

研究报告

2-(苯并吡啶酮)-乙基咪唑酸酯探针对
荧光和质谱的双增敏作用付艳艳¹ 李肖燕¹ 孙志伟^{2,3} 秦雪芹¹ 夏莲^{1,2,3}索有瑞² 李玉林² 尤进茂^{*1,2}¹(生命有机分析重点实验室,曲阜师范大学化学科学学院,曲阜 273165)²(中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810001) ³(中国科学院研究生院,北京 100049)

摘 要 采用 3 种不同衍生方法对胺类化合物进行标记,比较衍生效率的差别,给出最优方法:5-(2-羟乙基)-(苯并吡啶酮)与 *N,N*-羰基双咪唑(CDI)缩合形成的双敏感探针 2-(苯并吡啶酮)-乙基咪唑酸酯(BAEIC)与胺的衍生效率最高,产物稳定。BAEIC 在 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)溶剂中以 4-二甲氨基吡啶(DMAP)为催化剂,在 80 °C 条件下与胺反应生成的亲核取代物,不仅表现出强烈的荧光,同时具有很强的质谱离子化能力。估算了衍生物在乙腈和甲醇水溶液中百分离子化值 δ 在 5.62% ~ 58.08% 和 2.14% ~ 56.58% 范围内。本方法具有良好的重现性,激发和发射波长为 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/510$ nm,荧光检出限为 0.12 ~ 0.59 $\mu\text{g/L}$ (8.6 ~ 79 fmol);在线 APCI-MS 检出限为 1.9 ~ 14 $\mu\text{g/L}$ (544 ~ 825 fmol)。

关键词 液相色谱-质谱;脂肪胺;5-(2-羟乙基)-苯并吡啶酮;2-(苯并吡啶酮)-乙基咪唑酸酯

1 引言

质谱和荧光技术广泛应用于环境科学、毒物学及生命科学等领域中,用于确定诸多生物活性分子的含量及化学结构^[1~3]。环境中的胺多是由蛋白质、氨基酸等含氮类有机化合物经生物降解而成。大多数胺类化合物在亚硝化剂存在下可生成强致癌性的 *N*-亚硝基化合物^[4~8],因此,检测环境中的胺具有重要意义。目前,检测胺的方法主要有气相色谱法^[9]和离子交换法^[10]。尽管方法简便易行,但由于灵敏度低而受到限制。为提高检测灵敏度和改善选择性,采用柱前或柱后衍生化是一种行之有效的办法。但测定胺类化合物所用试剂较多^[11~14],如常用荧光试剂 FMOC-Cl 衍生化时,过量试剂易造成柱效降低。此外,试剂对脯氨酸和半胱氨酸衍生物表现出很弱的荧光,准确定量存在困难。

尽管多种胺类测定试剂^[15~18]具有很强的荧光灵敏度,然而它们在 APCI-MS 中的质谱离子化能力相对低,这对同时获得在线的高灵敏质谱鉴定十分不利。本研究制备了一种能同时满足荧光和质谱增敏的双敏感探针分子。结果表明 2-(苯并吡啶酮)-乙基咪唑酸酯(BAEIC)中间体与胺的亲核取代产物具有高荧光灵敏度及很强的质谱离子化能力。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 离子阱液相色谱-质谱联用仪,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(美国 Agilent 公司);大气压化学电离源(APCI Source);Delta 600 半制备色谱(美国 Waters 公司)。F-7000 荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司)。12 种脂肪胺标准品(美国 Sigma 公司);乙腈(色谱纯,禹王试剂公司);5-(2-羟乙基)-苯并吡啶酮(HBA,自制);2-(苯并吡啶酮)-乙基咪唑酸酯(BAEIC,自制);*N,N*-羰基双咪唑(CDI)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)等其它试剂均为分析纯。

2009-05-09 收稿;2009-08-14 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20075016)和中科院“百人计划”(No. 328)资助项目

* E-mail:jmyou6304@163.com

2.2 标准溶液配制

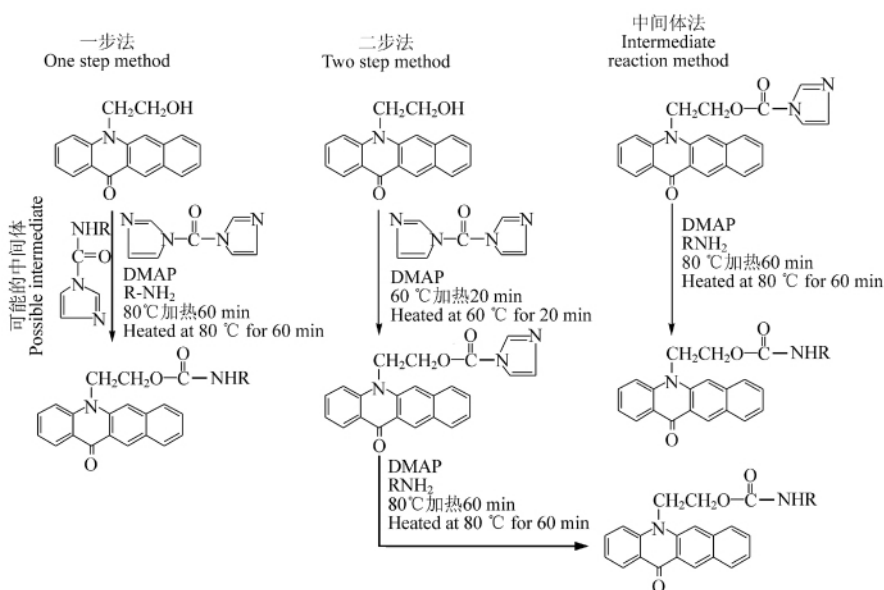
分别称取 12 种脂肪胺标品,用乙腈配成浓度为 0.1 mol/L 溶液,相应低浓度 12 种脂肪胺混合溶液 (2.0×10^{-3} mol/L) 用 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 稀释而成。称取 0.1156 g HBA 用 DMF 定容至 10 mL,浓度为 0.04 mol/L。称取 0.1532 g BAEIC 用 DMF 定容至 10 mL,浓度为 0.04 mol/L。称取 0.2 g DMAP 用 DMF 定容至 10 mL,浓度为 20 g/L。称取 0.1 g CDI 用 DMF 定容至 10 mL,浓度为 10 g/L。

2.3 色谱与质谱条件

Akasil- C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, 美国艾杰尔科技公司)。流动相 A:30 % 乙腈 (含 20 mmol/L $HCOONH_4$, pH 3.74); 流动相 B:100% 乙腈。梯度洗脱程序:0 ~ 30 min, 10 % ~ 100% B, 保持 10 min。流速为 1.0 mL/min, 进样量 10 μ L, 柱温 30 $^{\circ}C$ 。荧光激发和发射波长分别为 280 和 510 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 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 4000 nA (Pos)。

2.4 衍生方法

按 3 种方法进行衍生反应 (见图解 1): (1) 一步法 依次向安培瓶中加入 200 μ L HBA, 200 μ L DMAP, 350 μ L CDI 和 210 μ L 胺标准品, 密封后于 80 $^{\circ}C$ 水浴中振荡反应 60 min, 取 10 μ L, 加 190 μ L 乙腈稀释, 进样; (2) 两步法 依次向安培瓶中加入 200 μ L HBA, 200 μ L DMAP, 350 μ L CDI 溶液, 密封后于 60 $^{\circ}C$ 水浴中振荡反应 20 min, 使 HBA 与 CDI 作用形成中间体 BAEIC, 加入 210 μ L 12 种混合胺的标准溶液, 密封后于 80 $^{\circ}C$ 反应 60 min, 取 10 μ L, 加乙腈 190 μ L 稀释, 进样; (3) 中间体法 依次向安培瓶中加入 200 μ L BAEIC, 200 μ L DMAP, 350 μ L DMF, 210 μ L 12 种混合胺标品, 密封后于 80 $^{\circ}C$ 反应 60 min, 取 10 μ L, 加乙腈 190 μ L 稀释进样。



图解 1 衍生反应概况图

Scheme 1 Derivatization scheme of 3 methods

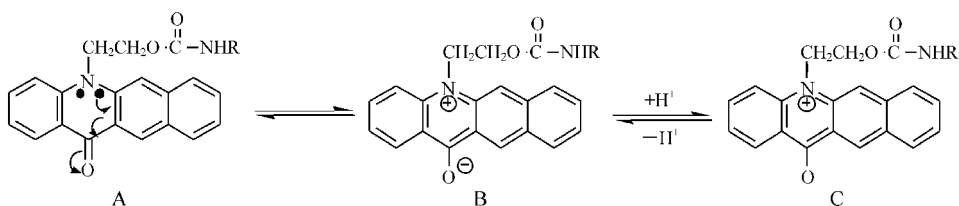
HBA: 5-(2-羟乙基)-苯并吡啶酮 (5-(2-Hydroxyethyl) benzoacridine); BAEIC: 2-(苯并吡啶酮)-乙基咪唑酸酯 (2-(Benzoacridin) ethyl-imidazole-1-carboxylate); DMAP: 4-二甲氨基吡啶 (4-Dimethyl-iminopyridine)

2.5 样品处理

取适量污水,用 HCl 调节至 pH 3.0,超声振荡 1 min,使水中的脂肪胺变为相应的有机盐,过滤,量取滤液 150 mL,旋干后,加 80% 乙腈 5 mL,用 0.1 mol/L NaOH 调至碱性后直接用于衍生化。

2.6 百分离子化估计

中间体 HBA 的母核属含 N、O 杂环的高共轭平面分子,由于 N 和羰基 O 原子处于特殊的对位结构,分子内的异构化转变相对容易 (见图解 2)。分子 A 中 N 原子的孤电子对首先通过异构化作用转移至



图解2 2-(苯并吡啶酮)-乙基咪唑酸酯衍生物在含乙腈水流动相中的异构化机理

Scheme 2 Isomerization mechanism of 2-(benzoacridin) ethyl-imidazole-1-carboxylate derivatives in aqueous acetonitrile

O原子,形成两性离子B。B的过渡态包含一个酚氧负离子,极易接受 H^+ 而产生季铵离子C,导致分子的荧光猝灭。其猝灭程度与体系内含质子给予体(H_2O)的浓度有关。借助不同质子给予体浓度下的荧光猝灭强度,即可计算出分子A在水相体系下的百分离子化 δ 值。当探针A溶在水相有机体系时,存在探针分子A、质子给予体E(H_2O)和质子接受体AE的平衡,荧光猝灭常数表达为:

$$K = \frac{[AE]}{[A] \cdot [E]} \quad (1)$$

$[A]$ 、 $[E]$ 和 $[AE]$ 为相应的平衡浓度,根据质量守恒定律,百分离子化值 δ 可定义为:

$$\delta = \frac{[AE]}{[A]_0} = \frac{[AE]}{[A] + [AE]} \quad (2)$$

假设未被离子化的A最初浓度为 $[A]_0$,荧光强度为 F_0 ,则:

$$F_0 = K' \varphi_f [A]_0 \quad (3)$$

K' 为与仪器相关的常数, φ_f 为A的量子产率。当A部分被质子化后,剩余A的荧光强度为 F ,此时 F 可表达为:

$$F = K' \varphi_f (1 - \delta) [A]_0 \quad (4)$$

(此处 $\delta = [AE]/[A]_0$)结合等式(3)和(4)得出:

$$(F_0 - F)/F = \delta/(1 - \delta) \quad (5)$$

结合等式(2)、(3)和(7)得到下式:

$$(F_0/F)/F = K[E] \quad (6)$$

($[E]$ 为质子给予体的平衡浓度,其值远比 $[A]$ 或 $[AE]$ 大,这样 $[E] \approx C_E$, C_E 为质子给予体的最初摩尔浓度),于是(6)式改写为:

$$(F_0 - F)/F = KC_E \quad (7)$$

将等式(7)中 $(F_0 - F)/F$ 代于等式(7)得到:

$$\delta = KC_E/(1 + KC_E) \quad (8)$$

根据不同质子给予体浓度下的荧光猝灭值,求得等式(7)中的猝灭常数 K 值后,代入等式(8)中获得相应的百分离子化值 δ 。

3 结果与讨论

3.1 荧光光谱性质

当水相体系处于恒温条件时,随体系中质子给予体浓度的增高,BAEIC-癸胺衍生物的荧光强度降低,这主要是探针分子与质子给予体形成季铵离子导致荧光猝灭的结果。表1为探针分子在不同浓度乙腈和甲醇水溶液中的相对荧光强度及发射波长。结果表明:随质子给予体浓度增加,荧光强度逐渐降低,且发射波长明显红移,在乙腈中红移约39 nm,甲醇中红移约13 nm。

理论上,百分离子化值 δ 与加入水的体积百分数应呈线性关系。在乙腈中,水的体积分数为0~70%时线性良好;进一步升高则偏离线性,主要是探针分子在低浓度乙腈中溶解度降低的缘故($\delta = 2.77 + 0.2414x$, $r = 0.9921$, x 为水的体积百分数)。甲醇中也有相似的结果。当甲醇中水的体积百分数在0~40%时线性良好($\delta = 0.30 + 0.17996x$, $r = 0.9896$),再高则偏离线性。上述百分离子化值

δ 很好地揭示了探针分子具有良好的质谱离子化能力,因为 APCI-MS 离子化主要是分子在质谱离子室中被水分子溶剂化的结果。

表 1 不同浓度乙腈、甲醇水溶液中 BAEIC-癸胺的荧光强度及百分离子化值

Table 1 Fluorescence intensity of BAEIC-decylamine in the presence of varying amount of water and corresponding calculated percent ionization δ values

H ₂ O (% , V/V)	乙腈 Acetonitrile				甲醇 Methanol			
	λ_{em} (nm)	荧光强度 Intensity	猝灭常数 Quenching constant $K(\times 10^{-2})$	离子化百分数 Percent ionization $\delta(\%)$	λ_{em} (nm)	荧光强度 Intensity	猝灭常数 Quenching constant $K(\times 10^{-2})$	离子化百分数 Percent ionization $\delta(\%)$
100	523	425	2.49	58.08	523	425	2.34	56.58
90	520	586	1.46	42.21	522	601	1.25	38.61
80	517	735	0.85	27.51	520	684	0.97	30.13
70	515	819	0.61	19.23	519	758	0.75	22.57
60	514	830	0.66	18.15	517	797	0.68	18.59
50	510	870	0.59	14.20	516	871	0.45	11.03
40	510	885	0.65	12.72	513	903	0.38	7.76
30	507	909	0.69	10.35	513	928	0.33	5.21
20	506	946	0.64	6.70	512	939	0.38	4.08
10	501	957	1.07	5.62	511	958	0.39	2.14
0	484	1014			510	979		

注 (note): 乙腈水或甲醇水中 BAEIC-癸胺浓度为 1.0×10^{-6} mol/L; F_0 为纯乙腈或甲醇中荧光强度 K 由公式 (7) 得出 δ 值由公式 (8) 得出 (Final concentration of BAEIC-decylamine in each aqueous acetonitrile or methanol is kept at 1.0×10^{-6} mol/L; F_0 was measured in 100% acetonitrile or methanol. K values were calculated according to the Eq. 7; δ values were calculated according to the Eq. 8 in each corresponding K value obtained)。

3.2 色谱分离

HBA 或 BAEIC 与脂肪胺的衍生化反应随碱性催化剂、CDI 用量、溶剂、衍生温度、衍生时间的不同, 衍生率有显著差异。以辛胺、壬胺、癸胺、十一胺、十二胺等对以上的衍生条件分别进行了优化。实验表明: 衍生温度 80 ℃ 衍生时间 60 min , 催化剂为 DMAP 共溶剂为 DMF 时具有最高衍生率。在最优化条件下, 考察了 3 种不同衍生化方法对衍生率的影响。结果表明, 在 3 种衍生方法中, 方法 A 最差, 方法 C 给出最高的衍生率, 方法 B 与 C 比较略差 (强度降低约 25 %) (见图 1 中 A , B , C)。其主要原因一步衍生过程中, 胺先与缩合剂 CDI 反应形成中间体 ACDI , 随后 HBA 的羟基与中间体 ACDI 的反应是一个慢亲核取代过程, 从而导致极低的衍生率。方法 C 是一个直接亲核取代过程, 产率达最高。

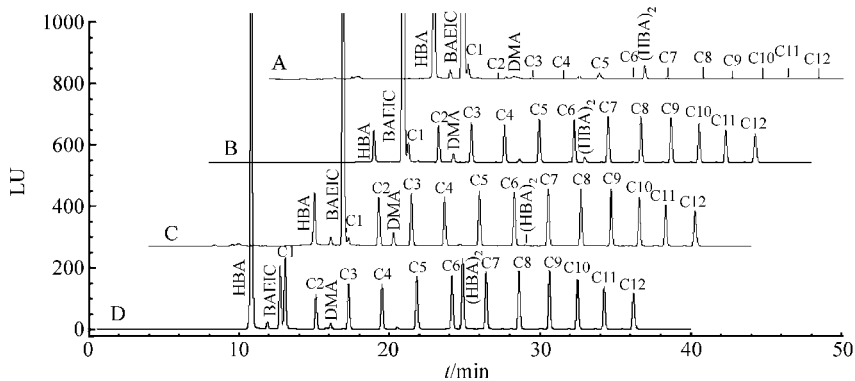


图 1 标准脂肪胺衍生物的色谱图

Fig. 1 Chromatograms for standard aliphatic amine derivatization

A: 一步法 (One step method); B: 两步法 (Two step method); C: 中间体法 (Intermediate reaction); D: 衍生过程存在少量水 (Derivatization in the presence of a small quantity of water); 峰 (Peaks): 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); DMY: 二甲胺 (Dimethylamine); HBA: 5-(2-羟乙基)-苯并吡啶酮 (5-(2-Hydroxyethyl)benzoacridine); BAEIC: 2-(苯并吡啶酮)-乙基咪唑酸酯 (2-(Benzoacridin) ethyl-imidazole-4-carboxylate); (HBA)₂: 双-(2-羟乙基苯并吡啶酮)-碳酸盐 (bis-(2-Hydroxyethyl)benzoacridine)-carbonate)。

尽管方法 B 采用两步法先形成中间体 BAEIC ,但部分胺优先与过量 CDI 反应形成中间体 ACDI ,因而产率低于方法 C。此外 ,衍生过程存在少量水时 ,BAEIC 峰强度大为降低 ,相应 HBA 和 (HBA)₂ 的峰强度加强 (图 1D) ,主要原因是中间体 BAEIC 水解 ,生成的 HBA 在碱性催化剂下与过量的 BAEIC 作用形成双取代的双-(2-羟乙基苯并吡啶酮)-碳酸酯 (HBA)₂ (*m/z* 605.6)。另外分离中产生小峰 DMA ,是碱性条件下 DMF 水解产生少量二甲胺的结果 (*m/z* 361.7)。

3.3 质谱鉴定

所有 BAEIC 胺衍生物产生特征碎片离子峰质谱数据见表 2。代表性 C10 胺衍生物的一级质谱、二级质谱及裂解模式见图 2。

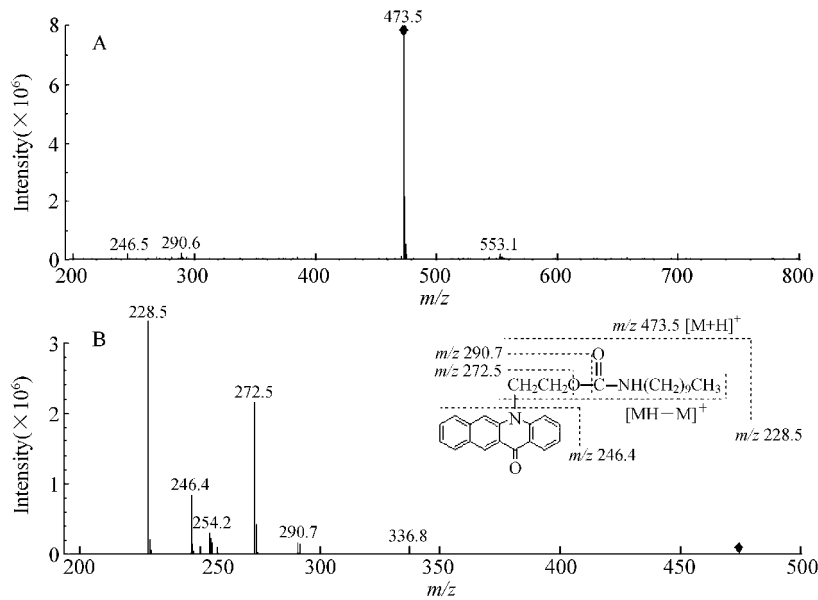


图2 BAEIC-癸胺衍生物质谱图:一级质谱(A) ,二级质谱(B)
Fig.2 APCI-MS/MS spectra of representative decylamine derivative: MS spectra (A) , MS/MS spectra(B)

3.4 线性回归方程、检出限和重现性

采用衍生方法 C ,进样量在 21 fmol ~43 pmol 范围内 ,依据峰面积和进样量 ,对胺类化合物进行线性回归 ,所得各衍生物的回归方程、相关系数和检出限 (*S/N* =3) 见表 2。对 43 pmol 脂肪胺衍生物平行测定 6 次 ,保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.05% ~0.08% 和 1.9% ~2.5% 范围内。

表2 脂肪胺衍生物的线性范围、回归方程、相关系数、检出限、线性范围和质谱数据
Table 2 Linear regression equations , correlation coefficients , detection limits , linear range and MS data of amine derivatives

胺衍生物 Amine derivatives	线性回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 LOD (fmol)	线性范围 Linear range (pmol)	一级质谱 MS (<i>M</i> + <i>H</i>) ⁺ (<i>m/z</i>)	二级质谱 MS/MS (<i>m/z</i>)	APCI-MS LOD (fmol)
C1	<i>Y</i> = 2.417270 + 6.626650 <i>X</i>	0.9991	79	0.3 ~ 10.7	347.7	290.7 , 272.6 , 246.4	610
C2	<i>Y</i> = 5.506290 + 33.09517 <i>X</i>	0.9992	17	0.08 ~ 10.7	361.7	290.7 , 272.6 , 246.4	544
C3	<i>Y</i> = 2.578320 + 37.58286 <i>X</i>	0.9999	29	0.08 ~ 10.7	375.6	290.7 , 272.6 , 246.4	825
C4	<i>Y</i> = 2.150190 + 35.03495 <i>X</i>	0.9998	29	0.08 ~ 10.7	389.6	290.7 , 272.6 , 246.4	731
C5	<i>Y</i> = 3.742540 + 39.59094 <i>X</i>	0.9999	25	0.08 ~ 10.7	403.6	290.6 , 272.5 , 246.4	772
C6	<i>Y</i> = 5.057960 + 39.26561 <i>X</i>	0.9998	20	0.2 ~ 10.7	417.5	290.5 , 272.5 , 246.4	727
C7	<i>Y</i> = 12.02493 + 41.12445 <i>X</i>	0.9993	8.6	0.08 ~ 10.7	431.5	290.5 , 272.5 , 246.4	709
C8	<i>Y</i> = 2.690940 + 40.52561 <i>X</i>	0.9999	19	0.08 ~ 10.7	445.5	290.5 , 272.5 , 246.4	795
C9	<i>Y</i> = 6.698310 + 39.81492 <i>X</i>	0.9999	8.7	0.2 ~ 10.7	459.5	290.5 , 272.5 , 246.4	794
C10	<i>Y</i> = 3.618940 + 33.64824 <i>X</i>	0.9998	23	0.2 ~ 10.7	473.5	290.6 , 272.5 , 246.4	766
C11	<i>Y</i> = 2.522100 + 29.78792 <i>X</i>	0.9998	35	0.08 ~ 10.7	487.5	290.5 , 272.5 , 246.4	774
C12	<i>Y</i> = 1.677860 + 30.71303 <i>X</i>	0.9999	25	0.2 ~ 10.7	501.6	290.3 , 272.5 , 246.4	763

Y:峰面积 (Peak area) ;*X*:注射量 (Injected amount) pmol ;质谱线性范围未测 (Linear ranges of APCI-MS were not tested)。

3.5 实际样品的分析

曲阜小沂河水色谱分离见图 3 ,水样中加胺标准品(5.0×10^{-4} mol/L) ,按照实验方法处理并衍生化 ,所得河水中脂肪胺化合物含量及回收率见表 3。

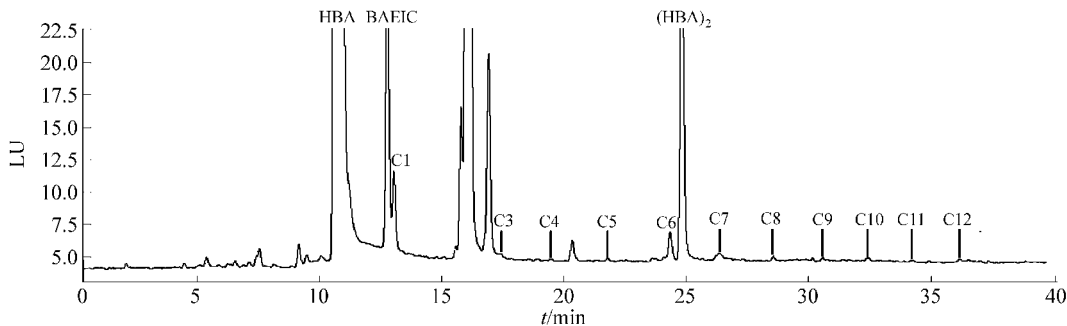


图 3 小沂河水中游离脂肪胺色谱分离图

Fig. 3 Chromatogram of aliphatic amine from water in Yihe river

色谱条件和峰号同图 1C(Chromatographic conditions and peaks same as in Fig. 1C)。

表 3 沂河水中脂肪胺的含量及回收率

Table 3 Content and recoveries of aliphatic amines from water in Yihe river

胺衍生物 Amine derivatives	河水中胺的含量 Amine in river water ($\mu\text{g/L}$)	MS ** 鉴定 MS identify	回收率 Recoveries (%)	胺衍生物 Amine derivatives	河水中胺的含量 Amine in river water ($\mu\text{g/L}$)	MS ** 鉴定 MS identify	回收率 Recoveries (%)
C1	2.558	Yes	99.3	C7	0.259	Yes	100.8
C2	*		100.1	C8	0.121	Yes	99.9
C3	0.075	Yes	98.5	C9	0.015		103.1
C4	0.049	Yes	101.4	C10	0.013		101.2
C5	0.067	Yes	102.2	C11	0.051	Yes	98.7
C6	0.364	Yes	103.6	C12	0.152	Yes	100.5

* 由于与未知组分共洗脱故未进行定量(C2 was not determined owing to co-eluting with unknowcomponents) ; ** 组分同时进行在线的质谱鉴定(The component was appraised by the online mass spectrum simultaneously)。

4 结 论

利用 HBA 和新合成的含 N、O 杂原子的双敏感探针 BAEIC ,对胺类化合物进行标记 ,比较了 3 种不同衍生方法产率的不同。结果表明:在建立的条件下 ,中间体 BAEIC 与胺的衍生率最高 ,所得胺的衍生物不仅具有较强的荧光发光特性 ,同时具有很强的质谱离子化能力。本方法具有线性范围宽、重现性好、操作简便等特性 ,对实际样品小沂河水中游离脂肪胺的分析结果满意。

References

1 Valeur B. In *Molecular Luminescence spectroscopy*; Schulman S G ,Ed. ; New York: Wiley Interscience ,**1993** ,Part 3: 25 ~84

2 Zhu Q Z ,Li F ,Guo X Q ,Xu J G ,Li W Y. *Analyst* ,**1997** ,122(9) : 937 ~940

3 SHEN Jin-Can(沈金灿) ,YE Wei-Xiang(叶卫翔) ,KANG Hai-Ning(康海宁) ,GE Li-Ya(葛丽雅) ,ZHUANG Shi-Xia(庄峙厦) ,WANG Xiao-Ru(王小如). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) ,**2009** ,37(7) : 957 ~947

4 You J ,Fan X ,Lao W ,Ou Q ,Zhu Q. *Talanta* ,**1999** ,48(2) : 437 ~449

5 Sacher F ,Lenz S ,Brauch H. *J. Chromatogr. A* ,**1997** ,764(1) : 85 ~93

6 Schade G W ,Crutzen P J. *J. Atmos. Chem.* ,**1995** ,22(3) : 319 ~346

7 Terashi A ,Hanada Y ,Kido A ,Shinohara R. *J. Chromatogr.* ,**1990** ,503(1) : 369 ~375

8 Abalos M ,Bayona J N ,Ventura F. *Anal. Chem.* ,**1999** ,71(16) : 3531 ~3537

9 Knapp D R. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions* ,New York: Wiley Interscience ,**1979** : 71 ~102

10 Gennaro M C ,Mentasti E ,Sarzanini C ,Porta V. *Chromatographia* ,**1988** ,25(2) : 117 ~124

11 Ahnoff M ,Grundevik I ,Arfwidsson A ,Fonselius J ,Persson B A. *Anal. Chem.* ,**1981** ,53(3) : 485 ~489

- 12 Einarsson S , Folestad S , Josefsson B , Legerkvist S. *Anal. Chem.* , **1986** , 58(8) : 1638 ~ 1643
- 13 Steven A C , Dennis P M. *Anal. Biochem.* , **1993** , 211(2) : 279 ~ 287
- 14 Liu H J. *J. Chromatogr. A* , **1994** , 670: 59 ~ 66
- 15 You J , Lao W , Sun X , Ou Q. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* , **1999** , 22(19) : 2907 ~ 2923
- 16 You J , Lao W , You J , Wang G. *Analyst* , **1999** , 124: 1755 ~ 1760
- 17 You J , Lao W , Wang G , Jia X. *Analyst* , **1999** , 124: 281 ~ 288
- 18 Fan X , You J , Kang J , Qu Q , Zhu Q. *Anal. Chim. Acta* , **1998** , 367: 81 ~ 91

Dual-Sensitive Probe of 2-(Benzoacridin) ethyl-imidazole-1-carboxylate for Determination of Aliphatic Amine with Fluorescence and Online Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry Identification

FU Yan-Yan¹ , LI Xiao-Yan¹ , SUN Zhi-Wei^{2,3} , QIN Xue-Qin¹ , XIA Lian^{1,2,3} ,
SUO You-Rui² , LI Yu-Lin² , YOU Jin-Mao^{*1,2}

¹ (The Key Laboratory of Life-Organic Analysis , Qufu Normal University , Qufu 273165)

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

³ (Graduate University of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049)

Abstract With comparison of three different methods for the marking of amines compound , an optimal derivatization method was selected. 5-(2-Hydroxyethyl) benzoacridine (HBA) reacts with coupling agent *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) to form an activated amide intermediate 2-(benzoacridin) ethyl-imidazole-1-carboxylate (BAEIC). BAEIC , which is dual-sensitive probe , reacts preferably with amino compounds at 80 °C in the presence of 4-dimethylaminopyridine (DMAP) catalyst in *N,N*-dimethylformamide (DMF) solvent to give the corresponding sensitively fluorescent derivatives with an excitation maximum at λ_{ex} of 280 nm and an emission maximum at λ_{em} of 510 nm. BAEIC-amine derivatives simultaneously exhibited high ionization potential with percent ionization (changing from 5.62% to 58.08% in aqueous acetonitrile and from 2.14% to 56.58% in aqueous methanol. Derivatives were not only sensitive to fluorescence but also to MS ionizable potential. The fluorescence detection limits ($S/N=3$) were 0.12 ~ 0.59 $\mu\text{g/L}$. The online APCI-MS detection limits were 1.9 ~ 14 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=5$).

Keywords High performance liquid chromatography/mass spectrometry; Aliphatic amines; 5-(2-Hydroxyethyl) benzoacridine; 2-(Benzoacridin) ethyl-imidazole-1-carboxylate

(Received 9 May 2009; accepted 14 August 2009)