

# 高效液相色谱-质谱分离鉴定荧光试剂标记的脂肪酸

朱芳<sup>1</sup> 赵文臣<sup>1</sup> 赵先恩<sup>2</sup> 索有瑞<sup>2</sup> 刘素娟<sup>1</sup> 尤进茂<sup>\*1,2</sup>

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

**摘要** 以 2-(2-(10-蒎基)萘[2,3-d]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯 (AN ITS) 作为柱前衍生化试剂, 在 Eclipse XDB-C<sub>8</sub> 色谱柱上, 梯度洗脱实现了 20 种游离脂肪酸 (FFA) 衍生物的完全基线分离。90 °C 下在 DMF 溶剂中以 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 作催化剂, 选取衍生试剂摩尔数为脂肪酸的 7 倍, 衍生反应 40 min 可获得稳定的荧光产物。激发和发射波长分别为 250 nm 和 512 nm。采用大气压化学电离源 (APCI) 正离子模式, 实现了油菜蜂花粉中游离脂肪酸的质谱鉴定。所有脂肪酸的线性相关系数均大于 0.9999, 检出限为 24.76 ~ 98.79 fmol。

**关键词** 高效液相色谱-质谱, 荧光检测, 柱前衍生, 脂肪酸, 蜂花粉

## 1 引言

脂肪酸广泛分布于自然界中, 是生物体内重要的营养物质和代谢产物, 对调节生物体内各项生理和生物功能起着重要作用。由于这类化合物在紫外-可见光区吸收较弱, 光度法难以准确测定<sup>[1]</sup>, HPLC 荧光检测法具有较高的灵敏度。用于脂肪酸测定的荧光标记试剂主要有溴代香豆素类化合物<sup>[2]</sup>和重氮甲烷类<sup>[3]</sup>, 通常情况下这些化合物对潮气及水不稳定。文献[4]采用 NOEPES 磺酸酯对脂肪酸类化合物进行了测定, 但衍生过程需在 KOH、冠醚及相转移催化剂的存在下于苯或甲苯溶剂中完成, 分离前需预处理, 费时费力。本实验采用新型荧光试剂 2-(2-(10-蒎基)萘[2,3-d]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯作为柱前衍生化试剂, 以 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 作溶剂, 在 90 °C 下以 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 作催化剂可获得稳定的荧光产物。衍生产率高, 条件温和, 操作简便, 衍生液不必预处理可直接进样分析。在激发和发射波长分别为 250 nm 和 512 nm 荧光检测下, 采用梯度洗脱对油菜蜂花粉中的游离脂肪酸实现了快速、灵敏的测定, 并对实际样品中各衍生组分进行了在线的柱后质谱鉴定, 结果满意。

## 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、大气压化学电离源 (APCI); Eclipse XDB-C<sub>8</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Agilent 公司); 2-(2-(10-蒎基)萘[2,3-d]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯 (自制); 20 种脂肪酸标准样品 (上海试剂厂); 光谱纯乙腈 (ACN, 德国 Merck 公司); 油菜蜂花粉 (青海、新疆)。其它试剂均为分析纯, 水由 Milli-Q 超纯水系统制备, DMF 经减压蒸馏后使用。

### 2.2 标准溶液的配制

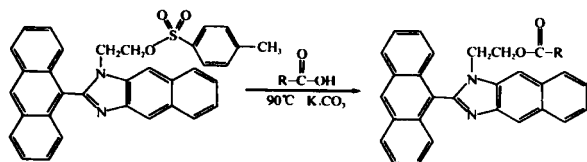
准确取定量脂肪酸标准品, 用光谱纯乙腈配成 10 mmol/L 的溶液 (长链脂肪酸需加少量 DMF 助溶)。称取 271.0 mg 的 2-(2-(10-蒎基)萘[2,3-d]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯, 用 DMF 定容至 10 mL, 浓度为 50 mmol/L。相应低浓度的衍生试剂 (5.0 × 10<sup>-3</sup> mol/L) 及低浓度脂肪酸 (1.0 × 10<sup>-4</sup> mol/L) 的标准液分别用 DMF 和光谱纯乙腈稀释而成。

### 2.3 标准品的衍生过程

向盛有 10 mg 无水 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 催化剂的 2 mL 安培瓶中依次加入 210 μL DMF、50 μL 混合脂肪酸 (0.1 mmol/L) 和 140 μL 衍生试剂溶液 (5.0 × 10<sup>-3</sup> mol/L), 封口后于 90 °C 恒温水浴下振荡反应 40 min,

2006-08-21 收稿; 2006-11-11 接受  
本文系国家自然科学基金资助项目 (No. 20075016)  
\* E-mail: jnyou6304@163.com

取出放冷后,加入 600  $\mu\text{L}$  ACN/DMF混和液 (ACN/DMF, 1:1, V/V)稀释后直接进样 10  $\mu\text{L}$  (50 pmol)分析。衍生反应如下:



## 2.4 色谱与质谱条件

Eclipse XDB-C<sub>8</sub>色谱柱 (4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。流动相 A: 50%乙腈水溶液 (含有 30 mmol/L 的 HCOONH<sub>4</sub>, pH 3.5); B: 100% 的乙腈。流速为 1.0 mL/min, 柱温 30。荧光激发和发射波长分别为: 250 nm 和 512 nm。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间 <i>T</i> (min)	0	20	30	45	50
A (%)	95	30	10	0	0
B (%)	5	70	90	100	100

大气压化学电离源 (APCI), 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, 气化温度 450, 毛细管电压 3500 V, 电晕电流 4000 nA (positive model)<sup>[5,6]</sup>。

## 3 结果与讨论

### 3.1 2-(2-(10-蒎基)萘[2,3-d]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯的稳定性与光谱性质

2-(2-(10-蒎基)萘[2,3-d]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯是由 2-(2-(10-蒎基)萘[2,3-d]咪唑)乙醇与对甲苯磺酰氯在吡啶溶剂中缩合反应而成,产物经水洗后在乙腈中重结晶。获得的产品对常规有机溶剂和水稳定,在 DMF 溶液中于室温下放置一星期,对脂肪酸的衍生产率未见明显改变。试剂分子展现出两个紫外吸收带,分别为 247 和 253 nm。后者与前者的强度比为 1:0.88。在甲醇、乙腈和乙醇 3 种溶剂中的最大紫外吸收带未见明显的红移或蓝移。甲醇为 254 nm、乙腈为 253 nm、乙醇为 254 nm。3 种溶剂的摩尔吸光系数 ( $\epsilon$ ) 分别为  $2.31 \times 10^5$  (254 nm)、 $2.07 \times 10^5$  (253 nm) 和  $2.18 \times 10^5$  (254 nm)  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 。实验中将 AN ITS 与先前报道的吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯<sup>[7]</sup> (AETS) 进行了对比,相同操作条件下 AETS 于前述 3 种溶剂中的最大紫外吸收分别为 254、253 和 255 nm; 摩尔吸光系数 ( $\epsilon$ ) 分别为  $5.45 \times 10^4$  (254 nm, 甲醇)、 $5.95 \times 10^4$  (253 nm, 乙腈) 和  $5.36 \times 10^4 \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (255 nm, 乙醇)。计算表明 3 种溶剂中两种试剂分子的摩尔吸光系数的比值为: AN ITS/AETS = 3.47 ~ 4.24。在 253 nm 的吸收带 AN ITS 显示出更强的摩尔吸光度。荧光光谱的扫描结果表明: AN ITS 在 3 种溶剂中的激发和发射波长均分别为 250 nm 和 512 nm, 溶剂的极性变化对 AN ITS 的最大发射波长影响相对较小,与 AETS 相比而言, AN ITS 发射波长较长 ( $\lambda_{\text{emAN ITS}} = 520 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emAETS}} = 440 \text{ nm}$ )。高的发射波长更有利于降低溶剂的背景吸收,大幅度提高检测灵敏度。

### 3.2 衍生条件的优化

2-(2-(10-蒎基)萘[2,3-d]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯与脂肪酸的衍生化反应随溶剂的不同,产率有显著差异。实验中分别选取乙腈 (ACN)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 干燥后减压蒸馏处理)、四氢呋喃 (THF) 和二甲亚砜 (DMSO, 干燥后减压蒸馏处理) 作为溶剂体系。以丙酸、庚酸、十二酸、十六酸为代表,对衍生产率进行了考察,结果表明: 四氢呋喃衍生产率较低。尽管 DMSO 具有与 DMF 相当的衍生产率,然而以 DMSO 为溶剂时所获得的衍生产物,在色谱分离过程中产生几个较大的干扰峰,色谱分离造成困难,故实验中选取 DMF 作衍生化溶剂。实验选取 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 NaAC 作为碱性催化剂,对衍生化产率的考察结果如图 1a。由图 1a 可知, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 作碱性催化剂时衍生产率最高,故实验选取 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 为碱性催化剂。尽管衍生产率随 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的用量增加而提高,但过高的用量将导致试剂的严重分解,实验中选取 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的用量为 10 mg。以丙酸、庚酸、十二酸、十六酸为代表,对衍生化温度进行了考察,结果表明: 衍生化产率随温度升高而提高,超过 90 衍生化率随之降低,可能过高的温度导致产物的分解,实验中选择衍生化温度为 90, 衍生化时间 40 min。对衍生试剂用量的考察结果见图 1b。

结果表明,当衍生试剂总摩尔数为脂肪酸总摩尔数的 7 倍时,衍生产率达最高。

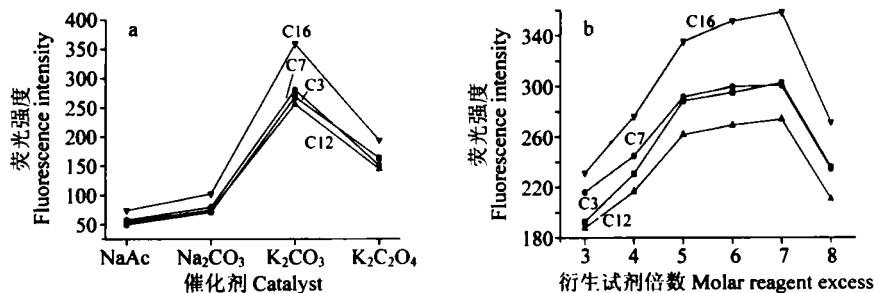


图 1 催化剂种类 (a) 及衍生试剂用量 (b) 对衍生产率的影响

Fig 1 Effect of catalyst types(a) and molar reagent amount (b) on derivatization yields

C3. 丙酸 (propionic acid); C7. 庚酸 (heptanoic acid); C12. 十二酸 (dodecanoic acid); C16. 十六酸 (hexadecanoic acid)。

### 3.3 标准品的色谱分离及质谱鉴定

按上述优化条件,对 20 种标准脂肪酸衍生物的色谱分离见图 2。所有衍生物均获得良好的基线分离。其中主要杂质组分 A 是试剂分解后的 2-(2-(10-蒎基)萘 [2,3-d]咪唑)乙醇,组分 D 是试剂峰,组分 B 和 C 是试剂对 DMF 分解后的衍生产物,质谱数据为 B:  $m/z$  398.2; C:  $m/z$  407.2,两组分的结构未进行归属。采用大气压化学电离源进行在线的柱后质谱鉴定,各衍生物显示出强烈的分子离子峰和相应的特征碎片离子峰,数据见表 2。以庚酸衍生物为例的质谱裂解模式见图 3A,质谱见图 3B (分别为一级和二级质谱)。庚酸衍生物的一级质谱分子离子峰为  $m/z$  501.0  $[M+H]^+$ 。二级质谱的 4 个特征碎片峰分别归属为:  $m/z$  388.9  $[M^1+H]^+$  ( $M^1$ 代表 2-(2-(10-蒎基)萘 [2,3-d]咪唑)乙醇);  $m/z$  371.3  $[M^1+H-H_2O]^+$ ;  $m/z$  344.9  $[M^1-CH_2CH_2OH]^+$ ;  $m/z$  156.8  $[M+H]^+-[M^1-CH_2CH_2OH]^+$ 。

### 3.4 线性回归方程、检出限及重现性

进样量在 200.0 pmol ~ 97.66 fmol 范围内 (浓度范围在  $9.766 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$  到  $20 \mu\text{mol/L}$ ),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 3。各脂肪酸衍生物的线性相关系数均大于 0.9999,各脂肪酸检出限按信噪比为 3 计算 ( $S/N=3$ ) 在 24.76 ~ 98.79 fmol 之间。在相同洗脱条件下,对 50 pmol 脂肪酸衍生物进行平行 6 次测定,保留时间和峰面积重现性见表 3,保留时间的相对标准偏差小于 0.18%,峰面积的相对标准偏差小于 0.91%。

### 3.5 实际样品分析

**3.5.1 蜂花粉中游离脂肪酸的提取** 将油菜花粉研细后,分别称取青海和新疆油菜花粉 3.0 g 于 2 个 10 mL 容量瓶中,用 10 mL 氯仿浸泡,超声振荡数次并放置过夜,过滤,滤液加 1.6 mL 吡啶超声振荡 30 s,使游离脂肪酸转变为相应的有机盐,溶剂  $N_2$  吹干后分别用 2.5 mL DMF 溶解备用。

**3.5.2 实际样品的测定** 按前述实验条件,青海油菜花粉中脂肪酸衍生物的色谱分离及质谱离子流图分别见图 4 (A 和 B),新疆油菜花粉的分离图谱和质谱离子流图略。2 种花粉种游离脂肪酸的测

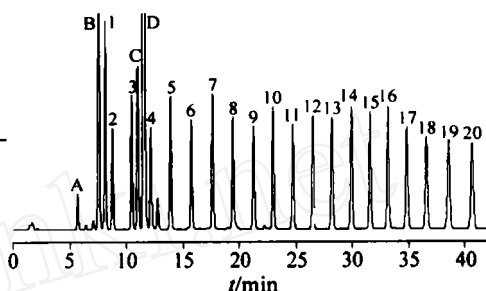


图 2 标准脂肪酸衍生物的色谱分离图 (50 pmol)

Fig 2 Chromatogram of fatty acid derivatives (50 pmol) 色谱条件见实验部分 (chromatographic conditions as described in experimental section)。1. 甲酸 (formic acid); 2. 乙酸 (acetic acid); 3. 丙酸 (propionic acid); 4. 正丁酸 (butyric acid); 5. 戊酸 (valeric acid); 6. 己酸 (hexanoic acid); 7. 庚酸 (heptanoic acid); 8. 辛酸 (octoic acid); 9. 壬酸 (pelargonic acid); 10. 癸酸 (decoic acid); 11. 十一酸 (undecanoic acid); 12. 十二酸 (dodecanoic acid); 13. 十三酸 (tridecanoic acid); 14. 十四酸 (tetradecanoic acid); 15. 十五酸 (pentadecanoic acid); 16. 十六酸 (hexadecanoic acid); 17. 十七酸 (heptadecanoic acid); 18. 十八酸 (octadecanoic acid); 19. 十九酸 (nonadecanoic acid); 20. 二十酸 (arachidic acid); A. 2-(2-(anthracen-10-yl)-1H-naphtho [2,3-d]imidazol-1-yl)-ethanol); B.  $m/z$  398.2; C.  $m/z$  407.2 (结构未定, molecular structure unidentified); D. 试剂峰 (reagent peak)。

定结果见表 4。

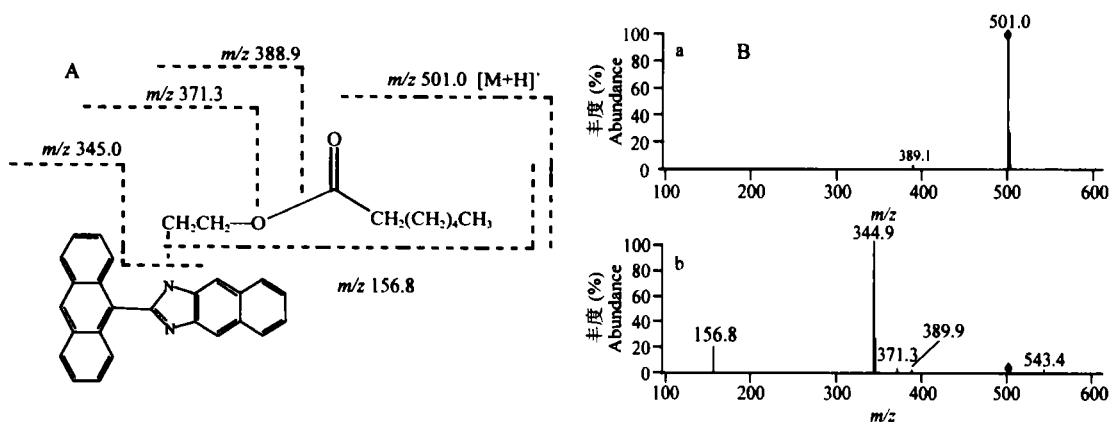


图 3 庚酸衍生物质谱峰归属 (A) 及其一级 (a) 与二级 (b) 质谱图 (B)

Fig 3 Mass breakage mode of heptic acid derivative (A) and its MS spectrum (B) (B-a), MS/MS spectrum (B-b).

表 2 脂肪酸衍生物的质谱数据

Table 2 MS and MS/MS data of fatty acid derivatives

脂肪酸 Fatty acids	分子量 Molecular weight	衍生物的分子量 Molecular weight of derivatives	一级质谱数据 MS data for the molecular ion [M + H] <sup>+</sup>	二级质谱的特征峰 MS/MS data for the specific fragment ions	二级质谱的特征峰 MS/MS data for the specific fragment ions [M + H] <sup>+</sup> - [M <sup>1</sup> - CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup>
C <sub>1</sub>	46	416	417.2	389.0, 371.0, 345.0	#
C <sub>2</sub>	60	430	431.1	389.8, 370.9, 344.9	#
C <sub>3</sub>	74	444	445.2	389.8, 371.7, 344.9	#
C <sub>4</sub>	88	458	459.2	389.9, 372.0, 345.0	114.7
C <sub>5</sub>	102	472	473.1	389.6, 371.1, 344.9	#
C <sub>6</sub>	116	486	487.1	389.5, 372.0, 344.9	142.7
C <sub>7</sub>	130	500	501.1	389.4, 371.3, 344.9	156.8
C <sub>8</sub>	144	514	515.2	389.5, 371.6, 344.9	170.8
C <sub>9</sub>	158	528	529.2	389.4, 371.8, 344.9	184.8
C <sub>10</sub>	172	542	543.2	389.3, 370.9, 344.9	198.8
C <sub>11</sub>	186	556	557.2	389.3, 370.9, 344.9	212.9
C <sub>12</sub>	200	570	571.3	389.5, 370.6, 344.9	226.8
C <sub>13</sub>	214	584	585.3	389.5, 370.5, 344.9	240.9
C <sub>14</sub>	228	598	599.3	389.2, 370.9, 344.9	255.0
C <sub>15</sub>	242	612	613.3	389.4, 371.9, 344.9	268.9
C <sub>16</sub>	256	626	627.3	389.2, 371.0, 345.0	282.9
C <sub>17</sub>	270	640	641.4	389.2, 371.0, 345.0	297.0
C <sub>18</sub>	284	654	655.4	389.3, 371.9, 344.9	311.0
C <sub>19</sub>	298	668	669.4	389.3, 370.8, 344.9	325.0
C <sub>20</sub>	312	682	683.4	389.2, 370.9, 344.8	339.2

#: 数据未显示 (data are not shown).

表 3 脂肪酸衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限及保留时间和峰面积的重现性 (n=6)

Table 3 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits and repeatability for peak area and retention time (n=6)

脂肪酸 Fatty acid	Y = A * X + B	线性相关系数 r	检出限 Detection limits (f mol)	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 (%)
C <sub>1</sub>	Y = 22.80X + 12.68	0.9999	24.76	0.18	0.34
C <sub>2</sub>	Y = 6.421X + 3.519	0.9999	49.86	0.16	0.82
C <sub>3</sub>	Y = 5.599X + 3.547	0.9999	65.55	0.14	0.54
C <sub>4</sub>	Y = 4.373X + 1.289	0.9999	75.21	0.067	0.52
C <sub>5</sub>	Y = 5.310X + 2.730	0.9999	33.51	0.045	0.91
C <sub>6</sub>	Y = 4.483X + 3.045	0.9999	86.48	0.022	0.63
C <sub>7</sub>	Y = 5.458X + 2.284	0.9999	29.24	0.017	0.79
C <sub>8</sub>	Y = 4.684X + 2.874	0.9999	65.55	0.015	0.46

续表 3 (continued to Table 3)

脂肪酸 Fatty acid	$Y = A \cdot X + B$	线性相关系数 $r$	检出限 Detection limits (fmol)	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 (%)
C <sub>9</sub>	$Y = 4.407X + 3.163$	0.9999	31.89	0.020	0.53
C <sub>10</sub>	$Y = 5.035X + 0.9316$	0.9999	43.39	0.027	0.74
C <sub>11</sub>	$Y = 4.362X + 3.026$	0.9999	49.86	0.032	0.43
C <sub>12</sub>	$Y = 4.924X + 2.756$	0.9999	65.55	0.039	0.37
C <sub>13</sub>	$Y = 5.103X + 3.335$	0.9999	65.55	0.047	0.39
C <sub>14</sub>	$Y = 5.641X + 3.709$	0.9999	49.86	0.058	0.45
C <sub>15</sub>	$Y = 5.500X + 2.708$	0.9999	75.21	0.058	0.43
C <sub>16</sub>	$Y = 6.028X + 4.156$	0.9999	43.49	0.057	0.56
C <sub>17</sub>	$Y = 5.404X + 3.035$	0.9999	57.18	0.066	0.60
C <sub>18</sub>	$Y = 5.257X + 3.344$	0.9999	26.70	0.079	0.55
C <sub>19</sub>	$Y = 5.496X + 3.630$	0.9999	27.89	0.089	0.29
C <sub>20</sub>	$Y = 5.754X + 3.567$	0.9999	98.79	0.10	0.16

X:进样量 (injected amount/pmole); Y:峰面积 (peak area)

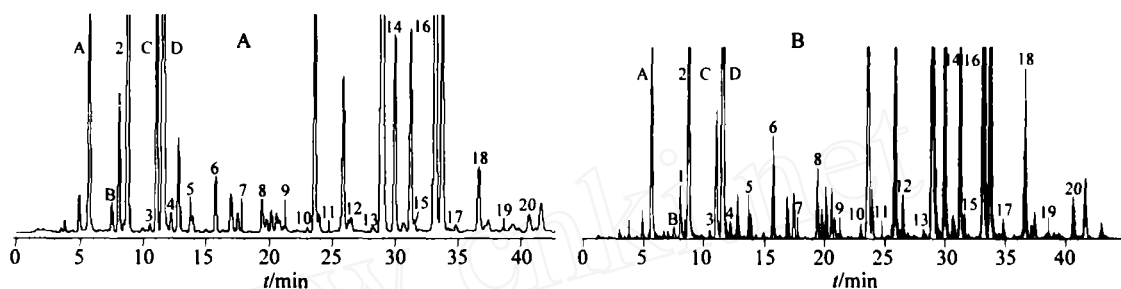


图 4 青海油菜花粉中游离脂肪酸的色谱分离图 (A) 和质谱离子流图 (B)

Fig 4 Chromatogram of separation (A) and MS ion current profile (B) of free fatty acid from Rape Bee Pollen of Qinghai

其它条件同图 3 (other conditions same as Fig 3)。

表 4 实际样品中游离脂肪酸的测定结果 ( $n = 3$ )Table 4 Results of free fatty acids from real sample ( $n = 3$ )

脂肪酸 Fatty acid	青海油菜花粉 Rape bee pollen of Qinghai ( $\mu\text{g/g}$ )	新疆油菜花粉 Rape bee pollen of Xinjiang ( $\mu\text{g/g}$ )	脂肪酸 Fatty acid	青海油菜花粉 Rape bee pollen of Qinghai ( $\mu\text{g/g}$ )	新疆油菜花粉 Rape bee pollen of Xinjiang ( $\mu\text{g/g}$ )
C <sub>1</sub>	1.19 $\pm$ 0.06	1.25 $\pm$ 0.05	C <sub>11</sub>	0.11 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.03
C <sub>2</sub>	38.3 $\pm$ 1.3	48.3 $\pm$ 1.4	C <sub>12</sub>	3.69 $\pm$ 0.13	3.58 $\pm$ 0.12
C <sub>3</sub>	0.49 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.02	C <sub>13</sub>	0.85 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.05
C <sub>4</sub>	1.92 $\pm$ 0.08	1.54 $\pm$ 0.06	C <sub>14</sub>	47.4 $\pm$ 1.6	32.1 $\pm$ 1.2
C <sub>5</sub>	1.53 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.04	C <sub>15</sub>	2.52 $\pm$ 0.11	1.94 $\pm$ 0.08
C <sub>6</sub>	7.45 $\pm$ 0.38	5.78 $\pm$ 0.13	C <sub>16</sub>	174.3 $\pm$ 3.0	136.1 $\pm$ 2.7
C <sub>7</sub>	0.39 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.01	C <sub>17</sub>	2.58 $\pm$ 0.10	4.09 $\pm$ 0.15
C <sub>8</sub>	1.88 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.01	C <sub>18</sub>	26.1 $\pm$ 1.0	22.3 $\pm$ 1.1
C <sub>9</sub>	2.28 $\pm$ 0.09	1.36 $\pm$ 0.05	C <sub>19</sub>	2.62 $\pm$ 0.12	8.74 $\pm$ 0.45
C <sub>10</sub>	0.97 $\pm$ 0.05	0.86 $\pm$ 0.04	C <sub>20</sub>	8.26 $\pm$ 0.41	16.12 $\pm$ 0.63

### 3.6 结论

采用 2-(2-(10-蒎基)萘 [2,3-d]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯作为柱前衍生化试剂,建立了灵敏、快速测定油菜花粉中脂肪酸的方法,同时实现了在线的柱后质谱鉴定。所建立的方法表明:试剂不仅稳定,且对各脂肪酸的标记具有灵敏、快速和衍生产率高的特性。标记后的衍生产物具有很强的荧光发光性质,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。对油菜花粉的测定结果表明:花粉中含有大量游离的脂肪酸,各脂肪酸的含量存在明显差异。总体而言,含偶数碳脂肪酸含量明显高于含奇数碳的脂肪酸。对低碳数脂肪酸而言,除 C<sub>2</sub> 含量稍高外, C<sub>4</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>10</sub> 和 C<sub>12</sub>

含量相对较低,随偶碳数的增加相应含量迅速提高,高数碳的脂肪酸以 C16 为中心呈现正态分布,十六酸含量达最高。

### References

- 1 Ingalls S T, Minkler P E, Hoppel C L. *J. Chromatogr.*, **1984**, 299: 365 ~ 376
- 2 Takadate A, Masuda T, Murata C, Haratake C, Isobe A, Irikura M, Goya S. *Anal. Sci.*, **1992**, 8: 695 ~ 697
- 3 Yoshida T, Uetake A, Yamaguchi H, Nimura N, Kinoshita T. *Anal. Biochem.*, **1988**, 173: 70 ~ 74
- 4 Chi Y L, Hsin L W, Su H C, Hwang S K, Shou M W. *Chromatographia*, **2000**, 51: 315 ~ 321
- 5 Karine N, Jean-Luc W, Kurt H. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 744: 249 ~ 255
- 6 Friso S, Choi S W, Gregory G, Dolnikowski, Jacob S. *Anal. Chem.*, **2002**, 74: 4526 ~ 4531
- 7 Zhao Xian en (赵先恩), Li Yulin (李玉林), Shi Yunwei (石运伟), Chen Xiangming (陈向明), Zhang Haifeng (张高峰), Sun Xuejun (孙学军), You Jinmao (尤进茂). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34 (2): 150 ~ 154

## Determination of Free Fatty Acids by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Identification with Mass Spectrometry

Zhu Fang<sup>1</sup>, Zhao Wen-Chen<sup>1</sup>, Zhao Xian-En<sup>2</sup>, Suo You-Rui<sup>2</sup>, Liu Su-Juan<sup>1</sup>, You Jin-Mao<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> (College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165)

<sup>2</sup> (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

**Abstract** On a reversed-phase Eclipse XDB-C<sub>8</sub> chromatographic column, 20 fatty acids were derivatized using 2-(2-(anthracen-10-yl)-1H-naphtho[2,3-d]imidazol-1-yl)ethyl-*p*-toluenesulfonate (ANITS) as pre-column derivatization reagent and separated by HPLC in conjunction with a gradient elution with fluorescence detection and MS identification. The reagent reacted with fatty acids in the presence of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> catalyst at 90 °C for 40 min in *N,N*-dimethylformamide solvent to give maximum and constant fluorescence intensity with the addition of 7-fold molar reagent excess to total molar fatty acids. The fluorescence excitation and emission wavelengths of derivatives were  $\lambda_{ex} = 250$  nm and  $\lambda_{em} = 512$  nm, respectively. The identification of fatty acid derivatives was performed by the online APCI/MS (atmospheric pressure chemical ionization source) in positive mode. All linear correlation coefficients for fatty acid derivatives are over 0.9999, and detection limits, at signal-to-noise of 3:1, are 24.76 - 98.79 fmol for labeled fatty acids. The established method is sensitive and repeatable. It has been applied to for the determination of free fatty acids from rape bee pollen samples with satisfactory results.

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

(Received 21 August 2006; accepted 11 November 2006)