

## 脂肪胺的高效液相色谱分离及质谱鉴定

陈向明, 石运伟, 赵先恩, 张海峰, 尤进茂

(曲阜师范大学化学科学学院, 山东 曲阜 273165)

**摘要** :采用新型荧光试剂 1-2-苯并-3,4-二氢咔唑-9-乙酸(BCAA)为柱前衍生化试剂,在 Hypersil BDS-C<sub>18</sub> 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,1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)环己碳二亚胺(EDAC)为缩合剂,在 50 ℃ 条件下衍生反应 15 min 后获得稳定的荧光产物。激发波长和发射波长分别为 333 nm 和 390 nm。采用大气压化学电离源(APCI)的正离子模式,实现了土壤和污水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 0.999 3,检测限为 12 ~ 28 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 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)06-0642-04

## Determination of Aliphatic Amines by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Detection and Identification by Mass Spectrometry

CHEN Xiangming, SHI Yunwei, ZHAO Xian'en, ZHANG Haifeng, YOU Jinmao

(College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

**Abstract** : Aliphatic amines exist widely in nature. Therefore, quick and precise determination of aliphatic amines is of great significance. A simple and highly sensitive method based on the derivatization of aliphatic amines 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 amines with BCAA at 50 ℃ for 15 min in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDAC) in acetonitrile solvent. The condition of derivatization was mild and the yield of derivative each aliphatic amine was higher than 94%. Derivatives were sufficiently stable to be efficiently analyzed by high performance chromatography without pretreatment. On a reversed-phase BDS-C<sub>18</sub> column, twelve aliphatic amine derivatives (C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>) were separated under gradient elution with baseline resolution. The precise determining aliphatic amines from soil and wastewater samples was obtained by post-column online mass spectrometric identification with atmospheric pressure chemical ionization(APIC) source under positive mode detection. The established method exhibited excellent reproducibility and recovery. Linear responses were observed with coefficients over 0.999 3. The detection limits (at signal-to-noise ratio of 3:1) were 12 - 28 fmol.

**Key words** : high performance liquid chromatography-mass spectrometry; fluorescence detection; pre-column derivatization; aliphatic amines

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

理学和临床医学具有重要的意义。但是脂肪胺在紫外-可见光区吸收极弱,用光度法难以准确测定。目前,高灵敏度测定脂肪胺的方法是用荧光试剂对其

收稿日期 2004-11-29

作者简介:陈向明,男,硕士研究生,从事荧光探针分子开发及色谱分析,E-mail: xmch913@163.com.

通讯联系人:尤进茂,男,教授,Tel (0537)4458501,E-mail:jmyou6304@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 20075016).

进行柱前衍生,广泛应用的衍生试剂主要有邻苯二甲醛(OPA)<sup>[1-3]</sup>、4-氯-7-硝基-2,1,3-苯并噁二唑(NBD-Cl)<sup>[4]</sup>、丹磺酰氯(DNS-Cl)<sup>[5]</sup>和芴甲氧羰酰氯(FMOC-Cl)<sup>[6,7]</sup>。但 OPA 不与二胺反应且重现性和相应衍生物的稳定性较差;NBD-Cl 在水溶液中的稳定性较差,见光易分解;DNS-Cl 除了其本身的稳定性差外,相应衍生物还伴有荧光猝灭现象,造成检测灵敏度的下降;FMOC-Cl 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性衍生物的损失。6-氨基喹啉基-N-琥珀酰亚胺碳酸酯(AQC)是近年来最为广泛应用的胺类衍生试剂之一<sup>[8,9]</sup>,但 AQC 在水中的荧光量子效率很低,不利于进行梯度洗脱。本实验以自制的 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙酸(BCAA)为柱前衍生化试剂,对 C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub> 脂肪酸实现了快速准确的分离测定,衍生物稳定,重现性好。

## 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)。

1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙酸(自制),C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub> 脂肪酸标准样品(购自 SIGMA 公司),乙腈(光谱纯,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),纯水(由 Milli-Q 超纯水系统制备)。

### 1.2 标准溶液的配制

脂肪酸标准溶液:准确量取一定量的脂肪酸标准品,用乙腈配成 C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub> 脂肪酸均为 1.0 × 10<sup>-2</sup> mol/L 的溶液,相应的低浓度脂肪酸标准溶液(1.0 × 10<sup>-4</sup> mol/L)用乙腈稀释而成。

BCAA 标准溶液:准确称取 0.016 6 g BCAA,用乙腈定容至 10 mL,浓度为 6 × 10<sup>-3</sup> mol/L。

EDAC 标准溶液:准确称取 0.192 g EDAC,用乙腈定容至 10 mL,浓度为 0.1 mol/L。

### 1.3 脂肪酸标准品的衍生过程

向 2 mL 安瓿瓶中依次加入 100 μL 混合脂肪酸溶液,80 μL EDAC 溶液,180 μL BCAA 溶液,封口后于 50 °C 水浴中反应 15 min,取出冷却后加入 500 μL 乙腈,直接进样 10 μL。衍生反应过程见图 1。C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub> 脂肪酸的衍生转化率依次为 94.97%, 96.88%, 97.19%, 97.52%, 97.20%, 96.13%, 101.83%, 101.79%, 97.85%, 96.35%, 95.21%, 95.96%, 均高于 94%。

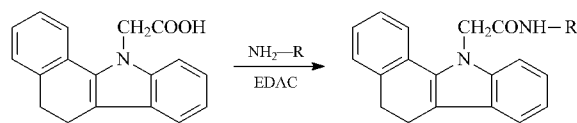


图 1 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙酸与脂肪酸的衍生反应

Fig.1 Derivatization scheme of 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-acetic acid (BCAA) with aliphatic amines

### 1.4 色谱及质谱条件

高效液相色谱条件:Hypersil BDS-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm i. d. × 100 mm 5 μm,大连依利特公司)。流动相 A 为 30% 乙腈水溶液,流动相 B 为 100% 乙腈,线性梯度洗脱条件:35 min 内由 30% B 液变化到 100% B 液,在 100% B 液条件下再运行 5 min,流速为 1.0 mL/min。进样量为 10 μL,柱温 30 °C。荧光检测器的激发波长 λ<sub>ex</sub> 和发射波长 λ<sub>em</sub> 分别为 333 nm 和 390 nm。

质谱条件:大气压化学电离源,正离子模式,喷雾压力为 0.4 MPa(60 psi),干燥气流量为 5 L/min,干燥气温度 350 °C,汽化温度 400 °C,毛细管电压 3 500 V,电晕电流 4 000 nA<sup>[10,11]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙酸的合成

在 500 mL 圆底烧瓶中加入 26.2 g 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶、150 mL 二甲亚砜,开始搅拌并加热至 120 °C。称取 20 g 氢氧化钾,在 20 min 内分批加入。烧瓶内溶液在 120 °C 下搅拌 30 min,然后将 50 mL 溴乙酸乙酯在 1 h 内滴加完,温度保持在 120 °C 下继续反应 3 h,溶液逐渐转变为暗褐色。将烧瓶内的混合溶液冷却至室温。在 200 mL 的水中加入 20 g 氢氧化钾,加热至沸腾,把烧瓶内的溶液慢慢倒入热的氢氧化钾溶液中,加热 30~45 min 使生成的酯充分水解。将水解物冷却过滤除掉杂质,滤液用盐酸调至酸性,析出大量固体,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。所得固体用甲醇重结晶 3 次,得白色晶体,产率为 73%。熔点(mp) 219.9~222.0 °C。IR(KBr): 3 123.69 (二聚, —OH), 1 707.12 (C=O), 1 465.83, 1 402.05, 1 234.36, 1 187.81, 737.6; APCI (M+H)<sup>+</sup> m/z 277。

### 2.2 标准品的高效液相色谱分离、质谱鉴定及衍生转化率

按照“1.3”节所述对 12 种脂肪酸标准品进行衍生后,按“1.4”节方法进行分离,在 35 min 内 12

种脂肪胺衍生物基本实现了基线分离,结果见图 2 (其中 A 为衍生试剂峰, B 为未知峰)。采用大气压化学电离源的正离子模式进行在线柱后质谱定性, 各组分质谱数据见表 1。以壬胺为例的质谱定性结果见图 3。

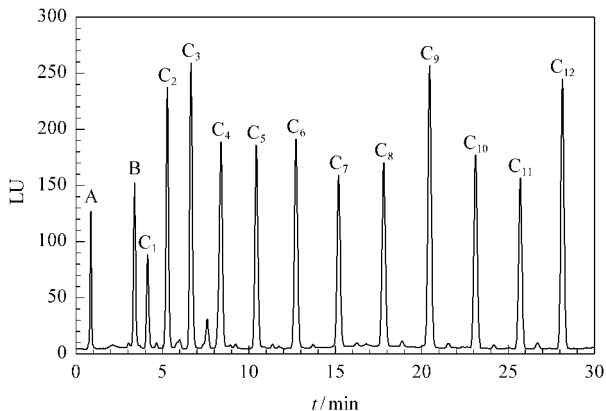


图 2 脂肪胺标准的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of standard amines derivatized with BCAA

1. methylamine ; 2. ethylamine ; 3. propylamine ; 4. butylamine ; 5. pentylamine ; 6. hexylamine ; 7. heptylamine ; 8. octylamine ; 9. nonylamine ; 10. decylamine ; 11. undecylamine ; 12. dodecylamine ; A. 1, 2-benzo-3, 4-dihydrocarbazole-9-acetic acid ; B. unidentified.

表 1 游离脂肪胺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 Regression equations, correlation coefficients, detection limits and mass spectral data of aliphatic amine derivatives

Amine derivative	Regression equation <sup>1)</sup>	r	Detection limit <sup>2)</sup> / ( fmol )	( M + H ) <sup>+</sup> / m/z
C <sub>1</sub>	Y = 16.61X - 5.00	0.9998	28	290.8
C <sub>2</sub>	Y = 48.01X - 5.60	0.9999	12	304.8
C <sub>3</sub>	Y = 55.94X - 4.81	0.9999	14	318.8
C <sub>4</sub>	Y = 48.86X + 0.89	0.9999	21	332.8
C <sub>5</sub>	Y = 45.11X - 1.09	0.9999	17	346.8
C <sub>6</sub>	Y = 50.09X + 40.15	0.9994	20	360.9
C <sub>7</sub>	Y = 42.66X + 20.63	0.9997	20	374.9
C <sub>8</sub>	Y = 46.15X + 17.53	0.9998	19	388.9
C <sub>9</sub>	Y = 72.22X + 17.94	0.9996	14	402.9
C <sub>10</sub>	Y = 49.20X + 0.33	0.9999	23	416.9
C <sub>11</sub>	Y = 42.82X + 0.06	0.9997	22	430.9
C <sub>12</sub>	Y = 65.24X - 3.23	0.9998	12	444.9

1) X : injected amount ( pmol ) ; Y : peak area ; linear range for each amine derivative : 48.83 fmol - 200 pmol. 2) calculated as S/N = 3.

### 2.3 线性回归方程及检测限

当进样量为 48.83 fmol ~ 200 pmol 时,依据峰面积 Y 和实际进样量 X ( pmol ) 进行线性回归, 所得回归方程、相关系数结果见表 1。12 种脂肪胺的线性相关系数在 0.9994 ~ 0.9999 的范围内。各脂肪胺衍生物的检测限按照信噪比为 3 ( S/N = 3 ) 来计算, 为 12 ~ 28 fmol。

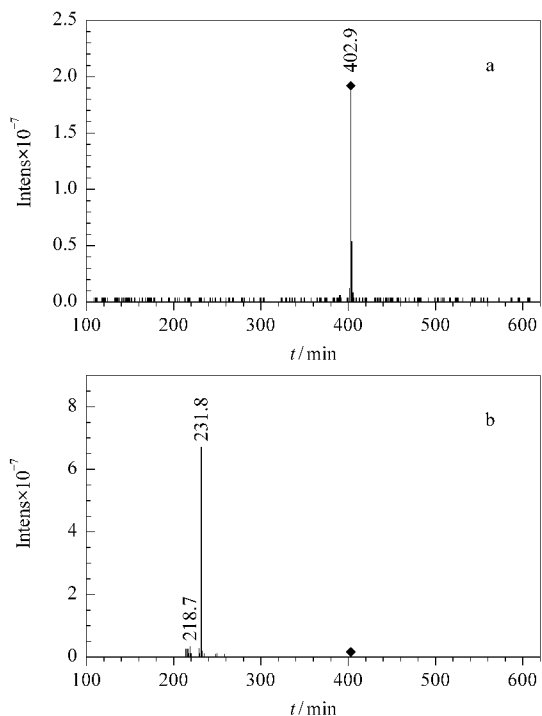


图 3 壬胺的一级 ( a )、二级 ( b ) 质谱图

Fig. 3 First ( a ) and second steps ( b ) mass spectrum of representative nonylamine

### 2.4 精密度试验

在相同的洗脱条件下,对 50 pmol 脂肪胺衍生物进行 6 次平行测定,保留时间和峰面积测定的精密度结果见表 2,每种脂肪胺衍生物保留时间的相对标准偏差 ( RSD ) 均小于 0.28%,峰面积的 RSD 均小于 1.6%。

表 2 保留时间和峰面积的精密度试验结果 ( n = 6 )

Table 2 precision of peak area and retention time ( n = 6 )

Amine derivative	RSD( 1 ) / %	RSD( 2 ) / %
C <sub>1</sub>	0.26	1.33
C <sub>2</sub>	0.26	0.63
C <sub>3</sub>	0.27	0.69
C <sub>4</sub>	0.26	0.83
C <sub>5</sub>	0.24	0.62
C <sub>6</sub>	0.21	0.78
C <sub>7</sub>	0.19	1.56
C <sub>8</sub>	0.15	1.08
C <sub>9</sub>	0.13	1.12
C <sub>10</sub>	0.10	1.14
C <sub>11</sub>	0.09	1.06
C <sub>12</sub>	0.07	0.74

RSD( 1 ) : RSD for retention time ; RSD( 2 ) : RSD for peak area.

### 2.5 实际样品的色谱分离测定

#### 2.5.1 土壤和造纸厂污水中脂肪胺的提取

称取土壤样品 200 g (取自曲阜师范大学图书馆前),用 200 mL 氯仿分两次超声振荡提取,合并提取液,过滤,在滤液中加 1.5 mL 甲酸,超声振荡

20 s 使其转变为相应脂肪胺的有机盐 ,溶剂减压蒸发至干 ,用 1.0 mL 80% 乙腈溶液溶解 ,冷藏备用。

取 50 mL 造纸厂污水(取自泗水造纸厂)用盐酸调至 pH 3.0 左右 ,超声振荡 20 s 使其转变为相应脂肪胺的有机盐 ,过滤后浓缩滤液并用乙腈定容到 10 mL ,冷藏备用。

2.5.2 土壤和污水中脂肪胺的测定

按前述实验条件 ,土壤和造纸厂污水样品的色谱分析结果见图 4 和图 5 ,脂肪胺含量的测定结果见表 3。

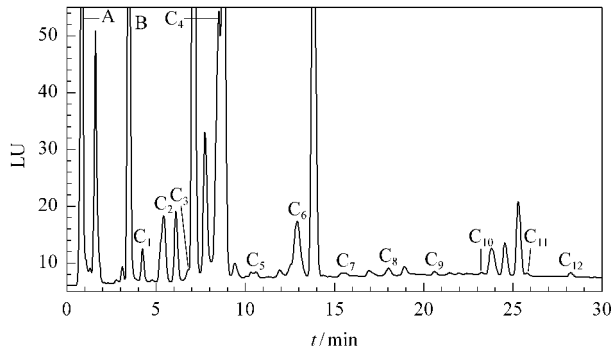


图 4 土壤样品的游离脂肪胺色谱分离图

Fig.4 Chromatogram of aliphatic amines from soil sample  
For peak identifications , see Fig.2.

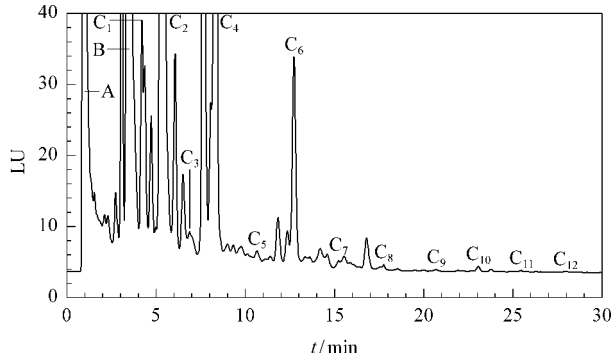


图 5 造纸厂污水样品中脂肪胺的色谱分离图

Fig.5 Chromatogram of aliphatic amines from waste water of paper mill sample  
For peak identifications , see Fig.2.

2.6 回收率试验

在土壤样品中加入一定量的脂肪胺标准品后 ,按照上述提取方法提取后进行衍生 ,所得回收率结果见表 3。

表 3 实际样品中脂肪胺的含量及回收率

Table 3 Content of aliphatic amines from real samples and recoveries

Amine derivative	Waste water sample/( $\mu\text{g/L}$ )	Soil sample/( $\text{ng/g}$ )	Recovery of soil sample/%
C <sub>1</sub>	83.33	4.39	97.14
C <sub>2</sub>	4190.73	4.73	103.41
C <sub>3</sub>	14.69 *	0.43 *	100.74
C <sub>4</sub>	637.46 *	13.24 *	120.22
C <sub>5</sub>	13.01	0.35	102.73
C <sub>6</sub>	246.03	4.45	101.29
C <sub>7</sub>	1.20	0.21	101.38
C <sub>8</sub>	6.95	0.19	104.13
C <sub>9</sub>	2.77	0.12	105.70
C <sub>10</sub>	10.85	0.11	107.03
C <sub>11</sub>	4.07	0.18	108.07
C <sub>12</sub>	5.76	0.25	109.39

\* The content results were obtained by manual integration.

3 结语

本文利用新型荧光试剂 1,2-苯并-3,4-二氢咪唑-9-乙酸对 12 种脂肪胺进行柱前衍生 ,建立了快速、灵敏的测定脂肪胺的方法。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。对实际样品的测定结果表明 :造纸污水中的脂肪胺含量远高于土壤中脂肪胺的含量。

参考文献 :

[ 1 ] Lindroth P , Mopper K. Anal Chem , 1979 , 51 : 1 667  
 [ 2 ] Hill D W , Walters F H , Wilson T D , Stuart J D. Anal Chem , 1979 , 51 : 1 338  
 [ 3 ] Chen R F , Scott C , Trepman E. Biochim Biophys Acta , 1979 , 576 : 440  
 [ 4 ] Ahnoff M , Grundevik I , Arfwidsson A , Fonselius J , Persson B A. Anal Chem , 1981 , 53 : 485  
 [ 5 ] Seiler N. Methods Biochem Anal , 1970 , 18 : 259  
 [ 6 ] Einarsson S , Josefsson B , Lagerkvist S. J Chromatogr , 1983 , 282 : 609  
 [ 7 ] Einarsson S , Folestad S , Josefsson B , Lagerkvist S. Anal Chem , 1986 , 58 : 1 638  
 [ 8 ] Cohen S A , Michaud D P. Anal Biochem , 1993 , 211 : 279  
 [ 9 ] Liu H J. J Chromatogr A , 1994 , 670 : 59  
 [ 10 ] Ndjoko K , Wolfender J L , Hostettmann K. J Chromatogr B , 2000 , 744 : 249  
 [ 11 ] Friso S , Choi S W , Dolnikowski G G , Selhub J. Anal Chem , 2002 , 74 : 4 526