

通过高效液相色谱仪/电感耦合等离子体质谱仪分析尿液中五种砷化合物的形态

简介

结合电感耦合等离子体质谱仪的高效液相色谱仪 (HPLC) 已成为用于确定痕量级单独砷化合物 (形态) 的强大分析工具。砷的形态可用于增进我们对砷的生物化学相互作用的了解以及评估毒性风险。砷的毒性以及生物利用率高度依赖于其形态或种类。表 1 中列出了五种最常见的砷化合物以及其在老鼠体内测得的 LD_{50} 值。¹

世界卫生组织已公布每天无机砷的总摄入量每千克生物体重不应超过 2 μg 。并认为人体暴露于无机形态的砷可增加罹患癌症机率。海产品中每克最多可含有 25 μg 砷, 但主要以低毒性的砷甜菜碱 (AsB) 形式存在; 因此个体砷物质质量对于危险性的精确评估是至关重要的。分析尿液的形态可表明近期砷的摄入源。²

除了砷的多种毒性外, 其化学构成也决定了砷在环境中的活动性。因此, 有关机构正在制定新的环保法规以专门监测砷的个体种类。³

表 1. 砷物质的毒性。

砷物质		老鼠体内的 LD_{50} (mg/kg)
亚砷酸	(AsIII)	4.5
砷酸	(AsV)	14-18
一甲基砷	(MMA)	1,800
二甲基砷	(DMA)	2,600
砷甜菜碱	(AsB)	10,000

尽管已将多种不同的分析技术应用到砷物质分析中, 但结合电感耦合等离子体质谱仪的高效液相色谱仪 (HPLC) 具有多项显著的优势。这些优势包括高效液相色谱仪卓越的分离能力, 结合了电感耦合等离子体质谱仪高度的元素特异性和极低的检出限, 因而可检测无机和有机砷物质而无需联机消解其有机形态。⁴ 此外, 系统的整体集成与轻松自动化在易于分析的同时也提供了极佳的精度。

在具有大量氯元素的样品 (例如尿液) 中, 由于会形成与 ^{75}As 具有相同 m/z 的 $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, 因此在电感耦合等离子体质谱仪中可潜在导致多原子同位素光谱重叠干扰。一些研究人员已经通过优化色谱参数从砷物质中

作者

Wilhad Reuter
Lee Davidowski
Ken Neubauer
珀金埃尔默生命与分析科学部
710 Bridgeport Avenue
Shelton, CT 06484 USA

Joe Di Bussolo
Cohesive Technologies
101 Constitution Boulevard
Franklin, MA 02038 USA

分解出 ArCl^+ 峰。⁵⁻⁶ 在本实验中，我们将使用动态反应池 (DRC) 技术，通过让砷离子与氧反应形成在 m/z 为 91 时可测量的 $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$ 离子的方式从 ArCl^+ 中“移走”砷离子。

本应用资料介绍了使用阴离子交换高效液相色谱仪/电感耦合等离子体质谱仪测定人体尿液中最常见的五种砷物质的分析条件、参数和过程。共测试了两种方法：一种方法使用配有梯度洗脱高效液相色谱仪程序的标准配置电感耦合等离子体质谱仪，另一种方法将 DRC 电感耦合等离子体质谱仪技术与更加简单快捷的等度高效液相色谱仪配合使用。⁷

实验

仪器：

图 1 中显示了整个系统的示意图。

用于梯度程序的高效液相色谱仪由珀金埃尔默 200 系列四元泵和具有 Hamilton PRP-X100 (4.1 mm x 250 mm, 10 μm) 阴离子交换色谱柱的 200 系列自动进样器组成。固相萃取 (SPE) 阴离子交换滤芯 (3 mL, Alltech 公司制造) 用于在硫酸胺溶剂储液器中清除杂质。表 2 列出了操作参数和梯度程序。

对于等度方法，则使用珀金埃尔默 200 系列微量泵取代四元泵。等度流动相为使用氢氧化铵将 pH 值调整为 9.4 的 10 mM 硝酸铵和 10 mM 磷酸铵。流速为 1.5 mL/分钟，样品进样 100 μL 。表 3 列出了详细信息。

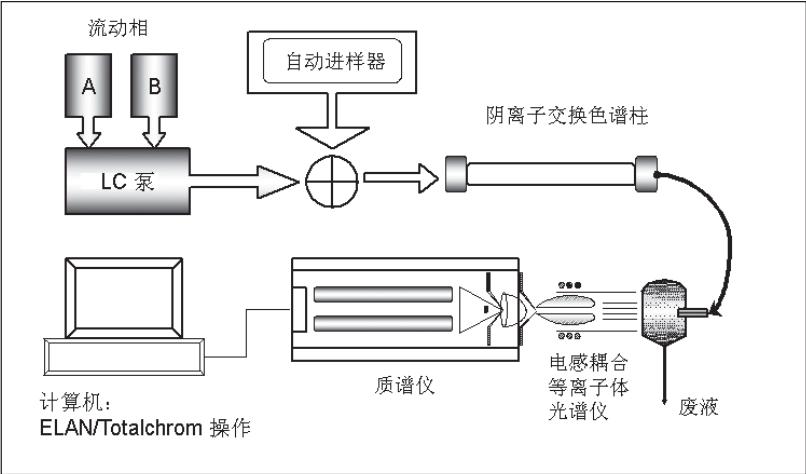


图 1 高效液相色谱仪/电感耦合等离子体质谱仪仪器设置示意图。

表 2. 高效液相色谱仪梯度方法和操作参数。

参数	设置
溶剂 A	pH 值为 8.5 的 20 mM 碳酸氢铵
溶剂 B	pH 值为 7.0 的 20 mM 硫酸铵
梯度结构	6 分钟时位于 100% A；12 分钟时跳至 100% B
流速	1.5 mL/分钟
色谱柱	阴离子交换，Hamilton PRP-X100，内径 4.1 mm x 250 mm，10 μm
色谱柱温度	室温
自动进样器冲洗溶剂	5% 甲醇/95% I 类去离子水
样品进样体积	100 μL
重新平衡时间	15 分钟
尿液样品制备	使用去离子水以 1:10 的比例稀释
固相萃取 (SPE) 滤芯	弱溶剂储液器中的 3mL Supelclean (Supelco™) LC-SAX SPE 滤芯
检测系统	珀金埃尔默/SCIEX ELAN 6100
总分析时间	33 分钟

表 3. 高效液相色谱仪等度方法和操作参数。

参数	设置
流动相	pH 值为 9.4 的 10 mM 硝酸铵和 10 mM 磷酸氢二铵；
流速	1.5 mL/分钟
运行时间	10 分钟
色谱柱	阴离子交换，Hamilton PRP-X100，内径 4.1 mm x 250 mm，10 μm
色谱柱温度	室温
自动进样器冲洗溶剂	5% 甲醇/95% I 类去离子水
样品进样体积	100 μL
尿液样品制备	以 1:5 的比例使用流动相稀释
检测	珀金埃尔默/SCIEX ELAN DRC II
总分析时间	10 分钟

珀金埃尔默 SCIEX 6100 型电感耦合等离子体质谱仪和 ELAN® DRC II 电感耦合等离子体质谱仪用于执行所有砷的测量。6100 型配备了镍锥，而 DRC 配备铂锥。两种仪器的样品引入系统部件均类似：一个旋流雾室 (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Australia) 和一个 Meinhard® A 类雾化器。由于使用了 PEEK 管（外径 1.59 mm）和死体积很低的 PEEK 连接器（部件号：WE024375），从液相色谱仪色谱柱中排出的液体直接输送到雾化器。表 4 列出了操作参数。

材料：
始终使用实验室纯净 18 MΩ 去离子水（ASTM I 类）（美国过滤器）。三氧化二砷、砷酸氢二钠、二甲砷酸（二甲砷酸，DMA）和砷甜菜碱从 Sigma-Aldrich 公司购买 (3300 South Second Street, St. Louis, MO, USA)。甲基砷酸钠 (MMA) 从 ChemService 公司购买 (660 Tower Lane, West Chester, PA USA)。As (III) 和 As (V) 的另一个来源是从 Spex Certiprep (Metuchen, NJ USA) 生产的 1000 mg/L 溶液中获得。用于高效液相色谱仪流动相的试剂包括碳酸氢铵、硫酸铵 (Fisher Sci., Pittsburgh, PA USA)、磷酸铵、硝酸以及氢氧化铵（高纯）(Baker Analyzed, Phillipsburg, NJ USA)。

表 4. 电感耦合等离子体质谱仪操作条件和参数。

参数	设置/类型
雾化器	Meinhard A 类石英 部件号: WE02-4371
雾室	ELAN 6100: 玻璃旋流 部件号: N812-2188 ELAN DRC II: 石英旋流 部件号: WE02-5221
RF 电源	1500 w
等离子氩流	15 L/分钟
雾化器氩流	0.95 L/分钟
辅助氩流	1.2 L/分钟
进样器	ELAN 6100: 内径 2.0 mm 氧化铝衬管 部件号: N812-6041 ELAN DRC II: 内径 2.0 mm 石英衬管 部件号: WE02-3915
监控的离子 m/z	75 (⁷⁵ As), DRC 为 91 (⁷⁵ As ¹⁶ O)
停留时间	500 ms
总采集时间	600 秒
CeO+/Ce+	< 2%
DRC 的氧气流	0.25 mL/分钟

等度实验的流动相制备：

制作 550 mL pH 值为 9.4 且含有 10 mM 硝酸铵和 10 mM 磷酸铵的溶液：

1. 向 500 mL 溶剂储液器中添加 500 mL 高效液相色谱仪级水。
2. 使用可变体积移液管，将 345 μL (450 mg) 浓硝酸移入储液器中。
3. 使用可变体积移液管，将 660 μL (583 mg) 浓氢氧化铵移入储液器中。
4. 称出 0.66 克磷酸氢二铵并添加到储液器中。
5. 使用氢氧化铵（~6-12 滴）将 pH 值调整为 9.4

溶剂最多可稳定 3 天

标准液制备：

各种物质的储备标准液通过在实验室纯水中连续稀释反应物来制备。制备以下五种浓度的混合标准液：1000、500、250、100、25 ng/L。这些标准液是通过混合单独储备物质标准液每日制备的。通过直接用电感耦合等离子体质谱仪吸液来验证所有标准液以获得适当的总体砷含量。

样品制备：

尿液样品来自于不同的志愿者并在 4 °C 条件下存储。对于梯度方法，在分析之前将样品在 18 MΩ 去离子水中以 1:10 的比例稀释。对于等度 DRC 方法，尿液样品使用缓冲流动相以 1:5 的比例稀释。

结果

将 ELAN .nsf 数据文件转换为 TotalChrom .raw 文件之后，通过 TotalChrom 6.2 实现了对所有定量和校正数据的评估。TotalChrom 提供了功能强大灵活、且直观的数据查看方式。在 TotalChrom 下，通过 ChromLink (SCIEX) 或转换应用程序执行数据转换。

使用电感耦合等离子体质谱仪的梯度高效液相色谱仪：⁷⁵As⁺ 检测

使用标准 ELAN 6100 电感耦合等离子体质谱仪检测的梯度方法显示了对所有砷物质的良好分离效果。通过分析单个成分标准液识别峰。洗脱顺序为 AsB、As (III)、DMA、MMA 和 As(V)。图 2 显示了各种浓度混合标准液的色谱。由 As-V 形成的大峰是由于流动相中含有杂质造成的。这一问题可通过向清除大多数 As-V 杂质的弱溶剂储液器中添加固相萃取滤芯在稍后得到更正。

图 3 显示了示例校正曲线 (AsB)。除 As(V) 外，所有曲线的更正系数均 ≥ 0.99 ；As(V) 所出现的问题是由于在流动相中含有杂质而导致的。使用标准电感耦合等离子体质谱仪检测，尿液样品中的 ArCl⁺ 峰出现在 MMA 和 As(V) 峰之间，如图 4 所示。尽管对此应用不会产生影响，但 ArCl⁺ 峰很可能与其它有机砷物质的峰相重叠。（注意：对于该梯度方法，使用 DRC 电感耦合等离子体质谱仪也可产生同等或更理想的结果。）

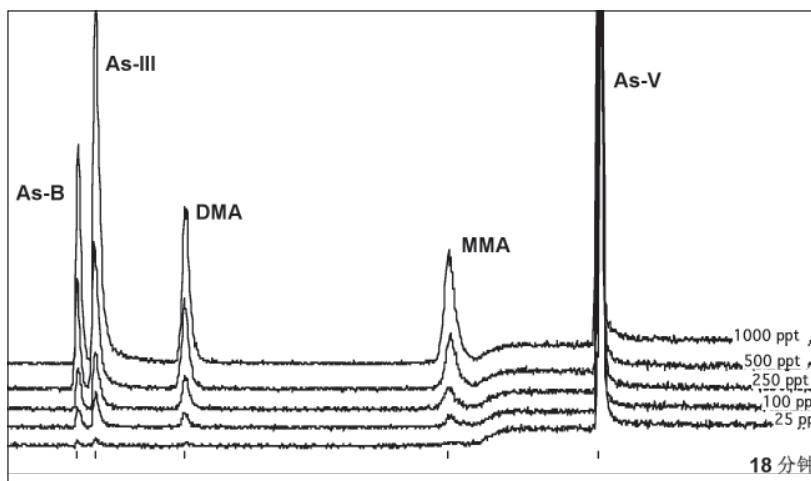


图 2 使用梯度洗脱的五种砷物质在五种不同浓度时的色谱。As-V 的大峰是由于在使用固相萃取色谱柱之前流动相中含有杂质造成的。

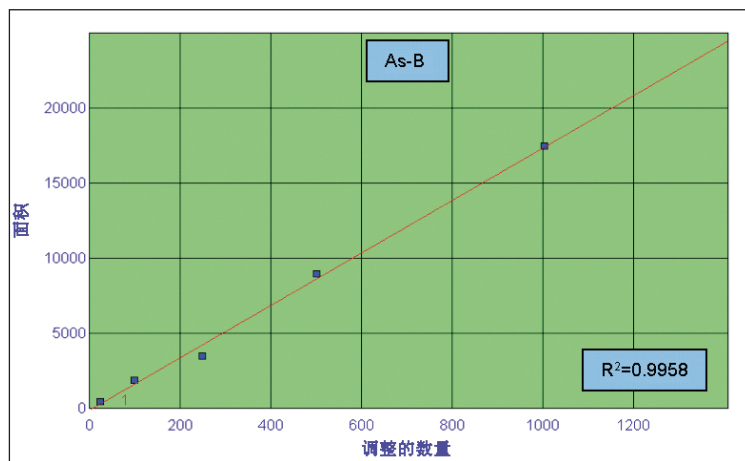


图 3 由图 2 中显示的色谱在 TotalChrom 中生成的典型校正曲线（砷甜菜碱）。X 轴上的单位为 ng/L。

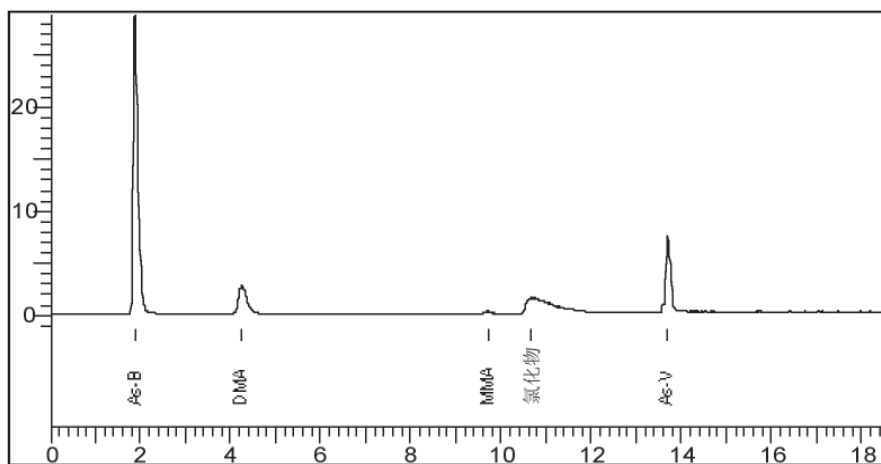


图 4 在监控 ⁷⁵As⁺ 的 ELAN 6100 上采集的尿液样品（表 4 的尿液 A）的色谱。在大约 11 分钟时出现的氯化物峰就是 ArCl⁺，该峰是由于在尿液中存在氯化物造成的。

表 5 显示了志愿者的尿液样品的形态分析。志愿者 A 近期食用了海产品，而志愿者 B 最近则没有食用海产品。因此，尿液 A 显示了很高的砷甜菜碱含量，即砷在深水鱼中常见的无毒形态，而尿液 B 则具有很低的砷含量。通过比较尿液样品中的砷甜菜碱含量，可以确定接受测试者近期是否食用过海产品。

表 5 还显示了在尿液 B 上的添加回收率测试。尿液中加入了 5 µg/L 各种砷物质，然后将其稀释进行分析。砷甜菜碱、As-III 以及 DMA 的回收率比较理想，但 MMA 的回收率很低，且没有检测到 As-V。MMA 的回收率可能受到氯化物干扰的影响；从图 4 的色谱中可以看出，氯化物峰的出现位置与 MMA 峰非常接近，因此有可能影响添加回收率。As-V 的问题是由于流动相中含有杂质而出现的（表 2 中的溶剂 A）。该数据是在固相萃取色谱柱可用之前采集的；将色谱柱安装到溶剂储液器的进气衬管上以后，As-V 背景得到了明显削弱。

表 5. 志愿者尿液中砷物质的浓度 (µg/L)。

峰	成分名称	尿液 A	尿液 B	尿液 B 回收百分比
1.	砷甜菜碱	123.5	1.0	88.6
2.	As(III)	< 0.25	0.8	93.8
3.	二甲基砷	17.0	8.0	91.0
4.	一甲基砷	28.5	1.8	66.4
5.	As(V)	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. 表示未检测到（由于流动相中含有杂质）

使用 DRC 电感耦合等离子体质谱仪的等度高效液相色谱仪：AsO⁺ 检测 (m/z 91)

等度高效液相色谱法是利用同一阴离子交换色谱柱在 pH 值为 9.4 的条件下开发的，只是分析时间更短一些。表 3 显示了高效液相色谱仪参数。为移除 ArCl⁺ 基体干扰的影响，ELAN DRC 使用氧作为反应气。⁸ 分析物砷离子与分子氧在电感耦合等离子体质谱仪的动态反应池中反应生成 AsO⁺ (m/z=91)，进而移除了 ArCl⁺ 的干扰。使用该方法，不会识别 ArCl⁺ 峰，因此也不会对色谱产生干扰。

图 5 显示了均为 1000 ng/L 的砷物质的色谱以及流动相。早期洗脱砷物质的分辨率足以完成本实验，但效果不如梯度方法好。这里对五种砷物质的洗脱要比梯度方法中稍早一些，且由于该方法是一种等度方法，因此无需经过色谱柱的重新平衡时间。这将总分析时间缩短为 10 分钟，即约为梯度方法的三分之一。

图 6 显示了在标准液和 DRC 模式中获得的尿液样品的色谱；消除氯化物峰的作用非常明显，且对于 MMA 的测定非常重要。

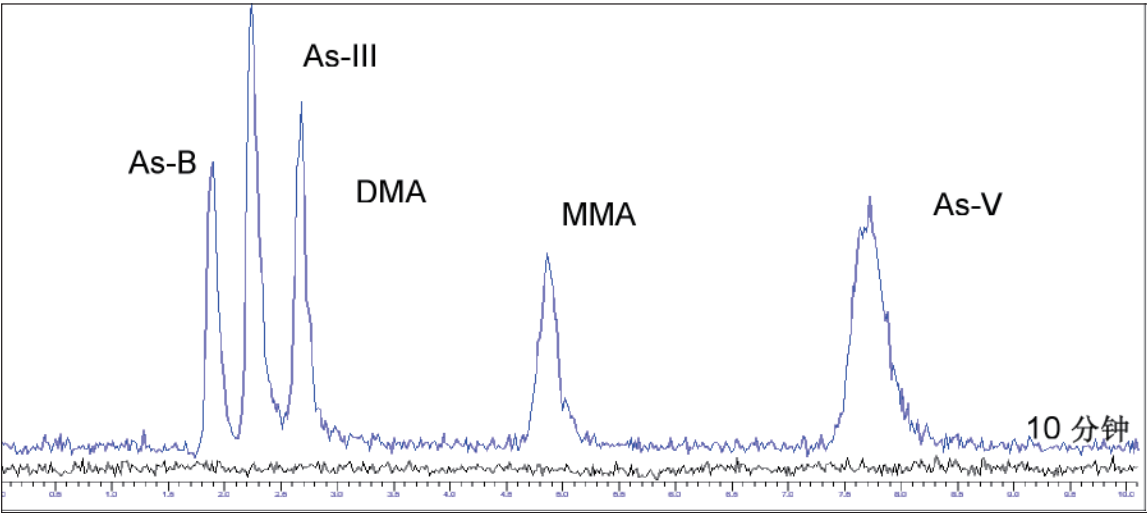


图 5 使用监控 AsO⁺ (m/z=91) 的 ELAN DRC 采集五种砷物质（分别为 1000 ng/L）及空白溶液的等度色谱。

图 7 显示了监控 AsO^+ ($m/z=91$) 的 1000 ng/L 标准液和志愿者 C 尿液的色谱覆盖图。请注意尿液色谱中未出现氯化物峰。切记尿液在流动相缓冲液中进行稀释，当在水中稀释时，砷物质的保留时间会较在标准液中的保留时间有所偏移。可能尿液的 pH 值或高离子化强度是导致保留时间偏移的原因。因此，在流动相中稀释可减弱该偏移。

通过运行各个物质 100、250、500 和 1000 ng/L 标准液执行外部标准液校正；图 8 中显示了这些校正标准液的色谱。除 As-V 以外，各物质校正曲线的更正系数均 ≥ 0.99 。该物质的问题是 100 ng/L 标准液的峰大于 250 ng/L 标准液的峰。该问题很可能是由于杂质造成的。该校正适用于图 6 中显示的尿液样品，表 6 显示了相应的定量结果。

结论

展示了两种用于测定人体尿液中最常见的五种砷物质的阴离子交换高效液相色谱仪/电感耦合等离子体质谱仪方法。展示了使用标准电感耦合等离子体质谱仪进行检测所用的梯度流动相方法，以分离五种不同的砷和 ArCl^+ 基体光谱干扰。梯度方法要求将额外的离子交换 SPE 滤芯连接到弱溶剂储液器的进样口，以控制 As(V) 杂质。只需对尿液样品使用水

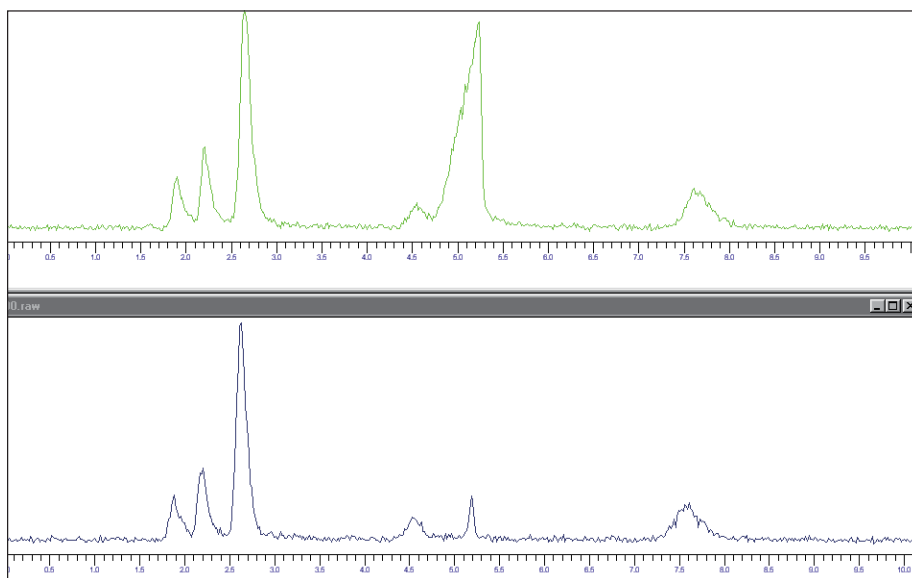


图 6 使用等度高效液相色谱法获得的尿液样品色谱。最上面的色谱通过在标准模式下监控 $^{75}\text{As}^+$ 采集，该模式下的反应池中不存在氧。存在较大的氯化物峰（由于 ArCl^+ ）。底部色谱是在同一色谱条件下采集的同一种样品，但监控的是 AsO^+ 。

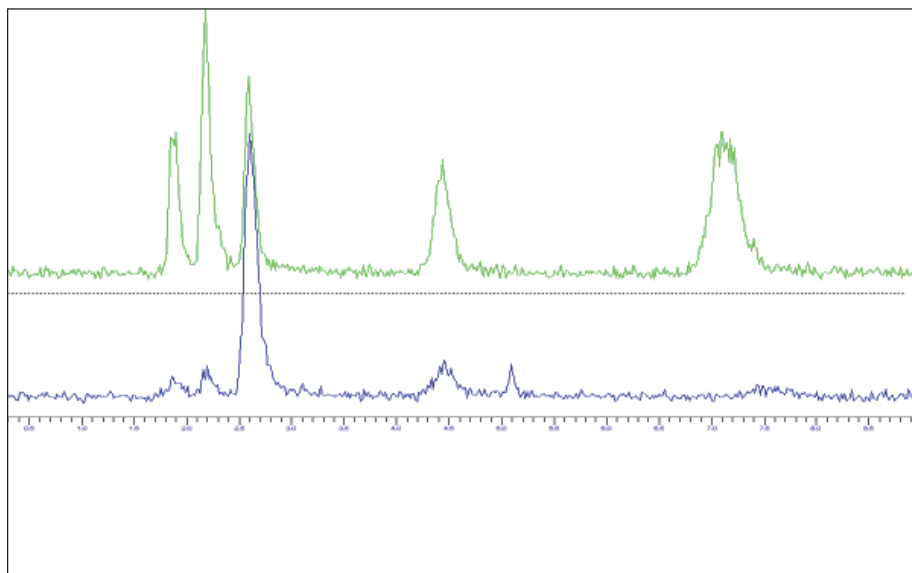


图 7 1000 ng/L 时五种砷物质的色谱（顶部）以及尿液样品稀释 5 倍后的色谱（底部）。数据在监控 AsO^+ ($m/z\ 91$) 期间采集。

进行稀释，然后就可进行分析。该方法的主要缺点就是每种样品的分析时间超过 30 分钟。

通过将 DRC 电感耦合等离子体质谱仪技术用于检测，进而开发了等度高效液相色谱仪方法。该方法使用单个缓冲的流动相，且不需要色谱柱重新平衡时间。DRC 用于使分析物砷离子与氧发生反应，以生成 AsO^+ 并将分析信号偏移至 $m/z=91$ ，进而消除 ArCl^+ 光谱干扰，这一点通过色谱图中不存在氯化物峰得到了验证。

该方法需要在流动相中稀释尿液样品，但每种样品的分析时间大约为 10 分钟，这明显少于梯度方法的时间。

两种方法均高度自动化，具有整体系统集成且易于分析的优点，除样品制备外无需操作员介入。通过消除 ArCl^+ 光谱干扰的效果，DRC 电感耦合等离子体质谱仪能够更迅速地提供色谱，并可将尿液中砷物质的测定应用于日常临床实验室分析中。

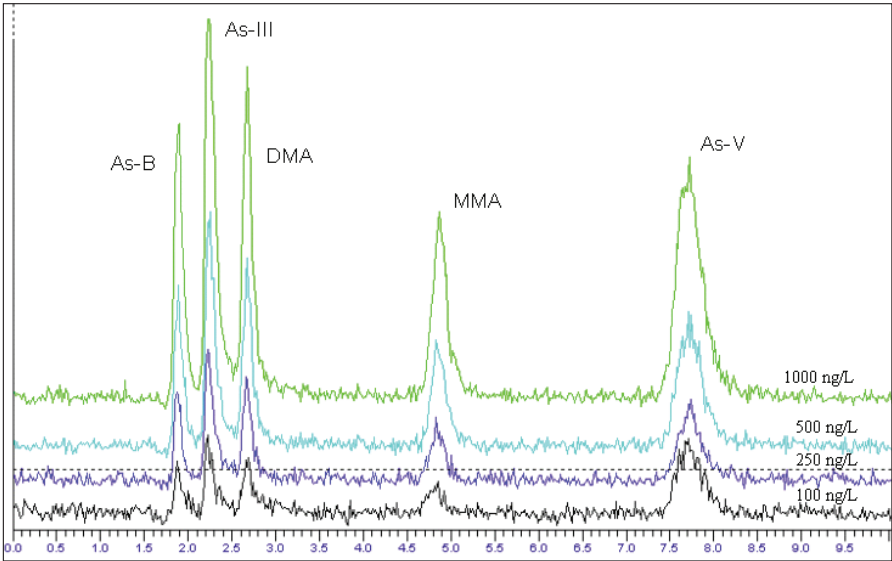


图 8 使用等度条件并监控 AsO^+ (m/z 91) 获得的砷校正标准液（各物质浓度为 100、250、500 和 1000 ng/L）的色谱。

表 6. 志愿者尿液样品的定量结果。

峰	砷物质	尿液中的浓度 ($\mu\text{g/L}$)
1	As-B	0.2
2	As-III	0.3
3	DMA	5.3
4	MMA	1.1
5	As-V	< 0.1

参考文献

1. Larsen, E.H., Pritzl, G., and Hansen, S.H., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 557.

2. Ritsema, R. et. al., *Applied Organometallic Chem.*, 1998, **12**, 591.

3. “Research Plan for Arsenic in Drinking Water”, www.epa.gov/ORD/WebPubs/final/

4. Le, X.C., and Ma, M., *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 1926.

5. Wei, X., Brockhoff-Schwegel, C., and Creed, J.T., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 12.

6. Heitkemper, D., Creed, J.T., and Caruso, J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1989, **4**, 279.

7. Heitkemper, D., Vela, N.P, Stewart, K.R., Westphal, C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 299.

8. Baranov, V.I., and Tanner, S.D., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 1.

珀金埃尔默生命与
分析科学部
710 Bridgeport Avenue
Shelton, CT 06484-4794 USA
电话: (800) 762-4000 或
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



要获取全球办事处的完整列表，请访问 www.perkinelmer.com/lasoffices

©2003 PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer 是珀金埃尔默有限公司的注册商标。SCIEX 和 ELAN 是 MDS Inc. 分部 MDS Sciex 的注册商标。Meinhard 是 Meinhard Glass Products 的注册商标。Supelco 是 Sigma-Aldrich, Inc 的商标。所提及的所有商标均为其各自所有者或所有者的财产。珀金埃尔默保留随时更改此文档的权利。对于编辑、图片或排版错误概不承担任何责任。

006736 KG020301 美国印刷