

HPLC-ICP-MS分析鱼类样品中的甲基汞

作者

S. Ghanthimathi^a, Norhidayu bt Ibrahim^a,
Zalilah bt Nasira, Lilian Lim^b, and Kenneth Ong^c

^a Metal Contaminant Unit, National Public Health
Laboratory, Sungai Buloh, Malaysia

^b PerkinElmer Malaysia

^c PerkinElmer Singapore

摘要：采用高效液相色谱（HPLC）和电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）联用分析了澳大利亚国际研究会确认的参考物质(a) TORT-2 and (b) DORM-2中汞的两个形态。温和的萃取方法保持了汞形态的完整性。采用0.1%L-半胱氨酸做为流动相，反相色谱柱做为分离柱，在6min内可以完成汞形态的分离。方法的检出限为0.5ppb，足以检测鱼样品中低含量的汞。通过分析海洋生物认证的参考材料(TORT-2 and DORM-2)验证了方法的准确性。该方法成功检测了印度鲭鱼中甲基汞的含量。

引言

汞在自然界中以不同形态存在，最常见的形态有金属汞、硫化汞（朱砂矿石）、氯化汞和甲基汞。在鱼类产品中，甲基汞是主要的存在形态。美国环境保护署（EPA）汞的概述文件中提到，大多数成年鱼中90%到100%的汞是甲基汞（US EPA,2001）。

甲基汞是一种具有神经毒性的环境污染物，不利于大脑的发育。该化合物可以通过胎盘屏障和血-脑屏障，因此，在怀孕期间甲基汞的风险是主要关注的问题。此外，甲基汞具有致癌性，对它的总体评价也非常重要。

甲基汞是近年来毒理学研究最广泛的化合物，一般来说，有机态的毒性大于无机态。汞存在于人类所消耗的鱼类产品和海洋哺乳动物体内。人类活动和自然释放的汞在水生环境中通过生物活性自然形成甲基汞，并通过食物链不断累积，导致高端的掠食性鱼类和哺乳动物体内的甲基汞浓度比水体和低等生物体内浓度高。鱼类中总汞的浓度大多数是有机汞形态（老鱼接近100%）。

甲基汞对人类及动物的一些器官系统会产生不利影响已经被证实，包括神经系统（智障、耳聋、失明、口齿不清等），肾脏系统，血液和心脏系统（血压、心率不齐和心脏疾病），其它影响还包括致癌性和基因变异。动物实验表明，甲基汞对免疫系统和生殖系统也有不利影响，是一个典型的致癌物。

为了开展研究，有必要选择适当的方法测定鱼类中甲基汞浓度，该方法要具有良好的再现性、重复性，和好的准确度。本文所采用的方法是在酸性介质中用甲苯提取甲基汞，然后用L-半胱氨酸盐酸盐将萃取液反萃取到水相中，水提取物中的甲基汞含量采用HPLC-ICP-MS分离测定。

一般来讲，汞的形态分析包括以下步骤：

- (1) 样品采集/预处理/保存/存储
- (2) 从基质里提取汞/分离/富集
- (3) 目标汞形态分离
- (4) 检测

条例法规

甲基汞的毒性已被公认，人类所面临的甲基汞的风险主要来源于鱼类，导致了世界各地政府和卫生机构立法的发展。大部分国家和组织现行标准为汞在鱼中的最大浓度为0.5毫克/公斤湿重。

欧洲委员会（EC）已经推出了EC 1881/2006法规，规定了某些污染物在食品中的限值。至于水产品和鱼类

中汞的含量，规则规定限值为0.5毫克/公斤湿重。为了符合这些严格的规定，政府和卫生机构需要一个可靠的鱼中汞的分析方法。高效液相色谱电感耦合等离子体质谱法（HPLC-ICP-MS）是测量鱼中低浓度汞的有力工具。本研究验证了HPLC-ICP-MS精确、可靠的分析鱼中低浓度汞的能力。

实验部分

ICP-MS工作条件

对于形态分析，HPLC分离洗脱后采用PerkinElmer® ELAN® DRC-e 型ICP-MS (PerkinElmer, Inc., Shelton, CT, USA)检测，ICP-MS工作条件和数据采集参数见表1。

色谱条件

高效液相色谱仪配有珀金埃尔默200系列泵，自动进样器，真空脱气机和柱温箱，所有分离在室温下等度淋洗。分离柱是珀金埃尔默®C-18柱（150mm×4.6mm×5 μm），进样量为50 μL，采用200μLPEEK定量环。HPLC与ICP-MS通过自动切换阀直接连接。最佳实验条件列于表2。

试剂

流动相制备：称取1克L-半胱氨酸溶解于1升去离子水中得到0.1%（w/v）L-半胱氨酸溶液。

金洗涤液制备：500ppb的金洗涤液由1000ppm的金储备液（珀金埃尔默）加去离子水制备，作为清洗液在所有样品和标准之间注入。

TABLE I
ICP-MS Operating
Conditions and Performance

Instrument	ELAN DRC-e ICP-MS
Analytes	Hg 199.968 amu
Calibration	External
RF Power	1300 W
RPa Setting	0
RPq Setting	0.25
Mode	Standard
Dwell Time	250 ms
Sweeps / Reading	1
Reading/ Replicates	3557
Replicates	1
Spray Chamber	Cyclonic Spray Chamber
Nebulizer	Meinhard Nebulizer

TABLE II
HPLC Operating Conditions and Performance

Instrument	HPLC Series 200 with Autosampler, Peltier Column Oven, Quaternary Pump, Vacuum Degasser and Rheodyne® Switching Valve
Software	Chromera Software Version 1.2
Column	PerkinElmer C ₁₈ Aqueous (a) Column Length: 150 mm (b) Inside Diameter: 4.6 mm (c) Particle Size: 5 μm (d) Pore Size: 100 Å
Injection Volume	50 μL
Oven Temperature	25 °C
Pump	Isocratic
Mobile Phase	0.1 % w/v L-cysteine
Flow Rate	1 mL/min
Sample Loop	200 μL
LC Pump Program	(a) Step 0 = 1 min (Equilibrium): 100 % of 0.1% (w/v) L-cysteine with flow rate of 1 mL/min (b) Step 1 = 6 min (Run): 100 % of 0.1 % w/v L-cysteine with flow rate of 1 mL/min (c) Step 2 = 1 min (Wash): 100 % of 0.1% (w/v) L-cysteine with flow rate of 1 mL/min

标准制备

1克L-半胱氨酸盐酸盐溶于1L去离子水中制备成0.1%L-半胱氨酸盐酸盐标准空白，汞标准系列由1000ppm汞储备液（珀金埃尔默）制备，介质为0.1%L-半胱氨酸盐酸盐。称取适量氯化甲基汞（购买于Fluka公司）溶解于0.1%L-半胱氨酸盐酸盐溶液里制备成2000ppm储备液，加入适量的2-巯基乙醇（Sigma）助溶。甲基汞标准储备液先稀释制备10ppm标准使用中间液，在由标准使用中间液稀释制备成不同溶度的标准使用液，介质为0.1%L-半胱氨酸盐酸盐溶液。所有的标准都在4℃下避光保存，汞标准工作液随用随配，介质为0.1%L-半胱氨酸盐酸盐溶液。为了验证方法，使用龙虾肝胰脏（TORT-2）和角鲨肌肉（NRCC）两个标准参考物质作为测试样本。

样品制备

称取5g左右冷冻干燥的样品（图1）于50mL洁净的聚丙烯管（pp管）中，加入10mL甲苯，涡旋混合器搅拌5min，均匀地分散样品，确保所有甲基汞溶解于甲苯中。然后加入25克0.1%L-半胱氨酸盐酸盐反萃取溶液，振荡提取所有形态的汞于水相中。样品管在800rpm转速下离心3min，分离水相和甲苯有机相。用塑料注射器收集水相转移到另一个干净的聚丙烯管中在4000rpm转速下离心5分钟。塑料注射器连接聚偏二氟乙烯（PVDF）过滤器转移萃取溶液至HPLC样品瓶中，然后进样分析。

结果与讨论

图2给出了2ppb无机汞、甲基汞和DORM-2 CRM的分离色谱图，无机汞和有机汞在六分钟内可以完全分离。



Fig. 1. Indian Mackerel fish.

图2显示,DORM-2 CRM的基体不影响色谱分离，SRM和标准的出峰时间一致。为了验证方法的稳定性，重复进样测定2ppb标准溶液，叠加色谱图如图3所示，几近完美的色谱重叠图证明了该方法的可重复性。

通过注入浓度的依次降低，直到三倍信噪比，确定该方法检测鱼样品中汞含量检出限（LOD）为0.5ppb（ $\mu\text{g/kg}$ ）。该方法的线性范围为0.5ppb至6ppb，相关系数（ R^2 ）>0.995。图4为校准曲线的色谱图，表明该方法有很宽的浓度范围。

为了验证HPLC-ICP-MS方法，测定TORT-2 和DORM-2 两个参考物质中的汞化合物，同时在参考物质中加入4ppb汞和2ppb甲基汞，计算回收率。

通过平行测定3个样（CRM, Spike 1 和 2）来验证方法的重复性，TORT-2参考物质中汞的参考值为 0.27 ± 0.06 mg/kg，甲基汞的参考值为 0.152 ± 0.013 mg/kg。

通过分析参考物质DORM-2的萃取液来验证方法的准确性，总汞的参考值为 4.64 ± 0.26 mg/kg，甲基汞的参考值为 4.47 ± 0.32 mg/kg。由于参考物质DORM-2中甲基汞的浓度较高，分析萃取液时需稀释25倍后测定以避免残留效应。因此，只有甲基汞被检出，而无机汞由于稀释因子较大，其含量（0.47 mg/kg）低于检测水平而没有报道（如图2所示）。

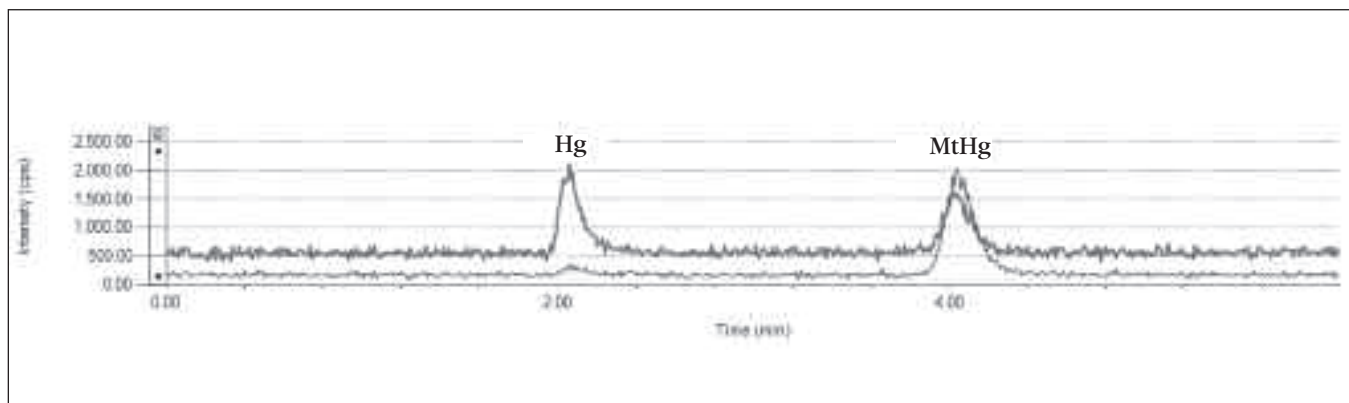


Fig. 2. Chromatograms of a standard containing 2 ppb of inorganic mercury and methylmercury (upper trace) and of the CRM DORM-2 (lower trace).

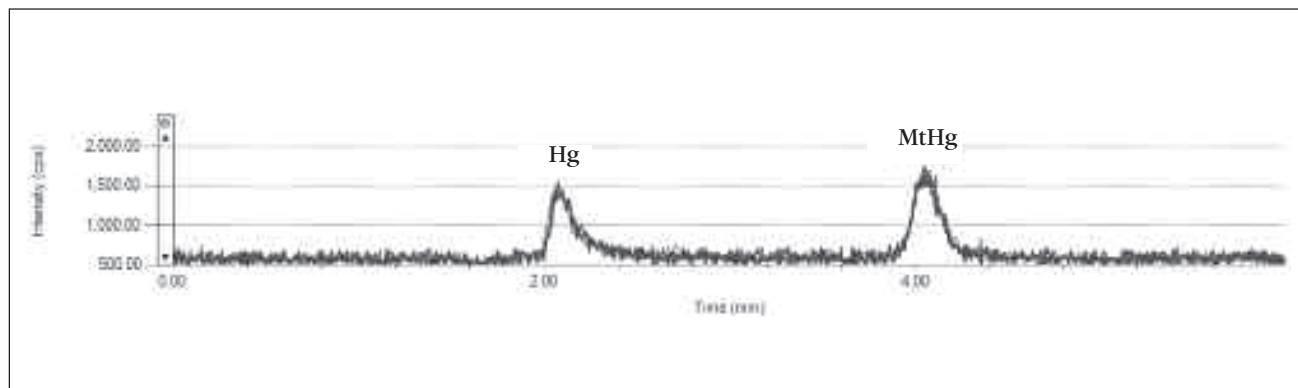


Fig. 3. Consecutive injections of a 2-ppb standard, demonstrating repeatability.

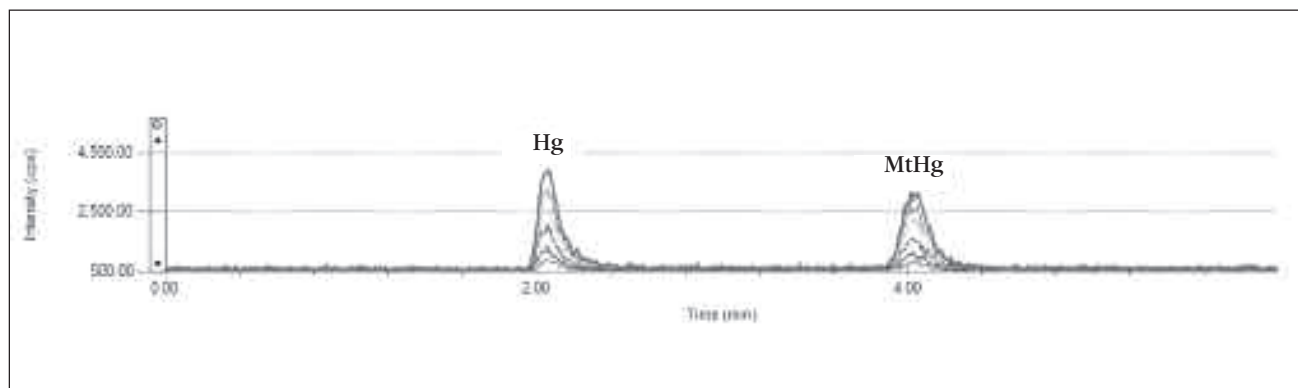


Fig. 4. Chromatograms of the calibration standards: 0.5 - 6.0 ppb Hg / MtHg.

将测定值与参考值相比较，该方法汞的回收率误差为 $\pm 10\%$ ，甲基汞的回收率误差为 $\pm 20\%$ （见表3）。

为了进一步验证方法对印度鲭鱼中甲基汞的提取效率，6个平行样提取前加入2ppb甲基汞，与未加标样相比较，计算回收率。鲭鱼399中未检出无机汞，甲基汞的浓度为0.4ppb。鲭鱼中甲基汞的加标回收率见表4，回收率误差在 $\pm 20\%$ 之间。

结论

本研究证明高效液相色谱（HPLC）与电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）联用是分析汞形态的有力工具。该方法分析鱼样品中痕量的汞形态具有较低的检测限，宽的线性范围，好的稳定性和准确性。

本研究中，建立了一个简单的提取鱼样品中汞化合物的有效方法。该方法具有极高的灵敏度、精确度和优异的检出限，能够满足欧盟委员会法规要求。HPLC-ICP-MS方法具有高的分析速度和效率，在6min内可以分析一个样。

该方法简单快速、可重复，为鱼类潜在汞污染提供了一个理想的解决方案。低的检出限满足实际鱼样中汞的形态分析而无需复杂的样品前处理。

TABLE III
Recovery for Certified Reference
Material TORT-2 and DORM-2

Sample ID	Recoveries	
	Hg	MtHg
DORM-2 Diluted	NA	89.7%
TORT-2	117.8%	100.9%
CRM Spike 1	108.1%	85.1%
CRM Spike 2	89.6%	79.5%
Average	98.9%	82.3%
SD	13.1	3.9
RSD (%)	13.3	4.8

TABLE IV
Recovery for
Indian Mackerel Fish

Sample ID	Recoveries MtHg
Indian Mackerel Fish Spike 1	86.3%
Indian Mackerel Fish Spike 2	96.2%
Indian Mackerel Fish Spike 3	83.2%
Indian Mackerel Fish Spike 4	109.1%
Indian Mackerel Fish Spike 5	95.4%
Average	94.1%
SD	10.1
RSD (%)	10.8

参考文献:

1. United Nations Environmental Programme (2002)
Global Mercury Assessment.
2. Food Safety Information Website, <http://www.foodhaccp.com>.
3. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19
December 2006:Setting maximum levels for certain
contaminants in foodstuffs.
4. Codex General Standard for Contaminants and
Toxins in Foods CODEX STAN 193-1995, Rev.3-2007.
5. P. Hajeb, S. Jinap, A. Ismail, A.B.Fatimah, B. Jamilah, M.
Abdul Rahim, Food Control 20, 79 (2009).
6. Kyung Su Park, JeongSook Kim, HyoMin Lee,
HeesooPyo, Sun-Tae Kim, Kang Bong Lee, Speciation of
Six Arsenic Compounds in Korean Seafood Samples.
Key Engineering Materials, 277-279, 431-437 (2005).
7. Chwei-Sheng Chiou, Shiuh-Jen Jiang, K. Suresh Kumar
Danadurai, Spectrochim. Acta, Part B, 56, 1133 (2001).
8. R. Rai, W. Maher, F. Kirkowa, J. Anal. At.Spectrom, 12,
1560 (2002).

珀金埃尔默仪器(上海)有限公司
地址: 上海 张江高科技园区 张衡路1670号
邮编: 201203
电话: 021-60645888
传真: 021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表, 请访问<http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有 ©2013, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。