HPLC-ICP-MS 测定乳制品中的三价铬和六价铬

胡玉军，覃毅磊，赖毅东

（广东省东莞市质量监督检测中心，广东东莞 523808）

摘要：建立了高效液相色谱仪（HPLC）与电感耦合等离子质谱仪（ICP-MS）联用同时测定乳制品中的三价铬和六价铬的方法。样品在 EDTA 缓冲液中煮沸，冷却后在离心机中以 8000 r/min 离心 10 min 沉降蛋白质，取清液用 0.45 μm 滤膜过滤，就完成了三价铬和六价铬的同时提取。以 NH_4NO_3 为流动相（pH=7.0~7.2），流速为 0.6 mL/min，使用 HPLC-ICP-MS 仅需 4 min 就完成了提取液中三价铬和六价铬的分离和测定。本文着重分析了各种前处理条件对测定结果的影响。EDTA 加入量要过量以消除钙、镁等元素的影响；煮沸能显著加快 EDTA 与三价铬的络合速度，但时间不能过长，以 2~3 min 为宜；pH 值在 7.0~7.2 时两种形态的铬回收率高，分离效果好。实验表明，三价铬和六价铬的线性范围在 0.2~20 μg/L，相关系数均大于 0.9995，检出限分别为 0.034 μg/L 和 0.066 μg/L。本方法操作简单，灵敏度高，准确性和精密度好。

关键词：液相色谱；电感耦合等离子体质谱；联用；乳制品；三价铬；六价铬

文章篇号：1673-9078(2014)4-301-305

Determination of Chromium (Ⅲ) and Chromium (Ⅵ) in Dairy Products by HPLC-ICP-MS

HU Yu-jun, QIN Yi-lei, LAI Yi-dong

(Guangdong Dongguan Quality Supervision Testing Center, Dongguan 523808, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of chromium(Ⅲ) and chromium(Ⅵ) in dairy products by high performance liquid chromatography(HPLC) coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry(ICP-MS). The sample was boiled in EDTA buffer solution, cooled down and centrifuged at 8000 r/min for 10 min to separate the protein. Then the supernatant was filtrated through 0.45 μm filter membrane, and chromium(Ⅲ) and chromium(Ⅵ) were simultaneously extracted. Using NH_4NO_3 as mobile phase (pH=7.0~7.2), Chromium(Ⅲ) and chromium(Ⅵ) were separated and detected in 4 min by HPLC-ICP-MS at a flow rate of 0.6 mL/min. The effects of various pretreatment conditions on test results were researched. The amount of EDTA should be excessive to eliminate the influence of calcium, magnesium and other elements. The complexation rate of EDTA with Chromium(Ⅲ) was significantly increased by boiling, but the time should not be too long, and 2~3 min was appropriate. The two chromium species had good recoveries and separation effect under pH 7.0~7.2. The results showed that the linear ranges for Chromium(Ⅲ) and chromium(Ⅵ) were between 0.2 and 20 μg/L with linear coefficients more than 0.9995, and the detection limits were 0.034 and 0.066 μg/L. The method had a simple pretreatment procedure, high sensitivity and good accuracy and precision.

Key words: high performance liquid chromatography; inductively coupled plasma-mass spectrometry; multiple techniques; dairy products; chromium(Ⅲ); chromium(Ⅵ)

不法商家为了提高乳制品中蛋白质含量的检测指标，人为地向乳制品中添加“皮革水解蛋白粉”。由于皮革在鞣制过程中会引入大量的重金属“铬”，这些铬元素在皮革水解后就混在“皮革水解蛋白粉”中，难以完全除去。铬元素主要以三价铬 Cr（Ⅲ）和六价铬 Cr（Ⅵ）的形态存在。六价铬具有很强的毒性，被确认为致癌物。三价铬是人体的一种必需微量元素，但较高剂量的三价铬仍然表现出细胞毒性反应[1]。由于三价铬和六价铬在一定条件下可以相互转化，因此同时检测乳制品中的三价铬和六价铬的含量对于辨别“皮革奶”具有重要意义。

对于铬的形态分析，传统方法是 AAS 或 ICP 等方法检测总铬含量，用分光光度法测定六价铬的含量，总铬与六价铬两者之差就是三价铬的含量。这种方法操作复杂费时，而且精确度也难以保证。有文献报道，对三价铬和六价铬分别进行柱前和柱后衍生，使用离

收稿日期：2014-01-08

基金项目：广东省质量技术监督局科技项目资助（2011CS09）

作者简介：胡玉军（1980-），男，工程师，研究方向为光谱仪器分析

通讯作者：赖毅东（1977-），男，高级工程师，研究方向为色谱仪器分析

子色谱仪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[2]。该法在三价铬和六价铬同时检测的技术上有了很大的改善，但是存在牛奶基体对光谱吸收的干扰，影响检出限。也有文献报道使用氢化物发生-原子荧光光谱法间接测定牛奶中三价铬和六价铬[3]。此方法需要经过浸泡、蒸发、炭化、灰化等诸多前处理步骤，操作繁琐，时间冗长。

HPLC与ICP-MS联用是元素形态分析非常有效的方法[4-9]。目前国内外尚没有采用HPLC-ICP-MS法测定乳制品中三价铬和六价铬的成果报道。有文献报道使用HPLC-ICP-MS测定废水中的三价铬和六价铬[10]。该文献分析的样品基体简单，着重探讨了仪器参数的优化。本文建立了乳制品中三价铬和六价铬同时提取和使用HPLC-ICP-MS同时测定的方法，着重分析了各种前处理条件和乳制品基体对测试结果的影响。本方法步骤简单，使用的试剂少，操作周期短，而且检测灵敏度高，准确性好。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

硝酸，德国CNW；氨水（分析纯）；乙二胺四乙酸二钠（EDTA，优级纯）；六价铬标准溶液（100 mg/L），上海市计量测试技术研究院；三价铬标准溶液（100 mg/L），上海安谱公司；超纯水（电阻率18.2 MΩ/cm）。

高效液相色谱仪（HPLC），美国Agilent公司1260型；电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS），美国Agilent公司7700x型；G3268-80001色谱柱，美国Agilent公司；SG2-ELK型pH计，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；0.45 μm微孔滤膜。

1.2 溶液的配制

流动相（0.05 mmol/L NH_4NO_3）：1 L水中加入约3.4 mL硝酸和约3.7 mL氨水，用10%硝酸溶液或10%氨水溶液调节pH 7.0~7.2；

缓冲液（0.1mol/L EDTA）：1 L流动相中加入33.3 g EDTA，用10%硝酸溶液或10%氨水溶液调节pH7.0~7.2；

Cr(Ⅲ)-EDTA标准储备液（10 mg/L）：取10 mL三价铬标准溶液（100 mg/L），加入10 mL缓冲液，用流动相定容至100 mL，在50 ℃水浴下保持1 h，生成Cr(Ⅲ)-EDTA络合物。冷却至室温。该溶液可在4 ℃下保存约3个月。

混合标准溶液：取Cr(Ⅲ)-EDTA标准储备液10 mL，100 mg/L的六价铬标准溶液1 mL，置于100 mL容量瓶中，用流动相稀释至刻度。该溶液中三价铬和六价铬浓度均为1 mg/L。分别取上述溶液0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0 mL置于七个50 mL容量瓶中，用流动相稀释至刻度，获得三价铬和六价铬浓度均为0.2、0.5、1、2、5、10、20 μg/L的混合标准溶液系列。

1.3 仪器条件

1.3.1 HPLC工作条件

流速：0.6 mL/min；进样量：100 μL；柱温：室温；时间：4 min。

1.3.2 ICP-MS工作条件

雾化器：玻璃同心雾化器；RF功率：1550 W；采样深度：8 mm；载气：1.2 L/min；积分时间：0.8 s；分析同位素：52Cr；采集模式：He模式，4.5 mL/min；蠕动泵：0.3 rps。

1.4 样液制备

取0.1 g固体样品或0.5 mL液体样品，置于200 mL高脚烧杯中，加入流动相25 mL，缓冲液5 mL，盖上表面皿，加热煮沸2~3 min，期间分次加入2~3mL 1%氨水溶液，使溶液pH值保持中性至弱碱性。将烧杯在凉水中迅速冷却后，溶液转移至50 mL容量瓶中，用超纯水定容。取溶液在8000 r/min离心10 min，取上清液过0.45 μm滤膜，滤液进HPLC-ICP-MS分析。

2 结果与讨论

2.1 前处理方法的研究

样品溶于水后，铬元素主要以三价铬和六价铬的形态存在。其中三价铬是Cr^{3+}阳离子，六价铬是铬酸根CrO_4^{2-}阴离子。在相同条件下，采用一种离子交换方法是不能对这两种离子都起作用的[11]。因此，前处理时加入EDTA缓冲液，因为EDTA是三价铬的有效络合剂，它能与三价铬形成稳定的Cr(Ⅲ)-EDTA络合物，溶于缓冲液中。六价铬不与EDTA络合，直接溶于缓冲液中。这样，三价铬和六价铬就分别以Cr(Ⅲ)-EDTA和CrO_4^{2-}形态在色谱柱中分离。

取浓度均为2.0 μg/L三价铬和六价铬混合标准溶液直接进样测定，分离谱图见图1。取0.1 g奶粉，加入混合标准溶液，按照1.4的操作步骤，制备得到样品溶液，进样分析后的谱图见图2。对比图1和图2可见，前处理步骤和奶粉基体对三价铬和六价铬的分离效果没有影响。另选取了纯牛奶、酸奶和奶酪为样品，进行同样的加标分析，结论与奶粉一致。

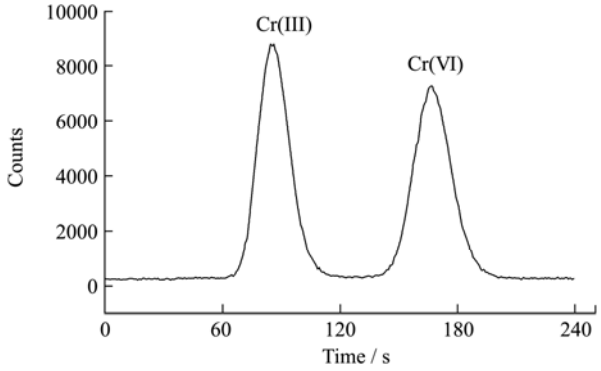


图 1 三价铬和六价铬标准品分离谱图

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

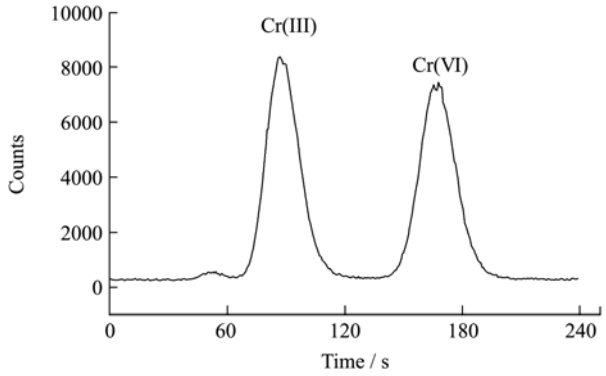


图 2 奶粉加标分离谱图

Fig.2 Chromatogram of spiked mixed standards in a milk powder sample

2.1.1 EDTA 加入量的影响

EDTA 是一种常用的络合剂，它既能与三价铬络合，也能与钙、镁、锌、铁等多种金属离子进行络合，它们之间是一种竞争关系。许多乳制品中通常含有浓度不低的钙、镁等元素。因此，如果 EDTA 加入量不够，就会导致三价铬的回收率偏低。《中国食物成分表》[12]采集了几十个乳制品样本，其中钙、镁等元素含量最高的样本是某品牌的高钙高铁低脂奶粉，每 100 g 奶粉中含有钙 1745 mg、镁 100 mg、铁 10 mg、锌 7 mg。EDTA 与金属离子通常以 1:1 络合，以上述奶粉为例，0.1 g 样品中的钙、镁等元素大约则需要 0.5 mL 浓度为 0.1 mol/L EDTA 缓冲液完全络合。本方法将此加入量放大 10 倍，即加入 5 mL，以保证三价铬与 EDTA 充分络合。

2.1.2 反应温度的影响

三价铬与 EDTA 在常温下络合速度非常缓慢，需要数十小时才能完全络合。随着温度升高，络合速度明显加快。经过实验发现，40 ℃加热约 3 h，或 50 ℃加热约 1 h，或 100 ℃煮沸仅需 1 min 就完全络合。煮沸不仅能加快络合速度，也能同时让蛋白质发生变性，有利于样液中蛋白质的沉降分离。

2.1.3 反应时间的影响

随着煮沸时间越长，蛋白质变性凝聚，有利于样液中的蛋白质离心沉降。但是，实验结果显示，煮沸一定时间后，六价铬回收率下降。在缓冲溶液煮沸时间越长，六价铬的回收率越低。六价铬随煮沸时间变化的回收率见图 3。

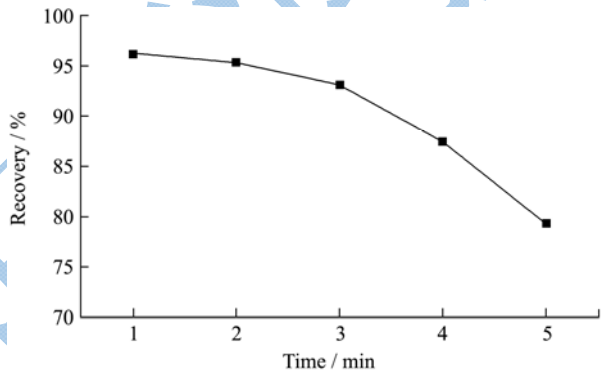


图 3 1 μg/L Cr（VI）标准溶液在缓冲液中随煮沸时间变化的回收率

Fig.3 Effect of boiling time on recoveries of 1 μg/L Cr(VI) in buffer solution

注：本方法采用煮沸 2~3min，六价铬回收率达到 93.1%~95.3%，离心沉降分离蛋白质的效果也满意。

2.1.4 pH 值的影响

取未与 EDTA 络合的三价铬标准溶液（10 μg/L）在不同 pH 值的缓冲液中煮沸 2 min 后，测定数据见表 1。由结果可以发现，随着 pH 值变化，三价铬的回收率保持稳定，说明缓冲液的 pH 值对三价铬的提取效率没有明显的影响。同时也证明，煮沸 2 min 后，EDTA 与三价铬已经完全络合。

表 1 10 μg/L Cr（III）标准溶液不同 pH 值下煮沸 2 min 后的测定结果（n=5）

Table 1 Recoveries of 10 μg/L Cr(III) by boiling 2 min under different pH

pH 值	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
Cr(III)实测值/(μg/L)	9.72±0.18	9.83±0.20	9.77±0.15	9.73±0.16	9.75±0.22
Cr(III)回收率/%	97.2±1.8	98.3±2.0	97.7±1.5	97.3±1.6	97.5±2.2

缓冲液的 pH 值对六价铬测定结果有显著的影响。取 10 μg/L 的六价铬标准溶液在不同 pH 值下煮沸 2 min 后的测试结果见表 2。结果显示，在 pH 值低于 7 时，随着 pH 值下降，六价铬的回收率随着降低；pH

值大于 7 时，六价铬的回收率基本不变。这是因为在酸性条件下，六价铬容易被还原为三价铬。实验结果也证实了这一点，HPLC-ICP-MS 分析谱图显示，六价铬标准溶液在酸性条件下煮沸后，在三价铬处也出现色谱峰，随着 pH 值下降，六价铬的峰面积越小，三价铬的峰面积就越大，并且三价铬与六价铬的回收率之和基本不变。由此可见，损失的六价铬均转化成了三价铬。

表 2 10 μg/L Cr（VI）标准溶液不同 pH 值下煮沸 2 min 后的测定结果（n=5）

Table 2 Recoveries of 10 μg/L Cr(VI) by boiling 2 min under different pH

pH 值	6.0	6.5	6.8	7.0	7.2	7.5	8.0
Cr(VI)实测值/(μg/L)	6.05±0.11	8.11±0.14	9.04±0.14	9.45±0.12	9.58±0.15	9.57±0.18	9.65±0.16
注Cr(III)实测值/(μg/L)	3.62±0.06	1.60±0.02	0.58±0.02	0.23±0.01	0.12±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01
Cr 总回收率/%	96.7±1.7	97.1±1.6	96.2±1.6	96.8±1.3	97.0±1.6	96.2±1.9	97.1±1.7

注：此处测得的三价铬是由加标的六价铬转化而来，而非三价铬加标回收数据。

为了防止六价铬在色谱柱中流动时转化为三价铬，流动相的 pH 值应该保持大于 7。然而经过实验后发现，随着流动相的 pH 值升高，三价铬与六价铬的分离效果变差。当流动相的 pH 值达到 7.5 时，二者的色谱峰开始部分重叠，分离不完全。本文采用流动相 pH 7.0~7.2，在流速 0.6 mL/min 时，三价铬的保留时间是 1.45±0.05 min，六价铬的保留时间是 2.80±0.06 min，分离效果理想。

2.2 标准曲线、检出限及精密度

取 1.2 中配制的混合标准溶液系列进样分析，以质量浓度为 X 轴，以峰面积为 Y 轴绘制标准曲线。三价铬的线性方程为 $Y=1.285\times10^5X+1.267\times10^3$，线性范围 0.2~20 μg/L，相关系数为 0.9998；六价铬的线性方程为 $Y=1.231\times10^5X-6.119\times10^3$，线性范围 0.2~20 μg/L，相关系数为 0.9996。

采用逐步稀释的方法测得信噪比为 3:1 时，三价铬和六价铬的最小检出限分别为 0.034 μg/L 和 0.066 μg/L。

取浓度为 1.0 μg/L 的混合标准溶液，连续进样 6 次，测得三价铬和六价铬的峰面积，计算其相对标准偏差（RSD）分别为 1.28%和 2.04%，重复性良好。

2.3 回收率分析

以奶粉、纯牛奶、酸奶和奶酪为例，考察了三价铬和六价铬的回收率。在市场上购买了多种乳制品，均未检出三价铬和六价铬。选择了其中奶粉、纯牛奶、酸奶和奶酪各两个，向其中加入不同水平的、未与 EDTA 络合三价铬标准溶液，按照 1.4 的操作步骤制备样品溶液，测得三价铬的加标回收率见表 3。结果显示，三价铬回收率良好而且稳定。

分析六价铬的加标回收率时发现，六价铬的实测值与加入量不相符，实测值偏低，并且异常地出现了三价铬的色谱峰。

经过对比发现，六价铬的回收损失量与三价铬的测得量基本相等。这是因为牛奶中存在一定量天然的还原性物质[13]，这些物质在样品处理的过程中将六价铬定量地还原成三价铬。为了证实这一点，选择同一个奶粉，取 0.1 g 和 0.2 g，各取三份，每份质量相等，分别加入不同水平的六价铬标准溶液，测得的加标回收数据见表 4。

表 3 三价铬加标回收数据（n=5）

Table 3 Recoveries of spiked Cr(III) in samples

样品	奶粉 1	奶粉 2	纯牛奶 1	纯牛奶 2	酸奶 1	酸奶 2	奶酪 1	奶酪 2
Cr(III)加入量/(μg/L)	2.00	10.00	2.00	10.00	2.00	10.00	2.00	10.00
Cr(III)实测值/(μg/L)	1.97±0.03	9.78±0.22	1.95±0.02	9.83±0.14	1.94±0.02	9.71±0.16	1.93±0.03	9.74±0.13
Cr(III)回收率/%	98.5±1.5	97.8±2.2	97.5±1.0	98.3±1.4	97.0±1.0	97.1±1.6	96.5±1.5	97.4±1.3

表 4 六价铬加标回收数据（n=3）

Table 4 Recoveries of spiked Cr (VI) in samples

样品质量/g	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
Cr(VI)加入量/(μg/L)	10.00	16.00	20.00	20.00	30.00	40.00
Cr(VI)实测值/(μg/L)	1.71±0.08	7.56±0.18	11.31±0.25	3.32±0.09	12.91±0.27	22.38±0.35
Cr(III)实测值/(μg/L)	7.99±0.18	7.91±0.13	7.91±0.17	15.92±0.25	15.84±0.21	16.03±0.19
Cr 总回收率/%	97.0±2.6	96.7±1.9	96.1±2.1	96.2±1.7	95.8±1.6	96.0±1.4

实验数据显示，质量相同的奶粉，六价铬还原成三价铬的量基本相同；奶粉的质量增加一倍，还原成三价铬的量也大致增加一倍；总铬的回收率良好并且稳定。以纯牛奶、酸奶和奶酪为样品进行同样的六价铬加标回收处理，得到的结论与奶粉一致，不同的是六价铬还原为三价铬的量与奶粉相比有区别。以上结果说明，同一个样品，单位质量中含有的还原性物质是恒量的。因此，在扣除样品基体的影响后，六价铬的加标回收率也是满意的。

3 结论

本方法采用 EDTA 缓冲液提取乳制品中的三价铬和六价铬，以 HPLC-ICP-MS 同时测定。探索了前处理方法，优化了实验条件，以 pH 值 7.0~7.2、0.05 mmol/L NH_4NO_3 为流动相，仅 4 min 就完成三价铬和六价铬的分离和测定，线性范围 0.2~20 μg/L，相关系数均大于 0.9995，检出限分别为 0.034 μg/L 和 0.066 μg/L，方法稳定，RSD 小于 5%，加标回收率良好。结果表明，所建立的方法前处理简单，检测灵敏度高，准确性、重复性好，是分析和鉴别“皮革奶”的有效方法。

参考文献

[1] 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
MO Min-shui, ZHONG Cai-gao, XIE Jin-yao, et al. A Comparison of Trivalent and Hexavalent Chromium-induced Cytotoxicity in L-02 Hepatocytes [J]. Practical Preventive Medicine, 2005, 12(1): 41-43

[2] 李静,王雨,陈华宝,等.牛奶中三价铬和六价铬的同时提取和检测方法[J].食品科学,2010,31(10):250-253
LI Jing, WANG Yu, CHEN Hua-bao, et al. Simultaneous Extraction and Determination of Chromium (III) and Chromiumin (VI) Milk [J]. Food Science, 2010, 31(10): 250-253

[3] 张立颖,谭芳维,陆建平,等.氢化物发生-原子荧光光谱法间接测定牛奶中 Cr(III)和 Cr(VI) [J].光谱学与光谱分析,2013,33(8):2211-2214
ZHANG Li-ying, TAN Wei-fang, LU Jian-ping, et al. Indirect Determination of Cr(III) and Cr(VI) in Milk by Hydride Generation-Fluorescence Spectrometry [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2013, 33(8): 2211-2214

[4] Jianguo Chen, Hengwu Chen, Xianzhong Jin, et al. Determination of ultra-trace amount methyl-, phenyl- and inorganic mercury in environmental and biological samples by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction preconcentration [J]. Talanta, 2009, 77(4): 1381-1387

[5] Susan C Hight, John Cheng. Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 567(2): 160-172

[6] C B Hymer, J A Caruso. Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1045(12): 1-13

[7] Sang-Ho Nam, Hae-Joon Oh, Hyung-Sik Min, et al. A study on the extraction and quantitation of total arsenic and arsenic species in seafood by HPLC-ICP-MS [J]. Microchemical Journal, 2010, 95(1): 20-24

[8] Tomohiro Narukawa, Kazumi Inagaki, Takayoshi Kuroiwa, et al. The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS [J]. Talanta, 2008, 77(1): 427-432

[9] Sébastien N. Ronkart, Vincent Laurent, Philippe Carbonnelle, et al. Speciation of five arsenic species (arsenite, arsenate, MMAAV, DMAAV and AsBet) in different kind of water by HPLC-ICP-MS [J]. Chemosphere, 2007, 66(4): 738-745

[10] 童成豹,黄凤妹.HPLC-ICPMS联用测定废水中的三价铬与六价铬[J].西部皮革,2013,35(10):48-51
TONG Cheng-bao, HUANG Feng-mei. Determination of Chromium(III) and Chromium(IV) in waste water by HPLC-ICPMS [J]. West Leather, 2013, 35(10): 48-51

[11] 李世豫,李淑妍.离子交换分离选择测定工业污水中微量六价铬及三价铬[J],环境科学丛刊,1982,3(5):19-25
LI Shi-yu, LI Shu-pin. Selective determination of trace amount hexavalent chromium and trivalent chromium in waste water after ion-exchange separation [J]. Environmental Science Series, 1982, 3(5): 19-25

[12] 杨月欣.中国食物成分表[M].北京:北京大学医学出版社,2005
YANG Yue-xin. China Food Composition Table [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2005

[13] 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
GUO Xi-rong, CHEN Rong-hua, WANG Fu-de. Comparison of antioxidant states of commercially available milk and breast milk [J]. Journal of Improving Birth Outcome and Child Development of China, 1995, 6(2): 52-53