

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定 婴幼儿谷类辅助食品中无机砷及其他砷形态

李凤标, 郑巨瑞*, 周柳金, 曾永芳
(贵港市疾病预防控制中心, 贵港 537100)

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婴幼儿谷类辅助食品中无机砷及其他砷形态的分析方法。**方法** 婴幼儿谷类辅助食品经 0.15 mol/L 硝酸溶液提取后, 采用阴离子分析柱, 以不同浓度的碳酸铵溶液作为流动相进行梯度洗脱分离, 用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱进行定性和定量分析。**结果** 建立的 5 种砷形态分析方法在 0~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好的线性关系, 相关系数 $r > 0.999$, 加标回收率在 89.0%~110.0%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) < 5%。婴幼儿谷类辅助食品中砷形态以无机砷为主, 在调查的样品中无机砷的含量均远低于国家食品标准的限量。**结论** 该方法简便、准确, 适用于婴幼儿谷类辅助食品中无机砷及其他砷形态的测定及食品安全的实际监测。

关键词: 无机砷; 砷形态; 婴幼儿谷类辅助食品; 高效液相色谱法; 电感耦合等离子体质谱法

Determination of inorganic arsenic and other arsenic species in infant cereals by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

LI Feng-Biao, ZHENG Ju-Rui*, ZHOU Liu-Jin, ZENG Yong-Fang
(Guigang Center for Disease Control and Prevention, Guigang 537100, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for investigation of inorganic arsenic and other arsenic species in cereal-based complementary food for infants and young children (infant cereals) by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). **Methods** The arsenic species in infant cereals were extracted by 0.15 mol/L nitric acid solution, separated by gradient elution with different concentrations of ammonium carbonate as the mobile phase on anion analysis column, and analyzed both quantitatively and qualitatively by HPLC-ICP-MS. **Results** The established method for 5 arsenic species analysis had good linearity in the concentration range of 0–100 $\mu\text{g/L}$, correlation coefficient of all the above 0.999 with the recovery rates of was 89.0%–110.0%, and relative standard deviation of less than 5%. The main forms of arsenic species in the infant cereal samples detected were inorganic arsenic. The content of inorganic arsenic in the samples investigated was all far lower than the national food standard limit. **Conclusion** This method is simple and accurate for the detection of inorganic arsenic and other arsenic species in infant cereals and could be applied in monitoring practice.

KEY WORDS: inorganic arsenic; arsenic species; infant cereals; high performance liquid chromatography; inductively coupled plasma mass spectrometry

*通讯作者: 郑巨瑞, 初级技师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: rui123xian@163.com

*Corresponding author: ZHENG Ju-Rui, Associate Technician, Guigang Center for Disease Control and Prevention, No.7, Jianshe West Road, Guigang 537100, China. E-mail: rui123xian@163.com

1 引言

砷是一种有害元素,其生理毒性大小与存在形态密切相关,不同形态的砷化合物的毒性差异很大^[1]。其中无机砷的毒性最大,如亚砷酸根[arsenic acid, As(III)]和砷酸根[arsenic acid, As(V)],有机砷的毒性较小些,如一甲基砷(monmethylarsonic acid, MMA)和二甲基砷(dimethylarsinic acid, DMA),而砷甜菜碱(arsenobetaine, AsB)、砷胆碱(arsenocholine, AsC)、砷糖等通常被认为是无毒的^[2-4]。GB 2762-2012《食品安全国家标准 食品中污染物限量》^[5]对无机砷限量要求为 0.2 mg/kg。分析及评价食品中的砷对人体危害的风险及其存在形态具有重要意义。

研究表明婴幼儿谷类辅助食品以大米等谷物为主要原料,是婴幼儿膳食摄入砷健康风险的主要来源。作为免疫力较弱的婴幼儿,对砷毒性更为敏感^[6,7]。因此婴幼儿谷类辅助食品中砷污染的问题近年来备受关注^[8-10]。由近年发表的文献来看,砷形态分析研究主要集中在海产品^[11]和粮食大米^[12]等,针对婴幼儿谷类辅助食品中砷形态分析文献报道较少。本研究采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定婴幼儿谷类辅助食品中总砷和无机砷的含量,了解婴幼儿谷类辅助食品中无机砷的情况,及时发现存在的问题,为采取针对性的干预措施提供依据,减少有问题的婴幼儿谷类辅助食品在市场中流通,保障婴幼儿的健康成长。

2 材料与方法

2.1 仪器

Ultimate-3000 型高效液相色谱、iCAPQ 型电感耦合等离子体质谱仪、HeraeusMultifuge XIR 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);ORTEX3 旋涡混匀仪(德国 IKA 公司);GR-246 恒温烘箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)

2.2 试剂与样品

硝酸(分析纯,德国 Merck 公司),碳酸铵(优级纯,中国西亚试剂公司),甲醇(色谱纯,中国西亚试剂公司);砷标准溶液($\geq 99.3\%$,中国计量科学研究院):砷酸根 As(V)[GBW08667,以砷(As)计:(17.5 ± 0.4) $\mu\text{g/g}$]、亚砷酸根 As(III)[GBW08666,以砷(As)计:(75.7 ± 1.2) $\mu\text{g/g}$]、一甲基砷 MMA[GBW08668,以砷(As)计:(25.1 ± 0.8) $\mu\text{g/g}$]、二甲基砷 DMA[GBW08669,以砷(As)计:(52.9 ± 1.8) $\mu\text{g/g}$]、砷甜菜碱 AsB[GBW08670,以砷(As)计:(38.8 ± 1.1) $\mu\text{g/g}$]以及砷单元素标准溶液(GBW08611,纯度 $\geq 99.3\%$,中国计量科学研究院);SupelcleanTMENVITM-18 小柱(3 mL)(美国 Supelco 公司);实验用水为 Milli-Q 超纯水

样品:在超市、农贸市场及个体经营商店随机采集 5 份婴幼儿谷类辅助食品。

2.3 实验方法

2.3.1 仪器条件

(1) 高效液相色谱条件

阴离子交换柱: DionexlonPacTM AS7 阴离子交换柱(250 mm \times 4.0 mm, 10 μm);流动相: A 相: 3.5 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、B 相: 100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$;流速: 1.0 mL/min;进样体积: 50 μL ;柱温: 35 $^\circ\text{C}$ 。

(2) 电感耦合等离子体质谱条件

射频功率(radio frequency, RF): 1550 W;检测电压: 1150 V;冷却气流速: 14 L/min;辅助气流速: 0.8 L/min;雾化气流速: 1.0 L/min;泵速: 40 r/min。

2.3.2 砷化合物标准溶液的配制

准确称取 0.13210 g 亚砷酸根[As(III)]、0.57143 g 砷酸根[As(V)]、0.39841 g 一甲基砷(MMA)、0.18901 g 二甲基砷(DMA)、0.25775 g 砷甜菜碱(AsB)标准溶液至 10 mL 棕色容量瓶中,用超纯水定容至刻度。配制成浓度为 1.0 mg/L(以砷计)的混合砷标准溶液。

2.3.3 样品前处理方法

称取婴幼儿谷类辅助食品约 1.0 g 于 50 mL 塑料离心管中,加入 20 mL 0.15 mol/L 硝酸溶液,于涡旋仪混匀后,置于 90 $^\circ\text{C}$ 恒温烘箱中热浸提 2.5 h,每隔 0.5 h 取出涡旋 1 次。然后取出冷却至室温,9000 r/min 离心 10 min,取上层清液过 C_{18} 小柱净化,最后过 0.45 μm 滤膜至进样瓶^[13],上高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪(high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometer, HPLC-ICP-MS)分析。在不称量任何食品样品情况下,按同一操作方法作空白试验。

2.3.4 统计分析

数据采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计算相对标准偏差。

2.3.5 质量控制

通过考察方法的加标回收率及平行样之间的相对标准偏差,以其检测结果是否在标准参考范围来考察实验的准确性。

3 结果与分析

3.1 流动相的选择

砷形态多是以离子型化合物形式存在,因此大多采用离子交换机制进行分离。当样品通过阴离子交换色谱柱时,不同砷形态的分离效果除了跟阴离子交换色谱柱分离性能有关之外,流动相的种类和离子强度也是影响其分离效果的主要因素^[14-17]。本研究选取 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 作为流动相,能够实现 5 种砷形态分离,分离度和保留时间均可以达到试验要求,图 1 为选用该流动相的 5 种砷形态标准品与样品色谱图。与国家标准方法 GB 5009.11-2014《食品中总砷及无机砷的测定》^[18]推荐的 LC-ICP/MS 法中选

用的流动相相比, 可获得更好的分离效果, 配制过程更加简单。

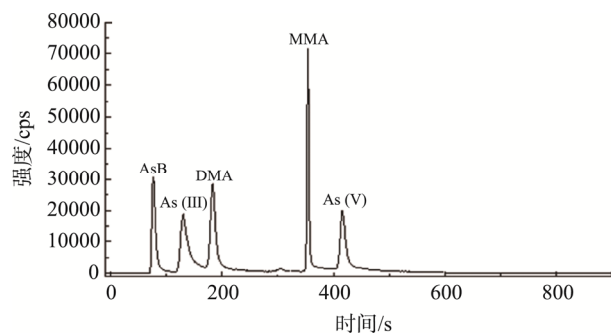


图 1 5 种砷形态标准分离图谱

Fig.1 Separation chromatogram of five arsenic species standard

3.2 梯度洗脱实验

为了保证 5 种砷形态分离效果并且缩短分析时间, 本研究使用了 3.5 mmol/L (NH₄)₂CO₃ 作为流动相 A、100 mmol/L (NH₄)₂CO₃ 作为流动相 B(增加碳酸铵浓度, 能增强流动相洗脱能力, 能够缩短各组分的保留时间, 故采用高低浓度的碳酸铵溶液作为流动相), 室温, 流速为 1.0 mL/min 进行梯度洗脱, 洗脱程序详见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
	3.5 mmol/L (NH ₄) ₂ CO ₃	100 mmol/L (NH ₄) ₂ CO ₃
0.0	100	0
3.0	100	0
3.1	0	100
8.0	0	100
8.1	100	0
15.0	100	0

3.3 方法线性范围及检出限

配制成浓度为 0.0、2.5、5.0、10.0、50.0、100.0 μg/L 的混合标准系列溶液, 分别在“2.3.1 仪器条件”下, 对 5 种砷形态标准溶液进行分析, 以峰面积为纵坐标、对应的组分浓度为横坐标绘制标准工作曲线。采用婴幼儿谷类辅助食品样品按照 2.3.3 样品前处理方法处理后对各组分进行了最低检出限的测定, 并以本底 3 倍噪音分别计算样品最低检出限, 试验结果见表 2。

3.4 方法的精密度

为考察方法的精密度, 选取 2 个婴幼儿谷类辅助食品原始样品平行测定 6 次, 5 种砷形态的 RSD 均小于 5%, 试验结果详见表 3。结果表明, 该方法具有较好的精密度。

表 2 5 种砷形态线性回归方程及检出限(n=6)
Table 2 Regression equations and detection limit of five arsenic species (n=6)

砷形态	线性范围/(μg/L)	线性方程	相关系数 r	最低检出限/(μg/kg)
AsB	0~100	Y=4362.3453X+1286.4323	0.9998	0.520
As(III)	0~100	Y=3611.2187X+4975.1284	0.9992	0.692
DMA	0~100	Y=4271.4711X+2698.0586	0.9993	1.750
MMA	0~100	Y=5302.3930X+1292.4846	1.0000	0.909
As(V)	0~100	Y=3018.6010X+9149.0205	0.9995	0.722

表 3 精密度测定结果(n=6)
Table 3 Results of precision determination (n=6)

砷形态	样品 1	RSD/%	样品 2	RSD/%
	测定均值/(μg/kg)		测定均值/(μg/kg)	
AsB	N.D.	0.00	8.032	4.04
As(III)	20.320	3.01	7.233	3.93
DMA	19.780	3.21	10.400	3.20
MMA	N.D.	0.00	5.484	2.92
As(V)	5.927	4.71	11.274	4.12

注: N.D.表示未检出。

3.5 方法的回收率

为考察方法的回收率和砷形态化合物稳定性, 在空白样品和随机 1 份婴幼儿谷类辅助食品样品(2#样品)中, 分别添加不同浓度的砷形态标准溶液(按照样品溶液浓度为 5.00、20.00 和 50.00 μg/L 的砷形态, 进行加标), 按实验方法进行处理、测定样品中的砷形态, 计算回收率, 加标试验结果详见表 4。由表 4 可知各加标回收率在 89.0%~110.0%之间, 说明该方法稳定、可靠。

3.6 婴幼儿谷类辅助食品中砷形态分布

选取市售的 5 种婴幼儿谷类辅助食品, 按所建立的 HPLC-ICP-MS 分析方法考察, 其中的无机砷及其他砷形态分布情况详见表 5。结果表明, 市售婴幼儿谷类辅助食品样品中无机砷的含量均远低于食品安全国家标准的限量, 故样品中无机砷的指标是安全的。

表 4 样品中 5 种形态砷回收率测定结果($n=6$)
Table 4 Recoveries of five arsenic species in sample ($n=6$)

样品	添加量 /($\mu\text{g/L}$)	AsB		As(III)		DMA		MMA		As(V)	
		实测值 /($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	实测值 /($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	实测值 /($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	实测值 /($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	实测值 /($\mu\text{g/L}$)	回收率/%
空白	5.00	4.92	98.3	5.20	104.0	5.20	104.0	4.60	92.0	4.45	89.0
	20.00	20.40	102.0	21.20	106.0	19.90	99.5	20.00	100.0	20.20	101.0
	50.00	49.90	99.8.0	48.90	97.8	53.00	106.0	54.00	108.0	48.10	96.2
2#样品	5.00	5.77	107.0	4.83	89.4	5.02	90.0	5.22	98.9	5.33	95.3
	20.00	18.90	92.5	21.00	103.0	19.80	96.4	21.90	108.0	22.40	109.0
	50.00	54.40	108.0	54.40	108.0	48.35	95.7	50.80	101.0	55.60	110.0

注: 由表 3 结果计算得 2#样品溶液(本底)中 AsB、As(III)、DMA、MMA、As(V)含量分别为 0.402、0.362、0.520、0.274、0.564 $\mu\text{g/L}$ 。

表 5 婴幼儿谷类辅助食品中砷形态分布
Table 5 The morphological distribution of arsenic in infant cereals

样品	AsB /($\mu\text{g/kg}$)	As(III) /($\mu\text{g/kg}$)	DMA /($\mu\text{g/kg}$)	MMA /($\mu\text{g/kg}$)	As(V) /($\mu\text{g/kg}$)	无机砷 [As(III)+As(V)]/($\mu\text{g/kg}$)	形态分析总砷 含量/($\mu\text{g/kg}$)	无机砷占总砷的 比例/%
1	N.D.	20.320	19.780	N.D.	5.927	26.247	46.027	57.0
2	8.032	7.233	10.400	5.484	11.274	18.507	42.423	43.6
3	2.567	5.090	N.D.	N.D.	2.600	7.690	10.257	75.0
4	N.D.	10.854	5.620	5.652	7.891	18.745	30.017	62.4
5	N.D.	5.905	5.643	N.D.	9.986	15.891	21.534	73.8

注: 无机砷含量为 As(III)+As(V)含量之和; N.D.表示未检出。

4 结论与讨论

本研究建立了高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定婴幼儿谷类辅助食品中无机砷及其他砷形态的分析方法。该方法在 0~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好的线性关系, 相关系数 r 全部在 0.999 以上, 加标回收率在 89%~110%, 相对标准偏差 $\text{RSD}<5\%$ 。通过测定 5 个市售婴幼儿谷类辅助食品的砷形态, 发现婴幼儿谷类辅助食品中的砷形态以无机砷为主, 无机砷含量占总砷含量的 43.6%以上。本次研究测定的市售婴幼儿谷类辅助食品中无机砷含量均远低于国家食品标准的限量, 符合 GB 2762-2012《食品安全国家标准食品中污染物限量》中婴幼儿谷类辅助食品无机砷 $<0.2 \text{ mg/kg}$ 的要求。

本研究通过建立婴幼儿谷类辅助食品中砷形态分析方法, 对市售婴幼儿谷类辅助食品中砷形态进行分析, 初步了解婴幼儿谷类辅助食品中无机砷的含量, 为婴幼儿谷类辅助食品中无机砷监测提供方法和有效数据。

参考文献

[1] 曾晨, 郭少娟, 杨立新. 汞、镉、铅、砷单一和混合暴露的毒性效应及机理研究进展[J]. 环境工程技术学报, 2018, 8(2): 221-230.

Zeng C, Guo SJ, Yang LX. Toxic effects and mechanisms of exposure to single and mixture of mercury, cadmium, lead and arsenic [J]. J Environ Eng Technol, 2018, 8(2): 221-230.

[2] 苏祖俭, 黄伟雄, 蔡文华, 等. 食品中无机砷分析技术进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3580-3589.

Su ZJ, Huang WX, Cai WH, *et al.* Advances in analysis of inorganic arsenic in food [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(14): 3580-3589.

[3] 杨艳, 陈宏靖, 李鑫, 等. 婴幼儿谷类辅助食品中砷形态分析[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(1): 136-139.

Yang Y, Chen HJ, Li X, *et al.* Detection of arsenic species in cereal-based complementary food for infants and young children [J]. Chin J Publ Health, 2018, 34(1): 136-139.

[4] Guo LX, Zhang GW, Wang JT, *et al.* Determination of arsenic species in ophiocordyceps sinensis from major habitats in China by HPLC-ICP-MS and the edible hazard assessment [J]. Molecules, 2018, 23(5): 1012-1016.

[5] GB 2762-2012 食品安全国家标准 食品中污染物限量[S].
GB 2762-2012 National food safety standard-Maximum levels of pollutants in foods [S].

[6] Antonio J, Signes P, Carey M, *et al.* Inorganic arsenic in rice-based products for infants and young children [J]. Food Chem, 2014, 3(3): 128-134.

[7] Sandra MP, Amanda RG, Francisco B, *et al.* Inorganic and total arsenic contents in rice-based foods for children with celiac disease [J]. J Food Sci, 2014, 79(1): 122-128.

- [8] 秦宇. 我国婴幼儿谷类辅助食品行业质量调研报告[J]. 质量与标准化, 2015, 9(23): 38-41.
Qin Y. Investigation report on the quality of infant grain auxiliary food industry in China [J]. Qual Stand, 2015, 9(23): 38-41
- [9] Carey M, Donaldson E, Signes AJ, *et al.* Dilution of rice with other gluten free grains to lower inorganic arsenic in foods for young children in response to European Union regulations provides impetus to setting stricter standards [J]. PLoS One, 2018, 13(1): 1-9.
- [10] Rothenberg SE, Jackson BP, Carly MC, *et al.* Co-exposure to methylmercury and inorganic arsenic in baby rice cereals and rice-containing teething biscuits [J]. Environ Res, 2017, 159(15): 639-647.
- [11] Schmidt L, Landero JA, Novo DR, *et al.* A feasible method for As speciation in several types of seafood by LC-ICP-MS/MS [J]. Food Chem, 2018, 255(1): 340-347
- [12] 史潜玉, 刘立, 倪志尧, 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 211-215.
Shi QY, Liu L, Ni ZY, *et al.* Determination of inorganic arsenic in rice by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(2): 211-215.
- [13] 朱云, 陈丹丹, 邵彪, 等. 液相色谱-原子荧光光谱法测定紫菜无机砷前处理方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(8): 1966-1970.
Zhu Y, Chen DD, Shao B, *et al.* Pretreatment method for the determination of inorganic arsenic in laver by liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(8): 1966-1970.
- [14] 贾秀敏. 砷在钛柱撑蒙脱土上的吸附行为及机理研究[D]. 天津: 天津大学, 2008.
Jia XM. Study on adsorption behavior and mechanism of arsenic on Ti-pillared montmorillonite [D]. Tianjin: Tianjin University, 2018.
- [15] 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.
- [16] 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 5 kinds of arsenic species by high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(9): 3654-3664.
- [17] 程静秋, 廖敏立, 梁华华. 高效液相色谱-电感耦合等离子质谱法测定大米中无机砷方法的优化[J]. 广东化工, 2019, 46(9): 206-207.
Cheng JQ, Liao ML, Liang HH. Optimization of HPLC-ICP-MS for the determination of inorganic arsenic in rice [J]. Guangdong Chem, 2019, 46(9): 206-207.
- [18] GB 5009.11-2014 食品中总砷及无机砷的测定[S].
GB 5009.11-2014 Determination of total arsenic and abio-arsenic in foods [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李凤标, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 573393846@qq.com



郑巨瑞, 硕士, 初级技师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: rui123xian@163.com