

浊点萃取 - 高效液相色谱法检测牛奶中苯甲酸

侯文欣, 商闯, 杨更亮*, 闫永娜, 张巧霞

(河北大学药学院河北省药物质量分析控制重点实验室, 保定 071002)

摘要: 建立了基于浊点萃取 (CPE) 测定牛奶中苯甲酸的高效液相 (HPLC) 色谱法。以非离子表面活性剂聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯 (Tween - 20) 为萃取剂, 考察了萃取剂的浓度、盐的浓度、加热温度及时间、pH值等因素对浊点萃取效果的影响。CPE方法的优化条件: Tween - 20的浓度为 3% (V/V)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度 300g/L、在 pH值为 4的条件下 90 萃取 10min; 色谱条件: 色谱柱为 Venusil MP C18 (4.6mm \times 150mm, 5 μ m), 流动相为乙酸铵水溶液 (0.02mol/L) - 甲醇 (体积比为 90 : 10), 流速为 1.0mL/min, 检测波长 230nm。在上述实验条件下, 苯甲酸在 0.2 - 2 μ g/mL时其浓度与检测信号呈线性关系, 相关系数为 0.9998, 检出限为 0.025 μ g/mL; 在牛奶样品中加标回收率为 98.90% ~ 100.16%, 相对标准偏差为 1.2% ~ 2.5%。

关键词: 浊点萃取; 高效液相色谱法; 苯甲酸; 牛奶

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A 文章编号: 1006 - 2513(2010)04 - 0277 - 04

Determination of benzoic acid in milk by cloud point extraction - high performance liquid chromatography detection

HOU Wen-xin, SHANG Chuang, YANG Geng-liang*, YAN Yong-na, ZHANG Qiao-xia

(Key Laboratory for Drug Quality Control and Analysis of Hebei Province,
College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002)

Abstract: A method based on cloud point extraction was developed to determine benzoic acid in milk using high - performance liquid chromatography detection. The non-ionic surfactant Tween - 20 was chosen as extraction solvent, the extraction parameters affecting extraction efficiency, such as concentrations of Tween - 20 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, equilibration temperature, equilibration time and pH were evaluated and optimized. The optimum CPE conditions were: 3% (V/V) Tween - 20, 300g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH4, equilibration temperature 90 for 10min; chromatographic conditions were: mobile phase of ammonium acetate buffer-methanol 90 : 10 (V/V), flow rate 1mL/min, the detection wave length 230nm. Under the above optimized conditions, the linearity of the calibration curve for benzoic acid was in the range of 0.2 ~ 2.0 μ g/mL, the limits of detection was 0.025 μ g/mL, the correlation coefficient was 0.9998. The recovery for the standard addition of the benzoic acid in the milk ranged from 98.90% to 100.16%, the relative standard deviations was in the range of 1.2% ~ 2.5%.

Key words: cloud point extraction; HPLC; benzoic acid; milk

收稿日期: 2009 - 09 - 24

*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 20375010, 20675084)、河北省科技攻关 (No. 06276479B, 07276407D)。

作者简介: 侯文欣 (1983 -), 女 (汉族), 硕士研究生, 主要从事色谱分析及方法研究。

浊点萃取法 (cloud point extraction, CPE) 是近年来新兴的一种环保型的液液萃取技术, 是以中性表面活性剂胶束水溶液的溶解性和浊点现象为基础, 通过改变实验参数引发相分离, 将疏水性物质与亲水性物质分离, 与传统的液液萃取相比, 此方法具有操作简单、高效、经济, 不使用挥发性有机溶剂, 不影响环境等优点。近年来, 此方法作为前处理方法已经有很多报道, 如利用浊点萃取富集测试样品溶液中的金属离子^[1-6], 蛋白质的分离纯化^[7], 吡啶-3-丁酸的测定^[8]和人尿中的4种抗凝血鼠药测定^[9]。CPE在环境污染物和农药残留检测方面也有应用^[10-15]。

苯甲酸作为一种食品添加剂, 具有杀死微生物或抑制其繁殖的作用, 但其对人体肝脏、肾脏均有一定损害, 且有一定的毒副作用^[16]。本文使用聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯 (Tween-20) 为萃取剂, 结合高效液相色谱法探讨了牛奶中苯甲酸测定的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

JASCO 高效液相色谱仪 (日本 JASCO 公司), 包括: PU-1587 泵, UV-1575 可变波长检测器, 南京千谱色谱工作站; CT15RT 通用低温离心机 (上海天美生化仪器设备工程有限公司); KQ3200B 型超声波清洗器 (昆山市超生仪器有限公司); Venusil MP C18 (4.6mm × 150mm, 5μm)。

苯甲酸溶液标准物质 (1.00mg/mL, 国家标准物质研究中心); 30% (V/V) Tween-20; 硫酸铵; 乙酸铵水溶液 (0.02mol/L); 甲醇; 盐酸。所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

液相色谱条件: 流动相为 V (0.02mol/L 乙酸铵水溶液) V (甲醇) = 90 10, 用前过 0.45μm 滤膜, 流速为 1mL/min, 检测波长为 230nm; 柱温为室温, 进样量为 5.0μL。

1.2.2 标准溶液的制备

取 1.00mg/mL 的苯甲酸标准溶液, 分别配制

成浓度为 0.2、0.4、0.5、1.0、2.0μg/mL 的苯甲酸标准溶液。

1.2.3 前处理方法

取市售牛奶样品 5.0mL 于 10mL 离心试管中, 再分别加入 1.2g (NH₄)₂SO₄ 和 1.0mL 30% Tween-20, 用超纯水定容至 10mL, 在 80℃ 水浴中加热 15min, 冷却至室温, 以 5000r/min 的速度在离心机中离心 10min, 取上清液, 再加入 (NH₄)₂SO₄ 使其浓度为 300g/L, 调节 pH 值为 4, 摇匀, 然后在 90℃ 水浴中平衡 10min, 可得到两相; 下层为水相, 上层为表面活性剂富集相, 苯甲酸即被增溶于该相中, 立即在冰水中冷却, 吸去水相, 将所得表面活性剂富集相用一定量甲醇溶解, 过 0.45μm 滤膜, 进高效液相色谱仪进行分析。

2 结果与讨论

2.1 破乳过程添加剂浓度的选择

为了能够充分破乳, 去除牛奶中其他物质的影响, 在加入表面活性剂之后, 加入 (NH₄)₂SO₄、Cu₂SO₄、AlCl₃、Na₂SO₄ 对牛奶进行破乳, 结果发现 (NH₄)₂SO₄ 破乳效果好, 没有颜色干扰, 在加入 (NH₄)₂SO₄ 后, 能够很快达到较好的破乳效果。(NH₄)₂SO₄ 质量浓度为 120g/L 时能够充分破乳。

2.2 破乳过程离心条件的选择

80℃ 水浴中加热 15min 破乳, 然后离心, 改变离心转速 (4000 ~ 9000r/min) 和时间 (10 ~ 30min), 转速低出现絮状漂浮物, 分层不明显, 结果显示转速为 5000r/min, 离心 10min 时分层明显, 效果最好。提高转速, 增加离心时间效果没有明显的提高。

2.3 浊点萃取条件的选择

参照传统萃取的基本特性可以获得影响浊点萃取平衡的主要因素有表面活性剂的类型及浓度、平衡温度和时间、pH 值、溶液中电解质的种类和浓度。本文分别考察了表面活性剂的浓度、平衡时间和温度、pH 值、电解质浓度这几个因素对实验的影响。图中的萃取率是通过在牛奶中添加一定量的待测标准物质, 萃取富集之后, 进样得到的实际峰面积与由理论计算得出的峰面积比

值。

2.3.1 表面活性剂浓度的选择

萃取体系中表面活性剂的浓度会影响到萃取容量、富集相体积以及浓缩因子 (Fc), 继而影响到萃取效率。表面活性剂的用量少会出现回收率低、难收集、准确度低、重现性差等问题; 用量过多浓缩因子会减小, 也可能出现回收率降低的现象。本实验通过改变 Tween - 20 的加入量, 使其浓度为 2% ~ 7% (V/V), 来考察表面活性剂浓度对油点萃取的影响, 结果如图 1 所示, 当表面活性剂浓度为 3% 时, 回收率达到最大, 浓度再增大萃取率降低, 因此, 选择 3% 作为 Tween - 20 的最佳浓度。

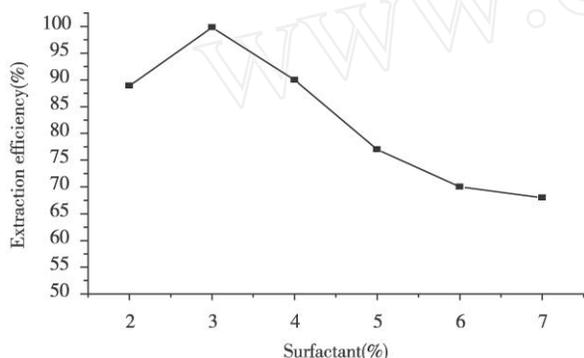


图 1 表面活性剂浓度对萃取率的影响

2.3.2 pH 值的影响和选择

萃取体系的酸碱度影响目标物在萃取环境中的存在状态, 从而影响萃取效率。所测苯甲酸为弱酸性有机物, 在碱性条件下易形成盐而溶于水, 所以萃取过程 pH 值应小于 7.0。实验选择了盐酸调节萃取体系的 pH 值, 考察酸度对萃取效率的影响, 见图 2。如图所示随着萃取体系 pH 值的增加萃取效率逐渐增大, 但当 pH 值超过 4.0 后, 萃取率反而减小, 所以选择萃取体系的最佳 pH 值为 4.0。

2.3.3 油点萃取过程添加剂浓度的选择

为了改善牛奶在油点萃取后两相的分离, 本实验选择加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 改变 CPE 体系的离子强度。结果如图 3, 实验表明适当的添加剂能够加快相分离行为, 降低油点萃取体系的温度。但是随着添加剂浓度的增加, 用甲醇溶解富集相时相对较为困难, 且待测液混浊, 可能是盐析效应, 使表面活性剂的疏水性增强, 在富集相的体

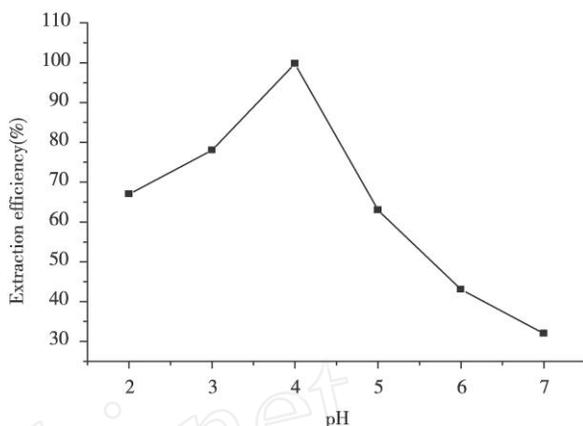


图 2 pH 值对回收率的影响

积减少的同时, 形成刚性液态晶体或以固态富集相沉淀出来所致, 增加了后续实验的难度^[17]。最后确定添加剂的质量浓度为 300g/L。

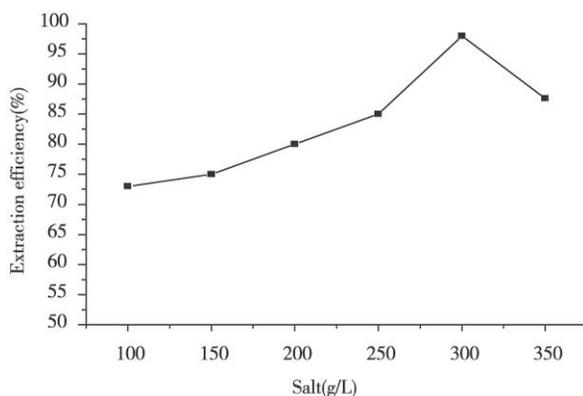


图 3 添加剂浓度对回收率的影响

2.3.4 油点萃取温度和时间的选择

温度对于表面活性剂胶束的性质, 尤其是分相后形成的凝聚相体积和含水量均有较大的影响。为了在较低的平衡温度和最短时间内达到完全萃取, 样品按照前面优化条件处理后, 研究了在不同温度和时间对萃取效率的影响。结果表明, 在 90 水浴下平衡 10min 萃取率达到最大。

实验的结果表明 pH 值、平衡温度和时间对本实验的影响较其它因素大。

2.4 线性回归方程及检出限

以色谱峰面积 (Y) 对浓度 (X, mg/mL) 进行线性回归, 得其回归方程为: $Y = 4 \times 10^7 X + 4471.34$, $r = 0.9998$, 表明苯甲酸在 0.2 ~ 2.0 μg/mL 浓度范围内呈良好线性关系。当信噪

比为 3 时, 测得苯甲酸的检出限为 0.025 μ g/mL。

2.5 精密度和回收率

精确量取等量样品三份, 分别加入一定对照品溶液, 每个质量浓度测定五次, 结果见表 1。图 4 为苯甲酸标准溶液和加标牛奶样品色谱图。

表 1 样品加标回收率实验

本底值 (μ g)	添加值 (μ g)	检测值 (μ g)	回收率 (%)	RSD (%)
0.416	0.2	0.612	99.35	1.2
0.416	0.8	1.218	100.16	2.5
0.416	1.5	1.895	98.90	1.9

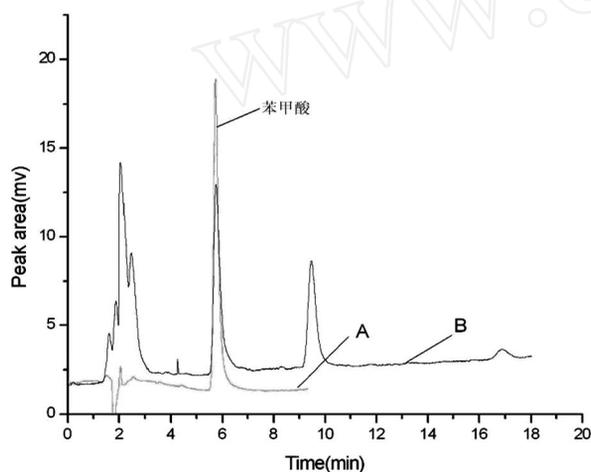


图 4 苯甲酸标准溶液 (A) 和加标牛奶样品 (B) 的高效液相色谱图

3 结论

采用 Tween - 20 对牛奶进行破乳大大简化了牛奶样品的前处理步骤, 破乳后样品的萃取和浓缩可以同时进行, 不需要再分离净化, 并且本方法大大减少了有机溶剂的使用, 实现了绿色分析。在本实验条件下, 回收率可达 98.90% ~ 100.16%, 检出浓度为 0.025 μ g/mL, 可以满足牛奶中苯甲酸的检测。

参考文献:

[1] 朱霞石, 江祖成, 胡斌. 浊点萃取 - 电热原子吸收光谱法分析铬的形态 [J]. 分析化学, 2003, 31 (11): 1312 - 1316.
[2] 朱霞石, 朱小红, 封克, 等. 浊点萃取 - 石墨炉原子吸收光谱法测定环境样品中的痕量镉 [J]. 分析化学, 2006, 34

(7): 951 - 954.
[3] 杨柳. 浊点萃取 - 火焰原子吸收光谱法测定痕量金属元素的研究 [D]. 湖南: 湘潭大学化学学院, 2007.
[4] 周庆祥, 白画画, 代文华, 等. 浊点萃取 - 火焰原子吸收光谱法测定环境水样中痕量铅 [J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2007, 35 (2): 115 - 118.
[5] 肖学明, 黄晖, 郭玉萍. 5 - Br - PADAP 浊点萃取分光光度法测定水样中的痕量铜 [J]. 宝鸡文理学院学报: 自然科学版, 2008, 28 (1): 37 - 40.
[6] 杨柳, 周方钦, 黄荣辉, 等. 浊点萃取 - 火焰原子吸收光谱法测定催化剂中痕量钨的研究 [J]. 分析试验室, 2006, 25 (12): 65 - 67.
[7] BORDER TM. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X - 114 solution [J]. Biol Chem, 1981, 256 (4): 1604 - 1607.
[8] 龙文清. 浊点萃取预富集胶束增稳室温磷光法测定吡啶 - 3 - 丁酸 [J]. 分析测试学报, 2007, 27 (1): 77 - 80.
[9] 孟庆玉, 黎源倩, 邹晓莉, 等. 浊点萃取 - 高效液相色谱法同时测定人尿中的 4 种抗凝血鼠药 [J]. 分析化学, 2008, 36 (6): 760 - 764.
[10] 王健, 崔艳梅, 刘伟, 等. 浊点萃取 - 高效液相色谱法检测牛奶中的六种农药 [J]. 色谱, 2007, 25 (6): 853 - 856.
[11] 陈建波, 刘伟, 崔艳梅, 等. 浊点萃取 - 高效液相色谱法测定草莓汁中的多种农药残留 [J]. 分析化学, 2008, 36 (3): 401 - 404.
[12] Panagiota D, Zygoura, Evangelos K, Paleologos, Kyriakos A, Riganakos, et al. Determination of diethylhexyladipate and acetyltributylcitrate in aqueous extracts after cloud point extraction coupled with microwave assisted back extraction and gas chromatographic separation [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1093 (1 - 2): 29 - 35.
[13] Wang Ling, Jiang Gui Bin, Cai Ya Qi, et al. Cloud point extraction coupled with HPLC - UV for the determination of phthalate esters in environmental water samples [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19 (17): 874 - 878.
[14] Fontana A R, Silvac M F, Martinez L D. Determination of polybrominated diphenyl esters in water and soil samples by cloud point extraction - ultrasound back - extraction - gas Chromatography - mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216 (20): 4339 - 4346.
[15] 申进朝, 邵学广. 浊点萃取技术及其在有机化合物分离分析中的应用 [J]. 化学进展, 2006, 18 (4): 482 - 487.
[16] 周春红, 董文彬. 固相萃取 - 高效液相色谱法测定酱油中的防腐剂苯甲酸 [J]. 食品科技, 2003 (5): 80 - 82.
[17] Hung K C, Chen B H, Yu L E. Cloud point extraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants [J]. Separation and Purification Technology, 2007, 57 (1): 1 - 10.