

高效液相色谱-氢化物发生原子荧光联用法检测 不同基质食品中的砷含量及其形态

董 喆¹, 高明义², 李梦怡¹, 张会亮¹, 张庆生¹, 曹 进^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 北京普析通用仪器有限责任公司, 北京 100085)

摘 要: 目的 建立高效液相色谱-氢化物发生原子荧光联用法检测大虾、金枪鱼、虾油、大米和菠菜等不同基质食品中的砷含量及其化学形态。**方法** 将大虾、金枪鱼、虾油、大米和菠菜样品采用 HNO_3 (0.15 mol/L) 浸提, 高效液相色谱-氢化物发生原子荧光联用法进行砷形态的研究, 并用湿法消解-原子荧光光谱法进行总砷含量的测定。**结果** 所测大虾、金枪鱼、虾油、大米、菠菜样品总砷含量为 0.23~4.68 mg/kg, 有机砷含量为 0~3.9 mg/kg。海产品中主要砷形态为 2 种砷化物: 二甲基砷(DMA)和砷甜菜碱(AsB); 大米及菠菜样品中主要的砷形态为: 三价砷 As(III) 、二甲基砷(DMA)和五价砷 As(V) 。**结论** 该方法操作简单, 灵敏度高, 重现性好, 适用于食品中砷形态含量的定量检测。

关键词: 食品; 砷形态; 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱

Determination of arsenic content and speciation in foods of different matrixes by high performance liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry

DONG Zhe¹, GAO Ming-Yi², LI Meng-Yi¹, ZHANG Hui-Liang¹, ZHANG Qing-Sheng¹, CAO Jin^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Beijing Purkinje General Instrument Ltd, Beijing 100085, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of total arsenic and chemical speciation in prawn, tuna, shrimp sauce, rice and spinach of different matrixes by high performance liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HPLC-HG-AFS). **Methods** After extracting the samples with HNO_3 (0.15 mol/L), the chemical speciation of arsenic was studied by HPLC-HG-AFS and the content of total arsenic was determined by atomic fluorescence spectrometry (AFS) after wet digestion. **Results** The total arsenic content in prawn, tuna, shrimp, rice, spinach ranged from 0.23 to 4.68 mg/kg, and organic arsenic content ranged from 0 to 3.9 mg/kg. There were 2 kinds of main arsenic speciation compounds in marine products: DMA and AsB, both were low toxic organic arsenic species. The main arsenic species in rice and spinach were As(III) , DMA and As(V) . **Conclusion** This method is effective to determine arsenic species for its high sensitivity and reproducibility.

KEY WORDS: food; arsenic speciation; high performance liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry

*通讯作者: 曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品化妆品质量分析。E-mail: caojin@tsinghua.org.cn

*Corresponding author: CAO Jin, Researcher, National Institutes of Food and Drug Control, No.2, Tiantan Xili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: caojin@tsinghua.org.cn

1 引 言

元素形态概念的提出是现代环境、食品安全和生命科学等学科发展的需要。当前,分析化学的趋势是鉴别和定量实际的化学形态,而不仅仅是元素总量的测定。砷按其化学形式可分为无机砷和有机砷,无机砷中三价砷和五价砷毒性很大,但其甲基化后则毒性大大降低,砷糖(AsS)和砷甜菜碱(AsB)基本无毒^[1]。元素的形态分析不仅要不同的形态进行定性分析,同时还要进行定量分析,常用的分析方法是联用技术。首先是对不同的形态进行分离,分离之后再进行处理,使它们转变为能被检测的形式,最后再用灵敏度选择和选择性好的检测器检测。常用的分离方法有气相色谱法、液相色谱法和毛细管电泳法。常用的检测方法有电感耦合等离子体质谱法(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)^[2,3]、原子吸收光谱法(atomic absorption spectroscopy, AAS)、原子荧光光谱法(atomic fluorescence spectroscopy, AFS)。国家标准 GB/T 5009.11-2003^[4]提出了总砷和无机砷含量的测定方法,但是此标准并不能解决目前砷形态特异性检测的需要。现有技术中,常以联用技术对砷进行形态分离检测,包括高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术^[5-7]、高效液相色谱-氢化物发生原子荧光光谱法^[8-12]、高效液相色谱-氢化物发生原子吸收光谱法^[13]和毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱联用技术^[14]等。以上几种现有技术中,原子荧光光谱法灵敏度高、选择性好、线性范围宽、操作简单,仪器使用成本低,适用于食品中砷形态的研究^[15]。本研究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,建立了不同基质食品中的砷形态的高效液相色谱-氢化物发生原子荧光联用 (high performance liquid chromatography hydride generation atomic fluorescence spectrometry, HPLC-HG-AFS)的技术方法,并对大虾、虾油、大米阳性样品,金枪鱼、菠菜标准物质进行了测定。

2 材料与方法

2.1 材料、仪器与试剂

大虾、虾油、大米为市面上购买的阳性样品,金枪鱼、菠菜为购买的标准物质,用来进行方法的准确

性验证。

PF73 原子荧光光度计 SA710 形态分析仪带 100 μL 定量环(北京普析通用仪器有限责任公司);离心机 (Sigma-aldrich 公司);天平 (METTLER 公司); Milli-Q 纯水机(法国密利博公司,出水电阻率 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$); HLB 固相萃取小柱(Waters 公司); PRP-X100 阴离子分离柱(Hamilton 公司)。所用的玻璃器皿经 HNO_3 浸泡 24 h, 用去离子水清洗 3 遍, 晾干后备用。

As(III)亚砷酸根溶液标准物质(GBW08666)、As(V)砷酸根溶液标准物质(GBW08667)、MMA 一甲基砷溶液标准物质(GBW08668)、DMA 二甲基砷溶液标准物质(GBW08669)、AsB 砷甜菜碱溶液标准物质(GBW08670)、菠菜 GBW10015(GSB-6)均购自国家标准物质中心;金枪鱼组织中砷的不同形态标准物质(BCR-627)英国 LGC 标准品、磷酸氢二铵 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (优级纯)、氢氧化钾 KOH(优级纯)、硼氢化钾 KBH_4 (优级纯)、硫脲 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (分析纯)、浓盐酸 HCl(优级纯)、浓硝酸 HNO_3 (优级纯)、过硫酸钾 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (分析纯)、浓硫酸(优级纯)试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。实验室用水为超纯水。

2.2 SA710 HPLC-HG-AFS 分析条件

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和氢化物发生原子荧光实验参数,见表 1。

表 1 砷形态测定 HPLC-HG-AFS 条件
Table 1 HPLC-HG-AFS parameters of arsenic speciation determination

项目	常态流路	紫外流路
流动相	15 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (甲酸调至 pH=6.0)	
流速	1 mL/min	
进样体积	100 μL	
载液 1	7% HCL	/
载液 2	/	7% HCL
还原剂	1.5% KBH_4 +0.5% KOH	
氧化剂	/	1.5% $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ +0.5% KOH
紫外灯	关闭	打开
负高压	300 V	
主灯电流	50 mA	
辅灯电流	50 mA	
炉高	8 cm	

2.3 实验方法

食品中不同砷形态经稀硝酸提取后,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。按保留时间定性,外标法定量。

砷形态测定:称取约0.5 g样品于50 mL具塞离心管中,精密加入9.50 mL 0.15 mol/L HNO_3 溶液,在旋涡混合器上混匀,浸泡过夜后,于70 °C超声提取2.0 h,冷却至室温,加入500 μL 3%乙酸溶液,4 °C冰箱中放置5 min后,在4 °C下8000 r/min离心15 min,取上清液,用0.22 μm 滤膜过滤后,过HLB固相萃取小柱后,待上机测定。

总砷含量测定:称取约0.5 g样品于三角瓶中,同时做试剂空白。加入硝酸高氯酸混合酸(V:V=4:1)10~15 mL,加入硫酸2.0 mL,由低温至高温加热消解,不时缓缓摇动使均匀,消解至冒白烟,消解液呈淡黄色或无色。冷至室温后定量转移至25 mL具塞比色管中,以超纯水定容。对于某些样品消解后

存在一些沉淀物或悬浊物,定容后过滤稀释测定。

3 结果与讨论

3.1 不同形态砷结果分析

用SA710的常态流路对As(III)、DMA、MMA、As(V)进行分离分析,4种砷形态的线性范围为0~100 $\mu\text{g/L}$,相关系数均 ≥ 0.9990 ,相对标准偏差均小于3.0%(10 $\mu\text{g/L}$, $n=7$),对4种砷形态As(III)、DMA、MMA、As(V)的仪器检出限分别为:0.23、0.35、0.34、1.2 $\mu\text{g/L}$ 。按照称样量0.5 g,定容体积10 mL计算,4种砷形态的方法检出浓度分别为4.6、7.0、6.8、24 $\mu\text{g/kg}$ (见图1和表2)。

用SA710的紫外流路对AsB进行分析,AsB的线性范围为0~200 $\mu\text{g/L}$,线性相关系数 ≥ 0.9990 ,相对标准偏差均小于3.0%(40 $\mu\text{g/L}$, $n=7$),AsB的仪器检出限为:2.0 $\mu\text{g/L}$ 。按照称样量0.5 g,定容体积10 mL计算,AsB的方法检出浓度为40 $\mu\text{g/kg}$ (见图2和表2)。

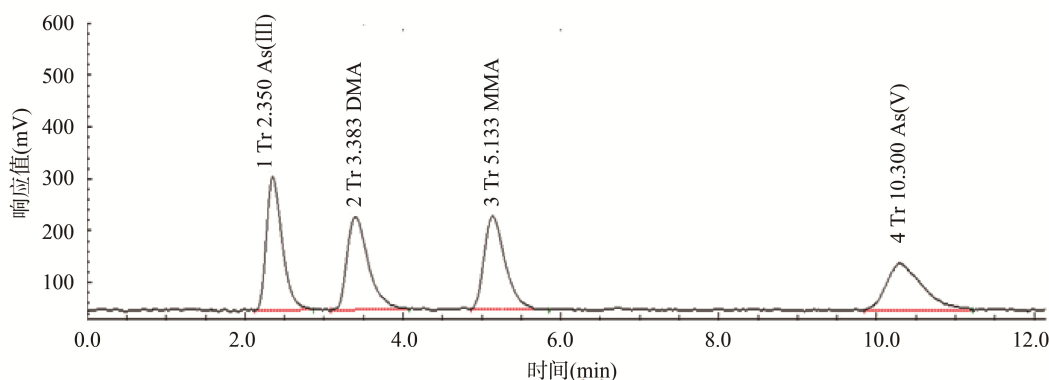


图1 砷的4种形态标准色谱图

Fig. 1 Standard chromatogram of 4 kinds of arsenic speciation

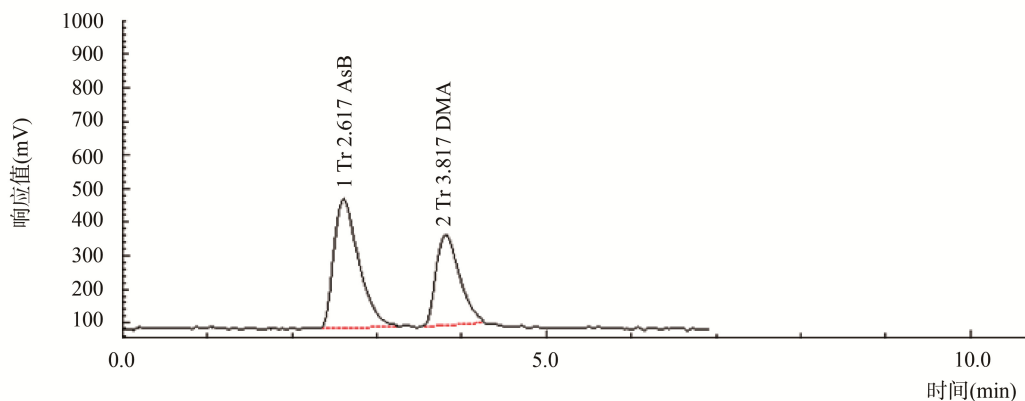


图2 AsB和DMA的标准色谱图

Fig. 2 Standard chromatogram of AsB and DMA

表 2 砷标准溶液的检出限、相对标准偏差和相关系数

Table 2 Detection limits, relative standard deviations and relative coefficients of arsenic standard solutions

项目	常态流路			紫外流路	
	As(III)	DMA	MMA	As(V)	AsB
相关系数(<i>r</i>)	0.9996	0.9993	0.9997	0.9992	0.9994
线性范围(μg/L)	0~100	0~100	0~100	0~100	0~200
检出限(μg/L)	0.23	0.35	0.34	1.2	2.0
相对标准偏差(RSD, <i>n</i> =7)	1.5%	2.1%	2.2%	1.5%	2.5%

在常态流路下, AsB 不出峰, 这说明 AsB 不能直接与 KBH_4 反应生成气态氢化物, 需通过在线紫外消解装置把 AsB 氧化成无机砷, 再进行测定。同时, 在紫外流路下测定 AsB 的含量时, As(III)与 AsB 在色谱柱中的保留时间非常接近, 从而严重干扰 As(III)和 AsB 的测定。若要消除待测液中 As(III)的干扰, 可在待测液中加入 10% H_2O_2 , 在 70℃ 水浴下加热 15 min, 把 As(III)氧化为 As(V), 而 10% H_2O_2 对 AsB、DMA、MMA 基本无影响。

本方法对常见的砷形态 AsC(砷胆碱)也进行了检测, AsC 的氢化物发生效率极低, 需在紫外消解流路条件下进行测量, 流动相配制成 5 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (pH=9.0)的水溶液, 可以实现 AsB 与 AsC 的分离, 出峰顺序为 AsC、AsB, 但样品中 AsB 组分之前均未检出组分峰, 说明样品中不含 AsC 或含量低于方法检出限, 所以没有详细说明。

3.2 样品中总砷含量的测定

本研究采用国标方法 GB/T 5009.11- 2003 《食品中总砷及无机砷的测定》^[4], 使用 PF73 原子荧光光谱对实验中的样品总砷进行多次(*n*=3)测定, 各样品的实际测定平均值与加标回收率结果见表 3。

总砷测定采用湿式消解法, 这是因为海产品中的有机砷在微波消解体系中不能消解完全, 使测定结果偏低。通过上述实验, 得到各样品中的总砷含量, 两种基质标物的测定值和标示值基本一致, 总砷含量的测定可为形态分析方法的准确性提供佐证。

3.3 形态砷分析前处理条件探索

本研究分别选择常用的 HNO_3 (0.15 mol/L)、 HCl (1.2 mol/L)、甲醇水(1:1, V:V)作为提取溶剂, 对比

测定结果。结果表明, 当采用 1.2 mol/L 的 HCl 提取样品时, 部分砷形态标物的保留时间会发生漂移, 尤其是 As(V)保留时间, 影响各形态的定性和定量, 同时样品的整体回收率也没有用 HNO_3 (0.15 mol/L)效果好。甲醇水(1:1, V:V)处理样品后, 需氮吹复溶后方能进行测定, 费时费力, 并且甲醇水(1:1, V:V)溶剂在处理虾油样品时, 出现乳化现象, 离心后滤膜和小柱都不能有效的将滤液分离, 甲醇提取法不适用于油脂含量特别大的样品, 因此选用 HNO_3 (0.15 mol/L)作为提取溶剂。

本研究对比了浸泡过夜和未浸泡直接提取的测定结果, 未浸泡过夜直接超声提取样品测定结果偏低, 只有浸泡过夜的 50%左右。同时对提取次数也作了考察, 浸泡过夜后提取 1 次和 2 次结果没有统计学差异(*t* 检验, 置信度 95%), 基本满足日常检测的需要。实验中还发现, 不同形态砷会出现相互转化的现象, 尤其在低浓度情况下, 如 As(III)向 As(V)转化, 因此, 对前处理的样品应该尽快测定。

3.4 样品的测定结果

用 2.3 的实验方法, 对大米、大虾、虾油样品, 菠菜和金枪鱼基质标物进行测定, 测定结果及提取效率见表 4。

3.5 样品添加回收率和精密度

以虾油为研究对象, 进行加标回收率和精密度实验, 考察方法的准确度和重现性。实验采用 0.5 g 样品添加 5 种砷形态的标准溶液, 实验结果见表 5。由表 5 可知, 测试样品的平均回收率在 86.67%~103.2%之间, 相对标准偏差 RSD 2.8%~4.5%(*n*=7), 具有较高的精密度。该方法可以满足食品中砷形态的测定要求。

表 3 样品中总砷含量结果(n=3)
Table 3 The content of total arsenic in the samples(n=3)

样品名称	标示量(mg/kg)	测定平均值(mg/Kg)	加标量(ng)	加标回收率(%)
大米	/	1.30	500	98.65
大虾	/	3.15	1500	104.90
虾油	/	1.25	500	95.86
菠菜(GSB-6)	0.23±0.03	0.23	100	96.7
金枪鱼(BCR-627)	4.8±0.3	4.68	2000	99.95

表 4 样品测定结果
Table 4 Determination results of samples

样品	总砷值 (mg/kg)	As(III) (mg/kg)	As(V) (mg/kg)	DMA (mg/kg)	MMA (mg/kg)	AsB (mg/kg)	提取率 (%)
大米	1.30	1.08	N.D	0.21	N.D	N.D	99.23
大虾	3.15	N.D	N.D	0.13	N.D	2.93	97.14
虾油	1.25	N.D	N.D	0.12	N.D	1.02	91.20
菠菜(GSB-6)	0.23	0.045	0.18	N.D	N.D	N.D	97.83
金枪鱼(BCR-627)	4.68	0.21	0.38	0.14	N.D	3.71	94.87

注: N.D 表示未检出; 提取率为各形态砷含量之和与总砷含量的比值。

表 5 虾油中添加回收率与精密度(n=7)
Table 5 Recovery and precision in shrimp sauce (n=7)

组分	样品本底值(μg/L)	加标量(μg/L)	平均实测浓度(μg/L)	平均回收率(%)	RSD(%)
As(III)	0	5	4.436	88.72	3.4
As(V)	0	10	8.667	86.67	3.6
MMA	0	5	4.478	89.56	2.8
DMA	6.0	5	10.51	90.21	3.9
AsB	51	20	71.64	103.2	4.5

4 结 论

本研究建立的硝酸提取、高效液相色谱-氢化物发生原子荧光联用方法能满足不同食品基质中砷形态研究的各项技术要求, 实验结果表明: 方法具有简便、准确、快速的特点, 具有良好的精密度和回收率, 适合于食品中不同砷形态的同时测定。

参考文献

[1] 高双荣, 梁爱华, 易艳, 等. 雄黄中砷的不同形态及其毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 243-247.

Gao SR, Liang AH, Yi Y, *et al.* Advances in research on different forms of arsenic in realgar and its toxicity [J]. Chin J Exper Tradit Medl Formul, 2011, 17(24): 243-247.

[2] 方军, 舒永红, 腾久委, 等. HPLC-ICP-MS 测定中药中砷的形态[J]. 分析实验室, 2006, 25(12): 95-98.

Fang J, Shu YH, Teng JW, *et al.* Determination of arsenic speciation in traditional Chinese medicine using HPLC-ICP-MS [J]. Chin J Anal Lab, 2006, 25(12): 95-98.

[3] Li WH, Wei C, Zhang C, *et al.* A survey of arsenic species in Chinese seafood [J]. Food Chem Toxicol, 2003, 41(8): 1103-1110.

[4] 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 inorganic-arsenic in foods [S].
- [5] Hamano-nagaoka M, Nishimura T, Matsuda R, *et al.* Evaluation of a nitric acid-based partial-digestion method for selective determination of inorganic arsenic in rice[J]. *J Food Hyg Japan Soc*, 2008, 49(2): 95–99.
- [6] 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联用测定婴幼儿辅食中的无机砷[J]. *食品科学*, 2011, (24): 281–284.
- Hou YX, Liu LP, Pan H, *et al.* Determination of inorganic arsenic in complementary foods for infants and young children by HPLC-ICP/MS [J]. *Food Sci*, 2011, (24): 281–284.
- [7] GB/T 23372-2009 食品中无机砷的测定液相色谱-电感耦合等离子体质谱法[S].
- GB/T23372-2009 Determination of inorganic-arsenic in foods by liquid chromatography-inductive coupled plasma mass spectrometry [S].
- [8] 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. Discussion for the determination method of inorganic arsenic[J]. *Mod Sci Instrum*, 2006, (6): 63–65.
- [9] 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.
- [10] 汤璠, 马冰洁, 应英, 等. 原子荧光形态分析仪测定植物类海产品中砷形态化合物[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, (11): 2729–2731.
- Tang Z, Ma BJ, Ying Y, *et al.* Determination of arsenic compounds in plant seafood by atomic fluorescence spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 11: 2729–2731.
- [11] 张磊, 周蕊, 李筱薇, 等. 动物性海产品中砷形态分析方法的研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2008, 42(5): 298–303.
- Zhang L, Zhou R, Li XW, *et al.* Study on arsenic speciation analysis in animal origin seafood[J]. *Chin J Prev Med*, 2008, 42(5): 298–303.
- [12] 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及其产地底泥中 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 Quarant*, 2013, 5: 53–56.
- [13] 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.
- [14] 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 Spect Anal*, 2014, 34(6): 1675–1678.
- [15] 韦昌金, 刘霁欣, 裴晓华. 离子交换色谱-氢化物发生双道原子荧光法同时测定砷和硒形态[J]. *分析化学*, 2008, 36(8): 1061–1065.
- Wei CJ, Liu JX, Pei XH. Ion exchange chromatography-hydride generation double channel atomic fluorescence spectrometry for simultaneous determination of arsenic and selenium speciation [J]. *Chin J Anal Chem*, 2008, 36(8): 1061–1065.

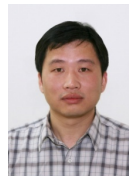
(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



董 喆, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: dongzh2009@126.com



曹 进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: caojin@nifdc.org.cn