

水中3种微囊藻毒素的高效液相色谱测定方法优化

沈友恒^{1,2}, 刘发根^{1,2}, 郭玉银^{1,2}, 陈贤哲^{1,2}, 张文彪^{1,2}, 陈文滔^{1,2}, 黄江^{1,2}

(1. 鄱阳湖水文水资源监测中心, 江西 南昌 330038;

2. 江西省鄱阳湖水文生态监测研究重点实验室, 江西 南昌 330002)

摘要:对天然水体中3种痕量微囊藻毒素(MC-RR、MC-YR、MC-LR)的淋洗、洗脱、液相色谱测定等环节进行单因素不同水平考察,结果表明:以体积分数为45%的甲醇水溶液(含0.1%的TFA)为固相萃取淋洗剂、10 mL 甲醇(含0.1% TFA)为固相萃取洗脱剂,体积分数为70%的甲醇水溶液(含0.1% TFA)为液相色谱流动相,可在6 min内有效分离MC-RR、MC-YR、MC-LR。将优化后的方法用于实际加标水样的测定,MC-RR、MC-YR、MC-LR的方法检出限分别为0.064 $\mu\text{g/L}$ 、0.098 $\mu\text{g/L}$ 、0.095 $\mu\text{g/L}$,加标回收率为87.0%~116%,RSD为10.2%~18.8%。

关键词:微囊藻毒素;固相萃取;高效液相色谱法;水质

中图分类号:O657.7⁺2

文献标志码:B

文章编号:1006-2009(2022)05-0053-04

Optimization of High-performance Liquid Chromatography Method for Determination of Three Microcystins in Water

SHEN You-heng^{1,2}, LIU Fa-gen^{1,2}, GUO Yu-yin^{1,2}, CHEN Xian-zhe^{1,2}, ZHANG Wen-biao^{1,2},

CHEN Wen-tao^{1,2}, HUANG Jiang^{1,2}

(1. Poyang Lake Hydrology and Water Resources Monitoring Centre, Nanchang, Jiangxi 330038, China;

2. Jiangxi Key Laboratory of Hydrology and Ecology Monitoring Research of Poyang Lake, Nanchang, Jiangxi 330002, China)

Abstract: The leaching, elution and liquid phase determination of three trace microcystins (MC-RR, MC-YR, MC-LR) in natural water were investigated at different levels by single factor. The results showed that MC-RR, MC-YR and MC-LR could be effectively separated within 6 minutes by using 45% methanol aqueous solution (containing 0.1% TFA) as solid phase extraction leachate, 10 mL methanol (containing 0.1% TFA) as solid phase extraction eluent, and 70% methanol aqueous solution (containing 0.1% TFA) as liquid chromatographic mobile phase. The optimized method was applied to the determination of spiked recovery of actual samples. The method detection limits of MC-RR, MC-YR, MC-LR were 0.064 $\mu\text{g/L}$, 0.098 $\mu\text{g/L}$, 0.095 $\mu\text{g/L}$, respectively, the recoveries were 87.0%~116% and the RSDs were 10.2%~18.8%.

Key words: Microcystin; Solid phase extraction; HPLC; Water quality

蓝藻水华产生的微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是危害最严重的一类蓝藻毒素,已发现90多种异构体,均具有肝毒性,其中毒性较强、产量较大的是MC-LR、MC-RR和MC-YR。因此,准确高效测定水中MCs具有一定意义。

MCs测定方法主要有生物毒理、化学分析、生物化学分析3类^[1],高效液相色谱(HPLC)法以其准确、灵敏、重现性好及能够同时分析多种异构体

等优点而被WHO、美国等推荐为MCs的标准测定方法。国内现行的7项MCs测定标准中有4项使用高效液相色谱法,均有待完善,如《生活饮用水标

收稿日期:2021-10-17;修订日期:2022-08-15

基金项目:江西省水利厅科技课题“鄱阳湖饮用水源地微囊藻毒素时空分布研究”基金资助项目(201921YBKT22)

作者简介:沈友恒(1993—),男,江西鄱阳人,工程师,学士,从事湖泊水环境生态监测研究。

准检验方法 有机物指标》(GB/T 5750.8—2006)^[2]和《水质 甲萘威、溴氰菊酯、微囊藻毒素—LR的测定 高效液相色谱法》(SL 740—2016)^[3]使用的乙腈毒性较大,《水中微囊藻毒素的测定》(GB/T 20466—2006)^[4]中磷酸盐易堵塞色谱柱,《藻类产品中微囊藻毒素测定 高效液相色谱法》(DB32/T 1481—2009)^[5]淋洗剂去杂质效果欠佳^[6]。虽然多项研究^[6-9]对HPLC法测定MCs的洗脱剂、淋洗剂、浓缩定容方式、流动相等进行优化^[10-13],但多仅限于一两种MCs。今围绕高效液相色谱法测定天然水体中3种主要痕量MCs(MC-RR、MC-YR、MC-LR),针对关键因素(淋洗剂、洗脱剂、HPLC流动相)进行不同水平考察,建立高效准确、安全实用的天然水样MCs测定方法,为常规检测优化和标准修订提供支撑。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

LC-2040C型高效液相色谱仪,日本岛津;AutoTrace 280型全自动固相萃取仪,Thermo Scientific;C₁₈固相萃取小柱(500 mg/3 mL),J&K Scientific;0.7 μm玻璃纤维滤膜,上海兴亚。

微囊藻毒素标准溶液:MC-LR(农业部)、MC-RR(坛墨)、MC-YR(美国ABR);甲醇(色谱纯),Thermo Fisher Scientific;三氟乙酸(TFA,色谱纯),TEDIA公司。

1.2 样品采集与前处理

采集天然水样,经玻璃纤维滤膜减压过滤,量取1 000 mL滤液置于棕色玻璃瓶中。若水样不能立即分析,则于-20℃保存,30 d内分析完毕。

用10 mL甲醇和10 mL纯水活化C₁₈固相萃取小柱。1 000 mL水样滤液以10 mL/min的流量均匀流经C₁₈固相萃取小柱进行富集,经淋洗、洗脱,在25℃下,用平行浓缩仪将洗脱溶液浓缩至近干,加入1.0 mL体积分数为70%的甲醇水溶液,涡旋混合1 min后转移至进样瓶,进行仪器分析。若不能立即分析,则于-20℃保存。

1.3 仪器条件

色谱柱为GL Sciences C₁₈(4.6 mm × 250 mm),流动相为体积分数为70%的甲醇水溶液(含0.1% TFA),流量1.0 mL/min,柱温35℃。紫外检测器(UVD),检测波长为238 nm,进样体积为10 μL。依据样品保留时间定性,峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 固相萃取淋洗剂选择

虽然淋洗剂中甲醇浓度越高,除杂效果越好,但可能引起MCs流失;而甲醇浓度低,洗下的杂质就有限。关于淋洗剂中甲醇的最佳比例,已有研究有3种结论:

(1)标准方法^[2,4-5]均使用体积分数为20%的甲醇水溶液。

(2)虽然部分研究推荐高浓度的甲醇,建议使用体积分数为30%^[8]、40%~45%的甲醇水溶液(含0.1% TFA)^[6],但当淋洗剂甲醇体积分数为50%时,MC-RR、MC-LR流失率分别为9.36%、11.17%^[14]。

(3)部分研究推荐低浓度的甲醇,认为体积分数为20%^[15]、30%^[16-17]的甲醇淋洗会造成MCs流失,宜用10%甲醇^[15],或10%甲醇+20%甲醇^[7],或5%、10%、15%的甲醇作梯度淋洗^[9]。

各研究结论迥异,可能是所使用的SPE小柱吸附性能存在差异。多项研究表明,含TFA的甲醇水溶液的淋洗效果更好^[6,8]。

试验设计5种淋洗剂配方进行比较。A1:10 mL体积分数为20%的甲醇水溶液;A2:10 mL体积分数为45%的甲醇水溶液(含0.1% TFA);A3:10 mL体积分数为10%的甲醇水溶液→10 mL体积分数为20%的甲醇水溶液;A4:10 mL体积分数为10%的甲醇水溶液(含0.1% TFA)→10 mL体积分数为20%的甲醇水溶液(含0.1% TFA);A5:10 mL体积分数为40%的甲醇水溶液(含0.1% TFA)。

用MCs标准溶液配制成0.500 mg/L的空白加标样品,按1.2所述处理,洗脱剂为10 mL甲醇(含0.1% TFA),在1.3条件下测定,考察5种淋洗剂的加标回收效果,见图1。

由图1可见,A2淋洗剂效果最佳,MC-LR、MC-RR、MC-YR的平均回收率分别为116%、106%、87%;A3次之,分别为87%、86%、94%;其余3组配方回收率均较低。综合考虑MC-RR、MC-YR、MC-LR的回收效果,兼顾试验便捷性,淋洗剂最优配方为A2。

2.2 固相萃取洗脱剂选择

虽然洗脱剂中甲醇浓度越高,洗脱效果越好,浓缩快,但可能引入更多杂质;而甲醇浓度低,引入杂质少,可能导致回收率低,且浓缩慢。关于洗脱剂中甲醇的最佳比例,研究已有2种结论:

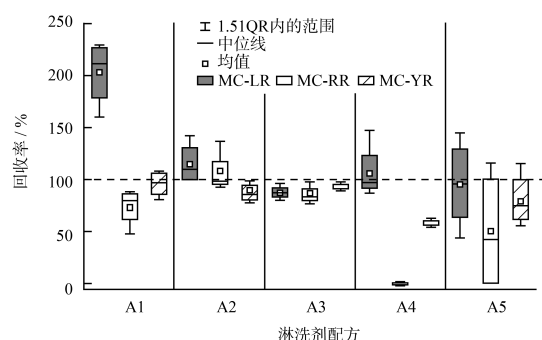


图1 不同淋洗剂的MCs加标回收效果

Fig. 1 Spiked recoveries of MCs with different kinds of leachate

(1) 标准方法^[2-5]均使用体积分数为100%的甲醇,其中3个标准的洗脱剂含TFA。

(2) 已有报道指出洗脱剂甲醇最佳体积分数为70%~100%不等:70%甲醇(含0.1% TFA)^[6,8]、75%甲醇^[14]、80%甲醇^[15,18]、90%甲醇(含0.1% TFA)^[19]、100%甲醇^[17]。不少研究认为,洗脱剂中加入TFA会提高回收率^[6,8]。

试验设计5种洗脱剂配方:B1为10 mL甲醇;B2为10 mL甲醇(含0.1% TFA);B3为先后用10 mL甲醇(含0.1% TFA)洗脱2次;B4为10 mL体积分数为90%的甲醇水溶液(含0.1% TFA);B5为10 mL体积分数为80%的甲醇水溶液(含0.1% TFA)。用MCs标准溶液配制成0.500 mg/L的空白加标样品,按1.2所述处理,淋洗剂为10 mL体积分数为45%的甲醇水溶液(含0.1% TFA),在1.3条件下测定,考察5种洗脱剂的加标回收效果,见图2。由图2可见,B2洗脱效果最佳,MC-LR、MC-RR、MC-YR的平均回收率分别为116%、106%、87%;其余4组配方回收率均较低。

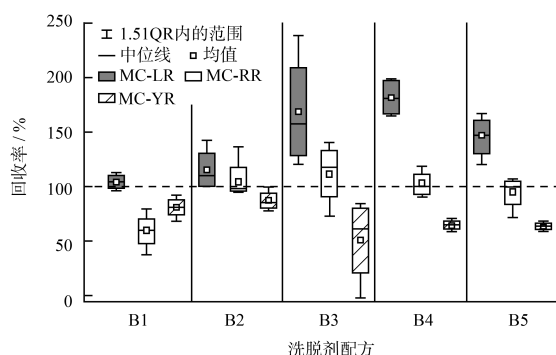


图2 不同洗脱剂的MCs加标回收效果

Fig. 2 Spiked recoveries of MCs with different eluents

故确定最优洗脱剂配方为B2。

2.3 HPLC 流动相比

HPLC 流动相主要有乙腈水溶液、甲醇水溶液、磷酸盐缓冲液3种。乙腈虽然灵敏度高、柱压低、便于梯度淋洗分析多种成分,但毒性大、成本高;甲醇毒性小、成本低,灵敏度略低,适合等梯度洗脱;磷酸盐缓冲液容易堵塞色谱柱。常规监测通常只要求分析1种或少数几种主要的MCs变体,等梯度洗脱因简单、可靠而更容易得到推广^[8],故试验选择甲醇为流动相。

甲醇流动相酸度的增大会改善MCs峰形,而MC-RR出峰过早易与杂质混合,且色谱柱耐酸能力也有限,故选择合适的酸度(0.1%的TFA),既能使MCs有较好的分离度和峰形,也能降低对色谱柱的损伤^[7-8]。虽然流动相里甲醇浓度高,出峰快,但易造成色谱峰重叠,尤其对早出峰的MC-RR干扰较大;而甲醇浓度低,出峰慢,MC-LR出峰较迟且峰形较差。

已有研究得出的甲醇最优体积分数为60%^[9,11-12]、62%^[8]、65%^[10]、70%^[10]不等,故试验设计4种流动相条件(甲醇体积分数为60%、62%、65%、70%,均含0.1% TFA),分别用于考察混合标准溶液(MC-RR、MC-YR、MC-LR均为2.00 mg/L)的出峰效果。结果表明,当甲醇体积分数为70%时,MC-RR、MC-YR、MC-LR仍分离完全(两两分离度为2.7、1.8),可在6 min内检测完毕(MC-LR出峰时间为5.512 min),继续提高甲醇比例很可能出现峰重叠。故确定HPLC流动相最佳条件为体积分数为70%的甲醇水溶液(含0.1% TFA)。

2.4 优化后的方法效能验证

用体积分数为70%的甲醇水溶液将MCs标准溶液临用前逐级稀释至0.200 mg/L、0.400 mg/L、0.600 mg/L、0.800 mg/L、2.00 mg/L,在1.3条件下测定,以质量浓度为横坐标,对应的峰面积响应值为纵坐标,绘制标准曲线。得到MC-RR、MC-YR、MC-LR回归方程分别为 $Y = 8.40 \times 10^3 X$ 、 $Y = 1.88 \times 10^4 X$ 、 $Y = 1.73 \times 10^4 X$,相关系数均 ≥ 0.999 ,方法检出限分别为0.064 $\mu\text{g/L}$ 、0.098 $\mu\text{g/L}$ 、0.095 $\mu\text{g/L}$ 。

对鄱阳湖实际水样做加标回收试验,用优化后的方法测定,并与4种标准方法作比对,结果见表1。MC-RR、MC-YR、MC-LR的加标回收率分

别为 106%、87.0%、116%，多次测定结果的 RSD 分别为 16.9%、18.8%、10.2%，表明优化后的方法灵敏度高，精密度与准确度高。由表 1 可知，与《生活饮用水标准检验方法 有机物指标》(GB/T 5750.8—2006)《水中微囊藻毒素的测定》(GB/T 20466—2006)《藻类产品中微囊藻毒素测定 高

效液相色谱法》(DB32/T 1481—2009)相比，优化后的方法测定 3 种目标物的检出限都更低，HPLC 检测耗时缩短至少一半。优化后的方法与《水质 甲萘威、溴氰菊酯、微囊藻毒素 - LR 的测定 高效液相色谱法》(SL 740—2016)相比，在 MC - LR 的检出限与 HPLC 检测耗时方面无优势。

表 1 优化方法与标准方法的比对

Table 1 Comparison results between optimized method and standard method

检测方法	固相萃取淋洗剂	固相萃取洗脱剂	HPLC 流动相	检出限 $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$			HPLC 检测耗时 t/min
				MC - RR	MC - YR	MC - LR	
优化后的方法	体积分数为 45% 的甲醇(含 0.1% TFA)	甲醇(含 0.1% TFA)	70% 甲醇(含 0.1% TFA)	0.064	0.098	0.095	6
文献[3]	二氯甲烷	甲醇(含 0.1% TFA)	40% 乙腈(含 0.1% TFA)			0.024 6	3
文献[4]	体积分数为 20% 的甲醇	甲醇(含 0.1% TFA)	57% 甲醇 + 磷酸盐缓冲液	0.1	0.1	0.1	12
文献[2]	体积分数为 20% 的甲醇	甲醇	38% 乙腈(含 0.04% TFA)	0.3		0.3	13
文献[5]	体积分数为 20% 的甲醇	甲醇(含 0.05% TFA)	55% 甲醇(含 0.05% TFA)	0.2		0.3	17.5

3 结语

对固相萃取 - 高效液相色谱法测定天然水中 3 种主要痕量微囊藻毒素 (MC - RR、MC - YR、MC - LR) 的关键因素进行优化,可在 6 min 内有效分离 3 种目标物,方法检出限分别为 0.064 $\mu\text{g/L}$ 、0.098 $\mu\text{g/L}$ 、0.095 $\mu\text{g/L}$,回收率分别为 106%、87.0%、116%。该方法提高了检测效率和准确度,降低了试验危害和成本,为常规检测优化和标准修订提供了科学依据,在实验室日常监测和应急环境监测领域具有一定的应用前景。

[参考文献]

[1] 邓方,万新军,王小东.富营养化水体中微囊藻毒素的检测方法研究进展[J].安徽农学通报,2013,19(16):19-21.

[2] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.生活饮用水标准检验方法 有机物指标:GB/T 5750.8—2006[S].北京:中国标准出版社,2006.

[3] 中华人民共和国水利部.水质 甲萘威、溴氰菊酯、微囊藻毒素 - LR 的测定 高效液相色谱法:SL 740—2016[S].北京:中国水利水电出版社,2016.

[4] 国家质量监督检验检疫总局.水中微囊藻毒素的测定:GB/T 20466—2006[S].北京:中国标准出版社,2006.

[5] 江苏省质量技术监督局.藻类产品中微囊藻毒素测定 高效液相色谱法:DB32/T 1481—2009[S].南京:江苏省质量技术监督局,2009.

[6] 刘碧波.微囊藻毒素的检测及其在水、沉积物和农田中的环境行为研究[D].武汉:中国科学院研究生院(水生生物研究所),2006.

[7] 张立将,尹立红,浦跃朴,等.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(3):446-451.

[8] 冯小刚.环境中微囊藻毒素的检测、提纯及其紫外光助催化降解的研究[D].南京:东南大学,2006.

[9] 李铮,杜克久,赵兴茹,等.高效液相色谱法测定天然水体中微囊藻毒素方法优化[J].环境化学,2012,31(4):545-551.

[10] 龚黎明.高效液相色谱法检测微囊藻毒素的条件优化及应用研究[J].资源信息与工程,2017,32(2):178-179.

[11] 刘畅.固相萃取 - 高效液相色谱法测定地表水中的微囊藻毒素 - LR 的方法优化[J].农业与技术,2021,41(5):23-25.

[12] 贾静,郑洋.地表水和饮用水中微囊藻毒素的测定相对国标方法的改进与优化研究[J].广东化工,2013,40(5):141-142.

[13] 杨芳.水体中 MC - LR 的高效液相色谱检测前处理条件优化[J].干旱环境监测,2016,30(4):145-150.

[14] 周世会,陈海龙,韩孟书,等.响应面法优化测定水体中微囊藻毒素[J].环境监测管理与技术,2021,33(1):43-46.

[15] 李莉,蔡金榜,赵志强,等.微囊藻毒素 3 种异构体的提取净化研究[J].安徽农业科学,2017,45(15):51-53.

[16] 赵永刚,胡冠九,章勇,等.固相萃取 - 高效液相色谱法测定地表水中微囊藻毒素[J].理化检验(化学分册),2008,44(12):1176-1178.

[17] 吴溶,崔莉凤,张冲,等.微囊藻毒素检测方法改进和圆明园实际水样的测定[J].北京工商大学学报(自然科学版),2010,28(1):24-29.

[18] 王良,陈翌,张青.提高固相萃取 - 高效液相色谱法测定水中微囊藻毒素回收率方法研究[J].当代化工研究,2020,62(9):145-146.

[19] 张玲玲.微囊藻毒素总量的快速检测方法研究[D].无锡:江南大学,2016.