

创新本底去除技术液相-电感耦合等离子体质谱法同时测定蔬菜 中 11 种砷形态及分布特征

赵发

(山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101)

摘要: 发展一种高灵敏度、高选择性、简单、高效可同时测定蔬菜中 11 种砷形态的方法, 考察 5 种提取方式和 8 种提取溶剂对蔬菜中砷形态的提取效率和砷形态的转化情况, 最终确定最优的提取方式, 对提取的条件进行优化。创新性的建立在线砷形态本底去除体系, 采用阀前柱技术, 去除环境中的砷对砷形态测定的影响。确定最优梯度洗脱条件, 解决以前研究分离度差, 色谱峰拖尾的问题, 实现砷形态完全分离。优化碰撞气流速去除 $^{75}\text{AsCl}$ 干扰。方法的定量限为 0.106~0.389mg/kg, 通过对蔬菜样品进行五个水平的加标考察方法的准确度和精密度, 加标回收率在 84.8~107%之间, RSD 在 1.9~5.6%之间。对五种蔬菜样品进行检测, 所有的蔬菜中均含有三价砷和五价砷, 有机砷只检测出砷甜菜碱和二甲基砷, 不同种蔬菜的有机砷含量及种类、五价砷和三价砷的比例和总砷含量差别较大, 这可能是有蔬菜对砷的吸收和转化的能力不同导致的。同种蔬菜中砷形态的种类和总砷含量也存在差别, 可能的原因是蔬菜在生长的土壤或者水等环境砷含量不同, 或者是在生长过程中使用了含砷的杀虫剂等原因造成的。

关键词: 电感耦合; 蔬菜; 砷

前言:

砷是重金属污染中的一种, 广泛存在的各种环境环境介质中的污染物。砷的急性和慢性毒性可涉及呼吸系统、心血管系统、神经系统和造血系统, 砷可以分为无机砷和有机砷, 无机砷为三价砷和五价砷, 有机砷主要包括砷甜菜碱、二甲基砷、砷胆碱、一甲基砷、卡巴肿、硝苯砷酸、4-羟基苯砷酸、洛克沙砷等。砷的毒性和它们的化学性质相关, 无机砷化合物比有机砷化合物毒性大, 三价砷比五价砷毒性强, 接触低剂量的三价砷也会引起不良反应。国际癌症研究机构 (IARC) 对无机砷化合物进行了分类, 作为第 1 组致癌物, 有机砷一般认为是低毒或无毒的。

先前的研究表明, 蔬菜受到砷污染的方式多种多样, 在发展中国家, 工业排放、废物及农兽药的使用可能是主要的污染途径, 一旦砷分散到水、土壤和空气中, 它们就可能被作物

积累。蔬菜通过吸收受污染的土壤溶液和暴露于受污染环境植物表面的污染物沉积物来吸收有毒金属，不同蔬菜中砷的浓度取决于土壤组成、养分平衡和砷的允许性、吸收能力和不同种类蔬菜对砷的吸收能力及当地环境中砷的含量。在收获、生产、运输和市场营销期间，砷可以沉积在蔬菜和表面上，导致蔬菜中砷的污染。

以前的研究一般对蔬菜中总砷的进行监测，只是局限于总砷的含量的研究，但是很少有学者对蔬菜中砷形态进行研究，导致蔬菜中砷的形态的毒理作用被忽视。不同种类蔬菜受环境的影响吸收砷的程度是否相同，不同种类蔬菜体内砷的转化和代谢过程是否相同，考虑到以上原因，正确的评判蔬菜中砷对人体的危害，应当对蔬菜中砷的形态及分布规律进行研究。

目前主要砷形态检测手段有石墨炉原子吸收、原子荧光、液相-电感耦合等离子体质谱、液相-有机质谱等仪器方法。但是石墨炉原子吸收对形态的检测需要在前处理过程中实现形态的分离，在对每一种元素形态分别检测。原子荧光对砷形态进行检测时有些有机砷并没有荧光相应，无法进行检测。HPLC-ICP-MS 目前已经成为最优的元素形态检测方法，可以实现在线对元素形态进行分离，一次进样对样品中多种元素形态进行检测，而且相比于其他检测手段，具有灵敏度高、检出限低、稳定性好等优点。

对于砷形态 HPLC-ICP-MS 的检测，其技术难点主要是砷形态的提取和砷形态分离检测的技术能力有限。在砷形态的提取方面，必须同时满足提高提取效率和保持砷形态的赋存形态不变，为了提高样品中砷形态的提取效率，多采用酶解或者溶剂提取的方式。酶提取主要应用于蛋白和脂肪含量较高动物性样品，其他样品一般采取无机溶剂和有机溶剂辅助提取。砷的不同形态在提取可能会发生相互转换，因此在砷形态的提取过程中很难保持砷形态的赋存形态。在砷形态的检测方面，由于色谱柱和流动相的限制目前检测的种类有限，检测的砷形态多了之后，难以实现多种砷形态的完美分离，因为 ICP-MS 依据砷质核比对不同形态进行定性，因此分离度存在问题会导致砷形态的定性错误，难以正确的评判蔬菜中砷对人体的危害和蔬菜中砷形态的分布规律。由于环境中存在大量砷元素，色谱流动相中极易存在一定含量的砷，因此在实验中如何去除流动相中本底带来的干扰是砷形态检测的难点，在使用 ICP-MS 对砷形态进行检测的过程中可能会存在砷测定的离子干扰，影响测定的准确性。

本研究的目的是发展一种高通量检测蔬菜中砷形态的方法，通过优化前处理方法和仪器条件，发展一种具有较强抗干扰能力的快速检测方法。本方法可以确定蔬菜中总砷和砷形态及其含量，对于理解蔬菜对于砷的吸收和砷形态的转化机制有帮助，有助于提高食品管理部门执行严格的规章制度，并有助于提高人们对蔬菜中砷含量及其危害的认识。

样品的提取方式优化

在蔬菜中砷形态的提取过程，最基本的条件是保证样品中所有砷形态均提取出来，并保证砷形态在提取的过程中没有发生转化。我们比较了五种提取方式和八种提取溶剂，其中提取方式包括两种超声辅助提取、两种微波辅助提取和一种加热辅助提取，提取溶剂包括：纯水、1%的盐酸、1%的磷酸、1%的硝酸、1%的硫酸、1%的醋酸、50%甲醇水和50%乙腈水。每种提取方式和提取溶剂都进行了评估和比较，首先根据提取效率选取提取方法和提取溶剂，然后确定在提取过程中砷形态是否发生转化，最终根据提取效率和砷形态的稳定性来确定最终的提取方式。

砷形态转化评估

通过考察提取效率，我们确定以硝酸为提取溶剂的微波辅助提取和以硝酸和盐酸为提取溶剂的加热辅助提取三种提取方法。评价提取方法除了对提取效率进行考察，还要对砷形态的转化进行评估。取 $10\mu\text{g/L}$ 的砷形态混合标液分别采用三种提取方式对提取方法进行砷形态转化的评估。

微波辅助提取结果表明，处理液中三价砷、砷胆碱、阿散酸测定值明显降低，而五价砷、4-羟基苯砷酸测定值明显升高，11种砷形态的平均测定值为 $10.0\mu\text{g/L}$ ，结果表明，砷形态在这种提取条件下会发生形态的转变，而平均测定值良好，证明三价砷、砷胆碱、阿散酸测定值低，并不是提取过程中损失，而是在提取过程中发生了砷形态的转化。

加热辅助提取实验结果表明：当以硝酸为提取溶剂时，处理液中三价砷（ $8.7\mu\text{g/L}$ ）、卡巴胂、阿散酸明显变低，而五价砷和4-羟基苯砷酸明显升高，其它6种砷形态的测定值在 $9.8\sim 10.4\mu\text{g/L}$ 之间，平均值为 $9.9\mu\text{g/L}$ ，结果表明，在以硝酸为提取溶剂五种砷形态发生明显变化，特变是阿散酸和4-羟基苯砷酸变化最为明显，硝酸对砷形态的影响和微波辅助提取的类似，因此硝酸不是合适的提取溶剂。当盐酸为提取溶剂时，11种砷形态测定值在 $9.5\sim 10.5\mu\text{g/L}$ 之间，平均值为 $10.0\mu\text{g/L}$ ，因此最终确定盐酸为最终提取溶剂。实验结果表明盐酸为合适的提取溶剂，我们对提取过程中，盐酸的浓度、提取时间、提取温度进行考察。

为了确定蔬菜中砷形态的提取方法，我们对五种提取方式和8种提取溶剂进行了考察，我们首先考察提取效率，然后选取提取效率达到满意结果后，再对砷形态是否发生转化进行考察，虽然有些提取方法和溶剂能够达到满意的提取率，但是在提取过程中会发生砷形态的转化，我们最终确定蔬菜中砷形态的提取方式为烘箱提取，提取溶剂为盐酸，在这种方式和方法下既可以达到满意的提取率，又可以保证没有砷形态的转化，保证了定量和定性的准确

动相中砷污染会对测定结果产生影响，产生和目标砷形态的保留时间相同的鬼峰，同时鬼峰的大小时大时小，影响测定结果的准确性，容易造成假阳性或假阴性。

在砷形态的分离过程中，我们采用碳酸铵作为流动相，我们通过对三个厂家的多批次碳酸铵进行实验，实验结果表明在 ASV 出峰的时间出现鬼峰，鬼峰的浓度最大可达到 1.23 $\mu\text{g/L}$ ，并且同一厂家不同批次的鬼峰大小也差距也比较大，例如一个厂家的不同批次的鬼峰浓度分别为 0.23、0.45、1.23 $\mu\text{g/L}$ 。

我们创新性消除了元素形态检测中流动相中的本底，通过阀前柱技术，在六通阀前接特定补集柱色谱柱，我们建立的流动相本底在线去除技术可以明显的改善在砷形态中梯度洗脱带来的干扰，同时此方法也可以应用于其他元素形态的测定，提高测定结果的准确性。

质谱条件的优化

我们对砷形态测定过程中 $^{75}\text{ArCl}$ 的干扰问题提出了解决的办法，但是并没有对采用的参数进行考察，在本次研究过程中我们对碰撞气参数进行进一步优化，我们将标液使用 HPLC-ICP-MS 进行检测，检测 ^{75}As 和 ^{35}Cl ，通过调节 He 的流速为 0、1、2、3、4、5ml/min 来监测 KED 模式去除干扰的能力，实验结果表明：当 He 流速为 0ml/min 时，在对 ^{75}As 进行检测时在 ^{35}Cl 的位置出现一个明显的干扰峰，随着 He 流速的增加，干扰峰逐渐变小，He 流速为 4ml/min 时，干扰峰彻底消失，继续增加 He 的流速为 5ml/min，干扰峰仍然消失，因此最终选取 He 流速为 4ml/min。

方法评价

一个分析方法最重要的是能否正确的反应待测物质在样品的含量，因此我们对本研究建立的蔬菜中砷形态的测定方法进行考察，为了验证本方法的可靠性，我们对方法的：线性、检出限、定量限、准确度、精确度进行考察。本方法的线性范围在 0.1-100mg/L，方法的线性范围 $R^2 > 0.9992$ ，线性良好。方法的检出限以三倍的信噪比计算，同时方法的定量限以 10 倍的信噪比来计算。ASB、DMA、As (III)、AsC、MMA、ASA、As (V)、CA、NIT、NAPP、ROX 的检出限为：0.032~0.118mg/kg，方法的定量限为 0.106~0.389 mg/kg，实验结果明显低于其他学者的研究结果。因为砷形态之间会发生相互转化，因此稳定可靠的标准物质比较少，为了验证方法的准确性，我们采取加标实验的方法进行验证，分别在蔬菜样品中加标量为 2.5、5、25、50、100mg/Kg 的加标试验 (n=6)，实验结果表明所有砷形态的加标回收率良好，在 84.8~107%之间，RSD 在 1.9~5.6%之间，具有良好的精密度。方法评价结果显示本方法可以准确、稳定的显示蔬菜中 11 种砷形态的含量。

实际样品的检测

我们对一百多批次蔬菜进行砷形态的检测，只检出四种砷形态，包括砷甜菜碱和二甲基砷两种有机砷，三价砷和五价砷两种无机砷，有机砷只在菠菜、韭菜、辣椒、芹菜中检出，六种蔬菜样品中均检出无机砷。

蔬菜种类不同检出有机砷的种类不同，而且含量差别较大，其中番茄和油菜有机砷均未检出，菠菜中只检出砷甜菜碱，检出比例为 8/25。韭菜中二甲基砷的检出率为 22/25，所有韭菜样品中均检出砷甜菜碱。辣椒中只有检出砷甜菜碱，而且只有一批次有检出。芹菜中砷甜菜碱含检出率为 3/24，二甲基砷的检出率为 13/24，检出砷甜菜碱的样品都含有二甲基砷。

不同种类蔬菜中有机砷的种类和含量差别较大，这可能于不通种类蔬菜对砷的吸收和富集能力不同造成的，相同的种类的蔬菜有机砷的含量也存在较大差异，韭菜中最高值明显高于其它样品中砷甜菜碱含量，辣椒中只有检出一批次砷甜菜碱，可能的原因是蔬菜在生长的土壤或者水等环境砷含量较高，或者是在生长过程中使用了含砷的杀虫剂等原因造成的。

所有蔬菜中均检出三价砷和五价砷，且无机砷的含量明显高于有机砷，菠菜样品中五价砷高于三价砷的比例为 24/25，番茄中五价砷高于三价砷的比例为 24/24，辣椒中五价砷高于三价砷的比例为 23/24，韭菜中五价砷大于三价砷的比例为 3/25，芹菜中五价砷大于三价砷的比例为 13/24，油菜中五价砷大于三价砷的比例为 13/20。不同蔬菜中五价砷和三价砷的含量比例是有一定规律的，这可能是由不同种类蔬菜自身对于不同砷形态的吸收和转化能力不同造成的。所有检测的蔬菜样品其砷含量主要是无机砷，根据总砷含量和无机砷总量作图，其线性相关系数在 0.9875~1.000 之间。不同种类蔬菜中总砷含量差别较大，番茄和辣椒可食用部分为果实，其总砷含量较低，油菜、芹菜、韭菜(、菠菜(9.301 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~117.612 $\mu\text{g}/\text{kg}$)可食用部分为叶，其总砷含量明显高于番茄和辣椒，可能原因是不同部位对于砷的富集能力不同造成。但是，相同种类蔬菜的总砷含量也存在较大差异，油菜砷含量的最高值和最低值相差 14 倍，其可能的原因是蔬菜在生长的土壤或者水等环境砷含量较高，或者是在生长过程中使用了含砷的杀虫剂等原因造成的。

结论

我们对比 5 种提取方式和 8 种提取溶剂，首先考察提取效率确定三种提取方式，然后评估砷形态的转化，确定以盐酸为提取溶剂，采用加热辅助提取的方式提取效率高并可以保持蔬菜中砷的赋予形态。通过考察盐酸浓度、提取时间和提取温度对提取的条件进行优化。创新性的建立在线砷形态本底去除体系，采用阀前柱技术，去除环境中的砷对砷形态测定的影

响，确定最优梯度洗脱条件，实现砷形态完全分离并不存在拖尾。采用氦气为碰撞气，并对氦气的流速进行考察，去除检测过程中 $^{75}\text{ArCl}$ 的干扰。我们对方法的线性、准确度、精密、检出限、定量限等进行考察，证明本方法对蔬菜中砷形态测定稳定可靠。

我们对五种蔬菜进行砷形态的测定，测定结果显示所有的蔬菜中均含有三价砷和五价砷，有机砷只检测出砷甜菜碱和二甲基砷，不同种蔬菜的有机砷含量及种类、五价砷和三价砷的比例和总砷含量差别较大，这可能是有蔬菜对砷的吸收和转化的能力不同导致的。同种蔬菜中砷形态的种类和总砷含量也存在差别，可能的原因是蔬菜在生长的土壤或者水等环境砷含量不同，或者是在生长过程中使用了含砷的杀虫剂等原因造成的。对于哪种含砷农药会造成蔬菜中砷形态含量的增加，环境中砷会对蔬菜砷含量及形态的影响程度，以及不同蔬菜对砷的吸收和转化效率还需要进一步研究。

本研究可以确定蔬菜中总砷和砷形态及其含量，对于理解蔬菜对于砷的吸收和砷形态的转化机制有帮助，有助于提高食品管理部门执行严格的规章制度，并有助于提高贸易商、农民和消费者对蔬菜中砷含量及其危害的认识。