吹扫捕集-气相色谱-冷原子荧光法测定 大闸蟹中的甲基汞含量

王雪婷1*,王恒2,姚燕林2,沈伟健1,王红1,熊文慧1

(1. 南京海关动植物与食品检测中心, 南京 210019; 2. 连云港海关综合技术中心, 连云港 222042)

摘 要:目的 建立吹扫捕集-气相色谱-冷原子荧光检测大闸蟹中甲基汞的分析方法。**方法** 样品经过硝酸 (30%, V:V)提取,采用乙基化试剂进行衍生将其转化为易挥发的甲基乙基汞,在线吹扫捕集至 Tenax 管,以高纯氩为载气,通过加热实现 Tenax 捕集管中各种形态汞的热脱附。使用气相色谱柱进行分离,在 700~900 ℃高温下形态汞热解还原为元素汞后进入冷原子荧光检测器进行检测。**结果** 在 0.5~1000.0 pg 范围内甲基汞的线性关系好,相关系数为 1.000,方法的检出限和定量限分别为 0.022 和 0.072 μ g/kg。在样品中分别添加 1、2、5 μ g/kg 甲基汞标准品进行加标回收率实验,平均回收率为 86.8%~109.8%,相对标准偏差为 1.1%~2.6% (n=6)。**结论** 本方法具有操作简单、灵敏度高等优点,适合于大闸蟹中甲基汞的检测。

关键词: 甲基汞; 吹扫捕集; 气相色谱-冷原子荧光法; 大闸蟹

Determination of methyl mercury in crabs by purge and trap gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry

WANG Xue-Ting^{1*}, WANG Heng², YAO Yan-Lin², SHEN Wei-Jian¹, WANG Hong¹, XIONG Wen-Hui¹

(1. Animal, Plant and Food Inspection Center, Nanjing Customs, Nanjing 210019, China; 2. Comprehensive Technology Center of Lianyungang Customs, Lianyungang 222042, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the detection of methyl mercury in crabs by purge and trap gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry. Methods The samples were extracted by nitric acid (30%, *V:V*) and converted methyl mercury to the more volatile methylethylmercury by the ethylation derivatization, which could be concentrated through online purge and trap system with Tenax capture tube, with high purity carrier gas Ar, the thermal desorption of various forms of Hg in the Tenax trap tube was heated and methyl mercury was pyrolyzed to elemental mercury at high temperature at 700–900 °C, then elemental mercury was detected by cold vapor atomic fluorescence spectrometer. Results The calibration curve of methyl mercury was in good linearity with a correlation coefficient of 1.000 in the range of 0.5–1000.0 pg, and the limit of detection and the limit of quantitation was 0.022 and 0.072 μg/kg respectively. While spiked at 1, 2 and 5 μg/kg, the recoveries of methyl mercury ranged from 86.8%–109.8% with the relative standard deviation ranged from 1.1%–2.6% (*n*=6). Conclusion This method is simple, sensitive and suitable for determination of methyl mercury in crabs.

基金项目: 南京海关科研项目(2021KJ19)、省地方标准和试点项目(2020APFIC-KJ-03)、海关总署科技项目(2020HK205)

Fund: Supported by the Nanjing Customs Scientific Research Project (2021KJ19), the Provincial Local Standards and Pilot Projects (2020APFIC-KJ-03), and the General Administration of Customs Scientific Research Project (2020HK205)

^{*}通信作者: 王雪婷, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: wangxueting@163.com

^{*}Corresponding author: WANG Xue-Ting, Master, Senior Engineer, Animal, Plant and Food Inspection Center of Nanjing Customs, No.39, Chuangzhi Road, Jianye District, Nanjing 210019, China. E-mail: wangxueting@163.com

KEY WORDS: methyl mercury; purge and trap; gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry; crabs

0 引言

中华绒螯蟹是一种经济蟹类,又称河蟹、大闸蟹,富含蛋白质、维生素 A、核黄素、烟酸以及矿物元素,是中国久负盛名的美食。江苏是我国大闸蟹主要出口口岸之一,大闸蟹作为江苏省的重要出口产品现已远销美国、澳大利亚、阿联酋等国家。

汞在自然界中的存在形态有金属汞、无机汞和有机汞, 它们对人体的毒性程度主要取决于人体对它们的吸收率, 甲基汞是各种汞形态中毒性最强的一种汞化合物, 具有高 脂溶性、易穿透生物膜、分子结构牢固、不易破坏、在体 内以原型蓄积等特点, 在自然界中水生生物对甲基汞的蓄 积能力最强, 据报道甲基汞在水牛牛物体中的富集因子能 达到 104~107。人若常期食用甲基汞含量过高的水产品,则 会造成生物致畸、免疫毒性和神经毒性[1-6], 早在 90 年代 初末我国和国外发达国家就已对水产品中甲基汞的含量水 平给出了具体的限量要求。现阶段水产品中甲基汞的检测 方法主要有气相色谱法[7-11]、液相色谱-串联原子荧光光谱 法[12-16]和液相色谱-串联电感耦合等离子体质谱法[17-18] 等。气相色谱法由于需要使用巯基棉吸附和苯萃取, 检测 效率低, 且环境污染严重现已逐渐被淘汰; 而液相色谱-串 联原子荧光光谱法和液相色谱-串联电感耦合等离子体质 谱法在水产品检测中也存在灵敏度低、干扰大、分离效果 不佳等问题。吹扫捕集-气相色谱-冷原子荧光法是近几年 出现的一种甲基汞检测新方法, 它具有检测限低、抗干扰 能力强等优点,目前主要用于环境样品[19-20]的检测,在食 品领域中的应用鲜有报道。本研究建立了全自动吹扫捕集-气相色谱-冷原子荧光光谱检测大闸蟹中甲基汞含量的方 法, 以期更好地检测出大闸蟹中甲基汞的含量水平, 为保 护我国人民食品质量安全、促进我国贸易健康发展提供技 术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

MERX 全自动甲基汞分析仪(美国 Brooks Rand Lab 公司); Elix Essential 型超纯水机(美国 Millipore 公司); FD115 鼓风干燥箱(德国 Binder 公司); Heraeus Multifuge X1R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LPD2500 多管漩涡混合仪[莱普特科学仪器(北京)有限公司]; XS204 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

硝酸(65%, 分析纯, 上海安谱公司); 甲基汞标准溶

液(1.0 mg/L, 中国计量科学研究院); 四乙基硼化钠(纯度 \geq 98%, 美国 Strem Chemicals 公司); 乙酸(纯度 \geq 99.7%, 美国 Sigma-Aldrich公司); 乙酸钠(纯度 \geq 99%, 德国 Merck 公司); 氢氧化钾、盐酸(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为电阻率不小于 18.2 M Ω ·cm 的去离子超纯水; 氩气(纯度 > 99.99%, 南京特种气体厂股份有限公司); 0.45 μm 尼龙微孔滤膜(天津市津腾实验设备有限公司)。

大闸蟹样品来源于江苏省各地区出口企业。

乙酸-盐酸溶液(0.2%-0.5%, V:V): 在 100 mL 容量瓶 中依次加入 0.5 mL 乙酸和 0.2 mL 盐酸,用水稀释并定容 至刻度,摇匀后使用。

乙酸-乙酸钠缓冲液(2 mol/L): 将11.8 mL乙酸和27.2 g 乙酸钠溶于水中,并用水定容至100 mL,摇匀后使用。

四乙基硼化钠溶液(1%):将 1.0 g 固体四乙基硼化钠溶于 100 mL 预先冷却至 0 $^{\circ}$ c的氢氧化钾溶液(2%, W:V)中,摇匀后分装至 20 个 5 mL 棕色样品瓶中,密封,避光冷冻保存,在半冰半液状态下使用。

1.2 样品的前处理

取大闸蟹可食用部分, 先用自来水冲洗, 再用去离子 超纯水洗净, 晾至无水后使用制样机将其完全绞碎并用均 质器使样品混匀。

称取 0.25 g 样品(精确至 0.001 g)于 50 mL 聚乙烯离心管中,加入 15 mL 硝酸溶液(30%, V:V),拧紧盖涡旋 5 min 后于 60 ℃鼓风干燥箱内放置过夜。将离心管从烘箱中取出冷却至室温,加入 15 mL 超纯水,涡旋 5 min,8000 r/min 离心后,取上清液过滤膜,样品滤液供下面乙基化反应。同时做试剂空白实验。

1.3 样品的衍生化

在 40 mL 吹扫瓶中加超纯水至离瓶口约 0.5 cm 处,加入 150 μL 上述样品滤液,使用氢氧化钾溶液(5%, W:V)调节溶液 pH 至 4.5~5.5 之间,再依次加入 300 μL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液、50 μL 四乙基硼化钠溶液,快速加入超纯水至满,拧紧盖子,密闭条件下反应 5 min,按上述步骤同时制备空白样溶液。

1.4 标准溶液的配制

使用乙酸-盐酸溶液将 1.0 mg/L 甲基汞贮备液逐级稀释至质量浓度为 10.000、1.000、0.100、0.010 μg/L 的标准中间液。在 40 mL 吹扫瓶中加超纯水至离瓶口约 0.5 cm 处,按表 1 所示分别吸取相应体积的标准中间液,并按照样品 1.3 操作步骤进行标准工作曲线的绘制。

	表 1	标准曲线溶液的配制及含量
Table 1	Prep	aration and content of standard curves

甲基汞标准使用液浓度/(μg/L)	0	0.010	0.010	0.100	0.100	1.000	1.000	10.000
甲基汞标准使用液加入体积/μL	0	50.0	100.0	50.0	100.0	50.0	100.0	50.0
甲基汞标准溶液含量/pg	0	0.5	1.0	5.0	10.0	50.0	100.0	500.0

注: 定容体积 40.0 mL。

1.5 仪器工作条件

吹扫时氩气流速: 400 mL/min, 吹扫时间: 5 min; 干燥时氩气流速: 300 mL/min, 干燥时间: 3 min; 气相载气流速: 30 mL/min; 高温热裂解时间: 9.9 s; 气相色谱分离柱温: 36 $^{\circ}$ C。

在上述仪器工作条件下,依次对衍生化反应后的标准系列溶液、试剂空白样溶液、样品溶液和加标样品溶液 进行测定。

2 结果与分析

2.1 衍生反应 pH 的确定

为了提高甲基汞的挥发性,需衍生化反应后再进行检测。使用衍生试剂,将样品中的甲基汞转化成甲基乙基汞,乙基汞转化成二乙基汞,二价汞离子转化成二乙基汞,而零价汞则不发生改变。利用这 4 种汞形态在色谱柱上的保留时间不同可对它们进行有效地分离。衍生效率完全受反应体系溶液 pH 的影响,本研究将 100 pg 甲基汞标准溶液分别在 pH 为 2、3、4、5、6、7、8 的条件下进行衍生化反应,每个条件平行做 6 次实验。通过比较甲基乙基汞的峰面积考察衍生效率,图 1 表明,衍生化反应体系的 pH 在 4.5~5.5 之间甲基汞的衍生效率最高。故本研究选择 4.5~5.5 为衍生反应 pH 范围。

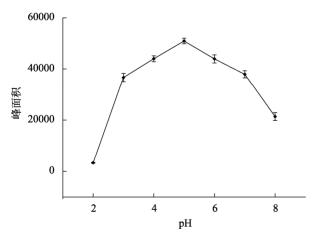


图 1 pH 对衍生化效率的影响(n=6)

Fig.1 Effects of pH on the efficiency of derivatization (n=6)

2.2 衍生试剂使用量的确定

衍生试剂的使用量影响着检测结果的准确性, 投入

量过少会导致甲基汞乙基化反应不完全,投放量过多不但会造成试剂浪费提高实验成本,也可能导致衍生化反应速度过快,影响甲基汞测定的准确性。本研究将衍生化反应体系的pH调节至5.0后,在100pg甲基汞标准溶液中分别加入10、20、30、40、50、60、70、80μL四乙基硼化钠溶液,通过比较甲基汞的峰面积考察衍生化效率。结合图2综合考虑,最终确定衍生化反应中四乙基硼化钠溶液的最佳使用量为50μL。

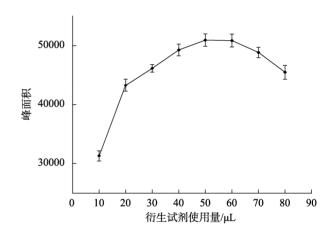


图 2 四乙基硼化钠溶液使用量对衍生化效率的影响(n=6) Fig.2 Effects of sodium tetraethyl borate solution usage on the efficiency of derivatization (n=6)

2.3 线性范围、检出限和定量限

配制质量为 0.5~1000.0 pg 的甲基汞标准溶液, 按优化后的 方法进样, 以衍生化合物甲基乙基汞的峰面积为纵坐标(Y), 对应 的甲基汞含量为横坐标(X, pg), 绘制线性回归曲线, 其线性方程为 Y=644.779X+11.078, 相关系数 r^2 =1.000, 方法线性良好。样品以 0.25 g 计算, 本方法的检出限(S/N>3)和定量限(S/N>10)分别为 0.022 和 0.072 μ g/kg, 方法灵敏度高。

2.4 回收率和精密度

在大闸蟹样品中分别添加低、中、高 3 个水平的甲基 汞标准品,每个添加水平做 6 次平行实验,外标法定量(见 表 2)。结果表明,该方法的加标回收率为 86.8%~109.8%, 相 对 标 准 偏 差 (relative standard deviations, RSDs) 为 1.1%~2.6%,方法精密度较高。色谱图见图 3,大闸蟹样品 中乙基化后的甲基乙基汞峰型尖锐且对称、信号响应值高, 各组分间可实现基线分离,分离效果满意。

表 2 甲基汞在大闸蟹样品中的加标回收率和精密度(n=6)

Table 2	Dogovorios and	I propinione of t	he methyl mercur	n cnikad in anak	se complee (n-6)
Table 2	Necoveries and	i di ecisions oi i	ne memvi mercur	v sdikeu ili ciai	is samples (<i>n</i> -o)

加标量/(μg/kg)			测定结果	(μg/kg)	亚拉佐(/1)	同业交(0/	DCD /0/		
	1	2	3	4	5	6	· 平均值/(µg/kg)	回收率/%	RSDs/%
0	6.21	6.13	6.44	6.22	6.56	6.31	6.31		2.6
1	7.32	7.41	7.25	7.26	7.18	7.32	7.29	86.8~109.8	1.1
2	8.11	8.23	8.39	8.28	8.41	8.29	8.29	89.9~104.9	1.3
5	11.3	11.8	11.6	11.4	11.0	11.2	11.4	93.8~109.8	2.5

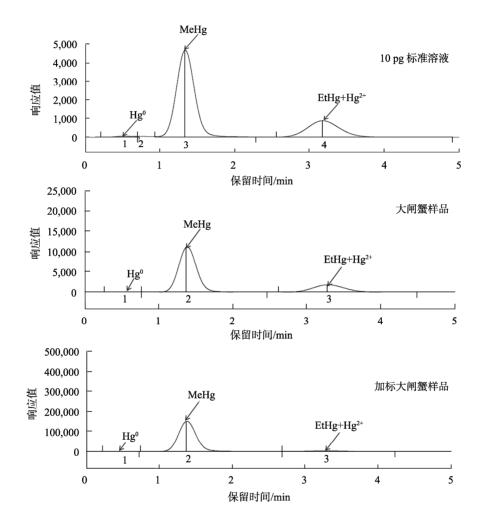


图 3 甲基汞标准溶液及大闸蟹样品和加标大闸蟹样品的色谱图

Fig.3 Chromatograms of the standard solution, crabs sample and spiked in crabs sample

2.5 实际样品分析

应用本研究建立的分析方法,分别对苏州、宿迁、泰州、常州大闸蟹养殖出口基地抽检的 200 个批次样品进行检测。在对不同地区大闸蟹样品检测数据分析的基础上,结合各国限量标准对江苏地区养殖大闸蟹的食用安全性进行了评价。从表 3 中可以看到,苏州、宿迁、泰州和常州 4 个地区养殖的大闸蟹中甲基汞的检测值范围

在 6.1~65.8 μg/kg, 其中苏州地区检测值最低, 其次是泰州, 常州地区检测值最高。大闸蟹中甲基汞的含量水平从一定程度上能够反映当地的养殖环境, 空气、水质和养殖底泥都会对它产生一定的影响。总体来看, 江苏地区养殖的大闸蟹中甲基汞的含量水平较低, 完全符合我国、美国、日本等国的限量要求, 是一种具有较好食用安全性的淡水产品。

Table 5 Sample analysis results and mint requirements (n-5)							
地区 抽检数	抽检数/批	松测传类用 // // /		限	量要求/(mg/kg)		
	1四个业安又/11几	检测值范围/(μg/kg)	中国	美国	日本	新西兰/CAC/欧洲联盟	
苏州	50	6.5~18.1					
宿迁	50	6.1~48.7	0.5	1	0.3 (甲基汞)	0.5	
泰州	50	7.8~20.1	(甲基汞)	(甲基汞)		(总汞)	
常州	50	47.1~65.8					

表 3 样品分析结果及限量要求(n=3)
Table 3 Sample analysis results and limit requirements (n=3)

注: 国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC)。

3 结 论

随着科技的进步,食品中有害元素的分析技术逐步朝着超痕量分析方向发展,为人们享受更优质的生活提供了技术保障。甲基汞是水产品中常见的有害元素,在人体内具有蓄积作用难以代谢,在全球范围内受到了普遍的关注。本研究建立的吹扫捕集-气相色谱-冷原子荧光检测大闸蟹中甲基汞的分析方法具有简单易操作、检测限低、检测结果精密度高的优点,在控制大闸蟹的品质及对其食用安全性评价方面都能起到一定的指导作用。

参考文献

- [1] HARADA M. Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution [J]. Crit Rev Toxicol, 1995, 25(1): 1–24.
- [2] CLARKSON TW, MAGOS L, MYERS GJ. The toxicology of mercurycurrent exposures and clinical manifestations [J]. New England J Med, 2003, 349(18): 1731–1737.
- [3] SCHEUHAMMER AM, MEYER MW, SANDHEINRICH MB, et al. Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish [J]. Ambio, 2007, 36(1): 12–18.
- [4] LEE YH, KIM DH, KANG HM, et al. Adverse effects of methylmercury (MeHg) on life parameters, antioxidant systems, and MAPK signaling pathways in the rotifer *Brachionus koreanus* and the copepod *Paracyclopina* nana [J]. Aqua Toxicol, 2017, 190: 181–189.
- [5] 任中华, 曹亮, 刘金虎, 等. 甲基汞在褐牙鲆幼鱼体内蓄积的组织特异性及其对免疫功能和生长的毒性作用[J]. 海洋科学, 2019, 43(5): 71-80.
 - REN ZH, CAO L, LIU JH, et al. Tissue-specific bioaccumulation of methylmercury (MeHg) and its toxicity to the immunologic function and growth of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Mar Sci, 2019, 43(5): 71–80.
- [6] 黄芮, 陈少威, 陈子慧, 等. 广东省沿海常见海水鱼中多不饱和脂肪酸及其与甲基汞共摄入对神经发育的风险-获益评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(3): 199-204.
 - HUANG R, CHEN SW, CHEN ZH, et al. Risk-benefit assessment of polyunsaturated fatty acid and methyl mercury on neurodevelopmental effect resulting from consumption of marine fish from coastal areas of Guangdong province [J]. Chin J Food Hyg, 2019, 31(3): 199–204.

- [7] 刘琳娟, 陆亮. 甲基汞在鲳鱼中的积累规律初探[J]. 环境监控与预警, 2019, 11(2): 38-40, 53.
 - LIU LJ, LU L. Study on the accumulation of methylmercury in pomfret [J]. Environ Monitor Forewarn, 2019, 11(2): 38–40, 53.
- [8] 刘巧莲, 刘彦辉. 毛细柱气相色谱法测定地下水中烷基汞[J]. 科技风, 2019. (36): 142.
 - LIU QL, LIU YH. Determination of alkyl mercury in groundwater by capillary gas chromatography [J]. Technol Wind, 2019, (36): 142.
- [9] 张君辉.不同毛细柱下气相色谱法对水中甲基汞的测定探究[J]. 江西农业学报, 2020, 32(12): 106-110.
 - ZHANG JH. Research on determination of methyl mercury by different capillary column gas chromatography [J]. Acta Agric Jiangxi, 2020, 32(12): 106–110.
- [10] 罗军侠, 蒋丹萍. 气相色谱法测定固体废物中的烷基汞[J]. 化学工程师, 2020, (6): 36–38, 61.
 - LUO JX, JIANG DP. Determination of alkylmercury by gas chromatography in solid wastes [J]. Chem Eng, 2020, (6): 36–38, 61.
- [11] 宗万里. 负化学源-气相色谱-质谱联用法测定虾仁中甲基汞含量[J]. 河北渔业, 2020, (11): 37-40.
 - ZONG WL. Determination of methylmercury in shrimp meat by NCI-GC-MS [J]. Hebei Fish, 2020, (11): 37–40.
- [12] 商律,梅勇,姬晓宇,等.水中不同形态汞的高效液相色谱-原子荧光 光谱测定法[J].环境与健康杂志,2018,35(1):84-86.
 - SHANG L, MEI Y, JI XY, et al. Determination of mercury species in water by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry [J]. J Environ Health, 2018, 35(1): 84–86.
- [13] 李浩洋, 汪海滨, 邓建, 等. LC-AFS 法测定水产饲料中的甲基汞[J]. 食品工业, 2019, 40(4): 315-318.
 - LI HY, WANG HB, DENG J, et al. Determination of methylmercury in aquatic feed by LC-AFS [J]. Food Ind, 2019, 40(4): 315–318.
- [14] 陈东洋, 卢岚, 张昊, 等. 固相萃取-液相色谱原子荧光光谱联用法测 定食品中烷基汞[J]. 分析试验室, 2020, 39(10): 1179-1182.
 - CHEN DY, LU L, ZHANG H, *et al.* Determination of alkyl mercury in food based on liquid chromatography with atomic fluorescence spectrometry after solid phase extraction [J]. Chin J Anal Lab, 2020, 39(10): 1179–1182.
- [15] 赵婉荣,郑清林,许娴. 液相色谱-冷原子荧光光谱法测定土壤中的烷基汞[J]. 现代科学仪器, 2020, (5): 39-45.
 - ZHAO WR, ZHENG QL, XU X. Determination of alkyl mercury in soil by interface technique coupled liquid chromatography with cold atomic

fluorescence spectrometry [J]. Mod Sci Instrum, 2020, (5): 39-45.

[16] 伍伟超,李梅. 土壤中甲基汞和乙基汞的测定液相色谱-原子荧光联用 法[J]. 广东化工, 2021, 48(8): 275–278.

WU WC, LI M. Determination of methyl mercury and ethyl mercury in soil by liquid chromatography atomic fluorescence spectrometry [J]. Guangdong Chem Ind, 2021, 48(8): 275–278.

[17] 龚燕,尚晓虹,赵馨. HPLC-ICP-MS 联用测定稻米中的无机汞和甲基汞[J]. 化学试剂, 2018, 40(3): 257–260.

GONG Y, SHANG XH, ZHAO X. Determination of mercury and methylmercury in rice by HPLC-ICP-MS [J]. Chem Reag, 2018, 40(3): 257–260.

[18] 余兰,王洋怡舟. 水产品中甲基汞检测方法的优化与讨论[J]. 食品工业,2020,41(9):231-234.

YU L, WANG YYZ. Optimization and analysis of methylmercury detection methods in aquatic products [J]. Food Ind, 2020, 41(9): 231–234.

[19] 孔维恒, 邱烨, 王琳丽, 等. 烷基汞分析仪测定沉积物中甲基汞[J]. 分析仪器, 2019, (5): 105-108.

KONG WH, QIU Y, WANG LL, et al. Determination of methyl mercury in sediments by alkyl mercury analyzer [J]. Anal Instrum, 2019, (5): 105–108.

[20] 王媛, 张雯, 刘华良, 等. 吹扫捕集/GC-冷原子荧光法测定包装饮用水中烷基汞[J]. 环境监测管理与技术, 2020, 32(3): 52-54, 62.

WANG Y, ZHANG W, LIU HL, et al. Determination of alkyl mercury in drinking water by purge and trap/gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry [J]. Admin Technol Environ Monitor, 2020, 32(3): 52–54, 62.

(责任编辑:张晓寒郑丽)

作者简介



王雪婷,硕士,高级工程师,主要研究 方向为食品安全检测。

E-mail: wangxueting@163.com