DOI: 10.3969/j.issn.1674 - 5663.2015.04.007

十四碳酸 2 - 硝基苯肼衍生物对照品的制备

苏可盈，严开芹，许洋珲，吴 青*
(华南农业大学 食品学院，广东 广州 510642)

摘要： 为测定柱前衍生 HPLC 分析脂质中脂肪酸组成的衍生率，制备了十四碳酸 2 - 硝基苯肼衍生物 (Myristic acid 2 - nitrophenylhydrazine，MANPH) 对照品. 以吡啶为催化剂，在 1 - 乙基 - (3 - 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐为偶联剂下，十四碳酸与 2 - 硝基苯肼反应，衍生为十四碳酸 2 - 硝基苯肼衍生物，采用硅胶柱层析和重结晶对衍生产物进行分离纯化，通过质谱和 ^{1}H - NMR 进行结构鉴定，通过薄层色谱检测和 HPLC 进行纯度检测，结果显示分离纯化获得了 MANPH 对照品，纯度为 99.81%，符合化学对照品的相关要求.

关键词： 十四碳酸 2 - 硝基苯肼衍生物；对照品；制备
中图分类号： O613 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674 - 5663(2015)04 - 0032 - 03

Preparation of reference material of Myristic acid 2 - Nitrophenylhydrazine derivates

SU Keying, YAN Kaiqin, XU Yanghui, WU Qin*
(Food College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To measure derivatization yields of the fatty acids in pre-column derivatization using HPLC, myristic acid 2 - Nitrophenylhydrazine (MANPH) derivate was prepared as reference substance. Myristic acid reacted with 2 - Nitrophenylhydrazine in the case of 1 - (3 - dimethylaminopropyl) - 3 - ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC · HCl) as coupling agent and pyridine as catalyst, and MANPH derivate was produced and then separated and purified by silica gel column chromatography and recrystallization. Its structure was identified by using mass spectrometer and ^{1}H-NMR. Its purity was detected by using thin liquid chromatograph and HPLC. The results showed that purified MANPH was obtained and its purity was 99.81% which can be used as a reference substance.

Key words: Myristic acid 2 - nitrophenylhydrazine derivate; reference material; preparation

脂肪酸在可见和紫外区域没有吸收官能团，也不具有荧光[1]，因此需要在 HPLC 分析前进行柱前衍生，使脂肪酸分子带上在紫外或在可见光或在荧光下有吸收的基团. 2 - 硝基苯肼是一种较好的衍生试剂[2-3]，在吡啶作催化剂、1 - 乙基 - (3 - 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐(1 - (3 - dimethylaminopropyl) - 3 - ethylcarbodiimide hydrochloride，EDC · HCl) 作偶联剂下的衍生反应可在温和条件(弱酸环境，60 ℃加热 15 min) 且在水相体系中进行，衍生化后的脂肪酸衍生物在 400 nm 有最大吸收，可以提高 HPLC 分析的灵敏度. 2 - 硝基苯肼衍生脂肪酸反应最准确的判断指标是脂肪酸的衍生率，衍生率越高，检测结果越准确. 而要获得衍生率，必须有纯化的脂肪酸 - 2 - 硝基苯肼衍生物为对照品，以其在一定浓度下对应的色谱图峰面积为理论值，一定条件下衍生后经 HPLC 分析获得的峰面积为实际值，计算衍生率. 作者选取食品中常用的十四碳酸为代表，与 2 - 硝基苯肼进行衍生反应，通过萃取、硅胶柱分离和重结晶进行纯化，以获得纯度高的十四碳酸 2 - 硝基苯肼衍生物 (Myristic acid 2 - nitrophenylhydrazine，MANPH) 对照品，用于柱前衍生 HPLC 法检测脂肪酸组成时研究

收稿日期：2015 - 09 - 15
基金项目：广东省科技计划(2010A032000001-4)、广东省教育部产学研结合(2010B090400362)、国家级大学生创新训练计划(201410564175)资助项目.
作者简介：苏可盈(1993 -)，女，广东湛江人，2012 级食品科学与工程专业在读本科生. * 通信作者：E-mail: wuqing@scau.edu.cn.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

脂肪酸衍生化条件中衍生率的测定，希望能够为相关研究与应用提供参考.

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

正十四碳酸标准品（纯度为质量分数 99.5%）、1 – 乙基 –（3 – 二甲基氨基丙基）碳酰二亚胺盐酸盐（1 –（3 – dimethylaminopropyl）– 3 – ethylcarbodiimide hydrochloride，EDC·HCl，分析纯）、吡啶（分析纯），阿拉丁生化科技公司；2 – 硝基苯肼盐酸盐（分析纯），安耐吉公司；乙腈（色谱纯），广州绿百草生物科技有限公司；粗孔柱层层析硅胶（zcx – II），上海上邦实业有限公司；硅胶板（25 mm × 75 mm），青岛谱科分离材料有限公司.

1525 高效液相色谱仪（配有 2998 PDA 检测器）、ACQUITY QDa 质谱检测器，Waters 公司；AVANCE DRX – 500 核磁共振仪，德国布鲁克公司；KQ – 100DE 数控超声波清洗器，Fisher 公司；N1001DWA 旋转蒸发仪，日本 EYELA 公司；5424R 高速离心机，Eppendorf 公司；WX – 80A 旋涡混合器，上海精科实业有限公司.

1.2　试剂的配制

0.02 mol/L 2 – 硝基苯肼盐酸盐溶液：以体积分数 80% 的乙醇溶解 2 – 硝基苯肼盐酸盐配制而成. 含吡啶的 EDC·HCl 溶液：将含体积分数 3% 吡啶的乙醇与 0.25 mol/L 的 EDC·HCl 溶液（乙醇溶解）等比例混合. 质量分数 15% 的 KOH 溶液：以 V（甲醇）∶V（水）= 4∶1 溶解 KOH 制成. 3 mol/L HCl 溶液：以 V（乙醇）∶V（水）= 4∶1 稀释盐酸制成.

1.3　试验方法

1.3.1　MANPH 对照品的合成　称取十四酸标准品 100 mg 溶于 100 mL 无水乙醇中，加入 0.02 mol/L 2 – 硝基苯肼盐酸盐溶液 200 mL、0.125 mol/L EDC·HCl 溶液 400 mL，于 80 ℃ 水浴中反应 5 min，然后加入质量分数 15% 的 KOH 溶液 100 mL，80 ℃ 下继续加热 5 min 以破除副产物和过量试剂，取出用流水冷却，加入 3 mol/L HCl 溶液 250 mL 进行中和，得到显黄色的产物混合液，最后加入正己烷进行 2 次萃取，合并正己烷层，旋转蒸发干溶剂后，用少量乙酸乙酯溶解.

1.3.2　MANPH 对照品的纯化　在装有硅胶的 750 mm × 14.5 mm 玻璃柱顶端加入溶有产物的乙酸乙酯溶液，用 V（乙酸乙酯）∶V（正己烷）= 1∶6 混合液进行洗脱，收集各段有颜色的洗脱液，取少量洗脱液，滴加 KOH 溶液，若显紫色表明洗脱液含有 MANPH 产物. 将该洗脱液浓缩，再分别用甲醇和正己烷溶解，进行两次重结晶，得到黄色针状晶体.

2　结果与分析

2.1　MANPH 对照品的结构确证

制备得到的 MANPH 对照品为黄色针状晶体，易溶于甲醇、乙醇、乙腈. 光谱扫描结果如下：λmax（MetOH）：230 和 400 nm. 电喷雾 – 质谱[14]（高分辨）在负离子模式下获得的分子质荷比 m/z：362 $[M-H]^-$；以马来酸为内标物 ^{1}H – NMR（$CDCl_3$）δ 数据如下：10.10（s，1H）、9.18（s，1H）、8.08（m，1H）、7.55（m，1H）、7.05（m，1H）、6.83（m，1H）、6.26（s，2H）、2.21（t，J = 7.4 Hz，2H）、1.253（d，J = 24.9 Hz，22H）、0.845（t，J = 7.0 Hz，3H）. 分析峰应以含有多个氢的单峰为特征峰[15]，本试验以 δ = 1.253 为特征峰，可得出各峰所示的 H 的结构. 其中，δ = 10.10、9.18、6.26 为内标物马来酸的 H；δ = 0.845 为 MANPH 分子中甲基上的 3 个 H，δ = 2.21 为与羰基相连的亚甲基上的 H，δ = 1.253 为其余亚甲基上的 H，δ = 3.10 为与 N 相连的 2 个 H，δ = 6.83、7.05、7.55、8.08 为苯环上的 4 个 H. 以上数据可确证该对照品为 MANPH，结构如图 1.

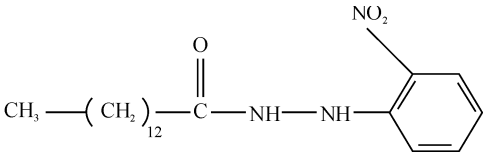


图 1　十四酸 2 – 硝基苯肼衍生物的结构

Fig. 1　The structure of myristic acid 2 – nitrophenylhydrazine derivates

2.2　MANPH 对照品的纯度检测

2.2.1　薄层色谱检测　取制备得到的 MANPH 对照品适量，用甲醇配成 1 mg/mL 的溶液，在同一硅胶板上以不同点样量点样，用 V（乙酸乙酯）∶V（正己烷）= 1∶2 作展开剂，结果只见单一的黄色斑点，未见杂质斑点，表明制备的 MANPH 对照品纯度较高.

2.2.2　HPLC 检测　称取 MANPH 对照品 10 mg，用甲醇制成 1 mg/mL 溶液，Sunfire C_{18} 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），流动相 V（乙腈）∶V（水）= 86∶14，流速 1 mL/min，检测波长 254 nm，进样量 20 mL. 该色谱条件只有 1 个主峰，保留时

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

间为 13.5 min，以峰面积归一化法计算其质量分数为 99.81%（图 2）. 在上述色谱图条件下采集 230 和 215 nm 下的色谱图同样只见 1 个主峰；改变流动相组成分别在 245、230 和 215 nm 下获得的色谱图亦只见 1 个主峰，未见其他异常峰，进一步表明该 MANPH 对照品纯度高.

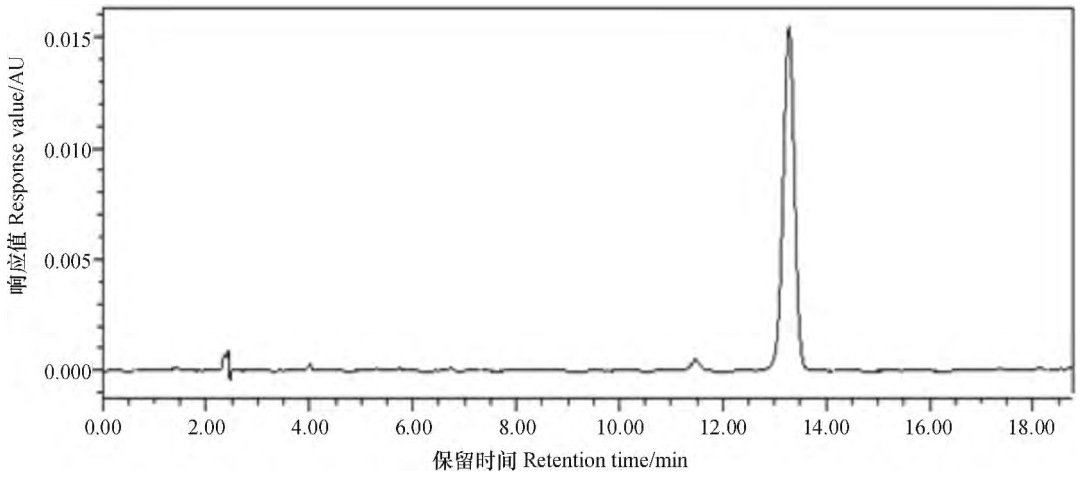


图 2 十四酸 2 – 硝基苯肼衍生物的色谱图

Fig. 2 The chromatogram of HPLC of myristic acid 2 – nitrophenylhydrazine derivates

3 结论

选取十四碳酸作代表，以 2 – 硝基苯肼盐酸为衍生剂，在吡啶作催化剂、EDC · HCl 作偶联剂下，合成了十四碳酸 2 – 硝基苯肼衍生物 MANPH，衍生后加入 KOH 溶液破坏过量的反应试剂和副产物，再加酸中和使 MANPH 去电荷，从而用正己烷萃取，可将水溶性杂质排除. 在硅胶柱分离过程中，采用乙酸乙酯与正己烷混和洗脱剂分离效果较好，再配合简单重结晶即可获得高纯度的 MANPH 对照品，可为研究 HPLC 柱前衍生检测脂肪酸组成的衍生条件提供衍生率判断的标准物.

参考文献:

[1] ILIA B. Development of fatty acid analysis by high – performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques [J]. Anal Chim Acta, 2002, 465(1): 1 – 37.

[2] PETERS R, HELLENBRAND J, Mengerinketal Y. On – line determination of carboxylic acid, aldehydes and ketones by high – performance liquid chromatography – diode array detection – atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry after derivatization with 2 – nitrophenylhydrazine [J]. J Chromatogr A, 2004, 1031(1 – 2): 35 – 50.

[3] STEFANIE K, STEGFRUED P, WALTER V. Direct determination of flavor relevant and further branched – chain fatty acids from sheep subcutaneous adipose tissue by gas chromatography with mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2014, 1350: 92 – 101.

[4] 张彦昌，曹金丽，王冬梅，等. 红外光谱、核磁氢谱在阳离子聚丙烯酰胺结构鉴定中的应用 [J]. 光谱学与光谱分析，2014，34(10)：77 – 78.

【责任编辑 夏成锋】

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net