

综述

食品中砷化合物的形态及分析技术

陈绍占^{1,2}, 刘丽萍¹, 杜振霞²

(1. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013; 2. 北京化工大学理学院, 北京 100029)

摘要: 随着现代分析技术的发展, 越来越多的砷化合物形态能够被分析测定。砷的毒性与其存在的形态密切相关, 仅测定食品中总砷的含量已不能满足食品安全的需要, 急需根据不同食品中的砷化合物形态种类建立适宜的分析检测方法, 测定不同砷化合物的含量以准确评价食品的安全性。本文综述了海产品、大米、饲料、畜禽肉产品、食用菌等食品中存在的主要砷化合物形态及相关检测方法, 并对常用的前处理方法和分离检测技术进行了总结。

关键词: 食品中砷化合物形态; 前处理方法; 分析检测技术

中图分类号: R155.5⁺1; TS201.6 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)03-0296-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.03.022

The presence form and analytic technology of arsenic in food

CHEN Shao-zhan, LIU Li-ping, DU Zhen-xia

(Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

Abstract: With the development of modern analytic technology, an increasing number of arsenic forms were identified. The toxicity of arsenic was closely related to its chemical form. Determination of total arsenic in food was not enough for food safety analysis, and there was an urgent need to establish appropriate analysis methods for different arsenic forms in food. Consulting relevant literature, arsenic form in food such as seafood, rice, feed, livestock and poultry meat products, edible fungus and commonly used pre-treatment, separation and detection methods was summarized.

Key words: Arsenic form in food; pre-treatment methods; analytical techniques

砷在地壳中的含量排在第二十位。由于砷的某些化合物对人类具有致癌作用, 1981 年国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC) 正式将砷列为人类致癌物。长期暴露在有害砷化合物含量较高的环境中或食用含有害砷化合物含量较高的食品会导致皮肤癌、膀胱癌、肺癌以及高血压和心血管疾病等^[1-4], 砷暴露已成为一个世界范围内的公共健康问题。砷化合物种类繁多, 其毒性和生物利用率取决于其化学形态和氧化态。一般来说, 无机砷都是有毒的, 包括砷酸盐[As(III)] 和亚砷酸盐[As(V)]; 一甲基砷酸(MMA) 和二甲基砷酸(DMA) 的毒性次之; 但高度甲基化的砷形态是无毒的, 如砷甜菜碱(AsB) 和砷胆碱(AsC)。由于不同砷形态化合物的毒性不同, 测定食品中总砷含量已不能

有效反映其受到砷污染的状况, 不能满足食品安全的需要。因此, 准确测定不同砷化合物形态的含量越来越受到重视和关注。

砷有 4 种氧化态(As^{3-} 、 As^0 、 As^{3+} 和 As^{5+})。在自然环境中, 砷通常以无机形式存在, 多以含氧阴离子存在, 例如: 在还原条件下以三价亚砷酸(H_3AsO_3) 存在, 氧化条件下以五价砷酸盐(H_2AsO_4^-) 存在^[5]。有机砷主要是生物活性的结果, 主要有一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)、一甲基次砷酸[MMA(III)]、二甲基次砷酸[DMA(III)]、三甲基砷(TMA)、三甲基砷氧化物(TMAO)、四甲基砷离子(TETRA)、砷甜菜碱(AsB)、砷胆碱(AsC) 和砷糖(AsS) 等。也有一部分有机砷是人工合成的, 如阿散酸($p\text{-AsA}$)、洛克沙肿(3-NHPAA)、4-羟基苯砷酸($p\text{-HPAA}$)、4-硝基苯砷酸($p\text{-NPAA}$)、苯砷酸(PAA)、卡巴砷($p\text{-UPAA}$) 等, 到目前为止, 已知的砷形态化合物大约有 50 多种。

收稿日期: 2013-07-26

作者简介: 陈绍占 男 硕士生 研究方向为无机元素分析及形态研究 E-mail: csz1987buct@163.com

通讯作者: 刘丽萍 女 主任技师 研究方向为光谱、质谱研究 E-mail: liulp@bjcdc.org

杜振霞 女 教授 研究方向为有机质谱分析及无机光谱分析 E-mail: duzx@mail.buct.edu.cn

1 砷形态的分离与检测技术

1.1 分离技术

高效液相色谱(HPLC) 是分离砷化合物形态最

常用的一种方法,主要包括离子对色谱(IPC)、离子交换色谱(IEC) 和尺寸排阻色谱(SEC),毛细管电泳(CE)、超临界流体色谱(SFC) 也可用于砷化合物形态的分离测定。本文主要对 IEC、IPC、SEC 和 CE 进行介绍。

1.1.1 离子对色谱

离子对色谱(IPC) 是一种分离中性和离子型砷化合物形态的常见分析方法,包括阴离子对和阳离子对色谱。

四丁铵(TBA,包括氢氧化物和磷酸盐) 是一种常见的分离 As(III)、As(V)、MMA 和 DMA 的阳离子对试剂^[6]。洗脱顺序一般是 As(III)、MMA、DMA 和 As(V),常用的液相色谱柱包括 Hamilton PRP-1、Phenomenex C₁₈和 Phenomenex ODS。离子对试剂的浓度、流速、离子强度和流动相 pH 值是决定其分辨率的重要因素^[7-8]。用于分离 As(III)、MMA、DMA 和 As(V) 等 4 种砷形态的最佳 pH 值范围为 5.0 ~ 7.0。

另外一种常用的离子对试剂是四乙基氢氧化铵(TEAH),主要用于分离 AsB 和砷糖^[9]。

通常使用丁烷磺酸钠^[10]、戊烷磺酸钠^[11]、己烷磺酸钠^[12]作为阴离子对分离阳离子的砷形态。Le 等^[12]使用 10 mmol/L 己烷磺酸钠和 1 mmol/L 四乙基氢氧化铵作流动相在反相 C₁₈柱上分离了 As(III)、As(V)、MMA、DMA、AsB、AsC 和 TETRA。

1.1.2 离子交换色谱

阴离子交换色谱和阳离子交换色谱均可用于砷形态分析。根据砷化合物的离子特性,阴离子交换色谱通常用来分析 As(III)、As(V)、MMA 和 DMA,而阳离子交换色谱用于分离 AsB、AsC、TMAO 和 TETRA。

常用的阴离子交换色谱柱是 Hamilton PRP-X100,在较宽的 pH 值(1 ~ 13) 范围内相对稳定。AsB 和 As(III) 在中性 pH 条件下出峰位置重叠,可向流动相中加入酒石酸使 As(III) 与酒石酸形成阴离子的络合物,在色谱柱内产生较强的保留,从而使 As(III) 与 AsB 分开。6 种砷分离的顺序是 AsC、AsB、DMA、MMA、As(III) 和 As(V)^[13]。也可通过增大 pH 值至 9.0 以上^[14]或将 As(III) 氧化成 As(V) 实现 As(III) 与 AsB 的分离。

另一种离子交换色谱柱(Dionex IonPac AS 19) 也常用于分离砷形态。杨丽君等^[15]采用 Dionex IonPac AS 19 作分析柱,以水和 50 mmol/L 碳酸铵作流动相梯度洗脱进行砷化合物形态分析。

常用的阳离子交换柱主要是 Hamilton PRP-X200。

1.1.3 尺寸排阻色谱

尺寸排阻色谱(SEC) 也称空间排阻色谱或凝胶渗透色谱,是一种根据试样中分子的尺寸进行分离的色谱技术。尺寸排阻色谱具有离子排阻、离子交换和疏水作用,适合各种各样砷形态的分离^[16]。Nakazato 等^[17]在羧基化的甲基丙烯酸甲酯树脂上实现了 As(V)、MMA、DMA、As(III) 和 AsB 的分离。

1.1.4 毛细管电泳

毛细管电泳(CE) 是一种基于待分离物组份间淌度和分配行为差异而实现分离的电泳技术,具有高分辨、高柱效、速度快、抗干扰能力强、选择性好等优点。但由于接口问题使其与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS) 联用受到一定的限制,近几年接口技术的突破使 CE 与 ICP-MS 联用技术用于形态分析有了新的进展。

赵云强等^[18]建立了 CE-ICP-MS 分析 6 种形态砷化合物的方法,25 min 内可实现 AsC、AsB、As(III)、DMA、MMA 和 As(V) 的良好分离。陈玉红等^[19]建立了 CE-ICP-MS 测定 AsB、AsC、As(III)、As(V)、MMA、DMA、*p*-ASA、3-NHPAA 等 8 种砷化合物的分析方法。

1.2 检测技术

目前常用的砷形态化合物检测技术主要有原子荧光光谱(AFS)、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)、含紫外检测器液相色谱(HPLC) 和电喷雾离子质谱(ESI-MS)。

AFS 具有灵敏度高、运行成本低、选择性好、线性范围宽、仪器操作简便、价格低廉等特点。HPLC 与 AFS 技术联用时,可以直接测定 As(III)、As(V)、MMA 和 DMA;但 AsB、AsC、砷糖等有机砷化合物由于很难形成气态砷化氢,需进行紫外消解后才可分析测定。

ICP-MS 具有灵敏度高、检出限低、线性范围宽、多元素同时检测等优点,近年来已成为重要的元素检测分析手段。高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS) 联用技术已经成为元素形态分析最常用和有效的方法之一。对于砷形态分析而言,在灵敏度、分离效能方面最具优势,但相对而言其运行成本较高。

使用紫外检测器的 HPLC 技术具有操作简单、快速、准确、实用性强等特点,多用于测定有机砷化合物,早期应用较多,由于灵敏度较低,目前较少使用。

电喷雾离子质谱(ESI-MS) 可以对有机砷化合物的结构进行鉴定,但其灵敏度较低,受基体干扰较大,前处理要求较高,主要用于定性分析。将 HPLC-ICP-MS 和 HPLC-ESI-MS 有机结合起来,可实现砷形态化合物的定性和定量分析,这将是砷形态

化合物分析的又一个发展方向。

2 前处理方法

食品样品种类繁多,基质复杂,若前处理条件选择不当,某些形态之间会发生转化,进而造成一些误测或假阳性现象^[20]。因此,在样品提取过程中如何保证各砷化合物形态之间不发生转化和提高砷化合物的提取效率是需要解决的关键问题。目前常用的提取方法有微波萃取、超声提取、加热提取和超声探针提取等。提取溶剂主要有甲醇-水、水、硝酸体系、酶体系及三氟乙酸体系等。

甲醇-水^[21-22]是常用的提取试剂之一,可保持各化合物形态、避免形态之间的转化。有机砷提取效率较高;但甲醇含量过高会降低无机砷的提取效率,影响砷的测定结果,需采用旋转蒸干或氮吹方法去除甲醇,前处理方法繁琐、回收率相对较低。

水^[23-24]是一种传统的提取溶剂,早期应用较多,能够满足大米等基质简单的样品提取,但对脂肪及蛋白质含量较高的样品,提取效率较低。

硝酸^[25-26]也是一种常用的提取剂,提取效率相对较高。当采用硝酸作提取剂时需控制酸度范围,否则易发生砷化合物形态之间的转化。目前常采

用此方法提取食品中的无机砷。

酶^[27-28]提取近年来较为常用,提取时不仅可以避免砷形态之间的转化,也可以降低共提取物的干扰。但酶提取成本较高,有的水解酶不易得到。

三氟乙酸^[29]作为砷化合物形态的提取试剂,有较好的提取效率,但由于其属于管制试剂,且具有强腐蚀性,为了避免对仪器的损害,测定前需除去,其实用性也受到一定的限制。

目前常用的提取方法各有特色,如微波萃取、超声提取和超声探针提取法具有提取时间短、砷化合物形态损失少、提取效率高等优点,但其成本较高。振荡提取和加热提取成本低,但处理时间长,易造成砷化合物形态的转化和损失。因此各实验室需结合实际情况,根据不同样品基质中所含的砷化合物形态,选用合适的提取剂和提取方法,有效地将各种砷化合物形态从样品中提取出来进行分析测定。

3 食品中的砷化合物存在形式

根据文献对海产品、大米、饲料及畜禽肉产品和食用菌中主要砷化合物形态、前处理方法和分离检测方法进行了总结,不同样品基质的砷化合物形态和分离所需的色谱条件见表 1。

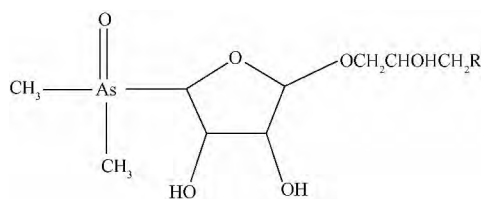
表 1 不同样品基质的砷化合物形态和分离所需的色谱条件

Table 1 Arsenic species in different sample matrixs and the chromatographic condition of separation

| 样品基质 | 砷化合物形态 | 色谱柱 | 流动相 | 参考文献 |
|------------|--|---|--|------|
| 鱼类 | AsB、AsC | Hamilton PRP-X100 | Milli-Q water, 用盐酸调 pH=4.0 | [30] |
| | As(III)、DMA、MMA、As(V) | | 17.5 mmol/L 磷酸缓冲液, pH=7.0 | |
| 双壳类、鱼类 | TMAO、AsB、AsC、TETRA | Adsorbosphere SCX | 2.5 mmol/L 吡啶, pH=2.65 | [23] |
| | As(III)、DMA、MMA、As(V) | Hamilton PRP-X100 | 20 mmol/L NH ₄ H ₂ PO ₄ , pH=6.0 | |
| 龙虾 | AsB、AsC、As(V)、As(III)、DMA、MMA | Hamilton PRP-X100 | A: 15 mmol/L (NH ₄) ₂ CO ₃ , pH=8.5 | [31] |
| | | | B: 50 mmol/L (NH ₄) ₂ CO ₃ , pH=8.5 | |
| 海带、羊栖菜、浒苔等 | As(III)、MMA、DMA、As(V)、AsB、AsC、砷糖-1、2、3、4 | Hamilton PRP-X100 | A: H ₂ O ₂ | [32] |
| | | | B: 50 mmol/L (NH ₄) ₂ CO ₃ , pH=9.5 | |
| 海藻 | 砷糖-1、2、3、4、As(III)、MMA、DMA、As(V)、AsB | Supelcosil SAX1; Superdex Peptide HR 10/30 column | 5~30 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH=6 | [33] |
| | | | 1% 乙酸水溶液, pH=3 | |
| 海藻 | 砷糖-1、2、3、4 和 DMA | Hamilton PRP-X100 | 20 mmol/L NH ₄ H ₂ PO ₄ , 用氨水调 pH=5.6 | [34] |
| | | Ionosphere-C | 20 mmol/L 吡啶, 用甲酸调 pH=2.6 | |
| 大米 | As(III)、As(V)、DMA、MMA | Hamilton PRP-X100 | 15 mmol/L K ₂ HPO ₄ , pH=6.0 | [35] |
| 大米 | As(III)、As(V)、DMA、MMA、AsB、AsC | Hamilton PRP-X100 | 20 mmol/L NH ₄ H ₂ PO ₄ , 用氨水调 pH=5.6 | [36] |
| 大米 | As(V)、DMA、MMA | Hamilton PRP-X100 | 10 mmol/L 丙二酸, 用氨水调 pH=5.6 | [37] |
| 饲料 | p-ASA、3-NHPAA、4-NPAA | Phenomenex Luna C ₁₈ | 0.1% 甲酸和 0.05 mmol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (90:10) | [38] |
| 饲料 | p-ASA、3-NHPAA、4-NPAA、p-UPAA | Zorbax SB-Aq C ₁₈ | 1% 乙酸-甲醇 (97:3, V/V) | [39] |
| 鸡肝 | 3-NHPAA | Nova-Pak R C ₁₈ | 0.05 mmol/L 磷酸二氢钾-甲醇-10% 乙酸 (80:10:10, V/V/V) | [40] |
| 鸡肉、鸡肝 | AsB、AsC、DMA、As(III)、MMA、As(V)、AsA | Dionex IonPac AS 19 | A: 水 B: 50 mmol/L 碳酸铵, pH=9.7 | [15] |
| | | | 梯度洗脱 | |
| 蘑菇 | As(III)、MMA、DMA、As(V) | Hamilton PRP-X100 | 15 mmol/L KH ₂ PO ₄ , pH=6.0 | [41] |
| | AsB、AsC、TMAO、TETRA | Hamilton PRP-X200 | 10 mmol/L HCl, pH=2.03 | |
| 紫蜡菇 | As(III)、MMA、DMA、As(V) | IC Sec ION-420 | 45 mmol/L (NH ₄) ₂ CO ₃ + 3% 甲醇, pH=10.3 | [42] |
| | DMA、AsB、TMAO | | 5 mmol/L 吡啶甲酸盐溶液 + 3% 甲醇, pH=2.7 | |

3.1 海产品中砷化合物形态

海洋生物中有机砷形态的含量较高,海洋动物中主要以 AsB 形式存在^[43-45],如鱼^[46]、软体动物^[46-48]和节肢动物^[46],且占总砷含量的 80% 以上^[43,49]。无机砷在海洋动物中的含量很少,一般小于总砷的 2%^[50]。海洋动物体内也发现了痕量的 DMA、MMA 和 AsC^[45,51-54]。海藻中含有丰富的砷糖,主要的 4 种结构如图 1 所示。在海洋环境中砷的代谢过程是经海藻将砷酸盐合成砷糖,再由海洋动物合成为 AsB^[55]。在许多海洋动物中也发现了三甲基胂氧化物(TMAO)^[45,56-57],其原因尚不明了。我国 GB 2762—2012《食品中污染物限量》^[58]对水产动物及其制品(鱼类及其制品除外)和鱼类及其制品的无机砷限量(以 As 计)进行规定,其限量值分别为 0.5 和 0.1 mg/kg。仅测定海产品中的总砷已不能满足实际工作要求。



1. R = OH; 2. R = OP(O)(OH)OCH₂CH(OH)CH₂OH;
3. R = SO₃H; 4. R = OSO₃H

图 1 砷糖的四种结构

Figure 1 The four structures of arsenic sugar

Mato-Fernández 等^[30]利用加压液液萃取法,以甲醇水混合液提取海洋生物样品(蚌和鱼类)和标准参考物(DORM-2,角鲨鱼)中的砷化合物形态;以 17.5 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH = 7.0)作流动相分离 As(III)、As(V)、MMA 和 DMA,以超纯水(pH = 4.0)作流动相分离 AsB 和 AsC,用紫外消解-氢化物发生-原子荧光法(UV-HG-AFS)进行了检测。Schaeffer 等^[23]以水作提取液,震荡 14 h,离心,上清液过滤后;采用液相色谱-光氧化-氢化物发生-原子荧光法(LC-PO-HG-AFS)测定海产品中 8 种砷化合物形态,结果显示 AsB 是其主要砷化合物形态,As(III)、DMA 和 AsC 为痕量级,在紫贻贝中检出砷糖。Brisbin 等^[31]用水作提取液,分别采用微波辅助提取法和超临界水提取法对标准物质(TORT-2)和龙虾组织中的砷形态进行提取,用 HPLC-ICP-MS 进行测定,发现 AsB 是主要存在形态;也存在 AsC、DMA、MMA 和 As(V),还发现两个未知砷形态。

高杨等^[32]选用 1:1(V/V)的甲醇-水提取海带、羊栖菜等样品中的砷化合物形态,重复 3 次,合并上清液,用快速逆流浓缩仪 65 °C 条件下浓缩,再用超纯水定重后;采用 HPLC-ICP-MS 进行分析,发现 3 种未

知的砷化合物,利用高效液相色谱-飞行时间质谱法(HPLC-TOF-MS)对其进行定性,确定为砷糖类物质。McSheehy 等^[33]以甲醇-水(1:1,V/V)提取海藻中砷形态,超声处理 20 min,转移提取液,再用甲醇-水(9:1,V/V)复提取,40 °C 减压旋转蒸干,用水溶解定容;在阴离子交换色谱(AE)与 ICP-MS 联用分析中发现 As(III)和 MMA 与砷糖同一时间洗脱出来,保留时间重现性差,受基质影响较大等,因此,凭保留时间对样品中砷化合物进行定性存在较大局限性。通过采用尺寸排阻色谱(SEC)与 ICP-MS 联用消除基质干扰,可以对羊栖菜中的砷糖进行准确分析测定,并与尺寸排阻色谱-电喷雾电离串联质谱(SEC-ESI-MS/MS)的分析结果进行了比较。Madsen 等^[50]建立了 HPLC-ICP-MS 和液相色谱-电喷雾电联质谱(LC-ESMS)定量分析海藻中的砷糖-1,2,3,4 和 DMA。

由于缺乏砷糖的标准物质,国内这方面的工作开展较少。

3.2 大米中砷化合物形态

联合国粮食及农业组织(FAO)在 2003 年指出中国是世界上最大的稻米生产国。据 Abedin 等^[59]报道,由于地下水受到严重的砷污染,而地下水又是灌溉水稻的一种重要水源,水稻中砷的污染不容忽视;因此,有必要对大米中的砷形态进行测定。土壤和地下水中的砷化合物形态主要是无机砷。由于微生物对无机砷的甲基化作用,土壤中也可能存在有机砷^[60]。在水稻组织和谷粒中发现主要的砷化合物形态是 As(V)、As(III)、DMA 和 MMA^[61-63]。我国 GB 2762—2012《食品中污染物限量》^[58]中规定谷物(稻谷除外)、谷物碾磨加工品(糙米、大米除外)中总砷限量均为 0.5 mg/kg,稻谷、糙米、大米中的无机砷限量(以 As 计)为 0.2 mg/kg。

姚晶晶等^[35]建立了以 1:1(V/V)的甲醇-水作提取液,70 °C 下超声 1 h,冷却离心,氮吹,过 0.45 μm 微孔滤膜,高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光法(HPLC-HG-AFS)测定了大米中的无机砷,加标回收率在 95.7% ~ 107.5% 之间,RSD 均 < 5%。Mihucz 等^[36]利用 α-淀粉酶和蛋白酶 XIV 酶催化提取了水洗和烹饪后的大米样品中的砷化合物形态,采用 HPLC 与扇形磁场电感耦合等离子质谱(ICP-SF-MS)联用技术对砷化合物形态进行定量分析,推断 As(III)在水洗和烹饪后可能会转化成 As(V)。Raber 等^[37]报道了用三氟乙酸-H₂O₂提取大米、鱼、和小麦样品中的 As(V)、DMA、MMA,用 HPLC-ICP-MS 对砷化合物形态进行分离测定,提效率 > 90%,回收率 > 95%。

3.3 饲料及畜禽肉产品中砷形态

1907 年,Erlich 等^[64]发现了洒尔佛散,从此砷

化合物开始应用于现代人类医学,主要用于治疗梅毒,同时研发了其他类似的砷化合物用于多种药用。在 1946 年,Morehouse 等^[65]发现 3-NHPAA 能够控制家禽中的盲肠球虫病。Pergantis 等^[66]指出 *p*-ASA、*p*-NPAA、*p*-UPAA 也可以作为生长促进剂,提高饲料转化率,提高产蛋量,促使羽毛鲜亮,增加色素沉着。美国食品和药品管理局(FDA)于 1964 年允许洛克沙肿用于鸡饲料,1983 年正式批准用作猪、鸡的促生长剂。我国农业部 1996 年批准了有机砷制剂的使用,随后我国逐渐开始大量生产,并广泛用于畜禽饲养业^[21]。

最近研究发现,高剂量的有机砷制剂有一定的毒副作用,并且有机砷制剂可能在动物体内发生转化形成有害的砷形态。有机砷制剂主要蓄积在动物的肝、肾、脾、骨骼、皮肤、毛发中,砷与巯基酶结合使其失活,导致细胞代谢紊乱,使动物中枢神经系统失调^[67]。有机砷制剂在制备过程中可能会残留少量的无机砷,无机砷在肝、肾等脏器中会产生蓄积;另外将有机砷制剂含量过高的畜禽粪便作为肥料用于农田当中就会造成土壤污染,进而污染到粮食作物。

我国 GB 2762—2012《食品中污染物限量》^[58]中规定肉及肉制品中的无机砷限量(以 As 计)为 0.5 mg/kg。我国食品卫生及饲料卫生标准均对各种食品和饲料原料、产品中的砷化合物含量作了严格规定。如规定鸡蛋中的 *p*-ASA 允许残留限量为 0.5 mg/kg,日本肯定列表也规定了各种禽肉产品中的 3-NHPAA 和 *p*-NPAA 的允许残留量为 0.5 和 2 mg/kg^[68]。基于此有机砷制剂的检测方法也在不断研究中。

肖亚兵等^[38]采用 1:1 (V/V) 的甲醇-水作提取液,采用强阴离子固相萃取柱净化样品,建立了固相萃取-高效液相色谱法同时测定饲料中的 *p*-ASA、*p*-NPAA 和 3-NHPAA 的分析方法。三种砷制剂的定量线性范围为 0.5 ~ 50 mg/L,相关系数均 > 0.999;检出限分别为 0.095、0.18、0.19 mg/kg; RSD < 0.51%。CHEN 等^[39]采用 1% 乙酸-甲醇(90:10, V/V)作提取液,漩涡,超声,离心,加 2% Cu₂SO₄ 沉淀蛋白,再漩涡,离心,之后进行固相萃取。利用高效液相色谱测定了鸡饲料和猪饲料中 *p*-ASA、3-NHPAA、*p*-NPAA 和 *p*-UPAA,加标回收率在 81.2% ~ 91.3% 之间。曹庆云等^[40]建立了 HPLC 测定鸡肝中 3-NHPAA 含量,样品经匀浆、甲醇提取、高氯酸去蛋白后,用 Nova-Pak 色谱柱分离。杨丽君等^[15]采用人工胃液作为提取液对鸡肉样品进行超声处理,以碳酸铵溶液和水作为流动相,用阴离子

分析柱进行分离;建立了同时测定 *p*-ASA、As(V)、As(III)、DMA、MMA、AsC 和 AsB 等 7 种砷形态的 HPLC-ICP-MS 分析方法。

3.4 食用菌中砷化合物形态

食用菌不仅味美,而且营养丰富,常被人们称作健康食品。在提供微量元素同时也含有危害人体健康的砷、镉、铅、汞等^[69-70]重金属。我国食用菌标准 GB 7096—2003《食用菌卫生标准》^[71]中规定鲜食用菌和干食用菌中的总砷限量分别为 0.5 和 1.0 mg/kg。据报道^[72-73],在食用菌里已经检测出的砷形态包括 As(III)、As(V)、MMA、DMA、TMAO 及 AsB 和 AsC。

Šlejkovec 等^[41]用甲醇-水(9:1, V/V)提取,振摇 12 h,离心、旋转蒸干,再用水复溶,过 0.22 μm 转蒸滤膜后,经阴-阳离子交换柱分离了蘑菇中的砷形态,采用 UV-HG-AFS 进行了测定。Larsen 等^[42]用甲醇-水(9:1, V/V),微波辅助提取,分析了食用菌中的砷化合物形态,发现紫蜡菇中存在 AsB 和 TMAO,还有未知的砷化合物形态。

目前,食用菌中砷化合物形态的报道较少,需要进一步关注和研究。

4 现有标准物质

砷化合物形态的种类繁多,但目前砷化合物形态的标准物质还较少,远远不能满足日益发展的检测工作需求。目前国内在售的标准物质有 As(III)、As(V)、MMA、DMA、AsB 和 AsC,主要为中国计量科学研究院研制。对于 *p*-ASA、*p*-NPAA、*p*-HPAA 和 3-NHPAA 这些标准品或对照品主要购于国外公司。

美国 Sigma-Aldrich 公司在售 As(III)、As(V)、MMA、DMA 和 AsB。日本和光纯药工业株式会在售 *p*-NPAA,常用的 *p*-ASA、*p*-NPAA 和 3-NHPAA 对照品多来自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。

由于砷糖结构比较复杂,一般是从天然产物中提取纯化制备,目前未见商业机构有售。

5 展望

研究砷化合物的形态对了解砷在环境中的迁移转化、动植物体内的代谢规律以及毒理等方面具有十分重要的意义。砷化合物形态的分析方法已经应用到临床、食品和环境等领域。由于分析技术的局限,GB 2762—2012《食品中污染物限量》仅对毒性较大的无机砷进行了限制,对一些低毒性的砷化合物还没有做出明确的规定。尽管 2009 年也颁布了相应的标准方法 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》^[74],标准检验方法 GB/T 5009.11—2003《食品

中总砷及无机砷的测定》^[75]也在修订中,但由于砷化合物形态的多样性及样品基质的复杂性,还远远不能满足工作的需要。目前砷化合物形态分析关键问题是样品提取时,保证有足够的提取效率及各形态之间不发生转化,分离时保证有足够的分离度,检测时有足够的灵敏度,另外相应标准物质的缺乏,这些都将是今后研究的方向和亟需解决的问题。

参考文献

- [1] Bagla P, Kaiser J. India's spreading health crisis draws global arsenic experts[J]. Science, 1996, 274(5285): 174-175.
- [2] National Research Council. Arsenic in drinking water [C]. National Academy Press, Washington, DC, 1999.
- [3] Bates M N, Smith A H, Hopenhayn-Rich C. Arsenic ingestion and internal cancers: a review [J]. American Journal of Epidemiology, 1992, 135(5): 462-476.
- [4] Hopenhayn-Rich C, Biggs M L, Fuchs A, et al. Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina [J]. Epidemiology, 1996, 7(2): 117-124.
- [5] Prohaska T, Stingeder G, Cornelis R, et al. Arsenic and arsenic species in environment and human nutrition [M]. John Wiley & Sons, New York, 2005.
- [6] GONG Z L, LU X F, MA M S, et al. Arsenic speciation analysis [J]. Talanta, 2002, 58(1): 77-96.
- [7] Wangkarn S, Pergantis S A. High-speed separation of arsenic compounds using narrow-bore high-performance liquid chromatography on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15(6): 627-633.
- [8] Do B, Robinet S, Pradeau D, et al. Speciation of arsenic and selenium compounds by ion-pair reversed-phase chromatography with electrothermal atomic absorption spectrometry: Application of experimental design for chromatographic optimization [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 918(1): 87-98.
- [9] Le S X C, Cullen W R, Reimer K J. Speciation of arsenic compounds in some marine organisms [J]. Environmental Science & Technology, 1994, 28(9): 1598-1604.
- [10] CHEN B B, HU B, HE M, et al. Synthesis of mixed coating with multi-functional groups for in-tube hollow fiber solid phase microextraction-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry Speciation of arsenic in human urine [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1227: 19.
- [11] Ackley K L, B'Hymer C, Sutton K L, et al. Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1999, 14(5): 845-850.
- [12] Le X C, LI X F, LAI V, et al. Simultaneous speciation of selenium and arsenic using elevated temperature liquid chromatography separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection [J]. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 1998, 53(6): 899-909.
- [13] ZHENG J, Kosmus W, Pichler-Semmelrock F, et al. Arsenic speciation in human urine reference materials using high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 1999, 13(3): 150-156.
- [14] Brima E I, Haris P I, Jenkins R O, et al. Understanding arsenic metabolism through a comparative study of arsenic levels in the urine, hair and fingernails of healthy volunteers from three unexposed ethnic groups in the United Kingdom [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 216(1): 122-130.
- [15] 杨丽君, 胡巧茹, 郭伟, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用同时测定鸡肉与鸡肝中的 7 种砷形态 [J]. 色谱, 2011, 29(5): 394-398.
- [16] Taniguchi T, TAO H, Tominaga M, et al. Sensitive determination of three arsenic species in water by ion exclusion chromatography-hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1999, 14(4): 651-655.
- [17] Nakazato T, Taniguchi T, TAO H, et al. Ion-exclusion chromatography combined with ICP-MS and hydride generation-ICP-MS for the determination of arsenic species in biological matrices [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15(12): 1546-1552.
- [18] 赵云强, 郑进平, 杨明伟, 等. 毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱法测定藻类中 6 种不同形态的砷化合物 [J]. 色谱, 2011, 29(2): 111-114.
- [19] 陈玉红, 米健秋, 徐陆正, 等. 毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱法联用(CE-ICP-MS)测定 8 种砷的化合物 [J]. 环境化学, 2011, 30(7): 1374-1377.
- [20] 齐慧, 贾瑞琳, 陈铭学. 食品中砷形态分析研究进展 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(36): 277-281.
- [21] 王培龙, 田静, 苏晓鸥. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱测定饲料中有机砷的研究 [J]. 分析化学, 2008, 36(2): 215-218.
- [22] Dagnac T, Padró A, Rubio R, et al. Optimisation of the extraction of arsenic species from mussels with low power focused microwaves by applying a Doehlert design [J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 364(1-3): 19-30.
- [23] Schaeffer R, Soeroes C, Ipolyi I, et al. Determination of arsenic species in seafood samples from the Aegean Sea by liquid chromatography-(photo-oxidation)-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 547(1): 109-118.
- [24] Soeroes Cs, Kienzl N, Ipolyi I, et al. Arsenic uptake and arsenic compounds in cultivated *Agaricus bisporus* [J]. Food Control, 2005, 16(5): 459-464.
- [25] HUANG J H, Fecher P, Ilgen G, et al. Speciation of arsenite and arsenate in rice grain-verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey [J]. Food Chemistry, 2012, 130(2): 453-459.
- [26] SUN G X, Williams P N, ZHU Y G, et al. Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments [J]. Environment International, 2009, 35(3): 473-475.
- [27] Moreda-Piñeiro A, Moreda-Piñeiro J, Herbello-Hermelo P, et al. Application of fast ultrasound water-bath assisted enzymatic hydrolysis-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry procedures for arsenic

- speciation in seafood materials [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(39): 6970-6980.
- [28] Sanz E, Muñoz-Olivas R, Cámara C. A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 535(1-2): 227-235.
- [29] Heitkemper D T, Vela N P, Stewart K R, et al. Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2001, 16(4): 299-306.
- [30] Mato-Fernández M J, Otero-Rey J R, Moreda-Piñeiro J, et al. Arsenic extraction in marine biological materials using pressurised liquid extraction [J]. *Talanta* 2007, 71(2): 515-520.
- [31] Brisbin J A, B' Hymer C, Caruso J A. A gradient anion exchange chromatographic method for the speciation of arsenic in lobster tissue extracts [J]. *Talanta* 2002, 58(1): 133-145.
- [32] 高杨, 曹焯, 余晶晶, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定干海产品中砷化学形态 [J]. *分析化学*, 2009, 37(12): 1738-1742.
- [33] McSheehy S, Szpunar J. Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection [J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2000, 15: 79-87.
- [34] Madsen A D, Goessler W, Pedersen S N, et al. Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC-electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies [J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, 15(6): 657-662.
- [35] 姚晶晶, 袁友明, 王明锐, 等. 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光法测定大米中的 4 种砷形态 [J]. *分析仪器* 2012(4): 37-39.
- [36] Mihucz V G, Tatár E, Virág I, et al. Arsenic removal from rice by washing and cooking with water [J]. *Food Chemistry* 2007, 105(4): 1718-1725.
- [37] Raber G, Stock N, Hanel P, et al. An improved HPLC-ICP-MS method for determining inorganic arsenic in food: application to rice, wheat and tuna fish [J]. *Food Chemistry* 2012, 134(1): 524-532.
- [38] 肖亚兵, 韦玮, 高健会, 等. 固相萃取/高效液相色谱法对饲料中阿散酸、硝苯砷酸和洛克沙砷的同时测定 [J]. *分析测试学报* 2008, 27(9): 964-967.
- [39] CHEN D M, ZHANG H H, TAO Y F, et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of four organoarsenic compounds in the feeds of swine and chicken [J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(11-12): 716-720.
- [40] 曹庆云, 颜惜玲, 周武艺, 等. 高效液相色谱测定鸡肝中洛克沙砷的方法研究 [J]. *应用化工* 2005, 34(10): 640-643.
- [41] Šlejkovec Z, Van Elteren J T, Byrne A R. A dual arsenic speciation system combining liquid chromatographic and purge and trap-gas chromatographic separation with atomic fluorescence spectrometric detection [J]. *Analytica Chimica Acta* 1998, 358(1): 51-60.
- [42] Larsen E H, Hansen M, Gössler W. Speciation and health risk considerations of arsenic in the edible mushroom *Laccaria amethystina* collected from contaminated and uncontaminated locations [J]. *Applied Organometallic Chemistry* 1998, 12(4): 285-291.
- [43] Cullen W R, Reimer K J. Arsenic speciation in the environment [J]. *Chemical Reviews* 1989, 89(4): 713-764.
- [44] Shibata Y, Morita M, Fuwa K. Selenium and arsenic in biology: their chemical forms and biological functions [J]. *Advances in Biophysics* 1992, 28: 31-80.
- [45] Francesconi K A, Edmonds J S. Arsenic and marine organisms [J]. *Advances in Inorganic Chemistry* 1996, 44: 147-189.
- [46] Francesconi K A, Micks P, Stockton R A, et al. Quantitative determination of arsenobetaine, the major water-soluble arsenical in three species of crab, using high pressure liquid chromatography and an inductively coupled argon plasma emission spectrometer as the arsenic-specific detector [J]. *Chemosphere*, 1985, 14(10): 1443-1453.
- [47] Shiomi K, Shinagawa A, Yamanaka H, et al. Purification and identification of arsenobetaine from the muscle of an octopus, *Paroctopus dofleini* [J]. *Bulletin of The Chemical Society of Japan* 1983, 49: 79.
- [48] Morita M, Shibata Y. Speciation of arsenic compounds in marine life by high performance liquid chromatography combined with inductively coupled argon plasma atomic emission spectrometry [J]. *Analytical Sciences* 1987, 3: 575-577.
- [49] Maher W, Butler E. Arsenic in the marine environment [J]. *Applied Organometallic Chemistry* 1988, 2(3): 191-214.
- [50] Edmonds J S, Francesconi K A. Arsenic in seafoods: human health aspects and regulations [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1993, 26(12): 665-674.
- [51] Larsen E H, Pritzl G, Hansen S H. Arsenic speciation in seafood samples with emphasis on minor constituents: an investigation using high-performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1993, 8: 1075-1084.
- [52] Caroli S, LaTorre F, Petrucci F, et al. On-line speciation of arsenical compounds in fish and mussel extracts by HPLC-ICP-MS [J]. *Environmental Science and Pollution Research* 1994, 1(4): 205-208.
- [53] Christakopoulos A, Hamasur B, Norin H, et al. Quantitative determination of arsenocholine and acetylarsenocholine in aquatic organisms using pyrolysis and gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Biomedical Mass Spectrometry* 1988, 15(2): 67-74.
- [54] Norin H, Christakopoulos A. Evidence for the presence of arsenobetaine and another organoarsenical in shrimps [J]. *Chemosphere* 1982, 11(3): 287-298.
- [55] Francesconi K A, Edmonds J S. Arsenic and marine organisms [J]. *Advances in Inorganic Chemistry* 1997, 44: 147.
- [56] Cullen W R, Dodd M. Arsenic speciation in clams of British Columbia [J]. *Applied Organometallic Chemistry* 1989, 3(1): 79-87.
- [57] Edmonds J S, Francesconi K A. Trimethylarsine oxide in estuary catfish (*Cnidogobius macrocephalus*) and school whiting (*Sillagobassensis*) after oral administration of sodium arsenate; and as a natural component of estuary catfish [J]. *Science of the Total Environment* 1987, 64(3): 317-323.
- [58] 中华人民共和国卫生部. GB 2762—2012 食品中污染物限量[S]. 北京: 中国标准出版社 2012.
- [59] Abedin M J, Feldmann J, Meharg A A. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants [J]. *Plant Physiology* 2002, 128(3): 1120-1128.
- [60] Takamatsu T, Aoki H, Yoshida T. Determination of arsenate, arsenite, monomethylarsonate, and dimethylarsinate in soil polluted with arsenic [J]. *Soil Science* 1982, 133(4): 239-246.

- [61] Williams P N ,Price A H ,Raab A ,et al. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure [J]. Environmental Science and Technology 2005 ,39(15) :5531-5540.
- [62] Abedin M J , Cresser M S , Meharg A A , et al. Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Environmental Science and Technology 2002 ,36(5) :962-968.
- [63] ZHU Y G ,SUN G X ,LEI M ,et al. High percentage inorganic arsenic content of mining impacted and nonimpacted Chinese rice [J]. Environmental Science and Technology 2008 ,42(13) :5008-5013.
- [64] Erlich P , Bertheim D. Über *p*-Aminophenylarsinsäure [J]. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 1907 ,40(3) :3292-3297.
- [65] Morehouse N F ,Mayfield O J. The effect of some arylarsonic acids on experimental coccidiosis infection in chickens [J]. J Parasitol , 1946 ,32: 20-24.
- [66] Pergantis S A , Cullen W R , Chow D T , et al. Liquid chromatography and mass spectrometry for the speciation of arsenic animal feed additives [J]. Journal of Chromatography A , 1997 ,764(2) :211-222.
- [67] 刘顺良 张喜旺 郭翠英. 银杏叶开发应用研究现状 [J]. 中国药业 2001 ,10(5) :46-47.
- [68] 食品中农业化学品残留限量编委会. 食品中农业化学品残留限量 [M]. 北京: 中国标准出版社 2006: 893 ,1108.
- [69] Benbrahim M ,Denaix L ,Thomas A L ,et al. Metal concentrations in edible mushrooms following municipal sludge application on forest land [J]. Environmental Pollution 2006 ,144(3) :847-854.
- [70] Rácz L ,Oldal V. Investigation of uptake processes in a soil/ mushroom system by AES and AAS methods [J]. Micro Chemical Journal 2000 ,67(1-3) :115-118.
- [71] 中华人民共和国卫生部. GB 7096—2003 食用菌卫生标准 [S]. 北京: 中国标准出版社 2003.
- [72] Byrne A R ,Tušek-Žnidarič M. Arsenic accumulation in the mushroom *Laccaria amethystina* [J]. Chemosphere 1983 ,12(7-8) :1113-1117.
- [73] Koch I ,WANG L X ,Reimer K J ,et al. Arsenic species in terrestrial fungi and lichens from Yellowknife , NWT , Canada [J]. Applied Organometallic Chemistry 2000 ,14(5) :245-252.
- [74] 中华人民共和国卫生部. 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 [S]. 北京: 中国标准出版社 2009.
- [75] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.11—2003 食品中总砷及无机砷的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社 2003.

综述

染料木素抗肿瘤衍生物的研究进展

孙军凤¹ 周泉城²

(1. 淄博市张店区疾病预防控制中心 ,山东 淄博 255033;
2. 山东理工大学农业工程与食品科学学院 ,山东 淄博 255049)

摘 要: 染料木素具有雌激素样作用 ,具备抗肿瘤、防止骨质疏松、抗氧化、降血脂、抗动脉粥样硬化等多种生物活性 ,近年来已逐渐成为国内外学者研究的热点。本文着重对染料木素抗肿瘤衍生物的研究进展进行了综述 ,以促进其研究和应用 ,并为进行抗肿瘤前药分子设计提供依据。

关键词: 染料木素; 衍生物; 抗肿瘤; 生物活性; 化学修饰; 保健食品

中图分类号: R155; O622. 4; TS213 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014) 03-303-04

DOI: 10. 13590/j. cjfh. 2014. 03. 023

Progress on genistein antitumor derivatives

SUN Jun-feng , ZHOU Quan-cheng

(Zhangdian District Center for Disease Control and Prevention , Shandong Zibo 255033 , China)

Abstract: Genistein has a variety of biological activities , such as estrogen , anti-tumor , prevent osteoporosis , anti-oxidation , lipid-reduction , anti-atherosclerosis and other physical activity. It has become a hot spot for worldwide in recent years. This review focuses on the anti-tumor activity of genistein derivatives , in order to facilitate its research and applications , and provide the basis for molecular design for the purpose of anti-tumor prodrug.

Key words: Genistein; derivative; anti-tumor; biological activity; chemical modification; health food

收稿日期: 2013-10-16

作者简介: 孙军凤 女 工程师 研究方向为食品安全与药品卫生 E-mail: 4566953@ qq. com

通讯作者: 周泉城 男 副教授 研究方向为功能性食品 E-mail: zhouquancheng@ 126. com