

高效液相色谱氢化物发生原子荧光光谱联用 检测海藻中砷形态

高 鹭¹, 董伟峰¹, 彭心婷², 史立娟¹, 李 妍¹, 庞艳华¹, 徐 静¹, 曹际娟^{1*}

(1. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001; 2. 塔城出入境检验检疫局, 塔城 834700)

摘 要: **目的** 测定 14 种海藻样品中总砷和无机砷的含量, 同时分析样品中 6 种砷形态。**方法** 将海藻样品经过微波消解的前处理方法, 通过电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)测定总砷含量; 根据国标方法中无机砷检测的前处理方法, 通过原子荧光光谱(atomic fluorescence spectrometry, AFS)测定无机砷含量; 最后通过酸提的前处理方法, 利用高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法(high performance liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry, HPLC-(UV)-HG-AFS)测定海藻样品中 6 种形态砷含量并与国标无机砷方法比较。**结果** 14 种海藻样品中总砷含量为 0.038~46.2 mg/kg; 无机砷含量为 0.006~19.3 mg/kg; 对 HPLC-(UV)-HG-AFS 仪器的优化和方法的摸索后, 从海藻样品中主要测得的砷形态为 As(III)、As(V)和 DMA, MMA 含量较少, 没有测出 AsB 和 AsC。**结论** 在砷形态较为复杂的海藻样品检测中, 通过 HPLC-(UV)-HG-AFS 检测方法可以有效避免无机砷前处理中可能出现的有机砷向无机砷转变的现象, 降低干扰, 增加测试的准确性, 更为具体地表现海藻样品中主要的砷形态含量。

关键词: 海藻; 砷形态; 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法

Determination of arsenic speciation in seaweeds using high performance liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry

GAO Lu¹, DONG Wei-Feng¹, PENG Xin-Ting², SHI Li-Juan¹, LI Yan¹, PANG Yan-Hua¹, XU Jing¹, CAO Ji-Juan^{1*}

(1. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China;
2. Tacheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tacheng 834700, China)

ABSTRACT: Objective The content of total arsenic and inorganic arsenic were determined in 14 seaweeds and 6 kinds of arsenic species were determined at the same time. **Methods** The content of total arsenic was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after microwave digestion. According to the pretreatment method of national standard method, the content of inorganic arsenic was determined by atomic fluorescence spectrometry (AFS). The results of 6 arsenic species were studied by high performance

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201310141)、辽宁省博士科研启动计划项目(20121146)

Fund: Supported by Quality Inspection Research in the Public Interest (201310141) and Liaoning Province Research Program for Young Scientist (20121146)

*通讯作者: 曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: cjj0909@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Professor, Technical Center of Liaoning Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.60, Changjiang East Road, Zhongshan District, Dalian 116001, China. E-mail: cjj0909@163.com

liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (HPLC-(UV)-HG-AFS) after acid extraction, which were compared with the national standard method. **Results** In 14 seaweeds, the content of total arsenic ranged from 0.038 to 46.2 mg/kg and the content of inorganic arsenic ranged from 0.006 to 19.3 mg/kg. After the instrument optimization and methods of exploration, only As(III), As(V) and DMA were found in seaweed samples. The content of MMA was less. AsB and AsC were not detected. **Conclusion** Through the detection method of HPLC-(UV)-HG-AFS, some seaweed samples with complicated morphology can effectively avoid the transformation between organic arsenic and inorganic arsenic. It can reduce interference and increase the accuracy of the test. More arsenic speciation will be performed in seaweed samples.

KEY WORDS: seaweed; arsenic speciation; high performance liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry

1 引言

砷是一种广泛存在于自然界中的非金属元素,极少有单质状态^[1]。如今由于工业化生产的不断发展,工厂产生的大量含砷化合物废水被排放到水体和土壤中,污染了人类赖以生存的环境^[2]。除此之外,作为生物体一种必需的微量元素,砷不仅具有多种重要的生理功能,同时又是一种毒性较高的污染元素,其毒性与赋存形态有关。常见的含砷化合物有:亚砷酸 As()、砷酸 As()、一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)、三甲基砷氧化物(TMAO)、砷甜菜碱(AsB)和砷胆碱(AsC),还有一些由有机基团结合而成的砷糖、砷脂类化合物等^[3]。无机砷为剧毒化合物,是国际癌症研究机构(IARC)确认的致癌物,而有机砷的毒性较低^[4]。无机形态的砷可以通过食物和水进入人体,经过对氧化磷酸化过程的解偶联作用,与巯基基团结合破坏酶活性,还可诱使 DNA 发生互换和断裂,造成基因变异^[5]。慢性砷中毒会导致各种循环和神经功能紊乱,以及突变、致癌和致畸形等后果^[6,7],所以对砷的形态进行研究非常重要。由于砷多种不同形态化合物的存在,仅从总砷含量的角度不能全面反映无机砷对于环境的污染状况,国家标准 GB/T 5009.11-2003 提出了总砷和无机砷含量的测定方法^[8],但是,对于砷形态较为复杂的海洋生物类样品,国标方法无法适应特异性检测的需要。鉴于产品以多种形态砷的形式存在,有必要对砷形态进行有效的分离,以降低其他砷形态化合物对无机砷测定的干扰。

近年来,全国各地的监督检查中多次出现海藻类产品“无机砷”含量超标问题,自此“无机砷”问题再次引起整个海藻行业的高度重视。由于海藻类产品的

特殊结构,无机砷极易被海藻吸收、富集,所以针对海藻类产品进行有效的形态砷分离对于海藻食品的安全监测至关重要。现有技术中,常以联用技术对砷进行形态分离,包括高效液相色谱-氢化物发生原子荧光光谱法(high performance liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry, HPLC-(UV)-HG-AFS)^[9-11],高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联机技术(high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)^[12-15],高效液相色谱-氢化物发生原子吸收光谱法(high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectroscopy, HPLC-HG-AAS)^[16]和毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱联机技术(capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry, CE-ICP-MS)^[17]等。HPLC 具有较高的分离能力,原子荧光仪器具有设备价格较低、线性范围宽、检出限低、灵敏度高、简单易操作等优点,两者结合在分析砷形态中得到了广泛应用。本文以液相色谱与氢化物原子荧光光谱联用技术开展砷形态分析,通过对仪器分析参数以及样品提取技术的优化,建立了海藻中砷形态化合物测定的高效液相色谱氢化物发生原子荧光光谱联用技术方法,并对进出口海藻产品进行测定。该研究对促进食品进出口业务,切实保护我国公众的消费安全具有重大意义,并填补了检验检疫方面检验仪器方法的空白。

2 材料和方法

2.1 仪器及试剂

电感耦合等离子体质谱仪 ICP-MS 7700(美国安捷伦公司);微波消解系统 MLS 1200(意大利迈尔斯

通公司); AFS-930 原子荧光光度计(北京吉天仪器有限公司); LC-15 高压液相泵(苏州岛津); 离心机(Sigma-aldrich 公司); Mini-Q synthesis 型超纯水净化系统(法国密理博公司)。

试验用水为 Millipore 纯水。甲醇(色谱纯, Dima 公司), 其他试剂均为优级纯和分析纯(科密欧公司)。

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准储备液、Agilent 调谐液和 Agilent 内标液(美国安捷伦公司); 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ As(国家标准物质研究中心); As(III)、As(V)、MMA、DMA、AsB 和 AsC 六种砷化合物标准溶液(国家标准物质研究中心, 六种砷标准溶液质量浓度分别为 32.4 ± 0.7 、 124.3 ± 1.2 、 46.2 ± 1.5 、 97.4 ± 3.3 、 92.2 ± 2.7 、 91.6 ± 3.7 $\mu\text{g}/\text{g}$)。

14 种海藻样品包括: 盐渍裙带菜、鲜裙带菜、干裙带菜、盐渍海带、干海带、海带片、干紫菜、海苔、干马尾藻、羊栖菜、红鸡冠草、绿鸡冠草、龙须菜和石花菜, 所有样品均采集自大连当地批发市场,

带回实验室后避光保存, 海藻样品经粉碎机研磨成碎块并用样品袋保存。

2.2 HPLC-(UV)-HG-AFS 分析条件

配制一定浓度的标准溶液, 经过反复测试仪器工作条件对仪器进行优化, 最后选定仪器的色谱实验参数(见表 1)和氢化物发生原子荧光实验参数(见表 2)。

2.3 实验方法

2.3.1 总砷和无机砷样品前处理

总砷的测定样品处理用微波消解法, 准确称量均质后的样品 0.5 g, 加入 5 mL 优级纯硝酸浸泡 0.5 h, 再加入 2 mL 双氧水, 放入微波消解仪中消化, 冷却后的消化液用纯水定容至 50 mL。

无机砷的测定根据“GB/T 5009.11-2003”中的氢化物原子荧光光度法, 将样品用 6 mol/L 盐酸在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中提取 18 h, 提取液经碘化钾和硫脲还原后, 用原子荧光测定其含量。

表 1 色谱实验参数
Table 1 HPLC experimental parameters

参数	数值
阴离子交换柱	Hamilton PRP-X100(250 mm \times 4.1 mm, <i>i.d.</i> , 10 μm)
保护柱	25 mm \times 2.3 mm, <i>i.d.</i> , 12~20 μm (Hamilton, Reno, NV).
流动相	15 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH6.0(10%甲酸)
流速	1 mL/min
进样体积	100 μL

表 2 氢化物发生原子荧光实验参数
Table 2 HG-AFS experimental parameters

参数	数值
还原剂	1.5% KBH_4 , 0.5% KOH , 6 mL/min
载流	7% HCl , 6.0 mL/min
氧化剂	UV 系统: 0.1% $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0.5% KOH , 6 mL/min
灯	高性能砷空心阴极灯, 193.76 nm
灯电流	总电流 100 mA, 辅电流 45 mA
光电倍增管负高压	300 mV
原子化器温度	200 $^{\circ}\text{C}$
原子化器高度	8 mm
载气	氩气 400 mL/min
屏蔽气	氩气 600 mL/min

2.3.2 砷形态检测提取方法

称取 2 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 塑料离心管中, 加入 16 mL 样品提取液, 70 °C 振荡提取 1.0 h, 再加入 16 mL 超纯水继续震荡 1.0 h, 8000 r/min 离心 10 min, 取 4 mL 上清液, 加入 4 mL 超纯水, 70 °C 水浴 20 min。试液依次过 0.22 μm 微孔滤膜后, 再过 RP 小柱待用。

3 结果与讨论

3.1 海藻中总砷和总无机砷含量测定

通过电感耦合等离子体质谱法对 14 个海藻样品进行总砷检测。从表 3 可知, 海藻中总砷含量最低为鲜裙带菜, 最高为羊栖菜, 不同海藻类产品对海水中砷的富集程度各不相同, 羊栖菜、马尾藻、海带富集砷的能力较强; 相同品种海藻的不同状态以及不同加工方式也直接影响到总砷的含量。在检测中, 对 14 种样品各添加了浓度为 1 mg/kg 的砷标准溶液, 通过添加回收率可以看出, 回收率在 91.4%~99.2% 之间。

根据“GB/T 5009.11-2003”中的氢化物发生原子荧光光度法, 对 14 种样品进行无机砷检测, 测得结果基本与总砷含量一致, 羊栖菜中检测出的无机砷含量最高, 其次为干海带和干马尾藻。对无机砷样品

进行添加回收, 加浓度为 0.5 mg/kg 的三价砷离子标液, 所得添加回收率基本在 82.6%~89.4% 之间。所得海藻中无机砷含量占总砷含量约 9.24%~24.1%。

3.2 HPLC-(UV)-HG-AFS 测定海藻样品中的 6 种砷形态

根据表 1 和表 2 的仪器检测最佳条件, 6 种砷形态可以在 10 min 内很好地被分离出来, 几种砷形态的图谱见图 1。

6 种砷形态的仪器检测限、相对标准偏差和相关系数见表 4。由表 4 可以看出仪器检出限在 0.682~2.188 μg/L 之间, 相对标准偏差小于 5%, 相关系数均在 0.9990 之上。海藻样品的砷形态检测结果见表 5。由 5 表可以看出, 14 种海藻中 As(III)、As(V) 和 DMA 含量较多, MMA 含量较少, 未检测出 AsB 和 AsC 两种砷形态。与表 3 对照可知, 检测所得 4 种有毒砷化合物占总砷含量的百分率, 这 4 种有毒砷的含量平均下来仅仅占总砷的 3.26%。

3.3 提取过程中砷形态稳定性及方法回收率

通过对总砷浓度含量最高的样品羊栖菜进行添加回收和相对标准偏差试验, 由检测结果可以看出(见表 6), 添加回收试验 6 种形态砷的添加回收率在 84.37%~90.17% 之间, 变异系数在 5% 以下。

表 3 海藻中总砷和无机砷含量
Table 3 The content of total arsenic and inorganic arsenic in seaweeds

样品	总砷(mg/kg)	添加回收率(%)	无机砷(mg/kg)	添加回收率(%)	无机砷占总砷(%)
盐渍裙带菜	2.80	94.5	0.313	86.2	11.2
鲜裙带菜	0.038	99.2	0.006	82.7	15.7
干裙带菜	19.2	94.6	3.19	83.9	16.6
盐渍海带	3.98	93.1	0.824	85.1	20.7
干海带	34.4	91.4	8.312	88.2	24.1
海带片	5.67	93.7	0.524	89.4	9.24
干紫菜	1.21	93.5	0.128	85.7	10.6
海苔	0.052	97.5	0.008	82.6	15.4
干马尾藻	23.9	94.2	5.63	86.4	23.6
羊栖菜	46.2	98.7	19.3	86.2	13.2
红鸡冠草	7.83	96.8	0.927	87.2	11.8
绿鸡冠草	6.17	94.3	0.896	84.3	14.5
龙须菜	3.43	96.1	0.412	87.2	12.0
石花菜	4.32	97.4	0.534	88.3	12.4

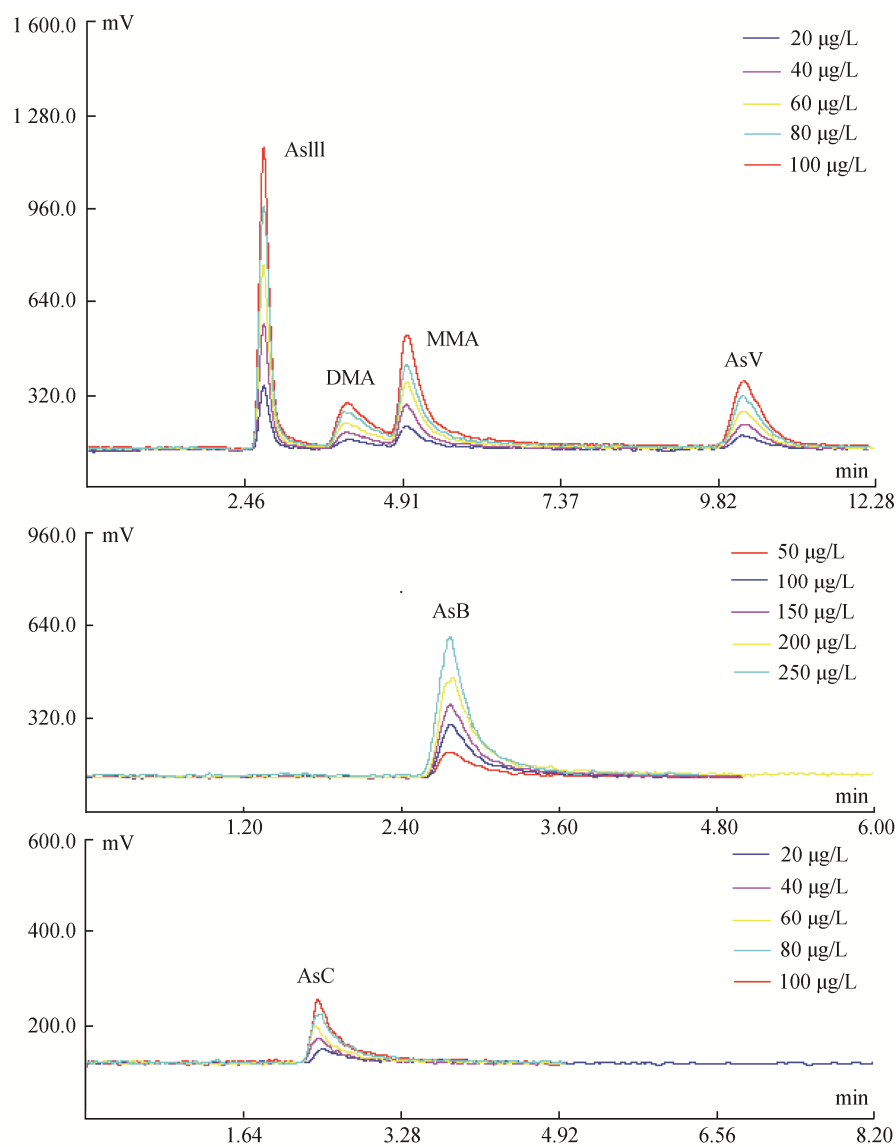


图 1 不同浓度的六种形态砷标样的色谱图

Fig. 1 Typical chromatograms of 6 arsenic species standard solutions

表 4 砷标准溶液的检出限、相对标准偏差和相关系数

Table 4 Detection limit, relative standard deviation and relative coefficient of 6 arsenic standard solutions

标准物质	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	相对标准偏差 %($n=7$)	相关系数 R
As(V)	0.682	2.8	0.9994
As(III)	1.968	3.8	0.9992
MMA	0.987	3.8	0.9994
DMA	1.333	3.7	0.9991
AsC	2.188	3.4	0.9997
AsB	1.791	3.9	0.9996

表 5 不同海藻样品中形态砷的含量($n=3$)
Table 5 The content of arsenic species in different samples ($n=3$)

组分	检测结果(mg/kg)						4种有毒砷含量(%)
	As(III)	As(V)	MMA	DMA	AsB	AsC	
盐渍裙带菜	0.025	0.010	N.D.*	0.029	N.D.	N.D.	2.29
鲜裙带菜	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	/
干裙带菜	0.243	0.144	0.046	0.265	N.D.	N.D.	3.64
盐渍海带	0.052	0.026	N.D.	0.056	N.D.	N.D.	3.37
干海带	0.375	0.230	0.114	0.416	N.D.	N.D.	3.30
海带片	0.064	0.022	N.D.	0.062	N.D.	N.D.	2.61
紫菜	0.012	0.007	N.D.	0.014	N.D.	N.D.	2.73
海苔	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	/
干马尾藻	0.347	0.121	0.037	0.366	N.D.	N.D.	3.64
羊栖菜	0.670	0.310	0.162	0.752	N.D.	N.D.	4.10
红鸡冠草	0.105	0.023	N.D.	0.122	N.D.	N.D.	3.19
绿鸡冠草	0.075	0.036	N.D.	0.088	N.D.	N.D.	3.23
龙须菜	0.038	0.025	N.D.	0.041	N.D.	N.D.	3.03
石花菜	0.047	0.016	N.D.	0.049	N.D.	N.D.	2.59

注: N.D 表示未检出

表 6 羊栖菜中 6 种形态砷的添加回收率与相对标准偏差($n=6$)
Table 6 The recoveries and CV% about 6 arsenic species in *Sargassum fusiforme* ($n=6$)

组分	添加水平($\mu\text{g/L}$)	平均实测浓度($\mu\text{g/L}$)	平均回收率(%)	变异系数RSD(%)
As(III)	60	71.67	88.56	3.4
As(V)	60	62.84	90.17	3.4
MMA	60	58.37	89.72	4.5
DMA	60	75.25	90.12	3.5
AsB	100	87.52	87.52	4.2
AsC	60	50.62	84.37	3.5

4 结论

本文对 14 种海藻类样品中砷的 6 种形态含量进行测定。实验结果表明, 通过酸提取的前处理方法经高效液相色谱氢化物发生原子荧光光谱联用技术检测得出海藻中仅有 5% 以下的砷具有毒性, 检测结果全部符合无机砷国家卫生标准 $\leq 1.5 \text{ mg/kg}$ 的要求。而通过国标方法检测的总无机砷含量高过本方法所测得所有有毒砷的 5 倍左右。由此说明, 对于砷形态较为复杂的海藻类样品, 利用国标方法进行无机砷检测存在一定误差, 这个过程可能发生砷糖类化合物的

转化, 最终通过氧化还原反应形成三价砷, 干扰检测结果^[18]。所以, 仅通过检测总无机砷的方法来判断海藻的毒性并不可取, 通过形态分析验证海藻中有毒砷含量相对测定总无机砷含量更加精确, 在样品的处理过程中可以有效防止砷糖等化合物向最终测试依据——三价砷的转化, 从而降低干扰, 增加测试准确性。

参考文献

- [1] Jerome ON . Arsenic in the environment, human health and ecosystem effects[M]. John Wiley & Sons Inc, 1994.

- [2] 陈玲, 赵建夫. 环境监测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
Chen L, Zhao JF. Environmental monitoring [M]. Beijing: Chem Indus Press, 2004.
- [3] Meharg AA, Hartley Whitaker J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species [J]. *New Phytol*, 2002, 154: 29–43.
- [4] Smith AH, Hopenhaynrich C, Bates MN, *et al.* Cancer risks from arsenic in drinking-water [J]. *Environ Health Persp*, 1992, 97: 259–267.
- [5] 吕宝忠, 赵素元. 肿瘤遗传学[M]. 北京: 北京科学出版社, 1998.
Lv BZ, Zhao SY. Cancer genetics [M]. Beijing: Sci Press, 1998.
- [6] Hartmann A, Speit G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cells gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1997, 23: 299–305.
- [7] Ferm VH, Saxon A, Smith BM. The teratogenic profile of sodium arsenate in the golden hamster [J]. *Arch Environ Health*, 1971, 22: 577–560.
- [8] GB/T 5009. 11- 2003 食品中总砷及无机砷的测定[S].
GB/T 5009. 11-2003 Determination of total arsenic and abio-arsenic in foods [S].
- [9] Mato-Fernández MJ, Otero-Rey JR, Moreda-Pineiro J, *et al.* Arsenic extraction in marine biological materials using pressurized liquid extraction [J]. *Talanta*, 2007, 71(2): 515–520.
- [10] 曹军, 于伯华, 沈山江, 等. 高效液相色谱-原子荧光光谱联用技术测定水产品产地底泥中 4 种砷的形态残留[J]. *检验检疫学刊*, 2013, 5: 53–56.
Cao J, Yu BH, Shen SJ, *et al.* Analysis of arsenic speciation in aquatic products and environments by HPLC-HG-AFS [J]. *J Inspect Quar*, 2013, 5: 53–56.
- [11] 田雨, 蔡璇, 郑锡波, 等. 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法分析桂皮中砷形态化合物的检测方法[J]. *化学工程师*, 2014, 28(2): 19–21.
Tian Y, Cai X, Zheng XB, *et al.* Arsenic speciation analysis in cinnamon by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry [J]. *Chem Eng*, 2014, 28(2): 19–21.
- [12] Nam SH, Oh HJ, Min HS, *et al.* A study on the extraction and quantization of total arsenic and arsenic species in sea food by HPLC-ICP-MS [J]. *Microchem J*, 2010, 95(1): 20–24.
- [13] 刘桂华, 汪丽. HPLC-ICP-MS 在紫菜中砷形态分析的应用[J]. *分析测试学报*, 2002, 21(4): 88–89.
Liu GH, Wang L. Determination of arsenic species in laver by HPLC-ICP-MS [J]. *J Instrum Anal*, 2002, 21(4): 88–89.
- [14] 李卫华, 王雅珍, 刘玉海. 高效液相色谱-电感耦合等离子体-质谱检测海藻中的砷[J]. *陕西师范大学学报*, 2006, 34(4): 65–68.
Li WH, Wang YZ, Liu YH. Detection of arsenic in algae with HPLC-ICP-MS [J]. *J Shanxi Normal Univ*, 2006, 34(4): 65–68.
- [15] Liu XP, Zhang WF, Hu YN, *et al.* Extraction and detection of organoarsenic feed additives and common arsenic species in environmental matrices by HPLC-ICP-MS [J]. *Microchem J*, 2013, 108: 38–45.
- [16] Villa-Lojo MC, Alonso-Rodríguez E, López-Mahía P. Coupled high performance liquid chromatography–microwave digestion–hydride generation–atomic absorption spectrometry for inorganic and organic arsenic speciation in fish tissue [J]. *Talanta*, 2002, 57: 741–750.
- [17] 陈发荣, 郑立, 王志广, 等. 毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱测定蓝点马鲛中砷化学形态[J]. *光谱学与光谱分析*, 2014, 34(6): 1675–1678.
Chen FR, Zheng L, Wang ZG, *et al.* Determination of arsenic speciation in scomberomorus niphonius by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Spectro Spectral Anal*, 2014, 34(6): 1675–1678.
- [18] 韦昌金, 刘丽萍, 刘霁欣. 无机砷分析方法的探讨[J]. *现代科学仪器*, 2006, (6): 63–65.
Wei CJ, Liu LP, Liu QX. The discussion for determination method of inorganic arsenic [J]. *Mod Sci Instrum*, 2006, (6): 63–65

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



高 鹭, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检验检疫安全。
E-mail: gaol892010@163.com



曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全与检验检疫安全
E-mail: cjj0909@163.com