2009年 6月

研究报告

2-[2-(7H-二苯并[a,g]咔唑)-乙氧基]-乙基氯甲酸酯对 脂肪胺类化合物的荧光标记及质谱鉴定

闫涛¹ 孙学军¹ 赵怀鑫¹ 孙志伟¹ 刘钦泽¹ 索有瑞² 尤进茂^{*1,2} ¹(曲阜师范大学化学与化工学院,山东省生命有机分析重点实验室,曲阜 273165) ²(中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810001)

摘 要 利用新型荧光标记试剂 2-[2-(7H二苯并 [a,g]咔唑 乙氧基)乙基氯甲酸酯作为柱前衍生化试剂, 在 Eclipse XDB-C₈反相色谱柱上,采用梯度洗脱,实现了 12种脂肪胺类化合物完全基线分离。检测最佳激发 和发射波长分别为 300和 400 nm。通过荧光检测及离子阱大气压化学电离源 (APCI Source)正离子模式实现 了在线的柱后质谱鉴定。对土壤中脂肪胺类化合物的测定快速、准确,具有良好的重现性。荧光定量检测的 回归系数大于 0.9991;检出限为 10.1~0.3 fmol

关键词 液相色谱 质谱,荧光标记,柱前衍生,脂肪胺

1 引 言

脂肪胺广泛分布于自然界中,因其毒性大、反应活性高而在环境监测和食品安全检测中备受关注。 快速准确地测定胺类化合物对环境化学、生物学、毒物学和临床医学具有重要意义。脂肪胺类化合物通 常无紫外吸收(或者仅有弱的紫外吸收),也不具备荧光发光性质,因此进行化学衍生是提高该类化合 物检测灵敏度的有效途径。高效液相色谱荧光衍生化中,广泛应用的衍生试剂主要有邻苯二甲醛 (OPA)^[1~3]、4氯-7硝基苯并-1,2,3噁二唑(NBD-CI)^[4]、1二甲氨基萘-5磺酰氯(DNS-CI)^[5]、芴甲氧 羰基氯(FMOC-CI)^[6,7]和 6氨基喹啉基 N琥珀酰亚胺碳酸酯(AQC)^[8,9]。这些衍生试剂在实际应用中 都存在一些缺陷,例如 OPA只与伯胺反应且重现性和相应衍生物的稳定性较差;NBD-CI试剂在水溶液 中的稳定性较差,见光容易分解;DNS-CI除稳定性差外,衍生物伴有荧光猝灭现象,造成检测灵敏度下 降;FMOC-CI衍生化需要经过萃取处理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;AQC在水中的量子效率很低,不利于梯度洗脱。因此研制开发高灵敏且价廉的发光材料用于它们 的测定,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^[10,11],含咔唑母体环类的衍生物则为其中的一类,该类化合物在本实验室中得到较好的应用^[12~14]。在此基础上,本实验合成了新型荧光衍生试剂 2-[2-(7H-二苯并 [a,g]咔唑 乙氧基)乙基氯甲酸酯 (DBCEC-Cl),其分子内含 1个氮杂原子并具有五环并联的高共轭体系。与先前制备四环并联的共轭体系 BCEC-Cl^{15]}相比,具有更强烈的光致发光性质。与同类试剂相比,衍生化简便、快速,衍生物稳定性好,具有较高的检测灵敏度和较宽的线性范围。对实际土壤样品中游离脂肪胺的测定结果满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100型离子阱液相色谱 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); Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (150 mm ×4.6 mm,

* E-mail: jmyou6304@163.com

²⁰⁰⁸⁻⁰⁹⁻²⁸收稿; 2008-12-23 接受

本文系国家自然基金 (Na 20075016)和中国科学院 "百人计划 "(Na 763)资助项目

5 μm,美国 Agilent公司)。AVANCE 400 MHz超导核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker公司); CARY300 Bio 型紫外 可见分光光度计; Carlo-Erba 1106元素分析仪; WRS-1A 数字熔点仪(上海精密科学仪器有限 公司)。12种脂肪胺标准样品(美国 Signa公司);乙腈(色谱纯,中国禹王试剂公司);乙酸等其它试 剂均为分析纯,实验用水由 Milli-Q超纯水系统制备。

2.2 实验方法

221标准溶液的配制 准确称取适量脂肪胺标准品,用乙腈配成 0.01 mol/L的溶液,相应低浓度 脂肪胺标准液 (0.1 mmol/L)用乙腈稀释而成。称取 37.35 mg 2-[2-(7H二苯并 [a,g]咔唑 乙氧基) 乙 基氯甲酸酯 (DBCEC-C1)用乙腈定容至 10 mL,浓度为 0.01mol/L。低浓度的 DBCEC-C1溶液 (2.0 mmol/L)用乙腈稀释而成。

222 标准品衍生化 向 2 mL安培瓶中依次加入 150 µL硼酸缓冲液 (pH 9.0), 44 µL乙腈, 20 µL 脂肪胺标准样品, 36 µL衍生试剂,密封后于 30~40 水浴中反应 4 min。加入 10 µL 30%乙酸水溶 液和 740 µL 80%乙腈水溶液后,进样 10 µL。衍生反应如下。



2.3 实际样品的处理

称取 100 g土壤放入容量瓶中,用 160 mL 氯仿分两次超声振荡提取,合并滤液,加 2 mL 甲酸,超声振荡 20 s,使其变为相应脂肪胺的有机盐,溶剂减压蒸发至干。残余物用 3 mL 80%乙腈/水溶液溶解, 放入冰箱中冷藏,待测。

2.4 色谱及质谱条件

Eclipse XDB-C₈色谱柱 (150 mm x4. 6 mm, 5 µm)。流动相 A:水;流动相 B:乙腈。梯度条件:A: 0~25 min;由 40%梯度变化到 0%;B: 0~25 min,由 60%梯度变化到 100% (保持 5 min)。流速为 1.0 mL/min;进样量 10 µL;柱温 30 。荧光激发和发射波长分别为 300和 400 nm。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 3.5 kV,电晕电流 4000 µA (Pos)^[16,17]。

25 2-[2-(7H二苯并 [a, g]咔唑 乙氧基) 乙基氯甲酸酯 (DBCEC-CI)的制备 DBCEC-CI的合成路线如下:



2 5 1 1,2,5,6 二苯并 -3,4 二氢咔唑的合成 向 1000 mL 配备机械搅拌和回流冷凝管的三颈烧瓶中 加入 170 mL HCl, 500 mL水, 38 g萘肼,加热回流 1 h,滴加 22 mL四氢萘酮。滴加结束继续搅拌回流 1 h,冷却后水洗结晶,再用 75%乙醇溶液浸洗。风干后用甲苯重结晶并用活性炭脱色,得红褐色晶体,总产率约 80%。熔点 (mp.):193.7~194.2。元素分析:测定值,C 89.32%,H 5.61%,N 5.18%; 理论值,C 89.22%,H 5.57%,N 5.20%。 R(KBr压片):3403.56($_{N-H}$),3048.03(Ar),2952.89, 2882.32(Ar),1503.86(Ar),1392.13($_{C-N}$),802.21,765.83。LC-APC HMS: m/z 269.9(正离子模式);MS/MS: m/z 269.9(二级质谱未裂解)。¹H NMR (400 MHz, DMSO) : 11.90(s, 1H, N⁻⁻H), 7.12~8.35(m, 10H, AF⁻H),3.12(t, 2H, C⁻⁻C⁻⁻CH₂),3.25(t, 2H, AF⁻⁻CH₂)。

2.5.2 7H 二苯并 [a.g] 咔唑的合成 向 500 mL 配备机械搅拌和回流冷凝管的三颈烧瓶中加入

450 mL二甲苯, 30 g 1, 2, 5, 6二苯并 -3, 4 二氢咔唑, 28 g四氯苯醌, 室温下搅拌 0.5 h, 加热回流 2 h, 放置过夜, 过滤, 滤出物用 10 % NaOH溶液洗至滤液为无色,风干后用甲苯重结晶,得白色固体,产率 约 85%。熔点 (mp.): 233.3 ~ 234.2;元素分析:测定值, C 90.20%, H 4.52%, N 5.20%; 理论值, C 90.23%, H 4.51%, N 5.26%。 **R** (KBr压片): 3432 34(_{N-H}), 3048.09 (Ar), 1382.09, 1363.75 (C⁻⁻N), 808.79, 741.12。LC-APC FMS: *m*/*z* 268.0 (正离子模式); MS/MS: *m*/*z* 268.0 (二级质谱未 裂解)。¹H NMR (400 MHz, DMSO) : 12.75 (s, 1H, N⁻⁻H), 7.48 ~ 8.89 (m, 12H, Ar⁻⁻H)。

25.3 2-(7H三苯并 [a, g]咔唑乙氧基)乙醇的合成 向 250 mL单口圆底烧瓶中加入 15 g 7H三苯并 [a, g]咔唑, 13 g碳酸亚乙酯, 痕量 KOH, 100 mL DMF。内溶物迅速加热回流 6 h, 冷却, 倒入 1000 mL 冰水中, 过滤, 固体用甲苯重结晶 3次, 得白色针状晶体。总产率约 80%。熔点 (mp.): 143.7~144.8; 元素分析:测定值, C 81.08%, H 5.89%, N 3.96%; 理论值, C 81.13%, H 5.91%, N 3.94%。 **R** (KB r压片): 3286.34 (_{0-H}), 2860.89 (Ar), 1122.59 (_{0-H}), 805.30, 737.90。LC-APC FMS: *m*/*z* 356.2 (正离子模式); MS/MS: *m*/*z* 294.1 (二级质谱裂解后得到母核分子)。¹H NMR (400 MHz, DMSO) 4.52 (t, 1H, O⁻H), 7.51~8.91 (m, 12H, Ar⁻H), 3.44 (t, 2H, H⁻CHOH), 3.56 (t, 2H, OCH₂), 4.52 (t, 2H, CH₂O), 5.24 (t, 2H, NCH₂)。

2 5.4 2-[2-(7H三苯并[a,g]咔唑乙氧基)乙基氯甲酸酯(DBCEC-Cl)的合成向 500 mL配有电磁搅拌的单口圆底烧瓶中加入 10 g固体光气,100 mL二氯甲烷,冰浴冷却条件下,加少量吡啶作催化剂,将溶有 7 g 2-(7H-二苯并[a,g]咔唑)乙醇的 200 mL二氯甲烷溶液缓慢地于 2 h内滴加到上述冷却溶液中,0 搅拌反应 4 h,将反应液温度升至室温保持 6 h。过滤,滤液用旋转蒸发仪减压蒸干,剩余物用 100 mL无水乙醚萃取 3次,浓缩后用无水乙醚重结晶 2次,得白色固体,产率 70%。熔点(mp): 60.5~61.5 。元素分析:测定值,C71.80%,H4.75%,N3.37%;理论值,C71.85%,H4.79%,N3.35%。 **R**(KBr压片): 3057.01, 2863.16(Ar), 1773.84(C=O), 1527.71, 1363.75, 1165.15(C=N),805.54^{,1}H NMR(400 MHz, DMSO) : 7.58~8.91(m, 12H, Ar=H), 3.48(t, 2H, OCH₂), 3.69(t, 2H, CH₂O), 4.16(t, 2H, CH₂O-C=O), 5.25(t, 2H, NCH₂)。

3 结果与讨论

3.1 DBCEC·OH的光谱性质

3 1.1 紫外光谱 DBCEC-OH是在 BCEC-OH咔唑环上增加 1个苯环。两者对比而言,DBCEC-OH共 轭体系进一步加强。DBCEC-OH在甲醇溶液中展现出 5个主要吸收带,其最大吸收波长 (nm)和摩尔吸 光系数 (L/(mol·cm))分别为: 236 nm (3. 20 ×10⁴)、290 nm (5. 20 ×10⁴)、301 nm (5. 30 ×10⁴)、 342 nm (1. 8 ×10⁴)、369 nm (7. 4 ×10³)。文献 [15 的实验结果表明: BCEC-OH在紫外区显示 5个主要 的吸收带,其最大吸收波长 (nm)和摩尔吸光系数 (L/(mol·cm))分别为: 230 nm (3. 80 ×10⁴)、244 nm (3. 90 ×10⁴)、253 nm (4. 4 ×10⁴)、279 nm (4. 60 ×10⁴) 和 305 nm (2. 60 ×10⁴)。实验数据表明: BCEC-OH增加 1个苯环后所获得的 DBCEC-OH,各个吸收峰位明显红移。增加 1个苯环后,2个最大吸收峰 由 BCEC-OH的 253和 279 nm 分别红移至 DBCEC-OH的 290和 301 nm,最大吸收峰位红移 22 ~ 37 nm。 摩尔吸光系数增大 1. 15 ~ 1. 18倍。

3 1.2 荧光光谱 DBCEC-OH在甲醇或乙腈溶液中的激发和发射波长分别为 300和 400 nm。溶剂浓度的改变对荧光强度和激发、发射波长位移的影响较小。由于 DBCEC-OH分子内共轭强度的加强,相应的激发和发射波长明显红移。这一特性在实际 LC分离测定中,有利于降低背景电解质的干扰,检测灵敏度得以提高。在相同实验条件下,DBCEC-CL BCEC-Cl¹⁵¹、BCEOC-Cl¹⁸¹和 FMOC-Cl⁶¹ 4种试剂对胺类化合物的灵敏度对比结果存在显著差异(见表 1)。由表 1数据知:DBCEC-Cl对胺类化合物展现出更强的荧光特性 (BCEC-Cl对甲胺和丙胺荧光强度略强)。 $f_{BCEC-Cl}/f_{ACEC-Cl} = 1.02 \sim 1.60$ (甲胺和丙胺除 外); $f_{BCEC-Cl}/f_{ACEC-Cl} = 1.30 \sim 2.57$; $f_{BCEC-Cl}/f_{MOC} = 2.20 \sim 4.12$ (*f*:相同条件下的相对荧光强度)。

以 1.0 ×10⁻⁶ mol/L DBCEC-C1和 FMOC-C1乙腈溶液分别在各自的最大激发和发射波长处测定相 对荧光强度 (DBCEC-OH, _{ex} = 300 nm, _{ex} = 400 nm; FMOC-OH, _{ex} = 263 nm, _{ex} = 316 nm)。实验中 对 DBCEC-CI和 FMOC-CI的荧光量子效率进行了考察。

$$I_{\rm f} = K \, \phi_{\rm f} \, I_0 \, (1 - 10^{-A}) \tag{1}$$

式中, I_f 为荧光强度, ϕ_f 为荧光量子产率,K为与仪器相关常数, I_b 为入射光强度,A为吸光度。 由式 (1)可得:

$$\frac{\phi_{f(\text{DBCEC-CU})}}{\phi_{f(\text{EMOC-CU})}} = \frac{I_{f(\text{DBCEC-CU})} \times (1 - 10^{-A (\text{EMOC-CU})})}{I_{f(\text{EMOC-CU})} \times (1 - 10^{-A (\text{EMOC-CU})})}$$
(2)

通过式 (2),计算了 DBCEC-CI的荧光量子效率与 FMOC-CI的量子效率比值 ($I_{(DBCEC-CI)}$ 为 DBCEC-CI的 荧光强度 , $A_{(DBCEC-CI)}$ 为 DBCEC-CI的吸光度 ; $I_{(FMOC-CI)}$ 为 FMOC-CI的荧光强度 , $A_{(FMOC-CI)}$ 为 FMOC-CI的吸光度)。测得 DBCEC-CI与 FMOC-CI的荧光量子效率之比为 $\phi_{f(DBCEC-CI)} / \phi_{f(FMOC-CI)} = 1.79$ 。测定结果表 明: DBCEC-CI与 FMOC-CI相比具有更强的荧光灵敏度。

表 1 脂肪胺衍生物荧光强度(1)对比

Table 1 Comparison of fluorescence intensity between 2-[2-(7H-dibenzo[a, g]-carbazol-7-yl)-ethoxy] ethyl Chloroformate (DBCEC-Cl), 1, 2-benzo-3, 4-dihydrocarbazole-9-ethylchloroformate (BCEOC-Cl), 2-(1H-benzo[a]carbozol-11-yl) ethyl chloroformate (BCEC-Cl) and 9-fluorenyl methyl chloroformate (FMOC-Cl) am ine derivatives

胺衍生物 Amine derivatives	I _{DBCEC-C1} / I _{BCEC-C1}	I _{DBCEC-CI} / I _{BCEOC-CI}	I _{DBCEC-C1} / I _{EMOC-C1}	胺衍生物 Amine derivatives	I _{DBCEC-C1} / I _{BCEC-C1}	I _{DBCEC-C1} / I _{BCEOC-C1}	I _{DBCEC-C1} / I _{EMOC-C1}
C1	0.89	1. 48	2. 28	C ₇	1. 50	2.37	4. 12
C ₂	1. 02	1. 70	2.85	C_8	1. 53	2.57	3. 95
C ₃	0. 85	1. 30	2. 20	C ₉	1. 55	2 35	4.07
C_4	1. 16	1. 78	2.83	C ₁₀	1. 60	2.39	3.96
C ₅	1. 26	2.00	3. 22	C ₁₁	1. 60	2.50	3. 90
C ₆	1. 47	2. 28	3. 82	C ₁₂	1. 55	2. 27	3. 67

3 1.3 质谱灵敏度的对比 对比 DBCEC-Cl BCEC-Cl和 BCEOC-Cl的分子母核结构表明: DBCEC-Cl 的母核由于增加了 1个苯环,共轭体系加大,分子的疏水性增强。在相同洗脱条件下,DBCEC-Cl对胺 衍生物的质谱离子流强度较 BCEC-Cl和 BCEOC-Cl衍生物强。3种试剂对 12种胺类衍生物的质谱检 测响应存在显著差异(相同的 APCI条件下, FMOC-Cl对胺衍生物不产生质谱离子流,原因是 FMOC对 胺衍生物分子中无质子 H₃O⁺接受点)。对胺衍生物的质谱离子流强度对比见表 2。由表 2数据知:在 相同条件下的相对质谱离子流强度(E)的比值分别为 $E_{\text{DBCEC-Cl}}/E_{\text{BCEC-Cl}} = 4.16 ~ 29.31; E_{\text{DBCEC-Cl}}/E_{\text{BCEC-Cl}}$

 $E_{\text{BCEOC-C1}} = 1.23 \sim 2.47_{\circ}$

表 2 脂肪胺衍生物质谱灵敏度 (E)对比

Table 2 Comparison of MS ion current intensity between aliphatic amine derivatives

胺衍生物 Amine derivatives	E _{DBCEC-C1} / E _{BCEC-C1}	E _{DBCEC-C1} / E _{BCEOC-C1}	胺衍生物 Amine derivatives	E _{DBCEC-C1} / E _{BCEC-C1}	E _{DBCEC-C1} / E _{BCEOC-C1}
C_1	10.88	2.47	C ₇	4. 87	1. 75
C_2	11. 36	2.34	C_8	13. 21	1. 59
C_3	4. 16	1. 45	C_9	15. 66	2 17
C_4	5. 38	1. 47	C_{10}	19. 78	1. 65
C ₅	4. 26	1. 48	C ₁₁	29. 31	1. 85
C_6	6.00	1. 76	C ₁₂	18.67	1. 23

3.2 衍生条件的优化

DBCEC-C1与脂肪胺的衍生化随衍生时间、pH和试剂用量的不同产率不同,以己胺、辛胺、癸胺、 十一胺为例,对上述 3种影响因素的考察结果表明:在固定试剂浓度的条件下,衍生反应随时间增加,衍 生物检测响应加大,4min后获得稳定的荧光产物。对 pH的考察表明,衍生产率随 pH值的升高先增大后 减小;pH = 9.0时衍生产率最高;缓冲液 pH超过 10.0时,由于水解作用产率下降。对试剂用量考察表 明:衍生化产率随试剂用量的增加而增大,当试剂摩尔用量为胺总摩尔用量的 3倍时产率最大。

3.3 标准品色谱分离及质谱鉴定

结构对比表明,DBCEC-OH是 1个含氮杂原子并具有五环并联的共轭分子,其疏水性大为增强。为 实现色谱体系下的快速分离,必须采用较高浓度的流动相组成。由于分子本身的强疏水性,加之被衍 生组分的强疏水性(高级脂肪胺类),衍生物的洗脱相对困难。本研究在设计化合物的合成时考虑了这一

缺点。实际合成中在分子内 N原子上引入 2个 串联的乙氧基团,使整个分子的亲水性得到极 大提高,有利于色谱体系下对衍生物的快速洗 脱。在 Eclipse XDB-C₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) 色谱柱上以乙腈 /水作流动相, 采用梯 度洗脱在 30 min内实现了 12种直链脂肪胺衍 生物 (C₁ ~ C₁₂)的完全基线分离, 色谱分离见 图 1。由图 1知,试剂衍生过程中存在少量副 反应,主要副产物为水解产生的 DBCEC-OH $(m/z 356.8 [M + H]^+)$, 以及 DBCEC-C1与 其自身水解产生的 (2-[2-(7H 二苯并 [a,g]咔 唑乙氧基)乙醇 (DBCEC-OH)反应形成的少 量双取代物 [2-(2-(7H 二苯并 [a,g] 咔唑 乙 氧基)乙基碳酸酯 (DBCEC)₂ (m/z = 737.3 $[M + H]^{+}$)。调整流动相的洗脱条件后, DBCEC-OH和 (DBCEC),对分离不产生干扰。 采用离子阱大气压化学电离源 (APCI Source) 正离子检测模式,进行在线的柱后质谱定性, 质谱离子流见图 2,相应质谱数据见表 3。以 正十一胺为例的一、二级质谱见图 3。

表 3 质谱数据 Table 3 MS data

792

胺 Amine	准分子离子 [M +H] ⁺ Pseudomolecular ion [M +H] ⁺	二级质谱 MS/MS data
C1	413. 2	356. 2, 294
C ₂	427. 2	356. 2
C ₃	441. 2	356. 2
C_4	455. 2	3562
C ₅	469. 2	356. 2
C ₆	483. 2	356.2
C_7	497. 2	356. 1
C_8	511. 2	356. 1
C ₉	525. 2	356. 1
C ₁₀	539. 2	356.2
C ₁₁	553. 2	356.1, 294.2
C ₁₂	567. 2	356. 1





图 1 标准脂肪胺衍生物的色谱图

Fig 1 Chromatogram for standard amines derivatized with DB-CEC-C1

C₁. 甲胺 (methylam ine); C₂. 乙胺 (ethylam ine); C₃. 丙胺 (propylam ine); C₄. 丁胺 (butylam ine); C₅. 戊胺 (pentylam ine); C₆. 己胺 (hexylam ine); C₇. 庚胺 (hep tylam ine); C₈. 辛胺 (octylam ine); C₉. 壬胺 (nonylam ine); C₁₀. 癸胺 (decylam ine); C₁₁. 十一胺 (undecylamine); C₁₂. 十二胺 (dodecylam ine); A和 B (unidentified); DBCEC-OH (2-[2-(7H 三苯并 [a, g]咔唑 乙氧基)乙醇: (2-[2-(7H - 古苯并 [a, g]咔唑 乙氧基)乙基碳酸酯: (DBCEC)₂: [2-(2-(7H - 五苯并 [a, g]咔唑 乙氧基)乙基碳酸酯: (bis-(2-[2-(7H - dibenzo[a, g] carbazol-7-yl) ethoxy] ethyl)-carbonate)。



图 2 标准脂肪胺衍生物的质谱离子流图

Fig 2 In current chromatogram for standard DBCEC-amine derivatives

 $C_1 \sim C_{12}$ 同图 1($C_1 \sim C_{12}$ are the same as In Fig 1)。





© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.4 线性回归方程、检出限、保留时间和峰面积重现性

进样量在 50 pmo1~24.4 fmol范围内,依据峰面积和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 4。各脂肪胺衍生物的线性相关系数均大于 0.9991;检出限在 10.1~0.3 fmol范围 (信噪比 S/N = 3)。

对 50 pmol脂肪胺衍生物平行分析 6次,保留时间和峰面积的重现性见表 4,保留时间的相对标准 偏差小于 0.081%,峰面积的相对标准偏差小于 1.03%。

表 4 脂肪胺衍生物的线性回归方程、相关系数和检出限以及保留时间和峰面积的重现性											
Table 4	Linear regression	equations,	detection	l i m its,	rep roducibility	for peak	area an	d retention	time of	aliphatic	am ine
derivative	s								Λ		

胺衍生物 Amine derivatives	Y = AX + B	线性回归系数 R	检出限 Detection limits (fmol)	保留时间 RSD RSD of retention time (%, n=6)	峰面积 RSD RSD of peak area (%, n=6)
C_1	Y = 0 05680 $X + 27$. 42	0. 9996	3. 0	0. 064	1. 02
C_2	Y = 0.06907X + 52.56	0. 9991	0. 5	0. 056	0.86
C ₃	Y = 0.05897X + 29.26	0. 99961	0. 1	0. 047	0.97
C_4	Y = 0 07667 $X + 41$. 04	0. 9995	2 0	0. 062	1. 03
C ₅	Y = 0.07627X + 39.95	0. 9996	0.8	0. 065	0.94
C_6	Y = 0.17559X + 95.35	0. 9995	0.4	0.46	0.86
C ₇	Y = 0.09131X + 49.36	0. 9995	0. 6	0. 081	0. 92
C ₈	Y = 0 11247 X + 61. 21	0. 9995	0.4	0. 072	0. 93
C ₉	Y = 0.08117X + 45.16	0. 9995	0.3	0. 046	0. 98
C ₁₀	Y = 0.09626X + 50.93	0. 9996	0.3	0. 072	1. 01
C ₁₁	Y = 0.07655X + 41.19	0. 9996	0.4	0. 045	1. 02
C ₁₂	Y = 0.08096X + 42.59	0. 9995	5. 1	0. 062	0.97

Y: 峰面积 (peak area); X: 注射量 (injected amount) pmol

3.5 实际样品分析

取土壤提取液,按前述色谱条件衍生化,土壤提取液有机胺色谱分离见图 4。在土壤样品中加入定 量脂肪胺标准品(5 ng/g),按照前述方法提取并衍生,所得土壤中胺类化合物的测定结果和回收率一 并列于表 5。尽管实际样品中存在较多脂肪胺的异构体,主要为 C₈和 C₄脂肪胺异构体,它们对分离产 生一定影响,采用峰高或手动积分方式该影响减小。C₅以后脂肪胺异构体对分离无干扰,定量准确。

表 5 实际样品中脂肪胺的含量及回收率

Table 5 Content of aliphatic amines from soil sample and recoveries

胺衍生物 Am ine derivatives	土壤样品 Soil sample (ng/g)	回收率 Recoveries (%)		
C1	0. 052	102. 1		
C ₂	0. 060	103. 2		
C_3	*	96. 9		
C_4	0. 056	100. 5		
C ₅	0. 128	101. 6		
C_6	0. 122	102. 4		
C_7	0. 113	100.8		
C_8	0. 156	103. 4		
C_9	0. 250	100. 7		
C ₁₀	0. 259	103. 4		
C ₁₁	0. 208	102. 2		
C ₁₂	0. 221	103. 2		



图 4 土壤样品的游离脂肪胺色谱分离图

* 未测出 (unidentified)。

3.6 结论

利用新合成的多环含氮杂原子的荧光试剂 2-[2-(7H二苯并 [a,g]咔唑 乙氧基) 乙基氯甲酸酯 (DBCEC-CI) 对胺类化合物进行了标记,试剂不仅具有强的紫外吸收,同时具有强的荧光发光特性。在 建立的条件下,试剂与胺类化合物的标记产率高、产物稳定。方法具有线性范围宽、重现性好、操作简便 等特点,对实际土壤样品中游离脂肪胺的分析结果满意。

Fig 4 Chromatogram of aliphatic amines from soil sample 色谱条件和峰号同图 1 (chromatographic conditions and peaks as Fig 1)。

References

- 1 Lindroth P, Mopper K Anal Chem., 1979, 51(11): 1667~1674
- 2 Hill D W, Walters F H, Wilson T D, Stuart J D. Anal Chan. , 1979, 51(8): 1338~1341
- 3 Chen R F, EllyTre C S B ioch in ica et B iophys A cta, 1979, 576: 440 ~ 455
- 4 Ahnoff M, Grundevik I, Arfwidsson A, Fonselius J, Peorsson B-A. Anal Chan., 1981, 53(3): 485~489
- 5 Seiler N. Metha Biochen., 1970, 18: 259 ~ 337
- 6 Einarsson S, Josefsson B, Lagerkvist S J. Chromatogr A, 1983, 282: 609~618
- 7 Einarsson S, Folestad S, Josefsson B, Lagerkvist S Anal Chen. , 1986, 58(8): 1638~1643
- 8 Cohen SA, Michaud D P. Anal Biochan., 1993, 211(2): 279~287
- 9 Liu H J. J. Chromatogr A, 1994, 670: 59~66
- 10 You J, Shan Y, Shan L, Zhen L, Zhang Y. Anal Biochem., 2003, 313(1): 17~27
- 11 You J, Zhang W, Jia X, Zhang Y. Chrom a tog raphia, 2001, 54: 316 ~ 322
- 12 Zhang L, You J, Ping G, Zhang L H, Duan J C, Zhang W, Liang Z, Zhang Y K Anal Chin. Acta, 2003, 494: 141 ~147
- 13 You J, Chen X, Zhao X, Suo Y, Wang H, Lin Y, Sun J. Chromatogr, 2006, 63: 337 ~ 343
- 14 You J, Ming Y, Shi Y, Zhao X, Suo Y, Wang H, Li Y, Sun J. Talanta, 2005, 68(2): 448~458
- 15 You J, Zhao W, Liu L, Zhao X, Suo Y, Wang H, Li Y, Ding C. Talanta, 2007, 72(3):914~925
- 16 Karine N, Jean-LucW, Kurt H. J. Chromatogr B, 2000, 744: 249~255
- 17 Simonetta F, SangWoon C, Gregory G Anal Chan. , 2002, 74(17): 4526~4531
- 18 You J, Ming Y, Shi Y, Zhao X, Suo Y, Wang H, Li Y, Sun J. Talanta, 2007, 68(2): 448~458

Mass Spectrometric Identification of Aliphatic Amines Using 2-[2-(7H-dibenzo[a, g]-carbazol-7-yl)-ethoxy] ethyl Chloroformate as Novel Fluorescence Labeling Reagent

YAN Tao¹, SUN Xue-Jun¹, ZHAO Huai-Xin¹, Sun Zhi-Wei¹,

Liu Qin-Ze¹, Suo You-Rui², You Jin-Mao^{*1,2}

¹ (Shandong Key Laboratory of Life Organic Analysis College of Chen istry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165) ² (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

Abstract On a reversed-phase Eclipse XDB C8 (150 mm $\times 4.6$ mm, 5 µm) column, 12 aliphatic amine derivatives were derivatized using 2-[2-(7H-dibenzo [a, g] carbazol-7-yl)-ethoxy] ethyl chloroformate (DBCEC-Cl) as a new pre-column derivatization reagent The complete baseline resolution was obtained in conjunction with a gradient elution with acetonitrile/H₂O as mobile phase. Detection was carried out by the fluorescence and online post-column atmospheric pressure chemical ionization (APCI) in positive-ion mode. The maximum excitation and emission wavelengths were at 300 nm and 400 nm, respectively. Identification of aliphatic amine derivatives was carried out by the online post-column ion trap/mass spectrometry with positive-ion detection modeof APC HMS. A rapid, accurate method for the determination of free aliphatic amine extracted from soil was proposed. The established method exhibited excellent reproducibility and recovery. Excellent linear responses were observed with the correlation coefficients >0.9991. The detection limits (at signal-to-noise of 3.1) were 10.1 - 0.3 fmol

Keywords High performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry, fluorescence detection, precolumn derivatization, aliphatic amines, 2-[2-(7H-dibenzo[a, g] carbazol-7-yl)-ethoxy] ethyl chloroformate (Received 28 September 2008; accepted 23 December 2008)