

研究报告

柱前衍生 - 反相高效液相色谱荧光测定及质谱 鉴定土壤和苔藓中的脂肪酸

赵先恩^{1,3}, 孙菁^{1,3}, 索有瑞¹, 刘素娟², 陈桂琛¹,
孙学军², 尤进茂^{1,2}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2 曲阜师范大学 化学科学学院,
山东 曲阜 273165; 3 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 合成新型荧光衍生试剂 1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑 [4,5-f]9,10-菲 (TSEPIP), 将其作为柱前衍生化试剂, 在 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱上, 采用梯度洗脱实现了 30 种游离脂肪酸 (FFA) 衍生物的基线分离。利用柱后在线的串联质谱以 APC/ESI 大气压化学电离源正离子模式实现了各组分的质谱定性。对土壤与两种苔藓 (狭叶绢藓、曲尾藓) 中 FFA 组分的定量结果表明, 苔藓植物从土壤中富集了大量的游离脂肪酸。荧光检测的激发和发射波长分别为 $\lambda_{ex} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 380 \text{ nm}$ 。绝大多数脂肪酸的线性回归系数大于 0.999 3, 检出限为 3.2 ~ 37 fmol。建立的方法具有良好的重复性, 对实际样品测定结果满意。

关键词: 高效液相色谱 - 质谱; 荧光检测; 柱前衍生; 脂肪酸

中图分类号: O657.63; O623.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2006)05-0001-06

Pre-column Derivatization - HPLC Determination of Free Fatty Acids in Soil and Bryophyte with Fluorescence Detection and Mass Spectrometric Identification

ZHAO Xian-en^{1,3}, SUN Jing^{1,3}, SUO You-rui¹, LIU Su-juan², CHEN Gui-chen¹,
SUN Xue-jun², YOU Jin-mao^{1,2}

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2 College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; 3 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A simple and sensitive method for the determination of free fatty acids using pre-column derivatization - reversed phase HPLC with fluorescence detection and mass spectrometric identification was developed. 1-[2-(*p*-toluenesulfonate) ethyl]-2-phenylimidazole [4,5-f]9,10-phenanthrene (TSEPIP) was synthesized and used as the pre-column derivatization reagent. Experimental results showed that free fatty acids could react rapidly with TSEPIP in the presence of K₂CO₃ catalyst at 90 °C in DMF solvent. Free fatty acid derivatives were separated on Eclipse XDB-C₈ column with a good baseline resolution. The identifications of 30 fatty acid derivatives were carried out by post-column in tandem mass spectrometer with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source. The contents of 30 free fatty acids in soil and two kinds of bryophytes (*Entodon macrosporus*, *Dicranum caesium*) were determined. The results indicated that the bryophyte plants enriched an abundance of free fatty acids from soil. The fluorescence excitation and emission wavelengths of derivatives were set at $\lambda_{ex} = 260 \text{ nm}$ and $\lambda_{em} = 380 \text{ nm}$, respectively. The correlation coefficients for most fatty acid derivatives were >0.999 3, and the detection limit range (at signal-to-noise of 3:1) was 3.2 - 37 fmol. The method has been applied to the determination of free fatty acids in real samples with satisfactory results.

Key words: HPLC - MS; Fluorescence detection; Pre-column derivatization; Fatty acids

脂肪酸广泛分布于动植物体内, 对于调节某些代谢作用和生理功能起着重要作用, 其含量测定对

收稿日期: 2005-09-29; 修回日期: 2005-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20075016)

作者简介: 赵先恩 (1981-), 男, 山东莱芜人, 博士研究生; 尤进茂, 联系人, Tel: 0537-4458501, E-mail: jnyou6304@163.com

进一步深入研究生理学和病理生理学以及对临床诊断具有重要意义^[1-2]。某些动植物体内富含人体必需的多种脂肪酸, 对其进行定量分析, 对饮食营养和保健品开发同样具有重要指导意义。

脂肪酸在紫外-可见光区吸收较弱, 光度法难以准确测定^[3]。HPLC 荧光检测法具有较高的灵敏度, 主要荧光衍生试剂有溴代香豆素类化合物^[4]和重氮甲烷类^[5], 然而这两类试剂不稳定。尽管 Chi-yu Lu 等采用 NOEPES 磺酸酯对脂肪酸类化合物进行了测定^[6], 但衍生过程需在氢氧化钾、冠醚及相转移催化剂的存在下于苯或甲苯溶剂中完成, 分离前需进行烦琐的预处理, 既费时又费力。本文采用新合成的 1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲 (TSEP-IP) 作为柱前衍生试剂, 以 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 作溶剂, 在 90 °C 下以 K_2CO_3 作催化剂可获得稳定的荧光产物。本方法试剂稳定、衍生率高、条件温和、操作简便, 衍生溶液不必预处理可直接进样分析。采用梯度洗脱实现了 $C_1 \sim C_{30}$ 脂肪酸衍生物的同时基线分离。对土壤与苔藓植物中的脂肪酸进行了快速、灵敏的测定, 结果满意。

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, 荧光检测器, 100 位自动进样器, 大气压化学电离源 (APCI), Eclipse XDB- C_8 色谱柱 (4.6 × 150 mm, 5 μm, Agilent 公司), 655-10S 型荧光分光光度计 (日本日立)。1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲 (自制, TSEP-IP), 30 种脂肪酸标准样品 (上海试剂厂), 狭叶绢藓 (吉林长白山)、曲尾藓 (四川黄龙), 光谱纯乙腈 (ACN, 德国 Merck 公司), 其他试剂皆为分析纯, 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 经减压蒸馏后使用。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 准确取定量脂肪酸标准品, 用乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L 的溶液 (长链脂肪酸需加入少量 DMF 作为助溶剂)。称取 0.246 0 g 的 TSEP-IP 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 mmol/L) 及低浓度脂肪酸 (0.1 mmol/L) 的标准液分别用 DMF 和乙腈稀释而成。

1.2.2 标准品的衍生过程 向盛有 10 mg 无水 K_2CO_3 的 2 mL 安培瓶中依次加入 200 μL DMF, 50 μL 混合脂肪酸 (0.1 mmol/L), 150 μL 衍生试剂溶液 (5.0 mmol/L), 封口后于 90 °C 恒温水浴下振荡反应 30 min, 放冷后取 100 μL 衍生液加入 150 μL ACN-DMF (体积比 1:1) 溶液稀释后直接进样 10 μL (50 pmol) 分析。衍生反应式见图 1。

1.2.3 色谱与质谱条件 色谱柱: Eclipse XDB- C_8 色谱柱 (4.6 × 150 mm, 5 μm)。流动相 A: 50% ACN 水溶液, B: 50% ACN 水溶液 (含 0.2 mol/L $HCOONH_4$), C: ACN-DMF (体积比 100:2), D: ACN-DMF (体积比 100:30)。

流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温 30 °C。荧光激发和发射波长分别为 $\lambda_{ex} = 260$ nm, $\lambda_{em} = 380$ nm。梯度洗脱程序如表 1。

大气压化学电离源 (APCI), 正离子模式, 喷雾压力 413.68 kPa, 干燥气流量为 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)^[7]。

1.2.4 土壤、苔藓中脂肪酸的提取 称取土壤 20 g, 用 40 mL 氯仿分两次超声振荡提取, 合并提取液过滤, 滤液加 1.5

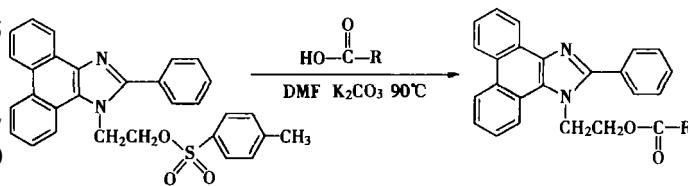


图 1 TSEP-IP 与脂肪酸衍生反应式

Fig. 1 Derivatization scheme of 1-[2-(*p*-toluenesulfonate)ethyl]-2-phenylimidazole[4,5-f]9,10-phenanthrene with fatty acids

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

Time <i>t</i> /min	(A) / %	(B) / %	(C) / %	(D) / %
0	95	0	5	0
4	95	0	5	0
4.2	0	95	5	0
8	0	95	5	0
8.5	0	75	25	0
15	0	50	50	0
40	0	0	100	0
48	0	0	0	100
65	0	0	0	100

mL 吡啶, 超声振荡 20 s 使其转变为相应脂肪酸的有机盐, 溶剂经 N_2 吹干后, 用 600 μ L DMF 定容备用。

新鲜的苔藓植物水洗干燥, 经粉碎后, 分别称取狭叶绢藓 0.218 0 g, 曲尾藓 0.178 6 g, 放入 2 个 10 mL 容量瓶中用 10 mL 氯仿浸泡, 超声振荡数次放置过夜后过滤, 滤液加 1.5 mL 吡啶超声振荡 20 s 使其转变为相应脂肪酸的有机盐, 溶剂经 N_2 吹干分别用 500 μ L DMF 定容备用。

1.3 TSEPIP 的合成

1.3.1 2-苯基咪唑 [4,5-f]9,10-菲的合成 2-苯基咪唑 [4,5-f]9,10-菲的合成参考文献 [8] 进行: 500 mL 三颈烧瓶中加入 16 g 菲醌, 10 mL 苯甲醛, 120 g 醋酸铵, 最后加入 300 mL 冰醋酸溶解, 在 80 ~ 90 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 3 h, 冷却, 倒入 300 mL 水中, 用氨水调节 pH 7 ~ 8, 得浅黄色沉淀, 抽滤, 水洗两次, 凉干后粗品在 ACN - DMF (体积比 5 : 1) 中重结晶, 产率 90%。

1.3.2 1-(2-羟乙基)-2-苯基咪唑 [4,5-f]9,10-菲的合成 500 mL 三颈烧瓶中加入 12 g 2-苯基咪唑 [4,5-f]9,10-菲, 4.5 g 碳酸亚乙酯, 痕量 KOH 和 150 mL DMF, 溶液迅速加热回流 6 h, 冷却, 倒入 300 mL 水中, 过滤, 水洗, 乙醇 - 水 (体积比 3 : 2) 洗, 凉干后在 ACN - DMF (体积比 5 : 1) 中重结晶, 得白色针状晶体, 产率 90% 以上。m.p. 274.5 ~ 275.8 $^{\circ}$ C, Found: C, 81.60; H, 5.34; N, 8.30; Calculated: C, 81.63; H, 5.36; N, 8.28。R (KBr): 3 193.13 ($-\text{OH}$), 1 603.5 ($\text{ph}-\text{C}-\text{N}-$), 1 559.6, 1 525.5, 1 496.8, 1 448.7 (ph), 1 397.6, 1 362.8 ($\text{C}-\text{H}$), 1 063.3 ($\text{C}-\text{O}$), 1 031.1, 770.9, 749.3, 722.4, 731.1。m/z (M + H)⁺: 339.0。以上数据验证了所合成的产物为目标化合物。

1.3.3 TSEPIP 的合成 100 mL 三角烧瓶加入 1.5 g 1-(2-羟乙基)-2-苯基咪唑 [4,5-f]9,10-菲和 50 mL 吡啶, 电磁搅拌, 冰浴控温 0 $^{\circ}$ C, 30 min 内分批加入 2.53 g 对甲苯磺酰氯, 0 $^{\circ}$ C 搅拌反应 6 h 后常温搅拌反应 4 h, 倒入水中, 水洗两次, 凉干后用乙腈重结晶 2 次得白色晶体 1.76 g, 产率 80.5%。m.p. 173.7 ~ 174.6 $^{\circ}$ C, Found: C, 73.13; H, 4.90; N, 5.71; S, 6.52; Calculated: C, 73.15; H, 4.91; N, 5.69; S, 6.51。R (KBr): 3 114.7 ($\text{ph}-\text{N}-\text{CH}_2-$), 1 625.3, 1 609.4 ($\text{ph}-\text{C}-\text{N}-$), 1 545.3, 1 509.6, 1 473.8, 1 444.9 (ph), 1 399.2, 1 378.75 ($\text{C}-\text{H}$), 1 355.7 ($-\text{C}-\text{SO}_2-$), 1 190.2, 1 176.9 ($\text{ph}-\text{S}-$), 1 094.4, 1 014.2, 908.8, 781.3, 754.3, 705.2 m/z (M + H)⁺: 493.0。以上数据验证了所合成的产物为目标化合物。

2 结果与讨论

2.1 TSEPIP 的稳定性与光谱性质

TSEPIP 对常规有机溶剂和水稳定, 在强碱性溶液中 24 h 分解约 95%。在乙腈中最大紫外吸收波长为 259 nm, 摩尔吸光系数 $\epsilon = 6.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (259 nm)。在乙腈溶液中的荧光激发和发射波长分别为 $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$ (未校正)。

2.2 衍生条件的优化

TSEPIP 与脂肪酸的衍生化随溶剂不同衍生化产率有显著差异。实验中分别选取苯、甲苯、ACN、DMF、四氢呋喃 (THF)、二甲亚砜 (DMSO) 作为溶剂体系, 以戊酸、辛酸、十二酸、十六酸为代表, 对衍生化率进行了考察, 结果如图 2a。尽管 DMSO 具有和 DMF 相当的衍生效果, 然而以 DMSO 为溶剂时所获得的衍生物在色谱分离时带来几个较大的干扰峰, 给色谱分析带来困难, 实验中选取 DMF 作衍生化溶剂。磺酸酯与脂肪酸的衍生化随碱性催化剂的不同, 反应产率不同, 实验中选取 K_2CO_3 、 $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 、 Na_2CO_3 、KAc 和柠檬酸钾等几种碱性催化剂, 对衍生化产率进行了考察, 结果表明: K_2CO_3 和 Na_2CO_3 具有最高的衍生化率, 考虑到 K_2CO_3 在 DMF 中具有较大的溶解度, 实验选取 K_2CO_3 为碱性催化剂。对 K_2CO_3 用量的考察表明, 过高的用量会导致试剂的分解, 用量为 10 mg 时具有最大衍生化率。以戊酸、辛酸、十二酸、十六酸为代表, 对衍生化温度进行了考察, 结果见图 2b。衍生化产率随温度升高而提高, 超过 90 $^{\circ}$ C 后衍生化率随之降低, 实验中选择衍生化温度为 90 $^{\circ}$ C, 衍生化时间 30 min。对衍生试剂用量的考察结果表明, 衍生试剂对脂肪酸的摩尔总数达 5 倍以上衍生化率恒定, 实验选取衍生试剂为脂肪酸总量的 5 倍。

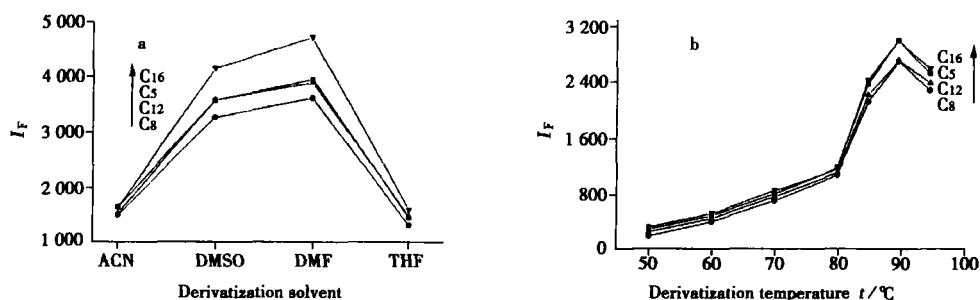


图 2 衍生反应溶剂 (a)及反应温度 (b)的优化

Fig. 2 Optimization of solvent (a) and temperature (b) for derivatization

C₅, 戊酸 (valeric acid); C₈, 辛酸 (octoic acid); C₁₂, 十二酸 (dodecanoic acid); C₁₆, 十六酸 (hexadecanoic acid)

2.3 标准品的色谱分离及质谱鉴定

按前述优化条件, 对 30 种标准脂肪酸衍生后的色谱分离见图 3, 所有衍生物可获得较好的基线分离。图中的主要杂质组分 A 和 B 是试剂在 K₂CO₃ 作用下分解出的 1-(2-羟乙基)-2-苯基咪唑 [4,5-f]9,10-菲和 2-苯基咪唑 [4,5-f]9,10-菲, 组分 C 为试剂峰。D 杂质峰可能是试剂对 DMF 分解后的产物同时衍生的结果, 不影响分离。组分定性采用在线的柱后质谱鉴定, 各组分一级质谱数据见表 2。

2.4 稳定性

取新衍生的同一份标准品衍生液 (50 pmol), 分别在室温放置 0、1、2、4、8、16、24、72 h 时进行色谱分析, 计算得各时间点下各脂肪酸衍生物峰面积对 0 h 时的标准偏差值均小于 3.0%, 表明衍生物对于常规色谱分析稳定性良好。

2.5 重复性、线性回归方程及检出限

在相同洗脱条件下, 对 50 pmol 脂肪酸衍生物进行 6 次平行分析, 保留时间和峰面积重复性见表 2, 保留时间相对标准偏差 RSD (%) 小于 0.41%, 峰面积相对标准偏差 RSD (%) 小于 2.6%。

进样量在 200.0 pmol~24.41 fmol 范围内, 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线性回归方程、相关系数和检出限见表 2。各脂肪酸衍生物的线性相关系数在 0.999 1~0.999 9 之间, 检出限在 3.2~37 fmol 之间 (按 $S/N=3$ 计算)。

表 2 游离脂肪酸衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限、一级质谱与保留时间和峰面积的重复性 (n=6)

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits, mass spectral data of free fatty acid derivatives and repeatability for peak area and retention time (n=6)

Free fatty acid	Linear regression equation $Y=AX+B$	Correlation coefficient r	Detection limit n/fmol	Primary MS[M+1] ⁺	RSD $s_r/\%$	
					Retention time	Peak area
C ₁	$Y=736.5X+208.6$	0.999 5	3.2	367.1	0.37	0.19
C ₂	$Y=169.1X+54.55$	0.999 1	24	381.2	0.41	0.65
C ₃	$Y=147.9X+43.74$	0.999 5	10	395.1	0.35	0.46
C ₄	$Y=94.80X+31.45$	0.999 4	14	409.2	0.32	0.83
C ₅	$Y=141.3X+35.15$	0.999 7	14	423.2	0.19	0.46
C ₆	$Y=113.2X+32.55$	0.999 7	12	437.2	0.18	0.69
C ₇	$Y=132.2X+31.11$	0.999 8	18	451.2	0.12	0.57
C ₈	$Y=120.2X+36.46$	0.999 7	16	465.2	0.099	0.56

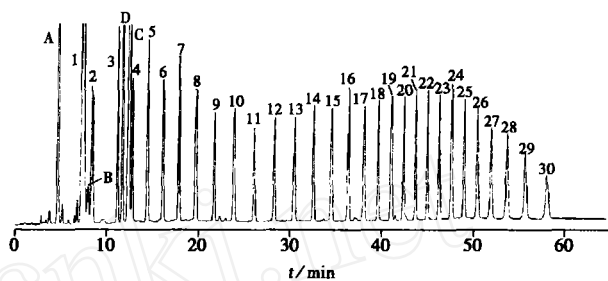


图 3 标准脂肪酸的色谱分离图 (50 pmol)

Fig. 3 Chromatogram of standard fatty acid derivatives (50 pmol) chromatographic conditions as described in experimental section;

1. formic acid; 2. acetic acid; 3. propionic acid; 4. butyric acid;
5. valeric acid; 6. hexanoic acid; 7. heptanoic acid; 8. octoic acid;
9. pelargonic acid; 10. decanoic acid; 11. undecanoic acid; 12. dodecanoic acid; 13. tridecanoic acid; 14. tetradecanoic acid; 15. pentadecanoic acid; 16. hexadecanoic acid; 17. heptadecanoic acid; 18. octadecanoic acid; 19. nonadecanoic acid; 20. eicosanoic acid; 21. heneicosanoic acid; 22. docosanoic acid; 23.tricosanoic acid; 24. tetracosanoic acid; 25. pentacosanoic acid; 26. hexacosanoic acid; 27. heptacosanoic acid; 28. octacosanoic acid; 29. nonacosanoic acid; 30. dotriacontanoic acid;
- A. 1-ethanol-2-phenylimidazole [4,5-f]9,10-phenanthrene;
- B. 2-phenylimidazole [4,5-f]9,10-phenanthrene;
- C. reagent;
- D. impurities

(续表 2)

Free fatty acid	Linear regression equation $Y = AX + B$ *	Correlation coefficient r	Detection limit n / fmol	Primary MS(M + 1) ⁺	RSD $s_r / \%$	
					Retention time	Peak area
C ₉	$Y = 102.6 X + 28.21$	0.999 6	27	479.2	0.089	0.44
C ₁₀	$Y = 112.3 X + 30.46$	0.999 6	24	493.3	0.073	0.31
C ₁₁	$Y = 95.73 X + 25.42$	0.999 6	31	507.3	0.081	0.44
C ₁₂	$Y = 105.3 X + 28.25$	0.999 6	29	521.3	0.063	0.38
C ₁₃	$Y = 105.2 X + 26.44$	0.999 7	29	535.4	0.056	0.24
C ₁₄	$Y = 114.9 X + 31.94$	0.999 5	26	549.4	0.044	0.25
C ₁₅	$Y = 109.7 X + 30.01$	0.999 5	27	563.4	0.043	0.17
C ₁₆	$Y = 128.5 X + 36.37$	0.999 5	22	577.4	0.031	0.095
C ₁₇	$Y = 104.6 X + 30.99$	0.999 5	25	591.4	0.026	0.17
C ₁₈	$Y = 107.2 X + 29.59$	0.999 5	23	605.4	0.019	0.16
C ₁₉	$Y = 102.5 X + 31.35$	0.999 2	24	619.5	0.020	0.16
C ₂₀	$Y = 102.8 X + 32.74$	0.999 3	22	633.5	0.043	0.36
C ₂₁	$Y = 106.7 X + 34.49$	0.999 2	23	647.6	0.072	0.88
C ₂₂	$Y = 110.6 X + 38.75$	0.999 3	25	661.6	0.095	1.2
C ₂₃	$Y = 113.8 X + 30.77$	0.999 3	24	675.6	0.12	1.4
C ₂₄	$Y = 131.4 X + 31.19$	0.999 5	20	689.6	0.20	1.6
C ₂₅	$Y = 122.8 X + 27.39$	0.999 7	21	703.6	0.23	2.0
C ₂₆	$Y = 119.34 X + 23.39$	0.999 9	23	717.6	0.27	2.2
C ₂₇	$Y = 122.3 X - 10.56$	0.999 3	24	731.5	0.24	2.1
C ₂₈	$Y = 118.6 X + 35.99$	0.999 5	30	745.6	0.25	2.4
C ₂₉	$Y = 103.1 X + 34.97$	0.999 4	32	759.5	0.27	2.6
C ₃₀	$Y = 82.02 X + 31.47$	0.999 4	37	773.6	0.24	2.4

* X. injected amount(pmol), Y. peak area

3 实际样品的色谱分离

3.1 回收率

在土壤样品中加入 10 μL 0.1 mmol/L 脂肪酸标准品后, 按照上述提取方法提取后进行衍生, 重复 3 次所得各脂肪酸的回收率在 90% ~ 105% 之间。

3.2 实际样品测定

实际样品的测定借助柱后质谱鉴定。土壤样品的色谱分离图见图 4; 狭叶绢藓色谱分离图见图 5 (曲尾藓样品色谱图略)。峰标注与图 3 相同。实际样品中脂肪酸的测定结果见表 3。结果表明, 两种苔藓中绝大多数脂肪酸含量为土壤的 100 倍以上, 并且长链偶数碳脂肪酸含量明显高于相邻的奇数碳脂肪酸, 这可能与其实生理活性有关。

表 3 实际样品中游离脂肪酸的含量 ($n=3$, $\mu\text{g/g}$)Table 3 Free fatty acids in real samples ($n=3$, $\mu\text{g/g}$)

FFA 脂肪酸	Soil 土壤	Entodon macropodus 狭叶绢藓	Dicranum aesium 曲尾藓	FFA 脂肪酸	Soil 土壤	Entodon macropodus 狭叶绢藓	Dicranum aesium 曲尾藓
C ₁	0.011 5	0.945	0.986	C ₁₆	0.153	103	74.8
C ₂	0.012 6	0.706	0.893	C ₁₇	0.003 45	2.62	4.39
C ₃	0.009 21	0.652	0.561	C ₁₈	0.105	13.4	21.4
C ₄	0.001 78	0.211	0.597	C ₁₉	0.001 86	0.693	0.562
C ₅	0.001 19	0.908	0.795	C ₂₀	0.009 17	3.10	10.1
C ₆	0.001 26	1.18	1.54	C ₂₁	0.001 73	0.484	0.602
C ₇	0.002 14	0.131	0.453	C ₂₂	0.010 7	10.7	11.7
C ₈	0.001 02	0.585	0.534	C ₂₃	0.004 10	2.36	1.42
C ₉	0.001 59	4.66	1.54	C ₂₄	0.023 3	30.5	18.4
C ₁₀	0.004 65	2.75	0.869	C ₂₅	0.004 96	6.79	3.94
C ₁₁	0	0	0	C ₂₆	0.011 8	27.2	11.9
C ₁₂	0	0	0	C ₂₇	0.003 86	3.28	1.81
C ₁₃	0.001 01	0.962	0.651	C ₂₈	0.010 1	19.9	9.94
C ₁₄	0.018 2	0.167	10.6	C ₂₉	0.003 92	1.59	0.789
C ₁₅	0.008 86	1.99	4.59	C ₃₀	0.010 1	16.9	10.9

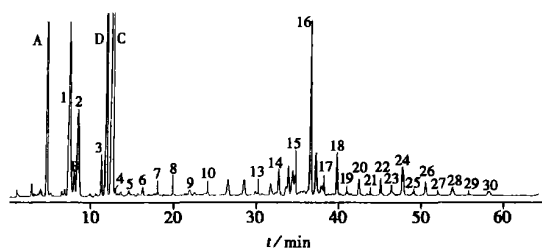


图 4 土壤样品的游离脂肪酸色谱分离图

Fig. 4 Chromatogram of free fatty acids from real soil sample

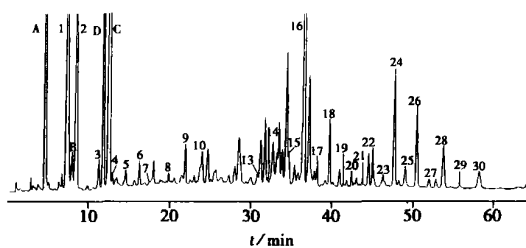


图 5 狭叶绢藓中游离脂肪酸色谱分离图

Fig. 5 Chromatogram of free fatty acids from *Entodon macropodus*

参考文献:

- [1] JOHNSON D W. Contemporary clinical usage of LC/MS: Analysis of biologically important carboxylic acids[J]. *Clinical Biochemistry*, 2005, 38: 351 - 361.
- [2] ROSENFELD J M. Application of analytical derivatization to the quantitative and qualitative determination of fatty acids [J]. *Analytical Chimica Acta*, 2002, 465: 93 - 100.
- [3] NGALLS S T, M NKLER P E, HOPPEL C L. Derivatization of carboxylic acids by reaction with 4 -bromophenacyl trifluoromethanesulfonate prior to determination by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1984, 299: 365 - 376.
- [4] TAKADATE A, MASUDA T, MURATA C, et al. 3-Bromoacetyl-6, 7-methylenedioxcoumarin as a highly reactive and sensitive fluorescence labeling reagent for fatty acids[J]. *Anal Sci*, 1992, 8: 695 - 697.
- [5] YOSHIDA T, UETAKE A, YAMAGUCHI H, et al. New preparation method for 9-anthryldiazomethane (ADAM) as a fluorescent labeling reagent for fatty acids and derivatives[J]. *Anal Biochem*, 1988, 173: 70 - 74.
- [6] LU CH Y, WU H L, CHEN S W, et al. A fluorimetric liquid chromatography for highly sensitive analysis of very long chain fatty acids as naphthoxyethyl derivatives[J]. *Chromatographia*, 2000, 51 (5/6): 315 - 321.
- [7] SMONETTA F, SANGW C, GREGORY G, 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.
- [8] EDGAR A S, ALLAN R D. Reaction of phenanthraquinone and retenequinone with aldehydes and ammonium acetate in acetic acid solution[J]. *Anal Chem*, 1943, 65: 452 - 456.

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《分析测试学报》

国内刊号: CN 44 - 1318/TH

国际标准刊号: ISSN 1004 - 4957

国际刊名代码 CODEN: FCEXES

邮发代号: 46 - 104

国外代号: BM 6013

广告经营许可证: 粤 010029

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物, 中文核心期刊。刊登电子显微学、质谱学、光谱学、色谱学、波谱学及电化学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果, 介绍新仪器装置及在医药、化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、大专院校、医疗、卫生、商检以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

本刊一直列入中国科技期刊统计源, 2004年继续入选为化学类核心期刊; 1987年以来常年入选美国化学文摘千种表, 入选俄罗斯《文摘杂志》; 此外还被英国皇家化学学会《分析文摘》(AA)及《质谱公报》(MBS)系统摘录。

本刊为双月刊, 国内外公开发行。大 16开, 单价: 12.00 元/册, 全年 72元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法: 请从邮局汇款至广州市先烈中路 100号《分析测试学报》编辑部, 邮编: 510070, 写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期), 电话: (020) 87684776或 37656606, E-mail: fxcxb@china.com, http://www.fxcxb.com。