

液相色谱-氢化物发生原子荧光光谱测定鸡肉中 4种形态砷化合物

陈玎玎, 葛高飞

(安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036)

摘要: 建立了鸡肉中三价砷(As(III))、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)和五价砷(As(V))的4种砷形态的高效液相色谱-氢化物发生原子荧光光谱(HPLC-HG-AFS)分析方法。样品采用 $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 稀硝酸+超声波进行提取, 以 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 和 $45\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH5.92)为流动相, 经PRP-X100阴离子交换色谱柱分离后, 原子荧光光谱测定。结果表明, 4种形态的砷在8 min内实现良好分离, 标准曲线的线性关系良好($r\geq 0.999$), 方法检出限为 $1.0\sim 3.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 6次平行测定的相对标准偏差(RSD)为 $2.0\%\sim 6.2\%$ ($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。鸡肉样品的加标回收率为 $82.1\%\sim 101\%$ 。

关键词: 砷形态; 液相色谱; 氢化物发生原子荧光光谱; 鸡肉

中图分类号: S859.84; Q657.72

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2017)03-0388-04

Simultaneous determination of four arsenic species in chicken using liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry

CHEN Dingding, GE Gaofei

(Biotechnolgy Center, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: An analytical method was developed for the simultaneous determination of four arsenic species including arsenite (As (III)), monomethylarsonic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), and arsenate (As(V)) in chickens by liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (HPLC-HG-AFS). The extraction of arsenic species from chicken samples was accomplished in $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitric acid with ultrasonic wave. The different arsenic species were separated on a PRP-X100 anion exchange column and analyzed by HG-AFS. The mobile phase was $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{HPO}_4$ and $45\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KH}_2\text{PO}_4$ buffer (pH5.92). The separation of four arsenic species were achieved in 8 min. A good linearity was obtained for all four arsenic species, with linear correlation coefficients being greater than 0.999. The detection limit (LODs) of the four species were between 1.0 and $3.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The relative standard deviations (RSD) in six replicated measures ($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) varied from 2.0% to 6.2%. The recovery rate for spiked chicken samples ranged from 82.1% to 101%. The method is simple and sensitive with a low operation cost and environmental friendly.

Key words: arsenic species; liquid chromatography; hydride generation atomic fluorescence spectrometry; chicken

20世纪80年代末,我国开始引进有机砷化合物作为抗菌药促生长类饲料添加剂在动物生产中推广使用,其中阿散酸(ASA)、洛克沙脯(ROX)和硝苯砷酸(NIT)运用得最广泛^[1]。有机砷制剂虽在促进动物生长、改善动物皮毛表现等方面有其独特的功效,但若过量使用,就会造成肉中砷的残

留,影响动物性食品安全^[2-6]。

砷的毒性不仅与其总量有关,更大程度上取决于存在的形态,不同形态毒性相差甚远^[7-10]。目前已发现50多种不同形态的砷化物,主要的砷化物有亚砷酸盐(As(III))、砷酸盐(As(V))、一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)、砷甜菜碱(AsB)、

收稿日期: 2016-09-18

基金项目: 2014校学科骨干培育项目(2014XKPY-65)资助。

作者简介: 陈玎玎, 副研究员。E-mail: dingding0626@126.com

砷胆碱 (AsC)、砷糖 (AsS) 和砷脂 (AsL) 等。研究表明 As(III) 和 As(V) 毒性较大, MMA 和 DMA 毒性较小, AsB、AsC 和 AsS 一般被认为无毒性。因此, 在测定肉品中砷的残留时, 进行砷的形态分析十分必要, 通过无机砷、有机砷及不同价态砷的组成进行砷毒性的综合评价, 比对总砷的含量评价更具科学性。

氢化物发生原子荧光光谱测定砷具有灵敏度高, 线性范围宽, 分析速度快, 仪器价格便宜, 运行成本低等优点^[11-14]。但要获得砷的不同形态的信息, 必须借助于高效的分离手段。液相色谱法是目前最常用分离方法, 本研究选用实验饲喂肉鸡为检测对象, 探讨液相色谱与原子荧光光谱联用技术分离检测 4 种不同形态砷化物的方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器

LC600-AFS9700 型液相-氢化物发生原子荧光联用仪 (LC-HG-AFS, 北京海光仪器公司); PHS-3C 精密 pH 计 (上海精密仪器有限公司); Sartorius BS 21S 电子天平 (万分之一, 德国赛多利斯公司); H-1650 离心机 (湖南湘仪有限公司); SB-25-12D 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技有限公司)。

1.2 材料与试剂

选择添加 50 mg·kg⁻¹ 洛克沙肿的饲料喂养黄羽肉鸡, 分别于饲喂 21、28 和 35 d 进行宰杀。取其胸肌, 并用超纯水洗去血污, 滤纸吸干后放入采样袋, 置于 -20℃ 保存。

不同形态砷化合物标准物质: 亚砷酸钠 (NaAsO₂)、砷酸氢二钠 (AsHNa₂O₄·7H₂O)、一甲基砷酸钠 (CH₃AsO₃Na) 和二甲基砷酸钠 (C₂H₅AsO₂Na) 购于 Sigma 公司; 硝酸、盐酸和氢氧化钠为优级纯, 十二水合磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O)、磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 为分析纯, 均购于国药集团化学试剂有限公司; 硼氢化钾为原子荧光专用试剂。实验用水均为 18.2 MΩ·cm 的超纯水。

1.3 方法

1.3.1 不同形态砷化物混合标准溶液的配制 先将 4 种砷形态的标准物质, 分别溶于超纯水中, 制成 1 000 mg·L⁻¹ 标准储备液, 4℃ 保存。取储备液逐级稀释至 1 mg·L⁻¹, 再分别从 1 mg·L⁻¹ 的亚砷酸盐 (As(III))、砷酸盐 (As(V))、一甲基砷酸盐 (MMA)、二甲基砷酸盐 (DMA) 的单标溶液中依次吸取 10、20、40、80、200 和 400 μL, 用超纯水

定容至 2 mL。获得 4 种砷化物浓度均为 5、10、20、40、100 和 200 μg·L⁻¹ 系列混合标准溶液。为了防止不同形态砷的相互转化, 混标溶液必须现用现配。

1.3.2 流动相和还原液的配制 分别精确称取磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 3.026 g 和十二水合磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄) 和 0.8954 g, 用超纯水定容至 500 mL。0.45 μm 微孔滤膜过滤, 超声脱气后为流动相。称取硼氢化钾 (KBH₄) 20 g, 溶于 5 g·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 000 mL 中, 即为还原液。

1.3.3 样品的前处理 将上述保存于冰箱中的鸡组织取出解冻后匀浆。称取匀浆样品 1.000 g, 置于 10 mL 聚丙烯离心管中, 加入 10 mL 0.15 mol·L⁻¹ HNO₃ 溶液, 密闭。于 80℃ 恒温下进行超声波浸提 2.5 h, 每 0.5 h 振摇 1 min。提取完毕, 取出冷却至室温, 8 000 r·min⁻¹ 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 后, 8 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 弃去上层液体。按此过程重复一次, 吸取下层清液, 依次经 C₁₈ 小柱净化及 0.45 μm 滤膜过滤后待测。

1.3.4 仪器配置及分析条件 Labtech LC600 液相色谱仪配有 PRP-X100 阴离子交换色谱柱 (250×4.1 mm, 美国 Hamilton 公司) 及 100 μL 样品环的进样阀。AFS-9700 原子荧光光谱仪, 配砷高性能空心阴极灯。

分析条件: HPLC 流动相 5 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 和 45 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ 缓冲液 (pH5.92); 流速 1 ml·L⁻¹, 进样量 100 μL。HG (氢化物发生) 蠕动泵转速 60 r·min⁻¹, 载气流速 400 mL·min⁻¹, 屏蔽气流速 900 mL·L⁻¹, KBH₄ 浓度 20 g·L⁻¹, HCl 浓度 5%。AFS As 灯主电流 80 mA, 辅电流 40 mA, 负高压 310 V, 原子化温度 300℃, 原子化高度 8 mm。

2 结果与分析

2.1 氢化物发生原子荧光光谱条件优化

2.1.1 硼氢化钾浓度的选择 氢化物发生原子荧光光谱测定砷的过程中, 硼氢化钾的作用是在酸性条件下与砷反应生成气态的氢化物, 同时还为氩氢火焰的原子化器提供适量的氢气。当硼氢化钾浓度较低时, 氢化反应可能不完全, 生成的氢化物减少, 测定值偏低; 但当硼氢化钾浓度过高时则会产生过多的氢气, 导致样品的氢化物浓度被稀释, 灵敏度下降。本实验考察了硼氢化钾质量浓度在 10.0~30.0 g·L⁻¹ 范围内对 0.2 μg·mL⁻¹ 混合标准溶液荧光强度的影响, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 当达到 20.0 g·L⁻¹ 时, 荧光强度最大。之后随着硼氢化钾

浓度再升高, 荧光强度开始降低。实验选择硼氢化钾溶液的浓度为 20.0 g·L⁻¹。

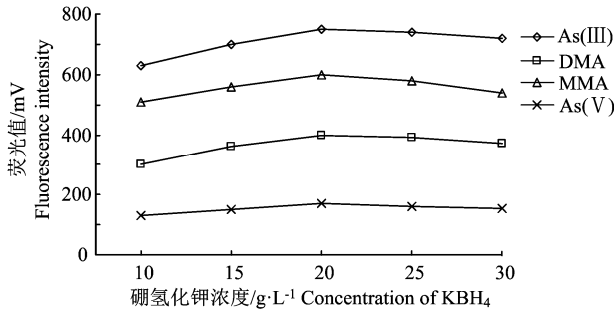


图 1 KBH₄ 的浓度对荧光强度的影响

Figure 1 Effects of KBH₄ concentration on fluorescence intensity

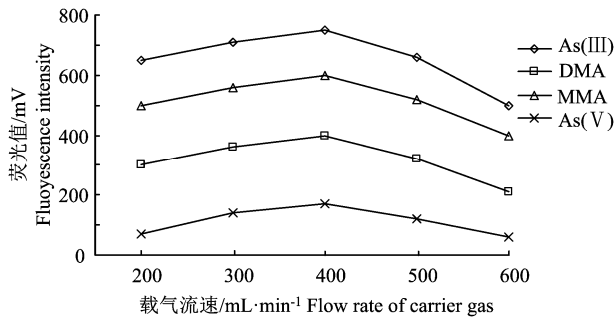


图 2 载气流速对荧光强度的影响

Figure 2 Effects of the carrier on fluorescence intensity

2.1.2 载气流速的选择 原子荧光光谱仪是以氩气作为载气和屏蔽气。载气的作用是携带反应产生的氢化物进入到原子化器中, 并提供氩氢火焰燃烧需要的氩气。当载气流速较小时, 由于不能迅速有效地将氢化物带入原子化器中而造成峰的展宽, 降低灵敏度。另外过低的载气流量也会使形成的氩氢火焰不够稳定, 导致测量的重现性不好。但当载气流量增大到一定程度时又会稀释氢化物浓度, 导致荧光强度降低。本实验考察了载气流速为 200~600 mL·min⁻¹ 时对荧光强度的影响, 结果载气流速为 400 mL·min⁻¹ 时, 荧光强度最高 (图 2)。

2.1.3 屏蔽气流速的选择 屏蔽气作为氩氢火焰的外围保护气体, 能够防止周围空气将原子蒸汽氧化。同时还可保证实验考察了屏蔽气流速为 800~1 100 mL·min⁻¹ 时对荧光强度的影响。结果表明, 当屏蔽

气流量达到 900 mL·min⁻¹ 时, 荧光强度最高 (见图 3)。

2.1.4 光电倍增管负高压和灯电流的选择 增大光电倍增管负高压可提高荧光强度, 但噪声也相应增大, 当负高压增大到一定程度时, 信噪比反而开始下降。实验考察了负高压为 290、300、310、320 和 330 V 时的信噪比, 结果表明当负高压为 330 V 时, 信噪比最佳。

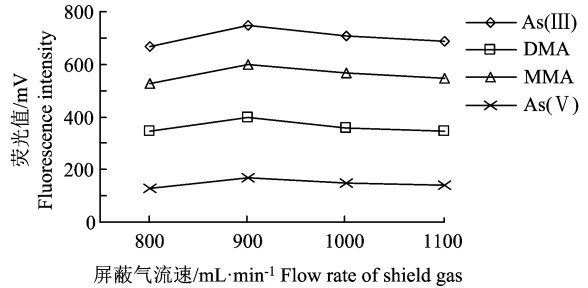


图 3 屏蔽气流速对荧光强度的影响

Figure 3 Effects of the shield gas on fluorescence intensity

表 1 3 种不同提取剂的提取率
Table 1 Extraction rate of three extracting agents %

砷形态 Arsenic species	硝酸 (0.15 mol·L ⁻¹) Nitric acid	水 Water	甲醇:水 (1:4) Methanol:Water
As(III)	90.1	88.4	82.1
DMA	86.5	83.8	86.2
MMA	88.4	85.6	87.3
As(V)	92.5	89.2	81.3

注: 标准添加浓度为 300 μg·kg⁻¹。

Note: spiked concentration 300 μg·kg⁻¹.

增大空心阴极灯的灯电流, 荧光强度也随着增强, 但是当灯电流过大时会发生自吸现象, 此时荧光强度反而减弱, 并且过大的灯电流会缩短灯的使用寿命。实验考察了灯电流为 80、90、100、110 和 120 mA 时的荧光强度, 结果表明当灯电流为 100 mA 时, 荧光强度最高。

2.1.5 样品制备提取剂的优化 在样品的前处理过程中, 分别采用了不同浓度的酸溶液、水、甲醇-水作为提取剂, 通过空白加标回收比较其提取效率。结果显示, 0.15 mol·L⁻¹ 稀硝酸+超声提取的效果最好, 见表 1。

表 2 4 种砷化合物的线性关系、检出限和重现性

Table 2 Linear equations, correlation coefficient, detection limits and repeatability of four arsenic species

砷形态 Arsenic species	线性范围/μg·L ⁻¹ Linear range	线性方程 Linear equation	相关系数 Coefficient of correlation	检出限/μg·L ⁻¹ LOD	精密度/% RSD
As(III)	5.0~200	IF=12.514C+59.24	0.9991	1.0	4.6
DMA	5.0~200	IF=15.389C+0.96	0.9998	3.0	6.2
MMA	5.0~200	IF=9.153C-18.35	0.9999	2.0	2.0
As(V)	5.0~200	IF=3.792C-27.52	0.9997	3.0	5.7

注: IF: 峰面积; C: 浓度。Note: IF: peak area; C: concentration

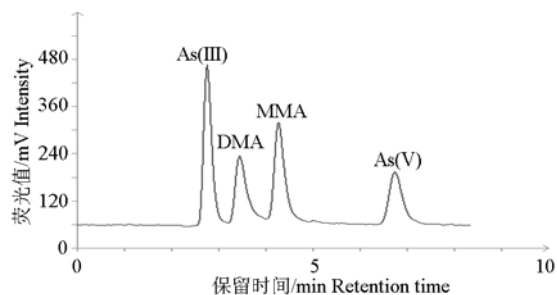


图 4 4 种砷化合物 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 混合标准溶液色谱
Figure 4 Chromatograms of four kinds arsenic compounds ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

表 2 4 种形态砷的鸡肉空白加标回收率

Table 2 The spiked recoveries of four arsenic species

砷形态 Arsenic species	添加浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Spiked	实测浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Measured	回收率/% Recovery
As(III)	10	8.23	82.3
	50	42.52	85.0
DMA	10	8.31	83.1
	50	43.25	86.5
MMA	10	8.95	89.5
	50	45.01	90.0
As(V)	10	9.23	92.3
	50	50.62	101.0

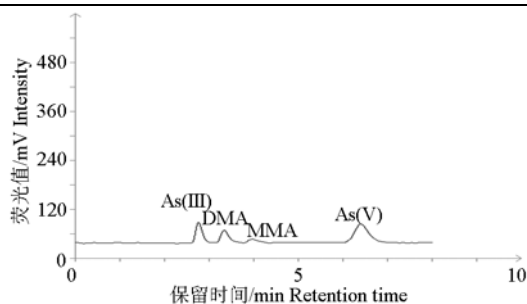


图 5 鸡肉样品砷形态色谱

Figure 5 Chromatograms of arsenic species in chicken sample

2.2 方法学考察

2.2.1 方法的线性和检出限 将系列混合标准工作液 (1.3.1), 在优化的分析条件下测试, 并以浓度和峰面积进行曲线拟合, 线性回归结果见表 2。As(III)、DMA、MMA 和 As(V) 4 种形态的检出限 (以 3 倍基线噪声比计) 分别 1.0、3.0、2.0 和 $3.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。6 次平行测定的相对标准偏差 (RSD) 为 2.0%~6.2% ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。混合标准溶液的色谱图见图 4。

2.2.2 实际样品的测定 采用所建立的方法对实验材料鸡肉组织进行了砷形态的分析, 并以未添加洛克沙肿的饲料 (经原子荧光光谱检测不含砷) 饲喂的鸡肉样品作为空白, 进行了加标回收实验, 结果见表 3。实际鸡肉样品的色谱图见图 5。

3 结论

本研究建立了 1 种鸡肉中三价砷 (As(III)、一甲基砷 (MMA)、二甲基砷 (DMA) 和五价砷 (As(V)) 的 4 种砷形态的高效液相色谱-氢化物发生原子荧光光谱 (HPLC-HG-AFS) 分析方法。4 种形态的砷 8 min 内实现良好分离, 保留时间误差小于 2%。标准曲线的线性关系良好 ($r \geq 0.999$), 方法检出限为 $1.0 \sim 3.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该方法具有前处理简单, 设备便宜, 分析速度快, 灵敏度高, 运行成本低等优点, 已成功用于鸡肉样品中砷形态的分析。

参考文献:

- [1] 廖巧霞. 洛克沙肿在养殖业中的应用[J]. 中国饲料添加剂, 2005 (8): 12-13.
- [2] 张秀芹. 有机砷制剂的应用及其毒性、环境行为研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2011 (10): 36-38.
- [3] 严建刚, 高峰. 有机砷制剂在畜牧生产中的应用与对环境污染问题的探讨[J]. 饲料广角, 2004 (17): 11-13.
- [4] 刘茂玲, 张迎. 饲用抗菌素有机砷制剂的毒性、排泄及残留问题的讨论[J]. 饲料研究, 2000(7): 28-29.
- [5] 周岩民, 杜文兴, 韩兆玉, 等. 洛克沙生对肉鸭生产性能和砷残留及组织病变的影响[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(4): 46-50.
- [6] 李银生, 曾振灵, 陈杖榴, 等. 洛克沙肿的作用, 毒性及环境行为[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2003(1): 10-12.
- [7] MCKINNEY J D. Metabolism and disposition of inorganic arsenic in laboratory animals and humans[J]. Environ Geochem Hlth, 1992, 14(2): 43-48.
- [8] HUGHES M F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action[J]. Toxicol Lett, 2002, 133(1): 1-16.
- [9] SCHWERDTLE T, WALTER I, MACKIWI I, et al. Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA[J]. Carcinogenesis, 2003, 24(5): 967-974.
- [10] 周瑛, 叶丽, 竹鑫平. HPLC、ICP、MS 在食品中硒和砷形态分析及其生物有效性研究中的应用[J]. 化学进展, 2007, 19(6): 982-995.
- [11] 郑光亚, 宋佳, 邓跃全, 等. 砷形态分析研究进展[J]. 理化检验(化学分册), 2015, 51(4): 560-564.
- [12] GALLARDO M V, BOHARI Y, ASTRUC A, et al. Speciation analysis of arsenic in environmental solids reference materials by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry following orthophosphoric acid extraction[J]. Anal Chim Acta, 2001, 441(2): 257-268.
- [13] KARADJOVA I B, LAMPUGNANI L, ONOR M, et al. Continuous flow hydride generation-atomic fluorescence spectrometric determination and speciation of arsenic in wine[J]. Spectrochim Acta B, 2005, 60(6): 816-823.
- [14] 张萌, 张瑞雪, 吴攀, 等. 液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法检测高砷煤矿区苔藓中的砷形态[J]. 分析科学学报, 2015, 31(4): 484-488.