

GS-SG

钠反应却得到熔点 143—144℃ 的 GS-SG, 低于 -15° 时又常常成冻状物, 使反应不完全。我们的实验结果表明 -15℃—-8℃ 是合适的。

关于脱除乙酰基反应的溶剂问题, 我们重复不出 Schneideru^[4] 用氯仿作溶剂的结果。这可能是因为氯仿同醇钠能发生反应, 生成原甲酸酯^[13]由于难于掌握。而改用甲醇为溶剂, 则得到比较理想的结果。由于产物在甲醇中溶解度比在乙醇中大, 因此选择甲醇比乙醇好。

本工作得到本室主任组经义同志的热情指导, 工作中元素分析由绪宝珍、厉惠萍两位同志承担; GTG 的 X 荧光分析由有机化学研究所分析室测定, 特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Andrew, H. et al.: *J. Clin. Investigation*, **56**, 769, 1975.
- [2] Schwarty, I. L. et al.: *Tr. Associ. Am. Physicians*, **774**, 300, 1961.
- [3] 秦正誉等: 《四军医大科技资料》, 1978 年。
- [4] Schneideru, W. et al.: *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **61**, 1244, 1928.
- [5] Horton, D.: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **VII**, 435, 1963.
- [6] Cern, Y. M. et al.: *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, **26**, 2084, 1961.
- [7] Acczal-Martos, M. B. et al.: *Nature* **165**, 369, 1950.
- [8] Cerny, M. et al.: *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, **24**, 64, 1959.
- [9] Wredef, Z.: *Physiol. Chem.*, **119**, 46, 54, 1922.
- [10] Richtmyer, N. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1477, 1943.
- [11] Kirk-othmer: *Encyclopedia of Chemical Technology*, **22**, 420, 1970. Second Edition.
- [12] *Chem. Abstr.* **33**, 8573, 1939.
- [13] 韩广甸等: 《有机制备化学手册》(上册), 1975.
- [14] Bonner, W. A. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2241, 1951.

【本文于 1978 年 10 月 20 日收到】

荧光胺的合成和应用

顾本贤 徐 珉 方继康

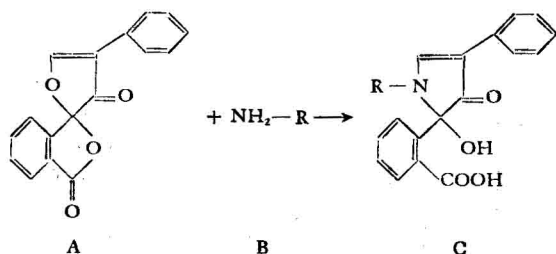
(中国科学院上海生物化学研究所)

近几年来, 在蛋白质化学研究中, 分析微量化的重要方面之一是使用荧光方法。在氨基酸、多肽、蛋白质测定中, 荧光胺 (Fluorescamine) 可与游离的氨基反应, 产生荧光的物质, 借此测定的灵敏度可提高达 10^{-12} 克分子。荧光胺在柱层析、薄层层析中都可用来测定氨基酸和多肽; 也有用作抗体荧光标记的荧光试剂。此试剂已有 Hoffman-La Roche 公司生产出售, 由于此试剂价格昂贵, 因而很多实验室都不能普遍使用。本实验室使用国内的现有试剂, 参照了有关的方法尝试合成该试剂, 现已初步合成。合成的试剂与进口的 Hoffman-La Roche 公司的产品作了比较, 基本符合。并且就此试剂在溶液

中和薄层中的测定作了一些比较。在此作一介绍。

一、基本原理

荧光胺与伯胺类反应的机制:



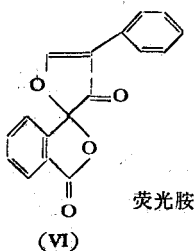
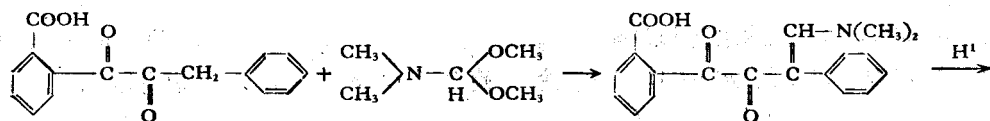
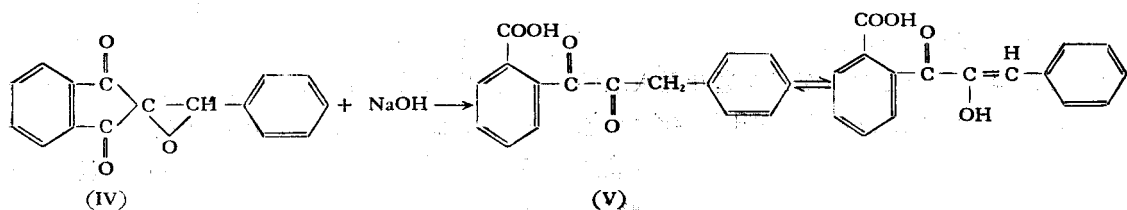
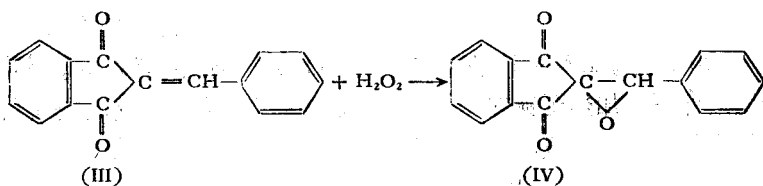
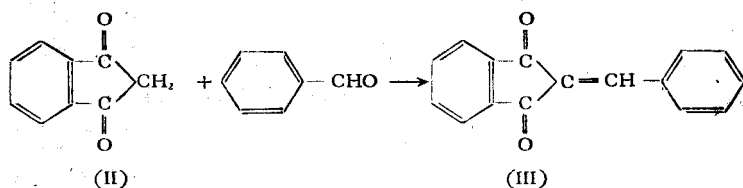
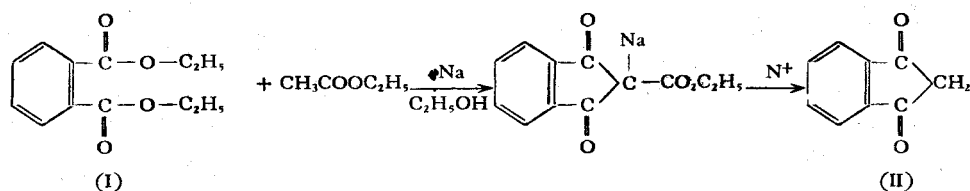
荧光胺 (A) + 伯胺 (B) 反应生成具有荧光

的物质(C), 而荧光胺遇水分解, 变成没有荧光的产物。同时荧光胺本身是不呈荧光的。

二、荧光胺的合成方法^[1]

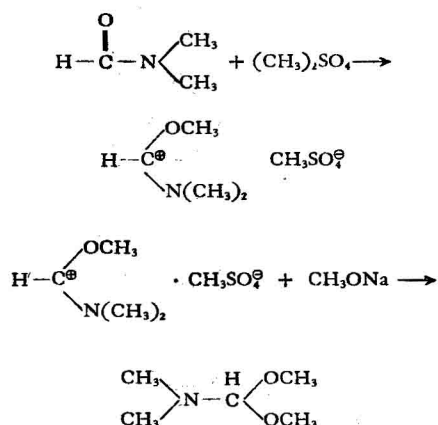
苯二甲酸二乙酯(I)与乙酸乙酯在金属钠存在下作用, 再经酸化水解脱羧得茚二酮(II)。

II与苯甲醛在氮气流下, 脱水, 得2-苯叉茚二酮(III)。III被过氧化氢氧化, 得2-苯基-螺环氧乙烷基-茚二酮(IV)。IV经碱水解得邻-(2)-羟基肉桂基苯甲酸(V)。V与N,N'-二甲基甲酰胺缩甲醛反应, 经酸化后, 直接得到荧光胺(VI)。



N, N'-二甲基甲酰胺缩甲醛 (DMF-DMA) 反应方程式^[2]:

二甲基甲酰胺和硫酸二甲酯反应, 得到二甲基甲酰胺甲酯-甲基硫酸酯, 此化合物与甲醇钠反应, 得到 N, N'-二甲基甲酰胺缩甲醛。



实验步骤:

1. 制备茚二酮

在80毫升重蒸二甲苯中, 加入钠20克(870毫克分子), 在干燥条件下, 加热至钠熔化并振摇, 钠泥珠形成, 停止加热后固化成小珠。倾去二甲苯, 加入35毫升苯, 35毫升二甲苯, 加入邻苯二甲酸二乙酯100克(450毫克分子), 在水浴中加热至96℃左右, 依次一滴滴加入60毫升含有乙醇的乙酸乙酯溶液(2.6毫升无水乙醇加57.4毫升乙酸乙酯)和50毫升乙酸乙酯, 加完后继续搅拌回流, 反应6—7小时。反应液由无色至橙红色。冷至室温有沉淀析出。抽滤反应液, 得到黄色滤瓶。滤瓶溶于1,500毫升热水中, 加热至90℃溶解, 在冰水冷却并搅拌下, 加200毫升稀硫酸(浓硫酸:水=3:1)后, 冷却, 抽滤, 用水洗到近中性。得到微红色氢化茚二酮结晶。低温干燥, 得35克(240毫克分子, 产率53.3%)。熔点: 123—126℃(文献: 130℃), (检验: 在稀氢氧化钠溶液中呈黄色为好)。

2. 制备2-茚叉-茚二酮

31.5克茚二酮(215.8毫克分子)加入175毫升苯, 25毫升苯甲醛(236毫克分子), 加入0.25毫升六氢吡啶(实验试剂)。用氮气流下,

80℃加热回流, 直到分水器上分出水量2.7毫升为止。冷却至室温, 放置次日即有大量沉淀析出。抽滤, 滤瓶用乙醚和石油醚混合液(1:2)洗数次干燥。得草绿色结晶, 重32克(136.8毫克分子, 产率63.4%), 熔点: 150—152℃。(文献: 150—152℃, 重结晶: 152—153℃)。

3. 制备2-苯基-螺环氧乙烷基-茚二酮

2-茚叉茚二酮26克(111毫克分子)悬浮于300毫升甲醇中, 加入30毫升30% H₂O₂, 冷至7—8℃, 加入4毫升1N NaOH, 先放置冰浴中搅拌, 然后在室温搅拌3—4小时, 将此甲醇溶液倾入1升蒸馏水中沉淀析出, 抽滤, 滤瓶以水洗。得白色略带黄色结晶。干燥后重: 26克(104毫克分子, 产率: 93.7%), 熔点: 158—160℃(文献: 154—156℃, 重结晶: 158℃)。

4. 制备2-羟基-肉桂基苯甲酸

2-苯基-螺环氧乙烷基茚二酮5克(20毫克分子)悬浮于50毫升10% NaOH 水溶液中, 再加入12.5毫升甲醇溶液, 冷却温度维持在35℃以下, 搅拌3.5小时, 反应液呈棕红色, 含有少量不溶物。将反应液倾入500毫升水中, 此棕色溶液用乙醚抽提三次, 不溶物在乙醚层, 弃去。碱性水层用10% HCl 酸化至pH1—2, 再用氯仿抽提三次, 合并氯仿液以水洗三次, 再以无水硫酸钠干燥。减压浓缩得残留物。将此残留物加入100毫升石油醚(含10%乙醚)并研磨成糊状, 过滤得淡黄色固体粉末。干燥重: 3.5克(13毫克分子, 产率: 65%), 熔点: 108—115℃(文献: 106—115℃)。

5. 制备荧光胺

邻-2-羟基肉桂基苯甲酸300毫克(1.1毫克分子)加入5毫升二甲基甲酰胺, 加入25毫升0.2 NDMF-DMA 的甲醇溶液, 置于30℃恒温室, 放至次日。取出来后, 浓缩至干。油状物悬浮于150毫升水, 加入稀盐酸酸化至pH3—4, 以二氯甲烷抽提三次, 二氯甲烷层以无水硫酸钠干燥, 浓缩至干得油状物, 加入几滴二氯甲烷, 有结晶物析出, 加入无水乙醚研磨, 抽滤, 以无水乙醚洗数次。得白色结晶, 熔点: 154℃(文献: 151—154℃), 重80毫克。

分子式: $C_{17}H_{10}O_4$

文献: C 73.34% H 3.62%

实验: C 72.00% H 3.91%

6. 制备 N,N'-二甲基甲酰胺缩甲醛(DMF-DMA)^[2,3]

146.2 毫升 N,N'-二甲基甲酰胺 (2 克分子) 和 190 毫升硫酸二甲酯 (2 克分子) 加热至 60℃, 干燥条件下反应 3 小时, 得淡橙色粘稠液体。

钠 46.2 克切成薄片加入 625 毫升无水甲醇中, 得乳白色清液。在冰水浴中, 维持温度 +5℃ 左右, 边搅拌边逐滴淡橙色粘稠液体加入乳白色醇钠溶液中, 得到乳白色固体和液体混合物。将此混合物以 40 公分分馏柱分馏, 收集 65℃ 馏份, 约 500 毫升。得到有三乙胺臭味甲醇液。滴定: 含有 N,N'-二甲基甲酰胺缩甲醛量: 0.2 N。

三、荧光胺的应用

1. 溶液显色方法

(1) 标准溶液 称甘氨酸 1.25 毫克溶于水至 25 毫升容量瓶刻度为止。摇匀。

(2) 实验试剂 pH 8.5, 0.15 M 硼酸钠缓冲液。荧光胺 30 毫克/100 毫升丙酮。

(3) 显色方法 试样液(如表 1)与 0.15 M pH 8.5 硼酸钠缓冲液混合至 1 毫升, 加入 0.15 毫升荧光胺溶液, 搅拌混合, 在激发波长 390 毫微米, 发射波长 470 毫微米下, 在 Model 204 (日立) 荧光分光光度计下读数值 (以缓冲液为空

白)。

表 1

标准溶液(微升)	0	1	2	10	20	40
进口荧光胺	7	10	18	43	66	100
自制荧光胺	7	13	17	34	62	100

(4) 结果 上述对比数值, 说明了合成荧光胺与进口荧光胺基本符合。

2. 薄层层析显色

五种混合氨基酸(亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天门冬氨酸、缬氨酸)的纤维素板显色图谱见图 1。

四、讨 论

用上述方法制备所得荧光胺与进口荧光胺相比质量相等, 在上述制备方法中, 还应指出邻-2-羟基肉桂苯甲酸有烯醇式或酮式, 由不同 pH 值而定。同时它不稳定, 在强酸性潮湿气下, 容易破坏。N,N'-二甲基甲酰胺缩甲醛与甲醇混合的共沸物, 由酸碱滴定计算其浓度。当此试剂被用于制备荧光胺时, 它必须过量, 并放置时间长些, 从二十四小时到几天, 虽然有部分副产物生成, 但可不必经硅胶柱加以纯化, 而直接由重结晶方法(重结晶溶剂为二氯甲烷: 无水乙醚 = 1:1 V/V) 得白色结晶。

本文承蒙黄惟德同志, 龚岳亭同志等热情指导, 一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Willy, L. et al.: *Ger. Offen.*, 2, 263, 534 (Cl. Co7C. Gln, Go 2N), *Fluorometric Compounds*.
- [2] Säureamid-Reaktionen: *Chem. Ber.*, 32, 96, 1350, 1963.
- [3] Arnold, Z. et al.: *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 29, 645, 1964.
- [4] Nakai, N. et al.: *Anal. Biochem.*, 58, 563, 1974.

[本文于 1978 年 5 月 24 日收到]



图 1 五种混合氨基酸单向层析异丙醇: 甲酸: 水 = 20:1:5 V/V; 每种氨基酸 5 毫微克; 纤维板 3×7 厘米