

贝类水产品中有机锡和甲基汞的检测研究

冷桃花^{1*}, 陈贵宇², 施敬文¹, 李亦奇¹, 段文锋¹

- (1. 上海市质量监督检验技术研究院/国家食品质量监督检验中心(上海), 上海 200233;
2. 华东理工大学精细化工研究所, 上海 200237)

摘要: **目的** 建立贝类水产品中甲基汞、三甲基锡(TMT)、一丁基锡(MBT)、二丁基锡(DBT)、三丁基锡(TBT)和三苯基锡(TPhT)等6种有机锡和甲基汞化合物的高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)的分离检测方法。**方法** 利用 Eclipse Plus C₁₈反相色谱柱对贝类水产品中6种有机金属化合物进行分离, 利用电感耦合等离子体质谱对锡和汞元素进行检测, 外标法定量测定水产品中6种有机金属化合物的含量。通过优化色谱分离条件, 以甲醇-0.06 mol/L 乙酸铵-乙酸溶液为流动相, 梯度洗脱。**结果** 6种有机金属化合物在30 min内得到了有效分离。6种有机金属化合物标准曲线的线性相关系数大于0.998, 检出限为0.5~2.5 μg/kg, 样品加标回收率在70%~110%。**结论** 该法操作简便, 分离效果好, 检出限低, 适用于贝类水产品中有机锡和甲基汞的检测。

关键词: 高效液相色谱-电感耦合等离子质谱; 有机锡; 甲基汞

Detection and analysis of organotin and methyl-mercury in aquatic products of shellfish

LENG Tao-Hua^{1*}, CHEN Gui-Yu², SHI Jing-Wen¹, LI Yi-Qi¹, DUAN Wen-Feng¹

- (1. Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research/National Food Quality Supervision and Inspection Center (Shanghai), Shanghai 200233, China; 2. Institute of Fine Chemicals, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of methyl-mercury and five organotin (TMT, MBT, DBT, TBT, TPhT) in aquatic products of shellfish using high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). **Methods** An Eclipse Plus C₁₈ column with methanol-0.06 mol/L ammonium acetate-acetate acid as mobile phased was used to separate the six compounds, and the content of these six compounds was carried out by external standard method using plasma mass spectrometry. **Results** The 6 compounds were effectively separated in 30 mins. The linear correlation coefficient of the standard curve of 6 kinds of organic metal compound was larger than 0.998, the detection limit was 0.5~2.5 μg/kg, and the spiked recoveries ranged from 70% to 110%. **Conclusion** The method is a simultaneous determination for organotin and methyl-mercury in aquatic products of shellfish with simple and convenient operation, efficient separation and low detection limit.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry; organotin; methyl-mercury

*通讯作者: 冷桃花, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品化妆品分析。E-mail: length@sqi.org.cn

*Corresponding author: LENG Tao-Hua, Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, No.381, Cangwu Road, Xuhui District, Shanghai 200233, China. E-mail: length@sqi.org.cn

1 引言

有机锡化合物被广泛用于船舶防污涂料、农药杀虫剂、塑料工业等^[1], 主要存在形态可分为单锡型($R\text{SnX}_3$)、二锡型($R_2\text{SnX}$)、三锡型($R_3\text{SnX}$)和四锡型($R_4\text{Sn}$)(其中 R 为烷基或芳香基, X 为除 C-Sn 以外与锡结合的无机或有机基团), 其生理活性三锡型>四锡型>二锡型>单锡型, 当 R 为丁基或丙基时生理活性最强, 以三锡型生物活性最高。研究表明, 有机锡化合物是已知的内分泌干扰物质之一, 能干扰牡蛎中钙的代谢, 还可导致腹足类动物由雌性向雄性转变, 通过改变其雌雄比例进而影响其种群繁殖^[2]。甲基汞是目前研究最多的有机汞, 它是一种脂溶性化合物, 易经消化道、呼吸道、皮肤黏膜吸收; 进入血液后, 除与血浆蛋白结合外, 大部分与血红蛋白结合, 由血液逐渐向器官分布^[3]。

近年来, 许多研究者用各种分离检测手段对有机锡和甲基汞进行分析, 一种是用气相色谱^[4-7]法对有机锡和甲基汞进行分离检测, 一种是用高效液相色谱^[8-12]法对有机锡进行分离检测。目前食品中有机锡的国家标准检测方法采用气相色谱法(GB/T5009.215)^[13], 甲基汞采用气相色谱法(GB/T5009.17)^[14]。该方法样品前处理过程复杂, 需要多步的净化和衍生, 不易实现规模化操作, 且针对不同的样品, 其基质不同势必影响到样品的提取效率, 尤其是该技术的衍生化步骤很难掌握, 导致回收率不稳定。高效液相色谱与电感耦合等离子质谱的联用在有机锡和甲基汞的分析当中得到了广泛应用, 且取得了初步的成效^[11,12]。本研究通过优化样品前处理过程和色谱分离条件, 建立了水产品中甲基汞、TMT、MBT、DBT、TBT、TPhT 等 6 种有机金属化合物的高效液相色谱-电感耦合等离子质谱(HPLC-ICP-MS)的分离检测方法, 简化样品处理过程, 极大缩短了样品处理步骤, 提高了效率。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

7500 型电感耦合等离子体质谱仪、1200 series 型高效液相色谱仪、ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 反相色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 美国 Agilent 公司; AL204 型万分位电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Sigma 4-16K 离心机, 美国 Sigma 公

司, IKA T25 digital Ultra Turrax 匀浆机, 美国 IKA 公司; 超声波清洗仪, 上海科导超声仪器有限公司。

甲基汞(60.2±2.3) $\mu\text{g/g}$, 北京中国计量科学研究; TMT(96.0%), TPhT(99.0%), TBT(94.0%), DBT(97.2), TBT(97.0), 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司; 色谱纯乙酸、甲醇、三乙胺, Fisher Scientific 公司; 实验用水为 Millipore-Q 超纯水系统纯化的去离子水(电阻率 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

2.2 仪器工作参数

色谱分离条件: ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 反相色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相 A: 100%甲醇; 流动相 B: 0.2%三乙胺(v:v)-25%乙酸水溶液(v:v); 流动相 C: 0.1%半胱氨酸-0.06 mol/L 乙酸铵的水溶液; 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL 。

ICP-MS 工作条件: 射频功率 1500 W; 雾化室温度 -5 $^{\circ}\text{C}$; 载气流量 0.5 L/min; 辅助气流量 0.1 L/min; 反应气 ($\text{O}_2/\text{Ar}=1/4$) 比例 20%; 采样模式: 时间积分; 分析时间: 1800 s。样品分析前用 ICP-MS 调节液将仪器灵敏度调至大于 3000 cps。

2.3 样品前处理方法

称取约 1 g 已经匀浆好的水产样品于 50 mL 离心管中, 加入 30 mL 提取液(其中乙酸 9 mL, 甲醇 18 mL, 2%的 L-半胱氨酸水溶液 3 mL), 超声 25 min, 6000 r/min 离心 3 min, 取上清液 20 mL 浓缩后用流动相定容至 2 mL, 过 0.45 μm 滤膜后进样测定。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件优化

本课题前期研究^[15,16]表明, 甲基汞分离使用的流动相体系与有机锡化合物分离体系存在一定的差异, 甲基汞的流动相为甲醇-乙酸铵体系(含 0.1%的半胱氨酸), 而有机锡的流动相体系为甲醇-乙酸体系(含 2%三乙胺)。介于分离甲基汞与有机锡所用流动相之间的差异, 本研究进一步优化了 6 种化合物分离的流动相组成, 采用两种体系混合, 调节混合比例(见表 1), 建立了同时分析甲基汞和有机锡的方法, 6 种化合物在 30 min 内取得了较好的分离(见图 1)。

3.2 样品前处理条件优化

根据文献报道^[17], 水产品中甲基汞的提取常采用酸消解法、碱消解法和有机溶剂提取法, 几种方法的提取均需使用络合剂 L-半胱氨酸或巯基乙醇等。

而本研究对水产品中有机锡化合物的提取采用的提取试剂为甲醇-乙酸溶液。考虑到提取甲基汞时需要用到 *L*-半胱氨酸, *L*-半胱氨酸不溶于甲醇, 溶于水, 甲醇与水可以互溶, 因此选用了甲醇-乙酸-半胱氨酸溶液体系作为提取剂, 并分别优化了提取时的超声时间、提取剂用量、提取剂中半胱氨酸含量、提取剂中乙酸含量对样品前处理回收率的影响。

3.2.1 超声时间和提取剂体积对样品回收率的影响

实验根据 2.3 样品前处理方法进行样品处理, 分别考察了超声时间和提取试剂的体积对回收率的影响。由图 2 可知, 随着超声时间的增加, 各化合物的回收率明显上升, 在 25 min 之后, 部分化合物的回收率开始降低, 这可能是因为超声时间长, 溶液温度上升导致回收率下降。同时, 除 TMT 外, 其他各种化合物的回收率随提取试剂体积的增加而增加, 到提取试剂用量达 30 mL 后回收率基本平稳(见图 3), 虽 TMT 随着提取试剂体积的增加, 回收率略有下降, 但总体回收率均大于 80%, 综合考虑之下, 本研究采用 30 mL 的提取剂, 超声提取时间 25 min。

表 1 液相色谱分离洗脱梯度

Table 1 Gradient elution conditions of HPLC

时间(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	5	55	40
5	60	0	40
20	60	0	40
21	5	55	40
30	5	55	40

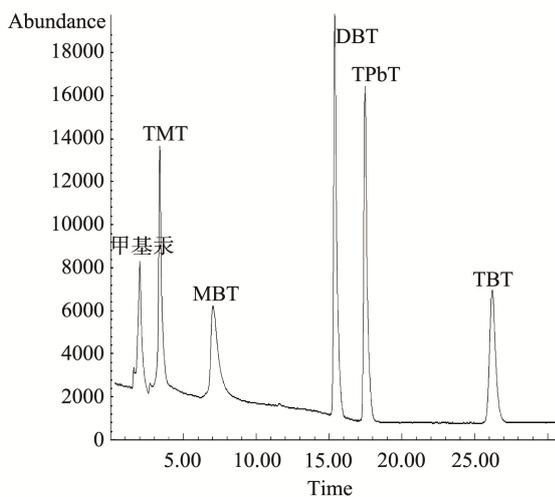


图 1 甲基汞和有机锡分离色谱图

Fig. 1 The chromatography of 6 organic-metals

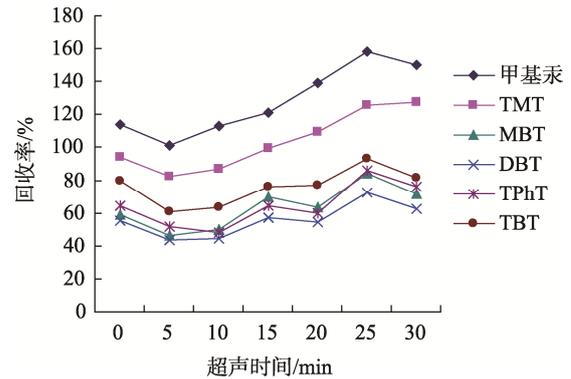


图 2 超声时间对回收率的影响

Fig. 2 The effect of time on recovery

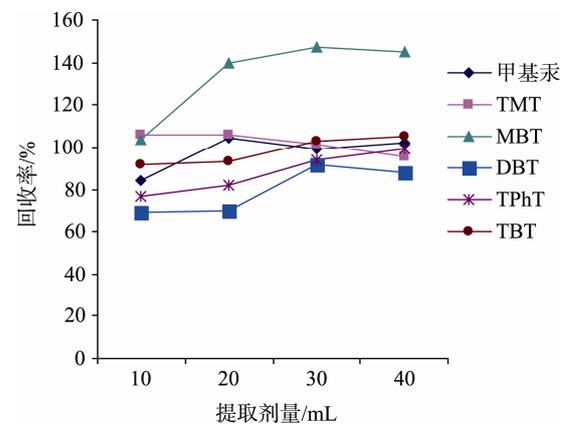


图 3 提取液量对回收率的影响

Fig. 3 The effect of volume on recovery

3.2.2 半胱氨酸的量对样品回收率的影响

由于甲基汞的提取依赖于 *L*-半胱氨酸, 研究表明, *L*-半胱氨酸的浓度对 6 种化合物的分离均有影响。

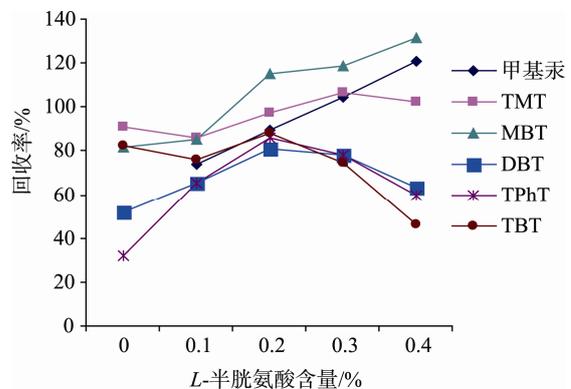


图 4 *L*-半胱氨酸含量对回收率的影响

Fig. 4 The effect of *L*-cysteine concentration on recovery

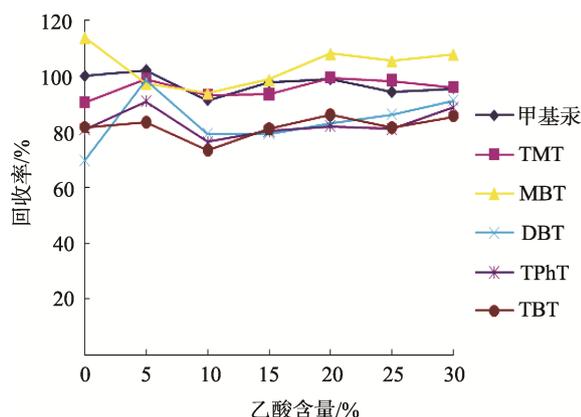


图5 乙酸含量对回收率的影响

Fig. 5 The effect of different ratio of acetic acid on recovery

分别加入 30 mL 提取液(含有 *L*-半胱氨酸分别为 0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%), 实验根据 2.3 样品前处理方法进行样品处理, 测定。由图 4 可知, 随着 *L*-半胱氨酸浓度的增加, DBT, MBT, TPhT, 甲基汞四种化合物的回收率逐渐提高, 浓度至 0.2% 时各化合物的回收率均达到 70% 以上, 而随着 *L*-半胱氨酸浓度的继续增加, DBT、TPhT 和 TBT 的回收率明显下降。考虑到各化合物的回收, 本研究选择 *L*-半胱氨酸的浓度为 0.2% (即 0.2 g/100 mL)。

3.2.3 乙酸的量对样品回收率的影响

乙酸在有机锡化合物提取中起到了重要作用。实验根据 2.3 样品前处理方法进行样品处理, 分别加入 30 mL 提取液(含 *L*-半胱氨酸分别为 0.2%, 乙酸含量分别为 0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%, 其余为甲醇), 考查了乙酸的浓度对各化合物回收率的影响。由图 5 可知, DBT、TPhT、TMT 等化合物的回收率随乙酸浓度的变化而变化, 在乙酸浓度达到 30% 的浓度时回收率基本趋于稳定, 且回收率较高, 因此选取 30% 的乙酸浓度添加至提取溶液中。

综上所述, 本研究采用 30 mL 含 30% (v:v) 乙酸-0.2% *L*-半胱氨酸-甲醇溶液为提取溶液, 经 25 min 超声提取, 6000 r/min 离心 3 min, 取上清液 20 mL 浓缩后用流动相定容至 2 mL, 过 0.45 μm 滤膜后进样测定。

3.3 方法的线性范围、检出限、回收率和精密度

配制质量浓度分别为 2.5、5、10、25、50、100 μg/L 的一系列 6 种化合物的混合标准溶液, 在优化的实验条件下考查方法的线性范围, 6 种化合物在 0~100

μg/L 的浓度范围内线性良好, 线性方程分别为: 甲基汞 $Y=170.03X+259.32$, TMT $Y=188.63X+61.46$, MBT $Y=183.95X-44.70$, DBT $Y=417.62X-118.02$, TPhT $Y=401.70X-88.98$, TBT $Y=296.31X-31.19$, 线性相关系数 R^2 均大于 0.998。在空白样品中加入 5 μg/L 的混合标准溶液, 以 3 倍基线噪音测定 6 种化合物的检出限分别为 0.5~2.5 μg/kg。分别向水产样品中加入 5、25、100 μg/L 三种不同水平的 6 种化合物标准溶液, 各平行处理 6 个样品, 经扣除样品空白后, 6 种化合物的回收率在 70%~110% 之间, 6 种化合物的相对标准偏差均在 10% 以内。

3.4 实际样品的检测

应用本研究优化的方法对市售的几种贝类产品进行测定, 结果发现野生小淡菜中甲基汞含量为 19.8 μg/kg, 皇冠贝中甲基汞含量 16.4 μg/kg, 绿壳贻贝中甲基汞含量为 14.2 μg/kg。大部分湿样贝类产品中未检出有机锡, 毛蛤干粉中 TBT 和 TPhT 均有检出, 含量分别为 53.4 和 98.1 μg/kg, 与相关文献报道^[8]结果基本一致。

4 结论

采用 HPLC-ICP-MS 测定水产品中 6 种有机金属化合物, 通过对色谱分离条件和样品前处理方法的优化, 利用高效液相色谱以 *L*-半胱氨酸为络合剂, C₁₈ 色谱柱分析 6 种化合物, 线性范围 0~100 μg/L, 线性相关系数 R^2 大于 0.998, 检出限 0.5~2.5 μg/kg, 6 种化合物的回收率在 70%~110% 之间, 6 种化合物的相对标准偏差均在 10% 以内。本方法样品前处理简便快速、线性范围宽、精密度高、重现性好, 能有效地同时处理和分析甲基汞和 5 种有机锡化合物, 适用于水产品中 6 种化合物的测定。

参考文献

- [1] 梁淑轩, 孙汉文. 有机锡的环境污染及监测方法研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2004, 21(6): 425-431.
Liang SX, Sun HW. Progress in studies of environmental organotin pollution and monitoring method [J]. J Environ Health, 2004, 21(6): 425-431.
- [2] 崔彦杰, 康天放, 巢静波. 牡蛎中有机锡形态分析初探[C]. 第五届全国环境化学大会, 2009.
Cui YJ, Kang TF, Chao JB. Analysis of organotin compounds in oyster[C]. The Fifth National Congress of Environmental

- Chemistry, 2009.
- [3] 王文雄. 微量金属生态毒理学和生物地球化学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 268–269.
Wang WX. Trace metal ecotoxicology and biogeochemical [M]. Beijing: Science Press, 2011: 268–269.
- [4] Julien H, Tea Z, *et al.* Analytical advances in butyl-, phenyl- and octyltin speciation analysis in soil by GC-PFPD [J]. *Talanta*, 2008, 75: 486–493.
- [5] Myriamel A, Gaetanelespes, *et al.* Determination of organotins in aquatic plants by headspace SPME followed by GC-PFPD determination [J]. *J Environ Anal Chem*, 2006, 86(10): 733–742.
- [6] 李妍, 刘书娟, 江冬青, 等. 气相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术应用于水产品中汞形态分析[J]. *分析化学*, 2008, 6(36): 792–798.
Li Y, Liu SJ, Jiang DQ, *et al.* Gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for mercuration in seafoods [J]. *Chin J Anal Chem*, 2008, 6(36): 792–798.
- [7] Yang L, Colomini V, Maxwell P, *et al.* Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gaschromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1011(1-2): 135–142.
- [8] 于振花, 荆森, 王庚, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用同时检测海产品中的多种有机锡[J]. *分析化学研究报告*, 2008, 8: 1035–1039.
Yu ZH, Jing M, Wang G, *et al.* Speciation analysis of organotin compounds in shellfish by hyphenated technique of high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2008, 8: 1035–1039.
- [9] Wang XP, Jin HY, Ding L, *et al.* Organotin speciation in textile and plastics by microwave-assisted extraction HPLC-ESI-MS [J]. *Talanta*, 2008, 75(2): 556–563.
- [10] Wahlen R, Catterick T, *et al.* Comparison of different liquid chromatography conditions for the separation and analysis of organotin compounds in mussel and oyster tissue by liquid chromatography -inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B, Anal Technol Biomed Life Sci*, 2003, 783(1): 221–229.
- [11] Sentosa P, M.Bachri A, Sadijah AC. Speciation of organotin compounds with ion pair-reversed phase chromatography technique [J]. *Eurasian J Anal Chem*, 2009, 4(2): 215–225.
- [12] 李湘, 余晶晶, 李冰, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子质谱法分析海洋沉积物中有机锡的形态[J]. *分析化学*, 2011, (9): 1400–1405.
Li X, Yu JJ, Li B, *et al.* Simultaneous determination of organotin compounds in marine sediments by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, (9): 1400–1405.
- [13] GB/T 5009.215-2008 食品中有机锡含量的测定[S].
GB/T 5009.215-2008 Determination of organotins in foods [S].
- [14] GB/T 5009.17-2003 食品中总汞及有机汞的测定[S].
GB/T 5009.17-2003 Determination of total mercury and organic-mercury in foods[S].
- [15] 曹程明, 冷桃花, 解楠, 等. 贝类水产品中汞的形态分析研究[J]. *食品科学*, 2013, 34(22): 193–197.
Cao CM, Leng TH, Xie N, *et al.* Speciation analysis of mercury in shellfish muscle [J]. *Food Sci*, 2013, 34(22): 193–197.
- [16] 解楠, 曹程明, 冷桃花, 等. 贝类产品中汞化合物的存在形态及检测方法研究进展[J]. *食品工业*, 2013, 34(4): 184–189.
Xie N, Cao CM, Leng TH, *et al.* Research progress in the speciation analysis and determination methods of mercury compounds in shellfish [J]. *Chin J Food Ind*, 2013, 34(4): 184–189.
- [17] 杨杰, 王竹天, 杨大颖, 等. 食品中甲基汞和汞形态分析技术的研究进展[J]. *国外医学卫生学分册*, 2008, 35(3): 181–187.
Yang J, Wang ZT, Yang DY, *et al.* Research progress of technology analysis of MeHg and Hg in food [J]. *Chin J Foreign Med Sci (Sect Hyg)*, 2008, 35(3): 181–187.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



冷桃花, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品化妆品分析。
E-mail: length@sqi.org.cn