

高效液相色谱柱前衍生荧光检测法测定游离脂肪醇

董秀丽, 陈向明

(滨州医学院烟台校区, 山东 烟台 264003)

摘要: 本文利用新型荧光试剂 1,2- 苯并 -3,4- 二氢咔唑 -9- 乙酸(BCAA)作为柱前衍生试剂建立了测定游离脂肪醇的方法,实验以 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基)环己碳二亚胺(EDAC)作为缩合剂,4- 二甲氨基吡啶(DMAP)为催化剂,55℃下衍生反应 25 min 后获得稳定的荧光产物。在 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱上,通过梯度洗脱对 12 种游离脂肪醇进行了分离和在线质谱定性。采用大气压化学电离源(APCI)正离子模式,对抗静电剂(十二烷基磷酸酯钾盐)中游离脂肪醇进行定性及相应含量测定。脂肪醇的线性回归系数大于 0.9997,检测限在 9.40-25.32fmol。

关键词: 高效液相色谱-质谱, 荧光检测, 柱前衍生, 脂肪醇

中图分类号: O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-8143(2010)03-0006-04

Determination of Aliphatic Alcohols by HPLC/MS with Fluorescence and Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) Detection

Dong Xiu-li, Chen Xiang-ming

(Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China)

Abstract: A simple and highly sensitive method based on the derivatization of aliphatic alcohols utilizing 1,2- benzo- 3, 4- dihydrocarbazole- 9- acetic acid (BCAA) as the novel pre- column derivatization reagent followed by high- performance liquid chromatography with fluorescence detection and online mass spectrometric identification was developed. Optimum derivatization was obtained by the reaction of aliphatic alcohols with BCAA at 55℃ for 25min in the presence of EDAC and DMAP in acetonitrile solvent. The condition of derivation was mildness. Derivatives were sufficiently stable to be efficiently analyzed by high- performance chromatography without pretreatment. On a reversed- phase Eclipse XDB- C₈ column, twelve kinds of aliphatic alcohols (C₁- C₁₂) derivatives were separated in conjunction with a gradient elution with a good baseline resolution. The precise determining aliphatic alcohols from antistat was obtained by post- column online 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 of >0.9997, detection limits (at signal- to- noise of 3:1) 9.40- 25.32fmol.

Keywords: High- performance Liquid Chromatography Mass Spectrum (HPLC/MS); fluorescence detection; pre- column derivatization; aliphatic alcohols

脂肪醇作为表面活性剂的主要原料已广泛应用于药物和化妆品行业,这类物质的检测仍然存在一定难度。目前高灵敏度测定脂肪醇的方法是利用荧光试剂对醇类化合物进行衍生^[1]。用于衍生脂肪醇的荧光试剂有酰氯类试剂^[2-4],这类试剂在潮湿环境下不稳定,因而对衍生条件的要求比较高。羧酸类试剂^[5,6]对水稳定,但需要有缩合剂的存在才能与

醇发生衍生反应,目前有报道用 1- 异丙基 -3-(3- 二甲氨基丙基)- 环己碳二亚胺(IDC)作缩合剂^[7],但是酯产率不高。本文利用一种新的羧酸类试剂,1,2- 苯并 -3,4- 二氢咔唑 -9- 乙酸作为柱前衍生试剂,用 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基)环己碳二亚胺(EDAC)作为缩合剂,对 C₁-C₁₂ 的脂肪醇实现了快速准确的柱前衍生和分离测定。此方法操作简便,衍生

收稿日期 2010- 3- 15

作者简介 董秀丽(1979-)女,讲师,主要从事色谱分析的研究工作。Email xmch913@163.com

产物稳定,重现性好,灵敏度高。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Agilent1100 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,大气压化学电离源(APCI) EclipseXDB-C₈ 色谱柱(4.6×150mm,5 μm)。1,2-苯并-3,4-二氢吡唑-9-乙酸(自制),12种脂肪醇标准样品(购自 SIGMA 公司),光谱纯乙腈(购自德国 MERCK 公司),1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)环己碳二亚胺(EDAC)(购自 SIGMA 公司),4-二甲氨基吡啶(DMAP)购自上海化学试剂公司,其他试剂均为分析纯,纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 标准溶液的配制

准确称取一定量脂肪醇(C₁-C₁₂)标准品,用光谱纯乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L 溶液,相应低浓度脂肪醇标准液(1.0×10^{-4} mol/L)以光谱纯乙腈稀释而成。准确称取 0.0166g 的 1,2-苯并-3,4-二氢吡唑-9-乙酸用乙腈溶解并定容至 10mL,浓度为 6×10^{-3} mol/L。准确称取 0.2g DMAP,用乙腈定容至 10mL,浓度为 0.16mol/L。准确称取 0.19g EDAC,用乙腈定容至 10mL,浓度为 0.1mol/L。

1.3 标准品的衍生过程

向 2mL 安培瓶中依次加入 100 μL 混合脂肪醇溶液,100 μL DMAP,40 μL EDAC,220 μL 衍生试剂溶液,封口后于 55℃ 温水浴中反应 25min,取出常温冷却后加入 540 μL 乙腈,直接进样 10 μL。衍生反应如图 1。

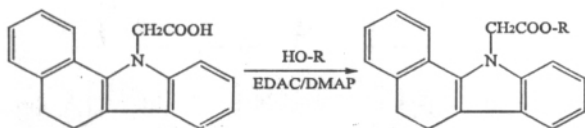


图1 1,2-苯并-3,4-二氢吡唑-9-乙酸与脂肪醇衍生反应过程

Fig. 1 Derivatization scheme of

1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-acetic acid (BCAA) with aliphatic alcohols

1.4 色谱及质谱条件

色谱条件:EclipseXDB-C₈ 色谱柱(4.6×150mm,5 μm)。流动相 A 50% 腈水溶液, B 100% 的乙腈。梯度条件:在 35min 内 B 由 0 梯度到 100%,100% B 再运行 5min。流速为 1.0mL/min,进样

量为 10 μL,柱温 30℃。荧光激发和发射波长分别为:λ_{ex}=333nm,λ_{em}=390nm。

质谱条件:大气压化学电离源(APCI),正离子模式,喷雾压力 60p.s.i(1p.s.i=6894.76Pa),干燥气流量为 5L/min,干燥气温度 350℃,气化温度 400℃,毛细管电压 3500V,电晕电流 4000nA(Pos)。

2 结果与讨论

2.1 标准品的高效液相色谱分离、质谱鉴定

按照 1.3 标准品的衍生过程进行衍生后,采用梯度洗脱在 35min 内实现了 12 种脂肪醇衍生物的基线分离,荧光检测色谱图见图 2(其中 A 为衍生试剂峰, B 为未知峰),色谱实验条件见 1.4。并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,各衍生物显示强烈的分子离子峰和相应的特征碎片离子峰,质谱数据见表 1。以十二醇为例的质谱图见图 3(分别为一级和二级质谱)。

2.2 线性回归方程及检测限

注射量在 200pmol-48.8fmol 范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得回归方程、相关系数和各脂肪醇检测限(LOD)见表 1。脂肪醇的线性相关系数在 0.9996-0.9999 之间。各脂肪醇衍生物检测限按照信噪比为 3 来计算(S/N=3:1),在 9.40-25.32fmol 之间。

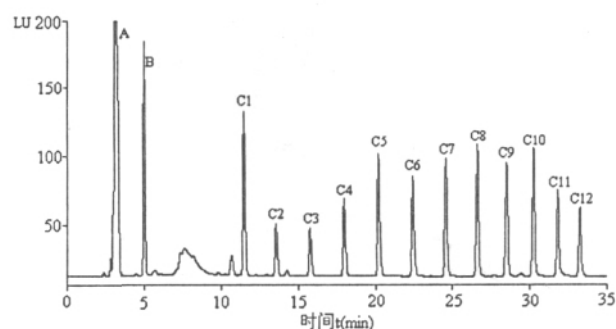


图2 标准脂肪醇的色谱图

Fig. 2 Chromatogram for standard aliphatic alcohols derivatized with BCAA

C₁(甲醇, methanol); C₂(乙醇, ethanol); C₃(丙醇, propanol); C₄(丁醇, butanol); C₅(戊醇, pentanol); C₆(己醇, hexanol); C₇(庚醇, heptanol); C₈(辛醇, octanol); C₉(壬醇, nonanol); C₁₀(癸醇, decanol); C₁₁(十一醇, undecyl alcohol); C₁₂(十二醇, dodecyl alcohol); A(1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-acetic acid); B(未知, unidentified)

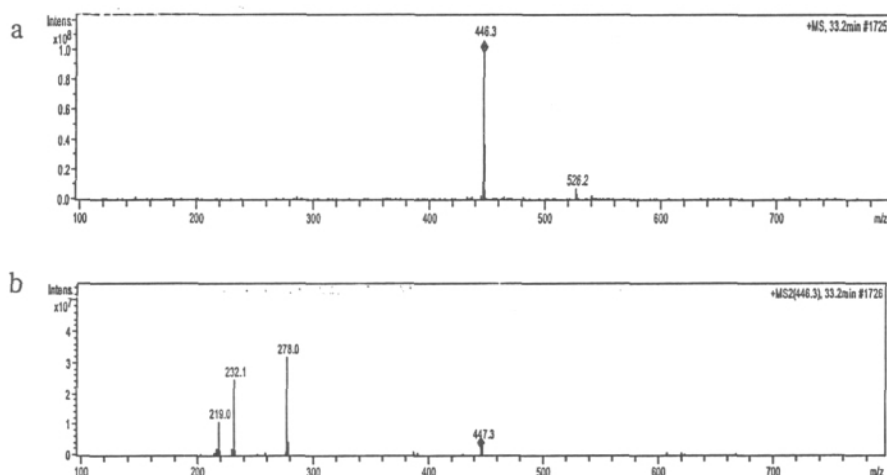


图3 十二醇的一级(a)、二级(b)质谱图

Fig.3 First and second steps mass spectrum of dodecyl alcohol

表1 游离脂肪醇衍生物的线性回归方程、相关系数、检测限和一级质谱数据

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits and mass spectral data of aliphatic alcohol derivatives

Alcohol derivatives	Y=AX+B		Limits of detection (fmol)	m/z (M+H)
	X: Injected amount (pmol)	R		
	Y: Peak area			
C ₁	Y=88.25X+57.36	0.9998	9.40	292.1
C ₂	Y=35.10X+26.10	0.9998	25.32	306.1
C ₃	Y=34.35X+23.77	0.9998	22.26	320.1
C ₄	Y=48.01X+36.45	0.9997	20.05	334.1
C ₅	Y=72.09X+55.41	0.9997	14.47	348.1
C ₆	Y=57.41X+43.33	0.9997	14.82	362.2
C ₇	Y=64.89X+48.17	0.9997	15.89	376.2
C ₈	Y=70.27X+54.12	0.9997	13.37	390.2
C ₉	Y=58.27X+45.87	0.9997	15.15	404.2
C ₁₀	Y=64.44X+50.03	0.9997	11.52	418.2
C ₁₁	Y=44.65X+34.09	0.9998	15.67	432.3
C ₁₂	Y=33.94X+25.50	0.9998	17.42	446.3

2.3 重现性实验

在相同洗脱条件下,对 50pmol 脂肪醇衍生物进行平行 6 次测定,保留时间和峰面积的重现性见表 2, 每种脂肪醇衍生物保留时间的相对标准偏差 RSD (%) 小于 0.40%, 峰面积的相对标准偏差 RSD (%) 小于 0.78%。

2.4 实际样品的色谱分离

2.4.1 抗静电剂中脂肪醇的提取

称取 3g 抗静电剂(十二烷基磷酸酯钾盐),加

到 10mL 去离子水中并充分搅拌 15min, 加入 4mL 0.1mol/L NaOH 溶液和 10mL 正己烷, 继续搅拌 10min 移取有机相。残余物再用 5mL 正己烷萃取, 合并有机相, 依次用 1mol/L 盐酸、1%Na₂CO₃ 溶液和去离子水洗涤。有机相用 N₂ 吹干, 用 2mL 乙腈溶解后进样测定。

2.4.2 实际样品脂肪醇的测定

按前述实验条件, 实际样品中脂肪醇的 HPLC 测定见图 4, 色谱条件见 1.4。

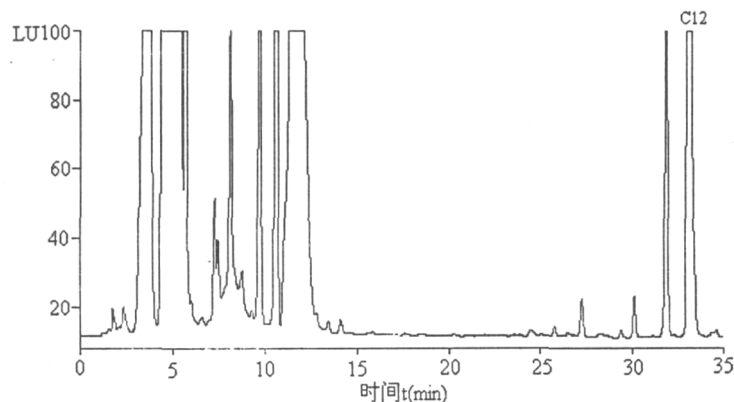


图4 抗静电剂中脂肪醇的色谱分析图

Fig. 4 Chromatogram of aliphatic alcohols from antistat

表2 保留时间和峰面积的重现性

Table 2 Reproducibility for area and retention time (n=6)

Alcohol derivatives	Retention time RSD (%)	Peak area RSD (%)
C ₁	0.40	0.32
C ₂	0.37	0.78
C ₃	0.33	0.56
C ₄	0.33	0.48
C ₅	0.25	0.41
C ₆	0.20	0.33
C ₇	0.16	0.19
C ₈	0.12	0.29
C ₉	0.09	0.20
C ₁₀	0.07	0.33
C ₁₁	0.06	0.20
C ₁₂	0.08	0.30

实验所用的抗静电剂为十二烷基磷酸酯钾盐,其中存在的游离脂肪醇主要为十二醇,按照前述实验条件对样品进行处理,以标准品的色谱条件进样分析,测得十二醇峰面积代入到标准方程中,计算抗静电剂中的游离十二醇的含量为 160.6 $\mu\text{g/g}$ 。

3 结 论

本文利用新型荧光试剂 1,2- 苯并 -3,4- 二氢吡嗪 -9- 乙酸(BCAA)对 12 种脂肪醇进行柱前衍生,建立了快速、灵敏的测定脂肪醇方法。此方法衍生率高,产物稳定,能够准确定量且具有线性范围宽,重现性好等优点。

参考文献

- [1] 劳文剑,游静,尤进茂,等. 高效液相色谱荧光衍生法检测醇和酸的进展[J]. 分析测试技术与仪器, 2001, 7(1):29-36.
- [2] Huang G, Deng G, Qiao H, Zhou X. Determination of trace C₁-C₄ aliphatic alcohols in aqueous samples by 9-Fluorenylmethyl chloroformate derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. Anal Chem, 1999, 71:4245-4249.
- [3] Wada M, Kinoshita S, Itayama Y, et al. Sensitive high-performance liquid chromatography determination with fluorescence detection of phenol and chlorophenols with 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride as a labeling reagent[J]. J. Chromatogr. B, 1999, 721:179-186.
- [4] Tsuruta Y, Watanabe S, Inoue H. Fluorometric determination of phenol and p-cresol in urine by precolumn high-performance liquid chromatography using 4-(N-phthalimidyl) benzene-sulfonyl chloride[J]. Anal Biochem., 1996, 243:86-91.
- [5] Haj-Yehia A I, Benet L A. Determination of alcohols by High-performance liquid chromatography with fluorimetric detection after precolumn derivatization with 2-(4-carboxyphenyl)-6-methoxybenzofuran [J]. J. Chromatogr. A, 1996, 724:107-115.
- [6] Assaf P, Katzhendler J, Haj-Yehia A I. 2-(4-Carboxyphenyl)-6-N,N-diethylaminobenzofuran: a useful reagent for the sensitive determination of alcohols by High-performance liquid chromatography with fluorimetric detection[J]. J. Chromatogr. A, 2000, 869:243-250.
- [7] Katayama M, Masuda Y, Taniguchi H. Determination of alcohols by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with 2-(4-carboxyphenyl)-5,6-dimethylbenzimidazole[J]. J. Chromatogr., 1991, 585:219-224.