

作者

Joaudimir Castro

Emmanuel Tessier

Olivier F.X. Donard

Institut des Sciences Analytiques et de Physicochimie
pour l' Environnement et les Matériaux
(IPREM)

Laboratoire de Chimie Analytique Bioinorganique
et Environnement (LCABIE)

UMR 5254 CNRS

Université de Pau et des Pays de l' Adour
Hélioparc, France

Kenneth Neubauer

PerkinElmer, Inc.
Shelton, CT USA

GC/ ICP-MS对 生物组织和沉积物 中汞形态的分析

前言

环境中汞的形态测定方法正受到人们的不断关注，主要原因有两点：一方面是提高对汞形态反应过程的理解，另外一方面是为了满足欧洲和美国的监管要求。汞形态是重要的环境污染物，这些污染物既可以由人类活动产生，也可以来自于自然界的生物甲基化过程。¹

水和沉积物中含有的汞以无机汞 (Hg^{2+}) 为主要形式，而甲基汞 (MMHg) 化合物的毒性比无机汞要强得多，而且还会在生物组织中蓄积。鱼蓄积MMHg的系数为 10^5 - 10^7 ，因此鱼的食用是人类和野生动物摄入汞的主要风险源。²欧盟 (EU) 已将汞及其化合物列入优先控制的污染物名单 (Decision 2455/2001/EC amending the Water Framework Directive 2000/60/EC)。³此外，EU还规定不同食品中Hg的最大浓度为 $0.5 \mu\text{g/g}$ (湿重) (欧盟委员会法规EC-78/2005 amending regulation CE-466/2001)。³美国食品与药品管理局 (FDA) 设立了鱼肉湿重 $1 \mu\text{g/g}$ 报告标准。2003年，FAO/WHO食品添加剂联合专家委员会 (JECFA) 建立了每周耐受摄入量的临时指导值，为每周每千克体重 $1.6 \mu\text{g}$ MMHg和 $5 \mu\text{g}$ 总Hg。⁴2010年，该委员会取消了总汞的每周耐受摄入量的临时指导值，取而代之的是无机汞 (Hg^{2+}) 每周每千克体重 $4 \mu\text{g}$ 。⁴

气相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法 (GC/ ICP-MS) 是一种可用于痕量分析的方法, 具有灵敏度高, 选择性高和多元素、多同位素同时检测的特点¹, 使用 GC-ICP-MS法, 所有类型的环境基质中的汞形态都可以使用完善的提取和衍生技术进行常规分析。目前, 主要应用的提取方法是开放的聚焦微波提取, 这主要是因为该方法具有很好的速度和效率。一旦提取完成, 必须将各种汞形态转换为气态形式, 以进行接下来的气相色谱分离。这种转换由使用烷基化试剂 (如四丙基硼化钠和四乙基硼化钠) 的衍生技术完成。原位衍生的使用减少了分析和检测过程中可能引入干扰的可能性。⁵

本研究重点关注的是使用GC传输线连接Clarus® GC和 NexION® ICP-MS仪器的条件和参数设置, 以及该联用系统在进行生物组织和沉积物中汞形态分析中的应用。

实验部分

试剂和化学品

实验使用Sigma-Aldrich®公司出品的氯化汞 (II) (Hg^{2+} 离子) 和氯化甲基汞 (MMHg), 并且母液分别使用超纯水和甲醇 (赛默飞世尔科技®的Optima级) 进行稀释。衍生剂使用四丙基硼化钠 (NaBPr_4) 和四乙基硼化钠 (NaBEt_4) (德国Merseburger Spezialchemikalien)。缓冲液 (0.1 M, pH 3.9) 使用MQ水 (Milli-Q water) 溶解醋酸钠 (Sigma-Aldrich®) 和冰醋酸 (HAC) (GFS Chemicals®) 配制而成。异辛烷 (HPLC级, 赛默飞世尔科技®) 和高纯氢氧化铵 (NH_4OH)、盐酸 (HCl), 以及氢氧化四甲基铵 (TMAH, 25%) 均购自GFS Chemicals®。标准参考物质BCR710牡蛎组织和CE-464金枪鱼购自比利时Geel参考物质与测量研究所 (IRMM), 参考物质IAEA 405河口泥沙购自奥地利维也纳国际原子能机构 (IAEA)。

仪器

通过GC传输线 (零件号: N0777440 (110V); N0777361 (220V)) 将一台Clarus 580 GC和一台NexION 300D ICP-MS (两台仪器均为美国康涅狄格州谢尔顿铂金埃尔默仪器有限公司制造) 连接起来。仪器连接后, ICP-MS在干等离子体条件下运行, 即仪器的雾化室被去除, 连接线直接插入到石英炬管和中心管的中心通道。⁶

GC传输线配备有一根内失活的毛细管柱, 并被连接到中心管。优化仪器操作参数 (比如: 从中心管尖端与内失活毛细管柱的距离, 氦气 (Ar) 的流速, 以及氧气的流速) 都在本文的结果与讨论部分进行了评价。本研究使用一台SP-D Discover开放式聚焦微波消解系统 (美国北卡罗来纳州马修斯CEM Corporation®)。操作条件和仪器参数总结详见表1。使用NexION和Chromera®形态分析软件完成数据的收集和分析。



图1.通过GC输送线将Clarus 580 GC (右) 与NexION300D ICP-MS (左) 相联接。

表1. GC/ICP-MS操作条件

GC仪器参数 (Clarus)	条件
色谱柱:	Elite-SMS (5%二苯基二甲基聚硅氧烷) (30 m, i.d. 0.25 mm, d.f. 0.25 μm)
进样口:	不分流进样
进样口温度:	250 °C
进样量:	1.0 μL
He载气流量(mL/min):	2.0
传输线温度:	300 °C
传输线毛细管:	Elite - Siltek失活熔融石英 (i.d. 0.25 mm)
Oven program: 升温程序:	50 °C \rightarrow ramp 10 °C/min \rightarrow 100 °C \rightarrow ramp 45 °C/min \rightarrow 290 °C (3 min)
ICP-MS仪器参数 (NexION)	Conditions条件
功率 (W):	1600 W
雾化气流量 (L/min):	0.98
辅助气流量 (L/min):	1.2
等离子体气流量 (L/min):	15
氧气流量 (L/min):	0.025
中心管直径:	1.2 mm i.d.
同位素/停留时间:	Hg: 199, 201, 202; N: 15 (30 ms)

样品前处理

样品前处理、微波提取和衍生化过程在现有文献中已有介绍。^{2,3}浓度为1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 Hg^{2+} 和MMHg母液标准分别使用 H_2O 和 MeOH 稀释。标准溶液工作液使用1% HCl 按照适当的比例稀释母液得到，每日现配，冰箱保存。校准曲线能够过标准系列溶液重复注射三次得到。取重约1.0克乙酸钠和2.4mL HAc ，用水定容至500mL，得到醋酸盐缓冲液(0.1M, pH3.9)。同样，用水配制1%和2.5%的 NaBPr_4 衍生化溶液。

分别在不同的提取瓶中加入0.2 g、0.1 g 和0.3 g的牡蛎组织、金枪鱼和河口泥沙干样，使用微波提取 Hg^{2+} 和MMHg。然后向生物组织中加入4mL 25%的TMAH，沉积物样品中加入4mL 6N HNO_3 。在每个提取瓶中放入磁力搅拌棒，然后将提取瓶置于微波炉中，按照表2中列举的条件进行操作。提取完成后，将样品离心(2500 rpm离心5min)，然后移入干净瓶中，冰箱保存待测。

表2.微波提取优化条件

CEM微波消解仪 (SP-D Discover)	条件
功率	沉积物: 35 W 生物组织: 75 W
升温时间 (min)	1.0
温度	70 °C
保持时间 (min)	4.0

加入5mL缓冲液进行衍生化。加入适当浓度的汞标准溶液制成所需的校准曲线。同样，使用适当量的样品提取液。在本研究中，考虑到每个样品的汞浓度，加入20 μL (金枪鱼)、200 μL (牡蛎组织)和1000 μL 样品提取液。然后在每个瓶子中加入1mL异辛烷、250 μL 1% NaBPr_4 (标准溶液加入)，和500 μL 2.5% NaBPr_4 (样品提取液)。给瓶子盖上盖，手动振摇5分钟。将有机相转移到GC样品瓶进行分析。本文将研究使用的全部样品前处理过程归纳为流程图，见图2。本研究还使用 NaBEt_4 作为衍生剂进行了相同的实验。

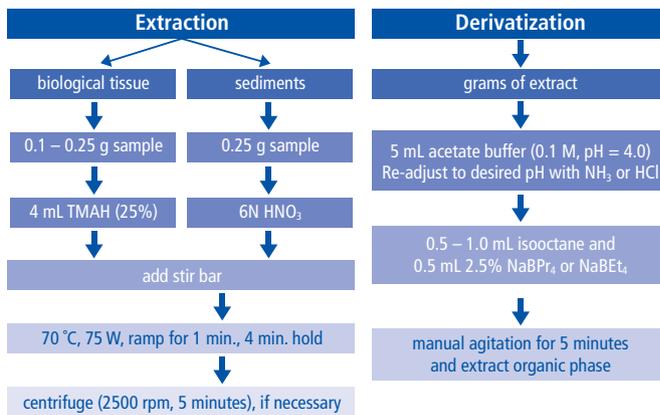


图2. 提取和衍生化过程的流程图

在洁净的条件下工作对于低浓度分析的成功非常重要。使用洗涤剂清洗容器，然后连续使用 HNO_3 和 HCl 淋洗，在每一步之间使用MQ水冲洗。清洗步骤完成后，将样品瓶置于层流罩下干燥，保存，直到使用。此外，还应牢记汞化合物都是剧毒物质，操作时必须做好个人防护。

结果和讨论

GC / ICP-MS接口的优化

通过测定氦气载气中的氮杂质 ($^{15}\text{N}^+$) 评价炬管的对齐和操作参数的优化(如: 内毛细管柱的距离和 Ar 气流速(即雾化气)), 使得在干等离子结构下待测物质的有效导入。为了防止样品锥处产生积碳, 有必要加入氧气 (O_2)。操作条件的优化也可以通过通入氙气/氩气 (Xe/Ar) 气体混合物 (2.6 mL/min) 实现。氮或氙提供的连续信号响应使得操作参数的优化变得简单。⁸

GC传输线是设计用于Clarus或AutoSystem气相色谱仪(铂金埃尔默仪器有限公司)的, 它也能够用于联接NexION和ELAN®系列的ICP-MS仪器(铂金埃尔默仪器有限公司)。GC传输线由一根的温度Silcosteel®管包裹一根惰性二氧化硅毛细管组成, 在GC炉箱中直接加热保持待测物质处于气体状态, 同时也可以预防传输线中出现冷点。⁶ Ar 气流量由ICP-MS雾化器控制, 主要作用是通过达到足够的流量, 将待测物质吹送到等离子体中, 一旦 Ar 气进入传输线就被加热。

使用安装在Clarus GC上的质量流量计控制O₂流量,并通过T型接口在传输线之前通入氧气。在完成设置和点火后,测定¹⁵N⁺响应,进行炬管对齐。之后通过在0.9-1.1 L/min范围内调整雾化气流量直到¹⁵N⁺的信号达到最大,实现Ar流量(O₂流量设定为0.025 L/min)的优化。一旦Ar流量的优化条件确定后,注入异辛烷确认待测元素到达等离子体。图3列出了¹⁵N⁺同位素的典型响应值,其中信号的下降表示溶剂的前缘。

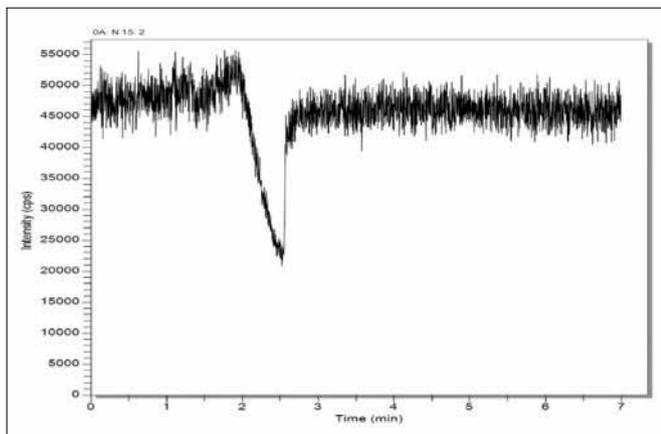


图3. 异辛烷溶剂注射¹⁵N⁺同位素的典型信号。

最后,内失活毛细管柱在传输线中位置的优化通过在传输线的前端注入浓度为1 ng/mL的MMHg和Hg²⁺混合溶液完成。毛细管的位置变化通过将柱子从传输线中Silcosteel®管前端移动0-10cm实现。²⁰²Hg⁺信号的最佳响应被认为是在大约7厘米处。毛细管末端和等离子体之间的区域是Ar气、O₂气、He载气和来自GC的待测物质的混合区域。表1列出了GC-ICP-MS系统的最佳条件。

GC条件

优化GC形态分析的参数设置,以得到对称的峰和良好的基线分辨率。色谱条件选择应确保汞形态物质的洗脱应远离受到溶剂洗脱干扰的区域(本研究下为异辛烷)。表1中列出的温度程序能够在不到8分钟时间内将汞化合物很好的分离,并且峰宽为2-3s。图4显示了在最佳条件下浓度为1.0 ng/mL,含有丙醇甲基汞(1.2 ng/mL)和丙醇Hg²⁺(1.7 ng/mL)(Hg质量数均为202)的标准溶液的色谱图。在建立方法过程中,对多种汞的同位

素(199、201、202)都进行了检测,但为简单起见,仅给出²⁰²Hg⁺的结果。4.6min和7min的峰分别对应丙醇甲基汞和丙醇Hg²⁺。此外,4.8min时的汞峰可能是由于衍生化过程中应用的NaBPr₄试剂中的NaBEt₄杂质。如要证实此峰,还需要开展进一步的工作。

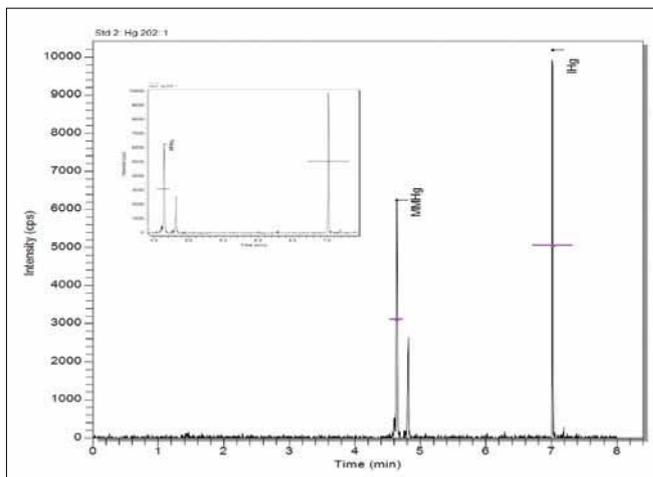


图4. 浓度为1 ng/mL的MMHg (1.2 ng/mL)和Hg²⁺ (1.7 ng/mL)标准溶液测得的²⁰²Hg⁺ GC/ICP-MS色谱图。

分析性能

一旦GC传输线的操作参数达到最优,就可以使用标准溶液确定MMHg和Hg²⁺的分析响应特征。校准曲线由浓度为0(即标准空白)到2ng/mL的MMHg和Hg²⁺混合标准系列溶液分别进样3次,每次进样1μL,通过计算²⁰²Hg⁺的峰面积后得到。由²⁰²Hg⁺响应函数(图5)可见,校准曲线线性良好,相关系数(R²值)令人满意。通过各校准响应函数可以确定检出限(LODs = 3σ空白/n,其中“n”代表读数的次数),MMHg和Hg²⁺作为²⁰²Hg⁺测定时得到的绝对检出限分别为4和5 fg。

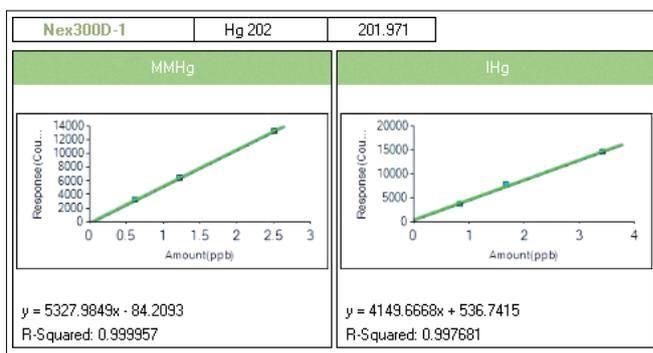


图5. ²⁰²Hg⁺的校准曲线。

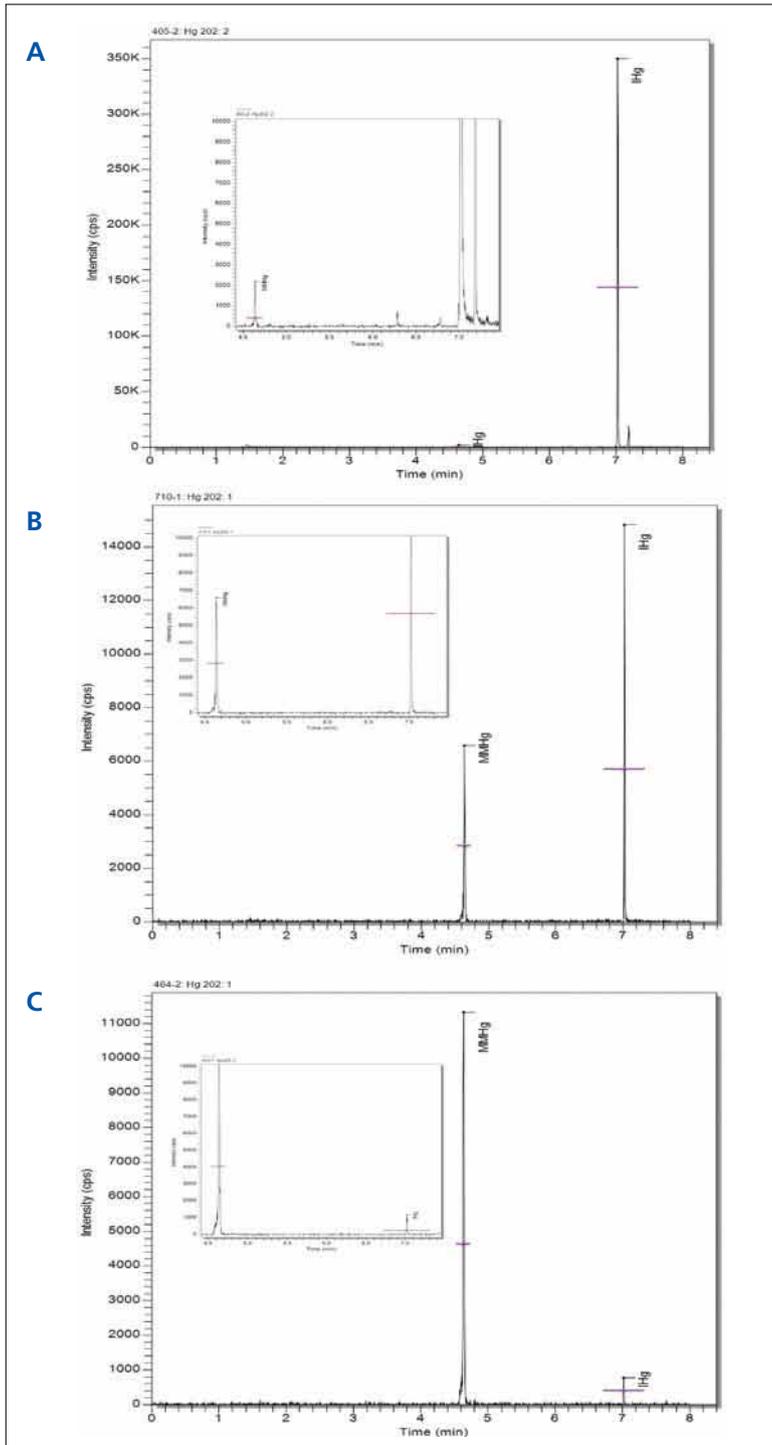


图6. $^{202}\text{Hg}^+$ 的GC/ ICP-MS色谱图; (A) BCR710-牡蛎组织; (B) IAEA405-河口泥沙; (C) 的BCR 464-金枪鱼提取物。

表3. 通过分析各种参考物质 (n = 3) 得到的MMHg浓度结果 (以 ng/g浓度的 ^{202}Hg 表示)。

标准参考物质	认证值	实验值	%RSD	回收率 (%)
BCR 464(金枪鱼)	5500 ± 170	4505 ± 98	2.2	82
BCR(牡蛎组织)	107 ± 17	104 ± 7	6.7	97
IAEA 405 (河口泥沙)	5.49 ± 0.53	5.41 ± 0.34	6.3	99

标准参考物质的应用

GC色谱分离和ICP-MS进行汞形态检测的仪器条件都列于表1。需要牢记的一点是GC仪器条件的选择主要是确保汞形态的洗脱远离溶剂洗脱影响的区域 (如图3所示, 当溶剂为异辛烷时, 应为2.5min后)。¹图6A-C分别列出了牡蛎组织、河口泥沙和金枪鱼标准参考物质的丙醇Hg形态物质 ($^{202}\text{Hg}^+$ 同位素) 的色谱分离情况。生物组织和沉积物标准参考物质中MMHg的外标定量结果的回收率大于82% (见表3)。金枪鱼标准参考物质的回收率较低有可能是因为MMHg没有被全部提取出来造成的。本研究使用的提取步骤是针对低浓度MMHg进行优化的, 对于较高浓度MMHg样品的提取可能还需要进一步完善。

结论

本文介绍了通过GC传输线成功实现Clarus 580 GC和NexION 300D ICP-MS联用的实例。当仪器都达到最佳条件后, 就能够得到具有很好线性的响应函数, 并确定在一个毫微微克水平的绝对检出限。使用GC对生物组织和沉积物基质的标准参考物质进行汞形态色谱分离。使用外标法对MMHg进行定量和验证, 测定结果的回收率 $\geq 82\%$, 并且相对标准偏差 (RSD) $\leq 7\%$ 。

参考文献

1. Monperrus, M., Rodríguez Martin-Doimeadios, R.C., Scancar, J., Amouroux, D., Donard, O.F.X. *Anal. Chem.* 75, (2003), 4095.
2. Rodríguez Martin-Doimeadios, R.C., Krupp, E., Amouroux, D., Donard, O.F.X. *Anal. Chem.* 74, (2002), 2505.
3. Jimenez Moreno, M., Pacheco-Arjona, J., Rodríguez-González, P., Preud'Homme, H., Amouroux, D., Donard, O.F.X. *J. Mass Spectrom.* 41, (2006), 1491.
4. Clémens, S., Monperrus, M., Donard, O.F.X., Amouroux, D., Guérin, T. *Talanta* 89, (2012), 12.
5. Morabito, R., Massanisso, P. *Trends in Anal. Chem.* 19, (2000), 113.
6. Bouyssiere, B., Szpunar, J., Lobinski, R., *Spectrochimica Acta Part B.* 57, (2002), 805.
7. Monperrus, M., Tessier, E., Veschambre, S., Amouroux, D., Donard, O. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, (2005), 854.
8. Tao, H., Murakami, T., Tominaga, M., Miyazaki, A., *J. Anal. At. Spectrom.* 13, (1998), 1085.

PerkinElmer, Inc.

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](http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs)

版权所有 ©2012, 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。