

水体中微囊藻毒素和节球藻毒素的 UPLC-MSⁿ 分析方法研究

何海波¹, 时肖宁¹, 刘敏^{2*}

摘要: [目的] 针对水体中 3 种代表性的微囊藻毒素 (microcystin-RR, MC-RR; microcystin-YR, MC-YR; microcystin-LR, MC-LR) 和节球藻毒素 (nodularin, NOD), 建立一种快速、准确、可靠的痕量分析方法。[方法] 样品经 C₁₈ 固相萃取柱净化富集后, 采用超高效液相色谱-电喷雾串联三重四级杆质谱法 (ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS), 在多反应监测 (Multi reaction monitoring, MRM) 模式下进行检测, 采用基质匹配标准曲线法消除基质效应。[结果] 该方法加标回收率为 95.7%~115.0%, 精密度 (RSD) 范围为 2.43%~6.04%, 检测限可达 0.05~0.20 ng/L。将该方法应用于实际水样分析, 水体中 3 种微囊藻毒素和节球藻毒素含量低于检测限。[结论] 建立了水体中 3 种痕量微囊藻毒素和节球藻毒素的 UPLC-MS/MS 分析方法, 该方法可用于实际水样的检测。

关键词: 超高效液相色谱-电喷雾三重四级杆串联质谱; 多反应监测; 微囊藻毒素; 节球藻毒素; 基质匹配标准曲线法; 水

Analysis of Microcystins and Nodularin in Water by Ultra Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry HE Hai-bo¹, SHI Xiao-ning¹, LIU Min^{2*} (1. College of Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Bioassay and Safety Assessment Laboratory, Shanghai Academy of Public Measurement, Shanghai 200031, China). *Address correspondence to LIU Min; E-mail: sundy6670@163.com

Abstract: [Objective] To establish an analytical method for the determination of trace content of microcystins (MC-RR, MC-YR and MC-LR) and nodularin (NOD) in water sample. [Methods] After cleaned and enriched by solid phase extraction (SPE) using C₁₈, the water sample was determined by ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) in multi-reaction-monitoring mode. Matrix-matched standard curves were used to compensate the matrix effect. [Results] The recoveries were in range of 95.7%-115.0% with relative standard deviation (RSD) 2.43%-6.04%. The detection limits were 0.05-0.20 ng/L. [Conclusion] An analytical method for the determination trace microcystins and nodularin in water sample was established by UPLC-MS/MS. This method could be used to analyze local water samples.

Key Words: UPLC-MS/MS; multi-reaction-monitoring; microcystins; nodularin; matrix-matched standard curves; water

微囊藻毒素 (MCs) 和节球藻毒素 (NOD) 是淡水蓝绿藻产生的两大类肝毒素。MCs 具有环状七肽结构, 性质稳定, 有强肝脏毒性, 是肿瘤促进剂^[1]。目前已发现的微囊藻毒素多达 60 多种, 其中以 microcystin-RR (MC-RR)、microcystin-YR (MC-YR)、microcystin-LR (MC-LR) 最为常见, 且含量高, 毒性强, 世界卫生组织对饮用水所规定的 MC-LR 最高允许量为 1 μg/L^[2]。近年来, 我国也制定了相关的饮用水标准^[3], 规定微囊藻毒素的限量为 0.001 mg/L。NOD 具有与 MCs 相似的环状五肽结构, 毒性强, 不仅是肿瘤促进剂, 还是直接的致癌物质。

[基金项目] 上海市自然科学基金资助项目 (编号: 08ZR1416600)

[作者简介] 何海波 (1979-), 女, 博士, 讲师; 研究方向: 环境有机污染物; E-mail: lmmfw2868@163.com; 该研究工作在上海市检测中心完成。

[*通信作者] 刘敏博士; E-mail: sundy6670@163.com

[作者单位] 1. 上海大学理学院, 上海 200444; 2. 上海市检测中心生物与安全实验室, 上海 201203

迄今, 已报道的微藻毒素检测技术主要有生物检测法 (小鼠检测)、蛋白质磷酸酶的抑制分析^[4]、免疫检测法^[5]和化学检测^[6]等, 这些技术各具优缺点。其中高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法的最大优势在于能区分毒物的种类, 但常用的紫外检测灵敏度差, 易受干扰^[7], 近年来逐渐被液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 所取代^[8-10]。相关的研究报道大多来自国外, 基本利用液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS), 采用外标法进行定量分析。随着近几年来我国水体环境的恶化, 太湖、巢湖和滇池等相继爆发蓝藻, 严重威胁饮用水安全, 不少研究机构也陆续展开了相关工作, 虞锐鹏等^[11]用 HPLC-MS 检测了水中 MC-RR 和 MC-LR, 绝对检测限达 50 pg, 王静等^[8]用超高效液相色谱-电喷雾串联三重四级杆质谱 (UPLC-MS/MS) 建立了水体中 4 种微藻毒素的快速痕量分析方法。但国内对 NOD 的研究, 特别是对其定量分析方法的研究几乎是空白, 急需建立一种快速、灵敏、可靠的分析方法。

本研究拟利用 UPLC-MS/MS 建立一种可同时分析水体中痕量 MC-RR、MC-YR、MC-LR 和 NOD 4 种藻毒素的方法。参照欧盟的 2002/657/EC 标准, 选取 2 对离子定性, 确保该方法的准确可靠性, 并采用基质匹配标准曲线法消除基质效应, 从而实现对两大类藻毒素的快速、准确、痕量分析。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

UPLC-MS/MS 仪 (Waters, Acquity/Quattro Premier XE); Masslynx 4.1 工作站; BUCHI Syncore 自动固相萃取仪; 氮吹仪 (Organomation Associate); ENVI-18 固相萃取小柱 (500 mg, 5 mL)。甲醇 (Sigma, HPLC 级); 乙腈 (Sigma, HPLC 级)、甲酸和三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) 均为分析纯, 来自美国 Sigma 公司。水由 Millipore 纯水机制备; MC-RR、MC-YR、MC-LR 和 NOD 标样购自 Alexis 公司。

1.2 样品前处理

取 1 L 水样经 0.45 μm 滤膜过滤后, 以 4 mL/min 的速度上样至经甲醇和水活化的 ENVI-18 柱。依次用纯水 5 mL 和 10% (体积分数) 甲醇水溶液 5 mL 淋洗后, 用含 0.1% TFA 的甲醇溶液 8 mL 洗脱, 洗脱液在 40 °C 条件下氮气吹至 1 mL 定容, 经 0.22 μm 滤头过滤后, 进 UPLC-MS/MS 分析。

1.3 色谱条件

Waters 超高效液相色谱柱: Acquity UPLCTM BEH C18 柱 (填料粒径 1.7 μm, 色谱柱内径和长度 2.1 mm × 50 mm), 柱温为 40 °C; 流动相为 A: 水; B: 乙腈; A、B 均含 0.12% (体积分数) 甲酸。流速为 0.2 mL/min; 梯度洗脱程序为 B: 20%~35% (0~0.6 min); 35%~40% (0.6~3.5 min)。进样量: 10 μL。

1.4 质谱条件

电喷雾离子源: 正离子电离模式 (ESI⁺); 离子源温度: 120 °C; 脱溶剂气温度: 380 °C; 毛细管电压: 3.0 kV; 锥脱溶剂气流量: 650 L/h; 孔气流量: 50 L/h。多反应监测 (MRM) 模式下定量分析, 氦气流量: 0.24 mL/min; 母-子离子对、锥孔电压、碰撞能量及采集时间见表 1。

表 1 MRM 分析的质谱参数

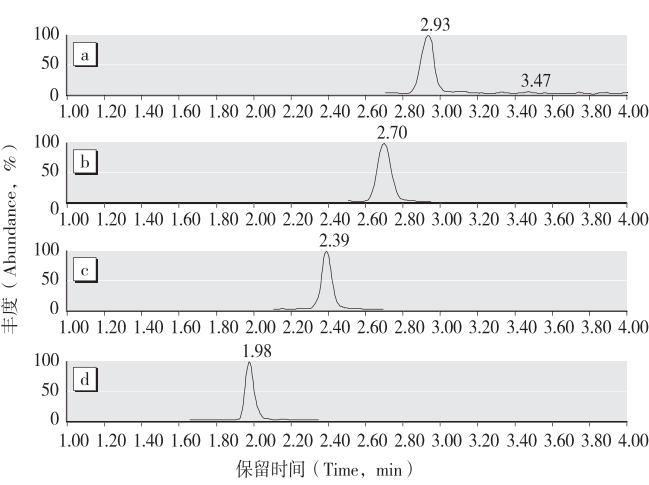
Table 1 Multi-reaction-monitoring conditions for detecting samples by tandem MS

藻毒素	离子对质荷比 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	采集时间 (min)
MCs and NOD	Transitions	Cone voltage	Collision energy	Retention window
MC-RR	519.8 > 135	42	32	1.65~2.35
	519.8 > 127		45	
NOD	825.3 > 135	75	58	2.1~2.7
	825.3 > 107.2		72	
MC-YR	1045.7 > 135	88	73	2.5~2.95
	1045.7 > 136		75	
MC-LR	995.7 > 135	80	75	2.7~3.5
	995.7 > 155		65	

2 结果

2.1 色谱与质谱条件

采用超高效液相色谱, 对 4 种藻毒素进行分离。图 1 为 10 μg/L 的标准品色谱图, 色谱峰从上到下依次为 MC-LR、MC-YR、NOD、MC-RR。



a: MC-LR; b: MC-YR; c: NOD; d: MC-RR

图 1 10 μg/L 的 MCs 和 NOD 标准品 MRM 色谱图

Figure 1 Chromatogram of MCs and NOD at 10 μg/L level

参照欧盟 2002/657/EC 标准用两个子离子对分析物进行定性 (表 1), 如图 2 所示, 质荷比 (m/z) 135 和 155 (结构为 [MdhA-Ala+H]⁺) 碎片都是 MC-LR 的特征碎片离子, 它们在二级质谱中的同时存在, 保证了 MC-LR 准确定性。其中, m/z 135 碎片是微囊藻毒素和节球藻毒素的典型碎片, 其结构为 [phenyl-CH₂-CH(OCH₃)]⁺, 丰度高, 用于定量。

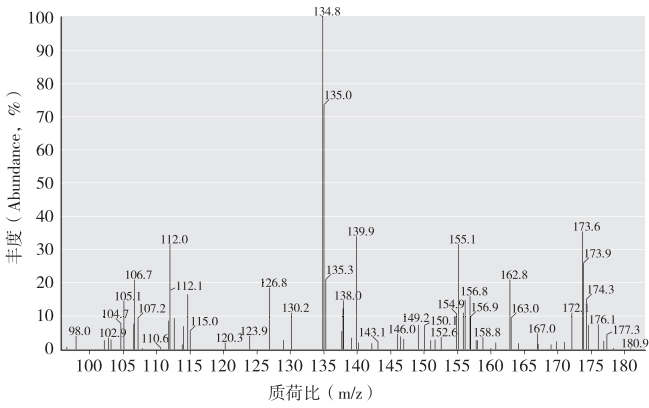


图 2 MC-LR 的二级质谱图

Figure 2 The secondary ions mass spectra of MC-LR

流动相中加入适量酸可提高被测物质的质子化效率, 从而提高分析灵敏度。分别向流动相中加入 0.1% 的甲酸和 0.1% 的乙酸, 比较其对分析灵敏度的影响, 结果表明, 甲酸稍优于乙酸。酸的加入量亦可对分析灵敏度产生影响, 本实验对比了流动相中甲酸含量 (体积分数分别为: 0.05%、0.08%、0.1%、0.12%、0.15% 和 0.2%) 对灵敏度的影响 (图 3)。结果表明, 除 MC-RR 外, 其他 3 种藻毒素的峰面积都随甲酸的量增加而增加。综合考虑, 选择加入 0.12% 甲酸。另外, 本研究还比较了甲醇和乙腈作为流动相 B 时, 对分离度和灵敏度的影响。实验表明, 乙腈作流动相在分离度和灵敏度上均优于甲醇。

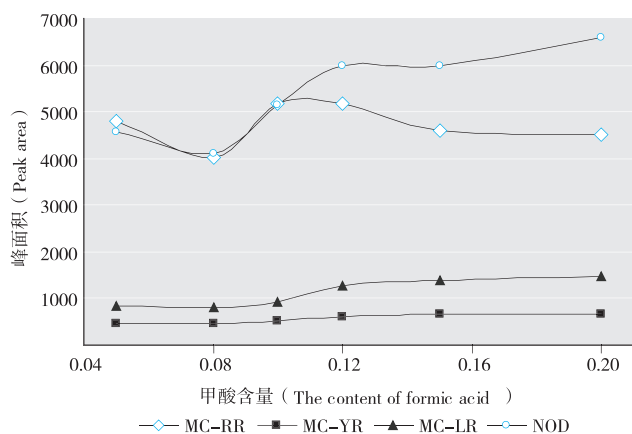


图3 流动相中甲酸含量对MCs和NOD灵敏度的影响

Figure 3 The effect of formic acid in mobile phase on sensitivity of MCs and NOD

2.2 样品的净化富集

由于实际水体中微囊藻毒素以及节球藻毒素的含量非常低,直接进样分析,低于仪器的检测限,无法检测,必须对水样进行富集。

采用疏水性 C_{18} 固相萃取柱,利用纯水对样品富集过程进行优化。实验发现,用纯甲醇洗脱 C_{18} SPE小柱时,MC-RR回收率比较低;用含0.1%TFA的甲醇作为洗脱液,可解决纯甲醇洗脱时回收率低的问题(图4)。另外,加入TFA后实验平行性也有所改善。

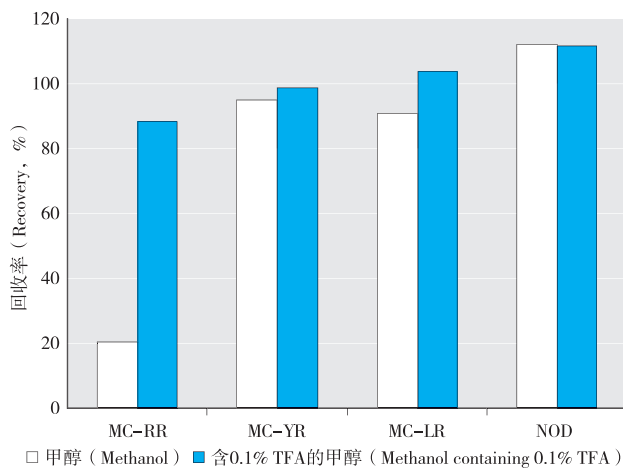


图4 洗脱液对MCs和NOD回收率的影响

Figure 4 Effect of eluent on recovery of MCs and NOD

2.3 基质匹配加标法分析实际水样

优化固相萃取程序后,将该程序应用于自来水和湖水,质谱响应明显高于纯水样品(图5)。采用基质匹配法绘制标准曲线,线性范围为1~1000 ng/L,相关系数大于0.995。将10 ng/L的混合标样1 mL加入1 L自来水中充分混匀,测定方法的回收率和精密度,见表2。回收率为95.7%~115.0%;批内精密度(RSD)为2.43%~6.04%;批间精密度(RSD)介于3.00%~6.43%之间。方法检测限为0.05~0.20 ng/L,定量限为0.10~0.50 ng/L。图6为典型的空白自来水样品和加标样品色谱图。

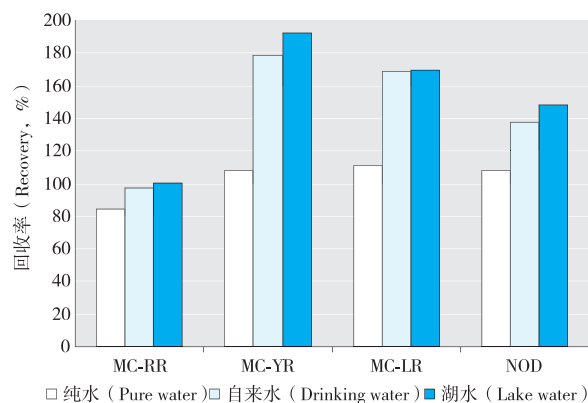


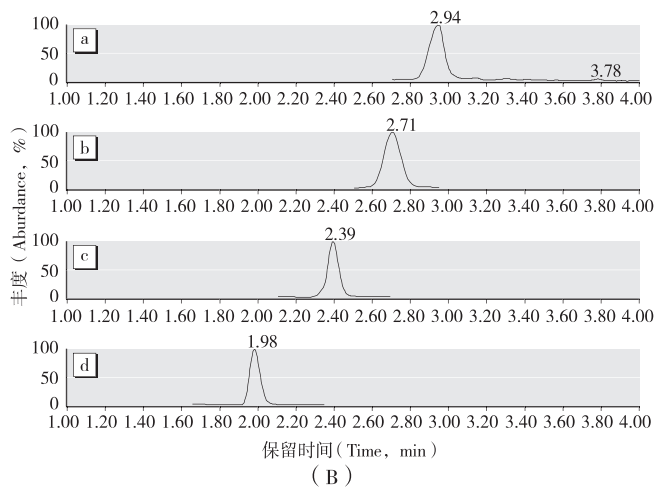
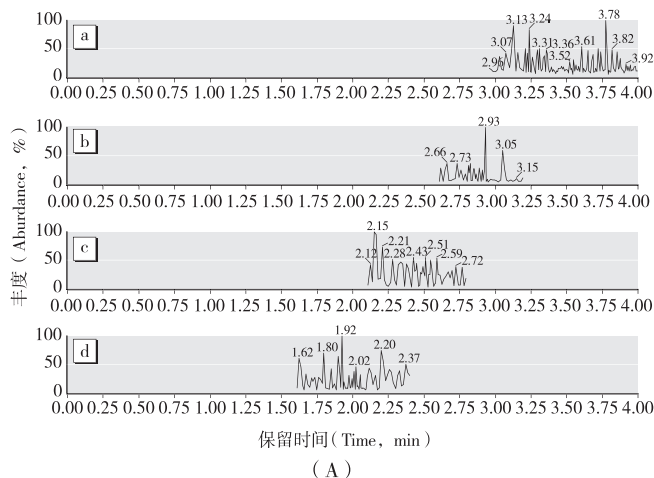
图5 3种水样的加标回收率对比

Figure 5 Comparison of Recoveries of three types of water sample

表2 MCs和NOD的加标回收率和精密度(%)

Table 2 Recoveries and precisions of MCs and NOD

藻毒素 MCs and NOD	回收率 Recoveries	批内RSD Within-run RSD	批间RSD Between-run RSD
MC-RR	95.7	6.04	6.43
NOD	115	2.43	3.53
MC-YR	112	2.98	3.00
MC-LR	107	3.55	3.68



a: MC-LR; b: MC-YR; c: NOD; d: MC-RR

图6 空白(A)及加标(B)水样色谱图

Figure 6 The chromatogram of blank (A) and spiked 10 ng/L MCs and NOD water (B)

2.4 实际水样的检测

实际检测水样为 2009 年 8 月份上海市自来水、上海市检测中心院内中心湖水和川杨河水各 4 份。结果表明,这 3 种水体中 MC-LR 的含量均在检测限以下,其他 3 种藻毒素含量也接近 MC-LR 的水平。

3 讨论

传统的 HPLC 法分离检测这 4 种藻毒素需 30 min 左右^[7],本项目采用超高效液相色谱(UPLC),利用快速分离柱,在 3 min 左右即可完成分离;大大提高了分析效率,节约试剂。

处理实际水样时,发现空白中的藻毒素含量远低于检测限,说明空白水样中不存在 MC-LR, MC-RR, MC-YR 和 NOD。纯水中加标回收率基本介于 80%~100% 之间,而对于自来水和湖水,除了 MC-RR 的回收率接近 100%,其余 3 种毒素的回收率,均大于 150%。即使用净化处理过的空白水样作溶剂来稀释标样,其质谱响应也远大于纯甲醇。而采用超纯水加标样品未发现此现象,这表明水样基质中的未知成分可能提高待测物在质谱中的质子化程度,从而使其表现出增强效应。为了消除基质效应的影响,采用基质匹配标准曲线法,将系列不同浓度的标样加入自来水中,经 C₁₈ 固相萃取,净化浓缩,定容,经 UPLC-MS/MS 分析,绘制标准曲线。结果表明,该方法有效地消除了基质效应,在 1~1 000 ng/L 的线性范围内,相关系数大于 0.995,具有良好的线性。经自来水和湖水回收率、精密度等测定,表明该方法具有很好的回收率和精密度。检测限达 0.05~0.20 ng/L,定量限为 0.10~0.50 ng/L。

WHO 以及我国饮用水标准规定^[2-3],MC-LR 的最大限量为 1 μg/L。该方法完全可以满足日常城市供水监测要求。在所分析的实际水样中,3 种微囊藻毒素和节球藻毒素的含量均低于 1 μg/L,说明以上水体是安全水体。后续本项目将进一步以该方法用于上海市饮用水源及居民饮用水分析。

2006 年,国家制定了国标(GB/T 20466—2006)水体中微囊藻毒素的测定^[12]。方法采用液相色谱分离,利用微囊藻毒素的紫外特征吸收峰 238 nm,经紫外检测器检测分析。与国标相比,本研究采用超高效液相色谱提高了分析速度。利用保留时间一致进行定性,由于实际样品基质复杂,水体中存在的杂质干扰待测物的定性。而利用质谱进行检测,参照欧盟 2002/657/EC 标准用两个子离子对分析物进行定性,准确度明显提高。同时质谱的灵敏度较紫外检测器提高 1~2 个数量级,对于痕量分析,可以减少所需富集的样品量,从而减少样品的富集时间。

此外,国标只用于测定水体中微囊藻毒素 MC-LR、MC-

RR、MC-YR。关于节球藻毒素的分析,目前还是空白,更没有相关的检测标准和限量标准,因而本方法的研究结果为相关标准的制定提供了基础依据。

参考文献:

- [1] OKA H, IWAYA M, HARADA K, et al. Recycling foam countercurrent chromatography[J]. Anal Chem, 2000, 72(7): 1490-1494.
- [2] WHO. Guidelines for drinking-water quality-second edition-volume2-health criteria and other supporting information-Addendum[R]. Geneva: WHO, 1998.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5749—2006 生活饮用水卫生标准[S].北京: 中国标准出版社, 2006.
- [4] ROBILLOT C, HENNION MC. Issues arising when interpreting the results of the protein phosphatase 2A inhibition assay for the monitoring of microcystins[J]. Anal Chim Acta, 2004, 512: 339-346.
- [5] MOUNTFORT DO, SUZUKI T, TRUMAN P. Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels[J]. Toxicon, 2001, 39(2/3): 383-390.
- [6] 郑雪琴, 苑宝玲, 邢核, 等. 高效液相色谱法测定蓝绿藻中微囊藻毒素[J]. 理化检验—化学分册, 2005, 41(2): 104-106.
- [7] MAIZELS M, BUDDE WL. A LC/MS method for the determination of cyanobacteria toxins in water[J]. Anal Chem, 2004, 76(5): 1342-1351.
- [8] 王静, 庞晓露, 刘铮铮, 等. 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, 24(4): 335-338.
- [9] ALLIS O, DAUPHARD J, HAMILTON B, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry application, for the determination of extracellular hepatotoxins in Irish lake and drinking waters[J]. Anal Chem, 2007, 79(9): 3436-3447.
- [10] HOWARD KL, BOYER GL. Quantitative analysis of cyanobacterial toxins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2007, 79(15): 5980-5986.
- [11] 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.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 20466—2006 水中微囊藻毒素的测定[S].北京: 中国标准出版社, 2006.

(收稿日期: 2010-01-20)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 徐新春)