

热浸提-高效液相色谱等度分离-原子荧光光谱法测定水产品中的 4 种砷形态

韦丽丽*, 石莉莉, 覃月媚

(梧州市疾病预防控制中心, 广西 梧州 543002)

摘要:建立了水产品中 4 种砷形态的热浸提-高效液相色谱等度分离-原子荧光光谱分析法,并对流动相浓度及 pH、流速、载流浓度、泵速、硼氢化钾浓度等条件进行了优化。在最佳实验条件下,亚砷酸[As(Ⅲ)]、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)和砷酸[As(V)] 4 种砷形态在 5~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数大于 0.999 5,检出限在 0.01~0.03 mg/kg ,相对标准偏差(RSD, $n=7$) 在 1.5%~5.0%。同时对不同样品进行 3 个水平的加标回收实验,各组分的加标回收率在 84.0%~97.5%。该方法操作简便,准确度好,精密度高,可用于测定水产品中的砷形态。

关键词:砷形态;水产品;高效液相色谱等度分离-原子荧光光谱法

中图分类号:TH3

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)07-0240-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2020.07.051

Determination of four arsenic species in aquatic products by thermal extraction-high performance liquid chromatography-isocratic separation-atomic fluorescence spectrometry

WEI Li-li*, SHI Li-li, QIN Yue-mei

(Wuzhou Center for Disease Prevention and Control, Wuzhou 543002, China)

Abstract: Thermal extraction-high performance liquid chromatography-isocratic separation-atomic fluorescence spectrometry method is developed for the determination of four arsenic species in aquatic products. Various conditions are optimized, such as the concentration, pH value and flow velocity of the mobile phase, carrier current concentration, pump speed and potassium borohydride concentration. Under the optimal conditions, there are good linear relationships for arsenious acid [As(Ⅲ)], arsenic acid [As(V)], monomethylarsenic acid (MMA), dimethylarsenic acid (DMA) in the range of 5-100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with correlation coefficients (r^2) larger than 0.999 5, detection limits being in the range of 0.01-0.03 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, and relative standard deviations remaining between 1.5% and 5.0%. The average recoveries at three spiked levels are in the range of 84.0%-97.5%. This method exhibits simple, good accuracy and height sensitivity, and can be applied in the species analysis of arsenic in aquatic products.

Key words: arsenic species; aquatic products; high performance liquid chromatography-isocratic separation-atomic fluorescence spectrometry

砷(As)是一种具有较强毒性的元素,具有准金属特性。由于工业“三废”的排放、矿藏的大量开发以及含砷农药的使用等,砷广泛存在于环境、食品中,因水生生物对砷有很强的富集作用,水产品中含砷量较高。砷对人体的皮肤、神经系统、心血管、肝脏及肾脏等都有明显损伤,美国疾病控制中心和国际癌症研究机构已经将砷确定为第一类致癌物质^[1],而在我国,砷也是食品风险监测的重点项目。常见的砷化合物包括亚砷酸[As(Ⅲ)]、砷酸[As(V)]、一甲基砷(MMA)和二甲基砷(DMA)、砷甜菜碱、砷胆碱、砷糖等^[2]。其中无机态的As(Ⅲ)和As(V)毒性较大,有机态的MMA和DMA毒性较小,其他有机形态常被认为是无毒

的^[3-4]。研究表明,砷的生物毒性很大程度上取决于其化学形态,因此,砷形态分析比总砷的分析更为重要。目前,砷形态的测定方法主要有液相色谱-原子荧光光谱法^[5-8]、液相色谱-原子吸收光谱法^[9]、液相色谱-电感耦合等离子体质谱法^[10-12]、气相色谱-质谱法^[13]和毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱法^[14-15]等。其中,液相色谱与原子吸收光谱法联用检测灵敏度不高;液相色谱-电感耦合等离子体质谱法价格昂贵,难以普及;气相色谱-质谱法必须预先对有机砷化合物进行衍生化反应,步骤烦琐;毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱法灵敏度较低、毛细管活化时间长;而原子荧光光谱法测定元素灵敏度高,操作成本均较低,与液相色谱具有良

收稿日期:2020-03-12;修回日期:2020-05-11

作者简介:韦丽丽(1983-),女,硕士,主管技师,研究方向为食品理化检验,通讯联系人,weilili034@163.com。

好的兼容性。本文中建立了热浸提-高效液相色谱等度分离-原子荧光光谱法,对市售水产品中的亚砷酸[As(Ⅲ)]、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)和砷酸[As(V)]的4种砷形态进行测定,操作简便,准确度高,结果满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SA-20型原子荧光形态分析仪(北京吉天仪器公司);砷编码式空心阴极灯(北京真空电子技术研究所);高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);恒温干燥箱(立德泰勃上海科学仪器有限公司);酸度计(梅特勒托利多有限公司)。

3价砷[As(Ⅲ)]、5价砷[As(V)]、一甲基砷(MMA)和二甲基砷(DMA)4种砷形态标准溶液浓度分别为(75.7±1.2)、(17.5±0.4)、(25.1±0.8)、(52.9±1.8) μg/g,购于国家标准物质研究中心。

流动相:15 mmol/L磷酸氢二铵溶液,用10%甲酸调节pH=5.8,经0.45 μm水系滤膜过滤后,于超声水浴中超声脱气20 min,备用。

硼氢化钾溶液(20 g/L),介质为5.0 g/L氢氧化钠溶液,临用前配制;浓盐酸;实验中所用试剂均为分析纯,酸为优级纯,试验用水为超纯水。

试验所用的玻璃器皿用(1+4)的硝酸溶液浸泡24 h,再依次用自来水、超纯水冲洗干净。

1.2 样品处理

分析样品均为市场采购的水产动物样品,洗净晾干,取可食用部分匀浆,装入洁净聚乙烯瓶中,密封于4℃冰箱冷藏备用。

称取试样1.0 g(精确至0.001 g),置于50 mL塑料离心管中,加入20 mL 0.15 mol/L硝酸溶液,放置过夜。于恒温箱90℃热浸提2.5 h,每30 min振荡1 min,提取完毕,取出冷却至室温,于高速冷冻离心机以8 000 r/min的转速4℃离心15 min,取上层清液置于10 mL离心管中,加入5 mL正己烷,振荡1 min,8 000 r/min 4℃离心15 min,弃去上层正己烷。按此过程重复1次。用移液器排空气体,插入离心管底部吸取下层清液,经0.45 μm有机滤膜过滤及C₁₈小柱净化后进样。同时做试剂空白。

1.3 仪器条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:CNW Sep AX HPLC Column 阴离子柱,250 mm×4.0 mm,10 μm;洗脱模式:等度洗脱;泵流

速1.2 mL/min;进样量100 μL。

1.3.2 原子荧光检测条件

光电倍增管负高压280 V;总灯电流60 mA;辅助灯电流30 mA;载气流量300 mL/min;屏蔽气流量600 mL/min;蠕动泵转速65 r/min。

1.4 标准溶液的配制

砷形态混合标准中间液(1 g/mL),准确移取一定量各砷形态标准溶液,用0.15 mol/L硝酸溶液配制而成。再分别移取一定体积中间液配制成质量浓度分别为0.5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、100.0 μg/L的砷形态混合标准溶液系列。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相中磷酸氢二铵浓度对砷形态分离的影响

离子交换色谱分离中,广泛采用钠、钾、铵的磷酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐溶液作为流动相。试验选择磷酸氢二铵溶液作为流动相,用10%甲酸溶液调节流动相pH至5.8,考察了不同浓度条件下对100 μg/L的砷形态混合标准溶液的分离情况。试验发现,当在较低浓度的流动相下(磷酸氢二铵浓度为5 mmol/L),最后流出的As(V)由于保留时间较长导致谱峰拖尾、展宽严重,不利于对其定量。随着磷酸氢二铵浓度的增加,As(Ⅲ)的保留时间基本不变,DMA的保留时间缓慢缩短,而MMA和As(V)的保留时间急剧减小,当磷酸氢二铵浓度大于15 mmol/L时,As(Ⅲ)、DMA和MMA无法实现基线分离。因此,适合砷形态分离的流动相浓度选择为15 mmol/L。

2.1.2 流动相pH对砷形态分离的影响

当流动相为15 mmol/L磷酸氢二铵溶液,试验发现,当pH<5.5时,As(Ⅲ)和DMA不能完全分离,随着pH的增高,As(Ⅲ)和As(V)的保留时间基本不变,DMA的保留时间缓慢增加,MMA的保留时间缓慢缩短,适合As形态分离的流动相pH范围5.5~6.0。当pH为5.8时,4种砷形态基线分离达到最佳。故流动相的pH最终定在5.8。

2.1.3 流动相流速对砷形态分离的影响

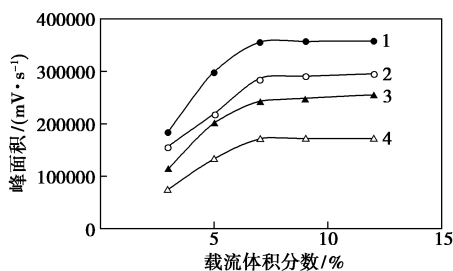
试验比较了流速分别为0.8、1.0、1.2、1.5 mL/min时,4种砷形态的分离情况。结果表明,随着流速的增加,保留时间缩短,峰宽变窄,峰形尖锐,当流速达到1.5 mL/min时,As(Ⅲ)和DMA基线不能完全分

离,流速为 1.2 mL/min 时,4 种砷形态分离效果好且分析时间短,故试验选择流速为 1.2 mL/min。

2.2 氢化物发生条件的优化

2.2.1 载流 HCl 浓度及泵速的选择

试验考察了不同 HCl 浓度对 4 种 As 形态分离分析的影响,结果见图 1。结果发现,随着 HCl 溶液浓度的增加,4 种砷形态的峰面积增大,当 HCl 溶液体积分数达到 7% 时,峰面积达到最大,再继续增大浓度,峰面积没有明显变化。同时考察了蠕动泵转速(50~80 r/min)的影响,结果显示,当蠕动泵转速由 50 r/min 增至 65 r/min 时,As(Ⅲ)、DMA、MMA 和 As(V) 的荧光值均持续增加至最高值,泵速继续增加时荧光值逐渐降低。因此,试验采用 7% 的 HCl 溶液作为载流,蠕动泵速为 65 r/min。

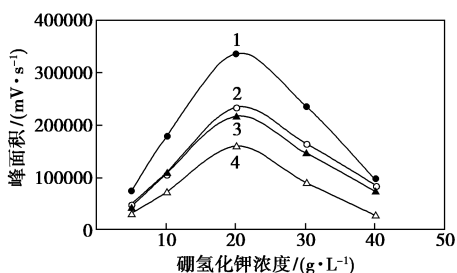


1—As(Ⅲ); 2—DMA; 3—MMA; 4—As(V)

图 1 载流体积分数的影响

2.2.2 硼氢化钾浓度的影响

考察当载流为 7% HCl 溶液时不同硼氢化钾浓度对 4 种砷形态分析测定的影响,结果见图 2。试验发现硼氢化钾的浓度过低,氢化物生成率低,虽然基线稳定但信号低,信噪比小;增大硼氢化钾的浓度,有利于砷氢化物的生成,峰面积增大,但硼氢化钾的浓度过高,基线噪声明显增大,基线漂移,此外,大量的氢气稀释了样品气的浓度,造成了峰面积减小,灵敏度降低。因此,试验采用硼氢化钾浓度为 20 g/L。



1—As(Ⅲ); 2—DMA; 3—MMA; 4—As(V)

图 2 硼氢化钾浓度的影响

2.3 方法学验证

2.3.1 标准谱图

在最佳实验条件下,对砷形态标准混合溶液进行分析,分离效果如图 3 所示,As(Ⅲ)、DMA、MMA 和 As(V) 4 种砷形态在 10 min 之内依次出峰,实现完全分离。

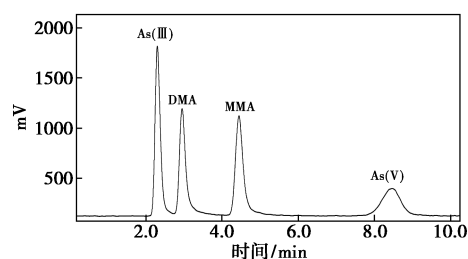


图 3 4 种砷形态的标准色谱图

2.3.2 标准曲线、检出限、定量限及精密度

按试验方法对砷形态标准混合溶液进行测定,以标准溶液的质量浓度为横坐标($X, \mu\text{g/L}$),各砷形态的色谱峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。以 3 倍信噪比($S/N \geq 3$)和 10 倍信噪比($S/N \geq 10$)分别计算得方法的检出限和定量限。取 $40 \mu\text{g/L}$ 砷形态混合标准溶液连续进样 7 次,计算相对标准偏差 RSD 。如表 1 结果表明,4 种砷形态在 $5 \sim 100 \mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数大于 0.999 5,检出限在 $0.01 \sim 0.03 \text{ mg/kg}$, RSD 在 $1.5\% \sim 5.0\%$ 。

表 1 各砷形态线性方程、相关系数、检出限、定量限和精密度 ($n=7$)

砷形态	标准曲线	相关系数	检出限/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	定量限/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	精密度 (RSD)/ %
As(Ⅲ)	$Y=6511.3X+926.3$	0.9999	0.01	0.03	1.5
DMA	$Y=5876.0X-3432.5$	0.9997	0.02	0.06	2.5
MMA	$Y=5043.5X-2264.3$	0.9998	0.02	0.06	2.1
As(V)	$Y=3798.2X-2510.6$	0.9995	0.03	0.09	5.0

2.3.3 实际样品的测定及加标回收率

应用所优化的实验方法分别对市场上出售的部分水产动物样品中砷形态含量进行检测,在样品中添加 3 个浓度水平的砷形态混合标准溶液做回收实验,结果如表 2 所示。4 种砷形态在不同水平的加标回收率分别为 $90.8\% \sim 97.5\%$ 、 $86.0\% \sim 90.8\%$ 、 $89.5\% \sim 92.5\%$ 、 $84.0\% \sim 90.4\%$,不同范围内均满足要求。

表2 实际样品分析结果

样品 基质	砷形态	本底值/ (mg· kg ⁻¹)	加标量/ (mg· kg ⁻¹)	测定值/ (mg· kg ⁻¹)	回收率/ %
虾	As(Ⅲ)	N. D	0.05, 0.2, 0.5	0.048, 0.195, 0.481	96.0, 97.5, 96.2
	DMA	0.019	0.05, 0.2, 0.5	0.062, 0.194, 0.464	86.0, 87.5, 89.0
	MMA	N. D	0.05, 0.2, 0.5	0.045, 0.183, 0.448	90.0, 91.5, 89.6
	As(V)	N. D	0.05, 0.2, 0.5	0.042, 0.179, 0.437	84.0, 89.5, 87.4
带子	As(Ⅲ)	0.043	0.05, 0.2, 0.5	0.089, 0.234, 0.511	92.0, 95.5, 93.6
	DMA	0.112	0.05, 0.2, 0.5	0.156, 0.293, 0.561	88.0, 90.5, 89.0
	MMA	N. D	0.05, 0.2, 0.5	0.046, 0.185, 0.452	92.0, 92.5, 90.4
	As(V)	0.032	0.05, 0.2, 0.5	0.076, 0.465, 0.484	88.1, 86.7, 90.3
鲈鱼	As(Ⅲ)	0.027	0.05, 0.2, 0.5	0.074, 0.209, 0.486	93.2, 90.8, 91.7
	DMA	0.036	0.05, 0.2, 0.5	0.081, 0.215, 0.475	90.8, 89.5, 87.8
	MMA	N. D	0.05, 0.2, 0.50.05	0.045, 0.181, 0.457	89.5, 90.1, 91.4
	As(V)	N. D	0.2, 0.5	0.043, 0.180, 0.444	86.3, 90.4, 88.7

3 小结

采用热浸提-高效液相色谱等度分离-原子荧光联用技术对水产动物样品中的4种砷形态进行测定。该方法使用0.15 mol/L硝酸溶液恒温加热提取样品,目标化合物净化后,采用pH为5.8、浓度为15 mmol/L磷酸氢二铵溶液作为流动相,经CNW Sep AX HPLC Column阴离子柱等度分离,在原子荧光光谱最佳实验条件下测定,其线性范围、相关系数、方法检出限、精密度及加标回收率等指标均符合分析检测的要求,结果准确可靠,可方便分析水产品中As(Ⅲ)、MMA、DMA和As(V)4种砷形态。

参考文献

[1] IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Some drinking-water disinfectants and contaminants,

including arsenic [C]. International Agency for Research on Cancer, 2003; 245-259.

- [2] Grotti M, Soggia F, Goessler W, et al. Arsenic species in certified reference material MURST-ISS-A2 (Antarctic krill) [J]. Talanta, 2010, 80: 1441-1444.
- [3] Zhang W, Guo Z Q, Song D D, et al. Arsenic speciation in wild marine organisms and a health risk assessment in a subtropical bay of China [J]. Sci Total Environ, 2018, 626: 621-629.
- [4] Ma Z L, Lin L D, Wu M J, et al. Total and inorganic arsenic contents in seaweeds: Absorption, accumulation, transformation and toxicity [J]. Aquaculture, 2018, 497: 49-55.
- [5] 刘淑晗, 张海燕, 姜晓祎, 等. 高效液相色谱-(紫外)氢化物发生原子荧光光谱法测定南极磷虾及其制品中6种砷形态[J]. 分析测试学报, 2019, 38(9): 1085-1090.
- [6] 董喆, 高明义, 李梦怡, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 927-932.
- [7] 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.
- [8] 谭洪涛, 周鸿, 李娟. 液相色谱-原子荧光光谱法测定大米中4种砷形态的含量[J]. 理化检验: 化学分册, 2016, 52(9): 1104-1107.
- [9] Gao Y, Baisch P, Mirlean N, et al. Arsenic speciation in fish and shellfish from the North Sea (Southern bight) and Acu Port area (Brazil) and health risks related to seafood consumption [J]. Chemosphere, 2018, 191: 89-96.
- [10] Tomohiro Narukawa, Takahiro Iwai, Koichi Chiba. Simultaneous speciation analysis of inorganic arsenic and methylmercury in edible oil by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Talanta, 2020, 210. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914019312792>. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120646.
- [11] 李建荣, 张学玲, 李瑞霞, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定虾油中2种无机砷[J]. 理化检验: 化学分册, 2019, 55(2): 238-241.
- [12] 陆奕娜, 魏建华, 许慨, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法同时测定海产品中9种砷形态化合物[J]. 理化检验: 化学分册, 2017, 53(9): 1087-1093.
- [13] Richter J, Lischka S, Piechotta C. Analysis of arsenic species in fish after derivatization by GC-MS [J]. Talanta, 2012, 101: 524-529.
- [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: 1675-1678.
- [15] Liu L H, He B, Yun Z J, et al. Speciation analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry using a novel interface [J]. J Chromatogr A, 2013, 1304: 227-233. ■