

大型仪器在食、药品安全中的应用成果(028~035)

27 种胺类物质与间甲基苯甲酰氯的衍生化特点 及 LC-MS 定性分析方法

陈 秀

(上海华测品标检测技术有限公司, 上海 201206)

摘要: 研究了 27 种胺类物质在与间甲基苯甲酰氯的衍生化过程中, 活泼氢与衍生化试剂的反应情况. 建立了超高压液相色谱-质谱分析 27 种胺类衍生物的定性分析方法. 使用 Waters ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱($\Phi 1.8\ \mu\text{m}$, $3.0\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$) 为分离柱, 乙腈和甲酸(体积比为 0.1%) 水溶液为流动相, 采用 2 种梯度洗脱程序, 经液相色谱分离后, 质谱采用电喷雾电离源正离子模式, 以各种胺类衍生化合物的选择离子 $[M+H]^+$ 监测模式进行定性分析. 试验发现, 仪器检出限可达 0.2 mg/L, 可以用于胺类物质的快速定性检测.

关键词: 胺类物质; 衍生反应; 间甲基苯甲酰氯; 超高压液相色谱-质谱法

中图分类号: O657.33

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2016)01-0028-08

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2016.01.005

Derivatization Characteristics of Twenty Seven Kinds of Amines with Methylbenzoyl Chloride and Qualitative Analysis Method by LC-MS

CHEN Xiu

(Centre Testing International Pinbiao(Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201206, China)

Abstract: In the process of derivation of twenty seven kinds of amines with methylbenzoyl chloride, the reaction between active hydrogen and derivative reagent was studied. A new method has been developed for the determination of twenty seven amine derivatives by the ultra high liquid chromatography-mass spectrometry. Waters ACQUITY UPLC[®] HSS T3 ($\Phi 1.8\ \mu\text{m}$, $3.0\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$) was employed as the analytical column, the mobile phase were acetonitrile and formic acid (0.1%), two gradient elution procedures were used. After the separation by liquid chromatography, the mass spectrometric qualitative analysis was performed based on the selective ionic measurement $[M+H]^+$ using the electro-spray ionization in positive mode. The instrument detection limits of amines were 0.2 mg/L. The proposed method was successfully applied to the fast qualitative analysis of amines.

Key words: amine; derivatization; methylbenzoyl chloride; ultra high liquid chromatography-mass spectrometry

胺类物质均具有强烈的氨臭, 多数有毒, 有刺激性, 能强烈刺激眼、皮肤和呼吸器官, 引起过敏症. 例如苯胺可以导致再生障碍性贫血, 通过吸入、食入或透过皮肤吸收而致中毒^[1]. 胺类化合物目前主要的分析方法有光度法^[2]、光谱法^[3]、气相色谱质谱法^[4]、液相色谱法^[5]、液相色谱质谱法^[6]. 现有的文

献多数研究了苯胺、联苯胺等芳香胺的检测^[7-10], 而对于短链的脂肪胺或是杂环胺、醇胺等未有过多的报道. 此类胺化合物几乎无特征的紫外吸收波长, 高温不稳定, 故并不适合用光度法或是气相色谱-质谱法进行检测. 目前, 该胺类化合物的检测方法多数是采用直接测定方式, 并未对其进行衍生化处

收稿日期: 2015-10-31; 修订日期: 2015-12-22.

作者简介: 陈秀 (1985-), 硕士, 主要从事有害化学物质检测工作, E-mail: nuaacx@163.com.

理,这并不适用于本文所述物质. 本文研究的胺化合物分子量较小,属极性化合物,若直接采用液相分析会很快流出,保留时间过短,且响应偏低,不能准确定性和定量. 本文采用间甲基苯甲酰氯为衍生化试剂,研究了 27 种胺类物质(包括烷基胺、芳香胺、环烷基胺、醇胺及其他)的反应过程,并建立了胺类衍生物的超高液相色谱-质谱的快速定性检测方法,对于伯胺(RNH_2 , R 为其他有机基团)、仲胺(R_2NH , R 为其他有机基团)、醇胺(胺类物质,带有 $-\text{OH}$ 基团)、二胺(H_2NRNH_2 , R 为其他有机基团)的检测具有普遍的指导意义.

1 试验部分

1.1 仪器及试剂

ACQUITY 超高效液相色谱仪, SQ Detector 质谱仪和 MassLynx 数据处理系统(美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司); 回旋振荡器(WSZ-200A, 上海一恒科学仪器有限公司); 氮吹仪(MG-2200, TOKYO RIKAKIKAI Co., LTD). 乙腈(色谱纯, Honeywell); 甲酸(99%, 北京百灵威科技有限公司); 胺类标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 间甲基苯甲酰氯(99%, 国药集团化学试剂有限公司); 氢氧化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有

限公司).

1.2 仪器工作条件

色谱条件: Waters ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱($\Phi 1.8\text{ }\mu\text{m}$, $3.0\text{ mm}\times 150\text{ mm}$); 柱温: $40\text{ }^\circ\text{C}$; 样品室温度: $27.6\text{ }^\circ\text{C}$; 进样量: $2\text{ }\mu\text{L}$.

流动相: A 为 0.1% (体积比) 甲酸水溶液, B 为乙腈; 流速为 0.3 mL/min .

梯度洗脱程序 1: $0\sim 8.0\text{ min}$ 时, A 由 50% 降至 20% ; $8.0\sim 10.0\text{ min}$ 时, A 由 20% 降至 5% ; $10.0\sim 12.0\text{ min}$ 时, A 由 5% 升至 40% ; $12.0\sim 13.0\text{ min}$ 时, A 由 40% 升至 50% , 并保持 1 min .

梯度洗脱程序 2: $0\sim 6.0\text{ min}$ 时, A 由 30% 降至 20% ; $6.0\sim 7.0\text{ min}$ 时, A 由 20% 降至 10% ; $7.0\sim 8.0\text{ min}$ 时, A 由 10% 升至 30% , 并保持 1 min .

质谱条件: 电离模式(Ion mode): ESI+; 毛细管电压(Capillary voltage): 3.5 kV ; 萃取锥孔电压(Extractor voltage): 3.0 V ; RF 透镜电压(RF lens): 0.1 V ; 离子源温度(Source temperature): $150\text{ }^\circ\text{C}$; 脱溶剂温度(Desolvation temperature): $400\text{ }^\circ\text{C}$; 锥孔气流速(Cone gas flow): 0 L/h ; 脱溶剂气流速(Desolvation gas flow): 500 L/h ; 采集模式: 选择离子反应监测模式(SIR). 采集离子及对应的锥孔电压(Cone voltage)如表 1 所列.

表 1 各胺类衍生物质的定性离子及锥孔电压
Table 1 Qualitative ions and cone voltages of amine derivatives

组号	胺类物质	CAS 号	衍生物[$\text{M}+\text{H}$] ⁺ 离子/(m/z)	锥孔电压 /v	保留时间 /min	采用的流动相梯度
第一组	二苄胺	103-49-1	316.423	23	10.77	梯度洗脱程序 1
	N-乙基间甲苯胺	102-27-2	254.352	23	8.59	
	N-乙基苄胺	14321-27-8	254.352	18	8.15	
	二乙胺	109-89-7	192.281	23	5.47	
	二正丁胺	111-92-2	248.389	23	10.79	
	N-甲基苯胺	100-61-8	226.298	23	6.38	
	N-乙基苯胺	103-69-5	240.325	23	7.47	
	正丙胺	107-10-8	178.254	23	4.62	
	正丁胺	109-73-9	192.281	18	5.65	
	环己胺	108-91-8	218.319	23	6.79	
	1-氨基-2-丙醇	78-96-6	194.254	15	2.82	
	乙醇胺	141-43-5	180.227	15	2.62	
	1,4-氧氮六环	110-91-8	206.265	18	3.62	
	四氢吡咯	123-75-1	190.265	23	4.47	

续表 1

组号	胺类物质	CAS 号	衍生物[M+H] ⁺ 离子/(m/z)	锥孔电压 /v	保留时间 /min	采用的流 动相梯度
第二组	1,3-丙二胺	109-76-2	193.261/311.404 (二取代响应强)	18	5.01(二取代 的保留时间)	梯度洗脱 程序 1
	乙二胺	107-15-3	179.234/297.377 (二取代响应强)	18	4.62(二取代的 保留时间)	
	4,4'-二氨基二苯甲烷	101-77-9	317.411/435.546 (一取代响应强)	18	3.79(一取代的 保留时间)	
	联苯胺	92-87-5	303.384/421.519 (一取代响应强)	23	4.88(一取代的 保留时间)	
	氨基苯	62-53-3	212.271	23	6.61	
	2,4,5-三甲基苯胺	137-17-7	254.352	23	8.34	
	对甲苯胺	106-49-0	226.298	23	7.53	
	N-乙基乙醇胺	110-73-6	208.280	18	3.12	
	二乙醇胺	111-42-2	224.280	18	2.35	
	二烯丙基胺	124-02-7	216.303	18	7.06	
第三组	对苯二胺	106-50-3	227.286/345.421 (一取代响应强)	23	2.17/4.28(分别为 一取代和二取代 的保留时间)	梯度洗脱 程序 2
	2,4-二氨基甲苯	95-80-7	241.313/359.448 (一取代响应强)	18	2.33/2.93(分别为 一取代同分异构体 的保留时间)	
	异佛尔酮二胺	2855-13-2	289.441/407.576 (二取代响应强)	23	5.13/6.03(分别为 二取代同分异构体 的保留时间)	

1.3 胺类标准溶液的配制

分别准确称取 0.100 0 g 各胺类单标标准品(精确到 0.000 1 g),用乙腈溶解并转移到 100 mL 容量瓶中定容,配制成 1 000 mg/L 的标准储备液,于 4 ℃ 冰箱内保存.使用时,标准储备液用乙腈稀释,配制成 10 mg/L 的单标标准品,同时根据表 1 配制 3 组混合标准品,每组中各胺类物质的质量浓度均为 10 mg/L.

1.4 衍生化试剂的配制

间甲基苯甲酰氯的配制:准确量取 200 μL 间甲基苯甲酰氯标准品,用乙腈溶解并转移到 100 mL 容量瓶中定容,配制成衍生化试剂.

氢氧化钠溶液的配制:准确称取 40 g 氢氧化

钠,用水溶解并转移到 100 mL 容量瓶中定容,配制成衍生过程促进剂.

1.5 衍生化过程

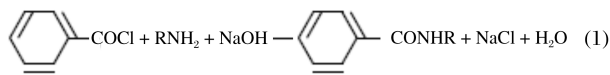
在 70 mL 螺口试管中加入 5 mL 间甲基苯甲酰氯衍生化试剂,分别取质量浓度为 10 mg/L 的每组胺类混合标准品 20 μL,再添加 1 mL 氢氧化钠溶液,拧紧盖子,放置回旋振荡器上振荡 1.5 h 后,将螺口试管竖直放置 1 h.取上层有机相于氮吹管中吹至近干,用乙腈清洗氮吹管并定容至 1 mL,则理论上可认为该溶液中各胺类衍生物的质量浓度对应的原始胺类物质的质量浓度为 0.2 mg/L.按照相同的方法,取质量浓度为 10 mg/L 的每种胺类单标标准品 100 μL,同样可得到对应原始胺类物质质量浓

度为 1 mg/L 的胺类衍生物溶液.

2 结果与讨论

2.1 MS 调谐参数的选择

苯甲酰氯可以与含活泼氢的胺类物质反应,苯甲酰基可将氢置换掉 (Schotten-Baumann 反应),生成酰胺类物质^[11]. 由于反应中生成氯化氢,因此需要用碱除去氯化氢,以防止其与胺成盐. 常用碱为氢氧化钠,化学方程式如式(1)所示.



由于生成的酰胺类化学电离性质属于弱碱性物质,故选择 ESI+电离模式. 将各胺类物质按照 1.5 衍生后,采用流动注射泵连续进样方式进行质谱条件的优化. 结果表明,在此电离方式下,酰胺物质可获得较高响应的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子. 选取响应较强的主要碎片离子作为各胺类的定性离子. 优化表 1 所列

的锥孔电压参数,使得各胺类衍生物的准分子离子产生的响应强度达到最大. 由于各胺类所含活泼氢数量不一,因此在与苯甲酰基置换时会发生一取代、二取代等等,在优化质谱条件时,同时考虑到这些问题,通过监测不同取代产生的离子响应大小,研究发现如下信息.

2.1.1 伯胺和仲胺

对于仲胺物质 (R_2NH , R 为其他有机基团),即仅含有一个活泼氢,苯甲酰基一般就和该活泼氢进行置换. 对于伯胺物质 (RNH_2 , R 为其他有机基团),即含有两个活泼氢,苯甲酰基一般仅与一个活泼氢置换,两个活泼氢同时置换的可能性很小. 以正丙胺为例,如图 1 所示,二取代物所对应的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子质核比数为 296.389,在色谱图上几乎没有特征峰. 另外,在采用流动注射泵连续进样方式进行质谱条件的优化时,也未曾得到较强的质核比数为 296.389 的响应,这可能是因为受到空间位阻效应的影响.

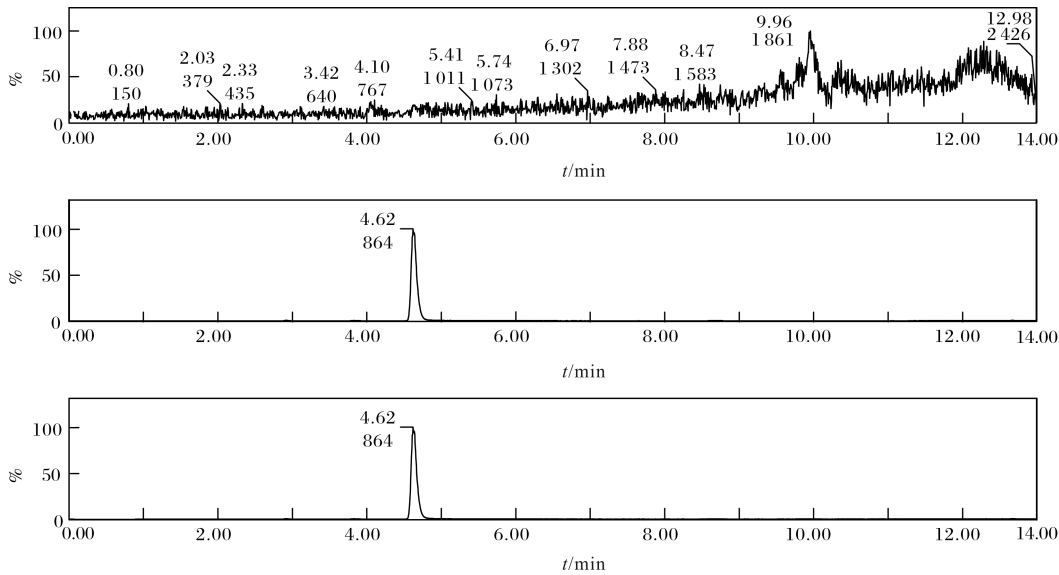


图 1 正丙胺衍生物的选择离子色谱图 (1 mg/L)

Fig. 1 SIR chromatograms of *N*-Propylamine derivative (1 mg/L)

图 1~6 均为研究初期,未将胺类衍生物进行分组时所做图谱;其所依据的洗脱程序是:

流动相 A 为 0.1% (体积比) 的甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈;以 A : B = 50% : 50% (体积比)

等度洗脱,流速为 0.3 mL/min,其余仪器条件见 1.2 节

2.1.2 醇胺

对于醇胺类物质,在适当的条件下,苯甲酰氯和含活泼氢的醇也能发生反应,苯甲酰基置换氢而成酯. 本文尝试采用同样的方式对 *N,N*-二甲基乙醇胺 (CAS 号:108-01-0)、2-二乙氨基乙醇 (CAS 号:

100-37-8) 和 3-(二甲氨基)-1-丙醇 (CAS 号:3179-63-3) 3 种叔醇胺进行衍生. 此 3 种胺类的氨基上无活泼氢,发现苯甲酰基并不会和羟基上的活泼氢发生明显的酯化反应. 以乙醇胺为例,如图 2 所示,二取代物所对应的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子质核比数为

298.362,在色谱图上几乎没有特征峰. 另外,在采用流动注射泵连续进样方式进行质谱条件的优化时,也未曾得到较强的质核比数为 298.362 的响应.

可见在 1.5 所述的条件下,对于醇胺类物质,参与置换的是氨基上的活泼氢.

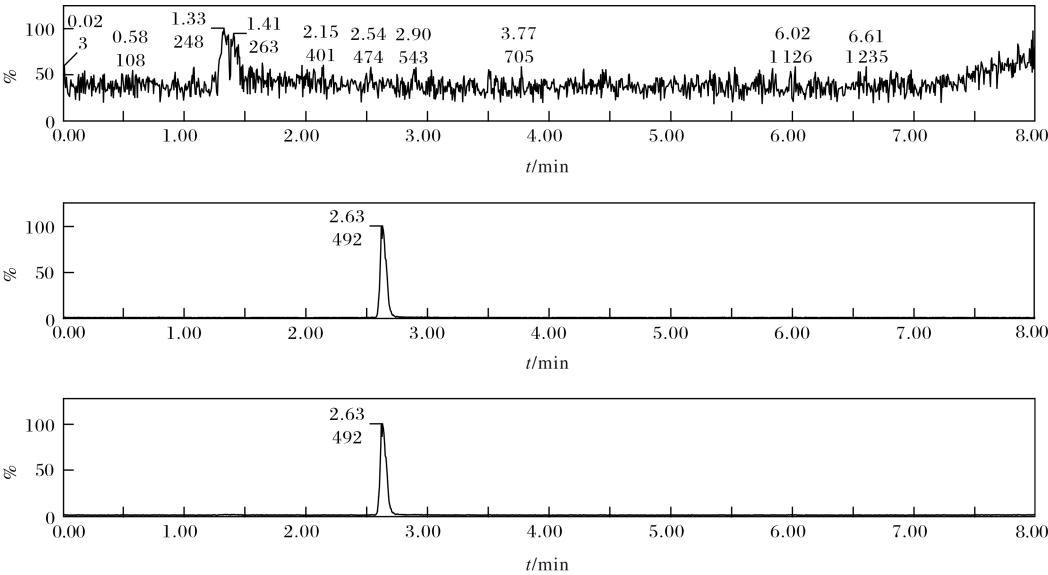


图 2 乙醇胺衍生物的选择离子色谱图 (1 mg/L)
Fig.2 SIR chromatograms of Ethanolamine derivative(1 mg/L)
色谱及仪器条件同图 1

2. 1. 3 二伯胺类物质

当胺类物质中含有两个-NH₂ 时,如果连接着的是烷烃或是环烷烃,以 1,3-丙二胺为例,则一般发生二取代的响应高些,反应式如式(2)、(3)所示,色谱图如图 3 所示. 如果连接着的是苯基,以 4,4'-二氨基二苯甲烷为例,如图 4 所示,则一般发

生一取代的响应高些,可能是因为空间位阻效应的影响.

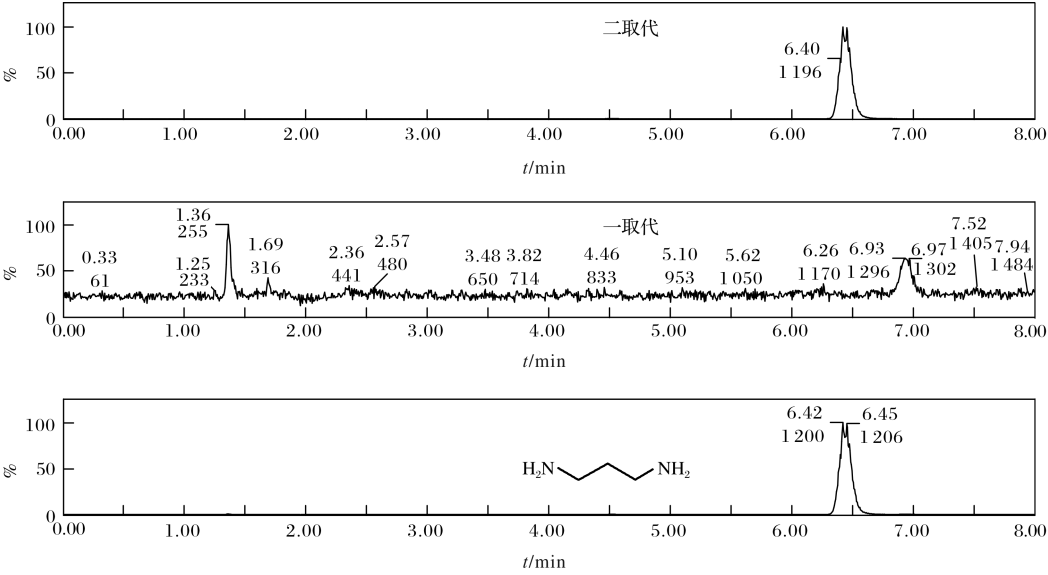
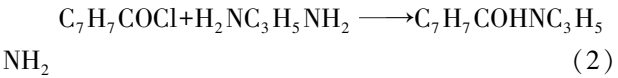


图 3 1,3-丙二胺衍生物的选择离子色谱图 (1 mg/L)
Fig.3 SIR chromatograms of Propylendiamine derivative(1 mg/L)
色谱及仪器条件同图 1

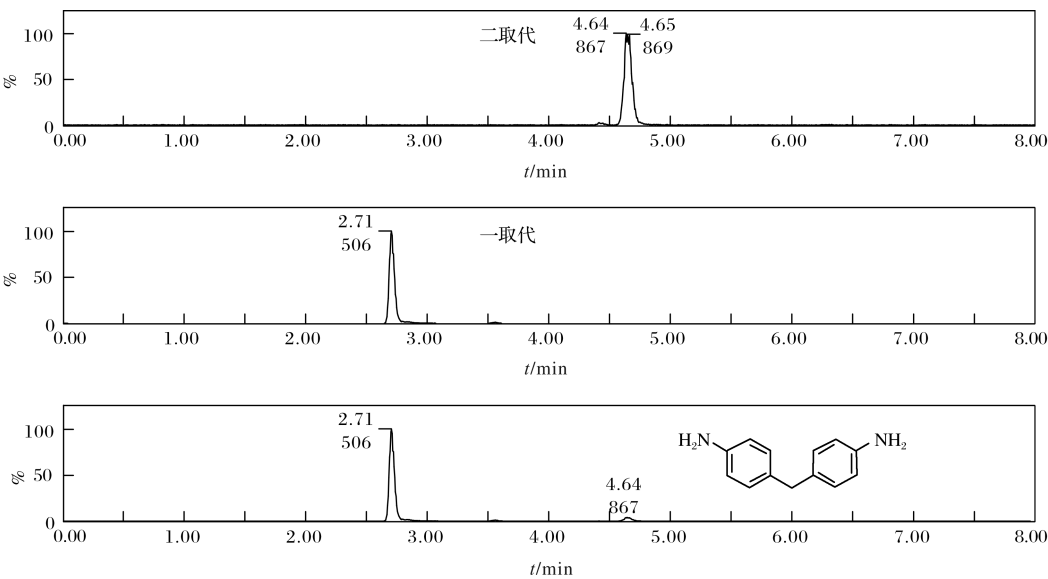


图 4 4,4'-二氨基二苯甲烷衍生物的选择离子色谱图 (1 mg/L)

Fig. 4 SIR chromatograms of 4,4'-Diaminodiphenylmethane derivative (1 mg/L)

色谱及仪器条件同图 1

2.1.4 特殊情况

(1) 对苯二胺,其两个-NH₂ 上二取代响应约为一取代响应的一半,高于其他苯二胺的比例,如图 5 所示. 这可能是因为它比 4,4'-二氨基二苯甲烷和联苯胺少苯环,且为对位二胺,并无其他基团阻碍,故其空间位阻效应较小,使得一、二取代响应相差不大.

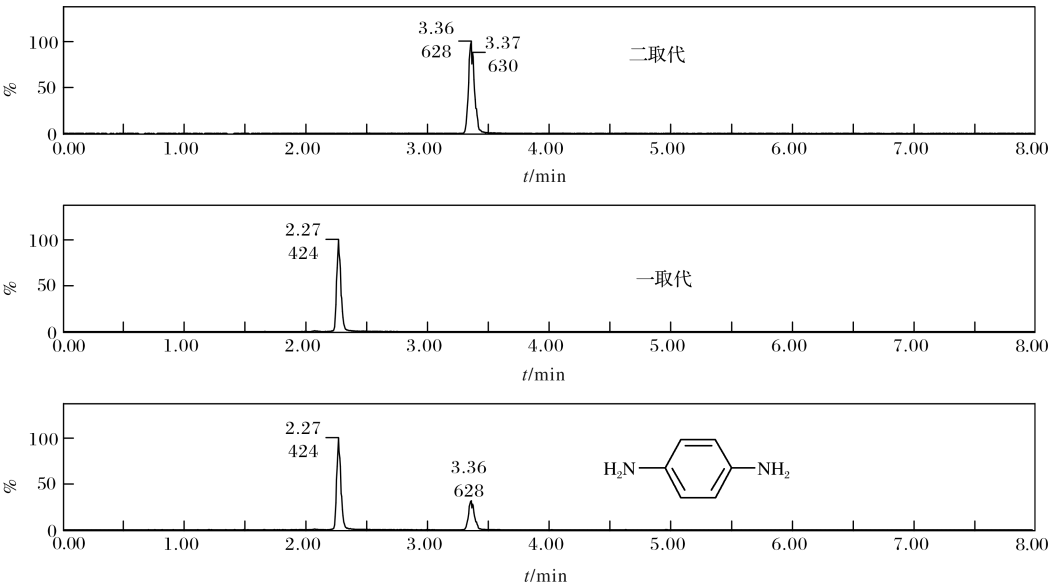


图 5 对苯二胺衍生物的选择离子色谱图 (1 mg/L)

Fig. 5 SIR chromatograms of 1,4-Phenylenediamine derivative (1 mg/L)

色谱及仪器条件同图 1

(2) 2,4-二氨基甲苯由于是间位二胺及甲基的位阻影响,与对苯二胺相比,二取代的响应不高,且由于两个-NH₂ 相对位置不同,其一取代存在两种结构,表现为在不同的保留时间段出峰,如图 6 所示.

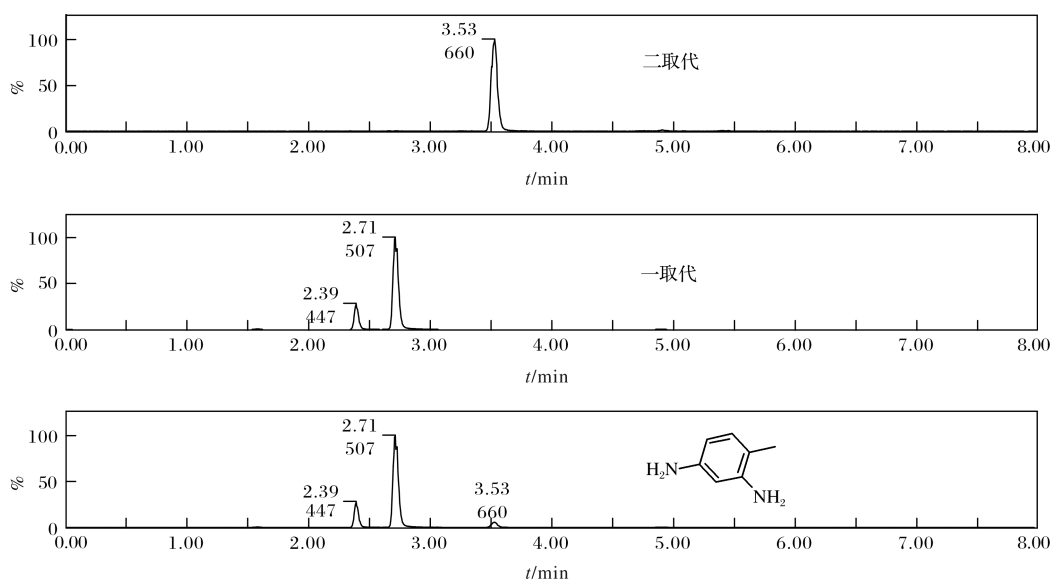


图6 2,4-二氨基甲苯衍生物的选择离子色谱图(1 mg/L)

Fig. 6 SIR chromatograms of 4-Methyl-m-phenyldiamine derivative(1 mg/L)
色谱及仪器条件同图1

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 色谱柱的选择

鉴于所测胺类种类较多,且衍生物性质接近,将27种胺类物质分成三组,如表1所列. 其中第一、二组采用梯度洗脱程序1,第三组采用梯度洗脱程序2. 分别选择 Waters ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱(Φ 1.8 μ m, 3.0 mm $\times$ 150 mm)、Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(Φ 1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 50 mm)和 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH HILIC 色谱柱(Φ 1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm)做分析用柱,比较3种柱子对化合物的分离情况. 结果发现 Waters ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱(Φ 1.8 μ m, 3.0 mm $\times$ 150 mm)对各组胺类的分离相对较好,故选择此柱作为分析用柱.

2.2.2 流动相的选择

首先考察了甲醇-水和乙腈-水溶剂体系作为流动相对各胺类衍生物的色谱行为和离子化程度的影响. 结果发现,乙腈-水溶剂体系的洗脱能力更好,不仅系统压力较低,且响应和峰形皆优于甲醇-水溶剂体系. 这可能是因为相对于甲醇而言,乙腈的非极性稍高一些,胺类衍生物在色谱柱中的分配倾向于流动相中,从而能够快速流出. 进一步研究了在乙腈-水流动相中添加甲酸的影响,当添加0.1% (体积比)的甲酸时能够显著增强峰响应强度.

2.2.3 流动相流速的选择

将流动相流速分别设置为0.15、0.20、0.25、0.30 mL/min,比较三组胺类衍生物的分度度和响应强度. 结果发现,当流速设置为0.3 mL/min时,不仅能将各组内衍生物完全分开,且分析时间能控制在14 min内,系统压力也不致太大.

2.3 色谱图

按照1.5节的衍生化方式,1.2节的分析条件得到各组胺类的色谱图如图7、8、9所示. 该色谱图是按照分组在梯度洗脱程序1和梯度洗脱程序2的条件下得到的. 每种胺类衍生物的保留时间参考表1,是由各胺类衍生物单标按照相同梯度程序走样得出,其中图8中二乙醇胺的峰形并不明显,是因为其

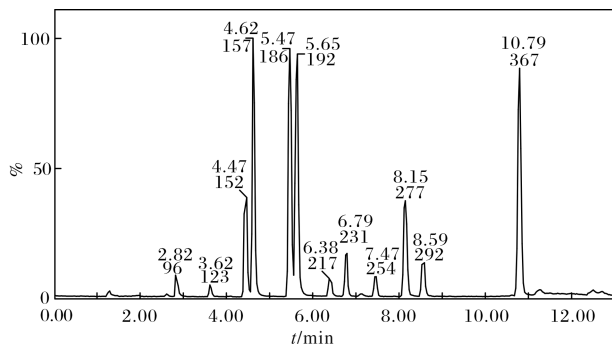


图7 第一组胺类衍生物的选择离子色谱图(0.2 mg/L)

Fig. 7 SIR chromatogram of group 1 amine derivatives(0.2 mg/L)

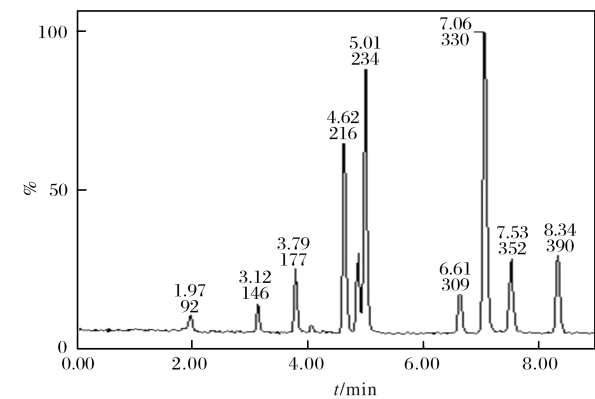


图 8 第二组胺类衍生物的选择离子色谱图(0.2 mg/L)
Fig. 8 SIR chromatogram of group 2 amine derivatives(0.2 mg/L)

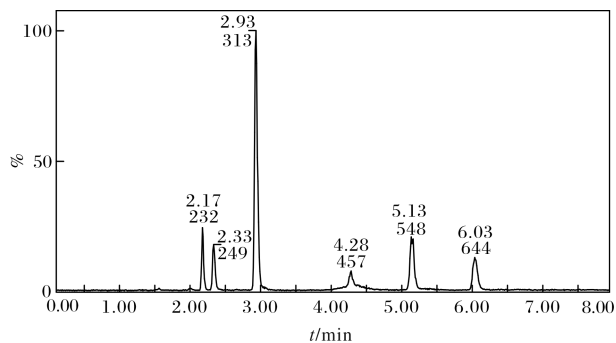


图 9 第三组胺类衍生物的选择离子色谱图(0.2 mg/L)
Fig. 9 SIR chromatogram of group 3 amine derivatives(0.2 mg/L)

响应相对较弱,但是在选择离子模式下,仍然可以满足信噪比 $S/N>3$ 的要求,可知对应于原始胺类质量浓度为 0.2 mg/L 时,经过衍生化后得到的衍生物响应信噪比能满足作为检出限的要求 ($S/N>3$),且每种胺类衍生物响应面积的相对标准偏差低于 5% ($n=7$).

3 结语

本文研究了 27 种胺类物质(包括烷基胺、芳香胺、环烷基胺、醇胺及其他)与间甲基苯甲酰氯的衍生化过程,初步了解了伯胺、仲胺、醇胺以及二胺的

反应机理,同时建立了各胺类衍生物的超高液相色谱-质谱检测方法,对于胺类物质的检测具有普遍的参考意义. 尤其对于小分子量的胺类,未见有其测定的相关报道,可以参考本文进行检测. 对于本文中的 27 种胺类物质,仪器检出限可达 0.2 mg/L,相对标准偏差低于 5%,可应用于实际的胺类物质快速定性分析.

参考文献:

[1] 王孝华. 苯胺废水处理的新进展[J]. 工业水处理, 2010, 30(2):11-14.
[2] 陈玉柱, 杨子毅, 陈前熙. 紫外扫描分光光度法测定水中的联苯胺[J]. 仪器仪表与分析监测, 2011, 3:40-42.
[3] 杨有铭, 阮伟东, 宋薇. 表面增强拉曼光谱检测联苯胺[J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(10):2191-2194.
[4] 康苏媛, 张庆, 白桦. 气相色谱-质谱法测定蜡笔中的芳香伯胺[J]. 色谱, 2011, 29(5):422-425.
[5] 王超, 吕怡兵, 滕恩江. 超高压液相色谱荧光检测法快速测定水中痕量苯胺与联苯胺[J]. 分析测试学报, 2013, 32(1):32-37.
[6] 顾海东, 尹燕敏, 秦宏兵. 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水中的苯胺及联苯胺[J]. 环境监控与预警, 2012, 4(1):24-26.
[7] 郭玉凤, 李景印, 傅承光. 对酞内酰胺苯甲酰氯柱前衍生反应 HPLC 法检测痕量芳香胺[J]. 分析测试学报, 1997, 16(2):61-63.
[8] 黄丽芳, 李来生, 刘超. 高效液相色谱-质谱法测定废水中芳香胺类化合物[J]. 分析科学学报, 2008, 24(3):265-269.
[9] 孙银峰, 牛增元, 叶曦雯, 等. 液相色谱/质谱法测定电气产品塑料部件中的初级芳香胺[J]. 分析化学, 2009, 37(6):861-866.
[10] 熊杰, 钱蜀, 谢永洪, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水中丙烯酰胺、苯胺和联苯胺[J]. 分析化学, 2014, 42(1):93-98.
[11] 赵美法, 李丛宝, 刘文武, 等. 苯甲酰氯的合成与应用[J]. 辽宁化工, 1998, 27(3):165-167.