

固相萃取-离子色谱法测定甘蔗糖蜜及糖蜜酒精 废液中的非氮有机酸和无机阴离子

曹家兴¹, 杭义萍², 陆建平^{1*}, 童张法¹

(1. 广西大学化学化工学院, 广西 南宁 530004; 2. 华南理工大学化学与化工学院, 广东 广州 510640)

摘要:建立了固相萃取-离子色谱测定甘蔗糖蜜及糖蜜酒精废液中乙酸、乳酸、琥珀酸、苹果酸、酒石酸、草酸、富马酸、柠檬酸、乌头酸等非氮有机酸和盐酸根、硫酸根、磷酸根等3种无机阴离子的方法。样品稀释液经强阴离子(SAX)固相萃取小柱净化除去糖类和色素等干扰基质,再用稀KOH溶液洗脱,经0.45 μm水膜过滤后,用IonPac AS15阴离子分离柱、KOH溶液梯度淋洗-抑制电导检测分离分析。考察了固相萃取小柱对待测离子的保留和洗脱条件。实验结果表明,除乙酸和乳酸的分离不完全、苹果酸与琥珀酸的组分重叠外,其余组分可达到完全分离,被测组分的浓度与其峰高在一定的范围呈良好的线性关系,检出限均低于0.20 mg/L,相对标准偏差(RSD)小于6.7%。测定了2种甘蔗糖蜜和1种糖蜜酒精废液中有有机酸及无机阴离子,结果满足检测的要求,样品中各组分的加标回收率为94%~109%。

关键词:固相萃取;离子色谱;非氮有机酸;无机阴离子;甘蔗糖蜜;糖蜜酒精;废液

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)09-0893-05

Determination of nonnitrogenous organic acids and inorganic anions in sugarcane molasses and molasses alcohol waste by ion chromatography with solid-phase extraction

CAO Jiaying¹, HANG Yiping², LU Jianping^{1*}, TONG Zhangfa¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A method was established for the determination of main nonnitrogenous organic acids (including acetic, lactic, succinic, maleic, tartaric, oxalic, fumaric, citric, and aconitic acids) and three inorganic anions (Cl^- , SO_4^{2-} and PO_4^{3-}) in sugarcane molasses and molasses alcohol waste by ion chromatography with solid-phase extraction. The diluted sample solution was purified by strong anion exchange (SAX) solid-phase extraction (SPE) in a small packed column to remove most of sugar, pigment and other interfering matrices. The eluate obtained from the column was rinsed with diluted KOH solution and filtered through a 0.45 μm inorganic membrane, finally separated on an anion column of IonPac AS15 with the gradient elution of KOH solution and determined with a suppressed conductivity detector. The pretreatment and procedures of SPE for separating organic acids and inorganic anions from their matrix were investigated. The detection limits were less than 0.20 mg/L. The relative standard derivations were less than 6.7%. The organic acids and inorganic anions in three real samples (two sugarcane molasses samples and an alcohol waste sample) were determined, the recovery ranges were from 94% to 109%. The method shows good precision and linearity.

Key words: solid-phase extraction (SPE); ion chromatography (IC); nonnitrogenous organic acids; inorganic anions; sugarcane molasses; molasses alcohol; waste

* 通讯联系人:陆建平,博士,教授,研究方向为光谱和色谱分析。E-mail:ljianpi@hotmail.com.

基金项目:广西壮族自治区科技厅基金项目(桂科自077800616)。

收稿日期:2010-06-25

糖蜜(废蜜)中含有多种非氮有机酸和无机阴离子^[1],其含量水平对评价制糖工艺及废蜜的综合利用有重要的意义。目前常用的分析方法是反相高效液相色谱法^[2-4],但是小分子有机酸在反相高效液相色谱中的保留值较小,若采用极性较大的流动相则可能导致电离而出现峰分裂^[5]。徐远金等将毛细管电泳^[6]的若干不同模式应用于糖蜜酒精废液有机酸分析的研究^[7,8],但是尚存在检测灵敏度低或仪器联用问题,在应用上受到一定的限制。

离子色谱法不但能同时分离测定多种有机酸和无机阴离子,而且操作简单,灵敏度高,已广泛应用于多种样品的分析^[9-13]。但在制糖工业中应用不多,原因在于糖蜜的组成复杂,存在着多种导致色谱柱污染的物质,且糖类物质作为一种羟基弱酸,在强碱性的氢氧化钾(KOH)溶液淋洗体系中能部分或完全电离,导致强吸附于色谱柱上,严重影响色谱柱的柱效,缩短色谱柱的寿命。为了测定糖蜜及其发酵液中的有机酸,探索一种合适的纯化样品前处理方法显得尤为迫切。本文针对甘蔗糖厂糖蜜中的非氮有机酸和常见无机离子,建立了同时测定它们的一种可行的离子色谱方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Dionex ICS-2000 型离子色谱仪(美国戴安公司)配 EGC II KOH 淋洗液自动发生器,Chromleon 6.80 色谱工作站, IonPac AG15 保护柱(50 mm × 4 mm, 5 μm), AS15 分离柱(250 mm × 4 mm, 5 μm), ASRS-ULTRA II 4-mm 电化学自发生抑制器, DS6 恒温电导检测器。

0.45 μm 微孔滤膜、Strata™ SAX 固相萃取小柱(150 mg, 3 mL)(Phenomenex 公司)。去离子水(电导率 < 18 μS/cm)。

有机酸标准贮备液(10 g/L):分别用水稀释分析纯试剂乙酸、乳酸、琥珀酸、苹果酸、酒石酸、草酸、富马酸、柠檬酸(国药集团化学试剂有限公司)和乌头酸(Alfa Aesar 公司)等制成各单标准有机酸标准贮备液。用标准 NaOH 溶液标定其浓度,一周内使用。

无机阴离子标准贮备液(10 g/L):分别用水溶解分析纯试剂无水硫酸钠(广东省化学试剂研究开发中心)、无水磷酸二氢钠和氯化钠(国药集团化学试剂有限公司)配制。

1.2 离子色谱条件

柱温 30 ℃;进样量 25 μL;由 EGC II KOH 淋

洗液自动发生器生成 5 ~ 60 mmol/L KOH 梯度淋洗液(梯度程序见表 1);流速 1.2 mL/min;抑制器再生模式为外加水电抑制,抑制电流为 150 mA;电导检测器检测;以峰高定量。

表 1 测定非氮有机酸及 3 种无机阴离子的 KOH 溶液梯度淋洗程序

Table 1 Gradient program of KOH solution for the determination of the nonnitrogenous organic acids and the three inorganic anions

t/min	c(KOH)/(mmol/L)
0	5
13	5
13.1	30
28	30
28.1	58
46	58
46.1	5
50	5

1.3 标准曲线的绘制

分别移取有机酸及无机阴离子标准溶液,按一定的浓度比例混合,配制混合标准溶液。进样测定,以峰高 Y (μS)对质量浓度 X (mg/L)分别绘制各组分的标准曲线。

1.4 样品预处理方法

Strata™ SAX SPE 小柱预先用 2 mL 乙腈进行活化,然后用 20 mL 0.5 mol/L KOH 以 1 mL/min 流速通过小柱,最后用去离子水冲洗至流出液为中性,保存于去离子水中备用。

准确称取约 5 ~ 10 g 糖蜜样品,用去离子水溶解,稀释并定容至 100 mL。取 1 mL 糖蜜稀释液置于活化后的 SPE 柱上,控制流速为 1 mL/min,使试液慢慢流过小柱;用约 5 ~ 10 mL 去离子水冲洗小柱,将弱保留组分洗去;再用 0.1 mol/L KOH 溶液 15 mL 洗脱待分析组分,收集洗脱液于 20 mL 容量瓶中并用去离子水定容,经 0.45 μm 滤膜过滤,滤液供测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 淋洗液浓度的选择

糖蜜中含有的非氮有机酸的色谱保留性质差别很大,有弱保留的一元酸如乙酸、乳酸等,中等保留的二元酸如琥珀酸、苹果酸、酒石酸、草酸等,以及强保留的三元酸如柠檬酸、乌头酸等,因此对保留强弱不同的多种离子,若采用等浓度淋洗则会出现多种组分共同淋洗下来或强保留组分无法洗脱的现象。

本文采用 EGC II KOH 淋洗液自动发生器在线生成高纯度的 KOH 淋洗液,可以避免杂质污染,保

证淋洗液浓度的准确,最大限度地降低梯度淋洗时的基线漂移和淋洗液浓度在线变化,平衡时间短,可方便实现梯度淋洗。IonPac AS15 色谱柱具有很强的疏水性,对有机酸具有较强的保留,而且对 OH^- 也有较好的选择性,可利用 KOH 淋洗液发生器在线产生不同浓度的 KOH 溶液,从而实现梯度淋洗的准确操作。开始阶段用较低浓度的淋洗液以增加弱保留组分的分离,然后增加淋洗液浓度以缩短强保留组分的保留时间,使所考察的有机酸在一定时间内都能完全淋洗出来并满足定量要求的分离度。优化的淋洗液浓度范围和梯度程序见表 1。

2.1.2 色谱分离情况

图 1 为有机酸、无机阴离子混合标准溶液,图 2 为糖蜜样品的色谱图。从图 1 可知,在所考察的有机酸种类中,对 AS15 阴离子色谱柱而言,乙酸和乳酸的分离不完全,同时苹果酸与琥珀酸的组分峰完全重叠,而且与纯水中溶解的 CO_2 产生 CO_3^{2-} 峰干扰峰根据表中的保留时间的位置是否正确;其余有机酸组分可达到完全分离。常见的 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 等阴离子与所测定的有机酸的保留时间不同。只要待测有机酸的浓度在它们测定的线性范围内,组分间就不会产生互相干扰。与标准溶液的谱图对比,糖蜜样品的谱图中,在乳酸和乙酸前还存在更易洗脱的弱保留组分,可能是糖类的多羟基成分,在本文中未得到定性。部分组分如乳酸和乙酸峰有叠加,但是峰形很尖锐,可以以峰高作定量指标。

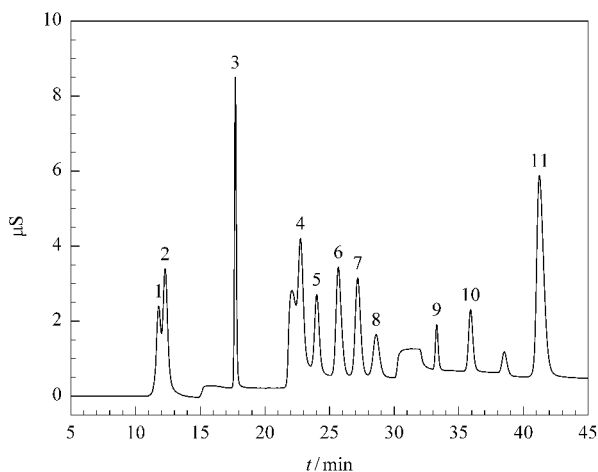


图 1 有机酸、无机阴离子混合标准溶液的离子色谱图

Fig. 1 Chromatogram of a mixture of organic acid and inorganic anion standards

1. acetic acid (10 mg/L); 2. lactic acid (16 mg/L); 3. Cl^- (5 mg/L); 4. succinic acid (10 mg/L) + maleic acid (20 mg/L); 5. tartaric acid (10 mg/L); 6. SO_4^{2-} (5 mg/L); 7. oxalic acid (10 mg/L); 8. fumaric acid (5 mg/L); 9. PO_4^{3-} (5 mg/L); 10. citric acid (10 mg/L); 11. aconitic acid (30 mg/L).

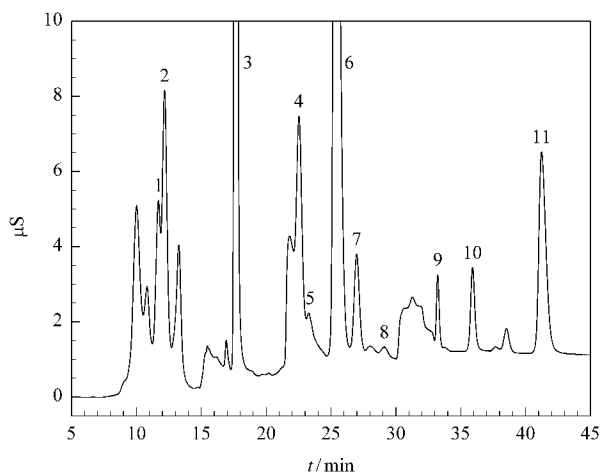


图 2 糖蜜样品的离子色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a molasses sample

1. acetic acid; 2. lactic acid; 3. Cl^- ; 4. succinic acid + maleic acid; 5. tartaric acid; 6. SO_4^{2-} ; 7. oxalic acid; 8. fumaric acid; 9. PO_4^{3-} ; 10. citric acid; 11. aconitic acid.

2.2 SPE 的洗脱及保留

糖蜜样品成分复杂,含有较多的色素、果胶质及大量的蔗糖成分^[1],这些多价羟基或酚基弱酸物质在强碱性的 KOH 淋洗体系中能部分或完全电离,进而导致强吸附于保护柱和分离柱上,严重地影响色谱柱的柱效和寿命,因此必须选择合适的前处理方法。

糖蜜中的有机酸在碱性溶液中电离呈阴离子,理论上用阴离子交换柱可将样品中的有机酸及阴离子富集,并通过适当方法洗脱。实验中采用柱床质量/柱体积为 150 mg/3 mL 的 Strata SAX SPE 小柱进行处理,其固定相是三甲基胺丙基的季铵活性基团,从该柱洗脱下来的样品对阴离子色谱柱来说是安全的。为了避免 SPE 柱的所有流出液全部进入色谱分离柱对待测组分产生干扰,将糖蜜样品上 SPE 柱后先用纯水洗去不被柱吸附的成分,再用与离子色谱淋洗液相似的条件将待测组分洗脱收集,再进样分析,这样既可避免样品强吸附组分对色谱柱的污染,又可大大减少其他组分对有机酸阴离子的干扰。图 3 显示了吸附于 SAX 固相萃取小柱上的待测有机酸和无机阴离子被 KOH 溶液洗脱的流出变化过程,上样小柱每次用 5.0 mL 0.1 mol/L KOH 溶液淋洗,连续淋洗 4 次,每次的洗脱液用去离子水定容至 20 mL 后供离子色谱分析。图 3 中标记为 Step 1 ~ Step 4 所对应曲线依次为第 1、2、3、4 次淋洗的洗脱液色谱图。显然,当用 0.1 mol/L KOH 溶液淋洗至第 3 次时,即 KOH 溶液用量为 15 mL 时能够实现待测组分的完全洗脱。

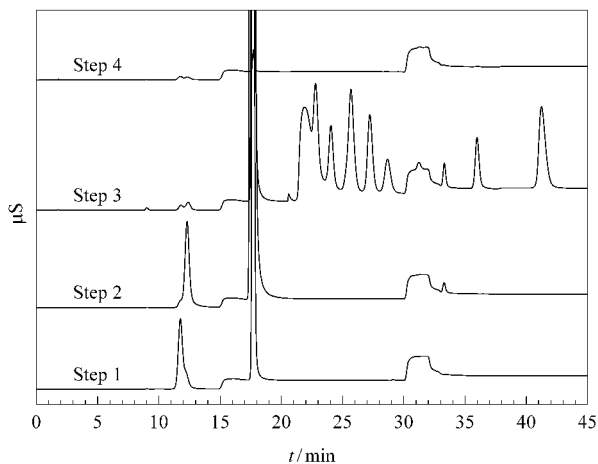


图 3 用 0.1 mol/L KOH 溶液 4 次洗脱吸附于 SAX 固相萃取小柱上的待测有机酸以及阴离子的色谱图
 Fig. 3 Chromatograms of the eluants of organic acids and inorganic anion in an SAX column by 0.1 mol/L KOH solution for four times

2.3 方法的线性范围、检出限及回收率

分别配制不同质量浓度的有机酸和无机阴离子的混合标准溶液,在上述实验条件下确定它们的线性范围,并绘制峰高 Y (μS)对组分质量浓度 X (mg/L)的标准曲线,观察样品淋洗曲线中组分峰之间基线的信号波动情况,确定该实验条件下噪声 (S_A)为 $0.01 \mu\text{S}$ 。按信噪比 (S/N)为 3 计算各组分的检出限,结果见表 2。

将糖蜜样品用水稀释后平行取 2 份,其中一份供测本底值,另一份添加一定质量浓度的混合标准溶液,做回收率实验,重复 3 次,测定结果见表 3。

2.4 样品分析

对取自广东某糖厂和台湾某糖厂的两种糖蜜和广西某糖蜜酒精发酵废液进行了有机酸和无机阴离子的分析,结果见表 4。

表 2 有机酸和无机阴离子的线性关系和检出限

Table 2 Linear relationships and detection limits (LOD) of organic acids and inorganic anions

Analyte	Linear range/(mg/L)	Linear regression equation	r	LOD($S/N = 3$)/(mg/L)
Acetic acid	1.1 - 53	$Y = -3.3773 + 5.5728X$	0.9653	0.01
Lactic acid	1.6 - 80	$Y = 0.0953 + 0.2071X$	0.9682	0.14
Cl^-	0.5 - 25	$Y = 1.3596 + 1.5382X$	0.9967	0.02
Succinic acid	1.0 - 49	$Y = -0.7646 + 0.3885X$	0.9385	0.08
Maleic acid	1.9 - 97	$Y = -0.7646 + 0.1972X$	0.9385	0.15
Tartaric acid	1.0 - 52	$Y = 0.1860 + 0.2102X$	0.9999	0.14
SO_4^{2-}	0.5 - 23	$Y = 3.1259 + 0.3661X$	0.7422	0.08
Oxalic acid	1.0 - 51	$Y = -0.0205 + 0.2651X$	0.9991	0.11
Fumaric acid	0.5 - 23	$Y = -0.0239 + 0.2599X$	0.9998	0.12
PO_4^{3-}	0.4 - 22	$Y = -0.2011 + 0.3112X$	0.9984	0.10
Citric acid	1.0 - 51	$Y = 0.0348 + 0.1578X$	0.9985	0.19
Aconitic acid	1.0 - 100	$Y = 0.0824 + 0.1363X$	0.9967	0.20

X : mass concentration (mg/L); Y : peak height (μS).

表 3 糖蜜样品中有机酸及无机阴离子的加标回收率($n = 3$)

Table 3 Spiked recoveries of organic acids in a sugarcane molasses sample ($n = 3$)

Analyte	Background/(mg/L)	Added/(mg/L)	Found/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
Acetic acid	44.71	4.90	49.69	101.6	6.0
Lactic acid	69.01	10.50	79.19	97.0	5.1
Cl^-	1042.86	16.00	1059.58	104.5	6.5
Succinic acid	35.88	9.85	46.21	104.9	3.2
Tartaric acid	7.13	10.40	17.01	95.0	3.5
SO_4^{2-}	111.11	24.60	137.09	105.6	5.3
Oxalic acid	23.96	10.10	34.02	99.6	2.6
Fumaric acid	1.04	2.00	3.22	109.3	6.7
PO_4^{3-}	10.02	4.45	14.21	94.2	4.0
Citric acid	55.87	10.20	65.67	96.0	4.3
Aconitic acid	134.65	20.52	154.60	97.2	3.8

表4 糖蜜及酒精发酵废液中有有机酸和无机阴离子组分的测定($n=3$)Table 4 Organic acids and inorganic anions contents in sugarcane molasses and molasses alcohol waste samples ($n=3$)

Analyte	Sugarcane molasses from Guangdong		Sugarcane molasses from Taiwan		Molasses alcohol waste from Guangxi	
	Content/(mg/kg)	RSD/%	Content/(mg/kg)	RSD/%	Content/(mg/kg)	RSD/%
Acetic acid	3606	6.0	2970	7.2	1500	5.1
Lactic acid	5565	4.7	4891	5.6	8864	4.8
Cl ⁻	84102	6.4	16581	7.0	50461	6.0
Succinic acid	2893	2.9	2203	3.2	1516	2.5
Tartaric acid	575	3.2	346	4.0	286	2.6
SO ₄ ²⁻	8961	5.7	9007	4.3	5376	4.0
Oxalic acid	1932	2.5	408	2.8	428	2.9
Fumaric acid	84	7.0	29	6.0	-	-
PO ₄ ³⁻	808	4.1	437	3.9	675	3.1
Citric acid	4506	4.1	3488	4.8	3829	5.0
Aconitic acid	10859	4.1	15637	3.2	486	3.1

3 结论

本文通过固相萃取方法使有机酸和无机阴离子组分与基体分离,进而以淋洗液发生器得到的高纯度 KOH 淋洗液为流动相进行梯度淋洗,结合有机酸在碱性溶液中电离呈阴离子的特性,采用阴离子交换-抑制电导进行检测,确定了最佳的梯度淋洗条件。方法快速、高效,同时分离和测定保留强弱不同的无机阴离子和有机酸,对于糖蜜等复杂样品中有机酸及阴离子的分析具有实际意义。

参考文献:

- [1] Chen W J. Sucrose Crystallization and Formation. Beijing: China Light Industry Press(陈维钧. 蔗糖结晶与成糖. 北京:中国轻工业出版社),2000:332
- [2] Yang Y, Li Q, Chen Y, et al. Food and Fermentation Industries(杨毅,李崎,陈蕴,等. 食品与发酵工业),2003,29(8):6
- [3] Gao N F, Zhang J, Han Y S. Liquor Making(高年发,张军,韩英素. 酿酒),2004,31(1):67
- [4] Chinnici F, Spinabelli U, Riponi C, et al. J Food Comp Anal,2005,18(2/3):121
- [5] Zhao J C, Guo Z A, Chang J H, et al. Chinese Journal of Chromatography(赵景婵,郭治安,常建华,等. 色谱),2001,19(3):260
- [6] Sawada H, Nogami C. Anal Chim Acta,2004,507(2):191
- [7] Xu Y J, Xu G P, Li Y K. Food and Fermentation Industries(徐远金,许桂苹,李永库. 食品与发酵工业),2005,31(9):74
- [8] Xu Y J, Xu G P, Wei Y A. Chinese Journal of Chromatography(徐远金,许桂苹,魏远安. 色谱),2006,24(1):35
- [9] Geng X M, Zhang S F, Wang Q, et al. J Chromatogr A,2008,1192(1):187
- [10] Wu F Y, Jia Z S, Zhu Y. Journal of Zhejiang University: Science Edition(吴飞燕,贾之慎,朱岩. 浙江大学学报:理学版),2006,33(3):312
- [11] Lin H Y, Lin F H, Sheng L N, et al. Chinese Journal of Chromatography(林华影,林风华,盛丽娜,等. 色谱),2007,25(1):107
- [12] Xu W, Yu G, Xue C H, et al. Food Science(徐伟,于刚,薛长湖,等. 食品科学),2008,29(4):306
- [13] Yoshikawa K, Okamura M, Inokuchi M, et al. Talanta,2007,72(1):305