

高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱测定 浒苔中砷及砷化学形态

余晶晶¹, 曹 焯^{1,2}, 崔维刚^{1,3}, 于振花^{1,4}, 黎先春¹, 王小如^{1,5,*}

(1. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 2. 中国海洋大学化学化工学院, 山东 青岛 266003;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 4. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071;

5. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 使用高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)联用技术对浒苔中的砷总量及其存在的化学形态进行分析。总量分析结果表明, 青岛海域的浒苔样品中砷总量介于 3.0 ~ 9.7 $\mu\text{g/g}$ 之间。在总量测定的基础上, 对浒苔样品的水煮提取液进行形态分析。结果表明, 浒苔中主要含有无机五价砷和一种疑为砷糖的物质以及少量的二甲基砷酸(DMA)和无机三价砷。鉴于这些砷形态的毒性或潜在毒性, 将其应用于食品及药物方面尚需谨慎。

关键词: 浒苔; 砷; 形态分析; 高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)

High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for the Determination of Arsenic Content and Speciation in Enteromorpha

YU Jing-jing¹, CAO Xuan^{1,2}, CUI Wei-gang^{1,3}, YU Zhen-hua^{1,4}, LEE Frank Sen-Chun¹, WANG Xiao-ru^{1,5,*}

(1. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China; 2. College of Chemistry and Chemical

Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean

University, Shanghai 201306, China; 4. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

5. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: This study analyzed arsenic content and speciation in Enteromorpha sampled from various coastal zones of Qindao using high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). The results showed that the total arsenic content in Enteromorpha was ranged from 3.0 to 9.7 $\mu\text{g/g}$. The speciation analysis of hot water extract of Enteromorpha indicated that the major arsenic forms in Enteromorpha were inorganic quinquivalence arsenate and a substance suspected as arsenic sugar. Besides, there were small amounts of inorganic trivalence arsenite and dimethylarsenate (DMA) in the extract. Due to the toxicity or potential toxicity of these arsenic forms, it should be paid great caution in the application of Enteromorpha as a material for food and medicine.

Key words: Enteromorpha; arsenic; speciation analysis; high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS)

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)16-0223-05

2008年6月中旬,大量浒苔进入青岛海域,严重影响奥运城市市容,引起了各方的关注。浒苔是一种大型绿藻,俗称苔条、青海苔等,为绿藻门石莼目石莼科浒苔属的藻类植物。据《本草纲目拾遗》记载:石莼“味甘、平、无毒”,“下水,利小便”;《随息居饮食谱》载有:浒苔“清胆,消瘵疔瘰,泄

涨,化痰,治水土不服”^[1]。目前,对浒苔的研究主要集中在对其营养成分的开发利用方面^[2-3],对其中有毒有害元素研究的报道较少。而有毒有害元素是评价浒苔是否可食用、药用的一个重要参考标准。鉴于目前出现大量关于我国海产品中砷含量超标的负面报道,本研究选取砷为研究对象,采用高效液相色谱 - 电感耦合等

收稿日期: 2008-11-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(20675021); 海洋一所基本科研专项(GY-022008T32)

作者简介: 余晶晶(1985 -), 女, 硕士研究生, 主要从事形态分析研究。E-mail: yjj08@126.com

* 通讯作者: 王小如(1949 -), 女, 教授, 博士, 主要从事光谱及元素质谱研究。E-mail: wang2003@yahoo.com.cn

离子体质谱联用技术(HPLC-ICP-MS)对青岛周边海域的浒苔样品中砷元素总量及形态进行分析,为浒苔的安全食用及药用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

浒苔样品采集于青岛周边海域,浒苔经去离子水清洗,去除其中泥沙及表面盐分,真空干燥、研磨,室温下避光保存。

硝酸、双氧水(优级纯) 德国 Merck 公司;碳酸铵(分析纯) 天津市巴斯夫化工有限公司;超纯水(18.2MΩ·cm);环境校准标样(Part#5183-4688)、内标混合物(Part# 5183-4680)、调谐溶液(Part#5184-3566) 美国 Agilent 公司;三碘化砷、五氧化二砷 美国 Alfa Aesar 公司;二甲基胂酸(DMA) 美国 Acros Organics 公司;甲基胂酸(MMA)、砷甜菜碱(AsB) 国家标准物质中心;角鲨肌肉组织(DORM-2)标准物质、龙虾肝胰腺(TORT-2)标准参考物质 加拿大国家研究中心;As(III)、As(V)、DMA、MMA 和 AsB 配制成 10 μg/g (以砷计)的储备液,4℃ 避光保存。

1.2 仪器与设备

7500a 型电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)和 1100 型高效液相色谱(HPLC) 美国 Agilent 公司;Milli-Q 超纯水处理系统 美国 Millipore 公司;AL104 型电子天平 瑞士 Mettler-Toledo 公司;ASE100 型快速溶剂萃取仪(ASE) 美国 Dionex 公司;R201 型旋转蒸发器 上海申生科技有限公司;Z383K 型离心机 德国 Hermle 公司;DZF-6020 真空干燥箱 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 浒苔样品中砷元素总量测定

称取 0.2g 研磨后的浒苔样品于酸煮洗净的聚四氟乙烯(PTFE)密闭消解罐中,加入 5ml 硝酸,于 80℃ 烘箱中预消解 4h 后,放气,再于 170℃ 条件下消解 4h。待冷却后加入 1ml 过氧化氢,反应 20min。然后将样品转移至干净的聚酯(PET)塑料瓶中,稀释定重至 20g,直接用 ICP-MS 测定样品中砷元素总量。

1.3.2 浒苔样品中砷元素形态分析

快速溶剂萃取(ASE):称量 0.5g 样品于不锈钢萃取池中。萃取液在 40℃ 水浴中旋转蒸发干,加水定重至 20g,用 0.45 μm 水膜过滤,即得待测样液。样液经 HPLC-ICP-MS 分析测定。

超声提取(SON):称取 0.2g 样品于 10ml 离心管中,加入 6ml 甲醇-水(1:1, V/V),涡旋混匀,浸泡过夜;室温下超声 45min;离心后,小心移出上层清液于 100ml 圆底烧瓶中。重复上述步骤 3 次。将 3 次合并液在 40

水浴中旋转蒸发干,所剩残渣用超纯水溶解并过滤,用于砷的形态分析。

水煮提取(WB):称取 0.2g 样品于 10ml 离心管中,加入 6ml 超纯水,涡旋混匀,浸泡过夜;置于 90℃ 水浴锅中 2h,其间多次振摇,使试样充分浸提。冷却、过滤,用于砷的形态分析。

1.3.3 测定条件

ICP-MS 条件:RF 功率 1360W,载气为高纯液氩,载气流速 1.13L/min,信号检测停留时间分别为 ^{75}As (0.5s)、 ^{72}Ge (0.1s)、 ^{35}Cl (0.1s)、 ^{77}Se (0.1s)、 ^{83}Kr (0.1s)。

HPLC 条件:Hamilton 阴离子交换色谱柱 PRP-X100 (250mm × 4.1mm, 10 μm)。流动相:A 为 H₂O, B 为 50mmol/L (NH₄)₂CO₃(pH9.5)。梯度洗脱程序为 0~15min, 100%~0 A, 0~100% B; 15~30min, 0~100% A, 100%~0 B。流速 1.5ml/min;进样体积为 100 μl。

ASE 条件:池体积 34ml,压力 1500psi,温度 100℃,静态时间 5min,冲刷体积 60%,放空时间 100s,静态循环两次,溶剂为纯甲醇。

2 结果与分析

2.1 干扰及消除

在分析测试前,先用调谐液优化仪器条件,使 ^{75}As 有较高的灵敏度和较低的检测限。由于 ^{35}Cl 和仪器所用的高纯载气(氩气)易形成 $^{75}\text{ClAr}^+$, 干扰 ^{75}As , 因此在砷的总量测定中,使用干扰方程 $^{75}\text{As} = ^{75}\text{M} - ^{77}\text{M}(3.127) + ^{82}\text{M}(2.733) - ^{83}\text{M}(2.757)$ 校正多原子离子干扰,以期获得 ^{75}As 的准确含量;同时使用在线加入内标的方法,可有效克服仪器漂移,保证测定的准确性。形态分析中,采用时间分辨分析模式,仪器同时监测 ^{75}As 、 ^{72}Ge 、 ^{35}Cl 、 ^{77}Se 、 ^{83}Kr 的信号,用以排除 $^{75}\text{ClAr}^+$ 干扰峰^[4]。

2.2 浒苔样品中砷元素总量的测定

测定 0~100 μg/kg 的标准溶液系列,元素的分析信号与浓度呈现良好的线性关系,相关系数在 0.9990 以上,能保证样品分析在有效的线性范围内。

对随机抽取的浒苔样品平行测定 7 次,得 RSD 为 1.97%,表明本工作所建立方法有较好的测定精密度。

为考察方法的准确性,用所建立方法对标准参考物质 DORM-2 和 TORT-2 进行了分析。在表 1 中给出了两种标准物质中 As 元素的测定结果,与标准物质参考值 DORM-2[(18 ± 1.1) μg/g]和 TORT-2[(21.6 ± 1.8) μg/g]相比较,二者并无显著性差异,说明该方法具有很好的准确性。

平行测定 7 次空白溶液,以计算 3 倍的相对标准偏差,其对应的浓度值为其检出限,当用本方法进行 As 的测定时,其检出限为 0.23 μg/L。

表1 标准参考物质及采自青岛周边海域的浒苔样品中的砷总量($n=3$)Table 1 Total arsenic content of certified reference materials and *Enteromorpha* sampled from the coastal zone of Qindao ($n=3$)

样品采集海域	石老人海	石老人浴场	海洋极地世界东侧	麦岛-外海	奥帆基地东侧	海涛园	花石楼	第一海水浴场	栈桥	DORM-2	TORT-2
砷总量($\mu\text{g/g}$, 以As计)	4.2 ± 0.26	4.6 ± 0.13	6.5 ± 0.65	3.5 ± 0.18	4.9 ± 0.15	5.6 ± 0.41	3.0 ± 0.09	6.9 ± 0.18	9.7 ± 0.38	18.3 ± 0.56	21.6 ± 1.50

表2 TORT-2中的砷化合物($n=3$)Table 2 Arsenic-containing compounds in TORT-2 ($n=3$)

	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	总As
参考值($\mu\text{g/g}$, 以As计)	14.25 ± 1.08	0.0928 ± 0.0371	0.84 ± 0.10	0.093 ± 0.069	0.0928 ± 0.0371	21.6 ± 1.8
实验值($\mu\text{g/g}$, 以As计)	14.0 ± 1.1	ND	0.8 ± 0.2	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	21.5 ± 1.6

注:总As为使用ICP-MS直接测定的酸消解后的砷总量。

应用所建立的砷总量测定方法,测定了青岛海域所采集的9个浒苔样品中砷,其含量在 $3.0 \sim 9.7 \mu\text{g/g}$ 之间,具体结果示于表1。

2.3 浒苔样品中砷形态的色谱分离及ICP-MS测定

长期以来,人们将有害元素的含量作为评价海洋生物是否可以食用或药用的一个指标,但近年来的研究发现,元素的毒性很大程度上取决于其存在的化学形态。砷化合物以小鼠半致死量 LD_{50} 计,其毒性依次为 $\text{H}_3\text{As}>\text{As(III)}$ (无机三价砷) $>\text{As(V)}$ (无机五价砷) $>\text{MMA}$ (甲基砷酸) $>\text{DMA}$ (二甲基砷酸) $>\text{TMAO}$ (三甲基砷氧) $>\text{AsC}$ (砷胆碱) $>\text{AsB}$ (砷甜菜碱),无机砷的毒性最大,有机砷的毒性较小,而AsB和AsC常被认为是无毒的^[5]。因而对浒苔的安全性评价,需从元素形态层面上做进一步分析,方可提供其安全性评价的科学信息。

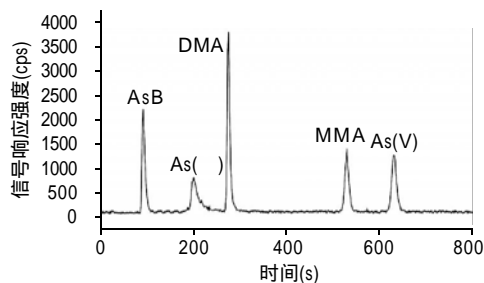


图1 五种砷形态标准的HPLC-ICP-MS色谱图

Fig.1 HPLC-ICP-MS chromatogram of mixed 5 standard arsenic forms

本研究在砷化学形态的分离分析中,以 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 和 H_2O 为流动相,使用梯度洗脱,进样量为 $100 \mu\text{l}$ 。使用该分离方法可对五种砷形态标准AsB、As(III)、As(V)、DMA和MMA进行基线分离,结果见图1。鉴于实际样品中的复杂基体,而且目前尚无相关的藻类标准参考物质能够给出其中的砷形态鉴定参考值,因此,本研究以Wahlen^[6]龙虾肝胰腺标准参考物质(TORT-2)中砷形态的测定数据为基准,采用本工作所建立方法对TORT-2中的砷形态进行分析,以此验证方法的准确性,结果见表2。结果显示,当采用该方法对TORT-

2中的砷形态进行分析时,所测得的AsB、As(V)、DMA和MMA与Wahlen的数据基本吻合,表明本工作所建立砷形态分析方法具有较好的准确性。

2.4 提取方法的比较

本研究选用快速溶剂萃取(ASE)和超声提取(SON)两种提取方法,分别使用甲醇、甲醇-水为提取剂对浒苔中的砷进行提取,甲醇因其对有机砷化物有较好的提取效果(相似相溶),而被广泛使用;研究显示,采用甲醇或甲醇-水提取海产品中的砷,其提取率可达80%以上^[7]。此外,为了模拟人们对海产品的烹饪方式,本研究还考察了水煮(WB)的方式对浒苔中砷形态进行提取,以探讨浒苔中的砷在水中的释放情况。

表3 用3种不同的方法提取的浒苔(花石楼)样品中的砷总量及其提取效率

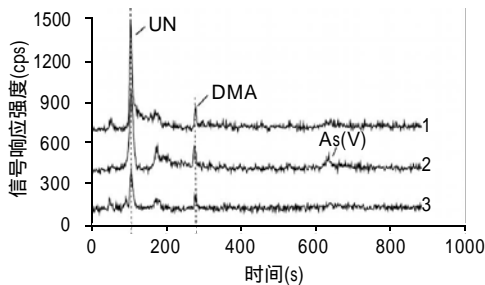
Table 3 Total arsenic contents of *Enteromorpha* obtained by extraction of sample by three different methods followed by determination using ICP-MS and extraction efficiencies of total arsenic by the methods

样品	提取方法	[As]	总As	提取率(%)
花石楼	ASE	0.40	3.0 ± 0.09	13.3
	SON	0.59		19.7
	WB	0.48		16.0

注:[As]为使用ICP-MS直接测定的提取液中的砷总量($\mu\text{g/g}$,以As计);总As为使用ICP-MS直接测定的酸消解后的砷总量($\mu\text{g/g}$,以As计);提取率为提取液中的砷总量占酸消解的砷总量的百分含量。

表3显示了ASE、SON和WB提取3种提取方法对浒苔样品(花石楼)的提取效果。表中所列提取效率是指直接用ICP-MS测定浒苔萃取液中的砷含量与酸消解后浒苔中的砷总量的比值,结果显示,3种方法的提取效率均较低(13.3%~19.7%);但据文献报道,ASE和SON方法对海产品中的砷化学形态有较好的提取效果^[6-7],这说明相同的提取方法应用于不同的海产品时,提取效率可能存在较大差异。Slejkovec等^[8]对10种不同的藻类进行分析时发现,Ceramium sp.的提取效率高达97%,而对于Ulva rigida和Enteromorpha,其提取率仅有20.7%和23.1%,这也间接说明浒苔中的砷化合物不易提取。该3种方法的提取效率依次为SON>WB>ASE。

图2是用3种提取方法提取浒苔中不同形态砷的色谱图,3种提取方法均得到了DMA与某种未知的砷化合物(UN),而BW法还得到了无机的五价砷As(V),且As(V)和DMA的峰面积相当,这说明与甲醇溶液提取剂相比,水能更好地对浒苔样品中的无机砷进行提取。鉴于无机态As(V)的毒性远远高于有机砷(DMA),本研究从食品安全的角度出发,选取水煮提取方法对浒苔样品进行As化学形态分析,并以此作为评价浒苔食用安全性的参考依据。



1.超声提取(SON);2.水煮提取(WB);3.快速溶剂萃取(ASE);UN.未知砷化合物。

图2 用3种不同的方法提取浒苔(花石楼)样品中的砷化合物的HPLC-ICP-MS色谱图

Fig.2 HPLC-ICP-MS chromatogram of arsenic-containing compounds extracted by three different methods

2.5 浒苔中的砷形态分析

对9种浒苔样品按照1.3.2节中所述的水煮提取(WB)方法进行提取,测定了提取液中不同化学形态的砷的含量(表4)。结果显示,在可标定的砷形态中,浒苔中的砷以无机态五价砷As(V)为主,由于海洋中的砷主要以无机态五价砷为主,浒苔能通过其渗透性膜从海水中吸收无机砷,因而浒苔中的大量As(V)应来自海水。除As(V)外,浒苔体内还有少量的无机三价砷As(III)和二甲基砷(DMA)。根据Hayakawa的砷代谢理论^[9],当无机五价砷进入生物体内,在酶的作用下,其首先被还原为三价无机砷,而后经历一系列复杂的生物甲基化过程,产生诸如一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)、三甲基砷(TMA),砷糖等代谢产物。浒苔中无机三价砷As(III)和DMA的存在说明浒苔对外源砷进行的代谢。由于没有相应的砷形态标准,对于测定中出现的未知峰,则无法判断其化学形态。但海洋藻类往往含有大量砷糖类物质^[10-11],Li等^[7]在对海带的分析中发现了大量的砷糖,而其中一种名为Arsenosugar 1(glycerol sugar)的砷糖,与本实验中给出的未知峰2(图3)的出峰位置极其相似,Almela等^[11]在对大型可食用褐藻进行分析的过程中,也得到了同样的结果。而Slejkovec等^[8]在研究中发现,浒苔中的Arsenosugar 1(glycerol sugar)占据了砷形态提取总量的88%,由此可推测,未知峰2极有可能就是这种

砷糖。对于这些物质的准确分子量及结构情况,则需要在下一步研究工作中进行验证。

表4 浒苔样品中的砷化合物

Table 4 Contents of arsenic-containing compounds in *Enteromorpha* sampled from various coastal zones of Qindao

样品采集海域	峰面积百分比(%)				含量(μg/kg)			
	*	As(III)	DMA	As(V)	As(III)	DMA	As(V)	[As]
石老人海	28.5	13.3	7.1	51.1	102.0	12.0	279.8	734.2
石老人浴场	60.2	14.4	5.5	19.9	83.2	1.7	74.8	513.2
海洋极地世界东侧	50.7	15.7	5.9	27.7	142.3	11.7	178.0	833.0
麦岛-外海	45.3	-	20.7	8.5	-	12.2	7.6	423.6
奥帆基地东侧	47.6	21.7	6.9	23.8	185.6	4.6	143.4	780.0
海涛园	47.3	31.1	12.6	9.0	189.7	22.5	32.0	540.0
花石楼	46.8	-	10	13.0	-	6.5	30.8	483.3
第一海水浴场	35.1	8.7	6.8	31.7	106.3	24.9	276.6	1110.0
栈桥	57.9	-	6.6	30.9	-	16.1	207.8	1730.8

注:[As]为使用ICP-MS直接测定的提取液中的砷总量;-未检出;*图3中出现的未知砷化合物。

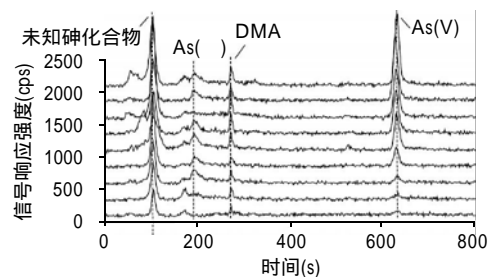


图3 水煮提取的浒苔样品中各种砷化合物的HPLC-ICP-MS色谱图

Fig.3 HPLC-ICP-MS chromatogram of arsenic-containing compounds extracted by hot water extraction method

从食品安全角度出发,浒苔中砷的主要存在形态为无机砷(三价和五价砷),有机砷(主要是DMA)以及砷糖。研究显示,三价砷As(III)能与带巯基(SH)的酶生成稳定的螯合物,使得很多的酶活性降低或消失,严重干扰细胞的生物功能、结构和正常代谢。而进入人体的MMA、DMA及无机砷在酶的作用下脱去甲基形成自由基,使抗体产生有害的超氧阴离子自由基和羟自由基,促使脂质氧化作用进行,损害膜细胞^[12],砷糖毒理研究有限,但多数学者认为砷糖可被人体代谢产生DMA,因而具有一定的潜在毒性。基于此,浒苔是否可作为可食用、药用的海洋植物还值得商榷。

3 结论

本研究建立了浒苔样品中砷总量及化学形态分析测定的HPLC-ICP-MS方法,并优化选择了样品中砷化学形态提取的方法。用所建立方法对采自青岛周边海域中9种浒苔样品中砷的总量及其化学形态进行了分析测定。总量分析结果显示,青岛周边海域浒苔中的砷总量在3.0~9.7μg/g之间。我国于2005年颁布的GB 2762—2005

《食品中污染物限量》中规定了藻类(干重计)中的无机砷限量指标为 1.5mg/kg; 因此, 在总量测定的基础上, 本研究采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICP-MS)对浒苔的水煮提取液进行了其化学形态分析, 结果显示, 青岛浒苔样品中砷的主要存在形态为 As(V)和疑为砷糖类的物质, 另外还有少量的 DMA 和 As(III)。鉴于这些砷形态的毒性或潜在毒性, 将其应用于食品及药物方面尚需谨慎。

参考文献:

- [1] 高福成. 新型海洋食品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [2] 何清, 胡晓波, 周峙苗, 等. 东海绿藻缘管浒苔营养成分分析及评价[J]. 海洋科学, 2006, 30(1): 34-38.
- [3] RAY B. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: isolation, purification and structural features[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 66: 408-416.
- [4] RONKART S N, LAURENT V, CARBONNELLE P, et al. Speciation of five arsenic species (arsenite, arsenate, MMAAV, DMAAV and AsBet) in different kind of water by HPLC-ICP-MS[J]. *Chemosphere*, 2007, 66(4): 738-745.
- [5] ZHANG X, CORNELIS R, KIMPE J D, et al. Accumulation of arsenic species in serum of patients with chronic renal disease[J]. *Clinical Chemistry*, 1996, 42 (8): 1231-1237.
- [6] WAHLEN R, MCSHEEHY S, SCRIVER C, et al. Arsenic speciation in marine certified reference materials. Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, 19: 876-882.
- [7] LI W H, WEI C, ZHANG C, et al. A survey of arsenic species in Chinese seafood[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, 41: 1103-1110.
- [8] SLEJKOVEC Z, KAPOLNA E, IPOLYI I, et al. Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the Adriatic sea[J]. *Chemosphere*, 2006, 63: 1098-1105.
- [9] HAYAKAWA T, KOBAYASHI Y, CUI. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19[J]. *Archives of Toxicology*, 2005, 79: 183-191.
- [10] EDMONDS J S, FRANCESCONI K A. Arseno-sugars from brown kelp (*Ecklonia radiata*) as intermediates in cycling of arsenic in marine ecosystem[J]. *Nature*, 1981, 289: 602-604.
- [11] ALMELA C, LAPARRA J M, VELEZ D, et al. Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: characterization and bioaccessibility[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005, 53 (18): 7344-7351.
- [12] 韦超. 砷元素形态分析的方法研究及其在食品安全领域的应用[D]. 北京: 清华大学, 2004.