

安捷伦 (Agilent)
环境科学专栏

液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用 (HPLC-ICP-MS) 测定乳制品的无机砷及其它砷形态

陈 光¹ 林 立¹ 陈玉红²

(1 国家食品质量监督检验中心, 北京, 100094; 2 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京 100102)

摘 要 采用液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定了乳制品中的无机砷及其它砷形态, 各种砷形态的方法检出限 (以砷计) 分别为: 三价砷 $As(III)$ $2.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 五价砷 $As(V)$ $3.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 一甲基胂 MMA $2.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 二甲基胂 DMA $1.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 甜菜碱 AsB $1.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. 根据加标回收的方法评价了该方法的准确性, 无机砷的加标回收率为 $89.9\% - 98.1\%$, 相对标准偏差为 $1.0\% - 3.21\%$ ($n = 6$). 根据所建立的方法, 分析了市售的部分鲜奶、酸奶和奶粉样品, 其中无机砷的含量均未超出国家标准限量.

关键词 HPLC-ICP-MS, 乳制品, 无机砷.

砷是一种广泛分布于自然界的元素. 各种不同的砷形态具有不同的物理、化学性质, 毒性亦各不相同. 其中无机砷的毒性最大如 $As(III)$ 和 $As(V)$, 有机砷的毒性较小些如 MMA 和 DMA , 而 AsB , AsC , 砷糖等通常被认为是无毒的^[1, 2]. 因此, 砷的形态尤其是在食品、环境中的存在形态越来越为人们所重视.

国家标准 GB2762-2005《食品中污染物限量》对乳粉、鲜乳中无机砷的限量要求分别为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 国家标准 GB19302-2003《酸乳卫生标准》规定了酸乳中无机砷的限量要求为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. 国家标准 GB/T 5009.11-2003“食品中总砷及无机砷的检测方法”采用 1:1 盐酸作为提取液, 根据氢化物原子荧光光谱法直接测定提取液中的砷总量, 易导致食品样品中其它的砷形态也被萃入提取液中, 使测定结果偏高. 由近年发表的文献来看, 砷的形态分析研究多数集中在海产品上, 关于乳制品中砷形态的报导较少.

本文采用 HPLC-ICP-MS 进行五种砷形态的分离分析, 针对乳制品样品基质复杂、含有高蛋白与高脂肪的问题, 采用简便、快速的前处理方法进行基质分离, 实现了乳制品的五种砷形态的准确测定.

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

砷甜菜碱、一甲基胂、二甲基胂、砷酸根、亚砷酸根 (以下简称五种砷形态) 的标准贮备溶液, 混合标准溶液系列由标准贮备液以超纯水逐级稀释配得; 调谐溶液: $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 锂、钴、钇、铈、铊混合标准溶液 (2% 硝酸介质) (Agilent Part# 5184-3566); 内标溶液: $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 锗 (2% 硝酸介质); 超纯水 ($18.2 \text{ M}\Omega$), 用于配制所有标准溶液与样品溶液; $0.45 \mu\text{m}$ 水相滤膜; 3 mL Dionex On Guard RP 柱.

1.2 样品处理

鲜奶、酸奶等液体乳制品称取 10 g (精确到 0.01 g), 乳粉等固体乳制品称取 2 g (精确到 0.01 g), 加入水称重至 38 g (精确到 0.01 g), 涡旋混匀后, 超声萃取 40 min , 加入 2.0 g (精确到 0.01 g) 3% 乙酸溶液混匀沉淀蛋白, 于 4C 冰箱中静置 5 min 后, 用定性滤纸过滤, 收集滤液, 将滤液过 3 mL Dionex On Guard RP 柱, 收集滤液, 再将此滤液用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤于 1.5 mL 离心管中, 以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速在 4C 下冷冻离心 10 min , 吸取上清液用于液相色谱仪进行分析. 同时制备试剂空白溶液.

1.3 分析方法

标准曲线配制分别用超纯水将五种砷的标准贮备溶液逐级稀释, 配制成浓度为 $1.0, 2.0, 5.0, 20.0, 50.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合标准溶液. 在优化的实验条件下, 采集标准溶液, 等离子体色谱软件计算各色谱峰的积分面积并自动绘制校准曲线.

Agilent 200 高效液相色谱仪, 四元梯度泵, MilliQ 超纯水系统, Agilent 7500ce 电感耦合等离子体质谱仪, 玻璃同心雾化器; 石英雾化室; 半导体控温于 $2 \pm 0.1\text{C}$; 炬管: 石英一体化, 2.5 mm 中心通道; 屏蔽炬; 样品锥: Ni 锥.

色谱条件: 色谱柱: 阴离子保护柱 IonPac AG 19 ($50 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}, 11 \mu\text{m}$); 阴离子分析柱 IonPac AS 19 ($250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}, 7.5 \mu\text{m}$), 流动相: A 相 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠 / $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸二钠) / $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 无水乙酸钠 / $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝

酸钾, $\mu\text{H} = 10.5 - 11.3$); B相(无水乙醇); A+B(99+1)混合等度淋洗; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: $5 - 50 \mu\text{L}$

ICP-MS条件: 功率: 1550 W ; 雾化器: 玻璃同心雾化器; 柱后在线加入内标, 内标溶液提升速率: $0.2 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1}$; 载气流量: $0.7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 辅助气流量: $0.32 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 采样深度: 9.5 mm ; 测定质量数: 砷 75, 氯 35, 锗 72

2 样品前处理

对于离子色谱柱而言, 蛋白、油脂和色素均会对柱效造成不可逆转的损害。而乳制品中蛋白、油脂的含量均较高, 其提纯净化相对复杂。若只是采用定性滤纸过滤、 $0.45 \mu\text{m}$ 有机滤膜过滤及离心过滤都不能有效去除上述杂质。分别比较了不同比例的甲醇、盐酸与乙酸体系, 作为动物性食品样品中无机砷的提取液^[3], 最终选择的萃取剂主要为水相。在提取过程中会萃入少量水可溶性的蛋白和脂肪, 加入乙酸后则可进一步去除蛋白, 脂肪则采用商品化的 $3 \text{ m} \text{ Dionex On Guard RP}$ 柱进行分离。经 RP 柱净化后的滤液过 $0.45 \mu\text{m}$ 无机滤膜去除大颗粒杂质, 8000 转以上冷冻离心再一次净化样品 (也可以进一步除去油脂)。经过以上处理后的样品对于色谱柱而言是较为干净的样品。

3 分离度的改善

因本研究的主要目标砷形态是以阴离子形式存在, 选择阴离子交换柱进行分离, 磷酸盐溶液进行等度淋洗。考虑到基体中引入的 Cl 可能会产生 AsCl 分子离子, 干扰 As 的准确测定, 因此在色谱条件优化过程中不仅考察了各种砷形态的分离度, 还充分考察了 Cl 与砷之间的分离度。通过对色谱条件的详细考察发现, 流动相 pH 值的变化对各种目标砷形态的分离度影响最大^[4]。此外, 比较了磷酸盐浓度为 $0, 1, 2, 3, 4 \text{ mmol}$ 时各种砷形态的分离度, 发现磷酸盐的用量对各个砷的形态之间的分离度影响不太大, 但对氯离子的保留时间有很大的影响。随着磷酸盐浓度的增加, 氯离子的保留时间推后, 可与砷的出峰时间错开, 有效避免 AsCl 对 As 的干扰。乙酸钠的加入对 AsB 、DMA 与 As(III) 的分离有一定的改善。图 1 为未加乙酸钠和加入 10 mmol 的乙酸钠时对各种砷形态的分离度之影响。乙酸钠用量越大, 分离度越佳, As(III) 的保留时间也越靠后, 当样品中 AsB 与 DMA 的含量较高时, As(III) 的定量更不容易受到影响。乙酸钠的用量达到 30 mmol 后, 分离度不再有明显改善, 且用量过大会造成淋洗液盐分偏高, ICP-MS 产生基体效应及信号漂移。

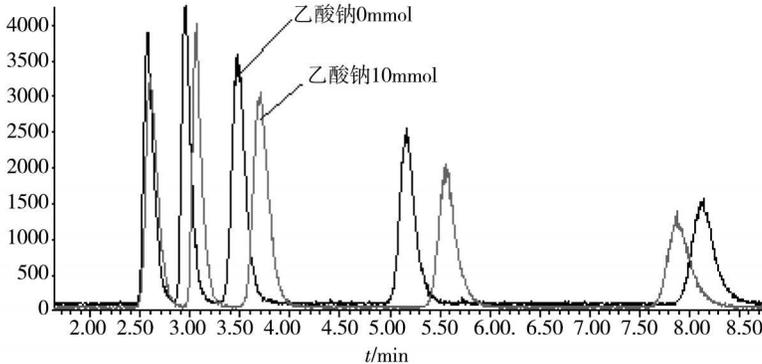


图 1 乙酸钠对分离度的影响

4 乙醇的增敏作用

砷的电离能较高 (9.81 eV), ICP-MS 测定时若溶液中含有一定的碳基质, 可有效改善等离子体条件, 提高砷的电离效率及灵敏度。因此, 在流动相中加入少量的甲醇或乙醇, 都能对砷的检测起到增敏效应。考虑到乙醇对人体的伤害较小, 因此实验选择在淋洗液中加入乙醇。分别比较了流动相中不加乙醇以及加入 1% 、 2% 、 3% 的乙醇对信号的影响。可知, 乙醇的加入对各种砷形态的分离度影响不大, $1\% - 2\%$ 的乙醇加入量可以有效地将灵敏度提高 1 倍以上。

5 工作曲线与方法检出限

对浓度分别为 $1.0, 2.0, 5.0, 20.0, 50.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的砷形态混合标准溶液进行 HPLC-ICP-MS 分析, 以各砷形态的峰面积对浓度进行线性回归。结果表明, 在给定的浓度范围内, 各种砷形态的线性回归方程相关系数均在 0.999 以上。根据样品前处理最大的稀释倍数, 计算得到乳制品各种砷形态的方法检出限分别为: 三价砷 As(III) $2.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 五价砷 As(V) $3.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 一甲基砷 MMA $2.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 二甲基砷 DMA $1.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 甜菜碱 AsB $1.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

6 回收率测定

选取市售鲜牛奶, 准确称取多份平行样品, 分别定量加入 As(III) 与 As(V) 标准溶液, 添加不同的浓度水平, 使最终定容溶液中 As(III) 与 As(V) 的浓度各自含有 $1.0, 5.0$ 及 $25.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 计算样品中无机砷的回收率, 详见表 1。由表 1 可知, 各加标水平的回收率在 $89.9\% - 98.1\%$, 相对标准偏差为 $1.09\% - 3.2\%$ ($n=6$)。

表 1 鲜牛奶中机砷 As(III)与 As(V)加标回收率(%, n=6)

平行次数	各加标 1.0 ng·mL ⁻¹	各加标 5.0 ng·mL ⁻¹	各加标 25.0 ng·mL ⁻¹
1	90.2	99.2	101.3
2	93.2	101.2	101.9
3	94.5	97.3	95.6
4	86.9	95.3	97.4
5	84.3	93.6	99.1
6	89.9	93.9	98.9
平均回收率	89.8	96.8	99.0
相对标准偏差	4.24	3.14	2.38

7 实际样品分析

选取市售乳粉、鲜奶和酸奶各 2 种, 按所建立的 HPLC-ICP-MS 分析方法考察其中的砷形态, 结果参见表 2 图 2 为奶粉样品与标准溶液中的五种砷形态的色谱图。结果表明, 市售乳制品样中无机砷的含量均远低于国家食品标准的限量, 故样品中无机砷的指标是安全的。

表 2 市售乳制品的检测结果 (单位: mg·kg⁻¹, n=3)

样品名称	AsB	DMA	MMA	As(III)	As(V)
乳粉 1#	N. D.	N. D.	N. D.	0.0015	N. D.
乳粉 2#	N. D.	0.00034	N. D.	0.0015	N. D.
鲜奶 1#	N. D.	0.00063	N. D.	N. D.	0.0023
鲜奶 2#	0.00021	N. D.	N. D.	N. D.	0.0029
酸奶 1#	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
酸奶 2#	0.00083	N. D.	N. D.	0.0034	N. D.

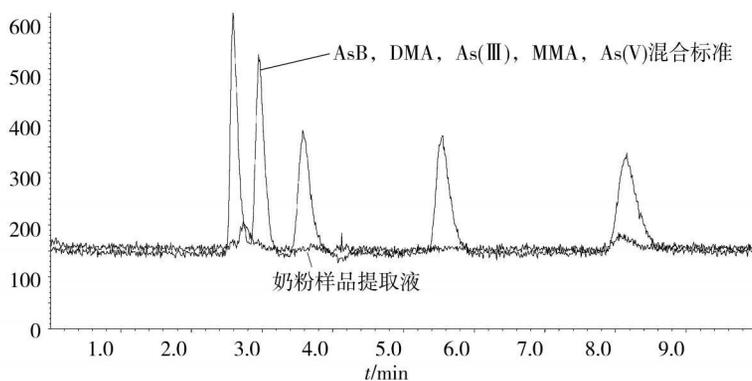


图 2 标准溶液以及奶粉样品提取液色谱图

参 考 文 献

- [1] BEARD H C, LYERLY L A, Separation of Arsenic from Antimony and Bismuth by Solvent Extraction [J]. *Anal Chem*, 1961, 33(12): 1781—1782
- [2] ZHANG X, VANDERBIJSEN V, CUBBER A D, Accumulation of Arsenic Species in Serum of Patients with Chronic Renal Disease [J]. *Clin. Chem.*, 1996, 42(8): 1231—1237
- [3] 林立, 陈光, 陈玉红, 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用测定动物性海产品中的无机砷 [J]. *环境化学*, 2009, 28(1): 149—152
- [4] 林立, 陈光, 陈玉红, 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用测定白酒中的无机砷 [J]. *环境化学*, 2008, 27(6): 853—855

DETERMINATION OF INORGANIC ARSENIC AND OTHER ARSENIC SPECIES IN DAIRY PRODUCTS BY HPLC-ICP-MS

CHEN Guang¹ LIN Li¹ CHEN Yu-hong²

(China Food Quality Safety Supervision and Inspection Center Beijing, 100083, China
Agilent Technologies Co., Ltd., Beijing 100102, China)

ABSTRACT

The method for determination of arsenic species in dairy products by using HPLC-ICP-MS has been developed. The method detection limits of each As species are as follows (count as As): As(III) $2.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, As(V) $3.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, MMA $2.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, DMA $1.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, AsB $1.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. The accuracy and precision of the method was evaluated by spike recovery testing. Recovery of inorganic arsenic were between 89.8%—99.0% and the relative standard deviation were within 1.09%—3.21% ($n=6$). Milk samples from the market were analyzed according to the presented method hereby. The result showed that inorganic arsenic in the dairy samples did not exceed national permission limits.

Keywords HPLC-ICP-MS, dairy product, Inorganic Arsenic