

# 水中亞硝胺類化合物檢測方法—液相層析串聯式質譜儀法

中華民國 111 年 11 月 24 日環署授檢字第 1117108358 號

自公告日生效

NIEA W792.50B

## 一、方法概要

樣品中亞硝胺類(Nitrosamines)化合物經固相萃取管匣捕集淨化後，以溶劑沖提，收集沖提液，經吹氮濃縮、定容，續以液相層析串聯式質譜儀(Liquid chromatograph tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)檢測。

## 二、適用範圍

本方法適用於飲用水、飲用水水源、地面水體、地下水體、放流水及廢(污)水中 N-亞硝二乙胺(N-Nitrosodiethylamine, NDEA)、N-亞硝二甲胺(N-Nitrosodimethylamine, NDMA)、N-亞硝二正丁基胺(N-Nitrosodi-n-butylamine, NDBA)、N-亞硝二正丙基胺(N-Nitrosodi-n-propylamine, NDPA)、N-亞硝甲基乙基胺(N-Nitrosomethylethylamine, NMEA)、N-亞硝哌啶(N-Nitrosopiperidine, NPIP)及 N-亞硝吡咯烷(N-Nitrosopyrrolidine, NPYR)等亞硝胺類化合物之檢測，如表一所列，未在表列中之化合物，經驗證後亦可適用。

## 三、干擾

- (一) 本方法的干擾可能來自於溶劑、試劑、玻璃器皿及樣品處理過程中所使用的硬體設備之污染，干擾物質會導致層析圖基線之漂移，可執行空白樣品測試，以確認無干擾情形。
- (二) 干擾物質可能是樣品中之其他物質，基質干擾的程度隨樣品之來源而不同。由於本方法所使用之偵測系統具選擇性，因此可降低來自基質中的干擾，如果有干擾發生，可用適當的淨化程序去除。
- (三) 儀器必須將質譜儀的條件調整至最佳化，以達到要求的解析度及質量的準確度。在 LC/MS/MS 中如層析管柱材質種類、管柱的長度、內徑、層析的流率、移動相及添加劑的選擇，都可能影響分析效果及儀器感度。

## 四、設備與材料

- (一) 採樣瓶：1 L 玻璃瓶、褐色玻璃瓶、聚丙烯(Polypropylene, PP)或聚乙烯(Polyethylene, PE)材質之採樣瓶，並附螺旋瓶蓋。使用前需先用試劑水及甲醇清洗並乾燥之。使用透明採樣瓶，可

用鋁箔紙包於瓶外，以避免照光。

- (二) 標準品瓶：褐色玻璃瓶並附螺旋瓶蓋，用於保存標準品，容量約 5 mL、10 mL 或其他適當體積。
- (三) 上機樣品瓶：褐色玻璃瓶並附含鐵氟龍墊片之螺旋瓶蓋，容量約 1.8 mL。
- (四) 定量瓶：硼矽玻璃材質，容量 10 mL 或其他適當體積。
- (五) 分析天平：可精稱至 0.1 mg。
- (六) 滴管：玻璃或塑膠材質。
- (七) 液相層析串聯式質譜儀
  - 1. 液相層析儀。
  - 2. 自動注射系統。
  - 3. 層析管柱：Hypersil Gold PFP HPLC 管柱，1.9  $\mu\text{m}$  (粒徑)，2.1 mm (內徑)  $\times$  100 mm (長度)、Atlantis Premier BEH C18 AX 管柱，1.7  $\mu\text{m}$  (粒徑)，2.1 mm (內徑)  $\times$  100 mm (長度)、ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl 管柱，130  $\text{\AA}$ ，1.7  $\mu\text{m}$  (粒徑)，2.1 mm (內徑)  $\times$  100 mm (長度)、ACQUITY UPLC HSS T3 管柱，100  $\text{\AA}$ ，1.8  $\mu\text{m}$  (粒徑)，2.1 mm (內徑)  $\times$  100 mm (長度)或同級品。
  - 4. 大氣壓力化學游離 (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 串聯式質譜儀。
  - 5. 數據處理系統：能顯示待測化合物的滯留時間及尖峰面積之定性及定量系統。
- (八) 固相萃取管匣：400 mg Sep-Pak AC2 Plus 或同級品。
- (九) 針頭式過濾膜：孔徑 0.22  $\mu\text{m}$  或以下，聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene fluoride, PVDF) 材質。
- (十) 蠕動幫浦：可調整流率之蠕動幫浦，如 Gilson Minipuls 3 型或其他類似之蠕動幫浦。
- (十一) 抽氣幫浦。
- (十二) 氮氣吹乾裝置：可調整氮氣吹出量。
- (十三) 塑膠針筒：3 mL、5 mL 或以上。
- (十四) 冷藏設施：儲放樣品，溫度可達  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- (十五) 冷凍設施：儲放標準品，溫度可達  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下。

- (十六) 低溫離心機：離心力可達  $900 \times g$  以上(註1)，具冷卻系統。
- (十七) 濾紙：孔徑  $1 \mu m$ 、 $4 \mu m$  或其他適合孔徑，建議直徑為  $47 \text{ mm}$ 。

## 五、試劑

- (一) 試劑水：不含待測化合物之去離子水或市售蒸餾水。
- (二) 甲醇(Methanol)、乙腈(Acetonitrile)、甲酸(Formic acid)：LC 級或 LC/MS 級。
- (三) 含 0.1 % 甲酸的試劑水：作為移動相 A，取甲酸 0.1 mL，加試劑水至 100 mL，使用當日配製。
- (四) 抗壞血酸(Ascorbic acid)：試藥級。
- (五) 標準溶液可用高純度標準品配製或市售具備可追溯濃度證明文件之溶液。
  - 1. 儲備標準溶液：稱取約 10 mg (精稱至 0.1 mg) 各待測化合物標準品，分別以適量乙腈定容至 10 mL，貯存於標準品瓶，亦可使用濃度經確認之市售標準溶液，於  $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  以下避光保存，儲存期限為 6 個月或依製造商標示；若該待測化合物的純度為 96 % 或更高時，則所稱之重量，可直接計算儲備標準溶液之濃度。
  - 2. 工作標準溶液：將儲備標準溶液以試劑水稀釋，配製成所需單一或混合待測化合物之工作標準溶液，建議配製濃度為  $100 \mu\text{g/L}$ ，貯存於標準品瓶，於  $4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  以下避光保存，儲存期限為 3 個月。
- (六) 內標準品溶液：內標準品可選用 N-亞硝二正丙基胺- $d_{14}$ (N-nitrosodi-n-propylamine- $d_{14}$ , NDPA- $d_{14}$ )或其他適用之化合物。
  - 1. 儲備內標準品溶液：稱取約 10 mg (精稱至 0.1 mg) 內標準品，並以適當量的乙腈定容至 10 mL，貯存於標準品瓶，亦可使用濃度經確認之市售內標準品溶液，於  $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  以下避光保存；若該化合物的純度為 96 % 或更高時，則所稱之重量，可直接計算儲備標準溶液之濃度。
  - 2. 工作內標準品溶液：將儲備內標準品溶液以試劑水稀釋，配製成所需之工作內標準品溶液，建議配製濃度為  $100 \mu\text{g/L}$ ，貯存於標準品瓶，於  $4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  以下避光保存。

## 六、採樣與保存

- (一) 採樣方法可參考本署公告之「飲用水水質採樣方法(NIEA

W101.5)」、「監測井地下水採樣方法(NIEA W103.5)」、「河川、湖泊及水庫水質採樣方法(NIEA W104.5)」、「事業放流水採樣方法(NIEA W109.5)」等相關水質樣品採樣方法(註2)。

(二) 樣品須冷藏於  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，且須避光。所有樣品須在 7 天內完成萃取，萃取液須在 14 天內完成分析。

(三) 含餘氯水樣每公升須加入 100 mg 抗壞血酸。

## 七、步驟

(一) 方法係使用內標準法定量之效能基準(Performance-based)分析方法，分析人員可依使用固相萃尿管匣、前處理程序、液相層析儀、層析管柱及串聯式質譜儀之不同，適當修改本方法之檢測程序，修改後之方法其執行檢測所有步驟及程序所得結果，應符合本方法品質管制規範。

### (二) 檢量線製備

1. 檢量線建立：以試劑水配製至少 5 種不同濃度之待測化合物標準溶液，建議濃度範圍為  $2\ \mu\text{g/L}$  至  $40\ \mu\text{g/L}$ ，內標準品濃度建議為  $10\ \mu\text{g/L}$ ，檢量線濃度範圍可依各待測化合物及儀器感度適當調整。

2. 採用線性迴歸法(Linear regression)製作檢量線，以化合物濃度與內標準品濃度比值為 X 軸，化合物感應面積與內標準品感應面積比值為 Y 軸，可使用  $1/x$  加權進行校正，以提高低濃度數值之準確性，其線性相關係數(Correlation coefficient,  $r$ )，必須大於或等於 0.995。

3. 檢量線確認：檢量線製備完成後，應以第二來源標準品(若無第二來源標準品且無不同批號標準品時，至少應使用另一獨立配製之標準品)配製接近檢量線中點濃度，進行檢量線確認，所測得濃度之相對誤差值在  $\pm 20\%$  以內。

### (三) 樣品前處理

1. 樣品中如果含有微粒或是懸浮物時，可將樣品倒入離心管中，以約  $900 \times g$  離心(溫度控制  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ )約 15 分鐘，或通過濾紙以真空抽引過濾，取上層澄清液或濾液進行固相萃取。

2. 取 250 mL 或適量體積樣品，加入濃度為  $100\ \mu\text{g/L}$  之工作內標準品溶液 100  $\mu\text{L}$ 。

3. 取 250 mL 或適量體積試劑水製備查核樣品，加入濃度為  $100\ \mu\text{g/L}$  之工作標準溶液 100  $\mu\text{L}$  及濃度為  $100\ \mu\text{g/L}$  之工作內標準

品溶液 100  $\mu\text{L}$ 。

- 4.取 250 mL 或適量體積樣品製備添加樣品，加入濃度為 100  $\mu\text{g/L}$  之工作標準溶液 100  $\mu\text{L}$  及濃度為 100  $\mu\text{g/L}$  之工作內標準品溶液 100  $\mu\text{L}$ 。
- 5.樣品於前處理前，內標準品添加量須與檢量線內標準品添加量一致。
- 6.固相萃取：
  - (1)固相萃尿管匣以 3 mL 乙腈流洗後抽乾約 1 分鐘，重複 2 次。
  - (2)固相萃尿管匣以 3 mL 甲醇流洗後抽乾約 1 分鐘，重複 2 次。
  - (3)續以 3 mL 之甲醇流經固相萃尿管匣，於固相萃尿管匣內填充物暴露於空氣之前關閉閥門，重複 2 次。
  - (4)續以 3 mL 之試劑水流經固相萃尿管匣，於固相萃尿管匣內填充物暴露於空氣之前關閉閥門，重複 5 次。
  - (5)樣品以大約 5 mL/min 至 8 mL/min 之流率流經固相萃尿管匣。
  - (6)抽乾固相萃尿管匣至少 30 分鐘。
  - (7)使用 10 mL 乙腈進行沖提，收集沖提液。
  - (8)沖提液吹氮濃縮至約 0.1 mL，續加入試劑水定容至 1 mL，沖提液經由針頭式過濾膜過濾，將沖提液移入上機樣品瓶待上機分析。
- 7.本方法為內標準法定量，當樣品待測化合物濃度超過檢量線，重新取較少樣品量，經前處理後上機分析。

(四) 液相層析串聯式質譜儀參考操作條件如下

- 1.管柱：Hypersil Gold PFP HPLC 管柱，1.9  $\mu\text{m}$  (粒徑)，2.1 mm (內徑)  $\times$  100 mm (長度)、Atlantis Premier BEH C18 AX 管柱，1.7  $\mu\text{m}$  (粒徑)，2.1mm (內徑)  $\times$  100 mm (長度)、ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl 管柱，130  $\text{\AA}$ ，1.7  $\mu\text{m}$  (粒徑)，2.1 mm (內徑)  $\times$  100 mm (長度)、ACQUITY UPLC HSS T3 管柱，100 $\text{\AA}$ ，1.8  $\mu\text{m}$  (粒徑)，2.1 mm (內徑)  $\times$  100 mm (長度)或同級品。
- 2.樣品注入量：10  $\mu\text{L}$ 。

3.管柱溫度：35 °C。

4.流率：0.25 mL/min。

5.移動相組成與梯度

移動相 A：含 0.1 % 甲酸的試劑水，使用當日配製

移動相 B：甲醇

時間(分鐘)	移動相A(%)	移動相B(%)
0	98	2
0.5	98	2
3.5	5	95
4	5	95
5	98	2
12	98	2

6.正電荷模式串聯式質譜儀條件(大氣壓力化學游離法)：

(1)霧化(或霧化器)電流(Nebulizer current)：2.0 kV。

(2)氣簾氣體(Curtain gas)：25 psi。

(3)霧化氣體(Ion source gas 1)：40 psi。

(4)加熱溫度(Temperature)：280 °C。

(5)碰撞氣體(Collision gas)：Medium。

7.質譜參數如表二。

#### (五) 定性與定量

1.使用液相層析串聯質譜系統之多重反應監測模式(Multiple reaction monitoring mode, MRM)，監測之前驅物／產物離子對(Precursor/product ion pairs)如表二所示。對每一種待測化合物監測其前驅物／產物離子對兩對，以其中感度較高的前驅物／產物離子對作為定量，第二前驅物／產物離子對作為定性的依據。多重反應監測模式下前驅物／產物離子對層析圖如附圖所示。

- 2.待測化合物之滯留時間須落在當天標準溶液或添加樣品待測化合物之滯留時間  $\pm 2.5\%$  範圍之內。
- 3.待測化合物之兩監測前驅物／產物離子對（積分面積或高度）的相對比率(Ion ratio)須落在可接受的離子比例範圍之內（如表三所示），其相對比率須以檢量線查核分析或品管樣品的前驅物／產物離子對的比例為基準計算之。

#### 八、結果處理

$$C_w = (C \times V \times D) / M$$

其中

$C_w$ ：水樣濃度( $\mu\text{g/L}$ )

$C$ ：由檢量線求得之待測化合物檢出濃度( $\mu\text{g/L}$ )

$V$ ：定容體積( $\text{mL}$ )

$M$ ：樣品取樣體積( $\text{mL}$ )

$D$ ：稀釋倍數

#### 九、品質管制

- (一) 檢量線查核：每批次或每 12 小時執行檢量線查核，完成樣品分析後應再執行檢量線之查核，所測得濃度之相對誤差值應在  $\pm 20\%$  以內。
- (二) 空白樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行空白樣品分析，空白樣品分析值應小於 2 倍方法偵測極限。
- (三) 重複樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行重複樣品分析，其相對差異百分比應在  $30\%$  以內。
- (四) 查核樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行查核樣品分析，其回收率範圍  $70\%$  至  $130\%$ 。
- (五) 添加樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行添加樣品分析，其回收率範圍  $70\%$  至  $130\%$ 。

#### 十、精密度與準確度

單一實驗室查核及添加樣品分析之精密度與準確度的結果如表四。

#### 十一、參考資料

- (一) 行政院環境保護署，水中極性有機物檢測方法－液相層析串聯式

質譜儀法 NIEA W547.51B，中華民國 111 年。

- (二) 衛生福利部食品藥物管理署，藥品中亞硝胺類化合物之檢驗方法－多重分析（液相層析串聯質譜法），中華民國 109 年。
- (三) U.S. EPA. Determination of Nitrosamines in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Capillary Column Gas Chromatography With Large Volume Injection and Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry (MS/MS). Method 521, 2004.
- (四) European Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC), Off. Eur. Commun. L221/8-35, 2002.

註1：離心力 (×g) 與離心機轉速之關係，如下列公式：

$$\text{離心力 (}\times\text{g)} = 1.118 \times (\text{rpm})^2 \times R \times 10^{-5}$$

式中 rpm 為離心機每分鐘轉速、R 為離心機轉子半徑以公分(cm)表示。

註2：本文引用之所有公告方法名稱及編碼，以行政院環境保護署最新公告者為準。



表一 亞硝胺類化合物與內標準品名稱

化合物中文名稱 英文名稱	CAS No.	英文簡寫
N-亞硝二乙胺 N-Nitrosodiethylamine	55-18-5	NDEA
N-亞硝二甲胺 N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	NDMA
N-亞硝二正丁基胺 N-Nitrosodi-n-butylamine	924-16-3	NDBA
N-亞硝二正丙基胺 N-Nitrosodi-n-propylamine	621-64-7	NDPA
N-亞硝甲基乙基胺 N-Nitrosomethylethylamine	10595-95-6	NMEA
N-亞硝哌啶 N-Nitrosopiperidine	100-75-4	NPIP
N-亞硝吡咯烷 N-Nitrosopyrrolidine	930-55-2	NPYR
N-亞硝二正丙基胺-d <sub>14</sub> (內標) N-Nitrosodi-n-propylamine-d <sub>14</sub>	93951-96-3	NDPA-d <sub>14</sub>

表二 前驅物／產物離子對質譜參數

化合物中文名稱 (英文簡寫)	前驅物 離子 (m/z)	產物 離子 (m/z)	DP (V)	CE (V)	EP (V)	CXP (V)
N-亞硝二乙胺 (NDEA)	103	75	50	15	10	10
	103	47	50	21	10	10
N-亞硝二甲胺 (NDMA)	75	43	50	20	10	10
	75	58	50	16	10	10
N-亞硝二正丁基胺 (NDBA)	159	57	75	15	10	10
	159	103	75	17	10	10
N-亞硝二正丙基胺 (NDPA)	131	89	40	14	10	10
	131	43	40	20	10	10
N-亞硝甲基乙基胺 (NMEA)	89	61	40	14	10	10
	89	43	40	16	10	10
N-亞硝哌啶 (NPIP)	115	69	20	20	10	10
	115	41	20	32	10	10
N-亞硝吡咯烷 (NPYR)	101	55	40	18	10	10
	101	41	40	40	10	10
N-亞硝二正丙基胺-d <sub>14</sub> (NDPA-d <sub>14</sub> )	145	50	60	20	10	10

註：DP：Decluster potential, CE：Collision energy, EP：Entrance potential, CXP：Cell exit potential，前述質譜參數可依實際需要適當調整。本表使用液相層析儀：Agilent 1290 Infinity II；串聯式質譜儀：SCIEX QTRAP 5500。

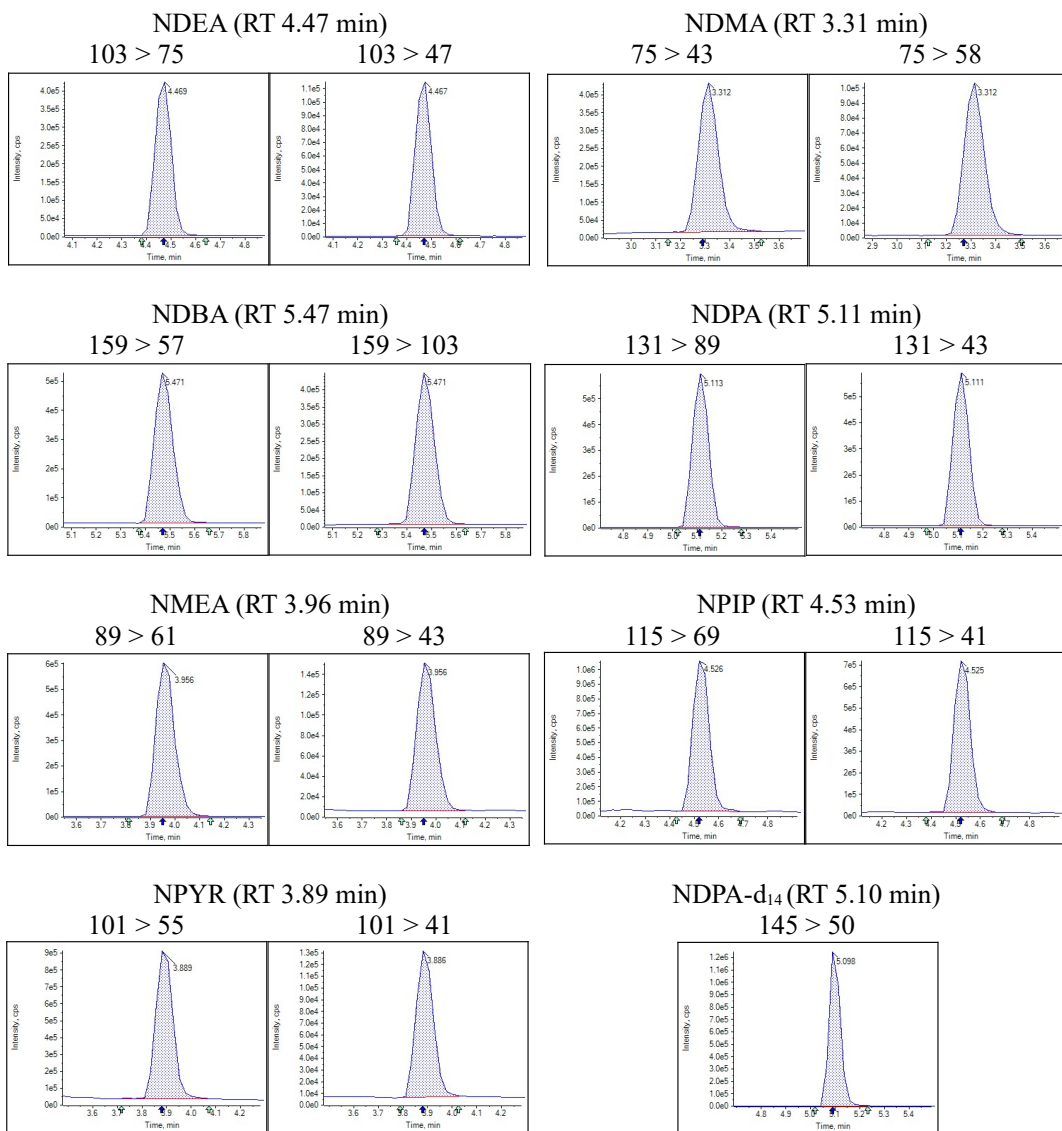
表三 LC/MS/MS 前驅物／產物離子對之離子強度比率(Ion ratio)規範

相對強度 (% of Base peak)	兩離子對比率的最大允許誤差(%)
> 50	± 20
> 20 至 50	± 25
> 10 至 20	± 30
≤ 10	± 50

表四 單一實驗室查核及添加樣品分析之精密度與準確度

化合物中文名稱(英文簡寫)	查核樣品 (n = 12)		添加樣品 (n = 8)	
	平均回收率 (%)	標準偏差 (%)	平均回收率 (%)	標準偏差 (%)
N-亞硝二乙胺(NDEA)	97.5	4.4	96.8	10.8
N-亞硝二甲胺(NDMA)	88.4	3.6	92.0	6.9
N-亞硝二正丁基胺(NDBA)	81.1	10.9	88.4	16.6
N-亞硝二正丙基胺(NDPA)	102.0	4.7	101.3	8.5
N-亞硝甲基乙基胺(NMEA)	95.7	4.6	94.7	13.9
N-亞硝哌啶(NPIP)	100.4	6.2	106.8	8.4
N-亞硝吡咯烷(NPYR)	107.5	4.0	105.4	6.8

註：配製查核樣品與添加樣品濃度為 0.04 µg/L，內標準品濃度 0.04 µg/L。



註：本層析圖使用 Hypersil Gold PFP HPLC 管柱，1.9 μm (粒徑)，2.1 mm (內徑) × 100 mm (長度)，滯留時間 (RT) 供參考。

附圖 多重反應監測模式前驅物／產物離子之層析圖