



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109180571 B

(45) 授权公告日 2021.08.13

(21) 申请号 201811257856.1

(22) 申请日 2018.10.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109180571 A

(43) 申请公布日 2019.01.11

(73) 专利权人 章健
地址 201209 上海市浦东新区民春路399弄
7号502室

(72) 发明人 吴俊清 郭廷翹 章健 吴冠英

(51) Int. Cl.
C07D 213/68 (2006.01)
C07D 471/22 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105218570 A, 2016.01.06

WO 0196877 A2, 2001.12.20

常宇等. 稀土穴状荧光配合物的合成与光谱性质.《应用化学》.2017,第34卷(第3期),第361-366页.

Loïc J. Charbonnière et al..Lanthanides to Quantum Dots Resonance Energy Transfer in Time-Resolved Fluoro-Immunoassays and Luminescence Microscopy.《J. AM. Chem. Soc.》.2006,第128卷第12800-12809页.

N. Sabbatini et al..Lanthanide luminescence in supramolecular species.《Journal of Luminescence》.1991,第48&49卷第463-468页.

审查员 刘欢

权利要求书3页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

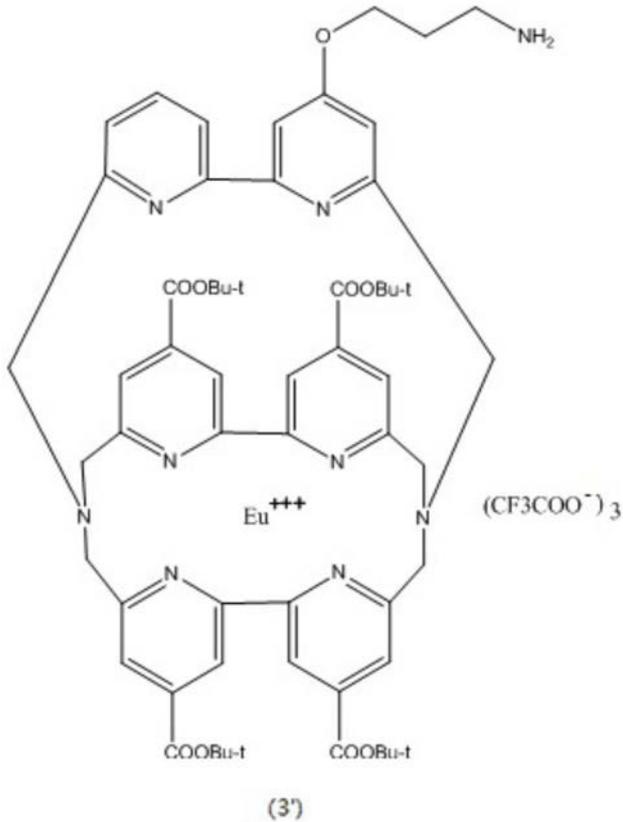
一种联吡啶衍生物及合成方法、用途

(57) 摘要

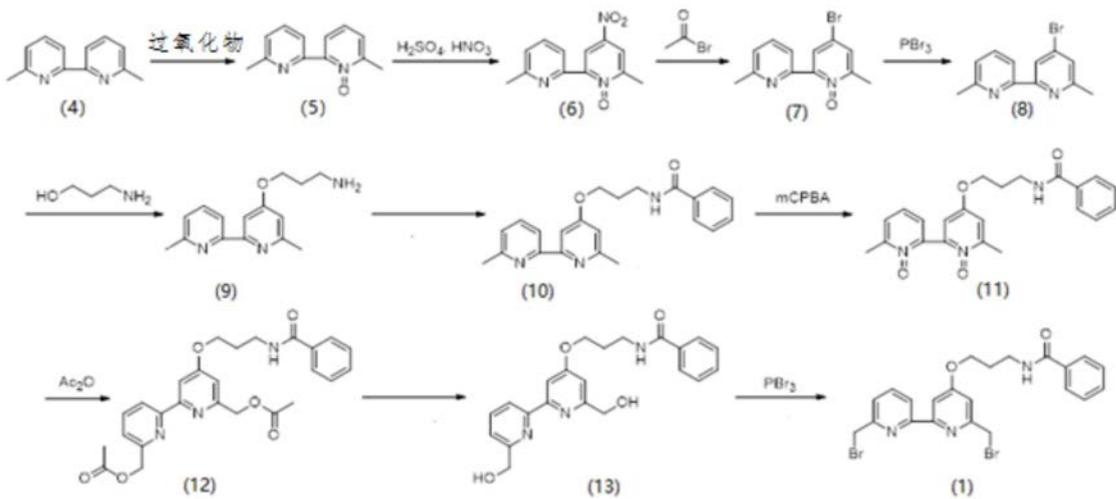
本发明提供了一种联吡啶化合物,该联吡啶化合物的穴状化合物产品是一类在发光和照明、荧光探针等领域显示出潜在应用前景的荧光材料,可以完全改变目前解离-增强时间分辨荧光免疫分析法(DELFLA)缺点,实现高灵敏、大通量、全自动时间分辨免疫荧光检测。



1. 一种联吡啶衍生物,其特征在于,化学结构式为:



2. 根据权利要求1所述的联吡啶衍生物的合成方法,其特征在于,所述联吡啶衍生物的其合成路线为:



包括以下步骤:

- A、用过氧化物将化合物(4)的一个吡啶环氧化,生成化合物(5);
- B、用硫酸与硝酸将化合物(5)硝化,生成化合物(6);
- C、用乙酰溴将化合物(6)上的硝基转化为溴,生成化合物(7);
- D、用三溴化磷将化合物(7)还原成化合物(8);
- E、将化合物(8)与3-氨基丙醇缩合,生成化合物(9);
- F、化合物(9)发生酰化反应生成化合物(10);

G、将化合物(10)用m-CPBA氧化成化合物(11)；

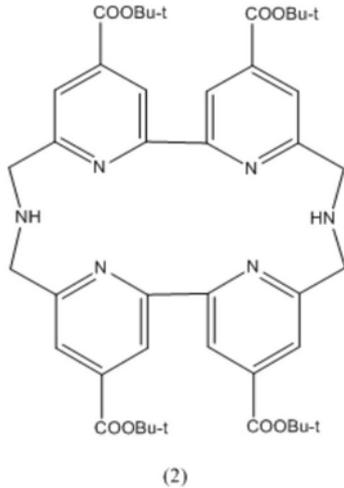
H、化合物(11)与乙酸酐反应,生成化合物(12)；

I、将化合物(12)水解成化合物(13)；

J、将化合物(13)溴化,生成化合物(1)；

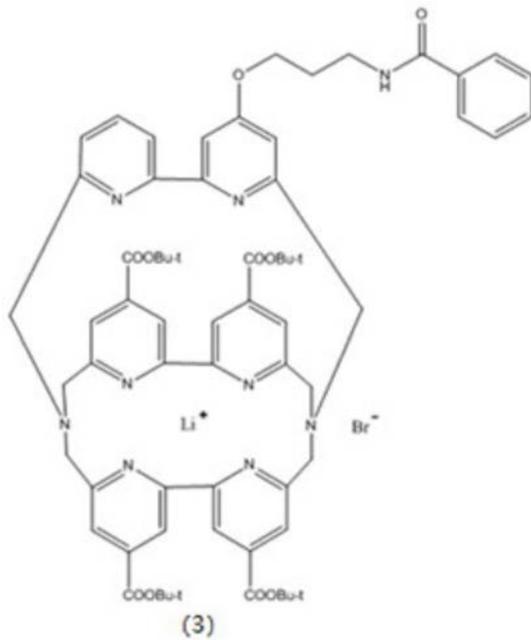
K、将化合物(2)溶解于含碳酸锂的溶剂中,与化合物(1)反应,搅拌,然后置冰浴中冷却,过滤后,将滤液蒸发至干,残余物通过反相层析,得到穴状化合物(3)；

化合物(2)的结构为：



；

化合物(3)的结构为：



；

L、将三氯化铕和化合物(3)加入到溶剂中,回流,蒸去溶剂,溶于酸液中,在室温下搅拌,然后减压蒸去过量酸,将其浓缩至干,通过反相层析,得到化合物(3')。

3. 根据权利要求2所述的联吡啶衍生物的合成方法,其特征在于,所述A步骤的过氧化物为m-CPBA。

4. 根据权利要求2所述的联吡啶衍生物的合成方法,其特征在于,所述F步骤与化合物

(9) 发生酰化反应的化合物是苯甲酰氯。

5. 根据权利要求2所述的联吡啶衍生物的合成方法, 其特征在于, 所述J步骤的溴化试剂是三溴化磷。

6. 根据权利要求2所述的联吡啶衍生物的合成方法, 其特征在于, 所述溶剂是乙醇、甲醇、乙醚、乙腈、二甲亚砜或者二氧六环。

7. 根据权利要求2所述的联吡啶衍生物的合成方法, 其特征在于, 所述的酸液为三氟乙酸。

8. 权利要求1所述的联吡啶衍生物在制备时间分辨荧光探针中的应用。

9. 权利要求1所述的联吡啶衍生物在制备时间分辨荧光检测试剂盒中的应用。

一种联吡啶衍生物及合成方法、用途

技术领域

[0001] 本发明属于荧光探针技术领域,具体涉及一种联吡啶衍生物及其用途。

背景技术

[0002] 随着医学和生命科学的飞速发展,对微量物质检测要求也越来越高,因而对应新的检测技术不断开发出来。时间分辨荧光免疫分析法(Time-Resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)于上世纪70年代末由Soini和Kojola首次提出的一种新型的分析方法。由于镧系离子螯合物具有大的Stokes位移,通过选择滤波片摒弃非特异性的荧光干扰;又因镧系离子螯合剂能发射出长寿命的荧光,通过时间分辨荧光分析技术,可以排除短寿命荧光背景影响,大大提高信噪比,使检测的灵敏度大为提高。因其能够大幅提升免疫分析的灵敏度,故TRFIA技术替代了高灵敏的放射免疫分析法,已在国际超微量分析技术领域展示了巨大的应用前景。但现行的TRFIA技术主要是采用解离增强镧系荧光免疫分析(DELFLIA),采用该体系标记的镧系离子是不发荧光的,必须加入一种增强液后,形成新的镧系螯合物才能发出很强的荧光。在形成新的镧系螯合物体系过程中,镧系离子已与标记物上解离出来,均相地游离在增强液中,已失去标识示踪物的作用。故该体系无法应用于需要用特定标识示踪物的时间分辨免疫荧光全自动化检测系统(简称:时间分辨随机系统)的全自动化随机检测系统中。为此,需要开发一种新型的双功能螯合剂。

[0003] 镧系络合的穴状化合物是一类在发光和照明、荧光探针等领域显示出潜在应用前景的荧光材料。穴状化合物的形成是将一个阳离子纳入到一个立体笼中。该笼能收集光能量,然后将能量转移到核心的镧系元素。大环的性质有利于跟镧系元素紧密相连,这种不可破的连接会形成异常稳固的复合体。基于镧系穴状化合物发展起来的时间分辨随机系统,可以完全改变目前解离-增强时间分辨荧光免疫分析法(DELFLA)缺点,实现高灵敏、大通量、全自动时间分辨免疫荧光检测。

[0004] 联吡啶类物质由于其螯合作用和供电子能力的存在,可以和镧系 Eu^{3+} 形成稳定的配合物,因此其可以作为有机配体的中心结构单元,进一步反应形成 Eu^{3+} -穴状物,起到敏化 Eu^{3+} 发光并连接待测生物分子的作用,是此类化合物中性能较好的。近年来已有许多此类化合物及中间体被合成出来,显示了优异的高镧系量子产率和动力学稳定性等荧光性能。

[0005] 专利“一种镧系化合物及其制备方法和应用”(CN105218570 B)所述镧系化合物所选择与蛋白相连的基团是不稳定的酰胺键,而且其合成从A8到A9反应过程中会产生单枝、双枝、三枝、四枝、五枝和六枝侧链的产物,多余一支时又可能产生在6个空间位置中结合不同位置的同枝数侧链产物,因此如此非常多的副产品,其单支链的产率必然很低,各种副产物间化学结构相差不大,令产品分离提纯非常困难,直接影响目标物纯度和在免疫分析方法上的应用。

[0006] 专利US7087384B2中所述穴状化合物主要应用在影像学上,因此其在连接蛋白上并没有考虑连接一个化合物链接蛋白的数量关系,出于合成的便利,设计了两个连接蛋白位置。该专利不能保证每个荧光基团链接一个抗原和抗体,降低了作为荧光标记的1对1的

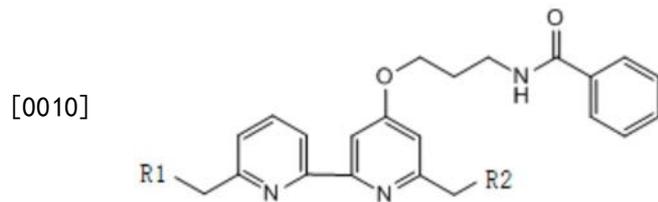
示踪准确性性,使得荧光标记无法区分识别一个抗原或抗体参与免疫反应还是2个同时参与免疫反应,因此其在免疫诊断学的应用就受到限制。另外,该专利在结合蛋白上存在分枝臂长较短,存在自身的亲水性或点位影响偶联的结合,甚至影响偶联蛋白的免疫反应特异性。

发明内容

[0007] 针对新型双功能螯合物中间体的缺少极大地限制了TRFIA技术的推广问题,本发明提供了一种联吡啶化合物,该联吡啶化合物的穴状化合物产品是一类在发光和照明、荧光探针等领域显示出潜在应用前景的荧光材料。

[0008] 为了实现本发明的目的,本发明采用的技术方案是:

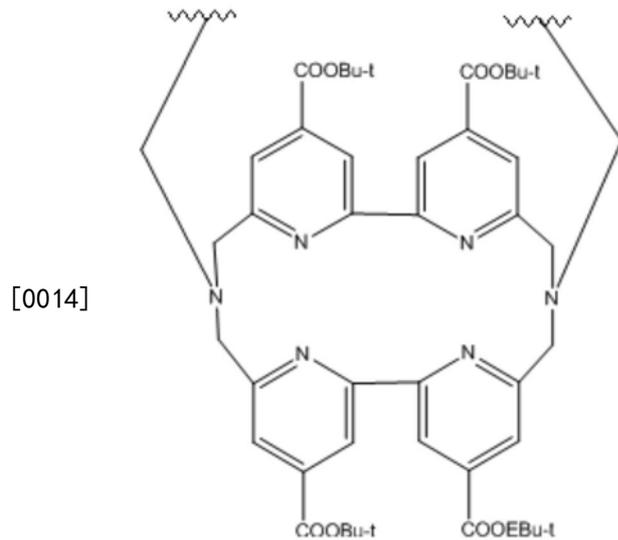
[0009] 一种联吡啶衍生物,其特征在于,化学结构式为:



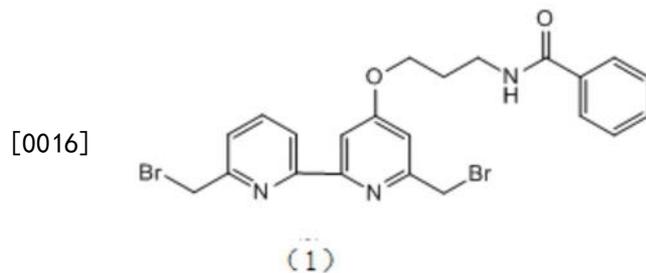
[0011] R1、R2均为Br;

[0012] 或者,

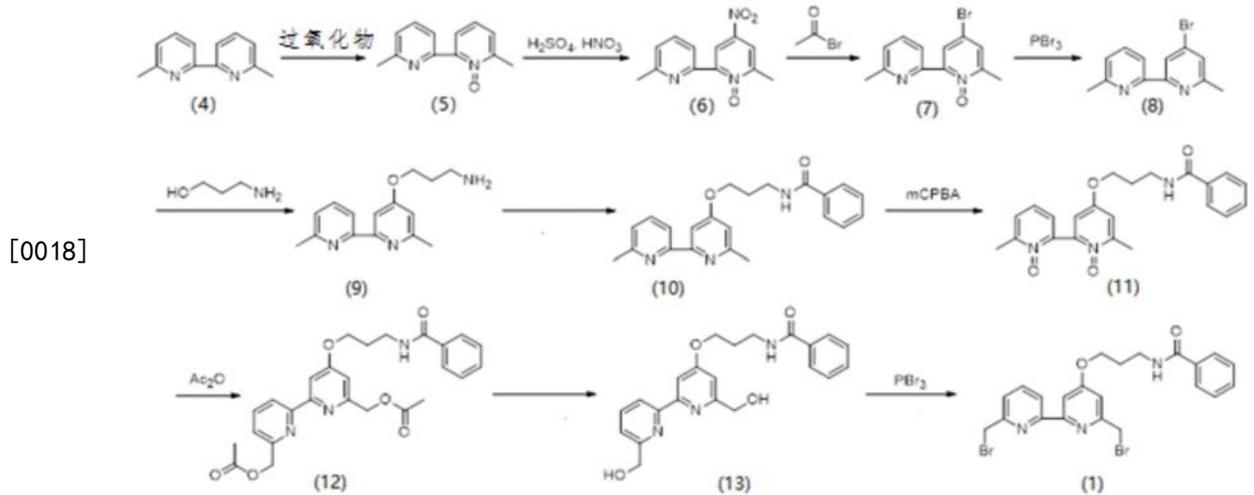
[0013] R1、R2分别连接以下穴状基团的两个连接键,形成镧系穴状化合物:



[0015] 所述联吡啶衍生物的结构如下:



[0017] 该联吡啶化合物的合成路线如下：



[0019] 包括以下步骤：

[0020] A、用过氧化物将化合物(4)的一个吡啶环氧化,生成化合物(5);B、用硫酸与硝酸将化合物(5)硝化,生成化合物(6);

[0021] C、用乙酰溴将化合物(6)上的硝基转化为溴,生成化合物(7);D、用三溴化磷将化合物(7)还原成化合物(8);

[0022] E、将化合物(8)与3-氨基丙醇缩合,生成化合物(9);

[0023] F、化合物(9)发生酰化反应生成化合物(10);

[0024] G、将化合物(10)用*m*-CPBA氧化成化合物(11);

[0025] H、化合物(11)与乙酸酐反应,生成化合物(12);

[0026] I、将化合物(12)水解成化合物(13);

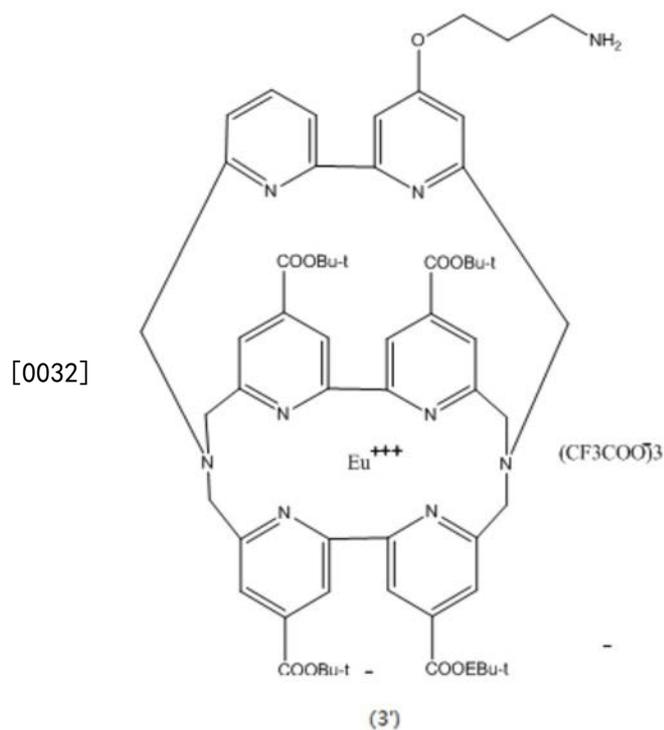
[0027] J、将化合物(13)溴化,生成化合物(1)。

[0028] 优选地,所述A步骤的过氧化物为*m*-CPBA。

[0029] 优选地,所述F步骤与化合物(9)发生酰化反应的化合物是苯甲酰氯、氯甲酸苄酯或者氯甲酸叔丁酯。

[0030] 优选地,所述J步骤的溴化试剂是三溴化磷或溴化氢。

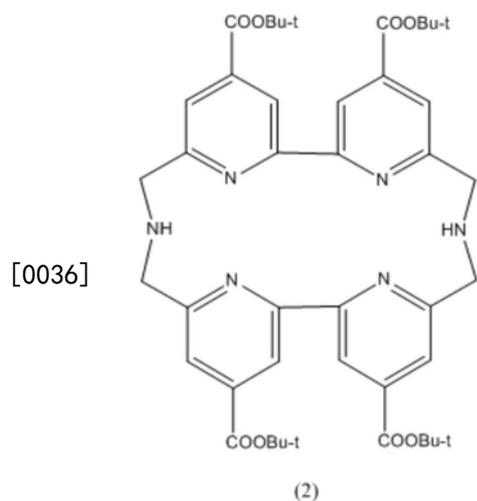
[0031] 本发明所述联吡啶衍生物的结构如下：



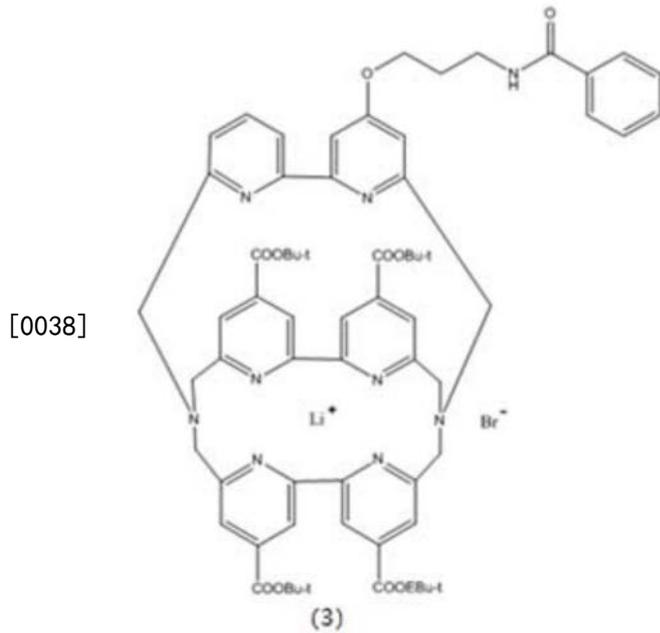
[0033] 该穴状化合物的合成方法包括以下步骤：

[0034] A、将化合物(2)溶解于含碳酸锂的溶剂中，与化合物(1)反应，搅拌，然后置冰浴中冷却，过滤后，将滤液蒸发至干，残余物通过反相层析，得到穴状产物(3)；

[0035] 化合物(2)的结构为：



[0037] 化合物(3)的结构为：



[0039] B、将三氯化铷和化合物(3)加入到溶剂中,回流,蒸去溶剂,溶于酸液中,在室温下搅拌,然后减压蒸去过量酸,将其浓缩至干,通过反相层析,得到化合物(3')。

[0040] 所述溶剂是乙醇、甲醇、乙醚、乙腈、二甲亚砜或者二氧六环,优选溶剂是乙腈。

[0041] 所述的酸液为三氟乙酸。

[0042] 本发明所述穴状化合物(3')的时间分辨荧光检测试剂盒。

[0043] 穴状化合物(3')可以与蛋白相连接形成示踪检测物,与磁微球标记的蛋白一起组装成检测试剂盒,应用于时间分辨免疫分析全自动化检测系统中。

[0044] 本发明的有益效果在于:

[0045] 1、穴状化合物是通过环外侧链上的氨基与生物体的蛋白基团连接的,本发明的穴状化合物只有单侧链的连接,可以提高免疫分析灵敏度和特异性。

[0046] 2、本发明是直接把连接蛋白基团提前接上,先构建单分支结构物,并对连接蛋白基团保护,保证在合成过程中不会影响最终目标产物偶联蛋白的能力,避免了专利CN105218570 B的缺点。

[0047] 3、本发明的联吡啶化合物(1)为首次合成,以其为原料得到的穴状化合物结构的臂长增加1倍以上,能够有效降低标记物本身电位或亲水性对结合偶联抗原或抗体的空间干扰,发挥偶联的蛋白自身的免疫特性,大大提高在免疫诊断上的检测示踪精度。

[0048] 4、本发明联吡啶化合物(1)的合成方法采用将联吡啶先氧化成N-氧化物再溴代的三步溴化法,溴代产物比较单一,副反应物少,易于提纯,产率高。

附图说明

[0049] 图1是本发明化合物(1)的NMR图。

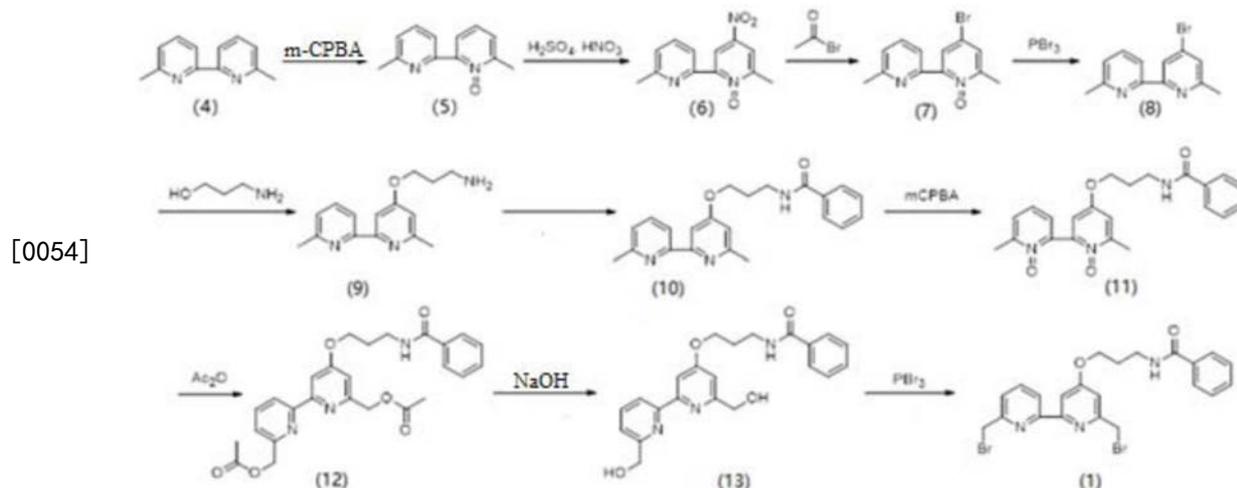
[0050] 图2是用本发明化合物(1)进一步合成的穴状化合物(3')应用于测定促甲状腺素的工作曲线。

具体实施方式

[0051] 为了更加清楚、详细地说明本发明的目的技术方案,下面通过相关实施例对本发明进行进一步描述。以下实施例仅为具体说明本发明的实施方法,并不限定本发明的保护范围。

[0052] 实施例1

[0053] 化合物(1)的合成路线如下:



[0055] 合成方法包括以下步骤:

[0056] A、用m-CPBA将化合物(4)的一个吡啶环氧化,生成化合物(5);

[0057] B、用硫酸与硝酸将化合物(5)硝化,生成化合物(6);

[0058] C、用乙酰溴将化合物(6)上的硝基转化为溴,生成化合物(7);

[0059] D、用三溴化磷将化合物(7)还原成化合物(8);

[0060] E、化合物(8)与3-氨基丙醇缩合,生成化合物(9);

[0061] F、化合物(9)与苯甲酰氯反应生成化合物(10);

[0062] G、将化合物(10)用m-CPBA氧化成化合物(11);

[0063] H、化合物(11)与乙酸酐反应,还原N-氧化物,生成化合物(12);

[0064] I、将化合物(12)水解成化合物(13);

[0065] J、使用三溴化磷将化合物(13)溴化,生成化合物(1)。

[0066] 实施例2

[0067] 本实施例在实施例1的基础上:

[0068] 所述A步骤用过氧化苯甲酸将化合物(4)的一个吡啶环氧化。

[0069] 所述F步骤与化合物(9)发生酰化反应的化合物是氯甲酸苄酯。

[0070] 实施例3

[0071] 本实施例在实施例1的基础上:

[0072] 所述A步骤用过硫酸铵等将化合物(4)的一个吡啶环氧化。

[0073] 所述F步骤与化合物(9)发生酰化反应的化合物是氯甲酸叔丁酯。

[0074] 所述J步骤使用的溴化试剂是溴化氢。

[0075] 实施例4

[0076] 6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N-氧化物(5)的合成

[0077] 将6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(4) (39.4g,0.21mol)溶于1000ml氯仿,在0℃下分批加入间氯过氧苯甲酸(49.0g,0.21mol,75%wt)。加毕,在室温搅拌4小时。反应用TLC监控。将混合物相继用饱和碳酸氢钠溶液、盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压蒸去溶剂,得到粗产物。将粗产物通过硅胶柱层析提纯(DCM:MeOH=30:1),得到无色油状的6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N-氧化物(30.0g,70%)。LCMS (ESI):m/z 201 (M+H)⁺;RT=1.6min。

[0078] 实施例5

[0079] 4-硝基-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N-氧化物(6)的合成

[0080] 在硫酸(135mL)和硝酸(100mL)的混合物中,加入6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N-氧化物(5) (25.0g,0.12mol),在100℃搅拌1小时。用TLC监控反应完成后,将混合物倒入冰水中,用1N氢氧化钠溶液和碳酸氢钠溶液将pH调至8,过滤析出的沉淀,干燥,得到4-硝基-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N-氧化物(20.0g,65%)的黄色固体。LCMS (ESI):m/z 246 (M+H)⁺;RT=1.9min。

[0081] 实施例6

[0082] 4-溴-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N-氧化物(7)的合成

[0083] 向4-硝基-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N-氧化物(6) (15.0g,0.06mol)在醋酸(120mL)的溶液中加入乙酰溴(65mL)。将混合物在80℃搅拌1.5小时。用TLC监控反应完成后,将混合物倒入冰水中,用1N氢氧化钠溶液和氢氧化钾固体溶液将pH调至8。然后将混合物用乙酸乙酯提取3次,合并有机层用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,得到粗产物。将粗产物通过NH硅胶柱层析(PE:EA=10:1到2:1),得到4-溴-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N-氧化物(5.0g,29%)的黄色固体。LCMS (ESI):m/z 279 (M+H)⁺;RT=1.7min。

[0084] 实施例7

[0085] 4-溴-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(8)合成

[0086] 向4-溴-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N-氧化物(7)在氯仿(100mL)的溶液中加入三溴化磷(11mL)。将混合物在室温搅拌15分钟。用TLC监控反应完成后,用1N氢氧化钠溶液和氢氧化钾固体溶液将pH调至8。然后将混合物用二氯甲烷提取3次,合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,得到4-溴-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(4.8g,90%)的棕色固体。LCMS (ESI):m/z 263 (M+H)⁺;RT=1.0min。

[0087] 实施例8

[0088] 4-(3-氨基丙氧基)-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(9)的合成

[0089] 混合氢氧化钾(2.0g,36.64mmol)和DMSO(15mL),在60℃搅拌1小时,然后加入4-溴-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(8) (4.8g,18.32mmol)和3-氨基丙醇(2.8g,18.32mmol),在60℃搅拌过夜。用TLC监控反应完成后,加水,用乙酸乙酯提取3次,相继用水,盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,得到粗产物。粗产物通过NH硅胶柱层析(DCM:MeOH=20:1到5:1),得到4-(3-氨基丙氧基)-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(2.9g,61%),呈淡黄色油状物。LCMS (ESI):m/z 258 (M+H)⁺;RT=1.6min。

[0090] 实施例9

[0091] 4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(10)合成

[0092] 将4-(3-氨基丙氧基)-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(9) (3.0g,11.67mmol)溶于吡啶(20mL),加入苯甲酰氯(1.8g,12.84mmol)。将混合物在室温搅拌20分钟。用TLC监控反应完

成后,加入氯仿和水,分出水层,用铝方再度提取。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,得到粗产物。粗产物通过NH硅胶柱层析(DCM:MeOH=20:1到10:1),得到4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(3.7g,87%),呈白色固体。LCMS(ESI):m/z 362(M+H)⁺;RT=1.0min.

[0093] 实施例10

[0094] 4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N,N'-二氧化物(11)合成

[0095] 将4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶(10)(1.0g,2.77mmol)溶于70mL氯仿,在10℃下分批加入间氯过氧苯甲酸(3.2g,13.85mol,75%wt)。在室温搅拌2小时,用TLC监控反应完成后,相继用饱和碳酸氢钠溶液,盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压蒸去溶剂,得到粗产物。粗产物通过NH硅胶柱层析(DCM:MeOH=30:1到10:1),得到4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N,N'-二氧化物(750mg,69%),呈白色固体。LCMS(ESI):m/z394(M+H)⁺;RT=1.6min。

[0096] 实施例11

[0097] 4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二乙酰氧基甲基-2,2'-联吡啶(12)合成

[0098] 将4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-N,N'-二氧化物(11)(1.5g,3.81mmol)和乙酸酐(30mL)混合,回流15分钟。用TLC监控反应完成后,将混合物蒸发至干,得到粗产物。粗产物通过NH硅胶柱层析(DCM:MeOH=30:1),得到4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二乙酰氧基甲基-2,2'-联吡啶(1.9g,95%),呈黄色固体。LCMS(ESI):m/z 478(M+H)⁺;RT=1.0min。

[0099] 实施例12

[0100] 4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二羟甲基甲基-2,2'-联吡啶(13)合成

[0101] 将4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二乙酰氧基甲基-2,2'-联吡啶(12)(1.9g,3.98mmol)溶于甲醇(20mL),加入1N氢氧化钠水溶液(2mL)。将混合物在室温搅拌1小时。用TLC监控反应完成后,加水,用乙酸乙酯提取3次。合并有机层,,用无水硫酸钠干燥,过滤,减压蒸发,得到粗产物。粗产物通过NH硅胶柱层析(DCM:MeOH=30:1到10:1),得到4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二羟甲基甲基-2,2'-联吡啶(800mg,51%),成黄色油状物。LCMS(ESI):m/z 394(M+H)⁺;RT=2.3min。

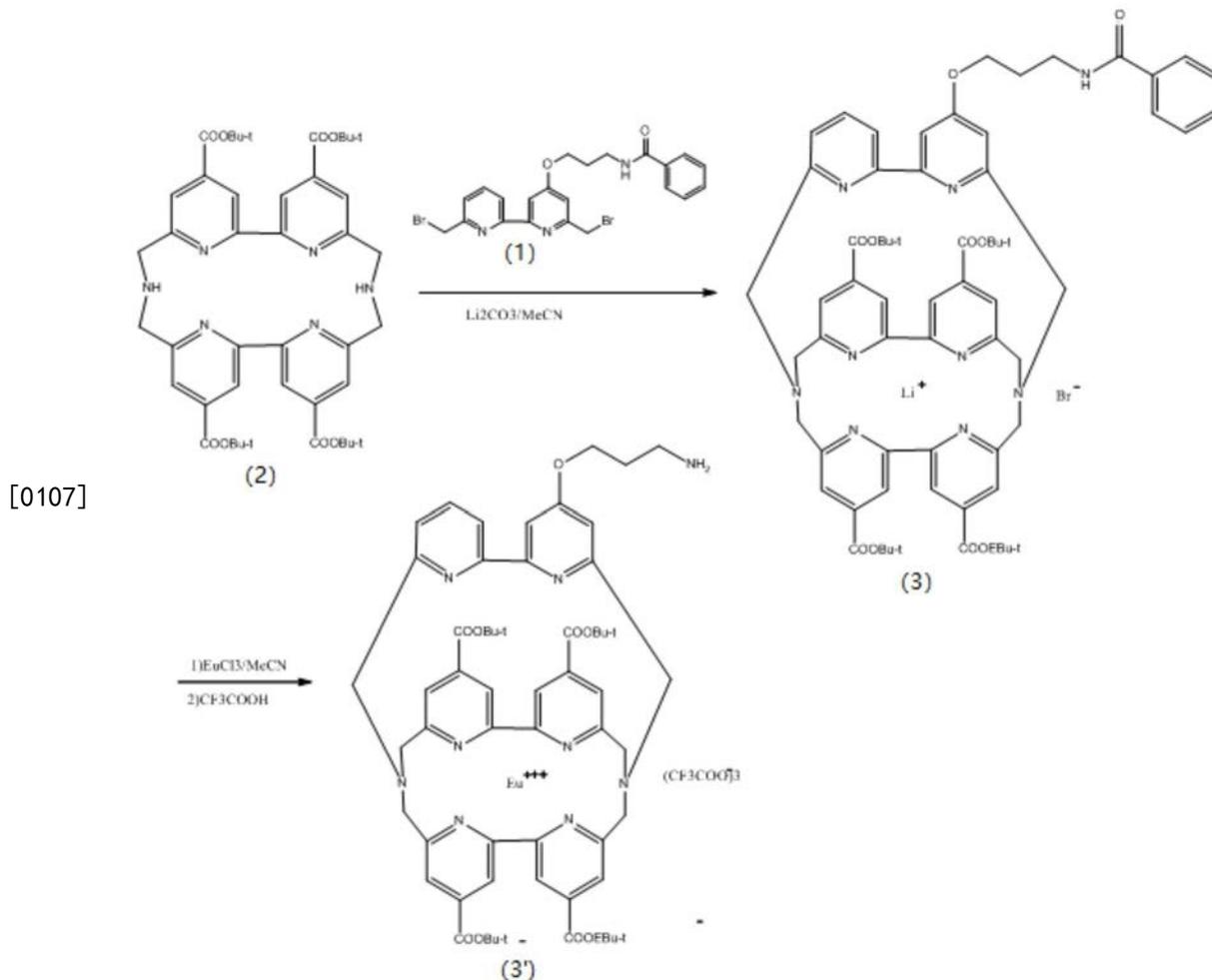
[0102] 实施例13

[0103] 4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二溴甲基-2,2'-联吡啶(1)的合成

[0104] 将4-(3-苯甲酰氨基丙氧基)-6,6'-二羟甲基甲基-2,2'-联吡啶(13)(200mg,0.51mmol)溶于DMF(10mL),在0℃加入三溴化磷(0.1mL),。将混合物在室温搅拌30分钟。用TLC监控反应完成后,倒入冰水中。用1N氢氧化钠水溶液调节pH至9,用乙酸乙酯提取3次。合并有机层,用盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压蒸发,得到粗产物。粗产物通过NH硅胶柱层析(DCM:MeOH=150:1),得到化合物(1)(80mg,30%),呈白色固体。LCMS(ESI):m/z 520(M+H)⁺;RT=3.2min.HPLC:96%,RT=4.9min.¹H NMR(400MHz,CDC13) δ8.37(d,J=7.1Hz,1H),7.95(d,J=2.3Hz,1H),7.80(m,3H),7.48(m,4H),7.00(d,J=2.3Hz,1H),6.50(s,1H),4.62(s,2H),4.56(s,2H),4.31(t,J=5.8Hz,2H),3.72(dd,J=12.4,6.3Hz,2H),2.26-2.16(m,2H),如图1。

[0105] 实施例14

[0106] 本发明的穴状化合物(3')的合成路线如下:



[0108] 合成方法包括以下步骤:

[0109] A、将化合物(2)溶解于含碳酸锂的溶剂中,与化合物(1)反应,搅拌,然后置冰浴中冷却,过滤后,将滤液蒸发至干,残余物通过反相层析,得到化合物(3);

[0110] B、将三氯化铕和化合物(3)加入到溶剂中,回流,蒸去溶剂,溶于酸液中,在室温下搅拌,然后减压蒸去过量酸,将其浓缩至干,通过反相层析,得到化合物(3')。

[0111] 实施例15

[0112] 化合物(3)的合成

[0113] 在25ml无水乙腈中混合25.3mg (3.18×10^{-5} mol)化合物(2)(按US7087384所述方法合成)和27mg (3.65×10^{-4} mol)碳酸锂,在氮气保护下回流15分钟。在10分钟内逐滴加入16.06mg (3.1×10^{-5} mol)化合物(1),在无水乙腈的溶液中产生悬浮液。继续在这些条件下搅拌23小时,然后置冰浴中冷却,过滤。将滤液蒸发至干,残余物通过反相层析,用含1%TFA的乙腈/水洗脱,得到化合物(3)。

[0114] 所述无水乙腈溶剂可由乙醇、甲醇、乙醚、二甲亚砜或者二氧六环替代。

[0115] 实施例16

[0116] 化合物(3')的合成

[0117] 12.8mg (3.5×10^{-5} mol)六水三氯化铕和17.46mg (1.51×10^{-5} mol)化合物(3)一起加到在10ml无水乙腈的溶液中。反应混合物在氮气保护下回流3小时。然后冷却,蒸去溶剂。

残余物直接用于下步反应。

[0118] 所述无水乙腈溶剂可由乙醇、甲醇、乙醚、二甲亚砜或者二氧六环替代。

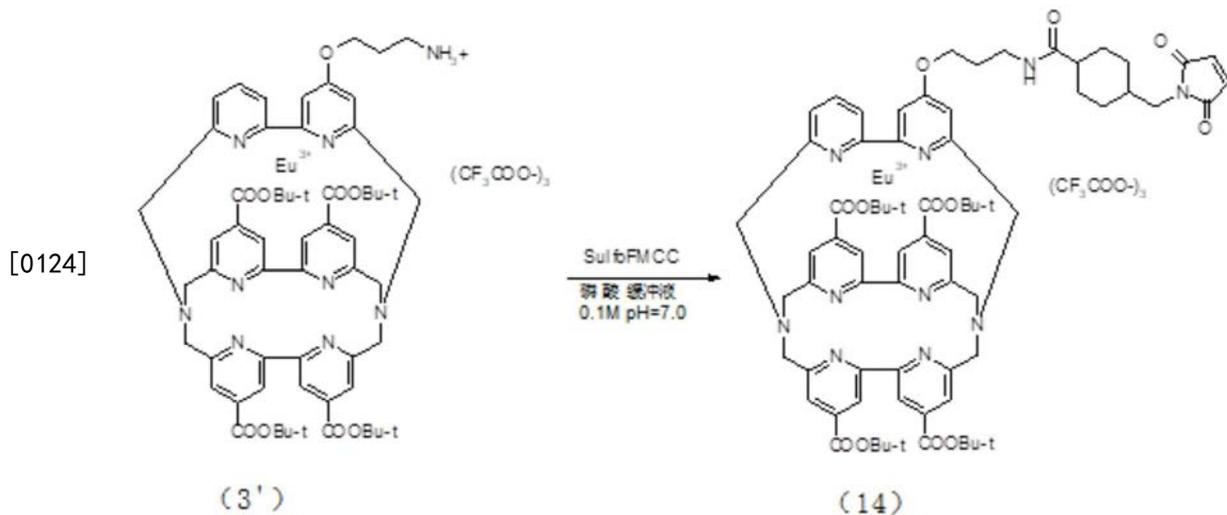
[0119] 将上步得到的残余物溶于14ml三氟乙酸中。所得均相溶液在室温搅拌4小时，然后减压蒸去过量酸，将其浓缩至干。通过反相层析，用含1%三氟乙酸/乙腈的水洗脱，得到四羧基丙酰氨基化合物的铕螯合物(化合物3')。

[0120] 其中的三氟乙酸可由盐酸等无机酸替代。

[0121] 实施例17

[0122] 穴状化合物(3')的马来酸亚胺基类活化

[0123] 在冰浴冷却下，向16.04mg (1.28×10^{-7} mol) 双环穴状化合物(3')在200 μ l 0.1M pH7.0的磷酸缓冲液的溶液中滴加由195 μ g (4.45×10^{-7} mol) 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC)在168 μ l磷酸缓冲液中的溶液。加毕，介质的温度升至20-25 $^{\circ}$ C，继续反应3小时。然后直接通过反相层析，用含1%三氟乙酸的乙腈洗脱，得到约100 μ g目标化合物活化的穴状化合物(14)。



[0125] 实施例18

[0126] 活化的穴状化合物(14)标记在抗人-TSH的 α -亚单元单克隆抗体

[0127] 首先把1mg抗人-TSH α -亚单元单克隆抗体(购于Mitsubishi chem.Co.)用pH8.3的0.05M硼酸缓冲溶液，2~8 $^{\circ}$ C透析四次。取出加入25mmol/L的PTT(二硫苏糖醇)常温搅拌反应25分钟后，加入活化的穴状化合物(14)0.2~0.5mg的低温反应20小时。

[0128] 用Sephadex G-50柱层析分离标记了穴状化合物的单抗和没在标记的单抗，用蛋白仪区分不同分子量的蛋白，同时检定标记到单抗的穴状化合物的比例。

[0129] 实施例19

[0130] 把抗人TSH的 β -亚单元单克隆抗体包被磁珠上。

[0131] 把1mg的抗人TSH β -亚单元单克隆抗体(购于Mitsubishi chem.Co.)用pH8.0的0.05M硼酸缓冲溶液，2~8 $^{\circ}$ C透析四次，最后取出体积不超过1ml。

[0132] 把10ml的粒径2微米(固含量2%)表面带羧基的磁微粒用磁铁吸在某一位置，吸出上清液，取5毫升25mM MES缓冲液(pH7.4)溶解，再加入混合均匀后加入5毫克NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)活化剂和2~5毫克EDC(碳二亚胺)活化剂，并充分搅拌30分钟；把活化后的磁珠用磁铁吸住，把上清液吸走，然后加入2毫升硼酸缓冲液(pH8.2)。

[0133] 把透析好的抗人TSH的 β -亚单元单克隆抗体放入活化的磁珠,低温振荡反应24小时后,用磁铁吸住,把上清液吸出,再注入10微升1%BSA封闭液,室温下振荡封闭12小时后,磁铁吸住,把上清液吸出,最后把稀释液加入,2~8℃低温贮存。

[0134] 实施例20

[0135] 促甲状腺素试剂盒的制备

[0136] 配制TSH标准品:配制TSH标准溶液,具体浓度分别是0、0.09、0.84、4.4、22.5、115mIU/L。

[0137] 把实施例19制备的抗人TSH β -亚单元单克隆抗体标记的磁珠和实施例18标记穴状化合物的抗人-TSH的 α -亚单元单克隆抗体分浓度调试,确定最合适的配比,然后与TSH标准品组合在一起,反应过程如下,取一定量的实施例15制备的抗人TSH β -亚单元单克隆抗体标记的磁珠放入管式反应器中加入标准品反应,旋转磁场反应1小时后,用电磁场分离磁珠,上清液取走,清洗,再加入实施例14标记穴状化合物的抗人-TSH的 α -亚单元单克隆抗体,旋转磁场反应1小时后,用电磁场分离磁珠,上清液取走,清洗。依次把剩下的五个标准品反应,检测,测定条件为:激发波长340nm;接收波长596nm和615nm;迟延时间0.2ms;窗口时间0.4ms;循环时间1.0ms。结果如下:促甲状腺素的工作曲线见图2,该工作曲线具有较好的线性,结合表1数值和图2可知,该检测方法具有良好的灵敏度,且实现了时间分辨荧光检测的自动化。

[0138] 表1时间分辨荧光免疫检测法测定促甲状腺素

[0139]

浓度	荧光强度
115mIU/L	8518461
	8331347
22.5mIU/L	1419195
	1426319
4.4mIU/L	220795
	235914
0.84mIU/L	43200
	42520
0.09mIU/L	6128
	6300
0mIU/L	1836
	1890

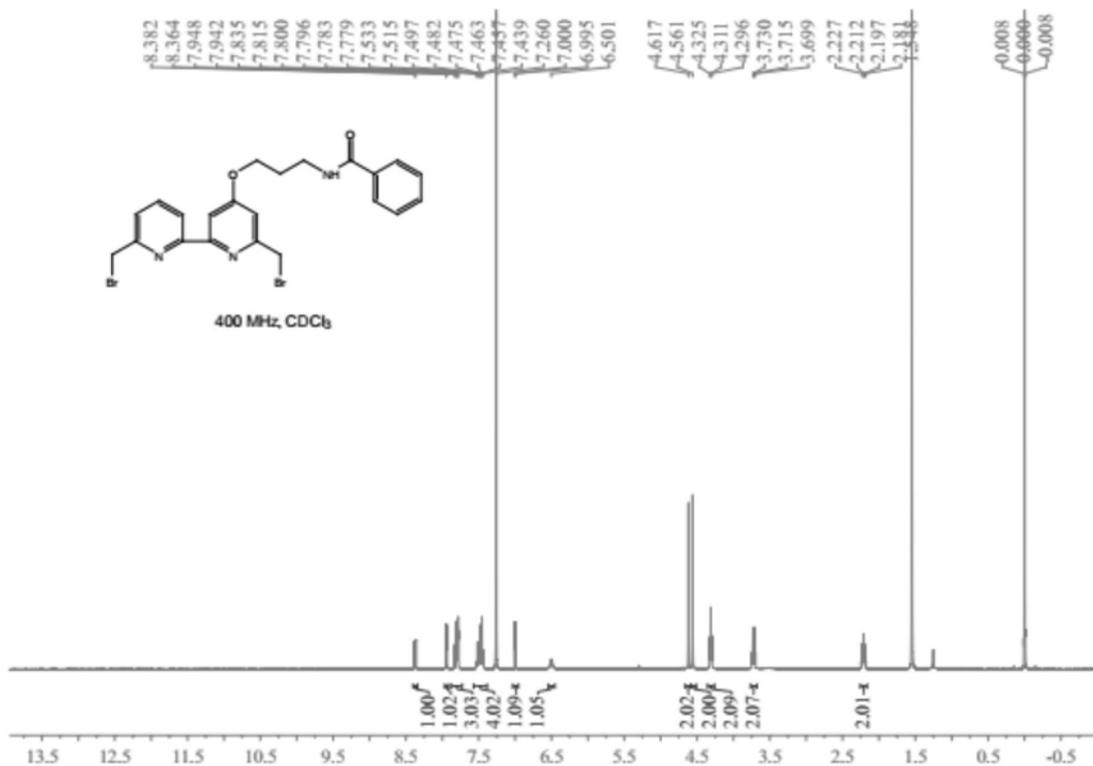


图1

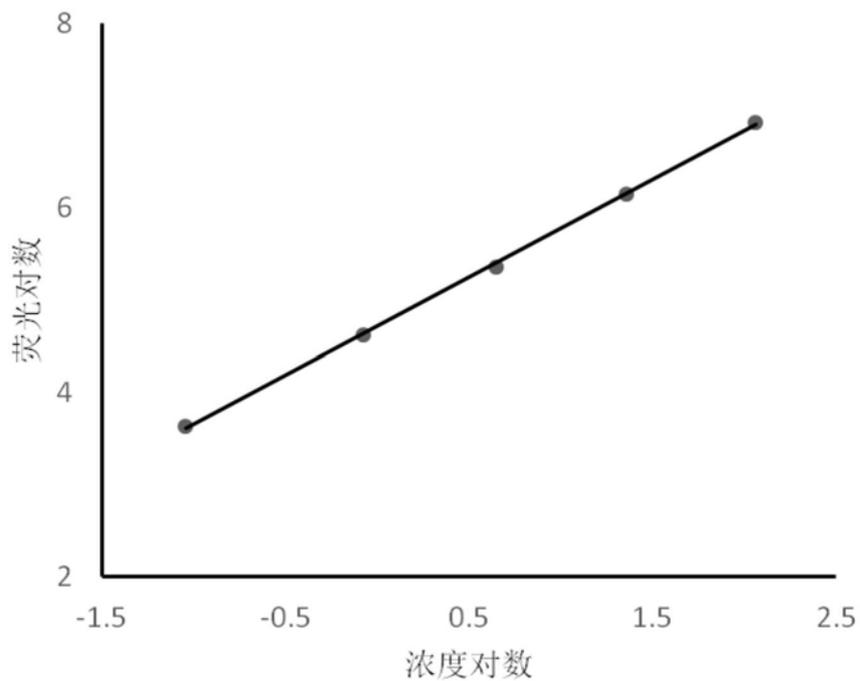


图2