

高效液相色谱-原子荧光光谱法测定慢性砷中毒患者头发中4种形态的砷化合物

周乐舟

湖南省职业病防治院, 湖南 长沙 410007

摘要:

[背景] 不同形态的砷化合物毒性差异很大, 头发作为慢性砷中毒患者砷的主要蓄积部位, 分析其中形态砷的含量对研究人体内砷代谢机制具有重要意义。

[目的] 建立高效液相色谱-原子荧光光谱(HPLC-AFS)联用技术测定头发中4种形态砷化合物的方法。

[方法] 实验考察了流动相对色谱分离的影响, 通过正交实验优化样品预处理条件和原子荧光(AFS)检测参数, 测试了批内、批间、加标回收试验等方法学性能指标。

[结果] 4种形态的砷化合物即亚砷酸盐(As^{III})、砷酸盐(As^{V})、一甲基砷酸(MMA^{V})和二甲基砷酸(DMA^{V})的线性范围为3.68~100.00 $\mu\text{g/L}$, 相关系数在0.9991~0.9996之间, 方法检出限为0.11~0.19 $\mu\text{g/g}$, 样品加标回收率为96.5%~102.8%, 相对标准偏差(RSD)为2.4%~4.3%, 浓度为10.00、40.00、80.00 $\mu\text{g/L}$ 的3个水平样品批内RSD为1.5%~4.4%, 批间RSD为1.9%~4.6%。

[结论] 所建方法具有较高的灵敏度可用于头发中4种形态砷化合物的测定。

关键词: 高效液相色谱-原子荧光光谱法; 砷; 头发; 慢性中毒

Determination of four arsenic species in hair of chronic arsenic poisoning patients by high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry ZHOU Le-zhou (Hunan Prevention and Treatment Institute for Occupational Disease, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract:

[Background] Different arsenic species vary greatly in toxicity. Determination of arsenic species in hair has great significance to the study of arsenic metabolism mechanism in human body because hair is the main part to accumulate arsenic in patients with chronic arsenic poisoning.

[Objective] This study aims to establish a method for determining four arsenic species in hair samples by high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry (HPLC-AFS).

[Methods] The effect of mobile phase on chromatography separation was investigated. Orthogonal experiment design was used to optimize sample pretreatment conditions and atomic fluorescence spectrometry (AFS) detection parameters. Methodological indicators were investigated including intra- and inter-batch relative standard deviations (RSD) and average spike recovery.

[Results] The method showed that four arsenic species including arsenite (As^{III}), arsenate (As^{V}), monomethylarsonic acid (MMA^{V}), and dimethylarsinic acid (DMA^{V}) were linear within the range of 3.68-100.00 $\mu\text{g/L}$. The correlation coefficients were 0.9991-0.9996. The limits of detection were 0.11-0.19 $\mu\text{g/g}$. The average spike recoveries were 96.5%-102.8% with RSD between 2.4% and 4.3%. The intra- and inter-batch RSDs of repetitive measurement at 10.00, 40.00, and 80.00 $\mu\text{g/L}$ were 1.5%-4.4% and 1.9%-4.6% respectively.

[Conclusion] The proposed method can be applied to the analysis of four arsenic species in hair samples with high sensitivity.

Keywords: high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry; arsenic; hair; chronic arsenic poisoning

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19150

基金项目

湖南省自然科学基金(2018JJ6021)

作者简介

周乐舟(1976—), 男, 硕士, 副主任技师;
E-mail: zhoulezhou2006@126.com

通信作者

周乐舟, E-mail: zhoulezhou2006@126.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-03-15

录用日期 2019-07-16

文章编号 2095-9982(2019)09-0858-06

中图分类号 R135.1

文献标志码 A

►引用

周乐舟. 高效液相色谱-原子荧光光谱法测定慢性砷中毒患者头发中4种形态的砷化合物[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(9): 858-863.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19150

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHOU Le-zhou, E-mail: zhoulezhou2006@126.com

Competing interests None declared

Received 2019-03-15

Accepted 2019-07-16

►To cite

ZHOU Le-zhou. Determination of four arsenic species in hair of chronic arsenic poisoning patients by high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(9): 858-863.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19150

砷(As)是一种类金属元素,以化合物形式广泛存在于地表、土壤、水、大气、食物及生物体内,如果人们长期生活在饮用水中砷含量高、食物受砷污染、燃煤中高砷含量的环境中,容易导致地方性砷中毒。如今,随着科学技术的发展,大量砷矿开采和冶炼,含砷农药的使用,砷元素及化合物的生产,使得许多人生活在砷超标的环境中。目前职业性砷中毒的主要途径是作业工人通过呼吸道或皮肤暴露,吸收后的砷通过影响代谢酶、脂质过氧化、基因损伤、基因表达等方面而发挥其毒性作用^[1-3]。按照地方性砷中毒诊断标准,砷中毒的参考指标为尿液或头发中总砷的含量。对于慢性砷中毒者,相比较而言,发砷能更准确地反应砷的长期蓄积程度。近年来,有报道称砷中毒患者尿液中可以检测到亚砷酸盐(arsenic, As^{III})、砷酸盐(arsenate, As^V)、一甲基砷酸(monomethylarsonic acid, MMA^V)和二甲基砷酸(dimethylarsinic acid, DMA^V)4种形态的砷化合物^[4-5]。但是尿液中砷的含量低且样品易腐败使得样品收集和储存困难,形态砷的检测也变得比较困难。头发作为固体生物样品易于采集和收藏且物理化学性质稳定,根据多年的检测研究发现慢性砷中毒患者头发中总砷的含量比较高^[6],是一种理想的生物样品。由于不同形态的砷化合物毒性不尽相同,其中亚砷酸盐毒性最大,而一甲基砷酸和二甲基砷酸普遍被认为毒性较低。因此,如果能定量测定头发中砷的形态将为砷在人体内的代谢模式和机制研究提供参考依据,也能够为砷中毒标志的研究提供新的思路。目前,头发中总砷的测定已有相关报道^[7],但是尚未见头发中形态砷检测相关方法学的研究。

目前测定总砷的主要方法(包括原子吸收和原子荧光光谱法^[8]、砷形态分析)中较多采用高效液相色谱分离(high performance liquid chromatography, HPLC)与电感耦合等离子体质谱以及石墨炉原子吸收光谱等联用技术^[9-11],但电感耦合等离子体质谱分析实际样品时有氯化氢(ArCl)干扰效应,同时还伴随有同位素的干扰,HPLC直接与石墨炉原子吸收光谱连接极为困难^[12]。HPLC与原子荧光(atomic fluorescence spectrometry, AFS)联用,使HPLC的高分离能力与AFS在分析砷元素中的特异性有效结合,成为元素形态分析有效手段,该技术具有灵敏度高、线性范围宽等优点,已在食品、水质和生物样品中广泛应用。从检测生物样品的角度看,这些联用技术大多数只测尿

液中As^{III}、As^V、MMA^V和DMA^V4种形态的砷化合物,可能是由于头发中的砷存在于固态物体中,在不破坏其形态的条件下无法有效提取进行检测;另一个原因是检测形态砷技术存在一定的难度。因此,本研究通过正交实验优化样品预处理条件和AFS检测参数,建立了HPLC-AFS联用技术,测定慢性砷中毒患者头发中4种形态砷化合物的方法,为临床诊治及中毒机制研究提供方法学参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-AFS6500原子荧光形态分析仪(北京海光仪器有限公司,中国);AFS8230原子荧光光度计(北京吉天仪器有限公司,中国);LC-210液相色谱-在线消解系统(北京海光仪器有限公司,中国);PRP-X100阴离子交换色谱柱(250.0mm×4.1mm×10.0μm, Hamilton公司,瑞士);PHSJ-5型酸度计(上海精科仪器厂,中国);Mili-Q超纯水系统(Milipore, 美国);Centrifuge 5430R高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国);一次性水系针头微孔过滤器(0.22μm, 上海安谱科学仪器有限公司, 中国),1/万电子天平(上海舜宇科学仪器有限公司, 中国)。

质量浓度(以As计)分别为10.0、17.5、25.1、53.0mg/L的As^{III}、As^V、MMA^V和DMA^V溶液标准物质(中国计量科学研究院, 中国);碳酸铵[(NH₄)₂CO₃]、磷酸铵[(NH₄)₃PO₄]、硼氢化钾(KBH₄)、硫酸铵[(NH₄)₂SO₄]等(阿拉丁试剂有限公司, 中国)均为优级纯;氢氧化钾(KOH)、盐酸(HCl)、硝酸(HNO₃)等(国药集团, 中国)均为优级纯。实验用水均为Mili-Q系统纯化水。除已注明外,所用试剂均为分析纯。

1.2 混合标准溶液及工作曲线的配制

分别移取1000μL As^{III}、573μL As^V、400μL MMA^V、187μL DMA^V至10mL的容量瓶中,用4.0mmol/L (NH₄)₂CO₃+4.0mmol/L (NH₄)₃PO₄+4.0mmol/L (NH₄)₂SO₄混合溶液定容至10mL,配制成混合标准工作液(1mg/L)。再分别移取混合标准工作液0.00、0.10、0.20、0.40、0.80、1.00mL于6只10mL的比色管中,用4.0mmol/L (NH₄)₂CO₃+4.0mmol/L (NH₄)₃PO₄+4.0mmol/L (NH₄)₂SO₄混合液定容至10mL,配成浓度为0.00、10.00、20.00、40.00、80.00、100.00μg/L的标准系列。

1.3 样品的采集和前处理

剪取慢性砷中毒患者枕部头发3.0g左右,将其放

置于密封袋中, 常温下至少可保存1月。临用前从密封袋中取出样品, 将头发按发根、发中、发梢分成三等份, 样品用溶有洗洁精的水溶液 (1L水加入10滴左右洗洁精, 混匀) 于室温下超声清洗10min, 然后用自来水冲洗干净, 晾干, 每份样品再用陶瓷剪刀剪碎储存, 使用时精密称取0.45~0.55 mg已清洗干净的样品于三角锥形瓶中, 加入体积分数 (后同) 为1.0% HNO_3 和5.0% 甲醇的水溶液10 mL, 置于90℃的水浴中提取30 min, 然后将样品在4℃、13 500 r/min (离心半径8 cm) 的条件下离心10 min, 取上清液, 用一次性水系针头微孔过滤器过滤, 滤液转移至50 mL容量瓶中, 用4.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ +4.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ +4.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合溶液定容至刻度, 待测。

1.4 HPLC-AFS工作条件

HPLC色谱条件: PRP-100阴离子交换色谱柱; 流动相为4.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ +4.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ +4.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合液, 用氨水或磷酸调节pH值至8.9, 液体流速为1.2 mL/min, 进样量为100 μL 。

AFS工作条件: 光电倍增管负高压, 300 V; 铷空心阴极灯, 60 mA; 原子化器高度10 mm; 载气流量600 mL/min; 屏蔽气流量900 mL/min; 载流为体积分数10%的盐酸, 还原剂是质量浓度为3.5%的 KBH_4 (含质量分数0.5%的 KOH); 采用标准曲线法定量。

1.5 正交试验

1.5.1 AFS检测条件的优化 AFS条件优化时, 原子荧光工作条件恒定为: 泵速, 80 r/min; 原子化高度, 8 cm; 屏蔽气流, 800 mL/min; 选取峰面积为定量指标。其他影响实验结果的主要因素有5个, 分别为载流体积分数A (%), KBH_4 质量分数B (%), 负高压C (V), 灯电流D (mA), 载气流量E (mL/min)。正交实验设计选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表, 做16次实验即可获得原子荧光在实验范围内的最佳实验条件, 正交因素水平表见表1。本实验设计不考虑因素间的交互作用对性能指标的影响, 样品选取50.0 $\mu\text{g/L}$ 的 As^{III} 溶液作为研究对象。

表1 AFS条件优化正交因素水平表

水平	载流体积分数A (%)	KBH_4 质量分数B (%)	负高压C (V)	灯电流D (mA)	载气流量E (mL/min)
1	5	2.5	280	50	400
2	10	3.0	290	60	500
3	15	3.5	300	70	600
4	20	4.0	310	80	700

1.5.2 样品处理条件优化 将仪器条件保持最优测量状态, 影响样品提取效率的因素分别是: 提取时间F (min)、提取温度G (℃)、提取剂H、提取剂用量I (mL)。正交实验设计选用 $L_{12}(4^4)$ 正交表, 做12次实验即可获得样品处理在实验范围内的最佳实验条件, 正交因素水平表见表2。

表2 样品处理条件优化正交因素水平表

水平	提取时间F (min)	提取温度G (℃)	提取试剂H	提取剂用量I (mL)
1	10	70	1.0% HNO_3	5
2	20	80	1.0% HNO_3 +5.0% 甲醇	10
3	30	90	5.0% 甲醇	20
4	40	100	水	30

1.6 结果计算

将HPLC-AFS分光光度计调整到最佳测定状态。进样量100 μL , 测定各标准管的荧光强度, 以各形态砷化合物的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制工作曲线。按下式计算头发中各形态砷的含量。 $X=C \times V \times K \div m$, 式中: X—头发中砷的含量, $\mu\text{g/g}$; C—由回归方程计算得出砷的浓度, $\mu\text{g/L}$; V—定容体积, mL; m—样品质量, g; K—稀释倍数。

2 结果

2.1 HPLC-AFS联用技术分离条件的优化

2.1.1 流动相种类对PRP-X100阴离子交换色谱柱分离条件的影响 流动相的选择对形态砷的分离有直接的影响, 实验考察了醋酸铵 (NH_4Ac)、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 之间各种组合对形态砷的分离效果, 结果发现 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ + $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液的组合能使不同形态砷化合物很好的分离。本研究选取 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ + $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液作为液相色谱离子交换的流动相。

2.1.2 流动相浓度的选择 实验分别考察了浓度为1.0~10.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、1.0~10.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、1.0~10.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 组合间对形态砷分离的影响, 发现: 当pH=8.9时4种形态砷化合物在10 min内能较好的分离, 试验选取浓度为4.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ +4.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ +4.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合液为流动相。色谱分离见图1。

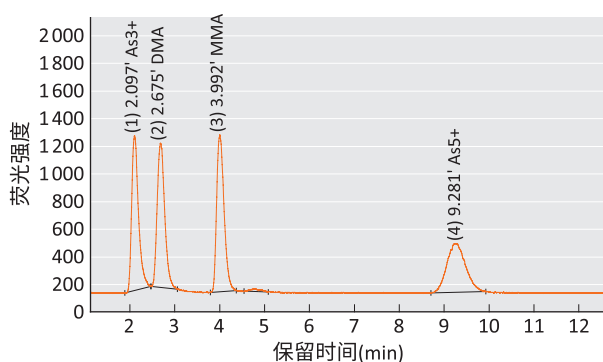


图1 HPLC-AFS法测定4种形态砷化合物的分离效果图

2.2 正交试验优化AFS检测的均值与极差结果

以峰面积为定量指标进行统计分析,均值与极差分析结果见表3,表中 K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 分别为在水平1、2、3、4的指标平均值。经分析,均值 $KA_3>KA_4>KA_2>KA_1$,判定 A_3 为A因素的最优水平,同样可判定, B_3 、 C_4 、 D_4 、 E_3 分别为因素B、C、D、E的最优水平。极差 $R_B>R_A>R_E>R_D>R_C$,因此,因素对指标的影响顺序为 $B>A>E>D>C$ 。即还原剂的浓度对峰面积影响较大,实验结果与理论分析相符,还原剂浓度太小,反应不完全,浓度太大发生荧光淬灭。通过分析因素对实验指标的影响规律和趋势,在所选择的水平范围内,随着因素A、C、D值的增大,峰面积呈现增大趋势;随着因素B、E值的增大,峰面积呈现先增大后减小趋势。A因素中样品载流浓度超过10%时,峰面积基本保持不变,盐酸的浓度太大,用量增大,对仪器的腐蚀性增强,工作环境中的酸度增高,因此该实验选择载流为10%的盐酸。随着负高压的增大,峰面积有所增大,但噪声明显增大且峰形不尖锐。灯电流增大对峰面积有增大趋势但不明显,峰形变宽,灯的使用寿命缩短。经综合考虑AFS检测条件的最优水平为:载流为体积分数10.0%的盐酸,还原剂为质量分数3.5%的 KBH_4 ,灯主电流为60mA,负高压为300V,载气流量为600mL/min。

表3 AFS检测条件正交实验的均值与极差分析

因素	载流体积分数A	KBH_4 质量分数B	负高压C	灯电流D	载气流量E
K_1	321523	258245	480276	470258	395879
K_2	520237	408271	562487	571269	475280
K_3	532459	620324	571245	592375	556268
K_4	529362	503256	592145	602021	523546
极差值R	210936	362079	111869	131763	160389

2.3 正交试验优化样品处理条件均值与极差结果

样品处理均值与极差分析结果见表4,从表中可以

看出各因素影响顺序为: $G>F>H>I$,从结果看温度对提取效率的影响最大,其次是提取时间,时间小于20min及温度低于70℃时,提取效率低60%;当提取时间大于25min及温度高于90℃时,形态砷提取效率高达95%以上,因此,试验选取提取时间为30min,温度为90℃,提取试剂为1.0%硝酸+5.0%甲醇的混合液10.0mL。

表4 样品处理条件正交实验的均值与极差分析

因素	提取时间F	提取温度G	提取试剂H	提取剂用量I
K_1	182589	98245	448381	470326
K_2	553047	243587	562283	561482
K_3	550558	572258	481226	562309
K_4	563904	563897	503214	551543
极差值R	381315	474013	113902	91983

2.4 方法学指标评价

2.4.1 方法线性范围和检出限 配制了浓度为0~100.0μg/L的4种形态的砷标准溶液。在优化的条件下进行分析,试验结果发现4种形态的砷在3.68~100.00μg/L浓度范围内,峰面积与浓度呈良好线性关系,工作曲线分别为: As^{III} , $\hat{y}=102800+102400x$; DMA^V , $\hat{y}=7024+79700x$; MMA^V , $\hat{y}=8126+91470x$; As^V , $\hat{y}=92850+62660x$ (式中: $\hat{y}$ —峰面积; x —As浓度, As^{III} 、 DMA^V 、 MMA^V 、 As^V 的相关系数 r 分别为0.9996、0.9991、0.9994、0.9993),仪器检出限分别为2.17、3.62、3.68、2.82μg/L。

方法检出限:方法检出限是指一个给定的分析方法在特定条件下能以合理的置信水平检出被测物的最小浓度,它是表征分析方法的最主要的参数之一。本研究方法检出限以取样1.0g,按方法处理后定容至50mL计, As^{III} 、 DMA^V 、 MMA^V 、 As^V 的方法检出限分别为0.11、0.18、0.19、0.14μg/g。

2.4.2 方法精密度和准确度试验结果 取正常人的头发,分为3组,每组18个样品,加入不同量的各种形态的砷标准溶液,配成低、中、高3个质量浓度的样品。每个质量浓度进行6次测定,同时做6支空白对照管,计算批内精密度和方法回收率。样品连续测定3d,每天每个质量浓度各测6个样品,重复6次,测定结果分别取平均值后,计算批间精密度。结果显示,方法的批内相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.5%~4.4%,回收率为88.5%~109.0%,批间RSD为1.9%~4.6%。符合生物等效性研究的方法学要求^[13]。结果见表5。

表 5 4 种形态砷化合物的精密度实验结果 (n=6)

组别	本底值 (μg/g)	加标量 (μg/g)	测定值 ($\bar{x}\pm s$, μg/g)	加标回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间精密度		
						测定次数	测得值 ($\bar{x}\pm s$, μg/g)	批间 RSD (%)
As ^{III}	2.25							
低质量浓度组		1.00	3.21±0.14	96.0	2.8	3	3.23±0.12	2.2
中质量浓度组		2.00	4.11±0.18	93.0	1.5	3	4.16±0.19	3.6
高浓度质量组		4.00	6.15±0.22	97.5	2.3	3	6.25±0.31	2.8
DMA ^V	—							
低质量浓度组		1.00	0.92±0.13	92.0	3.3	3	0.89±0.18	3.8
中质量浓度组		2.00	2.08±0.20	104.0	2.1	3	2.15±0.20	2.6
高浓度质量组		4.00	4.13±0.21	103.3	3.0	3	4.09±0.08	4.6
MMA ^V	—							
低质量浓度组		1.00	0.98±0.05	98.0	3.6	3	1.04±0.11	3.8
中质量浓度组		2.00	1.86±0.14	93.0	3.0	3	1.97±0.15	3.1
高浓度质量组		4.00	3.92±0.19	98.0	2.5	3	3.96±0.20	2.6
As ^V	1.46							
低质量浓度组		1.00	2.55±0.14	109.0	3.8	3	2.53±0.13	2.9
中质量浓度组		2.00	3.23±0.27	88.5	4.4	3	3.35±0.27	3.8
高浓度质量组		4.00	5.32±0.26	96.5	3.3	3	5.36±0.18	1.9

[注] “—”表示“未检出”。

2.5 实际样品测定

按试验方法对某慢性砷中毒患者头发中砷的形态进行分析, 比较了形态砷总和与湿法消解—原子荧光法测定总砷的结果之间的大小, 同时对样品做了加标回收试验。结果见表 6。

表 6 实际发样 4 种形态砷化合物分析结果

检测项目	测得值 (μg/g)	形态砷总和 (μg/g)	总砷测得值 (μg/g)	加入量 (μg/g)	测得值 (μg/g)	回收率 (%)	RSD (%)
As ^{III}	4.94	16.2	16.9	4.00	8.81	96.8	2.4
DMA ^V	2.06	16.2	16.9	4.00	6.15	102.3	3.5
MMA ^V	3.37	16.2	16.9	4.00	7.23	96.5	4.3
As ^V	5.82	16.2	16.9	4.00	9.93	102.8	2.6

从表 6 中可以看出方法测定形态砷的总和小于总砷的测定值, 比值为 0.96, 偏差在 5.0% 以内, 样品加标回收率在 96.5%~102.8% 之间, 相对标准偏差 2.4%~4.3% 之间, 说明该方法测定形态砷的准确度较高、重复性好。符合生物样品检验规范要求。

3 讨论

砷是一种有毒的类金属, 能以多种形态存在于生物体内, 不同形态的砷化合物毒性各不相同。测定总砷含量常常不能正确反映人体砷暴露后的代谢情况, 所以对不同形态、价态的砷化物进行测定就显得尤为重要。目前国内外的研究主要是以尿、血、头发等作为砷中毒标志物, 但是砷在血液中的半衰期很短, 大部分进入血液的砷化合物仅需几小时即可被清除, 因

此不是一种很好的生物标志物。尿砷可反映近期内砷暴露及代谢情况, 但在停止暴露之后, 尿中砷含量将明显降低, 不利于慢性中毒者的分析。头发相对于尿液其更新速度较慢, 因而可以反映人体砷的历史暴露情况, 更好地反应慢性中毒患者体内砷蓄积程度, 是比较理想的慢性砷中毒检测标志。

在方法研究过程中通过正交实验设计减少了实验的盲目性, 对多因素原子荧光检测条件和样品处理条件的探索有很大的优越性, 应用方便, 准确性高。通过正交实验得出最优载流为体积分数 10.0% 的盐酸, 还原剂为质量分数 3.5% 的 KBH₄, 灯主电流为 60 mA, 负高压为 300 V, 载气流量为 600 mL/min。最优样品处理条件为: 10 mL 1.0% HNO₃+5.0% 甲醇的混合液在 90℃ 水浴中提取 30 min。色谱分离效果直接影响形态砷的检测结果, 由于 As^{III}、As^V、MMA^V 和 DMA^V 呈弱酸或中强酸, 在适宜的 pH 值条件下, 均能以阴离子的形式存在^[14] 的特点。因此, 本方法采用 PRP-X100 阴离子交换色谱柱作为分离柱。根据峰型、分离效果、保留时间等因素, 研究选择 pH 值为 8.9 的 4.0 mmol/L (NH₄)₂CO₃+4.0 mmol/L (NH₄)₃PO₄+4.0 mmol/L (NH₄)₂SO₄ 作为 HPLC 流动相。

本研究建立了高效液相色谱-原子荧光光谱联用技术测定头发中 4 种砷形态的分析方法, 方法准确度高、检出限低、线性范围宽、处理简单、环保。可用于慢性砷中毒头发中形态砷含量的检测, 为慢性砷中毒患者治疗过程中体内代谢砷形态研究提供了方法学

参考。

参考文献

- [1] 成会荣, 秦明芳, 陈杨, 等. 砷冶炼厂工人砷甲基化代谢与肝和皮肤损伤及LncRNAs表达的关系 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (11) : 983-987.
- [2] SAKURAI T, QU W, SAKURAI M H, et al. A major human arsenic metabolite, dimethylarsinic acid, requires reduced glutathione to induce apoptosis [J]. Chem Res Toxicol, 2002, 15 (11) : 629-637.
- [3] KLIGERMAN A D, DOERR C L, TENNANT A H, et al. Cytogenetic studies of three triazine herbicides : II. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow [J]. Mutation Research Genetic Toxicol Environ Mutagen, 2000, 471 (1/2) : 107-112.
- [4] 潘巧裕, 黄汉林, 梁旭霞, 等. 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法测定尿中4种形态砷 [J]. 中国职业医学, 2014, 41 (1) : 102-106.
- [5] 宋冠仪, 梅勇, 商律, 等. 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光联用技术测定饮用水中四种形态砷 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (4) : 350-353.
- [6] 罗亚翠, 张海君, 郝伟, 等. 慢性砷中毒标志物及其形态分析 [J]. 职业与健康, 2019, 35 (8) : 1051-1054, 1058.
- [7] 李燕, 肖梅, 陈福明. 氢化物发生原子荧光检测人发中的砷 [J]. 广东微量元素科学, 2016, 23 (1) : 34-37.
- [8] 曹丽军. 微波消解石墨炉原子吸收测铁皮石斛中砷 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16 (7) : 805-806.
- [9] 王英锋, 李中锋, 热增才旦, 等. 藏药仁青常觉中砷在大鼠尿液中的HPLC-ICP-MS研究 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39 (2) : 263-271.
- [10] 杜航, 龚进, 代华, 等. 慢性砷中毒患者头发代谢物特征的代谢组学研究 [J]. 环境与职业医学, 2018, 35 (2) : 163-167.
- [11] 殷学锋, 徐光明, 谷雪, 等. 因子分析-氢化物发生原子吸收法分析砷的形态 [J]. 分析化学, 1999, 27 (7) : 798-801.
- [12] 杨慧, 王富华, 王旭, 等. 蔬菜中砷的形态分析研究及其应用 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49 (9) : 2230-2233.
- [13] 职业卫生标准制定指南 第5部分: 生物材料中化学物质的测定法: GBZ/T 210.5—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [14] 李拥军, 苏福荣, 魏静, 等. 尿中4种形态砷化物的离子色谱-氢化物发生-原子荧光光谱测定法 [J]. 环境与健康杂志, 2011, 28 (9) : 809-811.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 韩凤婵)

(上接第857页)

- [8] CLARKE P G. Developmental cell death : morphological diversity and multiple mechanisms [J]. Anat Embryol, 1990, 181 (3) : 195-213.
- [9] 韩冰, 王君丽, 李树钧. 亚砷酸对肺癌A549细胞凋亡及C-myc基因表达影响的研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2017, 51 (1) : 25-27.
- [10] KATAYAMA S, SHIMODA K, TAKENAGA Y. Loss of ADAR1 in human iPS cells promotes caspase3-mediated apoptotic cell death [J]. Genes Cells, 2015, 20 (8) : 675-680.
- [11] 徐辉. JNK/c-Jun 信号通路在低浓度亚砷酸钠所致 HELF 细胞增殖异常和细胞周期紊乱中的作用 [D]. 南京: 南京医科大学, 2009.
- [12] FREJO M T, DEL PINO J, LOBO M, et al. Liver and kidney damage induced by 4-aminopyridine in a repeated dose (28 days) oral toxicity study in rats : gene expression profile of hybrid cell death [J]. Toxicol Lett, 2014, 225 (2) : 252-263.
- [13] CHIU H W, LIN W, HO S Y, et al. Synergistic effects of arsenic trioxide and radiation in osteosarcoma cells through the induction of both autophagy and apoptosis [J]. Radiat Res, 2011, 175 (5) : 547-560.
- [14] MATTIOLO P, YUSTE V J, BOIX J, et al. Autophagy exacerbates caspase-dependent apoptotic cell death after short times of starvation [J]. Biochem Pharmacol, 2015, 98 (4) : 573-586.
- [15] YANG B, XUE Q, QI X, et al. Autophagy enhances the replication of Peste des petits ruminants virus and inhibits caspase-dependent apoptosis *in vitro* [J]. Virulence, 2018, 9 (1) : 1176-1194.
- [16] BONAKDARYAZDI B, KHODAGHOLI F, SHAERZADEH F, et al. The effect of arsenite on spatial learning : involvement of autophagy and apoptosis [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 796 : 54-61.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 韩凤婵)