

糙米中砷形态检测方法的对比研究

陈凌锋*

(福建省粮油质量监测所, 福州 350012)

摘要: **目的** 比较液相色谱-原子荧光光谱法(high performance liquid chromatography atomic fluorescence spectrometry, HPLC-AFS)和液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)两种方法对糙米中砷形态的测定。**方法** 糙米样品经 0.15 mol/L 硝酸溶液提取, 分别采用 HPLC-AFS 联用仪, 流动相为 15 mmol/L 的磷酸二氢氨缓冲溶液(pH=6.0), 经 CNW Sep AX 阴离子交换色谱柱分离检测; 同时, 采用 HPLC-ICP-MS 联用仪, 流动相为含 5 mmol/L 己烷磺酸钠、20 mmol/L 柠檬酸的缓冲溶液(pH=4.3), 经安捷伦 Zorbax SB-Aq 反相色谱柱分离检测。**结果** 两种方法检测 4 种砷形态在 5.0~100.0 ng/mL 范围内线性良好, 相关系数均在 0.999 以上; HPLC-AFS 法的检出限分别为 2.3、0.6、1.0 和 1.1 ng/mL, 加标回收率在 85.1%~106%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 5%; HPLC-ICP-MS 法的检出限分别为 0.1、0.1、0.1 和 0.2 ng/mL, 加标回收率在 82.8%~106%之间, 相对标准偏差(RSD)均小于 5%。**结论** 两种方法都可以满足糙米中 4 种砷形态的检测, 在实际情况中可根据需要选择相应的检测方法。

关键词: 糙米; 砷形态; 液相色谱法; 原子荧光光度计; 电感耦合等离子体质谱仪

Comparative study on the detection methods of arsenic in rice

CHEN Ling-Feng*

(Institute of Grain and Oil Quality Supervision and Test of Fujian Province, Fuzhou 350012, China)

ABSTRACT: Objective To compare the determination of arsenic species in brown rice by high performance liquid chromatography atomic fluorescence spectrometry (HPLC-AFS) and high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). **Methods** Rice samples were extracted with 0.15 mol/L nitric acid solution and separated by HPLC-AFS with 15 mmol/L ammonia dihydrogen phosphate buffer solution (pH=6.0) as mobile phase, and determined by CNW Sep AX anion exchange chromatography column. Meanwhile, the samples were separated by HPLC-ICP-MS with 5 mmol/L sodium hexane sulfonate and 20 mmol/L citric acid buffer solution (pH=4.3) as mobile phase, and determined by Agilent Zorbax SB-Aq reversed phase chromatography column. **Results** The linearity of the 2 methods was good in the range of 5.0–100.0 ng/mL, and the correlation coefficient was above 0.999. The detection limits of HPLC-AFS were 2.3, 0.6, 1.0 and 1.1 ng/mL, respectively, the recoveries were between 85.1% and 106%, and the relative standard deviation (RSD) was less than 5%. The detection limits of HPLC-ICP-MS were 0.1, 0.1, 0.1 and 0.2 ng/mL, respectively. The recoveries were between 82.8% and 106%, and the relative standard deviation (RSD) was less than 5%. **Conclusion** Both methods can satisfy the detection of 4 arsenic forms in rice, and the corresponding detection method can be selected according to needs in actual situations.

KEY WORDS: rice; arsenic species; liquid chromatography; atomic fluorescence spectrometry; inductively coupled plasma mass spectrometer

*通讯作者: 陈凌锋, 高级食品检验工, 主要研究方向为粮油饲料产品质量安全。E-mail: 392146730@qq.com

*Corresponding author: CHEN Ling-Feng, Senior Food Inspector, Institute of Grain and Oil Quality Supervision and Test of Fujian Province, No.390, Fufei North Road, Fuzhou 350012, China. E-mail: 392146730@qq.com

1 引言

砷元素广泛的存在于自然界中, 水稻是除饮用水外, 人体对砷摄入的最主要的来源^[1]。研究表明, 不同形态的砷毒性差异很大, 砷主要以无机态的砷酸盐 As(V)、亚砷酸盐 As(III), 以及有机态的一甲基砷(monomethylarsonic acid, MMA)、二甲砷(dimethylarsinic acid, DMA)等形式存在, 其毒性大小表现为 As(III)>As(V)>MMA>DMA^[2-4]。所以对糙米中各种砷形态进行准确的定性、定量是评价其毒性, 并进行相关食品安全风险评估的前提。

目前对砷形态的检测主要是通过相应的分离技术将各种砷形态分离, 再经光谱仪或质谱仪进行分析。比较常用的检测方法有液相色谱-原子荧光光谱法和液相色谱-电感耦合等离子体质谱法^[5-13]。本研究从原理、分析步骤、检出限以及准确度和精密度等方面, 对国家标准 GB 5009.11-2014《食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定》^[14]中使用的液相色谱-原子荧光光谱法(high performance liquid chromatography atomic fluorescence spectrometry, HPLC-AFS)与液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)进行方法比对, 以期检测人员分析糙米中的砷形态提供参考。

2 材料与方法

2.1 原理

HPLC-AFS 法原理: 糙米中不同形态的神经稀硝酸提取后, 以液相色谱进行分离, 分离后的目标化合物在酸性环境下与 KBH_4 反应, 生成气态砷化合物, 以原子荧光光谱仪进行测定^[14]。

HPLC-ICP-MS 法原理: 糙米中不同形态的神经稀硝酸提取后, 利用烷基磺酸盐与阴离子形式存在的砷化物形成离子对化合物, 这类化合物表现出疏水性而能被反相柱保留并分离^[15], 分离后的目标化合物经过雾化由载气送入 ICP 炬焰中, 经过蒸发、解离、原子化、电离等过程, 大部分转化为带正电荷的正离子, 经离子采集系统进入质谱仪, 质谱仪根据质荷比进行分离测定^[14]。

2.2 试剂与材料

磷酸二氢氨、硼氢化钾、氢氧化钾、氨水、柠檬酸、己烷磺酸钠、氢氧化钠(分析纯, 上海 March 公司); 硝酸(优级纯, 上海 March 公司); 实验用水为超纯水; 高纯氩气(纯度>99.99%)、高纯氦气(纯度>99.99%)(上海 March 公司)。

砷标准溶液: As(III)(GBW08666)、As(V)(GBW08667)、MMA(GBW08668)、DMA(GBW08669)(中国计量科学研究院)。4 种砷形态混合标准储备液: 用超纯水将 4 种砷形态稀释成质量浓度均为 1 mg/L(以 As 计)的混合标准储备液, 置于 4 °C 冰箱中避光保存。砷混合标准工作液现用现配。

样品: 大米粉成分分析标准物质(GBW(E)100352)(钢铁研究总院分析测试研究所)。

2.3 仪器

SA 20 液相色谱-AFS 922 原子荧光联用仪, 阴离子交换色谱柱 CNW Sep AX(250 mm×4.0 mm, 10 μm)(北京吉天仪器有限公司); 1260 高效液相色谱仪-7900 电感耦合等离子体质谱仪, 安捷伦 Zorbax SB-Aq 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Agilent 公司)。

2.4 仪器条件

2.4.1 液相色谱-原子荧光光谱法

色谱条件: CNW Sep AX 阴离子保护柱(5.0 mm×4.0 mm, 10 μm), CNW Sep AX 阴离子交换色谱柱 (250 mm×4.0 mm, 10 μm); 流动相: 含 15 mmol/L 磷酸二氢氨的缓冲液, 用氨水调至 pH=6.0; 等度洗脱; 流速 1.0 mL/min; 进样量: 100 μL。

原子荧光工作条件: 负高压 300 V; 砷灯总电流: 80 mA; 主电流/辅助电流: 80/40; 原子化方式: 火焰原子化; 原子化器温度: 中温。

载液: 10%硝酸溶液, 流速 4 mL/min; 还原剂: 15 g/L 硼氢化钾溶液, 流速 4 mL/min; 载气流速 300 mL/min; 屏蔽气流速: 500 mL/min。

2.4.2 反相色谱-电感耦合等离子体质谱法

色谱条件: 安捷伦 Zorbax SB-Aq 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 含 5 mmol/L 己烷磺酸钠、20 mmol/L 柠檬酸的缓冲液, 用氢氧化钠调至 pH=4.3; 等度洗脱; 流速 1.0 mL/min; 进样量: 5 μL。

ICP-MS 工作条件: RF 功率: 1550 W; 雾化器: 玻璃同心雾化器; 蠕动泵速率: 0.5 r/s; 载气流量: 1.03 L/min; 采样深度: 8 mm; 氦气碰撞反应池模式; 检测质量数 $m/z=75(\text{As})$, $m/z=35(\text{Cl})$ 。

2.5 样品处理

将脱壳糙米通过粉碎机粉碎过 40 目筛后, 准确称取 1.00 g 糙米样品于 50 mL 塑料离心管中, 加入 8 mL 0.15 mol/L 硝酸溶液, 放置过夜。于 90 °C 恒温箱中热浸提 2.5 h, 每 0.5 h 振摇 1 min。提取完毕, 取出冷却至室温 8000 r/min 离心 15 min, 取上层清液, 经 0.45 μm 有机滤膜过滤后, 按同一操作作空白试验, 分别供 HPLC-AFS 和 HPLC-ICP-MS 分析测定。

2.6 标准曲线绘制

分别用超纯水将 4 种砷的混合标准储备液逐级稀释, 配制成浓度为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL 的混合标准工作液系列, 绘制标准曲线。

3 结果与分析

3.1 方法的线性范围和检出限

将 4 种砷形态的混合标准溶液系列, 在最佳的仪器条件下, 分别由 HPLC-AFS 和 HPLC-ICP-MS 进样测定, 测定结果以各形态的质量浓度为横坐标(X, ng/mL), 峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 得到的线性方程和相关系数分别见表 1 和表

2. 结果表明, 2 种仪器测定的目标分析物在相应的质量浓度范围内均具有较好的线性关系, 各分析物标准曲线的相关系数均不低于 0.999。

4 种砷形态化合物浓度均为 10 ng/mL 的 HPLC-AFS 谱图

表 1 HPLC-AFS 测定 4 种砷形态的线性范围、线性方程、相关系数(r)、检出限(LOD)

Table 1 Linear ranges, linear, equations, correlation coefficients (r), limits of detection(LOD) of the 4 arsenic species detected by HPLC-AFS

砷形态	线性范围/(ng/mL)	线性方程	r	LOD/(ng/mL)
As(III)	5.0~100.0	$Y=3043.3X-4810.1$	0.9991	0.6
DMA	5.0~100.0	$Y=2156.0X-10350.0$	0.9997	1.1
MMA	5.0~100.0	$Y=2619.8X-4873.7$	0.9999	1.0
As(V)	5.0~100.0	$Y=1512.4X-1800.1$	0.9996	2.3

表 2 HPLC-ICP-MS 测定 4 种砷形态的线性范围、线性方程、相关系数(r)、检出限(LOD)

Table 2 Linear ranges, linear, equations, correlation coefficients(r), limits of detection(LODs) of the 4 arsenic species detected by HPLC-ICP-MS

砷形态	线性范围/(ng/mL)	线性方程	r	LOD/(ng/mL)
As(V)	5.0~100.0	$Y=4010X$	0.9994	0.1
MMA	5.0~100.0	$Y=3816X$	0.9999	0.1
As(III)	5.0~100.0	$Y=3110X$	0.9996	0.1
DMA	5.0~100.0	$Y=3450X$	0.9996	0.2

综上, 两种方法都能有效分离糙米中的 4 种砷形态, 都具有较高的灵敏度。其中, HPLC-ICP-MS 法具有更快的分离速度和更低的检出限。

3.2 方法的准确性

本研究通过对大米粉成分分析标准物质(GBW(E)100352)的测定考察 2 种方法的准确性。由表 3 可以看出, HPLC-AFS 和 HPLC-ICP-MS 对标准物质中无机砷之和(As(III)+ As(V))的测定结果均在标准值(0.15±0.02)mg/kg 的范围之内; HPLC-AFS 和 HPLC-ICP-MS 对标准物质中总砷的测定结果均在标准值(0.19±0.02)mg/kg 的范围之内, 证明两种方法的准确性良好。

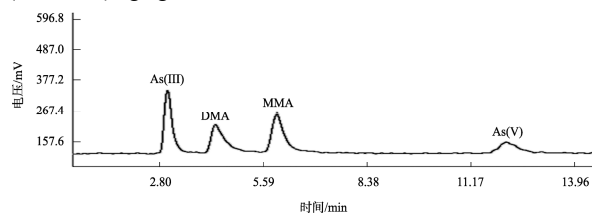


图 1 10 ng/mL 4 种砷形态化合物 HPLC-AFS 谱图

Fig.1 Chromatogram of 4 arsenic species by HPLC-AFS(10 ng/mL)

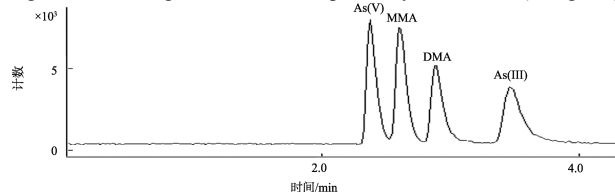


图 2 10 ng/mL 4 种砷形态化合物 HPLC-ICP-MS 谱图

Fig.2 Chromatogram of 4 arsenic species by HPLC-ICP-MS(10 ng/mL)

见图 1, 检测一个样品的时间为 15 min 左右。以 HPLC-AFS 色谱峰信噪比 S/N 为 3:1 时所对应的浓度计算检出限(见表 1)。在进样量为 100 μ L 时, As(III)、DMA、MMA 和 As(V)对应的检出限(以砷计)分别为 0.6、1.1、1.0 和 2.3 ng/mL。

表 3 两种方法测定 GBW(E)100352 中 4 种砷形态含量和相对标准偏差($n=6$)

Table 3 Contents and RSDs of the 4 arsenic species by HPLC-AFS and HPLC-ICP-MS in GBW(E)100352($n=6$)

砷形态	HPLC-AFS		HPLC-ICP-MS	
	GBW(E)100352/(mg/kg)	RSD/%	GBW(E)100352/(mg/kg)	RSD/%
As(III)	0.125	2.3	0.129	1.2
DMA	0.027	1.0	0.014	9.2
MMA	ND*	ND*	ND*	ND*
As(V)	0.035	8.6	0.040	4.5
无机砷	0.160	2.4	0.169	1.9
总砷	0.187	2.1	0.183	1.7

注: *为未检出。

3.3 方法的加标回收率和精密度

本研究在糙米样品中分别加入 100 ng/mL 的 4 种形态砷混合标准溶液 0.5、1.0、2.0 mL, 按照 2.5 的步骤进行处理, 分别通过 HPLC-AFS 和 HPLC-ICP-MS 测定 4 种砷形态的回收率及其精密度, 结果见表 4。结果表明, 两种方法均对 4 种砷形态回收率高, 精密度良好。

3.4 使用经济性对比

HPLC-ICP-MS 法在仪器费用上明显高于 HPLC-AFS 法。在实验操作过程中, HPLC-AFS 法要求进样体积为 100 μ L, 而 HPLC-ICP-MS 法的进样体积可以低至 5 μ L。比较两种方法试剂种类和分析 10 个样品(双平行)所需试剂体积、用气量等, HPLC-AFS 法中要求试剂一直流动, 需要消耗大量的试剂; 而 HPLC-ICP-MS 法要消耗大量的氦气。HPLC-AFS 法使用的阴离子色谱柱的柱效会随着进样次数的增加而下降, 需要及时更换; HPLC-ICP-MS 法中质谱仪使用的进样锥和截取锥也会被损耗, 需要更换。

4 结论

两种方法在原理上有所区别: 在液相色谱-原子荧光光谱法中, 经液相色谱分离后的目标化合物在酸性环境下与 KBH_4 反应, 生成气态砷化合物, 以原子荧光光谱仪进行测定; 在液相色谱-电感耦合等离子体质谱法中, 是利用烷基磺酸盐与阴离子形式存在的砷化物形成离子对化合物, 经反相柱分离, 由质谱仪根据

质荷比进行分离测定。两种方法在最优条件下对糙米样品进行测定,其线性范围、相关系数、方法检出限、准确性、精密性及加标回收率等指标均良好,说明两种方法准确可靠,可以满足糙米样品中 4 种砷形态的检测需要,实际工作中检验人员可根据具

体情况选择合适的方法对糙米中的 4 种砷形态进行分析。其中 HPLC-ICP-MS 法具有检测时间短、检出限低的优点,需要检测大批量样品或者低浓度样品时可以选择该方法;HPLC-AFS 法仪器成本低,检测需要花费的时间较长,适合经费有限的单位使用。

表 4 糙米基质中 4 种砷形态的加标回收率和相对标准偏差(n=6)
Table 4 Recoveries and RSDs of the 4 arsenic species spiked in rice(n=6)

加标量/ng	元素	背景/(mg/kg)	HPLC-AFS		HPLC-ICP-MS		
			回收率/%	RSD/%	背景/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
50	As(III)	0.125	90.6	0.5	0.129	104	4.0
	DMA	0.027	98.9	2.0	0.014	84.8	3.9
	MMA	ND*	87.1	2.2	ND*	83.7	3.6
100	As(V)	0.035	86.7	3.3	0.040	86.8	3.3
	As(III)	0.125	103	0.9	0.129	105	3.5
	DMA	0.027	96.2	3.2	0.014	88.4	3.1
200	MMA	ND*	92.1	2.1	ND*	86.1	1.4
	As(V)	0.035	89.3	2.7	0.040	86.9	4.3
	As(III)	0.125	85.1	0.2	0.129	106	1.3
	DMA	0.027	88.9	1.5	0.014	83.8	3.3
	MMA	ND*	85.5	2.2	ND*	82.8	2.0
	As(V)	0.035	106	1.8	0.040	84.3	2.2

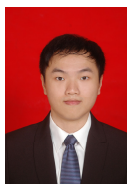
注: *为未检出。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 胡容, 张颖, 徐全金, 等. 液相色谱-原子荧光联用法测定大米中无机砷含量[J]. 贵州科学, 2017, 35(1): 87-89.
Hu R, Zhang Y, Xu QJ, *et al.* Determination of arsenic in rice by liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry [J]. *Guizhou Sci*, 2017, 35(1): 87-89.
- [3] Agusa T, Kunito T, Fujihara J, *et al.* Contamination by arsenic and other trace elements in tube well water and its risks assessments to humans in Hanoi, Vietnam [J]. *Environ Poll*, 2006, 139: 95-106.
- [4] Zhang XR, Rita C, Jurgen DK, *et al.* Accumulation of arsenic species in serum of patients with chronic renal disease [J]. *Clin Chem*, 1996, 42(8): 1231-1237.
- [5] 林滢. 基于反相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术快速测定饲料中砷形态的研究[J]. 饲料研究, 2019, 42(4): 80-83.
Lin H. Determination of arsenic species compounds in feed base on reversed-phase chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Feed Res*, 2019, 42(4): 80-83.
- [6] 汤彤. 液相色谱-原子荧光光谱法(HPLC-AFS)测定大米中的 4 种砷形态[J]. 湖南农业科学, 2019, (6): 94-96.
Tang T. Determination of 4 kinds of arsenic species in rice grain by HPLC-AFS [J]. *Hunan Agric Sci*, 2019, (6): 94-96.
- [7] 周明慧, 陈曦, 张洁琼, 等. 稻米中无机砷检测关键因素研究及方法建立[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(9): 112-117.
Zhou MH, Chen X, Zhang JQ, *et al.* Key Factors and establishment of detection methods of inorganic arsenic in rice [J]. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2019, 34(9): 112-117.
- [8] 陆奕娜, 卢金素, 朱婷, 等. 砷形态提取及分析方法研究进展[J]. 福建分析测试, 2017, 26(4): 26-33.
Lu YN, Lu JS, Zhu T, *et al.* Research progress on extraction and analysis for arsenic speciation [J]. *Fujian Anal Test*, 2017, 26(4): 26-33.
- [9] 易路遥, 章红, 李杰, 等. 高效液相色谱-原子荧光光谱法分析水产品中砷的形态[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(21): 3045-3048.
Yi LY, Zhang H, Li J, *et al.* Determination of arsenic speciation in aquatic products by high performance liquid chromatography with atomic fluorescence spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2016, 26(21): 3045-3048.
- [10] 魏洪敏, 甄长伟, 炼晓璐, 等. 微波提取-高压液相色谱-原子荧光光谱联用(HPLC-AFS)法分析稻米样品中砷形态[J]. 中国无机分析化学, 2019, 9(3): 4-9.
Wei HM, Zhen CW, Lian XL, *et al.* Speciation analysis of arsenic in rice samples by microwave extraction coupled with high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry [J]. *Chin J Inorganic Anal Chem*, 2019, 9(3): 4-9.
- [11] 刘静晶, 赵岚, 邹春苗, 等. 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法分析大米中的砷形态[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(19): 6513-6518.
Liu JJ, Zhao L, Zou CM, *et al.* Analysis of arsenic morphology in rice by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(19): 6513-6518.
- [12] 耿安静, 王旭, 李秋剑, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定水稻中的 5 种砷形态[J]. 农产品质量与安全, 2019, (4): 13-19.
Geng AJ, Wang X, Li QJ, *et al.* Detection of five arsenic speciation in rice by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Qual Saf Agro-Prod*, 2019, (4): 13-19.
- [13] 习淦, 李洋, 陈岚, 等. HPLC-ICP-MS 分析食品中砷形态的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 340-347.
Xi G, Li Y, Chen L, *et al.* Research progress on speciation analysis of arsenic in food by HPLC-ICP-MS [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(20): 340-347.
- [14] 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]. GB 5009.11-2014 National food safety standard-Determination of total arsenic and inorganic arsenic in food [S].
- [15] 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 reversed phase chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Environ Chem*, 2015, 34(1): 194-197.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



陈凌锋, 高级食品检验工, 主要研究方向为粮油饲料产品质量安全。
E-mail: 392146730@qq.com