三疣梭子蟹和虾蛄中镉的化学形态分析

赵艳芳[1,2]，尚德荣[1,2]，宁劲松[1,2]，翟毓秀[1,2]，丁海燕[1,2]，盛晓风[1,2]
（1.农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室，中国水产科学研究院黄海水产研究所，山东青岛 266071）
（2.农业部水产品质量安全风险评估实验室（青岛），山东青岛 266071）

摘要：本文针对三疣梭子蟹和虾蛄等甲壳类动物具有富集镉的特性，研究了运用体积排阻色谱-高效液相色谱电感耦合等离子体质谱联用技术（SEC-HPLC-ICP-MS）首次对三疣梭子蟹和虾蛄可食用组织中镉的形态进行分析，研究结果显示梭子蟹肝胰腺中总镉含量高于肌肉组织，且不同样品总镉含量差异很大，镉的形态也存在很大差异。总镉含量高的梭子蟹肝胰腺组织中 Cd 主要以 Cd-MT（金属硫蛋白）形态存在，而总镉含量低的梭子蟹肝胰腺组织中 Cd 主要以 Cd-Cys（半胱氨酸），梭子蟹的肌肉组织中 Cd 主要以 Cd-Cys 形态存在。虾蛄的肌肉组织中 Cd 主要以 Cd-MT 形态存在。基于本文的研究结论，建议对我国国家标准中甲壳类镉的限量标准做进一步评估和再评价研究。

关键词：梭子蟹；虾蛄；镉；化学形态分析
文章篇号：1673-9078(2017)5-259-264 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.041

Chemical Speciation Analysis of Cadmium in *Portunus trituberculatus* and *Oratosquilla oratoria*

ZHAO Yan-fang[1,2], SHANG De-rong[1,2], NING Jin-song[1,2], ZHAI Yu-xiu[1,2], DING Hai-yan[1,2], SHENG Xiao-feng[1,2]
(1.Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, P. R. China; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China) (2.Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products (Qingdao), Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China)

Abstract: Crustaceans are known to accumulate high concentrations of cadmium. Chemical speciation analysis of cadmium in edible tissues of two crustaceans (*P. trituberculatus* and *O. oratoria*) was performed using size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC-HPLC-ICP-MS). The results showed that the total cadmium content in the liver and pancreas of *P. trituberculatus* was higher than that in the muscle; in addition, significant differences were found between the total cadmium content in different samples and in the chemical forms of cadmium in these samples. In the liver and pancreas of *P. trituberculatus* samples with high cadmium content, cadmium mainly existed in the form of Cd-MT (metallothionein). Cd-Cys (cysteine) was the major form of cadmium in the liver and pancreas of samples with low cadmium content, as well as in the muscle tissues. Cadmium in the muscle tissues of *O. oratoria* was found to be mainly in the form of Cd-MT. These results indicated that further evaluation and assessment of the national standards in the limits of cadmium levels in crustaceans might be necessary.

Key words: *P. trituberculatus*; *O. oratoria*; cadmium; chemical speciation

三疣梭子蟹（*Portunus trituberculatus*）属于甲壳类动物，有较高的营养价值和经济价值，是我国沿海重要的经济蟹类。虾蛄，俗名琵琶虾、皮皮虾，属于节肢动物门甲壳动物亚门软甲纲掠虾亚纲口足目虾蛄科，为底栖穴居虾类。它是一种营养丰富、汁鲜肉嫩的海味食品，深受广大消费者青睐。近年来，随着鱼类资源的严重衰退，甲壳类的比重逐渐提高，如虾蛄（*Oratosquilla oratoria*）已经成为莱州湾渔获量最高的种类之一[1]。但是随着工农业生产的快速发展，我国沿海水域的重金属污染日益加重，直接影响水产品中重金属的含量。对国内外沿海水域经济水产品的重金属污染情况调查发现贝类、甲壳类中重金属的含量要远高于鱼类[2,3]。镉（Cadmium，Cd）是一种生物体非必需的有毒重金属，被美国毒物管理委员会(ATSDR)列为第六位危害人体健康的有毒物质。由于水生生物对镉的富集能力极强，镉已成为影响水产品食用安全的重要因素，对水产品中镉的检测成为水产

收稿日期：2016-06-30
基金项目：国家自然科学基金项目（41206101）
作者简介：赵艳芳（1979-），女，博士研究生，副研究员，研究方向：水产品质量安全
通讯作者：翟毓秀（1962-），男，研究员，研究方向：水产品质量安全

品质量安全控制的主要措施之一。方月华和林东明等发现蟹类中镉超标比较严重[4,5]。江晨洁等对全国 6 省市来自养殖和流通环节的 181 批次甲壳类水产品进行铅、镉含量的调查分析，结果表明铅、镉在肝胰脏中有明显的富集，且存在残留量超标现象[6]。王剑萍和申屠基康研究得出三疣梭子蟹中镉的含量远高于锯缘青蟹和中华绒螯蟹，超出国家标准中甲壳类限定值，并建议国家标准对甲壳类动物重金属镉限量做更细的区分和说明[7]。

镉在生物体内可以与蛋白质、有机酸等结合成有机镉形态存在，也可以离子态存在。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，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[8]。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，而目前尚未有梭子蟹和虾蛄中镉的形态分析研究。目前，已有 HPLC 与电感耦合等离子体质谱 ICP-MS[9]、电喷雾串联质谱 ES MS/MS[10~12]、飞行时间等离子体质谱 ICP-TOFMS[13]等联用分析生物体中镉的形态。由于体积排阻色谱分离（SEC-HPLC）与 ICP-MS 联用技术可以较准确的反应蛋白质以及其它巯基化合物在生物体内与元素的结合状况[14,15]，因此，本研究运用 SEC-HPLC-ICP 首次对三疣梭子蟹和虾蛄中的镉形态进行分析，以期为科学评价三疣梭子蟹和虾蛄中镉的食用风险分析提供技术支撑和重要的参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ICP-MS（ELAN DRC Ⅱ，Perkin-Elmer)，工作参数为：射频功率 1150 W，等离子体气流速 15 L/min，雾化气流速 0.94 L/min，透镜电压 7.00 V，辅助气流速 1.2 L/min。通过 Chromera 软件控制的触发接口电缆，以达到自动控制 HPLC 泵、自动进样器与 ICP-MS 联用，仪器自动积分，以峰面积计算含量。

有机镉形态分析条件：HPLC（Series 200，Perkin-Elmer），分离条件：TSK-GEL G3000 分离柱及 TSK-GEL^{TM}PWgruard Column 保护柱，流速：0.8 mL/min，进样量 80 μL，自动进样，采样时间 1500 s。标准溶液配制参照文献[16]：在氮气保护下配制 Cys-Cd 及 GSH-Cd 标准溶液，用于确定有机镉色谱峰保留时间。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 μm 滤膜过滤，超声 40 min 脱气。

1.2 样品中总镉含量测定

分别从市场随机挑选 20 个三疣梭子蟹和 20 个虾蛄样品，根据梭子蟹和虾蛄的可食用性处理样品，梭子蟹样品去壳，并去除蟹胃、内脏、鳃等非可食用部分，分离肌肉和肝胰腺等可食用组织匀浆后备用，虾蛄去壳去头后取可食肌肉部分匀浆后备用。分别称取约 5.0 g 梭子蟹和虾蛄样品于 100 mL 消化管中，分别加入 15 mL HNO_3 和 5.5 mL $HClO_4$ 浸泡 12 h，用控温消化炉消化。首先微热至无大量气泡产生后缓缓加热至 150~180 ℃消化，至无大量气泡产生，再在 200~250 ℃蒸发至近干（剩余消化液体积约为 1~2 mL），此时消化液应澄清透明或微带黄色视为消化完全，冷却后用超纯水定容至 100 mL 用于总镉测定。同时做试剂空白对照。总镉采用石墨炉原子吸收（AA600，Perkin-Elmer）测定，同时选择国家标准物质(GBW10050 大虾)为质控样品以保证检测准确性。

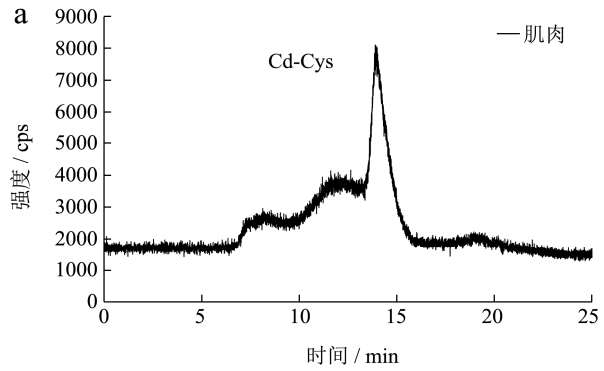
1.3 镉形态分析样品处理

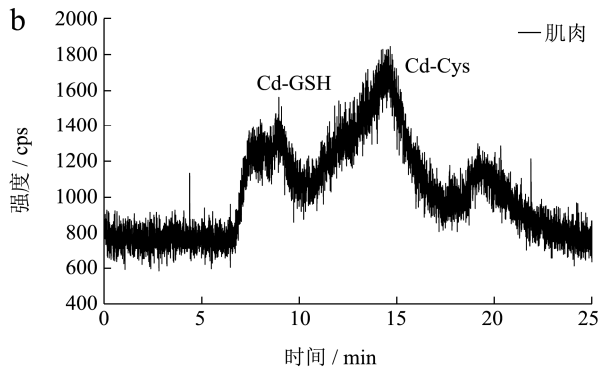
参照参考文献[16]，分别称取约 1.5 g 梭子蟹肌肉和肝胰腺两种组织和虾蛄肌肉组织，加入一定体积（*m/V*=1:20）经 4 ℃预冷的 10 mmol/L、pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液，用玻璃匀浆器在冰水浴条件下组织匀浆，取匀浆液于 8000 r/min 离心 20 min（4 ℃），取上清液，0.45 μm 滤膜过滤后上机进行镉的有机形态分析。

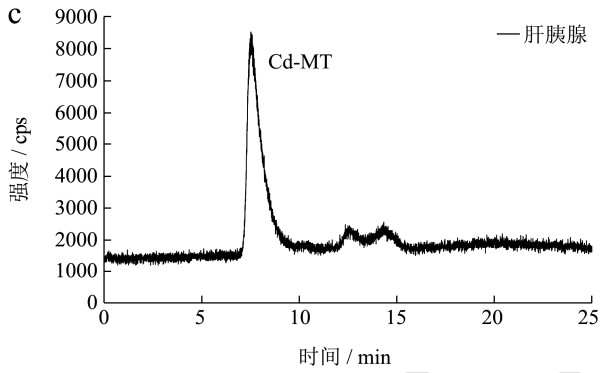
2 结果与分析

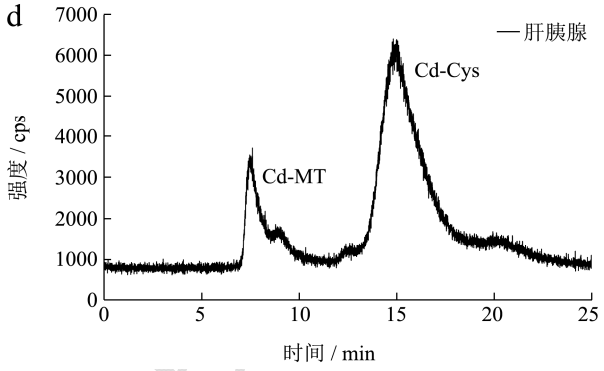
2.1 梭子蟹中镉的含量和形态分析

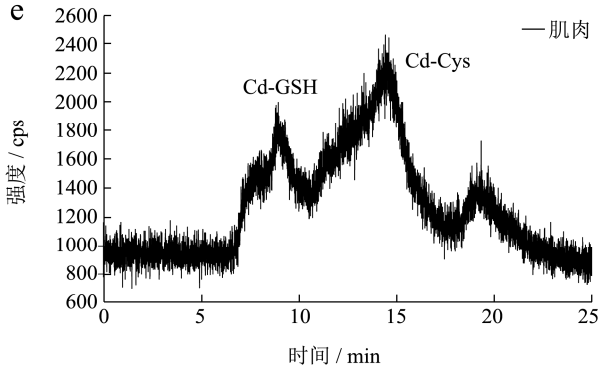
分别对梭子蟹肌肉和肝胰腺组织中镉的含量分析可见，肝胰腺中镉的含量高于肌肉组织。在分析的 20 个梭子蟹样品中，总镉平均含量为 2.79±2.27 mg/kg，肝胰腺和肌肉中总镉的平均含量分别为 3.97±2.20 和 0.88±0.44 mg/kg（见表 1）。总镉含量最高的样品肝胰腺中为 9.22 mg/kg，肌肉中为 1.94 mg/kg，总镉含量最低的样品肝胰腺中含量为 2.10 mg/kg，肌肉中为 0.46 mg/kg。已有研究表明三疣梭子蟹中、锯缘青蟹和中华绒螯蟹等肝胰腺中镉的含量最高，肌肉中含量最低[4,5]，与本文研究结果一致。肝胰腺是甲壳类动物重金属累积及解毒的主要器官，因此梭子蟹肝胰腺的重金属镉含量高于蟹其他部位。而梭子蟹的肝胰腺是被称为蟹黄/蟹膏的组成部分，也是重要的可食部分，因此对肝胰腺组织中镉进行形态分析具有重要意义。











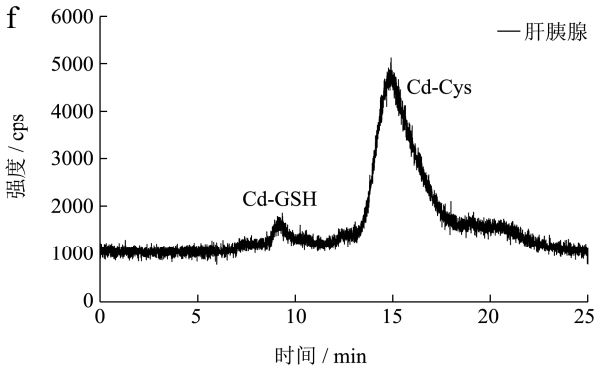


图 1 梭子蟹肌肉和肝胰腺组织中镉的有机形态分析谱图

Fig.1 Chromatograms of different Cd species in the muscle, liver, and pancreas of *P. trituberculatus*

注：a 表示样品 2；b 表示样品 19；c 表示样品 9。

表 1 梭子蟹不同部位及全蟹中总镉含量（mg/kg，湿重）

Table 1 Total Cd content in different tissues and the whole body of *P. trituberculatus* (mg/kg, wet weight)

样品编号	肝胰腺	肌肉	全蟹
1	6.42	1.39	5.64
2	9.22	1.94	8.57
3	2.52	0.64	1.52
4	2.41	0.55	1.35
5	7.48	1.42	5.68
6	8.84	1.88	7.86
7	2.62	0.56	1.55
8	3.93	0.61	2.79
9	2.10	0.46	1.06
10	2.24	0.83	1.32
11	4.06	1.12	3.28
12	2.18	0.46	1.22
13	2.47	0.78	1.24
14	2.22	0.68	1.25
15	2.42	0.65	1.40
16	2.24	0.53	1.36
17	3.98	0.61	1.25
18	3.03	0.66	1.21
19	4.02	0.82	2.82
20	5.08	1.10	3.51

对提取液中的镉进行形态分析发现，总镉含量高的样品中镉的有机形态与总镉含量低的样品中镉的有机形态存在差异。由于目前还没有有机态镉的标准物质，根据文献报道的分子量范围，初步判断 7.6 min 为 Cd-Mt（金属硫蛋白），9.1 min 为 Cd-GSH（谷胱甘肽），13.9 min 为 Cd-Cys（半胱氨酸）[15~17]。本文选择了 3 个镉含量水平的样品（样品编号分别为 2、19 和 9）进行详细分析，肝胰腺和肌肉中镉的含量分别

为 9.22 和 1.94 mg/kg、4.02 和 0.82 mg/kg、2.10 和 0.46 mg/kg，三个样品中有机镉形态分析分别见图 1。从图中可见，对于总镉含量高的样品（样品 2），肝胰腺中镉主要以 Cd-MT 形态存在，肌肉中镉主要以 Cd-Cys 形态存在（图 1a）。而对于总镉含量较低的样品（样品 19），肝胰腺中镉主要以 Cd-Cys 和 Cd-MT 形态存在，肌肉中的镉可以 Cd-Cys、Cd-MT 和 Cd-GSH 形态存在（图 1b）；对于总镉含量最低的样品（样品 9），肝胰腺中镉主要以 Cd-Cys 存在，肌肉中镉以 Cd-Cys 和 Cd-GSH 形态存在（图 1c）。

2.2 虾蛄中镉的含量和形态分析

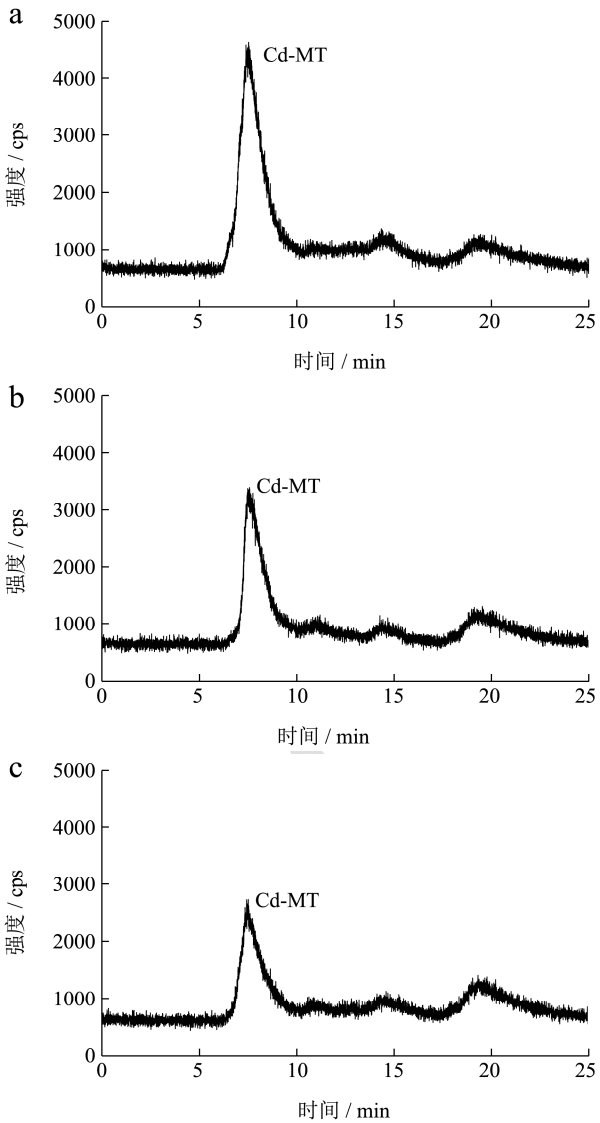


图 2 虾蛄肌肉组织中镉的有机形态分析

Fig 2 Chromatogram of different Cd species in the muscle tissues of *O. oratoria*

注：a 表示样品 3；b 表示样品 11；C 表示样品 13。

由于虾蛄的可食部分主要是肌肉，所以首先分析了 20 个虾蛄样品肌肉组织中镉的总量（见表 2），镉的含量范围为 0.23~3.94 mg/kg。

根据表 2 中的结果，选择了 3 个镉含量水平的样品（编号为 3，11 和 13），运用 SEC-HPLC-ICP-MS 法对 3 个样品肌肉组织提取液中镉进行有机形态分析。结果标明无论总镉含量高与低，所有虾蛄样品中的镉主要以 Cd-MT 形态存在（见图 2）。

表 2 虾蛄肌肉组织中总镉含量（mg/kg，湿重）

Table 2 Total Cd content in the muscle tissues of *O. oratoria* (mg/kg, wet weight)

样品编号	肌肉	样品编号	肌肉
1	1.36	11	1.20
2	1.83	12	1.35
3	3.94	13	0.23
4	1.74	14	1.74
5	2.10	15	1.29
6	2.17	16	1.16
7	1.85	17	0.84
8	1.44	18	0.73
9	3.75	19	0.46
10	1.35	20	1.36

3 结论

3.1 在海洋生物体内或某些组织中，具有积累和贮存重金属并使之解毒的特殊机制。生物体内的金属硫蛋白（MT）是一种低分子量、富含半胱氨酸的胞内蛋白质，其特殊的结构赋予了 MT 高效的重金属解毒能力。重金属在海洋生物体内积累和解毒的另一种机制是与生物体内小分子量的配位体形成络合物，这些小分子量配位体包括谷胱甘肽（GSH）、半胱氨酸和甘氨酸等[18]。本研究表明梭子蟹肝胰腺和肌肉组织中的 Cd 可以 Cd-MT，Cd-GSH 和 Cd-Cys 形态存在，而虾蛄肌肉组织中的 Cd 主要以 Cd-MT 形态存在。MT、GSH 和 Cys 作为解毒物质，能够通过巯基与金属离子结合形成无毒或低毒的配合物而排出体外，从而起到解毒的作用。因此，梭子蟹肝胰腺组织中虽然能富集高含量的镉，但镉以各种有机配合物形态存在，降低了其对生物体的危害。

3.2 另外，本研究发现总镉含量高的样品肝胰腺组织中的 Cd 主要与 MT 结合，而镉含量低的样品肝胰腺组织中 Cd 主要与 Cys 结合，也说明了半胱氨酸、谷胱甘肽等小分子配合物可能是梭子蟹肝胰腺组织解毒 Cd 的第一道屏障，随着富集 Cd 的含量增加，富含巯基的金属硫蛋白大量合成，并成为主要的解毒配体。而对于梭子蟹肌肉组织，镉的含量较低，Cd 主要与 Cys 结合。对于虾蛄，所有样品可食肌肉组织中的 Cd

均主要与 MT 结合，说明不同生物不同组织对 Cd 的解毒机制不同。

3.3 根据 GB 2762-2012《食品安全国家标准 食品中污染物限量》[19]，国内对甲壳类重金属镉限量值为 0.5 mg/kg；欧盟限定甲壳类动物镉含量为 0.5 mg/kg；美国限定甲壳类中镉限量值为 3.0 mg/kg，韩国限量值为 2.0 mg/kg[7]。因此，目前国际上尚未形成统一的关于甲壳类中重金属镉安全限量值的标准。结合本文镉的形态分析，发现三疣梭子蟹可食部分（肝胰腺和肌肉）及虾蛄可食部分（肌肉）中的镉以多种有机形态存在，由于不同形态镉具有不同的生物利用率和生物学毒性，因此不能仅满足于目前仅测定镉的总量并以毒性最高的无机离子态镉的毒性作为评价标准，并且由于不同品种甲壳类生物对镉的富集能力、解毒机制和解毒能力不同，因此建议需对我国国家标准中甲壳类动物镉的限量做进一步评估和再评价研究。

参考文献

[1] 吴强,陈瑞盛,黄经献,等.莱州湾口虾蛄的生物学特征与时空分布[J].水产学报,2015,39(8):1166-1177
WU Qiang, CHEN Rui-sheng, HUANG Jing-xian, et al. Fishery biology characteristics, temporal and spatial distribution of *Oratosquilla oratoria* in Laizhou bay, Bohai sea [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(8): 1166-1177

[2] Hu S, Su Z, Jiang J, et al. Lead, Cadmium pollution of seafood and human health risk assessment in the coastline of the southern China [J]. Stochastic Environmental Research and Risk Assessment, 2016, 30(5): 1379-1386

[3] da Araújo C F S, Lopes M V, Vasquez M R, et al. Cadmium and lead in seafood from the Aratu Bay, Brazil and the human risk assessment [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2016, 188(4): 259

[4] 方月华,邓志豪.澳门地区 198 件甲壳类海产品中重金属含量报告[J].中国公共卫生,2001,17(6):533-534
FANG Yue-hua, DENG Zhi-hao. Report on content of heavy metal in 198 shellfish cases surveyed in Macau [J]. China Public Health, 2001, 17(6): 533-534

[5] 林东明,吴利楠,麦洁梅,等.2009-2011 年广州市番禺区水产品污染状况分析[J].热带医学杂志,2012,12(9):1150-1153
LIN Dong-ming, WU Li-nan, MAI Jie-mei, et al. Monitoring of the pollution of aquatic products in Panyu, Guangzhou in 2009-2011 [J]. Journal of Tropical Medicine, 2012, 12(9): 1150-1153

[6] 江晨洁,吴光红,张美琴,等.全国 6 省市甲壳类水产品中铅和镉污染情况调查与分析[J].食品安全质量检测学报,2015, 6(8):3237-3246
JIANG Chen-jie, WU Guang-hong, ZHANG Mei-qin, et al. Investigation and analysis of Pb and Cd pollution in 6 provinces and municipalities in the curstacea [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(8): 3237-3246

[7] 王剑萍,申屠基康.三种蟹体中重金属镉含量研究[J].中外食品工业,2014,2:36-37
WANG Jian-ping, SHENTU Ji-kang. Study on three kinds of content of cadmium in crabs [J]. Sino-foreign Food Industry, 2014, 2: 36-37

[8] 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
LIN Jian-yun, CHEN Wei-fen, CHEN Han-zhen, et al. Studies on the chemical forms of Cd in aquatic feeds and its bioaccumulations [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2008, 27(4): 491-498

[9] Sadi B B M, Vonderheide A P, Gong J M, et al. An HPLC-ICP-MS technique for determination of cadmium-phytochelatins in genetically modified *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Chromatography B, 2008, 861(1): 123-129

[10] Vacchina V, Lobinski R, Oven M, et al. Signal identification in size-exclusion HPLC-ICP-MS chromatograms of plant extracts by electrsopray tandem mass spectrometry (ES-MS/MS) [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15(5): 529-534

[11] Poteć K, García-Arribas O, Peréz-Calvo M, et al. Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15(15): 1363-1368

[12] 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的形态研究[J].光谱学与光谱分析,2010, 30(4):1096-1100
LI Bin, LIU Li, WANG Qiu-quan, et al. Speciation analysis of cadmium in cadmium-enriched plants with SE-HPLC combined with ICP-MS and ESI-MS [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(4): 1096-1100

[13] Infante H G, Campenhout K V, Schaumlöffel D, et al. Multi-element speciation of metalloproteins in fish tissue using size-exclusion chromatography coupled “on-line” with ICP-isotope dilution-time-of-flight-mass spectrometry [J]. Analyst, 2003, 128(6): 651-657

[14] Wei Z G, Wong J 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(2): 146-158

[15] 杨红霞,刘葳,李冰,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
YANG Hong-xia, LIU Wei, LI Bing, et al. Speciation analysis of cadmium in Indian mustard (*Brassica Juncea*) by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography- inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(10): 1511-1514

[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,2012,40(5):681-686
ZHAO Yan-fang, SHANG De-rong, NING Jin-song, et al. Speciation analysis of cadmium in marine bivalves by size exclusion chromatography- high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(5): 681-686

[17] Polléc P 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(1): 61-70

[18] Nunez-Nogueira G, Mouneyrac C, Amiard C, et al. Subcellular distribution of zinc and cadmium in the hepatopancreas and gills of the decapod crustacean *Penaeus indicus* [J]. Marine Biology, 2006, 150(2): 197-211

[19] GB 2762-2012,食品安全国家标准 食品中污染物限量[S]
GB 2762-2012, National food safety standard-maximum levels of contaminants in foods[S]

现代食品科技