Nota de aplicação

Ambiental

Agilent

Trusted Answers

Quantificação de microcistinas em água pelo sistema LC/MS/MS com injeção direta e SPE on-line

Autores

Chang jiang, Pei-bin Hu
Agilent Technologies Inc.
Chengdu. China

Tarun Anumol
Agilent Technologies Inc.,
Wilmington, DE

Resumo

Esta nota de aplicação compara os métodos de injeção direta e SPE on-line usando cromatografia líquida (LC) com espectrometria de massas em tandem (MS/MS) para a análise de microcistinas (MCs) na água. Estas incluem MC-RR, MC-HtyR, MC-LR, MC-HilR, MC-LA e MC-LF. O sistema LC/MS/MS com SPE on-line elimina as demoradas e trabalhosas etapas de extração do SPE off-line. Tanto a injeção direta quanto o método SPE on-line alcançaram limites de detecção (LODs) de níveis baixos ou sub-ng/L, que são muito mais baixos que as diretrizes provisórias para água potável definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Introdução

MCs são peptídeos cíclicos com uma estrutura geral de ciclo [-D-Ala-R^2-D-MeAsp-R^4-Adda-D-Glu-Mdha-], onde o R^2 e o R^4 são L-aminoácidos variáveis (Figura 1, Tabela 1). Os dois aminoácidos variáveis e a metilação/desmetilação de outros aminoácidos criam uma grande variedade de MCs. Foram identificados mais de 80 MCs e, para este experimento, seis das MCs mais conhecidas foram escolhidas como compostos de interesse.

As MCs são toxinas naturais produzidas por certos gêneros de cianobactérias. Relatórios sugerem que as MCs são hepatotóxicas e potencialmente cancerígenas[1].

HPLC com detecção de UV tem sido usado para analisar MCs. Os métodos analíticos estão mudando mais em relação à detecção de MS. Existe um risco potencial de exposição crônica a MCs no abastecimento de água potável, resultando na publicação de uma diretriz provisória pela OMS, definindo a concentração máxima de MC-LR total (livre mais ligado à célula) na água potável como 1 µg/L. Muitos governos nacionais e regionais adotaram este valor de diretriz. Recentemente, uma rígida regulamentação foi aplicada em algumas regiões da China, especialmente para sistemas urbanos de abastecimento de água. Os limites de detecção do método para a injeção direta menores que 0,05 µg/L são desafiadores para a maioria dos sistemas MS/MS. É necessário o uso de um sistema SPE on-line acoplado ao MS para a detecção em baixas concentrações.

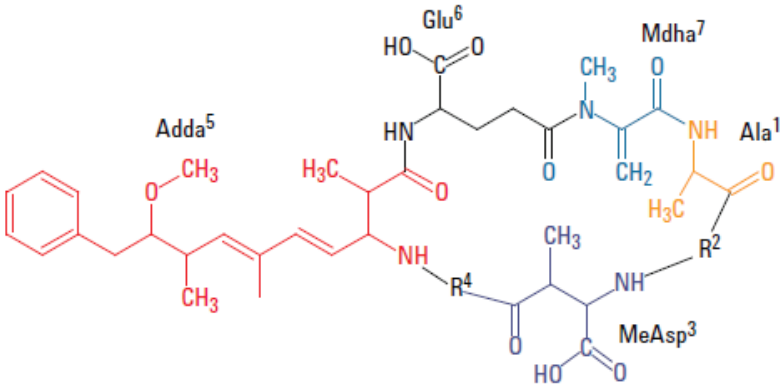

Figura 1. Estrutura das MCs. A nomenclatura da MC é baseada nos L-aminoácidos presentes nas posições R^2 e R^4.

Tabela 1. A composição do R^2/R^4 para diferentes MCs.

MC	R^2	R^4	Fórmula molecular	Massa exata
LR	Leu	Arg	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$	994,5488
RR	Arg	Arg	$C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$	1037,5658
LA	Leu	Ala	$C_{46}H_{67}N_7O_{12}$	909,4848
LF	Leu	Phe	$C_{52}H_{71}N_7O_{12}$	985,5161
HtyR	Homo-L-Tyr	Arg	$C_{53}H_{74}N_{10}O_{13}$	1058,5437
HilR	Homo-L-Ile	Arg	$C_{50}H_{76}N_{10}O_{12}$	1008,5644

Parte experimental

Padrões

Os padrões de MC foram adquiridos da Enzo Life Science International.

Instrumentação

Tabela 2. Configuração do instrumento.

Sistema SPE on-line Agilent 1290 Infinity II	Modelo n.º
Bomba flexível Agilent 1290 Infinity II	G7104A
Bomba de alta velocidade Agilent 1290 Infinity II	G7120A
Multisampler Agilent 1290 Infinity II	G7167B
Cabeça analítica, 900 µL	G4267-60046
Loop de amostra flex, 900 µL, lado direito	G7167-68900
Kit de várias gavetas para multisampler	G7167-68711
Kit de gavetas de altura tripla (3H)	G7167-60022
Termostato de múltiplas colunas Agilent 1290 Infinity II	G7116B
Conjunto inicial de SPE on-line Agilent (inclui uma válvula de 2 posições/10 portas e dois cartuchos de SPE on-line Agilent Bond Elute, PLRP-S, 2,1 × 12,5 mm)	G4742A
Acionador de válvula Agilent 1290 Infinity	G1170A
LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6470 com tecnologia Agilent Jet Stream	G6470A

Condições cromatográficas e parâmetros do MS

Tabela 3. Parâmetros do LC para injeção direta.

Parâmetro	Valor
Coluna analítica	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 100 mm, 2,7 µm (p/n 695975-302)
Temperatura da coluna	45°C
Volume de injeção	10 µL
Velocidade de aspiração e ejeção	100 µL/min; 400 µL/min
Lavagem da agulha	Metanol (MeOH), 5 segundos
Fases móveis	A) ácido fórmico 0,1% (FA) + fluoreto de amônio (NH_4F) 1 mM em água (H_2O) B) FA 0,1% em acetonitrila (ACN)
Tempo final	10 minutos
Tempo posterior	3 minutos
Vazão	0,4 mL/min
Gradiente	Tempo (min) %B 0 30 8 95 10 95

Tabela 4. Parâmetros do LC para a injeção por SPE on-line.

Parâmetro	Valor
Coluna analítica	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 100 mm, 2,7 µm (p/n 695975-302)
Temperatura da coluna	45°C
Colunas de extração	2 × cartuchos PLRP-S, 2,1 × 12,5 mm (p/n 5982-1271); Vials rosqueáveis de 6 mL (p/n 9301-1377), tampa rosqueável (p/n 9301-1379), Septo pré-cortado (p/n 5188-2758)
Volume de injeção	1.800 µL
Velocidade de aspiração e ejeção	1.000 µL/min; 4.000 µL/min
Lavagem da agulha	MeOH, 5 segundos
Fases móveis	A) FA 0,1% + 1 mM NH_4F em H_2O B) FA 0,1% em ACN
Tempo final	14 minutos
Tempo posterior	3 minutos
Vazão	0,4 mL/min
Gradiente	Tempo (min) %B 0 30 4 30 12 95 14 95

Tabela 5. Parâmetros da bomba flexível para carregamento e lavagem SPE.

Tempo (min)	Função	Parâmetro
0	Bombear para carregar	Bombear por 4 minutos; fluxo: 1,5 mL/min; H_2O
4	Mudar posição da válvula	Aumentar a posição da válvula (válvula seletora)
4,1	Bombear para lavagem	Bombear por 1 minuto; fluxo: 1,5 mL/min; H_2O
5	Bombear para lavagem	Bombear por 5 minutos; fluxo: 1,5 mL/min; ACN
10	Bombear para recarregar	Bombear por 7 minutos; fluxo: 1,5 mL/min; H_2O

Tabela 6. Parâmetros do MS para os métodos SPE on-line e injeção direta.

Parâmetro	Valor
Temperatura do gás de focalização	400°C
Fluxo do Sheath gas	12 L/min
Temperatura do gás de secagem	350°C
Fluxo do gás de secagem	10 L/min
Nebulizador	20 psi
Voltagem do capilar	4.500 V
Voltagem do nozzle	500 V
Delta EMV	300 V

Tabela 7. Parâmetros MRM para MCs.

Composto	Íon precursor (*m/z*)	Res. MS1	Íon produto (*m/z*)	Res. MS2	Dwell (ms)	Fragmentador (V)	Energia de colisão (eV)	Polaridade
LR	995,6	Unit.	213	Unit.	40	200	58	Positiva
	995,6	Unit.	135	Unit.	40	200	110	Positiva
RR	520,1	Unit.	213	Unit.	40	140	35	Positiva
	520,1	Unit.	135	Unit.	40	140	30	Positiva
LA	910,5	Unit.	213	Unit.	40	170	50	Positiva
	910,5	Unit.	135	Unit.	40	170	75	Positiva
LF	986,5	Unit.	213	Unit.	40	170	68	Positiva
	986,5	Unit.	135	Unit.	40	170	78	Positiva
HtyR	1.059,6	Unit.	106,7	Unit.	40	220	147	Positiva
	1.059,6	Unit.	103	Unit.	40	220	155	Positiva
HilR	1.009,6	Unit.	106,7	Unit.	40	210	128	Positiva
	1.009,6	Unit.	103	Unit.	40	210	160	Positiva

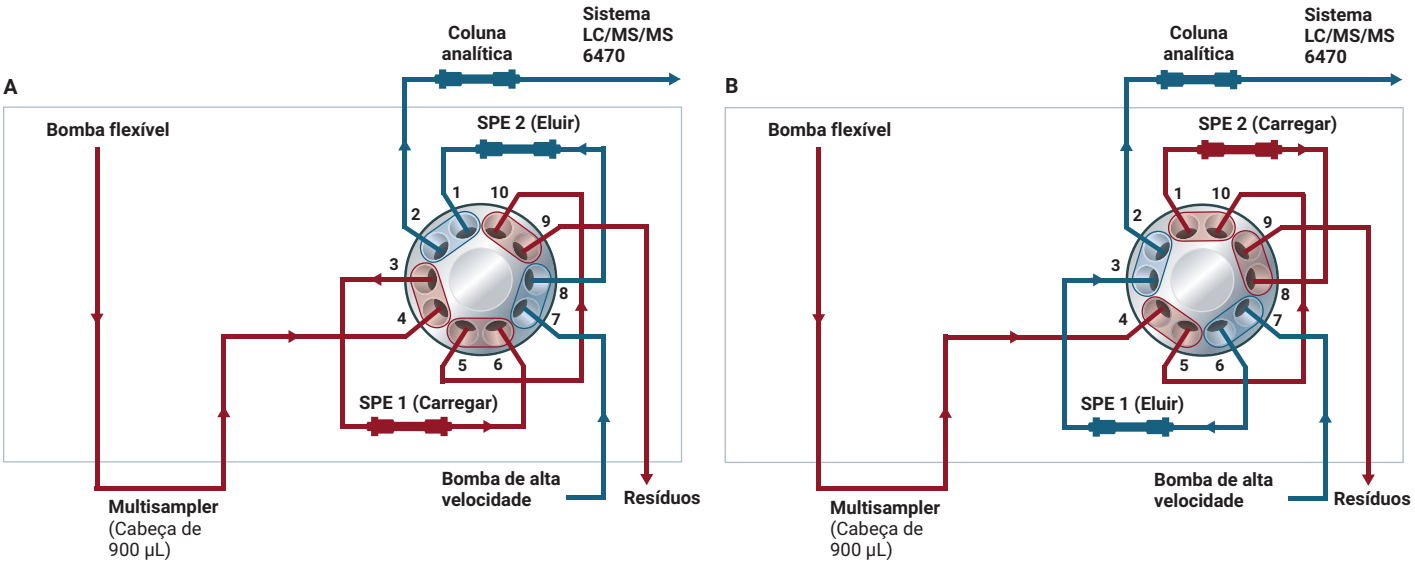

Figura 2. Posições da válvula para carregamento e eluição.

Resultados e discussão

A Figura 3 mostra os cromatogramas MRM das MCs analisadas por injeção direta (A) e SPE on-line (B). O $[M+2H]^{2+}$ foi escolhido como o íon precursor para a MC-RR, enquanto o $[M+H]^{+}$ foi usado como o íon precursor para as outras MCs para alcançar a melhor sensibilidade. O software otimizador MassHunter aprimorou automaticamente cada parâmetro MS, incluindo fragmentador, energia de colisão CE e temperatura, fluxo e voltagem da fonte de íons.

A separação completa pode ser alcançada em 7 e 10 minutos para os métodos de injeção direta e SPE on-line, respectivamente. O MC-RR, com o íon precursor duplamente carregado de maior abundância, deu a resposta mais sensível. Os formatos dos picos foram consistentes e reprodutíveis.

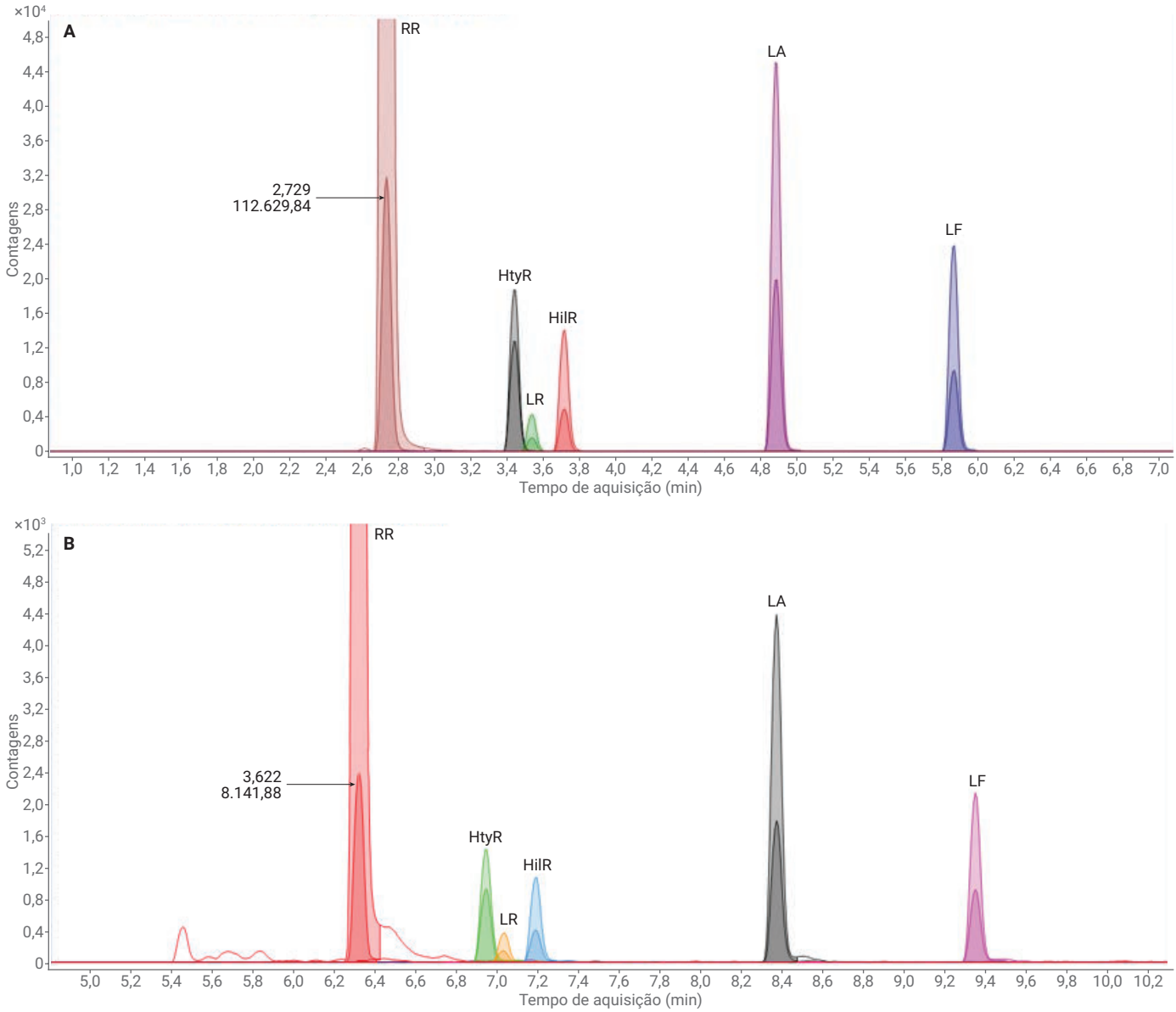

Figura 3. Cromatograma MRM para injeção direta (100 µg/L) e SPE on-line (2 µg/L).

Com o método de injeção direta, foi observada uma excelente linearidade na resposta do detector na faixa de 0,01 a 100 ng/mL para MC-RR, 0,05 a 100 ng/mL para MC-HtyR, MC-HilR, MC-LA e MC-LF e 0,1 a 100 ng/mL para MC-LR, respectivamente. Com o método SPE on-line, a faixa linear foi de 0,0002 a 2 ng/mL para MC-RR, 0,001 a 2 ng/mL para MC-HtyR, MC-HilR, MC-LA e MC-LF e 0,008 a 2 ng/mL para MC-LR, respectivamente. As Figuras 4 e 5 mostram as curvas de calibração.

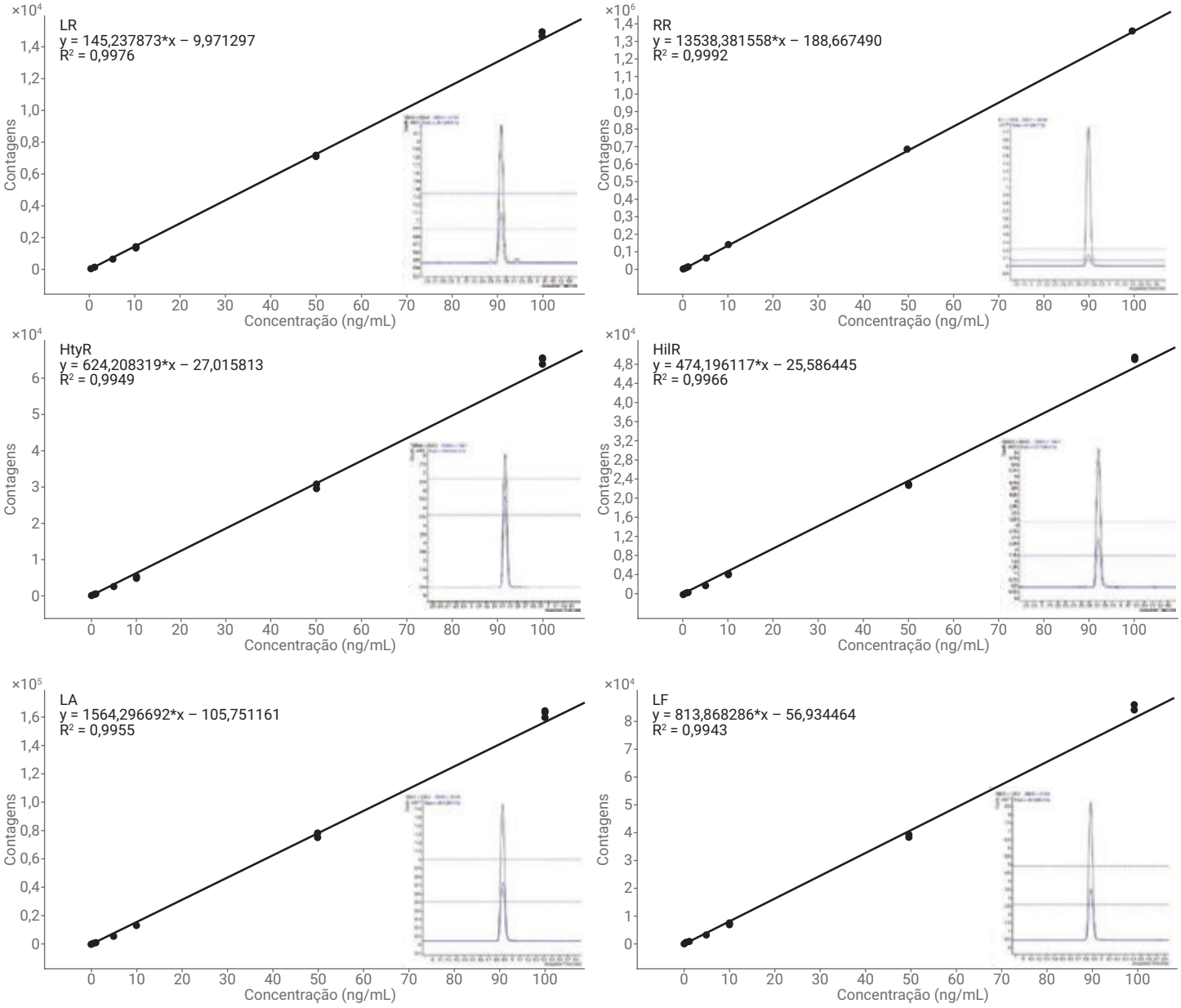

Figura 4. Curvas de calibração para quantificação de MCs com o método de injeção direta.

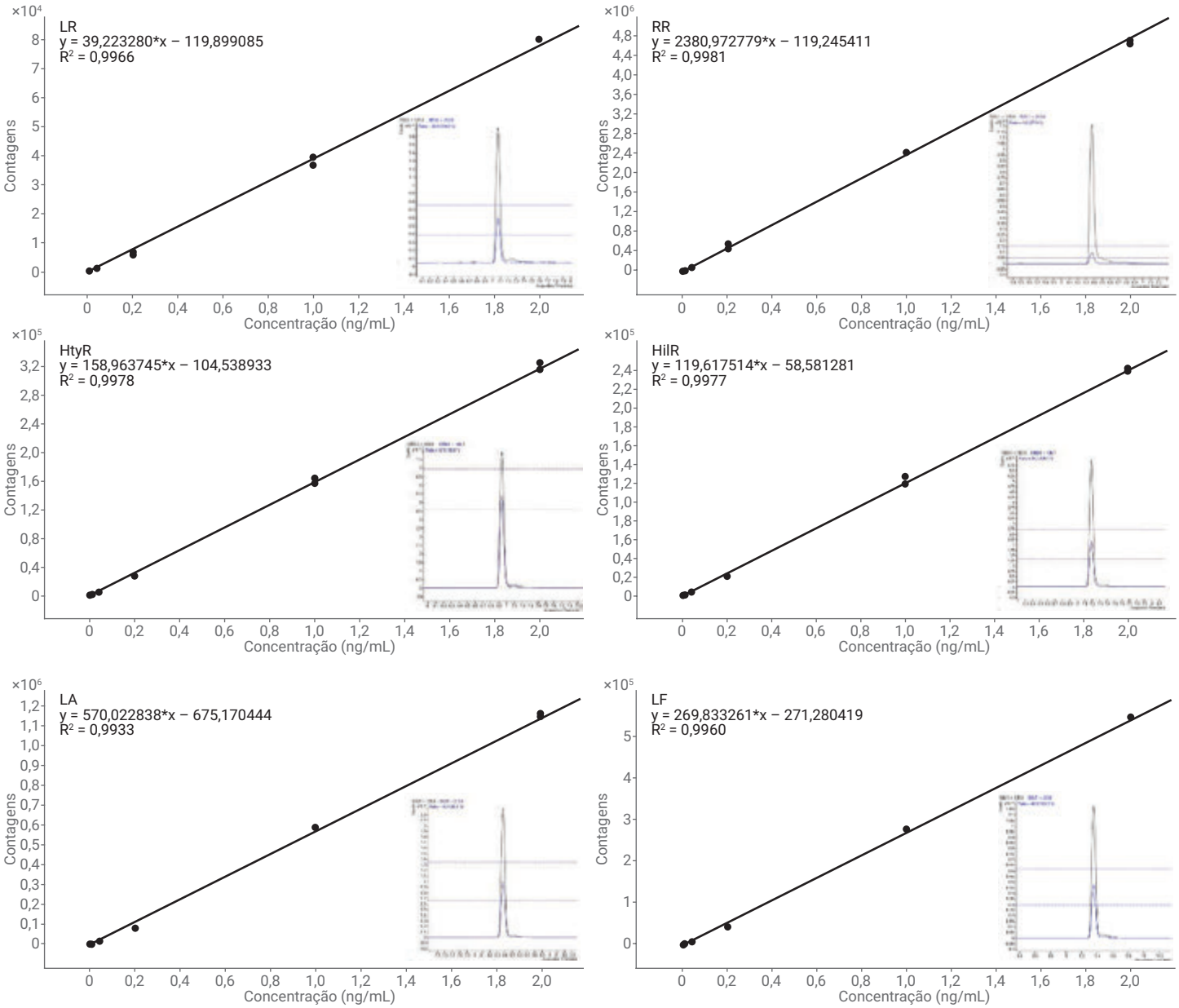

Figura 5. Curvas de calibração para quantificação de MCs com o método SPE on-line.

Os LODs e os limites de quantificação (LOQs) foram medidos para cada MC (Tabela 8). Para injeção direta, a sensibilidade de 2 a 20 ppt pode ser alcançada, o que está muito abaixo do nível recomendado pelas diretrizes da OMS de 1 ppb. No entanto, algumas regulações regionais estipulam limites de detecção do método de 20 ng/L para MC-RR e 100 ng/L para MC-LR3 nos sistemas de abastecimento de água urbanos. A sensibilidade foi adequada para injeção direta usando o sistema LC/MS triplo quadrupolo 6470, mas com o uso do SPE on-line é possível que instrumentos menos sensíveis alcancem LODs muito mais baixos.

Um teste de recuperação foi realizado através da injeção de água de superfície com adição a 500 ppt e 2 ppt no método de injeção direta e SPE on-line, respectivamente (n = 5). Para ambos os métodos, foram alcançadas recuperações entre 75 e 110% para todas as MCs. O método SPE on-line teve uma recuperação menor do que a injeção direta, possivelmente devido à captura e eluição de compostos no cartucho SPE, mas as recuperações ainda foram aceitáveis para todas as MCs (Tabela 9).

Análise de amostras reais de água

Três amostras de água de superfície ao redor do distrito de Chengdu foram coletadas, resultando em uma amostra positiva e duas negativas ao serem analisadas com o método SPE on-line. Além disso, devido ao baixo nível de concentração, a amostra positiva só pôde ser quantificada através do método SPE on-line, enquanto o método de injeção direta, com um volume de injeção de 10 µL, retornou um resultado não detectado (ND) para todas as MCs testadas.

Tabela 8. LODs e LOQs para ambos os métodos de injeção.

MCs	Injeção direta		SPE on-line	
	LOD (ppt)	LOQ (ppt)	LOD (ppt)	LOQ (ppt)
RR	10	50	0,05	0,2
HtyR	50	100	0,2	1
LR	100	500	0,5	2
HilR	50	100	0,2	1
LA	50	100	0,2	1
LF	50	100	0,2	1

Tabela 9. Recuperação (%) de ambos os métodos de injeção.

MCs	Injeção direta		SPE on-line	
	Média	RSD (%)	Média	RSD (%)
RR	98,02	1,78	80,38	5,83
HtyR	99,50	4,49	86,01	7,55
LR	94,79	4,20	76,85	5,27
HilR	93,70	5,27	86,25	8,83
LA	97,03	5,47	84,15	6,39
LF	100,26	7,06	82,41	3,01

Tabela 10. Resultados da detecção de MC para as amostras (ND = não detectado).

MCs	RR	HtyR	LR	HilR	LA	LF
Amostra 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 3	7,40 ppt	ND	73,41 ppt	4,39 ppt	3,20 ppt	ND

Conclusão

Foi desenvolvido um método simples e sensível para a determinação quantitativa de MCs. Os métodos de injeção direta e SPE on-line foram comparados usando o sistema LC/MS triplo quadrupolo 6470. Os LOQs obtidos para os métodos de injeção direta e SPE on-line foram menores do que o valor estabelecido na diretriz da OMS para as concentrações de MC-LR na água potável. O método do SPE on-line também atendeu às rigorosas diretrizes dos sistemas de abastecimento de água regionais publicadas recentemente em relação aos níveis de detecção exigidos na China. MC-RR e outras MCs foram detectadas em uma amostra de água de superfície, que só pôde ser quantificada com o método SPE on-line devido aos níveis de detecção mais baixos.

Referências

1. Carmichael, W. W. The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* **1994**, *270*, 64-72.
2. WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, terceira edição, volume um, *WHO*, Geneva, Suíça, **2004**.
3. Standard Water Quality Examination Methods for Urban Water Supply. People's Republic of China Urban Construction Industry Standards issued by Ministry of Housing and Urban-Rural Development of The People's Republic of China.

www.agilent.com/chem

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Impresso nos EUA, 29 de junho de 2018
5994-0007PTBR

Agilent
Trusted Answers