



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113008845 B

(45) 授权公告日 2022.08.12

(21) 申请号 202110111839.2

C07D 405/12 (2006.01)

(22) 申请日 2021.01.27

C07D 311/82 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C07D 405/14 (2006.01)

申请公布号 CN 113008845 A

审查员 游清萍

(43) 申请公布日 2021.06.22

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区粤海街  
道高新技术产业园南区粤兴一道18号  
香港理工大学产学研大楼205室

(72) 发明人 黄文健 薛凯怡 邓丽莹 吕迎迎

(74) 专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事

务所(普通合伙) 44268

专利代理师 谢松

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

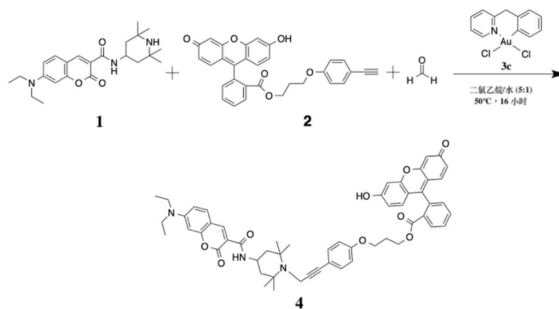
权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的  
甲醛检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法,包括:在溶解有待测样品的所述反应介质中加入带荧光基团的胺类、带荧光基团的炔烃以及金属催化剂,得到原始反应溶液;对原始反应溶液进行荧光检测,确定原始反应溶液对应的第一荧光发射峰强度;对原始反应溶液进行加热,使原始反应溶液中的各组分发生金属催化偶联反应,得到目标反应溶液;对目标反应溶液进行荧光检测,确定目标反应溶液对应的第二荧光发射峰强度;根据第一荧光发射峰强度和第二荧光发射峰强度,确定待测样品中的甲醛浓度。本发明采用荧光检测,配合荧光共振能量转移降低背景信号的干扰,省去洗脱步骤,使检测便捷,成本廉价且对甲醛选择性高。



1. 一种基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法,其特征在于,包括步骤:

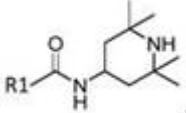
将待测样品溶解于反应介质中,并在溶解有待测样品的所述反应介质中加入带荧光基团的胺类、带荧光基团的炔烃以及金属催化剂,得到原始反应溶液;

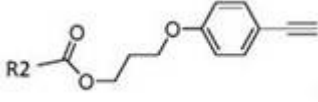
对所述原始反应溶液进行荧光检测,确定所述原始反应溶液对应的第一荧光发射峰强度;

对所述原始反应溶液进行加热,使所述待测样品中的甲醛、所述带荧光基团的胺类以及所述带荧光基团的炔烃在所述金属催化剂的催化作用下发生金属催化偶联反应,得到目标反应溶液,对原始反应溶液进行加热后,在加热条件下,待测样品中的甲醛、带荧光基团的胺类以及带荧光基团的炔烃在金属催化剂催化下会发生金属催化偶联反应,形成炔丙胺产物;

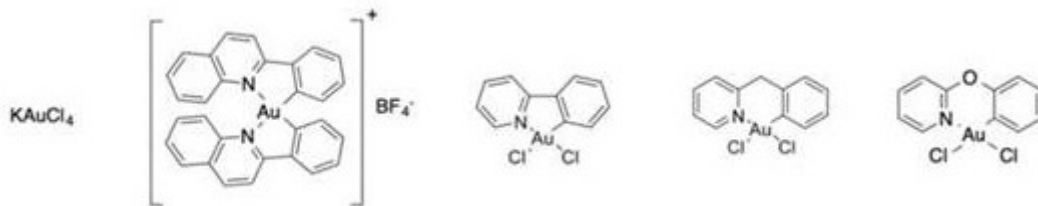
对所述目标反应溶液进行荧光检测,确定所述目标反应溶液对应的第二荧光发射峰强度;

根据所述第一荧光发射峰强度和所述第二荧光发射峰强度,确定所述待测样品中的甲醛浓度;

其中,所述带荧光基团的胺类为  其中,荧光基团R1为香豆素或荧光素;

所述带荧光基团的炔烃为  其中,荧光基团R2为香豆素或荧光素;

所述带荧光基团的胺类、带荧光基团的炔烃和金属催化剂的浓度比为1:1:0.02~0.1;  
所述金属催化剂为



中的一种;

所述反应介质为水、1,2-二氯乙烷、二甲基甲酰胺、二恶烷和乙酸乙酯中的一种或多种;

所述根据所述第一荧光发射峰强度和所述第二荧光发射峰强度,确定所述待测样品中的甲醛浓度的步骤包括:

根据所述第一荧光发射峰强度和所述第二荧光发射峰强度,确定荧光比;

根据所述荧光比以及预先确定的荧光比与甲醛浓度的对应关系,确定所述待测样品中的甲醛浓度;

所述荧光比的计算公式为:

$$R = 1 - F_{470\text{nm}}(T16) / F_{470\text{nm}}(T0)$$

其中,R为荧光比, $F_{470\text{nm}}$ (T16)为第二荧光发射峰强度, $F_{470\text{nm}}$ (T0)为第一荧光发射峰强度;

当所述带荧光基团的胺类的荧光基团为香豆素时,所述带荧光基团的炔烃的荧光基团为荧光素;当所述带荧光基团的胺类的荧光基团为荧光素时,所述带荧光基团的炔烃的荧光基团为香豆素。

## 基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学分析检测技术领域，具体涉及基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法。

### 背景技术

[0002] 甲醛是一种制造塑胶树脂的重要有机原料，广泛应用于造纸、纺织和木材业。人体大量接触甲醛可导致急性中毒、呕吐、休克、消化道出血、严重腹痛、昏迷，甚至死亡。国际癌症研究机构(IARC)的研究指出甲醛可导致人类罹患鼻咽癌，并引发白血病。长时间摄取甲醛的慢性毒性则包括基因毒性、神经毒性、生殖毒性、血液毒性和遗传毒性。

[0003] 为了更好地确保生活质量和安全，研究人员相继提出多种甲醛检测方法，包括分光光度法、电化学检测、气相色谱、液相色谱、化学滴定和荧光检测。但现有的甲醛检测方法的检测灵敏度和准确度容易受多种羰基化合物的干扰，且检测设备价格昂贵，设备操作复杂，需要专业技术人员操作，对多组分混合的食品样本检测需要冗长的预处理步骤。

[0004] 因此，现有技术还有待于改进和发展。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题在于，针对现有技术的上述缺陷，提供一种基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法，旨在解决现有甲醛检测方法的检测成本高，检测步骤复杂，且检测结果的灵敏度和准确度容易受多种羰基化合物的干扰的问题。

[0006] 本发明解决该技术问题所采用的技术方案是：一种基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法，包括步骤：

[0007] 将待测样品溶解于反应介质中，并在溶解有待测样品的所述反应介质中加入带荧光基团的胺类、带荧光基团的炔烃以及金属催化剂，得到原始反应溶液；

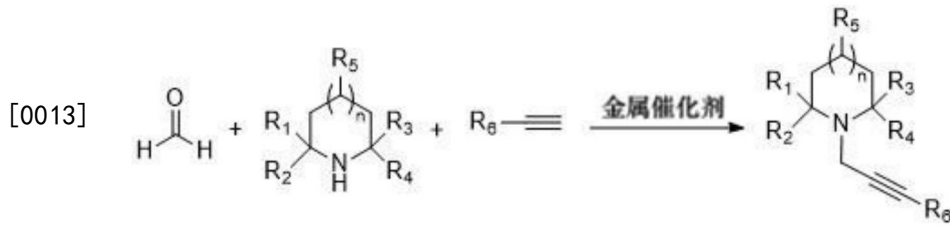
[0008] 对所述原始反应溶液进行荧光检测，确定所述原始反应溶液对应的第一荧光发射峰强度；

[0009] 对所述原始反应溶液进行加热，使所述待测样品中的甲醛、所述胺类以及所述炔烃在所述金属催化剂的催化作用下发生金属催化偶联反应，得到目标反应溶液；

[0010] 对所述目标反应溶液进行荧光检测，确定所述目标反应溶液对应的第二荧光发射峰强度；

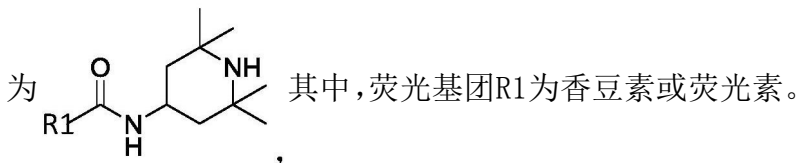
[0011] 根据所述第一荧光发射峰强度和所述第二荧光发射峰强度，确定所述待测样品中的甲醛浓度。

[0012] 所述的基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法，其中，所述金属催化偶联反应的反应式为：



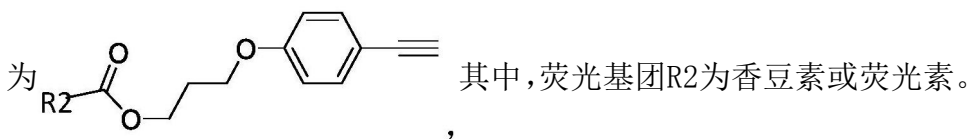
[0014] 其中,  $R_1$  至  $R_4$  为氢、卤素、杂原子、羟基、烷氧基、羧基、羰基、氰基、氨基、烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、杂原子芳基和取代杂原子芳基中的一种或多种;  $R_5$  为氢、卤素、杂原子、羟基、烷氧基、羧基、羰基、氰基、氨基、取代氨基、硝基、烧基、取代烷基、芳基、取代芳基、杂原子芳基和取代杂原子芳基中的一种或多种;  $R_6$  为氢、卤素、杂原子、羟基、烷氧基、羧基、羰基、氰基、氨基、取代氨基、硝基、烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、杂原子芳基和取代杂原子芳基中的一种或多种;  $n$  为 0~10 之间的整数。

[0015] 所述的基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法, 其中, 所述胺类



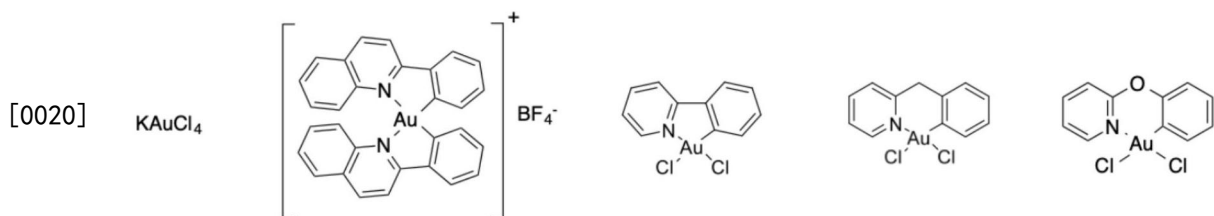
[0016] 所述的基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法, 其中, 当所述胺类的荧光基团为香豆素时, 所述炔烃的荧光基团为荧光素; 当所述胺类的荧光基团为荧光素时, 所述炔烃的荧光基团为香豆素。

[0017] 所述的基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法, 其中, 所述炔烃



[0018] 所述的基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法, 其中, 当所述炔烃的荧光基团为香豆素时, 所述胺类的荧光基团为荧光素; 当所述炔烃的荧光基团为荧光素时, 所述胺类的荧光基团为香豆素。

[0019] 所述的基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法, 其中, 所述金属催化剂为



中的一种。

[0021] 所述的基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法, 其中, 所述反应介质为水、1,2-二氯乙烷、二甲基甲酰胺、二恶烷和乙酸乙酯中的一种或多种。

[0022] 所述的基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法, 其中, 所述根据所述第一荧光发射峰强度和所述第二荧光发射峰强度, 确定所述待测样品中的甲醛浓度的步骤包括:

[0023] 根据所述第一荧光发射峰强度和所述第二荧光发射峰强度,确定荧光比;

[0024] 根据所述荧光比以及预先确定的荧光比与甲醛浓度的对应关系,确定所述待测样品中的甲醛浓度。

[0025] 所述的基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法,其中,所述荧光比的计算公式为:

$$[0026] \quad R = 1 - F_{470\text{nm}}(T16) / F_{470\text{nm}}(T0)$$

[0027] 其中,R为荧光比, $F_{470\text{nm}}(T16)$ 为第二荧光发射峰强度, $F_{470\text{nm}}(T0)$ 为第一荧光发射峰强度。

[0028] 有益效果:本发明通过带荧光基团的胺类和带荧光基团的炔烃组成的基于荧光共振能量转移的荧光探针在金属催化剂的催化作用下与待测样品中的甲醛发生金属催化偶联反应,从而对待测样品中的甲醛浓度进行检测,采用荧光检测,配合荧光共振能量转移降低背景信号的干扰,省去洗脱步骤,使检测便捷,成本廉价且对甲醛选择性高。

### 附图说明

[0029] 图1是本发明实施例1中制备带香豆素的胺类化合物1的示意图;

[0030] 图2是本发明实施例2中制备带荧光素的炔烃化合物2的示意图;

[0031] 图3是本发明实施例3中制备炔丙胺化合物4的示意图;

[0032] 图4是本发明实施例1、实施例2和实施例3中制备的带香豆素的胺类化合物1、带荧光素的炔烃化合物2和炔丙胺化合物4的荧光光谱图;

[0033] 图5是本发明实施例4中甲醛、其它较大的醛类和FRET探针的偶联反应的荧光光谱图;

[0034] 图6是本发明实施例4中甲醛、其它较大的醛类和FRET探针的偶联反应的去卷积质谱图;

[0035] 图7是本发明实施例5中反应试剂浓度与FRET荧光比之间的关系图;

[0036] 图8是本发明实施例9中不同甲醛浓度对应的荧光比率图。

### 具体实施方式

[0037] 本发明提供一种基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法,为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚、明确,以下对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0038] 在工业上,甲醛是一种制造塑胶树脂的重要有机原料,广泛应用于造纸、纺织和木材业。在多种活体内,甲醛为正常新陈代谢过程的产物,因此其天然存在于不同的新鲜或加工食物中,如菇菌、果蔬、甲壳动物和肉类等,一般而言活体中通常只会含有少量甲醛。从食物中摄取的少量甲醛会刺激口腔、咽、食道和胃的黏膜,人体可以经新陈代谢将微量甲醛转换并排除体外,故甲醛一般不会于体内积累,影响人体健康。然而,大量接触甲醛可以导致急性中毒、呕吐、休克、消化道出血、严重腹痛、昏迷甚至死亡。国际癌症研究机构(IARC)的研究指出甲醛可导致人类罹患鼻咽癌,并引发白血病。长时间摄取甲醛的慢性毒性则包括基因毒性、神经毒性、生殖毒性、血液毒性和遗传毒性。

[0039] 为了更好地确保生活质量和安全,研究人员相继提出多种甲醛检测方法,包括分

光光度法、电化学检测、气相色谱、液相色谱、化学滴定和荧光检测。现时主流的快速检测盒多用于检测生物医学样品或空气中的甲醛量,迄今最为广泛使用的食物中甲醛检测技术为佩戴紫外检测器的高压液相色谱仪。此方法通过不断改进后,灵敏度和准确度相对优良,但是依然会受到多种羰基化合物的干扰,而且购置仪器费用昂贵,设备操作过程繁复,需要专业技术人员操作,再者多组分混合的食品样本需要冗长的预处理步骤。近年来研究人员利用微流控芯片实现快速检测食品中甲醛的目标,但该方法仍处于产业应用的发展初期。

[0040] 为了解决上述问题,本发明提供了一种基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法,包括步骤:

[0041] S1、将待测样品溶解于反应介质中,并在溶解有待测样品的所述反应介质中加入带荧光基团的胺类、带荧光基团的炔烃以及金属催化剂,得到原始反应溶液。

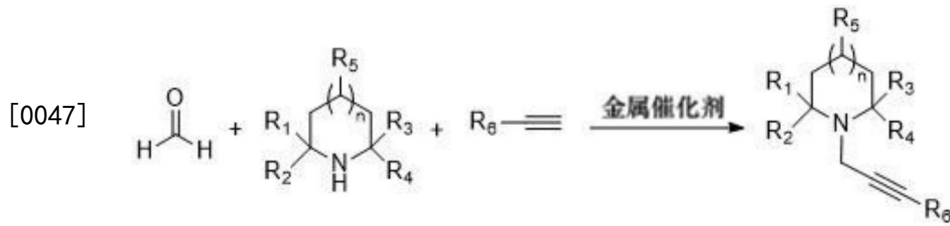
[0042] 金属催化偶联反应为甲醛、胺类和炔烃通过金属催化剂产生偶联反应形成炔丙胺,涉及的胺类和炔烃可以为环状或非环状,且能连接荧光基团。荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 即当供体荧光基团的荧光光谱与受体荧光基团的光谱重叠时,供体荧光基团的能量透过偶极耦合传递给受体基团,供体荧光基团自身的荧光强度退减,同时诱发受体分子发出荧光。本实施例中将待测样品溶解于反应介质中,配置成待测样品溶液,所述反应介质为水、1,2-二氯乙烷、二甲基甲酰胺、二恶烷和乙酸乙酯中的一种或多种;然后向待测样品溶液中加入带荧光基团的胺类、带荧光基团的炔烃以及金属催化剂,得到反应溶液,在甲醛检测过程中,带荧光基团的胺类和带荧光基团的炔烃组成的基于荧光共振能量转移的荧光探针 (FRET荧光探针) 在金属催化剂的催化作用下与待测样品中的甲醛发生金属催化偶联反应,导致FRET荧光探针的荧光共振能量发生转移,从而对待测样品中的甲醛浓度进行检测。本实施例中的甲醛检测方法采用荧光检测,配合荧光共振能量转移降低背景信号的干扰,省去洗脱步骤,使检测便捷,成本廉价且对甲醛选择性高。

[0043] S2、对所述原始反应溶液进行荧光检测,确定所述原始反应溶液对应的第一荧光发射峰强度。

[0044] 具体地,所述原始反应溶液为未发生金属催化偶联反应的溶液,得到原始反应溶液后,取适量原始反应溶液加入荧光检测体系中并使其均匀分散,随后使用430nm波长激发光对所述原始反应溶液进行荧光检测,得到所述原始反应溶液在470nm处的荧光发射峰强度作为第一荧光发射峰强度。

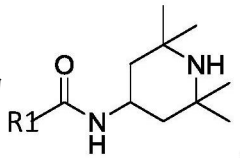
[0045] S3、对所述原始反应溶液进行加热,使所述待测样品中的甲醛、所述胺类以及所述炔烃在所述金属催化剂的催化作用下发生金属催化偶联反应,得到目标反应溶液。

[0046] 所述目标反应溶液为所述原始反应溶液中的各组份即待测样品中的甲醛、所述胺类以及所述炔烃在金属催化剂的催化作用下发生金属催化偶联反应后的溶液。本实施例中对原始反应溶液进行加热后,在加热条件下,待测样品中的甲醛、带荧光基团的胺类以及带荧光基团的炔烃在金属催化剂催化下会发生金属催化偶联反应,形成炔丙胺产物。其中,所述金属催化偶联反应的反应式为:

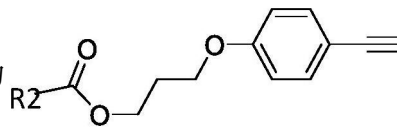


[0048] 其中,  $R_1$  至  $R_4$  为氢、卤素、杂原子、羟基、烷氧基、羧基、羰基、氰基、氨基、烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、杂原子芳基和取代杂原子芳基中的一种或多种;  $R_5$  为氢、卤素、杂原子、羟基、烷氧基、羧基、羰基、氰基、氨基、取代氨基、硝基、烧基、取代烷基、芳基、取代芳基、杂原子芳基和取代杂原子芳基中的一种或多种;  $R_6$  为氢、卤素、杂原子、羟基、烷氧基、羧基、羰基、氰基、氨基、取代氨基、硝基、烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、杂原子芳基和取代杂原子芳基中的一种或多种;  $n$  为 0~10 之间的整数。

[0049] 具体地, 所述胺类为连接荧光基团的胺类, 可以为环状或非环状, 炔烃为能连接荧光基团的炔烃, 胺类、炔烃和金属催化剂的浓度比为 1:1:0.02~0.1。在一具体实施例中,

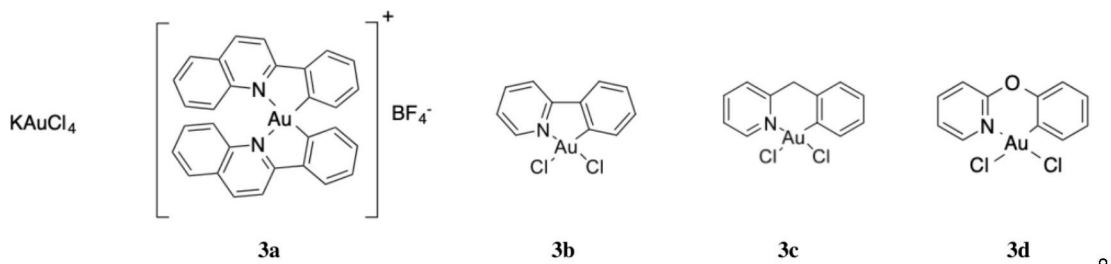
带荧光基团的胺类为  其中, 荧光基团  $R_1$  为香豆素或荧光素, 当所述胺类的

荧光基团为香豆素时, 所述炔烃的荧光基团为荧光素; 当所述胺类的荧光基团为荧光素时, 所述炔烃的荧光基团为香豆素。

[0050] 在一具体实施例中, 带荧光基团的炔烃为  其中, 荧

光基团  $R_2$  为香豆素或荧光素。当所述炔烃的荧光基团为香豆素时, 所述胺类的荧光基团为荧光素; 当所述炔烃的荧光基团为荧光素时, 所述胺类的荧光基团为香豆素。

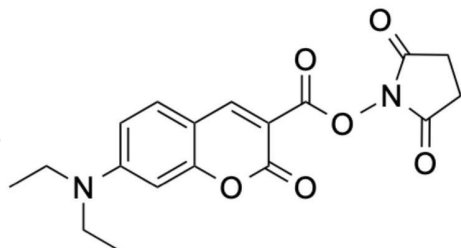
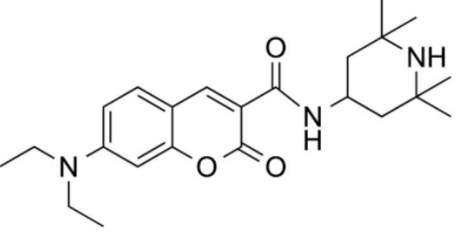
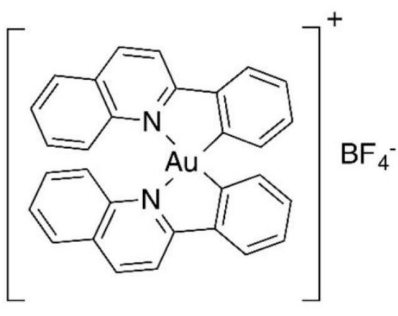
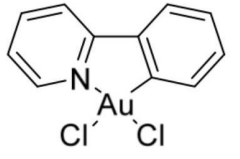
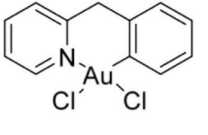
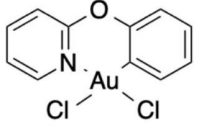
[0051] 在一具体实施方式中, 所述金属催化剂为金(III)催化剂, 其为  $\text{KAuCl}_4$ 、金属催化剂 3a、金属催化剂 3b、金属催化剂 3c、金属催化剂 3d 中的一种。其中, 各金属催化剂的化学结构如下所示:



[0052] 具体地, 上述金属催化偶联反应中使用的相关化合物的合成方法可参考现有文献, 具体见表 1。

[0053] 表 1 相关化合物合成方法及其参考文献的信息表



[0054]	 <p style="text-align: center;"><b>1a</b></p>	<p>M. L. Mason, R. F. Lalisce, T. J. Finnegan, C. M. Hadad, D. A. Modarelli, J. R. Parquette, <i>Langmuir</i>, 2019, <b>35</b>, 12460–12468</p>
	 <p style="text-align: center;"><b>2</b></p>	<p>E. Szabo, P. Hrdlovic and M. Danko, <i>Dyes Pigments</i>, 2011, <b>90</b>, 129–138</p>
[0055]	 <p style="text-align: center;"><b>3a</b></p>	<p>H. M. Ko, K. K. Y. Kung, J. F. Cui and M. K. Wong, <i>Chem. Comm.</i>, 2013, <b>49</b>, 8869–8871</p>
	 <p style="text-align: center;"><b>3b</b></p>	<p>E. C. Constable and T. A. Leese, <i>J. Organomet. Chem.</i>, 1989, <b>363</b>, 419–424</p>
	 <p style="text-align: center;"><b>3c</b></p>	<p>M. A. Cinellu, A. Zucca, S. Stoccoro, G. Minghetti, M. Manassero and M. Sansoni, <i>J. Chem. Soc., Dalton Trans.</i>, 1995, 2865–2872</p>
	 <p style="text-align: center;"><b>3d</b></p>	<p>J. F. Cui, H. M. Ko, K. P. Shing, J. R. Deng, N. C. H. Lai and M. K. Wong, <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i>, 2017, <b>56</b>, 3074–3079</p>

[0056] S4、对所述目标反应溶液进行荧光检测，确定所述目标反应溶液对应的第二荧光发射峰强度。

[0057] 由上述金属催化偶联反应的反应式可以看出, 甲醛、带荧光基团的胺类、带荧光基团的炔烃以及金属催化剂反应生成的产物为炔丙胺产物。带供体荧光基团和受体荧光基团的胺类和炔烃在反应形成炔丙胺产物的过程中, 供体荧光基团自身的荧光强度退减, 同时诱发受体分子发出荧光, 形成荧光共振能量转移, 因而形成的炔丙胺产物为荧光物质, 展示了从供体荧光基团至受体荧光基团的荧光共振能量转移, 通过测量反应溶液反应前后的荧光信号, 可以测量待测样品中甲醛浓度。本实施例中反应溶液发生金属催化偶联反应后, 取适量目标反应溶液加入荧光检测体系中并使其均匀分散, 随后使用430nm波长激发光对目标反应溶液进行荧光检测, 得到目标反应溶液在470nm 处的荧光发射峰强度作为第二荧光发射峰强度。

[0058] S5、根据所述第一荧光发射峰强度和所述第二荧光发射峰强度, 确定所述待测样品中的甲醛浓度。

[0059] 具体地, 本实施例中得到第一荧光发射峰强度和第二荧光发射峰强度后, 首先根据第一荧光发射峰强度和第二荧光发射峰强度, 确定荧光比; 然后根据所述荧光比以及预先确定的荧光比与甲醛浓度的对应关系, 即可确定待测样品中的甲醛浓度。其中, 所述荧光比的计算公式为:  $R = 1 - F_{470\text{nm}}(T16) / F_{470\text{nm}}(T0)$ , 其中,  $F_{470\text{nm}}(T16)$  为第二荧光发射峰强度,  $F_{470\text{nm}}(T0)$  为第一荧光发射峰强度。

[0060] 本实施例中预先将不同浓度的甲醛溶解于反应介质中, 并在溶解有甲醛的反应介质中加入一定量的带荧光基团的胺类、带荧光基团的炔烃以及金属催化剂, 得到反应溶液, 对反应溶液进行荧光检测, 得到不同浓度甲醛的反应溶液反应前对应的470nm处的荧光发射峰强度; 然后将反应溶液在50℃反应16小时, 并对反应后的反应溶液进行荧光检测, 得到不同浓度甲醛的反应溶液反应后对应的470nm处的荧光发射峰强度, 根据上述荧光比的计算公式即可确定不同浓度的甲醛对应的荧光比即确定荧光比与甲醛浓度的对应关系。

[0061] 下面通过具体实施例对本发明进行进一步的解释说明。

#### [0062] 实施例1

[0063] (1) 如图1所示, 将7-(二乙氨基) 香豆素-3-羧酸(2mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(2.6mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳酰二亚胺(EDCI)(2.6mmol) 和4-二甲氨基吡啶(DMAP)(2mmol) 混合并溶于二氯甲烷中(15mL), 在室温下搅拌混合物8小时。反应后, 加入二氯甲烷(30mL) 稀释反应混合物。混合物用水洗涤(30mL × 2次), 用无水硫酸镁干燥, 过滤, 然后减压浓缩、除去溶剂。残余物通过快速柱色谱纯化, 淋洗液为二氯甲烷/乙酸乙酯(10:1), 得到如图1所示的化合物1a, 且化合物1a收率为79%(0.56g);

[0064] (2) 将化合物1a(1mmol)、4-氨基-2,2,6,6-四甲基哌啶(1mmol) 和DMAP(0.2mmol) 溶于二氯甲烷(15mL), 混合物在室温下搅拌 8小时。反应后, 减压浓缩, 残余物通过快速柱色谱纯化, 淋洗液为二氯甲烷/甲醇(10:1), 得到如图1所示的香豆素连接的胺类化合物1(0.28g), 且胺类化合物1的收率为70%。

#### [0065] 实施例2

[0066] (1) 如图2所示, 将化合物2a(2mmol)、荧光素(2mmol) 和碳酸钾(6mmol) 混合并溶于二甲基甲酰胺(15mL), 并于室温下搅拌混合物8小时。反应后, 用水(30mL) 稀释反应混合物, 并用二氯甲烷(30mL × 3) 萃取, 获取的有机层用水(30mL × 3) 和盐水(30mL × 3) 洗涤, 然后用无水硫酸镁干燥, 过滤, 减压浓缩并除去溶剂。残余物通过快速柱色谱纯化, 淋洗液为二

氯甲烷/甲醇(30:1),得到如图2所示的化合物2b(0.71g),且化合物2b的收率为60%;

[0067] (2) 将化合物2b(1mmol)、三甲基硅基乙炔(3mmol)、反-二(三苯基膦)二氯化钯(II) ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ )(0.04mmol)、碘化亚铜(0.02mmol)和三乙胺(3mmol)溶于四氢呋喃(20mL),于氮气气氛下室温搅拌1小时。反应后,减压浓缩并除去溶剂,残余物通过快速柱色谱纯化,淋洗液为二氯甲烷/甲醇(40:1),得到如图2所示的化合物2c(0.42g),且化合物2c的收率为75%;

[0068] (3) 将化合物2c(0.6mmol)和碳酸钾(1.8mmol)溶于甲醇(10mL),室温下搅拌混合物10分钟。反应后,加水(20mL)稀释反应混合物,并用二氯甲烷(20mL $\times$ 3)萃取,获取的有机层用水(20mL $\times$ 3)和盐水(20mL $\times$ 3)洗涤,然后用无水硫酸镁干燥,过滤,减压浓缩,除去溶剂。得到的残余物通过快速柱色谱纯化,淋洗液为二氯甲烷/甲醇(20:1),得到如图2所示的荧光素连接的炔烃化合物2(0.21g),且炔烃化合物2的收率为70%;

[0069] (4) 炔烃化合物2表征分析数据:红色粉末,分析用TLC(硅胶60)(二氯甲烷/甲醇); $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ 8.32(d, $J=6.7\text{Hz}$ ,1H),7.85(dt, $J=7.5,3.8\text{Hz}$ ,1H),7.80(dt, $J=7.6,3.8\text{Hz}$ ,1H),7.43(d, $J=6.6\text{Hz}$ ,1H),7.37(d, $J=8.8\text{Hz}$ ,2H),7.03(d, $J=9.2\text{Hz}$ ,2H),6.77-6.66(m,6H),4.16(t, $J=5.9\text{Hz}$ ,2H),3.63(t, $J=6.1\text{Hz}$ ,2H),1.82-1.71(m,2H); $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 8.27(d, $J=7.6\text{Hz}$ ,1H),7.72(dt, $J=22.8,7.0\text{Hz}$ ,2H),7.37(d, $J=8.7\text{Hz}$ ,2H),7.32(d, $J=7.4\text{Hz}$ ,1H),6.98(d, $J=9.2\text{Hz}$ ,2H),6.89(d, $J=1.6\text{Hz}$ ,2H),6.82(dd, $J=9.2,1.8\text{Hz}$ ,2H),6.66(d, $J=8.7\text{Hz}$ ,2H),4.16(t, $J=6.0\text{Hz}$ ,2H),3.64(t, $J=5.8\text{Hz}$ ,2H),2.96(s,1H),1.82-1.71(m,2H); $^{13}\text{C}$  NMR(100MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 175.69,165.24,158.81,157.78,155.87,134.04,133.55,132.68,131.39,130.62,130.33,130.24,129.90,122.21,114.77,114.31,103.82,75.93,63.73,62.31,28.19;ESI-MS  $m/z$  491[M+H] $^+$ ;HRMS(ESI)[ $\text{C}_{31}\text{H}_{23}\text{O}_6$ ] $^+$ 计算值491.1495,实测值491.1494。

[0070] 实施例3

[0071] (1) 将带香豆素的胺类化合物1(0.1mmol)、带荧光素的炔烃化合物2(0.1mmol)、甲醛(0.2mmol)和金(III)催化剂3c(2mol%)溶于1,2-二氯乙烷/水中,并于50 $^\circ\text{C}$ 下反应16小时,该反应的反应式如图3所示;

[0072] (2) 快速柱色谱法纯化后,反应物进行ESI-MS和核磁共振检测,检测结果表明反应得到的炔丙胺化合物4成功转化,收率为31%,该结果表明在金(III)催化剂下,甲醛、带香豆素的胺类化合物1及带荧光素的炔烃化合物2的三组分偶联反应可以用以检测甲醛;

[0073] (3) 炔丙胺化合物4表征分析数据:红色粉末,分析用TLC(硅胶60)(二氯甲烷/甲醇); $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 8.72(d, $J=7.6\text{Hz}$ ,1H),8.64(s,1H),8.22(d, $J=7.7\text{Hz}$ ,1H),7.71(t, $J=7.5\text{Hz}$ ,1H),7.65(t, $J=7.6\text{Hz}$ ,1H),7.41(d, $J=9.0\text{Hz}$ ,1H),7.28(d, $J=4.6\text{Hz}$ ,2H),7.25(s,1H),6.89(d, $J=9.2\text{Hz}$ ,2H),6.82(s,2H),6.74(dd, $J=9.2,2.1\text{Hz}$ ,2H),6.64(d, $J=2.4\text{Hz}$ ,1H),6.60(d, $J=8.7\text{Hz}$ ,2H),6.48(d, $J=2.4\text{Hz}$ ,1H),4.37(m,1H),4.13(t, $J=6.0\text{Hz}$ ,2H),3.58(dd, $J=12.3,6.6\text{Hz}$ ,4H),3.44(q, $J=7.0\text{Hz}$ ,4H),2.03(d, $J=7.7\text{Hz}$ ,1H),1.89(dd, $J=12.3,3.7\text{Hz}$ ,2H),1.71(t, $J=5.9\text{Hz}$ ,2H),1.59(d, $J=12.1\text{Hz}$ ,2H),1.32(s,6H),1.25(s,6H),1.22(s,6H); $^{13}\text{C}$  NMR(100MHz, $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) $\delta$ 175.76,165.75,162.97,162.80,158.70,158.15,158.09,157.80,157.75,154.25,153.12,148.20,148.10,134.51,133.09,132.99,131.65,131.47,130.81,130.10,122.42,116.31,

115.31, 114.70, 110.53, 110.41, 108.68, 104.19, 100.42, 96.84, 64.28, 62.55, 57.52, 47.13, 45.47, 42.01, 33.97, 33.28, 30.10, 28.65, 22.36, 12.59; ESI-MS  $m/z$  902  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI)  $[C_{55}H_{56}N_3O_9]^+$  计算值 902.4011, 实测值 902.4138。

[0074] 实施例4

[0075] (1) 将带香豆素的胺类化合物1 (5mM)、带荧光素的炔烃化合物2 (1当量)、甲醛 (2当量)、乙醛 (2当量)、异丁醛 (2当量)、异戊醛 (2当量)、苯甲醛 (2当量) 和金属催化剂3c (2mol%) 于1,2-二氯乙烷/水 (5:1) (反应总体积为3mL), 并在50°C下搅拌16小时; 将反应后的混合溶液 (0.6 $\mu$ L) 与二甲基亚砜 (3mL), 以测量荧光信号。

[0076] 实施例5

[0077] (1) 如表2所示, 将不同浓度的带香豆素的胺类化合物1、带荧光素的炔烃化合物2、甲醛和2mol%金(III)催化剂溶于1,2-二氯乙烷/水 (5:1), 并在50°C下搅拌16小时; 对反应后的混合物进行分离、纯化并进行去卷积质谱分析和荧光检测。

[0078] 表2金属催化偶联反应中各反应物的浓度

[0079]

样品编号	化合物1 (mM)	化合物2 (mM)	甲醛 (mM)	3c ( $\mu$ M)
1	0.5	0.5	1	10
2	1	1	2	20
3	2	2	4	40
4	3	3	6	60
5	4	4	8	80
6	5	5	10	100
7	6	6	12	120
8	8	8	16	160

[0080] 实施例6

[0081] (1) 将5mM带香豆素的胺类化合物1、5mM带荧光素的炔烃化合物2、10mM甲醛和2mol%金(III)催化剂溶于1,2-二氯乙烷/水 (5:1) 50°C反应16小时。将反应后的混合物分离提纯并进行质谱分析和荧光检测。荧光光谱中观察到的FRET信号 (在470nm处蓝色荧光从强变弱, 而554nm处绿色荧光从弱变强) 和去卷积质谱分析中存在的901.39 $m/z$ 峰皆证明FRET荧光探针与甲醛成功通过金属催化剂进行偶联反应合成炔丙胺产物4。表3为不同金属催化剂进行偶联反应对合成的炔丙胺产物4荧光比的影响实验结果。由表3可以看出, 使用金(III)催化剂3c能产生最高FRET荧光比 (42%) 及最强催化活性。

[0082] 表3不同金属催化剂对应的荧光比

样品编号	金(III)催化剂	荧光比 $R = 1 - F_{470\text{nm}}(T_{16}/T_0)$ (%)
1	氯金酸钾	2
2	3a	18
3	3b	27
4	3c	42
5	3d	35

[0084] 实施例7

[0085] (1) 将5mM带香豆素的胺类化合物1、5mM带荧光素的炔烃化合物2、10mM甲醛和2mol%金(III)催化剂3c溶于溶剂中,并在50℃反应16小时。其中,溶剂为有机溶剂和水的混合溶剂,有机溶剂和水的比例为5:1,有机溶剂为1,2-二氯乙烷、二甲基甲酰胺、二恶烷、二甲基亚砷和乙酸乙酯中的一种。将反应后的混合物分离提纯并进行质谱分析和荧光检测。荧光光谱中观察到的FRET信号和去卷积质谱分析中存在的901.39m/z峰皆证明FRET荧光探针与甲醛成功通过金属催化剂进行偶联反应合成炔丙胺产物4。表4为不同有机溶剂对炔丙胺产物4荧光比的影响实验结果。由表4可以看出,当使用二甲基甲酰胺、二恶烷和二甲基亚砷作为溶剂时,未能从去卷积质谱分析中观察到炔丙胺产物4的转化,FRET荧光比几乎为零。而乙酸乙酯不良于偶联反应,炔丙胺产物4的去卷积质谱分析中转化率低且FRET荧光比低至14%,1,2-二氯乙烷为本偶联反应的最佳溶剂,FRET荧光比率高达42%。上述结果表明,以水和互溶极性溶剂所组成的共溶剂系统为反应介质会降低偶联反应形成炔丙胺产物4的能力和FRET荧光比;相反,不与水互溶的有机溶剂如乙酸乙酯或1,2-二氯乙烷则会提高收率及FRET荧光比。与乙酸乙酯相比,炔丙胺产物4更易溶于1,2-二氯乙烷,故其FRET荧光比率更高。

[0086] 表4不同溶剂对应的荧光比

样品编号	溶剂	荧光比 $R = 1 - F_{470\text{ nm}}(T_{16}/T_0)$ (%)
[0087] 1	1,2-二氯乙烷/水(5:1)	42
2	二甲基甲酰胺/水(5:1)	0
3	乙酸乙酯/水(5:1)	14
4	二恶烷/水(5:1)	2
[0088] 5	二甲基亚砷/水(5:1)	2

[0089] 实施例8

[0090] (1) 将不同量的带香豆素的胺类化合物1、带荧光素的炔烃化合物2、甲醛和2mol%金(III)催化剂3c溶于1,2-二氯乙烷/水(5:1)中,并在50℃反应16小时。将反应后的混合物分离提纯并进行质谱分析和荧光检测。反应物和催化剂的不同用量及实验结果见表5,表5为不同用量的反应物和催化剂对应的荧光比。由表5可以看出,当使用同等摩尔量的带香豆素的胺类化合物1、带荧光素的炔烃化合物2和甲醛时,FRET荧光比仅为10%;当使用2当量的甲醛代替时,FRET荧光比提升至39-42%。另一方面,在使用2mol%,5mol%和10mol%的金(III)催化剂3c的反应中(分别对应样品编号2,3,4),观察到大致相等的转化率和FRET荧光比(分别为42%、40%和39%),表明金(III)催化剂的分量对三组分偶联反应的转化没有明显影响。综合上述结果,1当量FRET荧光探针、2当量甲醛和2mol%金(III)催化剂3c为最佳反应物及催化剂比例。

[0091] 表5不同用量的反应物和催化剂对应的荧光比

样品编号	化合物 1 (mM)	化合物 2 (mM)	甲醛 (mM)	3c ( $\mu$ M)	荧光比 $R = 1 - F_{470\text{ nm}} (T_{16}/T_0)$ (%)
[0092] 1	5	5	5	0.1	10
2	5	5	10	0.1	42
3	5	5	10	0.25	40
4	5	5	10	0.5	39

### [0093] 实施例9

[0094] (1) 将5mM带香豆素的胺类化合物1、5mM带荧光素的炔烃化合物2、不同浓度的甲醛和2mol%金(III)催化剂3c溶于1,2-二氯乙烷/水(5:1)中,并在50℃反应16小时,将反应后的混合物分离提纯并进行质谱分析和荧光检测。

[0095] 图4为实施例1、实施例2和实施例3中制备的带香豆素的胺类化合物1、带荧光素的炔烃化合物2和炔丙胺产物4的荧光光谱图。由图4可以看出,带香豆素的胺类化合物1在470nm处发出强蓝色荧光,而带荧光素的炔烃化合物2在540nm处发出非常弱绿色荧光,而炔丙胺产物4在470nm处发出弱蓝色荧光并在554nm处发出非常强的绿色荧光。从炔丙胺产物4的荧光光谱中观察到FRET信号,带香豆素的胺类化合物1和带荧光素的炔烃化合物2分别为供体和受体的荧光基团。FRET信号从带香豆素的胺类化合物1的发射到带荧光素的炔烃化合物2的激发,故在470nm处观察到弱蓝色荧光,而在554nm处观察到绿色荧光。

[0096] 图5为实施例4中甲醛、其它较大的醛类和FRET探针的偶联反应的荧光光谱图,由图5可以看出,甲醛、其它较大的醛类和FRET探针的偶联反应荧光光谱(激发波长=430nm),按荧光比例分析,测试的FRET比率为32%。图6为实施例4中甲醛、其它较大的醛类和FRET探针的偶联反应的去卷积质谱图,从图6可以看出,仅发现一个产物峰,表明炔丙胺产物4的存在,同时并未观察到由FRET探针与其它较大的醛类之间偶联反应所生成的炔丙胺产物4,表明其它较大的醛类对甲醛检测结果不会造成影响。

[0097] 图7为实施例5中反应试剂浓度与FRET荧光比( $R = 1 - F_{470\text{ nm}} (T_{16}/T_0)$ )之间的关系图,从图7可以看出当FRET荧光探针与浓度低于2mM甲醛结合时,所形成的炔丙胺产物4几乎没有提供可观察的FRET荧光比,当FRET荧光探针与浓度在2mM至5mM之间的甲醛结合时,所得FRET荧光比随试剂浓度增加而递增,当FRET荧光探针与浓度高于2mM甲醛结合时,FRET荧光比率达至最高并趋向稳定。因此,各反应试剂的较佳浓度为:5mM的带香豆素的胺类化合物1、5mM带荧光素的炔烃化合物2、10mM甲醛和2mol%金(III)催化剂。

[0098] 图8为实施例9中不同甲醛浓度对应的荧光比率图,从图8可以看出,在缺失甲醛的情况下,荧光光谱中未能观察到FRET信号,同时去卷积质谱中未能见到炔丙胺产物4(901.39m/z),表明FRET荧光探针所产生的信号主要来自炔丙胺产物4的形成;当甲醛浓度在2mM至10mM之间时,FRET荧光信号以线性关系(决定系数 $R^2 = 0.9517$ )相应递增;当甲醛浓度超过10mM时,FRET荧光信号达到最高值42%,表明本实施例中的检测方法定量检测甲醛的线性检测范围为2mM~10mM。

[0099] 综上所述,本发明公开了一种基于偶联反应的荧光共振能量转移探针的甲醛检测方法,包括:将待测样品溶解于反应介质中,并在溶解有待测样品的所述反应介质中加入带荧光基团的胺类、带荧光基团的炔烃以及金属催化剂,得到原始反应溶液;对所述原始反应

溶液进行荧光检测,确定所述原始反应溶液对应的第一荧光发射峰强度;对所述原始反应溶液进行加热,使所述待测样品中的甲醛、所述胺类以及所述炔烃在所述金属催化剂的催化作用下发生金属催化偶联反应,得到目标反应溶液;对所述目标反应溶液进行荧光检测,确定所述目标反应溶液对应的第二荧光发射峰强度;根据所述第一荧光发射峰强度和所述第二荧光发射峰强度,确定所述待测样品中的甲醛浓度。本发明通过带荧光基团的胺类和带荧光基团的炔烃组成的基于荧光共振能量转移的荧光探针在金属催化剂的催化作用下与待测样品中的甲醛发生金属催化偶联反应,从而对待测样品中的甲醛浓度进行检测,采用荧光检测,配合荧光共振能量转移降低背景信号的干扰,省去洗脱步骤,使检测便捷,成本廉价且对甲醛选择性高。

[0100] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

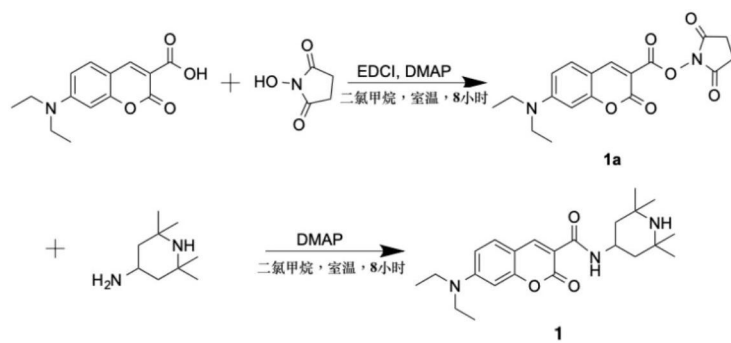


图1

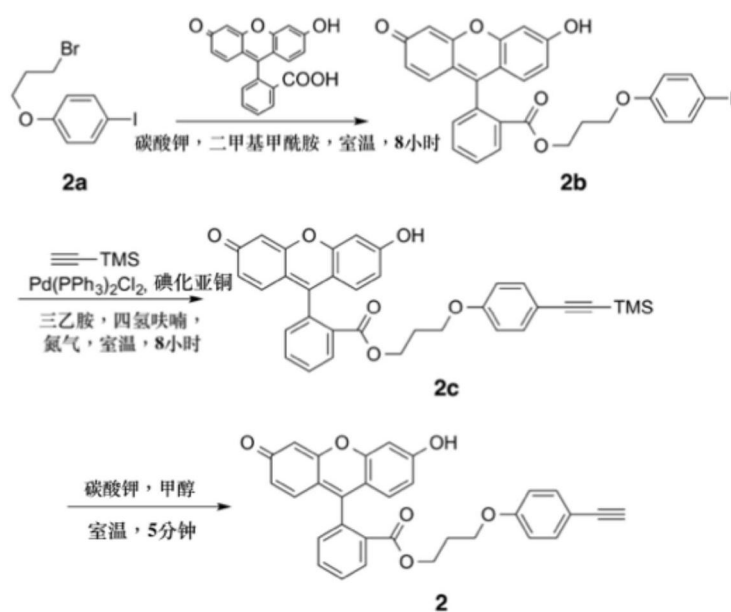


图2



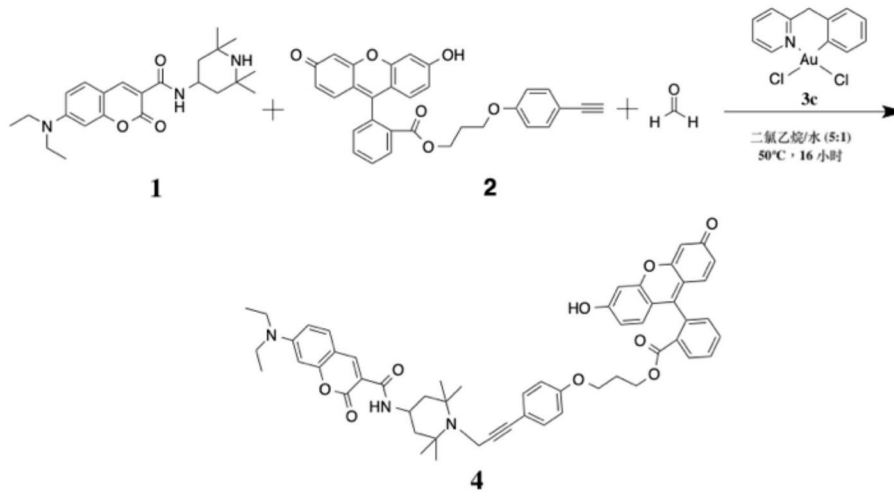


图3

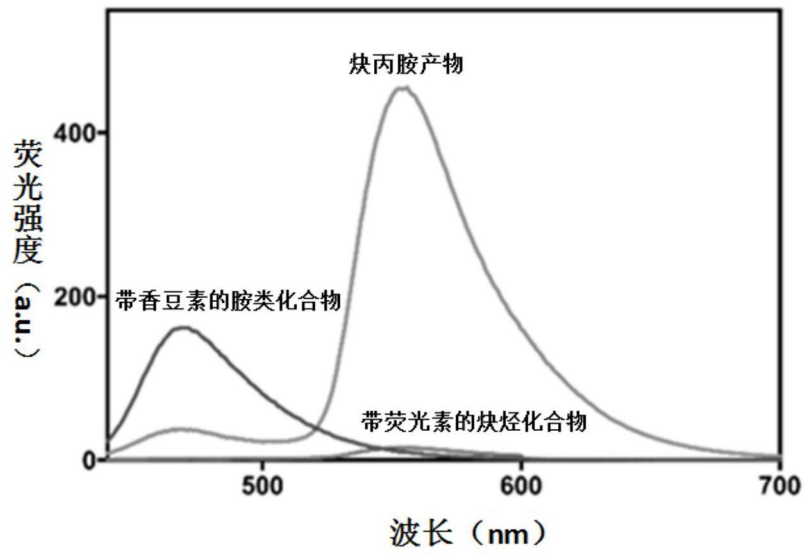


图4

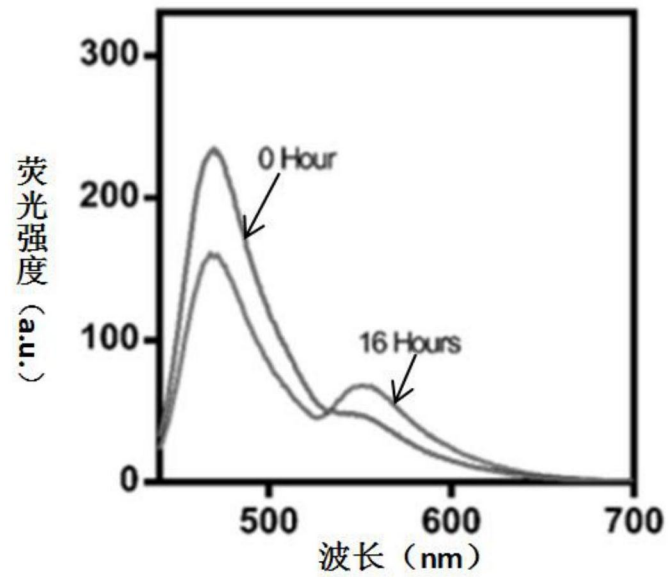


图5

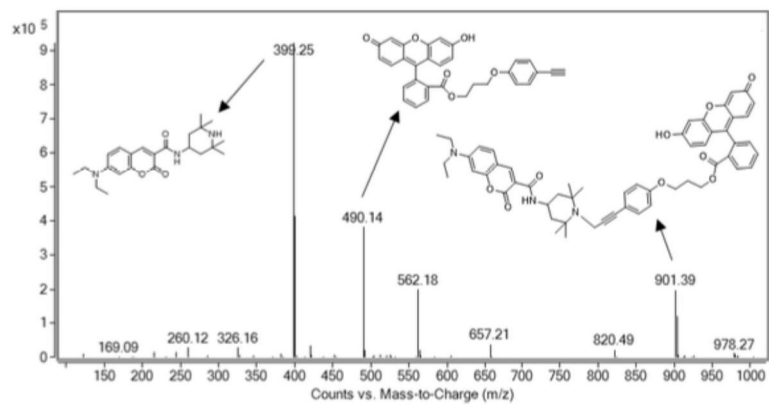


图6

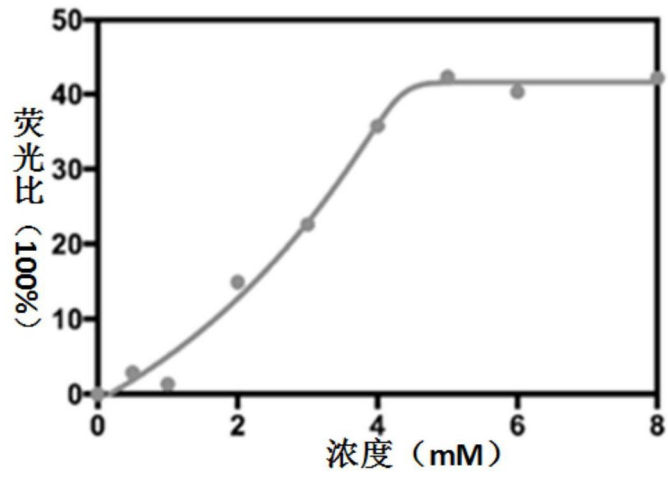


图7

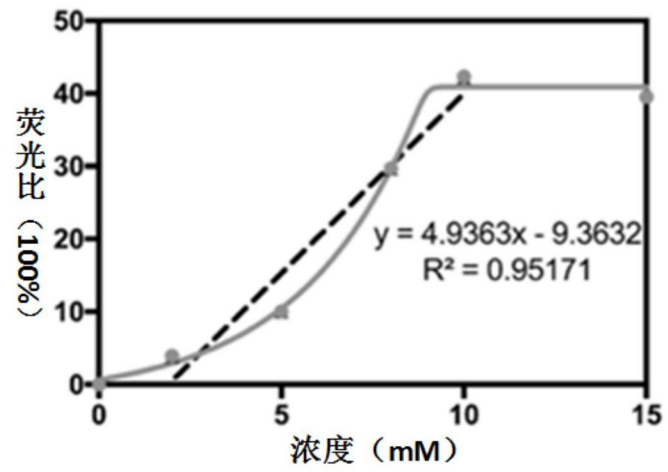


图8