

研究报告

DOI 10.3724/SP.J.1096.2010.00917

黄金蝉若虫体蛋白水解液的荧光标记及电喷雾质谱鉴定

李肖燕¹ 尤进茂^{*1,2} 孙志伟^{1,3} 付艳艳¹ 秦雪芹¹ 明州¹ 李玉林²¹(曲阜师范大学, 山东省生命有机分析重点实验室, 曲阜 273165)²(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008) ³(中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 采用 2-[2-(7H-二苯并[a,g]咪唑-乙氧基)-乙基]氯甲酸酯 (DBCEC-Cl) 作为柱前衍生试剂, 于室温下, 在硼酸钠缓冲液 (pH 9.0) 中, 金蝉若虫体蛋白水解液中氨基酸的完全衍生化在 5 min 即可完成。在 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 上, 采用梯度洗脱实现了各衍生物的完全基线分离。最佳荧光检测为 λ_{ex}/λ_{em} = 300/395 nm。在线串联的 ESIMS 正离子质谱数据显示: 所有衍生物均给出 m/z 338.5, 294.5 的特征碎片离子峰。荧光条件下的线性回归系数大于 0.9992, 检出限为 2.6~24 fmol。本方法灵敏、可靠、重现性好。对实际黄金蝉若虫体蛋白水解液中氨基酸的测定, 结果满意。

关键词 高效液相色谱-离子阱质谱; 荧光检测; 柱前衍生; 2-[2-(7H-二苯并[a,g]咪唑-乙氧基)-乙基]氯甲酸酯; 氨基酸

1 引言

金蝉若虫又名黄金蝉、知了龟。蝉若虫有极高的药膳营养价值和独特的口感, 尤以刚出土的若虫含蛋白质最高, 是难得的高蛋白、低脂肪的野味佳肴。金蝉除了食用价值外, 还有着极高的药用价值, 具有强肝、明目、降压、镇痛、止血、改善糖尿病, 提高消化能力的作用。氨基酸是构成生命有机体蛋白质的基本物质单元, 也是生命代谢过程中不可缺少的营养物质。目前, 测定氨基酸多采用离子交换色谱 (EC)、高效液相色谱 (HPLC) 和气相色谱 (GC) 等方法。这些方法多采用紫外^[1]、荧光^[2,3]、氢火焰离子化^[4]和化学发光检测^[5]。多数氨基酸仅表现出弱的紫外吸收, 直接紫外检测难以获得满意的灵敏度, 因此进行化学衍生是提高该类化合物检测灵敏度的有效途径。高效液相色谱荧光衍生化中, 被广泛应用的衍生试剂主要有邻苯二甲醛 (OPA)^[6-8]、4-氯-7-硝基苯并-1,2,3-二唑 (NBD-Cl)^[9]、1-二甲氨基萘-5-磺酰氯 (Dansyl-Cl)^[10]、芴甲氧羰基氯 (Fmoc-Cl)^[11,12] 和 6-氨基喹啉基-N-琥珀酰亚胺碳酸酯 (AQC)^[13,14]。这些衍生试剂在实际应用中都存在一定缺陷, 如 OPA 重现性和衍生物的稳定性较差, 衍生化受时间、温度和光照等因素的影响; NBD-Cl 试剂在水溶液中的稳定性较差, 见光易分解; Fmoc-Cl 衍生化需要经过萃取处理消除过量试剂的干扰, 操作过程繁琐且易造成疏水衍生物的丢失; AQC 在水相体系下量子化效率低, 不利于梯度洗脱。因此研制高灵敏且廉价的标记材料用于蛋白质氨基酸的测定十分必要。

多环含氮杂原子的化合物通常具有较强的光致发光特性^[15], 例如含咪唑母体环类的衍生物。本实验室已对该类化合物进行了较多研究^[16-18], 合成的 2-[2-(7H-二苯并[a,g]咪唑)-乙基]氯甲酸酯 (DBCEC-Cl) 的分子母核是个含氮杂原子并具有五环并联的高共轭体系, 与四环并联的共轭体系 BCEOC^[19] 和 BCEC-Cl^[20] 分子相比, 具有更强的光致发光性质。DBCEC-Cl 用于游离脂肪胺的标记具有良好的效果^[16]。本研究考察了 DBCEC-Cl 分子对氨基酸的标记、色谱分离和在线的质谱鉴定等参数的优化。实验表明, 试剂与氨基酸的衍生化反应简便、快速, 衍生条件温和, 衍生物具有良好的荧光特性。

2009-12-03 收稿; 2010-02-16 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20075016) 和中国科学院“百人计划” (No. 763) 资助项目

* E-mail: jinyou6304@163.com

2 实验部分

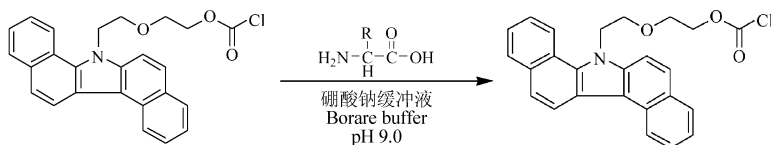
2.1 仪器与试剂

1100型离子阱液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent公司), 配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器和自动进样器; 电喷雾离子源(ESI Source; 大连依利特公司); Hypersil BDS C₁₈色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm, 大连依利特公司); F-7000荧光分光光度计(日本 Hitachi公司)。CARY300 Bio型紫外可见分光光度计, Carlo-Erba 1106元素分析仪。20种氨基酸标准样品(美国 Sigma公司); 乙腈(色谱纯, 禹王试剂公司)、乙酸等其它试剂均为分析纯, 实验用水由 MilliQ 超纯水系统制备。2-[2-(7H-二苯并[a,g]吡唑-乙氧基)-乙基]氯甲酸酯(DBCEC-Cl)的合成见文献[16]。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制 称取适量氨基酸标准品, 用少量 6 mol/L HCl 溶解, 并用 6 mol/L NaOH 调至中性, 用硼酸钠缓冲液(pH 9.0)稀释配成 0.01 mol/L 的标准溶液。低浓度氨基酸标准液(0.1 mmol/L)用硼酸钠缓冲液(pH 9.0)稀释而成。称取 32.6 mg DBCEC-Cl 用无水乙腈溶解并定容至 10 mL, 浓度为 0.01 mol/L, 低浓度的衍生试剂(5.0 mmol/L)用无水乙腈稀释而成。

2.2.2 标准品的衍生 向 2 mL 安培瓶中依次加入 80 μL 乙腈, 100 μL 0.2 mol/L 硼酸钠缓冲液(pH 9.0), 20 μL 混合氨基酸标准液, 200 μL 衍生试剂, 密封后于 30~40 °C 水浴中反应 5 min 后, 加入 100 μL 50% 乙酸溶液调至弱酸性后直接进样分析。衍生反应如下:



2.3 实际样品的处理

取金蝉于 50 °C 真空减压干燥, 干燥后的金蝉研磨粉碎, 称取金蝉样品 50 mg 置于 2 mL 安培瓶中, 加入 1 mL 6 mol/L HCl 密封后 110 °C 水解 24 h, 冷却后经氮气吹干, 用 3 mL 硼酸钠缓冲液(pH 9.0)溶解, 相应浓度为 16.7 μg/L, 低浓度水解液用硼酸钠缓冲液(pH 9.0)稀释而成, 在 -20 °C 下储存待用。

2.4 色谱与质谱条件

Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相 A: 30% 乙腈(含有 30 mmol/L 甲酸, 用氨水调至 pH = 3.6); B: 50% 乙腈(含有 30 mmol/L 甲酸/氨水缓冲液, pH = 3.6); C: 95% 乙腈。流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 35 °C。荧光激发和发射波长分别为 300 和 395 nm。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间 Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	30	70	0
15	0	100	0
20	0	95	5
30	0	95	5
40	0	65	35
45	0	35	65
55	0	30	70
60	0	0	100

电喷雾离子源(ESI), 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 °C, 毛细管电压 3.5 kV, 电晕电流 4000 nA。

3 结果与讨论

3.1 衍生化及分离条件的优化

考察了硼酸钠缓冲溶液的 pH 值、衍生化反应时间、衍生试剂用量对衍生化反应的影响。

当 pH < 7.0 时, 衍生反应难以进行, 随 pH 值的增大衍生率逐渐增高; 当 pH = 9.0 时衍生率最大; 继续增大 pH 值, 衍生化产率会因产物水解而降低, 实验中选择缓冲溶液的 pH 值为 9.0。

衍生化反应在 5 min 内可获得完全的衍生化, 进一步延长衍生时间(大于 10 min), 荧光响应反而降低, 可能是衍生物在高 pH 值下水解的结果。

试剂用量是氨基酸的总摩尔量 2~4 倍时可达完全衍生化, 进一步增加试剂用量, 衍生物荧光响应无明显增加。实验中选择衍生试剂用量是氨基酸总量的 4 倍。

将本研究组已合成的 BCEOC^[19]用于氨基酸衍生化的研究表明:在 pH 9.0 缓冲液中组氨酸的二取代衍生物 24 h 内有 23% 的产物降解为单取代衍生物。本研究中的 DBCEC-C1 对组氨酸的衍生化有着类似的结果,为防止其二取代产物的降解,衍生反应完毕后,加入 100 μ L 50% 乙酸,调节 pH 5.0~7.0。

在大多数研究^[21~23],氨基酸的反相分离常采用硼酸盐或者磷酸盐缓冲液来调节流动相 pH 值。本研究中,为减少金属盐对质谱离子室的污染,采用甲酸-氨水缓冲液控制流动相 A 和 B 的 pH 值,并在 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱上考察了流动相 A 的 pH 值对分离度的影响。结果表明:当流动相 A 的 pH=3.7 时,较难分离的 Asp 和 Ser 物质对基本实现基线分离。当流动相 A 的 pH<3.5 或 pH>3.8 时,Asp 和 Ser、DBCEC-OH 和 Met、Ile 和 Leu 产生部分共洗脱现象。实验结果也表明:流动相 pH 的改变,对高疏水性的 4 种氨基酸衍生物 His、O_m、Lys 和 Tyr 的分离度无明显改变。实验中选择流动相的 pH=3.7。

3.2 标准品的色谱分离及质谱鉴定

DBCEC 分子母核是一个五环并联的高共轭分子,与 BCEC 和 BCEOC 的分子母核相比具有更强的疏水性,这对 20 种氨基酸衍生物的快速分离十分不利。为此在试剂的合成过程中优先考虑了这一缺陷,当在 DBCEC 分子 N 连接的侧链上共价连接一个强亲水性的二聚乙二醇的醚链时,即能有效地解决这一问题。20 种氨基酸的色谱分离见图 1。各氨基酸衍生物的质谱数据见表 3。以鸟氨酸为代表性的氨基酸的质谱离子流图及质谱裂解模式见图 2。

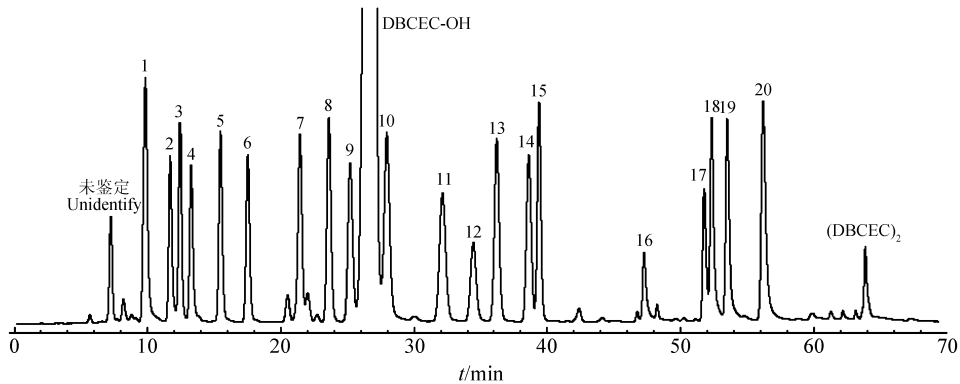


图 1 标准氨基酸的色谱图 (注射量 25 μ mol)

Fig. 1 Chromatograms for standard amino acid derivatives (corresponding injected amount 25 μ mol)

Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (Column): 200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m; 柱温 (Column temperature), 35 $^{\circ}$ C; 流速 (Flow rate), 1.0 mL/min; Excitation and emission $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 300/395 nm; Peaks are labeled with three letter abbreviations for all amino acids. 色谱峰 (Peak number): 1. 精氨酸 (Arg); 2. 天冬氨酸 (Asp); 3. 丝氨酸 (Ser); 4. 谷氨酸 (Glu); 5. 苏氨酸 (Thr); 6. 甘氨酸 (Gly); 7. 丙氨酸 (Ala); 8. 四氢基丁酸 (GABA); 9. 脯氨酸 (Pro); 10. 蛋氨酸 (Met); 11. 缬氨酸 (Val); 12. 色氨酸 (Trp); 13. 苯丙氨酸 (Phe); 14. 异亮氨酸 (Ile); 15. 亮氨酸 (Leu); 16. 胱氨酸 ((Cys)₂); 17. 组氨酸 (His); 18. 鸟氨酸 (O_m); 19. 赖氨酸 (Lys); 20. 酪氨酸 (Tyr); DBCEC-OH: (2-[2-(7H-二苯并[a,g]咪唑-乙氧基)-乙醇]); (DBCEC)₂: [2-(2-(7H-二苯并[a,g]咪唑-乙氧基)-乙基碳酸酯): (bis-[2-(2-(7H-dibenzo[a,g]carbazol-7-yl)-ethoxy)ethyl]-carbonate)。

3.3 灵敏度对比

由分子结构可知, BCEC 分子是在 BCEOC 的基础上经四氯苯醌脱氢而得 (表 2), BCEC 分子由于比 BCEOC 增加了一个共轭双键其荧光强度显著增强。而 DBCEC 分子则是在 BCEC 的基础上增加了一个共轭的苯环,其荧光强度又远比 BCEC 强。高荧光强度带来低的荧光检测限度,这对荧光检测十分有利。但对质谱灵敏度却相反,高荧光强度往往给出低的质谱灵敏度。为克服这一缺点,本研究对 DBCEC 分子 N 连接的侧链进行了修饰,在 BCEC 和 BCEOC 分子 N 连接的乙基氯甲酸酯的基础上修饰为乙氧基乙基氯甲酸酯。改进后的分子由于 N 连接侧链的中间含一个强电负性的氧原子,在 ESIMS 或 APCIMS 正离子条件下容易接受一个 H⁺ 质子,与 BCEC 和 BCEOC 分子相比表现出很强的质谱灵敏度。实验结果也表明:当 DBCEC、BCEC 和 BCEOC 在 N 连接的侧链同时连接相同的乙氧基氯甲酸酯时,对氨基酸衍生物的质谱灵敏度以 BCEOC 为最强,这是由于 BCEOC 的咪唑环未达到完全的共轭状

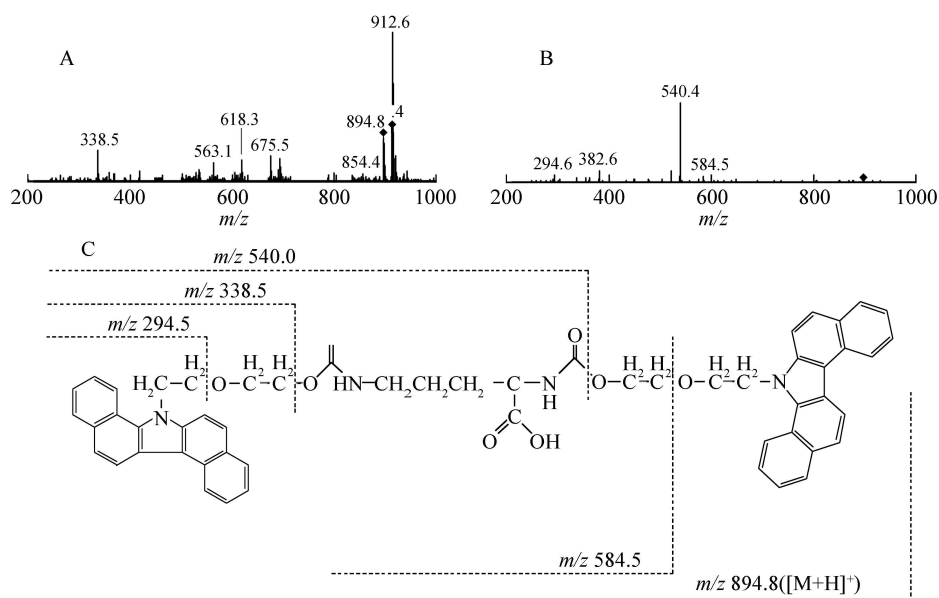


图 2 代表性鸟氨酸衍生物一级 (A)、二级 (B) 质谱图和相应裂解模式 (C)

Fig 2 (A): Molecular ion (MS), (B): MS/MS spectra (C): cleavage mode for representative ornithine derivatives

态, 咪唑环上的 N 原子表现出较强碱性的缘故。修饰后的 DBCEC 分子在质谱离子室中接受 $[H]^+$ 离子的位置主要以电负性氧原子为主, 因此表现出更强的质谱灵敏度。以苯丙氨酸为代表的衍生物而言, 三者的质谱灵敏度对比结果为: $IC_{DBCEC} : IC_{BCEC} : IC_{BCEOC} = 1.4 : 0.9 : 1.0$ (IC : 质谱条件下的离子流强度, AQC 与苯丙氨酸的质谱强度未做比较)。3 种试剂及 AQC 对氨基酸的检测灵敏度的对比结果见表 2。

表 2 4 种衍生试剂标记氨基酸的检出限的对比

Table 2 Four kinds of derivatization reagents contrast to detection limits

氨基酸 Amino acid	检出限 Detection limits (fmol)			
	DBCEC-C1	BCEC-C1 ^[24]	BCEOC-C1 ^[19]	AQC ^[25]
Arg	9.79	15.00	12.2	300
Asp	7.72	7.21	27.2	500
Ser	11.90	5.95	17.2	500
Glu	2.60	7.35	19.8	250
Thr	6.91	8.33	12.7	300
Gly	24.30	6.57	9.3	500
Ala	5.25	6.29	10.4	500
GABA	3.12	1.49	11.8	
Pro	3.37	7.35	13.1	500
Met	3.05	15.00	13.0	500
Val	4.86	6.05	13.6	500
Try	4.53	7.21	9.2	
Phe	8.68	42.68	8.3	300
ILE	7.29	4.03	19.4	500
Leu	11.10	3.83	10.4	300
(Cys) ₂	16.25	19.74	19.4	500
His	16.60	11.70	177.6	500
Om	4.23	1.87	7.7	
Lys	3.75	1.56	6.3	250
Tyr	2.98	2.34	15.8	300

3.4 线性回归方程、检出限、保留时间和峰面积的重现性

在 50 pmol~ 24.4 fmol 范围内, 依据峰面积和进样量进行线性回归, 所得各氨基酸衍生物的回归方程、线性相关系数和检出限见表 3。由表 3 可知, 线性相关系数均大于 0.9992, 检出限在 2.6~24 fmol 范围内 (信噪比 $S/N = 3$)。对 25 pmol 氨基酸衍生物平行分析 6 次, 保留时间和峰面积的重现性见表 3, 保留时间的相对标准偏差小于 0.044%, 峰面积的相对标准偏差小于 1.4%。

表 3 氨基酸衍生物的回归方程、线性相关系数、检出限和质谱数据以及保留时间和峰面积的重现性

Table 3 Linear regression equations, correlation coefficient, detection limits, mass data and repeatability for peak area and retention time of amino acids

氨基酸 Amino acids	线性回归方程 Linear equation	线性回归系数 (R) Correlation coefficient	检出限 Detection limits (fmol)	质荷比 m/z ($[M+H]^+$)	保留时间 Retention time RSD (% , n= 6)	峰面积 Peak area RSD (% , n= 6)
Arg	$Y = 78.96X - 67.88$	0.9995	9.8	556.8	0.006	1.2
Asp	$Y = 38.58X - 43.19$	0.9994	7.7	515.6	0.012	1.2
Ser	$Y = 57.71X - 11.64$	0.9999	12	487.6	0.011	1.3
Gly	$Y = 39.62X - 42.88$	0.9994	2.6	529.6	0.013	1.3
Thr	$Y = 59.90X + 1.55$	0.9997	6.9	501.7	0.005	1.2
Gly	$Y = 57.09X + 7.58$	0.9998	24	457.6	0.007	1.2
Ala	$Y = 66.82X + 7.32$	0.9999	5.2	471.6	0.005	1.1
GABA	$Y = 78.66X + 23.57$	0.9994	3.1	485.5	0.007	1.2
Pro	$Y = 62.05X + 9.29$	0.9998	3.4	497.5	0.005	1.0
Met	$Y = 9.766X - 11.03$	0.9995	3.0	531.3	0.004	1.2
Val	$Y = 77.58X + 15.38$	0.9998	4.9	499.6	0.006	1.0
Try	$Y = 50.30X + 0.26$	0.9999	4.5	585.9	0.006	0.79
Phe	$Y = 83.02X + 6.98$	0.9999	8.7	547.5	0.006	0.97
Ile	$Y = 69.06X + 13.46$	0.9998	7.3	513.5	0.006	1.2
Leu	$Y = 73.62X + 14.08$	0.9997	11	513.5	0.005	1.0
(Cys) ₂	$Y = 21.56X - 13.88$	0.9993	16	1004.0	0.044	1.4
His	$Y = 40.72X - 22.83$	0.9996	17	918.7	0.016	1.4
Om	$Y = 64.40X - 18.19$	0.9996	4.2	894.8	0.013	1.3
Lys	$Y = 85.28X - 8.20$	0.9997	3.8	908.2	0.005	1.4
Tyr	$Y = 101.52X + 23.40$	0.9996	3.0	944.6	0.007	1.4

Y: 峰面积 (Peak area); X: 进样浓度 (Injected amount) pmol

3.5 金蝉样品氨基酸的色谱分析

实际金蝉样品中氨基酸的分离见图 3 (样品衍生用量为 33.4 μg, 实际进样量为 42 ng), 各氨基酸含量见表 4。结果表明: 金蝉样品中明显地含有至少 15 种氨基酸, 人体不能合成的 8 种氨基酸 (Lys, Met, Leu, Ile, Thr, Val, Try 和 Phe) 中, 金蝉样品可提供其中的 6 种 (Lys, Leu, Ile, Thr, Val 和 Phe)。可见金蝉蛋白水解液含有大量丰富的人体自身不能合成的氨基酸, 同时含有高含量的谷氨酸和丙氨酸, 是人

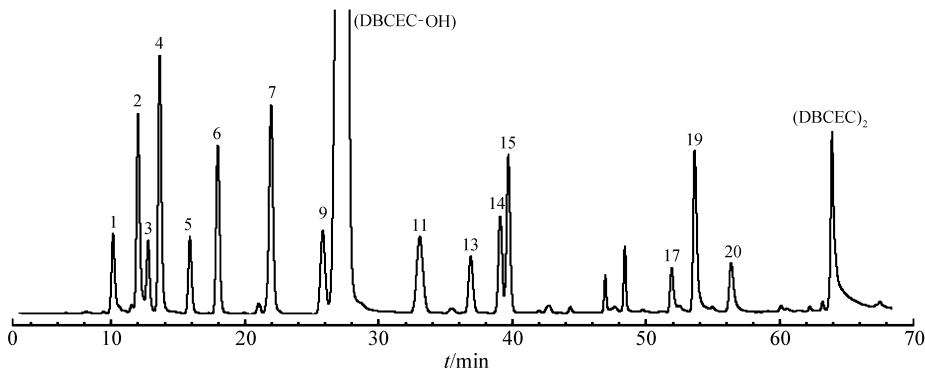


图 3 金蝉中氨基酸的色谱分析图

Fig 3 Chromatogram of amino acids in cicada

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

类理想的高蛋白药膳食品之一。

3.6 回收率测定

在金蝉样品中加入 0.1 g/g 各氨基酸的标准样品后,按照前述方法处理后进行衍生,所得各氨基酸的回收率在 74.0% ~ 107.0% 之间,结果见表 4。

表 4 金蝉中氨基酸的含量及回收率

Table 4 Contents of amino acids and recoveries from cicada sample

氨基酸 Amino acids	含量 Contents (g/g)	加入值 Added (g/g)	测定值 Determined (g/g)	回收率 Recoveries (%)	氨基酸 Amino acids	含量 Contents (g/g)	加入值 Added (g/g)	测定值 Determined (g/g)	回收率 Recoveries (%)
Arg	0.099	0.1	0.084	84	Val	0.124	0.1	0.085	85
Asp	0.34	0.1	0.097	97	Try	No	0.1	0.098	98
Ser	0.056	0.1	0.089	89	Phe	0.08	0.1	0.091	91
Glu	0.52	0.1	0.088	88	Leu	0.10	0.1	0.074	74
Thr	0.084	0.1	0.095	95	Leu	0.14	0.1	0.096	96
Gly	0.128	0.1	0.09	90	(Cys) ₂	No	0.1	0.104	104
Ala	0.188	0.1	0.096	96	His	0.092	0.1	0.082	82
GABA	No	0.1	0.101	101	Om	No	0.1	0.097	97
Pro	0.108	0.1	0.098	98	Lys	0.164	0.1	0.084	84
Met	No	0.1	0.107	107	Tyr	0.068	0.1	0.081	81

Na: not determined owing below LOQ.

3.7 结论

2-[2-(7H-二苯并[a,g]咪唑-乙氧基)-乙基]氯甲酸酯对氨基酸的标记不仅灵敏,同时由于分子侧链上引入一个强电负性氧原子的二聚乙二醇醚链后,表现出强的质谱灵敏度。试剂与氨基酸的标记产率高、产物稳定。本方法具有线性范围宽、重现性好、操作简便等特点。对黄金蝉若虫体蛋白水解液中氨基酸的分析表明:金蝉蛋白水解液含有丰富的自身不能合成的重要 6 种氨基酸,是高营养的药膳食品之一。

References

- SHANG ZhenHua(商振华), YU Y iN ian(于亿年), GUO W e i(郭为), LIU Y iHui(刘义辉), WANG J ianDe(王俊德). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **1993**, 11: 236~ 238
- Roth M. *Anal. Chem.*, **1971**, 43(7): 880~ 882
- Akira T, Kentaro A, Tomofumi S, Kazuhiko I. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(4): 732~ 739
- Kirkman M A. *J. Chromatogr. A*, **1974**, 97(2): 175~ 191
- YAN L i-rShu i(颜流水), LIANG N i ng(梁宁), LUO GuoAn(罗国安), WANG Y iM i ng(王义明), WANG J ianYong(王建勇). *Chin. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **2003**, 7: 1193~ 1197
- Lindroth P, Mopper K. *Anal. Chem.*, **1979**, 51(11): 1667~ 1674
- Hill D W, Walters F H, Wilson T D, Stuart J D. *Anal. Chem.*, **1979**, 51(8): 1338~ 1341
- Tseng S H, Chang P C, Chou S S. *J. Food Drug Anal.*, **1999**, 7(4): 269~ 277
- Ahnoff M, Gundevik I, Arfwilsson A, Fonselius J, Persson B-A. *Anal. Chem.*, **1981**, 53(3): 485~ 489
- Fürst P, Pollack L, Gasser T A, Godel H, Stehle P. *J. Chromatogr. A*, **1990**, 499(19): 557~ 569
- Einarsson S, Josefsson B, Lagerkvist S. *J. Chromatogr. A*, **1983**, 282: 609~ 618
- Einarsson S, Folestad S, Josefsson B, Lagerkvist S. *Anal. Chem.*, **1986**, 58(8): 1638~ 1643
- Cohen S A, Michaud D P. *Anal. Biochem.*, **1993**, 211(2): 279~ 287
- Li H J. *J. Chromatogr. A*, **1994**, 670(1-2): 59~ 66
- You J, Shan Y, Shan L, Zhen L, Zhang Y. *Anal. Biochem.*, **2003**, 313(1): 17~ 27
- YAN Tao(闫涛), SUN Xue-Jun(孙学军), ZHAO Hua-iX i n(赵怀鑫), SUN Zh iW e i(孙志伟), LIU Q i-rZe(刘钦则), SUO You-Ru i(索有瑞), YOU J i-nM ao(尤进茂). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(6): 788~ 794
- You J, Chen X, Zhao X, Suo Y, Wang H, Li Y, Sun J. *Chromatographia*, **2006**, 63(7-8): 337~ 343
- You J M i ng Y, Shi Y, Zhao X, Suo Y, Wang H, Li Y, Sun J. *Talanta*, **2005**, 68(2): 448~ 458

- 19 SHI Yun-Wei(石运伟), MING Yong-Fei(明永飞), WANG Cai-Ping(王彩萍), ZHAO Xian-En(赵先恩), ZHANG Rui(张蕊), YOU Jin-Mao(尤进茂). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(6): 503~507
- 20 LIU Ling-Jun(刘凌君), ZHAO Wen-Chen(赵文臣), YOU Jin-Mao(尤进茂). *J. Qufu Normal University*(曲阜师范大学学报), **2008**, 34(3): 76~78
- 21 Bruckner H, Haasman S, Langer M, Westhauser T, Wither R, Godel H. *J. Chromatogr.*, **1994**, 666(2): 259~273
- 22 Gatti R, Giacomini G, Andreatta P, Pentassuglia G. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2004**, 35(2): 339~348
- 23 Schwarz E L, Roberts W L, Pasquali M. *Clinica Chimica Acta*, **2005**, 354(1-2): 83~90
- 24 ZHAO Wen-Chen(赵文臣), LIU Ling-Jun(刘凌君), ZHAO Xian-En(赵先恩), DING Cherr-Xu(丁晨旭), SUO You-Rui(索有瑞), YOU Jin-Mao(尤进茂). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(8): 1071~1076
- 25 HOU Song-Mei(侯松媚), SUN Jing(孙敬), HE Hong-Bo(何红波), ZHANG Xu-Dong(张旭东), WANG Yan-Hong(王颜红). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(10): 1395~1400

Application of 2-[2-(7H-Dibenzo[a g]-carbazol-7-yl)-ethoxy] ethyl Chloroformate as A Pre-column Derivatization Reagent for Determination of Amino Acids from Hydrolyzed Cicada by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Mass Spectrometric Identification

LIXiao-Yan¹, YOU Jin-Mao^{1,2}, SUN Zhi-Wei³, FUYan-Yan¹, QIN Xue-Qin¹, DING Ming-Zhou¹, LIYU-Lin²

¹(College of Chemistry, Qufu Normal University, the Key Laboratory of Life-Organic Analysis, Qufu 273165)

²(Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

³(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract By using 2-[2-(7H-dibenzo[a g]-carbazole-ethoxy)-ethyl chloroformate (DBCEC-Cl) as a sensitive pre-column derivatization reagent, a simple method for evaluating the chemical compositions of protein amino acids from the hydrolyzed cicada sample has been developed. Studies on derivatization conditions indicated that the labeling reaction proceeded rapidly and smoothly in the presence of a base catalyst (pH 9.0) in acetonitrile to give the corresponding sensitively fluorescent derivatives with an excitation maximum at λ_{ex} 300 nm and an emission maximum at λ_{em} 395 nm. The separation of amino acid derivatives was carried out on a reversed phase Hypersil BDS-C₁₈ (200 mm × 4.6 mm × 5 μm) column in combination of a gradient elution. The complete baseline resolution for 20 amino acid derivatives was achieved within 65 min. Identification of amino acid derivatives was carried out by the online post-column ion trap/mass spectrometry with electrospray ion source (ESI source) in positive ion mode. Excellent linear response was observed, with coefficients of > 0.9992. Fluorescent detection limits calculated from 25 pmol injection at a signal-to-noise ratio of 3 were 2.6–24 fmol. The established method for the determination of amino acids from cicada sample was satisfactory.

Keywords High performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry; Fluorescence detection; Pre-column derivatization; 2-[2-(7H-Dibenzo[a g]-carbazol-7-yl)-ethoxy] ethyl chloroformate; Amino acids

(Received 3 December 2009; accepted 16 February 2010)