

HPLC-AFS 法测定水产品中 4 种砷形态

Determination of four arsenic species in aquatic products by liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry

刘正华^{1,2} 李忠海¹

LIU Zhenghua^{1,2} LI Zhonghai¹

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004; 2. 长沙海关技术中心, 湖南 长沙 410004)

(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Technology Center of Changsha Customs District of People's Republic of China, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:目的: 研究建立水产品中一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)、As(Ⅲ)和 As(V) 的超声辅助提取—高效液相色谱—原子荧光光谱分析方法。方法: 样品采用甲醇—水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$)溶液超声提取, 15 mmol/L 磷酸氢二铵溶液(pH 6.0)为流动相, 经 PRP-X100 阴离子交换柱分离, 原子荧光光谱分析方法测定。结果: 在优化试验条件下, MMA、DMA、As(Ⅲ)、As(V) 4 种砷形态化合物在 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数均在 0.998 以上, 检出限分别为 0.82, 0.94, 1.10, 0.78 $\mu\text{g/L}$, 相对标准偏差为 0.8%~3.7%, 加标回收率为 86.0%~110.0%。结论: 该方法简便, 准确度、灵敏度高且试剂耗材费用低, 适用于水产品中砷的形态分析。

关键词: 高效液相色谱—原子荧光光谱法(HPLC-AFS); 水产品; 砷; 形态分析

Abstract: Objective: Four arsenic species of arsenic in aquatic products were analyzed using ultrasonic-assisted extraction combined with high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry (HPLC-AFS). **Methods:** Four arsenic compounds were extracted ultrasonically from the samples using 50% (v/v) methanol-aqueous solution as extraction solvent. The chromatographic separation was performed on Hamilton PRP-X100 anion exchange column using a mixture of 15 mmol/L ammonium dihydrogen phosphate solution with the pH adjust to 6.0 as the mobile phase. **Results:** Under the optimized conditions, there were good linear relationships in the range of 0~100 $\mu\text{g/L}$

for four arsenic compounds, with correlation coefficients all above 0.998. The limit of detection (LODs) of four arsenic species MMA, DMA, As(Ⅲ), As(V) were 0.82, 0.94, 1.10, 0.78 $\mu\text{g/L}$ respectively. The relative standard deviations were in the range of 0.8%~3.7%. The recoveries ranged from 86.0% to 110.0%.

Conclusion: This method is simple, accurate, sensitive, and low reagent consumption costs, can be used for the determination of the arsenic species in aquatic products.

Keywords: high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry (HPLC-AFS); aquatic products; arsenic; speciation analysis

砷(As)作为常见的有毒有害元素, 一直备受人们关注。砷的毒性与砷的形态密切相关, 不同形态的砷毒性相差甚远, As(Ⅲ)和 As(V)毒性大, 一甲基砷酸(MMA)和二甲基砷酸(DMA)毒性小, 砷胆碱(AsC)和砷甜菜碱(AsB)则被认为没有毒性^[1]。由于水产品在养殖过程中易受到砷和其他元素的污染, 对水产品中有害重金属进行研究, 不但要考虑到有害重金属含量的高低, 更重要的是要研究有害重金属存在的形态及其形态的含量, 以无机砷与有机砷的不同毒性来综合评价, 比用砷的总量来评价砷的毒性更具科学性^[2]。

高效液相色谱—电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)^[3-6]、高效液相色谱—原子荧光光谱法(HPLC-AFS)^[7-9]等联用技术是元素形态分析较为有效的方法, 但 HPLC-ICP-MS 法因其仪器价格昂贵、运行费用高, 推广应用还存在一定困难。原子荧光光谱(AFS)仪器是中国具有自主知识产权的分析仪器, 具有设备简单、灵敏度高、光谱干扰少、试剂耗材成本低等优点, HPLC-AFS 已被广泛应用于砷、汞、硒等元素形态的检测^[10-13]。样品

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(编号: 2015IK126)

作者简介: 刘正华, 男, 长沙海关技术中心高级工程师, 博士。

通信作者: 李忠海(1960—), 男, 中南林业科技大学教授, 博士。
E-mail: lizh11@163.com

收稿日期: 2023-03-10 **改回日期:** 2023-07-18

前处理是形态分析的关键环节,超声提取具有提取时间短、提取温度低、成本低、操作简单等优点^[14-15]。研究拟采用超声辅助提取,结合低干扰、高灵敏度的原子荧光检测手段,建立超声辅助提取—高效液相色谱—原子荧光光谱法联用技术对水产样品中 4 种有毒砷形态的快速分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

亚砷酸根溶液标准物质(GBW08666)、砷酸根标准物质(GBW08667)、一甲基砷酸溶液标准物质(GBW08668)和二甲基砷酸溶液标准物质(GBW08669):中国计量科学研究院;

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、HCl、KOH、 KBH_4 :优级纯,国药集团化学试剂有限公司;

甲醇、甲酸:色谱纯,德国默克尔有限公司;

滤膜:0.45 μm ,上海光亚净化材料厂;

试验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

原子荧光光度计:AFS-9230 型,北京吉天仪器有限公司;

形态分析预处理装置:SAP-20 型,北京吉天仪器有限公司;

超声波清洗器:KM-500DV 型,昆山美美超声仪器有限公司;

电子天平:CPA225D 型,德国赛多利斯仪器有限公司;

通用台式离心机:ST16R 型,美国 Thermo 公司;

快速混匀器:SK-1 型,江苏荣华仪器制造有限公司;

氮吹仪:N-EVAP-34 型,美国 Orgnomation 公司;

超纯水仪:A10 型,美国 Millipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 液相色谱条件 阴离子交换柱为 Hamilton PRP-X100 (250 mm $\times$ 4.1 mm, 10 μm);流动相为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液(15 mmol/L,用 10% 甲酸调节至 pH 6.0);流速 1.0 mL/min;进样体积 100 μL ;形态分析仪泵速 50 r/min。

1.3.2 氢化物发生条件 载流 7% HCl,流速 60 mL/min;还原剂 10 g/L NaBH_4 溶液(含 0.5% NaOH);氧化剂 2% $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液(含 0.5% KOH);载气、屏蔽气均为氩气,载气流速 400 mL/min,屏蔽气流速 800 mL/min。

1.3.3 原子荧光光谱仪测定条件 砷高性能空心阴极灯(北京有色金属研究总院);灯电流 100 mA;原子化器高度 8 mm;负高压 270 V;测量方法为标准曲线法。

1.3.4 样品前处理 称取经粉碎、混合均匀的样品 2.0 g

于 25 mL 离心管中,加入 10 mL 甲醇—水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$)溶液,涡旋混匀,超声萃取 20 min,以 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液;沉淀再按相同方式提取一次,合并上清液,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹浓缩至 5 mL。冷却后加水定容至 10 mL,过 0.45 μm 水相滤膜后测定。同时做试剂空白。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

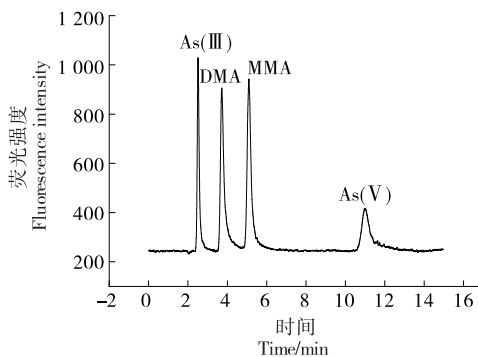
试验考察了 9, 12, 15, 18 mmol/L 的 4 种不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液作为流动相对各砷形态分离的影响。结果表明,保留时间随流动相中浓度的增加而减少,虽然在低浓度的流动相可以得到分离很好的色谱峰,但是最后流出的形态 As(V) 由于保留时间过长导致了谱峰展宽。综合考虑保留时间和分离度,选择 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的浓度为 15 mmol/L。

试验以甲酸作为酸度调节剂,考察了 pH 值在 5.5~6.5 范围内变化时,对各种砷化合物保留时间的影响。结果表明,pH 5.5 时,As(III) 和 DMA 不能完全分离,随着 pH 值增加,As(III) 的保留时间增加;pH 6.0 时,As(III) 和 DMA 两者达到基线完全分离;pH 6.5 时,DMA 和 MMA 的分离度下降。综合考虑保留时间和分离度,选择 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的 pH 值为 6.0。

在此分离条件下,12 min 内 As(III)、DMA、MMA 和 As(V) 4 种砷形态得到了较好的分离,保留时间分别为 2.5, 3.7, 5.1, 10.9 min,见图 1。

2.2 氢化物发生条件优化

在优化的色谱条件下,使用质量浓度均为 100 $\mu\text{g/L}$ 的 4 种砷形态考察了 NaBH_4 和 HCl 浓度对荧光强度的影响,结果见图 2 和图 3。由图 2 可知,当 NaBH_4 质量浓度为 10 g/L 时,4 种砷形态都可以得到较高的荧光强度



100 $\mu\text{g/L}$ As(III)、DMA、MMA、As(V) 混合溶液

图 1 4 种砷形态混合标准溶液色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram for a mixture of four arsenic standards

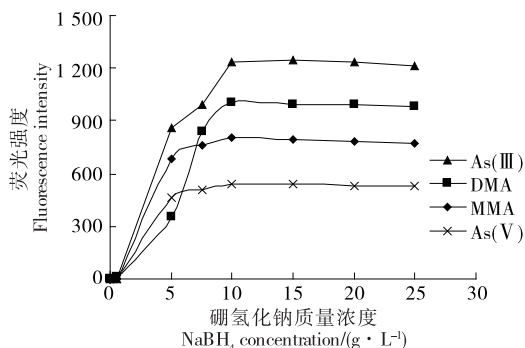


图 2 硼氢化钠质量浓度对荧光强度的影响

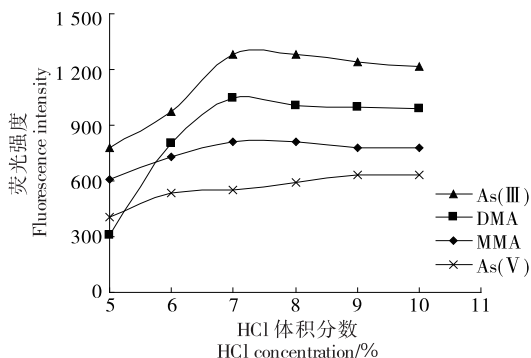
Figure 2 Effects of NaBH₄ concentration on fluorescence intensity

图 3 HCl 体积分数对荧光强度的影响

Figure 3 Effects of HCl concentration on fluorescence intensity

响应,继续增加 NaBH₄ 浓度,荧光强度反而下降,可能是低浓度的 NaBH₄ 导致了还原反应程度受到限制,而高浓度的 NaBH₄ 会使还原反应产生大量的氢气,会稀释样品气体,使得被测定的氢化物灵敏度下降。因此,选择 10 g/L 的 NaBH₄ 作为还原剂。

由图 3 可知,当 HCl 体积分数为 7% 时,As(III)、DMA、MMA 荧光强度达到最大值。尽管 HCl 体积分数较高时,As(V) 可以得到更高的荧光强度,但 As(III)、DMA、MMA 形态的荧光强度会随之降低,因此,选择体积分数为 7% 的 HCl 作为载流。有机砷与 NaBH₄ 发生氢化物反应效率低,需加氧化剂并开启紫外灯,才能将有机砷氧化为无机砷,使 DMA、MMA 与 NaBH₄ 发生反应,以提高荧光强度,综合还原剂浓度和仪器参数,试验选择 2% K₂S₂O₈ 溶液作为氧化剂。

2.3 原子荧光测定条件优化

2.3.1 光电倍增管负高压的影响 用 100 μg/L 的 As(III) 优化仪器参数,试验表明,砷的荧光强度随光电倍增管负高压的增大而增强,但噪声也相应增大,由于较低的负高压有助于延长光电倍增管的使用寿命,在灵敏度可以满足测定需求时应尽量选择较低的负高压,故选择负

高压为 270 V。

2.3.2 空心阴极灯电流的影响 用 100 μg/L 的 As(III) 优化仪器参数,试验表明,砷的荧光强度随灯电流的增大而增强,考虑到灯的使用寿命及发射谱线的自蚀现象,选择砷空心阴极灯电流为 100 mA,辅电流 45 mA。

2.3.3 载气流速的影响 用 100 μg/L 的 As(III) 优化仪器参数,试验表明,载气流速为 300~600 mL/min 时砷的荧光强度基本不变,载气流速从 600 mL/min 再增大时荧光强度下降,可能是较大的载气流稀释了火焰中原子蒸气的缘故。因此,选择载气流速为 400 mL/min。

2.3.4 原子化器温度的影响 考察了不同原子化温度对测定的影响,结果表明,温度低于 100 ℃ 无火焰产生,300 ℃ 时荧光强度反而下降。因此,选择原子化器温度为 200 ℃。

2.4 样品前处理方法优化

2.4.1 提取溶剂的选择 砷化合物的提取是形态分析的关键。目前,砷形态分析时常见的提取剂有稀酸提取剂、甲醇—水提取剂,根据文献[15]报道,结合水产样品特点,试验主要考察了纯水、磷酸—水($V_{\text{磷酸}}:V_{\text{水}}=1:19$)、盐酸—水($V_{\text{盐酸}}:V_{\text{水}}=1:19$)和甲醇—水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$) 4 种不同体系的提取效果(见图 4)。研究发现,甲醇—水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$) 对各形态砷的提取率高,均在 90% 以上;低浓度酸体系次之,仅有 75% 左右;水最低,只有 40% 左右。因此,选择甲醇—水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$) 作为提取溶剂。

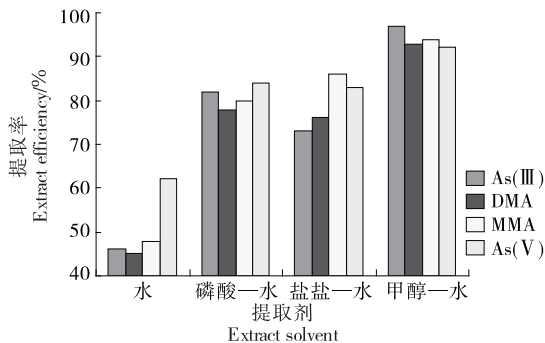


图 4 提取剂对各形态砷提取率的影响

Figure 4 Effects of different reagents on extraction efficiency of arsenic speciation

2.4.2 提取时间的选择 水产品中砷形态的提取方法主要有加速溶剂萃取、超声辅助提取和热浸提,其中超声辅助提取不仅提取率高,而且耗时短,得到广泛的应用。试验采用超声辅助提取方法,考察提取时间(5~40 min)对提取效果的影响。结果(图 5)表明,当超声提取时间达到 20 min 后,4 种砷化合物的提取率均能达到 90% 以上,继续增加时间,提取效率提高不大。综合考虑,选择提取时间为 20 min。

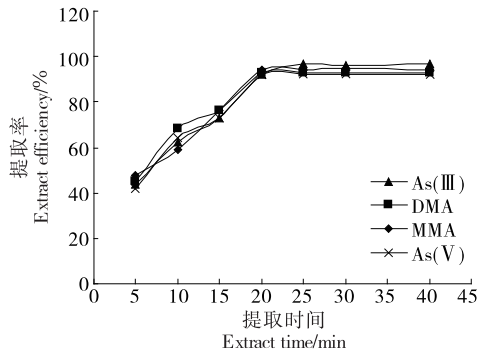


图 5 提取时间对各形态砷提取率的影响

Figure 5 Effects of extract time on extraction efficiency of arsenic speciation

2.5 方法学评价

2.5.1 线性关系与检出限 配制 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列砷化合物混合标准溶液, 在优化的分离、检测条件下进行线性回归试验, 回归方程及相关系数见表 1。4 种砷化合物在 0~100 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度范

表 1 标准曲线回归方程、相关系数及检出限

Table 1 Standard curve regression equation, correlation coefficient and detection limit

砷形态	浓度范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	线性方程	相关 系数	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
DMA	0~100	$Y=74.277\ 2X+2.741\ 2$	0.998 2	0.82
MMA	0~100	$Y=60.187\ 7X+8.741\ 2$	0.998 3	0.94
As(Ⅲ)	0~100	$Y=113.858\ 8X-20.233\ 2$	0.998 6	1.10
As(V)	0~100	$Y=89.508\ 9X+8.649\ 7$	0.998 7	0.78

围内呈良好的线性关系, 相关系数均在 0.998 以上。检出限(以 3 倍信噪比计)分别为 0.82, 0.94, 1.10, 0.78 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5.2 回收率和精密度 在小龙虾和大闸蟹中加入低、中、高 3 种浓度的砷混合标准溶液, 按样品处理方法测定, 平均回收率为 86.0%~110.0%, 相对标准偏差(RSD)为 0.8%~3.7%, 见表 2。

2.5.3 样品分析 分别选取常见出入境水产品带鱼、大虾、梭子蟹、白蚌进行砷形态分析, 结果见表 3。

表 2 加标回收率和精密度试验结果

Table 2 The results of precision and recovery tests ($n=6$)

砷形态	小龙虾					大闸蟹				
	本底值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均测定值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均回 收率/%	RSD/ %	本底值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均测定值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均回 收率/%	RSD/ %
DMA	ND	0.050	0.046	92.0	4.7	ND	0.050	0.044	88.0	3.4
		0.100	0.092	92.0	3.8		0.100	0.093	93.0	3.6
		0.200	0.185	92.5	2.5		0.200	0.190	95.0	2.5
MMA	ND	0.050	0.047	94.0	2.1	0.168	0.050	0.211	86.0	3.3
		0.100	0.091	91.0	2.3		0.100	0.262	94.0	1.9
		0.200	0.189	94.5	3.6		0.200	0.363	97.5	2.8
As(Ⅲ)	0.027	0.050	0.076	98.0	3.7	0.068	0.050	0.123	110.0	0.8
		0.100	0.126	99.0	2.4		0.100	0.169	101.0	1.9
		0.200	0.228	100.5	1.6		0.200	0.265	98.5	2.4
As(V)	0.022	0.050	0.070	96.0	1.5	ND	0.050	0.049	98.0	0.9
		0.100	0.120	98.0	2.1		0.100	0.095	95.0	2.1
		0.200	0.226	102.0	2.3		0.200	0.199	99.5	1.3

表 3 样品砷形态测定结果

Table 3 Determination results of samples $\mu\text{g/g}$

样品	DMA	MMA	As(Ⅲ)	As(V)
带鱼	ND	ND	ND	ND
大虾	0.27	0.14	ND	ND
梭子蟹	0.079 3	ND	0.057	ND
白蚌	ND	ND	0.062	0.119

3 结论

建立了水产样品中水产品中一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)、As(Ⅲ)和 As(V) 4 种砷形态的超声提取—高效液相色谱—原子荧光光谱分析方法, 优化了分离条件, 使 4 种砷形态在 12 min 内得以分离。该方法能快速分析水产品中 4 种砷形态, 具有前处理方法简单、设备价格低廉等优点, 适用于大批量进出口水产品样本中砷形态分析。

参考文献

- [1] 刘成新, 肖志明, 贾铮, 等. 液相色谱—氢化物发生原子荧光光谱法测定饲料中砷的形态[J]. 分析化学, 2018, 46(4): 537-542.
LIU C X, XIAO Z M, JIA Z, et al. Quantitative determination of arsenic species in feed using liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018, 46(4): 537-542.
- [2] 林洪. 水产品安全性[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010: 51-52.
LIN H. Seafoods safety [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2010: 51-52.
- [3] 谭婷婷, 王瑛, 滕久委, 等. 微波辅助提取—高效液相—电感耦合等离子体质谱法测定生米与熟米中各形态砷的含量[J]. 食品与机械, 2016, 32(6): 73-76.
TAN T T, WANG Y, TENG J W, et al. Comparison volumes of the different arsenic species between raw and cooked rice using AE-HPLC-ICP-MS[J]. Food & Machinery, 2016, 32(6): 73-76.
- [4] 王林裴, 郑亚哲, 彭新然. HPLC-ICP-MS 法测定水产动物及其制品中 5 种砷形态的含量[J]. 食品与机械, 2017, 33(11): 61-65.
WANG L P, ZHENG Y Z, PENG X R. Determination of five arsenic species in aquatic animals and their products by high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Food & Machinery, 2017, 33(11): 61-65.
- [5] 胥佳佳, 冯鑫, 汤静, 等. 超声辅助提取—高效液相色谱—电感耦合等离子体质谱法测定香菇中 6 种形态砷化合物[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 216-221.
XU J J, FENG X, TANG J, et al. Arsenic speciation analysis of lentinus edodes by ultrasonic-assisted extraction-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Food Science, 2016, 37(24): 216-221.
- [6] 陈练, 马莎莎, 易伦朝, 等. 砷的不同形态在石菖蒲中的分布[J]. 食品与机械, 2017, 33(4): 23-26.
CHEN L, MA S S, YI L Z, et al. Distribution research of arsenics speciation in acori tatarinowii[J]. Food & Machinery, 2017, 33(4): 23-26.
- [7] GONZALVEZ A, LLORENS A, CERVERA M L, et al. Non-chromatographic speciation of inorganic arsenic in mushrooms by hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 360-364.
- [8] HUERGA A, LAVILLA I, BENDICHO C. Speciation of the immediately mobilisable As(Ⅲ), As(Ⅴ), MMA and DMA in river sediments by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry following ultrasonic extraction[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 534(1): 121-128.
- [9] 樊祥, 张润何, 刘博, 等. 高效液相色谱—原子荧光光谱法测定水产品中不同形态汞含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 76-81.
FAN X, ZHANG R H, LIU B, et al. Determination the content of mercury in different speciations in aquatic products by high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(1): 76-81.
- [10] 王素芬, 陈芳, 王鹏, 等. HPLC-HG-AFS 联用技术检测蜂花粉中砷形态[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 189-193.
WANG S F, CHEN F, WANG P, et al. Determination of four arsenic species in bee pollen by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry[J]. Food Science, 2013, 34(12): 189-193.
- [11] 王亚, 张春华, 葛滢, 等. 高效液相色谱—氢化物发生—原子荧光光谱法检测紫菜中的砷形态[J]. 分析试验室, 2013, 32(5): 34-38.
WANG Y, ZHANG C H, GE Y, et al. Determination of arsenic speciation in porphyra tenera using HPLC-(UV)-HG-AFS [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2013, 32(5): 34-38.
- [12] 林凯, 姜杰, 黎雪慧, 等. 水产品中不同形态汞的高效液相色谱—原子荧光光谱分析研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 58-62.
LIN K, JIANG J, LI X H, et al. Approach for mercury species analysis in aquatic products by HPLC-AFS[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2014, 26(1): 58-62.
- [13] 王铁良, 张会芳, 魏亮亮, 等. 高效液相色谱—氢化物发生—原子荧光光谱联用技术测定富硒大米中的 5 种硒形态[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2 185-2 190.
WANG T L, ZHANG H F, WEI L L, et al. Determination of 5 kinds of selenium species in rice by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(6): 2 185-2 190.
- [14] 王增焕, 王许诺, 柯常亮, 等. 基于原子光谱法的元素形态分析技术进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(12): 3 377-3 382.
WANG Z H, WANG X N, KE C L, et al. The progress in speciation analysis of trace elements by atomic spectrometry[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2013, 33(12): 3 377-3 382.
- [15] 周朗君, 古君平, 施文庄. 食品中重金属元素形态分析前处理与检测研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(5): 1 261-1 269.
ZHOU L J, GU J P, SHI W Z. Research progress of sample preparation and analysis techniques on speciation analysis of heavy metals in food[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 5(5): 1 261-1 269.