

安捷伦 ICP-MS 联用技术应用文集

应用文集



前言

经过多年发展，元素形态分析作为一种分析方法，已经在分析科学领域有了一席之地。与常规元素分析相比，元素形态分析提供的信息不仅在学术研究方面具有价值，回答了有关生命活动中的重要问题，例如元素在环境中的循环、污染物分解的代谢途径、元素的毒性等，也为食品安全，环境保护提供了权威有力的表征指标。今天的元素形态分析方法，不仅被应用于法规要求的日常检测中，在科研领域也不断发展。

在过去的二十年里，元素形态分析方法的发展在很大程度上受检测系统 ICP-MS 的联用技术推动。作为 ICP-MS 联用技术的领先开发者和践行者，安捷伦在 ICP-MS 联用领域深耕二十年，基于 ICP-MS 与 LC, GC, CE, 以及LA等联用技术，在不同行业开发出大量解决方案，并积累了海量应用文献。此外，安捷伦独特的串接产品 ICP-MS/MS，更将联用技术的检测性能提到了一个新的高度，满足了某些存在特殊干扰或有更高灵敏度要求的特定元素分析的需求。

在有机物检测领域，安捷伦 ICP-MS 产品联用技术的应用范围不断被刷新和扩展。例如：利用 GC-ICP-MS/MS 联用技术对痕量有机磷和有机硫农药进行高灵敏度以及高选择性的检测，HPLC-ICP-MS 联用技术与有机质谱配合研究富硒蛋白鉴定等生物研究领域的应用。

相信在您今后的工作中，不论是在检测还是科研工作方面，安捷伦 ICP-MS 产品及联用技术解决方案均能助您实现成就。



安捷伦应用简报列表

下列表格可协助您按照应用行业、联用技术快速搜索出目标应用简报。

单击标题或出版号可跳转至相应的应用简报。

应用行业	联用技术	标题	出版号
食品	LC-ICP-MS	使用 HPLC-ICP-MS 快速测定精白米中的五种砷形态	5991-5933CHCN
		应用 HPLC-ICP-MS 联用技术进行食品中汞形态分析的优势	5991-0066CHCN
		应用一种新的毛细管 HPLC-ICP-MS 接口进行富硒酵母中含硒蛋白的鉴定	5991-0882CHCN
		LC(IC)-ICP-MS 对 Cr(III) 和 Cr(VI) 的低含量形态分析	5990-9366CHCN
		使用 HPLC-ICP-MS 对婴儿配方奶中的 碘和溴进行同步形态分析	5994-0843zh-cn
	LC-ICP-MS/MS	采用 Agilent 8800 ICP-MS/MS 通过 HPLC-ICP-MS 联机进行苹果汁中砷的形态分析	5991-0622CHCN
		使用 LC-ICP-MS/MS 快速分析葡萄酒中的砷形态	5991-8454ZHCN
	GC-ICP-MS/MS	利用基于 GC-ICP-MS/MS 的磷和硫检测方法测定食品中的农药	5991-6260CHCN
环境	LC-ICP-MS	使用 HPLC-ICP-MS 测定水和土壤中的甲基汞应用	5989-3572CHCN
		采用离子色谱-ICP-MS 测定环境水样中的碘普罗胺	5991-1044CHCN
	GC-ICP-MS	使用 GC-ICP-MS 研究废水萃取物中挥发性卤代有机物的存在、形态及转化	5991-4398CHCN
	IC-ICP-MS	离子色谱 (IC)ICP-MS分析天然水中铬	5889-2481CHCN
生物	LC-ICP-MS	通过毛细管 HPLC-ICP-MS 分析微升体积的植物汁液中锌的形态	5991-2415CHCN
	LC-ICP-MS/MS	采用安捷伦 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪通过 capLC-ICP-MS 联机同时测定多肽和磷酸肽	5991-1461CHCN
材料	LC-ICP-MS	用于玩具材料中三价和六价铬定量分析的 LC-ICP-MS 方法，满足欧洲法规 EN71-3:2012 特定元素迁移的要求	5991-2878CHCN
	LA-ICP-MS	激光烧蚀 (LA)-ICP-MS 在镍合金产品控制中的应用	5989-3254CHCN
石化	GC-ICP-MS	使用 GC-ICP-MS 对气体和液化气体样品中的挥发砷化合物同步进行总砷分析和形态分析	5991-8799ZHCN

安捷伦在环境化学上发表的期刊文章列表

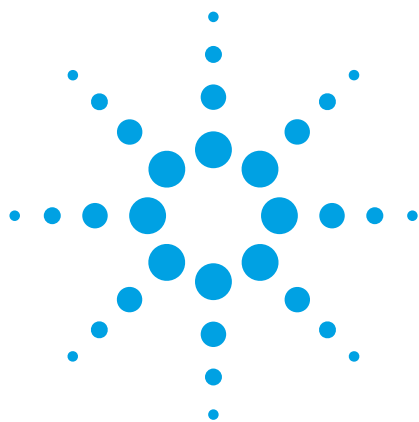
下列表格可协助您按照应用行业、联用技术快速搜索出目标期刊文章。

单击标题可跳转至相应的期刊文章。

应用行业	联用技术	标题	出版号
食品	LC-ICP-MS	高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用快速同时分析水中 5 种砷和 7 种硒	
		微波辅助萃取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用测定生物样品中的汞形态	
环境	LC-ICP-MS	反相色谱-电感耦合等离子体质谱法快速测定大气颗粒物中的无机砷	
		高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定环境水样中的二价汞、甲基汞、乙基汞与苯基汞	
	CE-ICP-MS	毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱法联用 (CE-ICP/MS) 测定八种砷的化合物	
制药	LC-ICP-MS	HPLC-ICP-MS 联用分析中成药中的可溶性砷形态	
材料	LC-ICP-MS	生物液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定玩具中超痕量六价铬	
		润肤霜类化妆品中金属元素的测定及砷形态初探	

安捷伦应用简报列表





使用 HPLC-ICP-MS 快速测定精白米中的五种砷形态

应用简报

食品安全

作者

Bing Yue

中国北京国家食品安全风险评估中心

Juane Song、Ke Xie、Zhao-jun Yun

和 Jian-qiu Mi

安捷伦科技公司，中国北京



前言

众所周知，砷 (As) 是一种有毒元素，可存在于环境和食品中。因此，多个国家和地区对其进行了严格监管。然而，由于砷的生物毒性在很大程度上取决于其化学形态，因此砷形态分析比总砷分析更为重要。例如，如果已知一种海藻样品含有高浓度砷，但主要以 AsB 形式存在，那么食用该样品就没有潜在风险，因为 AsB 是无毒的。在砷的五种主要形态 As(V)、MMA、As(III)、DMA 和 AsB 中，只有两种无机形态 (As(III) 和 As(V)) 是有毒的。这些无机砷还对人体有致癌作用，因此尤其需要对食品中的无机砷进行测定。以大米为主食的国家对大米中的砷特别关注。水稻可从土壤和水中吸收砷。与其他农作物相比，水稻的生长需要大量的水，因此更可能发生砷积聚。

本研究展示了使用配备 Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱的 Agilent 1260 HPLC 系统与 Agilent 7900 ICP-MS 联用对大米中有毒砷形态的快速测定方法。



Agilent Technologies

实验部分

仪器

将包含四元泵、自动进样器和真空脱气机的 Agilent 1260 HPLC 系统与 Agilent 7900 ICP-MS 联用。使用 PFA 管线将色谱柱出口端轻松连接至 ICP-MS 雾化器。在整个分析过程中, Agilent ZORBAX SB-Aq (部件号 880975-914, 4.6 mm 内径 x 250 mm, 5 μ m) 反相色谱柱保持在室温下运行。流动相为 20 mM 柠檬酸和 5 mM 己烷磺酸钠, 用氢氧化钠调节至 pH = 4.3。实验中对 5 μ L 和 100 μ L 两种进样量进行了评估。HPLC 和 ICP-MS 操作参数见表 1。

配备八极杆反应池系统 (ORS⁴) 碰撞/反应池 (CRC) 的 Agilent 7900 ICP-MS 能在多种干扰条件下对砷进行高灵敏度和高特异性分析。一些法规指导中规定必须使用盐酸提取食品样品以模拟胃内条件。而在本研究中, 基于 ArCl 和 CaCl 形成的多原子离子可能对砷的唯一同位素 (m/z 75) 造成质谱干扰。然而, 在氦气模式下运行 7900 ICP-MS ORS⁴ 可有效去除这类基体中多原子对砷的干扰。

表 1. Agilent 1260 HPLC 和 7900 ICP-MS 的运行条件

ICP-MS 参数	
RF 功率	1550 W
取样深度	8 mm
载气	0.6 L/min
尾吹气	0.5 L/min
反应池气体	He, 4 mL/min
KED	3 V
监测的同位素	⁷⁵ As、 ³⁵ Cl
驻留时间	1.0 s/ ⁷⁵ As; 0.1 s/ ³⁵ Cl
HPLC 参数	
流动相	等度洗脱, 20 mM C ₆ H ₈ O ₇ 和 5 mM C ₆ H ₁₃ NaO ₃ S, 用 NaOH 调节至 pH = 4.3
色谱柱	Agilent ZORBAX SB-Aq
流速	1.2 mL/min
温度	室温
进样量	5 μ L 或 100 μ L
运行时间	4 min

化学品与试剂

As(V)、MMA、As(III)、DMA 和 AsB 的标准储备溶液购自 NIMC (中国北京国家计量科学研究院)。高纯柠檬酸 ($\geq 99.5\%$)、己烷磺酸钠 ($\geq 98\%$) 和氢氧化钠 ($\geq 99.99\%$) 购自 Sigma Aldrich 化学品公司 (英国)。使用超纯级 HNO₃ (英国 Sigma Aldrich 公司) 进行样品前处理。

样品前处理

精白米购自中国以下地区: 江苏、福建、辽宁、重庆和江西。

将精白米样品碾碎并用 30 目滤网过筛, 制成米粉。称取 1.00 g 米粉置于聚丙烯离心管 (50 mL) 中。加入 15 mL 0.15 M HNO₃, 然后涡旋混合 30 秒。将盖紧盖的管在室温下放置过夜; 然后置于 90 °C 烘箱中 2.5 小时, 每 30 分钟振荡 30 秒。提取完成后, 将样品置于 4 °C 冰箱中冷却。将冷却的米粉悬浊液以 8000 rpm 离心 15 分钟, 然后用 0.22 μ m 聚醚砜 (PES) 过滤器对上清液进行过滤。在 4 °C 下储存滤液并在 24 小时内完成分析, 以最大限度减少砷的形态间转换。

结果与讨论

分离与定量

制备 6 种不同浓度的校准标准溶液 (含 5 种砷形态): 1 ppb、5 ppb、10 ppb、50 ppb、100 ppb 和 200 ppb, 并进行分析。10 ppb 校准标准溶液 (进样量 5 μ L) 的色谱图显示 5 种砷形态均在 4 分钟内得到良好分离 (图 1)。所得结果用于绘制砷形态校准曲线, 如图 2 所示。

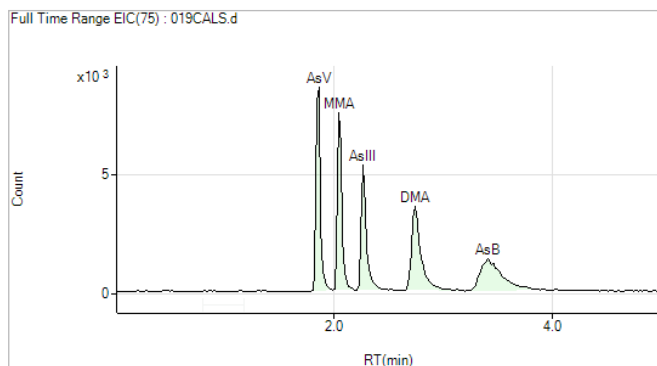


图 1. 10 ppb 砷（以砷元素浓度计）形态混合物标准品的色谱图（进样量 5 μL ）

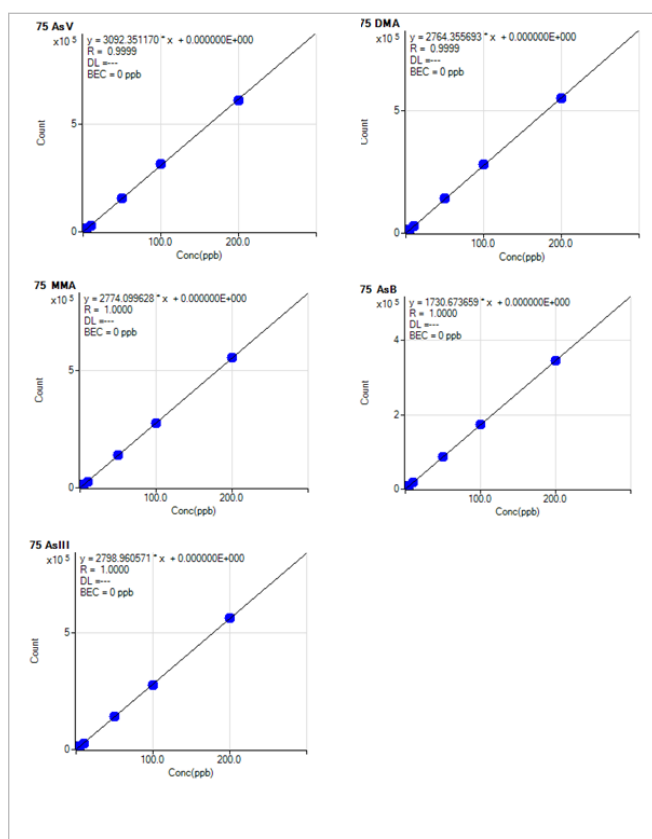


图 2. As(V)、MMA、As(III)、DMA 和 AsB 的校准图显示出良好线性

检测限

每种砷形态的检测限 (DL) 按照等同于标准品色谱图的色谱峰-峰基线噪音 (S/N) 三倍的浓度进行计算。结果汇总于表 2。如表中所示，当进样量为 5 μL 时，5 种砷形态的检测限介于 0.106 - 0.667 ppb 之间，当进样量为 100 μL 时，则介于 0.010 - 0.042 ppb 之间。

表 2. As(V)、MMA、As(III)、DMA 和 AsB 在 5 μL 和 100 μL 进样量下的检测限 (ppb)

进样量 (μL)	As(V)	MMA	As(III)	DMA	AsB
5	0.106	0.121	0.187	0.267	0.667
100	0.010	0.012	0.025	0.028	0.042

图 3 显示 50 ppt 砷形态标准品混合物的色谱图（进样量 100 μL ），展示了此方法的超痕量分析能力。

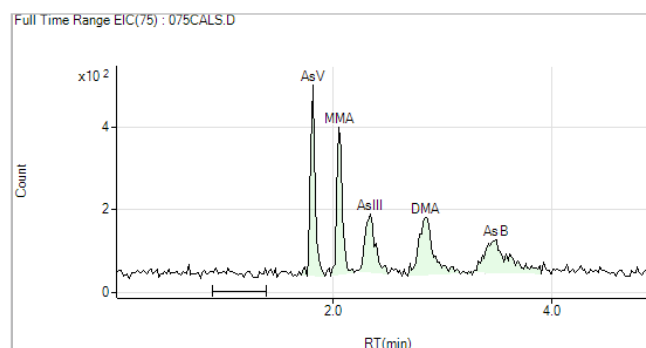


图 3. 50 ppt 砷形态混合物的色谱图（进样量 100 μL ）

有证标准物质 (CRM) 分析

此方法用于分析 NIST 1568a 和 NIST 1568b 2 种米粉有证标准物质。尽管 NIST 1568a 中仅认证了总砷含量 (290 ± 30 ppb)，但许多文献已对 CRM 进行了良好表征。按上述样品前处理方法提取 2 种 CRM，并分析 5 种砷形态。

表 3 和 4 汇总了 2 种 CRM 中无机砷形态、MMA、DMA 和总砷含量的定量结果、认证值或文献中的报道值。本研究中，由无机砷、MMA、DMA 和 AsB 的总和计算得到总砷含量。如表中所示，NIST 1568b 中无机砷 (iAs) 和两种 CRM 中总砷含量的定量结果与认证值一致，且均处于标准偏差内。每种砷形态的定量结果同样与文献中报道的值一致 [1-4]。

表 3. NIST 1568b 米粉中砷形态的定量分析结果^a

	As(V) (µg/kg)	MMA (µg/kg)	As(III) (µg/kg)	DMA (µg/kg)	iAs ^b (µg/kg)	总砷 (µg/kg)
本研究	62.0 ± 5.1	10.6 ± 1.3	36.8 ± 5.8	179 ± 7	98.8 ± 3.6	288.4
认证值		11.6 ± 3.5		180 ± 12	92 ± 10	285±14

^a 数值为 10 次进样的平均值 ± SD, ^b 无机砷: As(III) 和 As(V) 的总和

表 4. 本研究中测定的 NIST 1568a 米粉中砷形态的定量结果与文献值的比较^a。

NIST 1568a 中总砷含量的认证值为 290 ± 30 ppb

	As(V) (µg/kg)	MMA (µg/kg)	As(III) (µg/kg)	DMA (µg/kg)	iAs ^b (µg/kg)	总砷 (µg/kg)
参考文献 [1]	44±2	12±0.8	52±1	173±2	100	281±2
参考文献 [2]	50.3±2.9	14.9±3.9	63.4±3.5	144±4.5	113.7	272.8±9.9
参考文献 [3]	53.7±3.3	14.8±1.8	54.7±1.4	165±8	108.4	288.2
参考文献 [4]		13.6±2.5		168.0±2.2	104.3±4.4	286.1±3.8
本研究	64±5	14±2	57±4	140±4	121	275±4

^a 数值为 10 次进样的平均值 ± SD, ^b 无机砷: As(III) 和 As(V) 的总和

加标样品回收率

本研究测定了 5 种砷形态的加标样品回收率。将 As(V)、MMA、As(III)、DMA 和 AsB 的混合液分别以 1 ppb、5 ppb 和 10 ppb 的浓度加标至三种大米样品萃取物中。平行制备三份溶液（加标样品 1、2 和 3）。如表 5 所示，每份加标溶液中各个浓度下的所有砷形态均获得了良好的回收率，均介于 85% - 110% 之间。

表 5. 加标样品回收率结果（进样量 5 µL）

样品名称	加标浓度	As(V)		MMA		As(III)		DMA		AsB	
		浓度 (ppb)	回收率 (%)	浓度 (ppb)	回收率 (%)	浓度 (ppb)	回收率 (%)	浓度 (ppb)	回收率 (%)	浓度 (ppb)	回收率 (%)
大米 # 1		0.48	—	未检出	—	4.60	—	0.48	—	未检出	—
加标样品 1	1 ppb	1.38	89.2%	1.02	101.5%	5.65	105.6%	1.54	106.1%	1.03	103.2%
加标样品 2		1.43	94.5%	0.96	96.2%	5.51	90.8%	1.42	93.9%	1.07	106.5%
加标样品 3		1.47	98.1%	0.95	94.3%	5.52	92.2%	1.45	97.4%	0.98	98.4%
大米 # 2		1.14	—	未检出	—	5.82	—	1.32	—	未检出	—
加标样品 1	5 ppb	5.52	87.6%	4.96	99.2%	10.98	103.2%	6.23	98.3%	4.82	96.3%
加标样品 2		5.65	90.1%	4.77	95.3%	10.88	101.3%	6.45	102.6%	4.97	99.4%
加标样品 3		5.77	92.5%	4.34	86.7%	11.35	110.6%	6.62	106.1%	5.13	102.6%
大米 # 3		0.28	—	未检出	—	3.44	—	0.73	—	未检出	—
加标样品 1	10 ppb	9.65	93.7%	9.68	96.8%	13.35	99.1%	9.72	89.9%	8.91	89.1%
加标样品 2		9.89	96.1%	10.08	100.8%	12.97	95.3%	10.29	95.6%	9.54	95.4%
加标样品 3		9.53	92.5%	10.62	106.2%	13.10	96.6%	10.65	99.2%	10.48	104.8%

精密度

通过对大米样品重复进样 10 次测定方法的精密度。表 6 列出了所有砷形态的浓度结果，表明 10 次分析均具有出色的重现性。所有砷形态的 %RSD 均小于 4%，无机砷的 %RSD 小于 2%。

表 6. 大米 # 4 的重现性结果（n = 10，进样量 5 µL）

样品	As(V) (µg/kg)	MMA (µg/kg)	As(III) (µg/kg)	DMA (µg/kg)	AsB (µg/kg)	iAs (µg/kg)
大米 # 4-1	56.10	未检出	107.32	22.29	未检出	163.42
大米 # 4-2	55.23	未检出	110.39	24.74	未检出	165.62
大米 # 4-3	56.97	未检出	107.30	23.10	未检出	164.27
大米 # 4-4	57.68	未检出	108.51	24.19	未检出	166.18
大米 # 4-5	57.16	未检出	108.46	23.64	未检出	165.62
大米 # 4-6	56.10	未检出	108.52	24.82	未检出	164.62
大米 # 4-7	56.43	未检出	108.89	23.96	未检出	165.32
大米 # 4-8	57.27	未检出	107.90	22.37	未检出	165.17
大米 # 4-9	56.18	未检出	109.56	22.70	未检出	165.73
大米 # 4-10	56.71	未检出	108.76	23.35	未检出	165.47
平均值	56.58	—	108.56	23.52	—	165.14
% RSD	1.3%	—	0.9%	3.9%	—	0.5%

市售大米样品分析

20 种市售大米样品中的砷浓度测定结果列于表 7 中。如表中所示，20 种大米样品中均含有 As(V)、As(III) 和 DMA。大米样品中的无机砷和 DMA 含量差异很大，可能反映了原水稻生长环境中的砷浓度。虽然各样品中的有毒无机砷浓度不同，但所有大米样品中的无机砷含量均低于食品法典委员会的建议上限 0.2 mg/kg。

表 7. 20 种大米样品中 5 种砷形态的定量结果 (µg/kg)

样品名称	As(V)	MMA	As(III)	DMA	AsB	iAs
大米 # 1	7.27	未检出	68.97	7.16	未检出	76.24
大米 # 2	17.15	未检出	87.23	19.77	未检出	104.38
大米 # 3	4.26	未检出	51.57	10.93	未检出	55.83
大米 # 4	56.10	未检出	107.32	22.29	未检出	163.42
大米 # 5	17.31	未检出	147.2	26.38	未检出	164.73
大米 # 6	12.52	未检出	75.82	8.79	未检出	88.35
大米 # 7	7.14	未检出	53.84	2.67	未检出	68.94
大米 # 8	14.4	未检出	106.14	27.27	未检出	120.54
大米 # 9	14.49	未检出	72.24	29.51	未检出	86.73
大米 # 10	13.73	未检出	101.68	39.41	未检出	115.41
大米 # 11	20.50	未检出	87.04	285.21	未检出	107.55
大米 # 12	22.78	未检出	70.94	160.77	未检出	93.72
大米 # 13	23.74	未检出	122.19	34.53	未检出	145.94
大米 # 14	13.85	未检出	59.79	361.82	未检出	73.64
大米 # 15	16.38	未检出	91.34	83.42	未检出	125.38
大米 # 16	18.48	未检出	110.58	32.25	未检出	129.06
大米 # 17	10.83	未检出	61.56	6.69	未检出	72.39
大米 # 18	16.96	未检出	105.14	209.49	未检出	122.1
大米 # 19	36.04	未检出	97.17	176.12	未检出	133.22
大米 # 20	16.35	未检出	74.55	587.49	未检出	90.9

结论

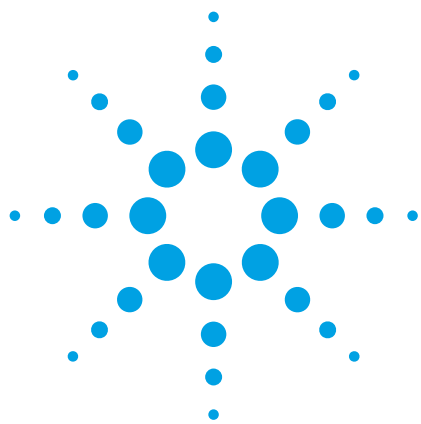
本研究采用 Agilent 1260 Infinity LC 与 Agilent 7900 ICP-MS 联用对精白米中的 5 种砷形态进行了分离。该方法分析速度快，可在四分钟内测定包括毒性相关无机形态 As(III) 和 As(V) 在内的 5 种砷形态，同时具有出色的灵敏度、准确度和精密度。采用在氦气模式下运行的 ORS⁴ 池可去除对砷的任何潜在干扰，例如 ArCl⁺。

在 20 种大米样品中均检测出了不同浓度的无机砷和 DMA。然而，所有样品均未超过食品法典委员会的建议限值 0.2 mg/kg。

本文中列出的经验证方法适用于快速测定大米和其他食品样品中的痕量 As(V)、MMA、As(III)、DMA 和 AsB。

参考文献

1. Narukawa T., Inagaki K., Kuroiwa T., Chiba K, 'The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS' [J], *Talanta* 77, 2008, 427-432
2. Huang J H, Ilgen G, 'Blank value, adsorption, preconcentration, and preservation for arsenic speciation of the environmental water samples' [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 512:1-10.
3. Caruso J.A, B'Hymer C, Heitkemper D.T., 'An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple sample' [J]. *Analyst*, 2001, 126: 136-140.
4. Toni Llorente-Mirandes et al., 'A fully validated method for the determination of arsenic species in rice and infant cereal products', *Pure Appl. Chem.*, 2012, vol. 84, No. 2, 225-238



应用 HPLC-ICP-MS 联用技术进行食品中汞形态分析的优势

应用简报

食品检测

作者

Sébastien Sannac, Yu-Hong Chen,
Raimund Wahlen, Ed McCurdy

Agilent Technologies
Manchester, UK



前言

汞是对生物体具有较强毒性的元素之一。环境中汞的浓度相对较低，但是食物链传递过程会使其浓度增大，最终导致一些食品中汞含量很高。此外，其毒性不仅与其总含量有关，还与其存在形态相关。因此研究食品中汞的存在形态对全面评价其对人体的潜在危害至关重要。

由于汞形态分析需要较低的检出限，因此 GC-ICP-MS 联用是首选方法。然而，随着现代 ICP-MS 系统灵敏度的提高，HPLC 也已开始应用到形态分析中。HPLC 与 ICP-MS 的联用由于其简单快速的技术连接而备受瞩目。此外，与 GC 分析相比，HPLC 可以对萃取的样品溶液直接进样，不需进行各形态的柱前衍生，大大简化了样品前处理，节省了总分析流程所需的成本。

Agilent 7800 ICP-MS
已得到验证



Agilent Technologies

本研究工作中,对采用 HPLC-ICP-MS 联用技术进行食品中汞的形态分析进行了评估。从毒理学角度来说无机汞 (Hg^{2+}) 和一甲基汞是主要的目标分析物,但本工作对可能遇到的乙基汞 (EtHg^+) 和苯基汞 (PhHg^+) 也作了研究。通过有机溶剂的梯度洗脱可将各形态分离开来。Agilent 7700/7800 ICP-MS 系统中采用了独特的快速频率匹配的固态射频 (RF) 发生器,允许在水相和有机相之间轻易转换而不会影响等离子体的稳定性。通过分析认证标准物质 (CRM) 验证了本方法的可靠性。结果表明,安捷伦的 HPLC-ICP-MS 联用系统是进行食品中汞形态分析的完整、全面集成和有效的解决方案。

实验部分

仪器

色谱分离采用 Agilent 1260 HPLC。1260 HPLC 最大允许压力可达 600bar,可使用极小粒径的色谱柱进行快速分离。本工作使用 1.8 μm 粒径的 Zorbax C-18 色谱柱 (安捷伦)。色谱条件见表 1。该分离基于 High 等人的之前的工作进行了优化 [1]。

表 1. Agilent 1260 HPLC 系统操作条件

参数	数值
流速	1 mL/min
进样量	50 μL
流动相:	
A 通道	0.5 g/L L-半胱氨酸
B 通道	0.5 g/L L-半胱氨酸、HCl、H ₂ O, HCl 调节 pH 至 2.3 甲醇

采用 Agilent 7700x ICP-MS 通过汞同位素 ^{201}Hg 测定汞,通过 7700x 可选的第 5 个质量流控制器往载气中加入氧气 (含有 20% 氧气的氩气)。等离子体中加入氧气确保有

机物可直接进入 ICP-MS,而不会造成接口锥的积碳。使用铂锥防止氧气加入造成的氧化,同时使用有机分析常用的内径为 1.0mm 的矩管。ICP-MS 7700x 仪器操作参数见表 2。

表 2. Agilent 7700x ICP-MS 操作参数

参数	数值
射频功率	1600 W
载气流速	0.54 L/min
补偿气流速	0.10 L/min
辅助气 (含20% 氧气和氩气)	0.06 L/min
雾化室温度	-5 °C
采样深度	8.0 mm

7700/7800 ICP-MS 的 Mass Hunter 工作站能同时控制常见的安捷伦 LC 和 GC 模块,可以在 ICP-MS Mass Hunter 软件中直接运行 1260 HPLC 方法和序列 (图1)。该特性不但简化了 HPLC-ICP-MS 的联用操作,还增加了此类分析的安全性,因为双向通讯可保证 HPLC 或 ICP-MS 任何一方停止运行的时候,该软件可自动停止另一方的运行。

样品前处理

选用两个 CRM 标准物质对方法进行了验证。取自金枪鱼肌肉组织的标准物质 BCR-464 (比利时 IRMM) 甲基汞标准值为 $5.12 \pm 0.16 \text{ mg/kg}$ (以汞计),占总汞的 97%。由角鲨肝脏制成的 DoIt-4 标准物质 (加拿大 NRC) 中甲基汞标准值为 $1.33 \pm 0.12 \text{ mg/kg}$ (以汞计),占总汞的 52%。

样品萃取过程参考前人的工作[2]。称取 150 mg 样品,加入 20 ml 流动相 A,在 140 w 条件下微波消解 11 min,取表层上清液过 0.45 μm 滤膜后直接进样 HPLC。

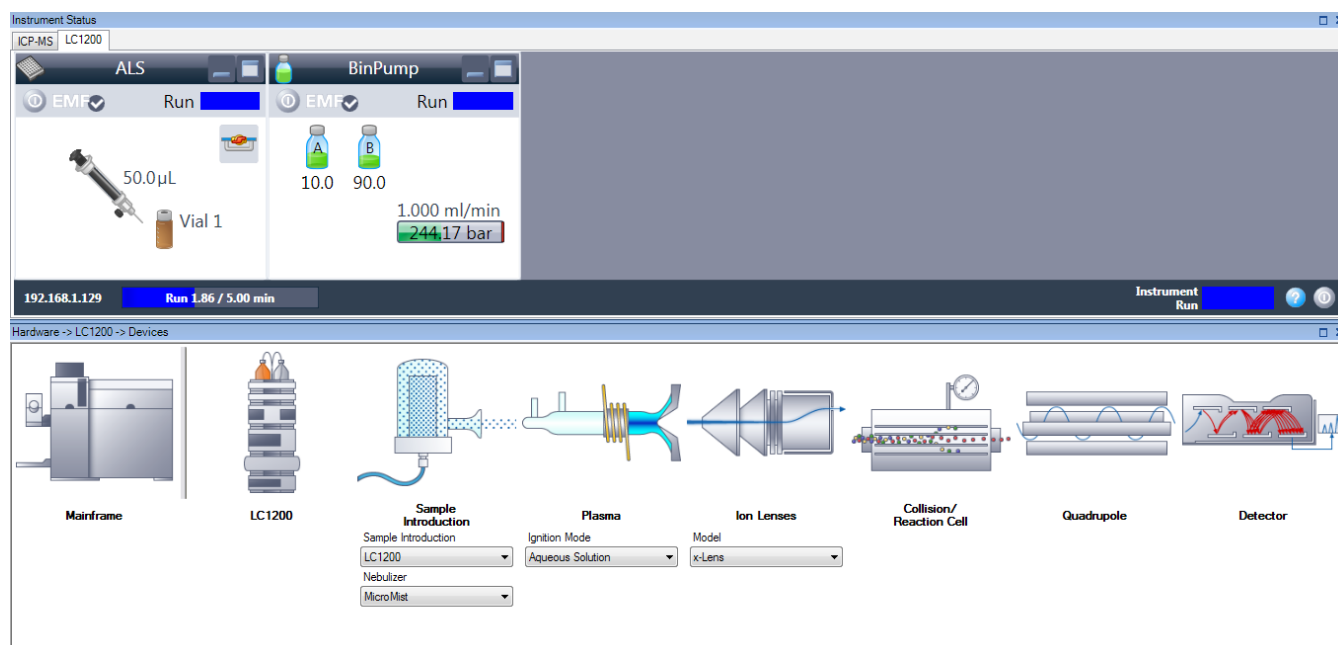


图 1. HPLC-ICP-MS 详细配置的 ICP-MS Mass Hunter 软件屏幕截图

结果和讨论

色谱条件优化

初始的汞形态色谱分离条件采用 L-半胱氨酸 (A 通道) 中加入 2% 甲醇 (B 通道) 的等度条件。色谱分离图如图 2 所示。

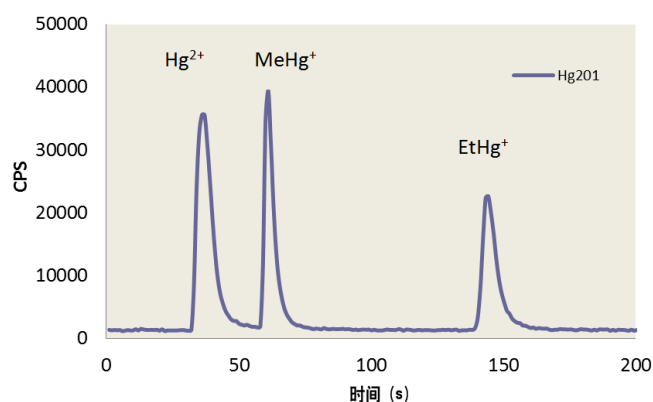


图 2. 等度条件下的汞形态分离

如图所示, 在等度条件下, 三种汞形态在三分钟内即可得到分离, 并且 Hg_2^+ 和 MeHg^+ 在两分钟内即可分离。但是苯基汞却被柱子保留无法检测。因此, 为了增强流动相的洗

脱能力, 试验了梯度洗脱方法。图 3 显示了分离过程中使用的梯度洗脱程序: 初始用 2% 甲醇洗脱, 在 1 min 内升高到 90%。

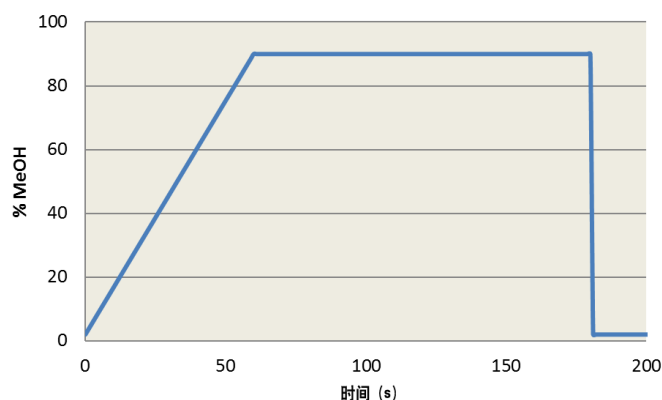


图 3. 分离过程中使用的梯度洗脱程序

通过使用梯度洗脱, 在 3 分钟内四种汞形态可以完全分离出来 (图 4)。此外, 由于 7700/7800 ICP-MS 的等离子体射频发生器具有快速频率匹配能力, 使得甲醇梯度洗脱并没有影响等离子体的稳定性。当分离结束时流动相迅速恢复为 2% 的甲醇, 没有出现等离子体稳定性问题。

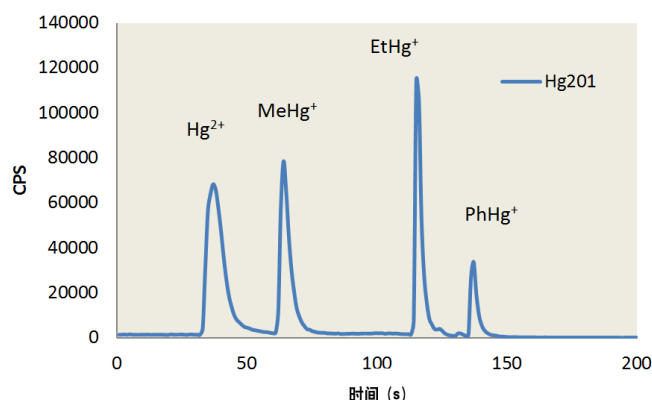


图 4. 梯度条件下的汞形态分离

HPLC-ICP-MS 系统的性能

在测定样品提取物之前，系统经由 4 个汞形态物质混标进行了校准，混标的浓度范围从大约 100 ng/L (ppt) 到 10 µg/L (ppb)。校准曲线如图 5 所示。

校准曲线展现了该分析方法优异的线性度：每种形态物质在其整个浓度范围内都能被完美校准。另外，流动相的背景等效浓度 (BEC) 测定结果如图 5 中所示。所有形态物质的背景等效浓度皆低于 20ng/L。这么低的背景等效浓度值意味着本检测几乎不存在流动相污染，并且也说明了该检测系统具有卓越的低浓度汞检出能力。

样品分析

两种 CRM 提取物通过优化的梯度洗脱方法进行分析。每个 CRM 重复提取三次。空白样品也通过相同的提取过程进行制备，分析结果显示空白中不含有任何可测得的污染。表 3 中所示是样品的测定结果。

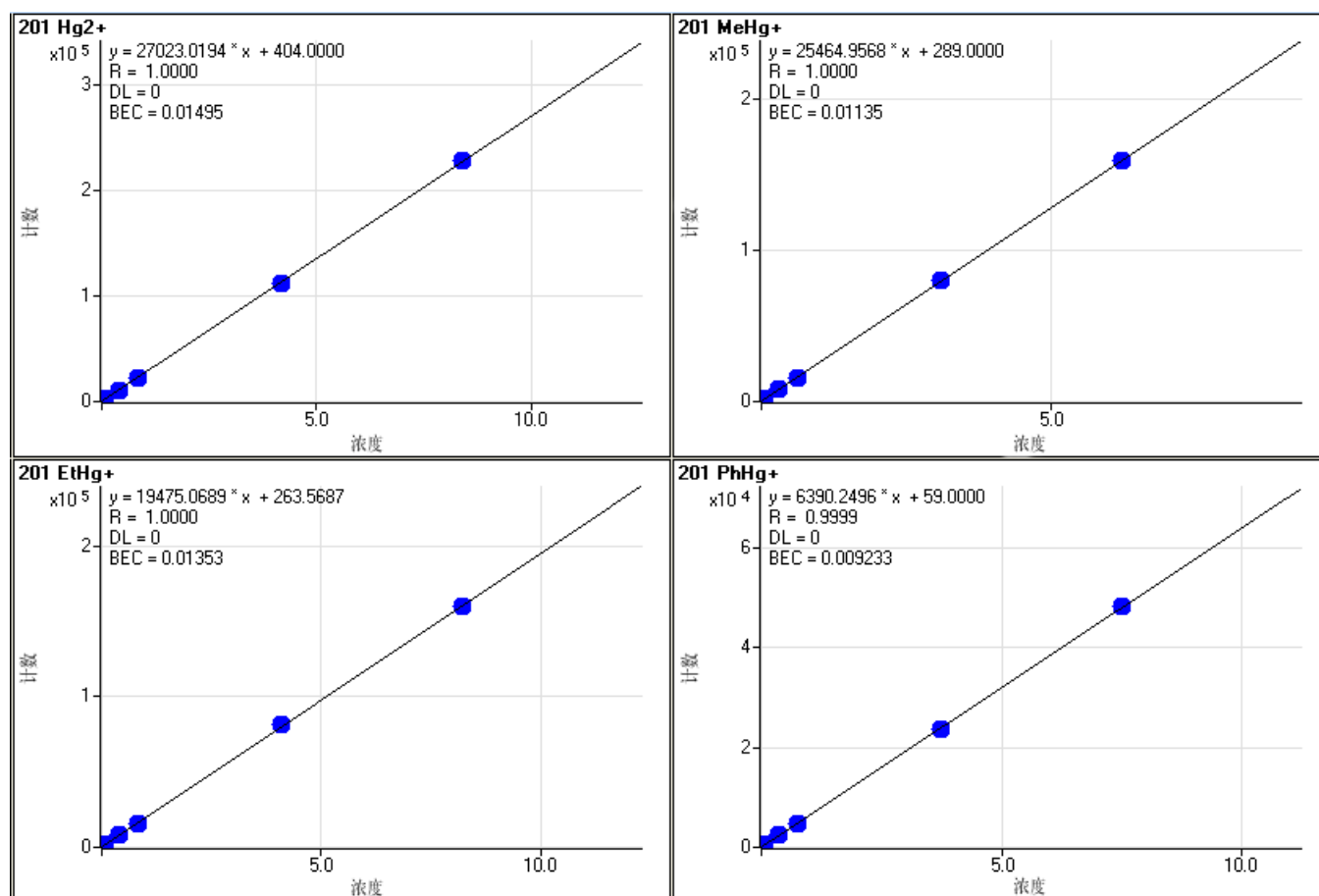


图 5. 4种汞形态分析的校准曲线

表 3. 认证标准物质样品分析结果——浓度以 mg/kg 汞表示

* 未认证浓度

	BCR-464	Dolt-4	
	201 MeHg ⁺	201 Hg ²⁺	201 MeHg ⁺
结果	4.93	1.17	1.34
RSD (%)	8	8	10
认证值	5.12 ± 0.16	(1.25)*	1.33 ± 0.12
回收率 (%)	96	94	101

由于这些样品中的无机汞含量是无参考值的, 因此无法评估实测值的准确度。只有样品中的甲基汞和总汞浓度是有准确参考值的。表 3 中括号里的浓度值是假设 Dolt-4 样品中仅存在二价汞和甲基汞 (样品色谱图中未观察到乙基汞或苯基汞) 的情况下获得的。在这种假设下, Dolt-4 样品中测得的无机汞含量结果与参考值相一致。

两种样品中甲基汞形态的测得值与参考值都非常的一致, 验证了该新方法对食物样品中甲基汞形态分离测定的准确性。尤其是 Dolt-4 标样中的甲基汞含量仅占总汞的 52%, 该甲基汞实测值与标准参考值的高度一致证明了样品制备阶段的提取操作过程充分保持了甲基汞形态, 而未发生转化。

结论

本研究针对食物样品中的汞形态分析开发了快速有效的梯度洗脱 HPLC-ICP-MS 方法。该方法能够在 3 分钟内将样品中的 4 种目标汞形态物质完全分离出来。用标准物质测定对该方法进行了验证, 与标准物质参考值相比较, 汞各形态回收率良好。另外, 若无需分离测定苯基汞, 该方法则可进一步简化为等度分离。

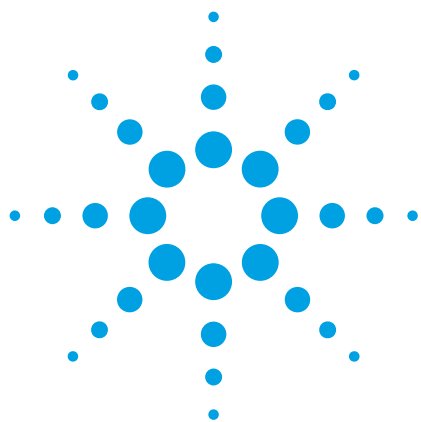
7700/7800 ICP-MS 的射频发生器所具有的快速频率匹配特性允许流动相由水相快速转换为 90% 甲醇, 因此可以在不影响等离子体稳定性的前提下实现汞形态的分离。这种特性为有机溶剂流动相 HPLC 分离和 ICP-MS 联机应用带来了新的可能。

致谢

感谢法国国家计量学实验室 (LNE, Laboratoire National de Métrologie et d'Essais) 的 Guillaume Labarraque 和 Caroline Oster 提供 CRM 提取物。

参考文献

1. Hight, S. C. & Cheng, J. (2006). *Anal. Chim. Acta*. 567:160–172
2. Sannac, S., Labarraque, G., Fiscaro, P., Pannier, F. & Potin Gautier, M. (2009). *Accred. Qual. Assur.* 14:263–267



应用一种新的毛细管 HPLC-ICP-MS 接口进行富硒酵母中含硒蛋白的鉴定

应用简报

食品添加剂

作者

Juliusz Bianga 和 Joanna Szpunar

Laboratoire de Chimie Analytique
Bio-inorganique et Environnement
Pau, France



前言

饮食是人体硒 (Se) 的主要来源，该必需元素的摄入主要取决于食品中的硒含量和所消耗的食物量。由于许多国家农产品中硒的含量很低，所以硒缺乏成为了一个值得注意的问题。人们已经开发了许多提高人体硒摄入的食品添加策略；富硒酵母就是人和动物添加剂最常用的硒来源之一。

评估硒是否充分不仅需要了解硒总含量，而且还要了解各种形态硒的含量。但到目前为止，大部分研究都仅限于针对占总硒 12-20% 左右的水溶性酵母成分。酵母的不溶性硒组分很多尚未被发现，表征这类主要组分的工作非常少，其中 Chassaigne 和 Chéry [1] 曾研究过酵母蛋白的硒特异性激光消融 (LA-) ICP-MS



Agilent Technologies

指纹谱，Tastet 等人 [2] 曾用实验室自制的 nanoHPLC-ICP-MS 接口对富硒多肽进行了硒选择性检测。在常规方法中，通过测定总硒代蛋氨酸含量（含硒蛋白含量）来评估富硒酵母的质量。

本研究提出了一个 ICP-MS 辅助的蛋白质组学方法，用于鉴定富硒酵母中的含硒蛋白。采用双向凝胶电泳分离不溶性含硒蛋白。使用 LA-ICP-MS 找出分离后的含硒蛋白斑点，经切割后，用胰蛋白酶消化；所得多肽通过毛细管 HPLC-ICP-MS 进行分析，然后用电喷雾离子化 (ESI-) MS/MS 进行表征，鉴定出富硒酵母中主要的含硒蛋白——甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶-3。由于胰蛋白酶裂解产物量非常少，所以需要使用毛细管色谱。

实验部分

样品

硒含量为 2.3 mg/g 的市售富硒酵母样品。

样品前处理

采用过去文献 [3] 所述的标准蛋白质组学方法进行蛋白质提取、双向凝胶电泳分离和目标斑点的胰酶裂解。

HPLC-ICP-MS 和 ESI-MS/MS 分析

使用配备毛细管泵（部件号 G1376A）和手动进样阀（100 nL 定量环）的 Agilent 1100 LC。取 8 μ L 胰酶裂解产物加入到 Agilent Zorbax 300 SB-C18 35 x 0.5 mm 5 μ m 多肽卡套柱上，采用流速 20 μ L/min 的等度洗脱，流动相为 2% 乙腈 (ACN) - 0.1% 甲酸 (FA)。使用流动相冲洗样品 2 分钟，然后反冲到 Agilent Zorbax 300SB-C18 150 x 0.3 mm x 3.5 μ m 分离柱上。使用梯度洗脱分离多肽，A：水 + 0.1% FA；B：ACN + 0.1% FA，流速 4 μ L/min。洗脱程序见表 1。

表 1. HPLC 洗脱程序

步骤	洗脱液 (%B)	时间 (分钟)
1	2	0–2
2	2–5	2–5
3	5–25	5–35
4	25–40	35–40
5	40–97	40–45
6	40–97	45–50
7	97–2	50–55

分离柱的出口与 ICP-MS 或 ESI-MS/MS 仪器连接。ICP-MS 操作条件见表 2。

表 2. Agilent 7700x ICP-MS 操作条件

参数	值
光谱仪	
雾化器/雾化室	毛细管 LC 接口套件（部件号 G3680A）
炬管 ID	1 mm
接口锥	铂
等离子体	
RF 功率	1560 W
取样深度	7.5 mm
载气流速	780 mL/min
可选气体 (O ₂) 流速	39 mL/min
透镜	
提取电压 1	3.2 V
提取电压 2	-200 V
反应池	
八极杆偏置电压	-100 V
氮气流速	10 mL/min
动能歧视	7 V

使用 20 ppb Y、Li、Tl、Ce 的 2% 硝酸溶液优化等离子体条件和检测参数。使用高能量氦碰撞池模式排除对硒同位素的多原子干扰。使用各 250 ms 的驻留时间采集 ^{77}Se 、 ^{78}Se 、 ^{80}Se 。

ESI LTQ Orbitrap Velos 质谱仪采用正离子模式；加热器和毛细管温度分别为 50 °C 和 280 °C。采用碰撞诱导解离 (CID) 在 MS SIM 模式下 (15% 标准化碰撞能量) 对 300–1100 m/z 质量范围进行测量；碰撞能量设置为 55% 时 HCD 池中产生子离子。

结果和讨论

蛋白质在凝胶上的分离结果如图 1 所示。选择用于证明 ICP-MS 辅助蛋白质组学方法可行性的斑点用圆圈标出。根据 LA-ICP-MS 测量结果，该蛋白斑点在胶上所有斑点中硒含量最高。

对该目标蛋白斑点进行胰酶裂解后的分离色谱图见图 2。毛细管 HPLC-ICP-MS 检测了 6 个峰 (图 2a)，其中 5 个可以用 ESI Orbitrap MS/MS 进行鉴定。ICP-MS 检测对确定硒肽的保留时间非常重要，可帮助找到质谱图中较小的硒形态，如图 2d 所示。使用基线 20 点标准差的 3 倍计算检测限 (LOD)。将该值与 1 ppm SeMet 信号进行比较。所得到的硒同位素 80 的 LOD (30% ACN, 0.1% FA 条件下) 为 0.2 pg。氨基酸缩写列表见表 3。

鉴定出的硒肽序列见表 4。使用 ICP-MS 检测所得信号与 ESI Orbitrap MS 在已鉴定硒肽对应的 m/z 值的选择离子模式 (图 2c) 所得的保留时间完全匹配。通过所得数据鉴定出了含硒的甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶-3 (表 5)。证明由于蛋白链中的硫-硒取代途径而引入硒，存在于蛋氨酸 (M) 和半胱氨酸 (C) 残基中，后者在酵母样品中首次发现。

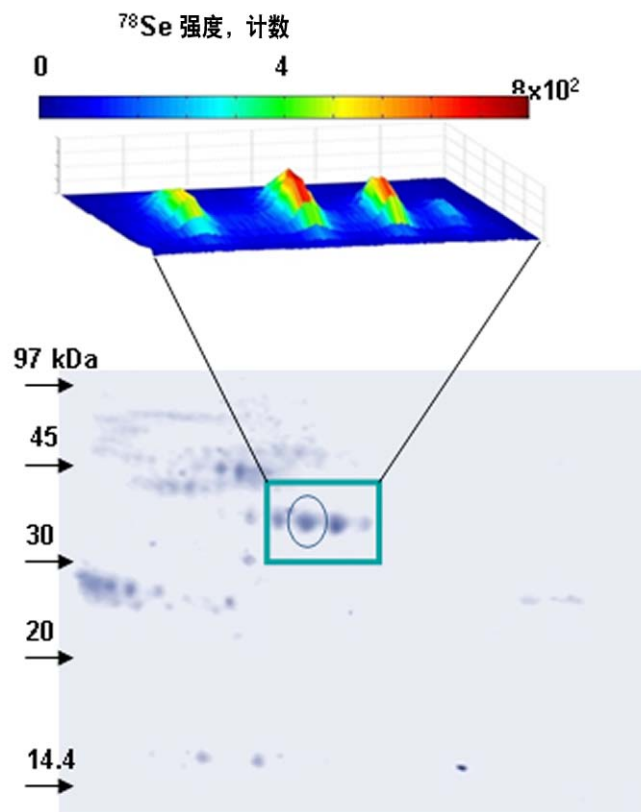


图 1. 含硒酵母蛋白的双向凝胶电泳分离 (凝胶上显示了 LA-ICP-MS 强度图像)

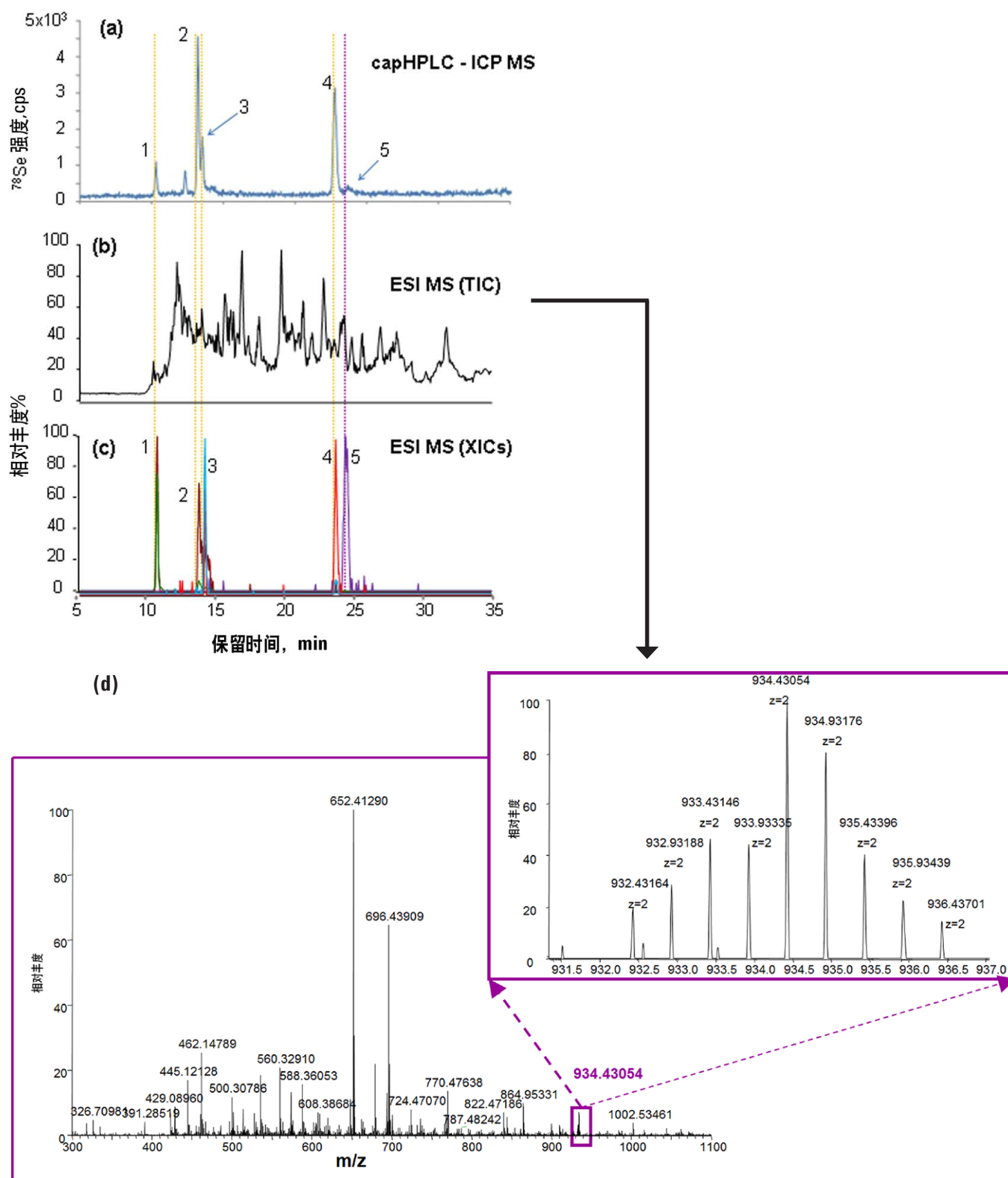


图 2. 图 1 标记的蛋白斑点胰酶裂解物中含硒多肽的毛细管 HPLC 分离。a) ICP-MS 检测, b) ESI Orbitrap MS 检测 (TIC), c) ESI Orbitrap MS 检测 (选择离子色谱), d) (小量) 硒形态的 ESI 质谱图。峰的鉴定结果见表 4

表 3. 氨基酸缩写

名称	缩写
丙氨酸	A
精氨酸	R
天门冬酰胺	N
天门冬氨酸	D
半胱氨酸	C
谷氨酸	E
谷氨酰胺	Q
甘氨酸	G
组氨酸	H
异亮氨酸	I
亮氨酸	L
赖氨酸	K
蛋氨酸	M
苯丙氨酸	F
脯氨酸	P
丝氨酸	S
苏氨酸	T
色氨酸	W
酪氨酸	Y
缬氨酸	V

表 4. 图 1 标记的蛋白斑点胰酶裂解物鉴定出的含硒多肽序列

色谱峰	序列	理论质量	实验质量	Δ 质量
1	LVSeM(ox)R	582.2523	582.2513	-0.00104
2	LVSeMR	566.2573	566.2564	-0.00094
3	LTGSeM(ox)AFR	430.1793	430.1837	0.004395
4	LTGSeMAFR	422.1822	422.1859	0.00369
5	IVSNASCTTNSeCLAPLAK 或 IVSNASSeCTTNCLAPLAK	934.4278	934.4279	0.00013

表 5. 图 1 标记的蛋白斑点中所鉴定的含硒蛋白甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶-3 的序列。粗体标记的多肽对应于色谱图 (图 2) 中检测到的和表 4 所列出的含硒肽

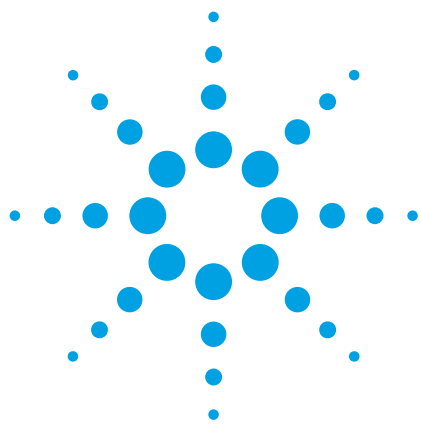
多肽
1 MVRVAINGFG RIGRL VM RIA LSRPNVEVVA LNDPFITNDY AAYMFKYDST
51 HGRYAGEVSH DDKHIVDGG KIATYQERDP ANLPWGSSNV DIAIDSTGVF
101 KELDTAQKHI DAGAKKVIT APSSTAPMFV MGVNEEKYTS DLKIV SNASC
151 TTNCLAPLAK VINDAFGIEE GLMTTVHSLT ATQKTVDGSPS HKDWRGGRTA
201 SGNIIPSSSTG AAKAVGKVLPL ELQGG LTGMA FRVPTVDVSV VDLTVKLNKE
251 TTYDEIKKVV KAAAEGLKLG VLGYTEDAVV SSDFLGDSHS SIFDASAGIQ
301 LSPKFVKLVLS WYDNEYGYST RVVDLVEHVA KA

结论

本文建立了有效的 ICP-MS 辅助蛋白质组学方法, 用于鉴定市售富硒酵母样品不溶性硒组分中的含硒蛋白。采用双向凝胶电泳分离含硒蛋白, 并用胰蛋白酶进行裂解。采用 LA-ICP-MS、毛细管 HPLC-ICP-MS 和 ESI MS/MS 组合方法对裂解产物进行鉴定、分析和表征。由于胰酶裂解产物量非常少, 所以需要使用毛细管色谱。采用本方法鉴定出了甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶-3, 这是富硒酵母中的主要含硒蛋白。证明由于蛋白链中的硫-硒取代途径而引入硒, 存在于蛋氨酸 (M) 和半胱氨酸 (C) 残基中, 后者在酵母样品中首次发现。

参考文献

1. Chassaigne, H., Chery, C. C., Bordin, G., Vanhaecke, F. & Rodriguez, A. R. (2004). *J. Anal. At. Spectrom.*, 19, 85.
2. Tastet, L., Schaumlöffel, D. & Lobinski, R. (2008). *J. Anal. At. Spectrom.*, 23, 309.
3. Von Hage, J. (2008). *Proteomics Sample Preparation*. Wiley-VCH, Weinheim.



LC(IC)-ICP-MS 对 Cr(III) 和 Cr(VI) 的低含量形态分析

应用简报

环境

作者

Mina Tanoshima¹, Tetsushi Sakai¹,
Craig Jones²

1. 安捷伦科技, 东京, 日本

2. 安捷伦科技, 圣克拉拉, 美国



引言

铬 (Cr) 可用于不锈钢和其他合金, 通常作为抗腐蚀镀层用于钢铁和其他金属。铬还广泛地应用于印染、防腐和制革工业。铬一般以两种形式存在: Cr(III), 称为 Cr^{3+} 或者三价铬; Cr(VI), 称为 Cr^{6+} 或者六价铬。两种氧化态的性质差别很大, Cr(III) 是人体必需的微量饮食营养元素, 而 Cr(VI) 是一种常见的致癌物质。因此, 需对多种样品 (包括环境、食品、饮用水、药品和生活用品) 中的铬进行监测和控制。世界各地对饮用水中铬含量的最大限制浓度一般约为 50 到 100 $\mu\text{g/L}$ (ppb) 之间, 但在加利福尼亚的环境保护署 (EPA) 的环境健康风险评估办公室 (OEHHA) 最近发布的公共卫生目标中, 针对饮用水中的 Cr(VI) 提出了“最低风险”控制限, 即饮用水中 Cr(VI) 的浓度为 0.02 $\mu\text{g/L}$ (20 ng/L 或 ppt), 比之前的控制限低了 1000 倍。



Agilent Technologies

预计美国环境保护署也会采取类似措施。例如，根据欧盟对有害物质（RoHS）的限制条例，即对电器、电子产品中某些有害物质（包括 Cr(VI)）进行控制，美国 EPA 对废弃物中的 Cr(VI) 也进行了管制。在众多工业领域中，Cr(VI) 的职业照射已被严格控制。最近的研究也显示了与铬慢性接触时摄入低含量 Cr(VI) 的健康风险问题。因此，有必要建立一个常规的、高灵敏度的铬形态分析方法，以测定各种不同类型样品中的 Cr(III) 和 Cr(VI)。以下介绍的是采用带有碰撞/反应池技术在氦池模式操作的 HPLC-ICP-MS 方法。

实验

安捷伦 7700 系列 ICP-MS 配有八极杆反应池系统（ORS³）碰撞/反应池（CRC），可以在多种干扰存在下为铬（Cr）提供灵敏特效的分析。这些干扰来自碳（ArC）和氯化物（ClO），能够影响铬的两个主要同位素，即 ⁵²Cr 和 ⁵³Cr。ORS³ 在氦模式操作时，可以消除基体引起的多原子对这两个同位素的干扰，使这两个同位素的测量结果经得起内部的比较验证。不过，在直接测定 Cr(VI) 之前必须先将 Cr(III) 分离，一般是在 ICP-MS 测量之前，先采用阴离子交换色谱法（LC）或离子色谱法（LC）。LC/IC-ICP-MS 是一种常规的已得到确认的形态分析技术。单独测定 Cr(VI) 很简单，但是测定 Cr 的两种形态却比较复杂，因为在溶液中 Cr(III) 是阳离子而 Cr(VI) 却是阴离子。在实际样品分析中，检测也因样品中所含的矿物元素在色谱柱上与 Cr 竞争结合位点而受到影响，导致回收率低、保留时间改变。一个最新的研究方法克服了这些挑战。

HPLC 条件

本研究工作采用的安捷伦 1200 高效液相色谱（HPLC）配备一个二元泵、自动进样器和真空脱气装置。液相色谱与安捷伦的液相色谱生物兼容套具（零件编号 5065-9972）相匹配，该系统用惰性材料比如 PEEK 代替了液相色谱样品路径中的金属部件。用安捷伦的液相色谱联接套具将 HPLC 和 ICP-MS 联机。阴离子交换色谱柱（4.6 mm 内径 x 30 mm 多烷基甲基丙烯酸酯树脂）用于分离。所有实验中，色谱柱都是在环境温度下运行。详细的操作条件见表 1。

ICP-MS 条件

安捷伦 7700x ICP-MS 用于 Cr 的检测，仪器操作条件列于表 1。ORS³ 在氦模式下操作，用以消除 ArC 和 ClOH 对 Cr 的主同位素 m/z 52 和次同位素 m/z 53 基于基体的干扰。为了确认主同位素测量结果的可靠性，除了测量主同位素 ⁵²Cr，还测量了 ⁵³Cr。氦模式是通用型（对所有多原子种类有效）检测模式，因此对于两种 Cr 同位素都是用相同的氦模式条件。

表 1. HPLC 和 ICP-MS 的操作条件

HPLC 参数	
色谱柱	安捷伦阴离子交换柱，部件号 G3268-80001 4.6 mm x 30 mm
流动相	5 mM EDTA (2Na)* – 5 mM NaH ₂ PO ₄ /15 mM Na ₂ SO ₄ , pH = 7.0 (用 NaOH 调节)
流速	1.2 mL/min
温度	Ambient
注入体积	100 µL
ICP-MS 参数	
RF 功率	1550 W
采样深度	8 mm
载气	1.05 L/min
停留时间	0.5 s/isotope
监测同位素	⁵² Cr, ⁵³ Cr
池气体	He, 4 mL/min

* 本工作采用高纯 Na-EDTA（Dojindo 实验室，日本），没有遇到痕量金属污染问题

结果和讨论

在上述条件下， $^{52}\text{Cr(III)}$ 和 $^{52}\text{Cr(VI)}$ 的检出限 (DL) 小于 200 ng/L。检出限以峰-峰信噪比的三倍计算。进样量从 5 μL 到 100 μL 获得的检出限列于表 2。

饮用水分析

此方法应用于加标和未加标矿泉水中 Cr(III) 和 Cr(VI) 的形态分析。检测了三个样品，一个日本矿泉水（水样 A）、两个法国矿泉水（水样 B 和水样 C）。选择的饮用水覆盖了一般矿泉水成份范围。水样 C 矿化度很高（Ca 含量高于 450 ppm，硫酸盐含量高于 1000 ppm）。这些水样的主要元素组成列于表 3。

图 1 为矿泉水 A 的色谱图：分别为未加标与加标 10 $\mu\text{g/L}$ Cr(III) 和 Cr(VI) 的色谱图。表 4 列出了对三种矿泉水长时间分析的结果（8 小时，每个样品 $n=30$ ）。两个 Cr 同位素 ppb 级加标所获得的极好的长期稳定性和准确回收率证明了该最佳化方法的有效性，尤其高基体水样 C 更加让人印象深刻。Cr(VI) 和 Cr(III) 峰面积和浓度的 RSD 均小于 2.5%，证明了该方法对于常规实验室应用具有很好的稳定性和再现性。而且，加入 EDTA 所形成的 Cr(III)-EDTA，避免了 Cr(III) 和 Cr(VI) 之间的相互转化，证明了两形态良好的加标回收率。

表 3. 三种不同矿泉水的主要元素组成

元素	水样 A (ppm)	水样 B (ppm)	水样 C (ppm)
Na	6.5	11.6	9.4
Ca	9.7	11.5	468
Mg	1.5	8	74.5
K	2.8	6.2	2.8
硫酸盐	-	-	1121

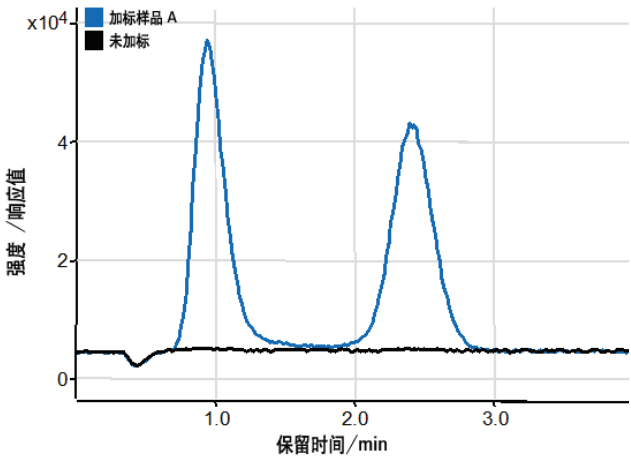


图 1. 矿泉水 A——未加标（黑色）和加标 10 $\mu\text{g/L}$ Cr 形态（蓝色）。Cr(III) 大约在 1 分钟被洗脱，Cr(VI) 大约在 2.5 分钟被洗脱

表 4. 10 $\mu\text{g/L}$ 加标矿泉水的浓度和稳定性试验（8 小时， $n=30$ ）

样品		$^{52}\text{Cr(III)-EDTA}$		$^{52}\text{Cr(VI)}$	
		面积	浓度 $\mu\text{g/L}$	面积	浓度 $\mu\text{g/L}$
水样 A	平均值	906410	10.4	913019	10.3
	%RSD	1.4	1.4	2.1	2.1
水样 B	平均值	933560	10.7	920154	10.3
	%RSD	1.0	1.0	2.3	2.3
水样 C	平均值	900775	10.3	879234	9.9
	%RSD	0.8	0.8	1.4	1.4

表 2. 不同注入体积时的 Cr 形态的检出限

注入体积 (μL)	峰高/响应值		噪音	面积/响应值		DL ($\mu\text{g/L}$)	
	$^{52}\text{Cr(III)}$	$^{52}\text{Cr(VI)}$		$^{52}\text{Cr(III)}$	$^{52}\text{Cr(VI)}$	$^{52}\text{Cr(III)}$	$^{52}\text{Cr(VI)}$
5	32621	24233	204	514586	503778	1.88	2.53
20	130764	97934	314	2101007	2007572	0.72	0.96
50	323593	241948	300	5154321	4970771	0.28	0.37
100	632808	475244	274	10204281	9796463	0.13	0.17

超痕量级 Cr(VI) 的定量

虽然已建立的新方法可以测定饮用水中 Cr(III) 和 Cr(VI) 含量，但美国加利福尼亚州最近（2009）新提出的“公共健康目标”中，规定饮用水中 Cr(VI) 含量不得高于 0.02 µg/L。为了满足这个目标，针对 Cr(VI) 的检测对方法进行了优化，使其具有更高的灵敏度和选择性。方法仍采用相同的色谱柱进行分离，但是增大了进样体积同时降低了流动相中 EDTA (2Na) 浓度。由于这些改动，因为大体积进样产生的水浴干扰使得 Cr(III) 无法定量。

采用大体积进样和改变流动相的方法，Cr(VI) 检出限降低到几个 ng/L (ppt)。如图 2 对 50 ng/L 标准溶液和三个加利福尼亚水样的色谱图所示，尽管饮用水中存在高浓度的阴离子，但是没有出现峰形或保留时间的变化。图 3 Cr(VI) 的校准曲线线性优于 0.9995（校准范围 0.05-1.00 µg/L）。Cr(VI) 检出限为 0.008 µg/L（峰-峰信噪比的三倍）。

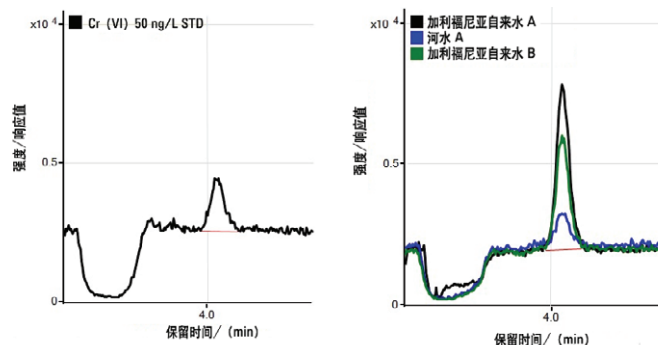


图 2. 50 ng/L Cr(VI) 标准溶液色谱图（左）和加利福尼亚州的三个不同水样（未加标）色谱图（右）

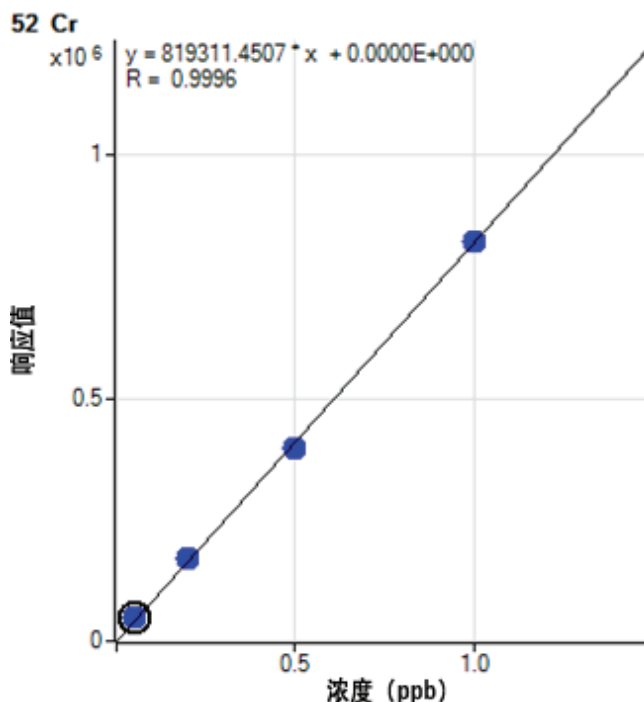
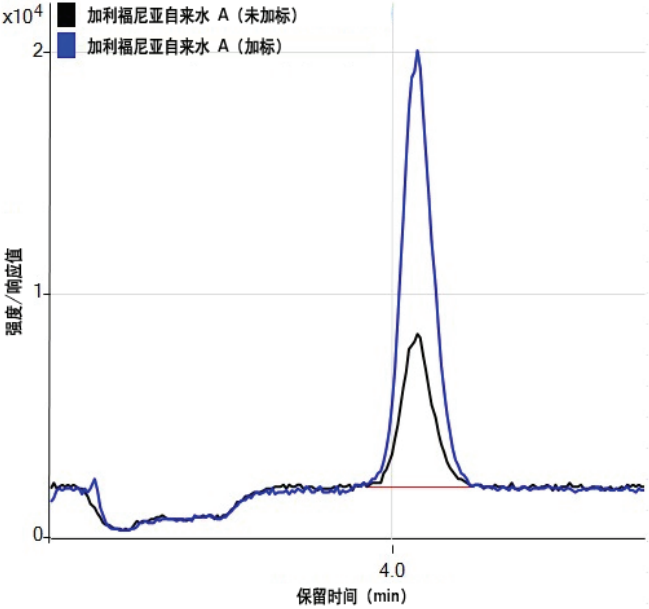


图 3. 利用改进方法测定 Cr(VI) 的校准曲线

表 5 列出了加利福尼亚州的两个饮用水（自来水 A 和 B）和一个河水（河水 A）样品的的分析结果和加标回收率。所有三个样品的 Cr(VI) 实测浓度超出了加利福尼亚提出的 0.02 ppb。自来水 A（未加标和加入 0.5 µg/L Cr(VI)）的色谱图如图 4 所示。

表 5. 三个不同水样的分析结果和加标回收率数据 (0.5 $\mu\text{g/L}$ Cr(VI))，单位: $\mu\text{g/L}$

	自来水 A			自来水 B			自来水 C		
	未加标	加标	回收率 (%)	未加标	加标	回收率 (%)	未加标	加标	回收率 (%)
1	0.1840	0.6335	90.58	0.1203	0.6198	99.12	0.0411	0.5231	96.27
2	0.1772	0.6470	93.28	0.1281	0.6222	99.60	0.0423	0.5282	97.30
平均值	0.1806	0.6403	91.93	0.1242	0.6210	99.36	0.0417	0.5256	96.79

图 4. 加标 (0.5 $\mu\text{g/L}$) 和未加标自来水 A Cr(VI) 的色谱图

结论

本文论证了一个能够准确灵敏测定高矿化度水样中铬形态的分析方法，将阳离子形式的 Cr(III) 与 EDTA 络合转化成阴离子，采用阴离子交换色谱法分离后测定。分析速度快（仅需 3 分钟），能够测定浓度低于 200 ng/L 的两种铬形态。采用调整流动相组成和增大进样体积的改进方法，可以进一步提高 Cr(VI) 的灵敏度。改进后的方法使得 Cr(VI) 的检出限降低到 0.008 $\mu\text{g/L}$ (8ppt)，但是不能同时测定 Cr(III)。改进后的检出限远低于加利福尼亚州提出的 0.02 $\mu\text{g/L}$ 公共健康目标。

使用 HPLC-ICP-MS 对婴儿配方奶中的碘和溴进行同步形态分析

在 6.5 分钟内测定四种卤素形态



作者

Lawrence Pacquette
Abbott Nutrition,
Columbus, Ohio, USA

Jenny Nelson, Shuofei
Dong, Michiko Yamanaka
安捷伦科技有限公司

前言

婴儿和幼儿在早期发育过程中通常依赖婴儿配方奶来满足其营养需求，因此监管机构对这些产品的安全性和营养价值设定了高标准。大多数国家/地区规定了婴儿配方奶中必需矿物质的最低含量（包括碘），以满足婴儿的营养需求。如果碘摄入过少或过多，婴幼儿就容易发生甲状腺问题^[1, 2]。

由牛奶或羊奶蛋白质或蛋白质水解产物制成的婴儿配方奶中碘的监管值与总碘有关（表 1）。但碘的生物利用度取决于存在于样品中的化学形态。碘化物 (I^-) 比碘酸盐 (IO_3^-) 的生物利用度更高，这一现象会影响食品中碘的营养状态。如需了解关于食品毒性和健康功效的更多信息，就要从碘 (I_2) 和碘有机形态中分离出碘化物和碘酸盐的元素形态。

溴的毒性取决于其形态。溴化物 (Br^-) 毒性低于溴酸盐 (BrO_3^-)，后者可能对人类有致癌作用^[3]。

表 1. 婴儿配方奶中碘的监管浓度

监管机构	最低浓度 $\mu\text{g}/100 \text{ kcal}$	最高浓度 $\mu\text{g}/100 \text{ kcal}$	参考文献
US FDA	5	75	[4]
欧盟	15	29	[5]
中国	10.5	58.6	[6]

本研究将 HPLC 与串联四极杆 ICP-MS (ICP-MS/MS) 联用测定四种市售婴儿配方奶中的四种形态：碘化物 (I^-)、碘酸盐 (IO_3^-)、溴化物 (Br^-) 和溴酸盐 (BrO_3^-)。HPLC-ICP-MS 方法是一种成熟的分析技术，已应用于各种食品基质（包括婴儿配方奶）中碘的形态分析^[7, 8]。本应用也可以使用单四极杆 ICP-MS（例如 Agilent 7800 或 7900 ICP-MS）作为元素检测器。

实验部分

试剂和标样

由 1000 ppm 储备液配制溴化物、溴酸盐、碘化物和碘酸盐标样。溴离子标准溶液购自东京 Kanto Chemical Co., Inc.。将 NaBrO_3 (Wako Pure Chemical Corporation, Osaka) 溶于水中，制得 1000 ppm 溴酸盐储备液。将 KI 和 KIO_3 (Wako Pure Chemical Corporation, Osaka) 分别溶解，制得 1000 ppm 碘化物和碘酸盐储备液。

标准参比物质和样品

采用标准参比物质 (SRM) NIST 1849a - 婴儿/成人营养配方奶 I (Gaithersburg, MD, USA) 验证测定总碘的分析方法。

四种市售婴儿配方奶中的两种购自美国加利福尼亚州伯克利，另外两种购自中国北京。所有四个样品均为粉末形态。

硝酸 (HNO_3 , $\geq 65\%$, Sigma-Aldrich) 用于微波消解和标样/样品前处理。所有稀释均用 18.2 M Ω ·cm (Millipore, Bedford, MA, USA) 去离子水 (DIW)。

样品前处理

对于总溴测定，对约 0.2 g NIST 1849a 和每个样品进行称重，并按照表 2 中概述的程序通过微波消解 (Mars 6, CEM) 在 5 mL HNO_3 中消解。然后用 DIW 将完全消解的样品稀释至 40 mL。所有样品和 SRM 平行配制三份。

表 2. 微波消解程序

阶段	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	程序升温时间 (min)	保持时间 (min)
1	30	5	30
2	210	20	30
3	30	30	-

对于 I 与 Br 形态和总碘测定，称量每种样品 0.2 g 左右于 20 mL DIW 中，然后置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 1 小时。然后使用针头过滤器 (0.45 μm 孔径) 过滤样品。将约 1 mL 过滤后的溶液置于 1 mL 聚丙烯 HPLC 样品瓶 (安捷伦部件号 5182-0567) 中，等待分析。

仪器

使用安捷伦液相色谱连接工具包 (部件号 G1833-65200) 将包含四元泵的 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统与 Agilent 8900 串联四极杆 ICP-MS (ICP-MS/MS) 联用。用于饮用水的安捷伦铬形态分析色谱柱 (部件号 G3268-80001) 阴离子交换色谱柱 (4.6 mm 内径 \times 30 mm 聚羟基甲基丙烯酸酯基体树脂) 用于分离不同碘和溴形态。运行条件和流动相的详细信息如表 3 所示。

Agilent 8900 ICP-MS/MS (高级应用配置, #100) 配有标准样品引入系统，包括玻璃同心雾化器、石英双通道雾化室、2.5 mm 中心管石英炬管和 Ni 接口锥。ICP-MS/MS 使用氦气作为反应池气体，在单四极杆 (SQ) 模式下运行，因此也可以使用 Agilent 7800 或 7900 ICP-MS 进行此应用。

表 3. HPLC 和 ICP-MS/MS 仪器运行条件

HPLC 参数	设置
流动相	5.0 mmol/L NaH ₂ PO ₄ /15.0 mmol/L Na ₂ SO ₄ /5.0 mmol/L EDTA (pH 7.0)
色谱柱	安捷伦 Cr 形态分析色谱柱 (部件号 G3268-80001)
流动相流速 (mL/min)	1.0
进样量 (μL)	100
温度	室温
分析时间 (min)	8
ICP-MS/MS 参数	设置
扫描模式	单四极杆模式
采样深度 (mm)	8.0
雾化器气体流速 (L/min)	1.10
雾化室温度 (°C)	2
提取电压 1 (V)	0.0
提取电压 2 (V)	-250
八极杆偏置电压 (V)	-20.0
氦池气体流速 (mL/min)	2.0
轴向加速 (V)	1.0
动能歧视电压 (V)	3.0
质量数 (m/z)	Br 为 79, I 为 127
积分时间 (s/质量数)	0.5

结果与讨论

校准

通过分析 0–100 ppb 的碘化物、碘酸盐、溴化物和溴酸盐溶液进行校准。图 1 显示校准曲线在校准范围内具有出色线性，校准线性等于或优于 0.9999。

5 ppb 碘和溴标样的色谱图如图 2 所示。在同一次分析中，IO₃⁻、I⁻、BrO₃⁻ 和 Br⁻ 所有四种形态在 6.5 分钟内即可实现基线分离。

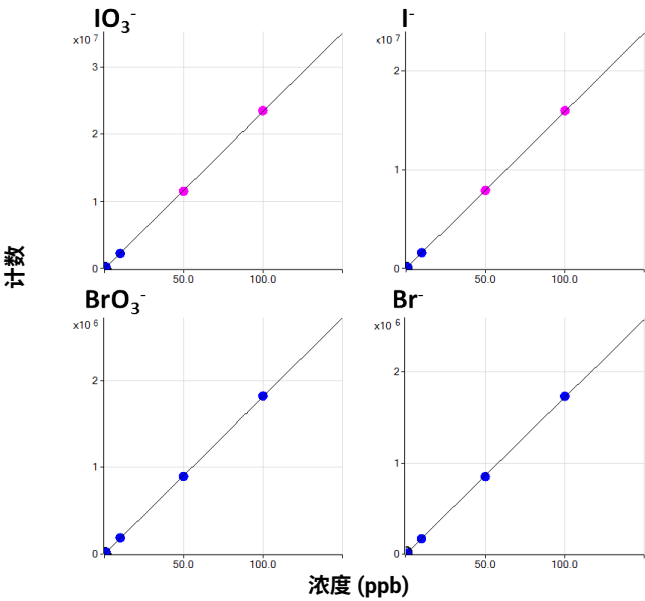


图 1. 校准曲线：IO₃⁻（左上）、I⁻（右上）、BrO₃⁻（左下）、Br⁻（右下）

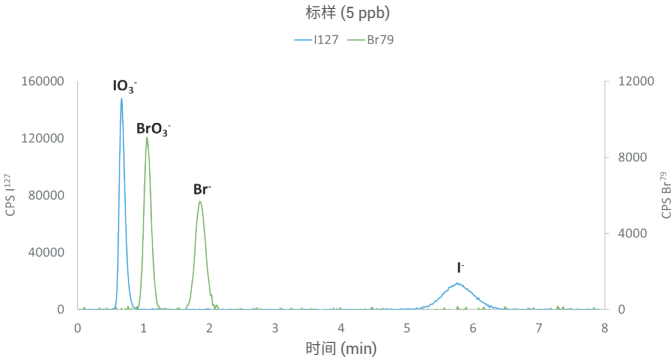


图 2. 同一次分析中 IO₃⁻、I⁻、BrO₃⁻ 和 Br⁻ 的 5 ppb 标样色谱图

检测限

由背景噪音 3 倍除以每个目标峰信号，计算得出信噪比 (S/N) 检测限 (DL)。如表 4 所示，四种形态的 DL 均处于 0.072–0.667 ppb 范围内。

表 4. 溴化物、溴酸盐、碘化物和碘酸盐的 S/N 和 DL

形态	标准浓度 (ppb)	信号	噪音	S/N	溶液中的 DL (ppb)
IO ₃ ⁻	0.98	27781	676.6	41.06	0.072
BrO ₃ ⁻	1.07	1979	320.2	6.18	0.519
Br ⁻	0.9	1296	320.0	4.05	0.667
I ⁻	0.78	3379	677.2	4.99	0.469

SRM 分析

使用 LC-ICP-MS/MS 测定婴儿/成人营养配方奶 SRM 中的四种形态（七次平行样品前处理，三次重复分析；n = 21）。使用 8900 ICP-MS/MS 测量总碘浓度（不经过 HPLC 分离）。表 5 中列出四种形态、总碘和总溴结果。SRM 中未检出碘酸盐或溴酸盐。¹²⁷I⁻ 和总碘的实测浓度以及总碘的认证浓度非常一致，表明方法准确度较高。SRM 中的溴未经过认证。

表 5. NIST 1849a 婴儿/成人营养配方奶 SRM* 的分析结果，n = 21
单位：mg/kg

¹²⁷ IO ₃ ⁻	¹²⁷ I ⁻	⁷⁹ BrO ₃ ⁻	⁷⁹ Br ⁻	总 I*		总 Br**
实测值				标准值	实测值	实测值
ND	1.31 ± 0.04	ND	0.74 ± 0.12	1.29 ± 0.11	1.33 ± 0.37 (103%)	0.77 ± 0.07 (96%)*

ND = 未检出。* 采用水浴提取配制
** 未给出溴标准值。*** ⁷⁹Br/总溴

婴儿配方奶产品的定量分析

四种婴儿配方奶粉样品的提取液平行配制两份，并用 LC-ICP-MS/MS 重复分析两次 (n = 4)。如表 6 所示，任何样品中均未检出碘酸盐或溴酸盐。碘化物相比总碘结果的回收率范围为 87%–102%，表明样品中存在的碘为碘化物形态。溴化物相比总溴结果的回收率范围为 85%–100%，表明样品中存在的溴为溴化物形态。

四种婴儿配方奶样品中的实测总碘范围为 1232–2592 µg/kg，相当于 25.9–54.5 µg/100 kcal。上述浓度符合美国和中国的总碘标准；但有些结果超出了 29 µg/100 kcal 的欧盟碘最高限量。

表 6. 婴儿配方奶样品分析结果。单位：µg/kg。百分比为碘化物和溴化物分别相对总碘和总溴的回收率

样品编号	¹²⁷ IO ₃ ⁻	¹²⁷ I ⁻	⁷⁹ BrO ₃ ⁻	⁷⁹ Br ⁻	总 I*	总 Br**
1-美国	ND	1157 ± 11	ND	2993 ± 27	1333 ± 16 (87%)	3112 ± 151 (96%)
2-美国	ND	1455 ± 29	ND	10826 ± 141	1426 ± 50 (102%)	10815 ± 478 (100%)
3-中国	ND	1240 ± 15	ND	25660 ± 230	1232 ± 23 (101%)	29850 ± 2392 (86%)
4-中国	ND	2372 ± 24	ND	8529 ± 64	2592 ± 44 (92%)	9997 ± 389 (85%)

* 用水提取法进行样品前处理
** 用微波消解法进行样品前处理

加标回收率测试

在提取前，向两种婴儿配方奶样品中加入 20 和 40 ppb IO₃⁻、BrO₃⁻、Br⁻ 和 I⁻，以进行加标回收率测试。每种加标样品平行配制三份，并分析两次。在多次 100 µL 进样过程中，实际样品中的四种形态在 20 ppb 和 40 ppb 浓度下均获得了良好的回收率（表 7）。结果表明，该方法可用于准确测定婴儿配方奶中的四种卤素形态。

表 7. 加标浓度为 20 和 40 ppb 的两种婴儿配方奶样品中 IO₃⁻、BrO₃⁻、Br⁻ 和 I⁻ 的平均加标回收率结果，n = 12

	¹²⁷ IO ₃ ⁻	⁷⁹ BrO ₃ ⁻	¹²⁷ I ⁻	⁷⁹ Br ⁻
平均回收率，%	96 ± 4	97 ± 5	98 ± 7	100 ± 5
回收率范围，%	90–100	89–101	88–104	94–105

图 3 为根据表 7 分析的两种婴儿配方奶中 ^{79}Br 和 ^{127}I 的叠加色谱图。以两个浓度（约 20 和 40 ppb）对购自美国和中国的婴儿配方奶进行加标，每种浓度平行配制三份。色谱图显示多次 100 μL 进样获得良好重现性。

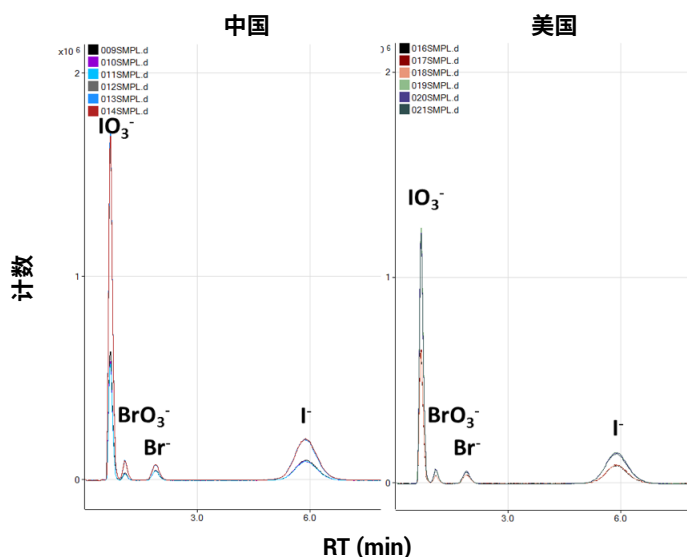


图 3. 美国婴儿配方奶（右侧色谱图）和中国婴儿配方奶（左侧色谱图）在两个加标浓度（约 20 和 40 ppb）下的 ^{79}Br 和 ^{127}I 的叠加色谱图。每幅色谱图 $n = 6$

结论

将 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统与 Agilent 8900 ICP-MS/MS 联用，首次测定了婴儿配方奶样品中的 4 种卤素形态。使用阴离子交换色谱柱可在约 6.5 分钟内实现基线分离， I^- 、 IO_3^- 、 Br^- 和 BrO_3^- 的检测限均小于等于 0.67 ppb。

婴儿配方奶的形态分析提供了关于碘生物有效性和溴酸盐潜在风险的有用信息。此外，还采用 8900 ICP-MS/MS 进行了碘和溴的总元素测定。婴儿配方奶 SRM 中碘的实测值与标准值非常一致，回收率为 103%。 $^{127}\text{I}^-$ 的实测浓度与标准值之间也具有很好的一致性，回收率为 101%。溴 SRM 未提供标准值。

本研究中分析的四种市售婴儿配方奶样品中未检出碘酸盐或溴酸盐，仅含有碘化物和溴化物。样品中的总碘含量范围为 25.9–54.5 $\mu\text{g}/100 \text{ kcal}$ 。该范围符合美国和中国婴儿配方奶中的碘标准，但超出了 29 $\mu\text{g}/100 \text{ kcal}$ 的欧盟最高限量。

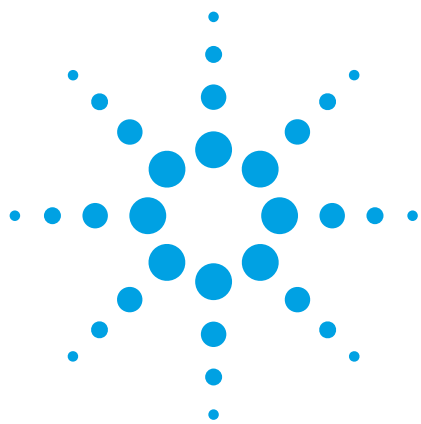
为测试该方法对准确测定婴儿配方奶样品中四种低浓度形态的适用性，在 20 和 40 ppb 下进行了加标回收率测试。结果实现了基线分离，在多次 100 μL 进样过程中表现出良好的重现性。

参考文献

1. A. Milanesi, and G. A. Brent, Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals, J.F. Collins (Ed.), 2017, Elsevier, London, UK, 143–150
2. P. Ghirri, S. Lunardi, A. Boldrini, Iodine Supplementation in the Newborn, *Nutrients*, **2014**, 6(1), 382–390
3. World Health Organization, International Agency of Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/ClassificationsAlphaOrder.pdf> (2019 年 2 月访问)
4. CFR Chapter I: Food and Drug Administration, in Title 21: Food and Drugs, Ch. 1, Part 107, Infant Formula, Code of Federal Regulations, U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD
5. Commission Delegated Regulation No. 2016/127/EU (2015) Off. J. Eur. Union L25, 1–29
6. GB 10765-2010: 婴儿配方食品国家食品安全标准, 中华人民共和国卫生部, 中国北京
7. Standard Method Performance Requirements (SMPRs) for Quantitation of Arsenic Species in Selected Foods and Beverages, *AOAC Int*, **2015**, Gaithersburg, MD, Method 2015.006
8. B. P. Jackson, V. F. Taylor, T. Punshon, K. L. Cottingham, Arsenic concentration and speciation in infant formulas and first foods, *Pure Appl. Chem.*, **2012**, 84, 215–223

更多信息

关于本研究的完整记述，请参见：Jennifer Nelson, Lawrence Pacquette, Shuofei Dong and Michiko Yamanaka, Simultaneous Analysis of Iodine and Bromine Species in Infant Formula using HPLC-ICP-MS, *JAOAC Int.*, 102, **2019**, DOI: 10.5740/jaoacint.18-0352



采用 Agilent 8800 ICP-MS/MS 通过 HPLC-ICP-MS 联机进行苹果汁中砷的形态分析

应用简报

食品和饮料

作者

Mina Tanoshima*、Tetsushi Sakai*
和 Ed McCurdy†

安捷伦科技公司

* 日本东京

† 英国斯托克波特



前言

食品中潜在有毒元素和化合物的存在日益受到公众的密切关注，因此，食品生产者及管理部门就要求有快速、可靠的筛选方法来准确定量食品和饮料中这些污染物的含量。对于砷 (As) 而言，它在食品中的富集浓度可能会通过以往含砷农药如砷酸氢铅（砷酸铅）或砷酸钙的使用而上升。这些化合物作为收获前农药在 20 世纪广泛用于控制水果类作物（主要是苹果）上的害虫，如苹果蠹蛾、苹果蛆和果蝇。虽然在 1970 年禁止了这些农药的广泛使用，但是砷酸铅和砷酸钙非常稳定并可长期存留于土壤之中，因此在其应用被禁止很长时间以后仍可以影响在污染土壤中生长的作物。



Agilent Technologies

食品安全中的砷形态分析非常重要，因为元素的毒性程度强烈依赖于其存在的化学形态或种类。众所周知，无机砷如亚砷酸盐 (As(III)) 和砷酸盐 (As(V)) 具有高毒性和致癌性，而有机砷如单甲基砷酸 (MMA) 和二甲基砷酸 (DMA) 却毒性较低，砷甜菜碱 (AB) 更被认为是无毒的。因此对许多类样品包括饮用水、食品和饮料、药品和石油化学制品中的无机砷含量水平已经开展日常监测。

针对多种类型的样品，如饮用水和尿液 [1]，已建立了通过 HPLC 分离各种含砷化合物然后使用 ICP-MS 进行检测的完善分析方法。

本研究开发了一种新的样品制备方法，包括样品过滤和采用去离子水稀释，用于苹果汁中低浓度水平砷形态的快速、日常检测。使用文献 1 建立并经确证的方法来分离和定量分析六种商品苹果汁中的上述五种砷形态，以确定这种日常消费的果汁中是否含有潜在有害浓度水平的砷形态。

美国环境保护署 (USEPA) 已建立了饮用水中总砷的最高污染物水平 (MCL) 限量为 10 $\mu\text{g/L}$ 。但我们必须考虑到食品中的砷是总膳食摄入量的一部分，USEPA 和欧洲食品安全局推荐的限量是每天 0.8 - 8 $\mu\text{g/kg}$ 体重。正常饮食中砷的其他膳食来源包括海产品、稻米等。

实验部分

样品制备

六种不同的苹果汁样品（苹果汁 #1 - #6）购自日本某超市。苹果汁样品采用两种一次性过滤器过滤（美国密理博公司的 Millex-LH，然后是日本 TOSHO 公司的 TOYOPAK ODS M）。采用 Millex-LH 过滤器去除苹果汁中的固形物，

然后采用 TOYOPAK ODS M 过滤器去除非极性化合物，防止 HPLC 色谱柱过载。按照制造商的说明对两种过滤器进行清洗和活化。过滤后，苹果汁样品用超纯水稀释一倍。应避免剧烈的样品消解和高稀释倍数，以最大程度地减少砷形态的相互转化，并且保证获得原样品最低的检测限。

为了评价方法对低浓度砷形态的准确检测能力，我们评估了样品制备过程中砷形态污染的可能性。按如下方式进行空白样品制备，用于识别源于不同样品制备步骤的任何可能污染：

1. 去离子水空白
2. Millex 膜过滤器空白
3. TOYOPAK ODS 过滤器空白
4. 方法空白（像样品一样过滤两次的去离子水）

所有四个制备空白样品采用文献 1 建立的 HPLC 方法及其使用的色谱柱和流动相进行检测，色谱图见图 1。四个制备空白与一个混合砷形态标准品（每种形态 50 ng/L (ppt)）的叠加色谱图确认，制备空白中未检出砷。

应注意，第一个洗脱出的峰是砷甜菜碱 (AB)，它未保留在柱子上，因此在柱空体积中被洗脱出来，它还可能与其他不被柱子保留的中性或阳离子组分共洗脱出来。虽然可利用所述的 LC-ICP-MS 方法来测量 AB，但如果样品中存在其他共洗脱物质，结果可能会出现偏差；但对于食品安全应用来讲，这并不是个问题，因为 AB 即使浓度非常高，也是没有毒性的。

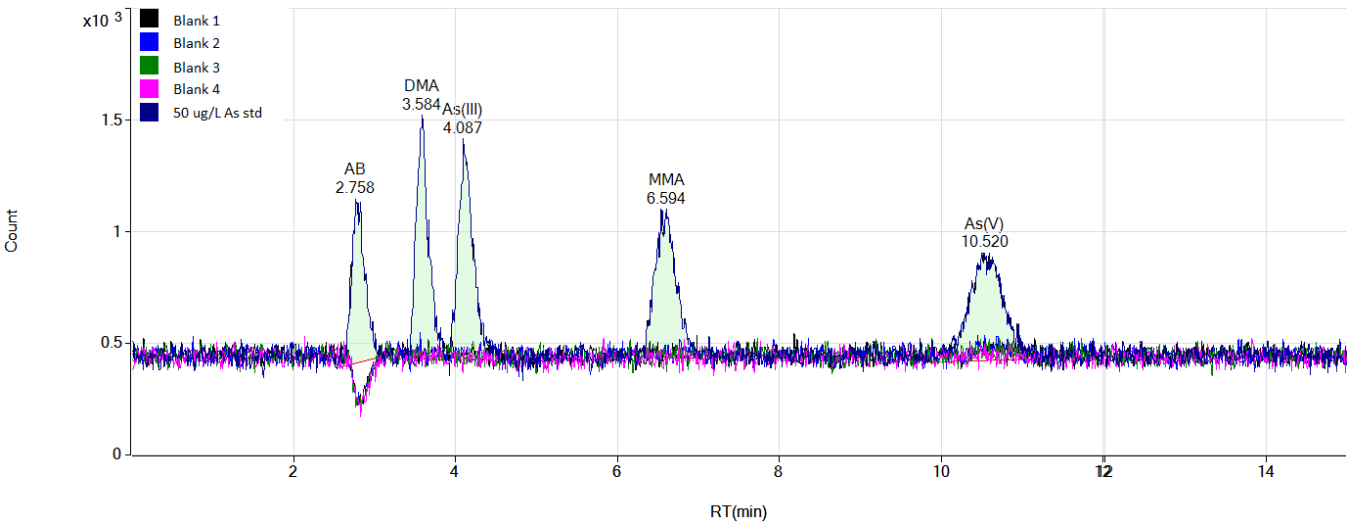


图 1. 制备空白样的评估，确定试剂和制备用过滤器不产生可检出的砷形态污染。展示了所有四个空白，与 50 ng/L (ppt) 的混合砷形态标准的叠加色谱图。

为了保证食品安全，必须分离并准确定量低浓度的关键形态 — As(III) 和 As(V)，它们的总量可称为“总无机砷”。

仪器

联用一台包括二元泵、自动进样器和真空脱气机的 Agilent 1290 Infinity LC 系统及一台 Agilent 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪 (ICP-MS/MS)。分离采用一根阴离子交换保护柱（安捷伦部件号 G3154-65002，4.6 mm 内径 x 10 mm 聚甲基丙烯酸酯）及一根砷形态分析柱（安捷伦部件号 G3288-80000，4.6 mm 内径 x 250 mm 聚甲基丙烯酸酯）。整个实验过程中色谱柱在室温下运行。HPLC 和 ICP-MS 操作参数见表 1。

砷形态的日常分离分析不需要使用 ICP-MS/MS 分离干扰物，因为对砷 (m/z 75) 有潜在多原子重叠的干扰在色谱中即已实现分离。如文献 1 所述，无机氯化物在 As(III) 和 MMA 峰之间流出，因此，由氯化物形成的 $ArCl^+$ 多原子离子不会影响任何目标砷化合物的测定。

然而，食品和饮料中的砷形态分析已经延伸到对极低浓度（低 ng/L 或 ppt 水平）有毒无机化合物的更高灵敏度检测。

表 1. Agilent 1290 LC 和 8800 电感耦合等离子体串联质谱系统的操作参数

1290 Infinity LC	
条件	数值
色谱柱	G3154-65002（保护柱），G3288-80000，4.6 x 250 mm（分析柱）
流动相	2.0 mM PBS/0.2 mM EDTA/10 mM CH ₃ COONa/3.0 mM NaNO ₃ /2% EtOH，pH 11.00（NaOH 调节）
流速	1.0 mL/min
柱温	室温
进样体积	100 µL
8800 ICP-MS/MS	
参数	数值
射频功率	1550 W
载气流速	1.05 L/min
雾化室温度	2 °C
采样深度	10 mm
提取透镜 1	0 V
四极杆模式	单四极杆模式
池气体模式	无气体

并且与常规四极杆 ICP-MS 相比，Agilent 8800 ICP-MS/MS 的背景干扰非常低，因此它可能更具分析优势。假如方法要求可以接受稍高的检测限，上述样品制备和 HPLC 方法无需任何修改即可全部转移到安捷伦 7700 系列 ICP-MS（灵敏度比 8800 约低 2 倍）上，但其检测限仍在十几 ng/L (ppt) 的范围。

结果与讨论

每种砷形态的检测限通过三倍色谱峰 - 峰信噪比 (S/N) 来计算，或者有时用 S/N=3 时的分析物浓度来表示。所有五种砷形态的检测限介于 10 ng/L - 22 ng/L 之间，见表 2。图 2 显示了用于计算 S/N 和 LOD 的 500 ng/L 各砷形态标准的色谱图，结果表明这五种砷形态具有高检测灵敏度和良好的峰分离度。

校准浓度范围为 10 ng/L - 500 ng/L，表明各砷形态线性关系良好，如图 3 所示。

苹果汁分析结果

六种不同苹果汁中的砷浓度测定结果见表 3（结果已考虑到 2 倍稀释因素），色谱图见图 4。我们从浓度结果可以清楚地看到，虽然大多数砷以有毒的无机形式存在，但所有苹果汁样品中总砷含量极低，大大低于 USEPA 针对饮用水规定的 10 µg/L 的限度。图 4 中的色谱图以相同的强度刻度展示，突出每种砷形态的不同相对浓度。

表 2. 砷甜菜碱 (AB)、二甲基胂酸 (DMA)、As(III)（亚砷酸盐）、单甲基胂酸 (MMA) 和 As(V)（砷酸盐）3 倍信噪比时的检测限。

* 砷甜菜碱 (AB) 在空柱体积中流出，由于存在一些其他共流出成分，无法对它进行可靠的定量分析。

化合物	保留时间 (min)	峰高	峰面积	噪音	S/N	LOD (ng/L)	噪音类型
AB*	2.823	19584	249584	153	127.99	11.72	峰-峰
DMA	3.602	22117	277103	153	144.54	10.38	峰-峰
As(III)	4.128	18022	265346	153	117.78	12.74	峰-峰
MMA	6.566	14421	299863	153	94.24	15.92	峰-峰
As(V)	10.431	10265	329325	153	67.08	22.36	峰-峰

Full Time Range EIC(75) : 008CALS.d

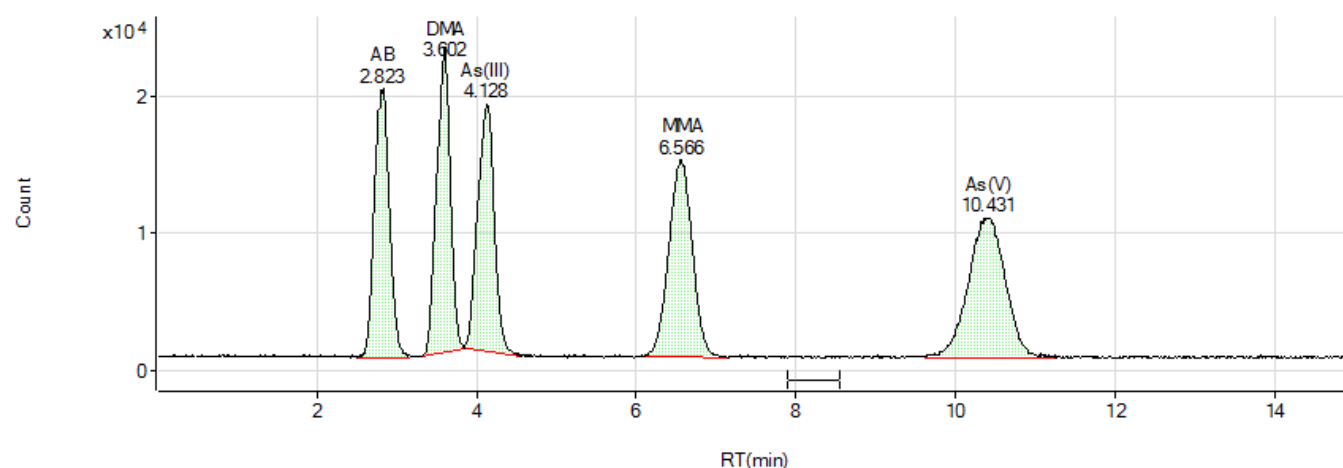


图 2. 500 ng/L (ppt) 混合砷形态标准的色谱图显示了高检测灵敏度和良好的峰分离度，以及用于 S/N 和 LOD 计算的噪音区

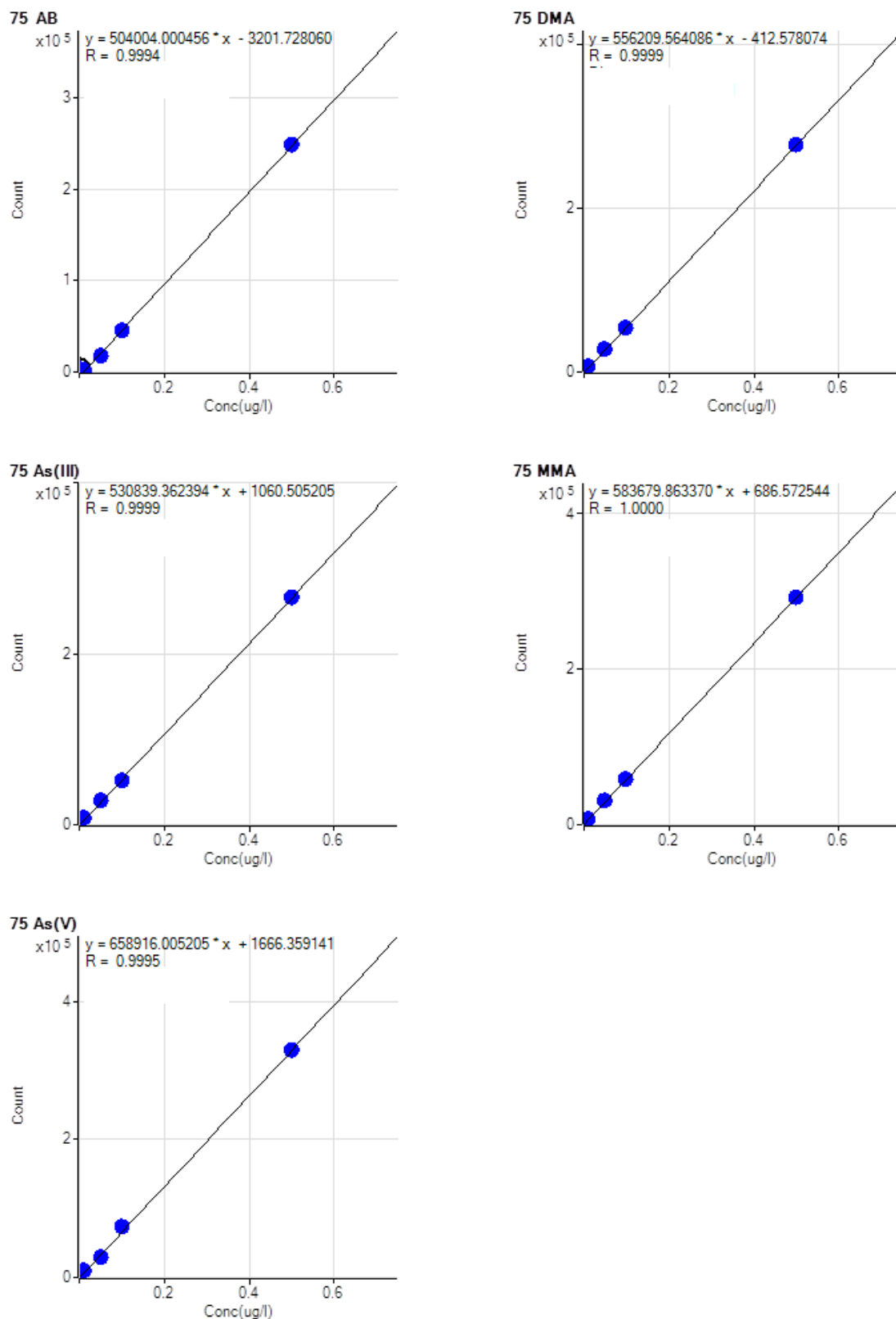


图 3. AB、DMA、As(III)、MMA 和 As(V) 的校准曲线

表 3. 采用 LC-ICP-MS/MS 分析六种商业苹果汁品牌中所有五种砷形态时的定量分析结果 (μg/L)

样品名	稀释倍数	浓度 μg/L						
		AB	DMA	As(III)	MMA	As(V)	无机砷	总砷
苹果汁 1	2	0.069	0.196	0.704	0.033	0.631	1.335	1.600
苹果汁 2	2	0.066	0.037	0.062	0.006	0.008	0.070	0.173
苹果汁 3	2	0.063	0.292	0.847	1.633	0.827	1.674	3.662
苹果汁 4	2	0.052	0.276	1.014	1.475	1.977	2.991	4.794
苹果汁 5	2	0.067	0.225	1.196	0.795	0.724	1.920	3.007
苹果汁 6	2	0.043	0.254	1.218	0.005	0.095	1.313	1.610

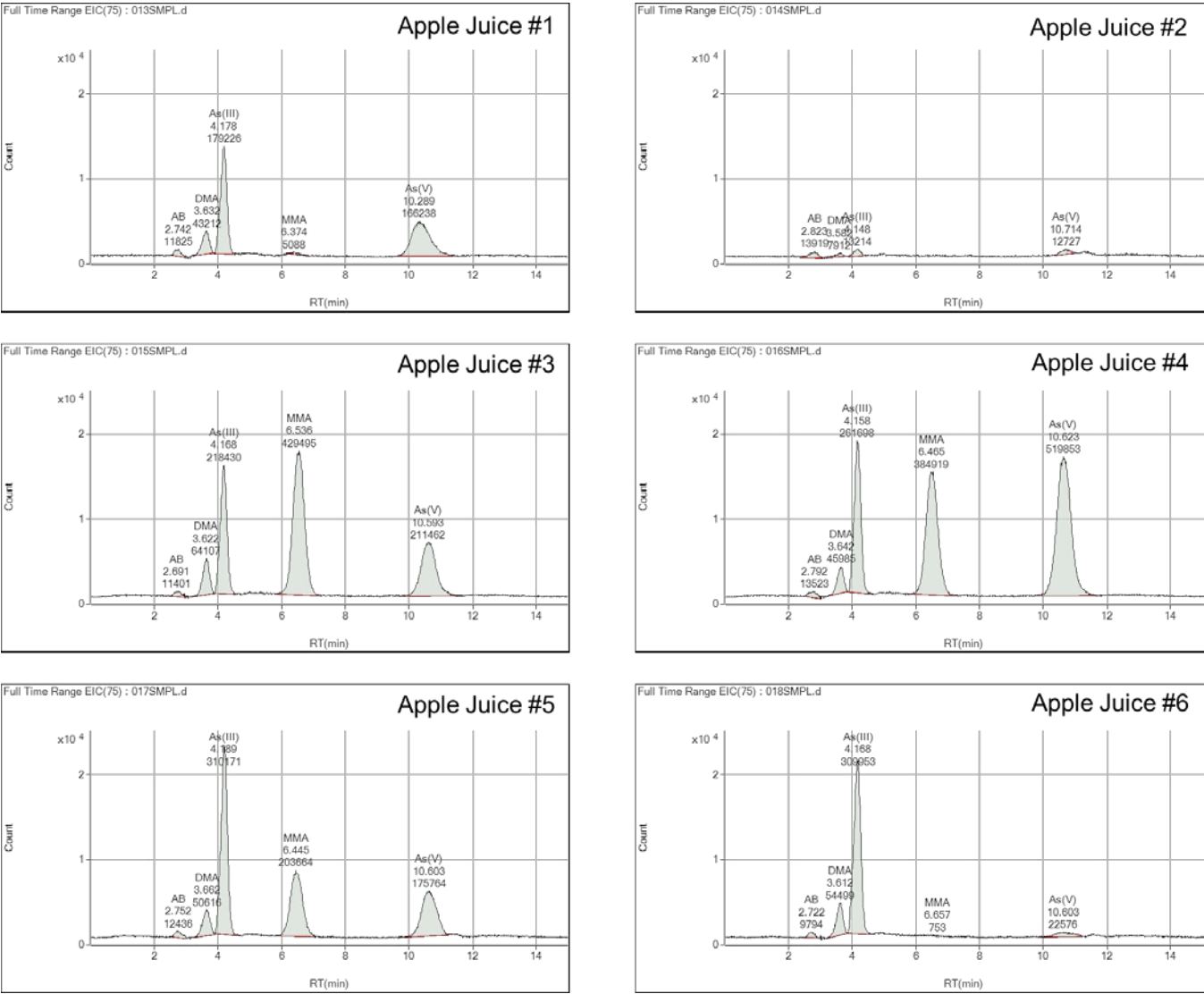


图 4. 六种苹果汁样品中砷形态的色谱图

虽然砷形态在所有六种苹果汁中均有发现，但总砷浓度和不同砷形态的相对浓度各异。然而，在测试的所有果汁样品中，各砷形态的总浓度均低于 5 µg/L，低于 USEPA 对饮用水最大污染限度 (10 µg/L) 规定的一半。所有样品中总无机砷 (As(III) 与 As(V) 之和) 的量低于 3 µg/L，并且所检测的六种苹果汁样品中有五个低于 2 µg/L。

加标回收率实验和重现性

为了验证分析实际样品时的方法性能，采用混合砷形态标准溶液进行加标回收率实验。#1 苹果汁样品加标砷形态标准品至 2 倍稀释样中的浓度为 500 ng/L。加标样品按未知样品重复测定，总共分别测定 7 次。表 4 列出了所有砷形态的保留时间 (RT) 和浓度结果，表明 7 次重复分析的 RT 和浓度具有优异的重现性。所有砷形态的保留时间 %RSD 小于 0.5%，浓度 %RSD 小于 1.6%。所有 7 次进样的叠加色谱图见图 5。

表 4. 1 µg/L 标准溶液加标到 #1 苹果汁中的加标回收率测定结果 (n = 7)

样品名	AB		DMA		As(III)		MMA		As(V)	
	保留时间 (min)	浓度 (µg/L)	保留时间 (min)	浓度 (µg/L)	保留时间 (min)	浓度 (µg/L)	保留时间 (min)	浓度 (µg/L)	保留时间 (min)	浓度 (µg/L)
苹果汁 1 加标 1	2.77	0.848	3.62	1.112	4.19	1.606	6.43	0.980	10.62	1.524
苹果汁 1 加标 2	2.76	0.862	3.61	1.116	4.19	1.632	6.43	0.996	10.63	1.560
苹果汁 1 加标 3	2.77	0.872	3.61	1.125	4.19	1.621	6.41	1.007	10.62	1.551
苹果汁 1 加标 4	2.77	0.886	3.61	1.122	4.18	1.632	6.41	1.003	10.63	1.554
苹果汁 1 加标 5	2.78	0.882	3.61	1.134	4.19	1.643	6.41	1.008	10.65	1.561
苹果汁 1 加标 6	2.78	0.873	3.61	1.146	4.17	1.637	6.37	1.016	10.68	1.597
苹果汁 1 加标 7	2.78	0.881	3.60	1.145	4.17	1.651	6.35	1.018	10.69	1.588
平均值	2.78	0.872	3.61	1.128	4.18	1.632	6.41	1.004	10.65	1.562
标准偏差	0.0076	0.0133	0.0058	0.0135	0.0096	0.0148	0.0306	0.0130	0.0291	0.0242
%RSD	0.28	1.53	0.16	1.20	0.23	0.91	0.48	1.29	0.27	1.55

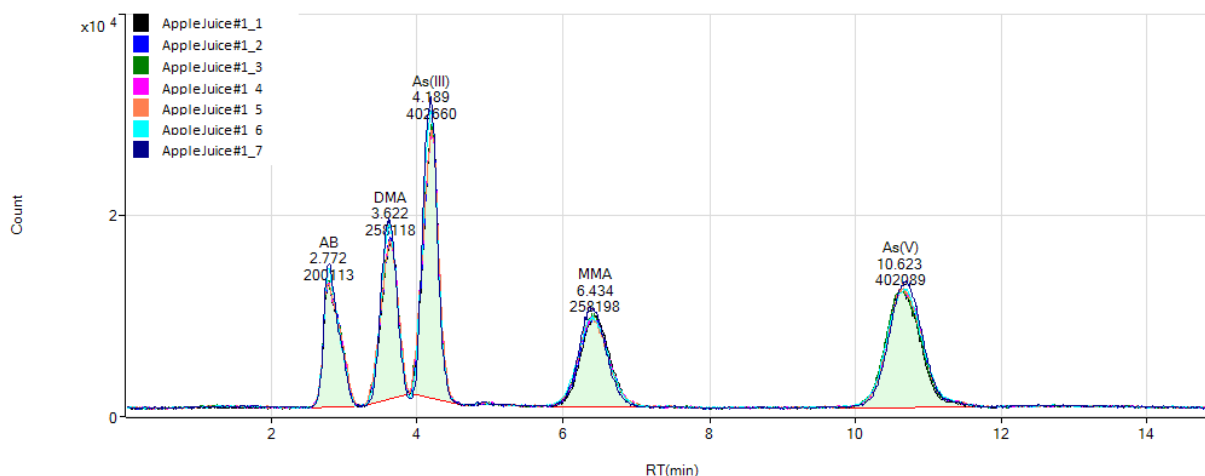


图 5. #1 苹果汁加标 500 ng/L 砷标准溶液的 7 次平行测量叠加色谱图

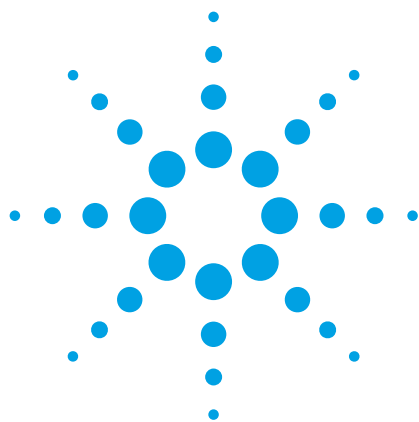
结论

采用 Agilent 1290 Infinity LC 联用 Agilent 8800 ICP-MS/MS，测定了商品苹果汁中 $\mu\text{g/L}$ 和亚 $\mu\text{g/L}$ 浓度的包括毒性相关无机形式 As(III) 和 As(V) 在内的五种砷形态。通过对苹果汁样品进行简单的过滤和 2 倍稀释，得到了所有砷形态在 10 - 20 ng/L (ppt) 范围内的检测限。所有检测的苹果汁样品中均发现了砷 (As) 形态，虽然各品牌中不同砷形态的浓度各异。在本研究所分析的样品中，所含的总砷均不超过 5 $\mu\text{g/L}$ ，所有样品中无机砷 (As(III) 和 As(V) 形态之和) 的浓度均低于 3 $\mu\text{g/L}$ ，而且分析的六个品牌中有五个低于 2 $\mu\text{g/L}$ 。

基于对日本苹果汁市场上这个小样本的分析，我们的数据支持了目前美国食品和药品监督管理局 (FDA) 关于在无机砷残留提高的情况下，商品苹果汁对人体健康无明显风险的意见。我们对日本市场上苹果汁的测试结果肯定了美国 FDA 监测计划的调查结果，即所有测试的苹果汁样品中，无机砷的含量水平低于饮用水中 10 $\mu\text{g/L}$ 的限量。

参考文献

1. Tetsushi Sakai 和 Steve Wilbur, Routine Analysis of Toxic Arsenic Species in Urine Using HPLC with ICP-MS (采用 HPLC 和 ICP-MS 常规分析尿液中的有毒砷形态)，安捷伦出版物 5989-5505EN。



使用 LC-ICP-MS/MS 快速分析葡萄酒中的砷形态

应用简报 食品和饮料

作者

Courtney Tanabe¹⁻², Susan E. Ebeler¹⁻², Jenny Nelson¹⁻³

¹ 美国加州大学戴维斯分校食品安全与测量机构

² 美国加州大学戴维斯分校葡萄栽培和酿酒系

³ 安捷伦科技有限公司，美国加利福尼亚州圣克拉拉市



前言

砷 (As) 天然存在于环境中，但人类活动也会造成某些地区的砷含量增加。人为砷来源包括采矿、冶炼和发电等工业过程，以及农业农药和木材防腐剂等^[1]。一旦发生砷污染，其在环境中可存在数十年。例如，在 20 世纪 70 年代禁止了含砷农用化学品的广泛使用，但在一些土壤中，砷酸铅和砷酸钙的含量仍然很高。土壤和水中的砷可被农作物吸收。以葡萄酒为例，砷含量也会受到酿酒过程的影响。

砷在食品和饮料中以多种形式存在，每种形式的毒性各不相同。砷的无机形式 (iAs) 包括 As(III) (亚砷酸盐) 和 As(V) (砷酸盐)，这些形式的毒性最高，被归类为 1 类致癌物质。相比之下，砷甜菜碱 (AB) 是新鲜海鲜中含量最高的 As 形式，对人体基本上无毒。由于不同形态 As 毒性的极大差异

经验证适用于 Agilent
8900 ICP-MS/MS



Agilent Technologies

以及 iAs 潜在的健康威胁，因此很有必要测定食品中各种形态砷的含量，而不仅仅是总 As 浓度。美国食品药品监督管理局 (FDA) 对苹果汁中的 iAs 规定了 10 µg/kg (ppb) 的行动限值^[2]，但美国目前尚未颁布葡萄酒中 As 含量的控制法规。加拿大（酒商质量联盟 (VQA)，安大略省）和欧洲（国际葡萄与葡萄酒组织 (OIV)）分别将葡萄酒中总砷的最高可接受限值规定为 100 µg/L 和 200 µg/L (ppb)^[3, 4]。

食品砷污染是公众关注的焦点。因此，非常需要快速可靠的筛查方法来准确测定食品和饮料中的 iAs 含量，以满足现有和未来的法规要求。其中，最有用且可靠的一种方法是，使用高效液相色谱 (HPLC) 对不同形态的砷进行分离，然后采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 进行定量分析^[5]。

本文所述的方法基于先前由 Jackson 开发的 As 形态分析方法，该方法将 HPLC 与串联四极杆 ICP-MS (ICP-MS/MS) 联用^[6]。本研究也采用 HPLC-ICP-MS/MS。然而，与分别分析 iAs 形态不同，在分析之前先用过氧化氢将 As(III) 氧化为 As(V)^[7, 8]。本方法通过转化 As(III) 并以 As(V) 的形式分析所有无机形态，能够在 2 分钟内将一甲基胂酸 (MMA) 和二甲基胂酸 (DMA) 与 iAs（呈 As(V) 形态）分离。本方法的分析时间比当前用于 As 形态分析的 FDA 方法快 10 倍^[9]。

在本研究中，在 ICP-MS/MS 碰撞/反应池 (CRC) 中采用氧气作为反应气体，以解决对 ⁷⁵As 的光谱干扰，同时保持出色的灵敏度。结果证明，新方法具有出色的准确性和重现性。由两个参与实验室分析同一种葡萄酒基质，对本方法进行了进一步验证。

实验部分

标准品

As (III) 和 As (V) 标准品购自 Spex Certiprep (Christiansburg, VA; Metuchen, NJ, USA)。MMA 和 DMA 标准品购自 Chem Service (West Chester, PA, USA)。AB 标准品同样购自 Chem Service，将其用作流动注射标记物（内标）进行柱后注射。对于 DMA、MMA 和总 iAs（As (III) 和 As (V) 总和），制备浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10 和 20 µg/L (ppb) 的校准标样。

样品

在验证 (V) 研究中使用五种不同的加利福尼亚葡萄酒。每种葡萄酒分别代表五种主要形式的葡萄酒之一：红葡萄酒、白葡萄酒、玫瑰红葡萄酒、起泡酒和餐后甜酒。在商品市场菜篮子 (MB) 研究中，对另外五种加利福尼亚葡萄酒进行了分析。表 1 列出了所有样品的葡萄酒类型、栽培品种、种植产地、年份和酒精含量的详细信息。

表 1. 用于验证和商品市场菜篮子研究的葡萄酒样品的葡萄酒类型、栽培品种、产地、年份和酒精含量

样品	类型	栽培品种	产地	年份	酒精含量 (%v/v)
V-1	玫瑰红葡萄酒	仙粉黛	纳帕与洛迪	不适用	9.5
V-2	白葡萄酒	白苏维浓	奥克维尔/纳帕县	2013	13.0
V-3	起泡酒	起泡白葡萄酒混酿	索诺马县	不适用	12.0
V-4	餐后甜酒	小西拉波特	克拉克斯堡/优洛县	2012	20.0
V-5	红葡萄酒	赤霞珠	蒙特雷县	2013	14.5
MB-1	红葡萄酒	赤霞珠	北海岸	2009	13.5
MB-2	红葡萄酒	黑比诺	中央海岸产区	2004	13.8
MB-3	白葡萄酒	莎当妮	圣巴巴拉县	2013	13.5
MB-4	玫瑰红葡萄酒	仙粉黛	纳帕与索诺马	2013	10.5
MB-5	白葡萄酒	莎当妮	中央海岸	2013	13.5

样品前处理

以 1:1 的比例将 H₂O₂ 加入所有样品中，将 As(III) 氧化为 As(V)。用去离子水进一步稀释每个样品，使总稀释倍数为 5 或 6（两个稀释倍数之间的结果没有差异）。然后使每个样品通过 0.45 µm 针头过滤器，以除去所有颗粒物。所有 As 形态按以下三种浓度加标至样品 V-1、V-4、V-5（均为一式两份）：5、10、30 µg/kg。

仪器

将配备 Hamilton PRP-X100 5 µm 50 × 2.1 mm 色谱柱的 Agilent 1260 HPLC 与 Agilent 8800 串联四极杆 ICP-MS (ICP-MS/MS) 联用。流动相为 40 mmol/L 碳酸铵 ((NH₄)₂CO₃，痕量金属级 99.999%，购自 Sigma Aldrich)，其中含 3% v/v 甲醇 (Optima LC/MS 级，购自 Fisher Chemical)，并用氢氧化铵 (Optima 级，Fisher Scientific) 将 pH 调节至 9.0。ICP-MS/MS 配备

标准样品引入系统，该系统包括带内径 2.5 mm 中心管的石英炬管、石英雾化室、玻璃同心雾化器和镍接口锥。按照 FDA EAM §4.10 和 4.11.15 进行峰积分^[9]。仪器操作条件汇总于表 2 中。

表 2. HPLC-ICP-MS/MS 操作条件

ICP-MS/MS	
正向功率	1550 W
采样深度	8.0 mm
雾化室温度	2 °C
载气	0.95 L/min
尾吹气	0.20 L/min
提取电压 1	0 V
八极杆偏置电压	-5.0 V
动能歧视电压	-7 V
池气体 (O ₂) 流速	0.31 mL/min
扫描模式	MS/MS
Q1/Q2 质量数	75/91 u
HPLC	
流动相流速	0.5 mL/min
进样量	5 µL
样品温度	4 °C
ISTD 进样量	5 µL

结果与讨论

快速方法的开发

在本研究中，方法开发的重点在于缩短每个样品的分析时间。在本方法的开发过程中，我们参照 Jackson 的方法，使用较小的进样量、短离子交换色谱柱、氧气池气体和高流动相线速度^[6]。

图 1 示出了 0.5、1.0、5.0 和 20 µg/kg 代表性校准标样组的重叠色谱图。所有 As 形态均在两分钟内得到清晰分离。只需将 As(III) 氧化为 As(V) 并以 As(V) 的形式分析所有 iAs，即可相对当前的 FDA 法规方法显著缩短分析时间^[9]。

线性校准

DMA、MMA 和 iAs 的校准曲线均显示出良好的线性（图 2）。除 iAs 外，葡萄酒样品中的所有 As 浓度均在线性范围内，iAs 是在最高浓度校准标样的 150% 的最大浓度下测定的。

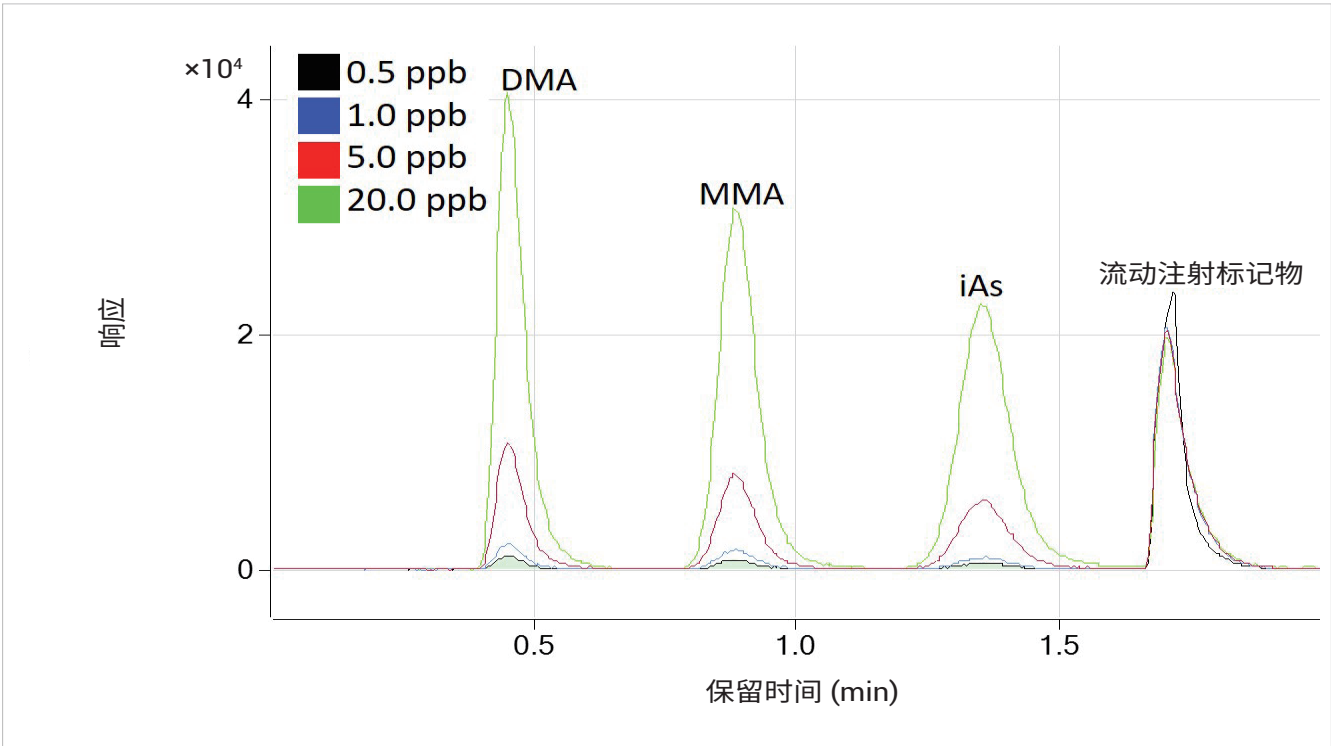


图 1. 0.5、1.0、5.0 和 20.0 µg/kg 校准标样的叠加图。通过外部切换阀在柱后加入 AB 内标（流动注射标记物；第四个峰）

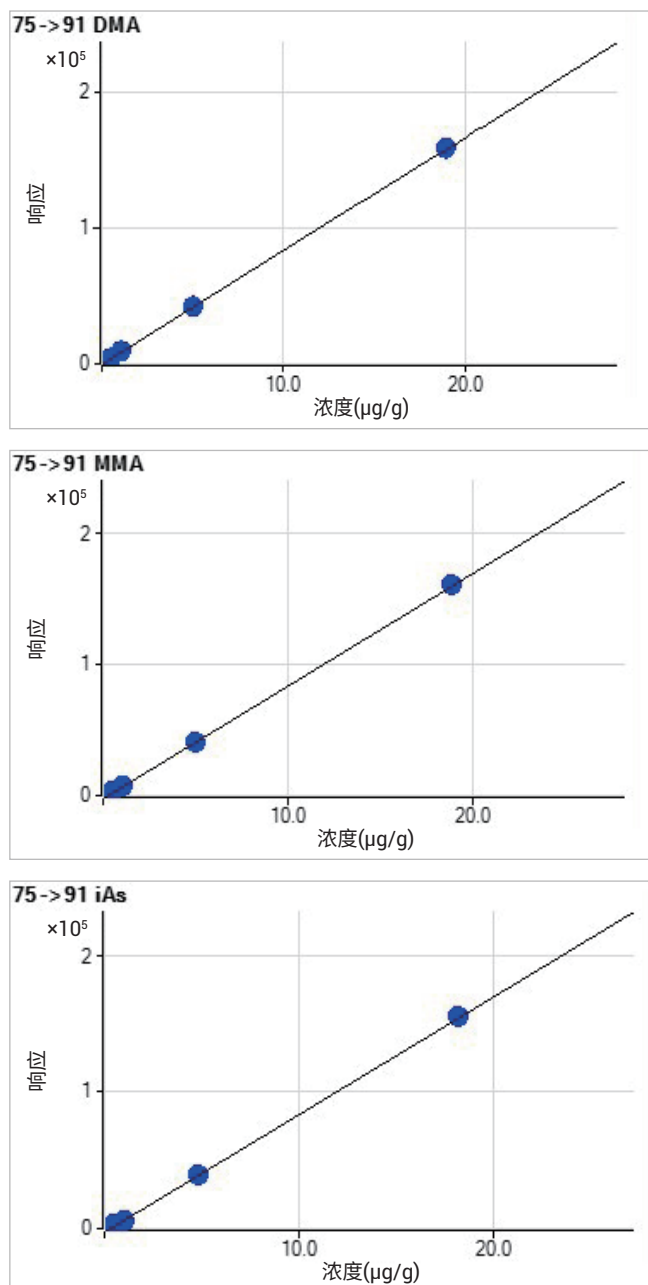


图 2. DMA、MMA 和总 iAs（转换后的 As (III) 和 As (V) 的总和）的校准曲线

检测限

表 3 列出了对 0.05 μg/kg (ppb) 混标进行重复测定得到的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)，n = 15。

表 3. LOD (3σ)、LOQ (30σ) 和葡萄酒 LOQ 估算值

	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)	葡萄酒 LOQ 估算值, (6 倍稀释) μg/kg
DMA	0.018	0.175	1.1
MMA	0.026	0.258	1.5
iAs	0.022	0.221	1.3

经英国皇家化学学会授权引用

加标回收率

将每种形态 (DMA、MMA 和按 As (V) 计的总 iAs) 以 5、10 和 30 μg/kg 的浓度对样品 V-1、V-4 和 V-5 进行加标 (均为一式两份)。在三种不同的加标浓度下, 所有 As 形态的平均回收率为 100±3% (表 4)。

表 4. 葡萄酒 V-1、V-4 和 V-5 中三种加标浓度的 DMA、MMA 和 iAs 的回收率 (平均值和范围)

	DMA	MMA	iAs
平均值, %	102	97	99
范围, %	97–107	91–102	95–103

定量结果

使用全新的 HPLC-ICP-MS/MS 方法对所有 10 种葡萄酒进行分析。表 5 列出了 DMA 和 iAs 的实测浓度。所有 MMA 的浓度均低于计算得到的 LOD (0.026 μg/kg), 无法定量。将使用新方法得到的实测浓度与使用 FDA EAM §4.10 扩展方法^[10]得到的值进行比较。测量结果之间的一致性大都处于 ±10% 以内。在所有葡萄酒中, iAs 代表了大部分 As, 仅有一个葡萄酒样品 (MB-3) 中包含的 DMA 浓度明显高于 1.1 μg/kg 的 LOQ。V-1 的色谱图见图 3。

总体来说, iAs 的浓度范围为 1.7±0.3 至 32.9±0.8 μg/kg (后者高于 FDA 规定的苹果汁中 iAs 的行动限值 10 μg/kg)。所有 As 形态的浓度之和 (表 5) 的范围从 2.2±0.3 μg/kg 的最低值到 32.9±0.8 μg/kg 的最高值, 这个范围低于 100 μg/L 的加拿大限值和 200 μg/L 的 OIV 限值。

表 5. 对于五种验证 (V) 葡萄酒和五种市场菜篮子 (MB) 葡萄酒，将采用快速且“切合实际需求”的分析方法的结果（在两个不同实验室测得）与 FDA EAM §4.10 扩展方法的结果进行比较。将“实测值”除以“EAM §4.10”并将“形态总和”除以“总浓度”，计算得到百分比回收率（在括号中给出）

样品	DMA (µg/kg)		iAs (µg/kg)		总砷 (µg/kg)	
	EAM §4.10	实测值	EAM §4.10	实测值	总浓度	形态总和
V-1	0.81 ± 0.1*	0.72 ± 0.04 (89%)	14.4 ± 1.0	16.0 ± 0.5 (111%)	16.5 ± 0.02	16.7 ± 0.5 (101%)
V-2	0.74 ± 0.04*	0.72 ± 0.06 (98%)	10.7 ± 0.2	11.4 ± 0.4 (107%)	12.6 ± 0.16	12.1 ± 0.3 (96%)
V-3	0.75 ± 0.1*	0.83 ± 0.04 (111%)	9.2 ± 0.4	9.5 ± 0.6 (103%)	10.4 ± 0.11	10.3 ± 0.5 (99%)
V-4	1.70 ± 0.1	1.86 ± 0.06 (109%)	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.4 (109%)	4.5 ± 0.01	4.1 ± 0.4 (92%)
V-5	0.45 ± 0.01*	0.47 ± 0.04 (105%)	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.3 (113%)	2.4 ± 0.03	2.2 ± 0.3 (90%)
MB-1	< LOD	< LOD	30.2 ± 1.3	32.9 ± 0.8 (109%)	34.4 ± 0.4	32.9 ± 0.8 (96%)
MB-2	0.33 ± 0.04*	< LOD	7.57 ± 0.49	9.1 ± 0.4 (120%)	9.1 ± 0.3	9.1 ± 0.4 (100%)
MB-3	0.71 ± 0.08*	1.1 ± 0.0 (155%)	24.64 ± 0.40	27.6 ± 0.7 (112%)	28.9 ± 0.9	28.6 ± 0.7 (99%)
MB-4	1.16 ± 0.09*	1.0 ± 0.1 (86%)	26.3 ± 0.89	27.5 ± 0.9 (105%)	27.9 ± 0.9	28.5 ± 0.9 (102%)
MB-5	< LOD	< LOD	3.5 ± 0.25	4.5 ± 0.1 (129%)	4.7 ± 0.1	4.5 ± 0.1 (96%)

平均值 ± 1σ, n = 3。* 表示值介于 EAM §4.10 方法的 LOD (0.17 µg/kg) 和 LOQ (1.3 µg/kg) 之间。有关 LOD 和 LOQ 实测值，请参见表 3

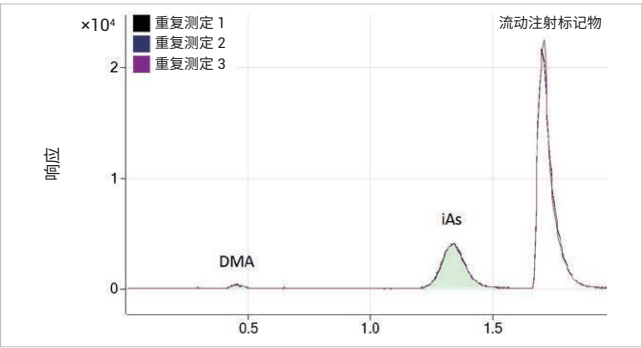


图 3. 葡萄酒样品 V-1 三次重复测定的叠加色谱图

结论

本简报介绍了一种简单、稳定且快速的 HPLC-ICP-MS/MS 方法，该方法可在两分钟内完成对毒性最高的无机 As 形态 (As(III) 和 As(V)) 的总浓度以及两种有机 As 形态的测量。在样品前处理期间，用 H₂O₂ 将 As (III) 氧化成 As (V)，能够以 As (V) 形式测定总 iAs，从而更快速地分离葡萄酒样品中的目标组分。窄径色谱柱和 0.5 mL/min 流速提供了出色的灵敏度，从而能够使用更低的进样量。与目前用于测定葡萄酒中砷的 FDA 方法相比，本方法的样品运行时间加快了 10 倍，并改善了检测限和定量限。

在本研究中，总砷浓度范围为 2.2–32.9 µg/kg，远低于加拿大安大略省规定的限值（100 µg/kg）和欧洲国际葡萄与葡萄酒组织规定的最大限值（200 µg/kg）。然而，iAs 是葡萄酒中的主要形态，测试的五种葡萄酒中的 iAs 浓度超出了 FDA 规定的苹果汁中 iAs 的行动限值 (10 µg/kg)。

采用快速且“切合实际需求”的新方法获得的结果与使用 FDA EAM §4.10 获得的数据非常吻合。

参考文献

1. H. Garelick, H. Jones, A. Dybowska, E. Valsami-Jones, Arsenic pollution sources, *Rev Environ Contam Toxicol.* **2008**, 197, 17-60
2. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, Guidance for Industry Arsenic in Apple Juice: Action Level (draft), 2013, 2017 年 8 月访问: <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm360020.htm>
3. Canada Ontario, V. Q. A., Wine Standards.1999, 2017 年 8 月访问: <http://www.vqaontario.ca/Regulations/Standards>
4. OIV-Compendium of International Methods of Analysis.Maximum acceptable limits of various substances contained in wine, 2011 issue. Europe
5. B. Sadee, M. E. Foulkes, S. J. Hill, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**, 30, 102-118
6. B. P. Jackson, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**, 30, 1405-1407
7. S. Musil, Á.H. Pétursdóttir, A. Raab, H. Gunnlaugsdóttir, E. Krupp, J. Feldmann, *Anal. Chem.*, **2014**, 86 (2), 993-999
8. H. R. Hansen, A. Raab, A. H. Price, G. Duan, Y. Zhu, G. J. Norton, J. Feldmann, A. A. Meharg, *J. Environ. Monit.*, **2011**, 13, 32-34
9. K. M. Kubachka, N. V. Shockey, T. A. Hanley, S. D. Conklin and D. T. Heitkemper, Arsenic Speciation in Rice and Rice Products Using High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination version 1.1, 2017 年 8 月访问, <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM479987.pdf>
10. C. K. Tanabe, H. Hopfer, S. E. Ebeler, J. Nelson, S. D. Conklin, K. M. Kubachka, and R. A. Wilson, Matrix Extension and Multilaboratory Validation of Arsenic Speciation Method EAM §4.10 to Include Wine, *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65 (20), 4193-4199

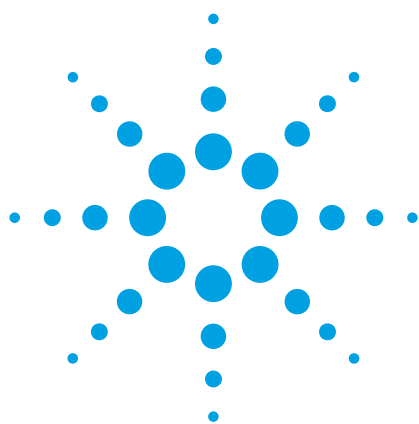
更多信息

关于本研究的完整记述, 请参见: Patrick J. Gray, Courtney K. Tanabe, Susan E. Ebeler, and Jenny Nelson, A fast and fit-for-purpose arsenic speciation method for wine and rice, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2017**, 32, 1031-1034; DOI: 10.1039/C7JA00041C

致谢

美国加州大学戴维斯分校食品安全与测量机构得到了安捷伦科技公司、Gerstel US 和 Constellation Brands 的捐赠支持。





利用基于 GC-ICP-MS/MS 的磷和硫检测方法测定食品中的农药

应用简报

食品检测

作者

Jenny Nelson^{1,3}、Helene Hopfer^{1,2,4}、
Fabio Silva³、Steve Wilbur³、
Jianmin Chen³、Kumi Shiota Ozawa³、
Philip L. Wylie⁵

¹ 加州大学戴维斯分校葡萄栽培和酿酒系，美国加利福尼亚州戴维斯

² 加州大学戴维斯分校食品安全与测量机构，美国加利福尼亚州戴维斯

³ 安捷伦科技有限公司，美国加利福尼亚州圣克拉拉市

⁴ HM Clause 公司，美国加利福尼亚州戴维斯

⁵ 安捷伦科技有限公司，美国特拉华州威尔明顿



前言

测定食品中的农药残留对于婴幼儿来讲尤其重要，因为他们摄入的食物量换算到单位体重会非常高。某些农药是已知的或疑似的内分泌干扰物 (EDC)，因此，即使它们浓度较低，也可能干扰天然激素的功能，从而严重影响儿童的成长。因为通过饮食长期低剂量接触农药，使得人们越来越关注能够将快速样品前处理与联用的分离和检测相结合的高灵敏度分析方法的开发。大多数农药残留实验室使用 QuEChERS（快速、简便、经济、高效、耐用和安全）萃取方法。对于热稳定的弱极性农药，通常使用气相色谱串联质谱 (GC/MS/MS) 分析提取物，对于挥发性较小和/或极性较强的农药，则使用液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 进行分析。一种近年来开发的替代技术涉及将气相色谱与串联四极杆 ICP-MS 联用 (GC-ICP-MS/MS)，该系统能够通过测量大多数农药中的杂原子 P 和 S（以及 Cl 和 Br）来测定农



Agilent Technologies

药。GC-ICP-MS/MS 提供了非常出色的选择性和特异性，并且灵敏度优于成熟的方法。本研究所述的方法可应用于其他化合物，例如有机磷化学战剂、溴代阻燃剂、聚合物添加剂以及香精和香料中的痕量硫化物。

实验部分

试剂

三种农药混标购自 Ultra Scientific (Kingstown, RI, USA) 和安捷伦科技公司 (部件号 5190-0468)。用高纯度乙腈稀释标准溶液以形成中间溶液，然后利用中间溶液通过乙腈连续稀释来配制校准标样溶液。

样品与样品前处理

对几种不同食品基质中的农药含量进行检测，包括婴儿食品水果泥（购自巴西圣保罗）和三种茶叶（购自中国）。将所有食品基质均质化，应用 AOAC 2007.1 QuEChERS 方法 [1]，使用 QuEChERS 萃取试剂盒（部件号 5982-5755）重复萃取三次。

首先，称取约 15 ± 0.1 g 婴儿食品样品或 5 ± 0.1 g 茶叶置于 50 mL 离心管，并向其中加入 15 mL 乙腈。放入两个陶瓷均质子，使用涡旋混合器对每个样品进行 1 min 的均质化混合。加入包含 6 g MgSO_4 和 1.5 g NaCl 的 Agilent Bond Elut QuEChERS 萃取无水盐包。将混合物搅拌 1 min，然后在 2600 g 下离心 5 min。

然后，将 8 mL 的上层乙腈溶液转移至 15 mL 用于一般水果和蔬菜的 Agilent Bond Elut QuEChERS 分散 SPE 离心管（部件号 5982-5058）中，其中包含 N-丙基乙二胺 (PSA) 和 MgSO_4 。将离心管涡旋混合 1 min 并在 2600 g 下离心 5 min。将所得的上清液转移至棕色玻璃样品瓶（部件号 5183-4496）中进行分析。

仪器

使用 Agilent GC-ICP-MS 接口 (G3158D) 将 Agilent 7890 气相色谱仪与 Agilent 8800 ICP-MS 联用。将两根安捷伦色谱柱串联使用。第一根色谱柱 5 m 长，从 $20 \text{ m} \times 0.18 \text{ mm} \times 0.18 \mu\text{m}$ （膜厚）DB-35ms 超高惰性 (UI) 毛细管柱（部件号 121-3822UI）切下（5 m 色谱柱以部件号 G3903-61005 提供）。该色谱柱安装在进样口和吹扫接口的一端之间，并且在运行马上结束前进行反吹，以免高沸点污染物进入第二根色谱柱。第二根色谱柱为 $15 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ （内径） $\times 0.25 \mu\text{m}$ （膜厚）DB-5MS UI 毛细管柱（部件号 19091S-431UI），其安装在吹扫接口的另一端和 GC 柱温箱内 ICP-MS 传输线接口之间。进样口保持 280°C ，在不分流条件下进样，进样量为 $1 \mu\text{L}$ 。利用预加热的尾吹气将气相色谱流出物高效带入等离子体中。GC 操作参数在之前的研究中详细列出 [2]。

磷和硫具有较高的第一电离势，因此它们在 ICP-MS 等离子体中很难被电离，导致其测量灵敏度相对较低。它们也很难通过传统的四极杆 ICP-MS (ICP-QMS) 进行测量，因为光谱干扰很强。然而，在 MS/MS 反应池模式下操作的 ICP-MS/MS 适用于解决这些光谱干扰问题，相比于之前所用的 ICP-QMS，其能够对浓度低得多的 P 和 S 进行定量分析。在本研究中，使用 MS/MS 质量转移模式并以 O_2 作为反应池气体，分别以 m/z 47 处的反应子离子 $^{31}\text{PO}^+$ 和 m/z 48 处的反应子离子 $^{32}\text{SO}^+$ 的形式对 P 和 S 进行测量。

在 ICP-MS/MS 调谐过程中，将供应给气相色谱进样口和辅助电子气路控制 (aux EPC) 模块的氦气载气替换为包含 100 ppm H_2S 的氩气。针对来自 H_2S 加标氩气的 $^{32}\text{S}^+$ 信号，对氧气反应池气体流速和反应池设置进行优化。在切换回纯氦气后，观察到较高的残留硫背景，表明需要在另一个位置将调谐气体引入 ICP-MS/MS 以实现更常规的应用。ICP-MS/MS 操作条件见表 1。

表 1. Agilent 8800 ICP-MS/MS 操作条件

	P 和 S 测量
采样深度 (mm)	3
尾吹气流速 (L/min)	0.6
八极杆偏置电压 (V)	-0.5
动能歧视 (V)	-13
反应池气体	O ₂
反应池气体流速	满量程的 20%
监测质量数	Q1 » Q2 31 » 47; 32 » 48

结果与讨论

为确认 GC-ICP-MS/MS 方法的线性，分别使用 10 个和 6 个校准标样以及空白溶液生成 P（约 0.01-16 µg/L）和 S（约 0.8-33 µg/L）的校准曲线。该浓度代表测量农药中的这些元素所需的范围。在常规操作中，每种化合物的校准可简化为采用 3 个或 4 个校准浓度。在所有化合物中，P 和 S 这两种元素均获得了高于 0.997 的相关系数 (R)，表明在校准范围内具有优异的线性，如表 2 所示。P 和 S 的代表性校准曲线如图 1 所示。

表 2. 基于 PO⁺ 和 SO⁺ 测量得到的 18 种农药化合物的校准范围和相关系数 (R)

化合物	保留时间 ± 0.3 (min)	P		S	
		化合物的校准范围 (µg/L)	相关系数 (R)	化合物的校准范围 (µg/L)	相关系数 (R)
敌百虫	4.103	0.02 - 12	0.999		
虫线磷	5.926	0.02 - 12	0.999	1 - 12	0.996
特丁磷	7.071	0.02 - 11	0.999	1.3 - 33	0.997
地虫磷	7.185	0.02 - 13	0.999	2 - 26	0.997
磷胺	7.299	0.02 - 21	0.998		
除线磷	7.858	0.01 - 10	0.999	0.8 - 10	0.999
甲基毒死蜱	7.973	0.01 - 10	0.997	0.8 - 10	0.995
杀螟硫磷	8.44	0.02 - 11	0.999	2 - 11	0.999
丙硫特普	8.705	0.02 - 16	0.999	0.7 - 16	0.998
毒虫畏	9.486	0.01 - 9	0.996		
丁烯磷	9.541	0.01 - 10	0.999		
三硫磷	11.158	0.08 - 9	0.999	1.1 - 28	0.997
乙硫磷	11.527	0.02 - 15	0.999		
氨磺磷	12.547	0.01 - 10	0.998	4 - 20	0.991
亚胺硫磷	12.851	0.14 - 10	0.996		
溴苯磷	13.263	0.01 - 8	0.999	1 - 8	0.999
益棉磷	13.827	0.01 - 9	0.999	3 - 19	0.996
敌杀磷	14.587	0.02 - 14	0.998		

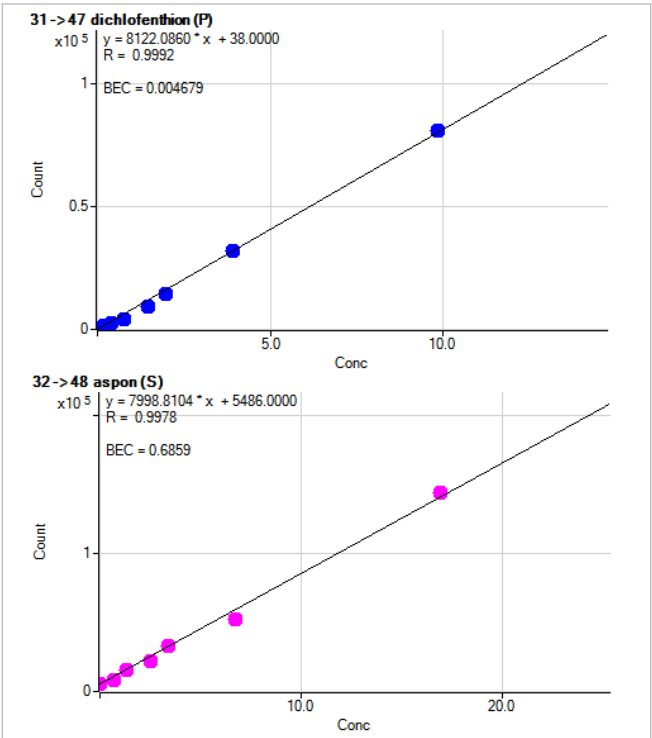


图 1. 上图：除线磷的校准曲线，基于 P 的响应（以 PO⁺ 测量）。
下图：丙硫特普的校准曲线，基于 S 的响应（以 SO⁺ 测量）

根据农药和所用的仪器不同，采用目前的 GC/MS/MS 仪器获得的农药的检测限 (DL) 通常在约 0.1 至 10 µg/L 之间变动 [3, 4]。表 3 所列的数据表明 GC-ICP-MS/MS 在有机磷农药的测定中提供了与 GC/MS/MS 相近或略低的 DL。对于含硫农药而言，GC-ICP-MS/MS 检测限与 GC/MS/MS 获得的检测限相近或略高。表 3 所列的大部分农药均可通过其 P 含量得到检测，且定量限 (LOQ) 远低于大多数食品安全实验室所要求的 10 µg/L。

图 2 示出农药混标中 P 和 S 的叠加色谱图。可轻松鉴定出包含多种杂元素的农药。对实际食品样品中的农药含量进行了测量，四种食品和 200 µg/L 农药混标中的 P 信号的色谱图如图 3 所示。有机磷农药的迹线可以在检测的所有食品样品中查看。

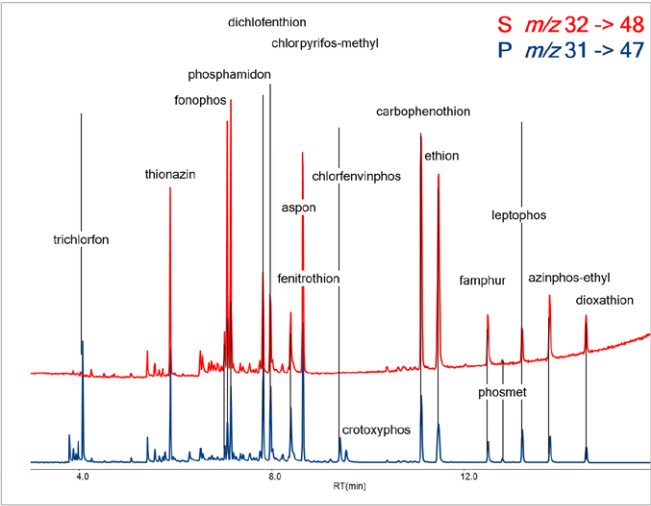


图 2. 色谱图显示了农药混标中鉴定出的农药化合物的 P 和 S 的杂原子迹线
转载经 *J. Agric.Food Chem.*, 2015, 63, 4478–4483 授权。版权所有 (2015) 美国化学学会

表 3. 农药化合物及农药杂原子元素的检测限。检测限 (LOD) 由 3 倍信噪比 (S/N) 计算得出

农药	RT ± 0.3 (min)	P		S	
		化合物 DL (µg/L)	元素 DL (µg/L)	化合物 DL (µg/L)	元素 DL (µg/L)
敌百虫	4.103	0.178	0.021		
虫线磷	5.926	0.221	0.028	11.93	1.580
特丁磷	7.071	0.718	0.077	9.708	3.231
地虫磷	7.185	0.455	0.057	7.917	2.057
磷胺	7.299	0.923	0.095		
除线磷	7.858	0.362	0.036	15.80	1.604
甲基毒死蜱	7.973	0.613	0.059	24.18	2.399
杀螟硫磷	8.440	0.907	0.101	19.52	2.253
丙硫特普	8.705	0.200	0.033	9.912	1.676
毒虫畏	9.486	2.020	0.174		
丁烯磷	9.541	3.338	0.329		
三硫磷	11.158	0.583	0.053	9.585	2.684
乙硫磷	11.527	0.707	0.114	11.51	3.832
氨磺磷	12.547	2.206	0.210	20.61	4.054
亚胺硫磷	12.851	3.829	0.374		
溴苯磷	13.263	1.125	0.085	18.35	1.425
益棉磷	13.827	1.812	0.163	21.33	3.952
敌杀磷	14.587	1.392	0.189	7.840	2.198

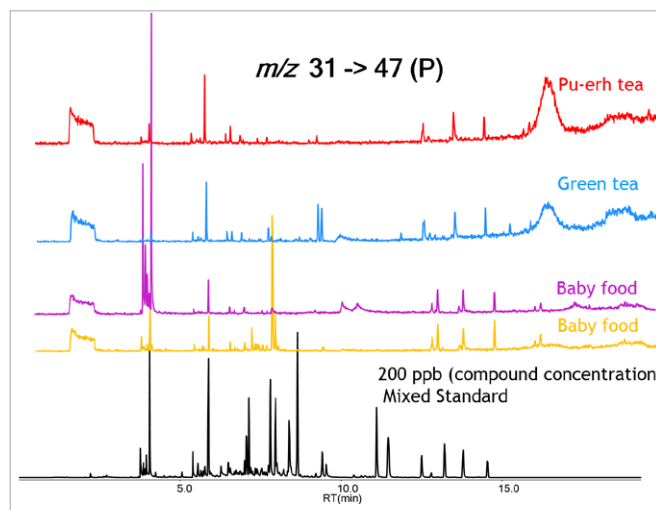


图 3. 示例色谱图显示出在四种食品样品和 200 µg/L 校准标样中测得的 P 信号

转载经 *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63, 4478–4483 授权。版权所有 (2015) 美国化学学会

结论

GC-ICP-MS/MS 方法适用于通过测量杂原子含量对有机磷和有机硫农药进行高选择性和高灵敏度检测。由于 Agilent 8800 ICP-MS/MS 具有显著更低的背景，因此 GC-ICP-MS/MS 相比于 GC/MS/MS 为有机磷农药的测定提供了更好的灵敏度。在调查的所有实际食品样品中，均检测出了农药。

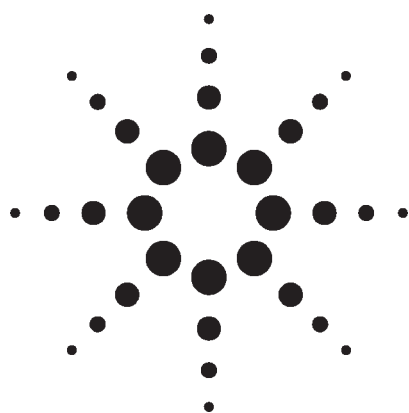
更多信息

关于本应用的完整记述，请参见：Jenny Nelson, Helene Hopper, Fabio Silva, Steve Wilbur, Jianmin Chen, Kumi Shiota Ozawa, and Philip L. Wylie, Evaluation of GC-ICP-MS/MS as a New Strategy for Specific Heteroatom Detection of Phosphorus, Sulfur, and Chlorine Determination in Foods, *J. Agric. Food Chem.*, 2015, DOI: 10.1021/jf506372e

参考文献

1. S. J. Lehotay et al., Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study, *J AOAC Int.* 2007 Mar-Apr; 90 (2): 485-520
2. P. L. Wylie, C. Meng, 安捷伦三重四极杆 GC/MS/MS 分析 175 种农药残留，安捷伦出版物，2009，5990-3578CHCN
3. M. Churley, 安捷伦科技公司。应用简报 5991-4131CHCN 2014，1–10
4. G. E. Mercer, B. Neuhaus, J. Jones, M. Wong, FDA/ORA/DFS Lab. Inf. Bull.1-32

使用 HPLC-ICP-MS 测定水和土壤中的甲基汞应用



环境保护

作者

陈登云 安捷伦科技（中国）有限公司
中国北京，邮编 100022

荆淼、王小如 国家海洋局第一海洋研究所
中国青岛，邮编 266061

摘要

本应用摘要描述了用于分离和测定甲基汞和乙基汞的方法，该方法基于高效液相色谱 (HPLC)/电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 联用系统。汞的化学形态不同毒性不同，因此将汞元素从烷基化形式分离出即可提供重要信息，了解样品的实际毒性。HPLC-ICP-MS 方法可用于分析水和土壤样品。该方法对于水中 MeHg、EtHg 和 Hg^{2+} 的检测限低于 10 ng/L，而对于土壤样品中的汞化合物，回收率在 80% 至 120% 之间。

前言

重金属是天然水中最主要的污染物。在各类污染物中，汞 (Hg) 因其毒性以及在食物链中可富集，尤其受关注。整个生态系统中，包括空气、水、土壤和生物体，都含有痕量的汞。这种痕量元素的不同物理和化学形式具有显著不同的性质 [1]。众所周知，汞的毒性高度依赖于其化学形式，无机汞和有机汞毒性不同。甲基汞 (MeHg) 是环境和生物材料中最常见到的有机汞化合物，也是毒性最大的，而乙基汞 (EtHg)

和苯基汞则在环境中很罕见。MeHg 的毒性比无机汞化合物的毒性要强 10-100 倍 [2, 3]，接触一定量的 MeHg 就会导致神经疾病 [4]。因为具有较高的脂溶性，所以 MeHg 可以透过血脑屏障并且易于扩散入细胞膜 [5]。由于胎儿的大脑处于快速发育期，因此极易受到伤害。汞的主要来源是发电和其它工业活动的废气排放。一旦进入环境，生物活动通常会将汞甲基化为 MeHg，有时也会生成二甲基汞。鱼类和其他海产品是人摄入 MeHg 的主要来源，所以孕妇应控制某些鱼类的摄入量。最近，FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会 (JECFA) 建议，MeHg 的暂定每周耐受摄入量 (PTWI) 由每周每千克体重 3.3 μg 降至每周每千克体重 1.6 μg 。见表 1。



表 1. 食品中 MeHg 的规定含量 (PTWI)

权威机构	MeHg ($\mu\text{g/kg}$ 体重)
联合国粮农组织	1.6
世界卫生组织 (WHO)	1.6

PTWI = 暂定每周最大摄入量。

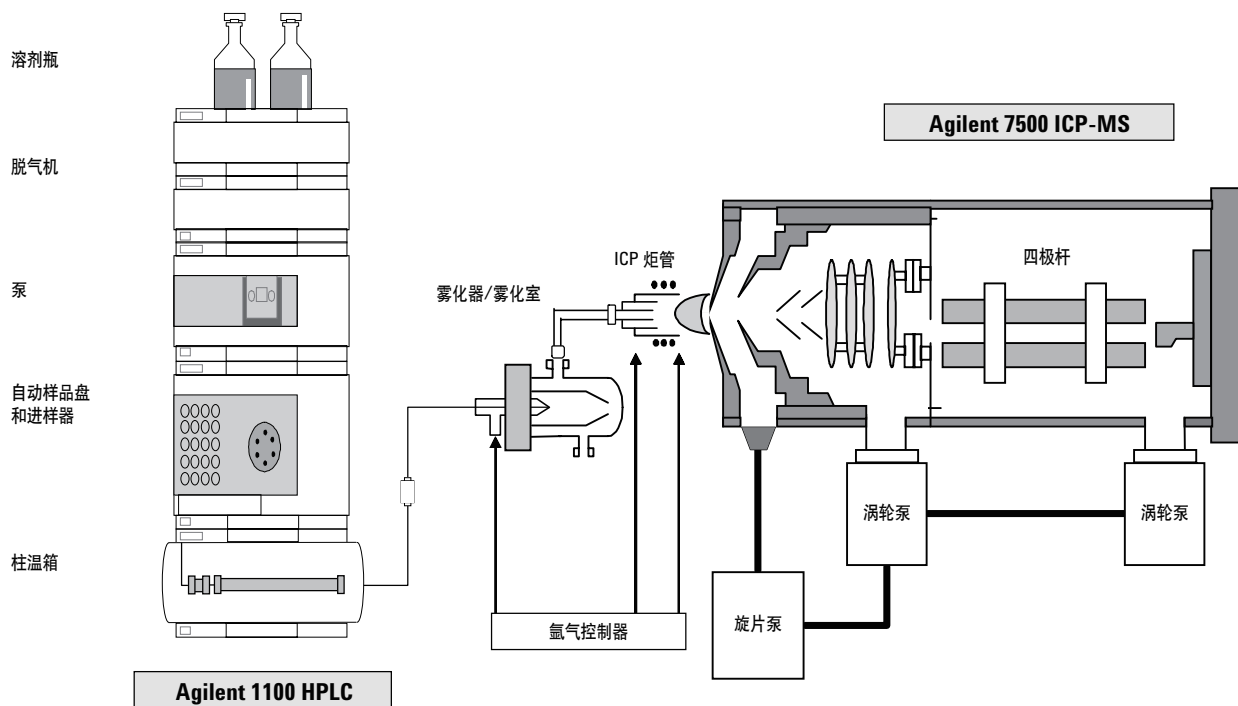
“中国城镇污水处理厂污染物排放标准 (GB 18918-2002)” 规定 MeHg 的含量水平为“检测不到”，即低于建议方法的检测限 (DL) (10 ng/L)[6]。

有几种方法可以测定环境样品中的总汞含量，但是同时测定无机汞和有机汞却并非易事。这是因为通常 MeHg 的浓度远低于无机汞。最常用的汞形态分析方法是结合汞特异性检测器（荧光、光度或其它的元素检测器）的气相色谱 (GC) 或 HPLC。天然水中汞的浓度很低，因此需要处理的样品体积非常大。还需要进行预浓缩步骤，因为目标物检测限经常低于所用检测器的灵敏度。

在中国，测定 MeHg 的建议方法 (GB/T14204-93) 使用配有电子捕获检测器 (ECD) 的气相色谱。这种方法的局限性包括

- 方法检测限 (MDL) 为 10 ng/L，但富集过程很复杂
- 不是汞元素特异性的检测方法
- 易受干扰，从而导致假阳性结果或者低回收率

本研究的目的是通过将 HPLC 与 ICP-MS 联用，开发一种灵敏且特异性的 MeHg 分析方法——见图 1。


图 1. Agilent 1100 HPLC 示意图。

仪器

Agilent 1100 HPLC 通过 Agilent HPLC-ICP-MS 接口与 Agilent 7500a 连接。选择 PEEK 20 μL 、100 μL 和 1000 μL 取样环。HPLC 和 ICP-MS 的操作参数在表 2a 和 2b 中列出。

表 2a. HPLC 的工作参数

色谱柱	ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm 内径 \times 50 mm, 5 μm
流动相	0.06 mol/L 乙酸铵, 5% v/v 甲醇, 0.1% 2-巯基乙醇, pH = 6.8
流速	0.4 mL/min
进样量	100 μL

表 2b. Agilent 7500a ICP-MS 的工作参数

射频功率	1550 W
喷雾器	PFA 同心 100 $\mu\text{L}/\text{min}$
雾化室	石英, Scott 双通道, 冷却至 -5°C
炬管	单片 Fassel 石英, 2.5 mm 进样器
取样深度	4.5 mm
载气流速	0.75 L/min
尾吹气流速	0.40 L/min

稳定性与灵敏度

为了监测仪器的稳定性, 向甲醇洗脱液中加入 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 铋 (Bi) 作为内标 (ISTD)。通过优化 Bi 信号而调试 7500a, 获得最高的灵敏度。在 10 个小时的测试中, 内标的 RSD 小于 5%。因为漂移降至最低, 所以无需进行内标校正。实际分析中不使用 Bi 或任何其它内标。

HPLC 色谱柱

为了得到最佳结果, 用泵以 0.4 mL/分钟抽入 HPLC 级甲醇至少 2 小时来对 HPLC 色谱柱 (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm 内径 \times 50 mm, 5 μm) 进行预调, 然后抽入洗脱液 (流速相同) 至少半小时进行调节。如果没有这个调节过程, 系统中的污染物将影响无机汞, 使回收率明显降低或出现峰分裂。

结果与讨论

使用标准溶液进行色谱分离

使用表 2a 和表 2b 中所述的操作条件, 将混合了汞化合物标准品的纯水溶液注入 HPLC。得到的总离子色谱 (TIC) 表明目标物分离良好。见图 2。

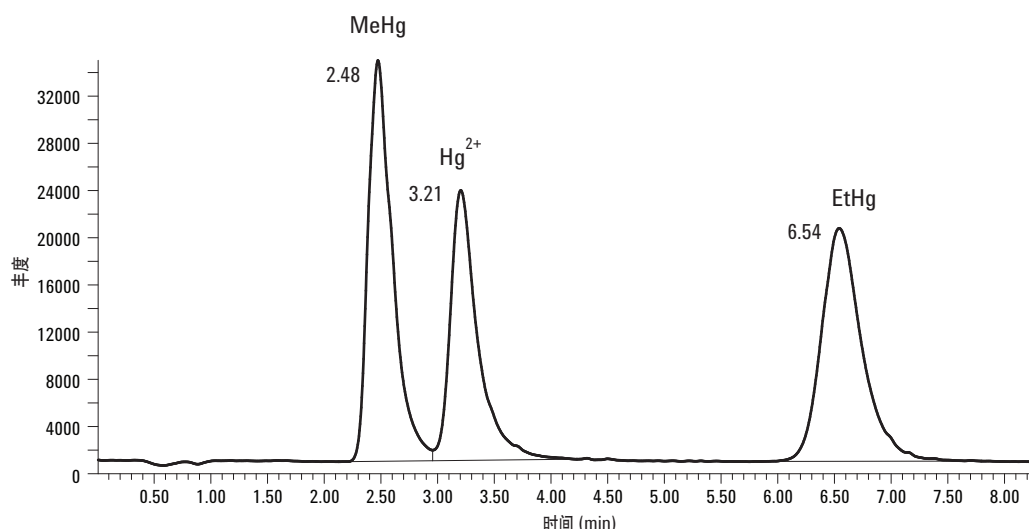


图 2. 三种混合的汞化合物标准品的纯水溶液的 HPLC-ICP-MS TIC: MeHg 2.48 min, Hg²⁺ 3.21 min, 而 EtHg 为 6.54 min, 使用 100 μL 进样环。各 1.0 ppb。

表 3. 用 HPLC-ICP-MS 测定的汞化合物形态的积分结果

保留时间 (min)	化合物	汞浓度 ($\mu\text{g/L}$)	峰面积
2.48	MeHg	1.0	5.09E+06
3.21	Hg ²⁺	0.8	3.87E+06
6.54	EtHg	1.0	4.91E+06

检测效率

因为每种汞化合物的加标浓度均为 1.0 $\mu\text{g/L}$ ，所以三种化合物形态的峰面积相似（见表 3）。细微的差别可能源于标准品的纯度或者标准品制备过程所导致的误差。

HPLC-ICP-MS 系统的一个优势是无论化合物的化学结构如何，氙等离子体都能分解元素并将其离子化。信号与初始结构无关称为化合物非依赖性，由此可以基于汞的摩尔浓度进行校正（化合物非依赖性校正 (CIC)）。对于所有确定的形态，得到的结果都相当准确，即使化合物未被识别（未知化合物）。

线性度

如图 3 所示，将样品稀释 100 倍时（对于 MeHg 和 EtHg 是 10 ng/L，对于 Hg²⁺ 是 8 ng/L），仍然可以测量出汞化合物。保留时间 (RT) 也相当稳定。RT 为 1.35 分钟的小峰是柱污染产生的。如果用甲醇清洗色谱柱就不会出现这个峰。

图 3 的色谱图显示，汞化合物的 MDL 低于 10 ng/L。如果使用较高纯度的试剂解决洗脱液污染的问题，则可以实现亚 ng/L 级的 MDL。

稀释混合的汞化合物储备液（对于纯水中的 MeHg 和 EtHg，汞浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，对于纯水中的 Hg²⁺，汞浓度为 0.8 $\mu\text{g/mL}$ ），制备浓度从 10 ng/L 到 100 $\mu\text{g/L}$ 的一系列校正标准品。始终使用 20 μL 进样环，但 10 ng/L 的数据除外，这是使用 100 μL 进样环得到的结果。将三种混合的汞化合物的不同浓度水平积分得到峰面积。使用 HPLC-ICP-MS 方法进行汞化合物形态分析的校正曲线的线性范围（表 4 和图 4）至少为 4 个数量级。这个线性范围覆盖了预计的实际样品水平，因此本方法适用于直接测定水样品而无需使用复杂的预浓缩过程。

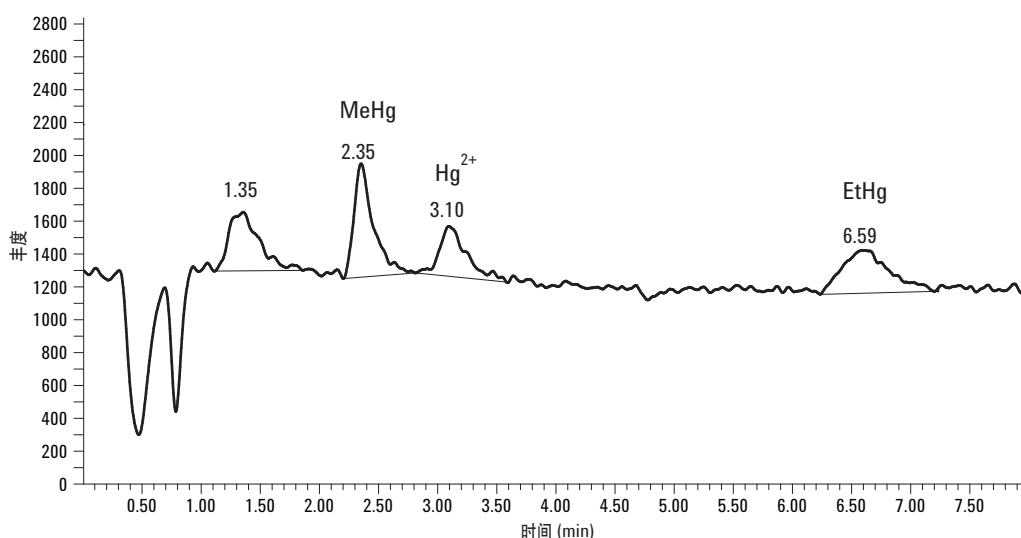


图 3. 10 ng/L 汞化合物标准的纯水溶液的 HPLC-ICP-MS TIC。（污染物 1.35 min，MeHg 2.35 min，Hg²⁺ 3.10 min，而 EtHg 为 6.59 min，使用 100 μL 进样环）

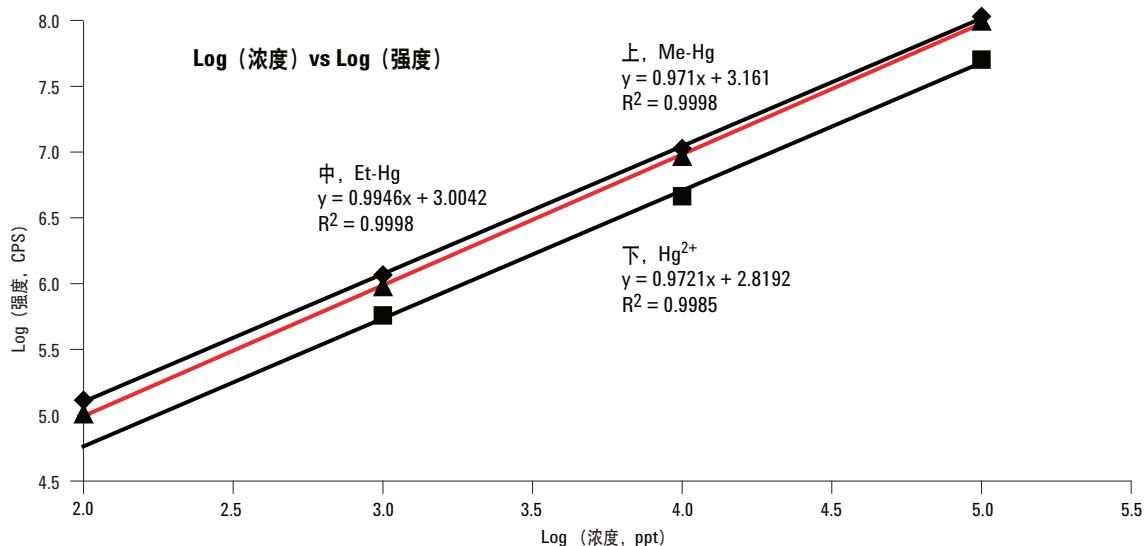


图 4. MeHg、Hg²⁺ 和 EtHg 的校正曲线。

表 4. 用 HPLC-ICP-MS 测定的不同浓度汞化合物形态的峰面积积分 (Hg²⁺ 浓度为所示数值的 80%)

浓度 (ng/L)	MeHg	Hg ²⁺	EtHg
100000	1.07E+08	5.03E+07	9.83E+07
10000	1.06E+07	4.61E+06	9.24E+06
1000	1.17E+06	5.72E+05	9.44E+05
100	1.30E+05	1.23E+05	1.02E+05
10	5.86E+04	3.55E+04	5.86E+04

100 ng/L 的 MeHg、EtHg 和 Hg²⁺。使用 0.45 μm 膜过滤溶液，然后进行分析。测量中使用 20 μL 进样环。如图 5 所示，²⁰²Hg 离子色谱与用纯水稀释成相同浓度的溶液的相应离子色谱图重叠。对 3% NaCl 溶液中汞化合物形态的峰面积进行积分，并且相对于溶于纯水的标准品，回收率在 90% 至 110% 之间。这证明本方法对于海水之类的高浓度基质样品也同样适用。

3% NaCl 溶液中汞化合物形态的色谱分离

为了测试本方法对于高基质样品的分析能力，将汞化合物储备液在 3% NaCl (w/v 水溶液) 中稀释，得到

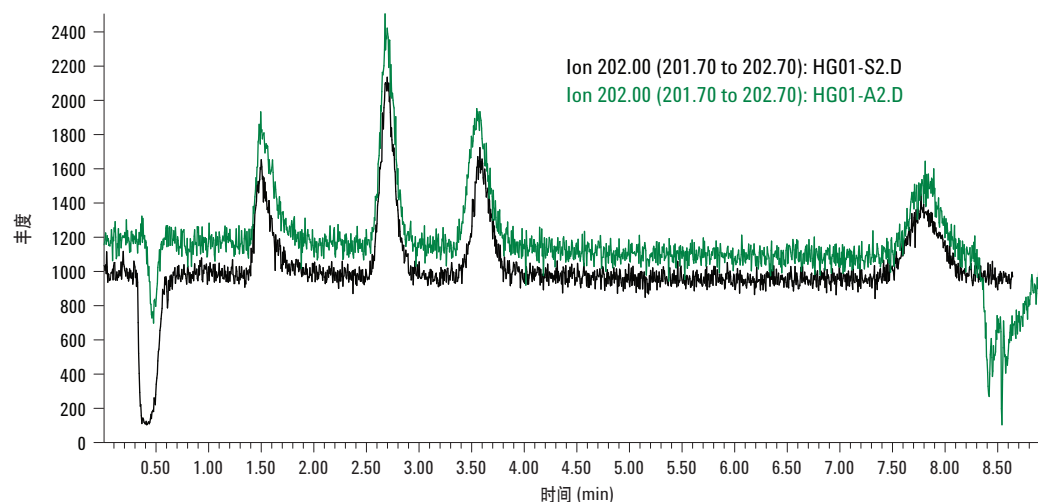


图 5. 纯水 (上方曲线) 中与 3% NaCl (w/v, 下方曲线) 中的 100 ng/L (使用 20 μL 进样环) 汞化合物标准品的 HPLC-ICP-MS 离子色谱图叠加。

土壤样品中的应用

将 HPLC-ICP-MS 方法用于固体样品，比如组织、土壤或沉积物时，需要进行样品前处理。从固体样品中提取汞化合物是一个关键步骤，因为环境样品中无机汞的含量很低。汞化合物，特别是 MeHg，很容易丢失或者转化成其它分子。根据报道，有多种方法可用于防止 MeHg 化合物在消化过程中受到破坏，包括使用稀盐酸或螯合剂从样品中提取化合物 [7]。然而已报道的提取无机汞和有机汞化合物的方法耗时费力，并且需要大量高纯度溶剂或特殊试剂。本研究使用基于稀盐酸的简单提取方法。土壤样品的加标回收率在 80% 至 120% 之间。计划进一步测试本方法以及含有 MeHg 的对照土壤样品。

汞化合物提取方法

1. 称取 1.00 g 土壤样品，放入 20 mL 塑料离心管中。
2. 向土壤样品中加入 0 至 90 μL 100 ng/L 混合的汞化合物标准品溶液。震荡混合。

3. 向每个管中加入 9.0 mL 7.6% HCl (w/v) 和 1.0 mL 10% 2-巯基乙醇。将样品在超声波清洗器中放置 30 分钟，促进提取。
4. 以 3000 rpm 的速度将样品离心 5 分钟，使颗粒沉淀。
5. 将 2.0 mL 上层（澄清）溶液转移到 50 mL 干净的 PET 瓶中。加入 15.0 mL 纯水。
6. 使用 10% 氨溶液将溶液的 pH 值调节至 6.8。
7. 向溶液中加入纯水直至溶液重量达到 20.0 g。
8. 使用 0.45 μm 膜过滤溶液，然后进行 HPLC-ICP-MS 测定。

用 7.6% HCl 提取的土壤样品的 HPLC-ICP-MS TIC 结果如图 6 所示。土壤样品中加入了 90 ng（汞含量）混合的汞化合物标准品。由于土壤中存在无机汞，因此色谱图中 Hg^{2+} 的峰高高於其它两个峰。对未加标的土壤样品的分析表明，MeHg 和 EtHg 的水平不显著。表 5 显示加标回收测试的测量结果。

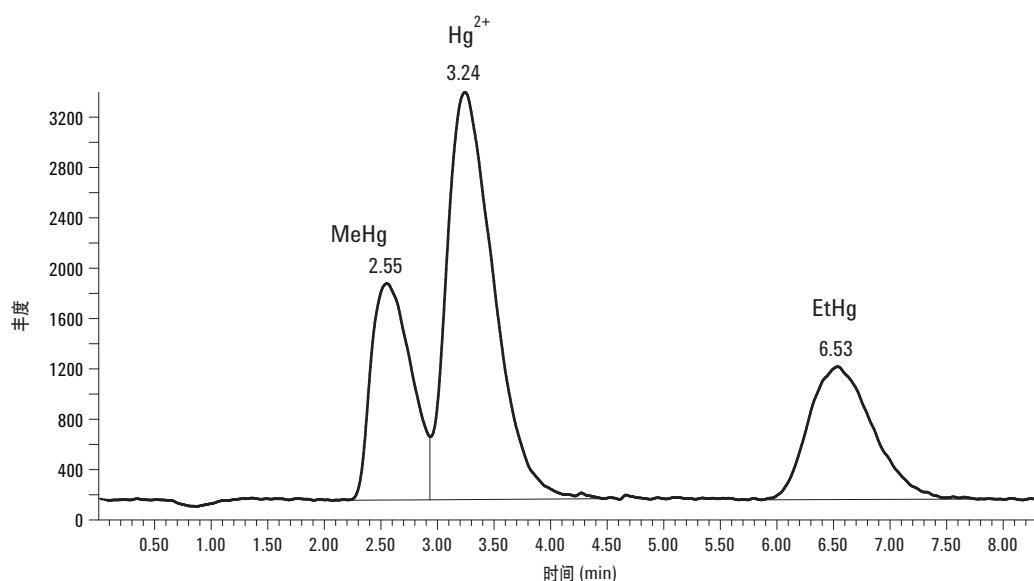


图 6. 土壤样品 S-A-03 的 HPLC-ICP-MS TIC 色谱图，该样品使用 7.6% HCl 提取，加入 0.9 ng（汞含量）混合的汞化合物标准品。MeHg 2.55 min， Hg^{2+} 3.24 min，而 EtHg 为 6.53 min，使用 100 μL 进样环。

表 5. 使用 HPLC-ICP-MS 测定的土壤样品中汞化合物的加标回收率

样品	汞化合物形态	实际值 (pg)	测量值 (pg)	回收率 (%)
S-BLK-1	MeHg	NA	2	NA
	Hg ²⁺	61	63	103
	EtHg	NA	+	NA
S-BLK-2	MeHg	NA	9	NA
	Hg ²⁺	61	65	107
	EtHg	NA	+	NA
S-A-03	MeHg	90	85	95
	Hg ²⁺	151	185	122
	EtHg	90	82	91
S-A-04	MeHg	90	80	89
	Hg ²⁺	151	181	120
	EtHg	90	75	83
S1-1	MeHg	36	34	94
	Hg ²⁺	97	88	91
	EtHg	36	28	77
S1-2	MeHg	36	37	104
	Hg ²⁺	97	105	108
	EtHg	36	35	97
S1-3	MeHg	36	41	113
	Hg ²⁺	97	98	101
	EtHg	36	43	120

NA 不适用

+ 未测量

加标回收率全部在大约 80% 至 120% 之间，证实这种样品前处理过程适用于使用 HPLC-ICP-MS 进行土壤样品分析。

结论

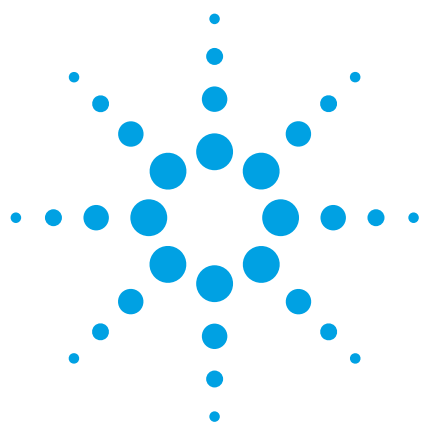
即使水样品中基质含量很高，HPLC-ICP-MS 也适合进行水样品分析。MeHg、EtHg 和 Hg²⁺ 的 MDL 均低于 10 ng/L，符合目前的法规要求。本方法用于土壤样品分析时，适合用 7.6% HCl 提取汞化合物，回收率在 80% 至 120% 之间。

参考文献

1. J. O. Nriagu (Ed.), *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979.
2. National Academy of Science, *An Assessment of Mercury in the Environment*, National Research Council, Washington, DC, 1978.
3. R. Hartung, B. D. Dinman (Eds.), *Environmental Mercury Contamination*, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, 1972.
4. M. Berlin, 1986. Mercury. In: Friberg, L., Nordberg, G., Vouk, V. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, Amsterdam, pp. 387–444.
5. J.S. Felton, E. Kahn, B., Salick, F.C. van Natta, and M.W. Whitehouse, (1972) Heavy metal poisoning: mercury and lead. *Ann. Intern. Med.* **76**, 779–792.
6. 中国城镇污水处理厂污染物排放标准, GB 18918-2002, 2002.
7. M. Jackie, A. C. Vikki, and H.E.G. Philip., *J. Anal. At. Spectrom.*, (2002), **17**, 377–381.

如需更多信息

有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。



采用离子色谱-ICP-MS 测定环境水样中的碘普罗胺

应用简报

环境

作者:

Armando Durazo, Tarun Anumol,
和 Shane A. Snyder

美国亚利桑那州图森市亚利桑那大学
化学与环境工程系和 BIO5 研究院



摘要

采用 Agilent 7700x ICP-MS 和 Agilent 1260 LC 完成了环境水样中碘普罗胺的测定。使用高基体样品引入 (HMI) 技术实现氢氧化钠 (NaOH) 洗脱液的持续运行, 八极杆反应池系统 (ORS³) 结合氦气模式减少了碘 (m/z 127) 的多原子干扰。



Agilent Technologies

引言

碘普罗胺是一种含碘的造影剂 (ICM)，可通过 X 射线或电脑断层成像术 (CT) 扫描对体内组织或血管成像。碘普罗胺通常以 g/L 的浓度水平施用给病患，并在 24 小时内随病患的尿液排出 [1]。它的亲水性 ($\log K_{ow} = -2.33$) 和非离子性极强，使其能在环境中持久存在。碘普罗胺的分子式是 $C_{18}H_{24}I_3N_3O_8$ ，其化学结构如图 1 所示。

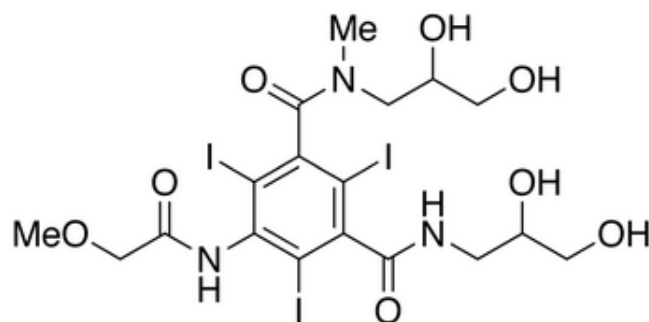


图 1. 碘普罗胺的化学结构

有关地表水和废水中存在碘普罗胺的报道很多，浓度范围从几个 ng/L 到污水处理厂的高达 10 $\mu\text{g/L}$ [2–4]。此外，已知 ICM 可抗污水处理，研究表明传统的处理工艺很难将其除去 [2, 5–7]。由于它的存在和环境持久性，有人提议用碘普罗胺作为废水污染的潜在指示剂 [8]。

最近的研究表明，碘普罗胺及其他 ICM 在水处理工艺的氧化和消毒过程中可形成有毒的碘化消毒副产物 (I-DBP) [4, 9, 10]。已知某些 I-DBP 的毒性要比氯化化和溴化的消毒副产物高好几倍 [11–13]，但是目前美国环境保护署 (USEPA) 和其它管理机构尚未对其进行管制。

大多数针对碘普罗胺和其它 ICM 所建立的分析方法使用的是液质联用技术，质谱仪通常是三重四极杆质谱仪 [9, 14–17]。离子阱和核磁共振的混合型方法也有被采用。本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 LC 和 Agilent 7700x ICP-MS 对水提取物中亚 ppb 级的碘普罗胺进行灵敏、可重现性分析的最佳条件。当进样量为 500 μL 时，我们在稀释的甲醇提取物中获得了低至 0.1 ppb 的碘普罗胺方法报告限 (MRL)；在理论上，这相当于环境水样中的 MRL 可低至 2 ppt 的水平。

实验部分

环境水样取自加利福尼亚州河流和小溪沿岸所设立的监测点，包括靠近水处理厂的位置。水样先经过 0.7 μm 滤膜过滤，然后通过自动固相萃取系统进行萃取。200 mg 亲水-亲脂平衡 (HLB) 填充柱先用 5 mL 甲基叔丁醚 (MTBE) 预处理，然后用 5 mL 甲醇和 5 mL HPLC 级水处理。每个样品取 1 L 按照 15 mL/min 的流速装载到柱子上，然后用 HPLC 级水淋洗，接着再用氮气干燥 30 min。使用 5 mL 甲醇，接着再用 5 mL 10/90 (v/v) 甲醇/MTBE 溶液将吸附的待分析物淋洗到 15 mL 的刻度圆锥管中。然后将淋洗液在氮气流中蒸发至体积不到 100 μL ，再用甲醇复溶至总体积为 1.0 mL。取 50 μL 该萃取液，加入 950 μL HPLC 级水稀释，该溶液用于 IC-ICP-MS 分析。

将上述稀释后的萃取液进样到与 Agilent 7700x ICP-MS 联用的 Agilent 1260 HPLC，进样体积为 500 μL 。色谱分离条件：Dionex AG16 4 x 50 mm 的保护柱，Dionex AS16 4 x 250 mm 分析柱，2–90 mM 氢氧化钠 (NaOH) 的梯度淋洗，二元梯度组成为试剂水 (A) 和 100 mM NaOH (B)，恒

定流速为 1.0 mL/min。梯度参数：2% B 淋洗 18.5 min，然后 3.5 min 内线性增加至 40% B，保持 2 min，最后增加到 90% B 并保持 6 min。在运行结束时梯度淋洗再返回到 2% B 5 min，以平衡柱子，总运行时间为 35 min。在所有标准品和样品进样之后，用 10% 的甲醇水溶液清洗进样针 25 秒。

Agilent 7700x ICP-MS 采用 HMI 样品引入（0.6 L/min 稀释气，0.5 L/min 载气，样品深度 = 9 mm），在氦气碰撞模式下运行（氦气流速 3.5 mL/min）。以时间分辨分析 (TPA) 模式对碘 (m/z 127) 强度进行监测，积分时间 2 s，时间窗口 37 min。使用 HMI 可以扩展分析高基质样品，最大限度减少基质在接口锥上的沉积；使用氦气碰撞池能够消除对质量数 127（如 $^{126}\text{XeH}^+$ ）的潜在多原子干扰。使用浓度为 0.0、0.1、1、10、100 和 1000 ppb 的碘普罗胺标准品水溶液制作了碘普罗胺的校准曲线（图 3）。

结果和讨论

使用上述方法，我们得以检测研究中所用的所有非零标准品中的碘普罗胺。进样 0.1 ppb 所得的色谱图明显区别于空白进样（如图 2 所示），且校准曲线在四个数量级范围内呈现出线性关系（如图 3 所示）。该浓度范围涵盖了已在环境水样（包括未经稀释的污水出水）中观测到的碘普罗胺浓度。

本报告中的标准品和样品是在 24 小时连续运行期间分析的。所得结果列于表 1。流程结束时分析的其它 CCV 的结果都与其预期值吻合，误差大约在 10% 的范围之内。

除了碘普罗胺外，在我们的色谱图中还检测出了多个其他含碘化合物，如图 4 所示。这些未知形态可以用化合物无关校准 (CIC)，按照其碘浓度进行定量。即利用已知含碘化合物（本例中采用碘普罗胺）的碘响应值校准未知化合物的碘含量。ICP-MS 是使用 CIC 进行分析的理想选择，因为高温 ICP 离子源能够确保目标元素（本例中为碘）的元素响应值基本上独立于目标元素所在的化合物。对这些未鉴定峰中的碘含量的定量结果列于表 2。

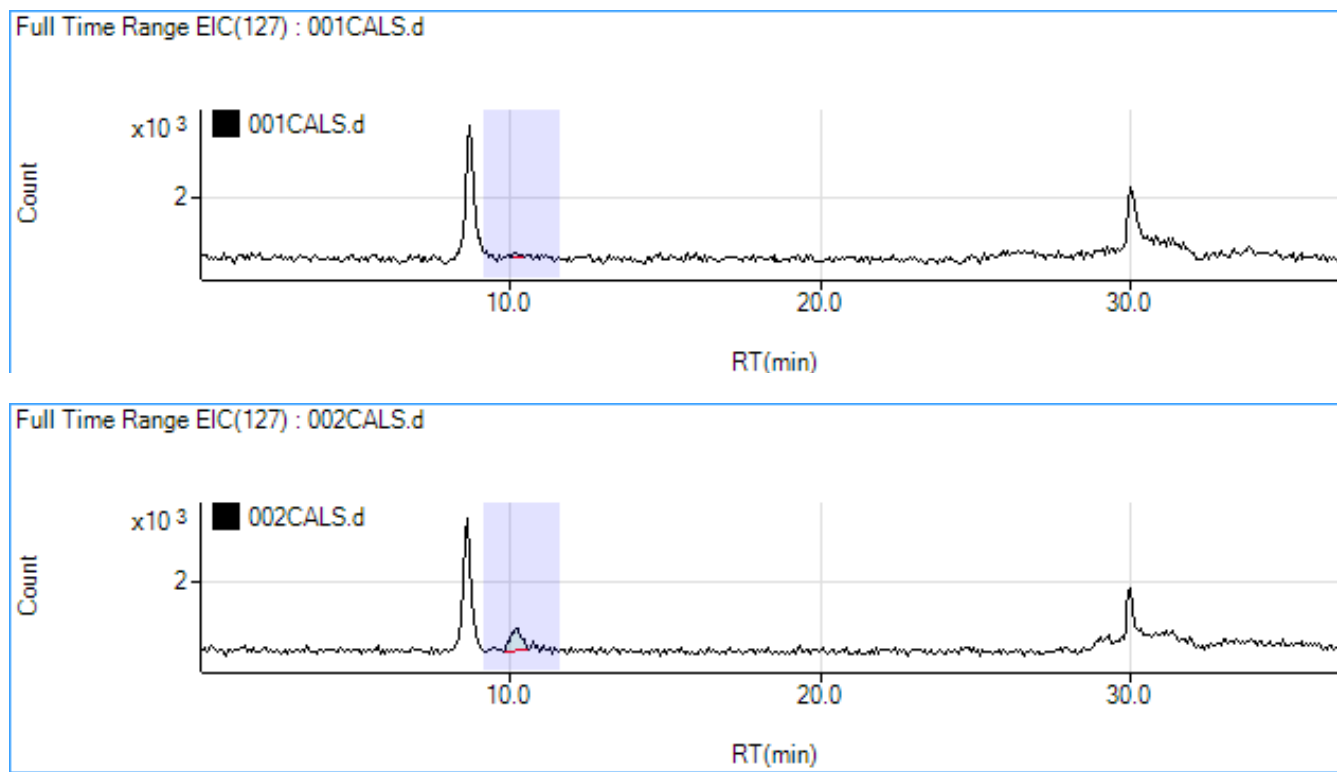


图 2. 碘 (m/z 127) 色谱图的比较: 上图为水空白提取液, 下图为含 0.1 ppb 碘普罗胺的标准水溶液。碘普罗胺的保留时间为 10.1 min

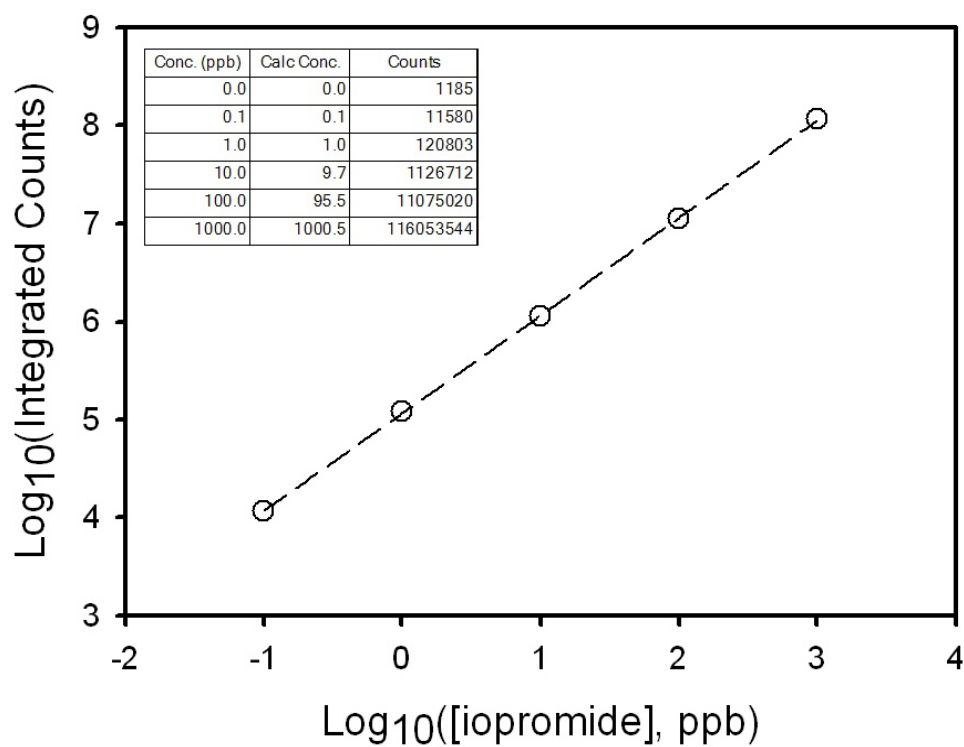


图 3. 碘普罗胺的校准曲线 (log/log)。浓度坐标轴单位为 ppb, 校准点分别为 0.0、0.1、1、10、100 和 1000 ppb。插入表给出的是校准标准溶液的具体响应值

表 1. 所有样品中测得的碘普罗胺浓度概览

样品					浓度 (ppb)
007SMPL.d	4/20/2012 2:03 PM	样品	SJC1		246.19
008SMPL.d	4/20/2012 2:48 PM	样品	LAR Ref		0.14
009SMPL.d	4/20/2012 3:33 PM	样品	LAR Eq 空白		0.19
010SMPL.d	4/20/2012 4:18 PM	样品	LAR 6		2.53
011SMPL.d	4/20/2012 5:04 PM	样品	LAR 5		1.97
012SMPL.d	4/20/2012 5:49 PM	样品	LAR 4		2.44
013SMPL.d	4/20/2012 6:34 PM	样品	LAR 3		1.86
014SMPL.d	4/20/2012 7:19 PM	样品	LAR 2		0.57
015SMPL.d	4/20/2012 8:04 PM	样品	LAR 1		2.19
016SMPL.d	4/20/2012 8:50 PM	样品	Eq 空白		0.00
017SMPL.d	4/20/2012 9:35 PM	样品	100 ppb STD		107.23
018SMPL.d	4/20/2012 10:20 PM	样品	SGR ref		0.14
019SMPL.d	4/20/2012 11:05 PM	样品	SGR 6		32.69
020SMPL.d	4/20/2012 11:51 PM	样品	SGR 5b		33.34
021SMPL.d	4/21/2012 12:36 AM	样品	SGR 5a		1.68
022SMPL.d	4/21/2012 1:21 AM	样品	SGR 5		85.22
023SMPL.d	4/21/2012 2:06 AM	样品	SGR 3b		1.13
024SMPL.d	4/21/2012 2:52 AM	样品	SGR 3a		108.35
025SMPL.d	4/21/2012 3:37 AM	样品	空白		0.05

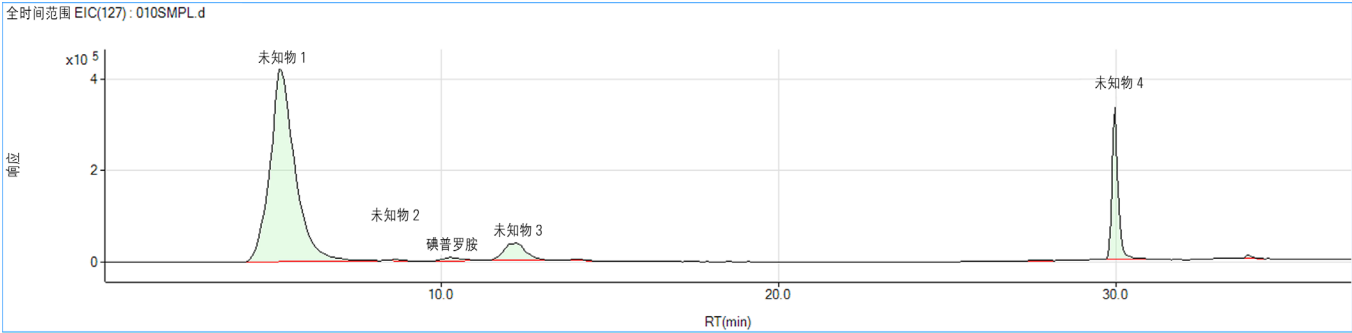


图 4. 代表样品的提取离子色谱 (m/z 127), 表明水提取液中各种含碘化合物的存在

表 2. 所有提取液中测量的含碘化合物的浓度（以碘浓度表示）。注意所有化合物包括碘普罗胺的结果都是以碘的浓度表示，因此，以碘浓度表示的碘普罗胺的报告值大约是表 1 所示的碘普罗胺实际浓度的一半

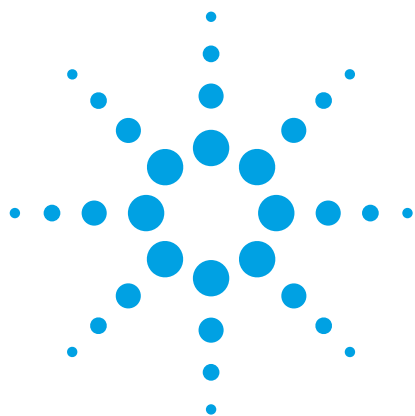
样品				未知物 1 保留时间 5.2 min	未知物 2 保留时间 8.5 min	碘普罗胺	未知物 3 保留时间 12 min	未知物 4 保留时间 30 min
数据文件	采集日期和时间	类型	样品名称	浓度 (ppb)	浓度 (ppb)	浓度 (ppb)	浓度 (ppb)	浓度 (ppb)
007SMPL.d	4/20/2012 2:03 PM	样品	SJC1	268.55	0.24	118.17	5.77	9.64
008SMPL.d	4/20/2012 2:48 PM	样品	LAR Ref	1.43	0.23	0.07	0.00	55.55
009SMPL.d	4/20/2012 3:33 PM	样品	LAR Eq 空白	1.86	0.20	0.09	0.00	0.38
010SMPL.d	4/20/2012 4:18 PM	样品	LAR 6	84.23	0.29	1.21	6.16	17.13
011SMPL.d	4/20/2012 5:04 PM	样品	LAR 5	98.87	0.39	0.95	7.11	11.95
012SMPL.d	4/20/2012 5:49 PM	样品	LAR 4	128.68	0.38	1.17	12.97	13.03
013SMPL.d	4/20/2012 6:34 PM	样品	LAR 3	116.40	0.27	0.89	10.21	12.62
014SMPL.d	4/20/2012 7:19 PM	样品	LAR 2	156.01	0.22	0.28	12.86	14.87
015SMPL.d	4/20/2012 8:04 PM	样品	LAR 1	189.00	0.29	1.05	12.15	22.51
016SMPL.d	4/20/2012 8:50 PM	样品	Eq 空白	0.28	0.19	0.00	0.00	0.21
017SMPL.d	4/20/2012 9:35 PM	样品	100 ppb STD	0.00	0.15	51.47	N/D	0.11
018SMPL.d	4/20/2012 10:20 PM	样品	SGR ref	0.34	0.21	0.07	0.00	0.29
019SMPL.d	4/20/2012 11:05 PM	样品	SGR 6	142.49	0.16	15.69	8.46	20.54
020SMPL.d	4/20/2012 11:51 PM	样品	SGR 5b	194.45	0.12	16.00	11.20	14.92
021SMPL.d	4/21/2012 12:36 AM	样品	SGR 5a	7.27	0.19	0.81	0.37	54.73
022SMPL.d	4/21/2012 1:21 AM	样品	SGR 5	326.73	0.10	40.91	11.29	5.66
023SMPL.d	4/21/2012 2:06 AM	样品	SGR 3b	24.46	0.28	0.54	3.95	6.56
024SMPL.d	4/21/2012 2:52 AM	样品	SGR 3a	322.50	N/D	52.01	11.36	3.14
025SMPL.d	4/21/2012 3:37 AM	样品	空白	0.03	0.23	0.03	0.00	0.18

结论

我们利用 Agilent 1260 LC 和 Agilent 7700x ICP-MS 联用系统成功地对一系列环境水样提取物中的碘普罗胺进行了定量分析。我们基于这一配置建立的分析方法，可使通过自动化 SPE 系统制备的提取液中碘普罗胺的方法检测限降低至 0.1 ppb。使用 HMI 接口可延长持续分析时间 (>24 h)（使用非挥发性洗脱液），最大限度减少基质在接口锥上的沉积，并且氦碰撞模式的应用有效消除了多原子干扰。我们的工作不仅证实并定量测定了这些环境样品中存在的碘普罗胺，而且还发现了这些样品中存在的其它含碘有机化合物，这些化合物很可能是人为排放的，而且可能具有生物活性。

参考文献

1. Steger-Hartmann, T. et al. (2002). Investigations into the environmental fate and effects of iopromide (ultravist), a widely used iodinated x-ray contrast medium. *Water Research*, 36(1), 266–274.
2. Ternes, T. A. & Hirsch, R. (2000). Occurrence and behavior of x-ray contrast media in sewage facilities and the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, 34(13), 2741–2748.
3. Carballa, M., et al. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, 38(12), 2918–2926.
4. Kormos, J. L., Schulz, M. & Ternes, T. A. (2011). Occurrence of iodinated x-ray contrast media and their biotransformation products in the urban water cycle. *Environmental Science & Technology*, 45(20), 8723–8732.
5. Drewes, J. E., Fox, P. & Jekel, M. (2001). Occurrence of iodinated x-ray contrast media in domestic effluents and their fate during indirect potable reuse. *Journal of Environmental Science and Health Part A — Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 36(9), 1633–1645.
6. Drewes, J. E., et al. (2003). Fate of pharmaceuticals during ground water recharge. *Ground Water Monitoring and Remediation*, 23(3), 64–72.
7. Snyder, S. A., et al. (2007). Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination*, 202(1–3), 156–181.
8. Dickenson, E. R. V. et al. (2011). Indicator compounds for assessment of wastewater effluent contributions to flow and water quality. *Water Research*, 45(3), 1199–1212.
9. Duirk, S. E., et al. (2011). Formation of toxic iodinated disinfection byproducts from compounds used in medical imaging. *Environmental Science & Technology*, 45(16), 6845–6854.
10. Schulz, M. et al. (2008). Transformation of the x-ray contrast medium iopromide in soil and biological wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 42(19), 7207–7217.
11. Richardson, S. D. et al. (2008). Occurrence and mammalian cell toxicity of iodinated disinfection byproducts in drinking water. *Environmental Science & Technology*, 42(22), 8330–8338.
12. Richardson, S. D. et al. (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection byproducts in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 636(1–3), 178–242.
13. Smith, E. M. et al. (2010). Comparison of byproduct formation in waters treated with chlorine and iodine: relevance to point-of-use treatment. *Environmental Science & Technology*, 44(22), 8446–8452.
14. Putschew, A., Schittko, S. & Jekel, M. (2001). Quantification of triiodinated benzene derivatives and x-ray contrast media in water samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 930(1–2), 127–134.
15. Hirsch, R. et al. (2000). A sensitive method for the determination of iodine containing diagnostic agents in aqueous matrices using LC-electrospray-tandem-MS detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366(8), 835–841.
16. Ternes, T. A. (2001). Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 20(8), 419–434.
17. Vanderford, B. J. et al. (2011). Assessment of sample preservation techniques for pharmaceuticals, personal care products, and steroids in surface and drinking water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(6), 2227–2234.



使用 GC-ICP-MS 研究废水萃取物中挥发性卤代有机物的存在、形态及转化

应用简报

环境

作者

Armando Durazo 和 Shane A. Snyder
化学与环境工程系
和 BIO5 研究所
亚利桑那大学
亚利桑那州图森市
美国

摘要

将 Agilent 7890A GC 与 Agilent 7700x ICP-MS 联用，研究一氯胺处理后的废水中挥发性卤代有机物的存在及转化。采用化合物无关校准曲线法 (CIC)，通过市售的二卤代芳族化合物 1-溴-4-碘苯得到校准曲线，基于校准曲线得到的元素响应测定多样化的有机物中特定元素溴和碘的含量。

前言

天然水中含有不同浓度的氯、溴和碘离子，这些离子在一定浓度范围内对人体健康无害。然而，使用氧化法（如氯化消毒、臭氧消毒、氯胺消毒）处理含有这些离子的水时，这些卤化物可能结合到有机分子中 [1,2]。处理过程中的氧化条件会将这些卤化物转化为活性形式，随后与废水中存在的有机分子反应形成卤代消毒副产物 (DBP) [3]，这些副产物中的许多物质尚不明确 [4]。

由于淡水资源越来越紧缺，许多市政当局正在考虑采用替代的饮用水源，包括废水净化和海水淡化。与大多数天然淡水源相比，废水和海水中的碘化物和溴化物浓度明显更高。虽然饮用水中的某些 DBP 受到美国国家环境保护局 (EPA) 监管，但是受监管的 DBP 只是一小部分已确认的化合物 [5]。



Agilent Technologies

由于碘代 DBP 和溴代 DBP 的毒性高于其氯代物 [6-8]，因此可取的办是快速采集 DBP 数据，更好地了解这些新兴 DBP 的浓度和分布情况。大部分分析方法（如 EPA 方法 551.1）采用气相色谱联用电子捕获型检测器 (GC-ECD) 测定从水体中制得的萃取物中挥发性卤代 DBP 的浓度。但这些方法无法将卤代物彼此区分开，也无法将目标物与其他干扰的非卤代物区分开。虽然可以采用 GC/MS 或 GC/MS/MS 法测定卤代 DBP，但由于电离本身存在的缺陷，这些分子质谱法不能通过一次分析筛查各种未鉴定分子中的卤素含量。化学电离 (CI) 无法电离所有类型的有机分子，而电子轰击 (EI) 可能导致过量且不需要的源内裂解。此外，GC/MS/MS 分析会受到卤代母离子没有完全碎裂为单原子卤素离子（即 Br^+ 和 Br^- ）的不利影响。

本应用简报介绍了一种新方法，使用 Agilent 7890A GC 与 Agilent 7700x ICP-MS 联用来检测和定量分析卤代有机化合物。本研究使用市售的 1-溴-4-碘苯绘制碘和溴的校准曲线。利用化合物无关校准曲线法 (CIC) 对萃取物中各种卤代有机物的卤素含量进行定量分析。随着化合物从气相色谱柱上洗脱，ICP-MS 离子源的高温将卤代有机物定量转化为有机碎片和卤素离子。本方法使用的干法等离子体条件最大程度减少了氧化物类干扰物的形成，并且无需碰撞池即可完成运行。

实验部分

化学品与标准品

利用 HPLC 级甲基叔丁基醚 (MTBE, Fisher Scientific) 配制 1-溴-4-碘苯 (Alfa Aesar) 的校准标样，完整化合物的浓度分别为 0、1、2、5、10、25 和 100 ng/mL。

仪器

本研究采用 Agilent 7890A GC 与 Agilent 7700x ICP-MS 联用。所用的仪器条件见表 1。

表 1. GC 和 ICP-MS 仪器参数条件

气相色谱条件	
预柱	无
分析柱	Agilent J&W HP-5, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm (部件号 19091J-413)
进样口温度	200 °C
进样模式	脉冲不分流 (0.75 min 前采用 10 psi，之后采用 5.8 psi) 恒压模式
进样量	1 μL
柱温箱升温程序	37 °C 下保持 6 min 以 10 °C/min 的速率升至 260 °C 在 260 °C 下保持 11 min
初始色谱柱流速	1.2 mL/min
载气	UHP 氮气
ICP-MS 传输线进样器	200 °C
温度	
GC 运行时间	39 min
ICP-MS 条件	
模式	无碰撞气体模式；对于质量数 79、81 和 127，采用时间分辨分析 (TRA)
积分时间	在 38 min 采集窗口中，对每个离子采用 0.15 s 的积分时间
RF 正向功率	700 W
稀释气流量	氩气，0.39 L/min
采样深度	3.0 mm

样品前处理

城市废水样品采集自不同的区域。将样品分成两部分，一半未经处理，另一半用预先制得的一氯胺水溶液处理使该混合物中一氯胺的初始浓度为 0.08 mM，反应时间为 4 小时。然后按照 EPA 551.1 方法的改良版，使用 5 mL MTBE 对经过处理和未经处理的 35 mL 等分样品进行萃取。在各个样品萃取液中，小心地分离出 MTBE 有机相，并将其装入 2.0 mL 棕色安捷伦气相色谱样品瓶中。

结果与讨论

碘和溴的检测

该方法中，1-溴-4-碘苯在 20.6 分钟处从色谱柱上洗脱。在所有非空白校准标样中均检出含碘的峰（图 1），并且在浓度高于 5 ng/mL 的校准标样（完整化合物）中检出含溴的峰。在每幅色谱图中， ^{127}I 和 ^{81}Br 处的背景（非峰）信号水平都非常低 (~30 cps)，并且对柱温没有明显的依赖性，说明存在极少的氢氧化物类干扰物（分别为 $^{126}\text{XeH}^+$ 和 $^{40}\text{Ar}_2\text{H}^+$ ）。

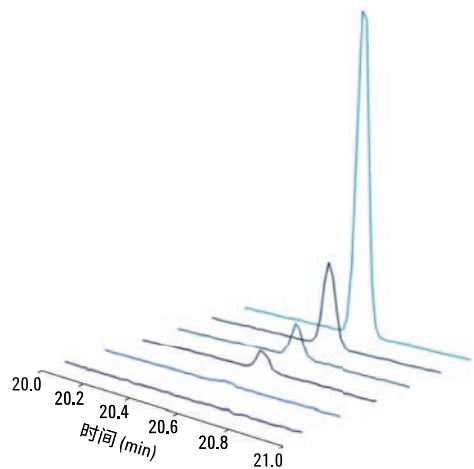
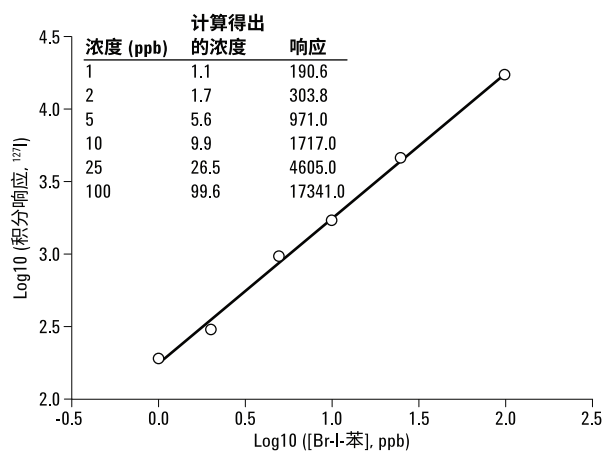


图 1. 由 1-溴-4-碘苯绘制的 ^{127}I 的校准曲线的 \log/\log 图 (左图), 以及本研究中分析的校准标样 (浓度从 0.0 到 25 ppb) 的 ^{127}I 峰强度的叠加图 (包括校准空白, 右图)。该化合物的保留时间为 20.6 min。本色谱图未扣除背景

废水样品分析

对一氯胺处理前后的废水样品进行测定。色谱图表明, 处理后的废水样品中, 溴代和碘代物质的浓度大幅提高, 并且有机卤素物质发生改变 (图 2 和 3)。在氯胺消毒之前, 废水中确实存在一些卤代有机物。此外, 在氯胺消毒后, 未经处理的废水中的许多非卤代有机物转化为新型卤代 DBP。同时, 消毒处理前存在的一些溴代和碘代

物质在一氯胺处理时具有抗转化能力, 而另一些则被消耗了 (也就是参与反应了), 并且可能转化为新型卤代 DBP (图 3)。

卤代反应的增加和卤代物质的变化是由于溴和碘在氧化处理过程中表现出高反应性。 $^{79/81}\text{Br}$ 的氙气类干扰物质 (分别为 $^{38}\text{Ar}^{40}\text{ArH}^+$ 和 $^{40}\text{Ar}_2\text{H}^+$) 的减少可归因于干法等离子体的 RF 功率低; 在较低 RF 功率下, 氙气的电离

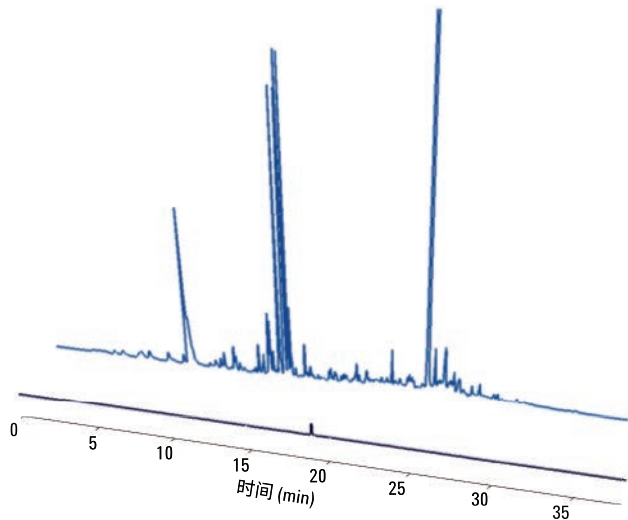


图 2. 由代表性废水样品制得的 MTBE 萃取物所获得的 ^{81}Br GC-ICPMS 色谱图: 氯胺消毒前 (紫线, 前) 和氯胺消毒后 (蓝线, 后)。两幅图中的强度刻度相同。本色谱图未扣除背景

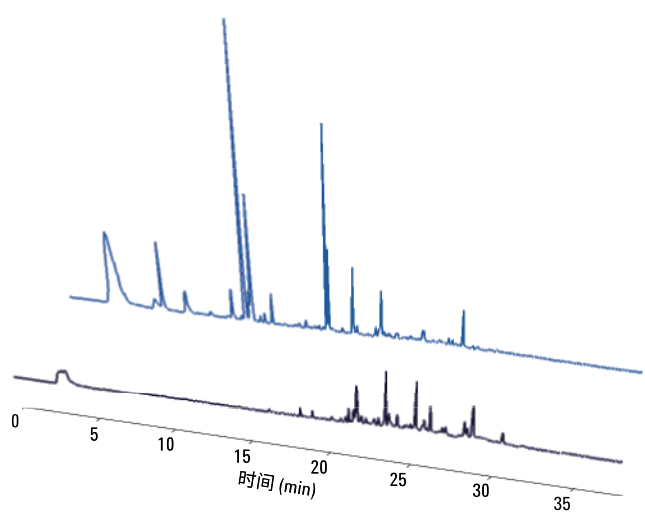


图 3. 由代表性废水样品制得的 MTBE 萃取物所获得的 ^{127}I GC-ICPMS 色谱图: 氯胺消毒前 (紫线, 前) 和氯胺消毒后 (蓝线, 后)。两幅图中的强度刻度相同。本色谱图未扣除背景

(IP1 = 15.8 eV) 比溴的电离 (IP1 = 11.8 eV) 受到更强的抑制。尽管存在氙类氢化物干扰物质 ($^{126}\text{XeH}^+$)，但可以在 m/z 127 (^{127}I) 处执行基本无干扰的测量，因为相比样品中的碘的同位素纯度，氙气气源中 Xe 的浓度较低且 ^{126}Xe 的同位素丰度较低 (0.09%) (由空白样品中存在稳定的 18 cps 浓度得以证实)。使用该方法生成的数据具有高重现性，所有连续校准验证 (CCV) 得到的溴和碘值均在初始校准中这两种元素值的 10% 范围内。

氯胺消毒前后检出许多卤代有机物，表 2 列出了其中一些。这些数据表明，氯胺消毒后，所有三个废水样品中的大多数卤代有机物浓度均显著升高 (表 2)。利用化合物无关校准曲线法 (CIC) 对这些未鉴定的 DBP 的浓度进行估算。尽管在 ICP-MS 中采用 CIC 是一种非常成熟的方法，不过本实验的定量测定仅为近似结果，因为 GC 中 He 载气流速随柱温程序而变化 (使用恒定进样口压力模式)。大多数有机卤素化合物的浓度在氯胺消毒后升高，两个例外是样品 1 中的未鉴定卤代化合物 Br-2 和 I-3 (表 2 中以黄色突出显示)。这两种化合物的检出浓

度在氯胺消毒后下降，表明这些化合物能够转化为新的且卤代程度可能更高的 DBP。

结论

使用 Agilent 7890A GC 与 Agilent 7700x ICP-MS 联用进行 GC-ICP-MS 分析能够有效测定氯胺消毒后废水中卤代 DBP 的存在、形态及转化。这一仪器配置调谐方便，可实现各种化合物的色谱分离，基本上能够免除干扰，能够对共价结合到有机分子上的卤素进行高灵敏度分析。采用 CIC 法可根据由市售二卤代芳族化合物获得的响应对这些化合物中的卤素含量进行近似定量分析。该技术还能够测定样品中挥发性溴代和碘代有机物的总浓度。使用 GC-ICP-MS 分析这些复杂的卤代有机物混合物的另一项优势在于，该 ICP-MS 平台的元素特异性优于 GC-ECD 等其他卤素检测方法。我们计划在将来采用 GC-Q-TOF 对这些 DBP 进行鉴定，进一步研究能够最大程度降低碘代和溴代 DBP 形成的废水处理技术。

表 2. 存在于各种有机卤素化合物中的卤素的浓度 (单位为 ppb)

	化合物名称	Br-1 [†]	Br-2 [†]	Br-I-苯*	Br-3 [†]	I-1 [†]	I-2 [†]	Br-I-苯*	I-3 [†]
	保留时间 (min)	15.4	19.0	20.6	25.2	12.2	12.6	20.6	29.0
	测得的同位素	^{81}Br	^{81}Br	^{81}Br	^{81}Br	^{127}I	^{127}I	^{127}I	^{127}I
标样	Br-I-苯* 1 ppb							0.5	
	Br-I-苯 2 ppb							0.8	
	Br-I-苯 5 ppb			1.2				2.5	
	Br-I-苯 10 ppb			3.0				4.4	
	Br-I-苯 25 ppb			7.1				11.9	
	Br-I-苯 100 ppb			28.3				44.7	
样品	MTBE 空白		2.5		4.2	1.2	0.6		0.6
	样品 1 氯胺消毒前	1.1	346.8	3.2	15.6		1.3	4.6	26.0
	样品 1 氯胺消毒后	3315.0	293.7		44558.0	169.9	103.4		1.6
	样品 2 氯胺消毒前	3.5	3.2		19.0	0.1	0.6	0.7	1.3
	样品 2 氯胺消毒后	4819.9	1254.7	1377.7	121428.9	23.5	34.8	18.5	6.6
	样品 3 氯胺消毒前	15.4	37.9		100.1	4.1	2.6	1.3	14.8
	样品 3 氯胺消毒后	3388.6	1130.8		126629.7	31.9	103.6	28.5	29.7

* 1-溴-4-碘苯 (标准品中的浓度是指完整化合物的浓度，单位为 ppb)

[†] 未鉴定的卤代有机物

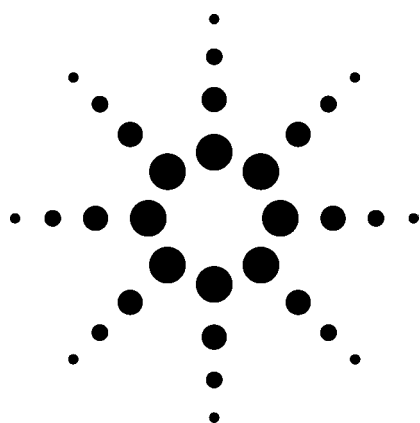
参考文献

1. S.D. Richardson, *et al.* "Occurrence and Mammalian Cell Toxicity of Iodinated Disinfection Byproducts in Drinking Water" *Environ. Sci. Technol.* **42**, 8330-8338 (2008)
2. V.K. Sharma, R. Zboril, T.J. McDonald "Formation and toxicity of brominated disinfection byproducts during chlorination and chloramination of water: A review" *J. Environ. Sci. Health B.* **49**, 212-228 (2013)
3. G. Hua, and D.A. Reckhow "Effect of pre-ozonation on the formation and speciation of DBPs" *Water Res.* **47**, 4322-4330 (2013)
4. C. H. Jeong, *et al.* "Occurrence and Toxicity of Disinfection Byproducts in European Drinking Waters in Relation with the HIWATE Epidemiology Study" *Environ. Sci. Technol.* **46**, 12120-12128 (2012)
5. United States EPA, National primary drinking water regulations: Stage 2 disinfectants and disinfection byproducts rule. *Fed. Regist.* 71, 387-493 (2006)
6. S.W. Krasner, *et al.* "Occurrence of a New Generation of Disinfection Byproducts" *Environ Sci Technol.* **40**, 7175-7185 (2006)
7. E.M. Smith, *et al.* "Comparison of Byproduct Formation in Waters Treated with Chlorine and Iodine: Relevance to Point-of-Use Treatment" *Environ. Sci. Technol.* **44**, 8446-8452 (2010)
8. Y.T. Woo, *et al.* "Use of Mechanism-Based Structure-Activity Relationships Analysis in Carcinogenic Potential Ranking for Drinking Water Disinfection By-Products" *Environ. Health Perspect. Suppl.* **110**, 75 (2002)

更多信息

有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

离子色谱 (IC) ICP-MS 分析天然水中铬应用



环境

作者

Tetsushi Sakai
Agilent Technologies
Musashino Center Building
1-19-18 Naka-cho Musashino-shi
Tokyo 180-0006
Japan

Ed McCurdy
Agilent Technologies
Lakeside, Cheadle Royal Business Park
Stockport
United Kingdom

Steve Wilbur
Agilent Technologies, Inc.
3380 146th Pl SE Suite 300
Bellevue, WA 98007
USA

摘要

痕量元素铬的分析在很多不同基体物质分析应用中非常热门。铬在环境中以两种不同的氧化态存在，即三价 Cr(III) 阳离子和六价 Cr(VI) 阴离子。在哺乳动物体内， Cr(III) 在葡萄糖调节过程中是一个基本元素。然而，已证明较低含量水平的六价铬形式具有诱导有机体突变和致癌效应。由于铬元素的这种

二元性，总铬浓度并不能提供充分的信息以确定其潜在的毒性。为了评价样品的潜在毒性，不能仅测量其总浓度，必须测量 Cr(VI) 的含量。本工作采用离子色谱和八极杆反应池 ICP-MS 联用技术，建立了一个简单可靠的测定 Cr(III) 和 Cr(VI) 的方法，为样品中有毒铬的含量提供了准确信息。该方法由于样品制备和色谱条件的最优化，可以分析高基体样品，比如硬质饮用水。另外，由于反应池中消除了一些潜在的背景干扰离子，ICP-MS 方法提供了卓越的信噪比，可以准确测量对于毒理学有用的 Cr(VI) 含量，即低于 $0.1 \mu\text{g/L}$ 的浓度。

引言

需要检测铬毒性的样品种类范围很宽，包括饮用水、食品以及临床样品（临床样品主要用于职业暴露评价）。不过，有毒的只是铬的六价形式 Cr(VI) ，而三价形式的铬则是人体营养的基本元素。因此，要想确定铬的毒性，必须测量其 Cr(VI) ，而不是简单的总铬浓度。

有两个途径可以解决这个问题：首先，如果测量的总铬浓度低于有毒的 Cr(VI) 水平，那么即使所有的铬都是以 Cr(VI) 存在，也有理由得出该样品中铬的浓度不具有毒性。不过，这种方法对于含有高浓度 Cr(III) 的样品来讲，会导致大量的假阳性现象，因此比较准确的方法是分离后测定 Cr(VI) 本身。理想的方法是对两种铬的形态分离和测定，一次分析可以得到总铬和有毒的 Cr(VI) 的含量。



元素的不同形态的分离和检测通常是一个直面的挑战。而铬的形态分析却不寻常。这是因为天然样品，比如水中铬的一般形态是 Cr(VI) 的铬酸盐 (CrO_4^{2-}) 以及 Cr(III) 的铬离子(Cr^{3+})。铬酸盐是一种阴离子，而三价铬离子是阳离子。所以在相同条件下，采用一种离子交换方法是不能对这两种离子都起作用的。还有一个问题是在诸如水这样的样品中，Cr(III) 是最稳定的氧化态，而 Cr(VI) 离子则是强氧化剂，在酸介质或有机物存在时，很容易被还原。因此，在样品采集、储存和制备过程中都必须非常小心，以保证原始样品中铬的形态分配在分析之前保持不变。因此，在样品采集、储存和制备过程中都必须非常小心，以保证原始样品中铬的形态分配在分析之前保持不变。

实验

本文介绍的方法采用一种最优化的样品稳定方法，将样品与EDTA放在 40 °C 恒温箱中，EDTA 与 Cr(III) 形成一种络合物，然后用一个简单的色谱法分离 Cr(III)EDTA 络合物和 Cr(VI)。形成 Cr(III)EDTA 络合物的反应取决于保温时间和温度。在 60 °C 1 个小时之内或 40 °C 3 小时条件下，反应完全。在室温条件下，即使放置 7 小时，反应也不会完全。

注意该方法对于天然水样品，需要加入比较高浓度的 EDTA。因为其它一些离子，比如 Ca 和 Mg，通常在硬质饮用水中的浓度为 10's 或 100's mg/L，也会和 Cr(III) 竞争形成EDTA的络合物，如 EDTA 量不够，导致 Cr(III) 的回收率随基体偏低。

采用离子色谱 (IC) 分离 Cr 的形态，ICP-MS 测定的联用技术是一种理想的分析方法。用一种简单的、低成本的离子色谱装置就可以分离铬的不同形态。ICP-MS 可以实现相当低浓度的铬形态的测量，提供准确的暴露水平评价浓度，甚至可以测量天然的或背景水平浓度的铬。

ICP-MS 具有卓越的灵敏度，因此是许多元素很好的检测器。碰撞/反应池的引入，消除了基体有关的 ArC 和 ClOH 的干扰，所以 ICP-MS 可以更为准确和灵敏的测定主同位素 ^{52}Cr 。铬形态分离所用的样品制备方法，色谱柱类型以及色谱条件列于表1。注意，除了样品用 EDTA 钠盐稳定外，流动项中也要加入 EDTA，在分离期间稳定 Cr(III) 的络合物。另外，必须将溶液调到 pH 7，以利于铬形态的稳定和最优化的色谱分离。

表 1. 铬形态分离的色谱条件

Cr 色谱柱	安捷伦部件号 G3268A, 30 mm × 4.6-mm id
流动相	5 mM EDTA (2Na), 用 NaOH 调至 pH 7
流速	1.2 mL/min
柱温	室温
进样体积	50~500 µL
样品制备	
反应温度	40 °C
保温时间	3 h
EDTA 浓度	5~15 mM, 用 NaOH 调至 pH 7

图 1 是本工作所用的离子色谱的结构。注意，采用非金属离子色谱泵（Metrohm 818 IC 泵）传输流动相，用安捷伦 7500ce ICP-MS 的可选集成样品引入系统 (ISIS) 填载和切换样品环。这种结构维持高精密度和较高的 IC 泵压力，比完整的 IC 或 HPLC 系统更为简单且成本低。因为除了 ICP-MS 项系统，只需要配上 IC 泵模块即可。

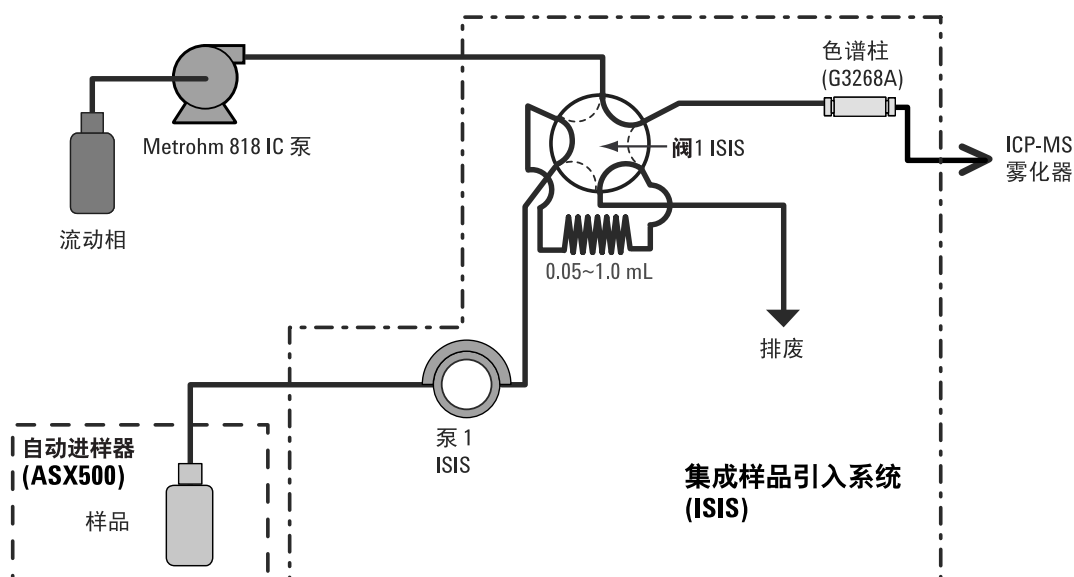


图 1. 铬分离所用的 IC-ICP-MS 结构图

结果和讨论

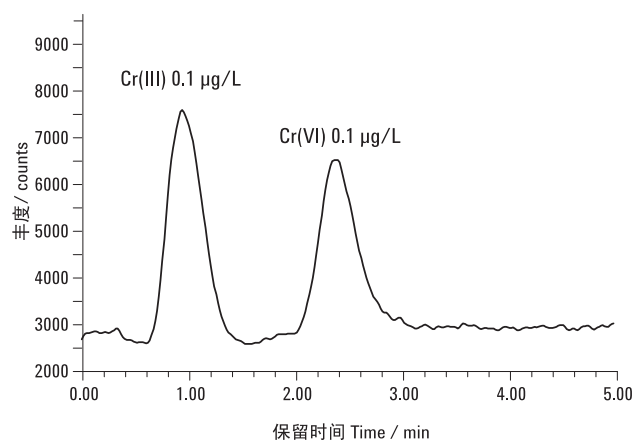
在上述条件下，用安捷伦 7500ce 的 H_2 池模式去除 ArC 和 ClOH 对 ^{52}Cr 的干扰，铬形态分析的检出限 (DLs) <20 ng/L，见表 2。许多有关六价铬的国际规范中指定的最大允许浓度是 $1 \mu g/L$ ，要求的检出限是其十分之一 (100 ng/L)。本工作即使采用少至 $100 \mu L$ 的进样体积，也还是很容易满足这些要求的。不过，将进样体积增加到 $500 \mu L$ ，检出限降低到 13.2 ng/L Cr(III)， 15.8 ng/L Cr(VI)。

表 2. IC-ICP-MS 分析铬形态的检出限

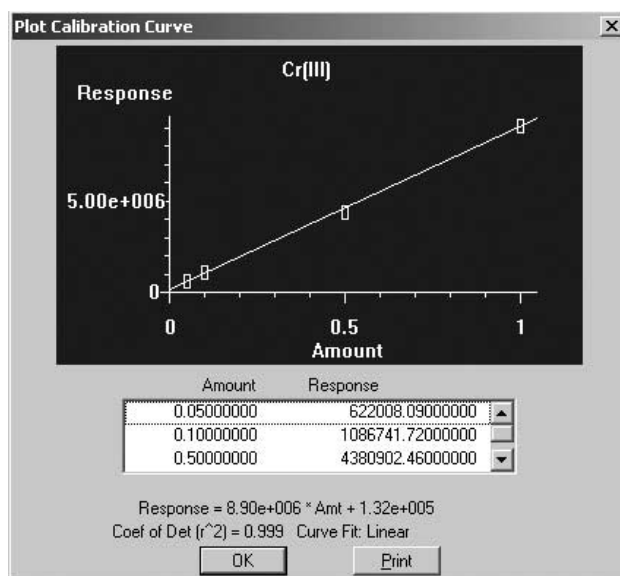
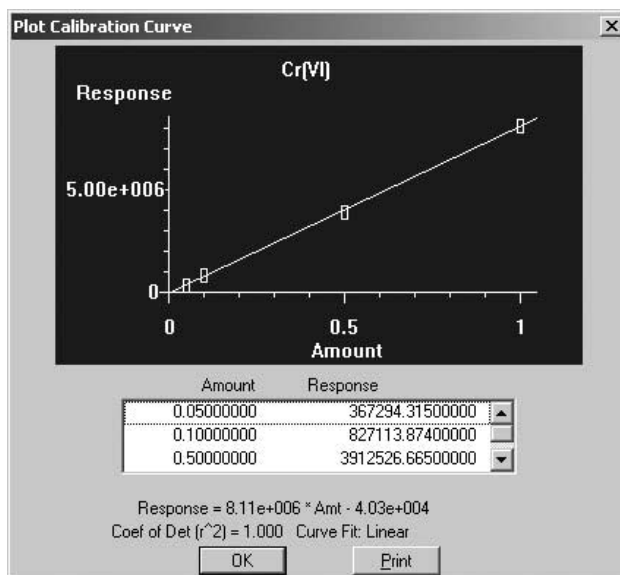
进样/ μL	保留时间/min		峰高/counts		峰面积/counts		检测限(ng/L)*	
	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)
50	0.79	2.09	8548	4261	1082295	914804	69.5	139.4
100	0.79	2.09	13688	7173	1704312	1525147	43.4	82.8
250	0.85	2.21	33967	20830	4939876	4546219	17.5	28.5
500	0.97	2.39	44870	37502	10268086	9398651	13.2	15.8

*检测限按照标准色谱图中 3 倍信噪比来计算

如图 2 所示,对于这些条件下简单的标准溶液,两种铬形态的信噪比都很好。该色谱图给出了浓度为 $0.1 \mu\text{g/L}$ (ppb), 进样体积为 $500 \mu\text{L}$ 的两种铬形态的分离情况。从图中可以看出,在总时间大约 3 分钟时,两种铬形态的峰很容易在背景和分离基线以上被检测。


图 2. 浓度为 $0.1 \mu\text{g/L}$ Cr(III) 和 Cr(VI) 的分离和检测

用低浓度的人工合成标准溶液建立了不同铬形态的校准曲线。定量分析基于峰面积测量。Cr(III) 和 Cr(VI) 的校准曲线分别示于图 3 和图 4。两个校准曲线都具有极好的灵敏度和线性。


图 3. Cr(III) 浓度为 0.05, 0.1, 0.5 和 1.0 $\mu\text{g/L}$ 的校准曲线

图 4. Cr(VI) 浓度为 0.05, 0.1, 0.5 和 1.0 $\mu\text{g/L}$ 的校准曲线

对于适合于常规分析的方法，除了灵敏度外，形态的稳定性、色谱分离以及校准的线性，要求能提供可接受的长期稳定性。在色谱分析中，稳定性受控于两个因素，即保留时间 RT 和峰面积的稳定性。表 3 的数据证明了这些参数的稳定性，说明该方法的稳定性可以被常规分析所接受。

常规分析

对于天然水样品中铬形态的常规分析来讲，更为重要的是在含有高浓度的其它离子的实际样品中能够保持这种极好的灵敏度、稳定性和色谱分离。为了检验方法对真实样品的的适应性，用该方法测定了加标和未加标的矿泉水样品中铬的两种形态。

第一个用于评价的样品是一个有名的法国矿泉水，本研究标示为矿泉水 A。图 5 是对这个矿泉水 A 加标和未加标的两种铬形态的色谱图。水的主要因素成分也示于图的插入表格中。一般饮用水大约含 100 mg/L Ca；K, Mg 和 Na 等其它元素在 5 mg/L 和 20 mg/L 之间。

表 3. 不同铬形态在 500 μ L 进样体积时 RT 和峰面积的稳定性

次数	RT/min		峰高/counts		峰面积/counts	
	Cr(III)-EDTA	Cr(VI)	Cr(III)-EDTA	Cr(VI)	Cr(III)-EDTA	Cr(VI)
1	0.969	2.338	23514	18437	5331427	4621752
2	0.969	2.338	22642	18784	5280683	4758462
3	0.969	2.338	22832	18615	5220349	4742259
4	0.952	2.338	24104	19944	5470760	4800723
5	0.969	2.372	22797	19203	5287094	4726640
6	0.969	2.405	23830	19328	5498172	4760285
7	0.985	2.338	23971	19479	5481984	4824934
8	0.969	2.338	23393	19675	5474510	4883193
9	0.969	2.355	23070	20097	5355106	4892160
10	0.969	2.372	23826	19896	5428247	4886400
平均	0.97	2.38	23398	19346	5382833	4789681
STD	0.008	0.014	534.45	581.88	100413.18	85782.42
RSD%	0.80	0.57	2.28	3.01	1.87	1.79

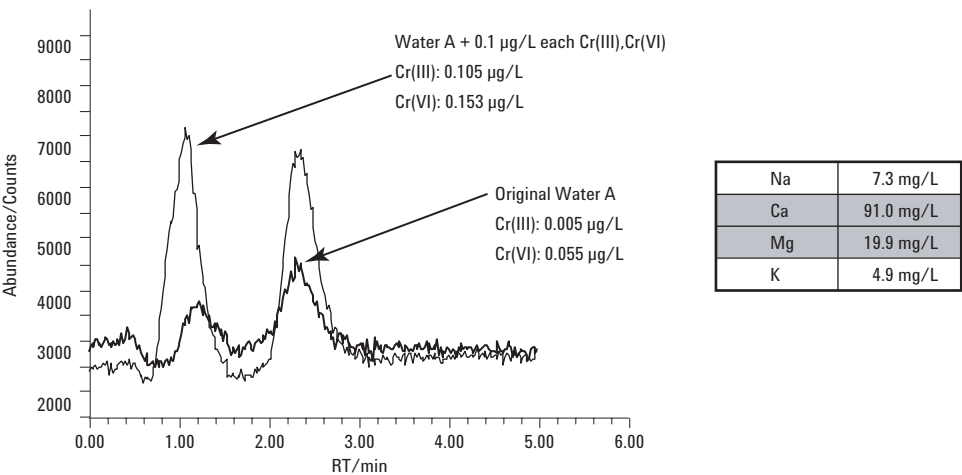


图 5. 矿泉水 A 加标和未加标的主要元素成分和色谱图

矿泉水 A 的加标回收率示于表 4。从表中结果可以看出，铬形态定量分析的浓度很低(对于 Cr(III) 和 Cr(VI) 分别为 0.005 $\mu\text{g/L}$ 和 0.055 $\mu\text{g/L}$)，这个样品的低浓度加标回收率很好，两种形态分析的误差小于 5%。

表 4. 矿泉水 A Cr(III) 和 Cr(VI) 在 0.1 $\mu\text{g/L}$ 的加标回收率数据

元素	原始矿泉水 A	测定值 ($\mu\text{g/L}$)		回收率 (%)
		加标量	加标测定值	
Cr(III)	0.005	0.10	0.105	100.0
Cr(VI)	0.055	0.10	0.150	95.0

第二个矿泉水样品也是一个法国矿泉水，标示为矿泉水 B。该矿泉水与一般矿泉水相比，含钙和硫酸盐较高（超过 450 mg/L Ca；大于 1000 mg/L 的硫酸盐）。和矿泉水 A 一样，也进行了加标和未加标实验。分析得到的色谱图示于图 6，加标回收数据列于表 5。

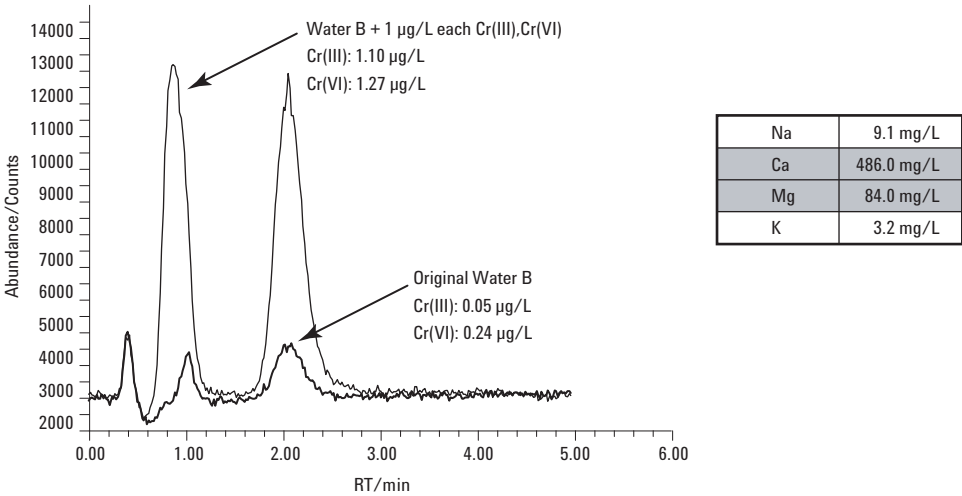


图 6. 矿泉水 B 加标和未加标的主要元素成分和色谱图

如同矿泉水样品 A，矿泉水 B 的主要元素成分示于色谱图的插入表中，可以看出其中的矿物质含量很高。尽管如此高的主要元素存在，但由于采用了最优化的样品制备和色谱方法，仍然获得了很好的色谱分离和极好的加标回收率结果。在这个样品中，由于铬的基础浓度（未加标）较高，所以采用了较高的加标量。

高基体样品中低浓度铬形态的回收能力证明了样品稳定过程所采用的最优化方法的有效性，即加入了足够浓度的 EDTA 以保证即使存在高含量的其它竞争离子，Cr(III) 也能被完全络合。

此外，两种铬形态在低浓度的准确加标回收率表明，通过对样品稳定化期间以及流动相选择合适的 pH，避免了可能存在的形态之间的转化问题（Cr(VI) 还原为 Cr(III)）。见表 5。

结论

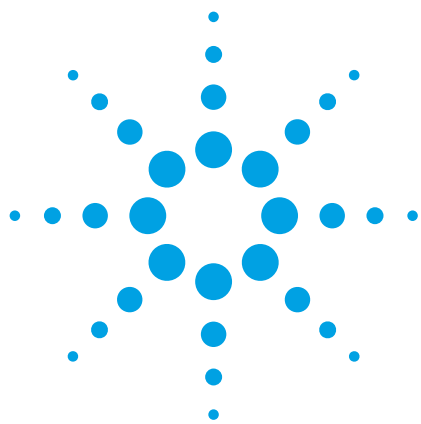
建立了一个天然高基体水样中 Cr(III) 和 Cr(IV) 的最佳稳定化和测定的新方法。检出限在 100- μ L 进样体积时为 0.05 μ g/L；500- μ L 进样体积为 0.015 μ g/L。

每个样品可靠稳定分离 Cr(III) 和 Cr(VI) 需要大约 3 分钟的时间。对于含有高浓度竞争离子的样品，比如 >500 mg/L 的矿物元素的矿泉水，也能够获得准确的形态分离和定量分析结果。

采用 Agilent 7500ce 的氢气反应池模式，可以实现国际规则所要求的低浓度铬（0.1 μ g/L）的准确无干扰分析。

表 5. 高度矿化水 (B) 中 Cr(III) 和 Cr(VI) 的加标回收率

元素	原始矿泉水 B	测定值 (μ g/L)		回收率(%)
		加入量	加标回收值	
Cr(III)	0.05	1.0	1.10	105
Cr(VI)	0.24	1.0	1.27	102



通过毛细管 HPLC-ICP-MS 分析微升体积的植物汁液中锌的形态

应用简报

环境

作者

Paulina Flis、Laurent Ouerdane、
Ryszard Lobinski

CNRS-UPPA, Laboratoire de
Chimie Analytique Bio-inorganique
et Environnement, UMR5254,
Hélioparc, 2, Av. Angot, 64053 Pau,
France



前言

许多金属元素对于正常的植物生长和发育非常重要。其中一种金属元素就是锌，它通常是生物体中第二丰富的过渡金属，并且作为重要的微量营养元素在植物生理学中发挥着不同的作用。锌是 300 多种酶的主要成分。它负责基因调控和蛋白质结构的稳定，包括锌指、锌簇和 RING 指结构域。锌还参与光合作用和 CO₂ 固定等基本过程。植物中的锌过量或缺乏将导致植物死亡率高、生长迟缓和萎缩、萎黄病、坏死、小叶病和开花延迟。所有这些症状都可能对食品安全产生严重影响，因为与锌可利用性相关的作物产量将显著降低 [1-3]。

Agilent 7800 ICP-MS
已得到验证



Agilent Technologies

通过鉴定植物汁液中存在的低分子量含金属化合物，有助于更深入地了解植物生理学，并且确定其准确的功能，这将进一步促进营养、农业和环境研究。然而，复杂生物基质如植物样品的研究可能在样品前处理或色谱分离过程中存在若干问题。主要的挑战与金属配合物的低浓度及其多样性有关。此外，金属配合物通常不稳定，能够在萃取、离线预浓缩步骤、甚至色谱分离中发生降解。在迄今为止所研究的色谱技术中，体积排阻色谱 (SEC)、亲水相互作用色谱 (HILIC) 和反相 (RP) 色谱已被证明是最适合避免金属配合物在分析过程中发生降解的技术 [4]。由预浓缩柱和 HILIC 或 RP 分离柱组成的色谱系统似乎是此类应用的理想选择。

本研究提出一种 ICP-MS 辅助的金属组学方法用于分离豌豆后韧皮部中存在的锌形态分析。通过具有在线预浓缩功能的毛细管 HPLC-ICP-MS 对胚囊液体进行分析。由于植物汁液量非常少，所以需要使用毛细管色谱。

实验部分

样品

本文对来自发育中的豌豆豆荚（嫩豌豆）的胚囊液体（后韧皮部）进行了研究。

样品前处理

用玻璃毛细管在豆荚中穿孔，使用蠕动泵提取液体胚乳，将其放入保存在冰上的 Eppendorf 管中。收集完成后，立即将样品置于液氮中冷冻，并在进一步分析之前将其置于 -20 °C 的温度下储存。在分析之前，将样品解冻，并用乙腈按 1:2 的比例（样品：乙腈）进行稀释，然后在 10000 rpm 的转速下离心 2 分钟。收集上清液并立即进行分析。

HPLC-ICP-MS 系统

使用配备毛细管泵和手动进样阀（定量环尺寸：100 μ L）的 Agilent 1100 液相色谱仪。将 30 μ L 上清液进样至 SeQuant 两性离子型 (ZIC-) HILIC 保护柱（Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 5 mm \times 1 mm（内径），5 μ m）中，使用 90% 乙腈和 10 mM 甲酸铵缓冲液 (pH 5.5) 进行等度洗脱 (20 μ L/min)。用流动相将样品清洗 4 min，然后反冲至用于化合物分离的 SeQuant ZIC-HILIC 毛细管柱（Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 150 mm \times 0.3 mm（内径），3.5 μ m）。使用洗脱液 A（10 mM 甲酸铵缓冲液 (pH 5.5)）和洗脱液 B（乙腈），进行流速为 4 μ L/min 的梯度洗脱。梯度程序见表 1。

表 1. HPLC 洗脱程序

步骤	洗脱液 [%B]	时间 [min]
1	90	0-5
2	90-65	5-17
3	65-52	17-47
4	52-35	47-53
5	35	53-65
6	35-90	65-70
7	90	70-75

HPLC-ICP-MS 和 ESI-MS/MS

将分离柱的出口连接至 Agilent 7700x ICP-MS（通过 Agilent capLC 接口，G3680A，图 1）或 ESI-MS/MS。

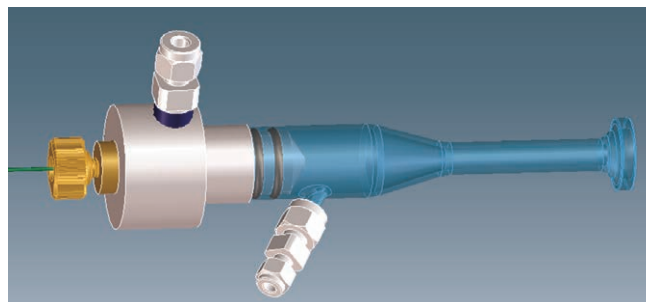


图 1. 安捷伦毛细管液相色谱接口套件 (G3680A)，其包括小型石英雾化室内部的总消耗型雾化器

使用含有 20 ppb Y、Li、Tl、Ce 溶于 2% 硝酸中的调谐溶液，在每天开始时自动对 ICP-MS 条件进行优化。7700x 的 ORS³ 碰撞/反应池在高能量氦模式下操作，以排除可能出现于 Zn 同位素中的多原子干扰。使用 60 ms 的驻留时间采集 ⁶⁴Zn 和 ⁶⁶Zn 的信号。ICP-MS 操作条件见表 2。

表 2. Agilent 7700x ICP-MS 操作条件

参数	值
雾化器/雾化室	毛细管液相色谱接口 G3680A
炬管内径	1 mm
接口锥	铂
RF 功率	1560 W
采样深度	7.5 mm
载气流速	0.78 L/ min
可选气体 (O ₂) 流速	0.04 L/ min
透镜	
提取电压 1	2.7 V
提取电压 2	-180 V
反应池	
八极杆偏置电压	-100 V
氦气流速	10 mL/ min
动能歧视	7 V

ESI LTQ Orbitrap Velos 质谱仪在正离子模式下操作，毛细管电压为 3.0 kV。将离子源的蒸发器温度设置为 120 °C，并将毛细管温度设置为 280 °C。全扫描 MS 模式的分辨率设置为 100000 (m/z 400 处的 FWHM)。

结果与讨论

获得的嫩豌豆后韧皮部的 ⁶⁴Zn 的色谱图如图 2 所示。使用具有在线预浓缩功能的毛细管 ZIC-HILIC ICP-MS 使我们能够获得尖锐的高强度色谱峰，并对两种锌形态进行分离和检测 (图 2a 和 2b)。使用 ESI Orbitrap MS/MS 鉴定两种金属配合物。ICP-MS 检测对于测定不同锌形态的保留时间和估计质量平衡至关重要。这简化了在 ESI-MS 质谱图中搜索锌配合物的步骤。质谱图的放大部分 (图 2d 和 2e) 清晰地显示了两种包含锌的同位素模式的离子。这些提取离子色谱图 (EIC) 的保留时间与通过毛细管

ZIC-HILIC ICP-MS 观察到的两个锌的峰 (图 2c) 具有良好的一致性。获得的数据使我们能够鉴定两种锌配合物：锌-烟草胺 (NA) 和锌-(组氨酸)₂ (表 3)。

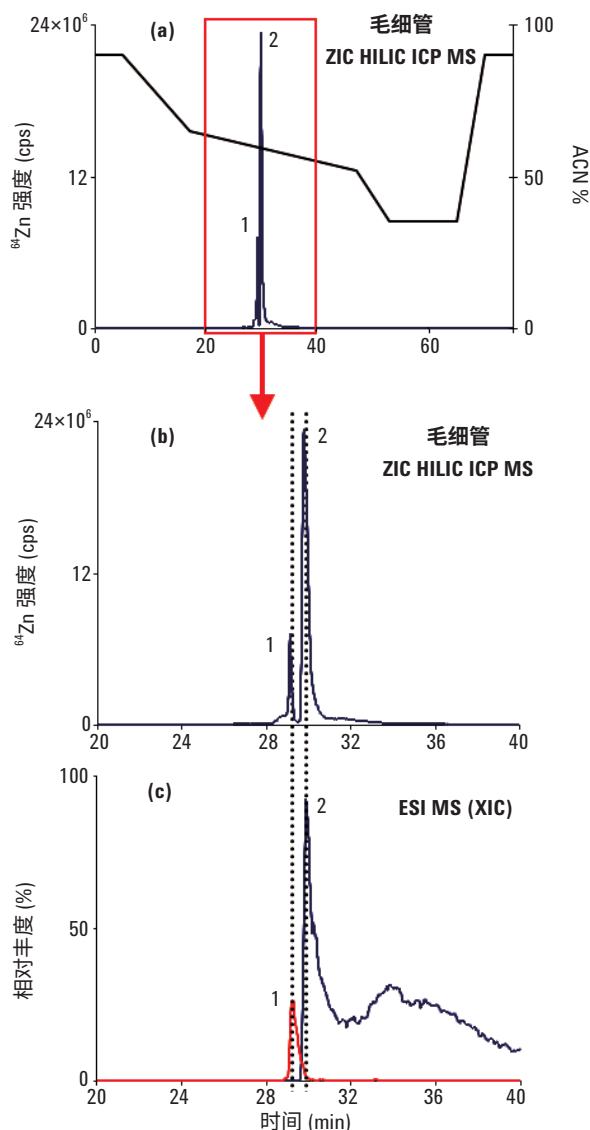


图 2. 通过 a) 毛细管 ZIC-HILIC-ICP-MS; b) 毛细管 ZIC-HILIC-ICP-MS — 色谱图部分放大图; c) 毛细管 ZIC-HILIC-ESI-MS (选择离子色谱图) 获得的色谱图。d) 和 e) 是 ESI-MS 谱图中包含锌同位素模式部分的放大图

表 3. 从豌豆（嫩豌豆）的后韧皮部中鉴定出的含锌配合物的列表

	峰 1	峰 2
配体	组氨酸	烟草胺
配合物	(His) ₂ -Zn	NA-Zn
分子式（中性形态）	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ N ₆ Zn	C ₁₂ H ₁₉ O ₆ N ₃ Zn
理论质量数	373.05973	366.06381
实验质量数	373.05957	366.06389
Δ (ppm)	-0.437	0.216

由毛细管 HPLC 和 ICP-MS 组成的色谱系统使我们获得的 ⁶⁴Zn（约 6 fmol 的 Zn-NA 配合物）的检测限为 75 ng/L，该检测限是由基线上 20 个点的标准偏差的 3 倍计算得到。将该数值与 Zn-NA 配合物的信号进行比较，所获得的 ⁶⁴Zn 的色谱柱回收率为 70-80%。

结论

本研究展示了一种有效的 ICP-MS 辅助的金属组学方法，用于分离和鉴定存在于豌豆后韧皮部中的锌配合物。使用 ZIC-HILIC 预柱对锌形态进行预浓缩，然后通过 ZIC-HILIC 毛细管柱进行分离。通过毛细管 HPLC 与 ICP-MS 和 ESI MS/MS 仪器联用获得的数据组合可用于鉴定不同的锌配合物。由于植物汁液量非常少，所以需要使用毛细管色谱。另外，具有在线预浓缩功能的色谱系统非常适用于分析包含低浓度金属形态（其有时也不稳定）的生物样品。本方法已成功用于鉴定两种锌形态：锌-烟草胺 (NA) 和锌-(组氨酸)₂ 配合物，证明 NA 和组氨酸是嫩豌豆后韧皮部中的两种与锌形成配合物的主要配体。

参考文献

1. M.R. Broadley, P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko, A. Lux, *New Phytologist*, 2007, 173, 677-702
2. T.C.Fox, M.L. Guerinot, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, 49, 669-696
3. C.A. Blindauer, R. Schmid, *Metallomics*, 2010, 2, 510-529
4. L. Ouerdane, S. Mari, P. Czernic, M. Lebrun, R. Lobinski, *JAAS*, 2006, 21, 676-683

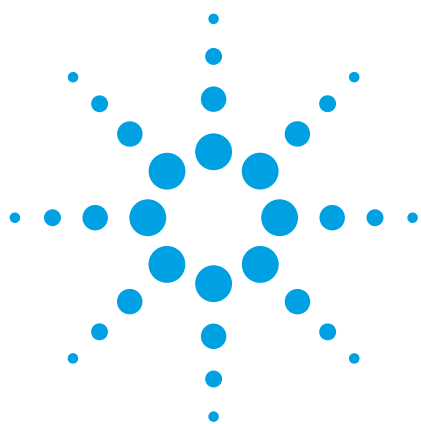


Agilent 7800 ICP-MS
已得到验证

本文档中列出的结果均由 7700x 获得，但经验证后得知性能参数同样适用于 7800 ICP-MS。



Agilent Technologies



采用安捷伦 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪通过 capLC-ICP-MS 联机同时测定多肽和磷酸肽

应用简报

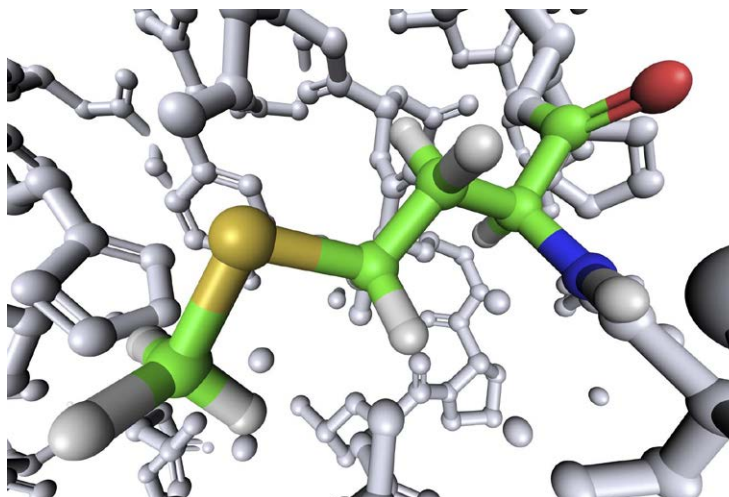
蛋白组学

作者

Silvia Diez Fernández¹、
Naoki Sugiyama²、
Jorge Ruiz Encinar¹ 和
Alfredo SanzMedel¹

¹ Oviedo 大学，物理与分析化学学院
Julián Clavería 8, 33006 Oviedo,
西班牙

² 安捷伦科技，东京，日本



摘要

结合毛细管液相色谱分离技术，Agilent 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪在 MS/MS 质量转移模式下可痕量测定磷酸肽中的磷与含硫多肽中的硫。使用 LC-ICP-MS 可获得前所未有的含硫和含磷物质的最低绝对检测限（分别为 11 fmol 和 6.6 fmol）。硫的同位素比值测定结果与其理论值高度吻合，从而证明干扰得以有效消除。所观测到的硫和磷的峰形和信噪比表现优异。测定结果表明 capLC 与 ICP-MS/MS 联用技术在使用非特殊标样测定含硫和含磷多肽的高灵敏度和同时绝对定量分析方面有巨大潜力。



Agilent Technologies

前言

LC-MS/MS 用于定量分析制药/生物制药和临床研究中的目标蛋白质。此方法常常使用同位素标记的合成蛋白质和多肽作为内标来定量分析相应的目标化合物。与之相反，LC-ICP-MS 通过测定目标化合物中含有的杂原子硫和磷对蛋白质和多肽进行非特异性定量分析。通过这种方式可以使用含有杂原子的不同化合物，并将单个含杂原子的非蛋白质化合物作为通用标样对其进行定量。不幸的是，硫和磷的检测限因其高电离能和单四极杆 ICP-MS (ICP-QMS) 的多原子干扰而大打折扣——即使使用了碰撞/反应池 (CRC)。虽然扇形磁场高分辨 ICP-MS (HR-ICP-MS) 也被用于该类应用，但迄今为止仍没有任何 ICP-MS 仪器能够达到已报道的 ESI-MS/MS 仪器使用同位素标记合成多肽时所具有的检测限（特别是对于硫）。表 1 列出了关于 LC-ICP-MS 对于硫和磷检测限的已发表数据，包括所用的 ICP-MS 技术和分离技术。在这项工作中，我们采用了 Agilent 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪（也简称为 ICP-MS/MS）通过对硫和磷杂原子进行绝对定量分析来测定蛋白质和多肽。

较之传统的仪器或 ICP-MS，Agilent 8800 在八极杆反应池 (ORS³) 和四极杆质量过滤器 (Q2) 前方配备了额外的主四极杆质量过滤器 (Q1)。在该串联质谱结构中，Q1 作为单位质量过滤器仅允许目标分析物质量数的离子进入反应池，排除了所有其他离子。因为等离子体和基质中的离子被 Q1 排除，确保了即使在复杂高基质样品中，ORS³ 中的反应过程也能得到精确控制从而实现准确测量，并且灵敏度也得到了极大的增强。色谱分离过程通过与 8800 ICP-MS/MS 联用的安捷伦 cap-LC 系统完成。

实验

试剂和材料

超纯水（Millipore，东京，日本），HPLC 和分析试剂级乙腈以及甲酸（Wako Pure Chemical, Ltd., 大阪，日本）。ICP-MS 标准品（SPEX CertiPrep, Inc., Metuchen, NJ, 美国）、对硝基苯酚磷酸二酯 (BNPP, 纯度 99%) 和蛋氨酸（纯度 ≥ 99% 82）(Sigma Aldrich, Steinheim, 德国)。磷酸肽标准品的氨基酸序列为 LRRApSLG 和 KRSpYEEHIP，含硫多肽标样为 ACTPERMAE 和 VPMLK。所有多肽购自 AnaSpec (Fremont, CA, 美国)，纯度都 ≥ 95%。

表 1. 不同 ICP-MS 仪器分析含硫和磷物质的检测限的比较

仪器	磷			硫		
	分离技术	检测限（化合物）	参考文献	分离技术	检测限（化合物）	参考文献
ICP-QMS 碰撞池（氦气）	capLC	110 fmol	1			
	LC	0.97 pmol	2			
	capLC	63 fmol	3			
	CE	19 fmol	2			
ICP-QMS 碰撞池（氩气）				nanoLC	1.5 pmol	6
				CE	2.6 pmol	7
ICP-QMSDRC（氧气）	LC	2.2 pmol	4	microLC	2.7 pmol	8
				microLC	3.1 pmol	9
				LC	2.3 pmol	4
HR-ICP-MS	capLC	100 fmol	5	microLC	9 pmol	11
	capLC	50 fmol	10	capLC	11 pmol	12
				capLC	10 pmol	13
ICP-MS/MS	capLC	6.6 fmol	本文	capLC	11 fmol	本文

制备含硫和磷的标样

使用 BNPP 和蛋氨酸在 1% 流动液相 B 基质中（这是液相色谱梯度淋洗的起始条件）制备 0、25、50、100 和 200 ng/mL（以硫、磷元素浓度计）的含硫和磷的校准标样。

磷酸肽溶液的制备

分别配制三份溶液（100 ng/mL，以磷元素浓度计）以确定每个多肽的保留时间和纯度。溶液 1 包含 LRRApSLG 和 ACTPERMAE，而溶液 2 包含 KRSpYEEHIP 和 VPMLK。两种溶液中均包含大约 100 ng/mL BNPP 和蛋氨酸。将溶液 1 和 2 按重量法 1:1 混合配制成 3。

仪器

capLC 系统

Agilent1200 系列，采用 Agilent Zorbax SB C18, 5 μ m, 150 x 0.3 mm 反相毛细管色谱柱的。流动相 A 和 B 分别包含水和乙腈。两种流动相都含有 0.1% 甲酸和 10 ng/mL 锗（作为 ICP-MS 内标使用）。进样量为 1-2 μ L。液相色谱流速为 5 μ L/min，液相色谱梯度淋洗条件如下：0-3 分钟：1% B，等度；3-35 分钟：1-60% B，线性梯度。

Cap LC-ICP-MS 接口

使用安捷伦 capLC 接口（安捷伦 G3680A 毛细柱液相色谱接口套件，图 1）将 capLC 色谱柱连接到 ICP-MS，此 capLC 接口结构为一个小的石英雾化室内包含一个消耗型的雾化器。

ICP-MS

使用 Agilent 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪。以 80 mL/min 的流速从雾化气通道通入氧气（氦:氧比例为 8:2）到雾化器气体中。池气体：氧气，流速为 0.35 mL/min。样品流速：5 μ L/min。 ^{31}P 、 ^{32}S 和 ^{34}S 的积分时间 150 ms（每个峰值一个点）。使用配于 30% 的乙腈中 100 ng/mL 磷和硫的标样对 8800 进行优化，以满足最低的磷、硫检出限要求，流速为 5 μ L/min，注射泵进样。使用 Agilent ICP-MS MassHunter 软件进行液相色谱操作和对色谱峰进行积分。

在 MS/MS 模式下使用 Agilent 8800 消除对硫和磷的干扰

8800 在 MS/MS 质量转移模式下操作以消除对硫和磷的干扰。在图 2 中，上方的示意图 (a) 将 Q1 设为 $m/z = 32$ ，从而允许 $^{32}\text{S}^+$ 进入反应池，排除了其它质量数的干扰（包括质荷比为 48 的离子）。 S^+ 在池内通过与氧气反应转换为 SO^+ 。Q2 设置为 $m/z = 48$ ，从而允许 SO^+ 进入检测器，排除了 $m/z = 32$ 的所有原始质量数干扰物。 $m/z = 48$ 的干扰物在碰撞反应池之前已由 Q1 排除。这是 MS/MS 结构具有强大消干扰能力的关键所在——实现了在可控条件下进行准确无干扰的反应物离子测量。

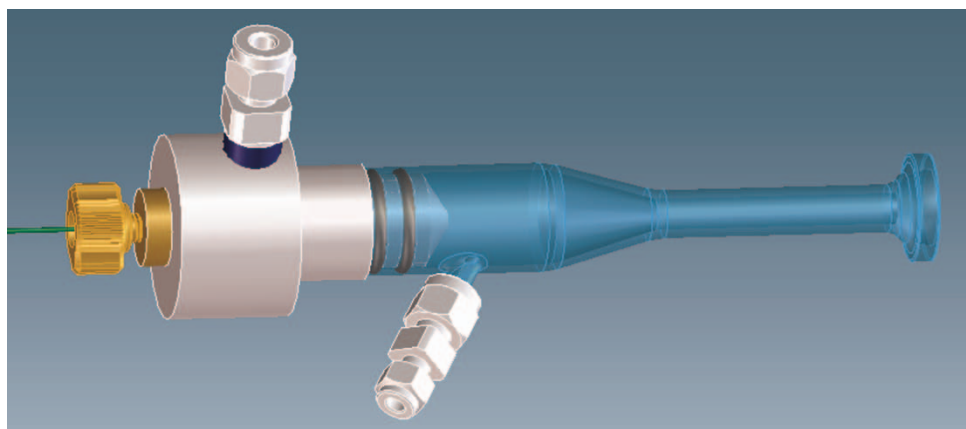


图 1. 安捷伦毛细柱液相色谱接口套件 (G3680A)

图 2 下方的示意图 (b) 显示了对磷的测定设置：Q1 设置为 $m/z = 31$ ，从而允许 $^{31}\text{P}^+$ 通过，排除了其它质量数的干扰（包括 $m/z = 47$ ）。 $^{31}\text{P}^+$ 在池内通过与氧气反应转换为 PO^+ 。Q2 设置为 $m/z = 47$ ，从而允许反应产物 PO^+ 进入检测器。 $m/z = 47$ 处的干扰物在碰撞反应池之前已由 Q1 排除。Q1 消除的干扰物包括：（ $m/z = 47$ 处 $^{47}\text{Ti}^+$ 、 $^{32}\text{S}^{14}\text{NH}^+$ 、 $^{32}\text{S}^{15}\text{N}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$ 对 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 的干扰，以及 $m/z = 48$ 处 $^{48}\text{Ti}^+$ 、 $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ 、 P^{16}OH^+ 、 $^{31}\text{P}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{48}\text{Ca}^+$ 对 SO^+ 的干扰），Q2 消除的干扰物包括：（ $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{16}\text{OH}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{12}\text{C}^{18}\text{OH}^+$ 对 $^{31}\text{P}^+$ 的干扰，以及 $^{16}\text{O}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{OH}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{18}\text{O}^+$ 对 $^{32}\text{S}^+$ 的干扰），如各图中所示。

同时可以看出，如果不使用 Q1，来自磷和硫的多原子离子将会彼此干扰，比如干扰 P/S 比例、含磷和硫的物质的测量（导致磷酸化水平的计算错误）、以及硫的同位素比例（例如，导致同位素稀释计算错误）。使用 8800 的 MS/MS 质量转移模式，反应产物离子保持了和母离子相同的同位素类型——而在 ICP-QMS 反应池中情况并非如此。在 ICP-QMS 中没有 Q1，因此硫的两种同位素都进入池内反应产生 SO 反应产物离子而彼此重叠。

最初，我们在高有机基质（30% 乙腈，通过注射泵连续进样）中测量了检测限以评估 Agilent 8800 消除干扰的有效性。所得的 ^{31}P 检测限为 0.6 ng/mL， ^{32}S 检测限为 1.2 ng/mL，两者的背景等效浓度分别为 9 ng/mL 和 5 ng/mL。这些值在水溶液中显著降低，意味着乙腈中含有磷和硫。为确认硫所受干扰被完全消除，测定了硫 34/32 的比率。由于 ^{32}S 所受干扰要高得多，如果测得的 34/32 比率与 $^{34}/^{32}\text{S}$ 的理论值吻合，则说明干扰得以有效去除。结果表明，空白溶液中 34/32 的比率 (0.0484 ± 0.0017) 与标准值 (0.0487 ± 0.0012) 吻合得非常好。 $^{34}/^{32}\text{S}$ 的 IUPAC 值为 0.0447 ± 0.0025 。测定值与理论值的差异在于质量偏离（8800 的比率值未经过质量歧视校正）。-4.0% 至 -4.3% 的质量歧视因子与文献 [14-16] 中的报道相匹配，证实了 8800 能够有效消除所有对硫的干扰，且乙腈中含有一定量的硫。

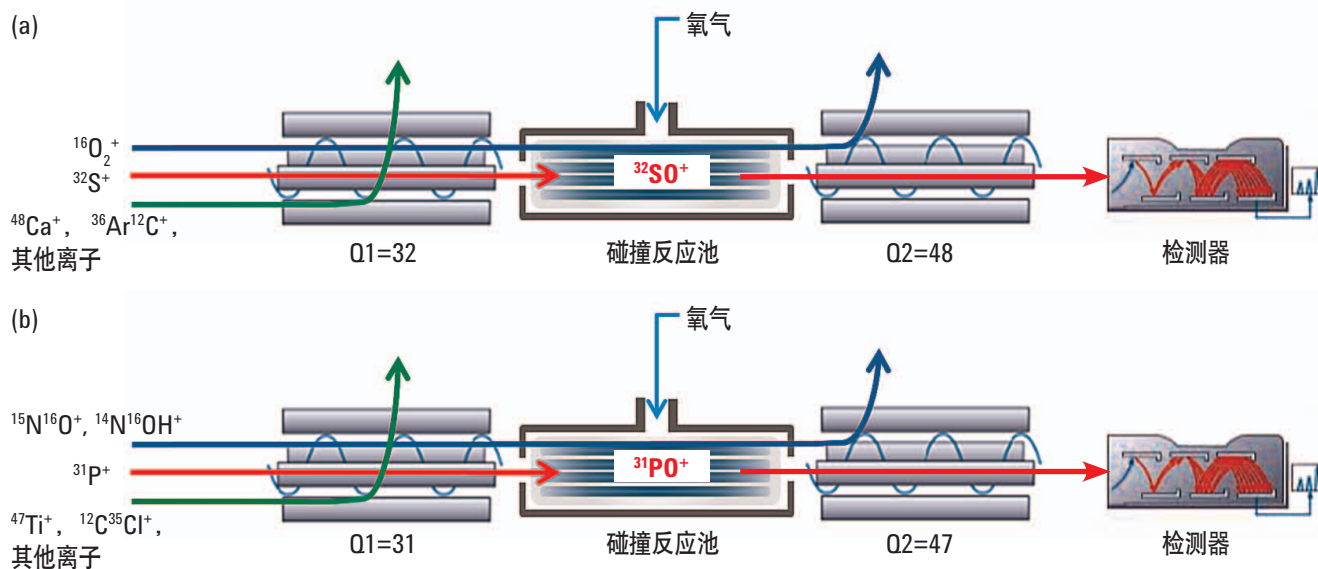


图 2. 8800 ICP-MS/MS 在 MS/MS 质量转移模式下操作可消除硫（图 a）和磷（图 b）所受到的质谱干扰

结果与讨论

改用 capLC-ICP-MS 分离和检测了含有 0、25、50、100 和 200 ng/mL 磷和硫（分别为 BNPP 和蛋氨酸）的校准标样，结果获得了优异的线性以及 < 4% 的 RSD（图 3）。

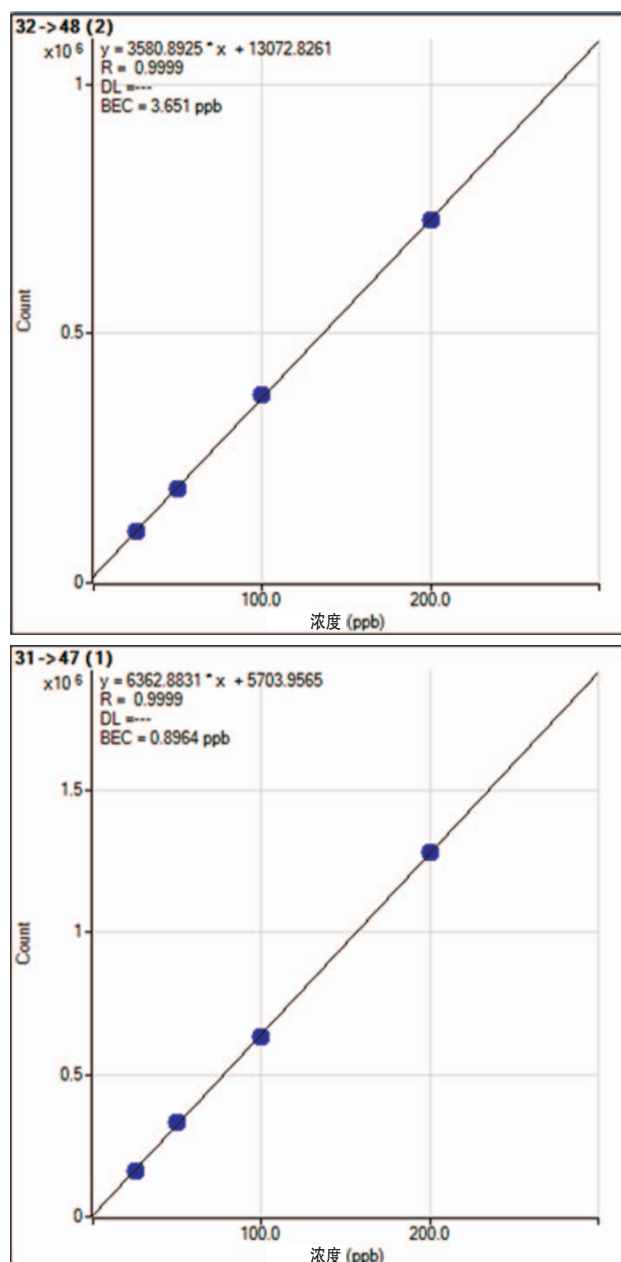


图 3. ^{32}S 和 ^{31}P （分别为蛋氨酸和 BNPP）在浓度为 25、50、100 和 200 ng/mL 时（以硫和磷元素浓度计）的校准曲线。进样量 = 2 μL ，流速 = 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，按文中所给梯度洗脱条件

图 4 为 50 ng/mL 标样的色谱图。观测到的两种元素的信噪比 (S/N) 均很好。在 LC-ICP-MS 分析中，由于乙腈流动相中的磷和硫带来的背景干扰能被有效去除，从而使得 8800 具备可准确测定此类分析物的能力。所得检测限分别为 0.10 ng/mL 磷和 0.18 ng/mL 硫（6.6 fmol 磷，11 fmol 硫，绝对值）。相信这是迄今为止所报道过的使用 LC-ICP-MS 获得的硫和磷分析的最低绝对检测限。详见表 1 中的总结。

测量磷酸肽和含硫多肽

采用 LC-ICP-MS 系统测量磷酸肽和含硫多肽。每种多肽的保留时间通过两种不同溶液（实验部分所描述的溶液 1 和 2）进行计算。溶液 3 含有两种多肽各约 45 ng/mL 和 105 ng/mL（以硫和磷元素计）的标样，在相同仪器条件下进行测量。由溶液 3 获得的色谱见图 5，该图清楚地显示了两种多肽和硫、磷标样的谱图。只有含磷酸化酪氨酸的多肽显示了一个小肩峰，所对应的可能是磷酸肽杂质，占信号的 9%。观测到的信噪比 S/N 极为优异（未进行平滑处理）。含硫多肽的检测限均值 (0.18 ng/mL S) 比从蛋氨酸标样中获取的值 (0.18 ng/mL S) 略高，这可能是由于其基峰的宽度 (24s) 略微宽于蛋氨酸标样 (9 s)。就磷而言，所得检测限均值 (0.33 ng/mL P) 大大高于 BNPP 标样中获得的值 (0.10 ng/mL P)，主要由于碳的存在使得磷的灵敏度提高（梯度洗脱）。

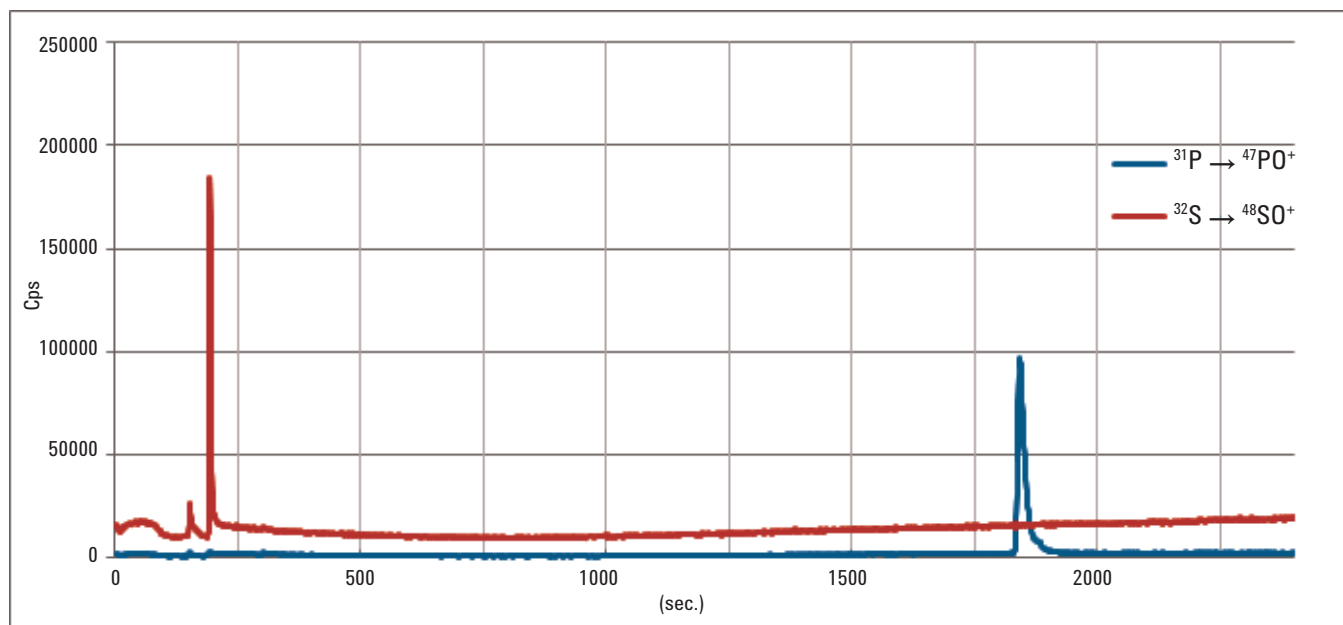


图 4. 50 ng/mL 标样的色谱图

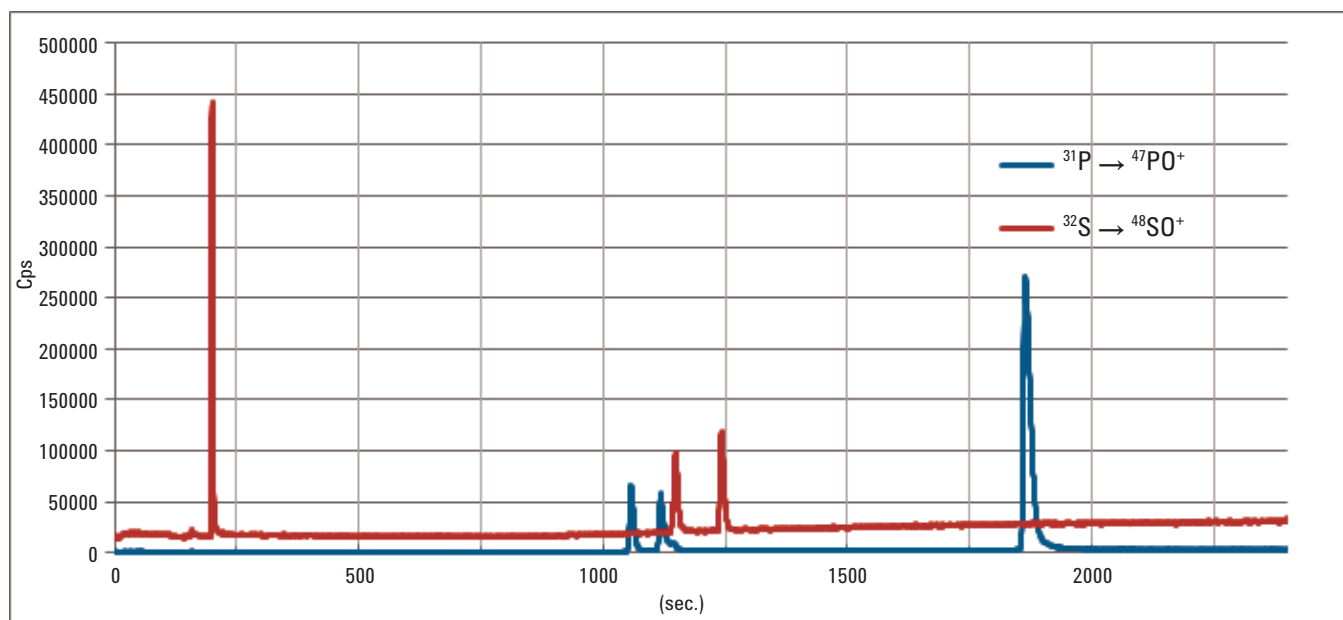


图 5. 含有 LRRApSLG、ACTPERMAE、KRSpYEEHIP、VPMLK 以及 BNPP 与氨基酸的混合溶液 3 的色谱图

结论

对蛋白质中天然存在的 ICP-MS 可检测元素进行高灵敏度和无干扰的定量检测将扩展 LC-ICP-MS 方法在蛋白质组学中的应用。通过与 cap-LC 分离方法联用, Agilent 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪利用 LC-ICP-MS 分析含硫和磷物质时可获得前所未有的最低检测限 (分别为 11 fmol 和 6.6 fmol)。

在 MS/MS 质量转移模式下操作时, Agilent 8800 通过分析物与氧气反应并测量产生的氧化物离子, 从而有效消除了对磷和硫的干扰。硫的同位素比测量值与理论值吻合良好, 证明硫干扰物得以有效消除, 并且由于串联质谱模式能保留正确的同位素模式, 可以通过同位素稀释法来校正因梯度淋洗导致的硫灵敏度的变化。

所测得的含硫和磷物质及多肽的峰形和信噪比极佳。这也是首次将通用标样应用于多肽和磷酸肽的同步绝对定量分析。

这种全新的功能强大的硫磷 (特别是硫) 检测法将使 LC-ICP-MS 在诸多领域中得到应用: 如药物研究 (药物和代谢物)、环境分析 (农药) 和纳米技术 (工程纳米颗粒的表征)。

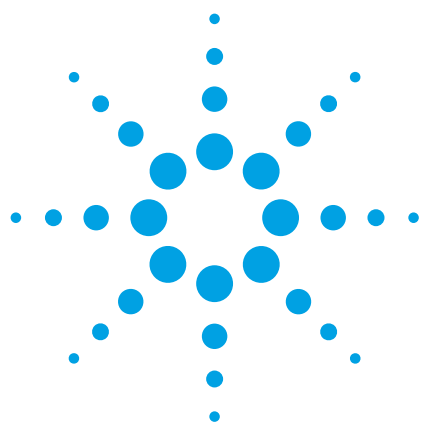
更多信息

为详细了解该应用, 请参看出版期刊: Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics, Silvia Diez Fernández, Naoki Sugiyama, Jorge Ruiz Encinar, Alfredo Sanz-Medel, Anal. Chem., 2012, 84(14), pp 5851–5857, Publication Date (Web): June 18, 2012

参考文献

1. Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 569-671.
2. Prüfrock, D.; Leonhard, P.; Prange, A. *J. Anal. At. Spectrom.* 2003, 18, 708-713.

3. Prüfrock, D.; Leonard, P.; Ruck, W.; Prange, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 381, 194-204.
4. Smith, C. J.; Wilson, I. D.; Weidolf, L.; Abou-Shakra, F.; Thomsen, M. *Chromatographia*. 2004, 59, S165-S170.
5. Wind, M.; Edler, M.; Jakubowski, N.; Linscheid, M.; Wesch, H.; Lehmann, W. D. *Anal. Chem.* 2001, 73, 29-35.
6. Schaumlöffel, D.; Giusti, P.; Preud'Homme, H.; Szpunar, J.; Lobinski, R. *Anal. Chem.* 2007, 79, 2859-2868.
7. Prüfrock, D.; Leonhard, P.; Prange, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 132-139.
8. Hann, S.; Koellensperger, G.; Obinger, C.; Furtmüller, P. G.; Stingeder, G. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19, 74-79.
9. Stürup, S.; Bendahl, L.; Gammelgaard, B. *J. Anal. At. Spectrom.* 2006, 21, 201–203.
10. Zinn, N.; Hahn, B.; Pipkorn, R.; Schwarzer, D.; Lehmann, W. D. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 4870–4875.
11. Hann, S.; Koellensperger, G.; Obinger, C.; Furtmüller, P. G.; Stingeder, G. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19, 74-79.
12. Zinn, N.; Krüger, R.; Leonhard, P.; Bettmer, J. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 537-543.
13. Wind, M.; Wegener, A.; Eisenmenger, A.; Kelner, R.; Lehmann, W. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 3425-3427.
14. Clough, R.; Evans, P.; Catterick, T.; Evans, E. H. *Anal. Chem.* 2006, 78, 6126-6132.
15. Becker, J. S. *J. Anal. At. Spectrom.* 2002, 17, 1172-1185.
16. Mason, P. R. D.; Košler, J.; de Hoog, J. C. M.; Sylvester, P. J.; Meffan-Main, S. *J. Anal. At. Spectrom.* 2006, 21, 177–186.



用于玩具材料中三价和六价铬定量分析的 LC-ICP-MS 方法，满足欧洲法规 EN71-3: 2012 特定元素迁移的要求

应用简报

材料

作者

Kazuhiro Sakai¹、Juane Song²、
Dong Yan² 和 XiangCheng Zeng²

¹安捷伦科技，日本

²安捷伦科技，中国



前言

铬 (Cr) 广泛应用于工业生产过程如电镀、制革和印染，以及钢铁和合金等工业产品中。Cr 具有不同的氧化态，但通常以三价 Cr (Cr(III)) 或六价 Cr (Cr(VI)) 的形式存在。Cr(III) 是维持人体健康的一种必需微量元素，而 Cr(VI) 却是一种大家熟知的有毒物质。Cr(VI) 被视为人体的一种致癌物质，因此其最大污染量受到法规的严格控制。例如，欧盟 (EU) 根据危害性物质限制指令 (RoHS)，禁止在电子设备中使用 Cr(VI)。

同样地，EU 玩具安全指令 (2009/48/EC) 通过最大程度地减少儿童接触潜在有害或有毒的玩具产品，来力保他们的安全。玩具安全的欧洲标准 (EN71) 支持 EU 指令 2009/48/EC 的要求，并且根据玩具可能会被嚼碎、吮吸或吞食的假设，标准 (EN71-3) 的第三部分涵盖了不同种类玩具产品中特定元素的迁移检测。EN71-3



Agilent Technologies

的最新修订版（2012 版）于 2013 年 7 月 20 日生效；从此，所有在 EU 销售的玩具必须遵守修订后的标准。

玩具材料和玩具部件被分为三类：第 I 类：干燥、易碎、粉末状或柔软的材料；第 II 类：液体或黏性材料；第 III 类：涂料和可刮掉的材料。EN71-3 规定了 17 种元素的迁移限度，它们是铝、锑、砷、钡、硼、镉、铬、钴、铜、铅、锰、汞、镍、硒、锶、锡（包括有机锡化合物）和锌。Cr 的 Cr(III) 和 Cr(VI) 分别有其各自的迁移限度，见表 1。第 II 类玩具材料（液体产品可能最容易被吞食）必须满足 Cr(VI) 5 ppb 的最低限度。EN71-3 中规定的样品制备方法（见图 1）最终将样品稀释 500 倍。这意味着样品中 Cr(VI) 的限度实测为 10 ppt，所以本应用需要灵敏度非常高的方法，以满足不同形态 Cr 的测定。本文描述了测定所需低浓度不同形态 Cr 的方法，该方法联用 Agilent 7700x ICP-MS 和 Agilent 1260 生物惰性 LC。

实验部分

联用 Agilent 7700x ICP-MS 和 Agilent 1260 生物惰性 LC。7700 的碰撞/反应池 (CRC) 使用氦 (He) 模式，以去除 $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ 、 $^{34}\text{S}^{18}\text{O}$ 、 $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$ 和 $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}$ 等的光谱干扰，它们会干扰低浓度 Cr 同位素的测定。对于不同形态的 Cr，He 模式可以使 7700 实现所需要的低检测限 (DL)，并且还能在不损失色谱性能的同时对色谱方法进行独立优化，以确保不同形态 Cr 的峰与碳、硫和/或氯化物的峰分开。为了测定这两种 Cr 形态，在溶液中以 $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ 形式存在的阳离子 Cr(III)，通过与 EDTA 整合被转变为阴离子 $[\text{Cr}^{3+}\text{-EDTA}]^{-1}$ 。从而这两种 Cr 形态就可以通过阴离子交换柱实现有效分离。整合方法的建立和 LC-ICP-MS 联用系统的流程控制由 ICP-MS MassHunter (MH) 软件包来完成。

表 1. 玩具材料分类和对应的不同形式 Cr 的迁移限度

玩具材料	类 1	类 2	类 3
绘画的涂料、清漆、漆料、印刷油墨、聚合物、泡沫及类似涂料			√
聚合物及类似材料，包括层合板，无论是否有纺织物加固，但不包括其它纺织品			√
纸和纸板			√
纺织品，无论是天然的还是合成的			√
玻璃、陶瓷和金属材料			√
无论是否着色的其它材料			
压缩的颜料片，会留下痕迹的材料或玩具中以固体形式存在的类似材料	√		
柔软的模型材料，包括雕塑土和石膏	√		
液体颜料，包括指画颜料、清漆、漆料、钢笔中的液体墨水，以及在玩具中以液体形式存在的类似材料		√	
玩具材料中的迁移限度 (mg/kg)			
铬 (III)	37.5	9.4	460
铬 (VI)	0.02	0.005	0.2

ICP-MS

使用配备标准 Micromist 雾化器的 Agilent 7700x ICP-MS 进行 Cr 的测定。LC 柱的出口直接与 ICP-MS 雾化器相连。钴 (Co) 作为内标 (ISTD)，通过在线 ISTD 套件 (G3280-60590) 引入。每张色谱图采用点对点 ISTD 校正，这是一种简单有效的校正信号漂移的方法。峰积分由 ICP-MS MassHunter 软件的自动积分器来完成。操作条件见表 2。在 He 碰撞模式下，优化等离子体条件以获得 Cr 测定时的最高灵敏度， CeO^+/Ce^+ 的氧化物比例低于 0.5%。通过 ICP-MS MassHunter 的自动调谐功能优化离子透镜电压。

HPLC

为满足极低 Cr 检测限的要求，我们使用了 Agilent 1260 Infinity 生物惰性 HPLC：G5611A 生物惰性四元泵和 G5667A 生物惰性高效自动进样器。生物惰性 HPLC 中所有与样品或流动相接触的材料全部更换为惰性材料，消除了

与蛋白质等生物样品发生反应的可能，也避免了 HPLC 部件中金属背景浸出。生物惰性 LC 非常适合于需要获得最低 DL 的金属形态分析工作。

使用阴离子交换柱 (Agilent Bio WAX NP5 (5190-2488)，4.6 x 50 mm，5 μm ，PEEK 保护柱)，在室温下进行不同形态 Cr 的分离。使用配有聚丙烯瓶盖的玻璃样品瓶 (5182-0540)。在使用前，将这些样品瓶用稀硝酸清洗，并用超纯水 (UPW) 彻底冲净。注意当样品接触到橡胶、塑料，甚至痕量有机残留物时，样品中不同形态的 Cr 很容易被还原。表 2 列出了 HPLC 的操作参数。

试剂

Cr(III) 和 Cr(VI) 分别用 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 和 K_2CrO_4 来制备，购自 KANTO 化学品公司 (东京，日本)。高纯 Na-EDTA 购自 DOJINDO 实验室公司 (熊本，日本)，经溶解和稀释后采用氨水中和。半导体级 HCl 和氨水 (Tamapure AA-100，购自 Tama 化学品公司，神奈川，日本) 用于样品制备。

样品制备

样品制备过程见图 1。该过程遵循 EN71-3，它模仿了当一个儿童吞下玩具材料后的胃部消化情况；它不能用于不同形态铬的总提取。得到的提取 (迁移) 溶液采用 EDTA 和氨水稳定化。加入氨水中和溶液，可以使从玩具材料中提取的不同形态的铬保持数小时稳定，不会发生形态间转换或者沉淀损失。我们确证了如果溶液被中和到 $\text{pH} = 7 \pm 0.5$ 时，这两种 Cr 在样品制备后会保持至少 24 小时稳定。采用相同的样品制备方法配制校准标准液。

表 2. LC-ICP-MS 操作参数

ICP-MS 条件	
RF 功率	1550 W
采样深度	8.0 mm
载气流量	1.10 L/min
辅助气流量	0 L/min
选择气流量	0 L/min
碰撞池气体流量	He, 4.3 mL/min
八极杆偏置电压	-18 V
KED	+3 V
HPLC 条件	
流动相	75 mM HNO_3 溶液，氨水调 $\text{pH} = 7$
流速	0.8 mL/min
进样量	100 μL
采集参数	
采集	时间分辨分析 (TRA)
驻留时间	1.0 s ($m/z = 52$)，0.1 s ($m/z = 59$)
运行时间	160 s

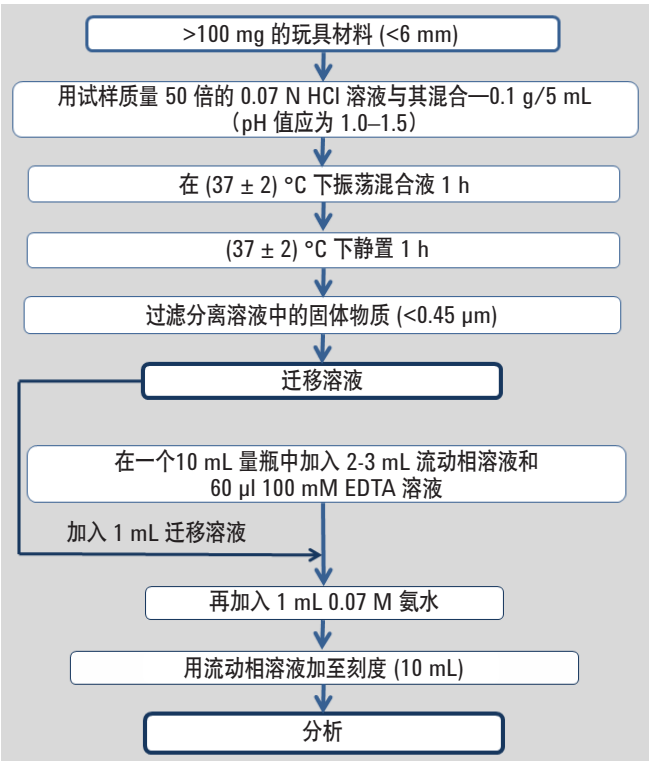


图 1. 样品制备流程（样品最终稀释 500 倍）

结果与讨论

图 2 展示了校准标准液的重叠色谱图，以及 Cr(VI) 的校准曲线。色谱图对应的校准标准液包括 5 ppt、10 ppt、20 ppt、50 ppt 和 100 ppt 的 Cr(VI)，以及高 10 倍浓度的 Cr(III)。不同形态的 Cr，Cr(III) 和 Cr(VI)，保留时间分别在 0.85 和 1.67 min，实现了完全分离。

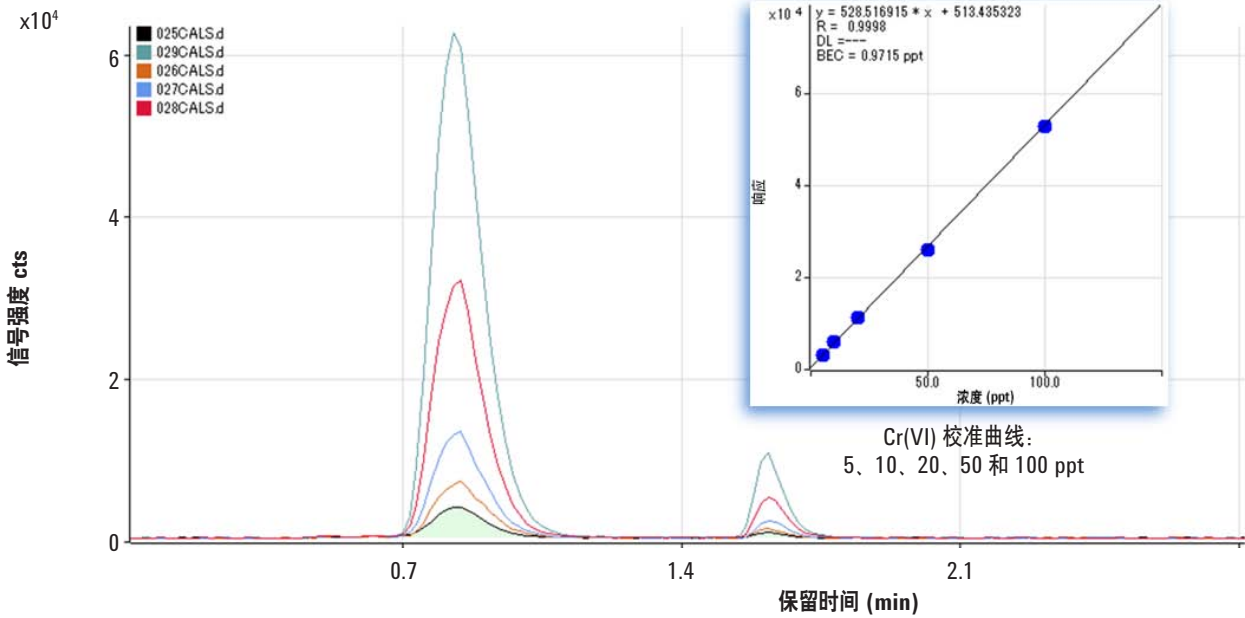


图 2. Cr(III) 和 Cr(VI) 校准标准液的重叠色谱图及 Cr(VI) 的校准曲线

表 3 列出了方法验证和三种玩具材料的分析结果。

表 3. 方法和分析汇总

			Cr(III)	Cr(VI)
保留时间		min	0.95	1.67
DL	溶液中	ppt	3.1	2.0
	材料中	µg/kg	1.6	1.0
MDL	溶液中	ppt	8.6	2.1
	材料中	µg/kg	4.3	1.1
残留			< 1/10000	< 1/10000
定量值	样品 1	µg/kg	78.6 ± 4.2	3.0 ± 0.7
	样品 2		15.1 ± 0.9	<D.L.
	样品 3		50.8 ± 1.3	<D.L.
加标回收率	样品 1	%	98.0	111.2
	样品 2		97.2	98.1
	样品 3		102.7	96.2
50 次样品测定的稳定性	样品 1	RSD %	2.4	2.9
	样品 2		2.9	4.6
	样品 3		1.4	4.3

DL 与 MDL

图 3 展示了浓度 1（最低浓度，50 ppt Cr(III) 和 5 ppt Cr(VI)）校准标准液 10 次重复分析的重叠色谱图。根据色谱图的 S/N，我们可以测得溶液中 Cr(III) 和 Cr(VI) 的检测限 (DL) 分别为 3.1 和 2.0 ppt。峰-峰噪音的测定范围如图所示，且 DL 计算的是 S/N = 3 时的浓度。这些得到的 DL 足够低，满足标准 EN71-3 中对具有最低迁移限度的第 2 类玩具材料的要求。方法检测限 (MDL) 也通过这 10 张色谱图进行计算。MDL 定义为 10 次分析定量值的 3σ 对应的浓度（表 3）。

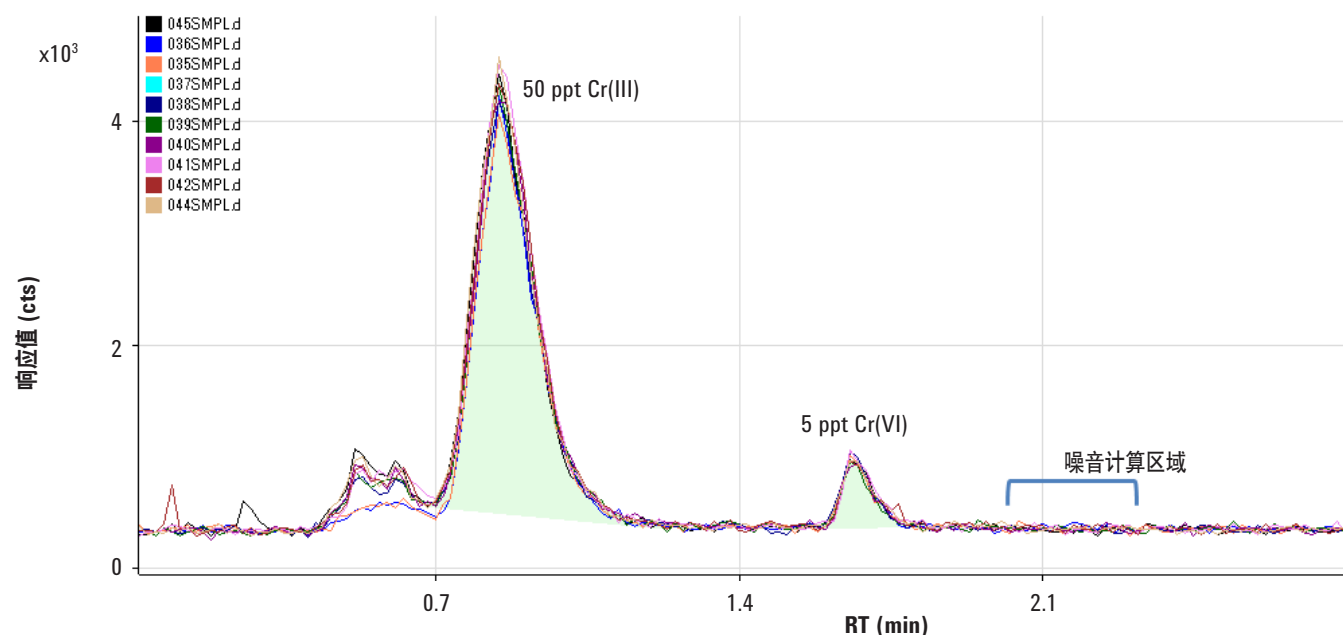


图 3. 浓度 1 标准液 10 次重复测定的重叠色谱图：50 ppt Cr(III) 和 5 ppt Cr(VI)

高浓度 Cr(III) 峰拖尾的影响

图 3 展示了这两种 Cr 看似出色的分离，但 Cr(III) 的浓度通常远高于 Cr(VI) 的浓度。这意味着痕量的 Cr(VI) 需要极好的分离，以在有高浓度 Cr(III) 存在时实现准确定量。图 4 为含 0.1 ppb Cr(VI) 和 200 ppb Cr(III) 的溶液的色谱图。在右侧的放大色谱图中，可以轻易辨认出 0.1 ppb Cr(VI) 的峰。它可以被准确积分，测得浓度为 0.097 ppb（回收率 97%），误差（计算 10 次重复测定的 SD）为 ± 0.003 ppb。这表明即使有 2000 倍更高浓度 Cr(III) 的存在，仍可准确定量 Cr(VI)。

冲洗试验

由于对 Cr(VI) 的测定需要相对低的 DL，所以我们应考虑高浓度样品进样后的残留污染。为了检查 LC-ICP-MS 方法的冲洗性能，我们在包含每种 Cr 形态 100 ppb 的溶液进样前

后立即分析一个制备的空白样品。结果发现在空白中测得的这两种 Cr 的浓度均低于其 DL。

玩具材料样品分析：定量分析、加标回收率试验和稳定性

我们分析了三种玩具材料：蜡笔（样品 1）、泡泡液（样品 2）和软塑料（样品 3）。这些材料分别属于 EN71-3 规定的类别 1、2 和 3。将它们按照图 1 描述的过程进行样品制备，然后采用上述 LC-ICP-MS 方法进行分析。每个样品中不同形态 Cr 的测得浓度列于表 3。

使用迁移溶液进行加标回收率试验。将 Cr(III) 和 Cr(VI) 加标到溶液中，使浓度分别为 1 ppb 和 0.1 ppb。溶液用氨水中和后再加标，避免 Cr(VI) 的还原。加标回收率试验的结果见表 3，确证了这两种 Cr 形态均具有良好的回收率。采用加标迁移样品，考察其长期稳定性，每种玩具材料各

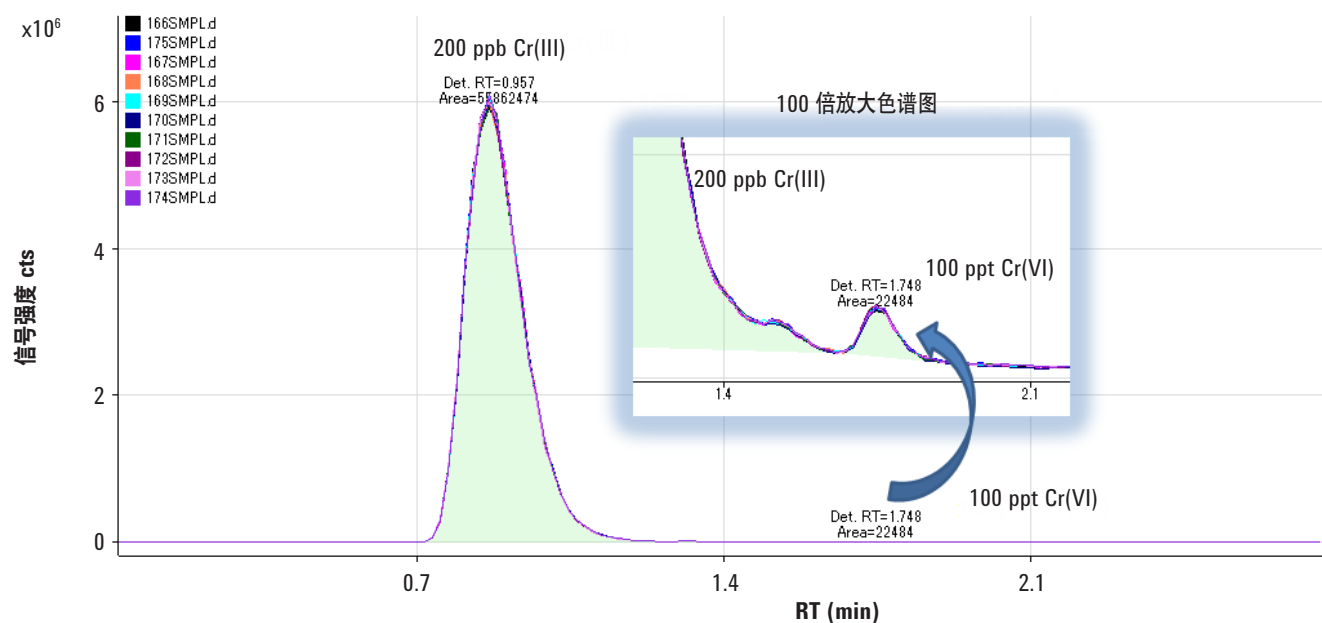


图 4. 200 ppb Cr(III) 存在下，0.1 ppb Cr(VI) 的分离和准确测定

50–60 次进样分析的结果见图 5。曲线表明在整个分析运行中每种 Cr 的测得浓度接近平均浓度。每个样品的运行时间约为 4 分钟，每种玩具材料样品的总运行时间为 3–4 小时。我们确证样品具有良好的稳定性，这表明三种玩具样品中不同形态的 Cr 之间都没有发生内部转换，也没有因沉淀而损失。

结论

开发了一种联用 Agilent 7700x ICP-MS 和 Agilent 1260 生物惰性 LC 的方法，用于玩具材料中 Cr 形态的分析 (Cr(III) 和 Cr(VI) 的分离和测定)，以遵守 EN71-3:2012 中新规定的限度。欧洲标准 EN71-3 支持 EU 玩具安全性指令 2009/48/EC 的目标，并且要求检测方法能够准确测定样品制备后测定液中 10 ppt 的 Cr(VI)。已证实建立的方法对于两种 Cr 形态均具有个位数 ppt 的 DL，并且验证了该方法具有应用中所需的性能。

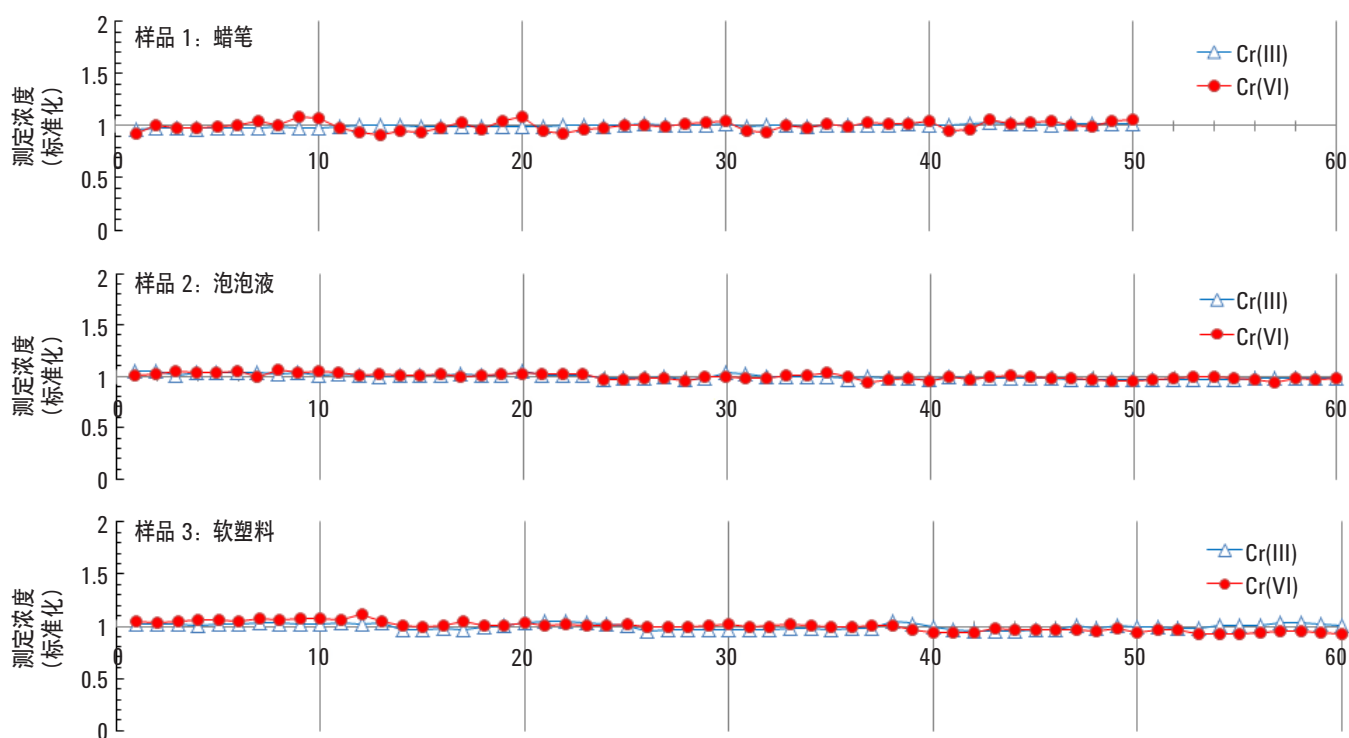
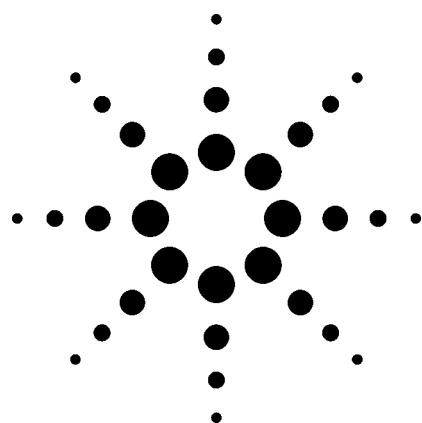


图 5. Cr(III) 和 Cr(VI) 各超过 50 次分析的信号稳定性 (200 分钟)。分析前，向三种玩具样品的迁移溶液中标加 1 ppb Cr(III) 和 0.1 ppb Cr(VI)

激光烧蚀 (LA)-ICP-MS 在镍合金产品控制中的应用



应用

冶金分析应用

作者

Ed McCurdy and Glenn Woods
Agilent Technologies UK Ltd.
5500 Lakeside, Cheadle Royal Business Park
Stockport, Cheshire, SK8 3GR, UK

Peter Scrimshire
IncoTest (Special Metals Wiggin Ltd.)
Holmer Road, Hereford, HR8 9SL, UK

摘要

镍合金被广泛应用于各个领域，在一些苛刻操作条件下起关键作用的部件中往往含有镍合金。因此，必须对其物理、化学以及力学性能有充分的了解，镍合金中痕量金属杂质元素含量的水平对合金的性能影响很大，而且必须进行严格控制。IncoTest (Wiggin 有限公司特种金属商业部) 就激光烧蚀电感耦合等离子体质谱 (LA-ICP-MS) 对镍合金的监控能力进行了评价，与常规仪器相比 (X-射线荧光和光学发射光谱)，可检测的痕量元素种类更多，测定下限更低。文中比较了采用不同技术得到的数据。结果表明，在所有情况下，采用 LA-ICP-MS 方法的检出限、准确度、回收率以及长期稳定性均令人满意。

引言

Special Metals Corporation (特种金属公司) 于 1998 年购买了 Inco 合金公司集团后，成为领先世界的高性能镍基材料包括 Nimonic, Inconel, Incoloy, Udimet, Monel, Nilo 合金的发明、生产和供应商。它在美国的 Huntington, WV, New Hartford, NY, 以及英国的 Hereford 均有主要制造厂。Incotest 实验室为各种各样不同的材料提供“现代化”的化学分析和力学测试。

镍基高温合金，属于“高温合金”的一种。“高温合金”的定义是“用于高温设备的合金，其基体通常为 γ 相，含有 80% 左右的 Ni 族元素，上述设备会遇到极强的机械应力，并对材料的表面稳定性要求极高。”[1]。这恰恰是气体涡轮机内部所存在的条件。事实上，1940 年代初期，喷气发动机的发展推动了早期镍基合金的发展进程。其后各种耐高温、耐极强的机械应力，耐腐蚀的新合金材料得以不断发展。各种不同的部件需用到不同的合金，这就要求对决定合金物理性能的合金元素及其杂质元素的作用有充分了解。

高温合金大致可分为三种类型：一类是镍铬合金；另一类是钴合金，还有一类就是铁合金。也有铬基合金，



但通常认为此类合金不属于高温合金。镍基高温合金长久以来一直是喷气发动机部件中的关键材料，在许多其它现代技术如船舶用和陆地用的气体涡轮机，石油化工厂、核反应器部件、火箭发动机、太空飞船、汽车排废和催化装置等。

许多镍基合金硬度很大，但其本身并不具有抗高温表面氧化的性能。耐高温和耐腐蚀的性质是由于加入了一些合金元素，尤其是 Cr，该元素可在合金表面氧化形成 Cr₂O₃。同样，加入 Ti 和 Al 会增加合金的强度 [2]。上述元素的加入量之精确水平对特定部件使用的合金所要求的性质至关重要。例如，可提高硬度的元素 Al, Ti 和 Nb 加入总量从 16% 增加到 20% 时，合金的硬度可提高 4 倍。合金中加入 C 和 B 可使晶界增强。上述特性及其它常用合金元素的作用列于表 1。

除了在纯镍材料中有意加入一些合金元素以改善其性能外，还会存在一些痕量杂质元素。杂质元素，可能

均匀地溶解于固态合金基体中或以独立的晶体或包裹体存在，其存在形式会大大影响最终产品的性质。例如，以氧化物形式存在的 Ti, Nb 和 Al 的杂质可能会导致材料脆裂而缩短寿命并导致不抗疲劳。那些能降低晶界性能并降低拉力－破坏性能的元素包括 Bi, Te, Se, Pb 和 Tl。所有这些元素的浓度即使低于 100 ppm 都存在有害影响，Bi 的浓度最低，但影响也最大 [3]。另有些元素会降低延展性和柔软性，如 As, Ba, Ca, Li, Mg, Sb, Sn 和 Sr 等，可能是由于它们对晶界性能产生了影响。

表 2 列出了目前镍基高温合金中每种痕量杂质元素的典型含量指标。从表中也可以看出：随着时间的变化，指标中要求测定的元素数量和每种杂质含量的最大允许限都发生了变化。

传统分析技术的检出限（DLs）足以监控较高限量的痕量元素，但对于那些要求更严、限量更低的元素而言，需要采用新的分析技术。而采用光学发射光谱法

表 1. 镍基高温合金中典型合金元素的作用

作用	合金元素													
	Cr	Al	Co	Fe	Mo	W	Ti	Ta	Nb	Hf	C	B	Zr	Mg
增强基体性能	X		X	X	X	X								
形成 γ 相		X					X	X	X					
形成碳化物	X				X	X	X	X	X	X				
形成氧化物	X	X												
晶界增强										X	X	X	X	X

表 2. 早期与目前镍基高温合金中杂质元素最高限量

指标	杂质元素指标 (所有值的单位均为 ppm)												
	Ag	Zn	Cd	Ga	In	Tl	Sn	Pb	As	Sb	Bi	Se	Te
1975 前	5							10			1		
AMS 2280 (1975–1992)													
杂质总含量最大为 400 ppm	50	50	50	50	50	5	50	5	50	50	0.5	3	0.5
目前典型指标	5	5	0.2	30	0.2	0.2	30	5	30	3	0.5	1	0.5

的最大难点恰恰在于难以检测和控制低含量元素。因此，IncoTest 就 LA-ICP-MS 在镍合金产品常规监控中的应用潜力进行了评价。

影响 LA-ICP-MS 在金属整体分析中被广泛应用的主要局限性是校准样品与被测样品需进行严格的基体匹配，此外，大多数商品化激光系统的设计适合于更为典型的“特征”分析，即小的烧蚀坑更为理想。然而，大采样面积的设备可采用存储分析模式可以对物质表面进行线或面（光栅式）采样的整体分析。最近，New Wave 紫外系列激光器的新款型号专门设计了能提供较大烧蚀坑尺寸的系统，进一步增加了样品烧蚀面积，本文采用的就是此种新型激光器。此外，随着激光技术的发展，激光烧蚀向着更低的、更为一致的能量密度以及更佳的烧蚀稳定性，目前可在一致的条件对不同种类的物质进行激光烧蚀，实现不同材料的测定。

实验部分

本工作的激光系统采用 New Wave UP266 MACRO (New Wave, Fremont, CA, USA)。ICP-MS 采用 Agilent 7500a。按照厂商的推荐设置激光方法和 ICP-MS

表 3. for LA-ICP-MS 系统主要操作参数

参数	设定值
New Wave UP266 MACRO	
烧蚀斑点尺寸 (μm)	515
能量 (%)	60
重复速率 (Hz)	10
线速度 (μm/s)	30
Agilent 7500a	
正向功率 (W)	1350
载气流速 (L/min)	1.2

调谐和采集参数，主要操作参数列于表 3。

采用 ICP-MS 分析任何高基体样品，均须考虑可能出现的质谱重叠干扰和多原子离子干扰问题。上述干扰来自被提取进入质谱仪的样品基体、或等离子气体尾焰成分。表 4 镍基合金材料分析中可能造成干扰的主要多原子离子干扰。

表 4. 镍基样品中的主要基体干扰

基体干扰	受干扰元素
^{62, 64} Ni ²⁺	³¹ P, ³² S
^{58, 62, 64} Ni ¹ H ⁺	⁵⁹ Co, ^{63, 65} Cu
^{60, 61, 62, 64} Ni ^{16, 18} O ⁺	^{76, 77, 78, 80, 82} Se
^{58, 62, 64} Ni ¹⁶ O ¹ H ⁺	⁷⁵ As, ^{79, 81} Br
^{58, 61} Ni ⁴⁰ Ar ⁺	⁹⁸ Mo, ¹⁰¹ Ru
Ni ₂ ⁺	^{118, 120} Sn, ^{121, 123} Sb, ¹²⁷ I, ^{125, 128} Te

上述干扰物水平多数极低（例如，与溶液雾化进样方式相比，激光进样方式大大降低了溶液雾化形成的水蒸汽，因此氧化物干扰大大减少。）还有一些干扰也可易于避免（例如，分析 ⁹⁵Mo，而不用分析受干扰的 ⁹⁸Mo）。对于其它一些可能受到干扰的分析物，Ni 合金生产商自制了极佳的参考物质，上述参考物质不含痕量杂质元素极易对基体引入的多原子离子干扰进行定量、校正或扣除。

结果与讨论

本文建立的镍基合金样品的预烧蚀和采集烧蚀的方法适于对样品表面具有代表性的区域进行采样，而采样面积比火花、空心阴极或 XRF 技术要小得多。尽管因采样面积小，激光采样比传统技术的大采样面积提供的移骄恨信号的重现性而言稍有不足，但它却可以提供一些其它信息。每个采样点所给出的平均结果均带有标准偏差 (SD)，因为每 1 cm 线扫描测量是由三次独立的采集而成，每次采集大约 3 mm 长×0.5 mm

宽。由三次不同采集点的三次分析获得平均结果，该结果与空心阴极法的结果具有可比性，同时还提供了每个采样区域内的品均匀性的信息，该信息是以往所使用的单一整体采样方法不可能获得的。

图 1 为镍合金采用上述激光烧蚀方法进行采样后的照片。注意该样品中清晰可见的晶体结构。实验表明，在加标的标准中（加入浓度远高于普通产品样品中的

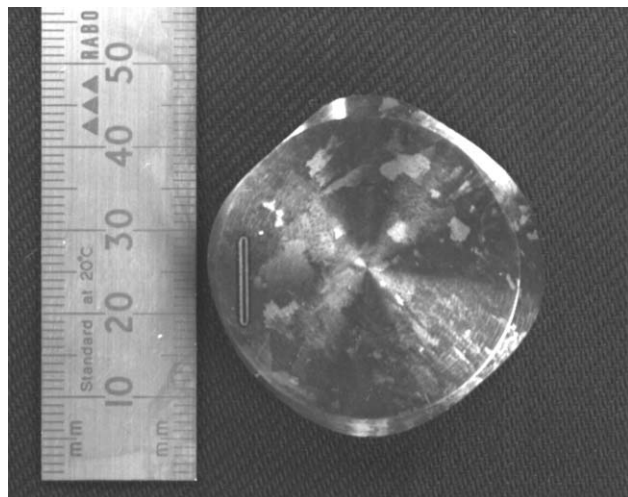


图 1. 激光烧蚀分析后的镍基合金样品

痕量元素)，痕量元素分布严重不均匀。在此情况中，痕量元素并没有完全混匀并分布到基体中，导致了杂质元素几乎是以纯包裹体形式存在。上述现象极易由

样品激光烧蚀轨迹较大的相对偏差来识别，重复采集分析的其中一个结果受包裹体的影响，而其它结果是基体中的低冶金尘坝的分析物信号。使用传统的分析技术是不可能获得上述信息的，因为在其它技术中，一个或多个包裹体通常都包含于每个采样点中，给出的是比较一致的平均结果，而不是痕量元素分布或包裹体存在的信息。

在元素分布均匀的地方，每个采集线三次重复测量的精度在 5% RSD 左右，这从图 2 的 As 与 Ga 的校准曲线上各点的结果可知，标准曲线上的每个点均测定

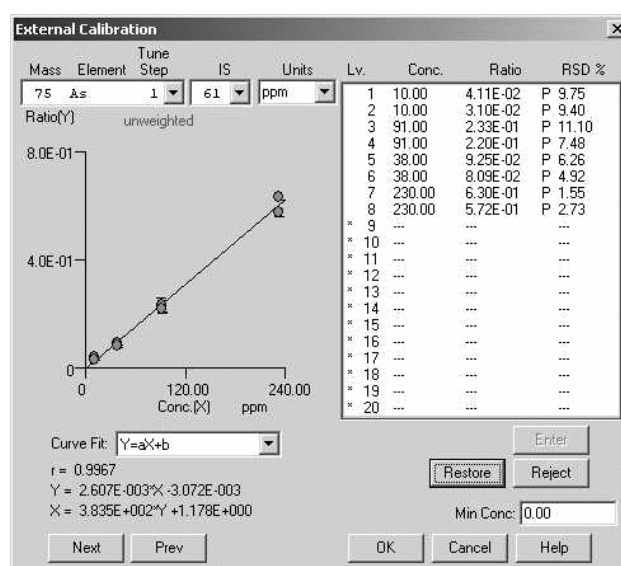
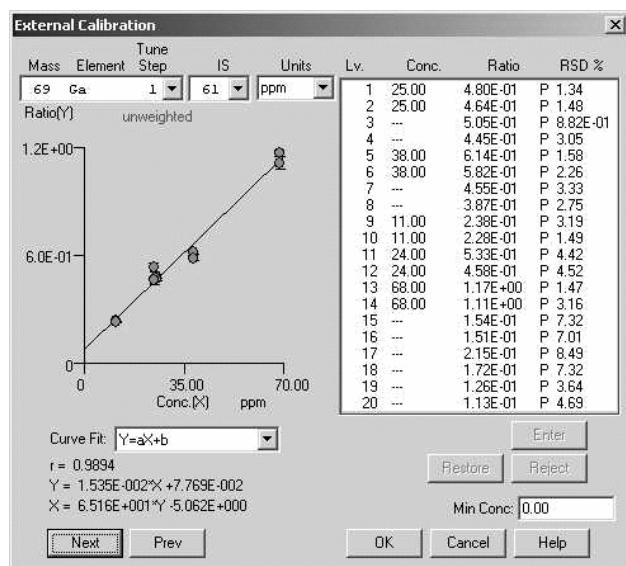


图 2. LA-ICP-MS 对镍基合金标准样品中 Ga (m/z 69) 和 As (m/z 75) 的校准曲线

两次，两次的结果重合。每个点重复三次，取平均值，三次测定的误差由 SD 表示（如校准曲线数据表可知）。

为了验证所建立的新方法，将 LA-ICP-MS 数据与现有其它分析方法进行了比较。表 5 的数据是采用 LA-ICP-MS 法对一个镍基合金标准参考物质在两周内的分析结果，并与以往采用空心阴极发射光谱法（OES）的结果进行了比较。

由表中结果可知，LA-ICP-MS 新方法在整个分析过程中获得了一致的结果（事实上，与空心阴极法相比，

表 5. 标准 5657 Nimonic 镍合金（空心阴极光谱法的质控标准）采用 LA-ICP-MS 的分析结果和空心阴极光谱法结果比较

元素	质量	标准值 ppm	空心阴极法		5月20日		5月25日 LA-ICP-MS		6月4日	
			平均值 ppm	可接受 范围	平均值 ppm	RSD %	平均值 ppm	RSD %	平均值 ppm	RSD %
Zn	66	22	23	17–30	19.7	4.6	20.6	0.9	18.8	4.2
Ga	69		4.9	2.3–7.5	2	2.7	2.4	4.5	1.3	10.4
As	75	9	10.6	6.7–14	10.8	5	11	5.2	10.6	3.7
Se	82		0.23	0–0.8	1.2	14.5	2.3	8.3	1.3	22.9
Ag	107	9.8	10.6	7.1–14	13	4.6	13	3.6	14.5	3
Cd	111	0.6	0.47	0.3–0.6	0.4	14.2	0.5	6.2	0.8	12.4
In	115		0.01	0–0.03	0.1	13.7	0.1	11	0.1	9.6
Sn	118	53	50	38–62	57	4	56.7	3.9	48.8	4.7
Sb	121	25	21	13–28	28.9	4.5	27.2	2.8	27.7	4.3
Te	125		9	6.4–12	10.7	15.9	8.6	5.6	10.8	9.1
Tl	205		0.18	0–0.25	0.2	3.9	0.2	7.6	0.2	3.8
Pb	208	12	11.5	8.7–14	13.5	4.5	13.8	6.1	15	13.4
Bi	209	8.4	8.8	6.8–11	12	4.75	11.5	5.4	13.2	16.7

结果的变化范围较小), 数据间的精密度较好 (一般在 5% 到 10% RSD s 之间), 分析结果与标准值吻合。

结论

IncoTest 成功地安装并应用 LA-ICP-MS 系统进行镍基高温合金中痕量杂质元素的常规监控。LA-ICP-MS 新方法不仅提供了理想的痕量元素检测限和稳定性外, 还与传统的空心阴极光谱法进行了比较。新方法对自制的参考物质进行分析并获得满意的结果, 同时对几种关键杂质元素提供了极低的检出限, 并且还可提供合金样品中痕量元素的分布信息。

参考文献

1. C. T. Sims, and W. C. Hagel, (Eds.), Preface, "The Superalloys", John Wiley and Sons, New York (1972).
2. R. Stickler, Phase Stability in Superalloys, in "High Temperature Materials in Gas Turbines", P. R. Sahm, and M. P. Speidel, (Eds), Elsevier, (1974).
3. G. B. Thomas and T. B. Gibbons, 1984, Materials Science and Engineering, **67**, 13–23.
4. "Trace Element Control - Nickel Alloy Castings", SAE Aerospace Material Specification AMS 2280, SAE, Warrendale, PA 15096, 1992, pp. 1–4.

如需了解更多信息

如需要了解我们的产品及服务更多信息请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

使用 GC-ICP-MS 对气体和液化气体样品中的挥发砷化合物同步进行总砷分析和形态分析



作者

Laura Freije-Carrello^a, Mariella Moldovan^a, J. Ignacio García Alonso^a, Thuy Diep Thanh VO^b, Jorge Ruiz Encinar^a

^a 奥维耶多大学物理与分析化学系, 西班牙

^b Borealis Polyolefine GmbH, 奥地利林茨

前言

许多不同类型的气体和液化气体样品中含有挥发性金属/类金属元素和化合物, 如天然气和沼气等。砷 (As) 是上述样品中最普遍的元素杂质之一, 它在许多行业中备受关注, 包括气体开采和加工以及聚合物制造。除了 As 的潜在毒性及其作为环境污染物的影响外, 必须在石化和聚合物行业中对其进行严格监测和控制。它存在于单体气体 (如乙烯和丙烯) 中时, 会影响以这些气体为原料合成的聚合物的性质。As 的挥发态也是高活性催化剂毒物。需要注意, 砷的毒性取决于它的化学形态, 其中砷化氢的毒性最强。因此, 需要借助可靠的方法进行气态样品中的总砷分析和砷形态分析。

将气相色谱 (GC) 与质谱检测器联用，为砷形态分析提供了强大的解决方案。然而，该系统并不总是适用于气体样品中的总砷测定，因为无法检测到未从色谱柱中洗脱（即与颗粒物质相关）的形态。

在本研究中，采用了一种新型 GC-ICP-MS 方法，一次测量即可进行砷的形态分析和总砷测定。实验证明，该方法还可同时测定气体中其他元素（例如 Hg）的总元素浓度和各形态浓度。

实验部分

气体标准品和样品

保存在氮气 (N₂) 中的砷化氢 (AsH₃) 标准品 (Linde AG, Munich) 用于样品定量分析。分析了在 N₂ 下加压并添加 AsH₃ (ISGAS, USA) 的液化丁烷和裂解厂 (Borealis, Sweden) 的实际丙烯样品。

仪器

使用 Agilent 7890B 气相色谱系统，配有两个互相连接的气体进样阀和 J&W GS-GasPro 色谱柱（长 60 m，内径 0.32 mm）。使用安捷伦 GC-ICP-MS 加热接口 (G3158D) 将气相色谱与 Agilent 7900 ICP-MS 连接。使用气体稀释器 GasMix Aiolos II 和气化室 (Alytech, France) 对样品和标准品进行在线稀释。优化后的 GC 和 ICP-MS 参数见表 1。

表 1. 优化后的 GC 和 ICP-MS 参数

ICP-MS 参数			气相色谱参数	
反应池气体模式	无气体	He	色谱柱流速 (mL/min)	3
RF 功率 (W)	1600		传输线流速 (mL/min)	5
采样深度 (mm)	8		柱温箱梯度	5 min 内 40–250 °C, 250 °C 保持 2 min
稀释气流速 (L/min)	0.3–0.4			
N ₂ 流速 (mL/min)	10			
提取透镜 1 (V)	0			
提取透镜 2 (V)	–200		进样模式	分流
Omega 偏置透镜 (V)	–80		分流比	1:6
Omega 透镜电压 (V)	10		GC-ICP-MS 接口温度 (°C)	250
反应池入口透镜 (V)	–30	–40		
反应池出口透镜 (V)	–50	–60		
偏转透镜电压 (V)	10	0		
板偏置透镜 (V)	–100	–60		

新仪器设置

GC-ICP-MS 配置的示意图如图 1 所示。将气体标准品、样品和稀释气体连接到稀释器（右上）。分析液化气体时，将气化室（固定在 120 °C）放置在样品和气体稀释器入口之间，使样品在稀释前蒸发。分析气态样品时，绕过气化室并将气体直接引入到稀释器中。采用三通阀可使稀释器出口气流通过气体进样阀 (GSV) 1 和 2（图 1 下半部分的实线）直接进样至气相色谱。GSV1 和 GSV2 在内部连接，因此同时加载。

可以通过 ICP-MS MassHunter 色谱方法设置独立控制两个阀的进样，但在本方法中，两个阀同时进样。

当 GSV 转到进样位置时，载入 GSV1 的气体体积通过气相色谱的进样口进样至分析柱。然后进行不同形态的传统气相色谱分离，在各个形态流经气相色谱柱到达 ICP 时实现分离。同时，将载入 GSV2 的气体体积进样至惰性（熔融石英去活，5 m，0.32 mm 内径）传输线，直接通向 GC-ICP-MS 接口。传输线置于气相色谱柱温箱内，并加热到气相色谱程序的初始温度。GSV2 气体体积绕过气相色谱柱，并快速转移至色谱柱出口处的三通接头。使用此配置使载入 GSV2 的气体进入 GC-ICP-MS 接口，并在 GSV1 进样的死体积流经气相色谱柱之前转移至 ICP。这种气体体积的直接转移允许对气体样品中存在的任意 ICP 可检测元素进行多元素流动注射分析 (FIA)。该选项能够进行快速总分析，并可用于评估来自气相色谱柱的元素总回收率（即，某些元素形态可能未从气相色谱柱洗脱，例如当元素形态被吸附到颗粒物质上时）。

惰性传输线（用于总元素分析）和分析色谱柱（用于形态分析）的末端均通过双孔密封垫圈连接至 GC-ICP-MS 接口。此时，气流与载气氦气流在线混合（预先在位于气相色谱柱温箱内的预热管中加热），然后通过加热气相色谱接口转移到 ICP-MS 等离子体。采用该方法可在同一样品注射中同时进行目标元素的总体和形态分析，简单且可重现。

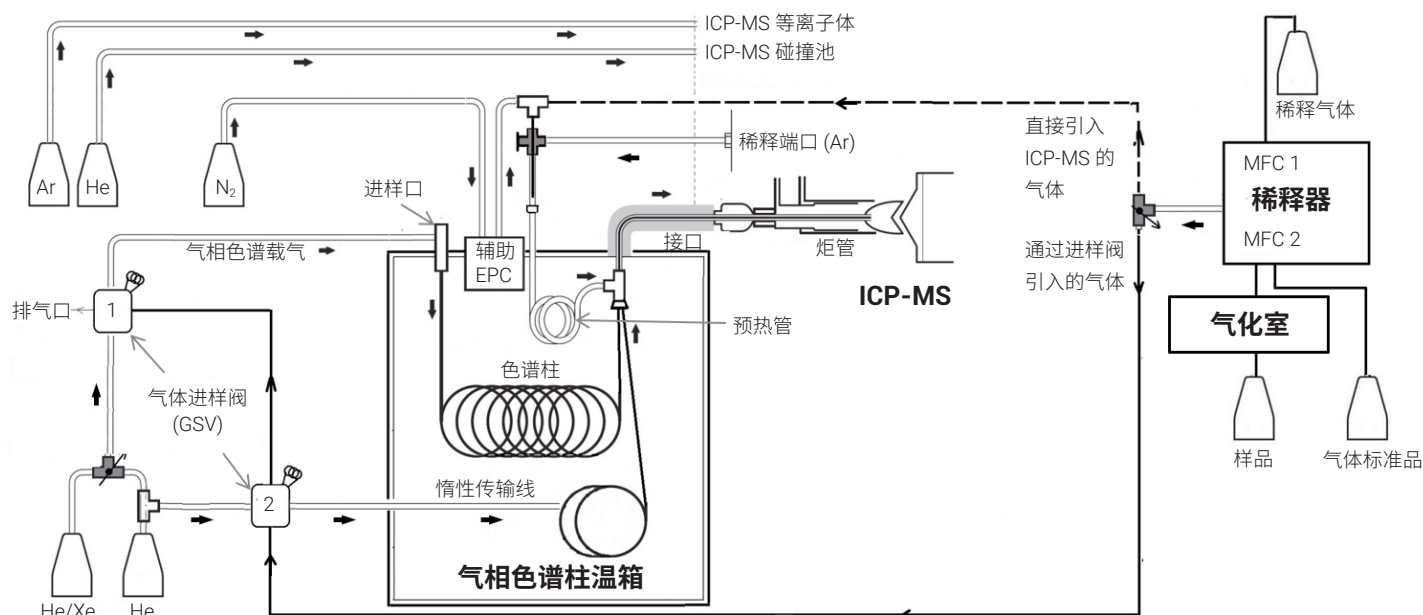


图 1. 用于同时进行总元素和形态分析的 GC-ICP-MS 仪器设置图（经作者同意，摘自 Laura Freije-Carrelo et al, Anal.Chem., 2017, 89 (11), pp 5719–5724. 2017 美国化学学会版权所有）

使用相同的系统配置，气体稀释器之后的三通阀可用于将气流直接转移到 GC-ICP-MS 接口（图 1 右上部分的虚线），绕过气体进样阀和气相色谱柱。使用四通，可在进入预热管之前将该气流与 ICP-MS 氦气稀释气体混合。此设置支持：

- 通过监测气体标准品/样品中分析物的连续信号来优化 ICP-MS 运行条件
- 使用快速的定性筛查采集进行分析，以确定样品是否含有目标元素，以及是否有必要进行后续定量分析

此外，再安装一个三通阀（图 1 的左下部分）以选择气相色谱载气。该阀允许载气从氦气切换到含有氙气的氦气混合气，以优化炬管位置和 ICP-MS 灵敏度。最后，采用辅助电子压力控制 (Aux EPC) 对氦气稀释气流中恒压 N_2 的添加进行控制，该稀释气流用于添加到 GC-ICP-MS 接口入口处的色谱柱/旁路气流中。研究证明，添加 N_2 可提高 GC-ICP-MS 应用中的砷灵敏度^[1]。

结果与讨论

N_2 中的 AsH_3 标准品用于优化系统的运行条件。 N_2 中的 68 ppb (v/v) 砷化氢标准品和 N_2 空白样品的色谱图如图 2 所示。从色谱图的 Y 轴刻度可以看出， N_2 空白样品的信号高度比 AsH_3 样品的信号高度低了大约两个数量级。由图可见，砷化氢标准品色谱图的第一个峰出现在 0.2 分钟，对应从惰性传输线（色谱柱旁路流路）中洗脱出的总砷。第二个峰出现在 3.8 分钟，对应形态分析（从色谱柱中洗脱出的 AsH_3 ）。色谱图证明，一次进样便可同时进行总砷分析和形态分析。

总砷分析和形态分析的峰面积差异是由于在气相色谱进样器使用的分流比 (1:6) 导致的。使用惰性传输线可以有效避免分析物吸附或是分析物损失。因此，将实验获取到的峰面积比例与预期理论上的气相色谱进样口分流比进行对比，可以评估观察到的总砷是只以 AsH_3 的形式存在，还是以其他形态存在于样品中。总砷和 AsH_3 校准曲线 (0.2–68 ppb, $n = 13$) 上各点

对应的峰面积积分值显示：标准品中 AsH_3 峰的平均回收率为总砷的 $89\% \pm 11\%$ 。该结果表明，如预期一样，砷只以砷化氢的形态存在于标准品中。注意，此质量平衡算法假定使用的是准确精密的分流比。此外，总砷分析（色谱柱旁路）测定中砷峰与样品基质共流出，因此相同气相色谱条件下直接分析的灵敏度可能不一致。以上两方面可以解释回收率计算值为何有明显的 uncertainty (12% RSD)。

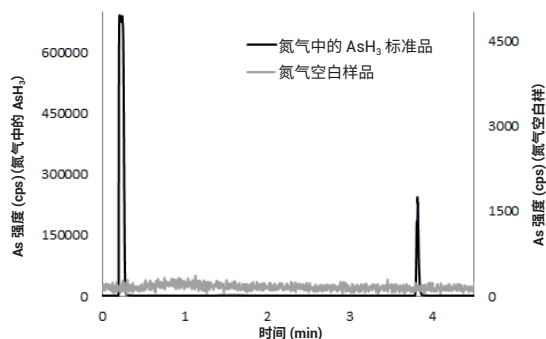


图 2. 氮气中砷化氢 (68 ppb, v/v) 的色谱图。(经作者同意，摘自 Laura Freije-Carrelo et al, Anal.Chem., 2017, 89 (11), pp 5719–5724。2017 美国化学学会版权所有)

如图 3 所示，使用浓度为 0.2–68 ppb 的 AsH_3 标准品生成了总砷分析和形态 (AsH_3) 分析的校准曲线。在总砷分析和形态分析的浓度范围内，该方法表现出良好的线性（总砷分析 $r^2 = 0.9996$ ，形态分析 $r^2 = 0.998$ ）。实验得出总砷分析的检测限为 2 ppt， AsH_3 形态分析的检测限为 12 ppt。在我们知道的气态样品直接总砷分析和 AsH_3 形态分析文献报道中，这两个检测限是最低的。

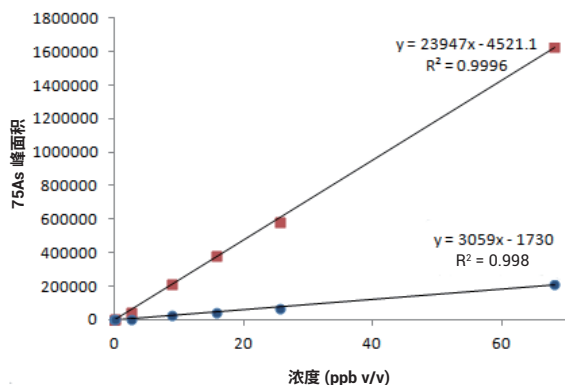


图 3. 使用砷化氢标准品的总砷（红点）和 AsH_3 （蓝点）校准曲线

合成样品分析

将添加非确定浓度砷化氢的液化丁烷作为合成样品进行分析。为将任意多原子干扰程度降到最低，选择氦模式用于样品分析。将气化室的温度设置为 120°C ，与气体稀释器在线连接，用于气化样品。丁烷（用氦气按 1:7 稀释）的色谱图如图 4 所示。

总砷分析和砷形态分析的结果如表 2 所示。生产商 (ISGAS) 和一所独立的实验室也对该合成丁烷样品进行了分析，其结果分别为 218 ppb 和 40 ppb 砷化氢。这两个结果跨度之大，证明开发出一种用于气体和液化气体样品的可靠分析法实属不易。本研究所得结果见表 2。砷化氢实测浓度 95 ppb 左右，在其他两个实验室得出的结果范围内，这为新 GC-ICP-MS 法的适用性提供了可靠证明。

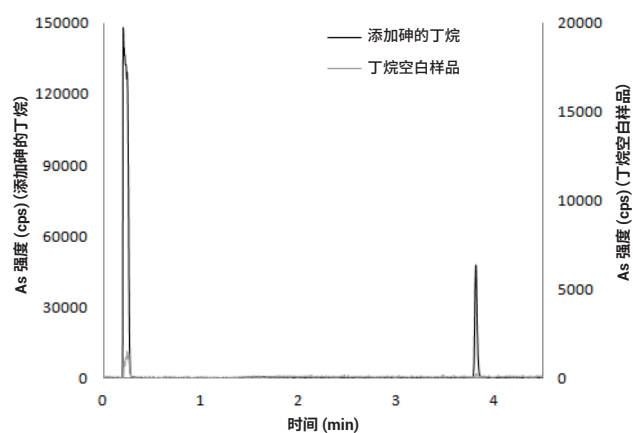


图 4. 以 1:7 稀释的丁烷空白样品和添加砷化氢的液化丁烷的砷分析色谱图。丁烷空白色谱图的强度低 7.5 个数量级

表 2. 添加砷化氢的液化丁烷和丙烯样品中砷的定量结果 (ppb 砷, v/v)。给出了扩展不确定度 (95% 置信水平，不包括 N_2 中砷化氢标准品的不确定度)

	液化丁烷	丙烯（气相）	丙烯（液相）
总砷分析	92 ± 4	54 ± 4	34 ± 3
形态分析	95 ± 4	53 ± 13	31 ± 5

(经作者同意，摘自 Laura Freije-Carrelo et al, Anal.Chem., 2017, 89 (11), pp 5719–5724。2017 美国化学学会版权所有)

丁烷中的汞

丁烷样品同样添加汞。在与砷相同的采集过程中同步测定汞，以显示系统的多元素分析能力。汞的色谱图如图 5 所示。图中表明，清晰检测到总汞（第一个峰）和汞形态（第二个峰）的信号。然而，汞的峰形比砷峰表现出更严重的峰拖尾。该峰形的形成原因，可能是由于汞形态在从气瓶到 ICP 的过程中和阀和其他装置发生了非特异性吸附。采用针对汞分析优化的方法和条件，可以减少峰拖尾。

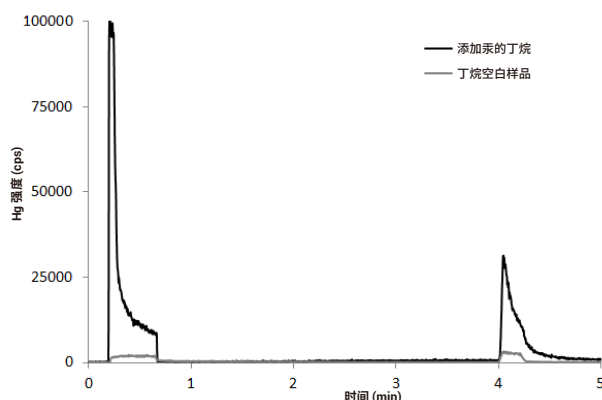


图 5. 以 1:7 稀释的丁烷空白样品和添加汞的液化丁烷的汞分析色谱图

实际样品分析

最后，对含气相和液化相的实际丙烯样品进行了分析。将气化室的温度设置为 120 °C，与气体稀释器在线连接，用于气化样品的液相。对于气相分析，将样品直接引入到气体稀释器。定量结果如表 2 所示。结果表明，该设置也可用于评估液化气体样品的气相和液相之间的总砷和其他形态砷的分离。

结论

结果证明，新 GC-ICP-MS 法适用于对 ICP 可检测的元素（如气体和液化样品中存在的砷和汞）进行直接的同步定量分析（总砷分析和形态分析）。

无需样品预浓缩步骤，即可获得低 ppt 浓度下总砷分析和形态砷分析的检测限。新 GC-ICP-MS 方法的快速分析（每次进样 5 分钟）有利于其在工业实验室中的实施。快速分析可以测定污染物，以判断是接受还是拒绝某一气体批次。

采用 ICP-MS 进行检测，可确保 GC-ICP-MS 设置适用于对气体和液化气体样品中任意 ICP 可检测的元素进行同步定量分析（总分析和形态分析）。

参考文献

1. Yang Song, Yuhong Chen, Determination of Arsine in Ethylene and Propylene by GC-ICP-MS, Handbook of Hyphenated ICP-MS Applications, 2nd Edition (采用 GC-ICP-MS 测定乙烯和丙烯中的砷化氢, ICP-MS 联用技术应用手册, 第二版) 第 75–76 页, 安捷伦出版物 2015, 5990-9473EN

更多信息

本研究最初发表于：

Laura Freije-Carrelo et al., Instrumental Setup for Simultaneous Total and Speciation Analysis of Volatile Arsenic Compounds in Gas and Liquefied Gas Samples, *Anal. Chem.* **2017**, 89, 5719-5724. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b01082

安捷伦在环境化学上发表的期刊 文章列表



陆秋艳, 张文婷, 林秋莲, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用快速同时分析水中 5 种砷和 7 种硒 [J]. 环境化学, 2018, 37 (7): 1671-1674.

LU Qiuyan, ZHANG Wenting, LIN Qiulian, et al. Quick and simultaneous analysis of seven selenium species and five arsenic species in water by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Environmental Chemistry, 2018, 37 (7): 1671-1674.



安捷伦科技 (Agilent)

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用快速 同时分析水中 5 种砷和 7 种硒*

陆秋艳^{1,2} 张文婷¹ 林秋莲³ 徐俊俊⁴

(1. 福建省疾病预防控制中心 (福建省人兽共患病研究重点实验室), 福州, 350001;

2. 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室, 莆田, 351100;

3. 福建医科大学公共卫生学院, 福州, 350004; 4. 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 上海, 200080)

摘 要 建立了高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术 (HPLC-ICP-MS) 同时测定水样中硒酸盐 (Se (VI))、亚硒酸盐 (Se (IV))、硒代蛋氨酸 (SeMet)、硒代胱氨酸 (SeCys₂)、甲基硒代半胱氨酸 (MeSeCys)、硒代乙硫氨酸 (SeEt)、硒脲 (SeUr) 和砷甜菜碱 (AsB)、一甲基砷酸 (MMA)、二甲基砷酸 (DMA)、亚砷酸盐 (As (III))、砷酸盐 (As (V)) 共 12 种不同形态元素的分析方法. 采用安捷伦 ZORBAX SB-Aq 反相色谱柱, 使用 20 mmol·L⁻¹ 柠檬酸+5 mmol·L⁻¹ 己烷磺酸钠体系 (pH=4.4) 为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 检测, 在 7.5 min 内完全分离 12 种不同砷、硒形态. 12 种元素形态的线性相关系数均大于 0.9995, 检出限分别为 0.15、0.13、0.15、0.18、0.12、0.29、0.25、0.26、0.10、0.15、0.14、0.10 μg·L⁻¹, 精密度均在 10% 以内, 加标回收率为 76.9%—106.2%. 该方法完全满足水样中 7 种硒和 5 种砷形态的准确定量分析.

关键词 砷形态, 硒形态, 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱.

元素的毒性、有益作用及其在生物体内的代谢行为主要取决于该元素的不同化学形态及不同化学形态下的浓度水平, 因此元素形态分析显得尤为重要. 目前, 元素形态分析在食品科学、营养学、环境科学、临床学等研究领域发挥着非常重要的作用, 其中砷、硒、汞、铬、镉、锡是目前元素形态分析中研究的热点, 而硒的形态分析更是近年来研究的热门.

在科学界, 硒元素一直是关注和争议的热点. 由于硒的安全和危险界限很狭窄, 以及它在地壳中的不确定分布, 导致了硒的健康影响是多元化和复杂的. 硒是一种典型的双功能元素, 当浓度在一定范围内时对动植物和人体是有益的, 而当浓度超过一个狭窄的水平值时, 就会对动植物和人体产生危害. 硒化合物的毒性随着存在形式的不同而存在较大差异, 无机硒的毒性普遍大于有机硒. 因此, 建立快速、灵敏、准确的硒形态分析方法, 对研究硒的毒性与人体的健康影响具有重要意义.

目前最常用的硒形态分析方法为高效液相色谱和电感耦合等离子体质谱联用, 常用的液相色谱主要为离子交换色谱和反相离子对色谱. 目前已报道的硒形态分析主要以离子交换柱为主, 最多分离 6 种硒形态, 分离时间在 20 min 左右, 存在分离周期长的问题. 本研究试图寻找一根快速分离色谱柱, 力求 10 min 内分离测定硒酸盐 (Se (VI))、亚硒酸盐 (Se (IV))、硒代蛋氨酸 (SeMet)、硒代胱氨酸 (SeCys₂)、甲基硒代半胱氨酸 (MeSeCys)、硒代乙硫氨酸 (SeEt) 和硒脲 (SeUr) 等 7 种硒形态, 建立 7 种硒形态的快速、准确、灵敏的形态分析方法.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪; Milli-Q 超纯水系统 (Millipore); Agilent 7900 电感耦合等离子体质谱仪; 柠檬酸、己烷磺酸钠、氨水均为优级纯; 砷甜菜碱 (AsB)、一甲基砷酸 (MMA)、二甲基砷酸 (DMA)、亚砷酸盐 (As (III))、砷酸盐 (As (V)) 的标准储备液购自中国计量科学研究院; 硒酸根 (SeO₄²⁻)、硒代胱氨酸 (SeCys₂)、亚硒酸根 (SeO₃²⁻)、硒代蛋氨酸

* 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室开放课题 (PY16007) 资助.

酸(SeMet)、甲基硒代半胱氨酸(MeSeCyS)的储备液购自中国计量科学研究院;硒脲(SeUr)标准品购自 Alfa Aesar;硒代乙硫氨酸(SeEt)标准品,购自加拿大 TRC 公司.标准储备液及标准品 4℃ 下冷藏,混合标准溶液系列均由标准溶储备液及标准品以超纯水逐级稀释配制,所有工作溶液均为当天配制.

1.2 色谱条件:

Agilent ZORBAX SB-Aq 反相色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm);流动相: 20 mmol·L⁻¹ 柠檬酸+5 mmol·L⁻¹ 己烷磺酸钠,用氨水调节 pH=4.4,等度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量:20 μL.

1.3 ICP-MS 工作条件

功率:1550 W;雾化器:玻璃同心雾化器;蠕动泵速率:0.4 r·min⁻¹;载气流量:1.09 L·min⁻¹;采样深度:8 mm;高氮碰撞反应池模式,流量:10 mL·min⁻¹;同位素:⁷⁵As(积分时间 0.5 s)和⁷⁸Se(积分时间 0.5 s).

1.4 标准曲线配制

分别用超纯水将 7 种硒、5 种砷化合物的标准品逐级稀释,配制成浓度为 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 μg·L⁻¹ 的混合标准溶液系列,在优化好的实验条件下,采用 ICP-MS Masshunter 软件计算各色谱峰的积分面积并自动绘制校准曲线.

2 结果与讨论

2.1 色谱参数的优化

2.1.1 色谱分离柱的选择

本研究选用 Dionex AS19 和 Hamilton PRP-X100 两种阴离子交换色谱柱,分离测定 7 种硒形态,当采用 Dionex AS19 阴离子交换色谱柱和柠檬酸溶液为流动相分离时,只分离了 3 种硒形态,而采用 Hamilton PRP-X100 阴离子交换色谱柱和柠檬酸溶液为流动相分离时,12 min 内分离了 7 种硒形态,但硒代蛋氨酸(SeMet)和硒脲(SeUr)无法实现基线分离.改变流动相 pH、浓度、流速均未将 SeMet 和 SeUr 完全分离,说明 Hamilton PRP-X100 和 Dionex AS19 两种阴离子交换色谱柱不适合分离 7 种硒形态.

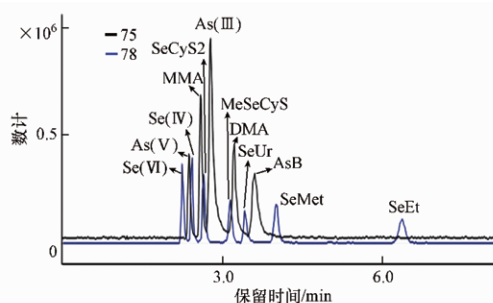


图 1 SB-Aq 分离色谱图

在尝试离子交换色谱效果不理想的情况下,改用反相离子对色谱来分离 7 种硒形态.韩枫等采用 Agilent ZORBAX SB-Aq 反相色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm)快速分离 5 种砷形态,考虑到砷、硒化学性质有一定的相似性,本研究尝试用该色谱柱来分离 7 种硒形态.采用柠檬酸和己烷磺酸钠作为流动相,发现 7 种硒形态都可以实现基线分离.在此基础上,尝试用该色谱柱进一步同时分离 7 种硒、5 种砷形态,发现 7.5 min 内可以同时完全分离 7 种硒、5 种砷形态(见图 1),因此,本研究选择 Agilent ZORBAX SB-Aq 反相色谱柱作为分离色谱柱.

2.1.2 pH 对不同砷、硒形态分离的影响

流动相的 pH 值是影响元素形态分离的主要因素,因此首要考察流动相的 pH 对不同砷、硒形态分离的影响.当流动相为 3.5 时,SeMet 峰型拖尾严重, MMA 和 As(III) 无法分开,随着 pH 值的增大,SeMet 峰型改善, MMA 和 As(III) 实现完全分离.但当 pH 值增至 4.8 时,7 种硒形态均能实现基线分离,但 As(V) 与 MMA 无法分开;当 pH 值增至 6.0 时,As(V) 与 MMA 直接重叠,只出现 4 个峰;7 种硒形态均能实现基线分离;当 pH 值继续增至 6.5 时,As 形态只出 4 个峰,且 As(III) 与 DMA 无法基线分离,7 种硒形态均能实现基线分离.当 pH 值为 4.4 时,As(V)、MMA、As(III)、DMA、AsB 及 Se(VI)、SeCyS₂、Se(IV)、SeMet、MeSeCyS、SeUr 共 12 种形态均能完全分离,且峰型及分离度最佳.因此,本研究选择流动相的 pH 值为 4.4.

2.1.3 流动相柠檬酸的浓度对不同砷、硒形态分离的影响

本研究采用简单的等度洗脱方法同时分离 5 种砷和 7 种硒形态,采用 Agilent ZORBAX SB-Aq 反相色谱柱,以不同浓度(5、10、20、30、40 mmol·L⁻¹)的柠檬酸溶液为流动相,加上 5 mmol·L⁻¹ 己烷磺酸钠作为离子对试剂,考察流动相浓度对砷、硒不同形态分离及灵敏度的影响.随着流动相浓度的增加,12 种砷硒形态的分离及保留时间未受显著影响,但各化合物的峰高及峰面积均随着流动相浓度的增加先增加后减少,在流动相浓度为 20 mmol·L⁻¹ 时,各化合物的峰高及峰面积均达到最大值,因此本研究选取流动相柠檬酸浓度为 20 mmol·L⁻¹.

2.1.4 离子对试剂及浓度对不同砷、硒形态分离的影响

选取不同离子对试剂(己烷磺酸钠、庚烷磺酸钠、辛烷磺酸钠),考察不同离子对试剂对不同砷、硒形态分离的影响.选择 3 种不同离子对试剂时,5 种砷形态化合物的分离没有显著影响.但选用辛烷磺酸钠作为离子对试剂时,SeUr 的灵敏度显著下降,且 SeEt 的峰型宽且存在拖尾现象;而选用庚烷磺酸钠作为离子对试剂时,7 种硒化合物均达到基线分离,只是 SeEt 的保留时间相对延迟.综合考虑,本研究选用己烷磺酸钠作为离子对试剂,12 种不同砷、硒形态的分离度和灵敏

度均最佳,且分析速度快。

离子对试剂的加入可以改善各化合物的分离,现考察离子对试剂的不同浓度(0、2.5、5、7.5 mmol·L⁻¹)对砷、硒形态分离的影响。当不加入己烷磺酸钠时,SeCyS₂和Se(IV)峰型重叠,且MMA和As(III)达不到基线分离。加入己烷磺酸钠时,12种不同砷、硒形态均可以达到基线分离,综合各砷、硒形态的峰高、峰面积、基体耐受性等因素,选择5.0 mmol·L⁻¹己烷磺酸钠作为离子对试剂。

2.1.5 流动相中添加甲醇含量对不同砷、硒形态分离的影响

为了获得良好的峰形及提高分离的灵敏度及效率,考察流动相中甲醇的含量(0、1%、2%、5%, V/V)对不同砷、硒形态分离的影响。甲醇的加入,可以明显提高不同砷、硒形态的灵敏度,并改善SeEt、DMA、AsB的峰形,相应的色谱峰峰宽降低,峰形尖锐,且总的分析时间减少。但随着甲醇添加量的增加,DMA和AsB无法实现基线分离。当甲醇含量增至5%时,MeSeCyS的色谱峰峰型变差。综合分析时间,各化合物的分离效果及峰形,本研究选择添加1%含量的甲醇。

2.2 As和Se形态同时测定的分析性能

在上述优化的条件下测定了As、Se形态的保留时间、检出限、精密度(RSD)和相关系数,结果见表1。配制浓度为100 μg·L⁻¹的12种砷、硒化合物的混合标准溶液,各形态在7.5 min内均达到良好的分离。混合标准溶液连续平行测定7次,各形态的精密度RSD均在5%以下,各形态在1—100 μg·L⁻¹范围内,具有极好的线性关系,线性相关系数均大于0.9995。以LC-ICP-MS色谱峰信噪比S/N为3:1时所对应的浓度计算检出限,计算结果见表1。从上述参数来看,该方法在测定12种不同砷、硒形态化合物时,具有快速、高效、灵敏度高等优点。

表1 HPLC-ICP-MS同时测定12种砷、硒形态化合物的分析性能

形态	保留时间/min	线性范围/ (μg·L ⁻¹)	相关系数 <i>r</i>	检出限/ (μg·L ⁻¹)	相对标准偏差 RSD(<i>n</i> = 7, %)
Se(VI)	2.142	1—100	1.000	0.15	1.11
Se(IV)	2.326	1—100	0.9999	0.13	1.44
SeCyS ₂	2.628	1—100	0.9999	0.18	2.48
MeSeCyS	3.096	1—100	0.9999	0.12	1.55
SeUr	3.447	1—100	1.000	0.25	3.46
SeMet	3.749	1—100	0.9999	0.15	1.93
SeEt	6.292	1—100	1.000	0.29	1.10
As(V)	2.310	1—100	0.9999	0.10	0.87
MMA	2.510	1—100	1.000	0.10	1.26
As(III)	2.778	1—100	1.000	0.14	2.15
DMA	3.180	1—100	1.000	0.15	0.46
AsB	3.548	1—100	1.000	0.26	2.06

2.3 实际样品分析及加标回收实验

利用建立的方法测定市场上销售的富硒水样(样1、样2)进行砷、硒形态分析,同时用国家标准GB/T 5750.6—2006电感耦合等离子体质谱法进行总硒、总砷含量的测定。实验发现,样1、样2中总砷含量分别为1.93、3.76 μg·L⁻¹,总硒含量分别为4.36、22.6 μg·L⁻¹。对样1、样2进行砷、硒形态分析时发现样1、样2中只检测出As(V)形态,含量分别为1.88、3.67 μg·L⁻¹;样1、样2中只有Se(VI)形态存在,含量分别为4.26、22.0 μg·L⁻¹。

加标回收实验选择样1为本底,分别添加不同浓度水平的12种砷、硒化合物的混合标准溶液,加标浓度为1.0、5.0、10.0 μg·L⁻¹,计算样品中砷、硒各形态化合物的加标回收率,结果见表2。由表2可以看出,各形态化合物的加标回收率在76.9%—106.2%之间,相对标准偏差(% , *n* = 5)除了SeUr在低浓度时为9.56%,其余均在5%以下。

表2 水样中砷、硒的加标回收率(%)

形态	本底/ (μg·L ⁻¹)	加标浓度/ (μg·L ⁻¹)	加标 回收率/%	相对标准 偏差/% (<i>n</i> = 5)	形态	本底/ (μg·L ⁻¹)	加标浓度/ (μg·L ⁻¹)	加标回 收率/%	相对标准 偏差/% (<i>n</i> = 5)
Se(VI)	4.26	1.0	88.9%	2.82%	SeEt	ND	1.0	95.3%	7.69%
		5.0	92.2%	2.70%			5.0	96.4%	4.25%
		10.0	90.8%	2.06%			10.0	91.0%	1.97%

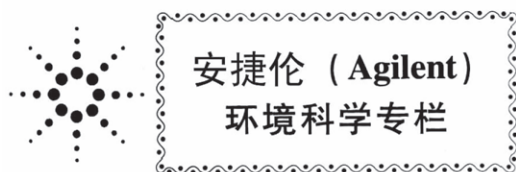
续表2

形态	本底/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	加标浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	加标 回收率/%	相对标准 偏差/% ($n=5$)	形态	本底/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	加标浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	加标回 收率/%	相对标准 偏差/% ($n=5$)
Se(IV)	ND	1.0	106.2%	3.14%	As(V)	1.88	1.0	89.3%	1.24%
		5.0	95.7%	2.03%			5.0	99.2%	1.50%
		10.0	94.9%	1.13%			10.0	98.4%	1.24%
SeCyS2	ND	1.0	77.5%	3.02%	MMA	ND	1.0	92.7%	4.76%
		5.0	87.7%	3.18%			5.0	91.8%	2.43%
		10.0	86.2%	2.48%			10.0	92.8%	1.74%
MeSeCyS	ND	1.0	79.6%	4.79%	As(III)	ND	1.0	90.0%	4.96%
		5.0	91.8%	4.37%			5.0	90.2%	4.86%
		10.0	90.3%	4.20%			10.0	88.9%	1.77%
SeUr	ND	1.0	82.4%	9.56%	DMA	ND	1.0	87.7%	4.45%
		5.0	87.6%	4.02%			5.0	91.6%	3.50%
		10.0	82.2%	3.87%			10.0	93.2%	1.76%
SeMet	ND	1.0	76.9%	3.81%	AsB	ND	1.0	88.7%	3.85%
		5.0	84.2%	3.10%			5.0	91.1%	3.32%
		10.0	82.8%	3.30%			10.0	92.4%	4.88%

注:ND 表示低于检出限。

3 结论

本研究建立了高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用同时测定水中 12 种砷、硒形态的分析方法,且分析时间短(7.5 min),具有高效、快速、灵敏、准确等优点,并将方法应用于市面上销售的富硒水样的分析,并进行了加标回收实验,结果满意.该方法为后续食品中砷、硒形态的同时快速分析奠定了基础。



微波辅助萃取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法 联用测定生物样品中的汞形态

张 兰^{1*} 陈玉红² 王英峰¹ 施燕支¹

(1. 首都师范大学分析测试中心, 北京, 100048; 2. 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京, 100102)

摘 要 建立了微波辅助萃取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用(HPLC-ICP/MS)测定生物样品中汞形态的方法。采用醋酸铵/L-半胱氨酸缓冲盐及甲醇体系组成的流动相按一定比例进行梯度洗脱,并结合了ICP/MS的时间分辨采集优化程序分析二价汞、甲基汞、乙基汞、苯基汞等4种汞形态。根据所建立的HPLC-ICP/MS方法分析了鱼肉及人发标准参考物质中的汞形态,样品前处理采用盐酸-半胱氨酸体系作为萃取剂、微波辅助萃取法。对于鱼肉和人发标准参考物质,6次平行样测定结果的相对标准偏差(RSD%)均小于5%,且测定值与标准值较吻合。该方法前处理简单、样品提取效率高、分析时间短、精密度及重现性理想,极适用于生物样品中汞形态的快速萃取与分析。

关键词 微波辅助萃取, HPLC-ICP/MS 联用, 生物样品, 汞形态。

汞的主要存在形态有无机汞、甲基汞、乙基汞和苯基汞及其它有机汞,环境中存在最多的是无机汞和甲基汞。汞的毒性主要依赖于所存在的化学形态及浓度,即使剂量极低亦可累积致毒。有机汞的毒性强于无机汞,而其中甲基汞是毒性最大的有机汞化合物,主要侵害神经系统尤其是中枢神经系统,且此类损害是不可逆的。苯基汞对皮肤、眼睛和呼吸道亦有中毒刺激作用,会使皮肤产生过敏反应,无机汞易通过生物甲基化作用形成甲基汞。鉴于不同形态汞化合物的毒性差异,有必要采用高灵敏度、快速的形态分析方法测定生物样品中汞形态。

目前,气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)与毛细管电泳(CE)作为主要的高效分离技术,与原子荧光光谱(AFS)、原子吸收光谱(AAS)、电感耦合等离子体-原子发射光谱(ICP/AES)以及电感耦合等离子体质谱(ICP/MS)等高灵敏度的检测技术联用已成为分析各种汞形态的主要手段^[1-4]。其中,HPLC-ICP/MS联用技术具有选择性与灵敏度最佳、接口简单、应用范围广、可以多检测器串联、前处理过程简便且有利于保持待测样品的原始形态不变等优点,在元素的形态价态分析应用较为广泛^[10-13]。汞形态分析的前处理方法主要有酸解溶剂萃取、碱消化萃取、酸挥发预富集、固相萃取(SPE)法、冷阱捕集法,固相微萃取法(SPME)^[13-20]。

本文以鱼肉和人发标准参考物质为研究对象,在已有文献酸式萃取的基础上,建立了微波辅助萃取、盐酸-半胱氨酸体系作为萃取剂进行样品前处理,并采用HPLC-ICP/MS法测定了生物样品中汞形态的分析方法。微波辅助萃取的样品提取效率高,操作简单,而所建立的HPLC-ICP/MS方法在8 min内即可完全分离分析4种汞形态,大大缩短了样品的分析时间,极适合于生物样品中汞形态的快速萃取分析要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 7500ce ICP-MS, 配备有机进样系统与加氧通道; Agilent 1200 HPLC; 微波辅助萃取仪(CEM MARSX)。高速冷冻离心机(BECKMAN COULTER Allegra TM 64RCentrifuge)。

醋酸铵(优级纯); L-半胱氨酸(优级纯); 甲醇(色谱纯); 二价汞(Hg^{2+})、甲基汞(Me-Hg)、乙基汞(Et-Hg)、苯基汞(Ph-Hg)标准溶液。超纯水:电阻率18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

汞标准参考物质: 鱼肉中的甲基汞标准参考物质 GBW10029(中国计量科学研究院), 人发标准参考物质 GBW07601(地矿部物化探研究所)

* 通讯联系人: Tel: (010) 68902695-802; E-mail: zhanglan123123@163.com

1.2 实验条件

色谱条件:Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 色谱柱,4.6 mm×150 mm,5 μm ;保护柱 Zorbax Eclipse Plus C18,4.6 mm×12.5 mm.流动相:A相为 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵/0.12% L-半胱氨酸,氨水调节 pH=7.5,经 0.45 μm 滤膜过滤;B相为甲醇.流动相流速为 1.0 mL·min⁻¹;进样量 5—100 μL .梯度洗脱程序如表 1.

表 1 梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0.00	92.0	8.0
2.50	92.0	8.0
2.51	55.0	45.0
6.50	55.0	45.0
6.51	92.0	8.0

ICP-MS 条件:入射功率 1550 W;采样深度 8.0 mm;载气流速:0.6 L·min⁻¹.玻璃同心雾化器;石英雾化室,半导体控温于 -5 $^{\circ}\text{C}$;Pt 采样锥和截取锥;有机进样专用炬管,1.0 mm 内径;高有机相时的 O₂/Ar 混合气(20:80) 加入量约 10%;采样模式:Time program.同位素:Hg²⁰²,积分时间 0.5 s.

1.3 样品前处理

准确称取 0.2000 g 样品置于酸煮、洗净的聚四氟乙烯-四氟乙烯(PTFE-TFE) 中压消解罐中,加入萃取剂,按萃取程序加热萃取:最大功率 1200 W,反应 10 min,温度 80 $^{\circ}\text{C}$,保持 60 min.萃取程序结束后,冷却至室温,打开密闭消解罐,样品萃取液转移至干净的 15 mL 塑料离心管,4000 r·min⁻¹ 转速于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,过 0.45 μm 滤膜过滤,上机待测.随同样品进行空白试验.

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法选择与优化

生物样品中的甲基汞分析前处理方法常采用碱消解-振荡法进行样品提取,再用二氯甲烷进行反萃^[11,20],其过程较繁琐,费时费力且回收率低;有文献^[4,18,21]采用 5—6 mol·L⁻¹ 左右的 HCl 作为萃取剂,超声辅助萃取法进行样品提取.微波萃取是利用微波能来提高萃取效率的一种最新发展起来的新技术.与超声、浸提等萃取方法相比,微波萃取具有简便、快速、萃取效率高、重现性好、污染与损失少等优点,因此本实验选择微波萃取作为提取生物样品——鱼肉和人发标准参考物质的前处理方法.实验采用 5 mol·L⁻¹ 的盐酸并加入一定量的 L-半胱氨酸作为提取剂,加入 L-半胱氨酸目的在于提高甲基汞的提取效率.文中以鱼肉中的甲基汞标准参考物质为例,详细考察了萃取剂中 L-半胱氨酸的浓度对结果的影响.结果表明,当半胱氨酸的浓度为 3%—5% 时提取效率较高(表 2).因此最终采用 5 mL 5 mol·L⁻¹ HCl-1 mL 3% L-半胱氨酸的体系进行微波辅助萃取.

表 2 L-半胱氨酸浓度对鱼肉标准参考物质中甲基汞萃取浓度的影响($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

	Hg ²⁺	Me-Hg	Et-Hg	Ph-Hg
5 mol·L ⁻¹ HCl + 0% L-半胱氨酸	N D	712.8	ND	ND
5 mol·L ⁻¹ HCl + 1% L-半胱氨酸	ND	731.4	ND	ND
5 mol·L ⁻¹ HCl + 2% L-半胱氨酸	ND	759.9	ND	ND
5 mol·L ⁻¹ HCl + 3% L-半胱氨酸	ND	800.1	ND	ND
5 mol·L ⁻¹ HCl + 4% L-半胱氨酸	ND	756.4	ND	ND
5 mol·L ⁻¹ HCl + 5% L-半胱氨酸	ND	795.2	ND	ND

ND, 未检出.

2.2 LC 与 ICP-MS 条件的选择

对色谱条件(色谱柱、流动相中缓冲盐乙酸铵的浓度、L-半胱氨酸的浓度、缓冲盐 pH 等)以及质谱条件均进行了优化^[22].在优化的条件下,采用 Plus C18 柱进行二价汞、甲基汞、乙基汞及苯基汞等 4 种汞形态的分离.流动相以 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵/0.12% L-半胱氨酸并加入一定量的甲醇作为淋洗液.考虑到苯基汞保留时间较长,采用梯度洗脱程序提高有机相比例以改善苯基汞的洗脱能力.4 种汞化合物的保留时间、峰高、拖尾因子均令人满意.此外,根据梯度淋洗过程中引入 ICP 中的基质差异,ICP-MS 的采集方式采用与液相梯度洗脱程序相匹配的时间分辨采集程序(Time program),可有效保证在流动相基质变化时各种汞形态的信号响应最高.

2.3 标准样品分析

为验证方法的准确性,按照所建立的微波辅助萃取、HPLC-ICP/MS 法对鱼肉及人发标准参考物质中的汞形态进行分

析,两种标准物质中的汞形态谱图分别参见图 1。每种样品平行处理 6 份,计算得到相对标准偏差(RSD%)均小于 5%,结果见表 3。此外,结果表明,该鱼肉标准样品中仅含甲基汞,人发样品中则含无机汞和甲基汞。

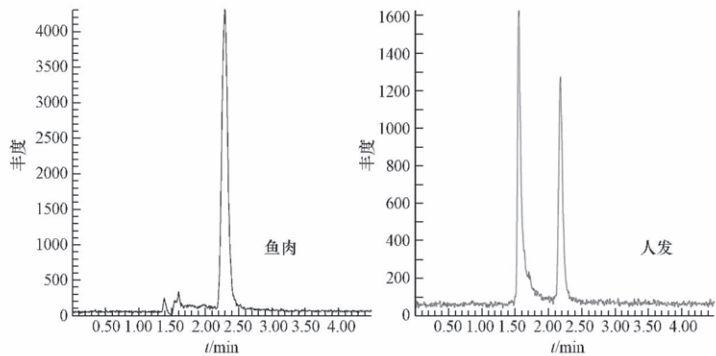


图 1 鱼肉与人发中的汞形态色谱图

表 3 鱼肉和人发标准参考物质的 4 种汞形态分析 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $n=6$)

	Hg^{2+}		Me-Hg		Et-Hg		Ph-Hg		总汞	
	Found	Certified	Found	Certified	Found	Certified	Found	Certified	Found	Certified
鱼肉	1	N D	/	795.9	840 ± 30	N D	/	N D	/	/
	2	N D	/	796.6		N D	/	N D	/	/
	3	N D	/	791.2		N D	/	N D	/	/
	4	N D	/	800.1		N D	/	N D	/	/
	5	N D	/	810.2		N D	/	N D	/	/
	6	N D	/	802.1		N D	/	N D	/	/
	平均	N D		799.4		N D		N D		
	RSD/%			0.81						
人发	1	212.4	/	171.8	/	N D	/	N D	/	384.2 360 ± 50
	2	211.9	/	181.4	/	N D	/	N D	/	394.3
	3	201.9	/	184.8	/	N D	/	N D	/	386.7
	4	225.4	/	172.7	/	N D	/	N D	/	398.1
	5	226.9	/	173.7	/	N D	/	N D	/	390.8
	6	217.5	/	171.6	/	N D	/	N D	/	398.5
	平均	216.0		175.9		N D		N D		391.9
	RSD/%	4.33		3.23						

3 结论

本文采用微波辅助萃取法进行样品前处理,并利用 HPLC-ICP-MS 联用技术建立了鱼肉、人发标准物质中汞形态的分析方法。在前处理方法和色谱、质谱实验条件优化下,选择 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸和 3% 半胱氨酸作为萃取剂,Plus C18 柱分离汞化合物形态。根据所建立的方法,以鱼肉和人发标准参考物质为研究对象验证方法的准确性,平行样品分析相对标准偏差(RSD)均小于 5% ($n=6$),精密度良好。鱼肉、人发标准物质中汞形态的测定结果表明,鱼肉标准参考物质主要含有甲基汞,人发标准物质含无机汞和甲基汞。本方法前处理简单、样品提取效率高、分析时间短,大大满足生物样品中汞形态的快速提取与分析的要求。

参 考 文 献

[1] 尚晓虹, 赵云峰, 张磊, 等. 水产品中汞元素形态的液相色谱-冷蒸气发生原子荧光光谱分析法 [J]. 卫生研究, 2010, 39 (3): 321-325

[2] Yuxiang Mao, Guangliang Liu, George Meichel, et al. Simultaneous speciation of monomethyl mercury and monoethyl mercury by aqueous phenylation and purge-and-trap preconcentration followed by atomic spectrometry detection [J]. Anal Chem, 2008, 80: 7163-7168

[3] Maria Maldonado Santoyo, Julio Alberto Landero Figueroa, Kazimierz Wrobel, et al. Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with Bi^{3+} as internal standard [J]. Talanta, 2009, 79: 706-711

- [4] Isabel Lopez, Susana Cuello, Carmen Camara, et al. Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS [J]. *Talanta* 82 (2010) 594-599
- [5] Susan C Hight, John Cheng. Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 567: 160-172
- [6] José Soares dos Santos, Miguel de la Guárdia, Augustin Pastor, et al. Determination of organic and inorganic mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS [J]. *Talanta*, 2009, 80: 207-211
- [7] Haiting Chena, Jianguo Chena, Xianzhong Jin, et al. Determination of trace mercury species by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172: 1282-1287
- [8] Jian guo Chen, Hengwu Chena, Xianzhong Jin, et al. Determination of ultra-trace amount methyl-, phenyl- and inorganic mercury in environmental and biological samples by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction Preconcentration [J]. *Talanta*, 2009, 77: 1381-1387
- [9] Maximilian Popp, Stephan Hann, Gunda Koellensperger, Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry—A review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 668: 114-129
- [10] 李妍, 刘书娟, 江冬青等. 气相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术应用于水产品中汞形态分析 [J]. *分析化学*, 2008, 36 (6): 793-798
- [11] Cairns W R L, Ranaldo M, Hennebell R, et al. Speciation analysis of mercury in seawater from the lagoon of Venice by on-line pre-concentration HPLC-ICP-MS [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 622 (1): 62-69
- [12] Chen J G, Chen H W, Jin X Z, et al. Determination of ultra-trace amount methyl-, phenyl- and inorganic mercury in environmental and biological samples by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction pre-concentration [J]. *Talanta*, 2009, 77: 1381-1387
- [13] 何滨, 江桂斌. 汞形态分析中的前处理技术 [J]. *分析测试学报*, 2001, 21 (1): 89-93
- [14] 孙瑾, 陈春英, 李玉峰, 等. 超声波辅助溶剂萃取-电感耦合等离子体质谱法测定生物样品中的总汞和甲基汞 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27 (1): 173-176
- [15] 吕蕾, 江志刚, 张帅. 碱体系-微波辅助萃取-HPLC-ICP-MS 测定干红虾中的甲基汞 [J]. *科技信息*, 2010: 424
- [16] 高尔乐, 何滨, 江桂斌, 等. 酸浸提-HPLC-ICP-MS 系统测定土壤与底泥样品中的甲基汞、乙基汞 [J]. *环境化学*, 2008, 27 (5): 698-700
- [17] 高尔乐, 何滨, 江桂斌, 等. 利用碱消解-HPLC-ICP-MS 系统测定生物样品中的甲基汞与乙基汞 [J]. *环境化学*, 2009, 28 (2): 310-312
- [18] Wang M, Feng W Y, Shi J W, et al. Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC-ICP-MS [J]. *Talanta*, 2007, 71, 2034-2039
- [19] Chiou C S, Jiang S J, Danadurai S K. Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Spectrochim Acta B*, 2001, 56 (7): 1133-1142
- [20] 杨红霞, 刘威, 李冰. 碱消解-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定生物样品中的甲基汞和乙基汞 [J]. *岩矿测试*, 2008, 27 (6): 405-408
- [21] 吕超, 刘丽萍, 董慧茹, 等. 盐酸提取-液相色谱-原子荧光联用技术检测水产品中甲基汞等汞化合物 [J]. *分析实验室*, 2010, 29 (2): 64-68
- [22] 张兰, 陈玉红, 施燕支, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定二价汞、甲基汞、乙基汞与苯基汞 [J]. *环境化学*, 2009, 28 (5): 772-775

宋睿, 宋娟娥, 负照军. 反相色谱-电感耦合等离子体质谱法快速测定大气颗粒物中的无机砷[J]. 环境化学, 2017, 36(1): 198-200.



安捷伦科技(Agilent)

反相色谱-电感耦合等离子体质谱法快速测定大气颗粒物中的无机砷

宋 睿¹ 宋娟娥² 负照军²

(1. 山西大同大学, 大同, 037009; 2. 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京, 100102)

摘 要 建立了反相高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICPMS)测定大气颗粒物中可溶性总砷和砷形态(砷酸盐、亚砷酸盐、一甲基砷酸、二甲基砷酸和砷甜菜碱)的分析方法. 本方法结合了安捷伦 Zorbax SB-Aq 反相色谱柱快速分离和 ICP-MS 的高灵敏度的特点, 在 4 min 内完成 5 种砷形态化合物的分离和检测. 通过比较盐酸羟氨和磷酸以及不同提取时间的提取效果, 最终选定 1% 磷酸超声萃取 15 min 的最佳实验方案. 使用该方法, 砷形态的加标回收率介于 85.5%—119.2% 之间. 通过测定真实样品发现, 大气颗粒物中的可溶性砷基本为无机砷, 占可溶性总砷比例的 80%—96%.

关键词 HPLC-ICPMS, 砷形态化合物, 快速分离, 可溶性总砷.

在自然界中, 砷元素以许多不同形态的化合物存在, 空气、土壤、沉积物和水中发现的主要砷化物有亚砷酸盐(As(III))、砷酸盐(As(V))、一甲基砷酸(MMA)和二甲基砷酸(DMA), 在海产品中则主要以砷甜菜碱(AsB)和砷胆碱(AsC)形式存在. 主要砷化物对大鼠的半致死量 LD50(mg·kg⁻¹)分别为: 亚砷酸盐(As(III)) 14, 砷酸盐(As(V)) 20, 一甲基砷酸(MMA) 700—1800, 二甲基砷酸(DMA) 700—2600, 砷胆碱(AsC) 6500, 砷甜菜碱(AsB) >10000. 由此可见, 无机砷的毒性最大, 甲基化砷的毒性较小, 而 AsB、AsC 和砷糖常被认为是无毒的^[1]. 由于各种不同形态的砷毒性大小不同, 因此砷的形态分析越来越被重视. 近年来, 砷形态分析已经被应用于环境、食品、医药等领域, 成为分析工作者、毒理和健康研究者以及法规制定者关注的焦点.

传统的砷形态分离通常采用阴离子交换柱, 实现常见的 5 种砷形态(As(III)、As(V)、MMA、DMA 和 AsB)分析需要 10 min 左右^[2-3], 且该方法使用的流动相条件中阳离子含量(通常称为盐度)较高, 普通的电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)很难耐受如此高盐度, 导致采用该条件进行大批量样品分析时受到局限.

本文建立了砷形态分析的快速方法, 用反相色谱分离技术替代传统的阴离子交换柱分离技术, 使用 Agilent Zorbax SB-Aq 反相色谱柱, 己烷磺酸钠/柠檬酸体系为流动相, 利用烷基磺酸盐与阴离子形式存在的砷化物形成离子对化合物, 这类化合物表现出疏水性而能被反相柱保留并分离. 通过减小进样量而延长色谱柱使用寿命、结合低盐度的流动相、同时配合 ICP-MS 的高灵敏度, 进而实现进样体积小、灵敏度高、分析速度快、适合大批量样品分析的特点.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪; Milli-Q 超纯水系统(Millipore, Element); Agilent 7800/7900 电感耦合等离子体质谱仪; 超声清洗器; 振荡仪.

柠檬酸、己烷磺酸钠、氢氧化钠均为优级纯; 磷酸和硝酸为优级纯, 购自 Sigma 公司; 砷甜菜碱(AsB)、一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)、亚砷酸盐(As(III))、砷酸盐(As(V))的贮备液购自国家标准物质中心, 砷元素标准购自 Agilent 公司.

1.2 仪器的工作参数

色谱条件: Agilent Zorbax SB-Aq 反相色谱柱(4.6×250 mm, 5 Micron); 流动相: 5 mmol·L⁻¹己烷磺酸钠/20 mmol·L⁻¹柠檬酸, 用氢氧化钠调至 pH=4.3; 等度洗脱; 流速 1.2 mL·min⁻¹; 进样量: 5 μL.

ICP-MS 工作条件: 功率: 1500 W; 雾化器: 玻璃同心雾化器; 蠕动泵速率: 0.5 r·min⁻¹; 载气流量: 0.85 L·min⁻¹; 补偿气流量: 0.25 L·min⁻¹; 采样深度: 8 mm; 氦气碰撞反应池模式, 流量: 5 mL·min⁻¹; 同位素: ⁷⁵As(积分时间 1.0 s), ³⁵Cl(积分时间 0.1 s, 形态分析采集该同位素).

1.3 样品前处理

将采集了 24 h 大气颗粒物的样品膜(流量 $1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)放置在玻璃板上,用专用取样装置(0.5 cm^2)取 6 cm^2 置于 15 mL 离心管中并加入 3 mL 1% 磷酸溶液,将离心管在室温条件下超声萃取 15 min 后,静置后取上清液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 水相膜过滤后直接进样.用 ICP-MS 测定可溶性总砷的含量,LC-ICPMS 测定各种砷形态的含量.滤液若不能马上检测则应放入 4°C 冰箱内保存,以防止形态物质之间的相互转化.如果大气颗粒物含量较低,可增加取样量.

1.4 数据换算公式

ICP-MS 或 LC-ICPMS 检测浓度值为 x ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),萃取液体积 v (mL),样品取样量 m (cm^2),则大气中 As 的质量浓度 ($\text{ng} \cdot \text{m}^{-3}$): $[\text{As}] = (xv/m) \times 414/1440$

2 结果及讨论

2.1 提取介质和时间

考察了文献报道的 2 种提取介质(1% 盐酸羟氨和 1% 磷酸)的提取效率,发现在相同的提取时间下,二者的提取效率相近,但盐酸羟氨的空白背景较高,不利于分析低含量的样品,故选择 1% 磷酸作为本文的提取液.

用 1% 磷酸超声萃取 15 min、30 min、45 min、1 h 和 2 h,实验发现提取时间在 15 min—1 h 间提取效率接近,但提取 2 h 后砷形态发生转化,三价砷转化为五价砷.综合提取率和形态转化的实验结果,本文最终选定超声萃取 15 min.

2.2 ICP-MS 测定可溶性总砷

用 2% 硝酸配制浓度为 0、0.5、2、10、50、200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 含砷元素的标准溶液,以 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rh 元素为内标,绘制标准曲线.以 1% 磷酸为样品空白,计算所得的方法检测限为 $0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.可溶性总砷的含量见表 1.

2.3 HPLC-ICPMS 测定砷形态

2.3.1 标准曲线及检出限

分别用超纯水将 5 种砷的标准储备溶液逐级稀释,配制浓度为 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合标准溶液系列.在优化好的实验条件下,采用 Agilent MassHunter 等离子体质谱软件计算各色谱峰的峰面积并自动绘制校准曲线,所得线性相关系数为 0.9995—1.000.图 1 为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混合标准溶液 HPLC-ICPMS 色谱图.

以 HPLC-ICPMS 色谱峰信噪比 S/N 为 3:1 时所对应的浓度计算检出限,在进样量为 $5 \mu\text{L}$ 时,As(V)、MMA、As(III)、DMA 和 AsB 对应的检出限(以砷计)分别为 0.078、0.079、0.100、0.180、0.360 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

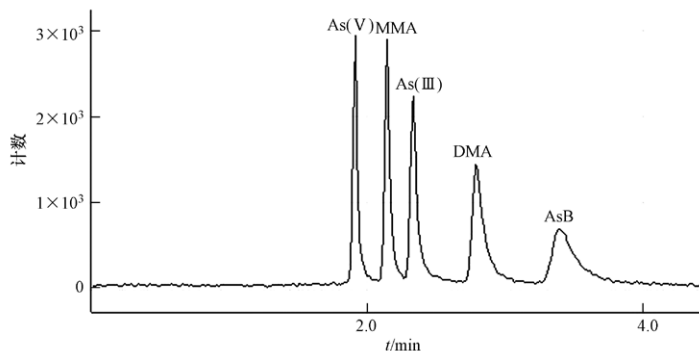


图 1 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 五种砷形态化合物 HPLC-ICPMS 色谱图

2.3.2 色谱条件的选择与优化

关于色谱条件的选择和优化已在之前的文章中有报道^[4].

2.3.3 实际样品分析

取 18 个实际样品按照本研究给出的方法进行样品前处理和检测,得到原始浓度数据,根据“1.4”节的公式进行换算,得到大气中砷元素和砷形态的质量浓度,结果见表 1.

实验发现,新鲜采集大气颗粒物的样品膜尽快测定,则可以检测到较高含量的三价砷,而当样品膜在 -20°C 长时间保存时(如半年以上),则样品中的部分三价砷将会转化为五价砷(图 2).

2.3.4 加标回收率

选择 2 个样品(13# 和 17#)在样品超声萃取的同时,同步进行加标回收实验,即将样品分成 2 份,一份直接萃取,另一份样品加入相应浓度的砷形态标准溶液后进行超声萃取.从表 2 的加标回收结果可见,三价砷和五价砷的回收率均在 80%—120% 之间,说明该方法稳定,可靠.

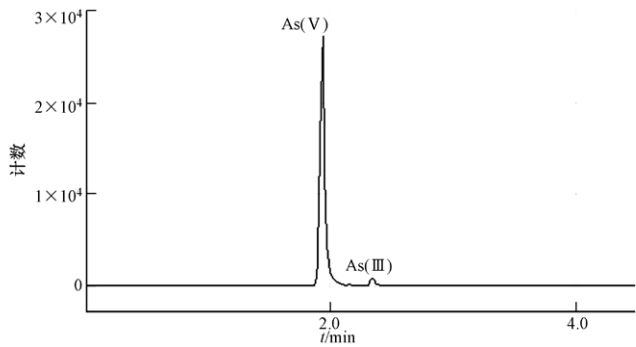


图 2 样品砷形态色谱图

表 1 样品可溶性总砷和形态砷的测定结果

样品名称	样品提取液浓度/(ng·mL ⁻¹)			大气颗粒物质量浓度/(ng·m ⁻³)			
	As(Ⅲ)	As(V)	总 As	As(Ⅲ)	As(V)	总 As	无机砷/总 As
1#	1.19	118.46	124.11	0.06	5.68	5.95	96%
2#	0.75	37.45	41.21	0.04	1.79	1.97	93%
3#	/	13.82	17.05	/	1.99	2.45	81%
4#	/	19.62	22.01	/	1.88	2.11	89%
5#	/	32.50	40.50	/	4.67	5.82	80%
6#	/	36.29	42.37	/	5.22	6.09	86%
7#	/	48.89	58.06	/	7.03	8.35	84%
8#	/	44.36	52.35	/	6.38	7.52	85%
9#	/	28.86	33.38	/	4.15	4.80	86%
10#	/	37.41	42.61	/	5.38	6.12	88%
11#	/	31.30	37.14	/	4.50	5.34	84%
12#	/	30.00	36.01	/	4.31	5.18	83%
13#	1.54	49.07	57.55	0.22	7.05	8.27	88%
14#	/	36.70	43.14	/	7.91	9.30	85%
15#	/	30.02	35.36	/	4.32	5.08	85%
16#	0.74	70.21	86.94	0.05	5.05	6.25	82%
17#	4.72	102.98	124.68	0.34	7.40	8.96	86%
18#	0.72	60.04	69.93	0.05	4.32	5.03	87%

表 2 大气颗粒物砷形态的加标回收结果(ng·mL⁻¹)

	As(Ⅲ)	As(V)		As(Ⅲ)	As(V)
13#	1.54	49.07	17#	4.72	102.98
加标量	2	50	加标量	10	100
加标后测定值	3.92	104.97	加标后测定值	14.0	188.48
回收率%	119.2%	111.8%	回收率%	92.8%	85.5%

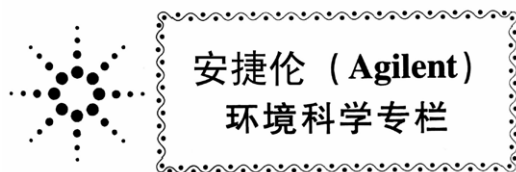
3 结论

本实验所测的绝大部分样品大气颗粒物中的砷是毒性较大的无机砷(三价砷和五价砷),以五价砷为主,低毒或无毒的有机砷均未检出.本实验中无机砷占可溶性总砷的比例为 80%—96%,可进一步验证该结论.

HPLC-ICPMS 方法由于其高选择性、强抗干扰能力等方面优点适合用可溶性砷形态方面的研究.本文建立了反相色谱的快速砷形态分析方法,与常规的离子交换方法比,将工作效率提高 2 倍,色谱柱的成本降低一半,为砷形态分析的实验室尤其是大批量样品分析实验室提供了非常好的参考.

参考文献(References)

[1] 刘桂华,汪丽. HPLC-ICP-MS在紫菜中砷形态分析的应用[J]. 分析测试学报,2002, 21(4):88-90.
[2] 吕超,刘丽萍,董慧茹,等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定水产类膳食中 5 种砷形态的方法研究[J]. 分析测试学报,2010, 29(5):465-468.
[3] 林立,陈光,陈玉红. 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用测定动物性海产品中的无机砷[J]. 环境化学,2009, 28(1):149-152.
[4] 韩枫,岳兵,米建秋,等. 反相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术快速测定大米中无机砷[J]. 环境化学,2015, 34(1):194-197.



高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定环境水样中的二价汞、甲基汞、乙基汞与苯基汞

陈玉红¹ 米健秋¹ 张 兰²

(1. 安捷伦科技中国有限公司, 北京, 100102; 2. 首都师范大学分析测试中心, 北京, 100048)

摘 要 采用醋酸铵/L-半胱氨酸缓冲盐及甲醇体系组成的流动相按一定比例进行梯度洗脱,建立了高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICPMS)测定二价汞、甲基汞、乙基汞、苯基汞等4种汞形态的分析方法,考察了环境水样并以加标回收的方式研究了该方法对环境水样的适用性,不同添加水平下4种Hg形态的加标回收率多数在91.0%—120%之间,方法准确、可靠。

关键词 HPLC-ICP/MS 联用, 环境水样, 二价汞, 甲基汞, 乙基汞, 苯基汞。

汞是一种剧毒的重金属元素,具有较强的挥发性。汞在空气中传输扩散,最后沉降到水和土壤中。汞及其化合物的毒性都很大,汞对生物的毒性既取决于浓度,也与化学形态及生物本身的特征密切相关,其有机化合物的毒性尤甚,其中烷基汞的毒性比芳基汞和无机汞都大。无机汞易通过生物甲基化作用生成毒性更强的烷基汞,累积在鱼、藻类及其它生物组织中,并通过食物链的富集作用进入人体,对环境和人类构成极大隐患^[1-2]。因此,采用高灵敏度的分析方法测定环境样品和生物样品中痕量汞形态的含量极为必要。

近年来,高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP/MS)联用技术因其灵敏度与选择性高、接口简单、前处理过程简便且有利于保持待测样品原始形态不变等特点,在汞形态分析中已有报道^[3-9]。

本文采用液相色谱作为分离手段,醋酸铵/L-半胱氨酸缓冲盐及甲醇体系作为淋洗液并进行梯度洗脱,ICP-MS作为检测器,二者联用实现了痕量二价汞、甲基汞、乙基汞、苯基汞的快速分离分析。方法准确、可靠、简便,适用于水样中汞形态分析的常规检测。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 7700x ICP-MS, Agilent 1200 HPLC,配有自动进样器。醋酸铵(优级纯);L-半胱氨酸(优级纯);甲醇(色谱纯)。二价汞(Hg^{2+})、甲基汞(MeHg)、乙基汞(EtHg)、苯基汞(PhHg)标准溶液。

1.2 仪器的工作参数

色谱条件:Agilent Zorbax Plus C18 色谱柱, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm ;流动相:A相为10 mmol·L⁻¹醋酸铵/0.12% L-半胱氨酸,氨水调节pH=7.5,经0.45 μm 滤膜过滤;B相为甲醇。流动相流速为1.0 mL·min⁻¹;进样量5—100 μL 。梯度洗脱。

ICP-MS的工作参数:入射功率1550 W;采样深度8.0 mm;玻璃同心雾化器;石英雾化室与炬管,雾室采用半导体控温于-5 $^{\circ}\text{C}$;Pt采样锥和截取锥;采样模式:Time program。同位素: Hg^{202} ,积分时间0.5 s。

2 结果与讨论

2.1 LC与ICP-MS分析条件

分别对色谱柱、流动相缓冲盐种类、用量及pH值、有机相比比例等色谱条件进行了详细考察,系统研究了最优化条件下4种汞形态的分离性能,最终选择Zorbax Eclipse Plus C18 色谱柱、醋酸铵/L-半胱氨酸体系下,采用梯度淋洗程序进行4种汞形态的分离。其中,2.5 min之前均采用92%醋酸铵/L-半胱氨酸溶液+8%甲醇以便实现二价汞、甲基汞、乙基汞的迅速分离,2.5 min后将甲醇比例直接提高至45%以实现苯基汞的快速洗脱。由于梯度淋洗过程中进入等离子体中的基体发生变化,从而产生基体效应,导致流动相改变时ICP-MS出现明显的灵敏度差异,因此采用与液相梯度淋洗程序相对应的ICP-MS时间分辨采集程序(表1)模式采集信号,对等离子体中不同的基体组成采用最匹配的ICP-MS仪器参

数,以保证梯度洗脱过程中各阶段汞的灵敏度均最佳(表1).具体的方法优化可参见文献[8].图1为所选色谱体系下,以7700x ICP-MS作为检测器、进样量20 μL 时,浓度约为 $5\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 的4种汞形态的色谱分离图.各种汞的保留时间依次为 Hg^{2+} 1.56 min,MeHg 2.30 min,EtHg 4.40 min,PhHg 6.51 min.

表1 电感耦合等离子体质谱的时间分辨采集程序

步骤	时间/s	Tuning file
1	0	8% MeOH. U
2	307	45% MeOH. U
3	135	8% MeOH. U
总时间	477	

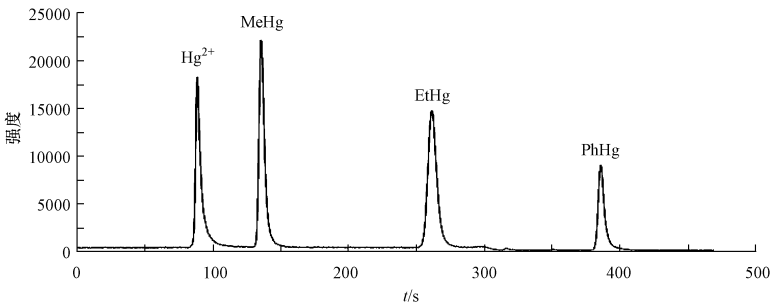


图1 1200 LC-7700x ICP-MS联用分析4种汞形态的色谱图

(汞浓度分别为(以 Hg 计): Hg^{2+} $5.009\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, MeHg $4.731\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, EtHg $4.446\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, PhHg $3.814\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$)

2.2 校准曲线线性与检出限

将4种汞形态的标准储备溶液稀释,以称重法配制成约 $20\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 的混合标准溶液,再将此混合溶液分别稀释成约 0.5 、 2.0 、 $5.0\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 的混合溶液系列(浓度均以 Hg 计).按照选定的仪器工作条件且进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$,依次测定4种混合标准溶液中的各种汞形态.根据色谱峰积分面积结果与浓度绘制校准曲线,详见表2与图2.结果表明,在给定浓度范围内汞的4种形态校准曲线均呈线性,线性回归方程相关系数在 0.9998 以上.

表2 各种汞形态标准溶液系列的浓度与积分面积(进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$)

Hg^{2+}		MeHg		EtHg		PhHg	
浓度 /($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	积分面积	浓度 /($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	积分面积	浓度 /($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	积分面积	浓度 /($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	积分面积
0.505	5637	0.477	9568	0.449	10622	0.385	4604
2.501	38694	2.363	52724	2.221	54222	1.905	23730
5.009	84345	4.731	104959	4.446	111863	3.814	48721
20.00	345470	18.80	395977	17.75	417700	15.23	206404

图3为进样量 $100\text{ }\mu\text{L}$ 时各种 Hg 形态的浓度约在 $0.100\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (浓度均以 Hg 计)时的LC-ICP/MS谱图.由图3可知,所建立的方法灵敏度高,完全可以满足浓度为ppt级的汞的分析要求.在LC-ICP/MS联机应用中,ICP-MS仅作为色谱的检测器,因此仪器检测限定义为信噪比(S/N)为3:1时所对应的浓度.在所选择的仪器条件下,计算得到二价汞、甲基汞、乙基汞与苯基汞的检出限(以 Hg 计)分别为 11 、 3.5 、 8.7 、 $9.4\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

2.3 环境水样分析与加标回收实验

用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔纤维滤膜对两个环境水样进行过滤,按照所建立的HPLC-ICPMS分析方法进行汞形态的分析.结果显示,在上述两个样品中均未检测到汞.

在水样中分别添加 0.10 、 0.50 与 $5.0\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 3个水平的混合汞标准溶液进行实验,计算加标回收率.具体数据见表3.由表3可知,除了加标量在 $0.10\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 时二价汞的回收率分别达到 130% 与 125% 以外,两个水样中3个添加水平下的回收率都在 91.0% — 120% 之间,说明本方法得到的数据是准确可靠的.

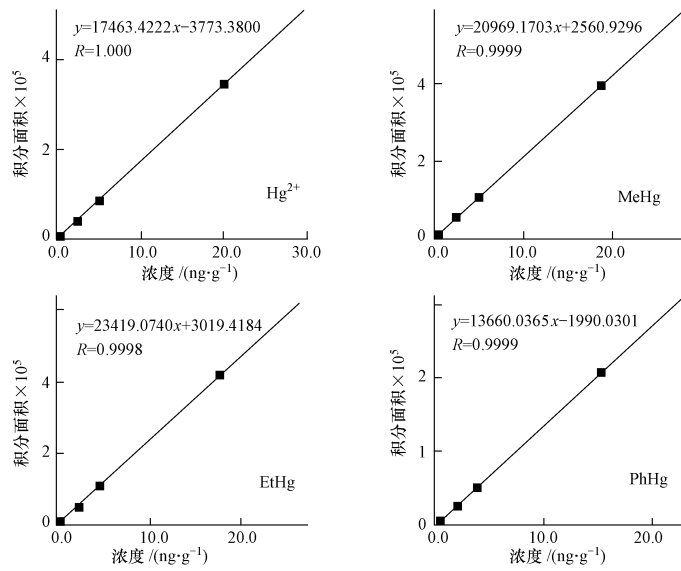


图2 1200 LC-7700x ICP-MS 联用测定各种汞形态的校准曲线

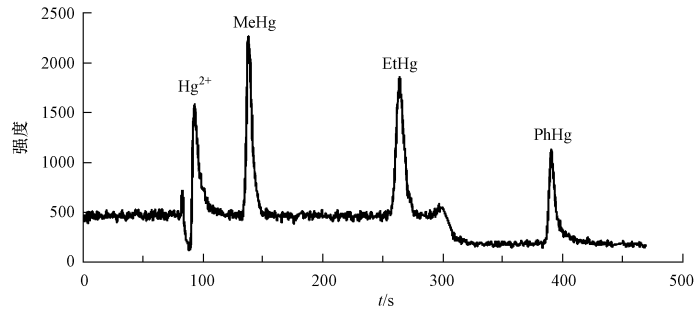
图3 浓度约为 $0.1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 的4种汞形态 LC-ICP/MS 谱图.(汞浓度(以汞计): Hg^{2+} $0.100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, MeHg $0.094 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, EtHg $0.089 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, PhHg $0.076 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$)

表3 水样加标回收结果(加标量以 Hg 计)

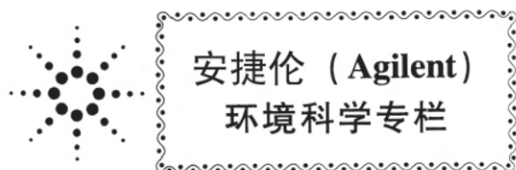
汞形态	加标量/ $(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$	水样 1		水样 2	
		加标测定值/ $(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$	回收率/%	加标测定值/ $(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$	回收率/%
二价汞	0.10	0.130	130	0.125	125
甲基汞	0.10	0.105	105	0.102	102
乙基汞	0.10	0.103	103	0.107	107
苯基汞	0.10	0.098	98.0	0.112	112
二价汞	0.50	0.602	120	0.557	111
甲基汞	0.50	0.543	109	0.521	104
乙基汞	0.50	0.490	98.0	0.476	95.2
苯基汞	0.50	0.455	91.0	0.482	96.4
二价汞	5.0	5.126	103	4.972	99.4
甲基汞	5.0	5.107	102	4.996	99.9
乙基汞	5.0	5.094	102	4.998	99.9
苯基汞	5.0	5.181	104	4.908	98.2

3 结论

本文将高灵敏度的 ICP-MS 与液相色谱联用,建立了快速测定环境水样中 4 种汞形态的分析方法. 将所建立的方法应用于环境水样中的汞形态分析,灵敏度高,4 种汞形态的检出限在 $3.5\text{--}11\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 的范围内. 以加标回收的方式研究了该方法对环境水样的适用性,加标回收多数在 91.0%—120% 之间,方法准确、可靠,为环境样品中的汞形态分析测定提供了有用的参考.

参 考 文 献

- [1] 梁立娜,江桂斌. 高效液相色谱及其联用技术在汞形态分析中的应用[J]. 分析科学学报,2002, 18(40):338-343
- [2] 王征,游飞明,邱秀玉,等. HPLC-ICP-MS 法测定水样中的甲基汞、乙基汞和无机汞 [J]. 福建分析测试, 2009, 18(1): 29-31
- [3] 黄志勇, 吴熙鸿, 胡广林, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术用于元素形态分析的研究进展[J]. 分析化学, 2002,30(11):1387-1393
- [4] 王萌,丰伟悦,张芳等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定生物样品中无机汞和甲基汞[J]. 分析化学,2005, 33(12): 1671-1675
- [5] Cairns W R L, Rinaldo M, Hennebelle R, et al. Speciation analysis of mercury in seawater from the Lagoon of Venice by on-line pre-concentration HPLC-ICP-MS [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 622(1): 62-69
- [6] 高尔乐, 何滨, 江桂斌, 等. 酸浸提-HPLC-ICP-MS 系统测定土壤与底泥样品中的甲基汞、乙基汞[J]. 环境化学,2008,27(5): 698-700
- [7] 杨红霞, 刘威, 李冰. 碱消解-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定生物样品中的甲基汞和乙基汞[J]. 岩矿测试,2008,27(6):405-408
- [8] 张兰,陈玉红,施燕支. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定二价汞、甲基汞、乙基汞与苯基汞[J]. 环境化学, 2009, 28(5):772-775
- [9] Chen J G, Chen H W, Jin X Z, et al. Determination of ultra-trace amount methyl-, phenyl- and inorganic mercury in environmental and biological samples by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction pre-concentration [J]. Talanta, 2009, 77: 1381-1387



毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱法联用 (CE-ICP/MS) 测定八种砷的化合物

陈玉红 米健秋 徐陆正 张之旭 李德仁

(安捷伦科技(中国)有限公司, 北京, 100102)

摘 要 本文建立了毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱联用(CE-ICP/MS)测定砷甜菜碱(AsB)、砷胆碱(AsC)、三价砷[As(III)]、五价砷[As(V)]、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)、阿散酸(*p*-ASA)、洛克沙肿(3-NHPAA)等8种砷化合物的分析方法。各种的砷化合物于20 min内完全分离,标准曲线线性良好,各种砷的迁移时间与峰面积之相对标准偏差RSD($n=6$)分别在1.2%—1.7%及1.6%—4.1%的范围内,检出限($S/N=3$)在0.3—0.8 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间,结果令人满意。

砷为重金属元素之一,该元素造成的污染问题日益受到重视。许多法规均对砷的限量进行了严格地规定。但是,目前已知环境中的砷形态种类超过30种以上^[1],而砷的毒性与生物活性很大程度上取决于其形态^[2]。在环境、食品、医学样品中通常存在的几种砷形态毒性大小依次为:As(III) > As(V) > DMA = MMA > AsC > AsB^[3]。此外,某些砷化合物如阿散酸、洛克沙肿被广泛作为家禽的生长促进剂与抗菌剂添加到饲料中。目前因其迁移性及对环境、人体的潜在毒性,已引起广泛关注,许多发达国家已禁用并严格规定相关产品中此类砷化合物的限量,例如:日本肯定列表中肉禽类产品中阿散酸和洛克沙肿的限量为2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。因此,对各种砷形态进行灵敏、快速、准确的分离分析,从而提供更为准确的毒性风险评估是非常必要的。

砷形态分析最常见的方法是采用IC^[4], LC^[5-6]或CE^[7-12]进行分离后引入合适的检测器。CE是以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力,根据样品中各组分之间迁移速度和分配行为上的差异而实现分离的一种液相分离技术,各组分的迁移速度与其净电荷、大小等有关。该技术具有极佳的分离效率,试剂与样品消耗量少,且较为简便,可与ICP-OES^[10-11]、ICP-MS^[12-16]及UV^[8, 16-17]等检测技术联用。其中,ICP-MS具有极佳的选择性与灵敏度,其与CE的联用技术在金属及金属化合物的分离分析中起着至关重要的作用。

本研究的目的在于采用CE-ICP/MS建立一种同时分离砷甜菜碱、砷胆碱、三价砷、五价砷、一甲基砷、二甲基砷、阿散酸、洛克沙肿等8种砷的化合物的分析方法。方法简便快速,分离度与灵敏度高。文中所使用的CE-ICP/MS接口由Agilent CE-MS sprayer kit改造制成,并将其作为ICP-MS的雾化器直接安装于雾室底座,最大程度减少了接口的死体积并保证了毛细管内液体稳定地雾化,接口简单、可靠,检出限、线性、重复性等分析性能均令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器

Agilent 7700x 电感耦合等离子体系统(ICP-MS); Agilent 7100 毛细管电泳系统(CE); Agilent CE-MS sprayer kit 喷雾针及1:100分流三通(G1607A); Agilent CE/MS卡套及准直接口(G1603); Agilent 1200 四元泵(或单元泵),用于驱动鞘液。ICP-MS配有石英双通道雾化室,2.5mm内径的石英炬管,Ni锥。待测同位素为⁷⁵As,正常模式,TRA采集方式,采集时间25min。毛细管电泳采用50 μm i. d. \times 90 cm 未涂层熔融石英毛细管,分离电压30kV,毛细管控温于25 $^{\circ}\text{C}$ 。因毛细管内液体流速极低($\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$),难以有效雾化,由液相四元泵泵入含100 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ Rh的3%乙醇溶液,经1:100分流后引入sprayer kit作为CE的鞘液,鞘液流速为5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

7100 CE工作条件:分离电压,30kV,毛细柱50 μm i. d. \times 90 cm 未涂层熔融石英毛细管;缓冲溶液20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH=9.2);鞘液流速5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;分离时间25 min;

7700x ICP-MS工作条件:入射功率1550 W,采样深度8.0 mm,载气流速1.35 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,雾室温度2 $^{\circ}\text{C}$,质量数⁷⁵As, ¹⁰³Rh;采集模式TRA,采集时间25 min,积分时间⁷⁵As 0.7s, ¹⁰³Rh 0.05s。

1.2 试剂与材料

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 优级纯 Sigma Aldrich), 乙醇(色谱纯), 硝酸(Sigma Aldrich 优级纯), 超纯水(UPW, $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), 取自 Milli-Q 纯水机 (Millipore, Bedford, MA). 阿散酸($p\text{-ASA}$, Sigma Aldrich), 洛克沙肿 (3-NHPAA, Sigma Aldrich). 三价砷 [$\text{As}(\text{III})$, GBW08666], 五价砷 [$\text{As}(\text{V})$, GBW08667], 二甲基砷 (DMA, GBW08669), 一甲基砷 (MMA, GBW08668), 砷胆碱 (AsC, GBW08671) 与砷甜菜碱 (AsB, GBW08670), 均购自于国家标准物质研究中心.

以水稀释分别配制成 10, 20, 50, 100 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 的标准溶液系列. 为避免砷形态的转化, 砷标准溶液均在 4°C 储存以保证其稳定性. 每隔 3 日定期检查其是否发生转化. 10 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Li, Co, Y, Ce, Tl 调谐液 (Agilent technologies), 100 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 铯标液 (Agilent technologies).

1.3 分析方法

CE 的鞘液由液相四元泵经 1:100 分流后引入, 四元泵流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 因此引入 CE 的鞘液流速为 $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. 通过监控鞘液中 Rh 的信号以获得最理想的稳定性与灵敏度, 该元素亦作为 ICP-MS 的内标元素. 进样前分别用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, UPW 与缓冲液冲洗毛细管, 然后在 50 mbar 压力下进样 10 s.

2 结果与讨论

2.1 CE-ICP/MS 接口

将 Agilent CE-MS sprayer kit (G1607A) 进行改造后, 直接用作 CE-ICP/MS 接口. 接口为鞘液接口技术, 同轴设计, 并作为 ICP-MS 的雾化器直接安装于雾室底座上, 结构如图 1 所示. 该接口由一个同心的不锈钢毛细管套在电泳毛细管末端, 由于电泳毛细管内溶液的流速极低 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 级), 因此在鞘内加入 $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 鞘液, 以保证稳定、有效的雾化. 在此不锈钢套外再套一个同心钢套, 通入高速载气 ($1.35 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$), 鞘液与毛细管电泳缓冲液在末端混合并被载气雾化形成气溶胶. 接口进入雾室之前用铜线接地, 此接口设计为毛细管电泳的分离提供了稳定的电场, 保证了待测化合物的有效传输并雾化, 且可将接口的死体积有效降低.

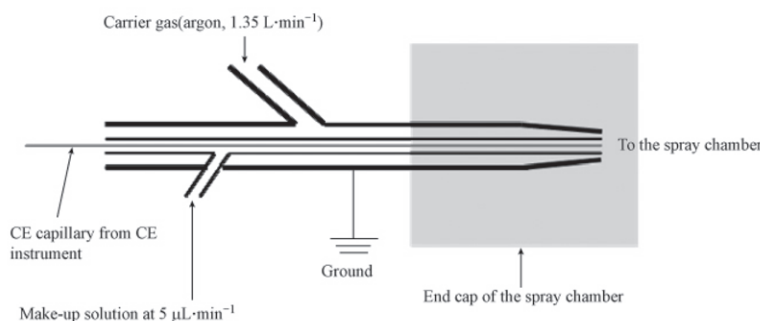


图 1 CE-ICP/MS 接口结构示意图

2.2 鞘液的选择

毛细管电泳以高压电场为驱动力、以毛细管为分离通道进行分离. 但毛细管内溶液流速极低 ($\text{nL} \cdot \text{min}^{-1}$ 级), 因此需增加一路补偿溶液即鞘液, 以实现理想的雾化. 根据文献的报道, 鞘液的种类分别有 NaCl [3], NH_4NO_3 [3], 缓冲液 [3] 或稀硝酸 [21-24] 等多种种类. 考虑到 CE 所联的检测器为 ICP-MS, 鞘液中若含盐较高易使 ICP-MS 产生较为严重的基体效应, 且基体中的盐类易沉积于锥口或透镜上, 造成 ICP-MS 信号漂移. 因此, 选择含 100 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 铯 (内标) 3% 乙醇混合溶液作为鞘液的主要组成, 其中, 加入乙醇的目的在于, 砷为高电离能元素, 基体中若含有一定量的碳, 可有效改善等离子体电离环境, 提高砷的电离效率, 因此在鞘液中加入一定含量的乙醇以提高砷的灵敏度, 其含量的优化详见图 2. 由图 2 可知, 各种砷形态的信号随着乙醇含量的提高而增加, 至 3% 乙醇时达至最高. 但当乙醇含量为 4% 时, 各种砷的信号又出现较为明显的降低, 这主要由于基体信号抑制的作用导致.

2.3 各种砷化合物的分离

将毛细管分离电压设为 30 kV, 各种砷化合物根据其电荷、分子量及其它特性在毛细管内进行迁移. 图 3 是含量为 50 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ (以砷计) 的 AsC, AsB, As(III), DMA, $p\text{-ASA}$, MMA, 3-NHPAA, As(V) 混合物 CE-ICP/MS 的 ^{75}As 提取离子流图. 在所选条件下, 8 种砷的化合物在 20 min 内即实现完全分离. 各种砷形态的迁移时间分别为: AsC 4.34 min, AsB 5.96 min, As(III) 7.44 min, DMA 9.13 min, $p\text{-ASA}$ 9.90 min, MMA 11.75 min, 3-NHPAA 14.30 min, As(V) 17.96 min. 由图可知, 各种砷形态的峰形及分离度均较为理想. 将浓度为 50 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 的 8 种砷化合物的混合标准溶液连续 6 次进样测定, 其迁移时间与峰面积见表 1. 由表 1 可知, 8 种砷的化合物的迁移时间及峰面积相对标准偏差分别在 1.2%—1.7% 与 1.6%—4.1% 的范围内. 在色谱-ICP/MS 联机应用中, ICP/MS 仅作为色谱的检测器, 因此检出限定义为信噪比 (S/N) 为

3:1 时所对应的浓度,计算得到本方法各种砷的检出限为 0.3—0.8 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (以砷计)。

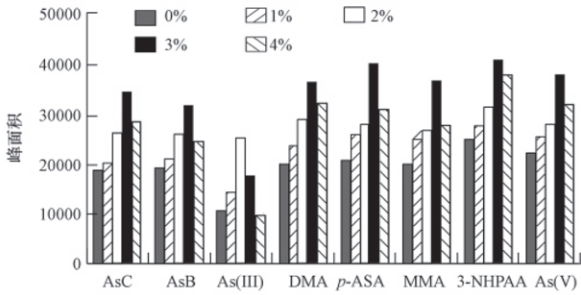


图 2 乙醇含量对砷信号(峰面积)的影响

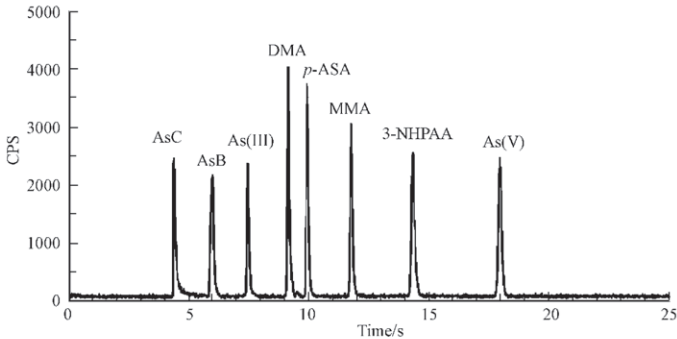


图 3 $50\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (以砷计)的 AsC, AsB, As(Ⅲ), DMA, *p*-ASA, MMA, 3-NHPAA, As(V) 混合物的 CE-ICP/MS 提取离子流图(^{75}As)

表 1 浓度为 $50\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (以砷计)的 8 种砷化合物 CE-ICP/MS 分析重现性 ($n=6$)

重复次数		1	2	3	4	5	6	RSD%
AsC	<i>t</i> /min	4.391	4.379	4.427	4.249	4.344	4.272	1.6
	峰面积	11854	11515	11089	11267	10502	11500	4.1
AsB	<i>t</i> /min	6.045	6.010	6.081	5.855	5.962	5.843	1.7
	峰面积	12184	12914	13122	12835	13288	13372	3.3
As(Ⅲ)	<i>t</i> /min	7.521	7.485	7.569	7.319	7.438	7.307	1.4
	峰面积	9488	9837	9577	8920	9267	9427	3.3
DMA	<i>t</i> /min	9.199	9.175	9.175	8.937	9.128	8.937	1.3
	峰面积	16047	16379	15946	17058	16398	16189	2.4
<i>p</i> -ASA	<i>t</i> /min	10.008	9.972	9.913	9.723	9.901	9.687	1.3
	峰面积	17903	18475	17394	18171	17574	17785	2.2
MMA	<i>t</i> /min	11.888	11.841	11.698	11.615	11.746	11.496	1.2
	峰面积	15190	15801	15894	15394	16298	15985	2.6
3-NHPAA	<i>t</i> /min	14.506	14.483	14.292	14.233	14.304	13.983	1.3
	峰面积	18423	18775	18634	18247	19026	18894	1.6
As(V)	<i>t</i> /min	18.445	18.219	17.957	18.148	17.957	17.529	1.7
	峰面积	17688	18070	17720	16843	18391	17572	2.9

2.4 校准曲线

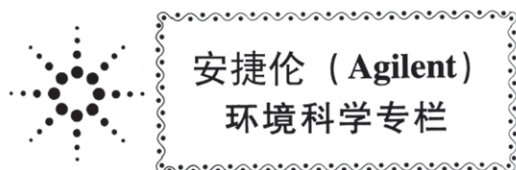
在选定的实验条件下,采用 CE-ICP/MS 分别测定浓度为 10, 20, 50, 100 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (以砷计)的 8 种砷形态混合标准溶液,各种砷的化合物校准曲线相关系数分别为:AsC 0.9991, AsB 0.9977, As(Ⅲ) 0.9946, DMA 0.9992, *p*-ASA 0.9996, MMA 0.9993, 3-NHPAA 1.0000, As(V) 0.9970。

3 结论

本文建立了 CE-ICP/MS 联用测定 AsC, AsB, As(Ⅲ), DMA, *p*-ASA, MMA, 3-NHPAA 与 As(V) 等 8 种砷化合物的分析方法. 将 Agilent CE-MS sprayer kit 直接改造成为 CE-ICP/MS 接口, 使两种技术的联用极为直接、简单并且稳定. 8 种砷的化合物一次进样、20min 内得以完全分离. 为提高砷的灵敏度, 于鞘液中加入 3% 乙醇用以增敏. 各种砷化合物的检出限在 0.3—0.8 ng·g⁻¹ 的范围内, 校准曲线线性、迁移时间与峰面积重现性均令人满意.

参 考 文 献

- [1] Francesconi K A, Kuehnelt D. Determination of arsenic species: a critical review of methods and applications [J]. 2000—2003, *Analyst*, 2004, 129, 373
- [2] Yamauchi H, Fowle B A. Toxicity and metabolism of inorganic and methylated arsenicals. //Nriagu J O (Eds). *Arsenic in the Environment, Part II* [M]. John Wiley & Sons, New York, 1994:35
- [3] X Zhang, R Cornelis, J De Kimpe, et al. Accumulation of arsenic species in serum of patients with chronic renal disease [J]. *Clin Chem*, 1996, 42, 1231
- [4] Kohlmeyer U, Jantzen E, Kuballa J, et al. Benefits of high resolution IC-ICP-MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377, 6
- [5] B'hymer C, Sutton K L, Caruso J A. Comparison of four nebulizer-spray chamber interfaces for the high-performance liquid chromatographic separation of arsenic compounds using inductively coupled plasma mass spectrometric detection [J]. *J Anal At Spectrom*, 1998, 13, 855
- [6] Brennan R G, O'Brien Murdock S, Farmand M, et al. Nano-HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation [J]. *J Anal At Spectrom*, 2007, 22, 1199
- [7] Kutschera K, Schmidt A C, Köhler S, et al. CZE for the speciation of arsenic in aqueous soil extracts [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28, 3466
- [8] Casiot C, Alonso M C B, Donard O F X, et al. Simultaneous speciation of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in waters and soil extracts by capillary electrophoresis and UV detection [J]. *Analyst*, 1998, 123, 2887
- [9] Sun B G, Macka M, Haddad P R. Speciation of arsenic and selenium by capillary electrophoresis [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1039, 201
- [10] Xiao-Dan Tian, Zhi-Xia Zhuang and Bin Chen, Movable reduction bed hydride generation system as an interface for capillary zone electrophoresis and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for arsenic speciation analysis [J]. *Analyst*, 1998, 123, 899.
- [11] Suárez C A, Giné M F. A reactor/phase separator coupling capillary electrophoresis to hydride generation and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (CE-HG-ICP OES) for arsenic speciation [J]. *J Anal At Spectrom*, 2005, 20, 1395
- [12] Rosal C, Mompalao G, Heithmar E. Roxarsone and transformation products in chicken manure: Determination by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26, 1606
- [13] Casiot C, Donard O F X, Potin-Gautier M. Optimization of the hyphenation between capillary zone electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of As⁻, Sb⁻, Se⁻ and Te⁻ species, applicable to soil extracts [J]. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2002, 57, 173
- [14] Yeh C F, Jiang S J. Speciation of arsenic compounds in fish and oyster tissues by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26, 1615
- [15] Yang G D, Xu J H, Zheng J P, et al. Speciation analysis of arsenic in *Mya arenaria* Linnaeus and Shrimp with capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2009, 78, 471
- [16] Day J A, Sutton K L, Soman R S, et al. A comparison of capillary electrophoresis using indirect UV absorbance and ICP-MS detection with self-aspirating nebulizer interface [J]. *Analyst*, 2000, 125:819
- [17] Casiot C, Alonso M C B, Boisson J, et al. Potin-Gautier, Simultaneous speciation of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in waters and soil extracts by capillary electrophoresis and UV detection [J]. *Analyst*, 1998, 123, 2887
- [18] Lu Q, Bird S M, Barnes R M. Interface for capillary electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1995, 67:2949
- [19] Taylor K A, Sharp B L, Lewis J, et al. Design and characterization of a microconcentric nebulizer interface for capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Anal At Spectrom*, 1998, 13, 1095
- [20] Majidi V, Miller-Ihli N J. Two simple interface designs for capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Analyst*, 1998, 123:803
- [21] Li J X, Umemura T, Odake T, et al. A High-Efficiency Cross-Flow Micronebulizer Interface for Capillary Electrophoresis and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2001, 73:5992
- [22] Liu Y, Lopez-Avila V, Zhu J J, et al. Capillary electrophoresis coupled online with inductively coupled plasma mass spectrometry for elemental speciation [J]. *Anal Chem*, 1995, 67, 2020
- [23] Rocha M S, Soldado A B, Blanco-Gonzalez E, et al. Speciation of mercury compounds by capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Anal At Spectrom*, 2000, 15:513
- [24] Kang J Z, Duan T C, Liu J, et al. A novel interface for coupling capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2004, 32: 262



HPLC-ICP-MS 联用分析中成药中的可溶性砷形态*

徐陆正² 解 清^{1,2} 陈玉红³ 白国银² 王京宇^{1,2**}

(1. 北京大学医药卫生分析中心, 北京, 100191; 2. 北京大学公共卫生学院, 北京, 100191;
3. 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京, 100102)

摘 要 建立了 HPLC-ICP-MS 联用技术分析三价砷、五价砷、一甲基砷和二甲基砷的方法, 并应用于中成药可溶性砷形态的研究中。分别考察了牛黄解毒片、赛金化毒散、牛黄清火丸、医病丸、乳核散结片等 5 种中成药, 并比较了水、盐酸、磷酸、人工胃肠液和甲醇水等多种提取介质以及超声辅助和振荡等提取方式。结果表明, 各种介质的提取效果差别不大, 其中以 1% 磷酸为提取介质、超声辅助提取 1h 的提取率稍高, 且形态不发生转化。所考察含矿物中成药的牛黄解毒片、赛金化毒散、牛黄清火丸、医病丸中可溶性砷的比例占总砷的 1% 以下, 主要为三价砷和五价砷, 而含有海产品的中成药乳核散结片中主要为三价砷、二甲基砷和五价砷。此方法 4 种砷的加标回收率在 90%—107% 之间, 平行 6 次提取结果 4 种砷相对标准偏差均小于 3%。

关键词 HPLC-ICP-MS 联用, 中成药, 可溶性砷, 形态。

中成药是以中草药为原料, 经制剂加工制成各种不同剂型的中药制品, 包括丸、散、片、膏、丹等多种剂型, 是我国历代医药学家经过千百年医疗实践创造、总结的有效方剂的精华。中成药在临床上的安全性评价中最值得关注的就是其重金属含量的评价, 其中就包括对砷这一有害元素含量的测定。但仅用总量评价其危害性是不科学的, 因为砷的毒性随形态的不同有极大的差异, 对于某些可溶性的成分如亚砷酸盐、砷酸盐、一甲基砷、二甲基砷, 其小鼠口服半数致死剂量 LD_{50} 分别为: $14\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $700\text{—}1800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $700\text{—}2600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 毒性相差可达数百倍; 而某些不溶成分如雄黄主要成分硫化砷因不能被人体吸收而毒性更低, 值得关注的是许多矿物性中成药中的绝大部分砷正是这些不溶的硫化砷。由此可知对中成药中可溶性砷形态的分析是准确评价中成药中砷的危害性的基础。HPLC 和 ICP-MS 联用方法具有高灵敏度、高选择性、强干扰能力及高分离效率等优点, 是用来分析基体复杂的样品如中成药的理想工具。因 ICP-MS 不受提取液酸碱度的影响, 对无机态砷和有机态砷中的砷有相同的灵敏度且干扰少, 分析结果也更为可靠。用于形态分析的提取方法要求原始形态尽量不发生转化, 而且为了精确定量要求有较高的提取率。应用中药分析的提取方法有很多种, 但是由于中成药成分复杂, 剂型间差别也较大, 而且砷的提取率较低, 尽管有不少相关研究, 但到目前为止还没有一种被广泛认可的提取方法。例如, 水、磷酸、盐酸、人工胃液、人工肠液和甲醇水等^[1-3] 都被应用于砷的形态分析提取方法中, 而应用于中药的提取液有水^[4]、甲醇水^[5] 和盐酸^[6] 等, 也有应用人工胃肠液^[7] 来分析生物可利用砷的, 但是比较这些提取液之间区别的还比较少, 而且比较的提取液种类也不够多。

本研究应用 HPLC-ICP-MS 联用技术, 着重对中成药中可溶性砷形态分析的提取方法做研究, 希望通过对多种剂型中成药的分析, 发现不同剂型及不同提取方式导致分析结果的差异, 探讨统一的中成药中可溶性砷形态提取方法的可能性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 7500cx 型电感耦合等离子体质谱, Agilent 1200 系列高效液相色谱仪, Milli-Q 超纯水系统 (Millipore), 色谱柱: Hamilton PRX-X100 (250mm × 4.1mm, 10 μm)。超声清洗器、振荡仪。

亚砷酸根 (As III)、二甲基砷 (DMA)、一甲基砷 (MMA)、砷酸根 (As V) 标准溶液, 配制成 $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 标准储备液, 用超纯水稀释配制浓度为 10、50、100、200、500、1000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的混合标准溶液。

* “重大新药创制”科技重大专项课题“中药中农药残留、重金属检测与分析关键技术研究”(2009ZX09502-027)。

** 通讯联系人, Tel: 010-82801107; E-mail: wjy@bjmu.edu.cn

人工胃液、人工肠液按照药典(2005 版)方法配制,所用磷酸、盐酸及其它试剂均为优级纯。

1.2 样品前处理

中药样品均购买于同仁堂等大型药品超市。中成药有很多种剂型,如散剂、片剂、水丸和蜜丸等,散剂混匀后直接称取,片剂和水丸压碎成粉末后称取,蜜丸切成小块后称取。

1.2.1 总砷测定的前处理方法:准确称取 0.1g 样品,加入 2ml 浓 HNO_3 和 1ml 浓 HCl ,密封静置过夜后置于微波消解仪中消解,然后加 5ml 高纯水转移至试管中,定容至 8ml,待测。

1.2.2 可溶性砷形态的提取方法:称取样品 0.2g(精确至 0.0001g)于 15ml 离心管中,加入 10ml 提取液,提取之后 $3600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15min,取上清液过 $0.45\mu\text{m}$ 水系滤膜,样品保存于 4°C 条件下,24h 内完成测定。

1.3 分析方法

砷总量测定:ICP-MS 条件:功率 1500W,玻璃同心雾化器,石英雾化室,半导体控温于 $(2\pm 0.1)^\circ\text{C}$,石英一体化炬管,2.5mm 中心通道,屏蔽炬,Pl 锥,载气流量 $0.75\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,补偿气 $0.35\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,采样深度 7.6mm,He 流量 $5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

形态分析:流动相: $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4/0.2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{EDTA}$, $\text{pH}=6.0$;流速: $1.0\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量 $5\mu\text{L}$ 。ICP-MS 条件:功率 1500W,玻璃同心雾化器,石英雾化室,半导体控温于 $(2\pm 0.1)^\circ\text{C}$,石英一体化炬管,2.5mm 中心通道,屏蔽炬,Pl 锥,载气流量 $0.6\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,补偿气 $0.35\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,采样深度 7.6mm,采集质量数砷 75、氯 35,分析时间 11min,峰面积定量。

2 结果及讨论

2.1 砷形态分析色谱条件的优化

用于砷形态分离的液相色谱体系也有很多种,根据相关文献报道及预实验,中成药中含有较高浓度的无机砷,因此选择阴离子交换色谱柱、洗脱能力较强的磷酸盐缓冲体系。分别比较了缓冲盐为 2、5、10、20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对保留时间的影响,其中三价砷、二甲基砷和一甲基砷的保留时间变化不大,五价砷的保留时间随着缓冲盐浓度增高而逐渐提前,分别为 9.96、9.61、8.82、7.97min。缓冲盐的浓度较高时易导致 ICP-MS 的基体效应并可能造成信号漂移。兼顾 4 种砷形态的分离效果及 ICP-MS 的长期稳定性,最终选择 $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缓冲盐作为流动相,4 种砷形态保留时间分别是三价砷 2.30min、二甲基砷 3.29min、一甲基砷 5.00min、五价砷 9.59min(见图 1)。

在本实验条件下,以 10、50、100、200、500、1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 混标测定线性范围,工作曲线依次为: $y=9394x+18338$, $y=9701x+16440$, $y=9622x+20150$, $y=9898x+20620$,相关系数均大于 0.9999。平行进 6 次 $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 标准溶液,4 种砷峰面积的 RSD 依次为 1.03%、1.23%、1.95%、0.55%。样品的测定过程中同时采集 ^{35}Cl 的信号值,监控 ArCl 对测定的干扰。由实际样品图谱(图 2,以牛黄解毒片为例)可知,Cl 的保留时间为 13.33min,远大于五价砷的保留时间,因此,样品中的 Cl 不会对砷的测定结果产生影响。

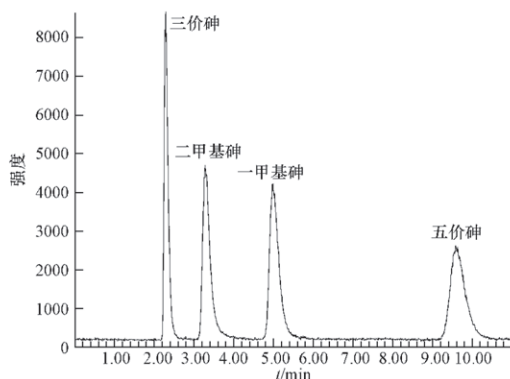


图 1 $5\mu\text{L}$ 进样, $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 混合标准溶液的色谱图

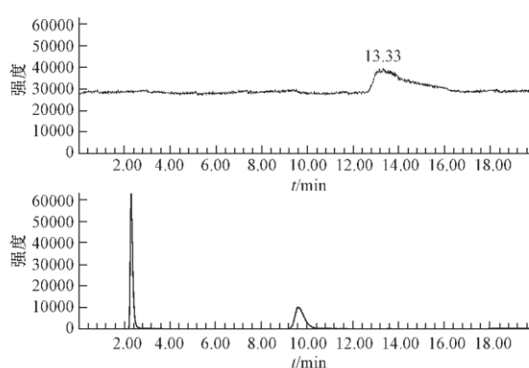


图 2 牛黄解毒片盐酸提取液的色谱图

2.2 提取方法和时间

利用王水微波消解中成药样品测定总砷,然后以形态分析方法分析提取液中所考察 4 种砷的含量。结果表明中成药样品中主要为三价砷和五价砷,在含有海产品的中成药乳核散结片中还检出了部分二甲基砷。比较了超声辅助和振荡的提取方法对提取率的影响,以救急散为例,超声 0.75、1、2、3h 的提取率分别是 0.34%、0.47%、0.40%、0.41%,而振荡 12h、24h 的提取率为 0.35%、0.35%。可以看到超声辅助提取的效率要高于振荡提取,超声 1h 的提取率已经超过振荡 12h 和 24h 的结果。比较不同超声时间的结果发现,超声 1h 有最高的提取率,为确保此条件下形态不发生转化,综合提取率的结果形态转化实验的结果,选择超声辅助 1h 作为提取方法。

2.3 提取介质

选取 5 种不同剂型的中成药作为实验对象,应用水、磷酸、盐酸、人工胃液、人工肠液和甲醇水这 6 种提取液提取以比较不同提取液之间的区别,结果见表 1.

表 1 提取介质对提取结果的影响

中成药	提取介质	三价砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	二甲基砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	一甲基砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	五价砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	4 种砷 形态之和/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	总砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	提取率/%
牛黄解毒片	水	96.6	N. D.	N. D.	106.6	203.2	71619.2	0.28
	1% 磷酸	120.8	N. D.	N. D.	101.1	221.9		0.31
	0.384% 盐酸	115.3	N. D.	N. D.	100.3	215.6		0.30
	人工胃液	123.2	N. D.	N. D.	82.9	206.1		0.29
	人工肠液	90.0	N. D.	N. D.	101.7	191.7		0.27
	50% 甲醇水	136.9	N. D.	N. D.	80.0	216.9		0.30
赛金化毒散	水	12.4	N. D.	N. D.	71.4	83.8	36184.7	0.23
	1% 磷酸	58.3	N. D.	N. D.	101.0	159.3		0.44
	0.384% 盐酸	66.7	N. D.	N. D.	87.5	154.2		0.43
	人工胃液	74.2	N. D.	N. D.	85.0	159.2		0.44
	人工肠液	40.0	N. D.	N. D.	56.1	96.1		0.26
	50% 甲醇水	52.6	N. D.	N. D.	68.6	121.2		0.33
牛黄清火丸	水	35.2	N. D.	N. D.	10.8	46.0	27964.7	0.16
	1% 磷酸	28.0	N. D.	N. D.	15.6	43.6		0.16
	0.384% 盐酸	33.6	N. D.	N. D.	14.3	47.9		0.17
	人工胃液	34.5	N. D.	N. D.	13.3	47.8		0.17
	人工肠液	20.6	N. D.	N. D.	24.4	45.0		0.16
	50% 甲醇水	36.9	N. D.	N. D.	10.6	47.5		0.17
医病丸	水	53.1	N. D.	N. D.	11.8	64.9	8892.7	0.73
	1% 磷酸	46.7	N. D.	N. D.	25.5	72.2		0.81
	0.384% 盐酸	46.0	N. D.	N. D.	26.7	72.7		0.82
	人工胃液	49.6	N. D.	N. D.	22.5	72.1		0.81
	人工肠液	57.8	N. D.	N. D.	18.7	76.5		0.86
	50% 甲醇水	63.9	N. D.	N. D.	3.9	67.8		0.76
乳核散结片	水	8.7	3.5	N. D.	7.7	19.9	42.8	46.5
	1% 磷酸	9.2	3.5	N. D.	9.7	22.4		52.3
	0.384% 盐酸	8.9	3.2	N. D.	8.9	21.0		49.1
	人工胃液	8.9	3.5	N. D.	8.8	21.2		49.5
	人工肠液	8.1	3.8	N. D.	8.8	20.7		48.4
	50% 甲醇水	10.0	3.4	N. D.	5.0	18.4		43.0

由表 1 可见,从提取率上看,含有海产品的乳核散结片明显高于其它 4 种含有雄黄的中成药,而其它 4 种的提取率按剂型从高到低依次是水丸、散剂、片剂和蜜丸,就每一种中成药 6 种提取液的提取率来看,6 种提取介质的结果差别不大,但 1% 磷酸有稍高的提取率.从提取出来的形态种类上看,含有海产品的乳核散结片除了含有三价砷、五价砷外还含有二甲基砷,一甲基砷未检出,对于其他 4 种含雄黄的中成药来说,它们三价砷和五价砷的比例也不尽相同,在赛金化毒散中五价砷含量明显高于三价砷,而在医病丸中三价砷含量明显高于五价砷,在牛黄解毒片中两种无机砷含量相当,雄黄在不同的样品基质条件下被提取出来的形态存在着明显的差异,不同中成药的基质不仅影响砷的溶出,同时影响溶出砷的形态分布.

2.4 提取次数

选择了含有雄黄和海产品的两种中成药连续提取 4 次,每次提出量占总提出量的百分比分别是 73.4%、17.1%、5.3%、4.2% 和 92.9%、5.4%、1.7%、0%. 可以看到两次提取分别能够到达 4 次提取总量的 98.3% 和 90.5%,值得注意的是两种中成药砷溶出规律的不同,含雄黄中成药在第三次和第四次提取值差别较小,趋于稳定,这种现象在其它研究也有报道^[4],可能的原因是雄黄中其它可溶的成分都已溶解,而剩下的就是其主要成分硫化砷在提取液中的溶出,有观点认为雄黄的药效正是由其中硫化砷持续低浓度的释放砷来达到的,本实验的现象符合这一假设的推断,但究其原因

还需要进一步的研究.

2.5 形态转化及加标回收考察

形态分析的提取过程需要保持原始形态不发生转化,为了考察本提取条件下的形态转化,首先应用了已知浓度的标准溶液加入相应的提取剂经过超声提取,然后分析测定其中各种砷的值来初步判断提取过程是否发生形态转化.本研究利用已知浓度的4种形态混合标准溶液在1%磷酸提取介质中经过超声0.75、1、2h提取后,发现三价砷的回收率依次为102%、98%、74%,五价砷的回收率依次为103%、104%、128%,一甲基砷和二甲基砷在100%—105%之间,可见超声2h条件下已经发生了明显三价砷和五价砷之间的形态转化,而在超声1h条件下还未观察到转化发生,究其原因一方面可能是长时间的超声提取导致温度升高,加快了反应速度,另一方面也有可能是超声条件下产生了某些种类的自由基,而自由基作为较强的氧化剂使得部分三价砷转化为五价砷^[8].

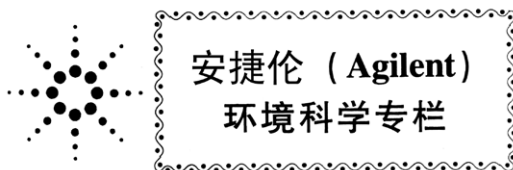
为了观察本提取条件下实际样品中是否发生形态转化,对样品进行加标回收实验,由于没有样品中含有一甲基砷,所以通过在样品中加入一定量的混合标准溶液得到模拟样品,测定模拟样品中4种砷的加标回收率分别为:三价砷98.56%—102.96%,二甲基砷90.67%—106.41%,一甲基砷96.62%—106.53%,五价砷92.20%—107.23%,结果表明在实际样品中4种砷也没有发生形态转化;对同一模拟样品分成6份,平行做6次提取,4种砷含量的相对标准偏差为三价砷1.59%,二甲基砷2.93%,一甲基砷2.77%,五价砷为1.29%.

3 结论

HPLC-ICP-MS方法由于其高选择性、强抗干扰能力等方面优点适合用于中成药中可溶性砷形态方面的研究,本研究结果表明,含矿物中成药牛黄解毒片、赛金花毒散、牛黄清火丸、医病丸中的可溶性砷占总砷的1%以下,其中主要以三价砷和五价砷的无机态存在,而含海产品的中成药乳核散结片中的可溶性砷除了无机砷外还含有二甲基砷,超声辅助提取较振荡提取更为简便、快速,且有更高的提取效率.结果表明,各种介质的提取效果差别不大,其中1%磷酸提取液可以提取率稍高且不发生形态转化,提取方法的稳定性也满足要求,该方法需要进一步在更多的中成药样品中应用,以建立中成药中可溶性砷形态分析的标准方法.

参 考 文 献

- [1] 陈光,林立,陈玉红.液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用(HPLC-ICP-MS)测定乳制品的无机砷及其它砷形态[J].环境化学,2009,28(04):608-611
- [2] 林立,陈光,陈玉红.液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用测定动物性海产品中的无机砷[J].环境化学,2009,28(01):149-152
- [3] 吕超,刘丽萍,董慧茹,等.高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定水产类膳食中5种砷形态的方法研究[J].分析测试学报,2010,29(05):465-468
- [4] 吴倩,梁琼麟,罗国安,等.六神丸可溶性砷形态的HPLC-ICP-MS研究[J].中国药科大学学报,2007,(04):332-335
- [5] 郝春莉,王庚,余晶晶,等.15种中药材中砷的形态分析[J].分析测试学报,2009,28(08):918-921
- [6] 许珺辉,王洪玮,崔蓉,等.雄黄及含雄黄中成药中砷的形态分析[J].药物分析杂志,2007,27(03):395-399
- [7] Koch I, Sylvester S, Lai V W, et al. Bioaccessibility and excretion of arsenic in Niu Huang Jie Du Pian pills[J]. Toxicology and Applied Pharmacol, 2007, 222(3): 357-364
- [8] Neppolian B, Doronila A, Ashokkumar M. Sonochemical oxidation of arsenic(Ⅲ) to arsenic(Ⅴ) using potassium peroxydisulfate as an oxidizing agent[J]. Water Research, 2010, 44: 3687-3695



生物液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定玩具中超痕量六价铬

宋娟娥 严 冬 曾祥程 张之旭

(安捷伦科技(中国)有限公司, 北京, 100102)

摘 要 建立了生物惰性高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(BioHPLC-ICPMS)测定超痕量三价铬和六价铬的分析方法. 该方法采用生物惰性液相色谱与 ICP-MS 联用, 对比数种色谱柱, 优化了 HPLC 和 ICP-MS 方法, 使得三价铬和六价铬检出限均达到 $5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$. 分别测定含六价铬 $5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合标准溶液 10 次, 六价铬的相对标准偏差(RSD)分别为 2.94% 和 1.75%. 该方法应用于玩具样品中六价铬分析, 进行了多组加标回收实验, 回收率在 90%—110% 之间, 进一步验证了该方法的准确性和适用性.

关键词 BioHPLC-ICPMS, 三价铬, 六价铬, 玩具, 欧盟法规 EN71.

人们对铬污染的关注由来已久, 究其原因主要有: (1) 铬在地壳中分布广泛, 如某一区域铬的环境本底值过高将会影响当地人畜健康; (2) 铬在工业生产中广泛使用, 如皮革、印染、电镀、玩具和涂料制造业等工业, 这些工业的废液进入环境, 将对环境和人类健康造成严重危害^[1-2].

铬表现为必需元素还是有害元素, 其价态起决定性作用. 三价铬是人体必需的微量元素, 人体缺三价铬会使糖代谢紊乱导致糖耐量异常, 引起动脉硬化及糖尿病等多种疾病^[3]. 六价铬被确认有致癌作用. 玩具是儿童接触最频繁的物品, 如果玩具中含有六价铬将对儿童造成重大损害. 因此铬的形态分析在环境科学和生命科学方面均具有重要的意义, 这就很好理解为什么欧盟最新玩具法规 EN71 对玩具中六价铬的限量要求非常严格. HPLC 与 ICP-MS 联用技术已经用于很多领域 Cr 价态的分析, 但针对欧盟法规中非常低的限量要求, 目前还未有在该领域有应用的报道.

电感耦合等离子体质谱(Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)具有高选择性、宽线性范围和低检出限等优势. 通过近年来高速发展的碰撞反应池技术, 有效解决了早期 ICP-MS 的缺陷——多原子分子对分析元素的干扰^[4]. 以铬分析为例, Cr 的主要同位素(质量数为 52 和 53)受到环境基体中普遍存在的氯化物、碳化物、氟化物和硫化物离子的干扰, 从而影响其定量分析的准确性. 而碰撞反应池技术可以有效消除基体干扰, 从而实现 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度水平检测铬元素的含量. HPLC-ICP-MS 联用技术结合了 HPLC 高效的分离与 ICP-MS 的超低检出限优势, 使三价铬和六价铬一次进样同时分析成为可能^[5].

本文通过优化 ICPMS 方法, 尝试不同类型 HPLC 及色谱柱, 并优化流动相组成、pH 值和流速等参数, 建立了超痕量 Cr(Ⅲ) 和 Cr(Ⅵ) 的分析方法, 并将其应用于多种玩具样品分析.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 7700x ICP-MS; Agilent 1260 Bio-HPLC; 硝酸(超纯, 电子级); EDTA(优级纯); 氨水(优级纯); 三价铬, 六价铬标准溶液.

1.2 仪器的工作参数

Bio-HPLC 色谱条件: Agilent BioWAX 阴离子交换色谱柱, $4.6 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; 流动相: $0.075 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸铵, 氨水调节 $\text{pH} = 7.0$; 流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 $100 \mu\text{L}$.

ICP-MS 的参数: 入射功率 1550 W ; 采样深度 8.0 mm ; 载气流速: $1.15 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 玻璃同心雾化器; 石英雾化室; 半导体控温于 2°C ; 镍采样锥和截取锥; 氦气碰撞反应池模式分析, 同位素: ^{52}Cr , 积分时间 0.8 s .

2 结果与讨论

2.1 色谱仪的选择

常规 HPLC 使用不锈钢材质, 不锈钢材质中铬含量为 12%—30%. 在使用流动相淋洗常规 HPLC 时, 难免会有微量

铬被洗脱. 而 Bio-HPLC 凡是和样品接触的部件均是由钛、陶瓷和 PEEK 制成. 这一设计完全避免了 HPLC 本身引入的铬污染, Bio-HPLC 的背景比常规 HPLC 低一个数量级.

2.2 色谱柱的选择

分别比较了 Agilent G3268-80001 和 Agilent BioWAX 以及 Hamilton PRP-X100 等 3 种色谱柱在最优化条件下的分离性能. 结果表明, Hamilton PRP-X100 柱以外, 其他两种色谱柱均可在 3 min 内使三价铬和六价铬达到完全基线分离. 其中 Agilent BioWAX 的分离度更佳(图 1).

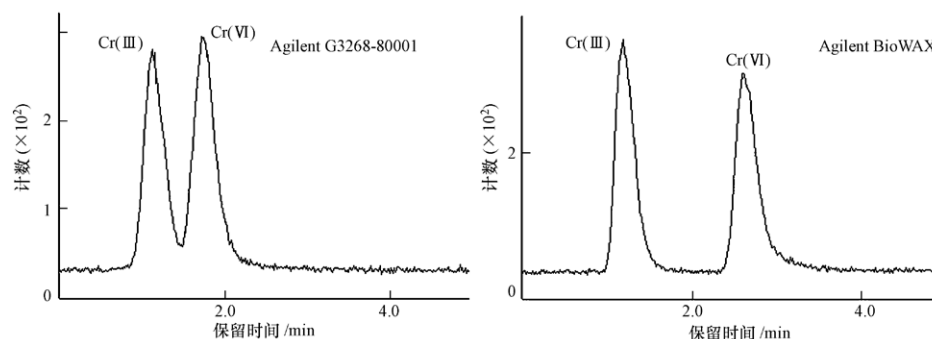


图 1 200 ng·L⁻¹不同色谱柱分离铬效果对比

2.3 硝酸铵的浓度

用 HPLC 进行分离时, 流动相离子强度会直接影响保留时间和分离度. 对不同浓度(0.05—0.15 mol·L⁻¹ 硝酸铵)的流动相进行对比. 实验表明, 随着硝酸铵浓度的增加, 保留时间缩短, 峰形有明显改善, 但 Cr(III) 和 Cr(VI) 分离度变差. 另外, 流动相离子浓度越大, ICP-MS 的维护频率越高. 因此, 综合考虑分离度, 峰性和大批量样品分析的时间成本, 流动相条件选择 0.075 mol·L⁻¹ 硝酸铵.

2.4 pH 的影响

流动相的 pH 对 Cr(III) 和 Cr(VI) 的价态有很大的影响. 当 pH 值为 5.5—7.0 时, Cr(III) 和 Cr(VI) 比较稳定. 当 pH 值大于 9 时, Cr(III) 生成沉淀, 信号严重降低; 而在酸性条件 pH 值小于 5 时, Cr(VI) 信号严重降低, 且部分会转化为 Cr(III). 综合上述因素, 最终选择欧盟玩具法规 EN71 推荐的 pH 7 这个条件.

2.5 检出限与精密度

考虑到玩具样品中三价铬的含量远高于六价铬, 在制备标准曲线时将三价铬和六价铬的标准储备溶液稀释配制成三价铬浓度为 50 μg·L⁻¹、六价铬浓度为 10 μg·L⁻¹ 的混合标准溶液, 再将此混合溶液分别稀释成三价铬为 25、50、100、250 ng·L⁻¹ 六价铬浓度为 5、10、20、50 ng·L⁻¹ 的混合溶液系列. 按照选定的仪器工作条件(进样量 100 μL), 根据色谱峰积分面积结果与浓度绘制校准曲线, 详见图 2. 结果表明, 在给定浓度范围内三价铬和六价铬均呈线性, 线性回归方程相关系数在 0.9998 以上.

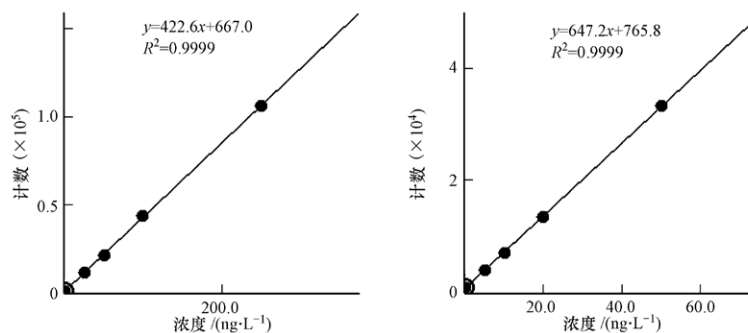


图 2 Agilent 1260 Bio-HPLC 与 Agilent 7700x ICP-MS 联用测定三价铬和六价铬的校准曲线

图 3 为进样量 100 μL 时三价铬和六价铬均为 10 ng·L⁻¹ 的 BioHPLC-ICPMS 谱图. 由图 3 可知, 所建立的方法灵敏度高, 完全可以满足浓度为 ng·L⁻¹ 级铬的价态分析要求. 在 HPLC-ICPMS 以色谱检测限定义: 信噪比(S/N) 为 3:1 时对应的浓度, 通过计算可得三价铬和六价铬的检测限分别为 5.2 ng·L⁻¹ 和 4.7 ng·L⁻¹. 由于欧盟玩具法规 EN71 要求溶液中六价铬的限量为 10 ng·L⁻¹, 因此重复测定 10 次浓度为 5 ng·L⁻¹ 和 10 ng·L⁻¹ 六价铬的标准溶液, 相对标准偏差分别

为 2.94% 和 1.75% . 进一步证明了该方法在测定超痕量六价铬时具有优越的精密度.

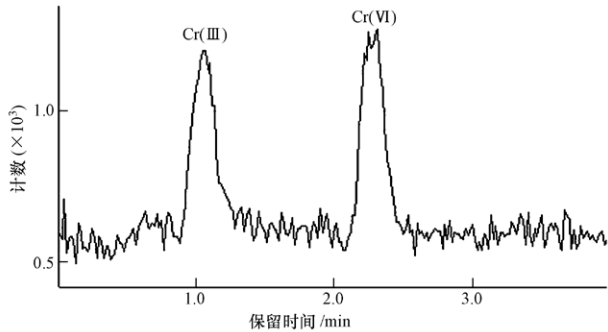


图3 三价铬和六价铬浓度均为 10 ng·L⁻¹ 的 BioHPLC-ICPMS 谱图

2.6 玩具样品分析与加标回收实验

按照欧盟法规 EN71 的前处理步骤对三类样品进行了测定, 并分别进行加标回收率试验(见表1). 由表1可见, 所测定的三类样品的加标回收率在 90%—110% , 证明该方法的准确度高, 能满足法规中三类样品的测定要求.

表1 三类玩具样品加标回收率

样品类型	样品处理方式	稀释倍数	加标/(ng·L ⁻¹)		实测/(ng·L ⁻¹)		回收率/%	
			Cr(Ⅲ)	Cr(Ⅵ)	Cr(Ⅲ)	Cr(Ⅵ)	Cr(Ⅲ)	Cr(Ⅵ)
I 类	加入 6 mmol·L ⁻¹ EDTA, 70 ℃ 加热 1 h	1000	/	/	15560	53.4	/	/
			50	10	15609	64.0	98.0	106.0
II 类	加入 0.6 mmol·L ⁻¹ EDTA, 70 ℃ 加热 1 h	500	/	/	17.8	N. D.	/	/
			50	10	67.3	9.70	99.0	97.0
III 类	加入 0.6 mmol·L ⁻¹ EDTA, 70 ℃ 加热 1 h	100	/	/	550	6.67	/	/
			/	10	549	16.4	/	97.3

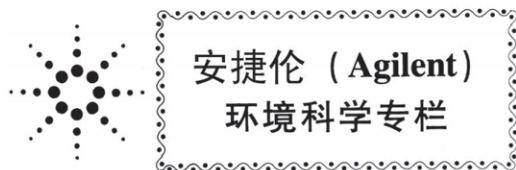
注: 以上稀释倍数均为样品按照 EN71-3 方法处理后所得到的稀释倍数

3 结论

本文将高灵敏度的 ICP-MS 与惰性材质的 Bio-HPLC 联用, 建立了超痕量铬形态分析的方法. 并将所建立的方法用于玩具分析并以加标回收实验验证了其对三类玩具样品的适用性, 方法准确、可靠, 为 EN71 法规规定的三价铬与六价铬分析测定提供了有用的参考.

参 考 文 献

[1] 徐衍忠, 秦绪娜, 刘祥红. 铬污染及其生态效应[J]. 环境科学与技术, 2002, (25): 8-9
[2] 李艳廷, 李芳. 环境中无机铬形态分析研究进展[J]. 化学研究与应用, 2000, 12(5): 476-481
[3] 陈德勋, 李玉珍. 岩矿测试[J]. 1999, 18(3): 171-175
[4] 王小如. 电感耦合等离子体质谱应用实例[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 271-280
[5] 王华建, 黎艳红, 丰伟悦, 等. 反相离子对色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定水中痕量 Cr(Ⅲ) 与 Cr(Ⅵ)[J]. 分析化学, 2009, 3(3): 433-436



润肤霜类化妆品中金属元素的测定及砷形态初探

林 立¹ 陈 光¹ 陈玉红²

(1 国家食品质量监督检验中心, 北京, 100094; 2 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京, 100102)

摘 要 采用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定化妆品中的金属元素铝、铬、镍、铜、锌、砷、硒、镉、锡、锑、钡、钼、铈、镧、钕、钐、汞、铅的总量,并结合液相色谱(HPLC)-ICP-MS联用技术考察了化妆品中的砷形态。研究表明,金属指标不合格的化妆品多为汞含量超标;此外,化妆品中的砷多以无机砷形式存在。

关键词 HPLC、ICP-MS、化妆品、金属元素、无机砷

2007年卫生部根据欧盟的《化妆品卫生规程》，发布了新的《化妆品卫生规范》。该规程修订了化妆品禁限用物质名单，增加了 790种禁用物质，现共有禁用物质 1286种，不仅对某些有毒有害重金属元素如汞、铅、砷、镉的限量进行了严格的规定，还对其它一些有害金属元素如锑、硒等元素及其化合物亦有相应的限制与规定。随着对金属元素毒理研究的深入，化妆品中需要关注的有害元素种类不断增加；并且，现有国家标准对金属元素的限量及相应的检测方法多是针对元素的总量，而某些元素总量的测定已不能满足安全监管的要求，上述观点在化妆品的安全性评价中已被一些专家提出。例如，近年来各种研究表明，砷的各种化合物中，无机砷的毒性最大，如 As(Ⅲ)与 As(Ⅴ)，有机砷的毒性较小，如 MMA, DMA, 而 A₃B, A₃C和砷糖常被认为是无毒的^[1-2]。因此，对化妆品中总砷的检测并不能完全真实地反映化妆品中砷毒性的

润肤霜是应用较为广泛的一种化妆品, 在日常生活中基本上天天都有接触。采用微波消解-HPLC法同时测定市售润肤霜类化妆品中的铝、铬、镍、铜、锌、砷、硒、镉、锡、锑、钨、钼、铈、镭、钆、钷、汞、铅等金属元素, 并利用 HPLC-ICPMS法考察了润肤霜类化妆品中的砷形态。所建方法具有灵敏度高、同时多元素分析、准确、实时、快速等优点。本文对部分市售润肤霜类化妆品中的金属元素与砷形态进行分析, 对化妆品进行更加科学的安全性评价提供了基础数据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 四元梯度泵 .Milli-Q 超纯水系统 (Millipore, Element) .Agilent 7500a/ce 电感耦合等离子体质谱仪 .色谱柱: 阴离子保护柱 bnPac AG 19 (50 mm ×4 mm, 11μm); 阴离子分析柱 bnPac AS 19 (250 mm ×4 mm, 7.5μm) .

流动相: A相 (2 mmol · l⁻¹ 磷酸二氢钠 / 0.2 mmol · l⁻¹ 乙二胺四乙酸二钠 / 10 mmol · l⁻¹ 无水乙酸钠 / 3 mmol · l⁻¹ 硝酸钾, pH = 10.5—11.3); B相 (无水乙醇); A + B (99% + 1%) 混合等度淋洗; 流速 1.0 ml · min⁻¹; 进样量: 10 μl. 砷甜菜碱 (AsB)、一甲基砷 (MMA)、二甲基砷 (DMA)、砷酸根 (AsⅢ)、亚砷酸根 (AsⅤ) 的标准储备溶液, 混合标准溶液系列由标准贮备液以超纯水逐级稀释配得. 水相滤膜: 0.45 μm.

1.2 样品处理方法

1.2.1 总量分析

称取润肤霜类化妆品样品 0.5g 于微波消解管中, 加入 4ml 浓硝酸, 放置过夜, 设定适合的微波消解程序, 样品消解后定容至 25ml 比色管中, 样液导入电感耦合等离子体质谱仪中进行测定

1.2.2 砷形态分析

称取润肤霜类化妆品样品 2.0 g 于锥形瓶中, 加入 20 mL $0.07\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的盐酸溶液, 涡旋混匀后, 超声萃取 40 min, 在电热板加热, 刚煮沸后立刻趁热过滤, 滤液过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜于 1.5 mL 离心管中, 以 $8000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 吸取清液注入液相色谱仪进行分析。

2 结果与讨论

2.1 润肤霜中金属元素总量分析结果

按 1.2.1 的样品处理方法对市售的 30 种不同品牌的润肤霜, 采用微波消解-ICPMS 法对其中的铝、铬、镍、铜、锌、砷、硒、镉、锡、锑、钡、镧、铈、镨、钕、钆、铽、铈、铉、铊等元素进行总量测定, 结果见表 1。

表 1 市售 30 种化妆品中各金属元素的含量

元素	含量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	元素	含量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
铝	0—5 (24 个); 300—500 (6 个)	锡	0.003—0.51
铬	0.003—0.27	锑	0.001—0.050
镉	0.008—0.026	钡	0.005—3.0 (28 个); 500—600 (2 个)
铅	0.02—0.68	镧	未检出—0.080
镍	0.02—0.33	铈	0.0009—0.2
铜	0.03—5.2	镨	未检出—0.02
锌	0.8—66	钕	0.0009—0.080
砷	0.04—1.2	钆	未检出—0.02
硒	0.005—0.1	铽	未检出—0.03 (22 个); 16—15000 (8 个)

由上表可知, 化妆品中汞含量超标的现象最为严重 (国家标准限量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 个别样品中的铝和钡含量较高。此外, 国家标准对化妆品中砷的限量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 所考察的样品中砷虽未超标, 但某些样品中还是检出了一定量的砷。鉴于砷存在多种不同的形态, 有些毒性极大 (如无机砷), 而有些对人体损害较小, 因此有必要进一步对化妆品中的砷形态进行进一步考察。

2.2 润肤霜中砷的形态分析

选择上述 30 种润肤霜中含有砷的 5 种样品, 按照 1.2.2 的方法进行砷形态分析。对于本文所选的砷形态分析色谱条件的优化可参见文献 [3, 4]。因化妆品在提取过程中易于乳化, 本文着重研究了此类样品的前处理方法。

2.2.1 砷形态分析前处理方法

对润肤霜类的化妆品来说, 或多或少都含有一定的乳化剂, 这些乳化剂易在提取过程中使溶液形成乳浊液, 从而导致难以分层过滤。常用的乳化方式有添加氯化钠、加温或在冰箱中静置^[5]。其中, 添加氯化钠的方式会造成样品溶液中盐分含量增加, 同时氯化物对砷的检测可能造成一定影响^[6], 且乳化效果并不十分理想。本文通过对以上几种破乳化方式的尝试, 最终选择加热的方式破乳化。发现大部分样品均能满足要求, 只有极少数样品还是不能达到破乳的要求。对加热后未完全破乳化的样品热滤后以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速于 4°C 离心 10 min , 取清液上机进行检测。由于破乳化过程中对样品进行了加热, 将 5 种砷的化合物混合标准溶液按上述步骤平行处理后上机检测, 考察该过程中各种砷形态的损失与转化情况。结果表明, 所考察的无机砷与有机砷在该条件下不会相互转化, 但是三价砷会部分氧化为五价砷, 即无机砷彼此之间互相转化; 该处理过程不会造成砷的损失, 完全满足实验的要求。

2.2.2 实际样品分析

按照所建立的方法对已检出砷的 5 种润肤霜进行砷形态分析, 结果见表 2。由表 2 可知, 化妆品中的砷主要以无机砷形式存在, 其含量接近于总砷含量。

表 2 润肤霜样品中砷的含量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

序号	As(III)	As(V)	无机砷	总砷
1	0.021	0.128	0.149	0.168
2	0.004	0.311	0.315	0.309
3	0.135	1.125	1.260	1.210
4	0.006	0.069	0.075	0.082
5	0.003	0.095	0.098	0.105

2.2.3 无机砷回收率测定

以某品牌的润肤霜打底, 进行无机砷的加标回收试验。准确称取多份平行样, 分别添加不同浓度水平的 As(III) 与 As(V) 标准溶液, 使得最终定容溶液中 As(III) 与 As(V) 的加标浓度各为 5.0 与 $100.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按 1.2.2 处理后上机测定。计算样品中无机砷的回收率, 结果详见表 3。由表 3 可知, 各加标水平的回收率在 $88.2\%—109.9\%$, 相对标准偏差为 $3.2\%—3.9\%$ ($n=6$)。

表 3 润肤霜中无机砷的加标回收率 (%) ($n=6$)

平行次数	各加标 $5.0 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	各加标 $100.0 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$
1	109.9	91.7
2	105.7	98.5
3	101.7	93.7
4	100.8	92.4
5	105.4	96.6
6	102.3	88.2
平均回收率 /%	104.3	93.5
相对标准偏差 /%	3.2	3.9

参 考 文 献

[1] Beard C, Lysterlyl A, Separation of Arsenic from Antimony and Bismuth by Solvent Extraction [J] . *Anal Chem.* , 1961, **33** (12) : 1781—1782

[2] Zhang X, Vanderbiesen V, Cubber A D, Accumulation of Arsenic Species in Serum of Patients with Chronic Renal Disease [J] . *Clin. Chem.* , 1996, **42** (8) : 1231—1237

[3] 林立, 陈光, 陈玉红, 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用测定白酒中的无机砷. 环境化学, 2008, **27** (6) : 150—152

[4] 林立, 陈光, 陈玉红, 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用测定海产品的无机砷. 环境化学, 2009, **28** (1) : 149—152

[5] 李正要, 汪莉, 采存义等, 乳化液废水处理方法, 北京科技大学学报, 2003, **25** (3) : 203—206

[6] 王小如, 电感耦合等离子体质谱应用实例. 化学工业出版社, 2005, 263

DETERM INATION OF METAL ELEMENTS AND INVESTIGATION
ON ARSENIC SPECIES IN CREAM COSMETICS

LI N Li¹ CHEN Guang¹ CHEN Yu-hong²

(1 China Food Quality Safety Supervision and Inspection Center, Beijing , 100094, China;

2 Agilent Technologies Co. , Ltd. , Beijing , 100022, China)

ABSTRACT

The determination method of the total metal elements including Al, Cr, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Sn, Sb, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Hg, Pb and arsenic species in cosmetics was developed by using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and HPLC-ICMS respectively. It was found that the content of mercury was usually at high levels and arsenic species was mainly inorganic in most cosmetics products.

Keywords: ICP-MS, HPLC-ICMS, cosmetics, inorganic arsenic

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/icpms

安捷伦客户服务中心：

免费专线：800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

Q 安捷伦视界

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020 年 02 月 03 日，中国出版
5994-1551ZHCN