

辛酸 TSEPIP 荧光衍生物制备及 荧光光谱研究与分析应用

赵先恩^{1,2}, 王小艳^{1,2}, 索有瑞¹, 刘永军^{*1}

(1. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 合成了荧光衍生试剂 1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲(TSEPIP), 经衍生化和固相萃取制得了 TSEPIP 的辛酸衍生物(TSEPIP-C₈)。研究了 TSEPIP-C₈ 在包括溶剂极性、温度、卤素离子、重金属离子等不同的溶液环境因素影响下的荧光光谱性质, 为高效液相色谱荧光分析检测提供了依据。在 Eclipse XDB-C₈ 反相色谱柱上, 在 380 nm 检测波长下采用梯度洗脱, 实现了 26 种脂肪酸(FFA) TSEPIP 衍生物的基线分离, 应用该法完成了丹参中脂肪酸的含量分析。借助柱后串联质谱 APCI 大气压化学电离源正离子模式, 能够实现各组分的快速定性。26 种脂肪酸的线性回归系数均 > 0.999 6, 检出限为 3.824~47.13 fmol (进样量 10 μL, 信噪比为 3:1)。

关键词: 荧光衍生试剂; 荧光光谱; 高效液相色谱-质谱; 柱前衍生; 荧光检测; 脂肪酸

中图分类号: O626; O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2007)11-0658-05

采用新型荧光衍生试剂对多种化学与生物分子进行衍生化, 经高效液相色谱分离与荧光检测, 或用液质联用等技术进行高灵敏分析的方法, 具有明显优势, 已广泛应用于环保、食品、临床、医药、化学、生命科学等领域^[1-3]。在衍生化和液相色谱分析检测过程中, 溶液中的环境因素对分子荧光可能产生强烈的影响, 了解和利用这一重要因素, 可以提高荧光分析的灵敏度和选择性^[4]。本文利用制得的 1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲(TSEPIP)^[5] 辛酸衍生物(TSEPIP-C₈)作代表, 研究了 TSEPIP-C₈ 受溶液中环境因素影响的荧光光谱性质, 为分析检测提供了指导和依据。脂肪酸在紫外-可见光区吸收较弱, 光度法难以准确测定^[6]。HPLC 荧光检测法具有较高的灵敏度, 但以往报导的荧光衍生试剂在应用中存在试剂不稳定、重现性差^[7,8]及衍生化繁琐^[9]等缺点, 本文采用 TSEPIP 作为柱前衍生试剂, 实现了丹参中脂肪酸的高效液相色谱荧光测定及柱后质谱快速定性。结果表明, 方法灵敏度高、重现性好、简便易行, 适合于生物及环境样品中脂肪酸的分析。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱-质谱联用仪(美

国 Agilent 公司), 配备四元梯度泵, 在线真空脱气机, 荧光检测器, 100 位自动进样器, 大气压化学电离源(APCI), Eclipse XDB-C₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); 650-10S 型荧光分光光度计(日本日立公司); Cary 300 Bio 型紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司); ODS C₁₈ 固相萃取柱(大连依利特公司)。

TSEPIP 参考文献[5]自制; 氯化钠、氯化钾、溴化钠、碘化钠、硝酸铜、硝酸银、硝酸铅、硝酸镉等为分析纯; 26 种脂肪酸标准品; 丹参药材; 十六烷基三甲基溴化铵和十二烷基硫酸钠(美国 Sigma 公司); 光谱纯乙腈(ACN, 德国 Merck 公司); *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)经减压蒸馏后使用; 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 TSEPIP-C₈ 衍生物的制备

TSEPIP 衍生试剂合成方法参考文献[5]进行。在优化的衍生条件确保定量辛酸完全衍生的情况下, 取 100 μL 1.0 × 10⁻⁴ mol/L 的辛酸进行衍生化。固相萃取柱分别经 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化, 取 100 μL 衍生液上样, 调节流速约 1 mL/min,

收稿日期: 2007-06-17

基金项目: 中国科学院百人计划项目资助。

作者简介: 赵先恩(1981-), 男, 山东莱芜人, 博士生, 研究方向为新型荧光衍生试剂的合成及在天然产物化学研究中的应用。

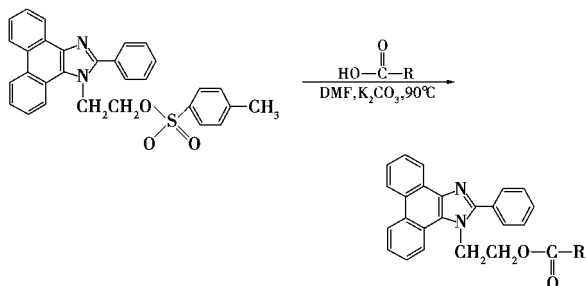
用 6 mL 60 % 的乙腈水溶液洗涤, 弃去洗涤液后再用 4 mL 乙腈洗脱 TSEPIP-C₈ 衍生物。如此重复 5 次, 收集洗脱液, 氮气吹干后用乙腈定容待用。

1.3 溶液配制

卤素盐、重金属盐用 50 % 乙腈水溶液配成 0.01 mol/L 标准液, 低浓度的相应溶液用 50 % 乙腈水溶液稀释而成。脂肪酸标准品经准确称取后, 用光谱纯乙腈配成 0.01 mol/L 标准液(长链脂肪酸需加入少量 DMF 作为助溶剂)。称取 0.246 0 g TSEPIP 用 DMF 定容至 10 mL, 浓度为 0.05 mol/L。低浓度的相应衍生试剂(5.0×10^{-3} mol/L)及低浓度脂肪酸(1.0×10^{-4} mol/L)的标准液分别用 DMF 和光谱纯乙腈稀释而成。

1.4 脂肪酸的衍生

向盛有 10 mg 无水 K₂CO₃ 的 2 mL 安瓿瓶中依次加入 170 μ L DMF, 50 μ L 混合脂肪酸(单个脂肪酸浓度为 1.0×10^{-4} mol/L), 130 μ L 衍生试剂溶液(5.0×10^{-3} mol/L), 封口后于 90 $^{\circ}$ C 恒温水浴中振荡反应 30 min, 取出放冷后, 加入 650 μ L ACN/DMF 溶液($V(\text{ACN}) : V(\text{DMF}) = 1 : 1$) 稀释后直接进样 10 μ L (50 pmol) 分析。衍生反应概况如下所示。



TSEPIP 与脂肪酸衍生反应

Derivatization reaction for TSEPIP with free fatty acid

1.5 色谱与质谱条件

表 1 梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution program

| t/ min | A/ % | B/ % | C/ % | D/ % |
|--------|------|------|------|------|
| 0 | 95 | 0 | 5 | 0 |
| 4 | 95 | 0 | 5 | 0 |
| 4.2 | 0 | 95 | 5 | 0 |
| 8 | 0 | 95 | 5 | 0 |
| 8.5 | 0 | 75 | 25 | 0 |
| 15 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| 40 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 45 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 60 | 0 | 0 | 0 | 100 |

色谱柱: Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6 \times 150 mm, 5 μ m)。流动相 A: 50 % 乙腈水溶液, B: 50 % 乙腈水溶液(含 0.2 mol/L HCOONH₄), C: 乙腈/DMF($V(\text{ACN}) : V(\text{DMF}) = 100 : 2$), D: 乙腈/DMF($V(\text{ACN}) : V(\text{DMF}) = 100 : 10$)。流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C。荧光激发和发射波长分别为: $\lambda_{\text{ex}} = 260$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 380$ nm。梯度洗脱程序如表 1。

大气压化学电离源(APCI), 正离子模式, 喷雾压力 413.69 kPa, 干燥气流量为 5 L/min, 干燥气温度 350 $^{\circ}$ C, 气化温度 450 $^{\circ}$ C, 毛细管电压 3 500 V, 电晕电流 4 000 nA(Pbs)。

1.6 丹参中脂肪酸的提取

干燥的丹参药材粉碎后, 称取 0.232 9 g 放入 10 mL 容量瓶中用 10 mL 氯仿浸泡, 超声振荡提取 4 h 后过滤, 再加入 10 mL 氯仿重复提取一次, 滤液合并后加 1.0 mL 吡啶超声振荡 20 s, 使其转变为相应脂肪酸的有机盐以防止脂肪酸挥发。溶剂经氮气吹干后用 500 μ L DMF 定容待测。

2 结果与讨论

2.1 衍生条件的优化

TSEPIP 与脂肪酸的衍生化优化条件可参考文献[5]。本文为了确保制备 TSEPIP-C₈ 衍生物时定量辛酸得到完全衍生, 对辛酸的衍生化条件单独进行了优化, 在其他优化条件与我们的报导相同的情况下, 当 TSEPIP 的物质的量数超过辛酸 5 倍后, 检测响应强度恒定, 达到了辛酸的完全衍生。

2.2 溶液环境因素对 TSEPIP-C₈ 荧光光谱性质的影响

2.2.1 溶剂极性对荧光光谱的影响

在 TSEPIP-C₈ 的浓度恒定为 5×10^{-5} mol/L 时, 研究了相同条件下 TSEPIP-C₈ 衍生物在 0 %、20 %、40 %、60 %、80 %、100 % 的乙腈/水溶液中的荧光光谱, 如图 1 所示。TSEPIP-C₈ 衍生物在 40 % 和 60 % 的乙腈/水溶液中的荧光发射强度基本相同且最大, 纯水中的荧光发射强度最小, 最大发射波长并未随溶剂极性的增大而变化。乙腈/水溶液从 100 % 80 % 60 %, 随溶剂极性的增强, 荧光发射强度逐渐增强。从 40 % 20 % 0 %, 随溶剂极性的增强, 荧光发射强度逐渐减弱, 纯水中的发射强度仅为 40 % 和 60 % 的乙腈/水溶液中发射强度的 1/6, 减弱的原因可能是由于 TSEPIP-C₈

衍生物相对分子质量大,疏水性强,水含量增加导致其溶解度减小。因此,在高效液相色谱荧光检测时,应避免使用纯水或含水量高的溶液做流动相,以免荧光检测灵敏度急剧降低。

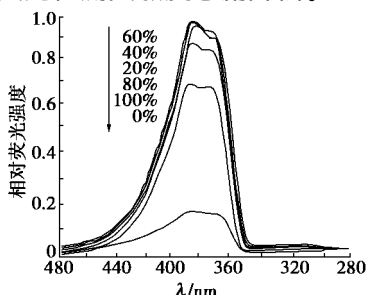


图1 TSEPIP-C₈在不同极性溶剂中的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescent spectrum of TSEPIP-C₈ in solvents of different polarities

实验温度为 30 °C, TSEPIP-C₈ 浓度为 5×10^{-5} mol/L,

激发和发射狭缝宽度为 9 nm

许多共轭芳香族化合物分子,受到激发时会发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁,溶剂极性对荧光强度的影响较大。这些分子受到激发时,其电子激发态比基态具有更大的极性,随着溶剂极性的增大,对激发态比对基态产生更大的稳定作用,结果是荧光强度随溶剂极性的增大而增强,有的荧光光谱的最大发射波长甚至随溶剂极性的增大而向长波方向移动。

2.2.2 温度对荧光光谱的影响

TSEPIP-C₈ 的浓度恒定为 5×10^{-5} mol/L, 溶剂为 50% 乙腈水溶液,研究了 TSEPIP-C₈ 衍生物在 30、40、50、60、70 °C 下的荧光发射光谱。如图 2 所示,随着温度的上升,荧光强度明显降低。因此,在高效液相色谱荧光检测时,色谱柱的柱温保持在 30 °C 具有最佳的检测灵敏度。

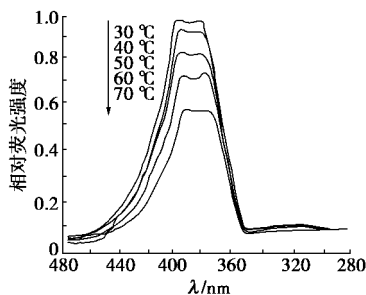


图2 TSEPIP-C₈ 衍生物在不同温度下的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescent spectrum of TSEPIP-C₈ at different temperatures

TSEPIP-C₈ 浓度为 5×10^{-5} mol/L, 激发与发射狭缝宽度为 9 nm

研究发现,在该温度范围内 $\ln I_{em}$ 与 $1/T$ 成良好的线性关系 (I_{em} : 荧光发射强度, T : 热力学温

度),这种变化规律符合 Arrhenius 公式: $\ln I_{em} = -G^0/RT + c$,按该式计算得出的发射稳定能 G^0 为 18.6 kJ/mol (线性回归系数 $r = 0.9992$)。由此可见, TSEPIP-C₈ 衍生物具有良好的热稳定性,在 30~70 °C 范围内,没有明显的分解。

温度之所以对荧光强度有着显著的影响,原因在于随着溶液温度的上升,荧光分子的荧光量子产率和荧光强度下降。这是由于温度对于分子的扩散、活化、分子内部能量转化以及对于溶液中各种平衡均有一定的影响,随着温度的上升,介质的粘度减小,使荧光分子与溶剂分子的碰撞淬灭机会增大,从而使荧光强度降低。

2.2.3 卤素离子对荧光光谱的影响

卤素离子能够引起分子荧光不同程度的淬灭,分别研究了 NaF、NaCl、NaBr、NaI 对 TSEPIP-C₈ 衍生物的荧光发射强度的影响。为减少外来卤素原子的影响,所用溶剂使用前二次蒸馏。TSEPIP-C₈ 衍生物测定浓度恒定为 5.72×10^{-7} mol/L, 当 NaF、NaCl、NaBr 在溶液中的浓度从 0~0.06 mol/L 逐渐增加时,荧光发射强度未见明显的减弱,说明 F⁻、Cl⁻、Br⁻ 对 TSEPIP-C₈ 衍生物分子的淬灭作用较小。当体系中 NaI 浓度从 0~0.06 mol/L 逐渐增加时,荧光强度有明显的淬灭,说明 I⁻ 对 TSEPIP-C₈ 衍生物分子有较强的淬灭作用。当 NaI 浓度 > 0.12 mol/L 时,荧光被完全淬灭。为评价 4 种卤素离子淬灭作用强弱,按 Stern-Volmer 公式^[4,10] $(F_0 - F)/F = K[D_0]$ 计算它们对 TSEPIP-C₈ 衍生物分子的淬灭常数,这里 F_0 和 F 分别为不存在和存在卤素离子时的荧光发射强度, K 为淬灭常数, $[D_0]$ 为淬灭剂卤素离子的浓度(单位为 mol/L)。NaF、NaCl、NaBr、NaI 的 K 值分别为 0.579, 0.818, 4.46, 113.9 L/mol, 淬灭作用的大小顺序为: NaF < NaCl < NaBr < NaI。因此,高效液相色谱荧光检测分析中,流动相所用水、乙腈、DMF 等纯度要高,卤素离子的含量不能超标,选择的被测样品中被测物的提取方法要考虑避免卤素离子的干扰。

2.2.4 重金属离子对荧光光谱的影响

重金属离子也能够引起分子荧光的强烈淬灭,研究了 Cu²⁺、Ag⁺、Pb²⁺、Cd²⁺ 4 种常见重金属离子对 TSEPIP-C₈ 衍生物荧光发射光谱的影响。结果表明, Cu²⁺、Ag⁺ 和 Pb²⁺ 对其具有明显的淬灭作用,而 Cd²⁺ 对其具有增敏作用。TSEPIP-C₈ 衍

生物浓度恒定为 8.57×10^{-7} mol/L,当存在 2×10^{-3} mol/L Cu^{2+} 时, $I/I_0 = 0.081$ (I 代表存在 2×10^{-3} mol/L Cu^{2+} 时的荧光强度, I_0 代表不加金属离子时的荧光强度),说明 Cu^{2+} 对其具有强烈的淬灭作用。改变加入的重金属离子的浓度($1 \times 10^{-5} \sim 0.1$ mol/L),按 Stern-Volmer 公式求得淬灭常数分别为: Cu^{2+} 4.79×10^3 L/mol, Ag^+ 4.46×10^3 L/mol, Pb^{2+} 8.6×10^3 L/mol。 Cd^{2+} 对 TSEPIP- C_8 衍生物具有增敏作用,这可能是 Cd^{2+} 与其形成了荧光配合物所致。当 Cd^{2+} 浓度达到 0.02 mol/L 以上时,增敏作用恒定,增敏后的荧光强度为不加 Cd^{2+} 时的 2.5 倍左右,此时其最大发射波长未见变化,但当加入的 Cd^{2+} 浓度达到 0.06 mol/L 以上时, TSEPIP- C_8 衍生物的最大荧光发射波长红移约 30 nm。因此,高效液相色谱荧光检测分析中,流动相所用水、乙腈、DMF 等纯度要高,不能含有导致荧光淬灭的重金属离子,被测样品提取方法也要考虑避免其干扰。

2.3 标准品色谱分离及质谱鉴定

26 种标准脂肪酸衍生物的色谱图见图 3。采用在线柱后质谱对各组分快速定性,质谱数据见表 2。

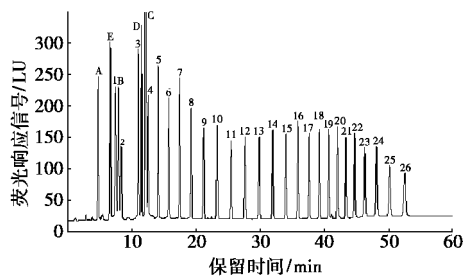


图 3 脂肪酸标准品衍生物的色谱分离图 (50 pmol)

Fig. 3 Chromatogram of standard free fatty acid derivatives (50 pmol)

1~26 为 26 种脂肪酸标准品衍生物;A 和 B 是衍生试剂在 K_2CO_3 作用下分解出的 1-(2-羟乙基)-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲和 2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲,C 为衍生试剂峰,D、E 为杂质峰,不干扰分离。

2.4 重现性、线性回归及检出限

在相同洗脱条件下,对 50 pmol 脂肪酸衍生物 6 次平行分析,保留时间和峰面积重现性见表 2。进样量在 200.0 pmol ~ 48.83 fmol 范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得各脂肪酸衍生物的线性回归方程、相关系数和检出限见表 2、表 3。

表 2 线性回归方程、相关系数、检出限与重现性

Tab. 2 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits and reproducibility ($n = 6$)

| 脂肪酸 | $Y = AX + B$ 注 | 线性相关系数 | 检出限/fmol | 保留时间 RSD/ % | 峰面积 RSD/ % |
|-----------------|-----------------------|---------|----------|-------------|------------|
| C ₁ | $Y = 142.1X + 27.54$ | 0.999 8 | 3.824 | 0.365 9 | 0.189 5 |
| C ₂ | $Y = 106.9X - 0.8267$ | 0.999 9 | 22.75 | 0.401 8 | 0.646 4 |
| C ₃ | $Y = 123.6X + 20.06$ | 0.999 8 | 8.377 | 0.348 9 | 0.459 3 |
| C ₄ | $Y = 81.39X + 3.508$ | 0.999 8 | 19.45 | 0.316 2 | 0.830 5 |
| C ₅ | $Y = 116.6X + 10.72$ | 0.999 7 | 11.37 | 0.191 2 | 0.461 9 |
| C ₆ | $Y = 93.46X + 4.811$ | 0.999 7 | 22.67 | 0.184 2 | 0.689 9 |
| C ₇ | $Y = 109.8X + 5.672$ | 0.999 8 | 15.96 | 0.140 9 | 0.571 9 |
| C ₈ | $Y = 92.62X + 6.306$ | 0.999 9 | 19.94 | 0.099 45 | 0.556 5 |
| C ₉ | $Y = 84.73X + 5.647$ | 0.999 7 | 19.65 | 0.089 42 | 0.435 1 |
| C ₁₀ | $Y = 93.62X + 5.311$ | 0.999 8 | 21.04 | 0.072 56 | 0.312 5 |
| C ₁₁ | $Y = 79.02X + 5.227$ | 0.999 8 | 31.27 | 0.081 41 | 0.436 9 |
| C ₁₂ | $Y = 87.16X + 5.918$ | 0.999 8 | 21.23 | 0.063 18 | 0.375 5 |
| C ₁₃ | $Y = 85.66X + 3.938$ | 0.999 8 | 27.59 | 0.055 97 | 0.235 5 |
| C ₁₄ | $Y = 94.75X + 6.626$ | 0.999 8 | 21.53 | 0.043 75 | 0.252 3 |
| C ₁₅ | $Y = 86.12X + 7.913$ | 0.999 7 | 26.67 | 0.043 31 | 0.136 9 |
| C ₁₆ | $Y = 102.7X + 6.051$ | 0.999 7 | 20.41 | 0.030 69 | 0.095 38 |
| C ₁₇ | $Y = 81.21X + 10.70$ | 0.999 6 | 23.77 | 0.026 16 | 0.174 6 |
| C ₁₈ | $Y = 83.32X + 5.758$ | 0.999 8 | 26.11 | 0.019 49 | 0.155 8 |
| C ₁₉ | $Y = 80.16X + 6.819$ | 0.999 8 | 28.20 | 0.020 18 | 0.156 2 |
| C ₂₀ | $Y = 84.92X - 0.1667$ | 0.999 9 | 18.80 | 0.043 26 | 0.364 3 |
| C ₂₁ | $Y = 75.85X + 2.668$ | 0.999 7 | 31.87 | 0.071 87 | 0.878 8 |
| C ₂₂ | $Y = 89.81X + 4.138$ | 0.999 8 | 35.15 | 0.095 15 | 1.246 |
| C ₂₃ | $Y = 84.73X + 5.283$ | 0.999 8 | 31.58 | 0.121 8 | 1.364 |
| C ₂₄ | $Y = 104.3X + 10.37$ | 0.999 7 | 34.75 | 0.198 5 | 1.852 |
| C ₂₅ | $Y = 83.66X + 5.228$ | 0.999 8 | 44.02 | 0.232 5 | 2.036 |
| C ₂₆ | $Y = 79.29X + 7.234$ | 0.999 7 | 47.13 | 0.269 4 | 2.443 |

注: X:进样量(pmol), Y:峰面积。

表 3 各脂肪酸衍生物的质谱数据

Tab. 3 The MS data of free fatty acid derivatives

| 脂肪酸 | 质谱 [M+1] ⁺ | 脂肪酸 | 质谱 [M+1] ⁺ | 脂肪酸 | 质谱 [M+1] ⁺ |
|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| C ₁ | 367.1 | C ₁₀ | 493.3 | C ₁₉ | 619.5 |
| C ₂ | 381.2 | C ₁₁ | 507.3 | C ₂₀ | 633.5 |
| C ₃ | 395.1 | C ₁₂ | 521.3 | C ₂₁ | 647.6 |
| C ₄ | 409.2 | C ₁₃ | 535.4 | C ₂₂ | 661.6 |
| C ₅ | 423.2 | C ₁₄ | 549.4 | C ₂₃ | 675.6 |
| C ₆ | 437.2 | C ₁₅ | 563.4 | C ₂₄ | 689.6 |
| C ₇ | 451.2 | C ₁₆ | 577.4 | C ₂₅ | 703.6 |
| C ₈ | 465.2 | C ₁₇ | 591.4 | C ₂₆ | 717.6 |
| C ₉ | 479.2 | C ₁₈ | 605.4 | | |

2.5 丹参样品的分析及回收率

在脂肪酸含量已知的丹参样品中加入 10 μL 浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 的脂肪酸标准品,按前述方法提取后进行衍生,重复 3 次所得的各脂肪酸平均回收率在 88.6% ~ 103.2% 之间。

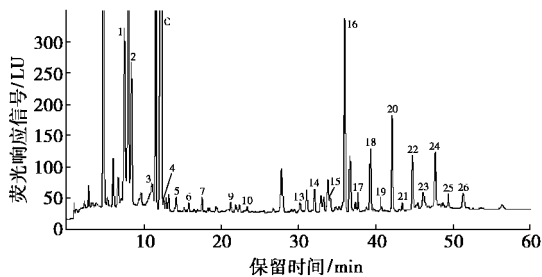


图 4 丹参中脂肪酸衍生物的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of free fatty acid derivatives in *Salvia miltiorrhiza* B.

表 4 回收率和丹参中游离脂肪酸含量

Tab. 4 Recoveries and contents of free fatty acids in *Salvia miltiorrhiza* B.

| 脂肪酸 | 回收率/ % | 含量/ ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 脂肪酸 | 回收率/ % | 含量/ ($\mu\text{g g}^{-1}$) |
|-----------------|-----------|---------------------------------|-----------------|-----------|---------------------------------|
| C ₁ | 96.2 | 2.897 | C ₁₄ | 93.8 | 3.458 |
| C ₂ | 98.4 | 4.645 | C ₁₅ | 90.8 | 1.109 |
| C ₃ | 97.6 | 0.615 6 | C ₁₆ | 98.9 | 29.59 |
| C ₄ | 88.6 | 0.318 7 | C ₁₇ | 102.4 | 1.376 |
| C ₅ | 101.0 | 0.493 3 | C ₁₈ | 103.2 | 12.24 |
| C ₆ | 100.8 | 0.500 9 | C ₁₉ | 100.2 | 1.056 |
| C ₇ | 102.3 | 0.822 9 | C ₂₀ | 101.4 | 20.88 |
| C ₈ | 100.4 | 0 | C ₂₁ | 102.6 | 1.753 |
| C ₉ | 99.6 | 0.902 6 | C ₂₂ | 101.2 | 12.36 |
| C ₁₀ | 98.7 | 0.510 2 | C ₂₃ | 103.0 | 6.227 |
| C ₁₁ | 101.3 | 0 | C ₂₄ | 102.7 | 13.68 |
| C ₁₂ | 102.6 | 0 | C ₂₅ | 102.8 | 1.612 |
| C ₁₃ | 94.5 | 1.196 | C ₂₆ | 101.3 | 6.809 |

丹参样品中脂肪酸衍生物的高效液相色谱荧光检测色谱图见图 4,借助柱后在线质谱快速定性,经线性回归方程外标法定量,各脂肪酸含量见表 4。

参考文献:

- [1] ZHAO Xiar'en, YOU Jir-mao, SUO You-ru. Determination of aliphatic amines from soil and wastewater of a paper mill by pre-column derivatization using HPLC and tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) [J]. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 2007, **30**(13): 1 963-1 979.
- [2] FUKUSHIMA T, USUI N, SANTA T, et al. Recent progress in derivatization methods for LC and CE analysis [J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **30**(6): 1 655-1 687.
- [3] 谢敏浩, 袁爱泳, 吴军, 等. 荧光衍生试剂 2-(9-咪唑)

乙酰氯的合成[J]. *化学试剂*, 2006, **28**(2): 93-94.

- [4] YOU Jir-mao, SUN Hai-tao, LAO Wen-jian, et al. Fluorescence properties of carbazole-9-yl-acetyl chloride and its application for the simultaneous determination of amino acids and biogenic amines via liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Anal. Chim. Acta*, 1999, **382**(1-2): 51-65.
- [5] 赵先恩, 索有瑞, 丁晨旭, 等. 荧光衍生试剂 1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲的合成及其在长链脂肪酸分析中的应用[J]. *色谱*, 2006, **24**(5): 456-461.
- [6] INGALLS S T, MINKLER P E, HOPPEL C L. Derivatization of carboxylic acids by reaction with 4-bromophenacyl trifluoromethanesulfonate prior to determination by high-performance liquid chromatography[J]. *J. Chromatogr. A*, 1984, **299**: 365-376.
- [7] TAKADATE A, MASUDA T, MURATA C, et al. 3-Bromoacetyl-6,7-methylenedioxy coumarin as a highly reactive and sensitive fluorescence labeling reagent for fatty acids[J]. *Anal. Sci.*, 1992, **8**(5): 695-698.
- [8] YOSHIDA T, UETAKE A, YAMAGUCHI H, et al. New preparation method for 9-anthryldiazomethane (ADAM) as a fluorescent labeling reagent for fatty acids and derivatives [J]. *Anal. Biochem.*, 1988, **173**(1): 70-74.
- [9] LU Chi-yu, WU Hsin-lung, CHEN Sur-hwei, et al. Simple and sensitive analysis of long-chain free fatty acids in milk by fluorogenic derivatization and high-performance liquid chromatography[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**(1): 71-73.
- [10] ZHU Qing-zhi, LI Fang, GUO Xiang-qun, et al. Application of a novel fluorescence probe in the determination of nucleic acids[J]. *Analyst*, 1997, **122**(9): 937-940.

Preparation of caprylic TSEPIP derivative and its fluorescence spectra study and application for HPLC analysis ZHAO Xiar'en^{1,2}, WANG Xiaoyan^{1,2}, SUO You-ru¹, LIU Yong-jun^{*1} (1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xi ning 810001, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China), *Huaxue Shiji*, 2007, **29**(11), 658 ~ 662; 672

Abstract: TSEPIP-C₈ derivative was prepared based on the derivatization of caprylic (C₈) acid using 1-[2-(*p*-toluenesulfonate) ethyl]-2-phenylimidazole [4, 5-f] 9, 10-phenanthrene (TSEPIP) as the derivatization reagent by pre-column derivatization and solid phase extraction (SPE). Fluorescence spectra properties of TSEPIP-C₈, at different solvent polarity, temperature and in the presence of different halide salts and heavy metal atoms, were studied on fluorescence spectrophotometer, which provided (下转第 672 页)

表 4 化合物 1、2 的 NMR 光谱分析

Tab. 4 The NMR data of the compounds

| 化合物 | ¹ H NMR | | ¹³ C NMR | |
|-----|--------------------|---------------------------|---------------------|-------------------|
| | 化学位移 | 结构 | 化学位移 | 碳位 |
| 1 | | | 62.17 | C-9 |
| | 2.11 | (s, 2H, OH) | 69.17 | C ^注 -O |
| | 3.99 | (s, 4H, CH ₂) | 124.19 | C-3 |
| | 7.35 | (t, 2H, Ar) | 130.14 | C-2 |
| | 7.45 | (t, 2H, Ar) | 131.67 | C-4 |
| | 7.63 | (d, 2H, Ar) | 132.29 | C-1 |
| | 7.79 | (d, 2H, Ar) | 145.36 | C-10 |
| 2 | | | 152.04 | C-11 |
| | | | 55.46 | C-9 |
| | 3.35 | (s, 6H, CH ₃) | 59.58 | CH ₃ |
| | 3.63 | (s, 4H, CH ₂) | 74.80 | CH ₂ |
| | 7.29 | (t, 2H, Ar) | 119.89 | C-3 |
| | 7.39 | (t, 2H, Ar) | 125.31 | C-2 |
| | 7.65 | (d, 2H, Ar) | 127.00 | C-4 |
| | 7.75 | (d, 2H, Ar) | 127.81 | C-1 |
| | | | 140.65 | C-10 |
| | | 146.83 | C-11 | |

注:与氧相连的亚甲基上的碳。

化合物 2 为 9,9-双甲氧甲基芴。

参考文献:

- [1] 余世金, 许招会, 王, 等. 外给电子体 CMMS、DCPMS 制备高结晶度聚丙烯的研究[J]. 应用化工, 2004, **33** (4): 38-39.
- [2] HU Y, CHIEN J C W. Superactive and stereospecific catalysts I structures and productivity. [J]. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 1988, **26**: 2 003-2 018.
- [3] AROUMANIDIS G G, KARA YANNIS N M. Infrared spectral characterization of spored propene polymerization catalysts: a link to catalyst performance [J]. *Appl. Catal.*, 1991, **76**: 221-231.
- [4] SOGA K, SHIONO T. Influence of internal and external donors on activity and stereospecificity of Ziegler-Natta catalysts [J]. *Macromol. Chem.*, 1988, **189**: 1 531-1 541.
- [5] SACCHI M C, FORLINI F, TRITTO I, et al. Polymerization stereochemistry with Ziegler-Natta catalysts containing dialkylpropane diethers: a tool for understanding internal/external donor relationships [J]. *Macromol. Chem.*, 1996, **29**: 3 314-3 345.
- [6] MORINI G, ALBIZZATI E, BALBONTIN G, et al. Microstructure distribution of polypropenes obtained in the presence of traditional phthalate/silane and novel diethers donors: a tool for understanding the role of electron donors in MgCl₂-supported Ziegler-Natta catalysts [J]. *Macromol. Chem.*, 1996, **29**: 5 770-5 776.
- [7] 李甲辉, 高占先. 二醚化合物在 Ziegler-Natta 催化剂中的应用及其合成研究 [J]. 辽宁化工, 2002, **31** (9): 392-396.
- [8] 林春花, 许招会, 廖维林. 新型二醚类给电子体 DMMF 的合成及结构表征 [J]. 应用化工, 2005, **34** (10): 607-608.
- [9] GIAMPIERO M. Diethers suitable for use in the preparation of Ziegler-Natta catalysts: EP, 0728724 AI [P]. 1996-08-28.

Synthesis of 9,9-bis(methoxymethyl)fluorene and its spectral analysis XU Zhaohui^{*1,2}, LIAO Weilin², TU Yuanyang², WANG Sheng¹ (1. Chemistry and Chemical Engineering College of Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; 2. Fine Chemical Key Laboratory of Jiangxi Province, Nanchang 330027, China), *Huaxue Shiji*, 2007, **29** (11), 670 ~ 672

Abstract: With fluorene serving as the starting material, an intermediate, namely 9,9-bis(hydroxymethyl)fluorene was synthesized through hydroxymethylation using sodium ethylate as the catalyst. Then 9,9-bis(hydroxymethyl)fluorene entered into reaction with NaOH and dimethyl carbonate to synthesize the target product by means of the phase transfer catalyst tetrabutyl ammonium bromide. The structure of the intermediate and end products was characterized by UV, FT-IR, and NMR.

Key words: 9,9-bis(methoxymethyl)fluorene; 9,9-bis(hydroxymethyl)fluorene; electron donor; spectral analysis

(上接第 662 页)

dependence for HPLC analysis with fluorescence detection. Separation of 26 types of derivatized fatty acids (C₁-C₂₆) was carried out at the detection wavelength 380 nm with a good baseline resolution in conjunction with a gradient elution on a reversed-phase Eclipse XDB-C₈ column. By this procedure, the contents of free fatty acids in *Salvia miltiorrhiza* B. were determined. The simple and convenient identification of fatty acid derivatives was carried

out by post-column tandem mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) source in a positive ion mode. Excellent linear responses were observed with correlation coefficients > 0.999 6, and the detection limits were 3.824 ~ 47.13 fmol (injection volume 10 μL, at signal-to-noise of 3:1).

Key words: fluorescence derivatization reagent; fluorescence spectra; high performance liquid chromatography-mass spectrometry; pre-column derivatization; fluorescence detection; fatty acid