2010 年第 68 卷
第 7 期, 653～660

化 学 学 报
ACTA CHIMICA SINICA

Vol. 68, 2010
No. 7, 653～660

• 研究论文 •

胆汁酸的双敏感探针苯并[*b*]吖啶酮-5-乙基对甲苯磺酸酯: 荧光检测和 APCI-MS 鉴定

付艳艳[a] 宋翠华[a] 秦雪芹[a] 李肖燕[a] 丁明州[a] 孙志伟[b,c]
夏 莲[a,b,c] 索有瑞[b] 李玉林[b] 尤进茂*[,a,b]

([a] 生命有机分析重点实验室 曲阜师范大学化学科学学院 曲阜 273165)
([b] 中国科学院西北高原生物研究所 西宁 810001)
([c] 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 在 Hypersil C_{18} 色谱柱上, 利用新型荧光试剂苯并[*b*]吖啶酮-5-乙基对甲苯磺酸酯(BAETS)作柱前衍生化试剂, 采用梯度洗脱对 10 种胆汁酸衍生物进行了优化分离. 在二甲亚砜溶剂中, 以碳酸钾作催化剂, 95 ℃, 45 min 后获得稳定的荧光产物. 衍生物在稳态荧光条件下, 在乙腈和甲醇水溶液中的百分离子化 δ 值在 0%～88.83%和 0%～89.15%范围内. 最大激发和发射波长为 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$＝272/505 nm. 采用大气压化学电离源(APCI)正离子模式实现了胆汁中胆汁酸的定性定量测定. 线性回归系数均在 0.9995 以上, 线性范围宽, 检出限为 0.76～1.62 ng/mL.

关键词 液相色谱-质谱; 百分离子化值; 苯并[*b*]吖啶酮-5-乙基对甲苯磺酸酯(BAETS); 胆汁酸

Dual-sensitive Probe 2-(12-Oxobenzo[*b*]acridin-5(12*H*)-yl)ethyl 4-Toluenesulfonate for Bile Acids: Fluorescence Detection and APCI-MS Identification

Fu, Yanyan[a] Song, Cuihua[a] Qin, Xueqin[a] Li, Xiaoyan[a] Ding, Mingzhou[a]
Sun, Zhiwei[b,c] Xia, Lian[a,b,c] Suo, Yourui[b] Li, Yulin[b] You, Jinmao*[,a,b]

([a] *Key Laboratory of Life-organic Analysis*, *Qufu Normal University*, *Qufu 273165*)
([b] *Northwest Plateau Institute of Biology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Xining 810001*)
([c] *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing 100049*)

Abstract On a reversed-phased Hypersil C_{18} column, 10 bile acid derivatives were separated using 2-(12-oxobenzo[b]acridin-5(12*H*)-yl)ethyl 4-toluenesulfonate (BAETS) as pre-column derivatization reagent by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrum identification in conjunction with a gradient elution. Optimum derivatization, giving the corresponding sensitively fluorescent derivatives, was obtained by the reacting of bile acids with BAETS at 95 ℃ for 30 min in the presence of basic catalyst potassium carbonate in dimethylsulfoxide solvent. The optimum excitation and emission wavelengths were at $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$＝272 nm/505 nm. The percent ionization δ values in aqueous acetonitrile and aqueous methanol were in the range of 0%～88.83% and 0%～89.15% respectively. The identification of bile acid derivatives was obtained on the basis of an atmosphere-pressure chemical ionization source at positive model detection. Correlation coefficients are ＞0.9995, and detection limits at signal-to-noise of 3 are 0.76～1.62 ng/mL for the labeled bile acids.

* E-mail: jmyou6304@163.com
Received September 5, 2009; revised October 25, 2009; accepted November 17, 2009.
国家自然科学基金(No. 20075016)和中国科学院“百人计划”(No. 328)资助项目.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Keywords high performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry; percent ionization; 2-(12-oxobenzo[b]acridin-5(12*H*)-yl)ethyl 4-toluenesulfonate (BAETS); bile acid

胆汁酸是动物体内重要的代谢调节物质, 能够乳化水中的疏水分子利于消化吸收, 平衡胆固醇, 消化脂肪, 防止胆结石的形成. 胆汁酸主要存在于血清、胃肠液、肝和胆囊中的胆汁、尿液和粪便中, 对其测定可为肝胆疾病、胃肠消化功能紊乱的诊断提供可靠的依据. 因此, 胆汁酸的测定对人类健康具有非常重要的意义[1]. 目前的检测方法有折光示差检测法[2]、紫外波长检测法[3]和气相色谱-质谱法[4,5], 尽管方法简便、易行但由于灵敏度低等因素而受到限制. 为提高检测灵敏度改善选择性, 采用柱前或柱后衍生化是一种行之有效的手段. 尽管用于胆汁酸类化合物测定的衍生化试剂较多, 但大都存在着一定的缺点. 例如香豆素[6~8]类化合物, 对潮气及水不稳定; NOEPES 磺酸酯[9], 以及 NE-OTf[10]和 AE-OTf[11]对胆汁酸的衍生化都需要冠醚相转移催化剂, 操作繁琐, 有时不成功.

在我们前期的研究中, 报道了几种酸类衍生化试剂[12~15], 尽管都能给出很强的荧光灵敏度, 然而却展现出相对低的质谱离子化能力, 不利于同时获得在线的高灵敏质谱鉴定. 本文的主要目的是制备一种能同时满足荧光和质谱增敏的双敏感探针分子. 结果表明苯并[*b*]吖啶酮-5-乙基对甲苯磺酸酯(BAETS)与胆汁酸的亲核取代产物, 既能展现高荧光灵敏度又能给出很强的质谱离子化能力.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 离子阱液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司), 配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器和自动进样器; 大气压化学电离源(APCI Source). Waters Delta 600 半制备色谱(美国 Waters 公司). F-7000 荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司). CARY300 Bio 型紫外可见分光光度计, Carlo-Erba 1106 元素分析仪. 10 种胆汁酸标准样品(美国, Sigma 公司), 乙腈(色谱纯, 中国, 禹王试剂公司), 碳酸钾、柠檬酸钾、酒石酸钠、硼砂等其他试剂均为分析纯, 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备.

1.2 试剂合成

3-氨基-2-萘甲酸、3-*N*-苯基-2-萘甲酸和苯并吖啶酮分别按文献[16], [17]和[18]合成.

5-(2-羟乙基)-12(5*H*)-苯并-[*b*]-吖啶酮(HBA)合成: 向 500 mL 三颈瓶中, 依次加入苯并吖啶酮 7.5 g, 300 mL DMF, 痕量 KOH, 7.2 g 碳酸亚乙酯, 内溶物迅速加热至回流, 跟踪检测反应转化完毕后, 将混合物倒入 600 mL 冰水中, 剧烈搅拌 30 min, 过滤, 所得固体常温干燥 48 h, 用乙腈重结晶两次, 得 5-(2-羟乙基)-12(5*H*)-苯并-[*b*]-吖啶酮 5.1 g, 产率, 56.8%. 熔点(m.p.): 241.5～242.2 ℃; IR(KBr 压片): 3320.98(ν_{O-H}), 3023.15(ν_{Ar-H}), 1605.94(Ph-C＝O), 1571.62, 1488.63, 1449.10, 1383.14, 1293.15, 757.07, 658.65 cm^{-1}. LC-APCI-MS *m*/*z*: 289.8(正离子模式); MS/MS *m*/*z*: 245.7(二级质谱裂解后得到母核分子). 元素分析: 测定值(Found), C 78.89%, H 5.22%, N 4.85%; 理论值(Calculated), C 78.87%, H 5.23%, N 4.84%.

苯并[*b*]吖啶酮-5-乙基对甲苯磺酸酯(BAETS): 在盛有 60 mL 无水吡啶的 100 mL 圆底烧瓶中, 加 3.0 g HBA, 混合物冰盐浴冷却, 剧烈搅拌下于 30 min 内分三次加入总量为 4.0 g 的对甲苯磺酰氯. 0 ℃下搅拌反应 6 h 后改为常温搅拌, 保持反应 24 h, 所得混合物倒入 500 mL 冰水中, 剧烈搅拌, 析出的固体水洗三次, 常温干燥 48 h. 用乙腈/DMF 混合溶剂(5∶1, *V*/*V*)重结晶三次, 得产品 1.82 g, 产率, 39.6%. 熔点(m.p.): ≥220 ℃(分解); IR (KBr 压片): 3037.86(ν_{Ar-H}), 2962.85(ν_{Ar-H}), 1618.87(Ph-C ＝ O), 1604.52(ν_{Ar-H}), 1487.52, 1471.04, 1453.93, 1398.32, 1371.41, 1360.17(C-SO_2), 1293.92, 1173.61, 1011.77, 883.13, 754.92 cm^{-1}. LC-APCI-MS *m*/*z*: 444.1(正离子模式); MS/MS *m*/*z*: 271.7(二级质谱裂解后得到母核分子). 元素分析: 测定值(Found), C 70.42%, H 4.81%, N 3.17%. 理论值(Calculated), C 70.41%, H 4.77%, N 3.16%.

1.3 标准溶液的配制

取胆汁酸标品, 用色谱纯乙腈配制成浓度为 1.0×10^{-3} mol/L 标液, 相应低浓度胆汁酸标品(1.0×10^{-4} mol/L)用乙腈稀释而成. 准确称取 221.5 mg 苯并[*b*]吖啶酮-5-乙基对甲苯磺酸酯用色谱纯二甲亚砜定容至 10 mL, 浓度为 5.0×10^{-2} mol/L. 相应低浓度的衍生试剂(5.0×10^{-3} mol/L)用二甲亚砜稀释而成.

1.4 色谱及质谱条件

色谱柱: Hypersil C_{18} column (200×4.6 mm i.d, 5 μm). 流动相 A: 50%乙腈水溶液, 流动相 B: 100%乙腈. 梯度洗脱程序: 0～17.5 min: 由 10%的 B 梯度到 35%的 B; 17.5～35 min: 35%的 B 梯度到 10%的 B; 35～40 min:

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

100%的B保持5 min. 流速为1.0 mL/min, 进样量10 μL, 柱温 30 ℃. 最大激发发射波长为 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$=272/505 nm. 质谱条件: 大气压化学电离源(APCI source), 正离子模式, 喷雾压力 413 kPa, 干燥气流量为 5 L/min, 干燥气温度350 ℃, 气化温度450 ℃, 毛细管电压3500 V, 电晕电流 4000 nA (Pos).

1.5　标准品衍生化

向装有 60 mg 碳酸钾的安瓿瓶中依次加入 100 μL DMSO, 50 μL 十种混合胆汁酸标品, 150 μL BAETS, 密封后于95 ℃水浴中振荡反应45 min, 完毕后取10 μL加乙腈 240 μL 稀释 25 倍, 直接进样. 衍生反应概况图见图 1, 胆汁酸分子结构见图 2.

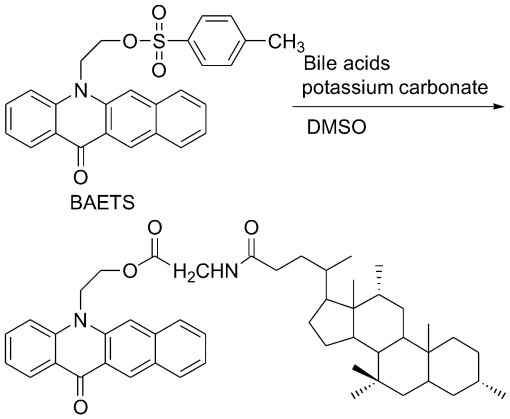

图 1　苯并[*b*]吖啶酮-5-乙基对甲苯磺酸酯衍生胆汁酸反应概况图

Figure 1　Derivatization scheme of 2-(12-oxobenzo[*b*]acridin-5(12H)-yl)ethyl 4-toluenesulfonate with bile acids

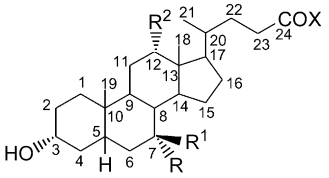

图 2　胆汁酸分子结构式

Figure 2　Structural formula of bile acids

游离胆汁酸	缩写符号	R	R^1	R^2	X
非共轭型					
胆酸	CA	OH	H	OH	OH
脱氧胆酸	DCA	H	H	OH	OH
鹅脱氧胆酸	CDCA	OH	H	H	OH
熊脱氧胆酸	UDCA	H	OH	H	OH
石胆酸	LCA	H	H	H	OH
甘氨酸共轭型					
甘氨胆酸	GCA	OH	H	OH	$NHCH_2CO_2H$
甘氨脱氧胆酸	GDCA	H	H	OH	$NHCH_2CO_2H$
甘氨鹅脱氧胆酸	GCDCA	OH	H	H	$NHCH_2CO_2H$
甘氨熊脱氧胆酸	GUDCA	H	OH	H	$NHCH_2CO_2H$
甘氨石胆酸	GLCA	H	H	H	$NHCH_2CO_2H$

1.6　样品处理

向盛有 3 mL 鸡胆汁样品的离心试管中加入 5 mL 甲醇并振荡摇匀, 然后加入硫酸铵超声振荡, 调节胆汁为弱碱性, 离心30 min后取上清液, $HCOONH_4$缓冲液调为酸性后, 用氮气吹干, 剩余物用 1 mL DMSO 溶解后加入 5 mL 水. 然后用经过 10 mL 甲醇和 10 mL 水冲洗的 C_{18} Sep-Pak 萃取柱过滤, 再用 10 mL 水冲洗萃取柱, 然后用 10 mL 乙腈将胆汁酸洗脱, 将洗脱液挥发至干用 500 μL DMSO 溶解冷藏备用.

1.7　理论部分——百分离子化估计

BAETS 衍生物的母核属含 N、O 杂环的高共轭平面分子, 由于N和羰基O原子处于特殊的对位结构, 分子内的异构化转变相对容易(见下图 3).

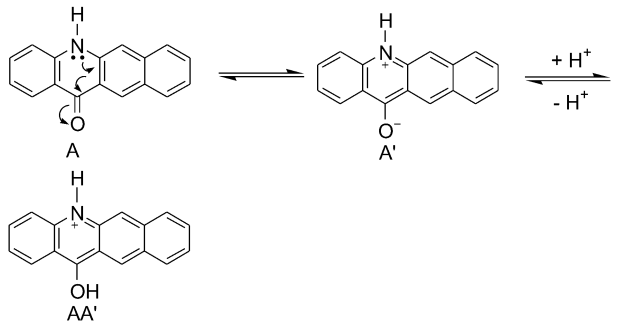

图 3　苯并吖啶酮在乙腈水溶液中的异构化机理

Figure 3　Isomerization mechanism of benzo[*b*]acridin-12(5*H*)-one in aqueous acetonitrile

首先, 通过异构化作用分子**A**中N原子的孤电子对转移至氧原子, 形成两性离子 **A'**. **A'**的过渡态包含一个酚氧负离子, 其极易接受$[H]^+$质子而产生季铵离子 **AA'** 导致分子的荧光猝灭. 其猝灭程度与体系内含质子给予体(H_2O)的体积百分数相关. 借助不同质子给予体浓度下的荧光猝灭强度, 即可计算分子**A**在水相体系下的百分离子化 δ 值. 探针 **A** 在水相有机体系中存在下列平衡

$$\mathbf{A}+\mathbf{B} \Leftrightarrow \mathbf{AB} \tag{1}$$

A 为探针分子, **B** 质子给予体(H_2O), **AB** 是产物(质子接受体). 荧光猝灭常数可表达为:

$$K=\frac{[\mathbf{AB}]}{[\mathbf{A}]\bullet[\mathbf{B}]} \tag{2}$$

[**A**], [**B**]和[**AB**]为相应的平衡浓度, 根据质量守恒定律, 百分离子化 δ 值可定义为:

$$\delta=\frac{[\mathbf{AB}]}{[\mathbf{A}]_0}=\frac{[\mathbf{AB}]}{[\mathbf{A}]+[\mathbf{AB}]} \tag{3}$$

假设未被离子化的 **A** 最初浓度为$[\mathbf{A}]_0$, 荧光强度

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

为 F_0，则下列关系成立.

$$F_0=K'\phi_f[\mathbf{A}]_0 \tag{4}$$

K'为与仪器相关的常数，ϕ_f 为 **A** 的量子产率. 当 **A** 部分被质子化后，剩余 **A** 的荧光强度为 F，此时 F 可表达为

$$F=K'\phi_f(1-\delta)[\mathbf{A}]_0 \tag{5}$$

这儿，$\delta=[\mathbf{AB}]/[\mathbf{A}]_0$，结合等式(4)和(5)得出:

$$\frac{F_0-F}{F}=\frac{K'\delta[\mathbf{A}]_0}{K'(1-\delta)[\mathbf{A}]_0} \tag{6}$$

等式(6)可简化为:

$$\frac{F_0-F}{F}=\frac{\delta}{1-\delta} \tag{7}$$

等式(7)改写为:

$$\delta=\frac{F_0/F-1}{F_0/F} \tag{8}$$

由(8)式知，在不同水的体积百分数下获得的荧光强度 F 值，即可求得相应的百分离子化 δ 值.

2 结果与讨论

2.1 光谱性质

2.1.1 紫外光谱性质

BAETS 的母核与 AETS 相比增加了一个苯环，从而使共轭体系进一步加强. BAETS 在甲醇溶液中展现出两个主要吸收带，其最大吸收(nm)和摩尔吸光系数($L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$)分别为: 276 nm ($2.99\times10^5$)和 297 nm ($8.36\times10^4$). 文献报道[19]: AETS 在紫外区也显示两个主要的吸收带，其最大吸收(nm)和摩尔吸光系数($L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$)分别为: 253 nm ($4.82\times10^4$)和 255 nm ($5.72\times10^4$). 实验数据表明: 与 AETS 相比 BAETS 吸收峰明显红移，最大吸收峰红移 23～42 nm，摩尔吸光系数增大 5.23 倍.

2.1.2 荧光光谱性质

试验中我们以 BAETS-GCDCA 衍生物(由 Waters Delta 600 半制备色谱制备)为代表考察了 DMSO 溶剂中不同温度下(20～70 ℃)荧光强度的变化，结果表明温度对荧光强度有显著影响，随着温度的升高，甘氨鹅脱氧胆酸(GCDCA)衍生物的相对荧光强度逐渐下降，见图 4. 主要原因是溶液中不存在质子给予体 H_2O 时，荧光量子产率的大小与辐射跃迁过程及非辐射跃迁过程的相对速率有关，然而辐射过程的速率不随温度而变，因此，荧光量子产率随非辐射跃迁过程的速率而改变. 随溶液温度升高，介质的黏度变小，从而增大了荧光分子与溶剂分子碰撞猝灭的几率，荧光量子产率降低，相对荧光强度降低. 依据荧光强度 ln I 与 $1/T$ 间的线性动力学关系[20]，获得 BAETS-GCDCA 在 DMSO 溶剂中的激发和发射稳态能分别为 4.09 kJ/moL ($r^2=0.9868$)和 3.34 kJ/moL ($r^2=0.9824$).

在常用的有机溶剂中，随着温度的升高，荧光探针分子的相对荧光强度逐渐下降，甲醇则相反. 在甲醇溶剂中BAETS-GCDCA衍生物的荧光强度随温度升高而增强. 相应的激发和发射稳定能分别为－3.78 ($r^2=0.9898$)和－4.01 kJ/mol ($r^2=0.9942$). 这可能是由于甲醇分子是水分子一个氢原子被甲基取代的结果，因而与水分子有着相似的分子结构. 当体系内含质子给予体(水或甲醇)时，探针分子与几个水分子间通过强的氢键产生强烈溶剂化作用，从而探针分子与溶剂分子间的直接碰撞几率减小，荧光量子产率升高，相对荧光强度增强.

当水相有机体系如乙腈、甲醇处于恒温条件时，随体系中质子给予体浓度的增高，荧光强度降低，这主要是探针分子与质子给予体形成象图 3 所示的季铵离子而导致荧光猝灭的结果. 对 BAETS-GCDCA 衍生物在不同浓度的乙腈、甲醇水溶液中的百分离子化的计算结果见表 1.

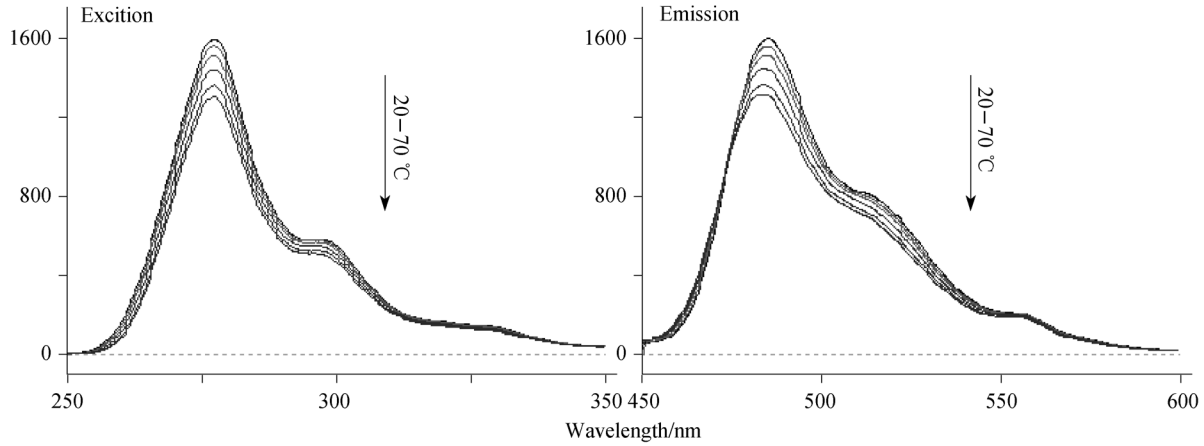

图 4 DMSO 作为共溶剂, BAETS-GCDCA 在不同温度下的荧光光谱图

Figure 4 The fluorescent spectra of BAETS-GCDCA at different temperatures with DMSO as co-solvent

Conditions: Wavelength(Ex/Em)＝278/486 nm; Scan speed, 1200 nm/min; Ex slit, 5.0 nm; Em slit, 5.0 nm; PMT Voltage, 400 V

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　不同浓度乙腈甲醇水溶液中 BAETS-GCDCA 的荧光强度及百分离子化值

Table 1　Fluorescence intensity of BAETS-GCDCA in the presence of varying amount of water and corresponding calculated percent ionization δ values

Solvent	acetonitrile			methanol		
H_2O%/(*V*/*V*)	Emission/nm	Relative intensity	Percent ionization δ/%	Emission/nm	Relative intensity	Percent ionization δ/%
100	517	159	88.83	517	148	89.15
90	513	812	42.98	516	373	72.65
80	511	997	30.00	515	790	42.08
70	510	1078	24.30	513	936	31.38
60	507	1117	21.56	510	1005	26.32
50	505	1157	18.75	510	1090	20.09
40	503	1208	15.17	508	1148	15.84
30	503	1257	11.73	508	1186	13.05
20	500	1317	7.51	506	1266	7.18
10	495	1354	4.92	506	1323	3.01
0	481	1424	0	506	1364	0

The concentration of BAETS-GCDCA in aqueous acetonitrile or methanol is kept at 4.0×10^{-7} mol/L; F_0 was measured in 100% acetonitrile or methanol. δ values were calculated according to the Eq. 8 in each corresponding F value obtained (with pure acetonitrile or methanol, the percent ionization $\delta=0$).

由表 1 知, 随质子给予体浓度增加, 荧光强度逐渐降低, 且发射波长明显红移, 乙腈中红移大约 36 nm, 甲醇中红移约 11 nm. 在乙腈溶液中BAETS衍生物分子百分离子化 δ 值为 4.92%～88.83%; 甲醇中的百分离子化δ值为3.01%～89.15%. 理论上, 百分离子化δ值与加入水的体积百分数应成线性关系. 但水的体积百分数在乙腈中超出 80%后则偏离线性关系, 主要是在低浓度乙腈中, 探针分子溶解度降低的结果($\delta=0.666+0.355\varphi$, $r=0.9942$, φ: 水的体积分数 0%～80%). 甲醇中具有相似结果, 水的百分数在 0%～70%时线性良好, 再高则偏离线性($\delta=-1.130+0.450\varphi$, $r=0.9915$, φ: 水的体积分数0%～70%). 上述估计的百分离子化δ值, 很好地揭示了探针分子在乙腈和甲醇的流动相体系中具有良好的质谱离子化能力.

2.2　衍生化条件

苯并[*b*]吖啶酮-5-乙基对甲苯磺酸酯与胆汁酸的衍生化随溶剂、催化剂、衍生温度及衍生试剂用量的不同产率有显著差异. 实验中选取一系列弱碱性催化剂(K_2CO_3、$K_2C_2O_4$、乙酸钠、柠檬酸钾、酒石酸钾和硼砂)对衍生化产率进行了考察(见图 5: 催化剂), 结果表明碱性稍弱(乙酸钠、酒石酸钠和 $K_2C_2O_4$)导致催化效率降低, 明显影响衍生产率; 尽管大量的 K_2CO_3, 由于碱性稍强会引起五种共轭型胆汁酸酰胺键的水解, 产生相应的五种非共轭型胆汁酸, 但是少量的 K_2CO_3 与等量的柠檬酸钾、硼砂相比给出较高的荧光信号, 且衍生反应的副产物较少. 因此最终选择 K_2CO_3 作为衍生反应的催化剂, 并对其用量从 10 mg 到 120 mg 进行了考察, 结果表明用量在 60 mg 时衍生产率最高(数据略).

选取二甲亚砜(DMSO)、*N*,*N*-二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、四氢呋喃和吡啶作为衍生共溶剂, 考察表明: DMSO 给出最高的检测响应(产率作为 100%)(见图 5: 溶剂). 乙腈、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、四氢呋喃和吡啶仅给出 1.65%～34.59%响应值, 主要是试剂及其衍生物在相应溶剂中具有较小溶解度的缘故; 与 DMSO 相比,

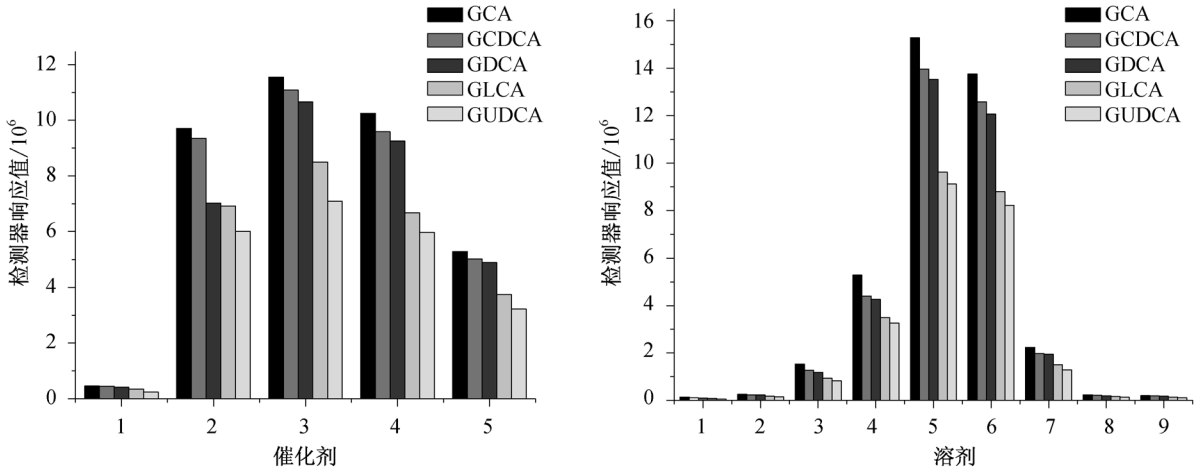

图 5　催化剂和溶剂对衍生效率的影响

Figure 5　Effect of different catalyst and solvent on yields of derivatization

Catalysis: 1. sodium acetate; 2. potassium citrate; 3. potassium carbonate; 4. potassium carbonate; 5. potassium oxalate. Solvent: 1. tetrahydrofuran; 2. ethyl acetate; 3. acetone; 4. pyridine; 5. methyl sulfoxide; 6. *N*,*N*-dimethylformamide; 7. acetonitrile; 8. chloroform; 9. dichloromethane

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

DMF 给出 90%的响应值. 因此实验中选取 DMSO 作反应共溶剂. 衍生产率和速率随温度的升高而增加, 95 ℃, 衍生反应 45 min 后产物信号强度基本稳定, 升高温度会引起衍生试剂轻度分解而影响衍生产率. 衍生试剂过量 15 倍, 衍生产率达最高, 由于试剂自身的荧光猝灭, 过量衍生试剂不会干扰分离.

2.3 色谱分离及质谱鉴定

在前述优化的基础上, 对十种胆汁酸进行柱前衍生后, 采用梯度洗脱在 40 min 内实现了完全基线分离, 色谱分离见图 6. 利用上述质谱条件进行柱后在线鉴定, 以熊脱氧胆酸(UDCA)为例的质谱见图 7 (A: MS, B: MS/MS), 各组分一级质谱数据见表 2.

2.4 线性回归方程、检出限和重现性

进样量在 32.2 fmol～66 pmol 范围内, 依据峰面积和实际进样量进行线性回归, 所得的线性回归方程、相关系数和检出限见表 2. 各胆汁酸衍生物的线性相关系数均大于 0.9995, 荧光检出限在 0.76～1.62 ng/mL 范围(信噪比按 S/N＝3 计算, 质谱线性范围略). 对 66 pmol 胆汁酸衍生物平行六次分析, 保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.045%～0.072%和 2.16%～2.73%范围内.

2.5 实际样品的分析

胆汁样品胆汁酸的色谱分离见图 8, 提取液中加胆汁酸标准品(1.0×10^{-4} mol/L), 按照实验方法处理并衍生化, 所得胆汁中胆汁酸含量和回收率见表 3.

3 结论

利用新合成的含 N, O 杂原子的荧光探针苯并[*b*]吖啶酮-5-乙基对甲苯磺酸酯(BAETS), 对十种胆汁酸进行了标记. 建立的公式计算了探针分子在乙腈和甲醇水溶液中的百分离子化 δ 值. 通过对衍生化条件和色谱分离条件的优化, 并进行柱后在线质谱鉴定, 建立了灵敏、快速测定胆汁中胆汁酸的方法. 衍生物不仅具有强荧光发光特性, 同时也具有很强的质谱离子化能力. 建立的方法具有线性范围宽、重现性好、操作简便、干扰小等特点, 对实际胆汁样品中胆汁酸的测定结果满意.

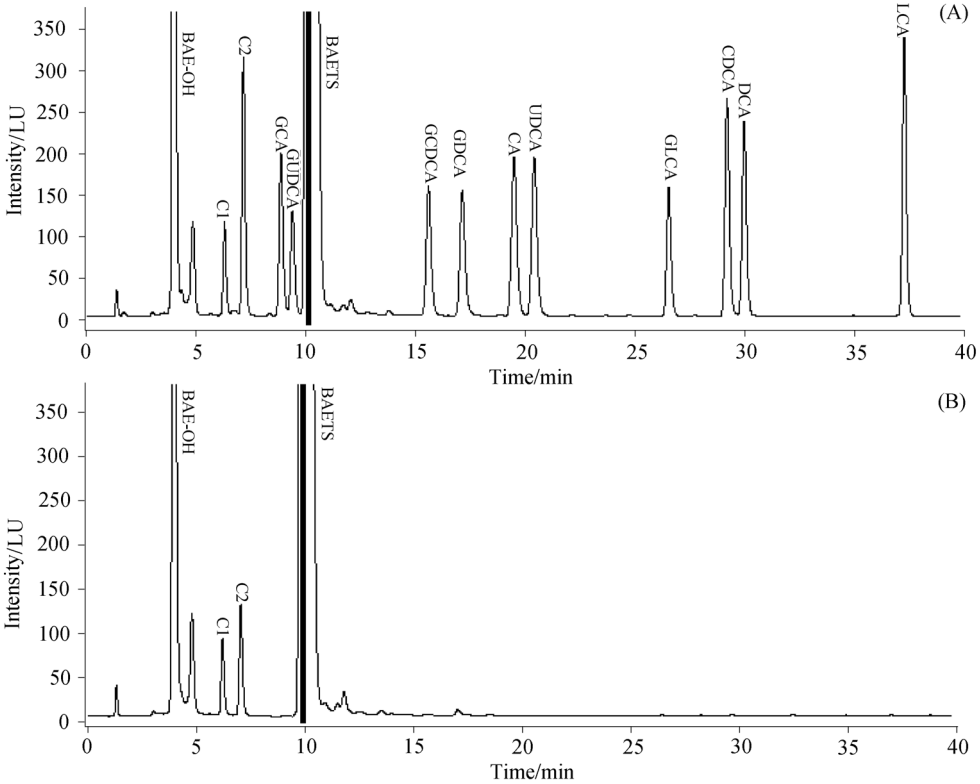

图 6 (A) 标准胆汁酸衍生物的色谱图; (B)标准品空白图

Figure 6 (A) Chromatogram of standard bile acid derivatives; (B) Chromatography of vacant standards

Peak: C1: formic acid; C2: acetic acid; GCA: glycocholic acid; GUDCA: glycoursodeoxycholic acid; GCDCA: glycochenodeoxycholic acid; GDCA: glycodeoxycholic acid; CA: cholic acid; UDCA:. ursodeoxycholic acid; GLCA: glycolithocholic acid; CDCA: chenodeoxycholic acid; DCA: deoxycholic acid; LCA: lithocholic acid; BAETS: 2-(12-oxobenzo[*b*]acridin-5(12*H*)-yl)ethyl 4-toluensulfonate; BAE-OH: 5-(2-hydroxyethyl)benzo[*b*]acridin-12(5*H*)-one

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

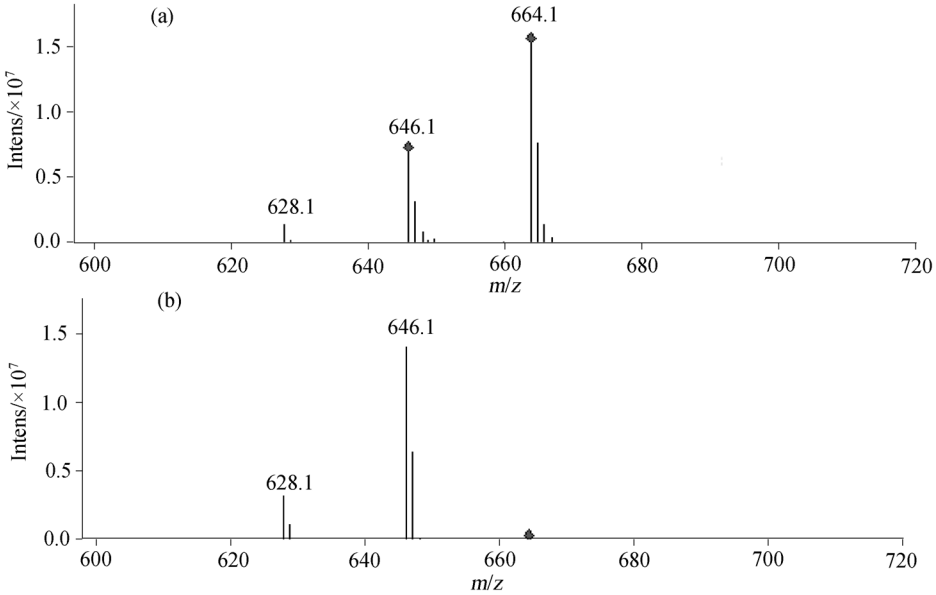

图 7　熊脱氧胆酸衍生物质谱图: (a) 一级质谱; (b) 二级质谱

m/z: 646.1 和 628.1 分别由分子离子$[M+H]^+$(664.1)失掉 1 和 2 分子水后得到的碎片峰: $[M+H-H_2O]^+=646.1$; $[M+H-2H_2O]^+=628.1$

Figure 7　The APCI-MS/MS spectra of ursodeoxycholic acid derivative: (a) MS spectra; (b) MS/MS spectra

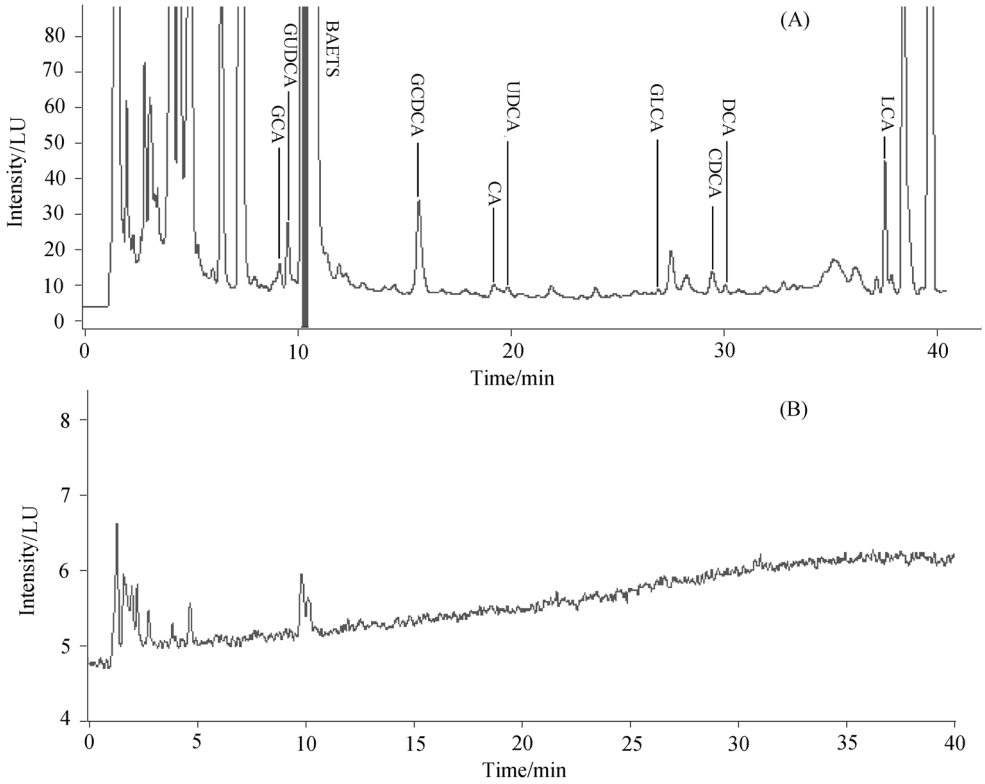

图 8　(A)鸡胆汁中胆汁酸色谱分离图; (B)衍生试剂空白图

Figure 8　(A) Chromatogram of bile acids from bile in chook; (B) chromatography of vacant derivative reagent

chromatographic conditions and peaks as Figure 5

表 2　胆汁酸衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限和质谱数据

Table 2　Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits and MS data of bile acid derivatives

Bile acid derivatives	Regression equation	Correlation coefficient	Fluorescence limit/ ($ng \cdot mL^{-1}$)	MS $(M+H)^+$
GCA	$Y=5.353360+0.62498X$	0.9997	1.05	737.1

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

续表

Bile acid derivatives	Regression equation	Correlation coefficient	Fluorescence limit/ ($ng•mL^{-1}$)	MS $(M+H)^+$
GUDCA	$Y=5.695050+0.38702X$	0.9996	1.62	721.2
GCDCA	$Y=6.459390+0.64391X$	0.9997	0.94	721.1
GDCA	$Y=6.901160+0.65208X$	0.9998	1.06	721.1
CA	$Y=12.66525+1.03158X$	0.9997	1.01	680.1
UDCA	$Y=11.16978+1.04587X$	0.9997	0.76	664.1
GLCA	$Y=7.447360+0.57393X$	0.9996	1.17	705.1
CDCA	$Y=11.56747+1.17620X$	0.9999	0.85	664.1
DCA	$Y=10.75858+1.01393X$	0.9995	0.82	664.1
LCA	$Y=13.52024+1.37546X$	0.9995	0.68	648.1

X: Injected amount/pmol, *Y*: peak area.

表 3 鸡胆汁中胆汁酸的含量及回收率

Table 3 Content and recoveries of bile acids from bile in chook

Bile acid	Bile sample/ ($\mu g•mL^{-1}$)	ID[b]	Recoveries	Bile acid	Bile sample/ ($\mu g•mL^{-1}$)	ID[b]	Recoveries
GCA	1.25	Yes	97.9	UDCA	0.09		102.5
GUDCA	3.10	Yes	98.4	GLCA	0.08		98.7
GCDCA	5.09	Yes	100.2	CDCA	0.52	Yes	100.6
GDCA	[a]		101.6	DCA	0.12		101.3
CA	0.10		99.7	LCA	1.52	Yes	100.5

[a] 由于与未知组分共洗脱故未进行定量; [b]ID: 组分同时进行在线的质谱鉴定.

References

1 Yuan, Y.-S. *Analysis of Clinical Medicine by Chromatography*, Nanjing University Press, **1994** (in Chinese).
(袁倚盛, 临床医药色谱分析, 南京大学出版社, **1994**.)

2 Shau, R. *Lipids* **1978**, *13*, 971.

3 Hakayama, F. *J. Chromatogr.* **1980**, *183*, 287.

4 Scalia, S. *J. Chromatogr. B* **1995**, *671*, 299.

5 Reid, A. D.; Baker, P. R. *J. Chromatogr.* **1982**, *247*, 149.

6 Novotny, M.; Karlsson, K.; Konishi, M.; Alasandro, M. *J. Chromatogr.* **1984**, *292*, 159.

7 Andreolini, F.; Beale, S. C.; Novotny, M. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1988**, *11*, 20.

8 Gluckman, D. S.; Shelly, D.; Novotny, M. *J. Chromatogr.* **1984**, *317*, 443.

9 Lu, C.-Y.; Wu, H.-L.; Chen, S.-H.; Kou, H.-S. *Chromatographia* **2000**, *51*, 315.

10 Yasaka, Y.; Tanaka, M.; Shono, T.; Tetsumi, T.; Katakawa, J. *J. Chromatogr.* **1990**, *508*, 133.

11 Akasaka, K.; Ohrui, H.; Meguro, H. *Analyst* **1993**, *118*, 765.

12 You, J.-M.; Shi, Y.-W.; Ming, Y.-F.; Yu, Z.-Y.; Yi, Y.-J.; Liu, J.-Y. *Chromatographia* **2004**, *60*, 527.

13 You, Y.-M.; Zhang, B.; Zhang, W.-B.; Yang, P.; Zhang, Y.-K. *J. Chromatogr. A* **2001**, *909*, 171.

14 You, J.-M.; Zhao, X.-E.; Suo, Y.-R.; Li, Y.-L.; Wang, H.-L.; Chen, G.-C. *J. Chromatogr. B* **2007**, *848*, 283.

15 Ding, Y.-J.; Zhao, X.-E.; Zhu, F.; Suo, Y.-R.; Li, Y.-L.; Chen, G.-C.; You, J.-M. *Chin. J. Anal. Chem.* **2007**, *35*, 375 (in Chinese).
(丁养军, 赵先恩, 朱芳, 索有瑞, 李玉林, 陈桂琛, 尤进茂, 分析化学, **2007**, *35*, 375.)

16 Allen, C. F. H.; Alan, B. *Org. Synth.* **1942**, *22*, 19.

17 Marthaed, W. *The Merck Index*, 11th ed., Merck & Co., Inc., Rahway (new Jersey), **1988**, 7290.

18 Shirley, D. A.; Tatum, W. E. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 2238.

19 Zhao, X.-E.; Li, Y.-L.; Shi, Y.-W.; Chen, X.-M.; Zhang, H.-F.; Sun, X.-J.; You, J.-M. *Chin. J. Anal. Chem.* **2006**, *34*, 150 (in Chinese).
(赵先恩, 李玉林, 石运伟, 陈向明, 张海峰, 孙学军, 尤进茂, 分析化学, **2006**, *34*, 150.)

20 Xu, J.-G.; Wang, Z.-B. *Fluorescence Analysis*, Beijing, Science Press, **2006**, pp. 49～61 (in Chinese).
(许金钩, 王尊本, 荧光分析法第三版, 科学出版社, 北京, **2006**, pp. 49～61.)

(A0909051 Cheng, F.)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net