

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定 食品中无机砷含量

刘 涛, 刘花梅*

(江西省食品检验检测研究院, 南昌 330002)

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食品中无机砷的分析方法。**方法** 样品用 20 mL 0.15 mol/L 的硝酸溶液于 90 °C 恒温箱中浸提 2.5 h, 经 8000 r/min 离心 15 min, 经 Agilent Zobarx Column 色谱柱分离, 以 5 mmol/L 己烷磺酸钠和 20 mmol/L 柠檬酸(用氢氧化钠调 pH 至 4.3)为流动相。电感耦合等离子体质谱仪进行定量分析无机砷的含量。**结果** 三价砷和五价砷在 1.0 ~ 50.0 µg/L 浓度范围线性关系良好, 线性相关系数(r^2)分别为 0.9998 和 1.000; 三价砷的加标回收率为 91% ~ 108%, 相对标准偏差为 1.5% ~ 4.3%; 五价砷的加标回收率为 85% ~ 106%, 相对标准偏差为 2.4% ~ 6.4%。**结论** 该方法准确、灵敏, 适合于批量食品中无机砷含量的精确测定。

关键词: 液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪; 无机砷; 三价砷; 五价砷

Determination of inorganic arsenic in food by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry

LIU Tao, LIU Hua-Mei*

(Jiangxi Food Inspection and Testing Institute, Nanchang 330002, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the determination of inorganic arsenic in food by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Methods** The sample was extracted by 20 mL 0.15 mol/L nitric acid solution in a 90 °C incubator for 2.5 h, centrifuged for 15 min at 8000 r/min, and separated by Agilent Zobarx column using 5 mmol/L sodium hexane sulfonate and 20 mmol/L citric acid (pH adjusted to 4.3 with sodium hydroxide) as mobile phase. The content of inorganic arsenic was quantitatively analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Results** Trivalent arsenic and pentavalent arsenic had a good linear relationship in the concentration range of 1.0 to 50.0 µg/L, the linear correlation coefficients (r^2) were 0.9998 and 1.000, respectively. The standard recovery rates of arsenic trivalent were 91%–108%, and the relative standard deviations were 1.5%–4.3%. The standard recovery rates of pentavalent arsenic were 85%–106%, and the relative standard deviations were 2.4%–6.4%. **Conclusion** The method is accurate, sensitive and suitable for the accurate determination of inorganic arsenic content in bulk food.

KEY WORDS: liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, inorganic arsenic; trivalent arsenic; pentavalent arsenic

*通讯作者: 刘花梅, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 87862769@qq.com

*Corresponding author: LIU Hua-Mei, Senior Engineer, Jiangxi food inspection and Testing Research Institute, 213 Jinggangshan Avenue, Nanchang City, Jiangxi Province. E-mail: 87862769@qq.com

1 引 言

砷(As)在大自然中普遍存在^[1],作为重金属砷以各种形式存在于自然界中,在空气、土壤、沉积物和水主要以 As_2S_3 、 As_2S_5 、 As_2O_3 或亚砷酸盐(AsIII)、砷酸盐(AsV)、一甲基砷酸(monomethyl arsenic acid, MMA)和二甲基砷酸(dimethyl arsenic acid, DMA)的形式存在^[2]。砷与其化合物被运用在农药、除草剂、杀虫剂,与许多种的合金中,易被动植物吸收并在体内积累。砷通过食物链进入人体内,对人的身体健康造成一定损害。不同形态的砷化合物,其毒性差别也很大,其中 As(III)是构成食品安全威胁的主要砷形态,AsIII易被氧化成毒性较小的 As(V)^[3]。砷化合物的半数致死量(median lethal dose, LD_{50})计,其毒性从大到小依次为亚砷酸盐(AsIII)、砷酸盐(AsV)、一甲基砷酸(monomethyl arsenic acid, MMA)、二甲基砷酸(dimethylarsinic acid, DMA)、砷胆碱(arsenical choline, ASC)、砷甜菜碱(arsenical beet, ASB)。其中无机砷的毒性最大,国际癌症研究委员会已将无机砷列为强致癌物;甲基化砷的毒性较小,而 AsB 和 AsC 被认为是无毒的,AsB 对人体无害,多数海洋生物中的砷主要以此形式存在^[4]。由于各种不同形态的砷具有不同的物理及化学性质,各种不同形态的砷具有不同的毒性,因此砷的形态分析越来越受到关注。GB 2762-2017《国家食品安全标准 食品中污染物限量》中规定了多类食品中无机砷的限量指标^[5]。有研究发现各类海产品中总砷含量为 0.36~35.91 mg/kg,但主要以低毒或无毒的砷甜菜碱或砷糖等有机砷形态存在,有机砷占总含量的 90%以上^[6],而大米中砷主要以三价砷、五价砷和二甲基砷等形态存在^[7]。

目前主要通过联用技术实现无机砷含量的测定,如液相色谱-原子荧光光谱法(Liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry, LC-AFS)法、液相色谱-电感耦合等离子质谱法(Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, LC-ICP/MS)^[8-11]、离子色谱分离-电感耦合等离子质谱联用法^[12,13]、流动注射-氢化物发生-原子吸收光谱法^[14]。最常用的是液相色谱-原子荧光光谱法、液相色谱-电感耦合等离子质谱法,而 GB 5009.11-2014《食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定》^[15]中液相色谱-电感耦合等离子质谱法用到的流动相盐溶液复杂,且分离 5 种砷形态的周期较长,这导致在进行大量样品测试时耗时长、效率低。鉴于此本研究采用 5 mmol/L 己烷磺酸钠+20 mmol/L 柠檬酸(用氢氧化钠调 pH 至 4.3)为流动相,经 Agilent Zorbax Column 色谱柱分离,方法快捷高效、准确、灵敏,能够准确检测出各种砷形态的含量,为日常监管检测提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

7900 电感耦合等离子体质谱仪(美国 Agilent 公司); HPLC 1260 高液相色谱(美国 Agilent 公司); CR22N 高速冷冻离心机(日本日立公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); DHA-9420A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

己烷磺酸钠(HPLC 级,费舍尔化学公司);一水合柠檬酸钠、氢氧化钠(优级纯,国药集团化学试剂有限公司);硝酸(优级纯,苏州晶瑞化学股份有限公司);砷酸根 AsIII、亚砷酸根 AsV、砷甜菜碱 AsB、甲基砷酸(methylarsonic acid, MMA)和二甲基砷酸(dimethylarsinic acid, DMA)(国家标准物质,中国计量科学研究院);纯水($\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, 实验室自制)。

大米、婴幼儿营养米粉和紫菜,海带,墨鱼均为市售样品。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理^[15]

(1)大米:称取大米样品 1.0 g 于 50 mL 离心管中,加入 20.0 mL 0.15 mol/L 的硝酸溶液于 90 °C 恒温箱中浸提 2.5 h,每 0.5 h 振摇 1 min,取出冷却至室温,经 8000 r/min 离心 15 min,取上层清液,经 0.45 μm 有机滤膜过滤后进样,同法处理空白。

(2)婴幼儿辅助食品:称取营养米粉样品 1.0 g 于 50 mL 离心管中,加入 20.0 mL 0.15 mol/L 的硝酸溶液于 90 °C 恒温箱中浸提 2.5 h,每 0.5 h 振摇 1 min,取出冷却至室温,经 8000 r/min 离心 15 min,取 5 mL 上清液至于离心管中,加入 5 mL 正己烷,振摇 1 min,8000 r/min 离心 15 min,弃取上层正己烷,按此过程重复一次。吸取下层清液,经 0.45 μm 有机滤膜过滤及 C_{18} 小柱净化后进样,同法处理空白。

(3)水产动植物产品:称取水产动植物样品 1.0 g 于 50 mL 离心管中,加入 20.0 mL 0.15 mol/L 的硝酸溶液于 90 °C 恒温箱中浸提 2.5 h,每 0.5 h 振摇 1 min,取出冷却至室温,经 8000 r/min 离心 15 min,取 5 mL 上清液至于离心管中,加入 5 mL 正己烷,振摇 1 min,8000 r/min 离心 15 min,弃取上层正己烷,按此过程重复一次。吸取下层清液,经 0.45 μm 有机滤膜过滤及 C_{18} 小柱净化后进样,同法处理空白。

2.2.2 液相色谱和电感耦合等离子体质谱仪条件

(1) 液相色谱条件

砷形态分离柱采用 Agilent Zorbax Column 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm),流动相为 5 mmol/L 己烷磺酸钠+20 mmol/L 柠檬酸(用氢氧化钠调 pH 至 4.3),进样量为 10 μL ,在流速为 1.2 mL/min 的条件下进行等度洗脱。

(2) 质谱条件

用 1 μg/L 质谱调谐液优化后的 ICP-MS 的工作参数: 射频功率: 1550 W; 等离子体气流量: 15 L/min; 载气: 0.90 L/min; 采样深度: 9.0 mm; 雾化室温度: 2 ℃。分析模式: 标准模式(No Gas 模式)。

3 结果与分析

3.1 流动相 pH 的优化

试验分别考察了用氢氧化钠调节流动相 pH 为 4.1, 4.3, 4.5 时, 不同 pH 值时各种砷形态的分离效果, 当 pH 为 4.1 时五价砷 ASV 与 MMA 不能很好的分开, 而当 pH 为 4.5 时三价砷(AsIII)与 MMA 不能很好的分开, 但当 pH 在 4.3 时 5 种不同形态砷的分离效果最好, 分离效果图见图 1。

3.2 方法的线性范围、检出限及定量限

用去离子水分别配制了 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/L 的 AsV 和 AsIII 标准溶液, 在优化的实验条件下进行测试, 1.0 ~ 50 μg/L 的范围内, 线性相关系数(r^2)分别为 0.9998 和 1.000, AsV 曲线方程为 $Y=2.841\times10^{-3}X+$

2.601×10^{-2} ; AsIII 曲线方程为 $Y=2.285\times10^{-3}X+2.365\times10^{-2}$ 。采用逐级稀释法对 AsV 和 AsIII 标准溶液进行稀释, 当采用大米、营养米粉、墨鱼阴性样品做基质时, 在 AsV 和 AsIII 的信噪比(S/N)均大于 3 时为检出限, 在 AsV 和 AsIII 的信噪比(S/N)均大于 10 时为定量限, 结果见表 1, 从表 1 可以看出大米和营养米粉检出限量定量限基本一致, 无明显差别, 墨鱼由于基质较为复杂, 故检出限和定量限均要大于大米和营养米粉。

3.3 方法的精密度及加标回收率

用大米(AsV 含量为未检出, AsIII 含量为 0.104 mg/kg)、婴幼儿营养米粉(AsV 含量为未检出, AsIII 含量为 0.0399 mg/kg)和墨鱼(AsV 含量为 0.0678 mg/kg, AsIII 含量为未检出)进行了加标回收试验, 按照 2.2.1 样品前处理, 在大米样品中分别定量添加 0.05、0.10、0.20 μg 的 AsIII 和 AsV, 在婴幼儿营养米粉和墨鱼中分别定量添加 0.04、0.08、0.12 μg 的 AsIII 和 AsV。按优化后的实验条件对样品进行处理, 测试并分别计算 AsIII 和 As(V)回收率和精密度, 测得平均回收率为 85%~108%, 相对标准偏差为 1.5%~6.4%(表 2)。

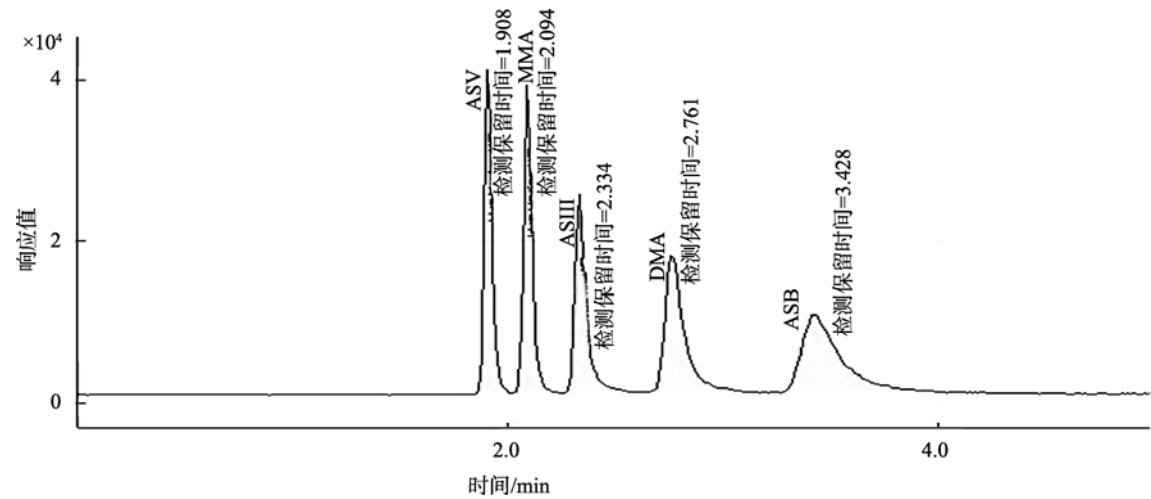


图 1 ASV(五价砷)AsIII(三价砷)与其他几种形态砷分离效果图(pH=4.3)
Fig.1 Separation effect of ASV (pentavalent arsenic) asiii (trivalent arsenic) and other forms of arsenic (pH = 4.3)

表 1 不同样品检出限和定量限
Table 1 Detection limit and quantitative limit of different products

样品	无机砷形态	信噪比≥3 时的浓度/(μg/L)	信噪比≥10 时的浓度/(μg/L)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
大米	AsV	0.25	0.75	0.005	0.015
	AsIII	0.25	0.75	0.005	0.015
婴幼儿营养米粉	AsV	0.25	0.75	0.005	0.015
	AsIII	0.25	0.75	0.005	0.015
墨鱼	AsV	0.3	1.0	0.006	0.02
	AsIII	0.3	1.0	0.006	0.02

3.4 样品分析

本实验选取了大米、婴幼儿营养米粉和紫菜, 海带, 墨鱼, 同时分离五中形态砷以及测定 AsIII、AsV 的含量,

结果列于表 3。从图 2~4 中可以看出, 在紫菜, 海带, 墨鱼中其主要以有机砷 ASB(砷甜菜碱)为主, 其无机砷含量均低于国家食品安全标准限量。

表 2 方法的精密度和回收率(n= 6)
Table 2 Precisions and recoveries of the method (n=6)

样品	添加量/(μg)	回收率/(%)		RSD/(%)		平均回收率/(%)	
		AsV	AsIII	AsV	AsIII	AsV	As III
大米	0.05	91.7 ~ 105.7	92.9 ~ 96.5	5.4	1.5	98.2	94.8
	0.10	85.4 ~ 99.8	95.5 ~ 103.7	6.4	2.7	92.0	99.8
	0.20	89.2 ~ 100.0	95.3 ~ 102.4	3.7	3.0	94.6	97.9
婴幼儿营养米粉	0.04	94.5 ~ 100.5	91.2 ~ 95.9	2.4	2.1	96.1	94.0
	0.08	95.4 ~ 102.8	99.7 ~ 108.4	2.5	3.5	98.8	104.5
	0.12	90.6 ~ 103.1	91.5 ~ 100.3	5.5	3.4	95.7	96.3
墨鱼	0.04	91.8~105.6	96.7~107.5	3.4	2.9	98.4	102.1
	0.08	94.6~106.3	92.8~105.4	4.6	4.3	100.2	99.4
	0.12	92.3~98.8	95.5~104.9	2.8	3.1	96.1	101.6

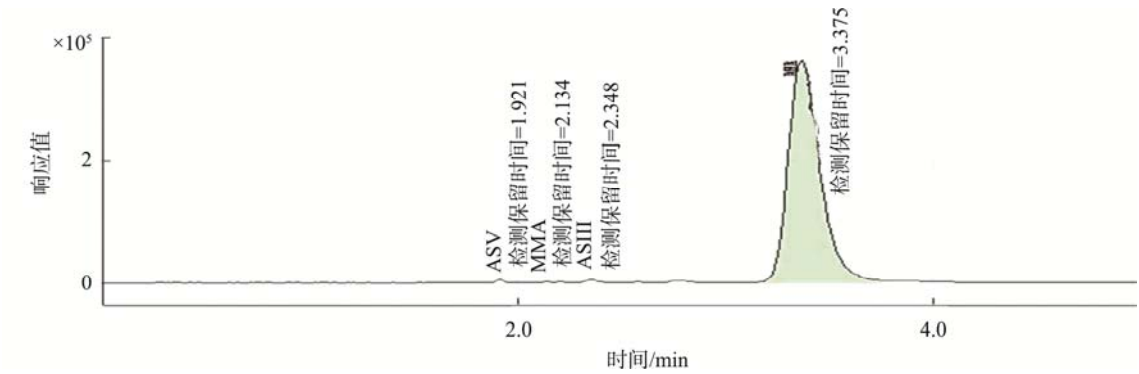


图 2 紫菜中五种砷形态的分离效果图
Fig.2 Separation effect of five arsenic forms in porphyra

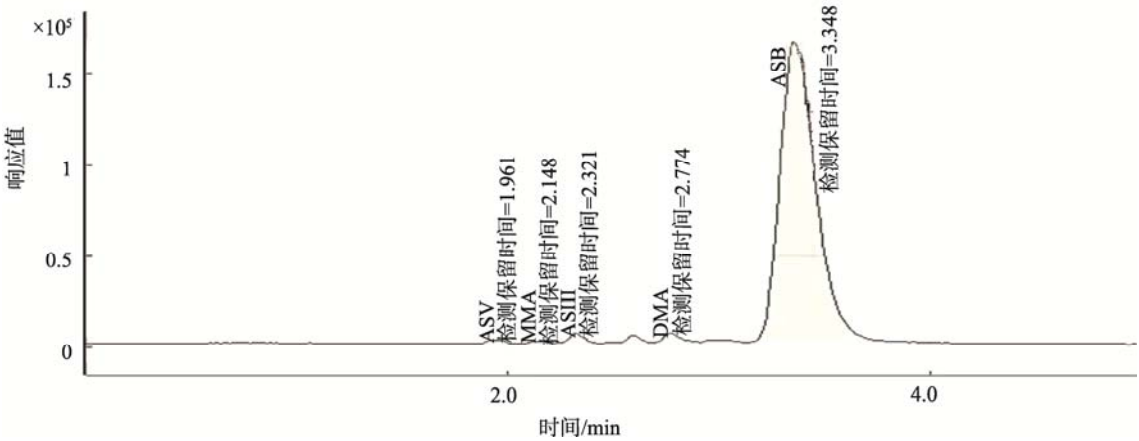


图 3 海带中五种砷形态的分离效果图
Fig.3 Separation effect of five arsenic forms in kelp

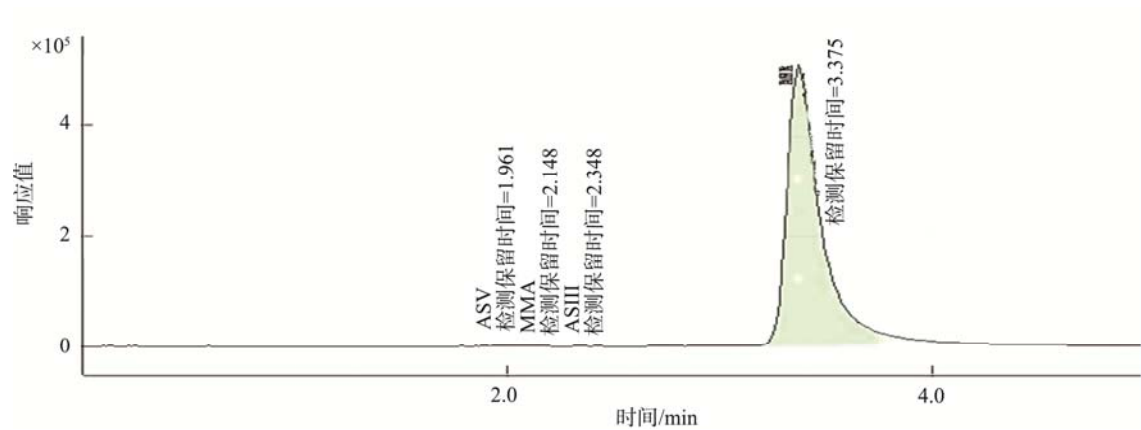


图 4 墨鱼中五种砷形态的分离效果图
Fig.4 Separation effect of five arsenic forms in cuttlefish

表 3 实际样品的测定结果
Table 3 Analytical results of marine products

样品	AsV	AsIII	无机砷含量
大米-1/(mg/kg)	未检出	0.0571	0.0571
大米-2/(mg/kg)	未检出	0.104	0.104
大米-3/(mg/kg)	未检出	0.0765	0.0765
婴幼儿营养米粉-1/(mg/kg)	未检出	0.0399	0.0399
婴幼儿营养米粉-2/(mg/kg)	未检出	0.0246	0.0246
婴幼儿营养米粉-3/(mg/kg)	0.0257	0.0825	0.108
紫菜/(mg/kg)	0.133	0.199	0.332
海带/(mg/kg)	0.0767	0.189	0.266
墨鱼/(mg/kg)	0.0678	未检出	0.0678

4 结 论

本研究建立了 Agilent Zobarx Column 色谱短柱分离 – 电感耦合等离子体质谱联用技术快速测定大米、婴幼儿营养米粉和紫菜，海带，墨鱼中无机砷的检测方法。相比于 GB 5009.11-2014《食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定》^[15]中第二篇无机砷的测定第二法的方法，本方法在分析时间上要更加快速，检出限和定量限也要优于国标。本文还研究了不同 pH 流动相对于 5 种形态砷的分离效果，发现在流动相 pH 为 4.3 时分离效果最好，同时分离时间只需要 5 min。该方法稳定、快速、灵敏；可满足于大米、婴幼儿营养米粉和紫菜，海带，墨鱼中无机砷测定。

参考文献

[1] Vahter M. Health effects of early life exposure to arsenic [J]. Basic Clin Pharmacol, 2008, 102: 204–211.
[2] Henke KR. Arsenic in natural environments [M]. Arsenic: John Wiley and Sons Ltd, 2009.

[3] 谭婷婷, 王瑛. 食品中砷的形态及无机砷降低毒性的研究进展[J]. 2014 年广东省食品学会年会论文集, 2014.
Tan TT, Wang Y. The form of arsenic in food and the progress of inorganic arsenic in reducing toxicity [J]. Proceedings of 2014 Annual Meeting of Guangdong Food Society, 2014.
[4] Brown JL, Kitchin KT, George M. Dimethylarsinic acid treatment alters six different rat biochemical parameters: Relevance to arsenic carcinogenesis [J]. Teratog Carcinog Mutag, 1997, 17(2): 71–84.
[5] GB 2762-2017 国家食品安全标准 食品中污染物限量[S].
GB 2762-2017 National food safety standard-limit of pollutants in food [S].
[6] 梅光明, 严国, 常家琪, 等. 浙江沿海海产品无机砷污染调查及食用风险分析[J]. 食品工业科技, 2019, (12): 218–229.
Mei GM, Yan G, Chang JQ, et al. Investigation of inorganic arsenic pollution and analysis of food risk in coastal seafood of Zhejiang province [J]. Food Ind Technol, 2019, (12): 218–229.
[7] 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的无机砷[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 2: 569–573.
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, 2: 569–573.
- [8] GB/T 5009.11-2003 食品中总砷及无机砷的测定[S].
GB/T 5009.11-2003 National standard of the people's Republic of China [S].
- [9] 尚德荣, 宁劲松, 赵艳芳. 高效液相色谱氢化物发生原子荧光(HPLC-HG-AFS)联用技术检测海藻食品中无机砷[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 132–137.
Shang DR, Ning JS, Zhao YF. Determination of inorganic arsenic in seaweed food by HPLC-HG-AFS [J]. J Fisher, 2010, 34(1): 132–137.
- [10] 林希, 叶俊君, 曾卫兴. 采用 HPLC 联合 ICP-MS 等离子体质谱法检测虾油中的无机砷[J]. 化工设计通讯, 2019, 45(6): 116–117.
Lin X, Ye JJ, Zeng WX. Determination of inorganic arsenic in shrimp oil by HPLC Combined with ICP-MS [J]. Chem Design Commun, 2019, 45(6): 116–117.
- [11] 彭海亮. 基于 ICP-MS 和 LC-AFS 技术检测籼稻谷总砷中无机砷的含量及其形态现代食品[J]. 现代食品, 2017, 23: 125–128.
Peng HL. Determination of inorganic arsenic in total arsenic of Indica Rice Based on ICP-MS and lc-afs technology and its form modern food [J]. Mod Food, 2017, 23: 125–128.
- [12] 黄红霞. 离子色谱分离-电感耦合等离子体质谱联用法测定肉类食品中无机砷[J]. 理化检验(化学分册), 2010, 46(10): 1122–1124.
Huang HX. Determination of inorganic arsenic in meat by ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2010, 46(10): 1122–1124.
- [13] 赵彤, 李海龙, 周慧敏. 离子色谱-电感耦合等离子体质谱法测定大米中无机砷[J]. 理化检验(化学分册), 2012, 48(5): 603.
Zhao T, Li HL, Zhou HM. Determination of inorganic arsenic in Rice by ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2012, 48(5): 603.
- [14] 苗雪原. 流动注射-氢化物发生-原子吸收光谱法测定食品中无机砷[J]. 理化检验(化学分册), 2009, 45(9): 1101–1102.
Miao XY. Determination of inorganic arsenic in food by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2009, 45(9): 1101–1102.
- [15] 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].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



刘 涛, 助理工程师, 主要研究方向为无机元素分析。
E-mail: 254584357@qq.com



刘花梅, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 87862769@qq.com