

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² 李玉林¹ 索有瑞¹ 石运伟² 陈向明²
张海峰² 孙学军² 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)

摘要 以吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯 (AETS) 作荧光衍生化试剂, 建立了灵敏、简单的游离脂肪酸反相高效液相色谱测定方法。在 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱上, 实现了 19 种游离脂肪酸 (FFA) 衍生物的完全基线分离。选取 AETS 摩尔数为脂肪酸的 6 倍, 以 DMF 作溶剂, 在 85 条件下以 K₂CO₃ 作催化剂可获得稳定的荧光产物, 条件温和、衍生率高。利用柱后在线串联质谱以 APCI 大气压化学电离源正离子模式实现了各组分的质谱定性。对土壤和 3 种苔藓植物中 (树藓、狭叶绢藓、曲尾藓) FFA 组分定量结果表明, 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 404 nm 和 440 nm。绝大多数脂肪酸的线性相关系数大于 0.9996, 检出限为 12.3 ~ 43.7 fmol。本方法具有良好的重现性, 用于实际样品测定, 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

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^[1]。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^[2]和重氮甲烷类^[3], 然而该类化合物对潮气及水不稳定。尽管 Lu 等^[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、冠醚以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。本实验采用新型荧光试剂吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯 (AETS) 作为柱前衍生化试剂, 以 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 作溶剂, 在 85 条件下以 K₂CO₃ 作催化剂可获得稳定的荧光产物。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。激发和发射波长分别为 404 nm 和 440 nm, 采用梯度洗脱实现了 C₁-C₁₉ 脂肪酸衍生物的同时分离。对土壤和苔藓植物样品中低含量的游离脂肪酸进行了快速、灵敏的测定, 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 (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-C₈ 色谱柱 (4.6 × 150 mm, 5 μm, Agilent 公司)。吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯 (自制); 19 种脂肪酸标准样品 (上海试剂厂), 树藓和狭叶绢藓 (长白山); 曲尾藓 (四川黄龙); 光谱纯乙腈 (德国 Merck 公司)。其他试剂皆为分析纯, 水由 Milli-Q 超纯水系统制备。DMF 经减压蒸馏后使用。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制 准确取定量脂肪酸标品, 用光谱纯乙腈配成 0.01 mol/L 的溶液 (长链脂肪酸需加入少量 DMF 作为助溶剂)。称取 0.1965 g 的吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯用 DMF 定容至 10 mL, 浓度为 0.05 mol/L。相应低浓度的衍生试剂 (5.0 × 10⁻³ mol/L) 及低浓度脂肪酸 (1.0 × 10⁻⁴ mol/L) 的标准液分别用 DMF 和光谱纯乙腈稀释而成。

2.2.2 标准品的衍生过程 向盛有 10 mg 无水 K₂CO₃ 催化剂的 2 mL 安培瓶中依次加入 180 μL

2005-04-16 收稿; 2005-07-15 接受
本文系国家自然科学基金资助项目 (No. 20075016)

DMF, 50 μL 混合脂肪酸 (0.1 mmol/L), 120 μL 衍生试剂溶液 (5.0×10^{-3} mol/L), 封口后于 85 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴下振荡反应 45 min, 取出放冷后, 加入 1.05 mL 乙腈水溶液 ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 1:1, V/V) 稀释后直接进样 10 μL (35.7 pmol) 分析。衍生反应概况如图 1。

2.2.3 色谱与质谱条件 色谱柱: Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm)。流动相 A: 20% 乙腈水溶液; B: 100% 的乙腈。流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。荧光激发 λ_{ex} 和发射波长 λ_{em} 分别为 404 nm 和 440 nm。梯度洗脱程序为 15% B 20 min 线性梯度到 25% B, 到 50 min 线性梯度到 100% B, 100% B 再运行 15 min。

大气压化学电离源 (APCI), 正离子模式, 喷雾压力 0.42 MPa, 干燥气流量为 5 L/min, 干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 气化温度 450 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压 3500 V, 电晕电流 4000 nA (Pos) [5, 61]。

3 结果与讨论

3.1 吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯的合成

3.1.1 吡啶酮的合成 500 mL 三颈烧瓶, 配置机械搅拌、回流冷凝。烧瓶中加入 25 g N-苯基邻胺基苯甲酸和 100 mL H_2SO_4 , 摇匀, 沸水浴搅拌反应 4 h, 产物慢慢倒入 1400 mL 沸水中, 快速搅拌, 有大量黄色沉淀析出, 煮沸 5 min, 降温抽滤, 固体用 1400 mL 1.0% Na_2CO_3 水溶液中煮沸 5 min, 用 1:1 HCl 调至 pH 7.0~8.0, 抽滤、水洗, 凉干后用冰醋酸/苯胺 (5:1, V/V) 重结晶, 母液水洗回收。总产率约 85%。

3.1.2 吡啶酮-9-羟乙基的合成 500 mL 的三颈烧瓶中加入 25 g 吡啶酮, 20 g 碳酸亚乙酯, 痕量的 KOH 和 80 mL DMF, 内容物迅速加热至回流, 反应 6 h, 反应液用旋转蒸发仪浓缩, 浓缩液用热乙醚萃取 4 次, 合并醚层并减压挥发干, 剩余黄色油状液体倒入 400 mL 水中, 剧烈搅拌, 固化, 过滤, 固体凉干后用苯重结晶两次得纯品 12.0 g, 产率 39.5%。m.p. 212.2~213.8, 实验测得 C 75.31, H 5.44, N 5.86 (理论值 C 75.30, H 5.45, N 5.85)。IR (KBr): 3325.8 (ν_{OH}), 1609.9 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1569 (ph), 1499.9, 1460.6, 1380.1, 1290.1, 755.9, 673.5。 $^1\text{H NMR}$: 1.66~1.73 (ν_{CH_3}), 5.31~5.52 ($\nu_{\text{CH-O}}$), 7.08~8.08 (ph), 12.3 (OH)。m/z (M+H)⁺: 240。

3.1.3 吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯的合成 在 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 4.0 g 对甲苯磺酰氯和 30 mL 吡啶, 冰水浴控温 0 $^{\circ}\text{C}$, 30 min 内搅拌滴加溶有 5 g 吡啶酮-9-羟乙基的 50 mL 吡啶溶液, 0 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 4 h 后常温搅拌反应 4 h, 反应液用旋转蒸发仪浓缩后用乙醚萃取 4 次, 萃取液减压蒸干后固体经水洗干燥, 粗品用甲醇重结晶 2 次, 得白色晶体 6.2 g, 产率 75.4%。m.p. 171.3~171.8。实验测得 C 67.17, H 4.83, N 3.57, S 8.14 (理论值 C 67.18, H 4.84, N 3.56, S 8.14)。IR (KBr): 3136.51 ($\nu_{\text{N-CH}_2}$), 1628.99, 1597.01 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1494.00, 1465.45 (ph), 1399.67, 1378.75 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1354.35 ($\nu_{\text{C-SO}_2}$), 1271.43, 1177.89 ($\nu_{\text{S-O}}$), 1015.29, 913.32, 751.29。m/z (M+H)⁺: 394。

3.2 吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯的稳定性及光谱性质 吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯是由吡啶酮-9-羟乙基与对甲苯磺酰氯在吡啶溶剂中缩合而成, 产物经水洗后在甲醇中结晶。试剂对常规有机溶剂和水稳定。在强碱性溶液中 24 h 分解约 97%。在乙腈和甲醇中最大紫外吸收分别为 253 nm 和 255 nm。摩尔吸光系数 $\epsilon = 4.82 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (253 nm); $\epsilon = 5.72 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (255 nm)。在甲醇或乙腈溶液中的激发和发射波长分别为 404 nm 和 440 nm。

3.3 衍生条件的优化

吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯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、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)、二甲亚砜 (DMSO, 干燥后减压蒸馏处理) 作为溶剂体系, 以丙酸、己酸、辛酸、十一酸为代表, 对衍生化产率进行了

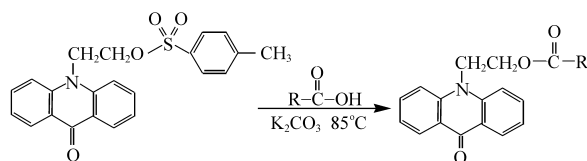


图 1 吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯与脂肪酸衍生反应
Fig 1 Derivatization scheme of acridone-9-ethyl-p-toluenesulfonate (AETS) with fatty acids

考察,结果如图 2(a)。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洗脱过程中导致较大的干扰峰(副反应产物多),实验中选取 DMF 作衍生溶剂。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。实验考察了 K_2CO_3 、 $K_2C_2O_4$ 、 Na_2CO_3 、KAc 和柠檬酸钾等几种碱性催化剂对衍生化产率的影响,结果表明: K_2CO_3 和 Na_2CO_3 具有最高的衍生率,考虑到 K_2CO_3 在 DMF 中具有较大的溶解度,实验中选取 K_2CO_3 为碱性催化剂。尽管衍生化产率随 K_2CO_3 用量的增加而提高,但过高的用量会导致试剂的严重分解。实验中选取 K_2CO_3 的用量为 10 mg (用量约为衍生化试剂用量的 120 倍)。以丙酸、己酸、辛酸、十一酸为代表,对衍生化温度进行了考察,结果见图 2b。由图 2b 可知,衍生化产率随温度升高而提高,超过 85 后衍生化产率随之降低,实验中选择衍生化温度为 85,衍生化时间 45 min。

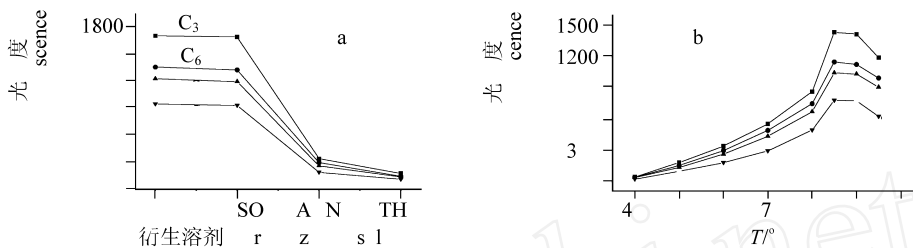


图 2 衍生反应溶剂 (a) 及反应温度 (b) 的优化

Fig 2 Optimization to derivatization conditions of solvents (a) and temperature (b)

C₃: 丙酸 (propionic acid); C₆: 己酸 (hexanoic acid); C₈: 辛酸 (octoic acid); C₁₁: 十一酸 (undecanoic acid)。DMF: *N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide); DMSO: 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide); ACN: 乙腈 (acetonitrile); THF: 四氢呋喃 (tetrahydrofuran)。

3.4 标准品的色谱分离及质谱鉴定

按前述优化条件,对 19 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 是试剂分解后的吡啶酮-9-羟乙基和吡啶酮,组分 C 为试剂峰。其它几个杂质峰可能来自试剂对 DMF 分解后的产物。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。以壬酸衍生物为例的一级质谱即分子离子峰为 $(M+H)^+$ 380.1,二级质谱为吡啶酮-9-羟乙基 $(M+H)^+$ 239.8 和吡啶酮 $(M+H)^+$ 195.8 两个碎片峰。

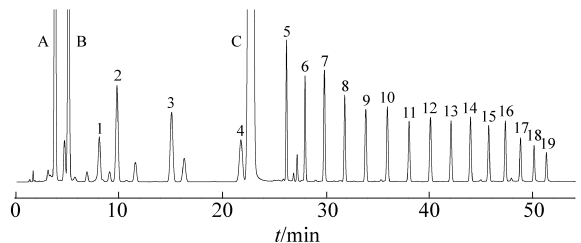


图 3 标准脂肪酸的色谱分离图 (35.7 pmol)

Fig 3 Chromatogram of standard fatty acid derivatives (35.7 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 (decanoic 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)。A: acridone-9-ethanol; B: acridone; C: 试剂峰 (reagent peak)。

3.5 线性回归方程,检出限和重现性

进样量在 200.0 pmol ~ 97.66 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回归方程、相关系数和检出限见表 1。各脂肪酸衍生物的线性相关系数在 0.9989 ~ 0.9998 之间,检出限在 12.3 ~ 43.7 fmol 之间 ($S/N = 3$)。

在相同洗脱条件下,对 50 pmol 脂肪酸衍生物进行平行 6 次分析,保留时间和峰面积重现性见表 1,保留时间的相对标准偏差小于 0.4489%,峰面积的相对标准偏差小于 2.236%。

3.6 实际样品的色谱分离

3.6.1 土壤和苔藓中游离脂肪酸的提取

称取土壤 20 g (取自曲阜师范大学校园),用 40 mL 氯仿分两次超声振荡提取,合并提取液过滤,滤液加入

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, 溶剂用 N_2 吹干后, 用 600 μ L DMF 溶解备用。新鲜的苔藓植物水洗干燥, 经粉碎后, 分别称取树藓 0.1758 g, 狭叶绢藓 0.2180 g, 曲尾藓 0.1786 g 放入 3 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 N_2 吹干后分别用 500 mL DMF 溶解备用。

表 1 游离脂肪酸衍生物的线性方程、相关系数、检测限、一级质谱与保留时间和峰面积的重现性 ($n=6$)

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits, mass spectral data of free fatty acid derivatives and repeatability for peak area and retention time ($n=6$)

脂肪酸 Free fatty acid	$Y=A \cdot X+B$	线性相关系数 r	检出限 Detection limits (fmol)	一级质谱 First step MS $[M+1]^+$	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 ₁	$Y=61.15X+31.02$	0.9997	20.6	268.0	0.3779	0.08915
C ₂	$Y=37.49X+18.32$	0.9998	12.5	282.0	0.4028	0.6464
C ₃	$Y=43.28X+20.36$	0.9998	15.2	296.0	0.4489	0.4593
C ₄	$Y=29.24X+12.92$	0.9998	33.3	310.0	0.4162	0.8305
C ₅	$Y=35.43X+16.11$	0.9998	17.3	324.1	0.1922	0.4619
C ₆	$Y=27.94X+13.56$	0.9997	13.4	338.1	0.08422	0.6899
C ₇	$Y=31.59X+15.47$	0.9998	12.3	352.1	0.04593	0.7719
C ₈	$Y=25.95X+13.06$	0.9998	13.5	366.1	0.03029	0.6565
C ₉	$Y=22.64X+11.61$	0.9997	14.6	380.1	0.02092	0.6351
C ₁₀	$Y=24.34X+12.73$	0.9998	14.4	394.2	0.01256	0.7125
C ₁₁	$Y=19.79X+10.61$	0.9998	15.3	408.2	0.007141	0.6369
C ₁₂	$Y=20.57X+10.97$	0.9998	14.6	422.2	0.001318	0.5755
C ₁₃	$Y=19.43X+9.716$	0.9998	14.5	436.2	0.006597	0.5355
C ₁₄	$Y=19.51X+9.148$	0.9998	15.2	450.3	0.007375	0.5523
C ₁₅	$Y=16.48X+7.878$	0.9997	18.5	464.3	0.009331	0.04369
C ₁₆	$Y=15.44X+8.873$	0.9997	16.8	478.3	0.01069	0.7538
C ₁₇	$Y=11.15X+6.207$	0.9997	24.7	492.3	0.01616	0.4746
C ₁₈	$Y=8.287X+5.368$	0.9995	32.95	506.4	0.01949	1.336
C ₁₉	$Y=5.533X+3.628$	0.9989	43.7	520.4	0.02018	2.236

X: 进样量 (Injected amount) (pmol); Y: 峰面积 (peak area)。

3.6.2 回收率和样品测定 在土壤样品中加入 10 μ L 浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 脂肪酸标准品后, 按照上述提取方法提取后进行衍生, 所得各脂肪酸的回收率在 98.72% ~ 102.1% 之间。土壤和苔藓中脂肪酸衍生物的色谱分离和质谱条件与实验方法部分所述相同, 土壤和曲尾藓的色谱分离图谱分别为图 4, 树藓和狭叶绢藓的色谱分离图谱从略。土壤和 3 种苔藓植物中各脂肪酸的测定结果见表 2。

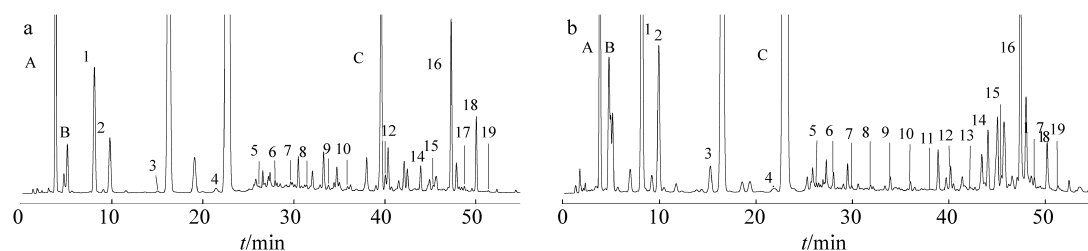


图 4 土壤样品 (a) 和曲尾藓 (b) 中游离脂肪酸色谱分离图

Fig 4 Chromatogram of free fatty acids from real soil sample (a) and dicranum caesium (b)

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

实验结果表明: 利用吡啶酮-9-乙基对甲苯磺酸酯作为柱前衍生试剂, 通过对衍生化和色谱分离条件的优化, 建立了灵敏度高、重现性好的饱和脂肪酸测定方法。对土壤和苔藓样品测定结果显示, 苔藓植物从土壤中富集了大量的游离脂肪酸, 除十八酸在 3 种苔藓中的含量为在土壤中的 50 ~ 70 倍外, 其余 18 种酸的含量在 3 种苔藓中是在土壤中的 100 倍以上, 含量较高的为十二酸、十四酸、十六酸、十八酸。因此, 含有丰富游离脂肪酸的苔藓植物具有很高的开发利用价值。

表 2 实际样品中游离脂肪酸的含量

Table 2 Content of free fatty acids from real samples

脂肪酸 Free fatty acid	土壤 Soil ($\mu\text{g/g}$)	树鲜 Tree moss ($\mu\text{g/g}$)	狭叶绢藓 Entodon macropodus ($\mu\text{g/g}$)	曲尾藓 Dicranum caesium ($\mu\text{g/g}$)	脂肪酸 Free fatty acid	土壤 Soil ($\mu\text{g/g}$)	树鲜 Tree moss ($\mu\text{g/g}$)	狭叶绢藓 Entodon macropodus ($\mu\text{g/g}$)	曲尾藓 Dicranum caesium ($\mu\text{g/g}$)
C ₁	0.02073	4.784	3.781	5.795	C ₁₁	*	*	0.5365	0.0420
C ₂	0.02049	4.223	7.771	6.283	C ₁₂	0.01512	3.529	3.319	3.741
C ₃	0.000561	0.4193	0.5597	1.607	C ₁₃	*	0.01541	3.679	0.8185
C ₄	0.005122	0.4283	0.6563	0.9349	C ₁₄	0.04906	8.342	5.214	12.45
C ₅	0.000142	0.0307	0.0789	0.0697	C ₁₅	0.00474	0.9274	0.6401	1.029
C ₆	0.002208	0.6248	0.8636	1.219	C ₁₆	0.4637	173.6	129.3	90.75
C ₇	0.000933	0.1161	0.4267	0.1407	C ₁₇	0.01326	3.351	3.172	3.169
C ₈	0.001564	0.3886	1.307	0.3110	C ₁₈	0.4186	29.48	21.05	30.99
C ₉	0.005024	1.291	4.692	1.674	C ₁₉	0.00362	0.8328	6.385	4.446
C ₁₀	0.002161	0.7342	0.9647	1.007					

$n=3$, * 未测出 (unidentified)。

References

- Ingalls S T, Minkler P E, Hoppel C L. *J. Chromatogr.*, **1984**, 299: 365 ~ 376
- Takadate A, Masuda T, Murata C, Haratake C, Isobe A, Irikura M, Goya S. *Anal. Sci.*, **1992**, 8: 695 ~ 697
- Yoshida T, Uetake A, Yamaguchi H, Nimura N, Kinoshita T. *Anal. Biochem.*, **1988**, 173: 70 ~ 74
- Lu C Y, Wu H L, Chen S H, Kou H S. *Chromatographia*, **2000**, 51 (5/6): 315 ~ 321
- Karine N, Jean-Luc W, Kurt H. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 744: 249 ~ 255
- Friso S, Choi S W, Gregory G, Dolnikowski, Jacob S. *Anal. Chem.*, **2002**, 74: 4526 ~ 4531

Determination of Free Fatty Acids from Soil and Bryophyte by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Their Mass Spectrum Identification

Zhao Xian en², Li Yulin¹, Suo Yourui¹, Shi Yunwei², Chen Xiangning², Zhang Haifeng², Sun Xuejun², You Jimao^{*1,2}

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

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

Abstract A simple and sensitive method for the determination of free fatty acids using acridone-9-ethyl-*p*-toluenesulfonate (AETS) as fluorescence derivatization reagent by reversed-phase high-performance liquid chromatography has been developed. Studies on derivatization conditions indicate that free fatty acids react rapidly and smoothly with AETS in the presence of K_2CO_3 catalyst at 85 °C in *N,N*-dimethylformamide solvent to give the corresponding sensitively fluorescent derivatives with maximal yields close to 100% with a 6-fold molar reagent excess. Free fatty acid derivatives were separated on Eclipse XDB-C₈ column with a good baseline resolution. The identification of 19 fatty acid derivatives was carried out by online post-column mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source under positive-ion mode detection. The contents of 19 free fatty acids in soil and three kinds of bryophytes (tree moss, entodon macropodus, dicranum caesium) were determined. The results indicate that the bryophyte plants enrich an abundance of free fatty acids from soil. The fluorescence excitation and emission wavelengths of derivatives were set at $\lambda_{\text{ex}}=404$ and $\lambda_{\text{em}}=440$ nm, respectively. Most linear correlation coefficients for fatty acid derivatives are over 0.9996, and detection limits (at signal-to-noise of 3:1) are 12.28 ~ 43.69 fmol.

Keywords High performance liquid chromatography/mass spectrometry, fluorescence detection, derivatization, fatty acids

(Received 16 April 2005; accepted 15 July 2005)