

研究报告

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王 萌^{1,2} 丰伟悦^{*1} 张 芳¹ 汪 冰^{1,2} 史俊稳^{1,2}
李 柏¹ 柴之芳¹ 赵宇亮¹¹ (中国科学院高能物理所核分析技术重点实验室, 北京 100049) ² (中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要 建立了高效液相色谱 (HPLC) 和电感耦合等离子体质谱 (ICPMS) 联用测定多种生物样品中的无机汞和甲基汞的方法, 并对比了提取生物样品中无机汞和甲基汞的不同前处理方法。实验使用 5 mol/L 的盐酸超声波提取样品中的无机汞和甲基汞。高效液相色谱流动相为含有 0.06 mol/L 醋酸氨, 20 $\mu\text{g/L}$ Bi, 0.1% (V/V) 2-巯基乙醇的 5% (V/V) 甲醇-水溶液, 色谱柱为 C_{18} 反相柱 (5 μm , 3.9 mm \times 150 mm)。提取液在液相色谱中分离后, 进入电感耦合等离子体质谱检测其中无机汞和甲基汞的浓度。测定了人发 (GBW 07601), 对虾 (GBW 08572), 鱼肉组织 (IAEA MA-B-3/TM) 和牛肝 (GBW 080193) 4 种生物标准参考物, 结果与标准参考物的标准值相符。无机汞和甲基汞检出限分别为 0.3 和 0.2 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词 高效液相色谱, 电感耦合等离子体质谱, 联用技术, 汞, 生物样品, 形态分析

1 引 言

汞 (Hg) 及其化合物是环境中广泛存在的一类持久性污染物。在日本和伊拉克大规模人群汞中毒事件发生以后, 尽管世界各国对汞的排放进行了控制, 但迄今为止, 全世界每年仍有将近 5000 吨的各种形态的汞排放到环境中^[1]。在微生物的作用下, 环境中的无机汞可以转化为毒性更强的有机汞 (主要为甲基汞)^[2]。脂溶性的有机汞更容易被生物体吸收, 并可以通过食物链富集最终进入人体。由于汞化合物的毒性依赖于其浓度与存在的化学形态, 所以仅仅分析样品中汞的总量是不够的, 还需要得到样品中汞各种化学形态的信息, 特别是在环境中广泛存在的甲基汞 (CH_3Hg^+) 和无机汞 (Hg^{2+})。

汞的形态分析可以通过各种联用技术实现^[3~6], 将气相色谱 (GC)、高效液相色谱 (HPLC)、毛细管电泳 (CE) 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 (ICPMS) 等具有元素选择性的检测手段相结合进行测定的方法^[4]。其中, 由于 ICPMS 具有更低的检出限, 更宽的线性范围, 多元素分析能力, 相对少的干扰, 特别是可进行同位素比值分析等诸多优点, 成为形态分析中首选的检测方法。与其它联用方法相比, HPLC-ICPMS 还具有接口简单, 应用范围广泛, 前处理过程简便而有利于保持待测样品原始形态不变等优点^[7], 在汞的形态分析中已有不少应用^[3,8,9]。

在痕量元素的形态分析中, 必须保持元素在样品中的原始形态不变。因此, 将样品中原始形态的汞高效率的提取出来是形态分析的关键步骤。汞形态分析的前处理方法主要有酸提取^[10], 碱式消化^[8]和蒸馏法^[9]等, 通过这些方法可以使 Hg^{2+} 、 CH_3Hg^+ 等从基体中分离出来。Morton 等^[11]在研究人发中的汞的形态时认为冷硝酸消化法可以达到对汞满意的提取效率。Cabanero 等^[12]在比较了酸提取、碱式消化等方法后发现, 超声波辅助盐酸提取鱼肉中 CH_3Hg^+ 和 Hg^{2+} 的效率最高。Hintemann^[13]发现, 在样品前处理过程中有可能导致汞各种形态间发生相互转化, 从而使得结果出现很大的偏差。有研究认为, 在前处理过程中采用超声波辅助盐酸或硝酸提取的方法, 汞形态间的转化率大大低于碱式消化和水蒸气蒸馏的方法^[14]。

2005-02-18 收稿; 2005-06-30 接受

本文系国家自然科学基金重大项目 (No. 10490181)、国家自然科学基金面上项目 (No. 204765055) 和中国科学院重要方向性项目 (No. KJCX2-N)

本实验用 HPLC-ICP-MS 联用的方法成功测定了多种生物标准参考物中 Hg^{2+} 和 CH_3Hg^+ 的含量,并比较了超声波辅助酸提取和冷酸消化法对生物样品中 Hg^{2+} 和 CH_3Hg^+ 的提取效率。

2 实验部分

2.1 仪器

Elemental X7 型 ICP-MS 仪 (美国 Thermo 公司)。用含 5% 甲醇的 $1\text{ }\mu\text{g/L}$ 的 Be、Co、In、U 混合标准溶液对仪器条件进行优化。仪器工作参数为:功率 1.2 kW ,雾化器流速 0.81 L/min (含 O_2), 驻留时间 200 ms ,检测 ^{202}Hg 同位素。采用同心雾化器,锥型带碰撞球雾室,雾室温度 1°C 。高效液相色谱:Waters 626 高效液相色谱系统。色谱柱:RP₁₈ (Waters 公司, $150\text{ mm} \times 3.9\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相流速: 1 mL/min ; 进样环: $50\text{ }\mu\text{L}$ PEEK; 流动相含有 0.06 mol/L 醋酸铵, $20\text{ }\mu\text{g/L}$ Bi, 0.1% (V/V) 2-巯基乙醇的 5% (V/V) 甲醇- H_2O 溶液。

接口:用 PEEK 管 ($\phi=0.13\text{ mm}$) 直接将色谱柱与质谱雾化器连接。

超声波清洗仪 (昆山超声仪器有限公司); Milli-Q 纯水器 (Millipore 公司); 离心机 (北京医用离心机厂)。所有容器使用前均在 8 mol/L 的 HNO_3 中浸泡至少 24 h 。

2.2 试剂和标准溶液

氯化甲基汞 (纯度 98% , 德国 Riedel-de Haën 公司); 氧化汞 (光谱纯, Merck 公司, 德国)。甲醇 (色谱纯, 天津四友生物医学技术公司); 2-巯基乙醇 (分析纯, Sigma 分装); HNO_3 、 HCl (Mos 级, 北京化学试剂研究所); H_2O_2 (优级纯)、醋酸氨 (分析纯) 和氨水 (分析纯) 为北京化工厂产品。标准溶液: CH_3HgCl 和 HgO 用 10% (V/V) HNO_3 配成浓度为 1000 mg/L Hg 储备液, 用聚乙烯瓶避光保存于 4°C 冰箱中备用。在实验当天用含 0.1% 的 2-巯基乙醇的超纯水逐级稀释使用。

2.3 样品的前处理方法

方法 1: 准确称取 $200\sim 300\text{ mg}$ 样品于 15 mL 离心管中, 加入 2 mL 浓 HNO_3 和 1 mL H_2O_2 , 密闭过夜。氨水调节 pH 至 $2\sim 8$, 用去离子水稀释, 定容至 10 mL , $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后备用; 方法 2: 准确称取 $200\sim 300\text{ mg}$ 样品于 15 mL 离心管中, 加入 3 mL 1.2 mol/L HNO_3 , 超声波提取 30 min 后, 3000 r/min 离心 10 min , 收集上清液。上述提取过程重复一次, 合并提取液。氨水调节 pH 至 $2\sim 8$, 用去离子水稀释, 定容至 10 mL , $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤备用; 方法 3: 准确称取 $200\sim 300\text{ mg}$ 样品于 15 mL 离心管中, 加入 3 mL 5 mol/L HCl , 以下步骤同方法 2。

2.4 汞的形态分析

用 PEEK 管 ($\phi=0.13\text{ mm}$) 连接高效液相色谱和等离子体质谱, 以色谱手动进样器为质谱工作的触发信号。用峰面积定量。

3 结果和讨论

3.1 标准溶液和标准曲线

配制同时含有 CH_3Hg^+ 和 Hg^{2+} 的浓度分别为 $1.0, 2.0, 5.0, 10, 20$ 和 $50\text{ }\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 浓度 (X) 为横坐标绘制标准曲线 (见表 1), 标准溶液的色谱图见图 1。由于 CH_3Hg^+ 与流动相中 2-巯基乙醇结合生成的直线型分子的极性大于 Hg^{2+} 与 2-巯基乙醇所生成的分子的极性, 因此, 在反相色谱中, CH_3Hg^+ 早于 Hg^{2+} 出峰。

表 1 标准曲线和检出限

Table 1 Calibration curve and limit of detection (LOD)

	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 LOD ($\mu\text{g/L}$)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/L}$)
CH_3Hg^+	$Y=4839X-2534$	0.9995	0.2	$1\sim 50$
Hg^{2+}	$Y=4362X-3394$	0.9996	0.3	$2\sim 50$

Y : 峰面积 (peak area), 计数 (counts); X : 浓度 (concentration), $\mu\text{g/L}$

3.2 前处理方法的比较

各种前处理方法的比较见表 2。从表 2 可以看出,采用 1.2 mol/L HNO_3 为超声波酸提取液,人发中的 CH_3Hg^+ 仅有约 30%被取出来,而 Hg^{2+} 则没有检出,说明此法可能并不适用于生物样品中 Hg 的提取,虽然文献 [14] 曾使用此法成功地提取出了沉积物中的超过 90% 的 Hg 。

前处理采用冷硝酸消化方法,发现 CH_3Hg^+ 的测定值远远低于文献值, Hg^{2+} 的测定值却高于文献值,而总汞值与标准值相符。这说明一部分 CH_3Hg^+ 有可能在前处理过程中转化成了 Hg^{2+} 。Rahman 等 [15] 在采用冷硝酸消化的方法测定沉积物中的 Hg^{2+} 和 CH_3Hg^+ 时,也得到了类似的结果。

采用 5 mol/L HCl 超声波提取生物样品中的 CH_3Hg^+ 和 Hg^{2+} , 所得的结果与标准值相符合。Logar 等 [16] 曾用 6 mol/L HCl 在摇床上振摇 24 h 的方法提取角鲨肝中的 Hg , 而使用超声波辅助酸提取的方法,可以大大缩短前处理时间。

表 2 各种提取方法的比较^a

Table 2 Comparison of different extraction methods

样品 Samples	样品数 Number of samples	提取方法 ^b Extract method	甲基汞 CH_3Hg^+ ($\mu\text{g Hg/kg}$)	无机汞 Hg^{2+} ($\mu\text{g/kg}$)	总汞 ^c Total Hg ($\mu\text{g/kg}$)	总汞标准值 Certified Value of Hg ($\mu\text{g/kg}$)	甲基汞文献值 Literature value of CH_3Hg^+ ($\mu\text{g Hg/kg}$)
人发 Human hair	2	(1)	ND ^d	346 \pm 45	346 \pm 45	360 \pm 50	180 \pm 50 ($n=8$) [17]
GBW 07601	2	(2)	63 \pm 1	ND	63 \pm 1		
	3	(3)	146 \pm 6	203 \pm 27	349 \pm 23		
对虾 Prawn	2	(1)	93 \pm 1	112 \pm 5	206 \pm 5	201 \pm 4	170 \pm 10 [18]
GBW 08572	3	(3)	178 \pm 5	ND	178 \pm 5		

a 结果按平均值 \pm 标准偏差表示 (results are (mean \pm SD)); b (1) 浓 HNO_3 消化 (concentrated HNO_3 digestion) (2) 1.2 mol/L HNO_3 提取 (extraction) (3) 5 mol/L HCl 提取 (extraction); c 总汞 (total Hg) = $\text{CH}_3\text{Hg}^+ + \text{Hg}^{2+}$; d ND: 未检出 (not detected)

3.3 HPLC-ICPMS 联用中的问题及解决办法

在 HPLC 的分离中,使用 C_{18} 反相柱对 Hg 的形态进行分离是应用较多的方法,色谱流动相中的有机试剂进入 ICPMS 后,会产生一系列不利的影响。过多的有机试剂可能会导致等离子体不稳定,甚至熄灭。从改善等离子体的稳定性和提高 Hg 分析的灵敏度等方面考虑,多数文献中使用甲醇-水流动相,而不使用乙腈-水流动相。进入 ICPMS 的有机物会以碳的形式沉积在采样锥锥口,引起仪器信号漂移,严重时可能堵塞锥口。

在流动相中加入少量有机改性剂,缓冲盐和离子对试剂,从而使各种形态的 Hg 在反相柱上得到很好地分离,并可以消除离子型 Hg 的记忆效应。本实验中选用 5% (V/V) 甲醇-水溶液作为流动相,并且降低雾室的温度 (1),可以减少进入 ICPMS 的有机试剂总量。为了消除在锥口的积碳,可以在雾化气中加入 2% (V/V) 的氧气。在流动相中加入 20 $\mu\text{g/L}$ 的 Bi 作为内标,可以校正仪器的漂移。另外,为了减少 Hg 吸附的可能,在实验中采用了管路为 PEEK 的 Waters 626 高效液相色谱系统。

3.4 生物标准参考物的测定

本实验测定了人发 (GBW 07601)、对虾 (GBW 08572)、鱼样 (AEA MA-B-3/TM) 和牛肝 (GBW 080193) 4 种标准参考物中 Hg^{2+} 和 CH_3Hg^+ 的含量 (见表 3)。其中,人发是一种很好的生物标志物,发 Hg 的含量可以反映人体 Hg 暴露的水平。水体中的 CH_3Hg^+ 通过生物放大作用富集于水产品中,因而鱼类和对虾等水产品是人群 CH_3Hg^+ 暴露的重要来源之一,其 Hg 的含量也可以反映水体的 Hg 污染水平。而肝脏作为哺乳动物重要的物质代谢器官,进入生物体内的 Hg^0 和 CH_3Hg^+ 可以在肝脏中转化为 Hg^{2+} 。因此,上述四类生物样品中 Hg , 特别是 Hg 不同化学形态含量的准确测定是十分重要的。但是,目前国内外标准参考物中有关 Hg 各种形态的数据仍然十分有限。使用 HPLC-ICPMS 联用的方法对以上 4 种标准参考物进行测定,既可以对本方法的可靠性进行验证,也可为标准参考物中 Hg 的各化学形态的含量提供一些参考值。

在本实验选用的 4 种标准参考物中,在检出限以上没有发现除 CH_3Hg^+ 和 Hg^{2+} 以外的其他 Hg 的存在形态。标准参考物的测定结果见表 3。从表中可以看到本方法对上述 4 种生物标准参考物的测定

结果与相应的标准值或文献值相符合,其中对虾由于 Hg^{2+} 含量低未被检出,使得总 Hg 值低于标准值。在人发样品中 CH_3Hg^+ 和 Hg^{2+} 均可被检出 (见图 2)。在鱼样和对虾样品中的 Hg 主要以 CH_3Hg^+ 的形态存在,而在牛肝中则以 Hg^{2+} 的形态为主 (见表 3)。

本实验所选均为 Hg 含量较高的标准参考物,对于更低含量的样品 (Hg 含量小于 $50 \mu\text{g/kg}$),则需要对仪器进行改进。比如采用 Hg 蒸汽发生装置,这样检出限还可以降低 1~2 个数量级。

表 3 标准参考物的测定结果^a

Table 3 The determination results of standard reference materials

样品 Samples	样品数 Number of samples	甲基汞 CH_3Hg^+ ($\mu\text{g Hg/kg}$)	无机汞 Hg^{2+} ($\mu\text{g/kg}$)	总汞 ^b Total Hg ($\mu\text{g/kg}$)	总汞标准值 Certified value of Hg ($\mu\text{g/kg}$)	甲基汞文献值 Literature value of CH_3Hg^+ ($\mu\text{g Hg/kg}$)
人发 Human hair GBW 07601	$n = 3$	$146 \pm 6^*$	203 ± 27	$349 \pm 23^*$	360 ± 50	$180 \pm 50 (n = 8)^{[17]}$
对虾 Prawn GBW 08572	$n = 3$	$178 \pm 5^*$	ND ^c	178 ± 5	201 ± 4	$170 \pm 10^{[18]}$
牛肝 Bovine liver GBW080193	$n = 3$	ND	167 ± 12	$167 \pm 12^*$	180^d	-
鱼 Fish IAEA MA-B-3/TM	$n = 3$	$434 \pm 21^*$	50 ± 10	$484 \pm 25^*$	510 ± 70	$434 \pm 15 (n = 23)^{[19]}$

a 结果按平均值 ± 标准偏差表示 (results are (mean ± SD)); b 总汞 (total Hg) = $\text{CH}_3\text{Hg}^+ + \text{Hg}^{2+}$; c 未检出 (not detected); d 参考值 (reference value); * 测量值与鉴定值无显著性差异 ($P < 0.05$) (there is no significant difference between the experimental data and the certified values $P < 0.05$)

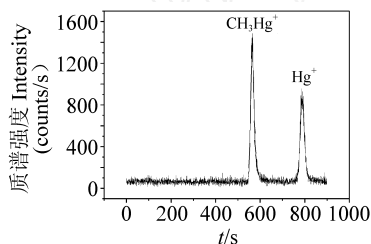


图 1 CH_3Hg^+ 和 Hg^{2+} 标准溶液 ($5 \mu\text{g/L}$) HPLC-ICPMS 谱图

Fig 1 High performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICPMS) chromatogram of CH_3Hg^+ and Hg^{2+} standard solution ($5 \mu\text{g/L}$)

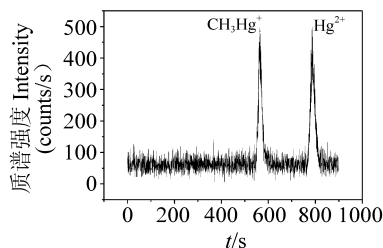


图 2 人发 (GBW 07601) 提取液 HPLC-ICPMS 谱图

Fig 2 HPLC-ICPMS chromatogram for the extraction of human hair (GBW 07601)

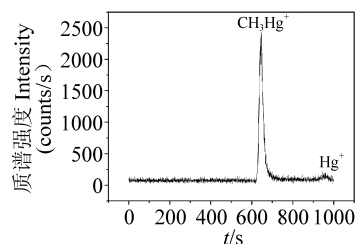


图 3 鱼样 (IAEA MA-B-3/TM) 提取液 HPLC-ICPMS 谱图

Fig 3 HPLC-ICPMS chromatogram for the extraction of fish (IAEA MA-B-3/TM)

致谢 感谢上海交通大学陆文伟和美国热电公司马玉平先生在 ICPMS 实验中给予的帮助。

References

- Boening D W. *Chemosphere*, **2000**, 40: 1335 ~ 1351
- Ullrich SM, Tanton TW, Abdrashitova SA. *Crit Rev Environ Sci Technol*, **2001**, 31(3): 241 ~ 293
- Liu Na (刘娜), Zhang Lanying (张兰英), Du Lianzhu (杜连柱), Zhang Yuling (张玉玲), Liu Rui (刘瑞), Chen Dengyun (陈登云). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2005**, 33(8): 1116 ~ 1118
- Yuan Zhuobin (袁卓斌), Zhu Min (朱敏), Han Shubo (韩树波). *Rock and Mineral Analysis* (岩矿测试), **1999**, 18(2): 150 ~ 156
- Liang Li na (梁立娜), Jiang Guibin (江桂斌). *Journal of Analytical Science* (分析科学学报), **2002**, 18(4): 338 ~ 343
- Uria J E S, Sanz-Medel A. *Talanta*, **1998**, 47: 509 ~ 524
- Huang Zhiyong (黄志勇), Wu Xihong (吴熙鸿), Hu Guanglin (胡广林), Zhuang Zhixia (庄峙厦), Wang Xiaoru (王小如). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2002**, 30(11): 1387 ~ 1393

- 8 Qvamstrom J, Frech W. *J. Anal At Spectrom.*, **2002**, 17: 1486 ~ 1491
- 9 Falter R, Ilgen G. *Fresenius J. Anal Chem.*, **1997**, 358: 401 ~ 406
- 10 Rio-Segade S, Bendicho C. *J. Anal At Spectrom.*, **1999**, 14: 263 ~ 268
- 11 Morton J, Carolan V A, Gardiner P H E. *J. Anal At Spectrom.*, **2002**, 17: 377 ~ 381
- 12 Cabanero A I, Madrid Y, Camara C. *J. Anal At Spectrom.*, **2002**, 17: 1595 ~ 1601
- 13 Hintelmann H. *Chemosphere*, **1999**, 39: 1093 ~ 1105
- 14 Hammerschmidt C R, Fitzgerald W F. *Anal Chem.*, **2001**, 73: 5930 ~ 5936
- 15 Rahman G M M, Kingston H M. *Anal Chem.*, **2004**, 76: 3548 ~ 3555
- 16 Logar M, Horvat M, Falcova I, Stibilj V. *Fresenius J. Anal Chem.*, **2000**, 366: 453 ~ 460
- 17 Feng W Y, Chai Z F, Qian Q F. *J. Radioanal Nucl Chem.*, **1996**, 212(1): 61 ~ 68
- 18 Li Xinji(李新纪), Chai Zhifang(柴之芳), Qian Qinfang(钱琴芳). *Shanghai Environmental Sciences(上海环境科学)*, **1994**, 13(9): 15 ~ 18
- 19 Horvat M. *Water Air Soil Poll*, **1991**, 56: 95 ~ 102

Determination of Inorganic and Methyl Mercury in Biological Samples by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

Wang Meng^{1, 2}, Feng Weiyue^{*1}, Zhang Fang¹, Wang Bing^{1, 2}, Shi Junwen^{1, 2}, Li Bai¹, Chai Zhifang¹, Zhao Yuliang¹

¹ (Key Laboratory of Nuclear Analytical Techniques, Institute of High Energy Physics,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

² (Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract High performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) has been developed for the determination of inorganic and methyl mercury in biological samples. Different techniques used to extract inorganic and methyl mercury from biological samples were also evaluated. The samples were sonicated to extract inorganic and methyl mercury in the system of 5 mol/L HCl. A 5% (V/V) methanol-water mobile phase containing 0.06 mol/L ammonium acetate, 20 µg/L Bi and 0.1% (V/V) 2-mercaptoethanol and a C₁₈ reversed-phase column (5 µm, 3.9 mm × 150 mm) was used for separation of CH₃Hg⁺ and Hg²⁺ by HPLC. The concentrations of CH₃Hg⁺ and Hg²⁺ in eluent were detected by ICP-MS. Total four certified reference materials including human hair (GBW 07601), prawn (GBW 08572), fish (AEA MA-B-3/TM) and bovine liver (GBW 080193) were analyzed. The results showed good accordance with the certified values. The detection limits of the method for inorganic and methyl mercury were 0.3 µg/L and 0.2 µg/L, respectively.

Keywords High performance liquid chromatography, inductively coupled plasma-mass spectrometry, hyphenated technique, mercury, biological samples, speciation analysis

(Received 18 February 2005; accepted 30 June 2005)