

程中六价铬转化为三价铬,能够准确测试明胶空心胶囊中铬的形态。对有限样品测试结果表明,样品中铬均以三价存在,且在28个月的观察期内未发生转化,表明本研究测试的空心胶囊样品转化为六价铬的风险较小。

参考文献

- [1] 黄文耀,邓琴,沈更新,等. 保健食品中三价铬的测定方法[J]. 公共卫生与预防医学,2006,17(3):66-67.
- [2] Coenelis R, Caruso J, Crews H, et al. Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational speciation health[M]. Chichester:Wiley,2004:120-135.
- [3] Berner T O, Murphy M M, Slesinski R. Determining the safety of

chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement[J]. Food and Chemical Toxicology,2004,42(6):1029-1042.

- [4] 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的铬[J]. 色谱,2011,29(10):1027-1030.
- [5] 李冰,杨红霞. 电感耦合等离子体质谱原理和应用[M]. 北京:地质出版社,2005:14-16.
- [6] 田雨荷,黄文耀,汤志勇,等. RPIC/ICP-MS 测定水中的 Cr(III)和 Cr(VI)[J]. 光谱实验室,2013,30(4):1980-1984.
- [7] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.123—2003 保健食品中吡啶甲酸铬含量的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

实验技术与方法

酸水解法测定婴幼儿配方食品、乳和乳制品中二噁英类持久性有机污染物

沈海涛^{1,2,3}, 丁钢强³, 李敬光¹, 张磊¹, 徐青元³, 韩见龙³, 吴永宁¹

(1. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100021; 2. 中国疾病预防控制中心, 北京 100021; 3. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051)

摘要:目的 建立适合婴幼儿配方食品、乳及乳制品中二噁英类持久性有机污染物(POPs)分析的前处理技术。方法 利用索氏抽提法和酸水解法分别提取婴幼儿配方食品、乳及乳制品中的脂肪,比较两种方法的差异。结果 对于婴幼儿配方食品,两种萃取方法测得的结果差异不大;对于乳粉和液态鲜乳,索氏抽提法的结果与实际值偏差较大。结论 不同类型乳粉的组分(酪蛋白与乳清蛋白比例等)和加工工艺差异很大,酸水解法能有效地使乳及乳制品中的脂肪转变为游离态,提高了脂肪的提取率,为准确测定 POPs 奠定基础。

关键词:乳; 乳制品; 婴幼儿配方食品; 二噁英; 食品污染物; 酸水解法; 前处理; 食品安全

中图分类号:R155.55;TS252.5;O622 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0569-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.013

Acid digestion for the determination of dioxin like POPs in infant formula, milk and milk-based products

SHEN Hai-tao, DING Gang-qiang, LI Jing-guang, ZHANG Lei, XU Qing-yuan, HAN Jian-long, WU Yong-ning
(China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To develop a fast, economical and sensitive method for determining the dioxin-like persistent organic pollutants (POPs) in infant formula, milk and milk-based products. **Methods** Lipid extraction efficiencies of traditional sample extraction (Soxhlet extraction) and acid digestion liquid-liquid extraction (LLE) were compared. **Results** For infant formula, lipid contents (%) determined by direct Soxhlet extraction (19.6 ± 2.0) and by LLE (20.9 ± 1.2) were close to the nutrition label (21.8 ± 1.3), and the differences in efficiency between these two methods were not significant (*t*-test, $P > 0.05$). For fresh cow milk and other milk powder however, lipid contents (%)

收稿日期:2014-07-21

基金项目:浙江省科技创新团队项目(2011R50021)

作者简介:沈海涛 男 副主任技师 研究方向为持久性有机污染物 E-mail:oldfishmann@hotmail.com

通讯作者:吴永宁 男 研究员 研究方向为食品安全 E-mail:wuyongning@cfsa.net.cn

韩见龙 男 主任技师 研究方向为理化检验 E-mail:jlhan@cdc.zj.cn

determined by direct Soxhlet extraction were much lower than the nutrition label. **Conclusion** Soxhlet extraction was not suitable for non-infant formula milk powder or fresh cow milk, whereas acid digestion LLE results accorded well with the true lipid content for all types of dairy products tested. This was due to different proportion of whey protein to casein in infant formula and other kinds of milk powder.

Key words: Milk; milk-based products; infant formula; dioxin; food contaminants; acid digestion; sample preparation; food safety

多氯代二苯并二噁英/呋喃(PCDD/Fs,简称二噁英)和多氯联苯(PCBs)是广为人知的持久性有机污染物(POPs)。这类污染物在环境中极难降解,由于脂溶性极强,它们常通过食物链逐级向顶端富集。膳食摄入是普通人群 POPs 暴露的主要途径^[1-2]。奶粉是人们,尤其是婴幼儿和青少年,重要的蛋白摄入来源。三聚氰胺事件后,我国加强了对乳品行业的监管力度,乳制品的质量受到了空前的关注(包括人体健康有益成分和有害成分的监测)。2013年,乳制品中二噁英类 POPs 开始被纳入全国食品污染物监测计划,迄今已有两年。在承担该项监测任务的过程中,我们发现直接用传统的样品萃取技术,如索氏抽提,不能有效提取某些类别奶粉中结合态的脂肪,并进而影响到检测结果的准确性。POPs 是脂溶性的化合物,对于脂肪含量较高的样品,例如鸡蛋、畜禽肉、鱼肉和乳制品等,检测结果常以脂肪计来表达,因此脂肪的测定对于 POPs 的准确定量具有重要的意义。对于乳制品中脂肪的测定,经典的方法包括酸水解法、罗兹哥特里法,巴布科克法和盖博法。作为二噁英分析经典指南的美国 EPA Method 1613^[3],尽管对组织样品提取给出了酸水解法的建议,但并未给出详细操作步骤,更未提及奶粉。已有文献报道^[4-12]环境或食品中 POPs 萃取过程常用的技术包括:液液萃取,柱萃取,索氏抽提,超临界萃取和加速溶剂萃取等,关于奶粉中 POPs 及其前处理的报道十分有限。本文比较了索氏抽提和酸水解法在提取各类乳制品中脂肪效果上的差异,对其原因做了初步的探讨,旨在抛砖引玉,找到一种适合所有乳制品中 POPs 分析的前处理方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

根据2013年浙江省食品安全风险监测方案,在全省12个监测点采集了88份乳及乳制品,包括婴幼儿配方食品33份,乳粉24份,液态乳31份。

1.1.2 主要仪器与试剂

6890型高分辨气相色谱-高分辨磁质谱仪(美国Agilent)、TTL-800型萃取净化振荡器(北京同泰联科技发展有限公司)、恒温培养振荡器。

¹³C₁₂标记的二噁英(PCDD/Fs)、多氯联苯

(PCBs)和多溴联苯醚(PBDEs)内标,各自对应的标准曲线系列溶液以及标准参考物质均购自美国Wellington Laboratories(编号:WMF-01)。盐酸、无水乙醇、硅胶、氧化铝均购自美国Sigma-Aldrich,正己烷、二氯甲烷、甲苯纯度均为农残级。

1.2 方法

1.2.1 样品萃取

索氏抽提:液态乳先经冷冻干燥,研磨成粉,密封装瓶置于干燥器内备用。均匀称取冻干乳样品或奶粉5.0g,加入¹³C₁₂标记的二噁英类 POPs 内标各2ng,转移到研钵内加适量无水硫酸钠后,研磨成均匀粉体后转入索氏抽提器内,用350ml正己烷-二氯甲烷(1:1,V/V)萃取24h,控制速度约10min/循环。

酸水解:均匀称取奶粉5.0g置于200ml烧杯,加入¹³C₁₂标记的二噁英类 POPs 内标各2ng,溶于20ml去离子水(对于液态乳,则直接加入二噁英类 POPs 内标各2ng),混匀后再加入20ml盐酸(37%,w/w),定量转移到250ml具塞三角烧瓶,置于80℃水浴摇床,以150r/min振摇1h,进行水解。待水解液冷却至室温,将其定量转移到250ml分液漏斗中。加入40ml无水乙醇,再加入80ml正己烷-二氯甲烷(1:1,V/V),振荡器振摇30min,使水解液中的脂肪进入有机相。重复此步骤[80ml的正己烷-二氯甲烷(1:1,V/V)振摇,若分层缓慢,可加入适量无水乙醇加速分层]2次,合并有机相至500ml平底烧瓶。旋蒸至约5ml,于通风橱内过夜使溶剂完全挥干,称重。比较烧瓶前后重量差异,即得到脂肪重量。

1.2.2 样品净化

待脂肪含量测定完毕,往瓶中加入适量正己烷使脂肪完全溶解。依次过自制的凝胶排阻色谱GPC(填料为Bio-SX3),酸碱硅胶柱和氧化铝柱净化(每步均浓缩至3~5ml)。浓缩液转移到700μl微量进样瓶后,以微弱氮气吹至约20μl,加入进样内标1ng,上机分析。

1.2.3 仪器条件

PCBs气相色谱条件:DB-5MS分离柱(60mm×0.25mm,0.1μm),恒压148kPa。进样口温度280℃,不分流模式,进样量1μl。升温程序:80℃保持2min,以8℃/min速率升温至150℃,以4℃/min速率升温至300℃保持2min。PCDD/Fs

和 PBDEs 的色谱条件同我们以往的报道^[2]。

质谱条件:离子源温度 280 ℃,电子能量 35.0 eV, Trap 电流 600 μA,检测方式为选择离子监测,分辨率 > 10 000 (10% 峰谷定义,全氟煤油为参考物质),定量方式为同位素内标法。

2 结果

对于婴幼儿配方食品,直接用索氏抽提测得的脂肪含量为(19.6 ± 2.0)% ,经酸水解液液萃取测得的脂肪含量为(20.9 ± 1.2)% ,二者与产品的出厂标示值(21.8 ± 1.3)% 均很接近,两种方法对脂肪的萃取

效率差异无统计学意义(*t* 检验, $P > 0.05$);但对于乳粉,尽管索氏抽提测得的同位素内标的回收率与酸水解法相比相差不多,但测得的脂肪含量为(0.9 ± 0.3)% ,远低于标示值(18.9 ± 5.5)% ;而采用酸水解液液萃取测得的脂肪含量为(18.8 ± 6.0)% ,非常接近于厂家标示值(18.9 ± 5.5)% 。对于鲜牛奶,情况也类似。当用索氏抽提法萃取鲜牛奶时,测得脂肪含量为(2.0 ± 0.4)% ;酸水解液液萃取测得的脂肪含量为(3.2 ± 0.5)% ,产品的出厂表示值为(3.3 ± 0.3)% ;经统计这二种方法萃取效率差异有统计学意义(*t* 检验, $P < 0.05$)结果见表 1。

表 1 索氏抽提和酸水解法对脂肪提取效率的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of lipid extraction efficiency between Soxhlet and acid digestion LLE

乳制品	索氏抽提(未经酸水解)				液液萃取(酸水解)			
	脂肪测定值 /%	脂肪标示值 /%	同位素内标平 均回收率/%	取样量 /g	脂肪测定值 /%	脂肪标示值 /%	同位素内标平 均回收率/%	取样量 /g
婴幼儿配方食品(<i>n</i> = 33)	19.6 ± 2.0	21.8 ± 1.3	77 ± 14	10	20.9 ± 1.2	21.8 ± 1.3	74 ± 10	4
乳粉(<i>n</i> = 24)	0.9 ± 0.3 ^a	18.9 ± 5.5	73 ± 14	10	18.8 ± 6.0	18.9 ± 5.5	71 ± 12	4
	1.4 ± 0.5 ^b		72 ± 15					
鲜牛奶(<i>n</i> = 31)	2.0 ± 0.4 [*]	3.3 ± 0.3	70 ± 13	50	3.2 ± 0.5	3.3 ± 0.3	67 ± 13	20
母乳 ^c	3.5	3.4 ± 0.39 [#]	69 ± 16	39.5	3.5	3.4 ± 0.39 [#]	70 ± 12	10.5

注:a 为直接索氏抽提;b 为复溶于超纯水(超声波温水浴助溶)后,冻干;c 为 POPs in food 2010 全球实验室间二恶英比对实验数据;* 为冻干后索氏抽提;# 为全球 100 多家实验室测定母乳中脂肪的均值

3 讨论

不同类型乳粉的生产工艺和配料差异决定了乳粉不同的理化性质。在乳粉的生产过程中,浓缩牛乳是蛋白的主要来源。天然牛乳中酪蛋白占了 80% 以上的比例,酪蛋白分子量较大(60 ~ 350 kD),这类蛋白能被成人消化吸收,但不易被婴幼儿吸收。为了生产适合婴幼儿吸收的母乳化配方乳粉,厂家一般降低酪蛋白的比例,提高乳清蛋白的比例(分子量约 150 kD),使二者比例达到约 60:40(V/V)^[13],以接近母乳的水平。Kim 等^[14]曾报道,在生产奶粉的喷雾干燥阶段,大部分的乳脂肪表面被“蛋白-乳糖结合体”包埋,形成所谓的胶囊化脂肪,只有少部分未被包埋的乳脂肪,即所谓游离脂肪,能被有机溶剂萃取。蛋白的分子量越大,包埋乳脂肪的程度就越深,后者也就越难被有机溶剂直接萃取出来。因此,对于母乳和母乳化的婴幼儿配方食品,由于其含有更多分子量的乳清蛋白,脂肪包埋程度浅,用索氏抽提法即可将脂肪提出;表 1 中母乳数据表明,两种方法对脂肪的萃取效率差异不显著(*t* 检验, $P > 0.05$)。而对于鲜牛奶和乳粉,由于其分子量大的酪蛋白含量较高,脂肪包埋程度深,萃取前必须用水解法将蛋白分子去除,使脂肪游离出来后再用有机溶剂萃取。如果不经水解,萃取的只是游离脂肪,而非全脂肪,影响测定结果的准确性。

参考文献

- [1] Fromme H, Körner W, Shahin N, et al. Human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDE), as evidenced by data from a duplicate diet study, indoor air, house dust, and biomonitoring in Germany[J]. *Environment International*, 2009, 35(8):1125-1135.
- [2] SHEN H T, DING G Q, WU Y N, et al. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans (PCDD/Fs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from Zhejiang, China[J]. *Environment International*, 2012, 42:84-90.
- [3] U. S. Environmental Protection Agency. Method 1613, revision B: tetra-through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS[Z]. Washington, 1997.
- [4] Chovancová J, Čonka K, Kočan A, et al. PCDD, PCDF, PCB and PBDE concentrations in breast milk of mothers residing in selected areas of Slovakia[J]. *Chemosphere*, 2011, 83(10):1383-1390.
- [5] Chung S W C, CHEN B L S. Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: a critical review on the analytical methods and their testing capabilities [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(33):5555-5567.
- [6] Hsu J F, GUO Y L, LIU C H, et al. A comparison of PCDD/PCDFs exposure in infants via formula milk or breast milk feeding [J]. *Chemosphere*, 2007, 66(2):311-319.
- [7] Ramos L, Eljarrat E, Hernández L M, et al. Comparative study of methodologies for the analysis of PCDDs and PCDFs in powdered full-fat milk. PCB, PCDD and PCDF levels in commercial samples from Spain[J]. *Chemosphere*, 1999, 38(11):2577-2589.
- [8] ZHANG J, JIANG Y, ZHOU J, et al. Concentrations of PCDD/

- PCDFs and PCBs in retail foods and an assessment of dietary intake for local population of Shenzhen in China[J]. *Environment International*, 2008, 34(6):799-803.
- [9] ZHOU P, WU Y, YIN S, et al. National survey of the levels of persistent organochlorine pesticides in the breast milk of mothers in China[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(2):524-531.
- [10] Ramos L, Hernández L M, González M J. Study of the distribution of the polychlorinated biphenyls in the milk fat globule by supercritical fluid extraction[J]. *Chemosphere*, 2000, 41(6):881-888.
- [11] Millqvist-Fureby A. Characterisation of spray-dried emulsions with mixed fat phases [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 31(1):65-79.
- [12] Pandelova M, Piccinelli R, Kasham S, et al. Assessment of dietary exposure to PCDD/F and dioxin-like PCB in infant formulae available on the EU market[J]. *Chemosphere*, 2010, 81(8):1018-1021.
- [13] McCarthy N A, Kelly A L, O'Mahony J A, et al. The physical characteristics and emulsification properties of partially dephosphorylated bovine β -casein[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2/3):1304-1311.
- [14] Kim E H J, CHEN X D, Pearce D. Melting characteristics of fat present on the surface of industrial spray-dried dairy powders [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 42(1):1-8.

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素

潘晓东, 吴平谷, 姜维

(浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定鱼肉中氯霉素(CAP)、甲砒霉素(TAP)和氟甲砒霉素(FF)的测定方法。方法 以氘代氯霉素(d5-CAP)为内标,样品采用乙酸乙酯提取,正己烷脱脂处理。在ACQUITY BEH-C₁₈色谱柱中分离,以水-甲醇做流动相梯度洗脱,以负离子多反应监测模式、同位素内标法定量。结果 CAP、TAP和FF方法的检出限分别为0.01、0.03、0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率分别为83.2%~96.5%、76.8%~93.8%和79.6%~95.0%;相对标准偏差为4.1%~8.8%。结论 本法具有良好的选择性、灵敏度和准确度,满足鱼肉中痕量氯霉素类药物残留的高灵敏分析需要。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱; 氯霉素; 甲砒霉素; 氟甲砒霉素; 抗生素残留; 违禁药物

中图分类号:R155; O657.63 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0572-03

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.014

Determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in fish muscle by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

PAN Xiao-dong, WU Ping-gu, JIANG wei

(Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310051, China)

Abstract: Objective To develop a quantification method for chloramphenicol (CAP), thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF) in fish muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

Methods Coupled with internal standard of d5-chloramphenicol, samples were extracted with ethyl acetate, then defatted by hexane. The extraction was separated by gradient elution with methanol-water in ACQUITY BEH C₁₈ column. The analytes were simultaneously quantified by the isotope internal standard under the negative ion mode and multiple reactions monitoring mode. **Results** The limits of detection for CAP, TAP and FF were 0.01, 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and average recoveries 83.2%-96.5%, 76.8%-93.8% and 79.6%-95.0% separately. The relative standard deviation varied between 4.1%-8.8%.

Conclusion The method was selective, sensitive, accurate and suitable for determination of trace three chloramphenicols analysis in fish muscle.

收稿日期:2014-07-29

基金项目:浙江省医药卫生项目(2013RCA008);国家高技术研究发展计划项目(2012AA101603)

作者简介:潘晓东 男 副研究员 研究方向为食品理化检验 E-mail:panxd2009@gmail.com