

文章编号: 1006-6144(2007)06-0621-06

鱿鱼丝中砷的形态分析

郝春莉¹, 曹 焯^{2,3}, 荆 森^{2,3}, 王 庚⁴, 杨黄浩³, 陈 曦¹, 王小如^{*3}

(1. 福州大学化学化工学院, 福州 350002; 2. 中国海洋大学化学化工学院, 山东青岛 266003; 3. 国家海洋局第一海洋研究所现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东青岛 266061; 4. 山东大学化学化工学院, 济南 250100)

摘 要:采用电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)测定了 14 种鱿鱼丝(Dried Shredded Squid, DSS)中的砷总量,发现 14 种鱿鱼丝中的砷总量均低于 $2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;用高效液相色谱(HPLC)与 ICP-MS 联用技术建立了 As()、As()、二甲基胂酸(DMA)、甲基胂酸(MMA)、砷甜菜碱(AsB)和砷胆碱(AsC)六种砷形态的分离分析方法;采用快速溶剂萃取(ASE)、超声溶剂提取(SON)和盐酸浸提三种不同的前处理方法分析了 3 种鱿鱼丝中的砷形态,发现鱿鱼丝中的砷主要以 AsB 形式存在。

关键词:砷;形态分析;高效液相色谱;电感耦合等离子体-质谱

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A

香港《大公报》曾报道香港消委会测试了市面上的 23 款鱿鱼丝(Dried Shredded Squid, DSS)和鱼干,发现鱿鱼丝中的砷严重超标,引起了巨大的公众效应。众所周知,砷普遍存在于自然界中,其中天然存在的约占 60%,而人为排放的约为 40%^[1]。目前,海洋水体受到人为的砷污染越来越严重。通过食物链,砷在海洋生物体内累积,对人体产生直接或间接的威胁。研究发现,砷的毒性大小与其存在的形态密切相关。以砷化合物的半致死量 LD_{50} 计,其毒性依次为 $\text{H}_3\text{As} > \text{As}(\text{ }) > \text{As}(\text{ }) > \text{甲基胂酸}(\text{MMA}) > \text{二甲基胂酸}(\text{DMA}) > \text{三甲基胂氧}(\text{TMAO}) > \text{砷胆碱}(\text{AsC}) > \text{砷甜菜碱}(\text{AsB})$,这表明不同形态砷的毒性不同,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^[2]。因此,研究海产品中砷的毒性,单测定砷的总量是不可信的,应同时对砷的形态加以研究。然而,国内外对海产品中的砷及其形态研究的报道多侧重于新鲜海产品。与新鲜海产品相比,干海产品需经过一系列的加工处理,其砷的形态尚待研究。

本课题组利用高效液相色谱(HPLC)和电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)联用技术建立了同时、快速分析鱿鱼丝中的 6 种砷形态的分析方法,以期对干海产品的质量控制在提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器

美国 Agilent 公司 1100 型高效液相色谱仪,配有手动进样器;Hamilton PRP-X100 阴离子交换色谱柱(250 × 4.1 mm, 10 μm);美国 Agilent 公司 7500a 型电感耦合等离子体-质谱仪(ICP-MS);美国 Millipore 公司超纯水机(Milli-Q);Dionex 公司的 ASE100 型快速溶剂萃取仪;美国 lifesciences 公司的快速漩流浓缩仪;德国 HERMLE Z383 K 型离心机;美国 LABCONCO 公司的 Freezone 冻干系统。

1.2 试剂及样品

砷标准物质三碘化砷、五氧化二砷从美国 Alfa Aesar 公司购买;二甲基胂酸(DMA)购于美国 Acros

收稿日期: 2006-07-13

基金项目: 国家自然科学基金(No. 20675021)

通讯联系人: 王小如,女,博士,教授,研究方向:环境分析.

Organics 公司;甲基胂酸(MMA)、砷胆碱(AsC)、砷甜菜碱(AsB)均由清华大学提供;标准物质 TORT-2 购于加拿大国家研究中心。As()、As()、DMA、MMA、AsB 和 AsC 均配制成 $10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (以砷计)的储备液,4 避光保存。硝酸、甲醇、过氧化氢均购于德国 Merck 公司; ^7Li 、 ^{89}Y 、 ^{140}Ce 、 ^{205}Tl 调谐液购于美国 Agilent 公司;盐酸、碳酸铵为分析纯;超纯水(电阻率 $18.2 \text{ M} \cdot \text{cm}$)。

鱿鱼丝为青岛市售干品。

1.3 HPLC 及 ICP-MS 条件

在分析测试前,先用 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ^7Li 、 ^{89}Y 、 ^{140}Ce 、 ^{205}Tl 调谐液对 ICP-MS 进行调谐,使 ^{89}Y 的灵敏度达到最优,同时也可使 ^{75}As 有较高的灵敏度和较低的检出限,优化后的条件见表 1。

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 $^{75}\text{As} = ^{75}\text{M} - ^{77}\text{M} (3.127) + ^{82}\text{M} (2.733) - ^{83}\text{M} (2.757)$ 来校正该多原子离子干扰,以期获得 ^{75}As 的准确含量。而在砷的形态分析中,采用了时间分辨分析模式,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^[3]。

Table 1 Instrumental parameters for total As determination and As speciation analysis

Total arsenic	Parameters		
ICP-MS	Agilent 7500a		
RF power	1 350 W		
RF matching	1.6 V		
Carrier gas flow rate	$1.10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$		
Peristaltic pump flow rate	$0.1 \text{ r} \cdot \text{s}^{-1}$		
Arsenic speciation	Parameters		
HPLC	Agilent 1100 Series		
Analytical column	Hamilton PRP-X100 (250 \times 4.1 mm, 10 μm)		
Flow rate	$1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$		
Injection volume	25 μL		
Mobile phase A	H_2O		
Mobile phase B	$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH = 9.5)		
Gradient program	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	100	0
	15	0	100
	30	100	0
ICP-MS	Agilent 7500a		
RF power	1 350 W		
RF matching	1.6 V		
Carrier gas flow rate	$1.10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$		
Peristaltic pump flow rate	$0.5 \text{ r} \cdot \text{s}^{-1}$		
Monitored signals (dwell times in ms)	^{75}As (500), ^{72}Ge (100), ^{35}Cl (100), ^{77}Se (100) and ^{83}Kr (100)		

1.4 砷总量测定

将 14 种鱿鱼丝冷冻干燥后粉碎。准确称取 0.2 g 粉碎后的鱿鱼丝于酸煮洗净的聚四氟乙烯(PTFE)密封罐中,加入 5 mL 硝酸。密封罐在 80 烘箱中预消解 4 h 后,放气,再于 170 条件下消解 4 h。待冷却后加入 1 mL 过氧化氢,反应 20 min。然后将样品转移至干净的聚乙烯(PET)塑料瓶中,稀释定重至 25 g^[4],即为待测样液。样液直接用 ICP-MS 测定砷总量。

1.5 砷形态分析

1.5.1 快速溶剂萃取(ASE) 取三种粉碎后的鱿鱼丝(鱿鱼丝(1)、(2)、(9)),准确称取 0.5 g 于不锈钢萃取池中。萃取程序如下:萃取时间:2 min \times 5;萃取温度:100 ;萃取溶剂:甲醇;萃取压力:1 500 psi^[11]。萃取液在 40 水浴中旋转蒸干,残渣用超纯水溶解,定重至 25 g,即得待测样液。样液经 HPLC 分离后按 ICP-MS 分析条件定量分析。

1.5.2 超声溶剂提取(SON) 准确称取鱿鱼丝(1)、(2)、(9)各 0.2 g 于离心管中,加入 5 mL 甲醇/水(1:1, V/V)超声 45 min,然后置于离心机中以 $5 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 旋转 30 min。小心移出上层清液于 100 mL

圆底烧瓶中^[5]。重复上述步骤三次。合并三次提取液并于 40 °C 水浴中旋转蒸干,所剩残渣用超纯水溶解,定重至 25 g,即为待测样液。样液通过 HPLC-ICP-MS 分离测定。

1.5.3 盐酸浸提 取三种粉碎后的鱿鱼丝(1)、(2)、(9),过 80 目筛,准确称取 1.25 g 于 15 mL 具塞刻度离心管中,加 HCl (1+1) 10 mL,混匀,置于 60 °C 水浴锅中 18 h,其间多次振摇,使试样充分浸提。冷却,过滤。取 2 mL 滤液于 5 mL 容量瓶中,加超纯水定容,用于砷的形态分析。

2 结果与讨论

2.1 总砷的测定

14 种鱿鱼丝中总砷的定量分析结果见表 2。

Table 2 Quantitative result of different DSSs

Sample		Source	As($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\pm\text{s}$) *
Chuangji guohuang	(1)	Qingdao	1.42 \pm 0.28
Qingsong DSS	(2)	Jiaozhou, Qingdao	1.27 \pm 0.23
Dayang DSS	(3)	Qingdao	0.57 \pm 0.20
Hailong DSS	(4)	Jimo, Qingdao	0.90 \pm 0.17
Beiyang DSS	(5)	Qingdao	0.95 \pm 0.16
Baifulai DSS	(6)	Qingdao	0.99 \pm 0.19
Guolin DSS	(7)	Qingdao	1.13 \pm 0.30
DSS in bulk	(8)	Dafuyuan supermarket in Qingdao	1.51 \pm 0.27
DSS in bulk	(9)	Zhencheng supermarket in Qingdao	1.43 \pm 0.21
DSS in bulk	(10)	The dry seafood market in Qingdao	1.12 \pm 0.21
DSS in bulk	(11)	Weike supermarket in Qingdao	0.70 \pm 0.03
Cuttlefish in bulk	(12)	Dafuyuan supermarket in Qingdao	1.24 \pm 0.33
Cuttlefish in bulk	(13)	The dry seafood market in Qingdao	1.24 \pm 0.14
Cuttlefish in bulk	(14)	Weike supermarket in Qingdao	1.37 \pm 0.22

* Average concentration of As in DSS \pm s for $n=3$ as determined by ICP-MS.

由表 2 可见,14 种鱿鱼丝中的砷总量都低于国家标准(GB4810-94)中规定的干海产品中无机砷的允许限量值 $2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。为了验证测定结果的准确性,同时考察了龙虾肝胰腺标准参考物质 TORT-2,测定值 $21.6\pm 1.3\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (标准值 $21.6\pm 1.8\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)^[6]。由此可见,青岛市售的 14 种鱿鱼丝中的砷含量均不超标。

2.2 色谱分离条件的选择

在水溶液中,As(III)、As(V)、DMA 和 MMA 是以阴离子形式存在,而 AsB 和 AsC 是以阳离子形式存在。因此,对于阴离子交换柱,在常用流动相条件下,As(III)、As(V)、DMA、MMA 和色谱柱固定相上的离子交换剂基团相互作用,按照作用力的大小,As(III)、DMA、MMA 和 As(V) 依次被洗脱出来。而 AsC 和 AsB 无法与离子交换剂的交换中心发生交换,只能随着流动相先流出,因此当 As(III)、As(V)、DMA、MMA、AsC 和 AsB 同时存在时,总是 AsC 和 AsB 最先出峰。

本实验参照 Brisbin 等^[7]的分离方法,选用碳酸铵和水为流动相,并考察了其在不同梯度下对 As(III)、As(V)、DMA、MMA、AsB 和 AsC 六种砷形态的洗脱能力。与色谱柱中离子交换剂的交换基团作用力较强的 As(III) 保留时间较长,能与其它砷形态完全分离,因此本实验在优化分离条件时只用了五种砷标准(As(III)、DMA、MMA、AsB 和 AsC)。

图 1 列出了该五种砷标准在不同梯度洗脱条件下的色谱图。据文献^[7]报道,碳酸铵的浓度越低,AsB 和 AsC 分离的就越完全。但在流速一定时,碳酸铵的浓度又影响各个砷形态的保留时间,碳酸铵浓度越低,保留时间就越长。在 As(III) 的梯度洗脱条件下,梯度时间较短,起始时流动相中碳酸铵的浓度较高,AsB 和 AsC 不能完全分离。在 As(V)、DMA 的梯度洗脱条件下,梯度时间增长,起始时流动相中碳酸铵的浓度降低,AsB 和 AsC 分离的就越来越完全,但是各个砷形态的保留时间却越来越长,即使在 $1.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速下,As(III) 中各砷形态的保留时间仍比较长。综合考虑,表 1 的梯度洗脱条件最优,六种砷标准在 15 min 内可以达到基线分离,优于文献^[7]的分离方法,分离结果见图 2。

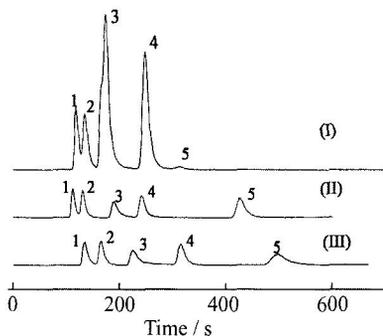


Fig. 1 Gradient anion exchange ICP-MS chromatograms of 10 µg L⁻¹ As(III), DMA, MMA, AsB and AsC arsenic standards

Mobile phase : A and B ; (I) : 0 ~ 8 min 100 % B , 8 ~ 15 min 100 % A , flow rate : 1.5 mL · min⁻¹ ; (II) : 0 ~ 12 min 100 % B , 12 ~ 15 min 100 % A , flow rate : 1.5 mL · min⁻¹ ; (III) : 0 ~ 18 min 100 % B , flow rate : 1.8 mL · min⁻¹. Peak identification : (1) AsC , (2) AsB , (3) As(III) , (4) DMA and (5) MMA.

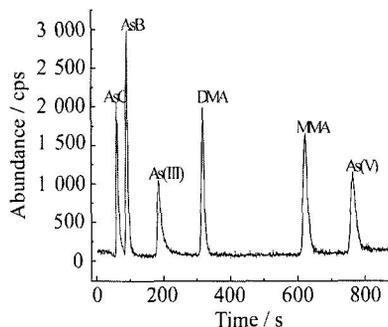


Fig. 2 Gradient anion exchange ICP-MS chromatograms of 20 µg · L⁻¹ As(III), As(V), DMA, MMA, AsB and AsC arsenic standards

Moible phase : A and B ; 0 ~ 15 min 100 % B , 15 ~ 30 min 100 % A.

2.3 提取方法的对比

对于高蛋白的样品,甲醇对其砷形态特别是 AsB 的提取效率较高^[8]。因此本实验以甲醇/水(1:1, V/V)、甲醇为提取剂,采用超声波辅助萃取和 ASE 这两种前处理方法对鱿鱼丝中的砷形态进行提取。而对于无机砷形态,以盐酸作为提取溶剂(参考国标:GB/T. 5009.11-2003:食品中无机砷和有机砷的分离方法)。对总砷含量较高的鱿鱼丝(1)、(2)、(9)中各种砷形态进行的定量分析结果见表 3。从表 3 可知,三种前处理方法提取到的主要砷形态是砷甜菜碱(AsB),另外还有低浓度的 DMA 和微量的 As(III)、AsC 等。表 5 列出了 AsB 的提取效率,发现甲醇/水(1:1)超声提取 AsB 的效率较高,这与前人在文献^[9]中阐述的结果一致。由此可见,鱿鱼丝中的砷主要以砷甜菜碱(AsB)的形式存在,这可能是因为在海洋生态系统中砷甜菜碱是砷循环的最终产物^[10]。图 2 对比了鱿鱼丝(9)用三种前处理方法处理得到的砷形态色谱图,发现相对于甲醇/水的高提取效率,盐酸浸提到的砷形态较多,目前作者尚无法给出明确的原因,将在以后的工作中做进一步的探讨、研究。

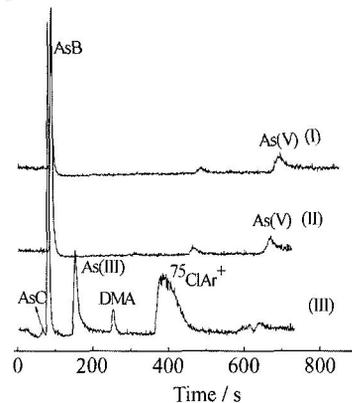


Fig. 3 Gradient anion exchange ICP-MS chromatograms of DSS(9) using three extraction methods
(I) : ASE ; (II) : SON ; (III) : HCL.

Table 3 Quantitative result of compounds of diferent arsenic species in DSS(1) ,(2) and (9) using three extraction methods

Sample	Extraction method	AsC	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)
DSS(1)	ASE	ND	0.93 ±0.04	ND	ND	ND	0.13 ±0.02
	SON	ND	0.98 ±0.06	ND	ND	ND	0.20 ±0.11
	HCL	0.11 ±0.01	0.78 ±0.20	0.39 ±0.04	0.10 ±0.01	ND	ND
DSS(2)	ASE	ND	0.63 ±0.03	ND	ND	ND	0.10 ±0.02
	SON	ND	0.70 ±0.03	ND	ND	ND	0.19 ±0.06
	HCL	0.019 ±0.03	0.71 ±0.04	0.39 ±0.10	ND	ND	ND
DSS(9)	ASE	ND	0.80 ±0.03	ND	ND	ND	0.18 ±0.04
	SON	ND	0.91 ±0.04	ND	ND	ND	0.20 ±0.05
	HCL	0.011 ±0.004	0.68 ±0.17	0.29 ±0.01	0.11 ±0.02	ND	ND

Mean ±SD/µg · g⁻¹ As , n = 3 ; ND = Not detectable.

同时为了验证方法的准确性对龙虾肝胰腺标准参考物质 TORT-2 进行了分析,分析结果见表 4 和表

5,可见 TORT 中最主要的砷形态是 AsB,这与文献[11]中阐述的结果一致。尤其甲醇/水(1:1)超声提取 AsB 的效率为 73.66%,与该文献中提到的 AsB 占水溶性砷形态的 73%非常一致。

Table 4 Quantitative result of compounds of different arsenic species in TORT-2 using three extraction methods

Sample	Extraction method	AsC	AsB	As()	DMA	MMA	As()
TORT-2	ASE	ND	13.11 ±2.02	ND	1.09 ±0.22	ND	ND
	SON	ND	15.91 ±0.11	ND	1.44 ±0.12	ND	1.36 ±0.34
	HCL	0.11 ±0.01	11.95 ±0.25	0.37 ±0.06	1.92 ±0.06	ND	ND

Mean ±SD/μg·g⁻¹ As, n=3; ND = Not detectable.

Table 5 The extraction efficiency of total As and AsB

Sample	Extraction method	Total As in extract	Extraction efficiency ^a (%)	Extraction efficiency of AsB ^b (%)
TORT-2	ASE	21.78 ±5.34	101	60.69
	SON	25.88 ±0.38	120	73.66
	HCl	21.65 ±1.43	100	55.32
DSS(1)	ASE	1.42 ±0.50	100	65.49
	SON	2.14 ±0.25	150	69.01
	HCl	1.60 ±0.57	113	54.93
DSS(2)	ASE	1.35 ±0.05	106	49.61
	SON	1.27 ±0.16	100	55.12
	HCl	1.55 ±0.47	122	55.91
DSS(9)	ASE	1.63 ±0.11	114	55.94
	SON	1.17 ±0.22	82	63.64
	HCl	1.57 ±0.53	110	47.55

Mean ±SD/μg·g⁻¹ As, n=3; ^aEfficiency of total As extraction compared with total arsenic using acid digestion; ^bEfficiency of the extracted AsB compared with total arsenic using acid digestion.

另外,采用甲醇/水(1:1)超声提取鱿鱼丝(1)中的砷形态时,总砷的提取效率高达 150%,究其原因可能是甲醇可提高 As 的离子化效率从而增强⁷⁵As 的信号^[4,12]。因此一旦提取液中的甲醇不能完全蒸干,就会使提取效率明显偏高。

3 结论

本文改进了 As()、As()、DMA、MMA、AsB 和 AsC 六种砷形态的分离分析方法,使六种不同形态的砷在 15 min 内采用梯度洗脱得以基线分离。并用该技术快速、准确地分析了青岛市售鱿鱼丝中的砷形态,发现无论从砷的总量还是从砷的形态分析来看,这些鱿鱼丝都是安全的,可以放心食用。这为判定鱿鱼丝以及干海产品中砷的毒性提供了可靠、科学的依据。

致谢 感谢利曼公司在前处理过程中给予的大力支持!

参考文献:

- [1] Wahlen Raimund. Environmental Monitoring in China(中国环境监测)[J],2004,20(6):68.
- [2] LIU Gui-hua(刘桂华),WANG Li(汪 丽). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报)[J],2002,21(4):88.
- [3] Ronkart Se bastien N,Laurent Vincent,Carbannelle Philippe,et al. Chemosphere[J],2007,66(4):738.
- [4] WANG Xiao-ru,et al(王小如等). Application Examples of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry(电感耦合等离子体质谱应用实例)[M]. Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社),2005:73.
- [5] W-M Lai Vivian,William R. Cullen,Sankar Ray. Marine Chemistry[J],1999,66:81.
- [6] Orum Ulrik N,W-M Lai Vivian,et al. Environ. Monit[J],2005,7:122.

- [7] Brisbin Judith A, Hymer Clayton B, Caruso Joseph A. *Talanta*[J], 2002, **58**:133.
- [8] Dietz Christian, Sanz Jon, Sanz Estrella, Muñoz-Olivas Rian. *Chromatography A*[J], 2007, **1153**:114.
- [9] Pizarro I, Gómez M, Cánara C, Palacios M A. *Analytical Chimica Acta*[J], 2003, **495**:85.
- [10] Borak Jonathan, Dean Hosgood H. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*[J], 2007, **47**:204.
- [11] Wahlen Raimund, McSheehy Shona, et al. *Anal. At. Spectrom*[J], 2004, **19**:876.
- [12] Allain Pierre, Jaunault Laurent, et al. *Analytical Chemistry*[J], 1991, **63**:1497.

Arsenic Speciation in Dried Shredded Squid

HAO Chun-li¹, CAO Xuan^{2,3}, JING Miao^{2,3}, WANG Geng⁴,
YANG Huang-hao³, CHEN Xi¹, WANG Xiao-ru^{*3}

(1. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002;*
2. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003;* 3. *Qingdao Key Lab of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography of SOA, Qingdao, Shandong 266061;* 4. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100*)

Abstract : 14 types dried shredded squid (DSS) saled in Qingdao were examined for their total arsenic content and As species. Total arsenic concentration in these DSS were all below $2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. For the species, a method was established using high performance liquid chromatography (HPLC) hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for separation of arsenobetaine (AsB), arsenocholine (AsC), arsenite (As()), arsenate (As()), monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA) in one chromatographic run. The As species in 3 DSSs were extracted using accelerated solvent extraction (ASE), sonication extraction (SON) and hydrochloric acid extraction. The results showed that arsenobetaine (AsB) was the main species in these DSS.

Keywords : Arsenic; Speciation; High performance liquid chromatography (HPLC); Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)