

分析测试

缺磷条件下玉米根系分泌有机酸的高效液相色谱测定方法研究

谢旭^{1,2}, 李明亮^{1,2}, 张帆^{1,2}, 卢兵^{1,2}, 杨园^{1,2*}, 赵文志^{1,2}

(1. 中国地质调查局哈尔滨自然资源综合调查中心, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 自然资源部哈尔滨黑土地地球关键带野外科学观测研究站, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:建立缺磷条件下玉米根系分泌有机酸的高效液相色谱测定方法,通过对色谱条件进行优化,实现对酒石酸、柠檬酸、苹果酸、丁二酸和反丁烯二酸的定量分析。结果表明,5种有机酸分离效果良好,线性相关系数 $R^2 > 0.999$,方法检出限为0.01~0.90 $\mu\text{g/mL}$,定量限为0.15~5.00 $\mu\text{g/mL}$,相对标准偏差(RSD)为2.48%~3.77%,回收率为89.0%~118.7%。该方法简便、灵敏、重现性好,适用于缺磷条件下玉米根系分泌有机酸的批量定量分析。

关键词:高效液相色谱法;玉米根系;有机酸;缺磷胁迫;分泌

中图分类号:O657.7

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2026)S2-0373-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2026.S2.062

Determination of organic acids secreted by maize roots under phosphorus deficiency by high-performance liquid chromatography

XIE Xu^{1,2}, LI Ming-liang^{1,2}, ZHANG Fan^{1,2}, LU Bing^{1,2}, YANG Yuan^{1,2*}, ZHAO Wen-zhi^{1,2}

(1. Harbin Natural Resources Comprehensive Survey Center, China Geological Survey, Harbin 150086, China;

2. Harbin Observation and Research Station of Earth Critical Zone in Black Soil, Ministry of Natural Resources, Harbin 150086, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established for the determination of organic acids secreted by maize roots under phosphorus-deficient conditions. By optimizing the chromatographic conditions, quantitative analysis of tartaric acid, citric acid, malic acid, succinic acid, and fumaric acid was achieved. The results showed good separation of the five organic acids, with linear correlation coefficients $R^2 > 0.999$. The limits of detection (LOD) ranged from 0.01 to 0.90 $\mu\text{g/mL}$, and the limits of quantification (LOQ) ranged from 0.15 to 5.00 $\mu\text{g/mL}$. The relative standard deviations (RSD) were 2.48%–3.77%, and the recoveries ranged from 89.0% to 118.7%. The method is simple, sensitive, and reproducible, making it suitable for the batch quantitative analysis of organic acids secreted by maize roots under phosphorus-deficient conditions.

Key words: high-performance liquid chromatography; maize roots; organic acids; phosphorus deficiency stress; secretion

磷(P)是植物生长发育所必需的大量营养元素之一,是植物体内许多代谢物和大分子物质(例如核酸、磷脂、蛋白质等)的重要组分,对作物生长发育、抗逆性、产量和品质形成起着重要作用^[1]。合理施用磷肥是保障土壤磷供应与作物高产稳产的重要措施^[2]。但我国耕地磷肥当季利用率仅10%~25%,大量磷素被土壤固定成为潜在磷源^[3-4]。提高作物自身磷利用效率、活化土壤难溶性磷已成为研究重点。低磷胁迫下,植物可通过根系形态重塑、

生理代谢调节及分泌物释放等策略活化土壤难溶性磷,其中根系分泌有机酸是提升磷吸收效率的核心机制^[5-8]。

目前有机酸检测以滴定法和高效液相色谱法为主,滴定法仅能测定总酸含量,无法实现单体有机酸区分^[9]。高效液相色谱法因灵敏度高、分离效果好、可多组分同步定量,已成为主流检测技术^[10]。张彩红等^[11]、朱敏等^[12]、马倩倩等^[13]分别建立了果实、茶叶等农产品中有机酸的HPLC检测方法;刘小

收稿日期:2026-04-17;修回日期:2026-06-08

基金项目:辽宁省科技计划联合计划(自然科学基金面上项目)(2024-MSLH-492);全国金矿等战略性矿产勘查实验测试技术支持与服务(哈尔滨中心)(DD20250209110);自然资源要素耦合过程与效应重点实验室开放课题(2025KFKT006)

作者简介:谢旭(1988-),男,学士,助理工程师,研究方向为地球化学样品测试分析,xiexu1818@126.com;杨园(1991-),女,硕士,工程师,研究方向为地球化学样品测试分析,通讯联系人,407902920@qq.com。

莉等^[14]、王丽丽等^[15]进一步优化了水溶性有机酸的分离条件。但这些方法普遍存在前处理复杂、提取效率不稳定等问题,且多针对食品基质,对低浓度、易降解、基质复杂的玉米根系分泌物适用性较差,针对缺磷胁迫下玉米根系有机酸的专属提取体系与色谱条件优化研究较少,难以满足精准、批量检测需求。

本文中以缺磷条件下玉米根系分泌物为研究对象,系统优化色谱条件(检测波长、流速、流动相组成及梯度洗脱程序),建立一种简便、灵敏、重现性好的高效液相色谱方法,为玉米低磷适应机制解析与磷高效利用研究提供技术支撑。

1 材料与试剂

LC-2040C 高效液相色谱仪器,日本岛津仪器公司;TG-16 湖南湘仪离心机仪器有限公司;R-300 旋转蒸发仪,瑞士步琦仪器设备有限公司。

酒石酸、柠檬酸、苹果酸、丁二酸和反丁烯二酸 5 种有机酸溶液,氯化钙、草酸、甲醇、磷酸二氢钾。

2 实验方法

2.1 植物培养与低磷处理

采用水培法培养玉米幼苗。选取饱满一致的玉米种子,经表面消毒后播种于石英砂中,待幼苗长至 2 叶 1 心时,移栽至含有 1/2 Hoagland 营养液的培养盆中。正常培养 7 d 后,将植株转移至低磷营养液(磷浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$)中进行缺磷胁迫处理,以正常磷浓度(500 $\mu\text{mol/L}$)培养植株作为对照。

2.2 根系分泌物的收集

缺磷处理 14 d 后,采用溶液收集法采集根系分泌物。用自来水轻轻冲洗,再用蒸馏水漂洗 3 次,尽量减少对根系的机械损伤。将洗净的根系转移至装有 200 mL 0.005 mol/L CaCl_2 溶液的收集瓶中,于光照条件下通风培养 2 h。收集液在 40℃ 下旋转蒸发浓缩至约 10 mL,经 0.45 μm 水相滤膜过滤后,于 -20℃ 保存待测。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

3.1.1 色谱柱的选择

本研究选用 InertSustain C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)作为分离柱。C18 反相柱是高效液相色谱中应用最广泛的固定相,在低 pH 流动相(0.1%磷酸)条件下,有机酸羧基质子化后疏水性增强,可获得良

好的保留与分离效果,且便于与已有文献[11-15]中采用 C18 柱的研究结果进行横向比较。与伍婵翠等^[16]采用 XSelect HSS T3 柱(专为极性化合物设计)的方法相比,本研究所用 C18 柱配合梯度洗脱程序,实现 5 种有机酸的基线分离(分离度>1.5),且柱压更低、运行成本更经济,同时避免了 T3 柱在梯度洗脱过程中基线漂移明显的缺陷。250 mm 柱长提供了足够的理论塔板数,能够有效分离结构相近的苹果酸和柠檬酸;5 μm 粒径在分离效率与柱压之间取得了合理平衡,兼顾了方法的普适性与推广价值。需要指出的是,本研究未考察氨基柱或离子交换柱等其他类型色谱柱的分离效果,后续研究可采用混合模式色谱柱(如反相/离子交换混合柱)以期实现更多种类有机酸的同时分离。

3.1.2 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对 190~300 nm 波长范围进行扫描,结果显示 5 种目标有机酸的紫外吸收峰主要分布于 200~230 nm 区间。在 210 nm 波长处,样品基质中其他组分的干扰较小,各有机酸响应良好。该波长选择与刘小莉等^[14]、王丽丽等^[15]的报道一致,也与国家标准 GB 5009.157—2016 推荐的有机酸通用检测波长相吻合^[10]。值得注意的是,210 nm 作为有机酸测定的常用波长,可在保证检测灵敏度的前提下简化多组分同时测定的操作流程。因此,本研究确定 210 nm 为最佳检测波长。

3.1.3 流动相流速的确定

流速是影响色谱分离效率与分析时间的重要参数。本文中考察了 0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min 4 种流速条件下有机酸的分离情况。结果如表 1 所示,流速为 0.6 mL/min 时,色谱峰形展宽明显,出现拖尾现象,分离效率较低;当流速升至 1.0 mL/min 及以上时,组分间分离度下降,部分有机酸无法实现基线分离。相比之下,0.8 mL/min 流速下各有机酸峰形对称、分离度理想(分离度均大于 1.5),且分析周期适中。综合考虑分离效率与分析时间,确定最佳流速为 0.8 mL/min。

表 1 流动相流速对分离度的影响

流速/ (mL·min ⁻¹)	分离度(R_s)				
	酒石酸	苹果酸	柠檬酸	丁二酸	反丁烯二酸
0.6	1.25	1.35	1.15	0.95	0.85
0.8	2.85	3.25	2.95	2.55	2.35
1.0	2.15	2.45	2.25	1.85	1.65
1.2	1.45	1.65	1.55	1.25	1.15

3.1.4 流动相比比例选择

由于有机酸极性较强,在纯水相中溶解度有限,等度洗脱难以实现多种有机酸的同时高效分离。本文中采用梯度洗脱程序,以 0.1% 磷酸水溶液为流动相 A、甲醇为流动相 B 进行优化。结果表明,在 0~10 min 维持 A 相 97.5%、B 相 2.5% 的条件下,酒石酸、苹果酸、柠檬酸可实现基线分离;随后在 10.1~16 min 切换至 B 相 100% 以洗脱强保留组分(丁二酸和反丁烯二酸);最后于 16.1~21 min 恢复初始比例并平衡色谱柱。如图 1 所示,该梯度程序下,5 种有机酸在 21 min 内实现完全分离,分离度均大于 1.5,峰形对称,重复性好。

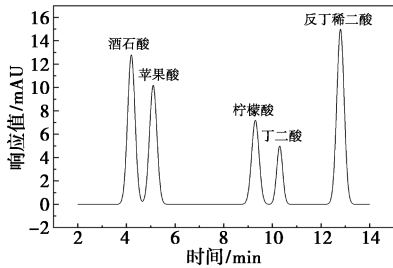


图 1 5 种有机酸的色谱

3.2 线性关系与灵敏度

在优化的色谱条件下,对系列浓度的混合标准溶液进行测定,以峰面积(y)对质量浓度(x , $\mu\text{g/mL}$)进行线性回归。结果如表 2 所示,5 种有机酸在各自的线性范围内呈良好的线性关系,相关系数 R^2 均大于 0.999。以 3 倍信噪比($S/N=3$)计算检出限(LOD),以 10 倍信噪比($S/N=10$)计算定量限(LOQ)。5 种有机酸的 LOD 为 0.01~0.90 $\mu\text{g/mL}$,LOQ 为 0.15~5.00 $\mu\text{g/mL}$,表明该方法具有较高的灵敏度,可满足玉米根系分泌物中有机酸的检测需求。

表 2 方法的灵敏度和线性关系

有机酸	回归方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
酒石酸	$y=100.24x+1.4119$	0.9999	6.0~483.0	0.50	5.00
苹果酸	$y=247.13x-5.2624$	0.9999	22.5~897.0	0.40	3.90
柠檬酸	$y=145.81x-3.2556$	0.9998	19.0~768.0	0.50	5.00
丁二酸	$y=273.52x-5.1020$	0.9999	22.5~898.0	0.90	3.00
反丁烯二酸	$y=0.66x-0.0878$	0.9998	0.6~11.4	0.01	0.15

3.3 精密度与回收率

3.3.1 精密度

取同一缺磷处理的玉米根系分泌物样品,按本

方法平行处理 6 份,在优化色谱条件下进行测定。结果如表 3 所示,5 种有机酸的相对标准偏差(RSD)为 2.48%~3.77%,表明该方法具有良好的重复性和精密度。

表 3 方法的精密度

有机酸	平均含量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	$RSD/\%$
酒石酸	13	3.54
苹果酸	875	2.48
柠檬酸	444	3.77
丁二酸	—	—
反丁烯二酸	—	—

注:“—”表示含量低于本方法的定量限,因此未标注含量,下同。

3.3.2 回收率试验

采用加标回收法评价方法的准确度。取已知含量的根系分泌物样品,分别添加低、中、高 3 个浓度水平的混合标准溶液,按本方法进行处理和测定。结果表明,5 种有机酸的平均加标回收率为 89.0%~118.7%(表 4), RSD 均小于 5%,满足定量分析要求。

表 4 回收率的测定结果

有机酸	本底质量 浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加标质量 浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测定质量 浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/ %
酒石酸	6.2	2.8	8.8	95.4
	6.4	5.6	11.5	95.4
	6.5	8.3	14.6	100.4
苹果酸	456	299	730	94.5
	459	597	1140	117.3
	465	896	1239	89.0
柠檬酸	229	108	353	118.7
	227	216	466	113.6
	243	324	568	103.0
丁二酸	—	3.2	3.3	106.3
	—	6.4	6.5	104.6
	—	9.6	9.5	101.9
反丁烯二酸	—	1.2	1.3	111.5
	—	2.5	2.6	107.3
	—	3.7	3.6	100.1

3.4 实际样品分析

为验证本方法在真实科研场景与实际样品中的

适用性与可靠性,对6份平行玉米根系分泌物样品进行测定,结果如表5所示,酒石酸、苹果酸、柠檬酸均可稳定检出,丁二酸和反丁烯二酸含量均低于定量限(<LOQ)。总有机酸含量为1332.0 mg/kg,其中苹果酸为优势组分,含量达875.0±45.6 mg/kg,占总有机酸65.7%;柠檬酸次之,含量444.0±28.3 mg/kg,占比33.3%;酒石酸含量最低,为13.0±1.2 mg/kg,仅占1.0%。3种检出有机酸检出率均为100%,数据稳定性良好。表明在批量实际样品测定中,数据重复性好、结果可靠。

表5 缺磷条件下玉米根系分泌物有机酸含量测定结果($n=6$)

有机酸种类	含量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	占总酸比例/ %	检出率/ %	样本数
酒石酸	13.0±1.2	1.0	100	6
苹果酸	875.0±45.6	65.7	100	6
柠檬酸	444.0±28.3	33.3	100	6
丁二酸	<LOQ	—	0	6
反丁烯二酸	<LOQ	—	0	6

注:数据以“均值±标准差”表示;<LOQ表示低于定量限。

4 结论

本研究针对缺磷条件下玉米根系分泌物基质复杂、有机酸含量低的特点,建立一种高效液相色谱测定方法。通过系统优化色谱条件,确定210 nm为最佳检测波长,采用磷酸水溶液-甲醇体系结合梯度洗脱程序,在流速0.8 mL/min下实现了酒石酸、柠檬酸、苹果酸、丁二酸和反丁烯二酸5种有机酸在21 min内的基线分离。方法学验证表明,各有机酸线性相关系数 R^2 均大于0.999,检出限为0.01~0.90 $\mu\text{g/mL}$,定量限为0.15~5.00 $\mu\text{g/mL}$;精密度试验相对标准偏差(RSD)为2.48%~3.77%,加标回收率为89.0%~118.7%,结果表明该方法线性关系良好、灵敏度高、准确可靠。通过实际样品验证,本方法操作简便,无需复杂衍生化或萃取步骤,分离效果好,分析周期适中,适用于缺磷条件下玉米根系分泌有机酸的批量定量分析,可为玉米低磷适应机制研究提供技术支撑。

参考文献

- [1] 邓亚萍.水稻耐低磷的机理与栽培调控技术[D].扬州:扬州大学,2022.
- [2] Yang Q L, Liu P, Dong S T, *et al.* Effects of fertilizer type and rate on summer maize grain yield and ammonia volatilization loss in northern China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2019, 27(4): 1-12.
- [3] 赵伟,宋春,周攀,等.施磷量与施磷深度对玉米-大豆套作系统磷素利用率及磷流失风险的影响[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(4): 1205-1214.
- [4] Shen J B, Yuan L X, Zhang J L. Phosphorus dynamics: From soil to plant[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156: 997-1005.
- [5] Wen Z H, Li H B, Shen J B, *et al.* Trade-offs among root morphology, exudation and mycorrhizal symbioses for phosphorus acquisition strategies of 16 crop species[J]. *New Phytologist*, 2019, 223: 882-895.
- [6] Adnane B, Noyce G L, Carlsson G, *et al.* Species interactions enhance root allocation, microbial diversity and P acquisition in intercropped wheat and soybean under P deficiency[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 120(C): 179-188.
- [7] 张德闪,王宇蕴,汤利,等.小麦蚕豆间作对红壤有效磷的影响及其与根际pH值的关系[J]. *植物营养与肥料学报*, 2013, 19(1): 127-133.
- [8] 刘春花,谢富,宋岩,等.植物生长及生理生化特性对低磷胁迫的响应研究进展[J]. *江西农业学报*, 2020, 32(2): 71-75.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 12456—2008 食品中总酸的测定[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.GB 5009.157—2016 食品中有机酸的测定[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [11] 张彩红,史鹏,杨延青,等.利用高效液相色谱法测定山西中条山五味子2种有机酸的含量[J]. *山西林业科技*, 2022, 51(4): 13-15.
- [12] 朱敏,何书强,罗石荣,等.高效液相色谱法测定黄皮果实中的有机酸[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(34): 187-192.
- [13] 马倩倩,吴翠云,蒲小秋,等.高效液相色谱法同时测定枣果实中的有机酸和VC含量[J]. *食品科学*, 2016, 37(14): 149-153.
- [14] 刘小莉,周剑忠,董明盛,等.高效液相色谱-二极管阵列检测器法测定水蜜桃中水溶性有机酸和维生素的含量[J]. *南京农业大学学报*, 2009, 32(1): 151-154.
- [15] 王丽丽,杨军国,林清霞,等.高效液相色谱-二极管阵列检测器法测定茶叶中10种有机酸含量[J]. *浙江大学学报:农业与生命科学版*, 2019, 45(1): 47-53.
- [16] 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. ■