

HPLC-ICPMS 测定血清中的形态砷

ICPMS-081

摘要：通过 HPLC-ICPMS 联用测定了血清中四种有毒形态砷。采用乙腈沉淀蛋白、离心、氮吹后经阴离子交换柱分离、ICP-MS 测定。各种形态砷在 1~50 $\mu\text{g/L}$ 范围回归系数大于 0.999，检出限 0.09 ~0.23 $\mu\text{g/L}$ ，样品加标回收率为 85.7%~113%，考察了基质效应对砷胆碱和砷甜菜碱两种低毒有机砷的分离影响。该方法适用于血液样品中有毒形态砷的分析测定。

关键词：HPLCICP-MS 血液 砷 形态

砷是一种有毒元素，砷矿的开采和熔炼、工业废料的排放、含砷农用化学品如杀虫剂、除草剂等的使用导致了砷环境污染。人体中的砷主要通过食物摄取在体内积累，会造成急性或慢性中毒，可致畸、致突变、致癌等。

砷的毒性与它的化学形态有关，不同价态、形态的砷，其毒性差别很大，无机砷毒性远远大于有机砷。砷形态主要有亚砷酸盐 (AsIII)、砷酸盐 (AsV)、一甲基砷 (MMA)、二甲基砷 (DMA)、砷甜菜碱 (AsB)、砷胆碱 (AsC)、砷糖、砷脂及阿散酸、硝苯砷酸、洛克沙砷等。由于测定砷总量不能反映准确的暴露水平，因此形态分析受到越来越多的关注与重视。

除了通过食品、饮用水等可能摄入有害砷之外，作为对疾病有特定作用的元素，砷化合物常用于抗肿瘤药物中，部分传统中药中也常含有砷。血液作为人体的重要组成部分，有毒有害的砷含量，尤其是毒性大的无机砷 (亚砷酸盐和砷酸盐) 形态检测具有重要的健康意义，也可监测含砷制剂使用在血液中的分布与转化。

高效液相色谱可以将不同形态砷有效分离，电感耦合等离子体质谱具有抗干扰能力强、灵敏度高和线性范围宽的特点，因此 HPLC-ICPMS 已成为砷元素形态分析中最具有应用前景的技术之一。

实验部分

1.1 对照品

砷酸 (AsO_3^{3-} , AsV)、亚砷酸 (AsO_4^{3-} , AsIII)、一甲基砷 ($\text{CH}_3\text{AsO}_3^{2-}$, MMA)、二甲基砷 ($\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$, DMA)、砷甜菜碱 ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{AsO}_2$, AsB) 和砷胆碱 ($\text{C}_5\text{H}_{14}\text{AsBrO}$, AsC) 标准物质，中国计量科学研究院国家标准物质研究中心。

1.2 实验检材

血清，北京朝阳医院。

1.3 仪器

岛津高效液相色谱仪 LC-20Ai 和 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪，低温高速离心机，旋涡混合器，氮吹仪。

1.4 试剂

碳酸铵，氨水，乙腈，甲醇。

方法和结果

2.1 对照品溶液配制

分别移取不同形态砷标准溶液，用纯水稀释为 0、1、2、5、10、50 $\mu\text{g/L}$ 的标准序列。

2.2 样品的处理方法

取 300 μL 血清于离心管中，加入 300 μL 乙腈，涡旋混合器振动 2 min，10000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，然后取 400 μL 上清液于离心管中，氮吹吹干后加入 200 μL 纯水复溶、涡旋摇匀后待测。同时相同步骤做空白和加标回收试验。

2.3 色谱条件

液相色谱条件及梯度洗脱程序见表 1 和表 2。

表1 HPLC色谱条件

参数	设定值
色谱柱	DionexlonPac™ AS197.5 μ m 250*4 mm
流动相	A: 0.1%甲醇水; B: 50 mmol/L碳酸铵水溶液, pH 9.0
流速	1.0 mL/min
柱温	30°C
进样量	20 μ L
洗针液	水
洗脱程序	梯度洗脱

表2 HPLC梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A 相	流动相 B 相
0	1.00	100	0
1.0	1.00	100	0
11.0	1.00	0	100
11.1	1.00	100	0
20.0	1.00	100	0

2.4 质谱条件

ICPMS-2030 仪器分析条件见表 3。

表3 ICP-MS分析条件

仪器参数	设定值	仪器参数	设定值
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	雾化器类型	同轴
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
碰撞气种类	He	碰撞气流速	5.0 mL/min
池电压	-21 V	能量过滤器电压	5.0 V

结果与讨论

3.1 色谱分离图

对空白进行考察排除系统干扰, 并且考察混合标准溶液中六种形态砷的分离度, 以确保实际样品分析过程中不存在假阳性检出。图 1 所示为标准溶液 (5 μ g/L) 色谱分离图 (单位 kcps), AsC、AsB、AsIII、DMA、MMA、AsV 保留时间分别为 1.971、2.307、6.528、6.931、11.206、13.101 min。

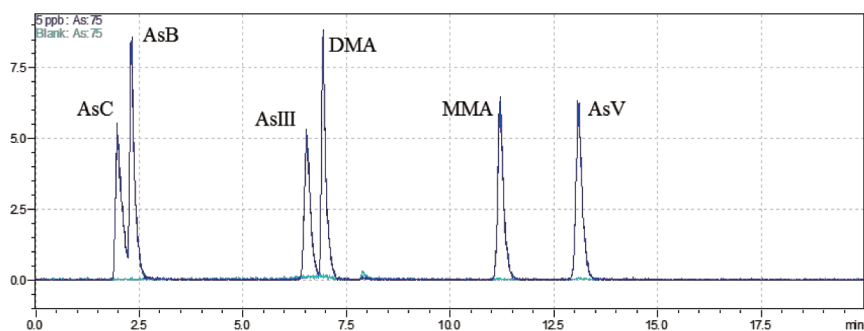


图1 六种形态砷混合标准溶液色谱图

3.2 线性关系

对各种形态砷峰面积及浓度绘制标准曲线，浓度范围为 1~50 $\mu\text{g/L}$ ，结果如图 2 至图 5 所示，线性相关系数均大于 0.999。

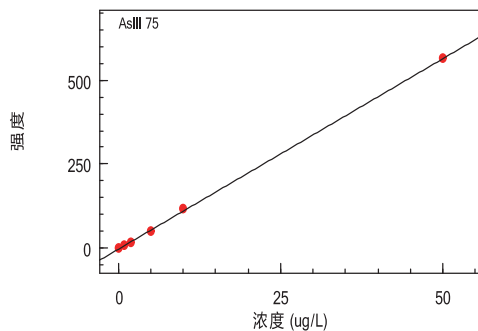


图2 亚砷酸 (AsIII) 标准曲线 ($r=0.9998$)

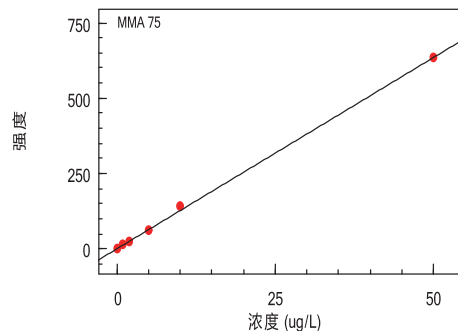


图4 一甲基砷 (MMA) 标准曲线 ($r=0.9996$)

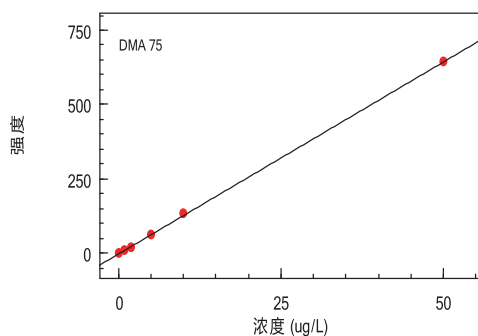


图3 二甲基砷 (DMA) 标准曲线 ($r=0.9999$)

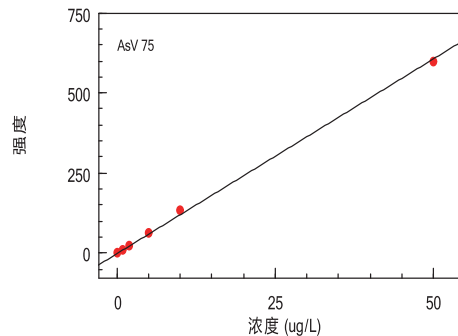


图5 砷酸 (AsV) 标准曲线 ($r=0.9993$)

3.3 检出限

对浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 的溶液考察形态砷的信噪比，以三倍信噪比 (S/N) 峰高对应浓度作为检出限，1 $\mu\text{g/L}$ 样品色谱图、基线及检出限结果分别见图 6、图 7 和表 4，四种形态砷检出限为 0.09~0.23 $\mu\text{g/L}$ 。

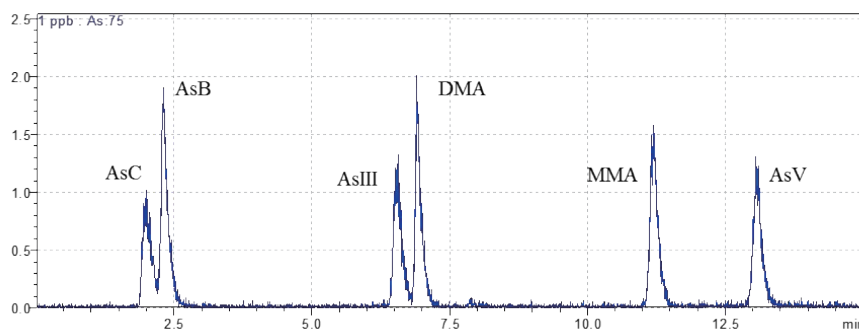


图6 六种1 $\mu\text{g/L}$ 形态砷色谱图

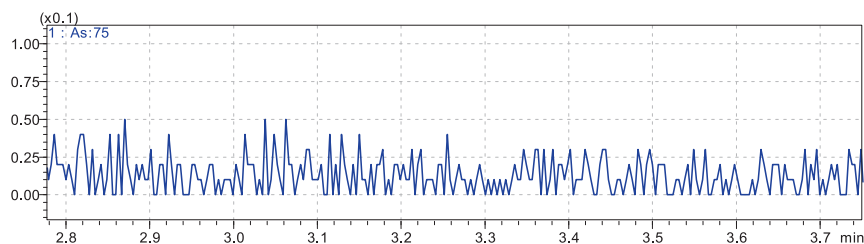


图7 色谱分离基线

表4 四种形态砷检出限

名称	仪器检出限 (μg/L)	方法检出限 (μg/L)
亚砷酸根	0.23	0.23
二甲基砷	0.09	0.09
一甲基砷	0.20	0.20
砷酸根	0.18	0.18

3.4 样品测试

取血清样品，按照前处理程序处理后测定，色谱图见图 8，测定结果见表 5，亚砷酸根、二甲基砷、一甲基砷、砷酸根四种有毒形态砷精密度 1.14~4.45%，加标回收率为 85.7%~113%，回收率良好。

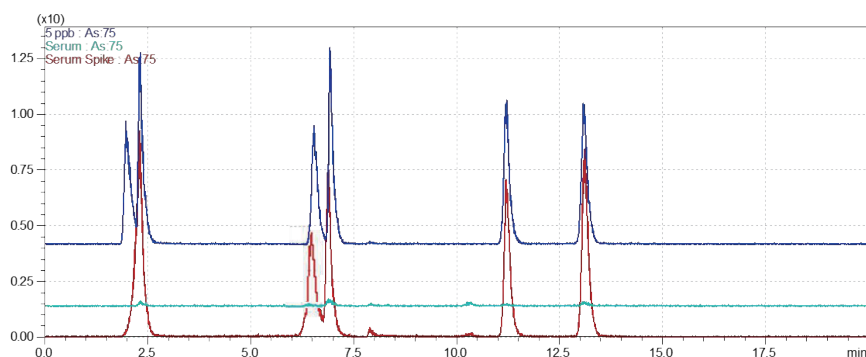


图8 血清及加标样品色谱图

表5 血清测试结果及加标回收

形态	样品	加标 2 μg/L			加标 5 μg/L		
		测定值 (μg/L)	RSD (n=3, %)	回收率 (%)	测定值 (μg/L)	RSD (n=3, %)	回收率 (%)
亚砷酸根	N.D.	2.26	1.77	113	5.27	1.14	105
二甲基砷	N.D.	1.74	1.15	87.0	4.29	1.98	85.7
一甲基砷	N.D.	2.03	1.23	101	4.73	3.07	94.5
砷酸根	N.D.	1.87	4.45	93.3	4.79	2.71	95.8

备注：N.D.表示未检出。

3.5 基体效应

使用色谱柱 AS19 对六种形态砷分离时砷胆碱和砷甜菜碱的分离度较低，由于血液样品基质复杂，导致经乙腈沉淀蛋白和超滤（3K 道尔顿）两种方法处理的血清原样检测时砷胆碱保留时间延后，和砷甜菜碱峰重合在一起，样品逐级稀释到 20 倍后保留时间与标准溶液一致，色谱图见图 9。由于未受砷暴露的正常人体血液中总砷含量少，不同形态的砷含量会更低，稀释倍数增大后可能导致各种形态砷不能准确定量检出。由于原样检测时主要影响砷胆碱和砷甜菜碱的分离度，且这两种砷形态毒性很小，在实际应用中可原样分析毒性大的亚砷酸根、砷酸根及毒性较弱的一甲基砷、二甲基砷，保证血清中有毒形态砷的准确定量。

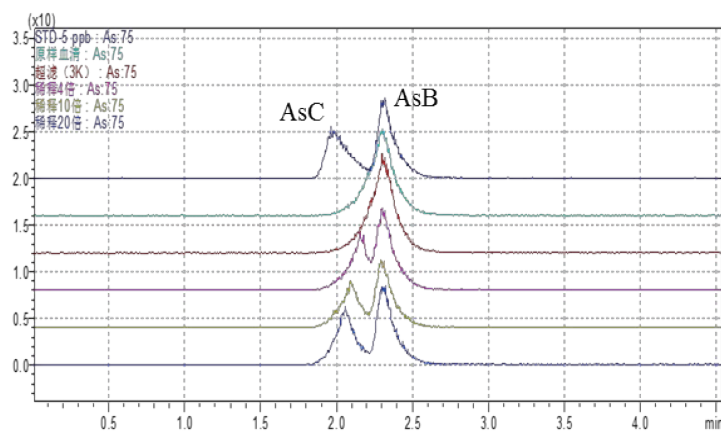


图9 基质对砷胆碱和砷甜菜碱分离的影响

■ 结论

使用岛津惰性液相系统 LC-20Ai 和 ICPMS-2030 型电感耦合等离子体质谱仪联用测定了血清样品中有毒形态砷含量。该方法灵敏度高，方法检出限 0.09~0.23 $\mu\text{g/L}$ ，测定结果准确，样品加标回收率为 85.7%~113%，可适用于血清样品中有毒形态砷的分析测定。