NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH TRINITROTOLUEN TRONG NƯỚC BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)

Khuất Hoàng Bình*, Nguyễn Thu Hương, Nguyễn Trần Hùng,
Hoàng Anh Tuấn, Đinh Thế Dũng, Trần Văn Khanh

Tóm tắt: *TNT là chất nổ có độc tính cao và có khả năng gây ô nhiễm môi trường. Hàm lượng vết của chúng trong nước sẽ được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS sử dụng kỹ thuật ion hóa APCI. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,202 µg/l.*

Từ khóa: Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ; Trinitrotoluen; Thuốc nổ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trinitrotoluen (TNT) được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp, có khả năng phát tán gây ô nhiễm môi trường. Hợp chất này đã được cơ quan Bảo vệ môi trường Mỹ xếp vào loại hóa chất có thể gây ung thư cho con người, nhóm ung thư 2B [1, 2]. TNT được phát hiện phổ biến trong các đối tượng đất, nước, không khí tại các nhà máy sản xuất thuốc nổ hay các nhà máy liên quan đến sản xuất và bảo quản đạn dược trong quân đội. Cần nghiên cứu và phân tích đầy đủ để đánh giá chính xác mức độ ô nhiễm tồn lưu trước khi đưa ra được phương án xử lý, giảm thiểu các nguồn thải gây ô nhiễm. Có nhiều phương pháp phân tích chúng như nhóm các phương pháp quang học, điện hóa,… , tuy nhiên, sắc kí vẫn là nhóm phương pháp được sử dụng nhiều nhất trong việc định lượng và định danh các hợp chất nổ nhóm nitro do có một số ưu điểm vượt trội so với các phương pháp khác như độ nhạy và độ chọn lọc rất tốt, độ lặp lại cao, giới hạn phát hiện thấp và có thể xác định đồng thời được nhiều hợp chất trong cùng một hỗn hợp phức tạp…[3, 4]. Phương pháp HPLC-UV được sử dụng làm tiêu chuẩn để xác định các hợp chất nổ nhóm nitro như EPA 8330 [5], tiêu chuẩn ISO 22478: 2006 [6].

Trong nghiên cứu này sẽ xác định hàm lượng TNT bằng phương pháp LS-MS/MS sử dụng kỹ thuật ion hóa APCI. Trong những năm gần đây, công nghệ LC-MS/MS có sự phát triển mạnh mẽ, đặc biệt với sự ra đời của công nghệ khối phổ tứ cực thời gian bay (QTOF), hệ thống MS/MS có độ phân giải và độ nhạy rất cao cho phép xác định chính xác hàm lượng siêu vết.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật tư hóa chất

2.1.1. Hóa chất

Các loại hóa chất đều thuộc loại hóa chất tinh khiết phân tích dùng cho sắc ký của Merck: Axetonitril, metanol, acid formic, amoniaxetat.

Chất chuẩn TNT ở dạng rắn (Trung Quốc), có độ tinh khiết P.A.

2.1.2. Thiết bị

- Cân phân tích HR 200 (Nhật) có độ chính xác ± 0,0002 g;
- Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS SCIEX X500R QTOF (Mỹ), Cột tách: C18 110 A^o (2,0 mm × 50 mm × 3 µm); Đầu ion hóa hóa học tại áp suất khí quyển (APCI).

2.2. Thực nghiệm

Các thông số hệ LC-MS/MS được cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khảo sát điều kiện tối ưu trên hệ LC và hệ MS theo phương pháp đơn biến, chỉ thay đổi thông số cần khảo sát và lựa chọn thông số tối ưu dựa trên cơ sở khả năng tách và tín hiệu pic thu được tốt nhất.

Điều kiện thí nghiệm ban đầu:

- Điều kiện LC:

Dung dịch TNT nồng độ 100 µg/l sẽ sử dụng trong các thí nghiệm khảo sát. Pha động A: Nước

cất và 0,1 % axit formic theo thể tích, pha động B: Metanol và 0,1 % axit formic theo thể tích; thời gian: 8 phút, tốc độ dòng: 0,3 ml/phút. Gradient pha động: 0 ÷ 1 phút đầu: 90% A và 10 % B; 1 ÷ 3 phút: 90% A và 10 % B; 3 ÷ 6 phút: 10% A và 90 % B; 6 ÷ 8 phút: 90% A và 10 % B.

- Điều kiện MS:

Quét m/z trong khoảng từ 40 đến 300 Dalton để khảo sát tìm ra ion mẹ và ion con của từng chất. Sử dụng chế độ quét IDA chọn được ion mẹ, 2 ion con dùng để định tính đối với từng chất. Sử dụng chế độ quét MRM để định lượng các hợp chất.

Cài đặt tham số MS ban đầu như bảng 1.

Bảng 1. *Điều kiện chạy MS theo hướng dẫn của nhà sản xuất.*

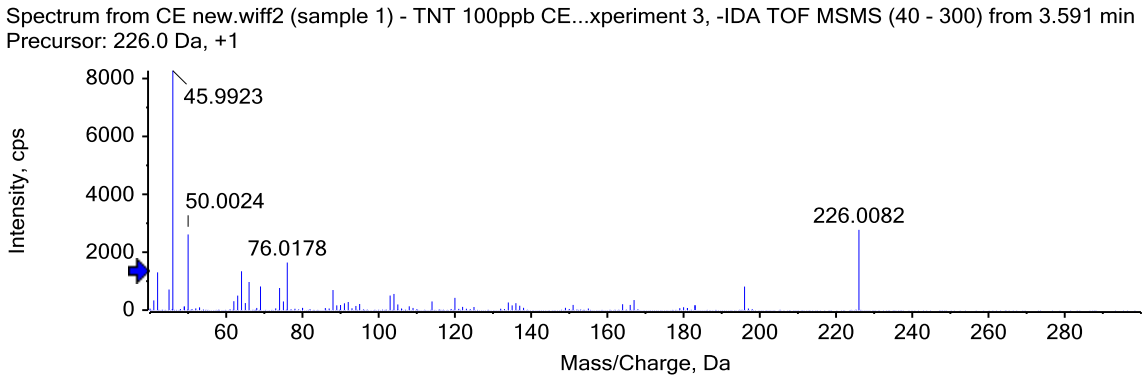
Thông số	**Giá trị**	**Thông số**	**Giá trị**
Áp suất khí (GAS)	50 psi	Năng lượng va chạm (CE) TOF MS	-10 V
Nhiệt độ (TEM)	500 ^{o}C	Áp suất dòng ni tơ (CUR)	25 psi
Thế đầu vào (DP)	-80 V	Nebulizer (APCI)	-3 µA

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu lựa chọn các điều kiện phân tích trên hệ MS

3.1.1. Đặc điểm sự ion hóa và sự phân mảnh

Phổ khối thu được của TNT thể hiện trên hình 1.



Hình 1. *Phổ khối MS/MS của TNT (tại CE = -10V).*

Quá trình khảo sát cho thấy TNT bị ion hóa ở dạng [M–H]− với mảnh 226,01 do hình thành 4,6-dinitro-2.1-benzoisoxazol. 2 mảnh thứ cấp chính quan sát thấy là m/z 45,9923 (NO_2-) và m/z 76,0178 của 5-metylidenecyclopenta-1,3-dien. Hai mảnh con này sẽ được dùng để định lượng. Kết quả thu được phù hợp với công bố của nhóm tác giả [3].

3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của năng lượng va chạm (CE)

Bảng 2. *Ảnh hưởng của năng lượng va chạm đến tín hiệu pic TNT.*

CE (V)	-5	-10	-15	-20	-25
Diện tích pic	2.678.435,2	2.931.293,0	1.886.109,1	433.407,8	88.308,6
Chiều cao pic	990.441,8	802.647,6	678.664,6	128.894,3	28.285,9

Giá trị CE càng lớn thì diện tích píc càng giảm, tại CE = -10V píc thu được cho tín hiệu tốt nhất, hình dạng píc đẹp nhất.

3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của thế đầu vào (DP)

Bảng 3. *Ảnh hưởng của thế đầu vào đến tín hiệu pic TNT.*

DP (V)	-60	-80	-100	-120
Diện tích pic	3.453.032,4	2.927.742,3	2.488.095,2	1.487.862,1
Chiều cao pic	795.871,3	962.631,2	735.277,6	435.348,8

Khi tăng thế áp đầu vào từ - 60 V đến -120 V thì diện tích píc giảm dần. Ở thế quá cao có thể bẻ gẫy luôn cả cấu trúc của phân tử ion mẹ dẫn đến làm giảm tín hiệu pic. Tại DP – 80 V cho tín hiệu pic tốt nhất, chiều cao pic cao nhất, pic thu được đẹp nhất.

3.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của áp suất khí

Bảng 4. *Ảnh hưởng của áp suất khí đến tín hiệu pic TNT.*

GAS (psi)	10	20	40	50	60
Diện tích pic	2.878.812,9	2.963.911,3	3.820.116,8	2.929.447,3	2.542.746,9
Chiều cao pic	812.622,7	883.835,0	1.192.923,1	962.700,1	740.310,3

Áp suất khí hai bên đầu phun có tác dụng làm cho sự hình thành các giọt được dễ dàng hơn. Khi áp suất khí thấp (10, 20 psi) tín hiệu pic không ổn định, nhiễu nền cao. Tăng áp suất khí tín hiệu pic sẽ ổn định hơn. Ở áp suất khí 40 Psi cho tín hiệu píc tốt nhất.

3.1.5. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Bảng 5. *Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tín hiệu pic TNT.*

T (^oC)	200	300	400	500
Diện tích pic	2.702.478,8	2.856.021,7	2.929.447,3	2.169.609,6
Chiều cao pic	793.063,3	818.460,4	962.700,1	703.073,9

Nhiệt độ của nguồn khí nóng thổi vào sẽ thúc đẩy quá trình hóa hơi các giọt chất phân tích khi đi ra khỏi đầu phun. Tại giá trị T = 400 ^oC cho tín hiệu pic lớn nhất và píc có hình dạng đẹp nhất.

3.1.6. Khảo sát ảnh hưởng của áp suất dòng ni tơ (CUR)

Bảng 6. *Ảnh hưởng của áp suất dòng ni tơ đến tín hiệu pic TNT.*

CUR (psi)	10	15	20	25	30
Diện tích pic	2.965.280,6	2.818.234,5	2.918.235,3	292.7742,0	3.244.490,0
Chiều cao pic	991.142,3	1.002.851,5	960.631,2	962.631,2	961.600,8

Khi thay đổi giá trị CUR không làm thay đổi nhiều đến tín hiệu pic. Tuy nhiên, để tránh nhiễm bẩn cần sử dụng giá trị cao nhất cho CUR mà không làm giảm độ nhạy. Tại CUR 25 cho píc đẹp nhất.

3.2. Nghiên cứu lựa chọn các điều kiện phân tích trên hệ LC

3.2.1. Khảo sát thời gian chạy LC

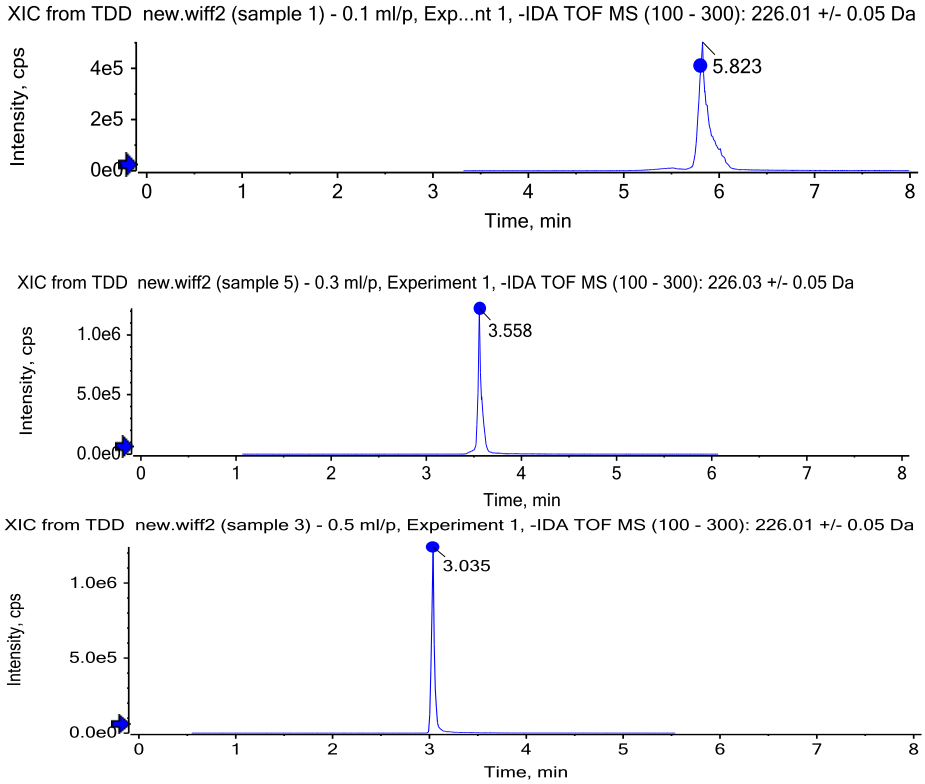
Sử dụng các điều kiện thí nghiệm ban đầu chỉ thay đổi thời gian chạy LC ở các giá trị 6, 8, 10, 12 phút. Qua khảo sát, nhận thấy TNT rửa giải ra khỏi cột với khoảng thời gian nhỏ hơn 5 phút. Để đảm bảo chất cần phân tích được rửa giải ra hết và để cột không bị nhiễm bẩn, vừa để tiết kiệm thời gian và dung môi chúng tôi chọn thời gian chạy LC là 6 phút.

3.2.2. Khảo sát tốc độ dòng

Thay đổi các tốc độ dòng tăng dần từ 0,1 đến 0,5 ml/phút, sắc ký đồ TNT thể hiện trong hình 2.

Khi tăng tốc độ dòng của pha động, TNT được rửa giải ra sớm hơn đồng thời pic sắc ký có xu hướng nhọn và rõ nét hơn. Tại tốc độ dòng > 0,5 ml/phút, hình dạng pic rất đẹp. Tuy nhiên, tốc độ càng cao thì áp suất của hệ cao, ảnh hưởng rất lớn đến áp suất đầu vào của cột và làm giảm tuổi thọ của cột. Do đó, chúng tôi chọn tốc độ dòng 0,3 ml/phút do ở tốc độ này, các píc tách tốt,

hình dạng píc đẹp.



Hình 2. *Sắc ký đồ TNT ở các tốc độ dòng pha động 0,1 ml/p; 0,3 ml/p; 0,5ml/p.*

3.2.3. Khảo sát tỷ lệ pha động

Để có thể vừa tách được chất, vừa tiết kiệm được thời gian phân tích và dung môi, tiến hành chạy pha động với chế độ gradient (GD).

Bảng 7. *Các chương trình gradient tách TNT.*

GD 1		GD 2		GD 3		GD 4	
t (phút)	%MeOH	t (phút)	%MeOH	t (phút)	%MeOH	t (phút)	%MeOH
0,01	10	0,01	5	0,01	10	0,01	10
1	10	1	5	3	90	1	90
2	90	4	95	5	90	5	90
5	90	5	95	5,01	10	5,01	10
5,01	10	5,01	5	6	10	6	10
6	10	6	5				
T lưu (phút) = 3,56		T lưu (phút) = 5,05		T lưu (phút) = 3,67		T lưu (phút) = 1,32	
$S_{pic} = 3,24*10^6$		$S_{pic} = 2,67*10^6$		$S_{pic} = 3,01*10^6$		$S_{pic} = 2,78*10^6$	
Pic đẹp		Pic chẻ và tù		Píc đẹp		Pic chẻ và tù	

Kết quả cho thấy, tỷ lệ pha hữu cơ (MeOH) tăng lên thì sẽ làm giảm thời gian rửa giải các hợp chất khảo sát. Khi giữ tỷ lệ metanol 90% quá ít (GD2) hoặc quá lâu (GD4) đều làm píc bị chẻ và tù, làm giảm độ nhạy của phương pháp. Chương trình chạy GD1 cho tín hiệu pic đẹp nhất, pic thu được không bị tù, chẻ píc và diện tích pic cũng cao nhất.

3.2.4.Khảo sát thành phần pha động

Kết quả khảo sát dung môi pha động được chỉ ra ở bảng 4.

Bảng 8. *Kết quả khảo sát thành phần pha động.*

CH_3COOH 0,1%		CH_3COONH_4 10 mM		CH_3COONH_4 5 mM	
t (phút)	S_{pic}	t (phút)	S_{pic}	t (phút)	S_{pic}
3,57	$1,37*10^6$	3,47	$3,23*10^6$	3,51	$2,94*10^6$

Nhận thấy, nền amoniaxetat cho kết quả tốt hơn rất nhiều so với nền axit formic. Tăng nồng độ amoniaxetat sẽ làm tăng tín hiệu pic, tuy nhiên, nếu nồng độ cao quá số lượng ion đi vào buồng ion của detector MS tăng, gây cạnh tranh với các ion của chất phân tích, làm giảm tín hiệu, đồng thời nồng độ muối cao sẽ gây hại đến hiệu lực và tuổi thọ của cột. Tại nồng độ amoniaxetat 10 mM các chất đều cho tín hiệu cao nhất, hình dạng pic đẹp.

Các giá trị tối ưu điều kiện phân tích TNT được liệt kê trong bảng 2.

Bảng 9. *Các thông số tối ưu MS/MS.*

Thông số	Giá trị	Thông số	Giá trị
Áp suất khí (GAS)	40 psi	Năng lượng va chạm (CE) TOF MS	-10 V
Nhiệt độ (TEM)	400 ^oC	Áp suất dòng ni tơ (CUR)	25 psi
Thế đầu vào (DP)	-80 V	Nebulizer (APCI)	-3 µA
Thời gian chạy LC	6 phút	Chế độ chạy pha động	GD1
Tốc độ dòng	0,3 ml/p	Thành phần pha động	Đệm amoniaxetat 10mM

3.3. Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Đo các dung dịch chuẩn TNT có nồng độ thay đổi từ 0 đến 500 µg/l và khảo sát sự phụ thuộc của tín hiệu vào nồng độ. Giới hạn tuyến tính (LOL) của TNT là 300 µg/l.

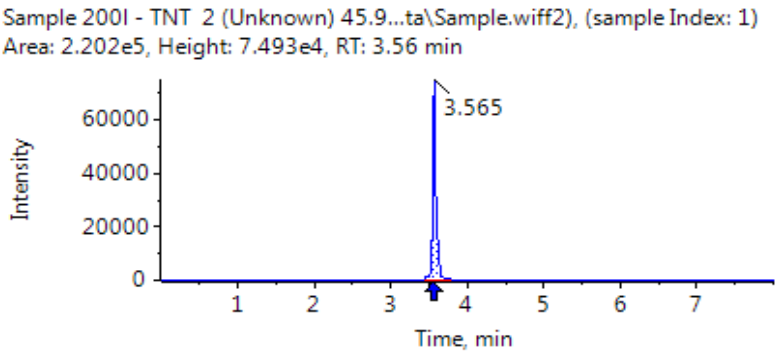
Tiến hành đo lặp lại 10 lần dung dịch chuẩn TNT chứa 1 µg/l. Dựa vào độ lệch chuẩn của các dung dịch này có thể xác định được LOD và LOQ. Kết quả sau khi xử lý số liệu dựa trên phần mềm Origin 6.1 đưa ra trong bảng 10.

Bảng 10. *Khoảng tuyến tính, LOD, LOQ xác định TNT bằng phương pháp LC-MS/MS.*

LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)	Khoảng tuyến tính	PT đường chuẩn (từ 1÷150 µg/l)
0,202	0,637	0,637 đến 300 µg/l	Y=1969,5X + 1141,7 (R^2 = 0,9995)

3.4. Phân tích mẫu thực

Sử dụng các kết quả khảo sát ở trên, ứng dụng phương pháp để phân tích một mẫu nước hồ trong khu vực nhà máy sản xuất quốc phòng. Sắc ký đồ mẫu thể hiện trong hình 3.



Hình 3. *Sắc ký đồ TNT trong mẫu hồ (Chế độ quét MRM).*

Kết quả thu được hàm lượng TNT có trong mẫu nước hồ là 0,11 mg/l, đạt tiêu chuẩn cho phép theo TCVN/QS 658:2012.

4. KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu ở trên chỉ ra rằng, phương pháp phân tích có độ nhạy cao, giới hạn phát hiện ở mức ppb, thời gian phân tích chỉ mất 6 phút cho một mẫu, nhanh hơn nhiều so với kỹ thuật sắc ký khác. Kết quả phân tích chính xác, có thể áp dụng phân tích dư lượng TNT trong môi trường nước với độ tin cậy cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. A.Preiss, A.Bauer, H.-M.Berstermann, S.Gerling, R.Haas, A.Joos, A.Lehmann, L.S, K.S, "*Advanced high-performance liquid chromatography method for highly polar nitroaromatic compounds in ground water samples from ammunition waste sites",* Journal of Chromatography A, **1216** (25), pp. 4968-4975 (2009).

[2]. A. Schmidt, B. Niehus, F. -M. Matysik,*"Identification and Quantification of Polar Nitroaromatic Compounds in Explosive-Contaminated Waters by means of HPLC-ESI-MS-MS and HPLC-UV"*, Chromatographia, **63** (1-2), pp. 1-11 (2006).

[3]. Becˇanova´, Friedl, Sˇimek, *"Identification and determination of trinitrotoluenes and their degradation products using liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry",* Int J Mass Spectrom, **291**, pp. 133-139 (2010).

[4]. David DeTata, Peter Collins, Allan McKinley, "*A fast liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QToF-MS) method for the identification of organic explosives and propellants"*, Forensic Science International, **233**, pp. 63-74 (2013).

[5]. Din En Iso 22478, German Version EN ISO 22478, Beuth, Berlin (2006).

[6]. Method 8330, USEPA, SW-846, "*Nitroaromatics, nitramines, and nitrat esters by hight performance liquid chromatography (HPLC)",* US Environmental Protection Agency, Washington, DC (1994).

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF TRINITROTOLUENES IN WATER USING LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)

TNT is a highly toxic and potentially polluting explosive. Their trace content in water will be determined by LC-MS/MS using APCI ionization technique. The limit of detection of the method is 0,202 µg/l.

Keywords: Liquid mass chromatography method; Trinitrotoluene; Explosives.

Nhận bài ngày 06 tháng 02 năm 2020
Hoàn thiện ngày 03 tháng 3 năm 2020
Chấp nhận đăng ngày 14 tháng 12 năm 2020

Địa chỉ: Viện Hóa học-Vật liệu.
*Email: hbinhkh@yahoo.com.