

# 适用于 EPA 8330B 方法的固相萃取和液-质联用仪分析水中爆炸物

## 应用简报

环境应用

### 作者

E. Michael Thurman and Imma Ferrer  
环境工程系  
科罗拉多大学  
科罗拉多州博尔市  
美国

### 摘要

用于水中爆炸物痕量检测的 EPA 8330B 方法中的检测方式经历了紫外检测到高效液相色谱检测到液-质联用仪检测的转移，本文使用配置了安捷伦 6460 三重四极杆液-质联用仪的安捷伦 1290 Infinity 液相色谱，在大气压化学电离源、负离子化模式条件下分析水中的爆炸物。用本方法分析了水中十一种痕量的爆炸物，检测限在 5-50 ng/L 范围内。使用固相萃取（SPE）C18 萃取柱和聚合物萃取柱用于评价测试。聚合物固相萃取柱具有超高的回收率，范围在 80%-101%（离线固相萃取）。超高压液相色谱/6460 三重四极杆液质联用系统是检测水中爆炸物的有效方法。



**Agilent Technologies**

## 前言

EPA 方法 8330B[1] 于 2006 年被提出，用来取代较早的版本 EPA 方法 8330，EPA 方法 8330 是结合紫外检测的高效液相色谱法，用于检测 17 种爆炸物。新的方法可以检测水中亚-ppb 浓度的痕量爆炸物。

军事行动和可能的生态破坏都能够导致爆炸物进入周边环境，由于它们对人体有急性和慢性毒性作用，所以环境中爆炸物的检测受到了很多关注。例如，2,4,6-TNT 会导致成年牛蛙产生急性毒性 [2]。此外，军事设施地点的爆炸残留物还能够通过土壤进入到地下水中 [3]。因此，潜在存在的环境问题的解决需要可靠而灵敏的检测方法，如质谱方法。

本应用简报介绍了将 EPA 8330B 方法转移至先进的质谱检测方法，此方法包括超高压液相色谱 (UHPLC) 法/三重四极杆质谱法。使用固相萃取，在结合了 6460 三重四极杆液质联用系统的 1290 Infinity 液相色谱系统上开发了爆炸物的检测方法并且测定了 11 种爆炸物的检测限 (LOD)，测试浓度范围是 5-50 ng/L，回收率是 80% 至 101%。

## 实验

### 试剂和标准品

所有标准品均购自 AccuStandard (New Haven, CT, USA)，17 种爆炸物分析标准品的产品编号是 M-8330-R。LC/MS-级甲醇、乙腈和水，购自 Burdick 和 Jackson (美国新泽西州莫里斯镇)。固相萃取柱为反相聚合物柱和 C18 萃取柱，购自安捷伦科技 (部件号 12102052)。所有的标准品都用甲醇溶解，浓度为 100 µg/mL，顺序稀释至合适的浓度。

### 仪器

本方法是在由二元泵、自动进样器、柱温箱和 UHPLC 柱组成的 1290 Infinity 液相色谱系统上开发的。液相色谱与 6460 三重四极杆液质联用系统。仪器操作条件列于表 1 中。

表 1. 液相色谱和质谱的运行条件

#### 液相色谱条件

色谱柱	安捷伦 ZORBAX C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 µm (部件号 95975-902)		
柱温	25 °C		
进样体积	100 µL		
流动相	A = 乙腈 B = 0.1% 乙酸水溶液		
流速	0.4 mL/min		
梯度	时间 (min)	% A	% B
	0	20	80
	1.7	20	80
	10	100	0
	10.3	100	0
后运行时间	4 min		
总分析时间	10.3 min		

#### 质谱条件

离子化模式	大气压化学电离，负模式		
干燥气温度	350 °C		
汽化器温度	275 °C		
干燥气流速	4 L/min		
雾化器压力	30 psig		
CORONA 电流 (负)	4 µA		
毛细管电压 (负)	1500 V		
MRM 参数	见表 4		

## 样品制备

在 Gilson 271-GX 全自动固相萃取系统 ( Gilson Inc., Madison, WI, USA) 上, 采用聚合物柱或 Bond Elut C18 柱对每个 100 mL 的样品进行富集浓缩。固相萃取柱先用 5 mL 甲醇、然后用 5 mL 水平衡。上水样, 速度控制在 10 mL/min, 最后用流速为 1 mL/min 的 5 mL 甲醇进行洗脱。在 Turbovap 浓缩工作站 ( Caliper Life Sciences, Mountain View, CA) 上, 在温度为 45 °C、水浴条件下, 利用氮吹将甲醇浓缩至 0.5 mL, 然后注入到高效液相色谱-串联质谱系统中进行分析。

## 结果与讨论

### 选择电离模式

表 2 列出了 EPA 8330B 方法中的 17 种爆炸物的名称、缩写和 CAS 号。表中列举还包括用苯胺制造的新型炸药, 如 HMX、高熔点炸药和 RDX、研究单位的炸药。用负模式的电喷雾 (ESI) 和大气压化学电离 (APCI) 对这 17 种爆炸物进行了分析。

负模式大气压化学电离源 (APCI) 比负模式电喷雾电离更适合爆炸物的检测 (表 3), 早期发表的文章也确认了这一结果[4]。由于结构的关系, 即使在大气压化学电离的负模式条件下, 还是有几个爆炸物无法离子化。尤其是, 如化合物含两个以下的硝基基团, 那么很难生成负离子。这里所指出的是, 硝基苯、2-硝基甲苯、3-硝基甲苯、4-硝基甲苯无法离子化。含有多个硝基基团的组分可以在 APCI 负模式下离子化, 它们通过丢失一个质子形成偶数电子离子, 或者捕获一个电子形成奇数电子离子。

表 4 显示了, 在负模式的大气压化学电离条件下形成的母离子的结构。17 个爆炸物中 11 个被有效离子化。值得注意的是, 表 4 中的所有化合物的结构都含有至少两个硝基基团, 这有助于在 APCI 负模式条件下被离子化。在超高压液相色谱 / 三重四极杆质谱联用仪上, 开发了这 11 种爆炸物的分析方法。

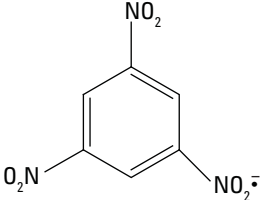
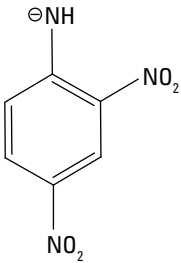
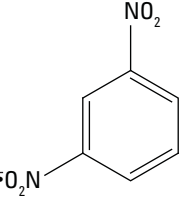
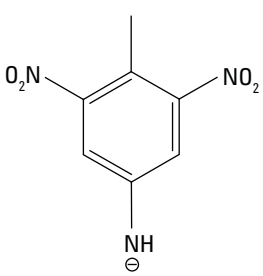
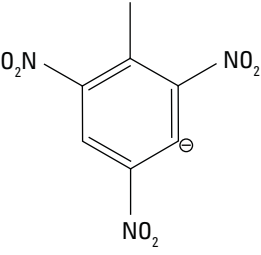
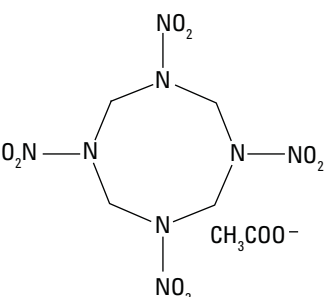
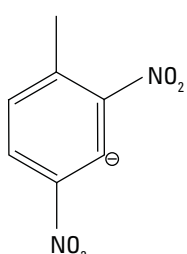
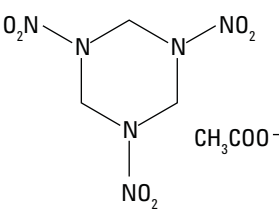
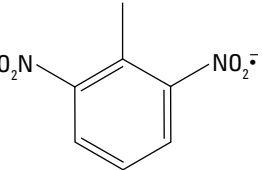
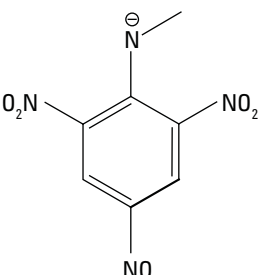
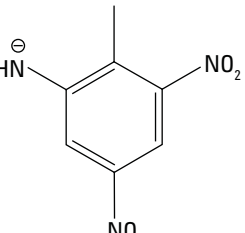
表 2. 本文研究的爆炸物的缩写、名称和 CAS 号

待测物 (缩写)	待测物名	CAS 号
1,3,5-TNB	1,3,5-三硝基苯	99-35-4
1,3-DNB	1,3-二硝基苯	99-65-0
2,4,6-TNT	2,4,6-三硝基甲苯	118-96-7
2,4-DNT	2,4-二硝基甲苯	121-14-2
2,6-DNT	2,6-二硝基甲苯	606-20-2
2-Am-DNT	2-氨基-4,6-二硝基甲苯	35572-78-2
2-NT	2-硝基甲苯	88-72-2
3,5-DNA	3,5-二硝基苯胺	618-87-1
3-NT	3-硝基甲苯	99-08-1
4-Am-DNT	4-氨基-2,6-二硝基甲苯	19406-51-0
4-NT	4-硝基甲苯	99-99-0
HMX	八氢-1,3,5,7-四硝基-1,3,5,7-奥克托今	2691-41-0
NB	硝基苯	98-95-3
NG	硝酸甘油	55-63-0
PETN	季戊四醇四硝酸酯	78-11-5
RDX	六氢-1,3,5-三硝基-1,3,5-三嗪	121-82-4
Tetryl	甲基-2,4,6-三硝基苯硝胺	479-45-8

表 3. 本文中研究的爆炸物的离子化选择 (X = 没有响应; ✓ = 有响应)

待测物缩写	ESI -	APCI -
1,3,5-TNB	✓	✓
1,3-DNB	X	✓
2,4,6-TNT	✓	✓
2,4-DNT	✓	✓
2,6-DNT	X	✓
2-Am-DNT	✓	✓
2-NT	X	X
3,5-DNA	✓	✓
3-NT	X	X
4-Am-DNT	✓	✓
4-NT	X	X
HMX	✓	✓
NB	X	X
NG	X	X
PETN	X	X
RDX	✓	✓
Tetryl	X	✓

表 4. 在 APCI 负模式条件下, 爆炸物生成的母离子的化学结构

待测物缩写	化学结构	母离子	待测物缩写	化学结构	母离子
1,3,5-TNB		$[M]^-$	3,5-DNA		$[MH]^-$
1,3,-DNB		$[MH]^-$	4-Am-DNT		$[MH]^-$
2,4,6-TNT		$[MH]^-$	HMX		$[M+CH_3COO]^-$
2,4-DNT		$[M]^-$	RDx		$[M+CH_3COO]^-$
2,6-DNT		$[M]^-$	Tetryl		$[M+NO_2]^-$
2-Am-DNT		$[MH]^-$			

## 分析方法参数优化

对 11 个化合物的碰撞电压进行优化以使其母离子的响应最大。在所有三种情况下，母离子是去质子化分子峰或者分子离子峰。HMX 和 RDX（较新的硝基胺类的爆炸物）均能在分子上形成乙酸加成物从而得到阴离子。另一方面，三硝基苯甲硝胺在碰撞反应池之前，失去一个硝基（主要发在离子源），形成其母离子。

表 5 所示为 11 种爆炸物的母离子、碰撞电压和产生两个子离子所需的碰撞能量。四极杆的分辨率包括宽设置 (wide) MS1 和单位质量分辨率 MS2，以保证捕获最强的离子信号，同时消除基质和溶剂中的杂散离子，保持低的背景噪音。子离子中出现  $m/z$  46 离子，即硝基( $\text{NO}_2^-$ )，这是常见的现象，因为对于每种爆炸物化合物，硝基是一个重要的丢失基团。对于所有的组分，离子驻留时间设为 5 ms。11 种化合物的 MRM 和它们的子离子列于表 5。这些 MRM 用于建立可靠的串联四极杆液质联用的方法。

表 5. 大气压化学电离（负模式）条件下，检测爆炸物组分的 MRM 参数

化合物名	母离子	MS1 res	子离子	MS2 res	离子驻留时间	碰撞电压	碰撞能量	碰撞反应池电压
1,3,5-TNB	213	Wide	183	Unit	5	70	5	3
1,3,5-TNB	213	Wide	95	Unit	5	70	20	3
1,3-DNB	168	Wide	138	Unit	5	50	5	3
1,3-DNB	168	Wide	46	Unit	5	50	5	3
2,4,6-TNT	226	Wide	196	Unit	5	90	5	3
2,4,6-TNT	226	Wide	46	Unit	5	90	20	3
2,4-DNT	181	Wide	135	Unit	5	90	20	3
2,4-DNT	181	Wide	46	Unit	5	90	20	3
2,6-DNT	182	Wide	152	Unit	5	50	20	3
2,6-DNT	182	Wide	46	Unit	5	50	10	3
2-Am-DNT	196	Wide	136	Unit	5	90	20	3
2-Am-DNT	196	Wide	46	Unit	5	90	20	3
3,5-DNA	182	Wide	152	Unit	5	90	10	3
3,5-DNA	182	Wide	46	Unit	5	90	20	3
4-Am-DNT	196	Wide	119	Unit	5	90	10	3
4-Am-DNT	196	Wide	46	Unit	5	90	20	3
HMX	355	Wide	147	Unit	5	50	5	3
HMX	355	Wide	46	Unit	5	50	10	3
RDX	281	Wide	59	Unit	5	50	10	3
RDX	281	Wide	46	Unit	5	50	20	3
Tetryl	241	Wide	213	Unit	5	70	0	3
Tetryl	241	Wide	196	Unit	5	70	10	3

实验条件也被优化，以得到最优的灵敏度、汽化温度、干燥气温度、流速、电晕电流和毛细管电压。可观察到将气体流速从 6 L/min 降至 4 L/min 时，信号明显增强，之前应用简报中使用的 LC/APCI-TOF-MS 也得到这个现象 [4]。由于某些化合物是热不稳定的，所以最优的汽化温度设为 275 °C。

## 检测和定量

图 1 所示为 11 种爆炸物的超高压液相色谱分离的色谱图。大多数组分都是基线分离。然而，有两个同分异构体（2-氨基-DNT 和 4-氨基-DNT）没有完全分离。由于硝基和甲基基团的位置不同导致不同的碎裂机理，因此每个组分产生不同子离子，可以通过质谱的 MRM 的方式将两个同分异构体分开。

对 11 种爆炸物建立了标准曲线，结果显示，每个组分都具有很好的线性。图 2 显示了 2,4-DNT 的标准曲线，线性相关系数 ( $R^2$ ) 是 0.999。外标校正曲线的浓度点分别是 1, 10, 25, 50, 和 100  $\mu\text{g/L}$  或 ppb，这是固相萃取浓缩后，大多数爆炸物化合物的灵敏度。

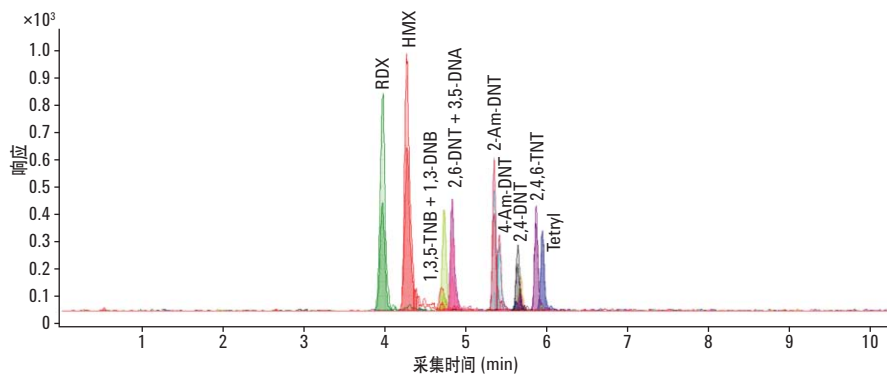


图 1. C18 柱上分离爆炸物化合物的色谱图

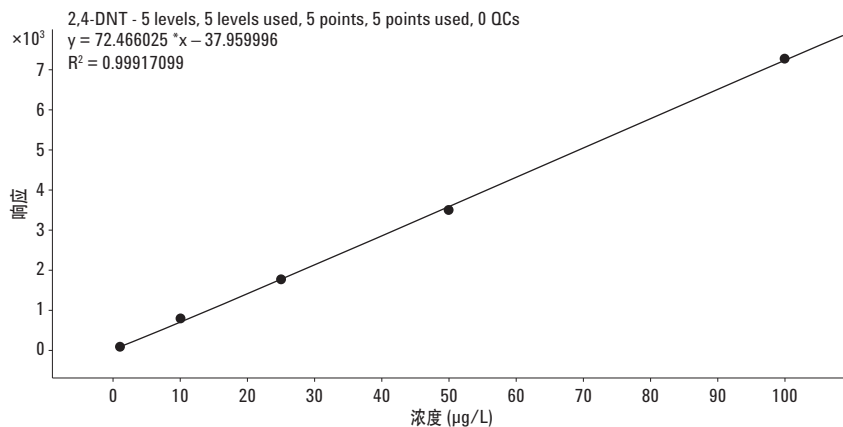


图 2. 2,4-DNT 的外标校正曲线，显示了良好的线性 ( $R^2=0.999$ )

## 样品制备

为了建立水中 ng/L 水平爆炸物的分析方法，需要使用固相萃取富集技术 (2-3)。因此，用 C18 和聚合物固相萃取柱测定 11 种爆炸物的回收率，结果见表 6。大多数爆炸物在两种固相萃取柱上得到相近的回收率，范围在 72% 至 101% 的范围内，只有 HMX 和 RDX 在 C18 柱的回收率较低，这主要是因为这两个化合物的极性所致。

使用聚合物固相萃取柱的离线固相萃取和 UHPLC/MS/MS 的多反应监测 (MRM) 体系建立了 11 种爆炸物的高灵敏度检测方法。表 7 显示了加标的 100 mL 地表水富集浓缩后的 11 种爆炸物的检测限 (LODs)。因为组分在大气压化学电离条件 (负模式) 下灵敏度的不同，其检测限在 5 至 50 ng/L 之间。

## 结论

用固相萃取进行样品的富集后，用 1290 Infinity 液相色谱/6460 三重四极杆液质联用系统建立了 EPA 8330B 中 11 种爆炸物的高灵敏度检测方法。这个可靠的方法采用两个 MRM 离子来进行地表水和地下水中爆炸物的定量和确认分析，检测限在 5-50 ng/L 范围内 (经过固相萃取富集)。用聚合物固相萃取柱的离线固相萃取得到的回收率在 80% - 101% 之间。

表 6. 回收率 (%) \*

化合物缩写	C18 Bond Elut 萃取柱 (%)	聚合物柱 (%)
1,3,5-TNB	72	80
1,3-DNB	82	101
2,4,6-TNT	101	95
2,4-DNT	91	86
2,6-DNT	95	83
2-Am-DNT	91	97
3,5-DNA	95	83
4-Am-DNT	91	88
HMX	9.2	84
RDX	19	88
Tetryl	88	82

\* 加标浓度为 100 ng/L 的 100 mL 地表水的固相萃取

表 7. 方法检测限 \*

化合物缩写	检测限 LOD (ng/L)
1,3,5-TNB	25
1,3-DNB	50
2,4,6-TNT	5
2,4-DNT	25
2,6-DNT	10
2-Am-DNT	5
3,5-DNA	5
4-Am-DNT	10
HMX	10
RDX	25
Tetryl	20

\* 加标浓度为 100 ng/L 的 100 mL 地表水的固相萃取

## 参考文献

1. Anon, 2006, “液相色谱法 (HPLC) 分析芳香族硝基化合物、硝胺和硝酸酯”, U.S. EPA Method 8330B, 29p
2. N.E Paden, E. E.Smith, R. J. Kendal, “2,4,6-三硝基甲苯、2,4-二硝基甲苯和 2,6-二硝基甲苯导致成年牛蛙的急性中毒 (Lithobates catesbiana)” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **80**, 487-491(2008)
3. K. Spiegel, J.V. Headley, K.M. Peru, N. Haidar, N.P. Gurprasard, “德国东部地区一处军事地点的爆炸物残留从土壤中迁移到水中”, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **36**, 133-153 (2005)
4. R. Kinghorn, C.Milner, J. Zweigenbaum, “安捷伦的飞行时间液质联用仪分析微量的爆炸物残留物”, 安捷伦应用报告, 5989-2449EN

## 更多信息

本文仅代表典型的结果。更多有关我们产品和服务, 请访问我们的网站: [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2012  
2012年6月27日, 中国印刷  
5991-0676CHCN