

# 高效液相色谱法测定土壤中化学武器 降解产物二苯砷酸\*

李士杏<sup>1,2</sup> 刘五星<sup>1</sup> 黄玉娟<sup>1</sup> 滕应<sup>1</sup> 骆永明<sup>1,2†</sup>

(1 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008)

(2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

## HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYZING DIPHENYLARSINIC ACID, A DEGRADATION PRODUCT OF CHEMICAL WARFARE AGENT, IN SOIL

Li Shixing<sup>1,2</sup> Liu Wuxing<sup>1</sup> Huang Yujuan<sup>1</sup> Teng Ying<sup>1</sup> Luo Yongming<sup>1,2†</sup>

(1 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

关键词 高效液相色谱; 二苯砷酸; 土壤

中图分类号 X132 文献标识码 A

二苯氰砷(diphenylcyanoarsine)和二苯氯砷(diphenylchloroarsine)是一战和二战期间被大量制造和使用的一类呕吐剂和糜烂剂,在日制化学武器系统中俗称“红弹”。战后,大量化学武器被遗弃于中国、欧洲和日本,且大部分通过海洋倾倒在陆地填埋方式进行处置。二苯氰砷和二苯氯砷在环境中极不稳定,容易发生水解,在有氧条件下可生成二苯砷酸(diphenylarsinic acid, DPAA, 图 1)<sup>[1]</sup>。与三氧化二砷(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)相比,DPAA 具有更强的神经毒性和基因毒性<sup>[2]</sup>。2002 年,在日本卡米苏地区首次报道了

由于饮用含 DPAA 的井水导致当地居民出现中枢神经系统疾病,表现为行走困难、视觉障碍、失眠和记忆力下降。在地下水样品中发现砷的主要存在形态为 DPAA,最高浓度超过饮用水砷含量标准的 450 倍<sup>[2-4]</sup>。在中国境内,日军随意遗弃的化学武器约有 200 万枚,遍布 14 个省和自治区<sup>[5]</sup>。某化学武器填埋点的土壤中也曾检出 DPAA<sup>[6-7]</sup>。目前,DPAA 已成为一种新型环境污染物,引起国内外研究者的高度关注。建立环境样品中 DPAA 的分析方法具有必要性和紧迫性。

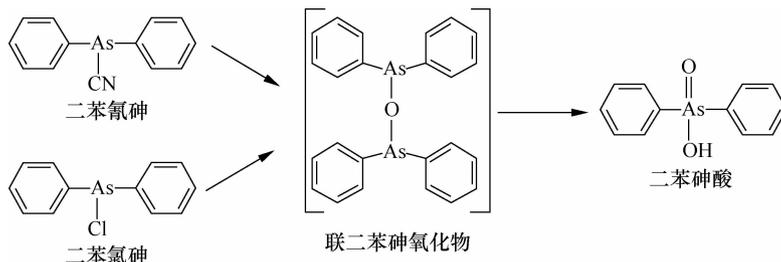


图 1 二苯氰砷和二苯氯砷的降解途径

\* 国家自然科学基金重大国际合作项目(40810180)、江苏省自然科学基金创新学者攀登项目(BK2009016)及中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-G-053-3)资助

† 通讯作者, E-mail: ymluo@issas.ac.cn

作者简介:李士杏(1978—),女,贵州龙里人,博士研究生,讲师,主要从事土壤重金属污染化学和生物修复研究。E-mail: lishixing@issas.ac.cn

收稿日期:2010-12-24;收到修改稿日期:2011-03-22

目前关于 DPAA 检测方法的报道为数不多,关于土壤中 DPAA 的提取和检测方法的研究尤其缺乏。高效液相色谱和等离子质谱联用法(HPLC-ICP-MS)是国外常用的检测方法,具有高灵敏度和选择性,可进行有机砷化合物和无机砷同时测定<sup>[8-9]</sup>。然而,该方法所需设备价格昂贵,运行成本高。气相色谱和质谱联用分析法(GC-MS)需进行衍生化处理,前处理过程复杂,样品回收率较低<sup>[2,6]</sup>。日本研究者提出采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分析发酵液中的 DPAA<sup>[10]</sup>,但并未用于土壤中 DPAA 的检测。国内学者李茂善等曾对高效液相色谱法分离检测几种苯基砷化合物进行了初步研究,但是对土壤中 DPAA 的提取方法未进行系统地比较和优化,且检出限较高,尚需进一步改进<sup>[7]</sup>。

本研究建立了反相高效液相色谱法检测土壤中 DPAA 的分析方法,优化了色谱分析条件和土壤中 DPAA 的提取方法。为含砷化学武器对土壤环境污染的监测工作和 DPAA 在环境中的累积和迁移等研究工作提供技术支持。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Shimadzu 高效液相色谱仪,配备 LC-20AT 二元泵,SIL-20A 自动进样器和 SPD-m20A 检测器;Millipore 超纯水设备;QH2-98A 全温度振荡培养箱。

二苯砷酸标准品(纯度 97%,日本 Wako 公司);乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司),其他试剂均为分析纯。所有溶液均采用 18 MΩ超纯水配制。

### 1.2 色谱条件

色谱分离柱采用 Shimadzu VP-ODS 反相 C18 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱温 30℃。流动相 A 为乙腈,B 为 0.02 mol L<sup>-1</sup>的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>水溶液,pH = 2.7(磷酸调节),A : B(体积比) = 19 : 81。流速为 1.0 ml min<sup>-1</sup>,进样体积为 10 μl。

### 1.3 标准溶液的配制

准确称取 10.000 mg DPAA 标准品溶于 100 ml 甲醇,配制成 100 mg L<sup>-1</sup>的标准储备液,密封,于零下 20℃保存。标准工作溶液由标准储备液逐级稀释得到。

### 1.4 样品准备

供试土壤于室内风干,混匀,研磨过 60 目筛备

用。准确称取土壤样品 0.500 g,加入 5 ml 提取剂,于 25℃下振荡或超声,于 4 000 r min<sup>-1</sup>离心 10 min,吸取上清液,过 0.22 μm 滤膜待测。称取土壤样品 10.00 g,加入浓度为 100 mg L<sup>-1</sup>的 DPAA 标准溶液 1ml,混合均匀,过夜老化,为土壤加标样品。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱分析条件优化

选用 Shimadzu VP-ODS 反相 C18 柱作为色谱分离柱,设置流动相中乙腈和磷酸缓冲液体积比为 19 : 81(pH 2.7),流速为 1.0 ml min<sup>-1</sup>,柱温 30℃,此时 DPAA 出峰时间为 10.7 min(图 2)。利用二极管阵列检测器的全波段扫描功能,得到 DPAA 的紫外吸收谱图,显示 DPAA 在 220 nm 处具有吸收峰(图 3)。因此,检测波长设为 220 nm。

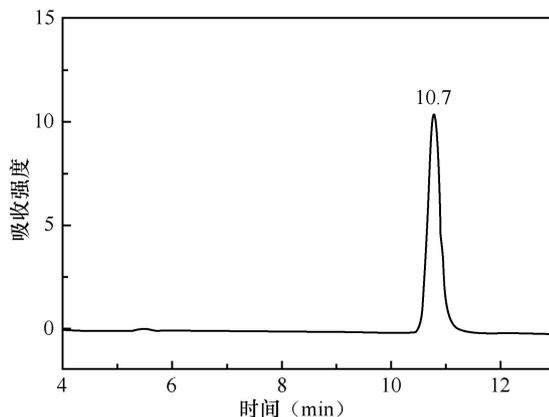


图 2 DPAA 标准溶液色谱图(5 mg L<sup>-1</sup>)

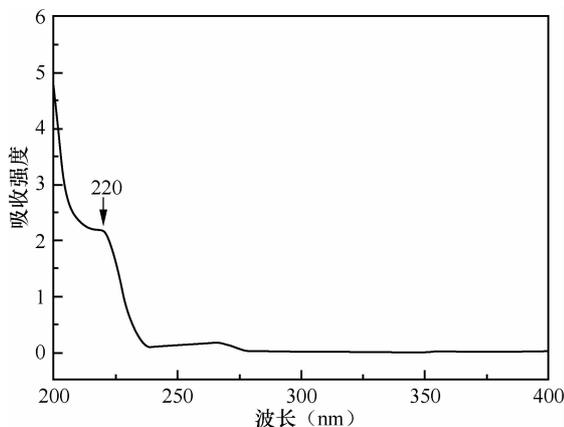


图 3 DPAA 紫外吸收光谱图

### 2.2 样品前处理优化

**2.2.1 提取剂** 比较了几种提取剂对于土壤中 DPAA 的提取效果(图 4)。甲醇难以提取土壤中的

DPAA,去离子水仅能提取部分 DPAA,提取率为 64.2%。磷酸盐是一种常用于提取生物样品中洛克沙砷的提取剂<sup>[11]</sup>,本文采用  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  作为提取剂。结果表明, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液的提取率明显高于去离子水,能将土壤中绝大部分(92.3%)的 DPAA 提取出来,是一种理想的提取剂。

有机化合物在土壤中的吸附机理十分复杂,包括静电吸附、离子交换吸附、范德华力吸附、氢键结合、配位交换以及与有机质之间的疏水吸附和分配。DPAA 具有较低的辛醇-水分配系数 ( $\lg K_{ow} = 2.08$ )<sup>[9]</sup>,在水溶液中可水解为离子状态,呈弱酸性。DPAA 与有机质之间的疏水吸附和分配过程可能不是控制 DPAA 在土壤中吸附的主导因素,所以甲醇提取率很低。而去离子水和磷酸盐溶液对土壤中 DPAA 有较高提取率,可能与土壤颗粒表面的阴离子交换过程有关。这一现象也表明土壤中的 DPAA 容易进入水相,具有较高的活性和迁移性,对生物体产生毒害和造成地下水污染的可能性很大。

为确定最佳提取剂浓度,比较了不同浓度的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液对土壤中 DPAA 的提取率,结果见图 5。 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  浓度为  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  时提取率迅速增加,而浓度从  $0.01$  增加到  $0.5$  时,提取率开始趋于稳定。其中,浓度为  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  的提取率略高于其他浓度,为最优提取剂。

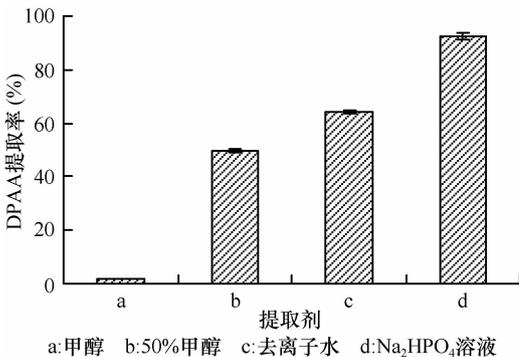


图 4 不同提取剂的提取率

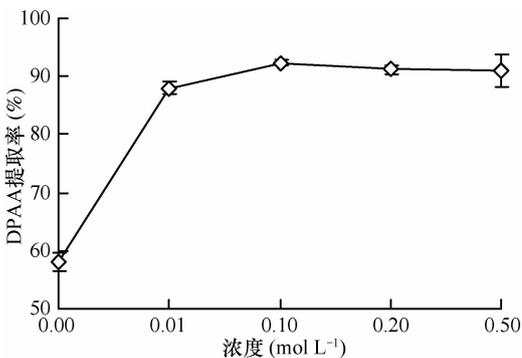


图 5 磷酸盐浓度对提取率的影响

**2.2.2 提取方法** 振荡和超声为两种常用提取方法。比较了振荡和超声两种提取方法和提取时间对提取率的影响(图 6 和图 7)。在 3 h 内,提取率随振荡时间的增加迅速增加;在 3 h 至 24 h,随振荡时间的增加,提取率变化不大。10 h 和 24 h 的振荡时间过长,会增加操作困难。振荡 6 h 的提取率(92.3%)高于 3 h 的提取率(90.4%),因此选择 6 h 为最佳振荡时间。

在 180 min 的超声时间内,提取率随超声时间的增加而增加。与振荡方式相比,180 min 的超声获得的提取率为 87.9%,略低于振荡 3 h 的提取率(90.4%)。超声本是一种在短时间内促进溶解,增大提取率的方式。然而,对于土壤中 DPAA 的提取,超声未能获得较振荡方式更理想的提取率。因此,振荡 6 h 为较优提取方法。

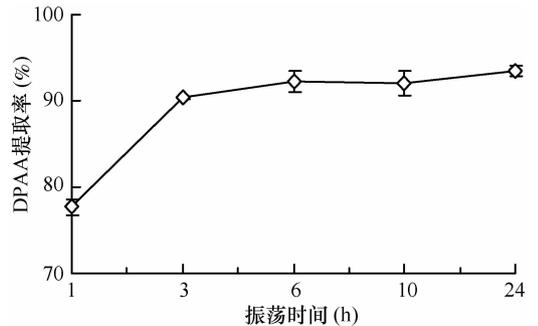


图 6 振荡时间对提取率的影响

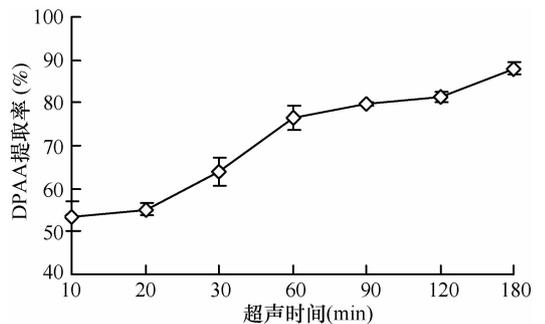


图 7 超声时间对提取率的影响

**2.2.3 土壤类型对提取效率的影响** 不同类型的土壤具有不同的组成和基本性质,从而对污染物的吸附和固持能力产生差异。为考察提取方法对于不同类型土壤的适用性,本文选用我国 4 种典型土壤,添加 DPAA 含量为  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ,比较了振荡提取法对 4 种土壤中 DPAA 的提取率(图 8)。该提取方法在 4 种不同土壤中的提取率为 90.0% ~ 95.9%,均能获得满意的提取效果。表明该提取方法具有较广的适用性。

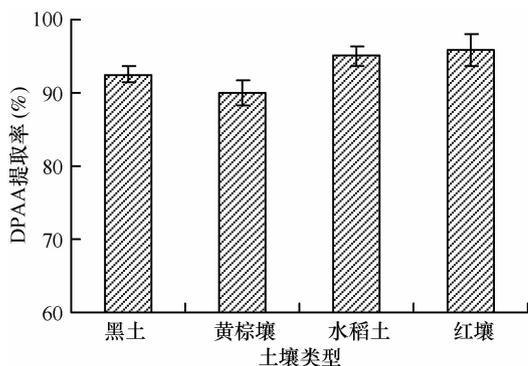


图 8 对不同类型土壤的提取率比较

### 2.3 分析方法参数

按上述优化的分析条件,测定不同浓度的 DPAA 标准溶液,以峰面积对浓度作图,得到 DPAA 检测的线性范围为  $0.1 \sim 20.0 \text{ mg L}^{-1}$ ,线性方程为  $y = 3.4 \times 10^5 x - 3650$ ,相关系数为 0.9998。连续进样 11 次,以 3 倍噪音计算仪器检出限为  $53 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ,以 7 次测定数据计算出相对标准偏差为 1.4%。回收率为  $92.4 (\pm 1.05) \%$ ,方法检出限为  $573 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ 。

## 3 结 论

本文建立了土壤中化学武器降解产物二苯砷酸(DPAA)的高效液相色谱检测方法,优化了测定条件和提取方法。具体方法为:采用  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  作为提取剂,于  $25^\circ\text{C}$   $200 \text{ r min}^{-1}$  下振荡 6 h,离心分离,上清液过  $0.22 \text{ } \mu\text{m}$  滤膜后待测。测定时以  $\text{C}_{18}$  反相柱为分离柱,乙腈和  $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH2.7) 溶液为流动相,体积比为 19:81,流速为  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$ ,于 220 nm 波长下检测。该方法检测限低,稳定可靠,适用性广,并且成本较低,操

作简便,是一种可广泛用于含砷化学武器埋藏地的环境污染监测、评价和研究工作的分析方法。

### 参 考 文 献

- [1] Ochi T, Suzuki T, Isono H, et al. In vitro cytotoxic and genotoxic effects of diphenylarsinic acid, a degradation product of chemical warfare agents. *Toxicol Appl Pharm*, 2004, 200(1): 64—72
- [2] Nakamiya K, Nakayama T, Ito H, et al. Degradation of arylarsenic compounds by microorganisms. *Fems Microbiol Lett*, 2007, 274(2): 184—188
- [3] Ishizaki M, Yanaoka T, Nakamura M, et al. Detection of bis(diphenylarsine) oxide, diphenylarsinic acid and phenylarsonic acid, compounds probably derived from chemical warfare agents, in drinking well water. *J Health Sci*, 2005, 51(2): 130—137
- [4] Ishii K, Tamaoka A, Otsuka F, et al. Diphenylarsinic acid poisoning from chemical weapons in Kamisu, Japan. *Ann Neuro*, 2004, 56(5): 741—745
- [5] 付小军. 日本遗弃在华化学武器问题研究. 上海:上海师范大学人文与传播学院, 2010: 63—67
- [6] 周黎明, 鲁胜利, 周建梅, 等. 日本遗弃化学武器污染土壤中砷的形态分析方法研究. *分析试验室*, 2008, 27: 84—88
- [7] 李善茂, 李伟, 岳丽君, 等. 高效液相色谱法分析环境样品中的苯基砷化合物. *色谱*, 2005, 23(5): 545—547
- [8] Baba K, Arao T, Maejima Y, et al. Arsenic speciation in rice and soil containing related compounds of chemical warfare agents. *Anal Chem*, 2008, 80(15): 5768—5775
- [9] Kinoshita K, Shida Y, Sakuma C, et al. Determination of diphenylarsinic acid and phenylarsonic acid, the degradation products of organoarsenic chemical warfare agents, in well water by HPLC-ICP-MS. *Appl Organomet Chem*, 2005, 19(2): 287—293
- [10] Harada N, Takagi K, Baba K, et al. Biodegradation of diphenylarsinic acid to arsenic acid by novel soil bacteria isolated from contaminated soil. *Biodegradation*, 2010, 21(3): 491—499
- [11] Schmidt A C, Kutschera K, Mattusch J, et al. Analysis of accumulation, extractability, and metabolization of five different phenylarsenic compounds in plants by ion chromatography with mass spectrometric detection and by atomic emission spectroscopy. *Chemosphere*, 2008, 73(11): 1781—1787