

一种分析土壤中酚酸类物质含量的新方法 —以连作苹果园土壤为试材

尹承苗¹, 王功帅¹, 李园园², 车金水³, 沈向¹, 陈学森¹, 毛志泉¹, 吴树敬¹

(¹ 山东农业大学园艺科学与工程学院/作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; ² 青岛明月蓝海生物科技有限公司, 山东青岛 266400; ³ 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海 201206)

摘要:【目的】建立一种以 ASE-HPLC 法为基础的快速、高效测定果园土壤酚酸类物质含量的新方法。【方法】以苹果特征酚酸类物质根皮苷为例, 采用加速溶剂提取法 (accelerated solvent extraction, ASE) 和高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 相结合的测定方法, 对萃取溶剂、萃取温度、压力和循环数等参数进行优化, 寻找 ASE 法提取酚酸类物质的最佳工艺条件。【结果】ASE 法提取苹果园土壤酚酸类物质的最佳工艺条件为: 先以无水乙醇为萃取溶剂, 再以甲醇为萃取溶剂, 提取温度为 120 °C, 压强为 10.3 MPa, 循环 2 次, 每次静态提取时间为 5 min, 吹扫体积为 60%, 吹扫时间为 90 s。【结论】该方法样品处理简单, 具有良好的重现性和线性, 相关性系数均达到 0.99, 回收率在 83%—98% 之间, 检测限为 1.3×10^{-4} — 2.5×10^{-2} $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。ASE-HPLC 法是一种简便、快速和高效测定土壤酚酸含量的新方法, 具有推广应用价值。

关键词: 连作苹果园; 酚酸类物质; 加速溶剂萃取法; 高效液相色谱法

A New Method for Analysis of Phenolic Acids in the Soil —Soil from Replanted Apple Orchards was Investigated

YIN Cheng-miao¹, WANG Gong-shuai¹, LI Yuan-yuan², CHE Jin-shui³, SHEN Xiang¹, CHEN Xue-sen¹, MAO Zhi-quan¹, WU Shu-jing¹

(¹ College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Biology, Taian 271018, Shandong; ² Qingdao Bright Moon Bluesea Bio-Tech Co, LTD, Qingdao 266400, Shandong; ³ Thermo Fisher Scientific, Shanghai 201206)

Abstract: 【Objective】To establish a new protocol based on the ASE-HPLC method, which could determine the content of phenolic acids in orchard soil rapidly and efficiently. 【Method】Phlorizin was set as a sample for analysis, which is one of the characteristic phenolic acids in apple orchard soil. Accelerated solvent extraction (ASE) combined with high performance liquid chromatography (HPLC) was used to assess it. Specifically, the parameters of extraction solvent, extraction temperature, pressure and number of cycles were optimized, aiming at exploring the optimal conditions of ASE extraction for phenolic acids. 【Result】The optimal conditions of ASE extraction for phenolic acids were as follows: Ethanol as extraction solvent initially, and methanol was the subsequent extraction solvent, extraction temperature at 120 °C, a pressure of 10.3 MPa, 2 cycles, every 5 min static time, 60% purge volume, and purge time for 90 s. 【Conclusion】The process was more simple, and with good reproducibility and linearity, correlation coefficient up to 0.99, recovery efficiency between 83% and 98%, detection limit to the amount of 1.3×10^{-4} — 2.5×10^{-2} $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. ASE-HPLC is an accurate and rapid new protocol to mensurate phenolic acids, which is an improved and practical method.

Key words: replanted apple orchards; phenolic acids; accelerated solvent extraction; performance liquid chromatography

收稿日期: 2013-05-31; 接受日期: 2013-08-13

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-28)、山东省农业重大应用技术创新课题、教育部长江学者和创新团队发展计划 (IRT1155)

联系方式: 尹承苗, E-mail: yinchengmiao@163.com. 通信作者毛志泉, Tel: 0538-8241984; E-mail: mzhiquan@sdau.edu.cn

0 引言

【研究意义】随着树龄的老化，果园更新是果园经营的重要任务之一，由于受土地等因子的限制，在更新的果园中，特别在传统的苹果产区，存在新建果园的连作（重茬），进而面临连作障碍的发生。连作障碍具有普遍性，是生产中的一大难题，给果农造成巨大的经济损失，严重制约了果树生产的可持续发展^[1]。苹果园连作障碍原因复杂，其中，连作果园土壤中由上茬根系分泌和上茬残根腐解产生的酚酸类物质是引起连作障碍的重要原因之一^[2-3]。早期研究发现，苹果根产生的根皮素、根皮苷和苦杏仁苷等酚酸类物质，能够强烈抑制苹果幼苗的生长^[4]。孙海兵等^[5]研究发现根皮苷、焦性没食子酸和绿原酸是环渤海湾地区连作苹果园土壤中含量显著变化的酚酸类物质，可能是促使苹果园出现连作障碍的关键的酚酸类物质。张淑香等^[6]研究认为，酚酸类物质是根系分泌物中的主要毒性物质，并且是造成连作障碍的重要因子。张江红等^[3]研究认为，苹果幼苗分泌物中的酚酸类物质主要有间苯三酚、根皮素和根皮苷，占分泌量的80%以上，苹果根系浸提液中的酚酸类物质是苹果园土壤中自毒物质的主要来源。植物通过地上部淋溶、根系分泌和植株残茬腐解等途径释放出的酚酸类物质进入土壤中^[7-9]，可直接影响土壤养分状况，还可通过土壤微生物活性和病虫害而间接地影响植物生长，从而导致连作障碍^[10-12]。因此，建立一种简便、快速和高效测定连作苹果园土壤酚酸含量的新方法，对推进苹果园连作障碍的研究具有重要意义。【前人研究进展】土壤酚酸提取方法主要有NaOH溶液提取法^[13]和二氯甲烷有机溶剂提取法^[3]。Hartley and Buchan^[13]研究发现，利用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液能够对土壤中的对羟基苯甲酸、丁香酸、肉桂酸、阿魏酸、咖啡酸等酚酸类物质进行提取，提取时间约15 h，提取液经离心调pH后的上清液就可直接进行HPLC检测。张江红^[3]利用二氯甲烷代替氯仿作为提取溶剂对果园土壤中的酚酸类物质进行提取，称取100 g风干土样，加入200 mL二氯甲烷，振荡过夜后，过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜，34减压浓缩近干，加入1 mL甲醇复溶，过 $0.22\ \mu\text{m}$ 有机相滤膜，待HPLC分析，但这些方法都存在提取效率低、溶剂消耗量大、提取周期长、能源消耗大等等缺点。高效液相色谱法具有分析时间短、结果准确可靠等特点，近年来得到了迅速发展。Haghi等^[14]利用HPLC方法分离鉴定了植物材料中没食子酸、原

儿茶酸、对羟基苯甲酸和间羟基苯甲酸4种酚酸的含量。Podsedek等^[15]检测到苹果果实中含有绿原酸、儿茶酚、槲皮素和根皮苷。【本研究切入点】到目前为止，用加速溶剂萃取法提取土壤酚酸类物质的研究未见报道。加速溶剂提取又称快速溶剂提取，是一种从固体和半固体基质中提取分析物的新的样品萃取技术^[16]。与以往的提取方法相比，加速溶剂提取法可以大幅缩短提取时间，并减少溶剂的消耗量，降低成本，已在土壤、蔬菜、水果及生物样品残留农药提取中得到广泛应用^[17-18]。已有学者将这项技术应用于植物药物定量和定性分析中样品的前处理^[19-20]。酚酸类物质种类多，结构极为相近，分离条件的优化非常重要。本试验通过更改流动相pH和流动相梯度，使14种酚酸能够达到基线分离，拟建立能够同时检测14种酚酸的HPLC分离鉴定方法。【拟解决的关键问题】以苹果特征酚酸类物质根皮苷为例，探讨ASE-HPLC法提取和测定酚酸类物质的最佳条件，建立一种快速、高效测定连作苹果园土壤酚酸类物质种类和含量的分析方法，为苹果园连作障碍防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ASE350 快速溶剂萃取仪，配有12个100 mL萃取池（美国Dionex公司），小型旋转蒸发仪（国产），Ultimate 3000 高效液相色谱仪（美国Dionex公司），DGP-3600 双低压梯度泵，WPS-3000TSL 自动进样器，TCC-3000 柱温箱，DAD-3000 二极管阵列UV检测器。

甲醇、无水乙醇、乙酸均为分析纯，乙腈（色谱纯），实验用水为超纯水（Milli-Q， $18.2\ \text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）；试剂和流动相以重蒸水配制，过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜并超声处理后使用。酚类物质标样：没食子酸、对羟基苯甲酸、儿茶素、咖啡酸、丁香酸、香草醛、阿魏酸、间苯三酚、苯甲酸、水杨酸、根皮苷、槲皮素、肉桂酸、根皮素，均购自美国Sigma公司。

1.2 样品采集

试验于2012年4月在山东农业大学园艺科学与工程学院国家苹果中心实验室和赛默飞世尔科技（中国）有限公司上海浦东新区张江高科技园区哈雷路实验室进行，连作土样取自山东省泰安市宁阳县磁窑镇大磨庄村的新建连作园，采用多点采样混合法，采取0—30 cm 土层土壤混合，四分法留取1 kg，装入黑色塑料袋带回实验室，在室温条件下风干，研磨过12目筛，

以备测定。土壤类型为褐土,土壤硝态氮含量为 $11.39 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 铵态氮含量为 $2.32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 速效钾含量为 $70.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 速效磷含量为 $25.4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 有机质含量为 $5.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.3 试验方法

1.3.1 加速溶剂萃取法提取 加速溶剂萃取是在加热加压条件下对样品进行萃取,影响加速溶剂萃取效率的因子主要包括提取溶剂的选择、提取压力、提取温度和提取时间,而提取时间的长短直接与提取时静置时间及静态循环次数相关,本试验中采用优化后的条件测定。

准确称取过 12 目筛的风干连作苹果园土壤 100 g,加入适量硅藻土,于烧杯中混合均匀。在 100 mL 萃取池底部垫上 1 片纤维素膜,将混合均匀的样品装入萃取池中,按优化好的 ASE 条件萃取:先以无水乙醇为萃取溶剂,温度 120,压强 10.3 MPa,静态萃取时间 5 min,循环次数 2 次,吹扫体积 60%,吹扫时间 90 s;然后以甲醇为萃取溶剂对同一样品在相同条件下再次萃取。萃取完成后,将两种萃取溶剂的收集液混合,34 减压浓缩近干,加入 1 mL 甲醇复溶,过 $0.22 \mu\text{m}$ 有机相滤膜,待 HPLC 分析。

1.3.2 有机溶剂法提取 参照张江红^[3]的方法进行。称取过 12 目筛的风干连作苹果园土壤 100 g 于 250 mL 棕色玻璃广口瓶中,加入 200 mL 二氯甲烷,震荡过夜后过滤,34 减压浓缩近干,1 mL 甲醇溶解,过 $0.22 \mu\text{m}$ 有机相滤膜,待 HPLC 分析。

1.3.3 色谱条件 色谱柱:Acclaim 120 C18 ($3 \mu\text{m}$, $150 \text{ mm}\times 3 \text{ mm}$),柱温 30 (美国 Dionex 公司)。流动相 A:乙腈,流动相 B:水(乙酸调 pH 至 2.6),流速: $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样方式及进样体积:自动进样,5 μL ;检测波长 280 nm。

1.3.4 数据分析 数据采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。

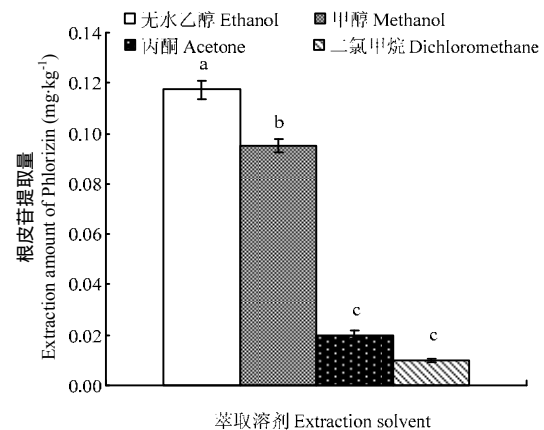
2 结果

2.1 ASE 萃取条件的优化

2.1.1 萃取溶剂的选择 本试验中选取了甲醇、无水乙醇、丙酮及二氯甲烷 4 种有机溶剂对土壤中的根皮苷及酚酸类物质进行提取。结果表明(图 1),采用无水乙醇对土壤中的根皮苷提取效率最佳,其次为甲醇,而采用丙酮和二氯甲烷对土壤中根皮苷的提取效率较低,4 种溶剂对土壤中根皮苷的提取量达显著性差异。考虑到酚酸标样都微溶于水,易

溶于甲醇、无水乙醇,本试验选取无水乙醇和甲醇作为萃取溶剂。

2.1.2 萃取温度的选择 对同一样品,分别以无水乙醇和甲醇为萃取溶剂,采用不同的萃取温度(40、60、80、100、120、140 和 160)进行提取试验。结果表明(图 2),随着萃取温度的升高,根皮苷的提取率显著增高,于 120 根皮苷的提取率达到最高。当温度超过 120 时,根皮苷提取率下降,可能是因为高温下所得根皮苷易被破坏,或根皮苷发生了热降解。综合考虑,选取 120 作为最终酚酸的萃取温度。



Duncan's 检测,图中不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。下同 Duncan's new multiple range test, Values followed by different letters in figure are significant at the 5% level. The same as follows

图 1 不同萃取溶剂对根皮苷的萃取效果

Fig. 1 Effect of different extraction solvents to extract phlorizin

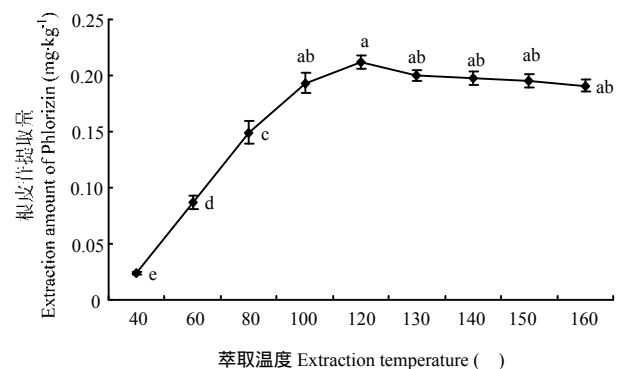


图 2 不同萃取温度提取效果比较

Fig. 2 Comparison of extraction of different extraction temperatures

2.1.3 不同萃取循环比较 本试验采用恒定静态萃取时间 (5 min), 对同一样品先以无水乙醇再以甲醇为萃取溶剂分别进行二次单循环萃取, 共 4 次循环, 分别收集在 4 个收集瓶中, 将各循环萃取液浓缩、定容后经 HPLC 分析, 比较各循环萃取液中目标组分的含量。结果 (图 3) 表明, 无水乙醇对根皮苷的提取效率优于甲醇, 且达显著性差异, 但无水乙醇不能实现对土壤中酚酸的充分提取, 需用甲醇再次提取。以无水乙醇为萃取溶剂时, 第 1 次萃取的根皮苷占二次萃取总量 (以无水乙醇为萃取溶剂的萃取总量) 的 96.2%, 第 2 次萃取的根皮苷占二次萃取总量 (以无水乙醇为萃取溶剂的萃取总量) 的 3.7%; 以甲醇为萃取溶剂时, 第 1 次萃取的根皮苷占二次萃取总量 (以甲醇为萃取溶剂的萃取总量) 的 94.8%, 第 2 次萃取的根皮苷占二次萃取总量 (以甲醇为萃取溶剂的萃取总量) 的 5.0%, 4 次循环萃取率高达 99.9%, 而以无水乙醇和甲醇各进行一次循环的萃取率为 95.5%。因此, 为节省时间和溶剂, 本试验采用 2 次萃取循环 (无水乙醇和甲醇各一次循环) 作为循环次数。

2.2 HPLC 色谱条件

2.2.1 HPLC 方法、线性及检出限 本试验中对液相条件进行了优化, 通过更改流动相 pH 和流动相梯度使对羟基苯甲酸和儿茶素, 苯甲酸和水杨酸达到基线分离。流动相组分为乙腈和水 (用乙酸调节 pH2.6) 柱温 30 , 流速 0.5 mL·min⁻¹, 进样量 5 μ L。采用 A、B 双泵系统, 梯度洗脱, 0—35 min, 乙腈从 5% 提高到 35%, 35—40 min, 乙腈保持 35%, 40—42 min, 乙腈从 35% 下降到

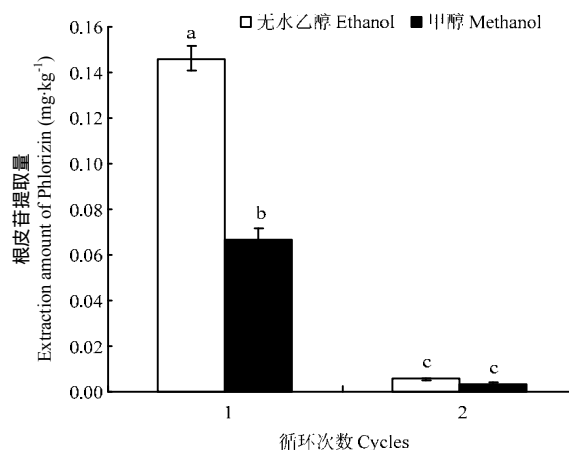
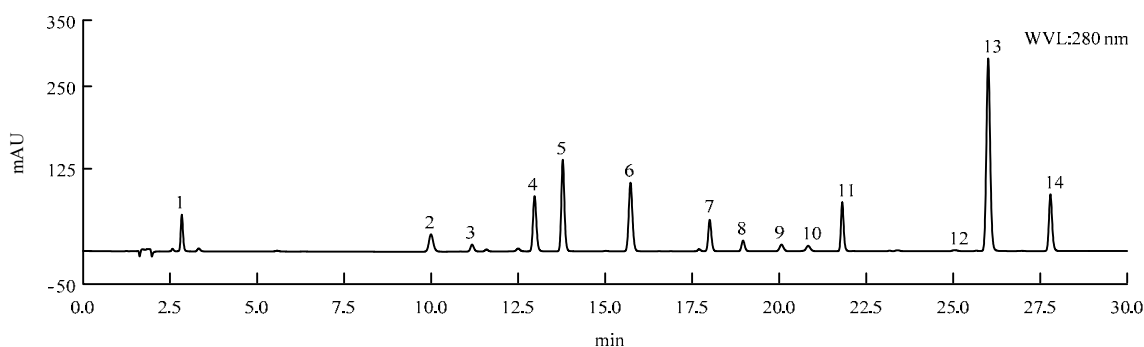


图 3 不同萃取循环次数提取率比较

Fig. 3 Comparison of extraction rate of different extraction cycles

5%。每个分析周期结束后基线平稳 10 min 后进样, 以去除干扰成分, 保证分析结果的稳定性和重复性。

酚酸标样的配制: 准确称量 10 mg 没食子酸、对羟基苯甲酸、儿茶素、咖啡酸、丁香酸、香草醛、阿魏酸、间苯三酚、苯甲酸、水杨酸、根皮苷、槲皮素、肉桂酸、根皮素, 分别置入 10 mL 容量瓶, 用甲醇溶解并定容至 10 mL。配制混合标准溶液: 取适量各标准品储备液, 用甲醇稀释至 30 μ g·mL⁻¹ 后, 采用流动相配置成 0.3、1.5、3.0、6.0 和 9.0 μ g·mL⁻¹ 的工作溶液, 采用 HPLC 分析, 测定谱图、线性方程、相关系数及检出限 (S/N=3) 结果见图 4 和表 1。



1. 没食子酸; 2. 对羟基苯甲酸; 3. 儿茶素; 4. 咖啡酸; 5. 丁香酸; 6. 香草醛; 7. 阿魏酸; 8. 间苯三酚; 9. 苯甲酸; 10. 水杨酸; 11. 根皮苷; 12. 槲皮素; 13. 肉桂酸; 14. 根皮素
1. Gallic acid; 2. P-hydroxybenzoic acid; 3. Catechin; 4. Caffeic acid; 5. Syringic acid; 6. Vanillic aldehyde; 7. Ferulic acid; 8. Phloroglucinol; 9. Benzoic acid; 10. Salicylic acid; 11. Phlorizin; 12. Quercetin; 13. Cinnamic acid; 14. Phloretin

图 4 14 种酚酸标准品测定谱图

Fig. 4 The phenolic standard measurement spectrum of 14 kinds of phenolic acids

表 1 保留时间、线性方程、相关系数及检出限

Table 1 Retention time, linear equation, correlation coefficient and detection limit

序号 Number	酚类化合物 Phenolic Compound	保留时间 Retention time (min)	线性方程 Linear equation	决定系数 (R^2) Correlation coefficient	检出限 Detection limit ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	没食子酸 Gallic acid	2.95	$y=2.652x+2.0981$	0.9999	0.0061
2	对羟基苯甲酸 P-hydroxybenzoic acid	10.38	$y=1.1476x+0.4557$	0.9963	0.0153
3	儿茶素 Catechin	11.63	$y=0.5233x+0.3277$	0.9981	0.0254
4	咖啡酸 Caffeic acid	13.28	$y=6.4564x+1.8327$	0.9991	0.0027
5	丁香酸 Syringic acid	14.03	$y=14.453x+0.1651$	0.9999	0.0013
6	香草醛 Vanillic aldehyde	15.97	$y=8.9167x-0.4102$	0.9999	0.0020
7	阿魏酸 Ferulic acid	18.19	$y=3.1315x+0.3994$	0.9976	0.0054
8	间苯三酚 Phloroglucinol	19.13	$y=0.5513x-0.0432$	0.9973	0.0215
9	苯甲酸 Benzoic acid	20.23	$y=0.2194x-0.0068$	0.9979	0.0413
10	水杨酸 Salicylic acid	20.94	$y=0.2223x+0.0017$	0.9998	0.0463
11	根皮苷 Phlorizin	21.95	$y=3.3742x+0.0382$	0.9987	0.0055
12	槲皮素 Quercetin	25.20	$y=0.5518x-0.0412$	0.9974	0.0223
13	肉桂酸 Cinnamic acid	26.13	$y=6.4602x+1.7775$	0.9993	0.0028
14	根皮素 Phloretin	27.94	$y=4.4998x-0.3590$	0.9996	0.0040

2.2.2 样品测定及加标回收 首先利用有机溶剂提取法对连作土壤样品进行提取测定,结果见表 2(B)。该提取方法只能检测到儿茶素、香草醛和苯甲酸 3 种酚酸类物质,其它酚酸类物质都低于检测限,且该方

法检测的酚酸浓度均低于加速溶剂萃取法。同时对根皮苷和根皮素两种酚酸进行加标试验,加标 1.00 mg,结果提取测定时根皮苷和根皮素的浓度仍低于检测限。

表 2 连作苹果园土壤样品的测定结果及加标回收试验结果

Table 2 Determination results of apple replanted orchard soil and recovery test

序号 Number	酚类化合物 Phenolic compound	A 含量 Count ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	B 含量 Count ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	添加回收率 Recovery (%)			相对标准偏差 RSD (% n=5)
				0.25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	
1	没食子酸 Gallic acid	0.005g	ND	85.8	88.7	91.2	3.05
2	对羟基苯甲酸 P-hydroxybenzoic acid	0.066f	ND	88.5	87.0	93.2	3.61
3	儿茶素 Catechin	0.047fg	0.021b	87.9	90.6	89.9	1.57
4	咖啡酸 Caffeic acid	0.068f	ND	83.2	86.7	89.1	3.44
5	丁香酸 Syringic acid	0.041fg	ND	88.9	90.1	92.5	2.03
6	香草醛 Vanillic aldehyde	2.208a	0.031a	89.9	93.6	98.8	4.75
7	阿魏酸 Ferulic acid	0.065f	ND	83.2	87.9	92.8	5.46
8	间苯三酚 Phloroglucinol	0.055fg	ND	82.5	86.8	89.3	3.99
9	苯甲酸 Benzoic acid	0.036fg	0.015c	88.7	90.2	96.7	4.63
10	水杨酸 Salicylic acid	1.859b	ND	89.5	92.1	97.5	4.39
11	根皮苷 Phlorizin	0.212e	ND	89.2	90.2	96.8	4.49
12	槲皮素 Quercetin	ND	ND	83.1	93.2	92.8	3.10
13	肉桂酸 Cinnamic acid	0.273d	ND	88.7	89.9	92.3	2.03
14	根皮素 Phloretin	0.489c	ND	84.6	88.7	94.2	5.40

ND: 未检出, A: 加速溶剂萃取法提取, B: 有机溶剂法提取 ND: not detected, A: ASE extraction method, B: Organic solvent extraction method

利用建立的提取和分析方法,对同一份连作土样品进行测定。结果见表 2(A),该提取方法可实现对土壤样品酚酸的提取,且提取效果较好,并能实现对酚酸各组分的检测,没有出现色谱峰干扰情况,同时本试验对加标回收率进行考察。对连作土壤样品添加混合标准溶液(加标浓度为 0.25、0.50、1.00 mg·kg⁻¹),考察 14 种酚酸的加标回收情况。结果表明,各组分的加标回收率在 83%—98%之间,符合分析检测要求。对同一样品重复进样 5 次,RSD 在 1.57—5.46 之间,仪器精密度符合检测要求。

3 讨论

Hartley 和 Buchan^[13]研究发现,利用 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液对土壤中的对羟基苯甲酸、丁香酸、肉桂酸、阿魏酸、咖啡酸等酚酸类物质进行提取,提取液经离心调 pH 值后的上清液就可直接进行 HPLC 检测,缺点是他用氢氧化钠提取的方法,可能提取出与化感无关的结合态酚类,与加速溶剂萃取法相比存在提取周期长,操作繁琐等缺点。王西奎等^[21]研究发现,NaOH 提取体系不仅提取效率偏低,而且数据波动较大,重现性差。这是由于在碱性条件下,酚以苯氧负离子的形式存在,电荷密度较高,易于发生各种化学变化所致,而用加速溶剂萃取法提取时提取效率高,且具有良好的重现性和线性。王西奎等^[21]还研究发现,以氯仿作为提取溶剂时,以分子形式存在的酚类化合物相对较稳定,因而氯仿是提取土壤中酚类化合物的适宜溶剂。考虑到氯仿的高毒性,张江红^[3]利用二氯甲烷代替氯仿作为提取溶剂对果园土壤中的酚类物质进行提取,但此法与加速溶剂萃取法相比存在提取时间长(12 h),溶剂用量大(200 mL),操作繁琐(需人工过滤,操作误差大),室温提取不需加热,效率较低等缺点。使用加速溶剂萃取法提取土壤中的酚酸,操作简单快捷(无需人工过滤,全自动化,操作误差小),提取时间短(25 min),提取效率高,以低毒性的无水乙醇和甲醇为萃取溶剂,就可达到良好的萃取效果,具有更好的安全实用性。因此,ASE-HPLC 法是一种简便、快速和高效测定土壤酚酸含量的新方法。

由于加速溶剂萃取法具有所需仪器设备简单、自动化程度高、安全性好、溶剂用量少、萃取完全、效率高、操作快速简便等突出优点,已被广泛应用于分析检测各类样品中不同目标物。如加速溶剂萃取法可用于分析检测水体、土壤、底质、矿物、化工产品、

生物样品(蔬菜、水果、动物肉类、鱼体、茶叶)中的各种有害物质(如各种农药成分、烃类污染物、化学物质等)^[22-25]。相关研究表明,采用加速溶剂萃取法分离萃取目标物具有比常规萃取法更快、萃取率更高的效果^[26-28]。本研究采用加速溶剂萃取法分离萃取连作果园土壤中的酚酸,同样显示出加速溶剂萃取法的优越性。由于所要提取的目标物具有不同的特点和特性,在加速溶剂萃取法的应用中应当根据实际情况设置萃取处理参数,以便获得有实用价值的最佳萃取条件。

HPLC 的原理是根据样品分子的性质选择合适的流动相 pH、分离温度、分析柱类型和流动相添加剂,利用溶质在化学性质上的差异分离化合物,在酚酸类物质的分离和鉴定方面已经得到广泛应用。刘江云等^[29]对 12 种天然酚酸的 HPLC 分离条件进行了优化,发现流动相和梯度洗脱影响试验的结果。Hilt^[30]利用 HPLC 测定草莓果实中根皮苷的含量,进一步利用 MS 和 NMR 确定其构造。苹果酚酸类物质含量丰富,种类多,结构极为相近,分离条件的优化非常重要。Schieber 等^[31]测定了苹果和梨果实中的酚类物质含量,60 min 分离一个样品。张江红^[3]在前人研究的基础上,将样品分离时间缩短为 42 min,并且建立 10 种酚酸 HPLC 的定量测定方法,该方法操作简便,重现性好,适合苹果酚酸定量检测。本试验中的液相条件在张江红^[3]所建立的方法上进行了再次优化,通过更改流动相 pH(用乙酸调节 pH 2.6)和流动相梯度使对羟基苯甲酸和儿茶素,苯甲酸和水杨酸能够达到基线分离,建立了 14 种酚酸 HPLC 的定量测定方法。

4 结论

使用加速溶剂提取法提取土壤酚酸,操作简单快捷,提取时间短,提取率较高。提取土壤酚酸类物质的最佳工艺条件为:先以无水乙醇为萃取溶剂,再以甲醇为萃取溶剂,提取温度为 120 ,压强为 10.3 MPa,循环 2 次(无水乙醇和甲醇各一次循环),每次静态提取时间为 5 min,吹扫体积为 60%,吹扫时间为 90 s。HPLC 色谱条件为:流动相组分为乙腈和水(用乙酸调节 pH 2.6),柱温 30 ,流速 0.5 mL·min⁻¹,进样量 5 μL。采用 A、B 双泵系统,梯度洗脱,0—35 min,乙腈从 5%提高到 35%,35—40 min,乙腈保持 35%,40—42 min,乙腈从 35%下降到 5%。每个分析周期结束后基线平稳 10 min 后进样,以去除干扰成分,保证分析结果的稳定性和重复性。方法回收率在 83%—98%之间,检测限为

1.3×10^{-4} — $2.5 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，且重现性好，具有推广应用价值。因此，ASE-HPLC 法是一种简便、快速和高效测定土壤酚酸含量的新方法。

References

- [1] Narwal S. Allelopathy in ecological sustainable organic agriculture. *Allelopathy Journal*, 2010, 25(1): 51-72.
- [2] 孔垂华, 胡飞. 植物化感相生相克作用及其应用. 北京: 中国农业出版社, 2001: 30-42.
Kong C H, Hu F. *Allelopathic Allelopathy and Its Application*. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 30-42. (in Chinese)
- [3] 张江红. 酚类物质对苹果的化感作用及重茬障碍影响机理的研究 [D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2005.
Zhang J H. Allelopathic effect of phenolics and its role on apple replant disease mechanism[D]. Taian, Shandong: Shandong Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [4] Kummeler M. Investigations into the causes of soil sickness in fruit trees. Part I. Influence of soil treatment and soil sickness on vegetative growth of Bittenfelder seedling. *Erwerbsobstbau*, 1981, 23(7): 162-168.
- [5] 孙海兵, 毛志泉, 朱树华. 环渤海湾地区连作苹果园土壤中酚酸类物质变化. *生态学报*, 2011, 31(1): 90-97.
Sun H B, Mao Z Q, Zhu S H. Changes of phenolic acids in the soil of replanted apple orchards surrounding Bohai Gulf. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(1): 90-97. (in Chinese)
- [6] 张淑香, 高子勤, 刘海玲. 连作障碍与根际微生态研究 : 土壤酚酸物质及其生物学效应. *应用生态学报*, 2000, 11(5): 741-744.
Zhang S X, Gao Z Q, Liu H L. Continuous cropping obstacle and rhizospheric micro-ecology. Soil phenolic acids and their biological effect. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(5): 741-744. (in Chinese)
- [7] Baerson S R, Dayan F E, Rimando A M, Nanayakkara N P, Liu C J, Schroder J, Fishbein M, Pan Z, Kagan I A, Pratt L H, Cordonnier-Pratt M M, Duke S O. A functional genomics investigation of allelochemical biosynthesis in Sorghum bicolor root hairs. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(6): 3231-3247.
- [8] Zhang J H, Mao Z Q, Wang L Q, Shu H R. Bioassay and identification of root exudates of three fruit tree species. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(3): 257-261.
- [9] Politycka B, Adamska D. Release of phenolic compounds from apple residues decomposing in soil and the influence of temperature on their degradation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2003, 12(1): 95-98.
- [10] Wu H W, Haig T, Pratley J, Lemerle D, An M. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): variation of phenolic acids in shoot tissues. *Journal of Chemical Ecology*, 2001, 27(1): 125-135.
- [11] Ogweno J, Yu J Q. Autotoxic potential in soil sickness: A re-examination. *Allelopathy Journal*, 2006, 18(1): 93-102.
- [12] Jilani G, Mahmood S, Chaudhry A N, Hassan I, Akram M. Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil: a review. *Annals of Microbiology*, 2008, 58(3): 351-357.
- [13] Hartley R D, Buchan H. High-performance liquid chromatography of phenolic acids and aldehydes derived from the decomposition of organic matter in soil. *Journal of Chromatography*, 1979, 180: 139-143.
- [14] Haghi G, Hatami A. Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in plant materials by a newly developed isocratic high-performance liquid chromatography approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58: 10812-10816.
- [15] Podsedek A, Wilska-Jeszka J, Anders B, Markowski J. Compositional characterisation of some apple varieties. *European Food Research and Technology*, 2000, 210: 268-272.
- [16] Richter B E, Jones B A, Ezzell J L, Porter N L, Avdalovic A, Pohl C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(6): 1033-1039.
- [17] 崔艳红, 巨天珍, 曹军, 陶澍. 加速溶剂提取法测定蔬菜中的多环芳烃和有机氯化物. *农业环境科学学报*, 2003, 22(3): 364-367.
Cui Y H, Ju T Z, Cao J, Tao S. Measurement of semi-volatile organic compounds in vegetables using accelerated solvent extraction. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(3): 364-367. (in Chinese)
- [18] 赵海香, 袁光耀, 邱月明, 汪丽萍, 周志强. 加速溶剂萃取技术 (ASE) 在农药残留分析中的应用. *农药*, 2006, 45(1): 15-21.
Zhao H X, Yuan G Y, Qiu Y M, Wang L P, Zhou Z Q. Use of accelerated solvent extraction techniques in pesticide residue analysis. *Chinese Journal of Pesticides*, 2006, 45(1): 15-21. (in Chinese)
- [19] Brachet A, Rudaz S, Mateus L, Christen P, Veuthey J. Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Journal of Separation Science*, 2001, 24: 865-873.
- [20] Eng S O, Shea M L. Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein and glycyrrhizin in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 482: 81.
- [21] 王西奎, 姜建臣. 提取土壤中酚类化合物方法的研究. *山东建材学院学报*, 1992, 6(4): 43-46.
Wang X K, Jiang J C. Study on a extraction method of phenolic compounds in soil. *Journal of Shandong Institute of Building Materials*, 1992, 6(4): 43-46. (in Chinese)
- [22] 常春艳, 王云凤, 葛宝坤, 刘暘. 利用快速溶剂萃取(ASE)法检测水果和蔬菜中有机氯农药残留. *口岸卫生控制*, 2004, 96(6): 25-26.

- Chang C Y, Wang Y F, Ge B K, Liu Y. Accelerated solvent extraction (ASE) assay organochlorine pesticide residues in fruits and vegetables. *Port health Control*, 2004, 96(6): 25-26. (in Chinese)
- [23] 朱晓兰, 蔡继宝, 杨俊, 苏庆德. 加速溶剂萃取-气相色谱法测定土壤中的有机磷农药残留. *化学分析*, 2005, 33(6): 821-824.
- Zhu X L, Cai J B, Yang J, Su Q D. Determination of organophosphate pesticide residues in soil by accelerated solvent extraction-gas chromatographic. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 33(6): 821-824. (in Chinese)
- [24] 王凌, 牟瑛琳, 黎先春. 加速溶剂萃取-气相色谱/质谱 (ASE-GC/MS) 法测定近海沉积物中的有机磷农药. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(5): 769-771.
- Wang L, Mu Y L, Li X C. Determination of organ phosphorus pesticide in sea-sediment by accelerated solvent extraction-gas chromatography/mass spectrometry. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17(5): 769-771. (in Chinese)
- [25] 龚迎莉, 孙玮琳, 汪双清, 沈斌. 生油岩中有机质加速溶剂萃取和索氏萃取方法对比. *岩矿测试*, 2009, 28(5): 416-422.
- Gong Y L, Sun W L, Wang S Q, Shen B. A Comparative study on extraction of organic matters in source rocks by accelerated solvent extraction and soxhlet extraction. *Rock and Mineral Analysis*, 2009, 28(5): 416-422. (in Chinese)
- [26] 庞新安, 刘文杰, 孙红专, 晋玉霞, 万英, 马玲, 孔星芸. 均匀设计法优化巴旦杏仁油的加速溶剂萃取工艺. *中国食物与营养*, 2007(4): 43-45.
- Pang X A, Liu W J, Sun H Z, Jin Y X, Wan Y, Ma L, Kong X Y. Uniform design almond-oil accelerated solvent extraction process. *Food and Nutrition in China*, 2007(4): 43-45. (in Chinese)
- [27] 张玉, 吴慧明, 余建伟, 詹士立, 王建清. 加速溶剂萃取技术提取柑橘皮中总黄酮的工艺研究. *食品科技*, 2007, 11: 213-215.
- Zhang Y, Wu H M, Yu J W, Zhan S L, Wang J Q. Extraction of total flavonoid from orange peel by accelerated solvent extraction. *Food Science and Technology*, 2007, 11: 213-215. (in Chinese)
- [28] 宋文斌, 代英成, 许敏, 李献刚, 于杰. 加速溶剂萃取-液相色谱-紫外检测法测定人参中多种人参皂甙含量. *现代科学仪器*, 2009, 6: 104-108.
- Song W B, Dai Y C, Xu M, Li X G, Yu J. Determination of ginsenosides in ginseng by ASE-SPE-LC-UV method. *Modern Scientific Instruments*, 2009, 6: 104-108. (in Chinese)
- [29] 刘江云, 杨学东, 徐丽珍, 杨世林. 天然酚酸类化合物的反相高效液相色谱分析. *色谱*, 2002, 20(3): 245-248.
- Liu J Y, Yang X D, Xu L Z, Yang S L. Studies on the separation and determination of natural phenolic acids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*, 2002, 20(3): 245-248. (in Chinese)
- [30] Hilt P, Schieber A, Yildirim C. Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(10): 2896-2899.
- [31] Schieber A, Keller P, Carle R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2001, 910: 265-273.

(责任编辑 曲来娥)