

固相微萃取及其在食品分析中的应用

刘 源 周光宏 徐幸莲

(南京农业大学食品科技学院, 南京, 210095)

摘 要 固相微萃取(SPME)是在固相萃取(SPE)的基础上发展起来的新型萃取分离技术。该技术集采样、萃取、浓缩、进样于一体, 简便、快速、经济安全、无溶剂、选择性好且灵敏度高。文中介绍了固相微萃取的装置、原理、操作, 论述了其工作条件选择及优化以及在食品分析中的应用, 并对其前景进行了展望。

关键词 固相微萃取, 萃取分离, 食品分析, 风味

固相微萃取(solid phase microextraction, SPME)是由加拿大 Waterloo 大学 Pawliszyn 及其合作者于 1990 年提出的^[1], 由 Supelco 公司(美国)1994 年推出其商业化产品。该技术最初用于环境化学分析, 随着方法本身的不断完善及装置的改进, 现在已逐步发展到食品、医药卫生、临床化学、生物化学、法医学等领域。关于 SPME 的出版物已达 416 种, 将近 40% 是关于环境监测问题的, 食品和植物方面的应用达 20%。与传统常用的风味抽提技术如顶空技术(HS)(氮气)吹扫捕集法(NPT)固相萃取(SPE)同时蒸馏萃取法(SDE)和超临界流体萃取法(SFE)等相比, 固相微萃取简便、快速、经济安全、无溶剂、选择性好且灵敏度高, 可直接与气相色谱-质谱(GC-MS)高效液相色谱(HPLC)毛细管电泳仪(CE)等联用, 集采样、萃取、浓缩、进样于一体, 大大加快了分析检测的速度。固相微萃取技术的检出限为 $\text{ng/g} \sim \text{pg/g}$ 级, 相对标准偏差小于 30%, 线性范围为 3 ~ 5 个数量级。

1 固相微萃取装置

目前国内所用的 SPME 装置大多为美国 Supelco 公司的产品, 也有一些自制的 SPME 装置, 效果也不错, 如方瑞斌^[2]等采用自制的改性碳基 SPME 分析香水中宽范围挥发性有

机物成分, 取得了良好的结果。

SPME 装置形状类似于一个微量进样器, 很小巧, 由萃取头(fiber)和手柄(holder)2 部分构成。萃取头有 2 种类型, 一种是由一根熔融的石英细丝表面涂渍某种色谱固定相或吸附剂做成的, 另一种萃取头是内部涂有固定相的细管或毛细管, 称为管内 SPME(in-tube SPME)。萃取头长约 1 cm, 接不锈钢丝, 平时收纳于萃取头鞘以防损坏。手柄用于固定纤维头, 可连接不同的萃取头。目前用于食品分析的主要是第 1 种 SPME 装置。如图 1 所示^[1]:

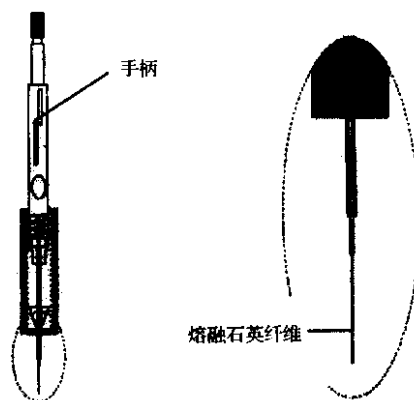


图 1 用于食品分析的 SPME 装置

2 原理及操作

固相微萃取根据有机物与溶剂之间“相

第一作者: 硕士研究生(徐幸莲为通讯作者)。

收稿时间 2003 - 03 - 02, 改回时间 2003 - 06 - 08

似相溶”的原理,利用萃取头表面的色谱固定相的吸附作用,将组分从样品基质中萃取富集起来,完成样品的前处理过程。达到吸附平衡时,由式:

$$W_f = K \times V_f \times C \quad (1)$$

W_f ——平衡时固定相中溶解的物质质量 kg;

V_f ——萃取头固定相液膜的体积 μm^3 ;

C ——萃取前物质的浓度 $\mu\text{mol/L}$;

K ——分配系数。

由式(1)可知,一旦萃取头选定, K 和 V_f 即确定,则 W_f 与 C 成正比,若加入内标物质,即可进行定量分析。

使用时,先将萃取头鞘插入样品瓶中,推手柄杆使萃取头伸出,进行萃取。萃取2种方式,1种是直接插入样品中进行萃取,即浸入方式(direct immersion, DI);另1种是将萃取头置于样品上空萃取,即顶空方式(head space, HS)。在达到或接近平衡后即萃取完成,缩回萃取头,并转移至气相色谱进样器中,推出萃取头完成解吸、色谱分析,整个过程90 min即可完成。

3 工作条件选择及优化

3.1 萃取头的选择

由不同固定相所构成的萃取头对物质的萃取吸附能力是不同的,故萃取头是整个SPME装置的核心,这包括2个方面,固定相和其厚度的选择。萃取头的选择由欲萃取组分的分配系数、极性、沸点等参数共同确定。

一般而言,挥发性越好的样品,需要的薄膜厚度越大,而薄的固定涂膜较适于半挥发性及不挥发性物质。显然厚膜可以萃取更多的物质,可有效吸附高沸点组分,但解吸所需的时间也较长。薄膜用来确保热解吸时高沸点化合物的快速解吸。膜的厚度通常在10~100 μm 之间。

按照聚合物的极性固定相涂层可分为3大类,一类为极性涂层,如聚丙烯酸酯(polyacrylate, PA)、聚乙二醇(polyethylene glycol,

PEG),适于极性化合物,已用于有机氮农药^[5]、脂肪酸^[6]、食品中香味、酚^[7~10]等的分析检测,如Calle^[10]采用85 μm PA检测了葡萄酒芳香成分,共分析出了90种物质;另一类为非极性涂层,如聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS),适于非极性和弱极性化合物,已用于有机氯、有机磷、有机氮农药,药品和麻醉品,食品中的香味、咖啡因、卤代物等的分析检测^[11],如Jun Song^[12]用100 μm PDMS检测苹果汁的挥发性风味物质,Volante^[13]用100 μm PDMS分析了马铃薯和蜂蜜中农药残留;第三类为中等极性混合型涂层,包括聚乙二醇-聚二乙烯基苯(carbowax-divinylbenzene, CW-DVB)、carboxen-divinylbenzene(CAR-DVB)、CAR-DVB-PDMS等,如Mazzini^[14]等用CAR-DVB分析橄榄油的挥发性成分,Grimm-CC^[15]等用CAR-DVB-PDMS分析大米顶空中的2-乙酰基-1-吡咯啉(被认为是爆米花香气成分的主要成分),Costa Freitas^[16]等采用2种不同的萃取头中等极性的CW-DVB和非极性的PDMS分析了咖啡中的挥发性物质。

按照萃取机理可将涂层分为2种:1种是均相的聚合物涂层,如PDMS和PA涂层,通过吸收来萃取分析组分;另1种为多孔颗粒聚合物涂层,通过吸附来萃取分析组分,如碳基涂层。

每次使用前或使用后要对萃取头进行老化处理,在250℃左右老化2h,以去除上次未被解吸掉的干扰物。如果分析物被衍生化,则老化时间要相应延长。

3.2 萃取方式的选择

SPME取样方式有2种:浸入方式(DI)和顶空方式(HS)。浸入方式适于气态样品和干净基质的液体样品,顶空方式适于挥发性好的气、液、固态样品。当分析组分主要存在于液体中时浸入方式比顶空方式更敏感,但同时萃取一些不需要的背景物质,也会减小萃取头的使用寿命,影响其重复使用效果^[1]。一般来说,顶空取样样品气体直接与萃取头

接触,易达到平衡,在食品风味分析中较多使用。与传统的顶空取样方法相比,HS-SPME 由于顶空中的分析物质被浓缩富集在固相微萃取涂层上,故检出灵敏度能提高几倍到几十倍。顶空体积的大小对检测的灵敏度、方法的精密度及萃取效率有重要影响。顶空体积增加时,萃取效率降低,据 Camarasu 的研究,顶空体积小于样品瓶体积的 $1/3$ 时,灵敏度增加但精密度降低,10 mL 的样品瓶最佳顶空体积为 3 mL^[1]。

3.3 萃取时间的确定

主要指达到或接近平衡所需要的时间。影响萃取时间的因素主要有萃取头的选择、分配系数、样品的扩散系数、顶空体积、样品萃取的温度等。萃取开始时萃取头固定相中物质浓度增加的很快,接近平衡时速度极其缓慢,但在平衡之前萃取头涂层中吸附的物质质量与其最终浓度就已存在一个比例关系,所以不必达到完全平衡^[1]。在接近平衡时即可完成萃取过程,视样品的情况不同,萃取时间一般为 2 ~ 60 min。当然延长萃取时间也无坏处,但要保证样品的稳定性。为了保证实验结果具有良好的重现性,在实验中应保持萃取时间的一致性。

3.4 萃取温度的确定

萃取温度对吸附采样的影响具有双面性,一方面,温度升高会加快样品分子运动,导致液体蒸汽压的增大,有利于吸附,尤其对于顶空固相微萃取(HS-SPME);另一方面,温度升高也会降低萃取头吸附分析组分的能力,使得吸附量下降。为了减小灵敏度的降低,可以通过一种内部冷却的装置,使样品加热的同时萃取头冷却。Zhang and Pawliszyn 采用这种装置从废水和土壤中定量萃取了苯和甲苯^[44]。对于样品而言存在着最佳萃取温度的问题,一般萃取温度为 40 ~ 90℃。

3.5 其他优化措施

(1) 搅拌。搅拌可促进样品均一化,使液态样品连续产生新鲜液面,加快分析物从样品到顶空的质量转移过程,尽快达到分配平

衡,缩短萃取时间。可采用磁力转子、高速匀浆、超声波来进行搅拌,其中超声波处理的效果最好,可以大大节约萃取时间。要注意搅拌的均匀性,不均匀搅拌会降低测定的精确度。

(2) 加无机盐。在样品中加入硫酸铵、氯化钠、碳酸钾、碳酸氢钠等无机盐可降低极性有机化合物的溶解度,产生盐析,提高分配系数,从而增加萃取头固定相对分析组分的吸附。加无机盐一般用于顶空方式,对于浸入方式加盐容易损坏萃取头。Fisher 在分析酒中污染物时加入无机盐比不加的分析结果高 25%^[11],对于挥发性较好和高分配系数的分析物则不需加无机盐,以免出现干扰峰。

(3) 调节 pH 值。改变 pH 值可以改变物质的溶解度,提高分配系数。萃取酸性或碱性物质时,通过调节样品的 pH 值可以改善组分的亲脂性,从而大大提高萃取效率。酸性物质在酸性条件下萃取更好,碱性物质在碱性条件下萃取更好。注意 pH 值不宜过高或过低,否则会影响固定相涂层。

(4) 衍生化。衍生化反应可用于减小极性化合物的极性,提高挥发性,从而增强被固定相吸附的能力。可以直接向样品中加入衍生剂,也可将衍生剂附着在萃取头固定相涂层上。

(5) 减压萃取。减压可提高挥发性物质在气相中浓度,大大提高萃取效率。如 Brunton-NF^[17]用 CAR = PDMS 萃取头分析火鸡生的和烹饪过的脯肉的顶空挥发性成分,采用减压可以获得更为有效的结果,在相同条件下比采用常压检测量多 5 倍。

(6) 微波萃取。将固态样品粉碎后加入一定量的水混合,然后微波处理。Wang 等用此法分析了马铃薯片的风味物质^[44]。

4 在食品分析中的应用

自从 SPME 的出现就有研究者采用这一技术进行食品分析。近 10 a 来,已广泛应用于食品风味、食品中农药残留、食品中有机物

的分析检测。

食品风味方面,农产品如草莓^[18]、大米^[15]、木薯产品^[19]、新鲜黄瓜^[20]、焙烤咖啡^[21]、苹果汁^[22]、橙汁^[23]挥发性风味的分析检测;酒类如葡萄酒^[10, 24, 25]、威士忌酒^[26]的风味成分分析检测;畜产品如瑞士奶酪^[9]、榛子乳酪^[27]、蜂蜜^[28]、生的和烹饪过的火鸡脯肉^[17]、干腌火腿和罐装肝肠^[29]、侗族发酵肉^[30]、烟熏香肠^[41]、煮牛肉^[42]等的风味成分分析检测;油类有橄榄油^[14, 31]、向日葵油^[32]中挥发性物质检测;调味品如芥末膏^[33]、一种叫 Mimosaceae^[34]的调味品、食用醋^[3]和大蒜^[35]风味成分分析。

SPME 在农药残留检测方面也具有极大的优势,如 Volante-M^[5]等 SPME-GC-MS 分析了蜂蜜中的农药残留,具有快速性、简便性和有效性,认为 SPME 是分析蜂蜜中残留物的有用的工具。其他如蔬菜中的农药残留^[5, 13]、果汁中苯和甲苯^[36]也有报道。

食品中挥发性有机物的分析检测,如茶和咖啡中咖啡因的含量^[37]、水果中挥发性芳香族化合物、酒中三氯甲氧基苯甲酰等芳香族化合物、熏火腿中硝基苯胺等芳香族化合物、马铃薯中有机酸、生物碱^[3]、奶酪中游离脂肪酸^[6]、禽肉和牛奶不良风味^[38, 39]的分析检测。

5 展 望

目前萃取头涂层均为非离子型,由 SPME 的原理可知,只能用于有机物质的分析。当萃取头使用离子交换涂层时,即可检测无机物,故新型萃取头将是 SPME 的研究方向。一个方面是萃取头材料的更新改进,由于熔融石英纤维有易碎的缺点,有报道用不锈钢毛细管柱来代替。新型萃取头微型吸附搅拌棒式的 SPME 即 SBSE(stir bar sorptive extraction)对目标分析物的吸附量比纤维针式高出 1~2 个数量级,主要用于食品中农药残留的富集分析,已有效地萃取奶昔、果汁、植物和动物捣碎浆液中的挥发性有机污染物^[40],对

SBSE 的改造产生了 HSSE(headspace sorptive extraction),它是一个由玻璃制造的萃取子,通过一个特殊装置置于样品顶空,解析方式和 SPME 相同。

此外一种直接萃取装置(DED)也已用于肉品检测,它采用保护装置可以直接插入固体样品中而无需样品处理^[43]。为了更有效地分析气体和挥发性差的成分,一种 SPDE 装置已经产生并商品化,它将 SPME 和静态顶空取样结合起来,将熔融的石英纤维安装在一个注射器上,当萃取头缩进注射针管时,一定量的气体通过开口的针管进入到注射器,为了减少由于萃取头探出和收缩时产生的机械损伤,可以将吸附剂涂在针管内壁。利用这种技术,通过一次注射即可分析检测大量的挥发性化合物^[44]。

另一个方面是萃取头固定相的研究,无机固定相和生物固定相可用于无机分析和生物分子分析,还有一点是与其他更多的装置联用,传统的是 SPME 与 HPLC(高效液相色谱)联用、SPME-GC-MS(气相色谱-质谱)联用,而与傅立叶变换红外光谱(FTIR)、电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)及拉曼光谱仪联用可以大大拓宽分析检测的领域,相信固相微萃取技术会有更广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Hiroyuki Kataoka, Heather L Lord, Janusz Pawliszyn. Journal of Chromatography A, 2000, 380: 35~62
- 2 方瑞斌,王 建,李 蕾等.日用化学工业,2001, 3: 54~56
- 3 赵大云,高明清.中国调味品,1999, 7: 24~29
- 4 刘俊斌.色谱,1997, 15(2): 118~119
- 5 Volante M, Galanini R, Miano V et al. Chromatographia, 2001, 54(3/4): 241~246
- 6 Wijesundera C, Drury L, Walsh T. Australian Journal of Dairy Technology, 1998, 53(2): 140
- 7 Grondin C, Guillard A. Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique et Toxicologique, 2002, 94(954): 63~68
- 8 Costa Freitas A M, Parreira C. Vilas Boas. Chromatographia, 2001, 54(9/10): 647~652
- 9 Kuen Da Jou. Dissertation Abstracts International, 1998, 58(7): 3386
- 10 Calle Garcia, Reichenbaecher, Danzer K et al. HRC, 1997, 20(12): 665~668
- 11 杨大进,方从容,王竹天.食品工业科技,1999

- (增刊):121~124
- 12 Jun Song ,Gardner B D , Holland J F et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry ,1997 45(5): 1 801 ~ 1 807
 - 13 Volante M , Cattaneo M , Bian Chi M et al. Journal of Environmental Science and Health , 1998 , B33 (3): 279 ~ 292
 - 14 Mazzini F ,Barsanti C , Saba A et al. Italian Food & Beverage Technology 2000 21 32 ~ 34
 - 15 Grimm C C ,Bergman C , Delgado J T et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry ,2001 49(1): 245 ~ 249
 - 16 Costa Freitas A M , Parreira C , Vilas Boas L et al. Chromatographia , 2001 , 54(9/10) : 647 ~ 652
 - 17 Brunton N P , Cronin D A , Aondhan F J et al. Flavour and Fragrance Journal ,2001 ,16(4):294 ~ 302
 - 18 Urruty L ,Giraudel J L , Lek S et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry , 2002 , 50 (11): 3 129 ~ 3 136
 - 19 Irovetz L ,Buchbauer G , Ngassoum M B et al. Ernährung ,1999 23(11) :461 ~ 464
 - 20 Palma Harris C , McFeeters R F , Fleming H P. Journal of Agricultural and Food Chemistry ,2001 ,49 (9) :4203 ~ 4 207
 - 21 Bicchi C ,Iori C ,Rubiolo P et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002 50(3) :449 ~ 459
 - 22 Jun Song ,Gardner B D , Holland J F et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry ,1997 45(5): 1 801 ~ 1 807
 - 23 Jordan M J ,Tillman T N , Mucci B et al. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie , 2001 , 34(4): 244 ~ 250
 - 24 Rocha S ,Ramalheira V , Barros A et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry ,2001 49(11): 5 142 ~ 5 151
 - 25 Vas G ,Koteleky K , Farkas M et al. American Journal of Enology and Viticulture ,1998 49(1): 100 ~ 104
 - 26 Lee K Y M ,Paterson A , Birkmyre L et al. Journal of the Institute of Brewing 2001 107(5) :315 ~ 332
 - 27 Saba A ,Cuzzola A , Raffaelli A et al. Italian Food & Beverage Technology 2001 23 34 ~ 36
 - 28 Guidotti M ,Vitali M. Industrie Alimentari ,1998 ,37 (368) :351 ~ 353 356
 - 29 Ruiz J ,Ventanas J. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002 49(11): 5 115 ~ 5 121
 - 30 李宗军.博士论文. 南京 南京农业大学 2002
 - 31 Bentivenga G ,D 'Auria M , Luca E et al. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse 2001 78(3): 157 ~ 162
 - 32 Keszler A , Heberger K , Gude M et al. Chromatographia ,1998 48(1/2) :127 ~ 132
 - 33 刘百战.分析化学 2000 28(12) :1 489 ~ 1 492
 - 34 Ngassoum M B , Jirovetz L , Buchbauer G. European Food Research and Technology ,2001 ,213(1):18 ~ 21
 - 35 Jirovetz L ,Buchbauer G , Ngassoum M B et al. European Food Research and Technology ,2002 ,214(3) : 212 ~ 215
 - 36 Clasadonte M T , Giuffrida R , Zerbo A et al. Rassegna Chimica , 1997 49(5) :345 ~ 352
 - 37 Guidotti M ,Panzironi L. Industrie delle Bevande 2000 , 29(170) :595 ~ 597 605
 - 38 Arnold J W ,Senter S D. Journal of the Science of Food and Agriculture ,1998 78(3) :343 ~ 348
 - 39 Marsili R T. Journal of Agricultural and Food Chemistry ,1999 47(2) :648 ~ 654
 - 40 马继平 ,王涵文 ,关亚凤.色谱 2002 20(1) :16 ~ 20
 - 41 Guillen M D , Salmeron J , Casas C. 48th ICoMST-Rome , 2002 , 2 : 812 ~ 813
 - 42 Machiels D ,Istasse L. 48th ICoMST-Rome , 2002 , 1 : 262 ~ 263
 - 43 Andres A I , Cava R , Ruiz J. Journal of Chromatography A , 2002(963) :83 ~ 88
 - 44 Pillonel L , Bosset J O , Tabacchi R. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie , 2002 35 :1 ~ 14

Solid Phase Microextraction (SPME) and Its Application in Food Analysis

Liu Yuan Zhou Guanghong Xu Xinglian

(College of Food Science and Technology , Nanjing Agriculture University , Nanjing 210095)

ABSTRACT Solid phase microextraction (SPME) is a new extraction technique which is based on the solid phase extraction (SPE). This system consists of sampling , extraction and concentration in one unit and has the advantage of simple operation , rapid analysis , low cost , safety , good resolution , high sensitivity and being free of organic solvents . The underlying principle and operation were summarized in this paper . The optimum parameters and conditions , as well as its application in food analysis were reviewed . Its future development was also discussed in this paper .

Key words solid phase microextraction (SPME) , extraction and separation , food analysis , flavour