

分析与监测

液相色谱/串联质谱法检测水中微囊藻毒素

王 刚¹, 周彩云¹, 倪先哲¹, 桂 波², 姚维昊³

(1. 吴江华衍水务有限公司 水质检测中心, 江苏 吴江 215200; 2. 同济大学 环境科学与工程学院, 上海 200092; 3. 常州大学 环境与安全工程学院, 江苏 常州 213164)

摘 要: 采用超高效液相色谱/串联质谱法检测水体中痕量微囊藻毒素(MCYST)。固相萃取富集、多反应监测(MRM)定性定量分析法检测 MCYST-LR、RR、YR 的平均回收率分别为 92.8%、96.3%、94.8%, 相对标准偏差分别为 3.1%、2.5%、2.8%, 经方法学验证, 该方法对 MCYST-LR、RR、YR 的最低检出限分别为 0.015、0.05、0.1 $\mu\text{g/L}$ (进样量为 10 μL), 最低定量限分别为 0.05、0.17、0.33 $\mu\text{g/L}$ 。在 0.5~300 $\mu\text{g/L}$ 的线性范围中, 相关系数 $r^2 > 0.999$ 。采用该方法检测实际样品快速、准确、灵敏度高且操作简单。对东太湖天然水体水样的检测表明, MCYST-LR 检出浓度较高, MCYST-RR 次之, 各采样点 MCYST-YR 均未检出, 同时对比检测了常规工艺及深度处理工艺出水水样, 结果表明常规工艺只能除去水中 46.77% 的微囊藻毒素, 臭氧-活性炭深度处理工艺对微囊藻毒素的去除率可达 97.13%。

关键词: 微囊藻毒素; 固相萃取; 超高效液相色谱/串联质谱

中图分类号: TU991 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-4602(2019)04-0113-05

Determination of Trace Microcystins in Water by Solid-phase Extraction and UPLC-MS/MS

WANG Gang¹, ZHOU Cai-yun¹, NI Xian-zhe¹, GUI Bo², YAO Wei-hao³

(1. Water Quality Testing Center, Wujiang Huayan Water Co. Ltd., Wujiang 215200, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 3. School of Environmental & Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: A test method of microcystin in the water using the solid-phase extraction and enrichment combined with multi reaction monitoring (MRM) was introduced. The average recovery rates of this method about MCYST-LR, RR, YR were respectively 92.8%, 96.3% and 94.8%, while RSD of them were respectively 3.1%, 2.5%, 2.8%. Through the methodological verification, limit of detections of these three matters were 0.015, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/L}$ (when the sampling quantity was 10 μL) and limit of quantities of them were 0.05, 0.17 and 0.33 $\mu\text{g/L}$ respectively. In the linear range from 0.5 $\mu\text{g/L}$ to 300 $\mu\text{g/L}$, correlation coefficient (r^2) of this method was greater than 0.999. This method was rapid, accurate, sensitive and easy to operate. The test result of the actual sample of Eastern Taihu Lake indicated that the detection concentration of MCYST-LR was higher, that of MCYST-RR took second place, the MCYST-YR of all the sampling spots were not found. Comparison of conventional process and O_3 -BAC process was conducted. Conventional process removed 46.77% of microcystin while the removal rate of microcystin on O_3 -BAC process was up to 97.13%.

Key words: microcystins; solid-phase extraction; UPLC-MS/MS

随着工业的快速发展,社会对环境造成的污染越来越严重,水源地水质富营养化现象持续加剧,近年来随着原水蓝藻的不断暴发^[1],富营养化水体的藻毒素污染已成为密切关注的话题。

微囊藻毒素 Microcystins (MCYST) 是由蓝藻水华,如固氮的鱼腥藻 (*Anabaena*)、拟柱胞藻 (*Clindrospermopsis*)、束丝藻 (*Aphanizomenon*)、胶刺藻 (*Gloeotrichia*) 和节球藻 (*Nodularia*),非固氮的微囊藻 (*Microcystis*)、颤藻 (*Oscillatoria*) 和鞘丝藻 (*Lyngbya*) 等暴发所产生的一种肝毒素,它对蛋白磷酸酶 1 和蛋白磷酸酶 2A 具有抑制作用,属于细胞内毒素,该毒素摄入人体后,会提升肝癌的发病率,同时会出现腹泻、乏力、厌食、呕吐、嗜睡、口眼分泌物增多等症状,甚至死亡^[2-4]。该毒素可以通过细胞膜的渗透作用或者细胞膜破裂后溶解在水中,其中蓝藻产生的微囊藻毒素 (MCYST) 是湖泊等淡水富营养化水体藻毒素的主要种类,蓝藻暴发时水体中会产生大量藻毒素,被人体饮用后,会给健康带来巨大危害^[5-8]。

自 1959 年 Bishop 首次分离出藻毒素后,不断有相关报道,美国、日本、澳大利亚、印度、加拿大、芬兰等 10 多个国家都曾报道了其湖泊、水库中有毒水华的形成,并分离出有毒藻株。我国东湖、巢湖、太湖、滇池、淀山湖、黄浦江等饮用水水源及各种湖泊在夏秋季节藻类水华严重,每年长达 7~8 个月,而天然水体蓝藻水华 80% 是产毒的。近年研究显示我国太湖、巢湖、滇池已出现严重污染,长江、黄河中下游许多湖泊也检测出微囊藻毒素^[9]。

目前,我国卫生部发布的《生活饮用水标准检测方法 有机物指标》(GB/T 5750.8—2006) 中规定采用高效液相色谱法配二极管阵列检测器检测饮用水及水源水中微囊藻毒素 (MCYST-LR, RR); 国家质量监督检验检疫总局发布的标准《水中微囊藻毒素的测定》(GB/T 20466—2006) 中规定用高效液相色谱法配紫外可见光检测器测定饮用水、湖泊水、河水及地表水中微囊藻毒素 (MCYST-LR, RR, YR)。但是以上两种检测方法都存在一些缺陷,例如:二极管阵列检测器的缺点是流动相的选择有一定限制,流动相的截止波长必须小于检测波长。紫外检测器在识别 MCYST 的过程中存在相互干扰的缺陷,影

响测定准确度;另外如果有其他物质伴随 MCYST 一同洗脱出来,其单波长吸收峰就会受到干扰。综上,亟需建立一种灵敏、快速检测水中微囊藻毒素的方法。

笔者采用液质联用法通过固相萃取进行水体中痕量的微囊藻毒素富集,样品经 UPLC/MS/MS 可以实现被测样品中三种微囊藻毒素的快速分离,MCYST 样品溶液在强电场的作用下破碎成许多细小的带有电荷的液滴,解吸出离子,离子碰撞活化裂解成碎片,从而获得分子的结构信息,样品的分子离子和裂片离子经一系列分离器和静电透镜进入质量分析器进行质谱分析从而对样品中微囊藻毒素进行准确的定性及定量。

1 实验部分

1.1 仪器及工作条件

仪器:美国 Waters 公司 ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪、美国 Waters 公司 Xevo-TQD 串联三重四极杆质谱仪、美国热电公司 AT280 全自动固相萃取仪、美国热电公司 TURBO VAPII 自动浓缩仪、美国 Millipore 公司 Synergy 超纯水器。

色谱条件:色谱柱 ACQUITY BEH C18 (1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm)。

液相流路:A 0.1% 甲酸水, B 乙腈;柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;流速为 0.4 mL/min;进样量为 10 μL 。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源 (ESI⁺),选取多反应监测模式 (MRM),毛细管电压为 0.5 kV,离子源温度为 150 $^{\circ}\text{C}$,去溶剂气温度为 500 $^{\circ}\text{C}$,去溶剂气和锥孔反吹气均为氦气,流速分别为 800 L/h 和 20 L/h;碰撞气为氩气,流速为 0.15 mL/min。目标化合物通过 Combine 模式引入三重四极杆质谱,利用 Targetlynx 软件 Intelstart 功能自动选择子离子和优化锥孔电压、碰撞能量等参数。

1.2 实验试剂及材料

甲醇,色谱纯,德国默克试剂;甲酸,色谱纯,山东西亚化学股份有限公司;MCYST-LR,标准液,农业部环境保护科研监测所;MCYST-RR,标准液,农业部环境保护科研监测所;MCYST-YR,标准液,农业部环境保护科研监测所;固相萃取小柱, SolEx-C18, 美国 DIONEX;固相萃取小柱, HLB, 美国 Waters。

1.3 样品处理

量取先用500目不锈钢筛过滤去除水体中浮游生物和悬浮物的水样50 mL,经0.45 μm 滤膜过滤,通过SolEx-C18小柱富集,SolEx-C18小柱使用前依次使用10 mL甲醇、10 mL纯水活化,以10 mL/min的流速上样,上样结束后用10%甲醇溶液淋洗,氮气吹15 min。用10 mL甲醇溶液洗脱,洗脱液在自动浓缩仪中40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至近干,用甲醇溶液定容至1 mL,进样UPLC-MS/MS检测。

1.4 标准曲线绘制

配制浓度为0.5、1、5、10、50、100、300 $\mu\text{g/L}$ 的MCYST-LR、RR、YR标准使用溶液,用固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定,绘制峰面积-浓度曲线。

1.5 实际样品测定

采样点包括东太湖吴江段水源水、北部养殖区、亭子港水库水、中试常规工艺及深度处理工艺出水等,经预处理后进行检测,并根据外标法计算水中MCYST-LR、RR、YR的含量。

2 结果与讨论

2.1 实验条件选择

2.1.1 样品前处理条件选择

固相萃取小柱、淋洗液及洗脱液的选择和用量以及上样流速均是影响样品富集的主要因素。本实验采用水样加标方式对上述条件进行了优化。

2.1.1.1 固相萃取小柱选择

根据文献资料^[10],HLB柱和C18柱均可有效富集和提取水中的微囊藻毒素。本实验选取SolEx-C18和HLB(6 mg,500 mL)经10 mL甲醇、10 mL纯水活化,分别在不同小柱中加入同等量的MCYST标准溶液,上样结束后用10%甲醇溶液淋洗,氮气吹15 min。用10 mL甲醇溶液洗脱,洗脱液在自动浓缩仪中40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至近干,用甲醇溶液定容至1 mL后进样分析,结果显示,SolEx-C18小柱空白加标回收率要高于HLB小柱,所以实验采用SolEx-C18固相萃取小柱。

2.1.1.2 淋洗、洗脱液的选择

淋洗优化:SolEx-C18固相萃取柱使用前以甲醇10 mL、纯水10 mL活化。加标水样以10 mL/min的流速流过固相萃取柱进行富集浓缩,上样完毕后,用10 mL 5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%甲醇水溶液作为淋洗剂对样品中的杂质进行

淋洗,做三组平行样。再用10 mL 100%的甲醇洗脱微囊藻毒素,将洗脱液浓缩定容至1 mL,进样进行UPLC-MS/MS检测,测定加标回收率并求出三组实验的平均值,结果见表1。可见淋洗液中甲醇含量高会造成微囊藻毒素的流失,而在淋洗液中甲醇含量小于10%时不能洗掉萃取柱中的杂质,且在甲醇含量为10%时三种藻毒素的回收率都有较高的回收率,所以实验选择10%的甲醇溶液为淋洗液。

表1 不同淋洗液及洗脱液对MCYST回收率的影响

Tab.1 Effect of different eluents on MCYST recoveries

		%		
项 目		MC-LR 回收率	MC-RR 回收率	MC-YR 回收率
淋洗液 (甲醇)	5	91.3	95.4	93.1
	10	90.8	95.3	93.0
	15	89.5	94.1	91.5
	20	88.4	93.4	90.2
	25	86.3	91.5	88.8
	30	87.8	90.4	85.4
	40	86.0	88.7	84.4
洗脱液 (甲醇)	50	84.8	87.1	83.2
	70	87.3	92.3	91.3
	80	88.2	92.9	90.8
	90	89.1	94.0	92.5
	100	90.5	95.1	93.3

洗脱优化:SolEx-C18固相萃取柱使用前以10 mL甲醇、10 mL纯水活化。将加标水样以10 mL/min的流速流过固相萃取柱进行富集浓缩。上样完毕后,用10 mL 10%的甲醇水溶液作为淋洗剂对样品中的杂质进行淋洗,再分别用10 mL 70%、80%、90%、100%的甲醇洗脱微囊藻毒素,做三组平行试验。将洗脱液浓缩定容至1 mL,进样UPLC-MS/MS检测,测定加标回收率并求出三组实验的平均值,结果见表1。可见,洗脱剂中甲醇含量越高则微囊藻毒素的洗脱效果越好,所以洗脱剂选择纯甲醇溶液。

2.1.1.3 上样流速的选择

选择5、10 mL/min上样流速进行对比,结果表明两种流速下空白加标回收率没有明显差异,为节约分析时间,选取上样流速为10 mL/min。

2.1.2 液相及质谱条件优化

目前国内外常用于分析微囊藻毒素的流动相主要有TFA-乙腈溶液:TFA-水溶液、甲醇:磷酸盐缓冲液。鉴于乙腈毒性较大且成本较高,磷酸盐

等缓冲盐易析出盐造成管路堵塞。实验选择以甲醇:0.1%甲酸水为流动相实现微囊藻毒素的分离。

分别用甲醇:0.1%甲酸水比例为20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20的流动相以0.4 mL/min流速等梯度分离三种微囊藻毒素,结果表明流动相中甲醇比例低时微囊藻毒素出峰时间较晚,耗时较长,而甲醇比例高时微囊藻毒素出峰较早,三种藻毒素分离状况不佳,实验最终选用甲醇:0.1%甲酸水=40:60。

MS/MS检测离子及碰撞参数见表2。

表2 MS/MS检测离子及碰撞参数

Tab.2 Detection ions and collision parameters

项 目	保留时间/ min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)		锥孔 电压/ eV	碰撞 电压/ eV
MCYST-LR	2.19	995.5	127.1	135.0 ^a	82	72
MCYST-RR	2.52	519.9	103.0	135.0 ^a	52	74
MCYST-YR	2.81	1 045.2	135.0 ^a	213.0	85	70

注: ^a 为定量离子。

2.2 方法性能

配制浓度为0.5、1、5、10、50、100、300 $\mu\text{g/L}$ 的MCYST-LR、RR、YR标准使用溶液进样分析,根据定量离子对的响应面积和对应浓度进行线性回归,在0.5~300 $\mu\text{g/L}$ 范围内三种MCYST均具有良好线性($r^2 > 0.999$),三种微囊藻毒素MCYST-LR、MCYST-RR、MCYST-YR的检出限(3倍信噪比估算)分别为0.015、0.05、0.1 $\mu\text{g/L}$;定量限(10倍信噪比估算)分别为0.05、0.17、0.33 $\mu\text{g/L}$ 。

在空白水样中添加10.0 $\mu\text{g/L}$ 三种微囊藻毒素的混合标准溶液,按实验方法进行回收实验。每个添加浓度重复测定6次,计算加标回收率以及测定结果的相对标准偏差。结果表明:MCYST-LR、RR、YR三种微囊藻毒素加标回收率分别为92.8%、96.3%、94.8%,测定结果的相对标准偏差分别为3.1%、2.5%、2.8%,方法的准确度和精密度均符合痕量分析的要求。

2.3 实际样品测定

2017年3月—10月期间,定期采集各采样点水面下0.5 m的水样,对东太湖天然水体水样的检测表明,MCYST-LR检出浓度较高,MCYST-RR次之,MCYST-YR均未检出;其中MCYST-LR峰值分别为:东太湖吴江段水源水1.43 $\mu\text{g/L}$ 、北部养殖场2.51 $\mu\text{g/L}$ 、亭子港水库水1.77 $\mu\text{g/L}$ (见图1)。

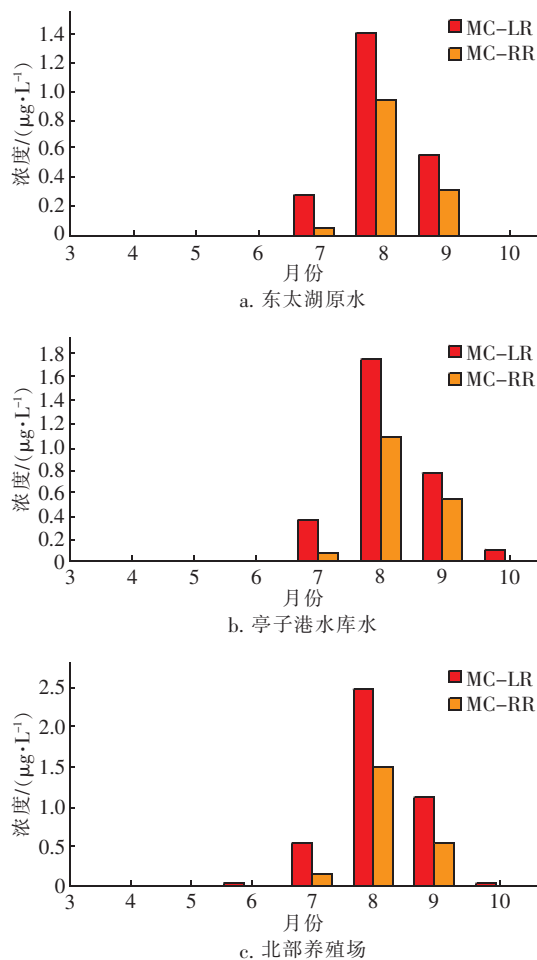


图1 各采样点微囊藻毒素浓度

Fig.1 Concentration of microcystin in different sampling points

2.4 不同工艺去除效果对比

资料显示^[11],生物降解和活性炭吸附是深度处理工艺去除MCYST的主要途径,对常规处理方法和深度处理方法出水中MCYST含量进行测试,结果如表3所示。

表3 常规工艺与深度处理工艺对藻毒素的处理效果对比

Tab.3 Comparison of treatment effect between conventional and O₃-BAC process

项目	常规处理			深度处理		
处理前/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.73	1.79	1.74	1.76	1.75	1.70
处理后/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.93	0.95	0.92	0.08	0.04	0.03
去除率/%	46.24	46.93	47.13	95.45	97.71	98.24
平均去除率/%	46.77			97.13		
残留率/%	53.76	53.07	52.87	4.55	2.29	1.76
平均残留率/%	53.23			2.87		

结果表明:深度处理出水中的微囊藻毒素的含

量远低于常规方法处理出水;常规处理和深度处理的MCYST去除率分别为46.77%和97.13%,深度处理工艺可高效去除水体中的微囊藻毒素。

3 结论

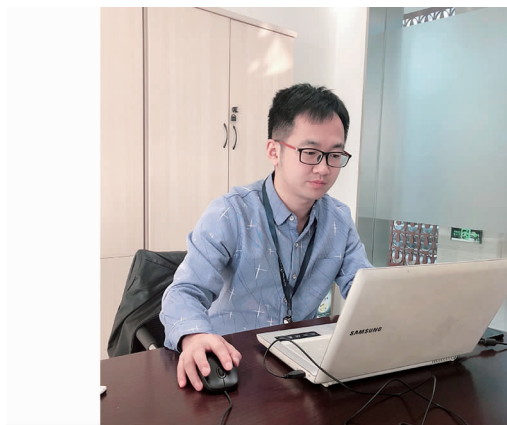
① 固相萃取/超高效液相色谱/质谱联用法可检测各类水体中微囊藻毒素含量,具有快速、准确、灵敏度高、分析周期短、适用范围广等优点。

② 对东太湖水体检测表明,夏季蓝藻暴发时水体受到不同程度的蓝藻毒素污染,其中MCYST-LR检出浓度较高,MCYST-RR次之,MCYST-YR未检出,特别是8月份各采样点水体中MCYST的浓度超过WHO规定的低于1.0 $\mu\text{g/L}$ 的限值,已对人体健康构成威胁,应该予以重视。

③ 通过实验发现,深度处理工艺去除微囊藻毒素比常规工艺更高效,常规处理和深度处理的去除率分别为46.77%和97.13%。

参考文献:

- [1] 黄艺,张郅灏. 微囊藻毒素的致毒机理和人体健康风险评估研究进展[J]. 生态环境学报,2013,22(2): 357-364.
Huang Yi, Zhang Zhihao. Advances in the study of toxicology and human health risk assessment of microcystin[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2013,22(2):357-364(in Chinese).
- [2] Brittain S, Mohamed Z A, Wang J, *et al.* Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont[J]. Toxicon, 2000,38(12):1759-1771.
- [3] Jochimsen E M, Carmichael W W, An J S, *et al.* Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil[J]. New Engl J Med, 1998,338(13):873-878.
- [4] Christine Edwards, Linda A Lawton, Sadie M Coyle, *et al.* Automated purification of microcystin[J]. J Chromatogr A,1996,734(1):175-182.
- [5] Nasri A B, Bouaicha N, Fastner J, *et al.* First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacteria *Microcystis* spp. in Lake Oubeira, eastern Algeria[J]. Arch Environ Contam Toxicol,2004,46(2):197-202.
- [6] Tore Lindholm, Pia Vesterkvist, Lisa Spoof, *et al.* Microcystin occurrence in lakes in Åland, SW Finland [J]. Hydrobiologia,2003,505(1):129-138.
- [7] Lora E Fleming, Carlos Rivero, John Burns, *et al.* Blue green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida[J]. Harmful Algae, 2002,1(2):157-168.
- [8] Sandra M Azevedo, Wayne Carmichael, Elise M Jochimsen, *et al.* Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil[J]. Toxicology,2003,181/182(1/3):441-446.
- [9] 何家菀,何振荣,郭琼林. 有毒铜绿微囊藻对鱼和蚤的毒性[J]. 湖泊科学,1997,9(1):49-56.
He Jiawan, He Zhenrong, Guo Qionglin. The toxicity of microcystis aeruginosa to fishes and daphnia[J]. Journal of Lake Sciences,1997,9(1):49-56(in Chinese).
- [10] Lisa Spoof, Pia Vesterkvist, Tore Lindholm, *et al.* Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodulain in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2004,1020(1):105-119.
- [11] 朱光灿,吕锡武. 去除藻毒素的水处理技术研究进展[J]. 中国给水排水,2003,19(8):36-39.
Zhu Guangcan, Lü Xiwu. Advance in study of algal toxins removal in water treatment process[J]. China Water & Wastewater, 2003, 19(8): 36-39(in Chinese).



作者简介:王刚(1990-),男,黑龙江黑河人,本科,助理工程师,检测工程师,主要研究方向为水中有机物、内分泌干扰物、抗生素等污染物的检测。

E-mail:705869392@qq.com

收稿日期:2018-10-30