

# HPLC 法测定蔬菜中草酸的干扰处理方法的研 究

丁健桦<sup>1</sup>, 罗明标<sup>1</sup>, 王兴祥<sup>2</sup>, 涂祁伟<sup>1</sup>

(1. 东华理工学院应用化学系, 江西 抚州 344000

2. 中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008)

**摘 要:** 采用Atlantis™ C<sub>18</sub>分析柱(250mm×4.6mm ID, 5μm), 以Resin HZ201强碱型阴离子交换树脂消除样品中普遍存在的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>干扰, 建立了一种反相高效液相色谱法测定蔬菜中草酸的分离与分析方法, 在紫外 220nm 条件下检测, 线性范围为0.5~300μg/ml, 变异系数为1.4%(n=10), 检测限(S/N=3)可达23ng/ml, 用于蔬菜中草酸含量的检测实验结果表明, 该方法具有灵敏、回收率高(达100.2%~101.9%)、干扰消除效果好, 而且操作简便、成本低等优点。

**关键词:** 反相高效液相色谱; 强碱型阴离子交换树脂; 干扰; 蔬菜; 草酸

## Study on Pretreatment Method for Determination of Oxalate in Vegetables by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography

DING Jian-hua<sup>1</sup>, LUO Ming-biao<sup>1</sup>, WANG Xing-xiang<sup>2</sup>, TU Qi-wei<sup>1</sup>

(1. Department of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China

2. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** A method was established for the determination of oxalate in vegetables by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with a reversed-phase Atlantis™ C<sub>18</sub> column(250mm×4.6mm ID, 5μm) as immobile phase. The general interfering factor NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in samples was eliminated by using the powerful anion exchange resin — Resin HZ201. When detected with an UV detector at 220nm, the calibration curve showed a linear range of 0.5~300μg/ml with a coefficient of variation of 1.4%(n=10) and a detection limit of 23ng/ml (S/N=3). It was found that the method was sensitive, with high percent recovery (from 100.2% to 101.9%), little disturbance, convenient and low cost.

**Key words:** reversed phase high performance liquid chromatography; strong base type anion-exchange resin; disturbance; vegetables; oxalate

中图分类号: Q946.815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0172-04

草酸(Oxalate)又名乙二酸, 是一种最简单的二元羧酸, 可以游离酸的形式存在于植物的细胞中。有研究表明<sup>[1,2]</sup>, 草酸有多方面的功能, 如, 在植物细胞阳离子平衡中起关键作用; 通过对Ca<sup>2+</sup>的可逆沉淀作用有效调节细胞钙浓度; 作为根瘤固氮酶固氮时的能量底物; 显著促进植物硝酸还原和铁还原; 在植物抗逆性中起重要作用, 等等。但有些蔬菜、水果或饮料(如菠菜、苋菜、柿子、啤酒)中草酸的含量过高, 则会降低其营养

品质甚至导致人体结石症, 对人体粘膜也具有较强的局部刺激作用, 长期大量食用还可引起肾结石、关节与心肌炎症等。因此, 建立一种简便有效的草酸测定方法, 有助于人们了解关于蔬菜、谷物、豆类、水果、饮料等各种日常食品(尤其在以植物性食品为主的我国)中草酸的含量, 从而能够合理地选择和控制饮食。

目前用于草酸的测定方法有不少, 如经典的方法有滴定法、比色法, 其它方法还有分光光度法<sup>[3~5]</sup>(包括原

收稿日期: 2004-12-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40371067)

作者简介: 丁健桦(1968-), 女, 副教授, 主要从事色谱分析教学及研究工作。

子吸收分光光度法、紫外分光光度法、动力学分光光度法等)、气相色谱法<sup>[6]</sup>和高效液相色谱法(HPLC)<sup>[7]</sup>等。由于HPLC法不仅简便快速,而且具有选择性好、准确度高、分离模式与检测方法多种多样等特点,是近年来发展较快并较有前途的分析方法。不过,由于受施肥或环境等各方面因素的影响,蔬果等植物组织中均含有一定量的 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{SO}_4^{2-}$ ,特别是 $\text{NO}_3^-$ 在绿叶蔬菜中的含量可达100~300mg/100g新鲜蔬菜<sup>[8]</sup>,用RP-HPLC分析其中草酸时,极易受它的干扰,为了解决这个问题,陈志强<sup>[9]</sup>等测定尿样中草酸含量时,先在尿液中加入氯化钙而发生草酸钙沉淀,再用盐酸溶解该沉淀作为预处理方法,然后用RP-HPLC法测定,结果表明草酸钙沉淀尿样预处理能消除杂质峰的干扰,预处理过程中草酸的丢失也较少;俞乐<sup>[10]</sup>等采用流动相中加入配对离子四丁基硫酸氢铵(TBA)并选用适当浓度,适当延长了草酸的保留时间,有效消除了分析中的干扰问题。本文则以Resin HZ201强碱型阴离子交换树脂来消除蔬菜样品中的 $\text{NO}_3^-$ 干扰,并采用紫外检测器,以 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{CH}_3\text{CN}$ 水溶液体系作为流动相,建立了阴离子交换树脂作为样品预处理方法的RP-HPLC法测定蔬菜中草酸含量的方法,本法成本低廉、操作更加简便,而且具有灵敏、回收率高、干扰消除效果好等优点。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪(含Waters 600泵和2487紫外检测器) 美国Waters公司;超越2000色谱工作站 浙江省科学器材进出口有限责任公司;UV-260紫外分光光度计 日本岛津公司;pHS-3C型精密酸度计 上海雷磁仪器厂;800型离心沉淀器 海手术器械十厂;隔膜真空泵 天津市腾达过滤器件厂。

草酸、磷酸二氢钾、磷酸、无水硫酸钠、硝酸钾、盐酸和无水乙醇等均为分析纯;乙腈为色谱试剂;HZ201强碱型阴离子交换树脂和D301大孔弱碱型阴离子交换树脂购自上海华东理工大学;苋菜和葱叶购于集市。

### 1.2 样品的制备

#### 1.2.1 草酸标准储备液的配制

准确称取草酸0.2500g,用二次水溶解并转入250ml容量瓶中,定容、摇匀,即得1mg/ml的草酸标准储备液。草酸标准溶液由该储备液适当稀释后即得。

#### 1.2.2 模拟样品溶液的配制

由草酸标准储备液适当稀释后配制成10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的草酸标准溶液,移取5ml,然后向其中加入3~4滴浓度均为10mg/L的 $\text{KNO}_3$ 和 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 混和溶液,即得模拟样品溶液。

#### 1.2.3 样品处理和样品溶液的配制

将苋菜叶片洗净、吸干表面水分后,称取鲜重0.5268g,加2ml 0.5mol/L HCl和少量石英砂充分研磨成匀浆,匀浆液倒入试管中,在沸水浴中加热15~20min,中间摇动几次,冷却后加入4ml二次水静置过夜。次日匀浆液用小漏斗过滤至50ml容量瓶中,再用二次水反复淋洗试管及残渣至近50ml,最后定容至50ml,即得苋菜样品溶液。

称取鲜重葱叶0.5374g,按配制苋菜样品溶液同样的方法可配制得葱样溶液。

### 1.3 树脂的活化

取HZ201强碱型阴离子交换树脂和D301大孔弱碱型阴离子交换树脂,分别用无水乙醇浸泡4h左右,然后用蒸馏水反复冲洗以除去杂质和无水乙醇,干燥即可。

### 1.4 干扰处理实验方法

将模拟样品溶液与20mmol/L pH2.2的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液、850ml/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$ 以5:4:1的体积比混合于试管中<sup>[10]</sup>,然后加入0.8g阴离子交换树脂,剧烈摇动1min后,立即用离心沉淀器离心移除树脂,取上层清液过0.45 $\mu\text{m}$ 水系微孔滤膜。

### 1.5 色谱条件

色谱柱:Atlantis™ C<sub>18</sub>分析柱(250mm×4.6mm ID, 5 $\mu\text{m}$ );流动相:20mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{CH}_3\text{CN}$ (体积比为95:5,并以 $\text{H}_3\text{PO}_4$ 调pH值为2.2);流速:0.8ml/min;紫外检测波长:220nm;柱温:室温;进样量:10 $\mu\text{l}$ 。

所有流动相及样品溶液进色谱仪前均需经0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤。

## 2 结果与讨论

### 2.1 草酸的回归方程

取草酸的标准储备液,经稀释后配制成一系列浓度的标准工作液,按照1.5中色谱条件,采用峰高外标法进行测定。图1是草酸的标准色谱图,在0.5~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内所得草酸的回归方程见表1。

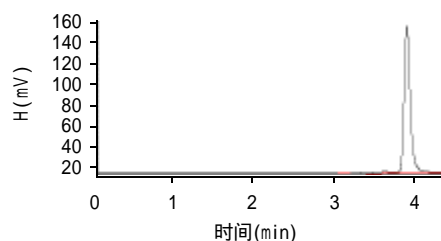


图1 草酸的标准色谱图

Fig.1 Standard chromatogram of oxalate

### 2.2 干扰因素的确定

用反相高效液相色谱法(紫外检测器)测定草酸,尤

表1 草酸的回归方程和检出限  
Table 1 Standard curve and detection limit of oxalate

标样	线性范围 ( $\mu\text{g/ml}$ )	回归 方程	相关 系数	检出限 ( $\text{ng/ml}$ )	RSD (%) ( $n=10$ )
草酸	0.5~300	$H=1.7188C+0.0017$	0.9998	23	1.4

注 \* H: 峰高 (mV); C: 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )。

其是植物中, 一个普遍存在的问题是易受到  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{SO}_4^{2-}$  的干扰, 这主要是因为  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{SO}_4^{2-}$  也具有较高的紫外吸收<sup>[11]</sup>。为此分别配制一定浓度的  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{SO}_4^{2-}$  溶液在 UV-260 紫外分光光度计上于紫外 190~350nm 范围内进行扫描(如图2所示), 可以发现两种干扰离子在 190~240nm 范围内均有紫外吸收, 而  $\text{SO}_4^{2-}$  的紫外吸收又远远小于  $\text{NO}_3^-$ , 尤其在草酸的检测波长 220nm 处  $\text{NO}_3^-$  有很强的吸收, 相比之下,  $\text{SO}_4^{2-}$  吸收可以忽略不计。因此, 初步认为最可能造成干扰的因素是  $\text{NO}_3^-$ 。

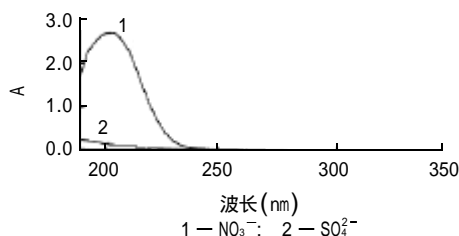


图2 干扰离子的紫外吸收光谱图

Fig.2 UV absorption spectra of interfering ions

为了进一步确定干扰因素, 在草酸的最佳色谱条件下, 将两种干扰离子(浓度均为  $1\mu\text{g/ml}$ ) 混和溶液上柱分析, 观察它们的保留时间。所得色谱图如图3所示。

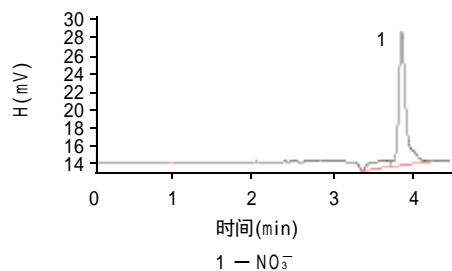


图3 干扰离子的色谱图

Fig.3 Chromatogram of interfering ions

图3是  $\text{NO}_3^-$  色谱峰, 其保留时间为 3.837min(同一色谱条件下草酸保留时间为 3.861min);  $\text{SO}_4^{2-}$  的峰无论怎样增加浓度都不明显, 几乎无影响。因此, 在相同的色谱条件下, 只有  $\text{NO}_3^-$  与草酸保留时间相近, 二者分离度太小, 而且无论如何改变色谱条件, 也难以区分开, 成为测定草酸最严重的干扰。而  $\text{SO}_4^{2-}$  的干扰则在 220nm 的检测波长下基本消除。

### 2.3 干扰的消除

阴离子交换树脂可以交换溶液中的  $\text{NO}_3^-$ , 从而消除

$\text{NO}_3^-$  的干扰, 但由于在低 pH 下阴离子交换树脂还对草酸有离解作用, 会造成部分草酸的损失, 因而在实际操作过程中既要消除干扰又要尽可能减小草酸的损失。

本文采用静态交换法, 按 1.4 的方法比较了 HZ201 强碱型阴离子交换树脂和 D301 大孔弱碱型阴离子交换树脂对  $\text{NO}_3^-$  干扰的消除率和对草酸回收率的影响, 结果见表2。

表2 阴离子交换树脂对干扰的消除率及草酸的回收率的影响  
Table 2 The affection of anion exchange resin on elimination factor of disturbance and percent recovery of oxalate

阴离子交换树脂	$\text{NO}_3^-$ 的消除率 (%)	草酸的回收率 (%)
Resin D301	90.07	71.35
Resin HZ201	97.76	63.39

可见, 从消除干扰的角度来讲, 两种阴离子交换树脂干扰消除率均较高, 特别是使用 HZ201 强碱型阴离子交换树脂时, 干扰消除率达 97.76%; 但从草酸的回收率上看, 两种树脂对草酸也有一定的交换, 特别是使用 Resin HZ201 时, 草酸的回收率仅为 63.39%。

为此, 本文先对阴离子交换树脂进行预处理, 即将两种树脂分别用  $20\text{mmol/L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (以  $\text{H}_3\text{PO}_4$  过调 pH 为 2.2) 缓冲溶液冲洗处理, 然后按前面的方法比较 HZ201 强碱型阴离子交换树脂和 D301 大孔弱碱型阴离子交换树脂对  $\text{NO}_3^-$  干扰的消除率和对草酸回收率的影响, 结果如表3。

表3 预处理后的阴离子交换树脂对干扰的消除率及草酸的回收率的影响  
Table 3 The affection of pretreated anion exchange resin on elimination factor of disturbance and percent recovery of oxalate

预处理后的阴离子交换树脂	$\text{NO}_3^-$ 的消除率 (%)	草酸的回收率 (%)
Resin D301	86.99	93.69
Resin HZ201	94.82	90.11

由此可见, 树脂经预处理后对  $\text{NO}_3^-$  的消除率略有下降, 但同时草酸的回收率却大幅度上升。这可能是由于树脂的一些交换点被  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  占据, 交换能力有所下降的缘故。为了兼顾干扰消除率和草酸的回收率, 本文选择预处理后的 HZ201 强碱型阴离子交换树脂来消除干扰。

### 2.4 蔬菜中草酸的测定

本文随机选择了苋菜和葱两种常见蔬菜, 按 1.2.3 方法制备实际样品溶液, 采用优化的干扰消除方法, 在最佳的色谱条件下进行分析, 所得样品色谱图见图4和图5, 分析结果见表4。

## 3 结论

Resin HZ201 强碱型阴离子交换树脂经 pH2.2 的

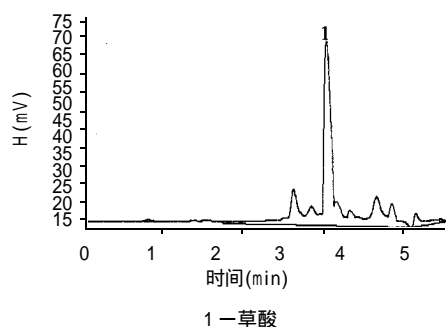


图4 苋菜中草酸的色谱图

Fig.4 The chromatogram of oxalate in amaranth

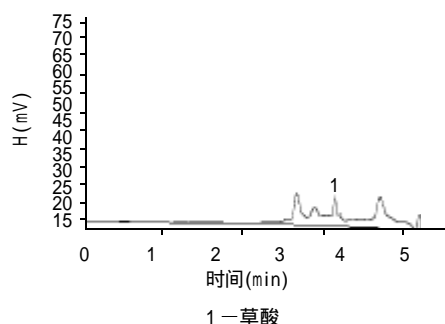


图5 葱样中草酸的色谱图

Fig.5 The chromatogram of oxalate in scallion

表4 分析结果

Table 4 The results of analysis

样品	样品中草酸浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	蔬菜中草酸的含量 ( $\text{mg}/100\text{g}$ )	草酸的回收率 (%)
苋菜	32.1	304.7	100.2
葱	2.0	18.6	101.9

20mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_3\text{PO}_4$  缓冲溶液体系处理后既能够有效消除  $\text{NO}_3^-$  的干扰又可以较好地保证草酸回收率, 是一种较理想的干扰消除方法。本文所建立的反相高效液

相色谱法分析草酸的方法具有灵敏、回收率高、重现性好、操作简便、成本低、干扰小等优点, 应用于蔬菜中草酸的测定, 结果令人满意。

## 参考文献:

- [1] 刘小琥, 彭新湘. 烟草叶片中草酸的形成及其向下运输[J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(2): 183-185.
- [2] 彭新湘, 李明启. 植物分子生理学进展[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2000.
- [3] 罗茂胜, 鹿毅. 原子吸收法在有机分析中的应用VII—蔬菜中草酸含量测定[J]. 新疆大学学报(自然科学版), 1997, 14(4): 65-66.
- [4] 张德良, 曾序玲. 动力学分光光度法测定微量草酸的研究[J]. 分析化学, 1995, 23(4): 395-397.
- [5] 刘海玲, 蓝柳珠. 催化动力学光度法测定生物样品中的草酸[J]. 分析科学学报, 1999, 15(5): 381-385.
- [6] 马茜, 畅志强, 张照星. 衍生气相色谱法分析中草药中的草酸[J]. 太原工业大学学报, 1994, 25(2): 108-112.
- [7] 张惠静, 张世德. 高效液相色谱法测定血和尿中的草酸[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(1): 87-88.
- [8] 申秀英, 许晓路. 金华市郊蔬菜硝酸盐污染现状分析[J]. 农业环境与发展, 2000, 17(2): 32-34.
- [9] 陈志强, 张旭, 杨为民, 等. 草酸钙沉淀作为高效液相色谱尿草酸测定的尿样预处理方法[J]. 同济医科大学学报, 2000, 29(5): 540-542.
- [10] 俞乐, 彭新湘, 杨崇, 等. 反相高效液相色谱法测定植物组织及根系分泌物中草酸[J]. 分析化学, 2002, 30(9): 1119-1122.
- [11] SHEN Jian-bo, ZHANG Fu-suo, MAO Da-ru. Determination of organic acids in root exudates by high performance liquid chromatography: effects of interfering factors[J]. Pedosphere, 1999, 9(2): 97-104.

## 信息

## 澳大利亚发明新型葡萄品种

澳大利亚联邦科学与工业研究组织已经发明了一种新型葡萄品种, 将于月底在澳大利亚西部开始销售。

白蜜麝香葡萄是一种金黄、有籽、易于成熟的葡萄, 具有浓厚芬芳的葡萄酒口味, 该组织说。麝香葡萄酒由于他们独特的口味而倍受关注, 以及适合于作为奶酪大浅盘。

根据该组织栽植技术人员Peter Clingeffer说, 这种新品种由于它独特的麝香口味、透明的金黄色浆果和卓越的葡萄园种植区, 给消费者和种植者留下了深刻的印象。它比其他相似的品种易于成熟, 而且给予种植者明显的市场优势。