

三通道自动固相萃取-高效液相色谱四极杆串联质谱法检测水中 8 种痕量微囊藻毒素

李献刚, 李 芳*, 贾文静, 沈致淳, 张学梅

(东港海关综合技术服务中心, 国家级农兽药残留及海洋生物毒素检测重点实验室, 东港 118300)

摘要: **目的** 建立三通道自动固相萃取-高效液相色谱-四极杆串联质谱法检测水中痕量的 8 种微囊藻毒素的分析方法。**方法** 采用高自动化的前处理设备, 采用 C₁₈ 固相萃取小柱富集浓缩, 应用液相色谱-四极杆串联质谱法定性定量地检测 8 种微囊藻毒素。**结果** 该方法检测水中的 8 种微囊藻毒素检出限为 0.01~0.6 μg/L, 在 0.25~62.5 μg/L 的线性范围中, 线性相关系数大于 0.99。**结论** 该方法自动化程度高、灵敏度高、定性定量准确、测定浓度范围广。

关键词: 三通道自动固相萃取; 微囊藻毒素; 高效液相色谱-四极杆串联质谱法

Determination of 8 microcystins in the water by tri-channel automatic solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-quadrupole tandem mass spectrometry

LI Xian-Gang, LI Fang*, JIA Wen-Jing, SHEN Zhi-Chun, ZHANG Xue-Mei

(Integrated Technical Service Center of Donggang Customs, National Level Key Laboratory of Veterinary Drug, Pesticide Residue & Marine Life's Toxin Detection, Donggang 118300, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of 8 microcystins in water by tri-channel automatic solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-quadrupole tandem mass spectrometry. **Methods** The highly automated pre-processing equipment was adopted, the C₁₈ solid phase extraction column was used for enrichment and concentration, and 8 microcystins were quantitatively and qualitatively determined by liquid chromatography-quadrupole tandem mass spectrometry. **Results** The limits of detection 8 microcystins in water by this method were 0.01–0.6 g/L. The linear correlation coefficient is greater than 0.99 in the linear range of 0.25–62.5 g/L. **Conclusion** This method has high automatization, high sensitivity, accurate qualitative and quantitative determination and wide concentration determination range.

KEY WORDS: three-channel automatic solid phase extraction; microcystins; high performance liquid chromatography-quadrupole tandem mass spectrometry

*通信作者: 李芳, 硕士, 主要研究方向为分析检测和方法研发。E-mail: fanglee_4125@163.com

*Corresponding author: LI Fang, Master, Integrated Technical Service Center of Donggang Customs, National Level Key Laboratory of Veterinary Drug, Pesticide Residue & Marine Life's Toxin Detection, Donggang 118300, China. E-mail: fanglee_4125@163.com

0 引言

随着社会经济的发展, 工业废水、生活污水及农田径流将大量的氮、磷带入到水体中富集, 导致水体富营养化。在合适的温度等环境因素的影响下, 水体中蓝藻大量生长, 形成了肉眼可见的蓝藻水华, 给水体生态环境造成了不利影响, 产生了巨大的经济损失, 并直接或间接地影响了人类健康, 已成为全世界普遍存在的主要环境问题之一^[1]。微囊藻毒素(microcystins, MCs)属于蓝藻死亡过程中释放的次级代谢物, 在蓝藻水华污染中出现频率最高, 产生量最大, 并且可能造成危害最严重的藻毒素^[2]。我国早在 20 世纪 60 年代太湖发现有蓝藻水华出现^[3]。除了云南滇池、江苏太湖和安徽巢湖 3 大淡水湖泊已发生严重的蓝藻水华污染外^[4-6], 长江、黄河中下游的很多湖泊和水库中也相继发生了不同程度的蓝藻水华^[7-9]。

由于微囊藻毒素是水体富营养化产生的一类毒素, 所以标准品的提取纯化有一定困难的, 纯度较高的标准品更不易得到, 现微囊藻毒素已发现的同分异构体有 65 种, 已经可以分离纯化的到的商品化标准品仅有 10 种。目前常用的微囊藻毒素检测方法有酶联免疫法、荧光定量法、高效液相色谱法、高效液相色谱串联质谱法等^[10-13]。其中高相液相色谱串联质谱法应用范围较广, 准确性较高, 为当下较为常用的方法。本研究采用高自动化的前处理设备和高灵敏度的检测设备, 建立三通道自动固相萃取仪-高效液相色谱-串联四极杆质谱法检测 8 种微囊藻毒素, 以期对相关检测部门提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

C₁₈ 固相萃取小柱(6 mL, 500 mg, 美 Agilent 公司); 0.45 μm 有机滤膜(美国 Agilent 公司); 微囊藻毒素-LR、微囊藻毒素-RR、微囊藻毒素-YR、微囊藻毒素-LA、微囊藻毒素-LY、微囊藻毒素-LW、微囊藻毒素-LF、微囊藻毒素-WR 标准品(纯度>95%, 北京伊普瑞斯公司); 乙腈(色谱级, 美国赛默飞世尔公司); 甲酸(色谱纯, 中国阿尔法公司); 甲醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 所有用水均为密理博(美国 Milli-Q)超纯水。

1.2 仪器与设备

6410B 液相色谱-四极杆串联质谱仪(美国安捷伦公司); Acce CLEAN 三通道自动固相萃取仪(德国 LC-tech 公司); 超纯水机(美国密理博 Milli-Q 公司)。

1.3 试样制备

1.3.1 水样预处理

采集的水样先用 500 目的不锈钢筛过滤, 去除水样中

大部分浮游生物和悬浮物, 过滤后的水样在经 0.45 μm 水样滤膜, 滤液不少于 100 mL, 置于棕色瓶中待检测。

1.3.2 水样的富集浓缩

本研究水样的富集使用 LC-tech 公司的 Acce CLEAN 三通道自动萃取仪将 20 mL 水样过 C₁₈ 固相萃取小柱, 三通道自动固相萃取仪参数设置如下: 通道 2 为甲醇, 通道 3 为水, 通道 4 为 10% 甲醇水, 通道 6 为 0.1% 甲酸甲醇, 具体过程见表 1。

表 1 三通道自动固相萃取仪参数设置
Table 1 Parameters of tri-channel automatic solid-phase extraction

	通道	体积/mL	n/次数	时间/s	速度/(mL/min)
condition	2	5	2	60	2
condition	3	5	2	60	2
load	0	5	4	60	2
wash	4	4	1	60	2
清洗	6	5	2	30	1

得到的 10 mL 0.1% 甲酸甲醇洗脱液, 在 40 °C 下氮气吹干, 用 50% 乙腈水定容至 1 mL, 过 0.45 μm 有机滤膜, 待上机检测。

1.4 测定方法

1.4.1 色谱条件

Agilent 色谱柱为 Sq-C₁₈, (4.6 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温箱温度为 25 °C; 流速为 0.2 mL/min; 样量为 20 μL, 利用外标法定量。流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 的甲酸水, 梯度洗脱, 见表 2。

表 2 流动相梯度洗脱
Table 2 Parameters for procedure gradient elution

时间/min	A/%	B/%
0	20	80
8	50	50
10	100	0
12	100	0
20	20	80

1.4.2 质谱条件

质谱分析条件为采用 ESI 离子源, 正离子模式扫描, 干燥器温度为 350 °C, 干燥器流速为 8 L/min, 喷雾器压力为 38.0 psi, 毛细管电压为 4000 V, 锥孔电压、碰撞能量及定性和定量离子对等质谱参数见表 3。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的选择及8种微囊藻毒素的MRM色谱图

由于微囊藻毒素为环状七肽的化合物,在电喷雾离子化源中容易形成多电荷离子 $[M+nH]^{n+}$,这8种微囊藻毒素中存在具有这种性质的物质^[14]。通过全扫描

图谱的比较,可以看出,MC-RR $[M+2H]^{2+}$ 分子母离子的灵敏度相对较高,而且可以产生稳定明显的碎片离子,所以该化合物选用 $[M+2H]/2$ 为母离子。利用 $[M+2H]/2$ 的母离子520,得到稳定明显的碎片离子,其余7种微囊藻毒素在 $[M+1H]^+$ 下就可以得到稳定的碎片离子并且具有较高的灵敏度。图1为8种微囊藻毒素的MRM色谱图。

表3 8种微囊藻毒素的质谱测定参数
Table 3 Mass parameters of 8 microcystins

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间/ms	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
微囊藻毒素-LR	995.6	213 135	200	130 130	70 70
微囊藻毒素-RR	520	135 213	200	140 140	40 40
微囊藻毒素-YR	1045.5	135 213	200	150 150	70 70
微囊藻毒素-LA	910.5	135 213	200	140 140	70 50
微囊藻毒素-LY	1002.5	135 213	200	150 150	80 70
微囊藻毒素-LW	1025.5	135 213	200	160 160	70 60
微囊藻毒素-LF	986.5	852.4 135	200	140 140	20 70
微囊藻毒素-WR	1068.5	135 213	200	160 160	70 70

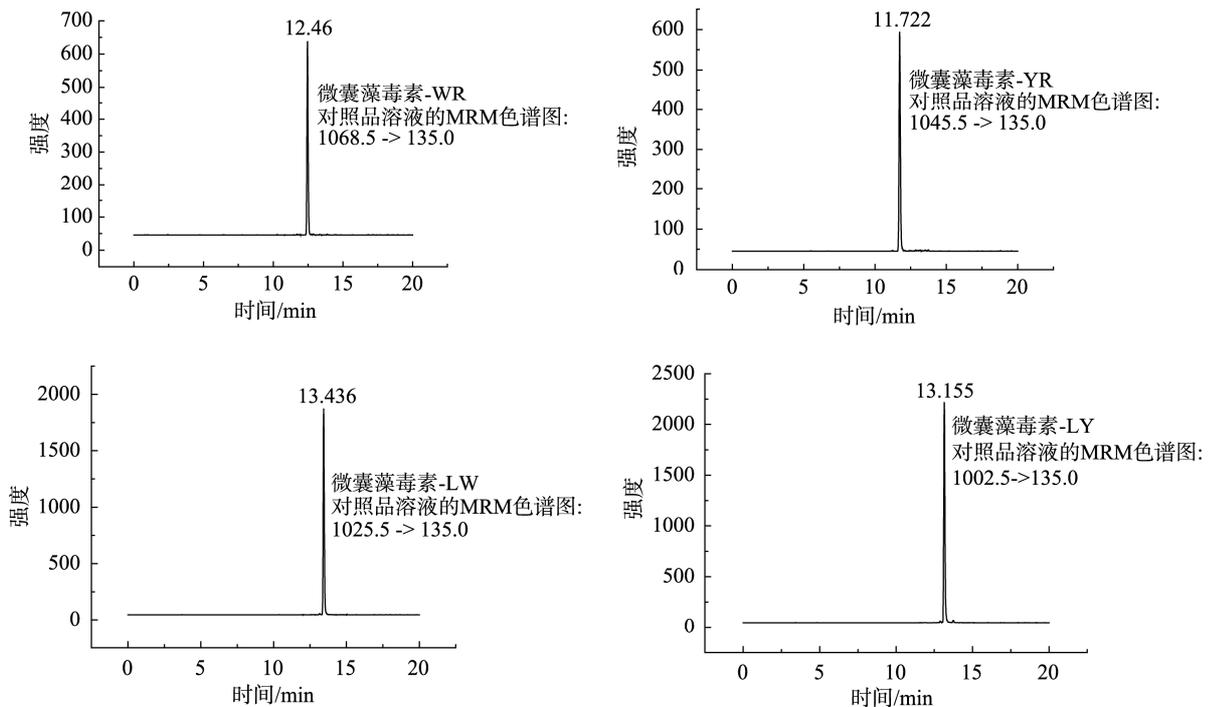


图1 8种微囊藻毒素的对照品溶液的MRM色谱图

Fig.1 MRM Chromatograms of 8 microcystins standard solution

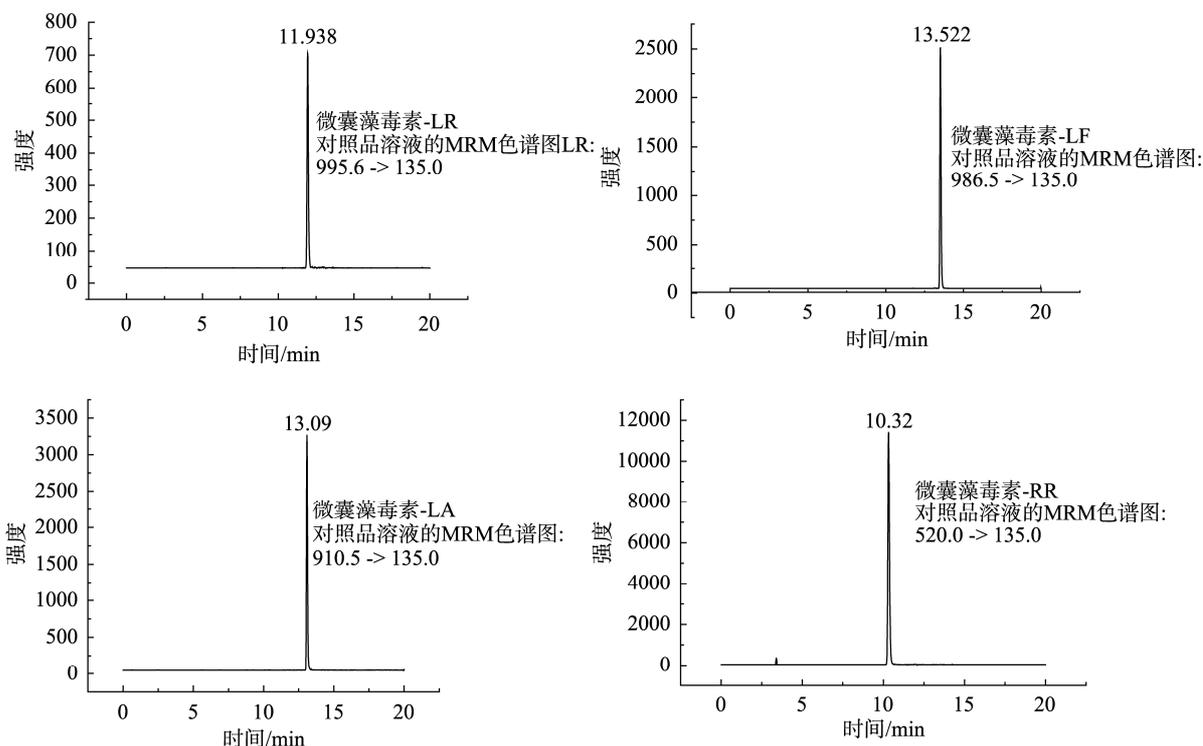


图 1(续) 8 种微囊藻毒素的对照品溶液的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM Chromatograms of 8 microcystins standard solution

2.2 固相萃取条件的优化

分别选择 C_{18} 柱、HLB 柱固相萃取柱为实验对象, 2 种固相萃取柱均可满足水样的富集和洗脱, 比较吸附洗脱效果, C_{18} 固相萃取小柱能得到更好的回收率, 回收率可达 65% 以上, 故本研究选择 C_{18} 固相萃取小柱。在淋洗时考查了水、10% 甲醇水溶液、20% 甲醇水溶液、30% 甲醇水溶液、50% 甲醇水溶液, 结果发现当甲醇含量超过 10%, 回收率有所下降, 较水与 10% 甲醇水溶液相比, 10% 甲醇水有一定的净化效果, 可以减少基质干扰, 故选择 10% 甲醇水溶液为淋洗液。考查洗脱液时选择 50% 甲醇水溶液、80% 甲醇水溶液、90% 甲醇水溶液及纯甲醇, 甲醇含量大于 80% 时才能将 8 种微囊藻毒素全部洗脱, 选择纯甲醇有利于减少氮吹时间, 避免氮吹时间过长造成的损失。

2.3 方法检出限、回收率、校正曲线及线性关系

应用质谱作为检测器, 考虑基质效应的影响, 基质

效应可以导致目标化合物发生离子增强或抑制, 故选择以空白样品的基质溶液作为溶剂配制标准曲线范围为 0.25~62.5 $\mu\text{g/L}$ 可以得到良好的线性关系, 线性相关系数均大于 0.99。方法检出限、线性相关系数、回收率及校正曲线见表 4。当添加浓度为 0.625 $\mu\text{g/L}$ 时, 回收率均可达到 64% 以上, 图 2 为 8 种微囊藻毒素混合的 MRM 色谱图。

3 结论

本研究建立了三通道自动固相萃取仪-高效液相色谱串联四极杆质谱法检测水中 8 种微囊藻毒素的方法, 利用三通道自动固相萃取仪可以到达自动化的目的, 同时可以增加前处理的重复性及稳定性, 使该方法具有稳定的提取浓缩过程; 使用高效液相色谱串联四极杆质谱作为检测手段, 以保留时间及特征离子对定性定量, 提高了方法的准确性。

表 4 方法检出限、回收率、校正曲线及线性关系

Table 4 Limits of detection, recoveries, regressions and correlation coefficients

化合物名称	检出限/ $(\mu\text{g/L})$	添加浓度/ $(\mu\text{g/L})$	回收率/%	校正曲线	相关系数
微囊藻毒素-LR	0.6	0.625	78.9	$Y=15.5174X-3.0938$	0.9958
		1.25	83.8		
微囊藻毒素-RR	0.1	0.625	64.6	$Y=276.7186X+36.1801$	0.9971
		1.25	66.2		

表 4(续)

化合物名称	检出限/($\mu\text{g/L}$)	添加浓度/($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	校正曲线	相关系数
微囊藻毒素-YR	0.6	0.625	84.3	$Y=12.5995X-0.5875$	0.9948
		1.25	89.0		
微囊藻毒素-LA	0.06	0.625	68.8	$Y=154.8518X-21.2059$	0.9994
		1.25	74.0		
微囊藻毒素-LY	0.06	0.625	68.5	$Y=102.9790X-26.0331$	0.9997
		1.25	69.1		
微囊藻毒素-LW	0.03	0.625	84.6	$Y=116.9492X-28.7807$	0.9991
		1.25	85.0		
微囊藻毒素-LF	0.01	0.625	69.6	$Y=134.4392X-2.0485$	0.9996
		1.25	74.7		
微囊藻毒素-WR	0.3	0.625	85.5	$Y=23.7765X-113.9905$	0.9918
		1.25	85.4		

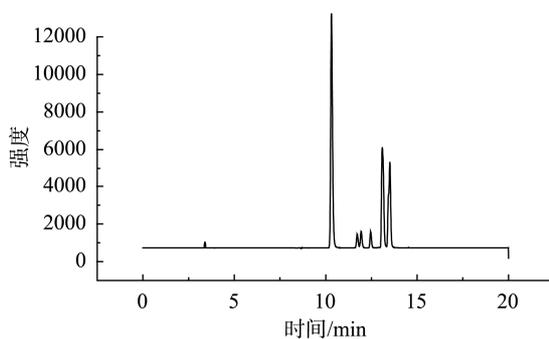


图 2 8 种微囊藻毒素的总离子流图

Fig.2 Total ion current chromatogram of 8 microcystins

参考文献

- [1] 邓莎, 周键. 蓝藻水华的危害及主要控制技术研究进展[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(18): 150-151.
DENG S, ZHOU J. Research advances in the harm of *Cyanobacteria* bloom and its main control technology [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2020, 26(18): 150-151.
- [2] DUYN N, LAM PKS, SHAW GR. Toxicology and risk assessment of fresh water *Cyanobacterial (Blue-green algae)* toxins in water [J]. Rev Environ Contam Toxicol, 2000, 163: 113-186.
- [3] MICHALAK AM, ANDERSON EJ, BELETSKY D, *et al.* Record-setting algal bloom in Lake Erie caused by agricultural and meteorological trends consistent with expected future conditions [J]. P Nat Acad United States Am, 2013, 110(16): 6448-6452.
- [4] 郭雅欣, 钱宗耀, 龚婷婷, 等. 太湖贝类中微囊藻毒素的测定与健康风险评估[J]. 环境化学, 2020, 36(10): 1-8.
GUO YX, QIAN ZY, GONG TT, *et al.* Determination and health risk assessment of microcystins in shellfish from lake Taihu [J]. Environ Chem, 2020, 39(10): 1-8.
- [5] 刘玉珊, 汪洋, 李春筱, 等. 云南滇池海埂水域产毒蓝藻产毒基因的多样性研究[J]. 生态与农村环境学报, 2019, 35(9): 1219-1224.
LIU YS, WANG Y, LI CX, *et al.* Study on the diversity of toxigenic *Cyanobacteria* in dianchi lagrange of Yunnan province [J]. J Ecol Rural Environ, 2019, 35(9): 1219-1224.
- [6] 张民, 史小丽, 阳振, 等. 2012—2018 年巢湖水质变化趋势分析和蓝藻防控建议[J]. 湖泊科学, 2020, 32(1): 11-20.
ZHANG M, SHI XL, YANG Z, *et al.* The variation of water quality from 2012 to 2018 in Lake Chaohu and the mitigating strategy on *Cyanobacterial blooms* [J]. J Lake Sci, 2020, 32(1): 11-20.
- [7] 杨桂山. 长江水问题基本态势及其形成原因与防控策略[J]. 长江流域资源与环境, 2012, 21(7): 821-830.
YANG GS. Water issues in the Yangtze river and its formation cause and controlling strategies [J]. Res Environ Yangtze Basin, 2012, 21(7): 821-830.
- [8] 孟玉珍, 张丁, 王兴国, 等. 郑州市水源水藻类和藻类毒素污染调查[J]. 卫生研究, 1999, 2: 100-101.
MENG YZ, ZHANG D, WANG XG, *et al.* Investigation of algal and algal toxin pollution in water sources in Zhengzhou [J]. Health Res, 1999, 2: 100-101.
- [9] 刘元波, 陈伟明, 范成新, 等. 太湖梅梁湾藻类生态模拟与蓝藻水华治理对策分析[J]. 湖泊科学, 1998, 10(4): 53-60.
LIU YB, CHEN WM, FAN CX, *et al.* Ecological simulation of blue algal bloom in Meiliang bay, Taihu lake and analysis of its harness strategies [J]. J Lake Sci, 1998, 10(4): 53-60.
- [10] 李秀娟. 水产品中微囊藻毒素 ELISA 和 LC/MS/MS 检测[J]. 福建分析测试, 2020, 29(1): 40-45.
LI XJ. ELISA and LC/MS/MS Methods applied for detection on microcystin in aquatic products [J]. Fujian Anal Test, 2020, 29(1): 40-45.
- [11] 陈蕾. 应用实时荧光定量 PCR 方法检测水库水体中微囊藻毒素[J]. 净水技术, 2020, 39(s1): 33-37.
CHEN L. Detection of microcystin of reservoir by real-time fluorescence quantitative PCR [J]. Water Purificat Technol, 2020, 39(s1): 33-37.
- [12] 蒋瑶, 杨卫花, 赵浩军, 等. 高效液相色谱法测定湖水中的微囊藻毒素[J]. 云南化工, 2018, 45(2): 66-68.

JIANG Y, YANG WH, ZHAO HJ, *et al.* Determination of microcystin in lake water by HPLC [J]. Yunnan Chem Technol, 2018, 45(2): 66-68.

2012, 28(9): 1243-1247.

(责任编辑: 王 欣)

- [13] 李芳, 王颖, 李献刚, 等. 液相色谱-三重四极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.

作者简介

LI F, WANG Y, LI XG, *et al.* Determination of microcystin-LR in water by high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(20): 5423-5427.

李献刚, 主要研究方向为分析检测。
E-mail: lixiangang07@126.com

- [14] 陈立坚, 何敏恒, 李秀英, 等. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中 7 种微囊藻毒素[J]. 现代食品科技, 2012, 28(9): 1243-1247.

李 芳, 硕士, 主要研究方向为分析检测和方法研发。

CHEN LJ, HE MH, LI XY, *et al.* Simultaneous determination of seven microcystins in aquatic product by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Mod Food Sci Technol,

E-mail: fanglee_4125@163.com



“生物毒素研究”专题征稿函

随着社会经济的发展, 人民越来越关注食品的安全问题。在日常生活中, 食物中毒事件时有发生。在食品安全事件中, 生物毒素中毒事件占一定比例。生物毒素是生物体内所产生的有毒代谢产物, 包括微生物毒素、植物毒素、动物毒素和海洋毒素。生物毒素不仅对消费者的健康造成危害, 还会对养殖业、种植业、畜牧水产业等行业造成巨大的经济损失。因此, 关注食品中生物毒素的安全, 是一项具有重大经济意义和科学意义的事情。

鉴于此, 本刊特别策划“生物毒素研究”专题。专题将围绕生物毒素的产生与调控机制、生物毒素的快速检测与筛查技术、生物毒素的脱毒方法与机制、生物毒素的毒理研究与风险评估、生物毒素的标准物质研发、生物毒素型药物的开发研究等问题展开讨论, 计划在 2021 年 3~4 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部全体成员特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2021 年 1 月 31 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**生物毒素研究**):

网站: www.chinafoodj.com(备注投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: **生物毒素研究**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: **生物毒素研究**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部