

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

* 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 °C 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 种砷、5 种硒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.

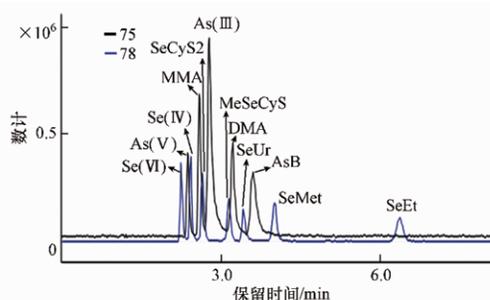


图 1 SB-Aq 分离色谱图

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 种砷、5 种砷形态, 发现 7.5 min 内可以同时完全分离 7 种砷、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.