

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果精簡報告

環境中有機金屬快速物種分析—

—微波魚肉中甲基汞之研究

計畫編號：NSC 88-2113-M032-004

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：許道平 淡江大學水資源暨環境工程研究所

一、中文摘要

魚肉中的汞大部分都是以甲基汞的型態存在，而甲基汞為所有汞化合物中毒性最為劇烈者，並具有生物累積性。一旦長期食用受到汞污染的魚肉，則將對於人體造成莫大的傷害。

傳統偵測魚肉中甲基汞之方法為源自於 Westoo 之氣相層析法，其過程不僅耗時，且耗費大量溶劑。本研究之目的為以微波萃取裝置 (MSE-1000) 萃取魚肉中甲基汞，經田口式直交表法 $L_9(3^4)$ 找尋一個最佳微波萃取魚肉中甲基汞的條件，並以氣相層析法—毛細管柱配合電子捕捉偵測器法分析 (CGC—ECD)，研究結果在萃取 3 g 的魚肉下：萃取劑甲苯 15 mL、溫度 120 °C、微波功率 950W (100 %)、停留時間 5 min，回收率可達 90 % 以上，且經 ANOVA 多變數分析的結果顯示發現此 4 因子對於魚肉中甲基汞的微波萃取皆有相當的影響力，儀器偵測極限為 0.01pg/ μ L，真實樣品鱸魚、鮪魚、旗魚、鯊魚之濃度分別為 0.31、0.68、0.75、0.40 μ g/g，加拿大參考魚肉樣品 DORM-2 準確度分析回收率則可 98% 上。此法不僅快速、操作簡單、溶劑耗量小以外，再加上操作簡單，價格不昂貴的氣相層析儀，將使魚肉中甲基汞之偵測達到快速便利和準確。

關鍵詞：微波萃取、甲基汞、魚肉

Abstract

Mercury compounds enter the environment through various natural and anthropogenic sources and have been a field of continuous concern over a long period of time. The methylmercury is one of the most toxic environmental pollutants that acquired notoriety for having killed 46 residents in their food in Japan. Specially fish tend to accumulate mercury by a factor of $10^5\sim 10^7$, which can lead to dangerous levels in seafood even in the area with tolerable aquatic mercury(II) concentration.

The goals of this study are to extract the methylmercury from the fish tissue using microwave energy and then to analyze the methylmercury by isothermal capillary gas chromatography (GC) with electron capture detection (ECD). The four factors of mix level orthogonal array design were used in this study to obtain the optimized extracting conditions which were (1) extraction solvent: toluene, (2) extraction time: 5 minutes, (3) temperature: 120°C, (4) microwave power: 697W.

A simple and effective procedure for the determination of methylmercury in fish tissue was developed. The GC-ECD system with CP-Sil 5CB column (30m \times 0.53mm I.D. \times 1.5 μ m) and isothermal oven (90°C) were

employed. The detection limit of this method is $0.012 \mu\text{g}$ of the certified reference material — DORM-2 in which a mean methylmercury recovery of 98.4% and RSD of 2.2% were obtained. In addition, the methylmercury contents of the marine fish were found higher than those from the freshwater. The concentrations of the methylmercury in tuna, swordfish and shark were found 0.68, 0.75, $0.40 \mu\text{g/g}$ respectively.

Keywords: microwave-assisted extraction, methylmercury, and fish

二、計畫緣由與目的

汞為全球性之污染物質，甲基汞、氯化汞及元素汞在美國環境保護署 IRIS (Integrated Risk Information System) 中均被列為致癌物質。歷年來汞中毒是建在日本的水灣及 1965 年日本新潟縣 (Nigata) 阿賀野河流域皆發生汞公害事件；伊拉克、巴基斯坦、芬蘭以及美國新墨西哥等地均也發生過類似情形，人類受有機汞及無機汞的累積毒傷勢公害污染中極重要的部分，這類似的問題同樣的在 1970 年代也造成相當的震撼，因此美國食品藥物管理局 (Food and Drugs Administration, FDA) 規定魚肉中含汞之現值為 1.0 ppm，並嚴禁超過此限值之魚類在市場上販售。

汞及其化合物會經由生物濃縮過程及食物鏈進入人體，若攝食量超過容忍限度時，就會出現中毒症狀，造成腦神經的障礙。目前衛生署、環保單位因缺乏對特定汞物種之標準檢測方法，僅訂出部分物種之總汞及甲基汞之最大限值，台灣關於汞的限值則如表 1、2 所示。日本則以水俣病

患者調查其最低發症量及以營養調查最大之魚貝類平均攝取量之關係，訂出魚貝類中總汞及甲基汞之容許量。

三、實驗材料與方法

1. 氣相層析儀器及分析操作條件

- (1) 機型：GC 為 China Chromatography 8700F (中國層析)。
- (2) Split/Splitless 系統分流口 (Vent) 流速： 30 mL/min 。
- (3) 隔墊去除氣體 (Septum purge) 流速： 5 mL/min 。
- (4) 注射氣溫度： $210 \text{ }^\circ\text{C}$ 。
- (5) 偵檢器：電子捕獲偵檢器 (ECD)。
- (6) 偵檢器溫度： $250 \text{ }^\circ\text{C}$ 。
- (7) 載流氣體流速 (He)： 12.5 mL/min 。
- (8) 輔助氣體流速 (N_2)： 66.6 mL/min 。
- (9) GC 烘箱 (Oven) 溫度： $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 。
- (10) 層析管柱：CP-Sil5 CB，dimethylpolysiloxane，靜相薄膜厚度 $1.5 \mu\text{m}$ ，長 30 公尺，內徑 0.53 mm 。

2. 藥品

- (1) 氯化甲基汞：由於無法尋得標準溶液，故購買相當純度之固體樣品。Methylmercury(II) chloride, 98%, Strem Chemicals, USA。
- (2) 氯化苯基汞：Phenylmercury chloride, 99%, AG, Riedel-de Haen, Germany。
- (3) 魚肉驗證參考物質 (Certified Reference Material)：本實驗所購置之參考物質為 DORM-2，由 Dogfish 肌肉與肝所製成，粉末狀。

3. 魚肉

本研究主要選用淡水河附近的海水鱸魚作為添加試驗，真實樣品則選用遠洋或

大型魚種—旗魚、鮭魚、鮪魚、鯊魚。去除魚骨及魚皮並以絞碎機絞碎均勻，分裝 3 g 重量，以鋁箔紙包裹 3 層後置於溫度 0 °C 以下冰櫃冷凍儲存，待日後實驗取用。

4. 微波萃取裝置

微波萃取系統：Microwave Extraction System MES-1000，(CEM-Corporation, North Carolina, U.S.A)。微波全功率為 950 ± 50W)，可設定微波功率：0 至 100%。

微波萃取程序：微波萃取魚肉中甲基汞流程：

- (1) 置入樣品於萃取瓶前，需先確定萃取瓶內外（包括外瓶和內瓶）是否乾燥，乾燥時方可使用。
- (2) 將樣品置入萃取瓶。
- (3) 在每個樣品瓶中加入 15 mL 萃取溶劑，需將樣品完全覆蓋住。
- (4) 確定各瓶蓋內以換裝入新的安全膜片後，鎖緊洩壓閥。
- (5) 旋緊萃取瓶，置入微波爐內萃取。
- (6) 萃取方式採取溫度方程式，設定升溫時間依微波條件而定，設定安全壓力為 175 psi。
- (7) 設定萃取條件：隨實驗條件設定輸出功率百分比，萃取時間和萃取溫度。
- (8) 萃取完成後，至少冷卻 20 分鐘以上，待瓶內溫度冷卻至室溫後，再將各瓶洩壓閥緩緩旋開，確定瓶內壓力降至原始的蒸汽壓後，壓閥緩緩旋開，確定瓶內壓力降至原始的蒸汽壓後才可開瓶。
- (9) 萃取液置入離心瓶內，並用甲苯淋洗二至三次。
- (10) 加入 1% 半胱氨酸溶液與鹽酸，並緩緩搖動。
- (11) 2000 rpm 下離心 10 分鐘。
- (12) 取出溶劑層，並通入 10 g 無水硫酸鈉之乾燥管。

(13) 定量至 20 mL，必要時用氮氣吹拂。

(14) 以 GC-ECD 分析之。

5. 管柱調理步驟：

預處理的方式是先升高烘箱溫度至 115°C，用 1000 ppm 的氯化汞在 5 至 10 分鐘之內用注射針連續注入十次，體積為 10 μ L。經過約 16 小時的等待後，接著注入 1 μ L 的苯或甲苯，若無雜訊出現，方可開始進行分析程序，如圖 1 所示。

6. 溶劑比較流程：

取 10 mL 的無汞水於 50 mL 的離心管內，並添加適當量的氯化甲基汞，加入 10 mL 的萃取溶劑於離心管內，並劇烈震盪 5 分鐘，經 2000 rpm 離心後取出溶劑層，最後定量至 10 mL，並置於樣品瓶內，待 GC-ECD 分析。

四、結果與討論

1. 氯化甲基汞停滯時間的建立

在管柱調理後，波峰高度變化在 20% 範圍內，我們方能接受數據，每注入樣品 10 次或者發現異樣時，立即注入 0.1 ppm 的氯化甲基汞標準品 1 μ L 加以檢查，若發現超出 20% 的波峰範圍值之外，立即檢查管線是否有衰減現象的發生，甚至進行管柱調理。整理如表 3、4。

2. 微波功率測試結果

取 1 L 的去離水分別用 25%、50%、75%、100% 的功率微波，所得最大輸出功率為 950 瓦， $r^2=0.9992$ 。

3. 管柱靜相厚度的影響

管柱厚度對於氯化甲基汞偵測的影響主要在於管柱效率與管柱偵測敏感度的持續力，圖 2 顯示 0.25 μ m 靜相膜厚以及 1.5

μm 靜相膜厚在注入第五次氯化甲基汞標準品後的情形，可以明顯的看出在膜厚較薄的情況之下，管柱效率的衰減也相對的加速。

4. 最佳微波萃取條件

在選擇萃取溶劑與管柱膜厚後，開始進行 L_9 測試，萃取因子為萃取時間、萃取溫度、溶劑體積與微波功率；甲苯體積的各水準為 5、15、25 mL，萃取後分別定量至 10、20、30 mL；萃取溫度分別為 70、100、120°C；萃取時間為 5、10、15 分；微波功率 30、70、100%。表 5 為微波萃取魚肉中甲基汞 $L_9(3^4)$ 因子配置表。趨勢圖如圖 3。由因子的趨勢圖得知魚肉中甲基汞微波萃取的最佳條件為：萃取時間 5 分鐘、萃取溫度 120°C、萃取溶劑體積 15 mL、微波功率 100%。我們進一步做回收率測試發現其回收率在 93% 以上，詳見表 6，因此此微波條件的確適合於魚肉中甲基汞之萃取。

由趨勢圖知，基本上萃取溫度越高應較有利於甲基汞之萃取，其實不然；實因倘若萃取溫度達到一定上限值時，魚體將破壞成乳狀，在甲基汞之萃取液的澄清度上，反倒有混濁之虞，徒增在淨化所耗費之時間，因此並不利於此條件的更適化；另外一方面本研究所使用之微波 Ramp 的時間皆為兩分半鐘，這也可能是此微波最佳條件會落於 5 分鐘這個微波時間上之故。

5. 儀器偵測極限

以 S/N 比為 3，取其偵測極限，由圖 4 可知氯化甲基汞的偵測極限為 $10\text{ pg}/\mu\text{L}$ 。

6. 方法偵測極限

以儀器偵測極限之 1 至 5 倍，添加入 3g 的鱸魚基質內，經微波萃取後，分析七個不同萃取瓶，所得的標準偏差乘以 3.14 即為方法偵測極限。本研究的方法偵測極限為 $14.3\text{ pg}/\mu\text{L}$ 。

8. 真實樣品的檢測

本研究取鱸魚、鮪魚、鯊魚以及旗魚來作為真實樣品之檢測，取 0.5g 之三重複分析平均值分別為 0.38、0.52、0.40、0.63 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，圖 5 則顯示真實樣品—鱸魚的氣相層析圖譜。

五、參考文獻

1. Westoo G. "Determination of Methylmercury Mercury Compounds in Foodstuff, II, Methylmercury Compounds in Fish, Identification and Determination", Acta. Chem. Scan. 20 (1966), 2131~2137.
2. Lindlberg, S. E. "Introduction: The fourth international conference on mercury as a global pollutant", Atmospheric Environment, 32 (1998), 807~808.
3. Holsbeek L., Das H. K., Joiris C. R. "Mercury speciation and accumulation in Bangladesh freshwater and anadromous fish", The science of the total environment, 198 (1997), 201~210.
4. 阮國棟，"汞之污染特性與處理技術"，工業污染防制，第 15 期，第 161~183 頁，民國 74 年。
5. 潘子明、吳振順，"魚貝類中甲基汞含量檢測方法之研究"，中國環境工程期刊，第二期，第 123~129 頁，民國 82 年。
6. Vazquez M. J., Carro A. M., Lorenzo R. A. and Cela R. "Optimization of Methylmercury Microwave-Assisted Extraction from Aquatic Sediments.", Anal. Chem. 69 (1997), 221~225.

表 1 食品中汞容許量的標準與法令

種類	物種	最大容許量	法令
魚蝦類	甲基汞 (非迴游性魚類)	0.5 ppm	衛署食字第 8143635 號公告修正
	甲基汞 (迴游性魚類)	2.0 ppm	81.8.26
食用油脂類	汞	0.05 ppm 以下	衛署食字第 8189322 號公告修正 82.1.4
食米類	汞	0.05 ppm 以下	衛署食字第 690279 號公告修正 76.9.16

表 2 水體中汞容許量的標準與法令

種類	物種	最大容許量	法令
放流水	總汞	0.005 ppm 以下	環署水字 78804 號令修正 86.12.24
	有機汞	不得檢出	
飲用水	汞	0.002 mg/L 以下	環署毒字第 0004428 號令修正 87.2.4

表 3 各個管柱調理後氯化甲基汞之滯留時間

管柱調理次數	滯留時間 (min)	波峰高度 (mv)
第一次	3.39± 0.04	113.75± 7.13
第五次	3.46± 0.03	109.06± 4.23
第十次	3.52± 0.03	99.06± 3.59

注：波峰高度為 100 pg 氯化甲基汞之強度。

表 4 各個管柱調理後之氯化甲基汞之檢量線

管柱調理次數	檢量線方程式	R-Sqr
第一次	C=0.843X-10.13	0.996
第五次	C=0.914X-0.8221	0.998
第十次	C=0.835X+13.85	0.999

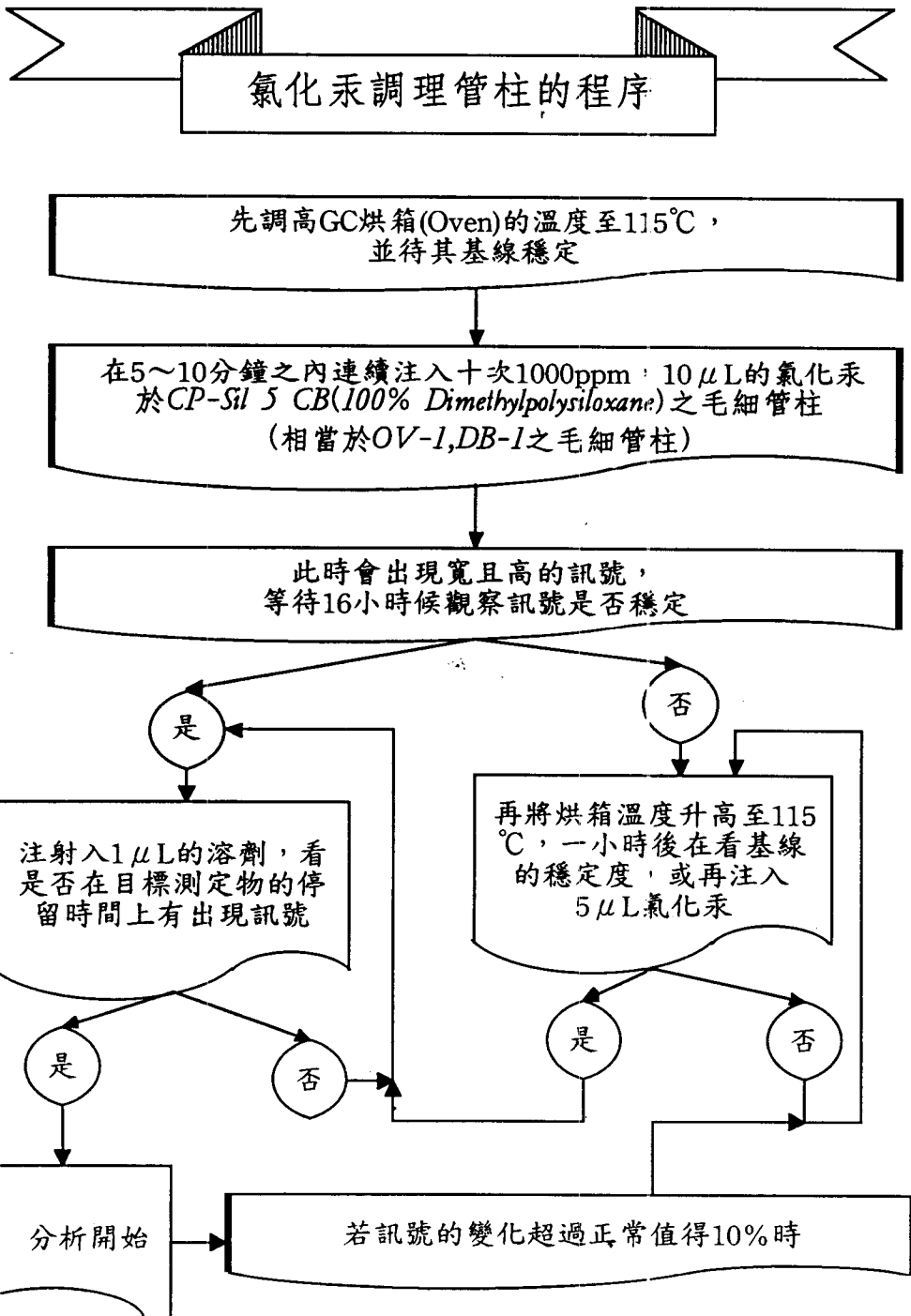
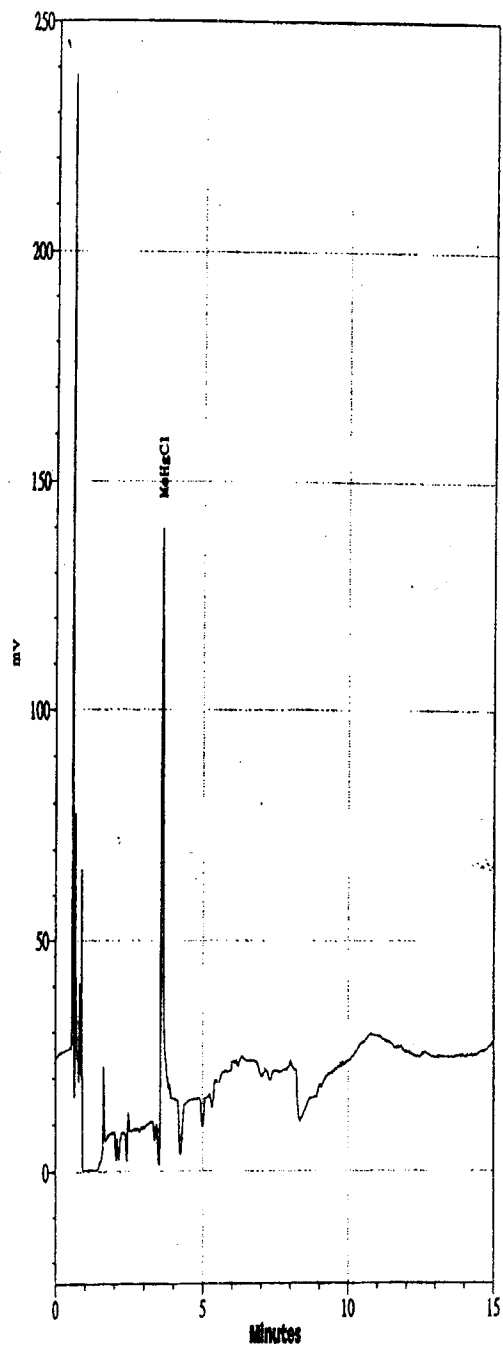
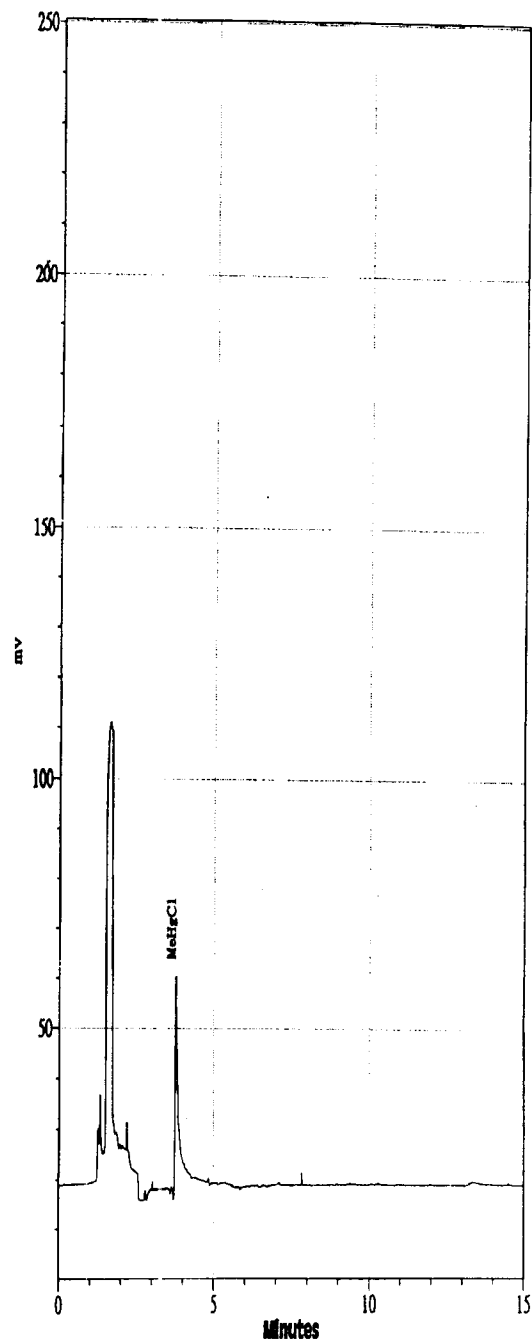


圖 1 氯化汞管柱調理程序圖



(a)



(b)

圖 2 管柱靜相厚度的影響

層析條件：注射器溫度 -210°C ，烘箱溫度 -90°C ，偵檢器 (ECD) 溫度 -250°C 。

載流氣體—氮氣 3.0 mL/min ，輔助氣體—氮氣 30 mL/min 。

層析管柱：(a) DB-1, dimethylpolysiloxane, $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 1.5\ \mu\text{m}$ 。

(b) DB-1, dimethylpolysiloxane, $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\ \mu\text{m}$ 。

注射樣品： $100\text{ pg}/\mu\text{L}$ 氯化甲基汞 $1\ \mu\text{L}$ 。

表 5 微波萃取魚肉中甲基汞 $L_9(3^4)$ 因子配置表

因子 水準	萃取溫度 (°C)	萃取時間 (min)	微波功率 (%)	甲苯體積 (mL)	魚肉中甲基汞濃度 (ng/g)
1	70 (I)	15 (I)	100 (I)	5 (I)	41.6
2	70 (I)	5 (II)	70 (II)	25 (II)	68.9
3	70 (I)	10 (III)	30 (III)	15 (III)	0
4	100 (II)	15 (I)	70 (II)	5 (I)	17.2
5	100 (II)	5 (II)	30 (III)	15 (III)	199.6
6	100 (II)	10 (III)	100 (I)	25 (II)	38.9
7	120 (III)	15 (I)	30 (III)	25 (II)	256.6
8	120 (III)	5 (II)	100 (I)	15 (III)	496.1
9	120 (III)	10 (III)	70 (II)	5 (I)	350.9
I 總和	110.5	315.4	576.6	409.7	
II 總和	255.7	764.6	437.0	364.4	
III 總和	1103.6	389.8	456.2	695.7	
水準差異	847.9	449.2	120.4	331.3	
水準和	1469.8	1469.8	1469.8	1469.8	

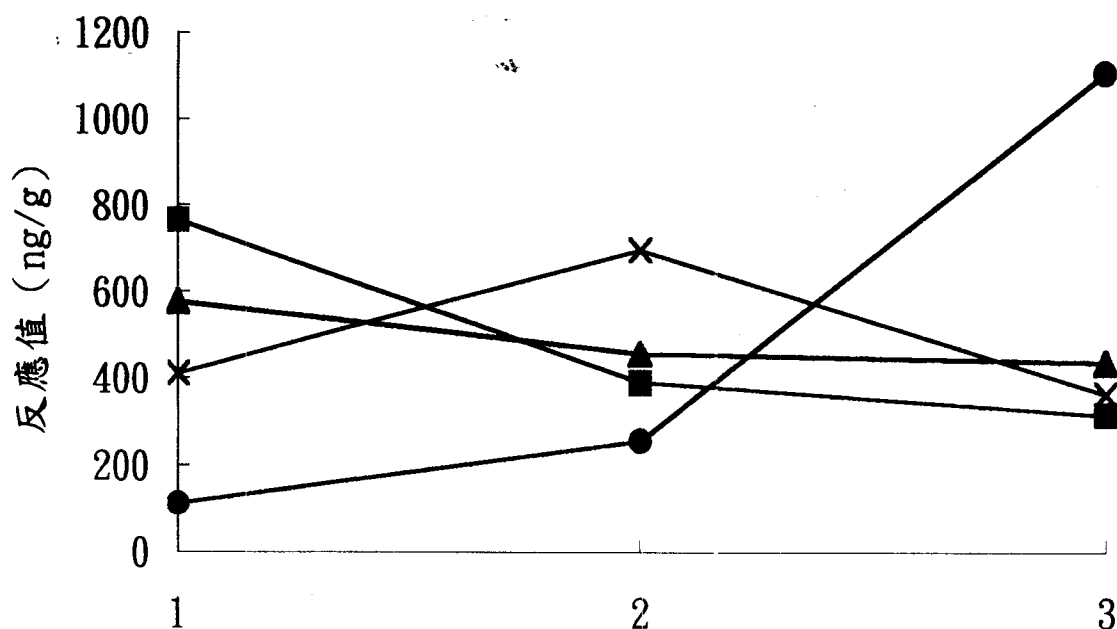


圖 3 微波萃取魚肉中甲基汞各因子總趨勢圖

以上各因子以及相關水準數值分別為：

○：萃取溫度 (°C) —1：70、2：100、3：120。

□：萃取時間 (min) —1：5、2：10、3：15。

△：微波功率 (W) —1：30、2：70、3：100。

×：甲苯體積 (mL) —1：5、2：15、3：25。

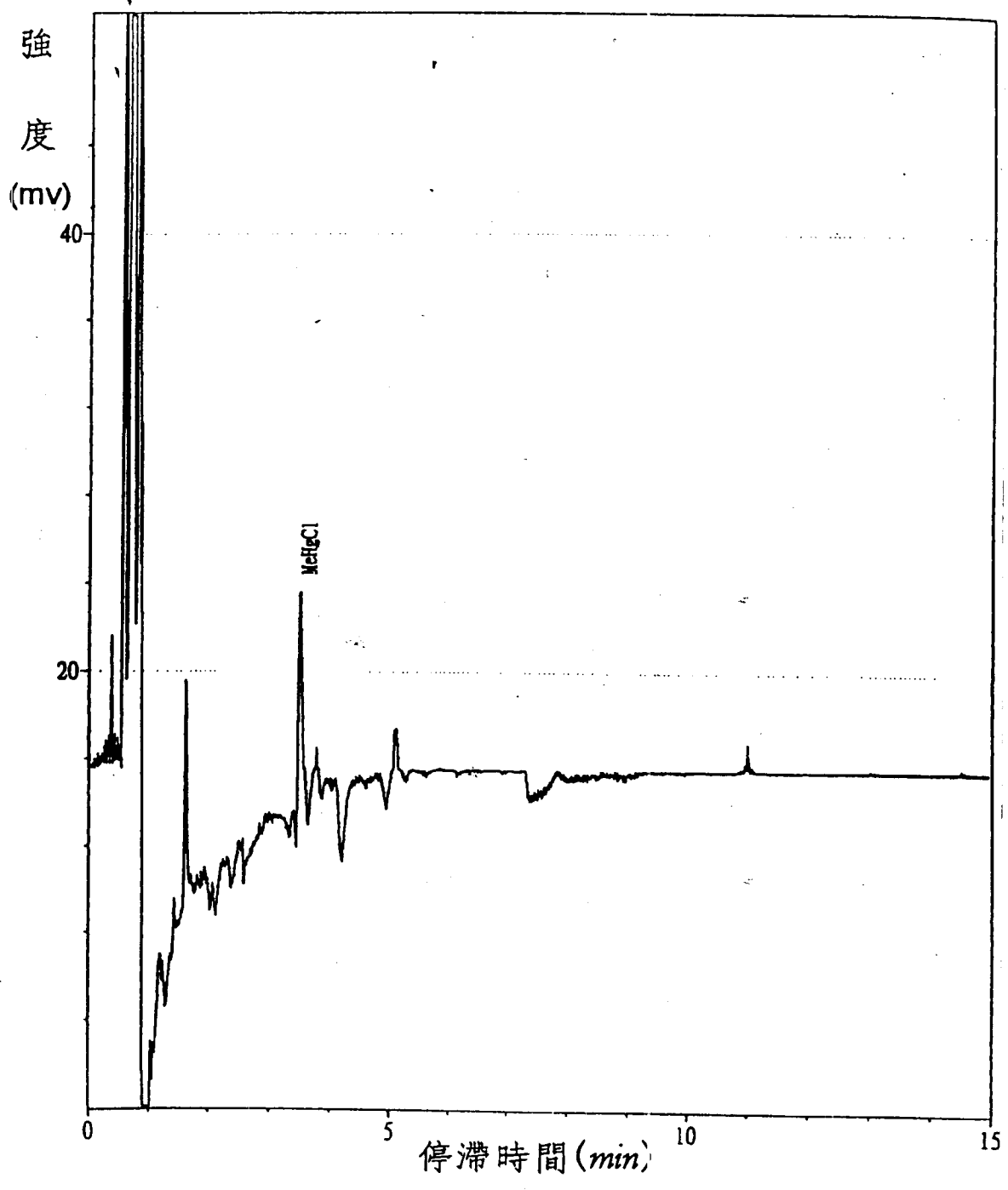


圖 4 儀器偵測極限

層析條件：注射器溫度—210°C，烘箱溫度—90°C，偵檢器 (ECD) 溫度—250°C。

載流氣體—氮氣 12.5 mL/min，輔助氣體—氮氣 66.6 mL/min。

層析管柱：CP-Sil 5CB，dimethylpolysiloxane，30 m x 0.53 mm x 1.5 μm。

注射樣品：10 pg/μL 氯化甲基汞 1 μL。

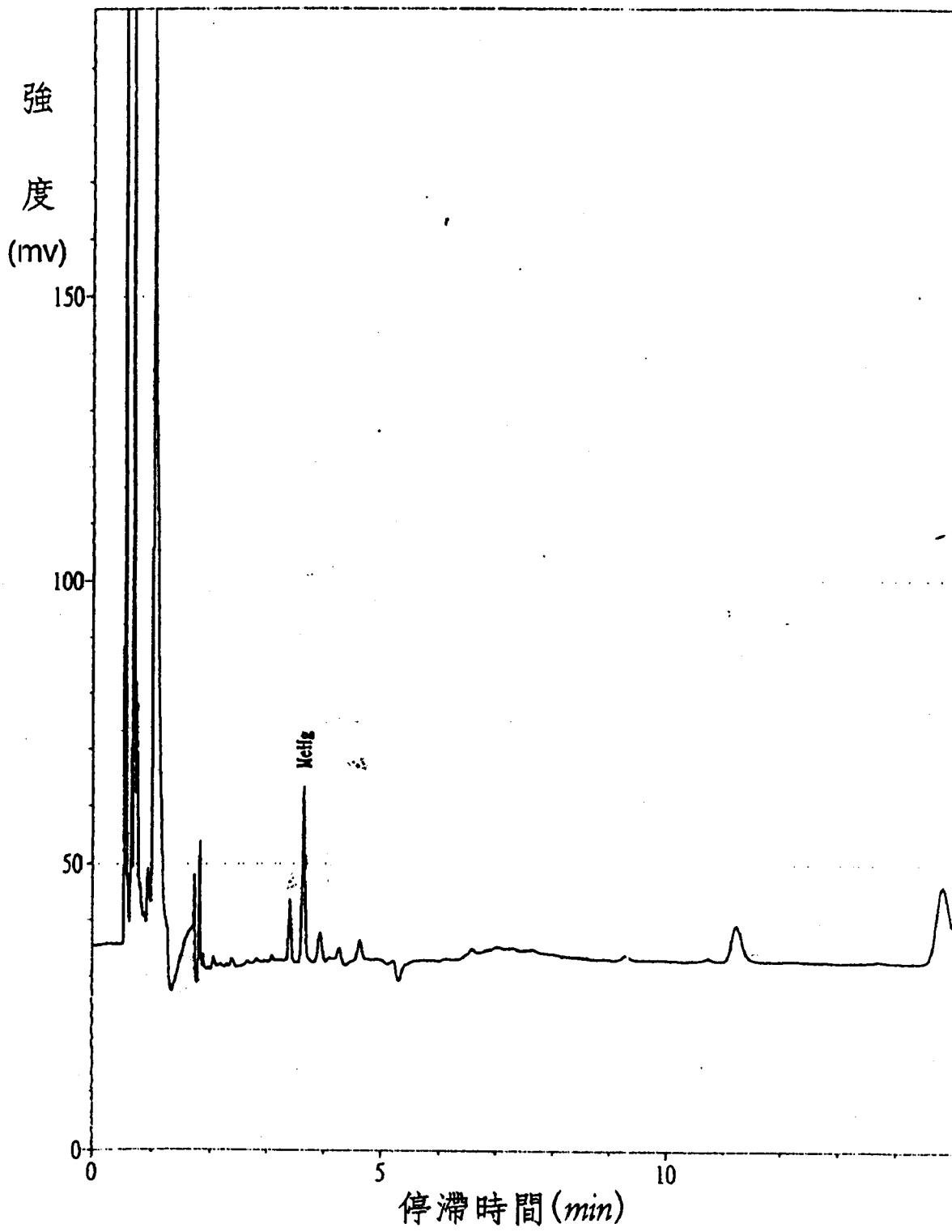


圖 5 真實樣品—鱸魚氣相層析圖
分析條件如圖 4，所得濃度為 $0.34 \mu\text{g/g}$ 。