

微波提取-高压液相色谱-原子荧光光谱联用 (HPLC-AFS)法分析稻米样品中砷形态

魏洪敏 甄长伟 炼晓璐 李银贺 柴刚

(北京海光仪器有限公司,北京 100015)

摘要 建立了液相色谱-原子荧光光谱联用(LC-AFS)法测定稻米中4种砷形态的方法。稻米样品用硝酸溶液(0.15 mol/L)微波提取50 min,消解溶液经离心分离后,采用Hamilton PRP-X100色谱柱, KH_2PO_4 (45 mmol/L)- Na_2HPO_4 (5 mmol/L)缓冲液为流动相,砷形态4个组分能够在7 min内达到基线分离,且无需调节pH值。优化了氢化物发生条件,使用了更低浓度的载流和还原剂。实验结果表明,各组分在2~10 ng/mL范围内线性关系良好,相关系数为0.998 8~0.999 8,各组分的检出限分别为0.29、0.47、0.62和1.16 ng/mL;各组分峰面积的相对标准偏差均低于3.1%;加标回收率为85.3%~113%;对稻米标准物质的分析测定结果表明方法定值准确。最后,与GB 5009.11—2014中使用的提取及测定条件进行对比,表明方法具备快速、环保、高效的特点。

关键词 高压液相色谱-原子荧光光谱联用法;形态分析;砷;微波提取

中图分类号:O657.31;TH744.16

文献标志码:A

文章编号:2095-1035(2019)03-0004-06

Speciation Analysis of Arsenic in Rice Samples by Microwave Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography-Atomic Fluorescence Spectrometry

WEI Hongmin, ZHEN Changwei, LIAN Xiaolu, LI Yinhe, CHAI Gang

(Beijing Haiguang Instrument Co., LTD., Beijing, 100015, China)

Abstract A method of high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry(HPLC-AFS) was established for the determination of four arsenic speciation in rice. The sample was extracted by microwave with 0.15 mol/L nitric acid solution for 50 min. After centrifugation, the extraction was separated by Hamilton PRP-X100 column using KH_2PO_4 (45 mmol/L)- Na_2HPO_4 (5 mmol/L) buffer as the mobile phase, and the four components of arsenic form could be separated from the baseline in 7 min. And the pH value of mobile phase was no need to adjust. The conditions of hydride generation were

收稿日期:2018-11-13 **修回日期**:2018-11-30

作者简介:魏洪敏,女,工程师,主要从事分析仪器研发及应用研究。E-mail:weihongmin0451@163.com

本文引用格式:魏洪敏,甄长伟,炼晓璐,等.微波提取-高压液相色谱-原子荧光光谱联用(HPLC-AFS)法分析稻米样品中砷形态[J].中国无机分析化学,2019,9(3):4-9.

WEI Hongmin, ZHEN Changwei, LIAN Xiaolu, et al. Speciation Analysis of Arsenic in Rice Samples by Microwave Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography-Atomic Fluorescence Spectrometry[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2019, 9(3): 4-9.

optimized, and the carrier current and reducing agent with lower concentration were used. The experimental results showed that good linear ranges of the four arsenic forms were obtained ranging from 2 ng/mL to 10 ng/mL, and the correlation coefficients were between 0.998 8 and 0.999 8. The limits of detection for the four compounds were 0.29, 0.47, 0.62 and 1.16 ng/mL, respectively. The relative standard deviations (RSD) of peak area for the four arsenic forms were less than 3.1%. The spiked recoveries of the four compounds were in the range of 85.3%—113%. The rice standard material was analyzed, and the accurate test results were obtained. Finally, the comparison with extraction and measuring conditions used in GB 5009.11—2014 showed that the method was fast, environmental and high efficiency.

Keywords HPLC-AFS; speciation analysis; arsenic; microwave extraction

前言

元素的毒性与元素的存在形态息息相关,就砷元素而言,无机砷的毒性要大于有机砷^[1-2]。因此,在分析砷元素时,其形态分析是十分必要的,比用砷的总量来评价更具科学性。近年来联用技术已经成为元素形态分析的主要手段。高效液相色谱-原子荧光光谱联用法可以对砷元素各形态进行有效分离,然后再逐一检测,从而实现样品的在线分离与测定。目前该方法已用于土壤^[3]、大米^[4]、水产动植物^[5]、地下水^[6]等样品中砷元素的形态分析。

食品安全国家标准 GB 5009.11—2014《食品中总砷和无机砷的测定》,应用的是液相色谱-原子荧光光谱联用法^[7]。本文围绕该标准,使用液相色谱-原子荧光光谱联用仪,对样品前处理方法、流动相、氢化反应条件等进行了优化。并在最优条件下对稻米及稻米标准物质进行分析测定,也对方法的精密度的、加标回收率、检出限等指标进行了验证,测定结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-AFS 6500 液相-原子荧光联用仪(北京海光仪器有限公司)、微波消解仪(上海新仪微波化学科技有限公司)、真空抽滤装置(天津奥特赛斯仪器有限公司)、BGZ-76 电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司)、高性能空心阴极灯(北京有色金属研究总院)、pH 计、离心机等。

磷酸二氢铵、磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠、氢氧化钠、盐酸(优级纯,北京化工厂)、硝酸(优级纯)、硼氢化钾,除另有说明,所用试剂均为分析纯,且购买于国药集团化学试剂有限公司。

砷形态溶液标准物质购买于中国计量科学研究

院:亚砷酸根[GBW08667,(75.7±1.2) μg/g],二甲基砷酸[GBW08666,(52.9±1.8) μg/g],甲基砷酸[GBW08669,(25.1±0.8) μg/g],砷酸根[GBW08667,(17.5±0.4) μg/g],含量均以 As 计。

1.2 样品前处理

称取约 1.0 g 样品于微波消解罐中,加 20 mL 硝酸溶液(0.15 mol/L),用微波消解仪 90 ℃下恒温提取 50 min。提取完毕后冷却至室温,于 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,过 0.45 μm 滤膜,使用液相色谱-原子荧光光谱联用仪进行测定。

1.3 分析条件

砷形态的测定条件如表 1 所示。

表 1 砷形态测定条件

Table 1	Conditions for determination of arsenic morphology
条件	数值
色谱柱/mm	250×4.1
流动相/(mmol·L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (45)-Na ₂ HPO ₄ (5)
柱流速/(mL·min ⁻¹)	1.0
HCl 载流(V/V)/%	10
还原剂/(g·L ⁻¹)	KBH ₄ (20)-NaOH(5)
灯电流/mA	60/30
负高压/V	300
载气流速/(mL·min ⁻¹)	300
屏蔽气流速/(mL·min ⁻¹)	900
蠕动泵转速/(r·min ⁻¹)	60

2 结果与讨论

本文对影响测量的条件进行了优化,包括样品前处理、流动相选择、氢化物发生条件。

2.1 实验条件的优化

2.1.1 样品前处理

形态分析的前处理一定要保证被测组分不能发生形态转变。选取了某糙米样品(含 As(III)和 DMA 两种目标组分),使用稀硝酸进行提取,研究了热浸提取和微波提取两种方法。

热浸提取:称取约 1.0 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 硝酸溶液(0.15 mol/L),放置过夜。于 90 ℃ 恒温箱中热浸提 2.5 h,每 30 min 振摇 1 min。提取完毕,取出冷却至室温,于 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,过 0.45 μm 滤膜,使用液相色谱-原子荧光光谱联用仪进行测定。

微波提取:按样品处理方法处理样品,分别提取了 20、30、40、50、60 min,结果表明,50 min 时,目标组分已基本提取完全。

两种方法经过对比分析发现,微波提取与热浸提取的测定结果相当,鉴于微波提取大大缩短了样品前处理的时间,最终选用了微波提取,且提取时间为 50 min。

2.1.2 流动相

2.1.2.1 流动相的选择

不同的元素形态具有不同的理化性质和毒性,不同形态的砷化合物能够被离子交换色谱分离的主要原因是:在适宜的 pH 值下,砷的化合物能够在流动相中电离,以不同离子形态存在于水溶液中。通常,对流动相有如下要求:1)对被分析物具有合适的溶解度,并提供离子交换所必须的缓冲溶液;2)对被测离子有不同的洗脱能力,能从分离柱中依次取代这些离子;3)要有合适的离子强度,以控制各目标分析物的保留时间。离子交换色谱一般都以各种盐类的缓冲溶液作流动相,通过调节缓冲溶液类型、pH 值、离子强度,以及通过加少量有机溶剂等增加对被分析物的分离选择性,使待测样品达到良好的分离效果^[8]。

使用 Hamilton 阴离子交换柱,以 15 mmol/L

磷酸二氢铵(pH=6)为流动相,分离测定砷元素的 4 个形态(As(III)、MMA、DMA 和 As(V)),分析时间约为 15 min。为提高效率缩短分析时间,对流动相进行了调整。参照文献^[9],选取了 KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲体系,并摸索了其对砷形态分离的影响。最终确定的流动相组成为 KH₂PO₄ (45 mmol/L)-Na₂HPO₄ (5 mmol/L),使用该流动相砷形态 4 个组分能够在 7 min 内达到基线分离,分析时间远远低于国家标准“GB5009.17—2014”中给出参考的 12 min。

2.1.2.2 流动相的配制

NH₄H₂PO₄ (15 mmol/L, pH = 6):称取 1.7 g NH₄H₂PO₄,溶于 1 000 mL 水中,用氨水调节 pH 值为 6.0。

KH₂PO₄ (45 mmol/L)-Na₂HPO₄ (5 mmol/L):称取 3.026 g KH₂PO₄ 和 0.895 4 g Na₂HPO₄ · 12H₂O,溶于 500 mL 水中,混匀,溶液的 pH 值为 5.91,无需调节。

2.1.2.3 流动相的优化

按表 2 的比例配制流动相(pH 值实测值与表中吻合),分别使用上述流动相对砷形态标准溶液进行洗脱,LC-AFS 的其余测定条件见表 1。测定结果见图 1,从上至下对应流动相的 pH 值分别为:5.29、5.59、5.91、6.24、6.47、6.64、6.81、9.18,从图中可知:1)随着流动相 pH 值的增大,As(III)保留时间基本保持不变,As(V)的保留时间逐渐缩短;2) pH 值为 5.91 时,各组分分离效果最好;3) pH 值较低时,As(III)和 DMA 分离不好;4) pH 值较高时,DMA 和 MMA 分离不好,甚至两色谱峰完全重叠。

表 2 KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲溶液
Table 2 KH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer solution

A															
磷酸二氢钾(1/15 mol/L)/mL	10	9.75	9.5	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	0.5	0.0	
B															
磷酸氢二钠(1/15 mol/L)/mL	0.0	0.25	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	9.5	10.0	
pH 值(18 ℃)	4.49	5.29	5.59	5.91	6.24	6.47	6.64	6.81	6.98	7.17	7.38	7.73	8.04	9.18	

为获得更好的分离效果,在 KH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄ 比例为 9 : 1 的条件下,对流动相进行稀释以降低离子强度。实验了总浓度为 50 mmol/L 和 25 mmol/L 的流动相,其 pH 值均为 5.91,并与表格中的 1/15 mol/L(总浓度为 66.7 mmol/L)的

流动相进行对比分析,各组分的分离效果见图 2。从图 2 可知,随着流动相中盐浓度的降低,各组分的分离效果变好,但某些组分的保留时间延长且峰展宽严重。综合考虑选择了 50 mmol/L [KH₂PO₄ (45 mmol/L)-Na₂HPO₄ (5 mmol/L)] 的缓冲盐作为流动相。

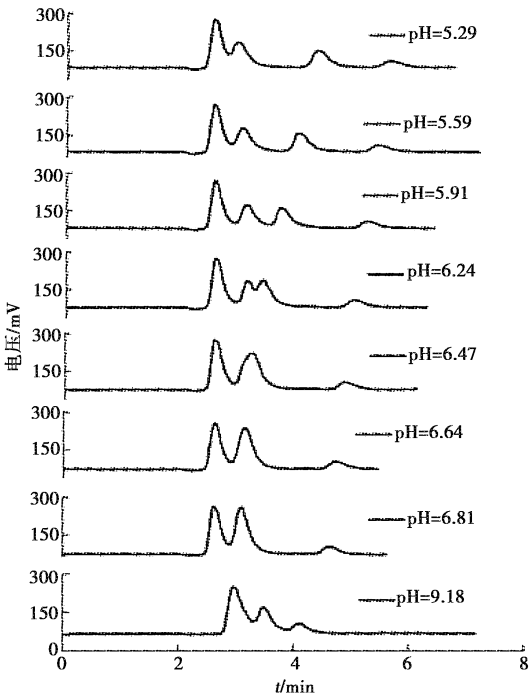


图 1 流动相对砷形态分离效果的影响
Figure 1 Effect of mobile phase on the separation efficiency of arsenic speciation

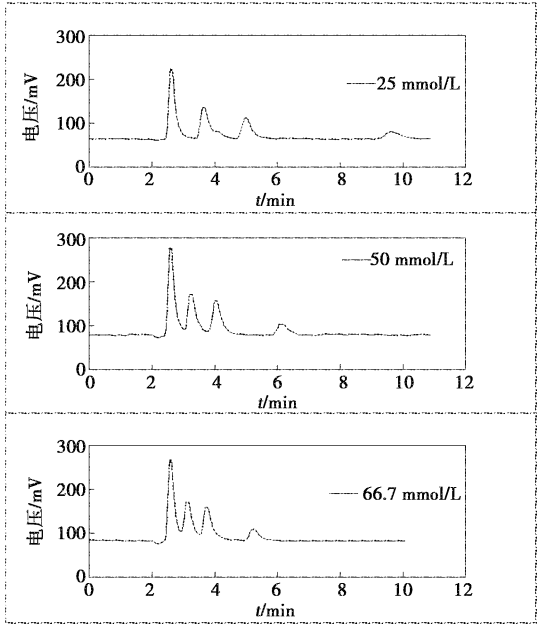


图 2 离子强度对分离效果的影响
Figure 2 Effect of ionic strength on the separation efficiency of arsenic speciation.

2.1.3 氢化反应条件

2.1.3.1 载流

以盐酸为载流,研究了其浓度对各形态峰面积的影响。从图 3 可知,当载流浓度为 2%时,峰面积较小,可能是由于酸浓度低时,反应速率低导致响应

值低;载流浓度为 5%时,峰面积最大。载流浓度大于 10%时,各组分的峰面积逐渐降低,可能是由于反应过程中产生的大量氢气稀释了原子化器中砷元素的浓度。但当载流为 10%时谱图的基线更平稳。最终,选择载流浓度为 10%。

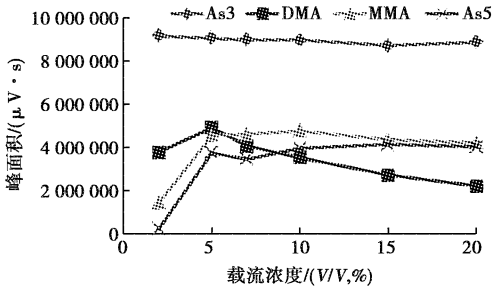


图 3 载流浓度对峰面积的影响
Figure 3 Effect of concentration of carrier current on the peak area.

2.1.3.2 还原剂

还原剂的作用是在一定的酸度下将砷元素各形态还原为氢化物。研究了 KBH_4 溶液浓度对砷形态峰面积的影响。从图 4 可知,当 KBH_4 浓度为 20 g/L 和 40 g/L 时,各组分的峰面积相对较高。考虑到 40 g/L 时“氢化反应”较剧烈,基线波动较大,最终选择了 20 g/L 的 KBH_4 作为还原剂。当 KBH_4 浓度为 10 g/L 时,响应值都偏低,这可能是由于氢化反应效率较低;当 KBH_4 浓度较高时,可能是由于反应过程中产生的大量氢气稀释了原子化器中砷原子的浓度,使得峰面积偏低。

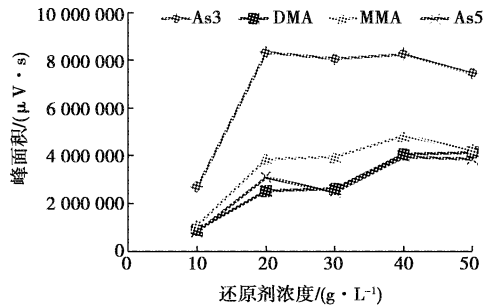


图 4 还原剂浓度对峰面积的影响
Figure 4 Effect of concentration of reducing agent on the peak area.

2.1.3.3 载气

实验研究了载气流速对各组分峰面积的影响。从图 5 可知,随着载气流速的增加,各组分的峰面积都逐渐降低,当载气流速为 200 mL/min 时各组分的峰面积最大;在实验中发现流速为 200 mL/min 时,

会引起较大的基线噪声和漂移。随着流速的继续增高,原子蒸汽被稀释,峰面积值降低。最终,选取 300 mL/min 为载气流速。

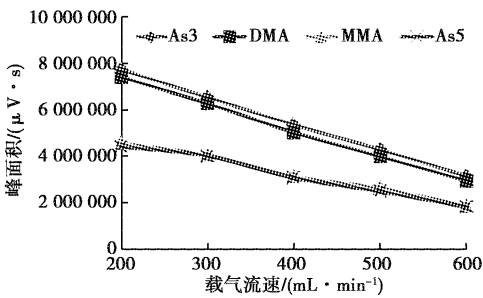


图 5 载气流速对峰面积的影响

Figure 5 Effect of speed of carrier gas on the peak area.

2.1.3.4 屏蔽气

屏蔽气能保持火焰形状稳定。研究了屏蔽气流速对各组分峰面积的影响。从图 6 图可知,屏蔽气流速为 900 mL/min 时,4 个组分的峰面积均最大。因此,选用 900 mL/min 为屏蔽气流速。

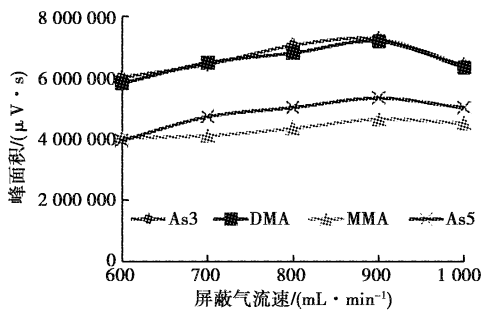


图 6 屏蔽气流速对峰面积的影响

Figure 6 Effect of speed of shielding gas on the peak area.

2.2 方法学考察

2.2.1 线性范围与检出限

考察方法的线性范围和检出限(以 3 倍的基线噪声比计),结果见表 3。配制一系列砷形态的标准样品:浓度为 2、4、6、8 和 10 ng/mL,绘制标准曲线,结果表明,各组分在测定范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.998 8。检出限分别为 0.29、0.47、0.62 和 1.16 ng/mL。

2.2.2 精密度实验

对同一浓度的砷形态标准溶液连续进样 7 次,将峰面积测定结果列于表 4 中,以峰面积 RSD 衡量定量重现性。从表 4 可知,峰面积 RSD 均低于 3.1%,表明方法重现性较好。

表 3 线性范围与检出限

Table 3 Linearity ranges and limits of detection			
组分名称	相关系数	线性范围/ (ng · mL ⁻¹)	检出限/ (ng · mL ⁻¹)
As(III)	0.999 8	2~10	0.29
DMA	0.998 8	2~10	0.47
MMA	0.999 2	2~10	0.62
As(V)	0.999 6	2~10	1.16

表 4 方法精密度实验

Table 4 The precision of the method				
项目	As(III)	DMA	MMA	As(V)
1	10137234	7952055	7258277	5082871
2	10183569	8424183	7449939	5325814
3	9914442	7984643	7183843	4927039
4	10028442	8077518	7167439	5149599
5	10654272	8462322	7571790	5120460
6	10209677	8013031	7240500	4842051
7	10209677	8075228	7342284	5024730
平均值	10191045	8141283	7316296	5067509
相对标准偏差 RSD/%	2.3	2.6	2.0	3.1

2.3 实际样品分析

按照实验方法分析 3 个市售大米样品以及 2 个糙米样品,将分析结果汇总于表 5 中。从表 5 数据可知,在所测定的样品中,As(III)都有检出、DMA 和 As(V)部分检出、MMA 均为未检出,且所有样品中总无机砷的含量均未超过“GB 2762—2012”中规定的限定值^[10](该标准中稻谷、糙米、大米中总无机砷的限量为 0.2 mg/kg)。

表 5 样品测定结果

Table 5 The determination results of samples					
样品	As(III)	DMA	MMA	As(V)	总无机砷 (mg · kg ⁻¹)
市售大米 1	0.107	0.013	-	-	0.107
市售大米 2	0.054	-	-	-	0.054
市售大米 3	0.100	-	-	-	0.100
糙米样品 1	0.082	0.012	-	0.055	0.137
糙米样品 2	0.078	0.010	-	0.053	0.131
稻米标准物质	0.232	0.019	-	0.066	0.297

另外,对稻米标准物质进行测定,该标准物质证书中总无机砷为(0.298±0.008) mg/kg,二甲基砷酸为(0.018 6±0.000 8) mg/kg。实际测定总无机砷的含量为 0.297 mg/kg,DMA 的含量为 0.019 mg/kg,可见结果都在不确定度范围内,说明该方法对无机砷的测定结果准确。

同时,对市售大米样品和糙米样品进行加标回收实验,添加水平为 2 ng/mL 和 4 ng/mL,并将加标

回收结果列于表 6 和表 7 中。结果表明,4 个组分在两类样品中的回收率都较好,回收率为 85.1%~113%。

表 6 市售大米 1 加标回收测定结果

Table 6 The recoveries of target analytes inrice sample 1 /(ng · mL ⁻¹)				
组分	样品检出浓度	加标浓度	加标检出浓度	回收率/%
As(III)	5.004	2	7.008	100
		4	8.818	96.3
DMA	-	2	1.861	93.1
		4	4.076	102
MMA	-	2	1.706	85.3
		4	3.701	92.5
As(V)	-	2	1.916	95.8
		4	4.202	105

2.4 方法比较

建立的微波提取法与 GB 5009.11—2014 的对

表 8 方法比较

Table 8 Comparison of the proposed method with the other method		
项目	原子荧光光谱法	GB 5009.17—2014 方法
样品前处理时间/ min	50	150
流动相	KH ₂ PO ₄ (45 mmol/L)-Na ₂ HPO ₄ (5 mmol/L) (无需调 pH 值)	NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH=6,15 mmol/L)
分析时间/min	7	15
HCl 载流(V/V)/%	10	20
KBH ₄ 还原剂(m/V)/%	2	3

3 结论

对 GB 5009.11—2014 中的样品前处理方法及砷形态测定的影响因素进行了优化研究。建立了更加高效环保的微波提取法,在最优条件下对稻米样品进行了测定,通过方法学考察和加标回收等实验,验证了该方法的有效性。结果表明该方法的线性范围、检出限、精密度和加标回收率等指标均良好,说明改进的方法完全可以用于稻米中砷形态的测定。

参考文献

[1] 陕红,袁志华,刘丹丹,等. HPLC-ICP-MS 法测定农业废水中有机砷与无机砷的方法研究[J]. 农业资源与环境学报 (Journal of Agricultural Resources and Environment), 2014, 31(2):197-201.

[2] 李昌平,李月娥,陈绍鹏,等. 高效液相色谱-原子荧光联用法测定水中形态砷[J]. 环境监测管理与技术 (The Administration and Technique of Environmental Monitoring), 2011, 23(6):61-64.

[3] 顾海东,陈邵鹏,秦宏兵. 高效液相色谱-原子荧光光谱联用分析土壤中形态砷[J]. 环境监测管理与技术 (The

比结果见表 8。从该表 8 可知,本实验所选择的微波提取法,前处理时间短、分析速度快,使用的载流和还原剂浓度也较低。

表 7 糙米样品 1 加标回收测定结果

Table 7 The recoveries of target analytes in rice sample 2 /(ng · mL ⁻¹)				
组分	样品检出浓度	加标浓度	加标检出浓度	回收率/%
As(III)	4.106	2	5.996	94.5
		4	8.618	113
DMA	0.576	2	2.435	93.0
		4	4.076	87.5
MMA	-	2	2.221	111
		4	3.701	92.5
As(V)	2.729	2	4.452	86.2
		4	6.811	102

Administration and Technique of Environmental Monitoring), 2012, 24(1):38-42.

[4] 魏茂琼,刘宏程,严红梅,等. 液相色谱-原子荧光法测定大米中 4 种砷形态[J]. 食品安全质量检测学报 (Journal of Food Safety & Quality), 2016, 7(9):3673-3677.

[5] 刘海涛,姚梦楠,薛慧,等. 高效液相色谱-原子荧光光谱 (HPLC-AFS) 法测定水产动植物样品中无机砷[J]. 中国无机分析化学 (Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry), 2017, 7(4):45-51.

[6] 陆守平,陈曦,刘洋,等. 液相色谱-原子荧光光谱联用法测定地下水中的三价砷和五价砷[J]. 中国无机分析化学 (Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry), 2017, 7(3):12-15.

[7] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品中总砷及无机砷的测定 GB 5009.11—2014[S]. 北京:中国质检出版社,2014.

[8] 师宇华,费强,于爱民,等. 色谱分析[M]. 北京:科学出版社,2015.

[9] 周同惠,汪尔康,陆婉珍,等. 分析化学手册基础知识与安全知识[M]. 第 2 版. 北京:化学工业出版社,1997.

[10] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准食品中污染物限量 GB 2762—2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.