



## HPLC-ICP-MS

作者:

Eve M. Kroukamp

PerkinElmer, Inc.  
Woodbridge, ON, Canada

## 使用 NexSAR HPLC-ICP-MS 形态分析就绪解决方案表征苹 果汁中的砷形态

### 引言

苹果汁是维生素、矿物质和膳食纤维的宝贵来源，是一种健康的饮品。也是许多父母给孩子作为代替碳酸饮料的首选。<sup>1</sup>

然而，人们对苹果汁<sup>2</sup>中砷的存在日益担忧，因为苹果汁中的砷含量很高，并且以往使用的杀虫剂中含有砷，而这种溶液的砷在使用后可能会在土壤中存留数十年之久。这由于涉及儿童的食物安全特别令人关注，因为儿童比成人产生的剂量反应更敏感。<sup>3</sup>

尽管从砷的总量分析中可获得有用的信息，但它提供的关于砷的影响也可能是片面的，因为不同化学形态的砷具有不同水平的毒性。相比之下，形态研究能够提供大量关于毒性的信息，因此研究与元素的化学形态以及每个形态的相对丰度有关。对于砷来说，无机形式（亚砷酸盐[As III]和砷酸盐[As V]）毒性最大，而甲基化的砷（二甲基砷酸[DMA]、一甲基砷酸[MMA]等）毒性较小。因此，美国食品和药物管理局设置的苹果汁中无机砷的限值为 10µg/L，<sup>4</sup> 大于此限值的浓度会对儿童带来中毒反应。<sup>1、2、3、5</sup>

为了分离不同化学形态的砷，通常使用色谱技术，如 HPLC，其中 ICP-MS 是许多分析实验室选择的检测器。这是因为它的线性动态范围宽，检测限低，以及具备分辨复杂干扰的能力。对于除了 As 以外的分析物，ICP-MS 具有分辨元素同位素的额外能力，能够让用户使用同位素稀释法，大大提高了分析的准确度。

HPLC-ICP-MS 用户面临的挑战是大多应用在强酸中或强碱流动相使用盐缓冲液，以实现想要的不同化学形态元素基线分离。在金属系统中，这种极端情况可能会导致泵和自动进样器部件在长期使用过程中受到腐蚀，而对于与流动相接触的组件，这种影响会更加明显。尽管这些系统可以在某种程度上用 20% HNO<sub>3</sub> 冲洗进行钝化，但腐蚀也还是存在。<sup>10</sup> 任何形成的铁锈都有可能脱落、堵塞，有时还会对昂贵的色谱柱造成不可逆转的损害。使用 NexSAR HPLC 系统可以有效防止这种问题，该系统具有的惰性、非金属管路解决了生锈问题。此外，使用这种设计可以确保其他分析物的背景低，这些分析物通常在痕量形态应用中具有分析价值，例如 Cr 和 Fe。

对于用户来说，还有更多的挑战，尽管对泵有着合理的操作，每天结束时用弱有机溶液冲洗泵，盐晶体仍可能在泵密封后形成。这会对密封处造成损害，影响分析结果，并且增加维修成本，增加仪器停机时间。这个问题可以通过使用 NexSAR HPLC 泵有效缓解，它具有密封后清洗的能力，在泵密封后主动清洗，减少密封处磨损。此项研究中，商品苹果汁中的四个砷形态用高效液相色谱法测定，这种方法是为了实现能快速、准确地分离和分析低浓度 As 形态。这种可靠且经验证过的方法由 Ernstberger 等人<sup>7,8</sup> 开发，用于定量苹果汁中常见的各种砷形态 (As III、As V、DMA、MMA)，从而评估其潜在毒性。这项分析使用珀金埃尔默 NexSAR™ HPLC-ICP-MS 解决方案进行，它由 NexSAR HPLC 系统联用 NexION® ICP-MS 组成，包括洗脱用的 NexSAR 色谱柱恒温箱恒温控制。

## 实验

### 样品制备

使用流动相制备下列物质 0.1、0.5、1、5、10 和 20µg/L 浓度的标准溶液：As (III) 的 999±5 mg/L 亚砷酸盐 (美国弗吉尼亚州克里斯琴堡, Inorganic Ventures 公司)，As (V) 的 1003±6 mg/L 砷酸盐 (美国密苏里州圣路易斯, Sigma Aldrich, 二甲基砷酸, 大于 99.0%) 和 MMA 来自 1000mg/L MMA (美国宾夕法尼亚州西切斯特, Chemservice)。选择这些形态是因为它们在以前曾经在苹果汁分析中被研究。<sup>6, 7</sup> 选择的浓度取决于美国食品和药物管理局规定的无机砷当前检测水平的浓度范围。<sup>4</sup>

使用酸性流动相 (pH4.0) 进行分析，此方法在以前就已经证明可准确对应苹果汁 pH 值，同时也确保了各种砷形态的完整性。<sup>7</sup>

四种常见的商品苹果汁在当地杂货店售卖。不考虑这些果汁在货架上放置时间。众所周知，各种砷的化学形态处于平衡状态，并在商品苹果汁中稳定储存很长时间。<sup>6,7</sup> 果汁在取样前经过完全摇晃确保均匀，每种苹果汁取 50mL 后用 0.45µm 聚四氟乙烯滤头 (亲水, Millex 和西格玛奥德里奇) 过滤，去除不要的微粒物质。直接对未稀释的样品进行分析。

在这项工作中，需制作校准标准，并重复分析四个苹果汁样品。将这四个样品倒进许多不同的塑料 HPLC 瓶中。空白样品在每个苹果汁后分析，用来检查样品之间的残留。因为缺乏有证标准物质，每种形态通过 2µg/L 和 10µg/L 加标确保准确性 (As III、As V、DMA 和 MMA)。

## 仪器

所有分析使用 NexSAR 形态分析 HPLC 系统 (珀金埃尔默公司, 美国康涅狄格州谢尔顿市)，它由 NexSAR 200 惰性 HPLC 泵、NexSAR 冷却惰性自动进样器、NexSAR 带脱气器的溶剂托盘和 NexSAR 柱温箱 (珀金埃尔默公司) 组成。此系统联用 NexION ICP-MS (珀金埃尔默公司)。关于 HPLC 和 ICP-MS 的具体情况分别如表 1 和表 2 所示，它们参考自以前的研究。<sup>7</sup> 在方法开发过程中，监测 m/z 75 和 77 以检查 75As<sup>+</sup> 上是否存在 75ArCl<sup>+</sup> 干扰。因为没有检测到 ArCl<sup>+</sup>，剩下的研究中用标准模式进行样品分析。所有分析和数据收集使用 Clarity™ 软件 8.1 版操作。

表 1 NexSAR 惰性 HPLC 系统情况。

参数	要求
色谱分析法	反相离子对色谱分析法
流动相	离子对试剂
pH	4.0
洗脱模式	等度
进样体积	20µL
进样瓶	高效液相色谱测试聚丙烯瓶, 1.5mL

表 2 NexION ICP-MS 仪器条件。

参数	要求
雾化器	MEINHARD® 加上玻璃类型 C
雾室	玻璃气旋
射频功率	1600W
中心管	2.0mm 石英内径
雾化气流量	<2% 氧化物最佳
模式	标准
驻留时间	100ms
采样速率	10 points/sec

## 结果与讨论

As V、MMA、As III 和 DMA 标准物质 (0.1–20 $\mu\text{g/L}$ ) 的相关系数分别为 0.99990、0.99999、0.99999 和 0.99998 (图 1)，图 2 所示为校准标准重叠。后者 (图 2) 显示泵的流速可靠而一致，表示无论浓度多少，保留时间都有极佳的重现性。

由于 NexSAR HPLC 系统的惰性流体通道，砷的色谱基线可以忽略不计，其中 0.1 ppb 标准物质的信噪比 (S/N) 在 12 到 7 之间，适用于砷的各种化学形态。

这使得砷的检测水平远低于美国食品和药物管理局的要求限值，也确保了化学形态，如低丰度的 MMA，可以很容易地定量。化学形态的检测对毒性有更全面的看法，这一点很重要，这些化学形态存在于低浓度中。另外，研究中使用了质量平衡公式，定量分析物能达到痕量水平这个会大大地提高分析物的回收率，从而提高此类结果的整体质量。

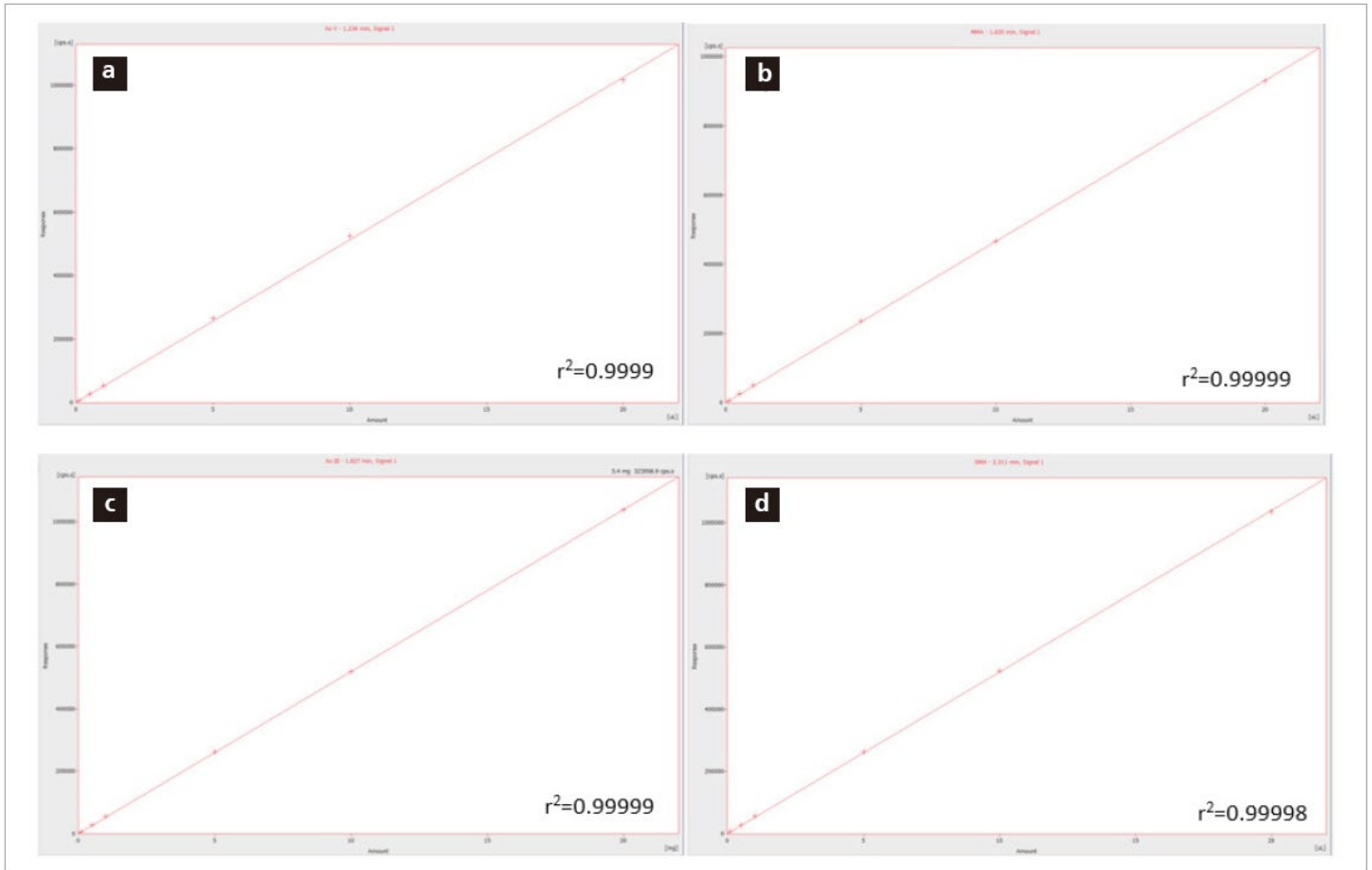


图1 流动相中 (a) As V, (b) MMA, (c) As III 和 (d) DMA 在 0.1–20 $\mu\text{g/L}$  校准标准浓度的线性回归和相应相关系数。

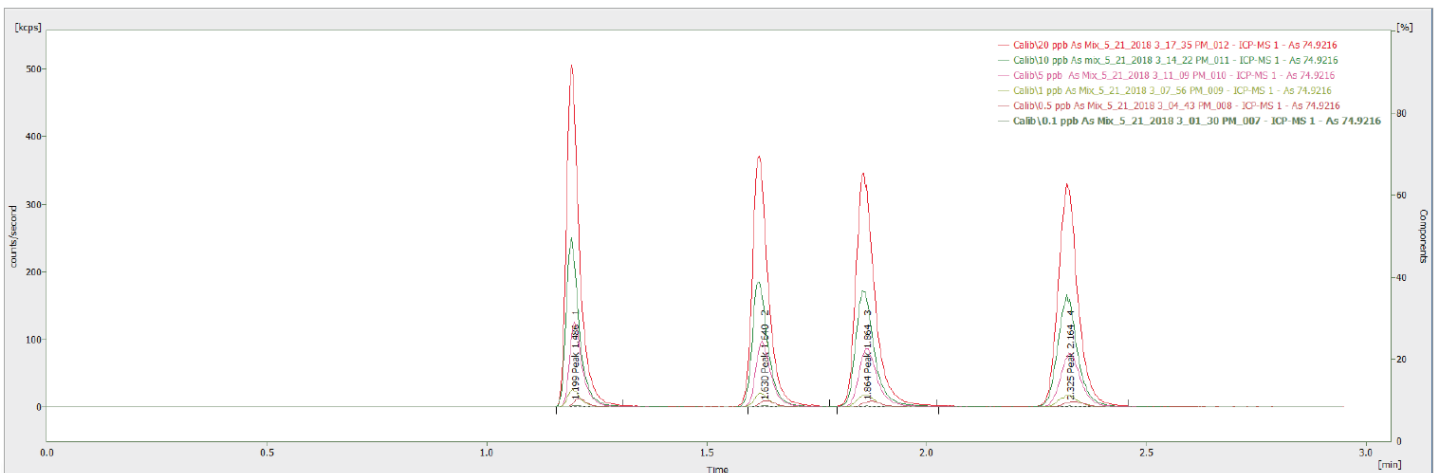


图2 色谱图显示 pH 值为 4 的流动相中校准标准 (0.1–20 $\mu\text{g/L}$ ) 重叠。

苹果汁基质复杂，所对于未稀释样品要得到复现性结果时具有挑战性。此项研究中发现，注射不同样品瓶中的相同样品具有极佳复现性（图 3），所有分析物的相对标准差（% RSD）低于 2%。另外，样品和校准标准的低色谱基线中可忽略的波动证明了该技术在不同基质中的稳定性，以及此应用中 HPLC 检测用的塑料小瓶的合适性。重叠部分也表示，进样量是十分稳定的，每次注入时都近乎一致。需要指出，更高质量的溶剂和化学物品能降低色谱基线（S/N）。因此，图 3 显示，低 ppt 的分析物可以准确定量，其中这项研究中 As V、MMA、As III 和 DMA 的浓度分别是 0.94、0.09、0.77 和 0.20 $\mu\text{g/L}$ ，最低浓度的分析物（MMA）的 S/N 是 6。

图 3 还显示，完全分离和准确定量每个样品苹果汁中已发现的四种最常见和最相关的砷的形态可以在三分钟内完成。这种洗脱时间是五分钟，比砷形态研究中使用的传统技术快，如阴离子交换色谱法。

这项工作没有制定内部标准，显示的重现性表示不需要内部标准；然而，如果需要内部标准，而以前的研究已经显示了砷甜菜碱（AsB）可以在三分钟后使用合适的方法洗脱。<sup>7</sup> 每个苹果汁样品之后的空白分析表明注入间无残留。无残留极为重要，尤其是在商业实验室，样品之间冲洗的减少意味着减少溶剂使用、降低管理费用和提高生产率。

为了评估苹果汁基质对分析准确性的影响，将每种砷形态的低浓度（2 $\mu\text{g/L}$ ）和高浓度（10 $\mu\text{g/L}$ ）加标溶液加入未稀释样品中。图 4 显示 2 $\mu\text{g/L}$  和 10 $\mu\text{g/L}$  加标的色谱图与样品的比较。与纯样品相比发现，加标样品的保留时间相似，加标回收率也很好，每种砷形态在 99%-111% 之间（As V、MMA、As III 和 DMA 的 2 $\mu\text{g/L}$  加标回收率分别为：103、111、100 和 99%，10 $\mu\text{g/L}$  加标为：106、103、111 和 101%）。这证明了此方法在较大线性动态范围内的准确性高，并表明样品可以以相对简单的方式制备。

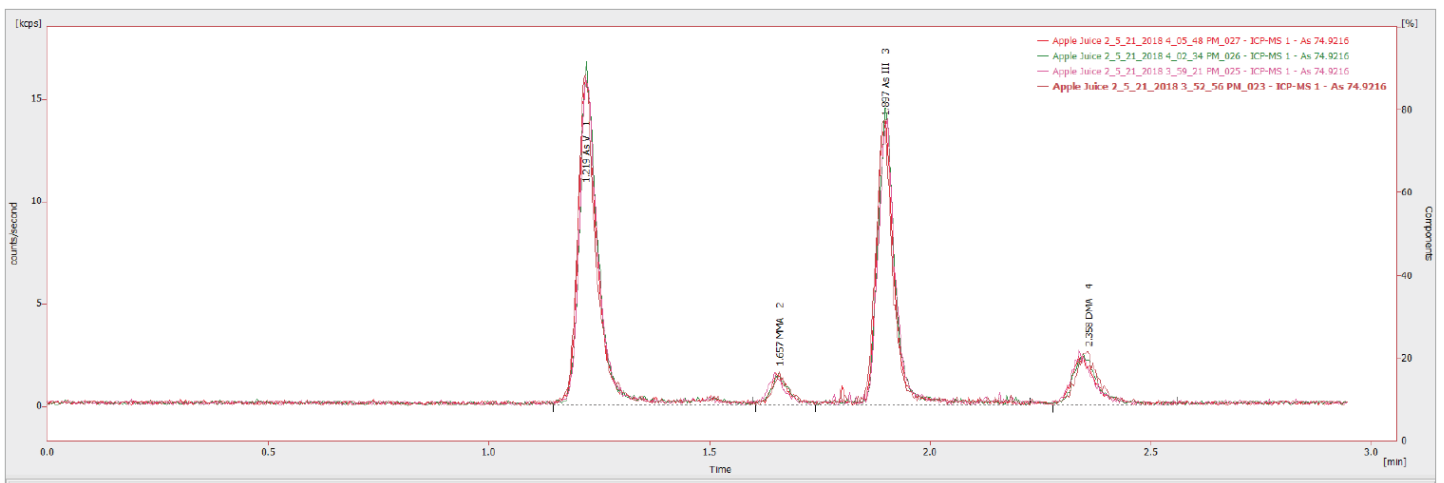


图3 色谱图显示四种不同样品瓶未稀释苹果汁样品的注入量（20 $\mu\text{L}$ ）。

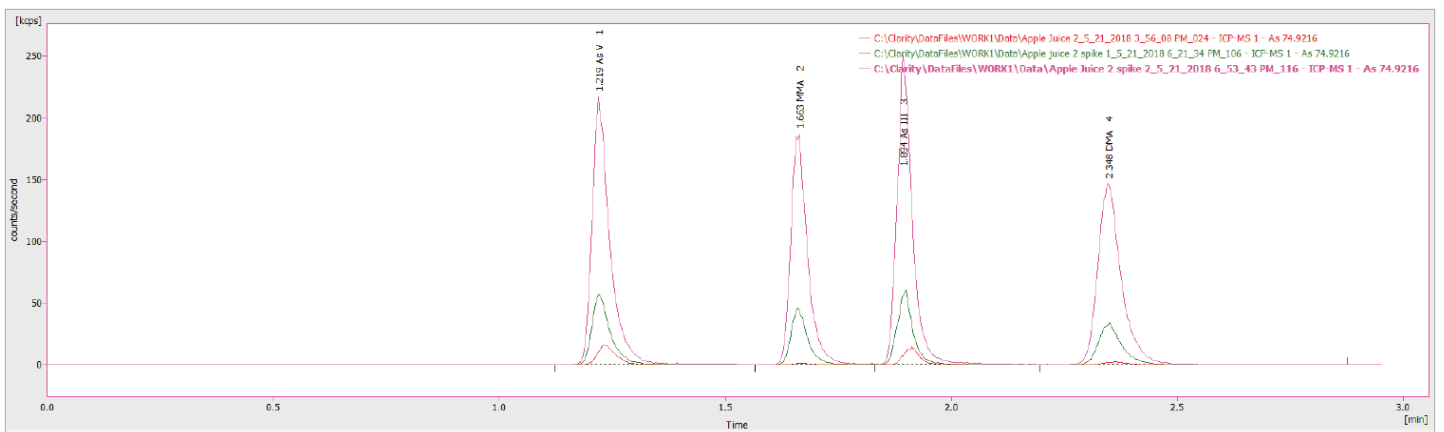


图4 未稀释苹果汁样品与低浓度（2 $\mu\text{g/L}$ ）和高浓度（10 $\mu\text{g/L}$ ）加标样品的色谱图。

图 5 显示了数据收集的结果。如以前的研究中所发现的，砷的主要形态是无机形式 As III 和 As V，DMA 是第三丰富的，而 MMA 只存在于少数样品中。<sup>6, 7</sup> 很明显，每种苹果汁都含有各种不同浓度的化学形态砷，但是所有样品中无机砷<sup>5</sup>的操作限值在 16-34% 之间变动，低于美国食品和药物管理局规定的毒理学关注阈值。<sup>4</sup>

## 结论

本研究显示，使用反相离子对法可在三分钟内完全分离和准确量化市面上可买到的苹果汁中主要的砷形态，包括主要的毒性形式 (As III 和 As V)。这项工作使用 NexSAR HPLC-ICP-MS 形态分析解决方案操作，其中浓度单位为  $\mu\text{g/L}$  和  $\text{ng/L}$ 。本研究分析的所有苹果汁样品中无机砷的浓度小于美国食品和药品管理局建议的检测限值  $10\mu\text{g/L}$ 。<sup>4</sup>

通过对重复性、残留和加标回收率的研究，证明了所提出方法具有的优势以及设备的可靠性和稳定性。另外，NexSAR 泵和自动进样器的惰性管路以及泵在密封后清洗确保了样品可以在低酸碱度 (本研究中的 pH 值为 4.0) 和盐缓冲液下正常操作，不会有腐蚀和严重损坏密封的风险。

## 参考文献

- Gerhauser C. 2008. Cancer Chemopreventive Potential of Apples, Apple Juice, and Apple Components, New York: Planta Medica DOI: 10.1055/s-0028-1088300.
- Wilson D, Hooper C, Shi W. 2012. Arsenic and Lead in Apple Juice: Apple, Citrus and Apple-Base, Journal of Environmental Health, 75: 14-21.
- de Burbure C, Buchet JP, Leroyer A, Nisse C, Haguenoer JM, Mutti A, Smerhovsky Z, Cikrt M, Trzcinka-Ochocka M, Razniewska G, Jakubowski M, Bernard A. 2006. Renal and Neurologic Effects of Cadmium, Lead, Mercury, and Arsenic in Children: Evidence of Early Effects and Multiple Interactions at Environmental Exposure Level, Environmental Health Perspective, 114: 584-590.
- FDA. 2013. Supporting Document for Action Level for Arsenic in Apple Juice. FDA-2012-D-0322.
- Bhattacharya P, Welch AH, Stollenwerk KG, McLaughlin MJ, Bundschuh J. 2007. Arsenic in the Environment: Biology and Chemistry, Science of the Total Environment, 379: 109-120.
- Neubauer K, Perrone P, Reuter W. 2012. Determination of Arsenic Speciation in Apple Juice by HPLC/ICP-MS. PerkinElmer Application Note.
- Ernstberger H, Neubauer K. 2015. Accurate and Rapid Determination of Arsenic Speciation in Apple Juice, PerkinElmer Application Note.

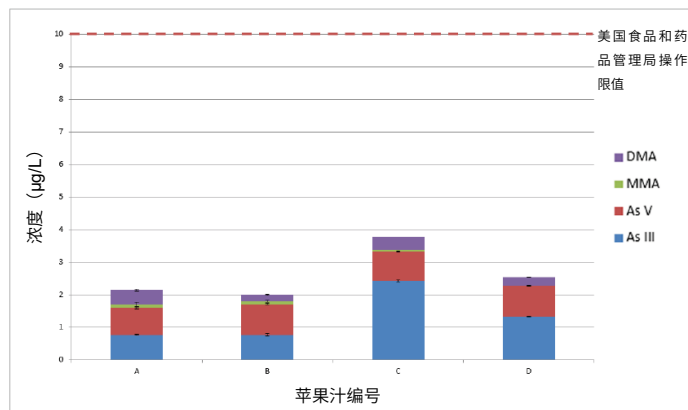


图 5 四种商业生产的苹果汁中 As III、As V、MMA 和 DMA 的平均浓度和操作限值  $10\mu\text{g/L}$  比较，误差条显示了重复分析的标准偏差。

## 使用的消耗品

成分	说明	零件号码
反相色谱柱	4.6mm 内径 x250mm, 5µm	N8145326
HPLC 进样瓶	高效液相色谱测试塑料瓶, 1.5mL 聚丙烯	N9301736
聚醚醚酮管	黄色, 0.007 英寸内径, 1/16 英寸外径 (5 英尺)	N9302678
聚醚醚酮配件	用手指拧紧外径为 1/16 英寸的聚醚醚酮管	09920513
雾化器连接器	柱玻璃同轴喷雾器连接器	N8152484

- Ernstberger H, Neubauer K. 2015. HPLC, ICP/MS Sniff Out Arsenic in Apple Juice: The Use of Ion Pairing Chromatography with Cation Pairing Reagent Enables Faster Run-Time and Lower Detection Capability during the Analysis of Arsenic in Apple Juice. Chromatography Techniques, p10.
- Heitland P, Köster HD. 2008. Fast Determination of Arsenic Species and Total Arsenic in Urine by HPLC-ICP-MS: Concentration Ranges for Unexposed German Inhabitants and Clinical Case Studies. Journal of Analytical Toxicology 32: 308-314.
- Liquid Chromatography Problem Solving and Troubleshooting. 1994. Journal of Chromatographic Science 32:524 <https://doi.org/10.1093/chromsci/32.11.524>

珀金埃尔默企业管理 (上海) 有限公司  
 地址: 上海 张江高科技园区 张衡路 1670 号  
 邮编: 201203  
 电话: 021-60645888  
 传真: 021-60645999  
[www.perkinelmer.com.cn](http://www.perkinelmer.com.cn)

欲获悉全球办事处的完整清单, 请登录 [www.perkinelmer.com/ContactUs](http://www.perkinelmer.com/ContactUs)

版权©2016, 珀金埃尔默公司。版权所有。PerkinElmer®是珀金埃尔默公司的注册商标。所有其他商标属于相应所有者的财产。

  
**PerkinElmer**<sup>®</sup>  
 For the Better