

# 阴/阳离子交换色谱-电感耦合等离子体质谱法分析 鱼和贝类海产品砷的形态

李卫华\* 刘玉海

(江苏技术师范学院化学化工学院,常州 213001)

**摘要** 采用阴(Hamilton PRP-X100 柱)阳(Dionex Ionpac CS-10 柱)离子交换色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术,分别以 pH 10.3 的 20 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和 pH 2.0 的 5 mmol/L 吡啶溶液为流动相,建立了三价砷  $\text{As(III)}$ 、五价砷  $\text{As(V)}$ 、一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)、砷甜菜碱( $\text{AsB}$ )、砷糖( $\text{PO}_4$ , OH,  $\text{SO}_3$ ,  $\text{SO}_4$ ) 砷形态的分析方法。采用微波消解法和超声溶剂提取法对我国不同海域 9 种鱼和贝类海产品进行前处理,对砷含量及其化学形态进行分析。实验表明,鱼和贝海产品主要砷形态为砷甜菜碱  $\text{AsB}$ ,其含量占可提取砷的 42.8% ~ 99.4%,大多数贝类样品含有砷糖  $\text{PO}_4$ 、砷糖 OH,其含量分别占可提取砷的 32.5% ~ 57.1% 和 1.4% ~ 3.3%,少数样品含有 DMA,其含量分别占可提取砷的 5.7% ~ 25.0%,所有样品无机砷的浓度均低于可提取砷的 2.0%。在鱼和贝类海产品中,含砷化合物主要是毒性较低的有机砷,不会对人的健康带来危害。

**关键词** 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱; 砷; 形态分析; 鱼和贝类海产品

## 1 引言

海洋生物中砷化物含量较高,是人体摄入砷的重要来源<sup>[1]</sup>。研究表明,砷的毒性与其存在的形态密切相关。以砷化物的半致死剂量  $\text{LD}_{50}$  计,其毒性依次为  $\text{H}_3\text{As} > \text{As(III)} > \text{As(V)} > \text{一甲基砷酸(MMA)} > \text{二甲基砷酸(DMA)} > \text{三甲基砷氧化物(TMAO)} > \text{砷糖} > \text{砷胆碱(AsC)} > \text{砷甜菜碱(AsB)}$ ,可见无机砷的毒性最大,而有机砷的毒性较小,而  $\text{AsC}$  和  $\text{AsB}$  被认为是无毒的<sup>[2]</sup>。因而传统的元素总浓度的测定已经不能满足评估砷的暴露或摄入对人体健康的影响,砷的毒性研究应该从砷的形态入手,区分海产品无机砷和有机砷化物,特别在砷的循环与转化过程中起重要作用的砷糖<sup>[3]</sup>,以及无毒的砷胆碱和砷甜菜碱对于评价海产品安全性非常重要。

砷的形态分析主要采用液相色谱分离与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)<sup>[2]</sup>、电感耦合等离子体发射光谱(ICP-AES)、原子荧光光谱(AFS)<sup>[4]</sup>、原子吸收光谱(AAS)等联用技术<sup>[5]</sup>。ICP-MS 具有灵敏度高、检出限低等优点,已成为砷形态分析中最具前景的联用方法之一<sup>[6]</sup>。Larsen 等<sup>[7]</sup>采用阴阳离子交换色谱成功分离 8 种不同形态砷的化合物,但不能分离 4 种砷糖;Madsen 等<sup>[8]</sup>采用阴离子交换色谱分离 4 种形态砷的标准化合物和 *Fucus* 抽取物,并采用 LC-ESMS(电喷雾质谱)确定四种砷糖结构,但  $\text{As(III)}$  与一种砷糖保留时间相同。本实验采用阴离子交换色谱(Hamilton PRP-X100 柱)和阳离子交换色谱(Dionex Ionpac CS-10 柱)与 ICP-MS 联用技术,建立了 9 种不同形态砷的化合物的分析方法,对我国不同海域 9 种鱼(黄鱼、带鱼、三文鱼、鳕鱼)和贝(螃蟹、虾、牡蛎、蛏子、蚌)海产品中砷含量及其化学形态进行分析检测。在所有分析样品萃取物中  $\text{AsB}$  为砷的主要形态,无机砷的浓度低于总砷的 2%。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Elan 6000 电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS,美国 PE 公司);Alltech Model 526 泵(Deerfield,IL,美国);Model 9010 金属阀 50  $\mu\text{L}$  进样管(Rheodyne, Cotata, CA, 美国);Ionpac CS10 阳离子交换柱(美国 Dionex 公司);PRP-X100 阴离子交换柱(美国 Hamilton 公司);XYJ80-4 型离心机(上海精密仪器仪表

2011-03-30 收稿;2011-06-18 接受

本文系江苏省省高等学校自然科学基金资助课题(No.07KJD150044)

\* E-Mail: liwh999999@163.com

有限公司) ,MDS-2002A 微波消解仪(上海新仪微波化学科技有限公司)。

吡啶(上海试剂厂);  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (北京试剂厂); 甲醇(天津四有生物试剂厂);  $\text{HNO}_3$ (北京试剂厂);  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  储备液(Sigma, St. Louis, MO, USA), 一甲基砷酸(MMA), 二甲基砷酸(DMA)(Commission of the European Communities, Standard, Measurement and Testing Programme); Kelp 粉末(Brickbeck College, University, UK); 砷糖  $\text{PO}_4$  和砷糖  $\text{OH}$ (作者从天然物质中分离), 鱼和贝样品(超市购买), 所用试剂均为分析纯。水为 18 M $\Omega$  超纯水。不同形态的砷的化学结构见文献[8]。

## 2.2 实验方法

**2.2.1 样品的萃取与硝化** 取适量鱼和贝类肌肉组织用粉碎机粉碎, 称取 5.000 g 于聚四氟乙烯管中, 加入 10 mL 甲醇-水(1:1, V/V), 超声 20 min 后离心 10 min, 吸取萃取液于 50 mL 烧杯中, 重复萃取 4 次, 合并萃取液, 在电热板上 30  $^\circ\text{C}$  蒸干, 以 10 mL 去离子水溶解, 保存在 4  $^\circ\text{C}$  冰箱中, 用于分析砷形态。

称取 1.0000 g 的鱼和贝类海产品肌肉组织于聚四氟乙烯(Teflon)离心管中, 加入 3 mL  $\text{HNO}_3$  和 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 拧松离心管帽于 750 W 微波消解 3~4 min。再重复两次, 每次间隔冷却 10 min, 清澈的样品液以去离子水定容 10 mL, 用于总砷检测<sup>[10]</sup>。

**2.2.2 总砷的测定** 以 9 mL 1%  $\text{HNO}_3$  稀释 1 mL 被硝化的样品, ICP-MS 测定萃取前后鱼和贝类海产品中的总砷,  $^{187}\text{Re}$  为内标, 以砷的标准曲线进行定量。

以标准参考物质 BCR-CRM 627(比利时标准参考物质及计量学会提供)考察方法的准确度, 标准参考值为  $(4.8 \pm 0.3)$  mg/kg As, 方法测定值为  $(5.0 \pm 0.3)$  mg/kg As。在标准参考物质中分别加入 2 ng/L 的 As(III), As(V), MMA 和 DMA, 平行 3 次测得平均回收率分别为 96%, 101%, 95% 和 100%。

**2.2.3 砷的形态分析** 阴、阳离子交换色谱与电感耦合等离子体质谱联用测定鱼和贝类海产品萃取物中不同形态的砷。电感耦合等离子体质谱及阴、阳离子交换色谱的条件见表 1。与标准物保留时间对照对砷的化合物定性。2002 年 Hulle<sup>[11]</sup> 等用 HPLC-ICP-MS 分析 Kelp 粉末萃取物含有 4 种砷糖, 并用电喷雾质谱(Electrospray mass spectrometry)确定 4 种砷糖的结构。本研究以 Kelp 粉末萃取物及标准物质的保留时间对鱼和贝类样品萃取物中的砷的化合物进行定性分析, 以  $\text{As}^{5+}$  的标准曲线对不同形态的砷进行定量分析。

表 1 高效液相色谱(HPLC)-电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)工作条件

Table 1 Operating conditions of ICP-MS and chromatographic systems

电感耦合等离子体质谱 Inductively coupled plasma-mass spectrometry		色谱系统 Chromatographic systems	
射频功率 Radio frequency power	1200 W	阳离子交换色谱预柱 Cation exchange guard column	Dionex Ionpac CS-10, 50 mm $\times$ 4 mm id, 10 $\mu\text{m}$
雾化器 Spray chamber	双通道 Double-pass (Scott type)	阳离子交换色谱分析柱 Cation exchange anal. column	Dionex Ionpac CS-10, 250 mm $\times$ 4 mm id, 10 $\mu\text{m}$
等离子体流 Plasma/coolant	15 L/min	流动相 Mobile phase	5 mmol/L pyridinium, adjusted to pH 2.0 with $\text{HNO}_3$
辅助气流 Auxiliary	0.8 L/min	流速 Flow rate	1.0 mL/min
雾化气流 Nebulizer	0.96 L/min	进样量 Injected volume	20 $\mu\text{L}$
数据获取模式图 Data acquisition modegraphics	信号强度对时间 Signal intensity versus time	阴离子交换色谱预柱 Anion exchange guard column	Hamilton PRP-X100, 25 mm $\times$ 2.3 mm id, 12-20 $\mu\text{m}$
		阴离子交换色谱分析柱 Anion exchange anal. column	Hamilton PRP-X100, 250 mm $\times$ 4.1 mm id, 10 $\mu\text{m}$
		流动相 Mobile phase	20 mmol/L $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 10.3 (Adjusted to pH 10.3 with $\text{NH}_4\text{OH}$ )
		流速 Flow rate	1.0 mL/min
		进样量 Injected volume	50 $\mu\text{L}$

## 3 结果与讨论

### 3.1 总砷的测定

表 2 给出了鱼和贝类不同样品总砷的含量及萃取效率。总砷浓度范围为 0.09 ~ 7.54 mg/kg, 其中浓度最高的是一种产自东海的螃蟹, 浓度最低的是产自渤海的牡蛎。甲醇-水被广泛用于海产品不同形

态砷的萃取<sup>[12]</sup> 然而实验表明,对于鱼和贝类海水动物样品萃取效率普遍不高,是由于样品含有大量的脂肪,脂肪是疏水性化合物所致。

表 2 样品总砷浓度( mg/kg 湿重)

Table 2 Total arsenic concentration in the samples ( mg/kg wet weight)

鱼类 Fish				贝类 Shellfish			
样品 Sample	产地 Origin	总砷含量 Total arsenic	萃取率 Extraction efficiency (%)	样品 Sample	产地 Origin	总砷含量 Total arsenic	萃取率 Extraction efficiency (%)
黄鱼 Yellow croaker	渤海 Bohai sea	2.38 ± 0.08	73	螃蟹 Crab	东海 The East China Sea	7.54 ± 0.06	89
带鱼 Hairtail	黄海 Yellow Sea	0.75 ± 0.03	70	虾 Shrimp	黄海 Yellow Sea	0.45 ± 0.02	88
三文鱼 Salmon	黄海 Yellow Sea	0.26 ± 0.01	69	蛏子 Clam	东海 The East China Sea	2.13 ± 0.07	80
鳕鱼 Hake	东海 The East China Sea	0.83 ± 0.02	76	牡蛎 Oyster	渤海 Bohai Sea	0.09 ± 0.07	78
				蚌 Mussel	东海 The East China Sea	0.57 ± 0.03	84

### 3.2 砷的形态分析

阴/阳离子交换色谱常用于 As(III), As(V), MMA 和 DMA 等砷化物的分离测定。Larsen 等<sup>[7]</sup> 采用阴离子交换色谱成功分离了在水溶液中以阴离子存在 As(III), As(V), MMA, DMA 和以阳离子存在 AsB, AsC, 但不能分离 4 种砷糖。为提高色谱分离的选择性,实现砷糖的分离,本实验选用 Hamilton PRP-X100( 250 mm × 4.1 mm id, 10 μm) 阴离子色谱柱,经过条件优化,选择 20 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>( pH 10.3) 为流动相成功分离 AsB, As(III), MMA 和 As(V) 的标准混合物和 4 种砷糖,结果见图 1 和图 2。

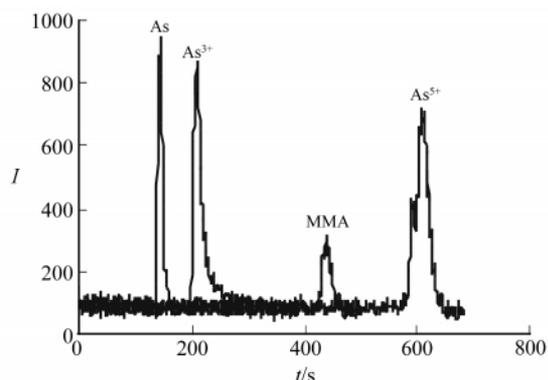


图 1 阴离子交换 HPLC-ICPMS 分离 AsB, As<sup>3+</sup>, MMA, 和 As<sup>5+</sup> 标准物质色谱图; 色谱条件见表 1

Fig. 1 Anion exchange HPLC-ICPMS chromatogram of four different arsenic standards: Arsenobetaine ( AsB ), As<sup>3+</sup>, monomethylarsonate ( MMA ), and As<sup>5+</sup>; Chromatographic conditions see Table 1

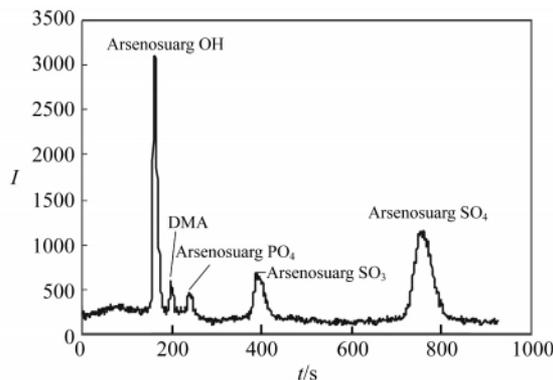


图 2 阴离子交换 HPLC-ICPMS 分离 kelp 粉末和 DMA 萃取物色谱图

Fig. 2 Anion exchange HPLC-ICPMS chromatogram of an extract of kelp powde and dimethylarsonate ( DMA) 色谱条件见表 1( Chromatographic conditions see Table 1) 。

对比色谱图 1 和图 2, AsB 和砷糖 OH 的保留时间均为 170 s, 但无论怎样改善流动相的浓度与酸度, AsB 和砷糖 OH 都不能被分离。选用 Dionex Ionpac CS-10 ( 250 mm × 4 mm id, 10 μm) 阳离子色谱柱, 实验发现 5 mmol/L 吡啶( pH 2.0, 以 HNO<sub>3</sub> 调节) 为流动相能成功分离 4 种砷的化合物砷糖 PO<sub>4</sub>, DMA, AsB 和砷糖 OH, 其保留时间分别为 103, 138, 224 和 474 s, 见色谱图 3。

在 pH 2.0 的酸性流动相系统中, DMA、砷糖 PO<sub>4</sub> 和砷糖 OH 将被质子化, 形成 As<sup>+</sup>-OH 结构<sup>[13]</sup>。同是质子化的阳离子结构, 砷糖 OH 保留时间最长, 而砷糖 PO<sub>4</sub> 保留时间最短。这是因为在砷糖 PO<sub>4</sub> 中的磷酸部分含有一个易解离的氢原子, 随着氢原子的解离, 砷糖 PO<sub>4</sub> 将可能变成阴离子结构, 使得其具有两性离子特征, As<sup>+</sup>-OH 中正电荷发生弱化, 致使砷糖 PO<sub>4</sub> 保留时间最短。

所有被分析样品均检出 AsB, 结果见表 3。AsB 在一种螃蟹中浓度最高( 6.60 mg/kg 湿重), 其次是

黄鱼 (1.73 mg/kg 湿重) ,而在其它样品中的分布相对较为均匀。在鱼类样品(除三文鱼外)中,AsB 的含量高于可提取砷的 96.0%。AsB 是稳定性较好的化合物,其在人体中不能代谢,直接被排除体外,不会危害人体健康<sup>[14]</sup>。而贝类样品则含有多种砷的化合物。在双壳类(牡蛎、蛎子和蚌)样品中,砷糖 PO<sub>4</sub> 含量较高,为可提取砷的 13.8% ~ 57.1%,而 AsB 为可提取砷的 42.8% ~ 82.6%,远低于鱼类样品。砷糖 OH 在所有双壳类样品中被检测,其含量为可提取砷的 1.4% ~ 3.3%。

尽管砷糖没有细胞毒性和诱变性,但当人摄入砷糖含量较高的海产品后,砷糖被代谢为 DMA,而 DMA 的毒性高于砷糖<sup>[15]</sup>。DMA 仅在三文鱼、虾和牡蛎样品中被检出,其含量分别为可提取砷的 25.0%,7.4%和 1.4%。在 1 个蛎子样品中,发现了一个未知砷的化合物(见图 4),其含量为其可提取砷的 6.5%。但在其它样品中均未检出。

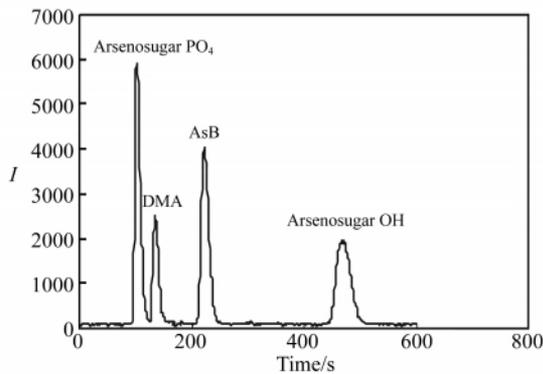


图 3 阳离子交换 HPLC-ICPMS 分离 AsB ,DMA , arsenosugar OH 和 arsenosugar PO<sub>4</sub> 色谱图

Fig. 3 Cation exchange HPLC-ICPMS chromatogram of AsB ,DMA , arsenosugar OH and arsenosugar PO<sub>4</sub> 色谱条件见表 2(Chromatographic conditions see Table 2)。

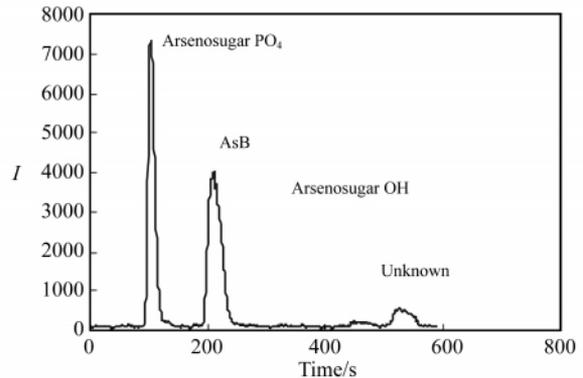


图 4 阳离子交换 HPLC-ICP-MS 分离蛎子抽取物色谱图

Fig. 4 Cation exchange HPLC-ICP-MS chromatograms of an extract of clam 色谱条件见表 2(Conditions see Table 2)。

无机砷在所有样品中被检测(见表 3),但其含量低于可提取砷的 2.0%。

表 3 鱼和贝类海产品萃取物砷的化合物的浓度(As mg/kg 湿重)

Table 3 Concentrations of arsenic compounds in extracts of fish (dry weight [As] mg/kg)

样品 Sample	萃取总砷浓度 Total extractable arsenic	二甲基砷 DMA	AsB Arsenobetaine	砷糖 PO <sub>4</sub> Arsenosugar PO <sub>4</sub>	砷糖 OH Arsenosugar OH	无机砷 Inorganic arsenic
黄鱼 Yellow croaker	1.74 ± 0.07	L. O. D.	1.73 ± 0.07	ND	ND	0.014 ± 0.002
带鱼 Hairtail	0.53 ± 0.03	L. O. D.	0.52 ± 0.03	ND	ND	0.009 ± 0.001
三文鱼 Salmon	0.18 ± 0.01	0.045 ± 0.003	0.13 ± 0.01	ND	ND	0.003 ± 0.001
鳕鱼 Hake	0.63 ± 0.02	L. O. D.	0.62 ± 0.02	ND	ND	0.007 ± 0.001
螃蟹 Crab	6.68 ± 0.05	L. O. D.	6.60 ± 0.05	ND	ND	0.073 ± 0.005
虾 Shrimp	0.39 ± 0.02	0.029 ± 0.003	0.34 ± 0.02	0.02 ± 0.01	ND	0.002 ± 0.001
牡蛎 Oyster	0.07 ± 0.01	0.004 ± 0.1	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.001 ± 0.001	ND
蛎子 Clam	1.70 ± 0.05	L. O. D.	0.79 ± 0.03	0.75 ± 0.03	0.027 ± 0.001	0.014 ± 0.002
蚌 Mussel	0.43 ± 0.03	L. O. D.	0.27 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.014 ± 0.001	0.004 ± 0.001

ND: 未检出(Not detected)。

### 3.3 小结

研究的 9 种鱼和贝类海产品中含砷化合物主要为 AsB,砷糖 PO<sub>4</sub>,砷糖 OH 和 DMA。其中 AsB 为最主要的形态,在鱼类样品(三文鱼除外)中含量高于可提取砷的 96.0%。在双壳贝类样品中 AsB 的含量为可提取砷的 42.8% ~ 82.6%,因为在这类样品中还含有一定量的砷糖。DMA 仅在少数几个样品(三文鱼、虾、蛎子)中被检测,在三文鱼中的含量较高,为总可提取砷的 25.0%,在所有样品中都检测到无机砷,但其含量低于可提取砷的 2.0%。综上所述,鱼和贝类海产品中主要砷的化合物为有机砷,其毒

性很低,因此,食用鱼和贝类海产品是安全的。但是,由于砷糖在人体内的代谢物为DMA,其毒性远大于砷糖,因此评估摄入这类海产品的毒性时必须关注砷化合物形态转变所带来的毒性变化的影响。

## References

- 1 Norwood W P, Borgmann U, Dixon D G. *Environ. Pollut.*, **2007**, 147(1): 262 ~ 272
- 2 GAO Yang, CAO Xuan, YU Jing-Jing, LI Xian-Chun, WANG Xiao-Ru(高阳,曹焯,余晶晶,黎先春,王小如). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) **2009**, 37(12): 1738 ~ 1742
- 3 Yamamoto S, Konishi Y, Shibata M, Matsuda T, Kuroda K, Endo G, Fukushima S. *Organometallic Chemistry*, **1994**, 8(3): 197 ~ 199
- 4 HE Ting-Ting, LI Bai, XU Dian-Dou, YANG Xiao-Zhi, MA Ling-Ling, WANG Hua-Jian, WANG Yan-Fei(贺婷婷,李柏,徐殿斗,杨孝智,马玲玲,王华建,王延飞). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2011**, 39(4): 491 ~ 495
- 5 LÜ Chao, LIU Li-Ping, DONG Hui-Ru, LI Xiao(吕超,刘丽萍,董慧茹,李筱). *Chinese Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), **2010**, 29(5): 465 ~ 468
- 6 Hymer C B, Caruso J A. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1045(1/2): 1 ~ 13
- 7 Larsen E H, Pritzel G, Hansen S H. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1993**, 8(8): 1075 ~ 1084
- 8 Madsen A D, Goessler W, Pedersen S N, Kevin A. *Francesconi. J. Anal.*, **2000**, 15(9): 657 ~ 662
- 9 Wei C, Li W, Zhang C, van Hulle M. *Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 29(8): 5176 ~ 5182
- 10 Feldmann J, John K, Pengpercha P. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **2000**, 368(1): 116 ~ 121
- 11 Van Hulle M, Zhang C, Zhang X R, Cornelis R. *Analyst*, **2002**, 127(5): 634 ~ 640
- 12 Suner M A, Devesa V, Jesus M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50(4): 924 ~ 932
- 13 Hansen S H, Larsen E H, Pritzel G. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1991**, 6(7): 629 ~ 634
- 14 Francesconi K A, Edmonds J S. *Inorg. Chem.*, **1996**, 44(1): 147 ~ 189
- 15 Le X-C, William R, Reimer K J. *Clinical Chemistry*, **1994**, 40(4): 617 ~ 624

## Analysis of Arsenic Speciation in Sea Fish and Shellfish by Anion/Cation Exchange High Performance Chromatography Coupled with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

LI Wei-Hua\*, LIU Yu-Hai

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu Teachers' College of Technology, Changzhou 213001)

**Abstract** The separation of arsenic compounds, including As(III), As(V), monomethylarsonate (MMA), dimethylarsonate (DMA), arsenobetaine (AsB), arsenosugar PO<sub>4</sub>, arsenosugar OH, arsenosugar SO<sub>3</sub> and arsenosugar SO<sub>4</sub> were carried out in Hamilton PRP-X100 anion-exchange column with a mobile phase of 20 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 10.3) and on a Dionex Ionpac CS-10 cation-exchange column with a mobile phase of 5 mmol/L pyridinium (pH 2.0) for their analysis by ICP-MS. Total content of As and its different species of eight types of fish and shellfish in microwave-assisted digestion and ultrasonic solvent extraction were examined. The results showed that main components in all of the extracted fish and shellfish samples were arsenobetaine (42.8% - 99.4%), while arsenosugar PO<sub>4</sub> and arsenosugar OH were detected in most extracted shellfish samples (32.5% - 57.1%, 1.4% - 3.3%), DMA was detected in a few extracted samples (5.7% - 25.0%). In contrast, no inorganic arsenic in fish and shellfish samples occurred at levels below 2.0%.

**Keywords** High performance liquid chromatography-mass spectrometry; Arsenic speciation; Fish and shellfish

(Received 30 March 2011; accepted 18 June 2011)