

高效液相色谱 - 电喷雾电离质谱法测定地表水中微囊藻毒素

宋俊密, 丁海霞, 段爱玲, 张国祯, 寇力斐
(甘肃省环境监测中心站, 甘肃 兰州 730020)

摘要: 采用固相萃取 - 高效液相色谱 - 电喷雾电离质谱法测定饮用水源地地表水中痕量微囊藻毒素 MC - LR, 优化了色谱和质谱条件, 以甲醇/水(含 0.1% 甲酸)混合溶液(体积比 60:40)为流动相, 选择定量离子质荷比(m/z) 996.3。方法在 0.100 mg/L ~ 2.00 mg/L 范围内线性良好, 检出限为 0.02 $\mu\text{g/L}$, 空白水样加标回收率为(96.2 \pm 5.4) %。

关键词: 微囊藻毒素 - LR; 固相萃取; 高效液相色谱 - 电喷雾电离质谱; 地表水

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-2009(2011)06-0065-03

Determination of MC - LR in Surface Water by High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry

SONG Jun-mi, DING Hai-xia, DUAN Ai-ling, ZHANG Guo-zhen, KOU Li-fei
(Gansu Province Environmental Monitoring Center, Lanzhou, Gansu 730020, China)

Abstract: Trace Microcystin (MC - LR) in drinking source surface water was determined by HPLC - ESI - MS with solid phase extraction and test conditions of chromatography and mass was optimized. The results showed that mobile solution [$V(\text{methanol}) : V(\text{water}) = 60:40$] which contained 0.1% methanoic acid, selective quantity ion ($m/z = 996.3$). Good linearity of the method was obtained in range from 0.100 mg/L to 2.00 mg/L, the detection limits 0.02 $\mu\text{g/L}$, spiked standard recoveries of blank samples (96.2 \pm 5.4) %.

Key words: MC - LR; Solid phase extraction; HPLC - ESI - MS; Surface water

微囊藻通常出现在富营养化或超富营养化水体中, 在合适的气候下, 微囊藻能成为优势种类, 可全年发生水华。许多蓝藻在死亡过程中释放出的次级代谢物微囊藻毒素(microcystin, MC)已成为水体中一类广泛存在的天然毒物, 具有较大毒害性, 能引起动物中毒致死, 威胁人类健康^[1-2]。在 MC 中研究最多且毒性较大的有 MC - LR、MC - RR 和 MC - YR, 世界卫生组织(WHO)和许多发达国家制定的饮用水标准, 以及我国《生活饮用水卫生规范》中均规定 MC - LR 限值为 0.001 mg/L^[3]。因此, 饮用水源地 MC - LR 的检测对于饮用水安全保障具有重要意义。目前, MC - LR 的检测手段很多, 其中高效液相色谱法(HPLC)紫外检测器应用最普遍^[4-5], 但灵敏度和选择性有待提高。电喷雾(ESI)质谱(MS)非常适合大分子的检测, 并且可以显著提高检测灵敏度和选择性, 采用液质联用(LC - MS)技术检测和鉴定各种 MC 已成为国内外

研究热点^[6-8]。今采用固相萃取(SPE) - 高效液相色谱 - 电喷雾电离质谱法(HPLC - ESI - MS)测定地表水中痕量 MC - LR, 获得了满意结果。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 6130 型高效液相色谱 - 单四级质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; 手动固相萃取仪, 美国 Supelco 公司; 氮吹仪, Organomation Associates, Inc 公司; HLB 固相萃取小柱(500 mg, 6 mL); 玻璃纤维滤膜(0.45 μm); 针头过滤器(0.2 μm); 玻璃注射器(50 mL)。

MC - LR 标样, 购自瑞士 Alexis 公司; 甲醇、甲酸, 均为色谱纯; 试验用水为 Millipore 纯水机制备

收稿日期: 2011 - 01 - 09; 修订日期: 2011 - 08 - 24

作者简介: 宋俊密(1983—), 女, 河北衡水人, 助理工程师, 硕士, 从事环境监测工作。

的三级水。

1.2 样品前处理

用采水器采集 1 000 mL 水样,经 500 目不锈钢筛过滤,除去大部分浮游生物和悬浮物。将过滤后的水样经 0.45 μm 滤膜减压过滤后,准确量取 500 mL 滤液,置于棕色试剂瓶中。

连接固相萃取装置,用玻璃注射器吸取 10 mL 甲醇,注入 HLB 固相萃取小柱(自然滴下),当甲醇液面接近小柱上层筛片时,加入 10 mL ~ 15 mL 纯水活化(小柱在活化过程中应始终充满液体)。调节固相萃取装置的压力,将 500 mL 滤液流经预活化的小柱,控制流量约 5 mL/min。水样富集完毕,抽掉空气,干燥 2 min,充分抽干小柱中的水分(小柱在萃取过程中应始终充满液体)。用 10 mL 甲醇洗脱小柱,再用氮吹仪将洗脱液浓缩至 1 mL,经 0.2 μm 针头过滤器过滤后待测。

1.3 色谱条件

Discovery@ C18 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 5 μm , Supelco 公司);柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;流动相为甲醇/水(含 0.1% 甲酸)混合溶液(体积比 60:40);流量 0.3 mL/min;DAD 检测器波长 238 nm;进样体积 10 μL 。

1.4 质谱条件

单四级杆质谱检测器;离子源电离模式为正离子模式(ESI^+);毛细管电压 4 000 V;干燥气流量 8 L/min;干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$;雾化器压力 103 kPa;增益 5;保留时间 2.53 min;母离子质荷比(m/z) 995.0。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

有文献报道,在流动相中添加甲酸可以提高检测灵敏度^[9]。研究发现,当流动相甲醇与水(含 0.1% 甲酸)的体积比为 60:40 时,峰形最好。温度对出峰情况影响不大,该试验选择在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下测定。利用 DAD 检测器的三维谱图,发现 MC-LR 在 238 nm 波长处有最大吸收。

2.2 质谱条件优化

有文献报道,采用正离子模式扫描,MC-LR 的检测灵敏度较高^[10]。在正离子模式下,通过仪器 FIA 进样模式,对影响 MC-LR 检测灵敏度的主要参数作优化。MC-LR 分子式为 $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$,相对分子质量为 995,得到基峰为 996.3 (m/z) 的

$[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子峰。因此,选择离子扫描(SIM)选定 996.3 离子(m/z)作专属性扫描,可提高检测灵敏度,同时避免了色谱柱分离效能所引起的对被测组分的干扰。在上述优化条件下,MC-LR 标准溶液(2.00 mg/L)的选择离子总离子流色谱峰见图 1,ESI-MS 峰见图 2。

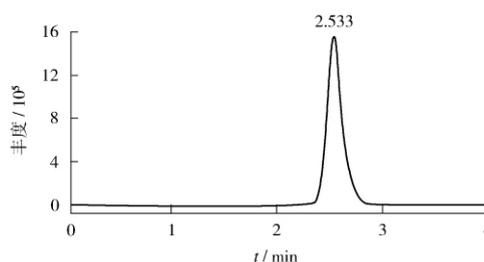


图 1 MC-LR 标准溶液(2.00 mg/L)的选择离子总离子流色谱峰

Fig. 1 TIC of selected ion by MC-LR standard solution (2.00 mg/L)

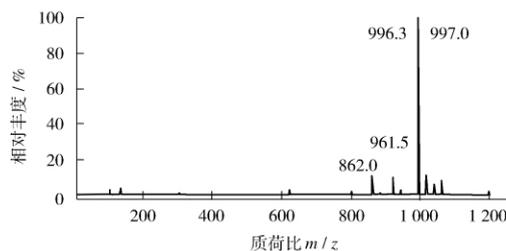


图 2 MC-LR 标准溶液(2.00 mg/L)的 ESI-MS 峰

Fig. 2 Fragment pattern of ESI-MS by MC-LR standard solution (2.00 mg/L)

2.3 标准曲线、方法检出限与加标回收试验

在上述优化条件下,测定 0.100 mg/L、0.200 mg/L、0.500 mg/L、1.00 mg/L、2.00 mg/L MC-LR 标准溶液系列,以响应峰面积(Y)对质量浓度(X)作线性回归分析,得标准曲线回归方程为 $Y = 8.09 \times 10^6 X - 3.25 \times 10^5$,相关系数 $r = 0.9985$ 。

在 500 mL 空白水样中,加入 10.0 mg/L MC-LR 标准溶液 10 μL ,得 0.200 $\mu\text{g/L}$ MC-LR 标准溶液。按试验方法浓缩至 1 mL 后测定,根据 $\text{MDL} = t_{(n-1,0.95)} \times s$ ^[11] 计算方法检出限为 0.02 $\mu\text{g/L}$ (当 $n=7$ 时, t 值取 3.14; s 为标准偏差),能满足饮用水源地 MC-LR 的检测要求。

在 500 mL 空白水样中,加入 10.0 mg/L MC-LR

LR 标准溶液 20 μL , 得 0.400 $\mu\text{g/L}$ MC-LR 标准溶液。按试验方法浓缩至 1 mL 后测定 ($n=3$), 回收率为 $(96.2 \pm 5.4)\%$ 。

2.4 实际水样测定

用该方法测定甘肃省兰州市和金昌市某饮用水源地地表水样品, MC-LR 均未检出。

3 结语

采用 HPLC-ESI-MS 方法测定地表水中 MC-LR, 通过准确的分子量与结构信息, 初步定性 MC-LR。方法最低检出限为 0.02 $\mu\text{g/L}$, 能满足地表水中痕量 MC-LR 的检测要求, 可为水质监测领域藻毒素的风险评价及监测水处理脱毒效能提供技术支持。

[参考文献]

- [1] CARMICHAEL W W, BEASLY V, BUNNER D L, et al. Naming of cyclo heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae) [J]. *Toxicon*, 1988, 26(11): 971-973.
- [2] 纪荣平, 李先宁, 吕锡武. 太湖梅梁湾水源水中微囊藻毒素浓度的变化 [J]. *环境监测管理与技术*, 2007, 19(3): 20-22.
- [3] WHO Chloroform. In: *Guidelines for drinking-water quality*. Second edition. Addendum to volume 2. Health criteria and

other supporting information [M]. Geneva: World Health Organization, 1998.

- [4] 乔素兰. 高效液相色谱法检测水中微囊藻毒素的实验条件优化 [J]. *环境监测管理与技术*, 2007, 19(6): 44-46.
- [5] 徐荣, 张德明, 卢益新. 高效液相色谱测定水中微囊藻毒素 [J]. *净水技术*, 2005, 24(5): 63-65.
- [6] AVERSANO C D, EAGLESHAM G K, QUILLIAM M A. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1028(1): 155-164.
- [7] HUMMERT C, DAHLMANN J, REICHEL T, et al. Analytical techniques for monitoring harmful cyanobacteria in lakes [J]. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 2001(6): 159-168.
- [8] KENICHI H, TOMOYO N, KIYONAGA F, et al. Comprehensive analysis system using liquid chromatography-mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1033: 107-113.
- [9] 虞锐鹏, 陶冠军, 秦方, 等. 液相色谱-电喷雾电离质谱法测定水中的微囊藻毒素 [J]. *分析化学研究简报*, 2003, 31(12): 1462-1464.
- [10] 王蕾, 李小艳, 张惠, 等. 高效液相色谱-质谱法测定蓝藻中的微囊藻毒素 [J]. *食品工业科技*, 2007, 28(3): 197-199.
- [11] 中华人民共和国环境保护部. HJ 168-2010 环境监测分析方法标准制订技术导则 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010.

本栏目责任编辑 姚朝英

(上接第7页)

据在总量考核、排污权交易和监督执法等工作中的应用提供了技术支持。在原有人工审核的基础上, 结合长期积累的实践经验, 开发了 CEMS 自动审核功能的程序, 以“自动审核为主, 人工审核为辅”的工作模式, 有效提高了工作效率, 并使 CEMS 数据审核机制得到完善。

[参考文献]

- [1] 朱法华, 李辉, 邱曙光. 烟气排放连续监测技术的发展及应用前景 [J]. *环境监测管理与技术*, 2010, 22(4): 10-14.
- [2] 郭卫兴, 胡敏, 刘启贞. 烟气 CEMS 比对监测及质量控制、数据审核要点解析 [J]. *黑龙江环境通报*, 2009, 33(2): 51-52.

- [3] 潘柳青. CEMS 比对监测要求探讨 [J]. *环境监测管理与技术*, 2008, 20(3): 58-59.
- [4] 裴冰, 万方. CEMS 比对监测相关问题探讨 [J]. *环境监测管理与技术*, 2010, 22(2): 8-10.
- [5] 国家环境保护总局. HJ/T 75-2007 固定污染源烟气排放连续监测技术规范 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007.
- [6] 国家环境保护总局. HJ/T 212-2005 污染源在线自动控制(监测)系统数据传输标准 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2005.
- [7] 沈静, 孙毅, 黄嘉雷. 浅谈烟气排放连续监测系统的数据应用与污染源管理 [J]. *黑龙江环境通报*, 2007, 31(3): 28-30.
- [8] 王悦, 潘启明. 大气污染源连续排放监测系统的数据审核 [J]. *黑龙江环境通报*, 2005, 29(4): 39-41.