

DOI: 10.11766/trxb202103080130

陈虹, 唐昊冶, 钟明, 刘晓东, 王如海, 俞元春. 偶联酰胺化衍生-液相色谱法高灵敏度检测土壤圈样品中小分子单羧酸[J]. 土壤学报, 2022, 59(6): 1594-1605.

CHEN Hong, TANG Haoye, ZHONG Ming, LIU Xiaodong, WANG Ruhai, YU Yuanchun. A Coupled Amidation-Liquid Chromatography Technique for Detecting Low Molecular Monocarboxylic Acid in Pedosphere Samples with High Sensitivity[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(6): 1594-1605.

## 偶联酰胺化衍生-液相色谱法高灵敏度检测土壤圈样品中小分子单羧酸\*

陈虹<sup>1, 2</sup>, 唐昊冶<sup>1</sup>, 钟明<sup>1</sup>, 刘晓东<sup>2</sup>, 王如海<sup>1</sup>, 俞元春<sup>2†</sup>

(1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与环境分析测试中心, 南京 210008; 2. 南京林业大学, 南方现代林业协同创新中心, 生物与环境学院, 南京 210037)

**摘要:** 甲、乙、丙、丁酸在土壤圈广泛存在, 通常含量较低, 测定时易受基质中杂质干扰, 难以准确定性定量。采用偶联酰胺化法将具有紫外高灵敏响应的吡啶基团引入其结构中, 生成酰胺类衍生物, 即可在液相色谱-二极管阵列/紫外检测器(HPLC-DAD/UV)下间接高灵敏度检测, 达到准确测定的目的。衍生化操作步骤如下: 先将适量样品和 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)水溶液加入反应小瓶中, 使反应体系 pH 保持约 5.5, 再加入适量的 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)水溶液, 交联反应 20 min 后再加入适量的 N-羟基丁二酰亚胺(NHS)水溶液, 之后经偶联反应适当时间后再加入色胺的乙腈水溶液, 酰胺化反应过夜, 第二天用超纯水定容终止反应, 待测。实验表明: 在衍生化过程中, 当保持 MES: EDC: NHS: 色胺: 羧基≈10: 7: 3: 7: 1(摩尔比)的比例, 加入 NHS 后偶联反应 45 min 时效果较佳。该方法中四种有机酸的检测限范围为 0.008~0.046 mg·L<sup>-1</sup>, 标准工作曲线的线性决定系数 R<sup>2</sup> 为 0.991~0.998, 平均回收率为 85.9%~123%, 方法精密度为 1.69%~8.41%, 可以满足有机分析要求。与液相色谱法直接测定小分子单羧酸相比, 发现直接法测试结果与衍生-液相色谱法测试结果基本一致, 但衍生法可以修正直接法中杂质干扰带来的阳性误差, 同时提升低浓度单羧酸样品中有机酸的检出率, 定性定量结果更可靠。

**关键词:** 小分子单羧酸; 偶联; 酰胺化; 液相色谱检测

中图分类号: O65 文献标志码: A

## A Coupled Amidation - Liquid Chromatography Technique for Detecting Low Molecular Monocarboxylic Acid in Pedosphere Samples with High Sensitivity

CHEN Hong<sup>1, 2</sup>, TANG Haoye<sup>1</sup>, ZHONG Ming<sup>1</sup>, LIU Xiaodong<sup>2</sup>, WANG Ruhai<sup>1</sup>, YU Yuanchun<sup>2†</sup>

(1. Soil and Environment Analysis Center, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

\* 中国科学院南京土壤研究所“135”创新基金(20752010028)资助 Supported by the “135” Innovation Fund of Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences (No. 20752010028)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ycyu@njfu.edu.cn

作者简介: 陈虹(1977—), 女, 江苏沭阳人, 博士研究生, 高级工程师, 主要从事仪器分析及研究工作。E-mail: chen hong@issas.ac.cn

收稿日期: 2021-03-08; 收到修改稿日期: 2021-06-14; 网络首发日期(www.cnki.net): 2021-08-02

**Abstract:** 【Objective】 Formic, acetic, propionic and butyric acid exist widely in the natural ecological environment, but their contents are usually low. Thus, their accurate qualitative and quantitative determination is often hindered by impurities in the sample matrix. 【Method】 Using the coupling amidation method, low molecular monocarboxylic acids (LMMAs) can form new derivatives with high sensitivity to ultraviolet (UV) light. This was achieved by incorporating the indole group into LMMAs' structure, which made it possible for the low-level LMMAs to be detected by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) under a specific wavelength UV light with high response. As a result, we observed the accurate determination of LMMAs. Through experimentations, we propose the following steps: first, a suitable amount of sample and MES (2-Morpholinoethanesulfonic Acid) aqueous solution were added into a small bottle with the reaction system adjusted to about  $\text{pH}\approx 5.5$ . This was followed by the addition of EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride) aqueous solution. After 20 minutes of cross-linking reaction, a suitable amount of NHS (N-Hydroxy succinimide) aqueous solution was added to promote coupling reactions. After an appropriate period, a tryptamine aqueous solution (containing acetonitrile) was added into the reaction system for amidation overnight. This was followed by the addition of ultrapure water to a certain volume and prepared for determination. 【Result】 The experimental results showed that for an optimized observation, the mole ratio of MES: EDC: NHS: tryptamine: carboxylic acid should be maintained at about 10 : 7 : 3 : 7 : 1 around and after 45 minutes of coupled reaction and the addition of tryptamine aqueous solution for amidation. The detection limit for the four organic acids in this method was from 0.008 to 0.046  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the linear determinate coefficient  $R^2$  of the standard working curve was around 0.991–0.998. The average recovery rate range was 85.9%–123%, and the precision of the method ranged between 1.69%–8.41%, which meets the requirements of organic analysis. 【Conclusion】 The actual sample test results showed that the data of the derivation method and the direct method were the same. However, compared with the HPLC direct detection method, the derivation-HPLC method could correct the positive error caused by the impurities in complex samples, and improve the detection rates of low concentration monocarboxylic acid samples. So the qualitative and quantitative results of the derivation-HPLC method were more reliable.

**Key words:** Low molecular monocarboxylic acids; Coupled; Amidation; Liquid Chromatography

有机酸广泛存在于土壤圈中,是土壤中碳的最活跃形式,作用于多种土壤过程,并强烈影响多种植物生理生态行为,其产生与土壤微生物数量和活性相关联,并与土壤类型、根圈环境等密切相关。目前,土壤圈样品中检出的小分子有机酸主要包括脂肪族和芳香族两大类,芳香族有机酸(通常也称为化感物质)主要包括具有芳香气味的如安息香酸、水杨酸、香草酸等酚酸类化合物;脂肪族有机酸则主要包括:甲酸、乙酸、草酸、苹果酸等<sup>[1-8]</sup>。其中乙酸在生态系统的碳氮循环过程中是重要的中间化合物,是温室气体二氧化碳和甲烷产生的来源之一<sup>[9-11]</sup>;故对乙酸的监测是相关研究者关注的重点。根际环境中大部分有机酸对植物的生长具有积极作用,但也需关注某些有机酸因过量而带来的不良影响,如植物根际中甲酸、乳酸、乙酸、丙酸、丁酸等脂肪族单羧酸积累到一定量后会影响植物根系的生长等<sup>[12]</sup>。因此,该类单羧酸在植物根系分泌物、有机肥料等相关研究中通常也会受到关注。

目前,脂肪族有机酸的检测可以使用气相色谱法(GC/FID)<sup>[13-16]</sup>或气相色谱-质谱法(GC/MS)<sup>[17-19]</sup>、高效液相色谱法(HPLC/UV)<sup>[20-25]</sup>、离子色谱法(IC/ED)<sup>[26-30]</sup>、毛细管电泳法(CE/UV)<sup>[31-33]</sup>和液相色谱-质谱法(LC-MS)<sup>[34-35]</sup>等。GC/FID法或GC/MS法测定时,色谱柱分离一般很好,但试样多需酯化或硅烷化等衍生处理后方可检测,复杂耗时,水溶性样品测定难度大,通常不可直接上机测定。HPLC法和IC法样品前处理较为简单,高含量有机酸样品可以直接过滤后进样,在色谱柱上的分离效果较好,目前这两种方法在有机酸分析中应用广泛;但主要缺点是实际试样中的复杂基质会影响目标物的准确定性与定量,且低含量试样难测出。CE法试样用量很少,分析时间短,干扰较HPLC法和IC法小,但仪器的稳定性较HPLC和IC差,低含量样品同样难测出。LC-MS法很少检测这几种酸,其一是甲酸、乙酸分子量过小,二是通常选择甲酸、乙酸及其盐溶液作为流动相,故文献报道较少。

1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)被作为交联剂在有机合成中广泛使用,且常与N-羟基丁二酰亚胺(NHS)搭配使用以增加偶联反应的效率,但其多应用于材料及其改性研究中,尤其是医用材料,定量分析较少,其在酰胺化反应中的原理值得借鉴<sup>[36-39]</sup>。鉴于土壤圈样品中甲、乙、丙、丁酸的含量通常较低,故借用该原理将此类酸衍生为含吡啶基团的增敏物质后再进行测定,灵敏度大幅提升,且衍生物具有特征光谱图,色谱分离条件得以良好改善,定性可靠,为土壤圈相关研究提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂材料

仪器:超高压液相色谱仪(Shimadzu LC-20A XR, 配备二极管阵列检测器( SPD)及荧光检测器( FLD), 岛津公司, 日本);液相色谱-飞行时间质谱联用仪( AB Sciex Exion UPLC-QTOF-MS/MS X500R) 移液器( 10~1 000  $\mu\text{L}$ , 精确至 1  $\mu\text{L}$ , 1~100  $\mu\text{L}$ , 精确至 0.1  $\mu\text{L}$ , Eppendorf公司, 德国);电子天平(精确至 0.0001g, 德国 Sartorius 公司, 德国);电子天平(精确至 0.001 g, 上海良平仪器仪表有限公司);超纯水机( Millipore, Mini-Q Reference A+, Merck 公司, 法国)。

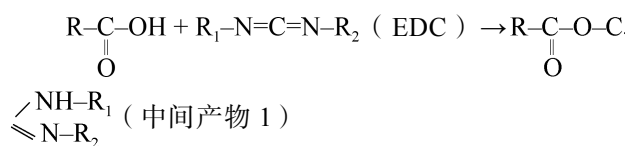
标样及试剂:甲酸(纯度>88%,成都市科龙化工试剂厂, LC/MS 级, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司);乙酸(纯度>99.8%, 南京化学试剂有限公司);丙酸(纯度>99.5%, 天津市科密欧化学试剂有限公司);丁酸(纯度>99.0%, 上海凌峰化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯, 美国 Tedia 公司);乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司);1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC, 含量>99.0%, BR, 国药集团);2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES, 含量>99.0%, Biosharp);N-羟基丁二酰亚胺(NHS, 含量 97.0%~102%, BR, 国药集团);色胺(含量 98.0%, 阿拉丁);N-乙酰基色胺(含量>99.0%, 东京化成工业株式会社, 日本);蒸馏水(由南京土壤研究所开发公司统一制备供应);超纯水(用蒸馏水经纯水机 Millipore 制得)。

### 1.2 实验方法

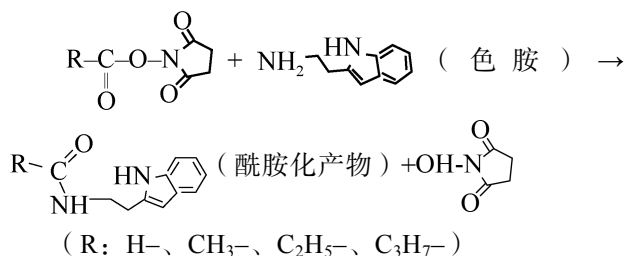
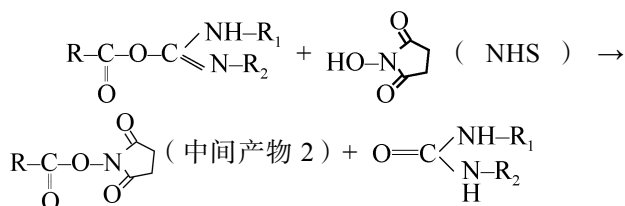
方法原理:甲、乙、丙、丁酸在紫外检测器下

随着碳链的延长,对紫外光的吸收越来越弱,当其含量较低时,更难检出。本法通过偶联-酰胺化法将色胺与此类酸进行反应,生成含吡啶基团的衍生物,在紫外光 223 nm 下具有高灵敏性,达到间接、高灵敏度检测此类单羧酸的目的。

其反应基理如下:



(R: H-, CH<sub>3</sub>-, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-); (EDC: R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-; R<sub>2</sub> = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-)



(1) 衍生化反应所需的试剂水溶液的配制。EDC 溶液(30~90 mmol·L<sup>-1</sup>);MES 溶液(30~60 mmol·L<sup>-1</sup>, 采用 NaOH 溶液调配 pH 为 5~6);NHS 溶液(20~90 mmol·L<sup>-1</sup>);色胺溶液(30~60 mmol·L<sup>-1</sup>, 需采用乙腈助溶)。

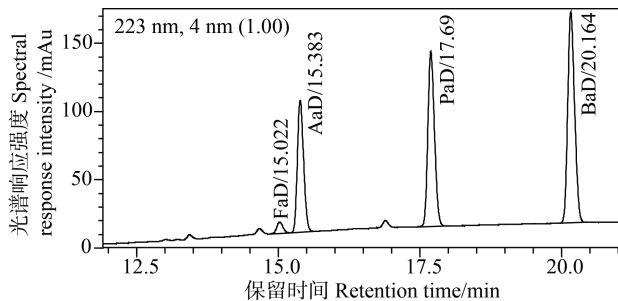
(2) 标准溶液配制。用超纯水配制 4 种单羧酸混合标准母液,其中含甲酸、乙酸、丙酸、丁酸均为 1 000 mg·L<sup>-1</sup>,同时加入适量乙腈以防菌,稀释为浓度为 100 mg·L<sup>-1</sup> 标准溶液使用。

(3) 衍生化反应。校准曲线样品的衍生化反应:分别取适量的 4 种有机酸混合标准母液(0~1 mL)加入 5 mL 的刻度试管中,再分别加入适量(0.2~1.0 mL)的 MES 溶液,0.1~0.6 mL EDC 溶液、20 min 后加入 0.1~0.5 mL NHS 溶液、此时,反应溶液的 pH 控制在 5.0~6.0 之间,静置反应 0.5~1 h 后,再加入适量(0.1~1.0 mL)的衍生试剂色胺溶液,静

置过夜, 最后采用超纯水定容至 5 mL, 终止反应, 溶液待测。整个反应过程室温控制约 25℃, 反应体系中羧酸: EDC: NHS: 胺基(摩尔比)控制在 1: (~4): (~2): (~5), 胺基过量。

样品溶液来源于植物根系分泌物, 或土壤圈其他溶液样品。样品的衍生化反应步骤与标准样的处理相同, 取样量视情况而定(0.5~1.0 mL)。

(4) 液相色谱(HPLC)测定方法。采用液相色谱仪对衍生后的标准溶液及样品溶液进行测定, 以二极管阵列检测器进行全波长扫描测定, 定量检测波长为 223 nm, 衍生物液相色谱图见图 1。液相色谱仪测定条件: 流动相为水(A)+乙腈(B); 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 色谱柱为 Agilent SB-C18, 250 mm×4.6 mm, 5μm, 柱温为 35℃。流动相梯度洗脱程序为: 初始乙腈体积比为 10%, 30 min 时升为 70%, 31 min 时快速升至 100%, 并保持至 31.5 min, 然后在 32 min 时降为 10%, 并保持至 34 min, 程序结束。



注: FaD-甲酸衍生物, AaD-乙酸衍生物, PaD-丙酸衍生物, BaD-丁酸衍生物。下同。Note: FaD-Formic acid derivative, AaD-Acetic acid derivative, PaD-Propionic acid derivative, BaD-Butyric acid derivative. The same as below.

图 1 四种有机酸衍生物液相色谱图

Fig. 1 Liquid chromatogram of four organic acid derivatives

## 2 结果与讨论

### 2.1 单羧酸衍生物的定性确认

图 2 为市面购得 N-乙酰基色胺标准物和各有机酸单独衍生后叠加色谱图, 表明乙酸衍生物与标准物保留时间一致, 且与图 1 混合标样衍生后保留时间一致; 图 3 为 N-乙酰基色胺标准物和各有机酸单独衍生后衍生物的紫外光谱图, 其中标准物与乙酸衍生物光谱图一致, 结合图 2 可确定为衍生物即为

标准物, 图 3 中甲酸、丙酸、丁酸等衍生物的色谱图也与标准物一致, 表明 3 种有机酸衍生后均含有目标基团。图 4 是采用液相色谱-飞行时间质谱仪

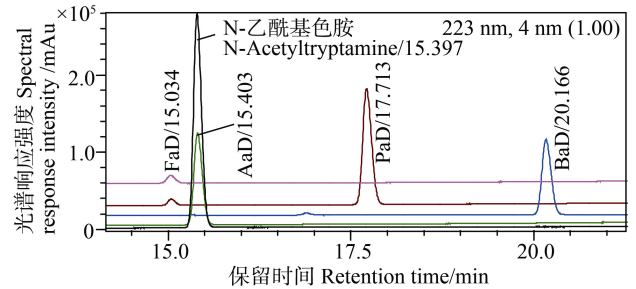


图 2 N-乙酰基色胺和四种单标有机酸衍生物液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatogram of N-Acetyltryptamine and four organic acids' derivatives respectively

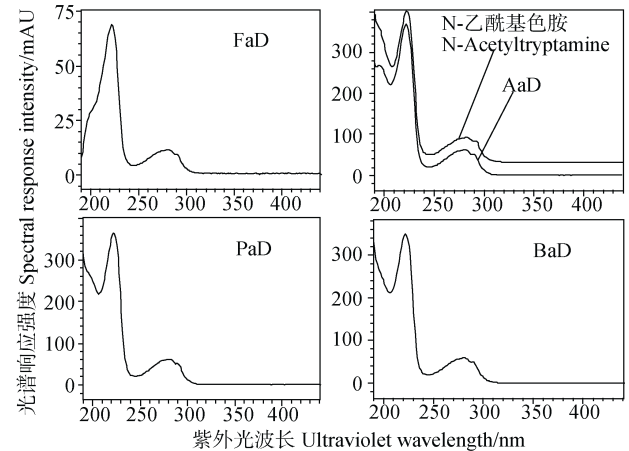


图 3 N-乙酰基色胺和四种单羧酸衍生物紫外光谱图

Fig. 3 UV spectra of N-Acetyltryptamine and four organic acids' derivatives respectively

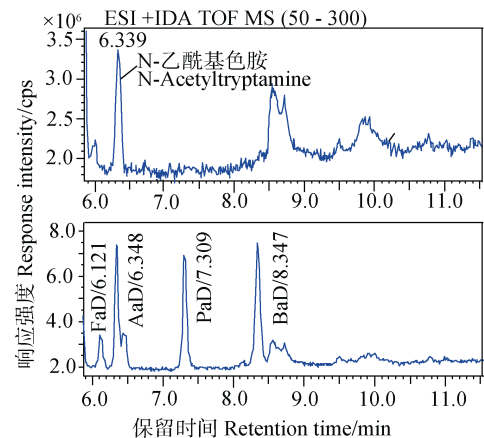


图 4 N-乙酰基色胺和四种单羧酸衍生物的 UPLC-QTOF-MS/MS 总离子流色谱图

Fig. 4 TIC of N-Acetyltryptamine and four organic acids' derivatives respectively by UPLC-QTOF-MS/MS

表 1 N-乙酰基色胺和四种单羧酸衍生物的 UPLC-QTOF-MS/MS 质谱鉴定信息表

Table 1 Tentatively identification of N-Acetyltryptamine and organic acids' derivatives by UPLC-QTOF-MS/MS

保留时间 Retention time/min	待测物 Tentative identification	分子式 Formula	分子质量 Monoisotopic mass	[M+H] <sup>+</sup> / (m·z <sup>-1</sup> )	相对误差 Relative error × 10 <sup>-6</sup>	MS/MS 测得的产物离子 MS/MS diagnostic product ions/ (m·z <sup>-1</sup> )
6.339	N-acetyltryptamine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	202.110 06	203.117 3	-2.9	144.079 3, 117.068 7, 143.072 2, 127.054 1
6.121	FaD	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	188.094 41	189.102 2	-0.2	144.079 9, 117.069 2, 143.072 7, 127.054 4
6.348	AaD	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	202.110 06	203.117 6	-1.4	144.079 4, 117.068 3, 143.072 1, 127.053 7
7.309	PaD	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	216.125 71	217.133 0	-2.5	144.079 5, 117.068 6, 143.072 4, 127.053 9
8.347	BaD	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	230.141 36	231.148 8	-1.7	144.079 5, 117.068 7, 143.072 4, 127.053 9

(UPLC-QTOF-MS/MS, 流动相为 0.1%甲酸水+乙腈, 色谱柱为 Phenomenex Omega 1.6 $\mu$ m Polar C18, 100 $\times$ 2.1 mm) 对标准物和衍生物测定后的总离子流色谱图, 表 1 是检测到的各化合物质谱信息, 表明衍生所得的衍生物与预期目标物的一级、二级质谱离子均相符, 再结合图 1~图 3, 可以确认图 1 中方法测定的甲酸、乙酸、丙酸、丁酸等有机酸衍生物即为预期的衍生物。

## 2.2 衍生化反应的效率

以 N-乙酰基色胺为标准品, 考察乙酸衍生产物的产率, 其浓度由 0~20 mg·L<sup>-1</sup> 的 N-乙酰基色胺的校准曲线 (线性方程  $y=228\ 761x+7\ 771.4$ ,  $R^2=0.999\ 9$ ) 算得, 并与理论浓度进行比较得到相应浓度的产率。结果表明, 在乙酸浓度为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 mg·L<sup>-1</sup> 下, 经扣除空白后, 各浓度下乙酸衍生产物的平均产率为 96.3%~135% ( $n=3$ ), 说明可以满足该方法分析要求。

## 2.3 衍生化反应的稳定性

将 0.5、1、10 mg·L<sup>-1</sup> 的有机酸衍生化反应标准溶液保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中, 放置 2 周后再进行复测, 峰面积均未显著性改变, 且采用现做的有机酸衍生化标准曲线进行标定后, 各有机酸浓度回收率 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 为 86.0%~109% ( $n=3$ ), 1 mg·L<sup>-1</sup> 为 81.2%~106.4% ( $n=3$ ), 10 mg·L<sup>-1</sup> 为 91.9%~107% ( $n=3$ ), 故认为衍生产物稳定存在, 衍生化反应稳定可靠。

## 2.4 衍生化反应的条件优化

该衍生化反应在实验中所给定的条件下均能发生反应, 但衍生产物的产率会有差异, 故对衍生化反应过程中各衍生试剂的浓度、反应条件进行优化, 以获得最优化反应条件, 达到最佳衍生效率。条件优化以一系列试验样品中某一条件呈梯度变化, 其他条件维持不变为准, 即作为非变量时, 试剂 MES、EDC、NHS 加入量均为 0.5 mL、色胺为 0.35 mL、偶联反应时长为 2 h。仪器测定后对峰面积作曲线图, 衍生产物的峰面积越高, 则溶液中浓度越高, 生成的衍生物量最多, 此时可认定为最优条件。图 5 是衍生化反应条件优化图。

由图 5a 知, 甲酸衍生物浓度随 MES 加入量增加而逐渐增高, 其他几种单羧酸的衍生物浓度则先降低再升高, 当加入 0.5 mL (30.0  $\mu$ mol) MES, 衍生物的产率达到较佳状态, 故选择加入 0.5 mL (30.0  $\mu$ mol) 的 MES。由图 5b, EDC 加入量越多, 衍生物浓度越高, 当加入 0.5 mL (22.5  $\mu$ mol) 后, 达最大值; 但是, 当加入 0.3 mL (13.5  $\mu$ mol) 后, 乙、丙、丁酸衍生物浓度增加缓慢, 且色谱图杂质峰随 EDC 加入量增多而增强。综合考虑, EDC 加入量不宜过多, 因此, 在灵敏度足够时, 本法选 0.3 mL (13.5  $\mu$ mol) 较佳, 既不影响样品分析, 又可保证液相色谱图的相对简单。且据实验证实, EDC 需即配即用, 否则不易发生交联反应。由图 5c, 当加入

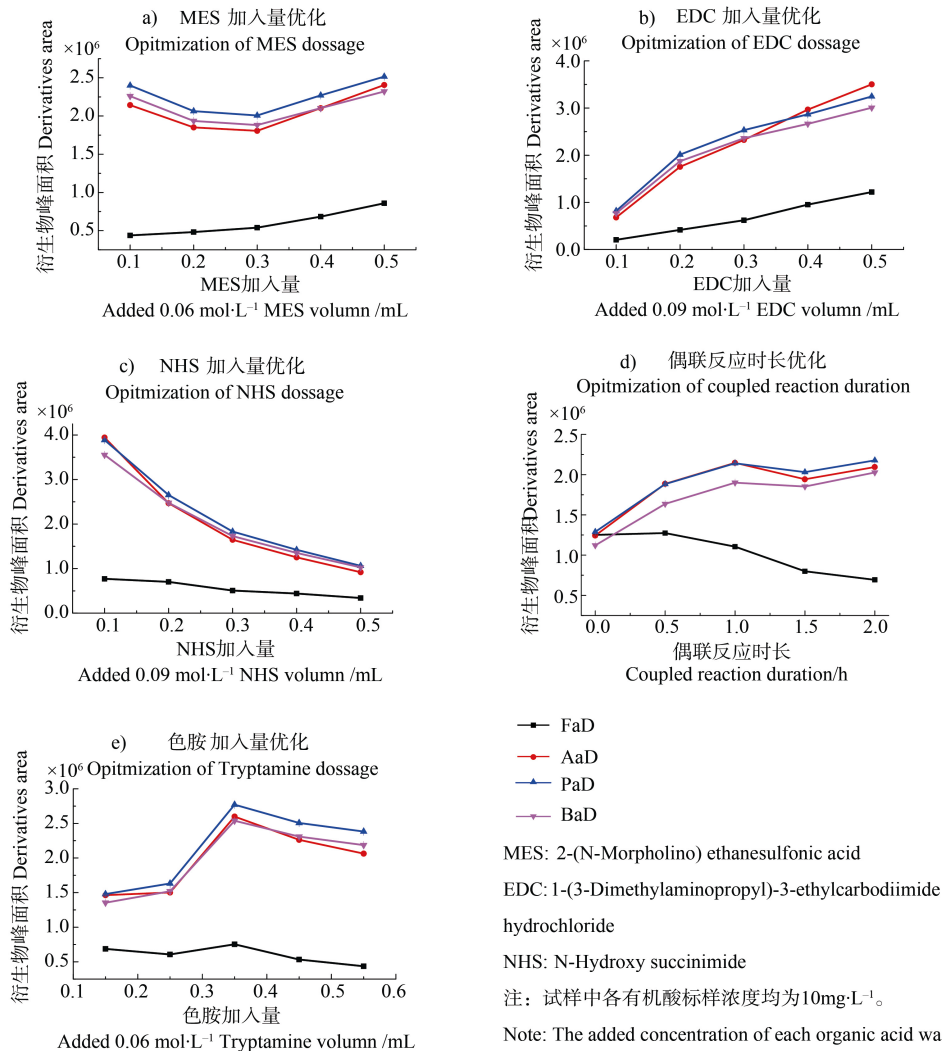


图5 衍生化反应条件优化图

Fig. 5 Optimized figures of derived reaction conditions

的 NHS 量越多, 衍生化产物的峰面积反而越小, 即衍生物浓度越低, 这应该与反应平衡有关。当 NHS 过量太多, 可能会抑制中间产物 2 与色胺的反应进行, 使最后一步酰胺化反应逆向进行, 进而使得目标产物减少, 故选择 0.1 mL (9.0  $\mu\text{mol}$ ) NHS 加入量。据图 5 d, 甲酸衍生物峰面积随着偶联反应时间的延长而减小, 反应 0.5 h 峰面积达峰值, 表明甲酸偶联反应很快, 故甲酸的最佳偶联反应时长为 0.5 h; 而对于乙酸、丙酸和丁酸而言, 衍生物峰面积随反应时间的延长先升高后降低, 当反应达到 1.0 h, 衍生物峰面积达最高, 故认为 1.0 h 为此三种酸的最优偶联反应时长。综合考虑, 选 0.75 h (45 min) 为四种酸的偶联优化反应时长。由图 5e, 在所设置的反应条件下, 当色胺溶液的加入量为 0.35 mL (21.0  $\mu\text{mol}$ ) 时, 各有机酸衍生物的峰面积最高, 即产率最高, 故

本法选 0.35 mL 为较佳 (若线性范围上限提高, 需要适当提升色胺的加入量)。

此外, 优化实验对整个反应温度也进行了考察, 发现相同的反应在 20℃ 和 25℃ 的条件下生成的各衍生化产物的峰面积没有显著性差异 ( $n=3$ ), 故选择室温 (20~25℃)。而在加入色胺进行酰胺化反应时间达 4 h 后, 衍生化产物的量不再增加 ( $n=3$ ), 考虑操作便捷性, 故选择静置反应过夜。

## 2.5 衍生法精密度和准确度评价

采用最优化反应条件对该方法进行方法精密度和准确度测试, 结果如下。

标准工作曲线。有机酸标准样衍生后的校准曲线线性方程和线性相关性如表 2, 由表 2, 各有机酸在衍生化后所得曲线方程线性相关性均为  $R^2 > 0.99$ , 可满足有机分析的要求。

表 2 有机酸衍生物校准曲线方程及线性相关性

Table 2 Linear equation and linearly dependence of derivatives

化合物名称 Compound	线性范围 Linear range/ (mg·L <sup>-1</sup> )	线性回归方程 Linear regression equation	决定系数 R <sup>2</sup> Determinate coefficient
FaD	0.1~20.0	y=91 633x+47 861	0.991
AaD	0.1~20.0	y=232 419x+43 680	0.996
PaD	0.1~20.0	y=244 143x+92 166	0.996
BaD	0.1~20.0	y=227 003x+34 280	0.998

方法加标回收率。加标样品衍生后回收率见表 3。4 种有机酸的加标回收率范围为 79.7%~133%，在有机分析的可控范围内，可满足有机分析的要求。

方法检测限。表 4 是采用样品溶液直接液相色谱法（直接法 DM）和有机酸衍生-液相色谱法（衍生法 DvM）测定时检出限对比表。表 4 表明衍生法不仅检

表 3 加标样品溶液经衍生化后测得的回收率

Table 3 Recovery of spiked sample by derivative method

样品名称 Sample name	分析物 Analysts	回收率 Recovery/%	平均回收率 AR <sup>①</sup> /%	标准差 SD	相对标准偏差 RSD <sup>②</sup> /%
加标样 1 SP1 0.5 mg·L <sup>-1</sup> (n=3)	FaD	93.9~102	98.5	4.30	4.37
	AaD	95.5~106	102	5.68	5.57
	PaD	84.7~98.9	91.3	7.14	7.83
	BaD	93.5~98.9	95.6	2.87	3.00
加标样 2 SP2 2 mg·L <sup>-1</sup> (n=3)	FaD	106~133	101	2.80	2.78
	AaD	95.2~111	95.1	3.06	3.22
	PaD	79.7~94.81	85.9	2.20	2.56
	BaD	107~113	98.3	4.74	4.82
加标样 3 SP3 10 mg·L <sup>-1</sup> (n=3)	FaD	97.9~104	123	10.35	8.41
	AaD	88.8~98.8	103	6.53	6.34
	PaD	81.9~87.7	91.5	6.61	7.22
	BaD	92.8~108	110	1.87	1.69

① AR-Average Recovery; ②RSD-Relative standard deviation.

表 4 直接法与衍生法检测限比较

Table 4 Method detection limit comparison of direct method and derivative method

名称 Name	甲酸 Fa		乙酸 Aa		丙酸 Pa		丁酸 Ba	
	DM <sup>1)</sup> (214 nm)	DvM <sup>2)</sup> (223 nm)	DM (214 nm)	DvM (223 nm)	DM (214 nm)	DvM (223 nm)	DM (214 nm)	DvM (223 nm)
方法检测限 MDL <sup>①</sup> (mg·L <sup>-1</sup> ) 进样 Inj. <sup>②</sup> 20uL	0.75	0.046	1.15	0.009	4.81	0.008	无响应 NR <sup>③</sup>	0.009

Note: 1) DM- 直接法 Direct method; 2) DvM-衍生法 Derivative method. ①MDL- Method detection limit; ②Injection volume; ③No response.下同。The same as below.

出限较直接法低得多, 还可以高灵敏度检测出丁酸。由于丁酸在紫外光下吸收很弱, 当采用直接法时较难测出, 故衍生法的检出优势更明显。其中直接法测定时所用仪器和色谱柱同衍生法, 定量检测波长为 214 nm, 流动相为 98%磷酸盐溶液 (0.02 mol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 为 2.5) +2%甲醇 (V/V), 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 等梯度洗脱, 其液相色谱图见图 6, 紫外光谱图见图 7, 丁酸在该测定条件下未能明显测出。

方法精密度和仪器精密度。表 5 为本方法测定时的方法精密度和 HPLC 仪器精密度。由表 5, 低浓度时 (2 mg·L<sup>-1</sup>) 4 种有机酸衍生物的方法精密度均 <10%, 各衍生物仪器精密度均 <3%, 而较高浓度

时 (10 mg·L<sup>-1</sup>) 各衍生物方法精密度均 <3%, 重复性很好, 可满足有机分析的要求。

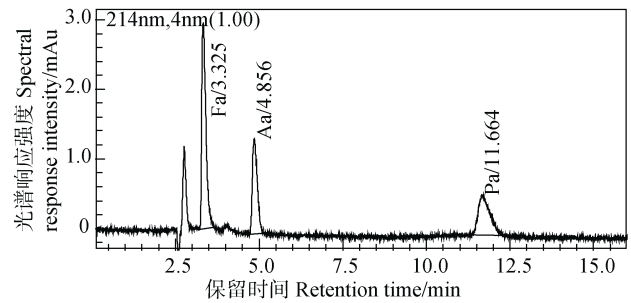


图 6 3 种有机酸标样 DM 液相色谱图 (20 mg·L<sup>-1</sup>)

Fig. 6 Liquid chromatogram of 3 organic acids by DM (20 mg·L<sup>-1</sup>)

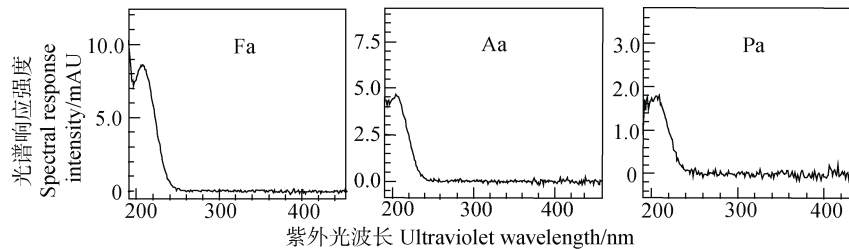


图 7 3 种有机酸紫外光谱图 (20 mg·L<sup>-1</sup>)

Fig. 7 UV spectrums of 3 organic acids by DM respectively (20 mg·L<sup>-1</sup>)

表 5 衍生法的精密度与仪器 (HPLC) 精密度

Table 5 Precisions of the derivative method and the instrument (HPLC)

名称 Name	FaD	AaD	PaD	Bad
方法精密度 MP/% (2 mg·L <sup>-1</sup> , n=7)	8.41	6.34	6.45	1.69
方法精密度 MP/% (10 mg·L <sup>-1</sup> , n=7)	2.13	2.40	2.56	2.86
仪器精密度 IP/% (2 mg·L <sup>-1</sup> , n=7)	2.58	2.68	0.58	1.57

注: 以峰面积计。Note: In terms of peak area. MP-Method precision; IP-Instrument precision.

## 2.6 实际样品分析与测定

为了验证该衍生方法, 对已经采用直接法测试过的两批次不同类型的样品进行衍生法复测并比较, 见表 6。其中样品 F36 和 F78 是农作物秸秆发酵液, 样品 X27 是水稻根系分泌物浓缩液, 直接取样进行衍生化。图 8~图 10 为各样品两种方法测试色谱图比较图。

图 8 为 F36 在两种方法测试下的色谱比较图。在 DM (直接法) 测试中, 甲酸 (Fa) 为未检出, 尽管在 Fa 出峰处有色谱峰, 但比较其紫外光谱图与图 7 后发现明显不是, 故判定为未检出。而在 DvM 法测试图中, 则可看到有较小 FaD (甲酸衍生物) 峰, 定量结果为 0.932 mg·L<sup>-1</sup> (见表 6), 表明样品中有少量 Fa 存在; DM 法条件下, 由于样品基质复杂及检测限较高很难测出, 难以对其进行定性与定量。DM 测试时 Aa (乙酸) 的保留时间为 4.840 min, 峰形尖锐且明显, 可以定性, 其定量结果为 46.0 mg·L<sup>-1</sup>, 但由该处对应的紫外光谱图与图 7 对比后, 发现在 270 nm 处有弱吸收, 应有杂质峰共流出, 定量结果应偏高; 而经 DvM 法测试后发现该样品有明显的 AaD (乙酸衍生物) 峰, 定量结果为 5.56 mg·L<sup>-1</sup> (见表 6), 两种方法测试结果差异较大, 此时 DvM 法 Aa 测试结果因无杂质峰共流出而更可靠。Pa (丙酸) 在 DM 测试时, 保留时间为 11.664 min, 其色谱峰左右没有干扰峰, 如果定量的话, 结果为 31.1 mg·L<sup>-1</sup> (见表 6), 但此处的紫外光谱图与图 7 比较后提示应不是丙酸; 而且在 DvM 法测试图中, PaD (丙酸衍生物) 峰几乎没有, 低于其检测限,



表 6 实际样品直接法 (DM) 与衍生法 (DvM) 测定结果比较

Table 6 Comparison of sample results detected by direct method (DM) and derivative method (DvM)

名称 Name	甲酸 Fa / (mg·L <sup>-1</sup> )		乙酸 Aa / (mg·L <sup>-1</sup> )		丙酸 Pa / (mg·L <sup>-1</sup> )		丁酸 Ba / (mg·L <sup>-1</sup> )	
	DM	DvM	DM	DvM	DM	DvM	DM	DvM
Rt <sup>①</sup> /min	3.325	15.022	4.856	15.383	11.664	17.690	—	20.164
样品 F36	ND <sup>②</sup>	0.932	46.0	5.56	31.1	ND	NR <sup>③</sup>	137
样品 F78	1.37	3.72	215	243	16.4	18.9	NR	262
样品 X27	59.9	0.78	80.4	90.8	ND	1.02	NR	0.06

注: 样品 F36 和 F78 是农作物秸秆发酵液, 样品 X27 是根系分泌物浓缩液。Note: F36 and F78 are crop straw fermentation broth, X27 is concentrated root exudates. ①Rt-保留时间 Retention time; ②ND-未检出 Not detected; ③NR-无响应 No response.

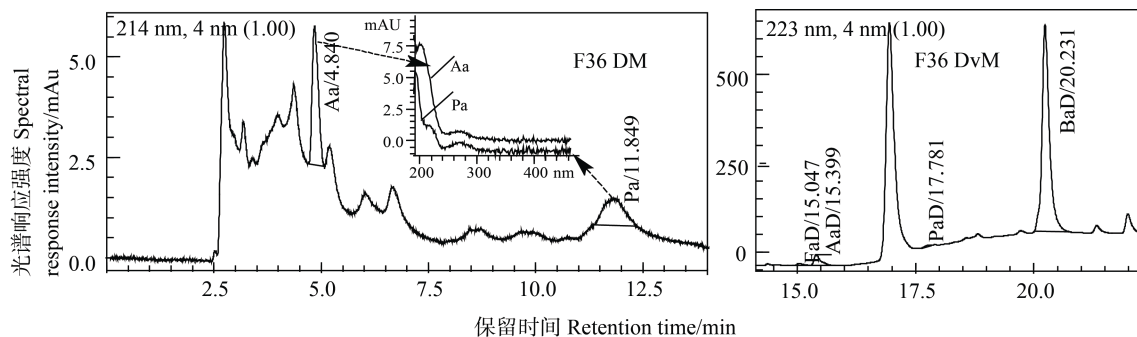


图 8 样品 F36 两种方法测试液相色谱图

Fig. 8 Liquid chromatograms of F36 by DM and DvM respectively

故可以认为该样品中应不含 Pa, 所以 Pa 判定为未检出; 两种方法的测试结果有差异, DvM 法测试时 Pa 结果更可信, 且当丙酸的浓度较低 (当 Pa 浓度 < 5 mg·L<sup>-1</sup>), 很难准确测出。丁酸则只能采用 DvM 法准确测出, 结果为 137 mg·L<sup>-1</sup> (见表 6)。

图 9 为两种方法下样品 F78 测试色谱图比较结果, 由图可以看出 Aa 在两种方法的色谱图中均有很强烈的响应峰, Pa 也均有明显的对应色谱峰, Fa

在 DM 图中有很弱的色谱峰, 在 DvM 法色谱图中有明显的色谱峰; 再由表 6, 可以看出, Fa、Aa 和 Pa 在两种方法测试下, 结果较一致, DvM 法结果可靠。丁酸只有在 DvM 法下测试结果为 262 mg·L<sup>-1</sup>, 其对应的色谱图较好地印证了这一点。

图 10 为两种方法下样品 X27 测试色谱图比较结果, 其中在 DM 测试图中, 3 种有机酸的定性保留时间取决于当次测试时有机酸标准样的液相色谱图, 见

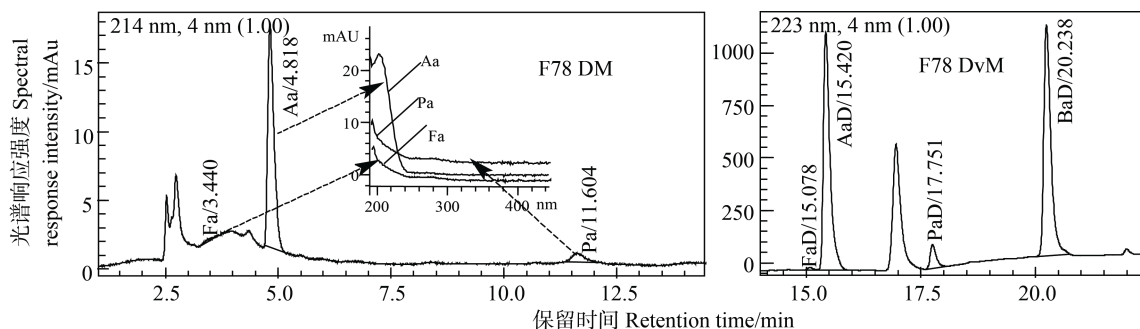


图 9 样品 F78 两种方法测试液相色谱图

Fig. 9 Liquid chromatograms of F78 by DM and DvM respectively

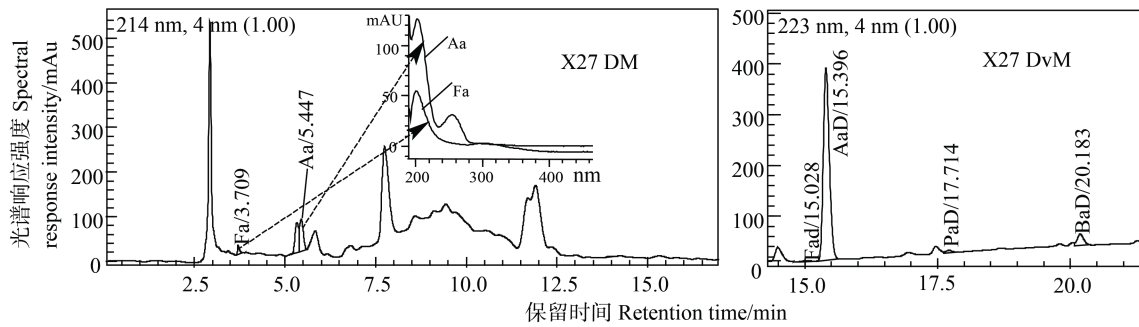


图 10 样品 X27 两种方法测试液相色谱图

Fig. 10 Liquid chromatograms of X27 by DM and DvM respectively

图 11。由图 10, DM 图中, Fa 在其标样出峰处有非常明显的色谱峰, Aa 出峰更显著, 但是 Aa 色谱峰与其他共流出物有交叠, Pa 则没有明显峰, 结合各自的紫外光谱图, 发现 Fa 和 Aa 出峰处很可能均有杂质峰, 因为它们分别在约 300 nm 和 250 nm 处均有吸收峰; 而由 DvM 法色谱图可看出该样品中 Aa 的含量较高, 其他 3 种有机酸存在, 但是含量不高。结合表 6, 说明 DM 测试时 Fa 的值偏高较多, Aa 则偏低, 可能与附近的杂质干扰有关。Pa 和 Ba 的测试结果则相对一致, 由于检测限的限制, DM 法很难测出此浓度水平下的含量, 而 DvM 法可以测出。

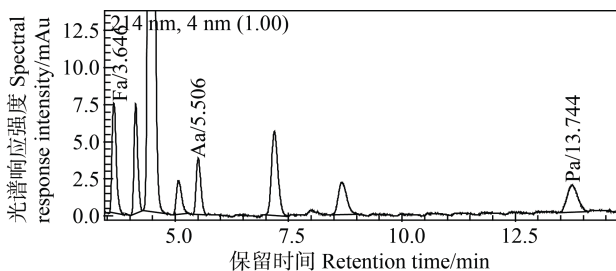
图 11 有机酸标样液相色谱图 ( $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )

Fig. 11 Liquid chromatogram of mix organic acids' standard

综上, 当采用 DM 测试此 4 种有机酸时, 样品中单羧酸含量需较高 (通常需  $>5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、杂质的种类和含量相对较少, 且在配备二极管阵列检测器时测试较为可靠, 否则很可能带来定性定量不准, 而采用 DvM 法测试时杂质干扰较小, 具有定性定量可靠的特性, 同时可以测定低含量样品, 增敏效果显著, 并且可以高灵敏度测定丁酸。

### 3 结 论

本文提出的几种小分子单羧酸偶联-酰胺化-液

相色谱检测法具有定性定量准确可靠; 灵敏度比液相色谱直接检测法提高达 100 倍以上, 而且可以高灵敏度测定丁酸, 优势明显; 对于这几种单羧酸浓度较低、或基质复杂的土壤圈样品, 具有样品前处理简单, 操作方便等优势。

### 参考文献 (References)

- [1] Shen A L, Li X Y, Wu S R. The composition characteristics of low-molecular-weight organic acids in soil and their roles on soil material cycling[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 1997, 3(4): 363—371. [沈阿林, 李学垣, 吴受容. 土壤中低分子量有机酸在物质循环中的作用[J]. 植物营养与肥料学报, 1997, 3(4): 363—371.]
- [2] Song J F, Cui X Y. Advances in the study of low molecular mass organic acids in forest soils[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2008, 44(6): 118—124. [宋金凤, 崔晓阳. 森林土壤中低分子量有机酸研究进展[J]. 林业科学, 2008, 44(6): 118—124.]
- [3] Wu L H, Luo Y M, Christie P, et al. Effects of EDTA and low molecular weight organic acids on soil solution properties of a heavy metal polluted soil[J]. Chemosphere, 2003, 50(6): 819—822.
- [4] Pramod K, Jyothi L N, Mani V P. Interactive effects of salicylic acid and phytohormones on photosynthesis and grain yield of soybean( Glycine, Merrill)[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2000, 6: 179—186.
- [5] Chen X Q, Kang Ou, Zhou J M, et. al. Effect of moisture conditions and OA Co-application on the transference and transformation of phosphorus in the fertisphere of a paddy soil from central China[J]. Soils, 2013, 45(5): 838—844. [陈小琴, 康 欧, 周健民, 等. 水分与有机酸对水稻土肥际微域磷迁移转化的影响[J]. 土壤, 2013, 45(5): 838—844.]
- [6] Wang D S, Liang C H, Wang W H. The dynamics research on the cinnamon releasing of brown soil extracted by low-molecular-weight organic acid[J]. Journal of Liaoning Agricultural Vocation-Technical

- College, 2005, 7 (1): 1—3. [王东升, 梁成华, 王文华. 低分子量有机酸作用下棕壤、褐土钾的释放动力学研究[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2005, 7 (1): 1—3.]
- [ 7 ] Qian Y, Liu Y. Effects of single and combined organic acids on form of Cd in soil[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2012, 43 (1): 186—189. [钱翌, 刘莹. 单一及复合有机酸对土壤中镉形态的影响研究[J]. 土壤通报, 2012, 43 (1): 186—189.]
- [ 8 ] Li W Z, Xie W M, Jiang T, et al. Effect of three low-molecular organic acids on desorption of DDT in soil[J]. Journal of Beihua University: Natural Science, 2009, 10 (6): 551—553. [李宛泽, 谢文明, 江涛, 等. 3种低相对分子质量有机酸对土壤中 DDT 的解吸[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2009, 10 (6): 551—553.]
- [ 9 ] Tagami K, Uchida S, Ishii N. Measurement of the fate of acetic acid form carbon in soil solution of flooded soils using high-performance liquid chromatography coupled with isotope ratio mass spectrometry[J]. Geoderma, 2011, 165 (1): 25—30.
- [ 10 ] Wang D L, Lin W H. Effects of CO<sub>2</sub> elevation on root exudates in rice[J]. Acta Ecologica Sinica, 1999, 19 (4): 570—572. [王大力, 林伟宏. CO<sub>2</sub> 浓度升高对水稻根系分泌物的影响——总有机碳、甲酸和乙酸含量变化[J]. 生态学报, 1999, 19 (4): 570—572.]
- [ 11 ] Thangarajan R, Bolan N S, Tian G L, et al. Role of organic amendment application on greenhouse gas emission from soil[J]. Science of the Total Environment, 2013, 465: 72—96.
- [ 12 ] Lynch J M. Production and phytotoxicity of acetic acid in anaerobic soils containing plant residues[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1978, 10 (2): 131—135.
- [ 13 ] Jiang Z Z, Zhang C Z, Wang Y F, et al. Establishment of a novel diagnostic method for colorectal cancer based on metabolites of intestinal microorganism[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44 (8): 1178—1184. [江振作, 张春泽, 王跃飞, 等. 基于肠道微生物代谢产物的人结肠癌诊断方法研究[J]. 分析化学, 2016, 44 (8): 1178—1184.]
- [ 14 ] Li J H, Wang Z C. Determination of propionic acid, malic acid and citric acid in the soil by gas chromatography[J]. Journal of East China Institute of Technology, 2006, 29 (4): 376—378. [李建红, 王志畅. 气相色谱法测定土壤中丙酸、苹果酸、柠檬酸[J]. 东华理工学院学报, 2006, 29 (4): 376—378.]
- [ 15 ] Li S H, Liu L, Liu B. Gas chromatography determination of monoprotic organic acids content in cyclohexane oxidation liquid[J]. China Synthetic Fiber Industry, 2011, 34 (2): 65—66. [李曙红, 柳利, 刘彬. 气相色谱法测定环己烷氧化液中一元有机酸含量[J]. 合成纤维工业, 2011, 34 (2): 65—66.]
- [ 16 ] Zhu L, Zheng J, Yang J, et al. Determination of polybasic acids and higher fatty acids in tobacco by microwave-assisted methyl esterification combining with fast GC[J]. Tobacco Science & Technology, 2015, 48 (9): 56—61, 74. [朱玲, 郑健, 杨涓, 等. 微波辅助甲酯化-快速 GC 法测定烟草中的多元酸和高级脂肪酸[J]. 烟草科技, 2015, 48 (9): 56—61, 74.]
- [ 17 ] Ji H W, Zhang L, Man J, et al. Determination of fourteen volatile organic acids in total particulate matters in mainstream cigarette smoke by shaking extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Tobacco Science & Technology, 2015, 48 (9): 33—39. [姬厚伟, 张丽, 满杰, 等. 振荡萃取-GC/MS 法测定卷烟主流烟气总颗粒物中的 14 种挥发性有机酸[J]. 烟草科技, 2015, 48 (9): 33—39.]
- [ 18 ] Zhang Q, Xiang Z M, Cai K, et al. Determination of organic acids from mainstream cigarette smoke using ultra low temperature solvent extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42 (8): 1124—1130. [张权, 向章敏, 蔡凯, 等. 超低温溶剂提取-全二维气相色谱/飞行时间质谱法测定卷烟主流烟气中有机酸成分[J]. 分析化学, 2014, 42 (8): 1124—1130.]
- [ 19 ] Zhao Y F, Lu S M, Wang H L, et al. Analysis of volatile acids in food by headspace gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2009, 28 (12): 1456—1459. [招云芳, 陆舍铭, 王海利, 等. 顶空气相色谱质谱法快速测定液体食品中的挥发性酸[J]. 分析测试学报, 2009, 28 (12): 1456—1459.]
- [ 20 ] Wang P, Zhou R. Determination of organic acids exuded from plant roots by high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2006, 24 (3): 239—242. [王平, 周荣. 高效液相色谱法测定植物根系分泌物中的有机酸[J]. 色谱, 2006, 24 (3): 239—242.]
- [ 21 ] Qian B, Zhang Y, Li S, et al. Determination of organic acids in propionic acid fermentation broth by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007, 35 (11): 1651—1653. [钱兵, 章燕, 李莎, 等. 反相高效液相色谱法测定丙酸发酵液中的有机酸[J]. 分析化学, 2007, 35 (11): 1651—1653.]
- [ 22 ] Huang T Z, Wang S J, Liu X M, et al. Rapid determination of eight organic acids in plant tissue by sequential extraction and high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32 (12): 1356—1361. [黄天志, 王世杰, 刘秀明, 等. 逐级提取-高效液相色谱法快速测定植物组织中 8 种有机酸[J]. 色谱, 2014, 32 (12): 1356—1361.]
- [ 23 ] Gao Y Y, Peng Z F, Yang C, et al. Determination of the effect of organic acids in *Ricinus communis* L. roots under copper stress by HPLC[J]. Guangdong Chemical Industry, 2018, 45 (21): 10—11, 14. [高媛媛, 彭兆丰, 杨成, 等. 应用 HPLC 检测蓖麻根系分泌物中有机酸的含量[J]. 广东化工, 2018, 45 (21): 10—11, 14.]
- [ 24 ] Wu C C, Liu J, Zhang X H. Determination of organic

- acids in the root exudates of Cr-hyperaccumulator *Leersia hexandra* Swartz using high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36 (2): 167—172. [伍婵翠, 刘杰, 张学洪. 高效液相色谱法测定铬超富集植物李氏禾根系分泌物中的有机酸[J]. 色谱, 2018, 36 (2): 167—172.]
- [ 25 ] Liu K L, Huang J, Han T F, et al. Variation of potassium-solubilizing bacteria in red soil under long-term fertilization and its driving factors[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57 (1): 183—194. [柳开楼, 黄晶, 韩天富, 等. 长期施肥下红壤旱地解钾菌变化及其驱动因子[J]. 土壤学报, 2020, 57 (1): 183—194.]
- [ 26 ] Shi Y L, Liu J S, Cai Y Q, et al. Simultaneous determination of organic acids and inorganic anions in beer by ion chromatography[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33 (5): 605—608. [史亚利, 刘京生, 蔡亚岐, 等. 离子交换色谱法同时测定啤酒中有机酸和无机阴离子[J]. 分析化学, 2005, 33 (5): 605—608.]
- [ 27 ] Cao J X, Hang Y P, Lu J P, et al. Determination of nonnitrogenous organic acids and inorganic anions in sugarcane molasses and molasses alcohol waste by ion chromatography with solid-phase extraction[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28 (9): 893—897. [曹家兴, 杭义萍, 陆建平, 等. 固相萃取-离子色谱法测定甘蔗糖蜜及糖蜜酒精废液中的非氮有机酸和无机阴离子[J]. 色谱, 2010, 28 (9): 893—897.]
- [ 28 ] Li F, Wang L L, Xu Y, et al. Determination of six kinds of organic acids in grapes by ion chromatography[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2011, 36 (1): 48—49. [李芳, 王丽丽, 徐熠, 等. 离子色谱法测定葡萄中六种有机酸[J]. 吉林农业科学, 2011, 36 (1): 48—49.]
- [ 29 ] Sun Y Y, Yu S, Luan L Y, et al. Simultaneous determination of formic acid, acetic acid, propionic acid and n-butyric acid in environmental samples by ion chromatography[J]. Shandong Science, 2017, 30 (4): 92—98. [孙芸芸, 于帅, 栾玲玉, 等. 离子色谱法同时测定环境样品中有机酸的研究[J]. 山东科学, 2017, 30 (4): 92—98.]
- [ 30 ] Mu X W, Zhang D G, Chen H, et al. Determination of organic acids and inorganic anions in the steam by ion chromatography[J]. Industrial Water Treatment, 2019, 39 (10): 100—103. [慕晓炜, 张达光, 陈皓, 等. 离子色谱法测定水汽中有机酸和无机阴离子[J]. 工业水处理, 2019, 39 (10): 100—103.]
- [ 31 ] Cheng J Y, Wang T D, Kang J W. Quantitative monitoring the concentration changes of organic acids in fermentation process of *Clostridium acetobutylicum* using capillary ion electrophoresis[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2008, 26 (6): 658—661. [程佳懿, 汪彤丹, 康经武. 毛细管离子电泳法定量监测丙酮丁醇梭菌发酵过程中产生的有机酸的浓度变化[J]. 色谱, 2008, 26 (6): 658—661.]
- [ 32 ] Yan L, Tu C Y, Tang M H. Determination of organic acid in fermentation broth by capillary electrophoresis[J]. Journal of Nanjing University of Technology: Natural Science Edition, 2008, 30 (6): 95—100. [严励, 屠春燕, 唐美华. 毛细管区带电泳法检测丁二酸发酵液中多种低相对分子质量有机酸[J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2008, 30 (6): 95—100.]
- [ 33 ] Brugnerotto P, Della Betta F, Gonzaga L V, et al. A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracinga honeydew honey and floral honey[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2019, 82: 103243.
- [ 34 ] Mi Z H, Chen Y F, Zhang H P. Application of UPLC-MS in analysis of organic acids in fermented milk[J]. China Dairy Industry, 2017, 45 (12): 37—39. [米智慧, 陈永福, 张和平. 超高效液相色谱质谱联用技术在发酵乳有机酸分析中的应用[J]. 中国乳品工业, 2017, 45 (12): 37—39.]
- [ 35 ] Wang S W, Liu Y P, Wang X N, et al. Determination of ten organic acids content in fresh *Litchi* based on high performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry technique[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2019, 21 (3): 359—365. [王思威, 刘艳萍, 王潇楠, 等. 基于高效液相色谱-三重四极杆串联质谱技术测定鲜荔枝果肉中 10 种有机酸含量[J]. 农药学学报, 2019, 21 (3): 359—365.]
- [ 36 ] Wang Y J, Yang C R, Wang L Y. Influence of EDC/NHS crosslinking on physicochemical properties of collagen[J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 2007, 35 (12): 66—70, 96. [王迎军, 杨春蓉, 汪凌云. EDC/NHS 交联对胶原物理化学性能的影响[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2007, 35 (12): 66—70, 96.]
- [ 37 ] Lu G Y, Kong L J, Sheng B Y, et al. Degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan and its potential application for peripheral nerve regeneration[J]. European Polymer Journal, 2007, 43 (9): 3807—3818.
- [ 38 ] Shepherd D V, Shepherd J H, Ghose S, et al. The process of EDC-NHS cross-linking of reconstituted collagen fibres increases collagen fibrillar order and alignment[J]. APL Materials, 2015, 3 (1): 014902.
- [ 39 ] Elahi M F, Guan G P, Wang L, et al. Influence of layer-by-layer polyelectrolyte deposition and EDC/NHS activated heparin immobilization onto silk fibroin fabric[J]. Materials: Basel, Switzerland, 2014, 7 (4): 2956—2977.

(责任编辑: 檀满枝)