

研究报告

柱前衍生-高效液相色谱分离测定及质谱鉴定脂肪胺

赵先恩^{1,3} 李玉林^{1,3} 尤进茂^{1,2} 刘永军¹ 索有瑞^{*1}

¹ (中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) ² (曲阜师范大学化学科学学院, 曲阜 273165)

³ (中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 采用新型荧光衍生试剂 2-(2-苯基-1-氢菲[9,10-*d*]咪唑)乙酸 (PPA) 进行柱前衍生, 经荧光检测实现了脂肪胺的高效液相色谱 (HPLC) 分离测定及柱后质谱鉴定。60 °C 下在乙腈溶剂中用 *N*-乙基-*N*-[(3-二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 做缩合剂, 衍生反应 15 min 可获得稳定的荧光产物。脂肪胺衍生物荧光检测波长为 380 nm (激发波长为 260 nm)。在 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱上, 采用梯度洗脱对 12 种脂肪胺衍生物进行了优化分离, 测定了造纸厂废水、大鼠端脑和酸奶中脂肪胺的含量。经柱后在线质谱大气压化学电离源 (APCI Source) 正离子模式实现了各种脂肪胺衍生物的质谱鉴定, 借助对活性中间体的质谱解析确定了衍生反应的反应机理。该方法具有良好的重现性和回收率, 多数脂肪胺的线性回归系数大于 0.9996; 检出限为 3.1 ~ 18 fmol (*S/N* = 3.1)。

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

脂肪胺广泛分布于自然界中。大多数胺类化合物包括脂肪胺是由蛋白质、氨基酸和其它含氮类有机化合物通过生物降解而成, 挥发性有机胺在亚硝化剂的存在下易形成强致癌性的 *N*-亚硝基化合物^[1,2]。脂肪胺的痕量测定对临床医学、环境检测与控制、食品检验和生物学等具有重要意义。

脂肪胺通常为无紫外吸收或本身不具发光特性的化合物, 进行化学衍生是提高其检测灵敏度的有效途径。国外用于测定脂肪胺荧光衍生试剂的报道较多, 但存在不同的缺陷, 如邻苯二甲醛 (OPA)^[3] 重现性和衍生物的稳定性较差, 4-氯-7-硝基苯并-1,2,3-噁二唑 (NBD-Cl)^[4] 试剂在溶液中的稳定性较差, 见光易分解, 6-氨基喹啉基-*N*-琥珀酰亚胺碳酸酯 (AQC)^[5] 是近年来广泛应用的胺类衍生试剂, 但其在水中的荧光量子效率很低, 不利于梯度洗脱。氯甲酸-9-芴甲酯 (FMOC-Cl)^[6] 虽然广泛应用于氨基类化合物的柱前衍生, 但衍生化后需经萃取消除过量试剂的干扰, 操作繁琐且易造成疏水衍生物的丢失。该类试剂的优点是衍生速度快、产率高, 但衍生试剂难合成、易水解^[7,8]。受脒基荧光衍生试剂在 EDC 作用下高灵敏衍生脂肪酸的启示^[9], 在前期工作的基础上^[10], 合成了更灵敏、更易质谱离子化的 2-(2-苯基-1-氢菲[9,10-*d*]咪唑)乙酸 (PPA)。采用梯度洗脱实现了 C₁-C₁₂ 脂肪胺衍生物的完全基线分离, 借助柱后在线质谱实现了快速定性并讨论了衍生反应机理。结果表明, 该衍生试剂灵敏度高、稳定性好, 衍生反应简单且产率高, 过量试剂不干扰分离, 衍生溶液不必预处理可直接进样分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 Trap SL 型高效液相色谱-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、100 位自动进样器、大气压化学电离源 (APCI Source); Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6 mm ×

2006-10-25 收稿; 2007-02-02 接受

本文系中国科学院百人计划及中国科学院“西部之光”人才培养计划项目资助

* E-mail: yrsuo@163.com

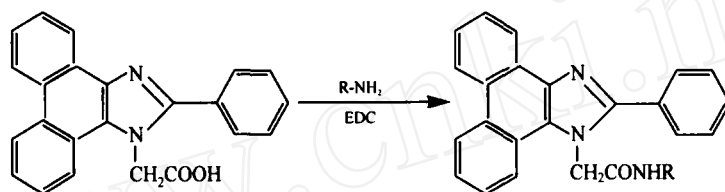
150 mm, 5 μm , 美国 Agilent 公司); 650-10S 型荧光分光光度计 (日本日立公司)。

2-(2-苯基-1-氢菲[9,10-*d*]咪唑)乙酸、2-苯基-1-氢菲[9,10-*d*]咪唑、1,2-苯并-3,4-二氢咪唑、吡啶酮 (本实验室自制, 经纯化后纯度达 98.5% 以上); 12 种脂肪胺标准品 (Sigma 公司); *N*-乙基-*N*-(3-二甲氨基)丙基 碳二亚胺盐酸盐 (EDC, Sigma 公司); 光谱级乙腈 (Merck 公司), 甲酸、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 等均为分析纯, 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 准确取定量脂肪胺标准品, 用光谱纯乙腈配成 0.01 mol/L 的溶液, 相应低浓度脂肪胺混合标准液 (1.0×10^{-4} mol/L) 用光谱纯乙腈稀释而成。称取 17.6 mg 的 PPA 用光谱纯乙腈定容至 25 mL (加入 2 mL 吡啶作助溶剂), 浓度为 2.0×10^{-3} mol/L。称取 0.2876 g EDC 溶于 10 mL 光谱纯乙腈配成 0.15 mol/L 的溶液待用。

2.2.2 脂肪胺的衍生化 向 2 mL 安培瓶中依次加入 40 μL EDC, 40 μL 脂肪胺标准品, 120 μL 衍生试剂溶液, 密封后于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 15 min, 取出放冷后冲稀 4 倍, 直接进样 10 μL (50 pmol) 分析。衍生反应如下式。



2.2.3 色谱与质谱条件 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm)。流动相 A: 30% 乙腈水溶液 (含 30 mmol/L 甲酸, pH 3.7); 流动相 B: 100% 乙腈。梯度洗脱程序: B 在 35 min 内从 0% 梯度到 100%, 保持 5 min。流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。激发和发射波长分别为 260 和 380 nm。

大气压化学电离源 (APCI Source), 正离子模式, 喷雾压力 60 psi (0.414 MPa), 干燥气流量为 5 L/min, 干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 气化温度 400 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压 3500 V, 电晕电流 4000 nA (Pos)^[11]。

2.2.4 造纸厂废水、大鼠端脑、酸奶中脂肪胺的提取 量取 50 mL 造纸厂废水 (取自山东济宁某造纸厂), 用盐酸调至 pH 3.0 左右, 超声振荡 20 s 使其转变为相应脂肪胺的有机盐, 过滤, 浓缩后调至 pH 7.0, 定容为 10 mL, 冷藏待测。

Wistar 雄性大鼠 (购自山东鲁抗制药集团, 体重约 300 g), 断头处死, 立即开颅取出全脑, 用冰生理盐水清洗, 在玻璃板上分离端脑, 称重 (约 2 g), 加入 1.2 mL 0.1 mol/L 的 HClO_4 , 匀浆, 低温 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min (18000 r/min) 去蛋白, 取出上清液, 用 4 mol/L NaOH 调至中性, 定容到 1.5 mL, 冷藏待测。

量取 2 mL 某品牌酸奶 (保质期结束前 2 天), 加入 2 mL 水, 0.5 mL 4 mol/L 的 NaOH 水溶液, 用 20 mL 氯仿超声振荡提取 10 min, 用医用注射器抽取氯仿层, 加入 1 mL 4 mol/L 的 HCl 调至 pH 3.0, 使脂肪胺转变为有机盐, 氮气吹干后用 1 mL 乙腈/水溶液 (ACN/H₂O = 4/1, V/V) 定容, 冷藏待测。

2.3 2-(2-苯基-1-氢菲[9,10-*d*]咪唑)乙酸的合成与表征

2.3.1 2-苯基-1-氢菲[9,10-*d*]咪唑的合成 参考了文献 [12] 改进如下: 在 500 mL 三颈烧瓶中加入 16 g 菲醌, 10 mL 苯甲醛, 120 g 醋酸铵, 最后加入 300 mL 冰醋酸溶解, 在 80 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 3 h, 冷却, 倒入 300 mL 水中, 用氨水调节 pH 7 ~ 8, 得浅黄色沉淀, 抽滤, 水洗两次, 粗品晾干后在乙腈/*N,N*-二甲基甲酰胺 (5/1, V/V) 中重结晶, 产率 90% 以上。

2.3.2 PPA 的合成与表征 500 mL 三颈烧瓶中加入 2-苯基-1-氢菲[9,10-*d*]咪唑 28 g, KOH 30 g 和二甲基亚砜 250 mL, 加热到 120 ~ 125 $^{\circ}\text{C}$, 机械搅拌反应 10 min 后, 30 min 内用滴液漏斗滴入 50 mL 溴乙酸乙酯与 30 mL 二甲基亚砜的混合溶液, 保持 120 ~ 125 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 2.5 h, 放冷, 倾入溶有 20 g KOH 的 500 mL 水溶液中, 加热煮沸 20 min, 使生成的酯充分水解, 放冷后用 HCl 调至 pH 8, 过滤除去杂质, HCl 调至 pH 3 析出产物, 过滤后将固体再溶于含少量 KOH 的水溶液中, HCl 调至 pH 8, 过滤除杂后再调至 pH 3 析出产物。如此重复 3 次, 所得固体用乙腈重结晶得白色晶体, 产率 84%。m. p. > 300 $^{\circ}\text{C}$ 。测得

C, 78.32%; H, 4.58%; N, 7.94%。理论值(%): C, 78.39; H, 4.57; N, 7.95。IR (KBr): 3110.57 (—OH, 二聚), 1711.82 (C=O), 1657.09, 1612.53 (pH—C=N—), 1529.62, 1474.14, 1460.11, 1424.59 (pH), 1399.26 (C—H), 1229.85, 1111.75, 773.37, 750.7, 720.84, 703.84。m/z [M+H]⁺: 353.1。

3 结果与讨论

3.1 PPIA 的稳定性与光谱性质

PPIA 是由 2-苯基-1-氢菲 [9,10-d]咪唑与溴乙酸乙酯在二甲亚砜溶剂中取代反应后经水解而成,产物经水洗后在乙腈中重结晶。衍生试剂对常规有机溶剂和水稳定,在乙腈溶液中室温放置一个月后再衍生脂肪酸未见明显变化。在乙腈溶液中的最大荧光激发和发射波长分别为 260 nm 和 380 nm。按照朗伯-比尔定律, PPIA 在乙腈中最大吸收波长 251 nm 处的摩尔吸光系数 $= 6.3 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。PPIA 与 4 种荧光衍生试剂 (AAA^[10]、BCEOC^[8]、CEOC^[13]、FMOC^[13]) 的摩尔吸光系数 () 及结构式见表 1。最大吸收波长处的摩尔吸光系数直接反映分子的灵敏度^[14],由表 1 可知 PPIA 的分子共轭度最大,值最大,这说明了荧光衍生试剂的分子结构是其具有高荧光灵敏度的基础和原因,为更灵敏荧光衍生试剂的设计合成提供了依据。

表 1 PPIA 与 4 种荧光衍生试剂摩尔吸光系数对比

Table 1 Comparative of molar absorptivity for 2-(2-phenyl-1H-phenanthro-[9,10-d]imidazole-1-yl)-acetic acid (PPIA) with other four fluorescence derivatization reagents

衍生试剂 Derivatization reagent	分子结构式 Molecular structure	摩尔吸光系数 (L mol ⁻¹ cm ⁻¹) Molar absorptivity
2-(2-苯基-1-氢菲 [9,10-d]咪唑)-乙酸 2-(2-Phenyl-1H-phenanthro-[9,10-d]imidazole-1-yl)-acetic acid (PPIA)		6.3×10^5
2-(9-吖啶酮)-乙酸 2-(9-Acridone)-acetic acid (AAA)		2.9×10^5
1,2-苯并-3,4-二氢咪唑-9-乙基氯甲酸酯 1,2-Benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl chloroformate (BCEOC)		2.4×10^4
2-(9-咪唑)-乙基氯甲酸酯 2-(9-Carbazole)-ethyl chloroformate (CEOC)		2.3×10^4
氯甲酸-9-芴甲酯 2-(9-Fluorenyl)-ethyl chloroformate (FMOC)		1.7×10^4

3.2 衍生条件的优化

PPIA 对脂肪酸的衍生化反应随衍生反应的时间和温度的不同及衍生试剂与 EDC 用量的不同,产率有明显的差异。对上述 4 个因素的优化结果表明:在其它因素一定的情况下,60 下具有最高衍生率。随着温度的上升有副反应发生且产率下降,衍生反应 15 min 后衍生产物信号强度稳定。衍生试剂摩尔数达到脂肪酸总摩尔数的 5 倍后信号强度稳定。EDC 用量为 40 μL (摩尔数为衍生试剂的 25 倍) 时产率最高。

3.3 衍生反应机理

参考脒基衍生试剂衍生脂肪酸的反应机理^[9],从理论上推测反应机理为: PPIA 首先与 EDC 反应生成活性中间体,脂肪酸再与活性中间体反应生成脂肪酸衍生物。借助柱后在线串联质谱对衍生产物色谱图中的组分 A 与 B 进行了鉴定,通过对其质谱裂解碎片峰的解析,确定了组分 A 与 B 为活性中间体,从而确定了衍生反应机理。中间体 A 与 B 的质谱图见图 1,质谱峰归属见图 2,衍生反应机理见图 3。

3.4 质谱灵敏度对比

在相同质谱条件下,对比了 2-苯基-1-氢菲 [9,10-d]咪唑 (PPIA)、1,2-苯并-3,4-二氢咪唑 (BDC)^[8]、

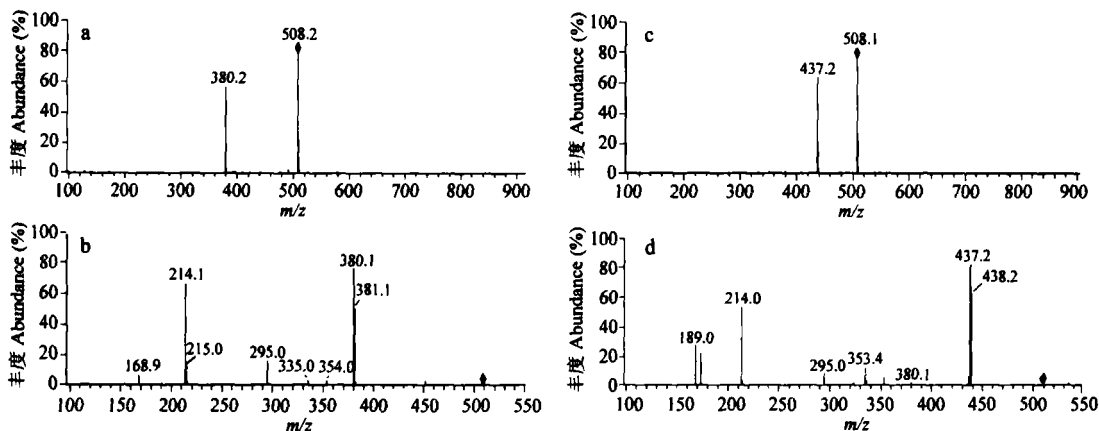


图 1 中间体 A 与 B 的质谱图

Fig 1 Mass spectrum of intermediates A and B

a, b 为 A 的分子离子质谱和二级质谱; c, d 为 B 的分子离子质谱和二级质谱 (a and b is molecular ion MS and MS/MS belonging to A respectively; c, d is molecular ion MS and MS/MS belonging to B respectively).

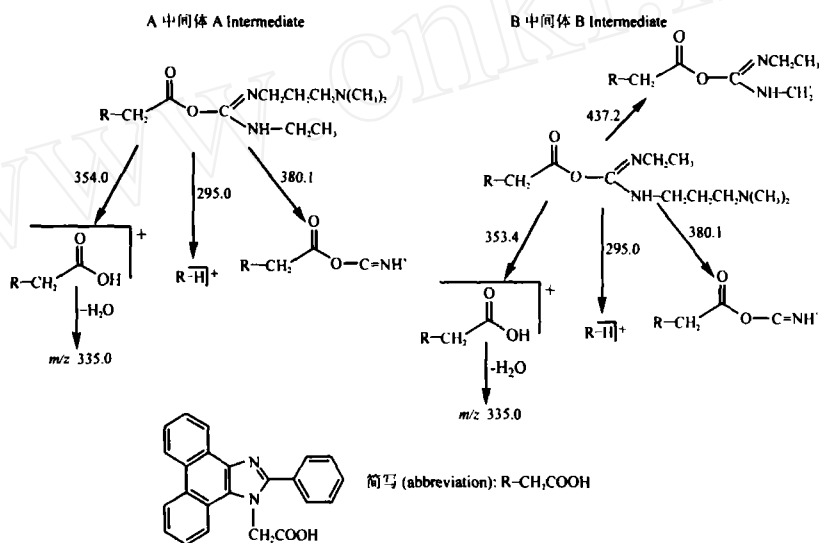


图 2 中间体 A 与 B 的质谱峰归属

Fig 2 Scheme of MS cleavage mode of intermediates A and B

吡啶酮 (Acridone)^[10] 3 种荧光母体环的质谱离子流强度, 注射相同量的上述 3 种物质, 结果表明: $I_{\text{PPI}} : I_{\text{Acridone}} : I_{\text{BDC}} = 12 : 5 : 1$ (I_{PPI} , I_{BDC} , I_{Acridone} 分别表示 PPI, BDC, Acridone 的质谱离子流强度), 这说明 2-苯基-1-氢-菲 [9, 10-*d*] 咪唑 (PPD) 具有更高的质谱离子化效率, 这可能是由于其分子中含有的两个电负性强的氮原子导致了质谱响应灵敏度增加。

3.5 标准品的色谱分离及质谱鉴定

通过调整梯度洗脱程序及流动相 A 的 pH 值, 实现了最优化的色谱分离。由于 PPA 荧光母体环中含两个弱碱性的氮原子, 用 pH 3.7 的甲酸氨缓冲液控制流动相 A 的 pH 值, 不但能够实现快速洗脱、改善分离度, 而且能够为柱后在线质谱的离子化提供氢质子, 提高了检测灵敏度。

脂肪胺标准品衍生色谱分离见图 4。采用大气压化学电离源 (APCI Source) 正离子模式进行在线柱后质谱鉴定, 各组分质谱数据见表 2。以癸胺为例的一级和二级质谱图见图 5。

3.6 稳定性、重现性、线性回归方程及检出限

取新衍生的同一份标准品衍生液 (50 pmol), 分别在室温放置 0、1、2、4、8、16、24 和 72 h, 进行色谱分析, 计算得各时间点下各脂肪胺衍生峰面积对 0 h 时的标准偏差值均小于 2.8%, 表明衍生物对于

常规色谱分析稳定性良好。

在相同洗脱条件下,对 50 pmol 脂肪酸衍生物进行平行 6 次分析,保留时间和峰面积重现性见表 2;保留时间相对标准偏差 RSD (%) 小于 0.10%;峰面积相对标准偏差 RSD (%) 小于 2.7%。

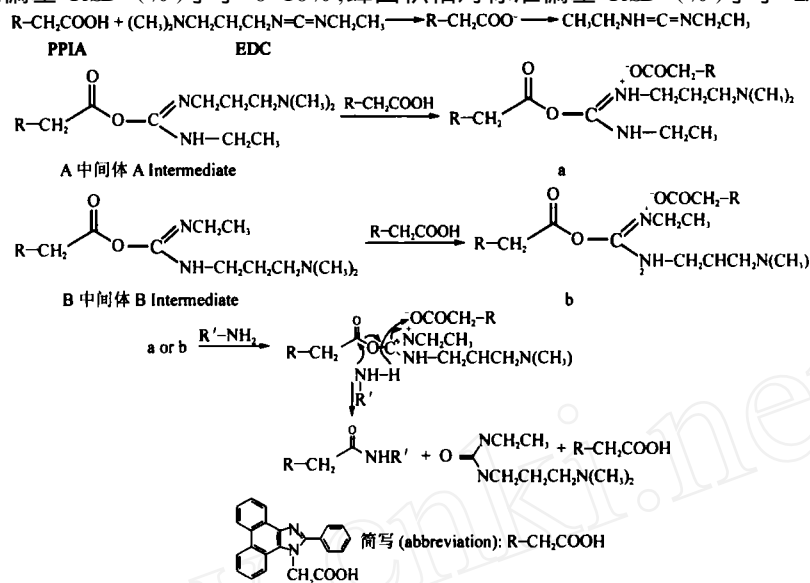


图 3 PPIA 与脂肪酸衍生反应机理图

Fig 3 Derivatization mechanism scheme of PPIA with amines

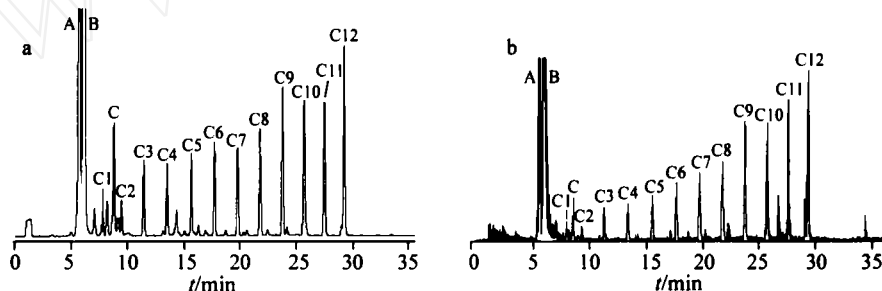


图 4 标准脂肪酸衍生物的色谱图 (a) 和质谱总离子流图 (TIC)

Fig 4 Chromatogram (a) and MS spectrum of total ion current (b) for standard amines derivatized with PPIA

色谱条件见实验部分 (chromatographic conditions as described in experimental section)。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 and B (中间体, intermediates); C. 2-苯基-1H-苯并[9,10-d]咪唑 (2-phenyl-1H-phenanthro-[9,10-d]imidazole)。

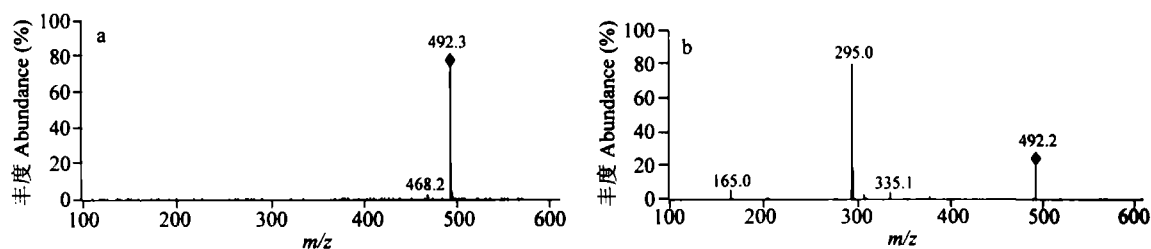


图 5 代表性的癸胺衍生物的一级质谱 (a) 和二级质谱 (b)

Fig 5 Typical MS chromatogram of molecular ion MS (a) and MS/MS (b)

进样量在 200.0 pmol ~ 48.83 fmol 范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得各脂肪酸

衍生物的回归方程、相关系数和检出限见表 2。各脂肪胺衍生物的线性相关系数除乙胺为 0.9985 外都在 0.9996 以上,检出限在 3.1~18 fmol 之间(按 $S/N=3$ 计算)。

表 2 脂肪胺衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限、质谱与保留时间和峰面积的重现性 ($n=6$)

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits, MS of aliphatic amine derivatives and repeatability for peak area and retention time ($n=6$)

脂肪胺 Amine	$Y=AX+B$	相关系数 Correlation coefficient (r)	检出限 Detection limits (fmol)	质谱 MS [M+1] ⁺	保留时间相对 标准偏差 (%) Retention time RSD (%)	峰面积相对 标准偏差 (%) Peak area RSD (%)
C ₁	$Y=20.03X-3.628$	0.9996	18	366.1	0.094	2.1
C ₂	$Y=25.59X+5.556$	0.9985	16	380.1	0.090	1.9
C ₃	$Y=56.41X+7.253$	0.9999	7.6	394.1	0.091	2.3
C ₄	$Y=52.42X+14.20$	0.9996	6.8	408.2	0.064	2.6
C ₅	$Y=58.33X+16.32$	0.9996	7.6	422.2	0.072	1.8
C ₆	$Y=65.67X+16.25$	0.9998	5.1	436.2	0.063	1.2
C ₇	$Y=65.24X+15.51$	0.9997	6.1	450.3	0.058	0.79
C ₈	$Y=78.75X+20.55$	0.9997	4.8	464.3	0.062	0.73
C ₉	$Y=109.9X+27.16$	0.9997	3.8	478.3	0.050	0.63
C ₁₀	$Y=107.5X+22.94$	0.9998	4.5	492.3	0.049	0.61
C ₁₁	$Y=101.8X+22.75$	0.9997	4.2	506.3	0.050	0.62
C ₁₂	$Y=141.3X+35.28$	0.9997	3.1	520.3	0.043	0.61

X: 进样量 (injected amount (pmol)); Y: 峰面积 (peak area)。

3.7 实际样品分析

在造纸厂污水样品中加入 10 μ L 浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 脂肪胺标准品后,按照上述提取方法提取后进行衍生,重复 3 次所得各脂肪胺的回收率在 86.62%~105.10% 之间,结果满意,具体结果见表 3。该衍生试剂反应产率高,衍生溶液不经预处理即可直接进样分析。

衍生和色谱分离按照前述优化的条件进行,衍生物组分借助柱后在线质谱鉴定。大鼠端脑的脂肪胺衍生物色谱分离分别见图 6,峰标注与图 3 相同。造纸厂废水、大鼠端脑和酸奶样品中脂肪胺含量的测定结果见表 3。

表 3 实际样品中脂肪胺的含量及回收率 ($n=3$)

Table 3 Contents of aliphatic amines from real samples and recoveries ($n=3$)

脂肪胺 Amine	造纸厂废水 Waste water of paper mill (μ g/L)	大鼠端脑 Telencephalon tissue of Wistar rat (μ g/g)	酸奶 Acidophilus milk (μ g/L)	回收率 Recoveries (%) of waste water
CH ₃ NH ₂	8.62	6.13	2.32	86.6
CH ₃ CH ₂ NH ₂	9.87	2.51	1.08	92.6
CH ₃ (CH ₂) ₂ NH ₂	7.94	0.61	0.84	97.8
CH ₃ (CH ₂) ₃ NH ₂	6.36	0	0	105.1
CH ₃ (CH ₂) ₄ NH ₂	1.21	0	0	102.6
CH ₃ (CH ₂) ₅ NH ₂	7.61	0	0	93.7
CH ₃ (CH ₂) ₆ NH ₂	1.21	0.58	0.46	99.9
CH ₃ (CH ₂) ₇ NH ₂	2.03	0.043	0.16	104.4
CH ₃ (CH ₂) ₈ NH ₂	1.81	0.013	0.14	89.2
CH ₃ (CH ₂) ₉ NH ₂	1.52	0	0	91.9
CH ₃ (CH ₂) ₁₀ NH ₂	2.19	0	0	101.3
CH ₃ (CH ₂) ₁₁ NH ₂	2.94	0	0	104.4

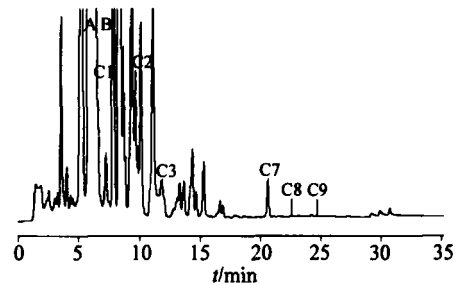


图 6 大鼠端脑中脂肪胺的色谱分离图

Fig 6 Chromatogram of free aliphatic amines from telencephalon tissue of Wistar rat

References

- 1 Sacher F, Lenz S, Brauch H. *J. Chromatogr A*, **1997**, 764: 85 ~ 93
- 2 Ababs M, Bayona J N, Ventura F. *Anal. Chem.*, **1999**, 71: 3531 ~ 3537
- 3 Lindroth P, Mopper K. *Anal. Chem.*, **1979**, 51: 1667 ~ 1674
- 4 Ahnoff M, Grundevik I, Arfwidsson A. *Anal. Chem.*, **1981**, 53: 485 ~ 489
- 5 Cohen S A, Deantonis K M. *J. Chromatogr A*, **1994**, 661: 25 ~ 34
- 6 Bauza T, Blaise A, Daumass F, Cabanis J C. *J. Chromatogr A*, **1995**, 707: 373 ~ 379
- 7 Long Mei (龙梅), Xie Mengxia (谢孟峡), Liu Yuan (刘媛). *J. Beijing Normal University (Natural Science)* (北京师范大学学报 自然科学版), **2000**, 36: 77 ~ 81
- 8 Shi Yunwei (石运伟), Ming Yongfei (明永飞), Wang Caiping (王彩萍), Zhao Xian'en (赵先恩), Zhang Rui (张蕊), You Jinmao (尤进茂). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(4): 503 ~ 507
- 9 Peters R, Hellenbrand J, Mengerink Y, Van der Wal S. *J. Chromatogr A*, **2004**, 1031: 35 ~ 50
- 10 Zhao Xian'en (赵先恩), Shi Yunwei (石运伟), Chen Xiangming (陈向明), Zhang Haifeng (张海峰), You Jinmao (尤进茂). *Chemical Research* (化学研究), **2005**, 16: 66 ~ 69
- 11 Friso S, Choi S W, Dolnikowski G G, Selhub J. *Anal. Chem.*, **2002**, 74: 4526 ~ 4531
- 12 Frederik C K, Holger S. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67(21): 7185 ~ 7192
- 13 You J M, Shan Y C, Zhen L, Zhang L, Zhang Y K. *Anal. Biochem.*, **2003**, 313: 17 ~ 27
- 14 Northeast Normal University (东北师范大学). *Analytical Chemistry* (分析化学). 3rd Edition, Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社), **2003**: 277 ~ 281

Pre-column Derivatization-High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Aliphatic Amines with Fluorescence Detection and Mass Spectrometric Identification

Zhao Xian-En^{1,3}, Li Yu-Lin^{1,3}, You Jin-Mao^{1,2}, Liu Yong-Jun¹, Suo You-Rui¹

¹ (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

² (College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165)

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

Abstract A simple and highly sensitive method based on the derivatization of aliphatic amines with 2-(2-phenyl-1H-phenanthro-[9, 10-d]imidazole-1-yl)-acetic acid (PPIA) followed by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and on-line post-column mass spectrometric identification has been developed. Optimum derivatization, giving the corresponding stable fluorescent derivatives, was obtained by reacting of aliphatic amines with PPIA at 60 °C for 15 min in the presence of *N*-ethyl-*N*-(3-*d*-methylamino propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) catalyst in acetonitrile solvent. The fluorescence detection wavelength of PPIA derivatives was 380 nm (excitation wavelength 260 nm). Separation of the derivatized amines with a good baseline resolution in conjunction with a gradient elution was carried out on a reversed phase Eclipse XDB-C₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), in this way, the content of free fatty amines in waste water of paper mill, telencephalon tissue of rat and acidophilus milk was determined. The identification of aliphatic amine derivatives was carried out by post-column online mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization source under positive-ion mode detection. The established method exhibits excellent reproducibility and recovery. Excellent linear responses are observed with regression coefficients > 0.9996, detection limits (at signal-to-noise of 3:1) are 3.1 - 18 fmol.

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

(Received 25 October 2006; accepted 2 February 2007)