

研究报告与简报

化学试剂, 1997, 19(4), 193~195; 212

新荧光衍生试剂 *N*-2-羟基琥珀酰亚胺-*A*-萘乙酸酯的合成及其应用研究³³刘勋 徐国良 张华山³ 程介克

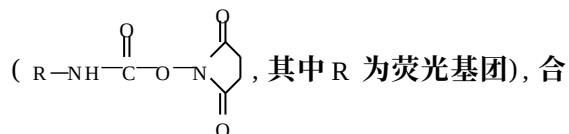
(武汉大学化学系, 武汉 430072)

摘要 报道了新荧光衍生试剂 *N*-2-羟基琥珀酰亚胺-2-萘乙酸酯(SNA)的合成。SNA 的乙腈溶液在 $K_{\text{A}}/K_{\text{M}} = 280\text{nm} \sim 339\text{nm}$ 处有最强荧光。在碱性水溶液中, SNA 易与胺、氨基酸等氨基化合物进行衍生反应, 生成有荧光的酰胺化合物, 过量试剂在 1h 内完全水解为相应的 2-萘乙酸, 衍生产物及水解物易在反相键合相色谱柱上分离。研究表明, SNA 易制备, 性能稳定, 与氨基化合物易衍生, 可用于柱前衍生 HPLC 分离及荧光检测氨基酸、生物胺等生物活性物质。

关键词 *N*-2-羟基琥珀酰亚胺-2-萘乙酸酯, 荧光衍生试剂, 氨基酸, 高效液相色谱

氨基酸及生物胺等氨基化合物是重要的生物活性物质, 通过化学衍生、高效液相色谱分离、荧光检测分析这些化学物质是当前最主要的方法之一。已报道的用于标记氨基酸的荧光衍生试剂主要有丹磺酰氯(DnsCl)、氯甲酸苄酯(FMOC)、邻苯二甲醛(OPA)及 4,2-二硝基-2,2',3,2'-二唑(NBDCl)^[1]等。

N-2-羟基琥珀酰亚胺活性酯是多肽合成中常用的中间体, 它与氨基化合物反应时, 具有条件温和、转化率高、产物稳定等特点。近年来已报道合成了 *N*-2-羟基琥珀酰亚胺-2-萘胺甲酸酯(SNC)^[2]、*N*-2-羟基琥珀酰亚胺苄基氨基甲酸酯^[3]及 6-氨基喹啉基-*N*-2-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯(AQC)^[4]。这些试剂用于胺及氨基酸的化学衍生, 经反相液相色谱分离、荧光检测, 取得了一定的效果。它们都属于氨基甲酸酯类试剂



成时必须使用昂贵的中间体——二(2-羟基琥珀酰亚胺)碳酸酯(DSC), 因此试剂价格高

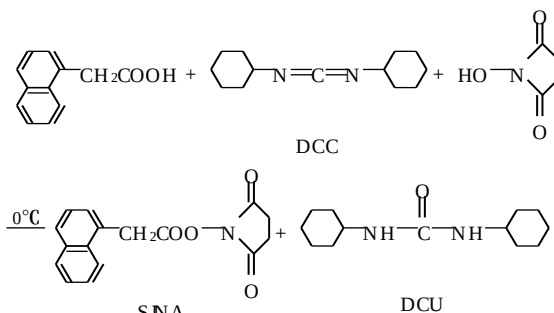
昂, 难以推广应用。

本文报道合成了一种新的荧光衍生试剂 *N*-2-羟基琥珀酰亚胺-2-萘乙酸酯, 萘环作为荧光团, 活性酯部分作为与氨基反应的活性基团, 可用于柱前衍生 HPLC 分离及荧光检测氨基酸、胺等物质。^{a a}

1 实验部分

1.1 SNA 的合成

1.1.1 合成反应



1.1.2 合成方法

^a 收稿日期: 1996 年 2 月 3 日。

^a 3.3 国家自然科学基金资助课题。

将 516g A2 萘乙酸和 3145g N 2 羟基琥珀酰亚胺溶于 150mL 四氢呋喃(THF)中后,置于 250mL 单颈烧瓶中。将 6118g 二环己基碳二亚胺(DCC)溶于 20mL THF 后,置于恒压漏斗中。装置用 CaCl₂ 干燥管保护,于 0℃ 搅拌,缓缓滴入 DCC 溶液,很快产生白色沉淀,1h 内滴加完毕,于 0℃ 下搅拌过夜。过滤除去白色沉淀二环己基脲(DCU),溶液减压除去 THF,得油状物。加入 75mL 无水乙醇,出现白色浑浊,静置结晶,晶体用无水乙醇重结晶,得无色晶体,mp 97~99℃。

元素分析,实测值(理论值),%: C 67.148 (67.184), H 4.154 (4.163), N 4.159 (4.194)。红外光谱(KBr 压片)表征见表 1。

表 1 SNA 红外光谱表征

波数, cm ⁻¹	振动	表征存在的官能团
3400~2400	M-H	没有宽吸收,说明无-COOH
1750~1850	M=O	
1230~1100	M-O	

112 主要仪器与试剂

RF25000 荧光分光光度计(日本岛津), LC210 高效液相色谱仪(日本分析工业公司), RF2530 荧光检测器(日本岛津), 反相键合相色谱柱(C₁₈, (10±1) μm, 内径 150mm×416mm)。

SNA 贮备液: 称取 SNA 0.10283g, 用乙腈定容至 100mL, 浓度为 1100×10⁻³ mol·L⁻¹ (乙腈用无水 K₂CO₃ 干燥几天, 再用 P₂O₅ 干燥, 蒸馏制得)。水为二次蒸馏水。其他试剂为分析纯以上, 采用常规方法配成溶液。

113 实验方法

11311 SNA 与氨基化合物的衍生方法

取一定量的胺或氨基酸溶液置于 10mL 容量瓶中, 加入 210mL 0.11mol·L⁻¹ Na₂B₄O₇ 溶液和适当过量的 SNA 贮备液。加水至刻度, 混匀, 室温静置反应 1h。

11312 色谱条件

色谱柱(C₁₈, (10±1) μm, 内径 150mm×

416mm), 流速 110mL/min, 柱温 35℃, 进样体积 20μL, 荧光检测波长 K_{ex} 280nm, K_{em} 339nm。流动相组成随分离对象不同而改变。

2 结果与讨论

211 SNA 试剂的一般性质

SNA 为无色晶体, 难溶于水, 易溶于甲醇、乙醇、乙腈、四氢呋喃、乙酸乙酯等。试剂性质十分稳定, 在冰箱中放置一年不变质, 其乙腈溶液在室温下放置半年也不变质, 在碱性水溶液中很快水解, 在酸性或中性水溶液中缓慢水解。

212 荧光光谱

图 1 是 110×10⁻⁵ mol·L⁻¹ SNA 的乙腈溶液的荧光光谱。SNA 水解液的荧光光谱与此基本相同。

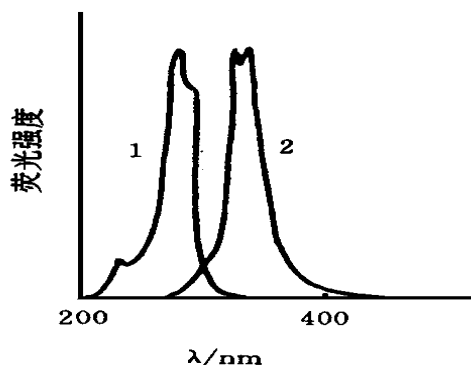


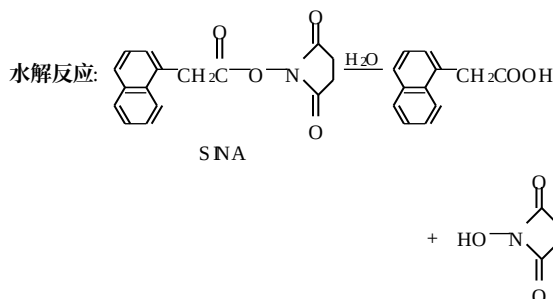
图 1 SNA 的荧光光谱

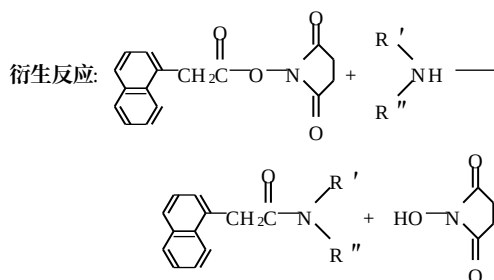
11 荧光激发光谱 21 荧光发射光谱

由图 1 可见, SNA 的乙腈溶液在 280nm 处有最大激发峰, 在 325nm 和 339nm 处有两个相邻的发射峰。

213 SNA 的水解及与氨基化合物的衍生

21311 水解反应及衍生反应





氨基的亲核能力强于水分子, 所以 SNA 优先与氨基化合物衍生。由于水溶液中水分子的浓度总是大大高于氨基化合物的浓度, 所以一部分 SNA 分子会发生水解反应, 形成一种竞争反应。

21312 SNA 水解反应

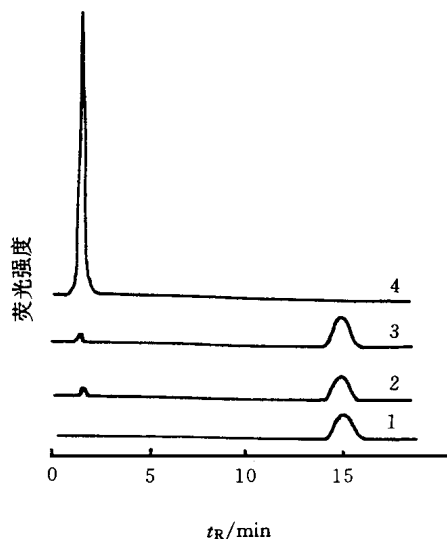


图 2 SNA 及其水解液色谱图

11 SNA 的乙腈溶液;

21 SNA 于水中水解 1h;

31 SNA 于 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{HCl}$ 中水解 1h;

41 SNA 于 $0.102\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 中水解 1h

色谱条件: 流动相为甲醇/水(50/50),

其他条件见实验部分 11312

由图 2 可见, SNA 在水中或 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{HCl}$ 中略有水解, 但速度很慢。SNA 在碱性水溶液中水解很快, 1h 内可水解完全。

21313 SNA 与氨基酸的衍生反应

由图 3 可见, SNA 易与氨基酸衍生, 产物易分离, 多余的试剂水解为 A2-萘乙酸, 也易与其他衍生物分离。

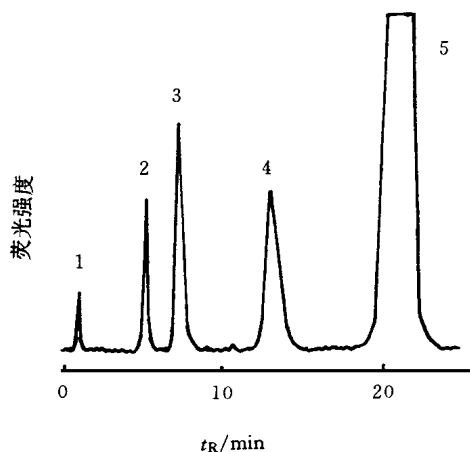


图 3 SNA-2-氨基酸衍生物色谱图

11 未知峰 21 谷氨酸 31 丝氨酸

41 丙氨酸 51 A2-萘乙酸

衍生条件见实验部分 11311, 色谱条件见 11312。流动相为甲醇/乙酸乙酯/水(10/62/88), 含 $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{HAc}/\text{NaAc}$ (pH 5.14)。进样量: 氨基酸各 50 μmol

21314 SNA 与胺类物质的衍生

由图 4 可见, SNA 与胺类物质易衍生, 产物易分离, 过量试剂水解为 A2-萘乙酸, 也易与其他衍生物分离。

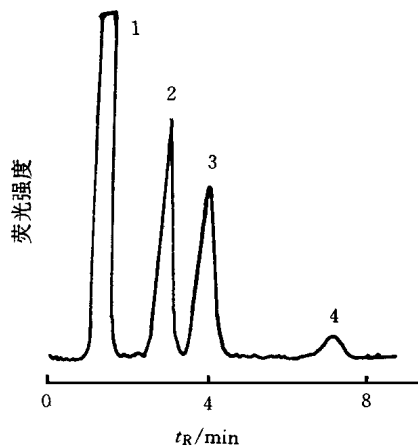


图 4 SNA-2-胺衍生物色谱图

11 A2-萘乙酸 21 NH_3 31 乙胺 41 二乙胺

衍生条件见实验部分 11311, 色谱条件见 11312。流动相为甲醇/乙酸乙酯/水(50/61/89)。进样量: 每种胺各 50 μmol

研究表明, 新合成的荧光衍生试剂 *N*-2-羟基琥珀酰亚胺-2-萘乙酸酯具有易制备、性能稳 (下转第 212 页)

表 2 合成与进口Mugal显色效果比较表^注

Mugal	加入量 ρ ($\text{Lg} \cdot \text{mL}^{-1}$)					
	25	50	75	100	150	200
合成	+	6	6	6	6	6
进口	+	6	6	6	6	6

注: 以上实验所用细菌为 E1Coli (TACC25922)

4 参考文献

- 1 Edberg S C, Allen M J, Smith D B *Appl & Environ Microbiol*, 1988, **54**(6): 1595
- 2 Edberg S C, Allen M J, Smith D B, et al *Appl & Environ Microbiol*, 1990, **56**(2): 366
- 3 Robinson D *Biochem J*, 1956, **63**: 39
- 4 Woollen J W, Walker P G *Clin Chim Acta*, 1965, **12**(6): 647
- 5 Maddocks J L, Greenan M J *J Clin Pathol*, 1975, **28**(8): 686
- 6 Courtin Duchateau M C, Veyrieres A *J Carbohydr Res*, 1978, **65**(1): 23
- 7 余诚方, 刘泽伏, 蔡孟深 1 高等学校化学学报, 1991, **12**(3): 349
- 8 Knoechel A, Rudolph G, Thiem J *Tetrahedron Lett*, 1974, (6): 551

- 9 Woods L L, Sapp J *J Org Chem*, 1962, **27**: 3703
- 10 Barczai M, Santos M, Kocsy F *Nature*, 1950, **165**: 369
- 11 Constantzas N, Kocourek J *Collect Czech Chem Commun*, 1959, **24**: 1099
- 12 Robinson D *Camp Biochem Physiol*, 1964, **12**(1): 95

Synthesis and application of Mugal, an enzyme-substrate rapid determination reagent Zhu Jialing³, Dong Jichang, Yang Zhiling (Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032), Huaxue Shiji, 1997, **19**(4), 210~212

4-Methylumbelliferone-2-D-galactoside, an enzyme-substrate rapid determination reagent was synthesized from the basic chemical materials resorcin, acetic ester and D-galactose. The total yield was obviously higher than that of the literature. The product has the same quality, purity and effect in use as that of Sigma.

Keywords 4-Methylumbelliferone-2-D-galactoside, enzyme-substrate rapid determination

(上接第 195 页)

定、价廉易得的优点, 与氨基酸或胺衍生时, 条件温和, 方法简单, 衍生物易分离, 具有强荧光, 可用荧光检测, 是一种性能优良的新荧光衍生试剂。

3 参考文献

- 1 Lingeman H, Underberg W J M, Takadate A, et al *J Biol Chem*, 1985, **8**(5): 789
- 2 Noriyuki N, Kazuo I, Toshio K, et al *Anal Chem*, 1986, **58**(12): 2372
- 3 平井利生, 北村正孝, 井上義敬 1 分析化学(日), 1991, **40**(5): 233
- 4 Cohen S A, Michaud D P *Anal Biochem*, 1993, **211**(2): 279

Zhang Huashan³, Cheng Jieke (Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072), Huaxue Shiji, 1997, **19**(4), 193~195; 212

A new fluorescence derivatization reagent for amino compounds, *N*-2-hydroxysuccinimidylnaphthylacetate (SNA), is easily prepared by the reaction of *N*-naphthylacetic acid with *N*-2-hydroxysuccinimide in the presence of dicyclohexylcarbodiimide. SNA in acetonitrile presents strong fluorescence at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280\text{nm}/339\text{nm}$. The reagent can readily react with amino compounds to give the corresponding fluorescent amides, which can be separated on reverse-phase column. SNA is found to be a promising derivatization reagent for analysis of amino compounds by HPLC with fluorescence detection.

Keywords *N*-2-hydroxysuccinimidylnaphthylacetate, fluorescence derivatization reagent, amino compounds, high performance liquid chromatography

Synthesis and properties of *N*-hydroxy-succinimidylnaphthylacetate as a new fluorescence derivatization reagent for amino compounds Liu Xun, Xu Guoliang,