

液相色谱-质谱法测定水中的微囊藻毒素

杨帆,钱宁,戴欣,彭俊

(松辽流域水资源保护局,吉林 长春 130021)

[摘要] 运用液相色谱-离子阱质谱法建立水中微囊藻毒素(MC-LR)的多反应监测的检测方法。采用全自动固相萃取装置富集、浓缩、净化样品。MC-LR的定量限为0.000 01 mg/L;回收率为71%~91%;在0.05~0.60 mg/L范围线性关系良好,相关系数(r)达到0.999。离子阱质谱的多反应监测能有效地降低背景干扰,提高仪器的灵敏度。

[关键词] 液相色谱-质谱法;微囊藻毒素;水;测定

[中图分类号] TV213.4

[文献标识码] A

近年来环境污染和富营养化程度不断加剧,蓝藻水华频繁发生,这已经成为国内外普遍关注的问题。微囊藻毒素即为水体中蓝藻类如铜绿微囊藻、鱼腥藻和念珠藻等藻属水华释放一类具有强烈致癌、具有肝毒性的单环七肽化合物,它的一般化学结构可表示为:环D-丙氨酸-L-X-赤- β -甲基-D-异天冬氨酸-L-Y-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸。其中Adda是表达MC活性的必需基因,其结构改变或被去除,毒素的毒性都会降低。X,Y为2个可变的L-氨基酸。由于X,Y的不同而产生多种异构体,目前已知有60多种。其中存在最普遍、含量较多、毒性较大的是MC-LR,MC-RR和MC-YR(L,R,Y分别代表亮氨酸、精氨酸和酪氨酸)。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Agilent 1 200 series -Agilent 6 310 Ion Trap MS液相色谱-离子阱质谱联用仪;Caliper Life Sciences全自动固相萃取装置;ISOLUTE C18(EC)固相萃取柱(200 mg,3 mL);OA-SYSTEM氮吹装置;电子天平(0.000 1 g);KD-浓缩瓶;滤膜(0.45 μ m GF/C玻璃纤维滤膜);过滤头。甲醇、甲酸均为Burdick & Jackson色谱纯;水为wahaha纯净水;微囊藻毒素标准样品10 mg/L。

1.2 样品前处理

1.2.1 样品制备

用0.45 μ m GF/C玻璃纤维滤膜过滤水样,用少量甲醇清洗滤膜。

1.2.2 样品的富集和洗脱

设置10 ml甲醇和10 ml高纯水,用流速为1 ml/min活化固相萃取柱。取1 000 ml水样滤液(1.2.1)以及空白和加标样品,以10 ml/min的流速通过全自动固相萃取装置进行富集。当所有样品通过萃取柱后,用高纯氮气吹5 min,再用10 ml 20%甲醇淋洗液淋洗固相萃取柱。最后用10 ml 100%甲醇洗脱富集在柱上的微囊藻毒素,将洗脱液收集在KD-浓缩瓶内。

1.2.3 富集浓缩

将KD-浓缩瓶放在40 $^{\circ}$ C的水浴上,用氮气吹脱浓缩至0.5 ml,用甲醇定容至1 ml,经过滤头转移至样品瓶。

1.3 色谱条件

Agilent 1 200 Series液相色谱,色谱柱ZORBAX Eclipse Plus C18(2.1 mm \times 100 mm,3.5 μ m),柱温20 $^{\circ}$ C,流动相为甲醇和0.1%(体积分数)甲酸水溶液,流速为0.3 ml/min,梯度洗脱为5.0 min内甲醇的体积分数从40%升至100%,保持12 min;进样量为10 μ l。

1.4 质谱条件

质谱工作条件见表1。

2 结果与讨论

2.1 试验条件优化

2.1.1 流动相选择

相关的标准方法以及文献中对于水中微囊藻毒素(MC-LR)的分析多为液相色谱法,使用乙腈和磷酸盐作为流动相,通过紫外检测器检测,乙腈

表1 质谱工作条件表

工作参数	工作条件	工作参数	工作条件
离子模式	Positive	毛细管出口电压	165.7 Volt
离子源类型	ESI	锥孔电压	40.00 Volt
干燥气温度	350 ℃	扫描范围	100~1 200 m/z
雾化气压力	35.00 psi	离子电荷控制	30 000
干燥气流量	8.00 L/min		

毒性大、成本高，而且磷酸盐容易堵塞色谱柱，影响离子化效率，污染离子源。这里选择甲醇和水作为流动相进行梯度洗脱，并且考虑到酸性环境可以保证MC-LR的离子化效率，故在水中加入0.1%甲酸，这样可以降低分析成本，保护色谱柱和离子源，并且减少了实验过程中对操作人员的危害。

2.1.2 离子模式选择

其它条件相同时，改变离子模式采集总离子流图，比较正负模式提取离子流图(EIC)，正模式的响应值明显高于负模式，所以选择正模式。见图1。

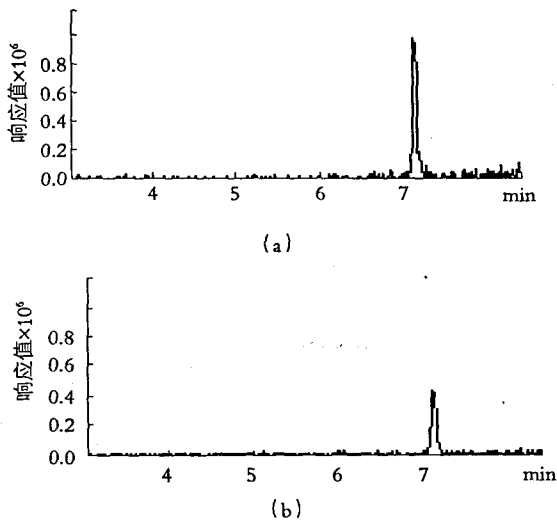


图1 正模式和负模式提取离子比较图

2.1.3 其它质谱条件选择

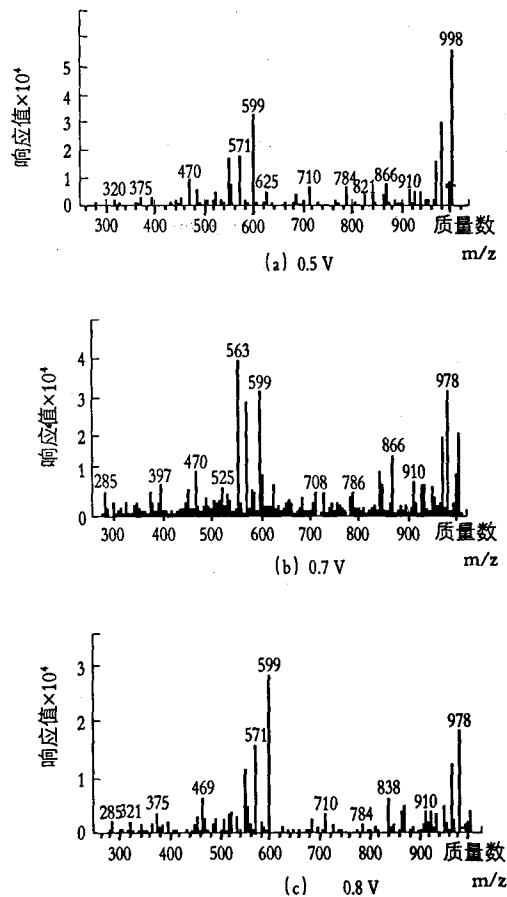
毛细管出口电压和锥孔电压影响离子的传输效率和离子阱的捕集效率，控制这两个电压可以方便地控制碰撞能量，从而得到不同丰度的碎片离子。当毛细管出口电压和锥孔电压过大时，传输效率高，但是会在传输过程中发生传输区的碰撞诱导解离，这里发生的碰撞诱导解离会使母离子破碎；过小会减低母离子传输效率。利用仪器优化参数调整功能，通过针泵把浓度为0.6 mg/L的MC-LR样品直接注入离子源，使用毛细管出口电压和锥孔电压优化程序，得到最优的毛细管出

口电压165.7 V和锥孔电压40.00 V。

本方法采用多反应监测模式进行微囊藻毒素的定量分析。选择合适的母离子和子离子是保证目标化合物获得最佳灵敏度的重要因素，通过目标化合物的一级质谱图选择相对较大的特征离子作为母离子，可以得到更高的灵敏度。MC-LR的分子式为C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂，在一级谱图中主要得到[M+H]⁺的母离子碎片。选定996 m/z作为母离子进入离子阱在碰撞诱导解离作用下，产生不同子离子碎片。当碰撞能量过大时阱中能量高，离子易碎裂，但也使碎片离子更易出阱；相反能量过低时，离子在阱中相对稳定，母离子不易打碎，产生子离子碎片过少。根据以上原因，观察不同能量二级质谱图产生的碎片离子，选择0.9 V，此时可以保证获得最佳灵敏度。图2为不同碰撞电压下的二级质谱图。选择定量离子553, 599, 978 m/z，对其加合进行定量，见图3。

2.2 线性、检出限和回收率试验

精密称取MC-LR 10.0 mg/L的标准溶液，逐级将其稀释成0.600, 0.200, 0.10, 0.050 mg/L的浓



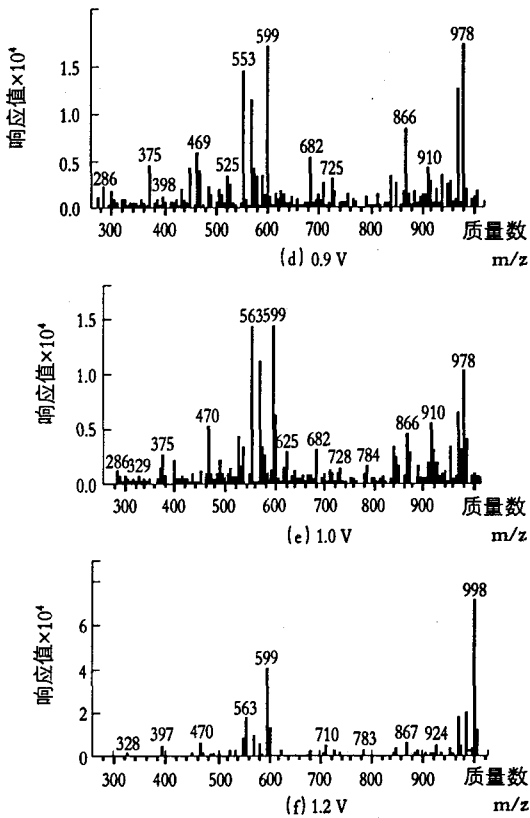


图2 不同碰撞电压下的二级质谱

度。在上述检测条件下测定,以峰面积对应不同浓度进行线性回归计算,回归方程为 $y = -122.35 + 3.729476x$,相关系数 $r = 0.999$ 。

按照信噪比($S/N \geq 10$)作为定量限进行试验,得到该化合物 MC-LR 的定量限为 0.01 mg/L,对 1 000 ml 水样富集浓缩到 1 ml,该方法定量限为 0.000 01 mg/L,能够满足地表水环境质量标准 GB3838-2002 和生活饮用水 GB/T5749-2006 MC-LR 的控制标准限值 0.001 mg/l,并且优于国标方法检测限 30 倍。

取同一水样 1 000 ml 为本底,分别加入 0.100 和 0.060 μg MC-LR 的标准溶液,按照 1.2 的步骤对该加标样品进行前处理,并分析测定。对其结果进行计算得出回收率分别为 91.26% 和 70.53%。

2.3 实际样品分析

对 2009 年 6 月辽河流域省界断面福德店东、福德店西、王奔、两家子和后义和进行含量检测,结果均未检出微囊藻毒素,低于地表水控制标准。

3 结论

本实验利用全自动固相萃取装置对样品进行富集、浓缩,选择甲醇-水作为流动相,使用液相色谱-

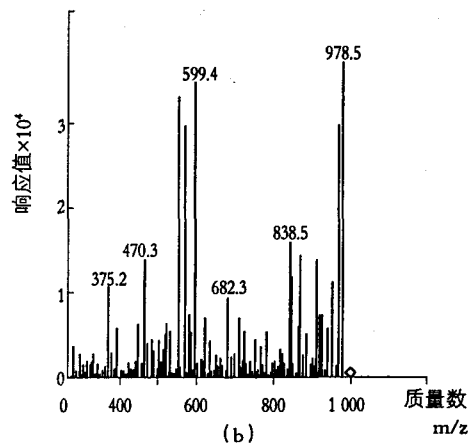
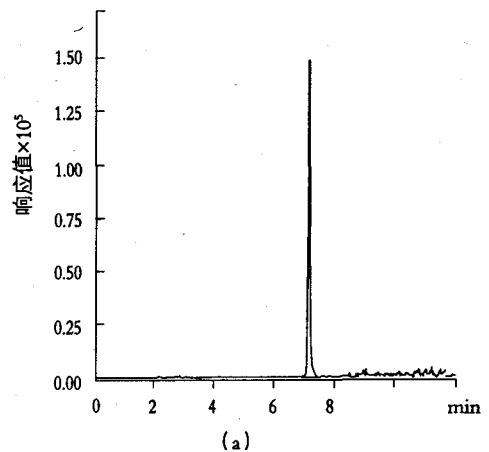


图3 MC-LR 的 MS(2)

谱-离子阱质谱,建立 MC-LR 的多反应监测的检测方法。该方法降低了背景噪音、灵敏度高、选择性好,回收率高且稳定,线性关系($r = 0.999$)和回收率(71%~91%)等方法学指标较好,检出限能完全满足我国地表水环境质量标准生活饮用水的控制标准。此方法用于辽河流域省界断面水样的检测,在 5 个水样中 MC-LR 均未检出。

[参考文献]

- [1] 殷丽红.微囊藻毒素致肝癌研究进展[M].国外医学卫生学分册,2005,32(3):170-174.
- [2] 王静,庞晓露,刘铮铮,侯镜德.超高效液相色谱串联质谱法分析水中的微囊藻毒素[J].色谱,2006:335-338.
- [3] BARCO M,FLORES C,RIVERA J,et al.Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of Planktothrix(Oscillatoria) rubescens in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS [J].Toxicon,2004,44(8):881-886.

[收稿日期] 2011-04-07