

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

Comparison volumes of the different arsenic species between raw and
cooked rice using AE—HPLC—ICP—MS

谭婷婷 王瑛 滕久委 欧仕益

TAN Ting-ting WANG Ying TENG Jiu-wei OU Shi-yi

(暨南大学食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

摘要:建立微波辅助提取—高效液相—电感耦合等离子体质谱(MAE—HPLC—ICP—MS)测定大米中各种形态砷含量的方法。通过对微波温度、时间、功率进行条件优化,在 80 °C、600 W、20 min 的微波条件下可得到最佳提取效果。As(Ⅲ)、DMA、MMA、As(V) 4 种砷形态的标准曲线线性良好,样品加标回收率在 86.15%~109.80%。所建方法与 GB/T 5009.11—2014 比较发现:两种方法测得的 As(Ⅲ)、DMA、As(V) 含量无显著差异,而所建方法测得的 MMA 含量则高于 GB/T 5009.11—2014 的。根据所建方法分别测定生米和熟米中各种形态砷的含量,发现大米经过蒸煮后 As(Ⅲ)和 DMA 比重下降,而 MMA 和 As(V)比重上升,总砷浓度下降了 8.77%。

关键词:生米;熟米;砷形态;微波;高效液相—电感耦合等离子体质谱

Abstract: Microwave-assisted extraction-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometer (MAE—HPLC—ICP—MS) method was developed to determine the contents of arsenic species in rice. Treatments in optimal conditions of 80 °C, microwave power of 600 W, for 20 min, As(Ⅲ), DMA, MMA, As(V) could be completely extracted. Linear correlations of As(Ⅲ), DMA, MMA, As(V) were satisfactory. Recoveries was between 86.15%~109.80%. The determination of As(Ⅲ), DMA and As(V) by the proposed method in this study was comparable to that by national standard (GB/T 5009.11—2014). MMA determined by this proposed method was higher than that by national standard, indicating a better extraction. Our results showed that different arse-

nic species could be detected in both raw and cooked rice, and the proportions of As(Ⅲ) and DMA were found declined, but As(V) and MMA increased in the latter respectively. The total arsenic content decreased during cooking by 8.77%.

Keywords: raw rice; cooked rice; arsenic species determination; MAE; HPLC—ICP—MS

近年来随着中国工农业的快速发展以及含砷农药的肆意乱用,砷污染问题已受到社会越来越多的关注,尤其是不同砷形态所引起的健康风险已经成为食品安全领域的研究热点^[1]。

砷作为自然界中普遍存在的有毒元素,其毒性与赋存的形态有关,一般来说,无机砷的毒性远大于有机砷^[2]。国际癌症研究中心已经确认无机砷及其化合物为 I 级致癌物质,有机砷中的一甲基砷酸(MMA)和二甲基砷酸(DMA)则被归为潜在的致癌物质^[3],由于这 4 种砷形态恰恰是大米中的主要砷形态^[4],因此大米中砷的风险尤其值得关注。中国作为大米的生产和消费大国,有 65% 的人口以大米为主食^[5],通过大米摄入的无机砷占有所有食品无机砷摄入的 60%^[6]。此外,从中国的日常生活习惯来看,大米被摄入人体前,往往需要高温蒸煮,而温度会使不同形态砷发生变化^[7],因此研究大米蒸煮前后砷形态的变化,对于形成健康饮食习惯有一定指导意义。

目前,食品中砷的提取方法主要包括热提取法、超声波提取法、加速溶剂萃取法以及微波辅助提取法等^[8]。相较于其他提取方法,微波辅助提取可有效地保护食品、药品及其它化工物料中的功能性成分,提取速度快,溶剂用量少、安全、节能、无污染,生产设备简单、节省投资,拥有“绿色提取工艺”的美称^[4]。检测技术主要有原子吸收光谱仪(AAS)、等离子体发射光谱仪(ICP—AES)、原子荧光仪

基金项目:国家自然科学基金(编号:31101307)

作者简介:谭婷婷,女,暨南大学在读硕士研究生。

通讯作者:王瑛(1976—),女,暨南大学副教授,博士。

E-mail: twangywy@jnu.edu.cn

收稿日期:2015—12—05

(AFS)及等离子体质谱仪(ICP—MS)^[9]。其中 ICP—MS 具有灵敏度高、抗干扰能力强、线性范围宽等优点^[10],并已被中国 GB/T 5009.11—2014 收录,但该标准中稻米试样在 90 °C 恒温箱中热浸提 2.5 h,每 0.5 h 振荡 1 min,不仅繁琐耗时耗能,而且振荡受人因因素影响大。本试验拟建立一种微波辅助提取—高效液相—电感耦合等离子体质谱法测定大米中各种形态砷含量的方法,着重分析各种微波提取条件对砷含量测定的影响,旨在快速准确评估大米中的砷风险。

1 材料与方 法

1.1 试剂和材料

亚砷酸根溶液标准物质(GBW08666)、砷酸根溶液标准物质(GBW08667)、一甲基砷溶液标准物质(GBW08668)、二甲基砷溶液标准物质(GBW08669);色谱纯,中国计量研究院;

硝酸:分析纯,广州化学试剂;

磷酸氢二铵、硝酸铵:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

糙米:中农鲜享农业发展(北京)有限公司;

试验用水为 MilliQ 超纯水。

1.2 仪器设备

超纯水系统:MilliQ Academic 型,美国 Millipore 公司;

常压微波合成/萃取反应仪:MAS-II 型,上海新仪微波化学科技有限公司;

高效液相色谱仪:E2695 型,美国沃特世公司;

电感耦合等离子体质谱:X-Series-II 型,美国赛默飞世尔科技公司;

摇摆式高速万能粉碎机:DFY-600 型,温岭市林大机械有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9145A 型,上海一恒科学仪器有限公司;

迷你蒸煮饭盒:DFH10-20 型,中山市小两口电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 各种砷化合物标准曲线的绘制 亚砷酸根溶液标准物质、砷酸根溶液标准物质、一甲基砷溶液标准物质和二甲基砷溶液标准物质分别稀释成 400 μg/kg,然后等体积混合,即得到 100 μg/kg 的砷混合标准溶液。在规定的仪器条件下依次吸取 5.0,10.0,20.0 μL 砷混合标准溶液,记录色谱图并用数据处理软件系统 Plasma Lab 计算峰面积。以峰面积(x)为横轴,相应各组分质量浓度(y , μg/kg)为纵坐标,绘制标准曲线及进行线性回归分析。

1.3.2 大米样品的制备 用去离子水将购买的糙米清洗 3 次,部分用电饭煲煮熟,剩下的生米和熟米一同进行冷冻干燥,然后分别用高速粉碎机将干燥后的生米和熟米样品粉碎,过 80 目筛,作为大米样品待用。

1.3.3 大米样品中砷形态的提取

(1) 微波辅助提取:准确称取样品 5.00 g,置于 100 mL 的三口烧瓶中,加入 50 mL 0.2 mol/L 的 HNO₃ 溶液和磁力搅拌器转子。固液混合完全后置于微波萃取仪中,根据不同条件进行砷形态提取。所得提取物冷却至室温后移入

50 mL 的离心管中,在 8 000 r/min 条件下离心 15 min,吸取上清液过 0.45 μm 滤膜后,待测。

(2) 国标法(GB/T 5009.11—2014)提取:称取大米样品 5.00 g,置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 50 mL 0.15 mol/L HNO₃ 溶液,密闭,于 90 °C 恒温箱中热浸提 2.5 h,每 30 min 振荡 1 min,提取完毕后,取出冷却至室温,在 8 000 r/min 条件下离心 15 min,吸取上清液过 0.45 μm 滤膜后,待测。

1.3.4 高效液相—电感耦合等离子体质谱的测定参数

HPLC:色谱柱:Hamilton PRP × 100 (250 mm × 4.1 mm,10 μm);流速:1.0 mL/min;进样量:50 μL;流动相:40 mmol/L 磷酸氢二铵水溶液(pH=9);洗脱方式:等度洗脱;洗脱时间:14 min。ICP—MS:高频等离子体发射功率:1 400 W;雾化器气体:0.80 L/min;载气流量:0.80 L/min;检测信号:⁷⁵As, ⁷⁰ArCl, ⁸²Se, ⁸³Kr。

1.3.5 大米样品中砷形态含量的测定 根据文献[11]。

2 结果与分析

2.1 各种砷化合物分离结果及其线性方程

在规定工作条件下,砷混合标准溶液的出峰顺序依次为 As(III)、DMA、MMA 和 As(V),且 14 min 内 4 种砷形态完全分离(见图 1)。根据式(1)计算出各形态砷的分离度依次为 1.71、1.61 和 7.90,均大于 1.5,即达到定性定量的分离要求^[12]。

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}, \quad (1)$$

式中:

R ——分离度;

t_{R2} ——相邻两峰中后一峰的保留时间, min;

t_{R1} ——相邻两峰中前一峰的保留时间, min;

w_1 、 w_2 ——相邻两峰的峰底宽, min。

对混和标准溶液分离检测得到的峰面积与浓度进行线性回归,发现线性拟合良好,相关系数均在 0.999 以上(表 1)。

2.2 微波提取条件的优化选择

2.2.1 微波温度的确定 准确称取经粉碎过 80 目筛的样品 5.00 g,在功率 600 W,提取时间 20 min 下,选择微波温度 50,60,70,80,90 °C,考察微波温度对大米中各种形态砷含量的影响,结果见图 2。

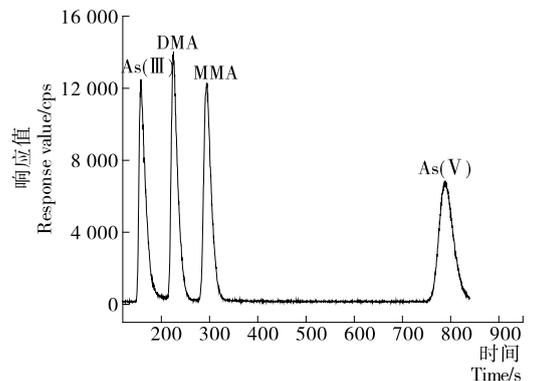


图 1 100 μg/kg 砷混合标准溶液的色谱图

Figure 1 HPLC—ICP—MS chromatogram for 100 μg/kg arsenic mixed standard solution

表 1 4 种形态砷的线性方程及相关系数[†]

Table 1 Linear regression equation and correlation coefficient of four arsenic species

砷形态	线性方程	相关系数 r^2
As(III)	$y = 0.000\ 250\ 1x + 0.617\ 0$	0.999\ 9
DMA	$y = 0.000\ 223\ 9x + 1.915\ 5$	0.999\ 9
MMA	$y = 0.000\ 221\ 9x + 1.837\ 4$	0.999\ 8
As(V)	$y = 0.000\ 210\ 1x - 0.126\ 2$	0.999\ 9

[†] y 表示浓度, $\mu\text{g}/\text{kg}$; x 表示积分峰面积。

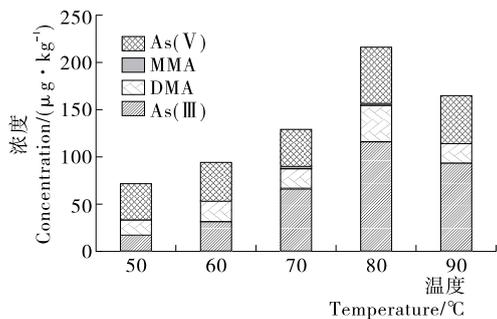


图 2 微波温度对大米中各种形态砷含量测定的影响
Figure 2 Effect of microwave temperature on arsenic species content detection in rice

由图 2 可知:随着微波温度的提高,大米中各种形态砷的提取量也逐渐增加,在 80 °C 取得最大提取量后,随着提取温度的上升各形态砷含量有所下降,这是由于提取剂在 90 °C 时会发生沸腾而造成一定量的砷损失,因此本试验优选 80 °C 下进行微波提取。

2.2.2 微波时间的确定 在微波温度 80 °C、功率 600 W 的条件下,考察不同微波提取时间(10, 15, 20, 25, 30 min)对大米中各种形态砷含量的影响,结果见图 3。

由图 3 可知:微波时间在 10~20 min 时,随着时间的延长,所测样品中各形态砷含量也随之提高,当提取时间超过 20 min 后,大米样品中各形态砷含量趋于稳定。出于经济高效考虑,优选 20 min 为本试验微波提取时间。

2.2.3 微波功率的确定 控制其他变量在最佳条件下,考察不同提取功率(400, 500, 600, 700, 800 W)对大米中各种形态砷含量的影响,结果见图 4。

由图 4 可知:微波功率为 600 W 时,样品中各砷形态保存相对完好,且总砷量及无机砷含量的测定结果最高,因此更能准确评估大米中的砷风险。超过 600 W 以后,部分形态

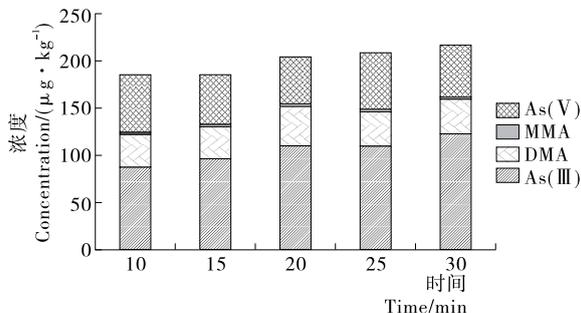


图 3 微波时间对大米中各种形态砷含量测定的影响
Figure 3 Effect of microwave time on arsenic species content detection in rice

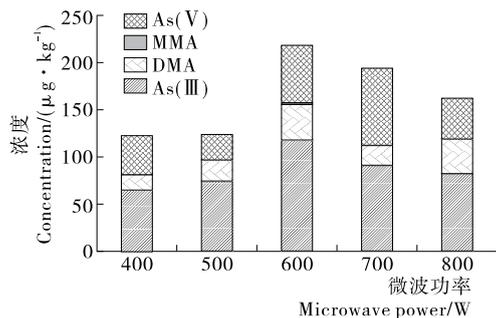


图 4 微波功率对大米中各种形态砷含量测定的影响
Figure 4 Effect of microwave power on arsenic species content detection in rice

砷含量有所降低,可能是随着微波功率增大,产生的热效应更强、温度更高,某些热敏性成分受到破坏,导致提取率下降^[13]。

2.3 对比试验

采用本法和国标法分别对同一大米样品中的各形态砷含量进行提取测定,结果见表 2。两种方法测得的 MMA 的含量有显著差异,本法测得的 MMA 含量明显高于国标法;As(III)、DMA 和 As(V)的含量则无显著差异(t 检验)。但相较于国标法 2.5 h 的热提取,微波辅助提取只需要 20 min,提取时间要短得多,操作也更为简单。可以认定本试验所建方法相对于国标法更为高效。

2.4 加标回收试验

在大米样品中加入 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的砷混合标准溶液后,采用所建立的方法测定加标大米样品中各形态砷的含量,计算出 As(III)、DMA、MMA 和 As(V)加标回收率为 86.15%~109.8%,相应 RSD 均小于 5%(见表 3),加标回收结果较为满意。

表 2 两种测定方法的对比试验结果[†]

Table 2 Comparison of experiment results using the proposed method and the national standard method

方法	As(III) ^a		DMA ^a		MMA ^b		As(V) ^a	
	含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	RSD/%						
本法	108.80	4.42	26.47	2.46	1.35	3.46	40.49	2.06
国标法	109.06	0.91	28.74	1.97	0.68	4.17	45.34	4.24

[†] a 表示两种测定方法无显著差异;b 表示两种测定方法有显著差异; $\alpha=0.01$ (两尾概率)。

表3 大米样品中加标回收试验结果

Table 3 The results of the spiked recovery test in rice sample

砷形态	回收率/%	RSD/%
As(Ⅲ)	94.18	2.13
DMA	90.32	0.47
MMA	86.15	0.16
As(V)	109.80	3.53

2.5 生米和熟米中各种形态砷的测定

按本试验所得到的最佳提取条件,分别对生米和熟米样品中各种形态砷进行提取和检测,结果见表4。

表4 生米与熟米中4种形态砷的测定含量

Table 4 Four arsenic species content detected in raw rice and cooked rice

样品	砷形态	测定值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	占总砷 比例/%	RSD/%
生米	As(Ⅲ)	90.48	58.42	2.20
	DMA	29.55	19.08	0.28
	MMA	2.48	1.60	4.77
	As(V)	32.37	20.90	5.11
熟米	As(Ⅲ)	79.90	56.55	0.34
	DMA	25.91	18.34	2.62
	MMA	2.50	1.77	1.51
	As(V)	32.99	23.34	3.02

由表4可知,生米样品中的总砷量为 $154.88 \mu\text{g}/\text{kg}$,熟米为 $141.29 \mu\text{g}/\text{kg}$,即大米经过蒸煮加工后,砷浓度降低了8.77%,这是因为在大米蒸煮过程中,砷溶解到了煮米水中并随水分被挥发^[7]。比较大米蒸煮前后各形态砷占总砷的百分比,发现熟米中As(Ⅲ)和DMA比重有所下降,而As(V)和MMA的比重则上升。造成这种变化的原因,推测有以下两个:①各形态砷在蒸煮中溶解挥发的程度不一,导致比重发生变化;②在空气介质中,As(Ⅲ)受热加速氧化成了As(V),造成As(Ⅲ)含量减少,而As(V)含量增加。

3 结论

本试验采用微波辅助提取大米样品中各种形态砷,并测定其含量,通过对微波提取条件进行优化,结果表明,在温度 $80 \text{ }^\circ\text{C}$,功率 600 W 下微波提取 20 min 后得到的测定结果最佳。与GB/T 5009.11—2014法测定大米样品中各种形态砷的含量相比,As(Ⅲ)、DMA、和As(V)无显著差异,MMA的测定结果则显示本试验所建方法更为高效,且本试验法提取时间较国标法更短,同时操作简单,耗能低,加标试验结果也显示该方法较为稳定,因此值得推广应用。采用本法测定生米和熟米中各种形态砷的含量,发现蒸煮后的大米总砷浓度下降,而且各形态砷含量也会发生变化,表明大米经过蒸煮后食用可降低大米中的砷风险,有益于人健康饮食。本试

验针对蒸煮对大米中砷的影响进行了初步研究,有关不同蒸煮条件对砷形态稳定性的影响还有待进一步探索。

参考文献

- [1] 云洪霄,张磊,李筱薇,等.大米中无机砷测定方法研究[J].卫生研究,2010,39(3):316-320.
- [2] SMEDLEY P L, KINNIBURGH D G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters[J]. Applied Geochemistry, 2002, 17(5): 517-568.
- [3] MARSHALL G, FERRECCIO C, YUAN Y, et al. Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water[J]. Journal of The National Cancer Institute, 2007, 99(12): 920-928.
- [4] 谢科.中国主要粮食产区的大米中总砷和砷形态物质的检测及其暴露评估[D].武汉:武汉轻工大学,2013.
- [5] 冯敏,陆迁,林建中.我国城乡大米消费弹性分析[J].当代经济,2011,10(3):84-85.
- [6] LI Gang, SUN Guo-xin, WILLAMS P N, et al. Inorganic arsenic in Chinese food and its cancer risk[J]. Environment International, 2011, 37(7): 1 219-1 225.
- [7] 汪光,李开明,吕永龙,等.食品烹调处理过程中砷的浓度、形态和生物可给性研究进展[J].生态毒理学报,2013,8(2):132-137.
- [8] NARUKAWA T, INAGAKI K, KUROIWA T, et al. The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS[J]. Talanta, 2008, 77(1): 427-432.
- [9] WELNA M, SZYMCZYCHA-MADEJA A, Pohl P. Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2015, 65: 122-136.
- [10] 叶嘉荣,罗晓茵,郭新东,等.微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定畜禽肉中的硼和铝[J].现代食品科技,2012,28(8):1 084-1 087.
- [11] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.11—2014 食品中总砷及无机砷的测定[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录36-37.
- [13] 付洋,张良慧,江慎华,等.超声-微波协同提取荷叶总黄酮工艺优化及其提取效果分析[J].现代工业科技,2015,36(18):261-266.