

1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮衍生试剂的制备及其在高效液相色谱-质谱法测定糖类化合物中的应用

孙志伟¹, 刘凌君¹, 户宝军¹, 盛筱¹, 王小艳², 索有瑞², 尤进茂^{1,2}

(1. 曲阜师范大学化学科学学院 山东省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:以 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP) 作为柱前衍生试剂, 建立了简单、灵敏的糖类组分的反相高效液相色谱测定方法。NMP 与糖在氨为催化剂的条件下, 于 70 °C 下反应可获得稳定的衍生产物。在 Hypersil ODS 2 反相色谱柱上, 实现了 8 种单糖的基线分离。衍生物线性相关系数均大于 0.998 5, 检出限为 0.58 ~ 1.1 pmol。利用柱后在线串联质谱的电喷雾电离正离子模式监测, 获得了各组分的质谱定性及裂解规律, 特别是 m/z 473 的特征碎片离子可作为单糖 NMP 衍生物的判定依据。与 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PM P) 相比, NMP 对糖的衍生化具有灵敏、简单、质谱裂解规律性强、重现性好等优点。该方法用于测定油菜花粉多糖中的单糖组成, 结果令人满意。

关键词: 高效液相色谱-质谱; 柱前衍生; 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮; 单糖

中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2008)02-0200-06 **栏目类别:** 研究论文

Preparation of 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone as pre-column derivatization reagent for the determination of saccharides using high performance liquid chromatography-mass spectrometry

SUN Zhiwei¹, LIU Lingjun¹, HU Baojun¹, SHENG Xiao¹,
WANG Xiaoyan², SUO Youru², YOU Jimin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Life-Organic Analysis of Shandong Province, College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; 2. Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: Eight saccharides were derivatized using 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) as pre-column derivatizing reagent, and separated on a reversed-phase Hypersil ODS 2 column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), by high performance liquid chromatography (HPLC) in conjunction with a gradient elution, detected by a diode array detector (DAD), and identified by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) in positive ion mode. NMP reacted with reductive saccharides easily in the presence of 17% ammonia water at 70 °C. All linear correlation coefficients for saccharide derivatives were over 0.998 5. The detection limits (at signal-to-noise of 3:1) were 0.58 - 1.1 pmol for saccharide derivatives. The characteristic fragment ions, especially m/z 473, from the cleavage of NMP-labeled saccharides exhibited high regularity for the identification of the composition of saccharide mixture. The established method is sensitive and repeatable for the determination of saccharides.

Key words: high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS); pre-column derivatization; 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone; saccharides

糖是细胞组成中的重要物质,但人们对糖类化合物在生物体内功能作用的研究却远远滞后,这主

要是因为糖的种类多、结构复杂且多为异构体,存在微观不均一性。通常,单糖、寡糖仅在基团-CHOH

收稿日期: 2007-09-10

第一作者: 孙志伟, 硕士研究生. E-mail: sunzhiw@126.com.

通讯联系人: 尤进茂, 教授. Tel: (0537) 4458501, E-mail: jnyou6304@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 20075016).

本文的英文电子版由 Elsevier 出版社在 ScienceDirect 上出版 (<http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722059>).

构型排列上有所不同,采用常规方法对其分离鉴定较为困难。糖在紫外区无吸收,采用示差折光检测的灵敏度低且不利于梯度洗脱^[1]。为此常采用衍生化处理,将糖类组分转变为带发色基团的分子,然后进行紫外或荧光检测。糖类物质的衍生反应多基于还原氨化法^[2,3],不仅过程繁琐、反应时间长,且可导致不稳定基团如唾液酸残基的解离,给测定结果带来偏差。1989年 Honda 等首次用 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 衍生还原性单糖并对衍生物进行高效液相色谱 (HPLC) 分析,取得了满意的结果^[4]。之后该法得到了不断的完善^[5-12]。PMP 与还原性糖的反应在不丢失唾液酸的前提下能够定量进行。本实验在 PMP 的基础上,合成了 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP)。与 PMP 对比,NMP 与还原性单糖的衍生化条件更为温和,产物更稳定,灵敏度更高。采用二极管阵列检测器 (DAD) 和在线的电喷雾电离质谱 (ESI/MS) 检测多糖衍生物,获得了更为满意的结果。该方法用于测定油菜花粉多糖中的单糖组成,结果令人满意。

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、

DAD 检测器、100 位自动进样器、电喷雾电离源; CARY 300 紫外可见光度计 (Varian 公司)。

NMP (自制); 单糖标准品: 葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal)、木糖 (Xyl)、甘露糖 (Man)、鼠李糖 (Rha) (国药集团化学试剂公司), 葡萄糖醛酸 (GlcUA)、半乳糖醛酸 (GalUA)、阿拉伯糖 (Ara) (Fluka 公司), 岩藻糖 (Fuc) (Sigma 公司); 光谱纯乙腈 (Merck 公司); 氨水等均为分析纯。纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称量标准品葡萄糖、半乳糖、甘露糖各 0.0180 g, 阿拉伯糖、木糖各 0.0150 g, 鼠李糖、岩藻糖各 0.0164 g, 葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸各 0.0212 g, 用水溶解并定容至 10 mL, 得到各单糖浓度均为 0.01 mol/L 的单糖标准品混合液。

准确称量 NMP 0.112 g, 用乙腈定容至 10 mL, 其浓度为 0.05 mol/L。

1.2.2 单糖标准品的衍生过程

向 2 mL 安瓿瓶中加入 200 μL 上述 NMP 乙腈溶液、20 mL 单糖标准品混合液、20 mL 17% 氨水, 封口后于 70 °C 水浴中反应 35 min, 取出放冷后用氮气吹干, 加入 2 mL 乙腈-水 (体积比为 4:1) 超声溶解, 取 10 μL 进样分析。衍生化反应过程见图 1。

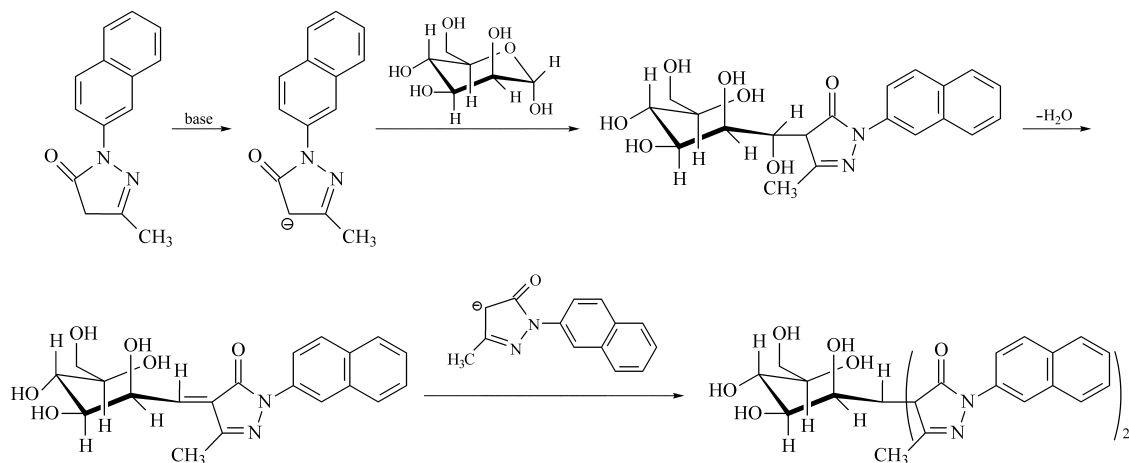


图 1 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP) 与还原性单糖衍生反应示意图

Fig. 1 Derivatization scheme of 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) with reductive saccharides

1.3 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS 2 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 大连依利特分析仪器有限公司)。流动相: A 相为 30% 乙腈 (含 30 mmol/L NH₄H₂PO₄); B 相为 60% 乙腈。洗脱程序: 0 ~ 50 min, 100% A ~ 55% A; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温 30

; 检测波长 254 nm。

质谱条件: 质谱分析时缓冲盐换为 20 mmol/L CH₃COONH₄ (pH 5.0)。电喷雾电离源, 正离子模式监测, 电喷雾压力 241.3 kPa (35 psi), 干燥气流量为 9 L/min, 干燥气温度 350 °C, 毛细管电压 3 500 V。

2 结果与讨论

2.1 NMP 的制备及光谱性质

2.1.1 NMP 的制备

称取 萘脒盐酸盐 50 g, 加 600 mL 水后加热至微沸, 使其溶解, 加 20% NaOH 溶液调节至强碱性, 抽滤后得到固体, 将其水洗至中性, 抽干后真空干燥, 得 萘脒 38 g。将其加至 500 mL 三颈烧瓶中, 并加入 200 mL 无水乙醇, 在水浴中加热至 55[°], 并在电磁搅拌下使其溶解。于 55[°] 条件下缓慢滴加 32.7 mL (33.5 g) 乙酰乙酸乙酯, 滴加完毕后恒温反应 2 h, 然后升温至 80[°] 回流 7 h。将反应液减压浓缩至干, 用甲醇将其重结晶 3 次, 得到淡黄色晶体。经测定, 该固体的熔点为 195.6 ~ 197.1[°], 产率为 68%; 元素分析结果为: w (C) = 74.97%, w (H) = 5.40%, w (N) = 12.48%, w (O) = 7.13%; 理论计算 NMP 的元素含量为: w (C) = 74.98%, w (H) = 5.39%, w (N) = 12.49%, w (O) = 7.13%; 红外光谱 IR (KBr) 分析表明, 化合物中有下列基团: 3 121.4 cm⁻¹, 3 055.20 cm⁻¹ 处有吸收峰表明有 -C-H; 1 722.1 cm⁻¹ 处有吸收峰表明有 -C=O; 1 562.1 cm⁻¹ 处有吸收峰表明有 Ph-H; 1 511.6 cm⁻¹ 处有吸收峰表明有 Ph-H; 1 469.44 cm⁻¹, 1 390.7 cm⁻¹ 和 1 363.8 cm⁻¹ 处有吸收峰表明有 C-H。MS 分析表明其 [M+H]⁺ 的 m/z 为 225。

2.1.2 NMP 的光谱性质

实验考察了 NMP 与 PMP 在甲醇 (MeOH)、乙醇 (EtOH)、乙腈 (ACN)、四氢呋喃 (THF)、1,4-二氧六环 5 种溶剂中的紫外吸收光谱, 结果表明 NMP 在 5 种溶剂中的紫外吸收均比 PMP 强, 其中在甲醇和乙腈中 NMP 与 PMP 的紫外吸收光谱图见图 2。

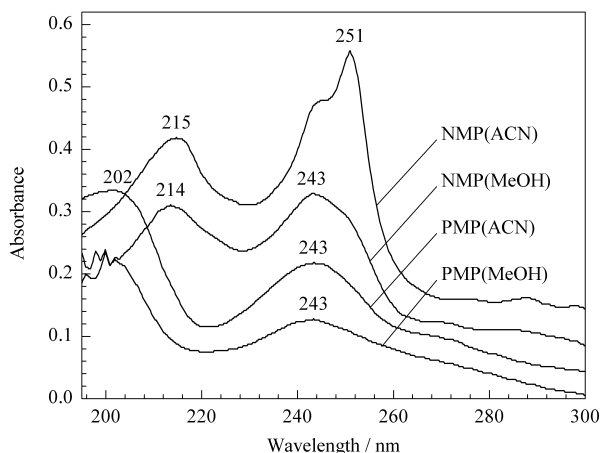


图 2 NMP 与 PMP 在甲醇和乙腈中的紫外吸收光谱图 (10 μmol/L)

Fig. 2 Ultraviolet spectra of NMP and PMP in methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) (10 μmol/L)

2.2 衍生条件的优化及衍生物的稳定性

2.2.1 衍生条件的优化

随着衍生溶剂的不同, NMP 与单糖的衍生化率有显著的差异。实验中分别选取 ACN、MeOH、THF、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲亚砜 (DMSO) 作溶剂, 对衍生化率进行了考察。结果表明, 在 DMF、DMSO 和 ACN 中的衍生化率基本相同, 均高于在 MeOH 和 THF 中。考虑到衍生液的后续处理, 实验中选用 ACN 作溶剂。

林雪等^[9] 改进了 PMP 与单糖的衍生反应, 用氨水代替 NaOH 作碱性催化剂, 得到了满意的结果。本实验采用 17% 氨水作为催化剂, 可得到与 NaOH 作催化剂相同的效果, 且反应产物可直接用氮气吹干, 从而简化了衍生液的后续处理。

实验中考察了温度对糖衍生化率的影响 (如图 3 所示)。结果表明: 温度低于 70[°] 时, 随着温度的升高, 衍生化率增大; 温度高于 70[°] 时, 随着温度的升高, 葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、木糖、阿拉伯糖和甘露糖的衍生化率明显下降, 鼠李糖和岩藻糖变化幅度较小。本实验中选择衍生温度为 70[°]。为了确保单糖衍生化完全, 衍生试剂对总糖的物质的量比为 5~6 倍, 衍生化时间为 35 min。

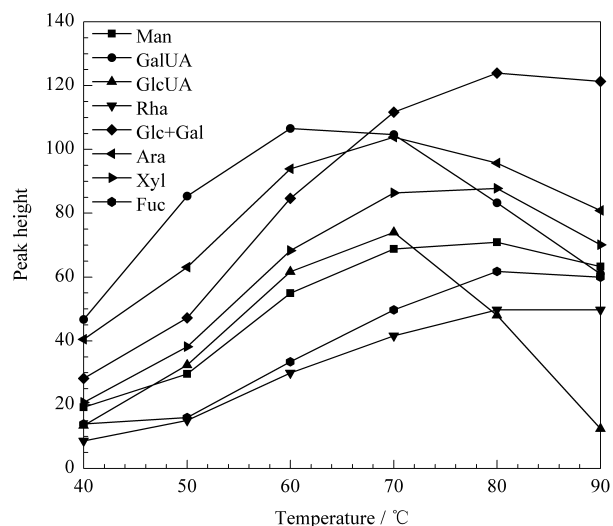


图 3 衍生化温度对单糖衍生化率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on derivatization yields of saccharides

Man: mannose; GalUA: galacturonic acid; GlcUA: glucuronic acid; Rha: rhamnose; Glc + Gal: glucose + galactose; Ara: arabinose; Xyl: xylose; Fuc: fucose.

2.2.2 衍生物的稳定性

本实验以岩藻糖为代表考察了单糖 NMP 衍生物的稳定性。将岩藻糖的衍生化溶液 (体积 1 mL, 含 0.1 mmol 岩藻糖衍生物) 过 Sapore C18 固相萃取小柱, 以 50 mL 30% 乙腈水溶液洗脱过量的 NMP 试剂, 之后用 50 mL 乙腈将岩藻糖的 NMP 衍生物

洗脱至 100 mL 的烧杯内 (衍生物的浓度为 4.67×10^{-5} mol/L)。取此溶液 4 份 (各 10 mL), 分别于冷藏避光、常温避光、常温见光和常温接触空气等 4 种环境下放置, 放置过程中每隔 8 h 检测一次, 衍生物在 4 种不同环境下存放的稳定性见图 4。结果表明: 衍生物接触空气和在光照射下分解速度最快, 在低温避光和隔绝空气条件下于 82 h 仅有 10% 的衍生物分解。将经氮气吹干了的 9 种单糖的 NMP 衍生物用乙腈-水 (体积比为 4:1) 溶解, 放置在低温避光条件下, 24 h 内各衍生物峰面积的相对标准偏差在 1.8%~2.9% 之间 ($n=8$), 完全能满足过夜分析的要求。

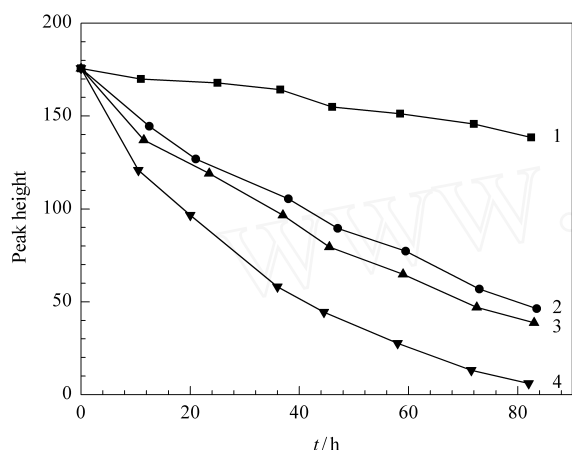


图 4 岩藻糖衍生物在 4 种不同环境条件下存放的稳定性
Fig. 4 Stability of fucose derivative under four different conditions

1. in darkness, at 4 °C and without air; 2. in darkness, at room temperature and without air; 3. with natural lighting, at room temperature and without air; 4. with natural lighting, at room temperature and exposed to air.

2.3 标准品的色谱分离及质谱定性

实验中选用 30 mmol/L 的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 与 20 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 5.0) 作为缓冲盐均能获得满意的分离度, 但使用醋酸缓冲盐时, 两种醛酸严重拖尾。为了获得准确的定量结果, 做定量分析时采用 30 mmol/L 的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 作缓冲盐; 当采用 ESI 电离源作质谱定性分析时, 为避免将非挥发性的缓冲盐引入到质谱电离室, 采用 20 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 5.0) 作缓冲盐。

实验中发现, 在 Hypersil ODS 2 柱上, 甲醇和乙腈对 9 种单糖衍生物的洗脱过程中表现出明显的选择性。乙腈可实现 8 种单糖的快速基线分离, 其中 Glc 和 Gal 共洗脱。甲醇可实现 7 种单糖基线分离, 其中 Gal, Ara 和 Xyl 共洗脱。实验中曾尝试采用甲醇、乙腈和水的三元混合梯度进行分离, 60 min 的梯度洗脱可实现两对差向异构体 Glc-Gal 及 Ara-Xyl 的部分分离, 然而分离度均不够理想。

最终采用“1.3 节中所述洗脱条件, 9 种单糖衍生物的色谱分离见图 5。

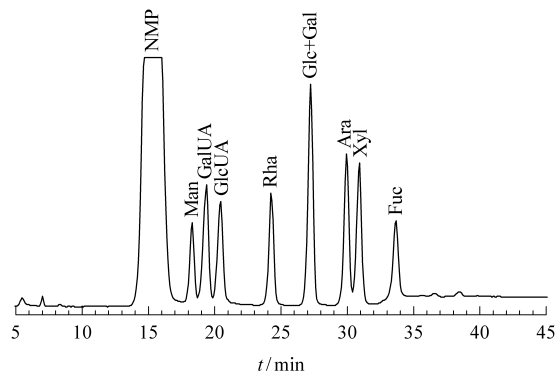


图 5 标准单糖衍生物 (1000 pmol) 的色谱分离图
Fig. 5 Chromatogram of saccharide derivatives (1000 pmol)

采用电喷雾电离源进行在线的柱后质谱鉴定, 各衍生物均显示出强的准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 和相应的特征碎片离子峰。代表性的甘露糖衍生物的质谱见图 6 (图 6-a 为一级质谱; 图 6-b 为二级质谱)。甘露糖衍生物的准分子离子峰为 m/z 611.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。二级质谱显示出 4 个特征碎片峰, 分别为 m/z 592.9, 473.0, 386.9 和 225.0。各特征碎片离子归属如下: m/z 592.9 为甘露糖衍生物分子离子的失水峰 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$; m/z 386.9 归属为甘露糖衍生物分子离子经碰撞后丢失一分子 NMP 的结果, 表示为 m/z $[\text{M} + \text{H} - \text{NMP}]^+$; m/z 225 为甘露糖衍生物分子裂解后所产生的 NMP 分子, 表示为 m/z $[\text{NMP} + \text{H}]^+$; m/z 473.0 是甘露糖衍生物分子糖碳链中 C2-C3 键断裂后同时丢失一分子 H_2O 的结果; 具体的断裂方式见图 7。9 种 NMP 糖类衍生物的质谱裂解数据见表 1。分析表明: 所有 NMP 衍生的糖分子均表现出上述特征碎片离子峰。尤其糖类衍生物分子中糖碳链中的 C2-C3 键断裂后形成的饱和度高且稳定的碎片离子 m/z 473 更能体现出 NMP 糖类分子裂解的特征性。该 m/z 473.0 的离子可表示为 $[\text{M} - \text{C}_m\text{H}_{2m}\text{O}_m - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ ($m = n - 2$, n 代表糖链分子中的碳原子数, 公式适用中性糖); 由于结构上的差异, 对于糖醛酸上述公式需改写为 $[\text{M} - \text{C}_m\text{H}_{2m-2}\text{O}_{m+1} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ ($m = n - 2$, n 代表糖醛酸分子中的碳原子数); 对于去氧糖, 上述公式又需改写为 $[\text{M} - \text{C}_m\text{H}_{2m}\text{O}_{m-1} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ ($m = n - 2$, n 代表去氧糖分子中的碳原子数)。尽管大多数样品中含有大量的脂肪醛和芳香醛, 且它们也能同时被 NMP 衍生, 但对脂肪醛和芳香醛的质谱分析表明, 它们都不产生 m/z 473 的特征碎片离子峰。以正戊醛为例, 质谱分析为: 准

分子离子峰 m/z 517.0 $[M + H]^+$; 特征碎片峰为 m/z 292.9 $[M - NMP + H]^+$ 和 m/z 225 $[NMP + H]^+$ (质谱图略)。此外, 由于脂肪醛和芳香醛生

物具有强的疏水性, 在 HPLC 洗脱过程中出峰远在糖衍生物之后, 对糖类化合物的分离分析不会产生任何干扰。

表 1 单糖衍生物的质谱数据

Table 1 MS and MS/MS data of saccharide derivatives

Saccharide	Molecular mass of derivative	MS data $[M + H]^+$ (m/z)	MS/MS data for the specific fragment ions (m/z)			
			$[M - H_2O + H]^+$	$[M - NMP + H]^+$	$[NMP + H]^+$	$[W + H]^+*$
Man	610	611.2	592.9	386.9	225.0	473.0
GalUA	624	625.1	606.9	400.7	225.2	472.9
GlcUA	624	625.1	607.0	401.0	224.9	473.1
Rha	594	595.1	577.3	370.9	224.9	473.2
Glc + Gal	610	611.1	593.3	387.0	224.9	473.0
Ara	580	581.1	563.3	357.0	224.9	472.7
Xyl	580	581.1	562.8	356.5	224.9	473.0
Fuc	594	595.2	577.2	371.1	224.9	473.0

* $[W + H]^+$: $[M - C_m H_{2m} O_m - H_2O + H]^+$ ($m = n - 2$, n denotes the number of carbon atoms in neutral saccharide molecule);
 $[M - C_m H_{2m - 2} O_{m + 1} - H_2O + H]^+$ ($m = n - 2$, n denotes the number of carbon atoms in uronic acid molecule);
 $[M - C_m H_{2m} O_{m - 1} - H_2O + H]^+$ ($m = n - 2$, n denotes the number of carbon atoms in deoxysugar molecule).

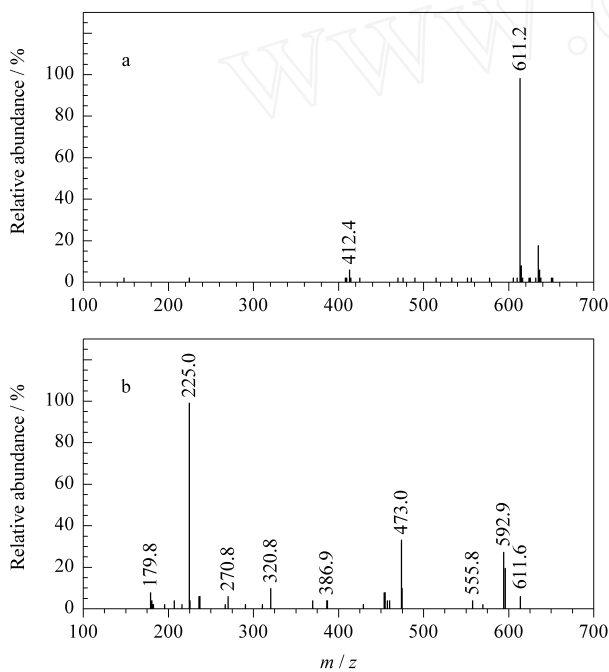


图 6 甘露单糖衍生物的 (a)一级与 (b)二级质谱图

Fig 6 (a) MS spectrum and (b) MS/MS spectrum of mannose derivative

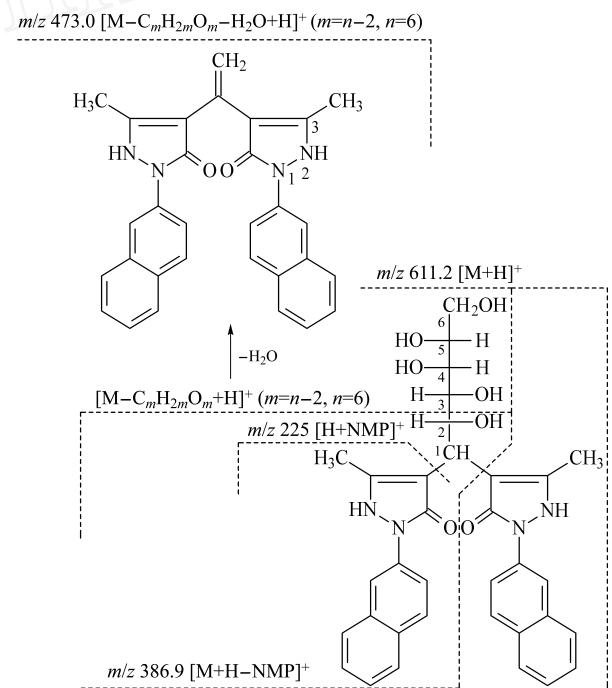


图 7 甘露单糖衍生物的质谱峰归属

Fig 7 Mass breakage mode of mannose derivative

2.4 线性回归方程、重现性和回收率

单糖衍生物进样量在 1 000 pmol~31.25 pmol 范围内, 依据峰面积和实际进样量进行线性回归, 各单糖衍生物的回归方程、相关系数和检测限见表 2。

在相同洗脱条件下, 对 250 pmol 单糖衍生物平行测定 6 次, 保留时间和峰面积重现性见表 2。

在花粉多糖水解液中分别加入 10 μ L 浓度为 1.0×10^{-2} mol/L 的单糖标准溶液, 按照上述方法进行衍生, 重复 3 次所得的各单糖的回收率在 94.83%~104.8%。

2.5 油菜花粉多糖组成的测定

称取研细、干燥的油菜花粉 20.0 g, 加去离子水 200 mL, 于 90 $^{\circ}$ C 下超声波浸提 1 h, 抽滤, 取上层清液减压浓缩。加 3 倍体积的 95% 乙醇, 静置 24 h, 高速离心得沉淀物, 加水溶解, 用 $CHCl_3$ -正丁醇 (体积比为 4:1) 萃取 3 次, 将上层清液减压浓缩至干燥, 得花粉粗多糖。称取花粉粗多糖 0.02 g, 加 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 2 mL, 封口后于 110 $^{\circ}$ C 下水解 2 h, 放冷后氮气吹干, 加 2 mL 水溶解并定容至 5 mL。取此花粉多糖水解液按前述方法进行化学

衍生、色谱分离及质谱鉴定, 所得色谱分离图及离子流色谱图见图 8。结果表明: 花粉多糖中除含有大量的 Ara, Glc, Gal, GaUA 和 Xyl 外, 还含有少量的 Man, Rha, Fuc, GlcUA, Lyx 和 GlyAld。色谱分离图中的 Lyx 和 GlyAld 两组分经质谱确定为异木糖和甘油醛 (未经标品对照)。所得异木糖的质谱数据为: m/z 581 $[M + H]^+$, m/z 562.8 $[M - H_2O + H]^+$, m/z 356.5 $[M - NMP + H]^+$, m/z 225 $[NMP + H]^+$ 和 m/z 473 $[M - C_m H_{2m} O_m - H_2O + H]^+$ ($m = n - 2$, $n = 5$, 为中性戊糖)。所得甘油醛的质谱数据为: m/z 521 $[M + H]^+$, m/z 502.8 $[M - H_2O + H]^+$, 296.5 $[M - NMP + H]^+$, m/z 225 $[NMP + H]^+$ 和 m/z 473 $[M - C_m H_{2m} O_m - H_2O + H]^+$ ($m = n - 2$, $n = 3$, 为中性三碳糖)。

表 2 单糖衍生物的线性回归方程、相关系数、检测限及保留时间和峰面积的重现性 ($n = 6$)

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

Saccharide	Regression equation *	r	RSD of retention time / %	RSD of peak area / %	Detection limit / pmol (S/N = 3)	Detection limits reported / pmol	
						Reference 7	Reference 8
Man	$y = 1.540x - 14.16$	0.9999	0.19	0.76	1.08	3	1
GaUA	$y = 2.631x - 1.602$	0.9999	0.23	0.43	0.59		
GlcUA	$y = 2.240x - 22.41$	0.9994	0.20	0.54	1.10		
Rha	$y = 2.091x - 28.18$	0.9994	0.09	0.52	0.87	3.3	1
Glc (Gal)	$y = 2.152x + 2.378$	0.9999	0.08	0.89	0.58	5(5)	7.4(4.8)
Ara	$y = 2.966x + 1.908$	0.9999	0.07	0.44	0.63		
Xyl	$y = 2.800x + 0.517$	0.9998	0.10	0.51	0.76	4.7	10
Fuc	$y = 1.683x + 25.01$	0.9985	0.15	0.54	0.87		

* y: peak area; x: injected amount, pmol

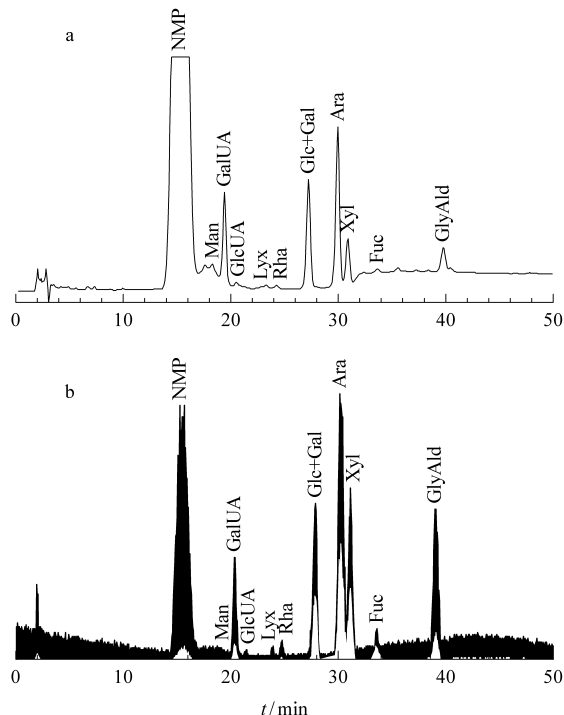


图 8 油菜花粉多糖水解的 (a) 色谱分离图和 (b) 质谱总离子流图
Fig. 8 (a) Chromatogram and (b) total ion current chromatogram of saccharide from rape pollen polysaccharide

3 结论

采用 NMP 作为柱前衍生化试剂, 通过对衍生化和色谱分离条件的优化, 建立了灵敏、快速测定单糖的方法, 同时实现了在线的柱后质谱鉴定。实验

表明: 该衍生试剂对各种还原性单糖具有灵敏、快速和衍生率高的特性。衍生物的质谱裂解规律性强, 特征碎片离子峰对单糖类化合物表现出高度专一性。实际分离中各组分展现出较宽的线性范围, 峰面积和保留时间的重现性良好。建立的方法对糖类化合物组成的确定灵敏、可靠。

参考文献:

- [1] Wang J, Wang Q, Xiang W S. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王静, 王晴, 向文胜. 分析化学), 2001, 29(2): 222
- [2] Takahashi N. J Chromatogr A, 1996, 720: 217
- [3] Okamoto M, Takahashi K, Doi T, et al Anal Chem, 1997, 69: 2919
- [4] Honda S, Akao E, Suzuki S, et al Anal Biochem, 1989, 180: 351
- [5] Strydom D J. J Chromatogr A, 1994, 678: 17
- [6] Yang X B, Zhao Y, Zhou S Y, et al Chinese Journal of Analytical Chemistry (杨兴斌, 赵燕, 周四元, 等. 分析化学), 2005, 33(9): 1287
- [7] Xu J, Li T, Zhang Q H, et al Life Science and Instruments (徐瑾, 李彤, 张庆合, 等. 生命科学仪器), 2005, 3(2): 30
- [8] Lin X, Jia J F, Huang L J, et al Food Science (林雪, 贾敬芬, 黄琳娟, 等. 食品科学), 2006, 27(4): 192
- [9] Lin X, Wang Z F, Huang L J, et al Chemical Journal of Chinese Universities (林雪, 王仲孚, 黄琳娟, 等. 高等学校化学学报), 2006, 27(8): 1456
- [10] Gucek M, Pihlar B. Chromatographia, 2000, 51: 139
- [11] Xu J, Zhang L Y, Zhang Q H, et al. Chinese Journal of Chromatography (徐瑾, 张凌怡, 张庆合, 等. 色谱), 2003, 21: 363
- [12] Yang X B, Zhao Y, Lv Y. J Agric Food Chem, 2007, 55: 4684