第 42 卷 第 2 期
2005 年 3 月

土 壤 学 报
ACTA PEDOLOGICA SINICA

Vol. 42, No. 2
Mar., 2005

同一流动相测定植物体内 12 种有机酸和维生素 C 的高效液相色谱法*

董彩霞 董园园 王 健 沈其荣† 王 格
(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

DETERMINATION OF THE CONTENTS OF TWELVE ORGANIC ACIDS AND VITAMIN C IN PLANTS WITH ONE MOBILE PHASE BY HPLC

Dong Caixia Dong Yuanyuan Wang Jian Shen Qirong† Wang Ge
(*College of Resources and Enviromental Sciences, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China*)

关键词 高效液相色谱; 有机酸; 维生素 C; 植物
中图分类号 O657.7+2 文献标识码 A

植物体内有机酸含量分析是近几年来研究的热点, 尤其是在逆境生理方面。果实中有机酸种类与含量也是衡量果实品质的重要指标。目前测定有机酸的方法通常包括气相色谱法、高效液相色谱法和离子色谱法, 其中气相色谱法(GC) 测定有机酸时, 常因酸的沸点较高、不易气化而需要先对其衍生再进行测定, 方法比较繁琐; 离子色谱法(HPIC) 是近来应用较多的测定植物体内有机酸的方法[1, 2], 可以同时测定溶液中的有机酸根离子和无机阴离子, 如 NO_3^-、Cl^-、PO_4^{3-} 等, 并且样品前处理简单[3~5], 但大量无机阴离子的存在通常增加了低含量有机酸的检测难度; 与之相比较, 高效液相色谱法(HPLC) 测定有机酸的方法比 GC 法简单[6, 7], 但也存在 pH、流动相的选择等方面的问题, 尤其是在测定十几种以上的有机酸时更为明显。维生素 C(Vc) 也称抗坏血酸, 不仅是植物抗逆生理中的一个重要指标, 也是衡量果蔬品质的一个重要指标。Vc 的常见化学分析方法是 2, 6-二氯靛酚滴定法, 整个过程繁琐、误差大。用高效液相色谱法测定 Vc 含量也有不少报道, 如用 0.004 mol L^{-1} 硫酸[8]、KH_2PO_4-H_3PO_4[9]、0.05 mol L^{-1} KH_2PO_4 缓冲液(A) + 甲醇(B)[10] 作为流动相, 笔者通过对多种流动相的研究发现, 采用同一种流动相($(NH_4)_2HPO_4$-H_3PO_4 缓冲液) 既可以测定植物体内多种有机酸, 又能测定维生素 C 含量, 是一种非常方便有效的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 600-2487 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 紫外检测器。水相针式过滤器, 超纯水(电阻率为 18.2 MΩ cm^{-2})。有机酸标准品: 甲酸、乙酸、丙酸、丙二酸、丁二酸(琥珀酸)、反丁烯二酸(富马酸)、酒石酸、柠檬酸、丙酮酸、(α-酮戊二酸、草酸均为分析纯试剂, 苹果酸采用 Sigma 公司产品。

1.2 有机酸和 Vc 标准液的配制

由于物质结构不同, 不同有机酸在 214 nm 下的吸收值相差很大, 如反丁烯二酸有一个双键结构, 所以在 214 nm 下的吸收值大大高于同一浓度下其他有机酸。为了整体上各色谱峰值较为一致, 分别适量称取各种有机酸(精确至 0.1 mg), 用超纯水超声溶解并定容至 100 ml 容量瓶中, 为有机酸的混合标准样母液; 临用时稀释为 7 个浓度梯度溶液(见表 1)。另外, 称取 0.5 g Vc, 溶解于 50 ml 棕色容量瓶

* 国家自然科学基金项目(30270790) 和中国博士后科学基金项目(2003033494) 资助
† 通讯作者, E-mail: qrshen@njau.edu.cn
作者简介: 董彩霞, 女, 山东文登人, 博士, 主要从事植物营养与植物生理学方面的研究
收稿日期: 2004-02-11; 收到修改稿日期: 2004-06-28

中, 用前稀释为 7 个浓度, 分别为 1、10、50、100、200、500、1 000 mg L^{-1}。

1.3 色谱条件

色谱柱: 德国 Merck 公司生产的 Hibar column RT 250 mm × 4.6 mm, 填料直径为 5 μm; 柱温: 30℃; 流动相: 0.5% $(NH_4)_2HPO_4$-H_3PO_4 缓冲液(pH 2.5), 使用前用 0.45 μm 滤膜抽滤; 流速: 1 ml min^{-1}; 紫外检测波长 214 nm 测定有机酸, 254 nm 测定维生素 C; 进样量: 20 μl。

表 1 有机酸标准浓度系列

编号	草酸	酒石酸	甲酸	丙酮酸	苹果酸	丙二酸	α-酮戊二酸	乙酸	柠檬酸	富马酸	丁二酸	丙酸
	(mg L^{-1})											
1	1	5	10	1	10	10	5	20	15	0.5	15	20
2	2	10	20	2	20	20	10	40	30	1	30	40
3	5	25	50	5	50	50	25	100	75	2.5	75	100
4	10	50	100	10	100	100	50	200	150	5	150	200
5	20	100	200	20	200	200	100	400	300	10	300	400
6	50	250	500	50	500	500	250	1 000	750	25	750	1 000
7	100	500	1 000	100	1 000	1 000	500	2 000	1 500	50	1 500	2 000

1.4 样品制备

1.4.1 有机酸样品制备 参照文献[3]。称取 2 g左右番茄幼叶于研钵中, 加 5 ml 超纯水研磨并无损转移至离心管中, 20 000 r min^{-1} 4℃离心 20 min, 将上清液转入小离心管, 于冰箱冷藏, 上机前用 0.45 μm滤膜抽滤。

1.4.2 Vc 样品制备 称取 2 g 菠菜样品于研钵中, 加入 0.1% 草酸研磨匀浆, 定容至 100 ml。将匀浆液在 12 000 r min^{-1}离心 5 min, 取上清液按照文献[6]的方法, 用 2, 6-二氯靛酚滴定溶液中的 Vc。同时, 取上清液用 0.45 μm 滤膜抽滤后上液相色谱仪测定。

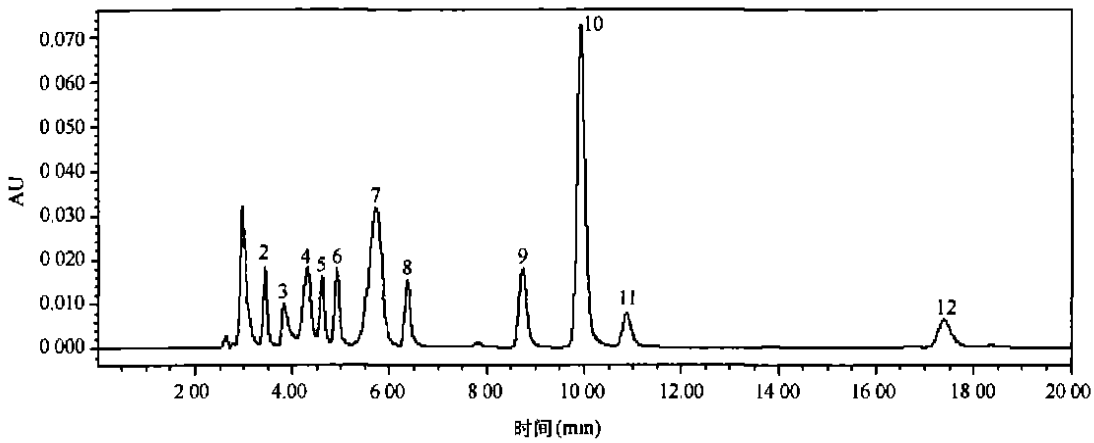
2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

采用高效液相色谱法测定有机酸的报道很多, 但是实验中所用的流动相种类、pH 有很大差别。常用的流动相有 0.5% $(NH_4)_2HPO_4$-H_3PO_4 缓冲液(pH 2.5)[6, 11]、甲醇-15 mmol L^{-1} KH_2PO_4 缓冲液(pH 2.1)(15∶85, V∶V)[7]、0.6% KH_2PO_4(pH 2.65)[12]、0.004 mol L^{-1}硫酸水溶液[8]等, pH 从 2.1 变化到 2.9[13]。通过对上述流动相的比较, 最终采用 0.5% $(NH_4)_2HPO_4$-H_3PO_4 缓冲液(pH 2.5) 为流动相, 得到 12 种有机酸的混合标准品色谱图(图 1)。

2.2 HPLC 测定有机酸方法的精密度和检测范围

通过对 12 种有机酸的保留时间、检测限、相关系数和回收率的测定表明(见表 2), 用 HPLC 在 20 min 内同时测定甲酸、乙酸、丙酸、丙二酸、α-酮戊二酸、丙酮酸、苹果酸、柠檬酸、富马酸、琥珀酸、酒石酸是可行的, 尤其是对于常见的草酸、酒石酸、丙酮酸、苹果酸、α-酮戊二酸、柠檬酸、富马酸和丁二酸在 12 min 内即可完成测定, 大大加快了测定速度。从表 2 中也可以看出, 草酸的检测限极低, 可能是该色谱柱对草酸较为敏感所致; 同时由于草酸被洗脱的时间最短, 在 3 min 左右, 在进行样品测定时很容易与样品中一些最先被洗脱下来的杂质等物质混在一起被洗脱(有的情况下酒石酸也混在一起不能分开, 如图 2A 所示), 这两方面的原因造成用该柱进行草酸的分析时偏差较大(或酒石酸检测不到)。因此, 该方法进行草酸分析时回收率偏高(即该法测定草酸时会使结果偏高), 其他有机酸的回收率则基本符合实验方法需要。但大量实验结果表明, 如果被分析样品中酸度较低(如用 100% NH_4^+-N 培养的番茄幼苗, 有机酸含量较低), 草酸和酒石酸就能被正常洗脱。番茄幼苗不同部位有机酸种类和含量有较大差异, 并不是每个处理或每个部位都含有上述有机酸, 例如 100% NH_4^+-N 处理下番茄根中含有丙酸而叶片中未被检出, 因而回收率并不是用同一处理或同一部位样品得到的。



1. 草酸; 2. 酒石酸; 3. 甲酸; 4. 丙酮酸; 5. 苹果酸; 6. 丙二酸; 7. α-酮戊二酸; 8. 乙酸; 9. 柠檬酸; 10. 富马酸; 11. 丁二酸; 12. 丙酸

图 1　12 种有机酸混合标准品色谱图(表 1 中的 4 号混合标准样)

表 **2**　**12** 种有机酸的保留时间、检测限、线性相关系数、线性范围、回收率和样品测定值

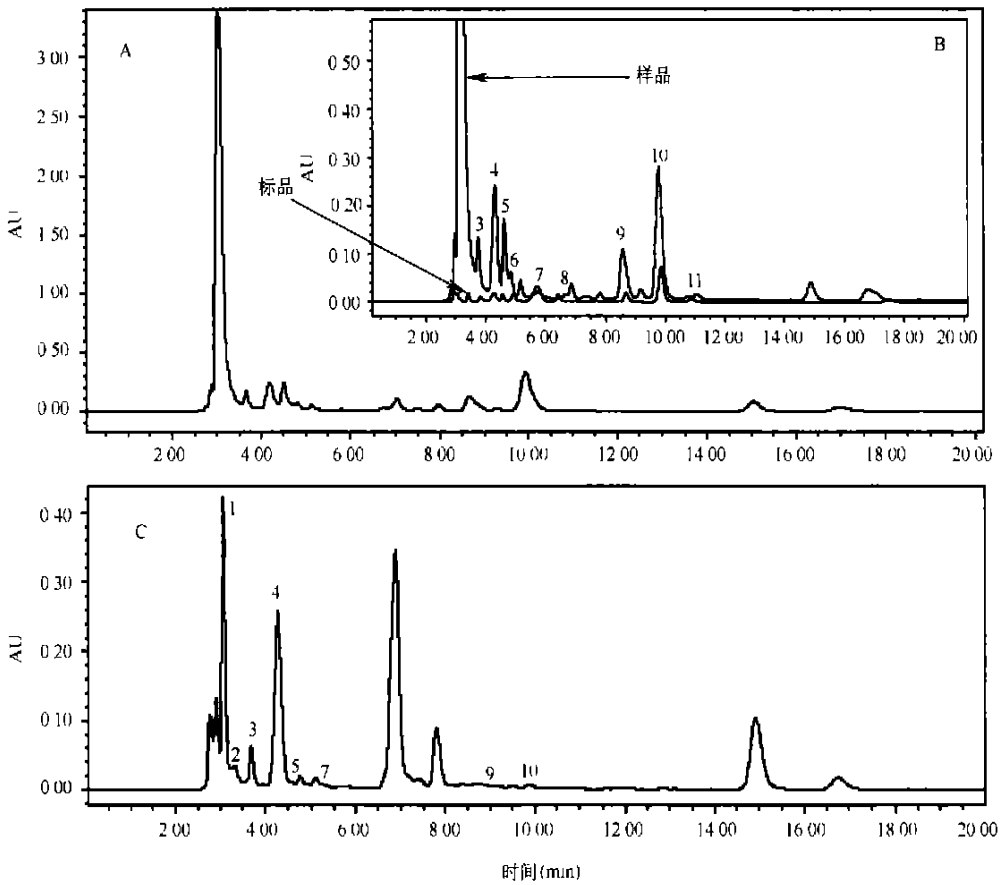
有机酸	保留时间 (min)	检测限 ($mg\ L^{-1}$)	相关系数 r	线性范围 ($mg\ L^{-1}$)	回收率 (%)	番茄幼叶有机酸含量[1)] ($mg\ L^{-1}$)	
						100% NO_3^--N	100% NH_4^+-N
草　酸	2.9	0.000 625	0.999 5	1~ 100	119.3	—[2)]	391.57±38.74
酒石酸	3.4	0.1	0.999 9	5~ 500	89.2	—	20.07±4.52
甲　酸	3.9	1.0	0.999 6	10~ 1 000	91.4	32.85±5.23	20.13±3.65
丙酮酸	4.2	0.1	0.999 9	1~ 100	103.1	234.51±25.55	291.40±92.34
苹果酸	4.6	0.1	0.999 9	10~ 1 000	101.6	1948.59±82.47	244.07±44.15
丙二酸	4.8	0.1	0.999 9	10~ 1 000	87.7	35.51±7.89	—
α-酮戊二酸	5.5	0.075	0.999 9	5~ 500	96.6	57.81±11.80	14.27±3.63
乙　酸	6.4	0.2	0.999 8	20~ 2 000	93.5	70.59±19.97	—
柠檬酸	8.5	0.2	0.999 9	15~ 1 500	99.4	2015.26±285.44	90.09±29.66
富马酸	9.5	0.000 1	0.999 9	0.5~ 50	93.3	43.63±3.35	0.56±0.10
丁二酸	10.9	0.5	0.999 8	15~ 1 500	93.6	550.32±104.07	—
丙　酸	17.5	10.0	0.999 9	20~ 2 000	98.9	—	—

1) $n = 3$; 2) "—" 表示未检出

2.3　用 HPLC 测定溶液中 Vc 含量的方法确定

由于 Vc 在水溶液中极易被氧化, 而在弱酸条件下比较稳定。因此, 在提取时应用草酸做提取液以保护 Vc 不被空气氧化。在参照文献[14~16]的基础上, 本实验选用了甲醇-水(50∶50, V∶V)、甲醇-水(90∶10, V∶V)、甲醇-水(95∶5, V∶V)、0.1% 草酸和 0.5% $(NH_4)_2HPO_4$-H_3PO_4(pH 2.5) 缓冲液作流动相, 分别在 λ 为 254 nm 和 214 nm 处观察 Vc 标准样的色谱图, 结果发现, 以$(NH_4)_2HPO_4$-H_3PO_4(pH 2.5) 缓冲液作为流动相, 紫外检测波长为 254 nm, 流速为 1.0 ml min^{-1}的条件适合 Vc 含量的分析。

为了验证 HPLC 法测定溶液中 Vc 含量的准确性, 将其同 2, 6-二氯靛酚滴定法作了比较。如表 3 所示, 两种方法测定同一样品中的 Vc 含量相同, 表明 HPLC 法测定 Vc 含量是可行的。表 3 还表明, 用 HPLC 法测定 Vc 含量不仅误差小、回收率高, 而且测定时间很短, 仅用 6 min 时间即可完成, 与 2, 6-二氯靛酚滴定法相比较, 大大降低了 Vc 测定的时间, 并简化了测定步骤。



A: 100% NO_3^--N 处理; B: 待测样品与标准品叠加色谱图; C: 100% NH_4^+-N 处理

图 2 HPLC 法测定番茄幼叶有机酸含量色谱图(图中数字标识同图 1)

表 3 Vc 的保留时间、检测限、线性相关系数、线性范围和回收率

测定方法	Vc 含量[1)] (mg 100 g^{-1}鲜重)		保留时间	检测限	相关系数	线性范围	回收率
	样本 1	样本 2	(min)	(mg L^{-1})	r	(mg L^{-1})	(%)
HPLC 法	39.64±1.03	56.86±2.24	5.4	0.01	0.999 9	1~1 000	97.9
2, 6-二氯靛酚滴定法	37.75±1.06	56.0±2.12					

1) n = 3

3 结 语

通过本文的分析, 我们认为植物体内的有机酸和 Vc 含量可以采用同一种流动相(0.5% $(NH_4)_2HPO_4$-H_3PO_4缓冲液(pH 2.5))在不同的紫外检测波长下测定, 方法可行。本方法还可以根据实验目的增删有机酸的种类, 如添加草酰乙酸、乳酸, 去掉甲酸、乙酸、丙酸等, 效果均较好, 但应注意的是, 本方法针对的是 Hibar column RT 250 mm × 4.6 mm色谱柱, 如果改换为其他色谱柱则需同时改变色谱条件, 最主要的是流动相。

致 谢 本方法的建立过程中得到了南京农业大学理学院杨红教授的指导, 在此谨表谢忱。

参 考 文 献

[1] 牟世芬, 蒋建萍, 侯小平. 有机酸的离子排斥色谱分析研究. 色谱, 1992, 10(3): 133~136

[2] 丁明玉, 陈培榕, 罗国安. 单一阴离子交换柱同时分离有机酸和无机阴阳离子. 分析化学, 1997, 25(2): 161~164

[3] 沈宏, 严小龙, 郑少玲等. 菜豆有机酸和无机阴离子同时分

析的离子色谱法. 华中农业大学学报, 2001, 22(2): 8~ 10
[4] 郜志峰, 傅承光. 单柱离子色谱同时分析有机酸和无机阴离子的研究. 分析测试学报, 1994, 13(5): 32~ 36
[5] 刘　, 刘克纳, 沈冬青等. 有机酸与无机阴离子的梯度离子色普法分析研究. 色谱, 1997, 15(4): 334~ 337
[6] 鲁如坤编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. 463~ 473
[7] 赵景婵, 郭治安, 常建华等. 有机酸类化合物的反相高效液相色普法的分离条件研究. 色谱, 2001, 19(3): 260~ 263
[8] 李海生, 吴贵华. HPLC 法用于北山楂和云南山楂中主要有机酸和维生素 C 的分析比较. 中草药, 1990, 21(4): 13~ 14
[9] 林维宣, 房学军, 杨红. 高效液相色谱法测定山楂中有机酸的研究. 大连轻工业学院学报, 1992, 11(3/4): 21~ 24
[10] 成志强, 孙成均, 黎源倩. 反相高效液相色谱法同时测定食品和多维片中 8 种水溶性维生素. 分析化学, 2001, 29(9): 1 068~ 1 071
[11] 李连朝, 李天荣, 汪沛洪. 反相 HPLC 测定食物中的有机酸. 分析测试通报, 1989, 8(3): 21~ 26
[12] 陈尚文, 胡谦. 高效液相色谱法测定食品中有机酸. 色谱, 1993, 11(3): 175~ 177
[13] 毕丽君, 张骊, 张鸿发. 固相萃取高效液相色普法分析酱油中的有机酸. 分析化学, 2000, 28(11): 1 391~ 1 394
[14] 熊凤麒, 袁吕江, 吴光权等. 高效液相色谱同时测定茶叶中维生素 C、没食子酸和咖啡碱的含量. 色谱, 1993, 11(6): 367~ 368
[15] 张国峰, 缪刚. 高效液相色谱法测定复方芦丁片中芦丁和维生素 C 的含量. 色谱, 1996, 14(3): 227~ 228
[16] 杨志洁, 叶建农, 刘彤等. 茶叶中维生素 C 和嘌呤碱的高效液相色谱测定法的研究. 色谱, 1996, 14(6): 492~ 493