

体积排阻高效液相色谱—电感耦合等离子 体质谱法测定紫菜中镉(Cd)的形态

赵艳芳^{1,2,3}, 尚德荣^{1,2,3*}, 宁劲松^{1,2,3}, 翟毓秀^{1,2,3}, 盛晓风^{1,2,3}, 张明^{1,2,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 国家水产品质量监督检验中心, 山东 青岛 266071;

3. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 运用体积排阻高效液相色谱—电感耦合等离子体质谱联用技术(SEC-HPLC-ICP-MS)分析了紫菜中Cd的存在形态, 结果发现, 在紫菜水提取液中检测到3种Cd形态, 根据其保留时间确定为植物螯合肽(PC)₃-Cd、谷胱甘肽(GSH)-Cd和1种未知小分子有机态Cd, 结合体外全仿生消化技术, 研究了在唾液、胃、肠无机物和有机物(含消化酶)作用下, 紫菜中Cd的主要存在形态, 分析发现在紫菜胃全仿生提取液中, 检测到2种未知小分子有机态Cd, 其中以保留时间为24.2 min的Cd形态为主要存在形态。在肠全仿生提取液中检测到2种Cd形态, 其中(PC)₃-Cd是主要存在形态。有关(PC)₃-Cd在生物体内的代谢规律还需进一步研究。实验确证了Cd在紫菜中的主要有机形态, 为紫菜食用安全风险评价提供重要依据。

关键词: 镉; 形态分析; 体积排阻高效液相色谱; 电感耦合等离子体质谱; 体外全仿生消化

中图分类号: X 835; S 917.3

文献标志码: A

我国是紫菜生产和出口大国, 主要出口至日本、韩国、欧美、东南亚地区等。但通过近些年来藻类质量安全普查发现, 我国紫菜中重金属镉(Cd)含量较高, 并且普遍高于日本、韩国等。紫菜中的高Cd含量已经成为某些进口国制造技术性贸易壁垒的借口, 严重影响了我国紫菜的对外出口。国内对紫菜及其制品的市场抽查也表明Cd含量超标情况十分严重, 因此亟需开展紫菜中Cd的食用安全研究。目前, 国内外对海藻及其制品中Cd的检测方法主要是将样品经过浓硝酸、高氯酸等强氧化剂消化后, 将所有形态的Cd转化成无机Cd, 得到的测定结果实际上是Cd的总量, 对海藻中Cd的食用安全评价也是以总量作为评价标准。由于Cd以多种形态存在于海藻中, Cd的毒性与其存在形态有关^[1], 若简单地仅采用Cd的总含量、并以其离子态的毒性效应作为评价标准往往会高估其毒害效应^[2]。因此, 研

究紫菜中Cd的存在形态具有重要意义。

赵艳芳等^[3]运用化学试剂逐步提取法分析紫菜中Cd的化学形态发现紫菜中的Cd主要以氯化钠提取态和醋酸提取态存在, 而乙醇提取态(即无机离子态)所占比例小于1%。色谱与原子光谱质谱联用是元素形态分析最主要的技术手段, 体积排阻色谱分离(SEC-HPLC)与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)联用技术同时具有交联葡聚糖(Sephadex G50)分子筛凝胶过滤层析的根据分子量分离化合物的优点和ICP-MS灵敏的多元素同时检测优点, 又因为其流动相一般采用中性的Tris-HCl/NaCl缓冲液, 与生物体本身条件相似, 因此可以较准确的反应蛋白质以及其它疏基化合物在生物体内与元素的结合状况^[4]。Wei等^[5]运用SEC-HPLC-ICP-MS联用分析了长穗偃麦草(*Agropyron elongatum*)中的Cu、Zn和Cd的形态; 杨红霞等^[6]运用SEC-HPLC-ICP-MS联用

收稿日期:2011-09-16 修回日期:2011-11-09

资助项目:中国水产科学研究院基本科研业务费(2010-t9-12);国家自然科学基金项目(30371103)

通讯作者:尚德荣, E-mail: shangdr@ysfri.ac.cn

分析了印度芥菜中 Cd 的形态,证明 Cd 以植物螯合肽(PC)3-Cd、植物螯合肽(PC)2-Cd、谷胱甘肽(GSH)-Cd,及半胱氨酸(Cys)-Cd 4 种形态存在。另外,研究在生物体胃、肠消化液作用下,紫菜中 Cd 的存在形态对评估紫菜中 Cd 的食用安全性具有积极意义。“全仿生消化”法即模拟人体消化环境,加入消化液所含无机物和有机物(包括消化酶),探讨海藻 Cd 在人体消化液作用后的主要存在形态。与动物模型相比,体外全仿生消化技术评价海藻中 Cd 形态变化更可靠、简便、易行。因此,本研究以紫菜为研究对象,运用 SEC-HPLC-ICP-MS 法首次分析紫菜中 Cd 的形态,并结合体外全仿生消化模型研究在生物体胃肠消化液作用下,紫菜中 Cd 的主要存在形态以及不同形态之间的转化规律,以期对紫菜中 Cd 的食用安全评估提供重要参考依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

ICP-MS (DRC II, Perkin-Elmer), 工作参数为射频功率 1 150 W, 等离子体气流速 15 L/min, 辅助气流速 1.2 L/min; 采样时间 1 300 s。

HPLC (Series 200, Perkin-Elmer), 分离条件为 TSK-GEL G3000 分离柱及 TSK-GEL™ PWguard Column 保护柱, 流速: 0.8 mL/min, 进样量 80 μ L, 仪器自动积分, 以峰面积计算含量。根据文献[6]的方法在氮气保护下配制 Cys-Cd 及 GSH-Cd 标准溶液, 用于确定色谱峰保留时间。流动相配制: 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 其中加入 0.1 mol/L NaCl 和 0.03% NaN_3 , 调节 pH = 7.5, 0.45 μ m 滤膜过滤, 超声 40 min 赶净溶解氧。

石墨炉原子吸收 (AA600, Perkin-Elmer); 超纯水系统 (Milli-Q element A10, Millipore); SHY-2A 型水浴恒温振荡器 (江苏金城国胜实验仪器公司); S40-K 型 pH 计 (梅特勒—托利多仪器公司); LNK-872 型多功能快速消化器 (江苏省宜兴市科教仪器研究所)。

1.2 样品处理

紫菜样品 [a. 坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*)] 原产地福建, 紫菜样品 [b. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*)] 原产地山东。将样品用超纯水冲洗 3 遍, 沥干, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重, 粉碎成均匀粉末状备用。称取干制紫菜样品 (a) 和 (b) 各 0.5 g,

加入 40 mL 超纯水在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡 24 h 后, 8 000 r/min 离心 10 min, 倒出上清液, 0.45 μ m 滤膜过滤后上机分析。

1.3 胃和肠全仿生消化液制备

参考文献[7-8]的方法, 制备胃和肠全仿生消化液, 分别加入胃和肠中所含的有机物和无机物, 调 pH 至各消化液对应的 pH, 分别加入相应消化酶, 制备胃和肠全仿生消化液。

1.4 紫菜全仿生提取液制备

称取干制紫菜样品 (a) 和 (b) 各 2.0 g, 加入全仿生唾液 10 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温振荡 5 min 后, 加胃液 150 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温振荡 2 h, 从胃仿生消化食糜中取 100 mL, 以 8 000 r/min 转速于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清用 0.45 μ m 滤膜抽滤, 得胃全仿生提取液; 往余下的胃仿生消化食糜中加十二指肠液 200 mL 和胆汁 80 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温振荡 7 h, 取肠仿生消化食糜 100 mL, 以 8 000 r/min 转速于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清用 0.45 μ m 滤膜抽滤, 得肠全仿生提取液。胃和肠的全仿生提取液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存待用。

1.5 紫菜中总 Cd 含量检测

称取 1.0 g 样品于 100 mL 消化管中, 分别加入 15 mL HNO_3 和 5.5 mL HClO_4 浸泡 12 h, 用多功能快速消化器消化。同时做试剂空白对照, 总 Cd 采用石墨炉原子吸收法测定。

2 结果

2.1 紫菜水提取液中 Cd 形态分析

紫菜样品 (a) 和 (b) 的总 Cd 含量分别为 5.4 mg/kg 和 4.0 mg/kg, 我国标准《绿色食品 藻类及其制品》(NY/T 1709-2009) 规定藻类中 Cd 的限量为 0.5 mg/kg, 《无公害食品 海藻》(NY 5056-2005) 规定海藻及其制品中 Cd 的限量为 1.0 mg/kg, 法国规定的限量为 0.5 mg/kg, 澳大利亚、新西兰、新加坡等国规定的限量为 0.2 mg/kg^[9], 因此, 紫菜中的 Cd 含量远远超出了国内及国外标准限量值。

对 2 个紫菜样品水提取液中 Cd 的形态分析, 在紫菜 (a) 水提取液中检测到 2 个明显的色谱峰, 保留时间为 10.8 和 16.5 min (图 1)。紫菜 (b) 水提取液中检测到 2 个明显的色谱峰, 保留时间为 7.8 和 10.8 min (图 1), 由于目前国内外缺乏有机 Cd 标准品, 只能根据半胱氨酸 (Cys)-

Cd、谷胱甘肽(GSH)-Cd 标准物质保留时间以及文献[6,10]报道的分子量范围初步判断,保留时间为 10.8 min 的峰为谷胱甘肽 GSH-Cd,保留时间为 7.8 min 的有机态 Cd 为植物螯合肽 Phytochelatins(PC)₃-Cd。

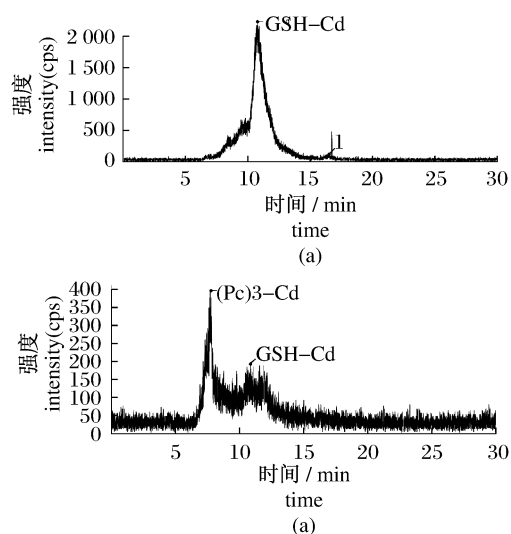


图1 SEC-HPLC-ICP-MS 联用技术分析坛紫菜 (a) 和条斑紫菜 (b) 水提取液中 Cd 形态分离色谱图

Fig.1 Chromatograms of Cd species in *P. haitanensis* (a) and *P. yezoensis* (b) by using SEC-HPLC-ICP-MS

2.2 紫菜胃和肠全仿生提取液中 Cd 的形态

紫菜样品 (a) 和 (b) 胃仿生提取液中 Cd 的存在形态见图 2, 2 个紫菜样品中均检测到 2 个主要

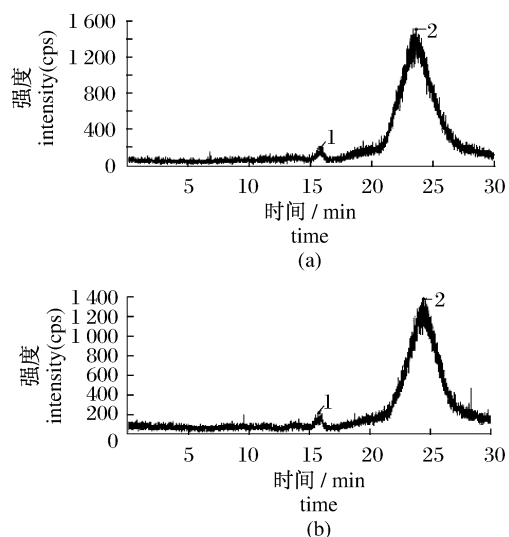


图2 坛紫菜 (a) 和条斑紫菜 (b) 胃仿生提取液中 Cd 形态分离色谱图

Fig.2 Cadmium speciation in whole-bionic digestion of gastric extracts in *P. haitanensis* (a) and *P. yezoensis* (b)

的未知 Cd 形态峰,保留时间分别为 15.8 min (未知峰 1) 和 24.2 min (未知峰 2),其中主要以保留时间为 24.2 min 的小分子有机 Cd 存在。在胃液作用下,紫菜中分离出大量小分子量的有机 Cd,可能是 Cd 与小分子氨基酸、有机酸等的络合态。

肠仿生提取液中检测到 2 个主要的 Cd 形态峰(图 3),保留时间分别为 7.8 min [初步判断为 (PC)₃-Cd] 和 15.8 min (未知峰 1)。

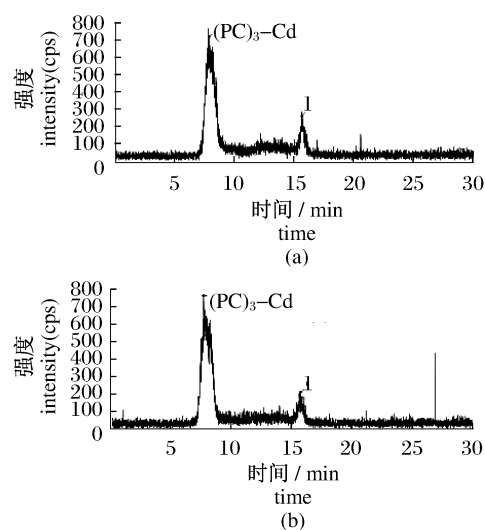


图3 坛紫菜 (a) 和条斑紫菜 (b) 肠仿生提取液中 Cd 形态分离色谱图

Fig.3 Cadmium speciation in whole-bionic digestion of intestinal extracts in *P. haitanensis* (a) and *P. yezoensis* (b)

3 讨论

紫菜由于其细胞壁主要由肽聚糖、磷脂和蛋白质组成,具有粘性,带负电荷,并可提供许多能与离子结合的官能团,因此具有富集金属离子的特性,其中包括许多有毒有害离子如 Cd^[11]。通过分析本实验中紫菜总 Cd 含量,发现紫菜中的 Cd 远远超出国内外标准限量。通过分析紫菜水提取液中 Cd 的形态发现 Cd 以 (PC)₃-Cd 和 GSH-Cd 等有机态形式存在。研究表明,Cd 高积累植物体内能生成一些特定功能的螯合体与有毒元素结合成稳定的化合物而消除这些元素的毒性作用,这些螯合体即为植物螯合肽(PCs)。PCs 是一种富含巯基的寡肽,对 Cd²⁺ 的螯合能力很强,在重金属的累积和解毒过程中发挥重要作用^[5,12-13]。通常认为,PC 对重金属解毒的机理是重金属离子进入植物体后,与细胞内的 PC 结合

形成复合物,然后转运到特定的细胞器(主要为液泡),进行区室化固定,从而使细胞质中有毒金属离子浓度降低到植物能够忍耐的程度^[14-15]。但有研究指出,PC在金属解毒机制中仅有短暂的作用,与超积累植物的高耐受性并不总是相关^[16-18]。GSH是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽,是植物体内一种必需的代谢物和调节物,是合成植物螯合肽的前体,具有非常重要的整合解毒作用。因此,紫菜中的Cd与PC和GSH等螯合体结合,降低了Cd的毒性,增强了对Cd的富集能力。

运用体外全仿生消化模型可以了解紫菜中的Cd在生物体胃肠消化液作用下的主要存在形态,从本实验中可见,2个紫菜样品中胃和肠提取液中的Cd形态相似。胃提取液中的Cd主要以小分子有机态Cd(未知峰2)存在,肠提取液中的Cd主要以(PC)₃-Cd的形态存在,目前,针对植物螯合肽在生物体内的消化代谢规律研究很少,而植物螯合肽是金属硫蛋白(包括金属硫蛋白MT、类金属硫蛋白MT-Like和植物螯合肽PC共3类)中的一类,PC与MT在结构及功能上很相似,因此可以推断,PC具有与MT相似的抗酸、抗碱、抗酶解的特性,在生物体胃肠道内不会被分解为单个氨基酸^[19-20]。另外,通过对哺乳动物灌喂MT,发现MT在哺乳动物各组织器官中的残留量小于8%^[21],因此,可以初步推断,紫菜中的PC-Cd在生物体内的残留量很低。有关PC-Cd以及胃仿生中的大量未知小分子有机Cd在生物体内的代谢排泄规律还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈启发. 镉毒性与水产配合饲料中镉的允许量探讨[J]. 台湾海峡, 2001, 20: 155-158.
- [2] 陶澍, 骆永明, 曹军, 等. 水生与陆生生态系统中微量金属的形态与生物有效性[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 1-141.
- [3] 赵艳芳, 宁劲松, 翟毓秀, 等. 镉在海藻中的化学形态[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 405-409.
- [4] Wei Z G, Wong W C, Zhao H Y, *et al.* Separation and determination of heavy metals associated with low molecular weight chelators in xylem saps of Indian mustard (*Brassica juncea*) by size exclusion chromatography and atomic absorption spectrometry [J]. *Biological Trace Element Research*, 2007, 118: 146-158.
- [5] Wei Z G, Wong J W C, Chen D Y. Speciation of heavy metal binding non-protein thiols (NPTs) in agropyron elongaurm by size-exclusion HPLC-ICP-MS [J]. *Microchem*, 2003, 74: 207-213.
- [6] 杨红霞, 刘葳, 刘冰, 等. 体积排阻高效液相色谱—电感耦合等离子体质谱测定印度芥菜中镉的形态[J]. *分析化学*, 2009, 37(10): 1511-1514.
- [7] Omen A G, Rompelberg C J M, Bruil M A, *et al.* Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 44: 281-287.
- [8] 林路秀, 李顺兴, 郑凤英. 应用体外仿生模型分析海藻水煎液中微量金属的形态和生物可给性[J]. *分析化学*, 2010, 38(6): 823-827.
- [9] Almela C, Clemente M J, Vélez D, Montoro R. Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44: 1901-1908.
- [10] Polec-Pawlaka K, Ruzik R, Abramski K, *et al.* Cadmium speciation in *Arabidopsis thaliana* as a strategy to study metal accumulation system in plants [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 540: 61-70.
- [11] 邱海源, 王宪. 自然水体生物膜及其对常规重金属吸附的基本特性研究[J]. *科学技术与工程*, 2004, 4(11): 916-920.
- [12] Rauser W E. Phytochelatins and related peptides [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109: 1141-1149.
- [13] Rauser W E. The role of thiols in plants under metal stress [M] // Brunold C, Rennenberg H, De Kok L J, Stulen I, *et al.* eds. *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants: Molecular Biochemical, Physiological Aspects* Paul Haupt, Bern, 2000: 169-183.
- [14] Clemens S, Palmgren M G, Karmer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation [J]. *Trends Plant Science*, 2002, 7: 309-315.
- [15] Hall J L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 1-11.
- [16] Leopold I, Gunther D, Schmit J, *et al.* Phytochelatins and heavy metal tolerance [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50: 1323-1328.
- [17] Sanita di Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1999, 41: 105-130.
- [18] Piechalack A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D, <http://www.scxuebao.cn>

- et al.* Accumulation and detoxification of lead ions in legumes[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60: 152 – 153.
- [19] Mehra R K, Bremner I. Development of a radioimmunoassay for rat liver metallothionein- I and its application to the analysis of rat plasma and kidneys [J]. *Biochemical Journal*, 1983, 213: 459 – 465.
- [20] 林忠宁,董胜璋,林育纯,等. 镉金属硫蛋白灌胃小鼠后镉的分布及毒性[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(7): 778 – 779.
- [21] 张彬,肖定福,李丽立,等. 金属硫蛋白在奶牛公犊体内的代谢规律研究[J]. *草业学报*, 2008, 17(6): 78 – 84.

Speciation analysis of cadmium in laver by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

ZHAO Yan-fang^{1,2,3}, SHANG De-rong^{1,2,3*}, NING Jin-song^{1,2,3},
ZHAI Yu-xiu^{1,2,3}, SHENG Xiao-feng^{1,2,3}, ZHANG Ming^{1,2,3}

(1. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;*

2. *The National Center for Quality Supervision and Test of Aquatic Products, Qingdao 266071, China;*

3. *Key Laboratory of Test and Evaluation on Quality and Safety of Aquatic Products, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China)*

Abstract: High content of cadmium in laver has seriously affected the edible safety, export and industry development of seaweed in our country. However, only total cadmium content was detected by present method used worldwide and the total cadmium was used to evaluate the food safety of the laver which may over-estimate the toxicity of the cadmium in laver. Because there are different cadmium forms in laver which have different biological toxicities, the speciation analysis of cadmium in the laver is very urgent. However, studies on the cadmium speciation analysis in seaweed are very scarce at present. In present experiment, we first analyzed the different cadmium forms in laver (*Porphyra haitanensis* and *Porphyra yezoensis*) which have high Cd accumulation capability by using size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC-HPLC-ICP-MS). The result showed that three Cd species including Phytochelatins(PC)₃-Cd, glutathione(GSH)-Cd and one small molecule Cd species were detected in the deionized water extraction of the laver. *In vitro* whole-bionic digestion model was used to determine the main cadmium forms in laver under the action of saliva, the acidity of stomach and intestine with inorganic and organic components and digestion enzymes. Two unknown Cd species with small molecule were detected in whole-bionic digestion of gastric extracts, and the retention time of main species was 24.2min. Two Cd species was detected in whole-bionic digestion of intestine extracts, and the main species was(PC)₃-Cd. However, further study is needed to study the metabolic characteristic of(PC)₃-Cd in the biology. Present study further proved the main organic cadmium species in seaweed and this has provided important basis for food safety evaluation of the laver.

Key words: cadmium; speciation analysis; size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography; inductively coupled plasma mass spectrometry; *in vitro* whole-bionic digestion

Corresponding author: SHANG De-rong. E-mail: shangdr@ysfri. ac. cn