

牛奶中三价铬和六价铬的同时提取和检测方法

李 静, 王 雨, 陈华宝, 梁立娜*
(戴安中国有限公司应用研究中心, 北京 100085)

摘 要: 建立牛奶中三价铬和六价铬的同时提取和测定方法。前处理过程中一次完成六价铬的提取、有机铬中三价铬的释放、三价铬柱前衍生以及牛奶蛋白沉降。铬的提取效率高, 牛奶基体去除效果好, 操作简单方便。使用 IonPac CS5A 色谱柱可以在 8min 内完成牛奶中两种铬的价态分析, 三价铬和六价铬分别以 PDCA 和 DPC 作为络合剂, 分别在紫外和可见波长下采用 UV-Vis 检测器进行检测, 灵敏度高, 基体干扰小。为牛奶的质量检测提供了准确实用的方法。

关键词: 三价铬; 六价铬; 离子色谱; UV-Vis 检测; 牛奶质量检测

Simultaneous Extraction and Determination of Chromium () and Chromium () in Milk

LI Jing, WANG Yu, CHEN Hua-bao, LIANG Li-na*
(Application Research Center, Dionex China, Beijing 100085, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous extraction and determination of chromium () and chromium () in milk. One pretreatment process was required for chromium () extraction, the release of chromium () from organic chromium, chromium () pre-column derivatization and milk protein sedimentation, which exhibited simplicity, convenience and high extraction efficiency of chromium. The separation of chromium () and chromium () was achieved on an IonPac CS5A column within 8 min. Chromium () and chromium () were chleated with PDCA and DPC and were detected with a UV-Vis detector at UV and visible wavelengths, respectively. This work provides an accurate and practical method for milk quality evaluation.

Key words: chromium (); chromium (); ion chromatography; UV-Vis detection; milk quality testing

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)10-0250-04

日前, 某乳业公司多批次牛奶中被检出一种名为“皮革水解蛋白粉”的物质, 该物质的生产原料是制革厂的边角废料, 由于制革过程中需要大量的三价铬作为铬鞣剂^[1], 因此皮革水解蛋白即使经过脱铬处理也会存在一定量的重金属铬^[2-3]。这些铬主要以 Cr() 和 Cr() 的形态存在, 六价铬具有很强的毒性, 可干扰重要的酶体系, 具有致癌和诱发基因突变的作用^[4-5]。三价铬是人体的一种必需微量元素, 在正常食品补给剂量下, 三价铬是无毒的^[6], 但较高剂量的三价铬仍表现出细胞毒性反应, 长期的累积毒性还有待于进一步的研究^[7]。由于三价铬和六价铬可以通过氧化还原作用相互转化^[8], 并且都具有一定毒性, 因此对于含“皮革水解蛋白粉”的乳制品, 同时检测其中三价铬和六价铬的含量具有重要意义。

原子吸收和发射光谱等方法只能检测铬的总量; 直接分光光度法检测时两种铬精确度难以保证。有文献报道用离子色谱分离, UV 或电感耦合等离子体质谱同时检测三价铬和六价铬^[9-10], 用 UV 检测的方法中六价铬没有经过络合, 因而灵敏度较低。本方法中对三价铬和六价铬分别进行柱前和柱后衍生, 并分别在紫外和可见波长条件下采用 UV-Vis 检测器进行检测, 以提高两种铬的检测灵敏度。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

牛奶 市售。

吡啶-2,6-二羧酸(PDCA, 纯度 99%) Aldrich 公司; 1,5-二苯卡巴肼(DPC, 分析纯) 新中化学厂;

收稿日期: 2009-07-04

作者简介: 李静(1982—), 女, 硕士, 研究方向为离子色谱分析。E-mail: lijing@dionex.com.cn

*通信作者: 梁立娜(1976—), 女, 博士, 研究方向为液相及离子色谱分析。E-mail: lianglina@rcees.ac.cn

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (分析纯) 国药集团; $\text{NaI} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (优级纯) 津科精细化工; $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (分析纯) 北京化学试剂公司; LiOH (56%) ACROS 公司; 甲醇(色谱纯)、硫酸(95%~98%)、硝酸(65%~68%)均为优级纯 北京化工厂; $\text{Cr}(\text{III})$ 、 $\text{Cr}(\text{VI})$ 标准试剂 百灵威公司; 超纯水(电阻率 $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$); $0.22\mu\text{m}$ 尼龙滤膜 天津贺世科技发展有限公司。

ICS-3000 离子色谱仪、Ultimate 3000 可变波长紫外可见检测器、PC-10 柱后衍生装置、 $375\mu\text{L}$ 编结反应管、OnGuard RP 前处理柱(1.0mL) 美国 Dionex 公司。

1.2 色谱条件

色谱柱: IonPac CS5A($4\text{mm} \times 250\text{mm}$) 分析柱、IonPac CG5A($4\text{mm} \times 50\text{mm}$) 保护柱; 淋洗液: 2mmol/L PDCA、 2mmol/L Na_2HPO_4 、 10mmol/L NaI 、 50mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 、 2.8mmol/L LiOH 混合水溶液; 衍生试剂: 2mmol/L DPC、 10% (V/V) 甲醇、 2.5% (V/V) 硫酸; 淋洗液流速: $1.0\text{mL}/\text{min}$; 衍生液流速: $0.5\text{mL}/\text{min}$; 检测波长: $0 \sim 4.3\text{min}$ 、 365nm ($\text{Cr}(\text{III})$ 检测波长), $4.3 \sim 8\text{min}$ 、 530nm ($\text{Cr}(\text{VI})$ 检测波长)。

1.3 溶液配制

1.3.1 淋洗液储备液的配制

配制 20mmol/L 吡啶-2,6-二羧酸(PDCA)、 20mmol/L Na_2HPO_4 、 100mmol/L NaI 、 500mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 和 28.0mmol/L LiOH 混合水溶液。PDCA 溶解速度较慢, 可略微加热促进其溶解, 所有溶质完全溶解后真空抽滤, 滤去不溶性杂质。

1.3.2 淋洗液的配制

将 100mL 淋洗液储备液用超纯水稀释到 1L , 稀释后淋洗液的 pH 值应在 $6.70 \sim 6.80$ 之间。

1.3.3 柱后衍生液的配制

将 0.5g 1,5-二苯卡巴肼(DPC)溶解在 100mL 甲醇中。在约 500mL 去离子水中加入浓硫酸 25mL 。将上述两种溶液混合, 并用超纯水准确定容至 1L , 所得溶液真空抽滤, 滤去不溶性杂质。

1.3.4 三价铬和六价铬混合标准溶液的配制

取 1000mg/L 的三价铬标准溶液 1.0mL , 1000mg/L 的六价铬标准溶液 0.1mL , 置于同一个 50mL 的容量瓶中, 用超纯水稀释至刻度, 该溶液中三价铬质量浓度为 20mg/L , 六价铬质量浓度为 2mg/L 。

分别取上述溶液 0.025 、 0.05 、 0.1 、 0.25 、 0.5 、 1.0 、 2.5 、 5.0mL 于 8 个 10mL 容量瓶中, 再分别加入 1mL 淋洗液储备液, 煮沸 1min , 溶液体积较少时, 可加入 1mL 超纯水以免煮干, 冷却后定容至刻度, 获得两种铬的混合标准溶液系列。

1.3.5 样品溶液的制备

在一个 50mL 容量瓶中, 按顺序加入牛奶或牛奶加标样品 0.5mL , 超纯水 4.5mL , 淋洗液储备液 5mL , 33% 硝酸 0.1mL , 煮沸 $2 \sim 3\text{min}$, 冷却定容后过 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜和 OnGuard RP 前处理柱, 流出液弃去前面的 3mL , 收集后面流出液用于进样。

2 结果与分析

2.1 分离条件和检测波长的选择

利用吡啶二羧酸铬($\text{Cr}(\text{III})$ -PDCA)的紫外吸收和二苯卡巴肼铬($\text{Cr}(\text{VI})$ -DPC)在可见光区的吸收来进行检测。由于三价铬的配位交换的动力较弱, 所以需要进行柱前衍生生成 $\text{Cr}(\text{III})$ -PDCA, 进样后在分析柱中以 $\text{Cr}(\text{PDCA})_2^-$ 的形式被分离, 而六价铬则以铬酸根离子(CrO_4^{2-})的形式被分离出来。在分离之后再采用柱后衍生生成 $\text{Cr}(\text{III})$ -DPC, 两种物质在不同波长处进行检测。

本实验中三价铬的检测波长为 365nm , 这虽不是三价铬的最大吸收波长, 但在该波长处检测可以有效避免牛奶基体对三价铬检测的干扰。

两种铬的标准品分离谱图和牛奶加标样品分离谱图见图 1 和图 2。由图 2 可见, 牛奶基体对两种铬的检测都没有干扰, 分析快速准确。

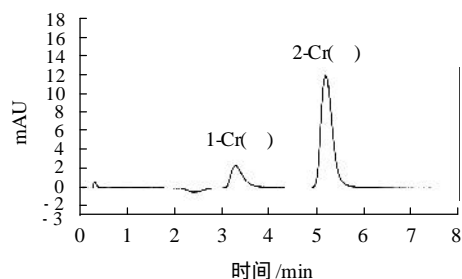


图1 三价铬和六价铬标准品分离谱图

Fig.1 Chromatogram of mixed chromium (III) and chromium (VI) standards

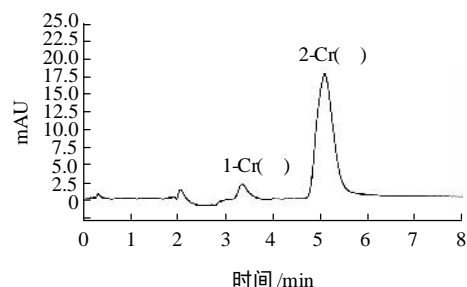


图2 牛奶加标样品分离谱图

Fig.2 Chromatogram of a spiked milk sample

2.2 前处理方法的研究

文献报道中三价铬和六价铬的检测基体一般为电镀废液、制革废水等, 三价铬和六价铬都以游离的离子

状态存在。而牛奶中的三价铬会与蛋白质上的羧基发生键合反应生成有机铬^[2,6],因此在沉降蛋白之前需要将三价铬释放出来。PDCA是三价铬的络合剂,将牛奶稀释10倍后,与等量的淋洗液储备液混合并加热,淋洗液储备液中的PDCA就可以与三价铬结合,以离子形式存在于溶液中,这个过程也同时完成了三价铬的柱前衍生,铬酸根离子由该溶液同时提取。加入淋洗液储备液之后,再加入少量的硝酸,煮沸,牛奶中的蛋白会发生沉降,将该溶液定容到一定体积后,经过0.22 μm滤膜和On Guard RP前处理柱就可以获得澄清的溶液。

2.3 线性范围、相关系数、最小检出限

采用1.3.4节中制备的标准溶液,分别对三价铬和六价铬8个浓度的标准溶液进样,考察三价铬和六价铬在0.05~10mg/L和0.005~1mg/L内质量浓度与峰面积的线性关系,两者的线性方程分别为 $y = 1.3965x - 0.003$ 和 $y = 82.6474x - 0.012$ [其中, y 为峰面积, x 为组分的质量浓度/(mg/L)],相关系数均为0.9999。

以信噪比3:1为检出限,三价铬和六价铬的最小检出质量浓度分别为23.3 μg/L和0.4 μg/L。以信噪比10:1为定量限,三价铬和六价铬的最小定量质量浓度分别为77.5 μg/L和1.3 μg/L。

2.4 方法重现性

取三价铬和六价铬质量浓度为0.5mg/L和0.05mg/L的混合标准溶液,连续进样6次,测得峰面积相对标准偏差(RSD)分别为2.3%和1.1%。

2.5 样品分析和回收率

为了考察本方法对实际牛奶样品的分析效果,检测了市场上购买到的几种纯牛奶,均不含有三价铬和六价铬,故需向牛奶中添加一定量的三价铬和六价铬,进行加标回收率测定。选择某品牌纯牛奶,向其中加入一定量的三价铬标准溶液,加标回收率见表1。三价铬的回收率良好,该方法对三价铬的测定准确可靠。

表1 三价铬加标回收率

Table 1 Recoveries for chromium () in a commercial milk sample (neither chromium () and chromium () detected) spiked at 3 levels

样品	加入水平/(mg/L)	测定值/(mg/L)	回收率/%
1	0.2	0.2053	102.7
2	0.4	0.3857	96.4
3	0.8	0.7821	97.8

在5mL ($V_{\text{牛奶}}$)牛奶中加入一定体积($V_{\text{加}}$)的1000mg/L ($C_{\text{Cr 标}}$)的六价铬标准溶液,按照1.3.5节的前处理方法和1.2节的色谱条件进行分析,加标回收结果见表2。可见,实测值($c_{\text{实}}$)与添加水平($c_{\text{加}}$)不相等,其差值接近一个恒定的数值($c_{\text{差}}$)。由于六价铬的定量限可达0.0013mg/L,因此加入水平为0.04mg/L时,应该就可以

检测到一个比较高的色谱峰,但在加标回收实验中根本检测不到六价铬,却检测到了三价铬,其他加标水平中三价铬的检出量基本等于六价铬的减少量。这是因为牛奶中存在一些天然的还原性物质^[11],会使六价铬定量的还原为三价铬,如果设这种还原性物质的质量浓度为 a (mg/L),通过下式可以计算出 a 值,其值也接近一个常数。

$$(V_{\text{加}} \times c_{\text{Cr 标}}) - (a \times V_{\text{牛奶}}) = c_{\text{差}} \times V_{\text{牛奶}}$$

表2 5mL牛奶中六价铬加标回收数据

Table 2 Recoveries for chromium chromium () in 5 mL of a blank milk sample spiked at 5 levels

项目	1	2	3	4	5	6
$V_{\text{加}}/\text{mL}$	0	0.020	0.040	0.050	0.100	0.120
$c_{\text{加}}/(\text{mg/L})$	0	0.040	0.080	0.100	0.200	0.240
$c_{\text{实}}/(\text{mg/L})$	0	0	0.027	0.042	0.135	0.186
$c_{\text{差}}/(\text{mg/L})$	0	0.04	0.053	0.058	0.065	0.054
$m_{\text{差}}/\mu\text{g}$	0	0.20	0.264	0.290	0.324	0.271
$a/(\text{mg/L})$	—	—	5.27	5.79	6.47	5.42
三价铬质量浓度/(mg/L)	0	0.0239	0.050	0.053	0.051	0.049

注:—由于未加入六价铬或六价铬加入浓度未能使所有还原性物质发生反应,因而无法计算 a 值。给出三价铬浓度有助于说明六价铬与三价铬的转化问题,但表中三价铬的浓度低于定量限,可能与实际浓度存在偏差。

为了进一步证明牛奶中还原性物质的存在,以及它对六价铬的影响,在所有前处理方法和检测方法不变的情况下,向2.5mL牛奶中添加六价铬标准溶液,那么2.5mL牛奶使六价铬的减少质量($m_{\text{差}}$)应为5mL牛奶的一半,加标回收数据见表3。

表3 2.5mL牛奶中六价铬加标回收数据

Table 3 Recoveries for chromium chromium () in 2.5 mL of a blank milk sample spiked at 5 levels

项目	1	2	3	4	5	6
$V_{\text{加}}/\text{mL}$	0	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
$c_{\text{加}}/(\text{mg/L})$	0	0.08	0.12	0.16	0.20	0.24
$c_{\text{实}}/(\text{mg/L})$	0	0.0096	0.0540	0.0999	0.1374	0.1706
$c_{\text{差}}/(\text{mg/L})$	0	0.0704	0.0660	0.0601	0.0626	0.0694
$m_{\text{差}}/\mu\text{g}$	0	0.176	0.165	0.150	0.157	0.174
$a/(\text{mg/L})$	—	7.04	6.60	6.01	6.26	6.94
三价铬质量浓度/(mg/L)	0	0.0509	0.0574	0.0432	0.0471	0.0647

由表3可见,2.5mL牛奶中六价铬的减少量($m_{\text{差}}$)近似为5mL牛奶减少量的一半,并且计算得到的 a 值也近似相等。证明了六价铬的回收率降低是由牛奶中还原性物质引起的,进一步的实验数据显示,不同品牌牛奶中该还原性物质的浓度可能有较大差别。

本方法使用的牛奶均为不添加任何抗氧化剂的纯牛奶,还原性物质是牛奶中天然存在的,但牛奶中人为添加的还原性物质同样可以使六价铬转化为三价铬。因此添加了皮革水解蛋白的牛奶,必须同时检测其中三价

铬和六价铬的含量, 所得数据才能比较正确地反映牛奶中六价铬的加入量。

但是有些配方奶粉中确实添加了三价铬作为有益微量元素, 这时是否检测到六价铬是牛奶中三价铬来源的判断依据, 因此需要对三价铬和六价铬进行分别检测。本方法对六价铬的检出限很低, 只要检测到六价铬, 就可以对三价铬的来源进行判断。同时正常牛奶中含三价铬 $5 \sim 16 \mu\text{g}/\text{kg}^{[12]}$, 如果检测到三价铬含量异常升高, 也应对三价铬来源进行进一步确认。

3 结 论

本实验建立了一种牛奶中三价铬和六价铬的同时提取和测定方法, 前处理方法高效简单快速, 检测方法灵敏准确, 并且应用该方法对牛奶中三价铬和六价铬的存在方式, 以及与牛奶中物质的相互作用等方面进行了系统的研究。结果表明对于添加皮革水解蛋白的牛奶, 需要同时检测三价铬和六价铬的含量, 并给出了判断三价铬来源的依据。为牛奶的质量检测提供了准确实用的方法。

参考文献:

- [1] 赵勇. 皮革中六价铬的成因及预防[J]. 中国皮革, 2005, 34(7): 11-14.
- [2] 刘华晖, 卿宁. 含铬皮革固体废弃物的回收及利用现状[J]. 中国皮革, 2008, 37(15): 23-27.
- [3] 徐海燕, 曹斌, 吕明霞, 等. 皮革蛋白粉中总六价铬的紫外分光光度法测定[J]. 饲料博览, 2005(9): 38-39.
- [4] 许春树. 皮革中六价铬的研究进展评述[J]. 西部皮革, 2005, 27(6): 15-20.
- [5] 考庆君, 吴坤, 邓晶, 等. 三价铬和六价铬对大鼠长期慢性毒性的比较[J]. 病变·畸变·突变, 2007, 19(6): 474-478.
- [6] 李静萍, 杜亚利. 铬对人体的作用[J]. 甘肃科技, 2003, 19(12): 118-119.
- [7] 莫民帅, 钟才高, 谢锦尧, 等. 三价铬与六价铬化合物对L-02肝细胞毒性的比较[J]. 实用预防医学, 2005, 12(1): 41-43.
- [8] 于义. 解决六价铬问题的技术手段[J]. 北京皮革: 中外皮革信息版, 2006(5): 94-96.
- [9] 朱岩, 朱利中. UV检测液相色谱法同时测定三价铬和六价铬[J]. 分析仪器, 1997(4): 50-53.
- [10] 朱敏, 林少美, 姚琪, 等. 离子色谱-电感耦合等离子体质谱联用检测尿样中的三价铬和六价铬[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2007(3): 326-329.
- [11] 郭锡熔, 陈荣华, 王福德. 市售牛奶与母乳抗氧化状态的比较[J]. 中国优生优育, 1995, 6(2): 52-53.
- [12] 刘学剑. 铬的生物学功能及其在奶牛生产中的应用[J]. 中国奶牛, 1999(1): 26-28.