

文章编号: 0254 - 5357(2014)03 - 0395 - 07

离子色谱 - 电感耦合等离子体质谱法测定乳粉的汞形态

林立^{1,2}, 王琳琳², 孙海波², 孙继红¹

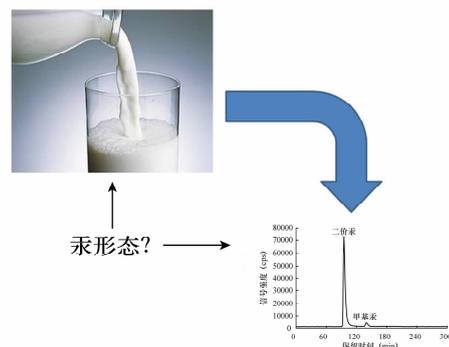
(1. 北京工业大学, 北京 100022; 2. 国家食品质量监督检验中心, 北京 100094)

摘要: 对于乳粉的汞形态分析, 由于基质的复杂性, 有机汞非常容易与样品中蛋白质上的巯基结合, 形成稳定的络合物, 在前处理过程中须保证各形态提取完全且各形态之间不会发生相互转化, 因此样品前处理是汞形态分析的难点; 同时乳粉中汞含量极低, 对方法检出限提出了更高的要求。本文通过优化样品前处理过程, 建立了离子色谱 - 电感耦合等离子体质谱测定乳粉中三种汞形态(二价汞、甲基汞、乙基汞)的方法。实验采用多种复合酶(蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶)对乳粉基质中的蛋白、脂肪、淀粉进行解离, 采用 L - 半胱氨酸 - 盐酸 - 甲醇的混合溶液作为提取剂进行超声提取, 样品过 RP 固相萃取小柱去除杂质后用 C18 色谱柱(5 μm , 4.6 mm \times 150 mm)进行分离, 流动相采用 10 mmol/L 乙酸铵 - 0.12% L - 半胱氨酸 - 5% 甲醇混合溶液进行淋洗, 5 min 内即可实现三种汞形态的基线分离。二价汞、甲基汞和乙基汞的加标回收率在 79.9% ~ 111.2% 之间, 检出限分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实际样品分析表明, 汞总量很低的乳粉, 汞各形态的提取率也能达到 70% 以上, 能够满足检测要求。本方法在样品前处理过程中采用酶解的方式解离复杂基体中的汞形态, 提高了提取率至 80% 以上; 仪器分析方面采用甲醇作为增敏剂, 提高了检测灵敏度, 适用于乳粉样品中痕量汞形态的检测。

关键词: 乳粉; 汞形态; 解离; 超声提取; 离子色谱法; 电感耦合等离子体质谱法

中图分类号: TS252.5; O614.243

文献标识码: A



汞化合物的生物化学行为和毒性与它们的化学形态密切相关, 仅仅从总量来评价其安全性是不科学的。有机汞的毒性大于无机汞, 其中甲基汞的毒性最强。由于甲基汞具有亲脂性、生物积累效应和生物放大效应, 其毒性是无机汞的几百倍^[1]。有机汞化合物在农业中常用作杀虫剂和杀菌剂, 很容易进入生物食物链^[2], 造成食品安全事件频频发生, 例如 2012 年奶粉的汞超标事件。对于汞形态分析, 应属水产品的报道较多, 在这些基体中汞常以甲基汞的形态存在; 而对乳粉样品的汞形态研究还未见报道。对于乳粉样品, 由于基质的复杂性, 乳粉中蛋白、脂肪、乳糖等有机物中所含的巯基与汞化合物的结合非常牢固, 形成稳定的络合物, 要将汞的各种形

态从结合态中完全解离出来是汞形态分析工作的重点, 同时在前处理过程中须保证各形态提取完全且各形态之间不会发生相互转化, 因此, 样品前处理是汞形态分析的难点。

乳粉中汞含量极低, 也对汞形态分析的检出限提出了更高的要求。目前汞形态分析的方法很多, 对汞形态的分离常采用色谱分离技术, 如气相色谱^[3-4]、高效液相色谱^[5-11]、离子色谱^[12]、毛细管电泳分离^[13-14]等。常用的检测手段有电化学检测器 (ECD)、原子吸收光谱仪 (AAS)^[3]、原子荧光光谱仪 (AFS)^[5,8-10,15]、电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP - AES)、电感耦合等离子体质谱仪 (ICP - MS)^[4,6-7,11-12,14] 等。各种分离技术均有优缺点。

收稿日期: 2013 - 11 - 02; 接受日期: 2013 - 11 - 29

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2012QK013); 质检公益性行业科研专项 (201210116)

作者简介: 林立, 高级工程师, 博士研究生, 主要从事分析化学的研究。E-mail: linli77422@aliyun.com。

如采用气相色谱进行分离,在前处理过程中需要衍生化,操作较为繁琐;采用毛细管电泳分离,设备普及率不及其他的分离手段。在检测手段方面,ECD、AAS、AFS、ICP-AES的检测灵敏度均不及ICP-MS;且ICP-MS具有很高的灵敏度和很好的选择性,对于汞的分析,选择丰度比最高的 202 作为采集的质量数,在乳粉基质中无质谱干扰,与离子色谱联机无需特别的接口,硬件条件很容易实现。

本文建立了一种离子色谱-电感耦合等离子体质谱(IC-ICP-MS)测定乳品中汞形态的分析技术。实验室重点优化了样品的前处理方法,采用多种复合酶(蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶)对奶粉基质中的蛋白、脂肪、淀粉进行解离,以L-半胱氨酸、盐酸和甲醇的混合溶液作为提取剂进行超声提取,样品过RP固相萃取小柱去除杂质后导入Agilent Eclipse XDB-C18色谱柱($5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$)进行分离,流动相采用 $10\ \text{mmol/L}$ 乙酸铵- 0.12% L-半胱氨酸- 5% 甲醇混合溶液进行淋洗,最后通过ICP-MS对三种汞形态(二价汞、甲基汞、乙基汞)进行定量。该方法可为乳粉中汞的富集形态研究提供数据支持。

1 实验部分

1.1 仪器及工作条件

ICS1500型离子色谱仪(美国Thermo公司)。离子色谱条件:Agilent Eclipse XDB-C18色谱柱($5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$);淋洗液: $10\ \text{mmol/L}$ 乙酸铵- 0.12% L-半胱氨酸- 5% 甲醇混合溶液;流速 $1\ \text{mL/min}$;进样量 $20\ \mu\text{L}$ 。

Agilent 8800电感耦合等离子体质谱仪(美国Agilent公司)。同心雾化器;石英雾化室:半导体控温(2 ± 0.1) $^{\circ}\text{C}$;屏蔽矩。质谱仪参考条件见表1。

色谱柱与ICP-MS相联的管线距离不超过 $0.5\ \text{m}$ 。

DMA80测汞仪(法国麦尔斯通公司)。

表1 ICP-MS仪器工作条件

Table 1 Working parameters of the ICP-MS instrument

工作参数	设定条件	工作参数	设定条件
功率	1500 W	采样深度	9.5 mm
载气(Ar)流量	0.60~1.20 L/min	采集质量数	^{202}Hg
辅助气(Ar)流量	与载气流量的总和保持在1.0~1.2 L/min之间	矩管	石英一体化, 2.5 mm中心通道
进样管内径	<0.2 mm	灵敏度	>300 Mcps/($\mu\text{g/g}$)
采样锥	铂锥	积分时间	0.5 s

超纯水机(德国Merk公司),超声波清洗器KQ-500E(昆山市超声仪器有限公司),水浴锅(北京长安永创科学仪器有限公司),冷冻离心机(湖南湘仪设备有限公司)。

1.2 标准溶液与主要试剂

甲基汞($76.6\ \mu\text{g/g}$)、乙基汞($75.3\ \mu\text{g/g}$)、二价汞($1000\ \mu\text{g/mL}$)标准溶液:购自中国计量科学研究院。调谐溶液: $10\ \text{ng/mL}$ 锂、钴、钇、铈、铊混合标准溶液(2% 硝酸介质,货号Part#5184-3566,购自美国Agilent公司)。

内标溶液: $1.0\ \mu\text{g/mL}$ 铋标准溶液(2% 硝酸介质):购自中国计量科学研究院。

L-半胱氨酸(纯度> 98% ,美国Sigma公司)。

蛋白酶(活性 $\geq 400\ \text{units/mg}$,美国Sigma公司),脂肪酶(活性 $\geq 700\ \text{units/mg}$,美国Sigma公司); α -淀粉酶(活性 $300\sim 5000\ \text{units/mg}$,天津市福晨化学试剂厂)。

RP固相萃取小柱($1\ \text{mL}$,天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

甲醇(色谱纯,百灵威公司),硫代硫酸钠(分析纯,北京化学试剂厂),盐酸(优级纯,北京化学试剂厂),超纯水(电阻率 $18.2\ \text{M}\Omega \cdot \text{cm}$),用于配制所有标准溶液与样品溶液。

1.3 实验方法

称取约 $0.5\ \text{g}$ 样品于 $30\ \text{mL}$ 锥形瓶中,加入约 $20\ \text{mL}$ 水摇匀,盖上瓶塞,加入蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶各 $0.06\ \text{g}$ (或配成溶液添加),置于 37°C 水浴锅中酶解 $14\ \text{h}$ 后,加入 $30\ \text{g/L}$ 的L-半胱氨酸 $1.0\ \text{mL}$ 、 $5\ \text{mol/L}$ 盐酸 $0.5\ \text{mL}$ 和甲醇 $1.25\ \text{mL}$ 振荡提取 $10\ \text{min}$ 。用水定容至 $25\ \text{mL}$ 比色管中, $5000\ \text{r/min}$ 高速离心后,取上清液过RP小柱,过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜后导入C18色谱柱($5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$)进行分离,采用电感耦合等离子体质谱仪进行定量,同时准备试剂空白。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法

检测乳制品中的汞形态,样品前处理的难度大于文献中常报道的海产品和环境样品的前处理^[3-4,8-9,11-12,16]。样品中有机汞非常容易和样品中蛋白质上的巯基结合,稳定地络合在蛋白上,会随着蛋白沉淀时沉淀下来或者是与蛋白质共同吸附在分离色谱柱上,无法洗脱,无法被检测器检测。乳粉基体主要由约 20% 的蛋白质、约 30% 的脂肪和约

50%的乳糖组成^[17-18]。蛋白、脂肪、淀粉等物质如果不在前处理过程中去除,会对色谱柱造成不可逆转的伤害。保证汞的各种形态在蛋白沉淀的过程中不随着共沉淀而损失,同时保持形态的稳定是本研究工作的重点。

2.1.1 样品中杂质的去除

乳粉样品基质复杂,要采用色谱柱进行分离,首先需去除基质中的蛋白。乳粉样品的除蛋白方式通常有以下几种:乙腈沉淀蛋白、乙酸沉淀蛋白、等电点沉淀蛋白以及酶解沉淀的方式。乙腈沉淀蛋白体系的样品中,由于含有大量的乙腈(一般含量在60%左右),采用ICP-MS作为检测器时,在溶剂流出的一瞬间,有机相含量太大,等离子体条件发生了较大变化,造成ICP-MS氩火焰不稳定,甚至熄灭,无法正常检测。乙酸沉淀蛋白体系虽然对于ICP-MS检测而言不存在较大的问题,但是由于现在的乳粉成分较为复杂,有些样品含有类似于增稠剂的食物添加剂等物质,采用乙酸沉降的方式很难沉淀下来,并不能适合于所有的奶粉基质。等电点沉淀蛋白体系适用于所有基质的乳粉,但是操作过程较为繁琐,需要对每个样品调其pH值,不适合大批量样品的检测。

本实验室选择酶解的方式去除杂质,对酶的用量、酶解时间进行了条件摸索。针对乳粉基质,实验室采用蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶组成的复合酶对乳粉进行酶解。复合酶的用量对酶解效果起着很重要的作用。一般而言,底物含量越高酶解的效果越好,但是酶本身也是一种蛋白质,其加入量过多也会吸附各种形态的汞,降低回收率。

在酶的用量实验中,称取约0.5 g样品于30 mL具塞三角瓶中。加入蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的含量分别由0.02 g逐级增加到0.1 g,对酶解效果进行评价。当各种酶的含量分别为0.06 g时,酶解效果较好。同时将酶解后的溶液过0.45 μm滤膜和RP小柱去除其中的蛋白,得到的样液采用测汞仪检测总汞含量得出了相同的结论。在此条件下,总汞的含量最大,酶解效果最好,汞从蛋白基质中的解离效果最好。

在酶解时间实验中,当酶解时间达到14 h以上时,酶解基本完成。一般在pH > 4.5的条件下进行酶解较好,实验室测试了0.5 g乳粉溶解在约20 mL的超纯水中时pH = 6.5,满足酶解的条件,无需调节pH值。酶解温度则一般选择细菌的培养温度37℃。

2.1.2 提取溶液的选择

对于汞形态分析,不同的样品基体需采用相应的提取方法,常用的提取方法有酸提法、碱提法以及超临界流体萃取等^[16]。实验室对于酸提取和碱提取两种提取方法进行了考察,样品溶液经处理用离子IC-ICP-MS进行形态分析。选择不含汞的乳粉样品在基质上加标试验,考察汞的各种形态的提取率(回收率)。

从表2的实验结果可以看出,对于不同的汞形态,不同提取体系的提取率各不相同。采用体系②进行提取,二价汞和甲基汞的回收率很高,而乙基汞的回收率在80%左右。当提取液中有硫代硫酸钠时,可以提高乙基汞的回收率,即采用体系①进行提取,这时乙基汞的回收率明显增加,接近100%,但是二价汞的回收率极低,无法满足检验的要求。体系③是碱性体系,汞各形态的回收率均较低,显然不适合应用。综合考虑三种体系中汞形态的回收率结果,本文确定采用体系②(即0.12% L-半胱氨酸溶液+0.1 mol/L盐酸+5%甲醇)进行提取。

表2 不同提取液对汞形态的回收率

Table 2 The recovery rate of Hg speciation by different extraction systems

汞形态	回收率(%)		
	体系①:0.12% L-半胱氨酸溶液+0.1%盐酸+0.1%硫代硫酸钠溶液+5%甲醇	体系②:0.12% L-半胱氨酸溶液+0.1 mol/L盐酸+5%甲醇	体系③:50 mmol/L氢氧化钠碱性溶液+5%甲醇
二价汞	12.1	98.5	55.3
甲基汞	100.4	102.3	44.9
乙基汞	97.6	80.6	39.4

2.1.3 提取方式的选择

一般溶剂提取采用超声、振荡、恒温水浴等方式。由于振荡法和恒温水浴法的提取时间较长,实验室对超声提取进行了条件摸索。将酶解后的溶液加入L-半胱氨酸、盐酸和甲醇混合溶液进行萃取,萃取时间分别设定为0、5、10、20、30、40、50、60 min。从图1可以看出10 min后提取量没有明显的变化,最终确定超声时间选择为10 min。同时在实验过程中发现,超声时间越长,乙基汞逐渐转化为二价汞,所以超声时间也不宜太长。

2.2 离子色谱-质谱联机检测条件

2.2.1 色谱柱和淋洗液的选择

进行汞形态分析,常用反相高效液相色谱柱作

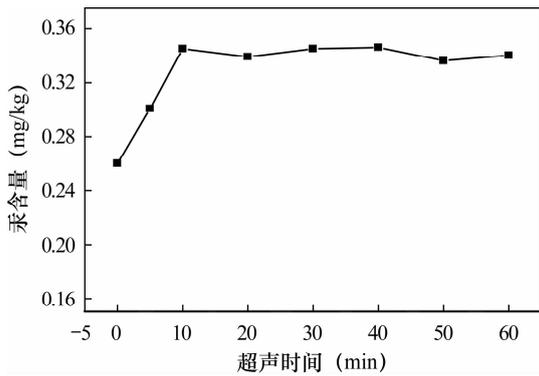


图1 超声时间对提取率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic extraction time on extraction rate of Hg speciation

为分离手段。在反相键合相色谱中,固定相的极性小于流动相的极性,适合于分离非极性、极性和离子型化合物^[16]。本实验选择 C18 柱作为汞形态的分离柱,选择适当的离子对试剂与汞化合物反应,生成非极性化合物在反相柱上进行分离。

实验室还考察了 L-半胱氨酸、四丁基溴化铵、溴化钾体系作为离子对试剂对汞形态进行洗脱。L-半胱氨酸的洗脱能力明显强于四丁基溴化铵和溴化钾,同时 L-半胱氨酸也作为一种络合剂,它的含量还会影响汞形态的峰形。当 L-半胱氨酸的含量较低时,汞的各种形态的保留时间较长,峰形拖尾;当汞含量增加到一定程度时,二价汞与甲基汞的分离效果变差,峰形却越来越尖锐;然而汞含量越高,带入的盐类不仅仅是容易在 ICP-MS 的截取锥沉积,同时对色谱柱的损伤也较为严重。当 L-半胱氨酸的浓度在 0.12% 时,能在 5 min 内完成分离。

甲醇在检测过程中有着双重的作用。①淋洗液中甲醇的加入会影响到极性,甲醇含量越大,汞的各种形态的保留时间越短;当甲醇浓度增加到 10% 时,二价汞与甲基汞很难实现完全的基线分离,因此要求甲醇的浓度在 10% 以下。②汞元素在 ICP-MS 检测器上的灵敏度较低,因为汞的第一电离能为 1007.1 kJ/mol,电离效率较低。因此,甲醇作为一种有机试剂,还对 ICP-MS 检测具有增敏效应,增敏效应产生的原因可能是电离的碳离子与部分未电离的目标离子之间发生了电荷转移效率,提高了汞的电离效率,增强了灵敏度^[19-20]。但是当甲醇的含量增加到过量的程度,会使等离子体炬的参数发生较大变化,反而增加了电离的负担,灵敏度又会下降。实验数据也证明了这一点。图 2 为不同的甲醇

浓度条件下,10 μg/L 汞溶液的灵敏度的变化。当甲醇含量约 5% 时,汞的灵敏度最高,这与色谱分离要求的甲醇含量在 10% 以下的条件相吻合,最终选择甲醇的浓度为 5%。

对分离条件进行优化后,在 5 min 内能实现三种汞形态的基线分离(图 3)。

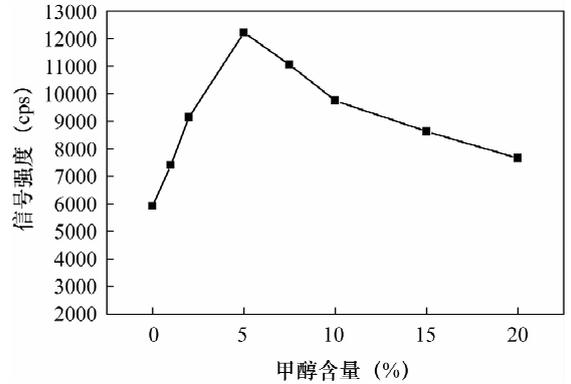


图2 甲醇对汞检测灵敏度的影响

Fig. 2 Effect of methanol on detection sensitivity of Hg

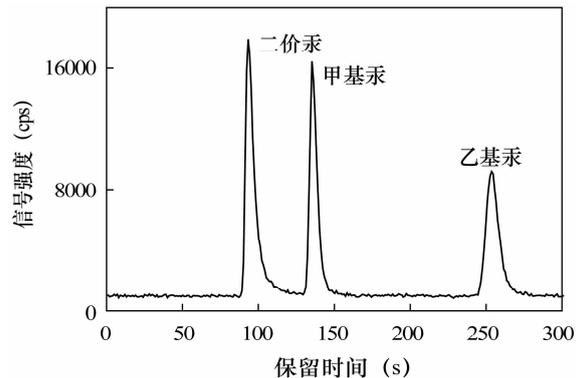


图3 IC-ICP-MS 联机检测汞的各种形态的分离色谱图 (浓度以汞计均为 10 μg/L)

Fig. 3 Chromatogram of mercury speciation by IC-ICP-MS

2.2.2 质谱分析条件的选择

汞在自然界共有 6 个同位素,其中丰度比较高的同位素有 ¹⁹⁹Hg、²⁰⁰Hg、²⁰¹Hg、²⁰²Hg,丰度比分别为 16.87%、23.10%、13.18%、29.86%,这些质量数分别容易受到 ¹⁸³W¹⁶O、¹⁸⁴W¹⁶O、¹⁸⁵Re¹⁶O、¹⁸⁶W¹⁶O 等多原子离子的干扰,然而可能干扰的这些物质几乎不存在于食品基体中,所以实验室选择了丰度比最高的 202 作为采集的质量数,样品基质中无质谱干扰。

2.3 方法检出限和线性范围

将浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20 μg/L 的二价汞、甲基汞和乙基汞系列标准溶液进行了线性范

围的测定,三条曲线的线性方程、相关系数见表3。调谐仪器到最佳状态,进样量10 μL。选择汞本底值较低的试剂进行实验,保证较低的基线背景。在最终确定的仪器条件下,奶粉中的二价汞、甲基汞和乙基汞的仪器检出限分别为0.01 μg/L、0.012 μg/L、0.018 μg/L(见表3)。对于乳粉样品如果稀释倍数是50倍时,固体样品的检出限分别为0.5 μg/kg、0.6 μg/kg、0.9 μg/kg。相关文献[7]采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)测定二价汞、甲基汞、乙基汞,本文采用的IC-ICP-MS仪器检出限与HPLC-ICP-MS方法相比较降低了一倍,达到了较好的检测水平,完全满足乳粉中痕量汞形态检测的要求。

表3 线性方程、线性范围和仪器检出限

Table 3 Linear equations, linear range and the detection limit of the instrument

汞形态	线性方程	相关系数 (r^2)	线性范围 (μg/L)	仪器检出限 (μg/L)
二价汞	$y = 20512x - 1268.7$	1.0000	0.5 ~ 20.0	0.01
甲基汞	$y = 14778x - 586.9$	0.9998	0.5 ~ 20.0	0.012
乙基汞	$y = 13671x - 258.4$	0.9993	0.5 ~ 20.0	0.018

2.4 加标回收率和精密度

为了考证汞的各形态的回收率情况,选择样品中汞含量低的样品进行加标回收实验。分别在样品中加入2、10、20 μg/L三个梯度的单标溶液,各溶液平行测定6次($n=6$)。由表4可以看出,无论是二价汞、甲基汞还是乙基汞,加标回收率均在79.9%~111.2%之间,精密度(RSD)在1.7%~3.2%之间,完全满足实验的要求。

表4 方法加标回收率和精密度

Table 4 Recovery and precision tests of the method

物质名称	加标溶液1 (2 μg/L)		加标溶液2 (10 μg/L)		加标溶液3 (20 μg/L)	
	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
二价汞	105.6	2.1	91.6	3.1	95.2	2.1
甲基汞	95.6	1.7	97.5	2.2	111.2	2.0
乙基汞	79.9	2.8	84.7	3.2	87.3	3.2

3 实际样品分析

采集5种实际乳粉样品,用测汞仪测定乳粉的总汞含量,同时采用本工作建立的IC-ICP-MS方

法分析二价汞、甲基汞、乙基汞三种汞形态,以三种汞形态的加和值与总汞检测结果相比较得到提取率,分析结果列于表5。从实验结果可以看出,对于汞总量很低的乳粉样品,汞各形态的提取率也能达到70%以上,可以满足实验的要求。

采用本工作建立的IC-ICP-MS方法对鱼肉国家标准物质(GBW 10029)进行测定,总汞与甲基汞的含量与相应的标准值吻合,证明该方法准确可靠(表5)。

图4为某汞含量高的乳粉的色谱分离图,可以看出奶粉中汞的富集形态主要是二价汞和甲基汞。

表5 乳粉中汞的形态分析

Table 5 Analytical results of mercury speciation in milk powder

样品名称	测汞仪测定的 总汞含量 (mg/kg)	汞形态的测定值(mg/kg)			汞形态的 提取率 (%)
		二价汞	甲基汞 (以汞计)	乙基汞 (以汞计)	
乳粉1	0.352	0.317	0.028	未检出	98.0
乳粉2	0.152	0.132	0.015	未检出	96.7
乳粉3	0.036	0.034	未检出	未检出	94.4
乳粉4	0.019	0.011	0.003	未检出	73.6
乳粉5	0.025	0.021	未检出	未检出	84.0
鱼肉标准物质 (GBW 10029) (标准值0.85)	0.86	未检出	0.85 (标准值0.84)	未检出	98.8

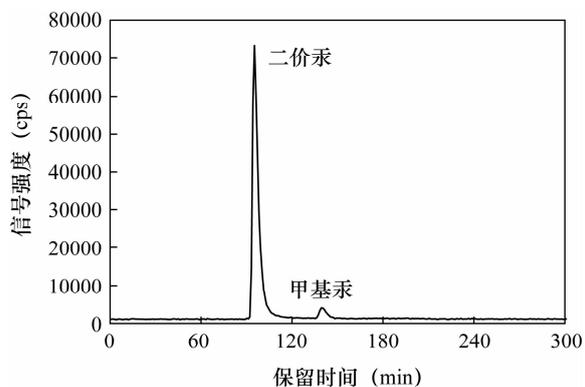


图4 乳粉样品中汞形态的色谱分离图

Fig. 4 Chromatogram of Hg speciation in milk powder

4 结语

乳粉的汞形态分析存在一些难点,如由于基质的复杂性造成提取率低、乳粉中汞含量极低对方法检出限提出了更高的要求,本文建立的离子色谱-电感耦合等离子体质谱方法解决了这些难点问题。该方法前处理过程中采用酶解的方式解离复杂基体中的汞形态,提高了提取率,仪器检测条件方面采用甲醇作为增敏剂,提高了检测灵敏度,方法检出限低。

本方法可以应用于乳粉样品的实际检测工作。而针对乙基汞的加标回收率(75%~90%)较低的问题,有待于进一步优化实验条件,提高乙基汞的检测能力。

5 参考文献

- [1] 金明华,张晶,刘晓梅,王雯,张洁,石龙,孙志伟.甲基汞对雄性小鼠的生殖发育毒性及作用机制[J].吉林大学学报(医学版),2005,31(4):522-525.
- [2] 万双秀,王俊东.汞对人体神经的毒性及其危害[J].微量元素与健康研究,2005,22(2):67-69.
- [3] 江桂斌,顾晓梅,倪哲明,王顺荣,韩恒斌.毛细管气相色谱-原子吸收法测定生物样品中的有机汞化合物[J].色谱,1991,9(6):350-352.
- [4] 李妍,刘书娟,江冬青,江焱,严秀平.气相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术应用于水产品中汞形态分析[J].分析化学,2008,36(6):793-798.
- [5] 徐国栋,邱海鸥,王义壮,汤志勇.原子荧光光谱法用于水系沉积物中迁移毒性态汞的形态分析[J].岩矿测试,2007,26(5):359-362.
- [6] Chen H Y, Chen J G, Jin X Z, Wei D Y. Determination of trace mercury species by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172: 1282-1287.
- [7] 张兰,陈玉红,施燕支,王英锋,米健秋,张之旭.高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定二价汞、甲基汞、乙基汞与苯基汞[J].环境化学,2009,28(5):772-774.
- [8] 毛红,秦德元,巩俐彤.液相色谱-原子荧光法测定鱼肉中甲基汞、乙基汞、无机汞[J].中国卫生检验杂志,2010,20(10):2439-2440.
- [9] 陈雪昌,梅光明,张小军,朱敬萍,郭远明,顾捷,郑斌.高效液相色谱-原子荧光法测定水产品中甲基汞含量[J].食品科学,2012,33(4):234-237.
- [10] Chen J, Yu X P, Guo Y F, Deng T L. Speciation analysis of mercury in natural water[J]. *岩矿测试*, 2012, 31(6): 939-944.
- [11] Jia X Y, Gong D R, Han Y, Wei C, Duan T C, Chen H T. Fast speciation of mercury in seawater by short-column high-performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma spectrometry after on-line cation exchange column preconcentration[J]. *Talanta*, 2012, 88: 724-729.
- [12] Chen X P, Han C, Cheng H Y, Wang Y C, Liu J H, Xu Z G, Hu L. Rapid speciation analysis of mercury in seawater and marine fish by cation exchange chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1314: 86-93.
- [13] 李保会,余莉萍,王朝晖,刘礼文,严秀平.基于低流速雾化器和可拆卸接口的毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱联用技术应用于汞的形态分析[J].光谱学与光谱分析,2005,25(8):1336-1338.
- [14] Zhao Y Q, Zheng J P, Fang L, Lin Q, Wu Y N, Xue Z M, Fu F F. Speciation analysis of mercury in natural water and fish samples by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2012, 89: 280-285.
- [15] 马名扬,张丽佳,毕鸿亮,张朝阳,卢普相.超声辅助溶剂萃取-原子荧光法用于土壤中汞的形态分析[J].分析试验室,2009,28(10):45-48.
- [16] 梁立娜,江桂斌.高效液相色谱及其联用技术在汞形态分析中的应用[J].分析科学学报,2002,18(4):338-343.
- [17] 姚晓敏,于自强,刘玲.奶粉物理性状的分析评价[J].上海交通大学学报(农业科学版),2007,25(10):421-425.
- [18] 戴智勇,张岩春,刘跃辉,沈国辉,莫红卫,杨抑,侯艳梅,潘丽娜,熊尉杰,高玉妹.婴幼儿配方乳粉中蛋白质、脂肪及碳水化合物调整[J].乳品加工,2011,112(4):58-61.
- [19] 季海冰,潘荷芳.异丙醇增感电感耦合等离子体质谱法直接测定土壤和沉积物中硒[J].中国环境监测,2010,26(6):16-19.
- [20] Mireia C, Manuela H, Mònica I. Arsenic determination by ICP-QMS with octopole collision/reaction cell overcome of matrix effects under vented and pressurized cell conditions[J]. *Talanta*, 2011, 85: 1941-1947.

Speciation Analysis of Mercury in Milk Powder using Ion Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Technique

LIN Li^{1,2}, WANG Ling-ling², SUN Hai-bo², SUN Ji-hong¹

(1. Beijing University of Technology, Beijing 100022, China;

2. China National Food and Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

Abstract: Sample pre-treatment difficulties arise during the analysis for mercury speciation in milk powder due to the complexity of the sample matrix. The organic mercury combines easily with sulfhydryl of proteins in the matrix sample, to form a stable complex. Therefore it is very important to ensure that all forms are extracted completely and do not transform during the pre-treatment process. The method with a lower detection limit was necessary because the concentration of mercury was too low. For this purpose, the method for determination of mercury speciation (inorganic mercury, methylmercury, ethylmercury) in milk was established by ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry with optimized pre-treatment conditions. Protein, fat, and starch in milk powder were dissociated using a variety of composite enzymes (protease, lipase and amylase). The sample was ultrasonically extracted using mixed solution of L-cysteine, hydrochloric acid with methanol and was further purified by RP solid phase column. Mercury speciation was separated by Agilent Eclipse XDB-C18 column (5 μm , 4.6 mm \times 150 mm). The mobile phase contained 10 mmol/L ammonium acetate, 0.12% L-cysteine, and 5% (*m:m*) methanol solution. Three kinds of mercury speciation were baseline separated within 5 min. The spiked recoveries of inorganic mercury, methylmercury and ethylmercury were obtained in the range of 79.9% - 111.2%. The instrument detection limits were 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The results obtained from actual sample testing show that the extraction rate of total mercury can reach more than 70% in low concentration mercury milk powder, which meets the test requirements. The extraction rate can reach more than 80% because the composite enzyme was used in this method to dissociate mercury speciation from the complex matrix during sample pre-treatment processing. Methanol was applied as a sensitizer to improve detection sensitivity. A simple, rapid and reliable method was developed for the determination of mercury speciation in milk powder.

Key words: milk powder; mercury speciation; dissociation; ultrasonic extraction; Ion Chromatography; Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry