应用简报

环境

Agilent

Trusted Answers

通过直接进样和在线 SPE LC/MS/MS 系统定量分析水中的微囊藻毒素

作者

Chang jiang，Pei-bin Hu
安捷伦科技有限公司，
中国成都

Tarun Anumol
安捷伦科技有限公司，
美国特拉华州威尔明顿

摘要

本应用简报比较了使用液相色谱 (LC) 联用串联质谱 (MS/MS) 分析水中微囊藻毒素 (MCs) 的直接进样和在线 SPE 方法。这些毒素包括 MC-RR、MC-HtyR、MC-LR、MC-HilR、MC-LA 和 MC-LF。在线 SPE LC/MS/MS 系统省去了耗时费力的离线 SPE 萃取步骤。直接进样和在线 SPE 方法均实现了低至 ng/L 或亚 ng/L 水平的检出限 (LODs)，远低于世界卫生组织 (WHO) 制定的饮用水暂行指南中的要求。

前言

MCs 是一种环肽，其一般结构为环[-D-Ala-R^2-D-MeAsp-R4-Adda-D-Glu-Mdha-]，其中 R^2 和 R^4 为可变的 L-氨基酸（图 1，表 1）。两个可变氨基酸和其他氨基酸的甲基化/去甲基化产生了多种 MCs。目前已鉴定出 80 多种 MCs，在本实验中，选择其中 6 种最为人所知的 MCs 作为目标化合物。

MCs 是某些蓝藻属产生的天然毒素。报告表明，MCs 具有肝毒性和潜在致癌性[1]。

HPLC 联用 UV 检测一直被用于分析 MCs。然而，分析方法正在更多地转向 MS 检测。饮用水存在长期暴露于 MCs 的潜在风险，这促使 WHO 发布了一份暂行指南，规定饮用水中总 MC-LR（包括游离和与细胞结合的 MC）最高浓度为 1 µg/L。许多国家和地区的政府都采用了这一指导值。最近，中国的部分地区，尤其是城市供水系统，已经开始实施严格的监管。对于大多数 MS/MS 系统来说，直接进样的方法检出限低于 0.05 µg/L 是一项挑战。对于低浓度检测，需要在线 SPE 系统联用 MS。

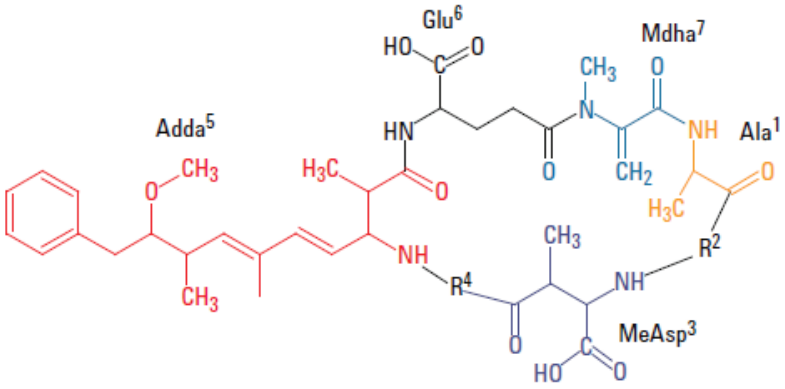

图 1. MCs 结构。MC 的命名基于 R^2 和 R^4 位置的 L-氨基酸

表 1. 不同 MCs 的 R^2/R^4 组成

MC	R^2	R^4	分子式	精确质量
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

实验部分

标准品

MC 标准品购自 Enzo Life Science International。

仪器

表 2. 仪器配置

Agilent 1290 Infinity II 在线 SPE 系统	型号
Agilent 1290 Infinity II 全能泵	G7104A
Agilent 1290 Infinity II 高速泵	G7120A
Agilent 1290 Infinity II Multisampler	G7167B
分析头，900 µL	G4267-60046
样品定量环（带卡套），900 µL，右侧	G7167-68900
用于 Multisampler 的多次抽取工具包	G7167-68711
三层高抽屉工具包 (3H)	G7167-60022
Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱	G7116B
安捷伦在线 SPE 启始装置（包括一个 2 位/10 通阀和两个 Agilent Bond Elute 在线 SPE 小柱，PLRP-S，2.1 × 12.5 mm）	G4742A
Agilent 1290 Infinity 阀驱动	G1170A
采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6470 三重四极杆 LC/MS 系统	G6470A

色谱条件和 MS 参数

表 3. 直接进样的 LC 参数

参数	值
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 µm（部件号 695975-302）
柱温	45 °C
进样量	10 µL
抽吸和推出速度	100 µL/min；400 µL/min
进样针清洗	甲醇 (MeOH)，5 秒
流动相	A）0.1% 甲酸 (FA) + 1 mM 氟化铵 (NH_4F) 水溶液 (H_2O) B) 含 0.1% FA 的乙腈溶液 (ACN)
停止时间	10 分钟
后运行时间	3 分钟
流速	0.4 mL/min
梯度	时间 (min) %B 0 30 8 95 10 95

表 4. 在线 SPE 进样的 LC 参数

参数	值
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 µm（部件号 695975-302）
柱温	45 °C
捕集柱	2 根 PLRP-S 小柱，2.1 × 12.5 mm（部件号 5982-1271）； 6 mL 螺口样品瓶（部件号 9301-1377），螺口盖（部件号 9301-1379），预开口隔垫（部件号 5188-2758）
进样量	1800 µL
抽吸和推出速度	1000 µL/min；4000 µL/min
进样针清洗	MeOH，5 秒
流动相	A) 0.1% FA + 1 mM NH_4F 水溶液 B) 含 0.1% FA 的乙腈溶液
停止时间	14 min
后运行时间	3 分钟
流速	0.4 mL/min
梯度	时间 (min) %B 0 30 4 30 12 95 14 95

表 5. 用于 SPE 上样和清洗的全能泵参数

时间 (min)	功能	参数
0	上样	泵送 4 min，流速：1.5 mL/min；H_2O
4	阀切换位置	增大阀位置（切换阀）
4.1	清洗	泵送 1 min，流速：1.5 mL/min；H_2O
5	清洗	泵送 5 min，流速：1.5 mL/min；ACN
10	再次上样	泵送 7 min，流速：1.5 mL/min；H_2O

表 6. 在线 SPE 方法和直接进样法的 MS 参数

参数	值
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
干燥气温度	350 °C
干燥气流速	10 L/min
雾化器	20 psi
毛细管电压	4500 V
喷嘴电压	500 V
Delta EMV	300 V

表 7. MCs 的 MRM 参数

化合物	母离子 (*m/z*)	MS1 分辨率	子离子 (*m/z*)	MS2 分辨率	驻留时间 (ms)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)	极性
LR	995.6	Unit	213	Unit	40	200	58	正
	995.6	Unit	135	Unit	40	200	110	正
RR	520.1	Unit	213	Unit	40	140	35	正
	520.1	Unit	135	Unit	40	140	30	正
LA	910.5	Unit	213	Unit	40	170	50	正
	910.5	Unit	135	Unit	40	170	75	正
LF	986.5	Unit	213	Unit	40	170	68	正
	986.5	Unit	135	Unit	40	170	78	正
HtyR	1059.6	Unit	106.7	Unit	40	220	147	正
	1059.6	Unit	103	Unit	40	220	155	正
HilR	1009.6	Unit	106.7	Unit	40	210	128	正
	1009.6	Unit	103	Unit	40	210	160	正

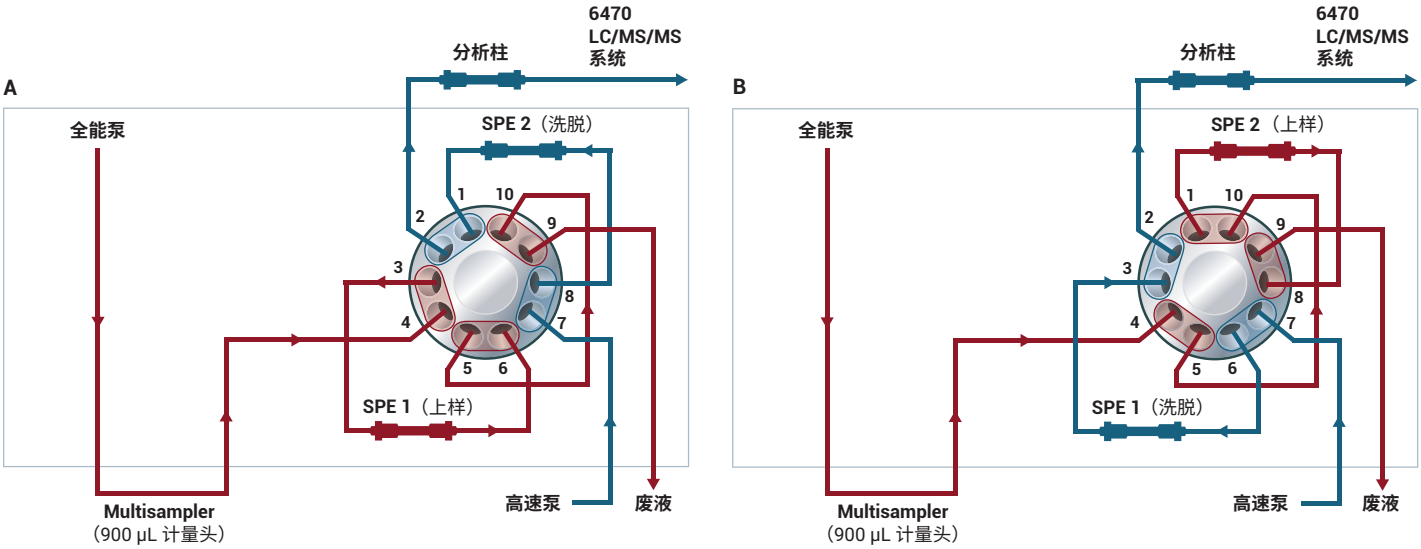

图 2. 用于上样和洗脱的阀位置

结果与讨论

图 3 显示了通过直接进样 (A) 和在线 SPE (B) 分析 MCs 获得的 MRM 色谱图。选择 $[M+2H]^{2+}$ 作为 MC-RR 的母离子，$[M+H]^{+}$ 作为其他 MCs 的母离子，以实现更出色的灵敏度。MassHunter Optimizer 软件自动优化每个 MS 参数，包括碎裂电压、CE 电压以及离子源温度、流速和电压。

直接进样法和在线 SPE 方法可分别在 7 分钟和 10 分钟内实现完全分离。MC-RR 的双电荷母离子丰度最高，响应最灵敏。峰形一致且可重现。

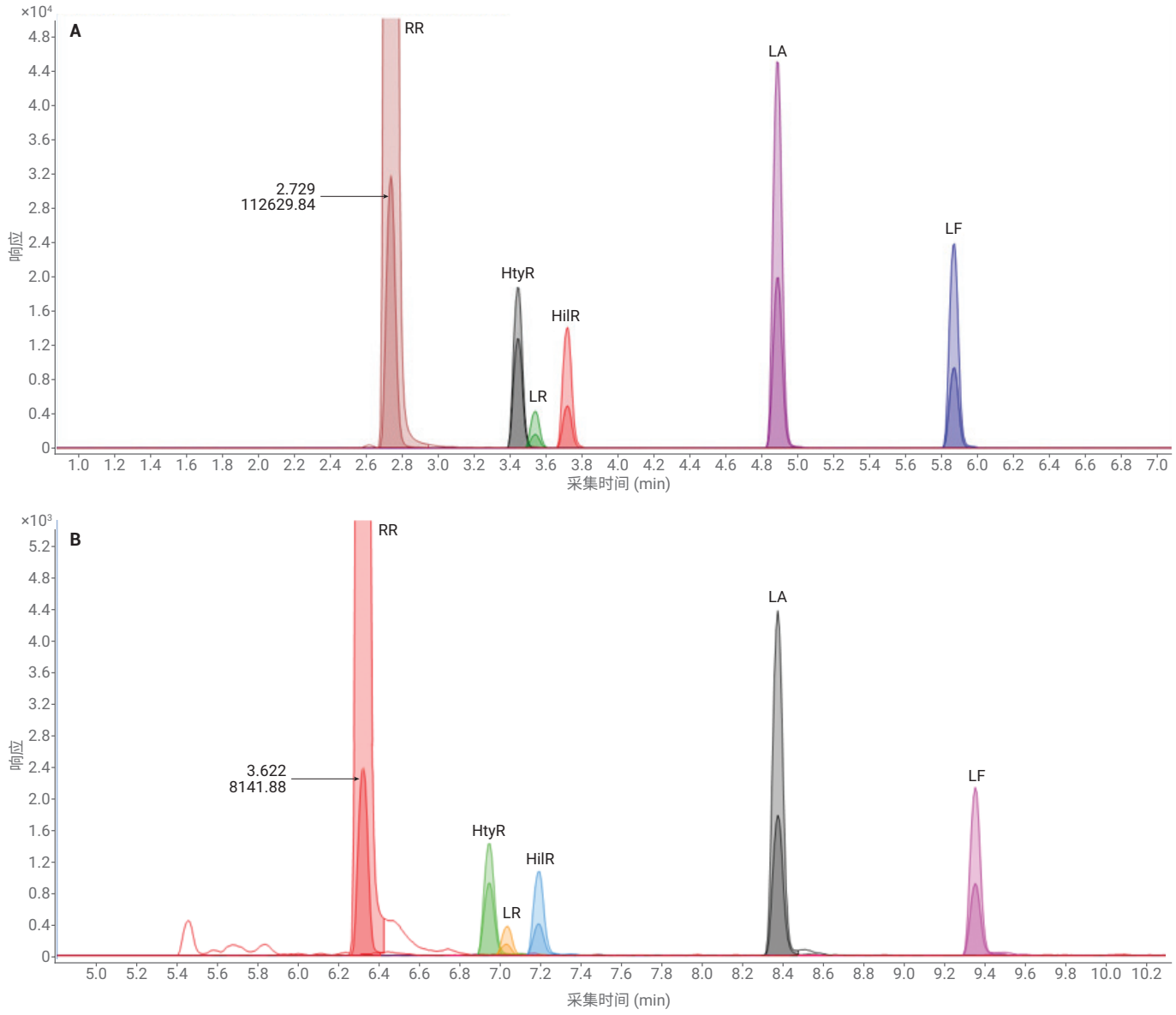

图 3. 直接进样 (100 µg/L) 和在线 SPE (2 µg/L) 的 MRM 色谱图

采用直接进样法，MC-RR 在 0.01–100 ng/mL 范围内，MC-HtyR、MC-HilR、MC-LA 和 MC-LF 在 0.05–100 ng/mL 范围内，MC-LR 在 0.1–100 ng/mL 范围内，检测器响应具有出色的线性。采用在线 SPE 法，MC-RR 的线性范围为 0.0002–2 ng/mL，MC-HtyR、MC-HilR、MC-LA 和 MC-LF 的线性范围为 0.001–2 ng/mL，MC-LR 的线性范围为 0.008–2 ng/mL。图 4 和图 5 显示了校准曲线。

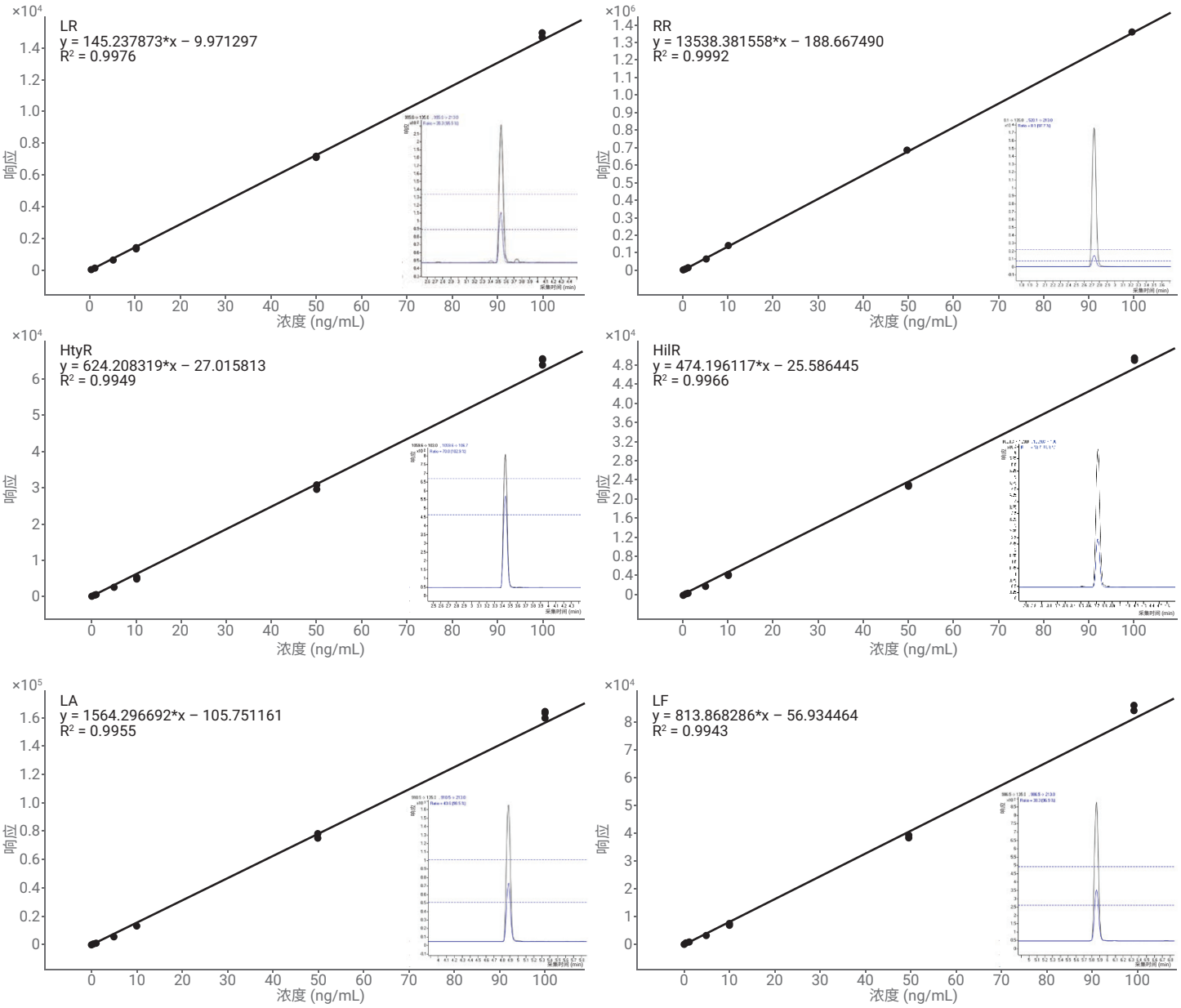

图 4. 采用直接进样法定量 MCs 的校准曲线

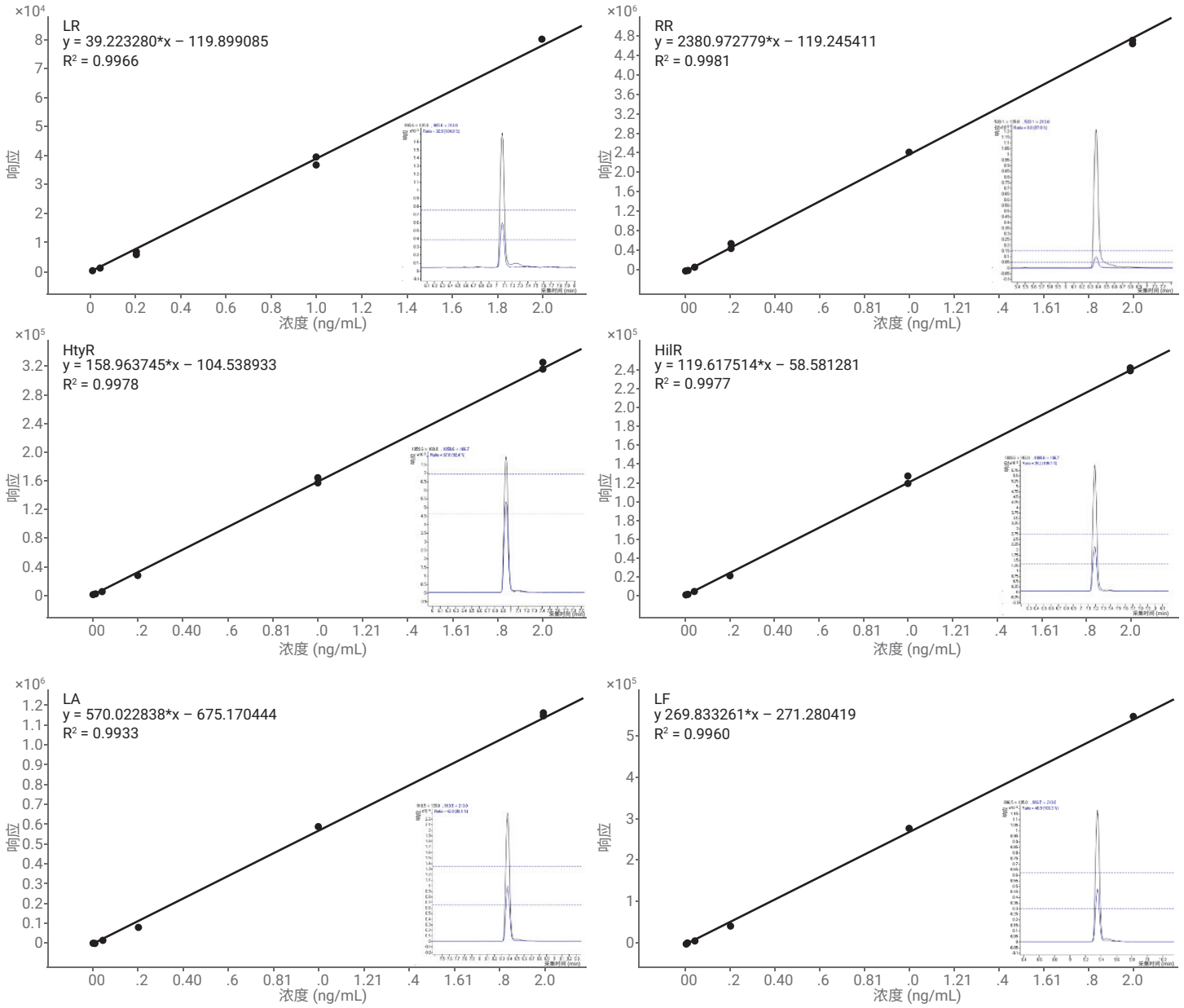

图 5. 采用在线 SPE 方法定量 MCs 的校准曲线

测定了各 MC 的 LODs 和定量限 (LOQs)（表 8）。采用直接进样法的灵敏度可达 2–20 ppt，远低于 WHO 建议的指导值 1 ppb。但是，一些地区有关城市供水系统的法规规定，MC-RR 的方法检出限为 20 ng/L，MC-LR3 的方法检出限为 100 ng/L。使用 6470 三重四极杆 LC/MS 系统时，直接进样可以实现足够的灵敏度，但使用在线 SPE 时，灵敏度较低的仪器也可以实现更低的 LODs。

在直接进样法和在线 SPE 方法中，分别进样 500 ppt 和 2 ppt 的加标地表水进行回收率测试 (n = 5)。两种方法对所有 MCs 的回收率都在 75% 到 110% 之间。在线 SPE 方法的回收率低于直接进样法，这可能是由于化合物在 SPE 小柱上被捕获并洗脱所致，但所有 MCs 的回收率仍可接受（表 9）。

实际水样分析

在成都周边采集 3 份地表水样品，经在线 SPE 方法分析，结果为 1 份阳性，2 份阴性。此外，由于分析物浓度较低，阳性样本只能通过在线 SPE 方法进行定量，而直接进样法的进样量为 10 µL 时，所有目标 MCs 的检测结果均为未检出 (ND)。

表 8. 两种进样方法的 LODs 和 LOQs

MCs	直接进样		在线 SPE	
	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

表 9. 两种进样方法的回收率 (%)

MCs	直接进样		在线 SPE	
	平均值	RSD (%)	平均值	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

表 10. 样品的 MC 检测结果（ND = 未检出）

MCs	RR	HtyR	LR	HilR	LA	LF
样品 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
样品 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
样品 3	7.40 ppt	ND	73.41 ppt	4.39 ppt	3.20 ppt	ND

结论

本研究开发了一种简单、灵敏的 MCs 定量测定方法。比较了使用 6470 三重四极杆 LC/MS 系统的直接进样法和在线 SPE 方法。直接进样法和在线 SPE 方法的 LOQs 均低于 WHO 规定的饮用水中 MC-LR 浓度的临时指导值。在线 SPE 方法也符合中国最近发布的严格的区域供水系统检出限指南的要求。在一份地表水样品中检测到了 MC-RR 和其他 MCs，由于其浓度较低，只能采用在线 SPE 方法进行定量。

参考文献

1. Carmichael, W. W. The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* **1994**, *270*, 64-72
2. WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, third edition, volume one, *WHO*, Geneva, Switzerland, **2004**
3. 城镇供水水质标准检验方法，中华人民共和国住房和城乡建设部发布的《中华人民共和国城镇建设行业标准》

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、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，2018

2018 年 6 月 29 日，中国出版

5994-0007ZHCN

Agilent

Trusted Answers