



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114591237 B

(45) 授权公告日 2023.08.01

(21) 申请号 202210349128.3

(22) 申请日 2022.04.01

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114591237 A

(43) 申请公布日 2022.06.07

(73) 专利权人 曲阜师范大学

地址 273100 山东省济宁市静轩西路57号

(72) 发明人 孙志伟 张嘉伟 宋翠华 尤进茂

(74) 专利代理机构 山东知圣律师事务所 37262

专利代理师 陈辉

(51) Int. Cl.

C07D 215/48 (2006.01)

审查员 童瑶

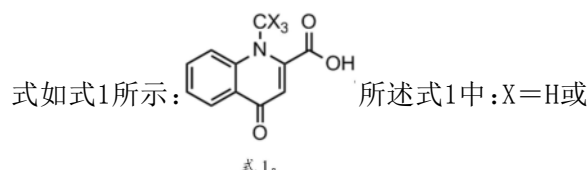
权利要求书4页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

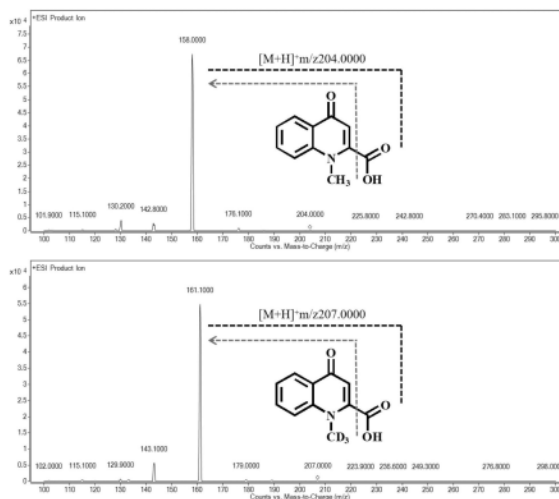
一种基于喹啉酮母体的同位素编码标记试剂及其合成方法与应用

(57) 摘要

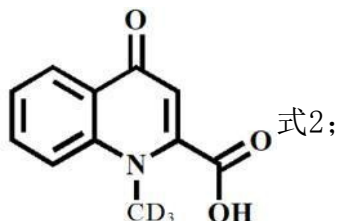
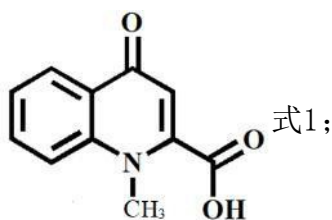
本发明涉及同位素编码衍生技术领域,具体公开一种基于喹啉酮母体的同位素编码标记试剂及其合成方法与应用,该标记试剂的化学结构



D. 采用本发明的同位素编码标记试剂对待测样本进行标记时,无需对样本进行复杂的前处理,通过重型标记试剂使目标物分子量更大地增大,避免了质谱检测低分子量区域的信号干扰。相比传统的内标,本发明的轻型、重型标记试剂不仅原料更易获得、价格相对低廉,合成路线简单、反应条件温和,显著降低了实验成本和难度。



1. 一种基于喹啉酮母体的同位素编码标记试剂的应用, 其特征在于, 所述基于喹啉酮母体的同位素编码标记试剂包括轻型标记试剂和重型标记试剂, 其中轻型标记试剂的化学结构式如式1所示, 命名为 $[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1, 4-二氢-代喹啉-2-羧酸; 重型标记试剂的化学结构式如式2所示, 命名为 $[d_3]$ 1-甲基-4-氧-1, 4-二氢-代喹啉-2-羧酸;



其中, 所述D即H元素的同位素氘;

其中, 所述标记试剂用于检测样品中胺类化合物或酚类化合物的浓度。

2. 根据权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述胺类化合物为尸胺、腐胺、乙胺、丙胺、丁胺、N-甲基乙胺、N-甲基丙胺或N-甲基丁胺; 所述酚类化合物为尼泊金酯、对氯苯酚、对溴苯酚或苯酚。

3. 根据权利要求2所述的应用, 其特征在于, 所述尼泊金酯为尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯或尼泊金丁酯。

4. 根据权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述胺类化合物为尸胺时, 采用以下步骤进行检测:

(1) 在10 mL容量瓶中配制浓度为 10^{-4} mol/L的尸胺标准溶液, 置于4℃冰箱中冷藏储存备用;

(2) 在10 mL容量瓶中配制浓度为0.1 mol/L的1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液, 置于4℃冰箱中冷藏储存备用;

(3) 在10 mL容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的 $[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1, 4-二氢-代喹啉-2-羧酸溶液, 置于4℃冰箱中冷藏储存备用;

(4) 在10 mL容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的 $[d_3]$ 1-甲基-4-氧-1, 4-二氢-代喹啉-2-羧酸溶液, 置于4℃冰箱中冷藏储存备用;

(5) 在第一安瓿瓶中加入100 μ L所述尸胺标准溶液, 100 μ L所述 $[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1, 4-二氢-代喹啉-2-羧酸溶液, 100 μ L 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液, 在50℃的水浴加热条件下进行缩合反应40 min, 即得反应液A, 备用;

(6) 在第二安瓿瓶中加入100 μ L所述尸胺标准溶液, 100 μ L所述 $[d_3]$ 1-甲基-4-氧-1, 4-二氢-代喹啉-2-羧酸溶液, 100 μ L 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液, 在50℃的水浴加热条件下进行缩合反应40 min, 即得反应液B, 备用;

(7) 将所述反应液A、反应液B按体积比1:1混合后, 进行HPLC-MS/MS串联质谱分析。

5. 根据权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述胺类化合物为腐胺时, 采用以下步骤

进行检测：

(1) 在10 mL容量瓶中配制浓度为 10^{-4} mol/L的腐胺标准溶液，置于4℃冰箱中冷藏储存备用；

(2) 在10 mL容量瓶中配制浓度为0.1 mol/L的1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液，置于4℃冰箱中冷藏储存备用；

(3) 在10 mL容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的 $[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸溶液，置于4℃冰箱中冷藏储存备用；

(4) 在10 mL容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的 $[d_3]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸溶液，置于4℃冰箱中冷藏储存备用；

(5) 在第一安瓿瓶中加入100 μ L所述腐胺标准溶液，100 μ L所述 $[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸溶液，100 μ L1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液，在50℃的水浴加热条件下进行缩合反应40 min，即得反应液C，备用；

(6) 在第二安瓿瓶中加入100 μ L所述腐胺标准溶液，100 μ L所述 $[d_3]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸溶液，100 μ L1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液，在50℃的水浴加热条件下进行缩合反应40 min，即得反应液D，备用；

(7) 将所述反应液C、反应液D按体积比1:1混合后，进行HPLC-MS/MS串联质谱分析。

6. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述酚类化合物为尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯或尼泊金丁酯时，采用以下步骤进行检测：

(1) 同位素编码酰氯试剂的制备：

步骤一、在50 mL圆底烧瓶中加入0.0022 g所述 $[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸，加入5 mL氯化亚砷，在70℃下回流50 min，将反应液用旋转蒸发仪在70℃下悬干，得轻型同位素编码酰氯试剂 $[d_0]$ -1-甲基-4-喹啉酮-2-甲酰氯，备用；

步骤二、在50 mL圆底烧瓶中加入0.0022 g所述 $[d_3]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸，加入5 mL氯化亚砷，在70℃下回流50 min，将反应液用旋转蒸发仪在70℃下悬干，得重型同位素编码酰氯试剂 $[d_3]$ -1-甲基-4-喹啉酮-2-甲酰氯，备用；

(2) 上述酰氯试剂用于尼泊金酯定性和相对定量分析，采用以下步骤：

步骤一、在四个10 mL容量瓶中分别配制浓度为 10^{-4} mol/L的尼泊金甲酯标准溶液、尼泊金乙酯标准溶液、尼泊金丙酯标准溶液、尼泊金丁酯标准溶液，均置于4℃冰箱中冷藏储存备用；

步骤二、用100 mL容量瓶配制浓度为0.1 mol/L的 $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲溶液，置于4℃冰箱中冷藏储存备用；

步骤三、在10 mL容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的 $[d_0]$ -1-甲基-4-喹啉酮-2-甲酰氯溶液，置于4℃冰箱中冷藏储存备用；

步骤四、在10 mL容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的 $[d_3]$ -1-甲基-4-喹啉酮-2-甲酰氯溶液，置于4℃冰箱中冷藏储存备用；

步骤五、准备四个安瓿瓶，分别加入100 μ L所述尼泊金甲酯标准溶液、尼泊金乙酯标准溶液、尼泊金丙酯标准溶液、尼泊金丁酯标准溶液，加入100 μ L所述 $[d_0]$ -1-甲基-4-喹啉酮-2-甲酰氯溶液，200 μ L pH=9的所述缓冲溶液，在70℃的水浴条件下加热反应30 min，即得反应液E；

步骤六、同时,在另外四个安瓿瓶中分别加入100 μL 所述尼泊金甲酯标准溶液、尼泊金乙酯标准溶液、尼泊金丙酯标准溶液、尼泊金丁酯标准溶液,加入100 μL 所述 $[\text{d}_3]$ -1-甲基-4-喹啉酮-2-甲酰氯溶液,200 μL $\text{pH}=9$ 的所述缓冲溶液,在70 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴条件下加热反应30 min,即得反应液F;

步骤七、将所述反应液E、反应液F按体积比1:1混合后,进行HPLC-MS/MS串联质谱分析。

7. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述胺类化合物为乙胺、丙胺、丁胺、N-甲基乙胺、N-甲基丙胺或N-甲基丁胺,或所述酚类化合物为对氯苯酚、对溴苯酚或苯酚时,采用以下步骤进行检测:

(1) 活性酯的制备:

步骤一、称取所述 $[\text{d}_0]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸0.5 g、羰基二咪唑0.25 g,置于250 mL的圆底烧瓶中,加入220 mL乙腈和5 mL DMF,使原料充分溶解;然后在80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热反应20 min;完成将温度降至50 $^{\circ}\text{C}$,向反应体系中加入0.325 g N-羟基琥珀酰亚胺,密封后反应60 min;反应完成后,冷却至室温,静置,取上清液减压蒸馏得到浅黄色固体,用水清洗三次以上,放入烘箱中调节温度为干燥,得轻型活性酯;

步骤二、称取所述 $[\text{d}_3]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸 0.5 g、羰基二咪唑0.25 g,置于250 mL的圆底烧瓶中,加入220 mL乙腈和5 mL DMF,使原料充分溶解;然后在80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热反应20 min;完成将温度降至50 $^{\circ}\text{C}$,向反应体系中加入0.325 g N-羟基琥珀酰亚胺,密封后反应60 min;反应完成后,冷却至室温,静置,取上清液减压蒸馏得到浅黄色固体,用水清洗三次以上,放入烘箱中调节温度为干燥,得重型活性酯;

(2) 将上述轻型活性酯、重型活性酯试剂用于所述胺类化合物或酚类化合物的定性和相对定量分析,包含以下步骤:

步骤一、在九个10 mL容量瓶中分别配制浓度为 10^{-4} mol/L的乙胺标准样品溶液、丙胺标准样品溶液、丁胺标准样品溶液、N-甲基乙胺标准样品溶液、N-甲基丙胺标准样品溶液、N-甲基丁胺标准样品溶液、对氯苯酚标准样品溶液、对溴苯酚标准样品溶液、苯酚标准样品溶液,均置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏储存备用;

步骤二、用100 mL容量瓶配制浓度为0.1 mol/L的 $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏储存备用;

步骤三、在10 mL容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的所述轻型活性酯溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏储存备用;

步骤四、在10 mL容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的所述重型活性酯溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏储存备用;

步骤五、准备九个安瓿瓶,分别加入100 μL 所述乙胺标准样品溶液、丙胺标准样品溶液、丁胺标准样品溶液、N-甲基乙胺标准样品溶液、N-甲基丙胺标准样品溶液、N-甲基丁胺标准样品溶液、对氯苯酚标准样品溶液、对溴苯酚标准样品溶液、苯酚标准样品溶液,加入100 μL 所述轻型活性酯溶液、200 μL $\text{pH}=9$ 的所述缓冲溶液,在70 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴条件下加热反应30 min,即得轻型衍生物的反应液G;

步骤六、准备九个安瓿瓶,分别加入100 μL 所述乙胺标准样品溶液、丙胺标准样品溶液、丁胺标准样品溶液、N-甲基乙胺标准样品溶液、N-甲基丙胺标准样品溶液、N-甲基丁胺标准样品溶液、对氯苯酚标准样品溶液、对溴苯酚标准样品溶液、苯酚标准样品溶液,加入

100 μL 所述重型活性酯溶液、200 μL pH=9的所述缓冲溶液,在70°C的水浴条件下加热反应30 min,即得含有重型衍生物的反应液H;

步骤七、将所述反应液G、反应液H按体积比1:1混合后,进行HPLC-MS/MS串联质谱分析。

一种基于喹啉酮母体的同位素编码标记试剂及其合成方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及同位素编码衍生技术领域,尤其涉及一种基于喹啉酮母体的同位素编码标记试剂及其合成方法与应用。

背景技术

[0002] 本发明背景技术中公开的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

[0003] 高效液相色谱-串联质谱技术(简称为HPLC-MS/MS)由于其高灵敏度、高选择性而被广泛地应用于食品分析、生命分析与环境监测等多种研究领域中。采用HPLC-MS/MS的选择反应监测(select reaction monitoring,SRM)或多级反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)可以同时监测多个化合物,并且可以选择性的监测目标分析物,具有较强的特异性。尤其适合于复杂的、基质背景高的样品,能够有效地降低噪音影响,具有灵敏度高且检测速度快等特点。但是基质效应问题却由于样品基质或者共洗脱的影响而难以解决,使其分析效能饱受影响而大打折扣。

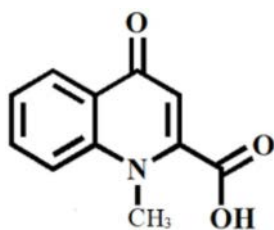
[0004] 近年来同位素编码衍生技术受到了广泛关注,该技术采用同位素标记试剂在分析物上引入轻/重同位素编码,从而得到具有相同官能团的一类同位素衍生物。目前,该技术主要采用通过对目标分析物中的可反应基团引入同位素内标进行修饰(即同位素内标法),通过高效液相色谱与质谱联用实现定性以及定量。然而,目前的这类同位素编码衍生技术依然存在以下方面的不足:一方面,对应的同位素内标往往昂贵且难以获得;另一方面,标记效率具有有限性且会对后续的分选检测过程引入定量误差。

发明内容

[0005] 针对上述的问题,本发明提供一种基于喹啉酮母体的同位素编码标记试剂及其合成方法与应用,相对于上述的现有的同位素编码衍生技术,本发明提供的同位素编码标记试剂能够显著的提高分析的准确性以及分析效率,而且成本更低。为实现上述目的,本发明公开如下的技术方案:

[0006] 在本发明的第一方面,提供一种基于喹啉酮母体的同位素编码轻型标记试剂,其命名为 $[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸,简称为 $[d_0]$ -MQOA,其化学结构式如式1所示。

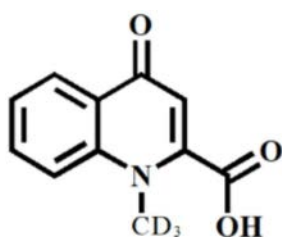
[0007]



式 1。

[0008] 在本发明的第二方面,提供一种基于喹啉酮母体的同位素编码重型标记试剂,其命名为 $[d_3]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸,简写为 $[d_3]$ -MQOA,其化学结构式如式2所示。

[0009]



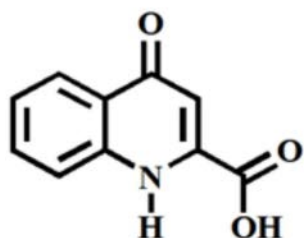
式 2。

[0010] 其中:所述D即H元素的同位素氘。

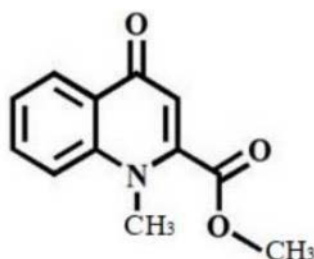
[0011] 在本发明的第三方面,提供所述基于喹啉酮母体的同位素编码轻型标记试剂的合成方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 将甲基化试剂、4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸加入溶剂中反应,即得轻型中间体。其中:所述4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸的化学结构式如式3所示,所述轻型中间体的化学结构式如式4所示。

[0013]



式 3。



式 4。

[0014] (2) 将所述轻型中间体在碱性条件下水解,完成后调节水解液的酸碱度使产物析出,即得所述轻型标记试剂。

[0015] 进一步地,步骤(1)中,所述甲基化试剂为碘甲烷(CH_3I),硫酸二甲酯($CH_3OSO_2OCH_3$)等中的任意一种。

[0016] 进一步地,步骤(1)中,所述甲基化试剂、4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸的摩尔比为1:3~1:10。

[0017] 进一步地,步骤(1)中,所述溶剂包括:二甲基亚砷(DMSO)、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)等中的至少一种。

[0018] 进一步地,步骤(2)中,所述碱性条件由氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氨水等碱性物质提供。

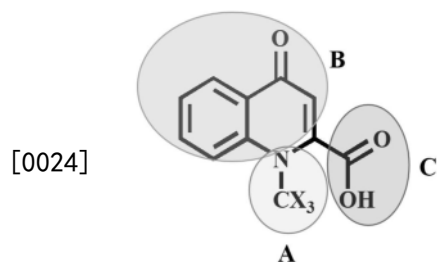
[0019] 进一步地,步骤(2)中,所述碱性条件的pH保持在pH=9~10范围内较佳。

[0020] 进一步地,步骤(2)中,将所述水解液调节为酸性,优选为pH=3~4,以便于目标产物轻型标记试剂的析出。

[0021] 在本发明的第四方面,提供所述基于喹啉酮母体的同位素编码重型标记试剂的合成方法,其合成方法参考上述轻型标记试剂的合成,区别在于用H元素的同位素氘(D)替代所述甲基化试剂中的H元素,如氘代碘甲烷(CD_3I),氘代硫酸二甲酯($\text{CD}_3\text{OSO}_2\text{OCD}_3$)等。

[0022] 在本发明的第五方面,公开所述基于喹啉酮母体的同位素编码标记试剂在生命分析、环境分析、食品分析等研究领域中的应用。

[0023] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:



式5。

[0025] (1) 参考上述的式5,其为所述轻型标记试剂和重型标记试剂的通式,当所述X=H时表示轻型标记试剂 $[\text{d}_0]$ -MQOA,当所述X=D时表示重型标记试剂 $[\text{d}_3]$ -MQOA。

[0026] 本发明提供的所述基于喹啉酮母体的同位素编码轻型/重型标记试剂的结构式具有以下不同于现有技术的结构特点,其中:所述基团A表示氮甲基部分,其作为同位素编码标签部位,含有三个氢/氘,由于该基团A的存在,使所述轻型、重型标记试剂分别用于胺类及酚类标记后,得到轻重衍生物也具有3Da的质量差(双标记产物的轻重型体质量差则为6Da)。所述基团B表示喹啉酮部分,其作为质谱信号增敏的功能部位,这是由于酮羰基亲合质子,具有疏水性,能够提高离子化效率,从而能够进一步提高质谱信号响应。所述基团C是标记反应活性部分,其作为编码衍生化的活性基团,可以在缩合剂的作用下标记胺类和酚类分析物;该部位还可以转化为酰氯,对胺类和酚类进行快速标记;也可以转化为活性酯类化合物,选择性地标记目标化合物。因此,所述基团C的在极大地扩展了本发明的标记试剂的鉴别范围。

[0027] (2) 本发明提供的所述轻型、重型标记试剂用于特异性的编码标记胺类及酚类化合物,显著降低了质谱分析的复杂程度,这是因为:串联质谱分析过程中产生的 m/z 离子能够用来指认标记片段,用所述标记试剂对待测物标记后可以增加其疏水性从而进一步使质谱信号增敏,其信号强度与稳定性被标记试剂提升。并且采用正离子模式,提升了离子化效率,使衍生反应能够高效率的进行,同位素编码标记后产生一对质荷比相差3Da或者6Da的质谱峰,在MS/MS中仍可保留编码信息,轻重信号的相对强度可代表相对浓度,有利于进行定性、定量分析。

[0028] (3) 采用本发明的轻型、重型标记试剂对待测样本进行标记时,无需对样本进行复杂的前处理,通过重型标记试剂使目标物分子量更大地增大,避免了质谱检测低分子量区域的信号干扰。相比较传统的内标,本发明的轻型、重型标记试剂不仅原料更易获得、价格相对低廉,合成路线简单、反应条件温和,显著降低了实验成本和难度。

[0029] (4) 采用本发明的轻型、重型标记试剂可实现对待测样品的HPLC-MS/MS串联质谱分析,不仅操作简便,分析时间短,而且样品不经过其他分离纯化步骤,去除了产生操作误差的过程,提高了分离检测效率,显著地提升了分析的实用性与选择性。

附图说明

[0030] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0031] 图1是本发明第一实施例和第二实施例分别制备的 $[d_0]$ -MQOA、 $[d_3]$ -MQOA试剂的质谱图谱。

[0032] 图2是本发明第一实施例和第二实施例分别制备的 $[d_0]$ -MQOA、 $[d_3]$ -MQOA试剂的核磁共振图谱。

[0033] 图3是本发明第七实施例制备的轻型活性酯、重型活性酯的质谱图谱。

[0034] 图4是本发明第七实施例用 $[d_0]$ -MQOA衍生物、 $[d_3]$ -MQOA衍生物标记代表性胺类和酚类的MRM离子流图。

具体实施方式

[0035] 在接下来的描述中进一步阐述了本发明的具体细节用于充分理解本发明。本发明中的说明书所使用的术语只是为了用于说明本发明的优点和特点,不是旨在限制本发明。

[0036] 除非另行定义,本发明中所使用的所有专业与科学术语属于本发明的技术领域的技术人员所理解的含义相同。如无特殊说明,本发明所使用的药品或试剂均按照产品说明书使用或采用所属领域的常规使用方法。

[0037] 正如前文所述,目前的一些同位素编码衍生技术依然存在以下方面的不足:一方面,对应的同位素内标往往昂贵且难以获得;另一方面,标记效率具有有限性且会对后续的分选检测过程引入定量误差。为此,本发明提出了一种基于喹啉酮母体的同位素编码标记试剂及其合成方法,现根据说明书附图和具体实施方式对该方法作进一步说明。

[0038] 第一实施例

[0039] 参考下述路线1进行轻型标记试剂($[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸)的合成,包括如下步骤:

[0040] (1) 称取4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸(购自阿拉丁)3.26mmol、量取DMSO 6.67ml,将上述两种原料加入到三口烧瓶中,并加入磁子,常温下搅拌20min,得到混合液,备用。

[0041] (2) 量取0.652mmol的碘甲烷和2ml的DMSO于恒压滴液漏斗中,将其逐滴滴加到步骤(1)的混合液中,半小时内将混合物缓慢逐滴滴加完毕,然后在常温下反应12小时,即得中间体I,备用。

[0042] (3) 在步骤(2)的中间体I中加入氢氧化钠后再加50ml蒸馏水,使溶液体系pH=10,在电热套上加热到75℃,回流1h。后冷却至室温用盐酸调节酸度至pH=3,静置后如绵砂状的黄色沉淀析出,待所有沉淀完全析出后,用真空泵抽滤,用水清洗三次以上,放入烘箱

中在50℃干燥8h,完成后即得轻型标记试剂($[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸),简称为 $[d_0]$ -MQOA。



[0044] 第二实施例

[0045] 参考下述路线2进行重型标记试剂($[d_3]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸)的合成,包括如下步骤:

[0046] (1)称取4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸(原料1)3.26mmol、量取DMSO6.67ml,将上述两种原料加入到三口烧瓶中,并加入磁子,常温下搅拌20min,得到混合液,备用。

[0047] (2)量取0.652mmol的氘代碘甲烷(CD_3I)和2ml的DMSO于恒压滴液漏斗中,将其逐滴滴加到步骤(1)的混合液中,半小时内将混合物缓慢逐滴滴加完毕,然后在常温下反应12小时,即得中间体II,备用。

[0048] (3)在步骤(2)的中间体II中加入过量氢氧化钠后再加50ml蒸馏水,在电热套上加热到75℃,回流1h。后冷却至室温用盐酸调节酸度至pH=3,静置后如绵砂糖状的黄色沉淀析出,待所有沉淀完全析出后,用真空泵抽滤,用水清洗三次以上,放入烘箱中在50℃干燥8h,完成后即得重型标记试剂($[d_3]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸),简称为 $[d_3]$ -MQOA。



[0050] 对上述第一实施例和第二实施例合成的轻型标记试剂 $[d_0]$ -MQOA、重型标记试剂 $[d_3]$ -MQOA进行质谱和核磁共振检测,结果分别如图1、图2所示。其中:

[0051] 如图1所示,质谱产物表征结果:所述 $[d_0]$ -MQOA的ESI-MS及MS/MS分析表明,MS中主要为 $m/z=204$ 的 $[M+H]^+$ 信号,MS/MS主要给出 $m/z=158$ 的碎片离子; $[d_3]$ -MQOA的主要为 $m/z=207$ 的 $[M+H]^+$ 信号,MS/MS主要给出 $m/z=161$ 的碎片离子。可以看出,所述 $[d_0]$ -MQOA与 $[d_3]$ -MQOA相差3Da的质量差,在MS/MS中的碎片离子也存在3Da的质量差,这两种标记试剂及其衍生物在MS/MS分析中未丢失编码信息。

[0052] 如图2所示,核磁共振表征结果:所述 $[d_0]$ -MQOA的 1H NMR (500MHz, DMSO): δ 8.21-8.19(d, 1H), 8.13-8.11(d, 1H), 7.88-7.85(t, 1H), 7.71-7.68(t, 1H), 7.58(s, 1H), 4.14(s, 3H)。所述 $[d_3]$ -MQOA的 1H NMR (500MHz, DMSO): δ 8.21-8.19(d, 1H), 8.14-8.12(d, 1H), 7.89-7.85(t, 1H), 7.72-7.69(t, 1H), 7.58(s, 1H)。可以看出,所述轻型试剂 $[d_0]$ -MQOA与重型试剂 $[d_3]$ -MQOA在化学位移4.14显示出3个1H的差异,对应N-甲基上三个编码原子。

[0053] 第三实施例

[0054] 一种重型标记试剂($[d_0]$ 1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸)的合成方法,包

括如下步骤:

[0055] (1)称取4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸(购自阿拉丁)10.861mmol、量取N,N-二甲基甲酰胺6.67ml,将上述两种原料加入到三口烧瓶中,并加入磁子,常温下搅拌20min,得到混合液,备用。

[0056] (2)量取1.086mmol的氘代硫酸二甲酯($\text{CD}_3\text{OSO}_2\text{OCD}_3$)和2ml的N,N-二甲基甲酰胺于恒压滴液漏斗中,将其逐滴滴加到步骤(1)的混合液中,半小时内将混合物缓慢逐滴滴加完毕,然后在常温下反应12小时,即得中间体I,备用。

[0057] (3)在步骤(2)的中间体I中加入氨水后再加50ml蒸馏水,使溶液体系 $\text{pH}=9$,在电热套上加热到 75°C ,回流1h。后冷却至室温用盐酸调节酸度至 $\text{pH}=3$,静置后如绵砂糖状的黄色沉淀析出,待所有沉淀完全析出后,用真空泵抽滤,用水清洗三次以上,放入烘箱中在 50°C 干燥8h,完成后即得轻型标记试剂($[\text{d}_0]$ -1-甲基-4-氧-1,4-二氢-代喹啉-2-羧酸),简称为 $[\text{d}_0]$ -MQOA。

[0058] 第四实施例

[0059] 参考下述路线3,采用上述第一、第二实施例分别制备的重型标记试剂($[\text{d}_0]$ -MQOA)、重型标记试剂($[\text{d}_3]$ -MQOA)对样品中尸胺进行标记试验,包括如下步骤:

[0060] (1)在10ml容量瓶中配制浓度为 10^{-4}mol/L 的尸胺标准溶液,置于 4°C 冰箱中冷藏储存备用。

[0061] (2)用10ml容量瓶配制浓度为 0.1mol/L 的EDC溶液,置于 4°C 冰箱中冷藏储存备用。

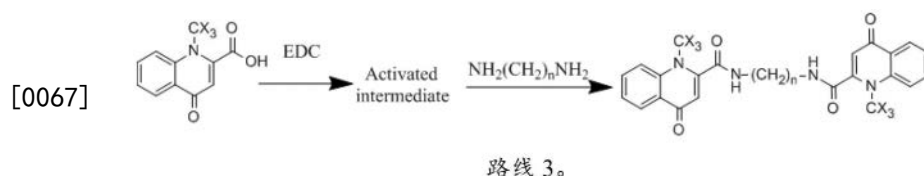
[0062] (3)在10ml容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 $7 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 的轻型标记试剂溶液,置于 4°C 冰箱中冷藏储存备用。

[0063] (4)在10ml容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 $7 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 的重型标记试剂溶液,置于 4°C 冰箱中冷藏储存备用。

[0064] (5)在第一安瓿瓶中加入 $100\mu\text{L}$ 所述尸胺标准溶液,然后 $100\mu\text{L}$ 所述轻型标记试剂溶液,加入 $100\mu\text{L}$ 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC),最后在 50°C 的水浴加热条件下进行缩合反应40min,即得反应液A,备用。

[0065] (6)在第二安瓿瓶中加入 $100\mu\text{L}$ 所述尸胺标准溶液,然后 $100\mu\text{L}$ 所述重型标记试剂溶液,加入 $100\mu\text{L}$ 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC),最后在 50°C 的水浴加热条件下进行缩合反应40min,即得反应液B,备用。

[0066] (7)将所述反应液A、反应液B按体积比1:1混合后,进行HPLC-MS/MS串联质谱分析。



[0068] 第五实施例

[0069] 参考上述路线3,采用上述第一、第二实施例分别制备的轻型标记试剂($[\text{d}_0]$ -MQOA)、重型标记试剂($[\text{d}_3]$ -MQOA)对样品中腐胺进行标记试验,包括如下步骤:

[0070] (1)在10ml容量瓶中配制浓度为 10^{-4}mol/L 的腐胺标准溶液,置于 4°C 冰箱中冷藏储存备用。

[0071] (2)用10ml容量瓶配制浓度为 0.1mol/L 的EDC溶液,置于 4°C 冰箱中冷藏储存备用。

[0072] (3)在10ml容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的轻型标记试剂溶液,置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0073] (4)在10ml容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的重型标记试剂溶液,置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0074] (5)在第一安瓿瓶中加入100μL所述腐胺标准溶液,然后100μ所述轻型标记试剂溶液,加入100μL1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC),最后在50℃的水浴加热条件下进行缩合反应40min,即得反应液C,备用。

[0075] (6)在第二安瓿瓶中加入100μL所述腐胺标准溶液,然后100μ所述种型标记试剂溶液,加入100μL1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC),最后在50℃的水浴加热条件下进行缩合反应40min,即得反应液D,备用。

[0076] (7)将所述反应液C、反应液D按体积比1:1混合后,进行HPLC-MS/MS串联质谱分析。

[0077] 上述第四和第五实施例的HPLC-MS/MS串联质谱测试结果显示:轻型和重型尸胺衍生物的 $[M+H]^+$ 的质荷比分别为 $m/z=458.2$ 和 $m/z=464.2$ 。轻型和重型腐胺衍生物的 $[M+H]^+$ 的质荷比分别为 $m/z=472.2$ 和 $m/z=478.2$ 。两种分析物均为双标记产物,轻重质荷比相差6Da,说明两种衍生物未丢失编码信息;检测限LOD为低于nM水平。轻型标记试剂衍生后得的峰面积为A1,标准品的浓度记为C1,重型衍生物的峰面积记为A2,样品中标准品的浓度记为C2,根据公式 $C1/C2=A1/A2$,即可求得样品中目标化合物的浓度。

[0078] 实验结果表明,尸胺轻重衍生物峰面积为 2.0316×10^5 和 2.0261×10^5 ,根据公式 $C1/C2=A1/A2$ 得 $C1/C2=1:1.003$,求得 $C2=7.02 \times 10^{-4}$ mol/L。腐胺轻重衍生物峰面积为 3.4513×10^5 和 3.4772×10^5 ,根据公式 $C1/C2=A1/A2$ 得 $C1/C2=0.993$ 求得 $C2=6.95 \times 10^{-4}$ mol/L。轻型重型衍生物峰面积均为 2×10^5 - 4×10^5 之间,根据公式可得 $C1/C2$ 在0.993-1.003范围内,求得 $C2$ 均为 7×10^{-4} mol/L左右,误差小于0.05。实验结果证明了同位素内标定量的可行性,说明了质谱信号强度比与轻重衍生物浓度比有很好的相关性,验证了本技术的先进性。

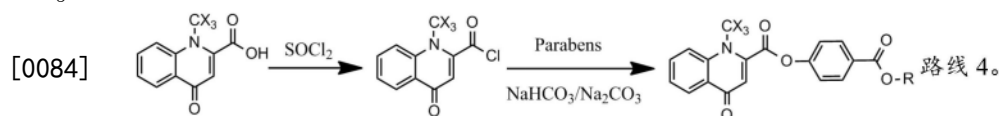
[0079] 第六实施例

[0080] 将述第一、第二实施例分别制备的轻型标记试剂($[d_0]$ -MQOA)、重型标记试剂($[d_3]$ -MQOA)活化为酰氯试剂后,再标记酚类物质(尼泊金酯)的试验,包括步骤:

[0081] 1、参考下述路线4,同位素编码酰氯试剂的制备:

[0082] (1)在50ml圆底烧瓶瓶中加入0.0022g所述轻型标记试剂,然后加入氯化亚砷5ml在70℃下回流50min,将反应液用旋转蒸发仪在70℃下悬干,得轻型同位素编码酰氯试剂($[d_0]$ -1-甲基-4-喹啉酮-2-甲酰氯),备用。

[0083] (2)在50ml圆底烧瓶瓶中加入0.0022g所述重型标记试剂,然后加入氯化亚砷5ml在70℃下回流50min,将反应液用旋转蒸发仪在70℃下悬干,得重型同位素编码酰氯试剂($[d_3]$ -1-甲基-4-喹啉酮-2-甲酰氯),备用。



[0085] 2、参考上述路线4,上述酰氯试剂用于尼泊金酯定性和相对定量的快速、灵敏、高效的分析,包含步骤:

[0086] (1) 在四个10ml容量瓶中分别配制浓度为 10^{-4} mol/L的尼泊金甲酯标准溶液、尼泊金乙酯标准溶液、尼泊金丙酯标准溶液、尼泊金丁酯标准溶液,该四种标准溶液均置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0087] (2) 用100ml容量瓶配制浓度为0.1mol/L的 $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲溶液,置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0088] (3) 在10ml容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的轻型同位素编码酰氯试剂溶液,置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0089] (4) 在10ml容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的重型同位素编码酰氯试剂溶液,置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0090] (5) 准备四个安瓿瓶,分别加入100 μL 所述尼泊金甲酯标准溶液、尼泊金乙酯标准溶液、尼泊金丙酯标准溶液、尼泊金丁酯标准溶液,然后加入100 μL 所述轻型同位素编码酰氯试剂溶液、200 μL pH=9的所述缓冲溶液,在70℃的水浴条件下加热反应30min,即得反应液E。

[0091] (6) 同时,在另外四个安瓿瓶中分别加入100 μL 所述尼泊金甲酯标准溶液、尼泊金乙酯标准溶液、尼泊金丙酯标准溶液、尼泊金丁酯标准溶液,然后加入100 μL 所述重型同位素编码酰氯试剂溶液、200 μL pH=9的所述缓冲溶液,在70℃的水浴条件下加热反应30min,即得反应液F。

[0092] (7) 将所述反应液E、反应液F按体积比1:1混合后,进行HPLC-MS/MS串联质谱分析。

[0093] 本实施例的HPLC-MS/MS串联质谱分析表明:尼泊金甲酯轻重衍生物的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的质荷比分别为 $m/z=337$ 和 $m/z=340$ 。尼泊金乙酯轻重衍生物的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的质荷比分别为 $m/z=351$ 和 $m/z=354$ 。尼泊金丙酯轻重衍生物的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的质荷比分别为 $m/z=365$ 和 $m/z=368$ 。尼泊金丁酯轻重衍生物的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的质荷比分别为 $m/z=379$ 和 $m/z=382$ 。

[0094] 可以看出,上述四种分析物轻型和重型的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 信号质荷比相差3Da,说明两种衍生物很好地保留了编码信息。所述轻重衍生物保留时间相差0.01-0.02min,检测限LOD低于nM水平。轻型标记试剂衍生后得的峰面积为 A_1 ,标准品的浓度记为 C_1 ,重型衍生物的峰面积记为 A_2 ,样品中标准品的浓度记为 C_2 ,根据公式 $C_1/C_2=A_1/A_2$,即可求得样品中目标化合物的浓度。

[0095] 实验结果表明,尼泊金甲酯轻重衍生物峰面积为 4.8756×10^5 和 4.8852×10^5 ,根据公式 $C_1/C_2=A_1/A_2$ 得 $C_1/C_2=1:0.998$,求得 $C_2=6.99 \times 10^{-4}$ mol/L。尼泊金乙酯轻重衍生物峰面积为 5.0211×10^5 和 5.0103×10^5 ,根据公式 $C_1/C_2=A_1/A_2$ 得 $C_1/C_2=1.002$ 求得 $C_2=7.01 \times 10^{-4}$ mol/L。尼泊金丙酯轻重衍生物峰面积为 5.2301×10^5 和 5.2248×10^5 ,根据公式 $C_1/C_2=A_1/A_2$ 得 $C_1/C_2=1.001$ 求得 $C_2=7.01 \times 10^{-4}$ mol/L。尼泊金丁酯轻重衍生物峰面积为 4.9301×10^5 和 4.9548×10^5 ,根据公式 $C_1/C_2=A_1/A_2$ 得 $C_1/C_2=0.995$ 求得 $C_2=6.97 \times 10^{-4}$ mol/L。轻型重型衍生物峰面积均为 5×10^5 左右,根据公式可得 C_1/C_2 在0.995-1.002范围内,求得 C_2 均为 7×10^{-4} mol/L左右,误差小于0.03。实验结果证明了同位素内标定量的可行性,说明了质谱信号强度比与轻重衍生物浓度比有很好的相关性,验证了本技术的先进性。

[0096] 第七实施例

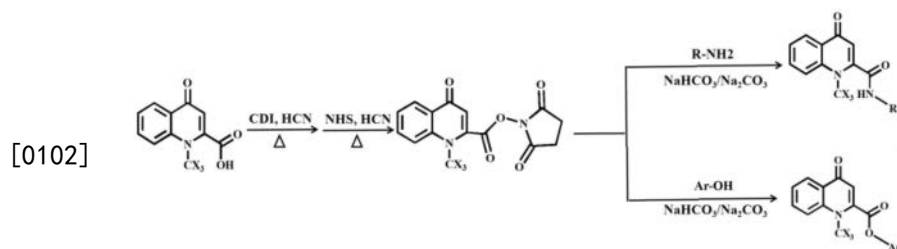
[0097] 将述第一、第二实施例分别制备的轻型标记试剂($[\text{d}_0]$ -MQOA)、重型标记试剂($[\text{d}_3]$ -MQOA)活化为酯类化合物后,再标记生物胺的试验。

[0098] 1、参考下述路线5,活性酯的制备:

[0099] (1) 称取 $[d_0]$ -MQOA 0.5g、羰基二咪唑(CDI)0.25g,置于250ml的圆底烧瓶中,加入220ml乙腈和5ml DMF,使原料充分溶解。然后在80℃水浴加热反应20min。完成将温度降至50℃,向反应体系中加入0.325g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),密封后反应60min。反应完成后,冷却至室温,静置一段时间后,取上清液减压蒸馏得到浅黄色固体,用水清洗三次以上,放入烘箱中调节温度为干燥,得轻型活性酯。

[0100] (2) 称取 $[d_3]$ -MQOA 0.5g、羰基二咪唑(CDI)0.25g,置于250ml的圆底烧瓶中,加入220ml乙腈和5ml DMF,使原料充分溶解。然后在80℃水浴加热反应20min。完成将温度降至50℃,向反应体系中加入0.325g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),密封后反应60min。反应完成后,冷却至室温,静置一段时间后,取上清液减压蒸馏得到浅黄色固体,用水清洗三次以上,放入烘箱中调节温度为干燥,得重型活性酯。

[0101] 所述轻型活性酯、重型活性酯的质谱数据见图3,可得 $m/z=301$ 和 $m/z=304$ 分别为轻型和重型活性酯的 $[M+H]^+$ 信号,两者的质荷比相差3Da;说明两种活性酯很好地保留了编码信息。



路线 5。

[0103] 2、参考上述路线5,将上述轻型活性酯、重型活性酯试剂用于代表性胺类和酚类的定性和相对定量的快速、灵敏、高效的分析含下列步骤:

[0104] (1) 在九个10ml容量瓶中分别配制浓度为 10^{-4} mol/L的乙胺标准样品溶液、丙胺标准样品溶液、丁胺标准样品溶液、N-甲基乙胺标准样品溶液、N-甲基丙胺标准样品溶液、N-甲基丁胺标准样品溶液、对氯苯酚标准样品溶液、对溴苯酚标准样品溶液、苯酚标准样品溶液。将得到的九种标准溶液均置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0105] (2) 用100ml容量瓶配制浓度为0.1mol/L的 $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲溶液,置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0106] (3) 在10ml容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的所述轻型活性酯溶液,置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0107] (4) 在10ml容量瓶中用乙腈为溶剂配制浓度为 7×10^{-4} mol/L的所述重型活性酯溶液,置于4℃冰箱中冷藏储存备用。

[0108] (5) 准备九个安瓿瓶,分别加入100μL所述乙胺标准样品溶液、丙胺标准样品溶液、丁胺标准样品溶液、N-甲基乙胺标准样品溶液、N-甲基丙胺标准样品溶液、N-甲基丁胺标准样品溶液、对氯苯酚标准样品溶液、对溴苯酚标准样品溶液、苯酚标准样品溶液,然后加入100μL所述轻型活性酯溶液、200μL pH=9的所述缓冲溶液,在70℃的水浴条件下加热反应30min,即得轻型衍生物的反应液G。

[0109] (6) 准备九个安瓿瓶,分别加入100μL所述乙胺标准样品溶液、丙胺标准样品溶液、丁胺标准样品溶液、N-甲基乙胺标准样品溶液、N-甲基丙胺标准样品溶液、N-甲基丁胺标准

样品溶液、对氯苯酚标准样品溶液、对溴苯酚标准样品溶液、苯酚标准样品溶液,然后加入100 μ L所述重型活性酯溶液、200 μ L pH=9的所述缓冲溶液,在70℃的水浴条件下加热反应30min,即得含有重型衍生物的反应液H。

[0110] (7)将所述反应液G、反应液H按体积比1:1混合后,进行HPLC-MS/MS串联质谱分析。

[0111] 本实施例的HPLC-MS/MS串联质谱分析:得到的 $[d_0]$ -MQOA衍生物(轻型衍生物)、 $[d_3]$ -MQOA衍生物(重型衍生物)母离子与MS/MS碎片离子质荷比见下表1。在正离子模式下选择m/z 158.0与m/z 161.1分别作为轻型衍生物与重型衍生物的定量离子,得到最优碰撞能FV=175v,最优碎片能CV=40v。六种分析物的轻重衍生物在8min内快速分离,峰形良好。

[0112] 本实施例通过所述 $[d_0]$ -MQOA衍生物、 $[d_3]$ -MQOA衍生物标记代表性胺类和酚类的MRM离子流图见图4。通过对 $[d_0]$ / $[d_3]$ -MQOA衍生物的线性,精密度,准确度等方面进行方法学验证来验证该方法的有效性,以 1×10^{-6} mol/LD的重型衍生物为内标,建立内标校准曲线,结果见表2。从表2可以看出:相关系数 R_2 均大于0.999且准确度在89.6~106.4%之间,精密度在1.54-4.70%之间,验证了本实施例轻型标记试剂($[d_0]$ -MQOA)、重型标记试剂($[d_3]$ -MQOA)活化为酯类化合物后,再标记生物胺的可行性与准确性,检测限LOD在0.6~2.3nM,说明方法具有高灵敏度和准确度。

[0113] 表1 $[d_0]$ / $[d_3]$ -MQOA衍生物质谱分析MRM采集参数

分析物	衍生物母离子		衍生物 MS/MS 碎片离子		Fragmentor (V)	Collision energy(V)
	轻型	重型	轻型	重型		
对氯苯酚	314.1	317.1	158.0	161.1	175	30
对溴苯酚	358.1	361.1	158.0	161.1	175	30
间苯二酚	296.2	299.2	158.0	161.1	175	30
葵胺	342.4	345.4	158.0	161.1	175	30
乙二胺	431.2	437.2	158.0	161.1	175	30
二乙胺	259.2	262.2	158.0	161.1	175	30

[0115] 表2 $[d_0]$ / $[d_3]$ -MQOA衍生物的内标定量测试结果

Analytes	Linearity	R^2	Accuracy RE%		Precision (RSD%)	
			intraday	interday	intraday	interday
对氯苯酚	Y=1.0554X-0.035	0.9995	106.4	89.6	1.54	2.97
对溴苯酚	Y=1.0261X-0.0421	0.9996	97.3	91.8	3.23	4.53
间苯二酚	Y=1.0066X-0.0031	0.9998	96.5	101.2	2.06	4.12
葵胺	Y=0.9971X+0.0711	0.9997	105.2	92.7	2.87	3.95
乙二胺	Y=0.9893X+0.0458	0.9999	98.3	90.4	3.19	4.70
二乙胺	Y=1.0256X-0.0194	0.9998	104.5	102.6	1.74	3.61

[0118] 以上所述仅说明了本发明的几个实施方式,并不能因此而理解是对本发明专利范围的限制。应当指出,对于本领域的其他人员来说,在不脱离本发明的构思和范围的情况下,还可进行修改替换改进等,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的专利保护范围应以所描述的权利要求为准。

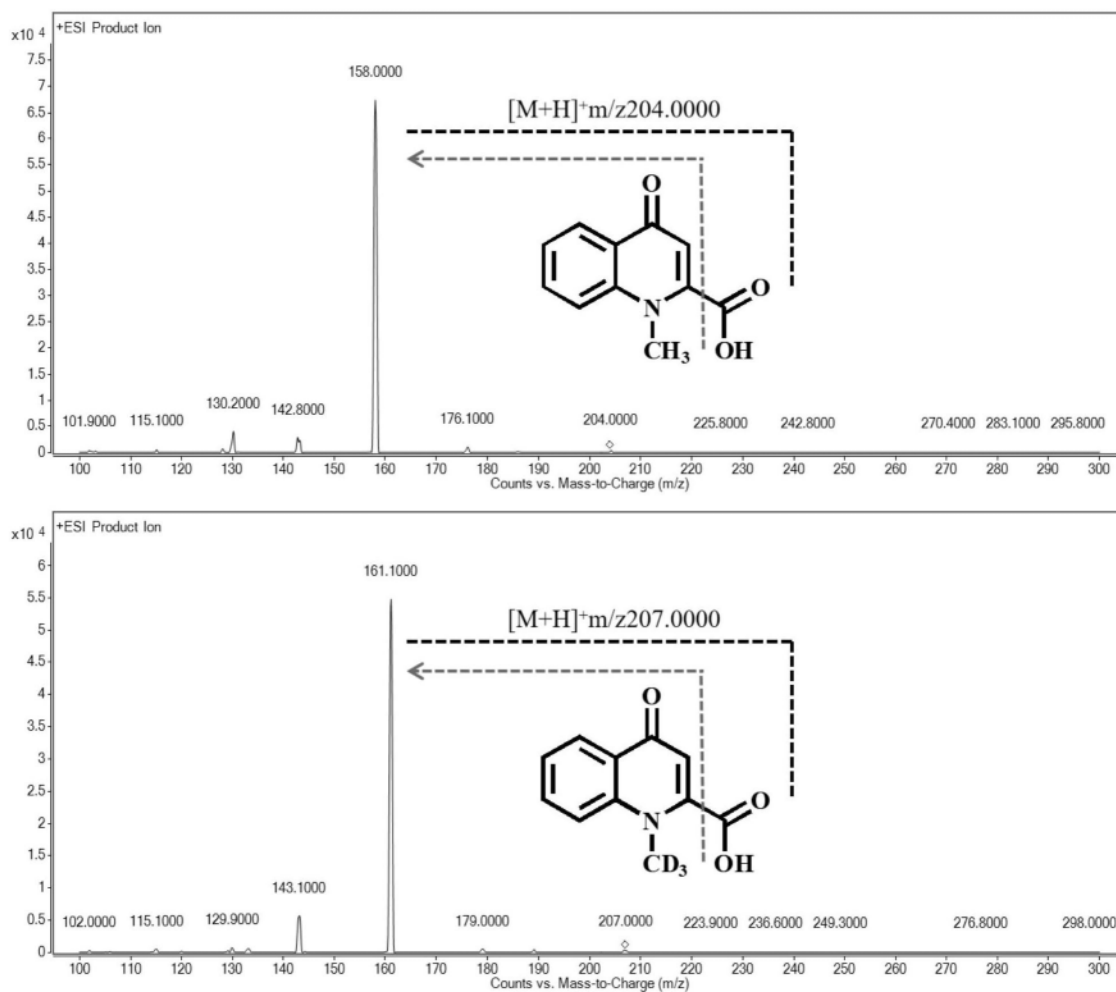


图1

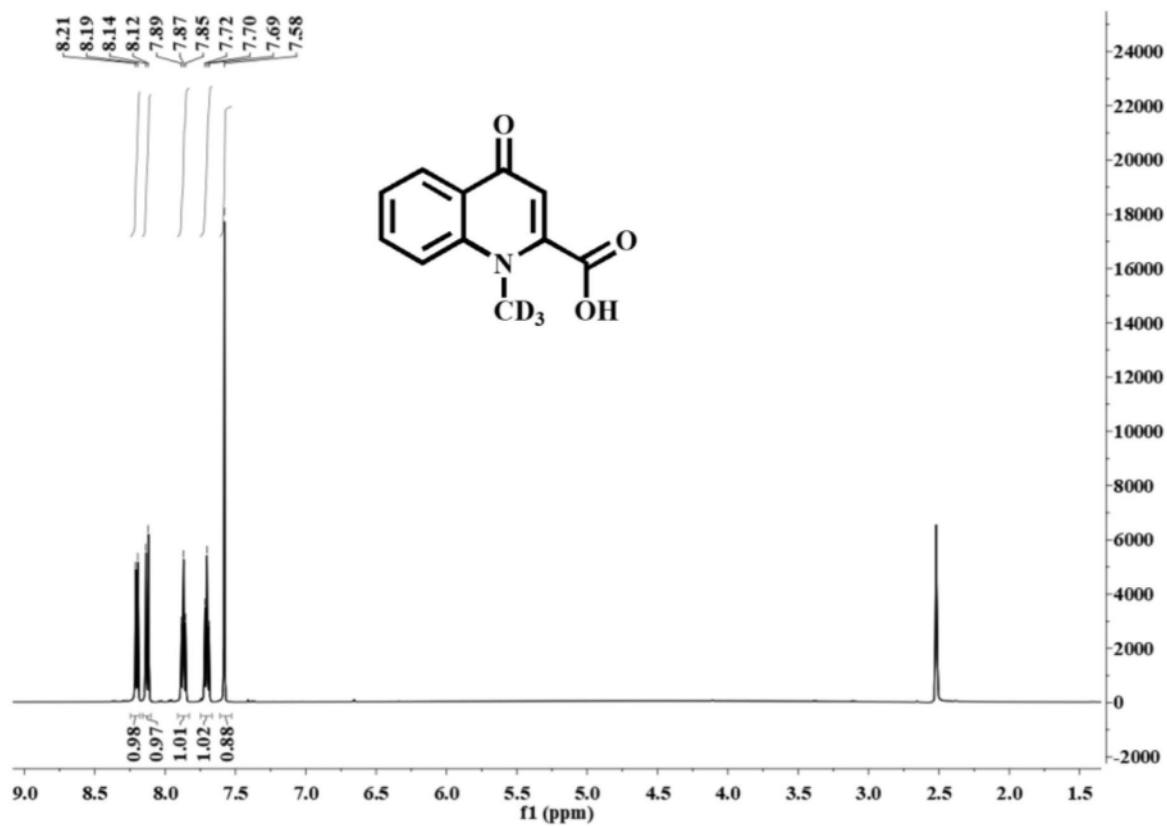
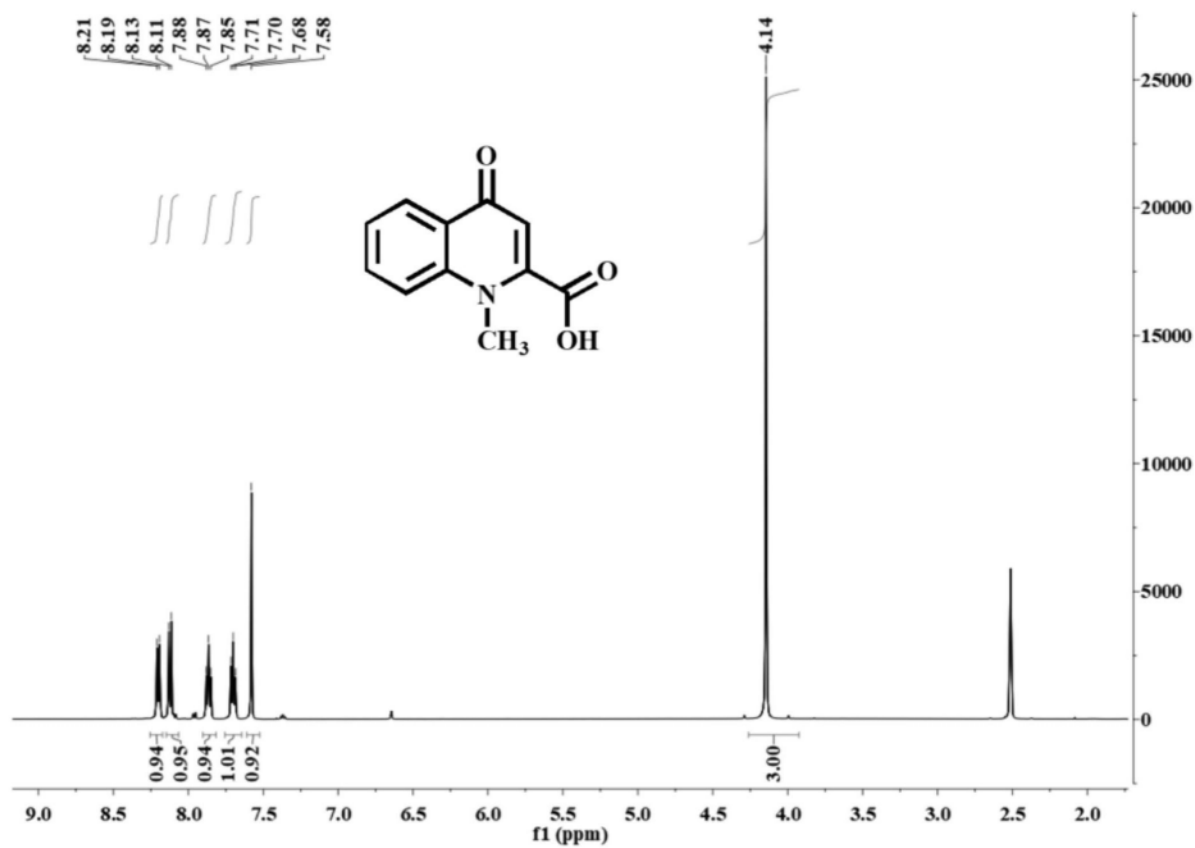


图2

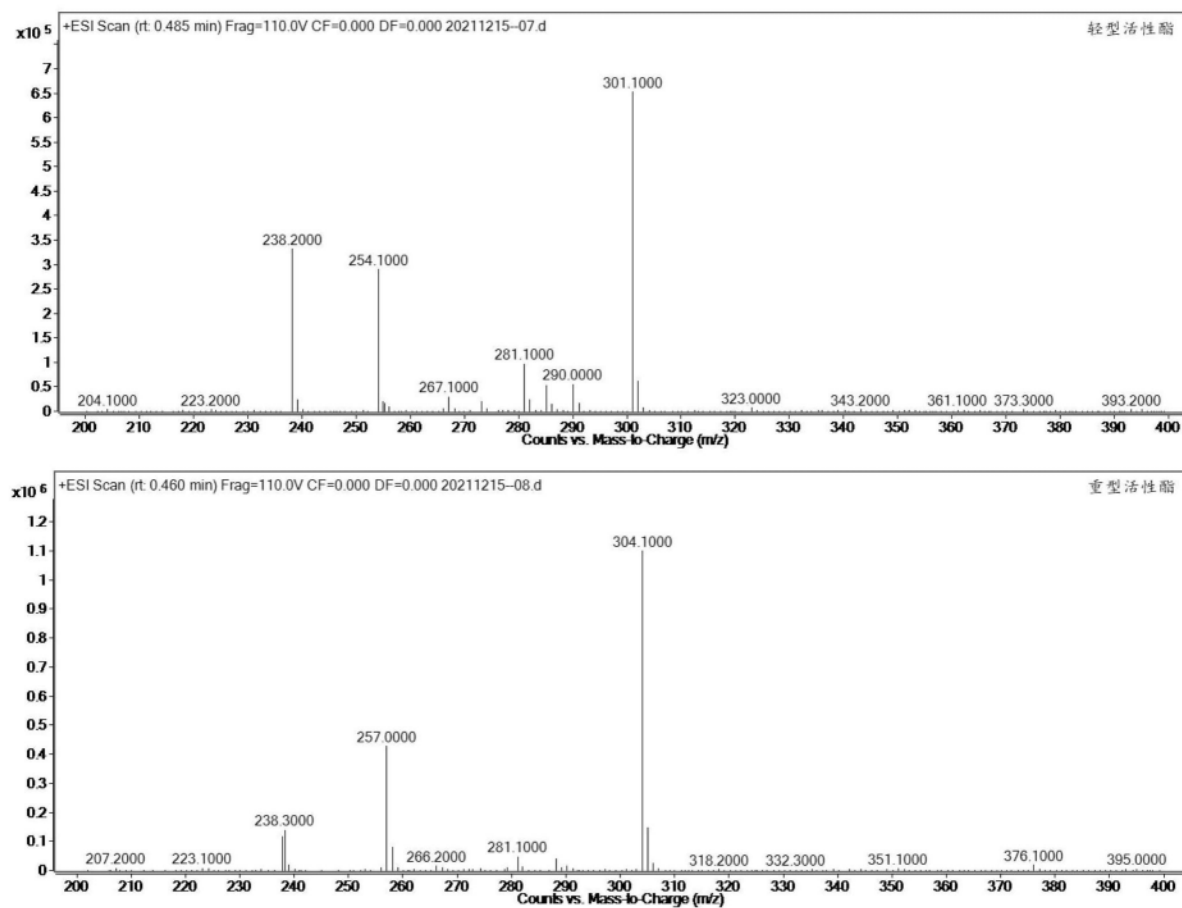


图3

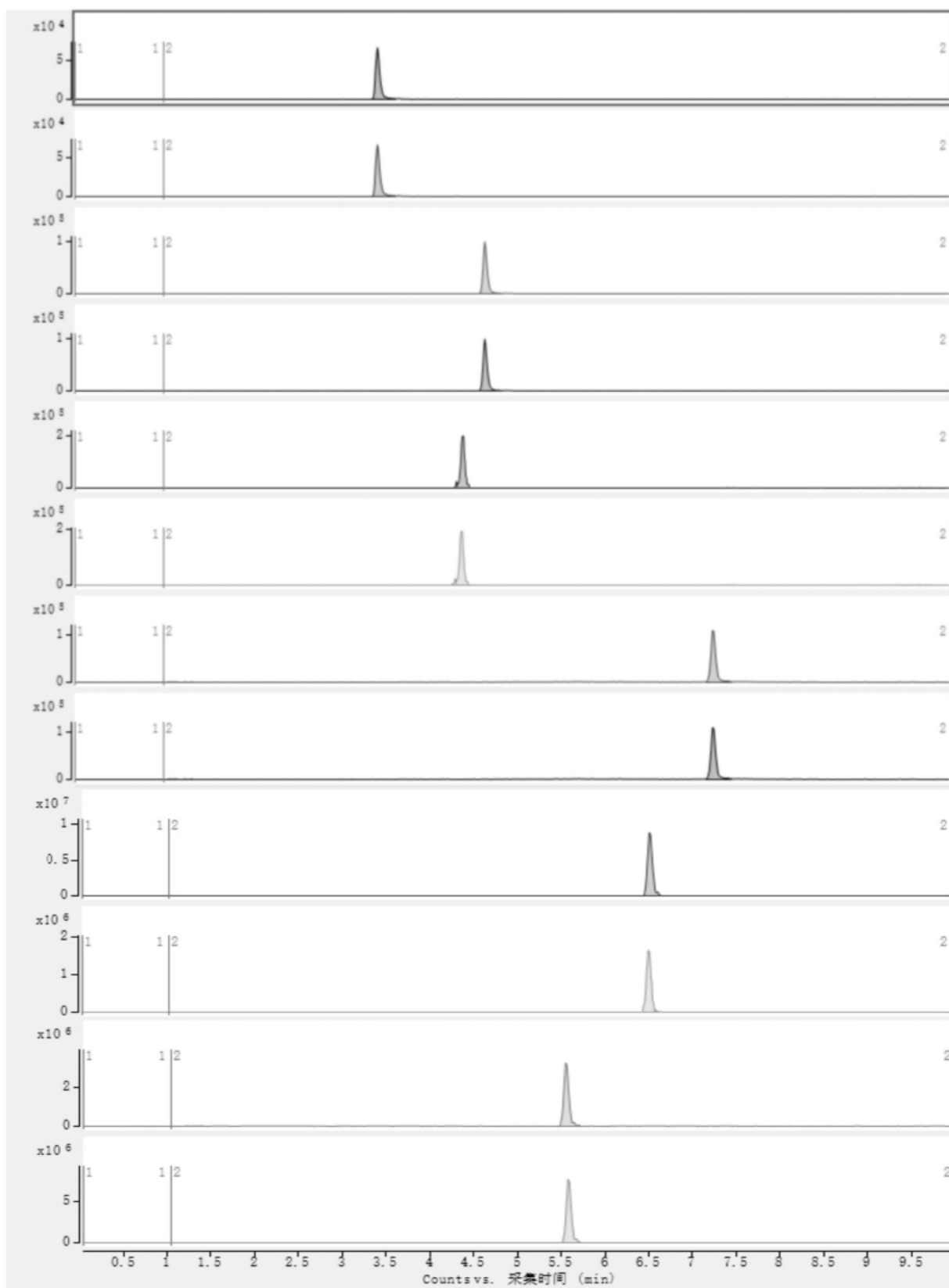


图4