

# Benefícios da combinação de HPLC-ICP-MS para a especificação do mercúrio em alimentos

## Nota de aplicação

Teste de alimentos

### Autores

Sébastien Sannac, Yu-Hong Chen,  
Raimund Wahlen, Ed McCurdy

Agilent Technologies  
Manchester, Reino Unido



### Introdução

O mercúrio é um dos elementos mais tóxicos para os organismos vivos. Ele é encontrado em concentrações relativamente baixas no meio ambiente, mas com sua amplificação na cadeia alimentar, a concentração final em alguns alimentos pode ser relativamente alta. Além disso, sua toxicidade não está vinculada apenas à sua concentração total, mas também depende da espécie do mercúrio. A especificação do mercúrio em análises de alimentos é necessária para estimar por completo o potencial tóxico desse elemento em relação aos humanos.

Devido aos baixos limites de detecção exigidos para a análise das espécies de Hg, o GC-ICP-MS tem sido o método preferido. No entanto, com as melhorias da sensibilidade nos sistemas ICP-MS modernos, o uso do HPLC se tornou prático para a separação. Combinar o HPLC e o ICP-MS é uma opção particularmente atraente devido à conexão simples e rápida entre as técnicas. Além disso, em contraste com a análise de GC, os extratos de amostras são diretamente injetados no sistema e nenhuma derivatização de espécie é necessária, o que simplifica consideravelmente a preparação de amostras e reduz o custo do procedimento analítico total.



**Agilent Technologies**

Neste estudo, o uso da combinação de HPLC-ICP-MS foi avaliado para a análise de especiação do mercúrio em amostras de alimentos. Do ponto de vista toxicológico, os compostos do mercúrio inorgânico ( $Hg^{2+}$ ) e do metilmercúrio ( $MeHg^+$ ) são as principais preocupações, mas o método também foi estendido a outras espécies que podem ser encontradas localmente, como o etilmercúrio ( $EtHg^+$ ) e o fenilmercúrio ( $PhHg^+$ ). A separação foi realizada com o uso de um gradiente de solvente orgânico para acelerar a separação das espécies. O exclusivo gerador de RF em fase sólida com rápido ajuste de frequência usado no sistema Agilent ICP-MS 7700x permite alternar facilmente entre os solventes aquosos e orgânicos sem afetar a estabilidade do plasma. O método foi validado usando materiais de referência certificados (CRMs). O resultado é uma solução completa totalmente validada e integrada para a análise de espécies de mercúrio em gêneros alimentícios usando um sistema HPLC-ICP-MS hifenado da Agilent Technologies.

## Experimento

### Instrumentação

A separação cromatográfica foi atingida usando um HPLC Agilent 1260. O HPLC 1260 é capaz de operar a pressões de até 600 bar, possibilitando uma cromatografia líquida de resolução rápida através do uso de colunas com diâmetros de partícula muito pequenas. A coluna usada neste trabalho foi a Zorbax C-18, 4,6 mm x 50 mm, com partículas a 1,8  $\mu m$  (Agilent). Os detalhes cromatográficos podem ser encontrados na Tabela 1. A separação é uma otimização de trabalhos anteriores publicados por Hight *et al.* [1].

**Tabela 1.** Configurações gerais de operação do sistema Agilent HPLC 1260

Parâmetros	Valores
Taxa de fluxo	1 ml/min
Volume de injeção	50 $\mu l$
Fase móvel:	
Canal A	0,5 g/l de L-cisteína
Canal B	0,5 g/l de L-cisteína, HCl, $H_2O$ , pH = 2,3 com HCl Metanol

O mercúrio foi medido no isótopo preferencial de  $^{201}Hg$  com o uso de um ICP-MS Agilent 7700x. Foi adicionado oxigênio (uma mistura de 20% de  $O_2$  em argônio) ao gás de arraste usando o 5° controlador do fluxo de massa do 7700x. A adição do oxigênio ao plasma garante que os solventes orgânicos possam ser diretamente

introduzidos ao ICP-MS sem o risco de que o carbono se deponha nos cones de interface. Foram utilizados cones de platina, que resistem à oxidação do oxigênio adicionado, e uma tocha de injetor com diâmetro interno de 1 mm (id), ambos típicos da análise orgânica. Os parâmetros operacionais do sistema ICP-MS 7700x estão detalhados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Configurações gerais de operação do Agilent ICP-MS 7700x

Parâmetros	Valores
Potência de RF	1.600 W
Taxa de fluxo do gás de arraste	0,54 l/min
Taxa de fluxo do gás auxiliar	0,10 l/min
Gás opcional (20% de $O_2$ em Ar)	0,06 l/min
Temperatura da câmara de nebulização	-5 °C
Profundidade da amostra	8,0 mm

O software da estação de trabalho MassHunter do ICP-MS série 7700 permite o controle direto de módulos comuns de LC e GC Agilent, possibilitando que o método HPLC 1260 e a sequência sejam diretamente configurados no software de ICP-MS MassHunter (Figura 1). Além da facilidade de uso da combinação do HPLC-ICP-MS, esse recurso aumenta a segurança da análise, visto que a comunicação bidirecional assegura que se o HPLC ou o ICP-MS parar, o software interromperá automaticamente o outro sistema.

### Preparação de amostras

Dois CRMs foram usados na validação do método. O BCR-464 do IRMM (Bélgica) é feito de músculo de atum e é certificado a  $5,12 \pm 0,16$  mg(Hg)/kg para o conteúdo de metilmercúrio, o que representa 97% do seu conteúdo total de mercúrio. O Dolt-4 do NRC (Canadá) é feito do fígado de cação e contém um conteúdo de  $MeHg^+$  de  $1,33 \pm 0,12$  mg(Hg)/kg (52% de seu conteúdo de mercúrio total).

O procedimento de extração foi baseado em um estudo anterior [2]. Resumidamente, foram extraídos 150 mg de material em 20 ml da fase móvel A. A extração foi auxiliada por micro-ondas: 11 min a 140 W. O material suspenso foi injetado diretamente no HPLC após a filtração a 0,45  $\mu m$ .

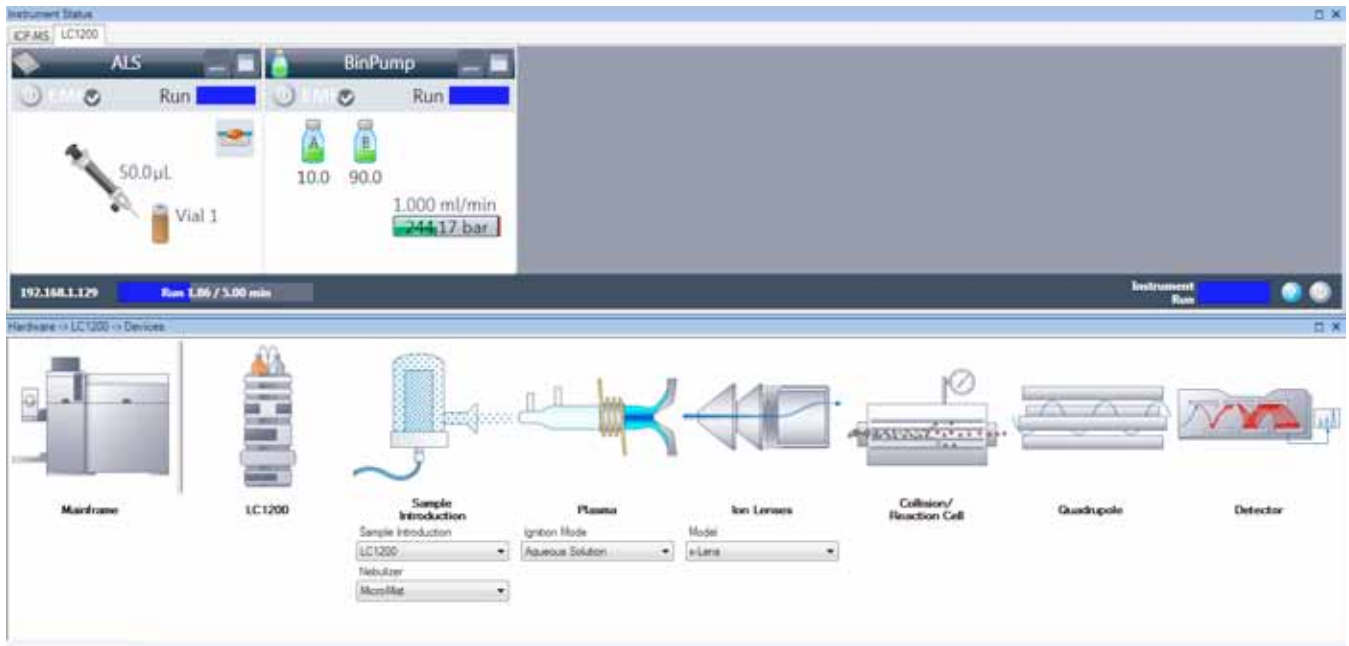


Figura 1. Captura de tela do software MassHunter do ICP-MS com detalhes da configuração do HPLC-ICP-MS

## Resultados e discussão

### Otimização cromatográfica

O método inicial para separar as espécies de mercúrio usaram condições isocráticas com metanol de 2% (canal B) sendo adicionado ao tampão de L-cisteína (canal A). O cromatograma resultante é exibido na Figura 2.

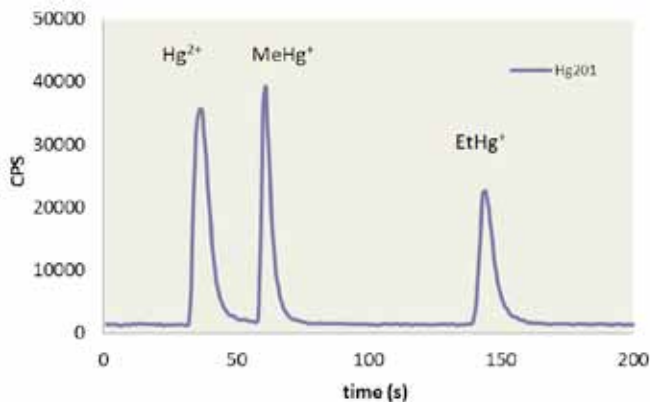


Figura 2. Separação de espécies de mercúrio sob condições isocráticas

Conforme pode ser visto, sob condições isocráticas, a separação de três espécies de mercúrio foi obtida em menos de 3 minutos, e em menos de 2 minutos para o  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{MeHg}^+$ . No entanto, o fenilmercúrio está vinculado à coluna e não pode ser detectado. Consequentemente,

para aumentar o potencial de eluição da fase móvel, foi proposta uma eluição de gradiente. A Figura 3 mostra o gradiente usado durante a separação: começando com metanol de 2% e aumentando para 90% em 1 minuto.

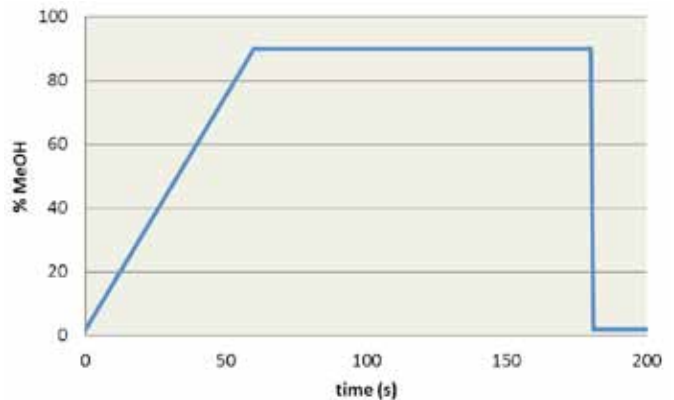


Figura 3. As condições do gradiente usado durante a separação

Com essa eluição de gradiente, todas as 4 espécies de mercúrio foram separadas com êxito em menos de 3 minutos (Figura 4). Além disso, o uso do gradiente de metanol não perturba a estabilidade do plasma devido à capacidade de rápido ajuste de frequência do gerador de RF de plasma do ICP-MS 7700. Ao final da separação, quando a fase móvel retornou rapidamente a metanol de 2%, não foi encontrado nenhum problema com a estabilidade do plasma.

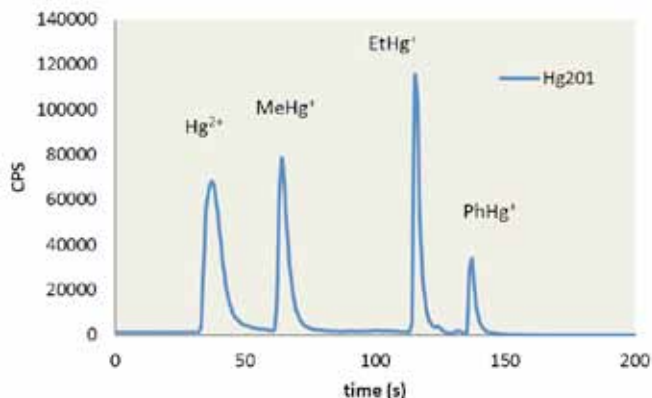


Figura 4. Separação de espécies de mercúrio sob condições de gradiente

### Desempenho do sistema HPLC-ICP-MS

Antes da análise dos extratos de amostras, o sistema foi calibrado com uma mistura de quatro espécies de mercúrio de aproximadamente 100 ng/l (ppt) até 10 µg/l (ppb). As curvas de calibração podem ser vistas na Figura 5.

As curvas de calibração destacam a linearidade da análise: cada espécie é perfeitamente calibrada em suas faixas de concentrações. Além disso, a concentração equivalente ao ruído (background equivalent concentration - BEC) da fase móvel é exibida na Figura 5. Para todas as espécies, o valor de BEC foi inferior a 20 ng/l. Esses baixos valores de BEC destacam a pequena contaminação da fase móvel e enfatizam a capacidade de detecção de mercúrio do sistema em baixas concentrações.

### Análise de amostras

Os dois extratos de CRM foram analisados com o uso do método de eluição de gradiente otimizado. Três amostras replicadas foram extraídas para cada CRM. As extrações em branco também foram preparadas e as análises não mostraram nenhuma contaminação mensurável. A Tabela 3 exhibe os resultados das amostras.

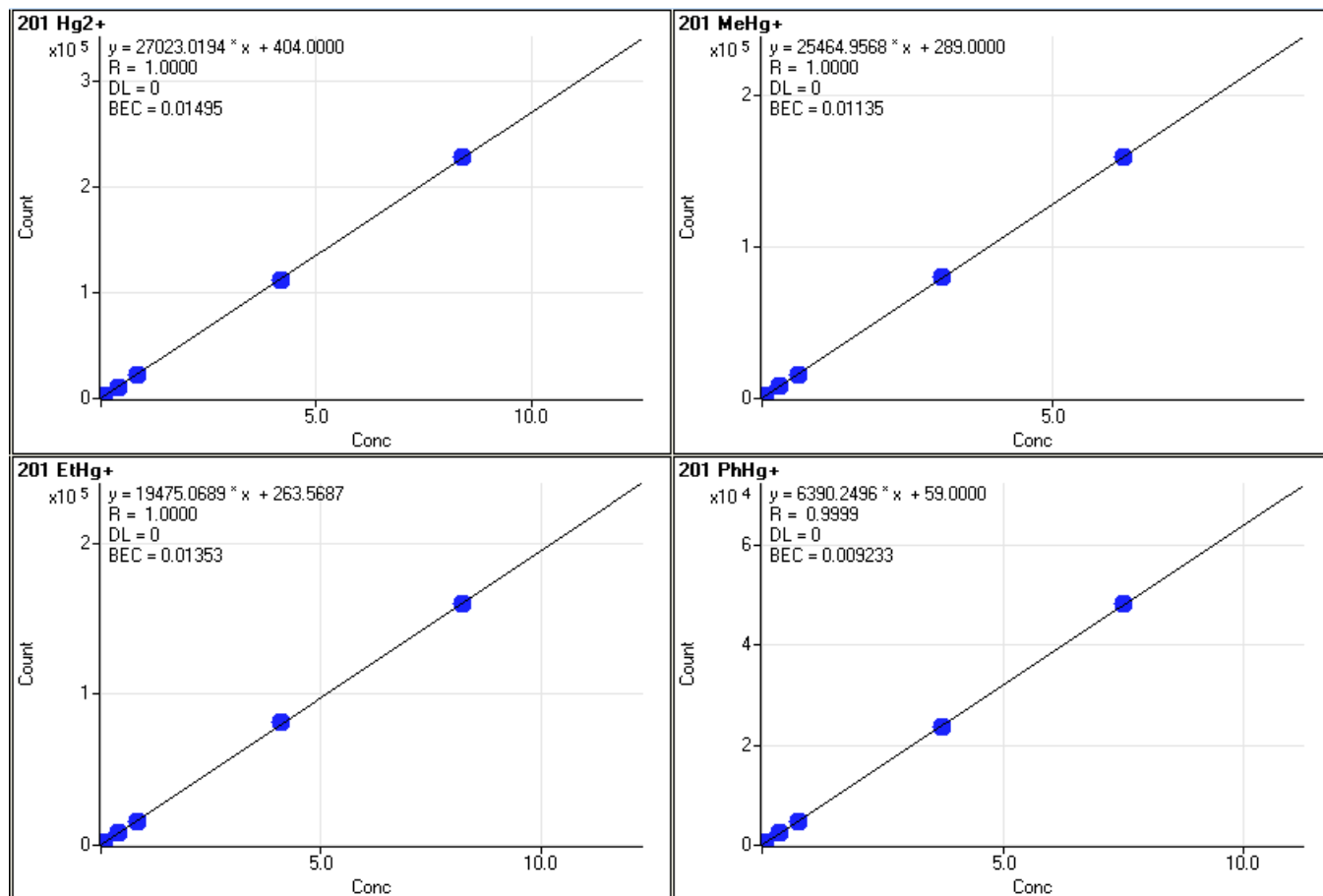


Figura 5. Curvas de calibração para a análise das quatro espécies de mercúrio

**Tabela 3.** Resultados da análise das amostras de CRM; as concentrações são expressas em mg/kg de mercúrio

\* Concentração não certificada

	BCR-464	Dolt-4	
	201 MeHg <sup>+</sup>	201 Hg <sup>2+</sup>	201 MeHg <sup>+</sup>
Resultados	4,93	1,17	1,34
RSD (%)	8	8	10
Certificado	5,12 ± 0,16	(1,25)*	1,33 ± 0,12
Recuperação (%)	96	94	101

O conteúdo do mercúrio inorgânico de três amostras não está certificado; portanto, é difícil avaliar a precisão do valor medido. Apenas o MeHg e as concentrações totais de Hg são certificadas. A concentração agrupada exibida na Tabela 3 baseia-se no pressuposto que somente o Hg<sup>2+</sup> e o MeHg<sup>+</sup> estão presentes na amostra de Dolt-4 (nenhum EtHg<sup>+</sup> ou PhHg<sup>+</sup> foi observado nos cromatogramas de amostra). Sob essa premissa, o resultado do mercúrio inorgânico da amostra de Dolt-4 está de acordo com o valor esperado.

Para o MeHg<sup>+</sup>, os valores medidos estão totalmente de acordo com as concentrações em ambas as amostras, validando a eficiência do novo método para determinação do MeHg<sup>+</sup> nessas amostras de alimentos. Especialmente para a amostra de Dolt-4, em que o conteúdo de MeHg<sup>+</sup> representa somente cerca de 52% do mercúrio total, uma excelente concordância da concentração medida com o valor certificado comprova a capacidade da preparação de amostras para conservar essa espécie durante a extração.

## Conclusões

Um método rápido e eficaz de HPLC-ICP-MS utilizando gradiente foi desenvolvido para a análise das espécies de mercúrio em amostras de alimentos e proporcionou uma separação completa das quatro espécies de interesse em menos de três minutos. O método foi testado em amostras certificadas e demonstrou fornecer excelentes recuperações de espécies de Hg em comparação aos valores certificados, quando disponíveis. Além disso, se o fenilmercúrio não precisar ser monitorado, o método pode ser ainda mais simples com o uso de uma separação isocrática.

Ao permitir o rápido gradiente de aquoso para metanol de 90%, o gerador de RF com rápido ajuste de frequência do ICP-MS 7700x possibilitou a separação de espécies de mercúrio sem nenhum efeito adverso na estabilidade do plasma. Esse recurso abrirá novas possibilidades para as separações de HPLC usando solventes orgânicos vinculados ao ICP-MS.

## Agradecimentos

Guillaume Labarraque e Caroline Oster do Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE, França) são reconhecidos pela preparação de extratos de CRM.

## Referências

1. Hight, S. C. & Cheng, J. (2006). *Anal. Chim. Acta.* 567:160–172.
2. Sannac, S., Labarraque, G., Fiscaro, P., Pannier, F. & Potin Gautier, M. (2009). *Accred. Qual. Assur.* 14:263–267.

**[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)**

A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2012

Publicado em 23 de março de 2012

Número da publicação: 5991-0066PTBR



**Agilent Technologies**