

# 炭黑氨基柱净化-HPLC-ICP-MS测定 黄酒中铬价态及含量

宋伟华,董文洪,胡贝贞,林环宇

(绍兴出入境检验检疫局综合技术服务中心,浙江绍兴 312000)

**摘要:**建立了一种测定黄酒中Cr(III)、Cr(VI)的高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱分析方法。黄酒经炭黑氨基柱净化,超纯水洗脱,色谱条件为:Dionex AS11-HC 阴离子预柱(4 mm×50 mm×9 μm);以60 mmol/L(pH9.0)硝酸铵作为流动相,流量为1.5 mL/min;以电感耦合等离子体质谱进行定性和定量分析。结果表明:在0~20 μg/L范围内Cr(III)、Cr(VI)线性良好,相关系数 $R^2$ 均在0.998以上;添加回收率在81.2%~94.8%之间,相对标准偏差为1.7%~4.1%;定量限分别为0.12 μg/L和0.18 μg/L。本方法简单快速,适用于黄酒中铬形态残留的分析检测,并利用该方法对不同年份、不同企业及不同类型的黄酒进行了检测,发现绍兴地区的黄酒中的铬主要以Cr(III)形态存在。

**关键词:**高效液相色谱,炭黑氨基柱净化,电感耦合等离子体质谱,铬形态,黄酒

## Determination of chromium species and content in rice wine by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

SONG Wei-hua, DONG Wen-hong, HU Bei-zhen, LIN Huan-yu

(Comprehensive Technologic Service Center of Shaoxing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shaoxing 312000, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) method was developed for determination of Cr(III), Cr(VI) in rice wine. The wine sample was purified with Carb-NH<sub>2</sub> SPE column, eluted with ultra-pure water and then separated on a Dionex AS11-HC (4 mm×50 mm×9 μm) column using 60 mmol/L ammonium nitrate (pH9.0) at 1.5 mL/min as mobile phase. Identification and quantification were achieved by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). It showed good linear correlation between 0 and 20 μg/L with correlation coefficients better than 0.998. The average recoveries of Cr(III) and Cr(VI) ranged from 81.2% to 94.8% at different spiked level and the relative standard deviations ranged from 1.7% to 4.1%. The quantification limits of Cr(III) and Cr(VI) were 0.12 μg/L and 0.18 μg/L respectively. The method was suited for determination of chromium species in rice wine. Shaoxing rice wines of different kind and different age from different manufacturers were determined using the established method, results showed that Cr(III) was the main specie.

**Key words:** high performance liquid chromatography; carbon black amino column; inductively coupled plasma mass spectrometry; chromium species; rice wine

中图分类号: TS207

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)21-0303-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.21.054

据统计,我国约有十分之一的耕地被重金属污染,形势非常严峻<sup>[1]</sup>。因此,对环境、食品以及水资源中的重金属含量进行监测至关重要的。本实验通过

日常检测发现黄酒中总铬的含量在9.2~31.7 μg/L。环境中的铬主要以两种价态形式存在,维持人体生命的必需元素Cr(III)和具有高毒、强致癌性的Cr

收稿日期: 2015-01-23

作者简介: 宋伟华(1982-),女,硕士研究生,工程师,从事食品工业品检测工作, E-mail: zcswh@sx.ziq.gov.cn。

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究(分析测试)项目(2013C37095)。

验杂志, 2005, 15(9): 1052-1053.

[13] 王骏, 胡梅, 张卉, 等. 二极管阵列检测器在食品分析中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2008(8): 154-157.

[14] 洪群发, 张庆合, 李彤, 等. 高效液相色谱仪的研制与技术开发——新型二极管阵列检测器[J]. 现代科学仪器, 2002(4): 15-18.

(VI)<sup>[2]</sup>。因此,对于铬的检测不能局限于总量,更要考虑其各价态的含量。当前,对于水质、食品、化妆品、尿液等中铬的形态研究也有较多的报道<sup>[3-9]</sup>。但对于黄酒中铬元素的检测也仅限于总量<sup>[10]</sup>而未见于形态分析。为了有效地评价黄酒中铬存在的形态,实验室建立了炭黑氨基柱净化-HPLC-ICP-MS测定黄酒中铬形态及含量的方法,并利用此方法对绍兴地区不同企业、不同年份及不同类别的黄酒进行了铬形态及含量的测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

Cr(III)、Cr(VI)标准品溶液 中国计量研究院;乙二胺四乙酸二氢二钾二水合物 梯爱希化成工业有限公司;分析纯氨水 江苏强盛功能化学有限公司;UP级(71%)硝酸 苏州晶瑞化学有限公司;色谱纯甲醇 美国天地试剂公司。AG11-HC阴离子预柱(4 mm×50 mm×9 μm) 赛默飞世尔公司;炭黑氨基柱(500 mg/6 mL) 杭州福裕科技有限公司。

电感耦合等离子体质谱 Aurora M90 美国布鲁克公司;超纯水仪 Milli-Q Element A10 法国Millipore公司;高效液相色谱仪 1260 安捷伦科技;多功能纯化器 美国加州仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验材料的准备 实验用水由 Milli-Q Element A10 超纯水仪制得,用于配制实验所用的标准溶液与样品溶液。硝酸与氨水分别由多功能纯化器纯化后再使用。炭黑氨基柱使用前用 5 mL(50%甲醇水溶液)活化,再用 25 mL 超纯水清洗。

60 mmol 的硝酸铵:取 3.95 mL 纯化后的硝酸,定容到 1000 mL,用纯化后的氨水调 pH 到 9.0。

1.2.2 样品的前处理 移取黄酒样品 1.0 mL,加入已活化好的炭黑氨基柱中,然后以 9.0 mL 超纯水进行洗脱,收集 15 mL 于塑料离心管中,定容到 10.0 mL。取收集液 0.5 mL 置于 1.5 mL 的进样瓶中,加入 10 mmol EDTA 溶液 0.5 mL,于 65 °C 水浴中反应 45 min 后冷却至室温后立即测定铬形态。

### 1.3 检测条件

高效液相色谱条件 色谱柱:AG11-HC 阴离子预柱(4 mm×50 mm×9 μm);流动相为 60 mmol/L 硝酸铵(pH9.0);流速 1.5 mL/min;柱温为 20 °C;进样量:50 μL。

电感耦合等离子体质谱条件 射频功率 1400 W;等离子体流速 18 L/min;辅助气流速 1.8 L/min;鞘气流速 0.2 L/min;雾化器流速 1.0 L/min,驻留时间 80000 μs;碰撞气 125 mL/min 氦气。

## 2 结果与分析

液体中铬的一般形态是 Cr(VI)的铬酸盐(CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)以及 Cr(III)的铬离子(Cr<sup>3+</sup>)。铬酸盐是一种阴离子,而三价铬离子是阳离子。所以在相同条件下,采用一种离子交换方法是不能对这两种离子都起作用的。而且铬的形态随着 pH 的改变,Cr(III)与 Cr(VI)的存在价态会发生改变。当溶液中含有大量还原成分时,pH 的降低又极易导致 Cr(VI)向

Cr(III)的转化。欲保证分析结果的可靠性,首先就要保证 Cr(III)与 Cr(VI)的形态稳定性。因此,在样品采集、储存和制备过程中都必须非常小心,以保证原始样品中铬的形态分配在分析之前保持不变。因此实验中,利用 Cr(III)与 EDTA 易形成的配合物的性质先将 Cr(III)转化为更稳定络合态,同时检测中也可以改善 Cr(III)与 Cr(VI)的分离效果<sup>[11]</sup>。标准溶液、样品及流动相均用 EDTA 钠盐稳定,将溶液调到 pH7,以利于铬形态的稳定和最优化的色谱分离。

根据日常检测工作及参考文献<sup>[12-13]</sup>知道,在黄酒中含有较高浓度的无机盐,尤其是钙离子含量在 0.05~0.4 g/L 范围内。因此,配制 EDTA 钾盐的溶液浓度为 10 mmol/L,调 pH7.0。标准溶液、样品均用 10 mmol/L 的 EDTA 钾盐 1:1 稳定,以利于铬形态的稳定和色谱分离。

### 2.1 前处理方法的选择

2.1.1 前处理方法的选择 本实验比较了不同前处理的方法,如:直接进样、固相萃取柱净化等。结果表明,直接进样方便,但由于黄酒中含有丰富的糖、氨基酸、色素等营养成分,容易影响离子色谱的分离性能和使用寿命,且检测再现性差,设备污染严重。最终选取了炭黑氨基柱净化后洗脱稀释进样的方式进行处理,效果较佳。

2.1.2 前处理方法的优化 黄酒中富含氨基酸,蛋白质、糖、色素等多种有机物,对 Cr 在色谱柱上的形态分离会有干扰,同时高含量的氨基酸、蛋白质等有机物也容易对离子色谱柱造成损伤,因此有必要在样品进色谱柱前进行净化处理。考虑到样品的基质特性,选取对氨基酸、蛋白质及色素有比较好吸附能力的炭黑氨基柱小柱作为净化柱<sup>[14]</sup>。通过对活化后的炭黑氨基柱的空白洗脱液测试发现,里面有一定的残留 Cr(III),我们采用 25 mL 超纯水洗脱后,能使残留在净化柱中的 Cr(III)小于仪器检出限。

考察了不同洗脱液的洗脱效果:1.0 mL 空白溶液(含 20 μg/L 的 Cr 混标和 15% 的乙醇)过净化柱后,分别用 9.0 mL 纯水、5% 的甲醇、10% 甲醇洗脱,测定并计算回收率,结果如表 2 所示。由表 2 可见,铬对洗脱溶剂中是否含有甲醇不敏感,所有条件下回收率都大于 95%。因而,采用超纯水作为洗脱液。

表 1 过柱后的各个形态物质的加标回收率(%)

Table 1 The standard addition recovery rate of Cr(III) and Cr(VI) after elution(%)

洗脱溶液	Cr(III)	Cr(VI)
10 mL 的超纯水	101.2	99.4
10 mL 的 5% 甲醇	98.2	101.7
10 mL 的 10% 甲醇	100.5	98.5

### 2.2 仪器条件的选择

2.2.1 ICP-MS 部分 联机前使用布鲁克·道尔顿公司提供的调谐液(Be、Mg、Co、In、Ba、Ce、TL、Pb、Th 浓度 1 μg/L)对 ICP-MS 进行自动调谐校正,使仪器灵敏度和质量数准确度在最佳状态。由于样品及流动相中都会有其他元素引入并在等离子体中形成多原

子离子如  $\text{ArC}^+$  和  $\text{ClOH}^+$  对  $\text{Cr}^{52}$  的检测造成干扰。因此需要利用仪器具备的锥面碰撞技术导入碰撞气以消除。采用仪器制造商推荐的 He 作为碰撞气,优化流量为 125 mL/min。

2.2.2 液相色谱部分 因  $\text{Cr}(\text{III})$  和  $\text{Cr}(\text{VI})$  在有氧化或还原物条件下形态间易互相转化,所有器皿的清洗与试剂的配制均采用超纯水。液相色谱的不锈钢( $\text{Cr}$  含量  $>13\%$ )也会带入本底污染,本实验中将液相部件间的连接不锈钢管路及定量环换成 PEEK 管,再用磷酸清洗,硝酸溶液( $v:v, 1:1$ )对液相色谱中剩余的不锈钢泵体及切换阀进行钝化处理,再用超纯水清洗至流出液 pH 为中性,并选择 PEEK 管装的离子色谱柱来分析样品。以 60 mmol 的硝酸铵溶液( $\text{pH}9.0$ )为流动相,流速为 1.5 mL/min,进样量为 50  $\mu\text{L}$  为液相分析条件,比较发现戴安的离子色谱柱对于  $\text{Cr}$  的分离优于汉密尔顿的柱子。汉密尔顿的色谱柱也能对  $\text{Cr}$  的两种形态进行分离,但分析时间过长,整个分离过程将近 10 min。而戴安的柱子可以在 3 min 内完成分析与冲洗,并有较好的分离效果,0.2  $\mu\text{g/L}$  的  $\text{Cr}(\text{III})$ 、 $\text{Cr}(\text{VI})$  标样色谱图见图 1。因而采用戴安 AG11-HC 阴离子预柱(4 mm  $\times$  50 mm  $\times$  9  $\mu\text{m}$ )来作为样品分离的色谱柱。

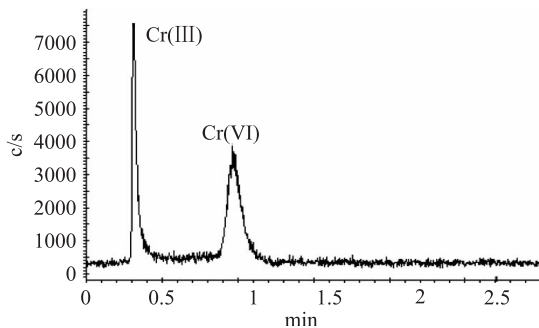


图1 0.2  $\mu\text{g/L}$  的  $\text{Cr}(\text{III})$ 、 $\text{Cr}(\text{VI})$  标样色谱图

Fig.1 Chromatogram of a mixture of  $\text{Cr}(\text{III})$  and  $\text{Cr}(\text{VI})$  standards

### 2.3 线性关系、测定低限、添加回收率及精密度

2.3.1 线性关系及测定低限 0~20.0  $\mu\text{g/L}$  范围内配制浓度为 0.0、0.2、0.5、1.0、2.0、10、20  $\mu\text{g/L}$  的 2 种铬形态的混合标准溶液,并分别以  $v:v(1:1)$  与 10 mmol/L EDTA 钾盐溶液混合,在 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴中反应 1 h,使  $\text{Cr}(\text{III})$  生成稳定的  $\text{Cr}(\text{III})$ -EDTA 配合物,冷却后上机检测。回归出铬形态的标准曲线(见表 3),Y 为响应值, X 为测试浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ),在 0~20.0  $\mu\text{g/L}$  范围内,2 种铬形态标准曲线线性良好,相关系数均大于 0.998。将 0.5  $\mu\text{g/L}$  的混标溶液逐级稀释,以 3 倍信噪比为检出限,10 倍信噪比为定量限,实验数据见表 3。

表2  $\text{Cr}$  价态线性关系及检出限

Table 2 Linear range and detection limit

Cr	方程	相关系数	检出限 ( $\mu\text{g/L}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/L}$ )
$\text{Cr}(\text{III})$	$Y = 414.7X + 3.304$	0.9996	0.04	0.12
$\text{Cr}(\text{VI})$	$Y = 710.7X + 16.299$	0.9985	0.06	0.18

2.3.2 添加回收及精密度 在实验室内按照 1.2 条件对添加标准溶液黄酒样品进行测定,验证方法的准确性和添加回收率。三个浓度下回收率在 81.2%~94.8%,精密度 1.7%~4.1%,检测结果见表 4。

### 2.4 方法的验证

联系三家不同的实验室对加标 2.5、5.0、10.0  $\mu\text{g/L}$  含有基质的样品,按照方法对回收率和稳定性进行了验证,验证情况如表 5。各实验室回收率在 81.6%~89.2%,精密度 0.8%~4.8%。

表3 黄酒样品添加结果及精密度数据

Table 3 The standard addition recovery and precision of rice wine

添加水平 ( $\mu\text{g/L}$ )	检测项目	回收率 (%)			RSD (%)
		1	2	3	
2.5	$\text{Cr}(\text{III})$	92.8	87.6	94.8	4.1
	$\text{Cr}(\text{VI})$	84.8	87.6	81.2	3.8
5.0	$\text{Cr}(\text{III})$	84.6	86.2	90.6	3.6
	$\text{Cr}(\text{VI})$	84.8	86.6	89.4	2.7
10.0	$\text{Cr}(\text{III})$	88.6	91.2	88.4	1.7
	$\text{Cr}(\text{VI})$	90.4	87.2	92.1	2.8

表4 方法验证数据

Table 4 The method validation data

添加水平 ( $\mu\text{g/L}$ )	检测项目	回收率 (%)			室间 RSD (%)
		A 检测 研究院	B 技术 中心	C 技术 中心	
2.5	$\text{Cr}(\text{III})$	88.4	81.6	89.2	4.8
	$\text{Cr}(\text{VI})$	86.4	84.4	88.4	2.3
5.0	$\text{Cr}(\text{III})$	84.2	86.2	85.4	1.2
	$\text{Cr}(\text{VI})$	83.8	83.0	88.0	3.2
10.0	$\text{Cr}(\text{III})$	87.1	87.4	86.0	0.8
	$\text{Cr}(\text{VI})$	87.8	87.8	89.0	0.8

### 2.5 实际样品的检测

选取铬总量含量较高的酒按照 2.2 条件对绍兴地区不同厂家的年份酒样中的铬形态及含量进行了测定并确定了各形态的含量,数据如表 6 所示,并以产品种类较丰富的 A 厂家为列,做了不同类型黄酒中铬形态分析测定,结果如表 7 所示。

由表 6、表 7 中数据发现:黄酒中的铬以  $\text{Cr}(\text{III})$  的形态存在,只有味淋酒中检测出少量的  $\text{Cr}(\text{VI})$ 。分析原因,可能是黄酒中在发酵过程中普遍会产生少量乙酸等酸性物质,导致黄酒的 pH 在 3~4 左右,同时黄酒中含有总酚、氨基酸等抗氧化物,容易使  $\text{Cr}(\text{VI})$  转化成  $\text{Cr}(\text{III})$ 。为了验证这个转化过程,将 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cr}(\text{VI})$  黄酒加标样品两天前后  $\text{Cr}(\text{VI})$  检测结果的对比,如图 2 所示,由图可见,2 d 后,  $\text{Cr}(\text{VI})$  的峰消失了,在  $\text{Cr}(\text{III})$  的位置出现了峰,由此推测,  $\text{Cr}(\text{VI})$  在酸性黄酒中不稳定,易向  $\text{Cr}(\text{III})$  转化。而味淋酒由于不经过发酵处理,其 pH 相对较高,一般在 6.0 左右,同时含有的总酚、氨基酸等的发酵产物的含量也相对较低,为  $\text{Cr}(\text{VI})$  存在创造了一定条件。

表5 不同厂家不同年份酒中的铬形态分析

Table 5 The content of chromium species in different vintages of different manufacturer

厂家	项目	不同年份酒检测结果(μg/L)						
		06年	07年	08年	09年	10年	11年	>10年
A厂	Cr(Ⅲ)	21.3	11.5	17.4	13.2	14.1	7.3	8.5
	Cr(Ⅵ)	-	-	-	-	-	-	-
B厂	Cr(Ⅲ)	10.3	7.6	5.7	6.3	6.1	6.5	9.2
	Cr(Ⅵ)	-	-	-	-	-	-	-
C厂	Cr(Ⅲ)	12.1	9.6	12.7	6.9	6.4	6.4	10.7
	Cr(Ⅵ)	-	-	-	-	-	-	-

表6 同厂家不同品种的酒的比较

Table 6 The content of chromium species in different vintages of different rice wine

实验号	名称	A厂检测结果(μg/L)									
		加饭酒	元红	香雪	善酿	青梅酒	味淋酒	成品酒	出口酒	厨用酒	香糟卤
1	Cr(Ⅲ)	13.3	16.4	8.2	15.7	10.2	12.1	13.5	12.1	13.2	18.7
2	Cr(Ⅵ)	-	-	-	-	-	2.1	-	-	-	-

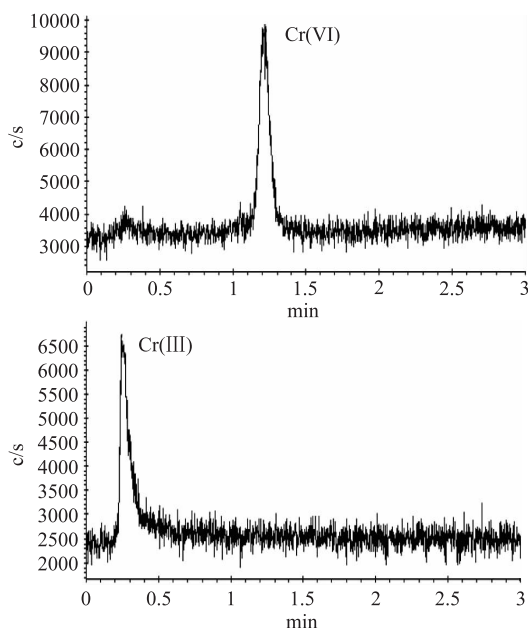


图2 1 μg/L Cr(VI)黄酒加标2 d前后谱图对照

Fig.2 1 μg/L Cr(VI) rice wine with

standard spectra comparison before and after two days

### 3 结论

通过对色谱及光谱质谱条件的优化,建立了炭黑氨基柱净化-HPLC-ICP-MS测定黄酒中铬价态及含量的方法。该方法简单快速,适用于黄酒中铬形态残留的分析检测,在0~20 μg/L范围内Cr(Ⅲ)、Cr(Ⅵ)线性良好,添加回收率在81.2%~94.8%之间,定量限分别为0.12 μg/L和0.18 μg/L。利用该方法对不同年份、不同企业及不同类型的黄酒进行了检测,发现绍兴地区的黄酒中的铬主要以Cr(Ⅲ)形态存在,此项工作的开展有助于黄酒消费者选择性的采购和监管部门采取相应的措施。

### 参考文献

[1] <http://business.sohu.com/20111107/n324738966.shtml>.

[2] Memon JR, Memon SQ, Bhangar MI, et al [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 163: 511-516.

[3] 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].环境污染治理技术与设备,1982,3(5): 19-25.

[4] 王华建,黎艳红,丰伟悦,等.反相离子对色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定水中痕量Cr(Ⅲ)与Cr(Ⅵ)[J].分析化学,2009,37(3): 433-436.

[5] 黎飞,王扬,张成,等.HPLC/ICP-MS法测定水质中Cr(Ⅲ)与Cr(Ⅵ)的研究[J].宁波大学学报(理工版)2012,25(3): 13-16.

[6] 郭志英,于水.HPLC/ICP-MS在环境用品的痕量元素形态分析中的应用[J].质谱学报,2006,27(1): 56-62.

[7] 黄冬根,廖世军,贺咏梅.食品中Cr(Ⅲ)和Cr(Ⅵ)分离及ICP-MS法测定研究[J].食品科学,2005,26(7): 172-174.

[8] 庞艳华,刘名扬,刘淑艳,等.反相离子对色谱-电感耦合等离子体质谱法测定化妆品中不同形态铬[J].色谱,2011,29(10): 1027-1030.

[9] 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,2007,34(3): 326-329.

[10] 程和勇,徐子刚,黄旭,等.电感耦合等离子体质谱测定不同酒类中铬、砷、镉、汞、铅含量[J].浙江大学学报(理学版),2011,36(6): 679-682.

[11] Pansar-Kallio M, Manninen P K, Frdsenius [J]. Journal of Chromatography A, 1996, 750(1-2): 89-95.

[12] 方继德,黎莉.白酒和黄酒中无机元素含量分析[J].微量元素与健康研究,2004,21(6): 69.

[13] 李博斌,刘兴泉,吴坚,等.黄酒中糖和无机元素成分与黄酒口味品质的定量关系研究[J].中国酿造,2010,221(8): 37-39.

[14] 胡贝贞,宋伟华,谢丽萍,等.加速溶剂萃取/凝胶渗透色谱-固相萃取净化/气相色谱质谱法测定茶叶中残留的33种农药[J].色谱,2008,26(1): 22-28.