

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定海洋贝类中的无机镉离子

姜 芳¹, 崔艳梅¹, 刘 鸽², 刘 欢², 韩典峰¹, 徐英江¹, 宫向红¹, 田秀慧^{1*}

(1. 山东省海洋资源与环境研究院, 烟台 264006; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 200120)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)检测海洋贝类中无机镉离子的分析方法。**方法** 取一定量样品加入 10 mmol/L Tris-HCl(其中加入 0.1 mol/L NaCl 溶液)提取液, 超声萃取 2 h, 离心过滤后至进样瓶中上机测定。流动相为 30 mmol/L 草酸水溶液和 55 mmol/L 氢氧化钾水溶液, 经 CS5A 阳离子交换色谱柱及 CG5A 保护柱对镉离子进行分离, 电感耦合等离子体质谱仪测定。**结果** 该方法线性关系良好, 相关系数 $r=0.998$, 且回收率在 86.4%~106%之间, 精密度的 2.95%~5.37%, 方法检出限为 0.002 mg/kg, 定量限为 0.006 mg/kg。**结论** 该方法准确灵敏, 适合测定海洋贝类中无机镉离子。

关键词: 无机镉离子; 高效液相色谱法; 电感耦合等离子体质谱法; 海洋贝类

Determination of inorganic cadmium ion in marine shellfish by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

JIANG Fang¹, CUI Yan-Mei¹, LIU Ge², LIU Huan², HAN Dian-Feng¹, XU Ying-Jiang¹,
GONG Xiang-Hong¹, TIAN Xiu-Hui^{1*}

(1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China;
2. Department of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200120, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of inorganic cadmium ions in marine shellfish by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). **Methods** A certain amount of samples were added to the extract of 10 mmol/L Tris-HCl (0.1 mol/L NaCl solution was added), ultrasonic extraction for 2 h, centrifuged and filtered, and then tested on the machine in the sample bottle. The mobile phase was 30 mmol/L oxalic acid aqueous solution and 55 mmol/L potassium hydroxide aqueous solution. Cadmium ions were separated by CS5A cationic exchange chromatography column and CG5A protective column, and determined by inductively coupled plasma mass spectrometer. **Results** The method had a good linear

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600702)、山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-26-05, SDAIT-14-08)、山东省农业重大应用技术创新项目(SF1805301301)、烟台市科技计划项目(2018ZHGY063)

Fund: Supported by National Key R&D Program of China (2017YFC1600702), the Modern Agro-industry Technology Research System in Shandong Province (SDAIT-26-05 and SDAIT-14-08), Agricultural Major Applied Technology Innovation Project in Shandong Province (SF1805301301), and Science and Technology Plan Project of Yantai City (2018ZHGY063)

***通讯作者:** 田秀慧, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。E-mail: tianxiuhui127@163.com

***Corresponding author:** TIAN Xiu-Hui, Associate Professor, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China. E-mail: tianxiuhui127@163.com

relationship, $r=0.998$, recovery rate between 86.4% and 106%, precision between 2.95% and 5.37%, detection limit of the method was 0.002 mg/kg, and quantitative limit was 0.006 mg/kg. **Conclusion** This method is accurate and sensitive, suitable for the determination of inorganic cadmium ions in marine shellfish.

KEY WORDS: inorganic cadmium ion; high performance liquid chromatography; inductively coupled plasma mass spectrometry; marine shellfish

1 引言

镉广泛存在于自然界中, 是人体不需要的化学元素之一, 但在工农业生产和军事领域等方面具有重要的用途。随着镉资源的不断开发和利用, 导致其对诸如大气、水体及土壤等环境造成了严重污染, 生物体对环境中的镉有富集和放大的作用^[1,2]。早在 1972 年, 联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)联合专家委员会在关于食品污染的毒性报告中指出: 镉毒性仅次于黄曲霉毒素和砷^[3]。现在人们逐步意识到镉元素对动植物尤其是人类的危害。镉在人体内逐渐蓄积, 会导致成骨细胞和破骨细胞的损伤, 引发软骨病、骨质疏松及骨折等骨骼疾病^[4-6], 还会影响肾脏功能^[7], 甚至导致其他恶性疾病^[8,9]。我国是世界上最大的贝类主产国, 产量位居世界第一。海洋贝类高蛋白、低脂肪, 富含矿物质和微量元素, 因其较高的营养价值被人们所喜爱。海洋贝类对镉有较强的富集能力^[10-12], 因此易通过食物链的传递作用在人体内累积, 危害人类健康。

镉进入生物体后的存在形式有 2 种, 一部分与蛋白等结合变成有机结合态, 一部分是游离的无机离子态。不同形态的镉的毒性不同, 无机镉离子的毒性比较大, 它通过干扰机体的正常结合代谢而产生细胞毒性, 可能使中毒患者出现神经、免疫和生殖系统损伤及肿瘤发生^[13,14]。因此检测海洋贝类中无机镉的含量更能有效地评估镉的毒性。现行的食品标准均测定总镉的含量, 未涉及镉形态的检测。赵艳芳等^[15,16]建立了水产品中有机镉和无机镉离子的分析方法, 并分析了我国主要海产贝类中有机镉的组成及离子态镉的含量, 但是选用的流动相不适合本实验室所用的仪器。本研究对上述方法进行了改进, 优化了流动相组成及浓度, 并选取黄渤海海域金城湾代表性的海洋贝类, 进行回收率及精密度的测定, 以验证本方法可以达到测定海洋贝类中无机镉离子的目的, 以期对其他海洋生物中无机镉离子的测定提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

UltiMate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo Scientific 公司); ICAP RQ 电感耦合等离子体质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司); SB-25-12DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 3K15 冷冻离心机(德国 Sigma

公司); IQ700 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

硝酸、盐酸、氯化钠、二水合草酸(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氢氧化钾(优级纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); Tris(优级纯, BBI 生命科学有限公司); 镉单元素标准溶液(国家标准样品, GSB 04-1721-2004, 1000 $\mu\text{g/mL}$); 本实验所用水均为 Mill-Q 超纯水(18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

(1) 无机镉样品前处理

太平洋牡蛎、栉孔扇贝等海洋贝类均购于本地的农贸市场。洗净外壳, 剖开取其肌肉, 用匀浆机匀浆待用。取约 1.0 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 的提取液(体积比 1:20), 混匀后, 超声萃取 2 h, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后, 至进样瓶中上机测定。

(2) 总镉样品前处理

称取海洋贝类样品约 0.5 g, 加入 10 mL 硝酸, 加盖放置 1 h, 微波消解仪消解后赶酸, 再用超纯水定容至 25 mL, 电感耦合等离子体质谱法测定样品中的总镉含量。

2.2.2 样品测定

(1) 色谱条件

色谱柱: CS5A 阳离子交换色谱柱, CG5A 保护柱, 进样量 100 μL , 流动相组成: 30 mmol/L 草酸水溶液, 55 mmol/L 氢氧化钾水溶液, 使用前经 0.45 μm 滤膜过滤并超声脱气 30 min, 流速 1 mL/min, 运行时间 14 min。

(2) 质谱条件

电感耦合等离子体质谱仪操作条件: 射频功率, 1550 W; 冷却气流速, 14 L/min; 辅助气流速, 0.8 L/min; 碰撞气流速 3.950 mL/min; 雾化气流速, 1.0250 L/min; 采样深度 5 mm; 采样时间 800 s。

2.2.3 标准曲线的绘制

将镉离子标准溶液逐级稀释成 1.0、5.0、10.0、20.0 和 50.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液, 以标准溶液色谱的脉冲强度积分为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线。

2.2.4 回收率及精密度

在栉孔扇贝样品中分别添加不同浓度的镉离子标准溶液, 每个浓度的实验重复 5 次, 计算回收率和精密度。

3 结果与分析

3.1 标准曲线

色谱图见图 1。由图 1 可见, 镉离子的保留时间在 510 s, 代表性线性方程 $Y=17800.7X-3965.2$ (Y 代表脉冲强度积分, X 代表浓度, $\mu\text{g/L}$), 相关系数 r 为 0.998。

3.2 样品处理优化

为了把海洋贝类中的镉离子尽量完全提取出来, 本研究分别试验不同提取液(水、Tris-HCl+NaCl)、提取方式(超声、水浴 80 °C)以及提取时间(40 min、2 h)等条件对无机镉离子提取效果的影响。

取太平洋牡蛎样品, 洗净外壳, 解剖去除内脏^[17], 将其肌肉均质混匀, 按上述不同的提取条件分为 8 组, 每组 3 次平行, 经前处理后上机比较样品中无机镉的含量。各组的条件及结果见表 1。

由表 1 可见, 提取液选用 Tris-HCl+NaCl、超声萃取时, 提取效率均高于其他各组, 说明在此条件下, 太平洋牡蛎中镉离子的提取效果更充分。同时结果表明: 当提取时间为 40 min 时, 未能将镉离子充分提取, 因此选择提取时间为 2 h。同时对栉孔扇贝、海湾扇贝及贻贝等 10 份海洋贝类样品中的无机镉进行测定, 结果表明选用 Tris-HCl+NaCl 作为提取液, 超声萃取时间为 2 h 时, 均能获得最高的提取效率。

综上所述最终确定的样品处理方案: 取约 1.0 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 的 10 mmol/L Tris-HCl(其中加入 0.1 mol/L NaCl 溶液), 混匀后, 超声萃取 2 h, 然后 4 °C 条件下 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液经过 0.45 μm 的滤膜过滤, 放到进样瓶中上机测定。此份太平洋牡蛎样品(去内脏)的总镉含量为 1.13 mg/kg, 无机镉含量占 32.6%。

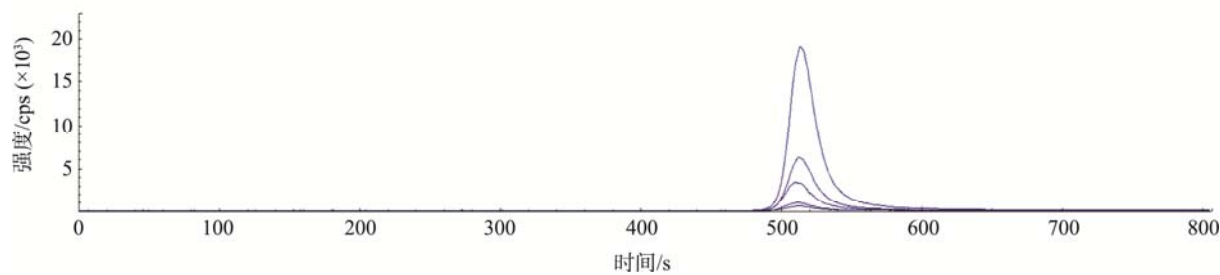


图 1 镉离子系列标准溶液色谱图
Fig.1 Chromatogram of cadmium ion of standard solutions

3.3 流动相的选择

根据赵艳芳等^[15]研究, 当选用 50 mmol/L 草酸和 95 mmol/L 氢氧化锂作为流动相, 镉离子分离效果良好, 且无杂峰干扰, 能满足贝类样品中镉离子的分离要求。鉴于本实验室的仪器条件, 电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)各个工作模块耐盐性都比较低, 若采用上述流动相条件, 易堵塞同心圆雾化器, 使其稳定性和灵敏度降低, 同时易造成样品锥截取锥的损耗, 所以本研究降低了流动相的浓度, 采用 30 mmol/L 草酸水溶液。其次, 鉴于锂元素会干扰 ICP-MS 的调谐结果。若使用文献中的流动相条件, 锂元素易在仪器中大量累积, 使调谐值达到几百万, 且难冲洗干净。所以本研究采用草酸和氢氧化钾作为流动相, 能较好地分离无机镉离子, 且可避免上述两种情况的发生。

选用 20 $\mu\text{g/L}$ 镉离子标准溶液进行流动相的优化, 尝试了 5 种流动相浓度配比(30 mmol/L 草酸水溶液+30、45、55、65、80 mmol/L 氢氧化钾水溶液), 发现 30 mmol/L 草

酸水溶液和 55 mmol/L 氢氧化钾水溶液作为流动相时, 镉离子分离情况良好, 峰高及峰型等最为理想。20 $\mu\text{g/L}$ 的镉离子标准溶液在此条件下的色谱图见图 2。使用其他的流动相组成, 峰高峰型都较差, 甚至没有峰出现。

表 1 各组不同提取方式及上机结果(mg/kg)
Table 1 Different extraction methods and computer results in each group (mg/kg)

	水		Tris-HCl+NaCl	
	40 min	2 h	40 min	2 h
超声	0.260	0.276	0.334	0.376
	0.251	0.263	0.349	0.362
	0.253	0.274	0.346	0.371
	0.197	0.195	0.308	0.329
水浴 80 °C	0.186	0.203	0.315	0.336
	0.189	0.197	0.316	0.334

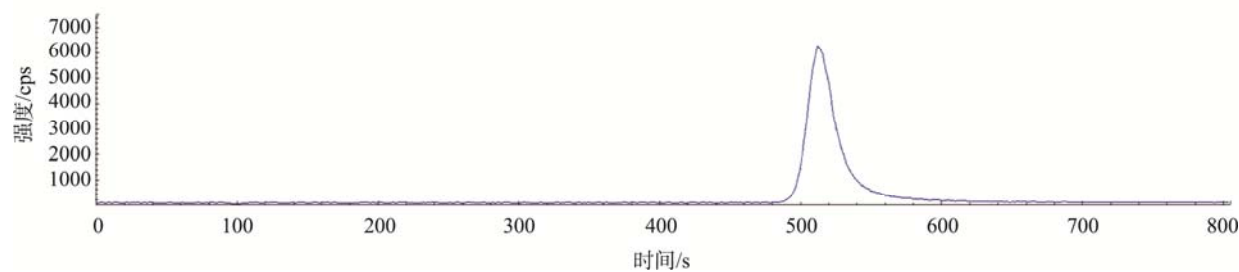


图 2 20.0 µg/L 镉离子标准溶液色谱图
Fig.2 Chromatogram of 20.0 µg/L cadmium ion standard solution

3.4 方法检出限和定量限

以 3 倍基线噪声确定无机镉离子的检出限($S/N=3$), 方法检出限为 0.002 mg/kg, 方法定量限($S/N=10$)为 0.006 mg/kg。

3.5 方法回收率和精密度

以栉孔扇贝为实验对象, 进行加标回收的测定, 以验证方法的准确性及精密度, 结果见表 2。栉孔扇贝中的无机镉的加标回收率为 86.4%~106%, 精密度为 2.95%~5.37%, 表明该方法准确度高精密度好, 适用于海洋贝类中的无机镉离子的测定。

4 结 论

本研究通过对样品处理过程及流动相进行优化, 建立了高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法测定海洋贝类中无机镉离子的方法。该方法检出限为 0.002 mg/kg, 在 0.50 mg/kg 和 1.00 mg/kg 2 个浓度水平下, 加标回收率为 86.4%~106%。该方法灵敏度高、精密度好, 适用于海洋贝类中无机镉离子的定量分析。鉴于元素镉的毒性与形态有关, 总镉检测不宜准确评估食品的安全性, 所以建议制定无机镉离子检测的相关标准。

表 2 栉孔扇贝中镉离子的加标回收率及精密度
Table 2 Recoveries and relative standard deviation of cadmium ion in *Chlamys farreri*

样品	镉离子本底值/(mg/kg)	添加量/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	回收率/%	精密度/%(n=5)
栉孔扇贝 1	0.695	0.50	1.127	86.4	2.95
		1.00	1.632	93.7	3.71
栉孔扇贝 2	0.825	0.50	1.359	106	5.37
		1.00	1.739	91.4	3.32

参考文献

[1] 刘伟成, 李祥云. 镉毒性毒理学研究进展[J]. 广东微量元素科学, 2005, 12(12): 1-5.
Liu WC, Li MY. Research advance of toxicological effects and toxigenicity mechanism of cadmium [J]. Guangdong Trace Elements Sci, 2005, 12(12): 1-5.
[2] 吴嘉文, 漆亚乔, 苏燕瑜. 食品中重金属镉的污染现状及其检测方法研究[J]. 广东化工, 2019, 46(15): 99.
Wu JW, Qi YQ, Su YY. Research progress in pollution status of heavy metal cadmium and its detection methods in foods [J]. Guangdong Chem Ind, 2019, 46(15): 99.
[3] 刘天红, 孙福新, 王颖, 等. 无机镉对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)急性毒性研究及其安全评价[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 161-165.
Liu TH, Sun FX, Wang Y, et al. The study on acute toxicity test on inorganic-cadmium to *Chlamys farreri* and its safety estimation [J]. Food Res Dev, 2010, 31(4): 161-165.
[4] 王雨昕, 李筱薇, 赖建强. 镉暴露对人体骨骼影响的研究进展[J]. 食

品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 2230-2234.
Wang YX, Li XW, Lai JQ. Research progress on effect of cadmium exposure on human skeleton [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(6): 2230-2234.
[5] Tomaszewska E, Dobrowolski P, Winiarska-Mieczan A, et al. The effect of tannic acid on the bone tissue of adult male Wistar rats exposed to cadmium and lead [J]. Exp Toxicol Pathol, 2017, 69(3): 131-141.
[6] Yoshiki S, Yanagisawa T, Kimura M, et al. Bone and kidney lesions in experimental cadmium intoxication [J]. Arch Environ Health, 1975, 30(11): 559-562.
[7] Akerstrom M, Barregard L, Lundh T, et al. The relationship between cadmium in kidney and cadmium in urine and blood in an environmentally exposed population [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 268(3): 286-293.
[8] Buha A, Matovic V, Andjelkovic M, et al. Exposure to cadmium is a risk factor for pancreatic cancer development: Three lines of evidence [J]. Pancreatolgy, 2018, 18(4): S7-S8.
[9] Soisungwan S, Vesey DA, Gobe GC. Kidney cadmium toxicity, diabetes and high blood pressure: The perfect storm [J]. The Tohoku J Exp Med, 2017, 241(1): 65-87.

- [10] 李玉环. 贝类体内重金属镉的富集和消除规律及食用安全性的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.
- Li YH. The study of accumulation and elimination of the heavy metal cadmium in shellfish and the edible safety of shellfish [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2005.
- [11] Dhinamala K, Pushpalatha M, Meeran M, *et al.* Bioaccumulation of cadmium in gills and muscles of shellfish from Pulicat lake, Tamil Nadu, India [J]. *J Coastal Life Med*, 2017, 5(2): 47–50.
- [12] Zang Y, Bolger PM. Toxic metals: Cadmium [J]. *Encyclopedia Food Saf*, 2014: 346–348.
- [13] 曾晨, 郭少娟, 杨立新. 汞、镉、铅、砷单一和混合暴露的毒性效应及机理研究进展[J]. *环境工程技术学报*, 2018, 8(3): 221–230.
- Ceng C, Guo SJ, Yang LX. Toxic effects and mechanisms of exposure to single and mixture of mercury, cadmium, lead and arsenic [J]. *J Environ Eng Technol*, 2018, 8(3): 221–230.
- [14] 方玲, 马海霞, 李来好, 等. 贝类中重金属镉的研究进展[J]. *核农学报*, 2019, 33(7): 150–156.
- Fang L, Ma HX, Li LH, *et al.* Research progress of cadmium in shellfish [J]. *J Nuclear Agric Sci*, 2019, 33(7): 150–156.
- [15] 赵艳芳, 宁劲松, 尚德荣, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定海水贝类中无机离子镉[J]. *分析化学研究简报*, 2016, 44(8): 1277–1280.
- Zhao YF, Ning JS, Shang DR, *et al.* Determination of free inorganic cadmium ions in marine bivalves by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2016, 44(8): 1277–1280.
- [16] 赵艳芳, 尚德荣, 宁劲松, 等. 体积排阻高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定海产贝类中镉的形态[J]. *分析化学研究简报*, 2012, 40(5): 681–686.
- Zhao YF, Shang DR, Ning JS, *et al.* Speciation analysis of cadmium in marine bivalves by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass Spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40(5): 681–686.
- [17] GB 2762–2017 食品安全国家标准 食品中污染物限量[S].
- GB 2762–2017 National food safety standard–Quantity of pollutants in food [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



姜 芳, 工程师, 主要研究方向为水产品质量安全。
E-mail: myjfang@163.com



田秀慧, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。
E-mail: tianxiuhui127@163.com