

# 高效液相色谱法测定明胶中的六价铬

罗东辉, 罗海英, 吴文海, 冼燕萍, 郭新东, 陈意光, 吴玉奎

(广州市质量监督检测研究院, 国家加工食品质量监督检验中心(广州), 广州市食品安全检测技术重点实验室, 广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心, 广东广州 510110)

**摘要:** 建立了一种测定明胶中六价铬的高效液相色谱法。方法以磷酸氢二钾缓冲溶液超声提取样品中的六价铬, 过滤后加入二苯基卡巴肼与六价铬发生显色反应生成紫红色络合物, 通过液相色谱柱分离, 可以有效减少杂质干扰, 以紫外检测器定性定量测定六价铬含量。方法定量限为 0.8 mg/kg, 在添加水平为 0.8~50.0 mg/kg 时, 回收率大于 75%, 方法的准确度和精密度均达到检测要求。

**关键词:** 明胶; 六价铬; 高效液相色谱法

文章编号: 1673-9078(2012)8-1091-1093

## Determination of Chromium VI in the Gelatin by High Performance Liquid Chromatography

LUO Dong-hui, LUO Hai-ying, WU Wen-hai, XIAN Yan-ping, GUO Xin-dong, CHEN Yi-guang, WU Yu-luan  
(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangzhou), Guangzhou City Key Laboratory of Detection Technology for Food Safety, Guangzhou City Research Center of Risk Dynamic Detection and Early Warning for Food Safety, Guangzhou Guangdong 510110, China)

**Abstract:** A method for determination of chromium VI in the gelatin by High Performance Liquid Chromatography was developed. Chromium VI was extracted by dipotassium hydrogen phosphate buffer. After filtered, Chromium VI reacted with Diphenylcarbazide to form purple complex. HPLC was applied to the separation and purification of target compound for effectively reducing the disturbance, and the chromium VI content can be detected selectively by the UV detector. The quantification limit of this method was 0.8 mg/kg. The recovery of chromium VI in gelatin was above 75% in the range of 0.8-50.0 mg/kg. Results indicated that the accuracy and precision met the requirements of the determination of chromium VI content in gelatin.

**Key word:** gelatin, chromium VI, HPLC

食用明胶需用新鲜的、经过严格检疫的猪、牛等动物骨骼或原皮加工, 而且采用全封闭的流水线进行烘干和粉碎。近期媒体报导的“毒胶囊”事件, 表明有不法企业基于利益驱使, 利用皮革下脚料甚至回收旧皮鞋制备工业明胶, 并可能冒充食用明胶添加到老酸奶和果冻等食品中。

铬是一种多价态的金属离子, 主要以正三价和正六价两种形态存在, 其价态不同对环境的影响和生物效应不同, 其中六价铬的毒性最大, 它可以影响细胞的氧化还原, 并对呼吸道、消化道产生刺激作用, 是强烈的致癌和致突变的诱发因子, 对人体产生严重危

害<sup>[1]</sup>。回收的皮革废料中富含三价铬, 三价铬极易被氧化为六价铬, 并可能随后续加工环节带入到工业明胶中。目前, 国内主要关注于明胶中铬的总含量的测定<sup>[2-7]</sup>, 尚未检索到有关明胶中六价铬检测方法的文献报道。因测定铬的总含量难以准确反映明胶的质量安全水平, 所以有必要研究开发明胶中六价铬含量的检测方法, 为加强食用明胶质量监管提供技术支撑。

经典的六价铬检测方法为分光光度法<sup>[8-10]</sup>, 如 GB/T 2287-2008《皮革和毛皮 化学实验 六价铬含量的测定》<sup>[8]</sup>, 但样品基体溶液的原有颜色或其它杂质等都会影响检测仪器光路的通过, 造成检测结果偏高。本实验优化采用国标 GB/T 2287-2008 的前处理技术, 并利用液相色谱柱将各种杂质良好分离, 以紫外可见光检测器检测, 有效降低了杂质的干扰, 提高了检测结果的准确性, 可用于明胶样品中六价铬的检测。

### 1 材料与方法

收稿日期: 2012-04-10

基金项目: 广州市科技计划项目([2011]233-34, 2011J2200016)

作者简介: 罗东辉(1982-), 男, 博士, 主要从事食品安全及风险预警方面的研究

通讯作者: 冼燕萍(1975-), 女, 高级工程师, 主要从事食品安全及风险预警方面的研究

### 1.1 主要仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱系统, 配备 Empower 色谱工作站; Mettler Toledo 电子天平; Millipore 超纯水机; IKA 涡旋振荡器。

六价铬标准液 (德国 Merck 公司), 二苯基卡巴肼 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 磷酸氢二钾和磷酸 (分析纯, 广州化学试剂厂); 甲醇 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 水为超纯水。

六价铬标准工作液: 移取适量六价铬标准液于 25 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 使其浓度为 100 mg/L。

二苯基卡巴肼丙酮溶液: 称取 0.125 g 二苯基卡巴肼, 溶于 50 mL 丙酮-水 (1:1 体积比) 混合溶液中, 当天配制, 并应注意避光放置。

70%磷酸溶液: 移取 70 mL 磷酸于 100 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 样品的提取

于 50 mL 比色管中, 加入 20 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钾缓冲液, 往瓶导入氮气 (50 mL/min, 5 min)。加入 1.0 g 明胶样品, 盖好磨口塞子, 涡旋振荡 2 min, 超声提取 30 min 至明胶完全溶解, 并调节提取液 pH 值在 7.5~8 之间。

#### 1.2.2 络合显色

倾出部分提取液于 15 mL 塑料离心管, 15000 r/min 离心 4min, 吸取 1 mL 上清液于 5mL 刻度离心管中, 加入 0.1 mL 70% 磷酸溶液及 1 mL 二苯基卡巴肼丙酮溶液, 用水定容至 2 mL, 涡旋混匀, 静置 15 min, 显示反应结束后, 用 0.45 μm 有机滤膜过滤, 待用高效液相色谱仪测定。

#### 1.2.3 高效液相色谱测定条件

色谱柱: Diamonsil C18(2), 150×4.6 mm, 5 μm; 柱温: 25 °C; 流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 543 nm; 进样量: 50 μL; 流动相: A 为 1 g/L 磷酸氢二钾水溶液 (磷酸调节 pH=2.5), B 为甲醇, 梯度洗脱, 洗脱条件见表 1。

表 1 高效液相色谱梯度洗脱条件

Table 1 The condition of gradient elution of HPLC

Time /min	A%	B%
0.0	80	20
5.0	50	50
10.0	50	50
10.1	80	20
12.0	80	20

#### 1.2.4 标准曲线制作

配制系列六价铬标准溶液, 按 1.2.2 条件处理使得最终溶液的上机浓度为 0.00 mg/L、0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L、0.10 mg/L、1.00 mg/L, 将色谱峰面积对六价铬浓度做图, 得到标准曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 pH 值的影响

样品的提取环境应在 pH 7.5~8 之间, 因为碱性环境下, 三价铬容易被氧化为六价铬, 酸性环境下, 六价铬呈强氧化性, 容易被还原为三价铬<sup>[8]</sup>。因此, 在显色阶段通过加入磷酸, 使六价铬氧化二苯基卡巴肼, 生成的二苯缩二氨基脲再与六价铬的还原产物 Cr<sup>3+</sup> 形成紫红色络合物, 该络合物在 543 nm 波长处有最大吸收 (如图 1 所示), 可以采用高效液相色谱实现对六价铬的测定, 显色产物的液相色谱图见图 2, 保留时间为 7.777 min。

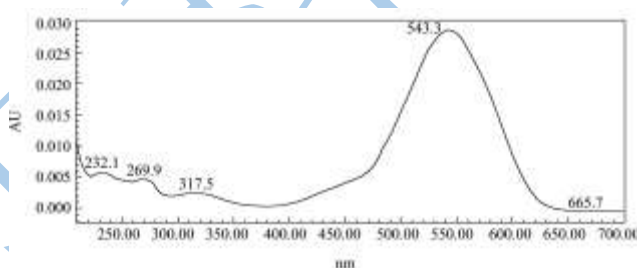


图 1 六价铬显色产物的光谱图

Fig.1 Spectrum of product of complexation reaction

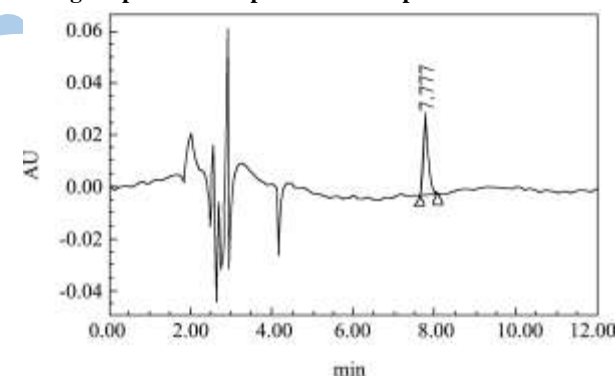


图 2 六价铬显色产物的液相色谱图

Fig.2 HPLC Chromatograms of product of complexation reaction

### 2.2 金属离子干扰的消除

本实验通过加入过量磷酸来使络合显色的环境呈酸性 (如 1.2.2 所述)。这是因为明胶中可能存在三价铁离子, 如果使用硫酸调节溶液 pH, 三价铁离子会与二苯基卡巴肼反应, 生成黄色化合物干扰<sup>[9]</sup>; 而磷酸可与三价铁离子络合, 形成无色络合物, 从而消除三价铁离子的干扰。

### 2.3 线性范围与定量限

将 1.2.4 的系列标准溶液按本方法仪器条件进行检测, 以色谱峰面积对相应的六价铬浓度绘制标准曲线, 线性方程为  $y = 2759.1x - 16593$ ,  $R^2 = 0.9999$ , 表明六价铬在 0.01 mg/L~1.00 mg/L 浓度范围内线性关系良好。根据 10 倍信噪比 ( $S/N=10$ ), 得到仪器定量限为 0.01 mg/L。

称取阴性明胶样品 7 份, 分别加入适量标准溶液, 制成含六价铬质量浓度分别为 0.00、0.40、0.80、2.00、4.00、10.00、20.00、50.00 mg/kg 的系列样品, 按 1.2.1 和 1.2.2 的条件处理测定。结果显示, 在样品六价铬含量为 0.80~50.00 mg/kg 范围内, 色谱峰面积与六价铬浓度呈良好线性关系, 线性方程  $y = 2203.9x - 27306$ ,  $R^2=0.9993$ , 方法定量限为 0.80 mg/kg ( $S/N>10$ )。

阴性样品及其加标样品的液相色谱图见图 3, 显色产物在 7.719 min 出峰。

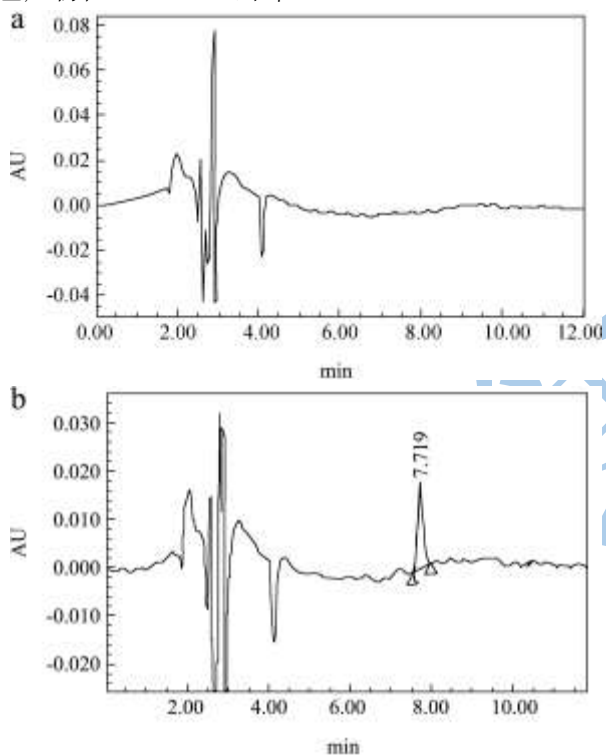


图 3 阴性样品 (a) 及其加标处理 (b) 的液相色谱图

Fig.3 HPLC Chromatograms of negative gelatin (a) and spiked (b)

#### 2.4 方法回收率和精密度实验

称取不含六价铬的阴性食用明胶样品, 进行 3 个添加水平的回收率实验。按本方法的条件进行检测 ( $n=6$ ), 结果如表 2 所示, 平均回收率为 75.5%~85.3%, 相对标准偏差为 2.4%~6.1%, 表明方法具有良好的准确度和精密度。

#### 2.5 与分光光度法的比较及实际样品的检测

表 2 方法回收率与精密度实验结果

Table 2 Recoveries and repeatabilities for chromium VI in gelatin

Added/(mg/kg)	Recovery/%	RSD/(%, n=6)
0.08	75.5	6.1
4.00	79.6	2.4
40.00	85.3	3.2

对 6 例阴性明胶样品, 分别按分光光度法 (参考 GB/T 2287-2008) 和本实验方法进行检测比较。分光光度法检出其中 5 例样品呈阳性, 最高检出六价铬含量为 40 mg/kg; 本实验方法的检测结果为 6 例样品均未检出。结果表明, 采用高效液相色谱系统检测, 通过色谱柱的分离, 可以有效减少明胶基质中杂质的干扰, 检测结果更准确。

### 3 结论

本方法建立了明胶中六价铬的高效液相色谱检测方法。方法具有操作简单快捷, 准确度高, 重现性好等特点, 适用于明胶中六价铬的定量检测, 可为食用明胶的生产安全监管提供技术支撑。

### 参考文献

- [1] 武叶红, 曾明. 六价铬致癌机制的研究进展[J]. 癌变、畸变、突变, 2006, 6: 0491-0493
- [2] 张秀尧. 炉内消化石墨炉原子吸收法测定明胶和水解蛋白中铬[J]. 中华预防医学杂志, 2005, 5: 352-353
- [3] 陈超, 陈瑜, 俞辉. 微波消解石墨炉原子吸收光谱法测定胶囊和片剂用明胶中铬含量[J]. 分析化学, 2006, 12: 1820-1821
- [4] 贺峥. 食用明胶铬含量测定方法的研究[D]. 北京化工大学, 2008
- [5] 鲁丹. 微波消解-端视 ICP-AES 法测定食用明胶中铅、铬和砷[J]. 食品与发酵工业, 2008, 9: 150-152
- [6] 贺峥, 黄雅钦, 石绍军. 湿法消解测定食用明胶中的微量铬[J]. 分析实验室, 2009, 5: 97-100
- [7] 李志娟, 宋春伟, 王金星. 消解-石墨炉原子吸收法测定明胶中铬[J]. 医学动物防制, 2011, 10: 972-973
- [8] GB/T 2287-2008 皮革和毛皮 化学实验 六价铬含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [9] 许春树. 皮革六价铬含量的检测方法及其改进[J]. 轻工标准与质量, 2005, 2: 34-35
- [10] 韩岩. 水中六价铬的应急事故测定方法[J]. 环境研究与监测, 2004, 17(4): 18-20