

# 固相微萃取 / 气相色谱 - 质谱法测定明胶中的对羟基苯甲酸乙酯

贾 丽<sup>1</sup>, 张耀方<sup>2</sup>, 刘海清<sup>2</sup>, 杜艳艳<sup>2</sup>

(1. 华南师范大学 激光生命科学研究所, 广东 广州 510631;

2. 汕头大学 理学院 化学系, 广东 汕头 515063)

**摘 要:** 建立固相微萃取 (SPME) 和气相色谱 - 质谱 (GC - MS) 联用技术测定明胶中的对羟基苯甲酸乙酯。以 SPB-1701 为分析柱优化了 GC - MS 分析对羟基苯甲酸乙酯的条件, 对 SPME 萃取对羟基苯甲酸乙酯的条件 (包括样品溶液的离子强度、萃取温度、萃取时间) 以及热解析时间和温度等实验条件进行了优化。该方法测定对羟基苯甲酸乙酯的线性范围为 0.05 ~ 5  $\mu\text{g/mL}$ , 检出限为 0.03  $\mu\text{g/mL}$ 。此法可成功地用于明胶样品中对羟基苯甲酸乙酯的测定。

**关键词:** 固相微萃取; 气相色谱 - 质谱; 对羟基苯甲酸乙酯; 明胶

**中图分类号:** O657.63; O625.54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957 (2006) 02 - 0067 - 04

## Determination of Ethyl 4-Hydroxybenzoate in Gelatin with Solid-phase Micro-extraction Coupled with Gas Chromatography - Mass Spectrometry

JIA Li<sup>1</sup>, ZHANG Yao-fang<sup>2</sup>, LU Hai-qing<sup>2</sup>, DU Yan-yan<sup>2</sup>

(1. Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Department of Chemistry, Shantou University, Shantou 515063, China)

**Abstract:** A technique combining solid-phase microextraction (SPME) with gas chromatography - mass spectrometry (GC - MS) was developed to determine ethyl 4-hydroxybenzoate in gelatin. GC - MS analysis of ethyl 4-hydroxybenzoate was initially optimized by liquid injection onto an SPB-1701 column. To optimize the extraction of ethyl 4-hydroxybenzoate, several SPME parameters (including ionic strength of sample solution, extraction time, and temperature) were examined. The desorption time and temperature were also investigated. The calibration curve of ethyl 4-hydroxybenzoate was linear in the range from 0.05 to 5  $\mu\text{g/mL}$  with a correlation coefficient of 0.991 and the detection limit ( $S/N = 3$ ) was 0.03  $\mu\text{g/mL}$ . The developed SPME/GC - MS method was successfully applied to the determination of ethyl 4-hydroxybenzoate in gelatin.

**Key words:** Solid-phase microextraction; Gas chromatography - mass spectrometry; Ethyl 4-hydroxybenzoate; Gelatin

明胶 (gelatin) 是一种广泛应用于食品及药品等领域的天然高分子材料, 其主要成分是动物胶原蛋白经部分水解衍生的相对分子质量约 10 000 ~ 70 000 的水溶性蛋白质, 能溶于热水, 冷却后成凝胶状物。在干燥情况下能长期储存, 但遇潮湿空气很容易受到细菌作用而变质, 所以常加入防腐剂以防腐<sup>[1-2]</sup>。

对羟基苯甲酸酯类是常用的防腐剂、抑菌剂, 对霉菌及酵母的抗菌作用强, 各国多将其乙酯及丙酯用于食品、化妆品、医药用品中<sup>[2]</sup>。目前, 已见文献报道的对羟基苯甲酸酯类的检测方法多为气相色谱法和高效液相色谱法, 样品的前处理均先酸化, 然后用乙醚萃取浓缩, 这种传统的液 - 液萃取法操作繁琐费时, 需要消耗大量有机试剂, 污染环境, 危害检测人员健康<sup>[3-4]</sup>。Mahuzier P. E. 等<sup>[5]</sup>报道了用微乳液电色谱法测定对羟基苯甲酸酯类。

SPME 与液 - 液萃取预富集技术相比, 具有不用或少用溶剂, 操作简便、快速, 样品用量少, 灵敏度高, 易于自动化和与其他技术在线联用等优点<sup>[6-8]</sup>。目前尚未见 SPME 和气相色谱 - 质谱 (GC - MS)

收稿日期: 2005 - 04 - 01; 修回日期: 2005 - 06 - 29

基金项目: 汕头大学校基金及工业催化 "211" 学科建设资助

作者简介: 贾 丽 (1970 -), 女, 河南信阳人, 教授, 博士, Tel: 020 - 85211436, E - mail: jiali\_70@yahoo.com

联用测定对羟基苯甲酸乙酯的报道。本文建立了测定明胶中对羟基苯甲酸乙酯的 SPME/GC-MS 方法。该方法使样品预处理过程大为简化,提高了分析速度及灵敏度。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

日本岛津 QP5050A 气相色谱/质谱联用仪;瑞士 METTLER AE240 电子分析天平;磁力加热搅拌器(上海浦东物理光学仪器厂);萃取操作平台,萃取头手柄,40 mL 萃取瓶,85  $\mu\text{m}$  聚丙烯酸酯 (polyacrylate, PA) 固相微萃取纤维购自 Supelco 公司。

### 1.2 色谱及质谱条件

气相色谱采用 SPB-1701 毛细管柱,30 m  $\times$  0.25 mm,膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ ;进样口温度 230  $^{\circ}\text{C}$ ,检测器温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ,色谱柱初始温度 50  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 3 min,以 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 220  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 8.5 min;无分流进样;进样口柱压 87.5 kPa,以峰面积定量。PA 纤维使用前在进样口 300  $^{\circ}\text{C}$  老化 2 h。质谱条件:检测器电压 1.5 kV,数据采集模式为扫描,扫描质荷比为 10~250  $u$ 。

### 1.3 标准溶液的配制

对羟基苯甲酸乙酯 (99%) 购自纯化化合物公司 (Pure Chemicals Company)。准确称取 50.0 mg 对羟基苯甲酸乙酯标样用甲醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 1 mg/mL 的储备液储存于 4  $^{\circ}\text{C}$  备用,实验时根据需要用水配制成相应浓度的标准溶液。

### 1.4 萃取方法

将 20 mL 去离子水、7 g NaCl 放入 40 mL 顶空瓶中,用电热磁力搅拌器加热到 90  $^{\circ}\text{C}$ ,加入样品,用 SPME 针头顶空萃取 30 min 后,将 SPME 针插入 230  $^{\circ}\text{C}$  汽化室热解析 10 min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 纤维表面固定相和萃取模式的选择

考虑被测组份对羟基苯甲酸乙酯的性质,根据“相似相溶”的原则,本实验选择极性的 PA 萃取纤维。

萃取模式的选择主要考虑样品基体及待测物的性质的影响。明胶是相对分子质量高的蛋白,难挥发,易于被萃取纤维的 PA 涂层吸附,很难用热解析的方法去除。采用直接法萃取对羟基苯甲酸乙酯时,只需 1 次,PA 萃取纤维就无法再继续使用。选用顶空的萃取模式萃取对羟基苯甲酸乙酯时,由于明胶样品基体不与萃取涂层直接接触,因此可保护涂层,并延长其使用寿命。

### 2.2 解析温度及时间的选择

解析过程主要受进样口温度、解析时间、待测物性质等因素影响。较高的进样口温度可以缩短解析时间,但也会使某些热不稳定物质发生热降解。

SPB-1701 柱的最高允许使用温度为 280  $^{\circ}\text{C}$ 。经实验发现,进样口温度为 230  $^{\circ}\text{C}$  时,解析时间在 10 min 内,对羟基苯甲酸乙酯的峰面积随解析时间的增加而增大,当解析时间超过 10 min 继续增大时,对羟基苯甲酸乙酯的峰面积基本保持不变,由此说明当进样口温度为 230  $^{\circ}\text{C}$ ,解析时间为 10 min 时,对羟基苯甲酸乙酯可解析完全。

在保持进样口温度为 230  $^{\circ}\text{C}$ ,解析时间为 10 min 的条件下,研究了起始柱温对对羟基苯甲酸乙酯的峰形和峰面积的影响。实验结果表明,当起始柱温为 50  $^{\circ}\text{C}$  时,对羟基苯甲酸乙酯的峰形尖锐,峰面积最大。当起始柱温小于 50  $^{\circ}\text{C}$  时,对羟基苯甲酸乙酯的峰拖尾;提高起始柱温,对羟基苯甲酸乙酯的峰高及峰面积减小,这是由于相对较低的起始柱温有利于待测物在色谱柱入口处重新富集。

在下面的实验中,选择进样口温度 230  $^{\circ}\text{C}$ ,解析时间 10 min,起始柱温 50  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.3 萃取条件的优化

2.3.1 离子强度的影响 本实验在萃取时间为 30 min,水浴温度为 80  $^{\circ}\text{C}$  的条件下,考察了向 20 mL 标准溶液中加入不同量的 NaCl 对萃取效率的影响。实验发现,对羟基苯甲酸乙酯的峰面积开始时随着

NaCl浓度的增大而增加，当 NaCl为 0.35 g/mL时，对羟基苯甲酸乙酯的峰面积最大，继续增大 NaCl的浓度时，对羟基苯甲酸乙酯的峰面积反而减小。这种现象是由于两种互相竞争的作用所致。一种作用是 NaCl与水分子相互作用，导致可溶解对羟基苯甲酸乙酯的水分子减少，因而对羟基苯甲酸乙酯在气相中的含量增加，萃取效率提高；另一种作用是 NaCl与对羟基苯甲酸乙酯之间的静电相互作用，减弱了对羟基苯甲酸乙酯进入气相的能力，导致萃取效率降低。开始时，NaCl与水分子的相互作用占主导作用，因此对羟基苯甲酸乙酯的萃取效率随着 NaCl浓度的增加而增加，随着 NaCl浓度的继续增加，NaCl与对羟基苯甲酸乙酯之间的静电相互作用开始占主导作用，因此对羟基苯甲酸乙酯的萃取效率反而减小。

我们选用 NaCl含量为 0.35 g/mL继续下面的实验。

2.3.2 萃取温度与时间的影响 首先考察了萃取温度为 90 °C，NaCl含量为 0.35 g/mL时，对羟基苯甲酸乙酯到达萃取平衡所需要的时间。实验结果表明，在该实验条件下，对羟基苯甲酸乙酯到达萃取平衡的时间为 180 min。

其次考察了萃取时间为 30 min，NaCl含量为 0.35 g/mL的条件下，萃取温度对对羟基苯甲酸乙酯萃取量的影响。实验结果表明，水浴温度从 50 °C到 90 °C，对羟基苯甲酸乙酯的萃取量随温度的升高而显著增加。图 1给出了对羟基苯甲酸乙酯的萃取量与温度的关系。

1997年 Al<sup>[9,10]</sup>提出在非平衡体系中，萃取纤维上待测物的含量在一定条件下正比于其在水相中的起始浓度，可进行定量分析。在萃取初始阶段，分析组分很容易且很快富集到纤维固定相中，随着时间的延长，富集的速度越来越慢。因此在下面的定量实验中选定萃取时间为 30 min，萃取温度为 90 °C。

## 2.4 定量分析

2.4.1 回归方程与线性范围 取一定体积的 1 mg/mL储备液，用去离子水稀释成不同浓度的标准溶液，进行 SPME/GC-MS测定，以对羟基苯甲酸乙酯的峰面积对其浓度进行最小二乘拟合得到回归方程为  $A = 6.08 \times 10^7 + 3.48 \times 10^7$ ，其中  $A$ 是峰面积，是对羟基苯甲酸乙酯的质量浓度，单位为  $\mu\text{g/mL}$ ，线性相关系数为 0.991，线性范围为 0.05 ~ 5  $\mu\text{g/mL}$ ；以信噪比等于 3为标准，计算出对羟基苯甲酸乙酯的检出限为 0.03  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.2 样品测定及回收率实验 在优化的实验条件下，测定了用于制造药用胶丸胶皮的明胶原料中对羟基苯甲酸乙酯的含量，并将一定量的标准溶液加入实际样品中测定回收率。实验结果见表 1，图 2为明胶样品的总离子流色谱图。

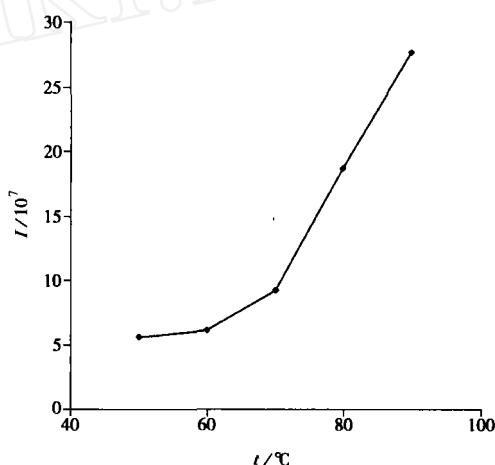


图 1 萃取时间为 30 min时温度对萃取效率的影响

Fig.1 Effects of extraction temperature on the extraction efficiency of ethyl 4-hydroxybenzoate with an extraction time of 30 min

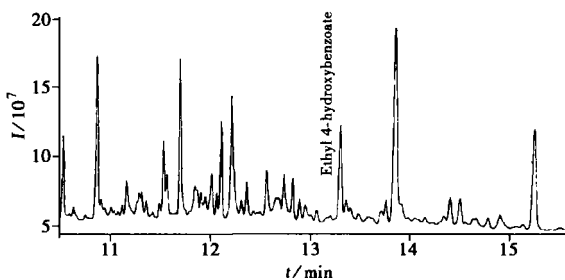


图 2 明胶中对羟基苯甲酸乙酯的测定结果

Fig.2 The analysis results of the gelatin sample

表 1 明胶中对羟基苯甲酸乙酯的测定结果

Table 1 Determination of ethyl 4-hydroxybenzoate in gelatin samples

| Sample       | Measured (n = 4)                          | RSD                | Added             | Recovery ±RSD (n = 4) |
|--------------|---|--------------------|-------------------|-----------------------|
|              | w / ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | s <sub>r</sub> / % | m / $\mu\text{g}$ | R / %                 |
| Gelatin (明胶) | 173                                       | 3.23               | 30                | 99.5 ±6.30            |

## 参考文献:

- [1] 严金龙, 孙汝东, 柏云杉, 等. 明胶的粘度行为和谱学特征 [J]. 皮革化工, 1999, 16(6): 1 - 3.
- [2] 中国化工产品大全 [M]. 第二版, 下卷, 北京: 化学工业出版社, 1994: 848 - 912.
- [3] 中华人民共和国国家标准. 食品中对羟基苯甲酸乙酯的测定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1999. GB 11672 - 89.
- [4] MORENO M A, CASTRO D, FRUTOS P, et al. Liquid chromatographic determination of methylparaben and propylparaben in nortriptyline hydrochloride oil - water microemulsions [J]. Chromatographia, 2000, 52(9/10): 589 - 592.
- [5] MAHUZIER P E, ALTRIA K D, CLARK B J. Selective and quantitative analysis of 4-hydroxybenzoate preservatives by microemulsion electrokinetic chromatography [J]. J Chromatogr, A, 2001, 924(1/2): 465 - 470.
- [6] PAWLISZYN J. Solid phase microextraction: theory and practice [M]. Wiley - VCH, 1997.
- [7] PAWLISZYN J. Applications of solid phase microextraction [M]. Royal Society of Chemistry, 1999.
- [8] 马继平, 王涵文, 关亚风. 固相微萃取新技术 [J]. 色谱, 2002, 20(1): 16 - 20.
- [9] A I J. Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations [J]. Anal Chem, 1997, 69(6): 1230 - 1236.
- [10] A I J. Headspace solid phase microextraction. Dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium [J]. Anal Chem, 1997, 69(16): 3260 - 3266.

---

(上接第 66 页)

- [3] RASH D B A, KWASOWSKI P, STEVENSON D. Solid phase extraction of clenbuterol from plasma using immunoaffinity followed by HPLC [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, 21(3): 635 - 639.
- [4] 戴华, 袁智能, 黄志强, 等. 饲料中盐酸克伦特罗、沙丁胺醇的高效液相色谱测定 [J]. 分析测试学报, 2003, 22(3): 57 - 59.
- [5] ENGELMANN M D, HENZ D, WENCLAWIAK B W. Solid-phase microextraction (SPME) and headspace derivatization of clenbuterol followed by GC - FID and GC - SMMS quantification [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 375(3): 460 - 464.
- [6] POSYNAK A, ZMUDZKIJ, NIEDZIELSKA J. Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483(1 - 2): 61 - 67.
- [7] VENTURA R, DAMASCENO L, FARREM, et al. Analytical methodology for the detection of  $\beta$ -agonists in urine by gas chromatography - mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 418(1): 79 - 92.
- [8] 吴平谷. 生物材料中克伦特罗的气相色谱 - 质谱法测定 [J]. 分析测试学报, 2002, 21(1): 19 - 21.
- [9] LAU J H W, KHOO C S, MURBY J E. Determination of clenbuterol, salbutamol, and clenbuterol in bovine retina by electrospray ionization - liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Journal of AOAC International, 2004, 87(1): 31 - 38.
- [10] JESUS V, ENRQUE G Y, APRYLL M S. Quantitative determination of clenbuterol, salbutamol and tulobuterol enantiomers by capillary electrophoresis [J]. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2001, 369(3 - 4): 212 - 219.