



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107266472 B

(45)授权公告日 2019.07.05

(21)申请号 201710522083.4

(22)申请日 2017.06.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107266472 A

(43)申请公布日 2017.10.20

(73)专利权人 叶水盛
地址 130000 吉林省长春市朝阳区力旺广
场B座12楼

(72)发明人 叶水盛 江银贵 叶育鑫 范秀荣
董秋阳

(74)专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务
所(普通合伙) 22210
代理人 陶尊新

(51)Int.Cl.
C07D 498/22(2006.01)
C09K 11/06(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

柴永真等.6,6'-二甲基-2,2'-联吡啶-4,4'-二甲酸甲酯的合成与表征.《应用化学》.2017,
Nicola Alzakhem等.Dependence of the
Photophysical Properties on the Number of
2,2'-Bipyridine Units in a Series of
Luminescent Europium and Terbium
Cryptates.《Inorg. Chem.》.2012,
Beatrice Alpha等.116. Synthesis and
Characterisation of the Sodium and
Lithium Cryptates of Macrobicyclic
Ligands Incorporating Pyridine,
Bipyridine, and Bisoquinoline Units.
《HELVETICAH IMICACTA》.1988,
刘巍.均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂中
间体的合成.《中国优秀硕士学位论文全文数据库-工程科技I辑》.2017,

审查员 张楠

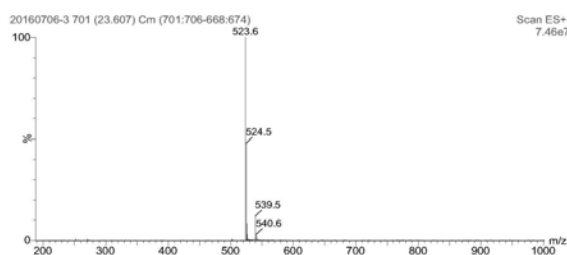
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

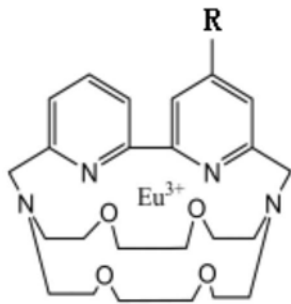
一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体、螯合剂及制备方法

(57)摘要

本发明提供一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体、螯合剂及制备方法,属于荧光免疫分析、有机合成技术领域。该中间体的结构式如式I所示,该结构利用含氮杂冠醚具有良好的水溶性,且能与联吡啶经过取代反应形成穴状化合物,所述的穴状结构的化合物既能吸收激发光并传递能量给Eu³⁺,又对Eu³⁺有较强的螯合作用,既增加螯合剂的稳定性和抗干扰性,又提高了螯合剂的水溶性;本发明还提供一种时间分辨荧光免疫分析螯合剂及其制备方法,该螯合剂的结构式如式II所示,本发明的螯合剂激发光谱波长范围较宽为200-380nm,最大激发光波长为363nm,有效扩展了其激发范围;并且获得了在不同溶剂中的荧光光谱和荧光寿命。



1. 一种均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂, 其特征在于, 该螯合剂的结构式如式 II 所示:



式 II

式 II 中, R 为酯基;

所述的酯基为甲酯基、乙酯基或叔丁酯基。

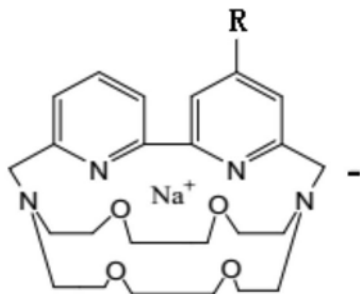
2. 根据权利要求 1 所述的一种均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂的制备方法, 其特征在于, 该方法包括:

将溶剂和中间体加入反应瓶, 再加入 EuCl_3 氯仿液, 回流 20-60h, 冷却到室温, 减压浓缩、分离, 得到时间分辨荧光免疫分析螯合剂;

所述的中间体的制备方法, 该方法包括:

将 4, 13-二氮杂-18-冠-6-醚、 NaCO_3 和 CH_3CN 加入反应瓶中, 搅拌溶解, 升温至 77-87 $^\circ\text{C}$, 然后加入 6, 6'-二溴二甲基-2, 2'-联吡啶-4-酯基溶液, 回流反应 24-60h, 冷却到室温, 减压浓缩后过硅胶柱, 得到一种时间分辨荧光免疫分析中间体;

所述的中间体结构式如式 I 所示:



式 I

式 I 中, R 为酯基;

所述的酯基为甲酯基、乙酯基或叔丁酯基。

3. 根据权利要求 2 所述的一种均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂的制备方法, 其特征在于, 所述中间体与 EuCl_3 的质量比为 1:1-1:2。

4. 根据权利要求 2 所述的一种均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂的制备方法, 其特征在于, 所述的 6, 6'-二溴二甲基-2, 2'-联吡啶-4-酯基为 6, 6'-二溴二甲基-2, 2'-联吡啶-4-甲酸甲酯、6, 6'-二溴二甲基-2, 2'-联吡啶-4-乙酯或 6, 6'-二溴二甲基-2, 2'-联吡啶-4-叔丁酯。

5. 根据权利要求 2 所述的一种均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂的制备方法, 其特征在于, 所述的 4, 13-二氮杂-18-冠-6-醚与 6, 6'-二溴二甲基-2, 2'-联吡啶-4-酯基的摩尔比为 1:1-1:1.5。

一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体、螯合剂及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于荧光免疫分析、有机合成技术领域,具体涉及一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体、螯合剂及制备方法。

背景技术

[0002] 均相免疫分析是一种不经冲洗分离结合与游离标记物,在液相中即可直接测量的分析方法。此方法由于操作简便,快速,易于实现自动化操作,故长期以来成为免疫分析方法学研究追求的主要目标之一。

[0003] 自1972年Rubenstein报告均相酶标记免疫分析方法之后,有关均相和非均相酶标记分析报告多达10000余份,研究报告证明均相分析由于不能排除血浆中蛋白,血红素和多种酶的干扰,使其灵敏度降低,因此最多用于体液中浓度较高的某些药物的分析。

[0004] 为解决上述酶作用底物显色易受血浆成分及外环境干扰,Boguslaski等(1980)用荧光染料代替酶标记发表了荧光均相免疫分析方法。荧光染料光学性质稳定,被广泛应用,但又遇到新的问题,在液相产生Raman散射以及其他大分子产生的波长为300-600nm的本底荧光,与检测荧光波长大部分重叠,而且其发光寿命都在1-50ns,降低了信号/噪声比,使分析的灵敏度降低。均相免疫分析的灵敏度还有一个限制因素,是其测量信号依赖加入启动剂或淬灭剂产生的测量信号或清除测量信号,这种机制难以提供足够强的测量信号。

[0005] 时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术是上个世纪80年代发展起来的一项新型非放射性免疫分析技术,它以稀土离子作为荧光探针,量子产率高,Stokes位移大,发射峰窄,激发和发射波长理想,荧光寿命长。采用时间分辨技术,可消除激发光源的光、电干扰及样品池等发出的短寿命荧光,成为目前无放射污染的高灵敏度的又有发展前途的免疫分析方法。

[0006] 1948年Forster提出了荧光共振能量转移理论,描述了当一对合适的荧光物质可以构成一个能量供体(donor)和能量受体(acceptor)对,它们之间由于偶极-偶极的相互作用,激发供体分子的光子能量 $h\nu$ 可能被传递至受体分子而后受体分子通过发射出光子 $h\nu_c$ ($h\nu > h\nu_c$)而松弛,其直观的表现就是供体和受体之间达到合适的间隔内(1~10nm),以供体的激发光激发,供体产生的荧光强度比它单独存在时要低得多,而受体发射的荧光却大大增强,同时伴随它们的荧光寿命的相应缩短和拉长。能量传递的效率和供体的发射光谱与受体的吸收光谱的重叠程度、供体与受体的跃迁偶极的相对取向、供体与受体之间的间隔等有关。

[0007] 将时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术和能量共振转移理论(FRET)相结合,为均相免疫分析提供了新的途径,但实现能量转移的条件是供体(D)与受体(A)之间的距离必须在10nm内,使D的能量转移至A,使后者发射出可供测量的信号,由此可显著提高信号/噪声比。

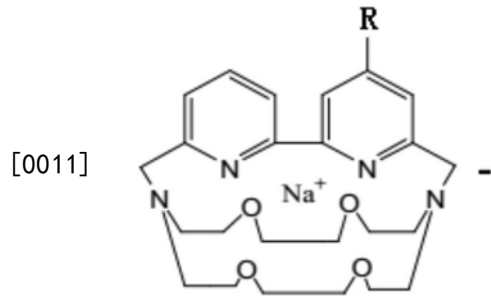
[0008] 由于生物样品的高度复杂性,对于均相标记用的稀土荧光探针作为能量供体D提出了很高的要求,例如较大的荧光量子产率、摩尔吸光系数和较长的荧光寿命、较好的水溶

性、稳定性,合成简便,易于生物分子标记,对所标记的生物分子的影响尽可能小等。迄今只有少数能达到产业化应用要求,因此,稀土双功能螯合剂面临着结构的改进和性能的完善。

发明内容

[0009] 本发明的目的是为了提供均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂,同时提供了螯合剂的中间体及制备方法。该螯合剂具有较好的水溶性和较长的荧光寿命。

[0010] 本发明首先提供一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体,该中间体的结构式如式 I 所示:



式 I

[0012] 式 I 中,R为酯基。

[0013] 优选的是,所述的酯基为甲酯基、乙酯基或叔丁酯基。

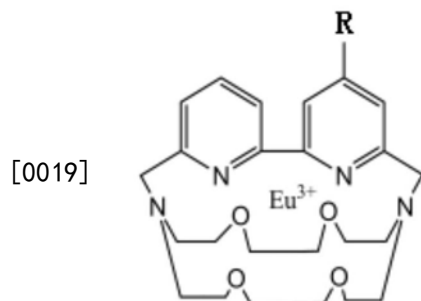
[0014] 本发明还提供一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体的制备方法,该方法包括:

[0015] 将4,13-二氮杂-18-冠-6-醚、 NaCO_3 和 CH_3CN 加入反应瓶中,搅拌溶解,升温至77-87 $^\circ\text{C}$,然后加入6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-酯基溶液,回流反应24-60h,冷却到室温,减压浓缩后过硅胶柱,得到一种时间分辨荧光免疫分析中间体。

[0016] 优选的是,所述的6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-酯基为6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-甲酯、6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-乙酯或6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-叔丁酯。

[0017] 优选的是,所述的4,13-二氮杂-18-冠-6-醚与6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-酯基的摩尔比为1:1-1:1.5。

[0018] 本发明还提供一种上述中间体制备得到的均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂,该螯合剂的结构式如式 II 所示:



式 II

[0020] 式 II 中,R为酯基。

[0021] 本发明还提供一种均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂的制备方法,该方法包括:

[0022] 将溶剂和中间体加入反应瓶,再加入 EuCl_3 氯仿液,回流20-60h,冷却到室温,减压

浓缩、分离,得到时间分辨荧光免疫分析螯合剂。

[0023] 优选的是,所述中间体与 EuCl_3 的质量比为1:1-1:2。

[0024] 本发明的有益效果

[0025] 本发明首先提供一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体及其制备方法,该中间体的结构式如式I所示,该结构利用含氮杂冠醚具有良好的水溶性,且能与联吡啶经过取代反应形成穴状化合物,所述的穴状结构的化合物既能吸收激发光并传递能量给 Eu^{3+} ,又对 Eu^{3+} 有较强的螯合作用,既增加螯合剂的稳定性和抗干扰性,又提高了螯合剂的水溶性;且含氮杂冠醚的配位能力介于与碱金属、碱土金属强配位的全氧冠醚和与过渡金属离子强配位的全氮大环多胺之间,它们对有机离子及多种金属离子及有良好的配位能力;在联吡啶4位上引入单羧酸乙酯用于连接蛋白分子,有利于减少蛋白质分子连接过程中的副反应。

[0026] 本发明还提供一种均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂及其制备方法,该螯合剂的结构式如式II所示,该螯合剂具有热稳定性和动力学螯合稳定性、水溶性、有合适的激发波长、发射波长,能与稀土离子实行能量转移的三重态和允许在螯合剂和生物分子之间形成共价连接的功能基团,并具有较长的荧光寿命,可用于蛋白质标记。本发明的螯合剂激发光谱波长范围较宽为200-380nm,最大激发光为363nm,相对于原有的对称联吡啶结构红移约50nm,有效扩展了其激发范围;最大发射光为583nm (${}^5\text{D}_0-{}^7\text{F}_0$), 621nm (${}^5\text{D}_0-{}^7\text{F}_2$);斯托克斯位移为258nm;并且获得了在不同溶剂(DMF、 CH_3OH)中的荧光光谱和荧光寿命。该螯合剂较好地解决了“提高水溶性”和“激发波长红移”的问题,为时间分辨荧光免疫分析提供了关键技术,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0027] 图1为本发明实施例1制备得到均相时间分辨荧光免疫分析中间体的质谱图;

[0028] 图2为本发明实施例1制备得到均相时间分辨荧光免疫分析中间体的核磁谱图;

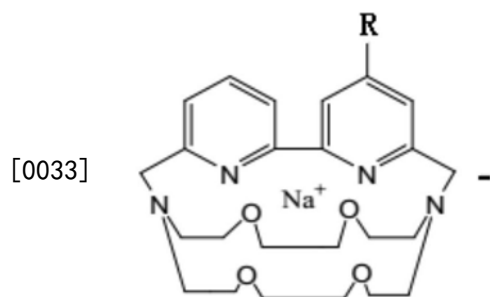
[0029] 图3为本发明实施例5制备得到的螯合剂的荧光激发光谱图;

[0030] 图4为本发明实施例5制备得到的螯合剂的荧光发射光谱图;

[0031] 图5为本发明实施例5制备得到的螯合剂在甲醇和DMF溶剂中的荧光寿命图。

具体实施方式

[0032] 本发明首先提供一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体,该中间体的结构式如式I所示:



式 I

[0034] 式I中,R为酯基,优选为甲酸甲酯基、甲酸乙酯基或乙酸丁酯基。

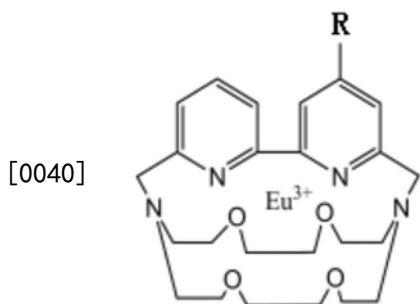
[0035] 本发明还提供一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体的制备方法,该方法包括:

[0036] 将4,13-二氮杂-18-冠-6-醚、NaCO₃和CH₃CN加入反应瓶中,搅拌溶解,升温至77-87℃,然后加入6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-酯基溶液,回流反应24-60h,优选30-40h,冷却到室温,减压浓缩后过硅胶柱(CH₂C₁₂:CH₃OH=85:15),得到一种时间分辨荧光免疫分析中间体。

[0037] 按照本发明,所述的6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-酯基优选为6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-甲酸甲酯、6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-乙酯或6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-叔丁酯。

[0038] 按照本发明,所述的4,13-二氮杂-18-冠-6-醚与6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-酯基的摩尔比优选为1:1-1:1.5,更优选为1:1;所述的4,13-二氮杂-18-冠-6-醚与NaCO₃摩尔比优选为1:10。

[0039] 本发明还提供一种上述中间体制备得到的均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂,该螯合剂的结构式如式II所示:



式 II

[0041] 式 II 中,R为酯基,优选为甲酯基、乙酯基或叔丁酯基。

[0042] 本发明的螯合剂具有热稳定性和动力学螯合稳定性、水溶性、有合适的激发波长、发射波长,能与稀土离子实行能量转移的三重态和允许在螯合剂和生物分子之间形成共价连接的功能基团,并具有较长的荧光寿命,可用于蛋白质标记。本发明的螯合剂激发光谱波长范围较宽为200-380nm,最大激发光为363nm,相对于原有的对称联吡啶结构红移约50nm,有效扩展了其激发范围;最大发射光为583nm (⁵D₀-⁷F₀),621nm (⁵D₀-⁷F₂);斯托克斯位移为258nm;并且获得了在不同溶剂(DMF、CH₃OH)中的荧光光谱和荧光寿命。

[0043] 本发明还提供一种均相时间分辨荧光免疫分析螯合剂的制备方法,该方法包括:

[0044] 将溶剂和中间体加入反应瓶,再加入EuCl₃氯仿液,回流20-60h,冷却到室温,减压浓缩、分离,得到时间分辨荧光免疫分析螯合剂。

[0045] 按照本发明,先将中间体溶于溶剂中,然后将EuCl₃的氯仿溶液加入到中间体溶液中,回流20-60h,优选为24-40h,冷却到室温,减压浓缩、优选用三氧化二铝柱(CH₃CN:0.1%的TFA溶液=7:3)分离,得到时间分辨荧光免疫分析螯合剂。所述的溶剂优选为甲醇或乙腈。

[0046] 按照本发明,所述中间体与EuCl₃的质量比优选为1:1-1:2;所述的中间体的质量(mg):溶剂的体积(mL)比为16.93:(5-30),所述的EuCl₃的质量(mg):氯仿的体积(mL)比为(16.93-33.86):10。

[0047] 本发明的螯合剂在紫外光源激发下,发出583nm (⁵D₀-⁷F₀),621nm (⁵D₀-⁷F₂) 铕离子特征峰。

[0048] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的说明

具体实施方式

[0049] 实施例1

[0050] 6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-甲酸甲酯-Na的合成

[0051] 将78.6mg的4,13-二氮杂-18-冠-6-醚、318mg NaCO₃、150mL CH₃CN加入反应瓶中,搅拌溶解,升温至82℃,加入120mg 6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-甲酸甲酯的CH₃CN(50mL)溶液,回流反应24h,冷却到室温,减压浓缩后过硅胶柱(CH₂C₁₂:CH₃OH=85:15),得到白色固体。产率为45.3%。

[0052] 图1为本发明实施例1制备得到的中间体的质谱图,MS(70eV)m/z(%):(M+Na)⁺=523,(M+K)⁺=539与6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-甲酸甲酯-Na的分子量理论值相符。

[0053] 图2为本发明实施例1制备得到的中间体的核磁谱图,¹H-NMR(CDC₁₃,400MHz)δ:8.40-7.41(5H,-C₅N);4.03(3H,-CH₃);3.93(4H,-CH₂N);3.88-2.65(s,24H,C₁₂O₄H₂₄N₂)。具体解析为:δ:8.40-7.41多重峰,是吡啶环上的6个氢;δ:4.03单重峰,4-位羧酸酯中-CH₃中的3个氢;δ:3.93是6,6'-两个亚甲基的4个氢;δ:3.88-2.65为含氮杂冠醚上的24个氢;δ:7.26是测样时溶剂CDC₁₃的出峰位置,δ:1.67是水峰,其对数据分析无影响。¹H-NMR数据各氢总数、出峰位置与C₂结构吻合。从上述谱图可以看出,6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-甲酸甲酯Na⁺的结构正确。

[0054] 实施例2

[0055] 6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-甲酸甲酯-Na的合成

[0056] 将78.6mg的4,13-二氮杂-18-冠-6-醚、318mg NaCO₃、150mLCH₃CN加入反应瓶中,搅拌溶解,升温至82℃,加入120mg 6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-甲酸甲酯的CH₃CN(50mL)溶液,回流反应30h,冷却到室温,减压浓缩后过硅胶柱(CH₂C₁₂:CH₃OH=85:15),得到白色固体。产率36.8%。

[0057] 实施例3

[0058] 6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-乙酯-Na的合成

[0059] 将78.6mg的4,13-二氮杂-18-冠-6-醚、318mg NaCO₃、150mL CH₃CN加入反应瓶中,搅拌溶解,升温至77℃,加入120mg 6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-乙酯的CH₃CN(50mL)溶液,回流反应40h,冷却到室温,减压浓缩后过硅胶柱(CH₂C₁₂:CH₃OH=85:15),得到白色固体。产率38.8%。

[0060] 实施例4

[0061] 6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-叔丁酯-Na的合成

[0062] 将78.6mg的4,13-二氮杂-18-冠-6-醚、318mg NaCO₃、150mL CH₃CN加入反应瓶中,搅拌溶解,升温至87℃,加入120mg 6,6'-二溴二甲基-2,2'-联吡啶-4-叔丁酯的CH₃CN(50mL)溶液,回流反应24h,冷却到室温,减压浓缩后过硅胶柱(CH₂C₁₂:CH₃OH=85:15),得到白色固体。产率38.8%。

[0063] 实施例5

[0064] 6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-甲酸甲酯-Eu³⁺合成

[0065] 将实施例1制备得到的16.93mg中间体溶于5mL甲醇中,得到中间体溶液,将16.93mgEuCl₃溶解在10mL氯仿,得到EuCl₃溶液,将EuCl₃溶液加入到中间体溶液中回流反应20h,冷却到室温,减压浓缩,然后过三氧化二铝柱(CH₃CN:0.1%的TFA溶液=7:3),得到淡黄色晶体。产率为35.3%。

[0066] 图3为本发明实施例5制备得到的螯合剂的荧光激发光谱图;由图3可知,该螯合剂的激发光谱的波长范围为200-380nm,最大激发波长为363nm。

[0067] 图4为本发明实施例5制备得到的螯合剂的荧光发射光谱图;由图4可知,该螯合剂的激发波长为363nm,发射波长为583nm、594nm、621nm。

[0068] 图5为本发明实施例5制备得到的螯合剂在甲醇和DMF溶剂中的荧光寿命图,从图5看出,该螯合剂甲醇液和DMF液的荧光寿命基本相同,约为1456μs。

[0069] 实施例6

[0070] 6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-甲酸甲酯-Eu³⁺合成

[0071] 将实施例2制备得到的16.93mg中间体溶于10mL甲醇中,得到中间体溶液,将16.93mgEuCl₃溶解在10mL氯仿中,得到EuCl₃溶液,将EuCl₃溶液加入到中间体溶液中回流反应24h,冷却到室温,减压浓缩,然后过三氧化二铝柱(CH₃CN:0.1%的TFA溶液=7:3),得到淡黄色晶体。产率39.5%。

[0072] 实施例7

[0073] 6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-乙酯-Eu³⁺合成

[0074] 将实施例3制备得到的16.93mg中间体溶于25mL甲醇中,得到中间体溶液,将16.93mgEuCl₃溶于10mL氯仿中,得到EuCl₃溶液,将EuCl₃溶液加入到中间体溶液中,回流反应40h,冷却到室温,减压浓缩,然后过三氧化二铝柱(CH₃CN:0.1%的TFA溶液=7:3),得到淡黄色晶体。产率39%。

[0075] 实施例8

[0076] 6,6'-{[4,13-二氮杂-18-冠-6-醚]二(氨甲基)}-2,2'-联吡啶-4-叔丁酯-Eu³⁺合成

[0077] 将实施例4制备得到的16.93mg中间体溶于30mL甲醇中,得到中间体溶液,将33.86mgEuCl₃溶解在10mL氯仿,得到EuCl₃溶液,将EuCl₃溶液加入到中间体溶液中回流反应40h,冷却到室温,减压浓缩,然后过三氧化二铝柱(CH₃CN:0.1%的TFA溶液=7:3),得到淡黄色晶体。产率39%。

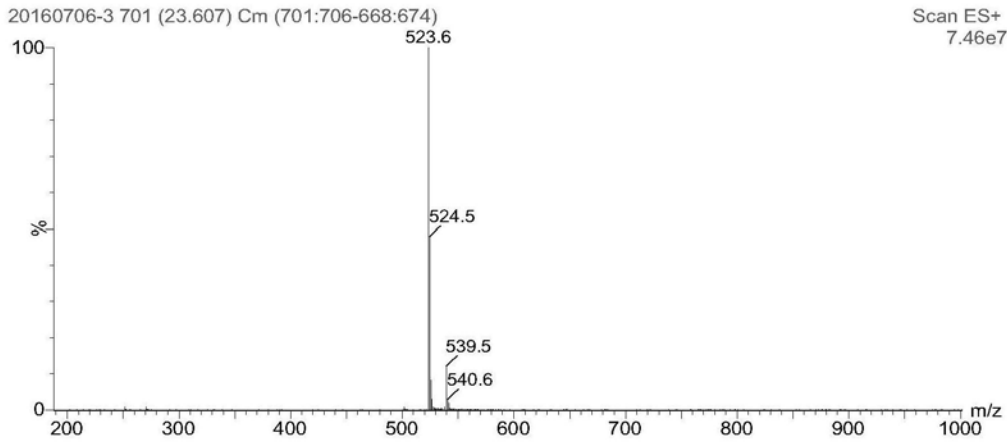


图1

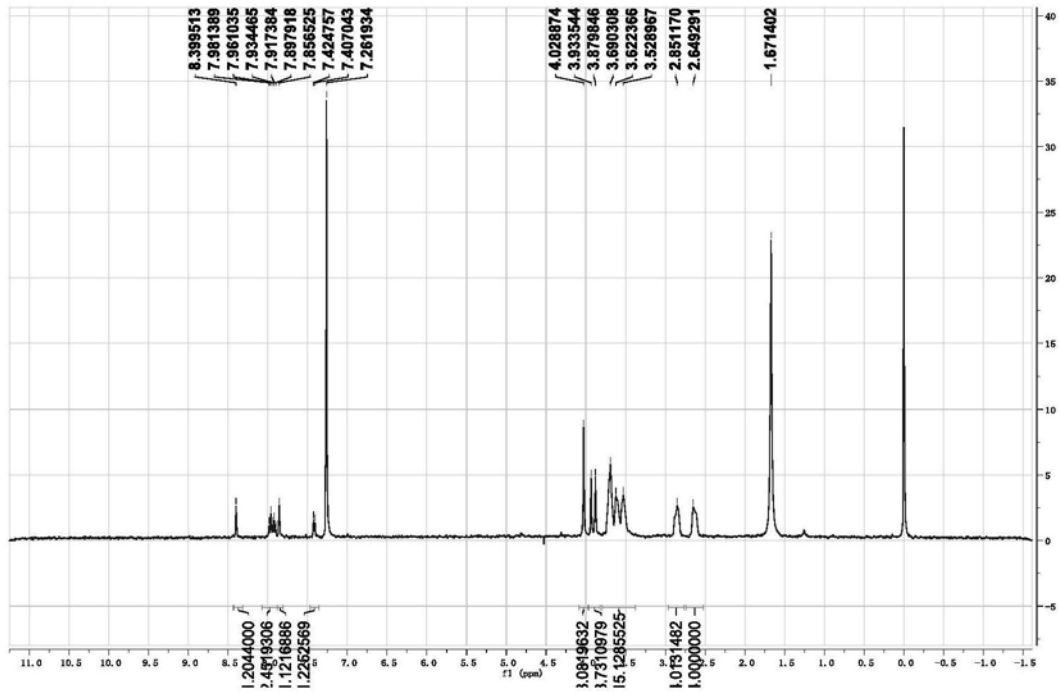


图2

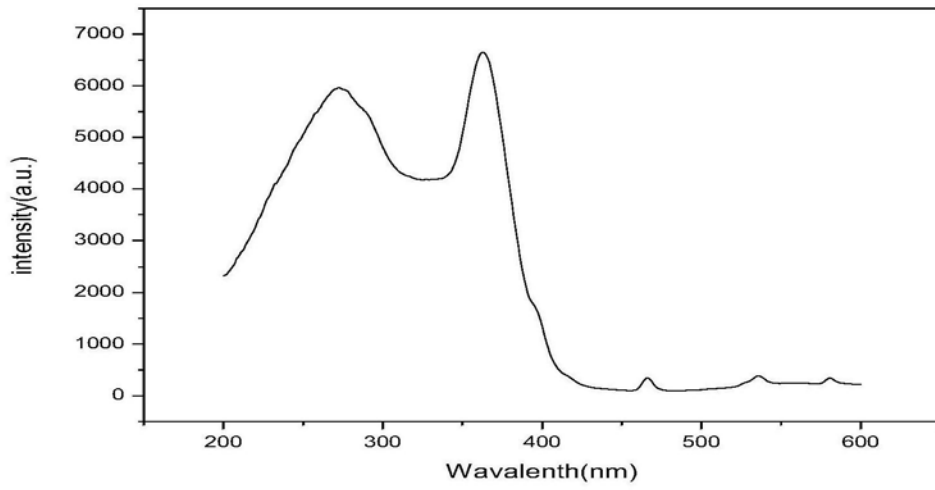


图3

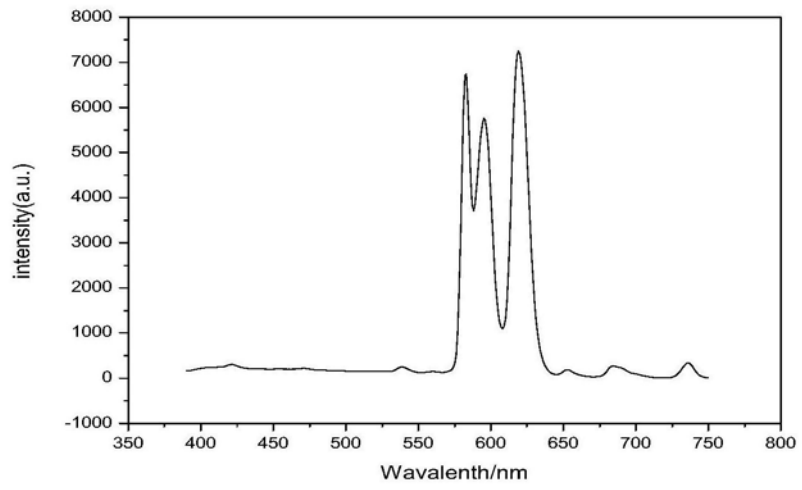


图4

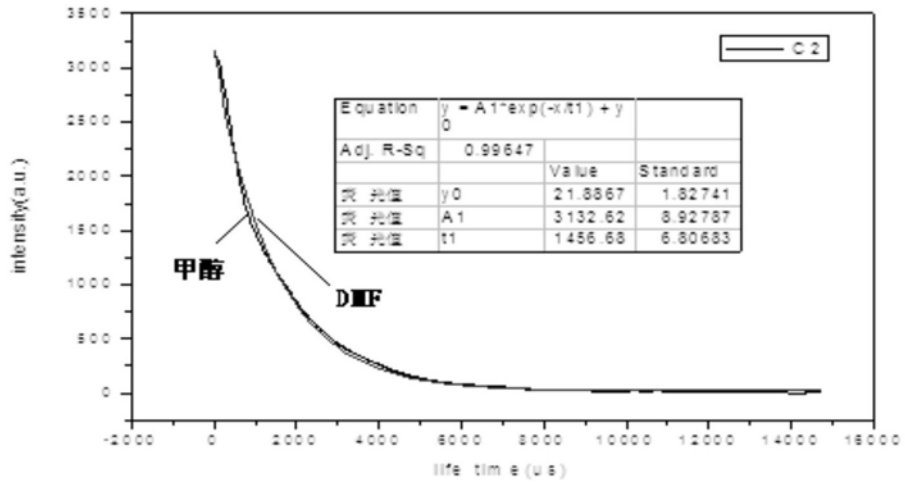


图5

专利名称(译)	一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体、螯合剂及制备方法		
公开(公告)号	CN107266472B	公开(公告)日	2019-07-05
申请号	CN201710522083.4	申请日	2017-06-30
[标]发明人	叶水盛 江银贵 叶育鑫 范秀荣 董秋阳		
发明人	叶水盛 江银贵 叶育鑫 范秀荣 董秋阳		
IPC分类号	C07D498/22 C09K11/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07D498/22 C09K11/06 C09K2211/1029 C09K2211/1055 C09K2211/1077 G01N33/53		
审查员(译)	张楠		
其他公开文献	CN107266472A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种均相时间分辨荧光免疫分析中间体、螯合剂及制备方法，属于荧光免疫分析、有机合成技术领域。该中间体的结构式如式I所示，该结构利用含氮杂冠醚具有良好的水溶性，且能与联吡啶经过取代反应形成穴状化合物，所述的穴状结构的化合物既能吸收激发光并传递能量给Eu³⁺，又对Eu³⁺有较强的螯合作用，既增加螯合剂的稳定性和抗干扰性，又提高了螯合剂的水溶性；本发明还提供一种时间分辨荧光免疫分析螯合剂及其制备方法，该螯合剂的结构式如式II所示，本发明的螯合剂激发光谱波长范围较宽为200-380nm，最大激发光波长为363nm，有效扩展了其激发范围；并且获得了在不同溶剂中的荧光光谱和荧光寿命。

