

# 氮杂环荧光试剂 2-(11H 苯 [a] 吡唑) 乙基氯甲酸酯 对胺类化合物标记及质谱鉴定

赵文臣<sup>2</sup> 刘凌君<sup>2</sup> 朱芳<sup>2</sup> 赵先恩<sup>1</sup> 刘素娟<sup>2</sup> 索有瑞<sup>1</sup> 尤进茂<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> (中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

<sup>2</sup> (曲阜师范大学化学科学学院, 生命有机化学重点实验室, 曲阜 273165)

**摘 要** 含氮类荧光试剂 2-(11H 苯 [a] 吡唑) 乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl) 经柱前衍生处理后, 采用荧光检测及柱后在线质谱鉴定对食品中胺类化合物进行了测定。标记反应在 pH 9 的硼酸缓冲液中进行, 3 min 后获得稳定的荧光产物。衍生物于  $\lambda_{\text{ex}} = 279 \text{ nm}$  激发条件下产生强烈荧光, 其发射波长在  $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$  处。产物的分离在 Eclipse XDB-C<sub>8</sub> 色谱柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 上进行, 采用梯度洗脱对 12 种脂肪胺衍生物进行了优化分离。采用大气压化学电离源 (APCI Source) 正离子模式进行在线的柱后质谱鉴定, 实现了多种脂肪胺衍生物的快速、准确测定。建立的方法具有良好的重现性, 回归系数大于 0.9996, 检出限为 1.8 ~ 14 fmol。

**关键词** 高效液相色谱-质谱, 荧光检测, 柱前衍生, 脂肪胺

## 1 引言

胺类化合物由于其毒性及高的反应活性倍受人们关注。该类化合物的测定, 对环境化学、生物学、毒物学和临床化学都具有重要意义。尤其食品中胺类化合物的测定, 对食品质量监控起着重要作用。脂肪胺类化合物通常无紫外吸收, 也无荧光的性质, 测定前进行衍生化处理是提高该类化合物检测灵敏度的一个有效途径。虽然胺类化合物的测定试剂较多<sup>[1~4]</sup>, 但多数试剂在应用中仍存在缺陷, 研制并开发高灵敏且廉价的发光材料用于它们的测定很有必要。

多环含氮杂原子的化合物通常显示出较强的光致发光特性<sup>[5,6]</sup>, 含吡唑母体环类的衍生物则为其中的一类, 该类化合物在本实验室中得到较好的应用<sup>[7~9]</sup>。在此研究基础上, 将 1,2 苯并-3,4 二氢吡唑母体环经 1,4 四氯苯醌脱氢处理获得四环并联且含有氮杂原子的高共轭程度的 2-(11H 苯 [a] 吡唑) 母体环, 对母体环再进行两步修饰后获得 2-(11H 苯 [a] 吡唑) 乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl)。与先前制备的 1,2 苯并-3,4 二氢吡唑-9 乙基氯甲酸酯 (BCEOC-Cl) 相比<sup>[9]</sup>, 后者具有更强烈的光致发光性质。标记反应在 pH 9.0 的硼酸盐缓冲液中进行, 所得衍生产物稳定、产率高。标记溶液经醋酸中和后, 不必进行预处理可直接进样分析。采用乙腈/水进行梯度洗脱, 实现了 C1-C12 脂肪胺衍生物的完全基线分离。借助于在线的柱后质谱定性, 实现了食品中多种脂肪胺类化合物的快速、准确测定。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱-质谱联用仪 (Agilent 公司), 配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器和 100 位自动进样器; 大气压化学电离源 (APCI Source), Eclipse XDB-C<sub>8</sub> 色谱柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Agilent 公司)。CARY300 Bio 型紫外可见分光光度计, Carlo-Erba 1106 元素分析仪。12 种脂肪胺标准样品 (Sigma 公司), 乙腈 (Merck 公司), 乙酸等其它试剂均为分析纯, 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

### 2.2 实验方法

**2.2.1 标准溶液的配制** 准确取适量脂肪胺标准品, 用光谱纯乙腈配成 10 mmol/L 的溶液, 相应低浓度脂肪胺标准液 (0.1 mmol/L) 用光谱纯乙腈稀释而成。称取 16.2 mg 的 2-(11H 苯 [a] 吡唑) 乙基氯甲酸

2006-10-19 收稿; 2007-04-02 接受

本文系国家自然科学基金积极基金资助项目 (No. 20075016)

\* E-mail: jnyou6304@163.com

酯用光谱纯乙腈定容至 10 mL,浓度为 5.0 mmol/L。低浓度的试剂 (2.5 mmol/L)用光谱纯乙腈稀释而成。

**2.2.2 标准品的衍生化** 向 2 mL 安培瓶中依次加入 150  $\mu$ L pH = 9 (0.2 mol/L)的硼酸缓冲液, 50  $\mu$ L 乙腈, 20  $\mu$ L 脂肪胺标准样品, 30  $\mu$ L 衍生试剂, 密封后于 40  $^{\circ}$ C 水浴中反应 3 min 后, 加入 10  $\mu$ L 50%乙酸水溶液, 加入 140  $\mu$ L 50%乙腈水溶液后稀释 2 倍进样 10  $\mu$ L。衍生反应如图 1。

### 2.3 色谱及质谱条件

**色谱柱:** Eclipse XDB-C<sub>8</sub> 色谱柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m, Agilent 公司)。流动相 A: 30% 乙腈水溶液 (含 20 mmol/L 甲酸胺, pH = 3.55); 流动相 B: 100% 的乙腈。A 在 35 min 内从 70% 梯度到 0%, B 在 35 min 内从 30% 梯度到 100%, 再保持 5 min, 流速为 1.0 mL/min, 进样量 10  $\mu$ L, 柱温 30  $^{\circ}$ C。荧光激发和发射波长分别为 279 nm 和 380 nm。

**质谱条件:** 大气压化学电离源 (APCI source), 正离子模式, 喷雾压力 413 kPa, 干燥气流量为 5 L/min, 干燥气温度 350  $^{\circ}$ C, 气化温度 450  $^{\circ}$ C, 毛细管电压 3500 V, 电晕电流 4  $\mu$ A (Pos)<sup>[10,11]</sup>。

### 2.4 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl) 的制备

**2.4.1 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙醇的合成及表征** 1,2-苯并-3,4-二氢咪唑的合成参考文献<sup>[12]</sup>。11H 苯 [a] 咪唑的合成参考文献<sup>[13]</sup>。2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙醇: 向 500 mL 配有机械搅拌, 温度计和恒压滴液漏斗的三颈烧瓶中依次加入 11H 苯 [a] 咪唑 20 g (约 0.1 mol), 7 g KOH, 200 mL 丁酮, 30~40  $^{\circ}$ C 搅拌溶解后冰水浴冷却到 0  $^{\circ}$ C, 向烧瓶中滴加含有 6.2 g 环氧乙烷的 50 mL 冰冻丁酮溶液, 1 h 内滴完, 冰浴中反应 2 h, 然后升温到 50  $^{\circ}$ C 反应 2 h。反应结束后趁热过滤, 用丁酮冲洗沉淀, 减压蒸馏滤液至无丁酮流出。剩余物倒入冰水中搅拌 30 min, 固化后过滤, 晾干后用活性炭脱色并用甲醇反复重结晶三次。得到白色晶体: m. p. 104.5~106.1  $^{\circ}$ C。Found, C 82.84, H 5.68, N 5.14; Calculated, C 82.76, H 5.75, N 5.36; IR (KBr), 3432-3163.4 ( $\nu$ -OH); 2922.44 (Ph); 1470.8 ( $\nu$ -H); 1405.3, 1384.96 ( $\nu$ -H); 1126.54 ( $\nu$ -C-O), 810.75, 741.67,  $m/z$ : 261.8 ( $M^+$ ),  $m/z$ : 243.8 ( $M - H_2O^+$ )。

**2.4.2 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl) 的合成及表征** 在 500 mL 的烧瓶中加入 2 g 固体光气, 100 mL 二氯甲烷中, 在电磁搅拌和冰浴冷却条件下, 加入少量吡啶做催化剂之后, 将溶于 5 g 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙醇 150 mL 的二氯甲烷溶液慢慢于 1 h 内滴加到上述冷却的溶液中, 保持 0  $^{\circ}$ C 搅拌反应 4 h 后, 慢慢将反应液温度升至室温继续反应 6 小时后过滤, 滤液用旋转蒸发器减压蒸干, 剩余物用无水乙醚 100 mL  $\times$  3 萃取 3 次, 浓缩后用无水乙醚重结晶两次, 得白色晶体 3.47 g, 产率 70.0%。m. p. 138.3~139.1  $^{\circ}$ C。Found, C 70.52, H 4.24, N 4.30, Cl 10.84; Calculated, C 70.48, H 4.33, N 4.33, Cl 10.97; IR (KBr), 1769.86 ( $\nu$ -C); 1469.33 ( $\nu$ -H); 1405.64, 1384.94 ( $\nu$ -H); 1147.28, 1101.35, 814.02, 741.18。

## 3 结果与讨论

### 3.1 BCEC-OH 与衍生物的 光谱性质

**3.1.1 紫外光谱的对比** BCEC-Cl 是在 BCEOC-Cl 基础上经 1,4-四氯苯醌脱氢获得。两者对比而言, BCEC-Cl 的母体环增加了一个双键, 共轭体系进一步加强。BCEC-OH 在甲醇溶液中展现出 5 个主要吸收带, 其最大吸收波长和摩尔吸光系数 ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) 分别为: 230 nm ( $3.80 \times 10^4$ ), 244 nm ( $3.90 \times 10^4$ ), 253 nm ( $4.40 \times 10^4$ ), 279 nm ( $4.60 \times 10^4$ ), 305 nm ( $2.60 \times 10^4$ )。BCEOC-OH 在紫外区显示

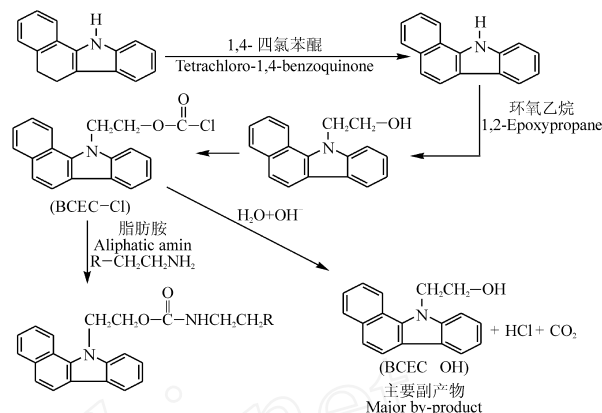


图 1 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙基氯甲酸酯与脂肪胺衍生概况图

Fig 1 Derivatization scheme of 2-(11H-benzo [a]-carbazol-11-yl) ethyl chloroformate (BCEC-Cl) with aliphatic amines

4个主要的吸收带,其最大吸收 (nm) 和摩尔吸光系数 ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) 分别为: 215 nm ( $2.0 \times 10^4$ ), 217 nm ( $1.95 \times 10^4$ ), 249 nm ( $1.95 \times 10^4$ ), 321 nm ( $2.0 \times 10^4$ )。数据表明增加一个双键后,除未脱氢前的 BCEOC-OH 的 321 nm 峰位蓝移外,其它相应的吸收峰位明显红移。未脱氢前 BCEOC-OH 的 249 nm 吸收带红移至脱氢后的 279 nm, 摩尔吸光系数增大 2.36 倍。

**3.1.2 标准品的衍生化** 文献 [9] 报道, BDC-OH 在甲醇溶液中显示的最大激发波长为 333 nm, 发射最大为 365 nm。本研究中, BCEC-OH 则显示 2 个最大激发波长为 279 和 300 nm, 2 个最大发射波长为 365 和 380 nm。激发强度的对比表明, 279 nm 的激发强度约为 300 nm 的 1.32 倍。就发射强度而言, 380 nm 的发射强度约为 365 nm 的 1.21 倍。因此实验中选择激发和发射波长分别为 279 和 380 nm。以正庚胺为代表, 按照前述条件衍生化, 所产物经过反相 ODS-C18 萃取小柱分离 (500 mg), 以 50% 乙腈洗脱未反应的试剂, 产物以乙腈 (100%) 洗脱, 氮气吹干, 得纯产物 20 mg, 以此纯品为参考, 对比衍生化产率, 结果表明 BCEC-C1 与胺类化合物的衍生化产率接近 100%。此外, 在相同实验条件下, 对 BCEC-C1, BCEOC-C1 和 Fmoc-C1 [21] 三者对胺类化合物的灵敏度进行了对比研究, 结果表明, 三者对 12 种胺类衍生物的荧光检测响应存在明显差异, 对比结果见表 1。数据表明 BCEC-C1 对胺类化合物表现出更强的荧光。 $I_{BCEC-C1} / I_{BCEOC-C1} = 1.94 \sim 2.17$ ;  $I_{BCEC-C1} / I_{Fmoc} = 1.04 \sim 2.19$  ( $I$ : 相同条件下的相对荧光强度)。

表 1 脂肪胺衍生物荧光强度 ( $I$ ) 对比

Table 1 Comparison fluorescence intensity of aliphatic amine derivatives

胺衍生物 Amine derivatives	$I_{BCEC-C1} / I_{BCEOC-C1}$	$I_{BCEC-C1} / I_{Fmoc}$	胺衍生物 Amine derivatives	$I_{BCEC-C1} / I_{BCEOC}$	$I_{BCEC-C1} / I_{Fmoc}$
C1	2.13	2.19	C7	2.14	1.53
C2	1.94	1.93	C8	2.17	1.43
C3	2.09	1.84	C9	2.14	1.32
C4	2.08	1.75	C10	2.00	1.18
C5	2.10	1.67	C11	2.00	1.05
C6	2.12	1.60	C12	2.06	1.04

### 3.2 衍生条件的优化

实验发现, BCEC-C1 对脂肪胺的衍生化随衍生时间和试剂用量的不同导致不同的衍生化产率, 以丙胺、己胺、壬胺、十二胺为例, 对上述两种影响因素进行了考察。结果表明: 在固定试剂浓度的条件下, 衍生反应随时间增加, 衍生物检测响应加大, 3 min 后即获得稳定的荧光产物。对试剂的用量考察表明, 衍生化产率随试剂用量的增加而增大, 当试剂的摩尔总量为样品摩尔总量的 2~3 倍时产率达最大, 继续增多试剂用量产率无明显改变。衍生时间及试剂用量的考察结果见图 2。

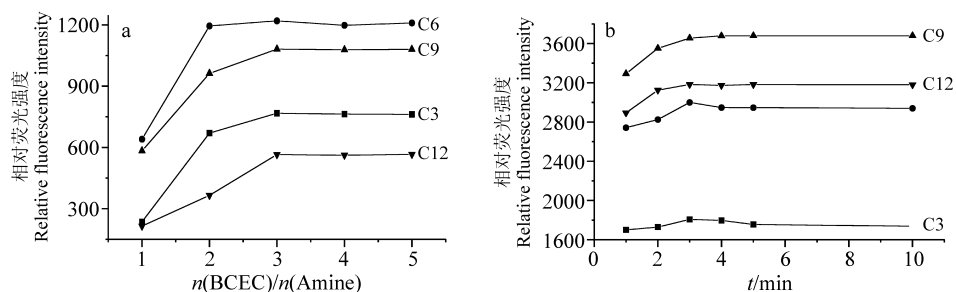


图 2 衍生试剂 (a) 用量及衍生时间 (b) 对脂肪胺衍生率的影响

Fig 2 Effects of derivatization reagent concentration (a) and reaction time (b) on derivatization yields of aliphatic amines

C3: 丙胺 (propylamine); C6: 己胺 (hexylamine); C9: 壬胺 (nonylamine); C12: 十二胺 (dodecylamine)。

### 3.3 标准品色谱分离及质谱鉴定

在 Eclipse XDB-C<sub>8</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱上用乙腈/水作流动相, 采用梯度洗脱在 40 min 内实现了 12 种 (C1-C12) 直链脂肪胺衍生物的完全基线分离, 结果见图 3。采用大气压化学电离

源 (APCI Source) 在正离子检测模式下, 进行了在线的柱后质谱定性, 各组分质谱数据见表 2。以正十二胺为例的一、二级质谱见图 4。

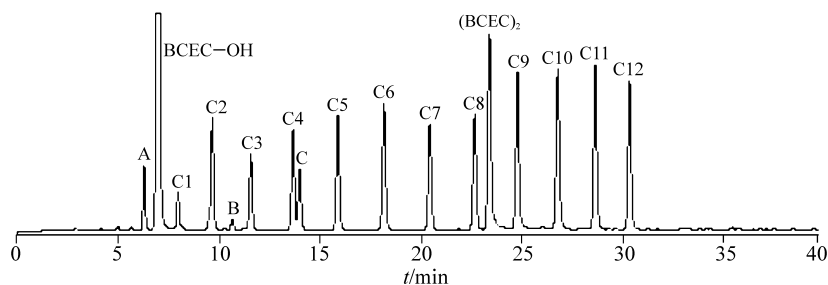


图 3 标准脂肪胺衍生物的色谱图

Fig 3 Chromatogram for standard amines derivatized with BCEC-Cl

C1. 甲胺 (methylamine); C2. 乙胺 (ethylamine); C3. 丙胺 (propylamine); C4. 丁胺 (butylamine); C5. 戊胺 (pentylamine); C6. 己胺 (hexylamine); C7. 庚胺 (heptylamine); C8. 辛胺 (octylamine); C9. 壬胺 (nonylamine); C10. 癸胺 (decylamine); C11. 十一胺 (undecylamine); C12. 十二胺 (dodecylamine); A 和 B (unidentified); C 丙烯胺 (allylamine); BCEC-OH (2-(11H-苯[a]咪唑)乙醇 2-(11H-benzo[ ]carbazol-11-yl)-ethanol); (BCEC)<sub>2</sub>: [二-(2-(11H-苯[a]咪唑)乙基碳酸酯 bis-(2-(11H-benzo[ ]carbazol-11-yl) ethyl) chloroformate ]。

表 2 质谱数据

Table 2 Mass spectrometric data

胺 Amines	分子离子 [M + H] <sup>+</sup> Molecular ion [M + H] <sup>+</sup>	二级质谱 MS/MS data	胺 Amines	分子离子 [M + H] <sup>+</sup> Molecular ion [M + H] <sup>+</sup>	二级质谱 MS/MS data
C1	319.1	261.9 243.8	C7	403.2	261.8 243.9
C2	333.1	261.8 243.9	C8	417.1	261.8 243.8
C3	347.2	261.8 243.8	C9	431.1	261.8 243.8
C4	361.3	261.8 243.9	C10	445.1	261.8 243.8 216.9
C5	375.2	261.9 243.8	C11	459.1	261.9 243.7 216.8
C6	389.3	261.9 243.8	C12	473.2	261.8 255.9 243.8

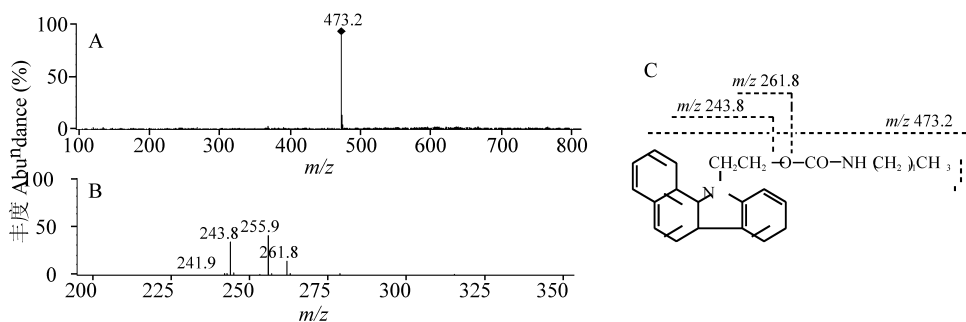


图 4 十二胺衍生物的质谱图及其归属 (A: 为一级质谱; B: 为二级质谱; C: 裂解模式)

Fig 4 MS (A); MS/MS (B) spectra; (C) mass cleavage mode for representative dodecylamine derivatives

### 3.4 线性回归方程及检出限

进样量在 50 pmol ~ 50 fmol 范围内, 依据峰面积和实际进样量进行线性回归, 所得各脂肪胺衍生物的回归方程、相关系数和检出限见表 3。各脂肪胺衍生物的线性相关系数在 0.9996 以上, 检出限为 1.8 ~ 14 fmol (按  $S/N = 3$  计算)。

### 3.5 重现性实验

在相同洗脱条件下, 对 50 pmol 脂肪胺衍生物平行 6 次分析, 保留时间和峰面积的重现性见表 4, 保留时间的相对标准偏差小于 0.079%, 峰面积的相对标准偏差小于 1.29%。

表 3 脂肪胺衍生物的线性回归方程、相关系数和检出限

Table 3 Linear regression equations, correlation coefficients and detection limits of aliphatic amine derivatives

胺衍生物 Amine derivative	$Y=AX+B$	线性 回归系数 $R$	检出限 Detection limits (fmol)	胺衍生物 Amine derivative	$Y=AX+B$	线性 回归系数 $R$	检出限 Detection limits (fmol)
C1	$Y=26.56X+4.07$	0.9998	14	C7	$Y=95.64X+16.10$	0.9999	4.9
C2	$Y=95.53X+29.39$	0.9999	5.8	C8	$Y=100.79X+19.81$	0.9999	3.4
C3	$Y=61.28X+5.82$	0.9999	6.3	C9	$Y=144.19X+37.45$	0.9997	2.0
C4	$Y=84.47X+12.04$	0.9999	3.3	C10	$Y=142.25X+51.33$	0.9996	2.3
C5	$Y=98.14X+12.97$	0.9999	4.3	C11	$Y=134.58X+80.55$	0.9999	1.9
C6	$Y=109.38X+15.97$	0.9999	3.6	C12	$Y=115.87X+82.30$	0.9999	1.8

X: 注射量 (injected amount pmol); Y: 峰面积 (peak area).

表 4 保留时间和峰面积的重现性

Table 4 Reproducibility for area and retention time ( $n=6$ )

胺衍生物 Amine derivative	保留时间 相对标准偏差 RSD of retention time (%)	峰面积 相对标准偏差 RSD of peak area (%)	胺衍生物 Amine derivative	保留时间 相对标准偏差 RSD of retention time (%)	峰面积 相对标准偏差 RSD of peak area (%)
C1	0.079	1.29	C7	0.051	0.85
C2	0.067	0.93	C8	0.042	0.99
C3	0.046	1.09	C9	0.041	1.25
C4	0.056	0.86	C10	0.029	0.96
C5	0.055	0.94	C11	0.019	0.96
C6	0.057	1.02	C12	0.022	1.12

### 3.6 实际样品分析

称取虾酱 2 g, 用 25 mL 80% 乙腈/水分三次超声振荡提取, 合并提取液过滤, 滤液加 0.5 mL HCl, 超声振荡 20 min 使其转变为相应脂肪胺的有机盐, 溶剂减压蒸发至干。残余物用 5.0 mL 80% 乙腈/水溶液溶解冷藏备用。按前述建立的色谱分离条件, 对虾酱提取液分离见图 5。在虾酱样品中加入一定量脂肪胺标准品后, 按照前述方法提取并衍生, 所得虾酱中胺类化合物的测定结果和回收率一并列于表 5。

本实验利用多环含氮杂原子的荧光试剂 2-(11H-苯[a]咔唑)乙基氯甲酸酯对胺类化合物进行了标记识别。研究表明, 试剂分子具有强的紫外吸收和荧光发光特性, 与胺类化合物的标记产率高、产物稳定。所建立的方法具有灵敏度高、线性范围宽、重现性好、操作简便。对样品测定结果满意。

表 5 实际样品中脂肪胺的含量及回收率

Table 5 Content of aliphatic amines from shrimp catsup sample and recoveries

胺衍生物 Amine derivatives	虾酱样品 Shrimp catsup sample (ng/g)	回收率 Recoveries (%)	胺衍生物 Amine derivatives	虾酱样品 Shrimp catsup sample (ng/g)	回收率 Recoveries (%)
C1	9.09 <sup>#</sup>	102.2	C7	0.0030	99.95
C2	0.13 <sup>#</sup>	101.7	C8	*	102.4
C3	*	97.6	C9	0.0030	103.4
C4	*	102.1	C10	0.0027	101.8
C5	0.0668 <sup>#</sup>	103.6	C11	0.0005	103.2
C6	0.0070	100.4	C12	*	103.4

<sup>#</sup>实际样品分离中 C1, C2 和 C5 经质谱鉴定, 其余组分因含量低未经质谱确定, 由保留值确定 (peaks of C1, C2 and C5 were simultaneously identified by retention values and mass spectrometry, the other peaks (C6, C7, C9, C10, C11) were only identified by retention values because their concentrations were lower than the detection limits of mass spectrometry); \* 未测出 (unidentified)。

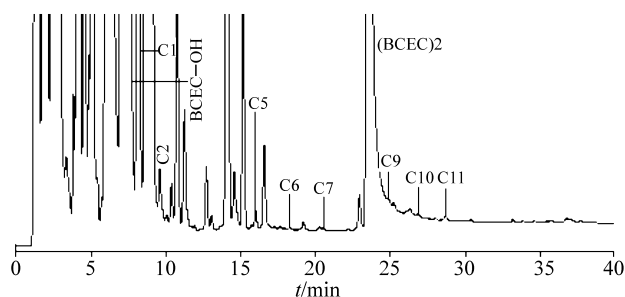


图 5 虾酱样品的游离脂肪胺色谱分离图

Fig 5 Chromatogram of aliphatic amines from shrimp catsup sample

色谱条件和峰号同图 2 (chromatographic conditions and peaks as in Fig 2)。

## References

- 1 Ahnoff M, Grundevik I, Arfwidsson A, Fonselius J, Persson B A. *Anal Chem.*, **1981**, 53: 485 ~ 489
- 2 Einarsson S, Folestad S, Josefsson B, Legerkvist S. *Anal Chem.*, **1986**, 58: 1638 ~ 1643
- 3 Steven A C, Dennis P M. *Anal Biochem.*, **1993**, 211: 279 ~ 287
- 4 Liu H J. *J. Chromatogr A*, **1994**, 670: 59 ~ 66
- 5 You J, Shan Y, Shan L, Zhen L, Zhang Y. *Anal Biochem.*, **2003**, 313: 17 ~ 27
- 6 You J, Zhang W, Jia X, Zhang Y. *Chromatographia*, **2001**, 54: 316 ~ 322
- 7 Zhang L, You J, Ping G, Zhang L H, Duan J C, Zhang W, Liang Z, Zhang Y K. *Anal Chim. Acta*, **2003**, 494: 141 ~ 147
- 8 You J, Chen X, Zhao X, Suo Y, Wang H, Lin Y, Sun J. *Chromatographia*, **2006**, 63: 337 ~ 343
- 9 You J, Ming Y, Shi Y, Zhao X, Suo Y, Wang H, Li Y, Sun J. *Talanta*, **2005**, 68: 448 ~ 458
- 10 Karine N, Jean-Luc W, Kurt H. *J. Chromatogr B*, **2000**, 744: 249 ~ 255
- 11 Simonetta F, Sang-Woon C, Gregory G. *Anal Chem.*, **2002**, 74: 4526 ~ 4531
- 12 You J, Shi Y W, Ming Y F, Yu Z Y, Yi Y J, Liu J Y. *Chromatographia*, **2004**, 60: 527 ~ 535
- 13 Oliveira M M, Salvador M A, Coelho P J, Carvalho L M. *Tetrahedron*, **2005**, 61: 1681 ~ 1691

## Mass Spectrometric Identification of Aliphatic Amines Using 2-(11H-Benzo[a]carbazol-11-yl) ethyl Chloroformate as Fluorescence Labeling Reagent

Zhao Wen-Chen<sup>2</sup>, Liu Ling-Jun<sup>2</sup>, Zhu Fang<sup>2</sup>, Zhao Xian-En<sup>1</sup>, Liu Su-Juan<sup>2</sup>, Suo You-Rui<sup>1</sup>, You Jin-Mao<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

<sup>2</sup> (The Sky Laboratory of Life-Organic Analysis, College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165)

**Abstract** A simple and highly sensitive method based on the pre-column derivatization for the determination of aliphatic amines in food using a nitrogen-containing 2-(11H-benzo[a]carbazol-11-yl) ethyl chloroformate (BCEC-Cl) as fluorescence labeling reagent followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection has been developed. The stable derivatives can be obtained by the labeling reaction of BCEC-Cl with amines in the presence of borate buffer (pH 9.0) within 3 min. The maximum excitation and emission wavelengths were 279 nm of  $\lambda_{ex}$  and 380 nm of  $\lambda_{em}$ , respectively. Separation of 12 amine-derivatives was achieved by a gradient elution on a reversed-phase Eclipse XDB C<sub>8</sub> (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) column with a good baseline resolution. The identification of amine-derivatives was carried out by the online post-column MS using atmospheric pressure chemical ionization (APCI) as ion source in positive-ion detection mode. The established method exhibits excellent reproducibility and recovery. Excellent linear responses were observed with the correlation coefficients  $> 0.9996$ . The detection limits (at signal-to-noise of 3:1) were at levels 1.8 - 14 fmol.

**Keywords** High performance liquid chromatography-mass spectrometry, fluorescence detection, pre-column derivatization, aliphatic amines

(Received 19 October 2006; accepted 2 April 2007)