

杨阳, 王帅, 贾立明, 等. 液相色谱/串联质谱法测定水中 8 种亚硝胺方法优化研究[J]. 环境化学, 2019, 38(3): 708-711.

YANG Yang, WANG Shuai, JIA Liming, et al. Determination of 8 nitrosamines in water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (II) [J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(3): 708-711.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE®
沃特世公司(Waters®)

液相色谱/串联质谱法测定水中 8 种亚硝胺方法优化研究*

杨阳¹ 王帅¹ 贾立明² 陈鑫^{3**}

(1. 黑龙江东方学院, 哈尔滨, 150066; 2. 黑龙江省环境监测中心站, 哈尔滨, 150056; 3. 中国环境监测总站, 北京, 100012)

摘要 本文使用液相色谱串联质谱法测定水中的 8 种亚硝胺类化合物, 研究了样品的 pH 值、保存时间和离子源的选择对测定的影响。样品可采用固相萃取或直接进样的方式, 使用内标法定量, 液相色谱串联质谱法分析。经优化, 各组分的响应良好, 线性方程相关系数均大于 0.995。进样量为 10 μL 时, 固相萃取法的检出限为 5.47—8.24 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 直接进样法的检出限为 1.01—1.12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词 液相色谱串联质谱法, 亚硝胺, 固相萃取, 直接进样。

Optimization of method for determination of 8 nitrosamines in water by liquid chromatography and tandem mass spectrometry

YANG Yang¹ WANG Shuai¹ JIA Liming² CHEN Xin^{3**}

(1. East University of Heilongjiang, Haerbin, 150066; 2. Heilongjiang Provincial National Environmental Monitoring Station, Haerbin, 150056; 3. China National Environmental Monitoring Station, Beijing, 100012)

Abstract: In this study, eight nitrosamines in water were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The effect of the pH, storage time and ion source selection on the assay was discussed. The samples can be determined by solid phase extraction or direct injection, and quantified by internal standard method. Using liquid chromatography tandem mass spectrometry, the response of each component was good, and the linear equation correlation coefficient was greater than 0.995. Liquid chromatography tandem mass spectrometry has high sensitivity, good selectivity, fast and accurate. When the injection volume is 10 μL , the detection limit of solid phase extraction is 5.47—8.24 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, and the detection limit of direct injection is 1.01—1.12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Keywords: liquid chromatography/tandem mass spectrometry, nitrosamines, solid phase extraction, direct injection.

目前, 亚硝胺的检测方法有多种。EPA Method 607 是使用气相色谱-氮磷检测器 (GC-NPD) 或热能分析器 (GC-TEA) 对生活污水和工业污水中三种常见的亚硝胺的测定方法进行了规定, 包括 N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二苯胺、亚硝基二正丙胺, 方法分离效果较差。EPA Method 521 是以固相萃取为前处理方法, 使用 GC/MS/MS 检测饮用水中浓度水平为 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 N-二甲基亚硝胺、N-甲基乙基亚硝胺、N-二乙基亚硝胺、N-亚硝基吡咯烷、N-亚硝胺哌啶、N-二丙基亚硝胺和 N-二丁基亚硝胺, 检出限和回收效率较高。安大略省环境部于 2004 年公布了饮用水中 NDMA 的检测方法, 该方法是用固相萃取法进行前处理, 利用气相色谱 (GC) 与高分辨质谱 (MS) 结合的技术对目标物进行分离和定量。EN 71—12:2013 使用 LC-MS/MS 检测方法检测婴儿奶嘴中亚硝胺及亚硝胺前体物迁移。2016 年 10 月, 欧洲标准化委员会 (CEN) 审批通过了弹性体或橡胶奶嘴及安抚奶嘴中亚硝胺和亚硝基物质相关的新标准 EN 12868:2017, 该标准中将液相色谱-质谱联用

* 松花江流域水生生物试点监测专项, 2017 年度黑龙江省高等教育教学改革研究项目 (SJGY20170317), 2017 年度黑龙江东方学院科研项目 (HDFHX170116), 2017 年度黑龙江东方学院科研项目 (HDFHX170101), 黑龙江省高等教育科学研究“十三五”规划课题 (16G386) 资助。

** 通讯联系人, E-mail: chenxin@cnemc.cn, Tel: 18611696797

(LC-MS)作为亚硝胺和亚硝基物质的替代性分析方法.

2016 年我国颁布了国家环境保护标准《水质 亚硝胺类化合物的测定 气相色谱法》(HJ 809—2016),该方法使用气相色谱法,分析组分为 N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二乙胺、N-亚硝基二正丙胺和 N-亚硝基二苯胺.当取样量为 250 mL 时,4 种组分的方法检出限分别为 0.86、0.78、0.65、0.96 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.目前我国还未制定地表水中 N-亚硝胺类化合物的标准限值,但参考国外的饮用水质量标准,此标准方法也不能完全满足环境管理要求.

已有的标准绝大多数使用的分析方法为气相色谱或者气相色谱质谱法.目前各国还没有在水质检测方面出台关于 N-亚硝胺类污染物的液相色谱串联质谱的标准检测技术方法,我国目前也仅有 HJ 809—2016 是针对水质中亚硝胺类化合物的检测方法.

本文是对已完成工作进行补充,包括电离源的选择、pH 的确定、样品的保存等实验,除此以外,实验亦尝试了直接进样的方式,与固相萃取法进行了比较,为后人的研究提供了参考.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

液相色谱/串联质谱仪(LC-MS/MS,美国赛默飞公司 Dionex Autotrace 280 全自动固相萃取仪);配有大气压化学电离源(APCI);液相色谱柱:HSS T3 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.8 μm .固相萃取装置:全自动或手动的固相萃取装置均可,只要能完成活化、萃取、淋洗、吹干、洗脱功能即可,本实验使用 Dionex Autotrace 280 全自动固相萃取仪.浓缩蒸发装置:目标化合物均具有一定的挥发性,样品浓缩过程应在较为温和的条件下进行,为有效控制回收效率,样品浓缩使用平行浓缩蒸发仪 Caliper TurboVap II.

本研究中的亚硝胺类化合物为 8 种组分,分别是 NDMA、NDEA、NMor、NPip、Npyr、NMEA、NDBA、NDPA.

亚硝胺混合标准溶液(上海 Anpel-o2i, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),包含 N-亚硝基二甲胺(NDMA)、N-亚硝基二乙胺(NDEA)、N-亚硝基吗啉(NMor)、N-亚硝基吡啶(NPip)、N-亚硝基吡咯烷(Npyr)、N-亚硝基甲乙胺(NMEA)、N-亚硝基二丁胺(NDBA)、N-亚硝基二丙胺(NDPA);同位素内标(NDMA-d6、NDPA-d14)(上海 Anpel-o2i 纯度均 $\geq 98\%$, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);甲醇、甲苯、二氯甲烷(农残级、Dikma 试剂),甲酸(色谱级,科密欧试剂),20%甲醇-水溶液作为杂质淋洗液,二氯甲烷作为洗脱剂,15mL.

1.2 实验方法

固相萃取法:取 500 mL 水样,在中性至弱碱性条件下($\text{pH}=6\text{—}8$)用固相萃取方式萃取水中亚硝胺,清洁的地表水和地下水萃取后的有机相浓缩至 1 mL 后直接用 LC-MS/MS 分析测定,成分复杂的工业废水和生活污水通过层析柱(硅酸镁柱或碱性氧化铝柱)净化后,有机相被浓缩至 1 mL 后再用 LC-MS/MS 进行分析测定,依据目标化合物的保留时间定性,内标法定量.

直接进样法:水样经过滤或离心,调节水样 pH($\text{pH}=6\text{—}8$),经 0.22 μm 滤膜过滤之后直接进样,用 LC/MS/MS 进行检测.根据保留时间和特征离子峰定性,内标法定量.

液相色谱、质谱详细分析条件请参考《液相色谱串联质谱法测定水中 8 种亚硝胺(I)》.

2 结果与讨论

2.1 样品 pH 条件的确定

为了确定水样的 pH 范围,以获得最好的加标回收率,试验分别在酸性($\text{pH}=4\text{—}6$)、近中性($\text{pH}=6\text{—}8$)和碱性($\text{pH}=8\text{—}10$)条件下对浓度为 20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 6 份空白加标水样使用固相萃取方法萃取,萃取液经浓缩后测定.结果表明,pH 在近中性时测得的样品加标回收率相对较高,其次是酸性,碱性条件下亚硝胺化合物的平均加标回收率最低,所以本方法选择调节水样 pH 至近中性.

2.2 电离源的选择

本研究考察了 ESI 正离子模式下 8 种 N-亚硝胺的仪器响应(峰面积),并对各参数进行优化.使用相同的流动相、流速、进样体积和梯度洗脱程序分析 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 N-亚硝胺混合标准溶液,将每个目标物在 APCI 模式下的仪器响应定义为 100%,ESI 模式下得到的各目标物的相对仪器响应列于表 1.

表 1 ESI 模式下 N-亚硝胺类化合物的仪器响应相对值

Table 1 Relative value of instrumental response of nitrosamines at ESI mode

目标化合物 Target compound	NDMA	NDBA	Npyr	NMEA	NDEA	NPip	NDPA	NMor
相对值%	45.41	74.34	60.01	61.61	62.12	57.13	79.44	72.44

从表 1 可以看出,在 APCI 模式下目标化合物的仪器响应均高于 ESI 模式.此外,考虑到本研究中的目标化合物大多

属于中等极性或弱极性化合物,更适于在 APCI 模式下电离,加之 APCI 的抗干扰能力更强,受样品基体的影响更小,因此实验选择 APCI 作为电离源^[1].

2.3 标准曲线

配制浓度依次为 0、10、20、40、100、200 μg·L⁻¹ 的 N-亚硝胺系列标准溶液,在该浓度范围内 8 种组份的相关系数均大于 0.995,线性关系良好(表 2).

表 2 N-亚硝胺化合物各组分标准曲线
Table 2 Standard curves of components of N-nitrosamines

序号	名称	校准曲线	相关系数 <i>r</i>
1	NDMA	$Y=4.75X-0.0312$	0.999
2	NMor	$Y=1.85X+0.131$	0.995
3	NPyr	$Y=0.927X+0.0146$	0.999
4	NMEA	$Y=9.63X+0.0201$	0.999
5	NDEA	$Y=4.63X+0.0312$	0.999
6	NPip	$Y=12.9X-0.072$	0.999
7	NDPA	$Y=5.06X-0.0162$	0.999
8	NDBA	$Y=4.90X-0.00452$	0.999

注: *Y*:定量离子对的峰面积;*X*:质量浓度,mg·L⁻¹.

2.4 方法检出限

固相萃取法检出限:根据《HJ/T 168—2010》中空白实验未检出目标物质的检出限测定方法,本实验以添加浓度为 0.040 μg·L⁻¹ 的水样浓度作为检出限的测定浓度,配制 7 份平行水样,经全程序分析,得到检出限、测定下限,固相萃取法的检出限范围为 5.47—8.24 ng·L⁻¹,详细数据见表 3.

直接进样法检出限:根据《HJ/T 168—2010》中空白实验未检出目标物质的检出限测定方法,选择 5.0 μg·L⁻¹ 作为检出限的测定浓度,配制 7 份浓度为 5.0 μg·L⁻¹ 的水样,过 0.22 μm 滤膜后直接进样分析.直接进样法的检出限范围为 1.01—1.12 μg·L⁻¹.

表 3 固相萃取法、直接进样法检出限结果(ng·L⁻¹, *n*=7)
Table 3 Detection limits of SPE and direct injection(*n*=7)

组分	固相萃取法/(ng·L ⁻¹)		直接进样法/(ng·L ⁻¹)	
	检出限	测定下限	检出限	测定下限
NDMA	7.80	31.21	1.05	4.21
NMor	7.28	29.14	1.07	4.30
NPyr	7.13	28.50	1.12	4.46
NMEA	6.76	27.05	1.04	3.89
NDEA	6.55	26.22	1.01	4.16
NPip	8.24	32.95	1.03	4.14
NDPA	7.30	29.19	1.05	4.19
NDBA	5.47	21.88	1.06	4.22

2.5 精密度和准确度

固相萃取法:对 3 个浓度水平分别为 20.0、50.0、100.0 ng·L⁻¹ 的 N-亚硝胺类化合物空白加标水样经过前处理后,定容至 1.0 mL,上机分析,每个浓度水平配制 6 份平行样品,计算回收率、相对标准偏差,.

直接进样法:对 3 个浓度水平分别为 10.0、25.0、50.0 μg·L⁻¹ 的 N-亚硝胺类化合物空白加标水样进行了精密度测试,每个浓度水平配制 6 份平行样品,计算回收率、相对标准偏差,两种方法的实验结果数据见表 4.

从表 4 可以看出,固相萃取法加标回收率范围为 63.1%—93.5%,相对标准偏差(RSD)范围为 1.9%—12.1%.直接进样法加标回收率范围为 94.4%—107.1%,相对标准偏差(RSD)范围为 2.4%—7.5%.相比较而言,直接进样法测定亚硝胺类化合物的加标回收率(*n*=6)要优于固相萃取法,且直接进样法快速省时,费用低.但是固相萃取法获得的检出限更低,在实际水体测定过程中,可能更接近环境中亚硝胺类污染物的含量.

2.6 样品的保存

实验采集的样品 4 ℃ 冷藏、避光保存条件下,选择 50 ng·L⁻¹ 和 200 ng·L⁻¹ 两种加标浓度样品连续测试 5 d,由实验结果可知,采样之后前 3 d 连续测定,目标物的稳定性较好,维持在一个相对稳定水平,第四天继续测定,目标物开始降解速率明显加快,因此建议样品采集后应在 3 d 内完成分析.

表 4 样品空白加标精密度与准确度结果(%,n=6)

Table 4 Precision and accuracy results of sample blank marking(n=6)

名称	固相萃取法						直接进样法					
	20 ng·L ⁻¹		50 ng·L ⁻¹		100 ng·L ⁻¹		10 μg·L ⁻¹		25 μg·L ⁻¹		50.0 μg·L ⁻¹	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
NDMA	63.1	8.5	72.2	6.2	92.0	3.8	95.4	6.8	101.2	3.7	101.3	5.6
NMor	67.3	8.7	80.9	9.5	93.3	6.6	94.7	7.1	102.5	2.6	103.0	3.9
NPyr	75.4	8.6	80.5	11.0	93.5	6.5	94.5	7.4	102.4	3.4	103.5	5.9
NMEA	75.7	7.7	82.3	7.6	88.8	5.5	96.0	6.3	102.2	4.3	101.2	6.4
NDEA	77.5	7.4	80.0	10.2	87.6	1.9	98.7	6.2	101.3	3.0	103.2	3.4
NPip	78.1	9.0	84.9	12.1	89.4	4.4	94.4	7.5	101.8	2.4	101.1	4.4
NDPA	77.3	8.2	79.7	11.3	89.6	3.8	95.5	6.9	102.1	2.5	101.8	5.1
NDBA	75.5	7.9	81.3	8.3	92.1	3.9	94.5	7.1	100.7	3.4	107.1	2.6

3 结论

本文研究了水样 PH 值的最佳调整范围、样品的保存时间、离子源的选择等条件对测定亚硝胺化合物的影响.水样在采集之后,调整 pH 值在 6—8 的范围、3 d 之内、使用 APCI 源进行测定有较好的实验结果,并探讨了分别使用固相萃取法和直接进样法的方式对加标回收率的影响.结果表明,固相萃取法的检出限范围为 5.47 —8.24 ng·L⁻¹,直接进样法的检出限范围为 1.01 —1.12 μg·L⁻¹;水中加标浓度为 20、50、100 ng·L⁻¹时,固相萃取法的平均加标回收率分别为 63.1%—78.1%、72.2%—84.9%、87.6%—93.5%,相对标准偏差分别为 7.4%—9.0%、6.2%—12.1%、1.9%—6.6%;加标浓度为 10.0、25.0、50.0 μg·L⁻¹时,直接进样法的加标回收率为 94.4%—98.7%、100.7%—102.5%、101.1%—107.1%,相对标准偏差为 6.2%—7.5%、2.4%—4.3%、2.6%—6.4%.相比较而言,固相萃取法的检出限更低,为纳克升水平,更接近环境中污染物的浓度水平,而直接进样法较快速、测试费用低,且具有更好的加标回收率结果.可根据实验室的实验条件选择适合的方法进行测定,如果二种方法都可实现,建议使用固相萃取法作为前处理方式.

参考文献(References)

[1] 黄理纳,李函珂,蚁乐洲,等.HPLC-APCI-MS/MS 法测定与口接触玩具及儿童用品中 14 种可迁移 N-亚硝胺及可 N-亚硝化物质[J]. 质谱学报, 2016,37(5):453-464.

HUANG L N, LI H K, YI L Z, et al. Determination of 14 Migrations of N-Nitrosamines and N-Nitrosatable Substances in Toys and Children's Products by HPLC-APCI-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2016,37(5):453-464(in Chinese).