

# HPLC-ICP-MS 法测定临床病人尿液中的形态砷

## ICPMS-146

**摘要：**本文建立了 HPLC-ICP-MS 测定临床病人尿液中四种有毒形态砷的分析方法。尿液经过稀释后，采用高效液相色谱 LC-20Ai 对形态砷进行分离，电感耦合等离子体质谱 ICPMS-2030 进行定量分析。在 1.0~100.0 ng/mL 范围内，各种形态砷的线性相关系数大于 0.99996，加标回收率在 92.4%~109.0% 之间，浓度和保留时间精密度 (n=3) 分别小于 3.0% 和 0.3%。方法检出限在 1.42-1.86 ng/mL 之间，该方法可应用于正常人尿液、接受砷剂治疗的患者尿液和其他砷中毒患者尿液中砷形态的分析。

**关键词：**HPLC-ICP-MS 临床病人 尿液 形态砷

砷是致癌物质，长期低剂量接触会引起皮肤癌、膀胱癌和肺癌，同时引发神经系统和心血管系统疾病。砷的毒性与其存在形态密切相关，在常见砷的化合物中，亚砷酸盐 (As (III)) 和砷酸盐 (As (V)) 毒性较大，一甲基砷酸 (MMA) 和二甲基砷酸 (DMA) 毒性较小，砷甜菜碱 (AsB)、砷胆碱 (AsC) 和砷糖等基本没有毒性。

砷在生物体内会发生代谢、转化、使得砷的形态变得复杂。大量的研究表明，人体经砷暴露后，无机砷 (As (III) 和 As (V)) 在体内经过甲基化和还原过程，产生多种甲基化代谢产物，随后经尿液排出。尿液是易获得的检材，且尿砷是一种较理想的反映近

期砷暴露的生物学标志。然而砷化合物的毒性各不相同，总砷含量常常不能正确反映人体经暴露后的代谢情况，所以对不同形态、价态的砷化物进行测定显得尤为重要。

本研究将尿液直接使用 20 mmol/L EDTA-2Na (含 0.1% 的曲拉通) 稀释。采用岛津高效液相色谱 LC-20Ai 与电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 联用对临床病人尿液中砷进行形态分析，定量分析各个形态砷的含量。本方法操作简便，可应用于正常人尿液、接受砷剂治疗的患者尿液和其他砷中毒患者尿液中砷形态分析。

## ■ 实验部分

### 1.1 对照品

砷酸、亚砷酸、一甲基砷、二甲基砷、砷胆碱、砷甜菜碱购于国家标准物质中心。

### 1.2 实验检材

正常人和临床病人尿液

### 1.3 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-20Ai 与电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 联用系统。具体配置为 LC-20Ai×2 输液泵，DGU-20A3 在线脱气机，SIL-20AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪，LabSolutions ICPMS TRM 工作站；AP135W 电子天平 (日本岛津公司)；Allegra 25R 低温高速离心机 (美国 Beckman)。

### 1.4 试剂

乙二胺四乙酸钠 (EDTA-2Na)、曲拉通及碳酸铵均为优级纯，甲醇为色谱纯。

## ■ 方法和结果

### 2.1 标准溶液配制

精密吸取对照品储备溶液适量，加 20 mmol/L EDTA-2Na（含 0.1% 的曲拉通）溶液制成每 1 mL 各含 1.0 ng、4.0 ng、10.0 ng、20.0 ng、50.0 ng、100.0 ng（均以砷计）系列浓度的混合溶液，摇匀，备用。

### 2.2 样品前处理

将尿样用 20 mmol/L EDTA-2Na（含 0.1% 的曲拉通）溶液稀释 20 倍后进 HPLC-ICP-MS 分析。

### 2.3 色谱条件

色谱条件参见表 1、表 2。

表 1 HPLC 分析条件

参 数	参数设定
色谱柱	Dionex IonPac™ AS19 7.5 μm 250*4 mm
流动相	A-50 mmol/L 碳酸铵水溶液 (pH=9) B- 水
流 速	1.2 mL/min
柱 温	30°C
进样量	20 μL
洗针液	水
洗脱程序	梯度洗脱

表 2 梯度洗脱条件

Time	Flow	A.Conc	B.Conc
0.00	1.20	0	100.0
5.00	1.20	100.0	0
9.00	1.20	100.0	0
10.00	1.20	0	100.0
25.00	1.20	0	100.0

### 2.4 质谱条件

ICP-MS 仪器分析条件见表 3。

表 3 ICP-MS 分析条件

参 数	参数设定	参 数	参数设定
高频功率	1.20 kW	等离子体气	9.0 L/min
辅助气	1.10 L/min	载气	0.70 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器	同心雾化器
雾化室	旋流雾室	雾化室温度	5°C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz
碰撞气	He	碰撞气流速	4 mL/min
池电压	-21 V	能量过滤器电压	5.0 V

## ■ 结果与讨论

### 3.1 专属性考察

对六种形态砷单标溶液和样品加混标溶液进样考察，排除系统干扰，并且考察六种形态砷的分离度，以确保实际样品分析过程中不会造成假阳性检出，见图 1。四种有毒形态砷分离度大于 1，不存在假阳性检出。

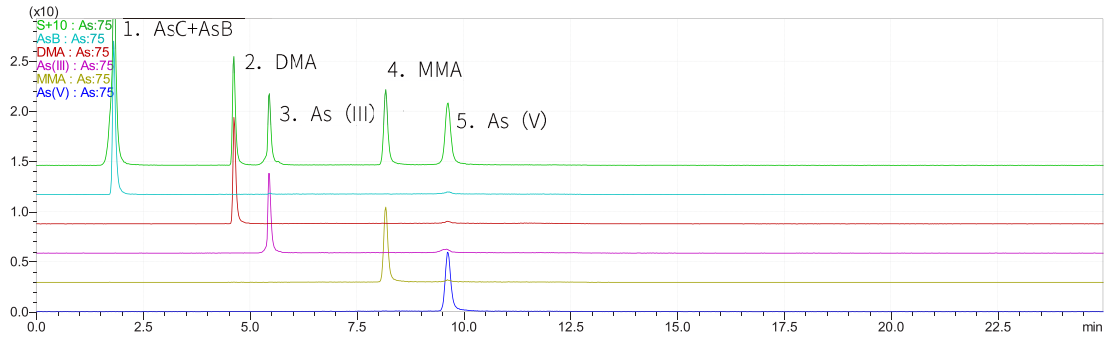


图 1 砷元素形态色谱图

1. 砷胆碱 (AsC)+ 砷甜菜碱 (AsB) 2. 二甲基砷 (DMA) 3. 亚砷酸 (As( III )) 4. 一甲基砷 (MMA) 5. 砷酸 (As( V ))

### 3.2 线性关系考察

按“2.1 标准溶液配制”规定进行标准曲线系列浓度的配制，记录各成分的峰面积，以浓度（浓度均以 As 计）与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线，结果如下图所示。在 1.0~100.0 ng/mL 范围内，四种有毒形态砷的线性相关系数大于 0.99996，线性关系良好。

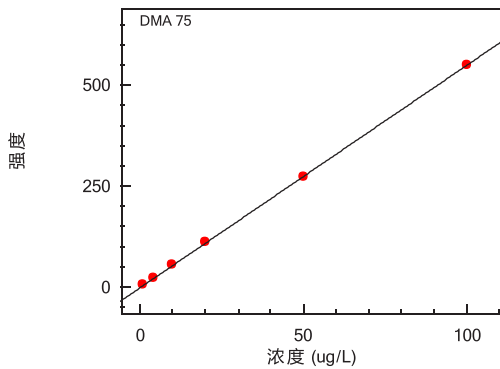


图 2 二甲基砷 (DMA)  $r=0.99999$

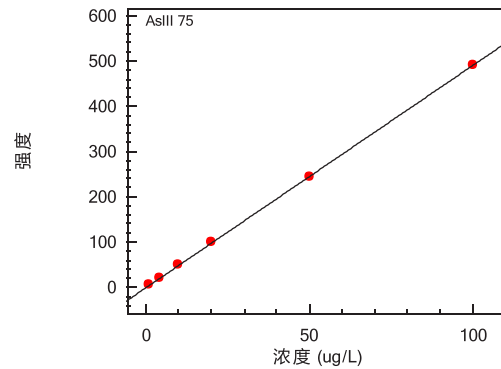


图 3 亚砷酸 (As( III ))  $r=0.99996$

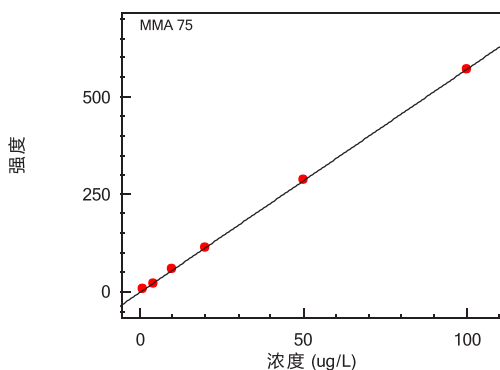


图 4 甲基砷 (MMA)  $r=0.99998$

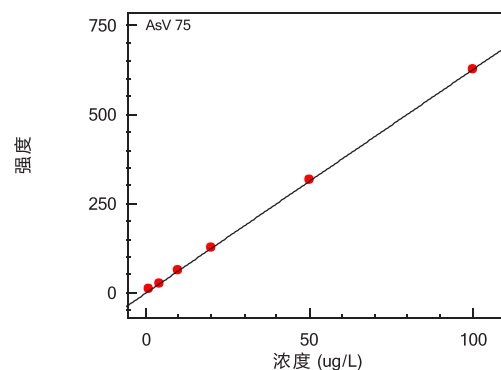


图 5 砷酸 (As(V))  $r=0.99998$

### 3.3 检出限考察

在进样体积为 20  $\mu\text{L}$  时, 对浓度为 1.0  $\text{ng/mL}$  样品溶液考察六种形态砷的信噪比, 以三倍信噪比 (3S/N) 峰高对应浓度作为检出限, 五种形态砷 1.0  $\text{ng/mL}$  色谱图、基线及检出限结果分别见图 6、7 和 表 4。

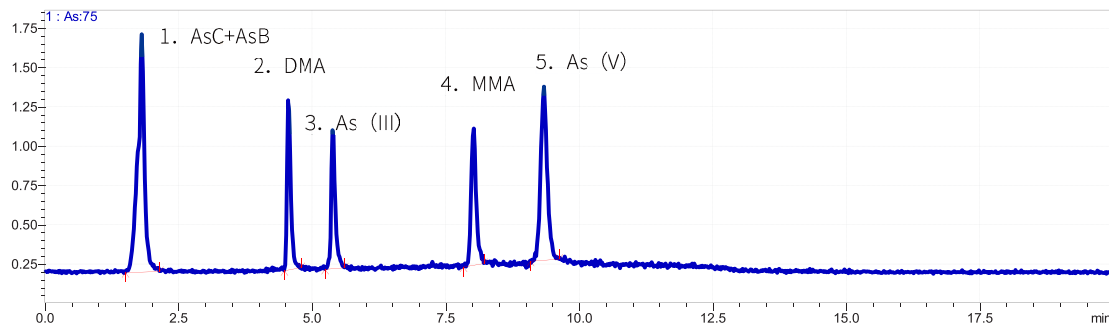


图 6 砷元素形态色谱图

1. 砷胆碱 (AsC)+ 砷甜菜碱 (AsB) 2. 二甲基砷 (DMA) 3. 亚砷酸 (As( III )) 4. 一甲基砷 (MMA) 5. 砷酸 (As( V ))

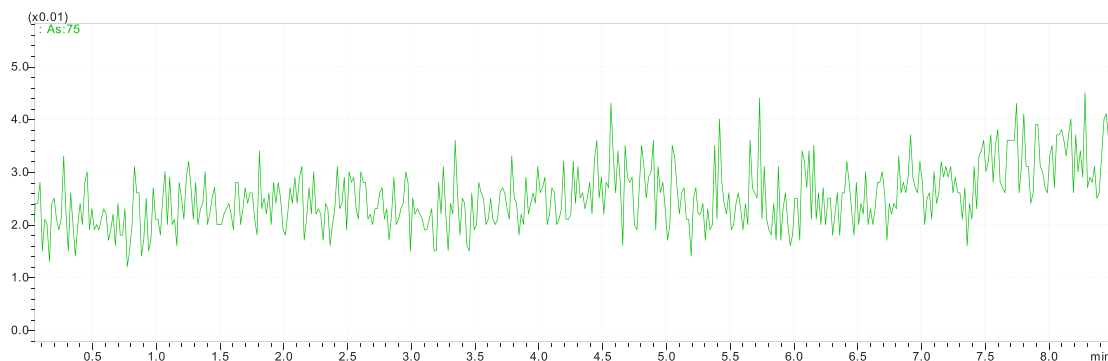


图 7 基线

表 4 检出限考察结果

目标物	中文名称	仪器检出限 ( $\text{ng/mL}$ )	方法检出限 ( $\text{ng/mL}$ )
DMA	二甲基砷	0.071	1.42
As( III )	亚砷酸	0.085	1.70
MMA	一甲基砷	0.093	1.86
As( V )	砷酸	0.078	1.56

### 3.4 样品测试结果及回收率考察

对正常人和临床病人尿液样品进行 LC-ICPMS 测定, 并对正常人样品进行低、中、高三个浓度级别加标回收试验, 样品加标回收结果见表 5, 临床病人测定结果见表 6。

表 5 样品加标回收率

目标物	中文名称	正常人测定结果 (ng/mL)	加标浓度 (ng/mL)	加标测定结果 (ng/mL)	回收率 (%)
AsC+AsB	砷胆碱 + 砷甜菜碱	2.63	2.0	4.69	103.3
			20	21.1	92.4
			100	99.2	96.6
DMA	二甲基砷	0.53	1.0	1.51	98.2
			10	9.9	93.7
			50	48.2	95.3
As( III )	亚砷酸根	ND.	1.0	1.02	102.0
			10	9.63	96.3
			50	47.8	95.6
MMA	一甲基砷	ND.	1.0	1.09	109.0
			10	9.34	93.4
			50	47.5	95.0
As( V )	砷酸根	0.20	1.0	1.23	103.0
			10	9.63	94.3
			50	48.2	96.0

备注：ND. 未检出

表 6 临床病人样品测定结果 (ng/mL)

样品名称	AsC+AsB	DMA	As( III )	MMA	As( V )
V-11	ND.	1094	1340	814	270
V-12	ND.	125.4	179	99.4	67.0
V-1	ND.	130.4	56.6	76.4	78.0
V-2	ND.	8.36	7.30	13.5	8.38
V-25	ND.	ND.	ND.	10.3	12.4
V-26	ND.	ND.	ND.	ND.	6.42
V-27	ND.	33.2	7.16	14.4	16.3

备注：ND. 未检出

### 3.5 精密度考察

取 3 份样品溶液，各加入 10.0 ng/mL 的 6 种形态砷混合标准溶液并重复 3 次测定，对方法学浓度和保留时间精密度进行考察，结果以 RSD 表示，见表 7。

表 7 浓度及保留时间精密度结果 (n=3)

目标物	中文名称	浓度精密度 (RSD, %)	保留时间精密度 (RSD, %)
AsC+ AsB	砷胆碱 + 砷甜菜碱	1.73	0.26
DMA	二甲基砷	2.05	0.13
As( III )	亚砷酸	2.60	0.01
MMA	一甲基砷	2.49	0.02
As( V )	砷酸	1.26	0.03

## ■ 结论

本文建立了 HPLC-ICP-MS 测定尿液中四种有毒形态砷的分析方法。分析结果显示, 四种形态砷在 1.0~100.0 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.99996, 加标回收率在 92.4%-109.0% 之间, 浓度和保留时间精密度 RSD (n=3) 分别小于 3.0% 和 0.3%。该方法可应用于正常人尿液、接受砷剂治疗的患者尿液和其他砷中毒患者尿液中砷形态分析。

岛津应用云

