

脂肪胺化合物的 HPLC 荧光法测定及质谱鉴定

刘素娟¹, 尤进茂²

(1. 牡丹江师范学院化学系, 黑龙江 牡丹江 157012; 2. 曲阜师范大学化学科学学院, 山东 曲阜 273165)

摘要: 采用合成的荧光试剂 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸(MPIBA)对脂肪胺进行柱前衍生后, 采用高效液相色谱(HPLC)分离和荧光检测。衍生物的荧光激发和发射波长分别为 $\lambda_{\text{ex}}=260\text{nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}}=446\text{nm}$ 。80 °C 条件下在四氢呋喃(THF)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 10min 后获得稳定的荧光产物。在 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6 × 150mm, 5 μm) 上, 采用梯度洗脱对 12 种游离脂肪胺衍生物进行优化分离。采用大气压化学电离源(APCI)正离子模式进行在线柱后质谱定性, 实现了各种脂肪胺衍生物的快速、准确测定。该方法具有良好的重现性, 多数脂肪胺的线性回归系数大于 0.9996, 检测限在 10.5 ~ 53.4 fmol 范围内, 对实际样品臭豆腐中脂肪胺的测定结果满意。

关键词: 高效液相色谱; 荧光检测; 柱前衍生; 脂肪胺

Pre-column Derivatization High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection-based Quantitation and Mass Spectrometric Identification of Aliphatic Amines

LIU Su-juan¹, YOU Jin-mao²

(1. Department of Chemistry, Mudanjiang Normal College, Mudanjiang 157012, China ;

2. College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract : In order to determine aliphatic amines, a fluorescent material, 4-(1-methy-1*H*-phenanthro[9,10-*d*]imidazol-2-yl) benzoic acid (MPIBA), was synthesized through the derivatization of aliphatic amines at 80 °C for 10 min in the presence of 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC · HCl) catalyst in tetrahydrofuran solution. The maximum excitation and emission wavelengths of this stable derivative were 260 and 446 nm, respectively. The separation of these derivatized amines was achieved on a reversed-phase Eclipse XDB C₈ (4.6 × 150 mm i.d., 5 μm) column using a gradient elution and exhibited a good baseline resolution. The identification of aliphatic amine derivatives was carried out by post-column online APCI/MS (atmospheric pressure chemical ionization) in a positive-ion mode. Excellent linear responses were observed with a coefficient of larger than 0.9996 and a detection limit (at signal-to-noise of 3:1) of 10.5 - 53.4 fmol. This established method provided satisfactory results for determining amines from bean curd with odor.

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

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0406-05

胺类化合物由于其毒性及反应活性已成为倍受环境检测部门关注的一类化合物。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。脂肪胺通常为无紫外吸收, 本身又不发射荧光的一类化合物, 因此借助柱前或柱后的化学衍生是提高对该类化合物的检测灵敏度的一种有效途径。尽管有大量不同的衍生化试剂可用于该类化合物的分析测定^[1-4], 但多数试剂在实际应用中存在缺陷, 近年来, 4-氯-7-硝基苯并-

1,2,3-噁二唑(NBD-F), 4-氯-7-硝基苯并-1,2,3-噁二唑(NBD-Cl)被广泛用作氨基酸和脂肪胺类化合物的标记试剂, 但两试剂在水溶液中稳定性差, 室温放置 25min, 试剂及其衍生物分解高达 30%, 继续开发灵敏度高且简便易行的试剂仍然十分必要。依据菲并咪唑类化合物具有发射强荧光的特性^[5], 合成了 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸 (MPIBA), 于 80 °C 条件下在四氢呋喃(THF)溶剂中用 *N*-乙基-*N*'-[(3-二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐

收稿日期: 2008-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(20075016); 山东省自然科学基金项目(02BS046)

作者简介: 刘素娟(1981 -), 女, 助教, 硕士, 主要从事色谱研究。E-mail: liusujuan610@163.com

酸盐(EDC)作催化剂 10min 内可实现脂肪胺的完全衍生化。所得产物稳定、产率高,衍生溶液不必预处理可直接进样分析。采用乙腈-水进行梯度洗脱实现了 $C_{11} \sim C_{12}$ 脂肪胺衍生物的完全基线分离。借助于在线柱后质谱定性,可实现 12 种脂肪胺的快速、准确测定。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

臭豆腐 曲阜市购。

4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸 自制;脂肪胺标准样品 Sigma 公司;乙腈(光谱纯) Merck 公司;甲酸、四氢呋喃(THF)等均为分析纯;纯水(由 Milli-Q 超纯水系统制备)。

Agilent1100 型高效液相色谱-质谱联用仪为 Agilent 公司产品,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)、Eclipse XDB-C₈ 色谱柱(4.6mm × 150mm, 5μm)。

1.2 标准溶液的配制

准确取定量脂肪胺标准品,用光谱纯乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L 的溶液,相应低浓度脂肪胺标准液(1.0×10^{-4} mol/L)用光谱纯乙腈稀释而成。称取 17.6mg 的 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸用 THF 定容至 10ml,浓度为 5.0×10^{-3} mol/L。称取 0.1917mg 的 *N*-乙基-*N*'-[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC · HCl),用乙腈定容至 10ml,浓度为 0.1mol/L。

1.3 脂肪胺标准品的衍生化

向 2ml 安培瓶中依次加入 30μl EDC, 40ml 脂肪胺标准样品, 90μl 衍生试剂溶液,密封后于 80℃ 水浴中反应 10min,取出冷却后用乙腈冲洗 10 倍后直接进样 10μl。衍生反应结果见图 1。

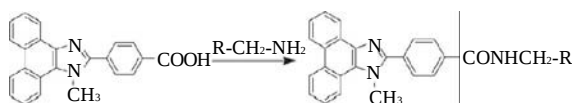


图1 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸与脂肪胺衍生反应
Fig.1 Derivatization scheme of 4-(1-methyl-1*H*-phenanthro[9,10-*d*]imidazol-2-yl)benzoic acid (MPIBA) with aliphatic amines

1.4 色谱及质谱条件

色谱条件: Eclipse XDB-C₈ 色谱柱;流动相 A: 30% 乙腈水溶液(含 30mmol/L 甲酸, pH3.55); B: 100% 乙腈。A 在 35min 内从 100% 梯度到 0, B 在 35min 内从 0 梯度到 100% 后保持 5min,流速为 1.0ml/min,进样量 10ml,柱温 30℃。荧光激发和发射波长分别为 $\lambda_{ex}=260$ nm、 $\lambda_{em}=446$ nm。

质谱条件: 大气压化学电离源, 正离子模式, 喷

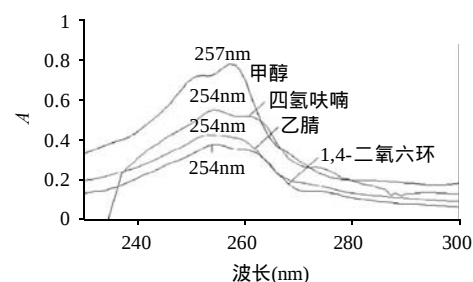
雾压力 60psi(1psi=6894.76Pa), 干燥气流量为 5L/min, 干燥气温度 350℃, 气化温度 450℃, 毛细管电压 3500V, 电晕电流 4000nA(Pos)^[6-7]。

2 结果与分析

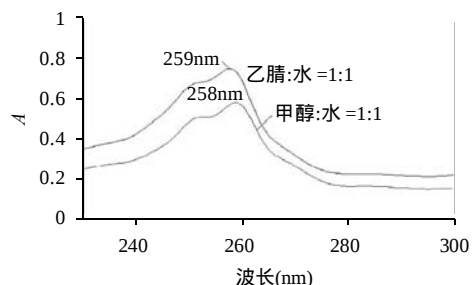
2.1 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸(MPIBA)的制备

2.1.1 4-(1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸(MPIBA)的合成
向 250ml 配置机械搅拌的三颈烧瓶中加入 8g 菲醌, 8g 对甲酰基苯甲酸, 60g 醋酸铵, 150ml 冰醋酸, 于恒温水浴锅中 80~90℃ 条件下搅拌反应 3h, 冷却, 倒入 150ml 水中, 用氨水调节 pH7~8, 得浅黄色沉淀, 抽滤, 水洗两次, 风干后用 *N,N*-二甲基甲酰胺/苯重结晶, 得黄色针状晶体, 产率约 90%。熔点(mp) > 300; IR(KBr): 1675.11(·C=O)、1568.13、1611.88(Ph·C=N·)、1481.64、1388.41、1326.47(Ph)、1283.48(C-H)1188.15、1042.13、987.69、867.36; MS: m/z 339。

2.1.2 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸的合成



a.单一溶剂



b.混合溶剂

图2 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸的紫外吸收图谱
Fig.2 UV spectra of 4-(1-methyl-1*H*-phenanthro[9,10-*d*]imidazol-2-yl) benzoic acid (MPIBA) in different solvents

向 100ml 配置机械搅拌、恒压滴液漏斗的三颈烧瓶中加入 8g 4-(1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-基)苯甲酸、50ml 二甲基亚砜、2.6g KOH, 加热使其溶解, 缓慢滴加 7.0ml 硫酸二甲酯后, 于常温搅拌反应 30min, 倾入溶有 10g KOH 的 150ml 水溶液中, 加热煮沸 30min, 放冷后用 3.0mol/L 盐酸调至 pH3, 析出乳白色沉淀, 水洗两次, 风干后用 *N,N*-二甲基甲酰胺重结晶, 得浅黄色针状晶

体。母液浓缩又得部分晶体,总产率约80%。熔点(mp) > 300; IR(KBr): 1692.40(-C=O)、1679.23、1610.48 (Ph-C=N-), 1467.15、1424.87、1408.37(Ph)、1264.44 (C-H)、1107.87、781.79、756.04、719.62; MS: m/z 353。
2.2 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-)苯甲酸(MPIBA)的紫外性质

选取甲醇、乙腈、THF、1,4-二氧六环及乙腈-水、甲醇-水两组溶剂,分别考察了MPIBA在溶剂中的紫外吸收,结果见图2。由图2a知,MPIBA在乙腈、THF和1,4-二氧六环的单一溶剂中的最大紫外吸收都在254nm波长,整个吸收曲线外型相似。在甲醇中的最大紫外吸收为257nm。在单一溶剂中的摩尔吸光系数(ϵ)分别为甲醇 $7.79 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 、THF $5.47 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 、乙腈 $4.27 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 、1,4-二氧六环 $3.78 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。在乙腈和甲醇水溶液中的最大紫外吸收分别红移至259nm和258nm,最大吸收处的摩尔吸光系数分别为乙腈 $7.46 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 、甲醇 $5.80 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

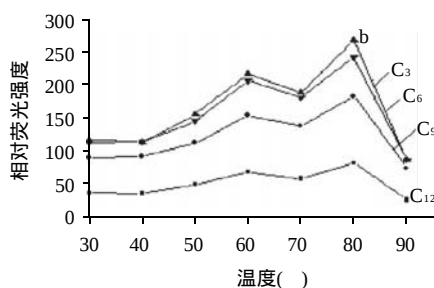
2.3 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-)苯甲酸(MPIBA)的荧光性质

在乙腈溶液中对代表性MPIBA-正丁胺衍生物的荧光光谱进行了研究,最大荧光激发和发射波长分别为 $\lambda_{\text{ex}}=260\text{nm}$ 和 $\lambda_{\text{em}}=446\text{nm}$ 。改变溶液的极性(0~100%, V/V)除荧光强度在低浓度的乙腈中表现出较低外,荧光激发和发射吸收带无明显的蓝移或红移。少量的有机离子(柠檬酸、醋酸和甲酸的阴离子)和无机阴离子(硫酸根、硝酸根、磷酸根等)对荧光发射光谱不产生明显猝灭现象。然而MPIBA-正丁胺衍生物的发射光谱随酸性环境的增强强度明显减弱。中性环境下的荧光强度是甲酸性环境下荧光强度的10~12倍,三氯乙酸及三氟乙酸产生类似现象。可能的原因是在强酸性环境下,MPIBA-正丁胺衍生物分子中咪唑环上的N原子接受一个 H^+ ,导致了N原子的部分质子化,从而减弱了整个分子的共轭程度。在10~30mmol/L甲酸溶液的环境下,MPIBA-正丁胺衍生物的荧光光谱无明显猝灭现象,因此在以10~30mmol/L的甲酸-氨水为缓冲液的色谱流动相分离体系下,采用荧光检测器对衍生物的检测不产生干扰。

2.4 衍生条件的优化

MPIBA对脂肪胺的衍生化反应随衍生反应的溶剂、温度、反应时间及衍生试剂与EDC用量的不同产率有明显差异,以丙胺、己胺、辛胺、十一胺为例,对上述五种影响因素进行了优化考察。在所选的五种溶剂:二甲基亚砆、*N,N*-二甲基甲酰胺、THF、吡啶和乙腈中的衍生化结果表明:THF作溶剂时,检测响应最大,实验中选择THF作为溶剂。改变不同的衍生温度结果表

明:衍生率随温度升高,产率加大,当温度达80时具有最大的衍生率(图3),随温度的进一步升高产率明显降低,可能的原因是较高温度下副反应产生的结果。对衍生化时间的考察表明,衍生率随衍生时间的增加产率提高,衍生时间达10min后获得稳定荧光产物。在THF溶剂中保持衍生反应10min,衍生温度为80的条件下,对试剂用量的考察表明:衍生试剂用量为脂肪胺总量的4倍以上时,可获得稳定的荧光产物。对EDC用量的考察表明:当EDC的浓度与试剂的浓度比为10:1时(实验中用量一般为30 μl),可获得稳定的荧光产物。

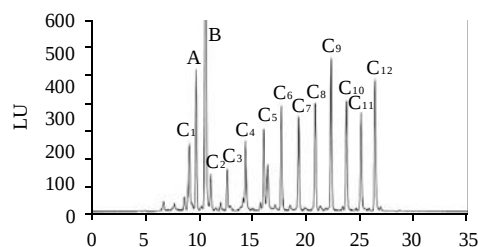


C₃. 丙胺; C₆. 己胺; C₉. 壬胺; C₁₂. 十二胺。

图3 温度对衍生化的影响

Fig.3 Effect of temperature on derivatization

2.5 标准品的色谱分离及质谱鉴定



C₁. 甲胺; C₂. 乙胺; C₃. 丙胺; C₄. 丁胺; C₅. 戊胺; C₆. 己胺; C₇. 庚胺; C₈. 辛胺; C₉. 壬胺; C₁₀. 癸胺; C₁₁. 十一胺; C₁₂. 十二胺; A. 未确定成分(The intermediate from the reaction of reagent (MPIBA) with EDC; *N*'-(3-(dimethylamino)propyl)-*N*-ethylcarbamidoyl-2-(2-(1-methyl-1*H*-phenanthro[9,10-*d*]imidazol-2-)-benzoic acid); B. 4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑-2-)苯甲酸。

图4 标准脂肪胺衍生物的色谱图

Fig.4 Chromatogram of derivatized amine standards

在Eclipse XDB-C₈(4.6mm × 150mm, 5 μm)色谱柱上用乙腈-水作流动相,采用梯度洗脱在40min内实现了12种直链脂肪胺衍生物的完全基线分离,结果见图4(荧光检测器检测结果)。图4中的组分A为试剂和EDC两者的缩合产物,相应的结构式及质谱断裂模式见图5。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,各组分定性的质谱数据见表

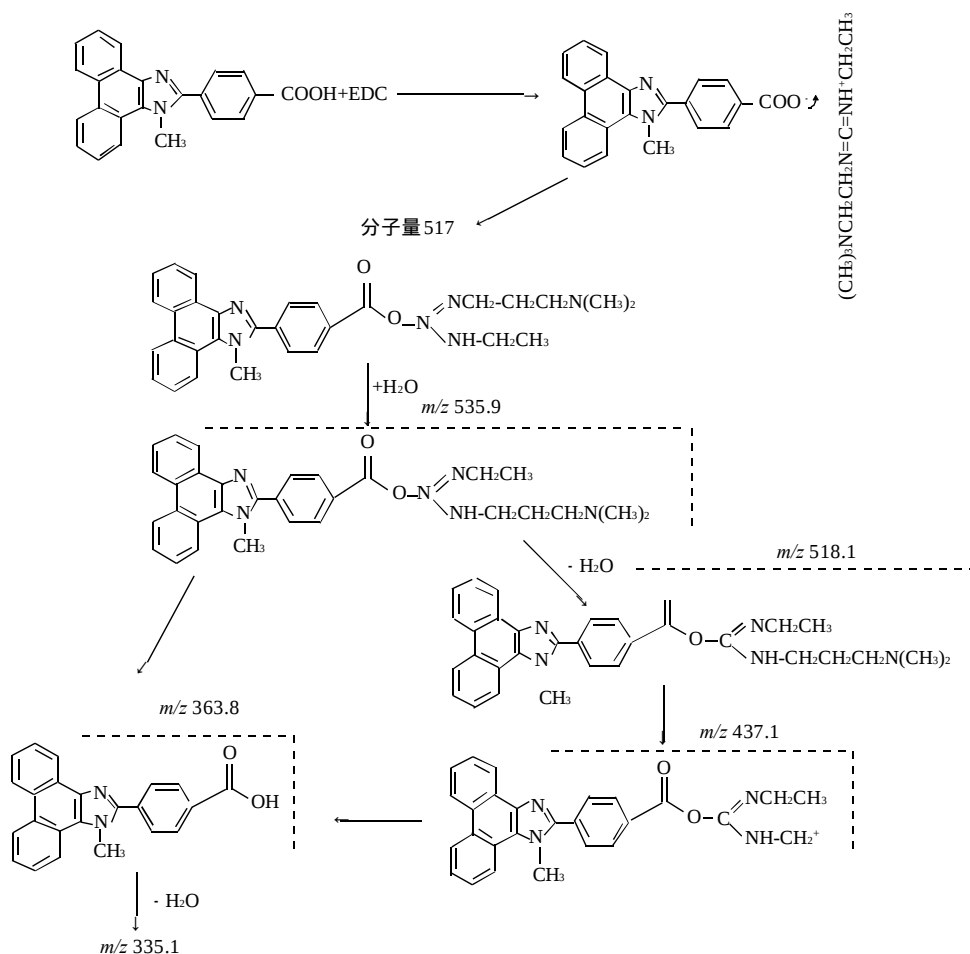


图5 MPIBA 与 EDC 缩合反应的中间体的质谱裂解模式

Fig.5 MS-monitored cleavage mode of intermediates obtained from the condensation reaction of MPIBA with EDC

1. 以十一胺为例的 MS 和 MS/MS 质谱分析见图 6。

2.6 线性回归方程及检出限

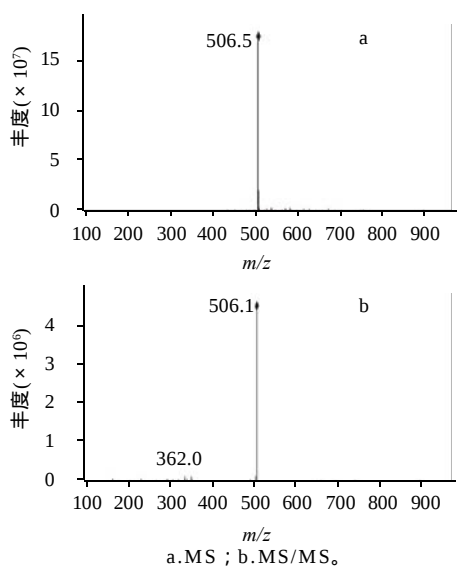


图6 十一胺代表性衍生物的质谱图

Fig.6 MS and MS/MS spectra of representative undecylamine derivative

表1 C₁~C₁₂ 脂肪胺衍生物的质谱数据Table 1 MS and MS/MS data of C₁ - C₁₂ amine derivatives

胺	胺的相对分子量	衍生物的相对分子量	[M+H] ⁺	m/z
C ₁	31	365	366.0	352.9, 339.3
C ₂	45	379	380.3	336.6, 365.4, 338.6, 306.9, 361.5
C ₃	59	393	394.4	352.5, 380.1, 339.6, 337.2
C ₄	73	407	408.4	338.6, 393.8, 352.9
C ₅	87	421	422.4	352.3, 409.9, 393.3, 338.2
C ₆	101	435	436.4	352.8, 339.2, 421.9
C ₇	115	449	450.5	352.5, 435.1
C ₈	129	463	464.5	352.3, 435.2
C ₉	143	477	478.4	450.6, 436.9
C ₁₀	157	491	492.4	352.7, 449.1, 477.0, 478.6, 336.8
C ₁₁	171	505	506.5	351.7, 353.0, 491.7
C ₁₂	185	519	520.5	351.9, 339.9

配制浓度为 $1.20 \times 10^{-5} \sim 6.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 的系列标准衍生溶液, $10 \mu\text{l}$ 进样(进样量在 $60 \sim 1.2 \times 10^5 \text{ fmol}$ 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。各组分线性相关系数大于0.9996, 检出限在10.5~53.4fmol之间(按 $S/N=3:1$ 计算)。

表2 脂肪胺衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits of aliphatic amine derivatives

胺类	回归方程	相关系数	检出限 (fmol)
C ₁	$Y=12.49X+3.621$	0.9999	53.4
C ₂	$Y=42.03X+13.15$	0.9999	17.5
C ₃	$Y=20.045X-8.81$	0.9996	36.9
C ₄	$Y=39.99X+0.057$	0.9997	30.1
C ₅	$Y=62.19X-11.25$	0.9996	29.4
C ₆	$Y=59.80X+12.19$	0.9998	23.8
C ₇	$Y=58.59X+6.24$	0.9999	23.8
C ₈	$Y=68.70X-14.00$	0.9998	18.7
C ₉	$Y=94.34X-7.79$	0.9999	16.4
C ₁₀	$Y=71.50X-26.41$	0.9999	13.8
C ₁₁	$Y=68.63X-19.04$	0.9999	10.5
C ₁₂	$Y=79.20X-14.94$	0.9999	10.5

2.7 精密度实验

在相同洗脱条件下, 对60pmol脂肪胺衍生物进行平行六次分析, 保留时间的相对标准偏差RSD(%)小于0.09%, 峰面积的相对标准偏差RSD(%)小于2.9%。

2.8 实际样品的色谱分离

2.8.1 臭豆腐中脂肪胺的提取及测定

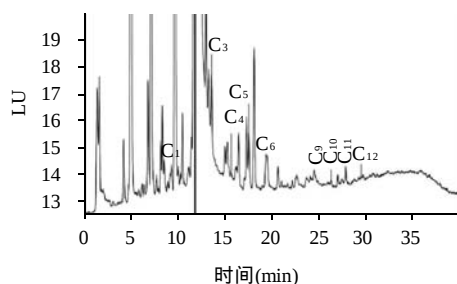


图7 臭豆腐中游离脂肪胺色谱分离图

Fig.7 Chromatogram of aliphatic amines from bean curd with odor

称取5g臭豆腐, 用15ml氯仿分三次超声振荡提取, 合并提取液过滤, 滤液加0.5ml甲酸, 超声振荡20s使其转变为相应脂肪胺的有机盐, 溶剂减压蒸发至干, 用1.0ml 80%乙腈-水溶液定容, 冷藏备用。按前述实验条件, 臭豆腐提取液色谱分析结果见图7, 脂肪胺含量

的测定结果见表3。

表3 实际样品中脂肪胺的含量

Table 3 Content of aliphatic amines in real samples of bean curd with odor

胺	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂
脂肪胺含量 (ng/g)	279.9	-	189.3	360.2	439.4	535.0	-	-	219.0	323.2	428.3	212.2

注: - 未测出。

2.8.2 回收率实验

臭豆腐样品中加入定量脂肪胺标品(100ng/g), 按照上述提取方法进行提取处理, 对比样品值及加标样后的测定值, 所得回收率在96.7%~106.8%之间。

3 结论

本实验采用新型高灵敏荧光试剂4-(1-甲基-1*H*-菲并[9,10-*d*]咪唑)-2-苯甲酸对12种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率高、产物稳定。对实际臭豆腐样品中脂肪胺的测定结果满意。

参考文献:

- [1] AHNOFF M, GRUNDEVIK I, ARFWIDSSON A. Derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofuran for liquid chromatographic determination of hydroxyproline in collagen hydrolysate[J]. Anal Chem, 1981, 53: 485-489.
- [2] EINARSSON S, FOLESTAD S, JOSEFSSON B. High-resolution reversed-phase liquid chromatography system for the analysis of complex solution of primary and secondary amino acids[J]. Anal Chem, 1986, 58: 1638-1623.
- [3] LIU H J. Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. J Chromatogr A, 1994, 670: 59-66.
- [4] STEVEN A C, DENNIS P M. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1993, 211: 279-287.
- [5] YOU J M, ZHAO X E, SUO Y R, et al. 2-(2-Phenyl-1*H*-phenanthro-[9, 10-*d*]imidazole-1-yl)-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: 168-177.
- [6] SIMONETTA F, CHOI S W, GREGORY G, et al. A method to assess genomic DNA methylation using highperformance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2002, 74: 4526-4531.
- [7] KARRIE N, WOLFENDER J L, KURT H. Determination of trace amounts of ginkgolic acids in ginkgo biloba leaf extracts and phytopharmaceuticals by liquid chromatography electrospray mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2000, 744: 249-255.