

· 争鸣与探索 ·

# 高效液相色谱法检测水中微囊藻毒素的实验条件优化

乔素兰

(深圳水务集团水质检测中心, 广东 深圳 518055)

**摘要:** 通过实验优化高效液相色谱检测水中微囊藻毒素的方法, 对水样前处理过程中使用的固相萃取柱、淋洗剂、洗脱剂及浓缩定容方式等进行了选择。用流动相为  $V(1.25\% \text{ TFA 水溶液}) : V(\text{甲醇}) = 40:60$  的溶液洗脱, MC-RR 和 MC-LR 在 15 min 内有较好的分离, 工作曲线的范围为  $0.1 \text{ mg/L} \sim 10 \text{ mg/L}$ , 方法检测限为  $0.1 \mu\text{g/L}$ , 两者的回收率分别为 98.1% 和 101%。测定方法简易、可靠和实用。

**关键词:** 高效液相色谱法; 前处理; 优化; 微囊藻毒素

中图分类号: O657.7<sup>+</sup> 文献标识码: B 文章编号: 1006-2009(2007)06-0044-03

## Optimization for HPLC Analysis and Water Sample Preparation of Microcystins

QIAO Su-lan

(Water Quality Monitoring Center, Shenzhen Water Group, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

**Abstract** The microcystins and its (MC) determination method was optimized in the test steps of the water sample preparation and high performance liquid chromatography (HPLC). The selected experiments were performed in columns of solid phase extraction, elution solutions and way of concentration. The MC-RR (microcystins RR) and MC-LR (microcystins LR) could be totally separated in 15 min at isocratic elution with mobile phase  $V(1.25\% \text{ trifluoroacetic acid}) : V(\text{methanol}) = 40:60$ . The range of linear relation was from  $0.1 \text{ mg/L}$  to  $10 \text{ mg/L}$ , sample detective limits  $0.1 \mu\text{g/L}$ , the recovery MC-RR 98.1% and MC-LR 101%. The optimized method is reliable and practical for detection of MC in the water.

**Key words** HPLC; Pretreatment; Optimization; Microcystins and its

高效液相色谱 (HPLC) 法测定微囊藻毒素不仅能定量, 还能够区分 MC 异构体<sup>[1]</sup>, 但国内实验室的条件和检测程序差别较大<sup>[2-5]</sup>, 需要对样品前处理和检测过程进行研究, 为实际工作提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器和试剂

Waters 2690 高效液相色谱仪, Waters symmetry C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱; Zmark Auto-trace 自动固相萃取装置; 6 mL, 500 mg 的 Sep-pak C<sub>18</sub> 固相萃取柱和 6 mL, 500 mg 的 Oasis HLB 固相萃取柱 (Waters 公司); 甲醇 (色谱纯, TEDIA), 三氟乙酸 (TFA, 化学纯, 上海化学试剂公司); MC-LR 和 MC-RR 标准品 (ALEXIS 产品), 用  $V(\text{TFA}) : V(\text{甲醇}) = 0.10:99.9$  溶液分别配制

质量浓度为  $0.10 \text{ mg/L}$ ,  $0.25 \text{ mg/L}$ ,  $0.50 \text{ mg/L}$ ,  $1.0 \text{ mg/L}$ ,  $2.5 \text{ mg/L}$  的标准工作溶液。

#### 1.2 色谱方法

优化色谱参数选择 3 种方案。方案 1 采用  $V(1.25\% \text{ TFA 水溶液}) : V(\text{甲醇}) = 30:70$  的溶液作为流动相; 方案 2 的流动相采用  $V(1.25\% \text{ TFA 水溶液}) : V(\text{甲醇}) = 40:60$  的溶液, 均在柱温为  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下作洗脱; 方案 3 采用文献 [2] 推荐的方法, 即用  $0.05\% \text{ TFA 水溶液}$  和甲醇组成的流动相在柱温为  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下, 进行梯度洗脱。流动相流量为  $1 \text{ mL/min}$ , 进样量为  $20 \mu\text{L}$ , 检测波长为  $238 \text{ nm}$ 。根据标准色谱图中的保留时间 (RT) 对 MC-LR 和

收稿日期: 2007-07-25 修订日期: 2007-09-20

作者简介: 乔素兰 (1969-), 女, 河南开封人, 博士, 从事环境有机物分析检测。

MC-RR 定性, 用外标法定量。

### 1.3 样品前处理

#### 1.3.1 水样采集及保存

用采水器采集 2 L 水样, 置于棕色玻璃容器中。自来水中加入硫代硫酸钠至质量浓度为 80 mg/L, 以去除其中的氯。用冰乙酸调整水样 pH 值为 3 和不做酸化处理的同一水样用相同方法检测, 结果作对比。水样经 GF/C 玻璃纤维滤膜过滤后富集, 若无法立即处理, 置 4 °C 冰箱保存, 保存期不超过一周。

#### 1.3.2 藻毒素的富集与净化

用 Waters Sep-pak C<sub>18</sub> 柱和 Waters Oasis HLB 柱吸附 1 000 mL 水样中的 MC, 过柱流量 5 mL/min, 吸附柱用氮气吹干, 洗脱液用氮吹仪浓缩, 定容至 1 mL。若不及时进样, 将样品密封, 置 -20 °C 冰箱内保存。观察 2 种不同吸附柱、4 组不同的淋洗剂和 3 种洗脱剂对检测结果的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件

选择的 3 种洗脱方法的结果表明, 用方案 1, 8 min 内 MC-LR, MC-RR 出峰完成, 但在 MC-RR 出峰处有干扰; 用方案 2 在 15 min 内完成出峰, 避开了 MC-RR 出峰处的干扰, 见图 1; 用方案 3 干扰不明显, 但 35 min~40 min 出峰才能完成, 且 MC-RR 峰形较差。

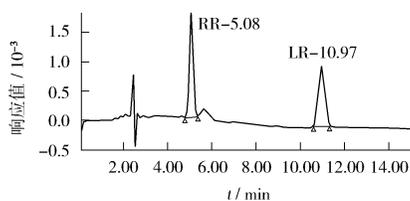


图 1 MC-RR, MC-LP 的 HPLC 色谱峰

对系列标准样品 (质量浓度分别为 0.050 mg/L, 0.10 mg/L, 0.25 mg/L, 0.50 mg/L, 1.0 mg/L, 2.5 mg/L, 5.0 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L) 进样分析, 绘制 MC-RR 和 MC-LR 的标准工作曲线, 在 0.1 mg/L~10 mg/L 两者相关系数  $r > 0.999$ , MC-RR 和 MC-LR 的仪器检测限 (信噪比为 3 时的进样检测质量浓度) 均为 0.1 mg/L, 绝对检出量为 1 ng, 该实验将样品富集浓缩 1 000 倍, 方法的检测限为 0.1 μg/L。

### 2.2 样品前处理

#### 2.2.1 SPE 柱吸附效率的比较

MC-RR 和 MC-LR 各 500 ng 加入去离子水 1 L 中, 比较 Sep-pak C<sub>18</sub> 柱和 Oasis HLB 柱 MC 测定结果的回收率。结果表明, 在方案 2 为流动相洗脱的条件下, 2 种 SPE 柱的 MC 回收率为 80%~95%, 经统计检验无显著性差异。用 Sep-pak C<sub>18</sub> 柱吸附样品, 其测定结果的相对标准偏差比 Oasis HLB 柱的小, 重复性好, 所以用 Sep-pak C<sub>18</sub> SPE 柱萃取 MC 更加适合, 见表 1。

表 1 不同 SPE 柱的 MC 吸附效果 ( $n=3$ ) %

柱名称	MC-RR		MC-LR	
	回收率	RSD	回收率	RSD
Sep-pak C <sub>18</sub>	91.5	5.2	92.9	2.8
Oasis HLB	87.8	6.2	91.3	3.7

#### 2.2.2 淋洗剂效果的比较

将不同淋洗剂处理方法分为 4 组, 各组先用 40 mL 去离子水淋洗 1 次, 再分别用下列不同的溶液淋洗<sup>[2-5]</sup>。①体积分数 10% 甲醇 20 mL 淋洗 1 次后, 再用体积分数 20% 甲醇 20 mL 淋洗 1 次; ②体积分数 20% 甲醇 40 mL 分 2 次淋洗; ③体积分数 20% 和 30% 的甲醇各 20 mL 先后淋洗 1 次; ④体积分数 30% 的甲醇 40 mL 分 2 次淋洗。实验发现, 体积分数 10% 和 20% 甲醇作先后淋洗效果最好。淋洗剂的甲醇体积分数大于 20% 时, MC 的回收率下降很快, MC-R 和 MC-LR 回收率由高到低依次为①组、②组、③组、④组, 见表 2。

表 2 不同淋洗液对回收率的影响 %

组号	MC-RR	MC-LR
①	98.1	105
②	45.2	71.9
③	36.8	44.8
④	13.1	29.8

各组淋洗剂间差异有显著性意义 ( $p < 0.05$ ), 随着淋洗剂中有机成分甲醇的体积分数减小, 干扰 MC 测定的成分增多<sup>[2]</sup>。综合去除杂质和回收率两方面考虑, 建议选用①组淋洗方式对 SPE 柱进行淋洗。

#### 2.2.3 洗脱剂的比较

用去离子水加入 MC 标准品, 配制质量浓度为

0.50 μg/L 待测标准回收水样。待测标准回收水样通过 C<sub>18</sub> 柱固相萃取,并用体积分数 10% 和 20% 甲醇各 20 mL 先后各淋洗 1 次,对选用的不同洗脱剂进行回收率比较实验。每次洗脱剂用量 5 mL,洗脱流量为 3 mL/min。比较实验的洗脱剂分组如下:① V(TFA):V(甲醇) = 0.10:0.99.9 溶液 2 次洗脱;② 100% 甲醇 2 次洗脱;③ 体积分数 90% 甲醇 2 次洗脱。对经酸化处理和未经酸化处理的加标样品进行洗脱,结果见表 3。

表 3 不同洗脱剂和样品酸化处理对回收率的影响 %

组号	MC-RR		MC-LR	
	酸化样品	非酸化样品	酸化样品	非酸化样品
①	91.8	98.1	95.8	101
②	6.9	11.9	11.2	41.8
③	93.9	34.8	89.0	48.9

①组和③组洗脱 MC-RR 与 MC-LR 经酸化处理的加标样品的回收较高,②组洗脱 MC-RR 与 MC-LR 的回收率差,③组洗脱 MC-RR 与 MC-LR 未经酸化处理的加标样品的效果也不理想。对于未经酸化处理的加标样品,用 5 mL V(TFA):V(甲醇) = 0.10:0.99.9 溶液洗脱 2 次;对于经酸化处理的加标样品,用 5 mL 的 V(TFA):V(甲醇) = 0.10:0.99.9 溶液洗脱 2 次,或者用 5 mL 体积分数 90% 甲醇洗脱 2 次,均能够满足洗脱要求。

TFA 和处于酸性环境的 SPE 柱可使 MC 质子化。回收率较高的 3 个处理组,都能促进 MC 多肽质子化,使 SPE 柱吸附的 MC 容易被洗脱。在无 TFA 存在的情况下,体积分数 90% 甲醇洗脱剂也满足了 MC 质子化的条件,得到了较高的回收率。用 100% 甲醇作洗脱剂,MC 的回收率约 10%,这与文献 [2] 中的洗脱回收率分别为 88.3% 和 81.3% 相悖。洗脱剂中水体积分数增加会使其浓缩时间倍增,这是由于水的沸点较甲醇的高,蒸发速度减慢所致。因此,兼顾回收率和省时两因素,水样不需酸化,选 V(TFA):V(甲醇) = 0.10:0.99.9 的溶液作为 SPE 柱的洗脱剂。

#### 2.2.4 不同浓缩定容方式比较

浓缩定容过程中不同吹脱方式对 MC 回收量有影响<sup>[2,4]</sup>,用氮吹仪对 10 mL 洗脱液吹脱,约 30 min 将洗脱液的体积浓缩至 1 mL 以下。通过

比较发现,洗脱液吹至半干后,定容所得的 MC 回收量显著高于其完全吹干后再定容的回收量,与文献 [2] 报道一致。

#### 2.5 环境水样检测

采用优化后的 MC 检测方法,对水厂周边水域不同季节的 90 份水样进行检测。部分水样可检测到 MC,质量浓度为 0.1 μg/L~0.5 μg/L,且季节差异不明显,低于国家标准值。从该水域取水厂的出水和其管网的水样偶能检出 MC-RR 或者 MC-LR,但测定值低于 MC 的卫生指导值<sup>[6]</sup>。

### 3 结论

微囊藻毒素测定方法的前处理流程为:水样经玻璃纤维滤膜过滤,滤液过 Sep-pak C<sub>18</sub> SPE 柱。SPE 柱经 40 mL 去离子水淋洗,再用体积分数为 10% 甲醇溶液 20 mL,体积分数为 20% 甲醇溶液 20 mL 各淋洗 1 次,然后用 V(TFA):V(甲醇) = 0.10:0.99.9 溶液洗脱。洗脱收集液用氮吹仪浓缩,吹至半干用 V(TFA):V(甲醇) = 0.10:0.99.9 溶液定容至 1.0 mL。

HPLC 进样分析时,用方案 2 作为流动相进行洗脱,在 15 min 内能完全分离 MC-RR 和 MC-LR,同时又避免杂质干扰,其方法检测限为 0.1 μg/L。方法的 MC-RR,MC-LR 的回收率分别为 98.1% 和 101%。实际水样中微囊藻毒素的检测结果表明,该方法简便、可靠和实用。

#### [参考文献]

- [1] 雷腊梅,甘南琴.三种检测微囊藻毒素的 ELISA 方法比较研究[J].高技术通讯,2004,7(3):89-92
- [2] 张立将,尹立红.水中微囊藻毒素高效液相色谱检测与前处理条件优化[J].东南大学学报(自然科学版),2005,35(3):446-451
- [3] 中国科学院水生生物研究所,湖北省质量技术监督局.DB42/T 275-2003 蓝藻及其制品中微囊藻毒素的检测方法[S].武汉:湖北省标准化协会,2003
- [4] 张维昊,徐小清.固相萃取高效液相色谱法测定水中痕量微囊藻毒素[J].分析化学研究报告,2005,29(5):522-525
- [5] 王东利,李洁,梁亚莉,等.水中痕量微囊藻毒素的测定[J].中国公共卫生,2003,19(8):992-993
- [6] 中华人民共和国卫生部.生活饮用水卫生规范[S].北京:中国标准出版社,2001