

研究报告

浒苔中有毒有害元素及砷化学形态的研究

曹 焯^{1,2}, 李景喜², 余晶晶², 于振花^{2,3}, 杨黄浩², 王小如²

(1. 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266003; 2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 3. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 建立了微波消解 - 电感耦合等离子体质谱 (ICP - MS) 法测定浒苔中 Cu、As、Cd、Hg、Pb 等元素含量的分析方法, 对各元素的线性关系良好 ($r=0.999\ 3\sim 0.999\ 9$), 检出限为 $0.28\sim 2.3\ \mu\text{g/L}$, 元素加标回收率为 $83\%\sim 108\%$, 符合痕量分析要求。并利用高效液相色谱 (HPLC) 与电感耦合等离子体质谱 (ICP - MS) 联用技术对浒苔样品中的砷化学形态进行了初步探讨, 发现其中砷主要以无机 As(V) 和某种未知的砷形态存在, 推测该未知砷形态为砷糖类物质。

关键词: 微波消解; 高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱; 浒苔; 砷化学形态

中图分类号: O657.63; Q949.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2009)03 - 0257 - 05

Study of Harmful Elements and Arsenic Species in *Enteromorpha Prolifera*

CAO Xuan^{1,2}, LI Jing-xi², YU Jing-jing², YU Zhen-hua^{2,3},
YANG Huang-hao², WANG Xiao-ru²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. First Institute Oceanography of State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China;

3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: A method involving microwave digestion and inductively coupled plasma - mass spectrometric (ICP - MS) analysis was established for the determination of five elements (Cu, As, Cd, Hg, Pb) in *Enteromorpha prolifera*. Good linearity of the calibration curves was obtained for all target elements ($r=0.999\ 3 - 0.999\ 9$). Detection limits for these five elements were in the range of 0.28 to $2.3\ \mu\text{g/L}$, and the recoveries ranged from 83% to 108% . In addition, the chemical forms of arsenic including inorganic As(V) and an unknown arsenic species deduced as arsenosugar in *Enteromorpha prolifera* samples were quantified by high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma - mass spectrometry (HPLC - ICP - MS). The speciation results were presented and the analytical merits of the technique were discussed. The technique could be applied for the quality control and safety evaluation of seafood samples.

Key words: microwave digestion; HPLC - ICP - MS; *Enteromorpha prolifera*; arsenic species

近期青岛海域出现大量浒苔, 严重影响奥运城市的风貌, 引起各方面的关注。浒苔属海藻中绿藻门, 石莼科, 浒苔属。据我国医学典籍《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》记载: 浒苔“清胆, 消瘵疔瘰, 泄涨, 化痰, 治水土不服”^[1]。研究报道, 浒苔除了具有药用价值还具有相当高的营养价值^[2-3]。长久以来, 浒苔作为一种食品和药品被人们广泛使用。然而作为一种可食用及药用的海产品, 浒苔中的微量元素特别是有毒有害元素的分析却很少报道。

对于海产品中的无机元素测定, 常规的分析方法如原子发射光谱 (AES)、原子吸收光谱 (AAS) 和原子荧光光谱 (AFS) 等操作繁琐、有基体干扰、分析周期较长。本文将准确、快速、高灵敏度、可多元素检测的电感耦合等离子体质谱法 (ICP - MS) 应用于浒苔无机元素研究, 并结合微波消解样品处理

收稿日期: 2008 - 10 - 17; 修回日期: 2008 - 11 - 15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20675021); 海洋一所基本科研业务专项资助 (GY-022008T32)

第一作者: 曹 焯 (1980 -), 男, 山东青岛人, 博士, Tel: 0532 - 88963253, E - mail: cxpy@hotmail.com

技术,建立了微波消解 ICP-MS测定浒苔中几种微量元素的分析方法。着重分析了浒苔中的铜、砷、镉、汞、铅等元素的含量,此外本文采用水煮方式提取浒苔中各化学形态的砷,结合高效液相色谱(HPLC)和电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)联用技术^[4-5]对浒苔中砷的化学形态进行了初步分析与探讨。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

7500a型电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)(美国 Agilent公司); 1100型高效液相色谱(HPLC)(美国 Agilent公司), Hamilton PRP-X100(250 mm ×4.1 mm, 10 μm)阴离子交换色谱柱; Speed wave MW-3⁺微波消解系统(德国 Berghof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)。

1.2 主要材料与试剂

硝酸、双氧水、氢氟酸为优级纯(德国 Merck公司); 盐酸、碳酸铵为分析纯; 超纯水(18.2 MΩ): 由 Milli-Q超纯水系统制得; Agilent多元素混标(Part#5183-4687), Agilent内标(Part#5183-4682), 10 μg/L Li、Y、Ce和 Ti的调谐液(美国 Agilent公司); 国家标准物质海带(CBW08517); 标准物质 TORT-2(加拿大国家研究中心)。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)、砷胆碱(AsC)、砷甜菜碱(AsB)(清华大学); 浒苔取自青岛海边。

1.3 实验步骤

1.3.1 样品前处理 浒苔用自来水浸泡去除表面盐分后,用超纯水清洗3次。过滤,置于烘箱内(温度控制在50℃)稳定8 h。待干燥后取出置于玛瑙研钵内磨碎,过0.2 mm筛待用。

微波消解法:准确称取0.20 g粉碎的浒苔样品,置于酸蒸洗净的 PTFE消解罐中,加入5 mL浓硝酸,室温下预消解过夜。然后按照 LEAF程序消解,冷却后加入1 mL H₂O₂,反应30 min,然后将样品移入 PET瓶中,用超纯水定重至20.00 g,即为待测溶液。标准物质和空白采用同样方式消解,每种样品和试剂空白各平行3份。

密闭容器消解法:准确称取0.20 g浒苔样品,置于酸蒸洗净的 PTFE消解罐中,加入5 mL浓硝酸,于烘箱中80℃预消解4 h放气,然后升温至170℃消解4 h,待冷却后加入1 mL H₂O₂,反应30 min,然后将样品移入 PET瓶中,用超纯水定重至20.00 g,即为待测溶液。

水煮提取浒苔中的砷化学形态:取粉碎的浒苔样品,过0.2 mm筛,准确称取1.00 g于15 mL具塞刻度离心管中,加10 mL超纯水,混匀,水浴95℃加热3 h。冷却、过滤,取3 mL滤液于 PET瓶中,加超纯水定重至20.00 g,用于砷的形态分析。同法提取龙虾肝胰腺标准参考物 TORT-2中的砷化学形态。

1.3.2 仪器参考条件 使用调谐液调整仪器各项指标,使仪器灵敏度、氧化物、双电荷、分辨率等各项指标达到测定要求。仪器 RF功率1350 W,等离子气流速14.9 L/min,载气流速1.13 L/min,辅助气流速0.89 L/min, S/C温度2.0℃,采样深度7.3 mm,采样锥孔径1.0 mm,截取锥孔径0.4 mm,元素积分时间0.3 s,数据采集3次,样品提升速率0.4 mL/min,分析室气压3.59 ×10⁻⁴ Pa。

1.3.3 标准溶液的配制 用5% (质量分数)硝酸逐级稀释多元素混标至质量浓度为0.0、10.0、20.0、50.0、100.0 μg/L,并另外配制1 μg/L和2 μg/L的 Hg²⁺单标溶液。

1.3.4 HPLC-ICP-MS分析浒苔中砷化学形态 HPLC条件:阴离子交换色谱柱 Hamilton PRP-X100(250 mm ×4.1 mm, 10 μm); 流动相:A. H₂O, B. 50 mmol/L (NH₄)₂CO₃ (pH 9.5), 二元泵梯度程序为0~15 min, 100%~0% A; 15~30 min, 0%~100% A; 流速1.5 mL/min, 进样体积20 μL。

ICP-MS条件: RF功率1350 W,载气为高纯氩气,载气流速1.08 L/min,停留时间分别为⁷⁵As(0.5 s)、⁷²Ge(0.1 s)、³⁵Cl(0.1 s)、⁷⁷Se(0.1 s)、⁸³Kr(0.1 s)。

2 结果与讨论

2.1 样品消解方法

对于样品无机元素的测定,常见的前处理方法有干法消化、湿法消解以及微波消解法。干法消化

虽能处理较大的样品量, 但可能会导致较高的基体效应, 而且耗时长, 易造成某些挥发元素如砷、汞的挥发损失。传统湿法消解采用强氧化剂敞口加热进行样品消解, 也不适用于易挥发元素的分析, 且易引入外界环境污染。密闭容器消解与微波消解法均在密闭消解罐中用强酸消化处理样品, 区别在于前者采用在烘箱中外加热消解罐使样品消解, 而后者是利用微波的穿透性和激活能力, 内加热密闭容器中的试剂和样品。本实验分别比较了密闭容器消解法和微波消解法对海带及 TORT - 2 参考物质的消解效果, 发现 2 种方法均可将样品消解完全, 其结果无显著性差异, 但前者耗时长、易引入污染, 而后者耗时短、空白低, 易挥发元素砷、汞的损失更少, 结果见表 1。因此, 文中采用微波消解法对样品进行处理。

表 1 2 种消解方法的比较 ($n=3$)Table 1 Comparison of two kinds of digestion methods ($n=3$) $w / (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$

Element	Kelp (海带)			TORT - 2		
	Certified (参考值)	Obturator digestion (密闭容器消解)	Microwave digestion (微波消解)	Certified (参考值)	Obturator digestion (密闭容器消解)	Microwave digestion (微波消解)
Cu	5.01 \pm 0.32	4.93 \pm 0.28	4.99 \pm 0.23	106 \pm 10	98.0 \pm 8.3	110 \pm 11
As	13.9 \pm 2.4	13.4 \pm 2.1	14.1 \pm 2.5	21.6 \pm 1.8	22.3 \pm 2.1	21.5 \pm 1.6
Cd	1.14 \pm 0.11	1.07 \pm 0.08	1.10 \pm 0.1	26.7 \pm 0.6	27.3 \pm 0.8	27.5 \pm 1.0
Hg	2.23 \pm 0.03	2.14 \pm 0.08	2.31 \pm 0.05	0.27 \pm 0.06	0.33 \pm 0.07	0.25 \pm 0.04
Pb	1.41 \pm 0.12	1.48 \pm 0.14	1.39 \pm 0.11	0.35 \pm 0.13	0.31 \pm 0.12	0.39 \pm 0.17

2.2 干扰及消除

本实验中采用仪器自带的 EPA6020 干扰校正方程, 并编写干扰方程 $^{75}\text{As} = ^{75}\text{M} - ^{77}\text{M}(3.127) + ^{82}\text{M}(2.733) - ^{83}\text{M}(2.757)$ 校正 As 的多原子离子干扰。非质谱干扰主要源于样品基体, 基体效应会对待测元素产生抑制作用, 克服基体效应最有效的方法是稀释样品、内标校正、标准加入、基体消除等。本实验通过加入 1 mg/L 的 Ge、Y、In、Bi 溶液作内标在线监测信号变动情况, 可有效克服仪器漂移, 保证测量的准确性。

2.3 线性范围、精密度与方法检出限

测定 0~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液系列, 各元素的分析信号值与浓度均呈良好的线性关系, 相关系数均大于 0.999 0, ICP-MS 具有极宽的线性动态范围 (可高达 9 个数量级), 能保证在有效范围内对样品进行分析。

对浒苔样品平行测定 11 次, 测得各元素的 RSD 为 1.25%~6.81%, 表明方法有较好的测定精度。平行测定 11 次空白溶液, 计算 10 倍的标准偏差, 其对应的浓度值为其检出限, 结果见表 2。

表 2 相关系数、检出限、精密度及回收率

Table 2 Correlation coefficients, detection limits, precision and recoveries

Element	r	Detection limit $/ (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	RSD $s_r / \%$	Original $w_0 / (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	Added $w_A / (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	Found $w_F / (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	Recovery $R / \%$
Cu	0.999 6	0.52	3.87	17.2	1.00	18.1	90
As	0.999 5	1.7	1.25	9.72	1.00	10.74	102
Cd	0.999 3	1.2	6.81	1.03	1.00	1.86	83
Hg	0.999 9	2.3	2.78	0.155	0.100	0.248	93
Pb	0.999 4	0.28	4.25	2.35	1.00	3.43	108

2.4 方法准确性与回收率

在实验优化条件下, 对标准参考海带 (海带 GBW08517) 以及 TORT - 2 进行分析, 结果见表 1, 比较结果表明二者无明显差别, 说明本方法可靠, 可用于浒苔中 Cu、As、Cd、Hg、Pb 等元素的测定。

取浒苔 (栈桥样) 0.20 g, 加入一定量的混合标样, 用 “1.3.1” 微波消解方法处理并测定加标样品, 计算加标回收率 (见表 2)。

回收率实验表明, 上述 5 种元素在 0.155~17.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 范围内加混合标样 1.00 $\mu\text{g}/\text{g}$ 时 (加汞单标 0.10 $\mu\text{g}/\text{g}$), 各元素加标回收率为 83%~108%, 本实验所采用样品消解方法可行。

2.5 样品结果分析

采用微波消解法对 8 个浒苔样品 (分别取自青岛附近各海区) 进行了测定, 结果见表 3。

表 3 浒苔中 5 种有害元素含量 ($n=3$)

Table 3 Contents of five hazardous elements in *Enteromorpha prolifera* ($n=3$)

$w / (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$

Origin of sample (样品来源)	Cu	As	Cd	Hg	Pb
Zhanqiao sea area (栈桥海区)	17.2	9.72	1.03	0.155	2.35
Shilaoren sea area (石老人海区)	15.4	4.64	0.829	0.0894	2.44
Haitaoyuan sea area (海涛园海区)	12.3	5.60	0.895	0.0624	1.90
First bathing area sea area (第一海水浴场海区)	13.3	6.93	0.779	0.110	2.10
Jidishijie sea area (海洋极地世界海区)	17.4	6.54	0.936	0.200	2.59
Maidao open sea (麦岛外海)	11.6	3.50	0.981	0.0516	1.14
Huashilou sea area (花石楼海区)	10.2	3.02	0.942	0.181	1.06
Aofan sea area (奥帆基地海区)	14.2	4.93	0.810	0.104	1.74

有害元素含量是评价某种海洋生物是否可以食用或药用的一个很重要的质量控制指标, 其中对人体危害较大的有害元素主要是 As、Cd、Hg、Pb。从表 3 可以看出, 来自青岛近海的浒苔样品中上述元素含量没有明显的差别。从食用安全考虑, 参考我国《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》对重金属及砷盐的限量指标发现, 除砷、镉外其他元素均符合行业标准。由于近年来的研究发现, 元素的毒性很大程度上取决于其化学形态, 因而判断浒苔的食品安全性不能仅从元素总量层次上分析而应进一步研究其元素形态。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, 本研究选取砷为对象对浒苔中的砷进行形态分析。

2.6 浒苔中砷化学形态分析

砷是一种剧毒元素, 可在体内蓄积, 并引起致癌、致突变和致畸等远期危害^[7], 但砷的毒性很大程度上取决于它的化学存在形态, 不同形态的砷以小鼠的半致死量 LD_{50} 计, 其毒性依次为 $H_3As > As() > As() > MMA$ (一甲基胂酸) $> DMA$ (二甲基胂酸) $> TMAO$ (三甲基胂氧) $>$ 砷糖和 AsC (砷胆碱) $> AsB$ (砷甜菜碱)^[6], 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, 而砷糖类、砷胆碱和砷甜菜碱可以近似认为无毒。为了研究浒苔中的砷形态, 本研究采用水煮提取法对浒苔中的砷化合物进行提取分析。

砷形态的分离参考 Judith 等^[7]的分离方法, 以碳酸铵和水为流动相, 考察了其在不同梯度下对 AsC 、 AsB 、 $As()$ 、 DMA 、 MMA 和 $As()$ 6 种砷标准的洗脱能力, 并改进了分离方法, 用“1.3.4”条件分别对 $10 \mu\text{g/L}$ 上述 6 种砷化学形态的标准溶液进行分析, 确定其不同保留时间; 用纯水配制上述 6 种砷化学形态的混合标样并用 HPLC-ICP-MS 分离测定, 其色谱图如图 1 所示, 在此梯度条件下基本实现了 6 种砷化学形态的分离, 且略优于文献^[7]的分离方法。

为验证方法准确性, 对标准参考物质 TORT-2 进行提取分析, 其色谱图见图 2; 根据“1.3.1”用水煮提取法提取浒苔 (石老人海区样品) 中的砷化学形态, 处理后直接进行 HPLC-ICP-MS 测定, 其色谱

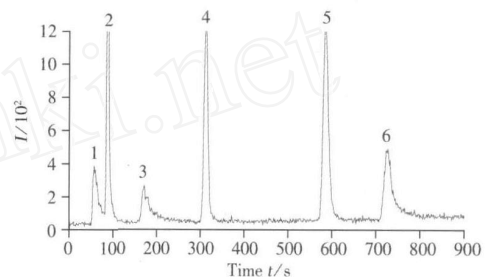


图 1 $10 \mu\text{g/L}$ AsC 、 AsB 、 $As(III)$ 、 DMA 、 MMA 和 $As(V)$ 混合标样的 HPLC-ICP-MS 色谱图

Fig. 1 HPLC-ICP-MS chromatogram of 6 mixed As species standards

1. arsenocholine (AsC);
2. arsenobetaine (AsB);
3. arsenite trioxide ($As(III)$);
4. dimethylarsinic acid (DMA);
5. monomethylarsinic acid (MMA);
6. arsenate oxide ($As(V)$)

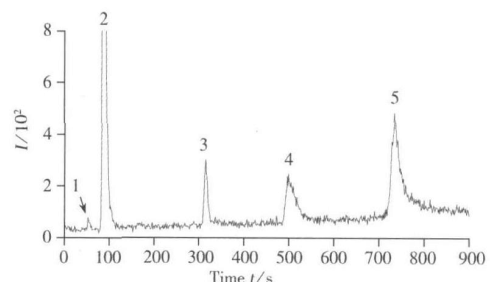


图 2 标准参考物 TORT-2 中各种砷化学形态的色谱图

Fig. 2 HPLC-ICP-MS chromatogram of As species in TORT-2

1. arsenocholine (AsC);
2. arsenobetaine (AsB);
3. dimethylarsinic acid (DMA);
4. $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$;
5. arsenate oxide ($As(V)$)

图见图 3。

由于浒苔样品和标准参考物 TORT - 2 中含有 NaCl, 而 NaCl 中 ^{35}Cl 和仪器所用的高纯氩气易形成 $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ 而干扰 ^{75}As , 因此在样品中砷化学形态分析时, 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 $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ 干扰峰^[8]。

由图 2 可见标准参考物 TORT - 2 中最主要的砷存在形态是 AsB, 其次为 As(V)、DMA 等, 这与文献 [9] 报道的结果一致, 从而证明该方法的准确性。

图 3 显示了青岛石老人海区浒苔样品中的砷形态, 由于浒苔样品与 TORT - 2 不是同一天测定, 因而保留时间稍有差异。通过对比标准物质的保留时间得知, 2、3、4 号色谱峰分别为 As()、DMA 和 As(V), 其中以五价无机砷 As(V) 的含量最高, 以峰面积计约占总砷含量的 45%。此外在谱图上发现了 1 个未知峰 (1 号峰), 其含量约占总砷量的 36%。由于缺少相应的标准, 无法准确判断其化学形态。但考虑到海洋藻类体内往往含有大量的砷糖类物质^[10], 而在浒苔中除此未知峰外未发现砷糖类物质。因而推测该未知峰可能是某种砷糖化合物。后期工作需对这种物质的准确相对分子质量及结构进行表征。

3 结 论

建立了微波消解 - 电感耦合等离子体质谱法同时测定浒苔中铜、砷、镉、铅、汞的方法, 测定了海带标准物质 (GBW 08517)、TORT - 2 标准物质中铜、砷、镉、铅、汞的含量, 测定值均在标准值范围内。采用该方法测定浒苔中铜、砷、镉、铅、汞的含量, 测定精密度为 1.25%~6.81%; 检出限为 0.28~2.3 $\mu\text{g/L}$; 加标回收率均为 82%~103%, 符合痕量分析的要求。本研究采用干扰方程、内标方法校正干扰, 实验证明该方法线性范围宽、精密度高、准确性好, 快速、灵敏, 适用于海产品中铜、砷、镉、铅、汞的测定。此外本研究利用高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱联用技术分析浒苔中的砷形态, 发现浒苔中砷的主要存在形态为有毒的 As(V) 和某种未知的砷化合物, 推测其可能为砷糖类物质。

参考文献:

- [1] 迟玉森. 新型海洋食品 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 121 - 123.
- [2] FLEURENCE J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses[J]. Trends Food Sci Technol, 1999, 10: 25 - 28.
- [3] WONG KH, PETER C K. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part I — proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties[J]. Food Chem, 2000, 71: 475 - 482.
- [4] YANG Chenglong, ZHUANG Zhixia, WANG Xiaoru, et al. Thermo spray nebulizer as sample introduction technique for microwave plasma torch atomic emission spectrometry[J]. Spectrochim Acta Part B, 1998, 53: 1427 - 1435.
- [5] NSKIR L, SZPUNAR J. Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques[J]. Anal Chim Acta, 1999, 400: 321 - 332.
- [6] ZHANG Xinrong, VANDERBIESEN V, CUBBER A D. Accumulation of arsenic species in serum of patients with chronic renal disease[J]. Clin Chem, 1996, 42(8): 1231 - 1237.
- [7] JUDITH A B, CLAYTON B H, JOSEPH A C. A gradient anion exchange chromatographic method for the speciation of arsenic in lobster tissue extracts[J]. Talanta, 2002, 58: 133 - 145.
- [8] SÉBASTIEN N R, VINCENT L, PHILIPPE C, 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.
- [9] WAHLEN R, MCSHEEHY S. 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]. J Anal At Spectrom, 2004, 19: 876 - 882.
- [10] LARSEN E H. Speciation of dimethylarsinyl-ribose derivatives (arsenosugars) in marine reference materials by HPLC - ICP - MS[J]. Fresenius J Anal Chem, 1995, 352: 582 - 588.

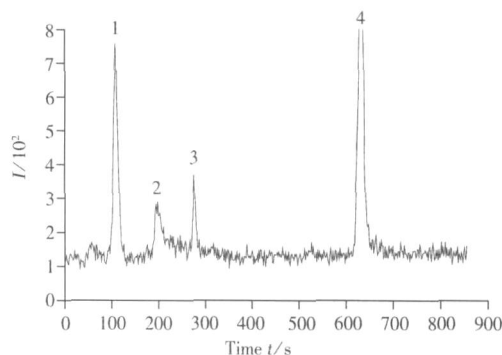


图 3 石老人海区浒苔样品中各形态砷化合物的色谱图

Fig. 3 HPLC - ICP - MS chromatogram of As species compounds in Shilaoen seas sample
1. unknown peak; 2. arsenite trioxide (As()); 3. dimethylarsinic acid (DMA); 4. arsenate oxide (As())