

DOI 编码 :10.3969/j.issn.1006-6144.2010.03.003

# 新型荧光试剂用于土壤中脂肪胺的高效液相色谱-质谱测定

秦雪芹<sup>1</sup>, 孙志伟<sup>2,3</sup>, 付艳艳<sup>1</sup>, 李肖燕<sup>1</sup>, 索有瑞<sup>2</sup>, 李玉林<sup>2</sup>, 尤进茂<sup>\*1,2</sup>

(1. 生命有机分析重点实验室; 曲阜师范大学化学与化工学院, 山东曲阜 273165;

2. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**利用新型荧光试剂 2-(2-(10-蒎基)-苯并咪唑)-乙酸 (ABIA) 为柱前衍生化试剂, 在 Akasil-C18 色谱柱上, 通过梯度洗脱对 12 种游离脂肪胺进行了分离和在线质谱定性。以乙腈为溶剂, N-乙基-N-[(3-二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 为缩合剂, 在 50 °C 条件下衍生反应 20 min 后获得稳定的荧光产物。激发波长和发射波长分别为 260 nm 和 430 nm, 采用大气压化学电离源 (APCI) 的正离子模式, 实现了土壤中脂肪胺的定性及其含量的测定。脂肪胺的线性相关系数大于 0.9990, 检出限为 11.72 ~ 25.63 fmol。

**关键词:**液相色谱-质谱; 荧光检测; 柱前衍生; 脂肪胺

**中图分类号:** O657.63

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-6144(2010)03-0261-05

胺类化合物(包括脂肪胺和芳香胺)由于其毒性以及反应活性已成为在环境检测中备受关注的一类化合物。因此,建立高灵敏度和高选择性的检测胺类化合物的方法具有重要意义。脂肪胺通常为无紫外吸收或本身不具发光特性的化合物,因而对其分析常采用柱前衍生化的方法,使其转变为含紫外吸收或发光基团的化学衍生物<sup>[1-2]</sup>。目前,用于胺类化合物柱前衍生的衍生化试剂有许多种<sup>[3-6]</sup>,但都有不同程度的缺陷。邻苯二甲醛(OPA)<sup>[7]</sup>重现性和相应衍生物稳定性较差;4-氯-7-硝基苯-2-氧-1,3-二唑(NBD-Cl)<sup>[8]</sup>试剂在水溶液中的稳定性较差,见光容易分解;芴甲氧羰基氯(FMOC-Cl)<sup>[9-10]</sup>衍生化需要经过萃取处理以消除过量试剂的干扰,操作过程繁琐且易造成疏水衍生物的丢失,6-氨基-喹啉基-N-琥珀酰亚胺碳酸酯(AQC)<sup>[11-12]</sup>是近年来广泛应用的胺类衍生试剂之一,但AQC衍生物在水中量子效率很低,不利于梯度洗脱。

本文采用一种新型衍生试剂 2-(2-(10-蒎基)-苯并咪唑)-乙酸 (ABIA) 对 C<sub>1</sub> ~ C<sub>12</sub> 脂肪胺进行柱前衍生。实验结果表明,以 N-乙基-N-[(3-二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 为缩合剂,在 50 °C 下反应 20 min 可获得最佳衍生效果。采用乙腈/水进行梯度洗脱实现了 C<sub>1</sub> ~ C<sub>12</sub> 脂肪胺衍生物的基线分离。借助于在线的柱后质谱定性,实现了 12 种脂肪胺的快速、准确测定。

## 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, Wa-

收稿日期: 2009-09-03 修回日期: 2009-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(No. 20075016); 中国科学院“百人计划”项目(No. 328)

\* 通讯作者: 尤进茂,男,博士,教授,硕士研究生导师;主要研究方向:新型荧光发光材料的开发。

ters 公司);F-7000 荧光分光光度计(日本,Hitachi 公司);CAR Y300 Bio 型紫外可见分光光度计;Carlo-Erba 1106 元素分析仪。

2-(2-(10-蒎基)-苯并咪唑)-乙酸(ABIA)(自制),用光谱纯乙腈配成  $5.0 \times 10^{-3}$  mol/L 的溶液;12 种脂肪胺标准样品(购自 Sigma 公司),配成相应低浓度( $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L)的标准溶液;EDC(购自 Sigma 公司),用光谱纯乙腈配成 0.1 mol/L 的溶液;光谱纯乙腈(购自 Merck 公司),色谱纯乙腈(购自禹王公司),纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 脂肪胺的衍生化** 向 2 mL 安瓿瓶中依次加入 20  $\mu$ L 脂肪胺标准溶液,48  $\mu$ L EDC 溶液,96  $\mu$ L 衍生试剂溶液,密封后于 50  $^{\circ}$ C 水浴中反应 20 min。

**1.2.2 色谱及质谱条件** 色谱柱:Kasil-C18 色谱柱(250  $\times$  4.6 mm,5  $\mu$ m)(美国,艾杰尔科技)。流动相 A:30%乙腈水溶液(含 30 mmol/L 的  $\text{HCOONH}_4$ ,pH = 3.74);B:100%的乙腈。B 在 35 min 内梯度从 10%到 100%,保持 5 min。流速为 1.0 mL/min,进样量 10  $\mu$ L,柱温 30  $^{\circ}$ C。荧光激发和发射波长分别为:  $\lambda_{ex} = 260$  nm,  $\lambda_{em} = 430$  nm。

质谱条件:大气压化学电离源(APCI Source),正离子模式,喷雾压力 413.68 kPa,干燥气流量为 5 L/min,干燥气温度 350  $^{\circ}$ C,气化温度 400  $^{\circ}$ C,毛细管电压 3 500 V,电晕电流 4 000 nA(Pos)。

## 1.3 土壤中脂肪胺的提取

称取 100 g 土壤置于试剂瓶中,加入 200 mL 氯仿超声振荡 1 h 后过滤,滤渣中再加入 50 mL 氯仿超声 20 min 后过滤,合并提取液,滤液用甲酸调至 pH 为 3.0,浓缩至干后,加 2 mL 乙腈,并用氢氧化钠调节 pH 为 12,直接用于衍生。

# 2 结果与讨论

## 2.1 ABIA 的稳定性及光谱性质

ABIA 由 2-(10-蒎基)-苯并咪唑与溴乙酸乙酯在二甲亚砜(DMSO)溶剂中发生取代反应后经水解而成。在密闭条件下,该试剂的乙腈溶液,在冰箱中保存一个月,经高效液相色谱荧光检测,荧光强度无明显变化,对脂肪胺的衍生效率也未见明显改变。ABIA 的母体环为蒎基苯并咪唑,具有很大的共轭结构,环中同时含有两个富电子的 N 原子,与母体环形成  $p-\pi$  超共轭,故具有很好的紫外吸收。

## 2.2 衍生条件的优化

ABIA 与脂肪胺的衍生化反应随衍生反应的时间、温度、衍生试剂用量、EDC 用量、溶剂的不同,衍生生产率有显著差异。试验中以丙胺、己胺、壬胺、十二胺为代表对以上的衍生条件分别进行了优化。结果表明:在其它因素一定的情况下,50  $^{\circ}$ C 时具有最高衍生效率,随着温度的上升有副反应发生,效率下降。衍生反应 20 min 后衍生产物信号强度稳定。衍生试剂摩尔数达到脂肪胺总摩尔数的 4 倍后信号强度稳定。EDC 用量为 48  $\mu$ L(摩尔数为衍生试剂的 10 倍)时产率最高。此外实验中选取 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)、乙腈、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷七种溶剂,考察了它们对衍生效率的影响。结果显示乙腈给出最高的检测响应。丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷做反应溶剂时检测相应降低,而且在色谱分离时带来几个较大的干扰峰,给色谱分析带来困难。因而实验中选取乙腈做溶剂。

## 2.3 标准品的色谱分离及质谱鉴定

按前述优化条件,用乙腈-水做流动相,采用梯度洗脱,40 min 内可实现对 12 种标准脂肪胺衍生后的色谱分离,结果见图 1,所有衍生物可获得较好的基线分离。采用大气压化学电离源(APCI Source)正离子模式进行在线柱后质谱鉴定,各组分质谱数据见表 1。以癸胺为例的一级和二级质谱图见图 2。

## 2.4 重现性、线性回归方程及检出限

在相同洗脱条件下,对 50 pmol 脂肪胺衍生物进行 6 次平行分析,保留时间和峰面积重现性见表 2;保留时间的相对标准偏差(RSD)小于 0.06%;峰面积的 RSD 小于 2.0%。

进样量在 50 pmol ~ 48.83 fmol 范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得各脂肪胺衍生物的回归方程、相关系数和检出限见表 2。各脂肪胺衍生物的线性相关系数都在 0.9990 以上,检出限(按信噪比 S/N = 3 计算)在 11.72 ~ 25.63 fmol 之间。

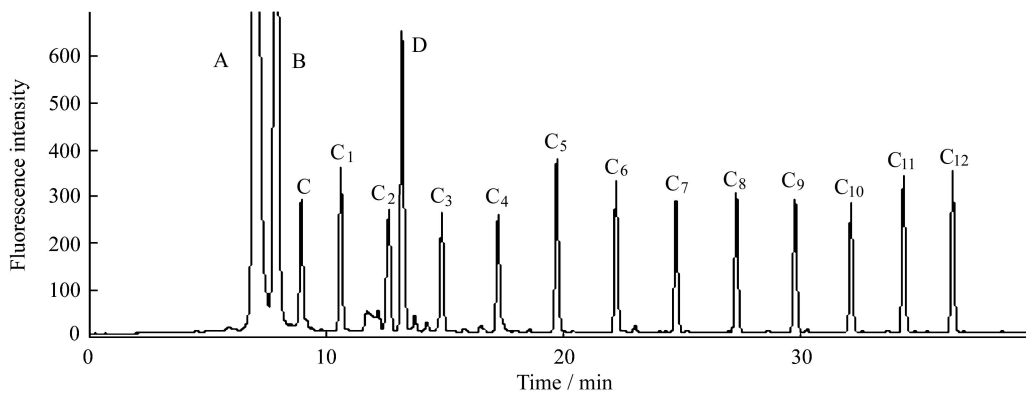


图 1 标准脂肪胺衍生物的色谱图 (50 pmol, 荧光检测)

Fig. 1 Chromatograms for standard aliphatic amine derivatization

C<sub>1</sub>. methylamine; C<sub>2</sub>. ethylamine; C<sub>3</sub>. propylamine; C<sub>4</sub>. butylamine; C<sub>5</sub>. pentylamine; C<sub>6</sub>. hexylamine; C<sub>7</sub>. heptylamine; C<sub>8</sub>. octylamine; C<sub>9</sub>. nonylamine; C<sub>10</sub>. decylamine; C<sub>11</sub>. undecylamine; C<sub>12</sub>. dodecylamine; A and B are reaction intermediates; C. 2-(2-(anthracen-9-yl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl) acetic acid; D. unknown.

表 1 质谱数据

Table 1 Mass data

Aliphatic amine derivatives	MS( <i>m/z</i> ) (M + H) <sup>+</sup>	MS-MS( <i>m/z</i> )	Aliphatic amine derivatives	MS( <i>m/z</i> ) (M + H) <sup>-</sup>	MS-MS( <i>m/z</i> )
C <sub>1</sub>	366.8	295.8, 307.8, 335.8	C <sub>7</sub>	450.8	295.6, 307.6, 335.6
C <sub>2</sub>	380.8	295.5, 307.7, 335.7	C <sub>8</sub>	464.8	295.5, 307.6, 335.6
C <sub>3</sub>	394.8	295.7, 307.7, 335.8	C <sub>9</sub>	478.7	295.5, 307.4, 335.5
C <sub>4</sub>	408.8	295.7, 307.7, 335.6	C <sub>10</sub>	492.8	295.5, 307.4, 335.3
C <sub>5</sub>	422.8	295.6, 307.7, 335.6	C <sub>11</sub>	506.8	295.5, 307.5, 335.4
C <sub>6</sub>	436.8	295.6, 307.5, 335.8	C <sub>12</sub>	520.8	295.6, 307.5, 335.7

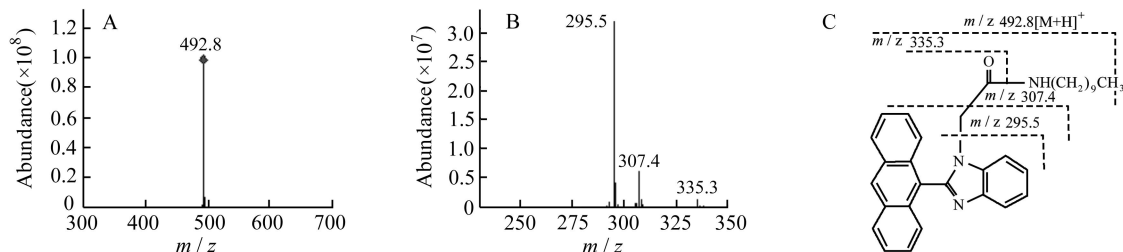


图 2 ABIA-癸胺衍生物质谱图

Fig. 2 The APCFMS/MS spectra of representative decylamine derivative

(A) MS spectra; (B) MS/MS spectra; (C) mode of fragmentation.

表 2 脂肪胺衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限与保留时间和峰面积的重现性 (n = 6)

Table 2 Analytical performance for aliphatic amines of this method (n = 6)

Aliphatic amine	Regression equation	Correlation coefficient	Detection limit (fmol)	RSD (%)	
				Retention time	Peak area
C <sub>1</sub>	$Y = 61.34X + 18.28$	0.9997	13.02	0.03027	0.9336
C <sub>2</sub>	$Y = 58.86X + 18.02$	0.9997	19.08	0.04297	1.4523
C <sub>3</sub>	$Y = 51.28X + 7.441$	0.9992	19.53	0.05965	1.9125
C <sub>4</sub>	$Y = 51.93X + 7.560$	0.9990	18.23	0.02827	0.7305
C <sub>5</sub>	$Y = 70.40X + 22.16$	0.9997	15.19	0.02089	0.6464
C <sub>6</sub>	$Y = 61.83X + 16.89$	0.9998	17.09	0.02319	0.6365
C <sub>7</sub>	$Y = 54.55X + 16.24$	0.9998	11.72	0.03416	1.0868
C <sub>8</sub>	$Y = 60.84X + 13.75$	0.9995	25.63	0.02356	0.6899
C <sub>9</sub>	$Y = 56.46X + 13.24$	0.9998	18.22	0.02447	0.7284
C <sub>10</sub>	$Y = 56.66X + 8.014$	0.9996	19.08	0.03165	0.9967
C <sub>11</sub>	$Y = 63.02X + 20.75$	0.9996	14.39	0.03694	1.1214
C <sub>12</sub>	$Y = 64.66X + 20.86$	0.9996	13.67	0.04285	1.4124

### 2.5 实际样品中脂肪胺的测定

衍生和色谱分离按照前述优化的条件进行,所得土壤中的脂肪胺衍生物色谱分离图如图 3。脂肪胺含量的测定结果见表 3。

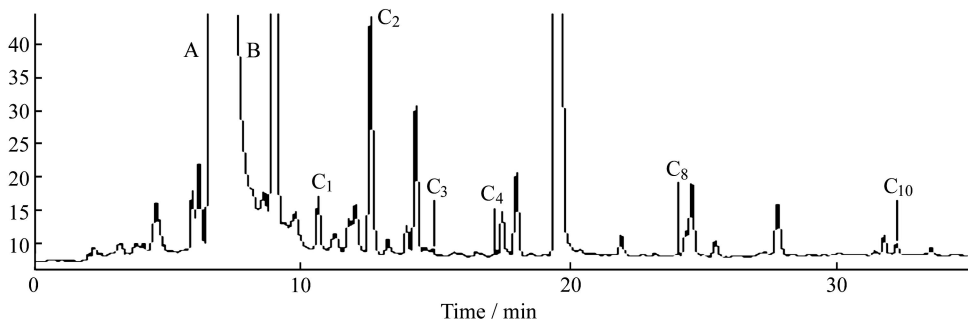


图 3 土壤中脂肪胺的色谱分析图  
Fig.3 Chromatogram of aliphatic amine in soil

### 2.6 回收率实验

在土壤样品中加入 10 μL 浓度为 5.0 ×10<sup>-4</sup> mol/L 脂肪胺标准品后,按照上述提取方法提取后进行衍生并测定,所得回收率结果见表 3。

表 3 实际样品中各脂肪胺的含量测定及回收率  
Table 3 Content and recoveries of aliphatic amines for soil samples

Amine derivatives	Amines in soil (ng/ g)	Recoveries (%)	Amine derivatives	Amines in soil (ng/ g)	Recoveries (%)
C <sub>1</sub>	0.087	98.6	C <sub>7</sub>	-	100.8
C <sub>2</sub>	0.85	102.6	C <sub>8</sub>	0.0079	89.9
C <sub>3</sub>	0.043	93.2	C <sub>9</sub>	-	103.4
C <sub>4</sub>	0.0093	90.1	C <sub>10</sub>	0.094	99.3
C <sub>5</sub>	-	100.1	C <sub>11</sub>	-	99.8
C <sub>6</sub>	-	101.2	C <sub>12</sub>	-	102.2

- :Not detected.

## 3 结论

本文采用新型荧光试剂 2-(2-(10-苄基)-苯并咪唑)-乙酸 (ABIA) 对 12 中游离脂肪胺进行柱前衍生,对衍生化和色谱条件进行了优化,方法线性范围宽,重现性好,试剂与脂肪胺的衍生效率高、产物稳定,对土壤中脂肪胺的测定结果满意。

### 参考文献:

- [1] ZHU Li-li(朱丽丽),WANG Yun(汪云),CAO Yu-hua(曹玉华).Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J], 2009,25(3):344.
- [2] WANG Hong(王红),LIU Xun(刘勋),ZHANG Hua-shan(张华山),CHENG Jie-ke(程介克).Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J],1999,15(6):472.
- [3] Martin Ahnoff, Inger Grundevik, Anders Arfwidsson, Jan Fonselius, Bengt-Arne Persson. Analytical Chemistry [J], 1981,53(3):485.
- [4] Stefan Einarsson, Staffan Folestad, Bjoern Josefsson, Soeren Lagerkvist. Analytical Chemistry [J], 1986,58(8):1638.
- [5] Cohen S A, Michaud D P. Analytical Biochemistry [J], 1993,211:279.
- [6] Liu Hong Ji. Journal of Chromatography A [J], 1994,670:59.
- [7] Stobaugh J F, Repta A J, Sternson L A, Garren K W. Analytical Biochemistry [J], 1983,135:495.
- [8] Peter Lindroth, Kenneth Mopper. Analytical Chemistry [J], 1979,51:1667.

- [9] Einarsson S, Josefsson B, Lagerkvist S. *Journal of Chromatography A* [J], 1983, **282**:609.
- [10] Karin Gartenmann, Sunil Kochhar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [J], 1999, **47**(12):5068.
- [11] Cohen Steven A, Kathryn M, De Antonis. *Journal of Chromatography A* [J], 1994, **661**:25.
- [12] Yang Jinghe, Zhang Guiling, Wu Xia, Huang Fang, Lin Cunguo, Cao Xihui, Sun Limei, Ding Yuanju. *Analytica Chimica Acta* [J], 1998, **363**:105.

## Determination of Aliphatic Amines in Soil Using Novel Pre-Column Derivatization Reagent with High Performance Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry Identification

QIN Xue-qin<sup>1</sup>, SUN Zhi-wei<sup>2,3</sup>, FU Yan-yan<sup>1</sup>, LI Xiao-yan<sup>1</sup>,  
SUO You-rui<sup>2</sup>, LI Yu-lin<sup>2</sup>, YOU Jin-mao<sup>\*1,2</sup>

(1. *The Key Laboratory of Life-Organic Analysis, Qufu Normal University, Qufu 273165;*

2. *Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001;*

3. *Graduate University of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049*)

**Abstract:** A simple and highly sensitive method based on the derivatization of aliphatic amines with 2-(2-(anthracen-9-yl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl) acetic acid (ABIA) as the novel pre-column derivatization reagent followed by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and on line mass spectrometric identification was developed. Derivatization was obtained by the reaction of aliphatic amines with ABIA at 50 °C for 20 min in the presence of N-ethyl-N-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) in acetonitrile solvent. Derivatives were sufficiently stable to be efficiently analyzed by high performance chromatography without pretreatment. On a reversed phase Akasil-C18 column, twelve aliphatic amine derivatives (C<sub>1</sub> ~ C<sub>12</sub>) were separated under gradient elution with an excitation maximum at  $\lambda_{ex}$  260 nm and an emission maximum at  $\lambda_{em}$  430 nm. The precise determining aliphatic amines in soil samples was obtained by post-column on line mass spectrometric identification with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source under positive mode detection. The established method exhibited excellent reproducibility and recovery. Linear responses were observed with coefficients over 0.9990. The detection limits (at signal-to-noise ratio of 3:1) were 11.72 ~ 25.63 fmol.

**Keywords:** High performance liquid chromatography-mass spectrometry; Fluorescence detection; Pre-column derivatization; Aliphatic amines