

实验技术与方法

微波萃取-液相色谱-电感耦合等离子体质谱法同时测定婴幼儿米粉中5种砷形态的研究

王文华^{1,2},刘通²,许秀丽²,杨庆利¹,侯秀丹¹,国伟²,张峰²

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109;

2. 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所, 北京 100176)

摘要:目的 建立一种基于微波萃取的前处理方法,结合液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(LC-ICPMS),准确测定婴幼儿米粉中砷甜菜碱(AsB)、亚砷酸根[As(III)]、二甲基砷酸(DMA)、一甲基砷酸(MMA)和砷酸根[As(V)] 5种砷形态的方法。方法 婴幼儿米粉样品采用1% HNO₃作为提取溶液,在90℃条件下微波萃取60 min,提取液离心过膜后,用LC-ICPMS方法进行定量分析。结果 建立的5种砷形态分析方法在0.1~50 μg/L范围内线性良好,决定系数 $R^2 > 0.9999$,加标回收率在95.20%~102.00%之间,日内日间精密度均小于5%,方法检出限为0.006~0.012 mg/kg。结论 该方法微波萃取前处理方法简单快速,定量分析灵敏准确,适用于婴幼儿米粉样品中砷形态的测定。

关键词:砷形态分析;微波萃取;液相色谱-电感耦合等离子体质谱法;婴幼儿米粉

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)02-0275-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.02.013

Simultaneous determination of five arsenic species in infant rice flour by microwave extraction-liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

WANG Wenhua^{1,2}, LIU Tong², XU Xiuli², YANG Qingli¹, HOU Xiudan¹, GUO Wei², ZHANG Feng²

(1. School of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Shandong Qingdao

266109, China; 2. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine,

Beijing 100176, China)

Abstract: Objective A pretreatment method based on microwave extraction combined with liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICPMS) was established to accurately determine the five arsenic speciations of arsenobetaine (AsB), arsenite (As(III)), dimethyl arsenate (DMA), monomethyl arsenate (MMA) and arsenate (As(V)) in infant rice flour. **Methods** The samples of infant rice flour were extracted with 1% HNO₃ and microwave extraction at 90 °C for 60 min, centrifuged through the membrane, and the extract was analyzed quantitatively by LC-ICPMS. **Results** The established method showed good linear relationships in the range of 0.1-50 μg/L with the coefficient of determination $R^2 > 0.9999$ for the five arsenic species. The recoveries at different spiked levels were 95.20%–102.00%, and the intra day and inter day precision was less than 5%. The limits of detection of the method were 0.006–0.012 mg/kg. **Conclusion** The microwave extraction pretreatment method was simple and fast, and the quantitative analysis was sensitive and accurate, which was suitable for the determination of arsenic species in infant rice flour samples.

Key words: Arsenic speciation analysis; microwave extraction; liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry; infant rice flour

砷(Arsenic, As)是土壤、水、植物和生物体中普遍存在的有毒元素,以其存在的化学形式分为有机

砷和无机砷^[1]。有机砷主要包含砷甜菜碱(Arsenobetaine, AsB)、一甲基砷酸(Monomethyl arsenate, MMA)和二甲基砷酸(Dimethyl arsenate, DMA),其中,AsB被认为是没有毒性的,MMA和DMA被认为是潜在的致癌物质^[2]。无机砷包括亚砷酸根[Arsenite, As(III)]和砷酸根[Arsenate, As(V)],其毒性远大于有机砷,被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)

收稿日期:2021-12-22

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFC1606500)

作者简介:王文华 女 硕士生 研究方向为食品安全

Email: 940698529@qq.com

通信作者:张峰 男 研究员 研究方向为食品安全

Email: fengzhang@126.com

列为 I 级致癌物质^[3-4]。联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)规定的无机砷每周耐受摄入量为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ ^[5]。

婴幼儿米粉是以大米为主要成分,加入鱼油、维生素、微量元素、益生菌等营养物质和果蔬类选择性配料,科学配方配料加工制作而成。作为辅助食品,米粉是婴幼儿获取营养素的重要途径,但也是摄入砷健康风险的主要来源,可能对婴幼儿健康构成风险。我国《食品安全国家标准 食品中污染物限量》(GB 2762—2017)^[6]规定了婴幼儿谷类辅助食品中无机砷的限量为 0.2 mg/kg,但是针对婴幼儿米粉中砷形态分析的文献较少,考虑到婴幼儿免疫力较弱^[5],有必要对婴幼儿米粉中的砷形态进行监测和分析。

目前食品中砷形态分析广泛使用热浸提的前处理方法,该方法程序繁琐、耗时长^[2,4]。微波萃取法具有萃取速度快,反应条件稳定等优点^[7],本研究基于微波萃取的前处理方法,结合液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, LC-ICPMS),建立了婴幼儿米粉中 5 种砷形态分析的方法,并应用于实际样品检测,以期对婴幼儿米粉的食品安全风险评估提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

NexION 2000 ICP-MS、Flexar LC(美国珀金埃尔默公司),Mars 6 高通量密闭高压微波萃取仪(美国 CEM 公司),Milli-Q 纯水处理系统(美国 Millipo 公司),Allegra X-22 多功能台式高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司)。

超级纯硝酸(Merck 公司),分析纯磷酸(Macklin 公司),氨水(Acros 公司),超纯水(电阻率 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$),AsB、As(V)、DMA、MMA 混合溶液标准物质(中国计量科学研究院,GBW(E)082204),As(III)标准溶液(ALADDIN 公司,1.011 $\mu\text{mol}/\text{g}$),大米粉成分分析标准物质(中国计量科学研究院,GBW(E)100353)。

1.2 测定条件

1.2.1 ICP-MS测定条件

仪器:PerkinElmer NexION 2000,RF 功率:1 600 W;采样深度:6.80 mm;冷却气流速:17 L/min;辅助气流速:1.35 L/min;雾化气流速:0.94 L/min;碰撞气选用氦气,流量为 100 mL/min。

1.2.2 LC测定条件

仪器:PerkinElmer Flexar,色谱柱:Hamilton PRP-X100 阴离子分析柱(5 μm ,4.6 \times 150 mm);流动相 A:超纯水,流动相 B:10 mmol/L NH_4NO_3 +10 mmol/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (pH=8.5);梯度洗脱程序:0~2 min:80%A,20%B \rightarrow 2~2.5 min:100%B \rightarrow 2.5~10 min:100%B \rightarrow 10~10.5 min:100%B \rightarrow 10.5~16 min:80%A,20%B;流动相流速:1 mL/min,进样量:100 μL 。

1.2.3 标准溶液制备

以体积分数 1% HNO_3 硝酸作为空白,分别利用上述标准物质配成以下浓度的混合标准溶液:0.1、0.5、1、5、10、20、50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

1.3 样品前处理

取 200 mg 样品于萃取罐中,加入 12 mL 1% HNO_3 提取液,90 $^\circ\text{C}$ 微波萃取 60 min 提取砷目标物,提取完毕后冷却至室温,于 4 $^\circ\text{C}$ 下 10 000 r/min 离心 10 min,将上清液过 0.45 μm 水系滤膜后上机,同时按以上步骤做空白实验。

1.4 统计学分析

试验数据使用 Microsoft Office Excel 2019 统计分析软件对目标物进行分析,图表使用 Origin 2018 软件制成。

2 结果

2.1 微波萃取提取溶液的优化

本研究采用微波萃取作为砷形态分析的样品前处理方法,相比传统的热浸提法,具有萃取速度快、操作简单等优点。因婴幼儿米粉是以大米为主要原料,故采用大米粉成分分析标准物质[CRMGBW(E)100353]作为样品进行微波萃取条件的优化。相关研究报道^[8],用于砷形态分析的提取溶液主要有水、稀硝酸和乙酸-水溶液等。本实验重点考察了水、1% HNO_3 和乙酸-水溶液[1:19(V/V)]三种提取溶液的提取效果,结果见表 1。大米粉标准物质中砷的存在形式主要是 As(III)、DMA 和 As(V)。当采用水、乙酸-水溶液作为提取液时,大米粉标准物质中总砷的提取效率较低(83.33%),且难以提取出 As(V),而 1% HNO_3 溶液作为提取液时提取效率最高(94.44%),且能有效提取出 As(III)、DMA 和 As(V),因此选取 1% HNO_3 溶液作为提取溶液进行后续研究。

2.2 硝酸浓度的优化

考虑到硝酸浓度会对提取产生一定的影响^[9],本实验考察了三个浓度水平(0.5%、1.0%、2.0%)的 HNO_3 溶液对微波萃取效率的影响。结果表明(表 2),浓度为 0.5% 的 HNO_3 作为提取液时,提取效

表1 微波萃取法不同提取溶液的提取效果($n=3$)Table 1 Extraction efficiency of As species from different extracts by microwave extraction ($n=3$)

提取液	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	sAs	提取效率/%
水	ND	0.12	0.03	ND	ND	0.15	83.33
1% HNO ₃	ND	0.11	0.03	ND	0.03	0.17	94.44
乙酸-水溶液[1:19(V/V)]	ND	0.12	0.03	ND	ND	0.15	83.33

注:sAs:砷提取物总数

表2 不同HNO₃浓度对砷形态的提取效果($n=3$)Table 2 Extraction efficiency of As species by different HNO₃ concentrations ($n=3$)

提取液浓度	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	sAs	As提取效率/%
0.5% HNO ₃	ND	0.10	0.02	ND	0.04	0.16	88.89
1.0% HNO ₃	ND	0.11	0.03	ND	0.03	0.17	94.44
2.0% HNO ₃	ND	0.12	0.02	ND	0.03	0.17	94.44

率较其余两浓度低,而浓度为1%和2%的HNO₃作为提取液时,砷的提取效率相对稳定,这与文献[10]报道的结果相符,出于绿色分析方面的考虑,为减少高酸度对环境的危害,选取1% HNO₃作为微波萃取的提取溶液。

2.3 微波萃取条件的优化

萃取温度和时间是微波萃取的两个关键参数^[7]。萃取温度过低,难以有效地将砷提取出来,而温度过高,将会引起砷形态间的转化。MA等^[11]研究发现,90℃微波萃取能最大程度提取出更多的砷形态,且能避免温度过高引起的砷形态间转化,因此,本实验采用90℃微波萃取条件,对不同萃取时间(30、60、90、120 min)进行了考察。结果如表3所示,当萃取时间过短(30 min)时,As(V)未被检测出,这可能是由于提取尚未完全;在提取时间为60 min时,砷形态的提取效率达到最高,继续增加萃取时间并不能有效提升提取效率。因此本实验最终选取1% HNO₃、90℃微波条件下萃取60 min为样品中砷形态的前处理方法。

表3 不同提取时间对砷形态的提取效果($n=3$)Table 3 Extraction efficiency of As species by different extraction time ($n=3$)

提取时间/min	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	sAs	As提取效率/%
30	ND	0.14	0.02	ND	ND	0.16	88.89
60	ND	0.11	0.03	ND	0.03	0.17	94.44
90	ND	0.12	0.03	ND	0.01	0.16	88.89
120	ND	0.12	0.02	ND	0.01	0.15	83.33

2.4 液相色谱流动相的选择

在不同砷形态的阴离子交换色谱中,目标物的保留时间受到诸多因素的应用,如色谱柱的类型、竞争离子的存在、流动相的pH值等^[12]。本实验中选择PRP-X100阴离子分析柱是基于其具有较强的

稳定性,且广泛应用于砷的形态分析^[2,13]。为了优化砷的色谱分离行为,以水为流动相A,试验考察了以10 mmol/L的(NH₄)₃PO₄、(NH₄)₂HPO₄、NH₄H₂PO₄分别与10 mmol/L NH₄NO₃混合作为流动相B时的色谱分析效果。图1展示了在三种不同流动相B的条件下五种砷形态(10 μg/L混合标准溶液)的分离情况。三种流动相对不同砷形态的保留时间影响不大,出峰顺序相同。其中,当(NH₄)₂HPO₄作流动相B时,MMA目标峰出现分叉,而当NH₄H₂PO₄作流动相时,响应值相对(NH₄)₃PO₄较低,综合峰型和响应值大小,本实验最终选择(NH₄)₃PO₄与NH₄NO₃混合溶液作为流动相B。

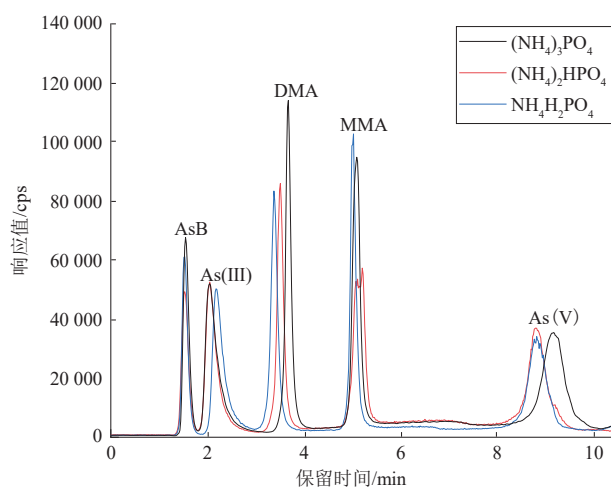


图1 不同流动相对砷分离效果的影响

Figure 1 Effect of different flow phase on arsenic separation

2.5 流动相B pH和浓度的优化

本实验还考察了流动相B在不同pH值(8.0、8.5、9.0)和浓度(5、10、20 mmol/L)条件下对砷形态分离的影响。实验结果如图2所示,当流动相pH=8.0时,虽然整体的分离时间较短,但AsB与As(III)的峰存在重叠现象,没有完全分开;当流动相的pH>8.5时,AsB与As(III)可完全分离,但是随着pH值增大(pH=9.0),质谱响应降低。因此选择流动相的最佳pH值为8.5。

当流动相B的浓度为5 mmol/L时,AsB与As(III)不能完全分离。当流动相浓度增加为10 mmol/L和20 mmol/L时,砷的5种形态都能够实现完全分离。但是随着流动相浓度增大,色谱分离时间变长。在达到完全分离的情况下,本实验最终选择分离时间相对

较短的 10 mmol/L 作为的流动相 B 的浓度。在最优的流动相条件下[流动相 A:水;流动相 B:10 mmol/L (NH₄)₃PO₄与 10 mmol/L NH₄NO₃混合溶液(pH=8.5)],

混合标准溶液中砷形态的色谱图如图 3 所示,可以在 10 min 内实现 5 种砷形态的完全分离。

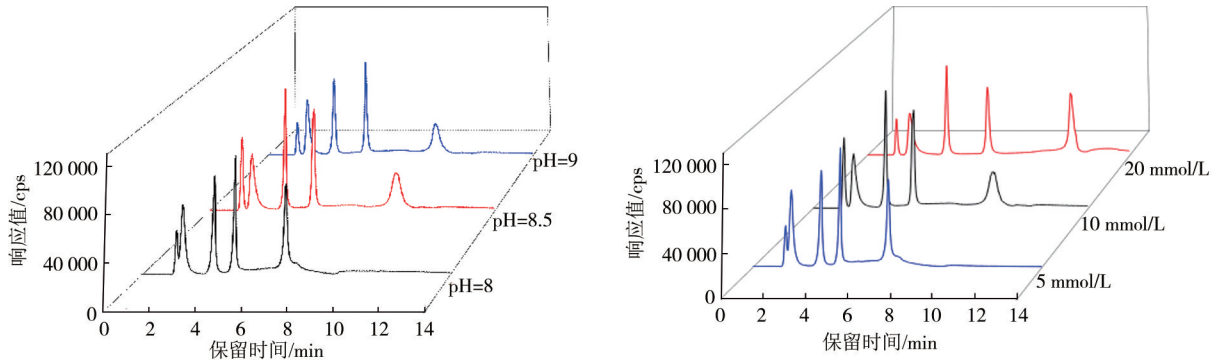


图2 不同 pH 和流动相浓度对砷分离效果的影响

Figure 2 Effects of different pH and mobile phase concentration on arsenic separation

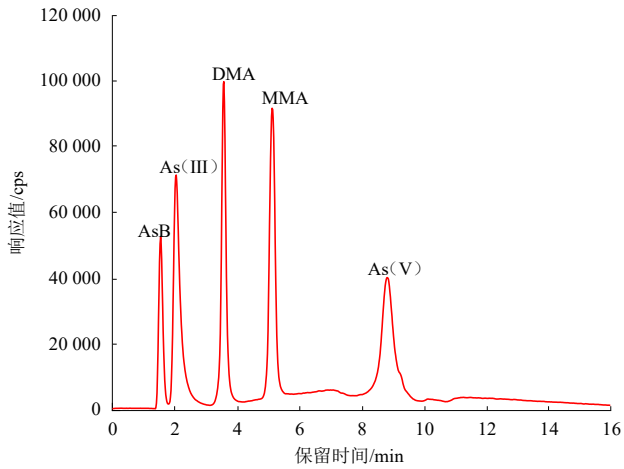


图3 优化条件下的5种砷形态混合标准溶液色谱图(10 μg/L)

Figure 3 Chromatograms of five arsenic forms mixed standard solutions under optimized conditions (10 μg/L)

2.6 方法的线性范围和检出限

配制质量浓度分别为 0.1、0.5、1、5、10、20、50 μg/L 的混标,在“1.2 测定条件”下,对 5 种砷标准溶液进行分析,以峰面积为纵坐标,以浓度为横坐标绘制标准工作曲线。以 3 倍信噪比计算检出

限。5 种砷形态在 0.1~50 μg/L 范围内线性关系良好,决定系数 R² 均大于 0.999 9。相关性、仪器检出限见表 4,当称样量为 200 mg,定容体积为 12 mL 时,方法检出限见表 4。

2.7 方法的重复性及加标回收率

选择目标含量较高的一份样品,加标 10 μg/L 制备 6 份平行样品,采用优化后的测定方法测定 5 种砷形态的含量,计算其回收率和 RSD,结果如表 5 所示,5 种砷形态的加标回收率在 95.20%~102.00% 之间,RSD 值均 <5%,说明该方法具有较好的精密度。

2.8 实际样品的测定

按本实验所建方法提取样品,在最佳条件下对北京市售 8 种婴幼儿米粉中 5 种砷形态进行测定,结果见表 6。结果表明婴幼儿米粉中的砷形态主要以无机砷[As(III)和 As(V)之和]和 DMA 为主,含有少量的 AsB。其中 2 号样品 DMA 的含量较其他样品偏高,可能是因为婴幼儿米粉中含鱼油等辅料造成检测结果偏高,但所有样品中无机砷的含量均

表4 方法线性范围和检出限

Table 4 Linear range and detection limits of the method

砷形态	线性范围/(μg/L)	线性方程	决定系数 R ²	仪器检出限/(μg/L)	方法检出限/(mg/kg)
AsB	0.1~50	Y=4.77e ⁴ X-6.01e ²	0.999 939	0.1	0.006
As(III)	0.1~50	Y=8.78e ⁴ X-7.45e ³	0.999 965	0.1	0.006
DMA	0.1~50	Y=8.65e ⁴ X-1.95e ⁴	0.999 926	0.1	0.006
MMA	0.1~50	Y=8.91e ⁴ X+3.89e ⁴	0.999 987	0.1	0.006
As(V)	0.1~50	Y=7.91e ⁴ X+9.65e ⁴	0.999 939	0.2	0.012

表5 回收率和精密度结果

Table 5 Recovery and precision results

砷形态	本底/(μg/L)	加标量/(μg/L)	测定值/(μg/L)	回收率/(n=6)	日内 RSDs/(n=6)	日间 RSDs/(n=6)
AsB	0.31	10	10.51	102.00%	0.14	1.28
As(III)	0.58	10	10.53	99.50%	0.45	2.11
DMA	0.23	10	9.74	95.10%	0.13	2.35
MMA	ND	10	10.02	100.20%	0.84	3.09
As(V)	0.68	10	10.20	95.20%	0.32	2.88

未超过食品中污染物限量标准,故样品中无机砷的指标是安全的。部分样品色谱图见图4。

表6 市售8种婴幼儿米粉中砷形态检测结果及无机砷含量($n=3$)

Table 6 Arsenic speciation and inorganic arsenic content in 8 kinds of infant rice flour sold in the market ($n=3$)

样品名称	AsB/(mg/kg)	As(III)/(mg/kg)	DMA/(mg/kg)	MMA/(mg/kg)	As(V)/(mg/kg)	无机砷/(mg/kg)
1号样品	0.01	0.03	0.11	ND	0.04	0.07
2号样品	0.01	0.05	1.99	ND	0.03	0.08
3号样品	0.01	0.04	0.18	ND	0.05	0.09
4号样品	0.01	0.04	0.15	ND	0.04	0.08
5号样品	0.09	0.08	0.03	ND	0.02	0.10
6号样品	0.09	0.04	0.03	ND	0.03	0.07
7号样品	0.10	0.05	0.03	ND	0.03	0.08
8号样品	0.01	0.06	0.03	ND	0.02	0.08

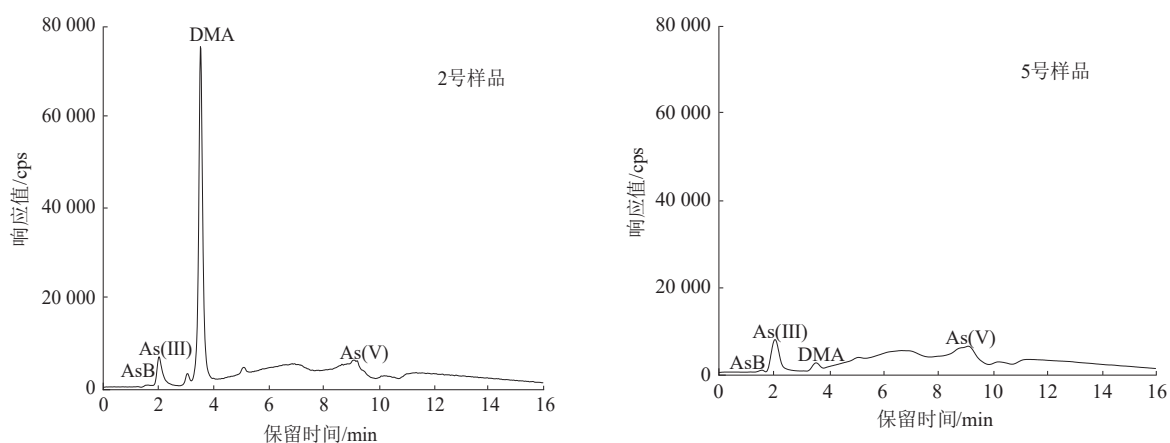


图4 部分实际样品色谱图

Figure 4 Chromatogram of some actual samples

3 结论

本研究通过优化微波萃取条件和液相色谱条件,建立了一种基于微波萃取前处理方法,结合液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(LC-ICPMS),准确测定婴幼儿米粉中砷甜菜碱(AsB)、亚砷酸根(As(III))、二甲基砷酸(DMA)、一甲基砷酸(MMA)和砷酸根(As(V))5种砷形态的方法。该方法能够实现在60 min内实现对样品中砷形态的快速提取。该方法前处理方法简便快速,具有良好的准确性和较高的精密度,适用于婴幼儿米粉中砷形态的快速测定。本方法的建立为婴幼儿米粉中砷形态的快速准确定量分析及质量评价提供了重要的技术支持。

参考文献

- [1] JIA Y Y, WANG L, MA L, et al. Speciation analysis of six arsenic species in marketed shellfish: Extraction optimization and health risk assessment [J]. Food Chemistry, 2018, 244: 311-316.
- [2] 李凤标, 郑巨瑞, 周柳金, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定婴幼儿谷类辅助食品中无机砷及其他砷形态[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(20): 7001-7005.
LI F B, ZHENG J R, ZHOU R J, et al. Determination of inorganic arsenic and other arsenic species in infant cereals by high performance liquid chromatography-inductively coupled

plasma mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(20): 7001-7005.

- [3] PARK M K, CHOI M, KIM L, et al. An improved rapid analytical method for the arsenic speciation analysis of marine environmental samples using high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2019, 191(8): 525.
- [4] 杨艳, 陈宏靖, 李鑫, 等. 婴幼儿谷类辅助食品中砷形态分析[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(1): 136-139.
YANG Y, CHEN H J, LI X, et al. Detection of arsenic species in cereal-based complementary food for infants and young children [J]. Chinese Journal of Public Health, 2018, 34(1): 136-139.
- [5] 廖文, 吴焯, 汪光, 等. 广州市居民食品砷摄入的健康风险评估[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 272-280.
LIAO W, WU Y, WANG G, et al. Human health risk assessment on residents' arsenic ingestion through food in guangzhou city [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(5): 272-280.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中污染物限量: GB2762—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
The State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, the State Food and Drug Administration. National Standard for Food Safety Limits of contaminants in food: GB2762—2017 [S]. Beijing: Standards

- Press of China, 2017.
- [7] LIU T, HE L, VALIENTEET M, et al. Fast determination of bioactive phytic acid and pyrophosphate in walnuts using microwave accelerated extraction [J]. Food Chemistry, 2017, 221: 771-775.
- [8] SCHMIDT L, LANDERO J A, NOVO D R, et al. A feasible method for As speciation in several types of seafood by LC-ICP-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2018, 255: 340-347.
- [9] 巩佳第, 曹晓林, 曹赵云, 等. 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定稻米中的5种砷形态[J]. 色谱, 2014, 32(7): 717-722.
GONG J D, CAO X L, CAO Z Y, et al. Determination of five arsenic species in rice by liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32(7): 717-722.
- [10] 侯艳霞, 刘丽萍, 潘浩, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱分析大米中砷形态化合物[J]. 分析试验室, 2013, 32(10): 103-107.
HOU Y X, LIU L P, PAN H, et al. Analysis of arsenic speciation compounds in rice by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2013, 32(10): 103-107.
- [11] MA L, YANG Z G, KONG Q, et al. Extraction and determination of arsenic species in leafy vegetables: Method development and application [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 524-530.
- [12] ARDINI F, DAN G, GROTTI M. Arsenic speciation analysis of environmental samples [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2020, 35(2): 215-237.
- [13] 陈镇, 刘丽萍, 陈绍占. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定蚝油类调味品中5种砷形态[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(2): 149-154.
CHEN Z, LIU L P, CHEN S Z. Determination of five arsenic species in oyster sauce condiments by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectroscopy [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(2): 149-154.