

- chromatography to the analysis of algal toxins in the aquatic environment [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 992(1):159-168.
- [6] Lehane M, Sáez M, Magdalena A, et al. Liquid chromatography-multiple tandem mass spectrometry for the determination of ten azaspiracids, including hydroxyl analogues in shellfish [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1024(1):63-70.
- [7] Regueiro J, Araceli E R, Gonzalo A, et al. Automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish [J]. *Food Chemistry*, 2011(129):533-540.
- [8] Gerssen A, Mulder P J, McElhinney M A, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline condition [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(9):1421.
- [9] 黄聪, 李晓晶, 彭荣飞, 等. 固相萃取-液相色谱-串联质谱检测贝类产品中7种脂溶性贝类毒素 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(5):1075-1077.
- [10] 母清林, 方杰, 万汉兴, 等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中腹泻性贝类毒素 [J]. *分析化学*, 2011, 39(1):111-114.
- [11] 姚建华, 谭志军, 周德庆. 液相色谱-串联质谱检测贝类组织中5种脂溶性贝类毒素 [J]. *分析化学*, 2010, 38(12):1714-1720.
- [12] 郭萌萌, 谭志军, 吴海燕, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定贝类中大田软海绵酸、鳍藻毒素、蛤毒素和虾夷扇贝毒素 [J]. *色谱*, 2012, 30(3):256-261.

实验技术与方法

程序控温石墨消解/微波灰化-氢化物发生-原子荧光光谱法 测定食用海藻中总砷

张妮娜, 刘丽萍, 陈绍占

(北京市疾病预防控制中心, 北京 100013)

摘要:目的 建立采用程序控温石墨消解/微波灰化-氢化物发生-原子荧光光谱法分析测定食用海藻中总砷的方法。方法 样品加入 5 ml HNO₃, 190 °C 程序控温石墨预消解 30 min; 加入灰化辅助剂硝酸镁, 550 °C 微波灰化 5 min, 用 HCl 溶解灰分, 采用氢化物发生-原子荧光光谱法 (HG-AFS) 测定总砷含量。结果 方法检出限为 0.42 μg/L, RSD < 5.0%, 加标回收率为 96% ~ 109%。测定程序控温石墨消解/微波灰化后消解液中砷形态, 确认食用海藻中 99% 以上的有机砷均消解为无机砷。本方法测定了海带 (GBW08517) 和紫菜 (GBW10023) 标准物质, 分析结果均在标准值范围内。结论 本方法重现性好、结果准确可靠, 适用于食用海藻中总砷的测定。

关键词:程序控温石墨消解/微波灰化-氢化物发生-原子荧光光谱法; 原子荧光光谱法; 砷; 海藻; 食品安全; 食品污染物

中图分类号: R155; O614 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)06-0629-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.06.006

Determination of total arsenic in alga by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry with program temperature graphite digestion/microwave ashing for sample preparation

ZHANG Ni-na, LIU Li-ping, CHEN Shao-zhan

(Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective A hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) method with program temperature graphite digestion/microwave ashing for sample preparation was developed for the determination of total arsenic in alga.

Methods The alga, into which 5 ml HNO₃ was added, was heated at 190 °C for 30 min with program temperature graphite digestion, then ashed at 550 °C for 5 min with microwave using magnesium nitrate as ashing auxiliary agent. The ashes were dissolved with hydrochloric acid and total arsenic was determined by HG-AFS. **Results** The detection limit was 0.42 μg/L, and the RSD was less than 5%. The recoveries were between 96% and 109%. The arsenic forms were detected in digested alga by program temperature graphite digestion/microwave ashing, the results confirmed that more than

收稿日期: 2015-03-30

作者简介: 张妮娜 女 主管检验师 研究方向为元素的光谱和质谱分析 E-mail: znnms@sina.com

通讯作者: 刘丽萍 女 主任技师 研究方向为光谱和质谱分析 E-mail: liulp@bjcdc.org

99% of organic arsenic in alga had been digested into inorganic arsenic. The method was applied to determine the total arsenic in two certified reference materials of *Laminaria japonica* (GBW08517) and laver (GBW10023), and the analysis results were all in the reference range. **Conclusion** The method had good accuracy and precision, and was suitable for the determination of total arsenic in alga.

Key words: Program temperature graphite digestion/microwave ashing-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry; atomic fluorescence spectroscopy; total arsenic; edible alga; food safety; food contaminant

砷及其化合物是食品安全领域的研究热点之一。砷以多种形态分布于自然界中,其毒性也取决于化学形态。无机砷的毒性最大,砷进入生物体内经过甲基化后毒性有所降低。总砷的测定方法很多,GB/T 5009.11—2003《食品中总砷和无机砷的测定》^[1]中包括氢化物-原子荧光光谱法(HG-AFS)、银盐法、砷斑法和硼氢化物还原比色法4种方法。由于HG-AFS法具有灵敏度高、选择性好、成本低廉等特点,成为实验室测定总砷普遍采用的方法。

由于海藻具有多孔网状的细胞壁结构,容易富集海水中的砷,海带对砷的富集率可达1万倍以上^[2],食用海藻中总砷含量相对较高,海带、紫菜、裙带菜和羊栖菜等食用海藻都是餐桌上的常见食品,所以测定食用海藻中总砷的含量十分有必要。在盲样考核和能力验证工作中,当采用原子荧光光谱法测定食用海藻中总砷时,常出现测定结果严重偏低的情况^[3,4],对质控样品海产品类标准物质的砷测定结果也远远低于标识值。食用海藻中砷形态多以大分子的砷糖(AsS)形式存在^[5,6],砷糖耐热性好,消解时不易分解^[7],由于HG-AFS法测定时需生成砷化氢,一般的前处理方法很难使砷糖完全消解为无机砷,导致测定结果偏低。因此选择适宜的样品前处理方法,是HG-AFS法准确测定食用海藻类样品中总砷的关键技术之一。GB/T 5009.11—2003中采用干灰化法和湿法消解食品样品,但这两种前处理方法在食用海藻类样品的前处理过程中均需把握一定的关键点,否则样品不易消解完全。针对实际工作存在的问题,本研究将程序控温石墨消解与微波灰化联合使用作为食用海藻中总砷的前处理方法,优化了石墨消解和微波灰化条件,很好的解决了样品消解不完全的问题,并采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)考察了经过前处理后食用海藻中有机砷的形态变化。本文所建立的程序控温石墨消解/微波灰化前处理法快速、简便、结果准确,能够使食用海藻中有机砷化合物完全转化为无机砷,适用于HG-AFS法测定食用海藻类样品中的总砷。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

HamiltonPRP-X100 阴离子交换柱(250 mm ×

4.1 mm, 10 μm)、HamiltonPRP-X100 预柱(20 mm × 4.1 mm, 10 μm)均购自瑞士 hamilton, Phoenix Airwave 微波灰化仪(美国 CEM), ST-60 程序控温石墨消解仪(北京普立泰科仪器有限公司), 9130 型原子荧光光谱仪、SA-20 形态分析仪均购自北京吉天仪器有限公司, 1260 型高效液相色谱仪、Agilent 7700 型电感耦合等离子体质谱仪均购自美国 Agilent, 数控超声波清洗器, 超纯水处理系统, 所用器皿均以 20% HNO₃ 浸泡 24 h 后用超纯水冲洗, 晾干备用。

砷单元素标准溶液[GBW(E)080117]、砷酸根(GBW08667)、亚砷酸根(GBW08666)、一甲基砷(GBW08668)、二甲基砷(GBW08669)均购于中国计量科学研究院, 海带(GBW08517)、紫菜(GBW10023)标准参考物质均购于中国计量科学研究院, 硫脲、抗坏血酸、盐酸、氢氧化钾、硼氢化钾、氧化镁、硝酸镁、硝酸均为优级纯, 试验用水均为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液配制

砷标准溶液系列:用5%硝酸逐级稀释0.1 μg/L 砷单元素标准溶液,配制成1、5、10、50、100、250、500 μg/L 的砷标准系列;砷形态混合标准溶液系列:将砷酸根、亚砷酸根、一甲基砷、二甲基砷逐级稀释,配制成5、10、20、40、80 μg/L(以As计)的混合标准溶液。

1.2.2 样品前处理

试验样品购自北京超市和农贸市场,海带、紫菜均为干制品,样品清洗干净后晾干至恒重,粉碎后密封置于干燥器中备用。

1.2.3 仪器条件

程序控温石墨消解程序:升温至190℃,震荡加热30 min;微波灰化升温程序:升温至150℃保持5 min,继续升至550℃保持5 min;AFS条件:灯电流50 mA,负高压300 V,载气流速600 ml/min,屏蔽气流速1 000 ml/min;砷形态分析仪器条件:HamiltonPRP-X100 阴离子交换柱(250 mm × 4.1 mm, 10 μm), HamiltonPRP-X100 预柱(20 mm × 4.1 mm, 10 μm), 流动相为15 mmol/L (NH₄)₂HPO₄ (以HAc调节至pH=6.0), 流速1.0 ml/min, 进样

体积 25 μl 。

ICP-MS 条件:射频入射功率 1 550 W,射频电压 1.8 V,高纯液氩为载气,载气流速 0.68 L/min,辅助气流速为 0.45 L/min,泵速 0.3 r/s,检测⁷⁵As。

1.2.4 样品灰化

石墨消解/微波灰化:称取 0.5 g 样品于消解管中,加入 5 ml HNO_3 ,按程序控温石墨消解程序预处理后,将溶液转移至 30 ml 瓷坩埚中,加入 5 ml 300 g/L $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$,置于电热板上 250 $^\circ\text{C}$ 加热至溶液近干;将坩埚转移至微波灰化仪内,按程序灰化,冷却后取出坩埚;用水润湿灰分,分批加入 9 ml HCl 溶解灰分,将溶解液转移到比色管中定容至 40 ml。

直接灰化法:称取 0.5 g 样品于 30 ml 瓷坩埚中,样品加少量水浸润,加入 10 ml 150 g/L $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$,混匀,在可调式电热板上低热蒸干;加入 1 g MgO 完整覆盖在样品干渣表面,于电热板上炭化至无黑烟;放入马弗炉中升温至 550 $^\circ\text{C}$,保持 4 h,冷却至室温取出;用 10 ml HCl(1:1, V:V) 溶解灰分,转移到比色管中,用硫酸(1:9, V:V) 分次涮洗坩埚并定容至 40 ml。

1.2.5 砷形态提取

称取 0.5 g 样品于 50 ml 离心管中,加入 20 ml 甲醇水溶液(1:1, V:V),置于 60 $^\circ\text{C}$ 水浴超声 3 h;取出样品后 4 $^\circ\text{C}$ 8 000 r/min 离心 10 min,将上清液过 0.22 μm 滤膜,取 0.5 ml 样品于 15 ml 离心管中,定容至 10 ml。

1.2.6 样品测定

吸取 0.5 ml 消化液至 10 ml 比色管中,纯水定容至 10 ml,加入 0.5 ml HCl、2 ml 硫脲-抗坏血酸,摇匀,室温放置 20 min,以 1% HCl 为载流、1% KBH_4 -0.5% KOH 为还原剂,193.75 nm 处测定样品中砷的荧光强度,空白和标准溶液也通过相同的处理方式进行测定。

2 结果与分析

2.1 石墨消解条件优化

食用海藻的粉质样品在灰化时极易发生爆燃,导致样品损失^[8],对食用海藻样品预消解可有效破坏食用海藻中长碳链,避免灰化阶段的样品损失,提高灰化效率。石墨消解仪采用石墨体三维立体式加热,并辅助振荡功能,可使样品受热均匀节约消化时间。消解试剂通常选择氧化性强酸,为避免过多试剂干扰,本文选择常用的硝酸为消解试剂。为使样品快速溶解,设定加热温度为 190 $^\circ\text{C}$,考察了硝酸用量和加热时间,试验表明,升温至 190 $^\circ\text{C}$,震荡加热 30 min 后样品可溶解完全,无残渣。

2.2 微波灰化条件优化

2.2.1 灰化温度和时间优化

影响灰化效果的关键因素是灰化温度的设定,本文试验了不同温度(400、450、500、550、600、650 $^\circ\text{C}$)下食用海藻的灰化效果,结果表明,温度 < 500 $^\circ\text{C}$ 时,样品灰化不完全,砷测定值随灰化温度升高而增加;温度在 500 ~ 600 $^\circ\text{C}$ 区间,测定值达到最大形成平台;当温度 > 600 $^\circ\text{C}$ 时,砷开始挥发损失,因此选择灰化温度为 550 $^\circ\text{C}$ 。进一步考察了灰化时间的影响,微波灰化利用微波的特性使样品各部分同时快速升温,因此能大幅缩短消化时间。由于食用海藻样品已经过石墨预消解为溶液,因此无需炭化,直接升温至 550 $^\circ\text{C}$ 灰化,保持时间分别设置为 1、5、10、15、20、25、30、35、40 min,结果表明,微波灰化升温达到 550 $^\circ\text{C}$ 保持 5 min 即可灰化完全,延长保持时间砷测定值不再增加,因此试验选择灰化温度为 550 $^\circ\text{C}$,保持加热 5 min。

2.2.2 灰化辅助剂影响

硝酸镁和氧化镁通常作为砷的灰化辅助剂。硝酸镁在高温下与砷生成难挥发的焦砷酸盐化合物,从而避免砷的高温挥发损失。氧化镁起到分散疏松作用,同时也能减小坩埚壁对砷的吸留。试验比较了加入 5 ml 300 g/L $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ + 1 g MgO、仅加入 5 ml 300 g/L $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 和不使用灰化辅助剂 3 种条件的灰化效果,结果见图 1。不使用灰化辅助剂时约 50% 的砷灰化损失,加入 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 避免了砷的灰化损失,而 MgO 的加入对灰化结果基本没有影响,原因可能是样品经石墨消解后为液体,不存在干样结块问题。因此试验选择加入 5 ml 300 g/L $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 辅助灰化。

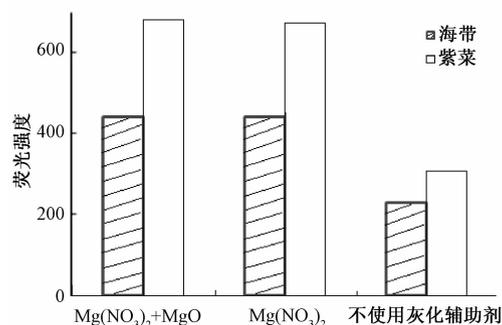


图 1 灰化辅助剂对荧光强度的影响

Figure 1 Affects of ashing auxiliary agent on fluorescence intensity in the detection of arsenic

2.2.3 灰分溶解试剂选择

灰化后的灰分用酸来溶解,试验考察了酸的种类和浓度对 AFS 测定结果的影响。由图 2 可见,盐酸和硝酸用量对海带和紫菜的影响趋势略有不同,

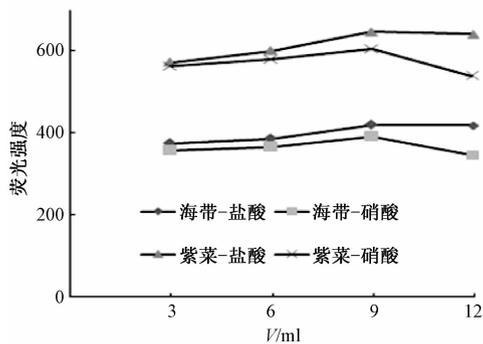


图2 酸浓度对荧光强度的影响

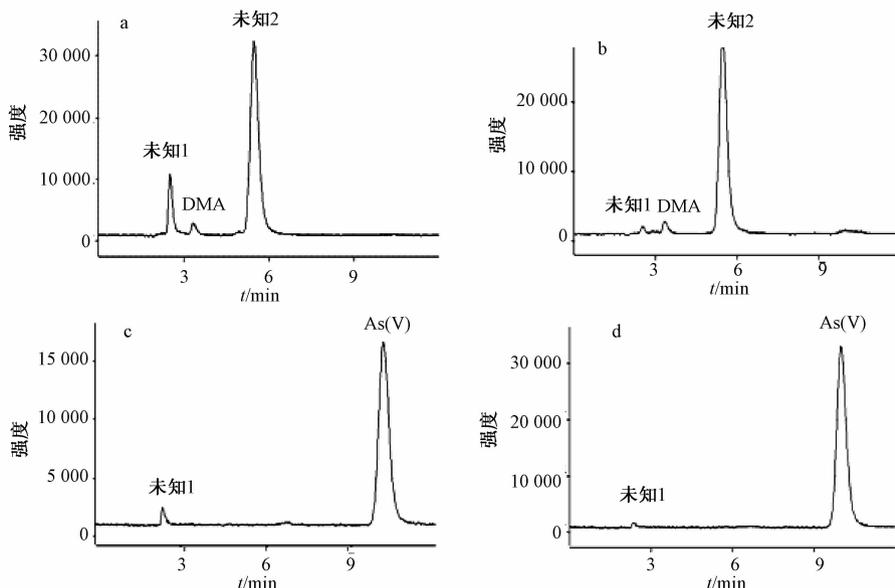
Figure 2 Affects of acid concentration fluorescence intensity in the detection of arsenic

随着盐酸用量的增加砷的荧光强度逐渐增大,盐酸用量 > 9 ml 后,砷荧光强度达到最大且不再增加;随着硝酸用量的增加砷荧光强度逐渐增大,硝酸用

量为 9 ml 时,砷荧光强度达到最大,继续增加硝酸用量,砷荧光强度反而逐渐降低,原因可能是硝酸根对荧光信号的抑制作用造成荧光强度降低。因此确定使用 9 ml 盐酸溶解灰分。

2.3 石墨消解/微波灰化对食用海藻中砷形态影响

对石墨消解/微波灰化法处理后的海带、紫菜进行砷形态提取,参照文献[9],采用 HPLC-ICP-MS 测定提取液中 As(III)、As(V)、一甲基砷酸(MMA)和二甲基砷酸(DMA)4种砷形态。由图3可见,海带、紫菜中含有少量DMA和大量有机砷(峰未知1和峰未知2可能为砷糖的代谢物),未检测出无机砷。经石墨消解/微波灰化后的海带、紫菜中,大部分有机砷转化为无机砷,砷主要以As(V)形态存在。对消化液进行定量分析,见表1。



注:a为海带提取液色谱图;b为紫菜提取液色谱图;c为海带经石墨消解/微波灰化后提取液色谱图;d为紫菜经石墨消解/微波灰化后提取液色谱图

图3 样品中砷形态色谱图

Figure 3 Chromatograms of arsenic species in samples

表1 食用海藻中砷的不同形态含量结果(mg/kg)

Table 1 Change of arsenic species in alga before and after digested

样品	总砷含量	DMA 含量	未知形态有机砷	As(V)
海带	23.25	0.51	22.74	23.12
紫菜	38.32	0.72	37.60	38.19

2.4 方法线性方程、相关系数与检出限

在优化的试验条件下,砷元素的荧光强度(I)与其质量浓度(C)在 1 ~ 500 μg/L 范围内呈线性关系,线性方程为 $I = 21.02C - 7.81$,相关系数(r)为 0.999 8。对空白溶液进行 11 次平行测定,计算其标准偏差,以 3 倍标准偏差所对应的浓度值为方法检出限,本方法检出限为 0.42 μg/L。

2.5 方法的精密度

选择低(19.6 mg/kg)、中(38.5 mg/kg)、高(66.8 mg/kg)3个浓度水平的食用海藻样品进行精密密度试验,考察方法重现性,3个浓度水平的RSD均 < 5.0%,结果见表2。

表2 方法精密密度(n=7)

Table 2 Results of RSD of the method

样品	测定值 / (mg/kg)							均值 / (mg/kg)	RSD / %
	18.8	19.1	19.8	20.9	18.9	20.5	19.2		
海带	18.8	19.1	19.8	20.9	18.9	20.5	19.2	19.6	4.3
紫菜 1	36.2	38.6	40.3	38.2	37.7	38.9	39.6	38.5	3.5
紫菜 2	67.9	65.1	66.3	70.6	65.2	66.7	65.8	66.8	2.9

2.6 方法的准确度

采用加标回收和标准物质考察方法的准确性。对海带和紫菜样品进行加标回收试验,分别加入低、中、高浓度的砷标准溶液,样品经前处理后测定,两种藻类中砷的加标回收率范围为 96% ~ 109%,见表 3。

表 3 样品中砷的加标回收率($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of arsenic in spiked samples

样品	本底值 /(mg/kg)	加标量 /(mg/kg)	测定值 /(mg/kg)	回收率 /%
紫菜	23.2	20.0	44.9 ± 1.2	109
		50.0	71.4 ± 1.0	96
		100.0	122.6 ± 2.1	99
海带	38.3	20.0	59.6 ± 0.9	106
		50.0	89.7 ± 1.8	102
		100.0	138.9 ± 1.6	101

分别采用石墨消解/微波灰化法(GD-MA)和 GB/T 5009.11—2003 中总砷的干灰化法(dry ash)处理样品,测定海带(GBW08517)和紫菜(GBW10023)成分分析标准物质中总砷含量,结果见表 4。结果表明,采用 GB/T 5009.11—2003 中灰

化法处理的样品测定结果偏低。试验发现食用海藻样品干灰化法的灰化产物中夹杂颗粒,不能完全溶于盐酸和硝酸,说明样品灰化不完全,原因是藻类的轻质粉末与灰化辅助剂混合物在高温下结块,混合物内部无法充分接触空气,导致测定结果偏低 30% 左右,说明干灰化法用于藻类中总砷测定时,还需要考虑更多的关键点。采用程序控温石墨消解/微波灰化法处理的标准参考物质总砷测定结果均在标准值范围内,表明方法准确度好,适合于食用海藻类样品的总砷分析。

表 4 标准物质测定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Analytical results of standard reference material

样品	dry ash	GD-MA	GB/T 5009.11—2003
海带(GBW08517)	11.5 ± 1.9	15.9 ± 0.8	13.9 ± 2.4
紫菜(GBW10023)	17.8 ± 3.4	31.5 ± 1.0	27.0 ± 6.0

2.7 实际样品的测定

采用本方法对北京市售海带、紫菜(各 6 份)进行测定,测定结果为 3 次测定的平均值及标准偏差范围,结果见表 5。所测定海带总砷含量范围为 21.8 ~ 56.7 mg/kg,紫菜总砷含量范围为 33.5 ~ 72.1 mg/kg。

表 5 样品的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3, \text{mg/kg}$)

Table 5 Analytical results of sample analysis

样品	1	2	3	4	5	6
海带	22.4 ± 0.9	21.8 ± 0.8	56.7 ± 0.6	31.1 ± 1.1	23.9 ± 0.8	26.5 ± 1.0
紫菜	33.5 ± 1.2	46.3 ± 0.9	53.3 ± 1.3	72.1 ± 1.5	58.9 ± 1.4	41.4 ± 0.9

3 小结

本文采用程序控温石墨消解/微波灰化-氢化物发生-原子荧光光谱法测定食用海藻中总砷的方法,在优化条件下,样品加入硝酸经程序控温石墨消解后进行微波灰化,能够将食用海藻中 99% 以上的有机砷转化为无机砷。应用本法对海带、紫菜标准物质中总砷进行测定,结果与国标法相近。本方法准确可靠、精密度好、回收率高,有效克服了藻类样品前处理消解不完全、重现性差的缺点,适用于准确测定食用海藻中总砷含量。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.11—2003 食品中总砷及无机砷的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

[2] Albert P, Anna M, Jose F L, et al. Occurrence of arsenic species in algae and freshwater plants of an extreme arid region in northern Chile, the Loa River Basin. [J]. Chemosphere, 2013, 90

(2):556-564.

[3] 解楠,徐红斌,胡其敏,等.微波消解-电感耦合等离子体-质谱和原子荧光光谱测定海产品中总砷含量差异的研究[J].光谱实验室,2011,28(2):645-649.

[4] 戚荣平,邱晓枫,孟琪,等.湿法消解-氢化物原子荧光光谱法测定海产品中总砷[J].中国卫生检验杂志,2010,20(2):287-288.

[5] 张磊,吴永宁,赵云峰.不同形态砷化合物稳定性研究和砷形态分析中样品前处理技术[J].国外医学卫生学分册,2007,34(4):238-244.

[6] 高杨,曹焯,余晶晶,等.高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定干海产品中砷化学形态[J].分析化学,2009,37(12):1738-1742.

[7] WEI C, LI W, ZHANG C, et al. Safety evaluation of organoarsenic species in edible *Porphyra* from the China sea [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(17):5176-5182.

[8] 马国军.不同前处理对原子荧光法测定海产品中总砷的影响[J].中国食品添加剂,2013(3):238-241.

[9] 候艳霞,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].分析实验室,2013,32(10):103-107.