



使用 Agilent 6410 三重四极杆 LC/MS 系统 监测水库原水中的微囊藻毒素

作者

Toni Hall
Wessex Water
巴斯
UK (英国)

应用简报

环境

摘要

本应用简报报导了一种使用 Agilent 6410 三重四极杆 LC/MS 系统，对水库原水中微囊藻毒素（微囊藻毒素-LR、YR 和 RR）进行检测的方法。

前言

微囊藻毒素是由蓝藻产生的一种毒素。蓝藻，也称为蓝绿藻，是一种同时具备细菌和藻类特性的有机体。当地表水条件（要求温暖、稳定的条件）适宜蓝藻繁殖时，就会导致蓝藻大规模爆发。但并不是所有藻类都会产生毒素。蓝藻菌在死亡或溶解时会释放毒素。所产生的藻毒素包括肝毒素（微囊藻毒素、节球藻毒素和柱孢藻毒素），神经毒素（鱼腥藻毒素-a，鱼腥藻毒素-a(S)，蛤蚌毒素）和皮炎毒素（鞘丝藻毒素-a，海兔毒素）三大类。这些毒素在释放后能够在水中持续存在数周到数月。其中微囊藻毒素会对人畜的健康造成危害。它们中的大多数为肝毒素，而同时也会刺激皮肤、眼睛和咽喉。

微囊藻毒素已收录于美国国家环境保护署 (USEPA) 的污染物候选列表中 [1]，世界卫生组织 (WHO) 规定处理饮用水中微囊藻毒素-LR 的暂行指导限值为 1 µg/L。英国尚未确立微囊藻毒素分析相关的法规。英国饮用水监管局 (DWI) 已对在英国境内开展微囊藻毒素分析的必要性进行审查 [3]。其得出的结论是：在原水中确实会出现此类毒素，而只有在爆发大规模蓝藻水华，此类毒素达到一定浓度时，才可以方便地对它们进行检测。此外，有多种水处理方法可以去除此类毒素。



Agilent Technologies

数据表明，在英国境内与蓝藻微囊藻毒素相关的饮用水健康风险非常低，大多数供水公司能够妥善管理饮用水源，将蓝藻的数量控制到最低值。

可采用多种分析技术分析水中的微囊藻毒素。包括生物分析技术，例如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 以及采用紫外-可见光 (LC/UV-Vis) 和质谱 (LC/MS) 检测的液相色谱技术 [1]。在这些技术中，LC/MS (尤其是三重四极杆 LC/MS) 具有良好的特异性和灵敏度 [4]。

Wessex Water 已开发了一种使用 Agilent 6410 三重四极杆 LC/MS 对水中微囊藻毒素-LR、-YR 和 -RR 进行测定的方法。该方法可检出各种水体中低至 0.1 µg/L 的微囊藻毒素-LR、-YR 和 -RR。对大量水库原水样品进行了分析。但是在爆发大规模蓝藻水华时，需要同时检测细胞结合态和溶解态毒素。出于预防目的，还对已经处理过的水样品进行了分析，确认水处理厂能否有效除去任何可能的污染物。

实验部分

样品前处理

标准品

DHI (丹麦)，通过 ISO 20179 认证

微囊藻毒素 RR-YR-LR 的 LGC 混合标样

用于溶解态微囊藻毒素分析的原水样品

在进行固相萃取前，原水样品已经过 GF/B (颗粒保留 1.0 µm) 滤纸过滤。

用于细胞结合态微囊藻毒素分析的细胞内液样品

对样品进行过滤，然后在甲醇/水 (70/30 v/v) 中将滤纸煮沸。然后在进行固相萃取之前，应蒸发除去溶液中的甲醇或稀释至一定浓度以下。

固相萃取 (SPE)

使用 IST 101 (100 mg, 3 mL) 小柱进行固相萃取。先使用甲醇 (1 体积)，再使用超纯水 (1 体积) 对小柱进行平衡，确保小柱不会变干。在萃取过程中，将储液瓶连接至小柱，然后对 75 mL 加入节球藻毒素内标 (1.0 µg/L) 的水样品，在重力和微真空条件下进行慢速萃取。通过经过滤的已知原水制备空白和一组标样 (0.02 µg/L、0.1 µg/L 和 1.0 µg/L)，并向其中加入内标，并与样品一同进行萃取。萃取完成后，使用 1 体积 30% 甲醇对小柱进行洗涤，然后在全真空条件下干燥 3 分钟。然后使用甲酸 (1%) 的甲醇溶液 (2 x 0.5 mL) 对小柱进行洗脱，此时应采用真空条件以确保完全洗脱。将萃取液蒸干，然后复溶于 150 µL 乙酸 (0.1%) 的乙腈 (25%) 溶液中，再装入样品瓶中上机分析。

表 1. LC 和 MS 仪器条件

LC 条件

分析型色谱柱	Bonus-RP 2.1 × 50 mm, 3.5 µm	
柱温	60 °C	
进样量	60 µL	
流动相	A = 0.1% 乙酸水溶液 B = 0.1% 乙酸的乙腈溶液	
运行时间	12 min	
流速	0.2 mL/min	
梯度程序	时间 (min)	梯度 (% B)
	0	20
	1	20
	7	90
	9	20

MS 条件

采集参数	ESI +
气体温度	350 °C
载气流速	9 L/min, 氮气
雾化器压力	40 psi
毛细管电压	4000 V

Table 2. Agilent 6410 三重四极杆 LC/MS 采集参数

化合物	定量/定性离子	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (msec)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	极性
微囊藻毒素-LR, $[M+H]^+$	定量离子	995.5	134.8	110	60	90	正
	定性离子	995.5	212.9	110	60	70	正
微囊藻毒素-YR, $[M+H]^+$	定量离子	1045.5	135.1	110	300	90	正
	定性离子	1045.5	212.6	110	300	80	正
微囊藻毒素-RR, $[M+2H]^{2+}$	定量离子	519.8	134.8	110	160	50	正
	定性离子	519.8	102.9	110	160	70	正
节球藻毒素, $[M+H]^+$	定量离子	825.4	134.8	110	190	70	正
内标	定性离子	825.4	162.9	110	190	50	正

结果与讨论

表 1 中所示为仪器操作条件。表 2 中所示为各化合物的定量或定性离子/裂解电压和碰撞能量。

微囊藻毒素是一类七肽单环肝毒素。根据肽结构上可变的氨基酸基团进行命名。微囊藻毒素-LR 具有亮氨酸 (L) 和精氨酸 (R) 氨基酸基团；微囊藻毒素-YR 具有酪氨酸 (Y) 和精氨酸 (R) 氨基酸基团；微囊藻毒素-RR 具有两个精氨酸 (R) 氨基酸基团。精氨酸具有一个自由氨基，该基团具有极强的质子亲和力，由于微囊藻毒素-RR 具有两个精氨酸基团，因此容易形成双电荷分子离子。图 1 所示为微囊藻毒素-LR 的结构。

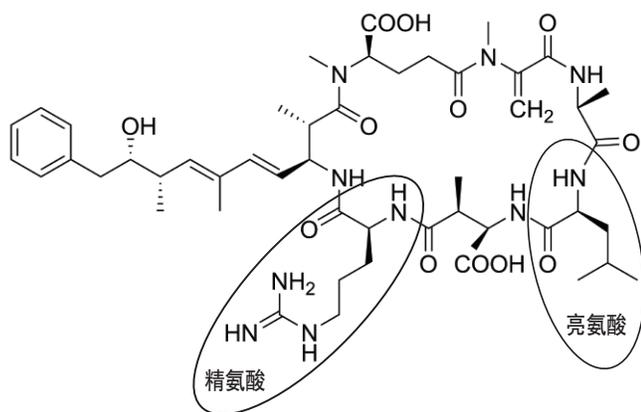


图 1. 微囊藻毒素-LR 的结构 ($C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$, CAS: 101043-37-2)

节球藻毒素具有环状五肽结构，在此用作内标。对水库原水中的微囊藻毒素进行分析时，选择节球藻毒素作为内标是非常明智的，因为节球藻毒素的结构和化学性质与微囊藻毒素非常相似，并且迄今为止，只在盐水环境中发现过节球藻毒素。当然，如果要分析盐水样品，则不能使用节球藻毒素作为内标。

图 2 所示为微囊藻毒素和节球藻毒素的片段图谱。

图 3 所示为微囊藻毒素-LR 和 -YR 的色谱图。第一张色谱图表明对于 0.02 $\mu\text{g/L}$ 标准品获得了良好的结果。第二张图为同时存在微囊藻毒素-LR 和 -YR 的水样品（原水样品 1）的色谱图。第三张为存在微囊藻毒素-LR 以及表现存在微囊藻毒素-YR 的水样品（原水样品 2）的色谱图。虽然它与微囊藻毒素-YR 的离子对相同，但是保留时间不同。这表明存在另一种微囊藻毒素，存在相同的离子对。

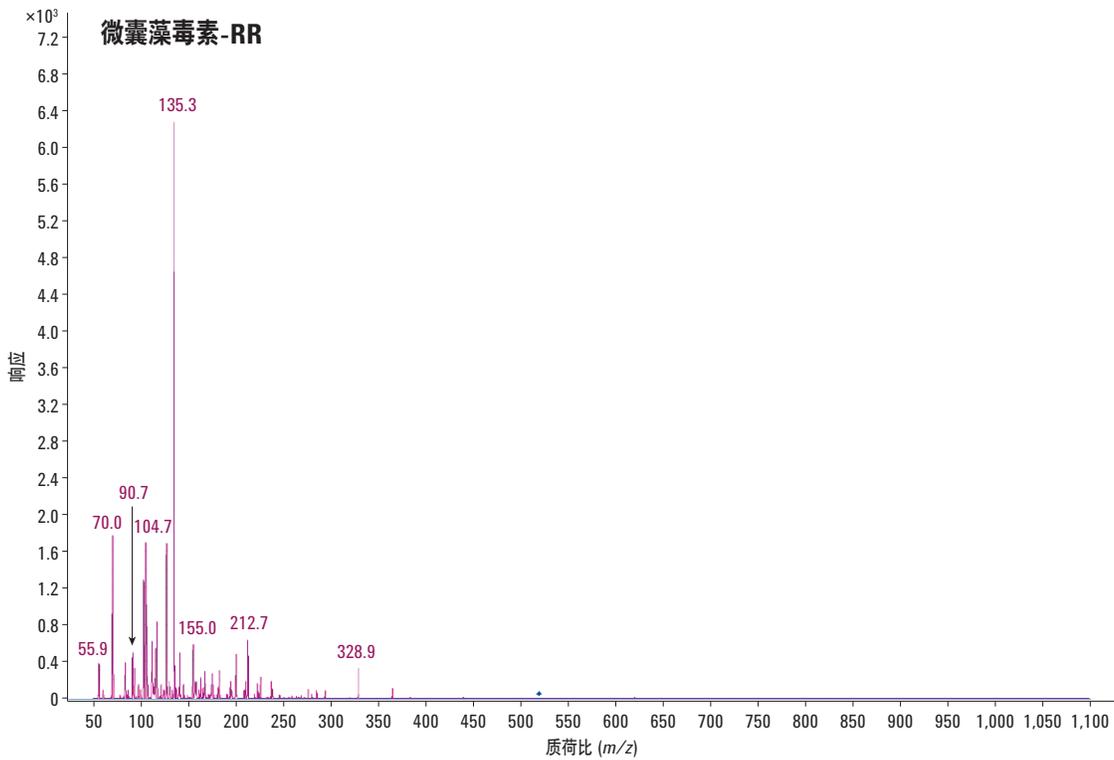
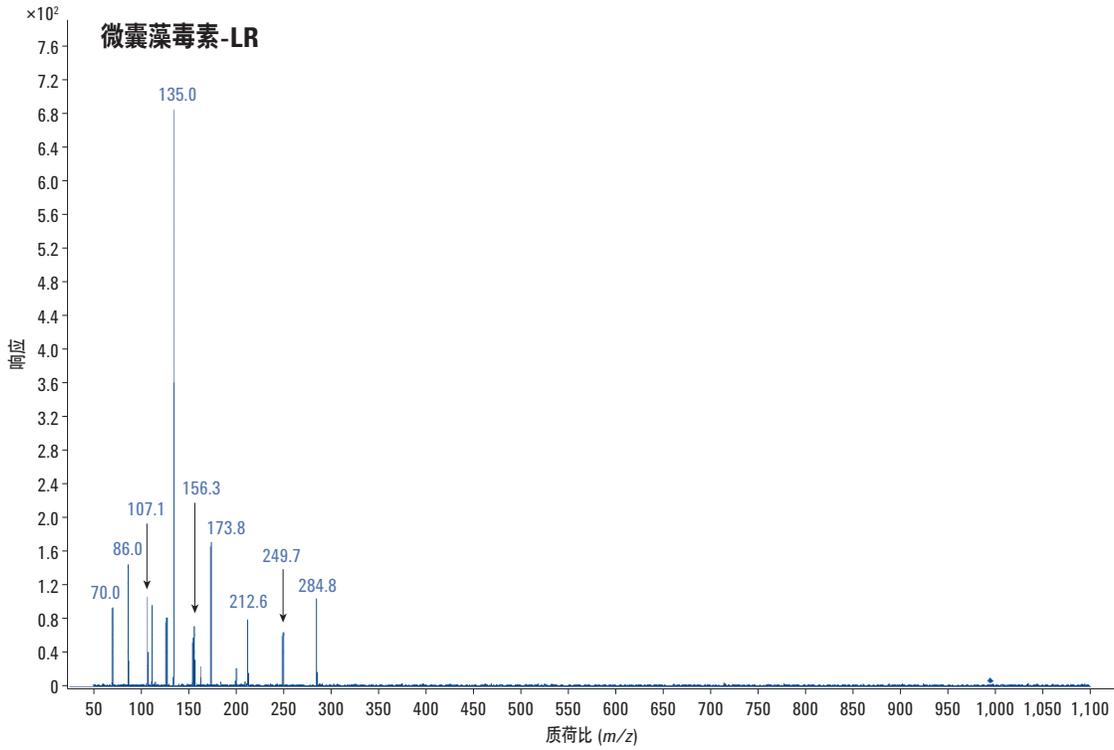


图2. 微囊藻毒素-LR、-YR、-RR 和节球藻毒素的裂解谱

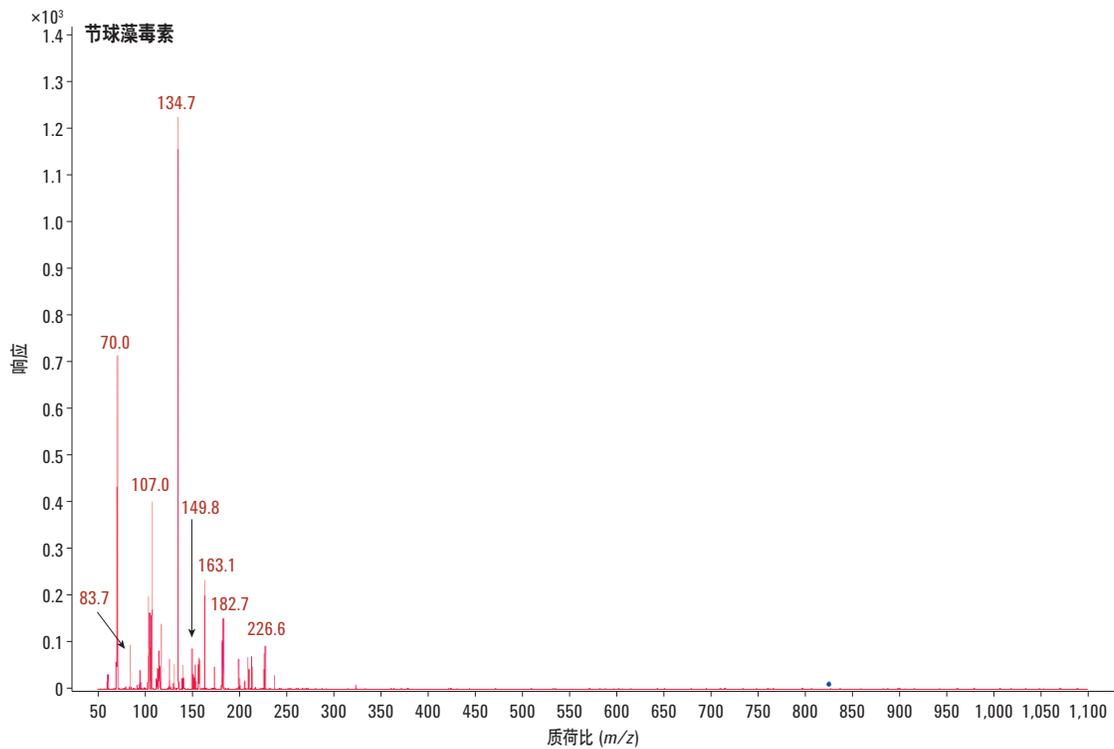
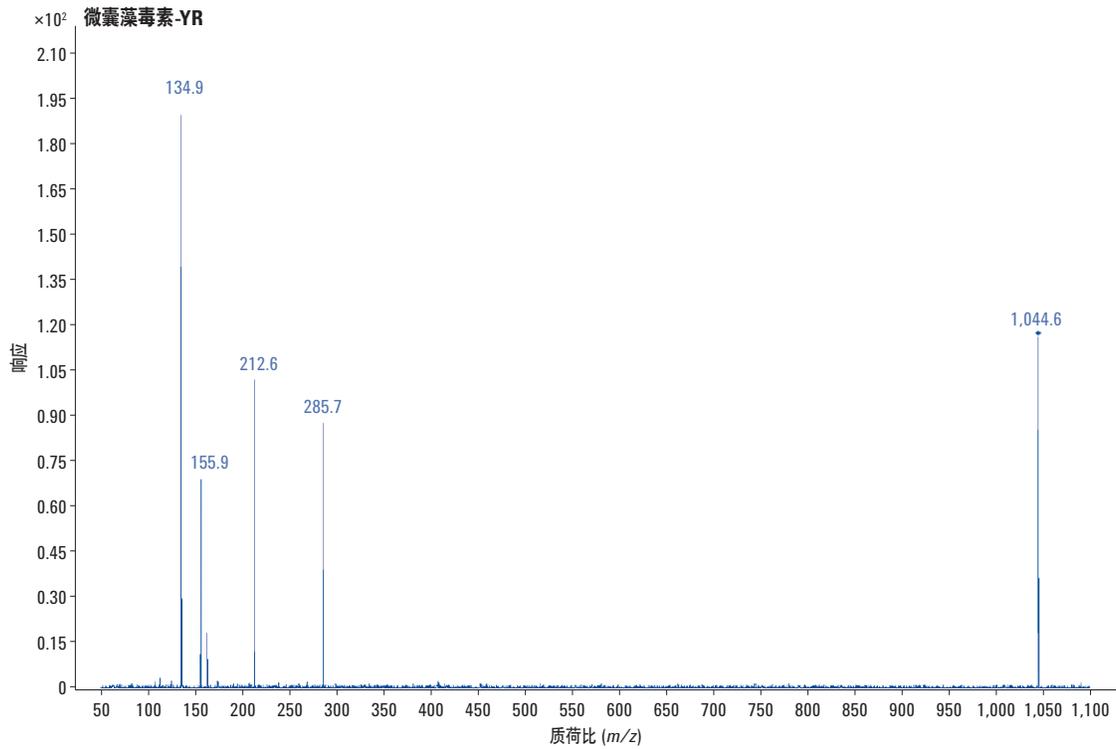


图2. 微囊藻毒素-LR、-YR、-RR 和节球藻毒素的裂解谱 (续)

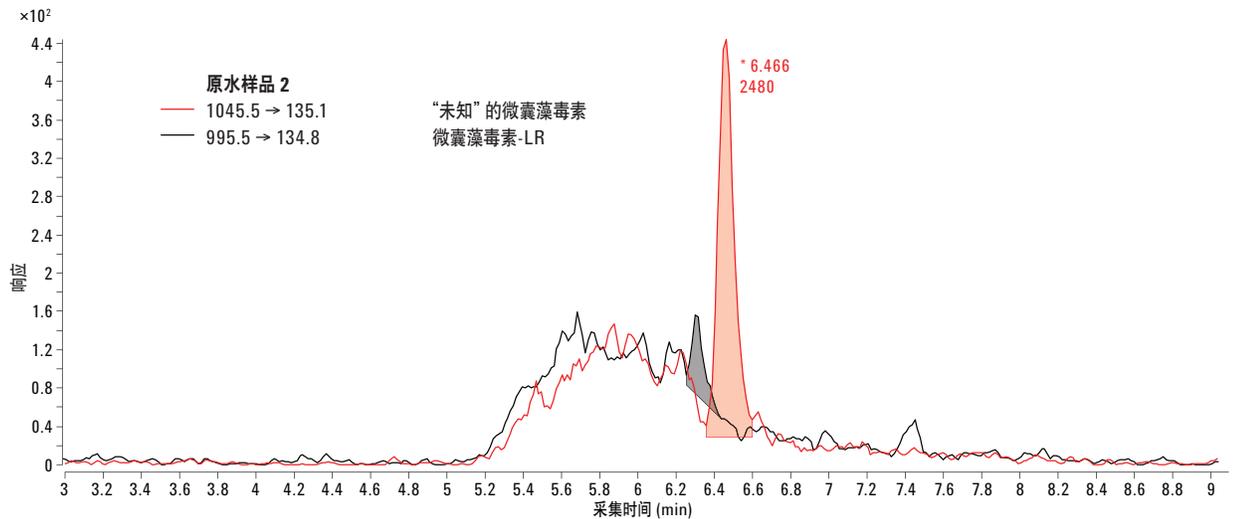
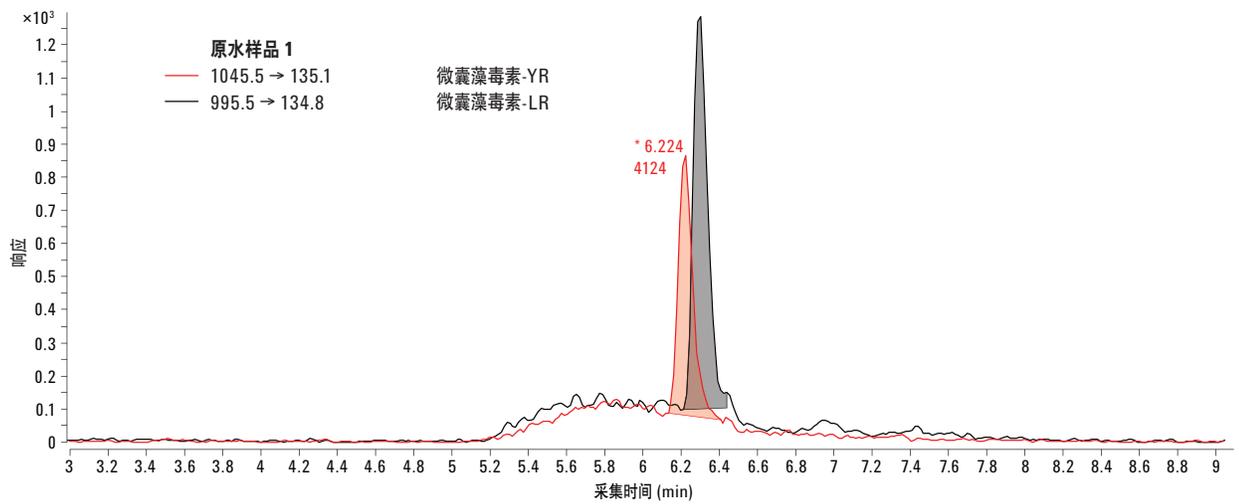
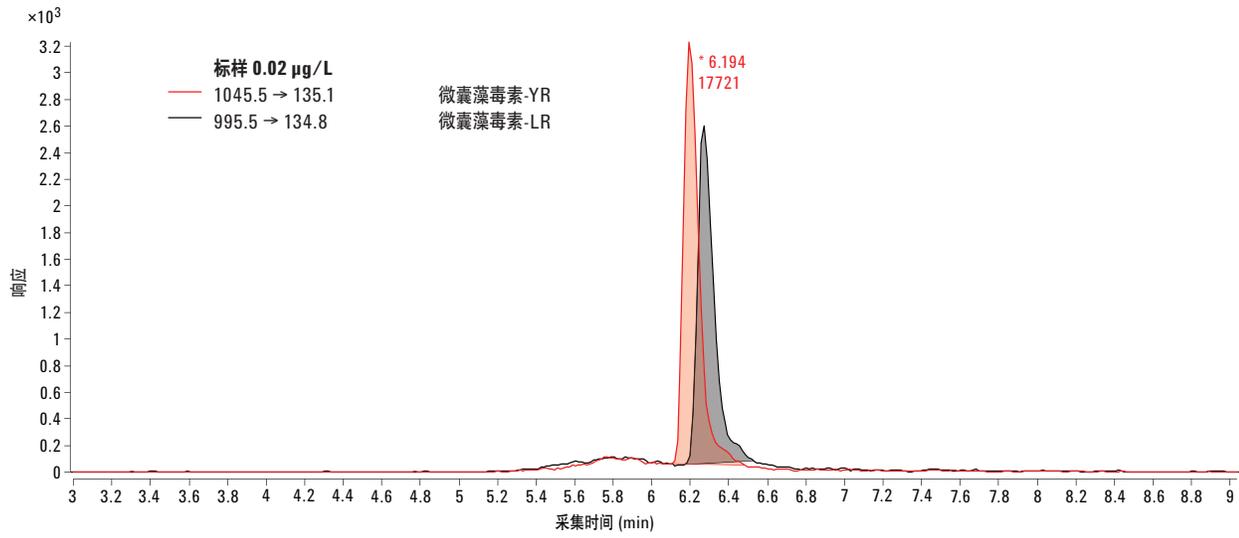


图 3. 0.02 µg/L 标样与两个原水样品的色谱图

每种微囊藻毒素的校正范围为 0.02 µg/L 到 1 µg/L，并且在 0.5 µg/L 处对分析质量对照样品 (AQC) 进行分析。图 4 所示为微囊藻毒素-LR 的典型校正曲线图。由于该方法通常仅用于分析原水样品，因此无需对其进行验证。虽然使用了 0.1 µg/L 的报告限，但是对于所有三种微囊藻毒素而言，检测限 (LOD) 应该会低于 0.005 µg/L。

除了能够分析水库原水以外，需要时还可以对细胞内液进行分析。这是由蓝藻细胞溶解后形成的，分析内容物可以了解细胞结合态微囊藻毒素的含量。通常仅在蓝藻大规模暴发或形成水华时执行此分析，以便了解在这些藻类死亡后是否会引起水体毒化。还对已经过处理的水样品进行了分析，确认水处理厂能否有效除去任何可能的污染物，并在必要时停止取水。

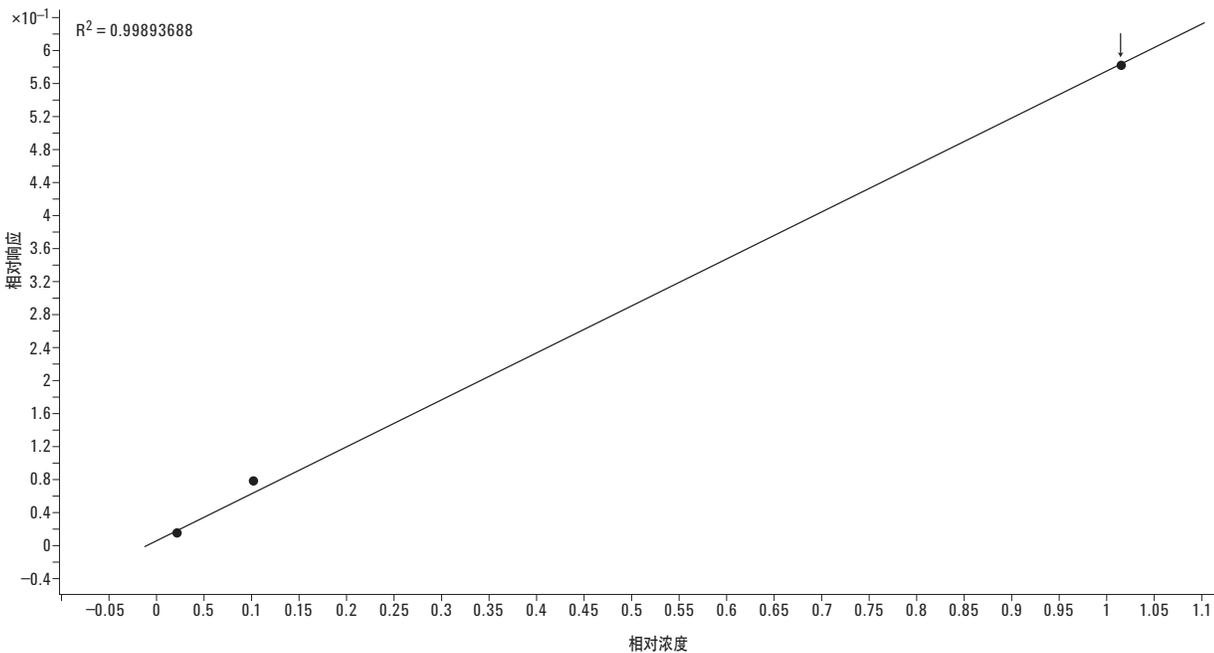


图 4. 微囊藻毒素-LR 的典型校正曲线图

结论

本应用摘要报导了一种使用 Agilent 6410 三重四极杆 LC/MS 系统，对水库原水中微囊藻毒素（微囊藻毒素-LR、-YR 和 -RR）进行测定的方法。本方法对于原水样品展现出良好的灵敏度，可以检测出浓度低于 0.005 µg/L 的以上三种毒素。

致谢

作者在此对痕量有机物研究团队 (Trace Organics Team) 的 Ana Castro 和实验室管理员 Helen Shapland 表示衷心感谢。

参考文献

1. United States Environmental Protection Agency, Office of Water, Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems, EPA-810F11001, July 2012.
2. World Health Organisation, Cyanobacterial Toxins: Microcystin-LR in Drinking Water; WHO/SDE/WSH/03.04/57, Geneva, Switzerland, 2003.
3. D. Maycock, J. Fawell, G. Merrington and C. Watts, Review of England and Wales Monitoring Data for Which a National or International Standard Has Been Set, DWI0855, March 2008.
4. A. Mekebri, G.J. Blondina, D.B. Crane, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 3147.

如需更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013

中国印制

2013 年 3 月 25 日

5991-2057CHCN



Agilent Technologies