

尿中砷形态测定 液相色谱-原子荧光法

Determination of urinary arsenic speciation —

liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry

2018 - 09 - 17 发布

2019 - 03 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：北京市疾病预防控制中心、重庆市疾病预防控制中心、广东省疾病预防控制中心、安徽省疾病预防控制中心、北京朝阳医院、山西省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：刘丽萍、王小艳、张妮娜、张洁、王晶、韦莹、李惠玲、郭舒岗、陈绍占、戴锐睿。

尿中砷形态测定 液相色谱-原子荧光法

1 范围

本标准规定了测定尿中砷形态（亚砷酸盐[As（III）]、砷酸盐[As（V）]、一甲基砷（MMA）和二甲基砷（DMA））的液相色谱-原子荧光法。

本标准适用于尿中砷形态（亚砷酸盐[As（III）]、砷酸盐[As（V）]、一甲基砷（MMA）和二甲基砷（DMA））的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

尿样按一定比例稀释后，以液相色谱进行分离，分离后的目标化合物在酸性介质下与硼氢化钾（ KBH_4 ）反应，生成气态砷化合物，用原子荧光光谱仪进行测定，保留时间定性，以峰高或者峰面积绘制标准曲线法定量。

4 仪器

4.1 玻璃器皿均需以硝酸溶液（1+4）浸泡 24 h，用水反复冲洗，最后用纯水冲洗干净。

4.2 液相色谱-原子荧光光谱联用仪。

4.3 pH 计（精度 0.01）。

4.4 电子天平（感量 0.1 mg）。

4.5 超声波清洗器。

4.6 离心机，转速 ≥ 8000 r/min。

4.7 纯水制备仪。

5 试剂

5.1 实验用水及试剂要求：除非另有说明，本方法所用试剂均为优级纯，纯水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 盐酸（HCl， $\rho=1.19\text{ g/mL}$ ）。

5.3 氢氧化钾（KOH）。

5.4 硼氢化钾（KBH₄）。

5.5 磷酸氢二铵[(NH₄)₂HPO₄]。

5.6 甲酸（HCOOH，99%）。

5.7 标准物质：亚砷酸根（AsO₃³⁻），砷酸根（AsO₄³⁻），一甲基砷（CH₃AsO₃⁻），二甲基砷（C₂H₅AsO₂⁻）均为有证标准物质。

6 试剂配制

6.1 载流，盐酸溶液（7+93）

量取 70 mL 盐酸，用纯水稀释至 1000 mL。

6.2 还原剂（20 g/L 硼氢化钾溶液-3.5 g/L 氢氧化钾溶液）

称取 3.5 g 氢氧化钾溶解于 900 mL 纯水中混匀，加入 20 g 硼氢化钾，用纯水稀释至 1000 mL，混匀。

6.3 甲酸溶液（10+90）

量取 10 mL 甲酸用纯水稀释至 100 mL。

6.4 流动相（15 mmol/L 磷酸氢二铵溶液）

称取 1.98 g 的磷酸氢二铵溶解于 1000 mL 纯水中，用甲酸溶液（10+90）调节 pH 至 6.0，超声脱气 5 min，备用。

6.5 砷形态标准溶液配制

6.5.1 砷形态标准储备溶液[$\rho(\text{As})=10.0\text{ mg/L}$]：分别准确称取适量亚砷酸根、砷酸根、一甲基砷、二甲基砷四种砷形态标准物质，用纯水配制成含砷浓度为 10.0 mg/L 的砷形态单标标准储备溶液，置于 4 °C 冰箱中保存。

6.5.2 砷形态混合标准溶液[$\rho(\text{As})=1.0\text{ mg/L}$]：分别准确移取 10.0 mg/L 的四种砷形态单标标准储备溶液 1.00 mL 置于 10 mL 容量瓶中，用纯水定容至刻度，现用现配。

6.5.3 砷形态混合标准使用系列溶液[$\rho(\text{As})=0\sim 100.0\ \mu\text{g/L}$]: 分别准确移取一定量的 1.0 mg/L 砷形态混合标准溶液, 用纯水逐级稀释成 0.0 $\mu\text{g/L}$ 、2.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、50.0 $\mu\text{g/L}$ 、100.0 $\mu\text{g/L}$ 四种砷形态混合标准系列使用溶液, 现用现配。

7 样品收集、运输和保存

收集不少于 10 mL 尿液, 置于洁净的聚丙烯塑料或玻璃试管中, 严密封口以防蒸发。现场收集尿样后, 在 4 °C 下保存运输; 样品应该尽快测定, 在 4 °C 下可保存 30 d。

8 分析步骤

8.1 试样的前处理

取 1 mL 均匀的尿样用纯水稀释 3 倍, 用 0.45 μm 水系滤膜过滤后上机测定。如果尿样中有沉淀, 先将尿样离心 10 min (8000 r/min), 取一定量的上清液按以上方法测定。如果样品中砷形态浓度超过标准曲线上限, 则将尿样按一定比例稀释后测定。

8.2 液相色谱参考条件

8.2.1 色谱柱条件: 阴离子交换色谱柱 (柱长 250 mm, 内径 4.1 mm), 或等效柱。阴离子交换色谱保护柱 (柱长 25 mm, 内径 2.3 mm), 或等效柱。

8.2.2 流动相组成: 15 mmol/L 磷酸氢二铵溶液 (pH=6.0) 作为流动相, 1.0 mL/min 流速洗脱, 进样体积为 100 μL 。

8.3 原子荧光检测参考条件

原子荧光检测参考条件如下:

- 光电倍增管负高压: 280 V;
- 砷空心阴极灯总电流: 90 mA;
- 辅阴极灯电流: 40 mA;
- 原子化方式: 火焰原子化;
- 原子化器温度: 中温;
- 氩载气流量: 300 mL/min;
- 氩屏蔽气流量: 600 mL/min;
- 还原剂: 20 g/L 硼氢化钾溶液-3.5 g/L 氢氧化钾溶液;

——载流：盐酸溶液（7+93）。

8.4 标准曲线的测定

分别吸取 100 μL 四种砷形态的混合标准使用系列溶液，依次注入液相色谱-原子荧光光谱联用仪进行分离及检测，得到色谱图，以保留时间定性。以标准系列溶液中砷形态的浓度为横坐标，以色谱峰高或峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。标准溶液色谱图见附录 A 中图 A.1。

8.5 试样溶液的测定

吸取 100 μL 试样溶液注入液相色谱—原子荧光光谱联用仪进行分析，得到色谱图，以保留时间定性。根据标准曲线得到试样溶液中砷形态的含量。试样溶液色谱图见图 A.2。

9 分析结果的计算

尿样中砷形态[As(III)、As(V)、MMA、DMA]的含量（以砷计）按式（1）计算：

$$X_i = (C_i - C_0) \cdot K \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_i ——尿样中砷形态的含量（以砷计），单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C_i ——由标准曲线查得的试样溶液中砷形态的浓度（以砷计），单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C_0 ——由标准曲线查得的现场空白中砷形态的浓度（以砷计），单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

K ——尿样稀释倍数。

10 方法特性

10.1 检出限

本方法中亚砷酸盐、一甲基砷、二甲基砷检出限均为 0.5 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 1.5 $\mu\text{g/L}$ ；砷酸盐检出限为 0.8 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 2.4 $\mu\text{g/L}$ 。

10.2 精密度

6个实验室对含砷形态为6.0 $\mu\text{g/L}$ ~400.0 $\mu\text{g/L}$ 的尿样进行6次重复测定，相对标准偏差均小于5.0%。

10.3 准确度

采用尿中砷形态成分标准物质及加标回收考察方法准确性，6个实验室测定的不同浓度的样品加标回收率在 80%~120%之间。

11 质量保证和质量控制要点

11.1 实验环境、器皿、试剂、采样及运输过程应避免砷污染。

11.2 每次样品测定时均应配制和测定标准系列，标准曲线回归方程的相关系数绝对值应 ≥ 0.998 。

11.3 推荐采用平行样品、冻干人尿中砷形态成分标准物质及加标回收作为质量控制手段。

11.4 随样品采集同时进行空白采集。

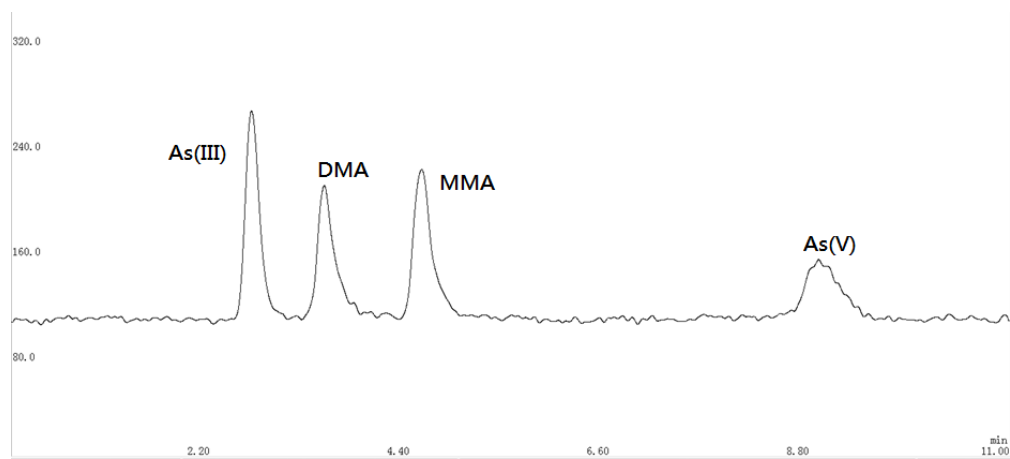
附录 A

(资料性附录)

砷形态标准溶液及试样溶液色谱图

A.1 砷形态标准溶液色谱图

10 $\mu\text{g/L}$ 亚砷酸[As(III)], 二甲基砷(DMA), 一甲基砷(MMA), 砷酸[As(V)]标准溶液色谱图, 见图 A.1。

图 A.1 砷形态标准溶液 (10 $\mu\text{g/L}$) 色谱图

A.2 试样溶液色谱图

试样溶液色谱图见图 A.2

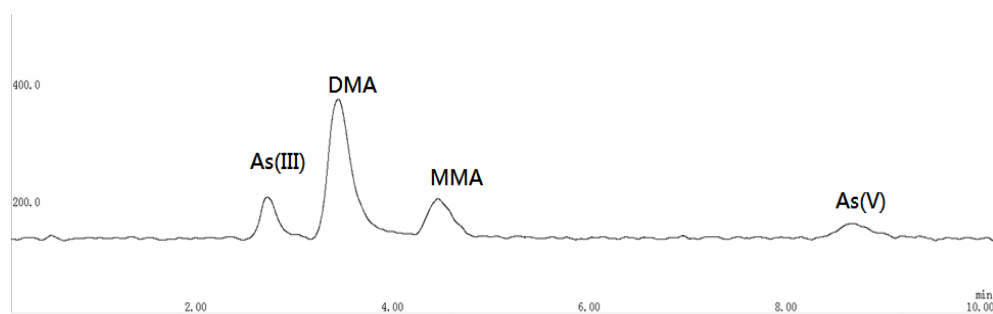


图 A.2 试样溶液中砷形态色谱图