

前处理方法和外源性物质对含 β -HgS 药物中 甲基汞检测假阳性结果的影响研究*

袁璐^{1,2,3}, 毕宏涛¹, 肖远灿¹, 李岑¹, 张明¹, 海平², 魏立新^{1**}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省藏药药理学和安全性评价研究重点实验室, 中国科学院藏药研究重点实验室, 西宁 810008; 2. 青海省药品检验检测院, 青海省中藏药现代化研究重点实验室, 西宁 810016; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 目的: 探索前处理方法和外源性物质对药物中 β -硫化汞 (β -HgS) 转化为甲基汞带来的影响。方法: 在前处理溶液体积为 5 mL 的条件下, 考察超纯水、酸性前处理溶剂、碱性前处理溶剂、酸浓度、物理浸萃前处理手段和外源性物质对 β -HgS 转化为甲基汞的影响, 采用高效液相色谱与冷蒸气-原子荧光光谱法 (HPLC-CV-AFS) 在线耦合测定甲基汞。色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m), 以甲醇-0.06 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液 (含 0.1% L-半胱氨酸) (5:95) 为流动相, 流速 1 mL · L⁻¹, 进样体积 100 μ L, 检测波长 254 nm。结果: 15 mg β -HgS 经超纯水前处理后, 测得甲基汞浓度低于检测下限; 经 5 mol · L⁻¹ 盐酸或 25% 氢氧化钾-甲醇溶液分别前处理后, 发现有 β -HgS 转化为甲基汞, 甲基汞质量浓度为 (0.63 ± 0.01) μ g · L⁻¹ 和 (2.32 ± 0.07) μ g · L⁻¹, 占可溶性汞的比值分别为 0.067% 和 1.162%; β -HgS 经加热法前处理后, 转化甲基汞质量浓度为 (0.71 ± 0.03) μ g · L⁻¹, 显著高于振荡法 [(0.52 ± 0.02) μ g · L⁻¹] 和超声法 [(0.61 ± 0.01) μ g · L⁻¹], 3 种物理浸萃方法的甲基汞占可溶出汞比值无显著性差异, 分别为 0.059%、0.061% 和 0.062%; 盐酸浓度为 0.5~5.0 mol · L⁻¹ 时, 测得甲基汞质量浓度为 (0.52 ± 0.02) ~ (0.63 ± 0.04) μ g · L⁻¹ (占可溶性汞的比值为 0.454%~0.069%), 8 mol · L⁻¹ 盐酸浓度下甲基汞的浓度显著升高为 (1.50 ± 0.08) μ g · L⁻¹ (占可溶性汞的比值为 0.018%); 与 β -HgS 对照组 [甲基汞浓度 (0.64 ± 0.02) μ g · L⁻¹, 占可溶性汞的比值为 0.069%] 相比, 加入纤维素和植物混合组分后甲基汞浓度为 (0.76 ± 0.03) μ g · L⁻¹ 和 (1.44 ± 0.07) μ g · L⁻¹, 占可溶性汞的比值分别为 0.070% 和 0.114%。结论: 本研究表明, 当样品中存在较高含量 β -HgS (\geq 15 mg) 时, 在 5 mol · L⁻¹ 盐酸或 25% 氢氧化钾-甲醇溶液做前处理溶剂的条件下, β -HgS 经前处理后会转化为甲基汞, 转化的甲基汞浓度与酸浓度呈正相关, 加热能够促进甲基化的发生, 某些外源性物质如纤维素等可促进高含量 β -HgS 样品转化为甲基汞。

关键词: β -硫化汞; 甲基汞检测假阳性; 前处理方法; 外源性物质; 含汞矿物药

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2021)02-0306-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2021.02.14

* 国家重点研发计划 (2018YFC1708006); 青海省重大科技专项 (2020-SF-A3-2); 中国科学院国际合作局对外合作重点项目 (153631KYSB20160004); 青海省重点实验室发展专项 (2017-ZJ-Y08)

** 通信作者 Tel: (0971) 6143900; E-mail: lxwei@nwipb.cas.cn

第一作者 Tel: (0971) 8247794; E-mail: yuanlu800@163.com

Influence of pretreatment methods and exogenous substances on false positive results of methylmercury in drugs containing β -HgS*

YUAN Lu^{1,2,3}, BI Hong-tao¹, XIAO Yuan-can¹, LI Cen¹,
ZHANG Ming¹, HAI Ping², WEI Li-xin^{1**}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Qinghai Province Key Laboratory of Pharmacology and Safety Evaluation for Tibetan Medicines, Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. Qinghai Provincial Drug Inspection and Testing Institute, Qinghai Key Lab for Modernization Research of Traditional Chinese and Tibetan Medicines, Xining 810016, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Objective: To explore the effects of pretreatment methods and exogenous substances on the conversion of β -HgS to methylmercury in drugs. **Methods:** With 5 mL pretreatment solution, β -HgS convert to methylmercury caused by ultrapure water, acidic pretreatment solvent, alkaline pretreatment solvent, acid concentration, physical leaching pretreatment methods and exogenous substances were investigated. Speciation analysis of methylmercury was done by on-line coupling of high performance liquid chromatography with cold vapor generation atomic fluorescence spectrometry (HPLC-CV-AFS). Agilent Eclipse Plus C₁₈ was used and the mobile phase consisted of 5% methanol, 0.06 mol · L⁻¹ ammonium acetate solution contained 0.1% L-cysteine (5:95) at a flow rate of 1 mL · L⁻¹. The injection value was 100 μ L and the detection wavelength was 254 nm.

Results: After 15 mg β -HgS was pretreated with ultrapure water, the measured methylmercury concentration did not reach the lowest detection limit of this LC-AFS. After pretreating with 5 mol · L⁻¹ hydrochloric acid and 25% potassium hydroxide-methanol solutions, the mercury element derived from β -HgS was methyl mercury concentrations in both kinds of solutions were (0.63 ± 0.01) μ g · L⁻¹ and (2.32 ± 0.07) μ g · L⁻¹, accounting for 0.067% and 1.162% in dissolved mercury respectively. β -HgS was converted into methylmercury after pretreatment by heating method, and the concentration was (0.71 ± 0.03) μ g · L⁻¹, accounting for 0.059% of the dissolved mercury, which was significantly higher than the shaking method (0.52 ± 0.02) μ g · L⁻¹ and ultrasonic method (0.61 ± 0.01) μ g · L⁻¹. There was no significant difference in the ratio of methylmercury to dissolved mercury in the three physical extraction methods, which were 0.059%, 0.061% and 0.062% respectively. When the concentration of hydrochloric acid was 0.5–5.0 mol · L⁻¹, the measured methylmercury concentration was (0.52 ± 0.02) – (0.63 ± 0.04) μ g · L⁻¹ (accounting for 0.454%–0.069% of the concentration of dissolved mercury), and the methylmercury concentration increases significantly to (1.50 ± 0.08) μ g · L⁻¹ at 8 mol · L⁻¹ acid concentration (accounting for 0.018% of the concentration rate of dissolved mercury). compared with the β -HgS control group (0.64 ± 0.02) μ g · L⁻¹, the methylmercury concentrations after adding cellulose and plant mixture were (0.76 ± 0.03) μ g · L⁻¹ and (1.44 ± 0.07) μ g · L⁻¹, accounting for 0.070% and 0.114% of dissolved mercury, respectively. **Conclusion:** We demonstrate that when there is a high content of β -HgS (\geq 15 mg) in the sample, with 5 mol · L⁻¹ hydrochloric acid or 25% potassium hydroxide-methanol solution as the pretreatment solvent, β -HgS can be converted into methylmercury after pretreatment. The converted methylmercury concentration is positively correlated with the acid concentration. Heating can promote methylation of β -HgS. Some exogenous substances such as cellulose can promote the conversion of samples with high content of β -HgS into methylmercury.

Keywords: β -HgS; false positive results of methylmercury; pretreatment methods; exogenous agents; mercury-contained mineral medicine

含硫化汞(HgS)矿物药(如中药朱砂、藏药佐太和蒙药银朱)在我国传统医药中具有悠久的临床应用历史,但因为含汞,其安全性备受人们关注^[1-2]。汞毒性与其形态密切相关, HgS 是溶解度极低 [$K_{sp}(\alpha\text{-HgS})=2\times 10^{-53}$; $K_{sp}(\beta\text{-HgS})=2\times 10^{-52}$] 的无机汞^[3], 毒性远小于有机汞中的甲基汞(MeHg)。甲基汞由于其生物食物链蓄积特性和体内放大效应,会对生态环境和人类健康造成严重危害^[4-5],如 20 世纪 50 年代发生在日本的水俣病事件,正是因为人们食用了被甲基汞污染的鱼后,造成了严重的汞中毒。因此,在评价含 HgS 药物的安全性时,测定甲基汞比单纯测定药物中总汞的含量更具指导性。

常见的甲基汞形态分析方法有蒸馏法^[6]、酸/碱溶剂法^[7-9]和有机溶剂法^[10], 色谱与原子光谱联用是检测甲基汞的有效手段^[10]。然而有文献报道,在汞污染的土壤和沉积物样品中(无机汞浓度大于 $500\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) 检出的甲基汞有一部分是由无机汞转化而来,而非样品本身所含有^[9]。Hintelmann 等^[6]用传统水蒸馏法检测沉积物中的甲基汞时发现,无机汞的甲基化率虽为 0.02%~0.03%,但由于样本背景,本底甲基汞含量极低,因此,这些由无机汞转化的甲基汞会导致最终误差达 30%~50%。《国家环境保护标准对水质中烷基汞检测》(HJ977-2018)标准的补充说明^[11]中写到,当样品中 Hg^{2+} 质量浓度高于 $440\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,会对烷基汞测定产生正干扰,不再适宜采用蒸馏法。Hammerschmidt 等^[12]用稀硝酸溶液对沉积物参考物质进行前处理后,测得甲基汞值高于标准值,进一步研究发现,是样品中的无机汞发生甲基化所致。

Liu 等^[13]对 7 种含佐太的藏成药进行了检测,测得总汞含量为 $24\sim 12\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 甲基汞含量为 $0.033\sim 37\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; Martin-Doimeadios 等^[14]测定了沉积物参考物质 IAEA356 中的甲基汞, IAEA356 的总汞认证值为 $(7.62\pm 0.65)\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 甲基汞认证值为 $(5.87\pm 0.89)\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 而作者实际测得甲基汞值为 $(19.8\pm 17)\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 高于认证值的 3 倍; Delgado 等^[15]对沉积物标准参考物质 CRM-580 中的甲基汞进行了检测,测得甲基汞浓度是认证值的 4 倍, Martin-Doimeadios 和 Delgado 经进一步研究后发现,沉积物中的溶出汞在前处理和检测过程中发生了甲基化,转化的甲基汞给检测结果造成了误差,导致甲基汞检测结果高于参考物质认证值的 3~4 倍。由

此可以怀疑, Liu 等^[10]对含佐太藏成药中甲基汞的检测结果也存在汞甲基化带来的误差。含佐太药物中的 $\beta\text{-HgS}$ 是否会转化为甲基汞? 影响其发生甲基化的因素是什么? 目前尚未见文献报道。本研究以 $\beta\text{-HgS}$ 作为研究对象,参考现行《食品安全国家标准-食品中总汞和有机汞的测定》(GB5009.17-2014)^[16]标准方法和文献方法^[8,13],考察了超纯水、酸前处理溶剂、碱前处理溶剂、物理浸萃前处理手段、酸浓度和外源性物质对甲基化的影响,以期客观评价含汞药物中甲基汞的检测结果提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

BSA-100C 高效液相色谱-原子荧光光谱联用仪,北京宝德仪器公司; KQ100DA 超声仪,昆山仪器公司; HZ-82(A) 回旋式气浴恒温振荡器,金坛市天瑞仪器有限公司; ME204 型电子天平, Mettler Toledo 公司; Sigma 3K-15 高速冷冻离心机, Sigma 公司。

1.2 样品与试剂

氯化甲基汞对照品 0.1 g (Dr. Ehrenstorfer 公司, 95%); 汞单元素标准溶液 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (GBW08617, 中国计量研究院); $\beta\text{-HgS}$ (分析纯, Alfa Aesar 公司, 纯度 > 98%); 单质硫(阿拉丁公司, 99.95%); 纤维素 (Sigma 公司); 淀粉(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乳清蛋白(源叶生物, 80%); L-半胱氨酸(阿拉丁公司, 99%); 盐酸 (GR 分析纯, 华北特种化学试剂有限公司, 36.5%); 甲醇(色谱纯, Merck 公司); 二氯甲烷(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 氢氧化钾和硼氢化钾为分析纯试剂。实验用水为 $18.2\ \text{M}\Omega$ 去离子水(由 Milli Q 超纯水机制备)。石榴籽、红花、肉桂、萆薢和豆蔻药材购自青海省富康医药有限责任公司。

氯化甲基汞标准品先用少量甲醇溶解后,用 2% 硝酸稀释成 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液约 100 mL, 保存于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中。

按照《中华人民共和国药典》2015 年版四部^[17], 分别配制 0.5、1、2、4、5 和 $8\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液。

1.3 甲基汞(MeHg^+)和可溶出汞(Hg^{2+})的检测方法及仪器工作条件

1.3.1 仪器工作条件 液相色谱条件: Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱 ($4.6\ \text{mm}\times 150\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$); 流动相: 甲醇 $-0.06\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液(含 0.1% L-半胱氨酸)(5:95); 流速: $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量: $100\ \mu\text{L}$ ^[16]。

原子荧光光谱仪条件:高强度汞空心阴极灯(灯电流 40 mA,负高压 300 V,测定波长 253.7 nm);氩气流速 400 mL·min⁻¹,辅助气流速 200 mL·min⁻¹。载流为 5% (v/V) 盐酸溶液,还原剂为 0.5% (m/V) 硼氢化钾溶液(含 0.5% 氢氧化钾)。

1.3.2 可溶出汞和甲基汞检测 按“1.5.1”项下方法,对经二氯甲烷萃取后的样品溶液上层水相部分稀释后进行可溶出汞的测定。对经硫代硫酸钠溶液反萃取后的水相溶液进行甲基汞的测定。

1.4 可溶出汞和甲基汞的标准曲线配制

准确吸取一定量氯化甲基汞储备液和汞单元素标准溶液,用去离子水稀释配制质量浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20 μg·L⁻¹ 的系列混合对照品溶液。采用浓度 X 作为横坐标,峰面积 Y 作为纵坐标,分别绘制可溶出汞和甲基汞的标准曲线。

1.5 前处理方法

1.5.1 酸/碱溶剂法 准确称取 β-HgS 15 mg(平行 6 份),分别置 15 mL 塑料离心管中,分别加入去离子水、不同浓度盐酸溶液(0.5、1、2、4、5、8 mol·L⁻¹)和 25% 氢氧化钾-甲醇溶液均 5 mL,涡旋混匀后超声(250 W, 50 kHz) 30 min^[8];然后在 4 °C 下以 5 000 r·min⁻¹ 速度离心 10 min,取上清液用 0.22 μm 的滤膜进行过滤后置于 15 mL 离心管中,加入二氯甲烷 5 mL 萃取甲基汞,室温下剧烈振荡 2 h 后,在 3 000 r·min⁻¹ 速度下离心(3 000 r·min⁻¹) 10 min;定量移取二氯甲烷层 4 mL 至另一 15 mL 离心管中,加入 10 mmol·L⁻¹ 硫代硫酸钠溶液 2 mL 并振荡 30 min,将甲基汞反萃取至水相;最后以 3 000 r·min⁻¹ 速度离心 5 min,取出上层水相溶液 1 mL 进行过滤,过滤液立即放入冰箱中,4 °C 冷藏,直到上机检测。

1.5.2 物理浸提法 采用的前处理溶剂均为 5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液。

振荡法: 将“1.5.1”项下“涡旋混匀后超声 30 min 改为“室温下机械振荡 1 h^[13]”,其他步骤与“1.5.1”完全一致。

超声法: 操作步骤完全同“1.5.1”项。

加热法: 将“1.5.1”项下“涡旋混匀后超声 30 min 改为“60 °C 水浴加热 12 h^[13]”,其他步骤与“1.5.1”项完全一致。

1.5.3 向 β-HgS 中加入外源性物质的前处理方法

由于含 β-HgS 药物制剂中成分复杂,因此需要进一步考察其他物质对汞甲基化的影响。含硫化汞

矿物药佐太的主要组成为 β-HgS(54%)和单质硫(S,32%)^[18],含佐太制剂中同时还存在其他植物组分,因此,拟考察单质硫、植物源性组分(纤维素、淀粉、葡萄糖、蛋白质)及植物混合组分(以含佐太制剂中常见植物药材石榴籽、红花、肉桂、芫荽和豆蔻的混合组分为例)对 β-HgS 甲基化的影响。

设置 β-HgS 作为对照组,将单质硫(10 mg)、纤维素(0.2 g)、淀粉(0.1 g)、葡萄糖(0.1 g)、蛋白质(0.1 g)和植物混合组分(0.2 g)分别加入 β-HgS 中,按照“1.5.1”项项方法操作后进行甲基汞检测。单质硫加入量依据占佐太的比例进行换算,纤维素和植物混合组分的加入量依据藏药制剂服用剂量进行比例换算^[19],淀粉、葡萄糖和蛋白质参考了人体糖、蛋白质和脂肪的每日摄入量^[20]。

1.6 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计学分析,以平均值 ± SD 表示,对于 2 组数据之间的比较采用独立样本 t 检验(independent-samples t test),多组数据之间的比较采用 ANOVA 中 Tukey 法。每份样品测定设置 6 个平行样。

2 实验结果

2.1 甲基汞和可溶性汞的标准曲线和检测下限 在本实验条件下,甲基汞和可溶性汞的线性回归方程分别为

$$Y=1\ 603.1X-268.5 \quad r=0.999\ 1$$

$$Y=1\ 620.5X-363.9 \quad r=0.999\ 4$$

检测下限分别为 0.03 μg·L⁻¹ 和 0.05 μg·L⁻¹,线性范围为 0.5~20 μg·L⁻¹。混合对照品溶液和样品溶液的色谱图见图 1。

2.2 加入 β-HgS 1.5、15 和 150 mg 发生甲基化的检测结果

根据 Liu 等^[13]对 7 种含佐太藏成药中总汞的检测结果换算出 β-HgS 的加入量。考察了 1.5、15 和 150 mg β-HgS 经 5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液超声前处理后发生甲基化的程度。结果表明,1.5 mg β-HgS 经前处理后,甲基汞浓度低于检测下限;15 mg 和 150 mg β-HgS 均会发生甲基化,测得甲基汞质量浓度分别为 (0.615 ± 0.011) μg·L⁻¹ 和 (1.692 ± 0.047) μg·L⁻¹,但 150 mg β-HgS 的可溶出汞质量浓度是 15 mg β-HgS 的 4.5 倍,可溶出汞甲基化百分比(0.041 ± 0.002%)反而低于 15 mg β-HgS(0.062 ± 0.001%)。因此,最终选择 15 mg β-HgS 作为实验对象。

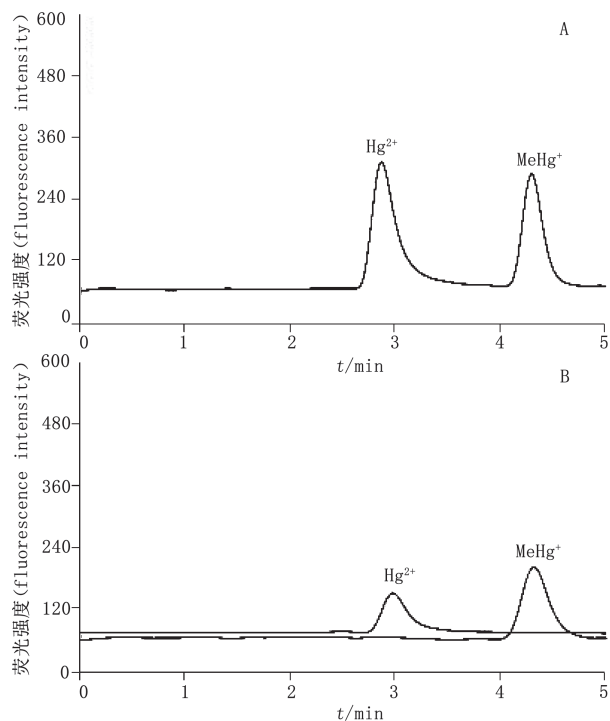


图1 甲基汞和可溶性汞混合对照品溶液(A)及β-HgS样品溶液(B)的液相色谱图

Fig. 1 LC chromatograms for MeHg⁺ and Hg²⁺ control solution (A) and β-HgS sample solution (B)

2.3 酸/碱前处理溶剂对β-HgS发生甲基化的影响
实验采用“1.5.1”项方法,以超纯水作为对

照,测得甲基汞浓度低于检测下限。β-HgS在5 mol·L⁻¹盐酸溶液中汞溶出增加并发生了甲基化,相比之下,碱性25%氢氧化钾-甲醇溶液显著促进了β-HgS转化为甲基汞(P<0.001),测得甲基汞浓度是5 mol·L⁻¹盐酸溶液处理后的4倍。5 mol·L⁻¹盐酸和25%氢氧化钾-甲醇空白溶液均未检出甲基汞。见表1。

2.4 振荡法、超声法和加热法对β-HgS发生甲基化的影响

实验采用“1.5.2”项下方法,β-HgS甲基化的影响由大到小依次为:加热法、超声法、振荡法;加热法会显著促进β-HgS中汞的溶出和甲基化,测得可溶出汞质量浓度为(1 220.193 ± 47.481) μg·L⁻¹,甲基汞质量浓度为(0.715 ± 0.028) μg·L⁻¹,β-HgS中汞的溶出程度和甲基化程度显著高于振荡法[可溶出汞(884.12 ± 38.32) μg·L⁻¹,甲基汞(0.523 ± 0.018) μg·L⁻¹]和超声法[可溶出汞(930.17 ± 28.19) μg·L⁻¹,甲基汞(0.614 ± 0.014) μg·L⁻¹]。3种方法测得甲基汞与可溶出汞的甲基化百分比分别为0.059%、0.061%和0.062%,无显著性差异。以静置处理代替振荡、超声和加热来做阴性对照,测得可溶出汞浓度分别为143.03、125.64和163.30 μg·L⁻¹,甲基汞低于检测下限。见图2。

表1 前处理溶剂对β-HgS发生甲基化的影响结果(平均值 ± SD, n=6)

Tab. 1 The effect of pretreatment solvent on the methylation of β-HgS (mean ± SD, n=6)

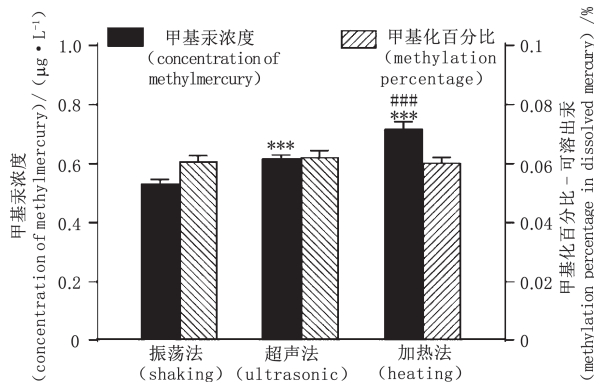
| 前处理溶剂 (pretreatment reagent) | 甲基汞浓度 (MeHg concentration) / (μg·L ⁻¹) | 可溶出汞浓度 (dissolved mercury concentration) / (μg·L ⁻¹) | 甲基化百分比 (percent of methylation) | |
|--|--|---|--|--|
| | | | vs. 总汞 ^a (vs. total Hg) /% | vs. 可溶出汞 ^b (vs. dissolved mercury) /% |
| 水 (water) | / | 1.905 ± 0.038 | / | / |
| 5 mol·L ⁻¹ 盐酸 (5 mol·L ⁻¹ hydrochloric acid) | 0.630 ± 0.011 | 930.179 ± 28.197 | 0.206 × 10 ⁻⁴ | 0.067 ± 0.002 |
| 25% 氢氧化钾-甲醇 (25% potassium hydroxide in methanol) | 2.323 ± 0.067 | 201.119 ± 15.981 | 0.769 × 10 ⁻⁴ | 1.162 ± 0.107 |

注 (note): a. 总汞甲基化百分比 (the percent of total Hg methylation) % = 100 × (M_{MeHg} - M₀) / M_{HgT} × 10⁶ [M_{MeHg} 代表测得甲基汞的量 (amount of measured methylmercury, ng), M₀ 代表甲基汞背景值 (measured background value of methylmercury, ng), M_{HgT} 代表总加入汞值 (amount of measured total Hg of β-HgS added, mg)]; b. 可溶出汞甲基化百分比 (the percent of dissolved mercury methylation) % = 100 × (C_{MeHg} - C₀) / (C_{Hg(II)-dissolved} - C_{Hg(II)-0}) [C_{MeHg} 代表测得甲基汞的浓度 (concentration of methylmercury, μg·L⁻¹), C₀ 代表甲基汞背景浓度 (background concentration of methylmercury, μg·L⁻¹), C_{Hg(II)-dissolved} 代表可溶出汞浓度 (μg·L⁻¹), C_{Hg(II)-0} 代表背景溶液中的Hg(II)浓度 (Hg(II) concentration of background Hg(II), μg·L⁻¹)]

2.5 不同浓度盐酸对β-HgS甲基化的影响

实验采用1.5.3项方法,0.5~8.0 mol·L⁻¹盐酸空白溶液均未检出甲基汞。测定结果显示,随着盐酸浓度增加,β-HgS的解离平衡向产生Hg²⁺的方向移动,从而促进了β-HgS中汞的溶出。从图3

中可以看出,在0.5~5.0 mol·L⁻¹浓度范围内,酸浓度与可溶出汞质量浓度和甲基汞浓度呈线性关系(R²=0.95, 0.96),可溶出汞质量浓度为(112.466 ± 4.718)~(914.228 ± 38.734) μg·L⁻¹,甲基汞质量浓度为(0.527 ± 0.018)~(0.632 ± 0.041) μg·L⁻¹,甲基汞



与振荡法相比 (compared with shaking method), $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; 与超声法相比 (compared with ultrasonic method), $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$, $\#\#\#P < 0.001$

图2 振荡法、超声法和加热法对 β -HgS 发生甲基化的影响结果 (平均值 \pm SD, $n=6$)

Fig. 2 The effect of shaking method, ultrasonic method and heating method on the methylation of β -HgS (mean \pm SD, $n=6$)

占可溶出汞的比值为 0.454%~0.069%, 二者间并不呈线性关系。8 mol \cdot L⁻¹ 盐酸浓度时, 可溶出汞质量浓度急剧升高至 (8 817.216 \pm 619.183) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 甲基汞质量浓度为 (1.504 \pm 0.078) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 占可溶出汞比为 0.018%。图 4 显示, β -HgS 的可溶出汞甲基化百分比随酸浓度增加而降低 (0.497%~0.018%)。

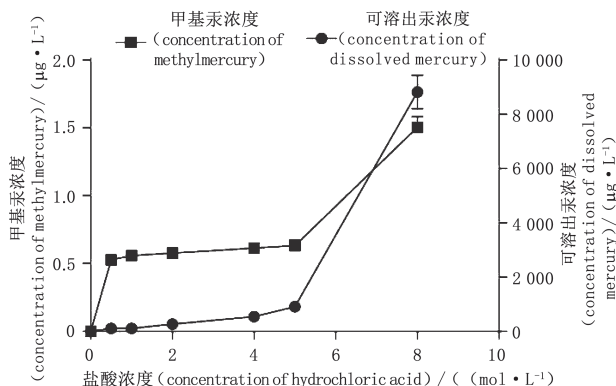


图3 不同浓度盐酸中转化甲基汞和可溶出汞浓度 (平均值 \pm SD, $n=6$)

2.6 外源性物质对 β -HgS 甲基化的影响

通过在 β -HgS 中加入单质硫、植物源性组分 (纤维素、淀粉、葡萄糖和蛋白质) 及植物混合组分, 来研究外源性物质对 β -HgS 甲基化的影响。所有未加入 β -HgS 的外源性物质空白溶液均未检出甲基汞。结果显示, β -HgS 对照组的可溶出汞质量浓度为 (936.208 \pm 53.642) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 甲基汞质量浓度为 (0.643 \pm 0.037) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (占可溶出汞比为 0.069%); 加

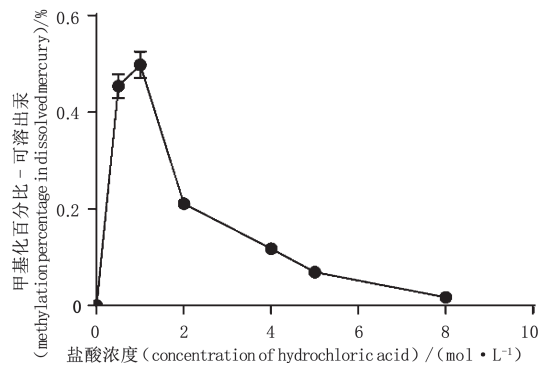


图4 β -HgS 在不同浓度盐酸中的甲基化百分比 (平均值 \pm SD, $n=6$)

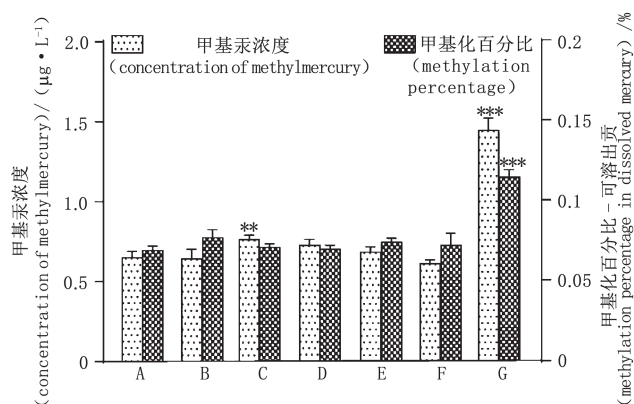
Fig. 4 The methylation percentage of β -HgS in different concentrations of hydrochloric acid (mean \pm SD, $n=6$)

入单质硫后测得甲基汞浓度与对照组相比无显著性差异, 但单质硫会抑制 β -HgS 的溶解 (甲基汞占可溶出汞比为 0.077%)。纤维素显著促进了 β -HgS 的溶解 [可溶出汞 (1 072.613 \pm 25.045) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$], 且甲基汞浓度增加至 (0.755 \pm 0.033) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (占可溶出汞比为 0.070%), 说明纤维素能够促进甲基化的发生。淀粉能促进 β -HgS 的溶解 ($P < 0.05$), 葡萄糖对 β -HgS 溶解无明显影响; 葡萄糖组和淀粉组的甲基汞浓度略有增加, 但无显著性差异。蛋白质对可溶出汞浓度和甲基汞浓度均无明显影响。

在 5 mol \cdot L⁻¹ 盐酸溶液做前处理溶剂时, 与 β -HgS 对照组相比, 植物混合组分促进了 β -HgS 的溶解 [(1 259.157 \pm 52.641) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.001$], 同时汞甲基化程度也显著增高, 测得甲基汞浓度为对照组的 2 倍 [(1.439 \pm 0.072) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$], 甲基汞占可溶出汞比值为 0.114%。7 组样品 (如图 5 所示) 的可溶出汞甲基化百分比为 0.069%~0.114%, 除植物混合组分外, 其他几组的甲基化百分比与 β -HgS 组相比均无显著性差异, 组间比较也无显著性差异。

3 讨论

Bloom 等^[21]采用氢氧化钾-甲醇溶液做前处理溶剂时, 发现沉积物样品中无机汞的总汞甲基化百分比为 0.046%, 本实验中的总汞甲基化百分比为 0.77×10^{-4} %, 因为沉积物基质复杂, 存在多种甲基供体, 所以甲基化程度较 β -HgS 更高。25% 氢氧化钾-甲醇组甲基化率远高于 5 mol \cdot L⁻¹ 盐酸组的原因可能是具有反应性的有机溶剂 (甲醇) 提供了甲基供体,



A. β -HgS 对照 (β -HgS control) B. β -HgS+ 单质硫 (β -HgS+sulfur) C. β -HgS+ 纤维素 (β -HgS+cellulose) D. β -HgS+ 淀粉 (β -HgS+starch) E. β -HgS+ 葡萄糖 (β -HgS+glucose) F. β -HgS+ 蛋白质 (β -HgS+protein) G. β -HgS+ 植物混合组分 (β -HgS+plant mixture)

与 β -HgS 相比 (compared with β -HgS), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

图 5 外源性物质对 β -HgS 发生甲基化的影响结果 (平均值 \pm SD, $n=6$)

Fig. 5 The effect of exogenous agents on the methylation of β -HgS (mean \pm SD, $n=6$)

促进了甲基化的发生。酸浓度在 $0.5\sim 5.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围时,与甲基汞浓度呈线性相关,但在 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,甲基化程度有所下降,造成这种结果的原因一方面可能是甲基汞发生了脱甲基化,另一方面可能是甲基化潜能耗尽,无机汞达到了甲基化的最大阈值。Horvat 等^[22]发现,当盐酸浓度大于 $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,甲基汞会发生分解。Tseng 等^[23]也发现,使用浓硝酸 ($>8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行前处理时,会因为甲基汞分解导致参考物质的回收率偏低。

对于可溶出汞和甲基汞之间的关系,本文研究发现,甲基化产生的甲基汞浓度与 β -HgS 在前处理过程中溶出的无机汞浓度之间呈正相关性,可促进 β -HgS 溶出的因素有 Hg^{2+} 络合配体,如有机质、多硫化物和含巯基化合物等会将 β -HgS 中的 S^{2-} 转化为可溶性或挥发性 S 物质,从而释放 Hg^{2+} ; 亲硫金属 (如 Cu^+ , Fe^{2+}) 会取代 HgS 中的 Hg^{2+} , 促进汞的溶出^[3]。当样品或前处理体系中存在上述因素时, β -HgS 溶出增加,但并不是全部的可溶出汞都参与了甲基化。Hammerschmidt 等^[12]发现,随着无机汞浓度增加,甲基化率会降低;本实验中, $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸组的可溶出汞浓度是 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸组的 9 倍,但测得的转化甲基汞浓度仅为 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸组的 2 倍,甲基化百分比相较其他组也更低,可能原因是无

机汞或未知烷基化剂的甲基化潜能耗尽或达到阈值。另外,脱甲基化反应在降低甲基汞浓度方面也可能起着重要作用^[24]。

外源性物质中,与各种无机物 (氯化物,硫酸盐或硫化物) 或有机配体 (水杨酸,乙酸,EDTA 或半胱氨酸) 相比,有机质对 HgS 的增溶作用通常更为显著^[25]。当以 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液为前处理溶剂时,加入纤维素和植物混合组分后, β -HgS 可以与其中的有机配体紧密结合,这种有机络合可以促进无机汞的溶出,同时对进一步甲基化反应提供甲基供体。含佐太的藏成药中含有大量植物药材,在这种前处理下发生甲基化反应会加重甲基汞测定结果的误差,甚至出现假阳性结果。

4 结论

本研究发现,《食品安全国家标准》食品中总汞和有机汞的测定中提供的酸性溶剂法和文献采用的碱性溶剂法 (25% 氢氧化钾-甲醇) 具有使含 β -HgS 样品发生甲基化的潜在风险;《食品安全国家标准》食品中污染物限量 (GB2762-2017) 中规定^[26],水产动物及其制品 (肉食性鱼类及其制品除外) 的甲基汞限度值为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以 Hg 计),肉食性鱼类及其制品的甲基汞限度值为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以 Hg 计),当采用 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸和 25% 氢氧化钾-甲醇溶液对含 β -HgS 的矿物药类制剂进行前处理时,不仅会促进汞的溶出,还会使部分溶出汞转化为甲基汞,测得的甲基汞含量误差较大,会在一定程度上影响结果判定。另外,随着盐酸浓度增加, β -HgS 转化的甲基汞浓度也随之增加;对比振荡法和超声法,加热法会促进 β -HgS 甲基化的发生;某些外源性添加物质如纤维素等可以促进高含量 β -HgS 样品中汞转化为甲基汞。因此,在检测甲基汞时,应考虑上述因素及不同样品中无机汞背景值对测定结果准确性的影响。

参考文献

- [1] LI C, XU W, CHU S, *et al.* The chemical speciation, spatial distribution and toxicity of mercury from Tibetan medicine Zuoaita- β -HgS and HgCl_2 in mouse kidney [J]. J Trace Elem Med Biol, 2018, 45: 104
- [2] 陈朝军, 武世奎, 李刚, 等. 民族医药中汞的形态分析研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 165
CHEN CJ, WU SK, LI G, *et al.* Research progress of mercury speciation analysis in minority medicine [J]. Chin J Pharm Anal,

- 2013, 33(1): 165
- [3] CHEN Y, YIN Y, SHI J, *et al.* Analytical methods, formation, and dissolution of cinnabar and its impact on environmental cycle of mercury [J]. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2018, 47(24): 2415
- [4] ZHANG BB, LI WK, HOU WY, *et al.* Zuotai and HgS differ from HgCl₂ and methyl mercury in Hg accumulation and toxicity in weanling and aged rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 331(15): 76
- [5] SYVERSEN T, KAUR P. The toxicology of mercury and its compounds [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2012, 26(4): 215
- [6] HINTELMANN H, FALTER R, ILGEN G, *et al.* Determination of artifactual formation of monomethylmercury (CH₃Hg⁺) in environmental samples using stable Hg²⁺ isotopes with ICP-MS detection: calculation of contents applying species specific isotope addition [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 1997, 358(3): 363
- [7] CARRASCOL, VASSILEVA E. Determination of methylmercury in marine sediment samples: Method validation and occurrence data [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 853: 167
- [8] YUN Z, HE B, WANG Z, *et al.* Evaluation of different extraction procedures for determination of organic mercury species in petroleum by high performance liquid chromatography coupled with cold vapor atomic fluorescence spectrometry [J]. *Talanta*, 2013, 106: 60
- [9] PIETILA H, PERAMAKI P, PIISPANEN J, *et al.* Determination of low methylmercury concentrations in peat soil samples by isotope dilution GC-ICP-MS using distillation and solvent extraction methods [J]. *Chemosphere*, 2015, 124: 47
- [10] JAGTAP R, MAHER W. Measurement of mercury species in sediments and soils by HPLC-ICPMS [J]. *Microchem J*, 2015, 121: 65
- [11] HJ 977-2018 水质烷基汞的测定吹扫捕集 / 气相色谱 - 冷原子荧光光谱法 [S]. 2018
HJ 977-2018 Water Quality-determination of Alkyl Mercury-purge and Trap/Gas Chromatography Cold Atomic Fluorescence Spectrometry [S]. 2018
- [12] HAMMERSCHMIDT CR, FITZGERALD WF. Formation of artifact methylmercury during extraction from a sediment reference material [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(24): 5930
- [13] LIU M, HE Y, BAUMANN Z, *et al.* Traditional tibetan medicine induced high methylmercury exposure level and environmental mercury burden in Tibet, China [J]. *Environ Sci Technol*, 2018, 52(15): 8838
- [14] RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS RC, MONPERRUS M, KRUPP E, *et al.* Using speciated isotope dilution with GC-inductively coupled plasma MS to determine and unravel the artificial formation of monomethylmercury in certified reference sediments [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(13): 3202
- [15] DELGADO A, PRIETO A, ZULOAGA O, *et al.* Production of artifact methylmercury during the analysis of certified reference sediments; use of ionic exchange in the sample treatment step to minimise the problem [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 582(1): 109
- [16] GB 5009. 17-2014 食品安全国家标准 食品中总汞及有机汞的测定 [S]. 2015
GB 5009. 17-2014 National Food Safety Standard, Determination of Total Mercury And Organic Mercury in Foods [S]. 2015
- [17] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部 [S]. 2015: 330
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 330
- [18] 李岑, 占堆, 楞本才让, 等. 藏药佐太的化学成分_汞配位结构及微观形貌分析 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2015, 35(4): 210
LI C, ZHAN D, LENG-BEN-CAI-RANG, *et al.* Analysis of the chemical composition, mercury coordination structure and micro-morphology of Tibetan medicine Zuotai [J]. *Spectrosc Spect Anal*, 2015, 35(4): 210
- [19] 杨红霞, 于明杰, 斗周才让, 等. 当佐与安置精华散对人体肝肾功能的影响 [J]. *华西药理学杂志*, 2016, 31(5): 548
YANG HX, YU MJ, DOU-ZHOU-CAI-RANG. *et al.* Effects of Dangzuo and Anzhi Jinghua powder on the function of liver and kidney [J]. *West China Pharm Sci*, 2016, 31(5): 548
- [20] NAP. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids [M]. Washington, DC: The National Academies, 2005: 107
- [21] BLOOM NS, COLMAN JA, BARBER L. Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 1997, 358(3): 371
- [22] HORVAT M, BLOOM NS, LIANG L. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples: Part 1. sediments [J]. *Anal Chim Acta*, 1993, 281(1): 135
- [23] TSENG CM, DIEGO AD, WASSERMAN JC, *et al.* Potential interferences generated during mercury species determination using acid leaching, aqueous ethylation, cryogenic gas chromatography and atomic spectrometry detection techniques [J]. *Chemosphere*, 1999, 39(7): 1119
- [24] QIN C, CHEN M, YAN H, *et al.* Compound specific stable isotope determination of methylmercury in contaminated soil [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 644: 406
- [25] MIRANDA-ANDRADES JR, KHAN S, PEDROZO-PENAFIEL MJ, *et al.* Combination of ultrasonic extraction in a surfactant-rich medium and distillation for mercury speciation in offshore petroleum produced waters by gas chromatography cold vapor atomic fluorescence spectrometry [J]. *Spectrochim Acta B*, 2019, 105641. doi: 10. 16/j. sab. 2019. 105641
- [26] GB 2762-2017 食品中污染物限量食品安全国家标准 [S]. 2017
GB 2762-2017 Maximum Levels of Contaminants in Foods, National Food Safety Standard [S]. 2017

(本文于 2020 年 8 月 24 日收到)