

应用纪要

使用液相色谱-串联四极杆质谱法通过直接进样测定饮用水中的卤代乙酸和丙烯酰胺

Janitha De-Alwis, Stuart Adams, Linda Schlittenbauer, Hannah Willmer

Waters Corporation



摘要

本研究旨在证明一种直接进样测定饮用水中丙烯酰胺和卤代乙酸的方法优于2020年新版欧盟饮用水指令的要求。使用反相液相色谱方法，在ACQUITY UPLC I-Class PLUS与Xevo TQ-S micro联用系统上完成方法性能研究。方法性能的评估方法为：向包含氯化铵添加剂（用作防腐剂）的矿泉水中加入九种卤代乙酸和丙烯酰胺，每种化合物以三种浓度加入（卤代乙酸：2、4和30 $\mu\text{g/L}$ ；丙烯酰胺：0.02、0.04和0.08 $\mu\text{g/L}$ ），每种浓度的样品重复测定22次。在每个加标浓度下，所有分析物的平均回收率均在97%至102%之间，且RSD均小于8%。只需不到8 min的LC-MS/MS运行时间和10 μL 进样体积即可实现此结果。在不经用户干预的情况下，将2 $\mu\text{g/L}$ 卤代乙酸和0.1 $\mu\text{g/L}$ 丙烯酰胺矿泉水校准标样进样分析270次，评估重现性。结果显示，对于所有检测的分析物，峰面积响应RSD小于10%，保留时间RSD小于1%。根据方法性能研究中最低浓度校准标样的结果可知，各卤代乙酸和丙烯酰胺的定量限(LOQ)分别为0.5 $\mu\text{g/L}$ 和0.02 $\mu\text{g/L}$ 。这些LOQ优于新版欧盟饮用水指令中对MCAA、DCAA、TCAA、MBAA和DBAA总和(60 $\mu\text{g/L}$)以及丙烯酰胺(0.1 $\mu\text{g/L}$)的要求。

优势

- 本应用涵盖丙烯酰胺以及新添加的卤代乙酸的现有要求，实验室效率因此提高
- 优于2020年新版欧盟饮用水指令的要求
- 快速反相LC-MS/MS方法无需样品预浓缩、衍生化或专用的离子色谱仪

简介

卤代乙酸是一种潜在的人类致癌物¹，在对含有机物的水进行消毒的过程中形成，已受到越来越多的关注。丙烯酰胺是一种公认的人类致癌物²，可通过水网灌浆使用的灌浆剂和饮用水净化使用的絮凝剂污染饮用水。

使用快速、高效的方法测定饮用水中的卤代乙酸和丙烯酰胺污染物非常重要，因为我们需要识别并管控饮用水源中与化学污染物相关的风险。世界卫生组织(WHO)于2017年更新了指南³，欧盟也在新版欧盟饮用水指令中设立了化学污染的新标准⁴。新指令纳入了MCAA、DCAA、TCAA、MBAA和DBAA（参数值为60 $\mu\text{g/L}$ ），并指出仍然需要持续监测丙烯酰胺（参数值为0.1 $\mu\text{g/L}$ ）。US EPA在《国家饮用水基本条例》(National Primary Drinking Water Regulations)中纳入5种卤代乙酸(HAA MCL = 60 $\mu\text{g/L}$)和丙烯酰胺（零容忍）⁵。

常用的卤代乙酸分析方法在以GC-ECD、GC-MS(/MS)测定时需要进行样品前处理或衍生化，也可直接进样至离子色谱-MS(/MS)系统^{6, 7, 8}。我们开发出一种将反相液相色谱与串联四极杆质谱仪联用直接进样小体积样品进行分析的方法，适用分析物同时包括卤代乙酸和丙烯酰胺。这种方法可以减少样品前处理和/或衍生化需求，降低与之相关的潜在分析物损失风险。该方法不使用HILIC，避免了耗时的色谱柱重新平衡过程，并且无需增加离子色谱分离系统。

实验

样品描述

从软水（英国威姆斯洛）和硬水（英国约克）地区收集多份1 L自来水样品，运输到应用实验室（英国威姆斯洛）。在英国购得多份1 L普通矿泉水样品用作基质空白。

方法条件

在实验室收到饮用水样品后，将其分为50 mL等分试样，并加入5 mg氯化铵作为防腐剂^{1,7}。然后将样品储存于4 °C冰箱中以待分析。

临分析之前，将50 µL甲酸加入50 mL样品中。然后将所得混合物的等分试样转移至2 mL液相色谱样品瓶中，再加入同位素标记的内标（丙烯酸d3）以测定丙烯酸。利用外标法测定卤代乙酸，丙烯酸-d3仅用作丙烯酸的内标。

完成方法开发阶段后，使用2批包含33个加标的矿泉水样品进行方法性能研究：以低、中和高浓度（卤代乙酸加标浓度为2、4和30 µg/L，丙烯酸加标浓度为0.02、0.04和0.08 µg/L）加标的样品各11个。使用LC-MS级水和矿泉水运行校准标样，在第一批样品中评估基质效应。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
样品瓶：	TruView LCMS认证样品瓶12 × 32 mm透明玻璃 螺纹颈口样品瓶（部件号：186005666CV）
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ SB 1.8 µm, 2.1 × 100 mm（部件号：186004119）
柱温：	30 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	10 µL

流速: 0.4 mL/min

流动相A: 0.05%乙酸的水溶液
(LC-MS级)

流动相B: 0.05%乙酸的甲醇溶液 (LC-MS级)

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	99	1	6
3.5	0.4	95	5	6
4.0	0.4	10	90	6
5.0	0.4	10	90	6
6.5	0.4	99	1	6
7.5	0.4	99	1	6

质谱条件

质谱系统: Xevo TQ-S micro

电离模式: ESI+ (用于丙烯酰胺), ESI- (用于HAA)

采集范围: MRM

毛细管电压: 在两种极性下均为0.5 kV

锥孔气流速: 50 L/h

脱溶剂气温度：	600 °C
脱溶剂气流速：	1000 L/h
离子源温度：	150 °C

数据管理

信息学软件：	MassLynx 4.2版
--------	---------------

结果与讨论

表1中列出的MRM突出显示了本研究在定量并确认卤代乙酸和丙烯酰胺时所用的优化离子通道。鉴定出丙烯酰胺的质子化母离子和MCAA、DCAA、MBAA、BCAA和DBAA的去质子化母离子。对于TCAA、BDCAA、CDBAA、TBAA，将(M-COOH)⁻鉴定为适合使用的母离子碎片。从灌注实验产生的质谱图中鉴定出稳定的源内碎片，将该碎片进一步处理以生成碎片离子。本应用纪要提供的结果表明，这是一种有效的卤代乙酸分析方法，也是文献中报道的卤代乙酸常用分析方法^{1,6}。

分析物	保留时间 (min)	极性	加合物	MRM	锥孔电压 (V)	CE (eV)
丙烯酰胺	1.35	ESI+	[M+H] ⁺	72.1>55.0	20	8
				72.1>26.9		12
丙烯酰胺d3	1.34	ESI+	[M+H] ⁺	75.0>58.1	20	8
二氯乙酸(DCAA)	0.84	ESI-	[M-H] ⁻	126.9>82.9	2	8
				128.9>84.9		10
一氯乙酸(MCAA)	0.86	ESI-	[M-H] ⁻	93.0>49.0	2	12
				93.0>35.0		6
一溴一氯乙酸(BCAA)	0.90	ESI-	[M-H] ⁻	172.9>128.9	2	10
				170.9>126.9		10
一溴乙酸(MBAA)	0.97	ESI-	[M-H] ⁻	138.9>80.9	2	10
				136.9>78.9		10
二溴乙酸(DBAA)	0.98	ESI-	[M-H] ⁻	214.9>170.8	2	11
				218.9>174.8		11
三氯乙酸(TCAA)	1.39	ESI-	[M-COOH] ⁻	118.9>34.7	10	8
				116.9>34.7		8
一溴二氯乙酸(BDCAA)	1.56	ESI-	[M-COOH] ⁻	160.8>78.9	10	8
				162.9>78.9		8
一氯二溴乙酸(CDBAA)	1.79	ESI-	[M-COOH] ⁻	208.8>80.8	10	12
				206.8>78.8		12
三溴乙酸(TBAA)	2.06	ESI-	[M-COOH] ⁻	250.8>78.8	20	12
				252.8>80.8	15	12

表1.分析物及相应同位素标记丙烯酰胺类似物的MRM通道（定量通道以粗体显示）

在开始方法性能研究之前，先对采集的饮用水和矿泉水样品进行卤代乙酸和丙烯酰胺筛查。在任何水样中均未检出丙烯酰胺。在矿泉水中未检出卤代乙酸。在软水中仅未检出TBAA，使用标准加入法定量其余8种卤代乙酸，得到的浓度范围为0.33 μg/L~11.1 μg/L。在硬水中仅检出DBAA，使用标准加入法定量得出其浓度为0.44 μg/L。由于软质饮用水和硬质饮用水样品中检出的化合物水平都会影响方法性能研究，因此选择矿泉水作为代表性样品类型。为模拟从自来水公司收集的样品，向所有样品（和校准标样）中加入氯化铵（防腐剂），并在临分析之前添加甲酸以反映当前的做法。

研究基质对分析物响应的影响。表2突出显示了“溶剂”标准品（在本例中为LC-MS级水）和基质标准品（矿泉水）的定量结果差异。因此，根据水样类型对校准标样进行基质匹配是使用该方法的重要操作。

化合物名称	基质效应
丙烯酰胺	120%
MCAA	64%
TCAA	102%
DCAA	64%
MBAA	79%
BDCAA	97%
BCAA	76%
CDBAA	104%
DBAA	86%
TBAA	102%

表2.基质效应，LC-MS级水与矿泉水中的响应

本研究使用2个分析批次评估方法性能，每个批次包含低、中、高浓度各11个加标样品，其中卤代乙酸的加标浓度分别为2、4和30 $\mu\text{g/L}$ ，丙烯酰胺的加标浓度分别为0.02、0.04和0.08 $\mu\text{g/L}$ 。整个方法性能研究使用的矿泉水均按照实验部分所述的方法处理。用矿泉水制备基质匹配校准标样，其中卤代乙酸的浓度范围为0.5~80 $\mu\text{g/L}$ ，丙烯酰胺的浓度范围为0.02~0.8 $\mu\text{g/L}$ 。图1展示了该方法的预期校准曲线。所有决定系数均高于0.996，标准曲线的残差均低于15%。表3展示了测得的校准性能。方法性能批次的结果见表4，结果表明，该方法的性能足以定量饮用水中的卤代乙酸和丙烯酰胺。图2所示为矿泉水加标样品（相对于标准加入法测定硬水）中所有化合物在低加标浓度下获得的色谱图示例。根据方法性能研究中最低浓度校准标样的结果可知，各卤代乙酸和丙烯酰胺的定量限(LOQ)分别为0.5 $\mu\text{g/L}$ 和0.02 $\mu\text{g/L}$ 。在方法性能研究之前实施的灵敏度研究表明，多种HAA都能在0.05 $\mu\text{g/L}$ 的浓度下检出。这些LOQ优于新版欧盟饮用水指令(5)的要求：MCAA、DCAA、TCAA、MBAA和DBAA总含量不超过60 $\mu\text{g/L}$ ，丙烯酰胺不超过0.1 $\mu\text{g/L}$ 。

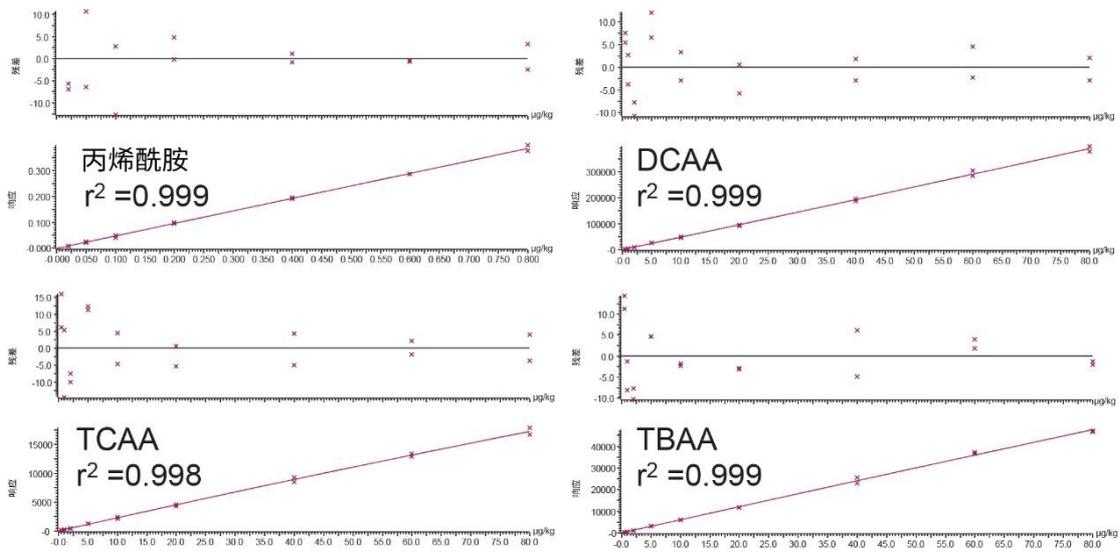


图1.含防腐剂的矿泉水中丙烯酰胺、DCAA、TCAA和TBAA的典型标准曲线

化合物名称	定量通道	决定系数	残差	范围
丙烯酰胺	72.1>55.0	0.999	<15%	0.02-0.80 ppb
MCAA	93.0>35.0	0.999	<15%	0.5-80 ppb
TCAA	118.9>34.7	0.998	<15%	0.5-80 ppb
DCAA	126.9>82.9	0.999	<15%	0.5-80 ppb
MBAA	138.9>80.9	0.999	<15%	0.5-80 ppb
BDCAA	160.8>78.9	0.997	<15%	0.5-80 ppb
BCAA	172.9>128.9	0.999	<15%	0.5-80 ppb
CDBAA	208.8>80.8	0.998	<15%	0.5-80 ppb
DBAA	214.9>170.8	0.999	<15%	0.5-80 ppb
TBAA	250.8>78.8	0.999	<15%	0.5-80 ppb

表3. 验证批次中矿泉水校准标样的典型校准参数

化合物	加标浓度		
	低 - 真实度 (%RSD)	中 - 真实度 (%RSD)	高 - 真实度 (%RSD)
丙烯酰胺	100 (7.3)	97 (3.1)	99 (3.1)
MCAA	97 (5.8)	99 (4.5)	98 (5.4)
TCAA	101 (5.3)	104 (4.2)	101 (4.1)
DCAA	96 (3.5)	100 (2.9)	100 (3.1)
MBAA	98 (4.7)	101 (5.3)	101 (4.2)
BDCAA	102 (6.0)	105 (2.7)	102 (2.8)
BCAA	97 (3.8)	100 (3.8)	100 (3.5)
CDBAA	100 (5.1)	102 (4.5)	99 (4.8)
DBAA	98 (4.7)	100 (3.6)	98 (1.7)
TBAA	102 (4.6)	105 (3.3)	100 (3.3)

表4.使用矿泉水进行方法验证所得的准确度参数。卤代乙酸的低、中、高加标浓度分别为2、4和30 $\mu\text{g/L}$ ，丙烯酰胺的加标浓度分别为0.02、0.04和0.08 $\mu\text{g/L}$ （每个浓度下 $n = 22$ ）。

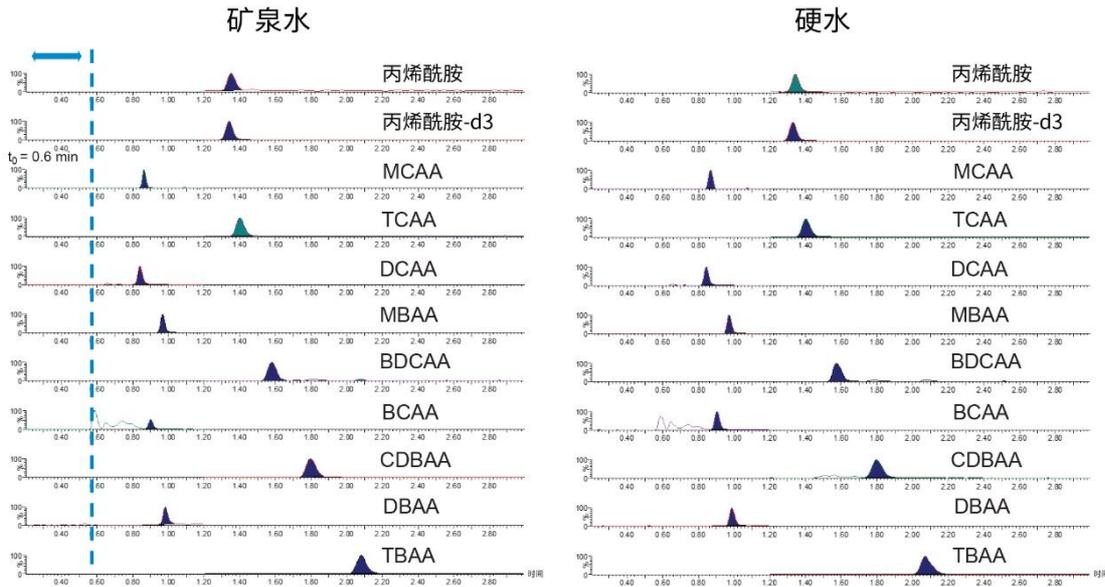


图2.矿泉水和硬水样品中加入卤代乙酸(2 $\mu\text{g/L}$)和丙烯酰胺(0.1 $\mu\text{g/L}$)所得的定量通道色谱图

峰响应和保留时间稳定性是方法验证过程中研究的重要因素。为此，利用所述方法对包含2 $\mu\text{g/L}$ 卤代乙酸和0.1 $\mu\text{g/L}$ 丙烯酰胺的矿泉水基质标准品连续进样270次，进行重现性研究。所有分析物的峰面积响应变化均低于10% RSD，保留时间稳定性均优于0.7% RSD。详细结果见表5，所选分析物的保留时间见图3。

	丙烯酰胺	MCAA	TCAA	DCAA	MBAA	BDCAA	BCAA	CDBAA	DBAA	TBAA
% RSD (峰面积)	7.2	6.1	8.2	7.4	6.2	8.3	4.7	4.9	4.4	4.5
% RSD (RT)	0.4	0.3	0.5	0.3	0.3	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6

表5.矿泉水基质标准品（含2 $\mu\text{g/L}$ 卤代乙酸和0.1 $\mu\text{g/L}$ 丙烯酰胺）在270次进样中的重现性。这是一组连续进样，无需操作人员干预。

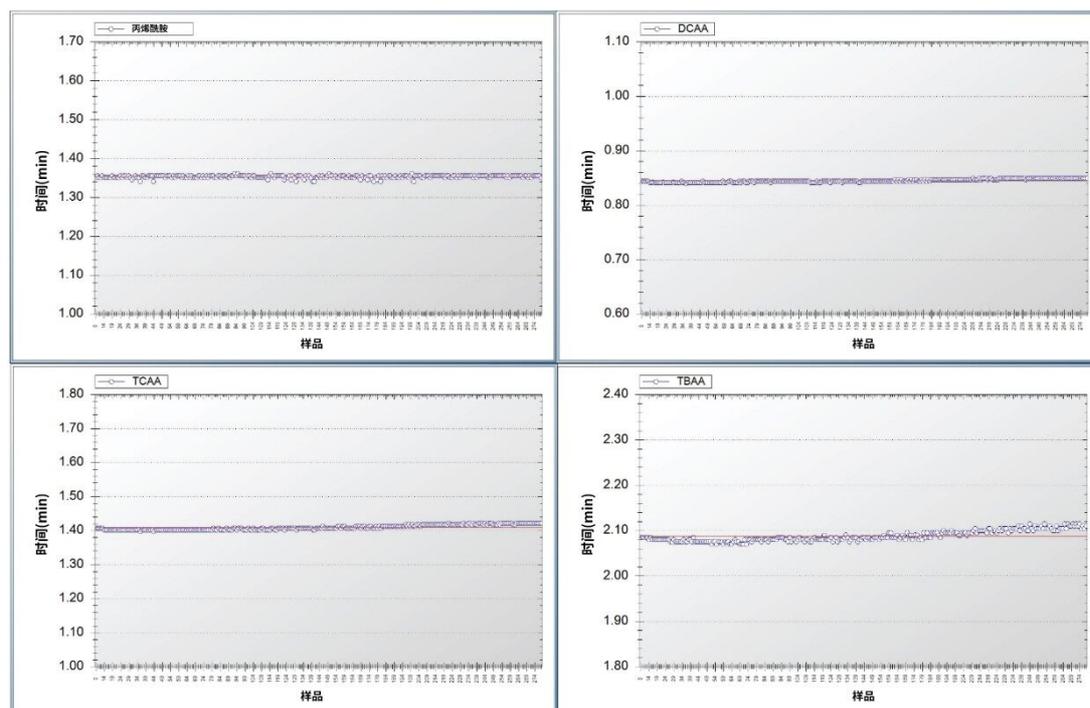


图3.矿泉水基质标准品（含2 $\mu\text{g/L}$ 卤代乙酸和0.1 $\mu\text{g/L}$ 丙烯酰胺）在270次进样中得到的丙烯酰胺、DCAA、TCAA和TBAA保留时间稳定性。这是一组连续进样，无需操作人员干预。

结论

方法性能研究数据证明，将水样直接进样至ACQUITY UPLC I-Class PLUS与Xevo TQ-S micro联用系统来测定卤代乙酸和丙烯酰胺的方法，优于2020年末生效的欧盟饮用水指令最新要求⁴。所有9种卤代乙酸的定量限为0.5 $\mu\text{g/L}$ ，而该指令规定，MCAA、DCAA、TCAA、MBAA和DBAA总含量的法定限值为60 $\mu\text{g/L}$ ，丙烯酰胺的法定限值为0.1 $\mu\text{g/L}$ 。丙烯酰胺的加入扩展了该方法的适用范围并提高了实验室效率。使用反相液相色谱方法

，HILIC分离时的潜在问题将不复存在，因此可以采用直接进样方法。结合标准UPLC-MS/MS系统，该分析无需采用专门的液相色谱或离子色谱仪器；270次进样得到的方法稳定性结果证明，该方法能够在至少2天内持续满足报告水平要求，无需用户干预。科学家必须在其实验室中对该方法进行验证，证明方法性能适合其用途，并且满足相关分析控制保证体系的要求。

参考资料

1. Method 557 Determination of Haloacetic Acids and Dalapoon in Drinking Water by Ion Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (IC-ESI_MS/MS) (Rev 1.0); U.S. Environmental Protection Agency, 2009.
2. Nikolaou AD, Golfinopoulos SK, Kostopoulou MN. Determination of Haloacetic Acids in Water by Acidic Methanol Esterification-GC-ECD Method, *Water Research* 2002, 36: 1089–1094.
3. Harman M, Rumsby P, Kanda R. Evaluation of Haloacetic Acid Concentration in Treated Drinking Water, DWI 70/2/253, May 2011 (accessed September 2020 http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/DWI70_2_253.pdf)
4. Directive of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption, Interinstitutional File 2017/03329(COD), 5 Feb 2020, 5813/20'.
5. US EPA National Drinking Primary Drinking Water Regulations, (accessed October 2020) <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations#six>.
6. WHO Guidelines for Drinking Water Quality Incorporating the 1st Addendum, 2017 (accessed September 2020 https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/en/).
7. Carere A. Genotoxicity and Carcinogenicity of Acrylamide; A Critical Review, *Ann Ist Super Sanita*, 2006, 43, 2, 144–155.
8. Malliarou E, Collins C, Graham N, Nieuwenhuijsen MJ. Haloacetic Acids in Drinking Water in the United Kingdom, *Water Research* 2005, 39: 2722–2730.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007071ZH, 2020年11月