리세린-3-인산염 산화효소, 지방산-조효소 A-아실 CoA 합성효소-아실 CoA 산화효소, 트리글리세리드-리포제-글리세롤 산화효소, 글루코스-글루코스 산화효소 그리고 갈락토즈-갈락토즈 산화효소와의 결합이다.

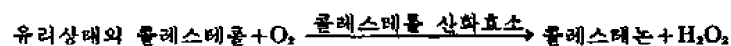
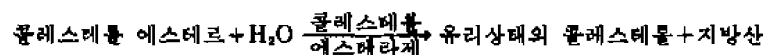
이들 효소반응의 기질은 혈청, 요소등에 들어있으며 이들 기질측정은 진단목적으로 유용하다.

효소반응의 개략적인 예들은 다음과 같다.

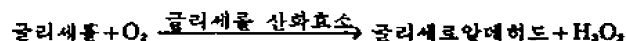
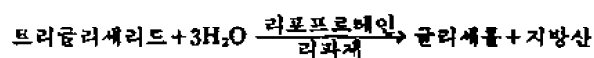
1. 요산



2. 총 콜레스테롤



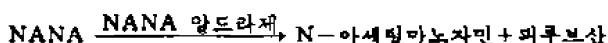
3. 트리 글리세리드



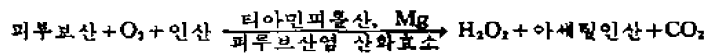
4. 유리상태의 지방산



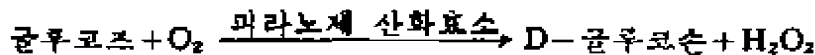
5. 시알산



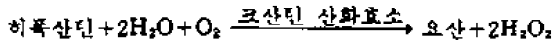
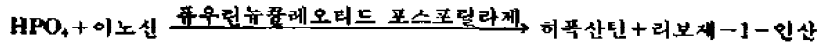
6. 피루브산



7. 글루코즈



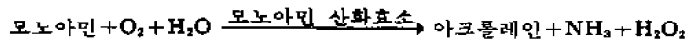
8. 무기인



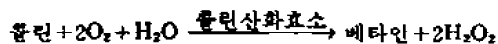
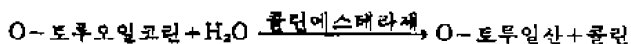
9. 포스폴리피드



10. 모노아민 산화효소



11. 콜린에스테라제



과산화수소 생성반응 및 색소 생성반응은 단계적으로 수행될 수가 있고, 또 바람직하게는 과산화수소의 측정은 시료에 과산화수소의 측정에 필요한 모든 성분을 첨가하여 모든 반응은 하나의 단계에서 일으키고 그 반응용액의 흡광도를 측정함으로써 수행된다.

그 성분은 측정될 기질에 대한 산화효소, 과산화효소, 화합물(I) 또는 (II)이다. 필요하다면 완충용액 또는 표면활성제를 첨가해도 좋다. 물론 기질용산화효소에 추가하여 기질을 산화시키기 위한 성분이 필요하다면 그러한 성분도 생성계에 첨가하여야 한다.

본 발명의 또다른 국면은 과산화수소의 측정을 위한 시험 조성물을 제공하는 것이며, 그것은 측정될 기질용 산화효소, 식(I) 또는 (II)으로써 표시되는 색원체 및 과산화효소으로써 이루어진다. 필요에 따라서는 그 조성물은 또한 완충시약은 물론 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 같은 표면활성제나 나트륨 아지드와 같은 방부제, 아스코르브산을 분해하기 위한 아스코르베이트 옥시다제 등을 포함할 수가 있다. 또한 그 조성물은 기질용산화효소가 아닌 과산화수소 생성에 필요한 성분을 포함할 수도 있다.

하기의 대표적인 예로써 본 발명에 관한 특정실시예를 설명하고자 한다.

[실시예 1]

본 실시예에서는 18U의 요산 분해효소, 100U의 과산화효소, 100mg의 트리톤 X-100, 0.1mg의 페놀 및 (A) 100mg의 4AA 및 100mg의 EMANE, (B) 50mg의 LBG, (C) 22.5mg의 화합물 No.3, (D) 22.5mg의 화합물 No.5, (E) 22.5mg의 화합물 No.6, (F) 22.5mg의 화합물 No.32 또는 (G) 22.5mg의 화합물 No.33을 50mM GOOD 완충용액(pH 6.5) 100ml에 용해시켜서 시약용액을 만들었다. 시험 튜브에 20μl의 혈청과, 3ml의 시약용액을 붓고 그 혼합물을 37℃를 유지하면서 10분간 반응하기 위하여 배양하였다. λ_{max}에서 사조규준으로써의 시약을 사용 않고 각 반응용액의 흡광도를 측정하였다. 요산의 혈청내 농도는 사전에 작성된 검량곡선을 사용해서 계산하였다.

비교를 위해서, 동일한 시료를 요산분해효소의 자외선 스펙트럼 분광 광도 분석방법으로써 분석하였다. 그 분석결과는 표4와 같다.

[표 4]

| 혈청번호 | 사조물질 | 요 산 량 (mg/dl) | | | | | | |
|------|------|---------------|------|------|------|------|------|------|
| | | A | B | C | D | E | F | G |
| 1 | 5.7 | 5.9 | 5.0 | 5.7 | 5.6 | 5.7 | 5.7 | 5.6 |
| 2 | 2.8 | 3.8 | 4.0 | 2.9 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.8 |
| 3 | 11.0 | 9.2 | 12.8 | 11.0 | 11.0 | 11.0 | 11.1 | 11.1 |
| 4 | 4.0 | 5.8 | 4.9 | 4.1 | 4.1 | 3.9 | 4.0 | 3.9 |
| 5 | 6.2 | 6.5 | 6.5 | 6.1 | 6.1 | 6.3 | 6.1 | 6.0 |

[실시에 2]

본 실시예에서는 15U의 콜레스테롤 산화효소, 20U의 콜레스테롤 에스테라제, 150U의 과산화효소, 100mg의 트리톤 X-100, 0.1mg의 페놀과 실시예1의 색원체(A-G)를 50mM Good 완충용액(pH 5.8)에 녹여서 시약용액을 준비하였다. 혈청 10 μ l과 시약용액 3ml을 시험관에 부어서 이 혼합물을 37℃에서 10분동안 반응을 위해 항온처리하였다. λ_{max} 에서 반응용액의 흡광도를 사조규준으로서 시약을 사용하지 않고 측정하였다. 혈청에서 콜레스테롤의 농도를 앞서 준비된 검량곡선을 사용하여 산출하였다.

비교용으로 같은 시료를 가스 크로마토그래피방법(GC)에 따라 분석하였다. 그 결과를 표 5에 나타낸다.

[표 5]

| 혈청번호 | 콜레스테롤 함량(mg/dl) | | | | | | | |
|------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | GC | A | B | C | D | E | F | G |
| 1 | 92 | 82 | 102 | 90 | 91 | 89 | 89 | 93 |
| 2 | 243 | 243 | 230 | 249 | 242 | 241 | 241 | 242 |
| 3 | 100 | 90 | 115 | 99 | 100 | 98 | 100 | 100 |
| 4 | 178 | 169 | 193 | 178 | 176 | 179 | 177 | 178 |
| 5 | 112 | 120 | 140 | 111 | 111 | 112 | 111 | 112 |

[실시에 3]

본 실시예에서는 9U의 아실 Co A 합성효소, 57U의 아실-Co A 산화효소, 833U의 과산화효소, 200mg의 ATP, 27mg의 Co A, 70mg의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 100mg Triton X-100, 0.1mg의 페놀과 실시예1에서 사용된 색원체(A-G)를 0.1M Good 완충용액(pH 6.75) 100ml에 녹여서 시약용액을 준비하였다. 20 μ l의 혈청시료를 3ml의 시약용액에 첨가하고 혼합물을 37℃에서 10분동안 반응시켰다. λ_{max} 에서 반응용액의 흡광도를 사조규준으로서 시약을 사용하지 않고 측정하고, 혈청에서 유리지방산의 농도를 검량곡선으로 산출하였다. 비교용으로서, 같은 시료를 가스 크로마토그래피방법(GC)에 따라 측정하였으며 그 결과를 표6에 나타낸다.

[표 6]

| 혈청번호 | 유리지방산 함량(mg/dl) | | | | | | | |
|------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | GC | A | B | C | D | E | F | G |
| 1 | 80 | 53 | 102 | 82 | 80 | 79 | 79 | 81 |
| 2 | 115 | 180 | 160 | 115 | 118 | 116 | 114 | 115 |
| 3 | 102 | 42 | 200 | 101 | 100 | 101 | 102 | 101 |
| 4 | 258 | 290 | 235 | 250 | 261 | 269 | 269 | 267 |
| 5 | 180 | 300 | 220 | 180 | 179 | 179 | 181 | 179 |

[실시에 4]

본 실시예에서는 140mg의 인산2수소칼륨을 함유하는 100ml의 완충용액, 23mg의 디아민 피로인산, 27mg의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 300U의 피루브산염 산화효소, 100U의 과산화효소, 100mg의 트리톤 X-100, 0.1mg의 페놀 및 (A) 100mg의 4AA와 100mg EMAE, (B) 50mg의 LBG, (C) 22.5mg의 화합물 No.5, (D) 22.5mg의 화합물 No.24, (E) 22.5mg의 화합물 No.25, (F) 22.5mg의 화합물 No.26 또는 (G) 22.5mg의 화합물 No.27을 시약용액으로서 준비하였다. 50 μ l 혈청샘플에 3ml의 시약용액을 가하여 혼합물을 37℃에서 10분동안 반응시켰다. λ_{max} 에서 반응용액의 흡광도를 사조규준으로서 시약을 사용하지 않고 측정하였다. 시료에서 피루브산염의 농도를 검량곡선으로 산출하여 그 결과를 표7에 나타낸다. 비교용으로 같은 시료를 유산 탈수소효소를 사용하여 UV 방법으로 측정하였다.

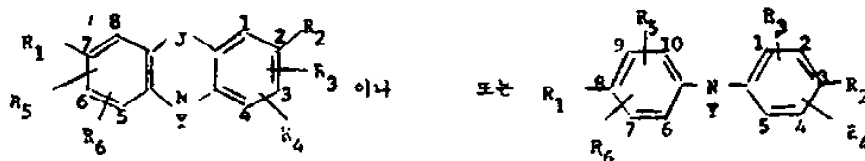
[표 7]

| 시료번호 | 과산화수소 함량(mg/g) | | | | | | | |
|------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | UV | A | B | C | D | E | F | G |
| 1 | 0.38 | 0.53 | 0.69 | 0.38 | 0.35 | 0.35 | 0.37 | 0.35 |
| 2 | 0.91 | 1.81 | 0.76 | 0.33 | 0.99 | 0.91 | 0.91 | 0.89 |
| 3 | 0.55 | 0.22 | 1.10 | 6.57 | 0.53 | 0.97 | 0.85 | 0.53 |
| 4 | 0.72 | 1.91 | 1.31 | 0.79 | 0.71 | 0.70 | 0.74 | 0.79 |
| 5 | 0.50 | 0.63 | 0.33 | 0.49 | 0.49 | 0.50 | 0.48 | 0.52 |

(57) 청구의 범위

청구항 1

과산화수소와 다음 일반식



으로 표시되는 색원체와를 과산화수소의 존재하에 반응시키고, 가시선 또는 적외선 근방에서 반응용액의 흡광도를 측정하는 것으로 구성되는 것을 특징으로 하는 시료내의 과산화수소를 측정하는

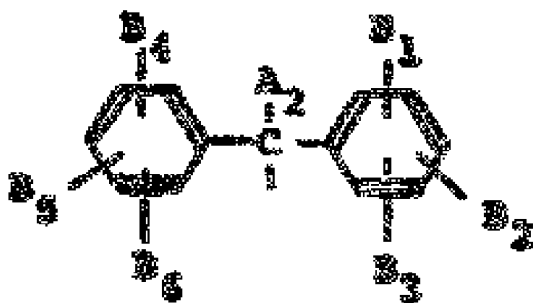


방법. 상기식에서 Y는 수소 또는 $\begin{array}{c} -C=Z \\ | \\ X \end{array}$ 를 나타내고 Z는 산소원자나 유황원자를 나타내고, X는 수소, 알킬, 알케닐, 아릴, 아르알킬, 아미노 또는 치환된 아미노이고, R₁은 하이드록실, 아미노 또는 치환된 아미노이고, R₂는 수소, 하이드록실, 알킬, 알콕시, 아릴, 아르알킬, 알케닐, 아미노 또는 치환된 아미노이고, R₃는 다음에 나타내는 일반식(III), (IV), (V) 또는 (VI)으로 표시되는 기이고, R₄, R₅ 또는 R₆는 동일 또는 상이한 것으로서 수소, 알킬, 알케닐, 아실, 아릴, 아르알킬, 할로겐원자, 니트로, 설포, 카복실, 하이드록실, 알콕시 또는 일반식(III), (IV), (V) 또는 (VI)으

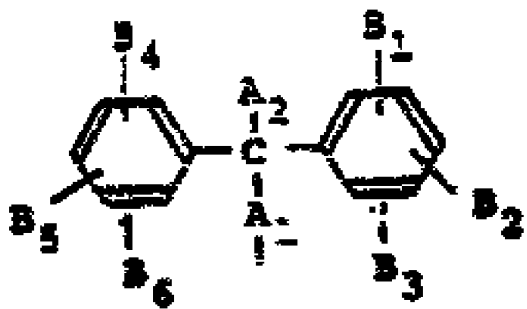


로 표시되는 기를 나타내며, J는-S-, -O-, 일반식 $\begin{array}{c} R_7 \\ | \\ -C- \\ | \\ R_8 \end{array}$ 또는 일반식 $\begin{array}{c} R_7 \\ | \\ -N- \end{array}$ 이고, R₇과 R₈은 동일 또는 상이한 것으로 수소원자, 알킬 또는 알케닐이며, R₅와 R₆는 알케닐렌을 형성할수 있다.

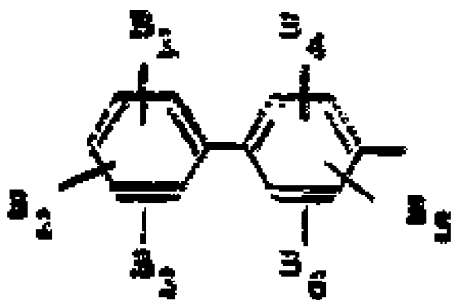
[일반식 III]



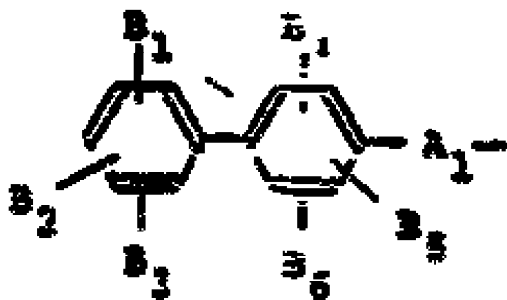
[일반식 IV]



[일반식 V]



[일반식 VI]



상기 식에서 A_1 은 알킬렌을 나타내고, A_2 는 R_2 의 의미와 같고, B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , B_5 또는 B_6 는 동일 또는 상이한 것으로 수소원자, 알킬, 알케닐, 아실, 아릴, 아르알킬, 할로겐원자, 니트릴, 설폰, 카르복실, 하이드록실 알콕시 또는 하이드록시 알킬을 나타낸다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 과산화수소가 효소반응으로 형성된 생성물인 것을 특징으로 하는 과산화수소의 측정방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 효소반응이 산화효소를 사용하는 기질의 산화반응인 것을 특징으로 하는 과산화수소의 측정방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 산화효소가 요산분해효소, 콜레스테롤 산화효소, 크산틴 산화효소, 콜린 산화효소, 피루브산염 산화효소, 글리세린-3-포스페이트 산화효소, 아실 Co A 산화효소, 글리세롤 산화효소, 글루코오즈 산화효소 및 갈락토오즈 산화효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 과산화수소의 측정방법.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 상기의 과산화수소-생성반응과 과산화수소와 색원체와의 반응이 동시에 수행되는 것을 특징으로 하는 과산화수소의 측정방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 이 반응이 완충용액내에서 수행되는 것을 특징으로 하는 과산화수소의 측정방법.

청구항 7

제 1 항에 정의한 색원체와 과산화효소로 구성되는 것을 특징으로 하는 과산화수소 측정용 시험조성

물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 조성물이 완충시약을 더 함유하는 것을 특징으로 하는 시험조성물.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 조성물이 계면활성제, 방부제 및 아스코르브산염 산화효소로 구성되는 군으로부터 선택된 한 성분을 더욱 함유하는 것을 특징으로 하는 시험조성물.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 조성물이 효소성 과산화수소-생성계를 더 함유하는 것을 특징으로 하는 시험조성물.

청구항 11

제 7 항에 있어서, 상기 계가 산화효소를 함유하는 것을 특징으로 하는 시험조성물.