

# 使用 LC-ICP-MS/MS 快速分析葡萄酒中的砷形态

## 应用简报 食品和饮料

### 作者

Courtney Tanabe<sup>1-2</sup>, Susan E. Ebeler<sup>1-2</sup>, Jenny Nelson<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> 美国加州大学戴维斯分校食品安全与测量机构

<sup>2</sup> 美国加州大学戴维斯分校葡萄栽培和酿酒系

<sup>3</sup> 安捷伦科技有限公司, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市



### 前言

砷 (As) 天然存在于环境中, 但人类活动也会造成某些地区的砷含量增加。人为砷来源包括采矿、冶炼和发电等工业过程, 以及农业农药和木材防腐剂等<sup>[1]</sup>。一旦发生砷污染, 其在环境中可存在数十年。例如, 在 20 世纪 70 年代禁止了含砷农用化学品的广泛使用, 但在一些土壤中, 砷酸铅和砷酸钙的含量仍然很高。土壤和水中的砷可被农作物吸收。以葡萄酒为例, 砷含量也会受到酿酒过程的影响。

砷在食品和饮料中以多种形式存在, 每种形式的毒性各不相同。砷的无机形式 (iAs) 包括 As(III) (亚砷酸盐) 和 As(V) (砷酸盐), 这些形式的毒性最高, 被归类为 1 类致癌物质。相比之下, 砷甜菜碱 (AB) 是新鲜海鲜中含量最高的 As 形式, 对人体基本上无毒。由于不同形态 As 毒性的极大差异

经验证适用于 Agilent  
8900 ICP-MS/MS



Agilent Technologies

以及 iAs 潜在的健康威胁, 因此很有必要测定食品中各种形态砷的含量, 而不仅仅是总 As 浓度。美国食品药品监督管理局 (FDA) 对苹果汁中的 iAs 规定了 10 µg/kg (ppb) 的行动限值<sup>[2]</sup>, 但美国目前尚未颁布葡萄酒中 As 含量的控制法规。加拿大 (酒商质量联盟 (VQA), 安大略省) 和欧洲 (国际葡萄与葡萄酒组织 (OIV)) 分别将葡萄酒中总砷的最高可接受限值规定为 100 µg/L 和 200 µg/L (ppb)<sup>[3, 4]</sup>。

食品砷污染是公众关注的焦点。因此, 非常需要快速可靠的筛查方法来准确测定食品和饮料中的 iAs 含量, 以满足现有和未来的法规要求。其中, 最有用且可靠的一种方法是, 使用高效液相色谱 (HPLC) 对不同形态的砷进行分离, 然后采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 进行定量分析<sup>[5]</sup>。

本文所述的方法基于先前由 Jackson 开发的 As 形态分析方法, 该方法将 HPLC 与串联四极杆 ICP-MS (ICP-MS/MS) 联用<sup>[6]</sup>。本研究也采用 HPLC-ICP-MS/MS。然而, 与分别分析 iAs 形态不同, 在分析之前先用过氧化氢将 As(III) 氧化为 As(V)<sup>[7, 8]</sup>。本方法通过转化 As(III) 并以 As(V) 的形式分析所有无机形态, 能够在 2 分钟内将一甲基砷酸 (MMA) 和二甲基砷酸 (DMA) 与 iAs (呈 As(V) 形态) 分离。本方法的分析时间比当前用于 As 形态分析的 FDA 方法快 10 倍<sup>[9]</sup>。

在本研究中, 在 ICP-MS/MS 碰撞/反应池 (CRC) 中采用氧气作为反应气体, 以解决对 <sup>75</sup>As 的光谱干扰, 同时保持出色的灵敏度。结果证明, 新方法具有出色的准确性和重现性。由两个参与实验室分析同一种葡萄酒基质, 对本方法进行了进一步验证。

## 实验部分

### 标准品

As (III) 和 As (V) 标准品购自 Spex Certiprep (Christiansburg, VA; Metuchen, NJ, USA)。MMA 和 DMA 标准品购自 Chem Service (West Chester, PA, USA)。AB 标准品同样购自 Chem Service, 将其用作流动注射标记物 (内标) 进行柱后注射。对于 DMA、MMA 和总 iAs (As (III) 和 As (V) 总和), 制备浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10 和 20 µg/L (ppb) 的校准标样。

### 样品

在验证 (V) 研究中使用五种不同的加利福尼亚葡萄酒。每种葡萄酒分别代表五种主要形式的葡萄酒之一: 红葡萄酒、白葡萄酒、玫瑰红葡萄酒、起泡酒和餐后甜酒。在商品市场菜篮子 (MB) 研究中, 对另外五种加利福尼亚葡萄酒进行了分析。表 1 列出了所有样品的葡萄酒类型、栽培品种、种植产地、年份和酒精含量的详细信息。

表 1. 用于验证和商品市场菜篮子研究的葡萄酒样品的葡萄酒类型、栽培品种、产地、年份和酒精含量

样品	类型	栽培品种	产地	年份	酒精含量 (%v/v)
V-1	玫瑰红葡萄酒	仙粉黛	纳帕与洛迪	不适用	9.5
V-2	白葡萄酒	白苏维浓	奥克维尔/纳帕县	2013	13.0
V-3	起泡酒	起泡白葡萄酒混酿	索诺马县	不适用	12.0
V-4	餐后甜酒	小西拉波特	克拉克斯堡/优洛县	2012	20.0
V-5	红葡萄酒	赤霞珠	蒙特雷县	2013	14.5
MB-1	红葡萄酒	赤霞珠	北海岸	2009	13.5
MB-2	红葡萄酒	黑比诺	中央海岸产区	2004	13.8
MB-3	白葡萄酒	莎当妮	圣巴巴拉县	2013	13.5
MB-4	玫瑰红葡萄酒	仙粉黛	纳帕与索诺马	2013	10.5
MB-5	白葡萄酒	莎当妮	中央海岸	2013	13.5

### 样品前处理

以 1:1 的比例将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入所有样品中, 将 As(III) 氧化为 As(V)。用去离子水进一步稀释每个样品, 使总稀释倍数为 5 或 6 (两个稀释倍数之间的结果没有差异)。然后使每个样品通过 0.45 µm 针头过滤器, 以除去所有颗粒物。所有 As 形态按以下三种浓度加标至样品 V-1、V-4、V-5 (均为一式两份): 5、10、30 µg/kg。

### 仪器

将配备 Hamilton PRP-X100 5 µm 50 × 2.1 mm 色谱柱的 Agilent 1260 HPLC 与 Agilent 8800 串联四极杆 ICP-MS (ICP-MS/MS) 联用。流动相为 40 mmol/L 碳酸铵 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 痕量金属级 99.999%, 购自 Sigma Aldrich), 其中含 3% v/v 甲醇 (Optima LC/MS 级, 购自 Fisher Chemical), 并用氢氧化铵 (Optima 级, Fisher Scientific) 将 pH 调节至 9.0。ICP-MS/MS 配备

标准样品引入系统，该系统包括带内径 2.5 mm 中心管的石英炬管、石英雾化室、玻璃同心雾化器和镍接口锥。按照 FDA EAM §4.10 和 4.11.15 进行峰积分<sup>[9]</sup>。仪器操作条件汇总于表 2 中。

表 2. HPLC-ICP-MS/MS 操作条件

ICP-MS/MS	
正向功率	1550 W
采样深度	8.0 mm
雾化室温度	2 °C
载气	0.95 L/min
尾吹气	0.20 L/min
提取电压 1	0 V
八极杆偏置电压	-5.0 V
动能歧视电压	-7 V
池气体 (O <sub>2</sub> ) 流速	0.31 mL/min
扫描模式	MS/MS
Q1/Q2 质量数	75/91 u
HPLC	
流动相流速	0.5 mL/min
进样量	5 µL
样品温度	4 °C
ISTD 进样量	5 µL

## 结果与讨论

### 快速方法的开发

在本研究中，方法开发的重点在于缩短每个样品的分析时间。在本方法的开发过程中，我们参照 Jackson 的方法，使用较小的进样量、短离子交换色谱柱、氧气池气体和高流动相线速度<sup>[6]</sup>。

图 1 示出了 0.5、1.0、5.0 和 20 µg/kg 代表性校准标样组的重叠色谱图。所有 As 形态均在两分钟内得到清晰分离。只需将 As(III) 氧化为 As(V) 并以 As(V) 的形式分析所有 iAs，即可相对当前的 FDA 法规方法显著缩短分析时间<sup>[9]</sup>。

### 线性校准

DMA、MMA 和 iAs 的校准曲线均显示出良好的线性 (图 2)。除 iAs 外，葡萄酒样品中的所有 As 浓度均在线性范围内，iAs 是在最高浓度校准标样的 150% 的最大浓度下测定的。

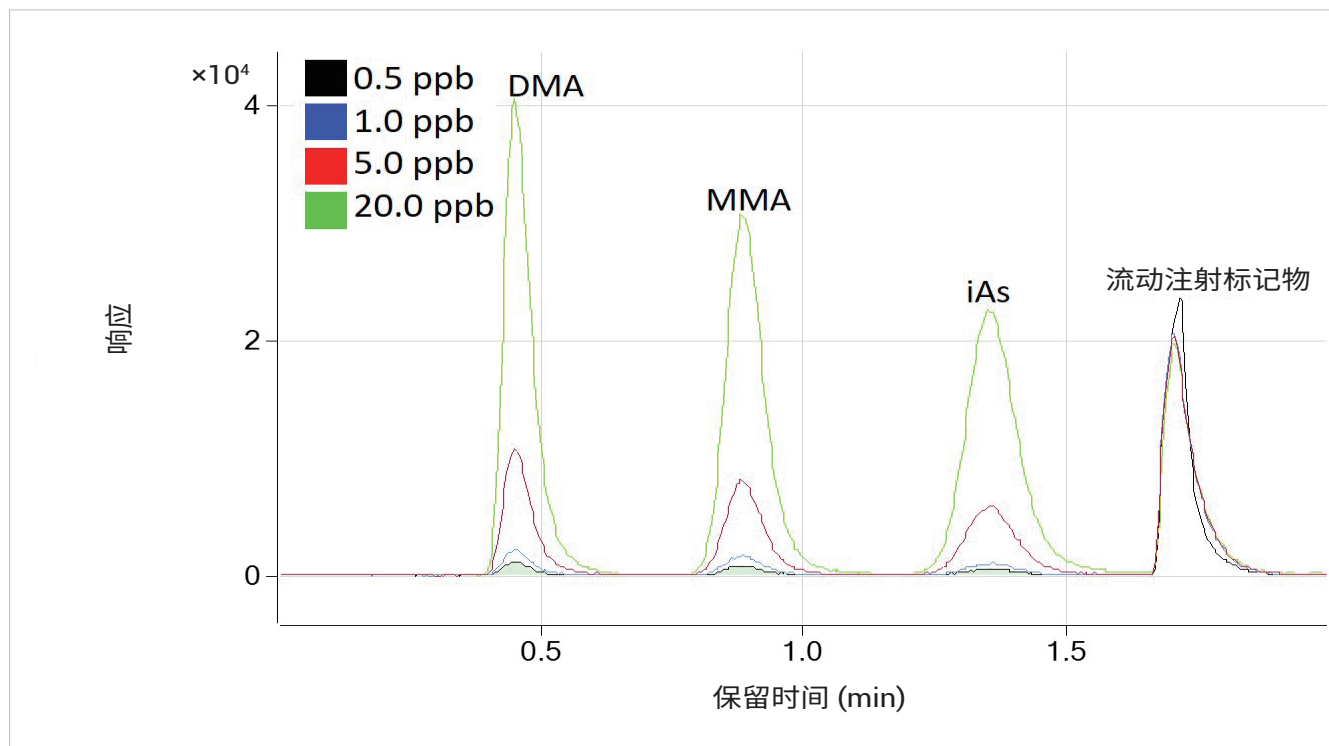


图 1. 0.5、1.0、5.0 和 20.0 µg/kg 校准标样的叠加图。通过外部切换阀在柱后加入 AB 内标 (流动注射标记物; 第四个峰)

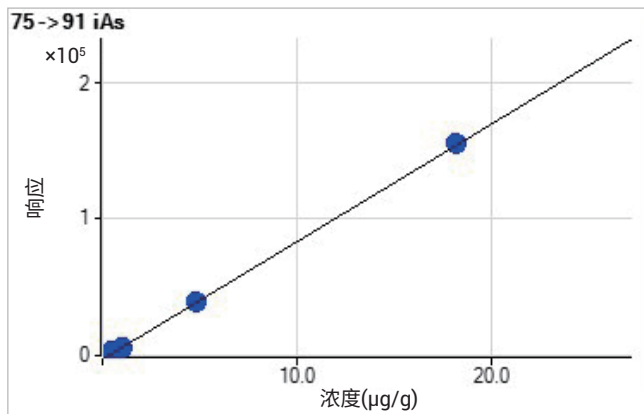
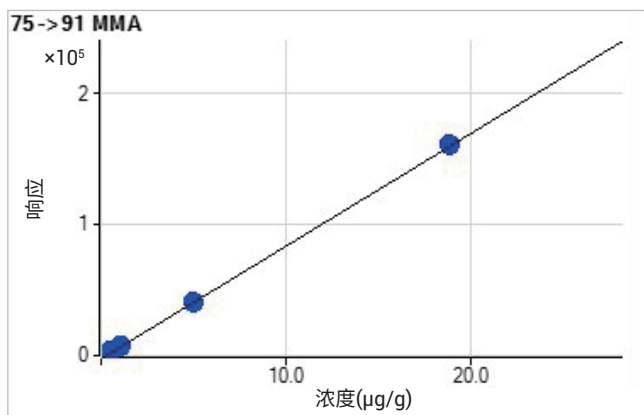
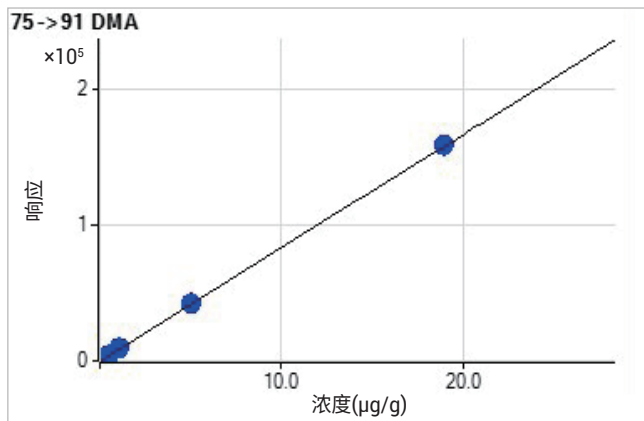


图 2. DMA、MMA 和总 iAs (转换后的 As (III) 和 As (V) 的总和) 的校准曲线

### 检测限

表 3 列出了对 0.05 µg/kg (ppb) 混标进行重复测定得到的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ), n = 15。

表 3. LOD (3σ)、LOQ (30σ) 和葡萄酒 LOQ 估算值

	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	葡萄酒 LOQ 估算值, (6 倍稀释) µg/kg
DMA	0.018	0.175	1.1
MMA	0.026	0.258	1.5
iAs	0.022	0.221	1.3

经英国皇家化学学会授权引用

### 加标回收率

将每种形态 (DMA、MMA 和按 As (V) 计的总 iAs) 以 5、10 和 30 µg/kg 的浓度对样品 V-1、V-4 和 V-5 进行加标 (均为一式两份)。在三种不同的加标浓度下, 所有 As 形态的平均回收率为 100±3% (表 4)。

表 4. 葡萄酒 V-1、V-4 和 V-5 中三种加标浓度的 DMA、MMA 和 iAs 的回收率 (平均值和范围)

	DMA	MMA	iAs
平均值, %	102	97	99
范围, %	97-107	91-102	95-103

### 定量结果

使用全新的 HPLC-ICP-MS/MS 方法对所有 10 种葡萄酒进行分析。表 5 列出了 DMA 和 iAs 的实测浓度。所有 MMA 的浓度均低于计算得到的 LOD (0.026 µg/kg), 无法定量。将使用新方法得到的实测浓度与使用 FDA EAM §4.10 扩展方法<sup>[10]</sup>得到的值进行比较。测量结果之间的一致性大都处于 ±10% 以内。在所有葡萄酒中, iAs 代表了大部分 As, 仅有一个葡萄酒样品 (MB-3) 中包含的 DMA 浓度明显高于 1.1 µg/kg 的 LOQ。V-1 的色谱图见图 3。

总体来说, iAs 的浓度范围为 1.7±0.3 至 32.9±0.8 µg/kg (后者高于 FDA 规定的苹果汁中 iAs 的行动限值 10 µg/kg)。所有 As 形态的浓度之和 (表 5) 的范围从 2.2±0.3 µg/kg 的最低值到 32.9±0.8 µg/kg 的最高值, 这个范围低于 100 µg/L 的加拿大限值和 200 µg/L 的 OIV 限值。

表 5. 对于五种验证 (V) 葡萄酒和五种市场菜篮子 (MB) 葡萄酒, 将采用快速且“切合实际需求”的分析方法的结果 (在两个不同实验室测得) 与 FDA EAM §4.10 扩展方法的结果进行比较。将“实测值”除以“EAM §4.10”并将“形态总和”除以“总浓度”, 计算得到百分比回收率 (在括号中给出)

样品	DMA (µg/kg)		iAs (µg/kg)		总砷 (µg/kg)	
	EAM §4.10	实测值	EAM §4.10	实测值	总浓度	形态总和
V-1	0.81 ± 0.1*	0.72 ± 0.04 (89%)	14.4 ± 1.0	16.0 ± 0.5 (111%)	16.5 ± 0.02	16.7 ± 0.5 (101%)
V-2	0.74 ± 0.04*	0.72 ± 0.06 (98%)	10.7 ± 0.2	11.4 ± 0.4 (107%)	12.6 ± 0.16	12.1 ± 0.3 (96%)
V-3	0.75 ± 0.1*	0.83 ± 0.04 (111%)	9.2 ± 0.4	9.5 ± 0.6 (103%)	10.4 ± 0.11	10.3 ± 0.5 (99%)
V-4	1.70 ± 0.1	1.86 ± 0.06 (109%)	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.4 (109%)	4.5 ± 0.01	4.1 ± 0.4 (92%)
V-5	0.45 ± 0.01*	0.47 ± 0.04 (105%)	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.3 (113%)	2.4 ± 0.03	2.2 ± 0.3 (90%)
MB-1	< LOD	< LOD	30.2 ± 1.3	32.9 ± 0.8 (109%)	34.4 ± 0.4	32.9 ± 0.8 (96%)
MB-2	0.33 ± 0.04*	< LOD	7.57 ± 0.49	9.1 ± 0.4 (120%)	9.1 ± 0.3	9.1 ± 0.4 (100%)
MB-3	0.71 ± 0.08*	1.1 ± 0.0 (155%)	24.64 ± 0.40	27.6 ± 0.7 (112%)	28.9 ± 0.9	28.6 ± 0.7 (99%)
MB-4	1.16 ± 0.09*	1.0 ± 0.1 (86%)	26.3 ± 0.89	27.5 ± 0.9 (105%)	27.9 ± 0.9	28.5 ± 0.9 (102%)
MB-5	< LOD	< LOD	3.5 ± 0.25	4.5 ± 0.1 (129%)	4.7 ± 0.1	4.5 ± 0.1 (96%)

平均值 ± 1σ, n = 3。\* 表示值介于 EAM §4.10 方法的 LOD (0.17 µg/kg) 和 LOQ (1.3 µg/kg) 之间。有关 LOD 和 LOQ 实测值, 请参见表 3

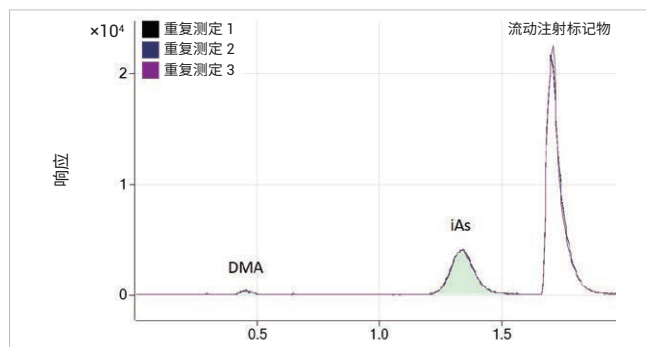


图 3. 葡萄酒样品 V-1 三次重复测定的叠加色谱图

在本研究中, 总砷浓度范围为 2.2–32.9 µg/kg, 远低于加拿大安大略省规定的限值 (100 µg/kg) 和欧洲国际葡萄与葡萄酒组织规定的最大限值 (200 µg/kg)。然而, iAs 是葡萄酒中的主要形态, 测试的五种葡萄酒中的 iAs 浓度超出了 FDA 规定的苹果汁中 iAs 的行动限值 (10 µg/kg)。

采用快速且“切合实际需求”的新方法获得的结果与使用 FDA EAM §4.10 获得的数据非常吻合。

## 结论

本简报介绍了一种简单、稳定且快速的 HPLC-ICP-MS/MS 方法, 该方法可在两分钟内完成对毒性最高的无机 As 形态 (As(III) 和 As(V)) 的总浓度以及两种有机 As 形态的测量。在样品前处理期间, 用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 将 As (III) 氧化成 As (V), 能够以 As (V) 形式测定总 iAs, 从而更快速地从葡萄酒样品中的目标组分。窄径色谱柱和 0.5 mL/min 流速提供了出色的灵敏度, 从而能够使用更低的进样量。与目前用于测定葡萄酒中砷的 FDA 方法相比, 本方法的样品运行时间加快了 10 倍, 并改善了检测限和定量限。

## 参考文献

1. H. Garelick, H. Jones, A. Dybowska, E. Valsami-Jones, Arsenic pollution sources, *Rev Environ Contam Toxicol.* **2008**, 197, 17-60
2. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, Guidance for Industry Arsenic in Apple Juice: Action Level (draft), 2013, 2017 年 8 月访问: <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm360020.htm>
3. Canada Ontario, V. Q. A., Wine Standards.1999, 2017 年 8 月访问: <http://www.vqaontario.ca/Regulations/Standards>
4. OIV-Compendium of International Methods of Analysis. Maximum acceptable limits of various substances contained in wine, 2011 issue. Europe
5. B. Sadee, M. E. Foulkes, S. J. Hill, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**, 30, 102-118
6. B. P. Jackson, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**, 30, 1405-1407
7. S. Musil, Á.H. Pétursdóttir, A. Raab, H. Gunnlaugsdóttir, E. Krupp, J. Feldmann, *Anal. Chem.*, **2014**, 86 (2), 993-999
8. H. R. Hansen, A. Raab, A. H. Price, G. Duan, Y. Zhu, G. J. Norton, J. Feldmann, A. A. Meharg, *J. Environ. Monit.*, **2011**, 13, 32-34
9. K. M. Kubachka, N. V. Shockey, T. A. Hanley, S. D. Conklin and D. T. Heitkemper, Arsenic Speciation in Rice and Rice Products Using High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination version 1.1, 2017 年 8 月访问, <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM479987.pdf>
10. C. K. Tanabe, H. Hopfer, S. E. Ebeler, J. Nelson, S. D. Conklin, K. M. Kubachka, and R. A. Wilson, Matrix Extension and Multilaboratory Validation of Arsenic Speciation Method EAM §4.10 to Include Wine, *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65 (20), 4193-4199

## 更多信息

关于本研究的完整记述, 请参见: Patrick J. Gray, Courtney K. Tanabe, Susan E. Ebeler, and Jenny Nelson, A fast and fit-for-purpose arsenic speciation method for wine and rice, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2017**, 32, 1031-1034; DOI: 10.1039/C7JA00041C

## 致谢

美国加州大学戴维斯分校食品安全与测量机构得到了安捷伦科技公司、Gerstel US 和 Constellation Brands 的捐赠支持。



[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017

2017 年 10 月 11 日, 中国出版  
出版号: 5991-8454ZHCN