

文章编号: 1000-5862(2018)04-0422-05

悬浮溶剂固化-分散液液微萃取法 提取小米中 β -胡萝卜素

王雪锋^{1,2}, 王亚丽^{1,2}, 赵文霞^{1,2}, 闫海彦¹, 曹江平^{1,2*}, 邸宏伟^{1,2}, 梁永锋^{1,2}, 解启龙³

(1. 宁夏师范学院化学化工学院, 宁夏 固原 756000; 2. 宁夏师范学院六盘山资源工程技术研究中心, 宁夏 固原 756000;
3. 中国科学院山西煤炭化学研究所煤转化国家重点实验室, 山西 太原 030001)

摘要: 建立了悬浮溶剂固化-分散液液微萃取法提取小米中 β -胡萝卜素的方法, 并用紫外-可见分光光度计测定其含量。结果表明, 最佳提取条件是: 取 4 mL 小米样品的皂化液, 用 5 mL 蒸馏水稀释到 10 mL 离心管中, 调节 pH 值为 7, 加入 NaCl 至饱和, 快速加入混匀的 200 μ L 十二醇和 200 μ L 乙腈溶液萃取, 完成后将离心管迅速置于冰水浴中静置 5 min, 用微量注射器吸出残余样品液后, 室温融化固化的萃取剂用四氢呋喃溶解并定容至 1 000 μ L。萃取完成后将提取液用紫外-可见分光光度计在波长 460 nm 处测定小米中 β -胡萝卜素含量。该方法工艺简单, 提取率高。

关键词: 悬浮溶剂固化; 分散液液微萃取; β -胡萝卜素

中图分类号: O 657 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2018.04.18

0 引言

β -胡萝卜素(β -carotene)是类胡萝卜素之一, 是自然界中稳定存在的脂溶性天然色素, 广泛分布于胡萝卜、木瓜、芒果、菠菜等果蔬中, 有抗氧化、促进新陈代谢、预防癌症等重要的生理功能^[1-3]。作为色素, 可为油炸食品及蛋白类食品如人造奶油调色。 β -胡萝卜素进入机体后, 经酶的作用转变为维生素 A, 有补肝明目的作用, 有助于增强机体的免疫力^[4], 在食品、药品、饲料等领域有着广泛的用途^[5-8]。因此, 分析检测常见食物中 β -胡萝卜素的含量对指导日常营养搭配、合理膳食有重要意义。

食品样品的基质复杂, 分析检测过程易因基质干扰问题影响测定结果^[9]。因此, 提取方法对分析检测小米中 β -胡萝卜素的含量至关重要。目前 β -胡萝卜素的提取方法主要有皂化-溶剂提取法^[10-11]、超声波辅助提取法^[12]、微波辅助提取法^[13]、快速溶剂萃取法^[14-15]、超临界流体萃取法^[16-17]、固相萃取法^[18]等。但这些 β -胡萝卜素的提取方法存在操作复杂耗时、有机溶剂用量大、能量消耗多、仪器设备

昂贵等缺点。分散液液微萃取是近年迅速发展起来的一种新型样品前处理技术, 有节省溶剂、快速准确、成本低廉等优点^[19-20]。本文通过悬浮溶剂固化-分散液液微萃取法提取小米中 β -胡萝卜素, 结合紫外-可见分光光度计测定其含量, 并将此法成功应用于小米样品 β -胡萝卜素的提取中, 方法有准确可靠、操作简捷、环保低耗等优点。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂 3 种小米样品购自当地超市, 干燥后粉碎备用。 β -胡萝卜素(分析标准品), 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 十一醇、十二醇、甲醇、乙腈、丙酮、四氢呋喃均为色谱纯; 氢氧化钾、氯化钠、盐酸、无水乙醇、抗坏血酸等其他试剂均为分析纯。实验用水为 2 次蒸馏水。

1.1.2 仪器与设备 UV-4750 型紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; DHG-9076A 型电子恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; PHS-3C 型 pH 计, 江苏江分电分析仪器有限公司; TDL80-2B 型台

收稿日期: 2017-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(21561027), 宁夏科技创新领军人才基金(KJT2016004), 宁夏师范学院校级科研(NXSFZ-DA1812, NXSFZD1715)和宁夏师范学院六盘山资源工程技术研究中心(HG18-04)资助项目。

通信作者: 曹江平(1984-), 男, 陕西陇县人, 助教, 主要从事分离分析新技术及其在食品、环境分析领域的应用研究。

E-mail: jiangpingcao@126.com

式离心机,上海安亭科学仪器厂;XMTD-204型数显式电热恒温水浴锅,昆山市仪器有限公司;FA2204B型分析天平,上海精科天美科学仪器有限公司;FW200A型高速万能粉碎机,北京科伟永兴仪器有限公司;KQ-5200E型超声波清洗器,昆山市超声波仪器有限公司;UPDR-II-20L型超纯组合高纯水制取系统,四川优普超纯科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 溶液的制备 1) 对照品溶液的制备. 准确称取 β -胡萝卜素标准品 5.0 mg, 用四氢呋喃溶解, 定容至 5 mL 的棕色容量瓶中, 得到 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -胡萝卜素储备液, 4°C 下低温保存. 分别移取 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -胡萝卜素储备液 25.0、100.0、250.0、500.0 μL , 用四氢呋喃稀释并定容至 5 mL 容量瓶中, 得浓度依次为 5.0、20.0、50.0、100.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -胡萝卜素标准系列溶液, 现用现配. 2) 工作液的制备. 取 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -胡萝卜素标准品 25 μL 于 25 mL 容量瓶中, 加入四氢呋喃溶解并定容至刻度, 即得 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液. 3) KOH 溶液的配制. 准确称取恒重的 KOH 固体 100 g, 加入 2 次蒸馏水溶解并定容于 100 mL 容量瓶中, 配成 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 KOH 溶液, 现用现配.

1.2.2 样品的制备与分析 1) 皂化. 称取 5.0 g 小米粉末于 250 mL 烧瓶中, 加入 50 mL 无水乙醇, 搅匀. 再加入 0.5 g 抗坏血酸、10 mL 浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氢氧化钾溶液, 混匀. 53°C 水浴回流 45 min, 皂化完成后立即放入冰水浴中冷却. $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 取上清液并用 2 次蒸馏水定容至 100 mL, 用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸调节 pH 值为 7. 2) 悬浮溶剂固化-分散液液微萃取. 移取 4 mL 上述皂化液于 10 mL 具塞锥底离心管中, 加入 5 mL 蒸馏水稀释, 并加入 NaCl 至饱和后, 快速加入混匀的 200 μL 十二醇和 200 μL 乙腈溶液轻摇 5 min 后离心 ($5000 \text{ rpm} \times 4 \text{ min}$), 完成后取出离心管迅速置于冰浴中静置 5 min, 用微量注射器吸出残余皂化液后室温融化固化的萃取剂, 用四氢呋喃溶解并定容至 1000 μL , 供紫外-可见分光光度计分析.

2 结果与分析

2.1 测定波长的选择

准确加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -胡萝卜素对照品溶液至比色皿刻度线, 在 200 ~ 800 nm 波长范围内进行全波长光谱扫描, 结果表明, β -胡萝卜素的最大吸收波长为 460 nm, 此结果与文献结果相近^[10-12], 故选择 460 nm 为测定波长.

2.2 SFO-DLLME 条件优化

取 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 工作液 4 mL, 加入 5 mL 蒸馏水稀释后, 按照 1.2.2 节方法进行悬浮溶剂固化-分散液液微萃取并上机测试, 用于 SFO-DLLME 条件的优化, 对比各平行条件下的回收率优化实验条件. 回收率计算公式为 $E_R = C_s V_s / (C_w V_w) \times 100\%$, 其中 C_s 是萃取完成后萃取剂中 β -胡萝卜素浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), V_s 是萃取完成后萃取剂体积 (mL); C_w 是萃取前皂化液中 β -胡萝卜素浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), V_w 是萃取前样品溶液的液体体积 (mL).

2.2.1 萃取剂种类和体积的选择 移取 4 mL 皂化液于 10 mL 具塞锥底离心管中, 加入 5 mL 蒸馏水稀释, 快速加入含有 100 μL 萃取剂的 100 μL 乙腈溶液进行萃取分析, 对比各萃取剂对应的回收率, 如图 1(a) 所示, 十二醇的萃取效果好于十一醇, 故选择十二醇为本实验的萃取剂.

萃取剂的用量对萃取效果也有明显影响, 萃取剂用量不足无法完全萃取, 萃取剂用量太多会使制备的样品液浓度低进而影响测试结果, 且容易因稀释作用损失样品液而使萃取率下降. 实验对比了 100 ~ 300 μL 不同萃取剂用量时的回收率. 结果如图 1(b) 所示, 当萃取剂加入量从 100 μL 增加到 200 μL 时, 回收率呈增加的趋势; 当萃取剂用量超过 200 μL 后, 回收率不再增加甚至减小. 可见, 萃取时加入 200 μL 萃取剂效果最佳, 因此, 本实验选择萃取剂的用量为 200 μL .

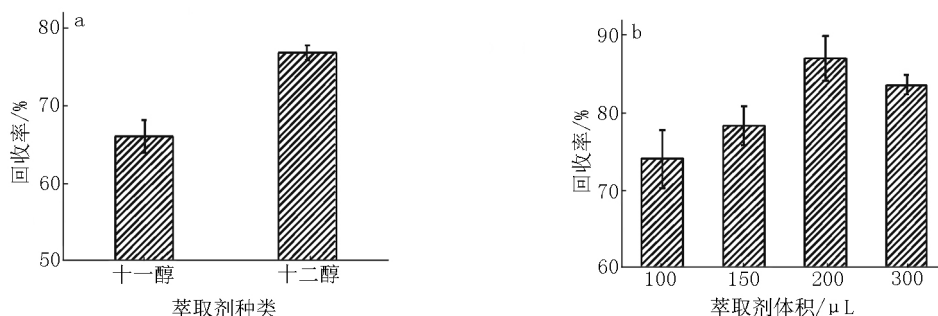


图1 萃取剂种类(a)和体积(b)的选择

2.2.2 分散剂的选择 分散液液微萃取操作一般选取可同时溶于样品和萃取剂的第 3 相——分散剂,以增加萃取率,常常用甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、四氢呋喃等作分散剂.因皂化液中含有乙醇,可作分散剂,参考文献[25],移取 4 mL 皂化液加入 5 mL 蒸馏水稀释后萃取效果较好.同时实验还考察了外加分散剂的效果,分别加入与萃取剂等体积(200 μ L)的甲醇、乙醇、乙腈、丙酮进行萃取操作,结果如图 2 所示.从图 2 可见,以乙腈作分散剂时回收率最高,故以乙腈为外加分散剂.从回收率数据可以看出,以等体积乙腈为分散剂时,回收率达到 88.3%.为方便操作,本实验选择加入等体积乙腈.

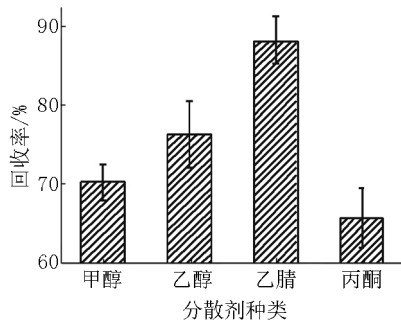


图2 分散剂的选择

2.2.3 pH 值的选择 调节样品液的 pH 值会改变分析物的存在状态,进而影响萃取率.实验选择调节皂化液 pH 值分别为 3.0、7.0、9.0 和 11.0 比较萃取率,结果如图 3 所示.从图 3 可见,皂化液 pH 值的改变对 β -胡萝卜素萃取率无明显影响,因为 β -胡萝卜素为极弱极性化合物, pH 值改变对其在溶液中

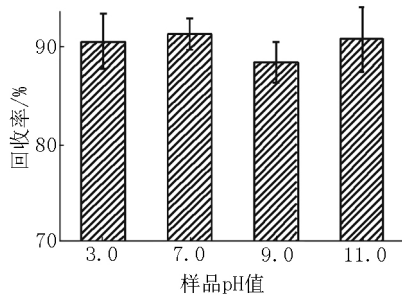


图3 pH 值的影响

存在状态影响不明显,故实验中调节皂化液 pH 值至中性.

2.2.4 离子强度的比较 加入可溶盐改变溶液的离子强度,借助盐析作用改变 β -胡萝卜素在皂化液中的溶解度.实验对比了分别加入质量分数为 5%、10%、20% 及饱和 NaCl 溶液对萃取率的影响.结果如图 4 所示.从图 4 可见,随着 NaCl 加入量的增加,回收率逐渐增加,当至饱和时达到最大,故实验中加入饱和量 NaCl 进行萃取.

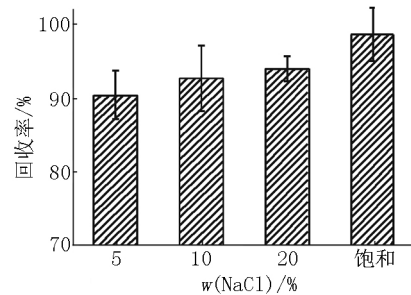


图4 离子强度的影响

2.3 线性、精密度、重现性和加标回收率

β -胡萝卜素溶液浓度在 $1 \sim 1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好,标准曲线的回归方程为 $Y = 0.1014X + 0.1215$ ($r > 0.9990$),精密度用 R_{SD} 表示为低于 4.5%.为了验证重现性,取皂化液分别做了日内和日间重现性实验,其 R_{SD} 分别为日内 1.8%,日间 5.0%.对 3 种小米样品做加标实验,结果如表 1,加标浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,加标回收率分别为 90.1% ~ 96.2% 和 95.5% ~ 103.0%, R_{SD} 为 1.4% ~ 4.5%.

2.4 实际样品分析

为检验该提取方法在实际样品中的适用性,运用该方法在最优条件下对 3 种小米样品测定,结果见表 1.3 种小米样品 β -胡萝卜素含量分别为 0.43、0.78 和 $0.52 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,从实际样品的加标回收率实验结果可看出,该法对小米中 β -胡萝卜素的提取率达到 90% 以上.

表1 样品测定结果、加标回收率

样品	含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \pm R_{SD} \% \quad n=3$)	加标量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	实测量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \pm R_{SD} \% \quad n=3$)	平均回收率/ ($\% \pm R_{SD} \% \quad n=3$)
S_1	0.43 ± 5.00	0.5	0.89 ± 4.72	92.7 ± 2.6
		1.0	1.46 ± 0.79	103.0 ± 4.1
S_2	0.78 ± 3.31	0.5	1.26 ± 2.66	96.2 ± 4.5
		1.0	1.73 ± 1.42	95.5 ± 3.9
S_3	0.52 ± 1.86	0.5	0.97 ± 4.03	90.1 ± 1.4
		1.0	1.48 ± 5.08	96.3 ± 3.5

3 结论

采用悬浮溶剂固化-分散液液微萃取法提取了小米中的 β -胡萝卜素,并以紫外-可见分光光度计测定其含量.实验得出小米中 β -胡萝卜素最佳提取条件为:皂化操作完成后,按 $v(\text{皂化液}):v(\text{水})=4\text{ mL}:5\text{ mL}$ 稀释并调至pH值为7,加入固体NaCl至溶液饱和,快速加入混匀的200 μL 十二醇和200 μL 乙腈溶液萃取,完成后取出离心管迅速置于冰浴中冷却分离,提取率达到90%以上.此法在实验过程中操作简捷,操作过程利用了液-固相利于分离的特点,方便了实验操作,且最大程度地提高了回收率.该方法工艺简单,易于操作,所用溶剂量少,萃取效率高.

4 参考文献

- [1] Roura S M D, Piedra J, Miravet S, et al. Beta-carotene reduces oxidative stress, improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in lead-exposed workers [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2014, 280(1):36-41.
- [2] 张良晨, 张锐. 胡萝卜汁中色素稳定性分析 [J]. 保鲜与加工, 2017(5):46-51.
- [3] Teng Yuning, Sheu M J, Hsieh Y W, et al. β -carotene reverses multidrug resistant cancer cells by selectively modulating human P-glycoprotein function [J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2016, 23(3):316-323.
- [4] Jin Qing, Cheng Haijian, Wan Fachun, et al. Effects of feeding β -carotene on levels of β -carotene and vitamin A in blood and tissues of beef cattle and the effects on beef quality [J]. Meat Science, 2015, 110:293-301.
- [5] 刘冬松, 邵剑钢, 韩培涛, 等. β -胡萝卜素在高原功能食品中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36(13):147-149.
- [6] Sharif H R, Goff H D, Majeed H, et al. Physicochemical stability of β -carotene and α -tocopherol enriched nanoemulsions: Influence of carrier oil, emulsifier and antioxidant [J]. Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects, 2017, 529:550-559.
- [7] 孙丽君, 林长春, 赵翔宇, 等. 响应面设计优化超临界 CO_2 抗溶剂法制备负载 β -胡萝卜素的玉米蛋白纳米粒 [J]. 食品科学, 2011, 32(8):19-23.
- [8] 余凡, 赵少丹, 葛亚龙, 等. β -胡萝卜素的提取合成分离及在饲料行业的应用 [J]. 饲料研究, 2014(7):34-39.
- [9] 周永丹, 张勇, 李存雄, 等. HPLC法同步测定谷物中的吡虫啉和辛硫磷 [J]. 江西师范大学学报:自然科学版, 2015, 39(6):566-569.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 5413.35—2010 婴幼儿食品和乳品中 β -胡萝卜素的测定 [S]. 北京:中国标准出版社, 2010.
- [11] Hosotani K, Kitagawa M. Improved simultaneous determination method of β -carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver [J]. Journal of Chromatography B, 2003, 791(1):305-313.
- [12] 张飞, 刘军, 王和平, 等. 超声波细胞破碎:高效液相色谱法定性定量分析黄骨鱼皮肤中的着色剂 [J]. 分析试验室, 2016, 35(11):1321-1325.
- [13] Chumnanpaisont N, Niamnuy C, Devahastin S. Mathematical model for continuous and intermittent microwave-assisted extraction of bioactive compound from plant material: extraction of β -carotene from carrot peels [J]. Chemical Engineering Science, 2014, 116:442-451.
- [14] 咸瑞卿, 李启艳, 刁飞燕, 等. 快速溶剂萃取:超高效液相色谱法测定螺旋藻中 β -胡萝卜素的含量 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(3):239-243.
- [15] Zaghdoudi K, Pontvianne S, Framboisier X, et al. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.) [J]. Food Chemistry, 2015, 184(5):131-139.
- [16] Bashipour F, Ghoreishi S M. Experimental optimization of supercritical extraction of β -carotene from Aloe barbadensis Miller via genetic algorithm [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2012, 72(72):312-319.
- [17] Iftikhar, Tan H J, Zhao Y P. Enrichment of β -carotene from palm oil using supercritical carbon dioxide pretreatment-solvent extraction technique [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 83:262-266.
- [18] Xu Hui, Jia Li. Capillary liquid chromatographic analysis of fat-soluble vitamins and beta-carotene in combination with in-tube solid-phase microextraction [J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877(1):13-16.
- [19] 曹江平, 邱宏伟, 周继梅, 等. 分散液液微萃取技术的研究进展 [J]. 分析测试学报, 2016, 35(7):913-921.
- [20] 曹江平, 刘世巍, 解启龙, 等. 分散液液微萃取:高效液相色谱法测定枸杞中 α -生育酚 [J]. 食品科学, 2015, 36(22):122-125.

The Extraction of β -Carotene in Millet Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Solidified Floating Organic Droplets

WANG Xuefeng^{1 2}, WANG Yali^{1 2}, ZHAO Wenxia^{1 2}, YAN Haiyan¹, CAO Jiangping^{1 2*},
DI Hongwei^{1 2}, LIANG Yongfeng^{1 2}, XIE Qilong³

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia Normal University, Guyuan Ningxia 756000, China;

2. Engineering and Technology Research Center of Liupanshan Resources, Ningxia Normal University, Guyuan Ningxia 756000, China;

3. State Key Laboratory of Coal Conversion, Institute of Coal Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Taiyuan Shanxi 030001, China)

Abstract: A novel method for the extraction and determination of β -carotene in millet has been developed by dispersive liquid-liquid microextraction combined with solidified floating organic droplets (SFO-DLLME) and ultraviolet visible spectrophotometer. The results show that the optimal parameters are diluting 4 mL of saponified solution with 5 mL water, adjusting pH = 7, adding saturated NaCl and 200 μ L 1-dodecanol (extractant) with the same volume of acetonitrile (dispersant) to the aqueous solution for extracting. After that, the centrifuge tube is immersed in an ice-water bath for 5 min, the floated organic solvent is solidified on top of the surface of the aqueous solution after a short period of time, and any liquid phase is removed using the same syringe. The solidified floating is quickly melted at room temperature and the extract is diluted to 1 000 μ L using THF. Ultimately β -carotene in the extract is determined by ultraviolet visible spectrophotometer. The advantage of the extraction method shows simplicity of the procedure, high extraction rate, which is available for the extraction and determination of β -carotene in millet.

Key words: solidified floating organic droplets; dispersive liquid-liquid microextraction; β -carotene

(责任编辑: 刘显亮)

(上接第 418 页)

The Preparation and Photoluminescence Properties of Europium Thenoyltrifluoroacetone Coordination Polymer Nanoparticles and Their Film

ZHAO Zhipeng, ZENG Chenghui, SHUAI Min, LIU Ran, ZHONG Shengliang*

(College of Chemical and Chemistry Engineering, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: Europium thenoyltrifluoroacetone coordination polymer (Eu-CP) nanoparticles have been prepared via a facile solvothermal method employing $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ as metal ion source and thiophene-formyl trifluoroacetone as organic ligand. In order to study the structure and composition of precursors, a series of characterizations of the precursors are performed and their luminescence properties are studied. In addition, a series of spin-coating films of Eu-CP nanoparticles with different raw material ratios are prepared by mixing with polymethyl methacrylate and using *N,N*-dimethylformamide as solvent. And their fluorescence intensities are compared. Furthermore, the light stability and thermal stability of the films obtained are also investigated.

Key words: coordination polymer; rare earth; thenoyltrifluoroacetone; nanoparticles; films

(责任编辑: 刘显亮)