



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106596485 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(21)申请号 201611129438.5

(22)申请日 2016.12.09

(71)申请人 乐山师范学院

地址 614004 四川省乐山市滨河路778号乐山师范学院生命科学学院

(72)发明人 文隲英 刘方庆 杨佐忠 邓加林 赵文海

(74)专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有限公司 11138

代理人 胡业勤

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

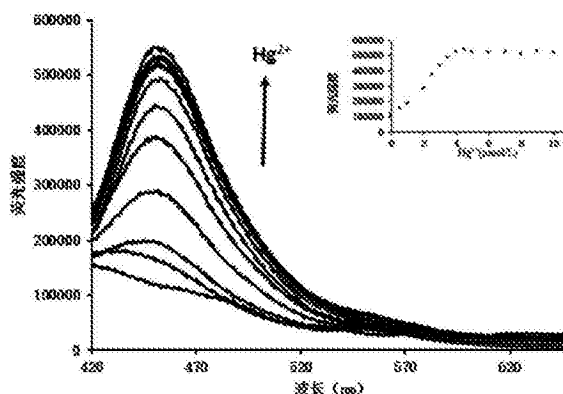
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

## (54)发明名称

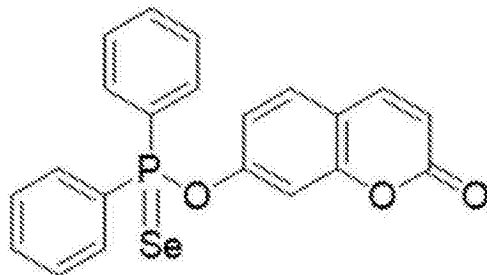
测定鸟类栖息地水源中汞离子浓度的比色探针

## (57)摘要

本发明涉及测定鸟类栖息地水源中汞离子浓度的比色探针,该探针是基于硒与汞的强亲和性而进行设计的。在乙醇/水(1/1,v/v)体系(pH=7.4,PBS缓冲液)中,探针可以实现对汞离子的检测。探针对汞离子的响应不受共存离子K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>的干扰,对Hg<sup>2+</sup>的选择性很好。当汞离子浓度在0-4 μmol/L范围内,汞离子的浓度和荧光强度成良好的线性关系,回归方程为:y=107305x+99254(R<sup>2</sup>=0.9875),检出限为0.07 μmol/L。



1. 一种检测环境中的 $\text{Hg}^{2+}$ 的探针,其结构如下:

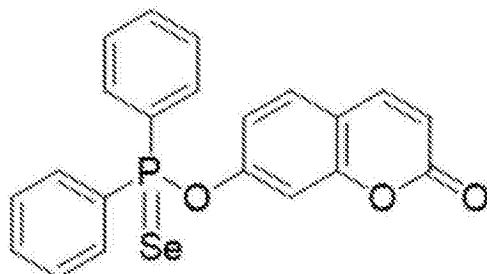


2. 根据权利要求1所述的探针,其中所述的环境是指水源地。

3. 根据权利要求1-2所述的探针,其中所述水源地是鸟类栖息地中水源。

4. 根据权利要求1-3所述的探针,其中所述水源的存在形式可以为河流,湖泊或沟渠等等。

5. 检测检测环境中的 $\text{Hg}^{2+}$ 的试剂盒,其包括结构如下的探针:



6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其中所述的环境是指水源。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中所述的水源地为鸟类栖息地中水源。

8. 根据权利要求5-7所述的试剂盒,其中所述水源的存在形式可以为河流,湖泊或沟渠。

9. 根据权利要求5-8所述的试剂盒,所述试剂盒还包含检测汞离子是所使用的缓冲剂或使用说明书。

## 测定鸟类栖息地水源中汞离子浓度的比色探针

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种测定鸟类栖息地水源中汞离子浓度的比色探针。

### 技术背景

[0002] 汞是一种易挥发且具有严重毒性的元素,汞元素一旦进入水体,环境中的汞离子就会被细菌转化为有机汞(如甲基汞等),并且会一直累积在生物体内,经食物链富集作用,最后被人类以及其他动物例如鸟类吸收产生危害。汞和它的衍生物会破坏生物体分子结构,这是由于汞离子可以和蛋白质、酶中的含硫的基团结合。尤其是甲基汞,会严重毒害动物的神经,造成动物的行为感知紊乱,毒害神经和肾脏,对人类以及其他动物例如鸟类的产生很大威胁。

[0003] 鸟的羽毛和卵对汞富集程度高,水源中汞离子含量对鸟类群落结构或者种群的影响是显而易见的,另外鸟类是环境的指示剂。所以政府部门监测水环境中汞的含量是至关重要的。因此,研究和开发更具高选择性、更加快速、更高灵敏度的可以在自然水体等环境中实时汞离子含量检测的方法是非常重要的,因为如此一来可以追踪水源中汞离子含量或其变化对鸟类群落结构或者种群的影响。

[0004] 目前,常见的汞元素检测手段主要是传统的双硫脲法比色法、阳极溶出伏安法、氧化还原电位法、电感耦合等离子体-质谱、原子吸收/发射光谱法、X射线荧光光谱法等。但在实际应用中,这些检测方法费用高且操作复杂。而荧光探针检测法由于具有便捷性好、选择性、灵敏度高等优点而极为引人注目。近年来,正是处于上述的种种背景下才使得汞离子荧光探针的研究得到越来越多的学者的关注。

[0005] 中国专利申请201610463837.9公开了一种基于萘酰亚胺的汞离子荧光探针及其制备方法和应用,所制备的汞离子荧光探针是以1,8-萘酰亚胺为荧光母体,依次通过与正丁胺反应,得到强荧光性的中间体N-丁基-4-溴-1,8-萘酰亚胺,所得中间体与2-甲氧基苯胺反应引入氮原子和氧原子,增强该化合物和金属离子的配位能力,检测过程中发明的该小分子传感器上的氮原子和氧原子能很快地和汞离子发生配位,使荧光迅速增强,从而实现汞离子的检测。

[0006] 中国专利申请201610397020.6公开了一种柠檬酸酯类荧光化合物,以二环己基碳二亚胺作为催化剂,不仅可以活化羧基,起到活化作用,还可以作为缚水剂,吸收酯化反应过程中产生的水,使得反应向生成酯的方向进行;通过简单的制备方法、较低的温度和较短的时间就可以得到荧光强度较高的黄绿色的柠檬酸酯类荧光化合物,荧光量子产率可达5.0%。

[0007] 中国专利申请201610112770.4公开了一种检测汞离子的新型罗丹明荧光探针及其制备方法,属于荧光探针及其制备方法技术领域。该申请除了公开了罗丹明荧光探针的结构,还公开了罗丹明荧光探针的制备方法:将罗丹明B与水合肼在乙醇中回流反应生成罗丹明酰肼;然后与苯基乙二醛在乙醇中回流反应,经重结晶得到席夫碱;再经硼氢化钠还原生成荧光探针。

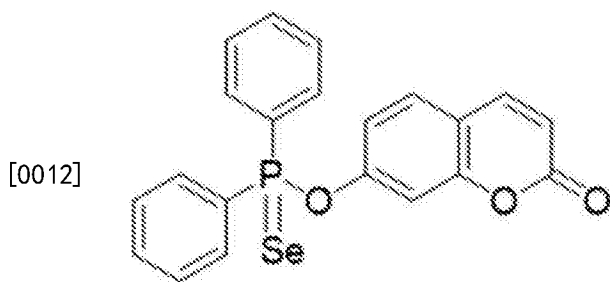
[0008] 中国专利申请201511031104.X公开了一种汞离子荧光探针化合物、制备方法及应用,涉及分析化学技术领域。该汞离子荧光探针的化学分子式为,是由2-(2'-羟苯基)苯并咪唑为母体结构,经过衍生化得到的。此探针对汞离子选择性好、灵敏度高且易于制备,是一种理想的汞离子传感分子。

[0009] 根据汞离子与探针分子的作用类型,可以将汞离子荧光探针分为配位型和反应型两大类,配位型的荧光探针通过非共价键的形式将荧光探针和汞离子相络合,但是这种络合作用力在应用于汞离子识别时,专一选择性并不高,而反应型的探针是基于二者之间的化学反应,会生成新的反应产物,进而引起体系的荧光或紫外吸收光谱发生改变,有很强的专一选择性,所以这种类型的探针具备更高的灵敏度和良好的抗阳离子干扰能力。

### 发明内容

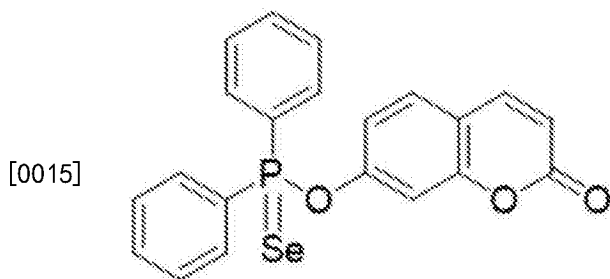
[0010] 本领域急需一种高选择性比色比率测定 $\text{Hg}^{2+}$ 的探针,从而能够有效检测特别是能够检测环境中(例如鸟类栖息地中水源)的 $\text{Hg}^{2+}$ 。本发明的发明人设计合成了一种脱硒作用来识别汞离子的探针,进而可以用于建立可以用于汞离子含量检测的方法。为此,本发明提供了一种新颖的高选择性比色比率检测 $\text{Hg}^{2+}$ 的探针,该探针的制备简单,和/或选择性高。

[0011] 本发明的一方面提供了检测环境中(例如鸟类栖息地中水源)的 $\text{Hg}^{2+}$ 的探针,其结构如下:



[0013] 示例性地,本发明中所述的环境是指水源地,例如鸟类栖息地中水源。所述水源的存在形式可以为河流,湖泊,沟渠等。

[0014] 本发明第二方面提供了一种检测检测环境中(例如鸟类栖息地中水源)的 $\text{Hg}^{2+}$ 的试剂盒,其包括结构如下的探针:



[0016] 在本发明的第三方面中,所述的环境是指水源地,例如鸟类栖息地中水源。所述水源的存在形式可以为河流,湖泊,沟渠等。

[0017] 任选地,所述试剂盒还包含检测汞离子所使用的缓冲剂或使用说明书。

[0018] 本发明的检测 $\text{Hg}^{2+}$ 的探针易于商业化的推广应用。

### 附图说明

[0019] 图1:探针 ( $5\mu\text{mol/L}$ ) 在pH 7.4PBS乙醇/水 (5:5) 的缓冲溶液中随汞离子浓度 (0-10  $\mu\text{mol/L}$ ) 改变的荧光发射光谱图,插入图表示探针 ( $5\mu\text{mol/L}$ ) 456nm处的荧光强度随汞离子浓度 (0-10 $\mu\text{mol/L}$ ) 的改变。汞离子的浓度从下到上分别为0,0.5,1,2,2.5,3,3.5,4,4.5,5,6,7,8,9,10 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0020] 图2:探针对汞离子响应的工作曲线。

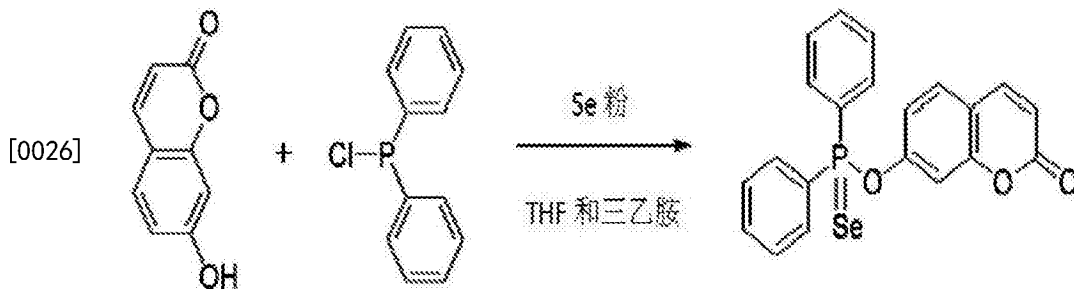
[0021] 图3:探针 ( $5\mu\text{mol/L}$ ) 在pH 7.4PBS乙醇/水 (5:5) 的缓冲溶液中对汞离子 (2.5 $\mu\text{mol/L}$ ) 响应随时间变化关系。

[0022] 图4:在pH 7.4PBS乙醇/水 (5:5) 的缓冲溶液中不同金属离子 (3 $\mu\text{mol/L}$ ) 对探针 ( $5\mu\text{mol/L}$ ) 荧光强度的影响。F:加入不同金属离子的荧光强度; $F_0$ :不加金属离子的荧光强度。

[0023] 图5:不同金属离子共存对探针荧光强度的影响。1:空白;2:汞离子;3:汞离子+镍离子;4:汞离子+镁离子;5:汞离子+钠离子;6:汞离子+铬离子;7:汞离子+锌离子;8:汞离子+铅离子;9:汞离子+铜离子;10:汞离子+钾离子;11:汞离子+镉离子。

[0024] 实施例1:荧光探针的合成

[0025] 本发明的汞离子荧光探针的合成路线和方法如下所示:



[0027] 具体地,将7-羟基香豆素 (0.49g, 3mmol) 溶于THF (2mL) 中,在氮气保护的条件下慢慢滴加硒粉 (0.19g, 24mmol) THF (5mL) 溶液,室温搅拌10min,加入溶于三乙胺 (2mL) 和THF (20mL) 混合溶液的二苯基氯化磷 (0.53g, 24mmol),氮气保护下搅拌反应24h,旋干溶剂,加入25mL甲苯用分水器回洗4h,除去固体,将有机相旋干,用柱层析分离提纯目标产物 (二氯甲烷:石油醚=1:1),得到1.01g红色粉末状荧光探针,产率52%。 $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.77-7.68 (m, 6H), 7.62 (dd,  $J=10.9, 4.0\text{Hz}$ , 1H), 7.55-7.43 (m, 8H).  $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{PSe}$  427.0,发现427.0。

[0028] 实施例2:反应试剂的配制

[0029] 探针储备液和探针测试液:准确称取4.26mg的实施例1中所合成的探针,先用少量二氯甲烷溶解,然后将其移入10mL容量瓶,用乙醇定容至刻度,混匀,此时得到浓度为1mmol/L的探针储备液。并取1mL的储备液加入到100mL的乙醇中,先加一些去离子水,再加入5mL的PBS缓冲液 (pH=7.4),继续加去离子水定容至200mL,得到 $5\mu\text{mol/L}$ 的探针测试液。

[0030] 汞离子储备液:准确称取32.46mg硝酸汞 ( $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ),加入去离子水进行溶解,待样品完全溶解后,全部移入10mL容量瓶中,定容至刻度,混匀,此溶液的浓度为10mmol/L。取1mL上述溶液将其稀释到1mmol/L。

[0031] 实施例3:探针荧光光谱的测定

[0032] 分别取15个10mL的比色管,然后进行编号,分别加入 $5\mu\text{mol/L}$ 的探针测试液5mL、然后分别加入 $1\text{mmol/L}$ 的汞离子依次为 $0\mu\text{L}$ ,  $2.5\mu\text{L}$ ,  $5\mu\text{L}$ ,  $10\mu\text{L}$ ,  $12.5\mu\text{L}$ ,  $15\mu\text{L}$ ,  $17.5\mu\text{L}$ ,  $20\mu\text{L}$ ,  $22.5\mu\text{L}$ ,  $25\mu\text{L}$ ,  $30\mu\text{L}$ ,  $35\mu\text{L}$ ,  $40\mu\text{L}$ ,  $45\mu\text{L}$ ,  $50\mu\text{L}$ , 摇匀。分别取上述15个比色管中溶液4mL于比色皿,在456nm处进行荧光光谱测定。

[0033] 实施例1中所合成的探针中加入不同浓度汞离子荧光强度的变化,如图1所示。随着汞离子浓度的增加,其荧光强度也在增加,当汞离子的浓度大于 $4\mu\text{mol/L}$ 时,实施例1中所合成的探针的荧光强度基本稳定,而且可以看出,汞离子浓度在 $0\sim 4\mu\text{mol/L}$ 时,汞离子浓度与荧光强度值呈现一定的线性关系。

[0034] 以汞离子浓度( $0\sim 4\mu\text{mol/L}$ )为横坐标,在456nm处的荧光强度值为纵坐标,绘制标准曲线,结果见图2所示。

[0035] 由图2可以看出,当汞离子浓度在 $0\sim 4\mu\text{mol/L}$ 内,汞离子的浓度和荧光强度成较好的线性关系,回归方程为: $y=107305x+99254$  ( $R^2=0.9875$ ),检出限为 $0.07\mu\text{mol/L}$ 。因此,本发明所设计的汞离子探针能利用荧光光谱确定待测汞离子的含量。

[0036] 检出限的计算:测定20次空白溶液在456nm处的荧光强度值,然后计算出 $\sigma$ ,且由工作曲线可知工作曲线的斜率 $K=107305$ 代入图2中的公式中得出,计算出该方法的检出限为 $0.07\mu\text{mol/L}$ 。

[0037] 以上实验结果表明,实施例1中所合成的探针与汞离子可以在水溶液中响应,可以用荧光信号对水中的汞离子进行检测。

[0038] 实施例4:反应时间的确定

[0039] 取出一个10mL的比色管,加入 $1\text{mmol/L}$ 的探针储备液5mL、然后加入 $1\text{mmol/L}$ 的汞离子储备液 $12.5\mu\text{L}$ ,摇匀。取上述溶液4mL于比色皿,检测456nm处的荧光强度在30min内随着时间的变化。记录荧光强度值随着时间发生变化的情况,从而确定反应的最佳时间。

[0040] 以同一浓度的含汞溶液在不同的反应时间条件下测定荧光强度值,绘制在不同的反应时间条件下的荧光强度值的变化曲线,结果如图3所示。从图3中可以看出,汞离子与实施例1中所合成的探针反应1min内荧光强度急剧增加并达到稳定,说明该反应为瞬时反应。

[0041] 实施例5:离子干扰试验

[0042] 考虑在汞离子测定方法的实际应用中,可能会受到一些其它的金属离子的干扰,因此,需要探讨不同类型的常见的金属离子对汞离子测定结果的影响。测试的离子包括: $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 。

[0043] 取10个10mL比色管进行编号,分别加入 $5\mu\text{mol/L}$ 的探针测试液5mL、然后分别不同离子: $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  (浓度为 $1\text{mmol/L}$ ) 溶液 $15\mu\text{L}$ ,摇匀。分别取上述10个比色管中溶液4mL于比色皿,在456nm处进行荧光光谱测定。

[0044] 研究实施例1中所合成的探针对汞离子的选择性,不同测试离子对探针荧光强度值的影响。测试的离子包括: $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ ,结果如图4。从图4可以看出,由于汞和硒的专一反应,加入汞离子,在456nm处荧光强度值有明显变化,而加入镍离子、镁离子、钠离子、锌离子、铅离子、钾离子、镉离子和铬离子对实施例1中所合成的探针的荧光强度基本无影响,相对而言,铜离子有较弱的响应,这可能是由于铜和汞属于同一主族,铜离子能发生汞离子的反应,但和加入汞离子相比,其影响很小可以忽略。实验表明,

实施例1中所合成的探针能够专一性地和汞离子进行反应,对汞离子具有较高的选择性。

[0045] 继续考察离子共存对荧光强度的影响。取9个10mL比色管进行编号,分别加入1mmol/L的实施例1中所合成的探针测试液5mL、15 $\mu$ L的1mmol/L汞离子、然后分别不同离子:  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、(浓度为1mmol/L)溶液15 $\mu$ L,摇匀。分别取上述9个比色管中溶液4mL于比色皿,在456nm处进行荧光光谱测定。结果如图5所示。由图5可知,其它金属离子的加入不会干扰汞对硒的特征反应,与单独加入汞离子的荧光强度差别不大,说明本文所探讨的上述共存金属离子对检测汞离子的干扰比较小,可知该探针对汞离子具有较好的选择性。

[0046] 总之,基于硒与汞的强亲和性,成功设计并合成了一个新型的荧光增强的香豆素类探针,建立了一种用于检测汞离子含量的方法。在乙醇/水(1/1, v/v)体系(pH=7.4, PBS缓冲液)中,探针可以实现对汞离子的检测。探针对汞离子的响应不受共存离子 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 的干扰,对 $Hg^{2+}$ 的选择性很好。当汞离子浓度在0-4 $\mu$ mol/L范围内,汞离子的浓度和荧光强度成良好的线性关系,回归方程为: $y = 107305x + 99254$  ( $R^2 = 0.9875$ ),检出限为0.07 $\mu$ mol/L。

[0047] 虽然用上述实施方式描述了本发明,应当理解的是,在不背离本发明的精神的前提下,本发明可进行进一步的修饰和变动,且这些修饰和变动均属于本发明的保护范围之内。

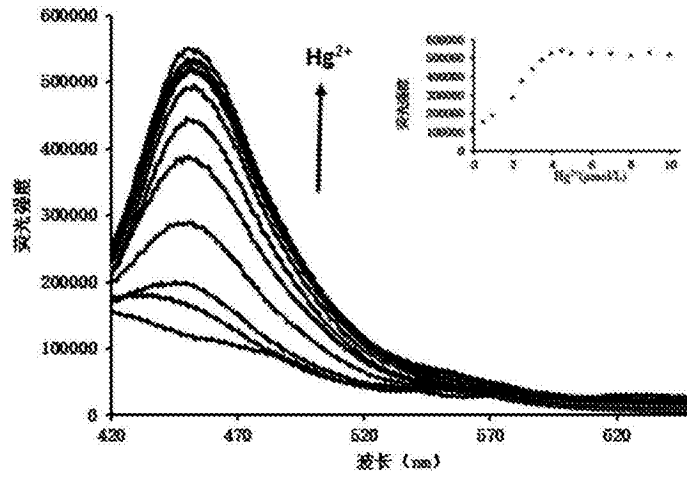


图1

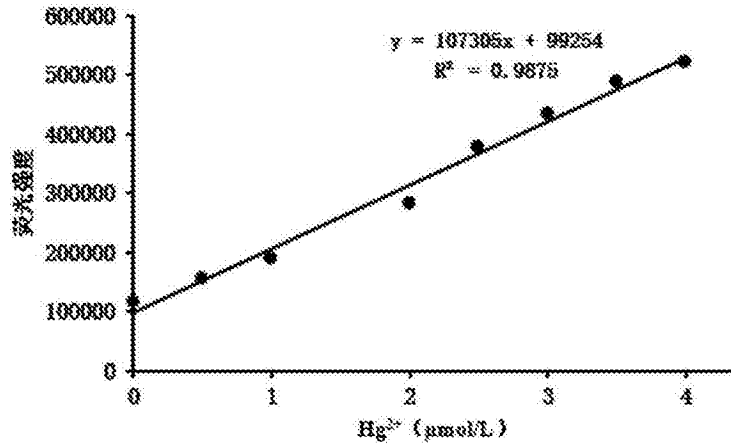


图2

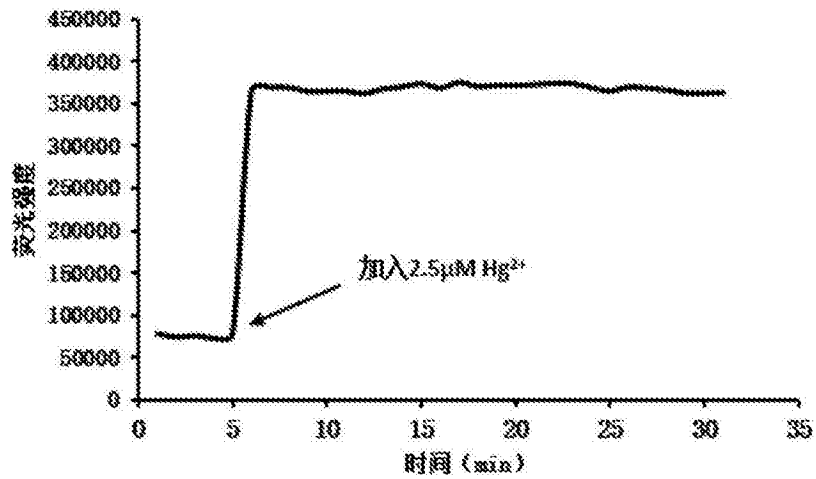


图3



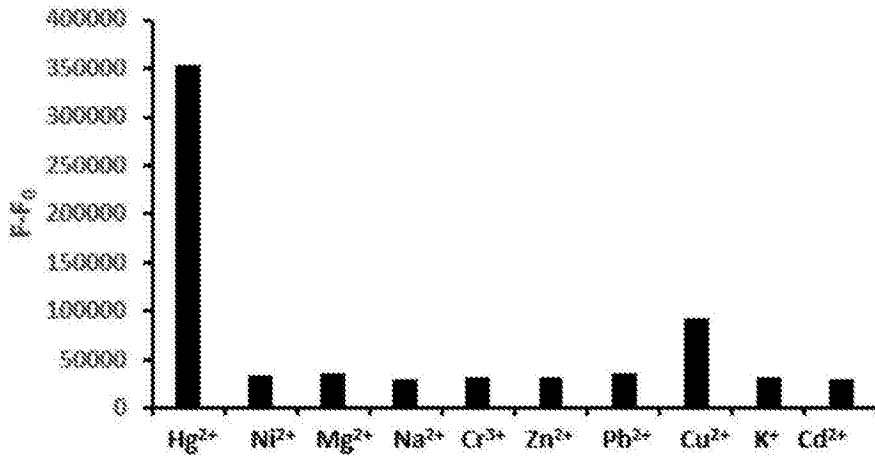


图4

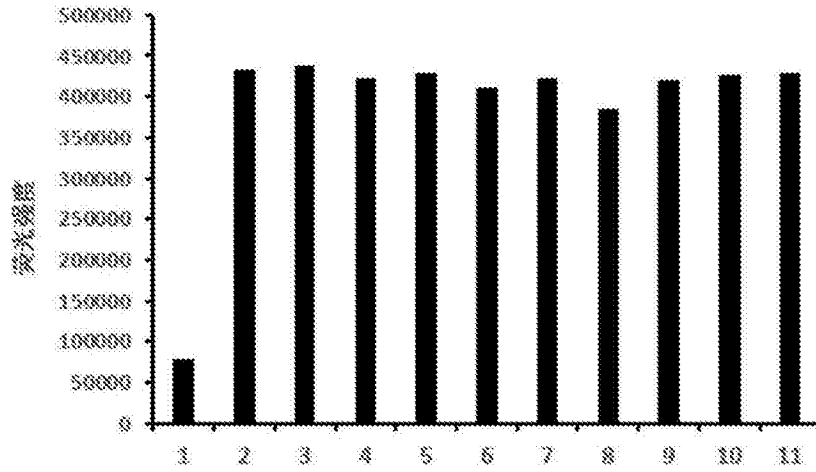


图5