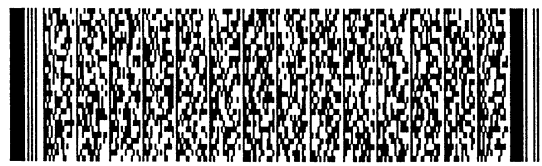


| | |
|------------------|-----------------|
| 申請日期： 88.3.11 | 案號： 881057.2 |
| 類別： 401N33/58 | 公告本 |
| (以上各欄由本局填註) | |

發明專利說明書

| | | |
|-------------------|-----------------------|--|
| 一、 發明名稱 | 中文 | 藉包含經取代配體之螢光鐳系金屬螯合複合物檢測分析物 |
| | 英文 | DETECTION OF ANALYTES BY FLUORESCENT LANTHANIDE METAL CHELATE COMPLEXES CONTAINING SUBSTITUTED LIGANDS |
| 二、 發明人 | 姓名 (中文) | 1. 艾德恩 F. 俄曼 2. 亞歷山卓 V. 尼可拉奇克 3. 喬治 Y. 丹尼爾羅夫 4. 大衛 派克 |
| | 姓名 (英文) | 1. EDWIN F. ULLMAN 2. ALEXANDRE V. NIKOLAITCHIK 3. GEORGE Y. DANILOFF 4. DAVID PARKER |
| | 國籍 | 1. 美國 2. 蘇聯 3. 美國 4. 英國 |
| | 住、居所 | 1. 美國加州艾得頓市沙比巷135號 2. 美國馬里蘭州鮑堤摩爾市荷利巷6311號 3. 美國馬里蘭州北波多馬克市邦尼戴爾大道13401號 4. 英國都哈市克雷巷海灘屋 |
| 三、 申請人 | 姓名 (名稱) (中文) | 1. 美商醫藥及科學感應公司 |
| | 姓名 (名稱) (英文) | 1. SENSORS FOR MEDICINE AND SCIENCE, INC. |
| | 國籍 | 1. 美國 |
| | 住、居所 (事務所) | 1. 美國馬里蘭州德國小鎮中溪路12321號第210室 |
| | 代表人 姓名 (中文) | 1. 馬克 R. 史奇尼鮑 |
| 代表人 姓名 (英文) | 1. MARC R. SCHNEEBAUM | |



I227323

申請日期：

案號：

類別：

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

| | | |
|------------|--------------------|---|
| 一、 發明名稱 | 中文 | |
| | 英文 | |
| 二、 發明人 | 姓名 (中文) | 5. 亞瑟 E. 寇文 6. 艾瑞斯東 G. 卡利瑞泰諾斯 |
| | 姓名 (英文) | 5. ARTHUR E. COLVIN 6. ARISTOLE G. KALIVRETENOS |
| | 國籍 | 5. 美國 6. 美國 |
| | 住、居所 | 5. 美國馬里蘭州蒙特艾瑞市國際鮑堤摩爾派克路4155號 6. 美國馬里蘭州哥倫比亞市永恆之光大道7106號 |
| 三、 申請人 | 姓名 (名稱) (中文) | |
| | 姓名 (名稱) (英文) | |
| | 國籍 | |
| | 住、居所 (事務所) | |
| | 代表人 姓名 (中文) | |
| | 代表人 姓名 (英文) | |



本案已向

國(地區)申請專利

美國 US

申請日期

1998/03/11 09/037,960

案號

主張優先權

有

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無



五、發明說明 (1)

相關申請案之對照

本申請案為1998年3月11日提出申請的申請案序號09/037,960之部份後續申請。

有關聯邦監督研究或發展之敘述不適用。

發明背景

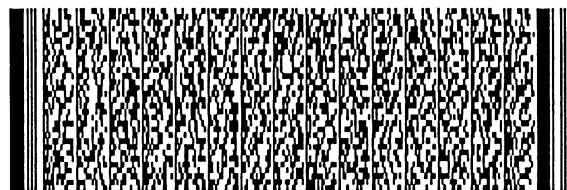
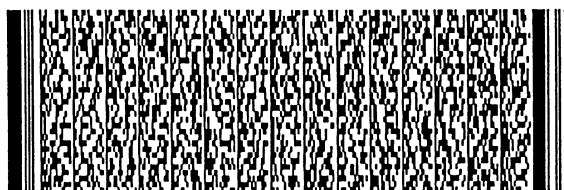
1. 發明領域

本發明係有關可用為指示劑分子以檢測介質例如液體中分析物的存在或濃度之螢光性化合物，及達到彼等檢測之方法。更特定言之，本發明係有關包含經取代配體的螢光鑷系金屬螯合複合物及彼等作為指示劑分子以檢測介質，包括液體介質例如生物液體中的分析物例如葡萄糖或其它順-二醇化合物的存在或濃度之用途。

2. 相關技藝之說明

某些稀土金屬螯合物在用紫外光 and 不同形式的可視光（如，紫光或藍光）予以照射時會發散出可視光，該發散係以經螯合的陽離子為其特性。某些鑷系離子，例如鎔 (Eu^{3+})，鈔 (Sm^{3+})，鈹 (Tb^{3+})，及較佳程度者，鐳 (Dy^{3+})，和釹 (Nd^{3+})，展現出以該離子為特性之典型螢光，特別是在其螯合到適當的激發能量媒介有機配體之時。彼等化合物的螢光性質-長史托克氏移動 (Stokes' shift)，窄譜帶型發散譜線，及異常的長螢光壽命-使彼等成為螢光免疫檢定和時間解析螢光測定技術之引人注目候選物。

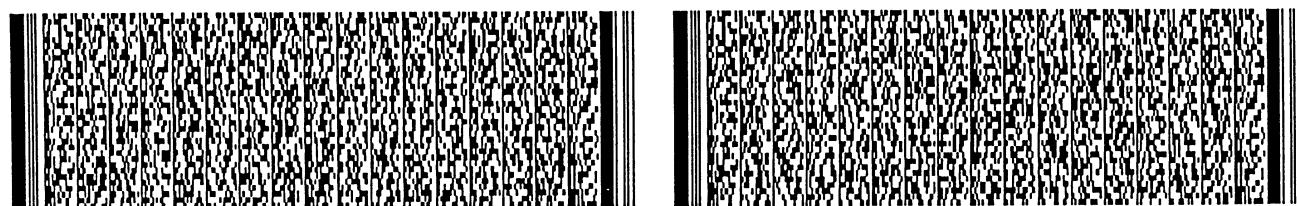
彼等螢光性鑷系螯合物的主要發散譜線係由稱為高敏性



五、發明說明 (2)

躍遷之躍遷所形成的且於 Eu^{3+} 係在613-615 nm，於 Tb^{3+} 係在545(和490) nm，於 Sm^{3+} 係在590和643 nm，而於 Dy^{3+} 係在573 nm。參看Hemmila, Application of Fluorescence in Immunoassays, 140-42 (1991)。亦參看Spectroscopy in Inorganic Chemistry, vol. 2, 255-85 (Academic Press 1971)。輻射典型地係被螯合物以該有機配體的特性波長吸收起來及以該金屬離子的特性線譜發散出來，係因為在配體至中心金屬離子有分子內能量輸移之故。有機配體會吸收能量且從其單線基態， S_0 ，提昇或激發到其第一單線激發態， S_1 ，的振動多線中之任一線，於該處其快速失去其過多的振動能量。於此點會有兩種可能性： $S_1 \rightarrow S_0$ 躍遷所致鬆弛現象(配體螢光)或系統間交叉到三線態之一， T_1 。參看E.P. Diamandis et al., Analytical Chemistry 62: (22) 1149A(1990)；亦參看Spectroscopy in Inorganic Chemistry, vol.2, 255-85 (Academic Press 1971)。

螢光銻螯合物係已知會展現出大史托克位移(~290 nm)而在激發光譜與發散光譜之間沒有重疊者且在615 nm有非常窄(10 nm 譜寬)發散光譜。此外，該螯合物所具長螢光壽命(可用微秒級次測量到而非傳統螢光團的在毫微秒級次才可測得之壽命)有助於濾掉噪音和具有低螢光壽命的其它干擾。長螢光壽命因而促成該螯合物對於微秒-時間解析性螢光測量，其更可減少所測得之背景信號。使用銻螯合劑的其它優點包括銻螯合物不會被氧所驟熄

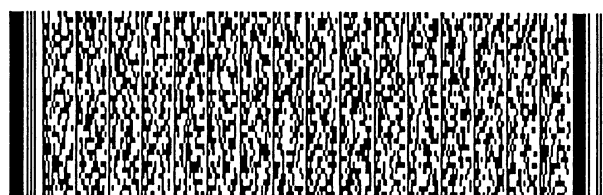
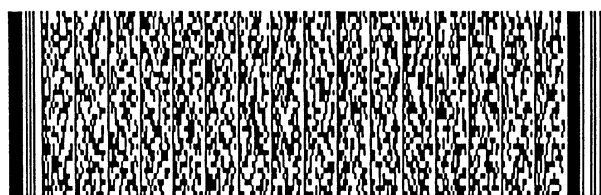


五、發明說明 (3)

(quenched)。

兩種鎔(Eu)螯合物，Eu-二苯甲醯基甲基化物和Eu-苯甲醯基丙酮化物，已使該等螯合物成為在雷射中的用途之引人注意候選物。參看H. Samuelson, et al., (J. Chem. Physics 39 (1): 110-12(1963))。Samuelson, et al., 研究過上述兩種鎔螯合物於固體和於溶液中之螢光和吸光現象。Samuelson, et al. 比較過該等鎔螯合物在各種條件下的螢光壽命與在其它化合物中的鎔螢光壽命。基於此種比較，Samuelson, et al., 推測兩組鎔化合物之間的壽命變異係鎔螯合物中配體-Eu交互作用之結果。特別地，Samuelson, et al. 測定出來自Eu-二苯甲醯基甲基化物的各發散譜線顯示出 $480 \pm 50 \mu s$ 之螢光壽命，其明顯地大於在其它鎔化合物中的螢光壽命。

Crosby, et al., J. Chem. Physics 34:743 (1961) 先前已研究過分子內能量轉移在稀土金屬螯合物，包括鎔二苯甲醯基甲基化物和鎔苯甲醯基丙酮化物螯合物，的敏化離子發散中之角色。Whan, et al., J. Mol. Spectroscopy 8:315-27 (1962) 報導過來自一組鐳系金屬離子(Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , 和 Sm^{3+})的螯合物之發散係由個別稀土金屬離子的特性亮光譜線所支配。Whan, et al. 發現 Eu^{3+} 和 Tb^{3+} 的苯甲醯基丙酮化物和二苯甲醯基甲基化物兩者皆為特別亮的發散體且彼等螯合物的亮光譜線發現及低磷光產率顯示在彼等螯合物內的配體至 Eu^{3+} 和 Tb^{3+} 離子之分子內能量轉移可以有效率地發生。Whan, et al., 於324頁。



五、發明說明 (4)

N. Filipescu, et al., J. Physical Chem. 68 (11): 3324 (1964) 報導鎔和鈹 β -二酮螯合物的螢光光譜於彼等螯合物的有機配體部份中所含取代基改變時曾經調節。

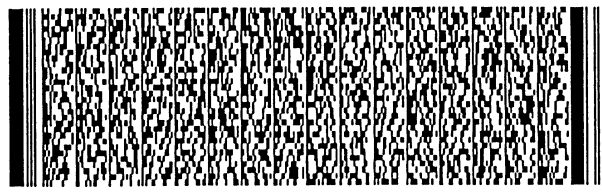
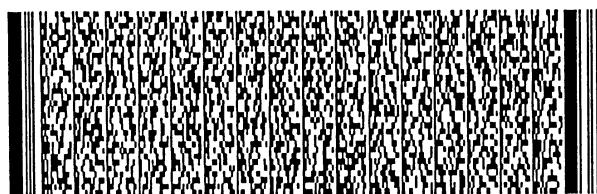
Filipescu, et al. 討論過鎔和鈹螯合物螢光譜線的相對強度，光譜分佈，偏移和分裂相對於取代基本質，其位置，分子組態，和整體分子內能量轉移之關聯性。

Filipescu, et al. 發現離子的特性整體螢光強度決定於兩項因素：1) 在有機三譜線可取得的能量，及2) 能量轉移到離子的效率。

Filipescu, et al. 也發現上述兩項因素會依不同取代基而變異。例如，用電子予體甲氧基在螯合物的間(meta)位取代鎔二苯甲醯基甲基化物螯合物時經發現可增強鎔離子的螢光發散，而對位甲氧基取代則經發現會減低鎔螢光。此外，對於二-比對於一-甲氧基取代二苯甲醯基甲基化物有更顯著的效應。相異者，對於經硝基取代的鎔二苯甲醯基甲基化物則有相反的效應。接到對位或間位的電子吸取性硝基經發現會減低鎔的總離子發散。此外，該效應對於二-取代比對一取代二苯甲醯基甲基化物更為顯著。

Filipescu, et al. 更發現鎔對-苯基二苯甲醯基甲基化物發散出的強離子螢光顯示芳族系統的尺寸會增強轉移到鎔離子的能量。此事實由經萘基取代二酮所得發散結果獲得確定，其經發現具有比二苯甲醯基甲基化物螯合物實質較高的離子發散。Filipescu, et al., 3328-29。

E. Diamandis, et al., Analytical Chemistry 62

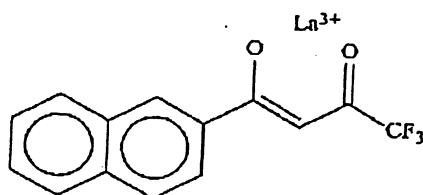


五、發明說明 (5)

(22): 1149A (1990) 述及如何使用鎔螯合物作為螢光免疫檢定和DNA雜合檢定中的標示物(label)。有關螢光檢定，該等作者述及鎔螯合物可在各種檢定組態，包括競爭性或非競爭性檢定中用為免疫標示物。

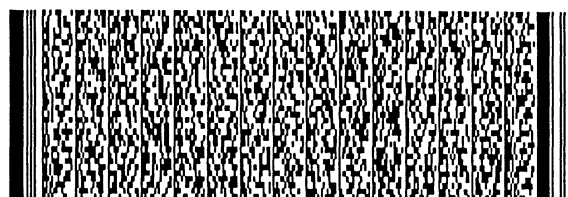
美國專利第4,374,120號(Soini, et al.)述及一種用螢光性鎔系元素螯合複合物作為標記(marker)以檢測物質之方法。美國專利第4,374,120號也述及使用 β -二酮類作為增強性配體以促進某些鎔系元素螯合物，尤其是鎔和鈹的螯合物之強螢光性質。

Wallac (Turku, Finland)發展出一種鎔系金屬螯合物以取代輻射標籤(tags)來進行免疫檢定，其具有下示構造：



Wallac分子經發現在稀溶液中有非常有效的表現。參看，Hemmila, Applications of Fluorescence in Immunoassays, p. 149 (1991)。

在水溶液，例如生物流體中使用鎔系金屬螯合物需要某些條件。例如，已知者該等螯合物首先必須溶於水溶液中及，第二，避免被傾向於填補鎔系離子空配位部位的水分子所驟熄。不過，除了配體構造外已有各種加成物或路以士鹼，例如膦類，氧化膦，或氮雜環，被用來在鎔系離子

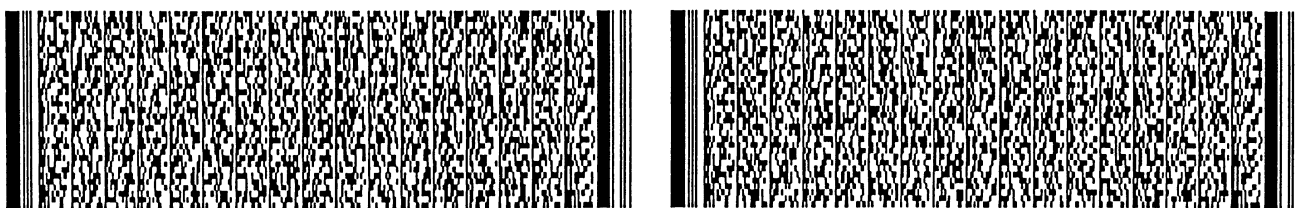


五、發明說明 (6)

周圍形成"隔離層"(insulating sheet)，經由阻止水分子穿透到複合物的內層而增強螢光。例如，經發展出用來螢光測定水系統中的鐳系元素之溶液(如，免疫檢定)即包括 β -二酮和氧化三辛基磷("TOPO")作為加成物形成性增效劑，及一清潔劑(如，Triton x100)其形成膠團(micelles)且幫助溶解配位複合物。參看Applications of Fluorescence in Immunoassays, p. 146-47。

鐳系金屬螯合複合物於先前尚未因為要利用獨特且特異性辨識元素特徵來活性偵檢分析物之目的，例如用硼酸基檢測葡萄糖和其它順-二醇，而透過螯合複合物中所含的一或多種配體予以研討或構成過。如上文討論過者，鐳系金屬螯合物主要是為了用為雷射染料，放射性同位素的替代標示物，及為了接著於抗體上作為免疫檢定中的標示物而研究過。鐳系金屬螯合物也被用於檢測四環素之定性分析程序中。

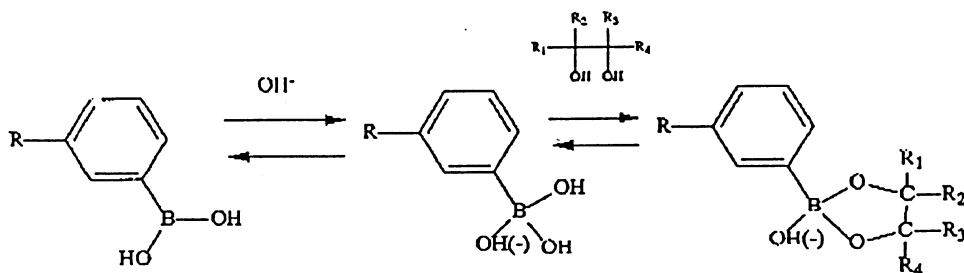
葡萄糖為活生物體不可缺少的有機化合物且於彼等生物體的資訊傳遞，能量新陳代謝和構造形成中有重要的作用。例如，葡萄糖，且更特定言之，D-葡萄糖對於構成各種器官的各種細胞而言為重要的能源。葡萄糖係以肝醣形式貯存於肝中，其在需要消耗能量時即釋出到體液中。葡萄糖的產生和消費在正常或健康人的體液中有良好的平衡，保持體液中固定的葡萄糖濃度。因此，檢測血液或尿液中有次水平或超水平的葡萄糖可提供有用的資訊以診斷疾病例如糖尿病和腎功能不足。



五、發明說明 (7)

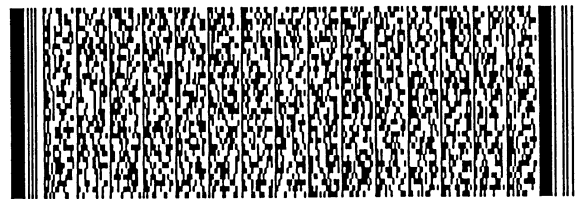
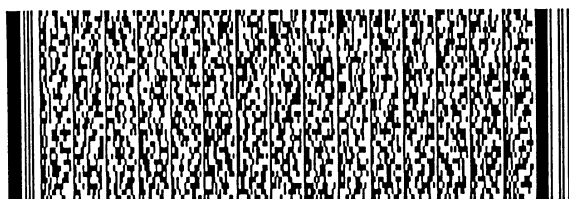
使用酵素的葡萄糖感測器(例如, Yellow Springs Instruments (YSI), Ohio所製者)為最為熟知的檢測葡萄糖所用實用手段。此種技術包括用酵素(葡萄糖氧化酶)分解葡萄糖及用恰當工具(例如電極)測量該分解所產生的過氧化氫量。雖則此種方法係頗為確定者,但源自活體的酵素,其品質會隨時間而不可逆地變化且不能回收再使用。此外,因為葡萄糖在檢測反應中係實際消耗掉者,所以葡萄糖感測器測量低水平葡萄糖的內稟能力受到限制。

含硼酸化合物結合葡萄糖係熟知者。其機制據信係經由葡萄糖上面的毗連羥基結合到硼酸部份體上的羥基而發生者,如下面所繪出者:



糖類,包括葡萄糖,與苯基硼酸的複合係已知有一段長時間者且該交互作用的可逆性已被用為糖類層析分離的基礎。特別者,於1959年, Lorand和Edwards報導出苯硼酸與許多種飽和多元醇在水中締合的締合常數;其結合交互作用從非常弱(如,乙二醇為 $K_d=360$ mM)至中等強(如,葡萄糖, $K_d=9.1$ mM),參看, J. Yoon, et al.,

Bioorganic and Medicinal Chemistry 1 (4): 267-71



五、發明說明 (8)

(1993)。

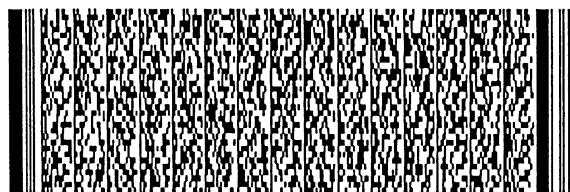
美國專利第5,503,770號(James, et al.)述及一種螢光性含酞酸化合物，其在結合到醣類，包括葡萄糖時會發散出高強度的螢光。該螢光性化合物的分子構造包括一螢光團，至少一個苯基酞酸部份體及至少一個提供胺基的氮原子其中該氮原子係配置在該苯基酞酸部份體的附近以使其與該酞酸發生分子內交互作用。彼等交互作用由是促使該化合物在結合醣類時發散出螢光。美國專利第5,503,770號述及該化合物適合用來檢測醣類。亦參看T. James, et al., J. Am. Chem. Soc. 117 (35): 8982-87 (1995)。

此外，使用含蔥酞酸化合物的螢光感測器來檢測血糖亦為技藝中已知者。例如，J. Yoon, et al., J. Am. Chem. Soc. 114: 5874-5875 (1992)述及蔥酞酸可用為螢光性化學感測劑以發放醣類結合信號，包括對葡萄糖和果糖的結合。

本發明的一項目的為檢測介質例如液體或氣體中分析物的存在或濃度，其包括測量鏽系金屬螯合混合物在該分析物透過分析物特定性辨識元件而結合到該螯合複合物所含一或多個螯合劑時所發散出的螢光之任何變化。

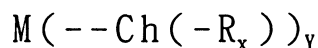
本發明的另一目的為提出一種分析物-特定性，含辨識元件的鏽系金屬螯合複合物作為指示劑分子以檢測介質例如液體中所含分析物例如葡萄糖或其它順-二醇化合物的存在或濃度。

發明概述



五、發明說明 (9)

本發明係有關一種用以檢測分析物存在或濃度之指示劑分子，其包括螢光性鑷系金屬螯合複合物其具有下式：

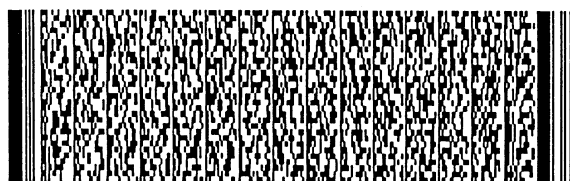


其中：

M表鑷系金屬離子，Ch表螯合劑其包括一配體，較佳者一有機配體其可包括下列任何一者或多者： β -二酮或其氮類似物，二羥基，含羧基雜環，烯醇，巨二環隱配體(cryptand)(亦即，籠狀配體)，苯醌酸，或多胺基-多元羧酸。Ch的有機配體也可包括下列任何一者或多者：含氮雜環，硫，和鍵聯的羧基。Ch的有機配體更可包括下列中任何一者或多者：烷基或烯基，較佳者含有1至10個碳原子者，以及芳族，碳環族或雜環族部份體，包括苄基，萘基，蔥基，菲基，或四環基。再者，一或多種與M複合的螯合劑可相同或為不同螯合劑的混合物(所謂的"混合配體或三元螯合物")。

R表分析物特定性辨識元件，一或多個彼等可結合到螯合複合物的一或多個配體，但不需要鍵聯到螯合複合物的每一配體。於本發明一較佳實施例中，R可為醌酸基或含醌酸基的化合物以檢測葡萄糖或其它順-二醇化合物。

X表分別接到一或多個螯合劑的辨識元件R之數目。X可為0至8之整數，且於本發明某些較佳實施例中，X=0至4或X=0至2。此外，分別接到一或多個螯合劑的辨識元件R之



五、發明說明 (10)

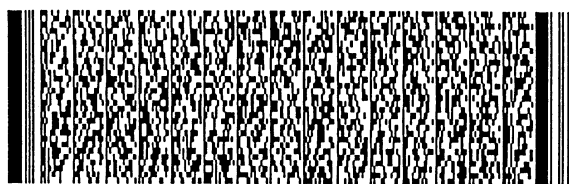
數目可相同或不同，其限制條件為對於一或多個螯合劑而言， $X > 0$ 。Y表與M複合的螯合劑數目，且可為1至4之整數。於本發明某些較佳實施例中， $Y=1$ ， $Y=3$ 或 $Y=4$ 。

本發明也有關如上文所定義的螢光性銻系金屬螯合複合物。

本發明更有關利用上述指示劑分子和螢光性銻系金屬螯合複合物檢測分析物的存在或濃度之方法。該方法包括下述諸步驟：將樣品暴露於包括具有上文所定義式子的螢光性銻系金屬螯合複合物之指示劑分子，測量該銻系金屬螯合複合物所發散的螢光之任何變化，及由是檢測出分析物的存在或濃度。

於本發明中，分析物的存在或濃度係經由測量該銻系金屬螯合複合物於該分析物透過一或多個分析物-特定性辨識元件結合到該螯合複合物所含一或多個螯合劑時所發散出來的螢光之任何變化而檢測的。特定言之，分析物，例如葡萄糖或其它順-二醇化合物的存在或濃度係經由觀察及/或測量分析物結合到螯合物所含分析物-特定性辨識元件-其用於檢測葡萄糖或其它順-二醇化合物時為含酮酸根辨識元件-時由該螢光性金屬離子發散出的螢光所具強度或壽命之變化(亦即，該螢光經減弱，增強或其波長有偏移)而測定的。

本發明的優點在於能夠利用以具有充分長度的螢光壽命(可在微秒而非毫微秒內測得)以及具有長史托克倫偏移的螢光性指示劑分子以分析物特定性方式檢測介質例如液體或



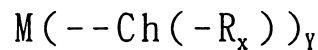
五、發明說明 (12)

圖12顯示出用葡萄糖和果糖在甲醇中滴定鎔(2-呋喃甲醯基-4-苯甲醯基甲烷醯酸)之結果。

圖13顯示出用葡萄糖和果糖在甲醇中滴定Eu(苯甲醯基-三氟甲基丙酮醯酸)之結果。

發明之詳細說明

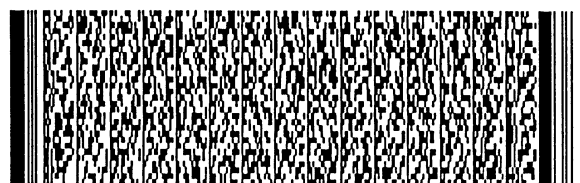
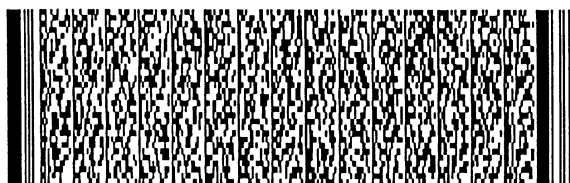
如上文所述者，於本發明中係經由觀察及/或測量在透過螢光性指示劑分子中所含一或多個分析物-特定性辨識元件結合到分析物後該指示劑分子所發散的螢光所具強度或壽命之變化來測定分析物的存在或濃度。該螢光指示劑分子包括具有下式之鑷系金屬螯合複合物：



其中：

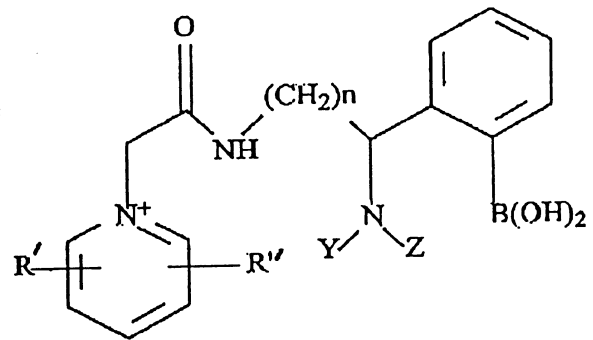
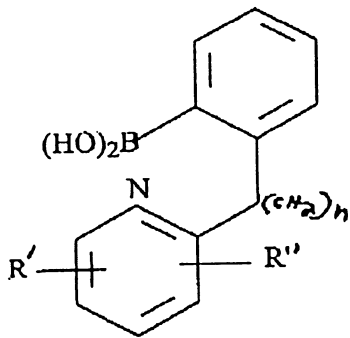
M表鑷系金屬離子，Ch表螯合劑其包括一配體，較佳者一有機配體其可包括下列任何一者或多者： β -二酮或其氮類似物，二羥基，含羧基雜環，烯醇，巨二環隱配體(cryptand)(亦即，籠狀配體)，苯醯酸，Cyclen(1,4,7,10-四氮雜環十二烷的四脂族羧酸鹽或磷酸鹽)或多胺基-多元羧酸。Ch的有機配體也可包括下列任何一者或多者：含氮雜環，硫，和鍵聯的羧基。

R表分析物特定性辨識元件，一或多個彼等可結合到螯合複合物的一或多個配體，但不需要鍵聯到螯合複合物的每一配體。於本發明一較佳實施例中，R可為用以檢測葡

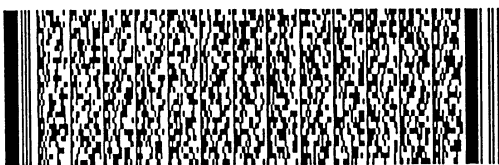
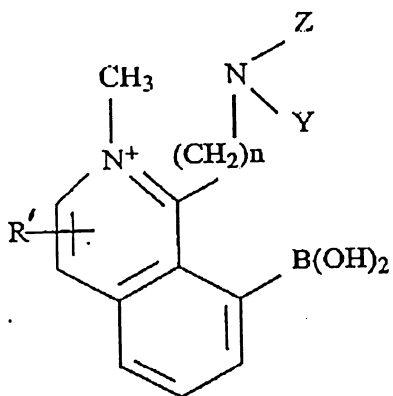


五、發明說明 (13)

葡萄糖或其它順-二醇或順-二醇作用性化合物之基。彼等基包括硼酸基，亞硼酸基和錯酸基，及含有彼等基的化合物。代表性含硼酸化合物包括具有下列通式者(於每一構造中， R' 和 R'' 各獨立地為稠合芳基，脂族基，第一，第二或第三胺；鹽胺；羧基；酮；酯；醇；或醛；且 Y 和 Z 各獨立地為脂族基，烷氧基或芳基)：

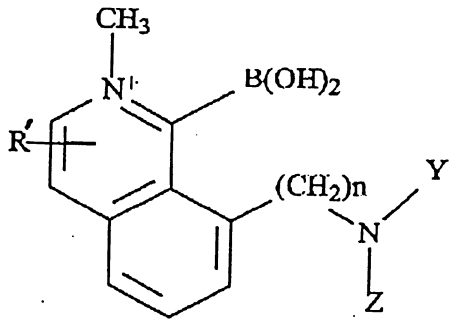


其中 n 為 0, 1 或 2；

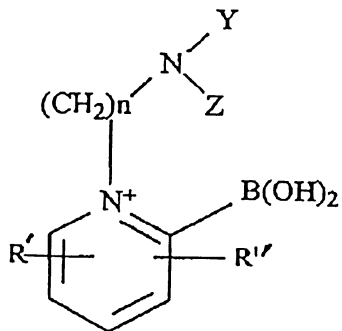


五、發明說明 (14)

其中 n 為 1；



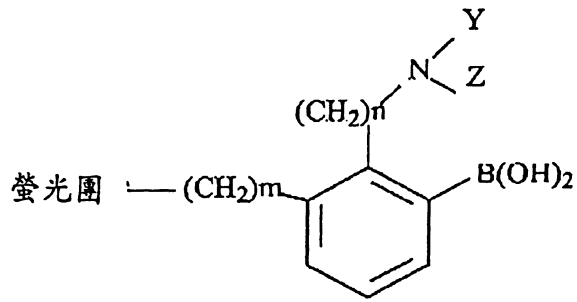
其中 n 為 0 或 1；



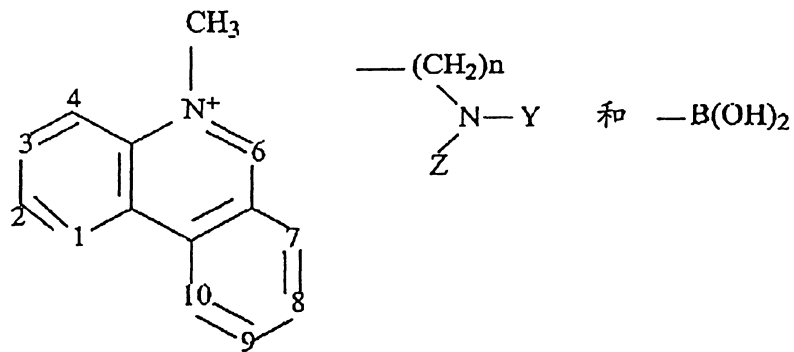
其中 n 為 2；



五、發明說明 (15)

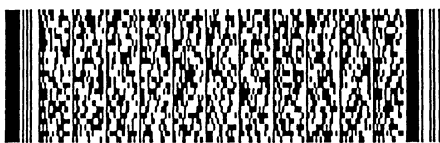


其中 m 為 0-5 且 n 為 1 或 2；及

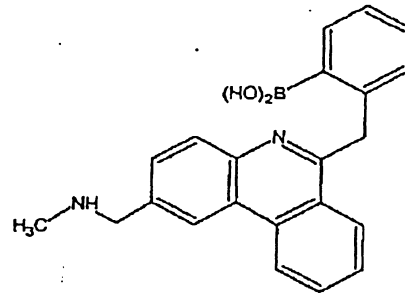


其中 n 為 0 或 1，且 酮酸和胺兩取代基係以配對方式配置在位置 1 和 10，3 和 4，6 和 7，7 和 8 或 9 和 10。

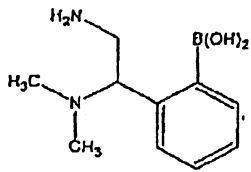
某些特殊的含 酮酸根化合物包括：



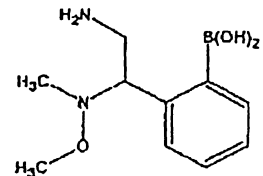
五、發明說明 (16)



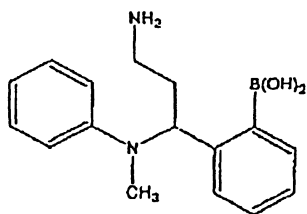
Target A



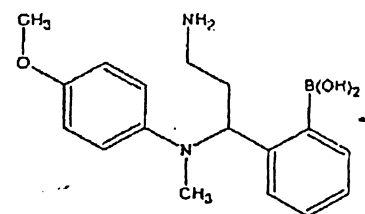
Target B



Target B-MeO



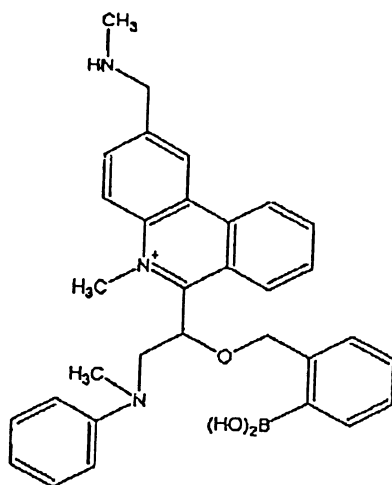
Target C



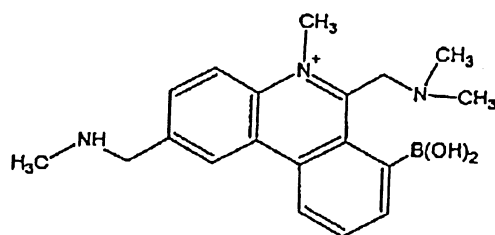
Target C-MeO



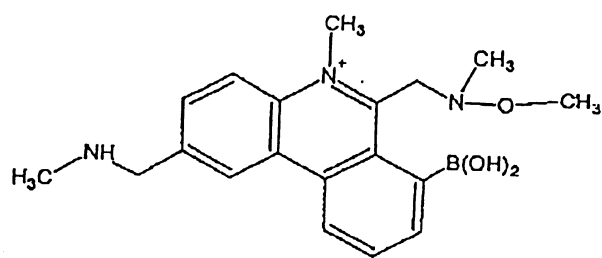
五、發明說明 (17)



Target D



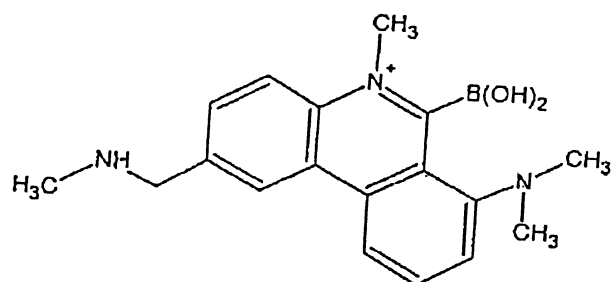
Target E



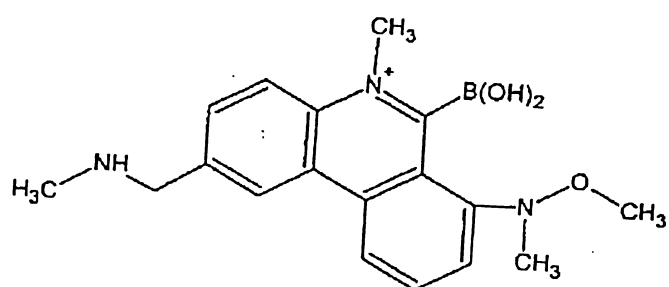
Target E-MeO



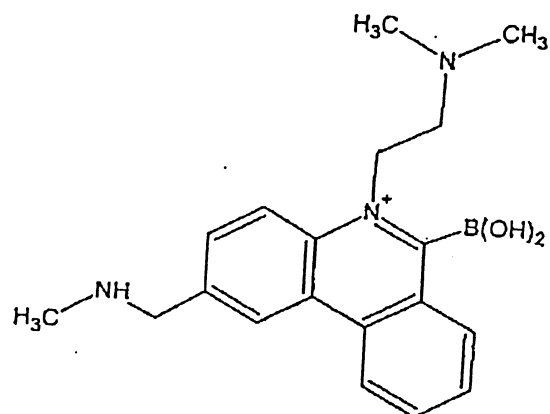
五、發明說明 (18)



Target EE



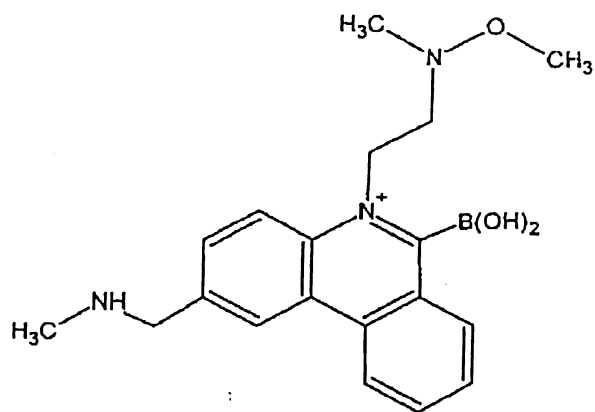
Target EE-MeO



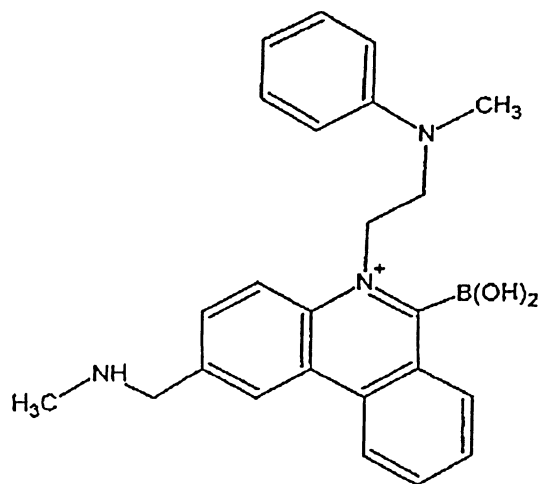
Target F



五、發明說明 (19)



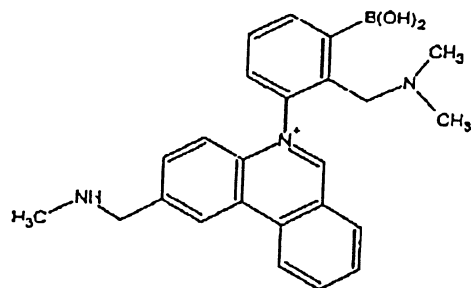
Target F-MeO



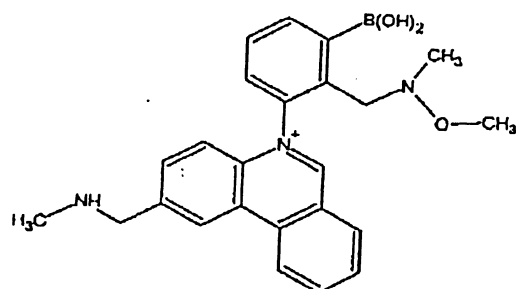
Target F-Phc



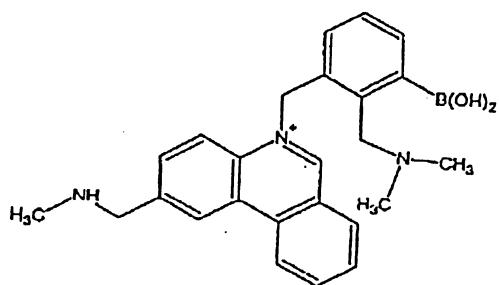
五、發明說明 (20)



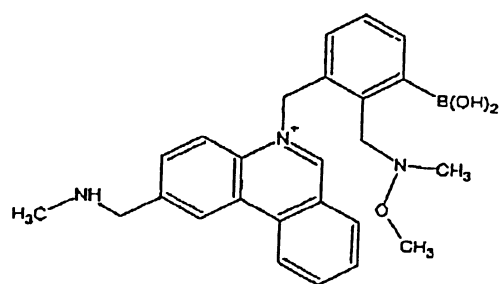
Target G



Target G-MeO



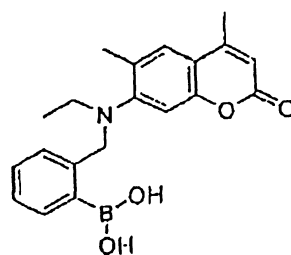
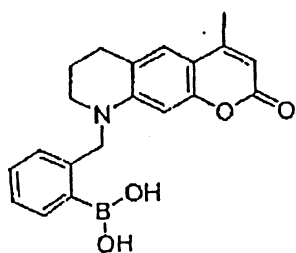
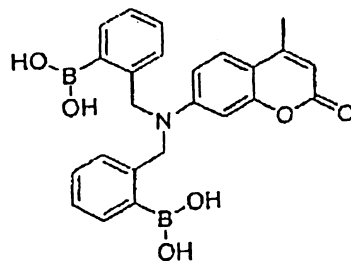
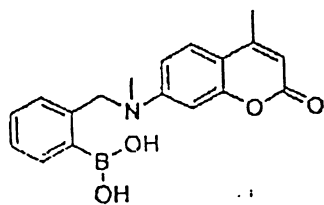
Target II



Target II-MeO



五、發明說明 (21)



五、發明說明 (22)

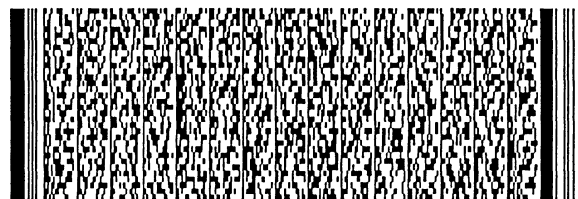
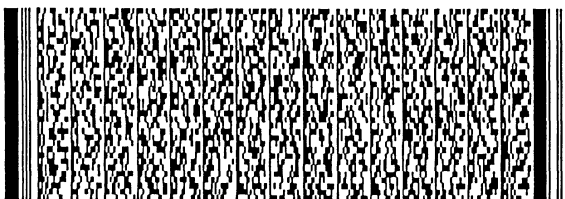
除了葡萄糖以外的順-二醇分析物化合物之例子包括其它糖例如果糖及甘油。兒茶酚(鄰-二羥基苯)和兒茶酚胺，包括激素例如多巴胺，腎上腺素和正腎上腺素，其含有相鄰(鄰位)羥基而就彼等與酮酸酯辨識元件的反應性擬似順-二醇。

鑷系金屬離子M可為鎔(Eu^{3+})，釷(Sm^{3+})，錒(Tb^{3+})，鐳(Dy^{3+})或釹(Nd^{3+})，較佳者為鎔(Eu^{3+})或錒(Tb^{3+})離子。

螯合劑Ch所含配體也可為有機配體，包括下列中任何一者或多者：烷基或烯基，較佳者含有1至10個碳原子者，以及芳族，碳環族或雜環族部份體，包括苄基，萘基，蔥基，菲基，或四環基。該配體也可以包括下列基： $-\text{CF}_3$ 和 $-\text{C}_2\text{F}_5$ ，只要該配體更包括於需要時可讓分析物-特定性辨識元件結合之部份體即可。此外，螯合複合物的任何配體可為無機者以取代有機者。

X表分別接到一或多個螯合劑的辨識元件R之數目。X可為0至8之整數，且於本發明某些較佳實施例中， $X=0$ 至4或 $X=0$ 至2。此外，分別接到一或多個螯合劑的辨識元件R之數目可相同或不同，其限制條件為對於一或多個螯合劑而言， $X>0$ 。Y表與M複合的螯合劑數目，且可為1至4之整數。於本發明某些較佳實施例中， $Y=1$ ， $Y=3$ 或 $Y=4$ 。

於本發明某些實施例中，該鑷系金屬螯合複合物可包括不同螯合劑之混合物其中一或多個該螯合劑不含分析物-特定性元件R。使用彼等亦稱為三元配體螯合劑的混合配體螯合劑之優點，包括某些有機配體，例如多胺基多羧



五、發明說明 (23)

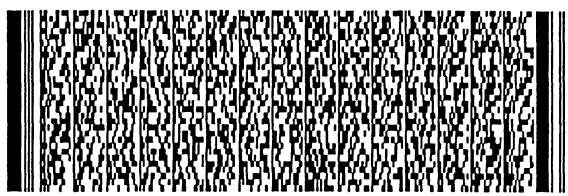
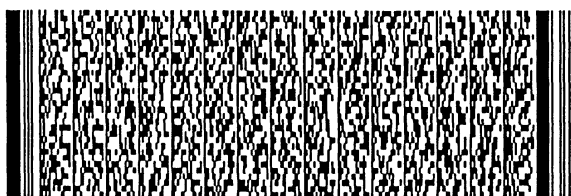
酸，比其它配體例如 β -二酮，更可溶於水中。所以，於至少一本發明實施例中，鏷系金屬螯合複合物可包括，第一，一或多個含有一或多個分析物-特定性辨識元件的 β -二酮，與，第二，一或多種其它配體例如多胺基-多羧酸，其可促進螯合複合物之水溶性。

於本發明其它實施例中，螯合複合物所含一或多個螯合劑可更包括 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{OH}$ 基，或任何其它取代基可使螯合複合物共價接著於鏈聯物(linker)或聚合物例如聚離胺酸，或其它固體擔體。

為了達到從複合物所含吸光部份到鏷系金屬離子的能量轉移，該吸光部份的三重線態能量較佳者要高於約230仟焦耳/莫耳。較佳的吸光部份包括啡啶(258仟焦耳/莫耳)，補骨脂內脂(psoralen)(262仟焦耳/莫耳)，啡啶吡(261仟焦耳/莫耳)，菲(258仟焦耳/莫耳)，三亞苯(280仟焦耳/莫耳)，二苯甲酮(287仟焦耳/莫耳)，吡啶(293仟焦耳/莫耳)和香豆素(258仟焦耳/莫耳)。

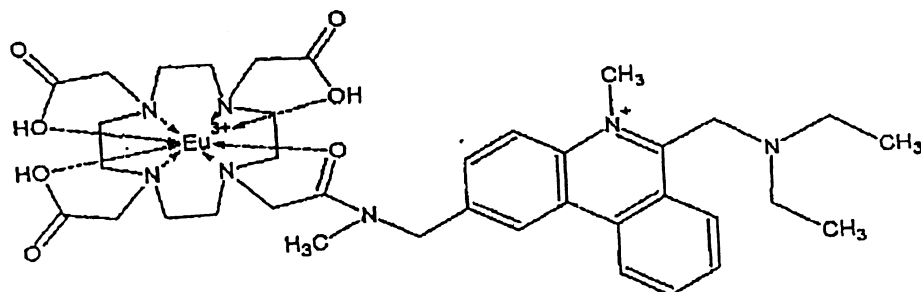
本發明鏷系金屬螯合複合物的螢光會經由將分析物透過一或多個辨識元件R結合到螯合複合物所含一或多個螯合劑而以分析物-特定性方式受到調制。

本發明螢光性指示劑分子可用來檢測與彼等具反應性之廣多種不同的可能化學分析物，因而可經由分析物-特定性辨識元件R以特定方式予以檢測。可用本發明檢測的較佳分析物為下列分析物：葡萄糖，果糖和其它順-二醇化合物。不過，依辨識元件之選擇，本發明指示劑分子也可

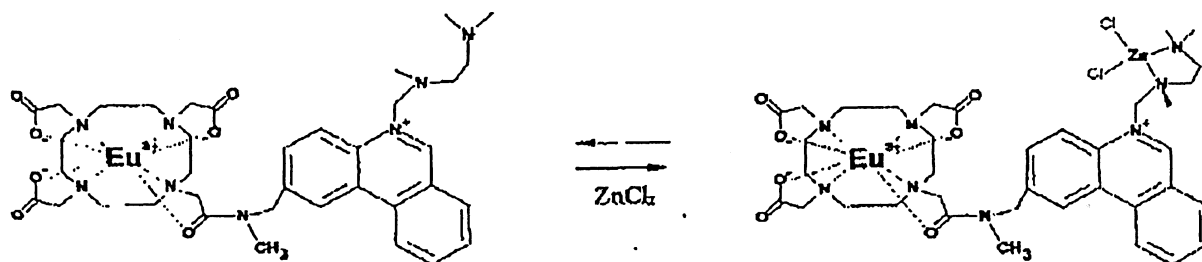


五、發明說明 (24)

用來檢測許多種其它的分析物。例如，下示分子具有一辨識元件使其可用為pH指示劑：



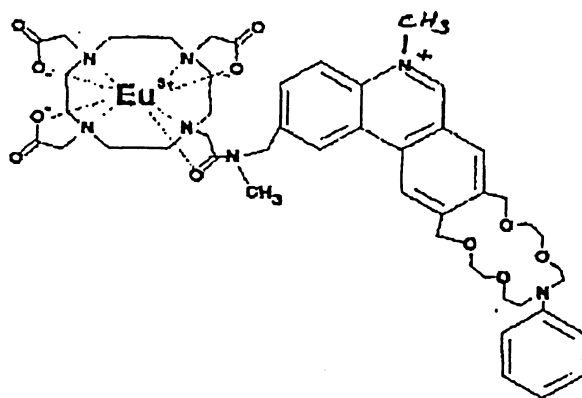
此外，下面所示為含有可用來結合鋅分析物的辨識元件之許多可能化合物中的一者(參看，例如，Huston, et al., JACS 1988, 110, 4460)：



如所示的鋅結合可增加該指示劑分子，及類似彼含有一類似辨識元件的其它者之螢光。此外，下面所示為含有可用來檢測鉀分析物的辨識元件之許多可能化合物中的一者(參看，例如，Sousa, et al., ACS Symposium Series 538, 1992, pp. 10-24)：



五、發明說明 (25)



於該化合物中，鉀離子係經配位於冠醚部份體內，促成立體組態變化使得該分子的苯胺部份摺回到啡啶部份上，導致螢光的消光。

使用本發明指示劑分子可檢測的化學分析物可呈各種不同的固體，氣體和液體形式存在著。此外，可在多種介質，包括液體和氣體介質中使用本發明指示劑分子來檢測分析物。

對於本發明螢光性化合物可存在許多可能的用途，包括作為指示劑分子用於能量，醫學和農業諸領域中。例如，該螢光化合物可用為指示劑分子以檢測在血液或尿液中的次水平或超水平葡萄糖，因而提供有用的資訊供診斷如糖尿病和腎功能不足等疾病所用。用於人類治療應用的醫藥葡萄糖生產需要加以監測和控制。本發明在農業中的可能用途包括檢測分析物例如葡萄糖在大豆和其它農產品中的水平。對於如釀酒葡萄等高價值產品的關鍵收穫決定中必須仔細地監測葡萄糖。由於葡萄糖為醱酵程序中最貴的



五、發明說明 (26)

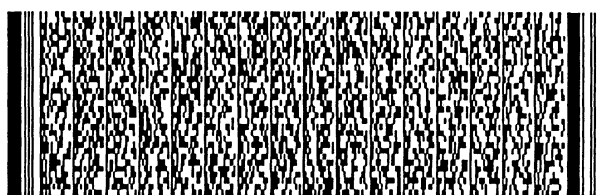
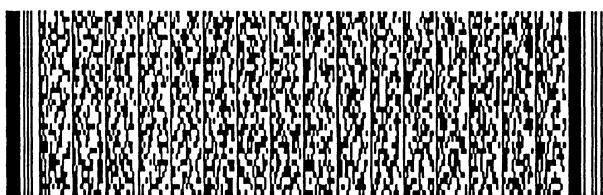
碳源和進料，因此用於最佳反應器進料速率控制的葡萄糖監測在動力醇生產中具有重要性。反應器混合和葡萄糖濃度控制也對無酒精飲料和發酵飲料的生產中之品質控制具關鍵性，因該生產在國際上都是消耗掉最大量的葡萄糖和可發酵(順-二醇)糖之故。

技藝中也有多種已知的檢測技術可利用本發明螢光化合物。例如，本發明螢光化合物可用於螢光感測裝置中(如，美國專利第5,517,313號)或可結合到聚合物材料例如試紙上供肉眼檢查所用。該後述技術可促成，例如，以類似於用石蕊試紙條測定pH之方式進行葡萄糖測量。本文所述及的螢光分子也可以用為單純的試劑供標準枱面分析儀器所用例如分光螢光計或臨床分析儀如Shimadzu, Hitachi, Jasco, Beckman和其它者所製者。彼等分子也可以提供分析物特定性化學/光學信號轉導供以光纖為基的感測器和分析螢光計所用，例如Ocean Optics (Clearwater, Florida)，或Oriel Optics所製者。

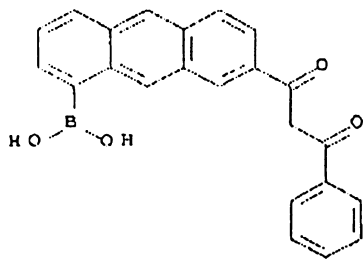
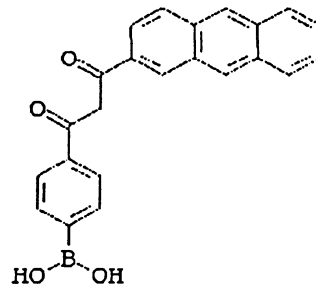
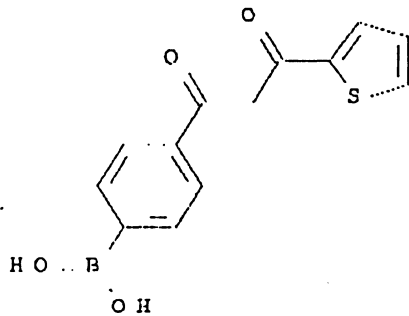
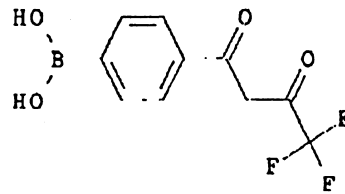
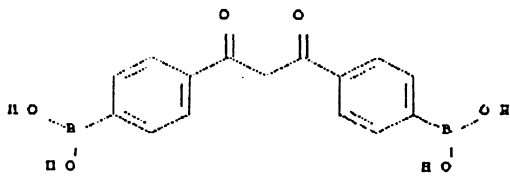
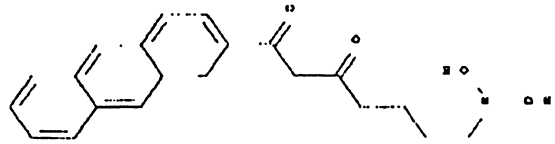
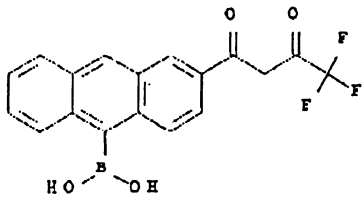
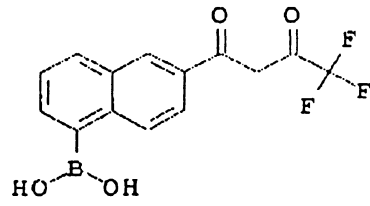
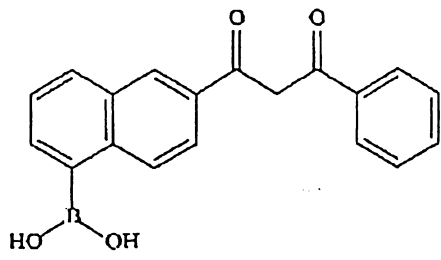
於本發明一較佳實施例中，有多種可能的螯合劑，其一或多者可與銲系金屬離子複合，且其可包括接有一或多個作為分析物-特定性辨識基R的酰胺基之有機配體，其例子為下文所示者。

A. β -二酮類

本發明銲系金屬螯合複合物的螯合劑Ch可為以 β -二酮為基之配體，其例子有下面所提出者。



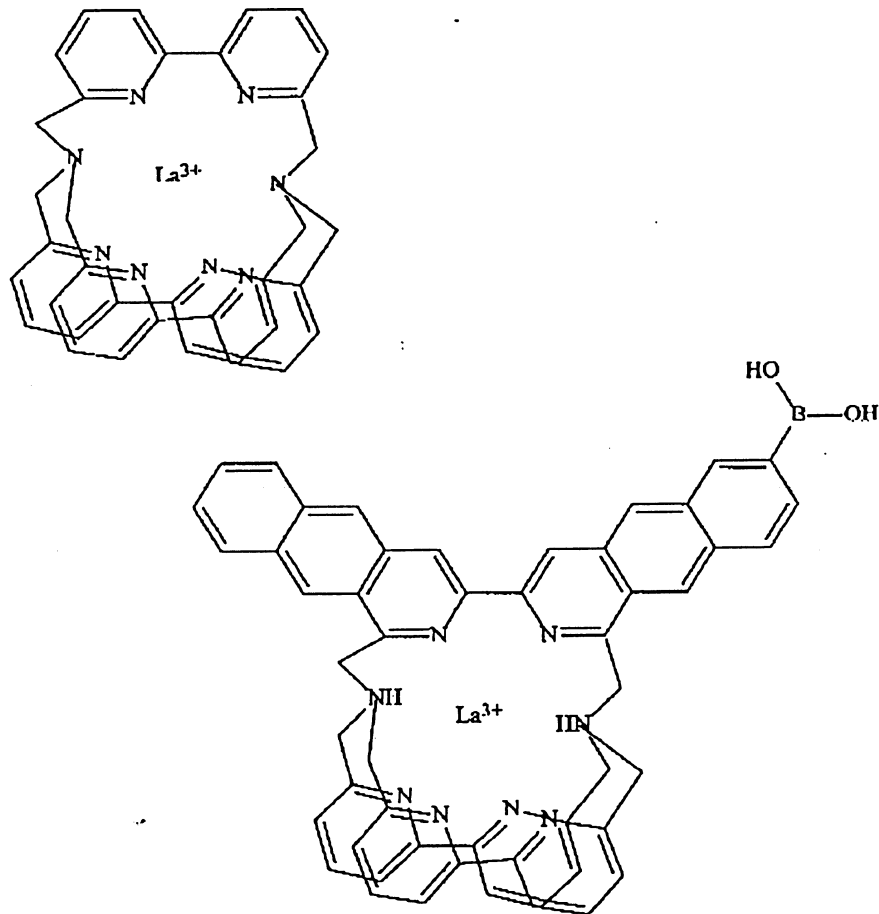
五、發明說明 (27)



五、發明說明 (28)

B. 巨雙環隱藏配體(籠型配體)

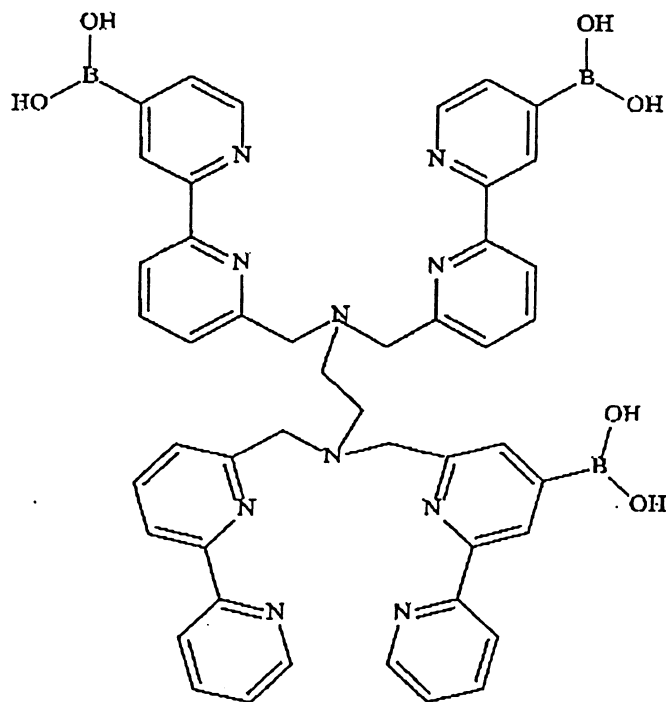
於本發明其它實施例中的螯合劑Ch可為巨雙環隱藏配體(或籠型配體)，其一例子為具有下面所示形式者：



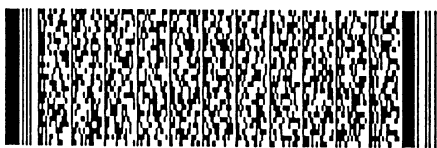
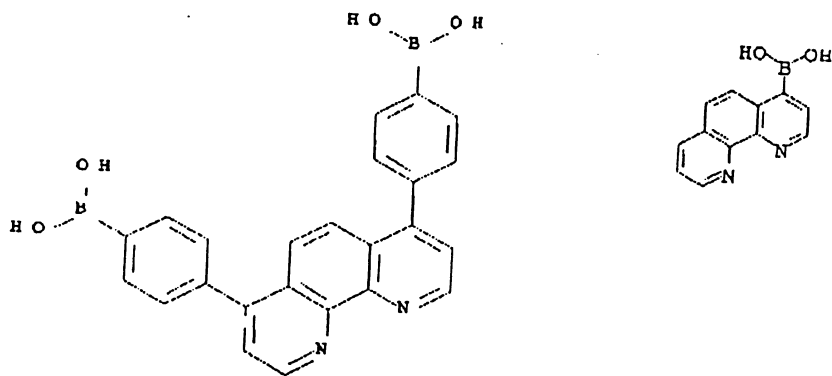
於本發明另一實施例中的螯合劑Ch可為具有下示構造的巨雙環隱藏配體。



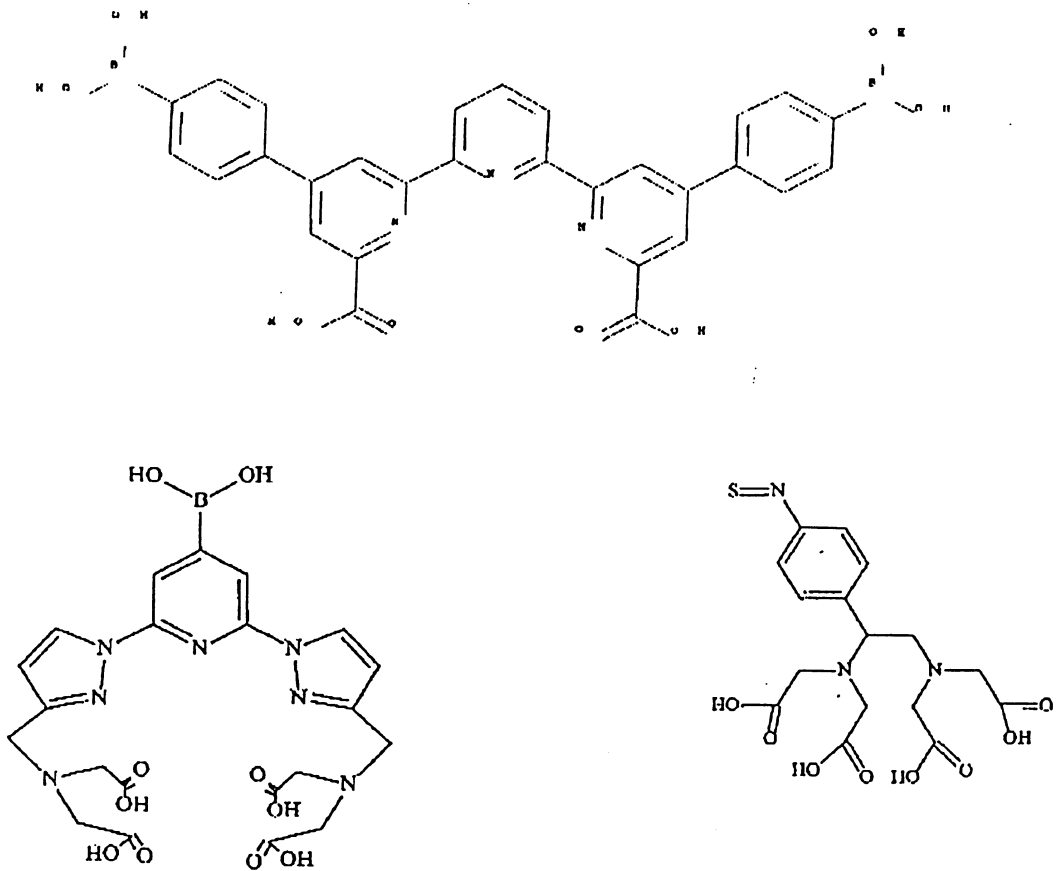
五、發明說明 (29)

C. 氮雜環和羧酸根配位配體

本發明鏷系金屬螯合複合物所含螯合劑Ch的實例也包括下列氮雜環和羧酸根配位配體。



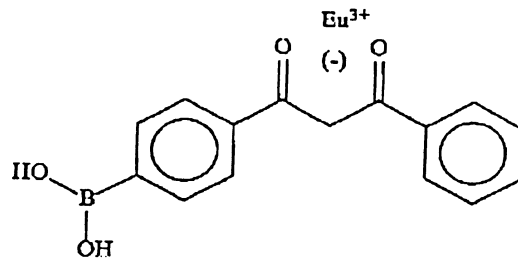
五、發明說明 (30)



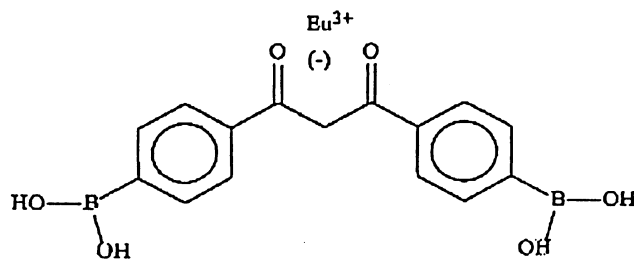
某些本發明最佳螢光性，含酮酸根辨識元件的鑷系金屬螯合劑包括下列銜螯合劑(為清晰起見只示出具有配體者)，其具有下列構造：



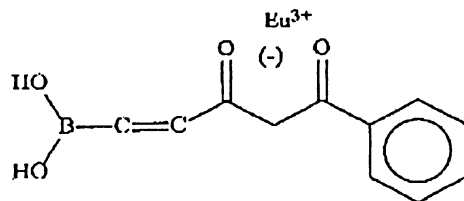
五、發明說明 (31)



(銻-對-硼酸化二苯甲醯基甲烷(II))

(Europium-p-boronatedibenzoylmethane (II))

(銻二-對-硼酸化二苯甲醯基甲烷(III))

(Europium Di-p-boronatedibenzoylmethane (III))

(銻苯甲醯基伸乙基甲烷-2-硼酸(IV))

(Europium Benzoylethylene methane-2-boronate (IV))

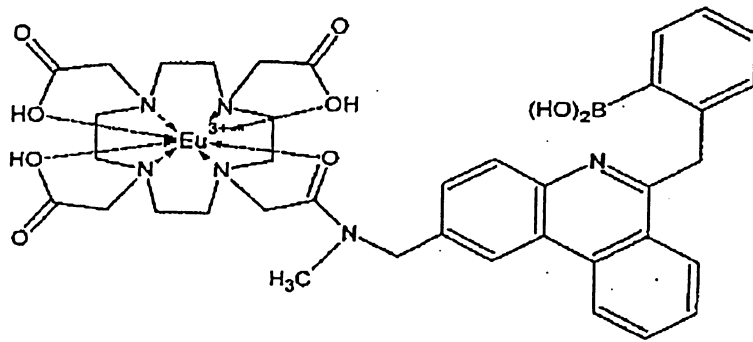
於本發明一較佳實施例中，係在螢光性銻(肆)β-萘甲



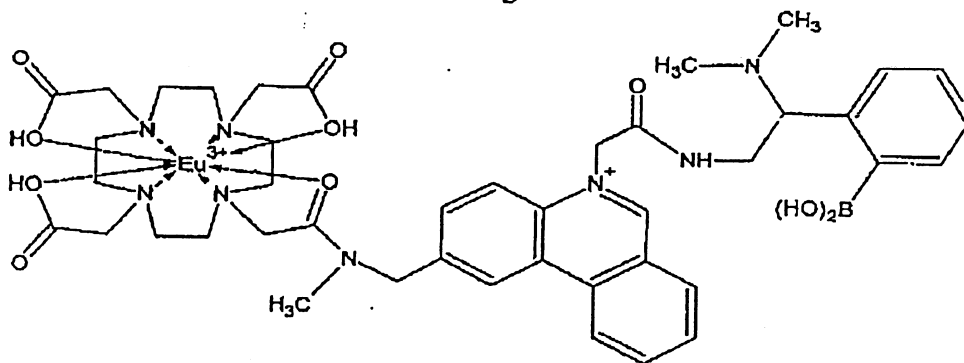
五、發明說明 (33)

Eu-bNTA 酮酸經發現具有約340 nm之激發波長和約613 nm，與其它銻螯合物所具者相同之發散波長。

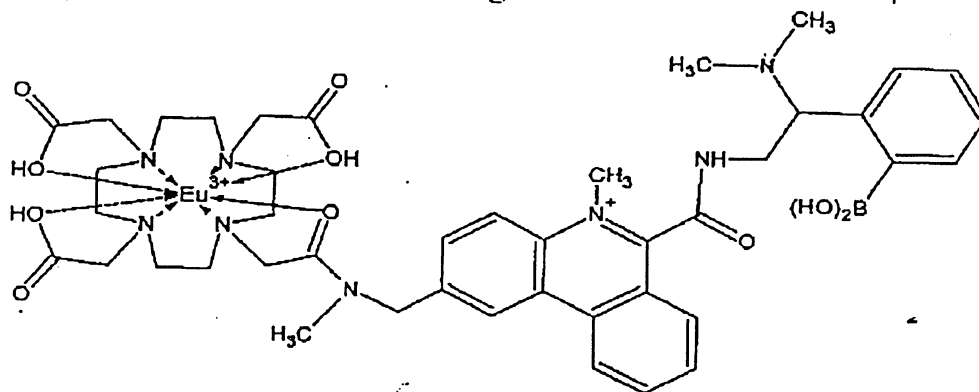
用以檢測順-二醇包括葡萄糖之其它較佳化合物包括下面所列者：



Target A

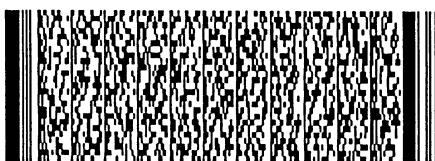


Target B-1

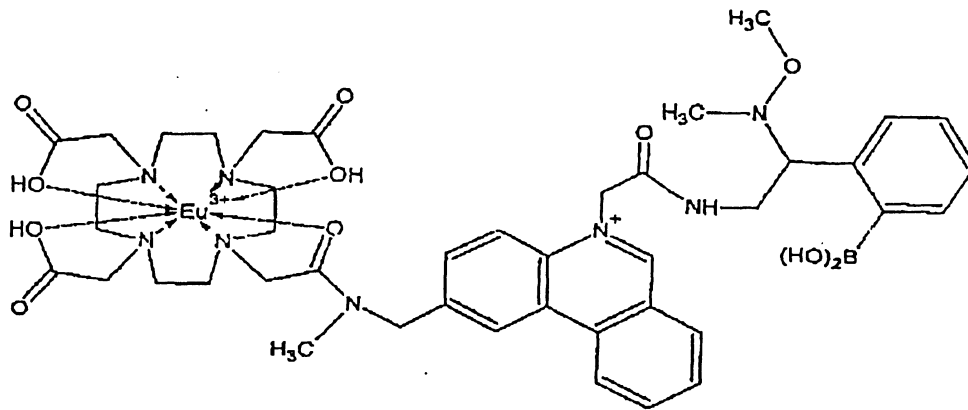


Target B-2

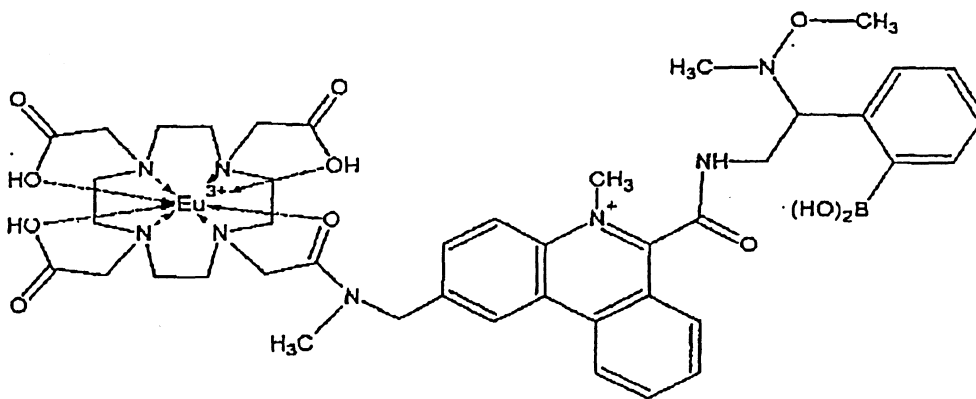
44r



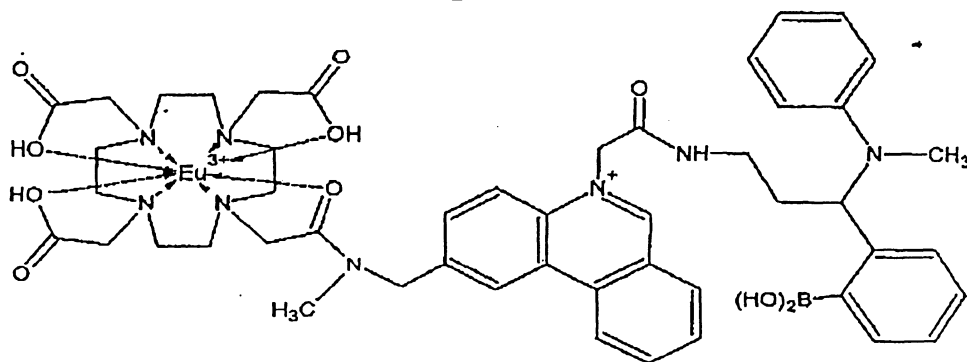
五、發明說明 (34)



Target B-MeO-1



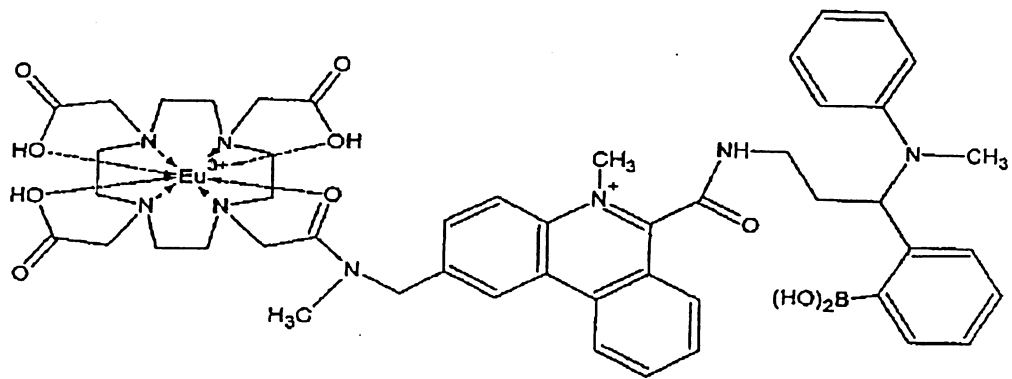
Target B-MeO-2



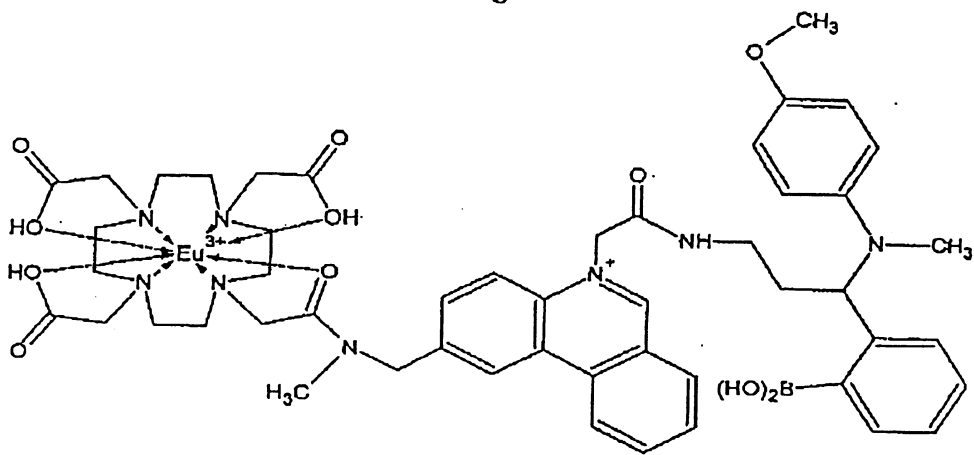
Target C-1



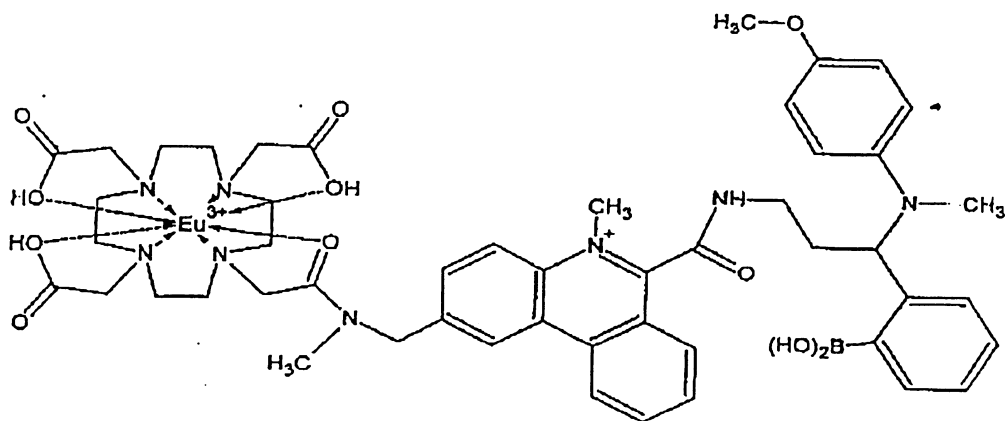
五、發明說明 (35)



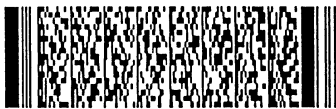
Target C-2



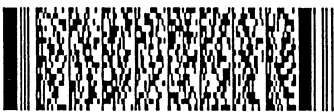
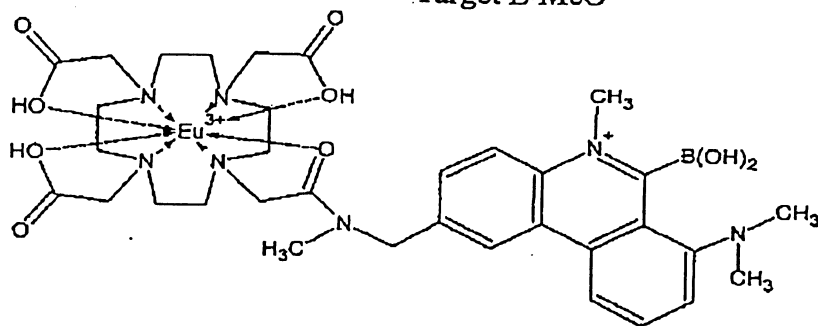
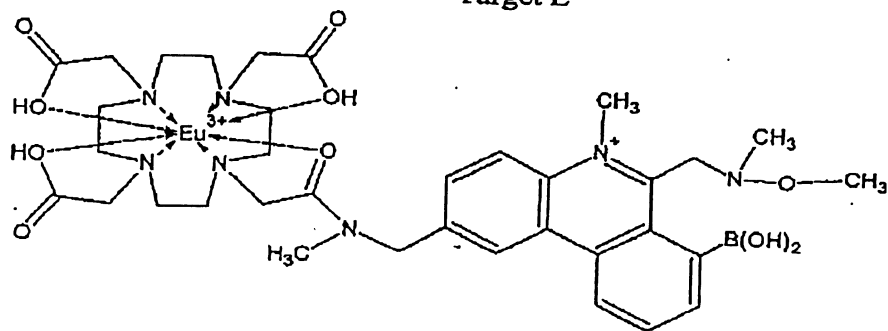
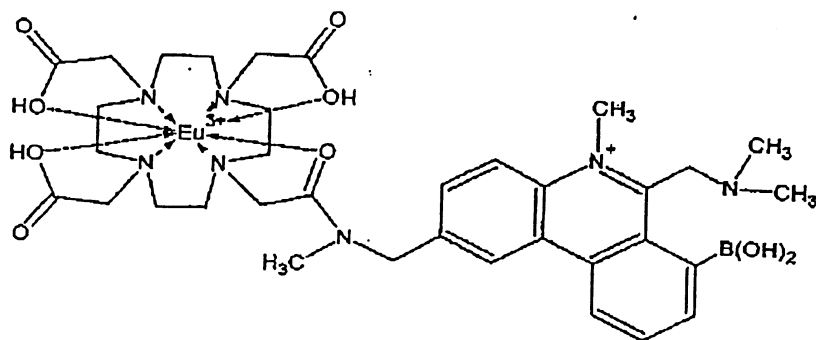
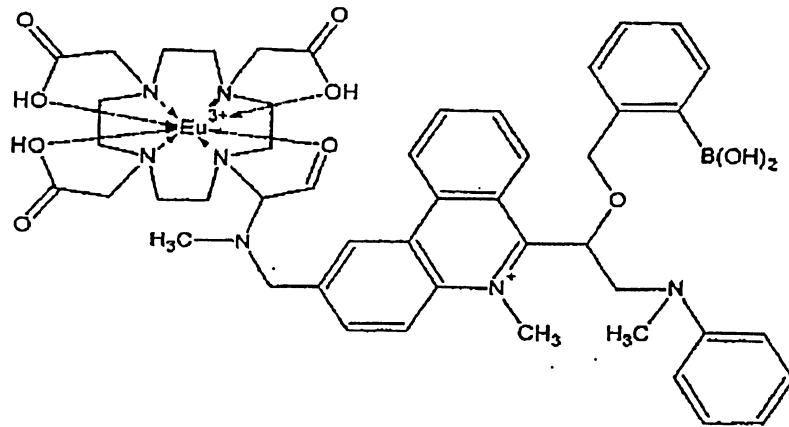
Target C-MeO-1



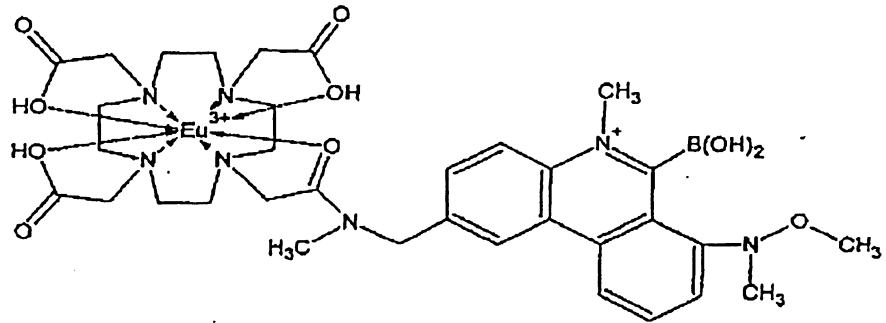
Target C-MeO-2



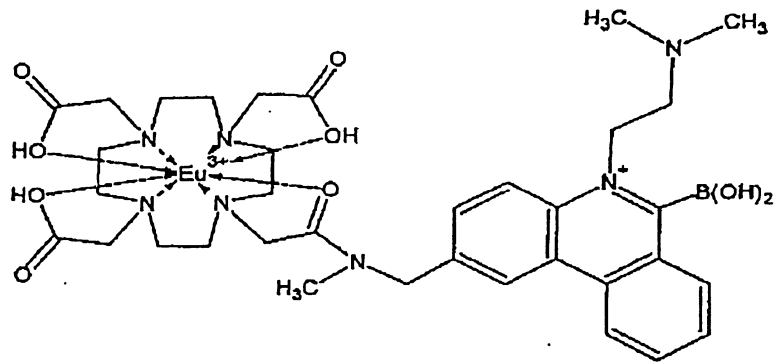
五、發明說明 (36)



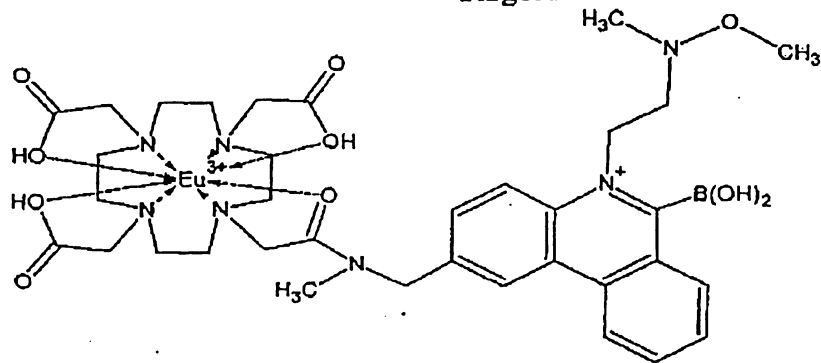
五、發明說明 (37)



Target EE-MeO



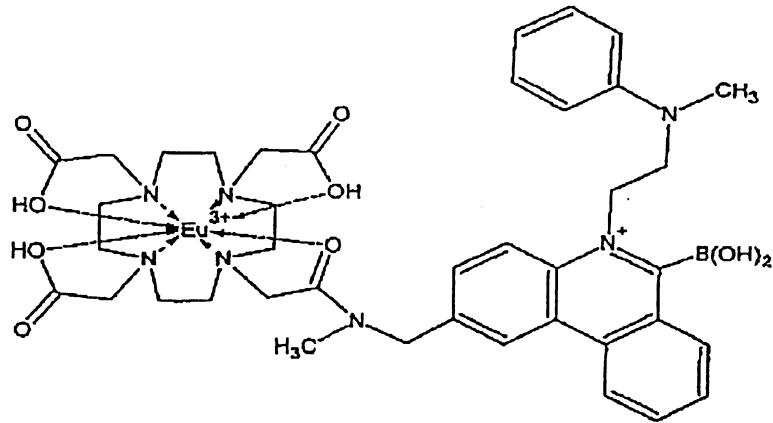
Target F



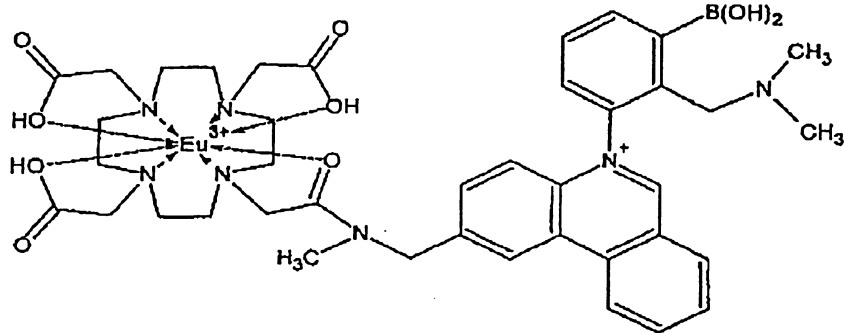
Target F-MeO



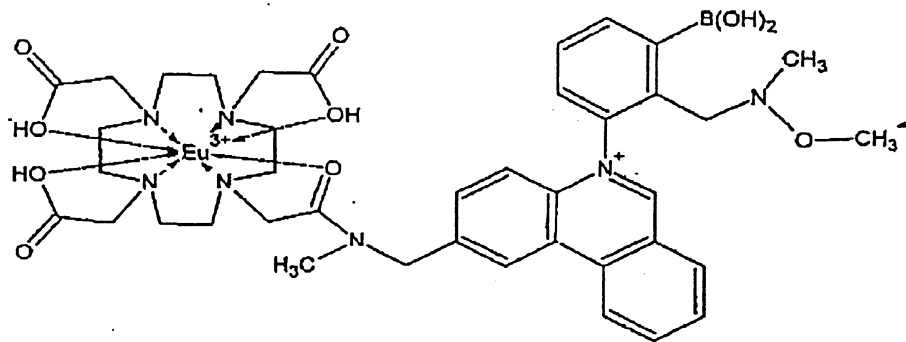
五、發明說明 (38)



Target F-Phe



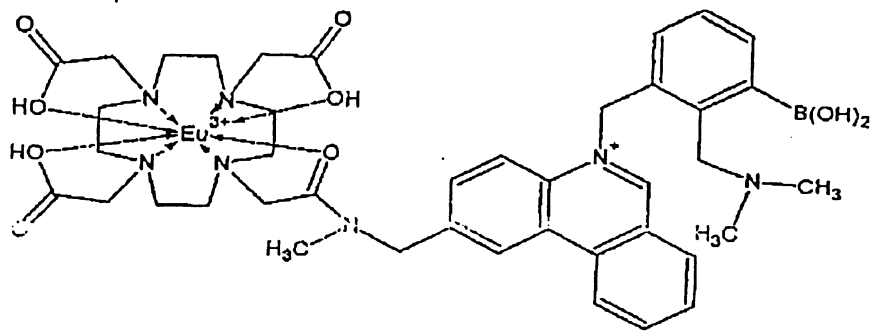
Target G



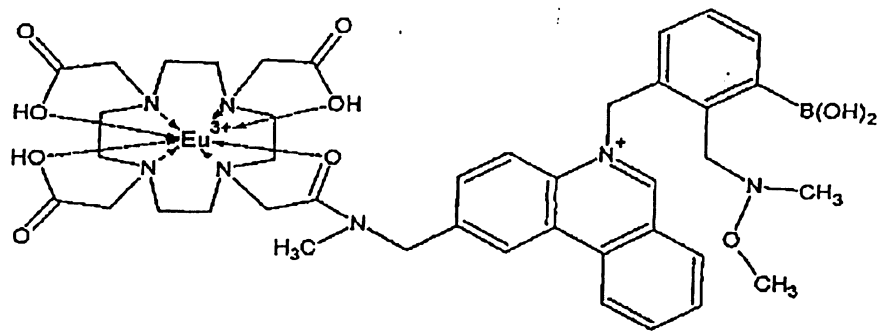
Target G-McO



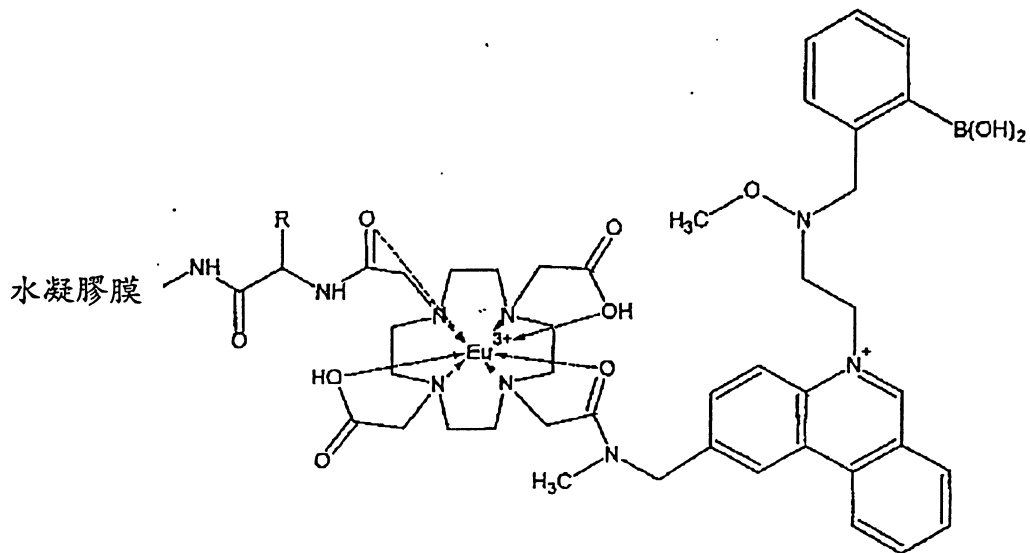
五、發明說明 (39)



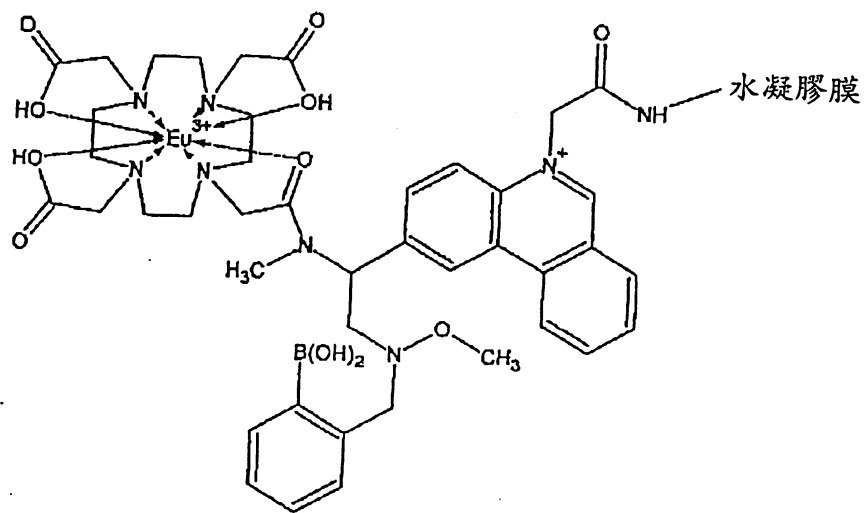
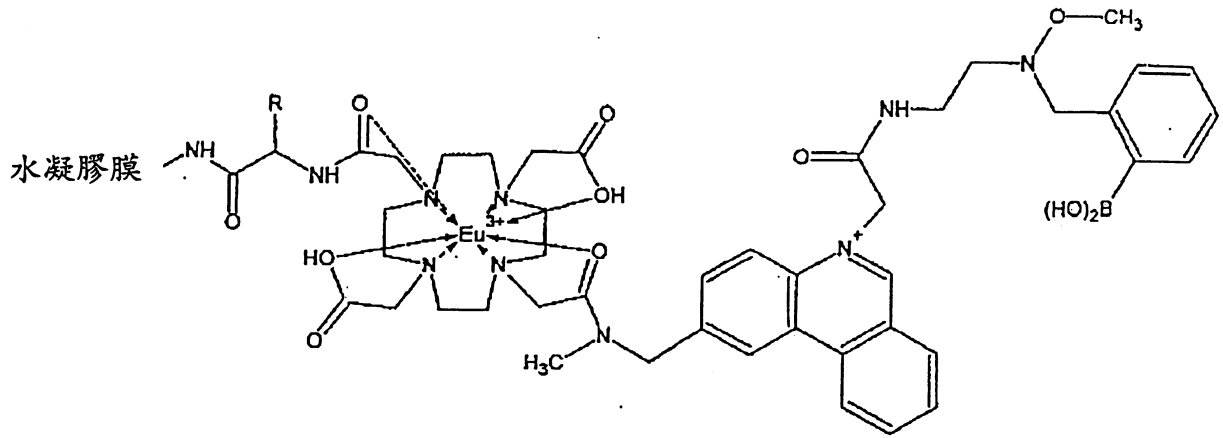
Target H



Target H-MeO



五、發明說明 (40)

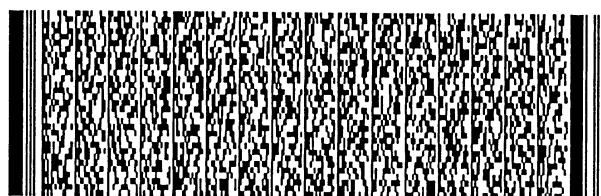
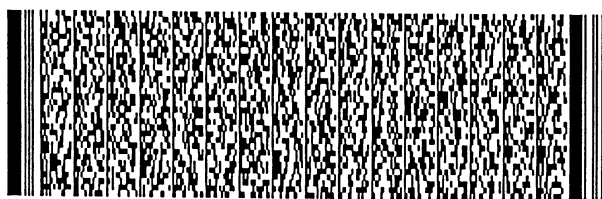


五、發明說明 (41)

如圖4-5中所示者，本發明優點以藉由測量兒茶酚(鄰-二羥基苯)對Eu-bNTA在乙醇溶液中所具螢光強度和壽命的影響之較佳實施例予以證實。圖5顯示出在添加兒茶酚於含Eu-bNTA的乙醇溶液中之後所檢測與測量到的螢光強度變化。不具有含酮酸根辨識元件的Eu-bNTA所具螢光壽命為362微秒 \pm 1微秒，而Eu-bNTA酮酸的螢光壽命則減少到270微秒 \pm 4微秒。於將Eu-bNTA酮酸暴露於兒茶酚之後，該分子的螢光壽命更減短到209微秒 \pm 15微秒。

此外也在水中測量兒茶酚對Eu-bNTA酮酸所具螢光強度和壽命之影響且顯示可消去螯合物所含鎔離子之螢光。之後加入三辛基膦("TOPO")以保護位於鎔螯合複合物內殼上的配位部位免於水的消光效應。圖3繪出添加TOPO到含Eu-bNTA酮酸的水溶液中之情形。

Eu-NTA酮酸也能夠檢驗甲醇中所含的葡萄糖。特定言之，係在甲醇中用Eu-NTA酮酸進行葡萄糖滴定。葡萄糖滴定所得數據示於圖6-8中，圖6繪出相對於遞增葡萄糖濃度的Eu-NTA酮酸滴定。圖7繪出在圖6中所示低範圍數據點的擴展圖。圖7所示結果證實Eu-NTA酮酸鹽可檢測到頗低於約4.7 mMol正常生理水平的濃度之葡萄糖。如圖7數據標繪所示者，可在低於約0.5 mMol生理範圍內鑑別葡萄糖濃度差。雖然於圖7中因為在.001 mMol葡萄糖以下的數據點密切相近之故而不能顯示出Eu-bNTA所具對葡萄糖濃度變化的低端敏感度，圖8則以葡萄糖濃度相對於 I/I_0 的半對數標繪圖標繪出圖7中的低範圍。

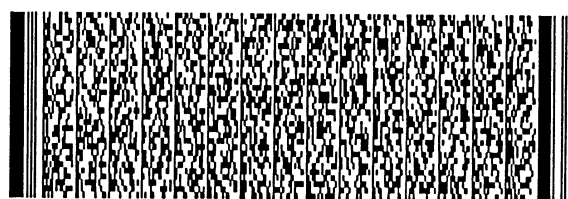
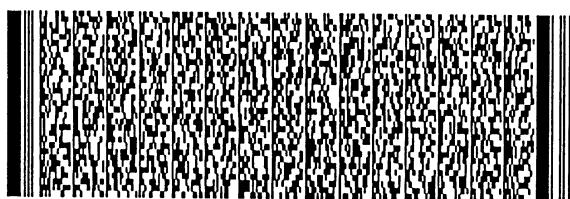


五、發明說明 (42)

圖9顯示出用葡萄糖和果糖分別在甲醇中滴定鎔二苯甲醯基甲烷(Eu-(DBM))和Eu(醯酸化DBM)所得結果。特定言之，葡萄糖和果糖的濃度變異為.0005，.005，.05，1，5，10和20 mM。圖9中對葡萄糖B和果糖B的數據標繪圖代表Eu(醯酸化DBM)的葡萄糖滴定與果糖滴定。從圖9的結果可以輕易看出在暴露於約0.01 mM以上的葡萄糖和果糖濃度時，醯酸化鎔二苯甲醯基甲烷的螢光強度即明顯地增加，而未經醯酸化的Eu(DBM)所具螢光強度在添加葡萄糖和果糖時都沒有任何可察覺程度之變化。沒有特定性辨識元件(如，醯酸根)時，鎔系金屬螯合複合物即對葡萄糖，果糖或其它順-二醇化合物的存在沒有反應。因此，有了分析物-特定性辨識元件，於此例中為一醯酸根，本發明鎔系金屬螯合複合物即對葡萄糖，果糖和其它順-二醇化合物的存在具敏感性，因而可用來檢測彼等和其它分析物的存在或濃度。

圖10-13進一步證實本發明鎔系金屬螯合複合物檢測樣品中葡萄糖及/或果糖的存在或濃度之能力。

如上文所述者，本發明螢光指示劑分子可用於許多不同類型的螢光感測器之中。該等螢光指示劑分子可用於感測器中以檢測樣品例如液體樣品，包括生物流體，且更特定言之人類流體中的分析物例如葡萄糖或其它順-二醇化合物之存在或濃度。例如，可將本發明螢光指示劑分子分散在可讓葡萄糖或其它順-二醇化合物穿透的聚合物基質內。然後經由測量指示劑分子於透過一或多個含醯酸根辨



五、發明說明 (43)

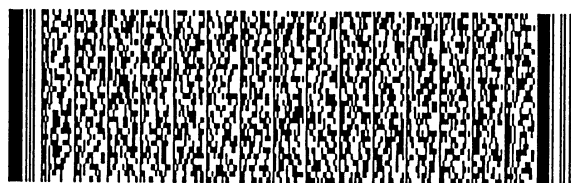
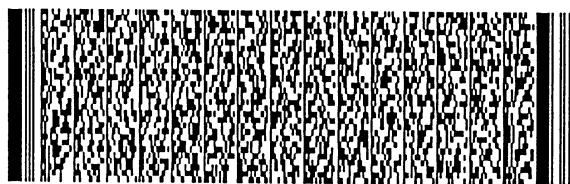
識元件結合到葡萄糖或其它順-二醇化合物後發散出的螢光所具強度或壽命之變化即可測定介質例如液體介質中的葡萄糖或其它順-二醇之存在或濃度。

美國專利第5,517,313號-其揭示內容併於本文作為參考-述及一種螢光感測裝置於其中可以使用本發明螢光指示劑分子測定液體介質中的分析物例如葡萄糖或其它順-二醇化合物之存在或濃度。該感測裝置包括一成層的含螢光指示劑分子基質行列(後文稱為"螢光基質")，一高通濾光器及一光電偵檢器。於此裝置中，於指示劑材料內至少部份配置著一光源，較佳者發光二極體("LED")，使得來自光源的入射光可促使指示劑分子發出螢光。高通濾光器使發散光到達該光電偵檢器，同時濾掉來自光源的散射入射光。

在美國專利第5,517,313號中所述裝置中所採用的指示劑分子所發螢光係經分析物例如葡萄糖或其它順-二醇化合物的局部存在而受到調制，如，衰減或增強。

於美國專利第5,517,313號所述感測器中，含指示劑分子的材料係分析物可穿透者。如此，分析物可從周圍試驗介質擴散到材料內，由是影響指示劑分子所發散出的螢光。該光源，含指示劑分子的材料，高通濾光器及光電偵檢器係經組裝成使指示劑分子所發散的螢光有至少一部份射到光電偵檢器，產生出顯示出周圍介質中的分析物所具濃度之電信號。

根據使用本發明螢光指示劑分子的另一可能實施例，也



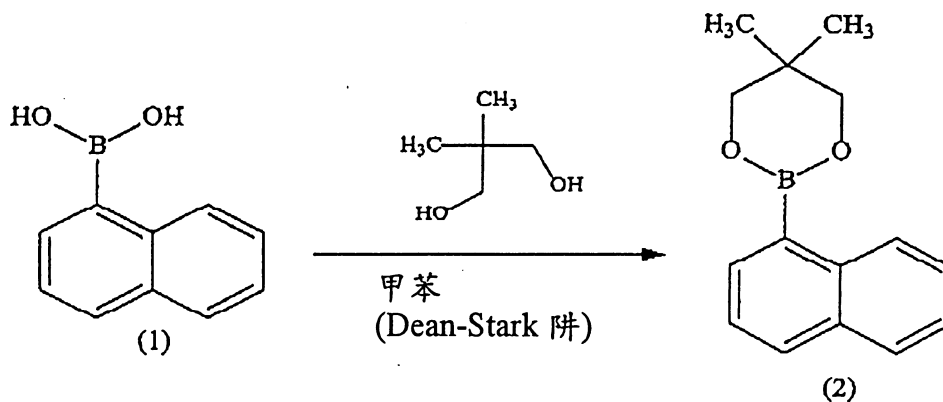
五、發明說明 (44)

在申請中的美國專利申請第08/855,234, 08/855,235和08/855,236號中述及螢光感測裝置，-彼等全部都併於本文作為參考。

本發明螢光指示劑分子可由諳於此技者不必經過份量實驗而使用已知的反應機制和藥劑，包括與下文所述通用程序相一致的反應機制，即可製得。

硼酸化鎔肆 β -二酮複合物之製備

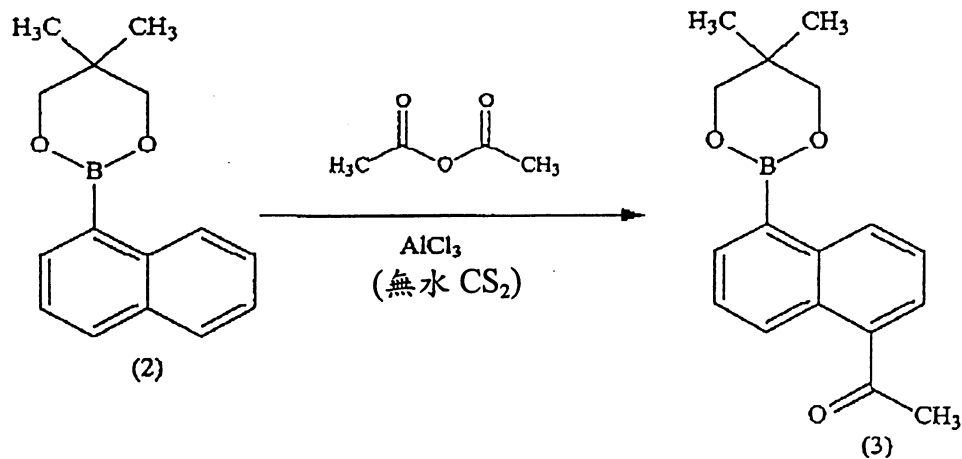
1. 將可得自Frontier Scientific (Logan, Utah)的萘-1-硼酸溶於甲苯內。
2. 該硼酸必須先經由與2,2-二甲基-1,3-丙二醇(Aldrich Chemical Company)反應同時使用Dean-Stark阱共沸脫除水予以保護(封蓋)住而得2,2-二甲基丙烷-1,3-二基1-萘基硼酸酯，如下所示者：



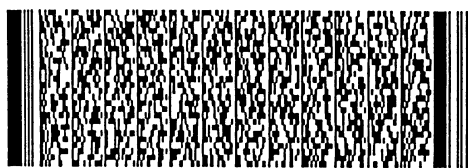
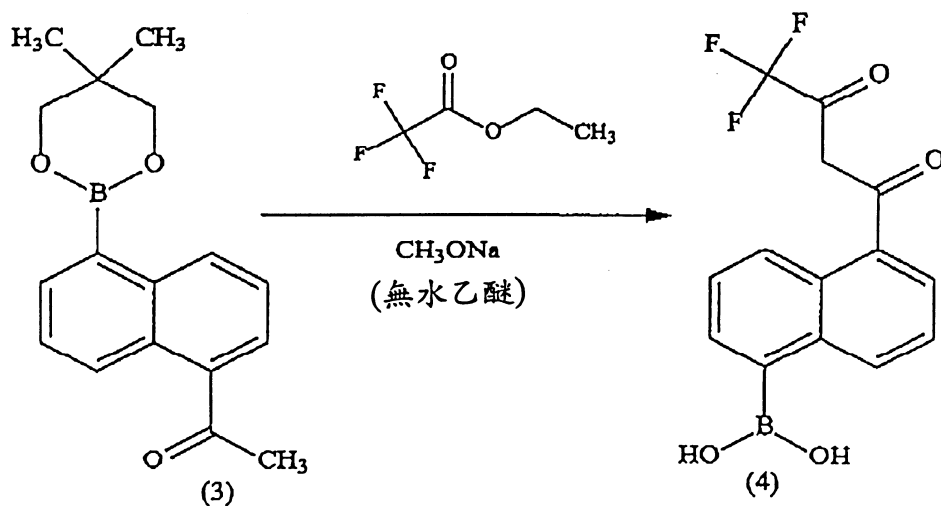
3. 然後將經封蓋的硼酸經由將該硼酸與乙酸酐和三氯化鋁在無水二硫化碳中反應進行Friedel-Crafts乙醯化予以醯化製得2,2-二甲基丙烷-1,3-二基5-乙醯基-1-萘基硼酸

五、發明說明 (45)

酯，典型地可得約70%產率的反應產物，其呈現為黏稠液體，如下面所示者：



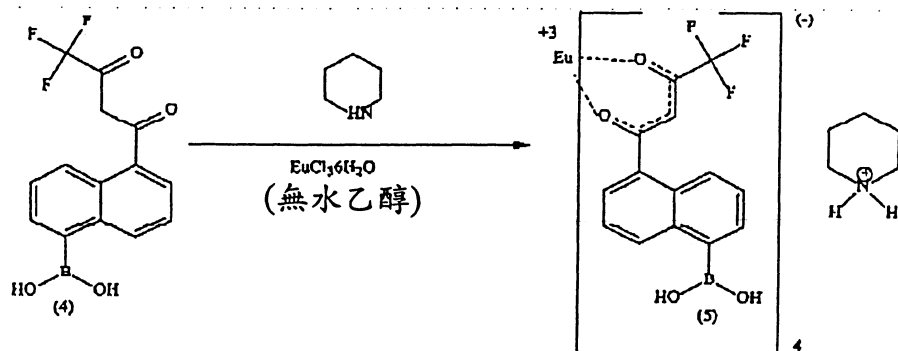
4. 之後經由使用甲氧化鈉作為縮合劑(於無水乙醚中)在(3)與三氟乙酸乙酯(Aldrich)之間進行Claisen縮合反應形成 β -二酮且去封蓋，如下所示者：



五、發明說明 (46)

5. 接著可以用製備型氧化矽凝膠TLC同時用二氯甲烷洗提純化出中間產物(4)，5-萘甲醯基-三氟丙酮醯酸。於至少一製備中，從板上收取第三譜帶洗提物($R_f=0.70-0.85$)且用質子NMR在400 MHz予以分析。NMR光譜展現出 β -二酮的烯醇形式之特性樣式，特別顯示出在 $\delta 6.69$ (單線)和 $\delta 15.28$ (寬胖單線)處之譜峯。

6. 最後經由用該 β -二酮(4)與三氯化鎔六水合物(Aldrich)和六氫吡啶在無水乙醇中反應製成含有醯酸根作為分析物-特定性辨識元件的鎔肆指示劑複合物，如下所示者：

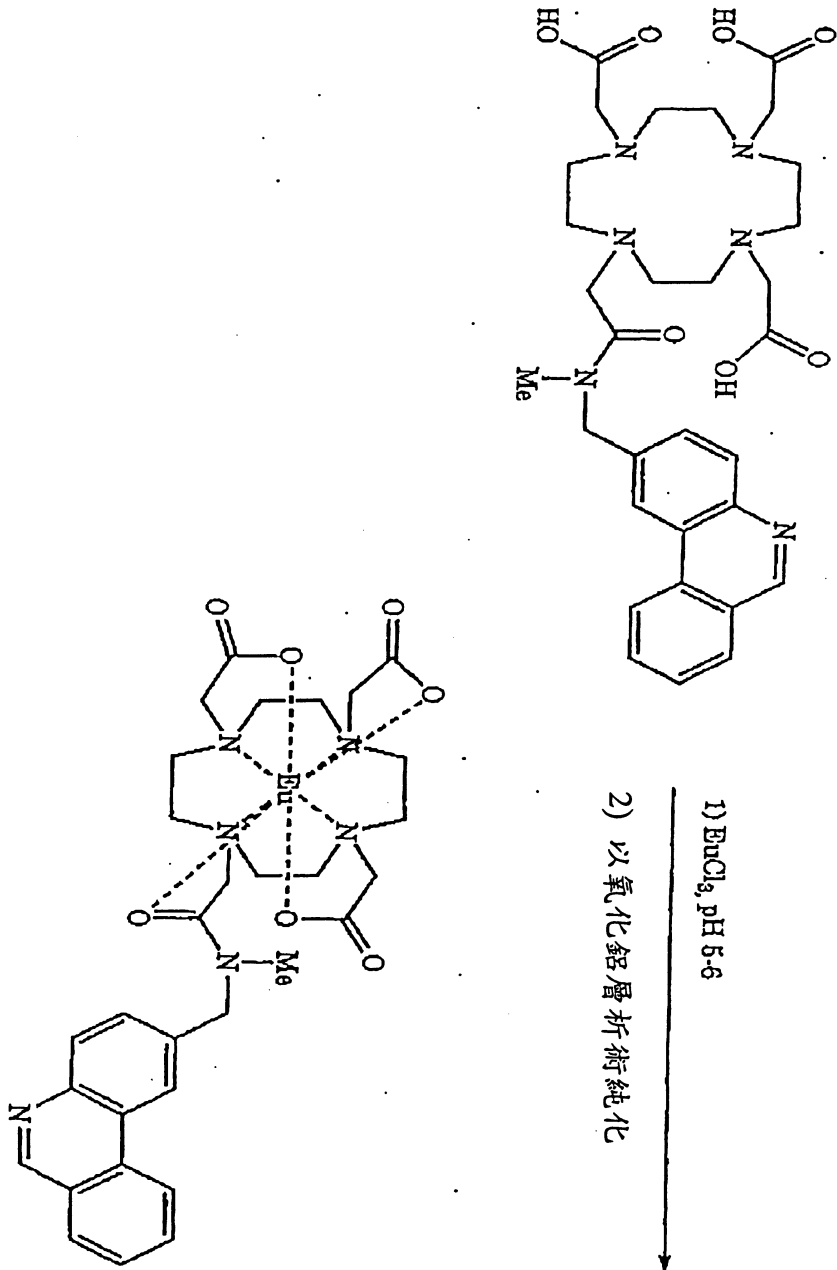


然後將該溶液加熱到70 °C 3小時。加熱後，所得溶液在用手持長波UV光源照射時顯示出特性橘紅色發散光。此外，用Shimadzu螢光計進行螢光掃描時顯示出340 nm之尖峯激發波長及613 nm之鎔複合物特性尖峯發散波長。

下面繪出可用來製備本發明化合物的其它合成程序。

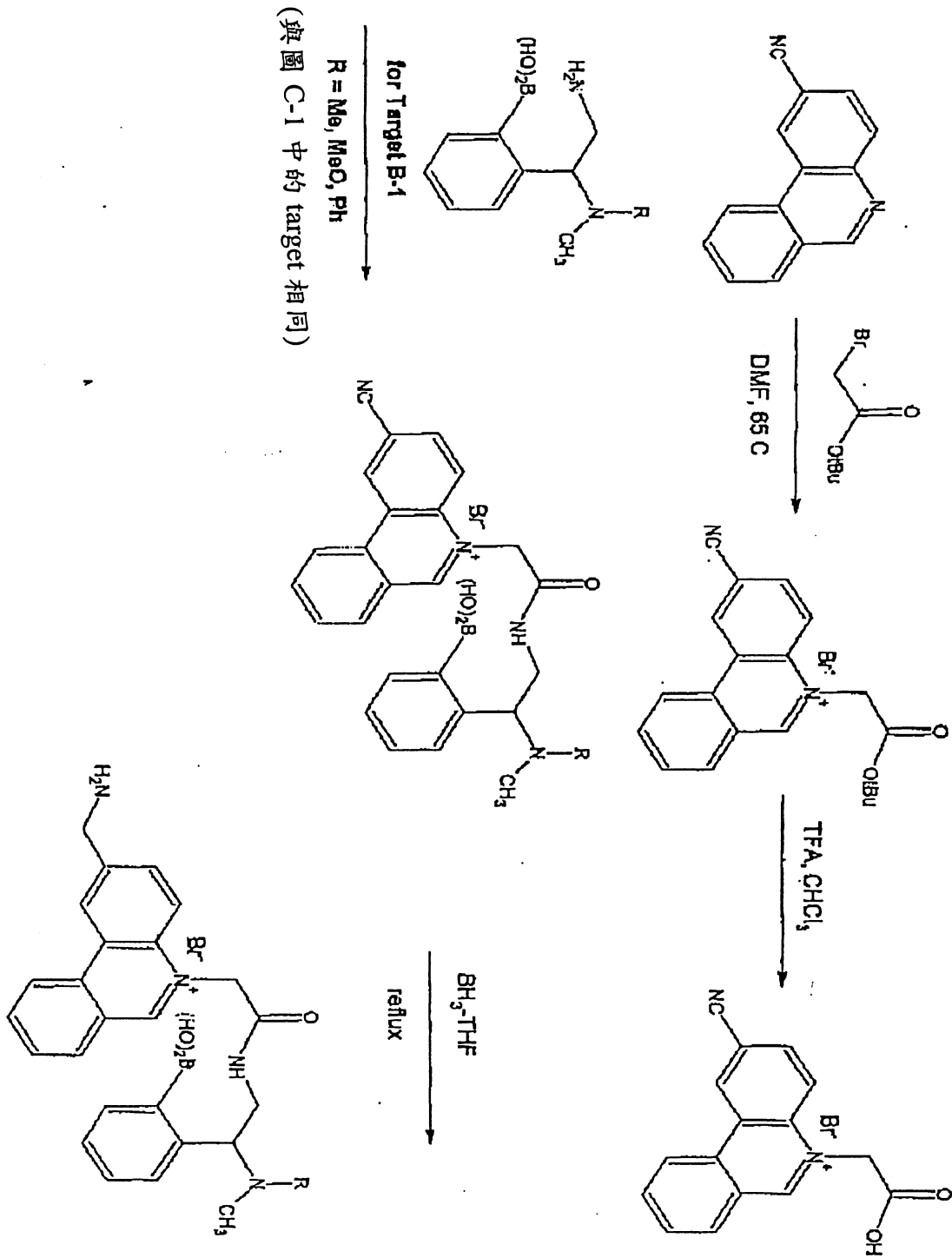


五、發明說明 (47)



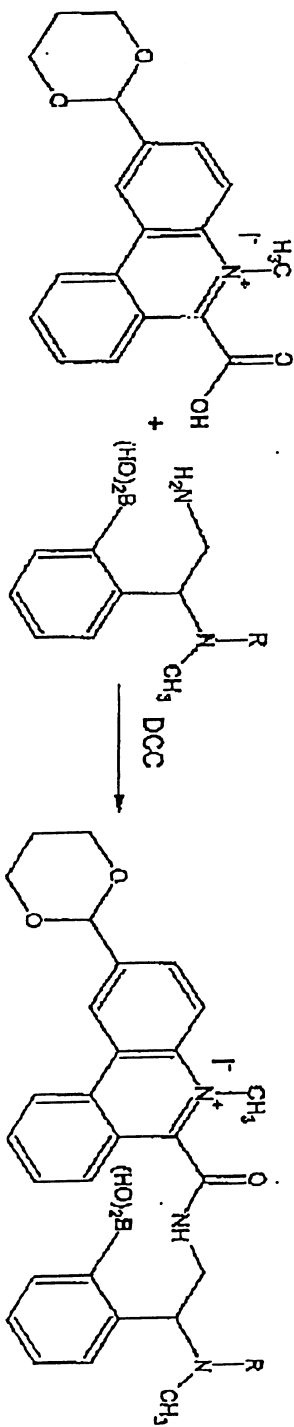
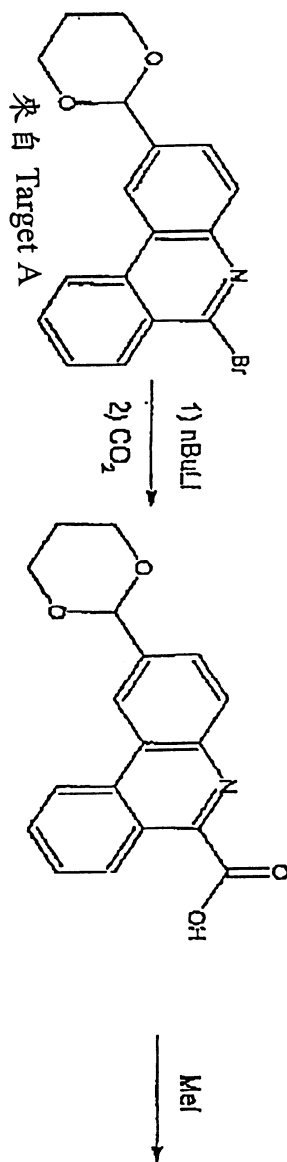
五、發明說明 (50)

Target B-1, C-1 中間體之合成



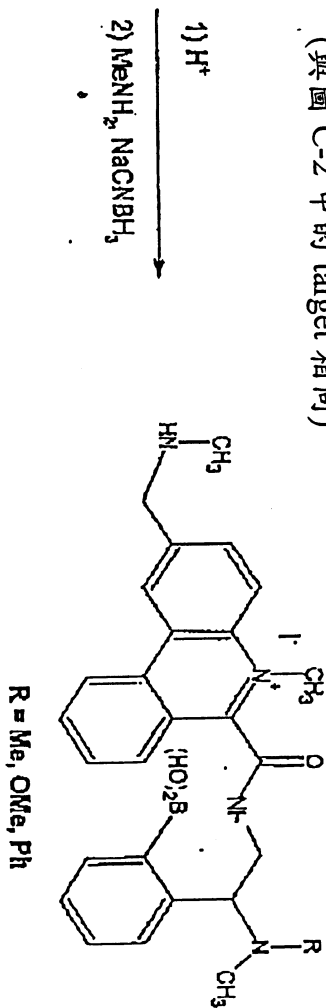
五、發明說明 (51)

Target B-2, C-2 中間體之合成



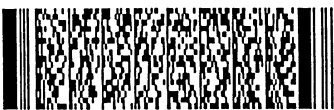
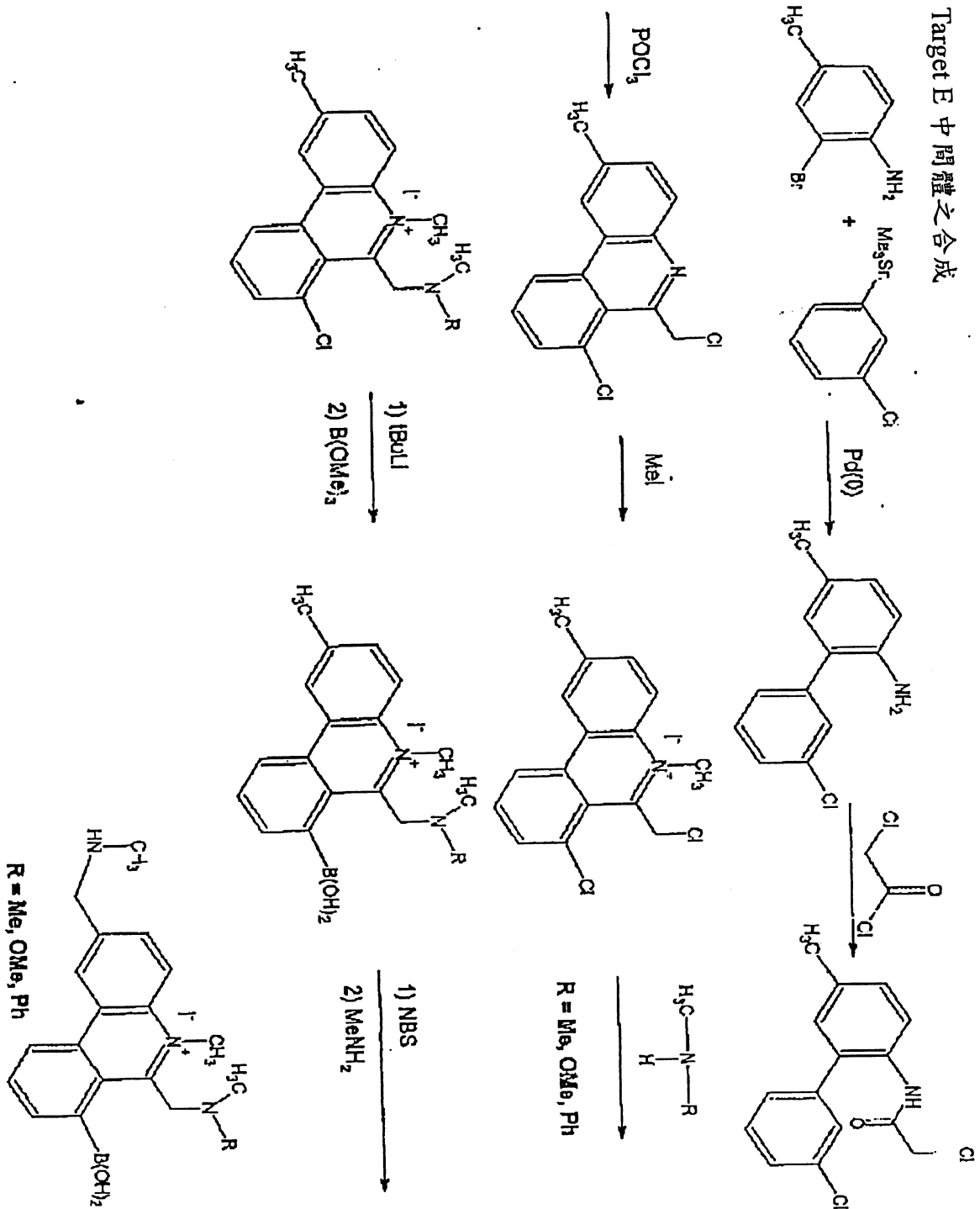
for Target B-2
R = Me, MeO, Ph

(與圖 C-2 中的 target 相同)



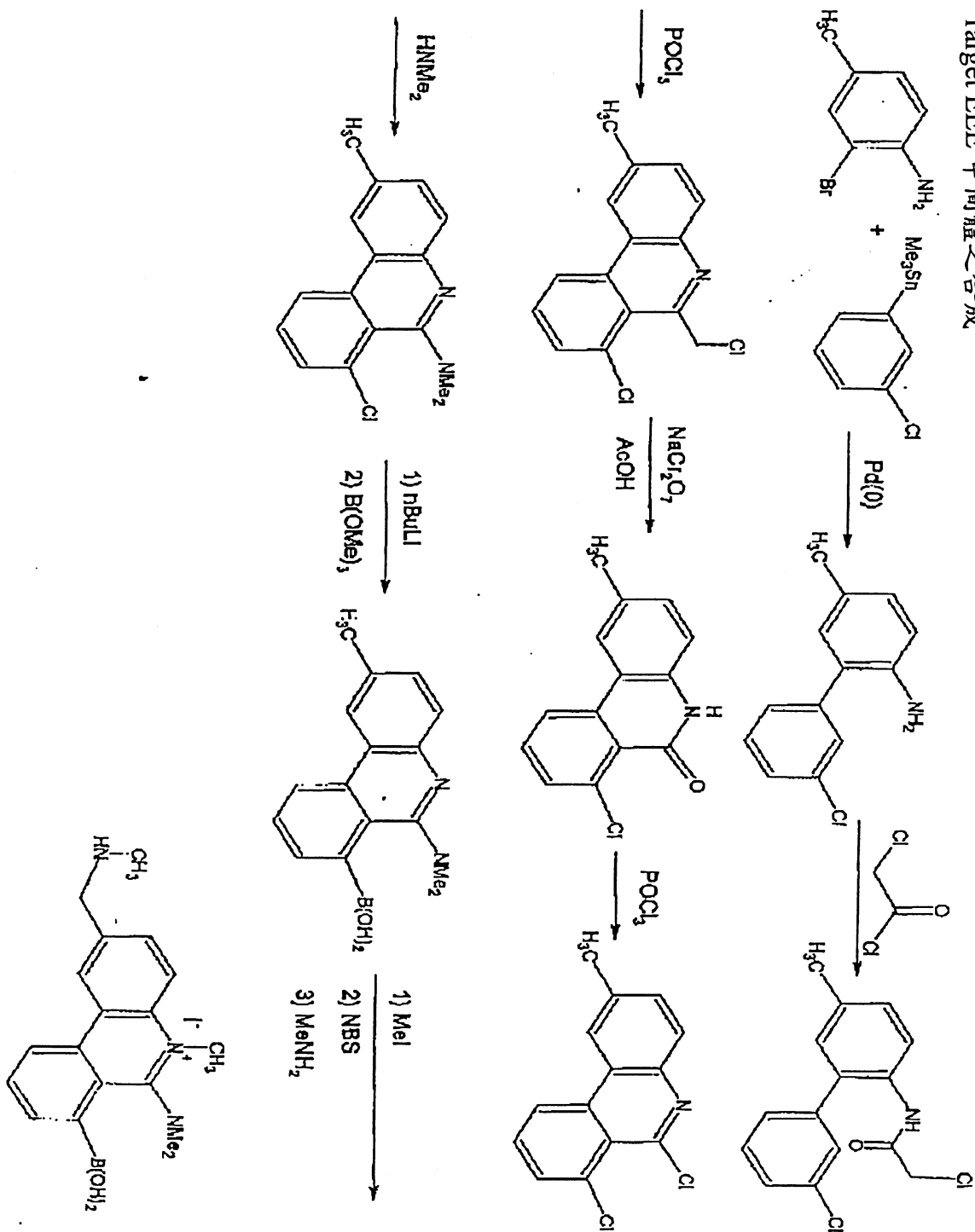
五、發明說明 (52)

Target E 中間體之合成



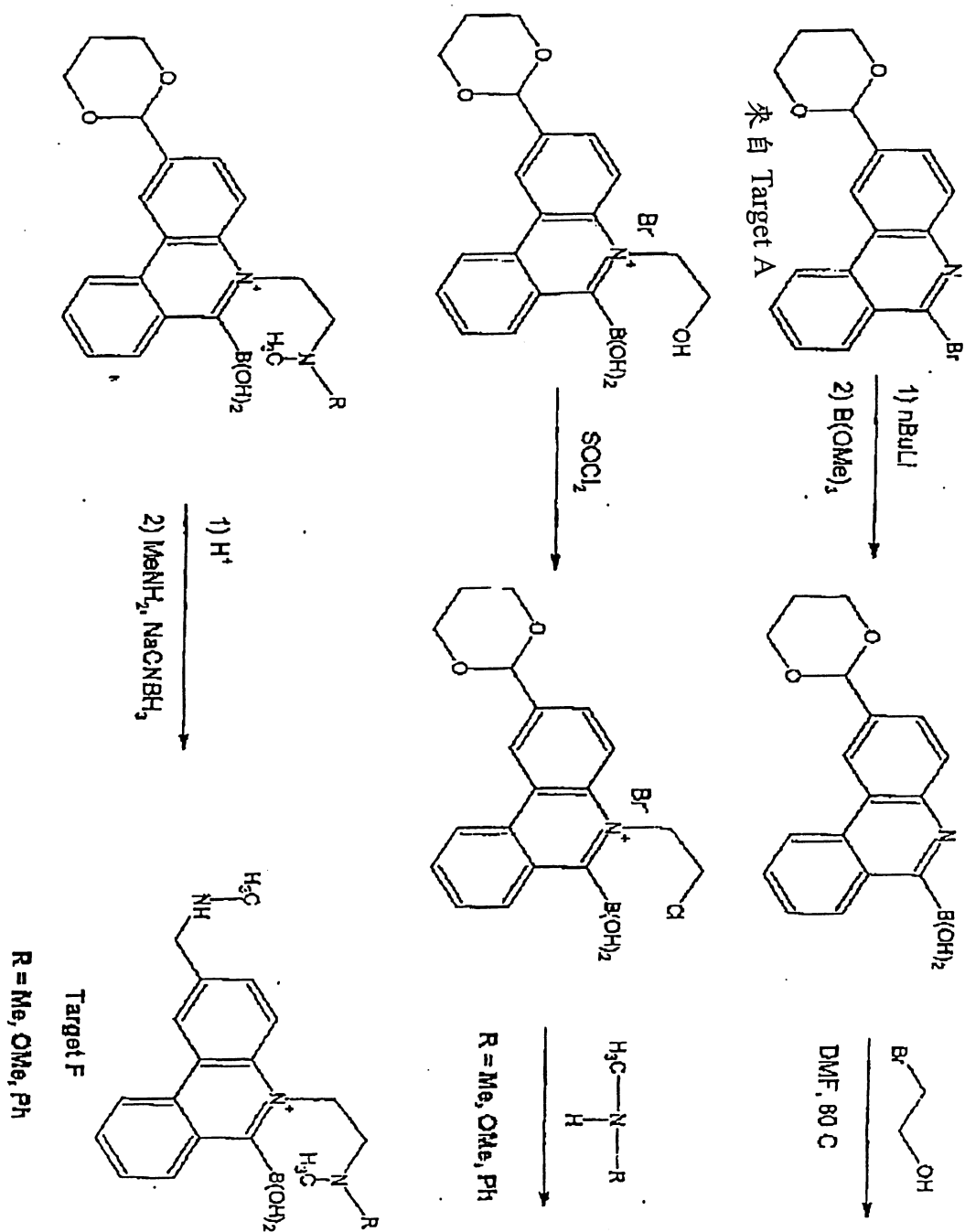
五、發明說明 (53)

Target EEE 中間體之合成



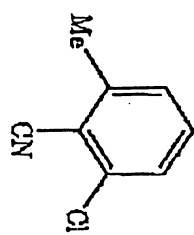
五、發明說明 (54)

Target F 中間體之合成

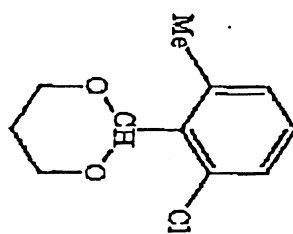


五、發明說明 (55)

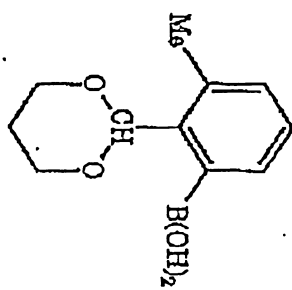
Target H 合成



1) DIBAL
2) 1,3-丙二醇
苯, cat TsOH

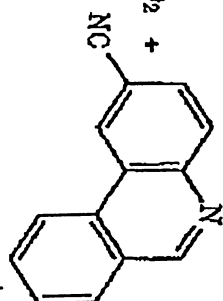
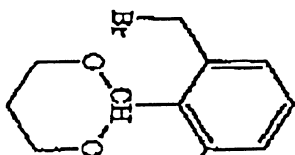


1) Mg⁰, ether
2) B(OMe)₃

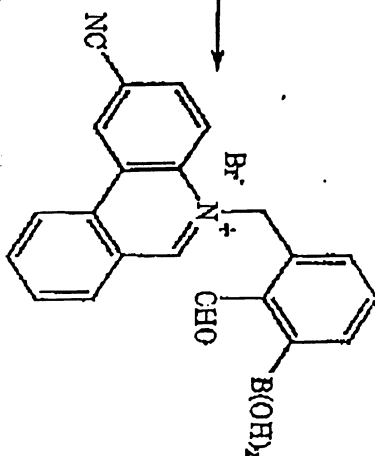


Aldrich Chemical Co.
St. Louis, MO

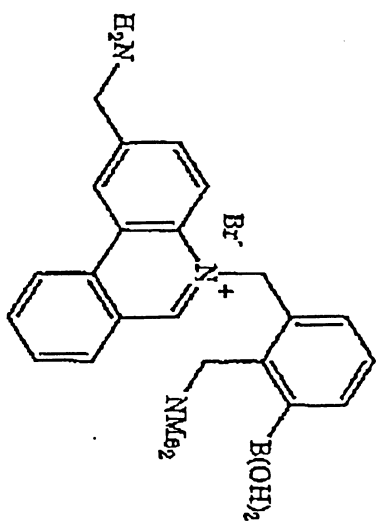
NBS, CCl₄



1) DMF
2) H⁺

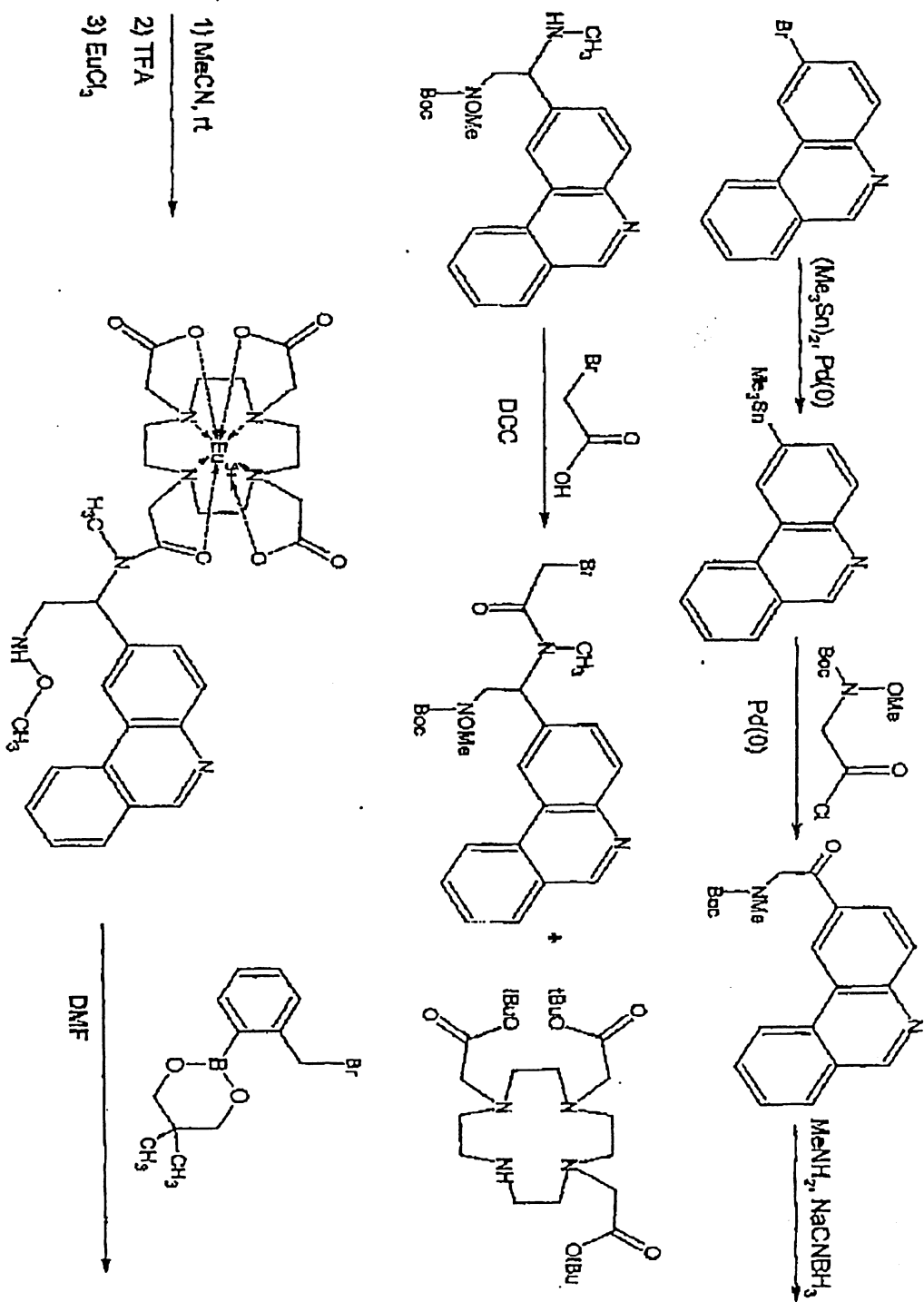


1) HNMe₂, NaCNBH₃, EtOH
2) BH₃

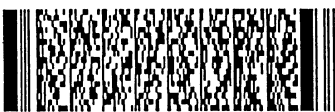
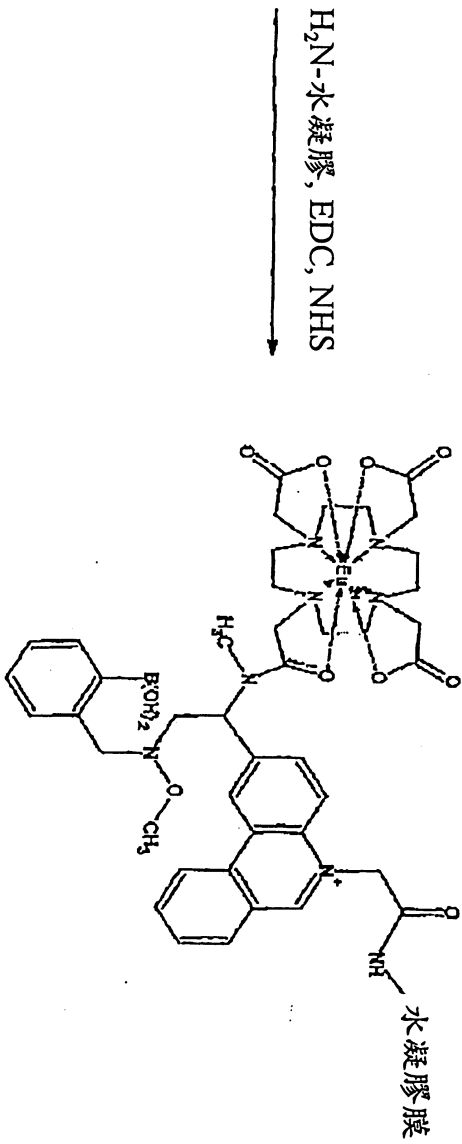
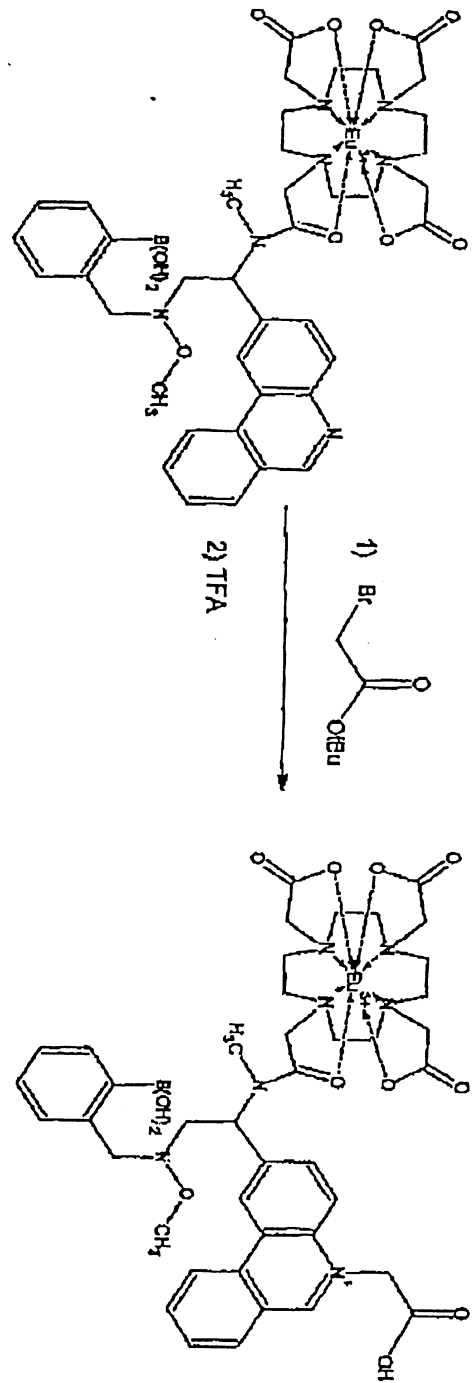


五、發明說明 (56)

措施 3 之合成程序



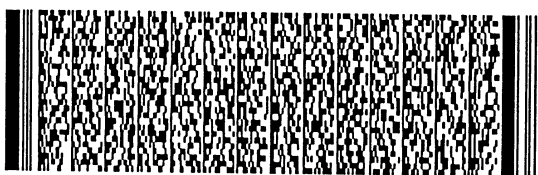
第 2 頁措施 3 之合成程序



五、發明說明 (58)

有關上文所繪諸合成程序諸部份的其它細部，可參看下列文章，彼等的內容皆併於本文作為參考：

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



五、發明說明 (59)

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

本發明要用下列實施例予以示範說明以對其進一步了解。

實施例I

用Eu(4-二苯甲醯基甲烷酮酸)檢測葡萄糖和果糖

將25微升的6.5 mM Eu(4-二苯甲醯基甲烷酮酸)/PyCl加到525微升甲醇中並予以迴轉混合。從甲醇中的儲液(4 μ M, 400 μ M, 4 mM和40 mM), 對兩種糖分別製備濃度為0.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 和20 mM之葡萄糖和果糖樣品。其結果示於圖9中, 在Eu螯合複合物經於所需的365 nm激發波長後對每一個別葡萄糖和果糖樣品, 監測Eu螯合複合物在613 nm的螢光發散強度。

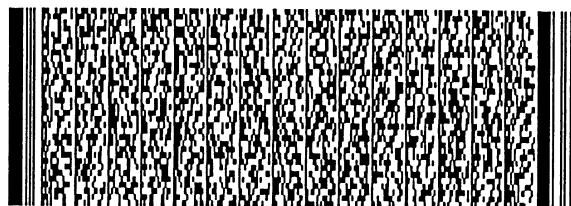
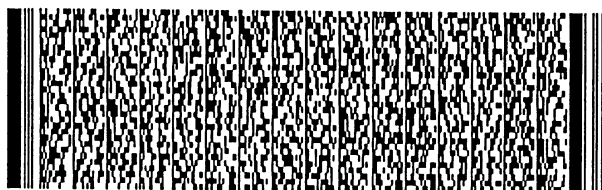
實施例II

鎔肆-5-萘甲醯基-三氟丙酮酮酸之合成

I. 2,2-二甲基丙烷-1,3-二基-1-萘基酮酸酯(1)之製備

前體的酮酸根係根據下列程序予以保護住以在鎔螯合複合物的合成中避免由隨後反應條件所引起的任何潛在不良影響:

將萘-1-酮酸(15.2克, 0.0884莫耳)與2,2-二甲基-1,3-



五、發明說明 (60)

丙二醇(10.0克, 0.0960莫耳, 1.1當量)置於甲苯(200毫升)中回流同時用Dean-Stark阱共沸脫水28小時。之後經由單純的蒸餾蒸掉甲苯, 接著於加熱下以抽氣機減壓蒸餾至到達約80°C溫度為止。然後在真空(0.5 mm)加熱到高達60°C下脫除未反應的2,2-二甲基-1,3-丙二醇。得到白色固體(20.94克, 99%純度)的2,2-二甲基丙烷-1,3-二基-1-萘基酮酸酯。

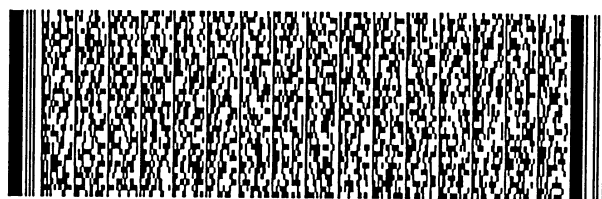
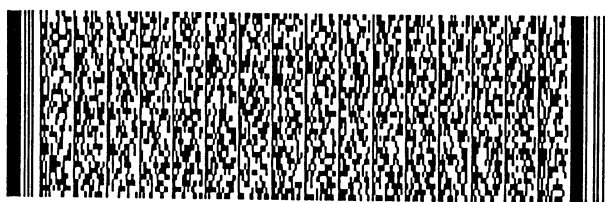
該產物經¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz)驗證過。

II. Friedel-Crafts 乙醯化: 2,2-二甲基丙烷-1,3-二基-5-乙醯基-1-萘基酮酸酯(2)之製備

根據下述程序將乙醯基導到前體所具芳族構造內以形成二酮:

將2,2-二甲基丙烷-1,3-二基-1-萘基酮酸酯(1)(21.0克, 0.0878莫耳)溶在150毫升無水二硫化碳中同時在置於冰水浴中的250毫升圓底燒瓶內攪拌。於兩小時期間加入分成數份的三氯化鋁(28.7克, 0.215莫耳)。然於一小時期間攪拌混合物並使其慢慢溫到室溫。可看到沉積在燒瓶內的黏滯深色半固體。將該混合物再置於冰水浴內冷卻, 其後在燒瓶上加裝回流冷凝器。於2小時期間加入乙酸酐(8.93克, 0.0875莫耳)。然後將混合物熱到40°C以起始反應。於乙酸酐添加期間, 需要偶合攪動反應混合物(經由手迴轉)以控制可能在反應中發生的任何放熱反應。

於使反應混合物置於室溫下2小時之後, 再於一小時期間將混合物慢慢加熱到50°C。可觀察到於反應混合物形成



五、發明說明 (61)

深色固體。

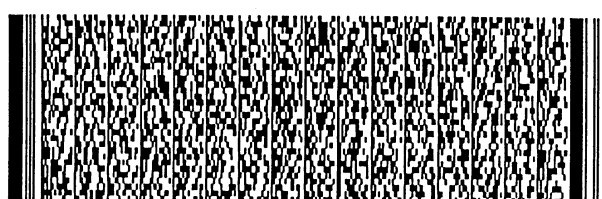
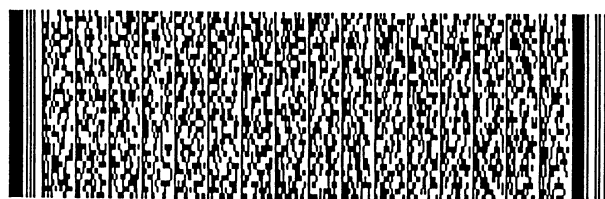
之後使用800毫升冰水，15毫升濃氯化氫和250毫升二氯甲烷一起將反應混合物分解和萃取成清楚的兩層。收集底部有機層，以硫酸鈉脫水，並在高達80°C下減壓蒸發三小時而成半固體形式，產率78%的19.39克二甲基丙烷-1,3-二基-5-乙醯基-1-萘基酮酸酯(2)。

III. Claisen縮合：5-萘甲醯基-三氟丙酮酮酸(3)之製備形成 β -二酮配體，如下所述：

用氫化鈉混合物與2毫升甲醇(0.313克，0.01302莫耳)在10毫升無水乙醚中反應。所得溶液於高達100°C的減壓下乾燥二小時而得固體形式的甲氧化鈉。之後用45毫升無水乙醚處理該甲氧化鈉且在冰水浴中冷卻。接著加入三氟乙酸乙酯(1.763克，0.0124莫耳)，10分鐘後，於另一10分鐘期間滴加二甲基丙烷-1,3-二基-5-乙醯基-1-萘基酮酸酯(2)(3.50克，0.0124莫耳)/20毫升無水乙醚溶液。在室溫下攪拌混合物30分再加熱回流70小時。將混合物置於冰水浴中攪拌之下，加入25毫升水和8毫升10%氯化氫以使水層酸化到pH 1。其後在燒瓶內呈現出清楚的兩層。

之後收集頂部乙醚層，以硫酸鈉脫水，及在高達60°C下減壓蒸發一小時而得到呈黑色液體形式(4.36克)的 β -二酮。用製備型氧化矽凝膠TLC以二氯甲烷洗提純化所得 β -二酮。從TLC板收取第三帶($R_f=0.70-0.85$)而得25%產率的5-萘甲醯基-三氟丙酮酮酸(3)(1.20克)。

該產物經質子NMR (400 MHz)光譜驗證為具有 β -二酮的



五、發明說明 (62)

烯醇形式特性樣式，具有於 $\delta 6.69$ (單線) 和 $\delta 15.28$ (寬胖三重線) 之譜峯。

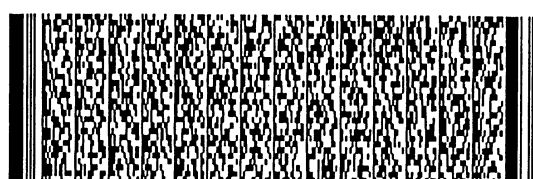
IV. 螯合/複合：鎔 (β -二酮酮酸) 肆複合物(4) 之形成

其後依下文所述製造作為螢光指示劑分子所用之鎔系金屬螯合複合物：

將三氯化鎔六水合物(0.7毫克，0.0019毫莫耳)/0.5毫升無水乙醇溶液加到5-萘甲醯基-三氟丙酮酮酸(3)(2.2毫克，.0058毫莫耳)和六氫吡啶(130毫克)在0.5毫升無水乙醇中的溶液內。於2小時期間將此混合物慢慢加熱到70°C並在該溫度下再保持3小時以形成鎔肆複合物(4)。

所得溶液在用手持長波紫外光源照射下展現出特性橘紅色發散光，此外，用Shimadzu螢光計測量所得螢光光譜顯示出340 nm尖峯激發波長及613 nm鎔螯合複合物特性發散樣式。

本發明已就某些較佳實施例予以說明過。諳於此技者皆承認可作出修飾和改良而不違離本發明旨意與範圍。



四、中文發明摘要 (發明之名稱：藉包含經取代配體之螢光鐳系金屬螯合複合物檢測分析物)

測定樣品中分析物的存在或濃度所用之組合物和方法，其包括將該樣品暴露於包括螢光鐳系金屬螯合複合物之指示劑分子。樣品中分析物的存在或濃度係經由觀察及/或測量分析物結合到該複合物中所含一或多個辨識元素時由該鐳系金屬螯合複合物發散出之螢光強度變化而測定的。該螢光指示劑分子可用於各種類型的螢光感測裝置中且可用於各種領域，包括能量，醫學和農業之中。

英文發明摘要 (發明之名稱：DETECTION OF ANALYTES BY FLUORESCENT LANTHANIDE METAL CHELATE COMPLEXES CONTAINING SUBSTITUTED LIGANDS)

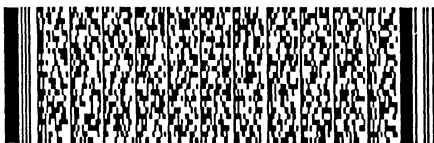
Compositions and methods for determining the presence or concentration of an analyte in a sample by exposing the sample to an indicator molecule comprising a fluorescent lanthanide metal chelate complex. The presence or concentration of the analyte in the sample is determined by observing and/or measuring the change in intensity of fluorescence emitted by the lanthanide metal chelate complex upon binding of the analyte to one or more recognition elements in the complex. The



四、中文發明摘要 (發明之名稱：藉包含經取代配體之螢光鐳系金屬螯合複合物檢測分析物)

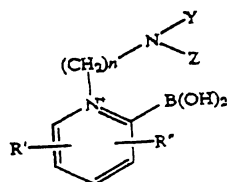
英文發明摘要 (發明之名稱：DETECTION OF ANALYTES BY FLUORESCENT LANTHANIDE METAL CHELATE COMPLEXES CONTAINING SUBSTITUTED LIGANDS)

fluorescent indicator molecules can be used in various types of fluorescent sensing devices and are useful in various fields, including energy, medicine and agriculture.

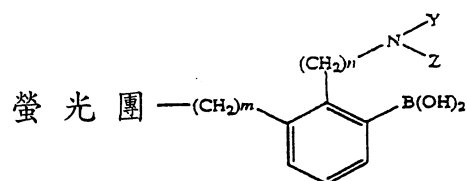


六、申請專利範圍

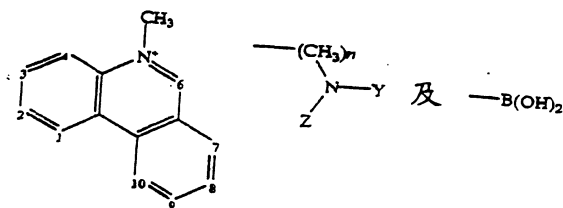
其中n為0或1；



其中n為2；



其中m為0至5且n為1或2；及



其中n為0或1；且該酮酸和胺基取代基係以呈配對形式配置於位置1和10，3和4，6和7，7和8，或9和10；且對所有構造，於可用時，R'和R''獨立地各為稠合芳基；脂族基；第一，第二或第三胺基；醯胺；羧基；酮；酯；醇；



五、發明說明 (11)

氣體中的分析物，例如葡萄糖或其它順-二醇化合物，由是可減低任何背景雜訊的影響以及可能減低分析物檢測敏感度的其它干擾，且不會被濃縮消光(concentration quenched)。

圖式之簡略說明

本發明指示劑分子的較佳實施例要參照附圖予以說明，其中：

圖1顯示出本發明含酞酸鎔螯合物(為清晰起見只顯示出一配體)。

圖2也顯示出本發明含酞酸鎔螯合物。

圖3顯示出在含有氧化三辛基磷("TOPO")的水溶液中之含多個含酞酸配體的鎔螯合複合物。

圖4顯示出在含有本發明含酞酸鎔螯合物的乙醇溶液中添加兒茶酚之影響。

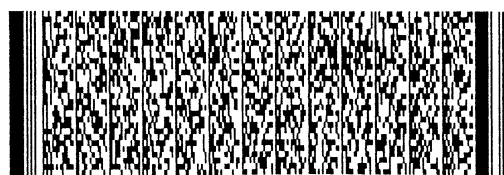
圖5顯示出於含鎔(肆) β -萘甲醯基三氟乙酸(Eu-bNTA)的乙醇溶液中添加兒茶酚之影響。

圖6-8顯示出用葡萄糖在甲醇中滴定Eu-NTA-酞酸酯之結果。

圖9顯示出用葡萄糖和果糖在甲醇中滴定鎔二苯甲醯基甲烷(Eu(DBM))和Eu(酞酸化DBM)之比較。

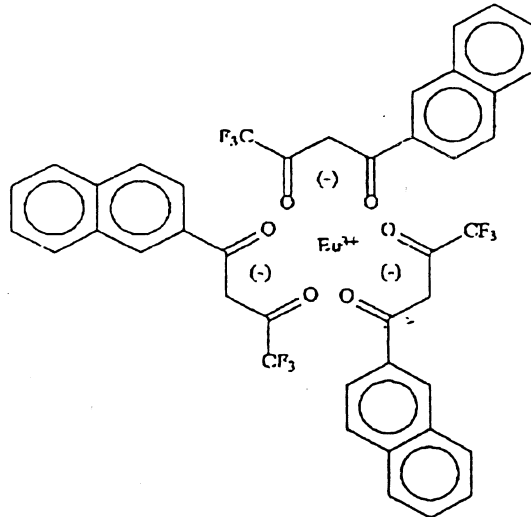
圖10顯示出用葡萄糖在甲醇中滴定Eu-NTA酞酸酯之結果。

圖11顯示出用葡萄糖和果糖在甲醇中滴定Eu-DBM酞酸酯之結果。

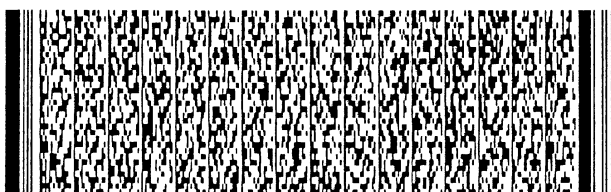
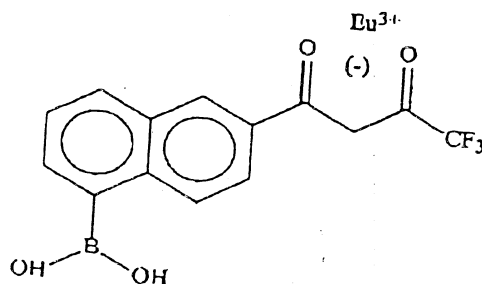


五、發明說明 (32)

醯基三氟乙酸(Eu-bNTA)螯合劑上接著對葡萄糖或其它順-二醇化合物具有分析物-特定性之含酮酸辨識元件。該螯合劑的有機配體部份係已知可在鏷系金屬離子(如, 鎔)周圍形成殼, 如下所示者:



此外, 也為已知者, 不同的溶劑可影響鏷系金屬離子的螢光衰減時間(如, 水可消滅鎔離子的螢光)。因此也研究用分析物-特定性辨識元件(如含酮酸辨識元件)改質外殼所含有機配體是否可微擾鎔離子所具衰減時間到任何可察覺程度, 因此乃合成且試驗下面的鎔螯合物, 鎔(肆) β -萘甲醯基三氟乙酸(Eu-bNTA)酮酸。



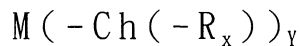
圖式簡單說明

93.9.24 修正
年 月 日
補充



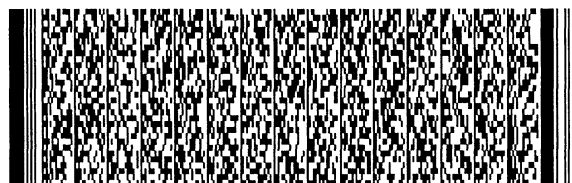
六、申請專利範圍

1. 一種用以檢測未標示分析物濃度之螢光性鏷系金屬螯合複合物，其具下式：



其中：

M表鏷系金屬離子；Ch為包括一配體的螯合劑；R為分析物-特定性辨識元件，其包括酮酸基、亞砷酸基或鍍酸基基團或其組合，且X表結合到每一螯合劑的辨識元件R之數目；X=0至4，且Y=1至4；且該辨識元件R的數目可相同或相異，其限制條件為對於一或多個螯合劑，X>0；且其中係經由測量在該分析物透過該辨識元件結合到該複合物所含一或多個螯合劑時該鏷系金屬螯合複合物所發散的螢光之任何變化而檢測該分析物的濃度，其中該一或多個螯合劑所含配體為包括下列任何一或多者之有機配體：β-二酮或其氮類似物，cyclen(1,4,7,10-四氮雜環十二烷的四脂族羧酸鹽或膦酸鹽)，二羥基，羧基配位雜環，烯醇，巨雙環隱藏配體，多胺基多羧酸，苯膦酸，含2至10個碳原子的烯基，氮、硫或連結羧基之雜環，膦氧化物，或碳環部份體，且其中至少一個配體包含，除了上述基團之一員外，一芳族基團其不會直接與該鏷系金屬離子螯合，該芳族以多至五個原子與該鏷系金屬離子分開，且其中一或多個螯合劑為陰離子性，並含有總共八個位置可與鏷系金屬離子配位。

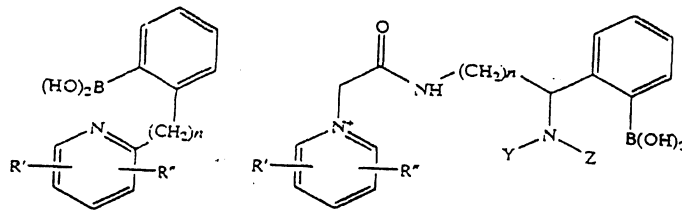


六、申請專利範圍

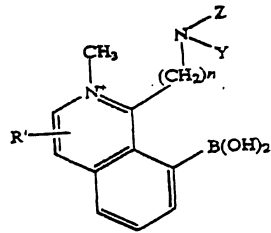
2. 根據申請專利範圍第1項之螢光性鑷系金屬整合複合物，其中M為鎔離子或鈹離子。

3. 根據申請專利範圍第1項之螢光性鑷系金屬整合複合物，其中該一或多個整合劑之配體包括β-二酮或 cyclen。

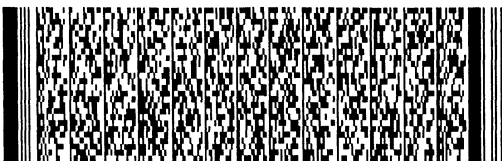
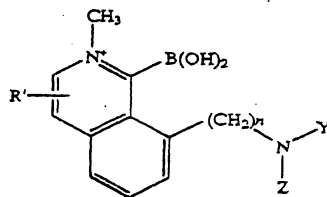
4. 根據申請專利範圍第1項之螢光性鑷系金屬整合複合物，其中該辨識元件係選自由下列所組成之群：



其中右邊結構之n為0、1或2且左邊結構之n為0或1；



其中n為1；



六、申請專利範圍

或醛；且Y和Z獨立地各為脂族基，烷氧基或芳基。

5. 根據申請專利範圍第1項之螢光性鑷系金屬螯合複合物，其中酮酸基、亞砷酸基或鍍酸基基團係接附至芳族部份體。

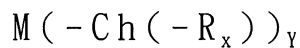
6. 根據申請專利範圍第1項之螢光性鑷系金屬螯合複合物，其係作為指示劑分子。

7. 根據申請專利範圍第6項之螢光性鑷系金屬螯合複合物，其中該一或多個螯合劑更包括一取代基以將該螯合複合物接著到一固體擔體。

8. 根據申請專利範圍第7項之螢光性鑷系金屬螯合複合物，其中用以將螯合複合物接著到一固體擔體的取代基為 $-NH_2$ 或 $-OH$ 基團。

9. 一種檢測樣品中未標示分析物的存在或濃度之方法，其包括下列諸步驟：

(a) 將樣品暴露於一具有下式的螢光性鑷系金屬螯合複合物：



其中：

M表鑷系金屬離子；Ch為包括一配體的螯合劑；R為分析物-特定性辨識元件，其包括酮酸基、亞砷酸基或鍍酸基基團或其組合，且X表結合到每一螯合劑的辨識元件R之數目； $X=0$ 至4，且 $Y=1$ 至4；且該辨識元件R的數目可相同



六、申請專利範圍

或相異，其限制條件為對於一或多個螯合劑， $X > 0$ ；且其中係經由測量在該分析物透過該辨識元件結合到該複合物所含一或多個螯合劑時該鑰系金屬螯合複合物所發散的螢光之任何變化而檢測該分析物的濃度，其中該一或多個螯合劑所含配體為包括下列任何一或多者之有機配體： β -二酮或其氮類似物，cyclen(1, 4, 7, 10-四氮雜環十二烷的四脂族羧酸鹽或磷酸鹽)，二羥基，羧基配位雜環，烯醇，巨雙環隱藏配體，多胺基多羧酸，苯膦酸，含2至10個碳原子的烯基，氮、硫或連結羧基之雜環，磷氧化物，或碳環部份體，且其中至少一個配體包含，除了上述基團之一員外，一芳族基團其不會直接與該鑰系金屬離子螯合，該芳族以多至五個原子與該鑰系金屬離子分開，且其中一或多個螯合劑為陰離子性，並含有總共八個位置可與鑰系金屬離子配位，及

(b) 測量在該分析物透過該分析物特定性辨識元件結合到該複合物所含一或多個螯合劑時該鑰系金屬螯合複合物所發散的螢光之任何變化，藉而檢測該分析物的存在或濃度。

10. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該鑰系金屬螯合複合物所含M為鎘離子或鈹離子。

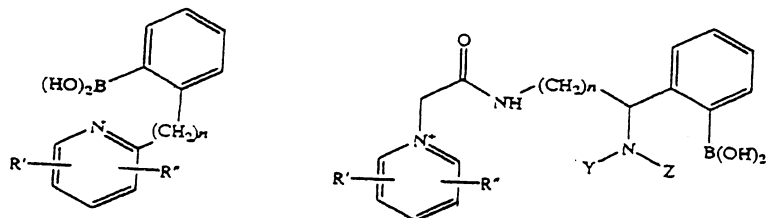
11. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該一或多個螯合劑所含配體包括 β -二酮或cyclen。

12. 根據申請專利範圍第11項之方法，其中該分析物為葡萄糖。

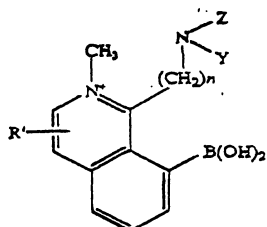


六、申請專利範圍

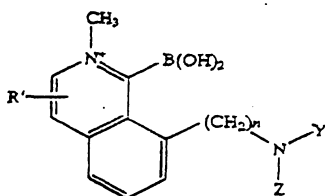
13. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該辨識元件係選自由下列所組成之群：



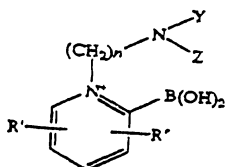
其中右邊結構之n為0、1或2且左邊結構之n為0或1；



其中n為1；

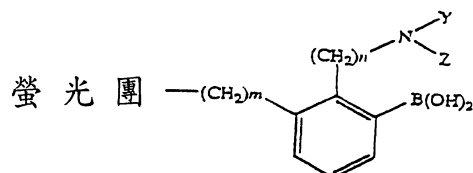


其中n為0或1；

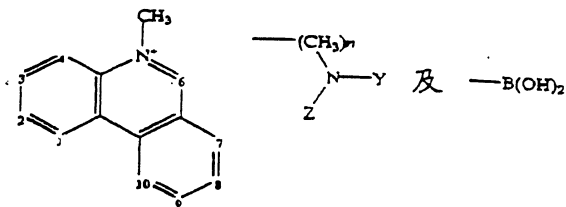


六、申請專利範圍

其中n為2；



其中m為0至5且n為1或2；及



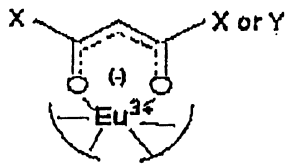
其中n為0或1；且該硼酸和胺基取代基係以呈配對形式配置於位置1和10，3和4，6和7，7和8，或9和10；且對所有構造，於可用時，R'和R''獨立地各為稠合芳基；脂族基；第一，第二或第三胺基；醯胺；羧基；酮；酯；醇；或醛；且Y和Z獨立地各為脂族基，烷氧基或芳基。

14. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中硼酸基、亞砷酸基或鍍酸基基團係接附至芳族部份體。



圖式

用於葡萄糖偵檢的含硼酸銻螯合物



其中 X 或 Y 或
兩者皆可經硼酸化

example
銻叁-二苯甲醯基
甲烷硼酸酯

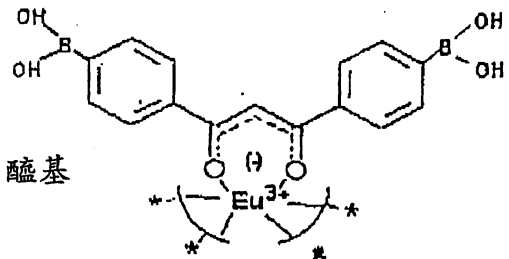


圖 1

圖式

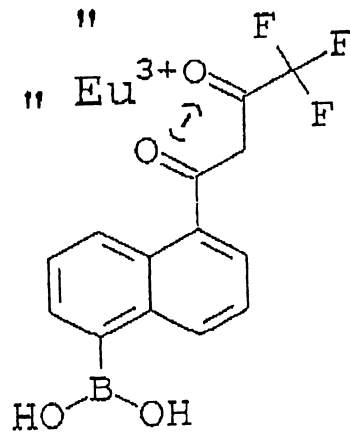


圖 2

圖式

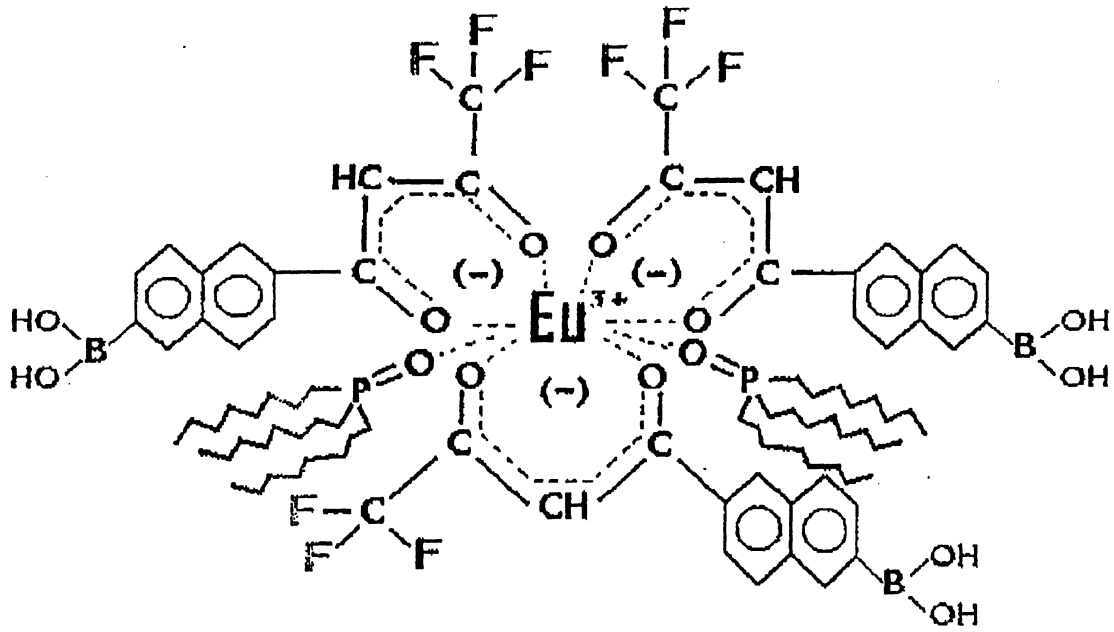


圖 3

圖式

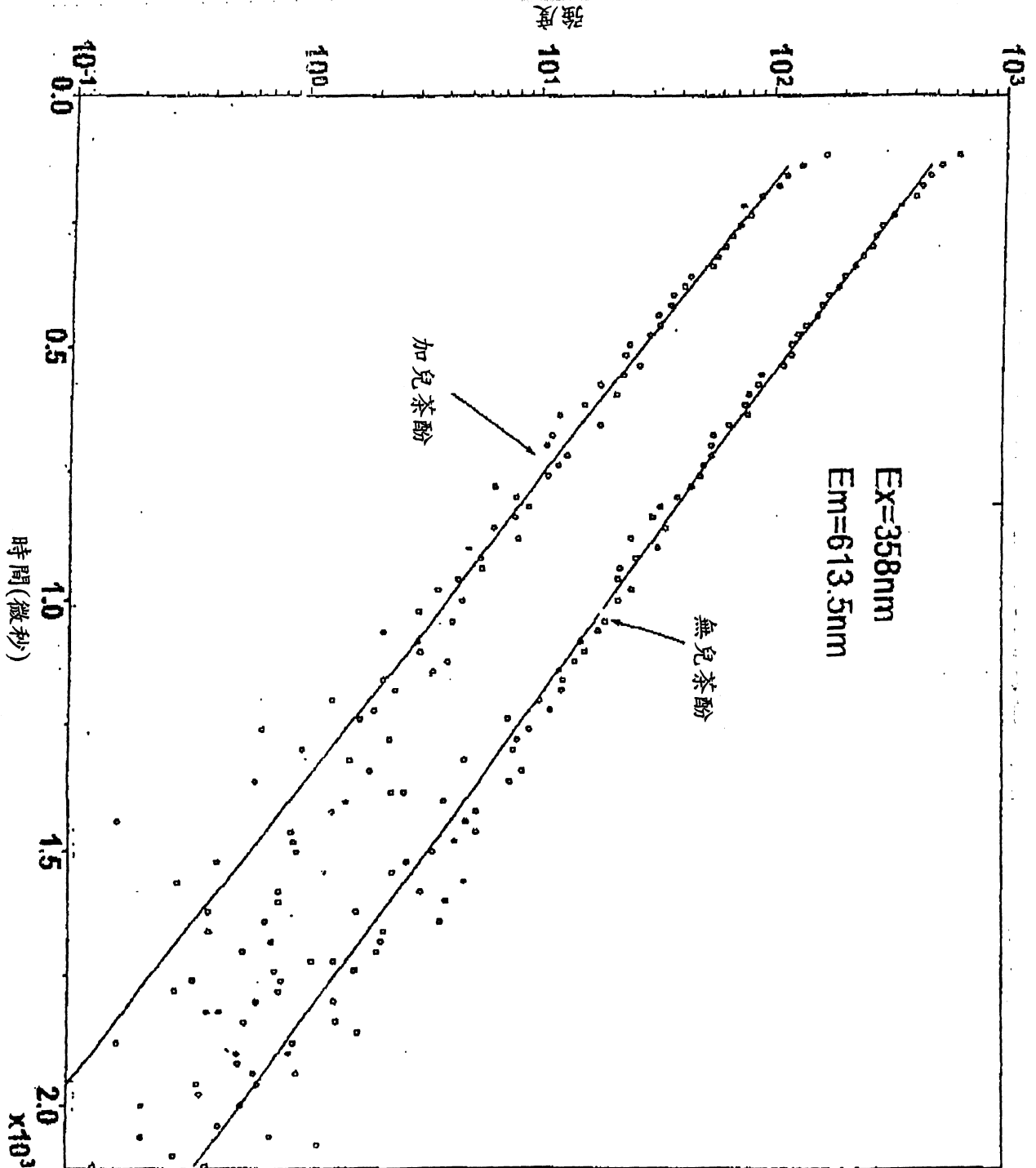
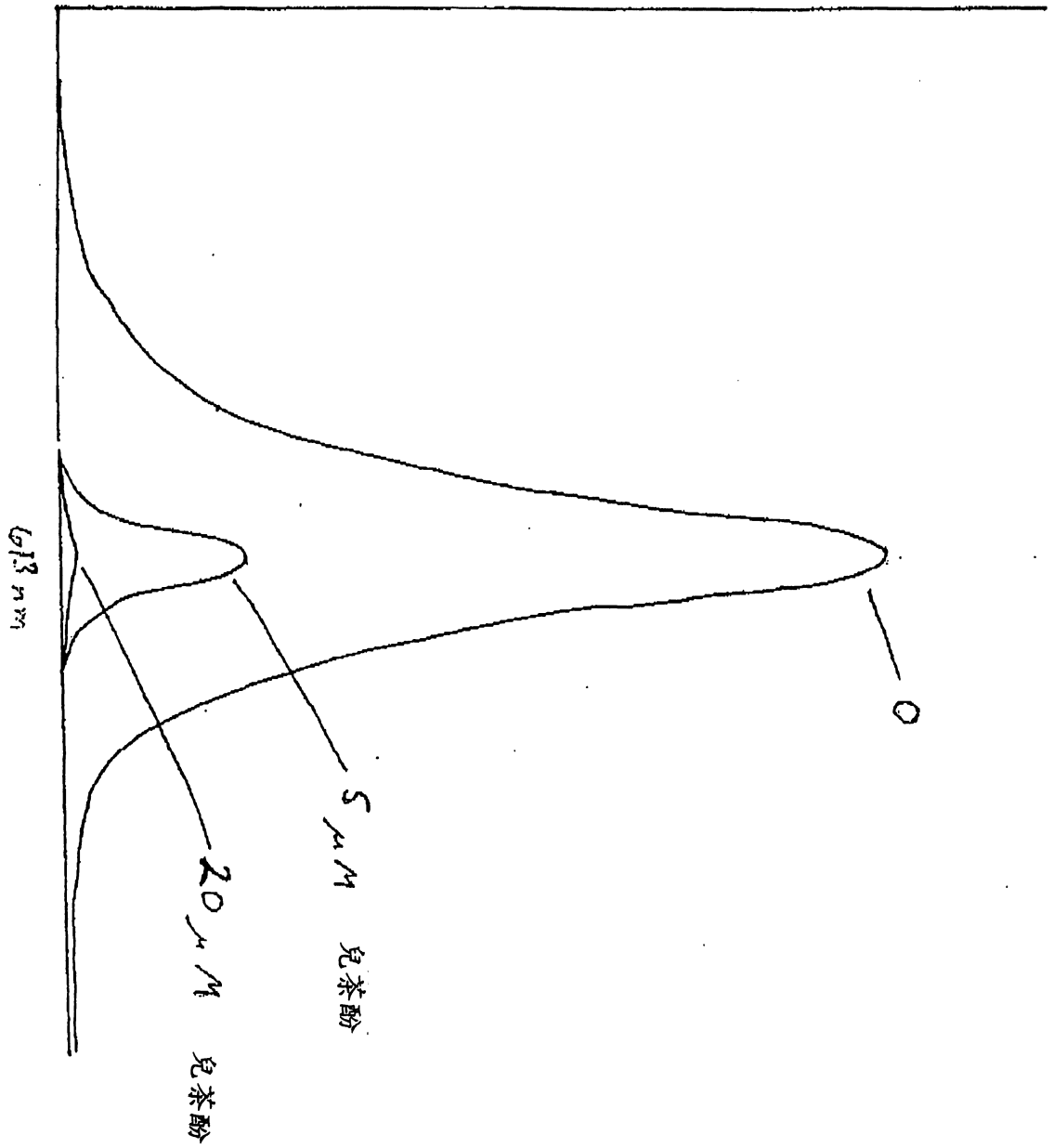


圖 4
時間(微秒)

圖式

圖 5



圖式

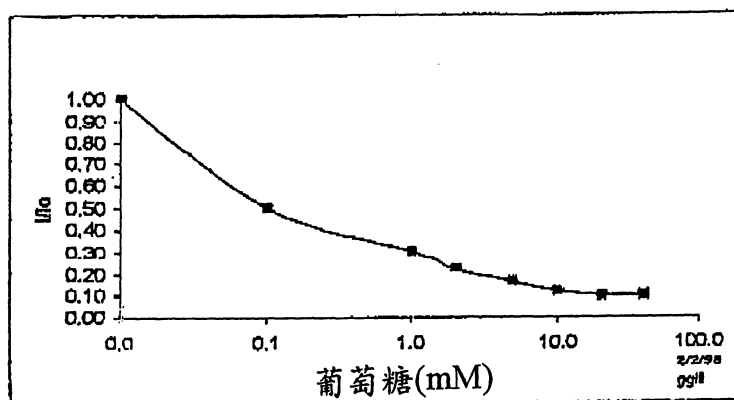


圖 6

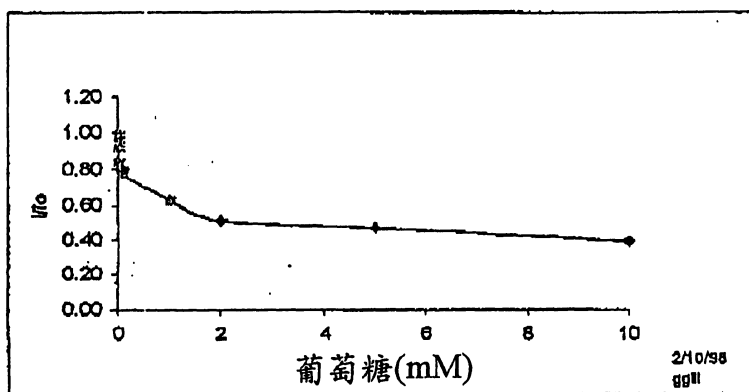


圖 7

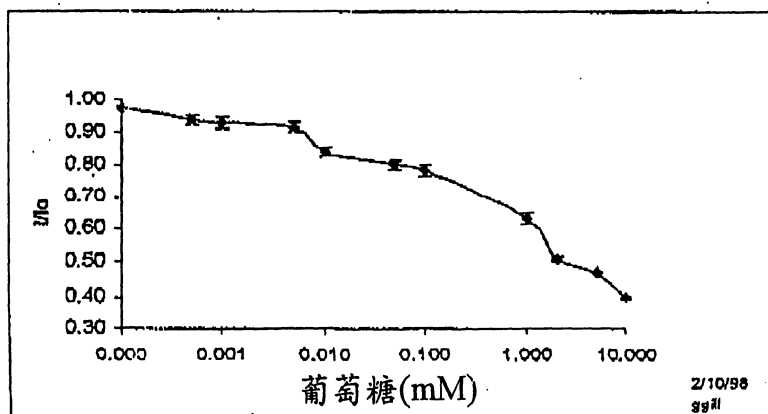
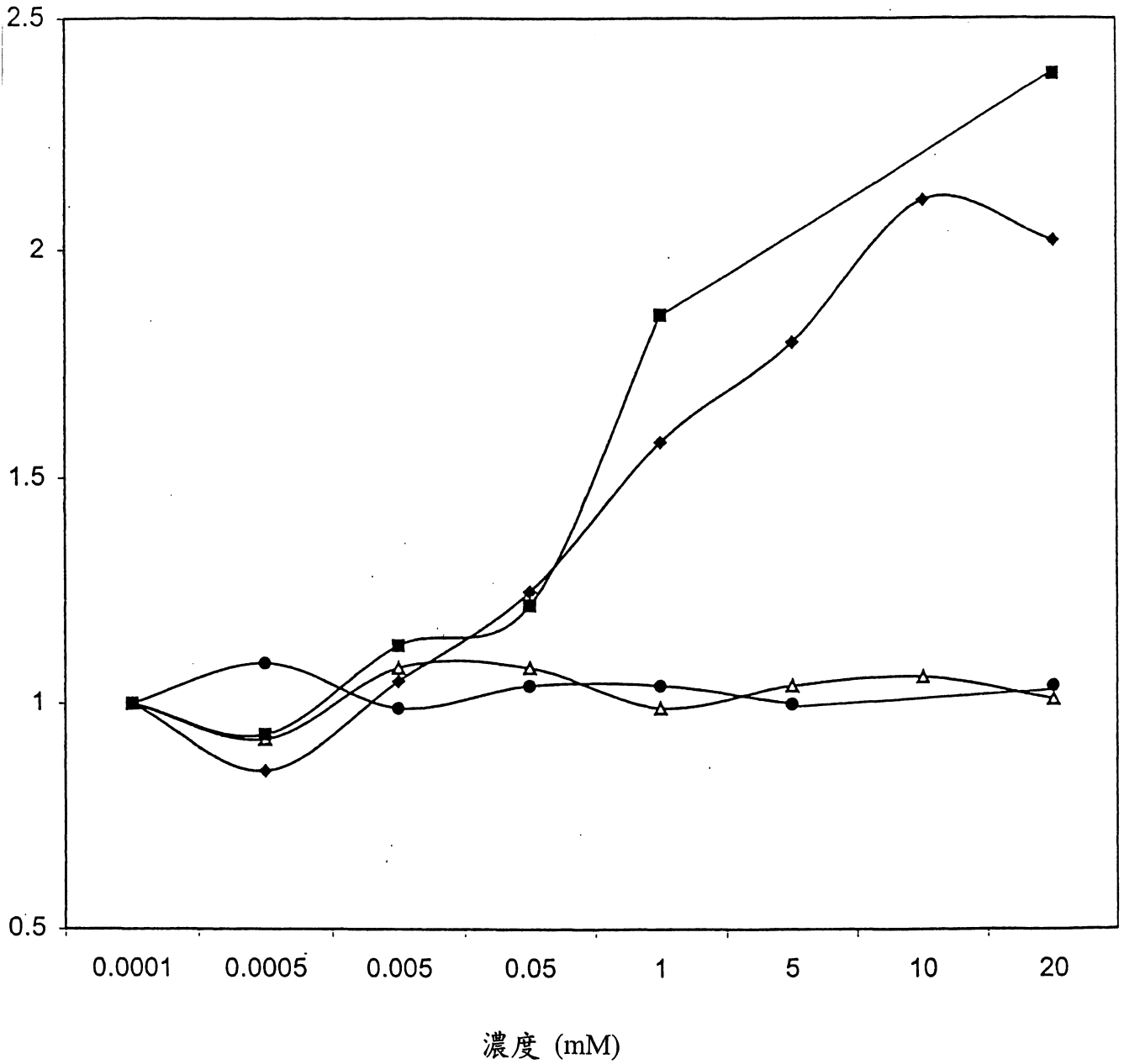


圖 8

圖式



—△— 葡萄糖+DBM —●— 果糖+DBM —◆— 葡萄糖+硼酸化-DBM —■— 果糖+硼酸化-DBM

圖9

圖式

銻β-萘甲醯基三氟丙酮-酞酸酯(Eu-BNTAB)

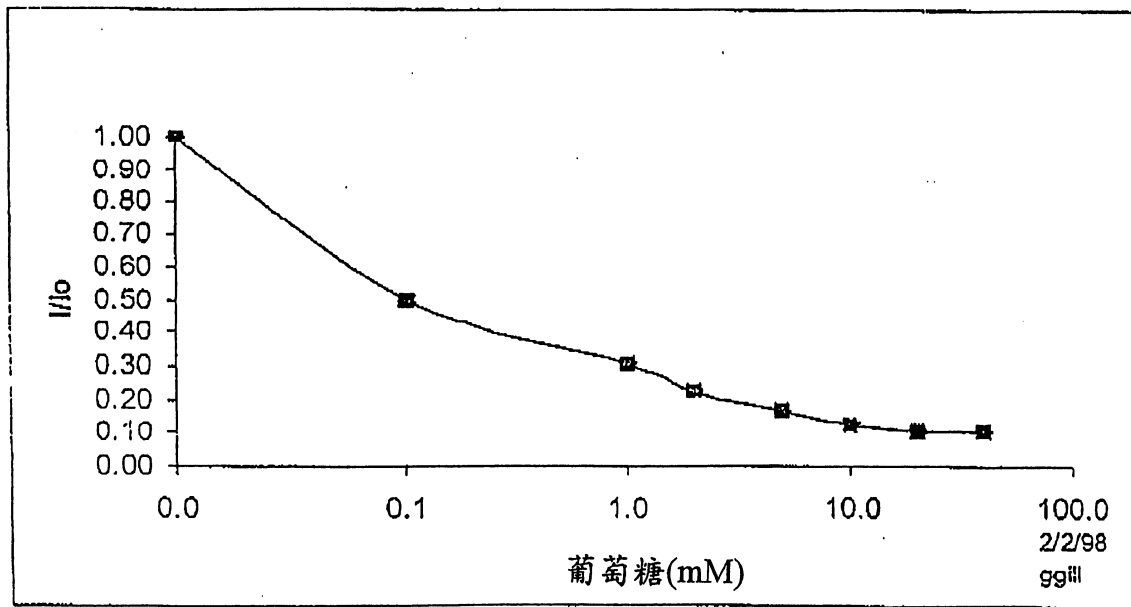
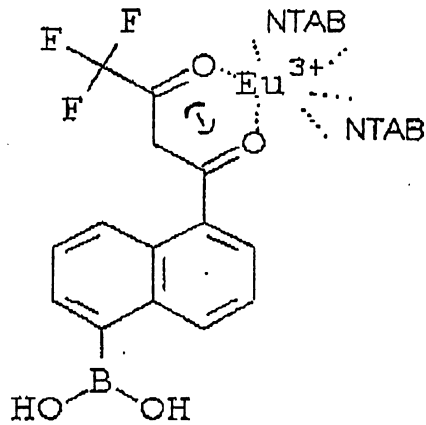


圖 10

圖式

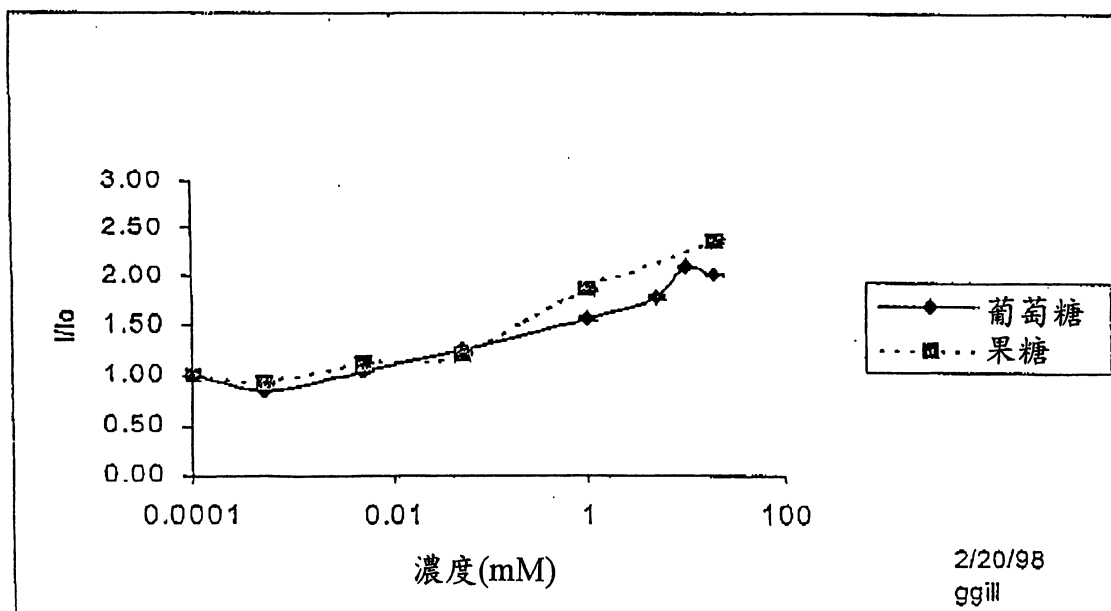
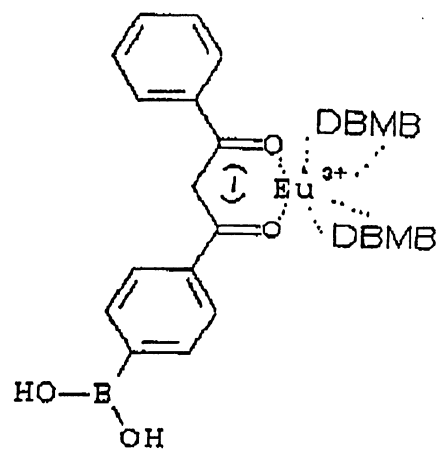
鎔二苯甲醯基甲烷硼酸酯(Eu-DBMB)

圖 11

圖式

鎔肆(2-噻吩甲醯基-4-苯甲醯基甲烷硼酸酯)

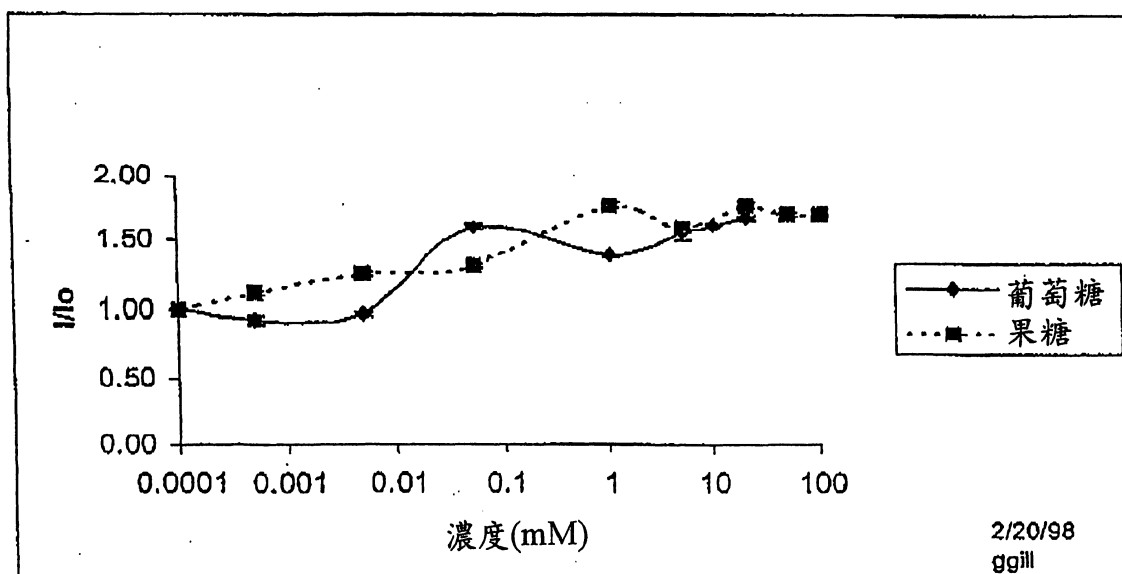
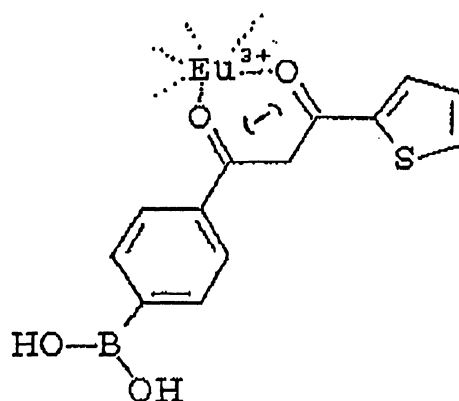
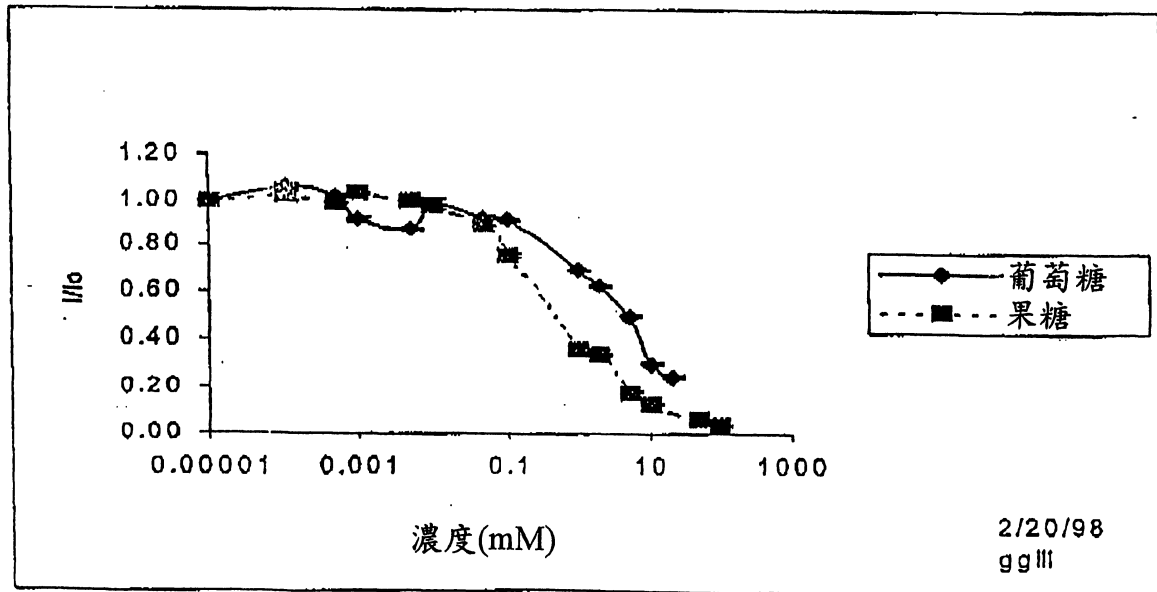
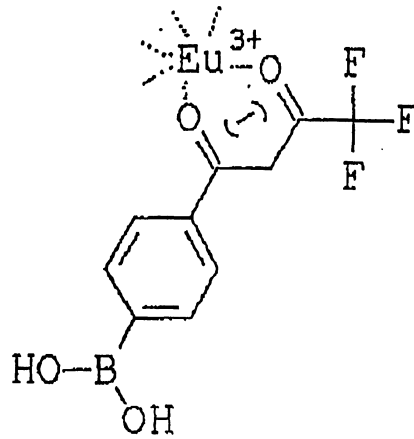


圖 12

圖式

銻叁(苯甲醯基三氟丙酮酸酯) (Eu-BTAB)



Eu (4-苯甲醯基-三氟甲基丙酮酸)₄ PyCl-葡萄糖濃度為 0, .0001, .0005, .001, .005, .01, .05, .1, 1, 2, 5, 10 和 20 mM。
果糖濃度為 0, .0001, .0005, .001, .005, .01, .05, .1, 1, 2, 5, 10, 50 和 100 mM。

圖 13