

超声波辅助溶剂萃取-电感耦合等离子体质谱法 测定生物样品中的总汞和甲基汞

孙 瑾^{1,2}, 陈春英^{1*}, 李玉锋^{1,2}, 李 柏¹, 高愈希¹, 柴之芳¹

1. 中国科学院核分析技术重点实验室, 中国科学院高能物理研究所, 北京 100049

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘 要 建立了超声波辅助溶剂萃取联用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定生物样品中总汞(T-Hg)和甲基汞(MeHg)的分析方法。实验优化了萃取溶剂种类, 溶剂浓度, 各种辅助方法和超声波振荡时间等各种萃取条件。选择 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 作为溶剂, 超声 2 h, 以有机溶剂萃取, 再以水反萃, 稀释后直接进行测量 MeHg 的含量。此方法可用于同时测定 T-Hg 和 MeHg, 检出限为 $0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相对标准偏差为 3.44%, 线性范围为 $1 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 加标回收率为 80%~97%。在此条件下测定了 5 种不同类型生物标准参考物质的 T-Hg 和 MeHg, 测定值与标准值吻合。该法综合了超声波辅助萃取和溶剂微萃取以及 ICP-MS 的优点, 操作简便快速, 灵敏度高, 适合于各种生物样品中痕量 MeHg 快速萃取分离和分析。

关键词 电感耦合等离子体质谱; 超声波辅助溶剂萃取; 生物样品; T-Hg; MeHg

中图分类号: O657.6; O614.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)01-0173-04

引 言

Hg (Mercury, Hg) 是一种全球性的重要污染物之一, 人们广泛关注。不同形态的 Hg, 其毒性是不同的。其中甲基汞 (methylmercury, MeHg) 可通过食物的富集最终进入人体, 通过对中枢神经系统的损伤, 引起一系列神经、精神疾病症状, 对人体的健康危害最大。震惊世界的水俣病事件就是由于当地人们食用了 MeHg 污染的鱼而造成的中毒^[1]。MeHg 可通过环境中的无机 Hg 在微生物的甲基化作用或非生物甲基化作用下而形成^[2]。因此测定生物样品中的 MeHg 已成为 Hg 污染研究的重点之一。

目前测定 MeHg 的方法很多。主要是利用气相色谱或液相色谱首先进行不同 Hg 种态的分离, 然后利用各种具有元素选择性的检测手段, 如电化学检测器 (ECD)、原子吸收光谱 (AAS)、原子荧光光谱 (AFS)、电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 等进行测定^[3-7]。其中 ICP-MS 具有多元素分析, 更低的检出限, 更宽的线性范围, 相对少的干扰等优点。目前已得到越来越多的广泛应用, 但国内应用较少。

在 MeHg 分析过程中, 提取和分离有机 Hg 化合物是最关键的步骤之一。常用的提取方法主要有酸浸提法、碱式消化法、水蒸气蒸馏技术和超临界流体萃取^[8-12], 而超临界流

体萃取技术主要用于萃取底泥中的 MeHg。通过这些方法, 可以把 T-Hg 从不同基体中提取出来, 然后再利用有机溶剂萃取或色谱分离的方法分析其中 MeHg 的含量。然而, 色谱分离的方法往往耗时较多、费用较高, 还需要气相色谱或液相色谱仪等设备, 在应用上有一定局限性。利用有机溶剂将 MeHg 从 T-Hg 中分离出来^[10, 13], 不需色谱分离步骤并可在短时间内定量分析样品中的 MeHg 含量。

本文比较了各种提取方法并且优化各种条件, 选择了以 HCl 为介质、超声波辅助溶剂萃取 T-Hg 后, 以 CH_2Cl_2 萃取 MeHg, 再以水反萃后, 直接用 ICP-MS 测量 MeHg 的方法。T-Hg 也可以在 CH_2Cl_2 萃取 MeHg 之前, 取部分溶液直接稀释用 ICP-MS 测量。应用此方法成功分析了多种生物标准参考物质, 如加拿大国家研究委员会 (NRCC) 研制的狗鲛鱼肝 (NRC DOLT-3), 狗鲛鱼肉 (NRC DORM-2) 和我国研制的人发 (GBW 07601), 黄鱼 (GBW 08573) 和牛肝 (GBW 080193) 等标准参考物质中的 T-Hg 和 MeHg。

1 实验部分

1.1 仪器

电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) (Thermo Elemental

收稿日期: 2005-11-06, 修订日期: 2006-03-26

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (10490180) 和国际原子能机构 CRP 项目 (13246/R0) 资助

作者简介: 孙 瑾, 女, 1974 年生, 中国科学院研究生院硕士研究生

*通讯联系人

e-mail: chenchy@mail.ihep.ac.cn

X7 series): 以 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Be, Co, In, U 混合标准溶液对仪器条件进行最优化选择。优化参数见表 1。

超声波清洗仪(昆山超声仪器有限公司); 离心机(北京医用离心机厂)。所有玻璃器皿和塑料容器均用 30% 的硝酸浸泡 2 d, 使用前用去离子水清洗干净。

Table 1 Instrumental conditions and data acquisition parameters of ICP-MS

| 参数 | 数值 |
|---|---------------------------------------|
| 等离子体射频功率/ W | 1 200 |
| 冷却气流速/ ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) | 13.0 |
| 辅助气流速/ ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) | 1.0 |
| 雾化气流速/ ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) | 0.84 |
| 同心雾化器 | |
| 采样深度/ mm | 9.1 |
| 扫描模式 | 跳峰 |
| 驻留时间/ ms | 10 |
| 样品提升速度/ ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) | 0.8 |
| 测量同位素 | ^{202}Hg , ^{115}In |

1.2 试剂

氯化 MeHg (Aldrich 公司), 溶于 2% () HNO_3 配成浓度为 $1 \text{g} \text{Hg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液, 于 4 °C 冰箱中保存。 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hg 标准储备液 GBW 08617 (国家标准物质中心)。 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ In 标准储备液 GBW 080270 (国家标准物质中心)。所需 Hg 工作溶液在实验当天逐级稀释, 现用现配。

T-Hg 的溶剂提取试剂分别采用 $6 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl; 18% () KBr 溶于 0.5% () H_2SO_4 和 $1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 的混合溶液; 25% () KOH 溶于 CH_3OH ; 5% () 十二烷基磺酸钠 (SDS) 和 1% () 十二烷基苯磺酸钠 (SDBS) 等。所用试剂均为分析纯或以上试剂。

CH_2Cl_2 (北京化工厂, 分析纯); HNO_3 和 HCl 均为 (MOS 级, 北京化学试剂研究所); 2-巯基乙醇 (分析纯, Sigma 分装)。Milli-Q 超纯水 (Millipore 纯水器制备)。

1.3 样品前处理

1.3.1 T-Hg 的提取

称取 0.1 g 样品于 5 mL 离心管中, 加入 2 mL $6 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 放置过夜, 超声 2 h, 然后 4000 rpm 离心 10 min, 取上层溶液一部分直接稀释后准备测量 T-Hg, 另一部分做进一步分析。同时做空白试验。

另做各种条件试验, 称取多份 0.1 g 样品 (以人发 GBW 07601 为例) 于 5 mL 离心管中, 分别加入 2 mL 2, 6, 12 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, KOH/ CH_3OH 溶液, SDS 溶液和 SDBS 溶液, 放置过夜, 分别做振荡 24 h, 超声 5, 30, 120 min, 80 °C 加热 30 min, 4000 rpm 离心 10 min, 取上层溶液做进一步分析。取 0.1 g 人发 (GBW 07601) 样品于 5 mL 离心管中, 加入 1 mL KBr/ H_2SO_4 溶液和 0.1 mL $1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 溶液, 放置 30 min, 做进一步分析。同时分别做溶剂空白试验。

1.3.2 MeHg 的萃取分离

取上述溶液分别加入 1 mL CH_2Cl_2 萃取 MeHg, 剧烈振荡 30 min, 4000 rpm 离心 10 min, 取下层有机相溶液, 再于

水相中加入 1 mL CH_2Cl_2 , 重复上述萃取过程, 合并两次萃取的有机相溶液, 加入 2 mL H_2O , 置于 60 °C 水浴中并充入氮气, 使有机相蒸发, 从而使 MeHg 留在水相中, 再加水定容, 待测。

1.4 Hg 的测量

用 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ In 的 2% HNO_3 () 溶液作为内标在线加入, 样品直接进入 ICP-MS 检测, 每个样品平行测量 3 次, 样品之间用 2% HNO_3 () 和 0.1% 2-巯基乙醇的混合溶液清洗管路以减少 Hg 的记忆效应。

2 结果与讨论

2.1 前处理方法的比较

实验研究了 5 种不同溶剂提取人发样品中的 MeHg, 结果表明, HCl 和 KBr/ H_2SO_4 - CuSO_4 的提取方法均能取得好的 MeHg 回收率 (80% 以上), 碱消化法和表面活性剂的提取效果较差。结果见表 2。但由于 KBr/ H_2SO_4 - CuSO_4 体系中所含盐离子浓度过高, 使用 ICP-MS 测量时, 易产生多离子干扰, 影响测量结果。所以选择 HCl 作为提取溶剂。

Table 2 Recovery of methylmercury using different extraction media (n = 3)

| 提取溶剂 | MeHg 的测量值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 回收率/ % |
|--|---|-------------|
| HCl | 0.169 ± 0.021 | 94 ± 12 |
| KBr/ H_2SO_4 - CuSO_4 | 0.146 ± 0.011 | 81 ± 6 |
| KOH/ CH_3OH | 0.049 ± 0.010 | 27 ± 6 |
| SDS 或 SDBS | 0.013 ± 0.002 | 7 ± 1 |

实验比较了 HCl 体系下各种不同的辅助萃取方式萃取 MeHg 效果。超声 30 min、振荡 24 h、80 °C 加热 30 min。表 3 表明超声和振荡比加热的效果好。可能是由于加热时 MeHg 会有一些挥发损失。但由于振荡比较费时, 因此选择超声作为辅助手段。

Table 3 Recovery of methylmercury using different assisted extraction methods

| 辅助手段 | MeHg 的测量值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 回收率/ % |
|-----------------|---|--------|
| 超声 30 min | 0.182 | 101 |
| 振荡 24 h | 0.145 | 80 |
| 加热 80 °C 30 min | 0.113 | 63 |

实验进一步比较了不同浓度的 HCl (2, 6, 12 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 提取人发样品中 Hg 的效果。结果如图 1 所示。2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 提取 T-Hg 效率较低, 只有 57% 左右, 而 6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 和 12 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 提取 T-Hg 效率分别达到 96% 和 102%, 说明低浓度的酸对 Hg 的萃取能力较低。进一步比较 6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 和 12 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 萃取 MeHg 的效果, 两者分别为 101% 和 90%。考虑到 12 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 体系的酸度太大, 对 ICP-MS 有一定影响, 因此选择 6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 为萃取体系。

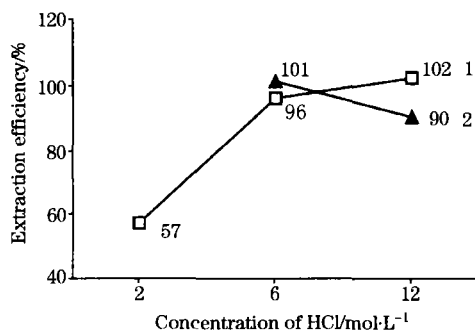


Fig 1 Effect of different concentrations of hydrochloric acid on mercury extraction efficiency

1: T-Hg; 2: MeHg

更进一步的实验比较了在 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 体系下, 超声时间的不同对样品中 Hg 提取的影响。分别选择超声 5, 30, 120 min 进行实验。结果见图 2。超声 5 和 30 min 时, T-Hg 的提取率只有 78%, 而超声 120 min 时 Hg 的回收率可达到 96%。又比较了超声 30 和 120 min 时的 MeHg 的萃取率, 结果均为 101%。因此, 选择在 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 体系下超声波辅助 120 min 进行样品的前处理。

通过上述条件实验, 选择在 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 萃取体系下, 超声 120 min 作为同时测定 T-Hg 和 MeHg 的样品前处

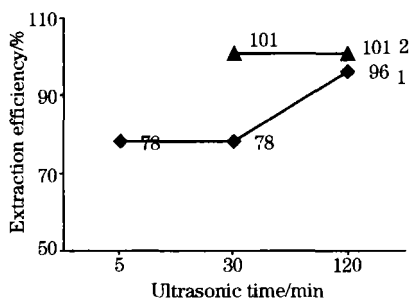


Fig 2 Effect of different time of ultrasonic radiation on mercury extraction efficiency

1: T-Hg; 2: MeHg

理方法, 可取得比较满意的结果。

目前, T-Hg 的测定多采用干法消化法或湿法消化法消解样品, 大多数为间接敞式加热, 不但费时耗电, 还容易损失易挥发的 Hg 元素。这种消解样品方式逐渐被微波消解所代替, 消解速度大大加快, 消解效率大大提高, 由于是在密闭的溶样罐中消解, 避免了 Hg 的挥发损失。其缺点是较为耗时和需要微波溶样系统。因此, 本文提出的方法不失为一种简便易行的途径, 并可同时检测样品中的 T-Hg 和 Me-Hg。

2.2 标准工作曲线的绘制和方法的检出限、精密度、线性范围和回收率实验

MeHg 储备液用去离子水稀释, Hg 标准储备液用 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 分别配成浓度为 0, 1, 5, 10, 20, 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Hg 的溶液, 用 ICP-MS 测量并绘制标准曲线, 线性范围为 $0 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。回归方程, 相关系数和检出限见表 4。检出限以空白溶液的 10 次重复测定的 3 倍标准偏差计算。将一份试样溶液平行测定 10 次, 计算测定的精密度 (RSD %), Hg 为 3.44%。平行称取标准发样 (GBW 07601), 狗鲨鱼肉 (NRC DORM-2) 和狗鲨鱼肝 (NRC DOL T-3) 各 3 份, 加入 Hg 标准溶液后, 进行 T-Hg 和 MeHg 的萃取, 做回收率实验, Hg 的回收率为 80% ~ 97%。

Table 4 Calibration curve and detection limit

| | 回归方程 | 相关系数 | 检出限/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
|------|-------------------------|--------|--|
| MeHg | $y = 2346.44x - 254.71$ | 0.9995 | 0.012 |
| T-Hg | $y = 2555.68x + 493.14$ | 0.9999 | 0.009 |

2.3 生物标准参考物质的测定

应用优化的方法测定了 5 种生物标准参考物质, 人发 (GBW 07601), 狗鲨鱼肉 (NRC DORM-2), 狗鲨鱼肝 (NRC DOL T-3), 黄鱼 (GBW 08573) 和牛肝 (GBW 080193) 的 T-Hg 和 MeHg, 其测量值与标准参考值相符合, 说明此方法准确可靠。结果见表 5。人发样品中 MeHg 约占一半, 在鱼肉中 90% 以上的 Hg 主要以 MeHg 的形态存在, 而在牛肝中 MeHg 的含量不到 10%。

Table 5 The analytical results ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of standard reference materials (n = 3)

| 标准物质名称 | T-Hg 测量值 | T-Hg 标准值 | MeHg 测量值 | MeHg 标准值 |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| 人发 GBW 07601 | 0.354 ± 0.019 | 0.36 ± 0.05 | 0.167 ± 0.016 | $0.18^{*} [14, 15]$ |
| 狗鲨鱼肉 NRC DORM-2 | 4.604 ± 0.083 | 4.64 ± 0.26 | 4.344 ± 0.103 | 4.47 ± 0.32 |
| 狗鲨鱼肝 NRC DOL T-3 | 3.327 ± 0.147 | 3.37 ± 0.14 | 1.752 ± 0.386 | 1.7^{*} |
| 牛肝 GBW 080193 | 0.173 ± 0.005 | 0.18^{*} | 0.013 ± 0.002 | - |
| 黄鱼 GBW 08573 | 0.187 ± 0.005 | 0.169 ± 0.018 | 0.155 ± 0.010 | - |

*参考值; **文献值

3 结论

综上所述, 本文提出的方法适用于不同类型生物样品的 T-Hg 和 MeHg 的测定。样品前处理过程简便、快速、经济、

实用; ICP-MS 检测更加灵敏、准确, 方法检出限可达 $0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 测定速度可达每小时 20 样品, 较其他方式检测 Hg 更为节省大型仪器的机时和使用损耗。

不久前, 铁梅等^[16]亦曾用 ICP-MS 法测定过食菌中的硒。

参 考 文 献

- [1] Harada M. Critical Reviews in Toxicology, 1995, 25(1) : 1.
- [2] Ullrich S M, Tanton T W, Abdrashitova, S A. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 2001, 31(3) : 241.
- [3] State Environmental Protection Administration of China(国家环境保护局). National Standard of the People's Republic of China GB/ T 17132—1997(中华人民共和国国家标准 GB/ T 17132—1997). Beijing: China Standard Press(北京: 中国标准出版社), 1998. 1.
- [4] Falter R, Scholer H F, Fresenius J. Anal. Chem., 1996, 354: 492.
- [5] Liang L, Horvat M, Bloom N S. Talanta, 1994, 41(3) : 371.
- [6] Tu Q, Qian J, Frech W. J. Anal. At. Spectrom., 2000, 15: 1583.
- [7] MU Ren-xiang, CHEN Ming-xue, ZHU Zhi-wei, et al(牟仁祥, 陈铭学, 朱智伟, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(2) : 236.
- [8] Rio-Segade S, Bendicho C. J. Anal. At. Spectrom., 1999, 14: 263.
- [9] LIANG Li-na, HU Jing-tian, JIANG Gui-bin, et al(梁丽娜, 胡敬田, 江桂斌, 等). Chinese J. Anal. Chem.(分析化学), 2005, 33(2) : 229.
- [10] QIU Guang-le, FENG Xin-bin, LIANG Lian, et al(仇广乐, 冯新斌, 梁琏, 等). J. Instrumental Analysis(分析测试学报), 2005, 24(1) : 29.
- [11] Eiden R, Falter R, Agustin-Castro B, et al. Fresenius J. Anal. Chem., 1997, 357: 439.
- [12] Emteborg H, Björklund E, Ödman F, et al. Analyst, 1996, 121(1) : 19.
- [13] Logar M, Horvat M, Falnoga I, et al. Fresenius J. Anal. Chem., 2000, 366: 453.
- [14] FENG Wei-yue, QIAN Qin-fang, CHAI Zhi-fang, et al(丰伟悦, 钱琴芳, 柴之芳, 等). J. Nuclear and Radiochemistry(核化学与放射化学), 1996, 18(3) : 187.
- [15] LI Xin-ji, CHAI Zhi-fang, QIAN Qin-fang(李新纪, 柴之芳, 钱琴芳). Shanghai Environmental Sciences(上海环境科学), 1994, 13(9) : 15.
- [16] TIE Mei, ZANG Shu-liang, ZHANG Wei, et al(铁梅, 臧树良, 张巍, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(3) : 551.

Rapid Analysis of Methylmercury and Total Mercury in Biological Samples by Ultrasonic-Assisted Solvent Extraction Coupled with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

SUN Jin^{1,2}, CHEN Chun-ying^{1*}, LI Yufeng^{1,2}, LI Bai¹, GAO Yu-xi¹, CHAI Zhi-fang¹

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

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract The analytical method for the determination of total mercury and methylmercury in biological samples was studied using ultrasonic-assisted solvent extraction coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry. Various extraction conditions like solvent types and concentrations, different assisted methods, and ultrasonic radiation time were optimized. Samples were digested with $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl, ultrasonicated for 2 hours, extracted by organic solvent, then back-extracted by water and directly measured after dilution. With the optimized method, the total mercury and methylmercury were simultaneously measured. The detection limit was $0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, the relative standard deviation (RSD) was 3.44%, the linearity of calibration curve of mercury was in the concentrations of $0.50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the recovery of mercury given by standard addition method was 80%-97%. Mercury in five different biological standard reference materials was determined by the described method. The experimental results were in good agreement with the certified values. The proposed method takes the advantage of ultrasonic-assisted extraction, micro-solvent extraction, and ICP-MS, which is especially suitable for the analysis of mercury in different biological samples.

Keywords Inductively coupled plasma-mass spectrometry; Ultrasonic-assisted solvent extraction; Biological samples; Total mercury; Methylmercury

* Corresponding author

(Received Nov. 6, 2005; accepted Mar. 26, 2006)