

实验技术与方法

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2019.11.011

高效液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱法同时测定土壤中的阿散酸、洛克沙肿及其降解产物

安娅丽^{1,2}, 赵艳萍², 刘宁², 班睿^{1*}

(1. 贵州民族大学 生态环境工程学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 广东省测试分析研究所 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东省水环境污染在线监测工程技术研究中心, 广东 广州 510070)

摘要: 建立了高效液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱(HPLC-ICP-MS/MS)同时测定土壤中阿散酸(*p*-ASA)、洛克沙肿(ROX)及其降解产物无机砷(i-As)(亚砷酸(As(III))和砷酸(As(V)))、一甲基砷(MMA)和二甲基砷(DMA)等5种砷形态的分析方法。以0.1 mol/L NaH₂PO₄-0.1 mol/L H₃PO₄(体积比9:1)为提取剂,液固比为50 mL/g,样品经微波辅助提取(80 °C, 30 min)后,采用Hamilton PRP-X100阴离子交换柱(250 mm×4.1 mm, 10 μm),以60 mmol/L(NH₄)₂HPO₄-5%甲醇(pH 6.0)和水为流动相进行梯度洗脱,在15 min内实现了5种砷形态的良好分离。在优化条件下,各砷形态在0~500 μg/L范围内线性良好($r^2 \geq 0.999$),检出限为0.043~0.080 μg/kg(以As计),相对标准偏差为1.7%~3.8%。将该方法用于分析3种土壤样品,各砷形态的加标回收率为71.6%~106%。该方法简单、快速、准确、可靠,适用于土壤中阿散酸、洛克沙肿和常规砷形态的检测。

关键词: 高效液相色谱; 电感耦合等离子体串联质谱; 微波辅助萃取; 砷形态分析; 土壤

中图分类号: O657.7; X132 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)11-1353-05

Simultaneous Determination of *p*-Arsanilic Acid, Roxarsone and Their Degradation Products in Soils by HPLC-ICP-MS/MS

AN Ya-li^{1,2}, ZHAO Yan-ping², LIU Ning², BAN Rui^{1*}

(1. College of Eco-Environmental Engineering, Guizhou Minzu University, Guiyang 550025, China; 2. Guangdong Engineering and Technology Research Center for Online Monitoring of Environment Water Pollution, Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, Guangdong Institute of Analysis, Guangzhou 510070, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry(HPLC-ICP-MS/MS) was developed for the simultaneous determination of six arsenic species, i. e. *p*-arsanilic acid(*p*-ASA), roxarsone(ROX) and their degradation products arsenite(As(III)) and arsenate(As(V))(inorganic arsenic), monomethylated arsenic(MMA) and dimethylated arsenic(DMA) in soils. The soil samples were extracted with 0.1 mol/L NaH₂PO₄-0.1 mol/L H₃PO₄(9:1, by volume) as extraction solvent at a liquid-to-solid ratio of 50 mL/g, by microwave-assisted extraction at 80 °C for 30 min. Five arsenic species in the extracts were well separated within 15 min on a Hamilton PRP-X100 anion exchange column(250 mm×4.1 mm, 10 μm) using 60 mmol/L(NH₄)₂HPO₄ containing 5% methanol(pH 6.0) and water as mobile phases by gradient elution. Under the optimized conditions, there were good linear relationships for the analytes in the concentration range of 0-500 μg/L with their correlation coefficients(r^2) not less than 0.999. The limits of detection were 0.043-0.080 μg/kg for the analytes, and the relative standard deviations ranged from 1.7% to 3.8%. The method was applied in the analysis of three soil samples, and

收稿日期: 2019-06-12; 修回日期: 2019-08-02

基金项目: 广东省科学院发展专项资金项目(2019GDASYL-0103023); 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2017]2861, 黔科合基础[2018]1081)

* 通讯作者: 班睿, 博士, 教授, 研究方向: 环境分析化学, E-mail: chem_banrui@163.com

recoveries for the analytes were in the ranges of 71.6% – 106%. The developed method is simple, rapid, accurate and reliable, and is suitable for the determination of arsenic species in soils.

Key words: high performance liquid chromatography; inductively coupled plasma – tandem mass spectrometry; microwave-assisted extraction; arsenic species analysis; soil

阿散酸(*p*-ASA)和洛克沙肿(ROX)是一类有机砷化合物,常作为饲料添加剂用于畜禽饲养业^[1]。但两者大部分不能被动物肠道吸收,会通过畜禽废水或动物粪便释放到土壤中,进而造成农田土壤及地下水环境砷污染,对生态环境产生严重威胁^[2]。砷的毒性由形态决定,亚砷酸(As(Ⅲ))和砷酸(As(V))以及有机砷,特别是一甲基砷(MMA)和二甲基砷(DMA),已被公认为环境中砷的主要毒性形态^[3-4]。通常,As(Ⅲ)的毒性大于As(V),而MMA和DMA的毒性低于无机砷(*i*-As)^[3-4]。由于*p*-ASA和ROX在土壤中极易降解为毒性更高的其它砷形态(如*i*-As、MMA和DMA)^[5],因此明确有机砷饲料添加剂污染土壤中的砷形态对于评价其中砷的转化规律、毒性及生态风险具有重要意义。

元素形态分析的常用方法为高效液相色谱(HPLC)与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)联用法^[6-8],但目前同时检测阿散酸、洛克沙肿和常规砷的HPLC-ICP-MS方法分析时间较长(>20 min)^[2]。另外,传统的ICP-MS在分析As时,样品中存在的Cl元素会形成⁴⁰Ar³⁵Cl而干扰⁷⁵As的检测。而电感耦合等离子体串联质谱(ICP-MS/MS)技术^[9]利用O₂和As反应生成新的目标物⁷⁵As¹⁶O,能够消除⁴⁰Ar³⁵Cl的干扰,并提高检测灵敏度。

目前,有机砷和常规砷形态的常用提取方法为振荡提取法^[2],但该方法耗时长(>12 h),提取效率低。本文采用微波辅助加热提取,建立了一种高效、快速、准确测定*i*-As和4种有机砷形态(MMA、DMA、*p*-ASA和ROX)的HPLC-ICP-MS/MS法,可为评估土壤中的砷形态污染状况提供可靠依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 8800型电感耦合等离子体质谱仪、Agilent 1260型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);Hamilton PRP-X100(250 mm×4.1 mm, 10 μm)阴离子交换柱(美国Hamilton公司);TOPEX+全能型微波化学工作平台(上海屹尧仪器科技发展有限公司);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);离心机(上海安亭科学仪器厂);万分位电子分析天平(广州市授科仪器科技有限公司);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

标准物质:砷酸溶液(GB08667)、亚砷酸溶液(GB08666)和一甲基砷溶液(GB08668)(中国计量科学研究院);二甲基砷(德国Sigma公司);阿散酸和洛克沙肿(梯希爱(上海)化成工业发展有限公司);甲醇(色谱纯,德国默克公司);磷酸氢二铵、磷酸、二水合磷酸二氢铵(分析纯,广州化学试剂厂);其他试剂均为优级纯。

混合标准溶液:由于As(Ⅲ)、As(V)和MMA呈液态,DMA、*p*-ASA和ROX呈固态,因此先配制1 000 mg/L(文中所有砷溶液均以As计)DMA、*p*-ASA和ROX的单标溶液,然后分别精密移取适量As(Ⅲ)、As(V)、DMA、MMA、*p*-ASA和ROX单标溶液,用去离子水稀释配成质量浓度为2 mg/L的混合标准溶液。

1.2 仪器工作条件

HPLC条件:色谱柱:Hamilton PRP-X100(250 mm×4.1 mm, 10 μm);流速:1.5 mL/min;流动相:A为水,B为60 mmol/L(NH₄)₂HPO₄-5%甲醇(pH 6.0);梯度洗脱程序:0~3 min, 100% A;3~5 min, 100%~80% A;5~5.5 min, 80%~0% A;5.5~16 min, 0% A;16~17 min, 0%~100% A;17~18 min, 100% A。

ICP-MS/MS条件:高频发射功率:1 550 W;载气:高纯氩气,流速为0.7 L/min,补偿气流速为0.3 L/min;样品提升速度:0.3 r/s;采样深度:8 mm;采样锥:孔径为1.0 mm, Pt锥;截取锥:孔径为7.0 mm, Ni锥。蠕动泵速为0.4 r/s,积分时间为0.3 s,分析方式为脉冲、模拟,碰撞气为O₂,气体流量40%,检测质量数为*m/z* 75(As)、*m/z* 91(AsO)。

1.3 样品前处理方法

样品采集与保存: 实验采用3种类型的背景土壤样品, 其中园林土和稻田土来自广州市, 菜园土来自韶关市。实际饲料添加剂污染土壤样品采自清远市的养鸡场和养猪场。土壤样品在现场取样后, 用塑料密封袋保存, 运抵实验室后于避光处风干, 过2 mm筛后, 常温保存。

加标样品制备: 称取100 mg风干的土壤样品于10 mL离心管中, 加入As(III)、As(V)、MMA、DMA、*p*-ASA和ROX混合标准溶液, 各砷形态的加标水平为2 mg/kg, 避光老化24 h, 于-20 °C冷冻24 h以上, 冷冻干燥备用。

加标样品提取: 向冻干的加标样品中加入5 mL提取液, 将10 mL离心管置于盛有30 mL蒸馏水的微波消解罐中, 设定微波萃取温度为60~80 °C, 萃取时间为15~120 min, 萃取液经3 000 r/min离心5 min后, 取上清液过0.45 μm滤膜, 滤液在24 h内完成测定。优化液固比条件时, 相应地调整土壤的称样量和提取剂的添加量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

砷形态分析的常用色谱柱为C₁₈和阴离子交换柱。Liu等^[2]研究表明, C₁₈柱不适用于环境样品中有机砷饲料添加剂及其降解产物的检测。结合相关文献^[10], 本实验采用阴离子交换色谱柱Hamilton PRP-X100(250 mm×4.1 mm, 10 μm)进行分离。

流动相的成分、浓度和pH值对目标物的分离和保留具有显著影响。由于磷酸盐常作为流动相用于分离各种砷形态^[11], 因此考察了0~100 mmol/L (NH₄)₂HPO₄的分离效果, 发现60 mmol/L (NH₄)₂HPO₄可有效分离各种砷形态, 但ROX的峰形较宽。实验尝试在流动相中添加0~10%的甲醇, 发现添加5%甲醇可有效改善ROX的峰形。本实验最终采用纯水和60 mmol/L (NH₄)₂HPO₄-5%甲醇(pH 6.0)作为流动相, 在“1.2”所示的梯度洗脱方式下实现了6种砷形态的良好分离(见图1)。

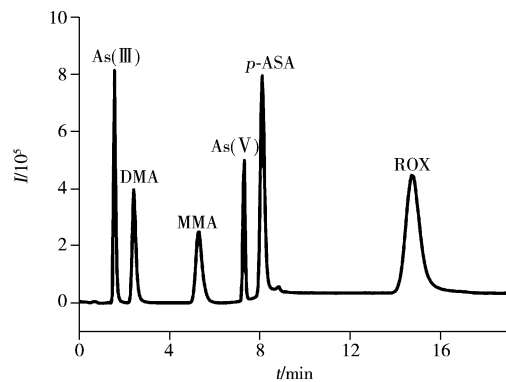


图1 6种砷形态的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of six arsenic species

2.2 质谱条件的优化

使用5 μg/L的砷单标准溶液对氧气流速进行优化, 使 m/z 75 (As)和 m/z 91 (AsO)的灵敏度最佳, 实验最终选择气体流量为40%; 同时用1 μg/L的Ce、Co、Li、Mg、Tl和Y调谐液对其他质谱参数进行优化, 使低质量数(m/z 7)、中质量数(m/z 89)和高质量数(m/z 205)的灵敏度最佳; 每次样品分析前, 需用1 μg/L的Ce、Co、Li、Mg、Tl和Y调谐液进行测试, 使各项指标(氧化物水平 $70\text{CeO}^+/140\text{Ce}^+ \leq 1.2\%$, 双电荷数 $70\text{CeO}^{2+}/140\text{Ce}^+ \leq 2.0\%$)满足要求。优化的质谱条件如“1.2”所示。

2.3 样品前处理条件的优化

2.3.1 提取剂的选择 砷形态分析的提取剂有三氟乙酸、有机酸、磷酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液^[12-13]。其中, 磷酸盐因与砷是同族元素, 其性质类似, 对砷的提取效果较好而常作为土壤中砷形态分析的提取剂^[14]。在提取剂与土壤的液固比为20 mL/g, 60 °C微波加热萃取30 min条件下, 分别考察了0.1 mol/L NaH₂PO₄-0.1 mol/L H₃PO₄(体积比9:1)和0.5 mol/L H₃PO₄两种提取剂对园林土、菜园土、稻田土3种加标(2 mg/kg)土壤中砷形态的提取效果。结果显示, 这2种提取剂对*p*-ASA和ROX的提取率较低, 分别为25.5%~53.6%和57.3%~89.8%。而0.1 mol/L NaH₂PO₄-0.1 mol/L H₃PO₄(9:1)对不同砷形态的提取效率总体优于0.5 mol/L H₃PO₄, 因此选其作为提取剂。

2.3.2 液固比的影响 以0.1 mol/L NaH₂PO₄-0.1 mol/L H₃PO₄(9:1)为提取剂, 在60 °C微波萃取30 min条件下, 以加标(2 mg/kg)菜园土为例, 考察了提取剂与土壤的液固比(2~100 mL/g)对各砷形态回收率的影响。结果如表1所示, 样品中各砷形态的提取回收率随液固比的增大而提高, 当液固比大于

50 mL/g 时, 阿散酸的提取率有所降低。综合考虑提取效率及提取剂用量, 选择液固比为 50 mL/g。

表 1 液固比对提取回收率的影响

Table 1 Influence of liquid-to-solid ratio on extraction recovery

Liquid-to-solid ratio (mL/g)	Extraction recovery (%)					
	i-As	DMA	MMA	p-ASA	ROX	Total
2	60.4	76.6	63.6	44.2	56.4	60.3
10	72.6	83.4	74.0	50.1	60.3	68.8
50	97.6	94.6	91.3	62.8	78.4	87.0
100	106	95.3	98.2	59.0	83.2	91.1

2.3.3 微波萃取温度的影响 以 0.1 mol/L NaH_2PO_4 - 0.1 mol/L H_3PO_4 (9 : 1) 为提取剂, 在液固比 50 mL/g, 微波萃取 30 min 条件下, 分别考察了微波加热温度(60、80、100 °C)对加标(2 mg/kg)菜园土中各砷形态回收率的影响。由表 2 可知, 随着温度增加, 各砷形态的回收率逐渐增大, 但温度由 80 °C 升至 100 °C 时, p-ASA 的回收率降低, 可能是由于高温导致 p-ASA 转变为 i-As。因此, 最终选择微波萃取温度为 80 °C, 该温度下各砷形态的回收率总体较好。

表 2 微波萃取温度对提取回收率的影响

Table 2 Influence of microwave temperature on extraction recovery

Temperature (°C)	Extraction recovery (%)					
	i-As	DMA	MMA	p-ASA	ROX	Total
60	95.8	94.2	94.3	71.7	82.3	89.0
80	100	95.0	96.4	79.3	94.7	94.3
100	108	95.0	94.0	69.1	96.1	94.9

2.3.4 微波萃取时间的影响 以 0.1 mol/L NaH_2PO_4 - 0.1 mol/L H_3PO_4 (9 : 1) 为提取剂, 在液固比 50 mL/g、微波温度 80 °C 条件下, 考察了微波萃取时间(15、30、60、120 min)对加标(2 mg/kg)菜园土中各砷形态回收率的影响。结果表明, 各砷形态的回收率随萃取时间的增加而增大, 萃取时间为 30 min 和 60 min 时, 各砷形态的回收率差别不大, 当萃取时间增至 120 min 时, 除 i-As 外其他砷形态的回收率均下降。为节省时间, 最终选择微波萃取时间为 30 min。

2.4 标准曲线、检出限与精密度

分别配制 0、5、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g/L}$ 的系列砷化合物混合标准工作溶液, 在优化的色谱和质谱条件下进行分析, 以各砷形态的峰面积(y)对质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)绘制标准曲线, 结果如表 3 所示。各砷形态在 0~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好, 相关系数 $r^2 \geq 0.9991$ 。以色谱峰信噪比 $S/N=3$, 计算得各砷形态的检出限(LOD)为 0.043~0.080 $\mu\text{g/kg}$; 以 50 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作溶液连续进样 6 次, 测得相对标准偏差(RSD)为 1.7%~3.8%。

表 3 各砷形态的线性方程、相关系数、检出限和相对标准偏差

Table 3 Linear equations, correlation coefficients(r^2), detection limits and relative standard deviations of different arsenic species

Arsenic specie	Linear equation	r^2	LOD($\mu\text{g/kg}$)	RSD(%)
As(III)	$y = 22\ 158x + 18\ 192$	0.999 8	0.043	1.7
DMA	$y = 21\ 579x + 23\ 434$	0.999 5	0.080	2.7
MMA	$y = 22\ 566x + 26\ 976$	0.999 4	0.047	3.8
As(V)	$y = 24\ 677x + 55\ 012$	0.999 4	0.047	1.5
p-ASA	$y = 18\ 080x + 1\ 918$	0.999 1	0.052	3.3
ROX	$y = 31\ 866x + 2\ 191$	0.999 1	0.058	3.1

2.5 加标回收率

采用本方法对园林土、稻田土和菜园土 3 种空白土壤进行加标回收实验, 加标水平为 0.5、2、5 mg/kg, 每个加标浓度平行 3 次。结果显示, i-As、DMA、MMA、p-ASA 和 ROX 的回收率分别为 71.6%~106%、90.5%~105%、85.1%~104%、77.6%~94.2% 和 92.3%~99.9%。3 种土壤中总砷的提取率达 81.4%~102%, 说明该提取方法的提取效果较好。

2.6 实际样品分析

采用本方法对广东省清远市的4份土壤样品进行砷形态分析(如表4)。结果显示,实际土壤中的砷主要以无机砷和一甲基砷的形式存在,其中无机砷含量最高。同时检出阿散酸和洛克沙肿,表明有机砷类饲料添加剂在养殖业中广泛使用,并残留于土壤中。

表4 实际样品的分析结果
Table 4 Analysis results of real soil samples $w/(mg \cdot kg^{-1})$

Sample	Location	Type	i-As	DMA	MMA	p-ASA	ROX
Soil 1	Qingyuan	Chicken farm	473 ± 3.9	- *	-	-	511 ± 3.9
Soil 2	Qingyuan	Chicken farm	440 ± 6.3	115 ± 0.1	107 ± 0.5	-	-
Soil 3	Qingyuan	Swine farm	1 080 ± 2.6	-	106 ± 0.5	329 ± 3.7	-
Soil 4	Qingyuan	Swine farm	2 650 ± 14.4	-	99 ± 1.8	264 ± 1.2	-

* not detected

3 结论

本文建立了一种微波辅助提取/HPLC-ICP-MS/MS测定土壤中无机砷、阿散酸、洛克沙肿、一甲基砷和二甲基砷的方法,整个提取操作可在30 min内完成,并在15 min内实现各砷形态的分离。结果表明,各砷形态的检出限为0.043~0.080 $\mu g/kg$,加标回收率为71.6%~106%。实际污染土壤样品的分析结果表明,阿散酸和洛克沙肿等饲料添加剂在养殖业中的广泛使用,使得各砷形态可能在养鸡场和养猪场附近土壤中残留,它们在土壤中的转化规律有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Fisher D J, Yonkos L T, Staver K W. *Environ. Sci. Technol.*, **2015**, 49: 1999-2012.
- [2] Liu X P, Zhang W F, Hu Y N, Cheng H F. *Microchem. J.*, **2013**, 108: 38-45.
- [3] Wilson S C, Lockwood P V, Ashley P M, Tighe M. *Environ. Pollut.*, **2010**, 158(5): 1169-1181.
- [4] Sun M, Liu G, Wu Q, Liu W. *Talanta*, **2013**, 106: 8-13.
- [5] Huang J H, Hu K N, Decker B. *Water, Air, & Soil Pollution*, **2011**, 219(1/4): 401-415.
- [6] Hou H F, Cui W J, Xu Q, Tao Z H, Guo Y F, Deng T L. *Int. J. Anal. Chem.*, **2019**, 2019: 1-6.
- [7] Li L, Bi R, Wang Z H, Xu C, Li B, Luan L L, Chen X F, Xue F M. *Spectrochim. Acta B*, **2019**, 159: 105653.
- [8] Wu S L, Wang X M, Yu J, Pan C, Wang K. *J. Instrum. Anal.* (吴思霖,王欣美,于建,潘晨,王柯.分析测试学报), **2018**, 37(4): 482-486.
- [9] Fernández S D, Sugishama N, Encinar J R, Sanz-Medel A. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(14): 5851-5857.
- [10] Jeong S, Lee H, Kim Y T, Yoon H O. *Microchem. J.*, **2017**, 134: 295-300.
- [11] Lu Y N, Chen J W, Zhang L T, Wei J H, Lin W. *J. Anal. Sci.* (陆奕娜,陈建伟,张林田,魏建华,林文.分析科学学报), **2016**, 32(1): 141-144.
- [12] Hu Y N, Zhang W F, Cheng H F, Tao S. *Environ. Sci. Technol.*, **2017**, 51(6): 3508-3517.
- [13] Nogueira R, Melo E A, Figueiredo J L, Santos J J, do Nascimento Neto A P. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2018**, 29(8): 1593-1600.
- [14] Mukhopadhyay S, Hashim M, Allen M, Gupta B S. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **2015**, 12(2): 617-632.

(责任编辑:丁岩)