

研究简报

铅形态的高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱分析

潘元海* 刘湘生 何小青 王长华

(北京有色金属研究总院, 北京 100088)

摘 要 用 50 mm 的反相高效液相色谱短柱在 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}} = 55/45$, 其中水相为 0.1 mol/L 乙酸 0.1 mol/L 乙酸钠的缓冲溶液 ($\text{pH} = 4.70$), 流速 0.6 mL/min 条件下, 约 10 min 内实现了无机铅离子 (Pb^{2+})、氯化三甲基铅 (TML)、氯化三乙基铅 (TEL) 和氯化三苯基铅 (TPHL) 的高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱 (HPLC-ICP-MS) 联用分析。4 种铅形态在去离子水和自来水中的加标回收率分别为 93.8% ~ 115.6% 和 89.3% ~ 137.8%; 峰强度和保留时间的 RSD 分别为 7.4% ~ 14.3% 和 0.5% ~ 1.3%; 仪器检出限及方法检出限分别为 0.27 ~ 3.07 $\mu\text{g/L}$ 和 1.20 ~ 2.33 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词 铅形态, 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱

1 引言

元素的行为效应并不仅仅取决于该元素的总量, 特定的元素只有在特定的浓度范围和一定的存在形态才能对生命系统和生物体发挥作用^[1]。为了全面评估铅对环境与健康的影响, 对各种铅形态进行分析测定对于研究铅污染物在环境中的分布、迁移、代谢过程和对人体的毒性、代谢、生物效应等, 预测铅的环境污染的可能性和程度; 以及采取何种措施避免污染, 具有重要的现实意义^[2-4]。

分光光度法易受干扰, 选择性差, 检出限在 10^{-6} 以上; 电化学法无法达到环境分析要求的灵敏度和选择性, 无法定量萃取出所有的烷基铅离子; GC 法无法直接分析不挥发且热稳定性差的二烷基铅, 对于热稳定性差且会与气相色谱柱发生反应的三烷基铅以及强极性的无机铅离子更是无能为力^[5]。本实验采用 50 mm 短柱, 应用 HPLC-ICP-MS 联用技术进行铅的形态分析, 将 HPLC 法的柱效高, 分离快速, 无需衍生化处理, 可在室温下实现样品分离, 能很好分离 GC 法难以分离的强极性、难挥发及热不稳定化合物等显著优点^[5-8], 与 ICP-MS 检测器的高灵敏度及高选择性结合在一起, 实现了 4 种铅形态的 HPLC-ICP-MS 联用分析, 取得良好结果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Sciex Elan 5000 型电感耦合等离子体质谱仪 (美国 PE 公司); Glison Minipuls 蠕动泵; 数据处理系统为 BM PS/2 型计算机。P99 型高效液相色谱仪 (北京温分公司), 配备 100 μL 微量进样器, 20 μL 六通阀。两根色谱柱分别是 Irregular C_{18} 10 μm , 150 mm $\times$ 4.6 mm i.d. (天津天合公司) 和 Kromasil C_{18} 5 μm , 50 mm $\times$ 4.6 mm i.d. (北京分析仪器厂) 色谱柱。HPLC 与 ICP-MS 之间的接口选用本实验室设计的同心雾化器, 旋流雾室作为接口。ICP-MS 仪器采用的常规参数是: 正向功率: 1000W; 雾室: 碳纤维雾室。镍采样锥孔径: 1.14 mm; 镍截取锥孔径: 0.89 mm; 采样深度: 5 mm。动态压力: 4×10^{-3} Pa; ETP 电位 (DC): -3200 V。分辨率 (10% 峰高): 0.8 ± 0.1 amu; 扫描方式: 元素 Pb^{208} ; 测定方式: 跳峰。

铅形态标准品分别是: 1 g/L Pb^{2+} 储备液为本测试中心配制 (5% HNO_3 介质); 氯化三甲基铅 (TML) 和氯化三乙基铅 (TEL) 均购自 Dr. Ehrenstorfer Gm. Germany 公司, TML 纯度为 99.5%, 白色绒状

2004-12-09 收稿; 2005-03-27 接受

结晶体;TEL纯度为98.0%,淡黄色绒状结晶体;氯化三苯基铅(TPhL)购自Aldrich化学公司,纯度为90%,白色绒状结晶体;四乙基铅(TTEL)购自Accu Standard Inc公司,为0.2 g/L的甲醇溶液标准样品。甲醇、乙腈均为色谱纯。乙酸、乙酸铵均为分析纯。去离子化的18M Ω 水。

2.2 实验方法

2.2.1 标准品及缓冲溶液的配制 实验用的铅形态浓度均是指该形态中Pb量的质量浓度。除Pb²⁺外,各标准品配制时均以色谱纯甲醇作为溶剂,配好的标样保存在4℃的冰箱中备用。0.1 mol/L乙酸-0.1 mol/L乙酸铵缓冲溶液为其水相缓冲溶液,每次使用时按常规方法现配。

2.2.2 色谱条件及质谱参数的优化方法 色谱条件的优化主要依据各个谱峰的保留时间,相邻谱峰之间的分离度。在选定了色谱条件后,采用单因素条件实验,依据质量色谱峰的峰强度对质谱参数进行优化。

2.2.3 自来水中铅形态的加标实验 取经静置后的自来水,配制成含1% HNO₃的自来水样,加入Pb²⁺、TML、TEL、TPhL标准溶液,以高纯水中加标液作标准,在优化的方法条件下进行加标实验。

3 结果与讨论

3.1 UV与ICP-MS检测器的选取 Pb²⁺无紫外吸收。选用150 mm色谱柱,流速1 mL/min, $\lambda = 254$ nm,观察TML、TEL、TPhL和TTEL的紫外响应情况。以 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}} = 30/70$ (该流动相中含0.1 mol/L乙酸-0.1 mol/L乙酸铵)为流动相考察了质量浓度分别为0.1、1、10 mg/L的TML、TEL、TPhL的UV响应情况,以100%甲醇为流动相考察了质量浓度为10 mg/L的TPhL以及质量浓度分别为0.1、1、10 mg/L TTEL的UV响应情况。实验发现,TML、TEL、TPhL和TTEL无UV响应或响应很差。如再提高标样的进样浓度,可能导致柱饱和并污染色谱柱及管路系统,故实验选用ICP-MS作为铅形态分析的检测器。

3.2 铅形态HPLC分离条件的确定

3.2.1 流动相体系的选择 实验发现,在ICP炬点火稳定后切换为 $V_{\text{乙腈}}/V_{\text{H}_2\text{O}} = 55/45$,流速0.4 mL/min,约15 min后观察到采样锥锥口处附着有蜂窝状黑色沉积物,并且越积越多。同一条件下,采用甲醇/水体系则无此现象,仪器能正常稳定工作。所以实验选用甲醇/水体系作为流动相体系。

3.2.2 标样介质条件的选择 由于Pb²⁺是以1% HNO₃为介质,当与以100%甲醇为介质的其它几种铅形态标准配制混标时,其介质条件发生了很大变化。实验发现Pb²⁺的峰形不锐,拖尾明显。为此,对Pb²⁺浓度为250 $\mu\text{g/L}$ 介质进行了系列条件实验。结果表明,随着介质中甲醇含量的降低,Pb²⁺的峰形由拖尾峰逐渐变为正态峰,峰强度也由小变大。当甲醇含量低于25%时,峰形变得很尖锐,无拖尾现象,峰强度基本相当,另外也发现在该介质条件下其它铅形态的峰形也较100%甲醇条件下的峰形尖锐。最终选用甲醇体积分数为7.5%、1% HNO₃体积分数为92.5%的介质作为Pb²⁺和混标的介质条件。

3.2.3 色谱柱的选择,梯度洗脱实验 文献多采用250 mm长柱^[9,10],20 mm^[11]或30 mm^[12]的保护柱对铅形态进行分离,仪器条件苛刻^[10],分析的铅形态种类少^[10~12]。为了克服250 mm柱分离时间过长,短柱分离样品过少的不足。考虑到本实验室ICP-MS RF功率为1 kW,不能进行冷却的雾化器的现有条件,所以选购了长为150和50 mm的两根色谱柱来进行铅形态分离。

一系列实验发现,当流动相中甲醇含量较低时(如在150 mm柱上进行的 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$ 分别为10/90、20/80、30/70,50 mm柱上进行的 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$ 分别为10/90、15/85、30/70、40/60相关实验),通过改变流速大小,两根色谱柱均可较好地实现Pb²⁺、TML、TEL 3种铅形态的有效分离。而TPhL和TTEL则难以洗脱出来,当 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}} = 40/60$,流速1.0 mL/min时,TPhL在50 mm柱上也需40 min才被洗脱出来。当流动相中甲醇含量进一步提高到50%时,虽然TPhL在150 mm柱上能被洗脱出来,但保留时间也长达30 min,并有拖尾现象,灵敏度也较差,另外,Pb²⁺与TML峰已发生重叠。而TPhL在50 mm柱上能在9~18 min被洗脱出来(见表1),其它各峰也能正常分离,但TTEL仍难以洗脱,如当 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}} = 50/50$,流速1.0 mL/min和当 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}} = 65/35$,流速0.4 mL/min时,走时长达60 min均未出峰,需进一步提高甲醇含量才有可能将其洗脱,如文献[10]采用梯度洗脱,最终将甲醇的含量提高到90%,方在可以接受的时间范围内(约30 min)将TTEL洗脱出来。洗脱液的甲醇含量过高,则ICP炬发生熄火。所以,在现有的

设备条件下无法实现 TTEL 的有效洗脱。

为了使最为相近的两峰 (Pb^{2+} 与 TML) 很好分离, 又尽可能地缩短难洗脱组分 TPhL 的保留时间, 为此, 在 50 mm 及 150 mm 色谱柱上对上述 4 种铅形态共设计了 5 种梯度洗脱程序, 结果发现, ICP 炬均发生熄火而无法工作, 使得梯度洗脱无法实现。文献 [9] 在应用梯度洗脱进行铅形态的 HPLC-ICPMS 分析时也发现等离子体不稳定而不适用于 ICPMS 分析采用。文献 [10] 虽然采用梯度洗脱成功实现了多种铅形态的分离, 但需要采用高的射频功率以及可进行冷却的雾化器, 仪器条件苛刻。所以, 在本实验室现有的条件下只能在等梯度洗脱方式下进行铅形态的分离。

3.2.4 流动相组成及流速的确定 采用 50 mm 短柱对 Pb^{2+} 、TML、TEL、TPhL 4 种铅形态进行了一系列液谱分离条件实验。结果表明, 当甲醇含量较低时, 如 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$ 分别为 10/90、15/85、30/70、40/60 时, TPhL 无法被洗脱或保留时间过长, 不宜采用。当甲醇组分含量进一步提高后, 如 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}} = 50/50$ 和 55/45 时, TPhL 的保留时间明显缩短, 且 4 种铅形态均有不同的保留时间, 均能相互分离。结合保留时间及相邻谱峰之间的分离度 (R) 来对分离效果进行评价 (见表 1)。

表 1 各铅形态的保留时间及相邻谱峰之间的分离度 (R)

Table 1 Retention time of lead species and resolution of neighboring chromatographic peaks

流动相组成 Mobile phase	流速 Flow rate (mL/min)	铅形态的保留时间 Retention time of lead species (s)				相邻谱峰之间的分离度 Resolution of two neighboring peaks		
		Pb	TML	TEL	TPhL	Pb + TML	TML + TEL	TEL + TPhL
$V_{\text{甲醇}}(\text{methanol})/V_{\text{H}_2\text{O}} = 50/50$	0.6	78	94	148	1064	1.42	3.51	18.17
	0.8	59	71	111	784	1.21	3.10	17.29
	1.0	47	58	89	629	0.81	2.21	15.76
	1.2	37	47	74	522	0.65	1.39	12.32
	0.4	112	132	190	906	1.47	3.08	15.42
$V_{\text{甲醇}}(\text{methanol})/V_{\text{H}_2\text{O}} = 55/45$	0.5	93	109	157	733	1.43	3.05	15.16
	0.6	79	92	134	621	1.41	3.02	14.82
	0.8	57	69	97	445	0.88	1.36	10.60

TML: trimethyllead chloride; TEL: triethyllead chloride; TPhL: triphenyllead chloride

可以看出, 在流动相组成不变的情况下, 保留时间和分离度都随流速的增大而减小, 即分离效果变差。如再提高甲醇组分含量, 则 ICP 炬易熄火。经比较可知, 当流动相组成选用 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{H}_2\text{O}} = 55/45$, 流速选用 0.6 mL/min 时, 在 11 min 即达到了 4 种铅形态最佳的有效分离, 典型的液质联用质量色谱图见图 1。其中水相为 0.1 mol/L 乙酸-0.1 mol/L 乙酸铵 ($\text{pH} = 4.70$) 的缓冲溶液, 各个铅形态标样的质量浓度均为 250 $\mu\text{g/L}$ 。

3.2.5 乙酸-乙酸铵缓冲液液的 pH 实验 通过改变缓冲溶液体系中乙酸-乙酸铵的摩尔浓度比来实现缓冲溶液 pH 值的变化。研究了流动相体系中乙酸-乙酸铵缓冲溶液 pH 值的变化对 4 种铅形态混标分离效果的影响。

结果表明, 当缓冲溶液 pH 值由大到小变化时, Pb^{2+} 、TML 的保留时间无明显的变化, TEL 保留时间明显提前, TPhL 的保留时间大大缩短。结合 t_R 与 R 综合考虑, 选择 0.1 mol/L 乙酸-0.1 mol/L 乙酸铵 ($\text{pH} = 4.70$) 作为缓冲溶液, 既有利于 Pb^{2+} 与 TML 的完全分离, 也尽可能地缩短了 TPhL 的保留时间。

3.3 校正工作曲线及标准加入回收实验

分别配制质量浓度均为 0、50、100、150、200、250 $\mu\text{g/L}$ 的 4 种铅形态的一系列混标, 另外配制浓度分别为 50 + 50、50 + 100、50 + 150 以及 100 + 100 $\mu\text{g/L}$ 的 4 种铅形态混标的加标溶液。在优化的条件下进行校正工作曲线及标准加入回收实验, 标准加入回收率 (见表 2) 在 93.8% ~ 115.6% 之间。各标样的校正工作曲线线性回归方程及相关系数分别是, Pb^{2+} : $y = 100.53x + 7189$, $r = 0.9581$; TML:

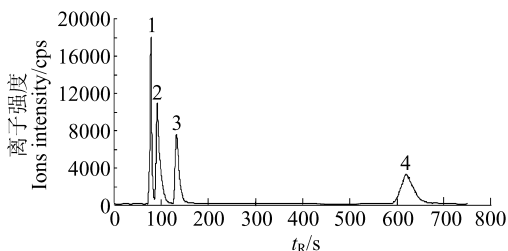


图 1 4 种铅形态的液质联用质量色谱图

Fig 1 Mass chromatographic spectra of four lead species by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry

1. Pb^{2+} ; 2. TML; 3. TEL; 4. TPhL.

$y = 101.24x + 1042.5$, $r = 0.9946$; TEL: $y = 90.542x + 678.38$, $r = 0.9957$; TPhL: $y = 34.302x + 201.95$, $r = 0.9939$ 。可以看出, Pb^{2+} 的校正工作曲线线性相关性较差,其余 3 种铅形态的线性相关性良好。自来水中铅形态的加标回收实验(见表 2)。因 Pb^{2+} 的空白较高,其加标回收率较差,TML, TEL 以及 TPhL 均有较好的回收率,范围在 92.1% ~ 116.5%。

3.4 精密度、灵敏度及检出限

液质联用得到的各个铅形态质量色谱峰强度以及保留时间(t_R)的相对标准偏差(RSD),以剪纸称重法计算 TPhL 峰面积的 RSD,灵敏度以及各铅形态的仪器检出限与方法检出限分别见表 3 和表 4。

可以看出,强度数据的精密度要比时间数据的精密度差,单个数据点的精密度与多个数据点平均值后得到的精密度基本相当。实验得

表 3 4 种铅形态的精密度及灵敏度 ($n = 8$)

铅形态 Lead species	精密度 Precision					灵敏度	
	强度对应的 RSD RSD of intensity (%)			t_R 对应的 RSD RSD of retention time (%)		Sensitivity/(cps/10 ⁻⁹)	
	实验值 Exp. value			文献值 ^[9] Ref. value		实验值 Exp. value	
						文献值 ^[9] Ref. value	
Pb^{2+}	7.4	8.4	4.2	1.3	1.0	303	385
TML	14.3	14.4	4.5	1.3	1.0	124	499
TEL	11.3	11.3	5.2	0.5	0.8	107	144
TPhL	9.1	8.3		0.9	0.6	4.5	40

注 (note): 强度数据取最大值的 RSD (RSD of the maximum intensity); 强度数据取最大值附近的 6 个点值的平均值得到的 RSD (RSD of the mean intensity of the six intensity near the maximum intensity); 最大强度值处对应时间的 RSD (RSD of the time of the maximum intensity); 为 中 6 个强度值处对应时间的平均值的 RSD (RSD of the mean time of the six time of the six intensity near the maximum intensity)

表 4 4 种铅形态的仪器检出限与方法检出限

铅形态 Lead species	仪器检出限 Equipment DL		方法检出限 Method DL			
	相对检出限 Relative DL ($\mu\text{g/L}$)	绝对检出限 Absolute DL (pg)	相对检出限 Relative DL ($\mu\text{g/L}$)		绝对检出限 Absolute DL (pg)	
			实验值 Exp. value	文献值 ^[9] Ref. value	实验值 Exp. value	文献值 ^[9] Ref. value
Pb^{2+}	0.27	5	1.89	0.32	38	32
TML	0.80	16	2.33	0.25	47	25
TEL	1.19	24	1.20	0.87	24	87
TPhL	3.07	61	1.96		39	

到的峰强度精密度比文献 [9] 差。由于本实验室的 ICP-MS 仪器软件中没有峰面积积分功能,在 $\lg I-t_R$ 图形中 Pb^{2+} 、TML 两峰相隔很近,其峰面积很小,难以采用手工剪纸称重法测量峰面积,只对 TPhL 进行了剪纸称重处理。比较可知,其峰面积对应的 RSD 明显低于强度对应的 RSD。可见,在进行定量分析时,采用峰面积计算的误差要比采用强度计算的误差小。 Pb^{2+} 和 TML 的绝对检出限文献值与实验值相当,TEL 的绝对检出限实验值明显低于文献值。

References

1 Wang Xiaoru (王小如), Sun Dahai (孙大海), Zhuang Zhixia (庄峙厦). Research on Major Problems in the Complex System of Traditional Chinese Medicine (中药复杂体系中重大科学问题探讨). Xiamen (厦门), Xiamen University Press (厦门大学出版社), 1998, 6: 60 ~ 73

2 Liang Shuxuan (梁淑轩), Sun Hanwen (孙汉文). Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chem. Anal.) (理化检验 化学分册), 2003, 39(7): 434 ~ 439

- 3 McBride M B. *J. Environ Qual*, **1995**, 24: 5 ~ 18
- 4 Lamy I, Bourgeviset S, Bemond A. *J. Environ Qual*, **1993**, 22: 731 ~ 737
- 5 Pan Yuanhai(潘元海), Jin Jun(金 军), Jiang Ke(蒋 可). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2000**, 28 (6): 666 ~ 671
- 6 Shen Hong(沈 宏), Xu Qing(徐 青), Yin Xuefeng(殷学锋). *J. Hangzhou Teachers College*(杭州师范学院学报), **1997**, 3: 111 ~ 117
- 7 Huang Zhiyong(黄志勇), Wu Xihong(吴熙鸿), Hu Guanglin(胡广林), Zhuang Zhixia(庄峙厦), Wang Xiaoru(王小如). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2002**, 30 (11): 1387 ~ 1393
- 8 Cai Zhuo(蔡 卓), Xiao Shaorong(肖少荣), Zheng Hailing(郑海林). *J. Guangxi University (Nat Sci ED.)* (广西大学学报(自然科学版)), **1996**, 21 (3): 242 ~ 246
- 9 AL-Rashdan A, Heitkemper D, Caruso J A. *J. Chromatogr Sci*, **1991**, 29 (3): 98 ~ 102
- 10 AL-Rashdan A, Vela N P, Caruso J A, Heitkemper D T. *J. Anal At Spectrom.*, **1992**, 7 (4): 551 ~ 555
- 11 Mester Z, Lord H, Pawliszyn J. *J. Anal At Spectrom.*, **2000**, 15 (4): 595 ~ 600
- 12 Yang H J, Jiang S J. *J. Anal At Spectrom.*, **1995**, 10 (11): 963 ~ 967

Lead Speciation Analysis by High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Pan Yuanhai*, Liu Xiangsheng, He Xiaoqing, Wang Changhua
(General Research Institute for Nonferrous Metals, Beijing 100088)

Abstract Speciation of inorganic lead (Pb^{2+}), trimethyllead chloride (TML), triethyllead chloride (TEL), triphenyllead chloride (TPhL) was investigated using high performance liquid chromatography (HPLC) with the detection of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) on a short reversed-phase liquid chromatographic column of 50 mm long in more than 10 minutes. Optimal chromatographic conditions were 0.1 mol/L acetic acid-0.1 mol/L ammonium acetate buffer at pH 4.70 and 55% methanol as the mobile phase with flow rate of 0.6 mL/min. Recovery of four lead species in de-ionized water and tap water are in the range of 93.8% ~ 115.6% and 89.3% ~ 137.8%, respectively. RSD of peak intensity and retention time is in the range of 7.4% ~ 14.3% and 0.5% ~ 1.3% and detection limits of equipment and method are in the range of 0.27 ~ 3.07 $\mu\text{g/L}$ and 1.20 ~ 2.33 $\mu\text{g/L}$, respectively.

Keywords Lead speciation, high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

(Received 9 December 2004; accepted 27 March 2005)

《毛细管电色谱及其在生命科学中的应用》新书问世

毛细管电色谱是近年发展起来的一种新型微分离技术,它整合了毛细管电泳与微径柱液相色谱的优点,通过在填充微细颗粒液相色谱填料的微径柱色谱柱两端施加直流高压电场,达到对痕量复杂生物及化学体系样品良好地分离。该书是作者近年来从事毛细管电色谱领域研究的积累和总结,全面介绍了毛细管电色谱基本原理、分离机理和分离行为,各类毛细管柱的制备方法和性能评价,加压毛细管电色谱仪的研制及应用实例。该书可供化学和生物专业研究生和科研人员参考阅读。

该书由清华大学罗国安、王明义、陈令新和梁琼麟著,科学出版社出版,定价 42.00 元。