

实验技术与方法

水产品中不同形态汞的高效液相色谱-原子荧光光谱分析研究

林凯¹, 姜杰¹, 黎雪慧¹, 林宇燕², 李瑞园¹, 张慧敏¹

(1. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518055; 2. 深圳市计量质量检测研究院, 广东 深圳 518055)

摘要:目的 建立高效液相色谱与原子荧光光谱联用测定水产品中甲基汞及其他形态汞的检测方法。方法 样品经盐酸超声提取后离心过滤,以5%乙腈-4.62 g/L乙酸铵-1.2 g/L半胱氨酸溶液作流动相,经反相C₁₈色谱柱分离后无需氧化和紫外消解,直接由原子荧光光谱仪检测,外标法定量。结果 甲基汞、乙基汞和无机汞的最佳线性范围为0~50 μg/L, $r > 0.999 0$,检出限为0.5~1.5 μg/L,精密密度RSD < 6%,加标回收率为78%~120%,鱼肉标准物质中甲基汞测定值在参考值范围内。结论 该法操作简便灵敏,结果准确可靠,适合于水产品中汞形态的测定。

关键词:高效液相-原子荧光光谱法; 甲基汞; 形态分析; 水产品; 汞; 重金属; 食品安全; 食品污染物

中图分类号:R155.51;O657;TS254;TL271.4 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)01-0058-05

Approach for mercury species analysis in aquatic products by HPLC-AFS

LIN Kai, JIANG Jie, LI Xue-hui, LIN Yu-yan, LI Rui-yuan, ZHANG Hui-min

(Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Shenzhen 518055, China)

Abstract: Objective To establish a method for measuring methylmercury and other mercury species in aquatic products by HPLC-AFS. **Methods** The samples were extracted and centrifuged after hydrochloric acid ultrasound treatment. 5% of Acetonitrile, 4.62 g/L ammonium acetate and 1.2 g/L cysteine solution was used as mobile phase. Then the samples, being tested with AFS after C₁₈ separated, were quantitatively determined by external standard method. There was no need of oxidization or ultraviolet photolysis. **Results** The best linear range of methylmercury, ethylmercury and inorganic mercury was 0 - 50 μg/L with correlation coefficients above 0.999 0, the detection limit was 0.5 - 1.5 μg/L, the precision relative standard deviation was less than 6%, and recovery of spiked samples was 78% - 120%. Methylmercury measurement of standard substance in fish was within the reference range. **Conclusion** This method was simple, sensitive, accurate and suitable for the determination of mercury species in aquatic products.

Key words: HPLC-AFS; methylmercury; species analysis; aquatic products; mercury; heavy metals; food safety; food contaminant

汞是环境中生物毒性极强的重金属,被联合国环境规划署列为全球性污染物,是对人类和环境最具危害性的元素之一^[1],已经引起各国政府和环保组织的极大关注。汞的毒性取决于它的化学形态,其形态有无机汞、甲基汞、乙基汞、苯基汞等,环境中存在最多的是无机汞和甲基汞,其中无机汞经微生物甲基化能转变成毒性大的甲基汞化合物,通过食物链富集作用并存在迁移转化,危害人体健康^[2]。水体中各种化学形态的汞可转化为甲基汞,甲基汞易在鱼类等生物体内富集,其含量可达总汞量的80%~100%^[3],因此对水产品中甲基汞与汞

的不同形态进行分析十分重要。

近年来,对汞形态分析方法的建立和发展,是分析化学研究领域的一个热点。早期用光谱或色谱技术来分析汞的有机化合物,如光谱原子吸收法^[4]、毛细管电泳法^[5],气相色谱法^[6],高效液相色谱法^[7],后3种方法常与各种灵敏的光谱学检测器或定性准确的质谱联用,克服单一技术性能上的缺欠。色谱与各种检测器的联用技术是分析汞形态分析的常用手段,其中高效液相色谱与原子荧光光谱仪联用(HPLC-AFS)以具有灵敏度高、检出限低和仪器使用成本低等优势而被广泛应用^[8]。

本试验采用HPLC-AFS分析方法,用盐酸溶液提取样品,由高效液相色谱分离,汞化合物在酸性环境下与硼氢化钾在线反应生成汞蒸气,经原子荧光光谱仪测定。未使用传统的柱后氧化及紫外消解步骤,简化步骤、节省试剂与时间,试验结果表

收稿日期:2013-08-26

基金项目:深圳市科技计划项目(200903119)

作者简介:林凯 女 副主任技师 研究方向为食品安全分析

E-mail:13510873711@139.com

通讯作者:张慧敏 女 主任技师 研究方向为元素及元素形态分析

E-mail:13602554145@139.com

明,灵敏度满足测定要求,方法准确可靠,满足水产品中汞形态测定的需要。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

AFS-9800 双道原子荧光光度计、汞空心阴极灯 AF-2(北京有色金属研究总院)、LC-20A 型高效液相色谱泵(配自动进样阀,日本岛津公司)、Agela Technologies Venusil MP C₁₈ 分析柱(150 mm × 1 mm,5 μm)、组织匀浆机、高速粉碎机、冷冻干燥机、离心机、超声清洗器、pH 计(精度为 0.01)。

氙气(99.999%)、硼氢化钾、氢氧化钠、氢氧化钾、盐酸、乙腈、乙酸铵(醋酸铵)、半胱氨酸、氨水(均为优级纯);汞标准物质:甲基汞(GBW08675,60.282.3 μg/g)、乙基汞[GBW(E)081524,75.382.7 μg/g]、无机汞[GBW08617,(1 000 ± 1) μg/ml],均购自中国计量科学研究院;试验用水为经 Milli-Q 纯水仪装置纯化的去离子水(18.2 MΩ/cm)。

1.2 方法

1.2.1 流动相制备

流动相为 5% 乙腈 + 4.62 g/L 乙酸铵 + 1.2 g/L 半胱氨酸,称取半胱氨酸 1.2 g,乙酸铵 4.62 g,置于 1 000 ml 容量瓶中,纯水溶解,加入 50 ml 乙腈,用纯水定容至 1 000 ml,经 0.45 μm 滤膜过滤,于超声水浴中超声脱气 30 min,备用,当日配制使用。

1.2.2 仪器测量参数

流动相流速 1.0 ml/min,氢化物发生还原剂为 2% 硼氢化钾溶液和 0.5% 氢氧化钾溶液,载流为 5% 盐酸溶液,灯电流 30 mA,载气流量 300 ml/min,辅助气流量 600 ml/min,泵转速 60 r/min,负高压 320 V,进样量 100 μl。

1.2.3 样品测定

干样经高速粉碎机粉碎,湿样经匀浆器匀浆。称取干重样品 0.2 ~ 0.5 g,或湿重样品 0.5 ~ 2 g(干、湿样品均精确到 0.001 g),置于 15 ml 离心管中,加入 10 ml HCl 提取试剂(5 mol/L),密闭放置过夜。于室温下超声水浴提取 60 min,期间振摇数次。于 4 ℃ 下 8 000 r/min 离心 15 min。移取 2 ml 上清液至离心管中,缓慢逐滴加入 1.5 ml 6 mol/L NaOH,使样液 pH 值在 2 ~ 8 之间。加入 0.2 ml 10 g/L 半胱氨酸溶液,定容至 5.0 ml,于 4 ℃ 下 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液过 0.45 μm 有机系滤膜,滤液进液相色谱-原子荧光光谱联用仪进行分析。同时做空白对照。

1.2.4 结果计算

$$X = \frac{25 \times (C - C_0)}{m \times 1\,000}$$

式中: X 为样品中甲基汞的含量,mg/kg; C_0 为经标准曲线得到的空白溶液中甲基汞的浓度,μg/L; C 为经标准曲线得到的测定液中甲基汞的浓度,μg/L; m 为试样质量,g; 25 为试样液稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 条件优化

2.1.1 操作步骤的简化

汞形态分析往往都有柱后氧化这一环节,其原理是当不同形态的汞化合物从色谱柱上依次洗脱后,与氧化剂过硫酸钾溶液混合进入紫外消解系统,在紫外线的照射下,过硫酸钾产生多种强氧化性物质,将有机汞转化为无机汞。柱后氧化和在线紫外消解环节的作用都是将待测组分中的有机汞氧化为无机汞,以利于检测。在本试验中,样品溶液从高效液相色谱柱中有效分离出来后,在酸性环境下,有机汞化物直接由硼氢化钾溶液还原,进行氢化物发生反应生成汞蒸气,由原子荧光光谱仪测定。取消柱后氧化和紫外消解后,检测灵敏度有所降低,但试验结果表明,3 种汞化物含量的测定值仍能满足试验要求。

2.1.2 流动相的影响

本试验选用流动相为 5% 乙腈 + 4.62 g/L 乙酸铵 + 1.2 g/L 半胱氨酸。乙腈的含量改变流动相极性,影响汞化合物的保留时间。乙腈浓度增高,各组分出峰时间缩短,但过高会使各组分无法分离,过低则导致色谱峰变形。本试验尝试分别用 6%、5%、4%、3% 乙腈含量流动相去测混合标样,结果随着浓度降低,有机汞化合物的色谱峰逐渐变宽,并且出峰时间延长,无机汞出峰时间影响不大,见图 1 和图 2; 选用 5% 甲醇代替 5% 乙腈,结果甲基汞的色谱峰略有拖尾,同时由于乙腈对汞与络合剂生成的络合物有较好的溶解性,所以选用 5% 乙腈比较合适。半胱氨酸是络合剂,利用的是巯基和汞结合的原理,改变流动相中半胱氨酸浓度,由 0.5 g/L 逐渐增加到 2.0 g/L,结果 3 种汞化物的出峰时间和灵敏度均无明显变化。

2.1.3 提取液 pH 值的影响

Agela C₁₈ 分析柱适用 pH 值在 1.5 ~ 9.0 之间,乙酸铵缓冲溶液调节流动相的 pH 值,使其符合色谱柱分离的 pH 范围。样品前处理选用 5 mol/L 酸度的 HCl 最为合适,用 3 mol/L HCl 提取效率低,而用 7 mol/L HCl 效率虽高,但酸度过高需加大量碱

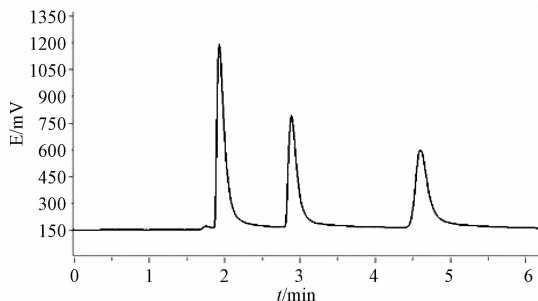


图1 流动相中乙腈含量为6%的色谱图

Figure 1 The acetonitrile content in mobile phase is 6%

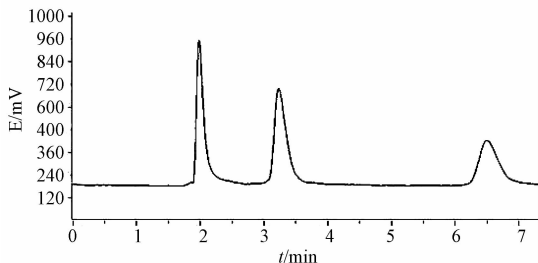


图2 流动相中乙腈含量为3%的色谱图

Figure 2 The acetonitrile content in mobile phase is 3%

中和,对色谱柱不利^[9]。测实际样品时,样品提取液 pH 最好调至 2~7 之间,3 种汞化合物分离较好,操作时可以先预加 1.2 ml 的 6 mol/L NaOH 溶液,再用低浓度碱液进行微调,缓慢滴入以防止汞化合物挥发损失。

2.1.4 还原剂的影响

本方法是将分离性能高的液相色谱与灵敏度高的原子荧光光谱仪结合起来,准确分离分析汞的各种形态,试验前须将原子荧光光谱仪的分析条件调至最佳状态,优化氢化物发生条件。本试验尝试改变还原剂浓度,分别用 3%、2%、1.5%、1%、0.5%、0.2% 硼氢化钾溶液去测混合标样,其余条件不变,进样 3 次取平均值,如图 3,当硼氢化钾浓度为 2% 时各组分响应值达到最大。

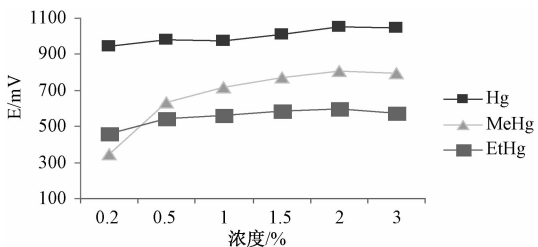


图3 还原剂硼氢化钾浓度对各组分响应值的影响

Figure 3 The concentration of reducing agent potassium borohydride's impact on the response of each component

2.2 标准谱图

采用反相 C₁₈ 分析柱,选用 5% 乙腈-4.62 g/L 乙酸铵-1.2 g/L 半胱氨酸溶液作为流动相,流速

1.0 ml/min,对 50 μg/L 的汞混合标准溶液进行分离,色谱峰见图 4。在 6 min 之内,无机汞、甲基汞和乙基汞依次出峰,实现完全分离,保留时间分别为 1.687、2.810 和 4.430 min,结果见图 4。

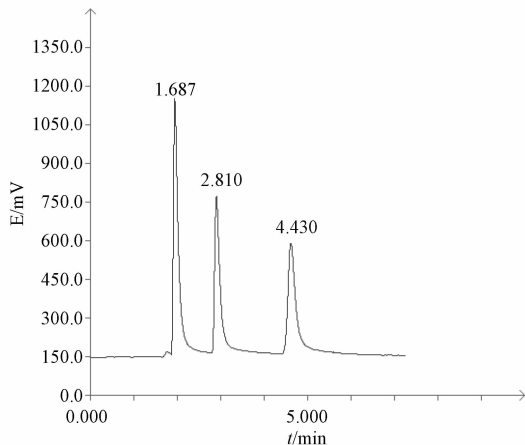


图4 无机汞、甲基汞、乙基汞的标准色谱图(浓度 50 μg/L)

Figure 4 Standard chromatograms of inorganic mercury, methylmercury and ethylmercury

2.3 种汞形态标准曲线及相关系数

准确移取甲基汞、乙基汞标准溶液,用甲醇稀释定容,配制成 1.0 μg/ml 的单标储备液;准确移取无机汞标准溶液,用 5% 硝酸-0.5 g/L 重铬酸钾溶液稀释定容,配制成 1.0 μg/ml 的单标储备液;再分别取 0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 ml 上述 3 种单标储备液以流动相稀释定容至 100 ml,配制成 2.5、5、10、20、50 μg/L 储备的汞混合标准使用液。当日配制使用。用该方法上机测定,以质量浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,方法的线性范围、回归方程、相关系数见表 1。

表1 三种形态汞的标准曲线

Table 1 Standard curve of three forms of mercury

组分	线性范围 / (μg/L)	回归方程	r	检出限 / (μg/L)
甲基汞	0 ~ 50	y = 2408x - 2901	0.999	0.5
乙基汞	0 ~ 50	y = 1837x - 2635	0.999	1.5
无机汞	0 ~ 50	y = 4298x - 8506	0.999	0.8

2.4 精密度试验

选取 3 种不同水平的汞化合物混合标准溶液和 3 份样品,重复测定 6 次,实验室内部的变异系数 RSD 分别 <6% 和 4%,结果见表 2 和表 3。

2.5 加标回收试验

选取 1 份水产品,分别加入低、中、高 3 种浓度的汞混合标准溶液,进行加标回收试验。由分析测定可知,甲基汞、乙基汞和无机汞的加标回收率分别在 82% ~ 110%、92% ~ 112%、78% ~ 120% 之间,有机汞的加标回收结果优于无机汞,结果见表 4。

表 2 不同浓度标准溶液测定精密度试验结果(μg/L)

Table 2 Result on standard solution testing precision measurement

测定值	甲基汞			乙基汞			无机汞		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
1	4.65	9.82	20.2	4.83	10.1	21.3	4.76	9.66	19.7
2	4.78	10.3	20.2	5.24	10.5	20.6	4.60	10.3	20.4
3	5.03	9.81	21.5	4.99	9.76	20.5	5.23	10.2	19.1
4	4.91	10.1	19.6	5.66	9.84	19.6	5.24	10.4	20.5
5	5.25	9.13	20.4	5.02	9.62	19.7	4.85	9.56	21.1
6	5.20	9.53	20.6	5.41	9.43	20.4	4.70	9.21	21.2
平均值	4.97	9.54	21.0	5.19	9.99	20.3	4.90	10.0	21.9
标准偏差	0.24	0.40	0.61	0.31	0.38	0.65	0.27	0.46	0.82
RSD %	4.74	4.25	2.90	5.91	3.79	3.19	5.60	4.62	3.73

表 3 样品中甲基汞测定精密度试验结果(n=6)

Table 3 Result on Methylmercury precision determination in sample

样品	测定值/(mg/kg)						平均值/ (mg/kg)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
带鱼	0.135	0.128	0.131	0.126	0.128	0.120	0.128	3.9
金鲳鱼	0.145	0.138	0.142	0.140	0.136	0.131	0.139	3.5
鲍鱼	0.170	0.158	0.165	0.171	0.159	0.163	0.164	3.3

表 4 加标回收试验结果

Table 4 Standard recovery test result

组分	本底含量/(μg/L)	加标量/(μg/L)			测定平均值/(μg/L)			回收率/%
		低	中	高	低	中	高	
甲基汞	4.8	5	20	50	8.9	23.8	59.8	82% ~ 110%
乙基汞	ND	5	20	50	4.6	22.4	55.0	92% ~ 112%
无机汞	3.6	5	20	50	7.5	18.6	63.6	78% ~ 120%

注:ND 为未检出

2.6 标准参考物质测定

用本方法对标准参考物质 GBW10029 鱼肉进行甲基汞含量的测定,参考值为(0.84 ± 0.03) mg/kg,结果测定值为 0.82 mg/kg,测定值在标准值范围内。

2.7 实际样品测定

用该法对深圳市市售的部分水产品进行汞化合物含量测定,结果见表 5。部分淡水鱼、海鱼和贝类检出甲基汞和无机汞,未检出乙基汞。根据 GB 2762—2012^[10] 食品中污染物限量规定,我国限定水产动物及其制品甲基汞含量 ≤ 0.5 mg/kg,肉食性鱼类及其制品甲基汞含量 ≤ 1.0 mg/kg,所测水产品的甲基汞含量均低于国家标准。由于甲基汞会危害人体发育中的胚胎和幼儿正在发育的神经系统,故建议孕妇、乳母和幼儿避免经常食用甲基汞含量

高的水产品^[11]。同时甲基汞常见于位处食物链较高层的大型鱼类中,因此最好挑选体型细小的鱼食用,并保持均衡饮食。

3 小结

本试验建立了 HPLC-AFS 法测定水产品中汞化合物形态的方法,本方法采用 5% 乙腈-4.62 g/L 乙酸铵-1.2 g/L 半胱氨酸溶液作为流动相,5 mol/L HCl 溶液提取样品,经反相 C₁₈ 分析柱分离,无需柱后氧化和紫外消解,在原子荧光光谱最佳试验条件下测定,其线性范围、相关系数、方法检出限、精密度、加标回收率及标准参考物质等指标均符合分析检验的要求,操作简便,结果准确可靠,适用于水产品中汞形态的测定。

表 5 深圳市市售的部分水产品汞化合物含量(mg/kg)

Table 5 Compound content in part of fish Mercury in Shenzhen market

样品名称	甲基汞	乙基汞	无机汞
福寿鱼	ND	ND	0.086
大头鱼	ND	ND	0.080
鲢鱼	ND	ND	0.091
黄鳝	0.071	ND	ND
鲍鱼	0.164	ND	0.112
生蚝	0.045	ND	0.055
金鲳鱼	0.139	ND	0.087
带鱼	0.128	ND	0.097
扇贝	0.142	ND	0.106

注:ND 为未检出

参考文献

- [1] WHO. Environmental health criteria for methylmercury. International programme on chemical safety[R]. Geneva:WHO,1990.
- [2] Susanne M U, Trevor W T, Svetlana A A. Mercury in the aquatic environment : A review of factors affecting methylation[J]. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol, 2001, 31(3) :241-293.
- [3] Agah G, Leermakers M, Eiskens M, et al. Total mercury and methyl mercury concentrations[J]. Water Air Soil Pollut, 2007, 181:95-105.
- [4] YAN X P, LI Y, JIANG Y. Selective measurement of ultratrace methylecury in fish by flow injection on-line microcolumn

displacement sorption preconcentration and separation coupled with eletrothermal atomic absorption spectrometry [J]. Anal Chem, 2003, 75(10) : 2251-2255.

[5] YIN X B. Dual-cloud point extraction as a preconcentration and clean-up technique for capillary electrophoresis speciation analysis of mercury[J]. J Chromatogr A, 2007, 1154(1-2) : 437-443.

[6] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009. 17—2003 食品中总汞及有机汞的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[7] YU L P. Cloud point extraction preconcentration prior to high-performance liquid chromatography coupled with cold vapor generation atomic fluorescence spectrometry for speciation analysis of mercury in fish samples [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(25) : 9656-9662.

[8] 墨淑敏, 梁立娜, 蔡亚岐, 等. 高效液相色谱与原子荧光光谱联用分析汞化合物形态的研究[J]. 分析化学, 2006, 34(4) : 493-496.

[9] 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.

[10] 中华人民共和国卫生部. GB 2762—2012 食品安全国家标准食品污染物限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[11] 江津津, 曾庆孝. 水产品中汞与甲基汞风险评估的研究进展[J]. 食品工业科技, 2007, 11(28) : 244-246.

· 公告 ·

关于禁止以委托、贴牌、分装等方式生产婴幼儿配方乳粉的公告

(2013 年 第 43 号)

为了规范婴幼儿配方乳粉生产经营活动, 加强婴幼儿配方乳粉质量安全监管, 根据《中华人民共和国食品安全法》及其实施条例等法律法规和《国务院办公厅转发食品药品监管总局等部门关于进一步加强婴幼儿配方乳粉质量安全工作意见的通知》(国办发[2013]57号), 现就禁止以委托加工、贴牌、分装等方式生产婴幼儿配方乳粉, 公告如下:

一、婴幼儿配方乳粉生产企业不得接受其他单位和个人委托, 为其生产婴幼儿配方乳粉。

任何单位和个人不得通过合同或者约定, 委托婴幼儿配方乳粉生产企业为其加工、制作婴幼儿配方乳粉。

二、婴幼儿配方乳粉生产企业不得为其他品牌持有人或代理人生产婴幼儿配方乳粉, 不得冒用他人品牌和包装生产婴幼儿配方乳粉。

三、婴幼儿配方乳粉生产企业不得在国内生产其仅在境外注册商标和企业名称、地址的婴幼儿配方乳粉, 不得在国内生产标注为境外企业名称、地址的婴幼儿配方乳粉。

四、任何单位和个人不得采购或进口婴幼儿配方乳粉直接进行装罐、装袋、装盒, 或者改变包装、标签生产婴幼儿配方乳粉。

五、婴幼儿配方乳粉生产企业不得使用相同的原料、辅料构成的同一种配方, 生产不同产品名称的婴幼儿配方乳粉。

六、婴幼儿配方乳粉生产企业不得使用除牛、羊乳及其乳粉、乳成分制品(包括乳蛋白、乳糖等)以外的其他动物乳和乳制品生产婴幼儿配方乳粉。

七、违反本公告要求的, 由县级以上地方食品药品监督管理部门依法予以查处; 涉嫌犯罪的, 移送司法机关依法追究其刑事责任。

本公告自发布之日起实施。

国家食品药品监督管理总局
二〇一三年十一月二十七日