

液相色谱-原子荧光联用法测定粮食中无机砷含量的不确定度评定

刘付英¹, 邵志凌¹, 李彩霞²

(1. 云南省粮油科学研究院, 云南 昆明 650033;
2. 玉溪师范学院化学生物与环境学院, 云南 玉溪 653100)

摘要:对液相色谱-原子荧光联用法测定粮食中无机砷含量进行不确定度评定, 为建立有效的质量控制方法提供参考。依据不确定度评定原理, 建立不确定度评定数学模型, 对各不确定度分量的来源进行分析、量化和合成, 并对测量结果的不确定度进行评定和表述。结果表明: 影响测量结果不确定度的主要因素为最小二乘法标准曲线拟合、样品回收率。无机砷含量测试结果表述为 (0.185 ± 0.017) mg/kg。

关键词:液相色谱-原子荧光联用法; 粮食; 无机砷; 不确定度

中图分类号: TS 210.7 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2018)04-0045-05

Evaluation of uncertainty in determination of inorganic arsenic in grain by liquid chromatography - atomic fluorescence spectrometry

LIU Fu - ying¹, SHAO Zhi - ling¹, LI Cai - xia²

(1. Yunnan Grain and Oil Science Research Institute, Kunming Yunnan 650033;
2. College of Chemistry Biology and Environment, Yuxi normal university, Yuxi Yunnan 653100)

Abstract: The uncertainty evaluation in the determination of inorganic arsenic in grain by liquid chromatography - atomic fluorescence spectrometry were evaluated to provide useful reference for establishing effective quality control methods. Based on the principle of uncertainty evaluation, the mathematical model of uncertainty was established and the source of each uncertainty component was analyzed, quantified and synthesized, and the uncertainty of measuring result was evaluated and described. The results showed that the main factors influencing the uncertainty included standard curve fitting of the least square method, and sample recovery rates. The inorganic arsenic content of the experimental determination result was (0.185 ± 0.017) mg/kg.

Key words: liquid chromatography - atomic fluorescence spectrometry; grain; inorganic arsenic; uncertainty

粮食中的砷以有机砷和无机砷两种形式存在, 其中无机砷(包括 As(Ⅲ)和 As(V))的毒性很高。按照《粮食质量安全监管办法》(国家发展和改革委员会令 第42号)对粮食质量安全监管工作的相关要求, 许多省份把无机砷列为粮食收购入库、粮食销售出库、粮食安全的限量为 0.2 mg/kg。《食品安全国家标准 食品中污染物限量》中规定, 食品中无机砷测定主要采用液相色谱-原子荧光光谱法

(LC-AFS)、液相色谱-电感耦合等离子质谱法(LC-ICP/MS)。依据 GB/T 32465—2015《化学分析方法验证确认和内部质量控制要求》, 实验室在采用扩充和修改过的标准方法前, 必须对新方法进行方法验证或确认, 以证实该方法适合于预期的用途。验证和确认具体的性能指标包括: 分析系统适用性、选择性、线性及校准、检出限和定量限、测量不确定度等。食品中无机砷测定的新方法对砷元素的各种形态进行了有效分离, As(Ⅲ)含量和 As(V)含量的加和为总无机砷含量, 真实地反映了食品中砷的安全性。据报道, 关于无机砷含量不确定

收稿日期: 2018-02-11

基金项目: 云南省科技厅青年项目(2016FD113)

作者简介: 刘付英, 1981年出生, 女, 硕士, 工程师。

通讯作者: 李彩霞, 1980年出生, 女, 博士, 讲师。

度的评定,研究人员常采用的是传统的原子荧光光度法^[1-5],液相色谱-原子荧光联用法更多被用于测定无机砷的含量^[6-11],对于无机砷含量不确定度评定方面,也仅在 GB 5009.11—2014《食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定》的编制说明^[12]中有较为详尽描述。在该编制说明中,研究人员对食品中无机砷不确定度评定进行了研究,其结果具有很好的普适性;但对于具体的某类样品(比如粮食),该研究结果则很难有针对性。本实验综合考虑粮食样品的自身属性及其无机砷的含量、限量、实验条件等,选用液相色谱-原子荧光联用法对粮食样品无机砷含量的不确定度进行评定。对测量结果及其质量进行不确定度评定,针对性更强,以期科学、正确评判粮食中无机砷的检验结果提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

硝酸、盐酸(均为优级纯)、氢氧化钠、硼氢化钾、磷酸二氢铵和氨水(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司。As(Ⅲ)、As(Ⅴ)标准溶液(1 000 mg/L):中国计量科学研究院。所用水为超纯水(电阻率小于 18.2 $\mu\text{s}/\text{cm}$)。

1.2 仪器和设备

液相色谱-原子荧光光谱联用仪(LC-AFS):北京吉天仪器有限公司;Direct Q5 UV 超纯水系统:法国密理博公司;3100 型实验磨:瑞典波通仪器公司;AR2130/C 型分析天平:梅特勒-托利多仪器有限公司;SF-TGL-16M 离心机:上海菲恰尔分析仪器有限公司;SX2-4-10 箱式电阻炉:上海市崇明实验仪器厂;PHS-25 pH 计:上海雷磁仪器厂;BCD-251WDPM 冰箱:青岛海尔股份有限公司。

所用器具均用 20% 的硝酸浸泡过夜,用超纯水充分冲洗备用。

1.3 实验方法

1.3.1 标准工作系列制备

As(Ⅲ)、As(Ⅴ)混合标准使用液(1.00 mg/L):分别准确吸取 1.0 mL As(Ⅲ)标准溶液(1 000 mg/L)、1.0 mL As(Ⅴ)标准液(1 000 mg/L)于 100 mL 容量瓶中,加水稀释并定容至刻度,得到 As(Ⅲ)、As(Ⅴ)混合标准液,浓度为 10.00 mg/L;准确吸取 10.0 mL As(Ⅲ)、As(Ⅴ)混合标准

液于 100 mL 容量瓶中,加水稀释并定容至刻度。

As(Ⅲ)、As(Ⅴ)混合标准工作液:分别准确吸取 1.00 mg/L 混合标准使用液 0.00、0.050、0.10、0.20、0.30、0.50 mL 于 10 mL 容量瓶中,加水稀释并定容至刻度,此标准系列溶液的浓度分别为 0.0、5.0、10、20、30、50 ng/mL。

1.3.2 样品前处理

称取约 1.0 g 稻米试样(准确至 0.001 g)于 50 mL 塑料离心管中,加入 20 mL 0.15 mol/L 硝酸溶液,放置过夜。于 90 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中热浸提 2.5 h,每 0.5 h 振荡 1 min。提取完毕,取出冷却至室温,8 000 r/min 离心 15 min,取上层清液,经 0.45 μm 有机滤膜过滤后进样测定。按同一操作方法作空白实验。

1.3.3 色谱条件

SAP-20 仪器参数:色谱柱:阴离子交换色谱柱(柱长 250 mm,内径 4 mm),阴离子交换色谱保护柱(柱长 10 mm,内径 4 mm)。流动相:15 mmol/L 磷酸二氢铵溶液(pH = 6.00)。流动相洗脱方式:等度洗脱。流动相流速:1.0 mL/min;进样体积:100 μL 。原子荧光光度计:负高压 280 V;灯电流 80 mA;载气流速 400 mL/min;辅助气流速:400 mL/min;载液:7% HCl;还原剂:0.5% KOH + 2% KHB₄。

2 结果与分析

2.1 数学模型

不确定度评定数学模型为:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000 \times 1\,000}$$

式中: X 为试样中无机砷的含量(以 As 计),mg/kg; c 为测定溶液中无机砷化合物浓度,ng/mL; c_0 为空白溶液中无机砷化合物浓度,ng/mL; m 为试样质量,g; V 为试样消化液体积,mL;1 000 为换算系数。

2.2 不确定度分量的来源及分析

根据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》和数学模型,液相色谱-原子荧光联用法测定粮食中无机砷含量的不确定度来源主要有:标准溶液,包括标准储备液自身的不确定度以及标准使用液稀释、标准工作液配制、标准曲线最小二乘法拟合产生的不确定度。样品称量,包括称量变动性及天平的最大允许误差;样品制备及处理过程,包

括样品均匀程度、提取液体积、处理过程中的样品回收率;测量的重复性。

2.3 不确定度分量的评定

2.3.1 标准溶液引入的不确定度

2.3.1.1 标准储备液 采用的 As(III)、As(V) 标准储备液浓度为 1 000 mg/L, 已知标准物质证书给出的 As(III) 的不确定度为 ±3.5 mg/L、As(V) 的不确定度为 ±3 mg/L, 按正态分布考虑, 包含因子 $k = 3$, 相对不确定度为: $\mu_{rel(As(III))} = \frac{3.5}{3 \times 1000} =$

1.17×10^{-3} ; $\mu_{rel(As(V))} = \frac{3}{3 \times 1000} = 1.00 \times 10^{-3}$, 标准储备液引入的相对不确定度为: $\mu_{rel(As)} = \sqrt{\mu_{rel(As(III))}^2 + \mu_{rel(As(V))}^2} = 1.54 \times 10^{-3}$ 。

2.3.1.2 标准溶液配制过程中由玻璃量器引入的不确定度 按照 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》的要求, 玻璃量器都有对应的最大允许误差, 其分布服从矩形分布, $k = \sqrt{3}$, 则标准溶液配制过程中由玻璃量器引入的不确定度见表 1。

表 1 标准溶液配制过程中玻璃量器引入的不确定度

玻璃量器	最大允许误差/mL	不确定度	相对不确定度
100 mL 容量瓶 A 级	±0.10	0.057 7	$\mu_1 = 5.77 \times 10^{-4}$
10 mL 容量瓶 A 级	±0.020	0.011 5	$\mu_2 = 1.15 \times 10^{-3}$
0.5 mL 分度吸量管 A 级	±0.005	2.89×10^{-3}	$\mu_3 = 5.78 \times 10^{-3}$
1 mL 单标线吸量管 A 级	±0.007	4.04×10^{-3}	$\mu_4 = 4.04 \times 10^{-3}$
10 mL 单标线吸量管 A 级	±0.020	0.011 5	$\mu_5 = 1.15 \times 10^{-3}$

根据各玻璃量器的相对不确定度, 合成后为:

$$\mu_{rel(v1)} = \sqrt{(\mu_1)^2 + (\mu_2)^2 + (\mu_3)^2 + (\mu_4)^2 + (\mu_5)^2} = 7.26 \times 10^{-3}$$

玻璃量器的校准温度为 20 °C, 假定实验室的温度在 (20 ± 5) °C 之间变动, 考虑到液体体积膨胀, 假设为矩形分布, 水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/\text{°C}$, 则温度变化引起的相对不确定度为:

$$\mu_{rel(w)} = \frac{5 \times 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 6.06 \times 10^{-4}$$

温度变化引起的合成相对不确定度:

$$\mu_{rel(v2)} = \sqrt{5 \times 0.000606^2} = 1.36 \times 10^{-3}$$

则标准溶液配制过程中由玻璃量器引入的相对不确定度为:

$$\mu_{rel(v)} = \sqrt{\mu_{rel(v1)}^2 + \mu_{rel(v2)}^2} = 7.39 \times 10^{-3}$$

2.3.1.3 标准曲线引入的不确定度 校准曲线是通过测定不同浓度的标准工作液而拟合的, 采用 6 个浓度水平的标准溶液, 每个浓度测量 3 次, 样品溶液测定 6 次, 测得 As(III)、As(V) 的峰面积, 用最小二乘法拟合, 得到 As(III) 的直线方程 $y = 7 470.2x + 1 686$, $R = 0.999 9$, 得到 As(V) 的直线方程 $y = 4 959.3x + 492.09$, $R = 0.999 7$, 详

见表 2。由标准曲线校正引入的不确定度计算公式为:

$$\mu_{(c0)} = \frac{s_{(y)}}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_{0i} - \bar{c})^2}{S_{cci}}}$$

$$S_{(y)} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [y_j - (a + bc_j)]^2}{n - 2}}$$

为标准溶液峰面积

残差的标准偏差; $S_{cci} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2$ 为标准溶液浓度残差的平方和; c_0 为实测样品的平均质量浓度; \bar{c} 为标准溶液浓度的平均值 (见表 3); p 为样品溶液测定的次数 $p = 6$; n 为标准溶液测定的总次数 $n = 18$; c_j 为各标准溶液中的砷浓度 (ng/mL); b 为拟合曲线的斜率; a 为拟合校准曲线的截距。

其中: $S_{(y)As(III)} = 2 494.616$ ng/mL; $S_{(cc)As(III)} = 2 711.304$ ng/mL; $S_{(y)As(V)} = 5 164.302$; $S_{(cc)As(V)} = 5 167.205$ 。

计算: $\mu_{(c0As(III))} = 0.170$, $\mu_{(c0As(V))} = 0.283$

$$\mu_{(c0)} = \sqrt{\mu_{(c0As(III))}^2 + \mu_{(c0As(V))}^2} = 0.330$$

ng/mL

$$\mu_{rel(c0)} = \frac{\mu_{(c0)}}{c_0} = 0.035 6$$

表2 校准标准溶液的峰面积测定结果

标准系列浓度 c/(ng/mL)	组分	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}
0		0	0	0	0
5	As ³⁺	38 804.7	37 556.8	38 180.8	38 180.8
10		79 570.5	79 102.5	79 336.5	79 336.5
20		155 893.4	148 952.6	152 423.0	152 423.0
30		226 822.5	221 254.8	224 038.7	224 038.7
50		377 178.1	373 245.6	375 211.9	375 211.9
0		0	0	0	0
5	As ⁵⁺	23 082	22 586.3	22 834.2	22 834.2
10		52 379.6	48 581.2	50 480.4	50 480.4
20		99 785.2	104 525.5	102 155.4	102 155.4
30		154 350.1	148 677.8	151 514.0	151 514.0
50		249 114.3	243 453.6	246 284.0	246 284.0

表3 样品溶液测试结果

测定 次数	As ³⁺ 浓度 /(ng/mL)	As ⁵⁺ 浓度 /(ng/mL)	无机砷浓度 /(ng/mL)	无机砷浓度 /(mg/kg)
1	5.618	3.682	9.300	0.186
2	5.523	3.826	9.349	0.187
3	5.456	3.715	9.171	0.183
4	5.625	3.596	9.221	0.184
5	5.688	3.637	9.325	0.187
6	5.731	3.468	9.199	0.184
平均值	5.607	3.654	9.261	0.185

2.3.1.4 标准溶液引入的合成相对不确定度 标准溶液引入的合成相对不确定度:

$$\mu_{rel(b)} = \sqrt{\mu_{rel(As)}^2 + \mu_{rel(c0)}^2 + \mu_{rel(v)}^2} = 0.0364。$$

2.3.2 样品称量引入的不确定度

2.3.2.1 称量变动性 用电子天平反复称量10次,得到天平变动性标准偏差为 $\mu_{(m1)} = 2.98 \times 10^{-3}$,则 $\mu_{rel(m1)} = 2.98 \times 10^{-3}$ 。

2.3.2.2 天平的最大允许误差 根据天平的检定证书可知其最大允许误差为 ± 0.5 mg,称样量1.000 g,按均匀分布换算:

$$\mu_{rel(m2)} = \frac{0.5}{1000 \times \sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-4}。$$

2.3.2.3 样品称量的合成相对不确定度 样品称量的合成相对不确定度:

$$\mu_{rel(m)} = \sqrt{\mu_{rel(m1)}^2 + \mu_{rel(m2)}^2} = 2.99 \times 10^{-3}。$$

2.3.3 样品制备和处理过程

2.3.3.1 样品均匀程度 根据 GB 5009.11—2014《食品安全国家标准食品中总砷及无机砷的测定》的规定,将样品充分混匀后再随机取样,可认为样品是均匀的,具有一定的代表性,由此所引入的不确定度可忽略不计。

2.3.3.2 提取液体积 JJG 196—2006 规定,20 mL 单标线吸量管(A级)的最大允许误差为 ± 0.030 mL,假设为三角分布。考虑到实验室环境温度一般在 $\pm 5^\circ\text{C}$ 范围波动,液体体积膨胀假设为矩形分布,水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$,则提取液体积引入的合成相对不确定度为:

$$\mu_{rel(t)} = \sqrt{(8.66 \times 10^{-4})^2 + (6.06 \times 10^{-4})^2} = 1.13 \times 10^{-3}$$

2.3.3.3 样品的回收率 样品处理过程涉及一系列的操作步骤,其中每一步操作都会引起不确定度,影响不确定度因素较多。此项不确定度可以通过样品的回收率来进行评定,见表4。则由样品回收率引入的相对不确定度为:

$$S_{\bar{R}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_i - \bar{R})^2}{n-1}}$$

$$\mu_{rel(R1)} = \frac{S_{\bar{R}}}{\bar{R} \sqrt{n}} = \frac{0.0490}{0.967\sqrt{6}} = 0.0207$$

$$\mu_{rel(R2)} = \frac{S_{\bar{R}}}{\bar{R} \sqrt{n}} = \frac{0.0448}{0.952\sqrt{6}} = 0.0192$$

$$\mu_{rel(R)} = \sqrt{\mu_{rel(R1)}^2 + \mu_{rel(R2)}^2} = \sqrt{(0.0207)^2 + (0.0192)^2} = 0.0282$$

表4 回收率测试结果

测定次数	回收率/%	
	As ³⁺	As ⁵⁺
1	91.5	89.3
2	96.6	92.6
3	98.2	97.2
4	105.5	102.4
5	94.8	95.8
6	93.6	93.6
平均值	96.7	95.2
S	4.90	4.48

2.3.3.4 样品制备和处理过程引入的合成相对不确定度 样品制备和处理过程引入的合成相对不确定度:

$$\begin{aligned}\mu_{\text{rel}(y)} &= \sqrt{(\mu_{\text{rel}(t)})^2 + \mu_{\text{rel}(R)}^2} \\ &= \sqrt{(1.13 \times 10^{-3})^2 + (0.0282)^2} \\ &= 0.0282.\end{aligned}$$

2.3.4 测量的重复性引入的不确定度

对某一样品进行6次重复测定,其测定结果见表3。求出样品重复性进样引入的相对不确定度:

$$\mu_{\text{rel}(x)} = \frac{S}{x\sqrt{n}} = \frac{0.00172}{0.185 \times \sqrt{6}} = 3.80 \times 10^{-3}.$$

2.4 相对不确定度的合成与扩展

2.4.1 合成标准不确定度

根据以上计算的各不确定度分量,计算最终的合成标准不确定度为:

$$\begin{aligned}\mu_{\text{rel}} &= \sqrt{\mu_{\text{rel}(b)}^2 + \mu_{\text{rel}(m)}^2 + \mu_{\text{rel}(y)}^2 + \mu_{\text{rel}(x)}^2} \\ &= 0.0463.\end{aligned}$$

2.4.2 扩展不确定度的评定

测量结果的扩展不确定度包含因子 $k=2$,置信概率 $P=95\%$,则无机砷含量测定的扩展不确定度:
 $U=0.185 \times 0.0463 \times 2 = 0.0171 \text{ mg/kg}$ 。

2.5 结果报告

待测样品中的无机砷含量表示为 $(0.185 \pm 0.017) \text{ mg/kg}$ 。

3 结论

以液相色谱-原子荧光联用法测定粮食中的无机砷含量,结果表示为无机砷含量 $(0.185 \pm 0.017) \text{ mg/kg}$,测定结果合理、分散性小。从影响测定结果的不确定度的诸多因素中,其中标准曲线最小二乘法拟合引入的不确定度最大,其次是回收

率,而其他因素引入的不确定度可忽略不计。

从不确定度的评定过程来看,针对液相色谱-原子荧光联用法测定粮食中无机砷含量中引入不确定度的主要因素,要想获得较小不确定度的测定结果,需要对校准溶液规范制备,在标准曲线配制时应使中点与样品浓度接近,同时样品处理过程中尽量规范操作步骤,必要时需要使用回收率校正因子对实验结果进行修正^[13],以减小实验过程中的不确定度,从而使测试结果的准确率提高,不仅为准确评估粮食质量安全风险提供了依据,而且提高了粮食质量安全评判的科学性,对指导粮食收购、存储、加工、销售等具有重要的导向意义。

参考文献:

- [1] 张建辉,石国荣,杨代明,等. 超声波提取-原子荧光光度法测定食品中无机砷及其不确定度的评估[J]. 食品与机械, 2009, 25(5):117-120.
- [2] 姚文冰. 氢化物原子荧光光谱法测定大米中无机砷的不确定度评定[J]. 中国药师, 2012, 15(6):902-904.
- [3] 李慧,李承凯,黄华,等. 原子荧光法测定乳品中无机砷的不确定度分析[J]. 中国食品工业, 2013(7):44-46.
- [4] 何岩,于治宇,张徐. 银盐法测定稻谷中无机砷含量的不确定度评定[J]. 粮食储藏, 2012, 41(5):48-51.
- [5] 杜京霖. 原子荧光光谱法测定稻谷中无机砷含量的不确定度[J]. 粮食流通技术, 2014(5):35-37.
- [6] 胡容,张颖,徐全金,等. 液相色谱-原子荧光联用法测定大米中无机砷含量[J]. 贵州科学, 2017, 35(1):87-89.
- [7] 尚德荣,于劲松,赵艳芳,等. 高效液相色谱-氢化物发生原子荧光(HPLC-HG-AFS)联用技术检测海藻食品中无机砷[J]. 水产学报, 2010, 34(1):132-138.
- [8] 吴思霖,于建,王欣美,等. 高效液相色谱-原子荧光联用技术测定水产品中无机砷[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7):2658-2662.
- [9] 赵付开. 高效液相色谱-原子荧光联用仪测定大米中的无机砷[J]. 农技服务, 2017(11).
- [10] 黄亚涛,毛雪飞,杨慧,等. 高效液相色谱-原子荧光联用技术测定大米中无机砷[J]. 广东农业科学, 2013, 40(12):117-121.
- [11] 姚晶晶,袁友明,王明锐,等. 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光法测定大米中的四种砷形态[C]// 全国光谱仪器与分析监测学术会议. 2011.
- [12] GB 5009.11-2014,《食品安全国家标准食品中总砷及无机砷的测定》的编制说明[EB/OL]. <http://www.doc88.com/p-7784790285588.html>
- [13] 陆美斌,李为喜,李静梅,等. 电感耦合等离子体质谱法测定谷物中砷镉的不确定度评定[J]. 中国食品学报, 2014, 14(5):180-185. 