

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2011年7月14日 (14.07.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/082566 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07D 417/06 (2006.01) C07D 401/06 (2006.01)
C07D 413/06 (2006.01) C09B 23/00 (2006.01)
C07D 421/06 (2006.01) C09K 11/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/072378
- (22) 国际申请日: 2010年4月30日 (30.04.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010022414.6 2010年1月5日 (05.01.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 大连理工大学 (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路2号, Liaoning 116024 (CN)。 大连福思达信息材料有限公司 (DALIAN FIRSTAR INFORMATION MATERIALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市高新园区区凌工路2号, Liaoning 116024 (CN)。
- (72) 发明人; 及
(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 彭孝军 (PENG, Xiaojun) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路158号, Liaoning 116012 (CN)。 吴彤 (WU, Tong) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路158号, Liaoning 116012 (CN)。 樊江莉 (FAN, Jiangli) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路158号, Liaoning 116012 (CN)。 孙世国 (SUN, Shiguo) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路158号, Liaoning 116012 (CN)。
- (74) 代理人: 大连东方专利代理有限责任公司 (DALIAN EAST PATENT AGENT LTD.); 中国辽宁省大连市西岗区黄河路263号608室, Liaoning 116011 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,

[见续页]

(54) Title: A FLUORESCENT DYE, ITS PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一类荧光染料、制备方法及其应用

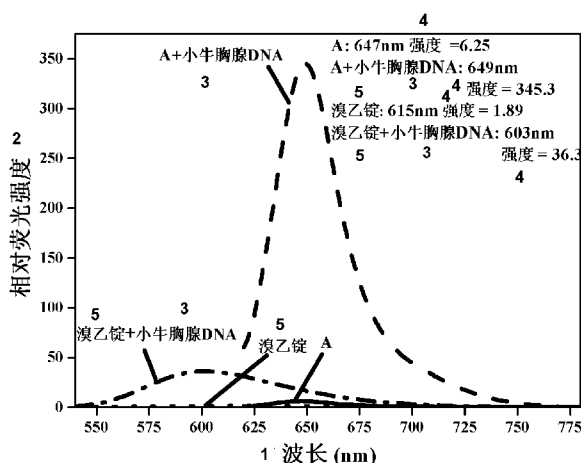
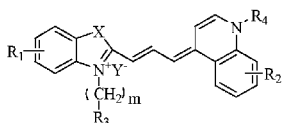


图 1 / FIG. 1

1 WAVELENGTH
2 RELATIVE FLUORESCENCE INTENSITY
3 CALF THYMUS
4 INTENSITY
5 EB



(I)

(57) Abstract: A kind of fluorescent dye of formula I is disclosed, wherein X is C(CH₃)₂, O, S or Se; m is an integer of 1-18; R₁ and R₂ are each independently selected from a group of H, C₁₋₁₈ alkyl, OR₇, -C₁₋₆ alkyl-OR₇ and halogen; R₃ is pyrrolyl, imidazolyl, piperidyl, piperazinyl, morpholinyl, guanidyl, NHR₅ or N(R₆)₂; R₄ is C₁₋₁₈ alkyl, benzyl or (CH₂)_mR₃; R₅ is saturated or unsaturated, straight-chain or branched-chain C₁₋₁₈ alkyl, hydroxyl C₁₋₁₈ alkyl, sulfhydryl C₁₋₁₈ alkyl, amino C₁₋₁₈ alkyl, acyl, phenyl, naphthyl or benzyl; R₆ is C₂₋₁₈ alkyl; R₇ is H or C₁₋₁₈ alkyl; Y⁻ is anion. This fluorescent dye can be used for biological staining, especially in the field of nucleic acids label, blood cell analysis, clinical diagnosis, immunoassay test and so on.

[见续页]

WO 2011/082566 A1



LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

- (84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,

根据细则 4.17 的声明:

- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(57) **摘要:**

本发明提供一类式 I 的荧光染料, 式中: X 为 C(CH₃)₂、O、S 或 Se; m 为 1~18 的整数; R₁ 和 R₂ 各自独立选自 H、C₁₋₁₈ 烷基、OR₇、-C₁₋₆ 烷基-OR₇ 或卤素; R₃ 为吡咯基、咪唑基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、胍基、NHR₅ 或 N(R₆)₂; R₄ 为 C₁₋₁₈ 烷基、苄基或(CH₂)_mR₃; R₅ 为饱和或不饱和、直链或支链的 C₁₋₁₈ 烷基、羟基 C₁₋₁₈ 烷基、巯基 C₁₋₁₈ 烷基、氨基 C₁₋₁₈ 烷基、酰基、苯基、萘基或苝基; R₆ 为 C₂₋₁₈ 烷基; R₇ 为 H 或 C₁₋₁₈ 烷基; Y 为负离子。该荧光染料可用于生物染色, 应用于核酸标记、血细胞分析、临床医疗诊断、免疫分析检测等领域:

一类荧光染料、制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及精细化工领域中一类新的荧光染料、制备方法及其应用，特别是涉及一类单电荷含氮菁类荧光染料、其制备方法，以及利用该荧光染料、其缀合物或其组合物在生物染色方面的应用。

背景技术

荧光染料作为功能性色素在科学技术的各个领域得到广泛应用，尤其在生命科学、临床医疗诊断、免疫分析检测等方面的研究在全世界备受瞩目。目前，菲啶类(EB、PI)、吡啶类(AO)、咪唑类(Hoechst、DAPI)和花菁家族类(Cy、TOTO、SYTO)等商品化荧光染料在基因组学技术、核酸定量检测、血细胞分析等领域中都起到了重要的作用。然而，这些染料都各自存在着应用的局限性。其一主要表现在大多荧光染料受限于固定细胞样品。例如TOPRO、TOTO家族染料、溴乙锭(EB)、碘化丙啶(PI)等需要通过增大细胞膜的通透性或类似使膜崩解的方法才能对生物样品进行有效的荧光标记。然而，这种固定方法往往对细胞和生物组织真实形态的观察有负面影响 [Kozubek S, Lukasova E, Amrichova J, Kozubek M, Liskova A, Slotova J. *Anal Biochem* 2000;282:29–38]。同时，溴乙锭等吡啶，菲啶类染料有很大的毒性和致癌性。其二，有相当一部分荧光染料的激发光处在紫外光区，如能够专一识别脱氧核糖核酸(DNA)的荧光染料4',6-二氨基-2-苯基咪唑啉化合物(DAPI)、Hoechst33258, Hoechst34580等，与DNA结合后，在紫外光激发放下产生蓝色荧光。由于紫外光对细胞内的核酸、蛋白等组分会造成严重的损伤，因此这类荧光在荧光显微技术中的使用受到光激发时间的限制 [Davis SK, Bardeen C, *J. Photochem Photobiol* 2003;77:675–679]。此外，在紫外区进行荧光检测时，生物样品在这个区间的吸收使光进入生物组织内部变得困难，同时生物样品中某些成分的自发荧光形成很强的背景干扰，使检测效率大大降低。因此，研究开发出具有良好荧光光谱性能，毒性小，活细胞通透性的新型荧光染料仍然是推动荧光分析技术和生命科学等领域发展的关键和核心。

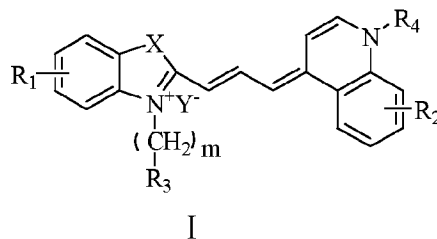
在众多种类的荧光染料中，菁类荧光染料以其波长范围宽，摩尔消光系数大，荧光量子产率适中等优点，作为生物分子荧光探针、CD和VCD记录材料、感光材料光敏剂、光电转换材料等已被广泛的应用。其中喹啉类不对称菁类荧

光染料与核酸有高度亲和力，而与其他生物大分子基本不结合的特异性使其在基因组学技术、核酸定量检测、血细胞分析等领域的应用中脱颖而出。该类化合物与核酸的结合方式包括静电吸引、碱基对嵌入及沟槽结合。具体的结合方式与结合能力取决于该标识物的结构及其与核酸浓度的比例。不对称菁类化合物中最典型的为TOTO及其类似物(YOYO)和衍生物类(TOPRPO)。TOTO (噻唑橙二聚体)、YOYO (恶唑黄二聚体)是由Glazer 研究组开发的一类对核酸具有高度亲和力的多正电荷不对称菁类荧光染料，通过改变多亚甲基链的长度和两端的芳香母核(噻唑、恶唑、喹啉、吡啶和吲哚啉)的结构可以得到不同的异二聚体类似物和衍生物。这类染料在溶液中几乎无荧光，降低了检测过程中的荧光背景干扰，与核酸结合后荧光增强。Jason等用溶液粘度测定法和原子力显微镜解释了TOTO和YOYO与DNA的双嵌入作用[J.A. Bordelon, K.J. Feierabend, S.A. Siddiqui, L.L. Wright. *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106, 4838-3843]。Fürstenberg 等利用超快速荧光转换和时间相关单光子计数法进一步阐述了荧光增强的动力学机理。[A. Fürstenberg, M.D. Julliard, T.G. Deligeorgie, N.I. Gadjev. *J. AM. CHEM. SOC.*, 2006, 128, 7661-7669] 此类染料中的有些品种已经商品化了，如：SYTOX Blue, TOTO, POPO, BOBO, YO-PRO 等。但这些商品化的染料大部分分子较大，结构复杂，属活细胞非通透性，只能应用于活体外核酸的识别与检测。

发明内容

因此，需要开发新的荧光染料，该荧光染料应当具有以下优点：在不存在核酸时具有较低的荧光背景，与核酸结合后具有较高的荧光量子产率，且对核酸以外的生物分子无亲和力；具有一定水平的水溶性，同时具有良好的细胞膜通透性；光谱范围与生物样品的光谱范围有较大差异。

在本发明的第一方面，本发明针对现有技术的不足，在其基础上改进，提供了一类结构简单、灵敏度高、长波长、且具有良好的细胞膜通透性的新化合物，其具有下列结构通式 I：



通式 I 中

X 为 C(CH₃)₂、O、S 或 Se；

m 为 1~18 的整数；

R_1 和 R_2 独立选自 H、 C_{1-18} 烷基、 OR_7 、 $-C_{1-6}$ 烷基- OR_7 或卤素。

R_3 为吡咯基、咪唑基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、胍基、 NHR_5 或 $N(R_6)_2$ ；

R_4 为 C_{1-18} 烷基、苄基或 $(CH_2)_mR_3$ ，所述苄基任选由选自以下的取代基取代：H、 C_{1-18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基氨基、 C_{1-6} 酰氨基、卤素、或 C_{1-6} 卤代烷基；

R_5 饱和或不饱和、直链或支链的 C_{1-18} 烷基、羟基 C_{1-18} 烷基、巯基 C_{1-18} 烷基、氨基 C_{1-18} 烷基、酰基、苯基、萘基或苄基，所述的苯基、萘基或苄基任选由选自以下的取代基取代：H、 C_{1-18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基氨基、 C_{1-6} 酰氨基、卤素、或 C_{1-6} 卤代烷基；

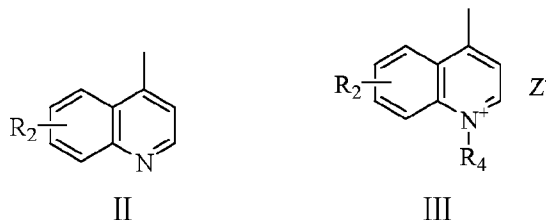
R_6 为 C_{2-18} 烷基；

R_7 为 H 或 C_{1-18} 烷基；

Y 为负离子。

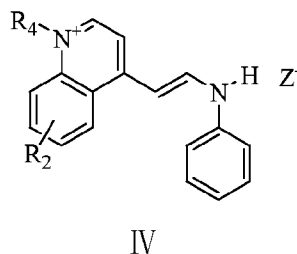
在本发明的第二方面提供一种制备本发明所述的化合物的方法，所述方法包括以下步骤：

1) 式 II 的 4-甲基喹啉芳香杂环化合物与 R_4Z 化合物反应制得第一季铵盐中间体 III，其中 Z 为卤素或 OTs，Z 为反应生成的卤素负离子或 OTs^- ：



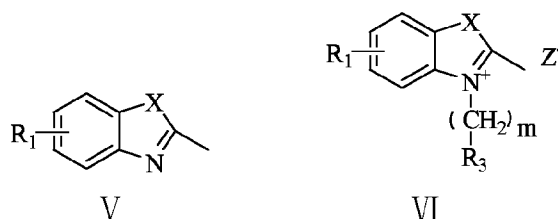
反应温度为 10-180℃，反应时间为 4-48 小时，反应溶剂为选自：二氯甲烷、氯仿、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、甲苯、二甲苯、邻二氯苯或它们的混合物的极性有机溶剂，式 II 化合物与 R_4Z 化合物的投料摩尔比为 1:1- 1:10；

2) 将步骤 1) 中得到的第一季铵盐中间体 III 与 N,N'-二苯基甲脒缩合，得到式 IV 化合物：



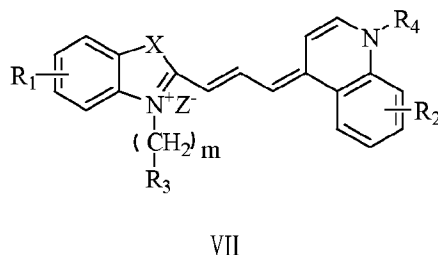
反应温度为 50-200℃，反应时间为 15 分钟到 4 小时，无反应溶剂或反应溶剂为醋酐、醋酸或其混合物，第一季铵盐中间体 III 与 N,N'-二苯基甲脒的投料摩尔比为 1:1- 1:4；

3)使通式 V 化合物与化合物 $R_3(CH_2)_mZ$ 反应制得第二季铵盐中间体 VI，其中 Z 为卤素或 OTs, Z 为反应生成的卤素负离子或 OTs⁻；



反应温度为 10-180℃，反应时间为 4-48 小时，反应溶剂为选自：二氯甲烷、氯仿、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、甲苯、二甲苯、邻二氯苯或它们的混合物的极性有机溶剂，式 V 化合物与化合物 $R_3(CH_2)_mZ$ 的投料摩尔比为 1:1- 1:10；

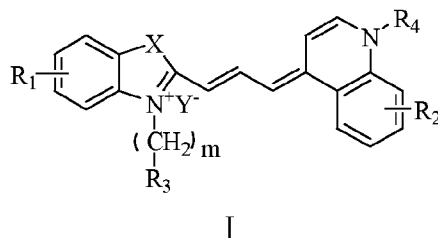
4) 将步骤 (2) 中得到的式 IV 化合物与步骤 (3) 中得到的第二季铵盐中间体 VI 反应，得到式 VII 化合物：



反应温度为 5-130℃，反应时间为 10 分钟到 6 小时，无反应溶剂或反应溶剂为选自：二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙二醇单甲醚、或它们的混合物的极性有机溶剂，催化剂为醋酐与有机碱的混合物，VI 与式 IV 化合物的投料摩尔比为 1.5:1- 1:1.5；

上述结构式中 X、m、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆ 和 R₇ 的定义同上述本发明化合物中的定义；

5) 将步骤 (4) 中得到的化合物 VII 与含 Y⁻ 的钠盐或钾盐进行负离子置换，得到式 I 化合物：



反应温度为 60-140℃,反应时间为 10 分钟到 2 小时,反应溶剂为选自 DMF、DMSO、或其混合物的极性有机溶剂,含 Y⁻的钠盐或钾盐与式 VII 化合物的投料摩尔比为 1:1- 10:1;

其中 Y 的定义如上述本发明化合物中的定义。

附图说明

图 1 是实施例 2 的化合物 A 和商品化染料溴乙锭(EB) 在 pH 7.36、浓度 10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液中,与小牛胸腺 DNA 结合前后相对荧光强度比照图。横坐标为波长(nm),纵坐标为相对荧光强度。所用仪器为紫外可见分光光度计,型号: Hp8453; 荧光分光光度计,型号: FP-6500。化合物 A 和溴乙锭(EB) 的浓度均为 1μM,小牛胸腺 DNA 的浓度为 100μM。

图 2 是实施例 3 的化合物 B 和商品化染料溴乙锭(EB) 在 pH 7.4、浓度 10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液中,与小牛胸腺 DNA 结合前后相对荧光强度比照图。横坐标为波长(nm),纵坐标为相对荧光强度。所用仪器为紫外可见分光光度计,型号: Hp8453; 荧光分光光度计,型号: FP-6500。化合物 B 和溴乙锭(EB) 的浓度均为 1μM,小牛胸腺 DNA 的浓度为 100μM。

图 3 是实施例 4 的化合物 C 和商品化染料溴乙锭(EB) 在 pH 7.24、浓度 10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液中,与小牛胸腺 DNA 结合前后相对荧光强度比照图。横坐标为波长(nm),纵坐标为相对荧光强度。所用仪器为紫外可见分光光度计,型号: Hp8453; 荧光分光光度计,型号: FP-6500。化合物 A 和溴乙锭(EB) 的浓度均为 1μM,小牛胸腺 DNA 的浓度为 100μM。

图 4 是化合物 A 和已知化合物 M₁、化合物 M₂,在 pH 为 7.4 和浓度 10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液中,与小牛胸腺 DNA 结合前后荧光量子产率比照图。纵坐标为荧光量子产率。所用仪器为紫外可见分光光度计,型号: Hp8453; 荧光分光光度计,型号: FP-6500。化合物 A 和化合物 M₁、M₂ 的浓度均为 1μM,小牛胸腺 DNA 的浓度为 100μM。

图 5 是化合物 A 和已知化合物 M₁ 分别在 pH 7.0、浓度 10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液中,与牛血清白蛋白和小牛胸腺 DNA 结合后以及未结合前的荧光增强倍数的比照图。纵坐标为荧光增强倍数。所用仪器为荧光分光光度计,型号: FP-6500。化合物 A 和化合物 M₁ 的浓度均为 1μM,牛血清白蛋白和小牛胸腺 DNA 的浓度均为 40μg/ml。

图 6A 为化合物 A 对活细胞 MCF-7(人乳腺癌细胞)染色的白场显微照片, 6B

是化合物 A 对活细胞 MCF-7 染色的荧光显微照片。化合物 A 的浓度为 $2\mu\text{M}$ 。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号：TCS-SP2。激发光通道：Cy5(633nm)。

图 7A 为实施例 5 的化合物 D 对活细胞 MCF-7(人乳癌细胞)染色的白场显微照片，7B 是化合物 D 对活细胞 MCF-7 染色的荧光显微照片。化合物 D 的浓度为 $1.5\mu\text{M}$ 。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号：TCS-SP2。激发光通道：Cy5(633nm)。

图 8A 为实施例 6 的化合物 E 对活细胞 MCF-7(人乳癌细胞)染色的白场显微照片，8B 是化合物 E 对活细胞 MCF-7 染色的荧光显微照片。化合物 A 的浓度为 $3\mu\text{M}$ 。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号：TCS-SP2。激发光通道：Cy5(633nm)。

图 9A 是已知化合物 M_1 对活细胞 MCF-7(人乳癌细胞)染色的白场显微照片，9B 为化合物 M_1 对活细胞 MCF-7 染色的荧光显微照片。化合物 M_1 的浓度为 $2\mu\text{M}$ 。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号：TCS-SP2。激发光通道：Cy5(633nm)。

具体实施方式

除另有说明外，本文中使用的术语具有以下含义。

本文中使用的术语“烷基”包括直链烷基和支链烷基。如提及单个烷基如“丙基”，则只特指直链烷基，如提及单个支链烷基如“异丙基”，则只特指支链烷基。例如，“ C_{1-6} 烷基”包括 C_{1-4} 烷基、 C_{1-3} 烷基、甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。类似的规则也适用于本说明书中使用的其它基团。

本文中使用的术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

本文中使用的术语“苄基”是指 $-\text{CH}_2-\text{Ph}$ 基团。当用“任选取代”修饰苄基时，指该苄基可以未取代的形式存在，或者可被合适的取代基在任何合适的位置取代。合适的取代基包括但不限于 H、 C_{1-18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基氨基、 C_{1-6} 酰氨基、卤素、或 C_{1-6} 卤代烷基等，只要最终形成的化合物具有本发明期望的性质。优选苄基由 COOH、 NH_2 、OH、 C_{1-6} 烷氧基、卤素任选取代。

本文中使用的 Y⁻表示负离子，其可为任何合适的负离子，包括但不限于无机负离子或有机负离子，例如卤素离子、 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 、 CH_3COO^- 或 OTs^- 。

在本发明的通式 I 化合物中，优选 X 为 C(CH₃)₂、O 或 S；更优选 X 为 C(CH₃)₂ 或 S；最优选 X 为 S。

优选 R_1 和 R_2 各自独立选自 H 或 C_{1-18} 烷基；再更优选 R_1 和 R_2 各自独立选自 H 或 C_{1-12} 烷基；再更优选 R_1 和 R_2 各自独立选自 H 或 C_{1-6} 烷基；最优选 R_1 和 R_2 均为 H。

优选 R_3 为 NHR_5 、 $N(R_6)_2$ 、吡咯基或哌啶基；最优选 R_3 为 NHR_5 或 $N(R_6)_2$ 。

优选 R_4 为 C_{1-18} 烷基或者苄基；更优选 R_4 为 C_{1-12} 烷基或者苄基；最优选 R_4 为 C_{1-6} 烷基或苄基；所述苄基由选自以下的取代基任选取代：H、 C_{1-18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基氨基、 C_{1-6} 酰氨基、卤素、或 C_{1-6} 卤代烷基；优选苄基由 COOH、 NH_2 、OH、 C_{1-6} 烷氧基、卤素任选取代。

优选 R_5 为饱和或不饱和、直链或支链的 C_{1-18} 烷基、或氨基 C_{1-18} 烷基；更优选 R_5 为饱和或不饱和、直链或支链的 C_{1-12} 烷基；最优选 R_5 为饱和或不饱和、直链或支链的 C_{1-6} 烷基。

优选 R_6 为 C_{2-6} 烷基。

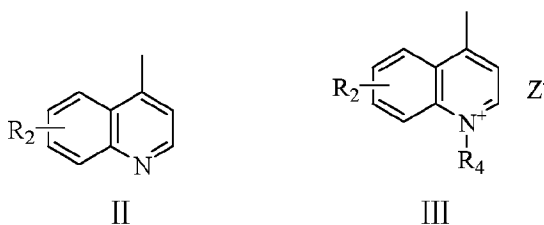
优选 R_7 为 H 或 C_{1-6} 烷基。

优选 Y 为卤素离子、 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 、 CH_3COO^- 或 OTs^- 。

在另一个方面，本发明还提供了上述化合物的制备方法，所述方法包括：

分别制备第一及第二季铵盐中间体，然后将第一或第二季铵盐中间体中的一个与 N,N-二苯基甲脒反应，之后再与另一中间体在有机碱（例如胺）和醋酐的作用下反应得到所述化合物。具体合成方案如下所述。

首先是制备第一季铵盐中间体，即结构通式为(II)的 4-甲基喹啉反应原料与化合物 R_4Z 反应，可制得第一季铵盐中间体(III)，Z 为卤素或 OTs，Z 为反应生成的卤素负离子或 OTs^- ：



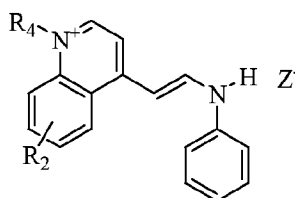
反应温度为 $10-180^{\circ}C$ ，反应时间为 4-48 小时，反应溶剂为选自：二氯甲烷、氯仿、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、甲苯、二甲苯、邻二氯苯或其混合物等的极性有机溶剂，原料式 II 化合物与化合物 R_4Z 的摩尔比为 1:1- 1:10。

在一个优选的实施方式中，反应温度为 $40-140^{\circ}C$ ，反应时间为 6-36 小时，反应溶剂为选自：氯仿、乙腈、甲苯、二甲苯、邻二氯苯或其混合物等的极性有机溶剂，式 II 化合物与化合物 R_4Z 的摩尔比为 1:1- 1:6。

在一个更优选的实施方式中，反应温度为 50-120℃，反应时间为 8-24 小时，反应溶剂为乙腈、甲苯、邻二氯苯或其混合物等的极性有机溶剂，式 II 化合物与化合物 R₄Z 的摩尔比为 1:1- 1:3。

在最优选的实施方式中，反应温度为 60-110℃，反应时间为 8-14 小时，反应溶剂为甲苯、邻二氯苯或其混合物等的极性有机溶剂，式 II 化合物与化合物 R₄Z 的摩尔比为 1:1- 1:1.5。

然后，将制得的 4-甲基喹啉的季铵盐中间体(III)与 N,N-二苯基甲脒缩合，得到具有通式 IV 的化合物：



IV

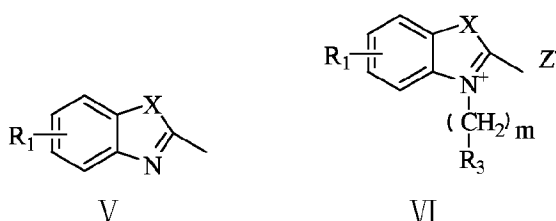
反应温度为 50-200℃，反应时间为 15 分钟到 4 小时，无反应溶剂或反应溶剂为醋酐、醋酸或其混合物，第一季铵盐中间体 III 与 N,N'-二苯基甲脒的投料摩尔比为 1:1- 1:4。

在一个优选实施方式中，反应温度为 70-170℃，反应时间为 20 分钟到 3 小时，无反应溶剂或反应溶剂为醋酐、醋酸或其混合物，第一季铵盐中间体 III 与 N,N'-二苯基甲脒的摩尔比为 1:1- 1:3。

在一个更优选的实施方式中，反应温度为 90-160℃，反应时间为 30 分钟到 2 小时，无反应溶剂或反应溶剂为醋酐、醋酸或其混合物，第一季铵盐中间体 III 与 N,N'-二苯基甲脒的摩尔比为 1:1.2- 1:3。

在最优选的实施方式中，反应温度为 120-160℃，反应时间为 30 分钟到 1.5 小时，无反应溶剂或反应溶剂为醋酐，第一季铵盐中间体 III 与 N,N'-二苯基甲脒的摩尔比为 1:1.2- 1:2；

通过与制备式 III 化合物类似的方法，使具有通式 V 的化合物，优选含取代基 R₁ 的 2-甲基苯并噻唑、含取代基 R₁ 的 2-甲基苯并恶唑、含取代基 R₁ 的 2-甲基苯并硒唑、或含取代基 R₁ 的 2,3,3-三甲基-3H-吲哚啉反应原料，与化合物 R₃(CH₂)_mZ 反应，制得第二季铵盐中间体 VI，其中 Z 为卤素或 OTs，Z 为反应生成的卤素负离子或 OTs⁻；



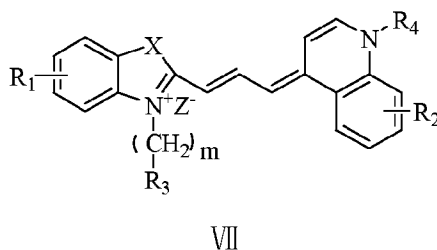
反应温度为 10-180℃，反应时间为 4-48 小时，反应溶剂为选自：二氯甲烷、氯仿、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、甲苯、二甲苯、邻二氯苯或其混合物等极性有机溶剂，反应原料式 V 化合物与化合物 $R_3(CH_2)_mZ$ 的投料摩尔比为 1:1-1:10。

在一个优选实施方式中，反应温度为 60-140℃，反应时间为 6-36 小时，反应溶剂为选自：氯仿、乙腈、甲苯、二甲苯、邻二氯苯或其混合物等的极性有机溶剂，式 V 化合物与化合物 $R_3(CH_2)_mZ$ 的投料摩尔比为 1:1-1:6。

在一个更优选的实施方式中，反应温度为 80-120℃，反应时间为 10-24 小时，反应溶剂为选自：乙腈、甲苯、邻二氯苯或其混合物等的极性有机溶剂，式 V 化合物与化合物 $R_3(CH_2)_mZ$ 的投料摩尔比为 1:1-1:3。

在一个最优选的实施方式中，反应温度为 90-120℃，反应时间为 12-18 小时，反应溶剂为甲苯、邻二氯苯或其混合物等的极性有机溶剂，式 V 化合物与化合物 $R_3(CH_2)_mZ$ 的投料摩尔比为 1:1-1:2。

然后将式(VI)化合物与第二季铵盐中间体 VI 在醋酐和有机碱（例如胺）的作用下反应，即可得到式 VII 的单电荷含氮菁类化合物：



反应温度为 5-130℃，反应时间为 10 分钟到 6 小时，无反应溶剂或反应溶剂为选自：二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙二醇单甲醚或其混合物等的极性有机溶剂，催化剂为醋酐与有机碱的混合物。所述有机碱优选选自：二乙胺、正丙胺、三乙胺、吡啶、哌啶、或其混合物。第二季铵盐中间体 VI 与式 IV 化合物的投料摩尔比为 1.5:1-1:1.5。

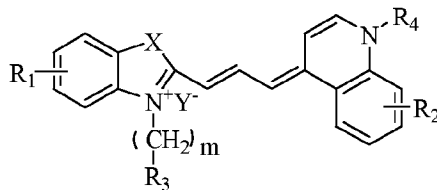
在一个优选的实施方式中，反应温度为 20-130℃，反应时间为 30 分钟到 5 小时，无反应溶剂或反应溶剂选自：甲醇、乙醇、乙二醇单甲醚、或其混合物

等的极性有机溶剂，有机碱选自三乙胺、吡啶、哌啶、或其混合物，第二季铵盐中间体VI与式IV化合物的投料摩尔比为 1.2:1- 1:1.5。

在一个更优选的实施方式中，反应温度为 30-120℃，反应时间为 1-4 小时，无反应溶剂或反应溶剂选自：甲醇、乙二醇单甲醚、或其混合物等的极性有机溶剂。有机碱选自三乙胺、吡啶或其混合物，第二季铵盐中间体VI与式IV化合物的投料摩尔比为 1.2:1- 1:1.2。

在一个最优选的实施方式中，反应温度为 30-100℃，反应时间为 1.5-3 小时，无反应溶剂或反应溶剂为甲醇、乙二醇单甲醚或其混合物等极性有机溶剂，催化剂中的有机碱为三乙胺、吡啶或其混合物，第二季铵盐中间体VI与式IV化合物的投料摩尔比为 1:1。

最后，根据需求，将化合物VII与含 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 或 CH_3COO^- 的钠盐或钾盐进行负离子置换，得到本发明的式 I 化合物：



I

反应温度为 60-140℃，反应时间为 10 分钟到 2 小时，反应溶剂为选自：DMF、DMSO、或其混合物等的极性有机溶剂，含 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 或 CH_3COO^- 的钠盐或钾盐与式VII化合物的投料摩尔比为 1:1- 10:1。

在一个优选实施方式中，反应温度为 70-130℃，反应时间为 15 分钟到 1.5 小时，反应溶剂为 DMF、DMSO 或其混合物等的极性有机溶剂。含 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 或 CH_3COO^- 的钠盐或钾盐与式VII化合物的摩尔比为 1:1- 7:1。

在一个更优选的实施方式中，反应温度为 80-120℃，反应时间为 20 分钟到 1 小时，反应溶剂为 DMF，含 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 或 CH_3COO^- 的钠盐或钾盐与式VII化合物的投料摩尔比为 1:1- 4:1。

在一个最优选的实施方式中，反应温度为 90-110℃，反应时间为 30 分钟，反应溶剂为 DMF，含 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 或 CH_3COO^- 的钠盐或钾盐与式VII化合物的投料摩尔比为 1:1- 2:1。

由本发明上述方法合成的式 I 化合物产物，可以采用核磁共振谱图或质谱来确认。还可以辅以碳谱、熔点测试来辅助确认其结构。

在本发明提供的上述通式 I 化合物中，最主要和最重要的结构特征是：由

原料式 V 化合物制备第二季铵盐中间体 VI 时所引入的含氮取代基团 $(\text{CH}_2)_m\text{R}_3$ 。其中，与 R_3 直接相连的 $-\text{CH}_2-$ 在 ^1H 核磁共振波谱中化学位移 δ : $4-6(m=1)$; $2-4(m=2\sim 18)$ 。

本发明还提供上述化合物的缀合物及包含上述化合物或其缀合物的组合物。

本发明还提供一种利用上述化合物、其缀合物或其组合物在生物染色方面的应用。

本发明的化合物用作荧光染料时具备的有益效果在于：

新化合物分子中引入含氮取代基，使染料与核酸的结合后荧光量子产率增大，提高了检测灵敏度。

新化合物分子引入的含氮取代基是非季胺化（非正电荷化）的，因此具有良好的细胞膜通透性，应用范围增大。

新化合物分子中引入含氮取代基，适当增大了分子极性，减小了对膜脂，蛋白等分子内部疏水区域的结合力，显现出对核酸的特异性结合。

新染料化合物一端引入喹啉杂环，与甲川链相同的对称苯并噻唑和吲哚啉类菁染料相比，紫外吸收最大波长可增加约 80nm，荧光发射波长可达 650nm，避免生物自身的荧光背景干扰。

新化合物可应用廉价、体积小、性能稳定的红色半导体激光器作为光源，大大降低使用成本。

新化合物产品毒副性小，原料易得，结构简单，一般通过 4 到 5 步反应即可合成目标分子，易产业化。

本发明的这些特征和优点以及其他特征和优点在参考以下附图和本发明的具体实施方式之后将变得显而易见。

本发明化合物可以以本文中所述的盐形式直接用于生物样品的染色。另外，本发明化合物的衍生物也可以用于生物样品的染色，所述衍生物包括但不限于缀合物。

典型地，缀合物在荧光激活细胞分选仪(FACS)中使用。本文中使用的“缀合物”是指本发明荧光染料通过共价键与其它分子连接而形成的化合物。可与本发明荧光染料缀合的分子可为与细胞或细胞成分特异性结合分子，包括但不限于抗体、抗原、受体、配体、酶、底物、辅酶等。通常，测试样品与荧光缀合物温育一段时间，使得该荧光缀合物与测试样品中的某些细胞或细胞成分特异性结合，该荧光缀合物与细胞或细胞成分的结合也可被称为染色。该染色步骤可依次进行多次，或用多种缀合物同

时进行多种染色。染色完成后，样品在荧光激活细胞分选仪中进行分析，其中激发光源激发缀合物中的本发明荧光染料，而测定装置测定由激发的荧光染料产生的发射光。

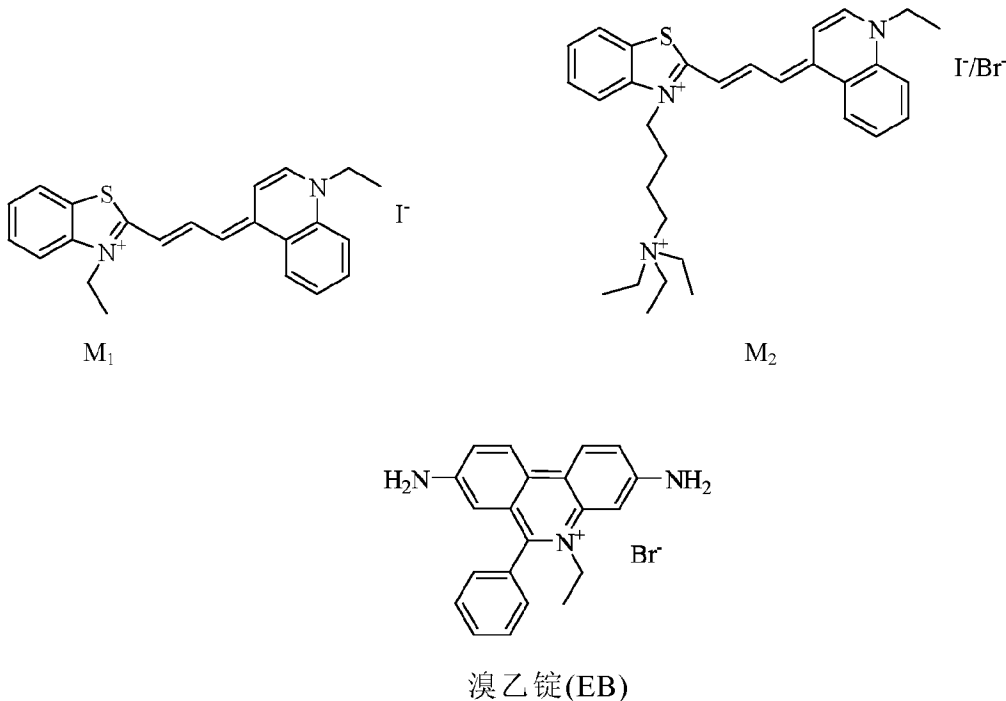
本发明还提供包含式 I 化合物或其缀合物的组合物，所述组合物用于生物样品的染色。

本发明的组合物除包含式 I 化合物或其缀合物外，还可包含生物样品染色所需要的其它组分，例如溶剂、渗透压调节剂、pH 调节剂、表面活性剂等。这些组分都是本行业内已知的。

本发明的组合物可以以水溶液形式存在，或者可以以临用前用水配制为溶液的其他合适形式存在。

在再一个方面，本发明还提供使用上述式 I 化合物、或其缀合物、或包含式 I 化合物的组合物以染色生物样品的方法，该方法包括使上述式 I 化合物或其缀合物或包含式 I 化合物的组合物与生物样品接触的步骤。本文中使用的术语“接触”可包括在溶液或固相中接触。

为了说明本发明的化合物在结构中引入含氮基团后对染料性能的优化改进，实施例 7、8、9、10、11 和比较例 15 中以化合物 M₂、已知化合物 M₁ 及商品化染料溴乙锭(EB)作为参照物，进行对比说明。其中化合物 M₁ 和 M₂ 结构如下：



实施例

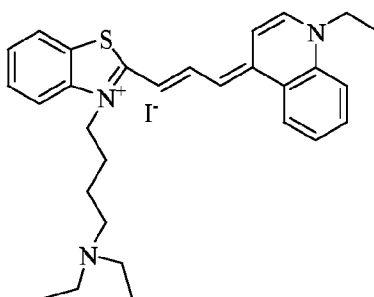
实施例 1

染料中间体 1-乙基-4-甲基喹啉季铵盐的合成:

将 20mmol 4-甲基喹啉和 40mmol 碘乙烷加入到 100ml 含 20ml 甲苯的圆底烧瓶中, 氩气保护。反应加热回流持续反应 10h 后停止。混合物冷却后过滤沉淀并用乙醚洗涤滤饼。干燥后得到淡黄色的固体粉末, 粗收率 85%。

实施例 2

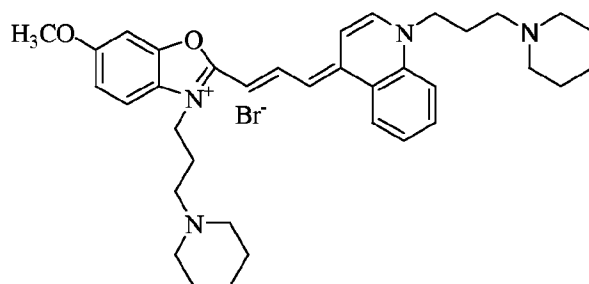
化合物 A 的制备:



将 10mmol 1-乙基-4-甲基喹啉季铵盐与 10mmol N, N'-二苯基甲脒于 160°C 油浴上加热搅拌 0.5 小时。将反应得到的红褐色固体在乙醇中重结晶, 得到紫红色晶体, 过滤, 干燥, 收率 45%。向其中加入 1-N,N-二乙胺基丁基-2-甲基苯并噻唑季铵盐 4.5mmol, 三乙胺及醋酐各 1.5ml, 在 25ml 乙二醇单甲醚中室温搅拌 1.5 小时。将反应液倒入乙醚中, 析出暗紫色小颗粒, 过滤, 干燥。染料通过硅胶柱分离, 用洗脱液二氯甲烷和甲醇梯度洗脱, 收集蓝色组分, 收率 60%。¹H-NMR (400 MHz, DMSO, TMS): δ 1.20 (t, 6H), 1.23 (t, 3H), 2.05 (m, 2H), 2.18 (m, 2H), 2.55-2.65 (m, 6H), 3.74 (t, 2H), 4.55 (tetra, 2H), 6.50 (d, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.30-8.07 (m, 8H), 8.15 (t, 1H), 8.41 (d, 1H), 8.48 (d, 1H)。MS (EI) C₂₉H₃₆IN₃S m/z: 458.26 [M-I]⁺。

实施例 3

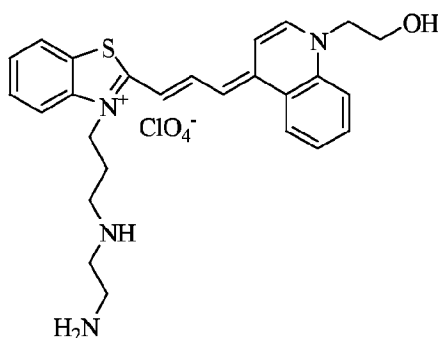
化合物 B 的制备:



将10mmol 1-(3-哌啶基)-丙基-4-甲基喹啉季铵盐与25mmolN, N'-二苯基甲脒在30ml的醋酐中于120°C油浴上加热搅拌1.5小时。冷却后,将反应液中析出的橙黄色固体,过滤,干燥,通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷和甲醇梯度洗脱,收集黄色组分,收率52%。向其中加入1-(3-哌啶基)-丙基-2-甲基-5-甲氧基苯并噻唑季铵盐5mmol,哌啶和醋酐各1.5ml,在25ml乙二醇单甲醚中回流搅拌1.5小时。冷却后,将反应液倒入乙醚中,析出暗紫色小颗粒,过滤,干燥。染料通过中性氧化铝柱分离,用洗脱液二氯甲烷和乙醇梯度洗脱,收集蓝色组分,收率44%。¹H-NMR (400 MHz, DMSO, TMS): δ 1.22-1.26 (m, 12H), 2.34(m, 2H), 2.38 (m, 2H), 2.62-2.74 (m, 6H), 3.73 (s, 3H), 3.78 (t, 2H), 4.58 (t, 2H), 6.50 (d, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.30-8.07 (m, 7H), 8.15 (t, 1H), 8.42 (d, 1H), 8.48 (d, 1H)。MS (EI) C₃₆H₄₇BrN₄O₂ m/z:567.37[M-Br]⁺。

实施例 4

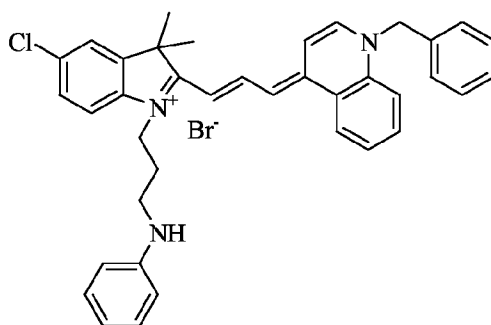
化合物 C 的制备:



将10mmol 1-羟基乙基-4-甲基喹啉季铵盐与10mmolN, N'-二苯基甲脒于160°C油浴上加热搅拌0.5小时。将反应得到的红褐色固体在乙醇中重结晶,得到紫红色晶体,过滤,干燥,收率48%。向其中加入1-氨基乙基氨基丙基-2-甲基苯并噻唑季铵盐5mmol及吡啶和醋酐各1.5ml,在20ml乙二醇单甲醚中室温搅拌1.5小时。再向反应液中加入5mmol NaClO₄溶于2mlDMF中得到的溶液,加热至回流搅拌30分钟,将反应液倒入乙醚中,析出蓝绿色小颗粒,过滤,干燥。染料通过中性氧化铝柱分离,用洗脱液二氯甲烷和乙醇梯度洗脱,收集蓝色组分,收率48%。¹H-NMR (400 MHz, DMSO, TMS): δ 2.34(m, 2H), 2.58-2.76 (m, 6H), 3.74 (t, 2H), 3.82 (tetra, 2H), 4.65 (t, 2H), 5.15(t, 1H), 6.50 (d, 1H), 7.12 (d, 1H), 7.30-8.07 (m, 8H), 8.15 (t, 1H), 8.41 (d, 1H), 8.48 (d, 1H)。MS (EI) C₂₆H₃₁ClN₄O₅S m/z:447.22 [M-ClO₄]⁺。

实施例 5

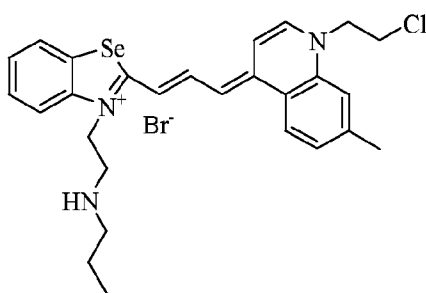
化合物 D 的制备:



将 10mmol 1-苄基-4-甲基喹啉季铵盐与 10mmol N, N'-二苯基甲脒于 160°C 油浴上加热搅拌 0.5 小时。将反应得到的红褐色固体在乙醇中重结晶, 得到紫红色晶体, 过滤, 干燥, 收率 42%。向其中加入 1-苯胺基丙基-2, 3, 3-三甲基-5-氯-3H-吡啶季铵盐 4mmol, 三乙胺及醋酐各 1.5ml, 20ml 甲醇中室温搅拌 4 小时。将反应液倒入乙醚中, 析出暗紫色小颗粒, 过滤, 干燥。染料通过硅胶柱分离, 用洗脱液二氯甲烷和甲醇梯度洗脱, 收集蓝色组分, 收率 47%。
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , TMS): δ 1.73 (s, 6H), 2.34 (m, 2H), 3.08 (t, 2H), 3.74 (t, 2H), 5.71 (s, 2H), 6.48 (d, 1H), 7.12 (d, 1H), 7.21-7.80 (m, 17H), 8.15 (t, 1H), 8.41 (d, 1H), 8.48 (d, 1H)。MS (EI) $\text{C}_{38}\text{H}_{37}\text{BrClN}_3$: m/z : 570.27 $[\text{M}-\text{Br}]^+$ 。

实施例 6

化合物 E 的制备:



将 10mmol 1-氯乙基-4, 7-二甲基喹啉季铵盐与 20mmol N, N'-二苯基甲脒在 30ml 的醋酐中于 120°C 油浴上加热搅拌 1.5 小时。冷却后, 将反应液中析出的橙黄色固体, 过滤, 干燥, 通过硅胶柱分离, 用洗脱液二氯甲烷和甲醇梯度洗脱, 收集黄色组分, 收率 47%。向其中加入 1-(N-丙基)-胺基乙基-2-甲基苯并硒唑季铵盐 5mmol, 正丙胺及醋酸酐各 2ml, 在 25ml 乙二醇单甲醚中回流搅拌 3 小时。冷却后, 将反应液倒入乙醚中, 析出暗紫色小颗粒, 过滤, 干

燥。染料通过硅胶柱分离，用洗脱液二氯甲烷和甲醇梯度洗脱，收集蓝色组分，收率 43%。将反应液倒入乙醚中，析出蓝绿色小颗粒，过滤，干燥。染料通过硅胶柱分离，用洗脱液二氯甲烷和甲醇梯度洗脱，收集蓝色组分，收率 66%。¹H-NMR (400 MHz, DMSO, TMS): δ 0.96 (t, 3H), 1.23 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.55 (tetra, 2H), 2.65 (tetra, 2H), 3.74 (t, 2H), 3.86 (t, 2H), 4.65 (t, 2H), 6.50 (d, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.30-8.07 (m, 7H), 8.15 (t, 1H), 8.41 (d, 1H), 8.48 (d, 1H)。MS (EI) C₂₇H₃₁BrClN₃Se: m/z: 512.14 [M-Br]⁺。

实施例 7

化合物 A 和商品化染料溴乙锭(EB)与小牛胸腺 DNA 结合前后荧光发射光谱及相对荧光强度的测定：

配置浓度为 1mM 的化合物 A 的 DMSO(二甲基亚砷)溶液和溴乙锭(EB)的水溶液，分别取 3 μ L，再加 pH 7.36、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液稀释至 3mL，置于比色皿中，测定其荧光强度。配置一定浓度的小牛胸腺 DNA 的水溶液，通过紫外吸收分光光度计测定其 260nm 处的吸光度值，标定其浓度为 1.5mM。另分别取浓度为 1mM 的化合物 A 的 DMSO(二甲基亚砷)溶液和溴乙锭(EB)的水溶液 3 μ L 于比色皿中，再分别向其中加入浓度为 1.5mM 的小牛胸腺 DNA 溶液 200 μ L，最后加 pH 7.36、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液稀释至 3mL，测定其荧光强度。相同条件下（相同底物浓度和 DNA 浓度），商品化染料溴乙锭(EB)，与小牛胸腺 DNA 结合后，相对荧光强度增加 19($I/I_0 = 36.3/1.89 = 19$)倍；而化合物 A 与小牛胸腺 DNA 结合后，相对荧光强度可增加 55($I/I_0 = 345.3/6.25 = 55$)倍。所用仪器为紫外可见分光光度计，型号：Hp8453；荧光分光光度计，型号：FP-6500。

实施例 8

化合物 B 和商品化染料溴乙锭(EB)与小牛胸腺 DNA 结合前后荧光发射光谱及相对荧光强度的测定：

配置浓度为 1mM 的化合物 B 的 DMSO(二甲基亚砷)溶液和溴乙锭(EB)的水溶液，分别取 3 μ L，加 pH 7.4、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液稀释至 3mL，置于比色皿中，测定其荧光强度。配置一定浓度的小牛胸腺 DNA 的水溶液，通过紫外吸收分光光度计测定其 260nm 处的吸光度值，标定其浓度为 1.5mM。另分别取浓度为 1mM 的化合物 B 的 DMSO(二甲基亚砷)溶液和溴乙锭(EB)的水溶液 3 μ L 于比色皿中，再分别向其中加入浓度为 1.5mM 的小

牛胸腺 DNA 溶液 200 μ L, 最后加 pH 7.4、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液稀释至 3mL, 测定其荧光强度。相同条件下(相同底物浓度和 DNA 浓度), 商品化染料溴乙锭(EB), 与小牛胸腺 DNA 结合后, 相对荧光强度增加 19($I/I_0 = 36.3/1.89 = 19$)倍; 而化合物 B 与小牛胸腺 DNA 结合后, 相对荧光强度可增加 89($I/I_0 = 203.3/2.28 = 89$)倍。所用仪器为紫外可见分光光度计, 型号: Hp8453; 荧光分光光度计, 型号: FP-6500。

实施例 9

化合物 C 和商品化染料溴乙锭(EB)与小牛胸腺 DNA 结合前后荧光发射光谱及相对荧光强度的测定:

配置浓度为 1mM 的化合物 C 的 DMSO(二甲基亚砜)溶液和溴乙锭(EB)的水溶液, 分别取 3 μ L, 加 pH 7.24、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液稀释至 3mL, 置于比色皿中, 测定其荧光强度。配置一定浓度的小牛胸腺 DNA 的水溶液, 通过紫外吸收分光光度计测定其 260nm 处的吸光度值, 标定其浓度为 1.5mM。另分别取浓度为 1mM 的化合物 C 的 DMSO(二甲基亚砜)溶液和溴乙锭(EB)的水溶液 3 μ L 于比色皿中, 再分别向其中加入浓度为 1.5mM 的小牛胸腺 DNA 溶液 200 μ L, 最后加 pH 7.24、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液稀释至 3mL, 测定其荧光强度。相同条件下(相同底物浓度和 DNA 浓度), 商品化染料溴乙锭(EB), 与小牛胸腺 DNA 结合后, 相对荧光强度增加 19($I/I_0 = 36.3/1.89 = 19$)倍; 而化合物 A 与小牛胸腺 DNA 结合后, 相对荧光强度可增加 75($I/I_0 = 274.5/3.65 = 75$)倍。所用仪器为紫外可见分光光度计, 型号: Hp8453; 荧光分光光度计, 型号: FP-6500。

实施例 10

化合物 A 和已知化合物 M_1, M_2 与小牛胸腺 DNA 结合前后荧光量子产率的测定:

取一定量的浓度为 1mM 的化合物 A 和化合物 M_1, M_2 的 DMSO 溶液, 加入到 pH 7.4、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐的缓冲溶液中, 使其满足经紫外可见分光光度计测定最大吸收值 < 0.1 。分别选定激发波长测定荧光强度。平行测定三次, 算出荧光量子产率, 取平均值。以罗丹明 B 作为标准物($\Phi_F = 0.97$, 乙醇, 15 $^{\circ}$ C)计算, 在缓冲溶液中, 化合物 M_1, M_2 和化合物 A 的荧光量子产率都小于 0.01, 三者都具有良好的低荧光背景。与相同浓度的小牛胸腺 DNA (100 μ M) 结合后, 化合物 M_1 的荧光量子产率 $\Phi_F = 0.26$; M_2 的荧光量子产率 $\Phi_F = 0.35$;

A 的荧光量子产率 $\Phi_F = 0.36$ 。单电荷含二乙胺基的化合物 A 在保持活细胞膜通透性的前提下，与 DNA 结合后的荧光量子产率增大，可达到双电荷同类型化合物的标识效果。所用仪器为紫外可见分光光度计，型号：Hp8453；荧光分光光度计，型号：FP-6500。

实施例 11

化合物 A 和已知化合物 M_1 分别与小牛胸腺 DNA 和牛血清白蛋白(BSA) 结合前后荧光强度的测定：

分别取 3 μ L 浓度为 1mM 化合物 A 和 M_1 的 DMSO 溶液，加 pH 7.0、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液稀释至 3mL，置于比色皿中，测定其荧光强度。分别取 3 μ L 浓度为 1×10^{-3} M 的化合物 A 和 M_1 的 DMSO 溶液置于两个比色皿中，再分别加入浓度为 30mg/mL 的 BSA 溶液 4 μ L，加 pH 7.0、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液稀释至 3mL，测定其荧光强度。另分别取 3 μ L 浓度为 1mM 的化合物 A 和 M_1 的 DMSO 溶液置于两个比色皿中，再分别向其中加入浓度为 600 μ g/mL 的小牛胸腺 DNA 溶液 200 μ L，最后加 pH 7.0、10mM 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液稀释至 3mL，测定其荧光强度。相同条件下（相同底物浓度、BSA 浓度和 DNA 浓度），已知化合物 M_1 与小牛胸腺 DNA 结合后相对荧光强度增加 40 倍；与牛血清白蛋白(BSA)结合后相对荧光强度增加 5.5 倍。而化合物 A 与小牛胸腺 DNA 结合后相对荧光强度可增加 45.5 倍；与牛血清白蛋白(BSA)结合后相对荧光强度增加 1.4 倍。化合物 A 对 DNA 有良好的特异性结合。所用仪器为紫外可见分光光度计，型号：Hp8453；荧光分光光度计，型号：FP-6500。

实施例 12

共聚焦激光扫描显微镜下观察化合物 A 对活细胞 MCF-7 的染色：

加配有化合物 A、浓度为 2 μ M 的 PBS 缓冲液 12 μ L 于培养好 MCF-7 细胞的六孔板中，在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 30min。然后，PBS 震荡漂洗 5 min \times 3，再加入细胞培养基，共聚焦激光扫描显微镜(TCS-SP2, Germany) 观察细胞形态。选取代表性区域，Cy5 (633nm)通道激发，用油镜(1000 \times)观察，重复三次。图 6A 为化合物 A 对活细胞 MCF-7 染色的白场显微照片，6B 是化合物 A 对活细胞 MCF-7 染色的荧光显微照片。如图可观察到化合物 A 对 MCF-7 细胞核特异性染色。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号：TCS-SP2。激发光通道：Cy5(633nm)。

实施例 13

共聚焦激光扫描显微镜下观察化合物 D 对活细胞 MCF-7 的染色：

加配有化合物 D、浓度为 1.5 μ M 的 PBS 缓冲液 12 μ L 于培养好 MCF-7 细胞的六孔板中，在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 30min。然后，PBS 震荡漂洗 5 min \times 3，再加入细胞培养基，共聚焦激光扫描显微镜(TCS-SP2, Germany) 观察细胞形态。选取代表性区域，Cy5 (633nm)通道激发，用油镜(1000 \times)观察，重复三次。图 7A 为化合物 D 对活细胞 MCF-7 染色的白场显微照片，7B 是化合物 D 对活细胞 MCF-7 染色的荧光显微照片。如图可观察到化合物 D 对 MCF-7 细胞核特异性染色。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号：TCS-SP2。激发光通道：Cy5(633nm)。

实施例 14

共聚焦激光扫描显微镜下观察化合物 E 对活细胞 MCF-7 的染色：

加配有化合物 E、浓度为 3 μ M 的 PBS 缓冲液 12 μ L 于培养好 MCF-7 细胞的六孔板中，在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 30min。然后，PBS 震荡漂洗 5 min \times 3，再加入细胞培养基，共聚焦激光扫描显微镜(TCS-SP2, Germany) 观察细胞形态。选取代表性区域，Cy5 (633nm)通道激发，用油镜(1000 \times)观察，重复三次。图 8A 为化合物 E 对活细胞 MCF-7 染色的白场显微照片，8B 是化合物 E 对活细胞 MCF-7 染色的荧光显微照片。如图可观察到化合物 E 对 MCF-7 细胞核特异性染色。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号：TCS-SP2。激发光通道：Cy5(633nm)。

比较例 15

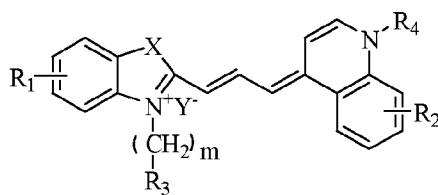
共聚焦激光扫描显微镜下观察已知化合物 M₁ 对活细胞 MCF-7 的染色：

加配有化合物 M₁、浓度为 2 μ M 的 PBS 缓冲液 12 μ L 于培养好 MCF-7 细胞的六孔板中，在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 30min。然后，PBS 震荡漂洗 5 min \times 3，再加入细胞培养基，共聚焦激光扫描显微镜(TCS-SP2, Germany) 观察细胞形态。选取代表性区域，Cy5 (633nm)通道激发，用油镜(1000 \times)观察，重复三次。图 9A 是化合物 M₁ 对活细胞 MCF-7 染色的白场显微照片，9B 为化合物 M₁ 对活细胞 MCF-7 染色的荧光显微照片。如图可观察到已知化合物 M₁ 对 MCF-7 细胞核及细胞质染色程度相当，属非特异性。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号：TCS-SP2。激发光通道：Cy5(633nm)。

以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。作为荧光染料是本发明新化合物的一种用途，不能认定本发明的化合物仅用于荧光染料，对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在基于本发明化合物用作荧光染料的相同作用机理的考虑下，还可以做出若干简单推理，得出本发明的化合物的其他应用用途，都应当视为属于本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一类荧光染料，所述染料具有如下结构通式 I：



I

其中：

X 为 $C(CH_3)_2$ 、O、S 或 Se；

m 为 1~18 的整数；

R_1 和 R_2 各自独立选自 H、 C_{1-18} 烷基、 OR_7 、 $-C_{1-6}$ 烷基- OR_7 或卤素；

R_3 为吡咯基、咪唑基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、胍基、 NHR_5 或 $N(R_6)_2$ ；

R_4 为 C_{1-18} 烷基、苄基或 $(CH_2)_m R_3$ ，所述苄基任选被选自以下的取代基取代：H、 C_{1-18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基氨基、 C_{1-6} 酰氨基、卤素、或 C_{1-6} 卤代烷基；

R_5 为饱和或不饱和、直链或支链的 C_{1-18} 烷基、羟基 C_{1-18} 烷基、巯基 C_{1-18} 烷基、氨基 C_{1-18} 烷基、酰基、苯基、萘基或苄基，所述苯基、萘基或苄基任选被选自以下的取代基取代：H、 C_{1-18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基氨基、 C_{1-6} 酰氨基、卤素、或 C_{1-6} 卤代烷基；

R_6 为 C_{2-18} 烷基；

R_7 为 H 或 C_{1-18} 烷基；

Y 为负离子。

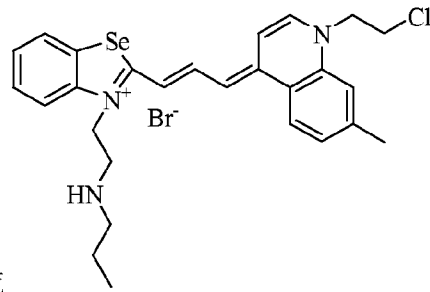
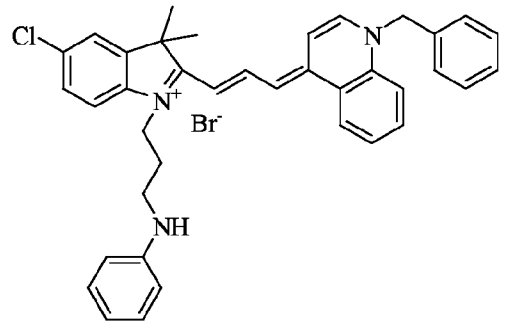
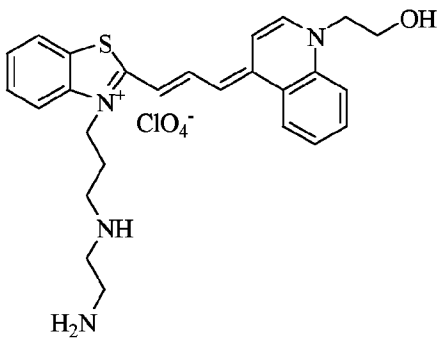
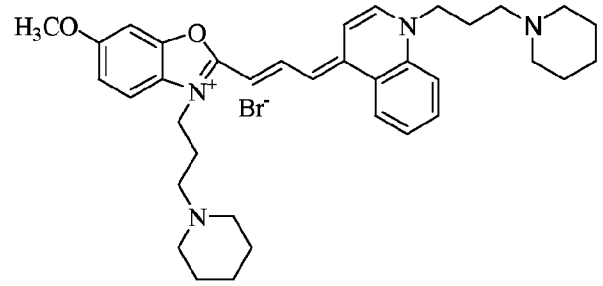
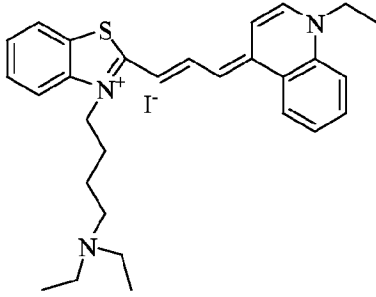
2. 权利要求 1 所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 各自独立选自 H 或 C_{1-18} 烷基。

3. 权利要求 1 所述的化合物，其中 R_3 为 NHR_5 、 $N(R_6)_2$ 、吡咯基或哌啶基。

4. 权利要求 1 所述的化合物，其中 R_4 为 C_{1-18} 烷基或者苄基。

5. 权利要求 1 所述的化合物，其中所述的 Y 为卤素离子、 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 、 CH_3COO^- 或 OTs^- 。

6. 权利要求 1-5 中任一项的化合物，其中所述化合物为：

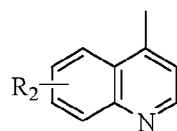


或

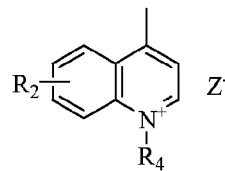
7. 一种缀合物，其特征在于，所述缀合物中包含权利要求 1-6 中任一项的化合物。

8. 一种制备权利要求 1 所述的化合物的方法，所述方法包括以下步骤：

1) 式 II 的 4-甲基喹啉芳香杂环化合物与 R_4Z 化合物反应制得第一季铵盐中间体 III，其中 Z 为卤素或 OTs，Z 为反应生成的卤素负离子或 OTs^- ：



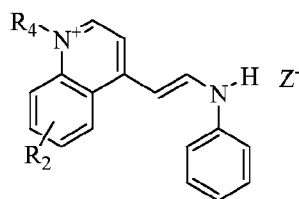
II



III

反应温度为 10-180℃，反应时间为 4-48 小时，反应溶剂为选自：二氯甲烷、氯仿、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、甲苯、二甲苯、邻二氯苯或它们的混合物的极性有机溶剂，式 II 化合物与 R₄Z 化合物的投料摩尔比为 1:1- 1:10；

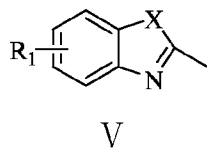
2) 将步骤 1)中得到的第一季铵盐中间体 III 与 N,N'-二苯基甲脒缩合，得到式 IV 化合物：



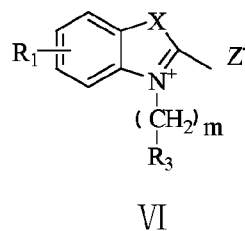
IV

反应温度为 50-200℃，反应时间为 15 分钟到 4 小时，无反应溶剂或反应溶剂为醋酐、醋酸或其混合物，第一季铵盐中间体 III 与 N,N'-二苯基甲脒的投料摩尔比为 1:1- 1:4；

3)使通式 V 化合物与化合物 R₃(CH₂)_mZ 反应制得第二季铵盐中间体 VI，其中 Z 为卤素或 OTs, Z⁻为反应生成的卤素负离子或 OTs⁻；



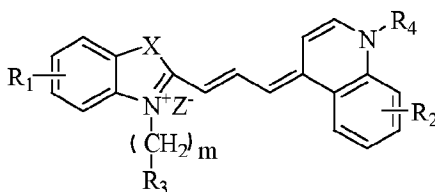
V



VI

反应温度为 10-180℃，反应时间为 4-48 小时，反应溶剂为选自：二氯甲烷、氯仿、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、甲苯、二甲苯、邻二氯苯或它们的混合物的极性有机溶剂，式 V 化合物与化合物 R₃(CH₂)_mZ 的投料摩尔比为 1:1- 1:10；

4) 将步骤 (2) 中得到的式 IV 化合物与步骤 (3)中得到的第二季铵盐中间体 VI 反应，得到式 VII 化合物：



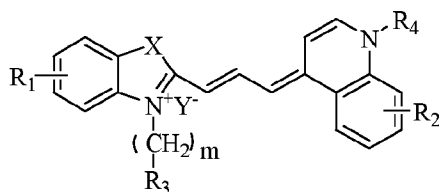
VII

反应温度为 5-130℃，反应时间为 10 分钟到 6 小时，无反应溶剂或反应溶剂为选自：二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙二醇单甲醚、或它们的混合物的

极性有机溶剂，催化剂为醋酐与有机碱的混合物，VI与式IV化合物的投料摩尔比为 1.5:1- 1:1.5；

上述结构式中 X、m、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆和 R₇的定义同权利要求 1；

5) 将步骤(4)中得到的化合物VII与含 Y⁻的钠盐或钾盐进行负离子置换，得到式 I 化合物：



I

反应温度为 60-140℃，反应时间为 10 分钟到 2 小时，反应溶剂为选自 DMF、DMSO、或其混合物的极性有机溶剂，含 Y⁻的钠盐或钾盐与式VII化合物的投料摩尔比为 1:1- 10:1；

其中 Y 的定义如权利要求 1 所述。

9. 一种用于生物样品染色的组合物，其特征在于所述组合物包含权利要求 1-6 中任一项的化合物或权利要求 7 的缀合物。

10. 一种染色生物样品的方法，所述方法包括将权利要求 1-6 中任一项的化合物、权利要求 7 的缀合物或权利要求 9 的组合物与生物样品接触。

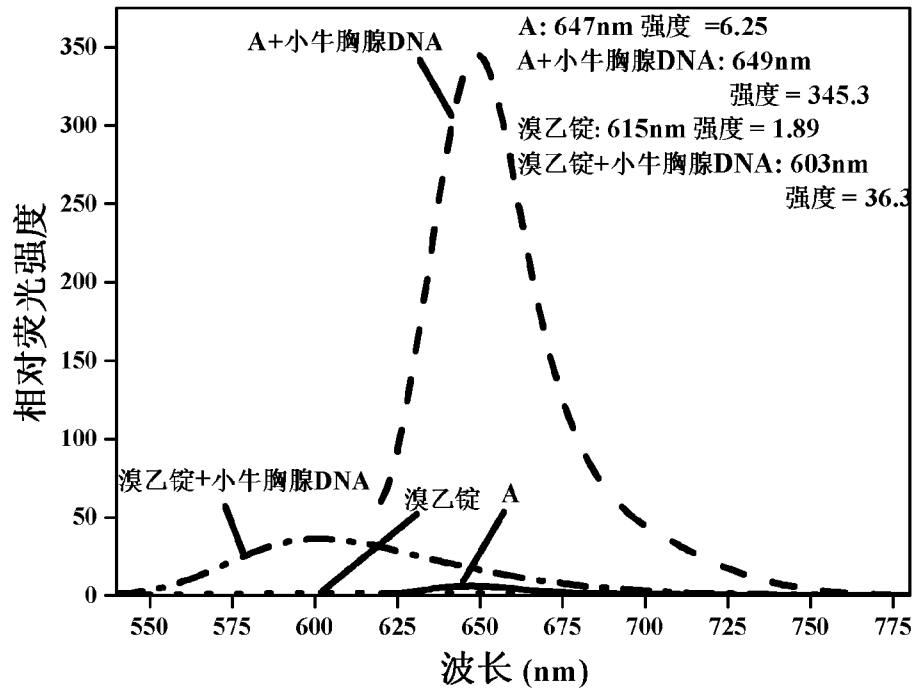


图 1

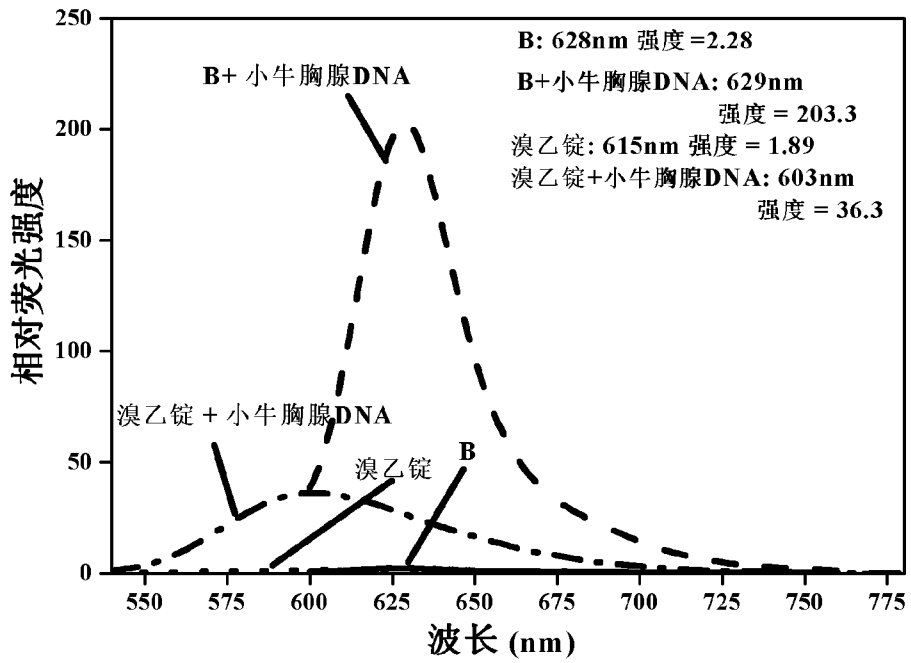


图 2

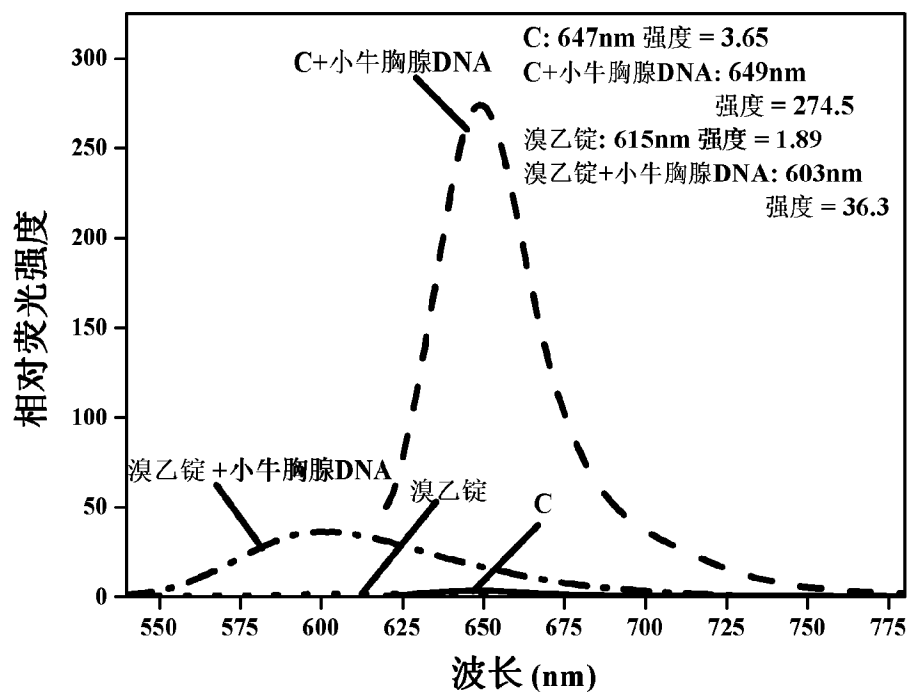


图 3

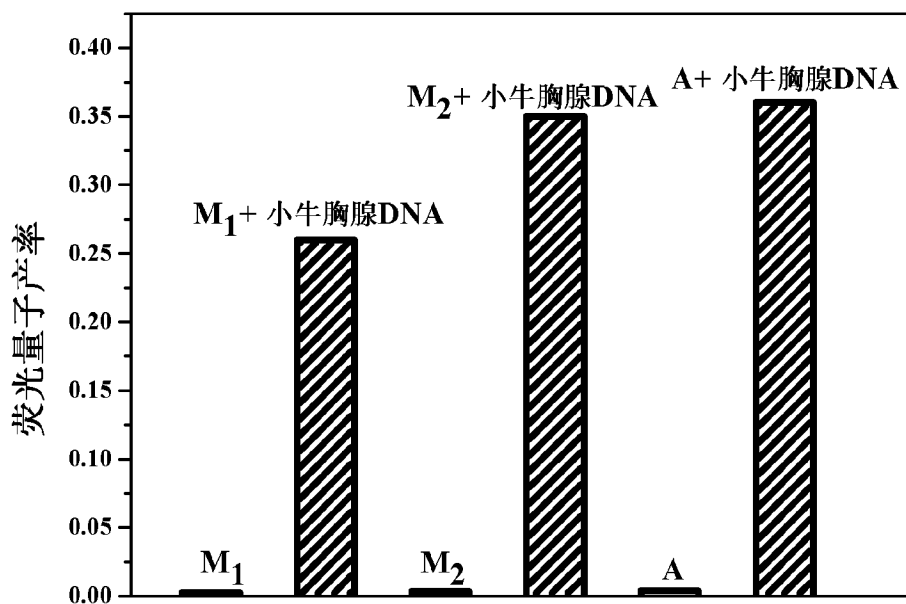


图 4

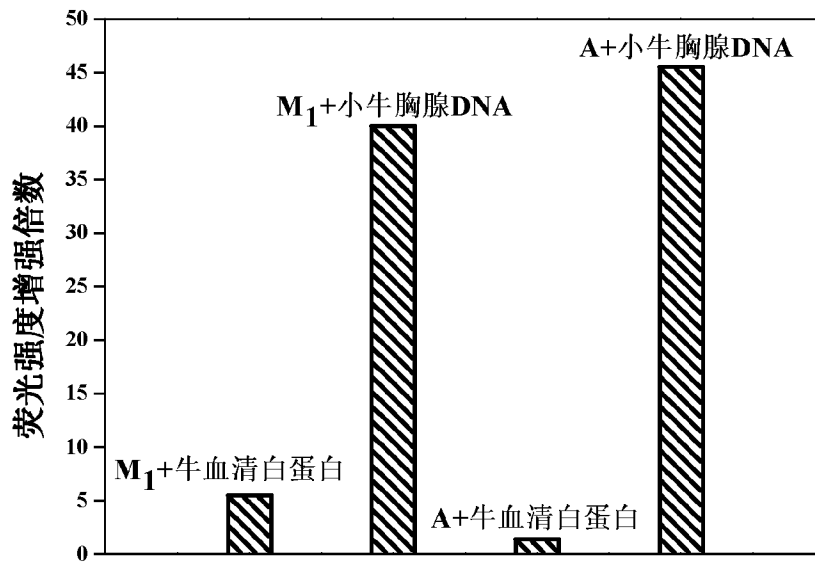


图 5

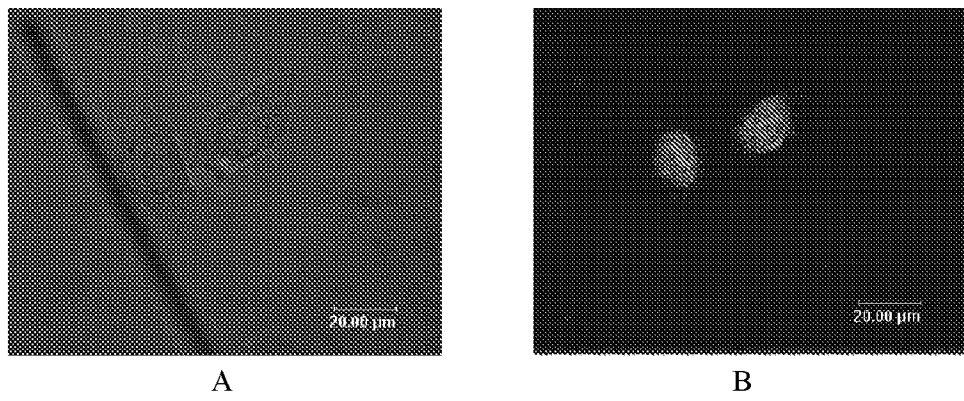


图 6

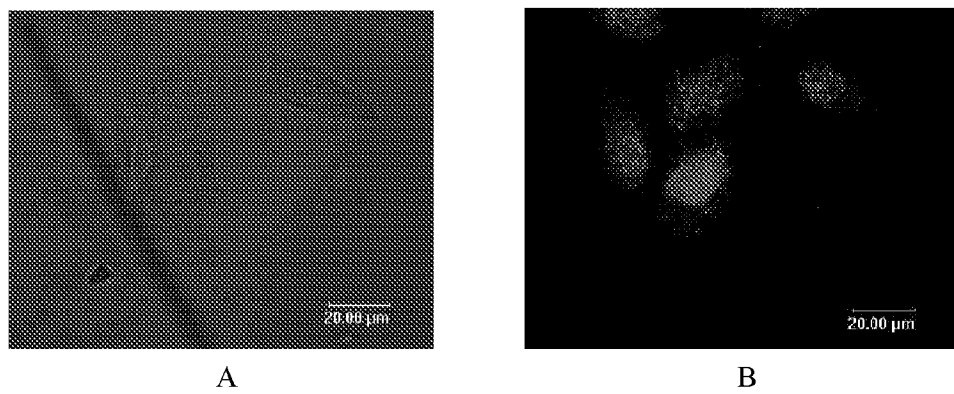


图 7

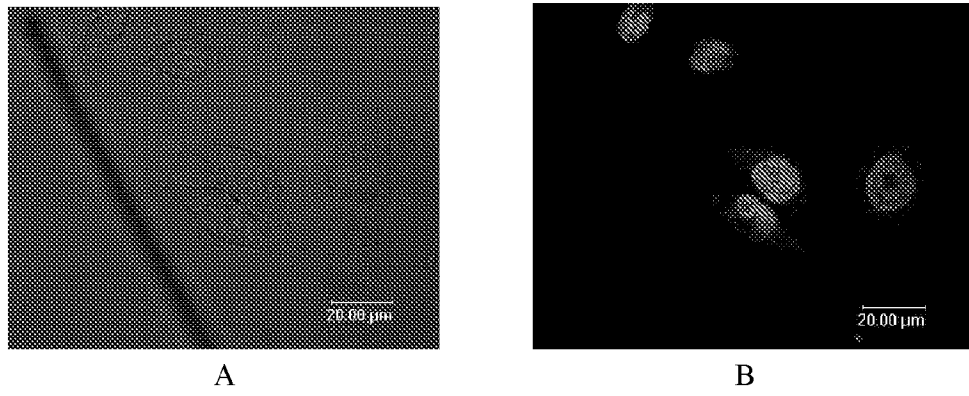


图 8

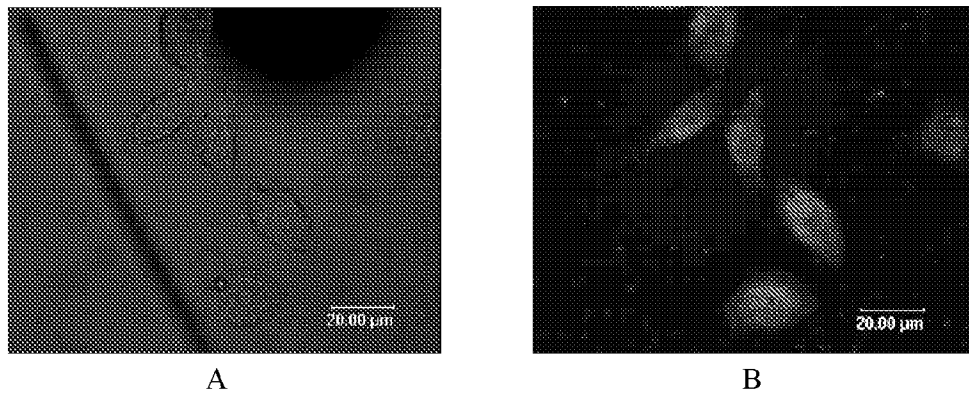


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/072378

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07D 417/-; C07D 413/-; C07D 421/-; C07D 401/-; C09B 23/-; C09K 11/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See extra sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5734058 A (BIOMETRIC IMAGING, INC.), 31 March 1998 (31.03.1998), see compounds of general formula in column 2, compounds in Table 3 and Table 4, examples 1 and 2, and column 37, paragraph 3	1-10 (in part)
X	CN 101555246 A (UNIV DALIAN SCI&TECHNOLOGY et al.), 14 October 2009 (14.10.2009), see the whole document, especially claims 1-5	1-10 (in part)

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 September 2010 (25.09.2010)Date of mailing of the international search report
28 Oct. 2010 (28.10.2010)Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451Authorized officer
WANG Qinghua
Telephone No. (86-10)62086301

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/072378

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 10 (in part)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 relates to a method of staining of biological samples, which may be used in some fields such as clinical diagnosis from the contents of the description. So some solutions in claim 10 relate to methods of treatment of the human/animal body (Rule 39.1(iv), 67.1(iv)).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/072378

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101475754 A (SHENZHEN MINDRAY BIO MEDICAL ELECTRONICS), 08 July 2009 (08.07.2009), see the whole document, especially claim 11	1-10 (in part)
X	CN 101602762 A (SHENZHEN MINDRAY BIO MEDICAL ELECTRONICS), 16 December 2009 (16.12.2009), see the whole document, especially claim 10	1-10 (in part)
A	US 5321130 A (MOLECULAR PROBES, INC.), 14 June 1994 (14.06.1994), see the whole document	1-10 (in part)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/072378

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US5734058A	31.03.1998	WO9717076A1 AU1117797A	15.05.1997 29.05.1997
-----	-----	-----	-----
CN101555246A	14.10.2009	none	
-----	-----	-----	-----
CN 101475754 A	08.07.2009	US2009176270A1	09.07.2009
-----	-----	-----	-----
CN 101602762 A	16.12.2009	US2009305285A1 US7709653B2	10.12.2009 04.05.2010
-----	-----	-----	-----
US5321130A	14.06.1994	none	
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/072378

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 417/06 (2006.01) i

C07D 413/06 (2006.01) i

C07D 421/06 (2006.01) i

C07D 401/06 (2006.01) i

C09B 23/00 (2006.01) i

C09K 11/06 (2006.01) i

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNKI, CPRS, Registry, CAplus: structural search of compound of formula (I), dye, cyanine

A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07D 417/-; C07D 413/-; C07D 421/-; C07D 401/-; C09B 23/-; C09K 11/-		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
参见附加页		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US 5734058 A(BIOMETRIC IMAGING, INC.), 31.3 月 1998(31.03.1998), 参见第 2 栏通式化合物, 表 3、表 4 中化合物, 实施例 1 和 2, 和第 37 栏第 3 段	1-10 (部分)
X	CN 101555246 A (大连理工大学 等), 14.10 月 2009 (14.10.2009), 参见全文, 特别是权利要求 1-5	1-10 (部分)
X	CN 101475754 A (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司), 08.7 月 2009 (08.07.2009), 参见全文, 特别是权利要求 11	1-10 (部分)
X	CN 101602762 A (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司), 16.12 月 2009 (16.12.2009), 参见全文, 特别是权利要求 10	1-10 (部分)
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 25.9 月 2010 (25.09.2010)		国际检索报告邮寄日期 28.10 月 2010 (28.10.2010)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 王青华 电话号码: (86-10) 62086301

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：10（部分）

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求10涉及包含染色生物样品的方法，由说明书记载的内容可知该方法可用于“临床医疗诊断”等领域，因此权利要求10中包含了属于对人体或动物体疾病的诊断方法的部分技术方案（细则39.1(iv)，67.1(iv)）。

2. 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明： 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 5321130 A(MOLECULAR PROBES, INC.), 14.6 月 1994(14.06.1994), 参见全文	1-10 (部分)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/072378

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US5734058A	31.03.1998	WO9717076A1 AU1117797A	15.05.1997 29.05.1997
CN101555246A	14.10.2009	无	
CN 101475754 A	08.07.2009	US2009176270A1	09.07.2009
CN 101602762 A	16.12.2009	US2009305285A1 US7709653B2	10.12.2009 04.05.2010
US5321130A	14.06.1994	无	

主题的分类

C07D 417/06 (2006.01) i

C07D 413/06 (2006.01) i

C07D 421/06 (2006.01) i

C07D 401/06 (2006.01) i

C09B 23/00 (2006.01) i

C09K 11/06 (2006.01) i

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, CNKI, CPRS, Registry, CAplus: 式 (I) 化合物结构式检索, 染料, 菁, dye, cyanine