

奶制品中二恶英类化合物两种提取方法的比较

蒋友胜, 张建清, 周健, 黄海燕, 李胜浓

摘要: [目的] 比较奶和奶制品中二恶英类化合物索氏抽提法和液液萃取法。[方法] 采集市售 4 种纯牛奶和 3 种奶粉, 分别通过索氏抽提和液液萃取, 再用酸性硅胶处理, 利用硅胶柱和铝柱净化, 用高分辨气相色谱/高分辨质谱检测分析 PCDDs/Fs 和 PCBs。[结果] 索氏抽提方法对牛奶和奶制品中脂肪不能提取完全, 得到的二恶英类化合物检测结果不能真实反映牛奶和奶制品中二恶英类化合物污染情况。液液萃取法能完全萃取牛奶和奶制品中脂肪以及溶于脂肪中的二恶英类化合物, 得到的结果能真实反映牛奶和奶制品中二恶英类化合物污染情况。[结论] 液液萃取法是适用于检测牛奶和奶制品中二恶英类化合物的检测方法。

关键词: 二恶英; 多氯联苯; 牛奶; HRGC/HRMS

COMPARISON OF TWO EXTRACTION METHODS FOR DETERMINATION OF DIOXIN AND DIOXIN-LIKE PCBs IN MILK AND MILK PRODUCTS JIANG You-sheng, ZHANG Jian-qing, ZHOU Jian, et al. (Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

Abstract: [Objective] To compare Soxhlet extraction with liquid-liquid extraction for determination of dioxin and dioxin-like PCBs in milk and milk products. [Methods] The total 4 kinds of milk and 3 kinds of milk powders were collected in the market, and were individually extracted by Soxhlet extraction and liquid-liquid extraction, and then treated by acidic silica gel, cleaned up through silica gel and alumina column and determined by HRGC/HRMS. [Results] Soxhlet extraction couldn't completely extract the full fat in milk and milk products, the result couldn't really reflect the pollution of dioxin and dioxin-like PCBs in milk and milk products. Liquid-liquid extraction could completely extract the full fat in milk and milk products, and the results were reliable. [Conclusion] Liquid-liquid extraction is a suitable method for determination of dioxin and dioxin-like PCBs in milk and milk products.

Key words: Dioxin; Polychlorinated Biphenyls; Milk; HRGC/HRMS

二恶英类化合物是内分泌干扰物, 具有免疫系统和神经系统毒性作用, 二恶英和多氯联苯还具有致畸、致癌和致突变作用。这类化合物广泛分布于环境中, 具有很高的化学稳定性和亲脂性, 难以生物降解, 能借助食物链在生物体内达到很高的富集倍数, 人体污染负荷主要来源于食物。奶和奶制品是富含脂肪的食品, 随着生活质量的提高, 奶和奶制品在食品消费中占越来越大的比重。奶是较容易受二恶英污染的食品, 饲料中的二恶英经奶牛通过牛奶进入人体, 为了食品安全, 非常有必要对牛奶中的二恶英进行检测。目前检测奶和奶制品(包括牛奶、羊奶和人奶等)中的二恶英主要有索氏抽提^[1,2]和液液萃取^[3,4]两种方法, 为了明确这两种提取方法是否都适用于牛奶和牛奶制品的检测, 了解这两种方法对奶和奶制品中二恶英类化合物检测结果的影响, 我们分别用这两种方法对 4 个液体奶和 3 个奶粉进行二恶英类化合物的检测。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与制备

作者简介: 蒋友胜 (1970-), 男, 硕士, 主管技师, 研究方向: 持久性有机污染物检验

作者单位: 深圳市疾病预防控制中心, 深圳, 518020

从市场上采集 4 个不同品牌的液体奶和 3 个不同品牌奶粉, 液体奶主要是盒装纯牛奶, 奶粉包括婴儿奶粉和成人奶粉。一部分液体奶在冻干机中冻干, 冻干后用匀浆器粉碎, 直至样品变成干燥的粉状, 保存在干燥器中待用。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 Trace GC 2000/MAT95XL 型高分辨气相色谱/高分辨质谱仪 (美国 Thermo 公司); FMS Power Prep 型自动纯化仪, 多层硅胶柱、碱性氧化铝柱、AX221 型碳吸附柱 (美国 Fluid Management Systems Inc.); R251 型旋转蒸发仪 (瑞士 BUCHI 公司); 1000ml 梨型分液漏斗 (美国 Glas-Col 公司)。

1.2.2 标准溶液 多氯代苯并二恶英和苯并呋喃 (polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, PCDDs/Fs) 和多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 标准溶液由美国 Cambridge Isotope Laboratories Inc. 提供, PCDDs/Fs 按 EPA1613 方法包括内标标准溶液 (EDF8999)、净化标准溶液 (EDF6999), 进样内标溶液 (EDF5999), 校正标准溶液 (EDF7999, 包括 CS0.2、CS1、CS2、CS3、CS4 和 CS5)。PCBs 按 EPA1668A 方法包括内标标准溶液 (EC4977)、净化标准溶液 (EC4978), 进样内标溶液 (EC4979), 校正标准溶液 (EC4976, 包括 CS0.2、CS1、CS2、CS3、CS4 和 CS5)。

1.2.3 试剂 农残级正己烷、乙醚、乙醇、石油醚、二氯甲

烷、甲苯、乙酸乙酯、丙酮、壬烷和氧化铝粉 (70~230 目) (德国 Merk 公司); 优质纯级硫酸 (广州市东红化工厂); 硅胶 (70~230 目) (德国 Fluka 公司); 优质纯草酸钠 (美国 Fisher 公司)。

1.3 样品前处理

1.3.1 索氏抽提 于萃取纸套筒内称取一定量 (由样品所含脂肪量确定) 已经冻干的样品或是奶粉, 加入 ^{13}C 标记的 PCDDs/Fs 和 PCBs 内标, 用 1:1 的正己烷/二氯甲烷连续索式提取 24 h, 控制回流速度为每小时回流 4 次。浓缩提取液, 待测脂肪含量。

1.3.2 液液萃取 称取约 250 ml 的液体奶, 奶粉称取约 20 g, 倒入 1 000 ml 梨型分液漏斗中, 奶粉加入去离子纯化水溶解, 终体积约 250 ml。加入 ^{13}C 标记的 PCDDs/Fs 和 PCBs 内标, 加入约 5 g 的草酸钠, 充分溶解, 加入 250 ml 乙醇, 混匀。加入 2:3 的正己烷/乙醚萃取 2 次, 每次萃取振荡 5 min, 静置分层。收集有机相, 浓缩有机相, 待测脂肪。

1.3.3 脂肪测定 浓缩前准确称重浓缩瓶, 将溶剂浓缩至干后恒重, 准确称重浓缩瓶, 两次称重结果的差值为试样的脂肪。

1.3.4 净化 浓缩的提取液中加入 ^{13}C 标记的 PCDDs/Fs 和 PCBs 净化标准, 再加入 150 ml 的正己烷, 加入约 50 g 的 30% 酸性硅胶, 在 70℃ 水浴中震荡保温 1 h。过滤, 滤液浓缩至微干。样品的纯化采用 Power-Pre 自动纯化系统, 电脑程序控制溶剂的流速、用量及流向。先用不同极性的溶剂润洗纯化柱, 将管路及纯化柱内的杂质干扰物冲洗掉。将样品浓缩液用正己烷溶解, 按照程序将样品的正己烷溶液流过多层硅胶柱及铝柱, 然后用 2:98 的二氯甲烷/正己烷溶液冲洗硅胶柱, 将目标化合物冲洗到铝柱, 由铝柱吸附, 然后用 1:1 的正己烷/二氯甲烷溶液冲洗铝柱, 冲洗液过碳柱, 收集流出组分。再用二氯甲烷冲洗铝柱, 收集流出组分。用 1:1 的甲苯/乙酸乙酯冲洗碳柱, 收集流出组分, 合并以上收集的 3 个组分, 这个组分里有目标化合物 PCBs。然后用甲苯冲洗碳柱, 收集流出组分, 这个组分含有 PCDDs/Fs。浓缩收集的流出组分, 用溶剂洗涤并转移至 1.5 ml 小瓶中, 用氮气吹干至溶剂量约 10 μl , 加入进样内标, 待上机检测。

1.4 仪器分析

1.4.1 气相色谱条件 PCDDs/Fs 和 PCBs 的检测使用的是毛细管柱 DB-5MS (60 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm), 进样口温度 280℃; 进样方式不分流; 传输线温度 280℃; 载气高纯氮 (0.999 99), 流量 1.0 ml/min (恒流)。PCDDs/Fs 升温程序: 120℃ 保持 1 min, 以 50℃/min 升至 220℃, 保持 15 min; 再以 1.5℃/min 升至 250℃, 以 0.59℃/min 升至 260℃; 最后以 33℃/min 升至 310℃, 310℃ 保持 8 min。PCBs 升温程序: 90℃ 保持 1 min, 以 20℃/min 升至 180℃, 保持 1 min; 再以 3℃/min 升至 300℃。

1.4.2 质谱分析条件 电离方式: 电子轰击源 (EI 源, pos); 离子源温度: 260℃; 加速电压: 5 000 V; 电子能量: 60 eV; 分辨率: 10 000; 以多离子监测 (MID) 模式同时监测目标化合物及其同位素内标化合物离子。

1.4.3 结果计算 采用同位素内标稀释技术定量测定试样中各目标化合物含量, 同时采用内标法计算同位素内标化合物的回收率。

2 结果与讨论

2.1 脂肪测定

二恶英类化合物是脂溶性化合物, 奶中二恶英含量是以脂肪中二恶英含量来计算的, 欧盟食品标准 (EC) No 199/2006 中牛奶和奶制品的二恶英限量标准是以脂肪浓度来表示的, 样品的脂肪测定非常重要。为了比较脂肪检测结果, 同时还用哥特里罗紫法测定了液体奶和奶粉中的脂肪含量, 测定的结果见表 1。哥特里罗紫法和本实验的液液萃取法得到的结果接近。牛奶中脂肪呈乳胶体, 脂肪球被乳中酪蛋白钙盐包裹, 用索氏抽提法不能对牛奶中脂肪提取完全, 需要破坏酪蛋白钙盐包裹。哥特里罗紫法利用氨液使乳中酪蛋白钙盐成为可溶性氨盐, 使得乙醚能提取完全脂肪。本实验的液液萃取法是利用草酸钠形成草酸钙沉淀, 生成可溶性酪蛋白钠, 从而释放脂肪球中脂肪, 使得脂肪萃取完全。

表 1 3 种方法测定纯牛奶和奶粉中脂肪结果 ($\times 10^{-2}$)

样品编号	哥特里罗紫法	索氏抽提	液液萃取
纯牛奶 1#	3.81	1.74	3.83
纯牛奶 2#	3.54	2.49	3.69
纯牛奶 3#	4.02	2.16	3.73
纯牛奶 4#	3.84	1.46	3.79
奶粉 1#	19.52	10.07	18.30
奶粉 2#	16.72	5.96	15.83
奶粉 3#	21.56	0.65	20.21

2.2 两种方法检测 PCDDs/Fs 结果比较

索氏抽提法和液液萃取法检测奶和奶制品中 PCDDs/Fs 的结果见表 2, 计算 PCDDs/Fs 的 TEQ 值, 各化合物的毒性当量值以 WHO 1998 年颁布的 I-TEF 值为准, 对未检出的组分在计算时以对应的 LOD 值计算。索氏抽提方法的全重计结果都低于液液萃取的全重计结果, 说明索氏抽提提取的不完整, 还有部分二恶英类化合物残留在样品中, 致使最后结果的不准确, 这和脂肪测定的结果相符。索氏抽提方法得到的结果和提取的脂肪量没有数值上的对应关系, 在不同奶和奶制品中二恶英在脂肪中的分布不是均匀的, 所以同一样品以脂肪计的结果相差比较大。

表 2 两种方法检测 PCDDs/Fs 结果 (WHO-TEQ pg/g)

样品编号	索氏抽提 (WHO-TEQ pg/g)		液液萃取 (WHO-TEQ pg/g)	
	全重计	脂肪计	全重计	脂肪计
纯牛奶 1#	0.021	1.17	0.029	0.75
纯牛奶 2#	0.020	0.79	0.033	0.89
纯牛奶 3#	0.026	1.18	0.056	1.50
纯牛奶 4#	0.021	1.47	0.075	1.98
奶粉 1#	0.035	0.35	0.037	0.20
奶粉 2#	0.029	0.49	0.130	0.90
奶粉 3#	0.011	1.65	0.034	0.17

2.3 两种方法检测 PCBs 结果比较

索氏抽提法和液液萃取法检测奶和奶制品中 PCBs 的结果见表 3。PCBs 的 WHO - TEQ 值是有二恶英毒性的 12 种 PCBs 的化合物 TEQ 总值, 总含量是有二恶英毒性的 12 种 PCB 和 6

种指示性 PCB 含量总和。两种方法检测 PCBs 得到的结果和二恶英的结果类似, 索氏抽提方法的全重计结果都低于液液萃取的全重计结果。

表 3 两种方法检测 PCBs 结果

样品编号	索氏抽提				液液萃取			
	(WHO - TEQ pg/g)		总含量 (pg/g)		(WHO - TEQ pg/g)		总含量 (pg/g)	
	全重计	脂肪计	全重计	脂肪计	全重计	脂肪计	全重计	脂肪计
纯牛奶 1#	0.016	0.91	22.83	1314.57	0.019	0.33	25.67	487.57
纯牛奶 2#	0.010	0.41	22.84	915.78	0.013	0.36	24.88	527.56
纯牛奶 3#	0.0053	0.25	9.12	422.72	0.010	0.27	9.39	252.00
纯牛奶 4#	0.018	1.21	14.14	974.65	0.022	0.57	9.23	243.49
奶粉 1#	0.029	0.29	55.31	549.17	0.052	0.29	109.14	596.43
奶粉 2#	0.0025	0.042	11.08	185.90	0.0069	0.046	31.78	214.31
奶粉 3#	0.0024	0.37	12.39	1900.00	0.0048	0.024	32.81	162.36

2.4 两种方法检测结果的相关性分析

两种方法检测 PCDDs/Fs 结果的相关性分析见图 1 和图 2, 图 1 是全重计结果的比较图, X 轴是索氏抽提检测全重计结果, Y 轴是液液萃取法检测全重计结果, $r = 0.339$ 。图 2 是脂肪计结果的比较图, $r = 0.298$ 。两种方法检测 PCBs 的相关性分析和 PCDDs/Fs 的结果相似, 以脂肪计的 PCBs 的 TEQ 值和总含量相关性分析后得到 r 值分别为 0.775 和 0.127。这两种方法得到的结果没有相关性, 差别较大, 索氏抽提方法得到的结果不能代表奶和奶制品中二恶英类化合物污染的情况。

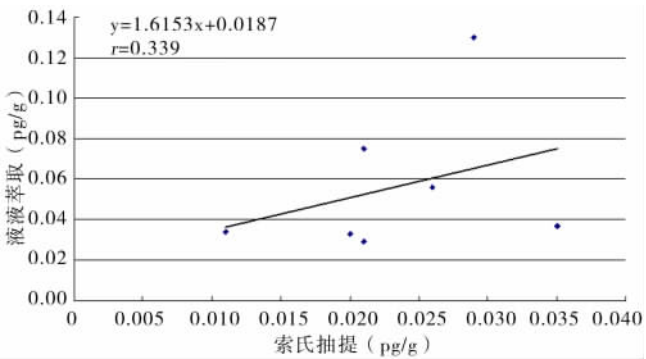


图 1 索氏抽提法和液液萃取法检测 PCDDs/Fs 全重计结果相关性分析

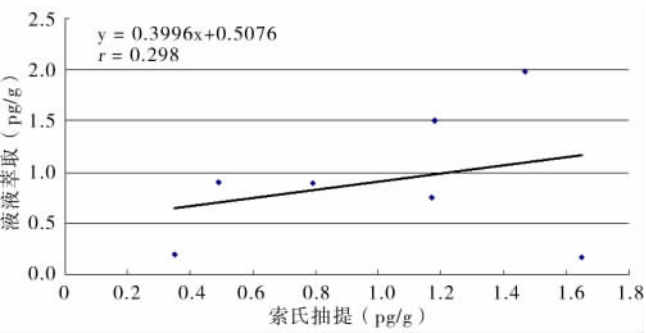


图 2 索氏抽提法和液液萃取法检测 PCDDs/Fs 脂肪计结果相关性分析

2.5 回收率分析

两种方法的 PCDDs/Fs 和 PCBs 的 ^{13}C 标记化合物回收率在 60%~110%之间, 符合美国 EPA 方法对回收率的要求。两种方法的 PCDDs/Fs 和 PCBs ^{13}C 标记化合物是直接加在样品中, 可被直接提取到有机溶剂中, 与样品中二恶英类化合物存在模式并不相同, 不能真实反映样品中二恶英类化合物提取情况。虽然两种方法回收率是一致的, 但最后结果相差较大。牛奶和奶制品中脂肪球被酪蛋白钙盐包裹, 索氏抽提法对牛奶和奶制品中脂肪不能抽提完全, 致使检测的结果与牛奶和奶制品中二恶英类化合物实际污染情况有较大偏差。

3 结论

索氏抽提法和液液萃取法检测奶和奶制品中二恶英类化合物得到的结果相差较大, 索氏抽提法得到的结果不能真实反映奶和奶制品中二恶英类化合物污染情况。液液萃取法利用草酸钠形成草酸钙沉淀, 生成可溶性酪蛋白钠, 从而释放脂肪球中脂肪, 使得脂肪萃取完全, 溶于脂肪中的二恶英类化合物也能被提取完全, 得到的结果能真实反映奶和奶制品中二恶英类化合物污染情况。液液萃取法是适用于检测牛奶和奶制品中二恶英类化合物的检测方法。

参考文献:

[1] Costera A, Feidt C, Marchand P, et al. PCDD/F and PCB transfer to milk in goats exposed to a long-term intake of contaminated hay[J]. Chemosphere, 2006, 64 (4): 650-657.
[2] Li J, Zhang L, Wu Y, et al. A national survey of polychlorinated dioxins, furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) in human milk in China [J]. Chemosphere, 2009, 75 (9): 1236-1242.
[3] Hsu J, Guo Y, Liu C, et al. A comparison of PCDD/PCDFs exposure in infants via formula milk or breast milk feeding [J]. Chemosphere, 2007, 66 (2): 311-319.
[4] Durand B, Dufour B, Vindel E, et al. A survey of PCDD and PCDF in French long-life half-skimmed drinking milk [J]. Chemosphere, 2000, 41 (6): 865-869.

(收稿日期: 2010-05-10)