

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ G01N 33/68	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	1999년 11월 15일 10-0231078 1999년 08월 26일	
(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-1992-0009663 1992년 06월 04일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	특 1993-0000953 1993년 01월 16일
(30) 우선권주장 (73) 특허권자	7/710,953 1991년 06월 06일 미국(US) 마일즈 인코포레이티드 프랭클린 이. 브레켈리지		
(72) 발명자	미합중국 인디애나 46514 엘크하트 머틀 스트리트 1127 폴에프. 코레이 미합중국 인디애나 46514 엘크하트 스프링브룩 드라이브 1535 안젤라에이. 마이클즈 미합중국 인디애나 46515 엘크하트 브라이어우드 드라이브 23789 로날드지. 서머 미합중국 인디애나 46514 엘크하트 멀 드라이브 55745 이병호		
(74) 대리인	이병호		

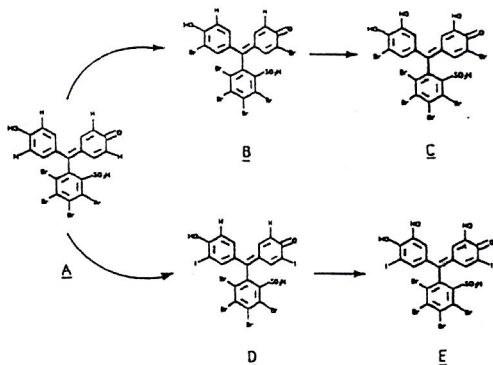
심사관 : 김호석

(54) 단백질 검출용 분석 시험 스트립 및 이를 사용하는 단백질 검출방법

요약

본 발명은 단백오차 지시제의 신규 배합물을 함유하는, 생물학적 샘플중의 단백질을 검출하기 위한 분석 시험 스트립을 제공한다. 본 발명은 B 및 /C 환에 니트로 또는 니트로소 치환체 그룹을 갖는 부분적으로 할로겐화된 페놀설포프탈레인 단백오차 지시제 및 메로시아닌 단백오차 지시제를 배합물로서 함유한다.

대표도



니트로소 치환된 페놀설포프탈레인 단백오차 지시제를 합성하기 위한 공정의 개략도

명세서

[발명의 명칭]

단백질 검출용 분석 시험 스트립 및 이를 사용하는 단백질 검출방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 니트로소 치환된 페놀설포프탈레인 단백오차 지시제(protein error indicator)를 합성하기 위한 공정의 개략도이다.

제2도는 니트로 치환된 페놀설포프탈레인 단백오차 지시제를 합성하기 위한 공정의 개략도이다.

제3도는 메로시아닌 단백오차 지시제를 합성하기 위한 공정의 개략도이다.

제4도는 5', 5"-디니트로-3', 3"-디요오드-3, 4, 5, 6-테트라브로모페놀설포프탈레인(D1DNTB), 1-(ω-설포프로필)-2-(4'-하이드록시-3', 5'-디요오도스티릴)-3, 3-디메틸인돌레닌 베타인(STD1B), 및 분자량이 2000인 폴리프로필렌 글리콜(-△-)로 함유된 분석용 스트립(strip)의 용량 반응 곡선 및

알부스틱스(Albustix)(-■-)로 함침된 분석용 스트립의 용량 반응 곡선을 나타낸 것이다.

제5도는 각각 DIDNTB 및 SPD1B(-■-) 단독, DIDNTB, SPD1B 및 페노일(Fenol) D 4030(-▣-), DIDNTB, SPD1B 및 P-2000(-□-), DIDNTB, SPD1B 및 KOK10,071(-▤-) 및 DIDNTB, SPD1B 및 루타놀(Lutanol) 130(-▥-)으로 함침된 분석 시험 스트립들의 용량 반응을 나타낸 막대 그래프이다.

[발명의 상세한 설명]

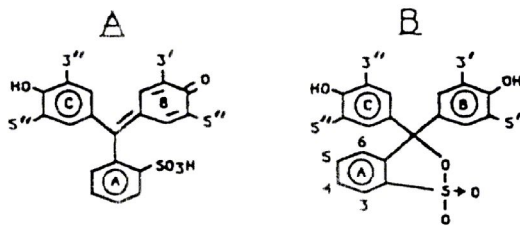
본 발명은 일반적으로 단백질의 검출에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신규한 단백오차 지시제를 사용하여 생물학적 샘플중의 단백질을 측정하는 신규한 방법에 관한 것이다.

생물학적 샘플중의 단백질의 존재여부를 측정하는 것은 신장, 순환계 및 중추 신경계에 침범하는 수개의 병적인 상태를 진단하는데 있어 가장 중요하다. 종종, 뇨(urine)중 단백질(알부민)을 질적 및 양적으로 측정하는 것이 필요하다. 이것은 특히 당뇨병 및 신장 질환의 진단에 있어 중요하다. 당뇨병에서 우세한 단백질은 알부민이므로, 단백질 뇨 시험을 위한 모델 시스템은 알부민이다.

뇨중의 알부민의 존재여부를 측정하는 방법은 익히 공지되어 있다. 알부민 측정을 위한 가장 저렴하고 통상적인 방법은 소량의 뇨로 시험지 스트립을 적시는 것을 포함한다. 시험 스트립은 단백오차 지시제로 함침시킨다. 샘플에 알부민이 있을 경우, 시험 스트립은 단순한 색 변화에 의해 이를 지시할 것이다. 관찰되는 색은 샘플에 있는 알부민의 농도에 따라 다양할 수 있다. 이러한 가변적인 색변화는 샘플에 있는 알부민의 양을 측정하는데 사용된다.

상기 유형의 시험지를 정확하게 사용하기 위해서는 최소한의 훈련이 요구된다. 이러한 시험 스트립은 단백질을 측색에서 측정하기 위한, 정확하고 편리하며 신속한 비이클(vehicle)을 제공한다. 이와 같은 시험지는 전문가에 의해 임상적 실험에서 뿐만 아니라, 의사에 의해 병원에서 널리 사용된다.

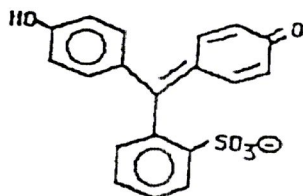
보다 상세하게는, 이러한 시험 스트립은 흡수성 캐리어 스트립, 즉 완충액, 중합체/계면활성제(안정성, 습윤성을 위해 요구되거나 완충액의 침출을 방지하는데 필요함) 및 단백오차 지시제로 함침된 종이를 포함한다. 실질적으로 상업적으로 시판되는 건조 상(dry phase) 시험물에서 사용되는 모든 단백오차 지시제는 하기와 같은 기본 구조를 갖는 페놀설포프탈레인 유도체이다:



구조 A는 양성자성 용매(물, 알코올 등)에서 페놀설포프탈레인 유도체의 일반적인 구조를 나타내며 구조 B는 무수 상태 또는 비양성자성 용매(에테르, 아세토니트릴 등)에서 이의 우세한 형태를 나타낸다. 일반적으로, 페놀설포프탈레인 유도된 단백오차 지시제는 구조 B로서 나타낸다. 일관성을 위해서, 페놀설포프탈레인 유도체인 본 발명의 단백오차 지시제는 구조 B를 사용해서 나타낸다. 그러나, 페놀설포프탈레인 유도체인 본 발명의 단백오차 지시제가 또한 구조 A로서 존재할 수도 있다는 것을 이해해야 한다.

단백오차 지시제는 단백질의 존재에 의해 대체되는 pKa 값을 갖는 이온화 가능한 그룹을 함유하는 pH 지시제이다. 페놀설포프탈레인의 경우, 이온화 가능한 그룹은 C환 페놀성 하이드록실이다. 페놀설포프탈레인 지시제의 pKa 값은 지시제 분자수의 반이 탈양성자화된 C환 페놀성 하이드록실 그룹을 포함하는 점에서의 pH값이다.

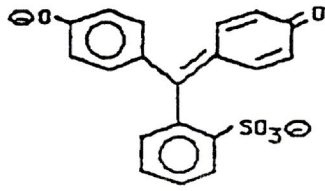
상기한 페놀설포프탈레인 단백오차 지시제와 관련하여, 관찰가능한 색 변화를 야기시키기 위해 2가지 탈양성자화가 일어난다. 제1 탈양성자화는 아릴 설포산으로부터 양성자를 제거하여 하기에 나타낸 화합물을 생성한다.



이 양성자의 pKa는 1미만이다. 따라서, 이러한 잔기는 모두 유용한 pH 값에서 이온화된다. 이러한 이온화된 그룹은 또한 이들 화합물의 수용성에 영향을 미친다.

제2 탈양성자화는 C환 페놀성 하이드록실로부터 양성자를 방출시켜서 하기와 같은 2가 음이온(dianion)

을 생성하는 것을 포함한다 :



단백오차 지시제에 있어서, 이러한 제2 탈양성자화는 시험할 샘플중의 단백질을 나타내주는 관찰가능한 색 변화를 일으킨다.

완충액은 지시제가 작용하게될 일정한 pH 환경을 제공한다. 그러므로, 종종 완충된 환경과는 상당히 다른 pH값을 갖는 생물학적 체액에 시험 스트립을 침지시킬 경우, 지시제는 생물학적 체액의 pH에 의해 영향을 받지 않는다. 이것은 지시제에서 후속적인 특정 색 변화가 지시제의 pKa값 이동의 결과이며, 시험될 샘플의 pH의 결과는 아니라는 것을 입증한다.

생물학적 샘플중의 단백질의 분석적 측정에 대해 유용하다고 통상적으로 고려되는 시험 스트립은 미국 특허 제4,013,416호에 기술되어 있다. 여기에 기술되어 있는 시험 스트립은 수 불혼화성 폴리프로필렌 글리콜, 완충액 및 옥타할로설포프탈레인 그룹의 단백오차 지시제로 함침된 흡수성 캐리어를 포함한다. 옥타할로설포프탈레인 지시제는 3',3'',5',5'',3,4,5 및 6위치에서 할로겐화된 페놀설포프탈레인 유도체이다. 이 특허 문헌에 따르면, 옥타할로설포프탈레인 및 수 불혼화성 폴리프로필렌 글리콜을 함유하는 시험 스트립은 기타 페놀설포프탈레인 지시제 및 습윤제를 함유하는 시험 스트립보다 시험 샘플에서 방해 질소 함유 화합물에 의해서 덜 방해 받는다고 한다.

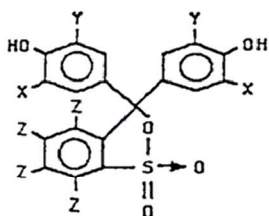
상기 기술된 시험 스트립이 샘플중의 질소 함유 화합물에 의해 덜 방해받지만, 이들 및 기타 현재 시판되는 시험 스트립은 수개의 공통적인 심각한 결점을 갖고 있다. 현재 시판되고 있는 시험 스트립은 오진을 초래할 수 있는 배경 네가티브 발색을 나타낸다. 예를 들면, 옥타할로설포프탈레인 그룹의 지시제는 알부민 부재시 황색이다.

후속적으로, 샘플에 알부민을 첨가할 경우, 색 변화는 황색에서 황록색, 녹색의 순서로 샘플에 있는 알부민의 농도에 따라서 변화된다. 이러한 배경 발색은, 정상적으로 황색 내지 황록색인 뇨가 대부분 흔히 시험되는 생물학적 체액이라는 것을 고려할 경우 특히 문제가 된다. 그러므로, 뇨중 약 10 내지 30mg/dl(데시리터 당 밀리그램)인 미량의 알부민으로 인한 시험 스트립의 색에서 작은 변화가 샘플 자체의 색에 의해 쉽게 차단되어서 검출할 수 없게 된다. 이는 또한 최소로 훈련된 전문가가 이러한 시험 스트립을 사용하기 때문에 관찰되는 결과를 판단하는데 어려움이 증가되는 것을 경험할 수 있으므로 문제가 된다. 이러한 시험의 결과를 기본으로 하여 종종 의학 치료가 시작되기 때문에, 결과의 정확한 판독이 불가피하다. 또한, 현재 시판되고 있는 시험 스트립은 충분히 민감하지 않아서 단백질의 매우 낮은 농도는 검출하지 못한다. 약 3 내지 약 10mg/dl의 뇨 알부민 농도가 당뇨병 및 신장 질환과 같은 생명에 위협적인 병리를 진단하는데 중요하다. 그럼에도 불구하고, 현재 시판되는 시험 스트립으로는 약 10 내지 15mg/dl이상의 알부민을 정확하게 검출할 수 없다.

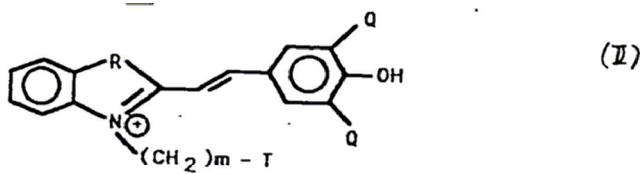
따라서, 상기 논의한 결점을 극복하기 위해, 단백질의 부재시에 황색이외의 다른 색을 갖는 단백오차 지시제를 제공하는 것이 매우 유리하다. 단백오차 지시제가 단백질이 없는 경우에 황색이외의 다른 색을 나타내고 단백질이 있는 경우는 제1색과 분명하게 구별되는 제2색을 제공할 경우, 이는 부가적인 이점을 제공한다. 알부민이 즉시 검출가능한 농도 이하로 존재하는지를 정확하고 분명하게 나타낼 경우 훨씬 더 유리하다.

이러한 단백오차 지시제를 함유하는 시험 스트립을 제공함으로써 추가의 이점들을 실현할 수 있다. 본 발명은 페놀설포프탈레인 단백오차 지시제 및 메로시아닌 단백오차 지시제로 함침된 흡수성 캐리어를 포함하는, 생물학적 샘플중의 단백질 검출을 위한 분석 시험 스트립을 제공한다.

본 발명에 따라, 일반식(I)의 페놀설포프탈레인 단백오차 지시제 화합물 및 일반식(II)의 메로시아닌 단백오차 지시제 화합물로 함침된 흡수성 캐리어를 포함하는, 생물학적 샘플중의 단백질을 검출하기 위한 분석 시험 스트립에 의해서 상기 기술한 이점이 제공된다.

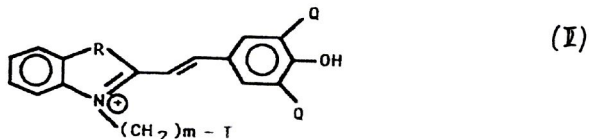
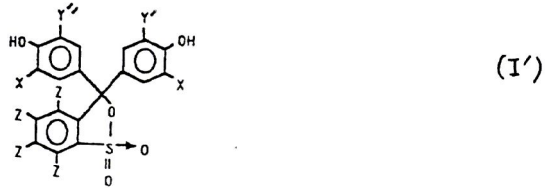


(I)



상기식에서, X는 -Cl, -Br 또는 -I이고, Y는 -NO₂ 또는 -NO이고, Z는 -Cl, Br 또는 -I이고, Q는 -Cl, -Br 또는 -I이고, m은 1 내지 6의 정수이고, R은 S, Se, O 또는 C(CnH_{2n+1})₂(여기서, n은 1 내지 6의 정수이다)이며, T는 -SO₃⁺ 또는 -H이다. 본 발명의 한 가지 양태에서는, X가 -I 또는 Br이고 Y가 -NO₂이고 Z가 -Br 또는 -Cl이고 m이 3 또는 4이고 R이 C(CH₃)₂이며 T가 -SO₃⁺이다.

본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 일반식(I')의 페놀설폰프탈레인 단백질오차 지시제 화합물 및 일반식(II)의 메로시아닌 단백질오차 지시제 화합물로 함침된 흡수성 캐리어를 포함하는, 생물학적 샘플중의 단백질을 검출하기 위한 분석 시험 스트립이 제공된다.



상기식에서, X는 -Cl, -Br 또는 -I이고, Y'는 -NO₂ 또는 -NO이고, Y''는 -Cl, -Br 또는 -I이고, Z는 -Cl, -Br 또는 -I이고, Q는 -Cl, -Br 또는 -I이고, m은 1 내지 6의 정수이고, R은 S, Se, O 또는 C(CnH_{2n+1})₂(여기서, n은 1 내지 6의 정수이다)이며, T는 -SO₃⁺ 또는 -H이다. 본 발명의 또 다른 양태에서는, X가 -I 또는 -Br이고 Y가 -NO₂이고 Z가 -Br 또는 -Cl이고 Q가 -Br 또는 -I이고 m이 3 또는 4이고 R이 C(CH₃)₂이며 T가 -SO₃⁺이다.

본 발명의 다른 양태는 생물학적 샘플중의 단백질을 검출하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 방법은 분석 시험 스트립을 생물학적 샘플에 적시는 단계를 포함한다.

시험 스트립은 상기한 단백질오차 지시제 화합물로 함침된 흡수성 캐리어를 포함한다. 시험 스트립에 어떠한 색 변화가 있는지를 관찰한다. 색 변화는 생물학적 샘플중의 단백질을 나타낸다.

본 발명의 한가지 양태에 따라, 시험 스트립은 열 응력에 대해 안정화되어 있다. 단백질 분석(시험 스트립)은, 열 안정성을 제공하기 위해 폴리프로필렌 글리콜과 같은 발색 증진중합체(color enhancing polymer)외에, 예를 들면 글리세롤 또는 솔비톨을 함유한다. 또한 단백질 분석에 사용되는 표준 시트레이트 완충액을 글리신으로 대체시킴으로써 내열성이 개선된다는 것을 발견하였다.

본 발명에 이르러, 생물학적 체액에 있는 단백질을 측정하기 위해서, 단백질에 대해 상당히 증가된 민감성을 갖는 시험 스트립이 본 발명의 신규한 단백질오차 지시제를 함유하는 분석 시험 스트립을 제조함으로써 수득될 수 있다는 것을 밝혀내었다.

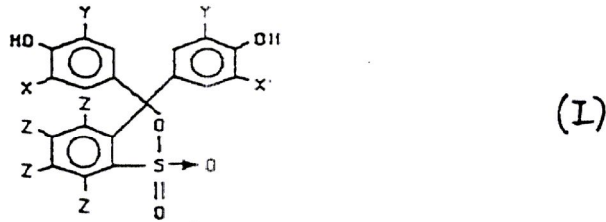
하기 기술되는 신규한 단백질오차 지시제의 배합물을 함유하는 시험 스트립은 밝은 복숭아색이고, 단백질을 함유하는 생물학적 샘플에 액침시키면 이는 진한 녹색, 청색 또는 자주색이 되며, 이러한 발색은 샘플중의 단백질의 농도를 반영한다. 생성된 녹색은 네가티브 시험의 밝은 복숭아색과는 분명하게 구별된다. 밝은 복숭아색에서 녹색, 청색 또는 자주색이 되는, 관찰가능한 색의 변화와 관련하여, 본 발명에 따라서 제조된 시험 스트립은 네가티브 시험에서의 밝은 복숭아색과는 분명하게 구별할 수 있는, 단백질 존재하에서 상이하고 뚜렷한 발색을 생성함으로써 생물학적 체액에 있는 단백질을 검출하기 위한 진단학적 수단이 된다. 이는 알부민의 존재하에 한가지 색의 하나의 명암이 다른 색으로 약간만 변하는 시험 스트립, 예를 들면 황색에서 황록색이 되는 다른 시험 스트립과는 구별된다. 네가티브 시험의 밝은 복숭아색과 포지티브 시험에서의 녹색, 청색 또는 자주색의 특징은 생물학적 샘플에 있는 단백질을 검출하는데 사용되는 이전의 방법 및 지시제를 크게 벗어난 것으로 여겨진다. 보다 상세하게는, 본 발명은 생물학적 샘플에 있는 단백질을 검출하기 위한 확실하고 간단하며 정확한 방법을 임상의학자에게 제공한다. 밝은 복숭아색에서 녹색, 청색 또는 자주색으로의 색의 변화는 시험의 결과를 판독하기 쉽게한다. 이는 오진을 줄여서 환자 및 건강 관리자의 비용을 줄일 것이다.

또한, 본 발명에 따라서 제조된 시험 스트립은 샘플중 단백질의 약 2 내지 약 500mg/dl의 범위를 양성적으로 검출한다. 본 발명 이전에는, 약 10mg/dl 미만의 알부민 농도는 정확하게 검출할 수 없었다. 본 발명을 사용하여 이렇게 매우 저농도인 단백질을 검출하는 것은 당뇨병 및 신장 질환을 포함하는, 생명에

위험적인 여러 가지 병리의 초기 진단을 가능하게 한다. 예를 들면, 3mg/dl 이상의 농도에서 단백뇨를 검출하는 것은 임상학자가 좀 더 초기에 당뇨병을 진단할 수 있도록 도와준다. 본 발명에 따라서 수득되는, 질환의 진단에 있어 이러한 상당한 진보와 관련하여, 본 발명의 시험 스트립중의 단백오차 지시제의 배합물은 당해 분야에 상당한 진보를 제공한다.

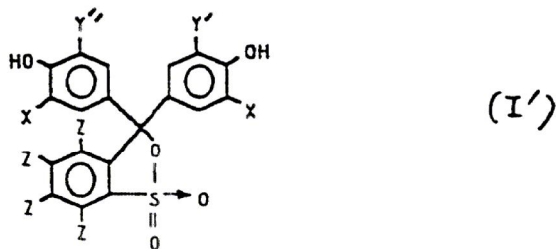
본 발명은 생물학적 샘플중의 단백질을 검출하기 위한 분석 시험 스트립에 단백오차 지시제의 신규한 배합물을 제공함으로써 상기 기술한 중요한 이점을 수득한다. 본 발명은 B 및/또는 C환에 니트로 또는 니트로소 치환제 그룹을 갖는, 부분적으로 할로겐화된 페놀설폰프탈레인 단백오차 지시제 화합물 및 메로시아닌 단백오차 지시제를 함유하는 분석 시험 스트립에 관한 것이다. 본 발명 이전에는 메로시아닌 염료가 단백오차 지시제로서 공지되지 않았다. 본 발명의 페놀설폰프탈레인 단백오차 지시제는 보다 저농도의 알부민에 대해 보다 더 민감하지만, 메로시아닌 단백오차 지시제는 보다 고농도의 알부민에 더 민감한 것으로 여겨진다. 따라서, 이들 화합물과 단백질과의 반응은 경쟁적이지 않아서, 신규한 배합물의 효과는 부가적이라기 보다는 상승적이다.

보다 상세하게는, 본 발명에 있어, 본 발명의 페놀설폰프탈레인 단백오차 지시제는 하기 일반식(I)의 화합물이다.



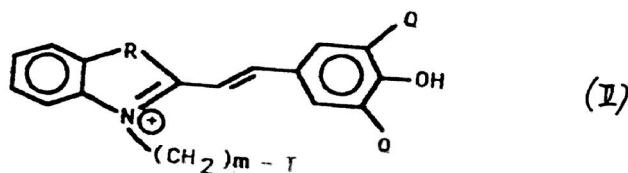
상기식에서, X는 -Cl, -Br 또는 -I이고, Y는 -NO₂ 또는 -NO이며, Z는 -Cl, -Br 또는 -I이다. 바람직하게는, X는 -I 또는 -Br 이고 Y는 -NO₂이며 Z는 -Br 또는 -Cl이다. 더욱 바람직하게는, X는 -I이고 Y는 -NO₂이며 Z는 -Br이다.

본 발명의 추가 양태에서, 페놀설폰프탈레인 단백오차 지시제 화합물은 하기 일반식(I')의 화합물로서 제공된다.



상기식에서, X는 -Cl, -Br 또는 -I이고, Y'는 -NO₂ 또는 -NO이고, Y''는 -Cl, -Br 또는 -I이며, Z는 -Cl, -Br 또는 -I이다. 보다 바람직하게는, X는 -I이고, Y'는 -NO₂이고, Y''는 -Br이며, Z는 -Br이다.

본 발명의 메로시아닌 단백오차 지시제는 하기 일반식(II)의 화합물이다.



상기식에서, Q는 -Cl, -Br 또는 -I이고, m은 1 내지 6의 정수이고, R은 S, Se, O 또는 C(C_nH_{2n+1})₂(여기서, n은 1 내지 3의 정수이다)이며, T는 -SO₃⁻ 또는 -H이다. 보다 바람직하게는, Q는 -Br 또는 -I이고 m은 2 내지 4의 정수이고 R은 C(CH₃)₂이며 T는 -SO₃⁻이다. 가장 바람직하게는, Q는 -I이고 m은 3이다.

본 발명은 단백오차 지시제로서 크로모겐(chromogen)의 메로시아닌계의 제1용도를 기술하고 있으며, 따라서 광범위하고 다양한 치환 유도체를 포함한다. 일반식에서 방향족 환은 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 치환제 그룹을 함유할 수 있음이 입증될 것이다. 이러한 치환제 그룹은 본 발명의 단백오차 지시제 특성을 갖는 안정한 화합물을 제조하기 위해 본 분야의 통상적인 숙련자에게만 제한될 수 있으며, 이러한 그룹은, 예를 들면 비치환되거나 치환된 알킬, 비치환되거나 치환된 아릴, 알콕시, 아릴옥시, 할로(예 : 플루오로, 클로로, 브로모), 니트로, 및 디알킬아미노와 같은 치환된 아미노를 포함한다.

본 발명의 문맥에서, "알킬"은 일반식 -C_nH_{2n+1}의 비치환된 탄화수소의 직쇄 및 측쇄 잔기를 포함하며, 바

람직하게는 n 이 1 내지 6이한 "저급 알킬" 지방족 유형이며, 예를 들면 메틸, 에틸, n -프로필, 이소-프로필, n -부틸, 이소-부틸, 3급-부틸, n -헥실등과 이들의 치환된 형태를 포함한다.

또한, 본 발명의 문맥에서, "아릴"은 수소원자를 제거함으로써 방향족 탄화수소 환 또는 시스템으로부터 유도된 유기 잔기를 포함하고, 페닐 및 나프틸과 같은 비치환된 탄화수소 환 잔기 및 이의 치환된 형태를 포함한다. 본 발명을 위해, 본 발명의 메로시아닌 단백질 지지체 화합물을 제공하기 위해서는 아릴 잔기는 당해 분야의 숙련가에 의해서 선택될 수 있는 1개 이상의 동일하거나 상이한 작용성 그룹 또는 치환제를 갖는 것을 포함한다.

보다 특정하게는, "아릴" 및 "알킬"이 치환되는 경우, 이러한 치환은 본 발명의 유용한 특징을 실질적으로 감소시키지 않는 작용성 그룹으로 일- 또는 다치환 될 경우의 이러한 그룹 또는 치환체를 포함한다. 이러한 작용성 그룹은 합성적으로 도입되어 본 발명의 안정되고 유용한 메로시아닌 단백질 지지체 화합물을 생성할 수 있는 화학적 그룹을 포함한다. 이러한 작용성 그룹의 예로는, 이로써 제한되지는 않지만 할로(예 : 플루오로, 클로로 브로모), 치환된 아미노(예 : 디알킬아미노), 니트로, 알콕시, 아릴옥시, 알킬 및 아릴이 포함된다.

메로시아닌 단백질 지지체는 예를 들면 다음과 같다; 1-(ω -설포프로필)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디브로모스티릴)-3,3-디메틸인돌레닌 베타인; 1-(ω -설포부틸)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디요오도스티릴)-벤조티아졸륨 베타인; 1-(ω -설포에틸)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디요오도스티릴)-3,3-디메틸인돌레닌 베타인; 1-(ω -설포프로필)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디요오도스티릴)-3,3-디메틸인돌레닌 베타인; 1-(ω -설포부틸)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디요오도스티릴)-3,3-디메틸인돌레닌 베타인 및 1-(n -부틸)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디요오도스티릴)-3,3-디메틸인돌레닌 요오다이드. 상기 기술된 메로시아닌 단백질 지지체를 제조하기 위한 상세한 프로토콜은 실시예에 설명되어 있다.

도면에 대해, 제1도는 일반적으로 본 발명의 2가지 디니트로소 치환된 지지체의 합성을 설명하고 있다. 보다 상세하게, 시판되고 있는 3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인(제1도의 화합물 A)로부터 3',3''-디니트로소-5',5'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설포프탈레인(제1도의 화합물 C) 및 3',3''-디니트로소-5',5''-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인(제1도의 화합물 E)을 합성하기 위한 가능성있는 합성 프로토콜을 나타낸다. 디브로모 중간체(제1도의 화합물 B)는 아세트산(HOAc)중 테트라브로모페놀설포프탈레인의 용액을 주위 온도에서 분자 브롬 2당량으로 처리함으로써 용이하게 제조된다. 이어서, 이를 이소아밀 니트라이드와의 산 촉매화된 반응에 의해 아세토니트릴(CH_3CN)중에서 니트로실화시켜 3',3''-디니트로소-5',5'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설포프탈레인을 수득한다.

디요오도 유사체도 유사하게 제조된다. 3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인을 주위 온도에서 HOAc중 일염화요오드(ICl) 3당량과 반응시킴으로서 요오드화시켜 제1도의 화합물 D로서 나타난 화합물을 수득한다. 이어서, 이 화합물을 상기과 같이 니트로실화시켜서 3',3''-디니트로소-5',5''-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인을 수득한다. 상기 기술된 프로토콜에 따라서, 3',3'',3,4,5,5',5'' 또는 6위치에 다른 할로겐, 알킬 그룹 또는 양성자(H)를 함유하는 유사체의 합성을 바로 진행시켜서 목적하는 화합물을 수득한다.

제2도는 일반적으로 본 발명의 니트로 치환된 단백질 지지체의 합성을 나타낸다. HOAc중 제2도의 화합물 A의 용액을 주위 온도에서 2당량 이하의 질산(HNO_3)으로 처리하여 3',3''-디니트로-5',5''-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인(제2도의 화합물 B)을 수득한다. 제2도의 화합물 A를 주위 온도에서 HOAc중 HNO_3 1당량으로 천천히 처리한 다음, 환류에서 과량의 Br_2 로 처리하여 모노니트로 유사체인 3'-니트로-5',5''-디요오도-3,3',4,5,6-펜타브로모페놀설포프탈레인(제2도의 화합물 C)을 수득한다. 상기 기술한 프로토콜에 따라서, 3',3'',3,4,5,5',5'' 또는 6위치에서 다른 할로겐, 알킬 그룹 또는 양성자(H)를 포함하는 유사체의 합성을 바로 진행시켜서 목적하는 화합물을 수득한다. 하기 기술되는 실시예는 제1도 및 제2도에 나타난 화합물 각각을 제조하기 위한 합성 프로토콜이 상세히 설명되어 있다.

본 발명을 제한하지 않으면서, 본 발명에 포함된 페놀설포프탈레인 단백질 지지체는 배합물의 단백질 민감도를 크게 증가시키는 것으로 생각되고, 보다 상세하게는, B 및 C환에 니트로 또는 니트로소 그룹(들)의 치환으로 인해 노 알부민에 대한 이들 화합물의 민감도가 증가되는 것으로 생각된다. 전자 구인(electron withdrawal) 및 전하 분산현상이 조합되어 민감도가 증가된 지지체를 제공하는 것으로 여겨진다. 또한 매우 저농도의 단백질의 존재하에 밝은 복숭아색에서 녹색으로의 놀랄만한 특징적인 변화는 본 발명의 2가지 단백질 지지체의 상호작용에 기인하는 것으로 여겨진다.

보다 상세하게는, 본 발명의 페놀설포프탈레인 단백질 지지체와 관련하여, 4' 및 4''위치에서 하이드록실 그룹에 인접하게 위치한 전기 음성도가 높은 니트로 및 니트로소 그룹이 이들 하이드록시 그룹의 반응성을 증가시킨다고 생각된다. 또한, 하이드록실 그룹의 반응성은 공명 안정성을 통해 더욱 향상된다고 생각된다. 분자의 이온 형태는 전하 분산을 통해 안정화된다고 생각된다. 치환체 니트로 및 니트로소 그룹에 의해 부여된 공명 안정성은 4' 및 4'' 위치에서 인접한 하이드록실 수소의 산도를 증가시킨다. 이러한 현상의 조합은 상승적으로 본 발명의 페놀설포프탈레인 지지체의 pKa를 감소시키고, 따라서 알부민에 대한 본 발명의 배합 지지체의 민감도를 증가시키는 것으로 여겨진다.

제3도는 통상적으로 본 발명의 수개의 메로시아닌 단백질 지지체 화합물의 합성을 기술하고 있다. 화학 반응은 바로 진행되며 통상적으로 염기성 반응 조건하에서의 헤테로사이클릭 4급 염과 방향족 하이드록시알데하이드의 커플링을 포함한다. 메로시아닌 단백질 지지체 제조에 사용되는 통상적인 방법은 제3도에 나타내었고, 하기 실시예에서 상세히 논하였다.

본 발명의 하나의 양태는 상기 기술한 페놀설포프탈레인 단백질 지지체 화합물 중의 하나 및 상기 기술한 메로시아닌 단백질 지지체 화합물 중의 하나로 함침된 흡수성 캐리어를 포함하는, 생물학적 샘플 중의 단백질을 검출하기 위한 분석 시험 스트립에 관한 것이다. 시험 스트립의 흡수성 캐리어는 바람직하게는 여과지이다. 흡수성 캐리어로서 유용한 기타 물질에는 펄프, 다공성 세라믹 스트립, 및 미국 특

허 제 3,846,247호에 기술되어 있는 제직 또는 매트 유리 섬유가 포함된다. 또한 미국 특허 제 3,552,928 호에 기술되어 있는 목재, 직물, 스폰지 물질 및 점토질 물질의 사용도 제안되어 있다. 또한, 흡수성 캐리어는 다양한 중합체성 필름, 유리 등과 같은 비다공성일 수 있다. 이러한 모든 흡수성 캐리어 물질은 다른 것과 마찬가지로 본 발명에 사용하기에 적합하다. 그러나, 여과지가 특히 적합한 것으로 밝혀졌다.

흡수성 스트립은 완충액으로 함침시키는 것이 바람직하다. pH를 약 1.5 내지 약 4.5로 조절할 수 있는 완충 시스템은 어떠한 것이든 본 발명에 사용하기에 적합하다. 바람직하게는, 완충 시스템의 pH는 약 2.0 내지 약 3.0, 가장 바람직하게는 약 2.5로 조절한다.

또한 시험 스트립은 발색 증진 중합체로 함침시킬 수 있다. 본 발명을 위해, "발색 증진 중합체"란 용어는 발색 형성의 동태 및 단백질 지시제의 용량 반응 둘다를 증가시키고/시키거나 네가티브 시험에 배경색을 감소시키는, 부자량이 약 400 내지 약 25,000인 중합체를 의미한다. 바람직한 발색 증진 중합체는 폴리프로필렌 글리콜, 폴리카보네이트, 폴리비닐에테르 및 폴리에틸렌 옥사이드를 포함한다. 한가지 바람직한 양태에 따른 발색 증진 중합체는 폴리프로필렌 글리콜이다.

수 혼화성 및 불혼화성 폴리프로필렌 글리콜 모두가 본 발명에 유용하다. 폴리프로필렌 글리콜의 분자량이 약 100 내지 약 10,000인 것이 바람직하다.

보다 바람직하게는, 폴리프로필렌 글리콜의 분자량은 약 1,000 내지 약 4,000이다. 그러나, 가장 바람직하게는, 폴리프로필렌 글리콜의 분자량은 약 2,000이다.

본 발명에 사용하기에 유용한 수 불혼화성 폴리프로필렌 글리콜은 미국 특허 제 4,013,416호에 상세히 논의되어 있다. 그럼에도 불구하고, 평균 분자량이 약 400인 수 혼화성 폴리프로필렌 글리콜이 본 발명에 유용한 것으로 평가되었다. 기타의 바람직한 발색 증진 중합체는 독일의 바이엘 아게(Bayer AG)로부터 상표명 KOK 10,701로 시판되는 폴리카보네이트 : 폴리프로필렌 옥사이드와 에틸렌 옥사이드 부가물, 또는 독일의 바이엘 아게로부터 상표명 페노일(Fenoil) D4030으로 시판되는 1,6-디메틸-4-노닐-페놀 및 미국 BASF로부터 상표명 루토날(Lutonol) 130으로 시판되는 폴리비닐에테르가 포함된다. 폴리프로필렌 글리콜, KOK 10,071, 페노일 D4030 및 루토날 130과 같은 특정한 발색 증진 중합체를 포함하는 본 발명의 시험 스트립은 증가된 용량 반응 범위, 알부민 농도와 감소된 네가티브 발색간의 증가된 분석능을 갖는 것으로 평가된다.

하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 양태 및 유용성을 기술하기 위해 제시되며, 첨부된 특허청구의 범위에서 달리 언급하지 않는한 이는 본 발명을 제한하려고 의도된 것은 아니다.

[실시예]

[실시예 1.3',3'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설폰프탈레인]

아세트산[(HOAc), 50ml(밀리리터)]중의 미국 위스콘신 밀웨이키 소재의 알드리치 케미칼 캄파니(Aldrich Chemical Co.)가 시판중인 3,4,5,6-테트라브로모페놀설폰프탈레인[5.03g(그램), 7.5mmole(밀리몰)]의 용액을 불활성 기체 대기하에 주위 온도에서 유지시킨다. 이 용액을 알드리치 케미칼 캄파니가 시판중인 브롬 용액(2.4g, 15mmole, HOAc중, 10ml)으로 10분 동안 적가 처리한 후, 방배 교반한다. 반응 혼합물로부터 분리된 고체를 여과로 수집해서 HOAc로 세척하고 진공중에서 건조시켜 3',3'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설폰프탈레인을 수득한다. 비등 HOAc로부터 재결정화하여, 159 내지 160°C에서 연화되고 162내지 164°C에서 가스 발생과 함께 용융되며, 융점이 270°C 이상인 재고형화되는 연분홍색 분말로서 분석학적으로 순수한 화합물(1.93g, 29.3%)을 수득한다. 이 화합물의 특성을 나타내는 분광 데이터는 하기 표1에 나타낸다.

[표 1]

IR(KBr) cm^{-1}	3435, 1703, 1605, 1497, 1416, 1360, 1340, 1295, 1227, 1192
$^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6) \delta$	8.03(s, 2H), 7.59(d, J=2.4Hz, 2H), 7.31(d of d, J ₁ =8.7Hz 및 J ₂ =2.4Hz, 2H), 7.11(d, J=8.7Hz, 2H)

$\text{C}_{19}\text{H}_8\text{Br}_6\text{O}_5\text{S} \cdot \text{HOAc}$ 에 대한 원소 분석

계산치 : C, 28.90; H, 1.39

실측치 : C, 28.55; H, 1.38

[실시예 2.5',5''-디니트로소-3',3'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설폰프탈레인]

무수 아세토니트릴(CH_3CN , 50ml)중의 3',3'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설폰프탈레인의 교반 용액(0.67g, 0.8mmole)을 불활성 기체 대기하에 주위 온도에서 유지시킨다. 용액을 HOAc의 촉매량(1적) 및 이소아밀 니트라이트(0.56g, 4.8mmole)로 처리한 다음, 4일 동안 교반한다. 반응 혼합물로부터 분리된 고체를 여과로 수집하여 CH_3CN (10ml)로 세척한다.

고체를 진공중에서 건조시켜 5',5''-디니트로소-3',3'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설폰프탈레인(0.45g, 64%)을 융점이 267 내지 269°C인 분석학적으로 순수한 황색 분말로서 수득한다. 농축된 모액로부터 후속적으로 2차 수확물(0.03g; 4%)을 수득한다.

이 화합물의 특성을 나타내는 분광 데이터는 표 2에 나타낸다.

[표 2]

IR(KBr)cm ⁻¹	1621, 1543, 1468, 1416, 1361, 1341, 1325, 1258, 1194, 1162, 1096
¹ H NMR(DMSO-d ⁶) δ	7.93(d, J=2.5Hz, 2H), 7.73(d, J=2.5Hz, 2H), 4.20(v. br. s, 2H)

C₁₉H₆Br₆N₂O₇S에 대한 원소 분석

계산치 : C, 25.76; H, 0.68; N, 3.16

실측치 : C, 25.61; H, 0.58; N, 3.40

[실시예 3. 3',3'',-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설폰프탈레인]

3,4,5,6-테트라브로모페놀설폰프탈레인(20.1g, 30mmole)을 70℃의 HOAc(550ml)에 용해시킨 다음 수욕에서 주위 온도로 냉각시킨다.

교반된 용액을 불활성 기체 대기하에 유지시킨다. 이 용액을 HOAc(50ml)중 일염화요오드(ICI)(14.61g, 90mmole)의 용액으로 처리하여 주위 온도에서 22.3시간 동안 방치한다.

반응 혼합물을 셀라이트 521의 패드[미국 코벳티켓 덴버 소재의 존스-맨빌 코퍼레이션(Johns-Manville Corp.)]를 통해 여과시키고, 진공중에서 증발 건조시킨다. 생성된 적색 타르를 HOAc(150ml)중에 용해시킨다. 방치시 용액으로부터 분리된 고체를 여과하여 HOAc로 세척하고, 진공중에서 분홍색 분말인 3',3'',-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설폰프탈레인(9.66g, 34.9%)을 수득한다. 후속적으로 농축된 모액으로부터 2차 수획물(4.03g, 14.6%)을 수득한다. 이 화합물의 특성을 나타내는 분광 데이터는 하기 표 3에 나타낸다.

[표 3]

IR(KBr)cm ⁻¹	1697, 1598, 1486, 1405, 1338, 1293, 1226, 1191
¹ H NMR(DMF-d ⁷) δ	8.03(s, 2H), 7.97(d, J=2.3Hz, 2H), 7.49(d of d, J ₁ =8.6Hz 및 J ₂ =2.3Hz, 2H), 7.02(d, J=8.6Hz, 2H)

C₁₉H₆Br₄I₂O₅S · HOAc에 대한 원소 분석

계산치 : C, 25.69; H, 1.23

실측치 : C, 25.94; H, 0.94

[실시예 4. 5',5'',-디니트로소-3',3'',-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설폰프탈레인]

무수 CH₃CN(50ml)중의 3',3'',-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설폰프탈레인(1.47g, 1.6mmole)의 용액을 불활성 기체 대기하에 주위 온도에서 유지시킨다.

혼합물을 HOAc의 촉매량(2적) 및 이소아밀 니트라이트(2.3g, 20mmole)로 처리한다. 생성된 혼합물을 2일 동안 교반시킨다. 반응 혼합물로부터 분리된 고체를 여과로 수집하고, 냉 CH₃CN로 세척하여 진공중에서 건조시켜 화합물 5',5'',-디니트로소-3',3'',-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설폰프탈레인(0.41g, 26%)을 수득한다. CH₃CN(50ml)로부터 재결정화하여 융점이 270℃ 이상인 담황색 울(wool)로서 분석 샘플을 수득한다. 이 화합물의 특성을 나타내는 분광 데이터는 표 4에 나타낸다

[표 4]

IR(KBr)cm ⁻¹	1616, 1541, 1460, 1410, 1360, 1322, 1257, 1195, 1091
¹ H NMR(DMSO-d ⁶) δ	8.00(d of d, J ₁ =2.0Hz 및 J ₂ =1.2Hz, 2H), 7.93(d, J=2.2Hz, 2H), 4.76(v. br. s, 2H)

C₁₉H₆Br₄I₂N₂O₇S에 대한 원소 분석

계산치 : C, 22.93; H, 0.46; N, 2.80

실측치 : C, 23.08; H, 0.71; N, 2.83

[실시예 5. 5',5'',-디니트로-3',3'',-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설폰프탈레인(DIDNTB)]

비등 HOAc(90ml)중의 3',3'',-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설폰프탈레인(1.85g, 2.0mmole)의 교반 용액을 약 16 내지 20℃로 냉각시킨다. 용액을 HOAc(10ml)중, 90℃ 질산(0.28g, 4.0mmole)의 용액으로 4 분간 적가 처리하여 주위 온도에서 불활성 기체 대기하에 방해 교반한다. 반응 혼합물로부터 분리된 고체를 여과로 수집하여, HOAc(5ml)로 세척하고 진공중에서 건조시켜서 조 제조물인 5',5'',-디니트로-

3',3''-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인을 수득한다. HOAc(110ml)로부터 1회 재결정화하여 황색 분말로서 분석학적으로 순수한 화합물인 5',5''-디니트로-3',3''-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인(0.90g, 38%)을 수득한다. 이 물질은 뚜렷한 융점이 없다. 그러나, 이 물질은 약 189 내지 190℃에서 오그라들고, 약 210 내지 220℃에서 가스를 발생하고 약 225℃에서 용융된다. 이 화합물의 특성을 나타내는 분광 데이터는 하기 표 5에 나타낸다.

[표 5]

IR(KBr) cm^{-1}	1707, 1616, 1541, 1460, 1408 1370, 1322, 1257, 1195, 1092
^1H NMR(DMSO- d_6) δ	8.03(d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 7.91(d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 6.0-7.0(br. s, 2H)

$\text{C}_{19}\text{H}_6\text{N}_2\text{Br}_4\text{I}_2\text{O}_9\text{S} \cdot 2\text{HOAc}$ 에 대한 원소 분석

계산치 : C, 24.40; H, 1.25; N, 2.48

실측치 : C, 24.49; H, 1.00; N, 2.42

[실시에 6. 5'-니트로-3',3''-디요오도-5'',3,4,5,6-펜타브로모페놀설포프탈레인]

비등 HOAc 중 3',3''-디요오도-3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인 (0.92g, 1.0mmole)의 교반된 용액을 주위 온도로 냉각시키고, 불활성 기체 대기하에서 유지시킨다.

이 용액을 HOAc중 1M의 HNO_3 (1.05ml; 1.05mmole)로 1.5시간 동안 천천히 적가 처리한다. 적가 완료시, 반응물을 5분 동안 교반한다. 그런 다음, 반응 혼합물을 HOAc중 Br_2 (1.5ml, 1.5mmole)의 용액으로 처리하고, 5.5시간 동안 환류시킨다. 혼합물을 주위 온도로 냉각시키고 진공중에서 증발 건조시켜서 금색-갈색 유리(1.10g)를 수득한다. 조 생성물을 에틸 아세테이트(EtOAc)의 최소 용적에 용해시키고 HOAc로 희석하여 결정상 고체를 수득한다. 2번 재결정화한 후 밝은 황색 분말로서 분석학적으로 순수한 5'-니트로-3',3''-디요오도-5'',3,4,5,6-펜타브로모페놀설포프탈레인(0.57g, 54.5%)을 수득한다.

이 화합물의 특성을 나타내는 분광 데이터는 하기 표 6에 나타낸다.

[표 6]

IR(KBr) cm^{-1}	1708, 1614, 1540, 1462, 1406, 1371, 1338, 1324, 1252, 1194, 1162, 1091, 1016, 823, 789, 765, 723, 671
^1H NMR(DMSO- d_6) δ	8.03(d of d, $J_1=24.8\text{Hz}$ 및 $J_2=2.3\text{Hz}$, 2H), 7.98(d of d, $J_1=22.7\text{Hz}$ 및 $J_2=2.4\text{Hz}$, 1H), 7.90(br. m, 1H), 7.67(br. m, 1H)

$\text{C}_{19}\text{H}_6\text{Br}_4\text{I}_2\text{NO}_7\text{S}$ 에 대한 원소 분석

계산치 : C, 21.82; H, 0.58; N, 1.34

실측치 : C, 22.16; H, 0.33; N, 1.33

[실시에 7. 1-(ω -설포프로필)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디브로모스티릴)-3,3-디메틸인돌레니늄 베타인]

EtOH (30ml)중의 3,5-디브로모-4-하이드록시벤즈알데하이드[미국 뉴 햄프셔 윈드함 소재의 랜카스터 신테시스 리미티드(Lancaster Synthesis Ltd.)](2.0g, 7.14mmole), 1-(ω -설포프로필)-2,3,3-트리메틸인돌레니늄 베타인(Belg. 726.639; CA 73; P 82538a)(2.0g, 7.11mmole) 및 피페리딘(0.4ml)의 용액을 불활성 기체 대기하에 유지시킨다. 용액을 50분 동안 환류시키고 빙욕에서 냉각시킨다. 반응 혼합물을 진공하에 증발 건조시키고, 최소량의 메탄올(MeOH)에 용해시킨다. 그런 다음, 용액을 $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ (1:4 v/v) 전개액을 사용하여 실리카 겔(600g)상에서 크로마토그래피한다. 대부분 자주색 생성물 밴드를 함유한 분획을 모아서 2-프로판올($i\text{-PrOH}$)중 과량의 HCl 로 산성화시켜서 자주색에서 황금색으로 색을 변화시킨다. 용액을 진공하에 증발 건조시킨다. 잔사를 뜨거운 EtOH (약 25ml)에 용해시켜서 냉각시키면서 결정화한다. 분리된 고체를 여과로 수집하고, 빙-냉 EtOH /헥산(3:1 v/v)로 세척하고 진공 건조시켜 황금색 결정으로서 분석학적으로 순수한 화합물인 1-(ω -설포프로필)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디브로모스티릴)-3,3-디메틸인돌레니늄베타인(0.96g, 25%)을 수득한다. 이 화합물은 뚜렷한 융점이 없지만, 200℃ 이상의 온도에서 검게된다. 이 화합물을 제조하기 위한 상기한 방법은 제3도의 반응 A로서 일반적으로 예시된다. 이 화합물의 특성을 나타내는 분광 데이터는 하기 표 7에 나타낸다.

[표 7]

IR(KBr)cm ⁻¹	3438, 3055, 1606, 1577, 1519, 1475, 1406, 1372, 1305, 1277, 1212, 1173, 1124, 739
¹ H NMR(DMSO-d ⁶) δ	8.58(s, 2H), 8.29(d, J=16.0Hz, 1H), 7.97(d, J=7.7Hz, 1H), 7.84(d of d, J ₁ =2.0Hz 및 J ₂ =6.6Hz, 1H), 7.67(d, J=16Hz, 1H), 7.54-7.64(m, 2H), 4.81(t, J=7.6Hz, 2H), 3.77(v. br. s, 1H), 2.63(t, J=6.6Hz, 2H), 2.10-2.22(m, 2H), 1.76(s, 6H)
¹³ C NMR(DMSO-d ⁶)ppm	181.6, 155.6, 151.3, 143.8, 140.9, 135.1, 129.2, 129.1, 128.7, 123.0, 115.2, 112.5, 111.6, 52.2, 47.3, 45.5, 25.6, 24.8(3 동시 밴드)

C₂₁H₂₁Br₂NO₄S · ½EtOH에 대한 원소 분석

계산치 : C, 46.65; H, 4.27; N, 2.47

실측치 : C, 46.48; H, 4.50; N, 2.33

[실시예 8. 1-(ω-설포부틸)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디요오도스티릴)-벤조티아졸륨 베타인]

EtOH(30ml)중의 3,5-디요오도-4-하이드록시벤즈알데하이드(미국 뉴 햄프셔 윈드함 소재의 램카스터 신테시스 리미티드)(3.7g, 10mmole), 3-(ω-설포부틸)-2-메틸벤조티아졸륨 베타인 (Brit, 742.112; CA 50 : P 11149e)(3.71g, 13mmole) 및 피페리딘(0.8ml)의 혼합물을 불활성 기체 대기하에 유지시킨다. 용액을 1 시간 동안 환류시킨 다음 주위 온도로 냉각시킨다.

반응 혼합물을 i-PrOH중 충분한 1.93M의 염산으로 산성화시켜서 자주색에서 황색으로 색을 변화시킨 후, 용액으로부터 고체를 분리한다. 고체를 여과로 수집하고, EtOH로 세척하여 건조시킨다.

그런 다음, 고체를 2M 수성 수산화나트륨(5.2ml)을 함유하는 따뜻한(55℃) EtOH/MeOH/H₂O(3 : 2 : 1 v/v/v)(300ml)중에 용해시키고 셀라이트(미국 코벳티크 덴버 소재의 존스-맨빌 코포레이션)를 통해 여과하고 3M 수성 염산(6ml)을 가해서 침전시킨다. 빙욕에서 냉각시킨 후, 고체를 여과해서 수집하고, EtOH로 세척하여 진공중에서 건조시킨다. 그런 다음 고체를 아세트산(HOAc)(600ml)중에서 비등시키고 여과하고, 115℃에서 진공중에서 건조시켜 황색 분말로서 분석학적으로 순수한 화합물인 1-(ω-설포부틸)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디요오도스티릴)-벤조티아졸륨 베타인 (5.10g, 79%)을 수득한다. 상기 기술된 이 화합물을 제조하기 위한 방법은 제3도의 반응 B로서 통상적으로 예시된다. 이 화합물의 특성을 나타내는 분광 데이터는 하기 표 8에 나타낸다.

[표 8]

IR(KBr)cm ⁻¹	3436, 1608, 1572, 1529, 1497, 1458, 1396, 1318, 1267, 1208, 1038
¹ H NMR(DMSO-d ⁶) δ	8.55(s, 1H), 8.30-8.50(m, 3H), 7.92-8.16(m, 3H), 7.73-7.88(m, 2H), 4.95(br. t, J=7.5Hz, 2H), 2.53(t, J=7.1Hz, 2H), 1.98(br. m, 2H), 1.81(q, J=7.0Hz, 2H)
¹³ C NMR(DMSO-d ⁶)ppm	171.4, 159.1, 148.1, 146.1, 141.0, 140.6, 131.5, 129.2, 128.0, 123.9, 116.7, 112.2, 86.4, 50.0, 48.8, 27.2, 21.9(2 동시 밴드)

C₁₉H₁₇I₂NS₂O₄에 대한 원소 분석

계산치 : C, 35.58; H, 2.67; N, 2.18

실측치 : C, 35.52; H, 2.75; N, 2.06

[실시예 9. 1-(ω-설포에틸)-2-(4'-하이드록시-3',5'-디요오도스티릴)-3,3-디메틸인돌레닌 베타인]

EtOH/MeOH(2 : 1 v/v)(60ml)중의 3,5-디요오도-4-하이드록시-벤즈알데하이드 (3.73g, 10mmole), 1-(ω-설포에틸)-2,3,3-트리메틸-인돌레닌 브로마이드(US 2,503,776 : CA 44 : P 5738i)(6.61g : 19mmole) 및 피페리딘(2.0ml)의 혼합물을 불활성 기체 대기하에 유지시킨다. 이 용액을 4시간 동안 환류시키고, 주위 온도로 냉각시키고, 진공중에서 증발 건조시키면 갈색 잔사가 남는다. 갈색 잔사를 MeOH(2 내지 3ml)중에 용해시킨다. 이 용액을 트리에틸아민(NEt₃)(2ml)으로 처리하고 MeOH/CHCl₃(1 : 4 v/v) 전개액을 사용하여 실리카 겔상에서 크로마토그래피한다. 자주색 생성물 밴드를 함유하는 분획을 모으고 진공중에서 증발 건조시킨다. 이러한 조 생성물을 EtOH(10ml)중에 용해시키고 i-PrOH중 충분한 1.93M의 HCl로 산성화시켜서 자주색에서 황색으로 색을 변화시킨다. 이 용액을 증발 건조시킨다. 그런 다음, 잔사를 EtOH/헥산(3 : 1 v/v)에 용해시키고, 이 용액이 결정화될 때까지 냉동시킨다. 분리된 결정상 고체를 여