

镉在海藻中的化学形态

赵艳芳^{1,2}, 宁劲松^{1,2}, 翟毓秀^{1,2}, 尚德荣^{1,2*}

(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)

摘要: 利用化学试剂逐步提取法研究了紫菜、海带、裙带菜和羊栖菜中镉的存在化学形态。研究表明: 镉以多种化学形态存在于4种海藻中, 1 mol/L 氯化钠提取态镉和 2% 醋酸提取态的镉所占比例较大, 两者约占总镉含量的 76.3% ~ 92.9%。0.6 mol/L 盐酸提取态、去离子水提取态和 80% 乙醇提取态镉所占比例较小, 其中乙醇提取态(离子态镉)约仅占总镉含量的 0.4% ~ 9.2%, 且对于4种海藻, 紫菜中的离子态镉所占比例最低(均小于1%)。实验进一步证实以海藻中总镉含量作为检测标准不能准确反映海藻及其制品的食用安全性, 因此亟需建立海藻中针对毒性较强的离子态镉的检测标准限量和快速有效的检测方法, 以保障我国海藻产业和出口创汇经济的顺利发展。

关键词: 海藻; 镉; 化学试剂逐步提取; 化学形态

中图分类号: Q 946.91⁺⁴

文献标识码: A

我国是海藻养殖大国, 主要的品种有海带 (*Laminaria japonica*)、紫菜 (*Porphyra haitanensis*)、裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 等。根据 FAO 统计, 2006 年我国海藻产业对全球的贡献率达到 72%, 约 $1\ 090 \times 10^4$ t, 在全球海藻养殖业中, 中国海藻养殖业产值约为 52 亿美元, 居首位^[1]。由于海藻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, 并提供许多能与离子结合的官能团, 因此海藻易从周围环境中富集各种离子, 其中包括许多有毒有害元素, 如砷 (As)、铅 (Pb) 和镉 (Cd) 等^[2-3]。特别是随着近年来环境污染越来越严重, 海藻中有毒有害元素超标现象时有发生, 不仅严重威胁到海藻的食用安全, 也严重影响了我国海藻产业和对外出口经济的发展。

近年来, 通过对我国海藻中有毒有害元素进行的质量安全普查发现, 紫菜中普遍含有较高含量的镉, 并且已经严重影响到我国海藻的对外出口。镉是生物体非必需的有害微量元素之一, 会对人和动物的肾、肺、肝、睾丸、脑、骨骼以及血液

系统产生一系列损伤, 而且还有研究揭示镉具有一定的致癌和致突变性。其在正常环境中含量很低, 但水生生物对镉的富集能力极强, 因此, 镉已成为影响水产品食用安全的重要因素之一。目前, 对水产品中镉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, 将所有形态的镉转化成无机镉, 因此得到的测定结果实际上是镉的总量。然而, 越来越多的环境学和毒理学研究结果证明, 镉的毒性与其存在形态有关^[4], 离子态镉的毒性较高, 结合态和有机态镉无毒或毒性非常微弱^[5-6]。若简单地仅采用镉的总含量、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^[7], 因此, 对海藻中镉的检测不能仅以总量来评价, 研究海藻中镉的化学形态, 并建立各种形态镉的分析技术已迫在眉睫。

针对海藻具有天然累积镉的特性, 本文首次对几种主要养殖海藻, 包括紫菜、海带、裙带菜和羊栖菜 (*Sargasum fusiforme*) 中镉的存在形态进行研究, 以期为提高海藻及其制品的食用安全性评估提供重要依据和参考。

收稿日期: 2010-10-14 修回日期: 2010-12-27

资助项目: 国家自然科学基金(30371103); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2060302)

通讯作者: 尚德荣, Tel: 0532-85826348, E-mail: shangdr@ysfri.ac.cn

1 材料与方法

1.1 样品

紫菜、海带、裙带菜和羊栖菜 4 种海藻,从江苏、浙江、福建、山东等地的养殖企业和市场购得。样品带至实验室 60 °C 烘干至恒重后,粉碎成均匀粉末状。每一样品做 3 次平行。

1.2 海藻体内镉的化学形态分析

采用化学试剂逐步提取法^[8],准确称取干制样品 0.500 0 g,加入 40 mL 提取剂混匀,提取剂及提取顺序分别为 80% 乙醇、去离子水、1 mol/L NaCl、2% 醋酸和 0.6 mol/L 盐酸。在 25 °C 恒温振荡 2 h,回收提取液,以后再重复一次,即在 24 h 内提取 3 次,集 3 次提取液(共 120 mL)于烧杯中。

1.3 样品镉含量测定

将所提取的 5 种提取液于电热板上蒸发近干后,以及残渣部分分别加入 10 mL HNO₃ (优级纯)浸泡 4 h,在约 150 °C 温度下加热消化,待消化稳定、大量 NO₂ 气体冒尽后,加入 2.5 mL 高氯酸(优级纯),在 200 ~ 220 °C 继续消化至产生大量

高氯酸白烟、溶液澄清无色,室温冷却后,用去离子水定容至 100 mL,原子吸收分光光度计(PE AA600)测定镉含量。采用国家标准物质(紫菜中成分分析标准物质 GBW08521 和海带中成分分析标准物质 GBW08517)进行分析质量控制。各提取剂作为空白对照。

分析所用 HNO₃ 和 HClO₄ 均为优级纯,实验所用玻璃器皿均经 10% HNO₃ 浸泡至少 24 h,自来水冲洗干净后,用去离子水冲洗至少 3 遍,晾干后备用。

1.4 数据统计分析

数据采用 Excel 软件进行统计处理,采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析(ANOVA)和 LSD 检验。

2 结果与分析

表 1 表示了 4 种海藻所含各提取态镉所占总镉的百分含量,表中所列各提取态所占百分率均为 3 次平行样的平均值,从表中可以看出本实验采用的连续浸提法能够对样品中各种形态的镉进行较好的回收,回收率总计在 96.1% ~ 103.3% 之间。

表 1 海藻中各种提取态镉所占总镉含量的百分率
Tab. 1 Percent distribution of Cd in different extraction forms in four kinds of seaweed %

序号 no.	80% 乙醇 80% ethanol	去离子水 deionized water	1 mol/L NaCl	2% 醋酸 2% acetic acid	0.6 mol/L HCl	残留态 residue	总计 sum
紫菜 <i>P. haitanensis</i>	1	0.6	5.6	65.9	23.3	1.8	99.5
	2	0.5	9.0	67.7	19.9	0.9	99.9
	3	0.8	8.0	60.7	22.1	1.2	96.1
	4	0.4	5.3	65.4	27.5	1.7	102.0
海带 <i>L. japonica</i>	1	9.2	5.9	54.9	21.9	5.9	98.9
	2	6.5	7.8	65.8	18.7	2.2	101.6
	3	8.6	7.2	60.8	19.2	2.4	99.0
裙带菜 <i>U. pinnatifida</i>	1	7.8	4.3	49.7	28.0	11.0	101.4
	2	5.1	4.0	40.5	35.8	13.9	100.2
	3	7.4	6.1	57.5	19.4	11.3	102.3
羊栖菜 <i>S. fusiforme</i>	1	8.8	4.1	61.1	16.0	9.8	100.2
	2	9.2	3.5	64.4	16.4	9.1	103.3
	3	7.3	2.8	59.8	22.2	7.3	99.9

对于同一种样品,不同提取态的镉形态含量进行统计分析(表 2),从表 2 中可见对于紫菜,氯化钠提取态镉含量最高,醋酸提取态次之,再次为去离子水提取态,且三者之间具有显著性差异($P < 0.05$),最后为残留态、盐酸提取态和乙醇提取态,三者之间无显著性差异;对于海带,氯化钠提取态镉含量最高,且显著性高于醋酸提取态

($P < 0.05$),其次为乙醇提取态、去离子水提取态和盐酸提取态,残留态最少;对于裙带菜,氯化钠提取态镉含量最高,醋酸提取态次之,且两者之间有显著性差异($P < 0.05$),盐酸提取态、乙醇提取态、去离子水提取态和残留态镉的百分含量依次递减,且四者之间无显著性差异;对于羊栖菜,各提取态镉的百分含量规律同裙带菜。综合可见,4

种海藻的氯化钠提取态镉含量均占最高百分含量 (16.0% ~ 35.8%), 两者合计约占总镉含量的 (占 40.5% ~ 67.7%), 醋酸提取态镉次之 (占 76.3% ~ 92.9%)。

表 2 各海藻中提取态镉占总镉含量百分率的差异性分析

Tab.2 The ANOVA analysis of the percent distribution of Cd in different extraction forms for every kind of seaweed

	80% 乙醇 80% ethanol	去离子水 deionized water	1 mol/L NaCl	2% 醋酸 2% acetic acid	0.6 mol/L HCl	残留态 residue
紫菜 <i>P. haitanensis</i>	0.6 ± 0.18 ^a	7.0 ± 1.8 ^b	64.9 ± 2.99 ^c	23.2 ± 3.23 ^d	1.4 ± 0.42 ^a	2.3 ± 0.72 ^a
海带 <i>L. japonica</i>	8.1 ± 1.4 ^b	7.0 ± 0.97 ^{ab}	60.5 ± 5.48 ^d	20.0 ± 1.74 ^c	3.5 ± 2.09 ^{ab}	0.8 ± 0.22 ^a
裙带菜 <i>U. pinnatifida</i>	6.7 ± 1.4 ^a	4.8 ± 1.1 ^a	49.2 ± 8.50 ^c	27.7 ± 8.19 ^b	12.1 ± 1.57 ^a	0.8 ± 0.22 ^a
羊栖菜 <i>S. fusiforme</i>	8.4 ± 1.0 ^{bc}	3.5 ± 0.6 ^{ab}	61.8 ± 2.38 ^c	18.2 ± 3.48 ^d	8.7 ± 1.28 ^c	0.5 ± 0.11 ^a

注:不同字母表示差异性显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Different superscripts mean significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

环境中的重金属等有毒元素被吸收到植物体内以不同的化学结合形态存在于各植物组织内,不同提取剂所提取样品中镉的形态不同,1 mol/L 氯化钠主要提取果胶酸盐、与蛋白质结合态或吸附态的镉等,2% 醋酸主要提取难溶于水的镉磷酸盐,去离子水主要提取水溶性有机酸镉盐,80% 乙醇主要提取硝酸镉、氯化物为主的镉盐,0.6 mol/L 盐酸主要提取草酸镉盐等。由于海藻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,易与金属阳离子结合,另外,当植物受到有毒元素胁迫时,体内会生成植物螯合肽 (phytochelatins, PCs),对镉离子的螯和能力很强,在重金属的累积和解毒过程中发挥重要作用^[9],因此,海藻各提取态镉中,氯化钠提取态镉 (蛋白质结合态或吸附态) 含量最高。另外,因海藻体内含有的大量多磷酸体 (polyphosphate bodies, PPB) 除了能够储存磷以外,还能够结合大量镉离子,从而对重金属起到解毒的作用^[10]。海藻细胞壁也可以提供许多能与离子结合的官能团包括磷酸根等,可以与镉结合形成磷酸盐,使得海藻中镉磷酸盐含量也比较高。因此,本实验海藻各提取镉形态中,氯化钠和醋酸提取态的镉所占比例较大 (两者共占镉总量的 76.3% ~ 92.9%)。镉在海藻中的化学形态与镉在海藻体内的迁移活性大小有联系,其中以乙醇可提取态和水溶态镉迁移活性最强,氯化钠提取态次之,醋酸和盐酸提取态迁移活性最弱^[11]。镉与有机酸、蛋白质结合形成的螯合物、以及形成的镉磷酸盐、草酸盐等难溶于水的化合物可限制金属在体内的移动性,减轻毒害^[12-13]。

目前有关生物体中镉的存在形态研究较少,主要集中在陆地植物中,如采用化学试剂逐步提取法研究了皖景天^[14]、水稻^[11]等植物体中镉的形态,GUNTHER 等^[15]研究尝试采用凝胶渗透色谱 (GPC) 分离分析菠菜和萝卜中镉的大分子组成的种类,杨红霞等^[9]采用体积排阻高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱发现在镉胁迫下,印度芥菜能诱导产生植物螯合肽,在叶片和根部均检测到植物螯合肽 (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,李彬等^[16]采用 SE-HPLC/ICP-MS/ESI-MS 联用技术研究富镉植物 (蕨类植物) 中镉的形态,发现不同形态的镉能不同程度的诱发植物体中 PCs 的合成,而目前有关水产品中镉的形态研究很少。通过我们的连续提取实验发现紫菜、海带、裙带菜和羊栖菜中镉的主要形态均是结合态或难溶于水的形态,而离子态镉含量较低 (0.4% ~ 9.2%), 其中紫菜最低,均 < 1.0%。根据我国标准《绿色食品 藻类及其制品》(NY/T 1709-2009) 规定藻类中镉的限量为 0.5 mg/kg,《无公害食品 海藻》(NY 5056-2005) 规定海藻及其制品中镉的限量为 1.0 mg/kg 以及《食品中污染物限量》(GB 2762-2005) 对食品中镉的限量为 0.05 ~ 1.0 mg/kg。通过海藻质量安全普查发现,4 种藻类样品中均有超标现象,其中紫菜中的镉含量超标较为严重,但是结合本实验结论可见,若以毒性较高的离子态镉为计,所有海藻样品中的镉含量均远远低于标准中限量。本结果也进一步证实以海藻中的总镉含量为检测指标不能如实反映其食用安全性,更不能准确地进行风险评估,应针对各种形态镉制定相应的检测标准限量。因此,研究采用 HPLC-ICP-MS 联用技

术建立海藻中各形态镉的方法以及研究不同形态镉的毒理学将是今后研究的重点,研究结果以期为监控和保障海藻及其制品的质量安全提供理论支持和技术支撑。

参考文献:

- [1] The state of world fisheries and aquaculture [R]. Rome: The United Nations Food and Agriculture Organization of the Ministry of Fisheries and Aquaculture, 2009.
- [2] 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.
- [3] 朱雪强, 韩宝平. 重金属生物吸附研究进展[J]. 中国环保产业, 2004(5): 19-21.
- [4] 廖惠珍, 林浪, 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.
- [5] 林忠宁, 董胜璋, 林育纯, 等. 有机镉染毒对小鼠免疫球蛋白及其亚类水平的影响[J]. 卫生研究, 2002, 31(6): 408-409.
- [6] 林建云, 陈维芬, 陈涵贞, 等. 水产饲料中镉的存在形态及其在养殖动物体内累积状况的研究[J]. 台湾海峡, 2008, 27(4): 491-498.
- [7] 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.
- [8] PERRONNET K, SCHWARTZ C, MOREL J L. Distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown on multicontaminated soil [J]. Plant Soil, 2003, 249(1): 19-25.
- [9] 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.
- [10] WALSH R S, HUNTER K A. Influence of phosphorus storage on the uptake of cadmium by the marine alga *Macrocystis pyrifera* [J]. Limnol Oceanology, 1992, 37(7): 1361-1369.
- [11] 于辉, 杨中艺, 杨知建, 等. 不同类型镉积累水稻细胞镉化学形态及亚细胞和分子分布[J]. 应用生态学报, 2008, 19(10): 2221-2226.
- [12] BOOMINATHAN R, DORAN P M. Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species [J]. J Biotechnol, 2003, 101: 131-146.
- [13] 于方明, 汤叶涛, 周小勇, 等. 镉在圆锥南芥 (*Arabis paniculata* Franch.) 中的亚细胞分布及其化学形态[J]. 中山大学学报, 2007, 46(6): 88-92.
- [14] 周守标, 徐礼生, 吴龙华, 等. 镉和锌在皖景天细胞内的分布及化学形态[J]. 应用生态学报, 2008, 19(11): 2515-2520.
- [15] GUNTHER K, JI G, KASTENHOLZ B. Characterization of high molecular weight cadmium species in contaminated vegetable food [J]. J Anal Chem, 2000, 368: 281-287.
- [16] 李彬, 刘丽, 王秋泉, 等. SE-HPLC/ICP-MS/ESI-MS 联用技术用于富镉植物中镉得形态研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(4): 1096-1100.

Speciation analysis of cadmium in seaweed

ZHAO Yan-fang^{1,2}, NING Jin-song^{1,2}, ZHAI Yu-xiu^{1,2}, SHANG De-rong^{1,2*}

(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)

Abstract: The speciation analysis of cadmium in seaweed (including *Porphyra haitanensis*, *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida* and *Sargassum fusiforme*) was firstly conducted using sequential chemical extraction considering that high content of cadmium in some seaweed had seriously affected the edible safety, export and industry development of seaweed in our country. The results showed that many forms of cadmium were in the four kinds of seaweed, and the greatest amount of cadmium was in the extraction of 1 mol/L NaCl, followed by 2% HAC and both forms accounted for 76.3% – 92.9% of the total cadmium. The cadmium content in the extraction of 0.6 mol/L HCl, deionized water and 80% ethanol was much smaller. 80% ethanol could extract the ionized cadmium (Cd^{2+}) which only accounted for 0.4% – 9.2% of the total cadmium, and especially for laver, ionized cadmium was all below 1%. Present experiment further proved that using total cadmium content as the detection standard could not accurately reflect the edible safety of the seaweed, so a more accurate limit standard and a quick detection method of the ionized cadmium for seaweed should be urgently researched and established in order to guarantee the fast development of the industry and export economy of the seaweed in China.

Key words: seaweed; cadmium; sequential chemical extraction; speciation analysis

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