

# HPLC - 高分辨飞行时间质谱测定水中多种微囊藻毒素

吴洁珊<sup>1</sup>,倪清泉<sup>2</sup>,任永霞<sup>1</sup>,徐日文<sup>1</sup>,梁宁<sup>1</sup>,黄晶<sup>1</sup>,戴正惠<sup>1</sup>

(1. 拱北海关,广东 珠海 519015;2. 珠海生产力促进中心,广东 珠海 519015)

**摘要:**水样经 HLB 小柱富集、净化后,采用高效液相色谱-四极杆-高分辨飞行时间质谱同时测定水样中 MC-LA、MC-LF、MC-LR、MC-LW、MC-LY、MC-RR、MC-YR、MC-WR 等 8 种微囊藻毒素。试验表明,8 种微囊藻毒素在 0.500  $\mu\text{g/L}$ ~100  $\mu\text{g/L}$  范围内线性良好,方法检出限为 0.001  $\mu\text{g/L}$ ~0.005  $\mu\text{g/L}$ ,自来水空白样品 3 个质量浓度水平的加标回收率为 72.5%~99.8%,5 次测定结果的 RSD 为 1.9%~11.2%。将该方法用于测定珠海本地水产养殖鱼塘和小型水库的水样,结果均未检出。

**关键词:**微囊藻毒素;固相萃取;高效液相色谱法;高分辨飞行时间质谱法;水质

中图分类号:0657.63 文献标志码:B 文章编号:1006-2009(2020)06-0054-04

## Determination of Microcystins in Water by HPLC-Quadrupole-High Resolution Time of Flight Mass Spectrometry

WU Jie-shan<sup>1</sup>, NI Qing-quan<sup>2</sup>, REN Yong-xia<sup>1</sup>, XU Ri-wen<sup>1</sup>, LIANG Ning<sup>1</sup>, HUANG Jing<sup>1</sup>, DAI Zheng-hui<sup>1</sup>

(1. Gongbei Customs, Zhuhai, Guangdong 519015, China;

2. Zhuhai Productivity Promotion Center, Zhuhai, Guangdong 519015, China)

**Abstract:** 8 kinds of microcystin, MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-LY, MC-RR, MC-YR and MC-WR, in water were purified and enriched by HLB column and determined simultaneously by high performance liquid chromatography-quadrupole-high resolution time of flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF). The experimental results showed that the calibration curves of microcystins had good linearity in the range of 0.500  $\mu\text{g/L}$  to 100  $\mu\text{g/L}$ . The detection limits were between 0.001  $\mu\text{g/L}$  and 0.005  $\mu\text{g/L}$ . The recoveries of blank samples at three mass concentration levels were from 72.5% to 99.8%, the RSDs of five measurements were from 1.9% to 11.2%. The method was applied in monitoring the water samples from local aquaculture fishponds and small reservoirs in Zhuhai, the results of the 8 kinds of microcystin were not detected.

**Key words:** Microcystin; Solid phase extraction; High performance liquid chromatography; High resolution time of flight mass spectrometry; Water quality

微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是蓝藻释放的有毒代谢物,现今已发现的微囊藻毒素有 100 多种,其中 MC-RR、MC-LR、MC-YR 最为常见。该类毒素毒性很强<sup>[1]</sup>,鉴于其毒性和危害,世界卫生组织在其推荐的饮用水标准指导中增加了微囊藻毒素(MC-LR, 1  $\mu\text{g/L}$ )的限值<sup>[2]</sup>,我国现行标准中也规定了 MC-LR 的限值,为 0.001  $\text{mg/L}$ <sup>[3-4]</sup>,故有必要建立相应的检测方法。

目前,用于水体中微囊藻毒素检测的方法主要是高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用法。高

效液相色谱法灵敏度较低,测定时需对大体积水样进行富集。液相色谱串联质谱法具有较高的灵敏度,是目前微囊藻毒素最常用的检测方法。高分辨飞行时间质谱检测方法以其超高质量的分辨率降低样品基质的干扰,可进一步提高方法的检测灵敏度,其灵敏度和准确性更优。在前期研究的基础

收稿日期:2019-09-06;修订日期:2020-09-25

基金项目:拱北海关科技计划基金资助项目(ZH2017-36)

作者简介:吴洁珊(1977—),女,广东揭阳人,高级工程师,硕士,研究方向为农药及污染残留检测。

上<sup>[5-15]</sup>,今采用固相萃取方法结合高分辨飞行时间质谱测定水中 8 种微囊藻毒素,方法简单,灵敏度高,适合环境水、饮用水中微囊藻毒素日常检测。

## 1 试验

### 1.1 主要仪器与试剂

ABX500R 型高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱仪,美国应用生物系统公司;LC - 30AD 型液相色谱仪,日本岛津公司;TDL - 40C 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂;HLB 固相萃取小柱 (60 mg/3 mL),Waters 公司。

10.0 mg/L 的微囊藻毒素 (包含 MC - LA、MC - LF、MC - LR、MC - LW、MC - LY、MC - RR、MC - YR、MC - WR 等),北京曼哈格生物科技有限公司;甲醇、甲酸、乙腈 (色谱纯),美国 TEDIA 试剂公司。

### 1.2 样品的提取和净化

环境水样以 4 000 r/min 转速离心 3 min,取上清水样醋酸纤维膜 (0.45  $\mu\text{m}$ , 28 mm) 过滤。100 mL 水以 5 mL/min 的流量通过先用 6 mL 甲醇

和 6 mL 纯净水活化过的 HLB 小柱,再用 6 mL 纯净水淋洗小柱,最后用 6 mL 甲醇洗脱,45  $^{\circ}\text{C}$  氮吹至近干,用体积分数为 5% 的甲醇水溶液溶解,按仪器工作条件测定。

### 1.3 仪器条件

色谱条件:Poroshell 120 EC -  $\text{C}_{18}$  柱 (2.1 mm  $\times$  100 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ )。流动相:A 为乙腈,B 为体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液,0 min ~ 3 min,  $\varphi$ (A) 由 20%  $\rightarrow$  90%,  $\varphi$ (B) 由 80%  $\rightarrow$  10%; 3 min ~ 4 min,  $\varphi$ (A) 为 90%,  $\varphi$ (B) 为 10%; 4 min ~ 8 min,  $\varphi$ (A) 为 20%,  $\varphi$ (B) 为 80%。流量为 0.30 mL/min。进样体积为 20  $\mu\text{L}$ 。

质谱条件:电喷雾离子源 (ESI),正离子检测模式,离子源温度 600  $^{\circ}\text{C}$ ,气帘气 (CUR) 0.21 MPa,雾化气 (GS1) 0.38 MPa,辅助加热气 (GS2) 0.38 MPa,碰撞气 (CAD) 0.05 MPa,离子喷雾电压 (IS) 5 500 V,IDA TOF MS 扫描范围为 100 u ~ 1 200 u,去簇电压 DP 为 80 V,碰撞能量 CE 为 10 eV。HMRM TOF MS/MS 监测参数见表 1。

表 1 微囊藻毒素 TOF MS/MS 监测分析参数

Table 1 TOF MS/MS parameter for MCs analysis

化合物	分子式	母离子质荷比	子离子质荷比	去簇电压 $U/\text{V}$	碰撞能量 $Q/\text{eV}$
MC - LW	$\text{C}_{54}\text{H}_{72}\text{N}_8\text{O}_{12}$	1 025.70	135.080 1 <sup>①</sup> , 213.087 4	36	74,42
MC - LY	$\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_7\text{O}_{13}$	1 002.80	135.080 6 <sup>①</sup> , 163.111 7	34	66,50
MC - LF	$\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_7\text{O}_{12}$	986.80	135.080 4 <sup>①</sup> , 163.112 0	34	70,48
MC - LA	$\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_{12}$	910.80	135.080 9 <sup>①</sup> , 107.085 3	32	64,66
MC - RR	$\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$	520.00	135.080 5 <sup>①</sup> , 620.342 5	38	28,27
MC - LR	$\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$	498.30	135.080 4, 861.482 9 <sup>①</sup>	45	20,16
MC - WR	$\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_7\text{O}_{13}$	534.80	135.080 9, 934.481 2 <sup>①</sup>	76	19,14
MC - YR	$\text{C}_{52}\text{H}_{72}\text{N}_{10}\text{O}_{13}$	523.30	135.080 1, 911.462 7 <sup>①</sup>	43	19,14

①为定量离子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 仪器条件优化

四极杆 - 高分辨飞行时间质谱存在多种数据采集模式,其全扫描模式无需事先设定待测物的任何信息,对所测定的样品进行全信息收集,测定后再进行数据处理,仪器测定方法简便可行。MRM HR 扫描模式类似于普通四极杆串联质谱,需对待测物的母离子、子离子进行选择 and 仪器参数优化,并使其达到最优效果。MRM HR 扫描模式因其超高的分辨率,降低了基质离子的干扰,其灵敏度和准确性更优。现采用 TOF 全扫描 IDA 模式和

MRM HR 模式两种扫描模式进行监测。

微囊藻毒素 (MC) 在电喷雾离子化源中可以形成单电荷离子  $[\text{M} + \text{H}]^+$  和多电荷离子  $[\text{M} + n\text{H}]^{n+}$ 。试验表明,MC - RR、MC - YR、MC - WR 和 MC - LR 以  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$  响应值更高,MC - LW、MC - LY、MC - LF 和 MC - LA 以单电荷离子  $[\text{M} + \text{H}]^+$  响应值更高,MC - RR 基本不出现  $[\text{M} + \text{H}]^+$  离子。因此,在以 MRM HR 扫描模式监测时,MC - RR、MC - YR、MC - WR 和 MC - LR 以  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$  为分子母离子进行子离子选择与参数优化,各参数见表 1。为确保仪器质量轴的准确性,每 5

次进样分析,仪器自动校准1次。

分别考察甲醇-乙酸铵、甲醇-甲酸、乙腈-乙酸铵和乙腈-甲酸混合溶液作为流动相时,对8种微囊藻毒素响应值的影响。结果表明,以乙腈与体积分数为0.1%的甲酸水溶液作为流动相时目标物响应值最高。故选择乙腈与体积分数为0.1%的甲酸水溶液作为流动相,进行梯度洗脱。

分别考察色谱柱PAK C<sub>18</sub> ACR (2.0 mm × 150 mm, 3 μm)和Poroshell 120 EC - C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm)对8种微囊藻毒素的分离情况。MC-LW、MC-LY、MC-LF和MC-LA在PAK C<sub>18</sub> ACR (2.0 mm × 150 mm, 3 μm)色谱柱上的分离效果较差,出峰时间较晚,峰形较宽,不对称,灵敏度较差。因此,采用Poroshell 120 EC - C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm)色谱柱进行分离。5.00 μg/L的微囊藻毒素标准溶液总离子流见图1。

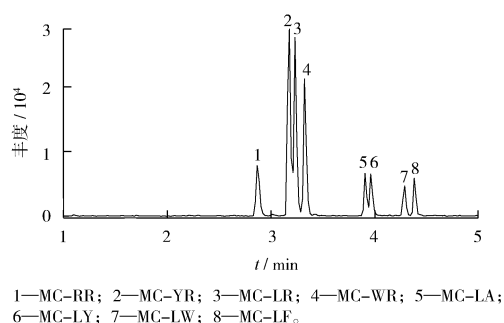


图1 微囊藻毒素标准溶液总离子流

Fig. 1 Total ion current of MCs standard solution

## 2.2 样品提取与净化

微囊藻毒素具有水溶性和耐热性,易溶于水、

甲醇或丙酮,不易挥发,故水中微囊藻毒素较难采用有机溶剂提取浓缩,多采用加热浓缩或固相萃取法进行富集、净化。已有的固相萃取主要采用C<sub>18</sub>、HLB小柱、磁性固相萃取的方法,结合现有试验条件考察了C<sub>18</sub>、HLB填料的固相萃取小柱对自来水和环境水中微囊藻毒素的富集净化情况,表明C<sub>18</sub>小柱容易受操作影响,回收率不稳定。同时,也比较了HLB填料对样品富集量的影响,分别考察60 mg、150 mg小柱对100 mL 1 μg/L目标物标准溶液的富集情况,结果两种规格的小柱都能较好地富集8种微囊藻毒素,考虑经济成本,采用60 mg规格的小柱。洗脱曲线试验表明,6 mL甲醇能完全把上述8种微囊藻毒素洗脱。由于有些环境水样含有泥沙,水样处理前先离心,经醋酸纤维膜过滤后再由固相萃取净化处理。

## 2.3 方法效能验证

标准储备液用甲醇配制,使用时用超纯水稀释标准储备液配制成0.500 μg/L、1.00 μg/L、2.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L、100 μg/L的标准系列,分别在1.3条件下测定,绘制标准曲线。以目标物峰面积响应值对其质量浓度进行线性回归,得到各化合物的回归方程,见表2。

重复空白试验7次得到各组分测定值,并计算7次测定结果的标准偏差S,依据公式 $MDL = t_{(n-1,0.99)} \times S$ 计算方法检出限,结果见表2。

## 2.4 加标回收试验

用上述方法对自来水空白样品做3个质量浓度水平的加标回收试验,平行试验5次,结果见表3。由表3可知,平均回收率为72.5%~99.8%,

表2 方法效能验证结果

Table 2 Method effectiveness verification results

化合物	TOF全扫描模式监测			MRM HR扫描模式监测		
	回归方程	相关系数 <i>r</i>	检出限 $\rho$ /( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	回归方程	相关系数 <i>r</i>	检出限 $\rho$ /( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
MC-LW	$y = 4.51 \times 10^3 x - 1.62 \times 10^3$	0.999 4	0.005	$y = 502x - 330$	0.998 4	0.005
MC-LY	$y = 4.76 \times 10^3 x - 4.01 \times 10^3$	0.999 6	0.005	$y = 498x - 408$	0.998 7	0.001
MC-LF	$y = 4.57 \times 10^3 x - 1.50 \times 10^3$	0.998 6	0.002	$y = 497x - 475$	0.998 9	0.002
MC-LA	$y = 5.35 \times 10^3 x - 889$	0.999 3	0.005	$y = 434x - 283$	0.998 3	0.002
MC-RR	$y = 1.24 \times 10^4 x - 1.23 \times 10^3$	0.999 9	0.002	$y = 1.39 \times 10^3 x + 233$	0.999 8	0.001
MC-LR	$y = 4.07 \times 10^3 x - 2.90$	0.999 7	0.005	$y = 3.58 \times 10^3 x + 1.32 \times 10^3$	0.999 8	0.001
MC-WR	$y = 4.76 \times 10^3 x - 4.01 \times 10^3$	0.999 9	0.005	$y = 2.31 \times 10^3 x - 861$	0.999 3	0.001
MC-YR	$y = 4.09 \times 10^3 x + 829$	0.999 9	0.005	$y = 3.50 \times 10^3 x + 1.66$	0.999 7	0.001

5 次测定结果的 RSD 为 1.9% ~ 11.2%, 符合残留分析质量控制的要求<sup>[16]</sup>。

### 2.5 实际样品检测

实际测定珠海本地 20 个水产养殖鱼塘和 3 个小型水库的水样, 结果上述 8 种微囊藻毒素均未检出。

表 3 加标回收试验结果

Table 3 Test results of recovery

化合物	加标量 $\rho/$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	TOF MS		MRM HR		化合物	加标量 $\rho/$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	TOF MS		MRM HR	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%			回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
MC-LW	0.02	88.2	8.2	83.1	9.8	MC-RR	0.02	77.2	10.4	82.1	7.2
	0.05	77.3	6.2	84.2	10.6		0.05	74.3	3.5	89.5	7.4
	0.5	92.8	5.8	91.3	9.6		0.5	78.7	4.6	75.2	6.9
MC-LY	0.02	92.5	7.6	94.0	5.9	MC-LR	0.02	84.7	6.2	84.7	4.9
	0.05	91.9	5.1	96.4	10.0		0.05	88.3	6.9	89.7	8.7
	0.5	87.6	6.5	89.0	9.4		0.5	85.1	5.6	84.9	5.8
MC-LF	0.02	91.0	6.1	96.0	7.0	MC-WR	0.02	82.9	6.7	83.9	6.6
	0.05	92.3	2.3	89.3	11.2		0.05	72.5	1.9	76.9	8.3
	0.5	89.4	5.2	91.7	8.6		0.5	75.1	6.5	88.0	5.6
MC-LA	0.02	94.0	8.1	99.8	8.9	MC-YR	0.02	83.7	6.6	89.0	6.8
	0.05	97.9	3.6	96.7	9.6		0.05	79.6	3.3	81.3	10.3
	0.5	84.8	4.5	86.0	7.8		0.5	75.3	4.5	75.4	6.5

### 3 结语

水样中的微囊藻毒素经 HLB 小柱富集、净化后, 用 HPLC-Q-TOF/MS 检测, 采用两种监测模式测定, 该方法灵敏度高, 操作简单、快速, 具有良好的精密度与准确度, 检出限低于国际饮用水卫生标准限量要求, 能满足环境水和饮用水中微囊藻毒素日常检测的要求。

#### [参考文献]

- [1] 王小宁, 杨传玺, 宗万松. 微囊藻毒素生物毒性作用机制与调控策略的研究进展[J]. 环境污染与防治, 2015, 37(6): 90-95.
- [2] World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality, fourth edition[EB/OL]. [2019-09-06]. [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/dwq\\_guidelines/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/).
- [3] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB 5749—2006 生活饮用水卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [4] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. GB 3838—2002 地表水环境质量标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [5] 张俊, 孟宪智, 张世禄, 等. 海河流域地表水中微囊藻毒素的测定[J]. 环境监测管理与技术, 2019, 31(5): 40-42.
- [6] 赵彬, 王昭, 张敏, 等. 超高效液相色谱/串联质谱法测定饮用水源水中多种藻毒素[J]. 环境监测管理与技术, 2018, 30(1): 54-57.
- [7] 李芳, 王颖, 李献刚, 等. 液相色谱-三重四级杆串联质谱法

快速检测水中微囊藻毒素-LR[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(20): 5423-5427.

- [8] 沈斐, 许燕娟, 姜晟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定地表水中 9 种藻毒素[J]. 理化检验-化学分册, 2018, 54(11): 1287-1291.
- [9] LIU X Y, GAO S Q, LI X Y, et al. Determination of microcystins in environmental water samples with ionic liquid magnetic graphene[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 176: 20-26.
- [10] 王阳, 徐明芳, 曾晓琮, 等. CE 和 HPLC 测定水源水体中微囊藻毒素方法比较[J]. 食品科学, 2016, 37(22): 210-215.
- [11] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 等. 直接进样-超高效液相色谱-三重四级杆质谱法同时快速测定水中 12 种微囊藻毒素和 1 种节球藻毒素[J]. 色谱, 2017, 35(12): 1286-1293.
- [12] 周倩如, 何岸檐, 杨伟, 等. 水中微囊藻毒素的超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2018, 35(6): 524-527.
- [13] 邹康兵, 向彩虹, 董玉莲. 超高效液相色谱-串联质谱法测定饮用水中微囊藻毒素[J]. 化学分析计量, 2017, 26(1): 42-46.
- [14] 连丽丽, 郭亭秀, 吴玉清, 等. 磁性固相萃取-液相色谱法测定环境水样中痕量的微囊藻毒素[J]. 分析化学, 2015, 43(12): 1876-1881.
- [15] 李宏, 潘纲, 张洪刚. 超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱结合内标物测定水体中微囊藻毒素[J]. 环境化学, 2014, 33(12): 2087-2093.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 32465—2015 化学分析方法验证确认和内部质量控制要求[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.