

四甲基氢氧化铵参与下的中空纤维微萃取结合进样口 衍生化气相色谱法同时测定啤酒中 6 种酚酸

王晓青¹ 黄翌磊¹ 孙 杨² 潘再法¹ 王丽丽^{* 1}

¹(浙江工业大学化学工程学院, 杭州 310014) ²(浙江省计量科学研究院, 杭州 310013)

摘 要 建立了以乙酸己酯为萃取相、四甲基氢氧化铵(TMAH)为接收相的中空纤维三相液相微萃取结合进样口衍生化气相色谱法,同时测定啤酒中水杨酸、对羟基苯甲酸、肉桂酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸等酚酸类物质。啤酒中的酚酸被中空纤维膜壁中的乙酸己酯萃取,接着溶于纤维膜内碱性的 TMAH 接收相。取 1 μ L 接收相进样,在进样口酚酸被 TMAH 衍生化成相应的甲酯。对影响萃取与衍生化效率的主要因素进行了优化,得到最佳条件:萃取剂为乙酸己酯,衍生化试剂和接受相为 5% TMAH 溶液,供给相 pH = 2, NaCl 浓度为 25%, 搅拌速度为 500 r/min,萃取时间为 40 min。在此条件下,方法的线性范围为 0.5 ~ 15 mg/L,检出限($S/N=3$)为 0.05 ~ 0.18 mg/L。在啤酒样品中检测到香草酸、对香豆酸、阿魏酸,其余未检出。样品加标回收率为 90.1% ~ 106.8% 相对标准偏差 RSD < 5.9% ($n=3$)。表明本方法适用于啤酒中酚酸类物质的测定。

关键词 中空纤维三相液相微萃取; 气相色谱法; 进样口衍生化; 四甲基氢氧化铵; 酚酸

1 引 言

啤酒中含有多种酚酸类物质,如水杨酸、对羟基苯甲酸、肉桂酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸等,主要来自原料和发酵过程中酵母代谢,对啤酒的非生物稳定性、风味稳定性、色泽、保鲜期等有重要影响。研究表明,减少啤酒中酚酸的含量,可提高啤酒的非生物稳定性,但其含量过低又会影响啤酒风味,使口味变淡^[1]。因此,只有将酚酸控制在一定范围内,才能既不影响啤酒风味又延长其保质期。

目前,酚酸的分析方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[2~4]、气相色谱法(GC)^[5]、气相色谱/质谱法(GC/MS)^[6]、毛细管电泳法(CE)^[7]等。因为啤酒中酚酸浓度较低,直接测定困难,需预先富集。常用于富集酚酸的技术有液-液萃取^[6]、固相萃取^[4]、固相微萃取^[5]等,但这些方法过程繁琐。中空纤维液相微萃取是一种新型样品前处理技术,集萃取、富集、进样于一体,操作简便,被广泛用于环境水样中酚类物质^[8,9]、土壤中农药^[10]等的萃取。中空纤维三相液相微萃取通常采用 NaOH 溶液作为接收相,萃取酸性物质, Sun 等以正辛醇为萃取剂,以有机碱四甲基醋酸铵(TMAAc)水溶液代替 NaOH 水溶液作为接受相,不仅完成饮料中苯甲酸、山梨酸等酸性防腐剂的萃取,还能在气相色谱进样口直接将其衍生化成相应的甲酯,提高了检测灵敏度^[11]。但该类方法用于啤酒中酚酸的测定则鲜见报道。

本研究建立了以乙酸己酯为萃取剂、有机碱四甲基氢氧化铵(TMAH)水溶液为接收相的中空纤维三相液相微萃取结合进样口在线衍生化-气相色谱法,测定啤酒中 6 种酚酸。对影响衍生化效率及萃取的主要因素进行了优化,特别对有机碱试剂与萃取剂进行了选择。并对方法学进行了考察,对啤酒样品进行了测定。结果表明,本方法操作简便、溶剂用量少,适用于快速准确测定啤酒中 6 种酚酸。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CP-3800 气相色谱仪(Varian 公司),配置氢火焰离子化检测器; C-MAG HS4 加热磁力搅拌器(IKA 公司)。SQ-80B 型超声波振荡器(无锡市同建科技有限公司)。

四甲基氢氧化铵,四甲基醋酸铵,乙酸己酯,水杨酸,肉桂酸,对香豆酸,香草酸和阿魏酸(分析纯,

2014-01-20 收稿;2014-03-07 接受

本文系浙江省分析测试基金资助项目(No. 2013C37067)

* E-mail: lili_wang@zjut.edu.cn

阿拉丁公司)； H_2SO_4 、甲苯(分析纯,衢州巨化试剂有限公司)；正辛醇(分析纯,五联化工厂)；正己烷(分析纯,天津市精细化学品有限公司)；对羟基苯甲酸(分析纯,上海试剂一厂)。Accurel Q3/2 聚丙烯中空纤维(膜内径 600 μm ,膜壁厚 200 μm ,膜孔径 0.2 μm ,Membrana 公司)；啤酒均购自当地超市。

2.2 色谱条件

色谱柱:UA-5 金属毛细管柱(30 m \times 0.25 mm i. d. \times 0.25 μm 膜厚,5% 苯基-甲基聚硅氧烷,日本)；柱温:初温 50 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升到 250 $^{\circ}\text{C}$ ；进样口温度为 300 $^{\circ}\text{C}$,检测器温度为 260 $^{\circ}\text{C}$,分流比 30:1；载气为 N_2 ；柱流量 1.0 mL/min。

2.3 标准溶液的配制

准确称取 6 种酚酸,用去离子水配成 15 mg/L 的标准溶液,分别稀释成 10,5,3,1 和 0.5 mg/L 溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。准确称取 TMAH 固体,用去离子水配成 25% 的溶液,分别稀释成 20%,15%,10%,5% 和 1% 溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

2.4 中空纤维三相液相微萃取-GC 测定

取 10 mL 样品溶液于萃取瓶中,加入适量浓 H_2SO_4 (溶液 pH = 2) 和 NaCl(25%),放入搅拌磁子后置于磁力搅拌器上。将中空纤维剪成 2.0 cm 小段,一端封口,在丙酮中超声清洗 10 min,取出晾干。接着取一段中空纤维在乙酸己酯中浸泡 60 s,使纤维膜孔壁充满萃取剂,再用去离子水冲洗,除去残留在纤维膜表面的萃取剂。用微量进样针取 3 μL 5% TMAH 溶液作为接收相注入纤维内腔。将该中空纤维置于样品溶液中,以 500 r/min 的搅拌速度萃取 40 min。此时,样品水溶液(供给相)中的酚酸先溶解于中空纤维膜壁中乙酸己酯萃取相,后又因更易溶于碱性溶液而被萃取到纤维膜内碱性的 TMAH 接收相中,完成液-液-液三相微萃取。用微量进样针回抽 1 μL 接收相溶液,注入气相色谱,酚酸在进样口高温下瞬间衍生化成相应甲酯,供 GC 分析。

3 结果与讨论

3.1 中空纤维微萃取-进样口衍生化 GC 分析法条件优化

3.1.1 有机碱试剂及浓度选择 有机碱试剂既作为接收相,萃取样品中的酚酸,又作为衍生化试剂,将酚酸在进样口高温下衍生化成易于 GC 分析的甲酯。常用的 GC 在线衍生化有机碱试剂有四甲基氢氧化铵(TMAH)、四甲基醋酸铵(TMAAc)、三甲基氢氧化硫(TMSH)等。有机碱试剂的结构与碱性影响萃取与衍生化效率,因此目标物不同时,适用的有机碱性试剂也不同。本研究考察了 25% TMAH 溶液和 25% TMAAc 溶液对 6 种酚酸萃取与衍生化效率的影响。结果如图 1 所示,使用 TMAH 时 6 种目标物的色谱峰强度较高,而用 TMAAc 时 6 种物质的响应很低,5 号与 6 号峰几乎检测不到,故选择 TMAH。同时考察了 TMAH 溶液浓度(1%,5%,10%,15%,20%,25%)对 6 种酚酸萃取效率的影响。结果表明,

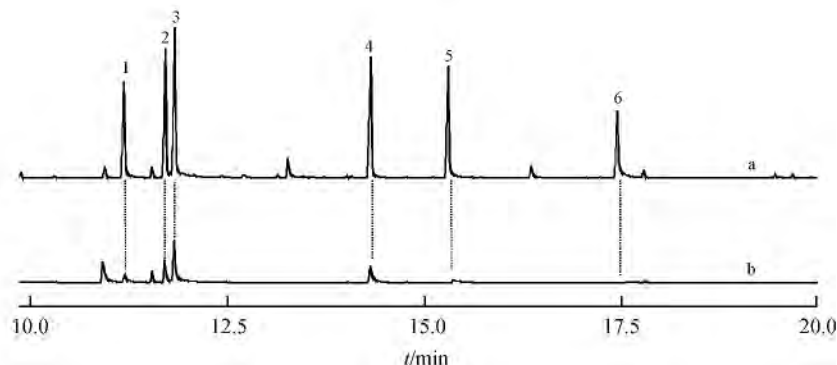


图 1 酚酸溶液与(a)25% TMAH 溶液和(b)25% TMAAc 溶液采用进样口衍生化得到的气相色谱图

Fig. 1 Chromatograms for a solution of phenolic acids with injection port derivatization in the presence of (a) the aqueous solution of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) (25%) and (b) aqueous solution of tetramethylammonium acetate (TMAAc) (25%)

1. Salicylic acid; 2. *p*-Hydroxy benzoic acid; 3. Cinnamic acid; 4. Vanillic acid; 5. *p*-Coumaric acid; 6. Ferulic acid.

选择 5% TMAH 溶液时萃取效率最高。

3.1.2 萃取剂的选择 萃取剂应对分析组分有较大的溶解度,以提高萃取效率;在水中溶解度小,以减少溶剂的损失;与中空纤维要有较强的亲和力,以便很好地进入纤维孔壁内,减少其在萃取过程中的损失^[12,13]。考察了乙酸己酯、正辛醇、甲苯、正己烷、正十二醇和环己醇 6 种常见萃取剂对酚酸萃取率的影响。结果表明,乙酸己酯对 6 种酚酸的萃取效率最好,其次是正辛醇,其余 4 种均未能萃取酚酸。因此,选择乙酸己酯为萃取剂。

3.1.3 供给相 pH 值的影响 样品溶液 pH 值的变化能改变酚酸在供给相中的存在状态(分子态和离子态),从而影响萃取效率。6 种酚酸均是弱酸, pK_a 在 2.98~4.57 之间。考察了供给相在 pH 1~6 范围内对 6 种酚酸萃取率的影响。结果如图 2 所示, pH=2 时萃取效率最高。

3.1.4 盐浓度的影响 考察了样品溶液中 NaCl 浓度(5%、10%、15%、20%、25%、30%)对酚酸萃取率的影响。结果表明,当 NaCl 溶液浓度为 25% 时,除水杨酸外其余 5 种酚酸萃取效率最高,而水杨酸在 NaCl 溶液浓度为 20% 时,萃取效率略高。综合考虑,选择 25% NaCl 溶液。

3.1.5 搅拌速度与萃取时间的影响 考察了搅拌速度(200、300、400、500 和 600 r/min)对酚酸萃取率的影响,结果表明,500 r/min 时效率最高。萃取达到平衡所需时间也非常重要,考察了萃取时间(10、20、30、40、50 和 60 min)对酚酸萃取率的影响。如图 3 所示,在 10~40 min 6 种酚酸的萃取效率随萃取时间延长而增高,40 min 后只有对香豆酸萃取效率增高,故最佳萃取时间为 40 min。

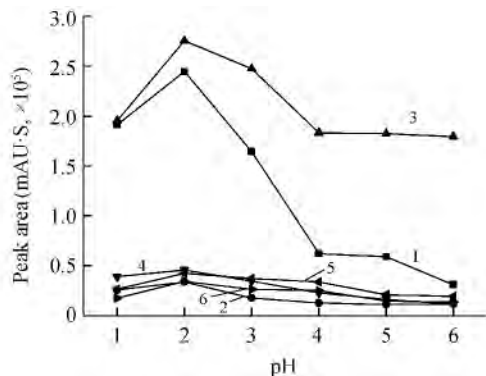


图 2 供给相 pH 值对酚酸萃取效率的影响

Fig. 2 Effects of the pH value of donor phase on extraction efficiency of phenolic acids

曲线编号同图 1 (The curve number are the same as in Fig. 1)。

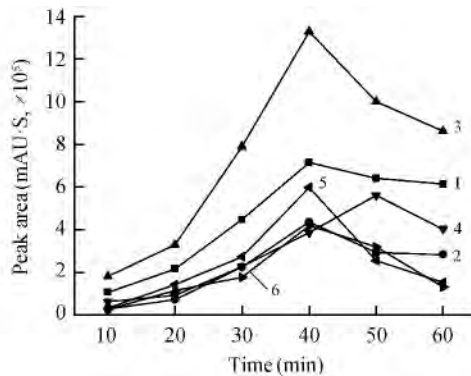


图 3 萃取时间对酚酸萃取效率的影响

Fig. 3 Effects of extraction time on extraction efficiency of phenolic acids

曲线编号同图 1 (The curve number are the same as in Fig. 1)。

3.2 方法学考察

在以上最佳条件下进行方法学考察,所得结果见表 1。在 0.5~15 mg/L 浓度范围内 6 种酚酸具有良好的线性关系,检出限($S/N=3$)为 0.05~0.18 mg/L,与 Citová 等^[5]测到的啤酒中酚酸检出限相近,但本方法操作更简便。富集倍数为 82~318。分别取 1 和 5 mg/L 酚酸标准溶液,平行测定 3 次,所得相

表 1 6 种酚酸的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和富集倍数

Table 1 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients, limits of detection (LOD) and enrichment factor of phenolic acids

分析物 Analyte	线性范围 Linear range (mg/L)	线性方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	检出限 Limit of detection (mg/L)	富集倍数* Enrichment factor	相对标准偏差 RSD (%) , $n=3$	
						1 mg/L	5 mg/L
水杨酸 Salicylic acid	0.5~15	$y=110000x+10316$	0.9973	0.05	318	1.8	4.9
对羟基苯甲酸 p -Hydroxy benzoic acid	0.5~15	$y=40406x+1995.6$	0.9969	0.10	82	0.3	3.3
肉桂酸 Cinnamic acid	0.5~15	$y=130000x-6429.6$	0.9983	0.05	248	5.3	4.0
香草酸 Vanillic acid	0.5~15	$y=44398x+9435.1$	0.9986	0.17	143	4.9	6.2
对香豆酸 p -Coumaric acid	0.5~15	$y=53065x+5116.6$	0.9910	0.18	162	1.7	4.7
阿魏酸 Ferulic acid	0.5~15	$y=40411x+8672.2$	0.9981	0.14	96	6.1	4.9

* : 各物质浓度为 1 mg/L 时测得值 (The detected data is in the concentration of 1 mg/L)。

对标准偏差为 0.3% ~ 6.2% ,说明本法适用于定量分析。

3.3 实际样品的测定

采用本方法对 6 种啤酒样品进行测定 ,结果见图 4。6 个目标物的色谱峰都得到很好的分离 ,样品中均测得香草酸、对香豆酸和阿魏酸 ,未测得水杨酸、对羟基苯甲酸和肉桂酸。通过外标法定量 ,6 种酚酸含量见表 2。从表 2 可知 ,香草酸 0.25 ~ 1.06 mg/L ,对香豆酸 0.62 ~ 1.61 mg/L ,阿魏酸 1.62 ~ 4.52 mg/L。这与文献[5]报道的啤酒中香草酸含量 0.59 ~ 0.85 mg/L ,阿魏酸含量 0 ~ 2.3 mg/L 相近。接着对啤酒 1 号和 2 号样品进行加标回收实验 ,结果见表 3。各酚酸的回收率为 90.1% ~ 106.8% ,相对标准偏差为 1.5% ~ 5.9% ,说明本方法重现性好、准确度高。

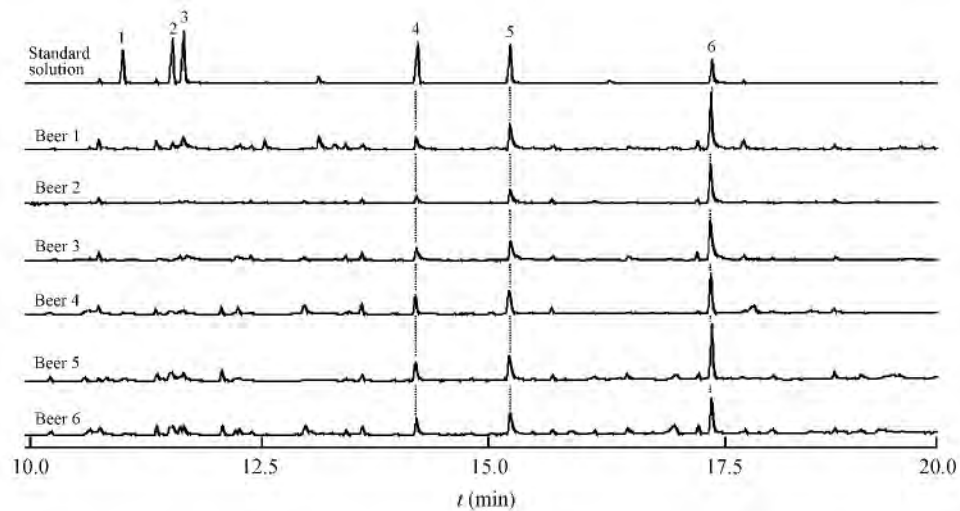


图 4 标准溶液及啤酒 1 ~ 6 样品的色谱图

Fig.4 Chromatograms of standard solution , beer 1 ~ 6 samples

1 ~ 6 号色谱峰分别为水杨酸、对羟基苯甲酸、肉桂酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸。

1. Salicylic acid; 2. *p*-Hydroxybenzoic acid; 3. Cinnamic acid; 4. Vanillic acid; 5. *p*-Coumaric acid; 6. Ferulic acid. Beer 1 , 2 , 3 from China , Beer 4 from Denmark , Beer 5 from Germany , Beer 6 from Korea.

表 2 啤酒样品中 6 种酚酸的含量

Table 2 Concentrations of phenolic acids in beer samples

样品 Sample	香草酸* Vanillic acid (mg/L)	对香豆酸* <i>p</i> -Coumaric acid (mg/L)	阿魏酸* Ferulic acid (mg/L)	样品 Sample	香草酸* Vanillic acid (mg/L)	对香豆酸* <i>p</i> -Coumaric acid (mg/L)	阿魏酸* Ferulic acid (mg/L)
Beer 1	0.70	1.61	4.52	Beer 4	1.06	1.32	2.34
Beer 2	0.49	1.12	3.72	Beer 5	0.71	1.03	3.04
Beer 3	0.62	1.47	2.69	Beer 6	0.25	0.62	1.62

水杨酸、对羟基苯甲酸、肉桂酸均未测得; * : 3 次测定的平均值。

Salicylic acid , *p*-hydroxybenzoic acid , cinnamic acid were not detected; * : Average value ($n=3$).

表 3 实际样品中 6 种酚酸的加标回收率和相对标准偏差

Table 3 Recoveries and RSDs values of phenolic acids in samples

样品 Sample	啤酒 1 Beer 1				啤酒 2 Beer 2			
	加标量 Added (mg/L)	测得值 Found (mg/L)	RSD (% , $n=3$)	回收率 Recovery (%)	加标量 Added (mg/L)	测得值 Found (mg/L)	RSD (% , $n=3$)	回收率 Recovery (%)
水杨酸 Salicylic acid	1.0	1.01	3.1	101.0	1.0	0.98	5.8	98.3
对羟基苯甲酸 <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	1.0	0.95	3.7	95.0	1.0	0.96	4.6	96.1
肉桂酸 Cinnamic acid	1.0	0.90	2.7	90.3	1.0	0.96	5.9	96.0
香草酸 Vanillic acid	1.0	1.62	5.3	92.1	0.5	0.94	2.7	90.4
对香豆酸 <i>p</i> -Coumaric acid	1.5	3.21	4.8	106.7	1.0	2.02	3.3	90.1
阿魏酸 Ferulic acid	4.5	9.31	4.9	106.4	3.5	7.46	1.5	106.8

结果表明 ,本方法操作简便、溶剂用量少、成本低 ,适用于快速准确测定啤酒中 6 种酚酸。

References

- 1 DONG Xia , LI Qi , GU Guo-Xian. *Liquor Making* , **2003** , 30(6) : 63 – 65
董霞 , 李崎 , 顾国贤. 酿酒 , **2003** , 30(6) : 63 – 65
- 2 Vanbeneden N , Delvaux F , Delvaux F R. *J. Chromatogr. A* , **2006** , 1136(2) : 237 – 242
- 3 Floridi S , Montanari L , Marconi O , Fantozzi P. *J. Agr. Food Chem.* , **2003** , 51(6) : 1548 – 1554
- 4 Alonso García A , Cancho Grande B , Simal Gándara J. *J. Chromatogr. A* , **2004** , 1054(1-2) : 175 – 180
- 5 Citová I , Sladkovsky R , Solich P. *Anal. Chem. Acta* , **2006** , 573 – 574 : 231 – 241
- 6 Proestos C , Sereli D , Komaitis M. *Food Chem.* , **2006** , 95(1) : 44 – 52
- 7 Nur B A B , Ahmad M , Bahruddin S. *Anal. Chem. Acta* , **2012** , 724 : 59 – 66
- 8 TAN Xiao-Wang , WEI Rui-Ping , SONG Yan-Xi , YI Gu-Yang. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2012** , 40(9) : 1409 – 1414
谭小旺 , 魏瑞萍 , 宋燕西 , 易谷洋. 分析化学 , **2012** , 40(9) : 1409 – 1414
- 9 Peng J F , Liu J F , Hu X L , Jiang G B. *J. Chromatogr. A* , **2007** , 1139(2) : 165 – 170
- 10 SHAO Yan , ZHANG Li-Jun , ZHANG Zhan-En. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2011** , 39(11) : 1753 – 1757
邵焰 , 张丽君 , 张占恩. 分析化学 , **2011** , 39(11) : 1753 – 1757
- 11 Sun Y , Wang X Q , Huang Y L , Pan Z F , Wang L L. *J. Sep. Sci.* , **2013** , 36(14) : 2268 – 2276
- 12 Wu J M , Lee H K. *J. Anal. Chem.* , **2006** , 78(20) : 7292 – 7301
- 13 Sanagi M M , Miskam M , Ibrahim W A W , Hermawan D , Aboul-Enein H Y. *J. Sep. Sci.* , **2010** , 33(14) : 2131 – 2139

Derivatization at Injection Port Following Hollow Fiber Microextraction with Tetramethylammonium Hydroxide for Determination of Six Phenolic Acids in Beers by Gas Chromatography

WANG Xiao-Qing¹ , HUANG Yi-Lei¹ , SUN Yang² , PAN Zai-Fa¹ , WANG Li-Li^{* 1}

¹ (College of Chemical Engineering , Zhejiang University of Technology , Hangzhou 310014 , China)

² (Zhejiang Province Institute of Metrology , Hangzhou 310013 , China)

Abstract A method of derivatization at injection port following three phase hollow fiber microextraction with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) as a dual-function reagent , for the simultaneous determination of salicylic acid , *p*-hydroxybenzoic acid , cinnamic acid , vanillic acid , *p*-coumaric acid and ferulic acid in beers by gas chromatography was developed. Phenolic acids were extracted from aqueous samples to a thin layer of organic solvent (hexyl acetate) phase impregnated into the pores of the hollow fiber wall , and then back extracted to an acceptor solution (TMAH) located inside the lumen of the hollow fiber. Upon injection , the phenolic acids were derivatized to their methyl esters in the GC injection port. Several parameters related to the derivatization and extraction efficiency were optimized. The optimized conditions were as follows: hexyl acetate was used as the extraction solvent , an aqueous solution of TMAH (5% W/V) was used as the derivatization reagent and acceptor phase , the pH value of donor phase was 2.0 , the concentrations of NaCl was 25% W/V , the stirring rate was 500 r/min , the extraction time was 40 min. Under the optimal conditions , the linear range of phenolic acids was 0.50 – 15.00 mg/L , the limits of detection were 0.05 – 0.18 mg/L. The proposed method was applied to the determination of the phenolic acids in beers. Vanillic acid , *p*-coumaric acid and ferulic acid were found in the beer samples , others were not detected. The spiked average recoveries were 90.1% – 106.8% and RSD% was less than 5.9% (*n* = 3). The method is suitable for the determination of phenolic acids in beers.

Keywords Three phase hollow fiber microextraction; Gas chromatography; Injection port derivatization; Tetramethylammonium hydroxide; Phenolic acids

(Received 20 January 2014 ; accepted 7 March 2014)

This work was supported by the Analysis and Measurement Foundation of Zhejiang Province (No. 2013C37067)