

HPLC-ICP-MS 法测定尿液中的形态砷

ICPMS-108

摘要：本文建立了 HPLC-ICP-MS 测定尿液中六种形态砷的分析方法。尿液直接离心过滤，使用 0.015 mol/L EDTA 溶液稀释，以 2% 甲醇和 50 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH=8) 作为流动相，采用高效液相色谱 LC-20Ai 对砷胆碱 (AsC)、砷甜菜碱 (AsB)、As (III)、二甲基砷 (DMA)、一甲基砷 (MMA) 和 As (V) 六种形态砷进行分离，电感耦合等离子体质谱 ICPMS-2030 检测进行定量分析。在优化的测试条件下，六种形态砷在 0.1~10 ng/mL 范围内线性关系良好，相关系数大于 0.9996，加标回收率在 92%~104% 之间，浓度和保留时间精密度 (n=6) 分别小于 3% 和 0.1%。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 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。

本研究将尿液离心过滤后，使用 0.015mol/L EDTA 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 联用对尿液中砷进行形态分析，定量测定各个形态砷的含量。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

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)、硝酸和碳酸铵均为优级纯，甲醇为质谱纯。

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 0.015 mol/L EDTA (pH=8) 溶液制成每 1 mL 各含 0.1 ng、0.5 ng、1.0ng、2.5 ng、5.0ng、10.0 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

将尿样置于离心管中, 10000 r/min 离心 15 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 用 0.015 mol/L EDTA (pH=8) 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	Hamilton PRP-X100 Anion Exchange 250*4.1mm
流动相	A-2% 甲醇水 B-50 mmol/L 碳酸铵水溶液 (pH=8)
流 速	1.5 mL/min
柱 温	40°C
进样量	50 μL
洗针液	水
洗脱程序	梯度洗脱

表 2 梯度洗脱条件

Time(min)	Flow(mL/min)	A.Conc (%)	B.Conc (%)
0.00	1.50	100	0.0
2.00	1.50	100	0.0
3.00	1.50	0.0	100.0
8.00	1.50	0.0	100.0
8.10	1.50	100	0.0
15.00	1.50	100	0.0

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	等离子体气流速	8.0 L/min
辅助气流速	1.10 L/min	载气流速	0.70 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器	同心雾化器
雾化室	旋流	雾化室温度	5 °C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz

■ 结果与讨论

3.1 专属性考察

对空白和六种形态砷溶液进样考察, 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。

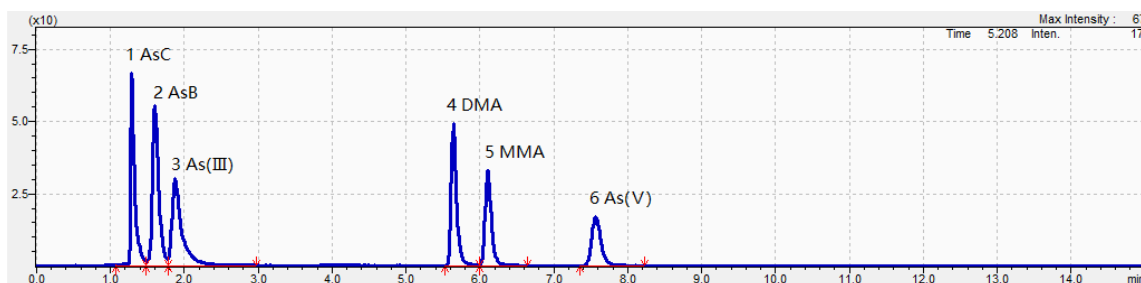


图 1 砷元素形态及价态测定图谱

1. 砷胆碱 (AsC); 2. 砷甜菜碱 (AsB); 3. 亚砷酸根 (As(III));
4. 二甲基砷 (DMA); 5. 一甲基砷 (MMA); 6. 砷酸根 (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，结果如下所示。

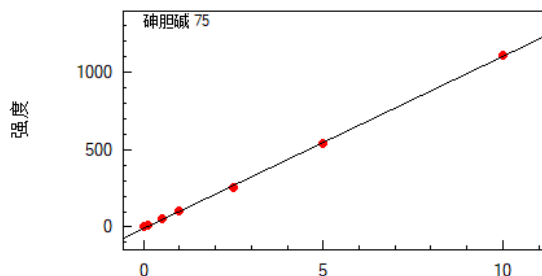


图 2 砷胆碱标准曲线 $r=0.99971$

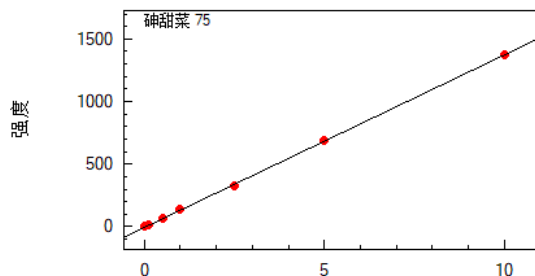


图 3 砷甜菜碱标准曲线 $r=0.99995$

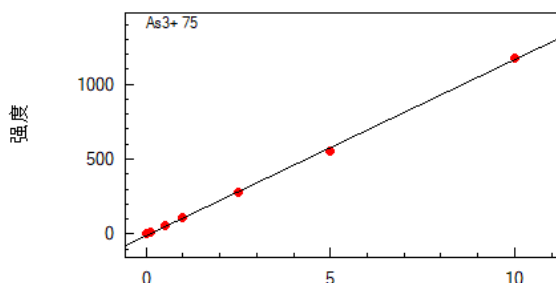


图 4 亚砷酸根标准曲线 $r=0.99965$

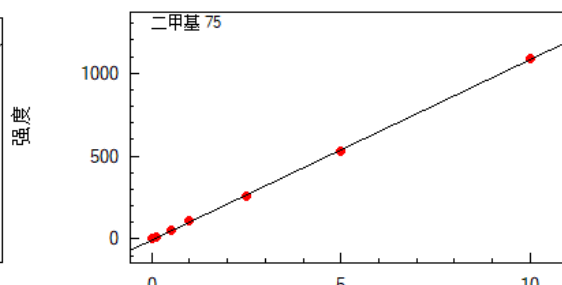


图 5 二甲基砷标准曲线 $r=0.99979$

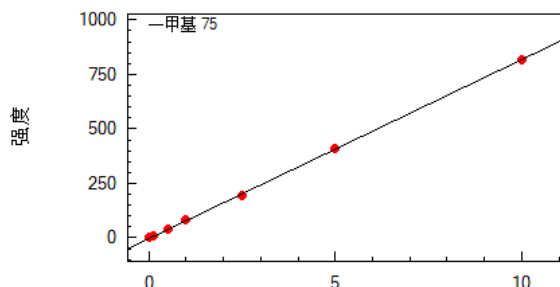


图 6 一甲基砷标准曲线 $r=0.99993$

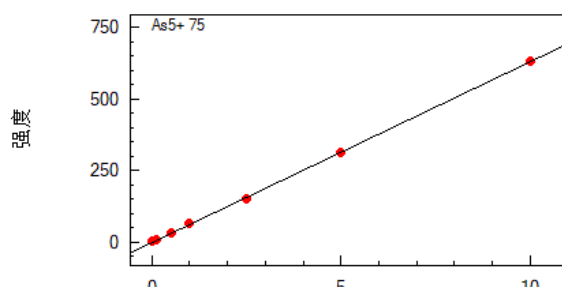


图 7 砷酸根标准曲线 $r=0.99988$

3.3 检出限考察

在进样体积为 50 μL 时, 对浓度为 1.0 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, 六种形态砷色谱图、基线及检出限结果分别见图 8、图 9 和表 4。

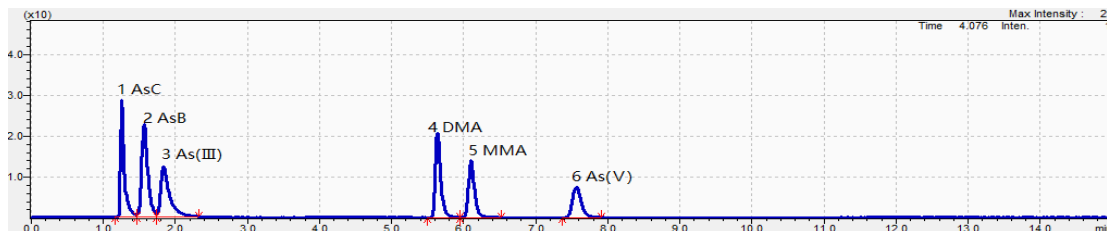


图 8 1.0 ng/mL 砷元素形态及价态测定图谱

1. 砷胆碱 (AsC); 2. 砷甜菜碱 (AsB); 3. 亚砷酸根 (As(III));
4. 二甲基砷 (DMA); 5. 一甲基砷 (MMA); 6. 砷酸根 (As(V))

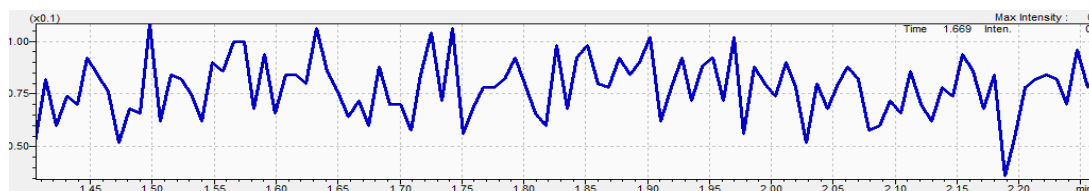


图 9 色谱分离基线

表 4 检出限考察结果

目标物	中文名称	仪器检出限 (ng/mL)	方法检出限 (ng/g)
AsC	砷胆碱	0.010	0.20
AsB	砷甜菜碱	0.013	0.26
As(III)	亚砷酸根	0.024	0.48
DMA	二甲基砷	0.015	0.30
MMA	一甲基砷	0.022	0.44
As(V)	砷酸根	0.041	0.82

3.4 样品测试结果及回收率考察

将尿液按“2.2 样品的处理方法”进行处理后进 HPLC-ICP-MS 分析, 并对尿液样品进行加标回收试验, 测定结果见表 5。

表 5 样品测定及回收率考察结果

目标物	中文名称	测定结果 (ng/mL)	样品换算结果 (ng/mL)	加标浓度 (ng/mL)	加标测定结果 (ng/mL)	回收率 (%)
AsC	砷胆碱	ND	ND	0.50	0.46	92
AsB	砷甜菜碱	ND	ND	0.50	0.52	104
As(III)	亚砷酸根	ND	ND	0.50	0.49	98
DMA	二甲基砷	1.35	27	2.00	3.38	102
MMA	一甲基砷	ND	ND	0.50	0.49	98
As(V)	砷酸根	ND	ND	0.50	0.51	102

3.5 精密度考察

取 6 份样品溶液，各加入 2.0 ng/mL 的 6 种形态砷混合标准溶液并重复 6 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 6。

表 6 浓度及保留时间精密度结果 (n=6)

目标物	中文名称	浓度精密度 (RSD%)	保留时间精密度 (RSD%)
AsC	砷胆碱	0.95	0.04
AsB	砷甜菜碱	0.47	0.10
As(III)	亚砷酸根	0.89	0.10
DMA	二甲基砷	0.40	0.04
MMA	一甲基砷	1.84	0.08
As(V)	砷酸根	2.60	0.05

■ 结论

本文建立了 HPLC-ICP-MS 测定尿液中六种形态砷的分析方法。直接离心过滤以 0.015 mol/L EDTA 溶液稀释处理样品，以 2% 甲醇和 50 mmol/L (NH₄)₂CO₃ (pH=8) 作为流动相，采用高效液相色谱 LC-20Ai 对砷胆碱 (AsC)、砷甜菜碱 (AsB)、As (III)、二甲基砷 (DMA)、一甲基砷 (MMA) 和 As(V) 六种形态砷进行分离，电感耦合等离子体质谱 ICPMS-2030 检测进行定量分析。在优化的测试条件下，六种形态砷在 0.1~10 ng/mL 范围内线性关系良好，相关系数大于 0.9996，加标回收率在 92%-104% 之间，浓度和保留时间精密度 (n=6) 分别小于 3% 和 0.1%。该方法操作简便，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。