

液相色谱-氢化物发生/原子荧光法测定啤酒中砷的形态

武 铎^{1,2}, 虞锐鹏², 宋启军^{*1}

(1. 江南大学化学与材料工程学院, 江苏无锡 214122;

2. 江南大学国家食品科学与技术重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘 要:采用液相色谱-氢化物发生/原子荧光(LC-HG/AFS)联用技术测定了啤酒中砷的形态。优化了氢化物发生的实验条件,当以 10% 的盐酸为载流,3.5% 的 KBH_4 为还原剂,流量为 500 mL/min 的氩气作为载气时,取得了较好的信号强度;以 20 mmol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH=6.0, 流速 1 mL/min) 为流动相,在 Hamilton PRP-X100 阴离子柱中,成功分离了亚砷酸($\text{As}(\text{III})$)、二甲基胂酸钠(DMA)、一甲基砷酸二钠(MMA)和砷酸 $\text{As}(\text{V})$ 四种砷的化合物,洗脱时间依次为 2.80 min、3.90 min、5.38 min 和 12.01 min,检测限分别是 0.8 $\mu\text{g/L}$ 、2.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.8 $\mu\text{g/L}$ 和 1.6 $\mu\text{g/L}$ 。4 种砷的化合物在 0~200 $\mu\text{g/L}$ 范围线性良好,其加标回收率范围在 91.4%~104.4% 之间。该法具有简便、快速、灵敏的特点。

关键词:砷形态;啤酒;液相色谱;原子荧光光谱

中图分类号:O657.31

文献标识码:A

砷广泛存在于自然界中,其化合物主要包括亚砷酸($\text{As}(\text{III})$)、砷酸($\text{As}(\text{V})$)、一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)、砷甜菜碱(AsB)和砷胆碱(AsC)等。国际癌症机构(IARC)已将砷归为人类致癌物。世界卫生组织规定了饮用水中砷的最高含量为 10 $\mu\text{g/L}$ 。我国规定了酒类中无机砷的含量为 50 $\mu\text{g/L}$ ^[1]。砷的理化性质以及毒性对老鼠的半致死量分别是 $\text{As}(\text{III})$ 4.5 mg/kg, $\text{As}(\text{V})$ 14~18 mg/kg, MMA 1 200 mg/kg, DMA 大约为 1 800 mg/kg。所以总砷的含量已不能准确的反应其对环境、生物体以及生态的影响,因此研究砷的形态就显得尤为重要。砷的形态分析,目前常用的分离技术有气相色谱(GC)^[3]、高效液相色谱(HPLC)和毛细管电泳(CE)等^[4],而检测方法常用原子吸收(AAS)^[5-6]、电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)^[7-8]和原子荧光光谱(AFS)^[9]等。

分析啤酒中砷的形态,并对其进行测定。将对规范啤酒生产和保证食品安全都具有重要的作用。Melo Coelho 等^[10]采用高效液相色谱-氢化物发生/原子荧光光谱(HPLC-HG-AFS)法测定了西班牙市场啤酒样中的砷形态,发现无机砷是啤酒中主要的存在形式,且 $\text{As}(\text{V}) > \text{As}(\text{III}) > \text{MMA} > \text{DMA}$ 。而 Moreno 等^[11]用 HPLC-HG-AAS 测定啤酒后发现砷的形态为 $\text{As}(\text{III}) > \text{MMA} > \text{DMA}$,不含 $\text{As}(\text{V})$ 。为了研究我国市场上啤酒含砷状况,本文采用 LC-HG-AFS 联用技术测定了 6 种国产啤酒中砷的形态。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

AFS-610D2 液相色谱-氢化物发生原子荧光联用仪(北京瑞利分析仪器公司); Hamilton PRP-X100 阴离子色谱柱(250×4.1 mm, 10 μm)为分离柱, Hamilton PRP X-100 阴离子交换色谱柱或等效柱(10×4.1 mm, 10 μm)为保护柱(美国, Hamilton); Sep-Pak C_{18} 固相萃取柱(500 mg/3mL, 德国 CNW Technologies

收稿日期: 2010-11-09

修回日期: 2011-03-21

基金项目: 国家自然科学基金(No. 2097704); 江苏省卫生厅科研基金(HD200865)

* 通讯作者: 宋启军,男,教授,博士研究生导师,主要从事分析化学研究。

GmbH 公司);MARS-5 微波消解仪(美国,CEM 公司)。

亚砷酸钠 As(Ⅲ)和砷酸氢二钠 As(V)购自国家计量科学总院,二甲基砷酸钠(DMA)购于美国 Accustandard 公司,一甲基砷酸二钠(MMA)购自 Sigma 公司。砷标准液:称取一定量的 As(Ⅲ)、DMA、MMA 或 As(V),以超纯水制成 1 000 mg/L 储备液,置于冰箱中保存,使用时用超纯水逐级稀释成使用液。流动相磷酸盐缓冲溶液用 0.45 μm 水膜过滤。分析纯 KBH_4 溶于 0.2% KOH 作为还原剂。其他试剂均为优级纯,购于国家药品试剂有限公司;超纯水(18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)用美国 Millipore 纯水机制得。

1.2 样品的预处理

对于啤酒中总砷的测定,取 10 mL 样品于聚四氟乙烯微波消解罐中,先置于可控温的电炉上,在 110℃ 下加热赶二氧化碳、乙醇、水等至 1~2 mL。待冷却后加入 4 mL 的浓硝酸,消化过夜,次日微波消解。后续过程参考国家标准方法^[12]。对于啤酒中砷的形态分析,将啤酒样品超声脱气 10 min 后,取样品 2.5 mL 置于活化的 C_{18} 固相萃取柱中,以净化样品,除去基体杂质。过柱后的样液用 0.45 μm 的有机针头过滤,并每次取 200 μL 进样分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离条件的选择

2.1.1 流动相 pH 的影响 砷的四种化合物为中强酸或弱酸,pH 可直接改变化合物的解离程度。当流动相 pH 为 5.5~6.5 时,As(Ⅲ)将以分子的形式存在而几乎不发生解离($\text{p}K_{\text{a}1}=9.2$),DMA 将发生部分解离($\text{p}K_{\text{a}1}=6.2$),MMA 将发生一级全部解离($\text{p}K_{\text{a}1}=3.6$),而 As(V)将发生部分二级解离($\text{p}K_{\text{a}2}=6.8$)^[13]。所以 pH 的变化范围初步可选择在 5.5~6.5 之间。试验了 pH 对分离的影响,结果显示当 pH 为 5.5 时,As(Ⅲ)与 DMA 保留时间接近,导致部分峰重叠,无法分离;当 pH 为 5.8 和 6.2 时色谱峰变宽,出现拖尾;当 pH 为 6.5 时,DMA 与 MMA 保留时间过于接近,也不利于分离。最终选定 pH 为 6.0 为最佳分离条件。

2.1.2 流动相浓度的影响 参考相关文献^[14],本文采用磷酸盐缓冲体系为流动相。固定流动相的 pH 为 6,调节其离子强度,发现改变离子强度并不影响四种砷化合物的出峰顺序,但影响其在柱上的保留时间(表 1)。离子强度越大,保留时间越短,反之则保留时间延长。当流动相的浓度为 5 mmol/L 和 10 mmol/L 时,分析时间长,峰形变宽且拖尾,特别是 As(V)色谱峰拖尾严重;调节其浓度为 30 mmol/L 时,As(Ⅲ)、DMA、MMA,三种砷化合物保留时间过于接近,无法达到很好分离。故最终的浓度选为 20 mmol/L。

表 1 流动相浓度对四种砷化合物保留时间的影响

Table 1 Influence of the concentration of mobile phase on the retention time for four arsenic compounds

$c(\text{KH}_2\text{PO}_4)$ (mmol/L)	Retention time(min)			
	As(Ⅲ)	DMA	MMA	As(V)
5	2.79	5.12	8.32	30.42
10	2.81	4.50	6.82	20.76
20	2.80	3.90	5.42	12.01
30	2.77	3.59	4.56	8.63

2.2 氢化物发生条件的选择

KBH_4 的浓度可影响氢化物的生成和氩氢焰的质量。实验表明: KBH_4 浓度在 0~3.5% 时,荧光强度将随着 KBH_4 的含量增加而增加。当浓度大于 4% 时,荧光强度开始减弱,信号变差,故本文把 KBH_4 的浓度选在 3.5%;HCl 的浓度过高,则生成过量的氢气,产生的火焰不稳定,导致信噪比小,重现性低。HCl 的浓度过低,三价的砷还原不完全,同时不能产生有效的氢气火焰。因此通过调试,选定 HCl 浓度为 10%。实验还考察了负高压、载气流量、电流、 KBH_4 及 HCl 流速等的影响,并对参数进行了优化,见表 2。

2.3 标准曲线、检出限以及精密度

在本实验条件下,四种砷形态可很好分离,并且峰形良好。分别配制浓度为 20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 的四种砷化合物的混和标准溶液,绘制标准曲线。对 50 $\mu\text{g/L}$ 的 As(Ⅲ)、DMA、MMA、As(V)四种砷混和

标准溶液,重复 7 次测定,其相对标准偏差(RSD)分别为 1.73%、1.99%、1.75%、1.83%。四种砷化合物的相关系数分别是 0.9982、0.9991、0.9990、0.9995,检出限分别是 0.8、2.1、0.8、1.6 $\mu\text{g/L}$ 。

表 2 砷形态分析的主要工作参数
Table 2 The main operating parameter of arsenic speciation

Item	Parameter	Item	Parameter
Negative high voltage of photomultiplier PMT	320 V	KBH_4 flow rate	4 mL/min
Lamp current(Primary/Auxiliary cathode lamp)	50/30 mA	HCl flow rate	4 mL/min
Primary/Auxiliary flow rate of carrier gas(Ar)	500/500(mL/min)	Mobile phase flow rate	1 mL/min
KBH_4 concentration	3.5%(m/V)	Injection volume	200 μL
HCl concentration	10%(V/V)		

2.4 啤酒样的测定结果

对市售的六种啤酒样进行了测定,结果见表 3。各形态的加和量(Sum)与总砷(Total)测定结果基本吻合。结果表明,啤酒中只含有 As(Ⅲ)和 As(V),即无机砷是啤酒中的主要存在形式,且 As(Ⅲ)>As(V),总砷含量最高为 10.66 $\mu\text{g/L}$ 。

表 3 六种样品砷形态以及总量的测定
Table 3 The determination of the six arsenic species and total content

Arsenic species	Sample 1 ($\mu\text{g/L}$)	Sample 2 ($\mu\text{g/L}$)	Sample 3 ($\mu\text{g/L}$)	Sample 4 ($\mu\text{g/L}$)	Sample 5 ($\mu\text{g/L}$)	Sample 6 ($\mu\text{g/L}$)
As(Ⅲ)	ND	5.46	8.27	ND	3.79	3.42
DMA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MMA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
As(V)	ND	2.89	3.47	1.60	1.24	3.04
Sum	ND	8.35	11.75	1.60	5.03	6.46
Total	1.59	10.56	10.66	2.65	4.67	7.22

ND: not detected.

2.5 加标回收实验

为了进一步验证方法的可靠性,我们对两种样品做了加标回收试验,结果见表 4。四种砷形态的回收率在 91.4%~104.4%之间,回收率良好。说明用该方法测定砷的形态是可行的。

表 4 样品 2 与样品 6 加标回收测定
Table 4 Spiked recovery of sample 2 and sample 6

Component	Sample 2				Sample 6			
	Content ($\mu\text{g/L}$)	Added ($\mu\text{g/L}$)	Found ($\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)	Content ($\mu\text{g/L}$)	Added ($\mu\text{g/L}$)	Found ($\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)
As(Ⅲ)	3.42	5	7.99	91.4	5.46	5	10.16	94.0
As(V)	3.04	5	8.26	104.4	2.89	5	7.88	99.8
DMA	ND	5	4.81	96.2	ND	5	4.79	95.8
MMA	ND	5	5.18	103.6	ND	5	5.04	100.8
As(Ⅲ)	3.42	10	12.89	94.7	5.46	10	15.86	104.0
As(V)	3.04	10	12.58	95.4	2.89	10	12.32	94.3
DMA	ND	10	9.54	95.4	ND	10	10.36	103.6
MMA	ND	10	9.67	96.7	ND	10	10.21	102.1

ND: not detected.

3 结论

实验表明液相色谱-氢化物发生/原子荧光法是一种简单可行的测定啤酒中砷形态的方法。该方法只需样品脱气以及 C_{18} 固相萃取柱去除杂质后过滤即可进样分析,前处理简单,快速。通过检出限、回收率

以及精密度实验证明了此法检出限低,动态线性宽、准确度高、稳定性高,适用于啤酒样中砷的痕量分析。

参考文献:

- [1] GB 2762-2005. Maximum Levels of Contaminants in Foods《食品中污染物限量》[S].
- [2] XIE Hui-fang(谢惠芳). Foreign Medical Sciences(Section of Hygiene)(国外医学卫生学分册)[J], 2001, **28**(5):265.
- [3] LI Shi-min(李士敏), ZHU Ya-er(朱亚尔), LI Jun(李俊). China Pharmaceutical Journal(中国药学杂志)[J], 2007, **42**(14), 1084.
- [4] SONG Qi-jun(宋启军), Greenway G M, McCreedy T. J. Anal. At. Spectrom. [J], 2003, **18**:1.
- [5] Sur R, Dunemann L. Journal of Chromatography B[J], 2004, **807**:169.
- [6] Diaz-Bone R A, Hollmann M, Wuerfel O, Pieper D. J. Anal. At. Spectrom. [J], 2009, **24**:808.
- [7] Feldmann J, Raab Andrea. Anal. Bioanal. Chem. [J], 2005, **381**:332.
- [8] Segura M, Muñoz J, Madrid Y, Cámara C. Anal. Bioanal. Chem. [J], 2002, **374**:513.
- [9] XIONG Peng(熊鹏), LI Yi-lian(李义连), ZHANG Fu-you(张富有), ZHENG Yan(郑艳). Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J], 2009, **25**(4):419.
- [10] Melo Coelho N M, Parrilla C, Cervera M L, Pastor A, de la Guardia M. Analytica Chimica Acta[J], 2003, **482**(1):73.
- [11] Moreno E, Cámara C, Corns W T, Bryce D W, Stockwell P B. Journal of Automated Methods & Management in Chemistry[J], 2000, **22**:33.
- [12] GB/T 5009. 11-2003. Note of Quarantine Technique of Food and Hygiene(Physics and Chemistry Section)《食品卫生检测方法(理化部分)注解》[S].
- [13] FANG Yu(方宇). Speciation Analysis of Arsenic by High Performance Liquid Chromatography Coupled With Atomic Fluorescence Spectrometry(高效液相色谱法与原子荧光光谱联用技术在砷形态分析中的应用)[D]. Hunan(湖南): Hunan Agricultural University(湖南农业大学), 2002.
- [14] McSheehy S, Pohl P, Lobinski R, Szpunar J. Analytica Chimica Acta[J], 2001, **440**:3.

Determination of Arsenic Species in Beer Samples by Liquid Chromatography-Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry

WU Shuo^{1,2}, YU Rui-peng², SONG Qi-jun^{*1}

(1. School of Chemistry and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122;

2. State key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract: Based on the hydride generation—atomic fluorescence spectrometry detection and liquid chromatography separation, an analytical method for arsenic speciation in beers was developed. Four arsenic species, i. e., arsenite As(Ⅲ), dimethylarsinic acid(DMA), monomethylarsonic acid(MMA) and arsenate As(V) were separated by anion-exchange chromatography with isocratic elution using 20 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ as the mobile phase with the flow rate of 1 mL/min. The elution time were 2.80, 3.90, 5.42 and 12.01 min for As(Ⅲ), DMA, MMA and As(V), respectively. Potassium borohydride (3.5%, m/V) and hydrochloric acid(10%, m/V) were used as the reduction agents and the argon with a flow rate of 500 mL/min was used as the carrier gas to deliver the volatilized species. The detection limits of the As(Ⅲ), DMA, MMA and As(V) were 0.8 $\mu\text{g/L}$, 1.6 $\mu\text{g/L}$, 0.8 $\mu\text{g/L}$, 2.1 $\mu\text{g/L}$, respectively. The linear response for the four arsenic species were obtained in the range of the 0~200 $\mu\text{g/L}$, and the recovery values were between 91.4%~104.4%. The developed method is simple, rapid and sensitive, and suitable for arsenic speciation in beer sample.

Keywords: Arsenic speciation; Beer; Liquid chromatography; Atomic fluorescence spectrometry