

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510023820.3

[51] Int. Cl.

C07C 49/80 (2006.01)  
C07F 5/00 (2006.01)  
C07D 327/06 (2006.01)  
C07D 265/30 (2006.01)  
C07D 417/04 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 100429197C

[51] Int. Cl. (续)

C09K 11/06 (2006.01)

[22] 申请日 2005.2.4

[21] 申请号 200510023820.3

[73] 专利权人 博阳生物科技(上海)有限公司  
地址 200023 上海市蔡伦路 88 号五楼东

[72] 发明人 何元

[56] 参考文献

JP 2003254958A 2003.9.10

US5780646A 1998.7.14

A new europium b - diketone chelate for ultra-sensitive time - resolved fluorescence immunoassays. Wu, Feng. Bo, Zhang, Chao. Analytical Biochemistry, Vol. 311 No. 1. 2002

Structure and luminescence properties of the tetradentate b - diketone - europium ( III ) complexes. Yuan, Jingli, Sueda, Shinji. Chemistry Letters, Vol. 32 No. 6. 2003

审查员 张靖

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司  
代理人 朱黎明

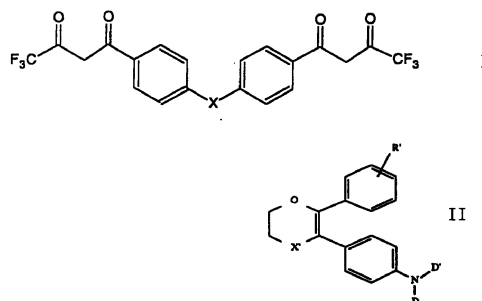
权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 2 页

[54] 发明名称

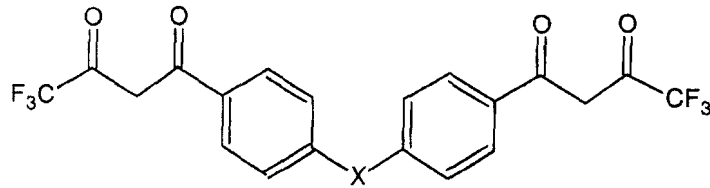
双丁二酮化合物、铕配合物、含该配合物的组合物及其用途

[57] 摘要

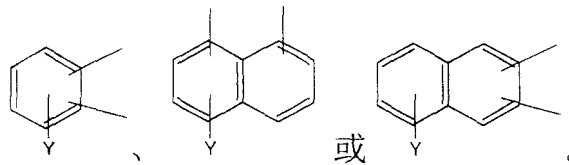
公开了一种化学发光组合物，它包括：1) 式 I 的铕配合物，其中：X 是具有 1 - 5 个碳原子直链烷基或者芳基和 2) 式 II 的含烯键化合物，其中，X' 是 S 或 NR，R 是具有 1 - 10 个碳原子的烷基或者 6 - 18 个碳原子的芳基；R' 是氢原子或者具有 1 - 10 个碳原子的烷基；D 和 D' 各自为氢原子或者具有 1 - 20 个碳原子的烷基。还公开了所述化学发光组合物在免疫分析中的用途。



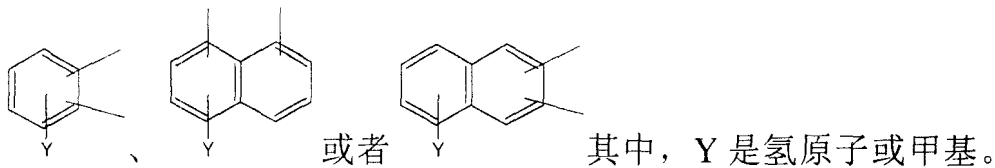
1. 一种具有如下通式的双丁二酮化合物：



其中：X 是具有 1-5 个碳原子直链亚烷基；或者  
具有下式的亚芳基，其中 Y 是氢原子或者 1-5 个碳原子的直链或支链烷基取代基：



2. 如权利要求 1 所述的双丁二酮化合物，其特征在于所述 X 基团选自具有 1-3 个碳原子的直链亚烷基、



3. 如权利要求 1 或 2 所述的双丁二酮化合物，其特征在于 x 选自亚甲基或邻亚苯基。

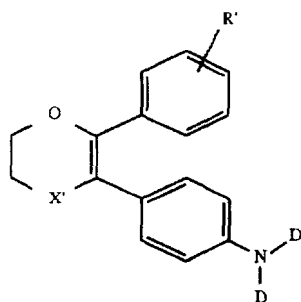
4. 如权利要求 1 所述的双丁二酮化合物，其特征在于它选自：

- 1) 1,1-二(对(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)甲烷；
- 2) 4,4'-二(1'',1'',1''-三氟-2'',4''-丁二酮-4''-基)邻联三苯；
- 3) 3-甲基-1,2-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)苯；
- 4) 1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘。

5. 一种化学发光组合物，它包括：

a) 铈配合物，该铈配合物带有权利要求 1-4 中任一项所述的双丁二酮化合物作为配位体；

2) 具有下列通式的含烯键化合物：



其中，X'是硫原子或NR，R是具有1-10个碳原子的烷基或者6-18个碳原子的芳基；

R'是氢原子或者具有1-10个碳原子的烷基；

D和D'各自为氢原子或者具有1-20个碳原子的烷基。

6. 如权利要求5所述的组合物，其特征在于X'是硫原子。

7. 如权利要求5或6所述的组合物，其特征在于R'是1-4个碳原子的烷基。

8. 如权利要求5或6所述的组合物，其特征在于D和D'各自选自氢原子或者具有4-14个碳原子的烷基。

9. 如权利要求7所述的组合物，其特征在于D和D'各自选自氢原子、丁基或者十四烷基。

10. 一种铈配合物，它含有权利要求1-4中任一项所述的化合物作为配位体。

11. 如权利要求10所述的铈配合物在免疫分析中的用途。

## 双丁二酮化合物、镧配合物、含该配合物 的组合物及其用途

### 技术领域

本发明涉及一种新型双丁二酮化合物、含该化合物作为配位体的镧配合物以及含该镧配合物的组合物。本发明还涉及所述组合物在化学发光免疫分析中的用途。

### 背景技术

迄今为止，生物体内微量生物活性物质的免疫测定方法已经历了由放射免疫分析（RIA）、荧光免疫分析（FIA）、酶联免疫分析（EIA），以及化学发光免疫分析等诸阶段。这一衍变过程主要是基于对检测方法的敏感性、准确性、以及操作简捷性的需求的不断提高而决定的。

正如放射免疫（RIA）分析技术当年从发明到应用的推陈出新的历程一样，化学发光免疫定量检测法成为现今取代放射免疫分析的有力分析手段和技术。在国际领域内，化学发光免疫定量检测法已成为临床检验的一个非常重要的新技术和检测手段，并将延展至临床检验的各个领域，这也是临床检验界的一致共识。

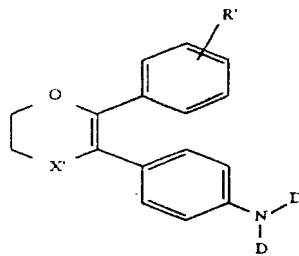
化学发光免疫分析法是一种利用化学发光物质发射的光波进行检测的方法。化学发光物质作为标记应用于核酸检测与免疫检测中。例如，可通过多种途径将特异结合对中的某一分子与发光物质结合形成发光复合物。该复合物可与样品中被检测物（特异结合对中的另一分子）反应，分配于固相与液相中，且分配比例与检测物的量相关。通过测定固相或液相中发光量，即可得出样品中检测物的相应浓度。

具体地说，在均相条件下，将包被有活性分子并且内部带有染料的感光微球(纳米级)以及包被有活性分子并且内部带有发光化合物的发光微球(纳米级)的混合物作为试剂和有可能含有目标分子的检测样品混合。此时包被有活性分子的纳米感光微球和包被有活性分子的纳米发光微球可迅速有效地捕捉目标分子，纳米感光微球、纳米发光微球和目标分子一起形成近距离的夹心复合物。经激发光照射，纳米感光微球中的染料被诱导激活并释放高能态的活性氧离子（单线态氧）。该高能态的活性氧离子被近距离的纳米发光微球俘获，从而传递能量以激活所述发

光微球中的发光化合物。发光微球中的发光化合物可于数微秒后在零背景无干扰的情况下释放出高能级红光。用光子计数器测定这些高能级光子并通过电脑将光子数量换算为目标分子浓度，光子数量的多少即精确地反映了目标分子的浓度。

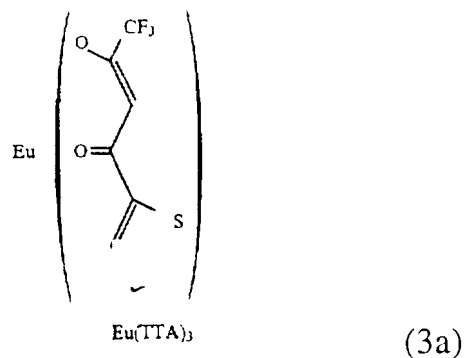
美国专利 5,709,994 公开了一种测定目标分子的方法，它包括对可能含有目标分子的组合物进行光辐照的步骤，所述组合物包括非颗粒基质或颗粒基质，所述基质包被有经光辐照会产生单线态氧的光敏剂和可被所述单线态氧活化的化学发光化合物。它还具体公开了所述化学发光化合物选自 9-亚烷基-N-甲基吡啶、烯醇醚和烯胺，所述光敏剂选自亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素。但是，这种光敏剂和化学发光化合物形成的特异结合对具有发光效率低的缺点。

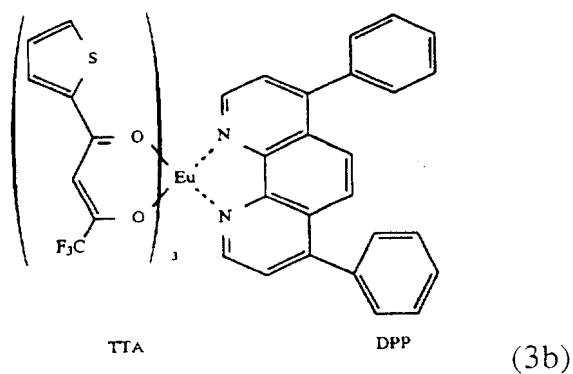
美国专利 5,780,646 公开了一种组合物，它包括(a)一种至少六配位的金属螯合物和(b)一种具有两个芳基的带双键的化合物。它还提到所述化合物(b)可具有如下通式：



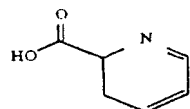
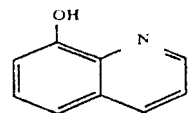
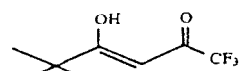
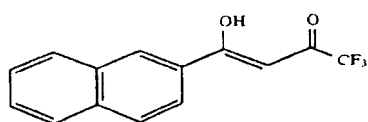
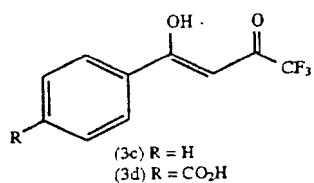
其中，X'是 S；D 和 D'各自选自  $\text{CH}_3$  和  $(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ ，R'为  $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$  或者  $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ 。

所述金属螯合物 (a) 可具有下列通式：

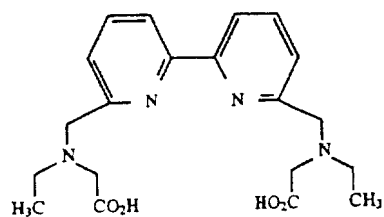
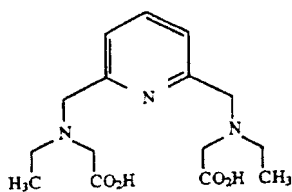


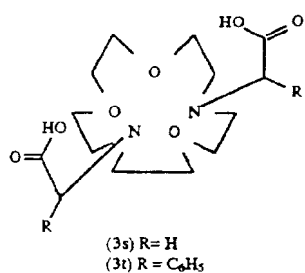
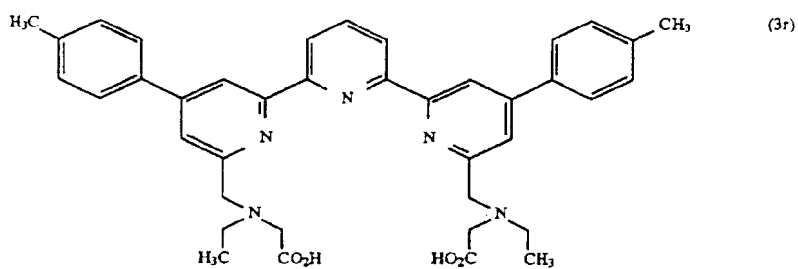
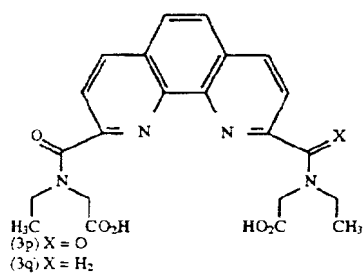
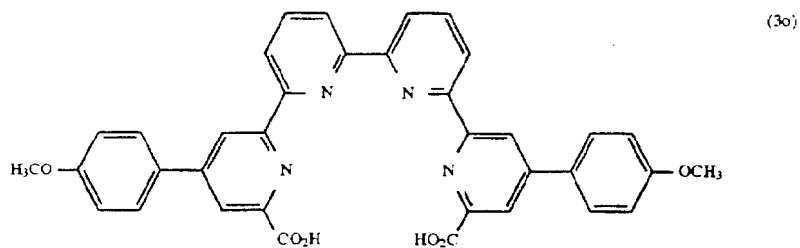
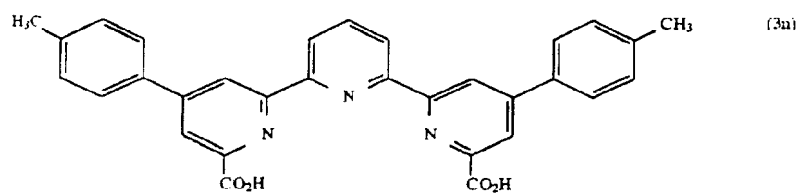


它还公开了在上式(3a)和(3b)中的一个 TTA 可被一个下述分子所代替:

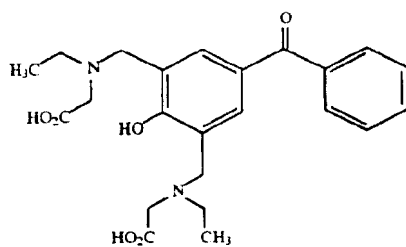


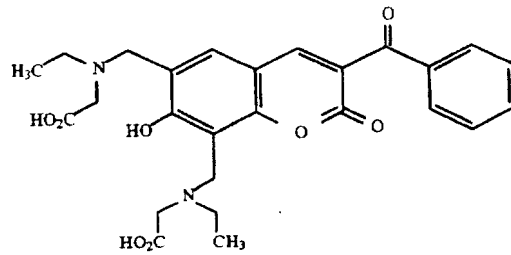
或者, 上式(3a)和(3b)中的两个 TTA 可各自被选自下列分子的基团所代替:





或者，三个 TTA 可各自被选自下列分子的基团所代替：





与现有技术相比，美国专利 5,780,646 通过加入铈配合物极大地提高了发光效率，从而提高了检测灵敏度。但是，这种方法还存在如下缺点：

由于现有的铈配合物螯合度不够，金属铈离子会螯合在纳米微球的表面，造成纳米微球表面包被容量下降。并且降低了发光效率。在将这种含所述金属螯合物(a)和所述具有两个芳基的带双键的化合物(b)的组合物置于纳米级发光微球中以后，发现发光微球的包被容量下降最高达 40%；发光效率下降了 30%-40%。

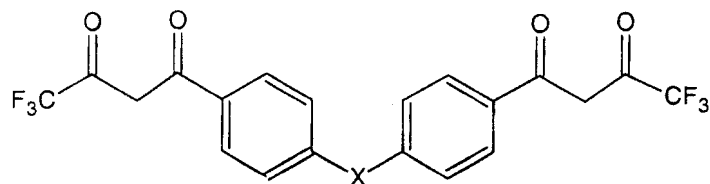
因此，需要开发一种新的、具有很强的螯合力的金属螯合物，它可以避免金属铈离子与纳米微球表面基团的反应，从而避免了纳米微球表面包被容量以及发光效率的下降。

### 发明的内容

鉴于现有技术的上述缺陷，本发明的一个目的是提供一种新型的发光组合物，它不会影响发光颗粒的包被容量并且显著提高了发光球的发光效率，尤其提高了检测信号值。

本发明的另一个目的是提供一种用于免疫分析的双丁二酮化合物。

因此，本发明提供一种具有如下通式的双丁二酮化合物：

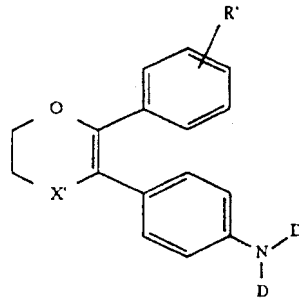


其中：X 是具有 1-5 个碳原子，较好 1-3 个碳原子的直链亚烷基或者具有下式的亚芳基，其中 Y 是 1-5 个碳原子的直链或支链烷基取代基：



本发明还提供一种化学发光组合物，它包括：

- 1) 带有本发明双丁二酮化合物作为配位体的铈配合物；
- 2) 具有下列通式的含烯键化合物：



其中，X'是S或NR，R是具有1-10个碳原子的烷基或者6-18个碳原子的芳基：

R'是氢原子或者具有1-10个碳原子的烷基；

D和D'各自为氢原子或者具有1-20个碳原子的烷基。

#### 附图说明

图1是光激化学发光免疫分析系统(LICA)检测原理图，其中

图1a是包被第一抗体并含有光敏试剂的光敏微球的示意图；

图1b是加入检测试样后被检测抗原与第一抗体结合的示意图；

图1c是加入包被有第二抗体并含有发光组合物的微球的示意图；

图1d是光致发光的示意图。

#### 具体实施方式

在本发明中，除非另有说明，否则术语“烷基”是指具有1-10个碳原子、较好1-6个碳原子，更好1-4个碳原子的直链或支链烷基，它包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、正戊基、异戊基、正己基、壬基、癸基等。

在本发明中，术语“芳基”是指具有6-18个环碳原子的芳香基团，它可以是未取代的，或者被具有1-10个碳原子的烷基所取代。

图1是本发明光激化学发光免疫分析系统(LICA)检测原理图。如图1a所示，纳米级的微球10中带有光敏剂，该微球表面包被有第一抗体1。如图1b所示，当将包被有第一抗体1并含有光敏剂的纳米微球加入含被检测抗原2的试样中以后，第一抗体1会与抗原2相结合。如图1c所示，发光微球20是含有发光组合物的纳米微球，它表面包被有第二抗体3。当将所述发光微球20加入上述试样中以后，该发光微球上包被的第二抗体3也会与已经与第一抗体1结合的抗原2相结合，形

成夹合体。如图 1d 所示，当用激光辐照光敏微球以后，光敏微球中的光敏剂会放出单线态氧，该单线态氧被发光微球中的发光组合物俘获后，会激发发光组合物中的发光化合物，发出特定波长的光线。通过检测该波长的光线就可测定抗原的量。

下面结合附图更详细地说明本发明。

### 一. 光敏微球

用作本发明光敏微球 10 的纳米级微球基质是本领域已知的微球基质，例如，它可以是例如羧基改性的乳胶颗粒。这种颗粒的详细情况可参见美国专利 5,709,994 与 5,780,646（该文献在此全文引为参考）。

用于光敏微球中的光敏剂无特别的限制，它可以是本领域已知的光敏剂，其非限定性例子有例如美国专利 5,709,994 公开的亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素。

在光敏微球中光敏剂的载带量无特别的限制，它可以是本领域常用的量。适用于本发明的光敏微球以及第一抗体的包被方法可例如参见美国专利 5,709,994 与 5,780,646。

用于将光敏剂加入纳米微球的方法以及包被该光敏微球的方法可以是本领域常用的任何方法。这种方法可例如参见美国专利 5,709,994 与 5,780,646。

### 二. 发光微球

#### 1. 基质

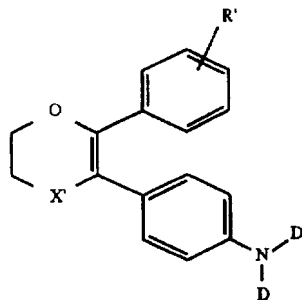
用作本发明发光微球 20 的纳米级微球基质是本领域已知的微球基质，它可以与所述光敏微球基质相同或不相同。例如，它可以是例如羧基改性的乳胶颗粒。这种颗粒的详细情况可参见美国专利 5,780,646 和 5,709,994（该文献在此全文引为参考）。

#### 2. 发光组合物

本发明发光微球中所含的发光组合物包括一种带双丁二酮化合物作为配位体的铈配合物和一种含不饱和烯键的化合物。这两种组分的含量无特别的限制，只要能使该组合物的发光效率满足最终免疫分析即可。在本发明的一个较好实例中，所述铈配合物占 10-400mg/g 微球，较好占 50-200mg/g 微球，更好占 100mg/g 微球；所述含不饱和烯键的化合物较好占 50-500mg/g 微球，更好占 100-300mg/g 微球，最好占 200mg/g 微球。

### a. 含烯键的化合物

适用于本发明组合物的含烯键的化合物具有如下通式：



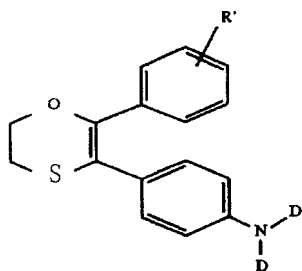
其中, X'是 S 或 NR, R 是具有 1-10 个碳原子的烷基或者 6-18 个碳原子的芳基;

R'是氢原子或者具有 1-10 个、较好 1-4 个碳原子的烷基;

D 和 D'各自为氢原子或者具有 1-20 个、较好 4-14 个碳原子的烷基, 例如丁基或者十四烷基。

在本发明中, X'可以是 NR, 其中 R 是具有 1-10 个碳原子的直链或支链烷基或者 6-18 个碳原子的取代或未取代的芳基。在本发明的一个较好实例中, 所述 R 基团是具有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基, 较好为 1-4 个碳原子的直链或支链烷基。在本发明的另一个较好的实例中, 所述 R 基团是具有 6-18 个碳原子的芳基, 它选自例如苯基、被具有 1-10 个碳原子的烷基取代的苯基; 所述烷基取代基的例子有甲基、乙基、丙基、丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、己基、庚基、辛基、异辛基等。

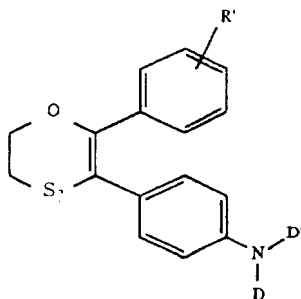
在本发明的一个较好实例中, 所述含烯键的化合物具有如下通式:



其中, D 和 D'各自选自氢原子或者具有 1-20 个碳原子的直链或支链烷基, 较好为具有 6-20 个碳原子直链或支链烷基、更好为具有 6-15 个、优选 4-14 个碳原子的直链或支链烷基, 优选为丁基、 $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$  或者  $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ ;

R'为氢原子或者具有 1-10 个碳原子的直链或支链烷基, 较好为具有 1-6 个碳原子直链或支链烷基、更好为具有 1-4 个碳原子的直链或支链烷基, 优选为  $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$  或者  $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ 。

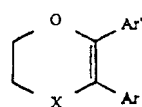
在本发明的另一个较好实例中, 所述含烯键的化合物具有如下通式:



其中，D 和 D'各自选自 $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ 或者 $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ ；

R'为氢原子、 $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ 或者 $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ 。

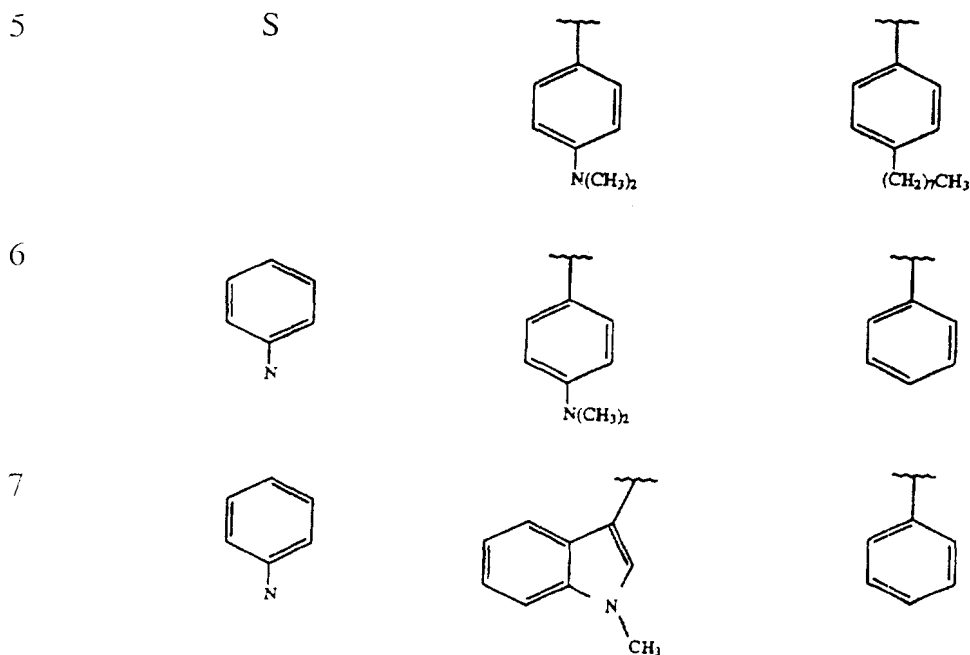
在本发明再一个较好的实例中，所述含烯键的化合物是如下化合物：



其中各取代基的含义见下表 A：

表 A

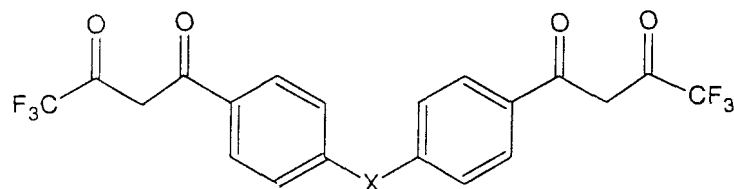
化合物	X	Ar	Ar'
1	O		
2	S		
3	S		
4	S		



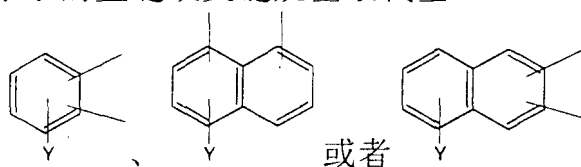
本发明上述含烯键的化合物的合成方法是本领域众所周知的。例如，它可采用美国专利 5,780,646 所述的方法合成。

#### b. 双丁二酮配位体

适用于本发明铜配合物的双丁二酮配位体具有如下通式：



其中，X 是具有 1-5 个碳原子直链烷基或者具有下式的芳基，其中 Y 是氢原子或者是具有 1-10 个碳原子的直链或支链烷基取代基：



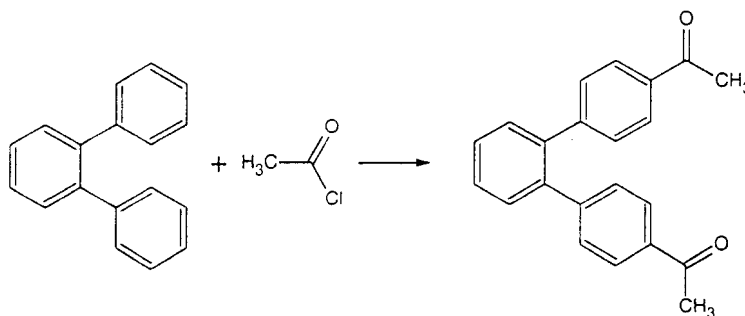
在本发明的一个较好实例中，所述 X 基团选自亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、邻亚苯基、3-甲基-1,2-亚苯基、4-甲基-1,2-亚苯基、3-乙基-1,2-亚苯基、4-乙基-1,2-亚苯基、2,3-亚萘基、1,8-亚萘基、4-甲基-1,8-亚萘基、3-戊基-1,2-亚苯基、4-己基-1,2-亚苯基、5-庚基-2,3-亚萘基、5-(2'-甲基己基)-2,3-亚萘基、4-乙基-1,8-亚萘基、5-甲基-1,8-亚萘基、4-丙基-1,8-亚萘基、4-甲基-2,3-亚萘基、4-乙基-2,3-亚萘基、5-甲基-2,3-亚萘基、4-丙基-2,3-亚萘基。

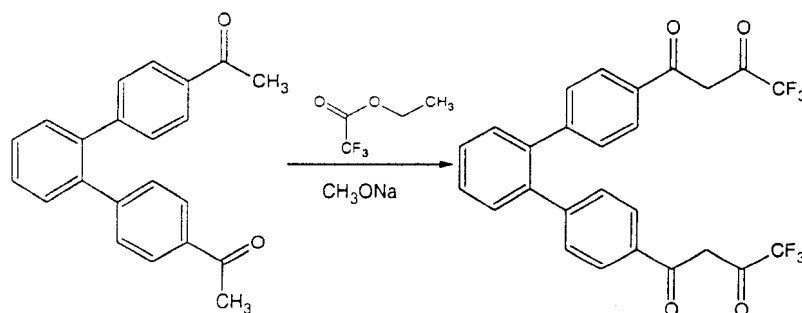
适用于本发明的双丁二酮化合物的非限定性例子有，例如下列化合物：

1) 1,1-二(对(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)甲烷；

- 2) 1,2-二(对(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)乙烷;
- 3) 1,3-二(对(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)丙烷;
- 4) 1,6-二(对(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)丁烷;
- 5) 4,4'-二(1'',1'',1''-三氟-2'',4''-丁二酮-4''-基)邻联三苯;
- 6) 3-甲基-1,2-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)苯;
- 7) 4-甲基-1,2-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)苯;
- 8) 3-乙基-1,2-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)苯;
- 9) 4-乙基-1,2-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)苯;
- 10) 2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 11) 5-庚基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 12) 5-(2''-甲基己基)-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 13) 4-甲基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 14) 4-乙基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 15) 5-甲基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 16) 4-丙基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘。
- 17) 1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 18) 5-庚基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 12) 5-(2''-甲基己基)-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 13) 4-甲基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 14) 4-乙基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 15) 5-甲基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘;
- 16) 4-丙基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘。

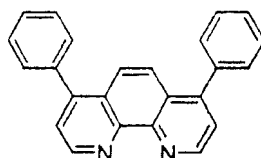
以 X 是苯基为例，在本发明的一个较好实例中，所述配位体是将二苯基取代的 X 化合物与乙酰卤反应，形成二(对甲基羰基苯基)取代的 X 化合物，随后再使得到的二(对甲基羰基苯基)取代的 X 化合物与三氟乙酸乙酯反应，生成本发明双丁二酮化合物。本发明双丁二酮化合物的合成路径如下：





### c. 带本发明双丁二酮配位体的铈配合物

本发明铈配合物可用通式  $\text{Eu}_2(\text{X}^{\prime\prime})_3(\text{DYE})_2$  表示，其中，DYE 是本领域常用的染料，其非限定性例子有例如 TOPO（三辛基氧磷）或者 DPP。较好是 DPP（4,7-二苯基-1,10-菲咯啉），它是一类常用的染料，它具有下列结构：



该配合物中配位体  $\text{X}^{\prime\prime}$  是本发明双丁二酮化合物，而染料 DYE 可采用本领域常用的方法制得，或从化学公司购得。

### 3. 发光球的制造方法

将所述铈配合物放入纳米发光球中的方法以及包被该发光球的方法可以是本领域常用的任何方法。在本发明的一个较好实例中，采用美国专利 5,780,646 公开的发光球制造方法，只是用本发明带双丁二酮配位体的铈配合物代替其金属螯合物。

在本发明的另一个较好实例中，使用本发明铈配合物形成的新型发光组合物不会影响发光颗粒的包被容量并且显著提高了发光球的发光效率，尤其提高了检测信号值，从而减少了测量误差。

下面，结合实施例进一步说明本发明：

#### 测试方法

##### 1. 包被容量

取一组不同浓度的葡聚糖标准溶液分别加入 1 mL 蒽酮，在 85 °C 孵育 30 分钟。冷却至室温后，测定不同溶液在 636nm 处的吸光光度值(日立 U-3000 型分光光度计，购自日本日立公司)制得标准曲线。

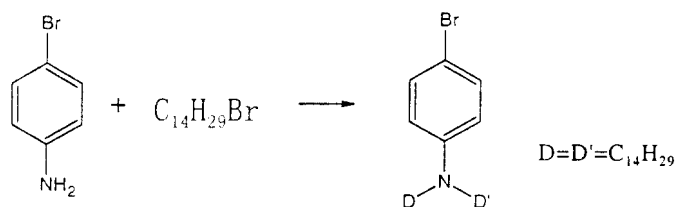
在样品纳米发光球上包被葡聚糖，随后加入 1ml 蒽酮，在 85℃，孵育 30 分钟。冷却至室温后，测定其在 636nm 处的吸光光度值，根据标准曲线计算微球表面的包被容量。

## 2. 发光效率

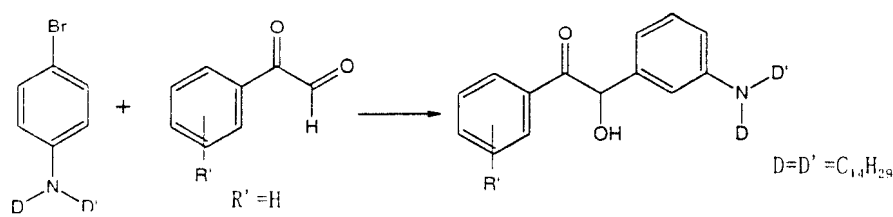
取等体积 500  $\mu$ l 的包被有抗体的感光球(50 $\mu$ g)与发光球(6.25  $\mu$ g)，加入 50  $\mu$ l 抗原与 100  $\mu$ l 作为检测缓冲液的 50mM 磷酸盐缓冲液（购自 Sigma）混合。37 度温育 15 分钟后，利用 PMT 光子计数器（购自上海朋远泰生物技术有限公司）读取光子数。

### 合成例 1

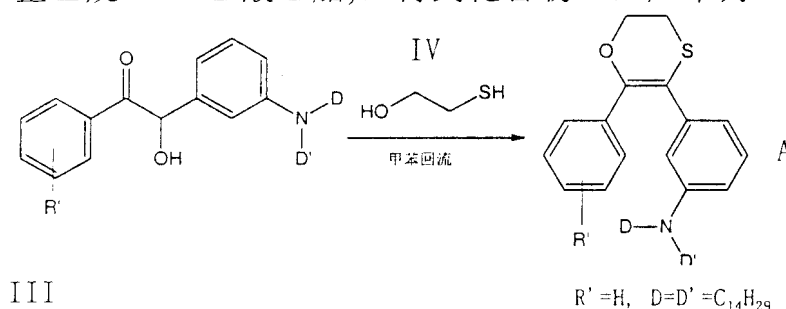
合成含不饱和烯键的化合物(A)：将 34.4g(0.2mol)溴代苯胺溶解在 125ml DMF 中，加入 0.6mol 溴代十四烷及 0.6mol 二异丙基乙胺，反应溶液加热到 100℃，然后反应 12 小时。反应的溶液加入 300ml 二氯甲烷，水洗三次除去 DMF。去除二氯甲烷，产物用乙醇重结晶。得到 N,N-二取代的对溴苯胺（式 I 化合物），反应的产率为 70%



向一个装有滴液漏斗、温度计和回流冷凝管的 100ml 圆底三颈烧瓶中加入 100ml 干燥的 THF，随后加入 3g 金属镁条，在回流条件下加入少量上面得到的 N,N-二取代的对溴苯胺产物（式 I 化合物）以启动反应，并加入少量的碘以帮助反应启动。将 0.11mol 上述 N,N-二取代的对溴苯胺产物（式 I 化合物）溶解于 50ml 干燥的 THF 中，并置于滴加漏斗中，缓缓地滴加此溶液并保持回流。加液完毕后让反应回流 1 小时。用冰浴冷却反应体系，在 0℃ 时缓缓地滴加 0.1mol 下式 (II) 化合物(购自 Aldrich/Sigma)的 50ml THF 溶液。让反应在 0℃ 进行 30 分钟，然后放置于室温 2 小时。缓缓地加入 0.1N HCl 溶液以水解生成的镁盐。加入 200ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，然后用水洗涤有机层 2-3 次。有机层用无水硫酸钠干燥。用硅胶柱分离所需产品。用 20% 乙酸乙酯 80% 正乙烷溶液分离产品，产品的 R<sub>f</sub> 值在 0.5 左右。(20% 乙酸乙酯/80% 正乙烷/TLC) 纯化后的产品（式 III 化合物）产率为 35%。



在一个带有冷凝管的 500ml 圆底烧瓶中将 0.1mol 上述式 III 化合物溶解在 100ml 甲苯中，加入少量  $ZnCl_2$  及 0.11mol 式 IV 化合物。回流并去除生成的水。反应 4 小时反应基本完成。用旋转蒸发器去除多余的甲苯。然后用硅胶柱分离纯化最后的产品(用 95 正乙烷，5% 乙酸乙酯)，得到化合物 A，产率为 60%。

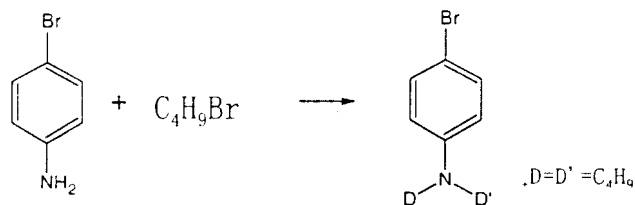


$^1H$  NMR: 7.0ppm-7.26ppm(多重峰, 7H), 6.42ppm-6.44ppm(多重峰, 2H), 4.48ppm-4.50ppm(多重峰, 2H), 3.16ppm-3.32ppm(多重峰, 4H), 1.52ppm-1.57ppm(多重峰, 4H), 1.3ppm(多重峰, 44H), 0.86ppm(3重峰, 6H)。

## 合成例 2

### 合成含不饱和烯键的化合物 (B)

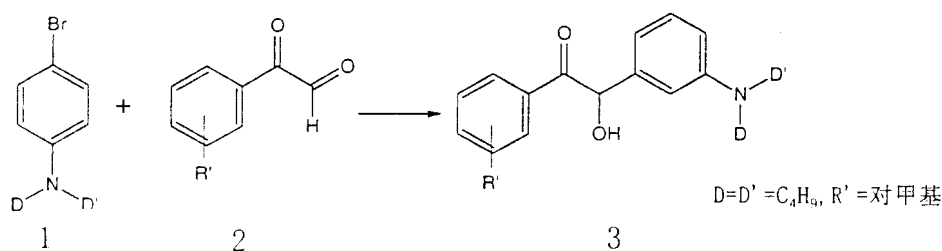
将 34.4g(0.2mol) 溴代苯胺溶解在 125ml DMF 中，加入 0.6mol 溴代丁烷及 0.6mol 二异丙基乙胺，反应溶液加热到  $100^\circ C$ ，然后反应 12 小时。反应的溶液加入 300ml 二氯甲烷，水洗三次除去 DMF。去除二氯甲烷，产物用乙醇重结晶。得到 N,N-二取代的对溴苯胺 (式 1 化合物)，反应的产率为 70%



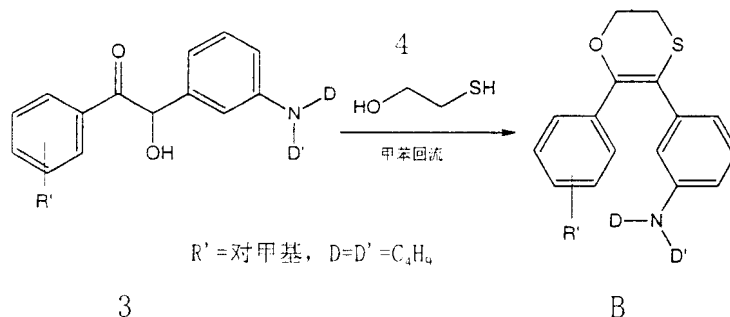
1

向一个装有滴液漏斗、温度计和回流冷凝管的 500ml 圆底三颈烧瓶中加入 100ml 干燥的 THF，随后加入 3g 金属镁条，在回流条件下加入少量上面得到的 N,N-二取代的对溴苯胺产物 (式 1 化合物) 以启动反应。将 0.11mol 上述 N,N-二取代的对溴苯胺产物 (式 1 化合物) 溶解于 50ml 干燥的 THF 中，并置于滴加漏斗中，

缓缓地滴加此溶液并保持回流。加液完毕后让反应回流 1 小时。用冰浴冷却反应体系，在 0℃ 时缓缓地滴加 0.1mol 下式 (2) 化合物(购自 Aldrich/Sigm)的 50ml THF 溶液。让反应在 0℃ 进行 30 分钟，然后放置于室温 2 小时。缓缓地加入 0.1N HCl 溶液以水解生成的镁盐。加入 200ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，然后用水洗涤有机层 2-3 次。有机层用无水硫酸钠干燥。用硅胶柱分离所需产品。用 20% 乙酸乙脂 80% 正乙烷溶液分离产品，产品的 R<sub>f</sub> 值在 0.5 左右。(20% 乙酸乙脂/80% 正乙烷/TLC) 纯化后的产品 (式 3 化合物) 产率为 35%。



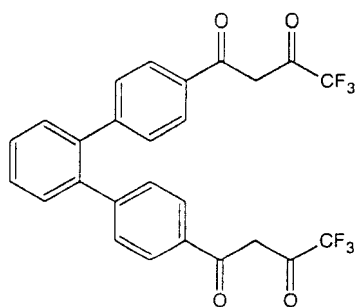
在一个带有冷凝管的 500ml 圆底烧瓶中将 0.1mol 上述式 3 化合物溶解在 100ml 甲苯中，加入少量 ZnCl<sub>2</sub> 及 0.11mol 式 4 化合物。回流并去除生成的水。反应 4 小时反应基本完成。用旋转蒸发仪去除多余的甲苯。然后用硅胶柱分离纯化最后的产品(用 95 正乙烷，5% 乙酸乙脂)，得到化合物 B，产率为 60%。



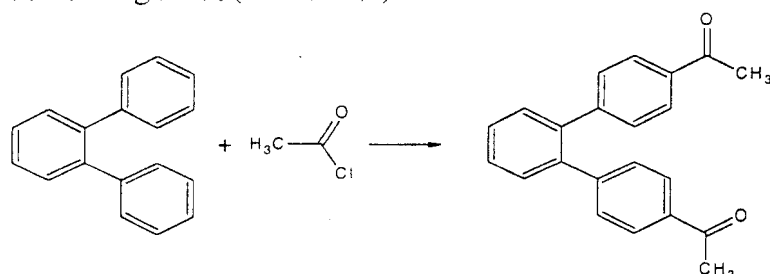
<sup>1</sup>H NMR 7.0ppm-7.26ppm(多重峰, 6H), 6.42ppm-6.44ppm(多重峰, 2H), 4.48ppm-4.50ppm(多重峰, 2H), 3.16ppm-3.32ppm(多重峰, 4H), 2.2ppm(单重峰, 3H), 1.52ppm-1.57ppm(多重峰, 4H), 0.86ppm(3重峰, 6H), 1.3ppm(多重峰, 4H)。

### 合成例 3

#### 合成配位体化合物 1

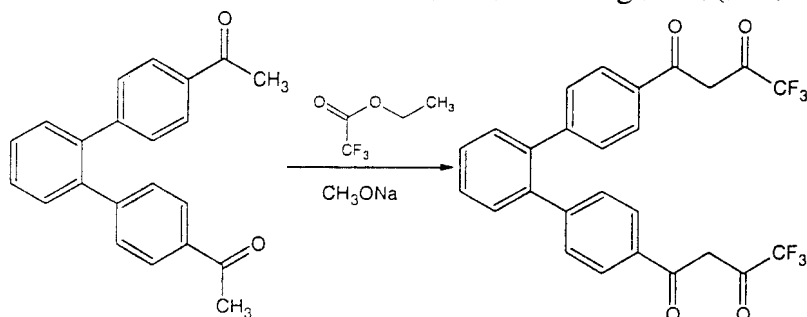


(1) 将 2.3g 邻苯基联苯溶解在 20ml 干燥的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液中，加入 2.94g  $\text{AlCl}_3$ ，然后冷却到  $0^\circ\text{C}$ 。在剧烈的搅拌下加入 2g 的  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{Cl}$  (购自 Aldrich/Sigma)。滴加完成后让反应在室温反应 1-2 小时。有机溶液用水洗三次，然后用无水硫酸钠干燥。去除溶剂后得到 2.6g 产物(81%产率)。



$^1\text{H NMR}$ : 7.1-7.9ppm(多重峰, 12H), 2.3ppm (单重峰, 6H)

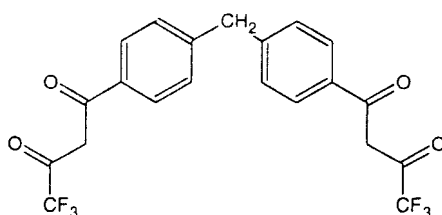
(2) 将 1.6g 上述产物溶解在 20ml 的无水乙醚中，加入 1g 的  $\text{CH}_3\text{ONa}$ (甲醇钠)及 2g  $\text{CF}_3\text{-C}(\text{O})\text{OEt}$ (三氟乙酸乙酯)。让反应在室温下搅拌 2-3 小时。然后用水洗三次。有机层用无水硫酸钠干燥，除去有机溶液后得到 1.6g 产物(产率 80%)



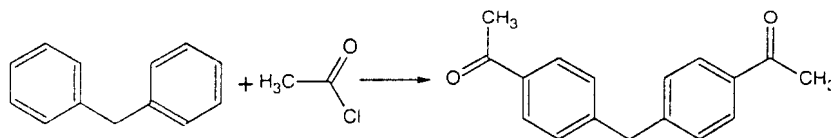
$^1\text{H NMR}$  7.1-7.9ppm(多重峰, 12H), 4.5ppm (单峰, 4H)

#### 合成例 4

##### 合成配位体化合物 2

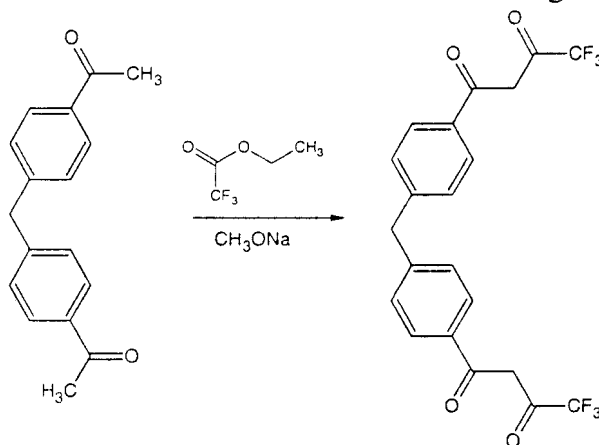


(1), 1.7g 二苯甲烷溶解在 20 干燥的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液中, 加入 2.94g  $\text{AlCl}_3$ , 然后冷却到  $0^\circ\text{C}$ 。在剧烈的搅拌下加入 2g 的  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ 。滴加完成后反应在室温反应 1-2 小时。有机溶液用水洗三次, 然后用无水硫酸钠干燥。去除溶剂后得到 1.4g 产物(70% 产率)



$^1\text{H NMR}$ : 7.6-7.9 (双重峰, 4H), 3.1 (单重峰, 2H), 2.3 (单重峰, 6H)

(2) 上述 1.3 g 上述产物溶解在 20ml 的无水乙醚中, 加入 1g 的  $\text{CH}_3\text{ONa}$ (甲醇钠)及 2g  $\text{CF}_3\text{-COOEt}$ (三氟乙酸乙酯)。让反应在室温下搅拌 2-3 小时。然后用水洗三次。有机层用无水硫酸钠干燥, 除去有机溶液后得到 1.2 g 产物(产率 80%)

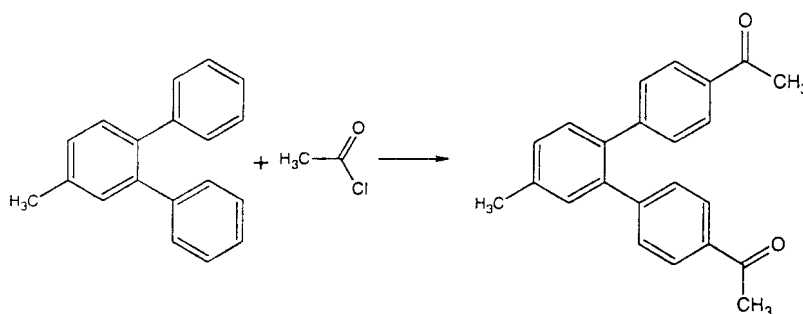


$^1\text{H NMR}$ : 7.6-7.9 (双重峰, 4H), 4.5 (单重峰, 4H), 3.1 (单重峰, 2H)。

### 合成例 5

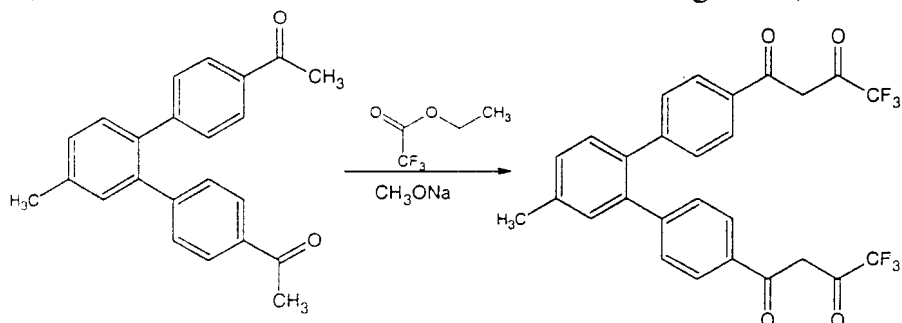
#### 合成配位体化合物 3

(1), 2.5g 甲基邻苯基联苯溶解在 20 干燥的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液中, 加入 2.94g  $\text{AlCl}_3$ , 然后冷却到  $0^\circ\text{C}$ 。在剧烈的搅拌下加入 2g 的  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ 。滴加完成后反应在室温反应 1-2 小时。有机溶液用水洗三次, 然后用无水硫酸钠干燥。去除溶剂后得到 1.4g 产物(70% 产率)



$^1\text{H NMR}$ : 7.6-7.9 (多重峰, 7H), 2.1 (单重峰, 3H), 2.3 (单重峰, 6H)

(2)上述 1.7g 上述产物溶解在 20ml 的无水乙醚中，加入 1g 的  $\text{CH}_3\text{ONa}$ (甲醇钠)及 2g  $\text{CF}_3\text{-COOEt}$ (三氟乙酸乙酯)。让反应在室温下搅拌 2-3 小时。然后用水洗三次。有机层用无水硫酸钠干燥，除去有机溶液后得到 1.6g 产物(产率 80%)

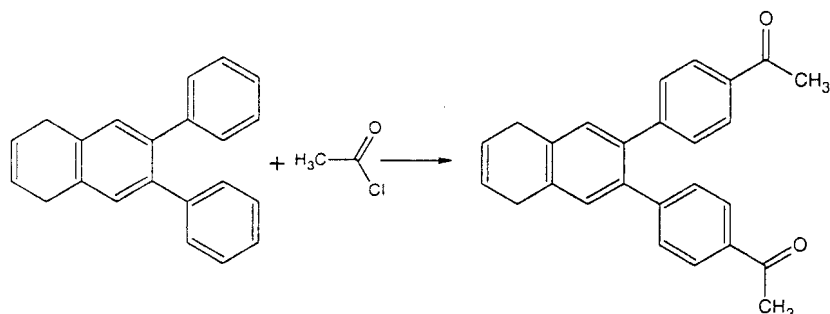


$^1\text{H NMR}$ : 7.6-7.9 (多重峰, 7H), 4.5(单重峰, 4H), 2.1(单重峰, 3H)。

### 合成例 6

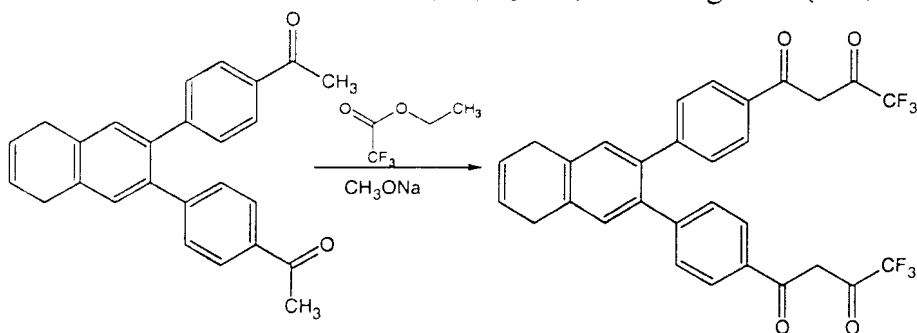
#### 合成配位体化合物 4

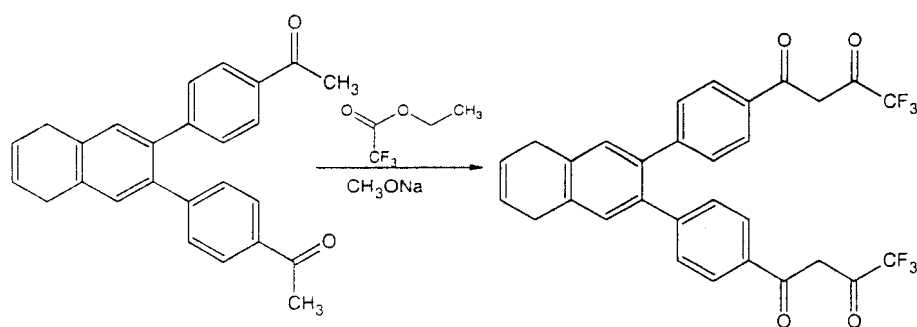
(1), 2.9g 邻二苯基萘溶解在 20 干燥的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液中，加入 2.94g  $\text{AlCl}_3$ ，然后冷却到  $0^\circ\text{C}$ 。在剧烈的搅拌下加入 2g 的  $\text{CH}_3\text{C(O)Cl}$ 。滴加完成后反应在室温反应 1-2 小时。有机溶液用水洗三次，然后用无水硫酸钠干燥。去除溶剂后得到 1.4g 产物(70%产率)



$^1\text{H NMR}$ : 7.3-7.9 (多重峰, 10H), 2.3(单重峰, 6H)

(2)上述 1.9g 上述产物溶解在 20ml 的无水乙醚中，加入 1g 的  $\text{CH}_3\text{ONa}$ (甲醇钠)及 2g  $\text{CF}_3\text{-COOEt}$ (三氟乙酸乙酯)。让反应在室温下搅拌 2-3 小时。然后用水洗三次。有机层用无水硫酸钠干燥，除去有机溶液后得到 1.8 g 产物(产率 80%)





$^1\text{H NMR}$ : 7.3-7.9 (多重峰, 10H), 4.5(单重峰, 4H)。

### 实施例 1

#### 合成带双二丁酮配位体的铕配合物

将 2.932 克  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  与 6.39 克上面制得的配位体化合物 1 混合, 加入 40 mL 无水乙醇溶解。搅拌加入 2 mL  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH 为 8 左右。室温搅拌 1 小时。将溶液加入到 800 mL 去离子水中, 过滤溶液, 收集沉淀, 为 10.3g。真空干燥后得到  $\text{Eu}(\text{配位体化合物 1})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 纯度约为 90%。

取 4.0 克 DPP 与 120 mL 乙醇加热溶解, 冷却后收集重结晶晶体。称取 3.014 克  $\text{Eu}(\text{配位体化合物 1})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  与 0.997 克 DPP, 加入 300 mL 甲苯,  $62^\circ\text{C}$  搅拌反应一小时。冷却到室温, 利用旋转蒸发除去甲苯。真空干燥, 收集铕配合物 1。

#### 制造发光球

用美国专利 5,780,646 的实施例所述的方法将 200mg 合成例 1 制得的含烯键化合物 A 和 100mg 上面制得的铕配合物 1 放入 200nm 的纳米颗粒(购自美国 Bangs Laboratories, Inc)中, 形成发光球 Eu-A。

#### 包被抗体

取 10mL 上述制得的发光球 (20 mg/mL, 50 mM 磷酸盐缓冲液, 内部染料为含烯键化合物 A 与本发明制得的铕配合物 1), 加入 40mg Amino-Dextran (4%, 缓冲体系 0.05Mes buffer), 20mg EDAC (4%, 缓冲体系 50 mM 磷酸盐缓冲液)。室温搅拌反应过夜。Sorvall SA-600 转头  $4^\circ\text{C}$  离心 1 小时, 转速为 15,000 rpm。离心后弃上清液, 以 8mL 50 mM 磷酸盐缓冲液重悬浮。重复离心清洗三次。

取上述制备得到的发光球 (25 mg/mL, 50 mM 磷酸盐缓冲液, 内部染料为含烯键化合物 A 与本发明制得的铕配合物 1, 外部包被有 Dextran) 0.4ml, 加入 8.16mg IgG1 按美国专利 5,780,646 实施例 1 所述制得的本发明发光球。

### 制造感光球

用美国专利 5,780,646 的实施例所述的方法将 200mg 叶绿素 A 放入 200nm 的纳米颗粒(购自美国 Bangs Laboratories, Inc )中, 并参照上述包被抗体的方法包被 IgG2, 形成本发明感光球。

### 包被容量测定

用上面所述的包被容量测试方法测得本发明试样的包被容量, 结果列于表 1。  
用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率, 结果列于表 2。

### 实施例 2

用与实施例 1 相同的方法制得实施例 2 的发光球, 但是使用合成例 2 合成的带不饱和烯键化合物 B 和合成例 4 制得的配位体化合物 2, 制得发光球 Eu-B。

使用与实施例 1 相同的感光球和包被容量试验方法测得试样的包被容量, 结果列于表 1

用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率, 结果列于表 2。

### 实施例 3

用与实施例 1 相同的方法制得实施例 3 的发光球, 但是使用合成例 1 合成的带不饱和烯键化合物 A 和合成例 5 制得的配位体化合物 3, 制得发光球 Eu-C。

使用与实施例 1 相同的感光球和包被容量试验方法测得试样的包被容量, 结果列于表 1

用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率, 结果列于表 2。

### 实施例 4

用与实施例 1 相同的方法制得实施例 4 的发光球, 但是使用合成例 2 合成的带不饱和烯键化合物 B 和合成例 6 制得的配位体化合物 4, 制得发光球 Eu-D。

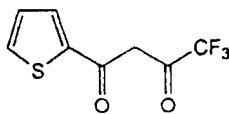
使用与实施例 1 相同的感光球和包被容量试验方法测得试样的包被容量, 结果列于表 1

用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率, 结果列于表 2。

### 比较例 1

用与实施例 1 相同的方法制得发光球, 但是使用 TTA(噻吩三氟丁二酮)代替

本发明的双丁二酮配位体制得铈配合物：



#### 实施例 5

用与实施例 1 相同的方法制得实施例 5 的发光球，但是使用根据美国专利 5,780,646 实施例 2 制得的上表 A 所列的带不饱和烯键化合物 2 和合成例 6 制得的配位体化合物 4，制得发光球 Eu-E。

使用与实施例 1 相同的感光球和包被容量试验方法测得试样的包被容量，结果列于表 1

用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率，结果列于表 2。

#### 实施例 6

用与实施例 1 相同的方法制得实施例 6 的发光球，但是使用根据美国专利 5,780,646 实施例 3 制得的上表 A 所列的带不饱和烯键化合物 3 和合成例 5 制得的配位体化合物 3，制得发光球 Eu-F。

使用与实施例 1 相同的感光球和包被容量试验方法测得试样的包被容量，结果列于表 1

用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率，结果列于表 2。

#### 实施例 7

用与实施例 1 相同的方法制得实施例 7 的发光球，但是使用根据美国专利 5,780,646 实施例 4 制得的上表 A 所列的带不饱和烯键化合物 5 和合成例 4 制得的配位体化合物 2，制得发光球 Eu-G。

使用与实施例 1 相同的感光球和包被容量试验方法测得试样的包被容量，结果列于表 1

用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率，结果列于表 2。

#### 实施例 8

用与实施例 1 相同的方法制得实施例 8 的发光球，但是使用根据美国专利 5,780,646 实施例 5 制得的上表 A 所列的带不饱和烯键化合物 6 和合成例 3 制得的配位体化合物 1，制得发光球 Eu-H。

使用与实施例 1 相同的感光球和包被容量试验方法测得试样的包被容量，结果列于表 1

用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率，结果列于表 2。

### 实施例 9

用与实施例 1 相同的方法制得实施例 9 的发光球，但是使用根据美国专利 5,780,646 实施例 6 制得的上表 A 所列的带不饱和烯键化合物 7 和合成例 3 制得的配位体化合物 1，制得发光球 Eu-I。

使用与实施例 1 相同的感光球和包被容量试验方法测得试样的包被容量，结果列于表 1

用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率，结果列于表 2。

为进行比较，表 1 还给出了空白微球（200nm, 25 mg/mL, 50 mM 磷酸盐缓冲液，内部无染料，外部包被有 Dextran）的包被容量，结果列于表 1。

### 实施例 10

用与实施例 1 相同的方法制得实施例 10 的发光球，但是使用 TOPO 取代 DPP 制得发光球 Eu-J。

使用与实施例 1 相同的感光球和包被容量试验方法测得试样的包被容量，结果列于表 1

用上面发光效率试验方法测得试样的发光效率，结果列于表 2。

表 1

试样	氨基-多糖的包被量 (ug/mg 微粒)
比较例 1	41.3
实施例 1	62.1
实施例 2	60.7
实施例 3	62.3
实施例 4	60.4
实施例 5	60.2
实施例 6	61.5
实施例 7	60.1
实施例 8	59.9
实施例 9	61.6
实施例 10	60.5
空白球	61.2

表 2

试样	光子计数
比较例 1	1,000,000
实施例 1	1,550,000
实施例 2	1,400,000
实施例 3	1,460,000
实施例 4	1,370,000
实施例 5	1,320,000
实施例 6	1,580,000
实施例 7	1,340,000
实施例 8	1,290,000
实施例 9	1,430,000
实施例 10	1,275,000

由试验结果可见，用本发明发光组合物填入纳米微球以后，该微球的包被容量与空白球相当，而采用现有的铈配合物包被纳米微球以后，其包被容量明显下降。另一方面，由表 2 可见，如果将现有的发光球的发光效率定为 1，则本发明发光球的发光效率分别为 1.5 和 1.4，明显高于现有的发光球的发光效率。上述试验证明，本发明通过改变铈配合物的配位化合物，极大地改进了纳米微球的包被容量和发光效率，取得了意想不到的效果。

在不偏离本发明发明思想的情况下，本领域的普通技术人员可容易地对本发明进行各种变化和改进。本发明包括在所附权利要求范围内的各种变化和改进。

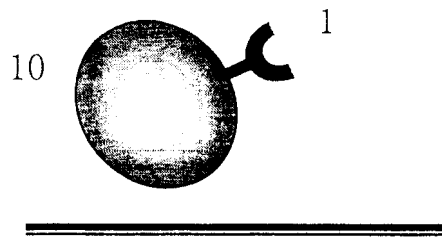


图 1a

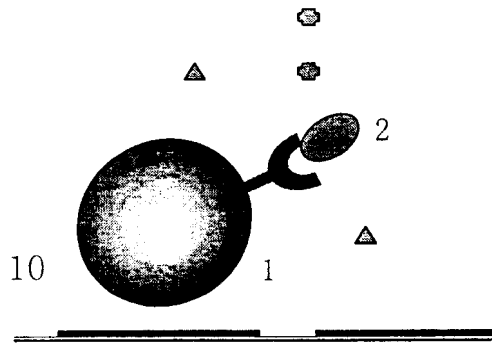


图 1b

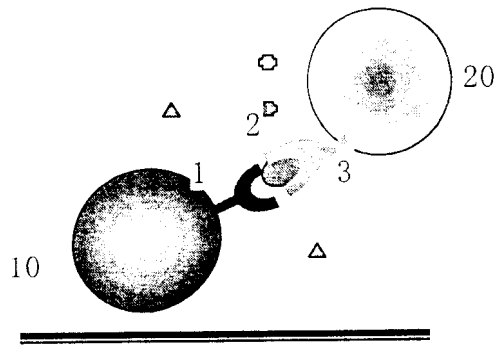


图 1c

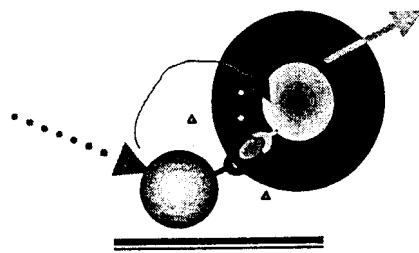


图 1d

专利名称(译)	双丁二酮化合物、铈配合物、含该配合物的组合物及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN100429197C</a>	公开(公告)日	2008-10-29
申请号	CN200510023820.3	申请日	2005-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	上海朋远泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海朋远泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
[标]发明人	何元		
发明人	何元		
IPC分类号	C07C49/80 C07F5/00 C07D327/06 C07D265/30 C07D417/04 G01N33/53 C09K11/06		
代理人(译)	朱黎明		
审查员(译)	张靖		
其他公开文献	CN1696093A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

公开了一种化学发光组合物，它包括：1)式I的铈配合物，其中：X是具有1-5个碳原子直链烷基或者芳基和2)式II的含烯键化合物，其中，X'是S或NR，R是具有1-10个碳原子的烷基或者6-18个碳原子的芳基；R'是氢原子或者具有1-10个碳原子的烷基；D和D'各自为氢原子或者具有1-20个碳原子的烷基。还公开了所述化学发光组合物在免疫分析中的用途。

