

2-(11H-苯[a]咔唑)-乙酸在脂肪胺的高效液相色谱分离及质谱鉴定中的应用

户宝军¹, 孙志伟², 尤进茂^{1,2}

(1. 曲阜师范大学 山东省生命有机分析重点实验室, 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)

摘要: 采用新型荧光衍生试剂 2-(11H-苯[a]咔唑)-乙酸 (BCA) 进行柱前衍生并经荧光检测对脂肪胺进行高效液相色谱 (HPLC) 分离和质谱定性。衍生物荧光激发和发射波长为 $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 384 \text{ nm}$ 。60 °C 下在乙腈溶剂中用 N-乙基-N-(3-二甲氨基)丙基 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 作催化剂, 衍生反应 15 min 后获得稳定的荧光产物。在 Hypersil BDS C₁₈ (4.0 mm \times 200 mm, 10 μ m) 色谱柱上, 采用梯度洗脱对 12 种脂肪胺衍生物进行了优化分离。采用大气压化学电离源 (APCI Source) 正离子模式进行质谱定性, 实现了各种脂肪胺衍生物的快速、准确测定。脂肪胺的线性回归系数不小于 0.999 8, 检出限 (S/N = 3) 为 5.73 ~ 31.3 fmol。

关键词: 高效液相色谱 - 质谱; 荧光检测; 柱前衍生; 脂肪胺

中图分类号: O657.72; O623.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)08 - 0807 - 05

Determination of Aliphatic Amines Using Pre-column Derivatization and HPLC with Fluorescence and Mass Spectrometric Detections

HU Bao-jun¹, SUN Zhi-wei², YOU Jin-mao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Life-organic Analysis of Shandong Province, Qufu Normal University, Qufu 273165, China;

2. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: A simple and highly sensitive method based on the derivatization of aliphatic amines with 2-(11H-benzo[a]carbazol-11-yl)-acetic acid (BCA) followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection and mass spectrometric identification was developed. The fluorescence excitation and emission wavelengths of derivatives were set at $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$ and $\lambda_{em} = 384 \text{ nm}$, respectively. A stable fluorescent derivative was obtained by reacting of with BCA at 60 °C for 15 min in the presence of N-ethyl-N-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) as catalyst in acetonitrile solvent. The separation of the derivatized amines with a good baseline resolution was achieved on a reversed-phase Hypersil BDS C₁₈ (4.0 mm \times 200 mm, 10 μ m) column with a gradient elution. The identifications of aliphatic amine derivatives were carried out by mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source under positive-ion mode detection. The established method exhibited excellent reproducibility and recovery. Excellent linear responses were observed with correlation coefficients no less than 0.999 8, detection limits (signal-to-noise ratio of 3 : 1) of 5.73 - 31.3 fmol.

Key words: HPLC - MS; fluorescence detection; pre-column derivatization; aliphatic amines

脂肪胺类化合物由于其毒性及反应活性已成为环境检测中倍受关注的一类化合物。该类化合物的测定, 对环境化学、生物学、毒物学和临床化学具有重要意义。脂肪胺通常无紫外吸收, 或本身不具发光特性, 需要进行化学衍生。虽然测定胺类化合物的荧光试剂较多^[1-4], 但多数试剂在应用中存在缺陷, 继续开发灵敏度高且简便易行的试剂仍然十分必要。

多环含氮杂原子的化合物通常显示出较强的光致发光特性^[5-6], 含咔唑母体环类的衍生物为其中的一类。本文在前期研究的基础上^[7-10], 将 1, 2-苯并-3, 4-二氢咔唑母体环经 1, 4-四氯苯醌脱氢处理获

收稿日期: 2007 - 12 - 03; 修回日期: 2008 - 01 - 12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20075016)

第一作者: 户宝军 (1982 -), 男, 山东淄博人, 硕士研究生

通讯作者: 尤进茂, Tel: 0537 - 4458501, E-mail: jnyou6304@163.com

得四环并联且含有氮杂原子的高共轭程度的 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 母体环, 再对母体环进行修饰后获得 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙酸 (BCA)。60 °C 下在乙腈溶剂中用 N-乙基-N'-(3-二甲氨基) 丙基 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 作催化剂, 15 min 内可实现脂肪胺的完全衍生化。所得产物稳定、产率高, 衍生溶液不需预处理可直接进样分析。采用乙腈-水进行梯度洗脱实现了 C₁~C₁₂ 脂肪胺衍生物的完全基线分离。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 型高效液相色谱-质谱联用仪 (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 Source), SL 型离子阱质谱仪 (MSD Trap), Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (4.0 × 200 mm, 10 μm, 大连依利特公司), 650-10S 型荧光分光光度计 (日本日立公司)。

2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙酸 (自制), 12 种脂肪胺 (甲胺 (methylanine)、乙胺 (ethylamine)、丙胺 (propylanine)、丁胺 (butylanine)、戊胺 (pentylanine)、己胺 (hexylanine)、庚胺 (heptylanine)、辛胺 (octylanine)、壬胺 (nonylanine)、癸胺 (decylanine)、十一胺 (undecylanine)、十二胺 (dodecylanine)) 标准样品及 EDC 均购自 Sigma 公司, 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 标准溶液的配制

用光谱纯乙腈将脂肪胺标准品配成 0.01 mol/L 的溶液, 并用光谱纯乙腈将其稀释成 0.1 mmol/L 的标准溶液。称取 16.45 mg BCA 用光谱纯乙腈定容至 10 mL, 浓度为 6.0 mmol/L。称取 0.1917 mg 的 EDC 溶于 10 mL 光谱纯乙腈配成 0.1 mol/L 的溶液。

1.3 脂肪胺的衍生化

向 2 mL 安培瓶中依次加入 60 μL EDC、50 μL 脂肪胺标准样品、60 μL 衍生试剂溶液 (BCA), 密封后于 60 °C 水浴中反应 15 min。

1.4 色谱及质谱条件

Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱。流动相 A: 30% (体积分数) 乙腈水溶液; B: 100% (体积分数) 的色谱纯乙腈。B 在 35 min 内从 30% 梯度到 100%, 保持 5 min。流速为 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C。荧光激发和发射波长分别为: λ_{ex} = 285 nm, λ_{em} = 384 nm。

质谱条件: 大气压化学电离源, 正离子模式, 喷雾压力 414 kPa, 干燥气流速为 5 L/min, 干燥气温度 350 °C, 气化温度 400 °C, 毛细管电压 3500 V, 电晕电流 4000 nA (Pos)^[11-12]。

1.5 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙酸 (BCA) 的合成

在 1000 mL 圆底烧瓶中加入 16 g 11H 苯 [a] 咪唑、640 mL 二甲亚砜, 开始搅拌并加热至 100 °C。称取 80 g 氢氧化钾在 20 min 内分批加入。烧瓶内溶液在 100 °C 下搅拌 30 min, 然后将 64 mL 溴乙酸乙酯在 1.5 h 内滴加完, 温度保持在 100 °C 下继续反应 1 h, 溶液逐渐转变为暗黄色。将烧瓶内的混合溶液冷却至室温后倒入 2000 mL 烧杯中并加入 1000 mL 水, 搅拌、过滤除掉杂质, 滤液用盐酸调至酸性, 析出大量白色固体, 将析出的固体用氢氧化钾水溶液溶解, 调 pH 值为 8, 过滤除去杂质, 再用盐酸中和至弱酸性, 析出固体。此过程重复 3 次, 产率为 90%。所得固体用甲苯重结晶 3 次, 得白色片状晶体。熔点 (m.p.): 199.9 ~ 203.5 °C。IR (KBr): 2974.92 (二聚, —OH), 1644.38 (C=O), 1408.96, 1384.32, 1089.81, 1049.27, 743.10 cm⁻¹; APCI (M+H)⁺: m/z 276.5。

2 结果与讨论

2.1 BCA 与衍生物的光谱性质

2.1.1 紫外光谱对比 按照朗伯-比尔定律, BCA 在乙腈中最大吸收波长 253 nm 处的摩尔吸光系数 ε = 3.81 × 10⁴ L · mol⁻¹ · cm⁻¹。比另两种胺类荧光衍生试剂 (2-(9H 吡啶酮) 乙酸 (AAA) (ε = 2.37 × 10⁴ L · mol⁻¹ · cm⁻¹)^[13]、1, 2 苯并-3, 4-二氢咪唑-9-乙酸 (BCAA) (ε = 1.92 × 10⁴ L · mol⁻¹ · cm⁻¹)^[14]) 的摩尔吸光系数 (ε) 大。这说明荧光衍生试剂的分子结构是其具有高荧光灵敏度的基础和原

因, 为更灵敏荧光衍生试剂的设计合成提供了依据。

2.1.2 荧光强度对比 在相同的实验条件下, 对 BCA、AAA 和 BCAA 三者对胺类化合物的灵敏度进行对比研究, 结果表明: 三者对 12 种胺类衍生物的荧光检测响应存在明显差异, BCA 对胺类化合物表现出更强的荧光。 $I_{BCA} / I_{AAA} = 1.70 \sim 2.45$; $I_{BCA} / I_{BCAA} = 1.47 \sim 2.07$ (I : 相同条件下的相对荧光强度)。

2.2 衍生条件的优化

衍生反应的时间、温度及衍生试剂与 EDC 用量对 2-(11H 苯 [a] 吡唑) 乙酸对脂肪胺的衍生化反应有明显的影响, 以丙胺、己胺、辛胺、十二胺为例, 对上述 4 个因素进行了优化。结果表明: 在其他因素一定的情况下, 60 时具有最高衍生生产率 (见图 2A), 随着温度的上升有副反应发生, 产率下降, 衍生反应 15 min 后衍生产物信号强度稳定, 作者选择在 60 时衍生反应 15 min。衍生试剂达到脂肪胺总量的 6 倍以后产物信号强度基本稳定 (见图 2B), EDC 用量为 60 μL 时产率最高。

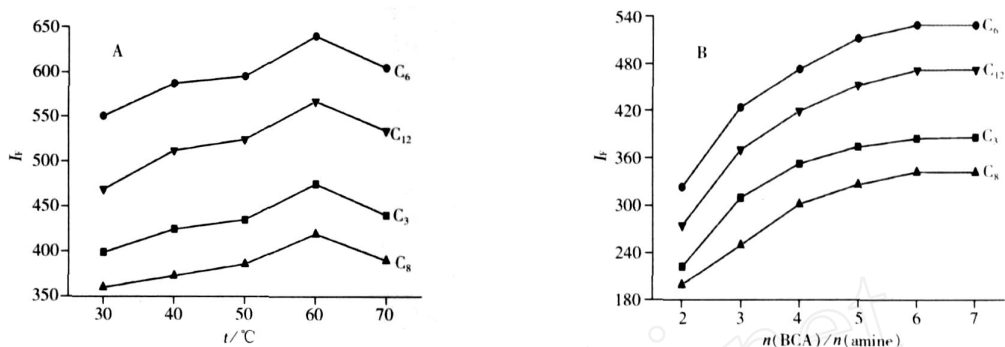


图 2 温度 (A) 和衍生试剂用量 (B) 对脂肪胺衍生生产率的影响

Fig. 2 Influences of temperature (A) and concentration of derivatization reagent (B) on derivation efficiency of aliphatic amines
C₃: propylamine (丙胺); C₆: hexylamine (己胺); C₈: octylamine (辛胺); C₁₂: dodecylamine (十二胺)

2.3 标准品的色谱分离及质谱鉴定

在 Hypersil BDS C₁₈ (4.0 mm \times 200 mm, 10 μm , 大连依利特公司) 色谱柱上用乙腈 - 水作流动相, 采用梯度洗脱在 40 min 内实现了 12 种 (C₁ ~ C₁₂) 直链脂肪胺衍生物的完全基线分离, 结果见图 3。采用大气压化学电离源 (APCI Source) 正离子模式进行在线的柱后质谱定性, 各组分质谱数据见表 1。以辛胺为例的裂解谱图见图 4。

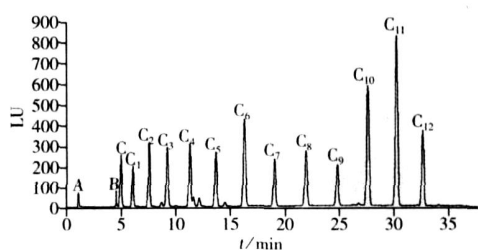


图 3 标准脂肪胺衍生物的色谱图

Fig. 3 Chromatogram for standard aliphatic amines derivatized with BCA

C₁: methylamine; C₂: ethylamine; C₃: propylamine; C₄: butylamine;
C₅: pentylamine; C₆: hexylamine; C₇: heptylamine; C₈: octylamine;
C₉: nonylamine; C₁₀: decylamine; C₁₁: undecylamine; C₁₂: dodecylamine;

A: derivatization reagent; B and C: intermediates; chromatographic conditions as described in experimental section

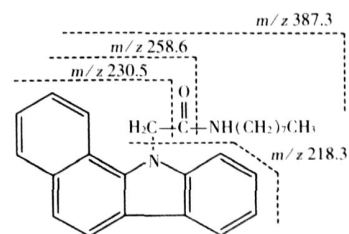


图 4 辛胺衍生物的裂解模式

Fig. 4 Fragmentation pathways for octylamine derivative

表 1 质谱数据

Table 1 Mass spectrometric data of aliphatic amines

Aliphatic amine derivatives	MS data m/z [M + H] ⁺	MS/MS data m/z	Aliphatic amine derivatives	MS data m/z [M + H] ⁺	MS/MS data m/z
C ₁	289.3	230.4, 218.1	C ₇	373.4	258.4, 230.3, 217.9
C ₂	303.3	258.6, 230.5, 217.6	C ₈	387.3	258.6, 230.5, 218.3
C ₃	317.2	258.3, 230.4, 218.4	C ₉	401.3	258.3, 230.4, 216.5
C ₄	331.4	258.5, 230.4, 217.7	C ₁₀	415.2	258.3, 230.3, 217.2
C ₅	345.4	258.6, 230.5, 218.3	C ₁₁	429.3	258.2, 230.3, 217.6
C ₆	359.4	258.8, 230.4, 217.5	C ₁₂	443.2	258.7, 230.2, 216.7

2.4 线性回归方程及检出限

进样量在 100 pmol~50 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 0.999 8 以上, 检出限为 5.73~31.33 fmol(按 $S/N=3$ 计算)。

表 2 脂肪胺衍生物的线性回归方程、相关系数和检出限以及实际样品中脂肪胺的含量与回收率
Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients and detection limits of aliphatic amine derivatives, and contents of aliphatic amines in a real sample and corresponding recoveries

Amine derivatives	Linear regression equation [*]	Correlation coefficient <i>r</i>	Detection limits <i>n</i> /fmol	Retention time RSD <i>s_r</i> /%	Peak area RSD <i>s_r</i> /%	Soil sample		Waste water sample	
						Content <i>w</i> /(ng·g ⁻¹)	Recovery <i>R</i> /%	Content /($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery <i>R</i> /%
C ₁	$Y=43.95X+5.98$	0.999 9	11.19	0.087	1.69	- **	100	1.64	106
C ₂	$Y=59.13X+1.66$	0.999 9	15.16	0.083	1.45	-	99	-	105
C ₃	$Y=50.20X+3.49$	0.999 9	13.06	0.084	1.25	17.57	100	-	109
C ₄	$Y=56.63X+12.10$	0.999 9	16.21	0.073	1.37	15.27	119	-	99
C ₅	$Y=50.82X+11.50$	0.999 9	23.50	0.065	1.30	17.02	108	5.46	112
C ₆	$Y=84.32X+10.47$	0.999 9	12.05	0.050	1.56	7.79	113	-	103
C ₇	$Y=48.81X-7.47$	0.999 8	12.70	0.033	2.39	24.89	104	-	102
C ₈	$Y=57.39X-4.36$	0.999 9	21.36	0.030	1.30	19.92	101	-	105
C ₉	$Y=45.2X-7.38$	0.999 9	31.33	0.030	1.44	30.97	103	2.64	98
C ₁₀	$Y=122.39X+9.53$	0.999 9	8.70	0.020	1.37	13.29	110	0.33	107
C ₁₁	$Y=168.57X+13.67$	0.999 9	5.73	0.020	1.37	3.39	115	0.22	114
C ₁₂	$Y=72.52X+3.32$	0.999 9	10.93	0.022	1.68	6.56	112	0.44	113

* *X*: injected amount(pmol), *Y*: peak area; ** unidentified

2.5 重复性实验

在相同洗脱条件下, 对 50 pmol 脂肪胺衍生物进行平行 6 次分析, 保留时间和峰面积的重复性见表 2, 保留时间的相对标准偏差不大于 0.087%, 峰面积的相对标准偏差不大于 2.39%。

2.6 实际样品的色谱分离

2.6.1 土壤与造纸厂污水中脂肪胺的提取 称取土壤 100 g (取自曲阜师范大学化学楼南侧), 用 200 mL 氯仿分 2 次超声振荡提取, 合并提取液过滤, 滤液加 2.0 mL 甲酸, 超声振荡 30 s 使其转变为相应脂肪胺的有机盐, 溶剂减压蒸发至干, 用 2.0 mL 80% (体积分数) 乙腈 - 水溶液溶解冷藏备用。

取 50 mL 造纸厂污水 (取自曲阜造纸厂) 用 HC 调至 pH 3.0 左右, 超声振荡 30 s 使其转变为相应脂肪胺的有机盐, 然后过滤, 浓缩定容到 10 mL, 提取液冷藏备用。

2.6.2 土壤中脂肪胺的测定 按前述实验条件, 对土壤 (见图 5) 和污水提取液 (图略) 进行了色谱分析, 脂肪胺含量的测定结果见表 2。

2.6.3 回收率实验 在土壤和污水样品中加入一定量脂肪胺标准品后, 按照上述提取方法提取后进行衍生, 所得回收率结果见表 2。

参考文献:

- [1] AHNOFF M, GRUNDEV IK I, ARFW DSSON A, et al. Derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofuran for liquid chromatographic determination of hydroxyproline in collagen hydrolysate[J]. Anal Chem, 1981, 53(3): 485 - 489.
- [2] ENARSSON S, FOLESTAD S, JOSEFSSON B, et al. High-resolution reversed-phase liquid chromatography system for the analysis of complex solution of primary and secondary amino acids[J]. Anal Chem, 1986, 58(8): 1638 - 1643.
- [3] STEVEN A C, DENNIS P M. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1993, 2(11): 279 - 287.
- [4] LU Hongji. Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate[J].

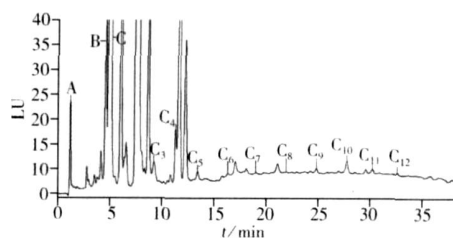


图 5 土壤样品中游离脂肪胺的色谱分离图

Fig. 5 Chromatograms of aliphatic amines from a soil sample see Fig. 3 for peak identifications

- banate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. J Chromatogr. A, 1994, 670: 59 - 66.
- [5] YOU Jimao, SHAN Yichu, ZHEN Liang, et al. Determination of peptides and amino acids from wool and beer with sensitive fluorescent reagent 9-(2-carbazole)-ethyl chloroformate by reverse phase high performance liquid and liquid chromatography mass spectrometry[J]. Anal Biochem, 2003, 313(1): 17 - 27.
- [6] YOU Jimao, ZHANG Weibing, JIA Xianglan, et al. An improved derivatization method for the sensitive determination of fatty acids by high-performance liquid chromatography using 9-(2-hydroxyethyl)-carbazole as derivatization agent with fluorescence detection[J]. Chromatographia, 2001, 54(5/6): 316 - 322.
- [7] YOU Jimao, ZHANG Weibing, ZHANG Yukui. Simple derivatization method for sensitive determination of fatty acids with fluorescence detection by high-performance chromatography using 9-(2-hydroxyethyl) carbazole derivatization reagent [J]. Anal Chim Acta, 2001, 436(1): 163 - 172.
- [8] YOU Jimao, SHI Yunwei, MENG Yongfei, et al. Development of a sensitive reagent 1, 2-benzo-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(9/10): 527 - 535.
- [9] YOU Jimao, CHEN Xiangning, ZHAO Xianen, et al. Pre-column derivatization of amines with 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-isopropyl chloroformate followed by LC-fluorescence and LC - APCI - MS [J]. Chromatographia, 2006, 63(7/8): 337 - 343.
- [10] 陈国防, 张维冰, 尤进茂, 等. 氯甲酸 2-(9 咪唑) 乙基酯柱前衍生化 HPLC 法用于环境水中脂肪胺测定 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(1): 28 - 31.
- [11] KARNE N, JEAN-LUC W, KURT H. Determination of trace amounts of ginkgolic acids in Ginkgo biloba L. leaf extracts and phytopharmaceuticals by liquid chromatography - electrospray mass spectrometry [J]. J Chromatogr. B, 2000, 744: 249 - 255.
- [12] FRISO S, CHOISW, GREGORY G, et al. A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2002, 74: 4526 - 4531.
- [13] 赵先恩, 石运伟, 陈向明, 等. 脂肪胺荧光衍生物的高效液相色谱分离及质谱鉴定 [J]. 化学研究, 2005, 16(2): 66 - 69.
- [14] 陈向明, 石运伟, 赵先恩, 等. 脂肪胺的高效液相色谱分离及质谱鉴定 [J]. 色谱, 2005, 23: 642 - 645.
- [15] 东北师范大学. 分析化学 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 277 - 281.

(上接第 806 页)

- [5] HE Tingchao, LI Pengwei, MO Yujun, et al. SERS-measured and DFT-calculated vibrational spectra of *p*-aminoazobenzene[J]. Eur Phys J Appl Phys, 2007, 38: 15.
- [6] 贺廷超, 贾廷见, 莫育俊, 等. 甲基橙在银镜衬底上的表面增强拉曼光谱研究 [J]. 光散射学报, 2007, 19: 6 - 10.
- [7] 丁丽, 张建奇, 莫育俊, 等. 激光刻蚀法制备银纳米颗粒及其光谱特性研究 [J]. 光散射学报, 2007, 19: 102 - 106.
- [8] 杜亚冰, 蔡志鹏, 莫育俊, 等. AAO 模板法制备 CdS 纳米微粒的 SERS 光谱研究 [J]. 光散射学报, 2007, 19: 206 - 211.
- [9] ZHANG Ling, BAI Ying, MO Yujun, et al. Experimental and theoretical studies of Raman spectroscopy on 4-mercaptopyridine aqueous solution and 4-mercaptopyridine/Ag complex system [J]. J Raman Spectrosc, 2007, 38(9): 1106 - 1111.
- [10] HE Tingchao, CHENG Yongguang, MO Yujun. Z-scan determination of third-order nonlinear optical nonlinearity of three azobenzenes doped polymer films [J]. Opt Commun, 2007, 275: 240.
- [11] KNEIPP K, KNEIPP H, ITZKAN I, et al. Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy [J]. Chem Rev, 1999, 99(10): 2957 - 2976.
- [12] LEE P C, MEISEL D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols [J]. J Phys Chem, 1982, 86(17): 3391 - 3395.
- [13] PARK SM, KM K, KMM S. Raman spectroscopy of isonicotinic acid adsorbed onto silver sol surface [J]. J Mol Stru, 1994, 328: 169 - 178.
- [14] LAURA R, SANCHEZ - CORTES S, ARCA - RAMOS J V. Raman structural study of thymine and its 2'-deoxy-ribosyl derivatives in solid state, aqueous solution and when adsorbed on silver nanoparticles [J]. Phys Chem Chem Phys, 2002, 4: 1943 - 1948.
- [15] WANG Yu, LI Yingsing, ZHANG Zenxin, et al. Surface-enhanced Raman scattering of some water insoluble drugs in silver hydrosols [J]. Spectrochim Acta Part A, 2003, 59: 589 - 594.