

(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 11 月 10 日 (10.11.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/137574 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07F 5/02 (2006.01) C09B 57/00 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/001973
- (22) 国际申请日: 2010 年 12 月 6 日 (06.12.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010166304.7 2010 年 5 月 5 日 (05.05.2010) 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]; 中国辽宁省大连市高新园区凌工路 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]; 中国辽宁省大连市高新园区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。 樊江莉 (FAN, Jiangli) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市高新园区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。 王嵩 (WANG, Song) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市高新园区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。 李宏林 (LI, Honglin)

[CN/CN]; 中国辽宁省大连市高新园区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。 胡明明 (HU, Mingming) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市高新园区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。 宋克东 (SONG, Kedong) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市高新园区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。

(74) 代理人: 大连星海专利事务所 (DALIAN XINGHAI PATENT LAW OFFICE); 中国辽宁省大连市西岗区唐山街 24 号春晖大厦 902, Liaoning 116012 (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, 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。

(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,

[见续页]

(54) Title: FLUORIDE-BORON DYE FLUORESCENT PROBE FOR DETECTING MERCURY ION

(54) 发明名称: 汞离子检测用氟硼染料荧光探针

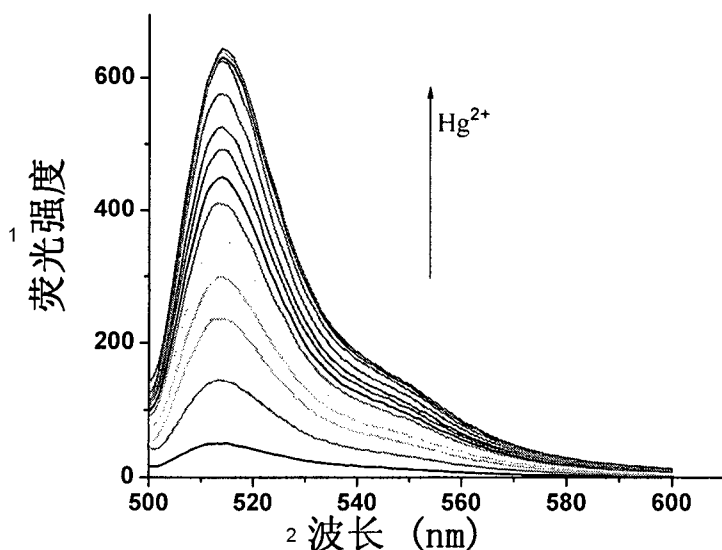


FIG. 1 / 图 1.

1 FLUORESCENCE INTENSITY
2 WAVELENGTH

(57) Abstract: A fluorescent probe and its combination are disclosed. They have excitation and emission wavelengths within visible range, high sensitivity, and good selectivity for mercury ion when pH is 5-12, and can be used to detect mercury ion in water sample. There is no interference of Na, K, Ca, Mg, Cu, chloride, nitrate and sulfate ions for the detection. In ethanol-HEPES buffer solution, the ion concentration and fluorescence intensity are in good linear relation within mercury ion concentration of 2-12 ppb.

[见续页]

WO 2011/137574 A1



NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 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:

本发明公开了一种荧光探针及其组合物。它们的激发和发射波长在可见光区,灵敏度高,在 pH=5~12 时对汞离子具有很好的选择性,可以用水样中检测汞离子。钠、钾、钙、镁、铜、氯、硝酸根和硫酸根离子对检测没有干扰。在乙醇-HEPES 缓冲溶液中,2—12ppb 的汞离子浓度范围内,离子浓度和荧光强度成良好的线性关系。

汞离子检测用氟硼染料荧光探针

技术领域

本发明涉及一种汞离子检测用氟硼染料荧光探针，其属于精细化工领域中适用于自然水样及生物细胞内汞离子检测用荧光分子探针。

背景技术

当体温计、电池成为每个家庭必备的生活用品时，汞产品已经深入人们生活的各个角落，由于人们的不正确使用汞产品，或者因汞泄露处理不当而引起汞污染的事件层出不穷。其他造成汞污染的途径还有很多，例如火山爆发、矿物燃料的消耗，尤其是汞矿的开采，造成了严重的汞污染，危害生态环境以及人类健康的问题已经日益严重！

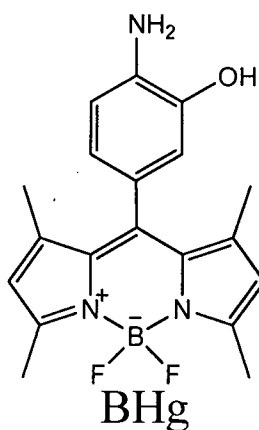
近年来，拥有高灵敏度、高选择性、简洁快速的荧光分子探针检测技术快速发展，在元素分析中的应用越来越广泛。目前能够检测汞离子的荧光分子探针有很多，例如罗丹明类荧光分子探针(Chen X Q, Nam S W, Jou M J, et al., *Org. Lett.*, 2008, 10, 5235-5238.)，荧光素为荧光母体、冠醚为识别基团的探针(Yoon S, Albers A E, Wong A P, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 16030-16031.)，基于荧光共振能量转移机理(FRET)设计的比率型荧光分子探针(Zhang X L, Xiao Y, Qian X H, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, 47, 8025-8029.)以及离子催化水解型荧光探针(Santra M, Ryu D, Chatterjee A, et al., *Chem. Commun.*, 2009, 2115-2117)。由于汞离子的嗜硫性，这些探针的识别基团大部分都含有硫元素。这样虽然提高了配体与汞离子的络合能力，但是同时也降低了配体的选择性，因为含硫基团也常与铅、银等元素络合。其次，这些探针大部分测试都是在实验室条件下进行的，而实际应用在自然环境条件下的案例却很少，因为自然环境条件复杂，对探针的水溶性、选择性、灵敏度都是极大的挑战。另外，生物体内的一些分子含有巯基，他们能与汞离子形成稳定的配合物，但是很少有文献去探讨这些生物分子对探针识别汞离子时的影响。因此，开发一种新型的结构简单易于制备的、高选择性与灵敏度的、并且能够应用在实际的自然环境条件下及生物细

胞内的荧光分子探针仍然是个挑战。

发明内容

本发明改进现有的基于络合型汞离子荧光探针结构和性能上的不足，设计并合成出适用于自然水样中低浓度汞离子检测以及活细胞内检测用、结构简单性能优良的基于氟硼荧光染料的探针分子为目的。

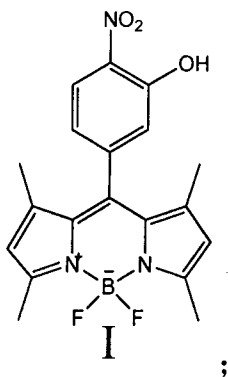
本发明采用的技术解决方案是：一种汞离子检测用氟硼染料荧光探针分子具有如下结构通式 **BHg**：



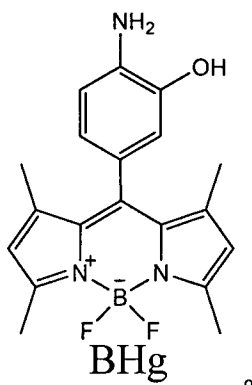
所述探针分子采用乙醇-HEPES 缓冲溶液配制成用于汞离子检测用的组合物。

所述的汞离子检测用氟硼染料荧光探针分子的合成方法包括下列步骤：

1) 使 2, 4-二甲基吡咯与 3-羟基-4 硝基-苯甲醛反应：将 2, 4-二甲基吡咯和 3-羟基-4 硝基-苯甲醛溶解在二氯甲烷中，滴一滴三氟乙酸，然后室温下搅拌 5 小时；减压蒸除溶剂，加入二氯二氟苯醌，搅拌 15 分钟后再加入三乙胺和三氟化硼乙醚溶液，继续搅拌 45 分钟，用水洗涤反应溶液，并用二氯甲烷萃取；减压蒸除二氯甲烷，用柱层析分离提纯目标产物，得到中间体 I：



2) 将中间体 I 还原, 得到化合物 **BHg**: 将中间体 I 溶解在乙醇中, 加入水合肼和钯碳催化剂, 回流反应 2 个小时; 冷却后, 将溶液过滤, 滤液减压蒸除乙醇, 然后用二氯甲烷重新溶解。用去离子水分两次洗涤有机层; 有机层溶液用无水硫酸钠干燥, 减压蒸除二氯甲烷, 用柱层析分离提纯目标产物, 得到红色固体:



上述的技术方案所得荧光染料可通过本领域公知的分离和纯化技术回收, 以达到需要的纯度。使用的各种原料均可市售获得, 或者可通过本领域技术人员公知的方法或现有技术中公开的方法由本领域公知的原料简单地制备得到。本发明不仅提供了包含上述化合物 **BHg** 的组合物, 所述组合物用于汞离子的检测。组合物可作为乙醇-HEPES 缓冲溶液形式存在, 或者可作为临用前用乙醇-HEPES 缓冲溶液配制为溶液的其它合适形式存在; 而且还提供了使用上述化合物 **BHg** 或包含 **BHg** 的组合物以检测汞离子的方法, 该方法包括使上述化合物 **BHg** 或包含 **BHg** 的组合物检测样品中的汞离子。

本发明的有益效果是: 上述的探针分子具有极其重要的应用价值。特别是探针分子检测灵敏度高, 对 pH 变化不敏感, 对各种金属离子以及阴离子具有很好的抗干扰能力, 不但可以应用在富硫环境中检测汞离子, 并且还可以应用在实际的自然水样中检测汞离子以及实现在活细胞内检测汞离子的存在, 使得这类探针作为测定汞离子浓度变化的试剂是极其有用的。由以上描述以及本领域技术人员公知的常识, 可了解 BODIPY 类染料分子荧光探针的各种优点, 包括但不限于以下:

(1) 荧光探针分子激发和发射光谱在可见区, 荧光量子产率高, 对溶剂

极性不敏感，并且化学/光稳定性好。

(2) 荧光探针分子的设计基于邻氨基酚与汞离子络合的机理，探针分子络合汞离子前后荧光发射约有 20 倍的增长。荧光探针分子对汞离子有很好的选择性，钠、钾、钙、镁、铜等金属离子对检测没有干扰。另外荧光探针分子对 pH 变化不敏感，在 pH 5-12 的范围内，pH 变化对荧光发射基本无影响。

(3) 荧光探针分子可以检测到 ppb 级汞离子浓度，并且有很好的线形关系。

(4) 荧光探针分子可以在富硫环境中检测汞离子而不受干扰。

(5) 荧光探针分子可以应用在实际的自然水样中检测汞离子。

(6) 荧光探针分子细胞渗透性好，对细胞本身毒副作用小，可以实现活细胞内汞离子的检测。

附图说明

图 1 是在乙醇-HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸) 缓冲溶液 (20 mM HEPES, 100 mM NaNO₃, 1:1, v/v, pH 7.2) 中进行的荧光分子探针 **BHg** 的荧光强度随汞离子浓度的变化关系图。荧光探针分子 **BHg** 的浓度是 10 μM, 汞离子的浓度变化从小到大依次是 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 20 μM。横坐标为波长(nm), 纵坐标为荧光强度。所用仪器为荧光分光光度计, 型号: LS 55。

图 2 是荧光分子探针 **BHg** 对汞离子的选择性荧光发射图。荧光探针分子 **BHg** 的浓度是 10 μM, 各种金属离子的浓度是其 5 倍当量时的荧光发射光谱。横坐标为波长(nm), 纵坐标为荧光强度。所用仪器为荧光分光光度计, 型号: LS 55。

图 3 是乙醇-HEPES 缓冲溶液 (20 mM HEPES, 100 mM NaNO₃, 1:1, v/v, pH 7.2) 中荧光探针分子 **BHg** 的荧光强度随 pH 变化的荧光发射图。横坐标为 pH, 纵坐标为荧光强度。荧光探针分子 **BHg** 的浓度为 10 μM。用 NaOH (1 M) 和 HCl (1 M) 调节 pH。所用仪器为荧光分光光度计, 型号: LS 55。

图 4 是在乙醇-HEPES 缓冲溶液 (20 mM HEPES, 100 mM NaNO₃, 1:1, v/v, pH 7.2) 中各种金属离子对于荧光探针分子 **BHg**—汞离子络合物的干扰实验, 先加入除汞离子外其他金属离子以及探针后再加入汞离子。荧光探针分子

BHg 的浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 。横坐标各种离子浓度为探针分子浓度的 5 倍，纵坐标为荧光强度。所用仪器为荧光分光光度计，型号：LS 55。

图 5 是在乙醇-HEPES 缓冲溶液（20 mM HEPES, 100 mM NaNO_3 , 1:1, v/v, pH 7.2）中各种阴离子对于荧光探针分子 **BHg**—汞离子络合物的干扰实验，先加入各种阴离子以及探针后再加入汞离子。荧光探针分子 **BHg** 的浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 。横坐标各种离子浓度为探针分子浓度的 5 倍，纵坐标为荧光强度。所用仪器为荧光分光光度计，型号：LS 55。

图 6 是用荧光探针分子 **BHg** 研究 ppb 级浓度汞离子与荧光强度线形关系图。荧光探针分子 **BHg** 的浓度为 $5\ \mu\text{M}$ 。横坐标为汞离子浓度，纵坐标为荧光强度。所用仪器为荧光分光光度计，型号：LS 55。

图 7 为 **BHg** 的荧光增强倍数随不同浓度汞离子的变化关系图。荧光探针分子 **BHg** 的浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 。横坐标为汞离子浓度，纵坐标为荧光增强倍数。所用仪器为荧光分光光度计，型号：LS 55。

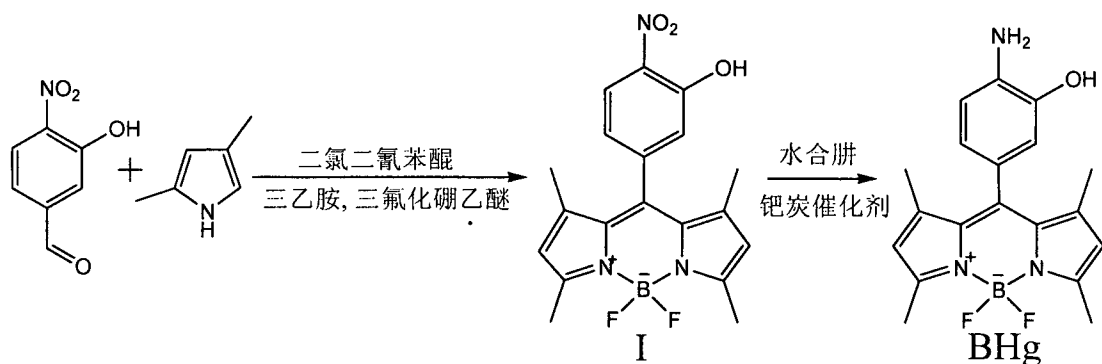
图 8 为三个水样中分别加入 50ppb 汞离子后 **BHg** 的荧光变化情况。横坐标为不同水源，纵坐标为荧光增强倍数。所用仪器为荧光分光光度计，型号：LS 55。

图 9 是 **BHg** 在富硫环境中识别汞离子的研究。荧光探针分子 **BHg** 的浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 。横坐标为不同体系，纵坐标为荧光强度。所用仪器为荧光分光光度计，型号：LS 55。

图 10 用荧光探针分子 **BHg** 在 Osteoblasts 细胞中对汞离子的识别成像图。图(a)为 **BHg** 加入培养好的 Osteoblasts 细胞中在 37°C 下培养基中培养 30 分钟后白的亮场成像图；图(b)为 **BHg** 加入培养好的 Osteoblasts 细胞中在 37°C 下培养基中培养 30 分钟后的图像；图(c) 向上述含探针的细胞培养液中加入汞离子后在 37°C 的条件下孵化 30 分钟后的图像。荧光探针分子 **BHg** 的浓度为 $10\ \mu\text{M}$ ，汞离子浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 。仪器为 Olympus IX70-131。

具体实施方式

实施例 1 探针 **BHg** 的合成：



(1) 中间体 I 的合成

将 2, 4-二甲基吡咯 (190 mg, 2 mmol) 和 3-羟基-4 硝基-苯甲醛 (167mg, 1mmol) 溶解在 150ml 二氯甲烷中, 滴一滴三氟乙酸, 然后室温下搅拌 5 小时。减压蒸除溶剂至 30ml, 加入二氯二氰苯醌(DDQ, 442mg, 2mmol), 搅拌 15 分钟后再加入 2ml 三乙胺和 4ml 三氟化硼乙醚溶液, 继续搅拌 45 分钟, 用 50ml 水洗涤反应溶液, 并用二氯甲烷萃取 (3×20mL)。减压蒸除二氯甲烷, 用柱层析分离提纯目标产物 (展开剂: 石油醚/乙酸乙酯=5: 1), 得到红色固体 88mg, 收率 23%。

^1H NMR(400 MHz, CDCl_3), δ : 10.67(s, 1H), 8.26(d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.18(s, 1H), 6.98(d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.02(s, 2H), 2.56(s, 6H), 1.50(s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ : 156.75, 155.42, 144.88, 142.48, 137.64, 133.65, 130.21, 126.07, 121.82, 120.37, 29.70, 14.67; TOF MS(ES): m/z Calcd for 384.1331(M-H^+), Found 384.1349.

(2) BHg 的合成

将化合物 2 (100mg, 0.26mmol) 溶解在 20ml 乙醇中, 加入 0.5ml 水合肼和 10mg 钯碳催化剂 (Pd/Ac, 10%), 回流反应 2 个小时。冷却后, 将溶液过滤, 滤液减压蒸除乙醇, 然后用 10ml 二氯甲烷重新溶解。用 50ml 去离子水分两次洗涤有机层。有机层溶液用无水硫酸钠干燥, 减压蒸除二氯甲烷, 用柱层析分离提纯目标产物 (展开剂: 石油醚/乙酸乙酯=4: 1), 得到红色固体 77mg, 收率 83%。 ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3), δ : 6.91(d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.62(s, 1H), 6.56(d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.04(s, 2H), 2.48(s, 6H), 1.58(s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ : 154.99, 144.36, 143.33, 142.09, 135.43, 131.86, 125.15, 120.94, 116.84, 114.57, 29.7, 14.57; TOF MS(ES): m/z Calcd for 354.1589(M-H^+), Found 354.1592.

实施例 2 探针 **BHg** 的荧光强度随汞离子浓度的变化关系：

将 **BHg** 加入乙醇-HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸) 缓冲溶液 (20 mM HEPES, 100 mM NaNO₃, 1:1, v/v, pH 7.2) 中, 配成 10 μ M 浓度的溶液。没加入汞离子时, **BHg** 荧光很弱, 然后依次逐渐增加汞离子的浓度 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 20 μ M, **BHg** 荧光也逐渐增强, 滴定到饱和荧光大约增强了 20 倍(图 1)。所用仪器为荧光分光光度计, 型号: LS 55。

实施例 3 探针 **BHg** 对汞离子选择性和抗干扰能力：

将 10 μ M 的化合物 **BHg** 加到 5 倍过量的各种金属离子的乙醇-HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸) 缓冲溶液 (20 mM HEPES, 100 mM NaNO₃, 1:1, v/v, pH 7.2), 探针激发波长为 490 nm, 探针发射波长 513 nm, 测试结果显示于图 2 中。从图中可以看到, 探针 **BHg** 对汞离子具有很高的选择性, 只有汞离子的加入才能产生明显的荧光的增强。另外从图 4、图 5 中可以看出钠、钾、钙、镁、铜等金属离子以及氯离子、硝酸根离子、硫酸根离子等阴离子对整个识别过程几乎没有干扰。所用仪器为荧光分光光度计, 型号: LS 55。

实施例 4 探针 **BHg** 对 pH 的不敏感性：

于化合物 **BHg** (10 μ M) 的乙醇-HEPES 缓冲溶液 (20 mM HEPES, 100 mM NaNO₃, 1:1, v/v, pH 7.2) 中滴加 NaOH 溶液 (1 M) 或 HCl 溶液 (1M) 来调节溶液的 pH 并测定荧光强度, 记录相应的荧光强度变化, 测试结果显示于图 3 中。从图中可以看出探针 **BHg** 在 pH 5-12 的范围内, pH 变化对荧光发射基本没有影响。因此探针可用于此 pH 范围内汞离子的检测。所用仪器为荧光分光光度计, 型号: LS 55。

实施例 5 探针 **BHg** 对汞离子检测的灵敏度：

于化合物 **BHg** (10 μ M) 乙醇-HEPES 缓冲溶液 (20 mM HEPES, 100 mM NaNO₃, 1:1, v/v, pH 7.2) 中加入 2-12 ppb 浓度的汞离子, 记录相应的荧光强度变化, 测试及过显示于图 6 中。从图中可以看出探针 **BHg**, 在 2-12 ppb 的范围内荧光强度有明显增强且荧光强度随汞离子浓度变化呈现很好的线形关系。因此探针可用于低浓度汞离子的检测。所用仪器为荧光分光光度计, 型号: LS 55。

实施例 6 探针 **BHg** 在自然水样中对汞离子的检测

我们选取了三处不同的水源：黄海海水（大连）、池水及自来水。在三个样品中分别加入 **BHg** 配成 $10\ \mu\text{M}$ 浓度的溶液，依次增加汞离子的加入量。从图 7 中可以看出，随着汞离子浓度的增加，三个水样的荧光强度均显著增加并有很好的线性关系，尤其加入 50ppb 汞离子后三个水样的荧光强度分别增加了 3.9 倍、4.5 倍、2.9 倍（图 8），效果明显，说明 **BHg** 可以应用在实际的自然水样中进行汞离子的检测。

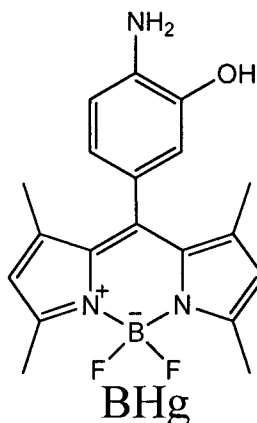
实施例 7 探针 **BHg** 在富硫环境中对汞离子的检测

在乙醇-HEPES 缓冲溶液（20 mM HEPES, 100 mM NaNO_3 , 1:1, v/v, pH 7.2）中，依次加入探针 **BHg**（ $10\ \mu\text{M}$ ）、半胱氨酸（ $50\ \mu\text{M}$ ）、汞离子（ $50\ \mu\text{M}$ ），记录荧光强度变化，并与直接加入汞离子（ $50\ \mu\text{M}$ ）**BHg** 的荧光强度变化做比较，根据图 9 所示，半胱氨酸并没有影响探针识别汞离子的过程，说明探针 **BHg** 可以应用在富硫环境中检测汞离子。

实施例 8 探针 **BHg** 系列在活细胞内对汞离子的检测：

将 **BHg** 加入培养好的 Osteoblasts 细胞中在 37°C 下在培养基中培养 30 分钟，此时的 **BHg** 在活的 Osteoblasts 细胞中的荧光很弱（图 10(b)）。向上述含探针的细胞培养液中加入汞离子后在 37°C 的条件下孵化 30 分钟，此时在活的 Osteoblasts 细胞中的荧光变得很强（图 10(c)）。亮场成像证明含有 **BHg** 以及汞离子的 Osteoblasts 细胞在整个过程中均可以观测到（图 10(a)）。所用仪器是 Olympus, IX70-131。

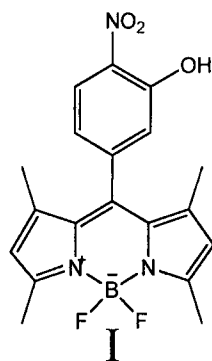
1. 一种汞离子检测用氟硼染料荧光探针，其特征在于：所述探针分子具有如下结构通式 **BHg**：



2. 据权利要求 1 所述的汞离子检测用氟硼染料荧光探针，其特征在于：所述探针分子采用乙醇-HEPES 缓冲溶液配制成用于汞离子检测用的组合物。

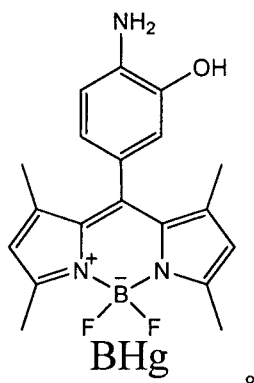
3. 据权利要求 1 所述的汞离子检测用氟硼染料荧光探针的合成方法，其特征在于：所述探针分子的合成方法包括下列步骤：

1) 使 2, 4-二甲基吡咯与 3-羟基-4 硝基-苯甲醛反应：将 2, 4-二甲基吡咯和 3-羟基-4 硝基-苯甲醛溶解在二氯甲烷中，滴一滴三氟乙酸，然后室温下搅拌 5 小时；减压蒸除溶剂，加入二氯二氟苯醌，搅拌 15 分钟后再加入三乙胺和三氟化硼乙醚溶液，继续搅拌 45 分钟，用水洗涤反应溶液，并用二氯甲烷萃取；减压蒸除二氯甲烷，用柱层析分离提纯目标产物，得到中间体 I：



2) 将中间体 I 还原，得到化合物 **BHg**：将中间体 I 溶解在乙醇中，加入水合肼和钨碳催化剂，回流反应 2 个小时；冷却后，将溶液过滤，滤液减压蒸除乙醇，然后用二氯甲烷重新溶解。用去离子水分两次洗涤有机层；有机层溶液

用无水硫酸钠干燥，减压蒸除二氯甲烷，用柱层析分离提纯目标产物，得到红色固体：



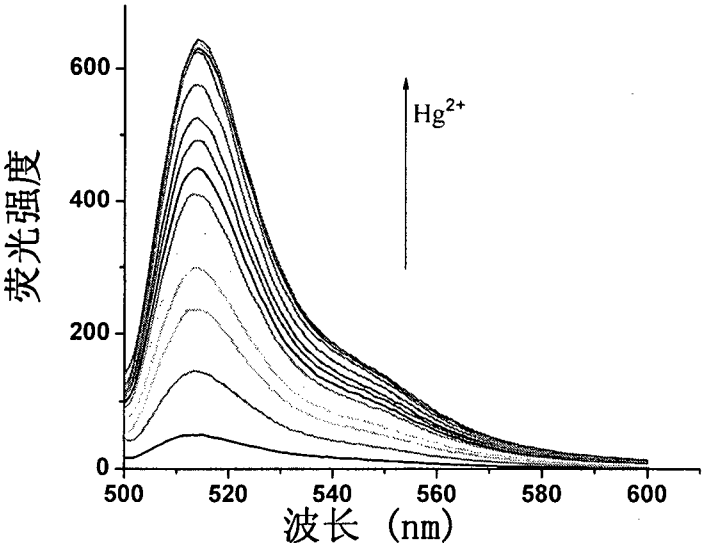


图 1.

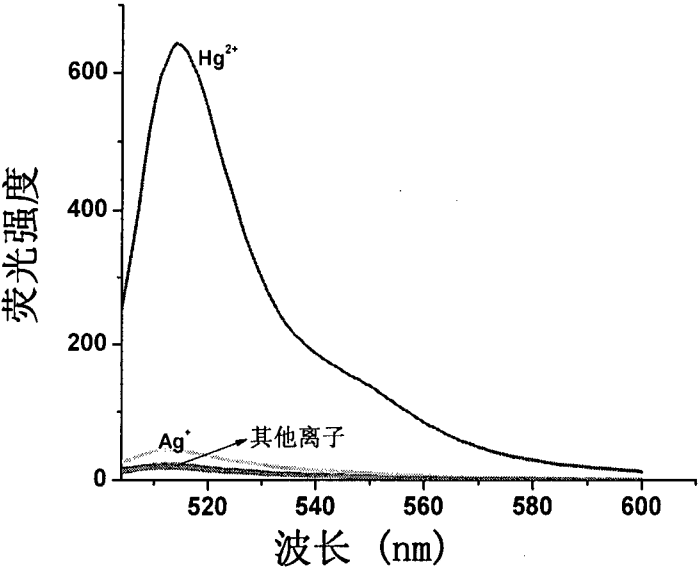


图 2.

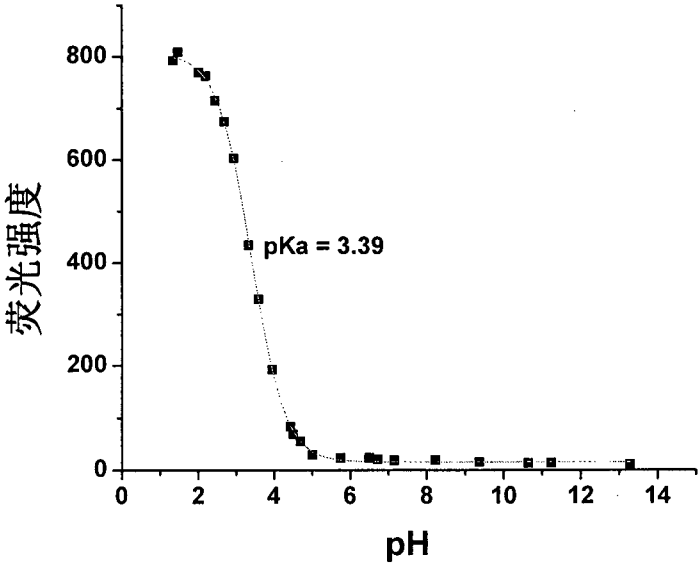


图 3

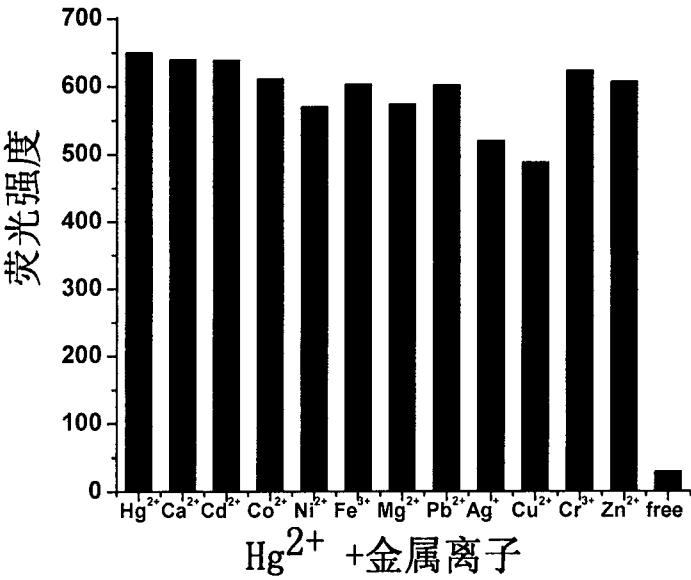


图 4

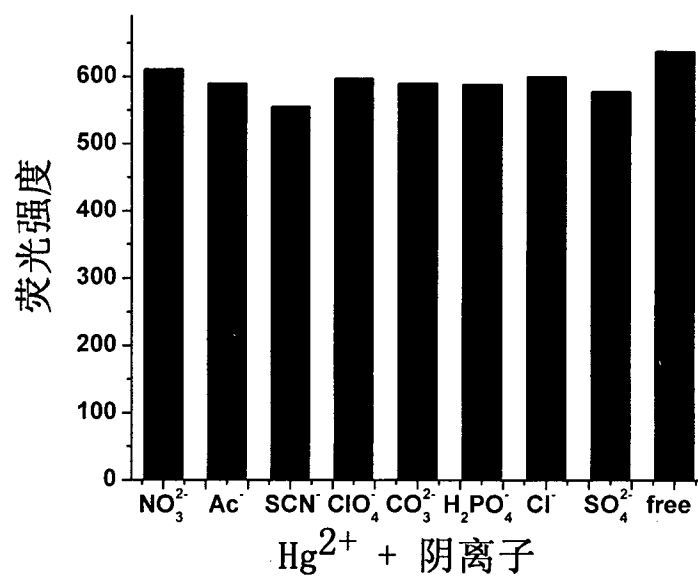


图 5

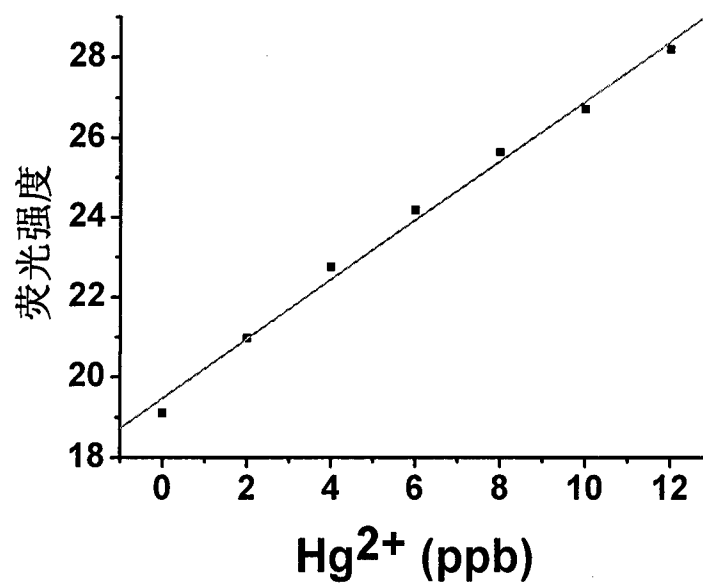


图 6

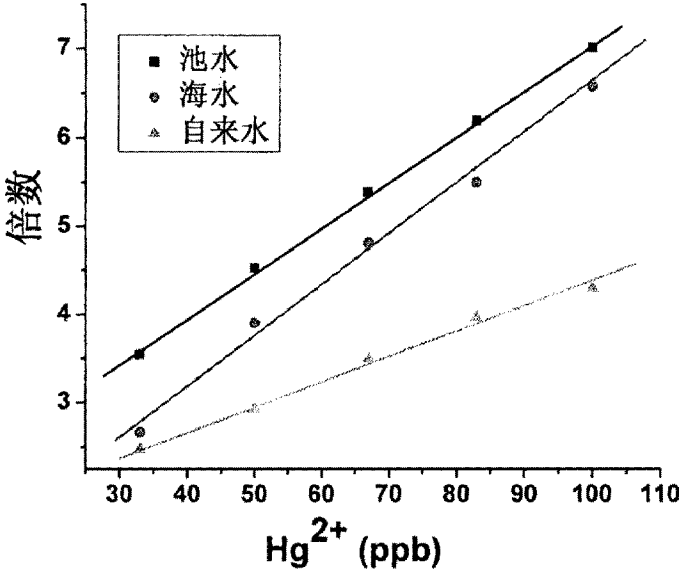


图 7

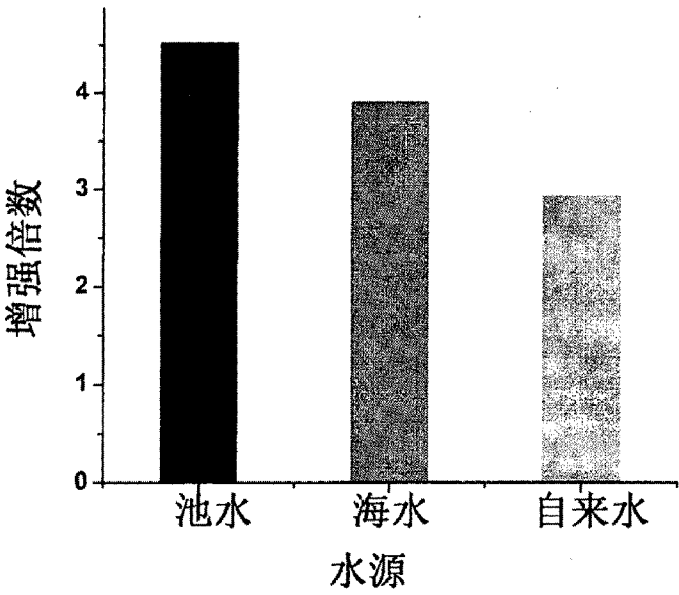


图 8

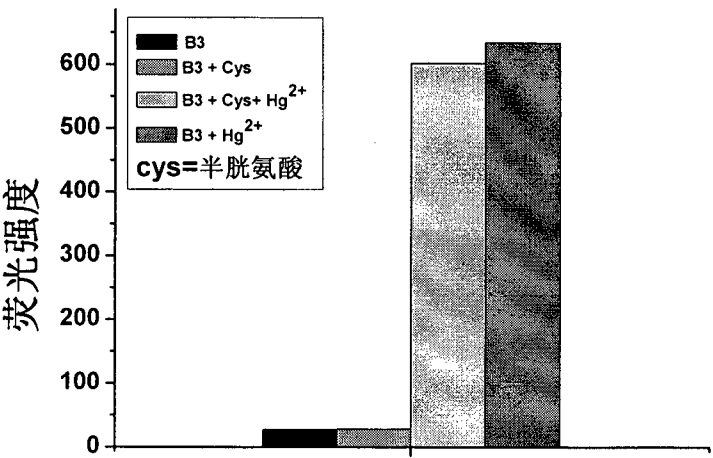


图 9

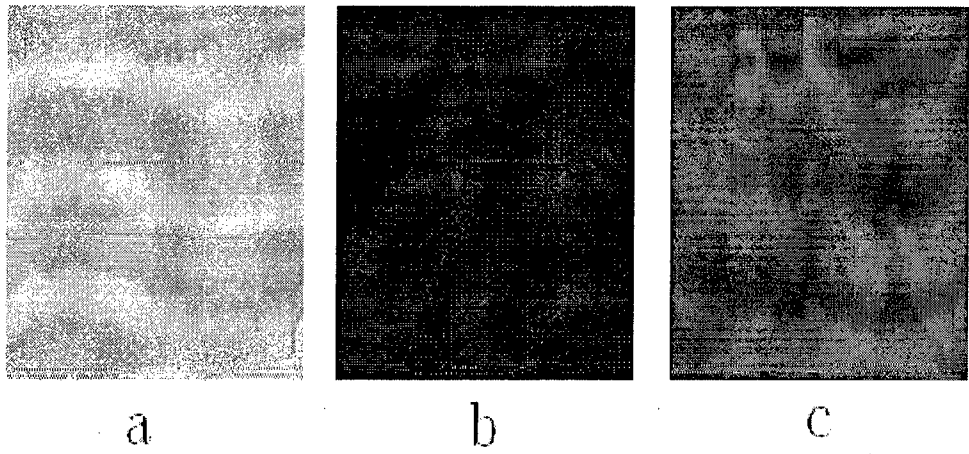


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001973

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: C07F 5, C09K 11, C09B 57, G01N 33

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)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CAPLUS, REG

fluorescent, probe, mercury, dye, fluorine, boron, search according to the structure of the compound of claims 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 101851500 A (UNIV DALIAN SCI & ENG), 06 Oct. 2010 (06.10.2010), see claims 1-3	1-3
X	Lu, Hua et al., Specific Cu ²⁺ -induced J-aggregation and Hg ²⁺ -induced fluorescence enhancement based on BODIPY, Chemical Communications, 15.04.2010, vol. 46, No. 20, pages 3565-3567, see Figure 1 and 5a and the third paragraph	1-2
Y	the same as above	3
Y	Lu, Hua et al., A highly selective and sensitive fluorescent turn-on sensor for Hg ²⁺ and its application in live cell imaging, Organic & Biomolecular, 2009, vol. 7, No. 12, pages 2554-2558, see scheme 1 and the "Synthesis"	3
A	Sunahara, Hisato et al., Design and Synthesis of a Library of BODIPY-Based Environmental Polarity Sensors Utilizing Photoinduced Electron-Transfer-Controlled Fluorescence ON/OFF Switching, Journal of the American Chemical Society, 2007, vol. 129, No. 17, pages 5597-5604	1-3

☐ 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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"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	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 11 Feb. 2011 (11.02.2011)	Date of mailing of the international search report 17 Mar. 2011 (17.03.2011)
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. 86-10-62019451	Authorized officer CHANG Xiaoyu Telephone No. (86-10)62084403

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/001973

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101851500 A	06.10.2010	none	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

C07F 5/02 (2006.01) i

C09K 11/06 (2006.01) i

C09B 57/00 (2006.01) i

G01N 33/52 (2006.01) i

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: C07F 5, C09K 11, C09B 57, G01N 33		
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))		
WPI, EPDOC, CNPAT, CNKI, CAPLUS, REG		
大连理工, 彭孝军+樊江莉+王嵩+李宏林+胡明明+宋克东, 探针, 荧光, 染料, 汞, 氟, 硼, fluorescent, probe, mercury, dye, fluorine, boron, 根据权利要求 1 化合物的结构检索		
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
PX	CN 101851500 A (大连理工大学), 06.10 月 2010 (06.10.2010), 参见权利要求 1-3	1-3
X	Lu, Hua 等, Specific Cu ²⁺ -induced J-aggregation and Hg ²⁺ -induced fluorescence enhancement based on BODIPY, Chemical Communications, 2010 年 4 月 15 日, 第 46 卷, 第 20 期, 3565-3567 页, 参见图 1、图 5a 和第三段。	1-2
Y	同上	3
Y	Lu, Hua 等, A highly selective and sensitive fluorescent turn-on sensor for Hg ²⁺ and its application in live cell imaging, Organic & Biomolecular, 2009 年, 第 7 卷, 第 12 期, 2554-2558 页, 参见流程图 1 和“合成”部分	3
A	Sunahara, Hisato 等, Design and Synthesis of a Library of BODIPY-Based Environmental Polarity Sensors Utilizing Photoinduced Electron-Transfer-Controlled Fluorescence ON/OFF Switching, Journal of the American Chemical Society, 2007 年, 第 129 卷, 第 17 期, 5597-5604 页	1-3
☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。 ☒ 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 11.2 月 2011 (11.02.2011)		国际检索报告邮寄日期 17.3 月 2011 (17.03.2011)
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		授权官员 常晓屿 电话号码: (86-10) 62084403

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2010/001973

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101851500 A	06. 10. 2010	无	

A. 主题的分类

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

C07F 5/02 (2006.01) i

C09K 11/06 (2006.01) i

C09B 57/00 (2006.01) i

G01N 33/52 (2006.01) i