

串联固相萃取-气相色谱串联质谱法同时测定生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺

李登昆^{1,2}, 陈春静¹, 刘祥萍¹, 张云¹, 倪海平¹, 李磊²

1. 南京医科大学附属南京市疾病预防控制中心, 江苏 南京 210003
2. 南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166



DOI 10.11836/JEOM21505

摘要:

[背景] 饮用水消毒副产物 *N*-亚硝胺对哺乳动物具有强烈的致癌性。饮用水中 *N*-亚硝胺的污染状况在 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平, 准确定性、定量分析存在较大困难, 因此开发一种灵敏、准确的生活饮用水中 *N*-亚硝胺的分析方法十分必要。

[目的] 建立生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺同时测定的串联固相萃取-气相色谱串联质谱法。应用建立的方法测定南京市生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺的含量, 初步了解南京市生活饮用水中 *N*-亚硝胺的污染状况。

[方法] 预实验对比椰壳活性炭、HLB Pro 两种固相萃取小柱对 10 种 *N*-亚硝胺的萃取效率。采用固相萃取小柱连接件将椰壳活性炭与 HLB Pro 固相萃取小柱进行串联, 分别组合成椰壳活性炭(上)-HLB Pro(下)与 HLB Pro(上)-椰壳活性炭(下)两种串联方式萃取加标样品, 结合直接、独立两种洗脱方式优化最佳萃取效率。2021 年 11—12 月用 1 L 棕色玻璃采样瓶采集南京地区 9 家市政供水单位的原水 9 份、出厂水 10 份及末梢水 7 份, 1.0 L 生活饮用水样品加入同位素内标制备成含 $25\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 同位素内标的待测样品。全自动固相萃取仪以 $15\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率全部上样至 HLB Pro(上)-椰壳活性炭(下)串联固相萃取小柱。萃取完成后将串联固相萃取小柱转移至固相萃取真空装置, HLB Pro、椰壳活性炭固相萃取小柱分别用 10 mL 二氯甲烷洗脱, 合并二氯甲烷洗脱液并移除上层少量水相, 氮吹浓缩至 1.0 mL 左右, 气相色谱质谱仪检测、同位素内标法定量。

[结果] 预实验发现椰壳活性炭、HLB Pro 两种固相萃取小柱对生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺的萃取效率具有较高的互补性。采用 HLB Pro(上)-椰壳活性炭(下)串联固相萃取方式、独立洗脱、洗脱液合并浓缩的程序, 可以获取最佳萃取效率。在此条件下, 采用气相色谱串联质谱法检测, 10 种 *N*-亚硝胺组分在 $2\sim 50\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999 6, 方法检出限为 $0.149\sim 0.211\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 测定下限为 $0.596\sim 0.844\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 5.0 、 15 、 $30\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 加标浓度下, 10 种 *N*-亚硝胺平均加标回收率 $88.0\%\sim 104.8\%$, 相对标准偏差 $1.22\%\sim 4.87\%$ 。应用本法对南京市生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺含量进行测定, 检测结果显示 10 种 *N*-亚硝胺在原水、出厂水和末梢水中均有不同程度的检出, 各组分检出率 $0\%\sim 100\%$, 检出质量浓度 $\text{ND}\sim 27.6\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

[结论] 本研究建立的串联固相萃取-气相色谱串联质谱法能够实现生活饮用水中多种 *N*-亚硝胺高灵敏、高通量的同时测定。

关键词: 串联固相萃取; 气相色谱串联质谱; 生活饮用水; *N*-亚硝胺

Simultaneous determination of 10 *N*-nitrosamines in drinking water by tandem solid phase extraction-gas chromatography tandem mass spectrometry LI Dengkun^{1,2}, CHEN Chunjing¹, LIU Xiangping¹, ZHANG Yun¹, NI Haiping¹, LI Lei² (1. Nanjing Municipal Central for Disease Control and Prevention Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210003, China; 2. School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 211166, China)

Abstract:

[Background] *N*-nitrosamines, a group of by-products of drinking water disinfection, have strong cytotoxicity to mammals. *N*-nitrosamines in drinking water are at the $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ level, and its accurate qualitative and quantitative analysis is difficult, so it is necessary to develop a sensitive and accurate method to determine *N*-nitrosamines in drinking water.

[Objective] To establish a solid phase extraction-gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) method for simultaneous determination of 10 kinds of *N*-nitrosamines in drinking

基金项目

2019 年度南京市卫生科技发展专项资金项目(YKK19126)

作者简介

李登昆(1987—), 男, 本科, 主管技师;
E-mail: 350386058@qq.com

通信作者

李磊, E-mail: lilei@njmu.edu.cn

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2021-10-17

录用日期

2022-06-05

文章编号

2095-9982(2022)08-0924-08

中图分类号

R123

文献标志码

A

► 引用

李登昆, 陈春静, 刘祥萍, 等. 串联固相萃取-气相色谱串联质谱法同时测定生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(8): 924-930, 936.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21505

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LI Lei, E-mail: lilei@njmu.edu.cn

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2021-10-17

Accepted

2022-06-05

► To cite

LI Dengkun, CHEN Chunjing, LIU Xiangping, et al. Simultaneous determination of 10 *N*-nitrosamines in drinking water by tandem solid phase extraction-gas chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(8): 924-930, 936.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21505

water. To apply the established method to determine the levels of 10 kinds of *N*-nitrosamines in drinking water in Nanjing, and to understand the pollution status.

[Methods] Coconut charcoal solid phase extraction (SPE) cartridge and HLB Pro SPE cartridge were compared for the extraction efficiency of 10 *N*-nitrosamines in drinking water. A coconut charcoal SPE cartridge and a HLB Pro SPE cartridge were concatenated using a SPE connector, and then formed two combinations: coconut charcoal (top)-HLB Pro (bottom) and HLB Pro (top)-coconut charcoal (bottom), to extract the spiked samples, and combined with direct and independent elution ways to obtain the best extraction efficiency. From November to December 2021, 9 raw water, 10 finished water, and 7 tap water samples were collected from 9 municipal water supply units in Nanjing with 1 L brown glass sampling bottles. An 1.0 L drinking water sample was added with the isotope internal standard to prepare a test sample containing an isotope internal standard concentration of 25 ng·L⁻¹. The automatic SPE instrument loaded all the 1.0 L drinking water samples to the tandem SPE cartridge of the HLB Pro (top)-coconut charcoal (bottom) at the rate of 15 mL·min⁻¹. After extraction, the HLB Pro SPE cartridge and coconut charcoal SPE cartridge were transferred to the solid phase extraction vacuum device and eluted with 10 mL of dichloromethane respectively, then the dichloromethane eluents were combined, and concentrated to about 1.0 mL by nitrogen blowing after a small amount of the upper aqueous phase was removed. The concentrated solution was detected by GC-MS/MS and quantified by isotope internal standard method.

[Results] The comparison of sample spike recovery experiments showed that coconut charcoal solid phase extraction (SPE) cartridge and HLB Pro SPE cartridge presented high complementarity for the extraction efficiency of 10 *N*-nitrosamines in drinking water. Using HLB Pro (top)-coconut charcoal (bottom), independent elution, and combined with eluents, the optimal extraction efficiency was obtained. Under these conditions, by GC MS/MS, the 10 *N*-nitrosamines showed a good linear relationship within the range of 2–50 ng·L⁻¹, the correlation coefficients were all greater than 0.9996, the method detection limit was 0.149–0.211 ng·L⁻¹, and the limit of quantification was 0.596–0.844 ng·L⁻¹. At the spiked concentrations of 5.0, 15, and 30 ng·L⁻¹, the average recoveries of the 10 kinds of *N*-nitrosamines were 88.0%–104.8%, and the relative standard deviations were 1.22%–4.87%. When applying the method to determine the concentrations of the 10 *N*-nitrosamines in Nanjing drinking water, the results showed that the 10 *N*-nitrosamines were positive in different degrees in raw water, finish water, and terminal water, the detection rates were 0%–100%, and the concentrations were ND–27.6 ng·L⁻¹.

[Conclusion] This tandem solid phase extraction-gas chromatography tandem mass spectrometry method can achieve simultaneous determination of a variety of *N*-nitrosamines in drinking water with high sensitivity and high throughput.

Keywords: tandem solid phase extraction; gas chromatography tandem mass spectrometry; drinking water; *N*-nitrosamines

饮用水消毒是杀灭水中有害细菌、病毒等病原微生物,防止介水疾病传播的有效途径。目前,国内外集中式和分散式供水主要采用氯、氯胺、二氧化氯、臭氧等消毒技术,但在消毒过程中消毒剂会与水中复杂的天然有机物形成大量的消毒副产物,*N*-亚硝胺便是其中一类含氮消毒副产物^[1]。毒理学研究表明,*N*-亚硝胺对哺乳动物具有强烈的致癌性^[2-3]。国际癌症研究机构、美国环境保护署(Environmental Protection Agency, EPA)将多种 *N*-亚硝胺列为二级 A 类、B 类致癌物^[4-5]。鉴于 *N*-亚硝胺对人类健康的重大危害,许多国家、地区和组织对饮用水中 *N*-亚硝基二甲胺(*N*-nitrosodimethylamine, NDMA)和其他 *N*-亚硝胺的污染采取了严格的控制措施。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)《饮用水水质准则》推荐 NDMA 准则值为 100 ng·L⁻¹^[6];加拿大《饮用水质量指南》规定饮用水中 NDMA 限量为 40 ng·L⁻¹^[7];美国明尼苏达州卫生部规定饮用水中 NDMA 的标准指导值为 5 ng·L⁻¹^[8]。美国 EPA^[9]将 *N*-亚硝基二乙胺(*N*-nitrosodiethylamine, NDEA)、NDMA、*N*-亚硝基二丙胺(*N*-nitrosodi-n-propylamine, NDPA)、*N*-亚硝基二苯胺(*N*-nitrosodiphenylamine, NDPhA)、*N*-亚硝基吡咯烷(*N*-nitrosopyrroli-

dine, NPYR)这 5 种 *N*-亚硝胺一起列入《饮用水污染物候选清单 3》,同时将 NDEA、NDMA、*N*-亚硝基二丁胺(*N*-nitrosodi-n-butylamine, NDPA)、NDPA、*N*-亚硝基甲基乙基胺(*N*-nitrosomethylethylamine, NMEA)、NPYR 这 6 种 *N*-亚硝胺纳入公共水系统非限制污染物监测条例^[10]。我国上海^[11]、深圳^[12]两地参照 WHO 相关标准,设定生活饮用水中 NDMA 卫生标准限值为 100 ng·L⁻¹。

N-亚硝胺的极性和疏水性随着分子量和烷基链长度的增加而降低^[1],本法拟研究的 10 种 *N*-亚硝胺极性分布范围宽、水溶性差异大,同时相关研究表明国内外饮用水中 *N*-亚硝胺的污染状况在 ng·L⁻¹ 水平^[13-14],准确性、定量分析存在较大困难,因此开发一种灵敏、准确的生活饮用水中 *N*-亚硝胺的分析方法十分必要。但目前主流色谱分析技术均难以直接测定,故富集浓缩成为检测如此低水平 *N*-亚硝胺方法的重要组成部分,富集浓缩的关键瓶颈是如何同时有效地从生活饮用水中萃取极性范围宽、水溶性差异大的 *N*-亚硝胺。在众多水样品前处理方法中,固相萃取因具有萃取溶剂用量少、不易乳化、浓缩倍数高、易于自动化的优点,是水体中痕量化合物最常用的富集、浓缩技术^[15-17]。

理想的固相萃取方法取决于萃取过程的两个因

素: (1) 目标化合物高效吸附在固相萃取材料表面; (2) 目标化合物从固相萃取材料表面有效洗脱收集。美国 EPA 方法 521^[15] 是测定生活饮用水中多种 *N*-亚硝胺的经典方法, 该法采用椰壳活性炭萃取生活饮用水中 7 种 *N*-亚硝胺取得较为满意的结果, 是目前萃取水体中 *N*-亚硝胺报道最为广泛的吸附材料^[15-17], 但相关研究发现椰壳活性炭材料对疏水性强、极性小的组分回收率较低^[18], 表明单一椰壳活性炭固相萃取小柱富集生活饮用水中极性分布范围宽、水溶性差异大的多种 *N*-亚硝胺存在较大难度。为萃取水质中多种 *N*-亚硝胺并获得更好的回收率, 需要开发使用两种类型固相萃取小柱的方法。本研究将从固相萃取小柱的选择、组合、洗脱及浓缩步骤等方面进行探讨, 结合气相色谱串联质谱技术, 建立同时测定生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺的串联固相萃取-气相色谱串联质谱法, 并应用建立的方法测定南京市生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺的含量, 初步了解南京市生活饮用水中 *N*-亚硝胺的污染状况。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

GCMS-TQ8050 NX 气相色谱串联质谱仪(日本 SHIMADZU), AutoTrace280 固相萃取仪(美国 Thermo Fisher), Milli-Q Reference 水纯化系统(美国 Millipore), G 系列 12 位固相萃取装置(配真空泵, 中国上海安谱), TZL-5013 多管旋涡混合仪(中国苏州 POXIWAR), Sorvall Lynx6000 高速离心机(美国 Thermo Fisher), N-EVAP-24 氮吹仪(温控精度 ± 2 °C, 美国 Organomation), ML203/02 电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO), 1700 系列进样针(10、25、50、100 μL , 瑞士 Hamilton)。

NDMA、NMEA、NDEA、*N*-亚硝基哌啶(*N*-nitrosopiperidine, NPIP)、NDPhA、*N*-亚硝基吗啉(*N*-nitrosomorpholine, NMorPh)、NDPA、NDBA、NPYR、*N*-亚硝基联苄基胺(*N*-nitrosodibenzylamine, NDBzA) 混合标准溶液(100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 美国 o2si), *N*-亚硝基二甲胺- d_6 (NDMA- d_6)、*N*-亚硝基二丙胺- d_{14} (NDPA- d_{14}) 混合标准溶液(10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 美国 o2 si), HLB Pro 固相萃取小柱(聚苯乙烯-二乙烯基苯填料, 200 mg, 6 mL, 中国上海安谱), 椰壳活性炭固相萃取小柱(2 g, 6 mL, 80~120 目, 中国上海安谱), 固相萃取小柱连接件(中国上海安谱), 二氯甲烷(色谱纯, 中国上海安谱), 甲醇(色谱纯, 德国 Merck), SCAA-113 亲水 PTFE 针式过滤器(13 mm \times 0.45 μm , 中国上海安谱), 无水硫酸镁除水盐包(EMR-

Lipid 5982-0102, 美国 Agilent), 一次性使用无菌注射器(2 mL 带针, 中国上海碧迪), 9 mm 棕色螺纹口自动进样瓶(2 mL, 中国上海安谱), 硫代硫酸钠(分析纯, 中国上海国药), 刻度离心管(15 mL, 美国 Corning)。实验所用纯水均由 Milli-Q Reference 水纯化系统制得, 符合分析实验室用水标准 GB/T 6682—2008 规定的一级水的标准。

1.2 仪器条件

气相色谱串联质谱条件参照李登昆等^[16, 19]研究, 并进行优化。

1.2.1 气相色谱 色谱柱采用美国 Agilent J&W VF-WAXms 色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 色谱柱流量 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (高纯 He > 99.999%), 进样口隔垫吹扫流量 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样体积 1.0 μL , 不分流进样; 气化室温度 250 °C; 色谱柱升温程序: 50 °C 保持 1 min, 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 110 °C, 15 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 200 °C, 最后 50 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 250 °C, 保持 10 min。

1.2.2 质谱条件 溶剂延迟 6 min; 质谱采用电子电离(electron Ionization, EI)源, 传输线温度 250 °C; 离子源温度 230 °C, EI 源电离能量 70 eV, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式扫描; 前四极杆温度 150 °C; 后四极杆温度 150 °C; 碰撞诱导裂解气: 高纯 Ar > 99.99%, 压力: 150 kPa。10 种 *N*-亚硝胺与 2 种同位素内标质谱参数见表 1。

1.3 标准储备液配制

从冰箱-20 °C 冷冻层取出 10 种 *N*-亚硝胺混合标准溶液(100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), NDMA- d_6 、NDPA- d_{14} 同位素内标混合标准溶液(10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)置于通风橱内恒温至室温, 分别用甲醇稀释成 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 10 种 *N*-亚硝胺混合标准储备液, 以及 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NDMA- d_6 、NDPA- d_{14} 同位素内标混合储备液。

1.4 样品采集和保存

采用 1 L 棕色具聚四氟乙烯材质盖垫的螺纹口玻璃瓶作为采样瓶, 参照 EPA 方法 521^[15] 水样的采集与保存措施, 加入 80~100 mg 硫代硫酸钠作为脱氯剂, 2021 年 11—12 月采集南京地区 9 家市政供水单位的原水 9 份、出厂水 10 份、末梢水 7 份, 水样充满玻璃瓶后密封、冷藏带回实验室, 6 °C 以下避光保存, 尽快完成萃取、测定。

1.5 样品处理

1.5.1 固相萃取小柱活化 采用固相萃取连接件将 HLB Pro 固相萃取小柱(上)与椰壳活性炭固相萃取小柱(下)串联, 串联固相萃取小柱依次用 6 mL 二氯甲烷

冲洗, 15 mL·min⁻¹ 的氮气吹 5 min, 6 mL 甲醇冲洗, 15 mL·min⁻¹ 的氮气吹 5 min, 再依次用 6 mL 甲醇及

15 mL 纯水活化平衡, 活化平衡过程始终保持固相萃取小柱填料处于活化液浸润状态。

表 1 10 种 *N*-亚硝胺与 2 种同位素内标的质谱参数

Table 1 MS/MS parameters for 10 *N*-nitrosamines and 2 isotope internal standards

化合物	扫描段/ min	间隔/ s	定量离子对		定性离子对1		定性离子对2	
			质荷比(m/z)	碰撞能量/eV	质荷比(m/z)	碰撞能量/eV	质荷比(m/z)	碰撞能量/eV
NDMA-d ₆	6.5~8.5	0.1	80.00 > 50.10	8	80.00 > 46.10	18	—	—
NDMA	6.5~8.5	0.1	74.00 > 44.10	6	74.00 > 42.10	21	—	—
NMEA	6.5~8.5	0.1	88.00 > 71.10	6	88.00 > 43.10	9	88.00 > 73.10	6
NDEA	6.5~8.5	0.1	102.00 > 85.10	6	102.00 > 44.10	12	102.00 > 56.10	15
NDPA-d ₁₄	8.5~10.5	0.1	144.00 > 126.20	4	126.00 > 78.10	12	—	—
NDPA	8.5~10.5	0.1	130.00 > 113.10	6	130.00 > 43.10	15	113.00 > 71.10	9
NDBA	10.5~13.5	0.05	116.00 > 99.10	6	158.00 > 141.20	4	141.00 > 99.10	8
NPIP	10.5~13.5	0.05	114.00 > 84.10	9	114.00 > 55.10	20	114.00 > 97.10	8
NPYR	10.5~13.5	0.1	100.00 > 68.10	8	100.00 > 43.10	9	100.00 > 55.10	9
NMorPh	10.5~13.5	0.1	116.00 > 86.10	6	86.00 > 56.10	12	116.00 > 56.10	12
NDPhA	13.5~18.0	0.1	169.00 > 167.20	24	168.00 > 166.10	28	169.00 > 66.10	24
NDBzA	18.0~21.5	0.1	91.00 > 65.10	15	181.10 > 166.10	12	181.10 > 103.10	16

1.5.2 样品萃取 用 50 μL 进样针准确移取同位素内标混合储备液 25 μL 加至 1.0 L 水样中并充分混匀, 制备成含同位素内标质量浓度为 25 ng·L⁻¹ 的待测样品。全自动固相萃取仪采用蠕动泵以 15 mL·min⁻¹ 的速率将待测样品全部上样至串联的固相萃取小柱, 压力控制模式下全自动固相萃取仪以 15 mL·min⁻¹ 的流速氮吹串联固相萃取小柱 10 min, 萃取步骤完成后将串联的固相萃取小柱转移至 12 位固相萃取装置上, 待洗脱。

1.5.3 固相萃取小柱洗脱 HLB Pro 固相萃取小柱、椰壳活性炭固相萃取小柱分别用 10 mL 二氯甲烷逐滴匀速洗脱至 15 mL 离心管中, 全部滴下后真空泵加压抽 2~3 min, 合并两管中二氯甲烷洗脱液并弃去上层少量残余水相。

1.5.4 洗脱液浓缩 二氯甲烷洗脱液的挥发是一个吸热过程, 在氮吹浓缩过程中离心管内外壁极易冷凝大量水珠, 为减少冷凝水珠的形成和缩短洗脱液的浓缩时间, 需要对浓缩离心管加热, 由于二氯甲烷的沸点小于 40 °C, 加热温度过高时又容易暴沸, 故将氮吹仪温度控制在 35 °C 左右, 同时为降低 NDMA、NMEA、NDEA 等易挥发组分在浓缩过程中的挥发损失, 将氮吹仪的氮气流速调成 0.5 mL·min⁻¹ 的微流状态。二氯甲烷脱液置于氮吹仪微流氮吹浓缩至 1.0 mL 左右时停止氮吹, 加入无水硫酸镁至出现粉末状时为止(约 0.2 g), 静置 3~5 min 充分吸附残留微量水分, 高速离心机以 100605×g 离心 2 min, 上层有机相经亲水式

PTFE 滤器过滤至 2.0 mL 自动进样瓶中, 待测定。

1.6 方法检出限(method detection limit, MDL)的确定方法

根据《环境监测分析方法标准制订技术导则(2020)》^[20], 按照公式 $V_{MDL} = t_{(n-1, 0.99)} \times S$ 计算 MDL, 4 倍 MDL 作为测定下限。式中: V_{MDL} ; n , 样品的平行测定次数; t , 自由度为 $n-1$, 置信度为 99% 时的 t 分布值(单侧); S , n 次平行测定标准偏差。其中, 当自由度为 6 时, 置信度为 99% 时, t 取值 3.143。

2 结果

2.1 串联固相萃取条件的确定

2.1.1 固相萃取小柱的选择 量取实验室自来水 1.0 L, 准确加入 10 种 *N*-亚硝胺混合标准储备液(1.0 mg·L⁻¹) 15 μL, 同位素内标储备液(1.0 mg·L⁻¹) 25 μL, 充分混匀配制成质量浓度为 15 ng·L⁻¹ 的加标样品, 按“1.5.1 固相萃取小柱活化”步骤活化固相萃取小柱, 按“1.5.2 样品萃取”步骤萃取加标样, 萃取完成后 10 mL 二氯甲烷逐滴匀速洗脱并收集, 洗脱液按“1.5.4”步骤氮吹浓缩, 浓缩液按“1.2 仪器条件”测定考察对比椰壳活性炭、HLB Pro 两种固相萃取小柱对饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺的萃取效率。预实验发现 HLB Pro 固相萃取小柱对 NDMA 与 NMEA 两种组分没有保留。为确保两种固相萃取小柱的萃取效率具有可比性, 全部以 NDPA-d₁₄ 作为参考内标进行定量, 椰壳活性炭固相萃取小柱对 NDMA、NMEA、NDEA、NDPA、NDBA、NPIP、NPYR、

NMorPh 的相对回收率在 94.5%~103.3% 的范围内, NDPhA、NDBzA 的相对回收率分别为 44.4%、30.0%; HLB Pro 固相萃取小柱对 NDPA、NPIP、NDPhA、NDBzA 的相对回收率在 82.6%~102.5% 之间, NDEA、NDBA 的相对回收率分别为 56.5%、62.7%, NPYR、NMorPh 的相对回收率仅为 5.7%、10.9% (图 1)。预实验结果表明椰壳活性炭小柱对生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺的多数组分具有较好的萃取效率, 仅 NDPhA、NDBzA 两种组分的相对回收率较差, 而 HLB Pro 小柱恰好能弥补椰壳活性炭小柱对 NDPhA、NDBzA 萃取性能的不足, 故本实验尝试串联两种固相萃取小柱萃取生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺。

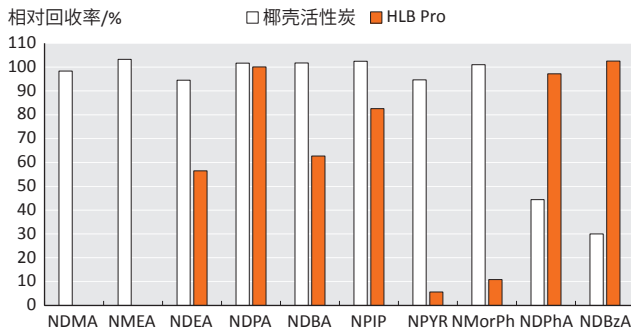


图 1 两种固相萃取小柱对 10 种 *N*-亚硝胺的萃取效率 (15 ng·L⁻¹)

Figure 1 Extraction efficiencies of 10 *N*-nitrosamines by 2 kinds of SPE columns (15 ng·L⁻¹)

2.1.2 固相萃取小柱的串联及洗脱 鉴于两种固相萃取小柱萃取效率的差异互补性, 采用固相萃取小柱连接件将椰壳活性炭、HLB Pro 固相萃取小柱进行串联组合, 按与“2.1.1”相同方式萃取、测定加标质量浓度均为 15 ng·L⁻¹ 的样品, 优化 10 种 *N*-亚硝胺相对回收率的串联组合及洗脱方式。首先组合成椰壳活性炭(上)-HLB Pro(下)的串联柱萃取加标样, 采用 20 mL 二氯甲烷直接洗脱、浓缩时, 串联柱对 10 种 *N*-亚硝胺的相对回收率与单根椰壳活性炭固相萃取小柱的性能几乎一致; 当串联的小柱分离, 各用 10 mL 二氯甲烷独立洗脱、合并浓缩测定时, NDMA、NMEA、NDEA、NDPA、NDBA、NPIP、NPYR、NMorPh 的相对回收率保持基本不变, 而 NDPhA、NDBzA 两种组分的相对回收率分别降至 26.8%、20.4%, 舍弃该串联组合。遂将串联组合调整为 HLB Pro(上)-椰壳活性炭(下)的方式萃取加标样, 20 mL 二氯甲烷直接洗脱、浓缩时, NDMA、NMEA、NDEA、NDPA、NDBA、NPIP、NPYR、NMorPh 的相对回收率在 90.8%~107.7% 之间, NDPhA、NDBzA 两种组分的相对回收率为 63.9%、64.6%; 当串联的小柱分离,

各用 10 mL 二氯甲烷独立洗脱、合并浓缩测定时, NDPhA、NDBzA 两种组分的相对回收率分别大幅提高至 88.0%、101.1%, 10 种 *N*-亚硝胺的相对回收率均在 88.0%~101.1% 之内。两种组合及不同洗脱方式的对比结果见表 2。综上, 本法采用 HLB Pro(上)-椰壳活性炭(下)的串联柱萃取, 串联小柱分离独立洗脱, 洗脱液合并浓缩的方式富集生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺。

表 2 串联固相萃取小柱对 10 种 *N*-亚硝胺的萃取效率
Table 2 Extraction efficiencies of 10 *N*-nitrosamines by tandem SPE columns

化合物	椰壳活性炭(上)-HLB Pro(下)串联萃取				HLB Pro(上)-椰壳活性炭(下)串联萃取			
	直接洗脱		独立洗脱		直接洗脱		独立洗脱	
	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
NDMA	94.7	2.77	96.0	3.67	95.3	2.30	99.2	1.97
NMEA	105.1	3.00	100.6	4.30	99.6	5.39	97.0	2.37
NDEA	97.6	3.31	100.1	3.28	92.7	5.21	95.2	2.47
NDPA	106.0	4.69	98.6	2.61	103.3	4.38	93.7	2.99
NDBA	106.6	3.94	96.5	2.49	107.7	3.97	97.4	1.32
NPIP	103.2	4.75	101.7	5.90	95.6	4.97	100.1	1.22
NPYR	104.5	5.62	106.0	3.99	90.8	4.01	93.6	4.87
NMorPh	101.4	5.38	102.1	4.25	94.1	4.80	97.9	2.86
NDPhA	44.7	3.43	26.8	3.49	63.9	3.57	88.0	1.32
NDBzA	33.3	14.59	20.4	18.25	64.6	3.13	101.1	3.03

2.2 方法验证

2.2.1 标准曲线的绘制 吸取“1.3 标准储备液配制”中 10 种 *N*-亚硝胺混合标准储备液 2、5、10、25、50 μL, NDMA-d₆、NDPA-d₁₄ 同位素内标混合储备液 25 μL, 用二氯甲烷稀释配制成相当于水体中 10 种 *N*-亚硝胺的质量浓度分别为 2、5、10、25、50 ng·L⁻¹, 两种同位素内标质量浓度分别为 25 ng·L⁻¹ 的混合标准系列, 按“1.2 仪器条件”测定, 得到 10 种 *N*-亚硝胺及 2 种同位素内标的 MRM 扫描总离子流色谱图(图 2)。根据“2.1 串联固相萃取条件的确定”实验结论, HLB Pro 小柱在串联柱的上部富集内标 NDPA-d₁₄ 及 NDEA、NDPA、NDBA、NPIP、NDPhA、NDBzA 组分, 而椰壳活性炭小柱在串联柱底部富集内标 NDMA-d₆ 及 NDMA、NMEA、NPYR、NMorPh 组分。根据内标富集对应关系, NDMA、NMEA、NPYR、NMorPh 组分以 NDMA-d₆ 为内标, NDEA、NDPA、NDBA、NPIP、NDPhA、NDBzA 组分以 NDPA-d₁₄ 为内标, 用目标化合物定量离子峰面积与内标物定量离子峰面积比为纵坐标, 系列溶液相对浓度为横坐标绘制标准曲线。10 种 *N*-亚硝胺同位素内标线性回归方程及相关参数见表 3。

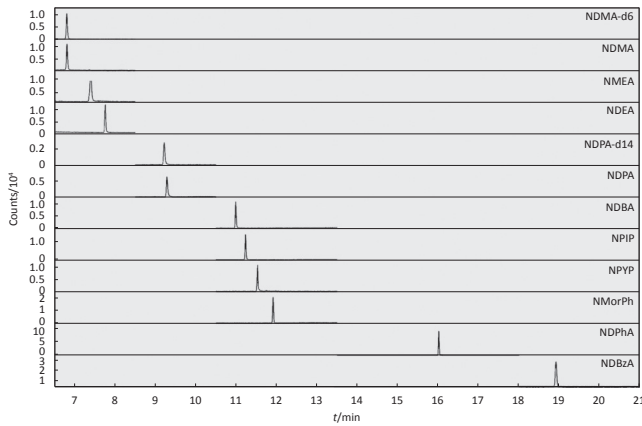


图2 10种N-亚硝胺及2种同位素内标总离子流色谱图(25 ng·L⁻¹)

Figure 2 Total ion chromatograms of 10 N-nitrosamines and 2 isotope internal standards (25 ng·L⁻¹)

2.2.2 方法检出限 量取纯水 1.0 L, 准确加入 10 种 N-亚硝胺混合标准储备液 2.0 μL, 配制成 2.0 ng·L⁻¹ 的加标样品 7 份, 加入同位素内标储备液 25 μL, 按方法 1.5 进行萃取、浓缩, 按方法 1.6 计算, 方法检出限为 0.149~0.211 ng·L⁻¹, 测定下限为 0.596~0.844 ng·L⁻¹。见表 3。

2.2.3 准确度和精密度 以实验室自来水作为末梢水样, 按方法 1.4 采集水样 1.0 L, 分别准确加入 10 种 N-亚硝胺混合标准储备液 5.0、15、30 μL, 同位素内标储备液 25 μL, 配制成 5.0、15、30 ng·L⁻¹ 的加标样品各 6 份, 按方法 1.5 进行萃取、浓缩、测定, 取纯水做空白实验。饮用水中 10 种 N-亚硝胺平均加标回收率为 88.0%~104.8%, 相对标准偏差为 1.22%~4.87%。见表 4。

表3 10种N-亚硝胺的线性参数、检出限及测定下限

Table 3 Linearity parameters, method detection limits, and lower limits of quantification of 10 N-nitrosamines

化合物	保留时间/min	内标物	线性范围/(ng·L ⁻¹)	线性回归方程	R ²	检出限/(ng·L ⁻¹)	测定下限/(ng·L ⁻¹)
NDMA	6.809	NDMA-d ₆	2~50	Y=4.074 3×10 ⁻² X-1.853 1×10 ⁻²	0.9996	0.151	0.603
NMEA	7.400	NDMA-d ₆	2~50	Y=4.190 1×10 ⁻² X-1.579 2×10 ⁻²	0.9997	0.149	0.596
NDEA	7.757	NDPA-d ₁₄	2~50	Y=0.1009X-9.351 1×10 ⁻³	0.9999	0.182	0.729
NDPA	9.282	NDPA-d ₁₄	2~50	Y=5.910 2×10 ⁻² X-2.611 0×10 ⁻³	0.9998	0.149	0.597
NDBA	10.984	NDPA-d ₁₄	2~50	Y=0.112 2X-4.555 9×10 ⁻⁴	0.9999	0.170	0.679
NPIP	11.230	NDPA-d ₁₄	2~50	Y=8.762 7×10 ⁻² X-2.727 4×10 ⁻³	0.9999	0.211	0.844
NPYR	11.527	NDMA-d ₆	2~50	Y=8.510 7×10 ⁻³ X-4.872 5×10 ⁻³	0.9996	0.192	0.768
NmorPh	11.913	NDMA-d ₆	2~50	Y=3.348 8×10 ⁻² X-1.318 9×10 ⁻²	0.9996	0.176	0.703
NDPhA	16.014	NDPA-d ₁₄	2~50	Y=0.648 6X-5.446 8×10 ⁻⁵	0.9999	0.164	0.657
NDBzA	18.915	NDPA-d ₁₄	2~50	Y=0.445 3X-0.116 3	0.9998	0.188	0.752

表4 饮用水中10种N-亚硝胺平均加标回收率与精密度(n=6)

Table 4 Average recoveries and precision of 10 N-nitrosamines in drinking water (n=6)

化合物	样品本底/(ng·L ⁻¹)	加标5.0 ng·L ⁻¹			加标15 ng·L ⁻¹			加标30 ng·L ⁻¹		
		测定平均值/(ng·L ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%	测定平均值/(ng·L ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%	测定平均值/(ng·L ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%
NDMA	7.57	12.3	95.3	2.71	22.5	99.2	1.97	36.8	97.4	1.95
NMEA	0.901	6.14	104.8	1.82	15.5	97.0	2.37	32.2	104.4	2.80
NDEA	0.846	5.90	101.0	2.42	15.1	95.2	2.47	28.9	93.6	2.73
NDPA	3.90	8.84	98.7	2.70	18.0	93.7	2.99	33.5	98.5	3.05
NDBA	4.64	9.57	98.6	2.76	19.3	97.4	1.32	34.9	100.9	3.19
NPIP	ND	5.13	94.2	2.98	15.0	97.3	1.22	29.7	97.7	2.82
NPYR	2.03	7.03	100.0	3.30	16.1	93.6	4.87	31.9	99.5	3.06
NMorPh	1.24	6.48	104.7	2.71	15.9	97.9	2.86	32.0	102.7	3.51
NDPhA	0.818	5.78	99.3	1.90	14.0	88.0	1.32	28.8	93.4	3.32
NDBzA	1.11	6.09	99.7	3.53	16.3	101.1	3.03	31.3	100.7	4.52

[注] ND: 低于测定下限, 以 1/2 测定下限的数值参加平均值统计计算。保留 3 位有效数字。

2.3 样品测定

准确移取同位素内标混合储备液 25 μL 至采集的 1.0 L 水样中, 并充分混匀制备成含 25 ng·L⁻¹ 同位素内标的待测样, 全自动固相萃取仪按“1.5.1 固相萃取小柱活化”步骤活化 HLB Pro(上)-椰壳活性炭(下)串联

固相萃取小柱, 按“1.5.2 样品萃取”步骤以 15 mL·min⁻¹ 的速率将待测样品全部上样至串联的固相萃取小柱, 萃取完成后 HLB Pro 固相萃取小柱与椰壳活性炭固相萃取小柱分别用 10 mL 二氯甲烷逐滴匀速洗脱至 15 mL 离心管中, 合并二氯甲烷洗脱液并弃去上层少量残余

水相,按“1.5.4 洗脱液浓缩”步骤氮吹浓缩,浓缩液按“1.2 仪器条件”测定。测定结果表明 10 种 *N*-亚硝胺在原水、出厂水、末梢水中均有不同程度的检出,各组分检出率 0%~100%,检出质量浓度 ND~27.6 ng·L⁻¹,见表 5。

表 5 原水、出厂水和末梢水中 10 种 *N*-亚硝胺的测定结果

Table 5 Determination of 10 *N*-nitrosamines in raw water, finished water and tap water

化合物	原水(<i>n</i> =9)			出厂水(<i>n</i> =10)			末梢水(<i>n</i> =7)		
	检出质量浓度/ (ng·L ⁻¹)	平均质量浓度/ (ng·L ⁻¹)	检出比	检出质量浓度/ (ng·L ⁻¹)	平均质量浓度/ (ng·L ⁻¹)	检出比	检出质量浓度/ (ng·L ⁻¹)	平均质量浓度/ (ng·L ⁻¹)	检出比
NDMA	7.75~27.6	17.1	9/9	0.812~21.9	9.30	10/10	5.24~9.19	6.98	7/7
NMEA	1.66~7.95	4.28	9/9	1.81~5.54	3.89	10/10	0.689~2.09	1.13	7/7
NDEA	ND~3.20	0.909	4/9	ND~2.69	1.11	8/10	ND~2.14	1.22	6/7
NDPA	ND~4.26	2.34	8/9	1.87~3.42	2.60	10/10	1.93~3.90	2.57	7/7
NDBA	1.86~13.7	6.29	9/9	3.15~9.69	5.86	10/10	1.38~9.75	4.01	7/7
NPIP	ND~1.17	0.576	2/9	ND~5.69	1.17	4/10	ND~1.58	0.883	4/7
NPYR	ND~18.8	5.90	6/9	1.40~9.96	5.65	10/10	ND~8.45	3.12	6/7
NMorPh	ND~5.36	3.08	8/9	ND~3.55	1.92	9/10	ND~3.80	1.55	6/7
NDPhA	ND~2.83	1.28	8/9	ND~3.32	1.14	8/10	ND~0.908	0.481	2/7
NDBzA	ND~11.4	2.98	6/9	ND~2.76	1.32	7/10	ND~4.06	1.33	4/7
总计	30.0~67.1	44.7	—	16.3~52.7	34.0	—	15.7~36.3	23.3	—

[注] ND: 低于测定下限,以 1/2 测定下限的数值参加平均值统计计算。保留 3 位有效数字。

3 讨论

椰壳活性炭固相萃取小柱是水体中 *N*-亚硝胺萃取富集的首选吸附材料,HLB Pro 固相萃取小柱是应用最为广泛的反相吸附小柱。本研究通过预实验对比椰壳活性炭、HLB Pro 两种固相萃取小柱对生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺的萃取效率,预实验结果显示,两种固相萃取小柱对 10 种 *N*-亚硝胺组分萃取效率差异具有较好的互补性,特别是 HLB Pro 小柱能弥补椰壳活性炭小柱对 NDPhA、NDBzA 萃取性能不足的弱点。

鉴于此,本研究采用固相萃取小柱连接件将椰壳活性炭、HLB Pro 固相萃取小柱进行串联萃取饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺。预实验首先采用椰壳活性炭(上)-HLB Pro(下)的串联方式进行萃取,结果显示采用此种串联组合方式萃取时,无论是直接洗脱还是独立洗脱,与单独椰壳活性炭固相萃取小柱的萃取效率相比,NDPhA、NDBzA 两种组分的相对回收率都不能得到明显改善,完全没有体现出 HLB Pro 小柱对椰壳活性炭小柱萃取效率互补的性能,究其原因 NDPhA、NDBzA 的疏水部分具有两个苯基,极易吸附到椰壳活性炭材料上难以洗脱。故调整为 HLB Pro(上)-椰壳活性炭(下)的串联方式进行萃取,当采用直接洗脱时 NDPhA、NDBzA 两种组分的相对回收率有了明显改善,进而采用独立洗脱、洗脱液合并浓缩测定时,NDPhA、NDBzA 的相对回收率大幅提升至 88.0%、101.1%,10 种 *N*-亚硝胺组分的相对回收率均在 88.0%~101.1%的范围内。综上,本法采用 HLB Pro(上)-椰壳活性炭(下)串联固相萃取方式、独立洗脱、洗脱液合并浓缩的程序,结合

气相色谱串联质谱仪建立的生活饮用水中 10 种 *N*-亚硝胺测定的串联固相萃取-气相色谱串联质谱法。

通过加标回收方式验证本法准确度和精密度,实验结果显示本法准确性高、稳定性好,能够克服单一椰壳活性炭固相小柱萃取性能不足的弱点,适用于生活饮用水中多种痕量 *N*-亚硝胺的测定。应用本法对南京市域内的原水、出厂水和末梢水中 10 种 *N*-亚硝胺含量进行分析,结果显示各水样中 10 种 *N*-亚硝胺均有不同程度的检出,尽管各组分浓度及总浓度均小于 WHO 推荐的 NDMA 准则值,但不应忽视 *N*-亚硝胺对健康的不利影响。

综上,本研究建立的串联固相萃取-气相色谱串联质谱法能够实现生活饮用水中多种 *N*-亚硝胺高灵敏、高通量的同时测定。

参考文献

- [1] LI X, RAO N R H, LINGE K L, et al. Formation of algal-derived nitrogenous disinfection by-products during chlorination and chloramination[J]. *Water Res*, 2020, 183: 116047.
- [2] 施文荣, 谢佐福, 刘艳, 等. 亚硝胺诱发大鼠食管癌 survivin mRNA 转录水平及与病理变化的关系[J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(10): 1113-1116.
SHI W R, XIE Z F, LIU Y, et al. Relationship between survivin mRNA transcription level and pathological changes in esophageal carcinogenesis of wistar rats induced by nitrosamine[J]. *Cancer Res Prev Treat*, 2011, 38(10): 1113-1116.
- [3] 顾洪伟, 陈琦, 张伟, 等. 小鼠原发性肝癌建模方法的优化[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(1): 20-24.
GU H W, CHEN Q, ZHANG W, et al. Optimization of the establishment method of mouse model of hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2016, 24(1): 20-24.

(下转第 936 页)