

超声辅助萃取-直接测汞法测定海产品中的甲基汞

庞艳华¹, 孙瑶¹, 高鹭¹, 王楠¹, 彭心婷², 宋海佳³, 曹际娟^{1*}

(1. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001; 2. 塔城出入境检验检疫局, 塔城 834700;
3. 大连工业大学食品学院, 大连 116034)

摘要: **目的** 建立超声辅助溶剂萃取——直接测汞法测定海产品中甲基汞的检测方法, 应用此方法检测黄鱼、鳕鱼、金枪鱼、扇贝、杂色蛤等海产品中甲基汞的含量。 **方法** 选择盐酸为萃取溶剂, 通过优化萃取溶剂的浓度和提取条件, 选择 5 mol/L 盐酸作为溶剂, 超声 1 h, 以二氯甲烷分两次萃取, 再以水反萃取, 应用测汞仪直接测定水相中甲基汞的含量。 **结果** 甲基汞标准曲线的线性相关系数大于 0.997, 检出限为 0.75 ng/g。不同类型生物标准参考物质实际测定值与标准参考值相符, 测定值的相对标准偏差小于 4%。 **结论** 该方法操作简便、快速、准确, 适用于鱼、贝类海产品中甲基汞的快速萃取分离和测定。不同种类样品中甲基汞污染程度不同, 实验选取的样品中甲基汞的含量均未超过卫生限量, 鳕鱼、金枪鱼中甲基汞含量较高。

关键词: 甲基汞; 海产品; 超声辅助萃取; 直接测汞法

Determination of methylmercury in seafood by ultrasonic-assisted extraction coupled with direct mercury analyzer

PANG Yan-Hua¹, SUN Yao¹, GAO Lu¹, WANG Nan¹, PENG Xin-Ting²,
SONG Hai-Jia³, CAO Ji-Juan^{1*}

(1. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 2. Tacheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tacheng 834700, China; 3. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of methylmercury (MeHg) in seafood using a direct Hg analyzer (DMA-80), and apply this method to detect the content of MeHg in Yellow croaker, cod, tuna, scallops, and clams. **Methods** MeHg was separated from bio sample matrix with 5 mol/L hydrochloric acid by ultrasound assisted for 1 h. The extraction conditions were optimized. After back-extraction of MeHg from organic methylene chloride solvent to aqueous solution, MeHg was determined by the mercury analyzer. **Results** The standard curve of linear correlation coefficient was greater than 0.997, and the detection limit of MeHg was 0.75 ng/g. The experimental results of standard reference materials were in a good agreement with the certified values, and the relative standard deviation of the determined values were less than 4%. **Conclusion** The method takes the advantage of simplicity and accuracy, and can be applied for

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201310141)、国家质检总局科技计划项目(2008IK132)、辽宁出入境检验检疫局科研项目(LK08-2008)

Fund: Supported by Special Fund for Quality Inspection Research in Public Interest (201310141), the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2008IK132) and the Project of Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (LK08-2008)

*通讯作者: 曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: caojijuanlnciq@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Professor, Technology Centre of Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.60, Changjiang East Road, Zhongshan District, Dalian 116001, China. E-mail: caojijuanlnciq@163.com

the analysis of MeHg in different seafoods. There is obvious difference of MeHg content levels in seafood samples. The MeHg content in experimental samples do not exceed the health limits, and MeHg content is higher in cod and tuna.

KEY WORDS: methylmercury; seafood; ultrasonic-assisted extraction; direct Hg analyzer

1 引言

汞及其化合物是环境中广泛存在的一类持久性污染物。自 20 世纪 50 年代日本水俣病爆发后, 对于汞毒性的研究备受关注^[1-4]。汞污染已经成为一个全球性污染问题。自然界中的汞主要以金属汞、无机汞和有机汞的形式存在, 不同形态的汞在环境中和其他生物体中可以相互转化^[5-7]。环境中的无机汞在微生物和其他因素作用下, 可以转化为毒性更强的有机汞^[8-9]。鉴于各种形态的汞表现出明显不同的毒性和生物可给性, 仅仅测定样品中汞的总量是不够的, 还需要区分汞各种化学形态的信息, 特别是环境样品中广泛存在的甲基汞(methylmercury, MeHg)。

目前, 生物样品中汞的形态分析主要是通过各种联用技术来实现, 大多采用气相色谱和液相色谱等分离手段与原子吸收光谱(AAS)、原子发射光谱(AES)、原子荧光光谱(AFS)、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)等具有元素选择性的检测手段相结合进行测定的方法^[10-18]。这些分析手段极大地方便了对鱼肉等生物样品中甲基汞的测定和分析, 但是 AES、AAS 等方法灵敏度不高, 不能满足环境样品中痕量分析的要求。AFS 灵敏度较高, 需要加入强氧化剂将有机汞氧化得到无机汞, 存在反应不充分, 转化率较低的问题。ICP-MS 设备昂贵限制了该方法的普遍应用。

本研究采用 DMA-80 直接测汞仪作为分析工具, 选择 5 mol/L 盐酸溶液为介质, 超声辅助溶剂萃取后, 用二氯甲烷萃取甲基汞, 再以水反萃取后, 用 DMA-80 测汞仪直接测定甲基汞。应用此方法对加拿大国家研究委员会(National Research Council Canada, NRCC)研制的角鲨鱼肉(DORM-2)和龙虾肝胰腺(TORT-2)生物标准参考物质进行了测定, 结果与标准参考物的标准值相符, 取得了较满意的结果。该方法样品处理程序简单, 大大节约了分析时间, 准确度高, 适用于鱼、贝类等海产品中甲基汞的测定。

2 材料与方法

2.1 仪器和试剂

DMA-80 直接测汞仪(意大利 Milestone 公司), 测量参数见表 1。超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)、冷冻干燥机(德国 Christ 公司)、超声波清洗器、涡旋、振荡器、离心机。

表 1 测汞仪工作参数

Table 1 Instrumental conditions of DMA-80

参数	数值	参数	数值
催化炉温度(°C)	250	净化时间(s)	60
汞合金加热时间(s)	12	积分时间(s)	30
升温程序	50 °C 升至 200 °C, 保持 1.0 min, 加热 1.5 min 使温度升至 650 °C, 保持 1.5 min		

所有玻璃器皿和容器均用 20%硝酸浸泡 48 h, 使用前用去离子水和超纯水分别清洗 3 次。

汞标准液(1000 mg/L, 中国计量科学研究院)、甲基汞标准液(86.2 µg/g, 中国计量科学研究院)、二氯甲烷(色谱纯)、盐酸(优级纯)。

2.2 样品前处理

选取了市场上常见的黄鱼、鳕鱼、金枪鱼、扇贝、蛤等海产品样品, 取可食肌肉组织冷冻干燥后, 研磨成粉末, 置于干燥中备用。

2.3 总汞的测定

称取干燥样品 0.1~0.2 g, 依据美国 EPA-7473 固态和液态样品中汞的分析方法, 用 DMA-80 测汞仪直接测定。

2.4 甲基汞的测定

称取干燥样品 0.5~1.0 g 于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 5 mol/L 盐酸溶液涡旋混匀后, 超声萃取 1 h, 然后以 4000 r/min 离心 10 min, 提取上清液 5 mL, 置于 15 mL 离心管中。加入 2 mL CH₂Cl₂ 萃取 MeHg, 剧

烈振荡 30 min, 4000 r/min 离心 10 min, 提取下层有机相至 10 mL 离心管中, 再于水相中加入 2 mL CH_2Cl_2 , 重复上述萃取过程, 合并两次萃取的有机相溶液, 加入 5 mL 纯水, 置于 50 °C 水浴中并充入氮气, 使有机相蒸发后, 水相直接用于测定甲基汞。同时做空白试验。

3 结果与讨论

3.1 前处理方法的比较

实验比较了盐酸体系下不同处理方式提取 MeHg 的效果, 结果如表 2 所示, 超声 1 h 和振荡 24 h 提取的效果较好。振荡提取时间较长, 因此选择超声提取作为辅助手段。

表 2 不同处理方式提取 MeHg 效果比较

Table 2 Recovery of methylmercury using different extraction methods

提取方式	MeHg标准量 (ng)	MeHg测定值 (ng)	回收率 (%)
超声30 min	76.3	52.2±3.6	68±5
超声60 min	77.7	77.2±2.8	99±4
超声120 min	77.8	76.3±4.6	98±6
振荡6 h	77.4	55.0±4.1	71±5
振荡12 h	79.2	73.9±3.1	93±4
振荡24 h	78.9	78.3±2.8	99±4

实验进一步研究了不同浓度盐酸溶液提取样品中 MeHg 的效果。结果如图 1 所示, 1 mol/L HCl 溶液提取 MeHg 效率较低, 仅达到 51%, 浓度大于 5 mol/L 提取效率较高, 说明低浓度的酸对 MeHg 的提取能力较低。因此选择 5 mol/L HCl 溶液作为提取溶液。

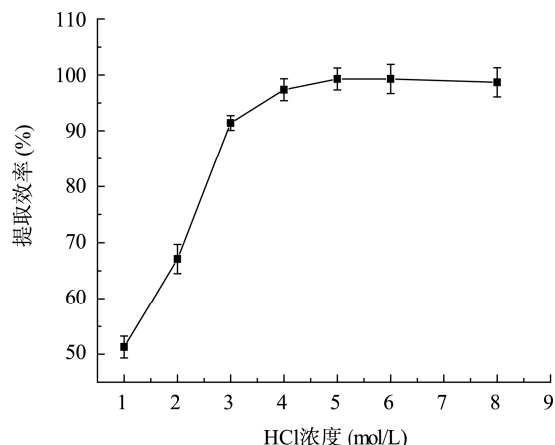


图 1 不同浓度 HCl 提取 MeHg 效果比较

Fig. 1 Effect of different concentrations of hydrochloric acid on methylmercury extraction efficiency

有机相二氯甲烷的萃取过程也是影响样品中 MeHg 提取效率的关键步骤。为了验证二氯甲烷萃取次数对 MeHg 萃取效率的影响, 本研究进行了二氯甲烷分步萃取实验。结果如表 3 所示, 一次二氯甲烷萃取 MeHg 并不充分, 萃取率为 82%~91%, 对一次提取后的盐酸溶液进行二次萃取, 萃取率为 6%~15%, 经过二次萃取后, MeHg 的总萃取率为 95%~99%, 基本萃取完全。

3.2 标准曲线及方法检出限

用汞标准储备液和甲基汞标准储备液, 分别配制浓度为 0、10、20、50、100、200、500 ng/mL 的总汞和甲基汞标准工作溶液, 根据标准工作溶液浓度和不同进样量, 绘制总汞和甲基汞的标准曲线, 标准曲线的回归方程、相关系数和检出限见表 4。检出限以 3 倍空白的标准偏差计算。

表 3 二氯甲烷分步萃取实验结果

Table 3 Results of step-extraction with dichloromethane

实验次数	甲基汞标准量 (ng)	一次萃取测定值 (ng)	一次萃取率 (%)	二次萃取测定值 (ng)	二次萃取率 (%)	总萃取率 (%)
1	76.3	62.6	82	11.4	15	97
2	77.8	66.1	85	7.7	10	95
3	80.0	72.8	91	4.8	6	97
4	78.9	69.4	88	7.1	9	97
5	77.2	67.0	87	9.3	12	99
6	77.7	66.1	85	8.5	11	96

3.3 方法的准确度和精密度

选择加拿大国家研究委员会研制的角鲨鱼肉(DORM-2)和龙虾肝胰腺(TORT-2)生物标准参考物质进行方法实验, 验证方法的准确度和精密度。平行测定 3 个样品, 甲基汞和总汞的测定结果分别列在表 5 中。结果表明, 本方法甲基汞和总汞的测定结果与标准值相符合, 相对误差小于 4%, 样品测定值的相对标准偏差(RSD)小于 4%, 具有较高的准确度和精密度。

3.4 实际样品的测定

应用超声辅助萃取-直接测汞法对常见海产品样

品中总汞和甲基汞含量进行了测定, 实验结果见表 6。结果可以看出, 海产品中的汞主要以甲基汞形态存在, 所测海产品中甲基汞占总汞的 56%~93%。不同海产品样品中总汞和甲基汞的含量存在较大差异。鳕鱼和金枪鱼是典型的海洋肉食性鱼类, 处于食物链的较高级, 食性很杂, 生活习性利于汞在鱼体内的富集, 因此鳕鱼和金枪鱼中总汞和甲基汞的含量较高。根据国家标准^[19]的规定, 水产动物(肉食性鱼类及制品除外)中甲基汞卫生限量为 0.5 mg/kg, 肉食性鱼类及制品为 1.0 mg/kg, 参照此标准, 本研究所测的海产品样品中甲基汞的含量均未超过卫生限量。

表 4 标准曲线和方法检出限
Table 4 Calibration curve and limit of detection

化合物	线性范围 (ng)	线性方程	相关系数	检出限 (ng/g)
THg	0~20	$Y = 0.014 + 0.042X$	0.9993	0.01
	20~200	$Y = 1.180 \times 10^{-2} + 6.840 \times 10^{-4}X$	0.9991	
MeHg	0~20	$Y = 0.014 + 0.040X$	0.9970	0.75
	20~200	$Y = 2.045 \times 10^{-2} + 6.138 \times 10^{-4}X$	0.9986	

表 5 标准参考物质测定结果
Table 5 Results of standard reference materials

标准物质	DORM-2			TORT-2		
MeHg标准值(mg/kg)	4.47±0.32			0.152±0.013		
MeHg测定值(mg/kg)	4.342	4.412	4.294	0.151	0.141	0.149
相对误差(%)	2.70			3.28		
RSD(%)	1.11			2.94		
THg标准值(mg/kg)	4.64±0.26			0.27±0.06		
THg测定值(mg/kg)	4.652	4.565	4.494	0.281	0.262	0.257
相对误差(%)	1.50			1.23		
RSD(%)	1.41			3.88		

表 6 常见海产品中总汞及甲基汞测定结果
Table 6 Concentrations of MeHg and Total Hg in sea products

样品	甲基汞含量(干重) (ng/g)	总汞含量(干重) (ng/g)	甲基汞占总汞比例 (%)
黄鱼	41.2	50.2	82
鳕鱼	407.3	452.6	90
金枪鱼	833.5	896.2	93
扇贝	23.8	42.5	56
杂色蛤	24.2	39.6	61

4 结 论

本研究建立了超声辅助萃取——直接测汞法测定海产品中的甲基汞。样品经盐酸溶液提取、二氯甲烷萃取、水反萃取等前处理步骤,应用DMA-80直接测汞仪测定样品中的甲基汞含量。结果表明,该方法前处理简单快速、样品用量少、结果稳定准确,适用于鱼、贝类等海产品中甲基汞含量的分析。应用该方法对常见海产品的测定结果显示,鳕鱼和金枪鱼中甲基汞和总汞的含量较高,在食用时应注意摄入量。

参考文献

- [1] Cantoni O, Christie NT, Swann A, *et al.* Mechanism of HgCl₂ cytotoxicity in cultured mammalian cells [J]. *Mol Pharmacol*, 1984, 26 (2):360 caojijuanlnciq@163.com 368.
- [2] 牛建军, 汪炳武. 痕量汞的分析现状和展望[J]. *分析化学*, 1991, 19(2): 1445-1448.
Niu JJ, Wang BW. Present status and prospect of trace mercury determination [J]. *Anal Chem*, 1991, 19(2): 1445-1448.
- [3] Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1995, 25(1): 1-24.
- [4] Clarkson TW. The three modern faces of mercury [J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 101 (Suppl 1): 11-23.
- [5] 廖自基. 环境中微量重金属元素的污染危害与迁移转化[M]. 北京: 科学出版社, 1989.
Liao ZJ. Pollution and migration of heavy metals in environment [M]. Beijing: Science Press, 1989.
- [6] 蔺玉华, 张冰艳, 卢健民, 等. 鱼体汞的甲基化及其甲基汞的吸收与代谢[J]. *水产学报*, 1994, 18(4): 326-329.
Lin YH, Zhang BY, LU JM, *et al.* Methylation of mercury and methylmercury metabolism in fish body [J]. *J Fish China*, 1994, 18(4): 326-329.
- [7] Furutani A, Rudd JW. Measurement of mercury methylation in lake water and sediment samples [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 40: 770-776.
- [8] 李春英, 邱炳源. 甲基汞的毒性作用[J]. *中国预防医学杂志*, 2001, 35(6): 420-421.
Li CY, Qiu BY. The toxic effect of methyl mercury [J]. *Chin J Prev Med*, 2001, 35(6): 420-421.
- [9] Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(18): 1731-1737.
- [10] 史建波. 气相色谱和原子荧光联用测定生物和沉积物样品中甲基汞[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(2): 336-339.
Shi JB. Determination of methylmercury in biological and sediment samples by capillary gas chromatography on-line coupled with atomic fluorescence spectrometry [J]. *Spectrosc Spect Anal*, 2006, 26(2): 336-339.
- [11] 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, 36(6): 793-798.
Li Y, Liu SJ, Jiang DQ, *et al.* Gas chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry for mercury speciation in seafoods [J]. *Chin J Anal Chem*, 2008, 36(6): 793-798.
- [12] Nevado JJB, Martin-Doimeadios RCR, Bernardo FJJ, *et al.* Determination of mercury species in fish reference materials by gas chromatography-atomic fluorescence detection after closed-vessel-microwave-assisted extraction [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1093(1): 21-28.
- [13] Schoeberl K, Leonhardt E, Kuballa T. Determination of methylmercury in fish and seafood using optimized digestion and derivatization followed by gas chromatography with atomic emission detection, European food research and technology [J]. *Eur Food Res Technol*, 2009, 228(3): 425-431.
- [14] 吕超, 刘丽萍, 董慧茹, 等. 盐酸提取-液相色谱-原子荧光联用技术检测水产品中甲基汞等汞化合物[J]. *分析实验室*, 2010, 29(2): 64-68.
Lv C, Liu LP, Dong HR, *et al.* Hydrochloric acid extract-mercury speciation analysis by high performance liquid chromatography coupled atomic fluorescence spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2010, 29(2): 64-68.
- [15] 王萌, 丰伟悦, 张芳, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定生物样品中无机汞和甲基汞[J]. *分析化学*, 2005, 33(12): 1671-1675.
Wang M, Feng WY, Zhang F, *et al.* Determination of inorganic and methyl mercury in biological samples by high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2005, 33(12): 1671-1675.
- [16] Gast CH, Kraak JC, Poppe H, *et al.* Capabilities of on-line element-specific detection in high-performance liquid chromatography using an inductively coupled argon plasma emission source detector [J]. *J Chromatogr*, 1979, 185(12): 549-561.
- [17] Yan XP, Li Y, Jiang Y. Selective measurement of ultratrace methylmercury in fish by flow injection on-line microcolumn displacement sorption preconcentration and separation coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(10): 2251-2255.
- [18] 李保会. 基于低流速雾化器和可拆卸接口的毛细管电泳-电感

耦合等离子体质谱联用技术应用于汞的形态分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(8): 1336-1338.

Li BH. Speciation analysis of mercury by capillary electrophoresis on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry based on a micro mist nebulizer and a removable interface [J]. Spectrosc Spect Anal, 2005, 25(8): 1336-1338.

- [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].

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



庞艳华, 博士, 高级工程师, 主要从事食品安全检测。

E-mail: pyh_lnciq@126.com



曹际娟, 博士, 研究员, 主要从事食品安全检测与研究。

E-mail: caojijuanlnciq@163.com