

# 序贯提取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定栉孔扇贝裙边中砷组分

陈 鹏, 徐 菲, 徐 莹\*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266000)

**摘要: 目的** 建立序贯提取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(hight performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)测定栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)裙边中砷组分。**方法** 以超纯水、甲醇及二氯甲烷-甲醇溶液为提取液, 采用序贯涡旋提取法, 提取扇贝裙边中砷, 并划分为水提取砷、非水提取砷及未提取砷3种组分。采用HPLC-ICP-MS砷形态检测法定性定量分析6类水提取已知砷: 砷酸、亚砷酸、一甲基胂、二甲基胂、砷甜菜碱、砷胆碱, 采用ICP-MS总砷检测法定量分析总砷、水提取未知砷、非水提取砷及未提取砷。**结果** 市售栉孔扇贝裙边中总砷含量高, 水提取已知砷、水提取未知砷、非水提取砷及未提取砷分别占24.5%、26.8%、25.4%及23.3%, 无机砷含量符合国家限量要求。优化条件下, 6种砷形态在0~100 μg/kg范围内线性关系良好, 检出限为0.014~2.366 μg/kg, 定量限为0.050~3.090 μg/kg, 加标回收率在78.1%~116.2%之间, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)在1.1%~10.1%之间。**结论** 本研究建立的砷组分分析方法精密度高、灵敏度高、砷提取效率高, 适用于扇贝裙边中砷组分的分析, 可为扇贝裙边的安全性评价提供理论依据。

**关键词:** 栉孔扇贝; 砷形态; 扇贝裙边; 序贯提取; 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法

## Determination of arsenic components in the skirt of *Chlamys farreri* by sequential extraction-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

CHEN Peng, XU Fei, XU Ying\*

(Food Science and Engineering College, Ocean University of China, Qingdao 266000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of arsenic components in the skirt of *Chlamys farreri* by sequential extraction-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). **Methods** Using ultrapure water, methanol and dichloromethane-methanol solution as extraction solutions, the arsenic in scallop skirts was extracted by sequential vortex extraction and was divided into 3 groups: Water-extracted arsenic, non-water-extracted arsenic and unextracted arsenic. The HPLC-ICP-MS arsenic speciation detection method was used to qualitatively and quantitatively analyze the 6 kinds of water-extracted known arsenic: Arsenate, arsenite, monomethylarsonate, dimethylarsonate, arsenobetaine, arsenocholine, total

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600702)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600702)

\*通信作者: 徐莹, 博士, 教授, 主要研究方向为食品有害成分控制。E-mail: xuy@ouc.edu.cn

\*Corresponding author: XU Ying, Ph.D, Professor, Food Science and Engineering College, Ocean University of China, Qingdao 266000, China.  
E-mail: xuy@ouc.edu.cn

arsenic, water-extracted unknown arsenic, non-water-extracted arsenic and unextracted arsenic were quantitatively analyzed by ICP-MS total arsenic detection method. **Results** The total arsenic content in the skirt of commercially available scallops was high, water-extracted known arsenic, water-extracted unknown arsenic, non-water extracted arsenic and unextracted arsenic accounted for 24.5%, 26.8%, 25.4% and 23.3%, respectively, and the content of inorganic arsenic met the national limit requirements. Under the optimized conditions, the 6 kinds of arsenic species had good linear relationships in the range of 0–100 μg/kg, the limits of detection were between 0.014–2.366 μg/kg, the limits of quantification were between 0.050–3.090 μg/kg, the recoveries were between 78.1%–116.2%, and the relative standard deviations (RSDs) were between 1.1%–10.1%. **Conclusion** The arsenic composition analysis method established in this study has high precision, high sensitivity and high arsenic extraction efficiency, which is suitable for the analysis of arsenic components in scallop skirts and can provide a theoretical basis for the safety evaluation of scallop skirts.

**KEY WORDS:** *Chlamys farreri*; arsenic species; scallop skirts; sequential extraction; high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

## 0 引言

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国重要的养殖海产品,味道鲜美、经济价值高,深受人们的喜欢<sup>[1]</sup>。食品工业中扇贝的主要加工对象是肌肉柱,而副产物扇贝裙边(除肌肉柱外软组织)通常被废弃<sup>[2]</sup>。扇贝裙边含有丰富的蛋白质、多糖、脂类等营养成分和活性物质,但砷、铅、镉等污染物含量较高<sup>[3–5]</sup>,阻碍了其高值化利用<sup>[6]</sup>。

砷是非金属微量元素,广泛分布在陆地和海洋环境中。目前已发现的砷形态有300余种<sup>[7]</sup>,研究较多的是水溶性砷,如砷酸/砷酸盐[arsenate, As(V)]、亚砷酸/亚砷酸盐[arsenite, As(III)]、一甲基胂(monomethylarsonate, MMA)、二甲基胂(dimethylarsonate, DMA)、砷甜菜碱(arsenobetaine, AsB)、砷胆碱(arsenocholine, AsC)等<sup>[8]</sup>。砷毒性与其形态密切相关:无机砷As(V)、As(III)能被胃肠道迅速吸收,国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将其归类为人类致癌物(1类);甲基化砷被证明可能对身体产生毒性,被归类为可能致癌物(2B类);AsB和其他不被人体吸收的含砷化合物则被归类为对人类致癌性无法分类物(3类)<sup>[9–12]</sup>。研究表明,世界上有超过6000万人处于砷暴露过量的风险中<sup>[13]</sup>,且人们日常饮食所摄入的砷约有90%来自于水产品(如扇贝)<sup>[14]</sup>。

砷是扇贝中常见的污染物,并有研究<sup>[5]</sup>表明,栉孔扇贝裙边的砷含量超过扇贝砷总量的80%。而目前关于砷分析的研究主要以完整的扇贝组织作为对象,针对扇贝裙边的研究罕见报道。现有的国家标准中,与砷检测相关的GB 5009.11—2014《食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定》及GB/T 23372—2009《食品中无机砷的测定 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法》均只涉及总砷与无机砷的测定,而有机态砷的检测尚无明确标准。ZHAO等<sup>[15]</sup>的研究显示有机态砷为双壳贝类中砷的主要存在形式,

TIBON等<sup>[16]</sup>也报道在贝类中可检测到除无机砷外的31种砷形态。为探究扇贝裙边的砷分布并对其进行安全性评价,急需建立适用的砷分析方法。近年国内关于砷形态提取及检测的研究多采用单一提取液提取法及离子交换色谱法<sup>[17–20]</sup>,有机态砷及残渣态砷未引起关注,缺乏对生产过程中各砷形态之间转化的风险评估。崔艳梅等<sup>[21]</sup>采用单一提取液提取法,以(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液作为提取液,利用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(hight performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)分析了扇贝中6类已知砷形态,但该研究忽视了水溶性未知砷、非极性砷及残渣态砷的存在。WOLLE等<sup>[22]</sup>采用序贯提取法,使用水与二氯甲烷-甲醇溶液两种提取液,依次从鲑鱼等样品中提取砷,并将砷划分为水溶性砷、非极性砷与残渣态砷3种组分,取得较优提取效果。与单一提取液提取法相比,组合使用多种提取液依次提取砷的序贯提取法对样品中砷分布的解析更为全面。因此,本研究联用序贯提取方法、HPLC-ICP-MS砷形态检测法与ICP-MS总砷检测法,建立栉孔扇贝裙边砷组分分析方法。该方法将扇贝裙边中砷组分细分为水提取已知砷、水提取未知砷、非水提取砷及未提取砷4类,为相关检测标准的确立、各砷形态之间的转化风险的评估与扇贝裙边的高值化利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)购自山东省青岛市市南区清泰水产店。

### 1.2 试剂

碳酸铵、硝酸(优级纯,国药集团化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯,德国默克公司);高氯酸(优级纯,天津政成

化学制品有限公司); 二氯甲烷(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 扇贝生物成分分析标准物质(GBW10024, GSB-15, 地球物理地球化学勘查研究所); 牡蛎组织标准参考物质(SRM 1566b, 美国国家标准协会); 砷标准液(GSB 04-1714-2004, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 国家有色金属及电子材料分析测试中心); 砷酸根溶液标准物质[GBW08666, (1.011 $\pm$ 0.016)  $\mu\text{mol}/\text{g}$ ]、砷胆碱溶液标准物质[GBW08671, (0.374 $\pm$ 0.015)  $\mu\text{mol}/\text{g}$ ]、一甲基胂溶液标准物质[GBW08668, (0.335 $\pm$ 0.011)  $\mu\text{mol}/\text{g}$ ]、二甲基胂溶液标准物质[GBW08669, (0.706 $\pm$ 0.024)  $\mu\text{mol}/\text{g}$ ]、砷甜菜碱溶液标准物质[GBW08670, (0.518 $\pm$ 0.015)  $\mu\text{mol}/\text{g}$ ](中国计量科学研究院)。

### 1.3 仪器与设备

8800 电感耦合等离子体三重四极杆质谱仪、1260 液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); EHD-24 电热消解仪(北京东航科仪仪器有限公司); FD-3 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); SB-5200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); TDL-8M 台式大容量冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); Hamilton PRP-X100 阴离子交换色谱柱(250 mm $\times$ 4.1 nm, 10  $\mu\text{m}$ , 瑞士哈美顿医疗公司)。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 扇贝裙边冻干样品的制备

从扇贝中采集裙边, 匀浆处理后于-40°C冻藏4 h, 取出样品进行冷冻干燥, 而后将其磨成粉状, 得到扇贝裙边冻干样品。

#### 1.4.2 总砷分析样品前处理方法

称取冻干样品0.25 g(精确至0.0001 g)于石英消化管中, 加入1 mL高氯酸与4 mL硝酸, 于电热消解仪中升温至140°C, 并保温50 min进行湿法消解。随后升温至190°C并保温2 h排酸。冷却至室温后采用超纯水转移消解液, 逐步稀释至待测液质量中总砷浓度为0~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 以孔径0.22  $\mu\text{m}$ 聚醚砜微孔滤膜过滤后用ICP-MS测定总砷含量。

#### 1.4.3 仪器条件

##### (1)质谱条件

射频功率: 1550 W; 等离子体流速: 15.0 L/min; 载气流速: 1.05 L/min; 稀释气流速: 0.95 L/min; 蠕动泵转速: 0.3 r/min; 雾化室温度: 2°C; 能量歧视: -7.0 V; Q1偏转电压: -1.0 V; Q1预过滤偏转电压: -38.0 V; Q1后过滤偏转电压: -22.0 V; 八极杆射频电压: 200 V; 碰撞/反应池气体: O<sub>2</sub>(0.5 mL/min); 检测离子: <sup>75</sup>As<sup>+</sup> $\rightarrow$ <sup>91</sup>AsO<sup>+</sup>。

##### (2)色谱条件

色谱柱: Hamilton PRP-X100 阴离子交换色谱柱(250 mm $\times$ 4.1 nm, 10  $\mu\text{m}$ ); 流动相A: 甲醇; 流动相B: 100 mmol/L碳酸铵溶液; 流动相C: 超纯水; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 柱温: 25°C; 液相色谱流速: 1.5 mL/min; ICP-MS蠕动泵泵速: 0.5 r/min,

#### 1.4.4 色谱条件优化

参考WANG等<sup>[23]</sup>的方法并做修改, 采用U<sub>6</sub>(2<sup>6</sup>)均匀设计法<sup>[24]</sup>优化色谱条件, 因素水平见表1。以流动相中100 mmol/L碳酸铵溶液含量与甲醇溶液含量为因素, 对As(III)、As(V)、MMA、DMA、AsC及AsB 6种砷形态进行等梯度洗脱实验。其中, 洗脱流速为1.5 mL/min, 洗脱时间为0~60 min, 样品为As(III)、As(V)、DMA、MMA、AsC、AsB 6种砷形态标准物质。

表1 U<sub>6</sub>(2<sup>6</sup>)均匀设计的因素水平表  
Table 1 U<sub>6</sub>(2<sup>6</sup>) Uniform design test scheme of mobile phase

实验组 编号	甲醇含量/%(A)	100 mmol/L 碳酸铵含量/%(B)
1	4.0	10.0
2	0	20.0
3	2.0	0
4	1.0	40.0
5	5.0	30.0
6	3.0	50.0

以流动相中100 mmol/L碳酸铵溶液含量与甲醇溶液含量为自变量, 以保留时间、积分面积、峰高、分辨率、半峰宽与对称性为因变量, 对均匀设计实验数据进行多项式逐步拟合, 得到显著拟合方程。将流动相中甲醇含量取值0~5.0%, 100 mmol/L碳酸铵溶液含量取值0~50.0%, 组合引入得到的显著拟合函数, 计算得因变量值, 筛选得到各组砷形态中各因变量均较优的流动相组成。将计算筛选得流动相组成组合为洗脱条件, 对As(III)、As(V)、MMA、DMA、AsC及AsB 6种砷形态进行梯度洗脱实验。对结果进行分析, 得到6种砷形态的最优色谱洗脱条件。

#### 1.4.5 砷形态分析的单一提取液提取实验

称取0.1 g(精确至0.0001 g)冻干样品于5 mL离心管中, 加入提取液3 mL, 依次涡旋振荡5 min, 水浴超声10 min, 敞口于沸水水浴加热10 min, 随后5000 r/min(离心半径170 mm, 下同)离心5 min, 收集上清液; 在离心沉淀中再加入同一提取液3 mL, 重复上述操作2次, 将3次提取液分别存放, 得到提取样品3份。用孔径0.45  $\mu\text{m}$ 的尼龙66微孔滤膜过滤, 使用HPLC-ICP-MS测定砷形态含量。采用的提取液及其沸水浴温度分别为:(1)超纯水(100°C); (2)1% (m:V)硝酸溶液(100°C); (3)1.5% (m:V)硝酸溶液(100°C); (4)50% (V:V)甲醇溶液(80°C); (5)含1% (m:V)硝酸的50% (V:V)甲醇溶液(80°C); (6)含1.5% (m:V)硝酸的50% (V:V)甲醇溶液(80°C)。

#### 1.4.6 砷形态分析的序贯提取法

##### (1)涡旋振荡提取法

涡旋振荡提取方法流程图见图1。

第1次提取: 取0.1 g(精确至0.0001 g)冻干样品, 加入3 mL超纯水, 涡旋振荡10 min, 5000 r/min离心5 min, 收集上清液; 离心沉淀中加入3 mL超纯水, 涡旋振荡10 min,

5000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 将 2 次离心上清液合并, 以 0.45 μm 的尼龙 66 微孔滤膜过滤后, 于 4°C 保存待测。

第 2 次提取: 向第 1 次提取离心残渣中加入 3 mL 甲醇, 涡旋振荡 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 以 0.45 μm 的尼龙 66 微孔滤膜过滤后, 于 4°C 保存待测。

第 3 次提取: 向第 2 次提取离心残渣中依次加入 1 mL 甲醇与 3 mL 二氯甲烷, 涡旋振荡 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 收集上清液; 离心沉淀中加入 1 mL 甲醇与 3 mL 二氯甲烷, 涡旋振荡 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 将 2 次离心上清液合并, 以 0.45 μm 的尼龙 66 微孔滤膜过滤后, 于 4°C 保存待测。

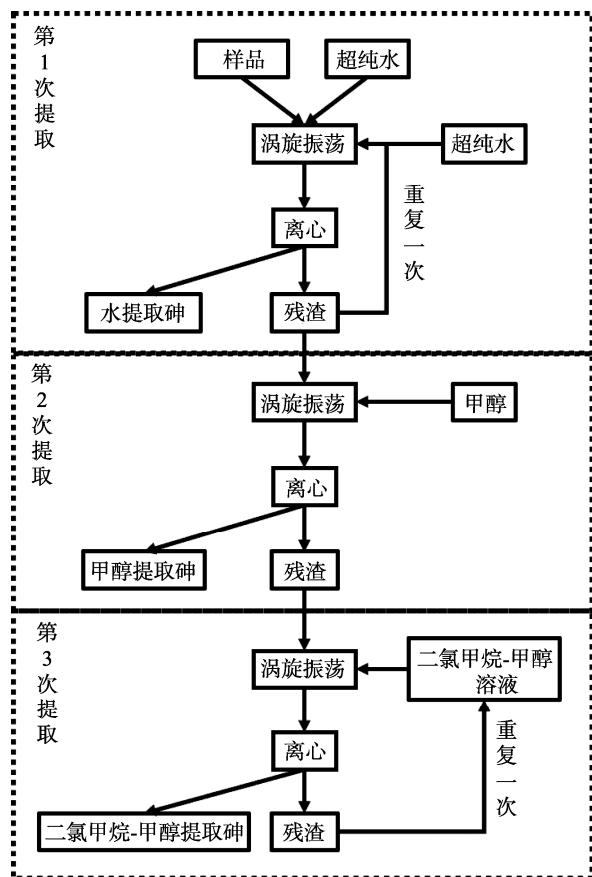


图 1 涡旋振荡提取方法流程图

Fig.1 Flow chart of vortex oscillation extraction method

## (2) 水浴超声提取法

第 1 次提取: 取 0.1 g 冻干样品(精确至 0.0001 g), 加入 3 mL 超纯水, 涡旋振荡 2 min, 水浴超声 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 收集上清液; 离心沉淀中加入 3 mL 超纯水, 涡旋 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 将 2 次离心上清液合并, 以 0.45 μm 的尼龙 66 微孔滤膜过滤后, 于 4°C 保存待测。

第 2、3 次提取分别与 1.4.6(1) 中第 2、3 次保持一致。

## (3) 沸水浴提取法

第 1 次提取: 取 0.1 g(精确至 0.0001 g)冻干样品, 加

入 3 mL 超纯水, 涡旋振荡 2 min, 沸水浴加热 10 min, 取出冷却至室温后, 5000 r/min 离心 5 min, 收集上清液; 离心沉淀中加入 3 mL 超纯水, 涡旋振荡 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 将 2 次离心上清液合并, 以 0.45 μm 的尼龙 66 微孔滤膜过滤后, 于 4°C 保存待测。

第 2、3 次提取分别与 1.4.6(1) 中第 2、3 次保持一致。

## 1.4.7 数据处理

应用 Origin 2018 对实验数据进行统计分析及绘图。除色谱优化实验外所有实验均重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的优化

优化后的 6 类砷形态液相色谱图与其洗脱程序分别如图 2、表 2 所示。已知 6 种砷形态按洗脱先后顺序为: AsC、AsB、As(III)、DMA、MMA、As(V)。其中, AsC 与 AsB 之间、DMA 与 MMA 之间虽然在图像上未完全分离, 但分辨率分别为  $1.84 \pm 0.04$ 、 $1.74 \pm 0.09$ , 均显著大于 1.5 ( $P < 0.05$ ), 符合《中国药典》<sup>[25]</sup>的要求, 分离度良好。优化得到的洗脱程序能在 10 min 内完成该 6 类砷形态的有效分离。

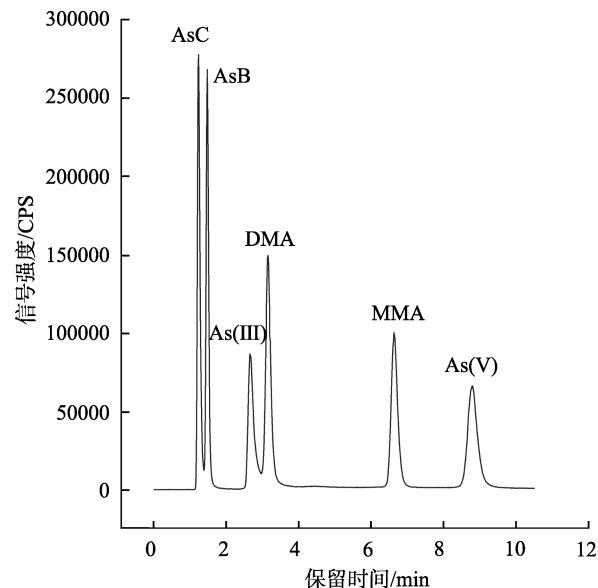


图 2 洗脱程序优化后的 6 种砷形态液相色谱图

Fig.2 Chromatogram of the 6 kinds of arsenic species after elution procedure optimization

表 2 优化所得 6 种砷形态的 HPLC 洗脱程序

Table 2 Optimized HPLC elution procedures for the 6 kinds of arsenic species

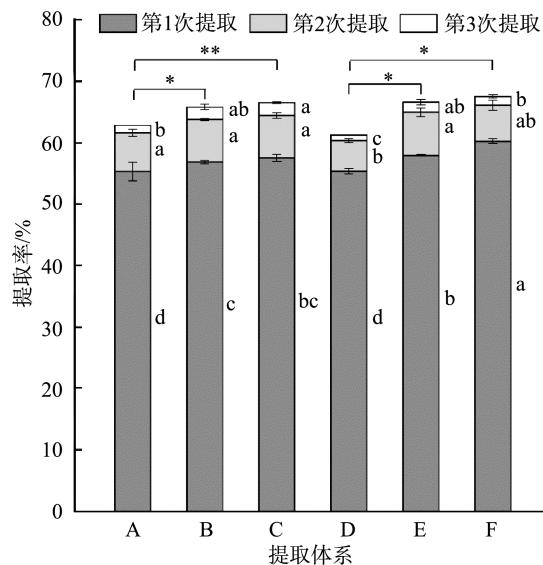
时间 /min	甲醇 /%	100 mmol/L 碳酸铵/%	超纯水 /%	流速 /(mL/min)
0.00	3.0	15.0	82.0	1.5
2.00	3.0	15.0	82.0	1.5
2.50	4.0	45.0	51.0	1.5
11.00	4.0	45.0	51.0	1.5

## 2.2 砷提取方法优化

### 2.2.1 单一提取液提取实验

文献中砷提取方法多见为溶剂萃取法。常见砷提取液有超纯水<sup>[26~27]</sup>、50% (V:V)甲醇溶液<sup>[26]</sup>、稀硝酸溶液<sup>[28]</sup>等。本研究考察了超纯水(A)、1% (m:V)硝酸溶液(B)、1.5% (m:V)硝酸溶液(C)、50%甲醇溶液(D)、含 1% (m:V)硝酸的 50% (V:V)甲醇溶液(E)与含 1.5% (m:V)硝酸的 50% (V:V)甲醇溶液(F) 6 类提取液的砷提取效果。选用易于操作的水浴超声-水浴加热法对扇贝裙边冻干样品进行单一提取液 3 次提取实验, 比较 6 类提取液在总砷提取率上的差异。其结果如图 3 所示。

6 类提取液的 3 次砷总提取率在 62.8%~67.6% 之间, 与文献[26]报道扇贝砷提取率(约 50%~90%)一致, 但处于中下水平。在同一提取液中, 2 次提取的砷总提取率与 3 次提取的砷总提取率间无显著差异( $P>0.05$ ), 表明 2 次提取即可完成游离砷从样品至提取液的转移。在相同甲醇浓度下, 硝酸的引入显著提高了砷的总提取率( $P<0.05$ )。PARK 等<sup>[29]</sup>称提取液的酸化是通过分解样品中有机物提高提取率, 而 CALEB 等<sup>[30]</sup>亦发现加热条件下稀硝酸会导致砷糖的降解, 因此推测硝酸的引入可促使样品中砷从与有机物的结合中释放, 存在破坏样品砷形态完整性的可能。综上, 后续实验中, 为保证砷提取的完全性与完整性, 提取次数确定为 2 次, 且不采用硝酸作为提取液。



注: 不同小写字母表示同一次提取的提取率具有显著性差异( $P<0.05$ ); 对 3 次砷总提取率进行显著性差异分析, \*表示存在显著差异( $P<0.05$ ), \*\*表示存在极显著差异( $P<0.01$ )。

图 3 提取液种类与提取次数对总砷提取率的影响( $n=3$ )

Fig.3 Effects of extract types and extraction times on the extraction rates of total arsenic ( $n=3$ )

### 2.2.2 序贯提取实验

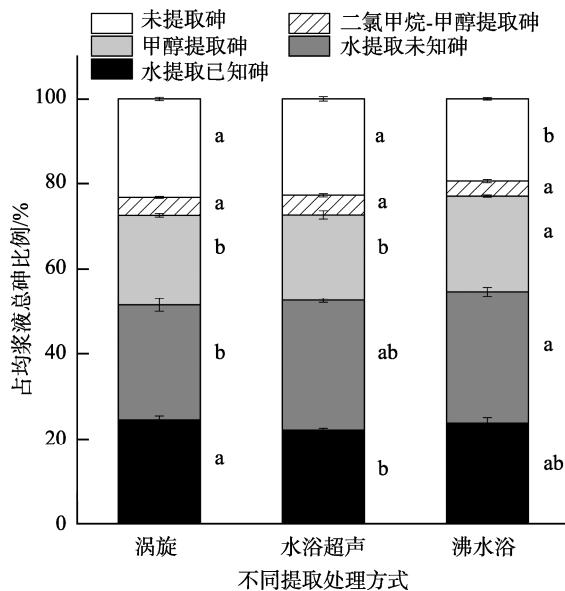
参考 WOLLE 等<sup>[22]</sup>建立的方法并做改动, 选用超纯

水、甲醇与二氯甲烷-甲醇(3:1, V:V)溶液对扇贝裙边进行序贯提取实验, 并将提取得到的砷分为 3 种组分: 水提取砷、非水提取砷(包含甲醇提取砷与二氯甲烷-甲醇提取砷)及未提取砷。该提取实验中, 超纯水与二氯甲烷-甲醇溶液各提取 2 次, 对水提取砷进行总砷分析与砷形态分析, 对二氯甲烷-甲醇提取砷与提取后残渣中未提取砷进行总砷分析。因为超纯水与二氯甲烷不互溶, 但均与甲醇互溶, 同时实验表明涡旋、水浴超声及沸水浴 3 种提取处理中, 甲醇 1 次提取与 2 次提取的砷提取率间无显著差异( $P>0.05$ ), 所以引入甲醇进行 1 次提取作为超纯水提取与二氯甲烷-甲醇溶液提取的过渡阶段, 并对甲醇提取砷进行总砷分析。

将水提取砷、甲醇提取砷与二氯甲烷-甲醇提取砷占样品总砷比例之和记为砷总提取率, 将总砷提取率与未提取砷占样品总砷比例之和记为砷总回收率。涡旋、水浴超声及沸水浴提取处理的总砷提取率分别为  $76.7\% \pm 0.4\%$ 、 $77.2\% \pm 0.5\%$ 、 $80.5\% \pm 0.3\%$ , 总砷回收率分别为  $103.3\% \pm 1.7\%$ 、 $101.3\% \pm 0.3\%$ 、 $102.4\% \pm 0.3\%$ 。序贯提取法的砷总提取率均高于单一提取液提取法(62.8%~67.6%), 并处于文献的中上水平(约 50%~90%)<sup>[24,28]</sup>。序贯提取法较单一提取液提取法获得更高砷总提取率的原因是, 存在部分非极性砷不溶于单一提取液的水溶液中, 但溶解于甲醇及二氯甲烷-甲醇溶液中。因而序贯提取法较单一提取液提取法能更全面揭示样品中砷的情况。涡旋法与水浴超声法的砷总提取率无显著性差异( $P>0.05$ ), 但沸水浴法的砷总提取率显著高于另两种提取处理方法的( $P<0.05$ ), 表明较另外两种方法, 沸水浴法对残渣中砷的结合有更大影响, 可令更多砷释放到提取液中。

为进一步探究 3 种提取处理方法的砷提取差异, 对各提取处理下砷组分占总砷的比例进行分析, 如图 4 所示。水提取砷中已知 6 种砷形态[AsB、AsC、As(III)、As(V)、MMA、DMA]被称为水提取已知砷, 其余水提取砷被称为水提取未知砷。涡旋法与水浴超声法两种提取处理中, 各提取液的提取率间无显著差异( $P>0.05$ ), 各总提取率间亦无显著性差异( $P>0.05$ ), 表明涡旋法与水浴超声法对样品中砷释放影响的差异小。沸水浴法与涡旋法两种提取处理中, 在水提取砷、甲醇提取砷与未提取砷的提取率上均存在显著差异( $P<0.05$ ), 该差异表现在沸水浴法的水提取未知砷占总砷比例显著大于涡旋法( $P<0.05$ ), 以及未提取砷占总砷的比例显著小于涡旋法( $P<0.05$ ), 而两种提取处理的非水提取砷占总砷比例间则无显著差异( $P>0.05$ ); 表明沸水浴法较涡旋法更能促使残渣中砷释放或转化为水提取未知砷, 并转移至提取液中。需要注意的是, 3 种提取处理下水提取砷提取率仅为 51.3%~54.5%, 显著小于单一提取液提取法的砷总提取率( $P<0.05$ ); 其原因, 一方面在于单一提取液提取方法中采用涡旋-水浴超声-沸水浴复合提取操作, 较序贯提取法中第 1 次提取的单一提取操作, 更能促

进样品基质中砷释放或转化游离至提取液中, 另一方面在于单一提取液提取方法中甲醇与硝酸的引入会促使一部分非极性砷溶于提取体系, 这部分非极性砷相当于序贯提取法的非水提取砷。

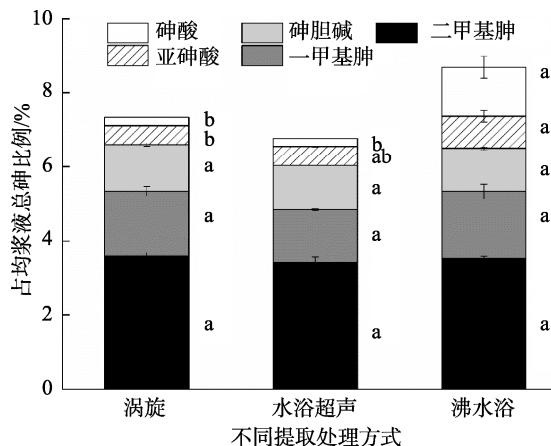


注: 同一砷组分在不同提取处理方式下, 不同小写字母表示具有显著性差异( $P<0.05$ )。

图4 3种提取处理下各砷组分占样品总砷比例堆积图( $n=3$ )  
Fig.4 Accumulation diagram of the proportion of each arsenic component in the total arsenic of the sample under 3 kinds of extraction treatments ( $n=3$ )

对水提取砷进行分析, 涡旋法、水浴超声法及沸水浴法 3 种不同提取处理方法提取的 AsB 占总砷比例为  $17.2\% \pm 0.7\%$ 、 $15.4\% \pm 0.4\%$  及  $15.3\% \pm 0.3\%$ , 除 AsB 外的 5 种水提取已知砷之和占总砷比例则为  $7.3\% \pm 0.3\%$ 、 $6.8\% \pm 0.1\%$  及  $8.4\% \pm 1.0\%$ , 由此可知, AsB 为水提取已知砷的主要部分。除 AsB 外, 5 种水提取已知砷占总砷比如图 5 所示, 沸水浴法提取的 As(III) 与 As(V) 占总砷比例均显著高于涡旋法与水浴超声法( $P<0.05$ ), 而 AsC、DMA、MMA 占总砷比例在 3 种处理方法下无显著差异( $P>0.05$ ), 推测沸水浴处理可促使其他形态砷转化为无机砷。

综上, 涡旋法与水浴超声法的砷总提取率无显著差异( $P>0.05$ ), 但涡旋法较水浴超声法有更优的已知砷形态提取效果, 两者间涡旋法更优。虽然沸水浴法较上述两种提取处理有更高的砷提取率, 但升高温度可能会影响样品微观结构与砷形态稳定性, 导致不溶性基质中砷释放或转化(如稳定性较差的砷糖<sup>[24]</sup>等), 破坏样品砷形态完整性。因此, 选取序贯涡旋提取法, 联用 ICP-MS 总砷分析方法与优化的 HPLC-ICP-MS 砷形态检测方法, 分析扇贝裙边砷组分。



注: 同一种砷形态在不同提取处理方式下, 不同小写字母表示具有显著性差异( $P<0.05$ )。

图5 砷酸、亚砷酸、一甲基胂、二甲基胂及砷胆碱占样品总砷比例堆积图( $n=3$ )  
Fig.5 Accumulation diagram of the proportion of As(V), As(III), MMA, DMA, and AsC in the total arsenic of the sample ( $n=3$ )

### 2.3 HPLC-ICP-MS 砷形态分析方法学验证

6 种砷形态的线性方程、相关系数、检出限、定量限与线性范围见表 3, 相关系数为 0.9970~0.9997, 检出限为  $0.014\text{--}2.366 \mu\text{g/kg}$ , 定量限为  $0.050\text{--}3.090 \mu\text{g/kg}$ 。其中, 各砷形态定量限均低于 GB 5009.11—2014 第二篇第一法水产动物无机砷总量定量限( $0.06 \text{ mg/kg}$ )与 GB/T 23372—2009 无机砷检出限[As(III):  $0.002 \text{ mg/kg}$ ; As(V):  $0.004 \text{ mg/kg}$ ], 说明 6 种砷形态在  $0\text{--}100 \mu\text{g/kg}$  范围内线性关系良好。

准确度分析结果如表 4 所示, 除 As(V) 的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs) 为  $8.8\%\text{--}10.1\%$  外, 其余 RSDs 均小于  $10\%$ , 且各测得值与目标浓度无显著性差异( $P>0.05$ ), 表明该方法准确度良好。

回收率实验结果如表 5 所示, 6 种砷形态的回收率介于  $78.1\%\text{--}116.2\%$  之间, RSDs 在  $10\%$  以内, 说明该方法有良好的重现性, 满足分析测试要求, 并证明该提取方法中已知 6 种砷形态之间不发生转化。

### 2.4 柄孔扇贝裙边中各砷组分含量分布特征

运用优化后砷组分分析方法对柄孔扇贝裙边进行分析, 结果如表 6 所示。样品中总砷浓度为  $(2.240 \pm 0.038) \text{ mg/kg}$  (ww) (ww 表示湿重), 其中水提取已知砷、水提取未知砷、非水提取砷及未提取砷各占总砷的  $24.5\%$ 、 $26.8\%$ 、 $25.4\%$  及  $23.3\%$ , 浓度分别为  $(0.549 \pm 0.023)$ 、 $(0.601 \pm 0.037)$ 、 $(0.568 \pm 0.010)$  及  $(0.522 \pm 0.008) \text{ mg/kg}$  (ww)。已知砷中无机砷浓度为  $(0.017 \pm 0.000) \text{ mg/kg}$  (ww)(占总砷的  $0.7\%\pm 0.2\%$ ), 符合 GB 2762—2017《食品安全国家标准食品中污染物限量》对贝类无机砷的限量要求 [ $0.5 \text{ mg/kg}$  (ww)]。砷甜菜碱是已知砷中浓度最大的砷形态, 占总砷的  $17.2\%\pm 0.7\%$  [ $(0.384 \pm 0.017) \text{ mg/kg}$  (ww)], 文献[31]表明砷甜菜碱不被人体代谢, 对人体没有毒性。

表3 洗脱程序优化后的6种砷形态的线性方程、检出限及定量限

Table 3 Linear equations, limits of detection and limits of quantification of 6 kinds of arsenic species after elution program optimization

砷形态	线性方程	$r^2$	检出限/(μg/kg) (n=7)	定量限/(μg/kg) (n=7)
砷胆碱	$Y=0.0267+0.2013X$	0.9991	0.015	0.050
砷甜菜碱	$Y=0.0098+0.1960X$	0.9997	0.014	0.163
亚砷酸	$Y=-0.3052+0.1484X$	0.9982	2.366	3.090
二甲基胂	$Y=-0.1025+0.2618X$	0.9996	0.533	0.863
一甲基胂	$Y=-0.1674+0.2211X$	0.9970	1.010	1.600
砷酸	$Y=-0.0001+0.1507X$	0.9838	0.561	1.868

表4 6种砷形态的砷分析方法准确度实验结果(n=6)

Table 4 Accuracy test results of arsenic analysis methods for 6 kinds of arsenic species (n=6)

砷形态	目标浓度/(μg/kg)	测得值/(μg/kg)	RSDs/%
砷胆碱	20	19.765±0.847	4.3
	40	40.132±0.909	2.3
	60	59.824±1.269	2.1
砷甜菜碱	20	19.934±0.384	1.9
	40	39.973±0.461	1.2
	60	59.969±0.683	1.1
亚砷酸	20	19.201±1.100	5.7
	40	38.967±1.918	4.9
	60	58.286±2.677	4.6
二甲基胂	20	20.056±0.790	3.9
	40	39.769±0.582	1.5
	60	59.664±0.871	1.5
一甲基胂	20	20.257±1.678	8.3
	40	39.646±1.488	3.8
	60	59.289±2.234	3.8
砷酸	20	20.678±1.830	8.8
	40	40.118±3.899	9.7
	60	59.455±6.015	10.1

表5 扇贝裙边砷加标回收实验结果(n=6)

Table 5 Experimental results of arsenic recoveries from scallop skirts (n=6)

砷形态	本底值/(ng As)	加标量/(ng As)	测定值/(ng As)	回收率/%	RSDs/%
砷胆碱	13.5	7.4	20.234~21.889	88.6~94.0	4.1
		14.9	27.364~28.46	93.3~98.8	3.1
		22.3	34.621~35.559	94.3~98.6	2.5
砷甜菜碱	354.6	111.8	455.766~486.265	88.3~89.4	0.9
		223.4	559.113~574.038	91.7~96.5	2.7
		333.4	677.045~695.454	94.8~102.0	3.9
亚砷酸	24.3	56.6	66.826~73.756	78.1~87.8	8.2
		99.8	115.160~117.648	92.0~92.5	0.3
		141.5	160.772~163.757	94.3~99.5	2.7

表 5(续)

砷形态	本底值/(ng As)	加标量/(ng As)	测定值/(ng As)	回收率/%	RSDs/%
二甲基胂	78.6	29.2	101.476~112.851	96.8~101.4	3.3
		54.0	122.721~127.464	83.2~88.5	3.1
		79.8	149.344~153.223	87.5~93.1	3.6
一甲基胂	42.6	21.0	58.660~64.998	116.2~116.2	2.5
		31.7	77.389~78.090	110.6~111.0	0.2
		44.7	91.937~94.057	107.7~109.1	0.9
砷酸	23.7	9.5	30.790~34.459	87.3~107.9	8.3
		16.6	40.545~41.245	101.1~105.9	2.5
		24.3	46.054~48.317	92.7~97.5	2.5

表 6 桔孔扇贝裙边中各砷组分砷浓度及占总砷比例( $n=3$ )  
Table 6 Concentrations of arsenic in the skirt of *Chlamys farreri* and their proportion in total arsenic ( $n=3$ )

砷组分	浓度/[mg/kg (ww)]	占总砷比例/%
总砷	2.240±0.038	100.0±0.0
水提取砷	1.150±0.029	51.3±0.7
非水提取砷	0.568±0.010	25.4±0.3
未提取砷	0.522±0.008	23.3±0.4
砷胆碱	0.028±0.001	1.3±0.0
砷甜菜碱	0.384±0.017	17.2±0.7
水提取已知砷	亚砷酸	0.012±0.000
	二甲基胂	0.081±0.002
	一甲基胂	0.039±0.003
水提取未知砷	砷酸	0.005±0.000
		0.2±0.0
水提取未知砷	0.601±0.037	26.8±1.5

### 3 结 论

本研究通过优化提取方法与色谱条件, 联用序贯涡旋提取法、HPLC-ICP-MS 砷形态检测法与 ICP-MS 总砷检测法, 建立了扇贝裙边砷组分的分析方法: 以超纯水、甲醇及二氯甲烷-甲醇(3:1, V:V)溶液为提取液, 对样品进行序贯涡旋提取; 采用 HPLC-ICP-MS 砷形态分析法对 AsB、AsC、As(V)、As(III)、MMA 与 DMA 6 类已知砷形态进行定性定量分析, 采用 ICP-MS 总砷检测法对总砷、水提取未知砷、非水提取砷与未提取砷进行定量分析。在优化的实验条件下, 6 类砷形态在 0~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  范围内线性关系良好, 检出限为 0.014~2.366  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限为 0.050~3.090  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 加标回收率在 78.1%~116.2% 之间。该方法准确度高、精密度好, 相比现行国家标准, 提取效率高, 无机砷定量限低, 并能同时对水提取未知砷、非水提取砷及未提取砷进行测定, 适用于桔孔扇贝裙边中砷组分的全面分析。运用本方法分析市售的桔孔扇贝裙边样品, 发现其总砷含量虽高, 但水

溶性已知砷仅占约 1/4, 其中无机砷含量不足总砷的 1%, 低于 0.02  $\text{mg}/\text{kg}$ , 符合国家标准限量要求; 而其总砷中约 3/4 为水溶性未知砷、非水提取砷与未提取砷, 这 3 种组分中砷形态的定性定量分析, 以及不同砷形态之间的相互转化机制, 仍待进一步探究。

### 参考文献

- [1] SCHMIDT L, LANDERO JA, NOVO DL, et al. A feasible method for As speciation in several types of seafood by LC-ICP-MS/MS [J]. Food Chem, 2018, 255: 340~347.
- [2] 马丽艳, 汪一红, 刘志东, 等. 扇贝加工副产物资源利用进展[J]. 渔业信息与战略, 2017, 32(3): 204~210.  
MA LY, WANG YH, LIU ZD, et al. Advances in utilization of by-products from scallop processing [J]. Fish Inform Strat, 2017, 32(3): 204~210.
- [3] 林怡辰. 重金属在近岸海域海产品中的富集及其影响机制研究[D]. 烟台: 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所), 2021.  
LIN YC. Bioaccumulation and influential mechanisms of heavy metals in offshore seafood [D]. Yantai: University of Chinese Academy (Yantai Institute of Coastal Zone Research), 2021.
- [4] 张梅超, 慕金雨, 王妍, 等. 电感耦合等离子体质谱法测定扇贝中铅、砷、镉含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(17): 5884~5888.  
ZHANG MC, MU JY, WANG Y, et al. Uncertainty evaluation for determination of lead, arsenic and cadmium in scallop by inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(17): 5884~5888.
- [5] XU F, CHEN P, YUAN YK, et al. Effects of steaming process on the distribution of arsenic in different tissues of the scallops (*Chlamys farreri*) [J]. Food Control, 2021, 123: 107694.
- [6] 徐文超. 扇贝蛋白的酶降解研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.  
XU WC. Studies of using enzymes to hydrolyze scallop protein [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.
- [7] XUE XM, CHAN X, YOSHINAGA M, et al. The enigma of environmental organoarsenic als: Insights and implications [J]. Crit Rev Environ Sci Technol, 2021, 27: 1~28.
- [8] JINADASA BK, FOWLER SW, POHL P. Arsenic in seafood: Current status, analysis, and toxicity [EB/OL]. [2021-02-16]. [https://doi.org/10.1007/978-981-33-6068-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-33-6068-6_3) [2022-04-28].

- [9] CASSONE G, CHILLE D, FOTI C, et al. Stability of hydrolytic arsenic species in aqueous solutions: As<sup>3+</sup> vs. As<sup>5+</sup> [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2018, 20(36): 23272–23280.
- [10] YOSHINAGA-SAKURAI K, SHINDE R, RODRIGUEZ M, et al. Comparative cytotoxicity of inorganic arsenite and methylarsenite in human brain cells [J]. *Acs Chem Neurosci*, 2020, 11(5): 743–51.
- [11] 赵艳芳, 康绪明, 宁劲松, 等. 虾蛄可食组织中镉和砷的形态及分布特征[J]. 食品科学, 2020, 41(8): 282–287.
- ZHAO YF, KANG XM, NING JS, et al. Speciation and distribution characteristics of cadmium and arsenic in the edible tissues of *Oratosquilla oratoria* [J]. *Food Sci*, 2020, 41(8): 282–287.
- [12] IARC. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1–129 [EB/OL]. [2021-09-27]. <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/> [2021-10-29].
- [13] 廖文. 砷和汞生物可给性及形态变化研究[D]. 广州: 中国科学院大学(中国科学院广州地球化学研究所), 2019.
- LIAO W. Study of speciation and bioaccessibility of arsenic and mercury in food [D]. Guangzhou: University of Chinese Academy (Guangzhou Institute of Geochemistry), 2019.
- [14] THOMAS DJ, BRADHAM. Role of complex organic arsenicals in food in aggregate exposure to arsenic [J]. *J Environ Sci*, 2016, 49: 86–96.
- [15] ZHAO Y, KANG X, DING H, et al. Bioaccumulation and biotransformation of inorganic arsenic in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) after waterborne exposure [J]. *Chemosphere*, 2021, 277: 130270.
- [16] TIBON J, SILVA M, SLOTH JJ, et al. Speciation analysis of organoarsenic species in marine samples: Method optimization using fractional factorial design and method validation [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(15): 3909–3923.
- [17] 刘歲, 胡俊栋, 杨红霞, 等. 电感耦合等离子体质谱联用技术在元素形态分析中的应用进展[J]. 岩矿测试, 2021, 40(3): 327–339.
- LIU W, HU JD, YANG HX, et al. Research progress on elemental speciation analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry hyphenated techniques [J]. *Rock Mine Anal*, 2021, 40(3): 327–339.
- [18] 付凤富, 孙颖, 王绪盛, 等. 海产品中砷形态分析研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(2): 341–349.
- DU FF, SUN Y, WANG XS, et al. Research progress on speciation analysis of arsenic in seafood [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(2): 341–349.
- [19] 陈晓红, 李晓晓, 金米聪. 海产品中砷形态分析研究进展[J]. 卫生研究, 2020, 49(1): 160–168.
- CHEN XH, LI XX, JIN MC. Research progress on speciation analysis of arsenic in seafood [J]. *J Hyg Res*, 2020, 49(1): 160–168.
- [20] 张伟, 黄良民. 海洋生物体内砷含量及其形态研究进展[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(1): 41–53.
- ZHANG W, HUANG LM. Advances of arsenic contents and different species in marine organisms [J]. *Asia J Ecot*, 2019, 14(1): 41–53.
- [21] 崔艳梅, 姜芳, 刘鸽, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定栉孔扇贝中6种砷形态化合物[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 4981–4988.
- CUI YM, JIANG F, LIU G, et al. Determination of 6 kinds of arsenic species in *Chlamys farreri* by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(15): 4981–4988.
- [22] WOLLE MM, CONKLIN SD. Speciation analysis of arsenic in seafood and seaweed: Part I-evaluation and optimization of methods [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(22): 5675–5687.
- [23] WANG ZP, XU J, LIU YJ, et al. Arsenic speciation of edible shrimp by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS): Method development and health assessment [J]. *Anal Lett*, 2019, 52(14): 2266–2282.
- [24] 王玉珊, 林德贵, 林琳好. 中药组方优化试验设计方法概述[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(3): 565–575.
- WANG YS, LIN DG, LIN JH. Summary of experimental design methods for optimization of complex prescription of Chinese medicine [J]. *J Anim Husb Vet Med*, 2021, 52(3): 565–575.
- [25] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- National Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [26] WHALEY-MARTIN KJ, KOCH I, REIMER KJ. Arsenic species extraction of biological marine samples (*Periwinkles*, *Littorina littorea*) from a highly contaminated site [J]. *Talanta*, 2012, 88: 187–192.
- [27] GOMEZ MM, KOVECS M, PALACIOS MA, et al. Effect of the mineralization method on arsenic determination in marine organisms by hydride generation atomic fluorescence spectroscopy [J]. *Microchim Acta*, 2005, 150(1): 9–14.
- [28] YU H, LI C, TIAN Y, et al. Recent developments in determination and speciation of arsenic in environmental and biological samples by atomic spectrometry [J]. *Microchem J*, 2020, 152: 104312.
- [29] PARK MK, CHOI M, KIM L, et al. An improved rapid analytical method for the arsenic speciation analysis of marine environmental samples using high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Environ Monit Assess*, 2019, 191(8): 1–4.
- [30] CALEB L, RIMMER CA, LEE L Y, et al. Determination of total arsenic and hydrophilic arsenic species in seafood [J]. *J Food Comp Anal*, 2021, 96: 103729.
- [31] 杜森, 张黎. 砷在海洋食物链中的生物放大潜力及发生机制探讨[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(1): 54–66.
- DU S, ZHANG L. Biomagnification potential and the mechanisms of arsenic in marine food chains [J]. *Asia J Ecotoxicol*, 2019, 14(1): 54–66.

(责任编辑: 于梦娇 郑丽)

## 作者简介



陈鹏, 硕士研究生, 主要研究方向为食品重金属检测与脱除。

E-mail: cp15063078380@aliyun.com



徐莹, 博士, 教授, 主要研究方向为食品有害成分控制。

E-mail: xuy@ouc.edu.cn