



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104193672 B

(45)授权公告日 2017.07.11

(21)申请号 201410409453.X

C07D 211/58(2006.01)

(22)申请日 2014.08.19

C09K 11/06(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 30/02(2006.01)

申请公布号 CN 104193672 A

G01N 21/64(2006.01)

(43)申请公布日 2014.12.10

(56)对比文件

(73)专利权人 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心

US 20140065616 A1,2014.03.06,全文.

CN 103570678 A,2014.02.12,全文.

地址 510700 广东省广州市珠江新城花城大道66号B座

CN 103570701 A,2014.02.12,全文.

专利权人 香港理工大学

柏林洋,等.微量甲醛检测方法的研究进展.《2005年全国甲醛行业年会论文集》.2005,第70-73页.

(72)发明人 相大鹏 黄文健 刘青 韦晓群 黄家兴 黄芷钊 邵仕萍

Neel S. Joshi,等.A Three-Component Mannich-Type Reaction for Selective Tyrosine Bioconjugation.《J. AM. CHEM. SOC.》.2004,(第126期),第15942-15943页.

(74)专利代理机构 广州市越秀区海心联合专利代理事务所(普通合伙) 44295

左国防.痕量甲醛快速检测的荧光分光光度法研究.《化工质量》.2003,(第四期),第45-46页.

代理人 王洪娟

审查员 王茜

(51)Int.Cl.

C07D 211/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书20页 附图10页

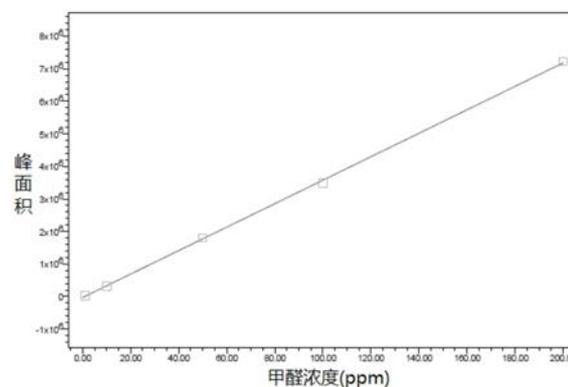
(54)发明名称

完成。

一种基于金属催化偶联反应的食品中甲醛的检测方法及其试剂盒

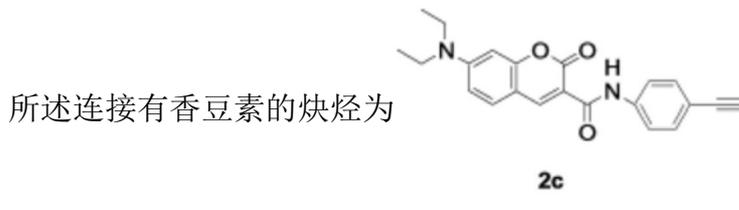
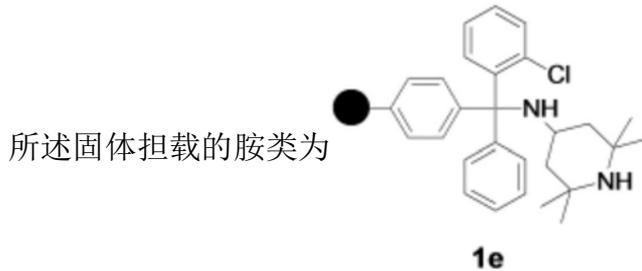
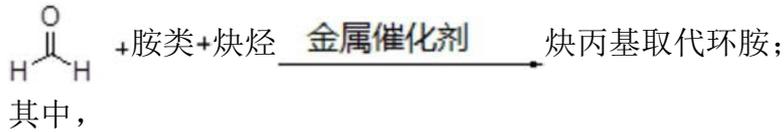
(57)摘要

本发明提供了一种基于金属催化偶联反应的食品中甲醛的检测方法及其试剂盒。金属催化偶联反应为甲醛、胺类和炔烃在金属催化剂的作用下偶联反应形成炔基丙胺,胺类为环状或非环状,能连接荧光基团和/或惰性的固体载体。该方法可以采用连接固体载体的方式。本发明还提供了一种基于金属催化偶联反应的食品中甲醛的检测试剂盒,包含胺类、炔烃、金属催化剂和反应介质。还提供了一种包含与胺类连接的固体载体的试剂盒。本发明的检测方法和试剂盒用于食品中甲醛的检测,采用荧光检测,整个反应系统被固定在固体载体上,便于对多余的反应物进行洗脱,具有较高的收率,且检测快捷,1小时之内可

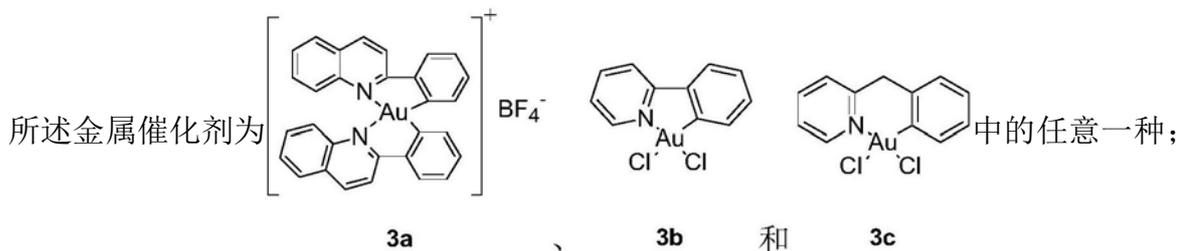


1. 一种基于金属催化偶联反应的食品中甲醛的检测方法,其特征在于,所述的方法具体为:

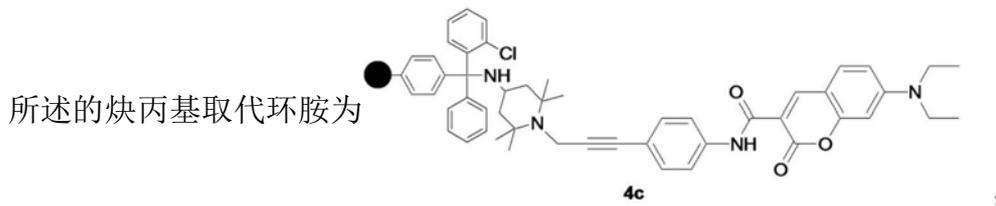
首先,通过金属催化偶联反应合成炔丙基取代环胺,所述金属催化偶联反应为甲醛、固体担载的胺类和连接有香豆素的炔烃在金属催化剂的作用下偶联反应形成炔丙基取代环胺,所述偶联反应的反应式如下:



反应物比例为甲醛:胺类:炔烃:金属催化剂=1:0.03-10:0.05-20:0.007-5;



所述反应介质为1,2-二氯乙烷;



反应条件为反应介质中20-100℃反应;

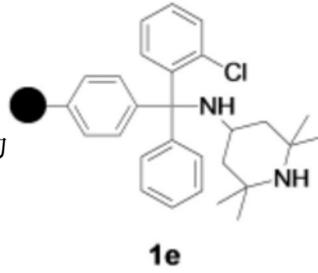
然后,通过观察所述的炔丙基取代环胺的荧光强度确定甲醛浓度。

2. 一种基于金属催化偶联反应的食品中甲醛检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含胺类、炔烃、金属催化剂和反应介质;

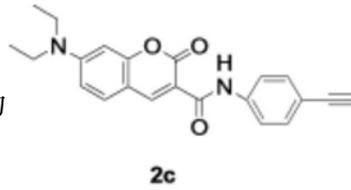
该试剂盒的检测原理为:通过金属催化偶联反应合成炔丙基取代环胺,所述金属催化偶联反应为甲醛、固体担载的胺类和连接有香豆素的炔烃在金属催化剂的作用下偶联反应形成炔丙基取代环胺,所述偶联反应的反应式如下:

$\text{H}-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ + 胺类 + 炔烃 $\xrightarrow{\text{金属催化剂}}$ 炔丙基取代环胺；
 其中，

所述固体担载的胺类为

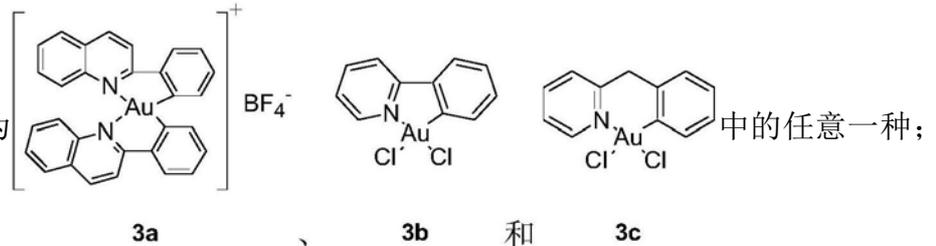


所述连接有香豆素的炔烃为



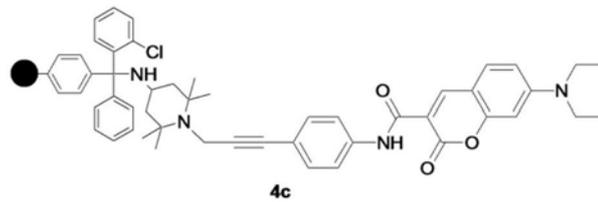
反应物比例为甲醛:胺类:炔烃:金属催化剂=1:0.03-10:0.05-20:0.007-5;

所述金属催化剂为



所述反应介质为1,2-二氯乙烷;

所述的炔丙基取代环胺为



反应条件为

反应介质中20-100℃反应;

然后,通过观察所述的炔丙基取代环胺的荧光强度确定甲醛浓度。

一种基于金属催化偶联反应的食品中甲醛的检测方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于甲醛检测领域,具体涉及一种基于金属催化偶联反应的食品中甲醛的检测方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 近年来,有关“食物中毒”和“不安全食品”的报道时常见诸新闻标题。伴随着高昂的医疗费用支出和生产力的损失,食品事故可以造成巨大的经济损失。根据世界卫生组织的国际贸易统计,食品事故对中国的食品出口造成了非常大的负面影响,由此造成的损失占据了全球农业贸易总额的4.1%。由于生活水平的提高,食品贸易的全球化,食品技术的发展,以及信息的高速传播,食品安全是现今人类从地方,国家到国际层面上都必须解决的重大问题之一。

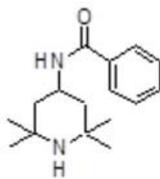
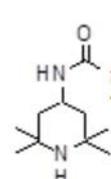
[0003] 甲醛存在于很多活体体内,是正常新陈代谢过程中产物,因此可在蘑菇,肉类,多种果蔬等新鲜和加工食物中正常存在。由于甲醛会很快被代谢为无毒的甲酸,因此活体中游离甲醛的浓度通常都是很低的。但是,最近人们发现,在大陆地区甲醛被人为的应用于食品加工过程中漂白,蛋白质絮凝和防腐工序,从而对公众健康造成严重伤害。受到影响的食品包括虾仁,腐竹,绿豆粉丝和牛肚、鸡爪等食品。

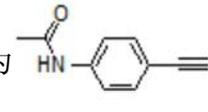
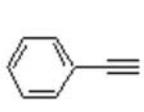
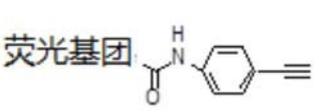
[0004] 大量接触甲醛可以导致急性中毒、皮肤过敏、过敏性气喘和受激问题,而甲醛的慢性毒性包括神经毒性、生殖系统毒性、血液毒性、基因毒性和对肺功能的损害。国际癌症研究机构(IARC)研究表明甲醛是一种导致人类罹患鼻咽癌的物质。正因为甲醛对人体健康有着负面影响,世界卫生组织(WTO)规定,甲醛每日耐受摄入量为0.15mg/kg/天。而美国环保局确定了甲醛的口服参考剂量为0.2mg/kg/天。

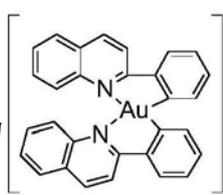
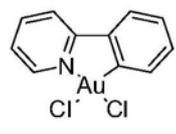
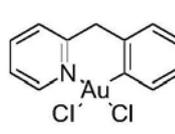
[0005] 在香港,甲醛是不允许用于食品用途的。为了应对公众对于食品中甲醛的担忧,食品安全中心(CFS)自2007年起定期开展针对白饭鱼中甲醛的食品调查行动。CFS报道称,迄今为止,从当地市场抽取白饭鱼样品一共56份,当中发现有19份曾非法使用甲醛。甲醛主要是在白饭鱼捕捞后,运输或者储存中用作保鲜剂。

[0006] 检测是确保食物的安全和质量必不可少的手段。人们开发了多种检测手段以测定食物中甲醛的含量,其中包括气相色谱、液相色谱、荧光检测和分光光度法。配有UV检测器的高压液相色谱是迄今应用最为广泛的检测食物中甲醛的技术。但是,除了仪器设备投入高昂和操作技能需求高之外,此方法灵敏度和选择性都相对较低(例如,多种羰基化合物都会产生干扰),对多组分混杂的食物样品需要冗长的预处理。

[0007] 除开最常用的HPLC-UV方法,最近开发了利用微流控芯片快速检测食物中甲醛的方法。但是,同样的,此方法仪器的设备投入高昂和操作技能需求高,灵敏度和选择性也相对较低(例如,多种羰基化合物都会产生干扰),对多组分混杂的食物样品需要冗长的预处理过程。现今市面上主流的快速检测盒主要是针对空气和生物医学样品中甲醛的测定。Global Complex公司最近开发了一款使用比色法的测试盒,允许对食品中的甲醛进行快速

[0021] 优选的,所述胺类为  或  , 所述荧光基团为香豆素。

[0022] 优选的,所述炔烃为  、  和  中的任意一种,所述荧光基团为香豆素。

[0023] 优选的,所述金属催化剂为  BF_4^- 、  和  中的任意一种。

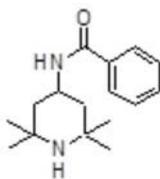
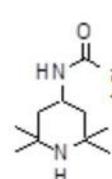
的任意一种。

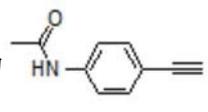
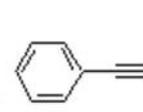
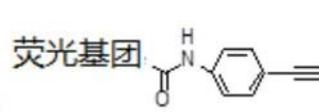
[0024] 优选的,所述反应介质为乙氰、水、缓冲溶液、二氯甲烷、己烷、乙醚、氯仿、甲醇、正丁醇、甲苯、二甲苯、二甲基甲酰胺、二恶烷、四氢呋喃、1,2-二氯乙烷和乙酸乙酯中的一种或多种。

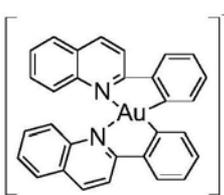
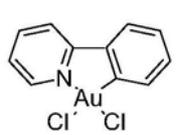
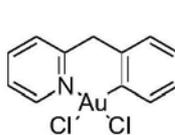
[0025] 上述检测方法,还包括固体载体,所述固体载体与所述胺类连接,所述固体载体为环糊精、树脂、玻璃、纸张、二氧化硅、塑料或者布料中的一种。

[0026] 优选的,所述固体载体为2-氯三苯甲基氯树脂。

[0027] 本发明还提供了一种基于金属催化偶联反应的食品中甲醛的检测试剂盒,所述试剂盒包含胺类、炔烃、金属催化剂和反应介质;

[0028] 所述胺类为  或  , 所述荧光基团为香豆素;

[0029] 所述炔烃为  或  或  , 所述荧光基团为香豆素;

[0030] 所述金属催化剂为  BF_4^- 、  和  中的任意一种。

一种。

[0031] 所述反应介质为乙氰、水、缓冲溶液、二氯甲烷、己烷、乙醚、氯仿、甲醇、正丁醇、甲苯、二甲苯、二甲基甲酰胺、二恶烷、四氢呋喃、1,2-二氯乙烷和乙酸乙酯中的一种或多种。

[0032] 优选的,所述试剂盒中还包括固体载体,所述固体载体与所述胺类连接,所述固体载体为环糊精、树脂、玻璃、纸张、二氧化硅、塑料或者布料中的一种。

[0033] 优选的,所述树脂为2-氯三苯甲基氯树脂。

[0034] 本发明的检测方法用于食物样品中甲醛的检测,采用荧光检测,整个反应系统可以被固定在固体载体上,便于对多余的反应物进行洗脱,具有较高的收率,且检测快捷,1小时之内可完成。

附图说明

[0035] 图1为C18柱分析模型反应产物的色谱图;

[0036] 图2A- 图 2D 为不同浓度的化合物1b、2b、3a和4b的HPLC图谱;其中,图2A为浓度均为10ppm 的化合物1b、2b、3a和4b的HPLC图谱,图2B为浓度均为50ppm的化合物1b、2b、3a和4b的HPLC图谱,图2C为化合物浓度均为100ppm的1b、2b、3a和4b的HPLC图谱,图2D为浓度均为200ppm的化合物1b、2b、3a和4b的HPLC图谱;

[0037] 图3为使用HPLC对模型反应得到的炔丙基胺进行定量的校正曲线;

[0038] 图4为带香豆素基团的胺类和丹酰基的炔烃反应产物的质谱图;

[0039] 图5为带香豆素基团的胺类化合物和苯基乙炔反应产物的质谱图;

[0040] 图6为2,2,6,6-四甲基吡啶和带香豆素基团的炔烃反应产物的质谱图;

[0041] 图7为2,2,6,6-四甲基吡啶和丹酰基炔烃反应产物的质谱图;

[0042] 图8为365nm波长的UV灯照射下,产物4c在500 μ L的二氯甲烷中的发光情况;

[0043] 图9为树脂上切除下来的产物的质谱图;

[0044] 图10为炔丙基胺5a的荧光光谱图;

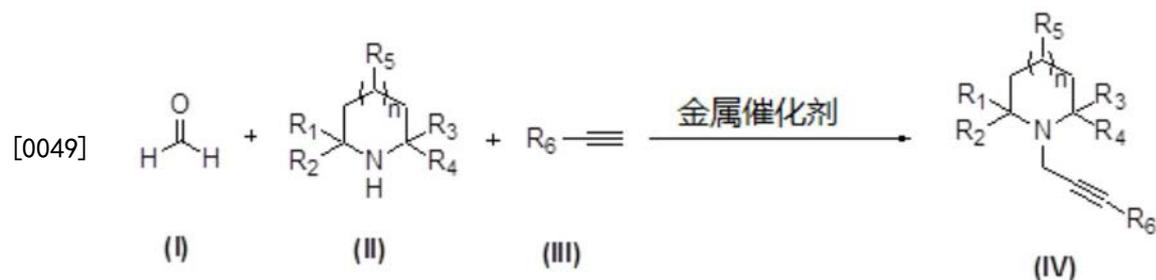
[0045] 图11为0-500ppm范围内甲醛浓度和树脂小球上荧光强度的线性关系图;

[0046] 图12为使用蘑菇样品为甲醛来源的实验中,树脂小球中切除下来的产物的质谱图。

具体实施方式

[0047] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围,下列实施例中未提及的具体实验方法,通常按照常规实验方法进行。

[0048] 在本发明中,我们通过金属催化甲醛(I)、胺类(II)和炔烃(III)的三组分偶联反应形成炔基丙胺(IV)来对甲醛进行专一性检测,反应式如下:



[0050] 1、模型反应的HPLC检测条件：

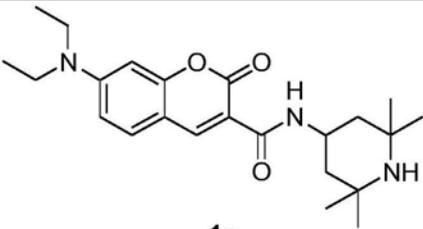
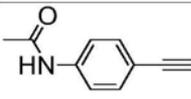
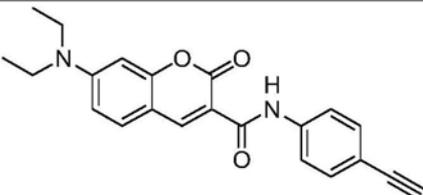
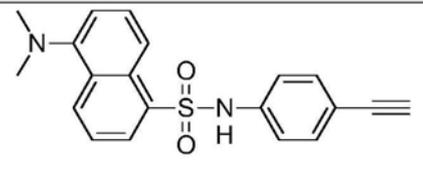
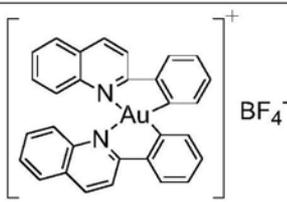
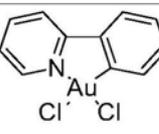
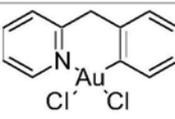
[0051] 使用Waters HPLC系统分离，配置有XTerra MS C18 (5 μ m, 4.6mm x 100mm) 柱以及Waters2998光电二极管阵列检测器(PDA)。流速为0.6mL/min，进样体积为10 μ L，PDA检测器波长设置为254nm。

[0052] 流动相A使用Milli-Q®超纯水。流动相B是乙腈。初始分离条件为30%B保持3min，3min内通过线性梯度到70%B，保持4min。1min内通过线性梯度到100%B，保持3min。2 min内通过线性梯度到30%B，最后保持2min。

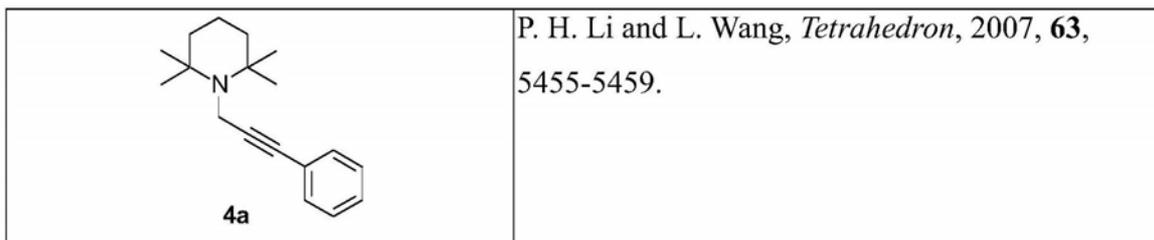
[0053] 2、相关化合物合成方法可参考的文献，具体见表1，表1为相关化合物合成方法及相关参考文献的信息表。

[0054] 表1

[0055]

 <p style="text-align: center;">1c</p>	E. Szabo, P. Hrdlovic and M. Danko, <i>Dyes Pigments</i> , 2011, 90 , 129-138.
 <p style="text-align: center;">2b</p>	W. K. Chan, C. M. Ho, M. K. Wong and C. M. Che, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2006, 128 , 14796-14797.
 <p style="text-align: center;">2c</p>	M. Maldonado-Domínguez, R. Arcos-Ramos, M. Romero, B. Flores-Pérez, R. Santillan, P. G. Lacroix, I. Malfant and N. Farfán, <i>New J. Chem.</i> , 2014, 38 , 260-268.
 <p style="text-align: center;">2d</p>	K. K. Y. Kung, G. L. Li, L. Zou, H. C. Chong, Y. C. Leung, K. H. Wong, V. K. Y. Lo, C. M. Che and M. K. Wong, <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 2012, 10 , 925-930.
 <p style="text-align: center;">3a</p>	H. M. Ko, K. K. Y. Kung, J. F. Cui and M. K. Wong, <i>Chem. Comm.</i> , 2013, 49 , 8869-8871.
 <p style="text-align: center;">3b</p>	E. C. Constable and T. A. Leese, <i>J. Organomet. Chem.</i> , 1989, 363 , 419-424.
 <p style="text-align: center;">3c</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.

[0056]



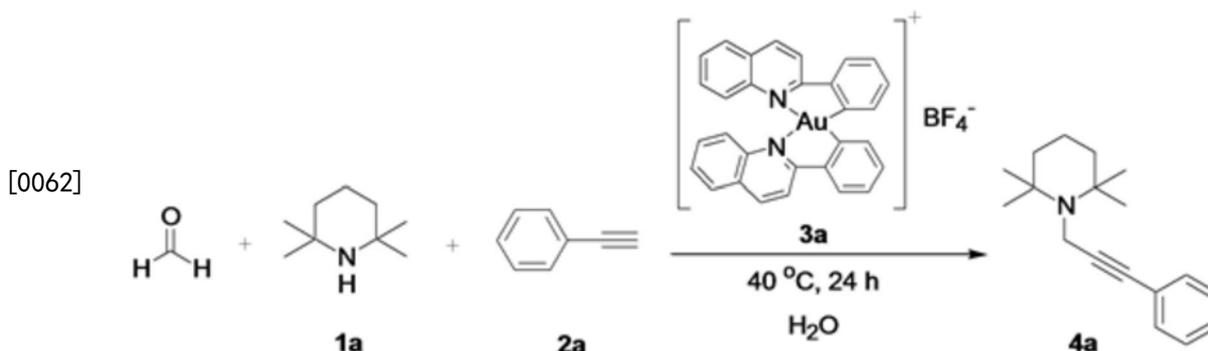
[0057] 实施例1: 甲醛探针选择性研究的反应条件

[0058] 由于甲醛是自然界中最小的醛类, 可通过提高氨基周围的空间位阻来达到对甲醛的高度选择测试性。

[0059] 本实施例研究了三分偶联反应的反应物二级胺的结构对甲醛探针的选择性影响。由于四个甲基基团形成较大的空间位阻, 商用化试剂2,2,6,6-四甲基吡啶可作为甲醛探针的关键组成部分。

[0060] 首先, 为了确认是否能得到炔丙胺4a, 本实施例做了如下实验:

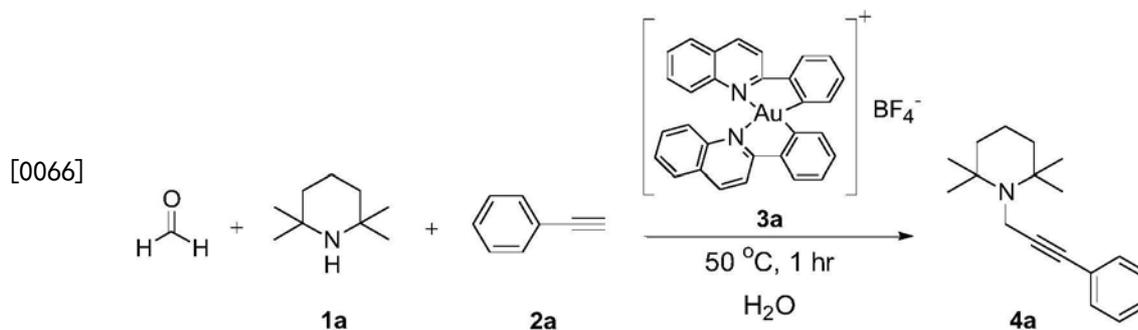
[0061] 1mmol 甲醛, 1.1mmol 2,2,6,6-四甲基吡啶1a, 1.5mmol 市售苯基乙炔2a和0.01mmol 双环金(III)配合物3a在1mL水中的反应, 40℃下反应24h。该反应的反应式如下:



[0063] 反应结束后, 用二氯甲烷将反应产物提取出来 (15mL × 3次), 合并有机层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。残余物用快速柱色谱提纯, 溶剂为乙酸乙酯/正己烷混合液。炔丙基胺化合物4a的分离收率为74%。

[0064] 该结果表明使用金(III)配合物催化甲醛、胺类分子和炔基化合物的反应可以用于甲醛的检测。

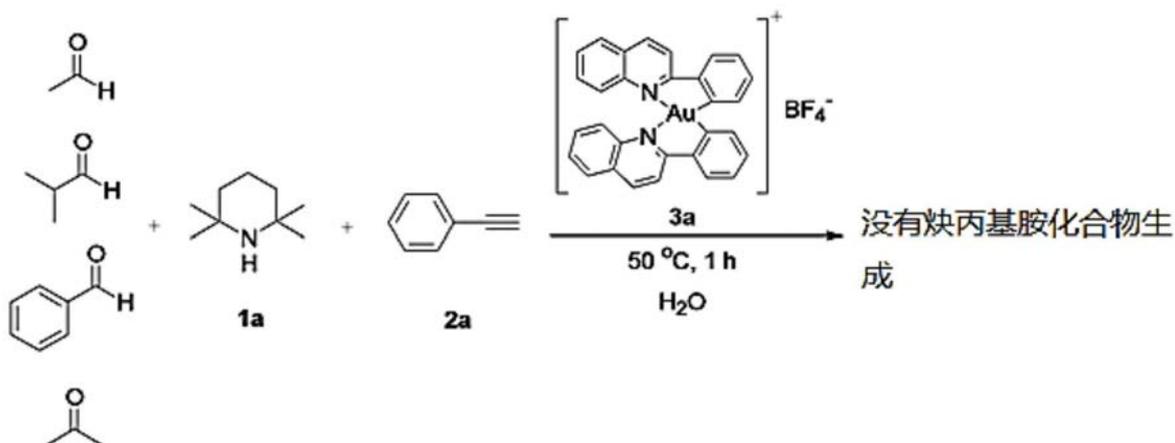
[0065] 为了将反应时间缩短到1h, 本实施例做了进一步实验。1mmol 甲醛, 1.1mmol 市售的2,2,6,6-四甲基吡啶1a, 1.5mmol 市售的苯乙炔2a以及0.1mmol 双环金(III)配合物3a在1mL水中反应1h。将反应温度提高到50℃, 催化剂用量增加到0.1mmol以补偿反应时间减少对收率的影响。反应式如下:



[0067] 反应后,使用二氯甲烷提取(15mL×3次)。合并有机层用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩。残余物用快速柱色谱提纯,溶剂为乙酸乙酯/正己烷混合液。炔丙基胺化合物4a的分离收率为6%,表明了1h的时间内甲醛依然可以和胺化合物和炔基化合物反应得到产物。

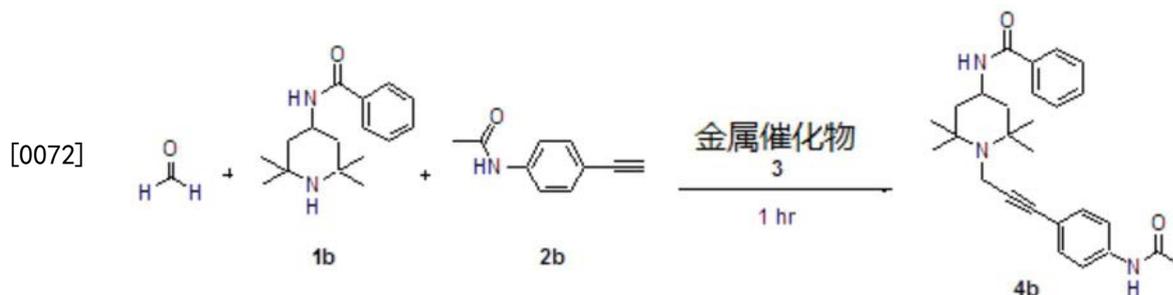
[0068] 同时,发明人使用等摩尔量的乙醛、异丁醛、苯甲醛和丙酮代替甲醛,在相同条件下反应,ESI-MS分析没有发现相对应的炔丙基胺化合物生成。

[0069]



[0070] 实施例2:用于甲醛检测的模型反应的HPLC分析条件的确定

[0071] 确证了此探针对甲醛检测的专一性后,我们设计了反应模型以及以HPLC为基础的检测方法考察诸如催化剂、溶剂、温度和反应物比例等不同参数对炔基丙胺(4b)收率的影响,反应模型如下:



[0073] 合成了胺(1b)和炔烃(2b),以便于用HPLC-DAD检测炔基丙胺(4b)。

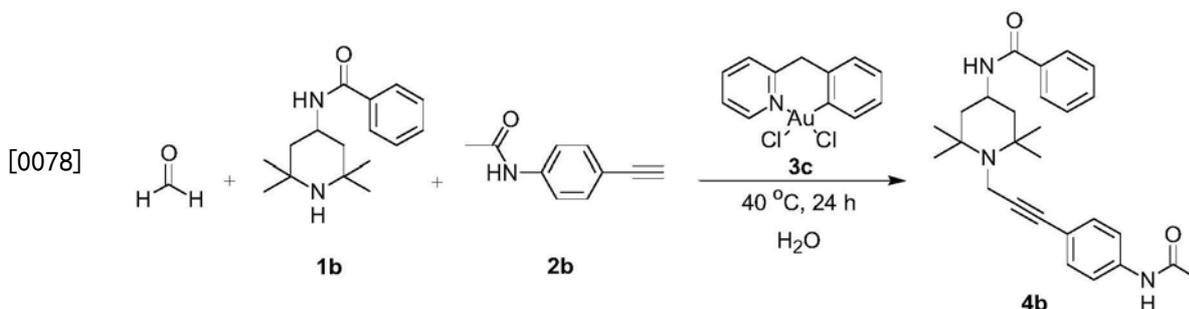
[0074] 合成化合物1b的步骤:将4-氨基-2,2,6,6-四甲基吡啶(6mmol),苯甲酰氯(3mmol)和吡啶混合物溶解于二氯甲烷(3mmol)中,氮气气氛下室温搅拌过夜。反应后,减压浓缩混合物。残余物用快速柱色谱提纯,溶剂为甲醇/乙酸乙酯混合液。胺基化合物1b的分离收率

为84%。

[0075] 1b的表征分析数据:白色粉末,分析用TLC(硅胶60)(40%甲醇/乙酸乙酯), $R_f=0.45$, $^1\text{H NMR}$ (400MHz,CDC13) δ 7.76(d, $J=7.2\text{Hz}$,2H), δ 7.48(t, $J=7.3\text{Hz}$,1H), δ 7.41(t, $J=7.6\text{Hz}$,2H), δ 6.05(d, $J=7.2\text{Hz}$,1H), δ 4.41-4.51(m,1H), δ 1.99(dd, $J=6.2\text{Hz}$,2H), δ 1.29(s,6H), δ 1.14(s,6H), δ 1.04(t, $J=12.2\text{Hz}$,2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz,CDC13) δ 166.70,134.75,131.34,128.51,126.75,51.24,45.20,43.05,34.82,28.42;ESI-MS m/z 261[M+H]⁺;HRMS(ESI)C₁₆H₂₅N₂O,理论计算值261.1961,实测值261.1960。

[0076] 化合物2b的合成步骤:4-乙炔基苯胺(2.5mmol)和乙酸酐(3.3mmol)溶解于二氯甲烷(5mL)中,室温搅拌6h。将溶剂蒸发后残余物用快速柱色谱净化,溶剂为乙酸乙酯/正己烷,炔基化合物2b收率为95%。

[0077] 化合物4b的合成步骤:将甲醛(1mmol),胺类化合物1b(1.1mmol),炔基化合物2b(1.5mmol)和环化金(III)配合物3c(0.01mmol)混合物在水(1mL)中40℃搅拌24h。反应后,混合物用乙酸乙酯提取(15mL×3次)。合并有机层并用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩。残余物用快速柱色谱提纯,溶剂为乙酸乙酯/正己烷混合液。炔丙基胺化合物4b的分离收率为36%。



[0079] 化合物4b表征分析数据:白色粉末,分析用TLC(硅胶60)(70%乙酸乙酯/正己烷), $R_f=0.57$; $^1\text{H NMR}$ (400MHz,CD₃OD) δ 7.81(d, $J=7.2\text{Hz}$,2H), δ 7.50(d, $J=8.1\text{Hz}$,3H), δ 7.44(t, $J=7.0\text{Hz}$,2H), δ 7.29(d, $J=8.1\text{Hz}$,2H), δ 4.36-4.42(m,1H), δ 3.63(s,2H), δ 2.11(s,3H), δ 1.79(d, $J=10.0\text{Hz}$,2H), δ 1.56(t, $J=12.2\text{Hz}$,2H), δ 1.32(s,6H), δ 1.25(s,6H); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz,CDC13) δ 171.65,169.76,139.59,136.07,132.82,132.57,129.52,128.36,120.86,120.80,92.69,82.19,57.37,43.35,34.22,33.99,23.89,22.39;ESI-MS m/z 432[M+H]⁺;HRMS(ESI)C₂₇H₃₄N₃O₂,计算值432.2646,实测值432.2649。

[0080] HPLC分析时,使用XTerra MS C18柱,反相梯度淋洗。流动相由水和乙腈组成。梯度淋洗保证可以在18min内分离混合物中的化合物1b,2b,3a和4b。图1为C18柱分析模型反应产物的色谱图。所有具有UV吸收的4种化合物1b,2b,3a和4b均被分离。

[0081] 为确定模型反应中生成的炔丙基胺4b的含量,使用了HPLC对1b、2b、3a和4b不同浓度做图谱,图2为不同浓度的化合物1b、2b、3a和4b的HPLC图谱;其中,图2A为浓度均为10ppm的化合物1b、2b、3a和4b的HPLC图谱,图2B为浓度均为50ppm的化合物1b、2b、3a和4b的HPLC图谱,图2C为化合物浓度均为100ppm的1b、2b、3a和4b的HPLC图谱,图2D为浓度均为200ppm的化合物1b、2b、3a和4b的HPLC图谱。同时,制作了4b的校正曲线,相关数据如表2所示,表2为标准曲线的相关数据表。

[0082] 表2

[0083]

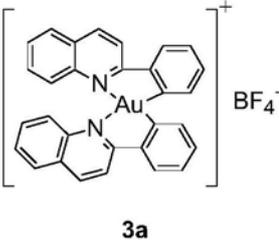
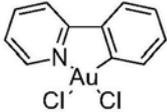
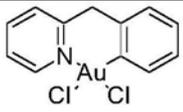
化合物4b的浓度	峰面积 (HPLC测定)
1	39195
10	324417
50	1797622
100	3481545
200	7222159

[0084] 结果见图3,图3为使用HPLC对模型反应得到的炔丙基胺进行定量的校正曲线。由图3可见,曲线的线性范围为1ppm至200ppm。计算出相关系数R2为0.9996,表示线性相关度很高。这表明,利用HPLC分析法对炔丙基胺4b进行定量时使用校正曲线,结果可信度很高。

[0085] 实施例3:高效的金(III)催化剂的选择实验

[0086] 本实施例研究了三种金属催化剂对于甲醛、胺类(1b)和炔烃(2b)的三组分偶联反应合成炔基丙胺(4b)过程的催化活性。三种金属催化剂见表1中所示。反应条件为:20 μmol 甲醛(水溶液形式),22 μmol 胺类(1b),30 μmol 炔烃(2b)和4 μmol 金属环化金配合物于50 $^{\circ}\text{C}$ 反应1小时;反应后混合物使用HPLC进行分离和确定各自收率。结果见表3,表3是模型反应中不同的金属环化金配合物对于炔基丙胺(4b)收率的影响实验结果,从表3可以看到,相对于使用其他两种催化剂的反应,使用双-金属环化金配合物(3a)的反应具有最高的收率(4.0%,1号进样口)。因此,使用金配合物3a进行后续实验。

[0087] 表3

进样口	环金属化金催化剂	炔基丙胺的收率 (%)
1	 <p>3a</p>	4.0
2	 <p>3b</p>	1.1
3	 <p>3c</p>	2.2

[0089] 实施例4:反应溶剂的选择实验

[0090] 上述实施例确定了最高效的金(III)催化剂3a,本实施例考察了不同溶剂对于产物收率的影响。甲醛以100 μL 水溶液的形式添加到反应中。反应条件为:20 μmol 甲醛(水溶液形式),22 μmol 胺类(1b),30 μmol 炔烃(2b)和4 μmol 金属环化金(III)配合物于50 $^{\circ}\text{C}$ 反应1小

时;HPLC分析。分别用乙腈,二甲基甲酰胺,四氢呋喃,1,4-二氧己烷,甲苯,乙酸乙酯和1,2-二氯乙烷代替水作溶剂重复反应。结果见表4,表4为模型反应中溶剂对于产物4b收率的影响研究结果表。从表4中可以看到,使用某些与水互容的极性溶剂(2-5号进样口)比起单纯使用水(1号进样口)得到的产品量要少,部分反应甚至不能使用HPLC检测出产品。

[0091] 上述结果表明,使用水和互溶极性溶剂的共溶剂系统比起单纯使用水做反应介质会降低金(III)配合物催化甲醛、胺类和炔烃合成炔基丙胺反应的产物收率。另一方面,使用不与水互溶的有机溶剂如乙酸乙酯或1,2-二氯乙烷(表4,第7和8号进样口)会提高反应产物的收率。特别是使用1,2-二氯乙烷的反应收率是单纯使用水做反应介质的反应的3倍。考虑到使用1,2-二氯乙烷可得到高产物收率,后续实验中采用1,2-二氯乙烷作为反应介质。

[0092] 表4

[0093]

进样口	溶剂	炔基丙胺的收率(%)
1	水	3.8

[0094]

2	乙腈	-
3	二甲基甲酰胺	-
4	四氢呋喃	1.6
5	1,4-二氧六环	2.2
6	甲苯	1.1
7	乙酸乙酯	5.4
8	1,2-二氯乙烷	12.1

[0095] 实施例五:反应温度的选择

[0096] 从25℃-60℃范围内选择了4个温度点研究模型反应中温度对收率的影响。反应条件为:20μmol甲醛(水溶液形式),22μmol胺类(1b),30μmol炔烃(2b)和4μmol金属环化金(III)配合物于1,2-二氯乙烷中反应1小时,HPLC定量。分别在40℃,50℃和60℃下重复该反应。表5为反应温度对模型反应中产物4b收率的影响实验结果表。由表5可见,在室温下反应1小时(1号进样口)没有产物4b生成。40℃和60℃反应条件(2和4号进样口)得到的收率接近,而50℃温度(3号进样口)下产物收率最高,为12.1%。60℃下产物收率没有50℃下高,可能是因为在高温条件下挥发了。

[0097] 表5

[0098]

进样口	温度(℃)	炔基丙胺的收率(%)
1	25	-
2	40	3.6
3	50	12.1
4	60	4.1

[0099] 实施例六:反应物和催化剂用量对反应产物收率的影响实验

[0100] 确定了最佳的反应温度后,我们考察了胺类(1b),炔烃(2b)和环金属化金(III)催

化剂 (3a) 的用量对反应产物收率的影响。将甲醛 (50 μ L水溶液), 胺类化合物1b, 炔基化合物2b和环化金 (III) 配合物3a根据不同比例混合溶解于1,2-二氯乙烷 (450 μ L) 中50 $^{\circ}$ C搅拌1h。反应后, 取20 μ L混合物与980 μ L乙腈混合后进样, HPLC分析。反应条件见表6下方的标注。实验结果见表6, 表6为反应应物比例对于产物4b的收率的影响结果表。一般而言, 产物4b的收率随着反应物和催化剂的用量增加而增加, 使用5倍当量于甲醛的双环金 (III) 催化剂 (编号12), 1小时内最高收率达到56%。必须注意到当使用等量的1b、2b 和3a时 (编号10) 产物的收率很低 (8%)。发明人进行了一组实验, 其中甲醛用量相对于胺类化合物1b的量是过量的 (编号17-25), 但是炔丙基胺4b的收率没有上面提到的高 (56%, 编号12)。因此, 发明人决定检测模式为使用过量的试剂和样品中有限的甲醛反应。

[0101] 表6

编号	胺类化合物 1b (μmol)	炔基化合物 2b (μmol)	金(III) 配合物 3a (μmol)	4b 收率 ^b (%)
1	10	15	2	-
2	10	50	10	18
3	10	50	30	19
4	10	100	1	5
5	10	100	2	-
6	10	150	2	-
7	10	200	1	1
8	50	10	10	19
9	50	50	30	41
10	50	50	50	8
11	50	100	2	-
[0102] 12	50	100	50	56
13	50	150	2	-
14	100	50	50	40
15	100	150	2	6
16	100	100	50	53
17 ^c	10	15	1	3
18 ^c	10	100	1	9
19 ^c	10	100	2	16
20 ^d	20	30	2	4
21 ^d	20	200	2	23
22 ^d	20	200	4	46
23 ^e	10	15	1	5
24 ^e	10	100	2	28
25 ^f	20	30	2	12

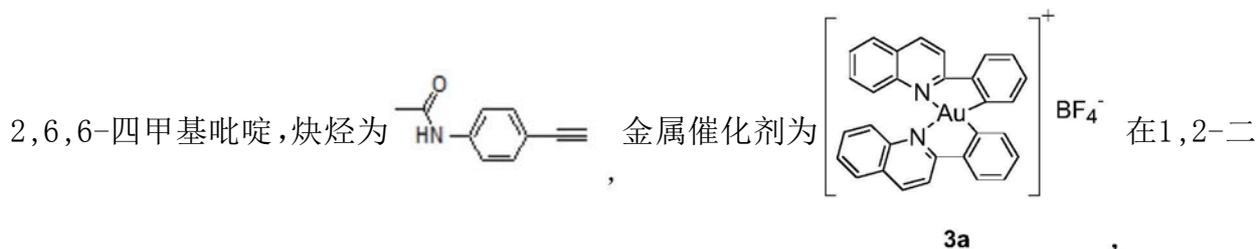
[0103] ^a除非有另外说明,反应条件为甲醛(10 μmol ,水溶液形式)在1,2-二氯乙烷中50 $^{\circ}\text{C}$ 反应1h;^bHPLC定量;^c使用100 μmol 甲醛;^d使用200 μmol 甲醛;^e使用300 μmol 甲醛;^f使用600 μmol 甲醛。

[0104] 实施例七:本发明的方法在检测香菇的水提取液做甲醛源中的应用实验

[0105] 为了确认使用环金属化金(III)配合物催化的三组分偶联反应是否能够用于检测食物中的甲醛,使用干香菇的水提取液做甲醛源。我们熟知甲醛是香菇中天然存在的成分。

[0106] 购买的蘑菇要用塑料袋密封并于室温下保存,同时避免阳光直射。将去除蘑菇柄后的样品充分打碎。称取约2g的样品于离心管中,加入20mL Milli-Q[®] 去离子水后加盖密封。离心管置于40℃超声水浴中提取1h,然后用4000rpm速度离心10min。用滤纸进行过滤,滤液收集于50mL容量瓶中。离心管中的沉淀再次加入20mL Milli-Q[®] 去离子水,按上述操作超声提取,离心并过滤,将滤出液与第一次的滤出液合并。用Milli-Q[®] 去离子定容并混合均匀。此溶液作为蘑菇样品的水提取液。

[0107] 将干香菇的水提取液与胺类和炔烃在金属催化剂的作用下偶联反应,胺类选用2,

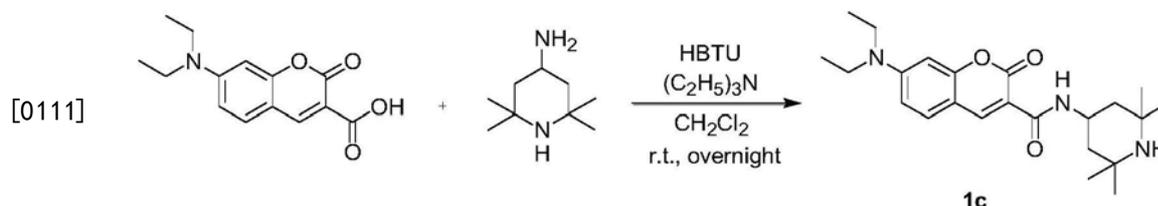


氯乙烷做反应介质的条件下,50℃反应1小时。ESI-MS确认得到了预期的炔基丙胺4b产物。

[0108] 实施例八:建立带荧光基团的胺类和带荧光基团的炔烃合成双荧光基团的炔基丙胺的反应

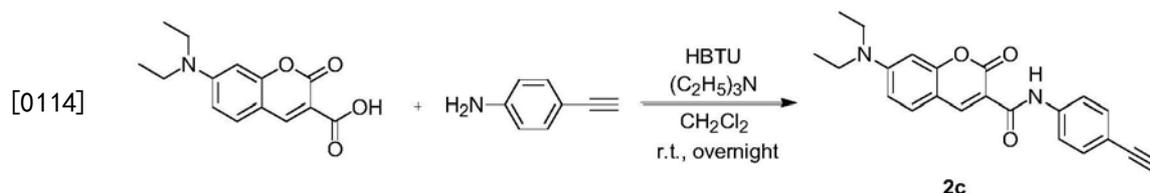
[0109] 本发明利用荧光检测的高灵敏度实现对食物中的甲醛的检测,因此,在本实施例中合成了带有荧光基团的胺类和带荧光基团的炔烃并用于合成反应,考察是否得到带有两个荧光基团的产物。

[0110] 化合物1c的合成步骤



[0112] 将7-(二乙氨基)香豆素-3-羧酸(0.5mmol),4-氨基-2,2,6,6-四甲基吡啶(0.6mmol),三乙胺(1mmol)和N,N,N',N'-四甲基-(O-苯并三唑-1-基)脲六氟磷酸酯(HBTU)(0.6mmol)混合并溶解于二氯甲烷(20mL)中,氮气气氛中室温搅拌过夜。反应后,混合物用水洗涤(15mL×3次),有机层用无水硫酸镁干燥,过滤,减压浓缩。残余物用快速柱色谱晶华,甲醇/二氯甲烷做淋洗液,化合物1c的收率为91%。

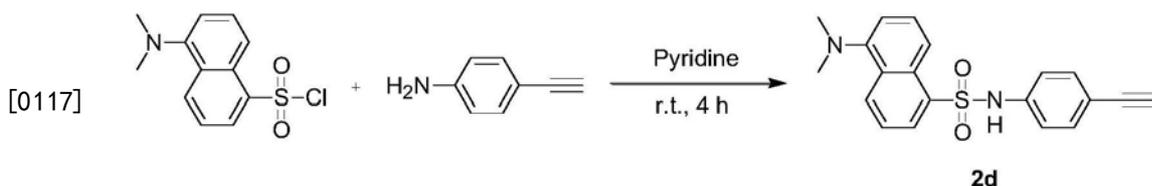
[0113] 化合物2c的合成



[0115] 将7-(二乙氨基)香豆素-3-羧酸(0.5mmol),4-乙炔基苯胺(0.6mmol),三乙胺(1mmol)和HBTU(0.6mmol)混合并溶解于二氯甲烷(20mL)中,氮气气氛中室温搅拌过夜。反应后,混合物用水洗涤(15mL×3次),有机层用无水硫酸镁干燥,过滤,减压浓缩。残余物用

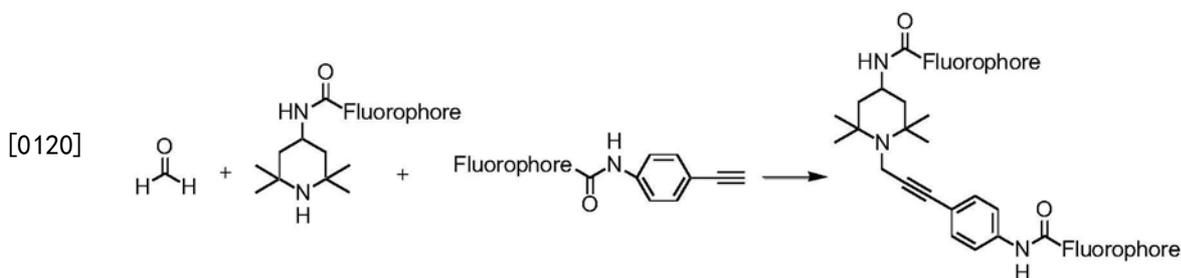
快速柱色谱晶华,二氯甲烷/正己烷做淋洗液,化合物2c的收率为91%。

[0116] 化合物2d的合成步骤



[0118] 将丹磺酰氯(0.5mmol),4-乙炔基苯胺(0.5mmol)溶解于吡啶(5mL)中,氮气气氛中室温搅拌4h。反应后,混合物用2M盐酸溶液洗涤(20mL),然后用乙酸乙酯提取(20mL×3次),有机层用无水硫酸镁干燥,过滤,减压浓缩。残余物用快速柱色谱晶华,乙酸乙酯/正己烷做淋洗液,化合物2d的收率为69%。

[0119] 甲醛的荧光检测步骤

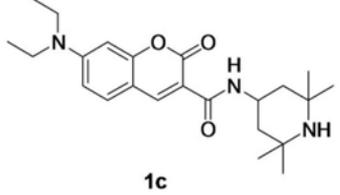
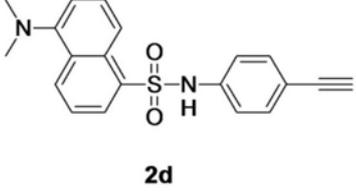
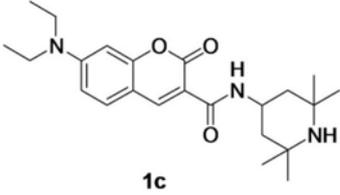
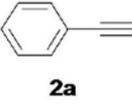
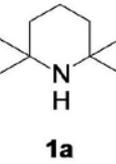
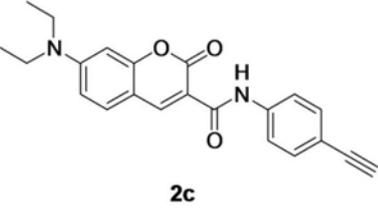
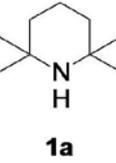
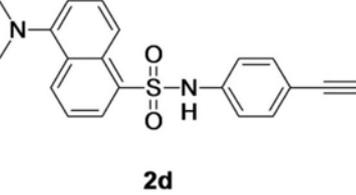


[0121] 将甲醛(20 μ mol,50 μ L水溶液),胺类化合物1a或1c(150 μ mol),炔基化合物2a,2c或2d(300 μ mol),以及环化金(III)配合物3a(150 μ mol)混合溶解于1,2-二氯乙烷(1mL)中,50 $^{\circ}$ C搅拌1h。反应后,混合物用ESI-MS分析确认反应产物的生成。

[0122] 合成之后,将胺类化合物1c以及带荧光基团的炔烃2c-d形成不同的组合应用于甲醛检测的三组分偶联反应中,结果见表7,表7是带不同荧光的胺类和炔烃形成带荧光基团的产物的研究结果表。利用ESI-MS可确定,不同的组合会形成不同的对应的炔丙基胺,结果图见图4、5、6,图4为带香豆素基团的胺类和丹酰基的炔烃反应产物的质谱图,图5为带香豆素基团的胺类化合物和苯基乙炔反应产物的质谱图;图6为2,2,6,6-四甲基吡啶和带香豆素基团的炔烃反应产物的质谱图;图7为2,2,6,6-四甲基吡啶和丹酰基炔烃反应产物的质谱图。香豆素激发波长是409nm,发射波长是473nm,发出蓝色的荧光。丹酰基团激发波长是337nm,发射波长是492nm,发出绿色的荧光。结果显示不同的荧光基团可以用于甲醛的检测,在实际中可根据需要选择使用一个还是两个荧光基团。由于合成带香豆素基团的胺类化合物1c和炔烃2c较为容易,因此选择香豆素基团做后续研究。

[0123] 表7

[0124]

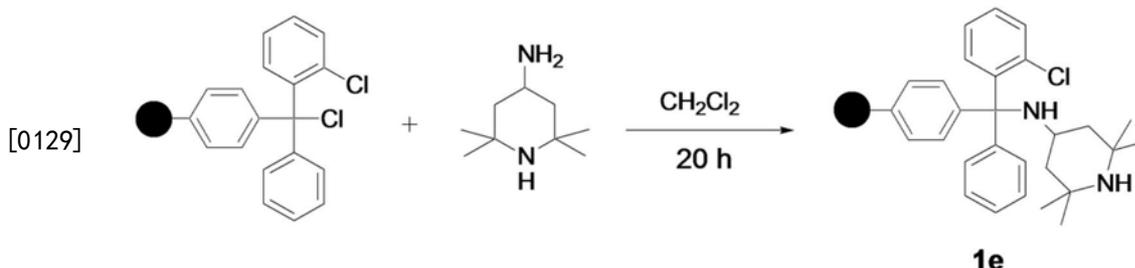
编号	胺类化合物	炔烃化合物	形成产物 b
1	 1c	 2d	可以
2	 1c	 2a	可以
3	 1a	 2c	可以
4	 1a	 2d	可以

[0125] ^a使用甲醛 (20 μ mol, 水溶液形式), 胺类化合物1a和1c (150 μ mol), 炔烃化合物2a, 2c-d (300 μ mol) 和金 (III) 配合物3a (150 μ mol), 在1000 μ L 1,2-二氯乙烷中50 $^{\circ}$ C反应1h; ^b用ESI-MS检测。

[0126] 实施例九: 建立检测食品中甲醛的固相形式的三组分偶联反应方法

[0127] 由于甲醛的定量是通过检测金 (III) 配合物催化的三组分偶联反应合成的炔基丙胺的荧光强度的, 因此在反应后和检测前, 必须除去多余荧光试剂以减少背景中的荧光信号。在使用远过量的试剂来提高产物收率的情况下, 洗脱步骤非常重要。为了加快洗脱步骤的速度, 上述的整个反应系统通过固相有机合成法 (SPOS) 被转移到固体载体上。

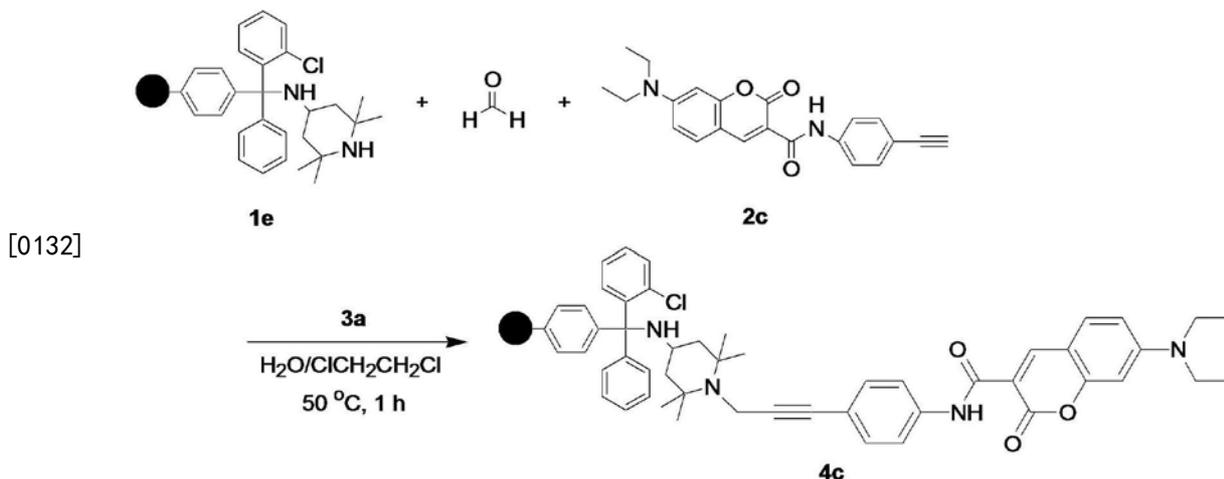
[0128] 采用了商用的聚合物键合的2-氯三苯甲基氯树脂作为固体载体。4-氨基-2,2,6,6,-四甲基吡啶被连接到树脂上作为甲醛探针 (1e)。合成反应式如下:



[0130] 合成方法如下: 将商业化的聚合物键合2-氯三苯甲基氯树脂 (15mg) 在二氯甲烷

(250 μ L)中溶胀15min。加入4-氨基-2,2,6,6-四甲基吡啶(0.19mmol),轻轻震荡反应瓶20h。反应后,加入12 μ L HPLC级的甲醇,搅拌15min以封闭残余的反应性2-氯三苯基团。树脂依次用1mL二氯甲烷洗涤3次,1mL二甲基甲酰胺洗涤2次,1mL二氯甲烷洗涤3次。干燥后备用。

[0131] 反应过后,用HPLC级的甲醛将剩余的活性2-氯三苯基基团封端。用二氯甲烷,二甲基甲酰胺洗涤,最后再用二氯甲烷洗涤以除去多余的没有反应的4-氨基-2,2,6,6-四甲基吡啶。干燥后,该氨基功能化的树脂即可用作甲醛探针。树脂上氨基的理论负载量为98%。由于树脂颗粒可在二氯甲烷中溶胀,因此使用1,2-二氯乙烷作为50 $^{\circ}$ C下的替代溶剂。使用过量的香豆素连接的炔烃(2c,0.02mmol)和环金属化金(III)催化剂(3a,0.01mmol),1小时后在树脂颗粒上得到产物(4c)。甲醛,固体负载胺类1e和带香豆素的炔烃化合物2c通过A3-偶联反应生成炔丙基胺,将固体负载的胺1e(15mg),甲醛(0.02mmol,100 μ L水溶液形式),香豆素炔烃2c(0.02mmol),双环化金(III)配合物3a(0.01mmol),已经600 μ L1,2-二氯乙烷均匀混合,50 $^{\circ}$ C搅拌1h。反应后,树脂依次用1mL二氯甲烷洗涤4次,2mL二甲基甲酰胺洗涤2次,1mL二氯甲烷洗涤3次。反应式如下:



[0133] 洗净树脂颗粒,在365nm的UV灯下,可以观察到由于连接上香豆素而被激发出来蓝色荧光的产物。树脂发出的荧光的亮度与甲醛浓度相关,如图8所示,图8为365nm波长的UV灯照射下,产物4c在500 μ L的二氯甲烷中的发光情况。

[0134] 为了确证产物的生成,用1:1的三氟乙酸和二氯甲烷混合物将炔丙基胺5a从树脂上切除下来。将树脂4c(15mg)分散于1:1的三氟乙酸和二氯甲烷的混合液(300 μ L)中,室温放置1min使炔丙基胺5a从固体载体上被切除下来。切除后的溶液用ESI-MS分析确认产物的生成。切除后的溶液用饱和NaHCO₃溶液(5mL)中和,有几层用无水硫酸镁干燥,减压浓缩。残余物用快速柱色谱净化,甲醇/二氯甲烷做净化液,炔丙基胺5a的收率为4%。

[0135] 反应式如下:

44.33, 44.24, 32.97, 21.42, 12.21; ESI-MS m/z 529 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) for $C_{32}H_{41}N_4O_3$, 理论计算值.529.3173, 测量值529.3177.

[0144] 为研究甲醛浓度和荧光强度之间的线性关系, 在树脂担载的反应中采用0至500ppm浓度的甲醛溶液, 与胺类1e (0.019mmol), 炔基化合物2c (0.02mmol) 和金(III)配合物3a (0.01mmol) 在600 μ L 1,2-二氯乙烷中50 $^{\circ}$ C反应。反应1h之后洗涤反应物, 对不同浓度反应混合物, 分别准确取2.0mg树脂小球, 转移到微孔板中, 使用酶标仪来测量荧光强度。结果见表8, 表8为树脂小球的校准曲线的相关数据。准确称量2.0mg处理了反应混合物的树脂小球, 置于酶标仪内进行荧光强度的测定。使用BMG FLUOstar Galaxy荧光强度酶标仪测量相应的荧光强度。循环次数, 闪烁次数number of flash以及循环时间均设定为10。延迟时间设定为0.5s。激发波长为355nm, 发射波长为460nm。

[0145] 表8

[0146]

甲醛浓度	荧光强度(任意单位)
0	1031
50	2187
100	2939
500	7603

[0147] 结果如图11所示, 图10为0-500ppm范围内甲醛浓度和树脂小球上荧光强度的线性关系图。图11结果表明, 甲醛浓度和荧光强度成良好的线性关系 ($R^2=0.99$), 表明这种固相形式的三组分偶联反应在甲醛检测上具有良好的潜在应用价值。

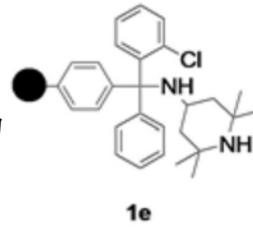
[0148] 实施例十: 固相形式的三组分偶联反应在检测食物中甲醛的适用性

[0149] 为了确认固相形式的金属环化金(III)配合物催化的三组分偶联反应在检测食物中甲醛的适用性, 使用香菇水提取液作为甲醛源。我们熟知甲醛是香菇中天然存在的成分。

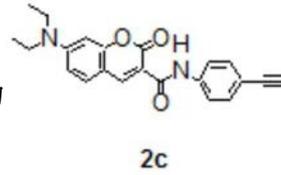
[0150] 购买的蘑菇要用塑料袋密封并于室温下保存, 同时避免阳光直射。将去除蘑菇柄后的样品充分打碎。称取约2g的样品于离心管中, 加入20mL Milli-Q[®]去离子水后加盖密封。离心管置于40 $^{\circ}$ C超声水浴中提取1h, 然后用4000rpm速度离心10min。用滤纸进行过滤, 滤液收集于50mL容量瓶中。离心管中的沉淀再次加入20mL Milli-Q[®]去离子水, 按上述操作超声提取, 离心并过滤, 将滤出液与第一次的滤出液合并。用Milli-Q[®]去离子定容并混合均匀。此溶液作为蘑菇样品的水提取液。

[0151] 在2-氯三苯甲基氯树脂担载的反应中, 将树脂小球担载的胺化合物1e (15mg), 蘑菇水提取液 (100 μ L), 连接有香豆素的炔烃2c (0.02mmol), Au(III)双环配合物3a (0.01mmol) 以及600 μ L 1,2-二氯乙烷混合, 50 $^{\circ}$ C反应1h, 催化偶联形成炔基丙胺(4c), 过程中轻微搅拌。反应后, 树脂用1mL二氯甲烷洗涤4次, 1mL二甲基甲酰胺洗涤2次, 最后用1mL二氯甲烷洗涤3次。将反应产物从树脂上切除出来之后用ESI-MS确认。

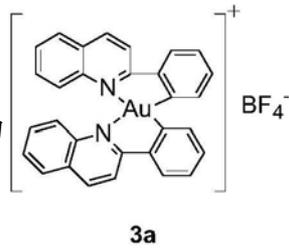
[0152] 其中,固体担载的胺类(1e)的结构式为



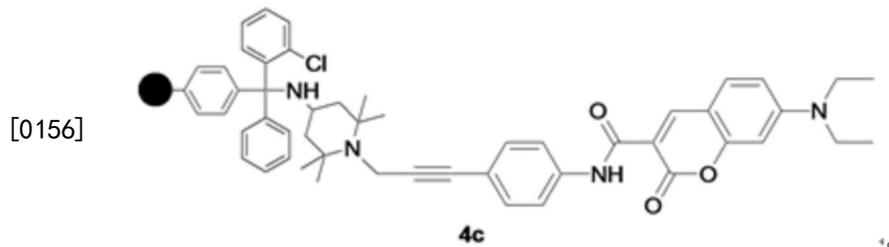
[0153] 连接有香豆素的炔烃(2c)的结构式为



[0154] 金(III)配合物(3a)的结构式为



[0155] 炔基丙胺(4c)的结构式为



[0157] 在1,2-二氯乙烷做反应介质的条件下,1小时后在树脂颗粒上得到产物(4c)。洗净树脂颗粒,在365nm的UV灯下,可以观察到由于连接上香豆素而被激发出来蓝色荧光的产物。使用1:1的三氟乙酸和二氯甲烷处理树脂,从树脂上离解得到炔基丙胺(5a),使用ESI-MS对产物进行确认。确认图谱见图12,图12为使用蘑菇样品为甲醛来源的实验中,树脂小球中切除下来的产物的质谱图。

[0158] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

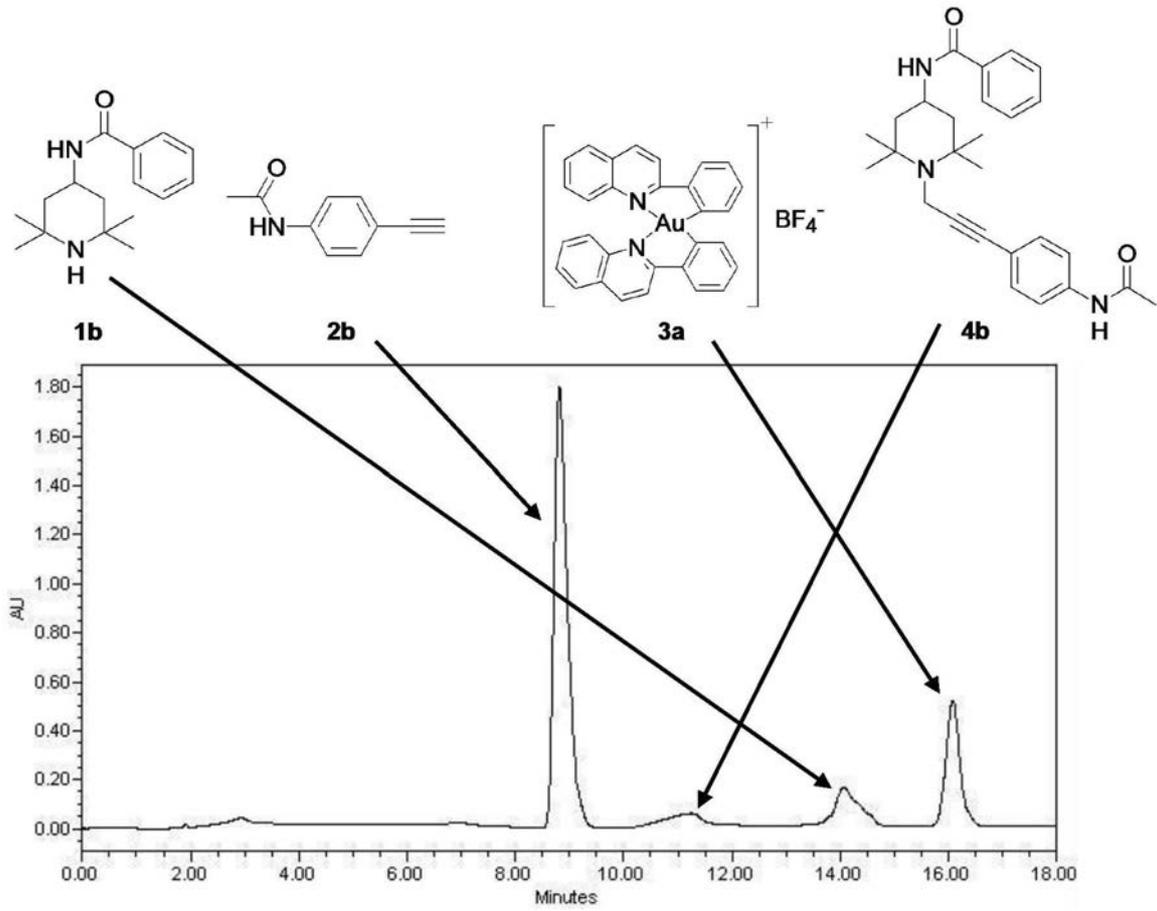


图1

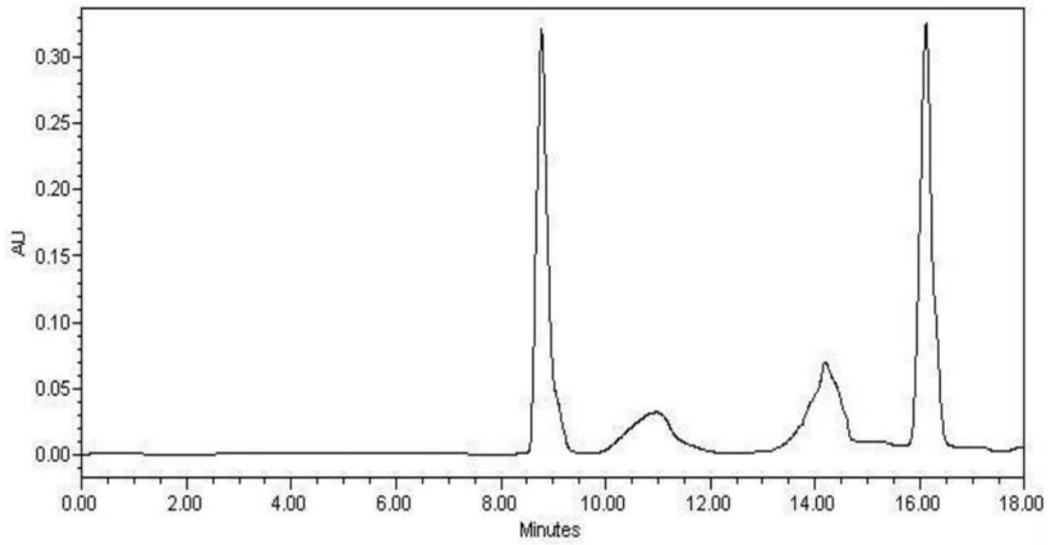


图2A

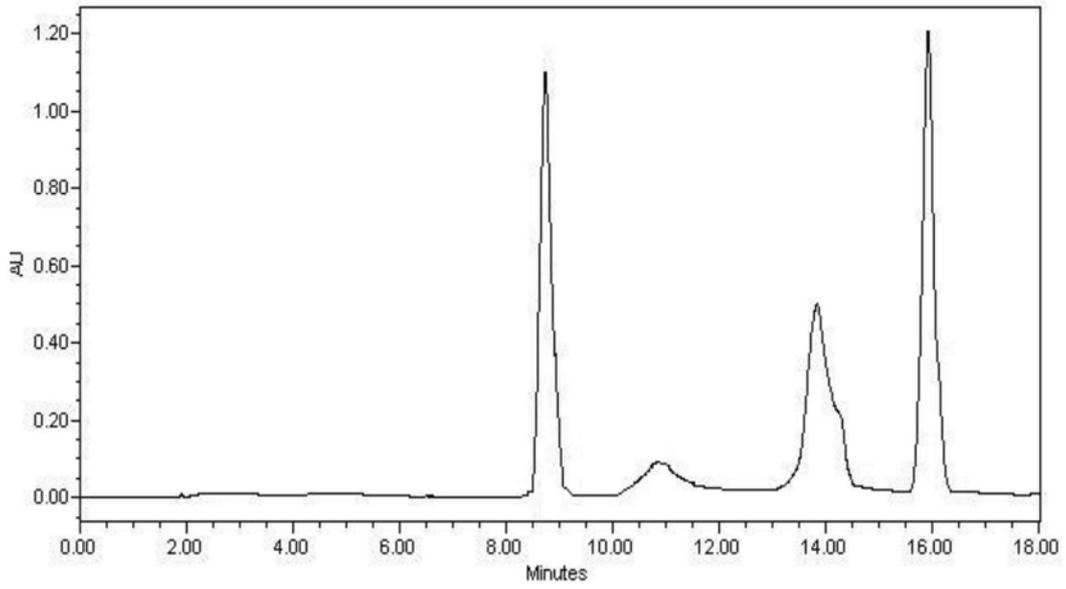


图2B

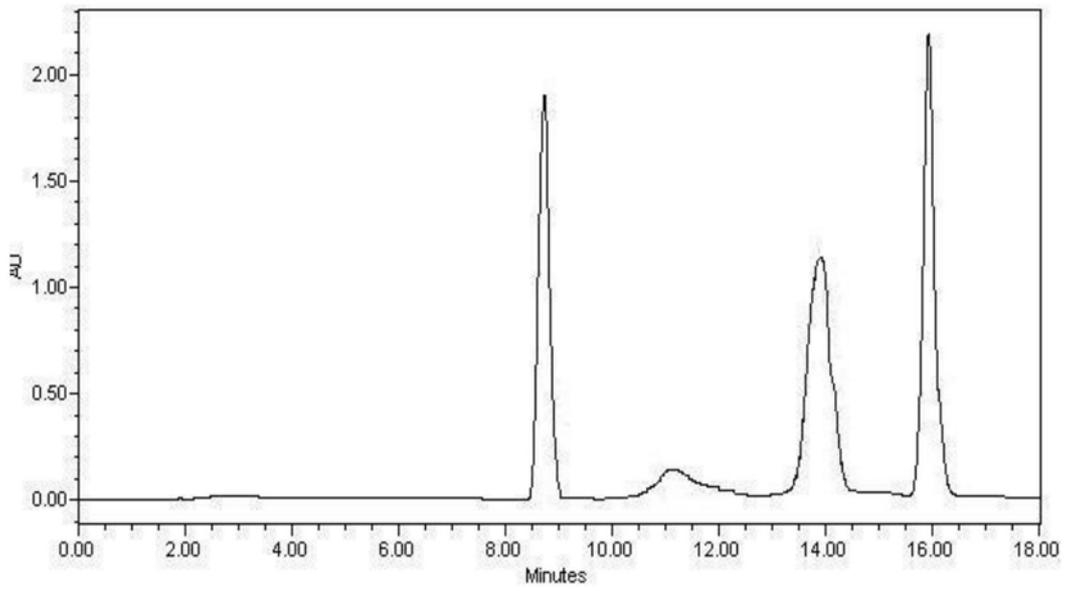


图2C

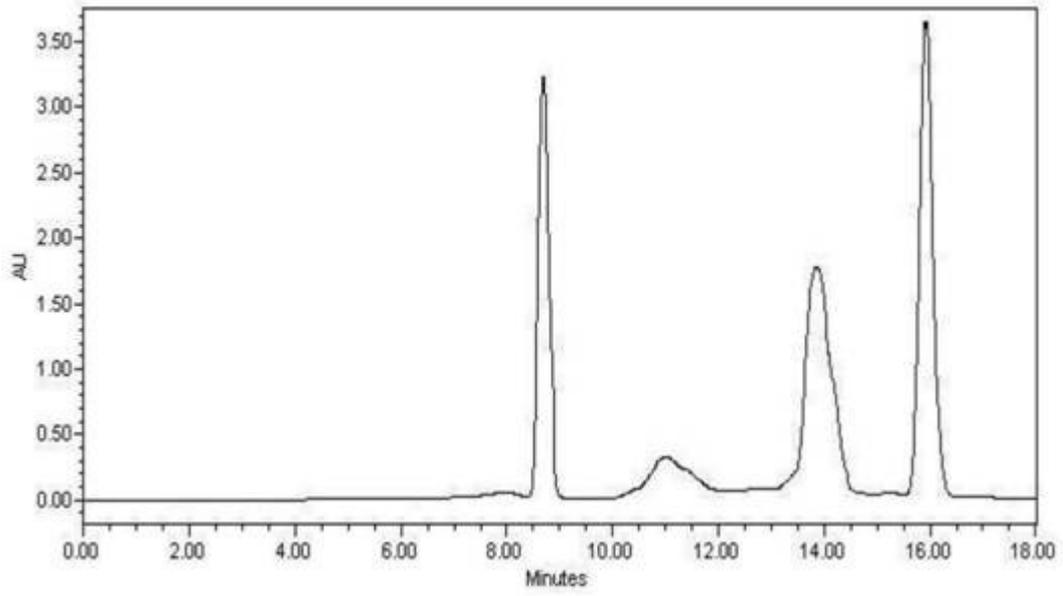


图2D

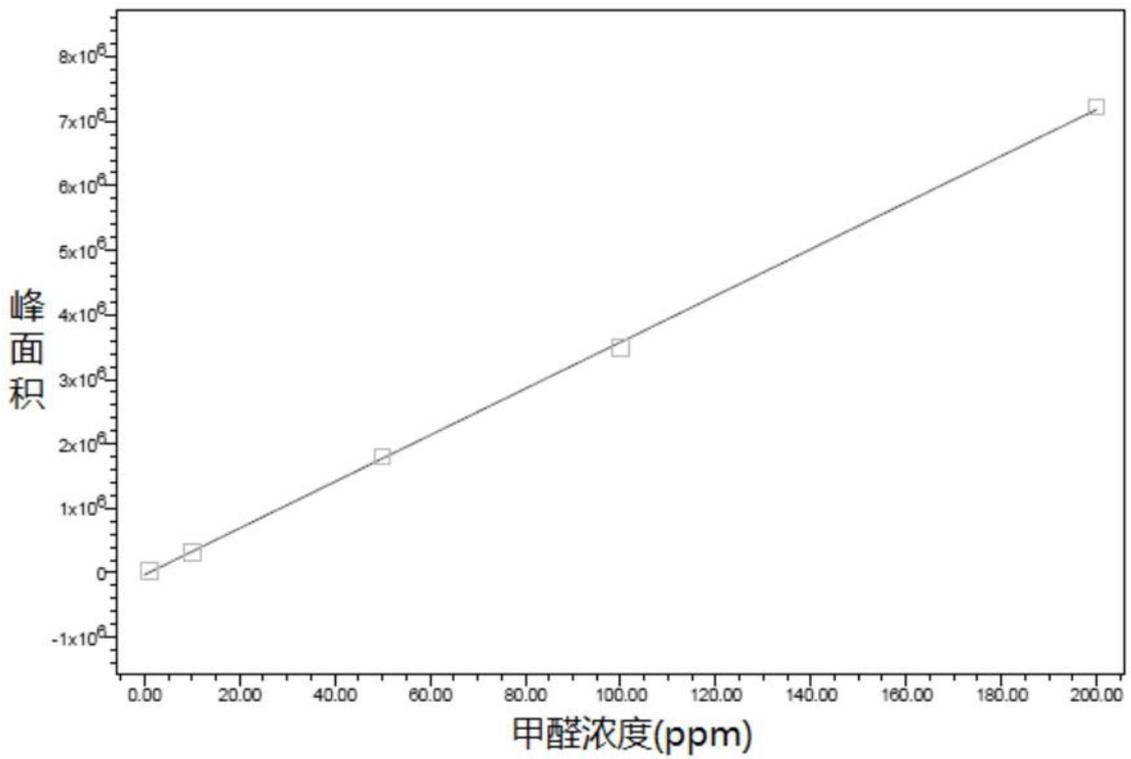


图3

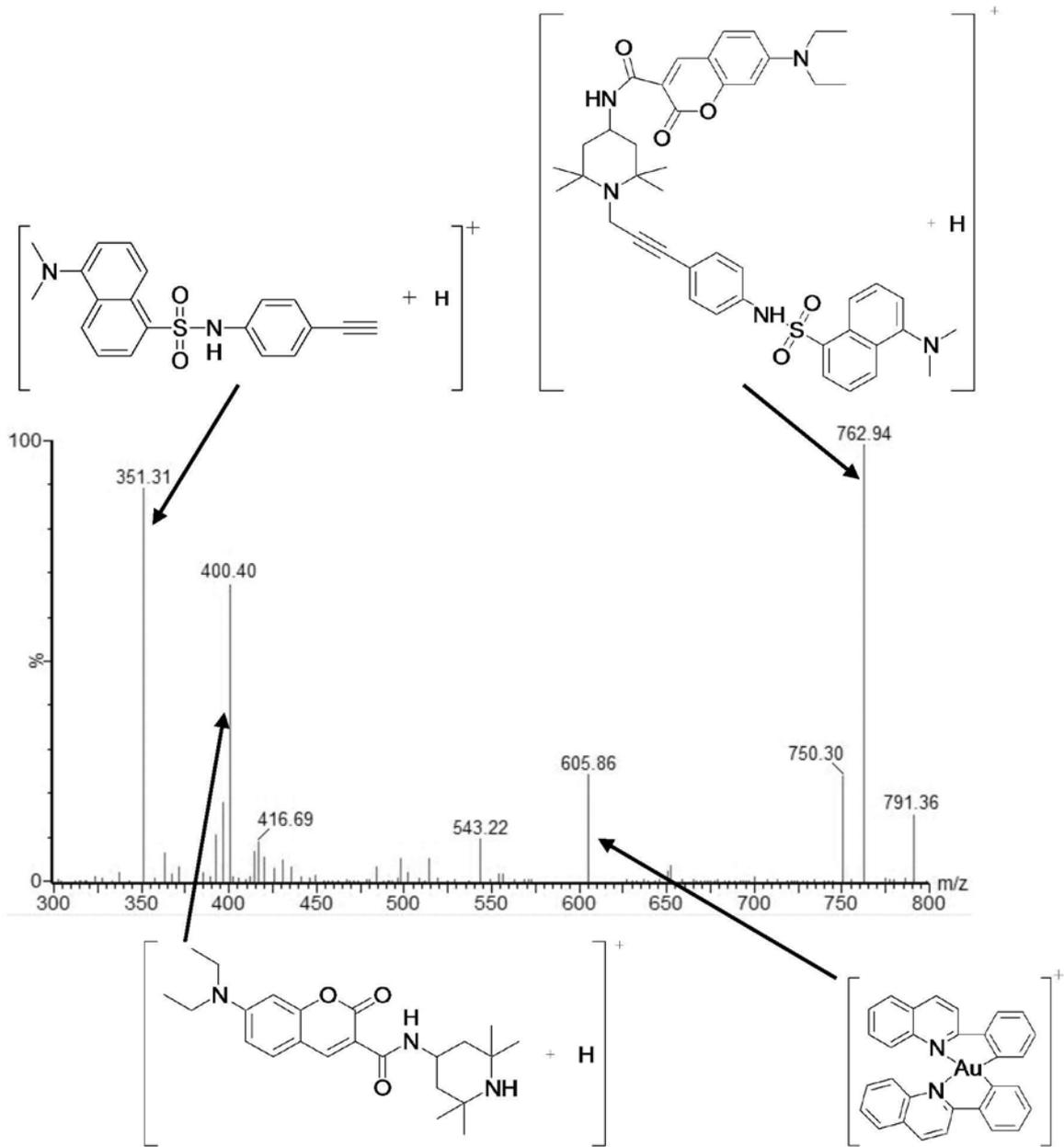


图4

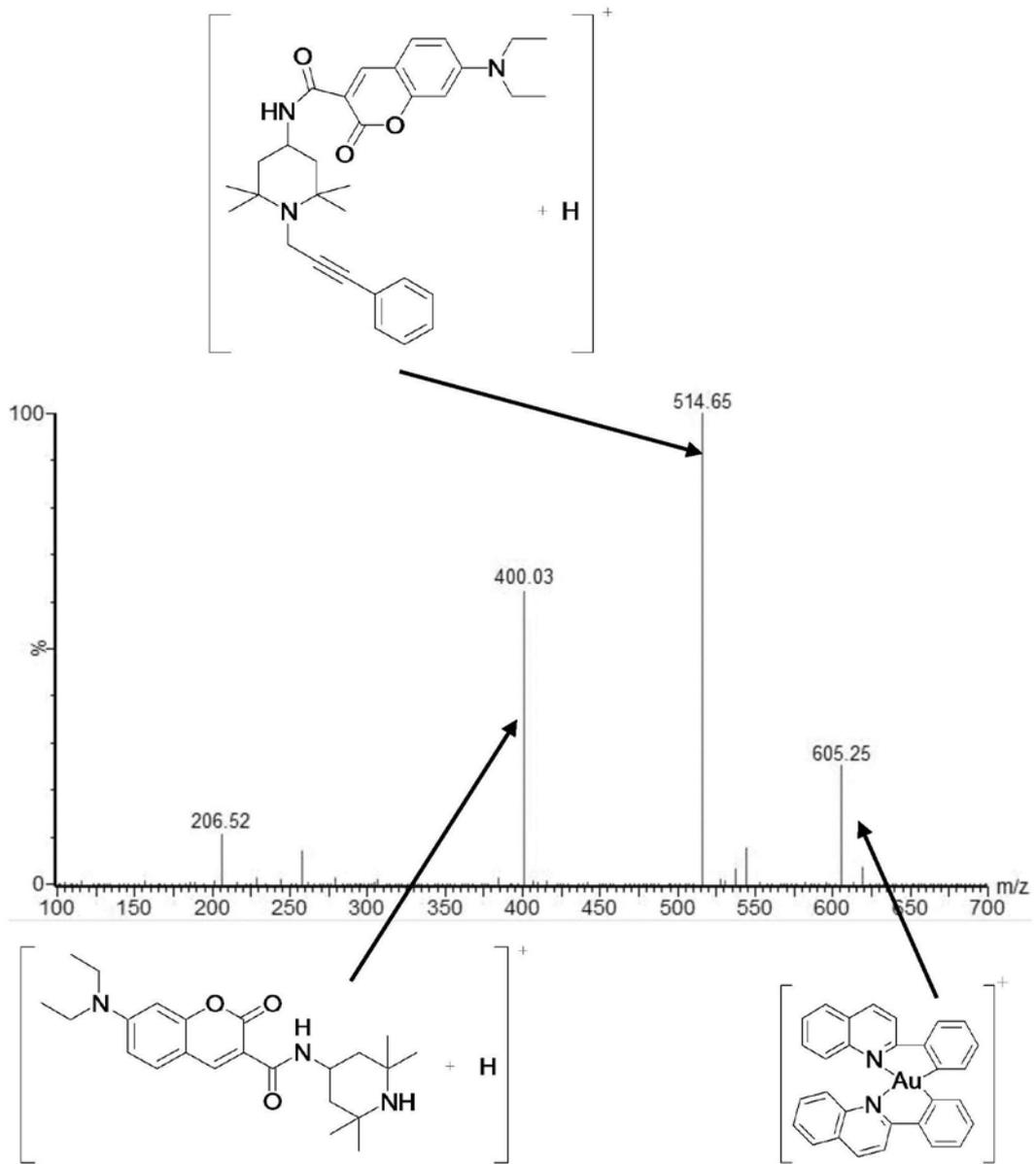


图5

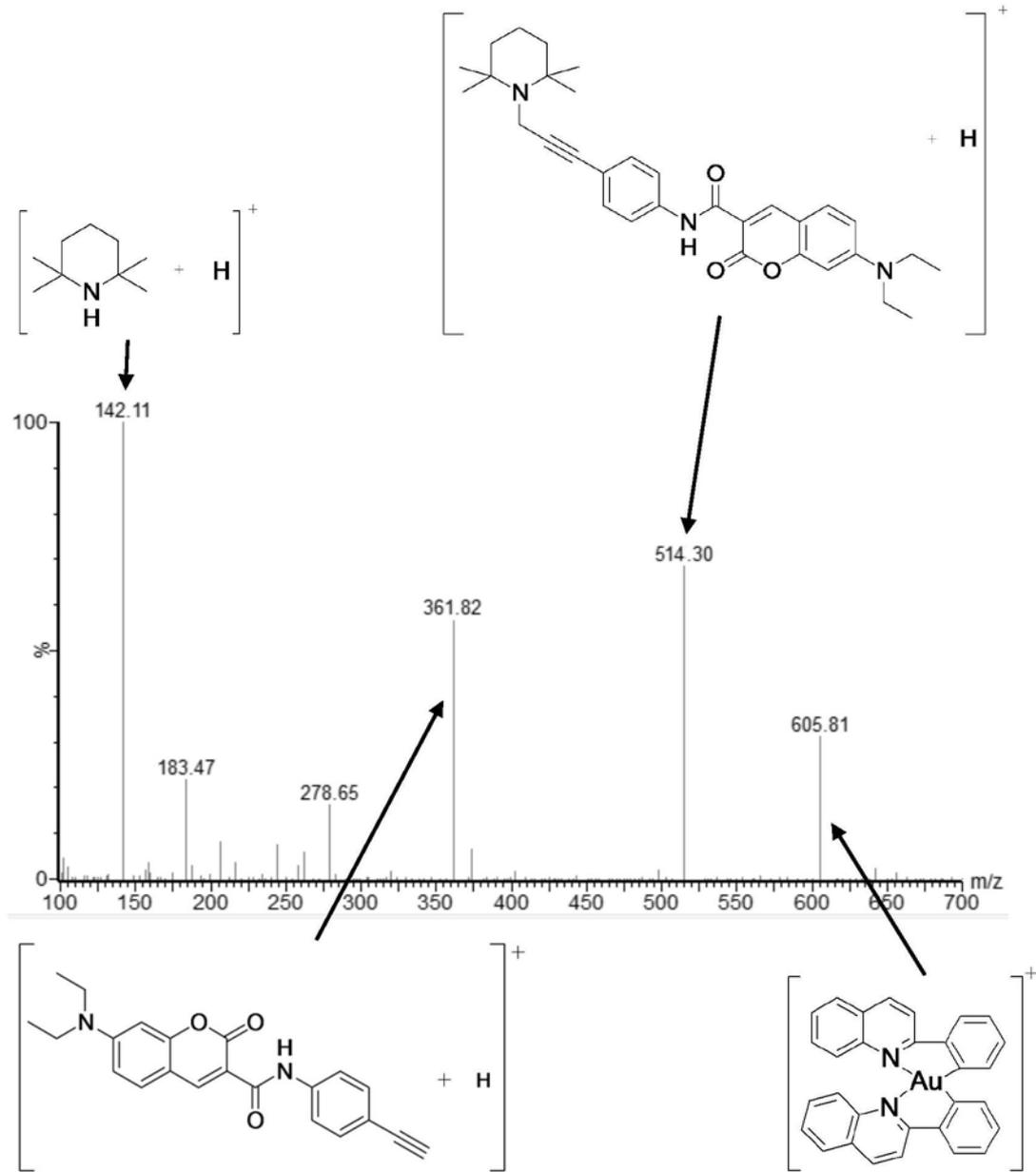


图6

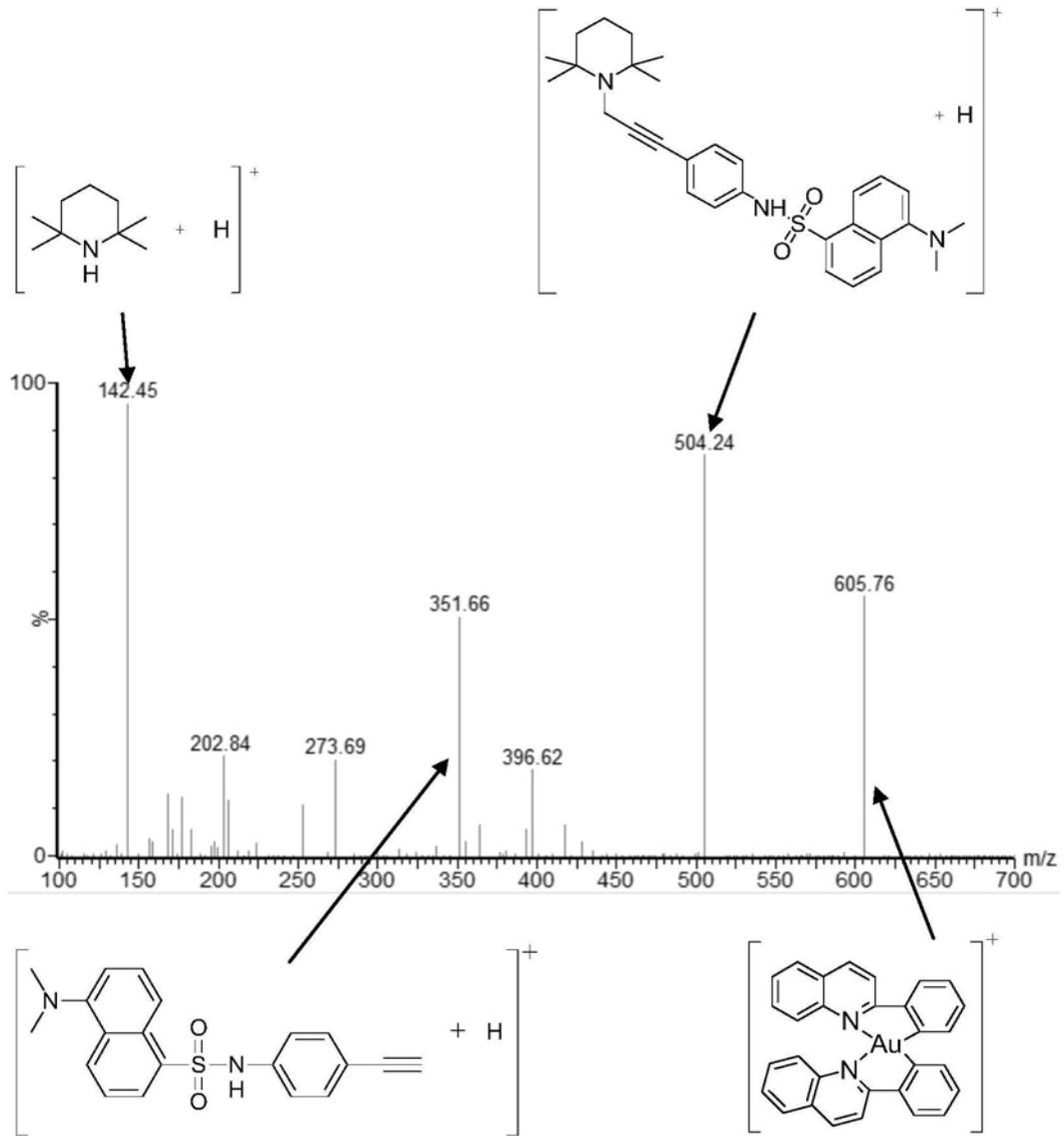


图7

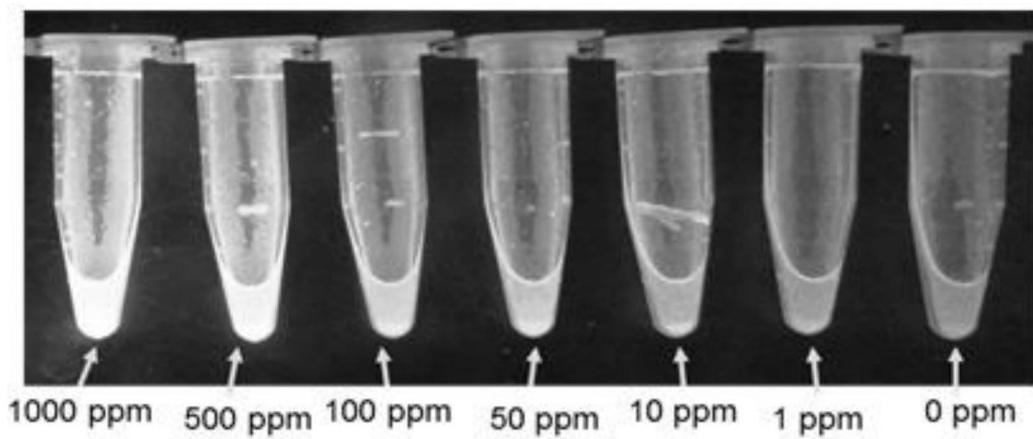


图8

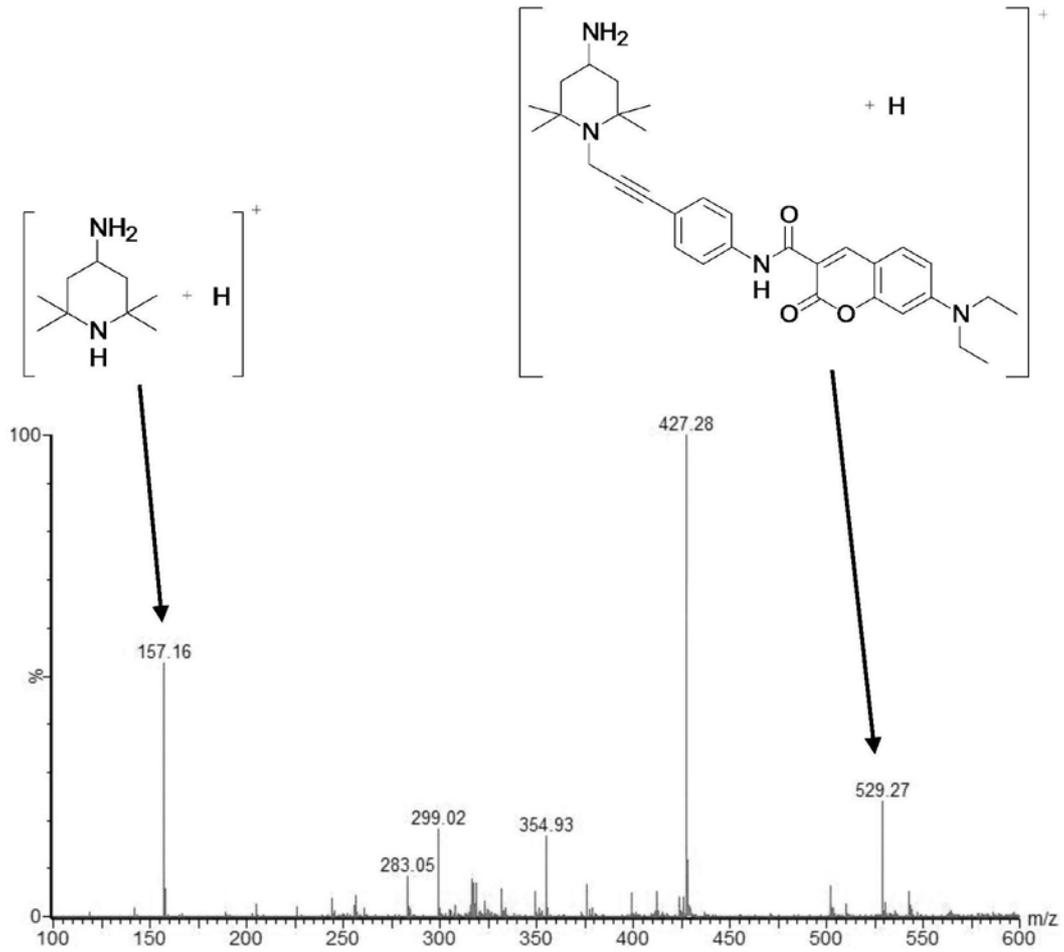


图9

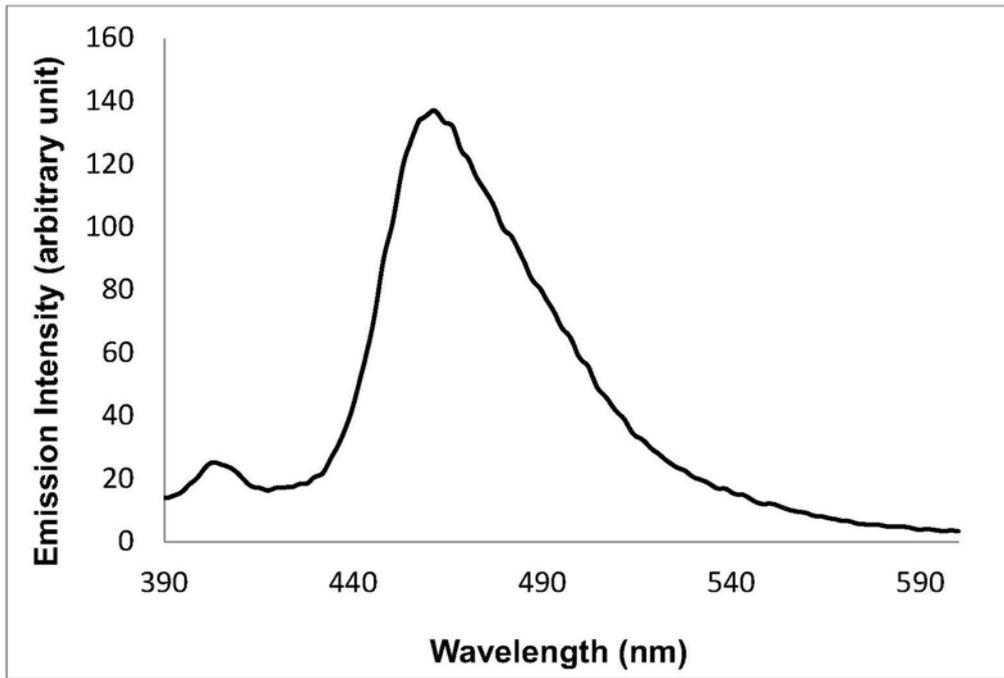


图10

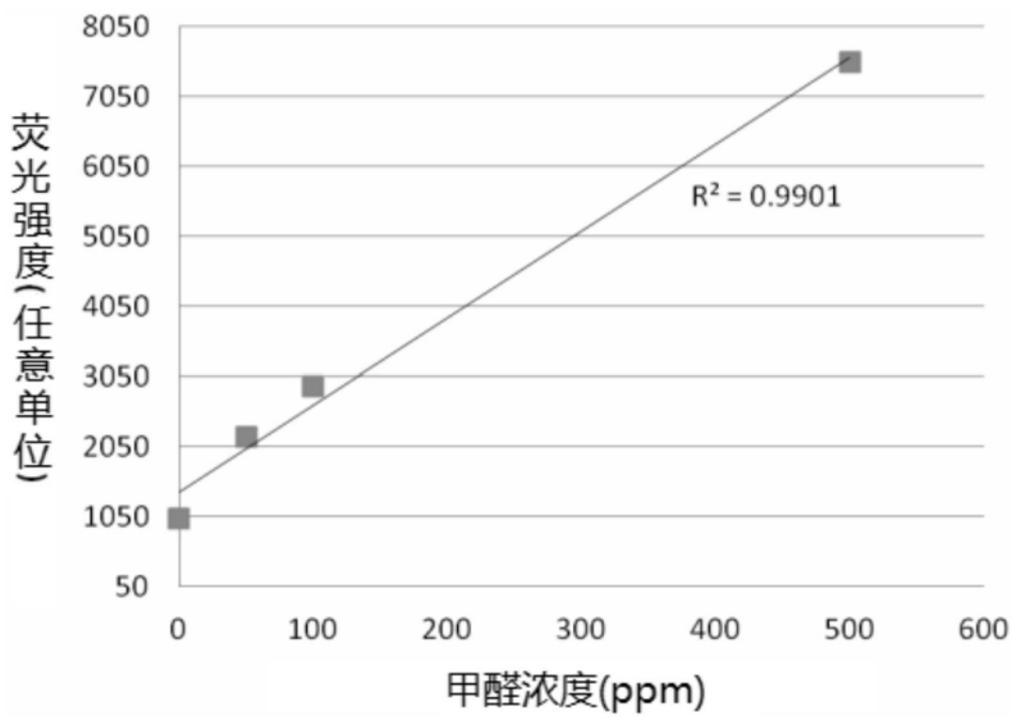


图11

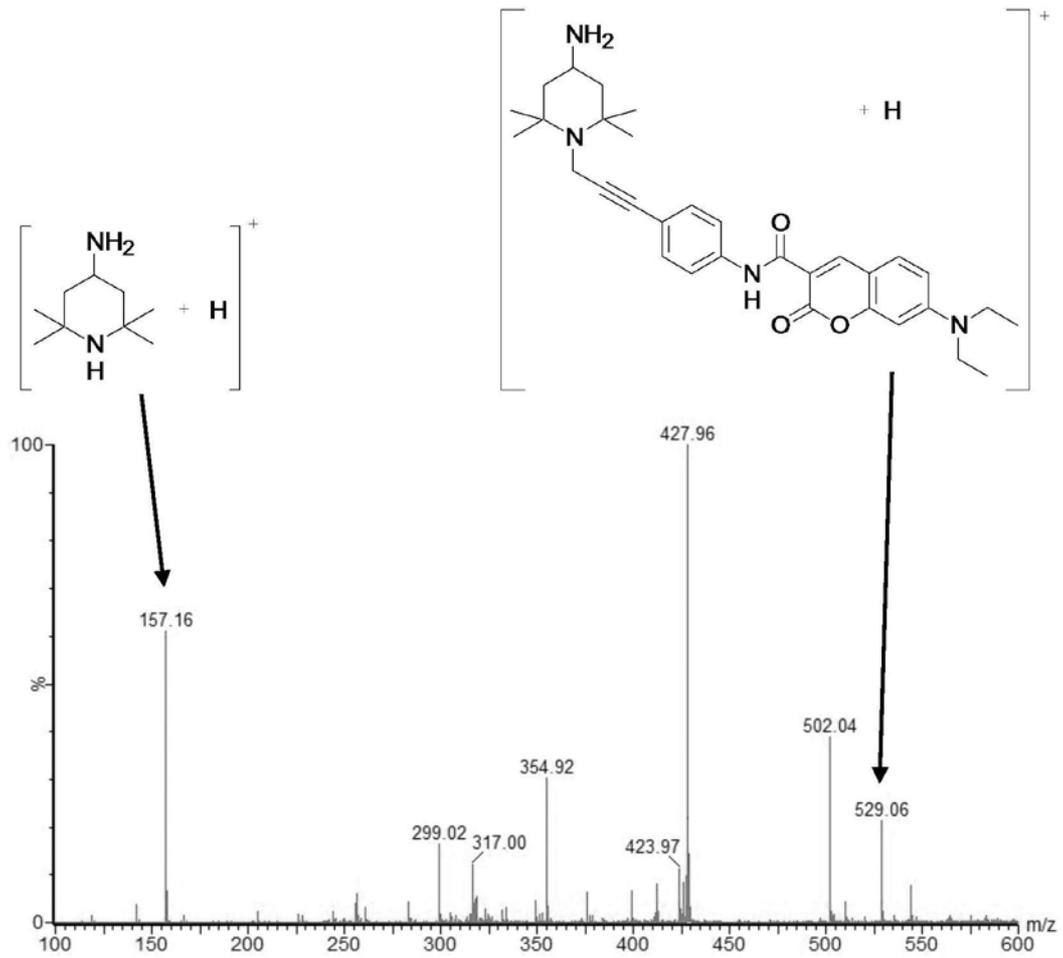


图12