

# 水中丙烯醯胺檢測方法

## —固相萃取與高效液相層析/串聯式質譜儀法

中華民國 101 年 12 月 22 日環署檢字第 1010117195 號公告

自中華民國 102 年 3 月 31 日生效

NIEA W544.50B

### 一、方法概要

水樣流經已活化之固相萃取管匣，並以幫浦將管匣內水分抽至近乾，經氟甲烷沖提，收集沖提液，吹氮、濃縮、定容、過濾後，以高效液相層析串聯式質譜儀 (HPLC/MS-MS) 檢測水中丙烯醯胺 (Acrylamide)。

### 二、適用範圍

- (一) 本方法適用於飲用水、飲用水水源、地面水體、地下水、及放流水中丙烯醯胺之檢測。
- (二) 本方法係為效能基準(Performance-based)分析方法，分析人員可依使用的固相萃取管匣、前處理程序、高效液相層析儀、層析管柱及串聯式質譜儀廠牌的不同，可適當修改本方法之樣品前處理程序，惟修改後之方法其執行檢測所有步驟及程序，應符合本方法品質管制規範。
- (三) 若有其他自動化設備或裝置，經驗證且符合本方法規範者，亦可使用。

### 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，須執行空白樣品的測試，以證明無干擾情形。
- (二) 使用之玻璃器皿或玻璃材料必須清洗乾淨以避免干擾。
- (三) 質譜儀的各項參數須調整至最佳化，以達到要求的解析度及質量的準確度。在 HPLC/MS-MS 中如層析管柱材質、管柱的長度、內徑、流動相流速、移動相及添加劑的選擇，都足以影響分析效果及儀器感度。而電灑法和待測物、溶劑及流速的關係密切，所

以需考量液體本身的電導係數及介電常數，以減少離子抑制的情況，達到 MS-MS 分析效率的最佳化。

#### 四、設備及材料

- (一) 採樣瓶：500 mL，棕色玻璃材質，附螺旋瓶蓋，瓶蓋內襯為鐵氟龍墊片。若使用無色玻璃瓶，可以鋁箔紙包於瓶外，以避免照光。使用前，玻璃瓶及瓶蓋內襯須事先清洗乾淨。
- (二) 定量瓶：棕色硼矽玻璃材質，10.0 mL 和 25.0 mL。
- (三) 定量管：硼矽玻璃材質，容量 15 mL，可定容至 2.0 mL。
- (四) 分析天平：可精秤至 0.1 mg。
- (五) 可調式微量吸管：10  $\mu$ L、25  $\mu$ L、50  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L。
- (六) 純水裝置：Millipore 公司之 Milli-Q 型純水系統；或同級品。
- (七) 塑膠針筒及針頭：可參考一般市售規格。
- (八) 過濾膜：0.2  $\mu$ m 孔徑，直徑 13 mm，Telfon 材質；或同級品。
- (九) 過濾濾紙：棉質纖維素成分，1  $\mu$ m，4  $\mu$ m 孔徑，直徑 70 mm，或同級品。
- (十) 高效液相層析串聯式質譜儀 (HPLC/MS-MS) 裝置
  - 1. 高效液相層析儀。
  - 2. 串聯式質譜儀。
  - 3. 數據處理系統：能顯示分析物的滯留時間及尖峰面積之定性及定量系統。
- (十一) 萃取裝置
  - 1. 活性碳固相萃取管匣(cartridge)：Sep-Pak AC2 內含 400 mg 活性碳或 BAKERBOND™ 內含 500 mg 活性碳之固相萃取管匣；或同級品。

- 2.固相萃取裝置：Waters，SPE 萃取裝置；或同級品。
- 3.蠕動馬達：Gilson Minipuls 3 型；或其他類似之蠕動馬達，可調整流速。
- 4.真空幫浦：可調整真空度，可達真空壓力 8~10 mmHg 以下。
- 5.氮氣吹乾裝置(N<sub>2</sub> Evaporator)：可調整加熱溫度和氮氣吹出量。

## 五、試劑

- (一) 試劑水：不含待測物之試劑水，其電阻應大於 18 MΩ-cm。
- (二) 甲醇 (Methanol)：HPLC 級或 LC/MS 級；或更高純度。
- (三) 氰甲烷 (Acetonitrile)：HPLC 級或 LC/MS 級；或更高純度。
- (四) 含 0.1% 甲酸之氰甲烷(Acetonitrile with 0.1% Formic Acid)：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (五) 含 0.1% 甲酸之水：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (六) 氮氣(N<sub>2</sub>)：純度 99.99%以上。
- (七) 儲備標準溶液：

### 1.標準品 (Acrylamide) 溶液配製：

- (1) 儲備標準溶液：稱取約 10.0 mg (精稱至 0.1 mg) 已知純度之標準品，置於 10 mL 定量瓶，以氰甲烷溶解後，定容至標線，濃度約為 1000 mg/L，貯存於棕色之玻璃瓶(瓶蓋需有鐵氟龍內襯)，於 -10°C 以下保存。在計算儲備標準溶液之濃度時，若該化合物的純度為 96% 或更高時，則所稱的重量可直接計算儲備標準溶液之濃度，而不需考慮因標準品純度不足 100% 所造成之誤差。或使用經製造商或一獨立機構確認過之市售標準溶液。
- (2) 中間標準溶液配製：將儲備標準溶液以氰甲烷稀釋配製成中間標準溶液(建議配製濃度為 1 mg/L)，貯存於棕色之玻璃瓶(瓶蓋需有鐵氟龍內襯)，於 -10°C 以下保存；或使用經製造商或一獨立機構確認過之市售標準溶液。以此溶液使

用於檢量線標準溶液之配製。

- 2.同位素內標準品 (Acrylamide- $^{13}\text{C}_3$ ) 溶液：儲備標準溶液與中間標準溶液配製方式與標準品溶液配製方式相同。

## 六、採樣與保存

採樣方法可參考本署公告之現行飲用水水質採樣方法 NIEA W101、監測井地下水採樣方法 NIEA W103、河川、湖泊及水庫水質採樣方法 NIEA W104、事業放流水採樣方法 NIEA W109 等相關水質樣品採樣方法。

- (一)以乾淨之棕色玻璃採樣瓶收集水樣 500 mL 以上。
- (二)所有樣品須於  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  冷藏，在採集後 14 天之內萃取，並在萃取後 40 天內完成分析，萃取液裝於密閉玻璃瓶，要避光並儲存於  $-10^\circ\text{C}$  以下。

## 七、步驟

(一)儀器分析條件 (建議條件)：

1.高效液相層析：

- (1)層析管柱：Phenomenex 公司之 Gemini  $3\mu\text{C}18$   $110\text{ \AA}$  ( $100 \times 2.0\text{ mm}$ )；或同級品。
- (2)移動相 A：含 0.1% 甲酸之水。
- (3)移動相 B：含 0.1% 甲酸之氫甲烷。
- (4)流速：0.2 mL/min。
- (5)樣品注入量：20  $\mu\text{L}$ 。
- (6)管柱溫度： $35^\circ\text{C}$ 。
- (7)分析時間：10 min。
- (8)層析條件：  
等梯度：A : B = 70% : 30%

## 2. 串聯式質譜儀：

(1) Ionization mode：正離子電灑游離法模式(ESI+)。

(2) MS/MS 系統參數：如表一所示。

(3) 多重反應監測模式( Multiple Reaction Monitoring mode，MRM)  
母子離子對及其質譜參考條件如表二所示。

### (二) 檢量線製備 (建議配製方式及濃度如下，使用者可依儀器廠牌的感度及線性範圍作適當的修正)

1. 檢量線溶液配製：取中間標準溶液配製檢量線，建議濃度範圍為 10~100  $\mu\text{g/L}$ 。
2. 分析至少 5 個不同濃度(由中間標準溶液所稀釋而得)之溶液，最低一點濃度宜與方法定量極限 (約為 3 倍方法偵測極限) 之濃度相當。
3. 上述溶液中加入適量之內標準品中間標準溶液，配製成含有內標準品 50  $\mu\text{g/L}$  (建議濃度) 的檢量線標準溶液，其最終溶液為 50% 氘甲烷水溶液。
4. 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)時，對每一種化合物監測其母離子/子離子之母子離子對兩對，除非要避掉干擾，一般以感度較高的母子離子對作為定量，另一對母子離子對作定性。表二為各待測物的定量與定性母子離子對，母子離子對離子層析圖如圖一所示。
5. 檢量線係採用線性迴歸法(linear regression) 製作檢量線，使用  $1/x$  加權，其線性相關係數必須大於或等於 0.995。
6. 檢量線確認：檢量線製備完成後，應即以第二來源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不得超過  $\pm 20\%$ 。

### (三) 樣品分析

#### 1. 水樣前處理

水樣中如果含有微粒或是不明混合物時，可先取適當水樣經過 4  $\mu\text{m}$  或 1  $\mu\text{m}$  孔徑濾紙以真空抽引過濾，以不阻塞固相萃取管匣為原則。

2. 固相萃取 (SPE) 方法 (以下是單一實驗室方法驗證時之操作條件，實驗室得依實際情況，適當修正之)：

- (1) 固相萃取管經由 5 mL 甲醇流洗二次後，再以 5 mL 試劑水流洗二次。
- (2) 取 200 mL 水樣放入 250 mL 玻璃樣品瓶中，連同空白樣品、查核樣品(建議添加中間標準溶液 1 mg/L, 100  $\mu\text{L}$ )及添加樣品(建議添加中間標準溶液 1 mg/L, 100  $\mu\text{L}$ )，所有樣品(包括品管樣品)，須加入 (建議添加 1 mg/L, 100  $\mu\text{L}$ ) 內標準品。
- (3) 水樣以約 5 mL/min 的流速流經固相萃取匣後，抽乾固相萃取匣。
- (4) 固相萃取匣內加入氬甲烷，沖提 2 次 (每次約 5 mL)，收集沖提液於定量管。
- (5) 沖提液於約 30 $^{\circ}\text{C}$  下以氮氣( $\text{N}_2$ )吹至約 1 mL 後，加入水定容至 2 mL 並振盪均勻。
- (6) 最後經由 0.2  $\mu\text{m}$  孔徑，直徑 13 mm Teflon 過濾膜過濾之。
- (7) 取適量樣品以高效液相層析串聯式質譜儀分析。

#### (四) 定性與定量準則

1. 待測物之兩監測母子離子對須同時出現，且兩母子離子對的訊噪比 (S/N) 必須大於 3。
2. 待測物之滯留時間須落在當天檢量線標準品 (各點平均) 或檢量線查核分析或品管樣品中待測物之滯留時間  $\pm 2.5\%$  範圍之內。
3. 一般以待測物感度較高的監測母子離子對之面積來定量該待測物的含量。若有干擾時，可選用其他的母子離子對之面積來定量。

4. 當樣品中待測物濃度定量結果未超過法規管制標準二分之一時，即可出具報告；若超過法規管制標準二分之一時，須完整進行第(5)點之確認動作。
5. 待測物之兩監測母子離子對(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(母子離子對比值的最大相對誤差表，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母子離子對的比例為基準計算之。

## 八、結果處理

由檢量線求得待測化合物之檢出濃度 C，依下列公式計算樣品濃度：

$$\text{濃度}(\mu\text{g/L}) = (C \times V \times D) / M$$

其中

- C：由檢量線求得之化合物檢出濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )
- V：定量體積 (mL)
- M：樣品取樣量，水體樣品單位為 (mL)
- D：稀釋因子。

## 九、品質管制

- (一) 檢量線：至少 5 點不同濃度，採用線性迴歸法(linear regression)，使用  $1/x$  加權，線性相關係數應大於或等於 0.995。
- (二) 檢量線查核：每批次或每 20 個樣品須查核檢量線之適用性，所測得濃度之相對誤差值不應超過  $\pm 20\%$ 。
- (三) 空白樣品分析：每 20 個樣品或每批次樣品，應執行空白樣品分析，空白樣品分析值應小於方法偵測極限值之 2 倍。
- (四) 查核樣品分析：每 20 個樣品或每批次樣品，應執行查核樣品分析，其回收率應在 80 至 120% 範圍內。
- (五) 添加樣品分析：每 20 個樣品或每批次樣品，應執行添加樣品分析，其回收率應在 70 至 130% 範圍內。
- (六) 重複樣品分析：每 20 個或每批樣品至少執行一次重複樣品分析，其相對差異百分比應在 25% 內。

## 十、準確度與精密度

單一實驗室所測得之方法偵測極限為 0.019  $\mu\text{g/L}$ ，精密度與準確度如表四；水質樣品中添加丙烯醯胺之回收率如表五。

#### 十一、參考資料

- (一) 陳麗霞、趙春美、陳怡如、翁英明，水中丙烯醯胺檢測方法驗證，環保署環境檢驗所技術建立報告，行政院環境保護署環境檢驗所，中華民國 101 年。
- (二) Lucentini, L., Ferretti, E., Veschetti, E., Achene, L., Turrio-Baldassarri, L., Ottaviani, M., Bogialli, S., Determination of low-level acrylamide in drinking water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of AOAC International* Volume 92, Issue 1, Pages 263-270, 2009.
- (三) European Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food animal origin (2003/18/EC), *Off. Eur. Commun.* L71, 2003.

註 1：本方法驗證相關資料，所使用之儀器為「Agilent 1100 型 HPLC 搭配 AB SCIEX API 2000 MS-MS」。

註 2：本檢驗相關樣品廢液，依有機廢液（非含氯有機廢液）處理。



表一 MS/MS 系統參數

MS/MS System	ESI <sup>+</sup> 參數
Ion Spray Voltage (IS)	5.2 KV
Curtain Gas (CUR)	35 psi
Nebulizer Gas (Gas 1)	40 psi
Turbo Gas(Gas 2)	60 psi
Temperature(°C)	420°C
Interface Heater	ON
Collision Gas (CAD)	4

表二 MRM 離子對參數與 ESI 正電荷參數

待測物	Q1 Mass →Q3 Mass (m/z)	Dwell time (ms)	DP (volts)	FP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Acrylamide	72.1→55.0 定量	300	20	400	7	18	5
	72.1→44.0 定性	500	20	400	7	31	5
Acrylamide- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> (ISTD)	75.1→58.0 定量	300	20	400	7	18	5
	75.1→45.2 定性	500	20	400	7	33	5

DP : Declustering Potential、 FP : Focusing Potential、 EP : Entrance Potential、 CE : Collision Energy、  
CXP : Collision Cell Exit Potential

表三 HPLC/MS-MS 兩母子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% to 50%	±25%
>10% to 20%	±30%
≤10%	±50%

表四 單一實驗室查核樣品分析之準確度與精密度

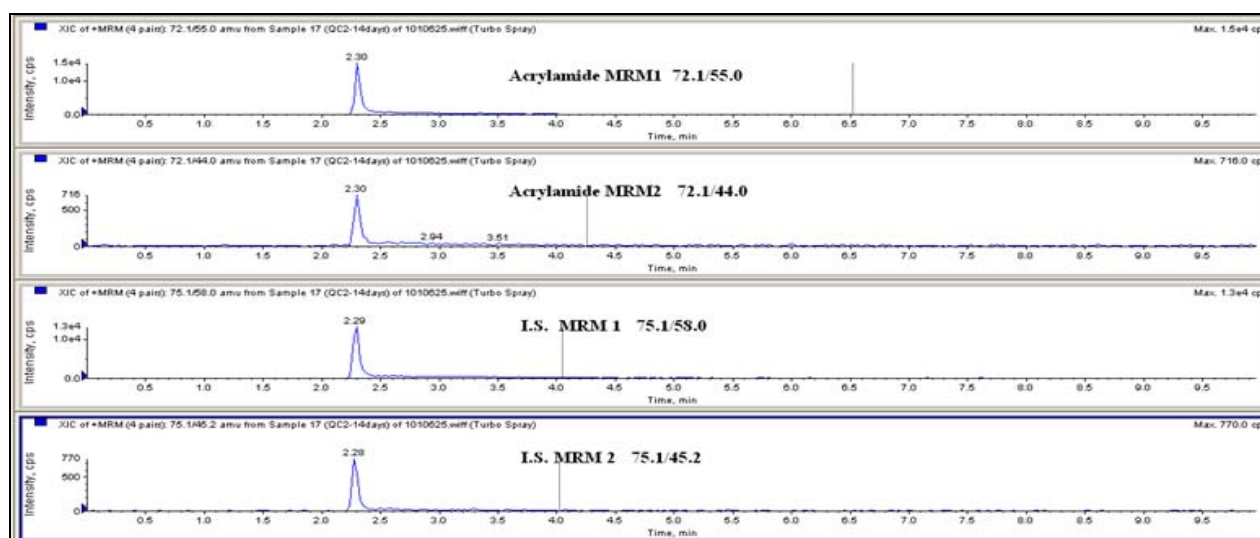
基質	添加濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	平均回收濃度 ( $\mu\text{g/L}$ ), n=7	回收率 $\pm$ SD n=7	RSD (%)
試劑水	0.50	0.49	98.0 $\pm$ 10.7	10.9

註：取 200 mL 試劑水，添加濃度為 1 mg/L 的同位素內標準品 100  $\mu\text{L}$  以及濃度為 1 mg/L 的中間標準溶液 100  $\mu\text{L}$ ，搖晃混合後作為查核樣品用。

表五 單一實驗室於水樣中添加丙烯醯胺之回收率

基質	添加濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收率 (%)
地面水	0.50	0.445	89
自來水	0.50	0.442	88.4
放流水	0.50	0.463	92.7

註：取 200 mL 水樣，添加濃度為 1 mg/L 的同位素內標準品 100  $\mu\text{L}$  以及濃度為 1mg/L 的中間標準溶液 100  $\mu\text{L}$ ，搖晃混合後作為添加樣品用。



圖一 丙烯醯胺母子離子對 (MRM) 層析圖