

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法测定 东海乌参样品中的二价汞、甲基汞、 乙基汞和苯基汞

贾彦博¹, 陆吉琛¹, 朱蓓¹, 林舒忆¹, 洪春来^{2*}

(1. 杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310022; 2. 浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所, 杭州 310021)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)测定东海乌参样品中的二价汞、甲基汞、乙基汞和苯基汞 4 种汞形态的含量。**方法** 样品经 25%KOH 微波萃取 1 h, 采用 Agilent Zorbax Plus C₁₈ 色谱柱分离, 以 10 mmol/L 醋酸铵+0.12%L-半胱氨酸缓冲盐及 2%甲醇作为流动相进行梯度洗脱, 采用 ICP-MS 进行检测。**结果** 二价汞、甲基汞、乙基汞和苯基汞在 10 min 内完成分离, 检出限分别为 0.8、0.2、0.2 和 0.8 ng/mL; 在 0.10、0.20 和 0.40 mg/kg 3 个加标水平下, 4 种汞化合物的回收率为 78.1%~105.8%, 相对标准偏差为 5.3%~8.2%。**结论** 本方法简便、快速、准确, 适用于汞形态的分析。

关键词: 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法; 二价汞; 甲基汞; 乙基汞; 苯基汞; 东海乌参

Determination of bivalent mercury, methyl-mercury, ethyl-mercury and phenyl-mercury in *Acaudina leucoprocta* by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry

JIA Yan-Bo¹, LU Ji-Chen¹, ZHU Bei¹, LIN Shu-Yi¹, HONG Chun-Lai^{2*}

(1. Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310022, China; 2. Institute of Environment, Resource Soil and Fertilizer, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of 4 kinds of mercury speciation including bivalent mercury, methyl-mercury, ethyl-mercury and phenyl-mercury in *Acaudina leucoprocta* by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). **Methods** After microwave extraction with 25% potassium hydroxide (KOH) for 1 h, the sample was separated by Agilent Zorbax Plus C₁₈ column with the mobile phase of 10 mmol/L ammonium acetate/0.12% L-cysteine/methanol for gradient elution and then detected by ICP-MS. **Results** Bivalent mercury, methyl-mercury, ethyl-mercury and phenyl-mercury could be separated within 10 min. The detect limits were 0.8, 0.2, 0.2 and 0.8 ng/mL, respectively. The recoveries of 4 kinds of mercury speciation spiked at 3 levels of 0.10, 0.20 and 0.40 mg/kg were ranged from 78.1% to 105.8% with the relative standard deviations of 5.3%~8.2%. **Conclusion** The developed method is simple, rapid and accurate, which

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究(分析测试)项目 (2013C37058)

Fund: Supported by the Project of Zhejiang Province Public Welfare Technology Application Research (Analysis) (2013C37058)

*通讯作者: 洪春来, 副研究员, 主要研究方向为固体废物资源化利用与环境修复。E-mail: 82004897@qq.com

*Corresponding author: HONG Chun-Lai, Associate Professor, Institute of Environment, Resource Soil and Fertilizer, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China. E-mail: 82998580@qq.com

can be used for determination of mercury speciation.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry; bivalent mercury; methyl-mercury; ethyl-mercury; phenyl-mercury; *Acaudina leucoprocta*

1 引言

东海乌参(学名为白肛海地瓜, *Acaudina leucoprocta*), 是我国20多种可供食用的海参之一, 口感和营养成分媲美北方刺参, 富含胶原蛋白、海参多糖、海参皂苷、维生素、必需脂肪酸以及常量和微量元素等成分, 且不含胆固醇, 长期食用能增强体质、预防疾病、抑制肿瘤及延缓衰老^[1]。东海乌参盛产于我国浙江、广东及福建等沿海一带, 由于其长年生长于海底淤泥上, 使其表面形成致密坚硬的体表污垢层, 这些污垢层是由含重金属沉积物的海底淤泥与它体表分泌的粘液牢固地结合而形成的。这些体表污垢层内含有的有害重金属如汞、砷、铅元素的含量会随着海水污染而日益加剧, 使得东海乌参体内重金属含量超标^[2,3]。

海洋环境(如海洋沉积物、海产品等)中特定污染元素如汞、砷的毒性和生物蓄积作用很大程度上依赖于它们存在的化学形态, 虽然在环境和生物样品中汞的形态不是很复杂, 但由于汞化合物的毒性和样品基体的复杂性, 使得汞的形态分析越来越受到科研工作者关注^[4-6]。不同的汞形态毒性大不同, 各汞形态化合物的毒性大小依次为: 甲基汞 > 乙基汞 > 无机汞, 且甲基汞和乙基汞均为脂溶性的, 容易被生物体吸收, 并通过食物链富集最终进入人体, 代谢周期长, 即使剂量很少也可累积致毒。此外, 苯基汞对皮肤、眼睛和呼吸道亦有中毒刺激作用, 会使皮肤产生过敏反应^[7]。因此, 迫切需要建立有效、快速的汞形态分析方法。

目前, 各种汞形态分析方法主要包括毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱(gas chromatography, GC)、电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)、电感耦合等离子体原子发射光谱(inductively coupled plasma atomic emission spectrum, ICP-AES)、原子吸收光谱(atomic absorption spectroscopy, AAS)及原子荧光光谱(atomic fluorescence spectroscopy, AFS)等。这些形态分析技术中首选的检测手段便是ICP-MS, 它具有干扰相对较少、线性范围更宽及检出限更低的优势, 与其他联用方法相比较, HPLC和ICP-MS联用技术具有前处理过程简便、应用范围广、接口简单、可以和多个检测器串联且可以保持待测样品原始形态等优点, 在元素形态分析中已有报道^[8-10]。水产品中蛋白含量高, 水溶性提取溶液黏度大^[11], 对样品的提取造成一定的困难, 因此应用HPLC-ICP-MS联用技术测定海参类样品中的汞形态近来较少报道。

本研究针对东海乌参富含胶原蛋白、样品基体复杂的特性, 建立了碱溶液-微波辅助萃取样品的前处理方法, 同时采用高灵敏度的ICP-MS为检测器, 与HPLC联用技术, 快速测定东海乌参样品中二价汞、甲基汞、乙基汞和苯基汞的含量。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Varian 820-MS 电感耦合等离子质谱仪(美国瓦里安公司); 液相色谱仪(Pro Star), 配有自动进样器(美国瓦里安公司); MILLI-Q 纯水—超纯水系统(美国 Millipore 仪器公司); 冷冻离心机(美国 Sigma 公司); FE20 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司); Multiwave 3000 OVEN 微波消解仪(奥地利安东帕公司)。

醋酸铵(优级纯)、L-半胱氨酸(优级纯)、甲醇(色谱纯)、氢氧化钾(优级纯)均购自华东医药股份有限公司; 氯化乙基汞(纯度>98.0%, 中国计量科学研究院); 氯化甲基汞(纯度>96.0%, 中国计量科学研究院); 无机汞标准储备液: 1000 μg/mL(中国计量科学研究院); 苯基汞(纯度 96.0%, 中国计量科学研究院); 氙气(纯度>99.999%, 中国计量科学研究院)。

东海乌参样品购自宁波石浦, 将刚捕捞上来的东海乌参直接放入冷库中冰冻, 以冷冻方式运至实验室, -20 °C 冰箱中冷冻备用。鱼肉标准物质(GBW10029)购自国家标准物质中心。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

甲基汞标准溶液 100 μg/mL: 准确称取 13.02 mg 氯化甲基汞于 100 mL 容量瓶中, 加入少量甲醇溶解并定容至刻度。4 °C 避光保存于冰箱。

乙基汞标准溶液 100 μg/mL: 准确称取 13.46 mg 氯化乙基汞于 100 mL 容量瓶中, 加入少量甲醇溶解并定容至刻度。4 °C 避光保存于冰箱。汞标准溶液 100 μg/mL: 准确移取 1000 μg/mL 汞标准溶液 10 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。4 °C 避光保存于冰箱。

苯基汞标准溶液 100 μg/mL: 准确称取 17.56 mg 二苯基汞于 100 mL 容量瓶中, 加入少量甲醇溶解并定容至刻度。4 °C 避光保存于冰箱。混合标准中间溶液 1 μg/mL(按 Hg 计): 准确移取 100 μg/mL 甲基汞、乙基汞、苯基汞、无机汞标准溶液各 1 mL, 用水稀释并定容至 100 mL 容量瓶中, 4 °C 避光保存于冰箱。

混合标准使用液 100 ng/mL(按 Hg 计): 分别准确移取 10.0 mL 中间液于 100 mL 容量瓶中, 纯水稀释并定容至刻度。当日配制使用。

醋酸铵(10 mmol/L)+L-半胱氨酸(0.12%)溶液: 分别称取 0.7708 g 醋酸铵和 1.2000 g L-半胱氨酸, 溶于 1000 mL 超纯水中, 以浓氨水调整 pH 值至 7.5, 经 0.45 μm 水系滤膜过滤后, 于超声水浴中超声脱气 30 min, 备用。

2.2.2 样品前处理

取个体大小比较均匀的东海乌参, 解冻洗净, 去除表面泥沙、污垢和内脏等非可食部分, 切块, 用打样机捣碎。在微波消解罐中, 准确称取 0.5000 g 制备的样品, 加入 5.00 mL 25%KOH 溶液, 轻轻振摇, 置于微波消解仪中, 按消解仪条件(表 1)提取 1 h。提取程序完成后, 转移样品至 50 mL 离心管中, 逐滴加入浓盐酸 2.00 mL, 用于中和过量的碱。再加入二氯甲烷 10 mL, 于水平振荡器内振荡 30 min, 在离心机上 4000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心 10 min。于 10 mL 塑料离心管中精密移取 5.00 mL 下层二氯甲烷, 加入 2.00 mL 0.01 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液, 振荡 1 h, 再在离心机上 4000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心 10 min。最后在 10 mL 刻度玻璃管中, 精密移取 1.00 mL 上层清液用超纯水定容至刻度, 上机测定。

表 1 微波消解条件
Table 1 Parameters of microwave digestion

步骤	功率(W)	温度($^{\circ}\text{C}$)	保持时间(min)
1	1600	40	40
2	1600	50	20

2.2.3 仪器参数

(1)色谱条件: Agilent Zorbax Plus XDB- C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相: A 相为 0.12%L-半胱氨酸-10 mmol/L 醋酸铵, 用氨水调节 pH 至 7.5, 用 0.45 μm 水相滤膜过滤; B 相为甲醇。流动相流速为 1.0 mL/min; 进样量 20 μL 。梯度洗脱。

(2)ICP-MS 的工作参数: 采样深度 6.5 mm; 入射功率 1400 W; 玻璃同心雾化器; 石英雾化室与炬管, 雾室采用半导体控于 -2 $^{\circ}\text{C}$; Ni 截取锥和采样锥; 采样模式: Time program。同位素: ^{202}Hg , 积分时间 0.5 s。

3 结果与讨论

3.1 样品中不同形态汞的提取

汞的形态分析中最重要的步骤之一是样品前处理方法, 它决定了整个方法的准确性、精密度和检出限。在生物组织样品中, 有机汞化合物能与硫牢固结合, 因此必须经过化学处理破坏硫化物并将其转变为卤代烷基汞才可提取至有机溶剂中。在样品提取过程中需要防止样品的污染, 克服汞的吸附和挥发, 保证样品中各种汞形态的原始特性

不变, 保持各种汞形态的稳定性^[11]。

常用的汞化合物萃取方法有固相微萃取、固相萃取、水蒸气蒸馏、碱消解和酸浸提等。海参样品由于胶原蛋白含量高, 样品基体比较复杂, 因此碱提取成为汞形态分析最常用的前处理方法^[11]。常用的碱试剂有四甲基氢氧化铵-甲醇溶液、四甲基氢氧化铵-水溶液、氢氧化钾-甲醇溶液等^[12-14]。固相萃取(solid phase extraction, SPE)技术具有能有效将干扰组分与分析物分离, 减少样品预处理过程, 操作简单、省力、省时等优点, 因此是一种应用广泛的样品预处理技术^[15]。经过实验, 比较了酸浸提和碱浸提的提取效果, 发现酸浸提方法样品中汞形态发生转化, 而采用碱浸提方法样品中汞形态原始性和稳定性较好。因此, 本研究选用 25%KOH 溶液作为东海乌参样品汞形态的提取剂。

3.2 HPLC 条件的优化

3.2.1 流动相中络合剂的选择

在流动相中加入一定量含硫的络合剂, 可以使汞化合物络合成较大的分子。这能够改善它在色谱柱上的保留时间, 有效分离样品中不同形态汞化合物。本研究选择了 0.12%半胱氨酸、0.12%一巯基乙醇 2 种络合剂, 在实验条件下, 比较了 2 种络合剂对无机汞、甲基汞、乙基汞和苯基汞的分离效果, 结果表明, 0.12%的半胱氨酸对东海乌参样品中 4 种汞形态的分离效果较好, 结果见图 1。

3.2.2 流动相中甲醇含量的选择

本实验研究了不同体积比例(0%、1%、2%、4%和 8%)的甲醇含量对各形态汞分离效果的影响。试验表明, 随着甲醇浓度的增加, 各形态汞的保留时间减少, 而且分离效果逐渐变差。甲醇含量过高, 引起锥口积碳, 从而影响 ICP-MS 信号的稳定性。经过实验, 最后选用 2%的甲醇(V:V)作为流动相。

3.2.3 进样体积的选择

随着进样体积的增大, 峰面积逐渐变大, 灵敏度也越来越高, 但峰形逐渐变宽, 分离效果随之变差。综合实验结果, 同时考虑色谱柱的有效容积, 而且进样体积 20 μL 已经完全满足实验灵敏度的要求。因此, 本研究最后选择进样体积为 20 μL 。

3.3 标准曲线及线性关系

分别准确移取 100 ng/mL 混合标准使用液 0.00、2.50、5.00、12.50 和 25 mL 于 50 mL 容量瓶, 纯水稀释至刻度, 此标准系列溶液的浓度分别为 0、5、10、25 和 50 ng/mL。

采用调谐液对仪器进行调谐, 使仪器双电荷、氧化物、灵敏度、分辨率等各项指标均达到检测要求。吸取标准系列溶液 20 μL 注入液相色谱-电感耦合等离子质谱联用仪, 得到色谱图, 以保留时间定性。以标准溶液中目标化合物的浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果以色谱峰面积对浓度进行线性回归。以 3 倍基线噪声($S/N=3$)计算 4 种汞形态的检出限, 结果见表 2。

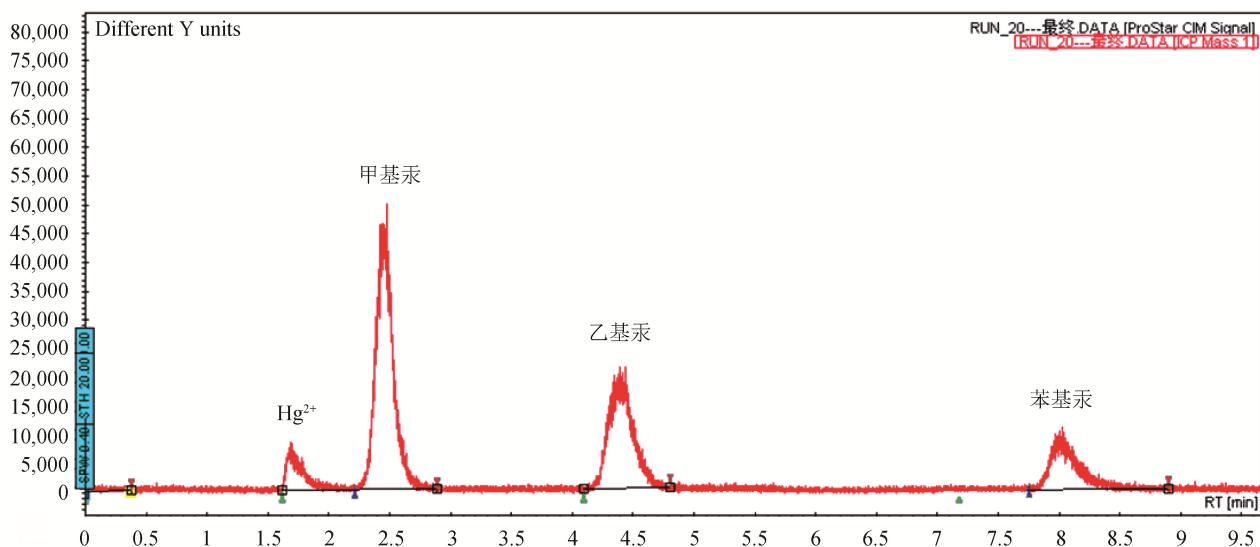


图 1 混合标准物质的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of standard

表 2 方法的线性范围和检出限
Table 2 Linear ranges and detection limits of the method

化合物	线性范围(ng/mL)	线性方程	相关系数	检出限(ng/mL)
无机汞	1~50	$Y=3.05 \times 10^4 X + 2.60 \times 10^4$	0.998	0.8
甲基汞	1~50	$Y=5.25 \times 10^4 X + 2.80 \times 10^4$	0.999	0.2
乙基汞	1~50	$Y=2.10 \times 10^4 X + 1.78 \times 10^4$	0.997	0.2
苯基汞	1~50	$Y=1.25 \times 10^4 X + 1.37 \times 10^4$	0.998	0.8

3.4 方法的精密度和准确度

方法的回收率和精密度结果见表 3, 由表 3 可知, 在优化的实验条件下, 汞各形态在 0.1、0.2 和 0.4 mg/kg 3 个水平上的加标回收率为 78.1%~105.8%, 相对标准偏差为 5.3%~8.2%, 说明该方法的准确度和精密度较好。采用优化后的提取条件、仪器条件, 对标准物质(鱼肉 GBW10029)进行了提取测定, 结果与标准值基本吻合(见表 4)。

4 结 论

针对东海乌参样品胶原蛋白、脂肪含量高的特点, 本研究建立了在 25%KOH 碱体系中, 采用微波辅助提取样品中的甲基汞、乙基汞、苯基汞和二价汞的样品前处理方法, 样品经二氯甲烷萃取、硫代硫酸钠富集净化后采用 HPLC 和 ICP-MS 联用测定甲基汞、乙基汞、苯基汞和二价汞的新方法。样品提取方法快速、简便, 可控性好, 测定方法准确度高、精密度好。

表 3 方法的回收率和精密度($n=3$)
Table 3 Recoveries and precisions of the method ($n=3$)

组分	样品本底 (mg/kg)	添加值 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD(%)
无机汞	0.0154	0.1000	86.1	7.8
		0.2000	99.9	6.0
		0.4000	105.8	5.3
甲基汞	0.0351	0.1000	84.5	8.0
		0.2000	88.2	6.2
		0.4000	97.1	7.7
乙基汞	ND	0.1000	85.2	6.2
		0.2000	93.8	5.9
		0.4000	102.3	6.4
苯基汞	ND	0.1000	78.1	8.2
		0.2000	86.9	5.8
		0.4000	95.1	6.1

注: ND 表示小于方法的检出限。

表 4 标准物质中甲基汞的测定结果

Table 4 Determination results of methyl mercury in standard material

样品名称	测定值 (mg/kg)	平均值 (mg/kg)	推荐值 (mg/kg)	准确度%
鱼肉 (GBW10029)	0.73			86.9
	0.75	0.74	0.84±0.03	89.3
	0.74			88.1

参考文献

- [1] 单恩莉, 林赛君, 薛亚平, 等. 东海海参重金属去除工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 239-244.
Shan EL, Lin SJ, X YP, *et al.* Study on technology of removing heavy metals from east sea cucumber (*Acaudina leucoprocta*) [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(13): 239-244.
- [2] 贾彦博, 林赛君, 陈美春, 等. 电感耦合等离子体质谱法测定东海海参中多种金属元素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(3): 929-934.
Jia YB, Lin SJ, Chen MC, *et al.* Determination of elements contents in *Acaudina leucoprocta* by inductive coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(3): 929-934.
- [3] NY/T 1514-2007 中华人民共和国农业行业标准 绿色食品 海参及制品 [S].
NY/T 1514-2007 National agricultural standard Green food-Sea cucumbers and products [S].
- [4] 高而乐, 何滨, 江桂斌, 等. 酸浸提-HPLC-ICP-MS 系统测定土壤与底泥样品中的甲基汞、乙基汞[J]. 环境化学, 2008, 27(5): 698-700.
Gao EL, He B, Jiang GB, *et al.* Determination of methyl mercury and ethyl mercury in soil or sediment using acid leaching-HPLC-ICP-MS [J]. *Environ Chem*, 2008, 27(5): 698-700.
- [5] 陈玉红, 米健秋, 张兰. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法测定环境水样中的二价汞、甲基汞、乙基汞与苯基汞[J]. 环境化学, 2011, 30(4): 893-896.
Chen YH, Min JQ, Zhang L. Determination of inorganic mercury, methyl mercury, ethyl mercury and phenyl mercury in environmental water samples using HPLC-ICP-MS [J]. *Environ Chem*, 2011, 30(4): 893-896.
- [6] Krishna MVB, Ranjit M, Karunasagr D, *et al.* A rapid ultrasound assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by cVAAs [J]. *Talanta*, 2005, 67(1): 70-81.
- [7] Leopold K, Foulkes M, Wbrsfold PJ. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters-a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 663(2): 127-138.
- [8] Muñoz J, Gallego M, Valc6rcel M. Solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry using a fullerene sorbent for the determination of inorganic mercury, methylmercury and ethylmercury in surface waters at sub-ng/ml levels [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1055(1-2): 185-190.
- [9] Brombach CC, Gajdosechova Z, Chen Bin, *et al.* Direct online HPLC-CV-AFS method for traces of methylmercury without derivatisation: a matrix independent method for urine, sediment and biological tissue samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 973-981.
- [10] Hashemi-Moghaddam H, Saber-Tehrani M. Sensitive mercury speciation by reversed-phase column high-performance liquid chromatography with UV-visible detection after solid-phase extraction using 6-mercaptopurine and dithizone [J]. *J AOAC Int*, 2008, 91(6): 1453-1458.
- [11] 梅光明, 郭远明, 张小军, 等. 浙江沿海海产品中汞形态分析测定与分布特征[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 229-234.
Mei YM, Guo YM, Zhang XJ, *et al.* Analysis and distribution characteristics of Mercury Species in seafood from the coast of Zhejiang province [J]. *Food Sci*, 2015, 36(24): 229-234.
- [12] 杨杰, 王竹天, 杨大进. 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 DJ. Research progress of analysis technology on methyl mercury and mercury speciation in food [J]. *Foreign Med Hyg Booklet*, 2008, 35(3): 181-187.
- [13] Chen SS, Chou SS, Hwang DF. Determination of methylmercury in fish using focused microwave digestion following by Cu²⁺ addition, sodium tetrapropylborate derivatization, n-heptane extraction, and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1024(1-2): 209-215.
- [14] Juan José BN, Rosa Carmen Rodríguez MD, Francisco Javier GB, *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 (1-2): 21-28.
- [15] Abranká L, ICmellár B, Fodor P. Comparison of extraction procedures for methylmercury determination by a SPME-GC-AFS system [J]. *Microchem J*, 2007, 85(1): 122-126.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



贾彦博, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: 82998580@qq.com



洪春来, 副研究员, 主要研究方向为固体废物资源化利用与环境修复。

E-mail: 82004897@qq.com