

液相色谱—电感耦合等离子体质谱法 分析大米中的砷形态

刘静晶, 赵 岚*, 邹春苗, 付 宇, 张宇博, 孙汉伟

(黑龙江省疾病预防控制中心, 哈尔滨 150030)

摘要: **目的** 建立液相色谱—电感耦合等离子体质谱法测定大米中砷形态化合物的分析方法。**方法** 样品经硝酸提取, 采用 Dionex IonPac AS7 色谱柱, 5 mmol/L 和 10 mmol/L 碳酸铵溶液作为流动相进行梯度洗脱, 液相色谱分离, 电感耦合等离子体质谱进行定性和定量分析。**结果** 在 1.0~100.0 μg/L 浓度范围内各砷形态线性良好, 相关系数 r 均优于 0.999, 方法加标回收率为 84.5%~112.1%, 相对标准偏差 <5%。**结论** 本研究建立的方法准确、可靠、灵敏度高, 适用于大米中砷形态化合物的定量检测。

关键词: 液相色谱法; 电感耦合等离子体质谱法; 砷; 形态化合物; 大米

Analysis of arsenic morphology in rice by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

LIU Jing-Jing, ZHAO Lan*, ZOU Chun-Miao, FU Yu, ZHANG Yu-Bo, SUN Han-Wei

(Heilongjiang Center for Disease Control and Prevention, Harbin 150030, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of arsenic morphology compounds in rice by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted with nitric acid, using Dionex IonPac AS7 chromatographic column, with 5 mmol/L and 10 mmol/L ammonium carbonate solutions as mobile phase for gradient elution, and the samples were separated by liquid chromatography, and inductively coupled plasma mass spectrometry was used for qualitative and quantitative analysis. **Results** Various arsenic forms had good linear relationships in the range of 1.0–100.0 g/L, and the correlation coefficient was higher than 0.999. The spiked recoveries were obtained from 84.5% to 112.1%, with the relative standard deviation was less than 5%. **Conclusion** This method is accurate, reliable and sensitive, which is suitable for the quantitative determination of arsenic morphological compounds in rice.

KEY WORDS: liquid chromatography; inductively coupled plasma mass spectrometry; arsenic; morphology compounds; rice

1 引言

砷是自然界中普遍存在的一种元素, 它的毒性随存在形式的不同相差很大, 元素砷毒性较弱, 当以化合物形

式存在时毒性增强^[1]。以砷形态化合物的半数致死量 LD50 计, 毒性强弱依次为: 亚砷酸盐[arsenious acid, As(III)]、砷酸盐[arsenic acid, As(V)]、一甲基砷酸(monomethylarsonic acid, MMA)、二甲基砷酸(dimethyl arsinic acid, DMA)、砷

*通讯作者: 赵岚, 博士, 主任医师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: zhaolan75@163.com

*Corresponding author: ZHAO Lan, Ph.D, Chief Physician, Heilongjiang Center for Disease Control and Prevention, No.40, Youfang Road, Xiangfang District, Harbin 150030, China. E-mail: zhaolan75@163.com

胆碱(arsenocholine, AsC)、砷甜菜碱(arsenobetaine, AsB)等^[2]。其中无机砷 As(III)、As(V)毒性最强^[3,4],国际癌症研究委员会已将无机砷列为一类致癌物质^[5];一甲基砷酸 MMA、二甲基砷酸 DMA 毒性次之;砷胆碱 AsC、砷甜菜碱 AsB 通常被认为是无毒的^[6,7]。因此单一检测总砷的含量不能满足人们对食品中砷摄入风险的正确评价,应同时分析砷不同形态化合物的含量,以此来评价食品的安全性更具有实际意义。

大米是除饮用水以外,人体摄入砷化合物的主要来源^[6-8]。联合国粮食及农业组织(Food And Agriculture Organization, FAO)在 2013 年指出中国为世界上最大的大米生产国^[9],食用大米亦为我国大多数居民的主要饮食习惯。砷形态分析技术逐渐成为国内外的研究热点,2015 年我国将食品中无机砷的检测纳入到国家标准方法中,并于 2016 年 3 月正式实施,目前,大米中砷形态化合物研究多以 2~5 种化合物为主^[10-13]。本研究选择液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定大米中砷的 6 种不同形态化合物 As(III)、As(V)、MMA、DMA、AsC、AsB,并在以往研究的基础上,探索更为简便、高效、适用性强的分析方法。为砷形态分析技术摸索更多新的途径,进一步完善食品安全性评价的技术保障,以期分析大米中砷形态化合物分布情况提供更多参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

U3000 液相色谱仪(美国 Thermofisher Scientific 公司);iCAP Q 电感耦合等离子体质谱仪(美国 Thermofisher Scientific 公司);Sartorius 超纯水处理机、BSA124S 电子天平(德国 Sartorius 公司);HWS28 型恒温水浴锅(上海一恒公司);Beckman Avanti J-25i 高效冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司);KQ-500VDE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

标准品:亚砷酸根 As(III)[(1.011±0.016) μmol/g]、砷酸根 As(V)[(0.233±0.005) μmol/g]、一甲基砷 MMA[(0.335±0.011) μmol/g]、二甲基砷 DMA[(0.706±0.024) μmol/g]、砷胆碱 AsC[(0.374±0.015) μmol/g]、砷甜菜碱 AsB[(0.518±0.015) μmol/g](中国计量科学研究院);质谱调谐液(1.0 μg/L,美国 Thermofisher Scientific 公司);超纯水(电阻率 18.2 MΩ·cm);硝酸(优级纯,德国默克公司);碳酸铵(99%,阿达玛斯试剂公司);甲醇(色谱纯,德国默克公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

准确量取适量 6 种砷形态化合物标准物质,以超纯水配制成浓度为 1.0 mg/L 的标准储备液。准确移取适量储备液,以流动相稀释成浓度为 0.0、1.0、5.0、10.0、50.0、

100.0 μg/L 的混合标准溶液。

2.2.2 液相色谱-电感耦合等离子体质谱条件

(1) 液相色谱条件

色谱柱:阴离子交换柱 Dionex IonPac AS7(250 mm×4 mm),保护柱:Dionex IonPac AG7(50 mm×4 mm);流动相:A 相为 5 mmol/L 碳酸铵溶液,B 相为 100 mmol/L 碳酸铵溶液;流速:1.0 mL/min,进样体积:20 μL;梯度洗脱程序:0~3.6 min,100%A,3.6~7 min,100%B,7~15 min,100%A。

(2) 电感耦合等离子体质谱条件

选择分析模式:动能歧视(kinetic energy discrimination, KED)模式,分析质量数为 75As,射频(radio frequency, RF)功率为 1550 W,进样深度为 5.0 mm,雾化气流速:1.05 L/min,冷却气流速:14 L/min,辅助气流速:0.8 L/min,碰撞气(He)流速:4.3 mL/min。

2.2.3 样品处理

将大米经粉碎机粉碎后,称取约 1.0 g 样品于 40 mL 离心管中,加入 20 mL 硝酸溶液(0.15 mol/L),振荡使样品充分浸泡在提取液后,于 90 °C 水浴中浸提 2.5 h,每 30 min 振摇 1 min,提取完毕,取出冷却至室温,8000 r/min 离心 15 min,取上清液,经 0.45 μm 水相滤膜过滤后进样测定。

3 结果与分析

3.1 质谱条件优化

在联机实验前,首先进行质谱条件优化,以确保检测的准确性和灵敏度。以 1.0 μg/L 调谐液(Ba、Bi、Ce、Co、In、Li、U)进行调谐,优化 ICP-MS 参数,包括载气流速、采样深度和炬管位置等,使灵敏度、氧化物比率、双电荷比率均符合实验要求。因 As 只有一种质量数 75,故选取 $m/z=75$ 为检测离子,为减小载气 40Ar 和 35Cl 可能形成 ArCl($m/z=75$)带来的干扰,本实验选取 KED 检测模式,以 He 作为碰撞气体。

3.2 色谱条件优化

3.2.1 流动相和洗脱方式的选择

考察不同的流动相和洗脱方式对分离的影响。根据文献^[14-17]报道,结合 LC-ICP-MS 的特性,本实验依次选取了 3 种不同的流动相和洗脱方式测定 As(III)、As(V)、MMA、DMA、AsC、AsB 6 种砷形态,分别为:(1)流动相:10 mmol/L 无水乙酸钠、3 mmol/L 硝酸钾、10 mmol/L 磷酸二氢钠、0.2 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠,pH=10,等度洗脱;(2)A 相:1 mmol/L 碳酸铵,B 相:12 mmol/L 硝酸铵+磷酸氢二铵,梯度洗脱;(3)A 相:5 mmol/L 碳酸铵,B 相:100 mmol/L 碳酸铵,梯度洗脱。

3 种不同方式的分离色谱图如图 1 所示。方法(1) 6 种砷形态没有完全分离,背景值偏高,AsC 与 MMA 没有分开而 AsB、DMA 和 As(III)中形态出峰时间接近出现部分峰

重叠, 分离效果不佳。方法(2) 能够分离出 6 种砷形态, 但 AsV 的峰形略宽。方法(3) 能够实现 6 种砷形态分离, 峰形尖锐, 灵敏度高。所以, 本研究采用方法(3)。

3.2.2 梯度洗脱的优化

在一定范围内, pH 和盐浓度对 AsB、DMA 和 As(III) 的出峰时间影响不明显, 而 MMA 和 As(V) 随着 pH 和盐浓度的增大, 出峰时间明显缩短^[1,18], 所以选择在 As(III) 出峰后转为 B 相。同时考虑高浓度 B 相对分离柱本身的损耗, 以及 A、B 两相间浓度差异较大, 在不明显影响 AsC、MMA 和 As(V) 分离效果和出峰时间的前提下, 尽快转为 A 相平衡色谱柱, 以减小高浓度盐对分离柱的损耗, 同时缩短整体检测时间。在 6 种砷形态化合物全部出峰后, 以 A 相平衡色谱柱仍要达到 5 min 以上, 以保证连续进样的稳定性。本次实验在 9.5 min 内, 6 种砷形态化合物全部分离出峰, 峰形良好, 总体持续时间为 15 min, 实验优化的梯度洗脱程序见 2.2.1。

3.3 线性范围及检出限

配制浓度为 0.0、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液序列, 进行线性范围实验。结果表明, 本方法在 1.0~100.0 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内, 线性良好, 线性相

关系数 r 均大于 0.999。采用逐级稀释法, 分别测定不同浓度下 6 种砷形态化合物的信噪比(S/N), 以各色谱峰信噪比 S/N 为 3:1 时所对应的浓度计算检出限, 实验结果见表 1。

3.4 方法准确度

分别以标准参考物质和加标回收率两种方式考量方法的准确度。

3.4.1 标准参考物质的测定

选取大米粉成分分析标准物质 GBW(E)100348, 该参考物质给出了无机砷及总砷的参考值范围。样品按所建方法进行平行测定, 测得样品中含有的砷形态化合物为 As(III)、DMA 和 As(V) 3 种, 以 As(III) 和 As(V) 加和获得无机砷测定结果在参考值范围内, 且 As(III)、DMA 和 As(V) 3 种砷形态结果加和达到总砷的参考值范围。具体标准参考物质色谱图见图 2。

3.4.2 加标回收率的测定

选取 3 份不同产地的大米样品, 每份做 2 个平行, 进行加标回收实验, 分别添加不同浓度的标准溶液, 加标浓度为 1.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/L}$ 。按所建方法处理测定砷形态化合物含量, 并计算加标回收率。结果显示, 6 种砷形态化合物加标回收率在 84.5%~112.1% 之间, 详情见表 2。

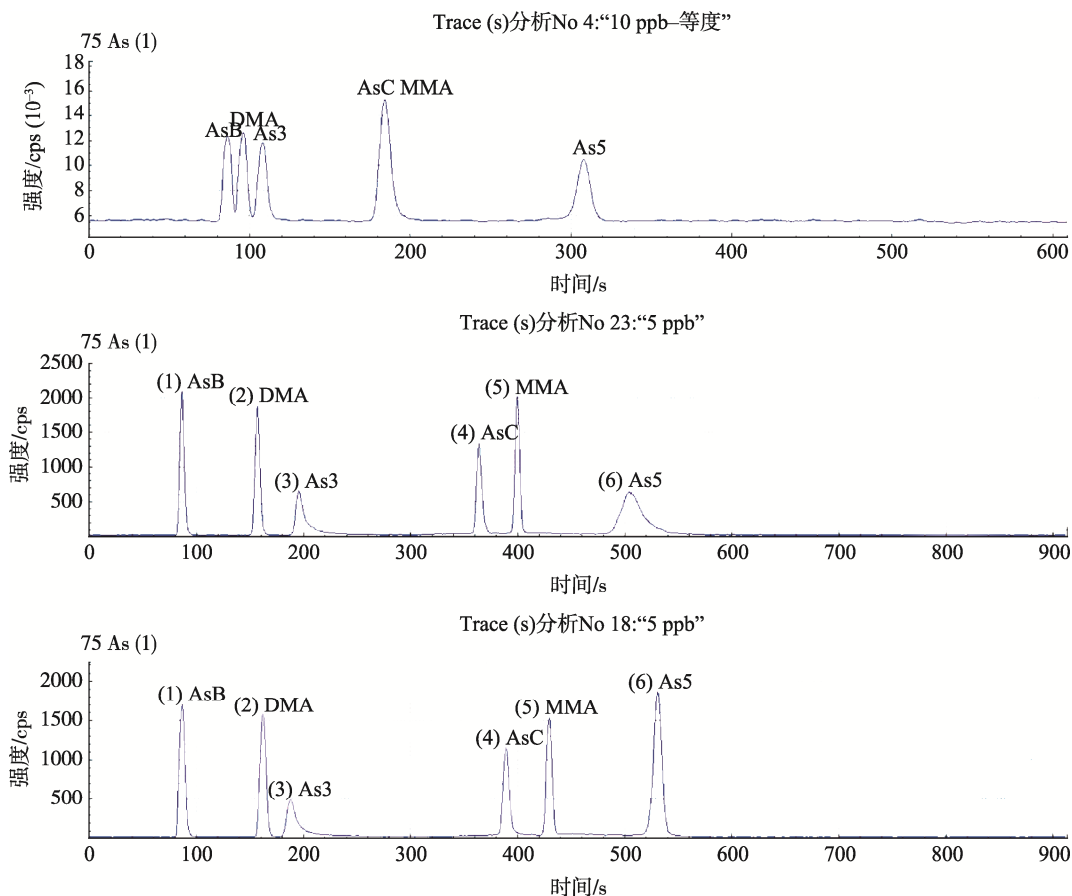


图 1 不同方式分离色谱图

Fig.1 Different ways of chromatogram separation

表 1 线性范围及检出限
Table 1 Linear range and detection limit

砷形态	线性方程	相关系数	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	检出限/($\mu\text{g/L}$)
AsB	$Y=1913.53X+384.91$	1.0000	1.0~100.0	0.08
DMA	$Y=1853.13X+53.412$	1.0000	1.0~100.0	0.09
As(III)	$Y=695.65X-351.84$	1.0000	1.0~100.0	0.02
AsC	$Y=948.48X-1202.11$	0.9990	1.0~100.0	0.01
MMA	$Y=1760.67X+275.11$	1.0000	1.0~100.0	0.09
As(V)	$Y=1543.40X+5327.18$	1.0000	1.0~100.0	0.07

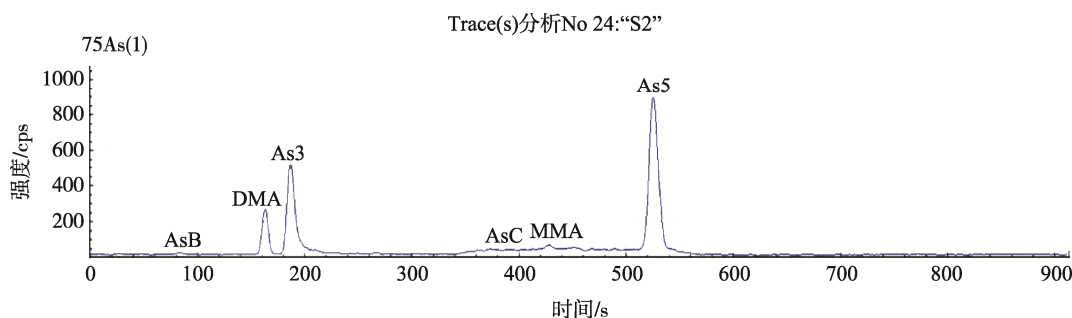


图 2 样品色谱图
Fig.2 Sample chromatogram

表 2 回收率实验结果
Table 2 Results of recovery test

加标量/($\mu\text{g/L}$)	编号	AsB 回收率/%	DMA 回收率/%	As(III)回收率/%	AsC 回收率/%	MMA 回收率/%	As(V)回收率/%
1.0	1-1	97.8	95.3	86.5	87.2	102.5	95.5
	1-2	101.6	104.1	90.0	90.4	97.0	86.3
5.0	2-1	99.3	105.5	90.5	89.5	96.4	84.5
	2-2	95.4	99.9	89.7	94.5	93.7	90.2
10.0	3-1	107.6	89.7	93.2	104.7	88.8	103.5
	3-2	112.1	93.5	90.9	101.8	91.0	96.4

3.5 方法重现性

以精密度考察方法重现性,用实际大米样品作为研究对象,因样品中不同时含有 6 种砷形态,故在样品中加入 2 种不同浓度的混合标准品,制备成含量高低不同的 2 份模拟样品。每份样品平行测定 6 次,计算样品中各种砷形态化合物的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。结果显示, RSD 在 1.5%~4.3%之间,图 3 为一模拟样品 6 次重复性色谱叠加图。

另外,考察非连续测定时方法的重现性,以上述模拟样品为研究对象,按照所建方法每间隔 2 d 重复测定流程 1 次,每种模拟样品每次测定平行样 2 份,连续重复测定 3 次,计算样品中各种砷形态化合物的相对标准偏差(RSD)。测定结果 RSD 值均小于 5%,由此可见该方法精密

度较高、重现性良好。

3.6 方法不确定度

根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》和数学模型,液相色谱—电感耦合等离子体质谱法测定大米中的砷形态分析,具体引入的不确定度的来源包括:样品称量、提取液的移取体积、标准曲线拟合、样品空白、提取液中砷形态含量的测定、方法回收率以及测量的重复性。其中测定的重复性、提取液中待测组分含量的计算、标准溶液的配制和方法的回收率为测量不确定度的主要来源,且测定过程引入的不确定度的对低含量组分影响相对更大^[19-22]。实测大米样品中 As(III)、As(V)、DMA 的含量分别为 0.137、0.040、0.063 mg/kg,在 95%的置信区间下,其扩展不确定度分别为 0.011、0.006、0.007 mg/kg, $k=2$ 。

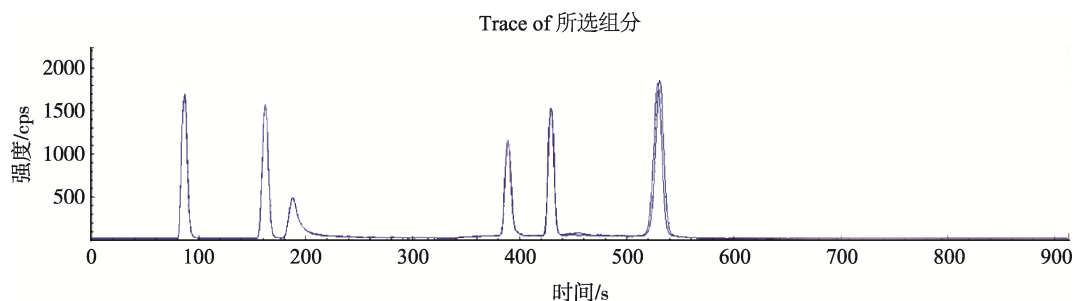


图 3 样品 6 次重复性色谱叠加图

Fig.3 Chromatogram fold figure of Sample 6 times repetitive

3.7 实际样品测定

采用本方法对 12 份市售大米中 6 种砷形态化合物含量进行检测, 实验结果显示, 测定的大米样品中主要含有的砷形态化合物为 As(III)、DMA 和 As(V), 检出样品数分别为 10 份、8 份和 5 份。

4 结 论

本次研究建立了液相色谱—电感耦合等离子体质谱法测定大米中 6 种砷形态化合物的分析方法, 并进行了实际大米样品的测定、方法精密度、准确度等实验。结果表明, 该方法准确、可靠, 且具有操作简便、高灵敏度、高选择性的特点, 适用于大米中多种砷形态分析。

参考文献

- [1] 杨婷, 张夏兰, 丁晓雯. 元素形态对食品安全影响的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(10): 295–303.
Yang T, Zhang XL, Ding XW. Advances studies of element formation impact on food safety [J]. Food Ferment Ind, 2018, 44(10): 295–303.
- [2] 侯艳霞. 食品及水中多元素形态分析研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2012.
Hou YX. The research of multielement species in food and water [D]. Beijing: Beijing University of Chemical, 2012.
- [3] Petrick JS, Ayala-Fierro F, Cullen WR. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenic in Chang human hepatocytes [J]. Toxicol Appl Pharm, 2000, 163(2): 203–207.
- [4] Hirano S, Kobayashi Y, Cui X, *et al.* The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: Important roles of thiol compounds [J]. Toxicol Appl Pharm, 2004, 198(3): 458–467.
- [5] 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 JQ, *et al.* Rapid determination of inorganic arsenic in rice by reverse-phase chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Environ Chem, 2015, 34(1): 194–197.
- [6] 曹立, 郭小娟. 慢性砷暴露与砷毒性的研究新进展[J]. 医学综述, 2014, 20(17): 3161–3163.
Cao L, Guo XJ. New research progress on chronic arsenic exposure and arsenic toxicity [J]. Med Recapit, 2014, 20(17): 3161–3163.
- [7] Jomova K, Jenisova Z, Feszterovam M, *et al.* Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease [J]. J Appl Toxicol, 2015, 31(2): 95–107.
- [8] 潘浩. 中国大米无机砷暴露评估研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.
Pan H. Exposure assessment studies for inorganic arsenic in Chinese rice [D]. Wuhan: Wuhan Institute of Technology, 2012.
- [9] 陈绍占, 刘丽萍, 杜振霞. 食品中砷化合物的形态及分析技术[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(3): 296–303.
Chen SZ, Liu LP, Du ZX. The presence form and analytic technology of arsenic in food [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 26(3): 296–303.
- [10] 冯灏, 岳兵, 尚晓虹, 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.* Analysis of five kinds of arsenic species by high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(9): 3653–3664.
- [11] 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]. 分析试验室, 2013, 32(10): 103–107.
Hou YX, Liu LP, Pan H, *et al.* Analysis of arsenic compounds in rice by HPLC and ICP-MS [J]. Chin J Anal Lab, 2013, 32(10): 103–107.
- [12] 魏茂琼, 刘宏程, 严红梅, 等. 液相色谱-原子荧光法测定大米中 4 种砷形态[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3673–3677.
Wei MQ, Liu HC, Yan HM, *et al.* Determination of four kinds of arsenic species in rice by liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(9): 3673–3677.
- [13] GB 5009.11-2014 食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定[S]. GB5009.11-2014 National food safety standards-Determination of total arsenic and inorganic arsenic in food [S].
- [14] 倪张林, 汤富彬, 屈明华, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定花茶中砷形态[J]. 分析科学学报, 2013, 29(4): 506–510.
Ni ZL, Tang FB, Qu MH, *et al.* Determination of arsenic in flower tea by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2013, 29(4): 506–510.
- [15] 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 forms in rice by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(7): 717–722.
- [16] 杨丽君, 宋晓华, 陈丽娟, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法同时测定果蔬中 6 种砷形态[J]. 分析试验室, 2011, 30(7): 62–66.
Yang LJ, Song XH, Chen LJ, *et al.* Simultaneous determination of six arsenic species in fruits and vegetables by high performance liquid

- chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2011, 30(7): 62–66.
- [17] Narukawa T, Inagaki K. The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS [J]. *Talanta*, 2008, 77(1): 427–432.
- [18] 陈绍占. 雄黄在大鼠体内代谢及食品中砷形态分析方法研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2014.
- Chen SZ. Study on the metabolism of realgar in rats and analytical method of arsenic speciation in food [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2014.
- [19] Adan H. Uncertainty, calibration and probability [M]. Dietrioh CF: Second Edition, 1991.
- [20] Ellison SLR, Williams A. Disseminating traceability in chemical measurement: Principles of a new EURACHEM/CITAC guide [J]. *Accredit Qual Assur*, 2003, 8(10): 483–485.
- [21] 苏祖俭, 胡曙光, 蔡文华, 等. 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不确定度评定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(14): 3603–3610.
- Su ZJ, Hu SG, Cai WH, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of inorganic arsenic in rice by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(14): 3603–3610.
- [22] 刘付英, 邵志凌, 李彩霞. 液相色谱-原子荧光联用法测定粮食中无机砷含量的不确定度评定[J]. *粮油食品科技*, 2018, 26(4): 45–49.
- Liu FY, Shao ZL, Li CX. Evaluation of uncertainty in determination of inorganic arsenic in grain by liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2018, 26(4): 45–49.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘静晶, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品、水质分析研究。

E-mail: xiaojingliu-2008@163.com



赵 岚, 博士, 主任医师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: zhaolan75@163.com