

文章编号: 0254-5357(2009)02-0097-04

土壤和白菜中低分子量有机酸的气相色谱分析

谢文明^{1,2}, KO Kwang-yong², LEE Kyu-seung²

(1. 吉林农业大学, 吉林 长春 130118; 2. 忠南大学, 大田 韩国 305-764)

摘要: 利用甲醇-硫酸混合液(体积比 10:7)对土壤和白菜中低分子量有机酸同时进行提取和甲酯化衍生, 然后利用二氯甲烷液-液萃取, 气相色谱法分析。土壤中 7 种低分子量有机酸(草酸、丙二酸、反丁烯二酸、琥珀酸、马来酸、L-苹果酸、柠檬酸)的添加回收率为 81.93%~95.58%, 白菜中的添加回收率为 84.78%~106.99%, 方法的检出限为 0.72~4.14 mg/kg。方法用于测定根际、非根际土壤和白菜根系、茎叶中的低分子量有机酸, 结果准确可靠。

关键词: 气相色谱法; 衍生化; 低分子量有机酸; 土壤; 白菜

中图分类号: O657.71 **文献标识码:** A

Determination of Low Molecular Weight Organic Acids in Soils and Cabbages by Gas Chromatography

XIE Wen-ming^{1,2}, KO Kwang-yong², LEE Kyu-seung²

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

Abstract: The low molecular weight organic acids (LMWOAs) in rhizosphere soil, bulk soil, root and leave of cabbages were extracted and derived by the mixture of methanol and sulfuric acid (10:7). Seven organic acids (oxalic, malonic, fumaric, succinic, maleic, L-malic and citric acid) were identified and quantified by GC instrument equipped with FID. The recovery were ranged from 81.93% to 95.58% for soils and from 84.78% to 106.99% for roots. The detection limit was ranged from 0.72 mg/kg to 4.14 mg/kg. The method was suitable for the reliable and accurate determination of low molecular weight organic acids in soils and cabbages.

Key words: gas chromatography; derivatization; low molecular weight organic acid; cabbage; soil

低分子量有机酸是指相对分子质量 < 500 的含羧基化合物, 是土壤中广泛存在的一类非常活泼的物质。土壤环境中的低分子量有机酸主要来源于表层土壤有机质分解、植物根系分泌物、微生物代谢作用和施入土壤有机物的转化^[1-3]。低分子量有机酸是根系分泌物中最为重要的成分, 有些是三羧酸循环的中间产物, 如柠檬酸、琥珀酸和苹果酸等; 也有其他一些常见的脂肪酸(如甲酸、乙酸、丙酸、酪酸、草酸、乙醇酸、乳酸和酒石酸)和芳香酸^[4](见图 1)。

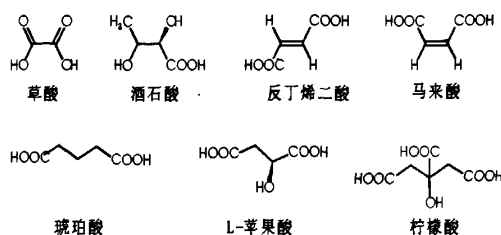


图 1 常见的低分子量有机酸化学结构

Fig. 1 Chemical structures of low molecular weight organic acids

收稿日期: 2008-07-25; 修订日期: 2008-11-21

基金项目: 韩国忠南大学基金项目资助(2006); 吉林农业大学博士科研启动基金项目资助(2005)

作者简介: 谢文明(1970-), 男, 山东潍坊人, 博士, 副教授, 主要从事土壤中农药等有机污染物的环境行为以及污染消除研究。E-mail: xiewenming@hotmail.com。

通过有机残体分解产生的有机酸,有一部分是原来植物体内游离的低级($C_1 \sim C_4$)脂肪酸、草酸、柠檬酸、苹果酸、酚酸等,但大部分是植物残体多种成分发酵或水解产生的低级饱和脂肪酸、木质素转化产生的酚酸、脂肪类分解产生的长链脂肪酸^[5]。

土壤低分子量有机酸的类型和数量因土壤类型、营养状况、土壤微生物的数量和活性而有很大的变化,并且处于合成和分解的动态过程中,其浓度一般不高^[1]。每千克土壤中脂肪族一元羧酸(甲酸、乙酸和丙酸等)的含量通常在 $0 \sim 1$ mmol,而二元和三元羧酸(包括草酸、柠檬酸、丙二酸、马来酸、琥珀酸和酒石酸)的浓度通常在 $0 \sim 50$ μ mol。植物根际由于根系分泌大量的有机酸以及分泌质子引起产酸细菌的繁殖生长,其低分子量有机酸在每千克土壤中含量一般可高达 $1 \sim 10$ mmol,明显高于本体土壤^[6-7]。

分离、纯化和测定土壤和根系中的低分子量有机酸是研究低分子量有机酸在土壤中的分布和作用的基础。色谱法是目前分析低分子量有机酸最普遍的方法,主要包括气相色谱法和液相色谱法^[8-12]。高效液相色谱法(HPLC)是较为常用的测定方法,但由于低分子量有机酸通常具有较低的pKa值,需要在较低pH的流动相中进行色谱分离,所以对色谱柱的要求较高。另外对于多种低分子量有机酸的分析,HPLC方法很难达到满意的分离度^[13]。而将低分子量有机酸甲酯化衍生后利用气相色谱法测定有机酸,特别是利用毛细管柱分离,可以达到满意的分离度^[13-14]。

本实验的目的是发展一种能够准确、快速检测土壤和植物中低分子量有机酸的方法。

1 实验部分

1.1 仪器和主要试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪(美国 Agilent 公司,配备 FID 检测器)。

Alltech AT-WAX 弹性石英毛细管柱($10\text{ m} \times 0.53\text{ mm} \times 1.2\text{ }\mu\text{m}$)。进样口和火焰离子化检测器的温度分别为 250°C 和 250°C 。柱箱程序升温初始温度为 80°C ,保持 2 min ,然后以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 200°C ,保持 5 min 。载气为高纯氮气,色谱柱流速为 $7.1\text{ mL}/\text{min}$,尾吹和载气采用恒定流量($45\text{ mL}/\text{min}$)的模式,利用自动进样器在不分流模式下进样 $1\text{ }\mu\text{L}$,分流时间 0.5 min 。各种低分子量

有机酸在混合标样中的浓度根据在实际样品中的大致浓度进行调整。

硫酸、甲醇、二氯甲烷等试剂均为分析纯。

1.2 植物和土壤样品的采集和处理

把盆栽的白菜从靠近土表的部位切断,将根和茎叶部分分开。把白菜的茎叶小心切碎并收集。将白菜的根系从土壤中挖出,轻轻地抖落附着的大土块,将牢固附着在根系上的土壤用软刷子刷下来作为根际土壤,剩余土壤充分混合作为非根际土壤。植物的根、茎叶、根际土壤和非根际土壤样品均在 50°C 条件下干燥 48 h ,然后磨碎,过筛($<0.5\text{ mm}$)。在 -24°C 条件下储存,备用。

1.3 低分子量有机酸的提取、甲酯化和净化

称取 1 g 土壤样品于 20 mL 具塞刻度试管中,加入 9 mL 甲醇-硫酸溶液(体积比 $10:7$)。在 60°C 水浴中提取和甲酯化 12 h 。冷却后将提取液离心分离上清液,然后再加入 5 mL 甲醇涡旋混合后离心,将上清液转移。合并两上清液并转移至 60 mL 分液漏斗中,加入 1 mL 饱和 NaCl 溶液、 20 mL 蒸馏水、 5 mL 二氯甲烷,剧烈振荡 60 s 后静置分层。将二氯甲烷转移至 10 mL 试管中,剩余水相加入另外 3 mL 二氯甲烷萃取,合并两次的二氯甲烷相。将脱水后的二氯甲烷相在 40°C 水浴条件下利用氮气吹干,然后准确加入 1 mL 二氯甲烷涡旋混合后进行气相色谱分析。

植物样品的称样量为 0.5 g ,其他处理步骤同土壤样品。

2 结果与讨论

2.1 低分子量有机酸的定性和定量

利用1.1节的色谱条件对不同浓度的标样进行分析,确定各低分子量有机酸的相对保留时间、线性范围和线性相关系数,结果显示,在分析浓度范围内各低分子量有机酸衍生物的线性关系良好(见表1)。

色谱流出曲线图表明,采用1.1节色谱条件可以在较短的时间内使所分析的低分子量有机酸达到完全分离,其中7种低分子量有机酸在色谱柱中的洗脱时间不超过 16 min ,每个样品的分析周期为 20 min 。标样衍生化后均可以达到完全基线分离,而且没有杂质干扰,从而确保迅速和准确地对土壤和植物中有机酸进行分析。图2分别为标样、土壤、根系和叶中的低分子量有机酸甲酯化衍生物的色谱图。

表 1 低分子量有机酸的相对保留时间、线性方程和相关系数

低分子量 有机酸	相对保留时间 \bar{t}_R/min	平均相对保留时间 \bar{t}_R/min	线性方程	相关系数	检出限 $L_D/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$
草酸	4.287, 4.287, 4.286, 4.288, 4.288, 4.287	4.287	$y = 3.65x + 28.40$	0.9997	1.42
丙二酸	5.648, 5.650, 5.647, 5.650, 5.648, 5.649	5.649	$y = 0.70x - 13.99$	0.9999	2.44
反丁烯二酸	6.095, 6.098, 6.095, 6.096, 6.096, 6.097	6.096	$y = 0.36x + 5.24$	0.9999	2.84
琥珀酸	6.712, 6.715, 6.713, 6.713, 6.713, 6.713	6.713	$y = 9.66x - 23.71$	0.9997	3.72
马来酸	7.782, 7.783, 7.783, 7.783, 7.783, 7.782	7.783	$y = 8.94x - 11.99$	0.9999	3.15
L-苹果酸	11.432, 11.435, 11.432, 11.433, 11.433, 11.433	11.433	$y = 21.34x - 64.17$	0.9998	0.72
柠檬酸	15.418, 15.417, 15.416, 15.417, 15.416, 15.415	15.417	$y = 9.77x - 254.14$	0.9932	4.14

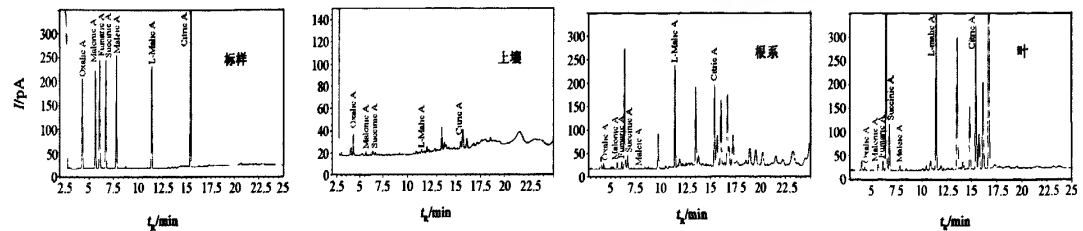


图 2 低分子量有机酸色谱图
Fig.2 Chromatograms of low molecular weight organic acids

分别取一定浓度的草酸、丙二酸、丁二酸、反丁烯二酸、顺丁烯二酸、苹果酸、柠檬酸标样,按样品处理方法进行甲酯化,在上述最佳色谱条件下进样分析,得到标样色谱图,确定各有机酸的出峰顺序和所对应的保留时间。在相同色谱条件下,将样品色谱图与有机酸标准样品色谱图进行对照,根据保留时间进行定性分析;根据峰面积利用外标法进行定量分析。

2.2 加标回收试验

为明确低分子量有机酸在样品提取、甲酯化和液-液分配净化过程中的损失,在样品基质中添加一定量的低分子量有机酸,在准确测定样品本底后计算加标回收率。表 2 结果表明,所分析的低分子量有机酸的回收率均在 80% 以上,显示该方法可以准确和精确地测定土壤和植物样品中的低分子量有机酸。

表 2 土壤和白菜根系中低分子量有机酸的加标回收率^①
Table 2 Recoveries of low molecular weight organic acids from soils and roots

样品	低分子量 有机酸	基质中含量 $\rho_B/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$		加标回收试验 $\rho_B/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$			回收率 $R/\%$
		测定值	平均值	添加量	添加后测定值	测定平均值	
土壤	草酸	30.04, 28.49, 31.45	29.99	381.22	352.36, 328.99, 345.68	342.34	81.93
	丙二酸	68.87, 65.31, 63.56	69.91	2549.72	2239.02, 2248.8, 2250.33	2246.05	85.35
	反丁烯二酸	-	-	5373.84	5127.59, 4606.9, 4896.36	4876.95	90.75
	琥珀酸	6.09, 5.77, 7.63	6.5	203.13	204.49, 195.81, 201.69	200.66	95.58
	马来酸	-	-	218.04	202.07, 179.68, 200.37	194.04	88.99
	L-苹果酸	5.33, 5.05, 5.42	5.23	74.01	69.31, 69.24, 70.42	69.65	87.04
	柠檬酸	42.45, 40.25, 41.53	41.41	360.31	364.71, 328.62, 342.59	345.31	84.34
根系	草酸	6.51, 3.65, 5.86	5.34	450.26	488.88, 498.173, 474.22	487.09	106.99
	丙二酸	475.55, 529.58, 540.87	515.34	5400.72	4745.94, 5988.79, 5719.74	5484.83	92.01
	反丁烯二酸	82.06, 45.42, 66.53	64.67	60730.84	66887.51, 74835.8, 49930.96	63884.75	105.08
	琥珀酸	751.18, 731.60, 597.21	693.34	20300.13	21363.91, 25583.89, 18659.68	21869.16	104.31
	马来酸	191.90, 213.54, 202.36	202.60	41800.04	41719.98, 50611.95, 33296.59	41876.17	99.69
	L-苹果酸	267.05, 253.21, 175.97	232.08	884.01	1121.46, 1230.21, 847.24	1066.31	94.36
	柠檬酸	1878.57, 1639.51, 1124.71	1547.59	1414.31	2841.94, 3147.57, 2250.53	2746.68	84.78

① “-”表示浓度低于检出限。

2.3 土壤和植物样品中的低分子量有机酸

在根际土壤和非根际土壤中均可以检测出丙二酸和柠檬酸,而苹果酸只是在根际土壤中检出,在非根际土壤中未检出。丙二酸在根际土壤和非根际土壤中的浓度差异并不明显;但是柠檬酸在根际土壤中的浓度明显高于非根际土壤。在白菜的根系和茎叶中可以检测出7种低分子量有机酸,而

且茎叶中的浓度明显高于根系中的浓度。在根系中低分子量有机酸的浓度从高到低的顺序为:反丁烯二酸、丙二酸、柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、草酸和马来酸;而在茎叶中低分子量有机酸的浓度从高到低的顺序为:反丁烯二酸、柠檬酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和草酸(见表3)。

表3 白菜根系、茎叶、根际土壤和非根际土壤中低分子量有机酸浓度^①

Table 3 Concentration of low molecular weight organic acids in cabbage leaves, cabbage roots, rhizosphere soil and bulk soil

样品	低分子量有机酸含量 $\rho_B/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$						
	草酸	丙二酸	反丁烯二酸	琥珀酸	马来酸	苹果酸	柠檬酸
白菜根系	223.72 ± 19.74	2776.13 ± 273.88	4765.07 ± 700.99	400.35 ± 40.56	50.44 ± 3.38	1127.93 ± 166.27	2710.33 ± 206.66
白菜茎叶	308.59 ± 77.78	5512.89 ± 297.40	30202.23 ± 1681.74	2820.39 ± 138.99	403.52 ± 152.68	6022.5 ± 1268.89	11371.59 ± 559.35
非根际土壤	-	6.41 ± 0.05	-	-	-	-	253.89 ± 34.70
根际土壤	-	6.93 ± 0.55	-	-	-	29.94 ± 4.16	235.55 ± 3.22

① 测定结果为平均值 ± 标准偏差(n=3)。“-”表示低于检出限。

3 结语

采用甲醇-硫酸浸提有机酸并直接进行甲酯化,游离有机酸可直接浸提甲酯化,结合态有机酸亦可在酸的作用下完成酯交换,使游离及结合态有机酸得以同时测定^[15]。将提取和衍生同时完成,不但可以减少样品前处理的步骤,而且能有效地避免传统测定方法中浓缩和酯化过程中易挥发有机酸的损失,酯化完全,样品转移简便,易于操作。

利用毛细管气相色谱法进行检测,选择性好,分离度高,可以有效地避免植物根系分泌物样品中低分子量复杂介质的干扰,是一种对土壤和植物样品中有机酸进行定性、定量分析的可靠方法。本方法的建立为植物根系分泌物中痕量有机酸的研究,以及植物根际环境中有机酸作用机理的探寻提供了重要的实验手段。

4 参考文献

[1] Jones D L. Organic acids in the rhizosphere—A critical review[J]. *Plant Soil*, 1998, 205: 25–44.
[2] Strobel B W. Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution—A review[J]. *Geoderma*, 2001, 99: 169–198.
[3] 莫淑勋. 土壤中有机的产生、转化及对土壤肥力的影响[J]. *土壤学进展*, 1986, 4 (1): 1–10.
[4] Stevenson F J. Organic acids in soil [M] // *Soil Biochemistry*. McLaren A D, Peterson G H, eds. New York: Marcel Dekker, 1967: 119–146.
[5] Liu D, Islam E, Li T Q, Yang X E, Jin X F, Mahmood Q. Comparison of synthetic chelators and low

molecular weight organic acids in enhancing phytoextraction of heavy metals by two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 153 (1–2): 114–122.
[6] Jones D L, Dennis P G, Owen A G, Van Hees P A W. Organic acids behavior in soils—Misconceptions and knowledge gaps [J]. *Plant Soil*, 2003, 248: 31–41.
[7] Shen A L, Li X Y, Kanamori T, Ono S, Arai T. Low-molecular-weight aliphatic acids in two soils incubated with plant residues under different moisture conditions [J]. *Pedosphere*, 1997, 7 (1): 79–86.
[8] 胡蓉, 乙引, 伍庆. RP-HPLC 法测定植物根系中有机酸含量[J]. *贵州农业科学*, 2007, 35 (2): 20–21.
[9] 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.
[10] 周光明, 高智席, 黄成, 李昌晓, 王莉. IS-RP-HPLC 法快速测定杉科植物中有机酸含量[J]. *分析化学*, 2006, 34 (1): 141.
[11] 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.
[12] 俞乐, 彭新湘, 杨崇, 刘拥海, 范燕萍. 反相高效液相色谱法测定植物组织及根分泌物中草酸[J]. *分析化学*, 2002, 30 (9): 1119–1122.
[13] 王敏, 屈锋, 林金明. 毛细管电泳在低分子量有机酸分析中的应用[J]. *分析科学学报*, 2005, 21 (4): 454–458.
[14] Song J F, Cui X Y. Analysis of organic acids in selected forest litters of Northeast China [J]. *Journal of Forestry Research*, 2003, 14 (4): 285–289.
[15] 宋金凤, 崔晓阳, 刘永. 毛细管气相色谱法测定森林凋落物中的有机酸[J]. *林业科学*, 2004, 40 (4): 185–188.