



HPLC-ICP-MS

作者：

马晓玲

PerkinElmer, Inc.
Shanghai Pudong, China

根据 GB5009.11-2014 分析 大米中的五种砷形态

引言

大米是世界上一半以上人口的主食。由于其无麸质和矿物质含量高，大米的粉状食品通常是第一批给婴儿食用的固体食品之一。它也是很受乳糜泻患者和无麸质饮食者欢迎的

谷物。然而，近年来，人们越来越关注大米中砷含量高的问题，这种致癌的非金属含量可能远远超过环境中的浓度。¹ 大米中砷的潜在来源有很多，如种植稻米的土壤、灌溉用水以及大气沉降物。土壤和水中的高浓度砷可能是因为该地区的自然地质和对这种非金属的沥滤造成的，也可能是经过各种不同的人为活动造成的。²

无机砷形态 (As III 和 As V) 是砷在地面环境存在的普遍形式，也是毒性最强的。稻田中常见的还原性和缺氧条件可以促进某些 As 形态向常见的有毒和致癌性 As 形态 (As III) 转化还原。当周边环境中的 As 被水稻吸收后，它可能会被代谢并甲基化成毒性较小的 As 形态，而这种甲基化的程度很大程度上取决于植物的部位 (根、芽、叶和种子)。因此，如果要评估水稻作物中砷的总浓度，这将仅仅研究水稻中砷的所有不同形态，可能导致我们对其潜在毒性得出不准确的结论。正是这个原因形态研究才有必要。

因为中国是世界上最大的大米生产国，中国政府发布了《食品安全国家标准》(GB 5009.11-2014)，帮助评估大米和大米制品中的砷形态。在此文件中，确定 HPLC-ICP-MS 为首选的分析技术。2017 年，中国发布了 GB 2762，规定了无机砷含量的最高允许浓度 (0.2mg/kg)。许多砷形态分析方法中遇到的挑战之一是需要一种能够控制各种砷形态洗脱的溶剂梯度。这需要一个能精确阻抗匹配的稳态等离子体，它能够处理溶剂梯度的变化及可能对电离的影响。另外，由于该方法可能增加泵密封件的磨损，因此具有能够在泵密封件后部进行有效清洗的机械泵将大大减少密封件的损坏，从而减少了停机时间和维护工作量。

在本研究中，使用梯度阴离子交换法根据 GB 5009.11 对商业大米样品和有证标准物质中的五种砷形态进行了表征。分析使用了珀金埃尔默 NexSAR™ HPLC-ICP-MS 形态解决方案，它由 NexSAR 惰性 HPLC 和 NexION® ICP-MS 构成。

实验

样品制备

用以下试剂在 0.15 M HNO₃ 中 (超纯, 68%, 苏州晶瑞化学股份有限公司, 中国江苏苏州) 制备浓度为 0.2、1、5、50 和 100µg/L 的标准溶液: 亚砷酸盐 As III (75.5±1.2µg/g)、砷酸盐 As V (17.5±0.4µg/g)、一甲基砷 (MMA; 25.1±0.8µg/g), 二甲基砷 (DMA; 52.9±1.8µg/g) 和砷甜菜碱 (AsB; 38.8±1.1µg/g) (中国计量科学研究院, 中国北京)。选择这些形态进行评估是因为国家标准以及它们在大米中的高含量要求。标准溶液浓度按照 GB 5009.11 中规定的建议浓度进行配制。按照对每种砷形态单独分析的洗脱时间确定其形态。

商业大米从当地商店购买作为进行分析的样品，有证标准物质 (CRM, GBW (E) 100348, 中国北京) 用于方法验证。将样品 (0.5 g) 在分析天平 (梅特勒-托利多, 美国俄亥俄州哥伦布) 上精确称量, 三份, 考虑了样品中的不均匀性, 并放入 15mL 聚丙烯试管中 (美国纽约市康马克市科晶)。将硝酸 (10mL 0.15 M HNO₃) 加入每个样品中, 并用试管搅拌, 确保样品完全浸入酸中。此后, 将样品放入 90°C 干燥箱中 (DHG-9000, 上海一恒科学仪器有限公司, 中国上海) 三小时, 每半小时摇晃 1 分钟。取出后, 冷却样品, 用离心机 (TDL-60B, 上海安亭科学仪器厂, 中国上海) 8000 转速离心 15 分钟。倒出上层清液用 0.45µm 注射器式滤器 (聚四氟乙烯, 亲水, Millex, Sigma Aldrich™, 美国密苏里州圣路易斯市) 过滤, 去除颗粒物质。

用与制备样品相同的方式制备方法空白样品和有证标准物质, 从而确保分析的准确性。作为方法考察的一部分, 对加标大米样品 (所有砷形态 5µg/L) 进行分析, 从而进一步验证样品中关于个别砷形态的分析方法。

流动相用 HNO₃ (苏州晶瑞化学股份有限公司), H₃PO₄ (85%, 美国飞世尔科技, 美国新罕布什尔州汉普顿) 和 NH₄OH (≥25%, 西格玛奥德里奇, 美国马萨诸塞州柏林顿) 制备。在分析中, 将标准溶液、大米提取物、有证标准物质和空白样品倒入无金属聚丙烯 HPLC 小瓶中, 并在不稀释的情况下进行分析。为了说明色谱基线梯度的变化, 将旁路样品 (只进流动相) 作为分析顺序的一部分进行分析, 并从空白、样品和有证标准物质色谱图中减去。

仪器

所有分析使用 NexSAR 形态分析 HPLC 系统 (珀金埃尔默公司, 美国康涅狄格州谢尔顿市), 它由 NexSAR 200 惰性 HPLC 泵、冷却惰性自动进样器和带脱气器的容积盘组成。此系统和 NexION ICP-MS (珀金埃尔默) 一起使用。关于 HPLC 和 ICP-MS 的仪器条件分别如表 1 和表 2 所示。样品和标准物质在标准模式下操作, 在标准模式下, 用校正方程来补偿 ArCl⁺ 多原子干扰。所有分析和数据收集使用 Clarity™ 色谱软件 (DataApex, 布拉格, 捷克共和国) 操作。

表 1. NexSAR 惰性 HPLC 条件。

组件/参数	类型/值
色谱分析法	阴离子交换色谱分析法
流动相	A: 10mM 磷酸铵 B: 10mM 硝酸铵
pH	8.6
流速	1mL/min
分离方法	梯度
运行时间	16 min
进样体积	100µL
柱温	30 °C
进样类型	满环进样
液相色谱瓶	高效液相色谱测试聚丙烯瓶, 1.5mL

表 2. NexION ICP-MS 条件。

组件/参数	类型/值
雾化器	MEINHARD® +C 型同心雾化
雾室	旋流雾室
射频功率	1600W
炬管	2.0mm 石英内径
模式	标准
停留时间	500ms

结果与讨论

标准物质 (0.2-100 $\mu\text{g/L}$, $n=6$) 的相关系数分别为 0.999965、0.999979、0.999999、0.999999 和 0.999989 (图 1a-e), 表明大米中的砷在 GB 5009.11 规定的预期浓度范围内具有良好的线性。

0.2-100 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液谱图的重叠 (图 2) 表明惰性 HPLC 泵出的流体具有一致性、可靠性和复现性, 从而确保色谱峰保持尖锐且能正确识别, 实现良好的准确度和信噪比 (S/N)。

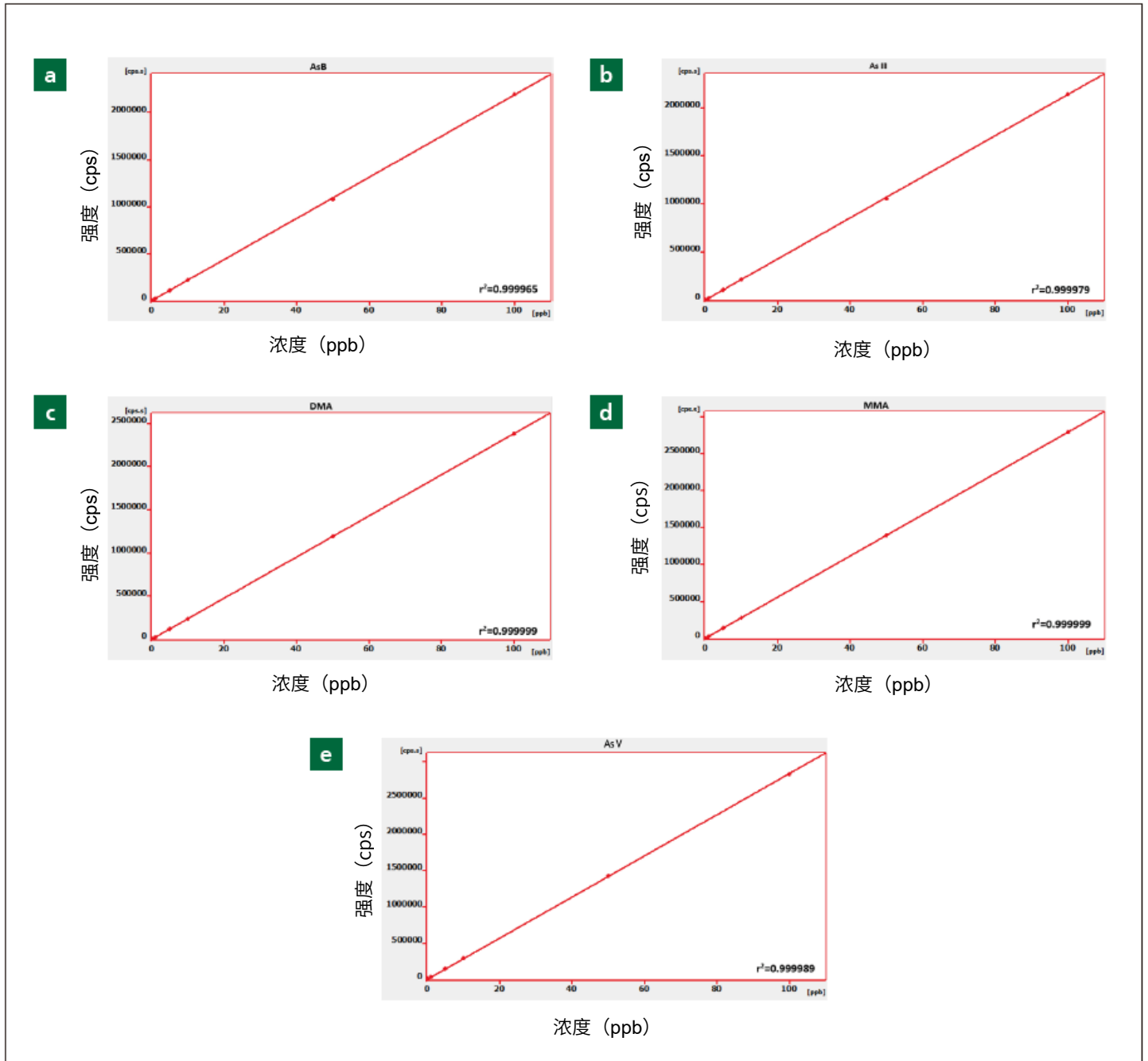


图1. 流动相 (pH 值为 8.6) 中的 (a) AsB、(b) As III、(c) DMA、(d) MMA 和 (e) As V 浓度范围为 0.2-100 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的线性回归和相应的相关系数。

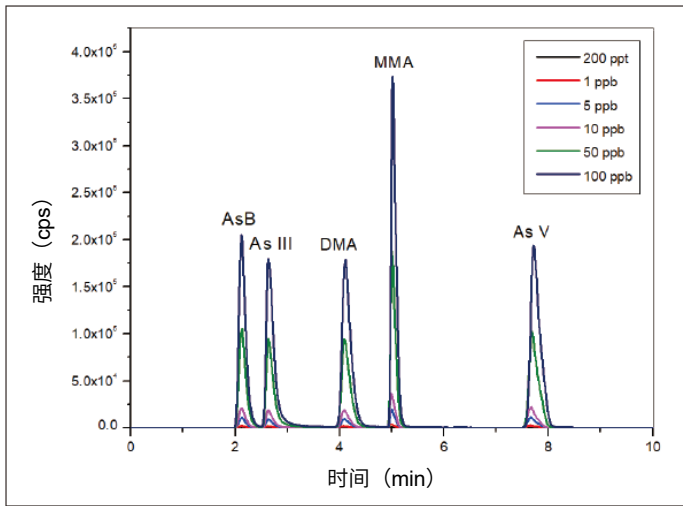


图2. pH 值为 8.6 的流动相中标准溶液 (0.2-100 μ g/L)。

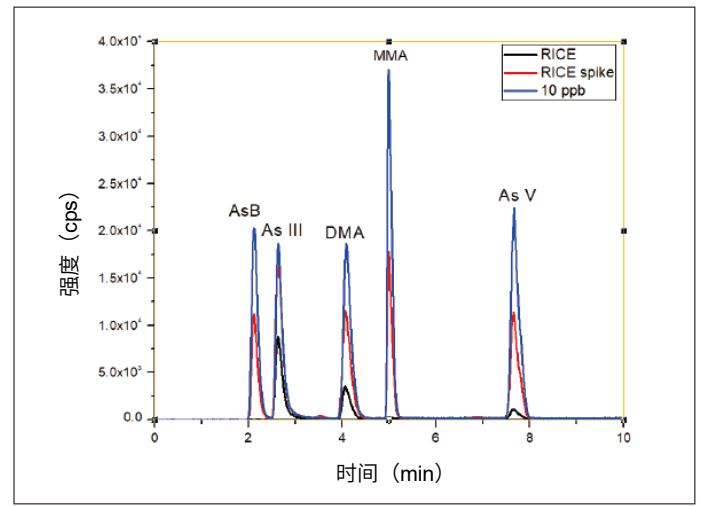


图4. 大米样品、加标大米样品和 10 μ g/L 标准溶液的色谱图叠加 (减去旁路的)。

使用规定的流动相测出 AsB、As III、DMA、MMA 和 As V 的 50ng/L 标准物质 (图 3) 的信噪比分别为 15、13、13、17 和 23, 其中 As III 和 DMA 的理论检测限为 11.5ng/L、6.5ng/L 为 As V、MMA 为 8.8ng/L 和 AsB 为 10ng/L。

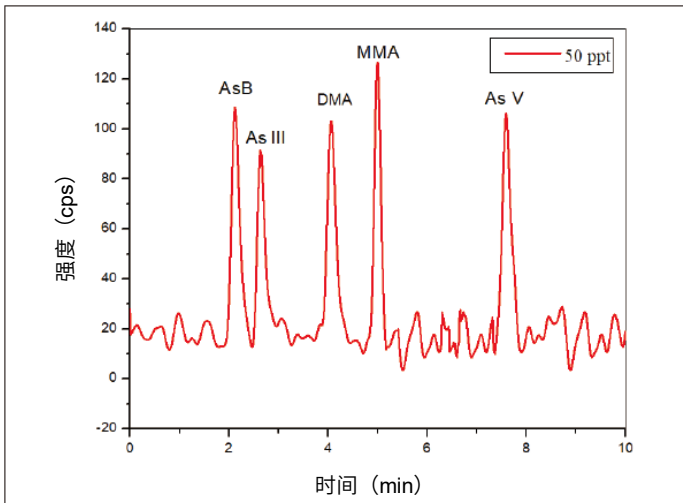


图3. 50ng/L 标准溶液 (减去旁路的)。

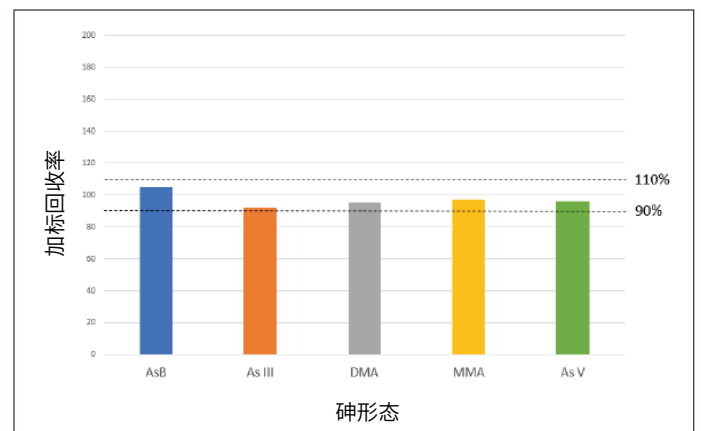


图5. 大米提取物中 AsB、As III、DMA、MMA 和 As V 加标 5 μ g/L 的加标回收率。

未加标大米样品、加标 (5 μ g/L) 大米样品和 10 μ g/L 标准物质的谱图重叠如图 4 所示。此重叠图表明, 样品基质对不同砷形态的保留时间无影响, 通过精确的泵流速保证了方法的稳定和重现性。AsB、As III、DMA、MMA 和 As V 的加标回收率良好, 分别为 105、92、95、97 和 96% (图 5), 进一步验证了此方法, 并证明了样品基质中每种单独的砷形态的准确性。此方法还通过使用有证标准物质 (GBW (E) 100348) 进行了验证, 其中图 6 显示了有证标准物质和 10 μ g/L 标准溶液的谱图重叠情况。有证标准物质的保留时间与标准溶液相同, 无机砷的回收率为 100%, 总砷含量回收率为 99%, 进一步证实了该方法分析的准确性。

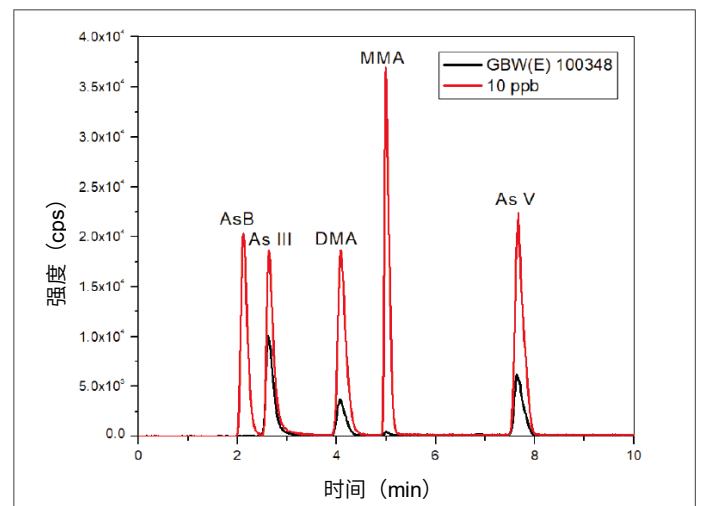


图6. 与 10 μ g/L 叠加的 GBW (E) 100348 有证标准溶液 (减去旁路的) 色谱图。

使用这种方法对从当地商店购买的大米样品中 As 形态浓度进行了评估 (表 3)。As III、As V 和 DMA 均高于方法检测限值, 其中无机砷的总量 (As III 和 As V) 低于 0.2mg/kg 的规定限值 (GB 2762)。AsB 和 MMA 都低于方法检出限, 这里没有进行记录。

表 3. 商业大米样品中的砷形态浓度。

形态	平均浓度±标准偏差 (µg/g)
AsB	BD*
As III	0.099±0.004
DMA	0.039±0.001
MMA	BD*
As V	0.0105±0.001

*BD: 低于检出限

结论

本研究根据 GB 5009.11 提出的方法使用 NexSAR 惰性 HPLC 系统和 NexION ICP-MS 评估大米样品中的砷形态、加标大米样品和大米有证标准物质。结果显示, 使用该形态分析解决方案和梯度洗脱法能简单且准确地定量低含量砷形态浓度。其中, NexION 稳定的等离子体和 HPLC 泵确保精确的流动相流速是实现这一点的关键。在评估的商业大米中, 发现无机砷含量低于规定量。

参考文献

1. Heikens, A., 2006. Arsenic Contamination of Irrigation Water, Soil and Crops in Bangladesh: Risk Implications for Sustainable Agriculture and Food Safety in Asia. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Regional Office for Asia and the Pacific.
2. ATSDR, 2013. Arsenic Toxicity: Where is Arsenic Found? <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=1&po=5>

消耗品

品名	说明	零件号码
HPLC 瓶	HPLC 测试塑料瓶, 1.5mL 聚丙烯	N9301736
聚醚醚酮管	黄色, 0.007 英寸内径, 1/16 英寸外径 (5 英尺)	N9302678
聚醚醚酮配件	外径为 1/16 英寸的聚醚醚酮接头螺母	09920513
雾化器连接器	MEINHARD®雾化器聚醚醚酮管线	N8152484

珀金埃尔默企业管理 (上海) 有限公司
 地址: 上海 张江高科技园区 张衡路 1670 号
 邮编: 201203
 电话: 021-60645888
 传真: 021-60645999
www.perkinelmer.com.cn

欲获悉全球办事处的完整清单, 请登录 www.perkinelmer.com/ContactUs

版权©2016, 珀金埃尔默公司。版权所有。PerkinElmer®是珀金埃尔默公司的注册商标。所有其他商标属于相应所有者的财产。

