

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07D 209/82 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510006265.3

[45] 授权公告日 2008年8月20日

[11] 授权公告号 CN 100412060C

[22] 申请日 2005.1.27

[21] 申请号 200510006265.3

[73] 专利权人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市中山路457号

[72] 发明人 张玉奎 张琳 张丽华 张维冰

[56] 参考文献

CN - 1415605A 2003.5.7

US - 5101059A 1992.3.31

US - 5079260A 1992.1.7

synthesis and application of fmoc - hydrazine for the quantitative determination of saccharides by reversed - phase high - performance liquid chromatography in the low and subpicomole range. Ren. En Zhang, et al. analytical biochemistry, Vol. 195. 1991

痕量氨基糖和中性单糖的高效毛细管电泳及液相色谱分析. 林启山等. 色谱, 第13卷第1期. 1995

审查员 代庆伟

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 周长兴

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

[54] 发明名称

2 - (N - 咪唑基) - 乙氧基碳酰肼的制备方法

[57] 摘要

一种2 - (N - 咪唑基) - 乙氧基碳酰肼的制备方法, 以氢氧化钾为催化剂, 在二甲基亚砜溶剂中, 咪唑与2 - 溴乙醇反应得2 - (N - 咪唑基) - 乙醇; 2 - (N - 咪唑基) - 乙醇在二氯甲烷溶液中与光气作用, 搅拌反应24小时得产物2 - (N - 咪唑基) - 乙基氯甲酸酯。经重结晶纯化反应产物, 得2 - (N - 咪唑基) - 乙基氯甲酸酯纯品, 再与水合肼反应即得目标产物2 - (N - 咪唑基) - 乙氧基碳酰肼。目标产物经重结晶纯化即可用于衍生化反应实验。

1. 一种 2-(N-咪唑基)-乙氧基碳酰肼的制备方法，其主要步骤为：

a) 以氢氧化钾为催化剂，咪唑与 2-溴乙醇在二甲基亚砷溶剂中反应得 2-(N-咪唑基)-乙醇；其中咪唑、2-溴乙醇及氢氧化钾之间的质量比为 2-3:3-4:1；反应温度 80-100℃，总反应时间 4-6 小时；将混合物冷却至室温，蒸出溶剂，残余物水洗，晾干后用正己烷加热至沸腾萃取，冷却后析出白色固体；

b) 将步骤 a 产物与光气在二氯甲烷溶液中反应，其中步骤 a 产物与光气的质量比为 1-1.5:1，0℃以下，搅拌反应 4 小时；将反应液温度升至室温保持 10 小时，反应完毕，蒸出溶剂，得到白色固体样品；

c) 将步骤 b 产物与水合肼在室温常压条件下反应 25-30 分钟，其中步骤 b 产物与水合肼质量比为 1:10-12；蒸发除去反应液中未反应的肼和溶剂，得目标产物 2-(N-咪唑基)-乙氧基碳酰肼。

2. 按权利要求 1 的制备方法，其特征在于，步骤 a 的产物经正己烷重结晶纯化后再进行步骤 b。

3. 按权利要求 1 的制备方法，其特征在于，步骤 b 的产物经乙醚和二氯甲烷的混合溶剂重结晶纯化后再进行步骤 c，其中乙醚和二氯甲烷的混合溶剂按体积比为 3:1。

4. 按权利要求 1 的制备方法，其特征在于，步骤 c 的产物用乙醇重结晶纯化。

2-(N-咪唑基)-乙氧基碳酰肼的制备方法

技术领域

本发明涉及一种荧光试剂的制备方法，具体地说涉及一种 2-(N-咪唑基)-乙氧基碳酰肼的制备方法。

背景技术

由于咪唑基的特殊结构性质，在已有的报道中，研究主要集中在对其量子性质的讨论方面。如 π -电子的跃迁、溶剂性质对咪唑衍生物荧光性质的影响等。已被研究过荧光性质的咪唑衍生物结构见附表 1。另一方面，咪唑与金属离子络合、与丙烯酸等共聚也可以得到具有特殊光学和电学性质的物质。以咪唑的简单衍生物，如咪唑-N-乙酰氯等作为荧光衍生生化试剂的研究也有报道。根据已有报道，现有试剂具有以下缺陷：反应活性较低，衍生速度较慢，衍生产物不稳定，荧光量子效率较高，洗脱前后组分检测灵敏度小，须经 8 小时(90℃)的还原反应再直接应用色谱分析。

比如伯胺基荧光衍生生化试剂衍生产物为席夫碱(Schiff base)不稳定，须经 8 小时(90℃)的还原反应才可生成稳定的用于分析用的叔胺衍生物，且不能还原酮糖。

发明内容

本发明的目的在于提供一种可用作荧光衍生试剂的 2-(N-咪唑基)-乙氧基碳酰肼的制备方法。

为实现上述目的，本发明的技术方案以咪唑为母体采用适宜的反应条件，合成得到目标产物。由于在 2-(N-咪唑基)-乙氧基碳酰肼分子中存在 N 原子介入的大 π 键，同时乙氧基碳酰肼的协同效应，使其激发和发射波长显著红移，分子的摩尔吸光度增大，水溶性增强。也由于乙氧基碳酰肼的适宜反应性和稳定性，使其更适宜于作为荧光衍生生化试剂，用于非荧光样品的荧光检测，可较大地提高样品的检测灵敏度。

本发明具体的制备方法是：

a) 以氢氧化钾为催化剂，咪唑与 2-溴乙醇在二甲基亚砷溶剂中反应得 2-(N-咪唑基)-乙醇；其中咪唑、2-溴乙醇及氢氧化钾之间的质量比为 2-3:3-4:1；反应温度 80-100℃，总反应时间 4-6 小时；将混合物冷却至室温，蒸出溶剂，残余物水洗，晾干后用正己烷加热至沸腾萃取，冷却后析出白色固体；

b) 将步骤 a 产物与光气在二氯甲烷溶液中反应，其中步骤 a 产物与光气的质量比为 1-1.5:1，0℃以下，搅拌反应 4 小时；将反应液温度升至室温保持 10 小时，反应完毕，蒸出溶剂，得到白色固体样品；

c) 将步骤 b 产物与水合肼在室温常压条件下反应 25-30 分钟，其中步骤 b 产物与水合肼质量比为 1:10-12；蒸发除去反应液中未反应的肼和溶剂，得目标产物 2-(N-咪唑基)-乙氧基碳酰肼。

所述的制备方法，步骤 a 的产物经正己烷重结晶纯化后再进行步骤 b。

所述的制备方法，步骤 b 的产物经乙醚和二氯甲烷的混合溶剂重结晶纯化后再进行步骤 c，其中乙醚和二氯甲烷的混合溶剂按体积比为 3:1。

所述的制备方法，步骤 c 的产物用乙醇重结晶纯化。

本发明经上述步骤制备的目标产物经重结晶纯化即可用于衍生化反应实验。

本发明制备的荧光试剂荧光强度较大，试剂反应活性高，衍生化速度快，衍生产物稳定，荧光量子效率高。

本发明的制备条件要求不苛刻。由于激发和发射波长的显著红移，使检测过程中溶剂组成引起的背景干扰降低。洗脱前后组分检测灵敏度小，产物可以马上用于色谱分析，而且不用进一步还原

本发明制备和荧光试剂可以作为荧光、紫外衍生试剂用于色谱分析中，能极大的提高检测灵敏度和改善分离，具有良好的应用前景。

附图说明

图 1 是本发明 2-(N-咪唑基)-乙氧基碳酰肼对 5 种糖进行柱前衍生荧光检测色谱图。

图 2 是本发明 2-(N-咪唑基)-乙氧基碳酰肼对 5 种糖进行柱前衍生紫外检测色谱图。

上述图 1 和图 2 中的峰值序号分别代表：1-乳糖(lactose)、2-甘露糖(mannose)、3-葡萄糖(glucose)、4-鼠李糖(rhamnose)、5-山梨糖(sorbose)。

具体实施方式

在 500ml 的圆底烧瓶中加入咪唑 30g，二甲亚砜 150mL，开动电磁搅拌并加热，在 20 分钟内将 10g 氢氧化钾分批加入，溶液温度保持 100℃下加热回流搅拌 30 分钟，将 40g 的 2-溴乙醇在 1 小时内加入，温度继续保持 100℃下继续加热回流搅拌反应 2.5 小时，溶液逐渐转变为暗褐色。将烧瓶内混合物冷却至室温，反应完毕后，用旋转蒸发仪在油浴加热的条件下将溶剂蒸出，残余物用水洗三次，晾干后用正己烷加热至沸腾萃取，冷却后析出白色固体，抽滤后滤饼再用正己烷重结晶两次，得白色针状晶体。

将 15g 光气溶解在 100ml 二氯甲烷中，倒入 500ml 的三颈烧瓶中，在电磁搅拌和冰盐浴的条件下，将 22.5g 2-(N-咪唑基)-乙基氯甲酸酯溶解在 40ml 的二氯甲烷中保持 0℃以下电磁搅拌 4 小时，慢慢将反应液温度升至室温保持 10 小时，反应完毕用旋转蒸发仪将溶剂蒸出，得到白色固体样品。再用乙醚和二氯甲烷按(3:1)的混合溶剂重结晶，产品为白色针状晶体。

将约 1g 2-(N-咪唑基)-乙基氯甲酸酯溶于 30 mL 乙腈中，在快速搅拌条件下，将上述溶液缓慢滴加到 10g 水合肼中，待反应 30 分钟后，将反应液在低于 40℃条件下真空旋转蒸发除去未反应的肼和溶剂，得白色固体物，可通过乙醇重结晶，得白色针状晶体。

试剂操作条件及效果：

咪唑-9-乙氧基碳酸酯肼溶液：准确称取 32 mg 咪唑-9-乙氧基碳酸酯肼加 10 mL 容量瓶中，用无水乙腈稀释至刻度，浓度为 1.2×10^{-2} mol/L；中性糖溶液：准确称取一定量的 5 种中性糖(乳糖，甘露糖，葡萄糖，鼠李糖，山梨糖)各 10 mg 置入 10 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，总浓度为 10 g/L。

取 100 μ L 中性糖标准品混合液，加入等体积的咪唑-9-乙氧基碳酸酯肼溶液，然后加入 10 μ L 冰醋酸，65℃水浴加热反应 5 h 后，冷却至室温，取 10 μ L 稀释至 200 μ L，进样 5 μ L。按如下色谱分离条件进行实验，结果见图 1，图 2。

色谱分离条件：

流动相 A: 醋酸铵缓冲溶液 (50mmol/L, pH=5), 流动相 B: 乙腈;
梯度条件: 0min=70% A, 10min=70% A, 11min=0% A, 30min=0% A; 流
速: 1mL/min; 柱温: 室温; 衍生物的荧光激发和发射波长为
 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=293/360\text{nm}$; 紫外检测波长: 254nm。Hypersil ODS2 色谱柱
(150×4.6 mm, i.d, 大连依利特科学仪器有限公司)。

附表 1: 文献报道的“carbazole”衍生物结构:

咪唑衍生物	文献
(Carbazole)-(CH ₂) _n -(Terephthalic Acid Methyl Ester)	J.Phys.Chem. 1996, 100 : 50 19295-19302.
11-(9-carbazole)undecanoic acid	J.Phys.Chem.B 1999, 103 : 40 8514 - 8523.
2-hydroxy-1-carbazole carboxylate	Publication date 22 Jun 1993 Analytical Abstracts
3-methacrylamide-9-carbazole	Publication date 2000 Plastics Rubber Fibers
5H-benzo[b]carbazole	Publication date 15 Dec 1988 Analytical Abstracts Publication date Sep 1992 Analytical Abstracts
7H-dibenzo[c,g]carbazole	Chem Biol Interact 1994 Nov, 93:2:139-53 Carcinogenesis 1989 Dec, 10:12:2187-95 Carcinogenesis 1989 Mar, 10:3:419-27 Chem Res Toxicol 1993 May-Jun, 6:3:345-50 Chem Res Toxicol 1992 Jan-Feb, 5:1:130-3
9-(4-cyanophenyl)-carbazole Abstracts	Publication date 1999 Beilstein
carbazole acetic acid derivative	J Chromatogr 1991 Jun 14, 567:1:175-83 Publication date 14 Jun 1991 Analytical Abstracts
carbazole alkaloid derivatives	Publication date Feb 1995 Analytical Abstracts
carbazole derivatives	Can.J.Chem. 1989, 67 : 2142-2147.
carbazole derivatives in cationic polymerization	Publication date 2000 Plastics Rubber Fibers
carbazole*B complexes (B = H ₂ O, D ₂ O, NH ₃)	J.Chem.Phys. 1986, 85 : 3 1234-1246.
carbazole-9-acetylbenzenedisulfonate	Publication date Jun 1999 Analytical Abstracts
carbazole-9-N-(2-methyl)-acetyl-benzene-disulfonate	Publication date Nov 1999 Analytical Abstracts
carbazole-9-propionyl chloride	Analytica Chimica Acta 1998, 367:1-3:81-91
carbazole-9-yl-acetyl chloride	Analytica Chimica Acta 1999, 382:1-2:51-65
carbazole-9-ylpropionic acid	Publication date Mar 1999 Analytical Abstracts
carbazole-labeled phospholipid	Chem Biol Interact 1980 Jun, 30:3:309-23 Chem Phys Lipids 1980 Jan, 26:1:1-40
carbazole-N-(2-methyl)acetyl chloride	Publication date 2 Jul 1999 Analytical Abstracts
carbazole-ruthenium complexes	Inorganica Chimica Acta 1999, 288:2:134 - 141
Carbazole-Viologen Compounds	Linked Tetrahedron Lett. 1998, 39 : 38 6915-6918
methylene-linked carbazole	Chem.Phys.Lett. 1999, 307 : 1-2 8 - 14.
N-(2-chloroethyl)carbazole	J.Phys.Chem. 1981, 85 : 14 2047-2050
N-(2-cyanoethyl)carbazole	J.Phys.Chem. 1981, 85 : 14 2047-2050
N-(2-iodoethyl)carbazole	J.Phys.Chem. 1981, 85 : 14 2047-2050
N-(2-Naphthylmethyl)carbazole	Bull.Chem.Soc.Jpn. 1996, 69 : 7 1849-1854.
N-(4-Cyanophenyl)carbazole	J.Chem.Soc.Faraday Trans. 1992, 88 : 19 2799-2804
N-(9-anthryl)carbazole	J.Phys.Chem. 1996, 100 : 47 18392-18398.
N-Methyl Carbazole	Russ.J.Phys.Chem.(Engl.Transl.) 1997, 71 : 7 1177-1178.
N-vinyl carbazole	Publication date 1997 Plastics Rubber Fibers
Oligomers and polymers of carbazole	Publication date 1995 Chemical Engineering and Biotechnology Abstracts
peptidyl-3-amino-9-ethyl-carbazole	EMBO J 1982, 1:3:303-6
poly[N-(2'-ethylhexyl)-carbazole-3,6-diyl-1,3,4-oxadiazole-2,5-diyl] (PCO)	Synthetic Metals 1999, 100:3:297-301
pyrazidole [2,3,3a,4,5,6-hexahydro-8-methyl-1H-pyrazino[3,2,1-jk]carbazole hydrochloride]	Publication date Jan-Feb 1988 Analytical Abstracts
tetrahydrocarbazole	Anal Chem 1976 Jan, 48:1:144-55

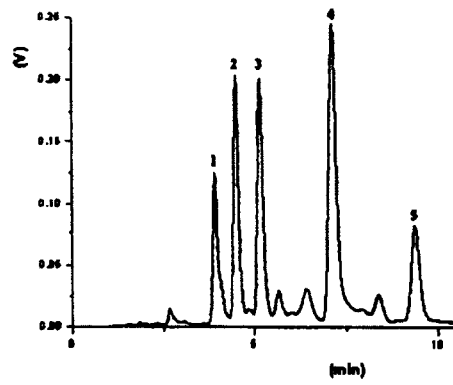


图 1

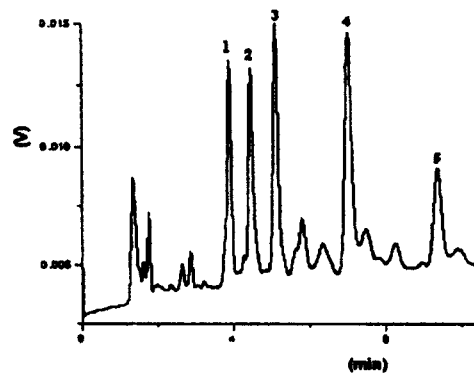


图 2