

2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙基氯甲酸酯柱前 衍生化用于氨基酸的高效液相色谱分析

赵文臣^{2,3} 刘凌君² 赵先恩¹ 丁晨旭¹ 索有瑞¹ 尤进茂^{*1,2}

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 (鲁南制药集团股份有限公司, 临沂 276005)

摘要 利用新型荧光试剂 2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl) 作为柱前衍生化试剂, 在 Hypersil BDS C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 反相色谱柱上, 采用梯度洗脱对 20 种氨基酸衍生物进行了分离检测。在乙腈与 Na₂B₄O₇ 缓冲液中, 室温下 BCEC-Cl 与氨基酸反应 5 min 可实现完全衍生。检测的激发和发射波长分别为 λ_{ex} = 279 nm, λ_{em} = 380 nm。采用柱后质谱电喷雾离子源 (ESI source) 正离子模式, 实现了水解牛血清白蛋白中氨基酸和油菜蜂花粉中氨基酸的定性定量检测。荧光定性检测的线性回归系数均大于 0.9990, 检出限为 1.49 ~ 19.74 fmol (S/N = 3)。

关键词 高效液相色谱 质谱, 荧光检测, 柱前衍生, 氨基酸, 蜂花粉

1 引言

氨基酸是生命有机体的重要组成部分, 但多数氨基酸在紫外-可见光区缺乏吸收, 光度法难以准确测定。为了提高检测灵敏度, 荧光衍生是常用的方法, 广泛应用的衍生试剂主要有邻苯二甲酰 (OPA)^[1~4]、4-氟-7-硝基苯并-1, 2, 3-恶二唑 (NBD-Cl)^[5]、芴甲氧羰基氯 (FMOC)^[6,7] 和 6-氨基喹啉基-N-琥珀酰亚胺碳酸酯 (AQC)^[8,9], 但它们在实际应用中都存在某些缺点, 如 OPA 灵敏度太低, 且只能测定伯胺类化合物; NBD-Cl 衍生产物不稳定, 室温放置 25 min 约有 25% 分解; FMOC 质谱灵敏度太差; AQC 在水中的荧光量子效率很低, 不利于梯度洗脱。本研究在对咪唑-9-乙基氯甲酸酯 (CEOC)^[10] 和 1, 2-苯并-3, 4-二氢咪唑-9-乙基氯甲酸酯 (BCEOC)^[11] 改进的基础上, 合成了新型高灵敏度荧光试剂 2-(11H-苯 [a] 咪唑) 乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl), 并以此作为柱前衍生化试剂, 30 ~ 40 °C 下在乙腈溶剂中以 Na₂B₄O₇ 缓冲溶液作催化剂, 5 min 即可衍生完全。衍生物稳定性好, 衍生产率高, 衍生溶液不必预处理可直接进样分析。在乙腈-水作流动相的条件下, 采用梯度洗脱实现了氨基酸衍生物的完全基线分离。采用电喷雾离子源 (ESI source) 正离子模式进行柱后在线质谱定性, 实现了水解牛血清白蛋白中氨基酸以及油菜蜂花粉中氨基酸的快速、准确分析。

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 (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, 电喷雾离子源 (ESI Source)。

2-(11H 苯 [a] 咪唑) 乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl) (自制); 氨基酸标准样品 (Sigma 公司); 乙腈 (色谱级, 禹王实业集团化学试剂厂); 乙腈 (光谱级, 德国 Merck 公司)。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 准确称取适量氨基酸标准品, 加入少量 6 mol/L HCl 溶解后用 6 mol/L NaOH 溶液调至中性, 然后用 0.1 mol/L Na₂B₄O₇ 缓冲溶液 (pH 9.0) 定容配成 1.0 × 10⁻² mol/L 的溶液, 相应低浓度氨基酸标准液 (1.0 × 10⁻⁴ mol/L) 以 Na₂B₄O₇ 缓冲液稀释而成。称取 16.2 mg 2-(11H 苯 [a] 咪

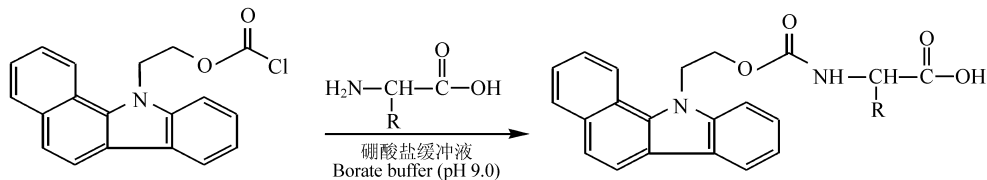
2007-11-23 收稿; 2008-03-21 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20075016) 资助项目

* E-mail: jnyou6304@163.com

唑)乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl),用光谱纯乙腈溶解并定容至 10 mL,其浓度为 5.0×10^{-3} mol/L。

2.2.2 标准品的衍生 向 2 mL 安培瓶中依次加入 100 μ L 乙腈、100 μ L 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液 (pH = 8.5)、50 μ L 混合氨基酸、40 μ L 衍生试剂溶液,于 30~40 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应 5 min,加入 20 μ L 50% 的乙酸溶液调至弱酸性后,稀释 1 倍,即可进样分析。衍生反应概况如下图。



2.2.3 色谱及质谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 色谱柱 (200 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 大连伊立特公司)。流动相 A: 30% 乙腈水溶液 (含 35 mmol/L 甲酸胺,用甲酸调至 pH = 3.7); 流动相 B: 50% 的乙腈 (含 30 mmol/L 甲酸胺, pH 3.75); 流动相 C: 95% 乙腈。流速 1.0 mL/min,进样量为 10 μ L,柱温 30 $^\circ\text{C}$ 。荧光激发和发射波长分别为: 279 和 380 nm。梯度洗脱程序见表 1。

电喷雾离子源正离子模式,干燥气流量为 9 L/min,干燥气温度 350 $^\circ\text{C}$,喷雾压力 0.241 MPa,毛细管电压 3500 V^[12,13]。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)	时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)	时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	55	45	0	37	0	80	20	55	0	0	100
15	45	55	0	40	0	50	50	60	0	0	100
17	28	72	0	42	0	50	50				
27	0	100	0	50	0	40	60				

2.2.4 2-(11H 苯 [a] 唑)乙基氯甲酸酯 (BCEC-Cl) 的制备 制备方法见文献 [14]。

2.2.5 BCEC-Cl 与 BCEOC 光谱性质的对比 (1) 紫外对比 BCEC-Cl 是在 BCEOC-1^[10] 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 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 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) 和 305 nm (2.60×10^4)。BCEOC-OH 在紫外区显示 4 个主要的吸收带,其最大吸收波长和摩尔吸光系数 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 分别为: 215 nm (2.0×10^4), 217 nm (1.95×10^4), 249 nm (1.95×10^4) 和 321 nm (2.0×10^4)。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。(2) 荧光对比 BCEOC-OH 在甲醇中显示的最大激发波长为 333 nm^[10],发射最大为 365 nm。本研究中, BCEC-OH 则显示两个最大激发波长为 279 和 300 nm,两个最大发射波长为 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为 $\lambda_{\text{ex}} 279 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 380 \text{ nm}$ 。此外,在相同实验条件下,对 BCEC-Cl 和 BCEOC-Cl 对胺类化合物的灵敏度进行了对比研究,结果表明,二者对 20 种氨基酸类衍生物的荧光检测响应存在明显差异,对比结果见表 3。数据表明, BCEC-Cl 对氨基酸类化合物表现出更强的荧光。 $k_{\text{BCEC-Cl}} / k_{\text{BCEOC-Cl}} = 1.46 \sim 2.95$ (k : 相同条件下的相对荧光强度)。

3 结果讨论

3.1 衍生反应条件的优化

考察了 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液的 pH 值、衍生化反应时间及衍生试剂用量对衍生化反应的影响: 当 pH 值小于 7.0 时,衍生化反应几乎不进行;随着 pH 值的增大衍生产率逐渐上升;当 pH 值为 8.5 时衍生产率达到最大;再增大 pH 衍生产率就会因衍生产物的水解而降低,并且在 pH 值为 8.5 时,组氨酸全生成二取代产物,其余条件下有一取代产物的生成,酪氨酸虽有一取代产物生成,但可对一取代及二取代峰

分别作标准曲线,求其线性方程,最后加和即可求出其准确含量,因此实验中 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液的 pH 值为 8.5 (由 pH 9.0 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲液加 6 mmol/L HCl 调制而成)。

实验证明衍生化反应在 5 min 内就可以完成。延长衍生化时间,衍生物的荧光响应未见增强。衍生试剂过量 2.5~4 倍时,可以达到完全衍生化,进一步增加试剂的用量,衍生物的荧光强度并没有相应的增大。为了防止氨基酸衍生物(特别是组氨酸)的水解,通常在衍生化反应之后,向溶液中加入 20 μL 50% 乙酸,把衍生溶液的 pH 值调节到 5.0~7.0。

3.2 色谱分离条件的优化

实验通过调整洗脱梯度及流动相 A 的 pH 值来选择最优化的分离条件:用甲酸铵控制流动相 A 和 B 的 pH 值,并在 Hypersil BDS C_{18} 色谱柱上进行了流动相 A 的 pH 值对分离度影响的考察,结果表明,当 pH 值为 3.7 时,较难分离的 Asp 和 Ser 实现了近基线分离,其它氨基酸衍生物均获得了令人满意的分离度。当流动相 A 的 pH 值小于 3.5 或大于 3.8 时,Asp 和 Ser, BDC-OH 和 Met, Ile 和 Leu 出现共洗脱。由于 His, Om, Lys 和 Tyr 4 种氨基酸衍生物具有较高的疏水性,它们的保留时间没有明显的变化。

3.3 标准品的色谱分离及质谱鉴定

按照标准品的衍生过程进行衍生后,在 Hypersil BDS C_{18} 色谱柱上乙腈/水溶液作流动相,采用梯度洗脱在 60 min 内实现了 20 种氨基酸衍生物的完全分离,结果见图 1。

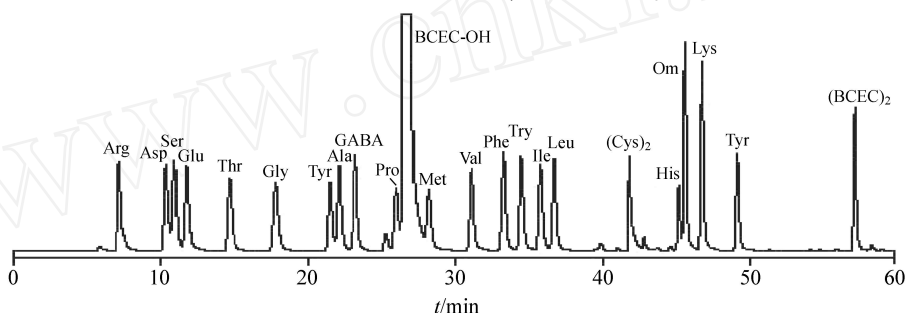


图 1 氨基酸标准品的色谱分离图

Fig 1 Chromatogram for 50 pmol of amino acid standards derivatized with BCEC-Cl

Arg 精氨酸 (arginine); Asp 天冬酸 (aspartic); Ser 丝氨酸 (serine); Glu 谷氨酸 (glutamic acid); Thr 苏氨酸 (threonine); Gly 甘氨酸 (glycine); Ala 丙氨酸 (alanine); GABA 四氨基丁酸 (4-aminobutyric acid); Pro 脯氨酸 (proline); Met 蛋氨酸 (methionine); Val 缬氨酸 (valine); Phe 苯丙氨酸 (L-phenylalanine); Try 色氨酸 (tryptophan); Ile 异亮氨酸 (isoleucine); Leu 亮氨酸 (nor-leucine); (Cys)₂ 胱氨酸 (cystine); His 组氨酸 (histidine); Om 鸟氨酸 (ornithine); Lys 赖氨酸 (lysine); Tyr 酪氨酸 (tyrosine); BCEC-OH (2-(11H-苯[a]吡唑)乙醇 2-(11H-benzotriazol-11-yl)ethanol); (BCEC)₂ 二-(2-(11H-苯[a]吡唑)乙基碳酸酯 (bis-(2-(11H-benzotriazol-11-yl)ethyl) chloroformate)。

采用电喷雾离子源 (ESI Source) 进行在线的柱后质谱定性分析,各组分离质谱数据见表 2,以胱氨酸为例的定性质谱见图 2。

3.4 线性回归方程、检出限和重现性实验

进样量在 100 pmol~50 fmol 范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得线性回归方程、线性相关系数和各种氨基酸衍生物检出限见表 2。各氨基酸衍生物的线性相关系数均在 0.9993 以上,各氨基酸衍生物的检出限 (按照 $S/N=3.1$ 计算) 在 1.49~19.74 fmol 之间。

在相同洗脱条件下,对 50 pmol 氨基酸衍生物进行 6 次平行分析,保留时间的相对标准偏差小于 0.05%;峰面积的相对标准偏差小于 1.6%,结果见表 2。

3.5 实际样品分析

3.5.1 牛血清白蛋白的水解 称取牛血清白蛋白 4.1 mg 于 2 mL 安培瓶中,加入 1 mL 6 mol/L HCl,保温 110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 24 h,氮气吹干后用 1 mL pH=9.0 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液溶解,相应浓度为 4.1 g/L,低浓度的水解溶液 (0.01 g/L) 用 pH=9.0 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液稀释而成。

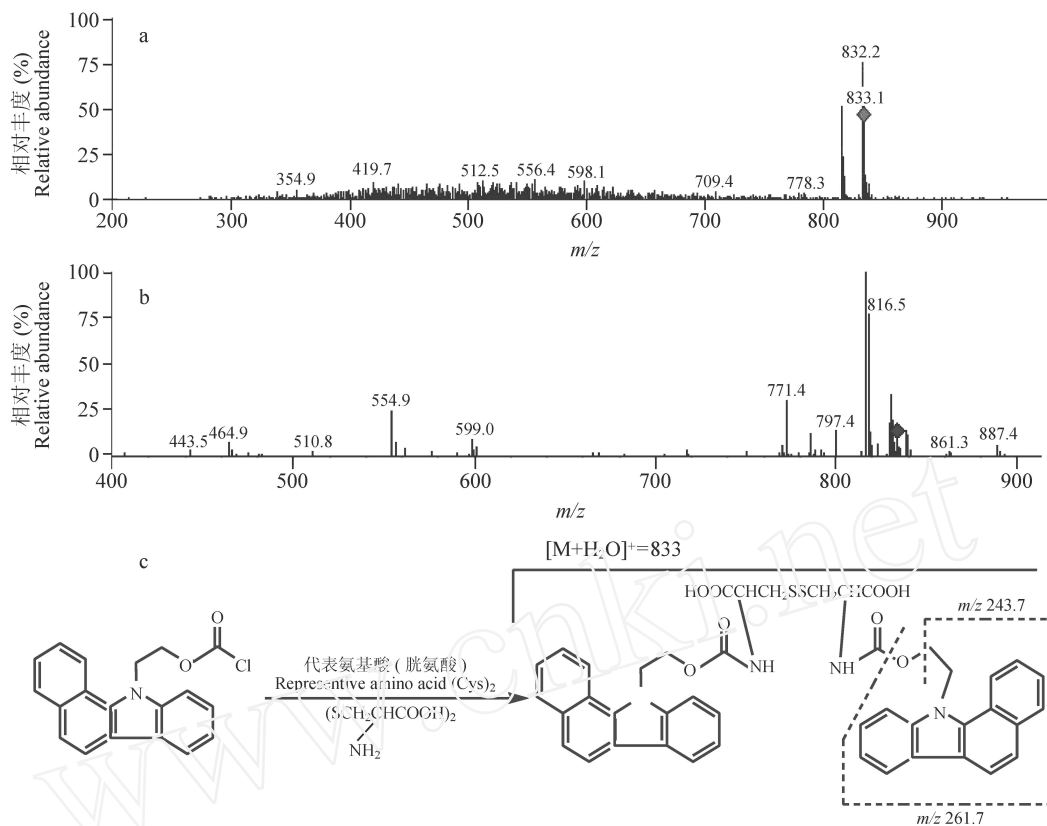


图 2 胱氨酸的一级 (a)、二级 (b) 质谱图及质谱裂解机理解析 (c)

Fig 2 MS spectrum (a), MS/MS spectrum (b), and mass cleavage mode (c) for representative cystine derivatives

表 2 氨基酸衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限、质谱数据及重现性 ($n = 6$)

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits, MS data and reproducibility for retention time and peak area ($n = 6$) of amino acid derivatives

氨基酸 Amino acid	线性回归方程 Linear equation	相关系数 R	检出限 Detection limits (fmol)	质谱 MS $[M + H]^+$	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 (%)
Arg	$Y = 67.73X + 27.35$	0.9999	15.0	462.4	0.008	1.22
Asp	$Y = 61.36X + 31.57$	0.9997	7.21	420.1	0.014	1.25
Ser	$Y = 67.24X + 42.21$	0.9996	5.95	393.4	0.012	1.18
Glu	$Y = 70.10X + 25.15$	0.9997	7.35	435.2	0.014	1.34
Thr	$Y = 61.07X + 36.84$	0.9996	8.33	407.2	0.005	1.12
Gly	$Y = 67.45X + 28.42$	0.9998	6.57	363.2	0.006	1.23
Tyr	$Y = 50.16X + 29.43$	0.9997	6.69	469.1	0.008	1.15
Ala	$Y = 66.61X + 35.20$	0.9998	6.29	377.1	0.006	1.31
GABA	$Y = 73.70X + 35.34$	0.9998	1.49	391.1	0.006	1.26
Pro	$Y = 48.90X + 30.91$	0.9996	7.35	403.1	0.005	1.04
Met	$Y = 59.55X - 13.72$	0.9996	15.0	437.1	0.008	1.44
Val	$Y = 66.04X + 37.28$	0.9996	6.05	405.0	0.007	1.12
Try	$Y = 71.32X + 46.02$	0.9995	7.21	492.1	0.005	0.84
Phe	$Y = 69.29X + 61.93$	0.999	42.68	453.1	0.008	0.95
Ile	$Y = 66.89X + 45.51$	0.9994	4.03	419.0	0.006	1.38
Leu	$Y = 67.83X + 42.51$	0.9994	3.83	419.0	0.007	1.04
(Cys) ₂	$Y = 57.52X + 30.74$	0.9998	19.74	833.0	0.042	1.29
His	$Y = 31.98X + 16.10$	0.9998	11.7	730.3	0.019	1.55
Om	$Y = 108.41X + 58.52$	0.9997	1.87	724.2	0.012	1.33
Lys	$Y = 105.24X + 45.11$	0.9998	1.56	738.4	0.008	1.44
Tyr	$Y = 58.71X + 33.59$	0.9996	2.34	774.1	0.007	1.46

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

3.5.2 水解牛血清白蛋白中氨基酸的色谱分析 按照前述实验条件,水解牛血清白蛋白样品的色谱分

析见图 3, 各种氨基酸含量的测定结果 (见表 3) 与文献 [15] 报道接近。

3.5.3 油菜蜂花粉的水解分析 称取油菜蜂花粉 50 mg 于 2 mL 安培瓶中, 加入 1 mL 6 mol/L HCl, 保温 110 °C 水解 24 h, 氮气吹干后用 2 mL pH = 9.0 的 Na₂B₄O₇ 缓冲溶液溶解、过滤, 并用 2 mL Na₂B₄O₇ 缓冲溶液分批洗涤滤渣, 相应浓度为 12.5 g/L, 衍生过程为 150 μL 缓冲液, 50 μL 乙腈, 10 μL 提取液, 90 μL 试剂 (5 × 10⁻³ mol/L), 40 °C 下衍生 5 min, 加 20 μL 50% 乙酸水溶液, 再加入 680 μL 80% 乙腈水溶液稀释, 进样 10 μL 分析。水解新疆油菜蜂花粉和青海油菜蜂花粉中氨基酸的分析结果见表 4。

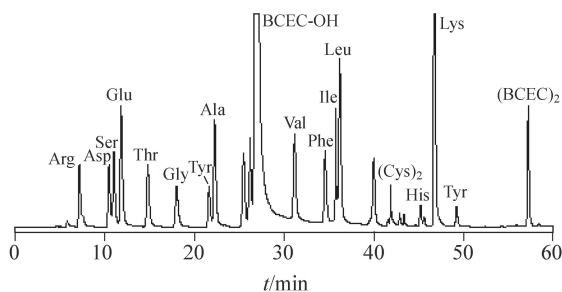


图 3 水解牛血清白蛋白中氨基酸的色谱分析图
Fig 3 Chromatogram of amino acids from hydrolyzed bovine serum albumin

表 3 BCEC-C1 与 BCEOC 衍生物荧光强度的对比、水解牛血清白蛋白中氨基酸含量及回收率
Table 3 Comparison of fluorescence intensity of BCEC-C1 and BCEOC derivatives, and amino acids content and recovery of bovine serum albumin

氨基酸 Amino acids	荧光强度对比 Ratio of fluorescence intensity of BCEC-C1/BCEOC derivatives	回收率 Recoveries (%)	牛血清白蛋白中氨基酸含量 Content of amino acids from bovine serum albumin			
			文献值 Literature values [14]		计算值 Calculated	
			氨基酸含量 Content of amino acids (g/g)	残基 Residues (mol)	氨基酸含量 Content of amino acids (g/g)	残基 Residues (mol)
Arg	1.97	105	0.0644	23	0.0693	24.75
Asp	2.05	102	0.0960	54	0.1012	56.93
Ser	2.07	94	0.0563	28	0.0543	27.00
Glu	2.09	98	0.0234	79	0.0245	82.70
Thr	2.13	96	0.0720	34	0.0710	33.52
Gly	2.10	104	0.0270	16	0.0278	16.47
Ala	3.02	110	0.0789	46	0.0800	46.64
GABA	1.72	106	0	0	0	0
Pro	1.46	105	0.0700	28	0.0698	27.92
Met	1.86	102	0	4	0	0
Val	1.93	96	0.0698	36	0.072343	7.29
Tyr	1.50	98	0.0089	0	0	0
Phe	2.00	96	0.0961	27	0.11233	1.55
Ile	2.47	102	0.0300	14	0.0371	17.30
Leu	2.00	106	0.1745	61	0.1783	62.36
(Cys) ₂	1.92	98	0.0310	0	0.03188	9.63
His	2.54	96	0.1453	17	0.1425	16.67
Om	1.79	92	0	0	0	0
Lys	1.83	97	0.1844	59	0.1952	62.46
Tyr	2.95	96	0.0979	19	0.0996	19.32

表 4 水解新疆和青海油菜蜂花粉中氨基酸含量 (g/g)
Table 4 Contents of amino acids from hydrolyzed Xinjiang bee pollen and Qinghai bee pollen (g/g)

氨基酸 Amino acid	新疆油菜蜂花粉 Xinjiang bee pollen	青海油菜蜂花粉 Qinghai bee pollen	氨基酸 Amino acid	新疆油菜蜂花粉 Xinjiang bee pollen	青海油菜蜂花粉 Qinghai bee pollen
Arg	0.00727	0.00645	Val	0.00640	0.00907
Asp	0.01060	0.01410	Tyr	0.00000	0.00000
Ser	0.00826	0.00797	Phe	0.00489	0.00525
Glu	0.00950	0.01185	Ile	0.00496	0.00502
Thr	0.00583	0.00682	Leu	0.00928	0.00986
Gly	0.00628	0.00646	(Cys) ₂	0.00000	0.00056
Ala	0.00655	0.00714	His	0.00299	0.00389
GABA	0.00034	0.00016	Om	0.00000	0.00000
Pro	0.01142	0.01217	Lys	0.00985	0.01036
Met	0.00000	0.00045	Tyr	0.00386	0.00427

与 BCEOC 的对比说明, BCEC-Cl 试剂对氨基酸的测定具有更高的灵敏度。此方法能够准确定量且具有线性范围宽、重现性好的优点。对水解牛血清白蛋白样品测定结果与文献报道基本相符^[15]。并且准确测定新疆和青海油菜蜂花粉氨基酸含量, 本方法可以部分替代氨基酸专用分析仪器。

References

- 1 Nojiri S, Kamata K, Nishijima M. *J. Pharmaceut Biomed*, **1998**, 16: 1357 ~ 1362
- 2 Tseng S H, Chang P C, Chou S S. *J. Food Drug Anal*, **1999**, 7(3): 225 ~ 232
- 3 Song Zhi-Feng (宋志峰), Wang Li (王 丽), Ji Feng (纪 锋), Huang Huang (黄 璜), Yu Zhi-Jing (于志晶). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2007**, 35(1): 25 ~ 30
- 4 Dobashi Y, Santa T, Nakagomi K, Inai K. *Analyst*, **2002**, 127: 54 ~ 59
- 5 Ahnoff M, Grundevik I, Arfvidsson A. *Anal Chem.*, **1981**, 53: 485 ~ 489
- 6 Einarsson S, Josefsson B, Lagerkvist S. *J. Chromatogr A*, **1983**, 282: 609 ~ 673
- 7 Einarsson S, Folestad S, Josefsson B. *Anal Chem.*, **1986**, 58: 1638 ~ 1642
- 8 Cohen S A, Michaud D P. *Anal Biochem.*, **1993**, 211: 279 ~ 287
- 9 Liu H, Sanuda-Pena M C, Harvey-White J D, Kalra S, Cohen S A. *J. Chromatogr A*, **1998**, 828: 383 ~ 395
- 10 You J, Shan Y, Zhen L. *Anal Biochem.*, **2003**, 313(1): 17 ~ 27
- 11 You J M, Ming Y F, Shi Y W, Zhao X E. *Talanta*, **2005**, 68: 448 ~ 458
- 12 Ndjoko K, Wolfender J L, Hostettmann K. *J. Chromatogr B*, **2000**, 744: 249 ~ 255
- 13 Friso S, Choi S W, Dolnikowski G G, Selhub J. *Anal Chem.*, **2002**, 74: 4526 ~ 4531
- 14 Zhao Wen-Chen (赵文臣), Liu Ling-Jun (刘凌君), Zhu Fang (朱 芳), Zhao Xian-En (赵先恩), Liu Su-Juan (刘素娟), Suo You-Rui (索有瑞), You Jin-Mao (尤进茂). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2007**, 35(9): 1251 ~ 1256
- 15 Steven A C, Dennis P M. *Anal Biochem.*, **1993**, 211: 279 ~ 287

Application of 2-(11H-benzo[a] carbazol-11-yl) Ethyl Carbonochloridate as a Pro-column Derivatization Reagent of Amino Acid by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

ZHAO Wen-Chen^{2,3}, LU Ling-Jun², ZHAO Xian-En¹, DING Chen-Xu¹, SUO You-Rui¹, YOU Jin-Mao^{1,2}

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

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

³ (Lu Nan Pharmacy Group Joint-stock Ltd, Linyi 276005)

Abstract On a reversed phase Hypersil BDS C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, 20 amino acids, which were derivatized using 2-(11H-benzo[a] carbazol-11-yl) ethyl carbonochloridate (BCEC-Cl) as pre-column derivatization reagent, were separated in conjunction with a gradient elution. Optimum derivatization was obtained by reacting of amino acids with BCEC-Cl at room temperature for 5 min in the presence of sodium borate catalyst in acetonitrile solvent. The fluorescence excitation and emission wavelengths were 279 nm and 380 nm respectively. The identification of amino acid derivatives from hydrolyzed bovine serum albumin and bee pollen was carried out by post-column mass spectrometry with electrospray ion source in positive ion mode. Linear correlation coefficients of the amino acid derivatives were >0.9990, and detection limits (at signal to noise of 3:1) were 1.49 - 19.74 fmol for the labeled amino acids.

Keywords High performance liquid chromatography/mass spectrometry, fluorescence detection, pre-column derivatization, amino acids, bee pollen

(Received 23 November 2007; accepted 21 March 2008)