

使用 Agilent Chem Elut S 固相支持液液萃取 (SLE) 小柱, 通过 HPLC 分析酱油和醋中的对羟基苯甲酸酯

作者

Xia Yang
Agilent Technologies, Inc.

摘要

本应用使用 Agilent Chem Elut S 12 cc 支持液液萃取 (SLE) 小柱, 通过 LC/DAD 检测分析酱油和醋中的七种对羟基苯甲酸酯。同时测试了传统液/液萃取 (LLE) 和四种市售的 SLE 产品以作对比。结果显示, SLE 比传统 LLE 的工作流程简单的多, 节省了大量的时间和工作量。Chem Elut S 使用了一种新颖的合成填料, 在回收率、重现性、可处理的样品量和清洁度上展示出更高的性能。

简介

LLE 是一种传统样品制备方法, 可通过改变水相的离子强度和萃取溶剂的种类, 来对水溶性液体样品基质进行提取。该方法从水溶性液体样品中萃取目标分析物的回收率和重现性都很优异。然而, LLE 方法在两相混合及有机相转移时, 通常比较费时费力, 并且样品容易出现乳化。另外, 在需要多次萃取时, LLE 会更加挑战, 耗费更长时间和更多的精力, 这对于有高通量和自动化需求的实验室来说, 难以实现。

SLE 能够节省时间和工作量, 不会形成乳状液, 能够简单自动操作, 是可以替代 LLE 的一种更先进的方法。传统 SLE 产品使用天然硅藻土 (DE) 材料, 难以控制吸附剂质量和颗粒一致性, 从而影响批次之间的重现性。而最新的合成填料 Chem Elut S, 其严格的质控流程, 保证了填料的质量和颗粒的均匀性。其产品性能和重现性相比天然硅藻土得到了很大的改进。

对羟基苯甲酸酯 (图 1) 被广泛用作食品防腐剂添加于烘焙食品、调味汁、果汁和果冻等食品中。使用对羟基苯甲酸酯可防止霉菌、酵母菌和细菌生长, 从而延长食品的保质期。在美国和中国等一些国家, 在特定限量浓度范围内添加对羟基苯甲酸酯被认为是安全的, 但在马来西亚等一些国家则被禁止使用。

中国食品安全国家标准 GB5009.31-016 中有关于使用 LLE 进行食品样品前处理的规定。¹但是, 这个方法需要进行多步萃取, 非常耗时, 而且由于要使用大量的乙醚而并不环保。该应用展示了使用 Chem Elut S 12 cc 小柱分析酱油和醋中的七种对羟基苯甲酸酯, 其中使用乙酸乙酯作为萃取剂。相较于国家标准 LLE 方法, Chem Elut S 方法只使用少量的毒性较低的溶剂。该方法的工作流程也更简单, 既能节省时间和工作量, 又能实现卓越的萃取和净化效果。

实验

试剂和化学品

所有试剂和溶剂都是 HPLC 或分析级试剂盒溶剂。甲醇 (MeOH) 来自 Honeywell (Muskegon, MI, USA), 乙酸乙酯 (EtOAc) 来自 Dikma (Lake forest, CA, USA), 氯化钠来自中国医药 (集团) 上海化学试剂公司。对羟基苯甲酸酯标准品对羟基苯甲酸甲酯 (MP)、对羟基苯甲酸乙酯 (EP)、对羟基苯甲酸丙酯 (PP)、对羟基苯甲酸异丙酯 (iPP)、对羟基苯甲酸丁酯 (BP)、对羟基苯甲酸庚酯 (HP) 以及对羟基苯甲酸苄酯 (BnP) 来自 AccuStandard (New Haven, CT, USA)。酱油和醋采购自当地超市。

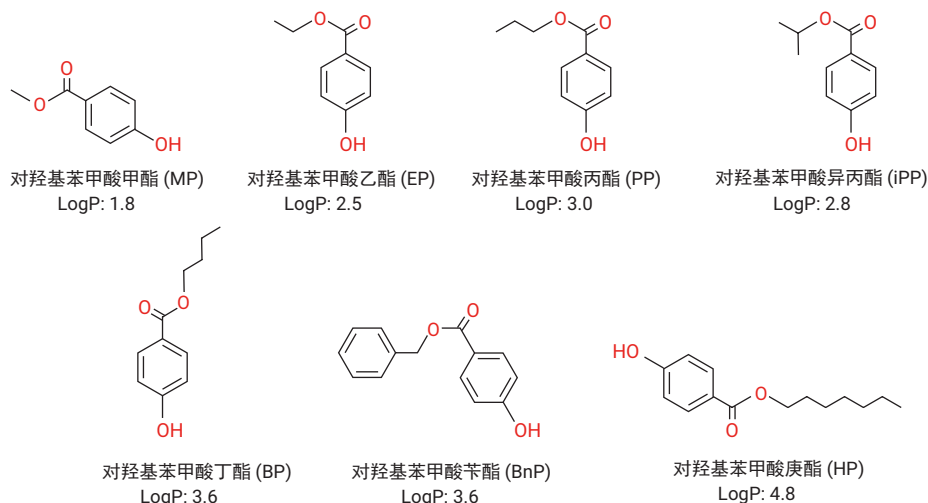


图 1. 在酱油和醋中研究的七种对羟基苯甲酸酯的结构和 logP 值。

标准品和溶液

混合标准加标溶液以 1 mg/mL 甲醇制备, 以适当量的单独储备溶液稀释, 在使用前存储在 -20 °C 环境中。在 100 mL 超纯水中溶解 1 g 氯化钠, 制成 1% 氯化钠溶液。

仪器和设备

使用配备 Agilent 1290 Infinity II 高速泵、Agilent 1290 Infinity II Multisampler、在线脱气机和 Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器的 Agilent 1290 Infinity II LC 进行分析。结合 Agilent Intuvo 9000 GC 和 Agilent 7000 三重四级杆 GC/MS, 通过 GC/MS 全扫描评估产品清洁度。使用 Agilent OpenLab 和 Agilent MassHunter 软件进行数据采集和分析。

用于样品制备的其他设备和材料包括:

- Eppendorf 移液枪
- Eppendorf 离心机 5810R (Hamburg, Germany)
- Agilent Chem Elut S 12 cc, 3 mL (部件号 5610-2008)
- 四种市售的 SLE 12 cc 产品
- SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder (Metuchen, NJ, USA)
- Agilent Vac Elut 20 歧管 (部件号 12234101)

样品制备

使用混合标准加标溶液加标酱油和醋以确定回收率。使用的方法修改自为测量沐浴露中对羟基苯甲酸酯而开发的已发布 LLE 和 SLE 方法。²图 2 介绍了样品制备流程。在萃取前相应地制备了酱油和醋的样品。以 20 ng/mL 加标水平, 分别为 SLE 和 LLE 执行了六次重复实验。添加了氯化钠

以提高醋样品中的离子强度。研究对比了 Chem Elut S (12 cc) 和四种市售 SLE 小柱产品 (12 cc)。在离心管中进行了 LLE。为提高萃取效率, 使用了 Geno Grinder 彻底混合样品。离心处理后, 小心地将乙酸乙酯层转移到干净的玻璃管中以避免转移部分水层, 然后用氮气进行干燥。最后, 使用 1 mL 甲醇复溶, 以用于注射。

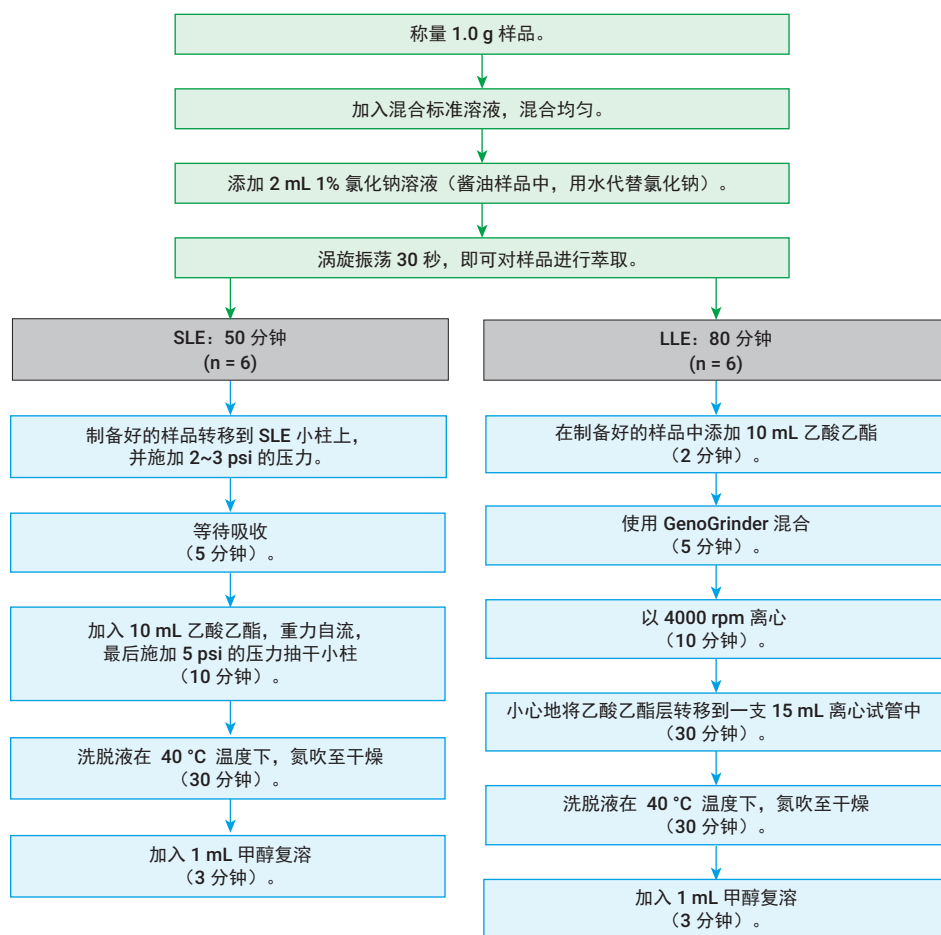


图 2. 使用 SLE 和 LLE 从酱油和醋中萃取对羟基苯甲酸酯的方案。

HPLC 条件

为了分离七种对羟基苯甲酸酯，尤其是 PP 和 iPP 两种同分异构体，我们考察了多根不同的 HPLC 色谱柱。经证实，Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP 柱比 C18 柱的分离效果更好。图 3 显示了七种对羟基苯甲酸酯的标准溶液 (20 ppb) 的色谱图，以及 LLE 后的酱油和醋基体空白样品。主要干扰物在三分钟前洗脱，在色谱分析方面并未干扰目标对羟基苯甲酸酯。

结果和讨论

SLE 与 LLE 比较

图 2 详细说明了 SLE 和 LLE 的萃取方案和处理时间。LLE 制备六个重复样品所需的总时间是 80 分钟，而 SLE 只需 50 分钟。LLE 更费时费力。采用 LLE 时，从已分层的样品中转移出有机相时，如果不小心转移了水层，可能还需要更长的干燥时间。所以，同时制备多个样品有一定难度。然而，SLE 的萃取工作流程要简单顺利得多，没有特殊注意事项，大大提高了样品萃取的效率。

图 4 显示了六个重复样品在酱油和醋中浓度为 20 ng/g 时的回收率和重现性结果。在分析物回收率 (88% 至 110%) 和重现性 (RSD<10%) 方面，LLE 和合成 SLE (Chem Elut S) 方法都能获得不错的结果。

Chem Elut S 与竞品的 SLE 比较

我们比较了 Chem Elut S 和四种市售 SLE 产品对酱油和醋中的七种对羟基苯甲酸酯分析的性能，加标水平为 20 ng/g。竞品 1、3、4 是基于 DE 的吸附剂，竞品 2 是合成 SLE 吸附剂。对于酱油来说，这几种产品的性能基本相同，但 Chem Elut S 在醋中的效果明显比其他几种要好得多，尤其对于疏水性最强的对羟基苯甲酸酯：HP。总体来说，Chem Elut S 和竞品 2 的产品略具优势 (RSD<5%)。通常，在分析 HP 时，Chem Elut S 与其他四种 SLE 产品的效果大致相同 (图 5)。

配置			
组件	Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A) Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B) Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)		
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-308)		
柱温	35 °C		
DAD 参数	260 nm		
进样量	2 μL		
流动相	A) 水 B) 甲醇		
变化梯度	时间 (分钟)	%B	流速 (mL/min)
	0	30	0.5
	1.0	45	0.5
	4.0	65	0.5
	6.0	95	0.5
	8.0	95	0.5
停止时间	10 分钟		

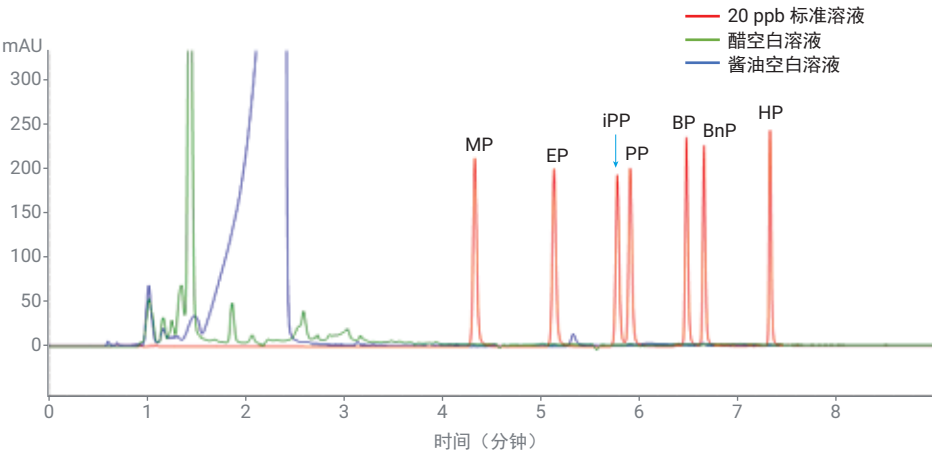


图 3.MP、EP、PP、iPP、BP、HP 和 BnP 对羟基苯甲酸酯标准溶液 (红色)、LLE 后的醋基体空白样品 (绿色) 以及 LLE 后的酱油基体空白样品 (蓝色) 的典型色谱图。

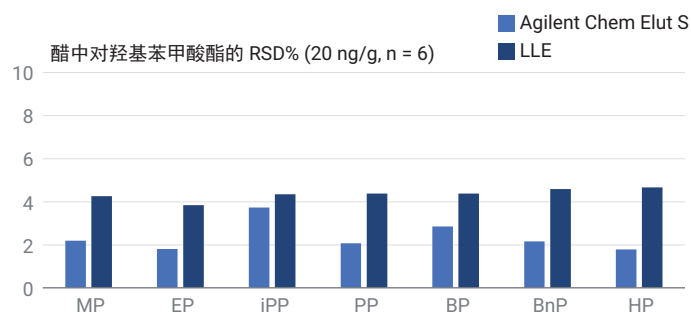
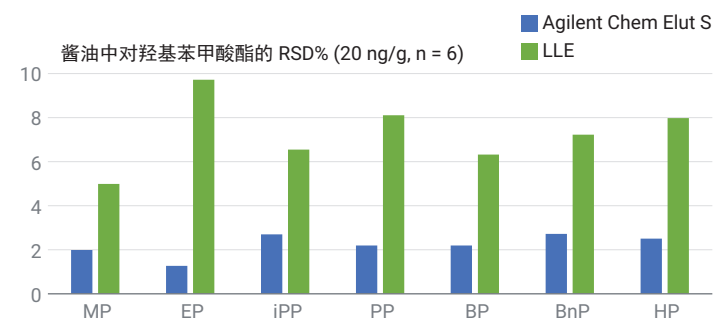
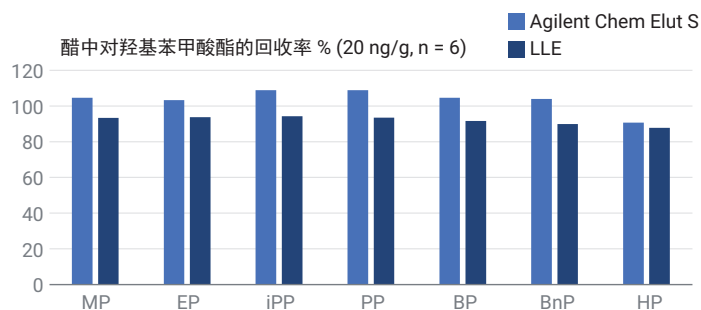
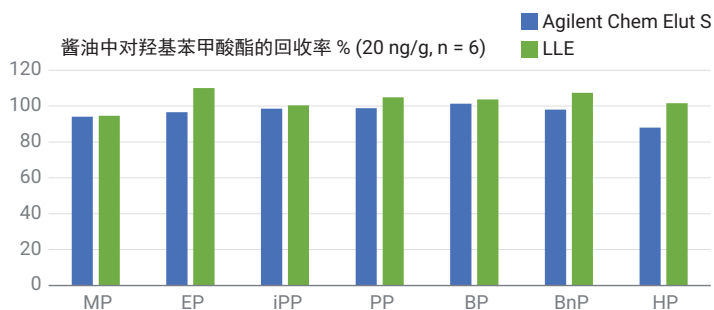


图 4.以 20 ng/g 加标水平进行的六次重复实验中, Agilent Chem Elut S 和 LLE 的回收和 RSD 结果。

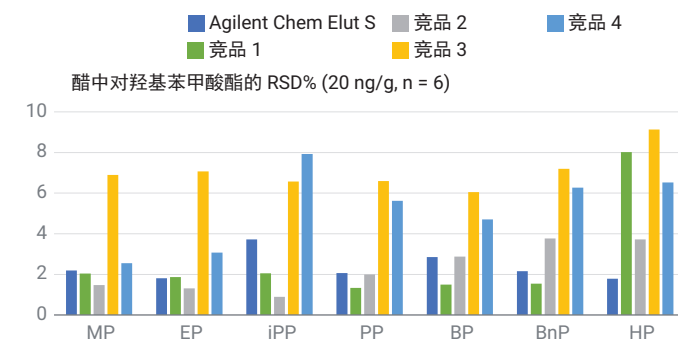
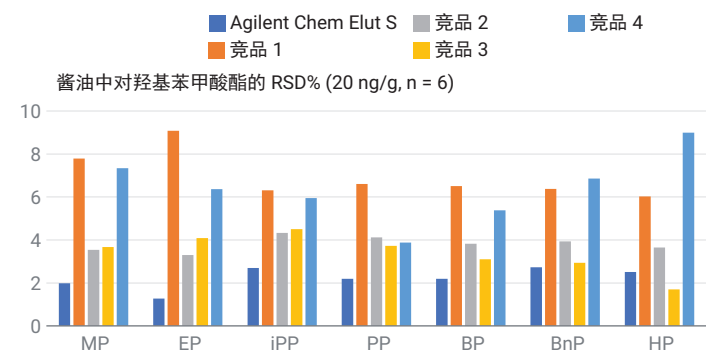
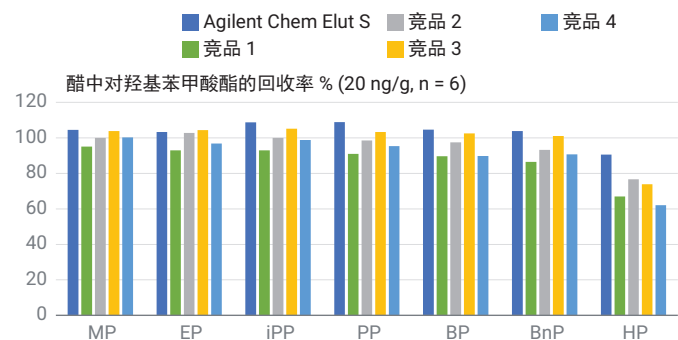
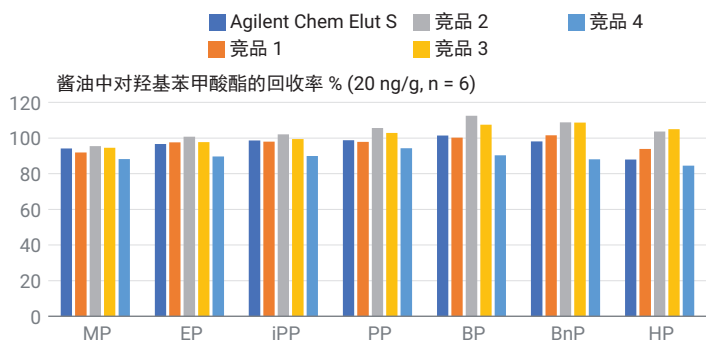


图 5.以 20 ng/g 加标水平进行的六次重复实验中, Agilent Chem Elut S 和四种竞品的 SLE 的回收率和重现性结果。

Chem Elut S 吸附剂的吸水量更高。因此，建议的样品加载量是 3 mL，是其他同规格竞品建议加载量 (2 mL) 的 1.5 倍。在同样的回收率条件下，Chem Elut S 可处理更大的样品量，从而提高了检测的灵敏度。图 6 显示了使用不同 SLE 产品进行相同样品浓度 (醋中 5 ng/g) 分析的色谱图。Chem Elut S (浅绿色) 的色谱峰响应和灵敏度最高，而且没有明显杂质干扰，但竞品 2 和 4 有明显的共萃物峰。

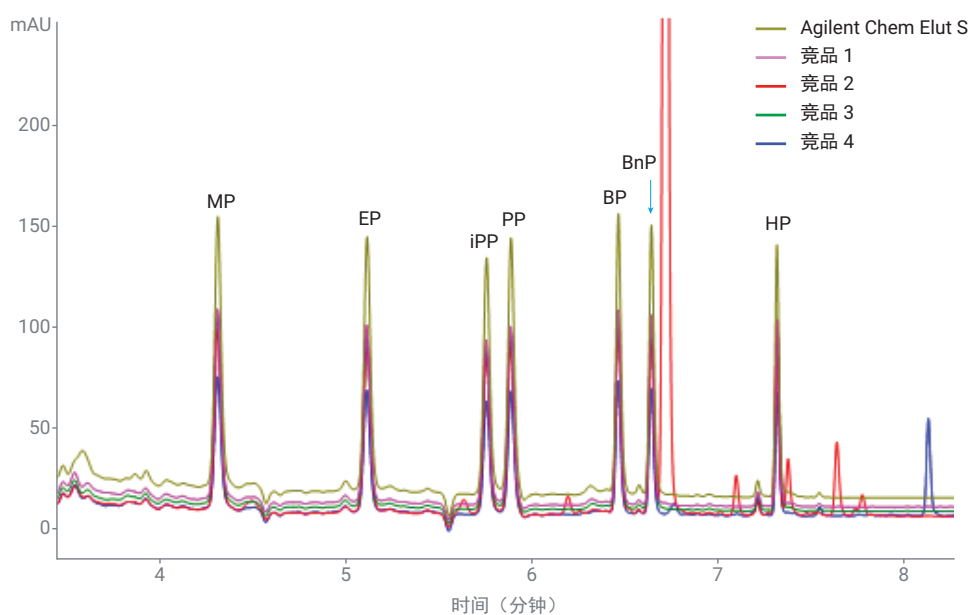


图 6.使用醋中对羟基苯甲酸酯浓度为 5 ng/g 的样品，同规格 (12 cc) 小柱的色谱比较。

在某些 SLE 产品中发现了意外污染物峰。为了确认污染源,我们用水代替样品基质,以相似方案测试了 SLE 产品的清洁度。图 7 显示了使用 UV 检测 (260 nm) 和 GC/MS 全扫描检测研究的产品清洁度结果。在 UV 检测和 GC/MS 全扫描检测中,竞品 2 (合成 SLE) 显示有比较多的来自产品本身的干扰。竞品 4 SLE 小柱也显示出干扰峰。Chem Elut S 以及竞品 1 和竞品 3 的干扰较少。在保留时间和峰高方面,UV 检测的结果与酱油和醋的对羟基苯甲酸酯分析中的干扰峰一致。这证明了干扰来自 SLE 产品,而不是食品基质。

结论

本应用采用 LLE 和 SLE,及多种 SLE 产品对酱油和醋中的对羟基苯甲酸酯的样品前处理进行了全面的对比。SLE 萃取流程简单,无乳化现象,萃取时间比 LLE 少 40%。相较于 LLE,Chem Elut S 也展现出优异的回收率和重现性,卓越的吸水性和产品的洁净度。相较于其他市售 SLE 产品,Chem Elut S 展现出相似甚至更高的精密度和回收率,尤其是对于疏水性高的分析物。最后,Chem Elut S 方法的工作流程更简单,灵敏度、重现性更高,并且产品本身不会带来多余的杂质干扰。

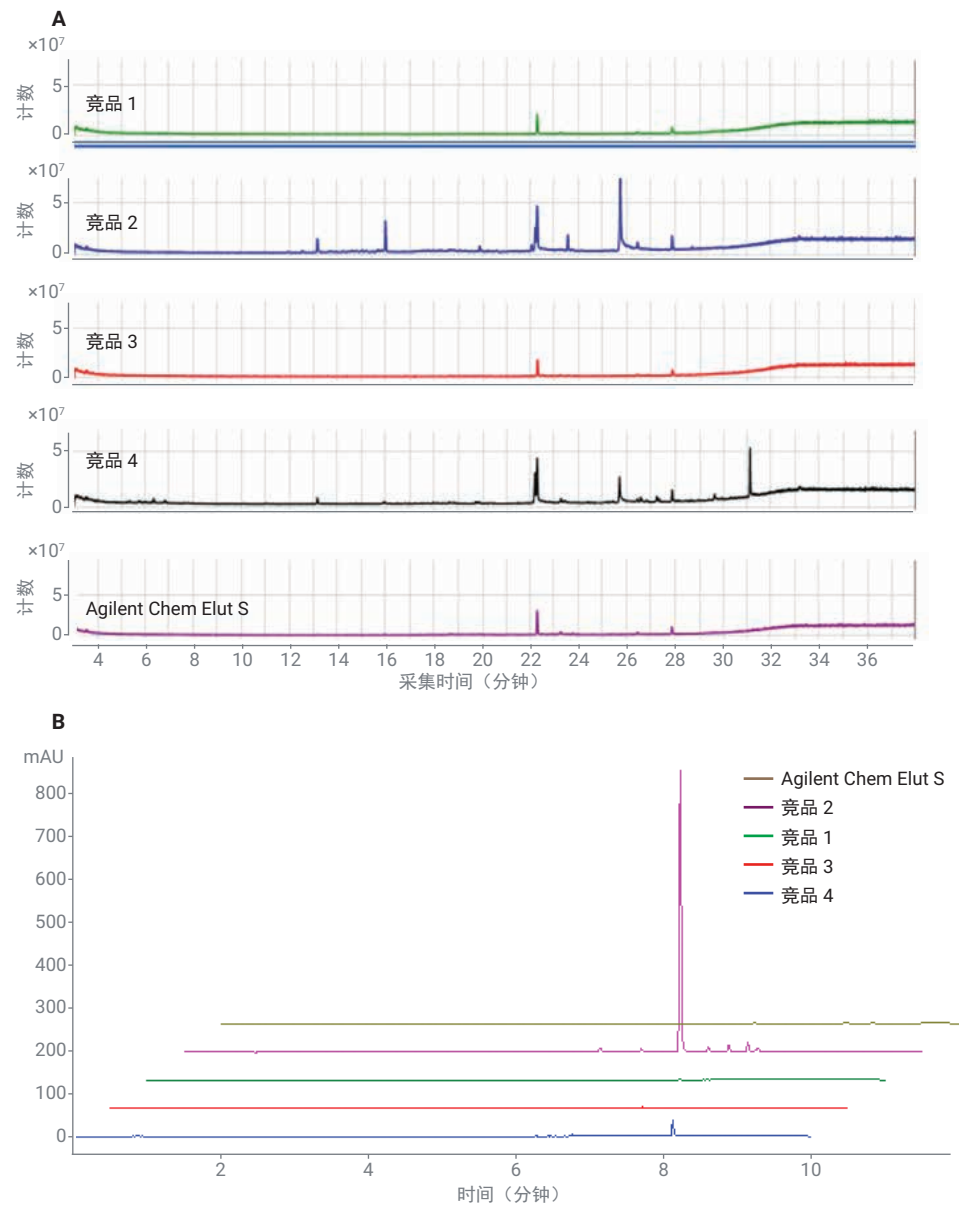


图 7.使用 GC/MS 全扫描 (A) 和 260 nm UV 检测 (B) 进行的 12 cc SLE 小柱净溶液清洁度测试。

参考资料

1. Chinese National Food Safety Standard - Determination of p-Hydroxybenzoic Acid Esters in Foodstuffs: GB5009.31-2016.
2. Zimmerman, D. C.; *et al.* Determination of Parabens in Body Wash using Solid-Supported Liquid-Liquid Extraction, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-2735EN, **2013**.

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem

本文信息如有更改，恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2019
中国印刷, 2019 年 5 月 24 日
5994-1018ZHCN