

文章编号: 1001-411X(2001)02-0008-03

菜豆有机酸和无机阴离子同时分析的离子色谱法

沈 宏, 严小龙, 郑少玲, 王秀荣

(华南农业大学植物营养遗传与根系生物学实验室, 广东 广州 510642)

摘要: 以甲醇作为有机改性剂, $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH} + \varphi(\text{甲醇})15\%$ 为淋洗液, 建立了菜豆有机酸和无机阴离子同时分析的离子色谱法。结果表明, 该方法能同时分析菜豆根部和叶部乙酸、琥珀酸、柠檬酸、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 等物质, 其检测限为 $0.02\sim 0.40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性工作范围为 $2\sim 120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 相对标准偏差低于 10% , 相关系数在 $0.9354\sim 0.9984$ 之间, 样品加标回收率为 $(100\pm 10)\%$ 。与 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 或 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 作淋洗液相比, 该法准确、方便、快速且不受干扰, 测定结果令人满意。

关键词: 离子色谱; 有机改性剂; 无机阴离子; 有机酸

中图分类号: S132

文献标识码: A

离子色谱法是分析有机酸的有效方法。与离子排斥色谱法和反相高效液相色谱法相比, 离子色谱分析有机酸的最大优点是: 不受其他有机物质干扰, 对共存的无机阴离子可同时进行分离和定量。高效液相色谱虽能对有机酸进行分离, 但受无机阴离子的干扰, 如 NO_3^- 干扰草酸的测定。气相色谱法测定挥发性有机酸, 虽然可用柱前衍生化气相色谱法分析, 但存在操作步骤繁琐、回收率不高、对热稳定性差和含量极低的有机酸难测定等缺陷^[1]。离子色谱法正好能弥补这些方法的不足。用离子色谱法和离子排斥色谱测定有机酸已有报道^[2,3], 但运用离子色谱法直接对植株有机酸和无机阴离子同时分析的实例还鲜有报道。笔者采用 NaOH 和甲醇混合溶液作为淋洗液, 对菜豆叶片和根系中有机酸和无机阴离子同时进行了分离。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

美国 Dionex 公司 Dionex-120 型离子色谱仪, ASRS 阴离子微膜抑制器, 电导检测器, CQ250 型超声脱气装置, 旋转蒸发器, Barnstead 纯水发生器、冷冻超速离心机, 微孔过滤器等。有机酸与无机阴离子标准样品: 柠檬酸、琥珀酸、乙酸、甲酸、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 等, 以上均为优级纯或分析纯。普通试剂有无水甲醇、异丙醇、乙腈、 NaOH 、

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 等。所有溶液均用重蒸去离子水配制。

1.2 分析方法

标准样品的制备: 分别称取 500 mg 柠檬酸、琥珀酸、乙酸、甲酸、 NaNO_3 、 NaNO_2 、 NaBr 、 NaCl 、 Na_2SO_4 、 Na_2HPO_4 , 溶于去离子水中, 定容于 100 mL 容量瓶中, 作为贮备液 ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 于冰箱保存。使用时, 根据不同物质峰高响应值稀释至一定倍数。试样的制备: 取有代表性的植株, 先用自来水清洗 3 次, 然后用蒸馏水清洗 3 次, 再用去离子水清洗 5 次, 用滤纸吸干表面水分, 选取典型部位将其剪碎, 称取植株鲜样 1 g , 加入 2 mL 去离子水, 再加入少量石英砂, 将其研磨成浆, 再加入 3 mL 去离子水将其洗入离心管中, 在 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 、转速为 $9\,000\text{ r/min}$ 条件下, 离心 0.5 h , 将上清液过滤到指形管中, 然后将其过 XAD 系列树脂层析柱, 用 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 洗脱; 将洗脱液过葡聚糖凝胶层析柱, 再用部分收集器分管收集、微孔滤膜 ($0.22\text{ }\mu\text{m}$) 过滤立即分析或放入冰箱 ($4\text{ }^\circ\text{C}$) 备用。

测定条件: 离子色谱仪型号为 Dionex-120 离子色谱仪, 分离柱为 IonpacAS11-HC, 保护柱为 IonpacAG11-HC, 载气为氮气, 压力为 0.3 MPa 。色谱条件如下: 色谱柱温 $25\text{ }^\circ\text{C}$, 淋洗液为 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、 $1.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 、 $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 及 $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH} + \varphi(\text{甲醇})15\%$ 的混合液

收稿日期: 2000-03-13

作者简介: 沈 宏(1970-), 男, 博士。

基金项目: 国家自然科学基金(39970431); 杰出青年基金(39925025); 国际科学基金(IFS, C/3042-1)资助项目

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

4 种、淋洗液流速 1.34 mL/min、进样量 25 μ L, 电导检测灵敏度为 1 μ S。

2 结果与分析

2.1 淋洗液的选择

淋洗液的选择对样品的有效分离具有十分明显的影响。淋洗液的选择要根据所测定样品的种类、性质而定, 因为不同物质的离解度、电荷性、亲水性差异较大。IonpacAS11-HC 型阴离子分离柱的树脂填料是亲水的微孔薄壳型阴离子交换树脂, 基核是乙烯基苯的聚合物, 离子交换功能基是季铵基 $-N^+(ROH)_3$, 亲水性较强。目前, 利用离子色谱仪分析无机阴离子最常见的淋洗液是 $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 缓冲溶液和 $Na_2B_4O_7$ 溶液。 $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 缓冲溶液的淋洗强度较大, 对固定相亲和力相近的离子进行分离存在如下不足之处^[4]: NO_2^- 与琥珀酸、甲酸与乙酸不能清楚分开; 在乙酸附近出现一个负峰, 此负峰干扰乙酸的定量。 $Na_2B_4O_7$ 的淋洗强度与 NaOH 相近, 但抑制产物是硼酸, 本底电导比水高^[1]。以 NaOH 作淋洗液, OH^- 是强亲水性离子, 易进入树脂亲水区, 能同时分离与树脂亲和力不同的无机阴离子, 且抑制产物是水, 本底电导也比较低, 因此, 本实验选用了 NaOH 作淋洗液。分别以甲醇、异丙醇和乙腈作有机改性剂进行实验, 发现异丙醇和乙腈的加入对有机酸分离无明显的改进作用。以甲醇作有机改性剂, 样品中的有机酸能分开而且基线平稳, 各离子保留时间的变化程度有明显的差异, 而且混合淋洗液体系的检测灵敏度也比单独体系有明显的改善。因此, 选用 30 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaOH 和 φ (甲醇)15% 的混合溶液作淋洗液。

2.2 方法的精密度和检测范围

通过对几种有机酸和无机阴离子标准样品的测定表明, 30 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaOH 和 φ (甲醇)15% 的混合液比单一 $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 淋洗液检测下限低、工作线性范围宽。这可能是: 氢氧化钠与甲醇混合淋洗液的背景电导比等物质的量浓度的 $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 溶液的背景电导低。而且 30 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaOH 和 φ (甲醇)15% 混合淋洗液的 pH 上升, 会使低相对分子质量的有机酸的离解度更加充分, 提高了低相对分子质量有机酸的检测灵敏度。本方法对各种离子或有机酸的检出限 ($S/N = 3$) 在 0.02 ~ 0.4 mg $\cdot$ L⁻¹ 之

间, 相对标准偏差在 3.57% ~ 9.14% 之间, 相关系数均在 0.935 4 以上, 工作曲线的线性范围在 2 个数量级以上(表 1)。几种有机酸和无机阴离子标准样品的离子色谱图见图 1-a。

表 1 被测阴离子和有机酸的检出限、相对标准偏差、线性相关系数和线性范围

Tab. 1 Detect limits relative standard deviation, linear correlated coefficient and linear range of anions and organic acids determined				
被测物质 matter determined	检出限 detect limit /(mg $\cdot$ L ⁻¹)	相对标准 偏差 relative standard deviation/ %	相关系数 correlation coefficient (r)	线性范围 linear range /(mg $\cdot$ L ⁻¹)
乙酸 acetic acid	0.40	7.85	0.998 4	2~60
甲酸 formic acid	0.20	6.54	0.995 2	4~80
Cl^-	0.02	7.34	0.981 2	2~40
琥珀酸 succinic acid	0.20	8.45	0.968 9	4~80
NO_2^-	0.05	3.57	0.975 8	2~80
SO_4^{2-}	0.04	4.68	0.964 2	2~40
柠檬酸 citric acid	0.40	6.25	0.978 5	6~120
Br^-	0.04	7.80	0.954 7	2~80
NO_3^-	0.05	9.14	0.935 4	2~40
PO_4^{3-}	0.05	5.86	0.952 7	6~120

2.3 菜豆根系与叶片提取物的测定

运用离子色谱仪对菜豆根系和叶片提取物进行了测定, 结果表明, 菜豆根系提取物中主要有机酸是乙酸和柠檬酸, 其含量大小为乙酸大于柠檬酸; 主要无机阴离子有 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} , 其含量大小为 $NO_3^- > SO_4^{2-} > PO_4^{3-} > Cl^-$ 。以样品测定结果和加入标准样品后通过增量法计算菜豆根系有机酸和无机阴离子的回收率在 91.9% ~ 102.0% 之间。菜豆叶片提取物中主要有机酸有乙酸、琥珀酸和柠檬酸, 其含量大小为乙酸 > 琥珀酸 > 柠檬酸; 主要无机阴离子有 Cl^- 、 NO_2^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 和 PO_4^{3-} , 其含量顺序为 $SO_4^{2-} > NO_3^- > PO_4^{3-} > NO_2^- > Cl^-$ 。以样品测定结果和加入标准样品后通过增量法计算菜豆叶片有机酸和无机阴离子回收率在 85.6% ~ 104.0% 之间(表 2)。由于菜豆叶片中有机酸和无机阴离子的含量较高, 在测定过程中, 样品经过稀释后测定, 故菜豆叶片有机酸和无机阴离子回收率变化范围大于根系样品回收率的变化范围。菜豆根系与叶片有机酸和无机阴离子色谱图见图 1-b、-c。

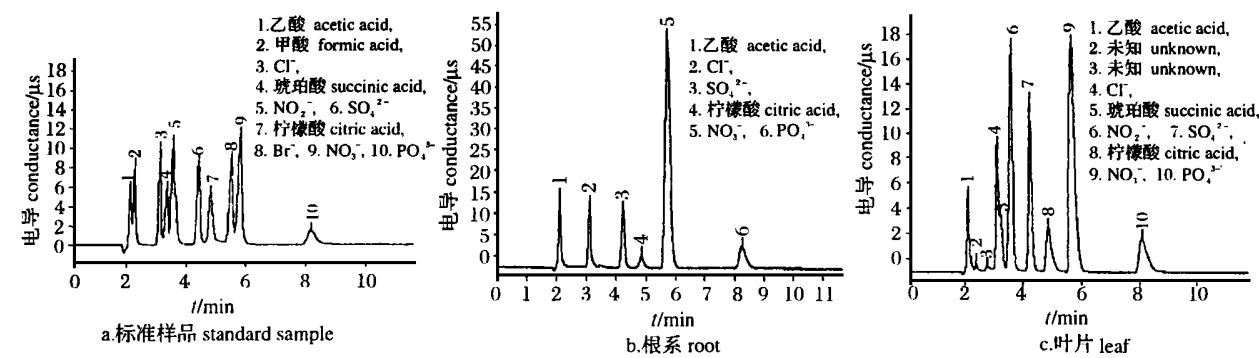


图 1 有机酸与无机阴离子的离子色谱图

Fig. 1 Ion chromatography of organic acids and inorganic anions

表 2 菜豆根系和叶片提取物中有机酸与无机阴离子的分析
Tab. 2 Analysis of organic acids and inorganic anions of root and leaf extracts in common bean

样品 sample	被测物质 matter determined	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$			回收率 recovery / %
		样品值	加入值	测得值	
根系 root	乙酸	7.67	7.00	15.00	102.0
	Cl^-	0.24	0.50	0.68	91.9
	SO_4^{2-}	1.03	1.00	1.95	96.1
	柠檬酸	5.54	5.00	10.2	96.8
	NO_3^-	1.72	2.00	3.54	95.2
	PO_4^{3-}	0.92	1.00	1.85	96.4
叶片 leaf	乙酸	88.40	90.0	185.00	104.0
	Cl^-	0.41	0.50	0.78	85.7
	琥珀酸	38.70	40.00	73.80	93.8
	NO_2^-	1.07	1.00	1.75	84.5
	SO_4^{2-}	2.64	3.00	5.30	94.0
	柠檬酸	21.60	20.00	38.80	93.3
	NO_3^-	1.57	2.00	3.44	96.4
	PO_4^{3-}	1.46	2.00	3.20	92.5

3 结语

上述结果表明: 以 NaOH 和甲醇混合液作淋洗液, 一次可以分离与固定相亲和力差异较大的多种有机酸和无机阴离子, 改善离子的色谱峰形, 提高了分离度和选择性. 该方法操作简便、快速, 又具有较高的灵敏度, 适合植株样品中无机阴离子和有机酸的同时分析, 可以尝试用于环境和食品样品的分析.

致谢: 实验过程中得到了赵明研究生的帮助, 谨此致谢.

参考文献:

[1] 丁明玉, 陈培榕, 罗国安. 单一阴离子交换柱分离有机酸和无机阴阳离子[J]. 分析化学, 1997, 25(2): 161—164.
[2] 屈 锋, 牟世芬, 侯小平, 等. 小麦根系中有机酸的离子色谱法分析研究[J]. 色谱, 1995, 13(5): 394—397.
[3] 邵志峰, 傅承光. 离子排斥色谱法分析有机酸和无机弱酸[J]. 色谱, 1996, 14(3): 237—238.
[4] 刘 吉, 刘克纳, 沈冬青, 等. 有机酸与无机阴离子的梯度离子色谱法分析研究[J]. 色谱, 1997, 15(4): 334—337.

Simultaneous Analysis of Organic Acids and Inorganic Anions in Common Bean by Ion Chromatography

SHEN Hong, YAN Xiao-long, ZHENG Shao-ling, WANG Xiu-rong

(Laboratory of Plant Nutritional Genetics Research Center of Root Biology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: An ion chromatographic method for the simultaneous analysis of organic acids and inorganic anions in common bean seedlings was developed. The results indicated that acetic, succinic, citric, NO_3^- , NO_2^- , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} etc. in plants were analyzed simultaneously and effectively with this method. The detection limits ranged from 0.02 to 0.40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Linear range was 2—120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The relative standard deviation lowered 10%. The correlation coefficient ranged from 0.935 4 to 0.998 4. Compared with $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ and $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ as eluent, this method was sensitive, convenient, rapid and without interference and could be used for simultaneous determination of organic acids and inorganic anions in plants. The results were satisfactory.

Key words: ion chromatography; organic modifier; inorganic anions; organic acids

【责任编辑 周志红】