

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4065053号
(P4065053)

(45) 発行日 平成20年3月19日 (2008. 3. 19)

(24) 登録日 平成20年1月11日 (2008. 1. 11)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 21/76 (2006. 01)

GO 1 N 21/76

CO 9 K 11/07 (2006. 01)

CO 9 K 11/07

請求項の数 6 (全 17 頁)

| | | | |
|--------------|--------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平10-151738 | (73) 特許権者 | 501205108 |
| (22) 出願日 | 平成10年6月1日 (1998. 6. 1) | | エフ ホフマンーラ ロッシュ アクチェ ン ゲゼルシャフト |
| (65) 公開番号 | 特開平11-14545 | | スイス連邦、ツェーハー ー 4 0 7 0 パー ゼル、グレンツアッハーシュトラーセ 1 2 4 |
| (43) 公開日 | 平成11年1月22日 (1999. 1. 22) | (74) 代理人 | 100079049 |
| 審査請求日 | 平成17年3月14日 (2005. 3. 14) | | 弁理士 中島 淳 |
| (31) 優先権主張番号 | A 930/97 | (74) 代理人 | 100084995 |
| (32) 優先日 | 平成9年5月30日 (1997. 5. 30) | | 弁理士 加藤 和詳 |
| (33) 優先権主張国 | オーストリア (AT) | (74) 代理人 | 100085279 |
| | | | 弁理士 西元 勝一 |
| | | (72) 発明者 | マルコ ジャン ピエール ライナー |
| | | | オーストリア国 アー ー 8 0 4 5 グラッ アム アイヒェングルント 1 0 |
| | | | 最終頁に続く |

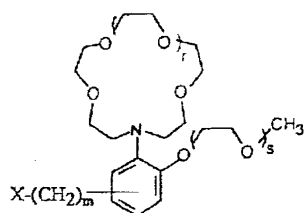
(54) 【発明の名称】 アルカリイオンの定量方法およびモノアザークラウンエーテル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中のアルカリイオンをルミノフォリック部分及びイオノフォリック部分を有する化合物と接触させ、前記イオノフォリック部分がサンプル中に存在するアルカリイオンと反応し、そのことによって前記ルミノフォリック部分のルミネセンス特性が変化し、その後、前記ルミネセンスを測定し、テスト読み取りを利用して前記アルカリイオンを定量する、アルカリイオンの定量方法であって、利用される前記化合物が下記一般式 I で表されるモノアザークラウンエーテルであることを特徴とする、アルカリイオンの定量方法。

【化 1】



(I)

(式 I 中、X はルミノフォリック部分であって、m は 0、1、或いは 2 であり、r と s は独立してそれぞれ 0、1 或いは 2 を意味する。)

【請求項 2】

ナトリウムイオンの定量に、 r 及び s がそれぞれ 1 及び 0 である前記一般式 I で表されるモノアザ - クラウンエーテルを使用することを特徴とする、請求項 1 のアルカリイオンの定量方法。

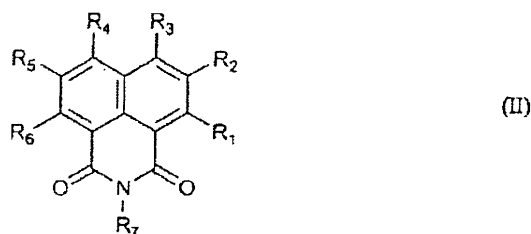
【請求項 3】

カリウムイオンの定量に、 r と s がそれぞれ 2 と 1 である前記一般式 I で表されるモノアザ - クラウンエーテルを使用することを特徴とする、請求項 1 のアルカリイオンの定量方法。

【請求項 4】

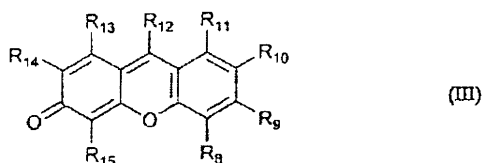
前記一般式 I の前記ルミノフォリック部分 X が、下記一般式 II のアミノ - ナフタルイミド基、又は、下記一般式 III のキサンテノン基であることを特徴とする請求項 1 から請求項 3 までのいずれか 1 項のアルカリイオンの定量方法。

【化 2】



(式 II 中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、及び R_6 のうちのの一つは - NH - 基であり、この基を介して X は前記一般式 I の化合物の - (CH₂)_m - 基と結合し、残りの置換基と R_7 はそれぞれ独立して水素、親油性基或いは親水性基或いはポリマーと結合する反応性基である。)

【化 3】

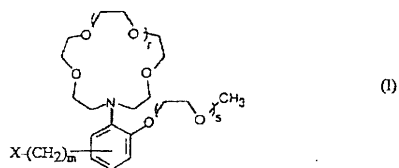


(式 III 中、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、及び R_{15} のうちのの一つが、化学結合であり、これを介して X は前記一般式 I の化合物のイオノフォリック部分に直接結合し ($m = 0$)、残りの置換基は、- OH、- OR₁₆ (R_{16} は親水性基或いは親油性基である)、- O - R₁₇ - G (R_{17} は親水性基或いは親油性基であり、G はポリマーと結合するための反応性基である)、或いは、- (CH₂)_n - COOH (n は 0 から 17 である) である。)

【請求項 5】

下記一般式 I で表されるモノアザ - クラウンエーテル。

【化 4】



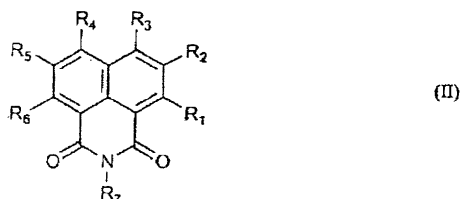
(式 I 中、X はルミノフォリック部分であり、 m は 0、1 或いは 2 であり、 r 及び s はそれぞれ独立して 0、1 或いは 2 を意味する。)

【請求項 6】

前記一般式 I における X が、下記一般式 II で表されるアミノ - ナフタルイミド基、もし

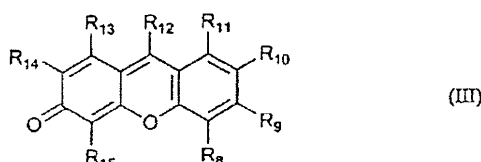
くは下記一般式III で表されるキサンテノン基である、請求項5記載のモノアザ - クラウンエーテル。

【化5】



(式II中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、及び R_6 のうちのの一つは - NH - 基であり、この基を介してXは前記一般式Iで表される化合物の $-(CH_2)_m$ - 基と結合し、残りの置換基と R_7 はそれぞれ独立して水素、親油性基、親水性基、またはポリマーと結合する反応性基である。)

【化6】



(式III中、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、及び R_{15} のうちのの一つが、化学結合であり、これを介してXは前記一般式Iで表される化合物のイオノフォリック部分に直接結合し ($m = 0$)、残りの置換基は、 $-OH$ 、 $-OR_{16}$ (ここで、 R_{16} は親水性基或いは親油性基である)、 $-O-R_{17}-G$ (ここで、 R_{17} は親水性基或いは親油性基であり、Gはポリマーと結合するための反応性基である)、或いは、 $-(CH_2)_n-COOH$ (n は0から17の整数) である。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はサンプル中のアルカリイオンを定量する方法に関する。詳細には、サンプル中のアルカリイオンがルミノフォリック部分(Luminophoric moiety)とイオノフォリック部分(Ionophoric moiety)を有する化合物 (= ルミノフォア - イオノフォア) に接触し、イオノフォリック部分がアルカリイオンと反応し、そのことによってルミノフォリック部分のルミネセンス特性が変化し、その後ルミネセンスが測定され、テスト読み取りを利用してアルカリイオンの濃度或いは活量が推測される、即ちアルカリイオンが定量される方法に関する。本発明は、又、アルカリイオンを定量するためにルミノフォア - イオノフォアとして使用されることが可能なジアザ - クリプタンドに関する。

【0002】

【従来の技術】

このタイプの定量方法はいわゆる "PET 効果" に基づく。この後者の用語はフォトンによって誘導されるイオノフォリック部分或いはイオノフォアからルミノフォリック部分或いはルミノフォアへの電子のそれぞれの移動 (Photoinduced electron transfer = PET) を意味し、この各々の移動はルミノフォアの (相対的) ルミネセンス強度及びルミネセンス減衰時間の減少をもたらす。しかし、吸収波長及び発光波長は、その過程において基本的に影響を受けずに保持される (J. R. Lakowicz, "Topics in Fluorescence Spectroscopy", Volume 4: "Probe Design and Chemical Sensing" ; Plenum Press, New York & London (1994))。

【0003】

イオンがイオノフォアと結合することによって、PET 効果は部分的に或いは完全に抑制されるため、ルミノフォリック部分のルミネセンスは強くなる。よって、サンプル中のイ

10

20

30

40

50

オンの濃度或いは活量は例えばルミネセンス強度及び／又はルミネセンス減衰時間などのルミネセンス特性の変化を測定することにより推測され得る。

【 0 0 0 4 】

米国特許第 A 5 , 5 1 6 , 9 1 1 には、細胞内カルシウムを定量するための蛍光指示薬として、光学的指示薬として機能し得る蛍光置換基を有するものが公開されている。

【 0 0 0 5 】

米国特許第 A 5 , 4 3 9 , 8 2 8 には、ジアザ - クリプタンドをルミノフォア - イオノフォアとして利用した前記方法と同種の方法が記載されている。この方法においては、ジアザ - クリプタンドは、蛍光性クマリンとともにフルオロフォアとして機能化されていて、このジアザ - クリプタンドが、その構造に対応して、リチウム、ナトリウム及びカリウムイオンを選択するものである。このルミノフォア - イオノフォアは中性 pH のサンプルにおいて使用され得ること、および、そのような系において利用されるのがむしろ好ましいことが記述されている。

10

【 0 0 0 6 】

しかし、生理学的 pH 範囲において、蛍光シグナルは、サンプルの pH に大きく依存し、蛍光シグナルは pH の減少に伴って強くなり、特に pH 7 . 4 以下に低下したところから顕著に強くなることが研究報告されている (Frank Kastenholz, Inaugural Dissertation, University of Cologne, 1993, Fig.32, p.54) 。このことは生物学的サンプルで行われる定量の正確性に影響を及ぼす。更に、用いられているクマリンが波長約 3 3 6 nm に吸収を示すため、商用 LED によって励起することができないという欠点もある。

20

【 0 0 0 7 】

又、米国特許 A 5 , 1 6 2 , 5 2 5 に記述されるルミノフォア - イオノフォアも同様な欠点を有する。

【 0 0 0 8 】

Tetrahedron Letters, Volume 31, No.36, pp.5193-5196(1990) には、芳香族環に結合している 2 つの窒素原子を有するジアザ - クリプタンド、即ち、アリアル窒素及びアニリン型窒素のそれぞれを有するジアザ - クリプタンドについて記載されている。しかし、出願人による研究では、このジアザ - クリプタンドが血液の生理学的濃度及び生理学的 pH 値 (7 . 0 - 7 . 6) においてカリウムイオンを定量するのには適さないことが分かった。

【 0 0 0 9 】

30

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、従来のアルカリイオンの定量方法を改良すること、及び生理学的 pH 値の範囲においてルミネセンス特性がサンプルの pH 値に大幅に影響されることがなく、生物学的サンプルにおける定量に適しているルミノフォア - イオノフォアを提供することである。特に、生理学的濃度にあるアルカリイオンを定量するのに適している、即ち、ルミネセンスシグナルがアルカリイオン濃度に強い依存性を示すアルカリイオンの定量方法を提供することである。

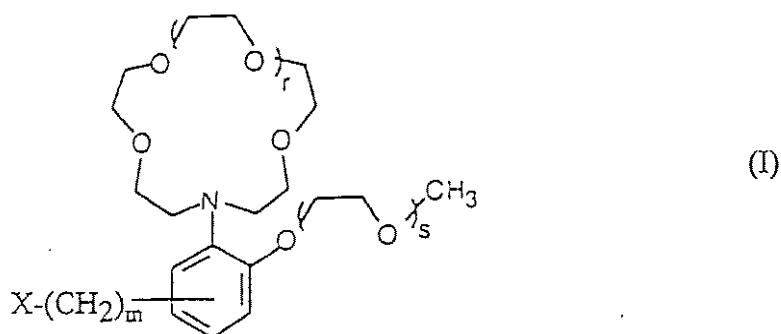
【 0 0 1 0 】

【課題を解決するための手段】

この目的は、前記の方法において、一般式 I のモノアザ - クラウンエーテルを化合物 (ルミノフォア - イオノフォア) として用いる場合に達成される。

40

【化 7】



10

ここで、Xはルミノフォリック部分であり、mは0、1、或いは2、r及びsはそれぞれ独立して0、1、或いは2を意味する。

【発明の実施の形態】

【0011】

上記の一般式Iで示すモノアザ-クラウンエーテルは新規である。これらの新規ルミノフォア-イオノフォアは、生理学的pH値及び生理学的濃度においてアルカリイオンを定量するのに、非常に有益である。

【0012】

一般式Iの本発明のモノアザ-クラウンエーテルは、110～180ミリモル/リットルの濃度範囲にあるナトリウムイオンを定量するのに、及び1.5～8.0ミリモル/リットルの濃度範囲にあるカリウムイオンを定量するのに特に有益である。

20

【0013】

特定の理論との結びつきはないが、本発明のモノアザ-クラウンエーテルが有益な特性を示すのは、窒素が芳香族性窒素であるという事実によるものと考えられている。

【0014】

ルミノフォリック部分Xは、イオノフォリック部分との組み合わせによってPET効果を生じ得る全てのルミノフォリック部分を含むものである。非常に多数のルミノフォリック部分(moieties)が、イオノフォアとの組み合わせによってPET効果をもたらすこと、或いは原則的にこの目的に適していることが文献からわかっている。これら周知のルミノフォリック部分を、一般式Iのベンゼン環と結合させることにより、新規化合物が得られる。新規化合物がPET効果を有するか否かについては、当業者が実験で確かめることができる。結合は、窒素に対して、オルト位、2つのメタ位、パラ位、いずれでもよいが、中でもパラ位にの位置に結合するのが好ましい。

30

【0015】

PET効果が起こるためには、イオノフォリック部分の電子ドナーがルミノフォリック部分の電子系から電気的に分離されていることが特に不可欠であることは、当業者に知られている。当技術分野においてよく知られているように、このようなイオノフォリック部分とルミノフォリック部分との電気的分離は、二つの部分をスペーサー基($(CH_2)_m$ 鎖($m > 0$))、或いは、仮想スペーサー($m = 0$) (例えば、ルミノフォリック部分の面をベンゼン環の面に対して回転させることによって)のいずれかによって分離することで達成され得る。従って、スペーサーの機能は、イオノフォリック部分の電子系がルミノフォリック部分の電子系と共役するのを妨害するものである。

40

尚、電子分離をしているかどうかは、例えば吸収波長及び発光波長に関して際立った変化がないことによって確認できる。

【0016】

ナトリウムイオンの定量には、一般式Iのr及びsがそれぞれ1及び0であるモノアザ-クラウンエーテルを用いるのが好ましい。

【0017】

カリウムイオンの定量には、一般式Iのrとsがそれぞれ2と1であるモノアザ-クラウンエーテルを用いるのが好ましい。

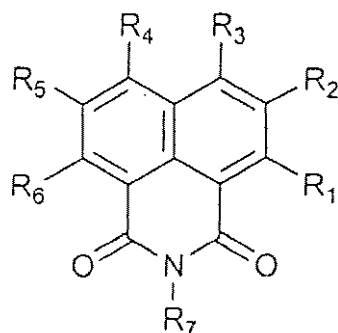
50

【 0 0 1 8 】

一般式 I のルミノフォリック部分 X は、一般式 II のアミノ - ナフタルイミド基、或いは一般式 III のキサントノン基であることが好ましい。

【 0 0 1 9 】

【 化 8 】



(II)

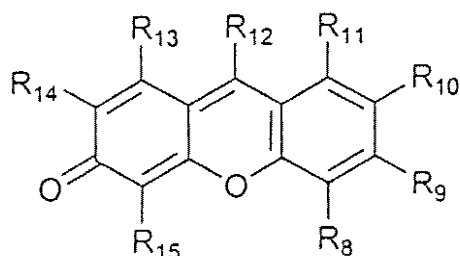
10

【 0 0 2 0 】

ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、及び R_6 のうちの一つは - NH - 基であり、この基により X は前記一般式 I で表される化合物の $-(CH_2)_m$ - 基に結合される。残りの置換基と R_7 は、それぞれ独立して水素、親油性基、親水性基、またはポリマーと結合する反応性基である。

【 0 0 2 1 】

【 化 9 】



(III)

30

【 0 0 2 2 】

ここで、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、及び R_{15} のうちの一つは化学結合であり、その化学結合により X が前記一般式 I の化合物のイオノフォリック部分と直接結合している ($m = 0$)。残りの置換基は - OH、- OR₁₆ (R_{16} は親水性基或いは親油性基である)、- O - R₁₇ - G (R_{17} は親水性基或いは親油性基であり、G はポリマーと結合するための反応性基である)、或いは $-(CH_2)_n - COOH$ (n は 0 から 17 である) である。

【 0 0 2 3 】

一般式 II において、 R_3 或いは R_4 が - NH - 基であり、 R_3 或いは R_4 を介して、ルミノフォリック部分が上記の一般式 I の $-(CH_2)_m$ - 基に結合しているのが好ましい。一般式 III において、 R_{12} が化学結合であり、 R_{12} を介して、ルミノフォリック部分が上記の一般式 I のイオノフォリック部分 ($m = 0$) に直接結合しているのが好ましい。

【 0 0 2 4 】

好ましい親油性基としては、例えば炭素数 20 までの置換又は無置換のアルキル基及びアルコキシル基が挙げられる。好ましい親水性基としては、例えば、少なくとも 1 つの水酸基及び / 又は測定溶液の pH において解離する官能基 (例えば、カルボン酸、スルホン酸、及びリン酸など) を一つ以上有する炭素数 1 ~ 17 のアルキル基が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

アミノ修飾されたポリマー (aminofunctionalized polymer: 例えば、アミノセルロース、及びアミノ修飾されたポリアクリルアミド (aminofunctionalized polymer) と結合する反

50

応基としては、例えば米国特許第 A 4 , 7 7 4 , 3 3 9 号、表 4 に記載されているものが挙げられる。

【 0 0 2 6 】

4 5 0 n m 以上の波長の光により励起され得るルミノフォリック部分が好ましい。

【 0 0 2 7 】

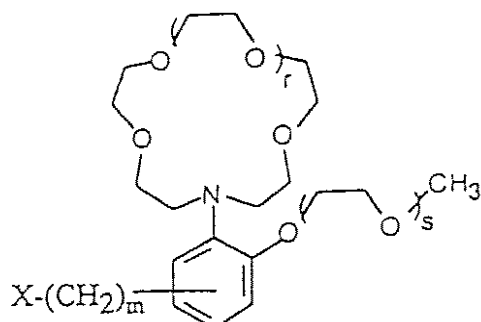
アルカリイオンを定量するための本発明の化合物は、溶解状態でサンプル溶液に加えられてもよい。又、これらの化合物は、センサーを構成していてもよく、その場合は、例えば図 6 に記載されているようなハイドロゲルから形成されている層に含有させてもよい。

【 0 0 2 8 】

本発明は、更に一般式 I のモノアザ - ク라운エーテルにも関する。

10

【 化 1 0 】



(I)

20

ここで、X はルミノフォリック部分であり、特に前記のとおり X は、一般式 II のアミノナフタリイミド基、または、一般式 III のキサンテノン基であるのが好ましい。また、m は 0、1、或いは 2、r 及び s はそれぞれ独立して 0、1、或いは 2 を意味する。

【 0 0 2 9 】

【 実施例 】

以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。実施例においては、本発明に用いられるのに好ましいモノアザ - ク라운エーテルの合成例と特性をいくつか示す。その他の化合物については、当業者はこれと類似した方法で合成することができる。

【 0 0 3 0 】

1 . 本発明のモノアザ - ク라운エーテルの合成 .

30

1 . 1 . 本発明のモノアザ - ク라운エーテルのイオノフォリック部分の合成

本発明によるモノアザ - ク라운エーテルのイオノフォリック部分の合成経路の概要を以下に示す。

【 0 0 3 1 】

プロセスの概要

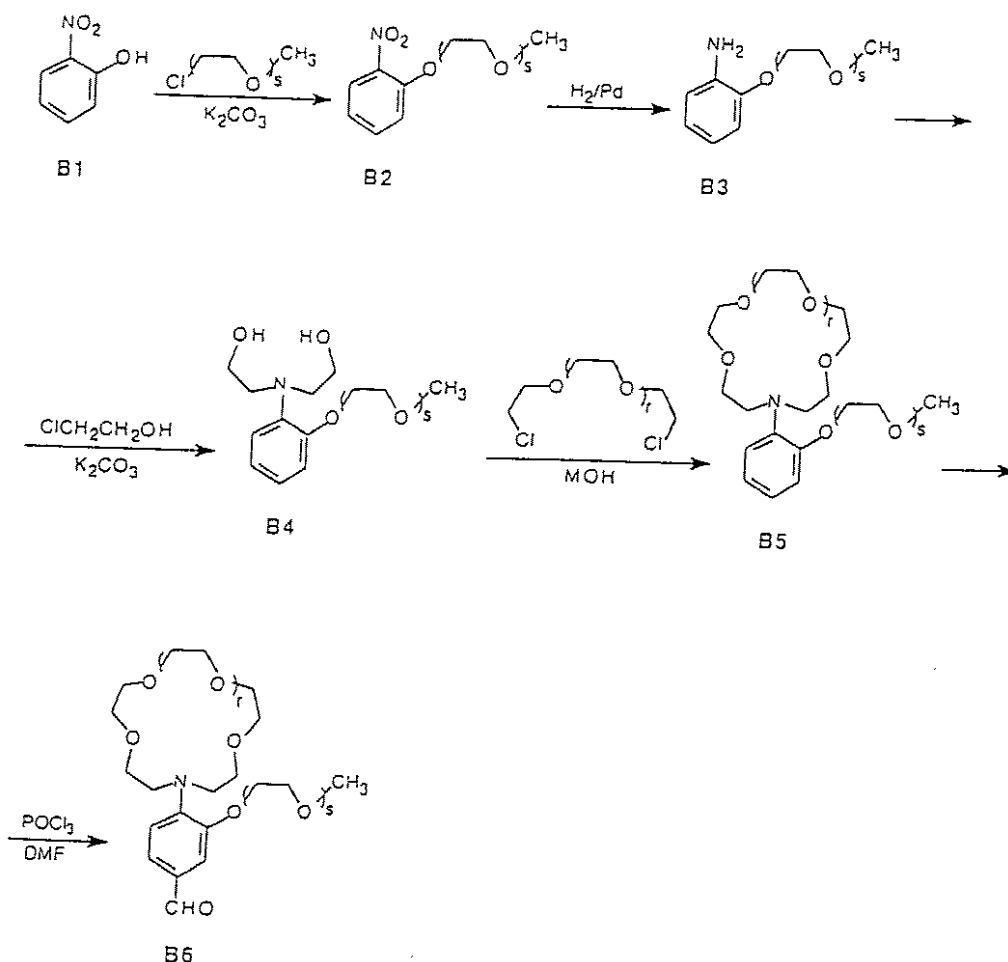
側鎖を有するモノアザクラウン（ラリアット構造）エーテルを、2つの主要な工程を経て合成した。アルキル化及び環化である。ジメチルホルムアミド中で、 K_2CO_3 の存在下、種々の鎖長（ $s=0,1,2$ それぞれ）のクロロエチルアルコキシエーテルを用いて、2 - ニトロフェノール B 1 をアルキル化した。その結果得られたニトロ化合物 B 2 を水素化してアミン B 3 を得た。次いで、クロロエタノール中で、 K_2CO_3 を塩基として、アミノ基をアルキル化し、2 - [N,N-bis(2- ヒドロキシエチラミノフェニール - アルコキシエチル - エーテル) B 4（ $s=0,1,2$ それぞれ）を得た。これらのビス - ヒドロキシ化合物 B 4 を、アルカリ金属の水酸化物を含有するジオキサン中で、エチルグリコールジクロロエチルエーテル（ $r=0,1,2$ それぞれ）で環化し、ラリアット構造エーテル B 5（ $r=0,1,2; s=0,1,2$ それぞれ）を得た。これらのエーテル B 5（フェニルアザクラウンエーテル）をホルミル化し、中間物質 B 6（ $r=0,1,2; s=0,1,2$ のそれぞれ）を得た。

40

合成スキームを以下に示す。

【 0 0 3 2 】

【 化 1 1 】



【 0 0 3 3 】

各反応ステップの説明

N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-メトキシアリニン B 4 (s=0):

452グラム(4モル)のo-アニシジン(1932グラム(24モル)の2-クロロエタノールに溶解し、80℃で15分間加熱した。続いて、温度が110℃(発熱反応)未満に保持されるように、608グラム(4.4モル)の K_2CO_3 を、徐々に加えた。混合液を95℃で22時間加熱し、その後冷却した。未反応の約800mlのクロロエタノールを蒸発させ、残留物を1リットルの水で希釈し、1リットルのクロロホルムで2回抽出した。抽出物を1.5リットルの水で5回洗浄し、 K_2CO_3 で乾燥した。溶媒を蒸発させ、404グラム(収率48%)の褐色の油を得た。薄層クロマトグラムでは純度約95%を示した。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$, (ppm): 3.18(t, 4H), 3.50(t, 4H), 3.60(m, 2H), 3.82(s, 3H), 6.90(m, 2H), 7.10(m, 1H), 7.19(m, 1H)

【 0 0 3 4 】

2-メトキシフェニルアザ-15-クラウン-5 B 5 (s=0, r=1):

この工程は、J.P.Dix and F.Vogtle, Chem. Ber., 113, 457-470 (1980)の記載に基づいて行った。

2210mlのジオキサンに403グラム(1.91モル)のB4(s=0)を溶解し、80℃で20分間加熱した。次いで、168グラム(4.20モル)の粉砕NaOHを3時間以内に徐々に加えた。300ml(1.93モル)のビス(2-クロロエトキシエタン)を一回で加えると、温度は95℃まで上がった。その後、反応混合液を95℃で30時間加熱した。高温の混合液を濾過し、溶媒を蒸発させた。残留物を、234グラム(1.91モル)の NaClO_4 を含む640mlのメタノールで処理した。混合液を60℃で30分間攪拌し、約

300mlまで濃縮した。860mlの酢酸エチルを加え、室温で20分間攪拌した。次いで混合液を室温で2時間放置した。

【0035】

得られた沈殿物を濾過し、200mlの酢酸エチルで2回洗浄し、室温で30分間乾燥すると、199グラムの軟質の白色粉末状のアザ-クラウンナトリウム過塩素酸塩錯体が得られた。この粉末を、600mlのジクロロメタン及び600mlの水との混合液に溶解し、その水相を400mlのジクロロメタンで再び抽出した。有機溶媒層を1つにして、600mlの脱イオン水で8回洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。ジクロロメタンを蒸発させると、100.4グラムの褐色の油（収率16%）が得られた。

^1H NMR(CDCl_3), (ppm): 3.49(t, 4H), 3.68(t, 16H), 3.82(s, 3H), 6.88(m, 3H), 7.12(m, 1H).

10

【0036】

4-ホルミル-2-メトキシフェニルアザ-15-クラウン-5 B6 (s=0, r=1):

500mlの三口フラスコ内で、100グラム(308ミリモル)のB5 (s=0, r=1)を145ml(1850ミリモル)のジメチルホルムアミドに溶解し、-5℃に冷却した。滴下漏斗を使用して57.4ml(616ミリモル)の POCl_3 を滴下して加えた。この時、フラスコ内部の温度が5℃を超えないようにした。次いで、室温で16時間攪拌し、500グラムの氷に注入し、 K_2CO_3 の飽和水溶液でpH7に調整した。溶液を500mlのクロロホルムで2回抽出した。クロロホルム相を500mlの水で2回洗浄し、次いで、100グラムの MgSO_4 で1時間乾燥した。溶媒を蒸発させると、85グラムの薄黄色の油が得られた。薄黄色の油は、室温で一晩放置したところ、結晶化した。エチルアセテート/ヘキサン(1:4)で再結晶化し、56グラムの薄オレンジ色の結晶（収率51%）を得た。

20

^1H NMR(CDCl_3), (ppm): 3.68(t, 16H), 3.78(t, 4H), 3.82(s, 3H), 7.05(m, 1H), 7.28(m, 2H), 9.78(s, 1H).

【0037】

1.2 本発明のモノアザ-クラウンエーテルの合成法

本発明のモノアザ-クラウンエーテルの合成方法を以下に示す。合成は、2つのルミノフォリック部分（アミノナフトールイミド及びキサンテノンそれぞれについて）について行った。以下に示す合成スキーム中、“Y”はイオノフォリック部分を示す。

【0038】

30

ルミノフォリック部分がアミノナフトールイミド基である場合の合成プロセスルミノフォリック部分とイオノフォリック部分との間のスペーサーとして1つの CH_2 基を有する本発明の化合物を合成するため、まず、化合物C1（即ち、前記合成スキームにおいてはB6であって、YはB5を表わす。）をオキシムC2に変換させ、Znの酢酸溶液を用いて還元し、アミンC3を得た。以下に概略的に示すように、C6とC7を K_2CO_3 の存在下で、ジメチルホルムアミド中で反応させることによってアミノナフトールイミドC8を得、これとアミンC3を結合させ、本発明の化合物C9を合成した。

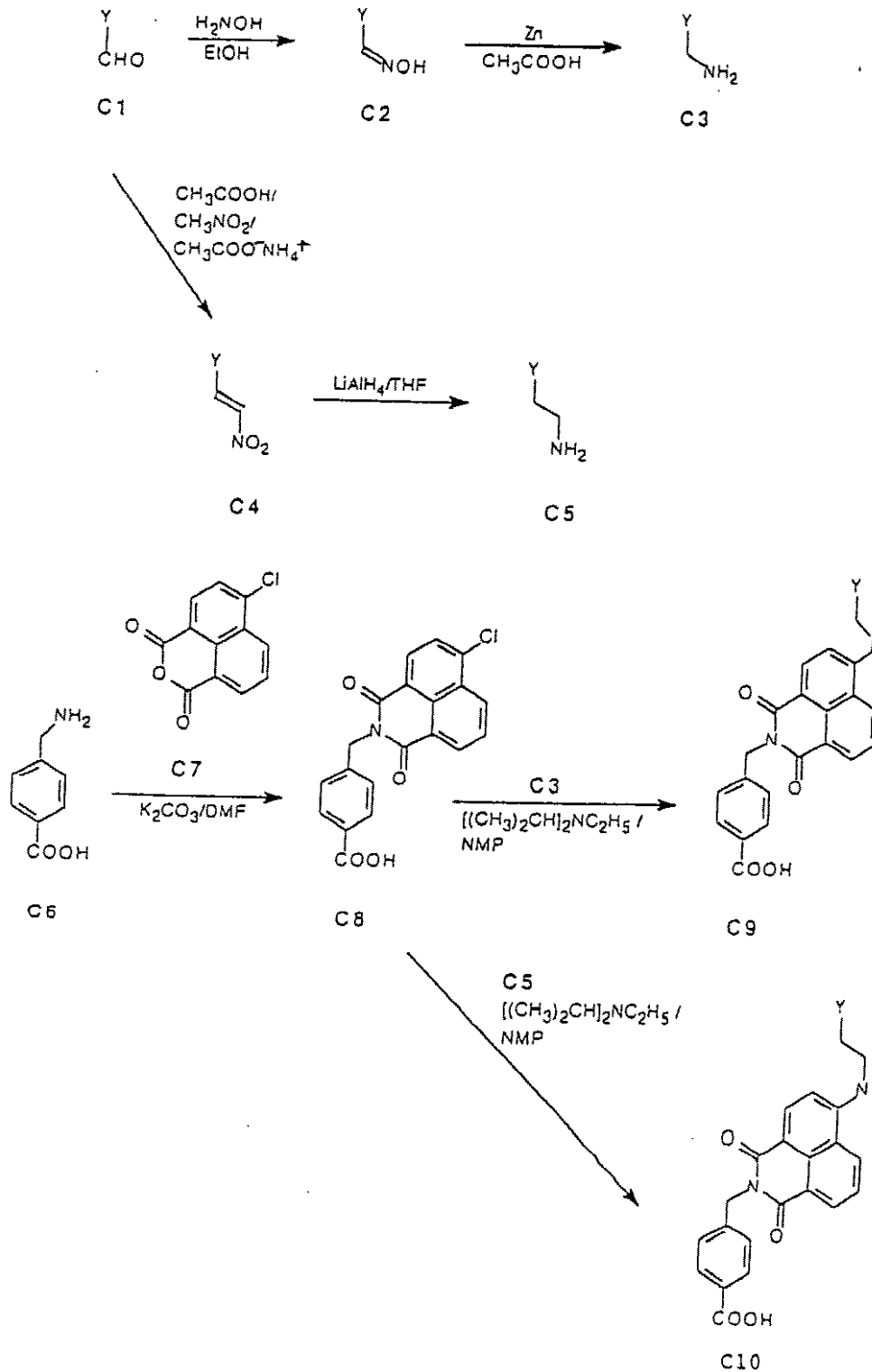
【0039】

ルミノフォリック部分及びイオノフォリック部分間にスペーサーとして二つの CH_2 基を有する化合物を合成するために、まず最初に、化合物C1を酢酸アンモニウムの存在下で非常に多量のニトロメタンと反応させて化合物C4を得、更に化合物C4を、 LiAlH_4 によってTHF中で還元し、アミンC5を得た。アミンC5とアミノナフトールイミドC8とを結合させ、化合物C10を合成した。以下に合成スキームを示す。

40

【0040】

【化12】



【 0 0 4 1 】

各反応ステップの説明

4-オキシミル-2- メトキシフェニルアザ-15-クラウン-5 C 2 (s=0, r=1) :

80グラム(226ミリモル)のB6を含む550mlのエタノールに、20.4グラム(293ミリモル)のヒドロキシルアミン塩酸塩及び20.4グラム(146ミリモル)の K_2CO_3 を含む550mlの水溶液を加えた。混合液を室温で16時間、70℃で3時間攪拌した。その後、エタノールを蒸発させ、残留物を500mlのクロロホルムと300mlの水との混合液に溶解した。水層を500mlのクロロホルムで抽出した。クロロホルム抽出液を1つにし、500mlの水で2回洗浄し、 K_2SO_4 で乾燥した。溶液

10

20

30

40

50

を蒸発させ、80.1グラムの黄色の油を得た（収率：96％）。

【0042】

4-アミノメチル-2-メトキシフェニルアザ-15-クラウン-5 C3 (s=0, r=1) :

45グラム（122ミリモル）のC2 (s=0, r=2 それぞれ）を含む450mlの酢酸に、冷却しながら、78グラム（1180ミリモル）の亜鉛粉を徐々に加えた。この懸濁液を室温で18時間、さらに70 で3時間攪拌し、濾過して200mlのエタノールで3回洗浄した。溶媒を蒸発させ、得られた油を300mlのクロロホルムと300mlの水の混合液に溶解し、6NのKOHでpH 12に調整した。水層を500mlのクロロホルムで洗浄し、K₂CO₃で乾燥した。溶媒を蒸発させると、35.2グラムの茶色がかった黄色の油（収率78％）が得られた。薄層クロマトグラフでは純度約70％を示し、ニン

10

【0043】

4-ニトロエチレニル-2-メトキシフェニルアザ-15-クラウン-5 C4 (s=0, r=1) :

100mlの酢酸に、18.8グラム（50ミリモル）のB6 (s=0, r=1)及び38.5グラム（500ミリモル）の酢酸アンモニウムを懸濁し、室温で10分間攪拌した。次に、59.4ml（1100ミリモル）のニトロメタンを加えた。混合液を60 で5時間加熱し、次いで氷水に注入した。得られた結晶を濾過し、水で洗浄し、P₂O₅を使用して乾燥器で乾燥した。11.9グラムの暗赤色の針状の生成物（収率60％）が得られた。¹H NMR(CDCl₃), (ppm):3.68(t, 16H), 3.78(t, 4H), 3.82(s, 3H), 6.88(m, 1H), 7.08(m, 2H), 7.45(d, 1H), 7.85(d, 2H).

20

【0044】

4-アミノエチル-2-メトキシフェニルアザ-15-クラウン-5 C5 (s=0, r=1) :

500mlの三口フラスコ中の200mlテトラヒドロフランに、3.8グラム（100ミリモル）のLiAlH₄を徐々に加えた。次いで4グラム（10ミリモル）のC4 (s=0, r=1 それぞれ）を含む50mlテトラヒドロフランを2時間内で滴下した。混合液を還流しながら4時間加熱し、次いで氷浴中で冷却した。未反応のLiAlH₄を分解するために、6NのKOHを加えた。次いで、濾過し、溶媒を蒸発させ、残留物を150mlのクロロホルムに溶解し、150mlの水で2回洗浄し、15グラムのK₂CO₃で乾燥した。溶媒が蒸発すると、4.9グラムのオレンジ色の油（収率125％）が得られた。薄層クロマトグラフでは約80％の純度を示し、ニンヒドリンで処理すると、スポットはブルーがかった赤色（bluish violet）に変わった。このアミンは、これ以上精製することなく、そのまま使用した。

30

【0045】

4-クロロ-N-(4-カルボキシフェニルメチル)-1,8-ナフタルイミド C8 :

46.4グラム（200ミリモル）の4-クロロ-1, 8-ナフタレン酸無水物C7、30.2グラム（200ミリモル）の4-アミノメチル安息香酸C6及び13.8グラム（100ミリモル）のK₂CO₃を、2リットルのジメチルホルムアミドに懸濁し、室温で16時間、60 で6時間攪拌した。次に混合液を4リットルの水に注入し、6NのHClを用いてpH 4に調整した。得られた沈殿物をろ取し、60 で18分間乾燥すると、36グラムのオフホワイト色の粉末（収率51％）が得られた。

40

【0046】

4-{4'-[4'-C-(アザ-15-クラウン-5)-3'-メトキシフェニルメチルアミノ]-1',-8'-ナフタルイミジルメチル}-安息香酸C9 :

3.68グラム（10ミリモル）のC3、5.05グラム（70％、10ミリモル）のC8 (r=1, s=0)、及び3.25グラム（25ミリモル）のジイソプロピルエチルアミンを、25mlのN-メチルピロリジノンに懸濁し、110 で15時間加熱し、次いで冷却して、475mlの2％酢酸中に注入した。得られた沈殿物をろ取し、100mlの水で2回洗浄し、P₂O₅を使用して乾燥器で18時間乾燥すると、C3と生成物との混合物である4.6グラムの茶色がかった黄色の固体が得られた。

50

【 0 0 4 7 】

この固体を、加熱されたクロロホルム/メタノール(3:1)の混合液に溶解し、その後、濾過した。濾液を60グラムのシリカゲル100が充填されたカラムに注入し、クロロホルム/メタノール(3:1)で洗浄し、未反応のC3を除去した。その後、1%の酢酸を含むクロロホルム/メタノール(3:1)で溶出させると、0.58グラム(収率8.5%)の所望の生成物が得られた。

$^1\text{H NMR}(\text{D}_3\text{CS}(=\text{O})\text{CD}_3)$, (ppm): 3.25(t, 4H), 3.50(t, 16H), 3.75(s, 3H), 4.15(t, 1H), 4.58(d, 2H), 5.25(s, 2H), 6.78(d, 1H), 6.88(m, 2H), 7.38(d, 2H), 7.55(m, 2H), 7.82(d, 2H), 8.20(d, 2H), 8.50(m, 1H), 8.80(d, 1H).

$\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{13}$ 計算値(ジアセテート): C62.75; H6.14; N5.23.、元素分析値: C62.37; H6.09; N5.12.

10

【 0 0 4 8 】

4- { 4'-[4''-C-(アザ-15-クラウン-5)-3''-メトキシフェニルメチルアミノ]-1', -8'-ナフタリイミジルメチル } - 安息香酸 C 1 0 :

1.85グラム(5ミリモル)のC5、2.62グラム(80%、10ミリモル)のC8($r=1, s=0$ それぞれ)、及び1.63グラム(12.5ミリモル)のジイソプロピルエチルアミンを、12.5mlのN-メチルピロリジノンに懸濁し、110で15時間加熱した。次に、冷却後、238mlの2%の酢酸に注入した。その結果生じた沈殿物を濾過し、50mlの水で洗浄し、 P_2O_5 を用いて乾燥器で18時間乾燥すると、C5と生成物との混合物である1.8グラムの茶色がかった黄色の固体が得られた。この固体を、1000mlの加熱されたクロロホルム/メタノール(9:1)の混合液に溶解し、その後、濾過した。濾液を180グラムのシリカゲル100が詰められたカラムに注入し、未反応のC5を除去し、1%の酢酸を含むクロロホルム/メタノール(9:1)で洗浄して、0.52グラム(収率14.9%)の所望の生成物を得た。

20

$^1\text{H NMR}(\text{D}_3\text{CS}(=\text{O})\text{CD}_3)$, (ppm): 2.90(t, 2H), 3.25(t, 4H), 3.50(t, 16H), 3.60(t, 2H), 3.75(s, 3H), 4.45(t, 1H), 5.25(s, 2H), 6.78(d, 1H), 6.88(d, 1H), 6.95(d, 1H), 7.25(m, 2H), 7.65(d, 1H), 7.80(d, 2H), 7.95(t, 1H), 8.25(d, 1H), 8.45(d, 1H), 8.75(d, 1H).

F A B M S (70eV, m-nitrobenzylalcohol dispersion with LiJ): 711(15%), (M+2Li-H); 670(31%), (M-CO₂-H+2Li); 313(100%) (phenylaza-crown+Li)

30

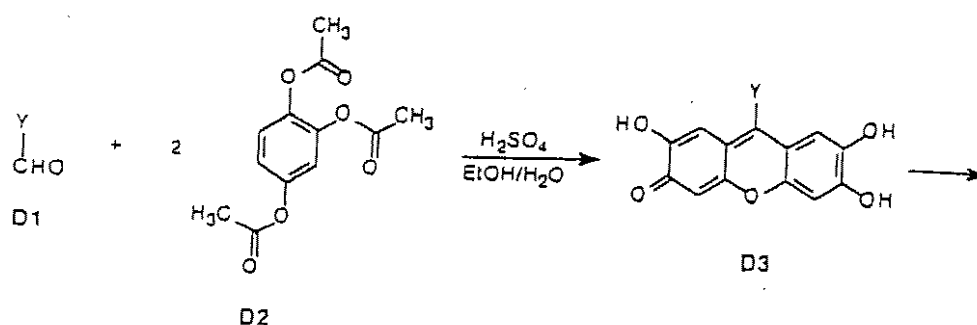
【 0 0 4 9 】

ルミノフォリック部分がキサンテノン基である場合の合成プロセス

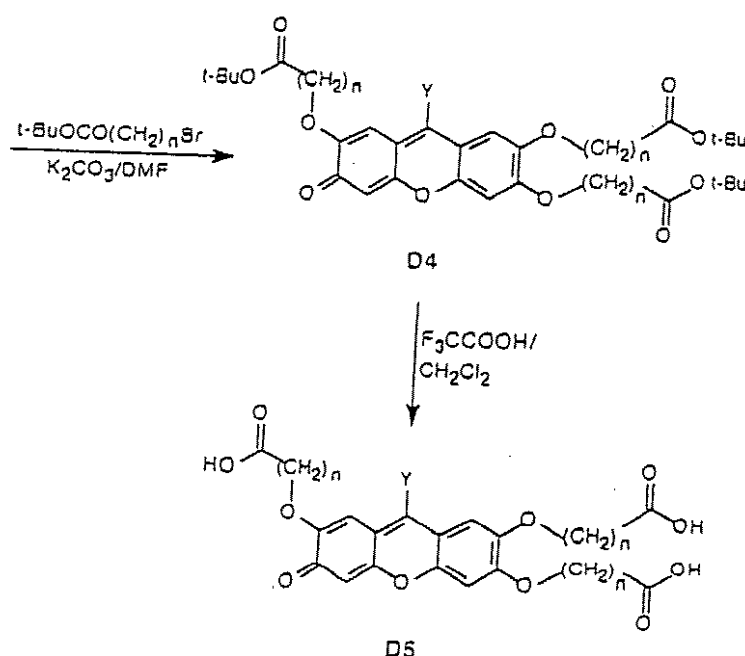
以下に、合成スキームを示す。

【 0 0 5 0 】

【 化 1 3 】



10



20

【 0 0 5 1 】

8-[4'-C-(アザ-15-クラウン-5)-3'- メトキシフェニル]-2,3,7-トリヒドロキシ発光体-6-オン D 3 (r=1,s=0):

6.51グラム(25ミリモル)のトリアセトキシベンゼンを含む60mlの50%(v/v)エタノール懸濁液に、5mlの高濃度 H_2SO_4 を滴下し、10分間攪拌した後、4.42グラム(12.5ミリモル)のB6(s=0,r=1)を一回で加えた。この懸濁液を80で22時間加熱した。その結果、エタノールのバルクは蒸発した。残留物を50mlの水で希釈し、25%のテトラメチルアンモニウム水酸化物でpH5に調整し、一晩放置した。液体をデカントし、赤色の固体を50mlの水で3回洗浄し、50mlのメタノールで3回こすった(trituration)。溶媒は蒸発させ、4.2グラム(33.5%)の赤色の泡状の生成物が得られた。この生成物をこのまま次のステップで利用した。

40

【 0 0 5 2 】

8-[4'-C-(アザ-15-クラウン-5)-3'- メトキシフェニル]-2,3,7-トリ-t-ブトキシカルボニルメチル発光体-6-オン D 4 (r=1,s=0):

1.14グラム(2ミリモル)のD3(r=1,s=0)、1.00グラム(6ミリモル)のヨウ化カリウム(KJ)、1.76グラム(9ミリモル)の K_2CO_3 及び1.76グラム(9ミリモル)のt-ブチルプロモアセテートを、10mlのジメチルフォルムアミドに懸濁し、110で1時間加熱した。混合液を冷却後、90mlの水で希釈した。この溶液を、80mlのクロロホルムで2回抽出し、160mlの水で3回洗浄し、 K_2CO_3 で乾燥した。溶液を蒸発させたところ、1.5グラムの濃い赤色のガム様の物質が得られた

50

。粗生成物質を、シリカゲル 100 でクロロホルム/メタノール (9 : 1) を用いて精製し、0.95 グラムの油を得た。

【0053】

8-[4'-C-(アザ-15-クラウン-5)-3'-メトキシフェニル]-2,3,7-トリカーボキシメチルフロア-6-オン D5:

0.93 グラム (1.1 ミリモル) の D3 ($r = 1$, $s = 0$) を 2.5 ml のジクロロメタンに溶解し、0.5 ml のトリフルオロ酢酸 (TFA) を加えた。この混合液を 40 で 4 時間加熱した。その後、溶媒および TFA を蒸発させて、残留物を 10 ml のメタノールに溶解し、メタノールを蒸発させた。この操作を 3 回繰り返し、TFA を完全に除去したところ、0.87 グラムの赤色のガム様の物質が得られた。このガム様の物質は、以下に説明する固定化反応にそのまま利用した。

【0054】

2. 本発明によるモノアザ-クラウンエーテルの発光特性

図 1 ~ 図 4 に、所定のアルカリイオン濃度の関数として、セルロースに固定化された本発明の化合物の溶液中におけるルミネセンス特性を示した。表の縦軸はそれぞれの相対的ルミネセンス強度を示す。

【0055】

図 1 に、本発明のモノアザ-クラウンエーテル C9 の水溶液 (2×10^{-5} モル/リットル; 30 ミリモル/リットル トリス/HCl 緩衝液; CO_2 - free; $\text{pH} = 7.4$; 37) の相対的発光強度を示す。各々の水溶液のナトリウム濃度は、0, 50, 100, 150, 200 ミリモル/リットルである。横軸は波長 (nm; 水平座標) を示す。励起スペクトル (左側) 及び発光スペクトル (右側) は、市販されている蛍光分光光度計を使用して測定した。

【0056】

図 2 は、アミノセルロース上に共有結合的に固定化された本発明のモノアザ-クラウンエーテル C9 の相対的発光強度を示す。

セルロース繊維上への固定化は、以下のように行なった。

0.03 ミリモルのクラウンエーテル C9、0.06 グラム (0.3 ミリモル) の N,N-ジクロヘキシル-1,3-カルボジイミド、0.4 グラム (0.3 ミリモル) の N-ヒドロキシサクシニイミド、及び 5 グラムの活性化されたセルロース (SU-A-1, 028, 677, CA99: 177723 h に記載された方法に基づいて製造されたもの) を 2 ml のジメチルホルムアミド中で 20 時間懸濁した。セルロースをろ取し、5 ml のジメチルホルムアミドで 5 回、5 ml の水で 1 回、5 ml の 0.2 N の HCl で 2 回、5 ml の水で 1 回、5 ml の 0.2 N の NaOH で 2 回、5 ml の水で 10 回、5 ml のアセトンで 2 回、及び 5 ml のエーテルで 2 回洗浄し、室温で 16 時間乾燥した。次に、セルロースをふるい分けした (25 μm)。

【0057】

センサーディスクは以下の方法で製造した。

クラウンエーテル C9 が固定化している 0.25 グラムのアミノセルロース繊維 (25 μm に篩い分けしたもの) を 90 % のエタノール水溶液中の 4.75 グラムの 10 % ハイドロゲル D4 (Tyndale Plains-Hunter LTD. Ringoes, NJ 08551) 中に 16 時間懸濁した。得られた均一の分散液をポリエステルホイル (Melinex foil, ICI America) 上に乾燥密度が 10 μm となるように塗布した。このホイルを 3 % の活性炭で被覆し、10 % のハイドロゲルを乾燥密度で 5 μm とし、直径 2.5 cm の小さなディスクを切りとった。このディスクを 16 時間以上緩衝液中に放置し、活性化した。

【0058】

センサーディスクの切り取り方法及び測定する方法は、M. J. P. Leiner and P. Hartmann, Sensors and actuators B, 11(1993), 281-189 ("Theory and Practice in optical pH sensing") に記載されている方法に従った。

【0059】

10

20

30

40

50

このようにして得られたセンサーディスクを用いた測定装置の概略を図 6 に示す。

図 6 において、S はセンサーディスクの一部を意味する。セルロース繊維に固定化された化合物は、I で示され、ハイドロゲル (M 層) 中に存在している。この M 層はイオン透過性であり、キャリア T に支持されている。キャリア T は、励起光及び測定放射光を透過する透明なホイルである。

本発明では、化合物 I はイオン透過性マトリックスに直接共有結合で結合していてもよいし、物理的に溶解した状態でマトリックス中に存在していてもよい。測定に際しては、センサーディスクを光を通さないサーモスタット付きの通過セル (through-flow cell) に挿入し、異なった濃度のナトリウムイオンを有するサンプル P に接触させた。

【 0 0 6 0 】

10

用いた光学的測定システムは、光源 A として青色の LED、検出器としてのフォトダイオード M、波長を選択するための光学的フィルター A 及び F、及び励起光をポリマー M まで伝導するため及び放射光を電子信号処理用素子 (表示せず) のような光検知器 M まで伝導するための、繊維光学配置から構成されている。励起光の端において、干渉フィルター (480 nm において最大透過度を示す) を利用し、照射光端において 520 nm の遮断フィルターを利用した。

【 0 0 6 1 】

図 2 に、種々のナトリウムイオン濃度 (10、50、100、124、144、164、184、300、500、及び 1000 ミリモル/リットル; 横座標; 対数目盛) に対する関数として、相対的ルミネセンス強度を示した。測定媒体は、30 ミリモル/リットルのトリス/HCl 緩衝液 (CO₂ フリー; pH = 7.4; 37) であった。

20

【 0 0 6 2 】

図 3 に、モノアザ - クラウンエーテル C 9 の代わりにモノアザ - クラウンエーテル C 10 を用いた場合の結果を示した。

【 0 0 6 3 】

図 4 に、本発明のモノアザ - クラウンエーテル D 5 の水溶液 (2X10⁻⁵ モル/リットル; 30 ミリモル/リットル トリス/HCl 緩衝液; CO²⁻ - free; pH = 7.4; 37) の相対的発光強度を示す。各々の水溶液のナトリウム濃度は、0, 100, 200 ミリモル/リットルである。横軸は波長 (nm) を示す。

【 0 0 6 4 】

30

図 5 に、モノアザ - クラウンエーテル C 9 の代わりにモノアザ - クラウンエーテル F 5 を用いて図 2 と同様に示されたグラフを示す。ナトリウムイオン濃度は、1, 50, 100, 138, 182, 300 ミリモル/リットルである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明のモノアザ - クラウンエーテルの励起スペクトル強度および発光スペクトル強度のアルカリイオン濃度依存性を示すグラフの一例である。

【図 2】本発明のモノアザ - クラウンエーテルを用いたセンサーディスクのルミネセンス特性とアルカリイオン濃度の相関を示すグラフの一例である。

【図 3】本発明のモノアザ - クラウンエーテルを用いたセンサーディスクのルミネセンス特性とアルカリイオン濃度の相関を示すグラフの一例である。

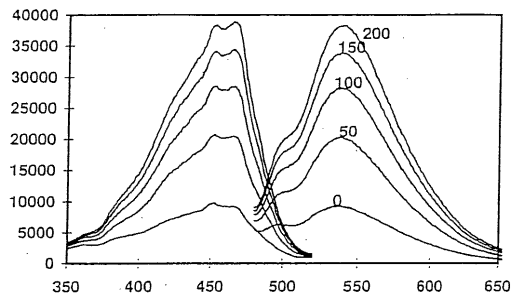
40

【図 4】本発明のモノアザ - クラウンエーテルの励起スペクトルおよび発光スペクトル強度のアルカリイオン濃度依存性を示すグラフの一例である。

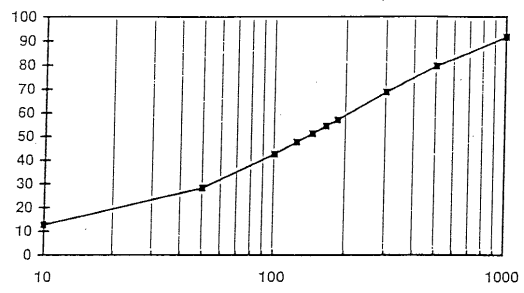
【図 5】本発明のモノアザ - クラウンエーテルを用いたセンサーディスクのルミネセンス特性とアルカリイオン濃度の相関を示すグラフの一例である。

【図 6】本発明のモノアザ - クラウンエーテルを利用したセンサーディスクの構成の一例である。

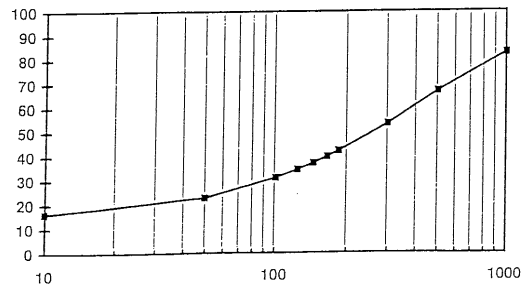
【図 1】



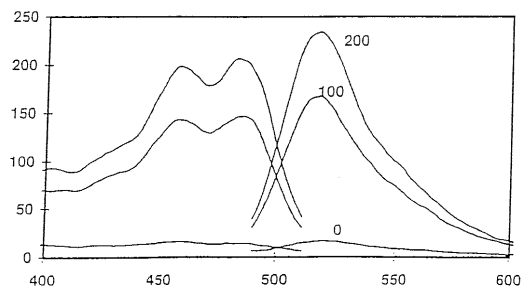
【図 3】



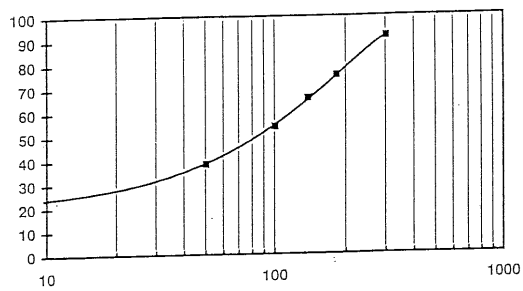
【図 2】



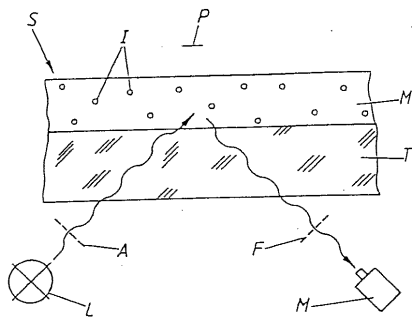
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(72)発明者 ファルイ ヒー

アメリカ合衆国 3 0 2 0 2 ジョージア州 アルファレッタ プレストン オークス ドライブ
2 9 0

(72)発明者 アンドレイ ボイラーゲーケル

オーストリア国 アー - 8 0 1 0 グラツ フェリックス ダーン - プラーツ

審査官 横井 亜矢子

(56)参考文献 特開平 7 - 1 8 8 2 4 8 (J P , A)

特開平 6 - 3 2 1 9 0 8 (J P , A)

特開平 7 - 6 3 7 6 8 (J P , A)

特開平 2 - 1 9 6 7 7 7 (J P , A)

Makoto Takagi et al. , A Novel Colorimetric Reagent for Potassium Based on Crown Ether
Complex Formation , Analytical Letters , 1 9 7 7 年 , Volume 10, Issue 13 , 1115 - 1122Akwasi Minta et al. , Fluorescent Indicators for Cytosolic Sodium , THE JOURNAL OF BIOLO
GICAL CHEMISTRY , 1 9 8 9 年 , Vol. 264, No. 32 , 19449-19457Aiden J. Bryan et al. , Photo-induced electron transfer as a general design logic for
fluorescent molecular sensors for cations , Biosensors , 1 9 8 9 年 , vol. 4, No. 3 , 169-
179Christopher Blackburn et al. , Lithium responsive fluorophores derived from Monoaza-12-
crown-4 and coumarin. The influence of a methoxy side-arm on photophysical properties
, Tetrahedron Letters , 1 9 9 4 年 , vol. 35, No. 43 , 7915-7918

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 21/75 - 21/83

G01N 31/00 - 31/22

C09K 11/07

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)

Science Direct

JSTPlus(JDream2)