

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

尚德荣^{1,2,3}, 宁劲松^{1,2}, 赵艳芳^{1,2}, 翟毓秀^{1,2*},
郭莹莹⁴, 王军⁴, 盛晓风^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室,山东 青岛 266071;
2. 国家水产品质量监督检验中心,山东 青岛 266071;
3. 中国海藻工业协会,北京 100125;
4. 中国海洋大学水产品安全实验室,山东 青岛 266003)

摘要:海藻食品中无机砷的含量是水产品质量检验中主要的安全卫生指标。实验采用高效液相色谱—氢化物发生原子荧光联用技术(HPLC-HG-AFS)对海藻食品中无机砷的检测进行了研究。通过实验优化了提取剂、提取时间及其仪器条件,建立了HPLC-HG-AFS联用技术检测海藻食品中无机砷含量的方法。用1.2 mol/L HCl在70℃水浴下提取1 h,用过氧化氢(H₂O₂)氧化;pH 6.0的15 mmol/L (NH₄)₂HPO₄溶液为流动相,HPLC-HG-AFS上机分析。样品加标量在0.10 mg/kg和1.00 mg/kg时的平均回收率均在92%以上,相对标准偏差均低于4%,方法精密度较高。研究结果表明,该方法测定海藻中的无机砷较为准确、可靠,为制定农业行业标准——海藻食品中无机砷的测定,提供技术支持。

关键词:高效液相色谱;氢化物发生原子荧光;海藻;无机砷

中图分类号: Q 657.7; X 834

文献标识码: A

海藻本身具有富集砷元素的特性,使得砷含量较高,被称为海洋环境中的“砷库”^[1]。砷主要有亚砷酸盐(As^{III})、砷酸盐(As^V)、一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)、砷甜菜碱(AsB)和砷胆碱(AsC)形式存在。另外,还有其他更复杂砷化合物,例如砷糖(arsenosugars)、砷脂类化合物等。不同形态砷化物的毒性不同,其中无机砷的毒性最大,甲基化砷的毒性较小,而AsB、AsC和砷糖常被认为是无毒的^[2-7]。因此无机砷的检测技术是海藻食品安全评价和产品质量检验的基础。现有国标关于食品中无机砷检测方法在用于海藻食品中时存在把部分有机砷误测为无机砷的问题^[8-9]。目前CAC和FAO均未有针对海藻食品中无机砷的检测方法。以上问题导致了海藻中无机砷含量的误判,严重影响了我海藻行业的生产和发展。因此研究制定适用于检测海藻中

无机砷的标准方法迫在眉睫。

目前在砷形态研究领域国内外专家先后采用:HPLC分离和ICP-MS、HG-AFS、HG-AAS、ES-MS-MS等检测器在线联用的技术^[10],成为4种砷形态(As^{III}、As^V、MMA、DMA)分析的有力工具,可以有效地解决无机砷检测方法中的一些干扰问题。但是由于HPLC分离和ICP-MS、HG-AAS和ES-MS-MS等检测器在线联用价格较贵,不易于普及,而HG-AFS是我国拥有自主知识产权的分析仪器,该分析仪器具有结构较简单,分析成本低,灵敏度高,选择性好,线性范围宽等优点,鉴于制定检测方法的适用性和可推广性等要求,选用HPLC-HG-AFS联用技术,研究海藻食品中无机砷的检测技术,为制定行业标准提供重要参考。

收稿日期:2009-01-20 修回日期:2009-09-27

资助项目:国家科技基础公益基金项目(2005DIB4J049);国家科技支撑计划(2007BAD62B01);农业行业标准(2008-10167)

通讯作者:翟毓秀, Tel.:0532-85846230; 13605326385, E-mail: zhaiyx@ysfri.ac.cn

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

仪器 HPLC-HG-AFS 联用仪由 3 部分组成:(1) HPLC, 使用 LC-20ATVP 高压液相泵(日本, SHIMADZU); 配有 100 μL 定量环的 7725i 六通进样阀(Rheodyne, Cotati, CA, USA); (2) 形

态分析预处理装置(SAP-10; 北京吉天仪器有限公司), 配有相同材质填料保护柱(25 mm \times 2.3 mm i. d, 12 ~ 20 μm) 的 PRP-X100(250 mm \times 4.1 mm i. d, 10 μm) 阴离子交换柱(Hamilton, Reno, NV); (3) AFS-9130 原子荧光光谱仪; 配有激发光源: 高性能砷空心阴极灯; 形态分析测量软件(北京吉天仪器有限公司)(表 1)。

表 1 无机砷测定 HPLC-HG-AFS 条件

Tab. 1 Experiment condition for determination of inorganic arsenic with HPLC-HG-AFS

仪器 instrument	项目 item	条件 experiment condition
高效液相色谱 HPLC	色谱柱 column	Hamilton PRP-X100 (250 mm \times 4.1 mm i. d., 10 μm)
	保护柱 guard column	Hamilton PRP-X100 (25 mm \times 2.3 mm i. d., 12 ~ 20 μm)
	等度分离流动相 mobile phase in isocratic separation	15 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 6.0
	进样体积 injection volume	100 μL
氢化物发生原子荧光 HG-AFS	还原剂 reductant	1.5% KBH_4 + 0.5% KOH
	负高压 PMT voltage	300 V
	载气 carrier gas 氩气 Ar	400 mL/min
	载流 carrier solution	7% HCl
	灯电流 HCl current	100 mA
	屏蔽气 shield gas	600 mL/min

试剂 As^{III} 标准溶液从国家标准物质中心购得。 $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{ONa})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MMA) 和 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (As^{V}) 从 Sigma-Aldrich 购得, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{H}$ 从 Acros (DMA) 购得。各标准储备液浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 通过溶解相应量的固体试剂得到, 4 $^\circ\text{C}$ 下保存, 标准工作曲线用的混合砷标准当日稀释配制。流动相使用之前需经过 0.45 μm 滤膜过滤, KBH_4 溶液用 0.5% KOH 当日配制, 所有的试剂均是优级纯或是分析纯, 实验用水应符合 GB/T 6682 中规定的一级水要求。氩气(纯度 $\geq 99.99\%$)。

1.2 实验方法

提取 称取经制备好的样品干样 1.000 g; 鲜样称取 2.000 g 于 25 mL 具塞刻度试管中, 加 10 mL 1.2 mol/L HCl , 在漩涡混合器上混匀, 70 $^\circ\text{C}$ 水浴下恒温震荡 1 h, 取出冷却, 再加入 10 mL 水(此时的总体积是 20 mL), 恒温震荡 0.5 h。取一定量提取液于 10 mL 离心管中, 4 000 r/min 下离心 15 min, 移取 1.0 mL 上清液于试管中, 加入 0.2 mL H_2O_2 , 和 0.8 mL 水(此时的体积为 2 mL), 混匀后在 70 $^\circ\text{C}$ 水浴下恒温保持 20 min, 取出冷却, 用 0.45 μm 滤膜过滤后, 取 100 μL 进样测定。同时做空白试验。

测定 (1) 标准系列的配置: 通过溶解相

应量的 MMA、DMA、 As^{V} 得到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各单标溶液; (标液可在 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱存放备用); (2) 混合砷标准溶液稀释配制(临用时现配): 将以上 4 种标液混合逐级稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准溶液, 然后再分别稀释为 10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、100 ng/mL 的浓度。

结果计算 (1) 定性: 开机后按上述条件进行设置, 待稳定后, 先做标准曲线, 然后测定处理好的样品溶液。用峰高或峰面积外标法定量(图 1)。

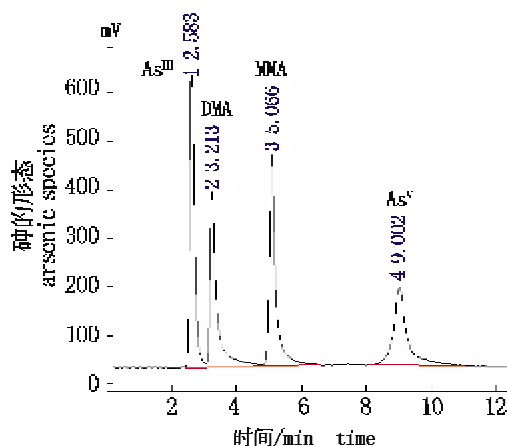


图 1 砷的 4 种形态等度分离图谱

Fig. 1 Chromatogram of arsenic species with isocratic separation

(2) 定量:吸取样品提取液 100 μL 进样,以样品加标的保留时间定性,以峰面积外标法定量。

即可得到待测溶液中的 As^{III} 、DMA、MMA、 As^{V} 的浓度,按式(1)计算可得试样中待测物的含量:

$$X = C \times V \times F / m \times 1000 \quad (1)$$

式中, X 为样品中待测物含量 (mg/kg), C 为待测液中无机砷浓度 (ng/L), m 为称样量 (g), V 为测定液体总体积 (20 mL), F 为稀释倍数 (2 倍)。

2 结果与讨论

2.1 不同形态砷的结果分析

为了确定 HPLC-HG-AFS 联用仪的分析性能,采用联用技术对 4 种主要砷形态进行分离分析,由表 2 可知采用该联用仪器分离分析 4 种砷形态的线性相关系数均 ≥ 0.999 ,相对标准偏差均

< 4.0 ,对 4 种砷形态 As^{III} 、DMA、MMA、 As^{V} 的检测限分别为 0.6 ng/mL 、1.0 ng/mL 、0.9 ng/mL 和 2.6 ng/mL 。该仪器的分析性能完全符合测定四种砷形态的要求。

2.2 提取剂及其浓度的选择

提取剂 实验中常用的 3 种强酸是盐酸 (HCl)、硝酸 (HNO_3) 和硫酸 (H_2SO_4),由于 H_2SO_4 的氧化性很强,并具有脱水性,易引起样品炭化;硝酸 (HNO_3) 中的 NO_3^- 在阴离子柱上保留极强,对柱效影响远大于 Cl^- ,因此选用 HCl 做提取剂。

浓度的选择 称取一定量的样品,采用不同浓度的 HCl 提取,从提取率和提取液中砷形态的变化可得,当 HCl 浓度为 1.2 mol/L 时,海带的砷提取率均大于 90.0% 以上,所以采用 1.2 mol/L 的 HCl 可以达到较理想的提取效果(表 3)。

表 2 高效液相色谱—氢化物发生原子荧光仪对 4 种砷形态的分析性能
Tab. 2 The analysis characteristics of HPLC-HG-AFS for 4 arsenical species

	As^{III}	DMA	MMA	As^{V}
线性范围(ng/mL) linear range	1.0 ~ 100	1.0 ~ 100	1.0 ~ 100	2.0 ~ 100
线性相关系数(R^2) linear correlation coefficient	0.999 8	0.999 7	0.999 6	0.999 0
最低检出限(ng/mL) detection limit	0.6	1.0	0.9	2.6
相对标准偏差 RSD (%) relative standard derivation	3.08	1.35	2.01	3.93

表 3 3 种海带样品在不同酸浓度下的砷提取率
Tab. 3 Extraction efficiencies with different acid in different concentration

样品编号 sample	总砷值 (mg/kg) total arsenic	提取率 (%) extraction efficiency					
		0.60 mol/L HCl	1.2 mol/L HCl	2.4 mol/L HCl	3.6 mol/L HCl	4.8 mol/L HCl	6.0 mol/L HCl
1	8.02	88.4	90.7	85.5	85.9	86.2	89.1
2	9.03	89.7	91.9	86.1	86.7	87.7	90.6
3	14.26	90.4	96.0	93.1	94.5	91.2	91.5

2.3 提取温度和提取时间的选择

通过用 1.2 mol/L 的 HCl 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下震荡提取海带样品 1 ~ 18 h(图 2),70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下震荡提取海带样品 0.5 ~ 2 h(图 3),图 2 和图 3 中的某未知有机砷糖 (AsS1) 的峰值随提取时间延长而降低,DMA 的峰值随提取时间延长而升高,但 As^{V} 的峰值不受提取时间和提取温度的影响。文献 [7,11] 也有同样的例证:未知有机砷 AsS1 在酸性介质中会发生分解,而 iAs 则没有变化。考虑到检测的时效性及样品之间的差异,最终确定采用 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下震荡 1 h 来提取样品中的无机砷。

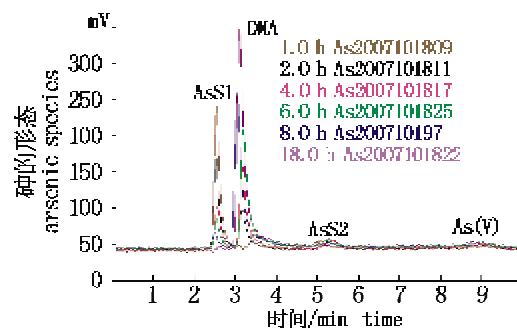


图 2 海带在 60 $^{\circ}\text{C}$ 浸提 1 ~ 18 h 砷形态变化
Fig. 2 Arsenic species changes of kelp extracted under 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 ~ 18 h

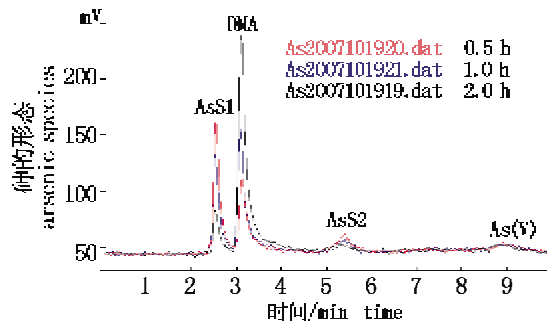


图3 紫菜在 70 °C 浸提 0.5 ~ 2 h 砷形态变化
Fig.3 Arsenic species changes of *Porphyra* extracted at 70 °C for 0.5 ~ 2 h

2.4 加入 H₂O₂ 的作用

用 1.2 mol/L HCl 浸提,不干扰 As^V 的定量,但 As^{III} 与一未知 AsS1 出峰时间非常接近,从而严重干扰 As^{III} 的准确定量,因此采用等度分离方法测定无机砷含量时,需在样品提取液中加入 H₂O₂ 把 As^{III} 氧化为 As^V,最终通过对 As^V 的定量计算样品中的 iAs 含量;通过考察 H₂O₂ 对 As^{III} 的氧化效率,确定 H₂O₂ 的浓度为 10% 适宜(表 4)。

表 5 DMA 和 MMA 在提取及氧化过程中的稳定性

Tab.5 Stability of the DMA and MMA during the extraction and oxidation procedure

基体状态 sample state	无基体 no sample		样品 sample	
加标砷形态 spiked arsenic species	DMA	MMA	DMA	MMA
加标浓度(最终溶液)(μg/L) spiked(final solution)	50	50	50	50
回收率(%) spiked recovery	99.5	107.9	106.7	105.3
无机砷回收率(%) spiked recovery of inorganic As	0	0	0	0

2.6 方法回收率和精密度

实验分别以海带和盐渍裙带菜为测试对象,进行加标回收率和精密度实验,以考察方法的准确度和重现性。实验采用 2 g 样品中分别添加 0.2 μg、和 2.0 μg 的 As^{III},添加量相当于 0.10 mg/kg 和 1.00 mg/kg,实验结果见表 6。从表 6 中可知,样品加标量在 0.10 mg/kg 和 1.00 mg/kg 时二种测试样品的平均回收率都在 92% 以上,相对标准偏差小于 4%,具有较高的精密度。以上试验结果可以证明,该方法可以满足无机砷检测要求。

表 4 添加 As^{III} 氧化后的回收率实验结果

Tab.4 The recovery ratio with As^{III} oxidation

样品名称 sample	添加 As ^{III} 水平 (mg/kg) added As ^{III}	As ^V 回收率(%) recovery of As ^V
海带 kelp	0.10	88.5 ~ 95.2
	0.50	94.8 ~ 100.5
	1.00	94.2 ~ 100.2
盐渍裙带菜 salted undaria	0.10	90.2 ~ 96.6
	0.50	95.4 ~ 102.1
	1.00	98.7 ~ 101.0

2.5 DMA 和 MMA 在提取及氧化过程中的稳定性

海藻中的主要砷形态有机砷(AsS1)在强酸的作用下会转化为 DMA^[12],为了证实 DMA 和 MMA 在酸提取条件下不会转化为无机砷,可以通过以下实验证明:分别在酸液和海藻的酸提取液中加入一定量的 DMA 和 MMA 后,重复一次酸提取及 H₂O₂ 氧化的全过程,然后用液相色谱原子荧光形态分析仪测量(表 5)。

2.7 联用方法与现行方法的比较

结合图 2 和图 3 藻类砷形态的转化,我们把现行方法及目前我们研究的仪器联用方法作了实验对比(表 7)。以上数据说明现行方法在用于海藻食品中时存在把部分有机砷误测为无机砷的问题,我们通过加标发现:在原子荧光法中添加 MMA 有 79.69% 的氢化物发生能力;DMA 有 10.58% 的氢化物发生能力;银盐法中 MMA、DMA 也会有不同程度的响应值。因此现行两种方法测定藻类食品中无机砷含量有较大的误差。

表 6 回收率及精密度($n=5$)
Tab. 6 Recovery ratio and accuracy

样品 sample	添加水平 (mg/kg) added	iAs 回收率(%) iAs recovery	平均回收率(%) average recovery	相对标准偏差(%) relative standard deviation (RSD)
海带 kelp	0.10	95.2/92.1/94.2/88.6/90.2	92.1	2.93
	1.00	97.6/96.2/94.2/100.2/98.8	97.4	2.40
盐渍裙带菜 salted undaria	0.10	98.6/94.6/92.5/90.2/96.1	94.4	3.42
	1.00	101.0/96.6/95.5/93.7/97.2	96.8	2.79

表 7 海带、紫菜中无机砷检测结果
Tab. 7 Determination of inorganic in kelp and laver

样品编号 sample number	样品名称 sample name	检测结果(mg/kg) test result		
		原子荧光法 AFS	银盐法 SDD	高效液相色谱- 氢化物发生原子荧光法 HPLC-HG-AFS
1	紫菜 laver	5.60	1.67	0.15
2	紫菜干品 dried laver	4.91	1.58	0.11
3	紫菜干品 dried laver	5.52	1.81	0.21
4	烤紫菜 roast laver	5.02	1.02	0.054
5	紫菜干品 dried laver	5.86	1.61	0.24
6	紫菜干品 dried laver	4.68	1.36	0.14
7	干海带 dried kelp	6.16	1.08	0.071
8	干海带 dried kelp	5.21	1.29	0.12
9	干海带 dried kelp	4.62	1.24	0.10
10	干海带 dried kelp	1.68	0.88	0.051
11	海带结 kelp knot	1.92	1.06	0.064
12	海带丝 kelp silk	1.76	0.98	0.050

3 结论

通过对总砷提取率、加标回收率和砷形态的转化试验的研究,优化了海藻中无机砷提取剂及其浓度、试样提取时间及温度、仪器条件等,建立了一种新的海藻食品中无机砷含量的测定方法:样品中的无机砷经酸性提取液提取后,经 H_2O_2 氧化为砷酸盐(As^V),通过阴离子色谱柱分离后,目标化合物在酸性条件下与硼氢化钾发生反应,

生成的砷化氢进入原子化器,由原子荧光分光光度计测定,按样品加标的保留时间定性,外标法定量。该方法测定无机砷的低限为 0.06 mg/kg。采用该方法对海藻食品中总砷的提取率都达到了 88.6% 以上;各种样品的加标回收率都在 88% ~ 102% 的范围之内,进一步说明采用此方法测定海藻中的无机砷是较为准确、可靠的。为制定农业行业标准——海藻食品中无机砷的测定提供技术支持。

参考文献:

- [1] Shiomi K. Chemical form, toxicity and metabolism of arsenic contained in marine organisms [J]. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 1992, 33(1): 1-10.
- [2] Mckinney J D. Metabolism and disposition of inorganic arsenic in laboratory animals and humans [J]. Environmental Geochemistry and Health, 1992, 14(2): 43-48.
- [3] Michael F H. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action [J]. Toxicology Letters, 2002, 133: 1-16.
- [4] Xie R, Johnson W, Spayd S, *et al.* Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 573: 186-194.
- [5] Csanaky I, Gregus Z. Species variations in the biliary and urinary excretion of arsenate, arsenite and their metabolites [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2002, 131: 355-365.
- [6] Peraza M A, Calter D E, Gandolfi A J. Toxicity and metabolism of subcytotoxic inorganic arsenic in human renal proximal tubule epithelial cells (HK-2) [J]. Cell Biology and Toxicology, 2003, 19: 253-264.
- [7] Shiomi K. Chemical form, toxicity and metabolism of arsenic contained in marine organisms [J]. Journal of Food Hygienic Society of Japan, 1992, 33(c1): 1-10.
- [8] 杨惠芬, 顾微, 边疆, 等. GB/TT 5009.11-2003: 食品中总砷的测定[S]. 中国标准出版社, 2003: 82-84.
- [9] 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.
- [10] Mato-Fernández M J, Otero-Rey J R, Moreda-Piñeiro J, *et al.* Arsenic extraction in marine biological materials using pressurised liquid extraction [J]. Talanta, 2007, 71: 515-520.
- [11] Gamble B M, Gallagher P A, Shoemaker J A, *et al.* An investigation of the chemical stability of arsenosugars in basic environments using IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS [J]. Analyst, 2002, 127: 781-785.
- [12] Wei C J, Liu J X. A new hydride generation system applied in determination of arsenic species with ion chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (IC-HG-AFS) [J]. Talanta, 2007, 73 (C3): 540-545.

Detection of inorganic arsenic in seaweed food using HPLC-HG-AFS

SHANG De-rong^{1,2,3}, NING Jing-song^{1,2}, ZHAO Yan-fang^{1,2}, ZHAI Yu-xiu^{1,2*},
GUO Ying-ying⁴, WANG Jun⁴, SHENG Xiao-feng^{1,2},

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. The National Center for Quality Supervision and Test of Aquatic Products, Qingdao 266071, China;

3. China Seaweed Industrial Association, Beijing 100125, China;

4. Seafood Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The inorganic arsenic (iAs) in seaweed food is an important safety index in seafood quality detection. High performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (HPLC-HG-AFS) was used to determine the iAs in seaweed food. The concentration of extraction reagents, the extraction time and instrument conditions were optimized. A new method to determine the content of inorganic arsenic in seaweed food using HPLC-HG-AFS was obtained; firstly the seaweeds were extracted with 1.2 mol/L HCl at 70 °C for 1 h, then the extracts were oxidized with hydrogen peroxide, and finally were analyzed by HPLC-HG-AFS under the condition of 15 mmol/L (NH₄)₂HPO₄ flow phase (pH=6.0). The average recovery rates of 0.10 mg/kg and 1.00 mg/kg As^{III} in samples were all above 92% and the relative standard deviations were all below 4% with a high accuracy. The present study proved that HPLC-HG-AFS was a reliable method to determine the iAs in seaweed food and provide enough evidences for the establishment of the standard for iAs in seaweed food.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); HG-AFS; hydride generation atomic fluorescence spectrometry; seaweed; inorganic arsenic

Corresponding author: ZHAI Yu-xiu. E-mail: zhaiyx@ysfri.ac.cn