

利用在线稀释的方法消除 LC-ICP-MS 测试过程形态转化问题

—以尿液中砷形态分析为例

C. Derrick Quarles, Jr, * Patrick Sullivan, M. Paul Field, Scott Smith and Daniel R. Wiederin

摘要

尿液中砷形态分析能为临床和病理学诊断提供重要的支持信息。许多学者通过多种方式研究砷形态转化过程,并试图提升样品保存时间,但没有人将在线稀释作为砷形态分析中样品稳定的解决方案。本工作建立了在线稀释测定尿液中 AsB, DMA, MMA, As III 和 As V 的方法。通过在线稀释标准储备液,建立标准曲线,获得了很好的线性相关性,检出限在 ppt 级别。将样品在线稀释 30、50、100 倍,导致 0.1 到 1.1s 的保留时间变化。同时本工作还对比了人工处理样品和在线稀释方法对于 As III 回收率的影响,人工的处理样品由于 As III 转化为 As V,在 24 内测定 As III 的回收率仅有 61%,而在线稀释的方法 As III 回收率为 101%,As III 到 As V 的转化率为 1%。利用本方法测定了尿液标准物质 NIST SRM 2669,对于五种砷形态测定值与文献参考值具有一致性。

关键词: LC-ICP-MS; PrepFAST; 价态转化; 在线稀释; 砷形态分析; 尿液分析

前言

痕量元素分析对于工业生产、医疗健康和科学研究具有重要意义。元素的总量信息固然重要,但不能提供样品里的元素形态信息。元素的化学形态直接影响了其生物活性和毒性,例如无机砷的毒性远大于有机砷,而有机汞的毒性远大于有机汞。

砷污染来源于地质过程、工业排放和矿山开采。在污染的饮用水或稻米中主要存在的是 As III 和 As V,而这两种形态也是毒性最强的。另外,人体对于砷的摄入还来源于海鲜,海鲜中的砷主要是有机砷,包括一甲基砷(MMA),二甲基砷(MMA)和甜菜碱。有机砷被认为是低生物活性,因此毒性低于无机砷砷(As III ($LD_{50} = 14 \text{ mg kg}^{-1}$) or As V ($LD_{50} = 20 \text{ mg kg}^{-1}$)). 砷暴露下会对人类健康造成不利影响,比如导致呼吸疾病,肺癌和肾脏、肝脏损伤。砷通过尿液排出,因此检测人类尿液可以反映其 2 天内砷的摄入情况。

一般的形态分析是利用形态分离设备和元素检测器的联用来完成。常见的是液相色谱(LC)和电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)联用。在过去的几十年里已有大量的基于 LC-ICP-MS 进行形态分析的报道。大型的商业化实验室配备了专门的仪器进行形态分析,而一些小的实验室只有一两台 ICP-MS 用于所有测试的测试任务,LC 系统需要经常与 ICP-MS 系统进行联用和拆换,这些过程耗时费力,因此渴求一个可以同时胜任总量分析和形态分析两种任务的仪器设备。

形态在样品中的稳定性是形态分析中另一个关注的重点。我们希望目标形态在溶液中最初的状态,不发生任何转化。样品的采集和处理过程是引起价态转化的主要影响因素,比如,改变温度,酸度或添加氧化剂都会使价态发生转变。离子交换色谱是进行砷形态的分析的首选方法,它可以根据不同的电荷数分离不同形态,同时除去可能造成干扰的氯离子。然而,大部分色谱柱的样品容量很小,样品只能以小体积载入或稀释至更低浓度。

本工作评价了注射泵驱动-阴离子交换色谱结合 ICP-MS 进行砷形态分析的方法。PrepFAST IC 是一台可以同时实现形态分析和总量分析的先进的技术设备。通过柱子的重现性、方法的稳健性,精确度、准确度和检出限这几方面对该仪器的砷形态分析能力进行了评价。同时对比了人工稀释和在线稀释样品处理过程对于形态稳定性的影响。

实验

试剂和标准

所有的试剂、稀释液和洗脱液都由超纯水制备，超纯水由 ENM Millipore 超纯过滤系统制备，电阻率为 18 MΩ cm (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA)，磷酸（85%，ICL Performance Products, St. Louis, MO, USA）用来配置 0.4 mM 和 80 mM 的磷酸铵洗脱液 1 和洗脱液 2（洗脱液 1，pH=9.6，洗脱液 2 pH=8.6）。校准标准由甜菜碱(AsB, Chem Services, West Chester, PA, USA)，一甲基砷(DMA, Chem Services)，二甲基砷(MMA, Chem Services)，三价砷(As III, High-Purity Standards, Charleston, SC, USA)和五价砷(As V, High-Purity Standards)的标准储备液配制而成。

样品制备

人尿样品由匿名捐赠获得，收集后过滤，发现该尿液中没有可以检测到的砷，所以以此作为后续实验的本底尿液。向 9.9 mL 本底尿液中添加 0.1 mL 水或砷标准获得加标尿液 10 mL。NIST SRM 2669 按照证书中推荐的方式处理。含有 10 ppb As 的加标尿液用于人工和在线稀释比对研究。在线稀释方法如上所述，人工稀释的最终稀释倍率为 30 倍（样品中含有 0.33 ppb As）

PrepFAST IC

注射泵驱动-离子色谱法由 PrepFAST IC 设备完成 (Elemental Scientific Inc. (ESI) ,Omaha, NE, USA)。PrepFAST IC 配备了形态分析模块 (S400V2)，可以实现梯度洗脱，并且通过转化阀可以控制色谱柱在线或离线状态。S400V2 的四个注射器分别用来调谐、洗脱液 1，洗脱液 2 和柱后内标添加，稀释或衍生。Elemental Scientific 阴离子交换柱用来分离 (50×40 mm) AsB, DMA, MMA, As III 和 As V。这个系统同时配备了 prepFAST M5 (S500V2) 模块，可以在线稀释样品和标准。图 1 简单展示了样品从样品环到稀释样品环再到柱子最后引入到 ICP-MS 的流道示意图。跟这个系统直接连接的是 PolyPro-ST 微流雾化器 (Elemental Scientific) 和石英的旋流雾化器 (Elemental Scientific)。本实验中用到两个 500 μL 的样品环：第一个样品环用来承载从自动进样器引入的原始样品，第二个样品环是用来添加本底尿液以实现基体匹配的校准标准（不用于样品）。然后，稀释的尿液标准或样品通过转换阀被引入色谱柱，该过程需要 7 s（按照稀释倍率为 30 倍的优化后时间），对应的注入样品量约为 23 μL。

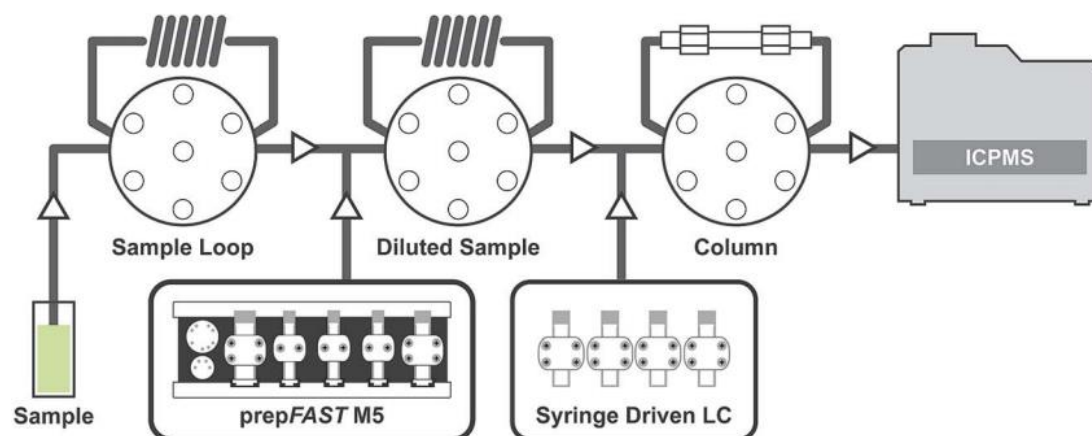


图 1 PrepFAST IC 样品流道示意图

ICP-MS

实验中所用到的 ICP-MS 型号为 Perkin Elmer NexION 350。等离子体气、辅助气和载气流速分别为 18, 1.2 和 1.0 L min⁻¹。等离子体功率 1.6 kW。分析采用实时信号模式, 监测 ⁷⁵As, 积分时间 100 ms, 读取 720 次读数, 一次重复, 总共 6 分钟 (每个数据点 0.5 s)。本方法采用动能歧视 (KED) 模式消除干扰, 氦气流速 2.0 mL min⁻¹, RPq 值为 0.25。氦气流速选择标准是向尿液中添加 Cl 后, 在等离子体中产生的 ArCl 不足以在 75 荷质比处产生明显干扰下的最低流速。样品提升和读数延迟设定时间为 0 s, 冲洗时间 240 s (ICP-MS 软件内设定)。240 s 的冲洗时间可以保证在 ICP-MS 提示引入下一个样品前重启注射器装载洗脱液 1 和洗脱液 2, 完成平衡柱子过程。

结果与讨论

柱子的化学性质

Elemental Scientific 阴离子交换柱的最佳洗脱条件为 0.4 mM 的磷酸铵缓冲溶液 (pH=9.6) 和 80 mM 的磷酸铵缓冲溶液 (pH=8.6), 两者分别作为洗脱液 1 和洗脱液 2。两步梯度洗脱: 第一步在 t=0-200 s 间, 用 100% 的洗脱液 1 以 200 μL min⁻¹ 流速洗脱, 第二步在 t=200-325 s 间, 用 100% 的洗脱液 2 以 300 μL min⁻¹ 流速洗脱。在上述条件下, 五种砷形态都可以在不同时间进行洗脱。表 1 列出了在洗脱液 1 中的各砷形态的 pK_a 值和净电荷数。AsB 因为与固定相没有任何作用, 所以是首先从柱子上被洗脱的。虽然 DMA 与亚砷酸具有相同电荷, 但由于羰基对氧上的负电荷离域作用 (图 2), DMA 先于亚砷酸洗出。MMA 和砷酸在洗脱液 1 的条件下仍吸附在固定相上, 因此提高缓冲液浓度, 并且降低 pH 来达到洗脱效果。两者都具有负 2 价, 但由于甲基对于 MMA 的作用和羟基对于砷酸的作用, 可以使两者分开。羟基作用下使得砷酸的 pK_a 值小于 MMA, 因此 MMA 先洗脱于砷酸。

表 1 不同砷形态的 pK_a 值及在洗脱液 1 的下的净电荷

Arsenic species	Abr.	pK _a (ref. 12)	Net charge@ pH = 9.6
Arsenobetaine	AsB	2.2	0
Dimethylarsinic acid	DMA	6.2	-1
Arsenite	As III	9.2, 12.1, 13.4	-1
Monomethylarsonic acid	MMA	3.6, 8.2	-2
Arsenate	As V	2.3, 6.8, 11.6	-2

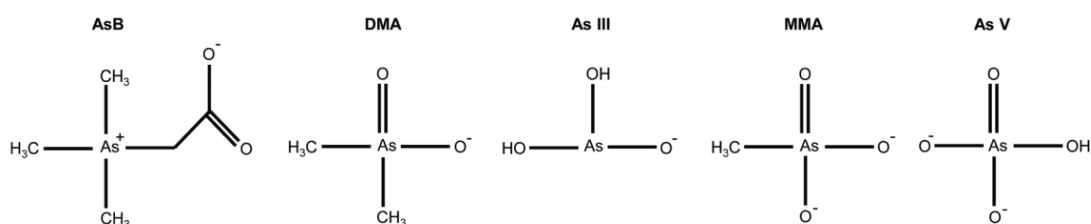


图 2 洗脱液 1 下的不同砷形态的分子结构

柱子的重现性

加标了不同砷形态的尿液(10ppb)以1到100倍的稀释倍率注入离子交换柱。相比30、50、100的稀释倍率,当稀释倍数小于20时,峰形扭曲并且AsB, DMA和As III的保留时间前移(图3),这样不理想的结果,最有可能是由于柱子过载造成的。表2比较了在两个操作条件完全一致下的两个柱子对于30、50、100稀释倍率下的样品溶液中砷形态的分离情况。对于单根柱子,不同稀释倍率的保留时间差异在0.1s到1.1s之间,柱A上变化差异最大的是As III。对于两根不同的柱子,保留时间仅有很小的变化,变化最大的仍是As III。最后,选取30的稀释倍率用于后续实验。

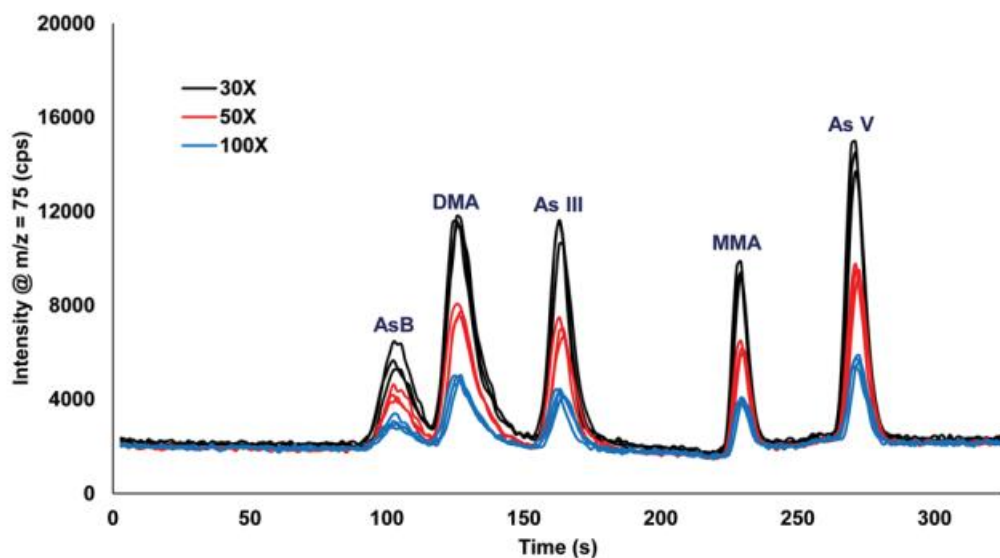


图3 在线稀释(30、50、100倍)的加标尿液(10ppb不同砷形态)的色谱图

表2 不同稀释倍率和不同柱子下的各砷形态的保留时间比较(30、50、100倍)。保留时间取最大峰高处时间,重复测定分两天进行(每天5次)。

	Dilution factor	Retention times (s)				
		AsB	DMA	As III	MMA	As V
Column A	30X	103.3 ± 0.8	125.4 ± 0.8	160.8 ± 2.1	228.9 ± 0.6	270.7 ± 0.8
	50X	103.1 ± 0.5	125.6 ± 0.8	161.9 ± 1.5	229.2 ± 0.7	271.4 ± 0.6
	100X	103.2 ± 0.6	126.0 ± 0.9	162.9 ± 0.9	229.5 ± 0.6	271.6 ± 0.6
	All	103.2 ± 0.1	125.7 ± 0.3	161.9 ± 1.1	229.2 ± 0.3	271.2 ± 0.5
Column B	30X	103.0 ± 0.9	123.8 ± 0.8	156.6 ± 1.4	228.1 ± 0.5	268.9 ± 0.7
	50X	102.5 ± 0.4	124.3 ± 0.3	157.1 ± 0.9	228.5 ± 0.7	269.3 ± 0.6
	100X	102.7 ± 0.6	123.6 ± 0.4	157.5 ± 0.8	228.4 ± 0.7	269.5 ± 0.9
	All	102.7 ± 0.3	123.9 ± 0.4	157.1 ± 0.5	228.3 ± 0.2	269.2 ± 0.3
Column A & B	All	103.0 ± 0.3	124.8 ± 1.0	159.5 ± 2.7	228.8 ± 0.5	270.2 ± 1.2

标准曲线

配置一个含有五种砷形态的标准储备液用于建立标准曲线。PrepFAST具有自动稀释功能,500 μL的样品环用于承载标准储备液,以超纯水在线稀释获得每个校准标准(比如,50ppb的标准储备液,稀释10倍即可得到5ppb的校准标准,然后被引入柱中,稀释2倍即可得25ppb校准标准)。PrepFAST的内标注射器一般被用来定量添加内标,本实验中没有用到,而是在样品注入柱子前将空白尿液(1份尿液:29份样品)加入到500 μL的样品环。Verdon等报道了尿液在pH>7的条件下As III转化为As V。而PrepFAST IC装置,尿液在数秒之内完成加标,紧接着引入柱中,因此减小或消除了可能发生As III转化为As V的反应时间。图4展示了色谱图和利用在线校准功能建立的标准曲线(为了简洁,只展示As V)。

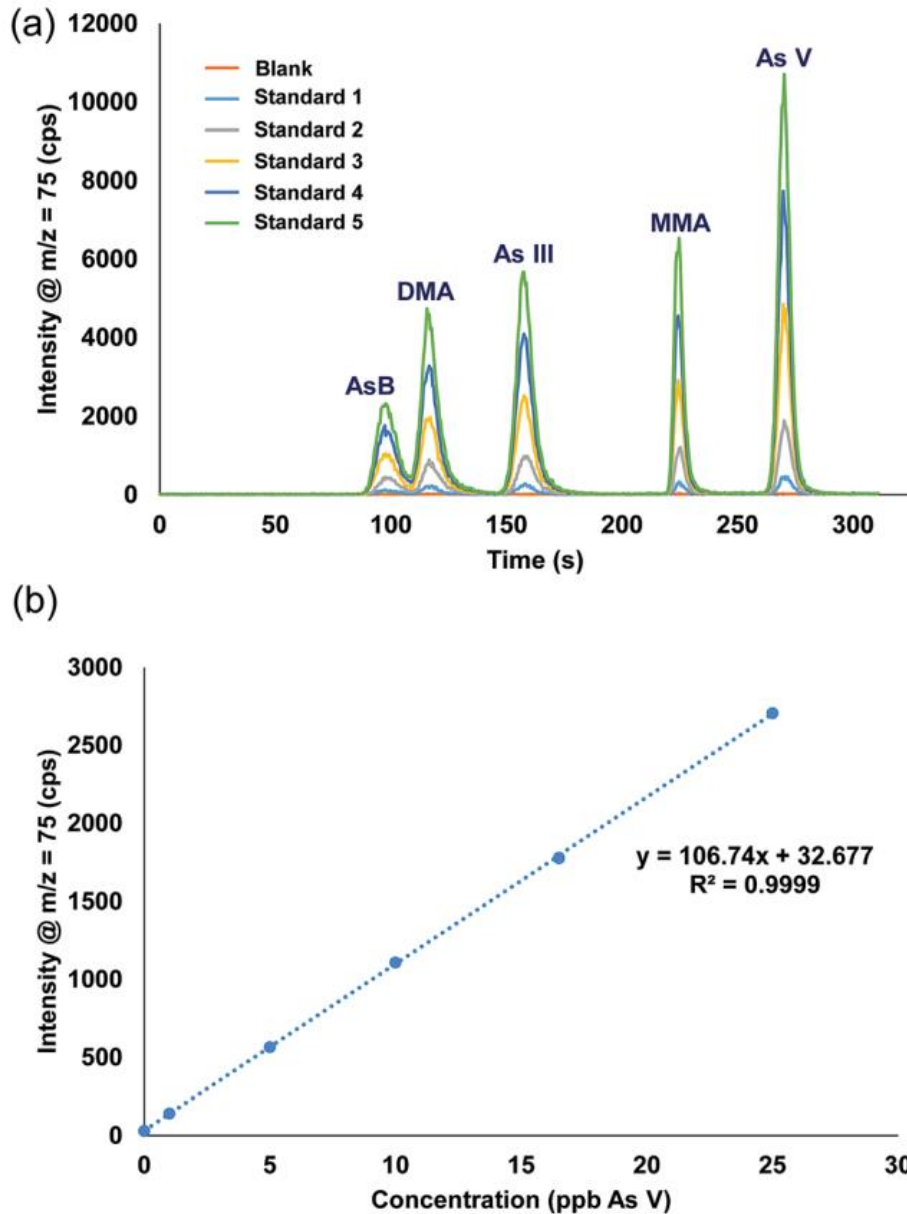


图 4 利用在线自动校准获得的色谱图，校准标准范围从 0ppb（空白尿液）到 27ppb。(b) As V 的校准曲线

人工处理样品与在线稀释样品对比

砷的形态在不同基质中的稳定性被广泛报道(水中,植物提取液中、苹果汁中和尿液中)。在最近的工作中,本实验室发现苹果汁和尿液中的无机砷形态会在处理后发生形态转化。初步试验证明在一些尿液样品试验中发生了不同砷形态转化,很大可能是由于 pH、氧化物和盐分共同作用的结果。因此,向这些匿名的尿液样品(发生了价态转化的)加入 1 ppb 的不同砷的形态。这些尿液样品在 $t=0$ h 和 24 h 分别测定一次,发现其中一个有 40% 的 As III 转化为 As V 的。这个样品被用于后续实验。

为了研究砷形态转化的影响因素,比较了人工处理样品和在线稀释处理样品,探究在注入分析柱前几秒钟内稀释样品是否有利于砷形态稳定。人工处理样品过程包括向尿液中添加 10 ppb AsB、DMA、MMA、As III 或 As V,然后将样品稀释 30 倍。每个样品在第一次分析前稀释,同时,为了更好探究可能发生的任何转变,每个样品只添加一种砷形态。在 24 h 内的 $t=0$ 、1、3、6、12、24 h 分别对同一溶液进行测定(这个溶液是 $t=0$ h 稀释的)。对于在

线稀释处理，加标尿液不需要被稀释，直接放置在自动进样器上，在上述相同的时间段进行测定，不同的是它的稀释过程发生在样品阀中，稀释后紧接着被注入到柱子中。

图 S1†展示了人工稀释的色谱图，AsB、DMA₂、MMA₂、和 As V 在 t=0 h 到 24 h 间没有发生变化。但从图 5 可以发现在 As III 的研究中有明显的 As V 峰出现，证明了存在 As III 转化为 As V。As III 在 t=0 h 是浓度值为 9.9 ppb，在 t=24 h 时浓度降低到 6.1 ppb (表 3)。表 4 证明了在本次研究中 As III 转化为 As V 的百分比。24 h 后 As III 的浓度值下降了 38%，而 21% 的 As III 转化为 As V，大约 17% 的 As III 损失，这个损失量与 Verdon 报道的相似。

图 S2†展示了在线稀释的色谱峰。AsB、DMA₂、MMA₂、As III 和 As V 都没有发生明显的转化现象，但在 24 h 后有 1.3% 的 As III 转化为 As V (表 4)。24 h 内在线稀释方式没有发现无机砷的损失，而人工稀释造成了约 17% 的损失。这些研究表明了对于需要在柱前稀释的样品，在线稀释是更好的解决方案。

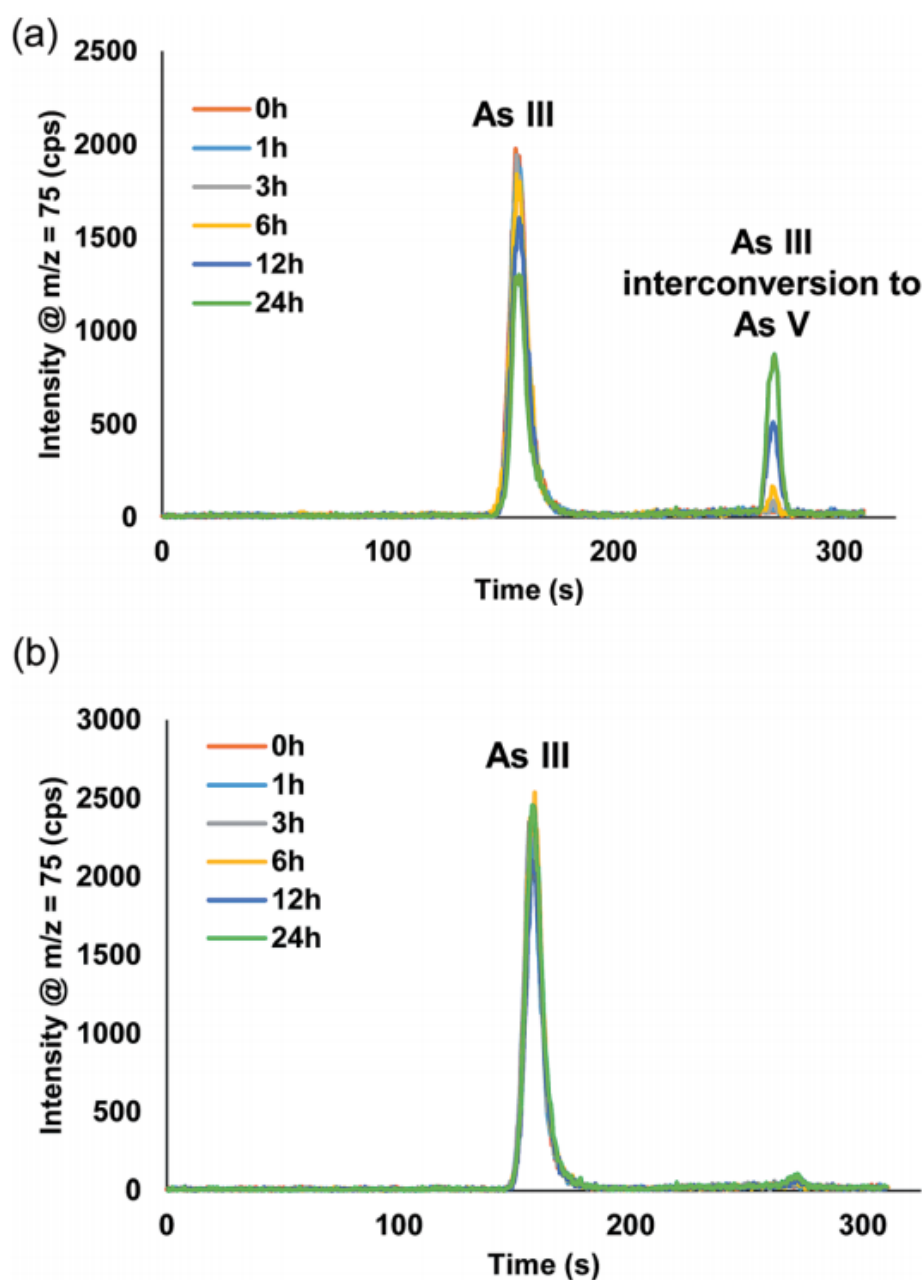


图 5 10 ppb 的 As III 在 0-24 h 内的色谱图 (a) 人工稀释, (b) 在线稀释

表 3 0 h 到 24 h 内人工稀释和在线稀释的样品的测定值

Time (h)	Measured concentration (ppb)				
	AsB	DMA	As III	MMA	As V
Manual dilution					
0	9.5	10.3	9.9	8.8	9.6
1	9.5	7.9	9.5	9.5	9.5
3	9.0	9.1	9.2	9.4	9.4
6	8.7	8.7	9.1	9.3	9.3
12	8.7	9.0	7.8	9.1	9.4
24	9.2	8.9	6.1	9.4	9.4
Inline autodilution					
0	10.9	10.2	9.7	11.0	11.0
1	10.2	10.0	10.0	10.6	10.1
3	9.0	9.1	10.6	9.7	11.3
6	9.5	8.4	10.8	10.6	10.2
12	9.1	8.8	9.2	9.4	10.0
24	9.9	9.8	10.1	9.5	10.4

表 4 0 h 到 24 h 内人工稀释和在线稀释后 As III 加标样品的测定值

Time (h)	10 ppb As III spiked urine samples		
	As III %	As V %	As III + As V
Manual dilution			
0	100.0	0.0	100.0
1	95.7	0.0	95.7
3	92.8	0.2	93.0
6	91.3	1.6	92.9
12	78.5	12.0	90.6
24	61.9	21.4	83.4
Inline autodilution			
0	100.0	0.0	100.0
1	102.8	0.0	102.8
3	105.2	0.0	105.2
6	106.4	0.0	106.4
12	95.1	0.5	95.6
24	102.9	1.3	104.2

^a As III % = (x h As III/0 h As III) × 100, As V % = (x h As V/0 h As III) × 100, As III + As V = As III % + As V %.

分析性能

为了评价该方法的准确性，选取了 NIST SRM 2669 levels I and II（冷冻人尿液中的砷形态）进行分析。表 5 给出了测试结果、NIST 标准值和相关报道中的最大/最小值。所有的 level I 中的测试结果除 MMA 偏差为 17.6%以外，其他的偏差都小于 10%（偏差%=(测定值-参考值)/(参考值×100)），但 MMA 测试结果落在报道值的 1.5-2.55 ppb 区间。levels II 中包含了本研究中不涉及的砷胆碱（AC）和三甲基砷氧化物（TMAO）。由于 TMAO 的共洗脱效应，导致 AsB 的分析结果高于标准值和报道值。除此之外，对于 levels II 的所有测定值与报道值偏差均小于 10%。

五种砷形态的方法检出限和定量限由稀释倍率 30 的条件下计算得到（表 6）。检出限和定量限分别由 3σ 倍和 10σ 倍计算得到（空白尿液测定 10 次）。检出限在 ppt 级别（0.3-1.7 ppt），优于 Carioni 等（LOD=4-25 ppt）和 Leese 等（LODs=3-51 ppt）所报道的。

表 6 方法的检出限和定量限

	AsB	DMA	As III	MMA	As V
LOD (ppt)	1.7	0.7	0.6	1.0	0.3
LOQ (ppt)	5.8	2.5	1.9	3.2	1.0

$$^a \text{LOD} = (3 \times \sigma_{\text{blank}})/m, \text{LOQ} = (10 \times \sigma_{\text{blank}})/m.$$

结论

prepFAST IC 与 ICP-MS 联用被证明是一种可靠的注射泵驱动-液相色谱系统，能准确测定甜菜碱、二甲基砷、亚砷酸、一甲基砷和砷酸。利用在线稀释功能，校准曲线可以由单一的标准储备液实现，并且可以得到很好的线性相关性，该过程节省了分析时间，较少了废物产生（比如塑料管等消耗品）。同时，相比人工稀释样品，在线稀释减小/消除了 As III 加标尿液分析中的价态转化问题。由于样品完成稀释后立刻被注入分析柱，所以整体的回收率也获得提升。该方法分析 NIST SRM 2669 与报道值有良好的一致性，证明了该方法的准确性。