

土壤中六溴環十二烷檢測方法—液相層析串聯式質譜儀法

中華民國 110 年 10 月 21 日環署授檢字第 1101005551 號

自公告日生效

NIEA S502.60B

一、方法概要

土壤樣品以二氯甲烷萃取後，萃液濃縮至近乾後以正己烷回溶，並以固相萃取管匣進行淨化，再以二氯甲烷沖提化合物，所收集沖提液經濃縮、水乙腈溶劑置換及過濾後，以液相層析串聯式質譜儀 (Liquid chromatography – tandem mass spectrometer, LC/MS/MS) 檢測樣品中六溴環十二烷 (Hexabromocyclododecane, HBCD)。

二、適用範圍

本方法適用土壤中六溴環十二烷之檢測，檢測之化合物包含 α -、 β -、 γ -六溴環十二烷之同分異構物，如表一所示。

三、干擾

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之污染，干擾物質會導致層析圖基線之漂移。

四、設備與材料

- (一) 樣品瓶：褐色玻璃製，並附螺旋瓶蓋。使用前需先用試劑水及甲醇清洗並乾燥之。
- (二) 離心管：玻璃材質附螺旋瓶蓋，50 mL 或其它適當體積。
- (三) 試管：玻璃材質，可置入固相淨化裝置內試管架。
- (四) 定量瓶：玻璃材質，2 mL、25 mL 或其他適當體積。
- (五) 移液管：20 mL 或 30 mL 或其它適當體積。
- (六) 分析天平：可精稱至 0.1 mg。
- (七) 渦漩混和器 (Vortex mixer)。
- (八) 超音波萃取設備：Qsonica Q700 Sonicator 或參考本署公告「超音波萃取法 (NIEA M167.0) (註1)」建議設備規格。
- (九) 液相層析串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) 裝置。
 1. 液相層析儀。
 2. 自動注射系統

- 3.層析管柱：Agilent Pursuit 3 PFP 管柱，3.0 μm （粒徑），2.1 mm（內徑） \times 150 mm（長度）或同級品。
- 4.電噴灑游離串聯式質譜儀。
- 5.數據處理系統：能顯示化合物的滯留時間及尖峰面積之定性及定量系統。

- (十) 研鉢與研杵：瓷器、氧化鋁或其他不干擾分析的材質製成。
- (十一) 機械式研磨器。
- (十二) 固相萃取管匣：矽酸鎂，2000 mg/12 mL，Merck；或同級品。
- (十三) 篩網：孔徑 \leq 2 mm (10 mesh)。
- (十四) 烘箱：循環送風式，附排氣設備。
- (十五) 冷凍乾燥機。
- (十六) 吹氮裝置：可調整加熱溫度和氮氣吹出量。
- (十七) 過濾膜：孔徑 0.22 μm （含）以下，Nylon 材質。
- (十八) 冷藏設施：溫度可控制 4 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ 。
- (十九) 冷凍設施：溫度可達 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下。
- (二十) 離心機：離心力可達 $900\times g$ 以上（註2），具冷卻系統。
- (二十一) 上機樣品瓶：硼矽玻璃材質。

五、試劑

- (一) 試劑水：不含待測物之試劑水。
- (二) 甲醇(Methanol)、乙腈(Acetonitrile)：LC 級或 LC/MS 級。
- (三) 二氯甲烷(Dichloromethane)、正己烷(Hexane)：殘量級或以上。
- (四) 50% 水乙腈溶液(v/v)：等體積試劑水與乙腈混和均勻。
- (五) 移動相 A：試劑水甲醇混和溶液試劑（試劑水：甲醇 = 3：1 (v/v)）。
- (六) 移動相 B：甲醇乙腈混和溶液（甲醇：乙腈 = 1：1 (v/v)）。
- (七) 標準溶液可用高純度標準品配製或市售可追溯濃度證明文件之溶液。
 1. 儲備標準品溶液：稱取約 5 mg（精稱至 0.1 mg）各待測物標準品，以乙腈定容至 25 mL，轉移至褐色樣品瓶。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，不需考慮因標準品純度不足 100 % 所造成之誤差。

2. 工作標準品溶液：將儲備標準溶液以 50 % 水乙腈溶液稀釋配製成工作標準溶液（建議配製濃度為 1.0 mg/L），配製完成保存於樣品瓶中 -20 °C 以下儲存，以此溶液使用於檢量線標準溶液之配製及樣品前處理添加。

(八) 內標準品溶液：可用高純度標準品配製或市售可追溯濃度證明文件之溶液，對應之內標準品如表二。

1. 儲備內標準品溶液：稱取約 1.0 mg（精稱至 0.1 mg）內標準品，以乙腈定容至 5 mL，轉移褐色樣品瓶；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，不需考慮因標準品純度不足 100 % 所造成之誤差。

2. 工作內標準品溶液：將儲備內標準品溶液以 50 % 水乙腈溶液稀釋，配製成所需單一或混合化合物之工作內標準品溶液（建議配製濃度為 1.0 mg/L），保存於褐色樣品瓶中，於 -20 °C 以下保存。

六、採樣與保存

參考本署公告「土壤採樣方法(NIEA S102.6)」進行採樣，置於 4 °C ± 2 °C 冷藏，採樣後應於 28 天內完成上機分析，若前處理完成當日無法上機分析其萃取液需於 -20 °C 中保存。

七、步驟

(一) 本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，應符合本方法品質管制規範。

(二) 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、層析的流速、移動相及添加劑的選擇，都可能影響分析效果及儀器感度。電噴灑法游離效率和化合物、溶劑及流率的關係密切，需考量移動相本身的電導率及介電常數，以減少離子抑制的情況，達到 MS/MS 分析效率的最佳化

(三) 液相層析串聯式質譜儀參考條件如下，可依實際需要適當調整之：

1. 層析管柱：Agilent Pursuit 3 PFP 管柱，3.0 μm（粒徑），2.1

mm (內徑) × 150 mm (長度) 或同級品。

2. 移動相組成與梯度

(1) 移動相 A：試劑水：甲醇 = 3：1 (v/v)

(2) 移動相 B：甲醇：乙腈 = 1：1 (v/v)

(3) 移動相梯度條件：

時間 (分鐘)	移動相A (%)	移動相B (%)
0.0	75	25
4.0	75	25
12.0	0	100
18.0	0	100
18.5	75	25
23.0	75	25

(3) 流率：0.3 mL/min。

(4) 注入體積：20 μL。

(5) 層析管柱溫度：35 °C ± 1 °C。

3. 負電荷模式串聯式質譜儀條件 (電噴灑法)：

(1) 離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：-4.5 kV。

(2) 氣簾氣體(Curtain gas)：25 psi。

(3) 碰撞氣體(Collision gas)：Medium。

(4) 霧化氣體(Ion source gas 1)：58 psi。

(5) 加熱氣體(Ion source gas 2)：55 psi。

(6) 加熱溫度(Temperature)：300 °C。

(7) 質譜參數如表三。

(四) 檢量線製備

1. 檢量線製備：配製至少 5 種不同濃度之待測物標準品於 50 % 水乙腈溶液溶液中，最低一點濃度宜與 3 倍方法偵測極限之濃

度相當，建議濃度範圍為 0.1 µg/L 至 30 µg/L，內標準品濃度為 10 µg/L，可依個別待測物感度適當調整之，其中各待測物建議對應之內標準品如表二。檢量線的製備係採用線性迴歸法 (Linear regression) 製作檢量線，為避免低濃度之偏差，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。

2. 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，可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不得超過 ± 25 %。

(五) 水分測定

1. 土壤水分含量測定：取適當樣品量依據公告方法「土壤及底泥水分含量測定方法-重量法(NIEA S280.6)」，測定乾重量為基礎之水分含量百分比(W_{H_2O} (m/m, %))。
2. 若樣品前處理稱取之樣品為七、步驟（五）樣品預處理之風乾樣品，則可省略水分測定步驟。

(六) 樣品預處理

土壤樣品放置於乾淨的塑膠器皿或鋁箔紙上置於乾淨區域，先剔除石礫、樹枝等雜物後，以自然風乾、30 °C ± 4 °C 之烘箱烘乾或冷凍乾燥等方式乾燥。風乾過程將團粒（如粒徑大於 15 mm）剝散，以免固態樣品因脫水而緊密膠結，有利於乾燥速度。風乾完成後，以木鎚敲碎，再經過研磨使其通過孔徑 ≤ 2 mm 的標準篩，充分混合均勻裝入樣品瓶內，待進行樣品前處理。

(七) 樣品前處理

1. 取約 5 克或適量重量樣品到離心管，另配製查核樣品與添加樣品（建議加入 1.0 mg/L 工作標準溶液 40 µL）。每個樣品建議添加 1.0 mg/L 工作內標準品溶液 40 µL（內標準品可使用混標），經前處理定容後內標準品濃度配製值應與檢量線標準溶液之內標準品濃度值一致。隨後加入二氯甲烷 10 mL 進行萃取，萃取方式可參考公告方法「超音波萃取法(NIEA M167.0)」，或其他可符合品管規範之萃取方法亦可。
2. 離心管以離心機轉速 980×g 離心至少 10 分鐘，取出澄清液，添加二氯甲烷 10 mL，並重複萃取與離心 1 次，隨後合併 2 次萃液。
3. 萃液使用吹氮裝置於約 35 °C 氮氣吹至近乾。

4. 加入約 3 mL 正己烷於離心管內震盪回溶。
5. 萃液淨化：
 - (1) 固相萃取管匣以 12 mL 二氯甲烷與上正己烷分別流洗，待流洗液面接近填充高度時，將樣品滴入固相萃取匣。
 - (2) 續以 6 mL 正己烷清洗固相萃取匣，並抽乾固相萃取匣。
 - (3) 加入約 8 mL 二氯甲烷進行沖提，收集沖提液。
6. 沖提液再使用吹氮裝置於約 35 °C 氮氣吹至近乾。
7. 加入 2 mL 乙腈溶液於離心管內震盪回溶，再加入 2 mL 試劑水，以渦漩混合器混和後經濾膜過濾上機分析。

(七) 定性與定量準則

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)，前驅/產物離子對如表三所示。多重反應監測模式下前驅/產物離子對層析圖如圖一所示。
2. 待測物之滯留時間須在當天標準品或添加樣品待測物之滯留時間 $\pm 2.5\%$ 範圍之內。
3. 待測物之兩監測前驅/產物離子對 (積分面積或高度) 的相對比率 (Ion ratio) 須在可接受的離子比例範圍之內 (如表四所示)，其離子比率須以檢量線查核分析或品管樣品的前驅/產物離子對的比率為基準計算之。
4. 當樣品待測物濃度超過檢量線時，應重新取較少樣品量，前處理後再上機分析。

八、結果處理

$$C_s = (C \times V) / W_{\text{dry}}$$

$$W_{\text{dry}} = W_{\text{wet}} \times 100 / (100 + W_{\text{H}_2\text{O}})$$

其中

C_s ：樣品濃度 (ng/g)

C ：由檢量線求得之化合物濃度 ($\mu\text{g/L}$)

V ：定容體積 (mL)

W_{dry} ：樣品乾基重量 (g)

W_{wet} ：樣品濕基重量 (g)

$W_{\text{H}_2\text{O}}$ ：乾重量為基礎之水分含量百分比 (m/m,%)

九、品質管制

- (一) 檢量線查核：檢量線應至少每 12 小時執行檢量線查核，所測得濃度之相對誤差值不應超過 $\pm 25\%$ 。
- (二) 空白樣品分析：每批次或每 20 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 20 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 20 個樣品，應執行查核樣品分析，其回收率範圍 60% 至 130%。
- (五) 添加樣品分析：每批次或每 20 個樣品，應執行添加樣品分析，其回收率範圍 50% 至 140%。

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五

十一、參考資料

- (一) 行政院環境保護署，土壤中全氟與多氟化合物檢測方法—液相層析串聯式質譜儀 NIEA S501.60B，中華民國 109 年。
- (二) García-Valcárcel, A, I.; Tadeo, J, L. Determination of hexabromocyclododecane isomers in sewage sludge by LC-MS/MS. *J Sep Sci.* 2009, 32 (22), 3890-3897.
- (三) Dodder N, G.; Peck A, M.; Kucklick, J, R.; Sander, L, C. Analysis of hexabromocyclododecane diastereomers and enantiomers by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: chromatographic selectivity and ionization matrix effects. *J Chromatogr A.* 2006, 1135 (1), 36-42.
- (四) Fengchan, Han.; Yudong, Gao.; Fen, Hu.; Xia, Yu.; Huijian, Xie.; Hongliang, Li.; Yijing, Zhao.; Susana, Y. Kimura.; Yubin, Zhang.; Maria, E. Zubizarreta.; Shuo, Xiao.; Ming, Zhan.; Weiwei, Zheng. Solid-phase extraction of seventeen alternative flame retardants in water as determined by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2019, 1602, 64-73.
- (五) An-Hong, Feng.; She-Jun, Chen; Man-Ying, Chen.; Ming-Jing, He.; Xiao-Jun, Luo.; Bi-Xian, Mai. Hexabromocyclododecane (HBCD) and tetrabromobisphenol A (TBBPA) in riverine and estuarine sediments of the Pearl River Delta in southern China, with emphasis

on spatial variability in diastereoisomer- and enantiomer-specific distribution of HBCD. Marine Pollution Bulletin. 2012, 64, 919-925.

- (六) Zhan, M.; Wang, H.; Hao, R.; Li, Y. A review of sample preparation and analysis methods for the hexabromocyclododecanes (HBCDS) in the Environment. Journal of Environmental & Analytical Toxicology. 2019, 9 (1), 1-7.
- (七) Shigeru, Suzuki.; Atsuko, Hasegawa. Determination of hexabromocyclododecane diastereoisomers and tetrabromobisphenol A in water and sediment by liquid chromatography/mass spectrometry. Analytical Sciences. 2006, 22, 469-474.

註1：本文引用之所有公告方法之名稱及編碼，以行政院環境保護署最新公告者為準。

註2：離心力 (g) 與離心機轉速之關係，如下列公式：

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

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。

表一 化合物與內標準品名稱

化合物名稱	英文名稱	CAS No.	簡寫
α -六溴環十二烷	Alpha- Hexabromocyclododecane	134237-50-6	α -HBCD
β -六溴環十二烷	Beta- Hexabromocyclododecane	134237-51-7	β -HBCD
γ -六溴環十二烷	Gamma- Hexabromocyclododecane	134237-52-8	γ -HBCD
α -六溴環十二烷- $^{13}\text{C}_{12}$ (內標)	Alpha- Hexabromocyclododecane - $^{13}\text{C}_{12}$ (IS)	-	α -HBCD- $^{13}\text{C}_{12}$
β -六溴環十二烷- $^{13}\text{C}_{12}$ (內標)	Beta- Hexabromocyclododecane - $^{13}\text{C}_{12}$ (IS)	-	β -HBCD- $^{13}\text{C}_{12}$
γ -六溴環十二烷- $^{13}\text{C}_{12}$ (內標)	Gamma- Hexabromocyclododecane - $^{13}\text{C}_{12}$ (IS)	-	γ -HBCD- $^{13}\text{C}_{12}$

表二 對應之內標準品表

待測物名稱	內標準品
α -六溴環十二烷	α -六溴環十二烷 - $^{13}\text{C}_{12}$
β -六溴環十二烷	β -六溴環十二烷 - $^{13}\text{C}_{12}$
γ -六溴環十二烷	γ -六溴環十二烷 - $^{13}\text{C}_{12}$

表三 前驅/產物離子對質譜參數

化合物	前驅離子	產物離子	DP (V)	CE (V)
α-六溴環十二烷	640.6	79	-90	-52
	642.6	81	-90	-50
β-六溴環十二烷	640.6	79	-90	-52
	642.6	81	-90	-50
γ-六溴環十二烷	640.6	79	-90	-52
	642.6	81	-90	-50
α-六溴環十二烷- ¹³ C ₁₂ (內標)	652.6	79	-80	-55
	652.6	79	-80	-55
β-六溴環十二烷- ¹³ C ₁₂ (內標)	652.6	79	-80	-55
	652.6	79	-80	-55
γ-六溴環十二烷- ¹³ C ₁₂ (內標)	652.6	79	-80	-55
	652.6	79	-80	-55

註：DP：Decluster Potential，CE：Collision Energy，前述質譜參數可依實際需要適當調整之。本表使用儀器：液相層析儀(Agilent 1290 Infinity II)；串聯式質譜儀：Sciex QTRAP 5500。

表四 LC/MS/MS 前驅/產物離子對之離子強度比率(Ion ratio)規範

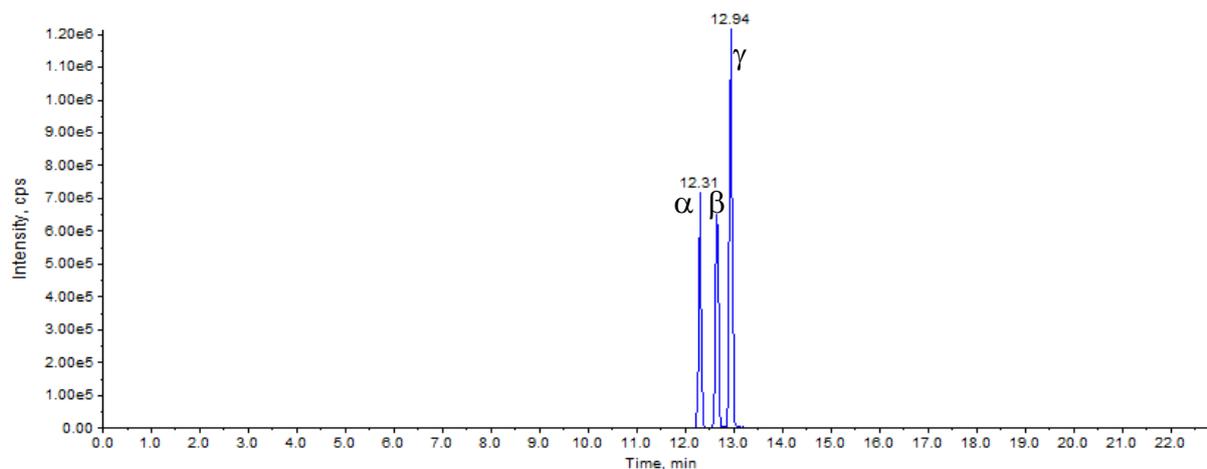
相對強度 (% of Base Peak)	兩離子對比率的最大允許誤差
> 50 %	± 20 %
> 20 % 至 50 %	± 25 %
> 10 % 至 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

表五 單一實驗室查核及土壤添加樣品分析之精密度與準確度

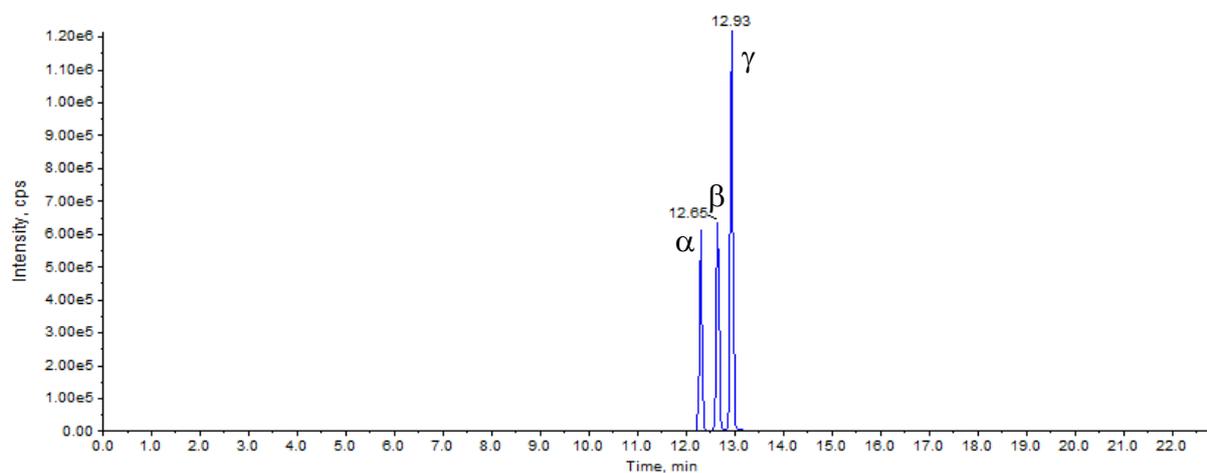
待測物名稱	查核樣品 (n=4)		添加樣品 (n=4)	
	平均 回收率 (%)	標準偏差 (%)	平均 回收率 (%)	標準偏差 (%)
α -六溴環十二烷	94.0	10.1	90.2	16.1
β -六溴環十二烷	104.1	9.0	100.0	6.1
γ -六溴環十二烷	103.2	7.2	88.5	11.7

註：配製查核樣品（不含待測物之空白土壤）與添加樣品（環檢所花圃土）添加濃度為 8 ng/g。

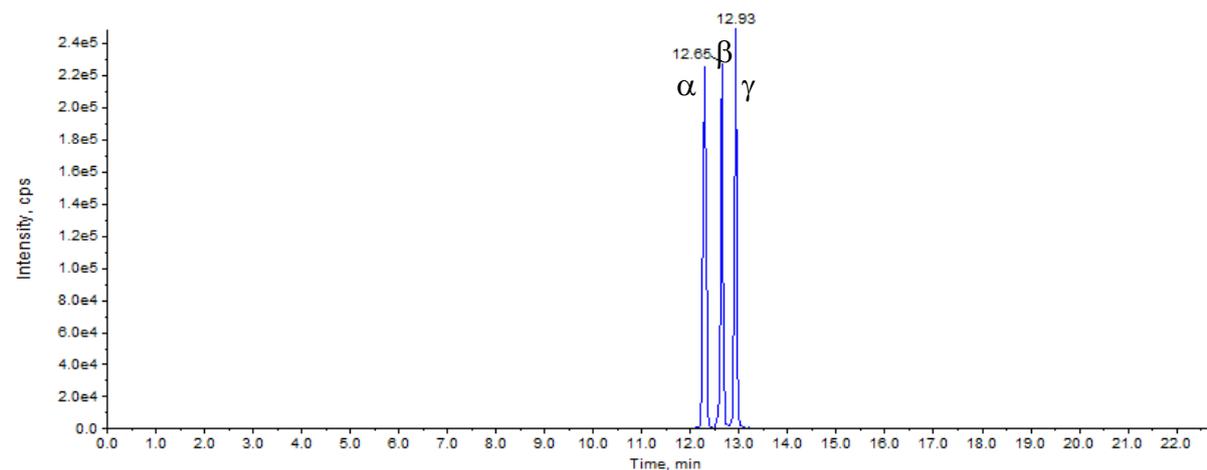
HBCDs 定量 MRM : 640.6 → 79



HBCDs 定性 MRM : 642.6 → 81



HBCDs ¹³C₁₂ MRM : 652.6 → 79



圖一 HBCDs 及內標準品多重反應監測模式(MRM) 前驅/產物離子對之層析圖