

分析测试

高效液相色谱法同时测定菌液中 5种有机酸的含量

万欣¹,江鹏¹,何苗^{1,2},肖章¹,王佳¹,李立欢¹,刘明学^{1,3*}

(1.西南科技大学生命科学与工程学院,四川绵阳621010;

2.绵阳市产品质量监督检验所,四川绵阳621010;

3.固体废物处理与资源化教育部重点实验室,四川绵阳621010)

摘要:建立了利用高效液相色谱同时测定粪产碱杆菌菌液中5种有机酸代谢产物的分析方法。采用Agilent Eclipse XDB-C18色谱柱(4.6×150 mm,5 μm),流动相为V(磷酸氢二钠):V(甲醇)=97:3,流速0.6 mL/min,检测波长210 nm,柱温35℃,进样量20 μL。结果表明,该方法在12 min内简便快速地分离出5种有机酸(丁二酸、乳酸、柠檬酸、乙醛酸和苹果酸),且峰形良好、分离度好,线性范围内各酸的浓度与色谱峰面积的线性关系良好,相关系数不低于0.999 5,加标回收率为99.22%~103.60%,相对标准偏差小于5%。该方法简便快速,具有前处理简单、分离效果好、精密度高、回收率高等特点,可用于同时测定菌液中5种有机酸的含量。

关键词:高效液相色谱;菌液;有机酸;含量测定

中图分类号:O657.7

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2023)04-0227-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.04.043

Determination of five kinds of organic acids in bacterial liquid by high performance liquid chromatography

WAN Xin¹, JIANG Peng¹, HE Miao^{1,2}, XIAO Zhang¹, WANG Jia¹, LI Li-huan¹, LIU Ming-xue^{1,3*}

(1.School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;

2.Mianyang Product Quality Supervision and Inspection Institute, Mianyang 621010, China; 3.Key Laboratory for Solid Waste Treatment and Resource Recycle of the Ministry of Education, Mianyang 621010, China)

Abstract: An analytical method for simultaneous determination of five kinds of organic acid metabolites in *Alcaligenes faecalis* is established by means of high performance liquid chromatography. An Agilent Eclipse XDB-C18 column (4.6×150 mm, 5 μm) is used, the mixed mobile phase is composed of disodium hydrogen phosphate:methanol=97:3, the flow rate is 0.6 mL·min⁻¹, the detection wavelength is 210 nm, the column temperature is 35℃, and injection volume is 20 μL. Results show that this method can easily and quickly separate five kinds of organic acids (succinic acid, lactic acid, citric acid, glyoxylic acid and malic acid) within 10 minutes, shows good peak shape and good resolution, and exhibits good linear relationship between the concentrations of each acid and chromatographic peak area. It delivers a correlation coefficient not less than 0.999 5, a standard addition recovery rate of 99.22%–103.60%, and a relative standard deviation less than 5%. It is verified that this method is simple and rapid, and shows the characteristics such as simple pretreatment, good separation effect, high precision and high recovery rate. It can be used to simultaneously determine the contents of five kinds of organic acids.

Key words: high performance liquid chromatography; bacteria liquid; organic acids; content determination

有机酸作为微生物新陈代谢的产物,常被用作化学工业的理想原料^[1],在化学工业、医药与食品工业中有着广泛的应用^[2]。但是,由于微生物代谢液成分复杂多样,存在着氨基酸、蛋白质、脂类等大量初级代谢产物^[3],以及醇类、酯类、醛类等大量的次级代谢产物^[4],对有机酸的检测和有效利用都存在着较大的影响。

目前,在各种不同的材料中,国内外对于有机酸

的检测存在着多种方法,主要有离子色谱法^[5-6]、毛细管电泳法^[7-8]、液相色谱法^[9-10]、气相色谱法等^[11-12]。其中,高效液相色谱法是一种以液体为流动相,采用高压输液系统,将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱,在柱内各成分被分离后,进入检测器进行检测,从而实现对试样的分离和分析的方法^[13],具有分析速度快、载液流速快、分离效能高和

收稿日期:2022-04-28;修回日期:2023-02-16

基金项目:国家自然科学基金面上项目(42172338);四川省科技厅项目(2021YJ0327)

作者简介:万欣(1998-),男,硕士生;刘明学(1975-),男,博士,教授,研究方向为环境微生物,通讯联系人,liumingxue@swust.edu.cn。

高灵敏度等特点^[14], 目前已在各种材料之中广泛应用。

在植物方面, 陈钰祺等^[15]运用高效液相色谱法准确测定 6 种冻干刺梨果中苹果酸、柠檬酸、富马酸和抗坏血酸的含量; 王超等^[16]运用高效液相色谱法准确测定灰枣和骏枣中苹果酸、柠檬酸、丁二酸和奎宁酸的含量; 陈艳杰^[17]运用高效液相色谱法准确测定银杏叶中 9 种小分子有机酸的含量。在微生物方面, 陈万超等^[18]运用高效液相色谱法准确测定 11 个品种的香菇中酒石酸、苹果酸、抗坏血酸、乙酸、柠檬酸、富马酸和丁二酸的含量; 李晶等^[19]运用高效液相色谱法准确测定杏鲍菇子实体中苹果酸、柠檬酸、延胡索酸、丁二酸、酒石酸和抗坏血酸的含量; 任氢欣等^[20]运用高效液相色谱法准确测定大豆根际踝节真菌代谢物中草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、马来酸、柠檬酸和富马酸的含量。但是, 对于菌液这一复杂体系中有有机酸的含量测定还有待进一步研究。

粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)是在土壤中普遍存在的非发酵性革兰氏阴性菌, 其代谢产物中含有丰富的有机酸, 如丁二酸、乳酸、柠檬酸、乙醛酸和苹果酸等^[21]。本研究针对微生物发酵液中有有机酸含量测定的需要, 以粪产碱杆菌为例, 拟通过对高效液相色谱条件进行优化, 得到一种全新的高效液相色谱方法, 以测定粪产碱杆菌代谢产物中 5 种有机酸的含量, 这对实现对菌液中有有机酸的快速准确测定以及有机酸的工业化利用有着重要价值。

1 材料与试剂

1.1 仪器及试剂

NU3000 型高效液相色谱仪, 江苏汉邦科技有限公司生产; Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱, 美国安捷伦科技公司生产; PHS-25 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司生产; PL-S100 型数显超声波清洗机, 东莞康士洁超声波科技有限公司生产; YT-CJ=1ND 型超净工作台, 北京亚泰科隆仪器计数有限公司生产; GI54DS 型自动压力蒸汽灭菌器, 致微(厦门)仪器有限公司生产; UPL-I-10T 型优普系列超纯水器, 四川优普超纯科技有限公司生产; 水系过滤器, 天津市津腾实验设备有限公司生产; 0.22 μm 微孔滤膜, 天津市津腾实验设备有限公司生产。

甲醇为色谱纯, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司生产; 磷酸氢二钠、乙醛酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、丁二酸为分析纯, 天津市福晨化学试剂厂生产。

1.2 菌株

本研究所用粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)菌株由西南科技大学生命科学与工程学院环境微生物学课题组提供。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱(4.6 \times 150 mm, 5 μm); 流动相: V (磷酸氢二钠): V (甲醇)=97:3, 磷酸氢二钠浓度为 63 mmol/L; 流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 标准品的制备

精密称取乙醛酸 0.018 6 g、苹果酸 0.005 0 g、乳酸 0.050 0 g、丁二酸 0.025 0 g、柠檬酸 0.005 5 g, 分别置于 50 mL 容量瓶中, 加入适量超纯水溶解并定容, 摇匀, 经 0.22 μm 滤膜过滤后即得各酸标准对照溶液(乙醛酸 300 mg/L、苹果酸 100 mg/L、乳酸 500 mg/L、丁二酸 500 mg/L、柠檬酸 100 mg/L)。

2.2.2 供试品溶液的制备

将培养完成的菌液在高速离心机上以 4 000 r/min 离心 8 min, 上清液过 0.22 μm 水相针式过滤器后作胞外样。离心得到的菌体在液氮中反复冻融 3 次后, 加入 1 mL 的超纯水, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液过 0.22 μm 水相针式过滤器后作胞内样。

2.3 色谱峰的定性鉴定

用配制完成的 5 个组分的标准溶液, 利用保留时间对合成原液的色谱峰进行分析, 鉴定出其中的丁二酸、乳酸、苹果酸、乙醛酸和柠檬酸的吸收峰。

3 方法学考察

3.1 线性关系考察

精密吸取 2.2.1 项下各酸标准对照溶液 1、2、3、4、5 mL, 分别置于 5 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容, 即得系列线性溶液, 取上述溶液适量, 再按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分峰面积(x)为横坐标、质量浓度(y , mg/L)为纵坐标进行线性回归, 得丁二酸、乳酸、苹果酸、乙醛酸和柠檬酸的线性回归方程, 见表 1。结果表明, 乙醛酸在 100~300 mg/L 线性关系良好, 相关系数 R^2 为 0.998 4; 苹果酸在 20~100 mg/L 线性关系良好, 相关系数 R^2 为 0.995 3; 乳酸在 100~500 mg/L 线性

关系良好,相关系数 R^2 为 0.998 1;柠檬酸在 20~100 mg/L 线性关系良好,相关系数 R^2 为 0.997 9;丁二酸在 100~500 mg/L 线性关系良好,相关系数 R^2 为 0.999 1。

表 1 线性关系考察结果

成分	回归方程	相关系数 R^2	线性范围/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
乙醛酸	$y=0.4215x-8.4557$	0.9984	100~300
苹果酸	$y=0.642x-22.683$	0.9953	20~100
乳酸	$y=0.6219x-18.73$	0.9981	100~500
柠檬酸	$y=0.4949x-0.554$	0.9979	20~100
丁二酸	$y=1.058x-17.097$	0.9991	100~500

3.2 定量限与检测限考察

取 2.2.1 项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为 10:1 时,取各有机酸定量限;当信噪比

为 3:1 时,取各酸检测限。结果如表 2 所示。

表 2 定量限和检测限考察结果 mg/L

有机酸	定量限	检测限
乙醛酸	19.51	5.85
苹果酸	37.02	11.11
乳酸	2.30	0.69
柠檬酸	2.60	0.78
丁二酸	0.78	0.23

3.3 精密度试验

取 2.2.1 项下各酸标准对照溶液 3 mL 于 5 mL 容量瓶中,用超纯水定容至刻度,过 0.22 μm 水系滤膜后,按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,同时对 5 种有机酸的峰面积进行测定,计算相对标准偏差值(RSD),结果如表 3 所示。由表 3 可知,5 种有机酸的 RSD 均在 5.00% 以下,表明仪器精密度良好。

表 3 精密度试验结果

有机酸	峰面积					均值	$RSD/\%$
乙醛酸	659.2154	673.8246	659.4995	640.3656	686.2901	640.8608	2.74
苹果酸	377.7892	366.3905	374.2766	375.3398	382.2955	374.7915	1.39
乳酸	559.1254	537.0226	556.8499	557.0449	557.2894	549.1708	1.53
柠檬酸	409.0072	396.3457	390.4327	389.0466	393.0404	396.0078	1.81
丁二酸	556.6763	542.6194	569.7092	553.7867	542.2909	525.5247	2.76

3.4 重复性试验

取 2.2.2 项下制备的胞外①号供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次,记录峰面积,计

算相对标准偏差值(RSD),结果如表 4 所示。由表 4 可知,5 种有机酸的 RSD 均在 5.00% 以下,表明方法重复性良好。

表 4 重复性试验结果

有机酸	峰面积					均值	$RSD/\%$
乙醛酸	621.9389	649.1559	611.1629	632.2617	642.9304	642.0331	2.28
苹果酸	356.5002	342.4141	321.2888	342.7878	329.8966	344.3287	3.62
乳酸	640.7248	644.6452	615.0873	640.4264	661.1902	646.4401	2.33
柠檬酸	512.2382	499.2878	509.1498	506.9613	510.8198	509.2408	0.90
丁二酸	352.5953	336.8113	330.9319	339.3829	356.5183	356.4260	3.21

3.5 稳定性试验

取 2.2.2 项下制备的胞外②号供试品溶液,分别于室温下放置 0、2、4、6、8 h 时,按 2.1 项下色谱条件

进样测定,记录峰面积,计算相对标准偏差值(RSD),结果如表 5 所示。由表 5 可知,5 种有机酸的 RSD 均在 5.00% 以下,表明样品在 8 h 内稳定性良好。

表 5 稳定性试验结果

有机酸	峰面积					均值	$RSD/\%$
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h		
乙醛酸	721.9389	713.5383	731.1161	712.5558	720.2688	719.8836	1.04
苹果酸	356.5002	356.7923	362.7361	351.6272	362.8926	358.1097	1.33
乳酸	640.7248	677.0679	693.4602	669.7396	690.7696	674.3524	3.14
柠檬酸	512.2382	521.3776	531.6818	512.4807	521.6152	519.8787	1.54
丁二酸	352.5953	358.1849	354.0066	353.2808	359.7587	355.5652	0.90

3.6 加标回收率试验

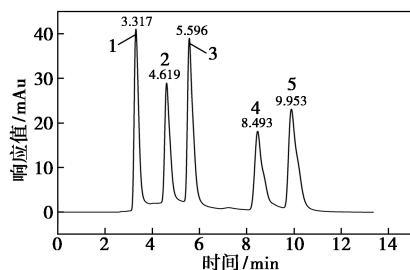
取已知含量的样品适量,共 3 份,每份 3 mL,分别加入相应质量的乙醛酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸和丁二酸对照品,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 6。

表 6 加标回收率试验结果

有机酸	样品浓度/(mg·L ⁻¹)	加入标样量/mg	理论浓度值/(mg·L ⁻¹)	实际浓度值/(mg·L ⁻¹)	回收率/%	平均回收率/%
乙醛酸	328	100	428	438.0588	102.35020	100.2748
		200	528	533.0793	100.96200	
		300	628	612.3762	97.51213	
苹果酸	240	100	340	355.0363	104.42240	99.22401
		200	440	397.2869	90.29247	
		300	540	555.9684	102.95710	
乳酸	346	100	446	453.9423	101.78080	100.7982
		200	546	539.0066	98.71916	
		300	646	658.2399	101.89470	
柠檬酸	254	100	354	361.7353	102.18510	103.6020
		200	454	471.1858	103.78540	
		300	554	580.7881	104.83540	
丁二酸	460	100	560	544.4471	97.22269	101.6313
		200	660	682.6993	103.43930	
		300	760	792.1634	104.23200	

3.7 样品含量测定

取 3 批样品各适量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,样品的色谱图见图 1。



1—乙醛酸;2—苹果酸;3—乳酸;4—柠檬酸;5—丁二酸

图 1 样品 HPLC 色谱图

由图 1 可知,3 个批次的样品都能准确地检测到乙醛酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、丁二酸,5 种酸达到很好的分离,表明此方法可以用于菌液中此 5 种酸的检测。

4 结论

本研究建立了一种全新的高效液相色谱方法,并以粪产碱杆菌为例,准确测定了菌液代谢产物中丁二酸、乳酸、柠檬酸、乙醛酸和苹果酸的含量,为在菌液这一复杂体系中准确测定有机酸含量提供了重要的检测手段。研究表明,本方法快速、准确,5 种有机酸均在 10 min 内得到有效分离,可以实现菌液代谢产物中有机酸含量的快速测定。

参考文献

- [1] Sallam K I, Abd-Elghany S M, Hussein M A, et al. Microbial decontamination of beef carcass surfaces by lactic acid, acetic acid, and trisodium phosphate sprays [J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 1-11.
- [2] 马建刚, 刘娇, 曾祥峰, 等. 大肠杆菌 9 种有机酸代谢产物的高效液相检测条件优化 [J]. *现代食品科技*, 2011, 27(5): 519-591-594.
- [3] 吴秀丽, 林生, 朱承根, 等. 火木层孔菌液体培养物的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(7): 874-880.
- [4] 佟永春, 刘雅茹, 何蕾, 等. 水母雪莲内生真菌 *Alternaria sp.* 的次级代谢产物鉴定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(7): 64-67.
- [5] Amorisco A, Locaputo V, Pastore C, et al. Identification of Low molecular weight organic acids by ion chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry during Uniblur-A ozonation [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013, 27(1): 187-199.
- [6] 郜志峰, 傅承光. 非抑制型电导检测离子排斥色谱法分析有机酸 [J]. *分析化学*, 1994, (12): 1234-1237.
- [7] Ivanova-Petropulos V, Naceva Z, Sandor V, et al. Fast determination of lactic, succinic, malic, tartaric, shikimic, and citric acids in red Vranec wines by CZE-ESI-QTOF-MS [J]. *Electrophoresis*, 2018, 39(13): 1597-1605.
- [8] 傅小芸, 吕建德, 陈耀祖. 毛细管电泳-间接紫外检测法分离和测定食品中的有机酸 [J]. *高等学校化学学报*, 1997, (9): 1453-1455.
- [9] Bernardes A N, Godoi L A G, Camiloti P R. Organic acids and alcohols quantification by HPLC/RID in sugarcane vinasse: Analytical method validation and matrix effect assessment [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2021, 101(3): 325-336.
- [10] Mortera P, Zuljan F A, Magni C, et al. Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data [J]. *Talanta: The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry*, 2018, 178: 15-23.

(下转第 236 页)

- cence light-up probe for visualizing intracellular peroxynitrite [J]. *Talanta*, 2019, 197: 431–435.
- [6] Pacher P, Beckman J S, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease [J]. *Physiological Reviews*, 2007, 87(1): 315–424.
- [7] Chen Y R, Chen C L, Chen W, *et al.* Formation of protein tyrosine ortho-semiquinone radical and nitrotyrosine from cytochrome c-derived tyrosyl radical [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(17): 18054–18062.
- [8] Amatore C, Arbault S, Bruce D, *et al.* Characterization of the electrochemical oxidation of peroxynitrite; Relevance to oxidative stress bursts measured at the single cell level [J]. *Chemistry-A European Journal*, 2001, 7(19): 4171–4179.
- [9] Daiber A, Oelze M, August M, *et al.* Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012 [J]. *Free Radical Research*, 2004, 38(3): 259–269.
- [10] Zhang J, Zhen X, Upputuri P K, *et al.* Activatable photoacoustic nanoprobes for in vivo ratiometric imaging of peroxynitrite [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(6): 1604764.
- [11] Chu C, Lu X, Wang Z, *et al.* Cocktail polydrug nanoparticles concurrently release cisplatin and peroxynitrite-generating nitric oxide in cisplatin-resistant cancers [J]. *Chem Eng J*, 2020, 402: 126125.
- [12] Liu C, Duan Q, Zhang X, *et al.* A novel hepatoma-specific fluorescent probe for imaging endogenous peroxynitrite in live HepG2 cells [J]. *Sens Actuators, B*, 2019, 289: 124–130.
- [13] Hu J, Shao C, Wang X, *et al.* Imaging dynamic peroxynitrite fluxes in epileptic brains with a near-infrared fluorescent probe [J]. *Adv Sci*, 2019, 6(15): 1900341.
- [14] Wu D, Ru J C, Chuang Y W, *et al.* A far-red-emitting fluorescence probe for sensitive and selective detection of peroxynitrite in live cells and tissues [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(20): 10924–10931.
- [15] Li J B, Chen L, Wang Q, *et al.* A bioluminescent probe for imaging endogenous peroxynitrite in living cells and mice [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(6): 4167–4173.
- [16] Wu Y, Shi A, Li Y, *et al.* A near-infrared xantheno fluorescence probe for monitoring peroxynitrite in living cells and mouse inflammation model [J]. *Analyst*, 2018, 143(22): 5512–5519.
- [17] Li J, Lim C S, Kim G, *et al.* Highly selective and sensitive two-photon fluorescence probe for endogenous peroxynitrite detection and its applications in living cells and tissues [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(16): 8496–8500.
- [18] Zhou D Y, Li Y, Jiang W L, *et al.* A ratiometric fluorescent probe for peroxynitrite prepared by de novo synthesis and its application in assessing the mitochondrial oxidative stress status in cells and in vivo [J]. *Chem Commun*, 2018, 54(82): 11590–11593.
- [19] Cao J, An W, Reeves A G, *et al.* A chemiluminescent probe for cellular peroxynitrite using a self-immolative oxidative decarbonylation reaction [J]. *Chem Sci*, 2018, 9(9): 2552–2558.
- [20] Wang C, Shu W, Chen Q, *et al.* A simple dual-response fluorescent probe for imaging of viscosity and ONOO⁻ through different fluorescence signals in living cells and zebrafish [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 260: 119990.
- [21] Wu L, Tian X, Han H H, *et al.* A Simple near-infrared fluorescent probe for the detection of peroxynitrite [J]. *Chemistry Open*, 2019, 8(12): 1407–1409.
- [22] Xia L, Tong Y, Li L, *et al.* A selective fluorescent turn-on probe for imaging peroxynitrite in living cells and drug-damaged liver tissues [J]. *Talanta*, 2019, 204: 431–437.
- [23] Zhao X, Jiang Y, Chen Y, *et al.* A new “off-on” NIR fluorescence probe for determination and bio-imaging of mitochondrial hypochlorite in living cells and zebrafish [J]. *Spectrochim Acta: Part A*, 2019, 219: 509–516.
- [24] Weber M, Mackenzie A B, Bull S D, *et al.* Fluorescence-based tool to detect endogenous peroxynitrite in M1-polarized murine J774.2 macrophages [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(17): 10621–10627. ■

(上接第 230 页)

- [11] Zhang M J, Chou J, Sun Z W, *et al.* Gas chromatography/mass spectrometry analysis of organic acid profiles in human serum: A protocol of direct ultrasound-assisted derivatization [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2021, 35(17): 9149–9157.
- [12] 于海龙, 车英慧, 高颖, 等. 气相色谱法测定唾液乳杆菌发酵过程中有机酸测定 [J]. *食品科学*, 2010, 31(S1): 133–137.
- [13] 赵一懿, 殷海利, 郭洪祝, 等. 基于多元统计分析的银杏叶提取物中有机酸类成分含量研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(14): 3679–3685.
- [14] 王俊德, 卢佩章. 色谱的发展对试剂的要求和希望 [J]. *化学试剂*, 1979, (3): 45–51, 43.
- [15] 陈钰祺, 徐玉娟, 林羨, 等. 不同成熟度及海拔地区刺梨果实营养活性成分比较 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(24): 9556–9564.
- [16] 王超, 吕文秀, 高京草, 等. 不同产地灰枣和骏枣干果风味研究 [J]. *果树学报*, 2021, 38(11): 1921–1929.
- [17] 陈艳杰. HPLC 法测定银杏叶提取物中 9 种小分子有机酸类含量研究 [J]. *粘接*, 2021, 48(12): 39–43.
- [18] 陈万超, 李文, 吴迪, 等. 11 个主栽品种香菇可溶性糖和有机酸测定及滋味品质评价 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(7): 1–7.
- [19] 李晶, 郑喜群, 刘晓兰. 玉米浆发酵液对杏鲍菇营养价值和挥发性呈味物质含量的影响 [J]. *食品与机械*, 2021, 37(12): 46–51.
- [20] 任氢欣, 王继华, 曾齐, 等. 大豆根际踝节真菌 WR1-4 的溶磷特性研究 [J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(1): 114–124.
- [21] Gamble T N, Betlach M R, Tiedje J M. Numerically dominant denitrifying 352 bacteria from world soils [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1977, 33: 926–939. ■