

荧光探针 5-羰基咪唑苯并吡啶酮的合成 及其 LC-APCI-MS 法测定胺

付艳艳², 孙志伟^{1,3}, 赵怀鑫², 白新伟², 索有瑞¹, 李玉林¹, 尤进茂^{1,2}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 曲阜师范大学化学与化工学院, 生命有机分析重点实验室, 曲阜 273165; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 在不加任何催化剂条件下, 2-(12-苯并吡啶酮)-乙酸 (BAAA) 与 *N,N'*-羰基双咪唑 (CDI) 缩合生成新型荧光探针 5-羰基咪唑苯并吡啶酮 (IEBA). IEBA 在 DMF 溶剂中与胺类化合物形成的酰胺类衍生物不仅可发出强烈的荧光, 还具有较高的质谱离子化能力. 该衍生物在乙腈和甲醇-水溶液中的百分离子化 δ 值分别在 0 ~ 57.32% 和 0 ~ 62.14% 范围内. 最大激发和发射波长 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 272 \text{ nm}/505 \text{ nm}$. 12 种胺类衍生物的荧光检出限范围为 0.15 ~ 0.50 ng/mL, 在线 APCI-MS 检出限范围为 1.43 ~ 8.51 ng/mL.

关键词 液相色谱-离子阱质谱; 百分离子化; 2-(12-苯并吡啶酮)-乙酸; 5-羰基咪唑苯并吡啶酮

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)11-2146-08

大多数胺类化合物具有刺激性气味, 可危害人的皮肤、眼睛及呼吸系统, 有些胺被人体组织吸收后可致癌^[1~3]. 许多胺类不仅自身有毒, 还易与空气中氮的氧化物及羟基自由基反应, 产生强致癌性——*N*-亚硝胺类化合物^[4~6]. 因此, 建立高灵敏和高选择性的胺类化合物检测方法, 对保护环境及人类健康具有非常重要的意义. 目前, 检测胺类的方法主要有气相色谱法^[7]和离子交换法^[8]等, 但由于方法灵敏度低而受到限制. 为提高检测灵敏度, 改善选择性, 采用柱前或柱后衍生是一种有效的手段. 尽管测定胺的试剂较多, 但大都存在一些缺点, 如 6-氨基喹啉基-*N*-琥珀酰亚胺碳酸酯 (AQC)^[9] 衍生物在水中量子效率很低, 不利于梯度洗脱; 4-氯-7-硝基-2,1,3-苯并恶唑 (NBD-Cl)^[10] 试剂在水溶液中的稳定性差, 见光易分解等.

本课题组曾报道了几种胺类衍生试剂^[11~14], 均具有很高的荧光灵敏度, 然而在质谱条件下却表现出相对低的离子化能力, 无法实现在线高灵敏质谱鉴定. 本文制备了一种能同时满足荧光和质谱增敏作用的探针分子. 实验结果表明, 5-羰基咪唑苯并吡啶酮 (IEBA) 与胺的亲核取代产物, 具有高荧光灵敏度和很强的质谱离子化能力.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 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); F-7000 型荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司); CARY300 Bio 型紫外-可见分光光度计; Carlo-Erba 1106 型元素分析仪.

12 种脂肪胺标准样品 (上海 Sigma 公司); 乙腈 (色谱纯, 禹城禹王试剂公司); *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 分析纯, 天津大茂试剂公司); *N,N'*-羰基二咪唑 (CDI, 北京百灵威公司) 等其它试剂均为分析纯, 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备.

1.2 试剂合成

3-氨基-2-萘甲酸、3-*N*-苯基-2-萘甲酸和苯并吡啶酮分别参照文献 [15~17] 方法合成.

收稿日期: 2009-06-24.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20075016) 和中国科学院“百人计划”项目 (批准号: 328) 资助.

联系人简介: 尤进茂, 男, 博士, 教授, 主要从事新型荧光材料的开发及在分析中的应用研究. E-mail: jmyou6304@163.com

2-(12-苯并吡啶酮)-乙酸的合成: 在盛有 80 mL DMSO 的 250 mL 三颈瓶中依次加入 10 g 苯并吡啶酮和 13 g KOH, 搅拌下加热至 100 °C 后, 将 13 mL 溴乙酸乙酯于 1 h 内滴加完毕. 继续搅拌 30 min 后冷却, 将混合物转移至 300 mL 水中, 加入 20 g KOH, 加热煮沸 30 min, 使生成的酯充分水解, 放冷后用盐酸调 pH 至 8, 过滤除杂质, 用盐酸调 pH 至 3, 析出沉淀, 将过滤所得的固体溶于含少量 KOH 的水溶液中, 用盐酸调 pH 至 8.0. 过滤杂质, 用盐酸调 pH 至 3, 析出的沉淀重新溶解. 此操作重复 3 次. 将获得的固体干燥后用乙腈重结晶, 得到 6.7 g 金黄色晶体, 产率 56.8%. m. p. 289 °C; 元素分析测定值(%): C 75.2, H 4.33, N 4.61; 理论值(%): C 75.24, H 4.32, N 4.62. IR (KBr 压片), $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3320.98 ($\nu_{\text{O-H}}$), 3023.15 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1605.94 (Ph—C=O), 1571.62, 1488.63, 1449.10, 1383.14, 1293.15, 757.07, 658.65. LC-APCI-MS: m/z 304.1 ($[\text{M} + \text{H}]^+$ 正离子模式); MS/MS: m/z 245.7 (二级质谱裂解后得到母核分子).

5-羰基咪唑苯并吡啶酮(IEBA)的合成: 向 250 mL 三颈瓶中依次加入 2.0 g 2-(12-苯并吡啶酮)-乙酸、3.74 g CDI、100 mL 乙腈和 50 mL 二甲亚砜, 将混合物迅速加热回流 1 h 后, 倒入 300 mL 水中, 搅拌 10 min, 抽滤, 水洗 2 次, 粗品用乙腈重结晶 1 次, 得到黄色晶体 1.23 g. 产率 53.5%, m. p. >239 °C (分解); 元素分析测定值(%): C 74.52, H 4.20, N 11.94; 理论值(%): C 74.78, H 4.25, N 11.89. IR (KBr 压片), $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3040.5 ($\nu_{\text{O-H}}$), 3022.36 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1747.82 (—C=O 在羰基咪唑官能团中), 1643.00 (—C=O 在吡啶环中), 1485.83, 1398.86, 1292.55, 1226.79, 750.64. LC-APCI-MS: m/z 354.0 ($[\text{M} + \text{H}]^+$ 正离子模式); MS/MS: m/z 245.6 (二级质谱裂解后得到母核分子).

1.3 标准溶液的配制

取脂肪胺标准品, 用 DMF 配制成浓度为 0.1 mol/L 的标准溶液, 相应低浓度脂肪胺标准溶液 (5.0×10^{-4} mol/L) 用 DMF 稀释而成. 准确称取 15.15 mg 2-(12-苯并吡啶酮)-乙酸(BAAA), 用 DMF 定容至 10 mL, 浓度为 5.0×10^{-3} mol/L. 准确称取 17.65 mg IEBA, 用 DMF 定容至 10 mL, 浓度为 5.0×10^{-3} mol/L. 准确称取 0.10 g CDI, 用 DMF 定容至 10 mL, 浓度为 6.2×10^{-2} mol/L.

1.4 色谱及质谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 柱 (200 mm \times 4.6 mm, i. d. 5 μm). 流动相 A: 30% 乙腈 (含 0.03 mol/L, pH=4.75 的甲酸/氨水缓冲液), 流动相 B: 95% 乙腈. 梯度洗脱程序: 0 ~ 30 min, 由 10% B 到 100% B; 30 ~ 40 min: 100% B 保持 10 min. 洗脱液流速为 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 272 和 505 nm. 质谱条件: 大气压化学电离源 (APCI), 正离子模式, 喷雾压力 413 kPa, 干燥气流量 5 L/min, 干燥气温度 350 °C, 气化温度 450 °C, 毛细管电压 3500 V, 电晕电流 4000 nA.

1.5 衍生化过程

采用图 1 所示 3 种衍生化方法进行.

方法 A (一步法): 依次向安瓿瓶中加入 88 μL DMF, 200 μL BAAA, 162 μL CDI 及 50 μL 胺标准溶液, 密封后于 80 °C 水浴中振荡反应 5 min, 完毕后取 10 μL 加入 190 μL 乙腈稀释进样.

方法 B (两步法): 依次向安瓿瓶中加入 88 μL DMF, 200 μL BAAA 及 162 μL CDI, 密封后于 60 °C 水浴中振荡反应 20 min, 使 BAAA 与 CDI 作用形成中间体 IEBA, 然后加入 50 μL 混合胺的标准溶液, 密封后于 80 °C 反应 5 min, 完毕后取 10 μL 加乙腈 190 μL 稀释进样.

方法 C (中间体法): 依次向安瓿瓶中加入 250 μL DMF 和 50 μL 混合胺的标准溶液, 再加入 200 μL IEBA, 密封后于 80 °C 反应 5 min, 完毕后取 10 μL 加入 190 μL 乙腈稀释进样.

1.6 样品处理

称取 50.0 g 土壤, 用 200 mL 氯仿分 3 次超声振荡 30 min, 合并滤液, 用甲酸饱和后, 减压挥发至干, 残余物用 80% 乙腈溶解后于 4 °C 条件下储存备用.

1.7 百分离子化估计

中间体 IEBA 衍生物的母核属于含 N, O 杂环的高共轭平面分子, 由于 N 和羰基 O 原子处于特殊的对位结构, 分子内的异构化转变相对容易 (见图 2).

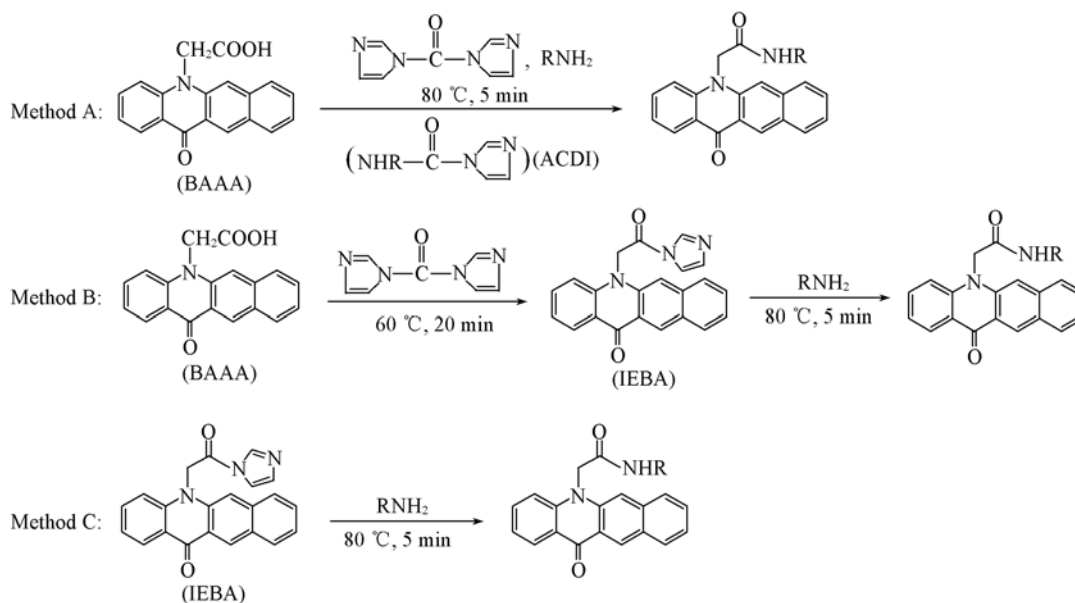


Fig. 1 Derivatization protocol of methods A, B and C

IEBA: 5-[2-(1*H*-imidazol-1-yl)-2-oxoethyl]benzo[*b*]acridin-12(5*H*)-one; BAAA: 2-[12-oxobenzo[*b*]acridin-5(12*H*)-yl]-acetic acid; ACDI: 1*H*-imidazol-1-yl-methanamide.

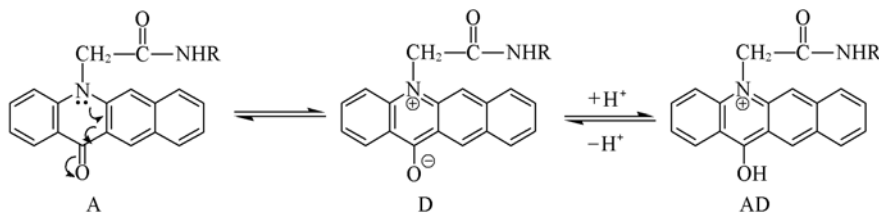


Fig. 2 Isomerization mechanism of IEBA-derivatives in aqueous acetonitrile

分子 A 中 N 原子的孤电子对首先通过异构化作用转移至氧原子, 形成两性离子 D. D 的过渡态包含一个酚氧负离子, 极易接受质子 $[\text{H}]^+$ 而产生季铵离子 AD, 导致分子的荧光猝灭. 其猝灭程度与体系内含质子给予体 (H_2O) 的体积分数有关. 根据不同质子给予体浓度下的荧光猝灭强度, 即可获得分子 A 在水相体系下的百分离子化 (δ) 值. 探针 A 在水相有机体系内存在下列平衡:



其中, A 为探针分子, B 质子给予体 (H_2O), AB 是产物(质子接受体). 荧光猝灭常数可表示为

$$K = \frac{[\text{AB}]}{[\text{A}] \cdot [\text{B}]} \quad (2)$$

其中, $[\text{A}]$, $[\text{B}]$ 和 $[\text{AB}]$ 为相应的平衡浓度, 根据质量守恒定律, 百分离子化 (δ) 值可定义为

$$\delta = \frac{[\text{AB}]}{[\text{A}]_0} = \frac{[\text{AB}]}{[\text{A}] + [\text{AB}]} \quad (3)$$

假设未被离子化的 A 的最初浓度为 $[\text{A}]_0$, 其对应的荧光强度为 F_0 , 则下列关系成立:

$$F_0 = K' \Phi_f [\text{A}]_0 \quad (4)$$

式中, K' 为与仪器相关的常数, Φ_f 为 A 的量子产率. 当部分 A 被质子化后, 剩余 A 的荧光强度为 F , 此时 F 可表示为

$$F = K' \Phi_f (1 - \delta) [\text{A}]_0 \quad (5)$$

式中, $\delta = [\text{AB}]/[\text{A}]_0$, 结合式(4)和式(5)得出:

$$\frac{F_0 - F}{F} = \frac{K' \delta [\text{A}]_0}{K' (1 - \delta) [\text{A}]_0} \quad (6)$$

式(6)可简化为

$$\frac{F_0 - F}{F} = \frac{\delta}{1 - \delta} \quad (7)$$

再将式(7)改写为

$$\delta = \frac{(F_0/F) - 1}{F_0/F} \quad (8)$$

根据不同浓度质子给予体下的荧光强度 F 值, 由式(8)可求得相应的百分离子化 δ 值.

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱性质

当溶液中不存在质子给予体 H_2O 时, 随着温度(10 ~ 70 °C)的升高, 探针 IEBA 荧光强度降低. 主要原因是荧光量子产率随非辐射跃迁过程的速率而改变. 溶液温度升高, 介质的黏度变小, 从而增大了荧光分子与溶剂分子碰撞猝灭的几率, 非辐射能量转移速率升高, 荧光量子产率降低, 相对荧光强度降低^[18].

当溶液中存在质子给予体 H_2O (或甲醇)时, 探针 IEBA 的荧光强度随温度(10 ~ 70 °C)的升高而升高. 由于 IEBA 分子特殊的结构, 存在分子内异构化作用, 能与水分子通过氢键作用形成 1:1 ~ 1:n (摩尔比)的加合物, 从而导致其与溶剂分子碰撞几率减小, 使荧光强度随温度升高而增强^[18]. 从甲醇与水的分子构造分析, 它们具有相似的结构, 因此甲醇也能与探针分子通过氢键作用产生强烈的溶剂化, 从而通过温度的升高增强荧光强度.

当水相的有机体系(如乙腈、甲醇)处于恒温条件时, 随着体系中质子给予体浓度的增加, 荧光强度降低, 这主要是探针分子与质子给予体形成如图 2 所示的季铵离子而导致荧光猝灭的结果. 对 IEBA 探针分子在不同浓度的乙腈及甲醇水溶液中的百分离子化计算结果列于表 1. 由表 1 可见, 随着质子给予体浓度的增加, 荧光强度逐渐降低, 且发射波长明显红移, 乙腈中红移约 47 nm, 甲醇中红移约 12 nm. 理论上, 百分离子化 δ 值与加入水的体积分数应呈线性关系($\delta = 0.763 + 0.256\varphi$, $r = 0.9927$, φ 为水的体积分数, 0 ~ 60%), 但乙腈中水的体积分数高于 60% 后则偏离线性关系, 这主要是探针分子在低浓度乙腈中溶解度降低的结果. 以甲醇为溶剂得到类似结果, 水含量在 0 ~ 50% 时线性良好($\delta = 1.108 + 0.315\varphi$, $r = 0.9914$), 水含量超 50% 后则偏离线性. 上述估计的百分离子化 δ 值很好地证明了探针分子在乙腈和甲醇流动相体系中具有良好的质谱离子化能力.

Table 1 Fluorescence intensity of IEBA in the presence of varying amount of water and corresponding calculated percent ionization δ values*

Volume fraction of H_2O in solvent (%)	Acetonitrile			Methanol		
	Emission wavelength/nm	Relative intensity/a. u.	Percent ionization, δ (%)	Emission wavelength/nm	Relative intensity/a. u.	Percent ionization, δ (%)
100	520	309	57.32	518	265	62.14
90	515	419	42.13	517	318	54.57
80	511	496	31.49	516	388	44.57
70	507	550	24.03	515	481	31.29
60	506	612	15.47	514	556	20.57
50	505	629	13.12	511	586	16.29
40	503	639	11.74	509	602	14.00
30	501	656	9.39	508	626	10.57
20	499	680	6.08	506	647	7.57
10	495	700	3.31	506	662	5.43
0	473	724	0	506	700	0

* Concentration of IEBA in aqueous acetonitrile or methanol is kept at 5.0×10^{-7} mol/L; F_0 is measured in 100% acetonitrile or methanol; δ values are calculated according to Eq. (8).

IEBA 的 50% 乙腈溶液(5.0×10^{-7} mol/L)的最大激发和发射波长分别为 272 和 505 nm, 荧光光谱见图 3. 由图 3 可知, 由于 IEBA 分子内共轭强度的增大, 相应发射光($\lambda_{em} = 505$ nm)已接近绿色荧光. 在实际 LC 分离测定中, 这一特性更有利于降低背景电解质的干扰, 提高检测灵敏度.

2.2 衍生化条件

选用辛胺、壬胺、癸胺、十一胺及十二胺考察了试剂用量、溶剂、温度和时间对衍生化产率的影响. 对温度和时间考察结果表明, 衍生温度为 80 °C、时间为 5 min 时具有最高的衍生化产率. 实验中选取乙腈、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)、丙酮、乙酸乙酯和三氯甲烷 6 种溶剂进行考察, 结果表明, DMF 给出最高的检测响应(其产率作为 100%). 丙酮、二氯甲烷和三氯甲烷仅给出 10% ~ 25% 的响应值, 这主要是试剂及其衍生物在相应溶剂中具有较小溶解度的缘故. 与 DMF 相比, DMSO 和乙酸乙酯给出 90% ~ 94% 的产率, 因此实验中选取 DMF 作为反应共溶剂. 在前述优化条件的基础上, 对衍生方法 A 和 B 中 CDI 的用量进行了考察, 结果表明, 当 CDI 与 BAAA 的摩尔比为 3 时, 衍生化率达最高; 继续增加 CDI 的用量, 衍生化率反而降低. 这主要是由于过量的 CDI 与胺形成 1*H*-咪唑甲酰胺(ACDI)中间体的缘故. 实验中采用 3 种衍生方法对 12 种脂肪胺进行色谱分离, 结果见图 4.

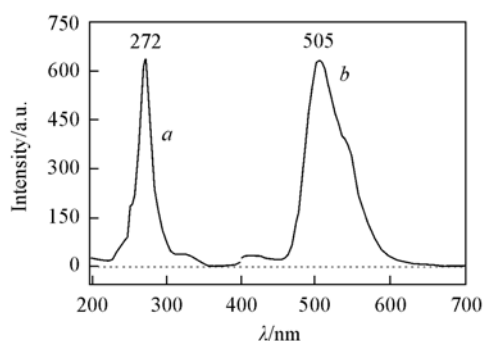


Fig. 3 Fluorescence spectra of IEBA

a. Excitation spectrum; b. emission spectrum.

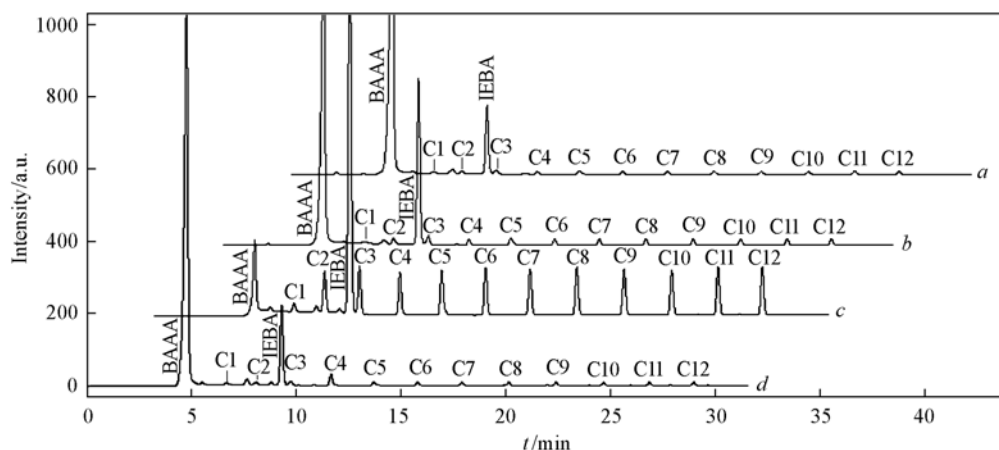


Fig. 4 Chromatograms for standard aliphatic amine derivatization

a. Method A; b. Method B; c. Method C; d. derivatization in the presence of a small quantity of water. C1: methylamine; C2: ethylamine; C3: propylamine; C4: butylamine; C5: pentylamine; C6: hexylamine; C7: heptylamine; C8: octylamine; C9: nonylamine; C10: decylamine; C11: undecylamine; C12: dodecylamine; BAAA: 2-[12-oxobenzo[*b*]acridin-5(12*H*)-yl]acetic acid; IEBA: 5-[2-(1*H*-imidazol-1-yl)-2-oxoethyl]benzo[*b*]acridin-12(5*H*)-one.

对比图 4 可知, 衍生化方法 A(图 4 曲线 *a*) 结果较差. 原因在于一步法中, CDI 首先与胺形成中间体 ACDI, BAAA 的羧基与中间体 ACDI 的反应是一个慢亲核取代过程, 从而导致衍生化产率极低. 尽管方法 B(图 4 曲线 *b*) 先形成中间体 IEBA, 但响应值与方法 C(图 4 曲线 *c*) 相比仍显著降低. 这是由于体系中存在过量的缩合剂 CDI, 当胺加入后, 像方法 A 一样, 部分胺优先与过量 CDI 反应形成中间体 ACDI, 导致产率降低. 方法 C(图 4 曲线 *c*) 是一个快速亲核取代过程, 产率最高^[19]. 因此随后的实验中选用衍生化方法 C. 值得注意的是, 当衍生过程有少量水存在时, 衍生物的检测响应显著降低, 中间体 IEBA 的峰强度大幅下降, 相应副产物 BAAA 的峰强度加强(图 4 曲线 *d*), 主要原因是水的存在导致中间体 IEBA 强烈水解, 产生 BAAA($[M+H]^+$; m/z 304.1; MS/MS: m/z 246.0).

2.3 质谱解析

与游离的伯胺和仲胺官能团 $[-NHR, -N(R)_2]$ 对比, IEBA 探针分子内的氮原子与苯环的 $n-\pi$ 共轭程度显著增强, 因此, 理论上 IEBA-胺衍生物应给出较弱的质谱离子化能力. 然而事实上, 衍生产物在 APCI-MS 条件下却表现出强质谱离子化能力, 原因在于 IEBA 分子的特殊结构. 在水相的有机溶剂中, IEBA 母核很容易产生分子内的烯醇式结构转变(见图 2), 异构体 A 和季铵盐离子 AD 在质子给

予体 H_2O 存在下, 能够很快地进行互变异构化^[20]. 由于 APCI-MS 离子化主要是分子在质谱离子室中被水分子溶剂化的结果, 因此这种异构化对提高质谱灵敏度至关重要.

探针分子 IEBA 结构也表明, pH 值将影响衍生物的荧光强度和质谱离子化能力, 即高 pH 值有利于荧光测定, 而低 pH 值有利于质谱鉴定. 为此实验中制备了 2 份流动相(30% 乙腈水溶液), 分别用甲酸/氨水缓冲液调至 pH = 3.75 和 pH = 8.65, 并对上述影响因素进行了对比研究. 结果表明, 脂肪胺衍生物在 pH = 3.75 时的荧光响应值比 pH = 8.65 时低 1.42 倍(色谱图略). pH = 3.75 时的质谱离子流响应值远远大于 pH = 8.65 时的响应值[见图 5(A) 和(B)], 这一结果也与百分离子化的预测结果, 即碱性条件下 IEBA 分子中的 N 原子难以离子化相一致. 实验表明, 当流动相 pH < 5.0 时, 质谱离子流强度与 pH = 3.75 时的强度相当, 且 pH 值的改变并未造成衍生物保留时间的明显变化. 考虑荧光和质谱两方面因素, 实验选用 pH = 4.75 的流动相.

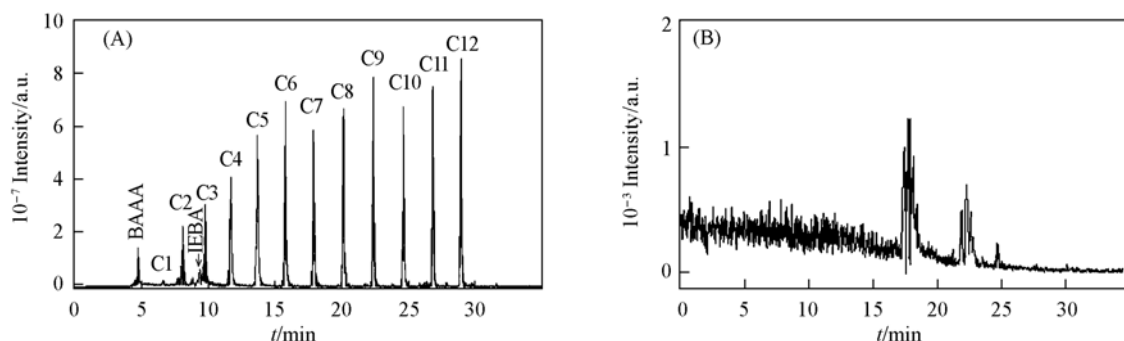


Fig. 5 Total ion current chromatogram for standard IEBA-aliphatic amines

(A) Ion current chromatogram at pH = 3.75; (B) ion current chromatogram at pH = 8.65.

以癸胺衍生物为代表的质谱图见图 6, 质谱裂解模式见图 6(B) 插图. 基于 m/z $[M + H]^+ \rightarrow m/z$ 286.4, m/z 258.6 和 m/z 245.4 的特征峰是胺类衍生物鉴定的有效依据.

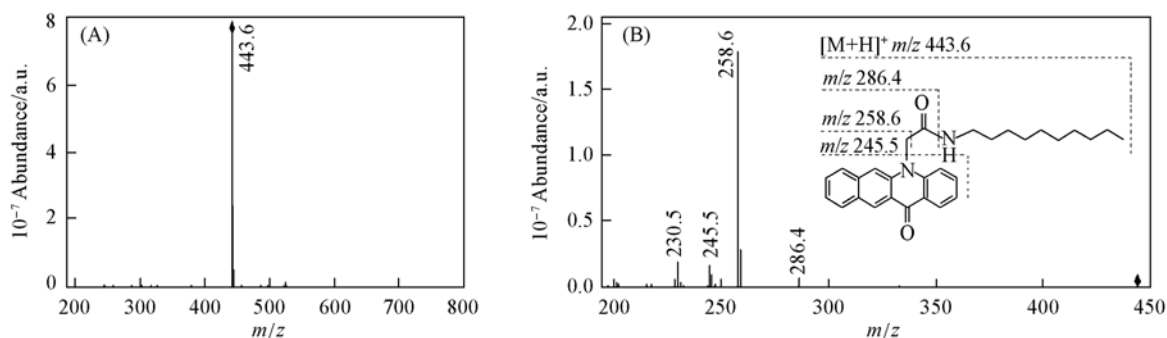


Fig. 6 APCI-MS/MS spectra of representative decylamine derivative

(A) MS spectrum; (B) MS/MS spectrum, inset: cleavage mode.

2.4 线性回归方程、检出限和重现性

实验中采用衍生方法 C 对胺类化合物进行线性回归, 进样量在 22.5 fmol ~ 46 pmol 范围内的线性回归方程、相关系数和检出限列于表 2. 各脂肪胺衍生物的线性相关系数均大于 0.9995, 荧光检出限在 0.15 ~ 0.50 ng/mL 范围内, 在线 APCI-MS 检出限在 2.07 ~ 8.51 ng/mL 范围内(信噪比按 $S/N = 3$ 计算, 质谱线性范围略). 对 46 pmol 脂肪胺衍生物平行 6 次分析, 保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.033% ~ 0.062% 和 1.72% ~ 2.13% 范围内.

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits and MS data of aliphatic amine derivatives*

Aliphatic amine derivative	Regression equation	Correlation coefficient	Fluorescence limits/(ng · mL ⁻¹)	MS(M + H) ⁺ , m/z	MS/MS, m/z	APCI-MS limits/(ng · mL ⁻¹)
C1	$Y = 0.37298 + 1.45836X$	0.9995	0.16	317.7	258.7, 246.7	1.43
C2	$Y = 2.34028 + 5.1401X$	0.9999	0.15	331.7	258.6, 246.7	2.07

Continued

Aliphatic amine derivative	Regression equation	Correlation coefficient	Fluorescence limits/(ng·mL ⁻¹)	MS(M+H) ⁺ , m/z	MS/MS, m/z	APCI-MS limits/(ng·mL ⁻¹)
C3	$Y=0.53372+4.86138X$	0.9999	0.20	345.7	258.7, 246.7	2.71
C4	$Y=2.33895+3.33948X$	0.9999	0.26	359.7	258.6, 246.6	3.36
C5	$Y=2.32124+3.13161X$	0.9998	0.33	373.7	258.6, 246.7	4.00
C6	$Y=0.27883+2.76496X$	0.9996	0.28	387.7	258.6, 246.6	4.65
C7	$Y=1.74897+2.35189X$	0.9999	0.45	401.6	258.5, 246.6	5.29
C8	$Y=2.41021+2.12646X$	0.9998	0.37	415.6	258.6, 246.6	5.93
C9	$Y=6.18825+1.80627X$	0.9998	0.47	429.6	258.5, 246.5	6.58
C10	$Y=3.02426+1.66835X$	0.9997	0.49	443.6	258.6, 246.6	7.22
C11	$Y=3.46850+1.60459X$	0.9999	0.50	457.6	258.5, 246.5	7.87
C12	$Y=2.46146+1.49140X$	0.9999	0.50	471.5	258.4, 246.6	8.51

* Linear ranges of APCI-MS were not detected.

2.5 实际样品的分析

土壤样品脂肪胺的色谱分离图见图7。在提取液中加入脂肪胺标准品(5.0×10^{-4} mol/L), 按照实验方法处理并衍生化, 所得土壤中脂肪胺含量和回收率见表3。

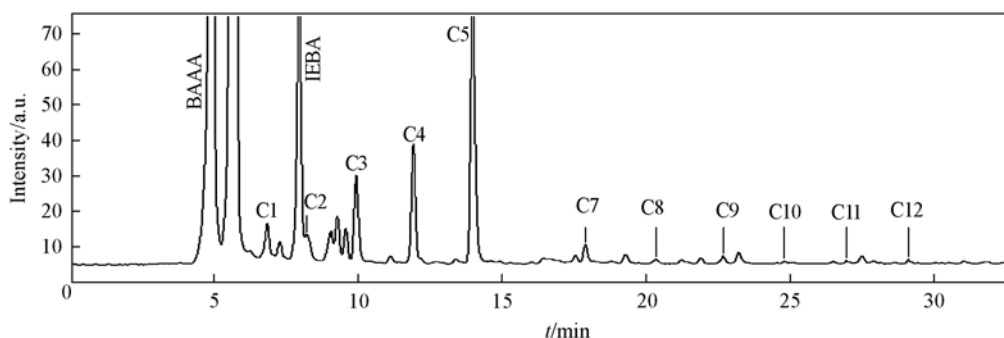


Fig. 7 Chromatogram of aliphatic amine from water in soil

Chromatographic conditions and peaks C1—C12 as those in Fig. 4.

Table 3 Content and recoveries of aliphatic amines from water in soil

Amine derivative	Content of soil sample/(ng·g ⁻¹)	ID ^a	Recovery(%)	Amine derivatives	Content of soil sample/(ng·g ⁻¹)	Recovery(%)
C1	13.52	Yes	98.2	C7	4.54	99.2
C2	2.42	Yes	99.6	C8	1.43	102.5
C3	10.26	Yes	101.3	C9	1.69	101.7
C4	20.42	Yes	98.5	C10	0.59	100.4
C5	52.11	Yes	100.8	C11	0.62	102.3
C6	ND ^b		99.7	C12	0.74	103.5

a. ID; componets were determined by on-line APCI-MS; b. C6 was not determined owing to co-eluting with unknown components.

3 结 论

利用新合成的含 N, O 杂原子的荧光探针 5-羰基咪唑苯并吡啶酮(IEBA), 对胺类化合物进行了标记. 利用建立的公式计算了探针分子在乙腈和甲醇水溶液中的百分离子化 δ 值. 实验中比较了 3 种不同方法下胺的衍生产率, 结果表明, 方法 C 给出最高的衍生产率. 试剂与 CDI 缩合形成的中间体 IE-BA 在不加任何催化剂条件下与胺形成稳定的衍生产物, 衍生物不仅具有强荧光发光特性, 同时具有很强的质谱离子化能力. 建立的方法具有线性范围宽、重现性好、操作简便且干扰小等特点, 对实际土壤样品中游离脂肪胺的测定结果令人满意.

参 考 文 献

- [1] Belin L., Wass U., Audunsson G., et al. Br. J. Med. [J], 1983, 40(3): 251—257
 [2] Gao C. X., Krull I. S., Trainor T. J. Chromatogr. Sci. [J], 1990, 28(3): 102—08

- [3] Dalene M. , Lundh T. , Mathiasson L. . J. Chromatogr. [J], 1985, **322**: 169—176
- [4] Önal A. . Food Chem. [J], 2007, **103**: 1475—1486
- [5] Yurchenko S. , Mölder U. . Food Chem. [J], 2007, **100**: 1713—1721
- [6] Yurchenko S. , Mölder U. . Food Chem. [J], 2006, **96**: 325—333
- [7] Deng C. , Li N. , Wang L. , *et al.* . J. Chromatogr. A [J], 2006, **1131**: 45—50
- [8] Casella I. G. , Palladino G. A. , Contursi M. . J. Sep. Sci. [J], 2008, **31**: 3718—3726
- [9] Motte J. C. , Windy R. , Delafortrie A. . J. Chromatogr. A [J], 1996, **728**: 333—341
- [10] Ahnoff M. , Grundevik I. , Arfwidsson A. , *et al.* . Anal. Chem. [J], 1981, **53**(2): 485—489
- [11] You J. , Zhao W. , Liu L. , *et al.* . Talanta [J], 2007, **72**: 914—925
- [12] You J. , Liu L. , Zhao W. , *et al.* . Anal. Bioanal. Chem. [J], 2007, **387**: 2705—2718
- [13] CHEN Xiang-Ming(陈向明), SHI Yun-Wei(石运伟), ZHAO Xian-En(赵先恩), *et al.* . Chinese Journal of Chromatography(色谱) [J], 2005, **23**(6): 642—645
- [14] ZHAO Xian-En(赵先恩), LI Yu-Lin(李玉林), YOU Jin-Mao(尤进茂), *et al.* . Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学) [J], 2007, **35**(6): 779—785
- [15] Allen C. F. H. , Alan B. . Organic Syntheses [J], 1942, **22**: 19—23
- [16] Marthaed W. . The Merck Index, 11th Ed. [M], Rahway: Merck & Co. Inc. , 1988: 7290
- [17] Shirley D. A. , Tatum W. E. . J. Org. Chem. [J], 1960, **25**(12): 2238—2240
- [18] XU Jin-Jun(许金钧), WANG Zun-Ben(王尊本). Fluorescence Analysis, 3rd Ed. (荧光分析法, 第三版) [M], Beijing: Science Press, 2006: 49—61
- [19] You J. , Zhang W. , Zhang Q. , *et al.* . Anal. Chem. [J], 2002, **74**: 261—269
- [20] ZHAO Huai-Xin(赵怀鑫), SUN Xue-Jun(孙学军), SUN Zhi-Wei(孙志伟), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2009, **30**(4): 675—681

Syntheses of Fluorescence Probe 5-[2-(1*H*-imidazol-1-yl)-2-oxoethyl]benzo[*b*]acridin-12(5*H*)-one and Its Application for the Determination of Aliphatic Amines with LC-APCI-MS

FU Yan-Yan², SUN Zhi-Wei^{1,3}, ZHAO Huai-Xin², BAI Xin-Wei²,
SUO You-Rui¹, LI Yu-Lin¹, YOU Jin-Mao^{1,2*}

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Key Laboratory of Life-Organic Analysis, School of Chemistry and Chemical Engineering,
Qufu Normal University, Qufu 273165, China;

3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract 2-[12-Oxobenzo[*b*]acridin-5(12*H*)-yl]-acetic acid (BAAA) reacted with coupling agent *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) to form an activated amide intermediate 5-[2-(1*H*-imidazol-1-yl)-2-oxoethyl]benzo[*b*]acridin-12(5*H*)-one (IEBA), which was a novel fluorescence probe. The amide intermediate (IEBA) reacted preferably with amines in DMF solvent in the absence of catalysts to give the high yields of derivatives, which not only have high fluorescence sensitivity but also have strong ionizable ability. The optimum excitation and emission wavelengths were at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 272 \text{ nm}/505 \text{ nm}$. The percent ionization δ values in aqueous acetonitrile and aqueous methanol were in the range of 0—57.32% and 0—62.14%, respectively. The fluorescence detection limits of twelve amine derivatives (at a signal-to-noise ratio of 3) were in the range of 0.15—0.50 ng/mL. The online APCI-MS detection limits were at levels of 1.43—8.51 ng/mL ($S/N = 3$).

Keywords High performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry; Percent ionization; 2-[12-Oxobenzo[*b*]acridin-5(12*H*)-yl]-acetic acid; 5-[2-(1*H*-imidazol-1-yl)-2-oxoethyl]benzo[*b*]acridin-12(5*H*)-one

(Ed. : A, G)