

鸡排泄物中洛克沙肿与多价态 As 的 分离与测定方法研究

曾 婧, 卓家珍, 陈杖榴, 孙永学

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:对鸡排泄物中洛克沙肿、总 As 及无机 As(Ⅲ)和 As(V)的分离与测定进行了研究. 采用磷酸氢二钾-甲醇混合液提取和载入固相萃取小柱净化, 对洛克沙肿进行 HPLC 法分析, 回收率 $\geq 74.4\%$, 最低检测限为 $0.1\text{ }\mu\text{g/g}$. 经微波消解处理后采用 AFS 法检测排泄物中总 As 含量, 检出限为 $0.08\text{ }\mu\text{g/L}$, 回收率 $\geq 94.7\%$. 经磷酸二氢钾溶液振荡提取过滤后, 依次经阳离子和阴离子交换树脂静态吸附与动态分离, 采用 AFS 法分别测定 As(Ⅲ)、As(V)含量, 检出限分别为 0.084 和 $0.210\text{ }\mu\text{g/L}$, 回收率分别为 $87.8\% \sim 113.0\%$ 和 $81.1\% \sim 127.3\%$.

关键词:鸡排泄物; 洛克沙肿; 砷; 高效液相色谱法; 原子荧光光谱法

中图分类号: S859.83

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)03-0094-04

Studies on the Separation and Determination of Roxarsone and Multi Valence As in the Excreta of Chicken

ZENG Jing, ZHUO Jia-zhen, CHEN Zhang-liu, SUN Yong-xue

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The methods based on HPLC and AFS for the separation and determination of roxarsone, total arsenic, As(Ⅲ) and As(V) in the excreta of chicken were established. The excreta were extracted with $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-CH}_3\text{OH}$, cleaned-up by Strata-X-AW SPE column and quantified with HPLC system. The recovery was all over 74.4% , and LOD was $0.1\text{ }\mu\text{g/g}$. A microwave digestion-atomic fluorescence spectrometry (AFS) method for determination of total arsenic was applied. The excreta were digested in a closed vessel device and determined by AFS. The LOD was $0.08\text{ }\mu\text{g/L}$ and the recovery was all over 94.7% . An ion exchange resin coupled with AFS method was also developed for isolating and determining As(Ⅲ) and As(V). The excreta were extracted with KH_2PO_4 , separated by cation and anion exchange resin and determined by AFS. The LODs of As(Ⅲ) and As(V) were 0.084 and $0.210\text{ }\mu\text{g/L}$ respectively. The recoveries of $87.8\% \sim 113.0\%$ for As(Ⅲ) and $81.1\% \sim 127.3\%$ for As(V) were obtained.

Key words: excrement; roxarsone; arsenic; HPLC; AFS

洛克沙肿(Roxarsone, ROX)是近十几年来被广泛用作畜禽促生长的一种有机砷添加剂,经畜禽摄入后大部分经排泄物排出体外并进入周边环境.国外对畜禽粪便中总 As 含量及其代谢物的检测已有报道^[1-2],结果表明排泄物中以 ROX 为主,亦检测到的不同价态 As. 关于 ROX 原形的测定已有氮定

法^[3]、GC 法^[4]和 HPLC 法^[5-6]等,用于砷价态分析的分方法有多种,其中以离子交换树脂法最为常用^[7-8],原子荧光法(AFS)亦常用于总 As 及无机 As(Ⅲ)、As(V)的痕量测定. 本文通过建立鸡排泄物中 ROX、总 As 及无机 As(Ⅲ)、As(V)的分离与测定,旨在为研究洛克沙肿在鸡饲喂后的排泄及消除

收稿日期: 2009-11-01

作者简介: 曾 婧(1985—),女,硕士研究生;通信作者: 孙永学(1969—),男,副教授,博士, E-mail: sunyx@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30130140)

规律提供检测基础,亦将为 ROX 在环境中的残留与生态毒理学评估提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

洛克沙肿对照品,纯度 99.6%,批号 20051214,由广州惠华动物保健品公司提供;砷标准储备液,含砷 1 000 mg/L,批号 2070314,由国家标准物质中心提供;三氧化二砷(As_2O_3),纯度 $\geq 99.9\%$,由 Sigma 公司提供;砷酸氢二钠,纯度 $\geq 99.9\%$,由 BBL 公司提供。其他化学试剂均为色谱纯或分析纯级。试验用水为超纯水。

1.2 主要仪器

高效液相色谱仪,Agilent 1100 型,美国 Agilent 公司生产;双道原子荧光光度计,AFS-9130 型,北京吉天仪器有限公司生产;微波消解系统,Ethos1 型,意大利 Milestone 公司生产;Straxa-X-AW 型固相萃取小柱(3 mL),美国 Phenomenex 公司生产;717 型强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂、732 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂,均由杭州市争光树脂有限公司提供。

1.3 标准试液配制

洛克沙肿储备液:称取洛克沙肿对照品 100.0 mg 于 100 mL 棕色容量瓶中,加适量流动相定容成 1 000 mg/L 储备液,4℃保存备用。砷标准使用液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$):由砷标准储备液用 $\varphi = 5\%$ 盐酸溶液逐级配制而成。砷(Ⅲ)标准储备液(1 mg/mL):称取干燥 As_2O_3 1.320 g 溶于 25 mL 200 g/L KOH 溶液中,以 H_2SO_4 ($\varphi = 20\%$) 定容至 1 000 mL 摇匀;砷(V)标准储备液(1 mg/mL):称取干燥砷酸氢二钠 1.650 g 溶于纯水中,用 H_2SO_4 ($\varphi = 20\%$) 定容至 1 000 mL 摇匀。均用 $\varphi = 5\%$ 盐酸溶液逐级稀释。

1.4 鸡排泄物中洛克沙肿含量的测定

1.4.1 提取 取 1.00 g 空白鸡粪于离心管中,依次添加 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洛克沙肿标准溶液 100 μL 和 10 mL 提取液[$V(0.05 \text{ mol/L}$ 磷酸氢二钾溶液): $V(\text{甲醇}) = 90:10$],震荡提取 30 min(60℃),残渣 2 次提取,合并上清液。加入 100 g/L 硫酸铜溶液 2 mL,混匀静置 20 min,以 8 000 r/min 离心 5 min,过滤至 25 mL 容量瓶中,提取液定容,调 pH 至 4.0~5.0,待净化。

1.4.2 SPE 净化 将 Straxa-X-AW 小柱用 3.0 mL 甲醇活化和超水平衡后,分 2 次加入 5.0 mL 提取液。依次用 6.0 mL 甲酸($\varphi = 1\%$)淋洗和 6.0 mL 氨甲醇($\varphi = 5\%$)洗脱洛克沙肿,负压抽滤后洗脱液在 60℃水浴吹干,加 1.0 mL 流动相溶解,经 0.22 μm

针头式过滤,滤液供检测。

色谱条件为 Prsil BDS C18(5 μm ,4.6 mm $\times$ 250 mm);紫外波长 266 nm;流动相为 $V(0.05 \text{ mol/L}$ 磷酸二氢钾溶液): $V(\text{甲醇}) = 90:10$,pH=2.5;进样量为 20 μL 。

1.4.3 标准曲线、回收率与变异系数的测定 取空白鸡粪 1.00 g 于离心管中,加入 100 μL 洛克沙肿标准系列(5~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$),制得系列质量比为 0.5~50.0 $\mu\text{g}/\text{g}$,按上法处理与测定,由质量比(C)与峰面积(S)求得标准曲线。在 1.00 g 空白粪样中分别加入 10、50 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洛克沙肿溶液各 100 μL ,制得质量比为 1.0、5.0 和 20.0 $\mu\text{g}/\text{g}$,重复 6 次,计算回收率。以上 3 个制得质量比各设 6 重复,共 4 批次,求批内、批间变异系数。

1.5 鸡排泄物中总砷含量的测定

1.5.1 样品处理 取 0.50 g 空白鸡粪于微波消化罐内,添加 0.5 mL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 砷标准使用液、2 mL HNO_3 和 0.5 mL H_2O_2 ,密封后设最佳消解条件消解。消解液经水浴赶酸、还原、纯水定容至 25 mL 后上 AFS 机检测,设空白样进行相对标准偏差(RSD)和检测限(LOD)测定。由荧光强度(I_f)根据标准曲线方程求空白液和样品中砷质量浓度。AFS 测定条件:载液为盐酸($\varphi = 5\%$),还原剂为硼氢化钾(20 mg/mL),负高压 270 V,灯电流 60 mA,载气流量 400 mL/min。

1.5.2 标准曲线、回收率和变异系数的测定 吸取 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 砷标准使用液 2.5 mL 于容量瓶中,加入 1.25 mL 浓盐酸、2 mL 还原剂,纯水定容并自动稀释测定 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 系列质量浓度的荧光值制备标准曲线。取 5 份空白鸡粪,测本底值和空白样添加 5 个砷标准系列质量浓度(10、20、40、60、80 $\mu\text{g}/\text{L}$),各设 5 个重复,计算回收率和变异系数。

1.6 鸡排泄物中无机 As(Ⅲ)、As(V)的分离测定

1.6.1 样品提取 取 1.00 g 空白鸡粪于 15 mL 离心管中,各添加 0.1 mL As(V)和 As(Ⅲ)标准工作液(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,制得质量比均为 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$),加 10 mL 提取液(0.6 mol/L 磷酸二氢钾溶液),振荡并离心,取上清液(重提 2 次)调 pH 至 5.0,进行树脂分离:提取液经 0.45 μm 滤膜过滤至阳离子树脂中,振荡后入阴离子交换树脂柱(流速 1.5 mL/min),收滤液加入 2.5 mL 浓盐酸,纯水定容至 50 mL,待测未吸附的 As(Ⅲ);用 20 mL 0.5 mol/L 醋酸-醋酸铵缓冲液淋洗树脂柱,弃解析液,用 30 mL 0.2 mol/L 盐酸淋洗,收解析液,纯水定容至 50 mL,待测 As(V)。均上 AFS 机检测,同时设空白样。

1.6.2 标准曲线、回收率和变异系数的测定 分别取 1.0 $\mu\text{g/mL}$ As(V)、As(III) 标准溶液 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中,加入 0.5 mL 浓盐酸,纯水定容,自动稀释测定 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/L}$ 系列质量浓度的荧光值制备标准曲线.先取 5 份空白鸡粪测得本底值后,空白添加 As(V)、As(III) 标准液(添加质量比为 0.05、0.50 和 5.00 $\mu\text{g/g}$,5 次重复)测定.计算回收率和变异系数.

2 结果与分析

2.1 鸡排泄物中洛克沙肿含量的测定

在空白粪样中添加 0.5 ~ 50.0 $\mu\text{g/g}$ 洛克沙肿系列质量比,经系列处理后进行 HPLC 测定可获得较好的回收率和净化效果,线性关系良好($r \geq 0.9994$),回收率为 75.82% ~ 79.36%,批内变异系数为 2.75% ~ 5.71%,批间变异系数为 4.22% ~ 5.11%,ROX 能与排泄物中其他组分较好地分离,保留时间约 7.6 min,表明本法精密度高、稳定性和重复性好.色谱图见图 1、图 2.

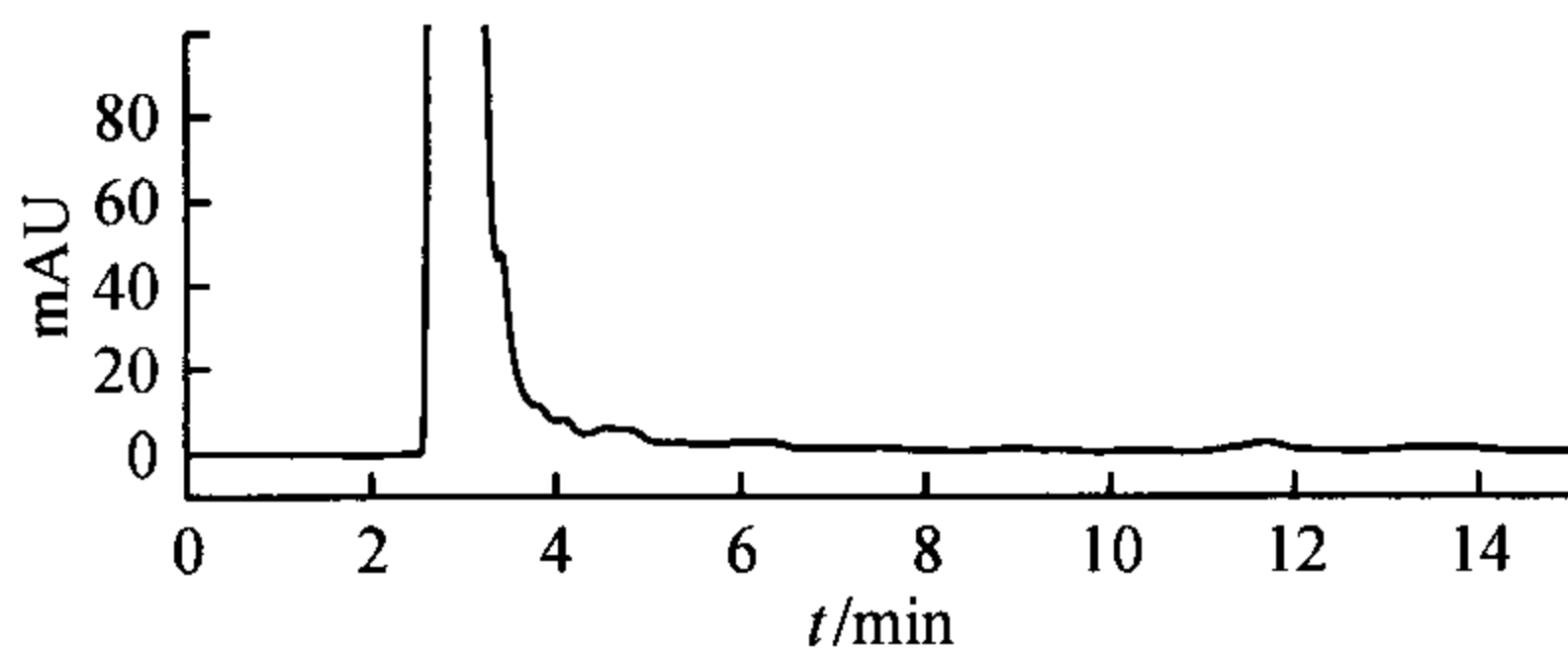


图1 鸡空白粪的色谱图

Fig.1 Chromatograms of the bland excreta sample of chicken

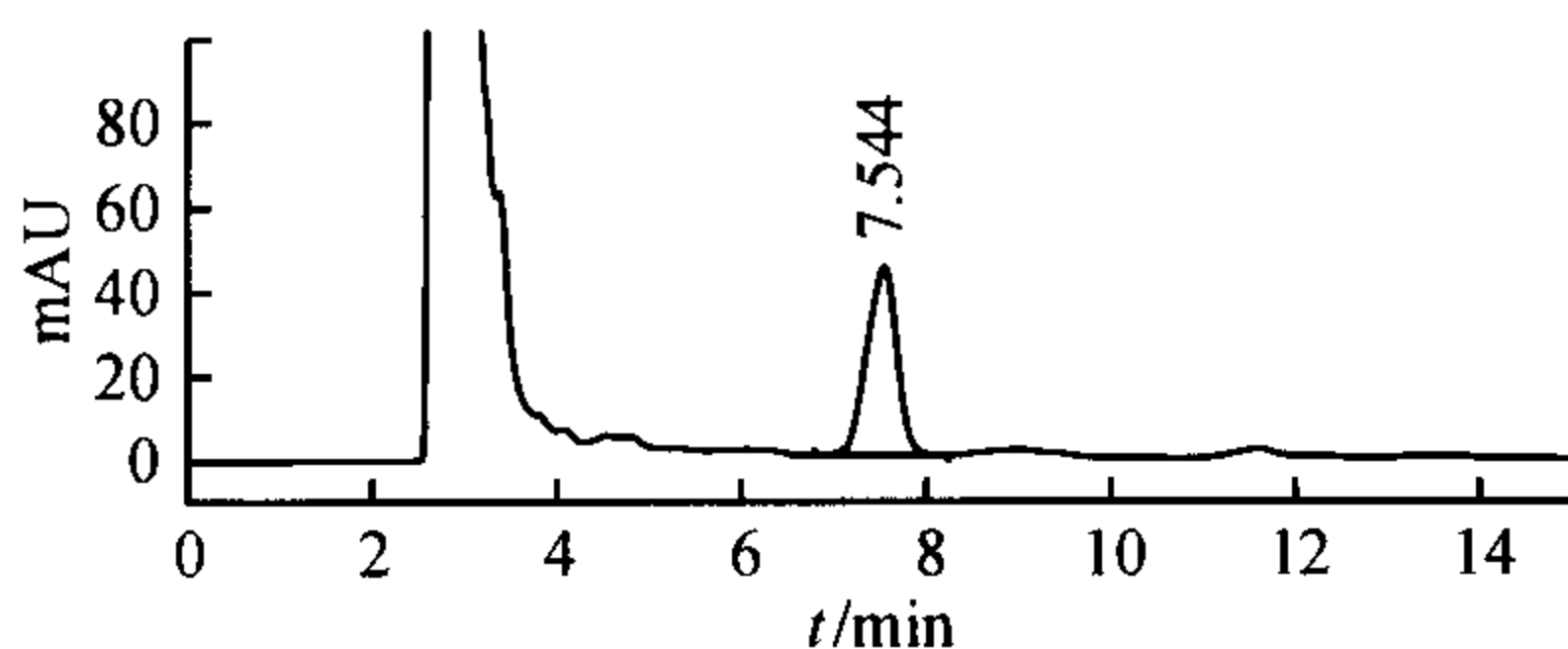


图2 鸡空白粪添加标液(10.0 $\mu\text{g/mL}$) 色谱图

Fig.2 Chromatograms of the bland excreta sample spiked with arsenic(10.0 $\mu\text{g/mL}$)

2.2 鸡排泄物中总砷含量的测定

采用 $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ (体积比 4:1) 消解液可将样品完全消解,呈澄清透明溶液.总砷质量浓度在 2 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好($r > 0.999$),检测限(LOD)为 0.08 $\mu\text{g/L}$,回收率为 94.69% ~ 109.17%,变异系数介于 1.50% ~ 4.74%,符合检测要求.

2.3 鸡排泄物中无机 As(III)、As(V) 的分离测定

As(III)、As(V) 标准曲线在 0.5 ~ 100.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好($r > 0.999$).在相同反应条件下 As(V)、As(III) 荧光强弱不同,前者约为后者的

1/3. As(V) 的 LOD 为 0.21.0 $\mu\text{g/L}$, As(III) 的 LOD 为 0.084 $\mu\text{g/L}$. As(III) 回收率为 87.8% ~ 113.0%,变异系数为 1.90% ~ 5.39%; As(V) 回收率为 81.1% ~ 127.3%,变异系数 0.96% ~ 3.54%. 均可满足检测要求.

3 讨论

3.1 洛克沙肿原形的提取与净化

对洛克沙肿的提取,所报道的方法不尽相同,常用超声提取或水浴振荡^[5,9-10]. 本试验中对比了甲醇、0.05 mol/L 磷酸氢二钾-甲醇混合液、0.05 mol/L 磷酸氢二钾及 20 g/L 磷酸氢二钾等 4 种提取液的提取效果,综合比较干扰度、杂峰、用量及操作性等,最后选用 0.05 mol/L 磷酸氢二钾-甲醇混合液按 90:10 (体积比) 2 次提取,达到较好的效果. 为克服鸡粪中蛋白成分的干扰,通过比较了高氯酸、三氯乙酸、硫酸铜等,选用 100 g/L 硫酸铜溶液除蛋白效果为最佳. 鸡排泄物的成分复杂,为充分去除基质的干扰,通过比较活性炭萃取小柱与弱阴离子柱 Waters Oasis^R MAX^[5]、强阴离子柱 SAX 与强阳离子柱 SCX^[11] 等,以固相萃取小柱 SAXj 净化效果为最佳. 按以上筛选的处理方法,与 AOAC (美国公职分析化学家协会) 规定的标准方法一致.

3.2 微波消解条件的选择及优化

已有报道采用微波消解处理排泄物,进而测定砷含量^[12]. 本文比较了 HNO_3 、 $\text{HNO}_3 + (\text{HClO}_4, \text{HF}$ 或 $\text{H}_2\text{O}_2)$ 4 种消解体系及不同用量的效果,结果表明:2.5 mL 提取液 [$V(\text{HNO}_3):V(\text{H}_2\text{O}_2) = 4:1$] 的效果最理想,利于赶酸、荧光值大、重现性好且消解完全呈清亮.

3.3 As(III)、As(V) 提取条件的选择

在各种形态砷中,无机砷毒性大于有机砷,又以无机 As(III) 毒性最强. 目前分离砷形态方法有 GC-MS、IC-AES、HPLC-HG-AFS、HPLC-ICP-MS 等^[13-16]. 离子交换树脂价廉且操作简单,多用于砷形态分析^[17]. AFS 法测定砷含量的方法成熟,故本文中先将砷几种形态加以分离,再用 AFS 法可测得排泄物中 As(III)、As(V) 含量. 因 AFS 只识别 As(III)、As(V)、DMA 和 MMA,需将它们分离并去除 DMA、MMA 干扰. DMA 在酸性条件下可吸附在阳离子树脂上,而 MMA 可吸附于阴离子树脂,本试验中通过先后采用阳、阴离子树脂的吸附与洗脱从而去除干扰.

参考文献:

- [1] RICE D A, KENNEDY S, MCMURRY C H. Experimental 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid toxicosis in pigs[J].

- Research in Veterinary Science, 1985, 39: 47-51.
- [2] JACKSON B P, MILLER W P. Effectiveness of phosphate and hydroxide for desorption of arsenic and selenium species from iron oxides [J]. Soil Sci Soc Am J, 2000, 64: 1616-1622.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [4] ROERDINK A R, ALDSTADT J H. Sensitive method for the determination of roxarsone using solid-phase microextraction with multi-detector gas chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1057(1-2): 177-183.
- [5] 王金荣, 张丽英, 马永喜. 饲料中洛克沙肿的固相萃取—高效液相色谱法检测技术研究 [J]. 饲料工业, 2005, 26(14): 38-41.
- [6] 曹庆云, 颜惜玲, 周武艺. 高效液相色谱测定鸡肝中洛克沙肿的方法研究 [J]. 应用化工, 2005, 34(10): 640-643.
- [7] 唐增煦, 薛颖, 马洁, 等. 应用阴离子交换树脂法进行食品中砷形态的研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(1): 49-51.
- [8] DIPANKAR C A. Arsenic in ground water in six districts of Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world [J]. Analyst, 1995, 120: 643-650.
- [9] JACKSON B P, SEAMAN J C, BERTSCH P M. Fate of arsenic compounds in poultry litter upon land application [J]. Chemosphere, 2006, 65: 2028-2034.
- [10] ROSAL C G, MOMPLAISIR G M, HEITHMA E M. Roxarsone and transformation products in chicken manure: detection by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2005, 26: 1606-1614.
- [11] JACKSON B P, BERTSCH P M, CABRERA M L. Trace Element Speciation in Poultry Litter [J]. J Environ Qual, 2003, 32: 535-540.
- [12] 郭春华, 吕元琦, 张君, 等. 服药动物排泄物中微量砷的微波消解—氢化物发生原子荧光法测定 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(1): 42-44.
- [13] PANTSAR K M, KOROEL A A. Analysis of gaseous arsenic species and stability studies of arsine and trimethylarsine by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 410: 65-70.
- [14] GETTAR R T, GARAVAGLIA R N, GAUTIER E A, et al. Determination of inorganic and organic anionic arsenic species in water by ion chromatography coupled to hydride generation-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 884: 211-221.
- [15] HE B, FANG Y, JIANG G B, et al. Optimization of the extraction for the determination of arsenic species in plant materials by high performance liquid chromatography coupled with hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. Spectrochimica Acta: Part B, 2002, 57: 1705-1711.
- [16] COELHO M M, COELHO L M, DELIMA E S, et al. Determination of arsenic compounds in beverages by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Talanta, 2005, 66: 818-822.
- [17] PACEY G E, FORD J A. Arsenic speciation by ion-exchange separation and graphite-furnace atomic-absorption spectrophotometry [J]. Talanta, 1981, 28: 935-938.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 93 页)

本研究中 mtDNA 单倍型丰富的多样性和特异性可从分子进化上证明中国沙皮犬是一个古老的犬种, 这与 Parker 等^[2]的研究结果是一致的. 由于中国沙皮犬原产于中国广东, 这揭示了中国广东有可能是家犬的起源中心之一. 因此, 中国沙皮犬可为世界家犬的多样性研究提供重要的基础信息, 可为今后继续深入研究世界家犬的起源及其品种形成提供备选犬种, 以揭示我国在家犬驯化和起源中可能起的重要作用.

参考文献:

- [1] SAVOLAINEN P, ZHANG Ya-ping, LUO Jing, et al. Genetic evidence for an east asian origin of domestic dogs [J]. Science, 2002, 298: 1610-1613.
- [2] PARKER H G, KIM L V, SUTTER N B, et al. Genetic structure of the purebred domestic dog [J]. Science, 2004, 304: 1160-1164.
- [3] 萨姆希鲁克 J, 弗里克 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版, 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1999: 463-469.
- [4] 罗理杨. 现代家犬的起源——线粒体 DNA 的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学动物科技学院, 2003.
- [5] KIM K S, LEE S E, JEONG H W, et al. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1998, 10(2): 210-220.
- [6] 张亚平, RYDER O A. 金丝猴属的 DNA 序列变异及进化与保护遗传学研究 [J]. 遗传学报, 1997, 24(2): 116-121.
- [7] 丁波, 张亚平. 濒危动物遗传多样性研究 [C] // 许智宏. 面向 21 世纪的中国生物多样性保护: 第三届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集. 北京: 中国林业出版社, 2000: 79-83.

【责任编辑 柴 焰】