

液相色谱-串联质谱法快速测定水及鱼肉中的苯胺

贺德春¹, 赵波¹, 唐才明², 许振成^{1*}, 张素坤¹, 韩静磊¹

(1. 环境保护部华南环境科学研究所, 广东 广州 510655;

2. 中国科学院广州地球化学研究所, 广东 广州 510540)

摘要:为快速准确测定水及鱼肉中的苯胺,采用乙腈提取、高效液相色谱-串联质谱测定,建立了水及鱼肉中苯胺的快速测定方法。水样与乙腈以4:1的体积比混合,1.00 g 鱼肉中加入2.00 mL 乙腈,涡旋提取1 min,水样和鱼肉样品的提取液离心5 min后取上清液测定。以C₁₈柱为分离柱,乙腈-0.5%(v/v)甲酸水溶液(85:15, v/v)为流动相,目标物质在3 min内分离。在0.5~500 μg/L范围内,苯胺峰面积与内标峰面积之比与质量浓度的线性关系良好($R^2 > 0.999$)。基质加标试验结果表明,苯胺在水中的回收率分别为93.7%(加标水平为40 ng)和86.7%(加标水平为400 ng),苯胺在鱼肉中的回收率分别为96.8%、92.6%和81.8%(加标水平分别为5、50和500 ng),相对标准偏差在1.5%~9.2%之间。水样和鱼肉样品中苯胺的检出限分别为0.50 μg/L和1.00 μg/kg,定量限分别为1.00 μg/L和2.00 μg/kg。应用该方法测定了从受苯胺污染的水库中采集的13份水样和12份鱼肉样品,结果表明,水和鱼肉中苯胺的最大含量分别为1943.6 μg/L和60.8 μg/kg。本方法快速、准确,适用于水和鱼肉中苯胺的快速测定。

关键词:液相色谱-串联质谱;苯胺;水;鱼

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2014)09-0926-04

Determination of aniline in water and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HE Dechun¹, ZHAO Bo¹, TANG Caiming², XU Zhencheng^{1*}, ZHANG Sukun¹, HAN Jinglei¹

(1 South China Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Guangzhou 510655,

China; 2 Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510540, China)

Abstract: A fast analytical method for the determination of aniline in water and fish meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been developed. The water sample was mixed with acetonitrile by 4:1 (v/v) and the fish sample was extracted by 2.00 mL acetonitrile for each gram of sample, and then the extracts of water and fish samples were centrifuged at 5 000 r/min for 5 min. The separation was performed on a reversed-phase C₁₈ column using mobile phases of acetonitrile-0.5%(v/v) formic acid aqueous solution (85:15, v/v). Aniline was separated within 3 min. The calibration curve was linear in the range of 0.5–500 μg/L with $R^2 > 0.999$. The limits of detection (LODs) were 0.50 μg/L and 1.00 μg/kg and the limits of quantification (LOQs) were 1.00 μg/L and 2.00 μg/kg for aniline in water and fish meat, respectively. The average recoveries of aniline in water were 93.7% at the spiked level of 40 ng and 86.7% at the spiked level of 400 ng ($n=5$). The average recoveries of aniline in fish were 96.8%, 92.6% and 81.8% at the spiked levels of 5, 50 and 500 ng respectively ($n=5$). The relative standard deviations were 1.5%–9.2%. Thirteen water samples and twelve fish samples were collected from a reservoir polluted by aniline and the maximum contents found were 1943.6 μg/L in water and 60.8 μg/kg in fish. The method is suitable for the determination of aniline residues in water and fish with the characteristics of easy operation, high accuracy and precision.

* 通讯联系人. E-mail: xuzhencheng@sceis.org.

基金项目: 环境保护部公益基金项目(201309001-04); 全国重点地区环境与健康专项调查(21111011101).

收稿日期: 2014-05-22

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); aniline; water; fish

苯胺是染料工业最重要的中间体之一,用于多种染料的合成,同时还广泛应用于农药、兽药、橡胶、香料、油漆及胶片的生产。苯胺属高毒性物质,可以经过皮肤、消化道和呼吸道等途径进入人体。短时间内摄入较大剂量苯胺可以导致急性中毒,引起人体高铁血红蛋白血症,使人体红细胞失去携氧能力,导致中毒,长期接触还可引起肝癌或膀胱癌。鉴于苯胺的危害性,美国环保局(EPA)将其列为优先控制的 129 种污染物之一,中国也将其列入优先控制污染物黑名单^[1]。近年来,苯胺泄漏事故频发,造成重大水环境污染事故,引起了极大的关注^[2]。鱼类作为水体中重要的物种,在维持水生态平衡方面具有至关重要的作用,同时,鱼类也是人类食物的重要来源。水体中的污染物可通过食物链在鱼体内富集,进而通过人类食用给人类健康带来潜在的危害,因此快速准确测定水体及生活在其中的鱼体内有毒物质的含量,对于保护人类健康具有重要意义。当前关于苯胺类物质的检测方法主要集中在液体样品中,有荧光光谱法^[3]、离子色谱法^[4]、高效液相色谱-紫外检测法^[5,6]、高效液相色谱-荧光检测法^[7,8]、液相色谱-串联质谱法^[9-11]、气相色谱-氢火焰离子法^[12]、气相色谱-电子捕获检测法^[13]和气相色谱-质谱法(GC-MS)^[14,15]等;对于鱼中苯胺的检测则仅有零星报道。Okumura 等^[16]建立了鱼中苯胺的 GC-MS 测定方法,样品经甲醇提取,离心、稀释后过固相萃取柱浓缩、净化、GC-MS 测定。该方法前处理繁琐,耗时长。本研究建立了水和鱼肉中苯胺的液相色谱-串联质谱测定方法,样品经乙腈提取,离心后取上清液测定,前处理简单、快速,串联质谱检测定性定量准确,可用于水体和鱼中苯胺残留的快速定性定量测定,对于苯胺泄漏事故应急监测,水体及水生态中苯胺污染的日常监测等均具有重要意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), AB 4000Qtrap 串联四极杆-线性离子阱质谱仪(ABSCIX, 美国), QL-886 涡旋混合器, DT5-2 台式离心机, Millipore 超纯水系统, Eppendorf 移液器(100~1 000 μL 和 100~5 000 μL), JJ500 型电子天平。甲醇、乙腈为农残级;甲酸、苯胺母体和苯胺同位素标准品均购自百灵威科技。0.22 μm 微孔滤膜分别购自天津津腾公司与美国安捷伦公司。

1.2 样品前处理方法

水样:取 8.0 mL 水样于 15 mL 聚丙烯离心管中,加入 100 μL 质量浓度为 2 500 mg/L 的同位素内标溶液,涡旋混合 1 min,再加入 2.00 mL 乙腈,涡旋混合 1 min, 5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液过 0.22 μm 滤膜待测。

鱼肉:称取经组织匀浆的鱼肉样品 1.00 g 于 15 mL 聚丙烯离心管中,加入 100 μL 质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的同位素内标溶液,涡旋混合 1 min,加入 2.00 mL 乙腈涡旋提取 1 min, 5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液过 0.22 μm 滤膜待测。

1.3 仪器测定条件

色谱柱:Agilent SB-C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 1.8 μm)。流动相为 0.5% (v/v) 甲酸水溶液-乙腈(85:15, v/v), 流速 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。质谱条件:电喷雾(ESI⁺)离子源,多反应监测(MRM)模式,锥孔电压 5 500 V,离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$,气帘气 103.4 kPa,雾化气 344.7 kPa,辅助气 275.8 kPa,入口电压(EP)10.00 V,碰撞室出口电压(CXP)15.00 V。其他参数见表 1。

1.4 计算方法

鱼肉样品中苯胺的计算公式为 $C_x = C_i \times V_1 / m$,水中苯胺的计算公式为 $C_x = C_i \times (V_1 + V_2) / V_2$ 。其中 C_x 为鱼肉或水中苯胺的含量(ng/g 或 $\mu\text{g}/\text{L}$); C_i 为由标准曲线计算得到的进样溶液中苯胺的质量浓度; V_1 为乙腈的体积(mL); m 为鱼肉样品的质量(g), V_2 为水样的体积(mL)。

表 1 苯胺的保留时间及优化的质谱条件

Table 1 Retention time and optimized MS-MS parameters for aniline

Retention time/ min	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Declustering potential/ V	Collision potential/ V	Q/q	SD
2.25	94.1	77.1(Q)	100	30	3.88	0.09
		51.1(q)	50	40		

Q: quantitative ion; q: qualitative ion. Q/q: abundance ratios of Q and q.

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂与方法的选择

考察了甲醇与乙腈对鱼肉中苯胺的提取效率,结果表明,乙腈和甲醇对苯胺的平均提取效率分别为 96.3% 和 87.4%,两种溶剂均可满足残留分析的要求,乙腈的提取效率高于甲醇。考虑到流动相体系为乙腈水溶液,因此选用乙腈作为提取溶剂。试验还比较了超声萃取与涡旋萃取对鱼肉中苯胺的萃取效率。结果表明,超声萃取与涡旋萃取对苯胺的萃取效率分别为 94.6% 和 92.5%,两种方法对鱼肉中苯胺的萃取效率均较高,考虑到涡旋萃取更加简便,选择涡旋萃取。

2.2 提取时间的影响

比较了不同涡旋萃取时间对提取效率的影响(见图 1),结果表明,萃取时间为 1、2、3、4 min 时,苯胺的回收率均在 91%~95% 之间,4 组结果相差不多,说明当萃取时间在 1 min 以上时,萃取率已达到较高水平,增加萃取时间并不能显著改善萃取效率,为节约分析时间,选定萃取时间为 1 min。

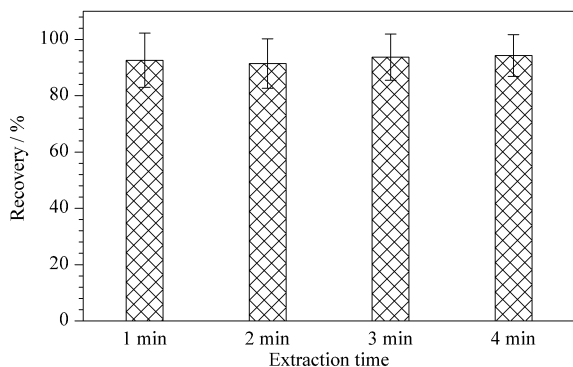


图 1 萃取时间对苯胺提取效率的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on the extraction efficiency of aniline

2.3 色谱条件的选择

比较了 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 和 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 两种流速下的分离及响应情况。两种流速下,苯胺的色谱分离效果及色谱峰形均很好,响应也十分接近。但在较大流速下,峰形更加尖锐对称,可缩短分析时间三分之一以上,故选择流速为 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。流动相的组成不仅可影响分离效果和色谱峰的形状,还影响灵敏度。流动相中加入甲酸等物质,可大大增强质谱检测信号,提高检测灵敏度,改善峰形。

在 1.3 节实验条件下,各类样品的色谱图见图 2。实际样品的色谱峰峰宽较大可能是由共萃取组分的影响所致。

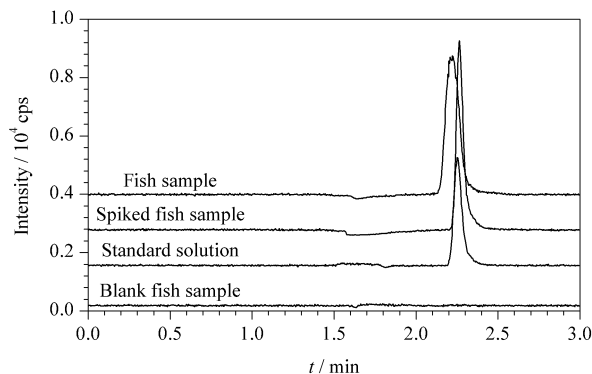


图 2 空白鱼肉样品、鱼肉添加样品(50 ng/g)、实际鱼肉样品(60.8 ng/g)和苯胺标准样品(10 $\mu\text{g}/\text{L}$)的总离子流色谱图

Fig. 2 TIC chromatograms of blank fish, blank fish spiked with aniline (50 ng/g), fish sample from a polluted reservoir (60.8 ng/g) and aniline standard solution (10 $\mu\text{g}/\text{L}$)

Chromatographic conditions: SB-C₁₈ column (100 mm \times 4.6 mm, 1.8 μm); mobile phases: acetonitrile-0.5% (v/v) formic acid aqueous solution (85:15, v/v); flow-rate: 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; column temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$; injection volume: 10 μL .

2.4 定性分析

采用保留时间与定性离子对来确认目标物。对不同浓度的苯胺标准溶液进行多次测定,确定保留时间为 2.25 min。同时通过定量、定性离子对的丰度比(Q/q)来进行确认。Q/q 理论值为 21 次试验的测定结果,即对 7 个不同质量浓度水平(0.5、2.5、5.0、25、50、250 和 500 $\mu\text{g}/\text{L}$)的标准样品各测定 3 次的平均值。计算 21 次试验离子对的丰度比及标准差,见表 1。苯胺的 Q/q 理论值为 3.88,标准差为 0.09,说明不管是低浓度还是高浓度,苯胺的 Q/q 值非常稳定。在苯胺的确认中,实际样品的 Q/q 值与理论值偏差不应超过 20%,如 Q/q 值的偏差超过 20%,可能存在干扰测定的情形,需采取措施进一步排除干扰。

2.5 干扰的去除

试验过程中使用的某些器皿会对测定过程带来干扰,导致空白样品中检出较高含量的苯胺(见图 3, Filter membrane-1)。分别用乙腈对前处理过程中使用的滤膜、离心管、针头过滤器等进行提取处理,测定提取后乙腈中的苯胺,考察空白干扰情况。结果发现某型号的针头过滤器造成空白干扰,因此在测定过程中需先对使用的过滤器、滤膜、离心管等前处理使用的器材进行空白确认。

2.6 线性范围与检出限

为减小基质效应的影响,采用空白基质提取液作为溶剂配制标准曲线。在优化的色谱、质谱条件下,对 0.5~500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的苯胺标准溶液进行 3 次测

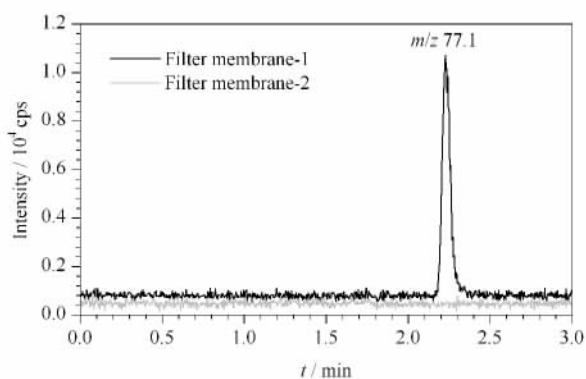


图 3 不同材质滤膜用于空白溶剂测定的总离子色谱图
Fig. 3 TIC chromatograms of solvent filtered with different filter membranes used for blank determination

定,以分析物的质量浓度为 X 、分析物峰面积与内标物峰面积的比值为 Y ,计算得到苯胺的标准曲线方程。水中为 $y=0.301x+0.063$ ($R^2=0.9996$), 鱼肉中为 $y=0.306x+0.021$ ($R^2=0.9992$),表明在 $0.5\sim 500\ \mu\text{g/L}$ 范围内,苯胺在两种基质中均呈现出良好的线性关系。采用基质加标的方法来确定方法的检出限与定量限。在空白样品中分别添加苯胺标准溶液,得到 0.25 、 0.50 、 1.00 和 $5.00\ \mu\text{g/L}$ 的水添加样品及 0.25 、 0.50 、 1.00 和 $5.00\ \mu\text{g/kg}$ 的鱼肉添加样品,按照 1.2 节方法处理后,以 $S/N\geq 3$ 时的最低含量为检出限, $S/N\geq 10$ 时的最低含量为定量限。测得空白水和鱼肉中苯胺的检出限分别为 $0.50\ \mu\text{g/L}$ 和 $1.00\ \mu\text{g/kg}$,定量限分别为 $1.00\ \mu\text{g/L}$ 和 $2.00\ \mu\text{g/kg}$ 。

2.7 准确度与精密度

采用空白基质加标的方法评价准确度与精密度。以某水库水及市场采购的罗非鱼为基质,按前处理方法取样于聚丙烯离心管中,分别添加 40 、 $400\ \text{ng}$ 和 5 、 50 、 $100\ \text{ng}$ 的苯胺标准品,每个浓度水平做 5 个平行样品,按 1.2 节方法处理后上机测定,结果见表 2。可以看出,该方法的准确度与精密度可满足痕量分析的要求。

表 2 苯胺在鱼肉和水中的添加回收率及 RSD ($n=5$)
Table 2 Recoveries and RSDs of aniline spiked in water and fish meat ($n=5$)

Sample	Spiked/ ng	Found/ ng	Recovery/ %	RSD/ %
Water	40	37.48	93.7	1.5
	400	355.68	86.7	3.3
Fish	5	4.84	96.8	4.3
	50	46.34	92.6	9.2
	100	81.78	81.8	8.0

2.8 实际样品分析

利用上述建立的方法,对某受苯胺污染水域的水样及鱼中的苯胺含量进行了测定。13 份水样中的 9 份检测到苯胺残留,含量分别为 138.1 、 1943.6 、 11.1 、 16.0 、 5.3 、 1.2 、 10.4 、 2.6 和 $5.6\ \mu\text{g/L}$,最高浓度达 $1943.6\ \mu\text{g/L}$; 12 份鱼样中的两份检出苯胺残留,含量分别为 60.8 和 $4.32\ \mu\text{g/kg}$ 。

3 结论

本工作建立了一种快速测定水及鱼肉中苯胺残留的高效液相色谱-串联质谱分析方法,该方法样品提取溶剂用量少,前处理简单,仪器分析速度快,抗干扰能力强,检出限和定量限低,方法的准确度和精密度均符合痕量残留分析的要求,适用于水和鱼肉中苯胺的快速定性定量分析。

参考文献:

- [1] Zhou W M, Fu D Q, Sun Z G, et al. Chinese Environmental Monitoring (周文敏,傅德黔,孙宗光,等. 中国环境监测), 1990, 6(4): 1
- [2] [2014-05-22]. http://www.cenews.com.cn/kp/hbxbk/201311/t20131114_750084_1.html
- [3] Chen X L, Li Z B, Zhu Y X. et al. Anal Chim Acta, 2004, 505(2): 283
- [4] Zhu Y, Zhu Y, Wang L L. Chinese Journal of Chromatography (诸寅,朱岩,王丽丽. 色谱), 2012, 30(4): 345
- [5] Wang W, Huang X H, Wang H. Chinese Journal of Chromatography (王伟,黄显会,王辉,等. 色谱), 2013, 31(10): 1028
- [6] Huang Y, Rao Z, Liu Y, et al. Rock and Mineral Analysis (黄毅,饶竹,刘艳,等. 岩矿测试), 2012, 31(4): 666
- [7] Wang C, Lü Y B, Teng E J, et al. Journal of Instrumental Analysis (王超,吕怡兵,滕恩江,等. 分析测试学报), 2013, 32(1): 32
- [8] Xue K S, Dong F X. Chinese Journal of Analysis Laboratory (薛科社,董发昕. 分析试验室), 2004, 23(8): 36
- [9] Gu H D, Yin Y M, Qin H B. Environmental Monitoring and Forewarning (顾海东,尹燕敏,秦宏兵. 环境监测与预警), 2012, 4(1): 24
- [10] Zou Y L, Chen Y, Lü G B, et al. Chemical Research and Application (邹玉林,陈勇,吕桂宾,等. 化学研究与应用), 2011, 23(5): 649
- [11] Xiong J, Qian S, Xie Y H, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (熊杰,钱蜀,谢永洪,等. 分析化学), 2014, 42(1): 93
- [12] Farajzadeh M A, Nouri N. Talanta, 2012, 99: 1004
- [13] Schmidt T C, Less M, Haas R, et al. J Chromatogr A, 1998, 810: 161
- [14] Chiang J S, Huang S D. Talanta, 2008, 75: 70
- [15] Chen M, Yin Y G, Tai C, et al. Chinese Science Bulletin (陈明,阴永光,郜超,等. 科学通报), 2006, 51(11): 1359
- [16] Okumura T, Imamura K, Nishikawa Y. J Chromatogr Sci, 1996, 34: 190