

鉴定阿尔伯达湖水中的未知微囊藻毒素

应用简报

环境

作者

Ralph Hindle
Vogon 实验室服务有限公司
Cochrane, 阿尔伯达
加拿大

Xu Zhang 和 David Kinniburgh
阿尔伯达毒理学中心
阿尔伯达健康与保健中心
卡尔加里大学
卡尔加里, 阿尔伯达
加拿大

摘要

使用三重四极杆液质联用系统与 LC/Q-TOF 相结合进行分析并利用根据世界卫生组织 (WHO) 列出的微囊藻毒素名单编译的个人化合物数据库 (PCD), 在缺乏分析标准品的情况下实现湖水中浓度极低的未知微囊藻毒素的检测、表征和初步鉴定。



Agilent Technologies

前言

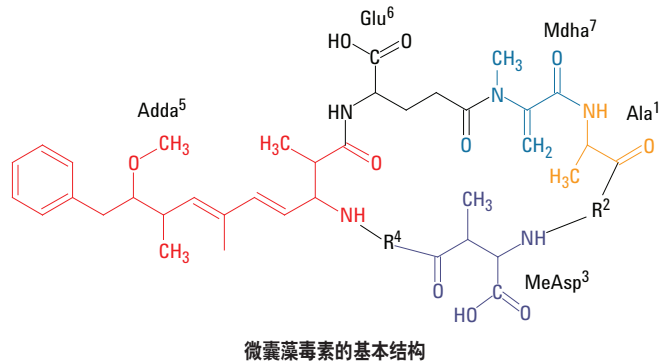
加拿大淡水中存在的蓝藻毒素严重影响了环境和公众的健康 [1]。微囊藻毒素 (MC) 是存在于加拿大湖泊中的一类常见的蓝藻毒素，是真核蛋白磷酸酶的有效抑制剂 [2]。微囊藻毒素还是一种强大的肝毒素，可能会促进哺乳动物体内肿瘤的生长，对家畜和人类饮用水具有严重的威胁。在加拿大的各省检出了这些蓝藻毒素，其浓度通常高于标准再生水的最高规定浓度 [2]。

MC 为含 7 种氨基酸的环肽。其基本结构如图 1 所示。表 1 显示了在阿尔伯达湖泊中检验到的 8 种微囊藻毒素的化学结构。最常报道的 MC 是 LR，在 R² 和 R⁴ 位置分别含有亮氨酸和精氨酸。

阿尔伯达毒理学中心 (ACFT) 对阿尔伯达湖泊中的微囊藻毒素进行了综合研究，并使用液相色谱和三重四极杆质谱继续对淡水水源进行监测。利用此方法检测 8 种微囊藻毒素的同时，还在样品中检出了一种非目标化合物，该化合物具有与 MC YR (*m/z* 1045) 相同的跃迁定性离子，但其保留时间 (RT) 和定性离子比值不正确。

本应用简报将介绍阿尔伯达毒理学中心 (ACFT) 和 Vagon 实验室服务部合作开发的两种方法，利用这两种方法能够灵敏地检测各种微囊藻毒素并鉴定出新观测到的化合物。使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统首次开发了一种确证方法，可获得不同于 ACFT 参考方法的保留时间图。然后，利用 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 系统测定精确质量数，从而对未知峰（如去甲基微囊藻毒素 HtyR）进行初步鉴定。

所有微囊藻毒素的检出浓度为 0.1 µg/mL，远低于 2007 年加拿大饮用水水质准则规定的 1.5 µg/L。安捷伦已根据世界卫生组织 (WHO) 列出的微囊藻毒素名单在 MassHunter 软件中创建了含 52 种化合物的个人化合物数据库 (PCD)，只需 Q-TOF 数据即可初步鉴定另外 7 种微囊藻毒素。



位置	缩写	氨基酸
R ¹	Ala ¹	丙氨酸
R ²	Leu ² (L)	亮氨酸
R ³	MeAsp ³	甲基天冬氨酸
R ⁴	Arg ⁴ (R)	精氨酸
R ⁵	Adda ⁵	3-氨基-9-甲氧基-2,6,6-三甲基-10-苯基-4(E),6(E)-二烯酸
R ⁶	Glu ⁶	谷氨酸
R ⁷	Mdha ⁷	N-甲基脱氢丙氨酸

图 1. 微囊藻毒素 (MC) 的基本结构

表 1. 在阿尔伯达湖泊中检测到的 8 种微囊藻毒素*

微囊藻毒素	R ²	R ⁴	分子式	中性分子质量
LR	亮氨酸	精氨酸	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	994.5488
去甲基 LR	亮氨酸	精氨酸	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂	980.5331
RR	精氨酸	精氨酸	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂	1037.5658
YR	酪氨酸	精氨酸	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃	1044.5280
LA	亮氨酸	丙氨酸	C ₄₆ H ₆₇ N ₇ O ₁₂	909.4848
LW	亮氨酸	苯丙氨酸	C ₅₄ H ₇₂ N ₈ O ₁₂	1024.5270
LF	亮氨酸	色氨酸	C ₅₂ H ₇₁ N ₇ O ₁₂	985.5161
HtyR	高酪氨酸	精氨酸	C ₅₃ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃	1058.5437

*微囊藻毒素的基本结构见图 1

实验部分

仪器

采用配有 Agilent G4226A 自动进样器的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统并结合 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统开发了此确证方法。表 2 中列出了仪器条件。

采用配有 G4226A 自动进样器的 1290 Infinity 液相色谱系统与配有喷射电喷雾离子源的 Agilent 6540B Q-TOF 液质联用系统开发了初步鉴定未知微囊藻毒素的方法。表 2 中列出了仪器条件。

表 2. 液相色谱和三重四极杆质谱的运行条件

液相色谱条件		
色谱柱	Agilent Poroshell SB-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685975-306)	
柱温	50 °C	
进样量	20 μL	
流动相	A) 1 mM 氟化铵的水溶液 (HPLC 级) B) 含 20% 异丙醇的乙腈溶液 (LC/MS 级)	
自动进样器温度	5 °C	
流速	0.6 mL/min	
梯度程序	时间 (min)	% B
	0	20
	3.0	30
	5.0	50
	6.0	100
停止	7 min	
后运行时间	2 min	
三重四极杆质谱条件		
电离模式	电离模式	
干燥气温度	350 °C	
干燥气流速	12 L/min	
雾化器压力	40 psig	
鞘气温度	400 °C	
鞘气流速	11 L/min	
鞘气流速	4000 V	
喷嘴电压	1000 V	
EMV	400 V	
四极杆飞行时间质谱条件		
模式	目标 MS/MS	
采集	棒状图和轮廓图; 2 GHz	
范围	100–1700 amu	
采集速率 (MS)	扫描 3 次/s	
采集速率 (MS/MS)	扫描 1 次/s	
扫描 1 次/s	121.0509 和 922.0098	

分析参数

6460 三重四极杆液质联用系统的多反应监测 (MRM) 分析参数如表 3 所示。

表 3. 使用三重四极杆液质联用系统进行目标化合物分析的 MRM 分析参数^a

微囊藻毒素	母离子 ^b (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
LR	995.6	135.2	80
		213.2	80
去甲基 LR	981.5	135.2	80
		213.2	80
RR	520.0	135.2	30
		213.2	40
YR	1045.5	135.2	80
		213.2	70
LA	910.5	135.2	70
		213.2	70
LY	1002.5	135.2	80
		213.2	70
LW	1025.5	135.2	80
		213.2	60
LF	986.5	135.2	70
		213.2	50
HtyR	1059.5	135.2	80
		213.2	70

^a 所有离子跃迁的碎裂电压和池加速电压分别为 150 V 和 2 V

^b 除 RR 带双电荷之外, 所有母离子均带单电荷

样品前处理

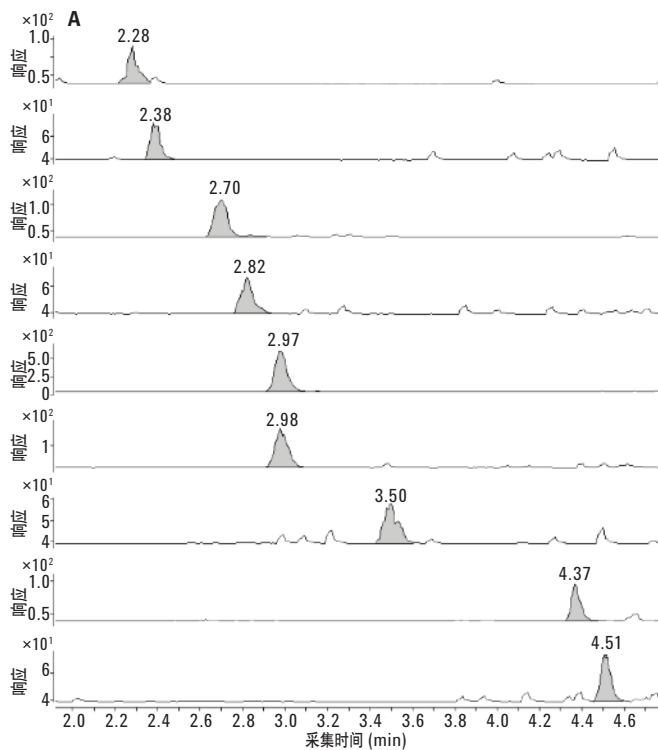
将水样 (10 mL) 进行 3 次冻融循环, 然后超声 5 min, 接着用 0.2 μm 纤维素滤膜直接过滤至自动进样器样品瓶中。

结果与讨论

鉴定未知微囊藻毒素

使用 ACFT 方法分析一个样品, 结果发现某化合物具有与 YR (m/z 1045) 相同的跃迁和定性离子, 但其保留时间 (RT) 和定性离子比值不正确。根据从 HtyR (m/z 1059) 损失的 14 amu 初步鉴定其为去甲基 HtyR。

为了定性鉴别这个未知 MC, 我们开发了三重四极杆液质联用确证方法, 从而获得了不同于 ACFT 参考方法的保留时间图。将其他微囊藻毒素分析物添加到此方法来帮助表征化合物。最后, 我们还使用 LC/Q-TOF 方法对样品进行分析以定性鉴别未知化合物。

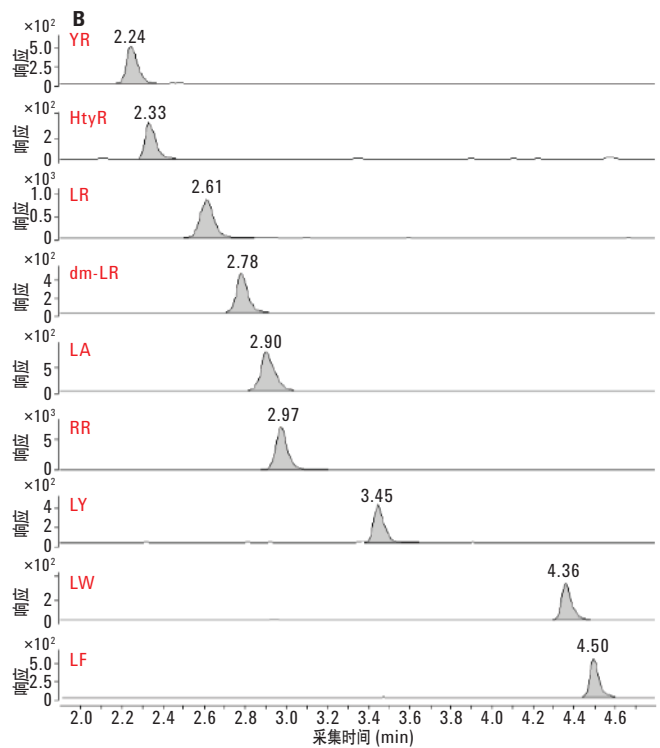


最低浓度的校准品

YR、LR 和 RR 为 0.1 $\mu\text{g/L}$
其他为 0.2 $\mu\text{g/L}$

确证方法

对三重四极杆液质联用确证方法进行优化以获得最低检测浓度约为加拿大饮用水水质准则 (CDWG) 规定浓度的 10%, 基于 MC LR, 准则规定浓度为 1.5 $\mu\text{g/L}$ 。本方法针对 MC YR、LR 和 RR 使用的校准品最低浓度为 0.1 $\mu\text{g/L}$, 其他均为 0.2 $\mu\text{g/L}$ 。图 2 表明采用高效液相色谱法 (HPLC), 9 种 MC 在最低校准品浓度和接近 CDWG 的校准品浓度下达到完全分离。



接近 DW 准则规定浓度的校准品

YR、LR 和 RR 为 0.9 $\mu\text{g/L}$
其他为 1.9 $\mu\text{g/L}$

图 2. 浓度约为 2007 年 CDWG 规定浓度的 10% (A) 和 100% (B) 的 9 种微囊藻毒素的总离子色谱图 (TIC) 示例

最低校准品浓度为 0.2 µg/L 和最高校准品浓度为 50 µg/L 时，6 种 MC 的定量校准系数 (R^2) 良好，在 0.9978-0.9995 范围之内 (表 4)。最低校准品浓度为 0.1 µg/L 和最高校准品浓度为 25 µg/L 时，3 种 MC 的 R^2 值范围为 0.9992-0.9997。如图 3 所示的 MC LR 代表性校准曲线说明即使在极低浓度下，线性仍良好。最低校准品浓度为 0.2 µg/L 时，6 种 MC 的准确度范围为 84% - 121%，最低校准品浓度为 0.1 µg/L 时，3 种 MC 的准确度范围为 110% - 119% (表 4)。

未知物分析

使用确证方法分析来自阿尔伯达湖泊水样的未知 MC，结果显示 MC 具有与 YR 相同的跃迁和定性离子峰，但其 RT 为 1.91 min，而非 2.24 min。并且定性离子比值 (m/z 213.2/135.2) 太低，因而不可能是 YR (2%，而 YR 为 24%)。低丰度峰 m/z 213.2 表明可能是 YR 结构中 N-甲基脱氢丙氨酸 (MDHA) 部分的去甲基化产物。然而，去甲基 HtyR 无市售品。因此，采用 Q-TOF 进行精确质量数分析以进一步确证去甲基化物的假设。

表 4. 校准系数和准确度 (回收率)

校准范围	MC	R^2	准确度 ^a (%)
0.2 - 50 µg/L	Hty R	0.9995	95
	去甲基 LR	0.9993	84
	LA	0.9988	121
	LY	0.9998	92
	LW	0.9989	118
	LF	0.9978	119
0.1 - 25 µg/L	YR	0.9993	118
	LR	0.9997	110
	RR	0.9992	119

^a 所列校准品 1 的定量准确度 (0.1 或 0.2 µg/L)

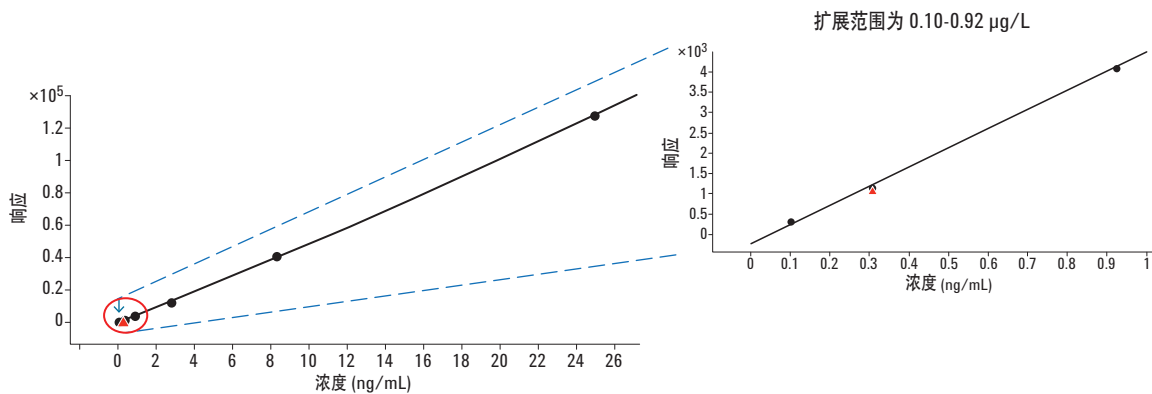


图 3. 经 3 倍连续稀释所得的浓度范围为 0.1 - 25 µg/L (包括 0.10 - 0.92 µg/L 的扩展浓度范围) 的 MC LR 校准曲线表现出良好的线性

LC/Q-TOF 分析

使用液相色谱/Q-TOF MS (LC/Q-TOF) 测得的未知 MC 母离子的精确质量数为 1059.5500, 与去甲基-HtyR 的实际质量数相匹配, 质量数误差为 5.0 ppm。这进一步支持了未知物由 HtyR 去甲基化形成的假设。跃迁离子的检测结果显示未知物和 YR 均含两个标称质

量数为 m/z 135 的微囊藻毒素特征离子 (图 4)。两个离子的实际质量数为 135.0804 和 135.1168, 由 Adda 基团的不同片段图谱组成。两种微囊藻毒素中的这两种离子均得到良好分离, 质量分辨率为 14000。

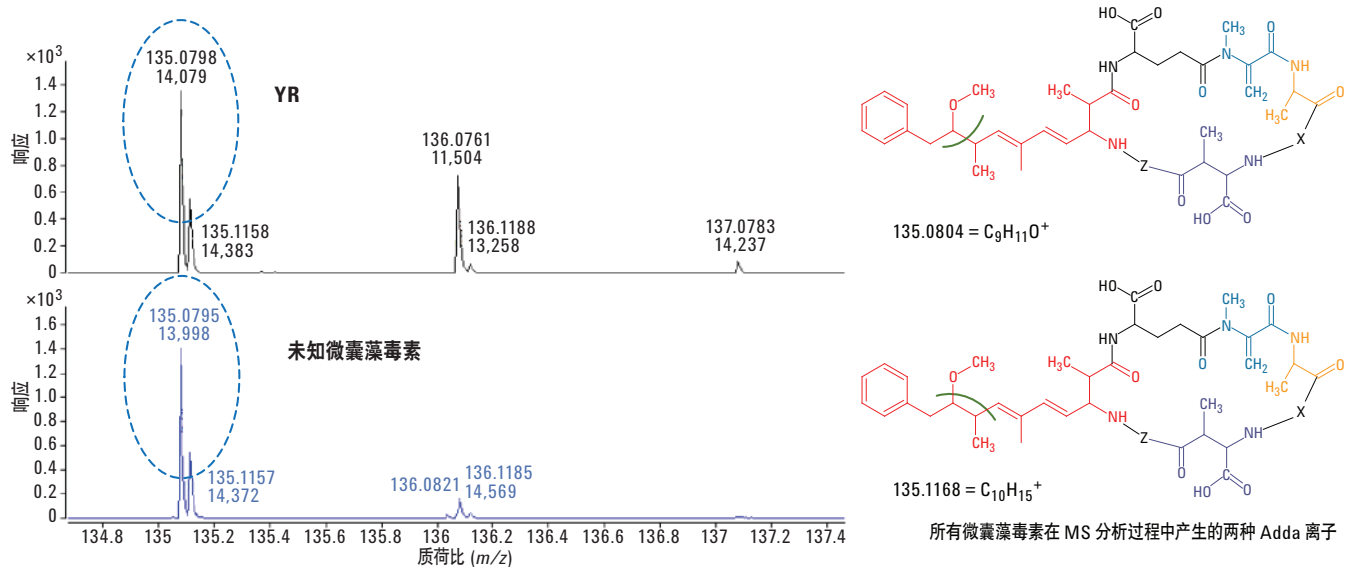


图 4. 使用 LC/Q-TOF 分析的谱图显示了从 Adda 基团衍生的两个离子和所有微囊藻毒素的特征离子, 这些离子在 YR 和未知微囊藻毒素中均获得良好分离

然而，正如预期，在 MC YR 中存在由微囊藻毒素的 Glu + Mdha 基团裂解形成的 m/z 213 离子，但该离子在未知 MC 中仅以痕量浓度存在（图 5）。这表明未知 MC 并不是 YR。我们预期 Glu + Mdha 基团去甲基化生成精确质量数为 199.0713 的离子（图 6）。该离子可在未知 MC 的谱图中观察到，而在 MC YR 谱图中没有。这些结果也支持了未知 MC 为 dm-HtyR 的假设。

先前微囊藻毒素结构的 LC/MS/MS 表征确定了 8 个主要离子，指定为 a-h [3]。其中的两个离子（f 和 h）可用于鉴定未知 MC。离子 f 含有 R^7 和 R^2 部分（图 1），应分别为微囊藻毒素 dm-HtyR 的 dm-Mdha (Dha) 和 Hty。离子 h 含 R^2 部分，也可能是甲基化位点 MeAsp³。根据 R^7 和 R^2 的鉴定结果的不同以及 R^3 位置是否甲基化，这两种离子的精确质量数会有所不同并且可用于诊断微囊藻毒素结构。

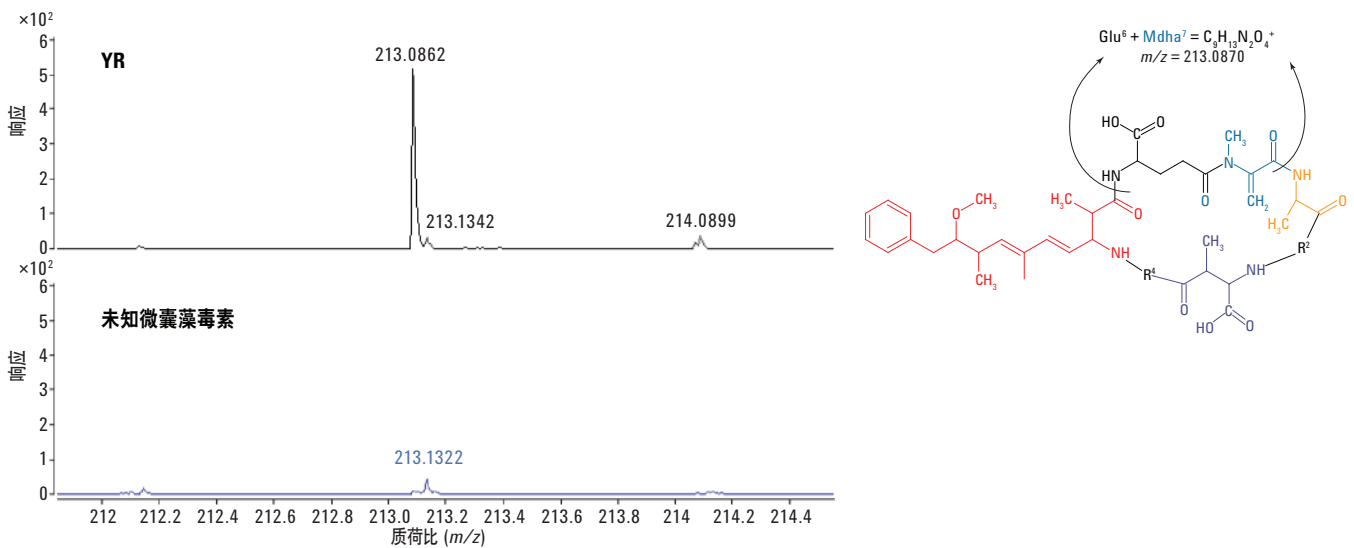


图 5. m/z 在 212-214.4 范围内的 YR 和未知微囊藻毒素的 Q-TOF 谱图。在微囊藻毒素 YR 中有 Glu + Mdha 基团的特征离子 m/z 213 存在，但在未知微囊藻毒素中的丰度较低

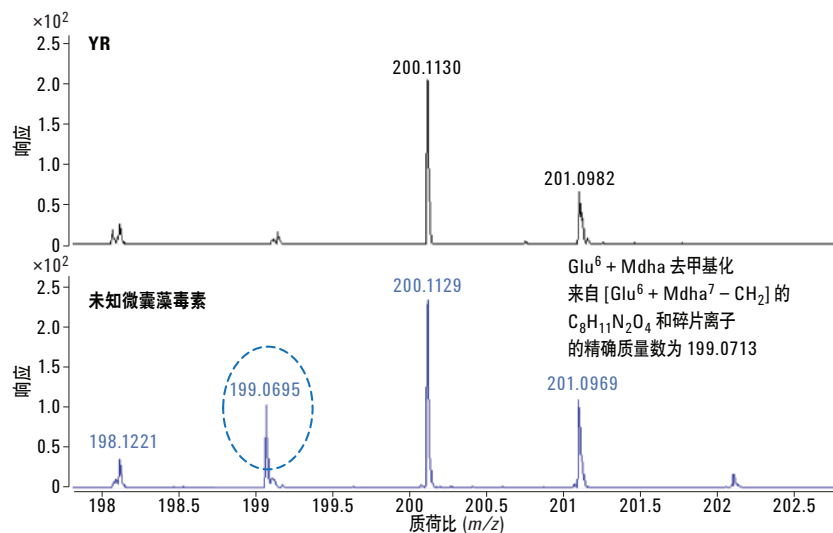


图 6. m/z 在 198-202 范围内的 YR 和未知微囊藻毒素的 Q-TOF 谱图。在未知微囊藻毒素谱图中存在峰 m/z 199，表明此物质为 Glu + Mdha 的去甲基化产物。此峰在 YR 中不存在。

采用 Q-TOF 分析未知微囊藻毒素中的离子 f 显示的精确质量数确证了第 7 位存在 Dha 和第 2 位存在 Hty，这与未知物为 dm-HtyR 的鉴定结果相符。分析 HtyR 标准品也同样得出了离子 f 的校正精确质量数（图 7）。

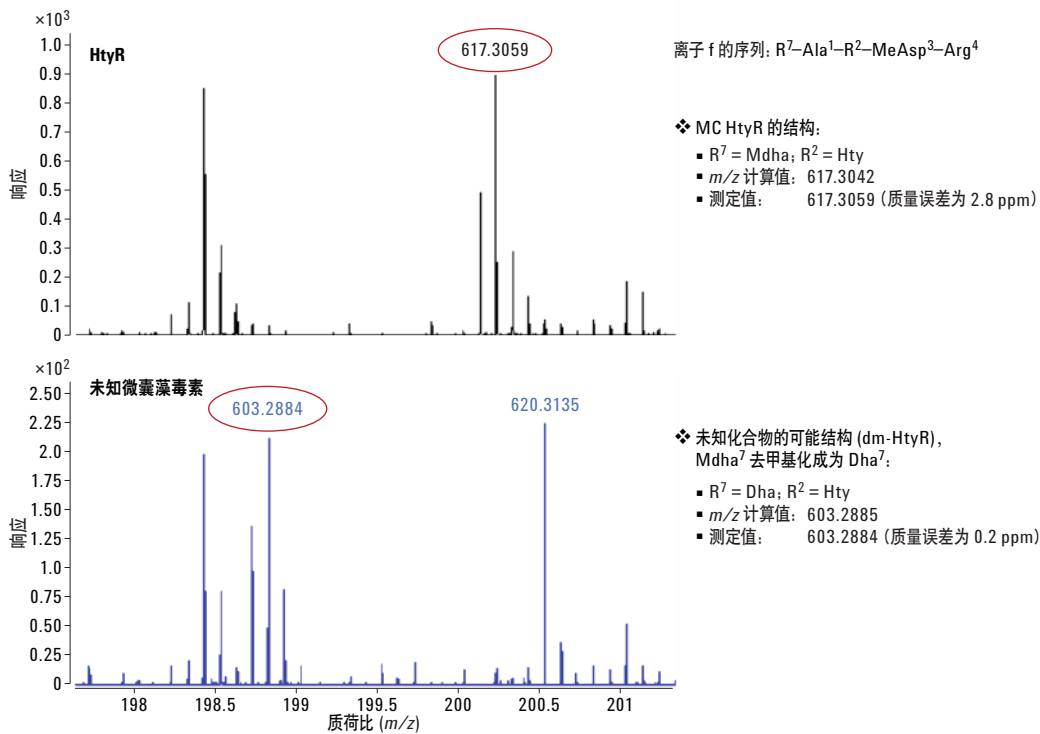


图 7. HtyR 和未知微囊藻毒素中离子 f 的 Q-TOF 谱图。在 HtyR (上方) 中检测所得的离子 f 的精确质量数与含有第 7 位 Hty 和第 R^3 位 Mdha 的离子的质量数计算值相匹配。相反, 在未知 MC 中检出的离子 f 的质量数与含有第 R^7 位 Hty 和第 R^3 位 Dha 的离子的质量数计算值相匹配

根据离子 h 的谱图确证了在未知 MC 的 R³ 位发生了最小程度的甲基化作用，因为其精确质量与计算得出的未知物和 HtyR 标准品第 3 位的甲基化天冬氨酸的精确质量数相匹配（图 8）。

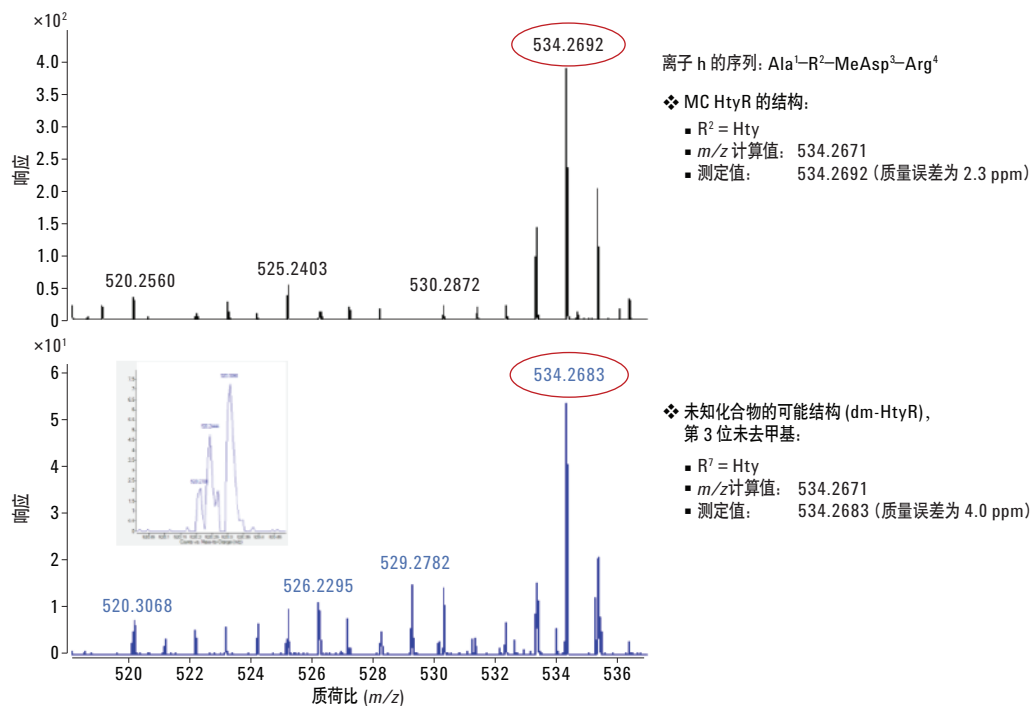
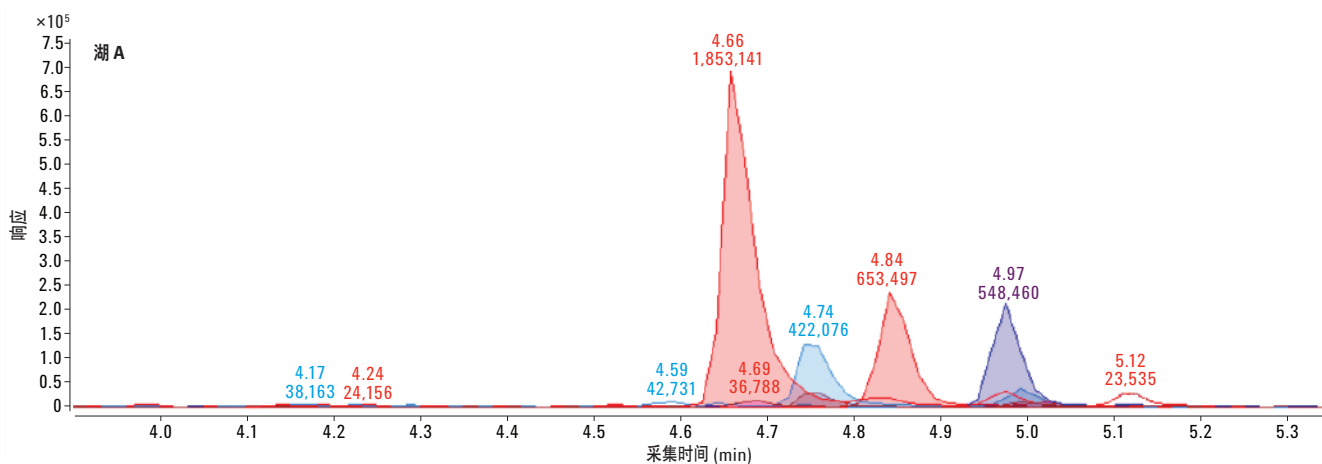


图 8. HtyR 和未知微囊藻毒素中离子 h 的 Q-TOF 谱图。在 HtyR (上方) 和未知 MC 中检测所得的离子 h 的精确质量数与含有第 R7 位 Hty 和第 R³ 位 Mdha 的离子的质量数计算值相匹配。相反, 检测结果显示在这两种微囊藻毒素中标称质量 m/z 520 处仅有一个极小的峰, 这表明 R³ 位置很少或没有发生去甲基化。

使用个人化合物数据库鉴定多种未知微囊藻毒素

仅根据微囊藻毒素的 H⁺ 加合物，具备精确质量数分析能力的 Q-TOF 就可以初步鉴定阿尔伯达湖泊中可能存在的其他微囊藻毒素。这一过程的第一步是使用 Agilent MassHunter PCDL Manager 软件建立个人化合物数据库 (PCD)，该软件能够让用户创建和编辑定制的 PCD，包括化合物、精确质量数和保留时间信息。精确质量数扫描数据的优势之一是利用此数据库可以追溯检索已获得的新化合物数据。

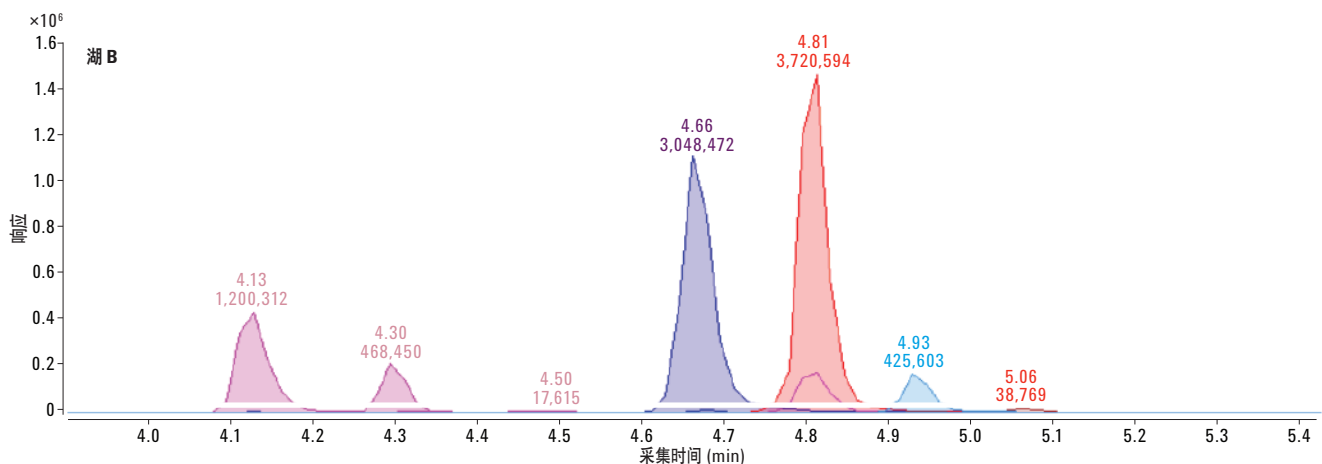
在本研究中，根据 WHO 列出的微囊藻毒素名单 [4] 将 52 种微囊藻毒素的分子式输入到 PCD 中，生成 H⁺ 加合物的精确质量数。然后，利用 MassHunter 中的分子式查找工具在样品总离子色谱图 (TIC) 数据文件中检索这些加合物的精确质量数。采用此方法并结合 Q-TOF，还可初步鉴定湖 A 和湖 B 样品中除去甲基 HtyR 以外的 7 种未知物 (图 9 和 10)。使用 Q-TOF MS/MS 进行额外分析并与分析标准品进行比较，以确证这些 MC 的存在并对其进行鉴定。我们将继续研究开发精确质量数计算器模型，以帮助鉴定非目标 MC 及其异构体。



保留时间	化合物名称	分子式	<i>m/z</i>	峰面积	分数	质量数误差 (ppm) *
4.66	MC-YR	C52 H72 N10 O13	1045.5346	1853141	98.5	-0.7
4.69	MC-LR	C49 H74 N10 O12	995.5549	36788	90.4	-0.1
4.74	MC-HtyR-DAsp3-Dha7	C51 H70 N10 O13	1031.5185	422076	96.8	-0.7
4.76	MC-HtyR	C53 H74 N10 O13	1059.5501	94974	98.4	-0.3
4.84	MC-DesMe-LR	C48 H72 N10 O12	981.5405	653497	99.1	-0.1
4.97	MC-HphR-Dha7	C52 H72 N10 O12	1029.5400	548460	99.6	-0.2
4.99	MC-LR-DAsp3-Dha7	C47 H70 N10 O12	967.5236	116668	94.3	-1.5
4.99	MC-LR	C49 H74 N10 O12	995.5559	32185	92.7	-0.6

*质量数误差的测定是利用 Q-TOF 分析得出的化合物质量数计算值减去其理论值，以 ppm 为单位

图 9. 取自湖 A 的水样的提取离子色谱图和表格，表格中包括了使用 MassHunter 分子式查找工具和针对 WHO 所列的各个微囊藻毒素创建的个人化合物数据库 (PCD) 初步鉴定所得的各个未知物的保留时间 (RT)、化合物名称、*m/z* 计算值及质量计算值与理论值之间的差值。H⁺ 加合物鉴定的质量数误差为 5 ppm，最低匹配得分为 70



保留时间	化合物名称	分子式	m/z	峰面积	分数	质量数误差 (ppm) *
4.13	MC-HtyR-DAsp3-Dha7	C51 H70 N10 O13	1031.5193	1200312	99.5	-0.4
4.30	MC-LR-DAsp3-Dha7	C47 H70 N10 O12	967.5246	468450	99.7	-0.3
4.50	MC-LR-DAsp3-Dha7	C47 H70 N10 O12	967.5256	17615	86.4	0.7
4.66	MC-HtyR-DAsp3-ADMAAdda5-Dhb7	C53 H72 N10 O14	1073.5305	3048472	99.4	0.4
4.68	MC-LR	C49 H74 N10 O12	995.5549	18,836	97.7	-1.1
4.81	MC-LR-DAsp3-ADMAAdda5-Dhb7	C49 H72 N10 O13	1009.5359	3720594	99.6	0.5
4.93	MC-LY	C52 H71 N7 O13	1002.5181	425603	99.4	-0.3
5.06	MC-LR-ADMAAdda5	C50 H74 N10 O13	1023.5505	38769	95.9	-0.6

*质量数误差的测定是利用 Q-TOF 分析得出的化合物质量数计算值减去其理论值，以 ppm 为单位

图 10. 取自湖 B 的水样的提取离子色谱图和表格，表格中包括了使用 MassHunter 分子式查找工具和针对 WHO 所列的各个微囊藻毒素创建的个人化合物数据库 (PCD) 初步鉴定所得的各个未知物的保留时间 (RT)、化合物名称、 m/z 计算值及质量计算值与理论值之间的差值。H+ 化合物鉴定的质量数误差为 5 ppm，最低匹配得分为 70

结论

获得分析标准品后，使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统可为微囊藻毒素目标物分析提供一个很好的平台。利用 Agilent 6540 Q-TOF 液质联用系统进行三重四极杆液质联用分析，并根据分子离子加合物以及 MS/MS

碎片的精确质量数来确证疑似化合物。这两种技术相结合支持了阿尔伯特湖泊水样中存在 dm HtyR 的假设。使用 Agilent MassHunter PCDL Manager 软件对数据库进行编辑，使其包括根据文献中报道的类似物所得的其他微囊藻毒素的化学式。使用 MassHunter 分子式查找工具可以在 PCDL 数据库和谱库中追溯检索先前采集的数据文件以获取其他这些已知的化合物。

参考文献

1. B.G. Kotak, A.K.-Y. Lam, E. E. Prepas, and S.E. Hrudey. "Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**, 1584–1593 (2000)
2. D. M. Orihel, D. F. Bird, M. Brylinsky, H. Chen, D. B. Donald, D. Y. Huang, A. Giani, D. Kinniburgh, H. Kling, B. G. Kotak, P. R. Leavitt, C. C. Nielsen, S. Reedyk, R. C. Rooney, S. B. Watson, R. W. Zurawell, and R. D. Vinebrooke. "High microcystin concentrations occur only at low nitrogen-to-phosphorus ratios in nutrient-rich Canadian lakes." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **69**, 1457-1462 (2012)
3. T. Mayumi, H. Kato, S. Imanishi, Y. Kawasaki, M. Hasegawa, K. Harada. "Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions." *J. Antibiot (Tokyo)* **59**, 710-719 (2006)
4. I. Chorus and J. Bartram (Eds.). "Toxic Cyanobacteria in Water—A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management. E & FN Spon, published on behalf of the World Health Organization, New York (1999)

更多信息

有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站

www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

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，2014
2014年4月28日，中国印刷
5991-4444CHCN



Agilent Technologies