

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定 大米中无机砷

史潜玉^{1,2}, 刘立^{1,2*}, 倪志尧^{1,2}, 柯润辉^{1,2}, 赵欣³, 尹建军^{1,2}, 宋全厚^{1,2}

(1. 中国食品发酵工业研究院, 北京 100015; 2. 国家食品质量监督检验中心, 北京 100015;
3. 聚光科技(杭州)股份有限公司, 杭州 310052)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定大米中无机砷的分析方法。**方法** 采用两种前处理方法对大米中的无机砷进行提取, 经高效液相色谱分离后, 利用电感耦合等离子体质谱进行测定。同时对大米样品进行微波消解后测定其中的总砷, 通过无机砷及有机砷的总和计算两种前处理方法的回收率, 从而对前处理方法进行比较。对磷酸二氢铵、碳酸铵以及磷酸氢二铵等缓冲盐进行选择, 并对pH值进行优化, 确定最优的流动相条件。**结果** 以12.5 mmol/L磷酸氢二铵作为流动相, 调节流动相pH为8.5, 流速为1 mL/min, 可以将5种无机砷形态完全分离。对两种前处理方法进行比较, 发现两种前处理方法的提取效率均大于87.5%, 其中酸-热辅助提取法的提取效率相对更高。**结论** 该方法准确、简单, 适合大米中无机砷的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 电感耦合等离子体质谱法; 无机砷; 形态分析

Determination of inorganic arsenic in rice by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

SHI Qian-Yu^{1,2}, LIU Li^{1,2*}, NI Zhi-Yao^{1,2}, KE Run-Hui^{1,2}, ZHAO Xin³, YIN Jian-Jun^{1,2}, SONG Quan-Hou^{1,2}

(1. China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, Beijing 100015, China; 2. National Food Quality Supervision and Inspection Center, Beijing 100015, China; 3. Focused Photonics (Hangzhou), Co., Ltd., Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of inorganic arsenic in rice by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). **Methods** Inorganic arsenic in rice was extracted by 2 kinds of pretreatment methods. After separated by HPLC, the samples were determined by ICP-MS. At the same time, the total arsenic of rice samples was determined after microwave digestion. The recoveries of 2 pretreatment methods were calculated by the sum of inorganic arsenic and organic arsenic, and the pretreatment methods were compared. The buffer salts such as ammonium dihydrogen phosphate, ammonium carbonate and diammonium hydrogen phosphate were selected and the pH value was optimized to confirm the optimum mobile phase conditions. **Results** In this method, 12.5 mmol/L diammonium hydrogen phosphate was

基金项目: 科技部国家重大科学仪器设备开发专项子项目(2011YQ06010007)

Fund: Supported by the Ministry of Science and Technology for Major National Scientific Equipment Development Special Subproject (2011YQ06010007)

*通讯作者: 刘立, 高级工程师, 主要研究方向为食品中无机元素分析。E-mail: cfda04@163.com

*Corresponding author: LIU Li, Senior Engineer, National Food Quality Supervision and Inspection Center, Building 6, Jiuxianqiao Road on the 24th House, Beijing 100024, China. E-mail: cfda04@163.com

used as the mobile phase, the mobile phase was adjusted to pH 8.5 and the flow rate was 1 mL/min. Under such conditions, 5 kinds of inorganic arsenic species could be separated completely. The results showed that the extraction efficiencies of the 2 pretreatment methods were higher than 87.5%, and the extraction efficiency of the acid-thermal assistant extraction method was higher. **Conclusions** The method is accurate, simple, which is suitable for the determination of inorganic arsenic in rice.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; inductively coupled plasma mass spectrometry; inorganic arsenic; morphological analysis

1 引言

大米是人类主要粮食作物之一,世界上约有50%人口以大米为主食^[1],在我国,以大米为主食的人口达到了65%^[2]。然而,有报道指出稻米可生物蓄积无机砷化合物,造成某些地区大米中无机砷含量较高^[3],大米中砷形态的分析与风险评价已成为食品安全领域的研究热点^[4]。在自然界中,砷的主要形态有无机形态的砷酸盐(arsenate, As^V)和亚砷酸盐(arsenite, As^{III}),以及一甲基砷(mono-methyl arsenic, MMA),二甲基砷(dimethyl arsenic, DMA)和砷甜菜碱(arsenobetaine, AsB)等有机砷。其中,无机砷的毒性较大,国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)已将无机砷列为强致癌物, MMA 和 DMA 的毒性较小, AsB 等通常被认为是无毒的砷化合物^[5]。大量研究表明,大米中砷主要以无机态的 As^V、As^{III},以及有机态的 DMA、MMA 和少量的 AsB 等形式存在^[6]。

在前人研究的基础上^[7-11],本研究采用酸-热辅助提取法和水-热辅助提取法对大米中砷形态的化合物进行提取,并利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)结合电感耦合等离子体质谱法(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)对大米中的5种砷形态化合物进行测定,对流动相进行优化,并对两种前处理的结果进行对比,建立准确、简单的大米中5种砷形态化合物的检测方法。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

大米,市售;超纯水:电阻率 18.2 MΩ·cm⁻¹; (NH₄)₂HPO₄(色谱纯,上海安谱公司);质谱调谐液:Li、Y、Ce、Tl、Co,质量浓度均为 1 μg/L(美国 Agilent 公司);硝酸(优级纯,美国 Fisher 公司);乙酸(色谱纯,天津市光复精细化工研究所);氨水(色谱纯,上海安谱公司)。

砷标准物质:砷酸盐(As^V)(GBW 08667)、亚砷酸盐(As^{III})(GBW 08666)、MMA(GBW 08668)、DMA(GBW 08669)、AsB(GBW 08670)(中国计量科学研究院)。5种砷形态单标准储备液:用纯水将5种砷形态稀释成浓度均为 5 mg/L(以 As 计)的单标准储备液,置于 4 °C 冰箱中避光保

存。砷形态标准工作液和混合标准工作液现用现配。

2.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪配有自动进样器、Agilent 7700X 型电感耦合等离子体质谱仪(美国 Agilent 公司);Mars 5 微波消解仪(美国 CEM 仪器有限公司);美国 Milli-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司);DHG-9145A 恒温干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);LG 10-2.4A 高速离心机(北京雷勃尔公司);FE-20 pH 酸度计(梅特勒-托利多公司);VORTEX-5 涡旋仪(海门市其林贝尔公司);FW80 高速粉碎机(天津泰斯特公司)。

2.3 样品前处理

酸-热辅助提取法:称取 1.0 g(精确至 0.001 g)经粉碎后混合均匀的大米样品,置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 25 mL 0.15 mol/L HNO₃ 溶液,混匀后密闭放置过夜。然后放入恒温箱内 90 °C 加热提取 2.5 h,每 0.5 h 取出振摇 1 min,提取完成后取出,待冷却至室温后于 8000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 有机滤膜过滤,滤液收集至液相进样小瓶待测。同时按相同方法做试剂空白。

水-热辅助提取法:称取 1.0 g(精确至 0.001 g)经粉碎后混合均匀的大米样品,置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 24 mL 超纯水,涡旋混匀,然后放入恒温箱内 90 °C 加热提取 2.5 h,每 0.5 h 取出振摇 1 min,提取完成后取出,加入 1 mL 3% 乙酸沉淀蛋白,于 4 °C 冰箱中静置 30 min 后,8000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 水相滤膜过滤,滤液收集至液相进样小瓶待测。同时按相同方法做试剂空白。

总砷含量的测定:称取 0.5 g(精确至 0.001 g)经粉碎后混合均匀的大米样品于微波消解管中,加硝酸 6 mL,过氧化氢 2 mL,放置 30 min 后旋紧外盖置于微波消解仪中。分 3 个阶段进行微波消解:室温~120 °C 升温时间 5 min,保持 120 °C 5 min;120~160 °C 升温时间 5 min,保持 5 min;160~180 °C 升温时间 5 min,保持 20 min。待冷却至室温后,打开消解管,加热赶酸,冷却后转移消化液至 25 mL 容量瓶中,同时做试剂空白,用 ICP-MS 进行测定。

2.4 高效液相色谱及 ICP-MS 条件

色谱条件:砷形态分离柱采用 Hamilton PRP-X 100 阴

离子交换柱(250 mm×4.1 mm, 10 μm); 保护柱: Hamilton PRP X-100 阴离子交换柱(10 mm×4.1 mm, 10 μm); 流动相: 12.5 mmol/L 磷酸氢二铵溶液, pH=8.5, 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μL, 积分时间 0.5 s。

ICP-MS 条件见表 1。

表 1 ICP-MS 仪器工作参数
Table 1 ICP-MS instrument operating parameters

| 雾化器 | MicroMist 同心雾化器 | 雾化室温度 | 2 °C |
|-------------|-----------------|-------|------------|
| 采样锥/截取锥 | 1.0/0.4 mm | 载气流速 | 0.95 L/min |
| 高频发射功率 | 1550 W | 等离子体气 | 15 L/min |
| 检测质量数 m/z | 75 | 稀释气 | 0.20 L/min |
| 采样深度 | 8 mm | 蠕动泵 | 0.1 r/s |
| 扫描方式 | 跳峰 | 观测点/峰 | 3 |

3 结果与分析

3.1 流动相的选择

在使用阴离子交换色谱柱时, 组分的保留值和分离度主要通过控制流动相的 pH 值和离子强度来调节。阴离子色谱柱的缓冲盐浓度一般介于 10~50 mmol/L 之间, 离子强度过高会影响色谱柱的使用寿命, 因此在能够将目标物完全分开的前提下应选择较小的缓冲液浓度。强碱性和强酸性的离子交换剂对 pH 值的依赖较小, 弱碱性和弱酸性的离子交换剂受 pH 的影响较大, 而阴离子交换色谱柱常使用含氨水的缓冲液作为流动相, 因此本实验对磷酸二氢铵、碳酸铵以及磷酸氢二铵缓冲盐溶液进行了考察, 并对其 pH 值进行了优化。以磷酸二氢铵或碳酸铵作为流动相进行分离测定时, AsB 与 As^{III} 不能完全分离。当选择磷酸氢二铵

溶液作为流动相, 浓度为 10 mmol/L 时, 离子强度较小, 5 种砷化合物分离效果不理想; 当选择浓度为 12.5 mmol/L、pH=8.0 时, AsB 与 As^{III} 不能完全分离; pH=9.0 时, As^{III} 与 DMA 不能完全分离; 最后选择 pH=8.5 时, 五种砷形态化合物都能得到完全分离。因此, 选择 12.5 mmol/L 磷酸氢二铵溶液, pH=8.5 作为流动相条件。

3.2 载气与稀释气的流速的选择

稀释气是在雾化器之后加入一路高纯氦气, 对载气具有一定的稀释作用, 能减少流动相中的盐在采样锥口的沉积, 进而提高样品测定的稳定性, 同时对采样锥具有一定的保护作用。稀释气的流速过高会大大降低测定的灵敏度, 过小则不能起到稀释气的作用, 最终选择载气流速为 0.95 L/min, 稀释气流速 0.20 L/min。

3.3 5 种砷形态标准曲线及相关系数

分别用超纯水将 5 种砷的标准储备溶液逐级稀释, 配置成浓度为 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μg/L 的混合标准系列溶液。在优化好的实验条件下, 通过 HPLC-ICP-MS 进行测定, 仪器软件按照编辑好的数据分析处理方法计算各色谱峰的积分面积, 并自动绘制标准曲线。

表 2 5 种砷形态的标准曲线
Table 2 Standard curves of 5 arsenic species

| 砷形态 | 线性范围(μg/L) | 回归方程 | 相关系数 |
|-------------------|------------|----------------|------------|
| AsB | 0~20.0 | $Y=6968.3529X$ | $r=0.9999$ |
| As ^{III} | 0~20.0 | $Y=5971.5499X$ | $r=0.9999$ |
| DMA | 0~20.0 | $Y=6353.8562X$ | $r=0.9998$ |
| MMA | 0~20.0 | $Y=3715.4541X$ | $r=0.9996$ |
| As ^V | 0~20.0 | $Y=6790.6365X$ | $r=0.9995$ |

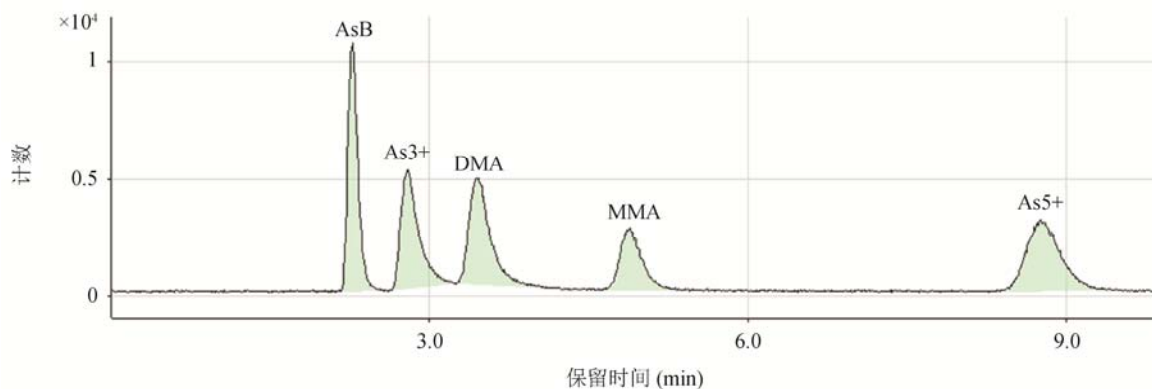


图 1 5 种砷形态标准分离图谱(10 ng/mL)

Fig. 1 Separation chromatogram of five arsenic species standard (10 ng/mL)

表 3 砷形态的提取效率(mg/kg)
Table 3 Extraction efficiency of arsenic species(mg/kg)

| 样品 | 方法 | AsB | As ^{III} | DMA | MMA | As ^V | 形态分析总砷含量 | ICP-MS 测得总砷含量 | 提取效率/% |
|----|-------|-----|-------------------|--------|-----|-----------------|----------|---------------|--------|
| 1 | 水-热辅助 | - | 0.0352 | 0.0142 | - | - | 0.049 | 0.056 | 87.5 |
| | 酸-热辅助 | - | 0.0347 | 0.0246 | - | - | 0.059 | | 105.4 |
| 2 | 水-热辅助 | - | 0.0022 | - | - | 0.0400 | 0.042 | 0.046 | 91.3 |
| | 酸-热辅助 | - | 0.0036 | - | - | 0.0408 | 0.044 | | 95.7 |
| 3 | 水-热辅助 | - | 0.0141 | - | - | 0.0337 | 0.048 | 0.054 | 88.9 |
| | 酸-热辅助 | - | 0.0156 | - | - | 0.0356 | 0.051 | | 94.4 |
| 4 | 水-热辅助 | - | 0.0024 | 0.0084 | - | 0.0318 | 0.043 | 0.049 | 87.8 |
| | 酸-热辅助 | - | 0.0025 | 0.0092 | - | 0.0333 | 0.045 | | 91.8 |

表 4 加标回收实验
Table 4 Spike recovery experiment

| 水-热辅助提取法 | | | | 酸-热辅助提取法 | | | | |
|-------------------|------------|------------|------------|----------|------------|------------|------------|--------|
| 无机砷形态 | 本底值/(μg/L) | 加标量/(μg/L) | 测定值/(μg/L) | 回收率(%) | 本底值/(μg/L) | 加标量/(μg/L) | 测定值/(μg/L) | 回收率(%) |
| As ^{III} | 1.452 | 2.0 | 3.327 | 93.8 | 1.437 | 2.0 | 3.430 | 99.6 |
| | | 5.0 | 5.968 | 90.3 | | 5.0 | 6.454 | 100.3 |
| | | 10.0 | 10.884 | 94.3 | | 10.0 | 10.776 | 93.4 |
| As ^V | 0.510 | 2.0 | 2.446 | 96.8 | 0.300 | 2.0 | 2.459 | 108.0 |
| | | 5.0 | 5.204 | 93.9 | | 5.0 | 5.052 | 95.0 |
| | | 10.0 | 9.931 | 94.2 | | 10.0 | 10.996 | 106.7 |

3.4 砷形态的提取效率

水-热辅助提取法是一种传统的砷形态提取方法,不会造成砷形态之间相互的转化^[9],实验采用水作为提取剂,密闭加热提取;同时采用了酸-热辅助提取法进行实验,并结合微波消解-ICP-MS 法测定总砷的含量对这两种方法的提取效率进行比较,结果见表 3。

3.5 加标回收实验

为考察两种方法的回收率和砷形态化合物稳定性,随机选取 1 个大米样品,分别加入质量浓度为 2.0、5.0 和 10.0 g/L 的无机砷形态标样,测定样品中的无机砷形态,计算回收率,结果见表 4。

4 结 论

本研究采用两种前处理方法对大米中的 5 种无机砷形态化合物进行了提取,以 12.5 mmol/L 磷酸氢二铵溶液作为流动相,取得了较好的分离效果。结果表明,大米中砷主要以三价砷、五价砷以及二甲基砷等形态存在;两种前处理方法的提取效率都令人满意,其中相对于水-热辅

助提取法,酸-热辅助提取法的提取效率稍高。

参考文献

- [1] Meharg AA, Williams PN, Adomako E, *et al.* Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice [J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(5):1612-1617.
- [2] 冯敏, 陆迁, 林建中. 我国城乡大米消费弹性分析[J]. *当代经济*, 2011, (6): 84-85.
Feng M, Lu Q, Lin JZ. Analysis on the consumption elasticity of rice in China [J]. *Contem Econ*, 2011, (6): 84-85.
- [3] Zhu YG, Williams PN, Meharg AA. Exposure to inorganic arsenic from rice: a global health issue [J]. *Environ Pollut*, 2008, 154: 169-171.
- [4] 云洪雷, 张磊, 李筱薇, 等. 大米中无机砷测定方法的研究[J]. *卫生研究*, 2010, 39(3): 316-320.
Yun HX, Zhang L, Li WW, *et al.* Determination of inorganic arsenic in rice [J]. *Health Res*, 2010, 39(3): 316-320.
- [5] 侯艳霞, 刘丽萍, 潘浩, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱分析大米中砷形态化合物[J]. *分析实验室*, 2013, 32(10): 103-107.
Hou YX, Liu LP, Pan H, *et al.* Analysis of arsenic species in rice by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Anal Lab*, 2013, 32(10): 103-107.
- [6] 巩佳第, 曹晓林, 曹赵云, 等. 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测

- 定稻米中的 5 种砷形态[J]. 色谱, 2014, 32(7): 717-722.
- Gong JD, Cao XL, Cao ZY, *et al.* Determination of five arsenic species in rice by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32(7): 717-722.
- [7] 冯灏, 岳兵, 尚晓红, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定不同膳食基质中 5 种砷形态的方法研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(9): 3654-3664.
- Feng H, Yue B, Shang XH, *et al.* Determination of five arsenic species in different dietary matrix by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(9): 3654-3664.
- [8] 韩枫, 岳兵, 米健秋, 等. 反相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术快速测定大米中无机砷[J]. *环境化学*, 2015, 34(1): 194-197.
- Han F, Yue B, Mi JX, *et al.* Rapid determination of inorganic arsenic in rice by reversed phase chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Environ Chem*, 2015, 34(1): 194-197.
- [9] 汤璐, 张琳琳, 张贵伟, 等. HPLC-ICP-MS 测定干香菇中砷形态[J]. *食品工业*, 2015, 36(12): 275-277.
- Tang L, Zhang LL, Zhang GW, *et al.* Determination of arsenic speciation in dried *Lentinula edodes* by HPLC-ICP-MS [J]. *Food Ind*, 2015, 36(12): 275-277.
- [10] 倪张林, 汤富彬, 喻晴, 等. 短柱分离-电感耦合等离子体质谱联用测定大米和紫菜中的无机砷[J]. *分析实验室*, 2014, 33(12): 1392-1396.
- Ni ZL, TANG FB, Yu Q, *et al.* Determination of inorganic arsenic in rice and seaweed by short column separation-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Anal Lab*, 2014, 33(12): 1392-1396.
- [11] 黄东仁. 福建省紫菜中砷的形态及含量[J]. *中国渔业质量与标准*, 2015, 5(1): 52-60.
- Huang DR. Speciation and content of arsenic in seaweed of Fujian [J]. *Qual Stand Fish China*, 2015, 5(1): 52-60.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介

史潜玉, 工程师, 硕士, 主要研究方向为无机元素分析。

E-mail: thesong_qyshi@163.com



刘立, 高级工程师, 主要研究方向为无机元素分析。

E-mail: cfda04@163.com