

HPLC-ICP-MS 测定奶制品中六种形态砷

ICPMS-072

摘要：参考 GB 5009.11-2014《食品安全国家标准食品中总砷及无机砷的测定》，以及 SN/T 3933-2014《出口食品中砷形态的测定方法高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱》标准，建立了一种测定牛奶中形态砷的高效液相色谱电感耦合等离子体质谱法（HPLC-ICP-MS）。实验结果表明，六种形态砷的方法检出限介于 1.60~2.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，线性范围为 1~50 ng/mL ，相关系数大于 0.9996，加标回收率介于 100.8%~109.0%。该方法灵敏度高，检出限低，适用于牛奶中形态砷的分析。

关键词：形态砷 牛奶 食品安全 HPLC-ICP-MS

砷是一种常见的有毒致癌性元素，在自然界中以多种化合物形态存在，其生物毒性不仅与其含量有关，还取决于其存在化合物形态。常见的砷形态有：亚砷酸（As（III））、砷酸（As（V））、一甲基砷酸（MMA）、二甲基砷酸（DMA）、砷甜菜碱（AsB）和砷胆碱（AsC）等。无机砷（As（III））毒性最大，甲基化砷的毒性较小，而砷甜菜碱和砷胆碱普遍认为是无毒的。由于不同形态的砷化合物毒性差异很大，且各形态的砷随着所处环境的不同处于动态互变之中，所以常规分析中砷的总量测定，不能给出砷的相关毒性确切信息。为正确评估砷对人体健康的危害，砷的存在形态，尤其是在食品中的形态日益受到关注。

形态砷分析主要采用液相色谱与电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）、原子荧光（AFS）、原子吸收（AAS）等联用技术。由于电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）具有灵敏度高、检出限低、线性范围宽等优点，HPLC-ICP-MS 成为形态砷分析最具有应用前景的联用方法，已广泛应用于元素形态学研究。

本文参考 GB 5009.11-2014《食品安全国家标准食品中总砷及无机砷的测定》和 SN/T3933-2014《出口食品中砷形态的测定方法高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法》标准，采用岛津高效液相色谱 LC-20Ai 与电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 联用对牛奶进行砷形态分析。

实验部分

1.1 对照品

砷胆碱、砷甜菜碱、砷酸、亚砷酸、一甲基砷、二甲基砷购于国家标准物质中心。

1.2 实验检材

市售牛奶

1.3 仪器

岛津高效液相色谱仪 LC-20Ai 与电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 联用系统；AY-120 电子天平（日本岛津公司）；Vortex-5 微型涡旋混合仪（中国其林贝尔公司）；Allegra 64R 低温高速离心机（美国 Beckman 公司）；Advantage A10 超纯水仪（瑞士 Milli-Q 公司）。

1.4 试剂

甲醇、正己烷及硝酸购自德国 Merck 公司；实验用水由 Milli-Q 水净化系统经去离子与二次净化制得；碳酸铵及其他试剂购自国药集团。

方法和结果

2.1 对照品溶液配制

用 1% 的稀硝酸配制 As(III)、As(V)、MMA、DMA、AsC 和 AsB 的混合标准溶液，浓度分别为 0.0、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0 及 50.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

2.2 样品的处理方法

称取 1.0 g (精确到 0.0001 g) 于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 0.15 mol/L 硝酸溶液, 放置过夜。于 90°C 恒温箱中热浸提 2.5 h, 每 0.5 小时振摇 1 min, 提取完毕, 取出冷却至室温, 8000 r/min 离心 15 min。

取 5 mL 上清液置于离心管中, 加入 5 mL 正己烷, 振摇 1 min, 8000 r/min 离心 15 min, 弃去上层正己烷。按此操作重复一次, 吸取下层清液, 经 0.45 μm 有机滤膜过滤及 C₁₈ 小柱净化后进行分析。按相同的方法制作空白样品和加标样品。

2.3 色谱条件

色谱柱: Dionex IonPac™ AS19 4×250 mm

柱温: 30 °C

流动相: A-0.1% 的甲醇水溶液 B-50 mM 碳酸铵

进样量: 20 μL

水溶液

洗针液: 10% 甲醇水溶液

流速: 1.0 mL/min

洗脱程序: 梯度洗脱

表1 梯度程序

Time	Module	Action	Value
0.00	Pump	B Conc.	0
1.00	Pump	B Conc.	0
11.00	Pump	B Conc.	100
11.10	Pump	B Conc.	0
20.00	Controller		Stop

2.4 质谱条件

等离子体参数:

高频功率: 1.2 kW

雾室温度: 5°C

辅助气流速: 1.1 L/min

高频频率: 27.12 MHz

炬管类型: Mini

碰撞池参数:

雾化室: 旋流

碰撞气种类: He

采样深度: 5.0 mm

池电压: -21 V

等离子体气流速: 8.0 L/min

碰撞气流速: 6.0 mL/min

载气流速: 0.7 L/min

能量过滤器电压: 7.0 V

雾化器类型: 同心

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察

对空白进行进行考察, 排除系统干扰, 并且考察四种有毒形态砷的分离度以及有毒形态砷和无毒形态砷之间的分离度, 以确保实际样品分析过程中不造成假阳性检出。结果表明, 两种无毒砷 (砷甜菜碱和砷胆碱) 的分离度大于 1, 四种有毒砷 (亚砷酸、二甲基砷酸、一甲基砷酸和砷酸) 的分离度大于 1.8, 有毒砷和无毒砷能够彻底分离, 不存在假阳性检出。六种形态砷的分离色谱图如图 1 所示:

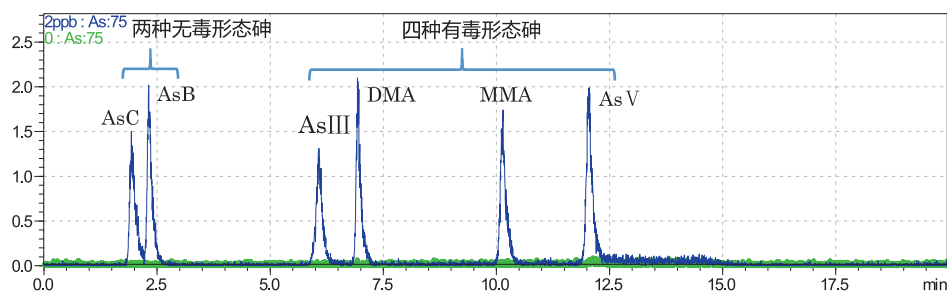


图1 六种形态砷典型色谱图

2.5.2 线性关系考察

依次分析标准曲线浓度点，记录各形态成分的峰面积，以浓度（浓度均以 As 计）与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线，结果如下所示：

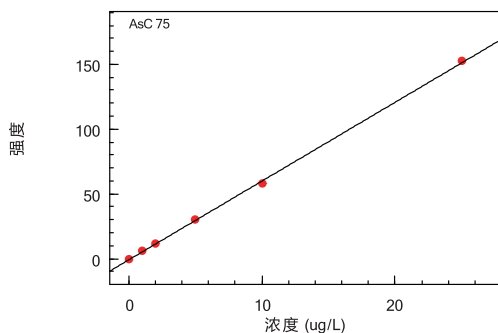


图2 砷胆碱(AsC)标准曲线 $r=0.99985$

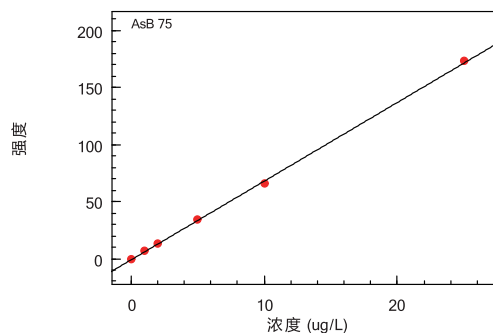


图3 砷甜菜碱(AsB)标准曲线 $r=0.99976$

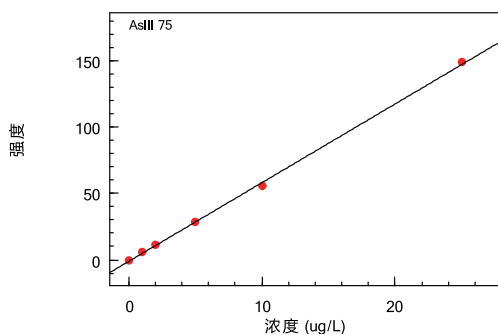


图4 亚砷酸(AsIII)标准曲线 $r=0.99968$

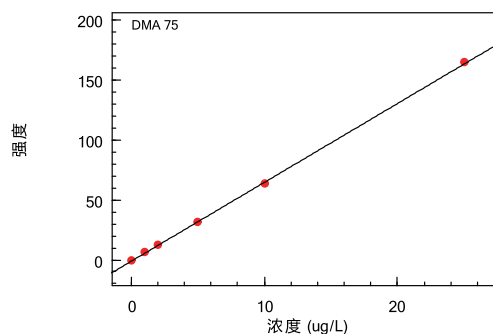


图5 二甲基砷(DMA)标准曲线 $r=0.99988$

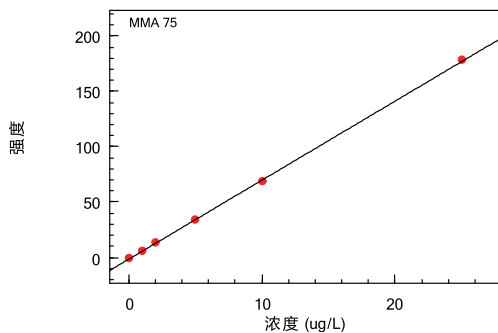


图6 一甲基砷(MMA)标准曲线 $r=0.99990$

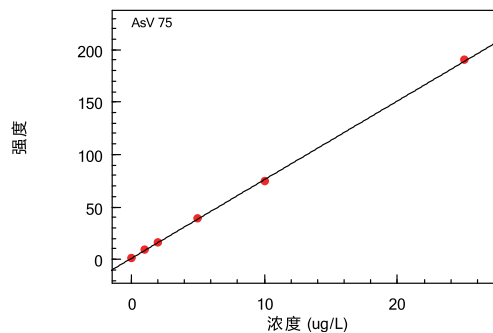


图7 砷酸(As V)标准曲线 $r=0.99992$

2.5.3 检出限考察

对浓度为 1 ng/mL 样品溶液考察六种形态砷的信噪比，折算信噪比 $S/N=3$ 时检出限以及 $S/N=10$ 定量限，六种形态砷的方法检出限为 1.60~2.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，方法定量限为 5.5~8.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果如下：

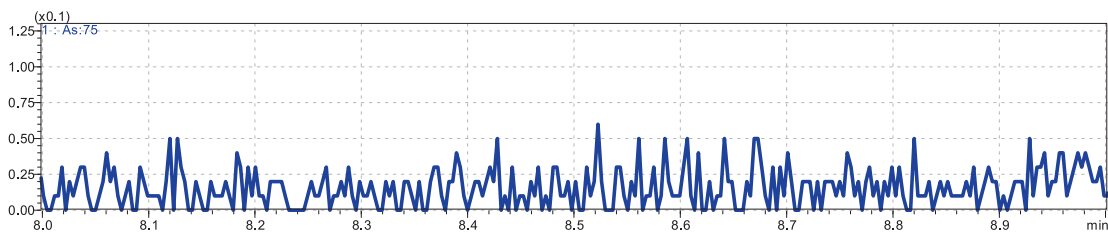


图8 基线考察

表2 灵敏度考察结果

名称	仪器检出限 (ng/mL)	方法检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	仪器定量限 (ng/mL)	方法定量限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
砷胆碱(AsC)	0.23	2.3	0.75	7.5
砷甜菜碱(AsB)	0.17	1.7	0.57	5.7
亚砷酸(AsIII)	0.24	2.4	0.80	8.0
二甲基砷(DMA)	0.18	1.8	0.60	6.0
一甲基砷(MMA)	0.23	2.3	0.75	7.5
砷酸(AsV)	0.16	1.6	0.55	5.5

2.5.4 样品测试结果及回收率考察

对牛奶平行样品进行检测，六种形态砷均未检出。对牛奶样品进行加标回收试验，分别加入 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ （低浓度）和 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ （高浓度）六种形态砷的混标，低浓度加标回收率介于 103.8%~108.0%，高浓度加标回收率介于 100.8%~109.0%。实验结果见表 3：

表3 牛奶测试结果及回收率(%)

名称	测定结果 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	低浓度加标量 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	低浓度加标 回收率(%)	高浓度加标量 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	高浓度加标 回收率 (%)
砷胆碱(AsC)	N.D	1.0	104.2	10.0	107.1
砷甜菜碱(AsB)	N.D	1.0	104.7	10.0	109.0
亚砷酸(AsIII)	N.D	1.0	106.0	10.0	104.7
二甲基砷(DMA)	N.D	1.0	108.0	10.0	100.8
一甲基砷(MMA)	N.D	1.0	105.2	10.0	105.4
砷酸(AsV)	N.D	1.0	103.8	10.0	100.8

N.D: 未检出

结论

参考 GB 5009.11-2014《食品安全国家标准食品中总砷及无机砷的测定》，以及 SN/T3933-2014《出口食品中砷形态的测定方法高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法》标准，优化了 LC 的分离条件和 ICP-MS 测定条件，建立了六种形态砷的 HPLC-ICPMS 联用分离检测方法。该方法灵敏度高，方法检出限低，适用于牛奶中六种形态砷的分析。