

氮杂多环光致发光分子用于食品中脂肪胺的分析及质谱鉴定

刘凌君¹, 赵文臣¹, 索有瑞², 尤进茂^{1,2}

(1. 曲阜师范大学 化学科学学院, 生命有机分析重点实验室, 山东 曲阜 273165;

2. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

摘要: 对含氮类光致发光分子 2-(11H-苯[a]吡唑)异丙基氯甲酸酯进行柱前衍生处理, 并经荧光检测对脂肪胺进行高效液相色谱(HPLC)分离和质谱定性。衍生物于 $\lambda_{ex} = 279$ nm 产生强烈荧光, 发射波长为 $\lambda_{em} = 380$ nm。40 °C 下在 pH 9.0 的硼酸缓冲液中, 衍生反应 3 min 后获得稳定的荧光产物。在 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 上, 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) 正离子模式进行质谱定性, 实现了各种脂肪胺衍生物的快速、准确测定。该方法具有良好的重复性, 多数脂肪胺的线性回归系数大于 0.999 4, 检出限在 2.73 ~ 23.16 fmol 水平。

关键词: 高效液相色谱-质谱; 荧光检测; 柱前衍生; 脂肪胺

中图分类号: O657.63; O623.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2008)09-0942-06

Application of Nitrogen Heterocyclic Photoluminescence Molecule for the Determination of Aliphatic Amines in Food with HPLC and Identification with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry

LIU Ling-jun¹, ZHAO Wen-chen¹, SUO You-rui², YOU Jin-mao^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Life-organic Analysis, College of Chemistry Science, Qufu Normal University,

Qufu 273165, China; 2. Northwest Plateau Institute of Biology,

Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: A simple and highly sensitive method was developed for the determination of aliphatic amines (AA) in food using HPLC with fluorescence detection and identification with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS). It was based on the pre-column derivatization of aliphatic amine with a nitrogen heterocyclic photoluminescence molecule 2-(11H-benzo[a]carbazol-11-yl) isopropyl chloroformate (BCPC-Cl). Stable amine derivatives were obtained in the presence of borate buffer (pH 9.0) within 3 min. The maximum excitation and emission wavelengths were at 279 nm and 380 nm, respectively. Separation of 12 amine-derivatives was achieved by a gradient elution on a reversed-phase Eclipse XDB C₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column with a good baseline resolution. The identification of amine-derivatives was carried out by MS using APCI as the ion source in positive-ion mode. The relative standard deviation (RSD) of the retention time and the peak area were less than 0.109% and 2.671%, respectively. Good linear responses were observed with correlation coefficients $r > 0.999 4$. The detection limits ranged from 2.73 to 23.16 fmol.

Key words: HPLC-MS; fluorescence detection; pre-column derivatization; aliphatic amines

脂肪胺类化合物因其毒性及反应活性已成为环境检测倍受关注的一类化合物。该类化合物的测定对环境化学、生物学、毒物学和临床化学具有重要意义, 尤其是食品中脂肪胺的含量, 对食品质量的检测, 更起到重要的作用。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一个有效途径。虽然测定胺类化合物的荧光试剂较多^[1-4], 但多数试剂在应用中

收稿日期: 2007-12-21; 修回日期: 2008-01-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20075016)

第一作者: 刘凌君 (1966-), 女, 山东曲阜人, 讲师, 硕士

通讯作者: 尤进茂, Tel: 0537-4458501, E-mail: jnyou6304@163.com

存在缺陷, 因此开发灵敏度高且简便易行的试剂仍然十分必要。

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^[5-6], 含咔唑母体环类的衍生物为其中的一类。本文在前期研究基础上^[7-11], 将 1, 2-苯并-3, 4-二氢咔唑母体环经 1, 4-四氯苯醌脱氢处理获得三环并联且含有氮杂原子的高共轭程度的 2-(11H-苯[a]咔唑)母体环, 对母体环再进行 2 步修饰后获得 2-(11H-苯[a]咔唑)异丙基氯甲酸酯 (BCPC-Cl)。与先前制备的 1, 2-苯并-3, 4-二氢咔唑-9-异丙基氯甲酸酯 (BCI-Cl) 相比^[9], BCPC-Cl 表现出更为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, 所得衍生物稳定、产率高。标记溶液经乙酸中和后, 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。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 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, 100 位自动进样器, 大气压化学电离源 (APCI), Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm; Agilent 公司)。

2-(11H-苯[a]咔唑)异丙基氯甲酸酯 (BCPC-Cl, 自制), 12 种脂肪胺标准样品 (Sigma 公司), 光谱纯乙腈 (Merck 公司), 甲酸, N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 均为分析纯, 水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 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 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 16.9 mg 的 BCPC-Cl 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。

1.3 脂肪胺的衍生化

向 2 mL 安培瓶中依次加入 150 μL pH 9.0 的硼酸盐缓冲液, 20 μL 脂肪胺标准样品, 30 μL 衍生试剂后于 40 °C 水浴中反应 3 min。衍生反应如图 1 所示。

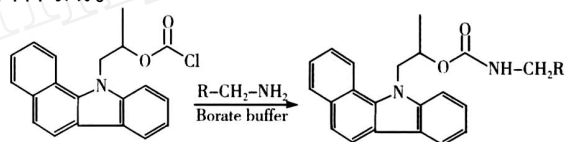


图 1 BCPC-Cl 与脂肪胺的衍生反应

Fig. 1 Derivatization scheme of aliphatic amines with 2-(11H-benz[a]carbazol-11-yl) isopropyl chloroformate (BCPC-Cl)

1.4 色谱及质谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C₈ 色谱柱。流动相 A: 30% (体积分数) 乙腈水溶液 (含 20 mmol/L 甲酸胺 pH 3.6); B: 100% 的乙腈。A 在 35 min 内从 70% 变化到 0%; B 在 35 min 内从 30% 变化到 100%, 保持 5 min, 流速为 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C。荧光激发和发射波长分别为 λ_{ex} = 275 nm, λ_{em} = 380 nm。

质谱条件: 大气压化学电离源 (APCI), 正离子模式, 喷雾压力 4.14 × 10⁵ Pa, 干燥气流速为 5 L/min, 干燥气温度 350 °C, 气化温度 450 °C, 毛细管电压 3 500 V, 电晕电流 4 000 nA (Pos)^[12-13]。

1.5 BCPC-Cl 的制备

1.5.1 2-(11H-苯[a]咔唑)异丙醇的合成 1, 2-苯并-3, 4-二氢咔唑的合成参考文献 [14], 11H-苯[a]咔唑的合成参考文献 [15]。2-(11H-苯[a]咔唑)异丙醇的合成: 向 500 mL 配备机械搅拌、温度计和恒压滴液漏斗的三颈烧瓶中依次加入 2-(11H-苯[a]咔唑) 20 g (约 0.1 mol)、7 g 氢氧化钾、200 mL 丁酮, 30~40 °C 搅拌溶解后冰水浴冷却到 0 °C, 向烧瓶中滴加含有 8 g 1, 2-环氧丙烷的 50 mL 冰冻丁酮溶液, 于 1 h 内滴完, 冰浴中反应 2 h, 然后升温到 50 °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蒸出。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, 甲醇重结晶 3 次。m.p. 146.6~147.1 °C; 产率: 81.3%。测定值 (w/%): C 82.84, H 5.68, N 5.14; 计算值 (w/%): C 82.31, H 6.86, N 5.05。R (KBr), 3 329.8 (—OH); 3 057.11, 2 974.93, 2 962.18, 2 922.65 (Ph); 1 470.75 (C—H); 1 359.54, 1 337.55 (C—H); 1 102.08 (—C—O), 839.71, 735.90。MS: m/z 276 [M+H]⁺, m/z 258 [MH⁺ - H₂O]。

1.5.2 2-(11H-苯[a]咔唑)异丙基氯甲酸酯 (BCPC-Cl) 的合成与结构表征 在 500 mL 的烧瓶中加入

4 g 固体光气, 溶解在 100 mL 的二氯甲烷中, 加入少量吡啶作催化剂, 在电磁搅拌和冰浴冷却下, 将溶有 6.1 g 2-(11H 苯 [a] 咔唑) 异丙醇的 150 mL 的二氯甲烷溶液于 1 h 内滴加到上述冷却液中, 保持 0 搅拌反应 4 h 后, 将温度升到室温继续反应 6 h。旋转减压近干, 剩余物用无水乙醚萃取 3 次, 每次 100 mL。浓缩后用无水乙醚重结晶 3 次, 得到白色晶体 4.7 g, 产率 63.0%。m. p. 136.2 ~ 137.1。测定值 (w / %): C 70.8, H 4.71, N 4.14, Cl 10.47; 计算值 (w / %): C 71.1, H 4.74, N 4.15, Cl 10.52; R (KBr), 1 774.16 ($-C=O$); 1 470.26 ($C-H$); 1 355.56, 1 344.0 ($C-H$); 1 246.4, 1 119.04, 836.18, 744.6。

2 结果与讨论

2.1 BCPC-OH 与衍生物光谱性质

2.1.1 紫外光谱 BCPC-Cl 是 BCIC-Cl 经 1, 4-四氯苯醌脱氢获得。两者相比, BCPC-Cl 的母体环增加了 1 个双键, 共轭体系进一步加强。由图 2 可见, BCPC-OH 在甲醇溶液中表现出 5 个主要吸收带, 其最大吸收 (nm) 和摩尔吸光系数 ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) 分别为: 230 nm (3.80×10^4), 244 nm (3.90×10^4), 253 nm (4.40×10^4), 279 nm (4.60×10^4), 305 nm (2.60×10^4)。BCIC-OH 在紫外区显示 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 (2.0×10^4), 217 (1.95×10^4), 249 (1.95×10^4), 321 (2.0×10^4)。数据表明增加 1 个双键后, 除未脱氢前的 BCIC-OH 的 320 nm 峰位蓝移外, 其它相应的吸收峰位明显红移。未脱氢前 BCIC-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。

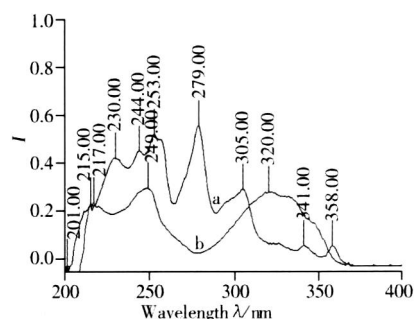


图 2 BCPC-OH 与 BCIC-OH 紫外吸收比较

Fig. 2 Ultraviolet absorbance spectra of BCPC-OH (a) and BCIC-OH (b)

2.1.2 荧光光谱 先前的报道表明^[9], BCIC-OH 在甲醇溶液中显示的最大激发波长为 333 nm, 发射波长为 365 nm。本研究中, BCPC-OH 则显示 2 个最大激发波长为 279 nm 和 300 nm, 279 nm 处的激发强度约为 300 nm 处的 1.32 倍; 2 个最大发射波长为 365 和 380 nm, 380 nm 处的发射强度约为 365 nm 处的 1.21 倍。因此实验中选择激发和发射波长为 λ_{ex} 279 / λ_{em} 380 nm。此外, 在相同实验条件下, 对 BCPC-Cl, BCIC-Cl 和 FMOC-Cl^[2] 对胺类化合物的灵敏度进行了对比研究, 结果表明, BCPC-Cl 对胺类化合物表现出更强的荧光。 $I_{BCPC-Cl} / I_{BCIC-Cl} = 1.54 \sim 2.42$; $I_{BCPC-Cl} / I_{FMOC} = 1.30 \sim 2.87$ (I : 相同条件下的相对荧光强度)。

2.2 衍生条件优化

BCPC-Cl 对脂肪胺衍生化反应的衍生产率随衍生反应的时间、衍生试剂用量的不同而有明显差异, 以丙胺、己胺、壬胺、十二胺为例, 对上述 2 个因素进行了优化。结果表明: 在其他因素一定的情况下, 衍生试剂用量为样品总量的 3 倍, 衍生时间为 3 min 时, 可获得稳定的荧光响应 (试剂用量及时间对衍生产率影响见图 3)。

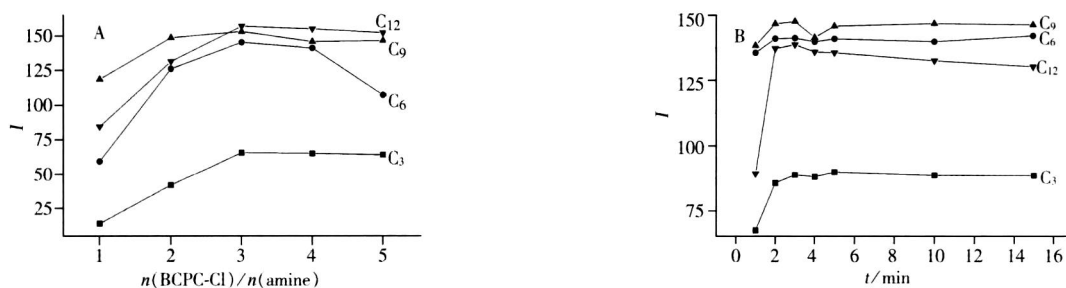


图 3 衍生试剂用量 (A) 和衍生时间 (B) 对脂肪胺衍生产率的影响

Fig. 3 Effects of derivatization reagent dosage (A) and time (B) on the derivatization yield of aliphatic amines C₃: propylamine (丙胺); C₆: hexylamine (己胺); C₉: nonylamine (壬胺); C₁₂: dodecylamine (十二胺)

2.3 标准品的色谱分离及质谱鉴定

用乙腈 - 水作流动相, 采用梯度洗脱在 40 min 内实现了 12 种 ($C_1 \sim C_{12}$) 直链脂肪胺衍生物的完全基线分离, 荧光检测结果见图 4。采用 APC 正离子模式进行质谱定性, 以壬胺为例的裂解模式见图 5, 并且此裂解模式有很强的规律性, 各组分裂解所得质谱数据见表 1。

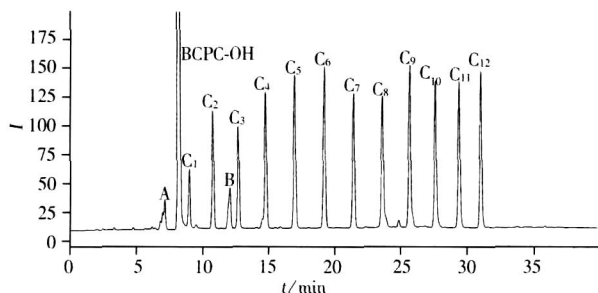


图 4 标准脂肪胺衍生物的荧光检测色谱图 (进样量为 20 pmol)

Fig. 4 Chromatogram for standard aliphatic amines derivatives with fluorescence detection (sampling amount is 20 pmol)

C_1 . methylamine; C_2 . ethylamine; C_3 . propylamine; C_4 . butylamine;
 C_5 . pentylamine; C_6 . hexylamine; C_7 . heptylamine; C_8 . octylamine;
 C_9 . nonylamine; C_{10} . decylamine; C_{11} . undecylamine; C_{12} . dodecylamine;

A. unidentified; B. allylamine; chromatographic conditions as described in experimental section

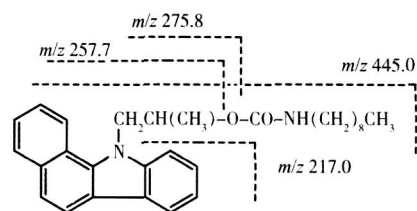


图 5 壬胺衍生物质谱归属

Fig. 5 Assignment of mass spectrum of nonylamine derivative

表 1 脂肪胺衍生物的质谱数据

Table 1 Mass spectrum data of aliphatic amine derivatives

Aliphatic amine derivative	$[M + H]^+ m/z (I_R^*)$	MS/MS data m/z	Aliphatic amine derivative	$[M + H]^+ m/z (I_R^*)$	MS/MS data m/z
C_1	333.1 (1)	257.8, 217.9	C_7	417.1 (0.94)	275.5, 257.8, 217.9
C_2	347.1 (0.56)	257.8, 217.9	C_8	431.1 (1.71)	257.8, 217.9
C_3	361.3 (0.68)	257.8, 217.9	C_9	445.0 (3.11)	275.8, 257.7, 217.0
C_4	375.3 (0.79)	257.9, 216.7	C_{10}	459.0 (3.04)	275.5, 257.8
C_5	389.2 (0.79)	257.8, 216.7	C_{11}	473.0 (3.72)	275.7, 257.8, 216.6
C_6	403.1 (1.16)	258.1, 216.8	C_{12}	487.1 (5.02)	275.8, 257.8, 217.9

* take MS intensity of methylamine derivative as standard (以甲胺衍生物质谱强度为标准)

2.4 线性回归方程及检出限

进样量在 50 fmol ~ 50 pmol 范围内, 依据峰面积和实际进样量进行线性回归。各脂肪胺衍生物的线性相关系数均在 0.999 4 以上, 检出限为 2.73 ~ 23.16 fmol (按 $S/N = 3$ 计算)。

2.5 重复性实验

在相同洗脱条件下, 对 50 pmol 脂肪胺衍生物平行分析 6 次, 保留时间的相对标准偏差小于 0.109%, 峰面积的相对标准偏差小于 2.671%。

2.6 实际样品的色谱分离

2.6.1 虾酱中脂肪胺的提取 称取某品牌虾酱 2 g (曲阜师范大学某超市), 用 25 mL 80% (体积分数) 乙腈 - 水分 3 次超声振荡提取, 合并提取液过滤, 滤液加 1.5 mL 盐酸, 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, 用 10 mL 80% (体积分数) 乙腈 - 水溶液溶解冷藏备用。

2.6.2 虾酱中脂肪胺的测定 按前述实验条件, 对虾酱提取液进行了色谱分析, 色谱分离图见图 6, 脂肪胺含量的测定结果见表 2。

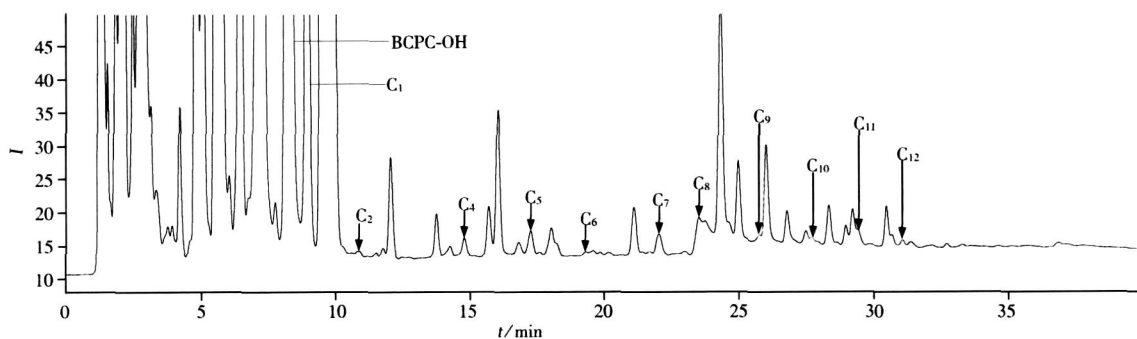


图 6 虾酱样品的游离脂肪胺色谱分离图

Fig. 6 Chromatogram of free aliphatic amines from shrimp catsup sample chromatographic condition and peaks as in Fig. 4

2.6.3 回收率实验 在虾酱样品中加入一定量脂肪胺标准品后,按照上述提取方法提取后进行衍生,所得回收率结果见表 2。

表 2 虾酱样品中脂肪胺的含量及回收率

Table 2 Content of aliphatic amines from shrimp catsup sample and recoveries

Aliphatic amine derivatives	Sample $w / (\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	Recovery $R / \%$	Aliphatic amine derivatives	Sample $w / (\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	Recovery $R / \%$
C ₁	5.173 0	101	C ₇	0.003 4	100
C ₂	0.121 2	103	C ₈	0.045 8	102
C ₃	- *	99	C ₉	0.013 6	101
C ₄	0.086 5	101	C ₁₀	0.008 0	102
C ₅	0.148 2	104	C ₁₁	0.050 1	102
C ₆	0.004 2	102	C ₁₂	0.004 4	99

* no detected

参考文献:

- [1] AHNOFF M, GRUNDEV IK I, ARFW DSSON A, et al Derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofuran for liquid chromatographic determination of hydroxyproline in collagen hydrolysate[J]. Anal Chem, 1981, 53(3): 485 - 489.
- [2] ENARSSON S, FOLESTAD S, JOSEFSSON B, et al High-resolution reversed-phase liquid chromatography system for the analysis of complex solution of primary and secondary amino acids[J]. Anal Chem, 1986, 58(8): 1638 - 1643.
- [3] COHEN S A, MCHAUD D P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1993, 211(2): 279 - 287.
- [4] LU Hongji Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. J Chromatogr. A, 1994, 670: 59 - 66.
- [5] YOU Jimao, SHAN Yichu, ZHEN Liang, et al Determination of peptides and amino acids from wool and beer with sensitive fluorescent reagent 9-(2-carbazole)-ethyl chloroformate by reverse phase high performance liquid and liquid chromatography mass spectrometry[J]. Anal Biochem, 2003, 313(1): 17 - 27.
- [6] YOU Jimao, ZHANG Weibing, JIA Xianglan, et al An improved derivatization method for the sensitive determination of fatty acids by high-performance liquid chromatography using 9-(2-hydroxyethyl)-carbazole as derivatization agent with fluorescence detection[J]. Chromatographia, 2001, 54: 316 - 322.
- [7] YOU Jimao, ZHANG Weibing, ZHANG Yukui Simple derivatization method for sensitive determination of fatty acids with fluorescence detection by high-performance chromatography using 9-(2-hydroxyethyl) carbazole derivatization reagent [J]. Anal Chim Acta, 2001, 436: 163 - 172.
- [8] YOU Jimao, SHI Yunwei, MENG Yongfei, et al Development of a sensitive reagent, 1, 2-benzo-3, 4-dihydrocarbazole-9-ethyl-p-toluenesulfonate, for determination of bile acids in serum by HPLC with fluorescence detection, and identification by mass spectrometry with an APCI source[J]. Chromatographia, 2004, 60: 527 - 535.
- [9] YOU Jimao, CHEN Xiangning, ZHAO Xianen, et al Pre-column derivatization of amines with 1, 2-benzo-3, 4-dihydrocarbazole-9-isopropyl chloroformate followed by LC-fluorescence and LC-APC/MS[J]. Chromatographia, 2006, 63: 337 - 343.
- [10] 陈国防, 张维冰, 尤进茂, 等. 氯甲酸 2-(9-咔唑)乙基酯柱前衍生化 HPLC法用于环境水中脂肪胺测定 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(1): 28 - 31.

(下转第 950 页)

由表 1 和图 3 都可以表明 MIP 中的印迹孔穴能选择性地识别 CAP 上的功能基团, 对 CAP 有较好的特异性吸附。

2.3 MIP 的应用

向“1.5”中吹干后的离心管中加入 200 μL 流动相混匀, 取 100 μL 注入高效液相色谱仪测定, 结果见表 2。由表中结果可知, MIP 作为 SPE 柱填料对 CAP 的吸附率高于 94.7%, 重复性好, 相对标准偏差为 3.6%。而 NIP 对 CAP 的吸附率为 43.5%。

且 CAP-MIP 的最大吸附量是 4 670 $\mu\text{g/g}$, 因此, 该 MIP 可以作为 SPE 柱的填料, 用于样品 CAP 残留的选择性分离富集。

参考文献:

- [1] 颜流水, 黄智敏, 蒲守智, 等. 氯霉素分子印迹聚合物的制备研究 [J]. 南昌航空工业学院学报: 自然科学版, 2005, 19(1): 1 - 5.
- [2] 吴晓丰, 杨鹭花. 氯霉素残留的危害及其检测方法 [J]. 动物医学进展, 2004, 25(3): 41 - 43.
- [3] 岳振峰, 陈小霞, 郑卫平, 等. 高效液相色谱 - 电喷雾三级四极杆质谱测定鸡肉组织中氯霉素残留的研究 [J]. 分析测试学报, 2005, 24(1): 80 - 82.
- [4] 蔡亚岐, 牟世芬. 分子印迹固相萃取及其应用 [J]. 分析测试学报, 2005, 24(5): 116 - 121.
- [5] SHI Xizhi, WU Aibo, ZHENG Sulian, et al. Molecularly imprinted polymer micro-spheres for solid-phase extraction of chloramphenicol residues in foods [J]. J Chromatogr. B, 2007, 850(1/2): 24 - 30.
- [6] 姜忠义, 喻应霞, 吴洪. 分子印迹聚合物的制备及其应用 [J]. 膜科学与技术, 2006, 26(1): 78 - 84.

(上接第 946 页)

- [11] 户宝军, 孙志伟, 尤进茂. 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙酸用于脂肪胺的高效液相色谱分离及质谱鉴定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(8): 待发表.
- [12] NDJOKO K, WOLFENDER J L, HOSTETTMANN K. Determination of trace amounts of ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* L. leaf extracts and phytopharmaceuticals by liquid chromatography - electrospray mass spectrometry [J]. J Chromatogr. B, 2000, 744: 249 - 255.
- [13] CHO I S W, DOLN IKOWSKI G G, FR ISOS, et al. A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2002, 74: 4526 - 4531.
- [14] YOU Jinmao, M NG Yongfei, SHI Yunwei, et al. Development of a sensitive fluorescent derivatization reagent 1, 2-benzo-3, 4-dihydrocarbazole-9-ethyl chloroformate (BCEOC) and its application for determination of amino acids from seeds and bryophyte plants using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and identification with electrospray ionization mass spectrometry [J]. Talanta, 2005, 68: 448 - 458.
- [15] OL MEIRA M M, SALVADOR M A, COELHO P J, et al. New benzopyranocarbazoles: synthesis and photochromic behaviour [J]. Tetrahedron, 2005, 61(7): 1681 - 1691.