

氢化物-原子荧光光谱法测定岩藻聚糖硫酸酯中 As, Hg 含量

刘翼翔, 吴永沛*, 王 力, 黄志勇

集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021

摘 要 岩藻聚糖硫酸酯结合大量的重金属, 降低了它的生物活性, 使之在保健品、药物开发中的应用受到限制。文章采用高压微波消解、氢化物-原子荧光光谱(HG-AFS)法测定了岩藻聚糖硫酸酯中的 As, Hg 含量, 并对仪器工作参数(原子化器温度、灯电流、负高压等)及氢化物发生条件(载流酸度、载气流量、KBH₄浓度等)进行了优化。结果表明, 脱盐后岩藻聚糖硫酸酯中 As 和 Hg 的含量分别为 2.78 和 0.119 mg · kg⁻¹。说明 As 和 Hg 是以结合态形式存在于岩藻聚糖硫酸酯中。As, Hg 的检出限分别为 0.173 和 0.012 2 ng · kg⁻¹, 加标回收率分别为 93.31%~100.9%, 91.21%~106.1%。

关键词 岩藻聚糖硫酸酯; 砷; 汞; 原子荧光

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)11-2691-04

引 言

岩藻聚糖硫酸酯(Fucoidan)是存在于褐藻细胞壁基质中的一种富含岩藻糖(L-fucose)和硫酸根的杂多糖^[1,2]。它在褐藻中的含量与褐藻的种类、产地、年龄等有关, 有的可达到10%左右^[3]。大量研究表明, 岩藻聚糖硫酸酯具有抗病毒^[4-6]、抗凝血^[7-9]、抗氧化^[10,11]、抑制肿瘤^[12,13]、降血压^[14]以及免疫调节^[15]等多种生物活性。因此, 岩藻聚糖硫酸酯是一种开发海洋保健品和药物的重要资源。

然而, 人们在从事工农业的活动中使环境污染加剧, 及褐藻藻体对 As, Hg 等元素具有强的富集作用^[16], 最后导致多糖含有大量的 As, Hg 等元素, 且部分以结合态形式存在于多糖中。As, Hg 的存在, 严重限制了多糖在食品、药品领域中的应用。此外, 如果 As, Hg 与多糖中的硫酸根结合, 将大大降低多糖的生物活性。为了正确评价 As, Hg 对岩藻聚糖硫酸酯的物化性质、生物活性的影响, 准确检测其在该多糖中的含量是十分必要的。

氢化物-原子荧光光谱(HG-AFS)法具有灵敏、简便、快速等特点^[17]。本文采用高压微波消解、用 HG-AFS 准确测定了岩藻聚糖硫酸酯中 As, Hg 的含量。

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

1.1.1 实验仪器

AF-640 原子荧光光谱仪: 北京瑞利分析仪器公司; MDS-2003F 微波消解制样系统仪: 上海新仪微波化学科技有限公司。

1.1.2 实验试剂

100 μg · mL⁻¹ 汞单元素标准溶液(GBW(E)080126): 国家标准物质研究中心; 100 μg · mL⁻¹ 砷单元素标准溶液(GBW(E)080117): 国家标准物质研究中心; 实验所用试剂均为分析纯及以上级别, 实验用水为 TKA-Genpure 超纯水系统制备的超纯水。

1.2 实验材料

岩藻聚糖硫酸酯的提取^[18]: 80 目海带粉经 80 °C 热水提取, 0.1 mol · L⁻¹ HCl 沉淀褐藻胶, 并分别以 30% 和 60% 乙醇(v/v)分级沉淀得到岩藻聚糖硫酸酯粗品。粗糖样品经 95% 乙醇洗涤、冷冻干燥后, 待测。

1.3 实验方法

1.3.1 样品消解

按文献[19,20]方法, 称取 0.7 g 糖样于聚四氟乙烯(PTFE)消解罐中, 加入 9 mL 浓硝酸, 在 100 °C 下预消解

收稿日期: 2007-10-06, 修订日期: 2008-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(20175022), 福建省自然科学基金项目(C0410037)和集美大学中青年创新团队专项基金项目(2006A002)资助

作者简介: 刘翼翔, 1982 年生, 集美大学生物工程学院硕士 e-mail: lyxjmu@163.com

*通讯联系人 e-mail: wyp@jmu.edu.cn

6 h 后, 按以下参数进行微波消解工步设置: 压力和时间分别为 2 atm, 3 min; 5 atm, 2 min; 10 atm, 2 min; 15 atm, 6 min。消解完毕后, 冷却。取出 PTFE 罐, 置于加热板上 120 赶酸至冒白烟。用于测 As 的消解液及样品空白皆加入 5 mL 5 % 硫脲 (w/v), 并分别用 8 % HCl (φ) 转移、定容到 50 mL; 用于测 Hg 的消解液及样品空白分别用 10 % HCl (φ) 转移并定容到 50 mL。每个样品各平行 3 份。

1.3.2 标准曲线的制作

As 标准曲线, 分别加入 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ As 标液 0, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 mL 于 25 mL 容量瓶中 (各相当于砷浓度 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加入 5 mL 8.0 % 盐酸 (φ) 和 5 mL 5 % 硫脲 (w/v) 后, 用水定容, 摇匀测量。

Hg 标准曲线, 分别加入 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hg 标液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 于 25 mL 容量瓶中 (各相当于汞浓度 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 用 10 % 盐酸 (φ) 定容, 摇匀测量。

2 结果与讨论

2.1 仪器参数对荧光强度及测量稳定性的影响

2.1.1 原子化器温度

实验表明, 原子化温度在 25 ~ 400 时, As 的荧光强度随温度的升高而增加, 说明温度升高提高了 AsH_3 的传输效率。但温度过高会使 AsH_3 在经过原子化器加热的石英管中时被部分分解, 分解产物即便进入氢火焰也不会被原子化, 从而造成荧光信号减弱。实验发现, 检测 As 和 Hg 选择原子化器温度为 300 可获得良好检测效果。

2.1.2 灯电流

当灯电流 < 100 mA 时, 灯电流越高, 分析元素的荧光强度也越高, 但过高的灯电流会降低空心阴极灯的使用寿命, 且测量重复性差。从图 1 可以看出, 检测 As 和 Hg 分别使用 70 和 40 mA 的灯电流可得到很好的灵敏度和稳定性。

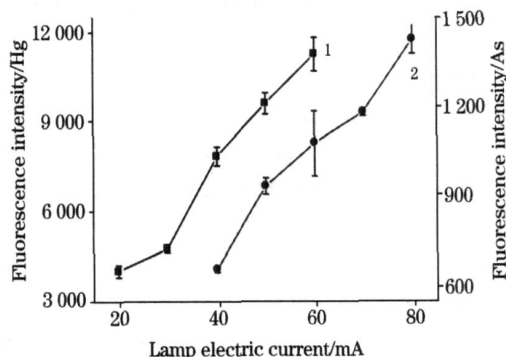


Fig 1 Effect of lamp electric current on the fluorescence intensity

1: Hg; 2: As

2.1.3 负高压 (PMT)

从图 2 可以看出, 检测时增加负高压可明显提高荧光强度, 但过高的负高压会使测定的重现性变差。检测 As 和 Hg 都采用 240 V 的负高压可以获得良好的灵敏度和稳定性。

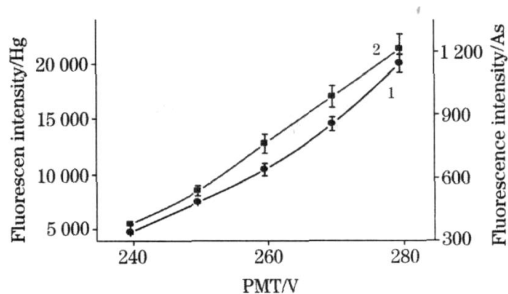


Fig 2 Effect of PMT on the fluorescence intensity

1: Hg; 2: As

2.2 氢化发生条件对荧光强度及测量稳定性的影响

2.2.1 载流酸度

载流酸度直接影响着原子荧光的强度。以硼氢化钾-酸为还原体系, 载流、硼氢化钾和采样液在氢化物发生器中混合, 酸和硼氢化钾发生分解反应, 产生大量的氢气并使 As 和 Hg 离子生成相应的氢化物。研究发现, 以 HCl 为载流, 其酸度在 2 % ~ 14 % (φ) 范围内, As 原子荧光强度随酸度增加而变大, 并在 8 % 时变化开始趋于平缓; 而酸度对 Hg 原子荧光强度的影响不大。

2.2.2 KBH_4 浓度

KBH_4 浓度过高, 会产生过量的氢气, 将检测离子的氢化物稀释, 使荧光强度减弱。此外, KBH_4 的浓度还会影响 Hg 原子荧光的稳定性。实验表明, 检测 As 和 Hg 分别选用 10 %, 3 % (w/v) 的 KBH_4 可获得很好的灵敏度和稳定性。

2.2.3 预还原剂

以硫脲为预还原剂, 发现硫脲的浓度对 As 的原子荧光强度的影响并不明显。但在用于检测 As 和 Hg 样品中添加 5 % 硫脲 (w/v) 可以对其他金属离子产生掩蔽作用。

2.2.4 氩气流量

过低的氩气流量不能将足够的氢化物带到原子化器中, 使荧光强度降低, 影响检测的灵敏度和稳定性; 流量过高, 会稀释氢化物, 也会导致检测灵敏性和稳定性变差。实验表明, 检测 As 使用 $600 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的氩气流量, 检测 Hg 使用 $400 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的氩气流量和 $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的屏蔽气效果较好。

2.3 标准曲线及检出限

As 和 Hg 的浓度与其荧光强度的关系为: $I_{\text{As}} = 102.9 + 54.343c_{\text{As}}$, $r = 0.9999$; $I_{\text{Hg}} = -3343.0 + 5400.3c_{\text{Hg}}$, $r = 0.9998$ 。As, Hg 浓度分别在 0 ~ 200, 2.0 ~ 10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 有良好的线性关系。对样品空白进行 10 次检测, 用三倍标准偏差法计算检出限, As 的检出限为 $0.173 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; Hg 检出限为 $0.0122 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.4 精密度分析

对样品进行连续测定 ($n = 8$), 算得 As 和 Hg 的相对标准偏差分别为 1.09 %, 1.69 %。

2.5 样品及加标回收率测定

为了考察岩藻聚糖硫酸酯中结合态的 As 和 Hg 含量, 将岩藻聚糖硫酸酯分为两份, 其中一份经超滤脱盐除去游离态的 As 和 Hg, 另一份则未经超滤脱盐。样品和加标回收率

Table 1 Analytical results and recovery tests

样品	As				Hg			
	本底值 / (μg · g ⁻¹)	加标量 / (μg · g ⁻¹)	测得值 / (μg · g ⁻¹)	回收率 / %	本底值 / (μg · g ⁻¹)	加标量 / (μg · g ⁻¹)	测得值 / (μg · g ⁻¹)	回收率 / %
FCD ₁	2.78	1.50	4.25	97.03	0.125	0.060	0.179	96.76
		2.50	5.02	93.31		0.120	0.260	106.1
		4.00	6.56	96.76		0.180	0.296	97.05
FCD ₂	2.26	1.00	3.14	96.32	0.119	0.060	0.180	100.6
		2.00	4.30	100.9		0.120	0.218	91.21
		3.00	5.06	96.20		0.180	0.289	96.66

注：FCD₁，FCD₂ 分别表示未经和经超滤脱盐的岩藻聚糖硫酸酯

测定结果如表 1 所示。

率分析均得到了良好的结果。(2) 样品检测结果显示，脱盐前后岩藻聚糖硫酸酯中的 As 和 Hg 含量分别为 2.78 和 0.125 mg · kg⁻¹；2.26 和 0.119 mg · kg⁻¹，表明 As 和 Hg 主要是以结合态形式存在于岩藻聚糖硫酸酯中，用超滤的方法无法将其去除。

3 结 论

(1)通过对实验条件的优化，检出限、精密度、加标回收

参 考 文 献

[1] Evans L V, Holligan S. New Phytologist, 1972, 71(6) : 1673.

[2] Shevchenko N M, Anastyuk S D, Gerasimenko N I, et al. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2007, 33(1) : 88.

[3] Zvyagintseva T N, Shevchenko N M, Nazarenko E L, et al. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005, 320(2) : 123.

[4] Dostilovi Z, Calvente J J, Petersn E T, et al. AWN-Biochem., 1995, 230: 329.

[5] Yim J H, Kim S J, Ahn S H. Marine Biotechnology, 2004, 6: 17.

[6] Lapshina L A, Reunov A V, Nagorskaya V P. Russian Journal of Plant Physiology, 2006, 53 (2) : 246.

[7] Paulo A S. Current Pharmaceutical Design, 2004, 10: 967.

[8] Hall G, Lang D, Qiu Xiang-dong, et al. Blood Coagulation and Fibrinolysis, 2006, 17(4) : 277.

[9] MAO Wen-jun, ZANG Xiao-xue, YI Li, et al. Journal of Applied Phycology, 2006, 18: 9.

[10] Souza M C, Marques C T, Rocha H A, et al. Appl. Phycol., 2006, 10: 65.

[11] Xue Chang-Hu, Yu Fang, Hong Lin, et al. Journal of Applied Phycology, 2001, 13: 67.

[12] Soeda S, Shimeno H, Nagamatsu A. Cancer Letters, 1994, 85(1) : 133.

[13] Soeda S, Ishida S, Shimeno H, et al. Jap. J. Cancer Res., 1994, 85 (11) : 1144.

[14] ZHU Hai-bo, GENG Mei-yu, GUAN Hua-shi (朱海波, 耿美玉, 管华诗). Journal of Ocean University of Qingdao (青岛海洋大学学报), 2000, 30(3) : 463.

[15] Haneji K, Matsuda T, Tomita M, et al. Nutrition and Cancer-An International Journal, 2005, 52(2) : 189.

[16] Smith K I, Hann A C, Harwood J L. Physiol. Plant., 1986, 66: 692.

[17] Gomez M M, Kovacs M, Palacios M A, et al. Microchim. Acta, 2005, 150(1) : 9.

[18] Ray B. Carbohydrate Polymers, 2006, 66: 408.

[19] YUAN Ai-ping, TANG Yan-xia, HUANG Yu-long, et al (袁爱萍, 唐艳霞, 黄玉龙, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(8) : 1553.

[20] WENG Di (翁 棣). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(12) : 2073.

Determination of Total Arsenic and Mercury in the Fucoidans by Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectroscopy

LIU Yi-xiang, WU Yong-pei^{*}, WANG Li, HUANG Zhi-yong
Bioengineering School of Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract In the present article, the method of high pressure microwave digestion and hydride generation atomic fluorescence spectroscopy (HG-AFS) was used for the determination of total arsenic and mercury in fucoidans, and the detecting conditions were optimized, including instrument working parameters, such as atomic temperature, lamp current, high voltage of PMT etc, and the conditions of hydride generation, such as the acid concentration of loading fluid, speed of carrying gas, the concentration of KBH_4 etc. The result shows that there are good linear relations between fluorescence intensity and the concentrations of arsenic and mercury where their concentrations are $0\text{--}200\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $2\text{--}10.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, and the related coefficient of arsenic is 0.9999 and that of mercury's is 0.9998. The blanks of samples were detected constantly ($n=10$), and the detection limit of this method is $0.173\ \text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ for total arsenic and $0.0122\ \text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ for mercury. In order to do precise analysis, the samples were detected constantly ($n=8$), and the relative standard deviations (RSDs) of arsenic and mercury are 1.09% and 1.69%, severally. The quantitative arsenic and mercury were added into the samples before they were digested, and the recovery range is 93.31%–100.9% for arsenic and 91.21%–106.1% for mercury. The contents of total arsenic and mercury in fucoidans before desalted by ultrafiltration are $2.78\ \text{mg}$ and $0.125\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. Nevertheless, the contents of total arsenic and mercury in fucoidans desalted by ultrafiltration are $2.26\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $0.119\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, severally.

Keywords Fucoidans; Arsenic; Mercury; Atomic fluorescence

(Received Oct. 6, 2007; accepted Jan. 8, 2008)

* Corresponding author