

4-氨基安替吡啉分光光度法测定木醋液中酚类含量

石文, 张长森, 徐兴敏, 张少辉, 张瑞芹

(郑州大学 化学系 环境科学研究院 河南 郑州 450001)

摘要: 研究了 4-氨基安替吡啉分光光度法测定木醋液中酚类含量的适宜条件. 结果表明, 当稀释因子在 40~500 范围内, 放置时间为 10 min 时, 酚类化合物在 0.005~0.08 g/L 范围内与吸光度呈良好的线性关系, 相关系数 R^2 为 0.994 7. 按不同的稀释因子测定了木醋液中的酚含量, 其 RSD 为 0.38%. 测定方法的平均回收率为 99.4%, 同时对减压蒸馏预处理进行了加标实验, 其平均回收率为 96.5%.

关键词: 木醋液; 4-氨基安替吡啉; 分光光度法; 酚类

中图分类号: O 656. 3

文献标识码: A

文章编号: 1671-6841(2010)03-0093-05

0 引言

木醋液是生物质在缺氧状态下, 经高温慢速热解后, 进一步冷凝分离而得到的一种液体产物. 由于木醋液具有多种功效, 日益成为人们研究的热点. 木醋液成分复杂, 含水量 89.9%~93.97%^[1], 另外还含有羧酸、酚、醛酮、醇等多种有机物以及少量无机物. 酚类作为其中的一类物质, 在木醋液的多种用途中发挥着重要作用. 近年来, 用天然抗氧化剂替代有致癌副作用的合成抗氧化剂引起了人们的广泛兴趣, Loo 等^[2]从木醋液中分离浓缩了邻苯二酚、3-甲氧基苯酚、2,6-二甲氧基苯酚. 经研究认为从木醋液中分离出的天然酚类具有良好的抗氧化活性及清除自由基的能力. 另一方面, 在木醋液用作饮料、食品等添加剂时, 酚类物质是对人体有害的主要成分, 必须对其含量加以严格控制^[3].

无论是从木醋液中分离天然活性抗氧化剂还是用作食品添加剂, 准确测定其酚含量都十分重要. 目前酚类物质的测定有多种方法, 如气相色谱法^[4]、高效液相色谱法(HPLC)^[5]、Folin-Ciocalteu 分光光度法^[6]等. 但以上方法都存在一定的缺点, 如气相、液相色谱法对一种或几种酚类定量分析较为准确, 但对所有酚类的定量在实际应用中则受到限制. Folin-Ciocalteu 分光光度法适用于测定多酚类物质, 但极易受到还原性物质的干扰, 对于测定木醋液中的酚类物质具有一定缺陷. 本文采用 4-氨基安替吡啉分光光度法测定木醋液中的酚类含量, 为木醋液中酚类物质的测定提供了较为准确、简便的方法.

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

756CRT 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、Milli-Q 型超纯水机(美国 MILLIPORE 公司)、电子天平(Sartorius BS210S).

粗木醋液(由润迪生物质能源有限公司提供, 静置 2 个月, 原料为花生壳)、4-氨基安替吡啉水溶液(质量分数 2%)、铁氰化钾水溶液(质量分数 8%)、 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液($\text{pH}=10.7$)、苯酚(GR).

1.2 木醋液的预处理

粗木醋液含有大量焦油及杂质(如极微细悬浮碳颗粒等), 导致颜色较深常呈深咖啡色. 焦油及杂质的存

收稿日期: 2009-12-01

基金项目: 河南省科技厅资助项目, 编号 74300510015.

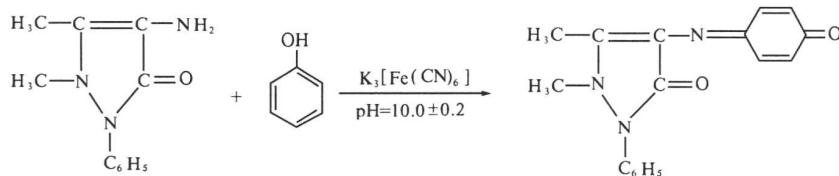
作者简介: 石文(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事生物质可再生能源的转化与利用, E-mail: shiwenky@126.com; 通讯联系人: 张瑞芹(1965-), 女, 教授, 主要从事生物质可再生能源及环境化学研究, E-mail: rzhang@zzu.edu.cn

Copyright © 2010. All rights reserved. http://www.cnki.net

在为测定酚含量带来很大困难,因此需要通过预处理脱除焦油及杂质.本实验采用减压蒸馏法脱除焦油及杂质.取 100 mL 木醋液用慢速滤纸过滤,去除固体杂质,然后将滤液在 180 °C、8~10 kPa 条件下减压蒸馏,至几乎无液滴流出时停止.初步精制后的木醋液颜色呈淡金黄色,不含焦油及杂质.

1.3 酚含量的测定

1.3.1 测定方法及原理 酚类化合物于 $\text{pH}=10.0\pm 0.2$ 的介质中,在铁氰化钾存在下,与 4-氨基安替吡啉反应,生成橙红色的吡啶酚安替吡啉染料,其显色液在 510 nm 波长处有最大吸收^[7].有关反应式为:



徐社阳等^[8]通过 GC-MS 测定木醋液成分,其中含有 14 种酚类化合物,主要为苯酚、邻苯二酚、3-甲基苯酚、2-甲基苯酚、对甲氧基苯酚等.表 1 列出了各种酚类物质与 4-氨基安替吡啉反应显色的情况.从表 1 中可知,这些酚类化合物绝大部分能与 4-氨基安替吡啉反应显色,并且在一定范围内符合朗伯-比尔定律.木醋液经过预处理及显色后,在一定条件下测定其吸光度,通过回归方程计算可得到其酚类含量.

表 1 木醋液中的酚类物质与 4-氨基安替吡啉的显色反应情况

Tab.1 Color reaction of 4-aminoantipyrine with phenols in pyrolygneous acid

编号	酚类	分子式	质量分数/ % ^[8]	与 4-氨基安替吡啉的显色情况
1	苯酚	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	3.92	显色
2	2-甲基苯酚	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$	1.21	显色
3	3-甲基苯酚	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$	2.11	显色
4	对甲氧基苯酚	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	1.81	显色
5	麦芽酚	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	0.16	不显色
6	2,4-二甲基苯酚	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$	0.41	显色
7	邻苯二酚	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	3.41	显色
8	2-甲氧基-5-甲基苯酚	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$	1.34	显色
9	3-甲基邻苯二酚	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	0.73	显色
10	对苯二酚	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	0.28	不显色
11	4-乙基-2-甲氧基苯酚	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$	0.31	显色
12	4-甲基邻苯二酚	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	1.39	显色
13	2-甲基对苯二酚	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	0.19	不显色
14	4-乙基间苯二酚	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$	0.34	显色

1.3.2 标准曲线绘制

用超纯水配制 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.08 g/L 的苯酚标准溶液各 100 mL. 从以上溶液中各取 1 mL, 然后向各溶液中依次加入 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液 0.5 mL、质量分数 2% 的 4-氨基安替吡啉溶液 1.0 mL, 摇匀, 最后加入质量分数 8% 的铁氰化钾溶液 1.0 mL. 充分混匀后, 室温下放置 10 min, 立即于 510 nm 波长处, 使用光程为 10 mm 的石英比色皿, 以超纯水作为空白, 测量吸光度(A). 绘制吸光度(A)与苯酚含量(C)的标准曲线, 回归方程为 $C=0.0313A-0.0031$, 相关系数 $R^2=0.9991$, 线性范围为 0.005~0.08 g/L.

1.3.3 样品测定

按照稀释因子 500, 250, 100, 50, 40 用超纯水稀释木醋液, 从以上溶液中各取 1 mL, 然后依次加入 0.5 mL $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液、1.0 mL 4-氨基安替吡啉溶液、1.0 mL 铁氰化钾溶液, 摇匀, 室温下放置 10 min 后立即于 510 nm 处, 使用光程为 10 mm 的石英比色皿, 以超纯水为空白, 测量吸光度(A), 通过标准曲线得到样品的酚类含量(C).

2 结果与讨论

2.1 最佳吸收波长的选择

将 0.01 g/L 的苯酚标准溶液、0.005 g/L 的木醋液分别与 4-氨基安替吡啉显色后于 450~650 nm 波长范围内扫描.结果表明,两者吸收曲线均在 510 nm 处出现最大吸收峰,并且吸收较为稳定,因此选择 510 nm 作为最佳吸收波长.

2.2 放置时间对显色稳定性的影响

取 6.6 mg/L 的木醋液与 20 mg/L 的苯酚标准溶液 1 mL,按照样品与显色液放置时间的不同,分别于波长 510 nm 处测定吸光度.木醋液与苯酚的吸光度随放置时间的变化关系见图 1、图 2.

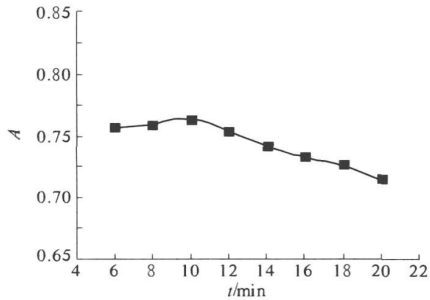


图 1 放置时间对苯酚显色液吸光度的影响

Fig. 1 Effects of standing time on phenol absorbance

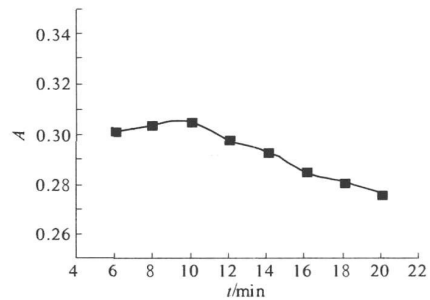


图 2 放置时间对木醋液显色液吸光度的影响

Fig. 2 Effects of standing time on pyroigneous absorbance

从以上关系曲线可以看出,随反应时间的延长,显色液吸光度先增大后减小,因此需要严格控制反应时间.放置时间为 10 min 时,吸光度较大,因此选择反应时间 10 min.

2.3 稀释因子的选择

由于木醋液样品中酚类含量过高,难以用直接显色法测定,故采用稀释的方法使木醋液中的酚类含量在 0.001~0.08 g/L 线性范围之内.通过实验发现稀释因子在 500~40 范围内时,木醋液中的酚含量在 0.001~0.08g/L 线性范围内,并且稀释因子的倒数与样品的吸光度呈良好的线性关系.按稀释因子 500, 250, 100, 50, 40 稀释木醋液,然后从以上溶液中各取 1 mL,按照 1.3.3 方法测定各样品的吸光度值,则稀释因子的倒数与吸光度关系曲线的回归方程为 $Y=105.1367X+0.1415$, $R^2=0.9947$. 样品吸光度与稀释因子倒数的关系如图 3 所示.

由于木醋液成分复杂,含有多种有机物,当稀释因子小于 40 时,待测样品中其他有机化合物(如酸、酮、呋喃等)的含量增大,这些有机化合物对酚显色反应产生较大影响,使吸光度的测定值开始偏离直线.同时,稀释因子越小,待测样品中的酚含量越高,当稀释因子过小时,显色液的吸光度值过大,超出测量范围.为了减少木醋液中其他成分对显色反应的影响以及保证测定值在线性范围内,选择稀释因子大于 40 时进行测定,结果较为可靠.当稀释因子 >500 时,尽管减弱了木醋液中其他成分对苯酚显色反应的影响,然而同时也减小了酚类物质的浓度,降低了仪器的灵敏度,增大了误差.因此,选择稀释因子在 40~500 范围内是较为准确、可靠的.

2.4 不同稀释因子下的重复性实验

取木醋液 5 份,在 500~40 范围内按照不同的稀释因子稀释木醋液,然后从以上溶液中各取 1 mL,按照 1.3.3 方法测定各样品的吸光度值,取平均值,结果见表 2.

由表 2 可知按不同稀释因子测定的木醋液其酚类平均含量为 3.40 g/L,相对标准偏差为 0.38%. 实验

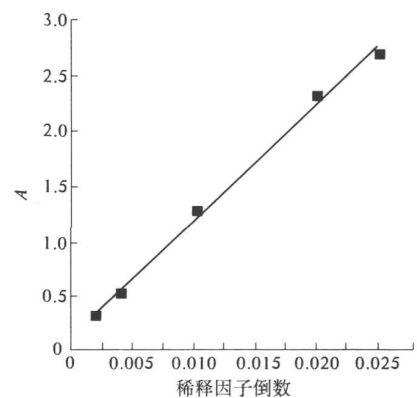


图 3 样品吸光度与稀释因子倒数的关系曲线

Fig. 3 Relation of absorbency and the reciprocal value of dilution factor

结果与 Loo 等^[9]利用 Folin-Ciocalteu 法所测的 2.47 g/L 稍有差别,原因可能是木醋液原料的不同以及实验方法的不同引起。

表2 木醋液样品测定结果

Tab.2 Determination results of pyroligneous acid

稀释因子	吸光度(A)	检测质量浓度 /(g·L ⁻¹)	样品质量浓度 /(g·L ⁻¹)	样品平均浓度 /(g·L ⁻¹)	标准偏差	相对标准 偏差/%
500	0.312	0.006 7	3.38			
250	0.533	0.013 6	3.40			
100	1.188	0.034 1	3.41	3.40	0.013	0.38
50	2.281	0.068 3	3.41			
40	2.806	0.084 8	3.39			

2.5 加标回收实验

取稀释因子 500, 250, 100, 50, 40 的木醋液 0.5 mL 于 5 mL 的容量瓶中, 然后分别依次加入 0.02 g/L 的苯酚标准溶液 0.5 mL, 再依次加入 0.5 mL NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液、1.0 mL 4-氨基安替吡啉溶液、1.0 mL 铁氰化钾溶液, 摇匀, 放置 10 min 后立即于 510 nm 处测量吸光度. 以超纯水为空白, 通过标准曲线得到样品的酚浓度. 按照加标回收率的计算公式计算回收率, 计算公式为

$$P = (c_2 - c_1) / c_3 \times 100\%$$

式中: P 为加标回收率; c_1 为试样浓度; c_2 为加标试样浓度; c_3 为加标量.

表3 木醋液加标回收实验测定结果

Tab.3 Determination results of added pyroligneous acid

稀释因子	样品质量浓度 /(g·L ⁻¹)	加标量 /(g·L ⁻¹)	总测值 /(g·L ⁻¹)	回收率 /%	平均回收率 /%
500	0.003 3	0.01	0.013 1	97.8	
250	0.006 8	0.01	0.016 6	98.0	
100	0.017 0	0.01	0.026 4	94.0	99.4
50	0.034 2	0.01	0.044 1	99.1	
40	0.042 4	0.01	0.053 2	108.3	

2.6 减压蒸馏对酚类回收率的测定

通过 GC-MS 分析可知, 木醋液中主要含邻甲氧基苯酚、苯酚、间甲基苯酚等酚类化合物, 这些酚类物质在常压下的沸点一般都低于 230 °C. 为减少预处理过程对酚类物质的损失及高温对木醋液成分的影响, 采用减压蒸馏法脱除深黑色焦油及杂质. 原木醋液经简单过滤后, 取 500 mL 木醋液于 1 000 mL 蒸馏烧瓶中, 加入 0.5 g 苯酚标准品, 在 180 °C、8~10 kPa 条件下进行蒸馏. 重复以上实验 6 次, 结果见表 4.

表4 加标木醋液减压蒸馏回收率测定结果

Tab.4 The recovery of added pyroligneous acid by vacuum distillation

m 馏分/m 原样/%	样品质量浓度 /(g·L ⁻¹)	加标量 /(g·L ⁻¹)	总测值 /(g·L ⁻¹)	回收率 /%	平均回收率 /%
92.8	3.40	1.01	4.51	110.0	
91.3	3.40	1.01	4.27	86.1	
93.6	3.40	1.01	4.36	95.0	96.5
91.5	3.40	1.00	4.42	102.0	
92.4	3.40	1.01	4.39	98.0	
91.9	3.40	1.01	4.29	88.1	

通过以上数据可知, 在 180 °C、8~10 kPa 条件下对木醋液进行减压蒸馏, 苯酚的平均回收率达到 96.5%, 实验结果表明此预处理方法可以脱除焦油及杂质, 同时可以有效回收绝大部分酚类物质.

3 结论

~0.08 g/L 范围内与吸光度具有良好的线性关系($R^2=0.9991$), 回归方程 $C=0.0313A-0.0031$. 通过稀释因子的倒数与样品的吸光度之间的线性关系, 选定稀释因子的线性范围为 40~500. 木醋液中酚含量的测定值为 3.40 g/L, 相对标准偏差为 0.38%. 为了验证测定结果, 进行了加标回收实验, 苯酚加标回收率为 99.4%, 从而验证了结果的可靠性. 同时对粗木醋液的预处理进行了加标回收实验, 平均回收率为 96.5%, 证明此预处理方法可以有效地回收酚类物质, 减少损失.

参考文献:

- [1] 周岭, 蒋恩臣, 张强, 等. 木醋液的精制方法及其在农林生产上的应用[J]. 可再生能源, 2007, 25(4): 56-60.
- [2] Loo A Y, Jain K, Darah I. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata* [J]. Food Chemistry, 2008, 107(3): 1151-1160.
- [3] 朴哲, 闫吉昌, 崔香兰, 等. 木醋液的精制及有机成分研究[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(2): 18-21.
- [4] 胡睿, 王琳玲, 陆晓华. 固相萃取-气相色谱法测定水中的酚类污染物[J]. 环境科学与技术, 2005, 28(1): 56-57.
- [5] 董瑞圣, 张立尖. 高效液相色谱法测定酚类化合物[J]. 净水技术, 2001, 20(1): 36-39.
- [6] 张丽莹. 紫外分光光度法测定水中酚[J]. 光谱实验室, 2006, 23(4): 890-892.
- [7] 吴小伟. 痕量环境水质指标分析条件的改进[D]. 南京: 南京工业大学, 2004.
- [8] 徐社阳, 陈就记, 曹德榕. 木醋液的成分分析[J]. 广州化学, 2006, 31(3): 28-31.
- [9] Loo A Y, Jain K, Darah I. Antioxidant and radical scavenging activities of the pyroligneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*[J]. Food Chemistry, 2007, 104(1): 300-307.

Determination of Phenolic Content in Pyroligneous Acid by 4-Aminoantipyrine Spectrophotometry

SHI Wen, ZHANG Chang-sen, XU Xing-min, ZHANG Shao-hui, ZHANG Rui-qin
(Research Institute of Environmental Science, Department of Chemistry,
Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: A new method is developed for the determination of phenolic content in pyroligneous acid by 4-aminoantipyrine spectrophotometry. The results indicate that dilution factor is in range of 40~500, and the reaction time is 10 min. By plotting phenols content against absorbance, a linear relationship is obtained($R^2=0.9947$). The linear range of phenols content vs absorbance is from 0.005 to 0.08 g/L. With different dilution factors, phenols content is determined in pyroligneous acid, and the relative standard deviations(RSD) is 0.38%. The average recovery rate of the sample is 99.4%, as well as the average recovery rate of added pyroligneous acid by vacuum distillation is 96.5%.

Key words: pyroligneous acid; 4-aminoantipyrine; spectrophotometry; phenolic compound