

新型脂肪胺荧光标记试剂的合成及小分子 脂肪胺的衍生检测

肖玲艳¹, 李赛花¹, 马明^{2,3*}, 肖道清^{2,3}, 陈丹超², 俞雄飞²

(1. 通标标准技术服务有限公司宁波分公司, 宁波 315040; 2. 宁波出入境检验检疫局技术中心, 宁波 315012;
3. 宁波检验检疫科学技术研究院, 宁波 315012)

摘要: **目的** 合成一种新的以荧光素为荧光团, N-羟基琥珀酰亚胺活性酯为反应基团的脂肪胺荧光标记试剂, 并建立以新试剂标记短链脂肪胺并用高效液相色谱-荧光检测法进行分离的方法。 **方法** 在 pH 8.5 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 缓冲溶液中, 25 °C 下, 衍生试剂浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 衍生反应进行 10 min, 衍生物峰面积即可达到最大且稳定。 **结果** 在优化的条件下, 建立的检测方法的线性范围为 0.01~2 $\mu\text{mol/L}$, 线性回归系数 > 0.999, 检测限达到 0.1~1 $\mu\text{g/L}$ 。 **结论** 衍生后的产物利用高效液相色谱-荧光检测法, 可以使得 6 种小分子脂肪胺得到有效分离, 方法具有衍生速度快, 灵敏度高等优点。

关键词: 脂肪胺; 荧光标记; 高效液相色谱

Synthesis of novel aliphatic amine fluorescence labeling reagents and derivative determination of micromolecule aliphatic amine

XIAO Ling-Yan¹, LI Sai-Hua¹, MA Ming^{2,3*}, XIAO Dao-Qing^{2,3}, CHEN Dan-Chao¹, YU Xiong-Fei¹

(1. *Societe Generale de Surveillance S.A.-China Standard Technology Development Corp. Standards Technical Services Co., Ltd. Ningbo Branch, Ningbo, 315040, China*; 2. *Technology Center of Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012, China*; 3. *Ningbo Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Ningbo 315012, China*)

ABSTRACT: Objective To synthesize a new aliphatic amine labeling reagent, using fluorescein as fluorophore and N-hydroxysuccinimidyl active ester as reaction group, and establish a separation method by labeling short chain aliphatic amine with new reagent and using high performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Methods** The derivatization reaction was achieved with the buffer of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ at pH 8.5, the reaction temperature at 25 °C, the reagent solution at 50 $\mu\text{mol/L}$ and the reaction time of 10 min. **Results** The linear range from 0.01 $\mu\text{mol/L}$ to 2 $\mu\text{mol/L}$ was observed for the proposed method. The limit of detection (LOD) of developed method was between 0.1 $\mu\text{g/L}$ and 1 $\mu\text{g/L}$ with the linear regression coefficient above 0.999. **Conclusion** The baseline separation of 6 small molecule aliphatic amine derivatives is achieved using optimized HPLC fluorescence detection. The method has the advantages of high derivative speed and sensitivity.

KEY WORDS: aliphatic amine; fluorescence labeling; high performance liquid chromatography

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目(2011IK217)、宁波市自然科学基金项目(2010A610032)、宁波市社会发展科研项目(2014C50050)

Fund: Supported by Scientific Research Project of National Quality Supervision, Inspection and Quarantine Bureau (2011IK217), Ningbo Natural Science Foundation (2010A610032), and Ningbo Social Development Research Project (2014C50050)

*通讯作者: 马明, 高级工程师, 主要研究方向为色谱分离技术。E-mail: mam@nbciq.gov.cn

*Corresponding author: MA Ming, Senior Engineer, Technical Center of Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012, China. Email: mam@nbciq.gov.cn

1 引言

甲胺(methylamine, MA)、乙胺(ethylamine, EA)、丙胺(propylamine, PrA)、丁胺(butylamine, BA)、戊胺(pentylamine, PA)、己胺(hexylamine, HA)等小分子脂肪胺是一类具有广泛用途的工业原料。小分子脂肪胺是氨基酸、蛋白质的降解产物之一,存在于多种生物体内和食品及饮料中^[1-3],由于小分子脂肪胺具有刺激性气味,对皮肤、黏膜、眼睛等有损害,且在亚硝胺的形成中具有重要作用,因此对环境对人体具有一定的危害。

用于测定脂肪胺的方法有气相色谱法^[4]、荧光分光光度法^[3]、高效液相色谱法^[5]、毛细管电泳法^[6]等。其中,高效液相色谱法测定环境样品、酒水饮料等日常食物中的脂肪胺是一种快速、可靠且应用最为广泛的分离检测手段。

由于小分子脂肪胺本身没有荧光,要对它们进行灵敏检测就要用衍生试剂对它们进行标记。常见的用于衍生氨基化合物的荧光试剂有丹磺酰氯(Dns-Cl)^[7]、4-氯-7-硝基-2,1,3-苯并邻苯噻二唑(NBD-Cl)^[8]、邻苯二甲酐(OPA)^[9]、6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺甲酸酯(AQC)^[10]、荧光素异硫氰酸酯(FITC)^[11]、5(6)-羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)^[12]、6-氧-[(1-琥珀酰亚胺)氧酰甲基]-荧光素乙酯(SOFE)^[13]等。这些荧光标记试剂标记脂肪胺均具有

一些缺点,如 OPA 和脂肪胺的衍生产物不稳定, FITC 衍生的时间较长, CFSE 合成较为复杂等。

本文以荧光素为荧光团, N-羟基琥珀酰亚胺活性酯为反应基团设计合成了一种新的氨基化合物的荧光标记试剂: 6-氧-(N-羟基琥珀酰亚胺丁二酸单酯)-9-(2'-甲氧羰基)荧光素(SSMF)。该脂肪胺荧光标记试剂合成纯化方法简单,对脂肪胺的衍生效率高、衍生条件温和,衍生产物稳定,衍生产物的高效液相色谱荧光检测法灵敏度较高。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Alliance e2695 型高效液相色谱仪,配有 2475 型荧光检测器(美国 Waters 公司)。

甲醇为色谱纯(迪马科技公司),甲胺、乙胺、丙胺、丁胺、戊胺、己胺均为标准品(Sigma 公司),荧光素、丁二酸酐、N-羟基丁二酰亚胺、二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N-二甲基甲酰胺、硫酸、乙酸、乙醚、碳酸氢钠、硼酸、硼砂等均为分析纯,购自国药集团。

试验用水为 milli-Q 超纯水。

2.2 方法

2.2.1 荧光标记试剂的合成

新荧光标记试剂 6-氧-(N-羟基琥珀酰亚胺丁二酸单酯)-9-(2'-甲氧羰基)荧光素(SSMF)按照如下路线进行合成:

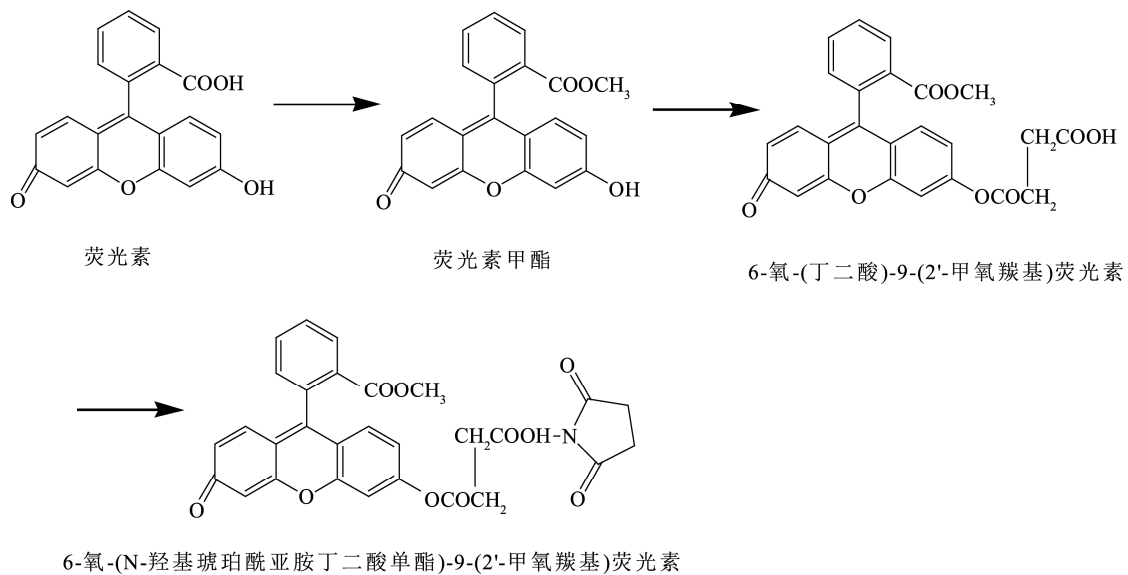


图1 6-氧-(N-羟基琥珀酰亚胺丁二酸单酯)-9-(2'-甲氧羰基)荧光素的合成路线

Fig. 1 The synthesis route of 6-oxo-(N-succinimidyl succinate acid monoester)-9-(2'-methoxycarbonyl) fluorescein

荧光素甲酯按文献方法合成^[14]。将 10 mmol 荧光素溶于 10 mL 甲醇中, 滴入 2.5 mL 浓硫酸。加热回流约 12 h。反应停止后, 迅速冷却反应液, 分批加入 10 g NaHCO₃ 粉末。反应结束后过滤, 用少量水洗, 得到的红色固体放入 2% 50 mL NaHCO₃ 水溶液中, 过滤, 用水洗。重复洗涤 3 次。再加入 1% 醋酸溶液, 过滤, 水洗。干燥后, 得到红棕色固体荧光素甲酯。

取上述制备的荧光素甲酯, 溶于 10 mL 无水 DMF 中, 加入适量丁二酸酐, 75 °C 加热回流约 10 h, 停止反应。向产物中加入约 100 mL 2% NaHCO₃ 溶液, 充分反应后, 用 0.1 mol/L 盐酸调节体系至酸性, 过滤。得到的红棕色固体用 1% 乙酸洗涤 3 次, 40 °C 真空干燥 24 h 以上, 得 6-氧-丁二酸-9-(2'-甲氧羰基)荧光素。

取适量 6-氧-丁二酸-9-(2'-甲氧羰基)荧光素和 N-羟基琥珀酰亚胺, 溶于 3 mL 无水 DMF 中, 再加入 0.5 g 二环己基碳二亚胺, 室温(20 °C)下密闭搅拌过夜。过滤除去沉淀, 用少量无水乙腈淋洗, 滤液中加入无水乙醚, 剧烈搅拌, 收集沉淀, 用乙醚淋洗, 在 40 °C 真空中干燥 24 h, 得到红橙色 6-氧-(N-羟基琥珀酰亚胺丁二酸单酯)-9-(2'-甲氧羰基)荧光素粉末。

2.2.2 衍生反应

取 10 μL 甲胺、乙胺、正丙胺、正丁胺、正戊胺、正己胺混合溶液于 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μL Na₂B₄O₇-H₃BO₃ 溶液(pH 8.5)缓冲溶液, 再加入 10 μL SSMF 乙腈溶液, 用水稀释至 1 mL, 室温下衍生 10 min。0.45 μm 滤膜过滤后直接进样。

2.2.3 色谱条件

色谱柱为 Xbridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水, 流速为 1.0 mL/min, 采用下列程序进行梯度洗脱: 0~5 min: 甲醇-水(30:70, V:V); 5~15 min: 线性升至甲醇-水(80:20, V:V); 15~20 min: 甲醇-水(80:20, V:V)。柱温和样品盘温度均为 25 °C。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

甲醇-水是最常用的流动相体系, 分别试验了不同配比的甲醇-水体系, 结果表明: 采用等度洗脱时, 当流动相中甲醇含量大于 80%(V:V)时, 6 种小分子脂肪胺的衍生物的色谱峰重合; 降低甲醇在流动相中的比例, 当流动相中甲醇含量大于 50%(V:V)时, 6 种小分子脂肪胺的衍生物不能有效分离; 继续降低甲

醇浓度, 当流动相中甲醇含量降至 30%(V:V)时, 6 种小分子脂肪胺的衍生物可以完全分离, 但己胺衍生物的色谱峰洗脱时间达到 70min 以上, 检测时间过长。为了兼顾分离的效率和分离效果, 我们采用梯度洗脱方式进行洗脱, 经优化, 采用如下梯度洗脱程序: 0~5 min: 甲醇-水(30:70, V:V)5~15 min: 线性升至甲醇-水(80:20, V:V)15~20 min: 甲醇-水(80:20, V:V)。六种小分子脂肪胺的衍生物可以在 22 min 内达到有效分离。

3.2 衍生条件的优化

3.2.1 衍生试剂用量的选择

N-羟基琥珀酰亚胺活性酯衍生胺的反应一般在水相中进行, 然而, 在此反应中 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯衍生胺的反应与其水解反应是一对竞争反应, 因此, 为了保证胺的完全衍生标记, 衍生试剂应该适量过量。我们试验了当胺的浓度为 0.50 μmol/L 时, 不同浓度衍生试剂的影响, 结果如图 2 所示。

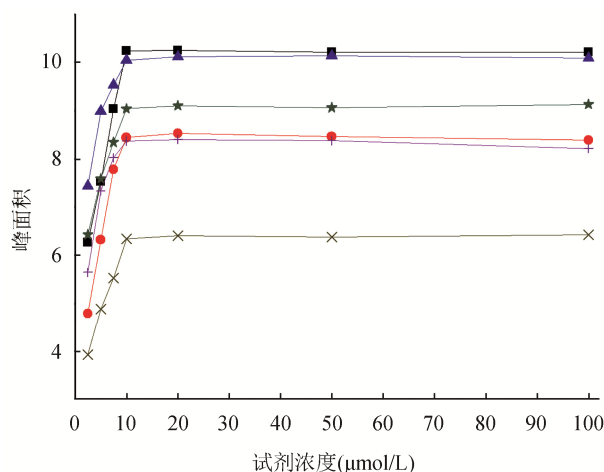


图 2 SSMF 浓度对胺衍生物峰面积的影响

Fig. 2 Effect of SSMF concentration on the peak area of amine derivatives

▲: 甲胺; ●: 乙胺; ■: 丙胺; ★: 丁胺; +: 戊胺; ×: 己胺.
▲: MA; ●: EA; ■: PrA; ★: BA; +: PA; ×: HA.

由图 2 可知, 当衍生试剂的用量在 10~100 μmol/L 之间时, 衍生物的峰面积达到最大且稳定。试剂用量小于 7.5 μmol/L 时, 衍生物的峰面积偏小。试剂用量大于 10 μmol/L 时, 衍生峰面积没有提高, 但水解峰的峰面积会增大, 一方面有可能对色谱柱造成污染损伤, 也可能覆盖甲胺的色谱峰。故选用 50 μmol/L 为本实验的最佳试剂用量。

3.2.2 缓冲溶液 pH 的选择

N-羟基琥珀酰亚胺活性酯衍生胺的反应一般在碱性的环境下进行, 常见的碱性缓冲溶液有 $H_3BO_3-Na_2B_4O_7$ 体系、 H_3PO_4-NaOH 体系、 NH_4Cl-NH_3 体系等, H_3PO_4-NaOH 体系在碱性条件下的缓冲容量较小, 而 NH_4Cl-NH_3 体系则同样会与 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯发生衍生反应从而会对脂肪胺的衍生造成严重干扰, 故选择 $H_3BO_3-Na_2B_4O_7$ 体系作为缓冲溶液体系。分别试验了 pH 7.5~9.0 对衍生峰峰面积的影响, 结果如图 3 所示, pH 8.0~9.0 时, 峰面积最大且稳定, 故选择 pH 8.5 为最佳衍生 pH 值。

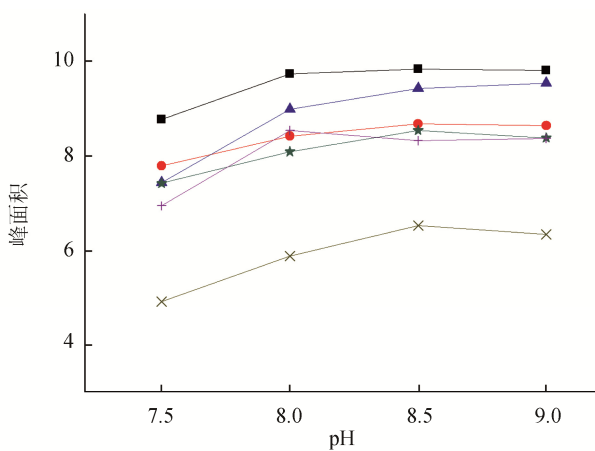


图 3 pH 对胺衍生生物峰面积的影响

Fig. 3 Effect of pH on the peak area of amine derivatives

▲: 甲胺; ●: 乙胺; ■: 丙胺; ★: 丁胺; +: 戊胺; ×: 己胺.

▲: MA; ●: EA; ■: PrA; ★: BA; +: PA; ×: HA.

3.2.3 衍生温度的选择

分别试验了 10 °C~50 °C 对衍生反应的影响, 结果表明, 当衍生温度达到 20 °C 以上时, 衍生物峰面积即可达到最大且稳定, 因此选择 25 °C 为最佳衍生温度。

3.2.4 衍生时间的选择

在 25 °C 条件下, 研究了衍生时间对衍生物峰面积的影响, 结果表明, 当衍生时间达到 5 min 后, 衍生反应即可完成, 衍生物峰面积不发生变化。为了保证衍生反应的完全进行, 选择 10 min 为最佳衍生时间。

3.3 方法的线性范围、标准曲线、相关系数、相对标准偏差、检出限

准确移取不同量的标准脂肪胺混合溶液, 按优化的衍生条件和色谱分离条件进行分离测定, 以峰面积定量得到脂肪胺衍生物的浓度与峰面积的回归方程, 脂肪胺的线性范围和检测限。线性范围为 0.01~2 $\mu\text{mol/L}$, 结果见表 1, 标准品色谱图见图 4。

4 结论

本方法新设计合成了一种基于荧光素为荧光团, N-羟基琥珀酰亚胺活性酯为反应基团的新型氨基荧光标记试剂: 6-氧-(N-琥珀酰亚胺丁二酸单酯)-9-(2'-甲氧羰基), 其合成方法较为简单, 仅需三步即可完成。该荧光衍生试剂应用于柱前衍生 HPLC 分离荧光检测小分子脂肪胺, 衍生条件温和, 衍生时间短, 且衍生物稳定, 检测限较低。

表 1 方法的线性范围、标准曲线、相关系数、相对标准偏差以及检出限

Table 1 Linear calibration ranges, regression equations, correlation coefficients, relative standard deviations and detection limits of amino derivatives

脂肪胺	线性范围($\mu\text{mol/L}$)	线性方程	r^2	RSD(% , $n=6$)	LOD($\mu\text{g/L}$)
MA	0.01~2	$Y=40991231X+40349$	0.9991	1.4	0.1
EA	0.02~2	$Y=15901932X-19464$	0.9997	2.3	0.2
PrA	0.01~2	$Y=165964578X-80448$	0.9995	2.7	0.1
BA	0.02~2	$Y=353399742X+883636$	0.9982	3.0	0.4
PA	0.02~2	$Y=39356643X-53210$	0.9976	1.9	0.4
HA	0.05~2	$Y=16783784X-42577$	0.9979	2.6	1

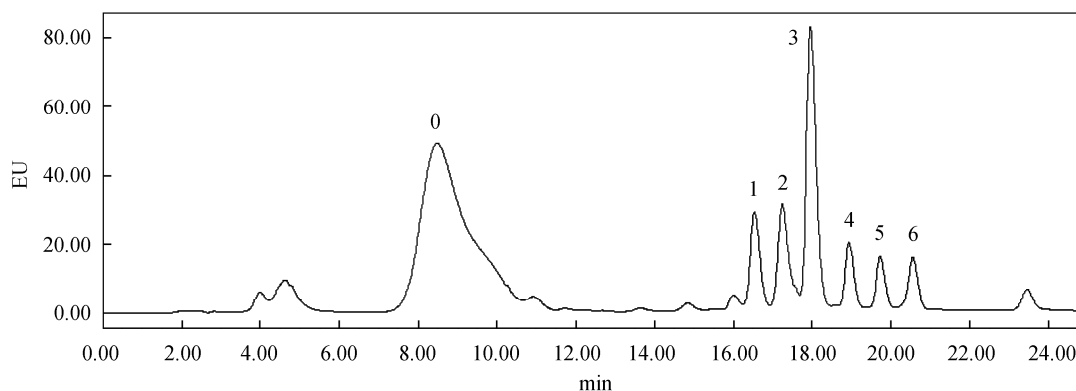


图 4 6 种脂肪胺衍生物分离色谱图

Fig. 4 Chromatograms of 6 aliphatic amine derivatives

0: 水解峰; 1: 甲胺衍生峰; 2: 乙胺衍生峰; 3: 丙胺衍生峰; 4: 丁胺衍生峰; 5: 戊胺衍生峰; 6: 己胺衍生峰

0: hydrolyzed SIIA; 1: MA derivatives; 2: EA derivatives; 3: PrA derivatives; 4: BA derivatives; 5: PA derivatives; 6: HA derivatives.

参考文献

- [1] Busto O, Guasch J, Borrull F, Improvement of a solid-phase extraction method for determining biogenic amines in wines [J]. *J Chromatogr A*, 1995, 718(2): 309–317.
- [2] Cao LW, Wang H, Zhang HS, *et al.* 6-Oxy-(N-succinimidyl acetate)-9-(2'-methoxycarbonyl) fluorescein as a new fluorescent labeling reagent for aliphatic amines in environmental and food samples using high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1063(1–2): 143–151.
- [3] Cao LW, Wang H, Zhang HS, *et al.* Spectrofluorimetric determination of aliphatic amines using a new fluorogenic reagent: 2,6-dimethylquinoline-4-(N-succinimidyl)-formate [J]. *Talanta*, 2003, 59(5): 973–979.
- [4] Zhao YY, Cai LS, Jing ZZ, *et al.* Determination of aliphatic amines using N-succinimidyl benzoate as a new derivatization reagent in gas chromatography combined with solid-phase microextraction [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1021(1–2): 175–181.
- [5] 赵先恩, 李玉林, 尤进茂, 等. 柱前衍生-高效液相色谱分离测定及质谱鉴定脂肪胺[J]. *分析化学*, 2007, 35(6): 779–785.
Zhao XE, Li YL, You JM, *et al.* Pre-column derivatization-high performance liquid chromatography for the determination of aliphatic amines with fluorescence detection and mass spectrometric identification [J]. *Chin J Anal Chem*, 2007, 35(6): 779–785.
- [6] Cao LW, Wang H, Zhang HS, Analytical potential of 6-oxy-(N-succinimidyl acetate)-9-(2'-methoxycarbonyl) fluorescein for the determination of amino compounds by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26: 1954–1962.
- [7] Yamada K, Aizawa Y. Determination of catecholamines in rat tissue by precolumn dansylation using micro high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Pharmacol Meth*, 1983, 9(1): 1–6.
- [8] 苑广信, 何巧红, 陈恒武, 等. 芯片毛细管电泳激光诱导荧光快速分离检测麻黄碱类兴奋剂[J]. *分析化学*, 2006, 34(12): 1693–1696.
Yuan GX, He QH, Chen HW, *et al.* Rapid separation and determination of ephedrine dopes by chip-based capillary electrophoresis and laser induced fluorescence detection [J]. *Chin J Anal Chem*, 2006, 34(12): 1693–1696.
- [9] Lange J, Thomas K, Wittmann C. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples [J]. *J Chromatogr B*, 2002, 779(2): 229–239.
- [10] 候松岫, 孙敬, 何红波, 等. AQC 柱前衍生反相高效液相色谱法测定土壤中氨基酸[J]. *分析化学*, 2006, 34(10): 1395–1400.
Hou SM, Sun J, He HB, *et al.* Simultaneous determination of amino acids in soil by reversed phase high performance liquid chromatography by using 6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidyl carbamate as a precolumn derivatization reagent [J]. *Chin J Anal Chem*, 2006, 34(10): 1395–1400.
- [11] Mattush JJ, Dittrich KJ. Improvement of laser-induced fluorescence detection of amino acids in capillary zone electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1994, 680: 279–285.
- [12] Lau Shung Kei, Zaccardo Fabian, Little Michael, *et al.* Nanomolar derivatizations with 5-carboxyfluorescein succinimidyl ester for fluorescence detection in capillary

electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 1998, 809(1-2): 203-210.

- [13] 曹丽伟, 孟建新, 刘咏娟. 毛细管电泳分离-激光诱导荧光检测生物胺[J]. 分析化学, 2008, 36(1): 24-28.

Cao LW, Meng JX, Liu YJ. Determination of biogenic amines using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. Chin J Anal Chem, 2008, 36(1): 24-28.

- [14] Adamczyk M, Grote J, Moore JA, Chemoenzymatic synthesis of 3'-O-(carboxyalkyl) fluorescein labels [J]. Bioconjugate Chem, 1999, 10(10): 544-547.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



肖玲艳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为化学品和消费品安全分析检测。

E-mail: xiaolingyan2008@163.com



马明, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为色谱分离技术。

E-mail: mam@nbcic.gov.cn