

董会军, 马天翼, 李义, 等. 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法测定环境水体中三种苯扎氯铵同系物[J]. 岩矿测试, 2022, 41(6): 1050-1059.

DONG Huijun, MA Tianyi, LI Yi, et al. Determination of Three Benzalkonium Chloride Homologues in Environmental Water by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole/Electrostatic Field Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry[J]. Rock and Mineral Analysis, 2022, 41(6): 1050-1059. [DOI: 10.15898/j.cnki.11-2131/td.202201190015]

## 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法测定环境水体中三种苯扎氯铵同系物

董会军, 马天翼, 李义, 白雪山\*, 董建芳, 张璐

(河北省地质环境监测院, 河北省地质资源环境监测与保护重点实验室, 河北 石家庄 050021)

**摘要:** 苯扎氯铵具有非氧化性杀菌作用, 被大量应用于医疗卫生系统, 随着污水排放到环境中, 已被确定为可能严重影响生态系统中敏感生物有害化合物的有害化合物, 准确检测环境水体中苯扎氯铵的含量对于维护人体和生态环境健康具有重要意义。由于环境水体中残留苯扎氯铵的浓度低, 且检测时容易受到复杂污染组分的干扰, 结果出现假阳性, 因此要求检测方法具有更低的检出限和更准确的定性能力。本文利用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术(UPLC-Q-Orbitrap HRMS), 建立了准确定性定量检测环境水体中苯扎氯铵三种同系物(十二烷基二甲基苄基氯化铵、十四烷基二甲基苄基氯化铵、十六烷基二甲基苄基氯化铵)的方法。样品经0.22 $\mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤, 加入同等体积的甲醇混匀, 流动相为含1%(V/V)三乙胺的10mmol/L乙酸铵-水溶液和甲醇, 梯度洗脱, 采用Accucore C18色谱柱(150mm $\times$ 2.1mm, 2.6 $\mu\text{m}$ )进行分离, 6min内三种苯扎氯铵同系物实现基线分离, 静电场轨道离子阱质谱在60000分辨率条件下以SIM模式进行数据采集。结果表明: 三种苯扎氯铵在0.10~10.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好( $R>0.999$ ), 检出限为0.03~0.06 $\mu\text{g/L}$ , 加标回收率为86.7%~111.2%。经实际样品验证, 该方法在检出限和抗干扰能力上能够满足地表水和浅层地下水等环境水体中三种苯扎氯铵同系物的检测, 并识别出十六烷基二甲基苄基氯化铵的疑似干扰物为质量数 $m/z$  360.323的丙二醇脂肪酸酯。

**关键词:** 环境水体; 苯扎氯铵; 超高效液相色谱; 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法; SIM模式  
**要点:**

- (1) 水样经0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤与等体积甲醇混合, 增强苯扎氯铵在水样中的均匀性。
- (2) 高分辨质谱能够通过准确的质核比, 识别出C16-BAC的干扰物为丙二醇脂肪酸酯。
- (3) SIM模式平衡了灵敏度和分辨率的优势, 方法检出限低, 抗干扰能力强。

中图分类号: O657.63 文献标识码: A

苯扎氯铵(Benzalkonium Chlorides, BACs), 别名洁尔灭, 是一种季铵盐类阳离子表面活性剂, 主要由十二烷基二甲基苄基氯化铵(C<sub>12</sub>-BAC)、十四烷基二甲基苄基氯化铵(C<sub>14</sub>-BAC)、十六烷基二甲基苄基氯化铵(C<sub>16</sub>-BAC)三种同系物组成。苯扎氯铵具

有非氧化性杀菌作用, 被应用于医疗卫生系统, 消毒湿巾、免洗洗手液、滴眼液中均含有苯扎氯铵成分<sup>[1]</sup>。新型冠状病毒(2019-nCoV)肺炎疫情发生以来, 苯扎氯铵更是在日常消毒中被大量使用, 随着污水排放到环境中。苯扎氯铵已被列入欧盟委员会提

收稿日期: 2022-01-19; 修回日期: 2022-05-10; 接受日期: 2022-07-15

基金项目: 河北省“三三三人才工程”项目(A2017002031)

第一作者: 董会军, 工程师, 主要从事地下水检测工作。E-mail: donghuijun@hegeoenv.com。

通信作者: 白雪山, 正高级工程师, 主要从事地下水环境监测、水土污染防治等工作。E-mail: bxs90005@163.com。

出的优先物质清单,并确定为可能严重影响生态系统中敏感生物的有害化合物。有报道表明,苯扎氯铵对体外培养的人角膜上皮细胞具有明确的毒性作用<sup>[2]</sup>,可造成小鼠干眼症形成<sup>[3]</sup>,当城市污水苯扎氯铵的浓度超过2mg/L时,会影响污水处理厂污泥的呼吸作用,抑制生物脱氮作用<sup>[4]</sup>。准确检测环境水体中苯扎氯铵的含量对于维护人体和生态环境健康具有重要意义。

苯扎氯铵的检测方法主要有化学法和仪器法。国际标准ISO 2871、ISO 2271和中国标准《表面活性剂洗涤剂 阳离子活性物含量的测定 直接两相滴定法》(GB/T 5174)采用滴定法检测洗涤剂中季铵盐(含苯扎氯铵)的含量,适用于苯扎氯铵质量分数在5%~100%范围内的样品。仪器分析法中较早开始采用分光光度法对其进行检测,包括示差分光光度法<sup>[5]</sup>、基于曙红Y和曙红B与苯扎氯铵离子缔合反应的紫外分光光度法<sup>[6]</sup>、铝试剂或考马斯亮蓝G250与苯扎氯铵相互作用的共振光散射光谱法等<sup>[7-8]</sup>。分光光度法是利用苯扎氯铵的特异性反应,具有仪器简单、测定速度快等优点,可以检测溶液浓度在0.05~10mg/L范围的样品。拉曼光谱法<sup>[9]</sup>和傅里叶变换红外光谱<sup>[10]</sup>可以结合回归模型对工业产品中的苯扎氯铵进行快速且非破坏性检测。另外一类检测苯扎氯铵的方法是先对样品进行分离,再采用紫外检测器定量,如采用毛细管电泳法(CE)进行分离,分离缓冲液为磷酸二氢钠,分离电压为10kV时可实现苯扎氯铵同系物的有效分离<sup>[11]</sup>。毛细管电泳法在分离效率上优势明显,但是前处理步骤较为复杂,且容易受样品基质影响<sup>[12]</sup>。国际上早期有研究采用气相色谱法分离苯扎氯铵<sup>[13]</sup>,FID检测器进行定量分析。黄渤能<sup>[14]</sup>尝试采用气相色谱-质谱法测定婴幼儿湿巾中苯扎氯铵的含量,在0.5~10mg/L范围内线性关系良好。但是苯扎氯铵在气相色谱仪上会发生热降解,产物为烷基二甲胺<sup>[13]</sup>。目前国内外用于苯扎氯铵检测最为广泛的方法是高效液相色谱法<sup>[15-26]</sup>,设备普及率高,前处理方法简便、稳定性好,仪器上机的浓度线性范围在10.0~500mg/L左右,如果用于环境水体的检测需要浓缩10000倍以上。近些年液相色谱-三重四极杆质谱联用法因其对痕量有机物强大的定性定量能力已被逐步推广,被应用于苯扎氯铵的检测中<sup>[27-31]</sup>。该方法具有准确、高灵敏度的特点,但王浩等<sup>[28]</sup>采用液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿配方乳粉中6种消毒剂残留时发现,采用MRM模式检测,C<sub>16</sub>-BAC依

然会出现假阳性问题,这可能是因为母离子和子离子同时受到了 $m/z$ 近似的离子干扰。解决这一问题,则需要分辨率更高的质谱检测器。目前比三重四极杆质谱仪分辨率高的质谱仪器,有傅里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR)、飞行时间质谱(TOF)、静电场轨道离子阱质谱(Orbitrap)等,这些仪器尚未应用于苯扎氯铵的检测。

在已报道的苯扎氯铵检测方法中,检测对象多为滴眼液、湿巾等,鲜见以环境水体为研究基体的报道。对于环境水体,其污染组分的来源复杂,存在更多的干扰物质影响苯扎氯铵的检测,更容易出现假阳性,并且环境水体中残留苯扎氯铵的浓度相对于消毒剂、滴眼液等基体低得多。本文拟建立一种环境水体中检出限低、抗干扰能力强的三种苯扎氯铵同系物C<sub>12</sub>-BAC、C<sub>14</sub>-BAC、C<sub>16</sub>-BAC的检测方法,探索环境水体简单准确的前处理方法,通过优化液相色谱分离条件,选择一种灵敏度和分辨率兼具的高分辨质谱检测模式,并通过实际样品验证方法的适用性。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、材料与试剂

超高效液相色谱仪(Vanquish,美国ThermoFisher公司),配备在线脱气机、二元高压泵、柱温箱、自动进样器;四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱检测器(Orbitrap Exploris 120,美国ThermoScientific公司);液相色谱柱(Accucore C18,150mm×2.1mm,2.6 $\mu$ m,美国ThermoFisher公司)。

棕色玻璃进样瓶(2mL,上海安谱公司),聚四氟乙烯微孔滤膜(0.22 $\mu$ m孔径,美国Waters公司)。

三种苯扎氯铵同系物(C<sub>12</sub>-BAC、C<sub>14</sub>-BAC、C<sub>16</sub>-BAC)混合溶液(1000mg/L,溶剂甲醇,上海安谱公司)。

甲醇(色谱级,美国ThermoFisher公司),乙酸铵(优级纯,国药集团),三乙胺(色谱级,上海安谱公司)。

实验用水为Milli-Q超纯水,其他试剂均为优级纯。

### 1.2 标准溶液的配制

三种苯扎氯铵混合溶液(1000mg/L)使用甲醇逐级稀释,得到1.0mg/L的标准中间液;使用50%甲醇-水溶液稀释得到10.0 $\mu$ g/L标准使用液;使用50%甲醇-水溶液逐级稀释标准使用液,得到0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、10.00 $\mu$ g/L的标准系列;进

行样品加标时,取一定体积的 10.0 $\mu\text{g/L}$  或 100 $\mu\text{g/L}$  标准溶液加入到每组待加标样品中。

### 1.3 样品采集及前处理

样品采集于干净干燥的棕色玻璃瓶中,配螺旋塑料瓶盖(内垫为聚四氟乙烯材质);水样充满 100mL 样品瓶,4 $^{\circ}\text{C}$  冷藏保存;3 天内完成检测,适用于地下水和地表水的采样。

样品在上机前,经过 0.22 $\mu\text{m}$  孔径的滤膜过滤,弃去至少 1mL 初滤液,移取 0.50mL 过滤后的样品于棕色玻璃进样瓶中,并加入 0.50mL 甲醇,混匀待测。

### 1.4 色谱-质谱分析条件

#### 1.4.1 色谱条件

流动相:A 为含 1% 三乙胺的 10mmol/L 乙酸铵-水溶液,B 为甲醇。梯度洗脱:0~3.0min,B 由 50% 线性递增至 95%;3.0~7.0min,B 保持 95%;7.0~7.1min,B 的比例降到 50%;7.1~10.0min,B 保持 50%。流速 0.25mL/min;柱温箱 40 $^{\circ}\text{C}$ ;进样量 20 $\mu\text{L}$ 。

#### 1.4.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI)源,正离子扫描;工作模式:选择离子扫描(SIM, $\pm 1m/z$ );质谱参数为:鞘气流速 35Arb;辅助气流速 10Arb;喷雾电压 3500V(ESI+);毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$ ;离子源温度 350 $^{\circ}\text{C}$ ;一级质量分辨率 60000。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理方式的选择

为了有效地去除环境水体中的颗粒和胶体,本研究中水样采用 0.22 $\mu\text{m}$  孔径的微孔滤膜过滤的前处理方式,避免堵塞高效液相色谱体系。有研究表明聚乙烯塑料对苯扎氯铵有较强的吸附作用<sup>[32]</sup>,因此与样品有接触的器皿应避免使用聚乙烯材质。

在建立标准曲线的过程中发现,用纯水配制的苯扎氯铵标准曲线,配制过程及标准曲线的溶液均采用涡旋振荡器进行了摇匀处理,三种苯扎氯铵同系物的线性关系仅为 0.90~0.996。而使用 50% 甲醇-水溶液配制的标准曲线,三种苯扎氯铵同系物的线性相关系数均大于 0.999,且添加甲醇后,灵敏度有明显增加。

纯水和 50% 甲醇-水溶液两种溶剂配制的标准溶液的响应值详见图 1。图 1 中,纯水配制的标准系列线性相关性较差,说明三种苯扎氯铵同系物在纯水溶液中的均匀性较差,这可能是由于三种苯扎氯铵同系物均含有苯环和长碳链结构,虽然在水中

易溶,但仍然处在非均质态。线性相关性上, $C_{16}\text{-BAC}<C_{14}\text{-BAC}<C_{12}\text{-BAC}$ ,说明碳链越长,甲醇的影响越大。《城镇供水标准检验方法》(CJ/T 141—2018)中检测溴氰菊酯等极性较弱的化合物时,也采取了类似处理方式。当纯水中添加 50% 的甲醇,能促进苯扎氯铵在水中的分散,且促进响应值的增加。杨芬等<sup>[33]</sup>在研究 HPLC-ICP-MS 分析砷形态时发现了甲醇存在类似效果。

因此,为了保证环境水体中苯扎氯铵保持均质状态,过滤后的水样取 0.5mL 与相同体积的甲醇混匀待测,虽然样品稀释了 2 倍,但是样品稀释后的仪器信号响应值依然大于原样品中的响应值,方法的灵敏度并没有降低,且样品测试的精密度更高。

### 2.2 色谱条件的优化

本研究借鉴文献中液相色谱分离条件,确定了考察的液相色谱柱、流动相和流速条件,寻求一种简单、快速分离三种苯扎氯铵同系物的方法。

● $y=5.34699E7x+2480038$ $R^2=0.9997$	■ $y=1.57372E7x-4609306$ $R^2=0.996$
▲ $y=5.26484E7x-3206174$ $R^2=0.9997$	● $y=8519144x+3358007$ $R^2=0.95$
■ $y=3.76762E7x-617066$ $R^2=0.9998$	▲ $y=7366202x+6257379$ $R^2=0.90$

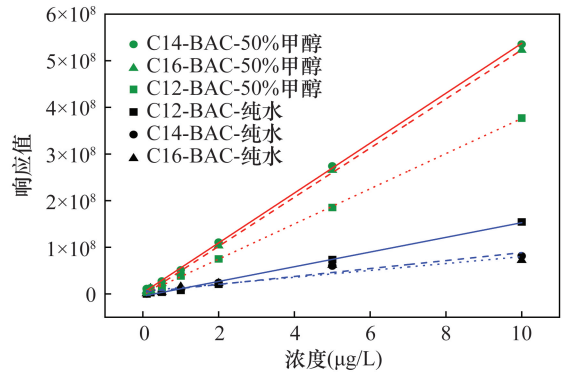


图 1 不同溶剂中苯扎氯铵标准系列的仪器信号响应

Fig. 1 Instrument signal response of standard series of benzalkonium chloride in different solvents

### 2.2.1 色谱柱

以往的报道中,反相色谱柱<sup>[15,17,19,27-31]</sup>和氰基色谱柱<sup>[16,18,21-25]</sup>均能够实现三种苯扎氯铵同系物的分离。本研究根据三种苯扎氯铵因碳链长短不同而产生的极性差异,选用兼容性较强的反相色谱柱(考虑到 pH 范围适用,文献中也曾使用),考察了 Accucore C18 (150mm $\times$ 2.1mm,2.6 $\mu\text{m}$ )<sup>[27,30]</sup>、ODS (100mm $\times$ 2.0mm,1.9 $\mu\text{m}$ )<sup>[15]</sup>、T3 (100mm $\times$ 2.1mm,1.8 $\mu\text{m}$ )<sup>[21]</sup>,这三根

色谱柱键合相存在区别,从分离效果和峰形上考虑,确定选择效果最好的 Accucore C18 色谱柱。

### 2.2.2 流动相

本研究采用反相 C18 色谱柱,而苯扎氯铵同系物中的碳链较长,洗脱需要高比例的有机相,另外考虑到环境水体中存在极性较强的杂质,初始梯度为 10mmol/L 乙酸铵水溶液(含 1%三乙胺)和甲醇的比例为 50% : 50%,可以用于洗脱这部分杂质<sup>[26-27]</sup>,因此本研究采用梯度洗脱。考察了乙腈和甲醇作为有机流动相,分离度和峰形区别不大,但乙腈作为流动相时,三种苯扎氯铵的保留时间比甲醇晚 0.5~0.6min,故选择甲醇作为有机流动相。

当采用 C18 反相色谱柱分离三种苯扎氯铵同系物时,在水相流动相中加入乙酸铵作为离子对试剂,加入三乙胺作为扫尾剂。实验中考察了乙酸铵 4 个浓度: 5mmol/L<sup>[29]</sup>、10mmol/L、20mmol/L<sup>[17]</sup>、100mmol/L<sup>[26]</sup>,结果表明乙酸铵浓度越大,苯扎氯铵出峰越快。液相体系内水相的比例为 5%时,在乙酸铵浓度为 20mmol/L 和 100mmol/L 条件下,三种苯扎氯铵同系物无法实现有效分离;浓度为 5mmol/L 时,最后一种苯扎氯铵出峰的时间是 7.8min;浓度为 10mmol/L 时,最后出峰的时间为 6.0min,选择该浓度能够更快出峰。水相仅为乙酸铵溶液时,三种苯扎氯铵同系物的色谱峰存在一定的拖尾和展宽的情况,在水相溶液中加入三乙胺可以改善峰展宽,使得峰形更尖锐。从峰形对比情况(图 2)来看,1.0%(V/V)的三乙胺比 0.5%(V/V)的效果更明显,但当体积分数为 2%时,C<sub>12</sub>-BAC 和 C<sub>14</sub>-BAC 的分离不完全,这与文献[15,19-20]选择相同。另外,三乙胺也能够使三种苯扎氯铵同系物出峰时间提前,为了使得乙酸铵和三乙胺叠加以后,三种苯扎氯铵同系物也能够实现分离,因此乙酸铵不能选择过高的浓度。

### 2.2.3 柱温

实验考察了 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 五个温度的分离情况,在不同温度条件下,三种苯扎氯铵同系物均能够实现分离。本研究选择出峰速度最快的 40℃ 作为实验温度。

### 2.3 质谱条件的优化

将浓度为 100μg/L 的三种苯扎氯铵同系物标准溶液注入离子源中,在正离子模式下进行母离子扫描,得到苯扎氯铵同系物的母离子。同时正离子模式下进行产物离子扫描,优化 Absolute 模式电压,选择 30kV 电压,得到苯扎氯铵同系物的主要产物离子。苯扎氯铵同系物的母离子、产物离子及响应强度见表 1。

表 1 苯扎氯铵同系物的母离子、产物离子及其强度

Table 1 Parent ions, product ions of benzalkonium chloride homologues and their response intensity

苯扎氯铵同系物	母离子		产物离子	
	质量数 (m/z)	响应强度	质量数 (m/z)	响应强度
C <sub>12</sub> -BAC	304.2988	4.10×10 <sup>7</sup>	91.0537(定量) 212.2354(定性)	9.89×10 <sup>5</sup> -
C <sub>14</sub> -BAC	332.3300	4.56×10 <sup>7</sup>	91.0536(定量) 240.2673(定性)	7.10×10 <sup>5</sup> -
C <sub>16</sub> -BAC	360.3613	3.27×10 <sup>7</sup>	91.0537(定量) 268.2991(定性)	3.48×10 <sup>5</sup> -

由于苯扎氯铵同系物为长碳链结构,二级碎片断裂位置不固定,优化出的产物离子为 m/z 91.053,通过准确质量推测应为苯甲基,其结构上也相对稳定,符合断裂的规律。但是背景噪声较高,二级扫描的优势发挥不出来,并且产物离子的强度因为经过碰撞碎裂的过程,信号响应值不如母离子扫描。因此本研究选用母离子扫描模式。

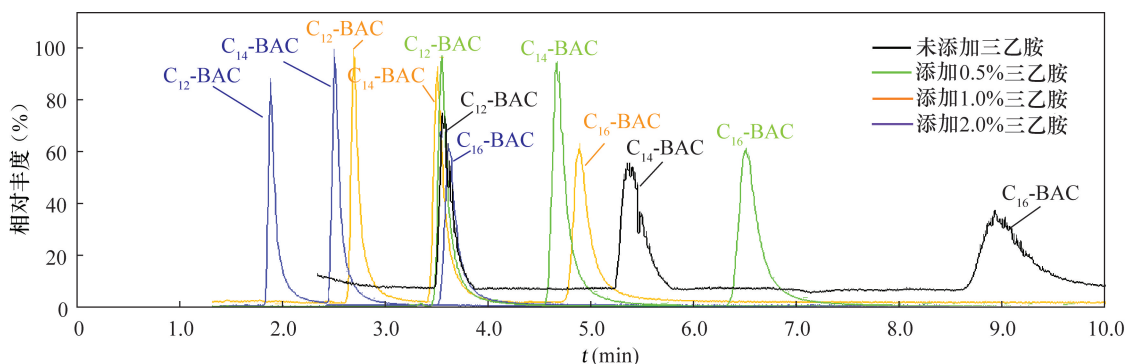


图 2 三乙胺对苯扎氯胺色谱分离的影响

Fig. 2 Effect of triethylamine on chromatographic separation of benzalkonium chloride

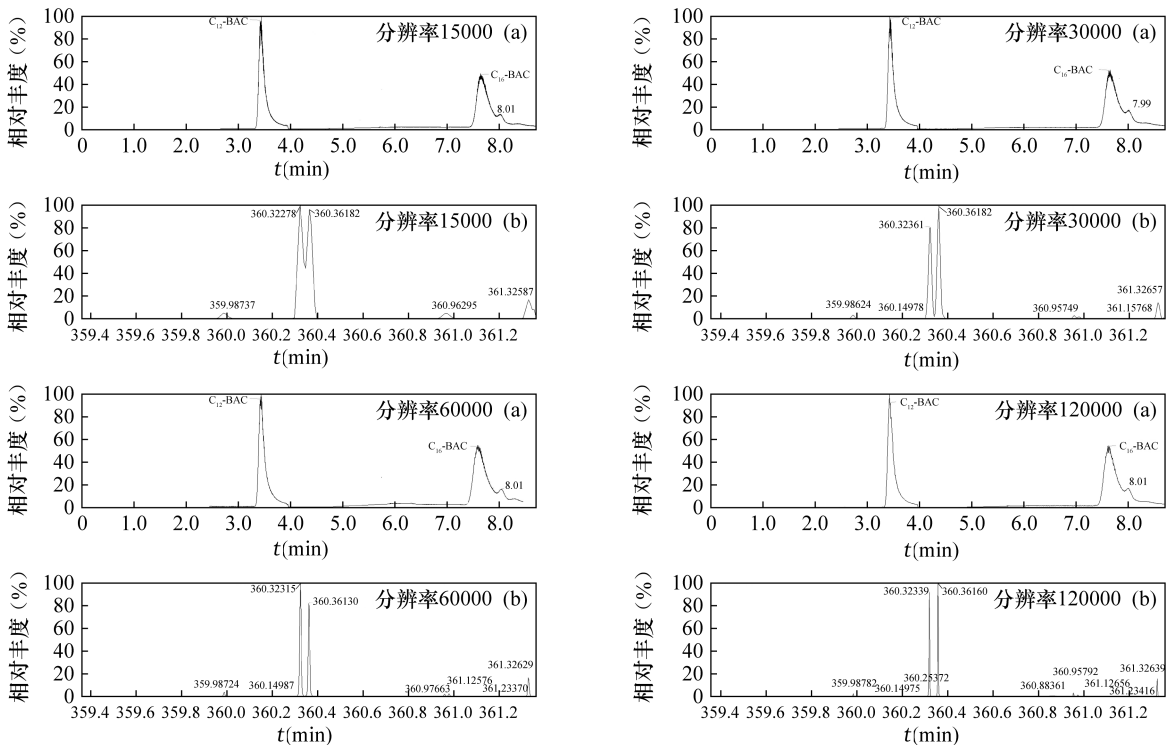
在以往的文献报道中,无论液相色谱法还是液相色谱-质谱联用法,研究人员发现  $C_{16}$ -BAC 存在假阳性的情况<sup>[26-28]</sup>。通过高分辨质谱对离子之间极小的质量差异分辨,从而从复杂基质样品中准确测定目标物,减少出现假阳性和假阴性的可能性<sup>[34]</sup>。在本研究中,尤其注意了  $C_{16}$ -BAC 的谱图,在检测某城市中心河水时发现,  $C_{12}$ -BAC 和  $C_{16}$ -BAC 检出,但  $C_{16}$ -BAC 谱图包含 2 个质量数  $m/z$  360.361 和  $m/z$  360.323,  $C_{16}$ -BAC 的准确质量数应该为  $m/z$  360.361。通过调整流动相的洗脱梯度,在  $C_{16}$ -BAC 色谱峰后分离出一个小峰,但还是不能完全分离。

在分辨率 15000、30000、60000 和 120000 条件下分别进行扫描分析,得到谱图见图 3。图中包含了 4 个分辨率条件下的谱图,每个分辨率分为 a 和 b 两部分,图 3a 是色谱分离的总离子流图(TIC),图 3b 是  $C_{16}$ -BAC 后小峰峰尖位置的质谱扫描图(保留时间为 8.01min 或 7.99min)的质谱扫描图。可以看出,在 4 个分辨率条件下,都能看到  $m/z$  360.361 和  $m/z$  360.323 两个质量数,其中  $m/z$  360.361 是  $C_{16}$ -

BAC 的质量数,  $m/z$  360.323 通过准确质量推测为丙二醇脂肪酸酯;在分辨率 15000 的条件下,  $m/z$  360.361 和  $m/z$  360.323 无法完全分离;随着分辨率的增加,  $m/z$  360.361 和  $m/z$  360.323 逐步分离,当分辨率为 60000 时,两个质核比的分离度  $R$  大于 1.5,即使色谱峰不分离或分离效果不佳,在定量时准确输入  $C_{16}$ -BAC 的质量数,  $m/z$  360.323 的响应值不再影响  $C_{16}$ -BAC 的定量。在色谱分离的基础上进行质量数分辨,能够有效地避免假阳性和基质干扰。由于质谱扫描时,分辨率越高,灵敏度越低,因此在质量数可以有效地分离的情况下,选择 60000 的分辨率。

## 2.4 线性关系及方法检出限

测定浓度范围在 0.10~10.0  $\mu\text{g/L}$  的标准系列工作液,测定结果经线性回归( $y$  为峰面积;  $x$  为浓度,单位  $\mu\text{g/L}$ ),得到相关系数。在 7 份空白水样中进行加标实验,加标浓度为 0.10  $\mu\text{g/L}$ ,计算 7 份平行样测定结果的标准偏差,按照公式  $\text{MDL} = t_{(n-1, 0.99)} \times s$  计算方法检出限(式中:  $n=7$ ,  $t=3.143$ ,  $s$  为标准偏差)。三种苯扎氯铵同系物的方法特性指标见表 2。



a 为总离子流图(TIC); b 为  $C_{16}$ -BAC 后小峰峰尖位置的质谱扫描图。

图 3 不同分辨率下三种苯扎氯铵同系物的扫描图

Fig. 3 Scanning spectra of three benzalkonium chloride homologues at different resolution

表2 三种苯扎氯铵同系物的方法特性指标

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients and detection limits of three benzalkonium chloride homologues

苯扎氯铵同系物	线性方程	线性范围 ( $\mu\text{g/L}$ )	相关系数	检出限 ( $\mu\text{g/L}$ )
C <sub>12</sub> -BAC	$y=1.12\times 10^6+3.77\times 10^7x$	0.10~10.0	0.9998	0.03
C <sub>14</sub> -BAC	$y=2.48\times 10^6+5.35\times 10^7x$	0.10~10.0	0.9998	0.03
C <sub>16</sub> -BAC	$y=-3.21\times 10^6+5.26\times 10^7x$	0.10~10.0	0.9998	0.06

## 2.5 方法准确度和精密度

采集了石家庄市内某断面河水和地下水监测井两种类型的水样进行方法准确度和精密度测定,水样相对洁净,溶解性总固体含量小于200mg/L。采集的样品使用0.22 $\mu\text{m}$ 孔径滤膜进行过滤,取0.50mL过滤液与等体积甲醇混合后上机测定。其中地表水中检出C<sub>12</sub>-BAC(1.71 $\mu\text{g/L}$ )和C<sub>16</sub>-BAC(1.34 $\mu\text{g/L}$ ),地下水未有检出。地表水取两组样品,每组6份,分别加入1.00、5.00 $\mu\text{g/L}$ 两个浓度的苯扎氯铵混合溶液;地下水取三组样品,每组6份,分别加入0.20、1.00、5.00 $\mu\text{g/L}$ 三个浓度的苯扎氯铵混合溶液,样品经前处理后进行测定。从测定结果(表3)可以看出不同浓度平均加标回收率为86.7%~111.2%,相对标准偏差(RSD)为3.7%~10.2%( $n=6$ )。

表3 三种苯扎氯铵同系物的加标回收率和精密度( $n=6$ )Table 3 Recoveries and RSD for three benzalkonium chloride homologues in spiked samples ( $n=6$ )

水样	苯扎氯铵同系物	加标量 0.20 $\mu\text{g/L}$		加标量 1.00 $\mu\text{g/L}$		加标量 5.00 $\mu\text{g/L}$	
		平均加标回收率 (%)	RSD (%)	平均加标回收率 (%)	RSD (%)	平均加标回收率 (%)	RSD (%)
地表水	C <sub>12</sub> -BAC	-	-	94.2	5.5	92.3	3.9
	C <sub>14</sub> -BAC	-	-	92.5	5.9	89.7	6.4
	C <sub>16</sub> -BAC	-	-	90.7	7.7	89.6	5.6
地下水	C <sub>12</sub> -BAC	99.7	4.1	111.2	3.7	86.7	9.3
	C <sub>14</sub> -BAC	88.6	6.5	91.2	4.2	89.3	7.1
	C <sub>16</sub> -BAC	103.0	7.0	101.3	6.7	96.5	10.2

## 2.6 实际样品检测

采用本方法对4个污染地块的浅层地下水进行检测,其中2个浅层地下水中检出了苯扎氯铵。且每个样品中同时检出三种同系物,第1个样品检出浓度在0.61~1.20 $\mu\text{g/L}$ 范围,第2个样品检出浓度在3.84~5.41 $\mu\text{g/L}$ 范围。以第1个样品的谱图

为例进行分析,图4a为色谱分离图,C<sub>16</sub>-BAC受到一定的基体干扰;图4中b、c、d分别为C<sub>12</sub>-BAC、C<sub>14</sub>-BAC、C<sub>16</sub>-BAC对应质量数提取的定量谱图,从图4d可以看出,与图4a对应的色谱分离图不同,C<sub>16</sub>-BAC的质谱图峰形对称,不再受基体干扰的影响。对水样进行加标回收确认,第一个样品加标1.0 $\mu\text{g/L}$ ,第2个样品加标5.0 $\mu\text{g/L}$ ,加标回收率在93.5%~107.1%之间,且原样品出峰时间和加标样品出峰时间匹配。结果表明该方法的灵敏度高,定性和定量能力强。

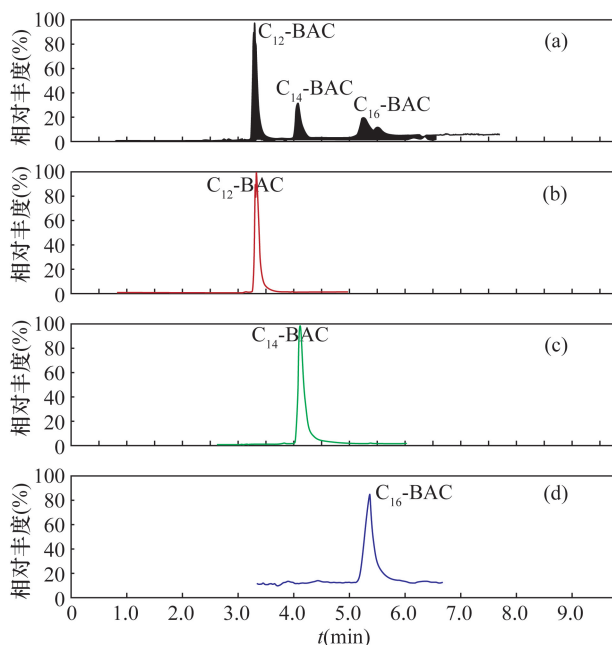


图4 实际水样谱图

Fig. 4 Spectrograms of actual aqueous sample

## 3 结论

本文在环境水体前处理过程中对过滤后的样品加入甲醇,增强了苯扎氯铵的溶解及其在水样中的均匀性,优化了液相色谱分离条件,使得三种苯扎氯铵同系物能够快速有效地分离,利用静电场轨道阱质谱分析了干扰C<sub>16</sub>-BAC检测的物质。建立的超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法能够满足环境水体中三种苯扎氯铵同系物的检测需求。

本文建立的方法检出限低、抗干扰能力强,契合了环境水体监测的要求,解决了液相色谱法分离苯扎氯铵同系物可能存在的假阳性问题,实现了环境水体中苯扎氯铵同系物的准确定量分析,可为环境水体中苯扎氯铵同系物的监测提供

技术支撑。同时发现水相中的苯扎氯铵并非均匀地分布,其在环境水体中的赋存状态需要今后开展进一步深入研究。

#### 4 参考文献

- [1] Lavorgna M, Russo C, Dabrosca B, et al. Toxicity and genotoxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BAC) using *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* as model systems [J]. *Environmental Pollution*, 2016, 210: 34–39.
- [2] 张志芳, 谢立科, 孟祥慈, 等. 道生散对干眼角膜上皮细胞损伤模型的干预研究[J]. *环球中医药*, 2018, 11(3): 358–364.  
Zhang Z F, Xie L K, Meng X C, et al. Intervention study of Xiaosheng powder on dry eye corneal epithelial cell injury model [J]. *Global Traditional Chinese Medicine*, 2018, 11(3): 358–364.
- [3] 陈宇, 马贤德, 刘昱麟, 等. 山茱萸对苯扎氯铵诱导的干眼症小鼠视黄醇转运的调控作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2019, 45(4): 752–758.  
Chen Y, Ma X D, Liu Y L, et al. Regulatory effects of fructus corni on retinol transport in mice with dry eye syndrome induced by benzalkonium chloride [J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2019, 45(4): 752–758.
- [4] 安鸿雪, 任建姣, 马骏, 等. 苯扎氯铵对活性污泥微生物活性的影响[J]. *环境工程学报*, 2020, 14(10): 2701–2709.  
An H X, Ren J J, Ma J, et al. Effect of benzalkonium chloride on microbial activity of activated sludge [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2020, 14(10): 2701–2709.
- [5] Kovacs – Hadady K, Fabian I. The determination of benzalkonium chloride in eye – drops by difference spectrophotometry [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998(16): 733–740.
- [6] Ma W X, Ma X D, Sha O, et al. Two spectrophotometric methods for the assay of benzalkonium chloride in bandage samples [J]. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2014, 17: 177–181.
- [7] 李银华, 许钟元, 王振, 等. 铝试剂共振光谱散射光谱法测定苯扎氯铵含量的研究[J]. *精细石油化工*, 2022, 39(2): 64–68.  
Li Y H, Xu Z Y, Wang Z, et al. Study on determination of benzalkonium chloride by resonance lights scattering spectrometry with aluminon [J]. *Speciality Petrochemicals*, 2022, 39(2): 64–68.
- [8] 李银华, 许钟元, 王振, 等. 共振光散射光谱法测定邦迪中苯扎氯铵含量[J]. *江苏海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 29(1): 71–74.  
Li Y H, Xu Z Y, Wang Z, et al. Determination of benzalkonium chloride in bandage by resonance light scattering [J]. *Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition)*, 2020, 29(1): 71–74.
- [9] Ly N H, Nguyen P D, Son S J, et al. Detection of benzalkonium chloride on glass surfaces using silver nanoparticles [J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2022, 43: 246–254.
- [10] Asghari A, Adl A, Ghajarbeygi P, et al. Rapid determination of benzalkonium chloride in aqueous samples by FTIR spectroscopy in tandem with chemometrics [J]. *Infrared Physics and Technology*, 2021, 116: 103762.
- [11] 王萍, 李梦琦, 赵丽媛, 等. 基于均匀和正交试验设计的胶束电动毛细管色谱法同时测定消毒剂和抗菌产品中 3 种核苷类抗病毒药物 [J]. *色谱*, 2018, 36(9): 931–937.  
Wang P, Li M Q, Zhao L Y, et al. Uniform and orthogonal designs on experimental design and optimization of micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the simultaneous analysis of three nucleoside antivirus drugs in disinfectant and anti-bacteriostatic products [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2018, 36(9): 931–937.
- [12] 沈婵, 毛志平, 赵海浪, 等. 苯扎氯铵的快速检测方法及其在纺织工业中的应用 [J]. *纺织检测与标准*, 2022(1): 11–14.  
Shen C, Mao Z P, Zhao H L, et al. Rapid detection method of benzalkonium chloride and its application in the textile industry [J]. *Textile Tesing and Standard*, 2022(1): 11–14.
- [13] Lay-Keow N G, Hupe M, Harris A. Direct gas chromatographic method for determining the homologue composition of benzalkonium chlorides [J]. *Journal of Chromatography*, 1986, 351: 554–559.
- [14] 黄博能. 气相色谱-质谱联用测定婴幼儿湿巾中苯扎氯铵的含量[J]. *中国纤检*, 2015(20): 79–81.  
Huang B N. Determination of benzalkonium chlorite in baby wipes by gas chromatography – mass spectrometry [J]. *China Fiber Inspection*, 2015(20): 79–81.
- [15] 刘雯雯, 张瑾, 乔俊琴, 等. 复方化学消毒剂中苯扎氯铵的高效液相色谱测定 [J]. *岩矿测试*, 2011, 30(6): 677–682.  
Liu W W, Zhang J, Qiao J Q, et al. Determination of benzalkonium chloride homologs in complex chemical disinfectant by high – performance liquid chromatography [J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2011, 30(6): 677–682.

- [16] Hashem A, Yasmin A. Determination of benzalkonium chloride in ophthalmic solutions by stability-indicating HPLC method: Application to a stability study [J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2016, 6(5): 80-89.
- [17] 杨向妮,姚志湘,栗晖,等.斜投影和空间夹角判据结合紫外光谱分析滴眼液中苯扎氯铵[J].分析测试学报, 2016, 35(3): 337-341.  
Yang X N, Yao Z X, Li H, et al. Rapid determination of benzalkonium chloride in eye drops with ultraviolet spectrum based on oblique projection and space angle criterion [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2016, 35(3): 337-341.
- [18] 杨龙华,宿洁,陈涛,等.高效液相色谱法测定复方混悬滴眼液中苯扎氯铵含量[J].中国药业, 2016, 25(2): 70-72.  
Yang L H, Su J, Chen T, et al. Determination of benzalkonium chloride in loteprednol and tobramycin ophthalmic suspension by HPLC [J]. China Pharmaceuticals, 2016, 25(2): 70-72.
- [19] 顾晓红,顾炳仁,蒋玲俐.高效液相色谱法测定新霉素地塞米松滴眼液中苯扎氯铵的含量[J].安徽医药, 2017, 21(8): 1391-1394.  
Gu X H, Gu B R, Jiang L L. The determination of benzalkonium chloride in neomycin dexamethasone eye drops by HPLC [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2017, 21(8): 1391-1394.
- [20] 张勇,余权.高效液相色谱法测定包装材料中苯扎氯铵含量[J].包装工程, 2017, 38(11): 60-63.  
Zhang Y, Yu Q. Determination of benzalkonium chloride in packaging materials by high performance liquid chromatography [J]. Packaging Engineering, 2017, 38(11): 60-63.
- [21] 成霏,王妍,郭松年.超高效液相色谱法测定湿巾中的苯扎氯铵含量[J].当代化工研究, 2017(1): 35-36.  
Cheng P, Wang Y, Guo S N. Measurement of benzalkonium chloride content in moist wipes by super-efficient liquid chromatography method [J]. Modern Chemical Research, 2017(1): 35-36.
- [22] 周朝东,黄哲甦.高效液相色谱法测定鲑鱼降钙素鼻喷剂中苯扎氯铵的含量[J].天津药学, 2018, 30(5): 1-3.  
Zhou C D, Huang Z S. Determination of benzalkonium chloride in salmon calcitonin nasal spray by HPLC [J]. Tianjin Pharmacy, 2018, 30(5): 1-3.
- [23] Kostic D A, Mitic S S, Naskovic D C, et al. Determination of benzalkonium chloride in nasal drops by high-performance liquid chromatography [J]. E - Journal of Chemistry, 2012, 9(3): 1599-1604.
- [24] Kulkarni P N, Dodake-Supekar A M, Gill C H. Simultaneous determination of mometasone furoate and benzalkonium chloride a stability indicating method [J]. Rasayan Journal Chemical, 2020, 13(3): 1522-1530.
- [25] 郑国灿,徐亚龙,董浩然,等.高效液相色谱法测定牙膏中3种苯扎氯铵同系物[J].理化检验(化学分册), 2020, 56(10): 1102-1106.  
Zheng G C, Xu Y L, Dong H R, et al. HPLC determination of 3 homologues of benzalkonium chloride in toothpaste [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2020, 56(10): 1102-1106.
- [26] 陈小轲,沈婵,曹石森,等.高效液相色谱法测定纺织品中3种苯扎氯铵同系物[J].印染, 2021(12): 53-56.  
Chen X K, Shen C, Cao S M, et al. Determination of 3 benzalkonium chloride homologs in textiles by high performance liquid chromatography [J]. China Dyeing & Finishing, 2021(12): 53-56.
- [27] 孙龙,邵明媛,王浩. LC/MS/MS 测定婴幼儿配方乳粉中3种苯扎氯铵同系物[J].食品研究与开发, 2017, 38(1): 165-169.  
Sun L, Shao M Y, Wang H. Simultaneous determination of three kinds of benzalkonium chloride homologs in infant formula milk powder by LC/MS/MS [J]. Food Research and Development, 2017, 38(1): 165-169.
- [28] 王浩,陈江龙,张杉,等.液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿配方乳粉中六种消毒剂残留[J].中国乳品工业, 2019, 47(1): 46-48.  
Wang H, Chen J L, Zhang S, et al. Determination of six disinfectants in infant milk powder by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Dairy Industry, 2019, 47(1): 46-48.
- [29] 查越,沈学静,李明.基于纳升电喷雾-便携式离子阱质谱的苯扎氯铵快检方法[J].分析试验室, 2021, 40(10): 1166-1170.  
Zha Y, Shen X J, Li M. Fast detection of benzalkonium chloride in eye drops based on nano electrospray-portable ion trap mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2021, 40(10): 1166-1170.
- [30] 沈婵,毛志平,赵海浪,等.基于HPLC-MS/MS技术测定纺织品中的苯扎氯铵[J].印染, 2022(2): 68-72.  
Shen C, Mao Z P, Zhao H L, et al. Determination of benzalkonium chloride in textiles by HPLC-MS/MS [J]. China Dyeing & Finishing, 2022(2): 68-72.
- [31] Kang H I, Shin H S. Rapid and sensitive determination of benzalkonium chloride biocide residues in soil using



- liquid chromatography-tandem mass spectrometry after ultrasonically assisted extraction [J]. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2016, 37: 1219-1227.
- [32] Kim T K, Jang M, Hwang Y S, et al. Adsorption of benzalkonium chlorides onto polyethylene microplastics; Mechanism and toxicity evaluation [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 426: 128076.
- [33] 杨芬, 谢邵文, 韦朝阳, 等. HPLC-ICP-MS 联用技术研究甲醇对砷形态分析结果的影响 [J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(6): 1884-1888.  
Yang F, Xie S W, Wei C Y, et al. Effects of methanol addition on arsenic speciation analysis with HPLC-ICP-MS [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(6): 1884-1888.
- [34] 宋淑玲, 郭晓辰, 胡小建, 等. 气相色谱-高分辨质谱联用测定地下水中 16 种典型痕量含氯持久性有机污染物 [J]. 岩矿测试, 2013, 32(2): 319-324.  
Song S L, Guo X C, Hu X J, et al. Determination of 16 typical chlorinated persistent organic pollutants in groundwater by gas chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Rock and Mineral Analysis, 2013, 32(2): 319-324.

## Determination of Three Benzalkonium Chloride Homologues in Environmental Water by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole/Electrostatic Field Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry

DONG Huijun, MA Tianyi, LI Yi, BAI Xueshan\*, DONG Jianfang, ZHANG Lu

(Hebei Geological Environment Monitoring, Hebei Key Laboratory of Geological Resources and Environment Monitoring & Protection, Shijiazhuang 050021, China)

### HIGHLIGHTS

- (1) The aqueous samples were filtered by 0.22 μm membrane and mixed with methanol of the same volume to enhance the uniformity of the benzalkonium chloride in the sample.
- (2) The difference in  $m/z$  of 0.01 between the target and interfering matrix was identified, eliminating the interference to C16-BAC.
- (3) The advantages of sensitivity and resolution are balanced by SIM mode, and the method has a low detection limit and strong anti-jamming ability.

**ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Benzalkonium chloride has a non-oxidizing bactericidal effect and is widely used in medical and health service. With the discharge of sewage into the environment, benzalkonium chloride has been identified as a harmful compound that may seriously inspect susceptible organisms in the ecosystem. Exact quantitative analysis of benzalkonium chloride in environmental water is of great significance for human and ecological environmental health. However, low content of benzalkonium chloride exist in environmental water. The interference of a complex matrix causes false positive results to occur easily. Therefore, the detection method is required to have lower detection limits and more accurate qualitative analysis ability.

**OBJECTIVES:** To establish a method for the determination of three benzalkonium chloride homologues ( $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$ ,  $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$ ,  $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$ ) in environmental water.

**METHODS:** Ultra-high performance liquid chromatography quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) was used. The sample was filtered through a  $0.22\mu\text{m}$  membrane, and then mixed with the same volume of methanol. The mobile phase consisted of  $10\text{mmol/L}$  ammonium acetate aqueous solution which contained 1% ( $V/V$ ) triethylamine as mobile phase B and methanol as phase A, with gradient elution. Accucore C18 column ( $150\text{mm}\times 2.1\text{mm}, 2.6\mu\text{m}$ ) was used to separate the baseline of three benzalkonium chloride within 6 minutes, and the data were collected by electrostatic field orbitrap mass spectrometry in SIM mode at 60,000 resolution.

**RESULTS:** The contents of three benzalkonium chloride within the range of  $0.10\text{--}10.0\mu\text{g/L}$  had a linear relationship ( $r>0.999$ ). The detection limits ranged from  $0.03$  to  $0.06\mu\text{g/L}$ . The recoveries of three kinds of benzalkonium chloride were  $86.7\%\text{--}111.2\%$ .

**CONCLUSIONS:** Verified by samples, this method meets the detection limits and has anti-interference abilities of three benzalkonium chloride homologues in surface water and shallow groundwater. Moreover, it was identified that the suspected disrupting chemical of cetyl dimethyl benzyl ammonium chloride is propylene glycol fatty acid ester at  $m/z$  360.323.

**KEY WORDS:** environmental water; benzalkonium chloride; high-performance liquid chromatography; quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry; SIM mode