

10种芳香化合物的分离及紫外和荧光光谱研究

赵先恩^{1,3}, 索有瑞¹, 张海峰², 尤进茂^{*1,2}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 曲阜师范大学化学科学学院, 山东 曲阜 273165; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:采用反相高效液相色谱梯度洗脱, 在 SinoChrom ODS-BP 型色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 上, 实现了包括 5 种荧光衍生试剂母体分子 (咔唑、1,2-苯并-3,4-二氢吡啶、吡啶酮、2-苯基-1-氢-菲 [9,10-d] 咪唑、吡唑并 [3,4-b]-7-甲基喹啉) 在内的 10 种含氮芳香化合物的基线分离。通过测定每种物质的紫外吸收曲线, 得到了它们的最大紫外吸收波长和摩尔吸光系数 (), 并探讨了分子结构、摩尔吸光系数 () 和灵敏度之间的关系。扫描了它们的荧光激发和发射光谱, 得出了它们的最大激发波长和发射波长。

关键词:芳香化合物; 高效液相色谱; 分离; 紫外; 摩尔吸光系数 (); 荧光

中图分类号: O657.7; O657.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2007)05-0260-03

近年来, 荧光衍生试剂衍生化后经高效液相色谱分离以检测多种化学与生物分子的方法, 已广泛应用于临床、医药、食品、环保、生物化学等方面^[1-3], 因此, 继续合成更灵敏的新型荧光衍生试剂具有广阔应用前景和重要意义。一种新荧光衍生试剂是否具有高的灵敏度, 即是否具有应用价值, 可以通过其紫外和荧光光谱性质来考察。本文在原有工作的基础上, 研究了包括 5 种荧光衍生试剂母体分子 (咔唑^[4]、1,2-苯并-3,4-二氢吡啶^[5]、吡啶酮^[6]、2-苯基-1-氢-菲 [9,10-d] 咪唑^[7]、吡唑并 [3,4-b]-7-甲基喹啉) 在内的 10 种含氮芳香化合物的高效液相色谱分离及紫外和荧光光谱性质, 为对比优选灵敏度高的荧光母体分子提供了依据, 对开发高灵敏荧光衍生试剂具有重要的指导意义。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

P230 型高效液相色谱仪, 配备 P230 高压恒流泵、UV230⁺ 紫外-可见检测器 (大连依利特分析仪器有限公司), 色谱柱为 SinoChrom ODS-BP 型 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 大连化学物理研究所); PHMK 型显微熔点仪 (温度计未校正); FT-IR 10dx 型红外光谱仪 (KBr 压片, 美国 Nicolet 公司); Agilent 1100 MSD Trap SL 质谱仪 (美国安捷伦公司); Carlo-Erba 1106 型元素分析仪; 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)。

联苯二胺、1-萘胺、2-苯基-3-(2-硝基苯基) 丙

烯酸、乙腈为分析纯; 7-甲基-3-甲酰基-2-氯喹啉、咔唑、吩噻嗪为分析纯 (Sigma 公司); 吡啶酮、吡唑并 [3,4-b]-7-甲基喹啉、2-苯基-1-氢-菲 [9,10-d] 咪唑、1,2-苯并-3,4-二氢吡啶为自制 (纯化后纯度均达 98.5% 以上); 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 试剂合成

4 种荧光衍生试剂母体分子的合成及分析应用见参考文献: 咔唑^[4]、1,2-苯并-3,4-二氢吡啶^[5]、吡啶酮^[6]、2-苯基-1-氢-菲 [9,10-d] 咪唑^[7]。

吡唑并 [3,4-b]-7-甲基喹啉的合成参考了文献^[8], 改进后的操作如下:

100 mL 圆底烧瓶中, 依次加入 2.33 g 7-甲基-3-甲酰基-2-氯喹啉、2.28 mL 85% 水合肼、1 g 对甲苯磺酸, 拌匀后于 130 °C 油浴反应 40 min。反应完毕后固体用冷水清洗, 然后用稀盐酸提取 3 次, 合并滤液, 用稀 NaOH 溶液调至 pH 7, 析出大量固体, 过滤后将固体晾干, 甲醇重结晶得黄色针状晶体, 产率 76%。m. p. 229.5 ~ 230.2 °C。元素分析, 实测值 (计算值), %: C 72.11 (72.08); H 4.95 (4.92)。IR (KBr), cm^{-1} : 1625.27, 1439.69, 930.73, 905.21, 853.49, 773.78。质谱, m/z : [M + H]⁺ 184.1。

收稿日期: 2006-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20075016); 中国科学院知识创新工程资助项目。

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。

1.3 溶液配制

1.3.1 混合溶液的配制

准确称取 10 种化合物置于 50 mL 容量瓶中,用乙腈定容,得 1×10^{-3} mol/L 的标准混合液,待高效液相色谱分离用。

1.3.2 单个标准溶液的配制

准确称取样品 1~10 质量分别为 0.002 4、0.002 0、0.002 6、0.001 8、0.003 0、0.002 2、0.002 0、0.002 1、0.003 0、0.002 8 g,并分别置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容,作为测定紫外和荧光光谱的操作液。

1.4 色谱条件

色谱柱: SinoChrom ODS-BP 型色谱柱 (4.6×200 mm, $5 \mu\text{m}$)。流动相: A 25% 乙腈/水溶液, B 100% 乙腈。流速 1.0 mL/min, 进样量 5 μL , 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 254 nm。每次进样前用 100% A 流动相平衡色谱柱 10 min。梯度洗脱程序为: 在 35 min 内从 100% A 梯度洗脱到 100% B, 100% B 再运行 10 min。

2 结果与讨论

2.1 高效液相色谱优化分离

在色谱分离优化过程中发现, 甲醇作流动相时, 色谱峰展宽和拖尾严重, 而用乙腈则能得到如图 1 所示的尖锐峰。色谱柱类型对分离也有影响, 对比了 ODS 柱、BDS C_{18} 柱和 Eclipse XDB- C_8 柱

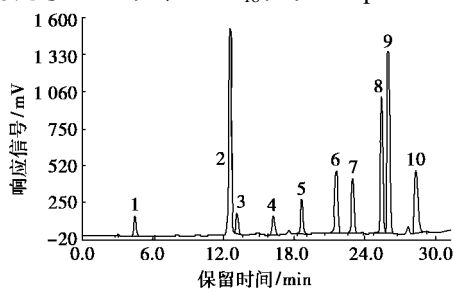
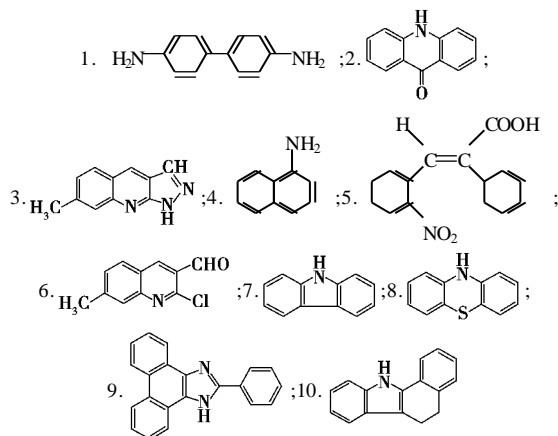


图 1 10 种芳香化合物的色谱分离图



(美国安捷伦公司), 发现 ODS-BP 柱具有最好的分离效果。10 种芳香化合物的色谱分离图见图 1。

虽然图 1 中 10 种化合物的摩尔数相同, 但由于各物质的最大紫外吸收波长不同, 在采用 254 nm 作检测波长时, 峰高不同。由表 1 可知各物质的最大紫外吸收波长在 210~290 nm 之间, 最终选定适中的 254 nm 作为检测波长。

2.2 紫外光谱性质

用乙腈作为对照液, 分别测定了 10 种化合物在乙腈溶液中的紫外吸收光谱, 得到了它们的最大紫外吸收波长及吸光度 A , 经朗伯-比尔定律 ($A = bc$, A : 吸光度, ϵ : 摩尔吸光系数, b : 比色皿宽度, 一般为 1 cm, c : 溶液浓度, 单位为 mol/L) 计算, 得到了相应的摩尔吸光系数 ϵ , 见表 1。在最大紫外吸收波长下的 ϵ 值反映了分子的灵敏度^[9], 因此, 研究分子结构、和灵敏度之间的关系, 对于设计合成和优选高灵敏度的荧光母体分子具有重要指导意义。 ϵ 值由大到小的顺序为: $9 > 2 > 8 > 10 > 3 > 7 > 6 > 1 > 4 > 5$, 这与各物质分子的共轭度基本一致, 2-苯基-1-氢-菲[9,10-d]咪唑的分子共轭程度最大, 其中还有两个 N 原子的给电子共轭作用, 其 ϵ 值最大; 2-苯基-3-(2-硝基苯基) 丙烯酸的两个苯环离得最远, 还有强拉电子基团 $-\text{NO}_2$ 的破坏共轭作用, 其共轭程度最小, ϵ 值最小。较特殊的是吡啶酮 (2) 和吩噻嗪 (8), 可能是由于它们分子中含有比 N 原子给电子共轭作用更强的 O、S 原子, 导致了共轭增强, ϵ 值较大, 但吩噻嗪由于含有导致荧光淬灭的 S 原子而

表 1 紫外光谱数据

样品	化合物名	测定浓度 $\times 10^5 /$ (mol L^{-1})	$\lambda_{\text{max}} /$ nm	吸光 度 A	$\epsilon \times 10^{-4} /$ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
1	联苯二胺	2.608	288	0.428	1.64
2	吡啶酮	1.026	250	0.555	5.41
3	吡唑并[3,4-b]-7-甲基 咪唑	1.421	238	0.327	2.30
4	1-萘胺	1.259	254	0.180	1.43
5	2-苯基-3-(2-硝基苯基) 丙烯酸	1.115	267	0.132	1.18
6	7-甲基-3-甲酰基-2-氯 咪唑	1.071	253	0.200	1.87
7	咪唑	1.200	233	0.253	2.11
8	吩噻嗪	1.055	252	0.433	4.10
9	2-苯基-1-氢-菲[9,10-d] 咪唑	1.020	260	0.575	5.64
10	1,2-苯并-3,4-二氢咪唑	1.279	208	0.302	2.36

不具荧光特性,故一般用来研制紫外衍生试剂。吡啶酮则具有强荧光,在溶液中就能看到漂亮的蓝色荧光,已被研制为荧光衍生试剂^[6]。

2.3 荧光光谱性质

表2 荧光光谱数据(样品标号与表1相同)

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λ_{ex}/nm	300	404	325	250	310	305	335	-	260	333
λ_{em}/nm	390	440	410	375	390	380	360	-	380	390

在室温下,测定了10种化合物在乙腈溶剂中的荧光光谱,得出了它们的最大激发波长(λ_{ex})和最大发射波长(λ_{em}),见表2。如2.2中所述,吩噻嗪本身不发荧光,故无法测到其激发和发射波长。

参考文献:

- [1] YOU Jir-mao, ZHAO Xian-en, SUO You-rui, et al. 2-(2-Phenyl-1H-phenanthro[9,10-d]imidazole-1-yl)-acetic acid (PPIA) and its application for determination of amines by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and identification with mass spectroscopy/atmospheric pressure chemical ionization[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2006, **565**(2):168-177.
- [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, 裘爱泳, 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, SHAN Yi-chu, ZHEN Liang, et al. Determination of peptides and amino acids from wool and beer with sensitive fluorescent reagent 2-(9-carbazole)-ethyl chloroformate by reverse phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry[J]. *Anal. Biochem.*, 2003, **313**(1):17-27.
- [5] YOU Jir-mao, SHI Yun-wei, MING Yong-fei, et al. Development of a sensitive reagent, 1,2-benzox-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl-*p*-toluenesulfonate, for determination of bile acids in serum by HPLC with fluorescence detection, and identification by mass spectrometry with an APCI source[J]. *Chromatographia*, 2004, **60**(9):527-535.

- [6] 赵先恩, 李玉林, 索有瑞, 等. 高效液相色谱荧光测定及质谱鉴定土壤和苔藓中的脂肪酸[J]. *分析化学*, 2006, **34**(2):150-154.
- [7] 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.
- [8] PAUL S, GUPTA M, GUPTA R, et al. Microwave assisted solvent-free synthesis of pyrazolo[3,4-b]quinolines and pyrazolo[3,4-c]pyrazoles using *p*-TsOH[J]. *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**(23):3 827-3 829.
- [9] 华中师范大学. *分析化学*[M]. 第三版. 北京:高等教育出版社, 2003:277-281.

Separation and study on ultraviolet and fluorescence spectra of ten aromatic compounds ZHAO Xian-en^{1,3}, SUO You-rui¹, ZHANG Hai-feng², YOU Jir-mao^{*1,2} (1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China), *Huaxue Shiji*, 2007, **29**(5):260~262

Abstract: A reversed phase high-performance liquid chromatographic method for separation of ten aromatic compounds containing five fluorescence derivatization reagent core molecules (carbazole, 1,2-benzox-3,4-dihydrocarbazole, acridone, 2-phenyl-1H-phenanthro[9,10-d]imidazole, pyrazolo[3,4-b]-7-methylquinoline) with a good baseline resolution in conjunction with a gradient elution on a SinoChrom ODS-BP column (4.6 mm \times 200 mm, 5 μ m) has been developed. Their maximum ultraviolet absorption wavelengths and molar absorbance coefficients () were obtained by scanning their ultraviolet absorption curves. The relationship between the molecular structure, molar absorbance coefficients () and sensitivity of these compounds was discussed. Their maximum fluorescence excitation and emission wavelengths were obtained by scanning their fluorescence spectra on a fluorescence spectrophotometer.

Key words: aromatic compounds; high-performance liquid chromatography; separation; ultraviolet; molar absorbance coefficient (); fluorescence

(上接第 259 页)

Abstract: Five new compounds were synthesized from 3,4-dimethoxybenzaldehyde and *p*-nitrotoluene via multiple steps, including condensation, catalytic reduction, diazotization, hydroxylation, nucleophilic substitution and acylation. The structures of

these compounds have been determined by elemental analysis, IR spectra, ¹HNMR, ¹³CNMR and two-dimensional NMR spectroscopy.

Key words: resveratrol analogues; *p*-nitrotoluene; 3,4-dimethoxybenzaldehyde; synthesis