

使用单颗粒 ICP-MS 定量分析植物叶中的铜纳米颗粒

使用 Agilent 7900 ICP-MS 研究纳米农药在植物上的吸附和释放



作者

Arturo A. Keller^{1,2}, Yuxiong Huang^{1,2}, Jenny Nelson³

¹ 美国加州大学圣塔芭芭拉分校布伦环境科学与管理学院

² 美国加州大学圣塔芭芭拉分校纳米技术环境影响中心

³ 安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

前言

纳米形态的农用化学品效果可能会更好，从而可减少所需化学品的用量。这使纳米肥料和纳米农药受到越来越多的关注，使用范围也越来越广。过去十年间的研究增进了我们对纳米农用化学品特性和功效的了解。但我们仍需要了解它们对农作物的影响以及残留在食品上的可能性的更多信息。此外，与其他工程纳米颗粒 (ENP) 一样，纳米农用化学品也需要可靠的分析方法来支持其对人类健康和环境长期影响的研究。

ICP-MS 可用于测量环境和食品样品中纳米颗粒 (NP) 的含量，采用的技术称为单颗粒 ICP-MS (spICP-MS)^[1]。spICP-MS 适用于纳米颗粒表征，因为它可以测定颗粒数和粒径分布，以及颗粒和溶解元素组分的浓度。

由于 ICP-MS 具有高灵敏度和特异性，与动态光散射 (DLS) 或多角度光散射 (MALS) 等技术相比，它可以提供额外且通常互补的信息。此外，与扫描/透射电子显微镜 (SEM、TEM)、原子力显微镜 (AFM) 等技术或差速离心沉降 (DCS) 等分离技术相比，ICP-MS 分析速度更快，几乎不需要样品前处理^[2]。

铜是所有生物体中必需的微量元素，但过量的铜有毒性^[3]。含铜农药（如硫酸铜、氯氧铜和碳酸铜）已有多年使用史，主要用于防止真菌感染和藻类生长。实际上，商业杀菌剂的起源可追溯到偶然发现“波尔多混合剂”（由硫酸铜和熟石灰制成）的防霉性。19 世纪，法国波尔多地区会在葡萄藤上喷洒亮蓝色的苦味化学物质，以防止当地居民偷吃葡萄。偶然发现喷洒过的植物没有遭受该地区葡萄藤霜霉病的影响。这一现象使 Cu²⁺ 的杀真菌特性公之于众。

近年来，多种基于铜的农药纳米制剂已商品化。尽管早期研究没有明显关注与铜纳米农药有关的问题，但对含铜纳米颗粒进行表征和定量分析的常规方法开发将促进该领域的研究。在本研究中，使多种可食用作物的叶片接触纳米 CuO，模拟喷洒铜纳米农药。接触纳米 CuO 后，用去离子 (DI) 水清洗植物叶片，然后使用 Agilent 7900 ICP-MS 在 spICP-MS 模式下测定清洗水中的含铜纳米颗粒。

为给出膳食中铜摄入量的建议，欧洲食品安全局 (EFSA) 综合各项研究建议，为维持健康的铜平衡，需要使总膳食摄入量保持在 0.7 mg/天至 1.5 mg/天之间^[4]。欧盟 (EU) 指令 2002/46/EC 关于食品补充剂中维生素和矿物质的建议剂量上限为 4 mg/天。世界卫生组织建议饮用水中铜的参考值为 2 mg/L，可接受总膳食摄入量下限为 ~1.3 mg/天（来自所有来源），容许摄入量上限为 10 mg/天^[5]。美国医学研究院 (IOM) 规定的建议（下限）膳食允许值 (RDA) 为 0.9 mg/天，容许摄入量上限 (UL) 为 10 mg/天。美国国家环境保护局规定饮用水中铜的最大污染物浓度 (MCL) 为 1.3 mg/L (ppm)^[6]。

实验部分

标准品

主要粒径为 20–100 nm 的未涂覆纳米 CuO 购自 U.S. Research Nano-materials (Houston, TX, USA)。之前的研究^[7]测定该纳米颗粒在 pH 7 (0.5 mmol/L 磷酸盐缓冲液) 的 DI 水中的流体动力学直径 (HDD) 为 280 ± 15 nm。

标称直径 60 ± 4 nm 的金 NP 购自 nanoComposix (San Diego, CA)，用于测定 ICP-MS 雾化效率。雾化效率为检出的颗粒数除以参比溶液中已知存在的颗粒数得到的比。需要用雾化效率值计算颗粒数浓度（每毫升包含的颗粒数量），并将测得的颗粒信号转换为 NP 质量及其粒径^[8]。在不含金属聚丙烯的试管中用 DI 水将 60 nm 金 NP 标准品 (99% 纯度) 稀释为 100 ng/L 的 Au 浓度。

使用以 1% HNO₃ 配制的铜离子标样 (1 µg/L, ppb) 测定铜元素响应因子（用于将原始 NP 信号转化为颗粒粒径的方程式中所需的另一参数）。

样品前处理

叶类蔬菜甘蓝 (*Brassica oleracea*, var. *Acephala Lacinato*)、生菜 (*Lactuca sativa* var. *green leaf cultivar*) 和羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea*, var. *Acephala*) 样品产自 Cal-Organic 农场 (Bakersfield, CA, USA)，分析当天新鲜购买。将每种蔬菜叶样品切成 75 × 75 mm 的正方形，各平行制备三份。将纳米 CuO 悬浮于 DI 水中，超声处理 30 分钟后施于蔬菜叶表面。用分析移液管将 10 滴（每滴 20 µL）纳米 CuO 悬浮液（颗粒浓度 1 mg/L）均匀铺展在每个正方形叶片上，确保所有样品接触等量纳米 CuO。风干 2 小时后，用 10 mL DI 水清洗叶片三次。将三次清洗溶液分别收集于不含金属的聚丙烯试管中，准备分析。另使用相同步骤但不接触纳米 CuO 溶液，制得对照（未接触）叶片样品。采用电子显微镜 (FEI Tecnai G2 Sphera 200 kV TEM) 研究施用前后纳米 CuO 的形态和粒径。如需了解详细信息，请参阅“更多信息”部分中引用的完整出版物。

仪器

使用 Agilent 7900 ICP-MS 在 splCP-MS 模式下测定清洗溶液样品中纳米 CuO 的粒径和浓度。该仪器配备标准玻璃同心雾化器和石英雾化室、带小内径中心管 (1.0 mm) 的石英炬管以及标准镍接口锥。通过标准蠕动泵及泵管 (内径 1.02 mm) 将样品直接引入 ICP-MS 中。7900 ICP-MS 具有快速时间分辨分析 (快速 TRA) 模式, 允许以 100 μ s 的采样速率 (每秒测量 10000 次) 采集单个元素, 测量之间无需稳定时间。

研究采用 ICP-MS MassHunter 软件的单纳米颗粒应用模块进行方法设置、数据采集和数据分析。方法向导指导用户完成整个过程并自动给出或计算所需方法参数。7900 ICP-MS 的仪器设置如表 1 所示。

表 1. 7900 ICP-MS 运行条件

参数	值
RF 功率 (W)	1550
载气流速 (L/min)	0.67
补偿气流速 (L/min)	0
雾化室温度 ($^{\circ}$ C)	2
雾化器泵速 (rps)	0.1
采样深度 (mm)	8.0
氧化物比 (%)	1
积分时间 (μ s)	100
采集时间 (s)	90
监测质量	63 Cu
ORS ⁴ 池模式	无气体

分析前, 用 DI 水稀释清洗水样, 使颗粒浓度在 10–100 ng/L 之间。样品进样流速为 0.346 mL/min。通过实验确定颗粒化合物质量分数 (颗粒化合物质量/分析物质量) 并将其设为 1.33, 同时将 CuO 颗粒密度设为 6 g/cm³。

在分析当天进行 NP 样品前处理和稀释, 以免样品降解, 并最大程度减少 CuO 分解。样品初始稀释前及分析前, 将所有溶液置于超声水浴中超声 10 分钟。超声可确保悬浮颗粒分布均匀。

结果与讨论

对照样品 — 未接触 CuO NP 的叶片

采用 splCP-MS 分析对照样品 (来自未接触纳米 CuO 叶片的清洗水样) 中的含铜 NP。假设检出的任意含铜颗粒均具有与纳米 CuO 相同的物理化学性质 (密度和铜含量)。在对照样品上检出的任意 NP 可能来源于生长环境, 或随正常生产分布链引入。

采用 splCP-MS 分析来自未接触叶片的初级 (第一次) 清洗水样。在所有三种叶片类型的清洗水样中均检出粒径范围为 20–50 nm 的含铜 NP, 如图 1 所示。而在第一次清洗水样中, NP 浓度非常低, 为 30–90 ng/L (图 2)。此外还分析了另外两次清洗收集的水样, 结果如图 2 所示。

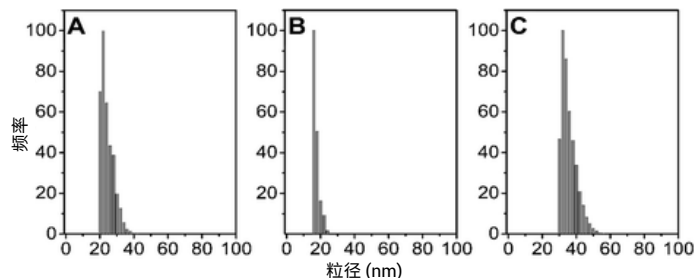


图 1. 来自 A 绿叶生菜、B 羽衣甘蓝和 C 甘蓝的未接触 (未添加 CuO NP) 样品初始清洗的 Cu NP 粒径分布。采用 splCP-MS 获得数据*

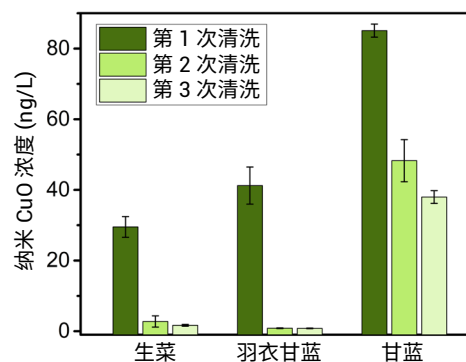


图 2. 来自三种叶片组织的未接触 (未添加 CuO NP) 样品清洗水样中的 Cu NP 浓度。误差条表示三次平行分析计算得到的标准偏差。采用 splCP-MS 获得数据*

* 经作者同意, 摘自 Springer Nature, A.A. Keller et al, *J Nanopart Res*, 2018, 20: 101. (2)

第一次清洗可将大多数含铜 NP 从生菜和羽衣甘蓝中除去（与第一次清洗中检出的浓度相比，第三次清洗中仅剩 5%）。甘蓝的总颗粒浓度最高（所有三个清洗步骤中测得的铜 NP 浓度总和），约为其他两种植物上检出总纳米 Cu 浓度的 4 倍或 5 倍。在初始清洗步骤后，甘蓝也保留了更多 NP，可能是由于其叶片较粗糙。来自未接触甘蓝叶第三次清洗水样中的 NP 浓度为第一次清洗水样浓度的 43%。

纳米 CuO 接触叶片组织的清洗水样

使用相同的 spICP-MS 方法分析由接触纳米 CuO 的每种植物叶片样品收集的清洗水样。NP 粒径中值和均值数据如表 2 所示。在第一次清洗水样中，检出的多数纳米 CuO 颗粒直径在 30–78 nm 之间。第一次清洗中除去大部分小颗粒，意味着在生菜第二次清洗以及所有三种叶片类型第三次清洗中检出的粒径中值和均值会更大。结果表明，小颗粒更容易从所有三种农作物叶片表面（特别是生菜的光滑表面）去除，而较大 NP 可能在第一次（和第二次）清洗后保留，说明它们可能残留在叶片表面裂缝或气孔中。

来自接触叶片第一次清洗水样中纳米 CuO 的浓度范围为 500–750 µg/L，如图 3 所示（注意对数坐标）。

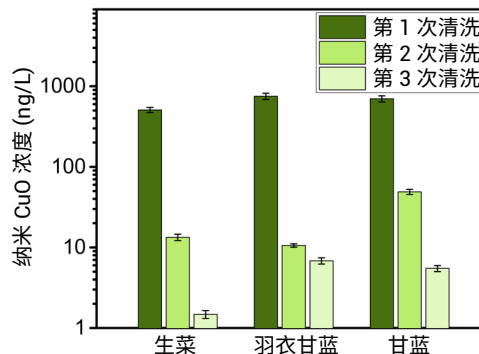


图 3. 来自接触纳米 CuO 的叶片组织清洗水样中的 CuO 颗粒浓度（对数坐标）。误差条表示三次平行分析计算得到的标准偏差。采用 spICP-MS 获得数据*

在羽衣甘蓝叶片清洗水样中检出的浓度最高 (752.5 µg/L)，其次是甘蓝和生菜的叶片 (508.6 µg/L)。结果表明，第一次清洗水样中的 Cu NP 浓度受叶面特征的影响。

表 2. 接触叶片组织清洗水样中纳米 CuO 的粒径中值和均值。采用 spICP-MS 获得数据*

参数	清洗次数	粒径中值 (nm)			粒径均值 (nm)		
		平均值	标准偏差	RSD (%)	平均值	标准偏差	RSD (%)
生菜	1	34.80	1.88	5.4	45.61	5.21	11.4
生菜	2	233.68	10.51	4.5	229.29	14.46	6.3
生菜	3	236.17	12.79	5.4	221.87	17.88	8.1
羽衣甘蓝	1	30.36	2.53	8.3	78.32	6.09	7.8
羽衣甘蓝	2	22.92	1.68	7.3	23.76	1.96	8.2
羽衣甘蓝	3	135.48	13.01	9.6	153.04	11.77	7.7
甘蓝	1	35.14	2.63	7.5	76.00	3.40	4.5
甘蓝	2	32.63	0.74	2.3	36.37	3.16	8.7
甘蓝	3	135.48	13.01	9.6	163.91	11.98	7.3

甘蓝叶表面的疏水性和表面粗糙度最大，可能使施用的 NP 悬浮液和清洗水流经叶片的区域有限。相比之下，生菜叶片更光滑、亲水性更强，可能允许纳米农药在表面的扩散范围更广。

对于所有三种叶片类型（特别是生菜叶），第 2 次和第 3 次清洗水样中检出的浓度明显低于第一次清洗水样中检出的纳米 CuO 浓度。与未接触叶片的结果一样，甘蓝在第一次清洗步骤之后比其他叶片类型保留了更多的纳米 Cu。在所有情况下，残留 Cu 浓度均低于 EPA 规定的饮用水中 Cu 的 MCL 1.3 ppm。

结论

使用 Agilent 7900 ICP-MS 在 spICP-MS 下能够常规测定食品和环境样品中存在的纳米颗粒。使用 ICP-MS MassHunter 单颗粒应用软件模块可简化方法开发。ICP-MS MassHunter 方法向导自动生成所有采集和数据分析参数，还可推荐样品列表。

利用纳米 CuO 模拟 Cu 纳米农药，采用 spICP-MS 方法对三种接触农作物清洗水样中的 NP 进行表征。使用 spICP-MS 可在单次快速分析中同时获得粒径分布、颗粒浓度和溶解元素浓度。其他技术通常无法提供这些信息。在清洗水样中检出 ppb 级的 NP。该范围低于美国 EPA 规定的饮用水中 Cu 的 MCL 1.3 mg/L (ppm)。本研究表明，清洗农作物的叶片是一种去除 NP 简单有效的方法。

spICP-MS 可用于研究 ENP（如纳米农用化学品）和植物之间的相互作用。该技术也可用于监测径流水、植物组织和清洗水样中的纳米农用化学品。更深入地了解上述问题可能会影响纳米农药的开发，降低 ENP 的人类和环境暴露的风险。

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018 年 11 月 8 日，中国出版
5994-0214ZHCN

参考文献

1. M.D. Montano, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single particle ICP-MS: advances toward routine analysis of nanomaterials. *Anal Bioanal Chem* 408, **2016**, 5053–5074
2. X. Sun, S.M. Tabakman, S. Won-Seok, K. Zhang, G. Zhang, S. Sherlock, L. Bai, H. Dai, Separation of Nanoparticles in a Density Gradient: FeCo@C and Gold Nanocrystals. *Ang. Chem.* **2009**, 48, 939–942
3. P. Trumbo, A.A. Yates, S. Schlicker, M. Poos, Dietary reference intakes: vitamin a, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, Iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc.* **2001**, 101(3):294–301
4. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for copper, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), *EFSA Journal*, **2015**, 13(10):4253
5. Guidelines for drinking-water quality, fourth edition, World Health Organization (2011), 在线访问网址 http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/
6. National Primary Drinking Water Regulations (NPDWR), US EPA, 2018 年 5 月访问, <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>
7. A.S.Adeleye, J.R. Conway, T. Perez, P. Rutten, A.A. Keller, Influence of extracellular polymeric substances on the long-term fate, dissolution, and speciation of copper-based nanoparticles, *Environ Sci Technol*, **2014**, 48, 12561–12568
8. H. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins, J. F. Ranville, Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 9361-9369

更多信息

A.A. Keller, Y. Huang, and J. Nelson, Detection of nanoparticles in edible plant tissues exposed to nano-copper using single-particle ICP-MS, *J Nanopart Res*, **2018**, 20: 101.
<https://doi.org/10.1007/s11051-018-4192-8>

