

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.12.017

超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱结合 内标物测定水体中微囊藻毒素*

李 宏 潘 纲** 张洪刚

(中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

摘 要 本文建立了超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱(UPLC-MS/MS)测定水体中MC-RR和MC-LR的方法,比较了内标的加入对不同水样富集体积下MCs测定准确度的影响.结果表明,以乙腈和水(均含0.1%甲酸)为流动相时,MC-RR和MC-LR在Acquity UPLC BEH C₁₈色谱分离柱(2.1 mm×100 mm i.d.粒径1.7 μm,孔径130 Å)于4 min内完全分离.经优化质谱参数,选择m/z 519.8>134.3和995.5>134.6分别为MC-RR、MC-LR质谱检测的定量离子对.方法学验证表明,在所设定的色谱、质谱参数条件下,UPLC-MS/MS对MC-RR和MC-LR的检出限分别为2.0 ng·L⁻¹和1.0 ng·L⁻¹,定量限分别为6.0 ng·L⁻¹和3.0 ng·L⁻¹,回收率分别达98.9%—106.5%和98.4%—101.5%.测定太湖梅梁湾水样时,当水体中MCs浓度达到UPLC-MS/MS方法定量限20倍时,可通过加入内标物亮氨酸脑啡肽,实现快速(不经过水样富集)且准确(相对标准偏差<5.0%)的MC-RR与MC-LR测定.

关键词 有毒水华, 微囊藻毒素, 超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱, 内标.

Determination of microcystin in water samples by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry coupled with internal standard

LI Hong PAN Gang** ZHANG Honggang

(Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China)

Abstract: Preconcentration of water sample is required for the determination of microcystins using liquid chromatography-mass spectrometry method, during which the matrix effects and loss of substrates may influence the accuracy. An ultra performance liquid chromatography electrospray ionization tandem triple quadrupole/mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was developed to determine microcystins (MC-RR and MC-LR) in water samples, and the impact of internal standard on MCs measurement accuracy under different preconcentration volumes were assessed. Results show that when acetonitrile and water (both containing 0.1% formic acid) were used as mobile phase, MC-RR and MC-LR were separated in an acquity UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm i.d. particle size 1.7 μm, pore size 130 Å) within 4 mins. Product-ion traces at m/z 519.8>134.3 and 995.5>134.6 were set as quantitative ions of MC-RR and MC-LR, respectively. Upon method validation, the limit of detection (LOD) for MC-RR and MC-LR was 2.0 and 1.0 ng·L⁻¹, the limit of quantification (LOQ) was 6.0 and 3.0 ng·L⁻¹, and the recoveries were in the range of 98.9%—106.5% and 98.4%—101.5%, respectively. When the method was applied for determination of MC-RR and MC-LR in water samples of Taihu Lake, rapid (without preconcentration of water samples) and accurate (RSD<5.0%) determination of MCs was achieved when internal standard (leucine

2014年3月18日收稿.

* 中国科学院生态环境研究中心科技创新项目(YSW2013B05)资助.

** 通讯联系人, Tel: 010-62849686; E-mail: gpan@rcees.ac.cn

enkephalin) was added in the raw water and microcystins levels were above 20-fold of the LOQ.

Keywords: toxic algal blooms, microcystins, UPLC-MS/MS, internal standard.

铜绿微囊藻在富营养水体中大量繁殖会造成蓝藻水华,同时导致微囊藻毒素(Microcystins, MCs)的释放^[1].当爆发蓝藻水华时,水体中溶解态 MCs 浓度通常在 0.1—10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[2],但频繁接触含低浓度 MCs 的水体,或者长期食用富集了 MCs 的水产品,会导致人体肝脏类疾病的发生^[3],因此快速、准确检测水体中痕量藻毒素对于 MCs 预警十分重要.

MCs 是一组环状多肽类物质,具有 90 种不同的异构体^[4],其中最为常见、毒性最强的分别是 MC-RR 和 MC-LR,世界卫生组织对饮用水中 MC-LR 最高允许量为 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.目前用于藻毒素检测的生化分析法如酶联免疫吸附、蛋白磷酸酶抑制等只能测定总 MCs 量,无法对 MCs 异构体进行定量^[5].高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)可对 MCs 各种异构体进行检测,对 MC-RR 和 MC-LR 的定量限最低分别达 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[6]和 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[7].在 HPLC-MS/MS 基础上发展起来的超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱(UPLC-MS/MS)采用了小颗粒、高性能微粒的固定相,超高压输液泵以及更为灵敏的检测器,因此增加了分析灵敏度^[8],对 MC-RR 和 MC-LR 的定量限最低可达 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[9]和 0.08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[10].但由于天然水体中 MCs 含量低^[2],无论是 HPLC-MS/MS 还是 UPLC-MS/MS,都需将水样通过固相萃取柱富集 1000 倍左右^[11-12],再用溶剂淋洗,然后用甲醇将吸附在固相萃取柱上的 MCs 洗脱,洗脱液收集后再用于分析,这种预处理增加了藻毒素的测定时间^[13].水样在富集过程中 MCs 的损失或洗脱不完全等因素也会影响其定量,而且对于水体中痕量 MCs 的测定,即使经过 1000 倍富集^[14-15],水体中的其他有机物及复杂组分的基质效应也会影响 MCs 定量的准确性^[6,16].在水样中加入内标进行样品分析可以降低复杂样品基质对待测物的影响,同时削减样品预处理过程中待测物的损失对定量的干扰^[17-18].对于藻毒素测定时内标物的选择,最理想的是藻毒素的同位素物质^[9],但这种内标目前很难买到.亮氨酸脑啡肽在天然环境水体中不存在,其环状结构与藻毒素相似.Xu 等将一定浓度的亮氨酸脑啡肽与 4 种藻毒素标样混合后用 HPLC-MS/MS 分析,发现藻毒素与亮氨酸脑啡肽可以很好分离,且回收率相近,因此认为亮氨酸脑啡肽可以作为藻毒素测定的内标物^[9],但是对于内标的加入对不同水样富集量下 MCs 测定准确度影响的研究尚无公开报导.

本文建立了超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱(UPLC-MS/MS)测定水体 MC-RR 和 MC-LR 的方法,并比较了天然水样在不同富集体积下添加内标(亮氨酸脑啡肽)对 MCs 测定准确性的影响,目的在于建立一种检测灵敏、定量准确且不需水样富集的 MCs 测定方法.

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

MC-RR 及 MC-LR 标样(纯度均大于 95%)购自伊普锐斯科技有限公司,内标物亮氨酸脑啡肽(Leucine Enkephalin, CAS number 81678-16-2)购自 Sigma 公司.将 MC-RR 及 MC-LR 分别用甲醇配制成浓度 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存.用 50% 甲醇的水溶液配制浓度为 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 亮氨酸脑啡肽内标液,在 3 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存.甲醇、乙腈均为色谱纯(Fisher),甲酸为分析纯,超纯水由 Millipore 纯水系统制备.固相萃取柱为 SupelcleanTM LC-18.利用 Acquity 超高效液相色谱仪和 Quattro Premier XE 质谱仪(美国 waters 公司)对藻毒素进行分析.

1.2 色谱与质谱条件

Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm),柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,流动相为 A:水;B:乙腈, A、B 均含 0.1% 甲酸.流速为 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 10 μL .梯度洗脱程序为:在 3 min 内乙腈从 10% 增加到 100%,保持 2 min,在 0.1 min 后流动相比例回到初始状态,并保留 2 min 以平衡色谱柱.

采用正离子电离模式(ESI+),离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度 250 $^{\circ}\text{C}$,喷雾电压 3.5 kV,脱溶剂气流量 500 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$,锥孔气流量 50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$,四级杆范围 m/z 100—1200,多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下定量分析,氦气流量 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

1.3 实际水样的预处理

在 2012 年 1 月(蓝藻水华未爆发期,样品 1)与 10 月(蓝藻水华爆发期,样品 2)采集太湖梅梁湾地区水样,分为 2 组,每组各 5 L.其中一组加入 10 mL 浓度为 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亮氨酸脑啡肽内标液,水样与内标物充分混匀并过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜去除水体中颗粒物后,取 1 mL 水样直接用于 UPLC-MS/MS 分析,另取 10、100、1000 mL 水样分别过 SPE 柱富集.另一组不加内标液,水样过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜后取 1 mL 直接用于 UPLC-MS/MS 分析,同时取 10、100、1000 mL 水样过 SPE 柱富集.以上处理均做 3 次重复.

水样富集方法如下:用 10 mL 甲醇和 10 mL 水活化 SPE 固相萃取柱,将上述水样以 $5.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速通过已活化的 SPE 柱后,用 10 mL 20% 甲醇洗涤 SPE 柱,最后用 10 mL 纯甲醇洗脱吸附在固相萃取柱上的 MCs,收集洗脱液于 50 mL 试管中,30 °C 下用高纯氮气吹干后,用 50% 甲醇水溶液定容至 1 mL,过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜后用于分析.

1.4 数据处理

用 SPSS 18.0 软件计算相对标准偏差(RSD),用单因素方差分析比较数据的差异性,统计显著性水平为 $P<0.05$.

2 结果与讨论

2.1 色谱柱及流动相

本文选用 Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱($2.1 \text{ mm}\times 100 \text{ mm i.d.}$ 粒径 $1.7 \mu\text{m}$),其 130 \AA 孔径可满足 MC-RR, MC-LR 的 <1000 分子量的分离要求.由于微囊藻毒素呈中性或带有负电荷,向流动相中加入一定量的酸可改善 MCs 分离效果及峰形^[7],因此本实验的流动相由加入 0.1% 甲酸的乙腈和水组成.将内标亮氨酸脑啡肽,MC-RR 和 MC-LR 混合后进样,在 4 min 内可完全分离,且各组分分离良好,色谱峰对称,基线平稳(图 1).通常采用 HPLC-MS/MS 法需 25 min 左右才能实现 MC-RR 和 MC-LR 的分离^[13],Oehrle 等建立的 UPLC-MS/MS 法使分离时间缩短至 7 min^[19].与上述方法相比,本文所建立的方法可显著缩短分析时间.

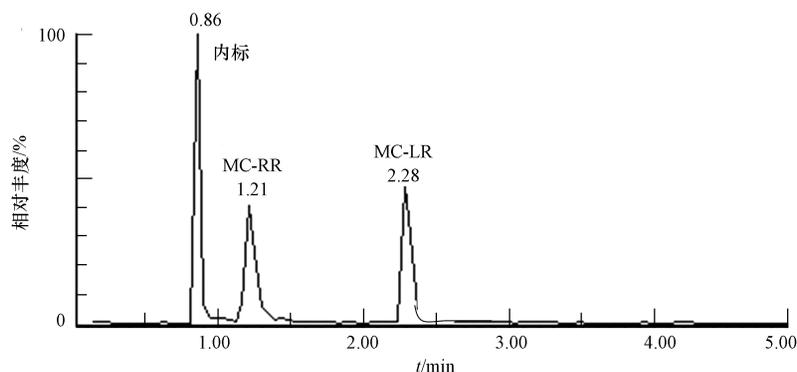


图 1 MC-RR、MC-LR 及内标的混合标准溶液色谱图

Fig.1 LC-MS/MS chromatograms of MC-RR, MC-LR and internal standard

2.2 质谱条件

2.2.1 母离子的选择

根据各种 MCs 分子结构,选择 ESI(+) 作为电离化模式,将 MC-RR 和 MC-LR 标准品分别配制成 $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,通过全扫描方式找出其母离子,依据 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 或 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 准分子离子的信号强度稳定性进行手动方式优化质谱参数.结果表明,MC-RR 给出了基峰为 m/z 519.8 的 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ 峰,而 MC-LR 给出基峰为 m/z 995.5 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰,MC-RR(m/z 519.8)在锥孔电压为 50 V 时有较强的响应(图 2a),MC-LR(m/z 995.5)在一定范围内随锥孔电压的增高响应增大,当锥孔电压为 80 V 时信号最强(图 2b).

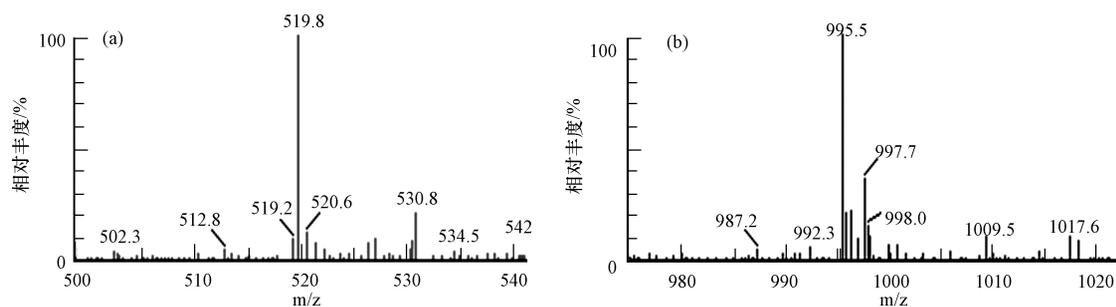


图2 MC-RR(a)和MC-LR(b)的全扫描图

Fig.2 Full scan MS spectra of MC-RR (a) and MC-LR (b)

2.2.2 特征离子的选择

使用 Daughter 扫描的方式,调节碰撞能量,选择丰度最高的子离子作为定量离子,丰度次高的离子作为定性离子,并确定其最佳诱导碰撞能量值.结果表明, m/z 134.3 和 m/z 134.6 分别是 MC-RR 和 MC-LR 的定量离子, m/z 455.9(图 3a)和 m/z 199.5(图 3b)分别作为定性离子.最终所选择的母离子、定量离子、定性离子及质谱参数见表 1.

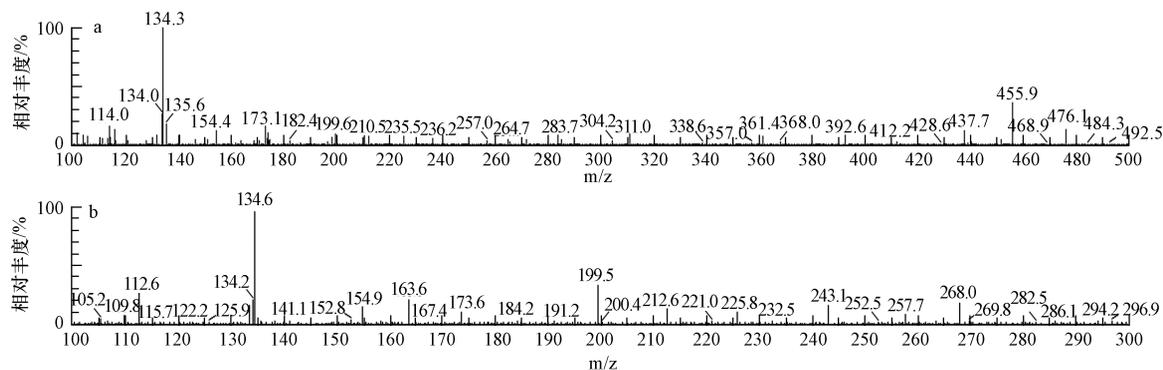


图3 MC-RR(a)和MC-LR(b)的二级质谱扫描图

Fig.3 MS/MS spectra of MC-RR (a) and MC-LR (b)

表1 MRM 分析的质谱参数

Table 1 Multi Reaction Monitoring conditions for detecting MC-RR and MC-LR

检测物质	离子对质荷比(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min
MC-RR	519.8>134.3 ^a	50	32	1.21
	519.8>455.9		45	
MC-LR	995.5>134.6 ^a	80	75	2.28
	995.5>199.5		65	

注: a 为定量离子.

2.3 方法学验证

2.3.1 标准曲线的绘制

分别配制浓度为 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MC-RR 和浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MC-LR 标准藻毒素溶液,取 10 μL 进样,按“1.2 节”色谱、质谱条件进行测定,以 MCs 峰面积为横坐标,MCs 浓度为纵坐标,得标准曲线(表 2).结果表明,在 0.2—10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-RR 与 0.1—5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR 的范围内,相关系数均大于 0.999,在较宽阔的浓度范围内呈良好线性关系.

2.3.2 检出限与定量限

分别将 MC-RR 和 MC-LR 配制成浓度为 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液后进样,以信噪比(S/N)为 3 时的溶液浓度为检出限,MC-RR、MC-LR 的检出限(limit of detection, LOD)分别为 0.002、0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.以信噪比为 10 时的溶液浓度为定量限(limit of quantification, LOQ),则 MC-RR、MC-LR 的定量限(LOQ)分别为

0.006、0.003 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 较之前报道的测定 MC-RR 和 MC-LR 的 UPLC-MS/MS 法(定量限最低可达 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[9]和 0.08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[10]), 定量限降低了近 10 倍。Wang 等通过将水样富集 1000 倍, 使 MC-RR 和 MC-LR 的定量限达到了 6.0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.5 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[14], 张春燕等开发的在线固相萃取/超高效液相色谱/串联四极杆质谱法, 在 15 mL 进样量的条件下使 MC-RR 和 MC-LR 的定量限分别达 0.07 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.17 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[15]。在本文所设定的色谱、质谱条件下, UPLC-MS/MS 对 MC-RR 和 MC-LR 测定的定量限均达到了 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的级别。

表 2 MC-RR, MC-LR 的线性方程、检出限和定量限

Table 2 Linear relationship, limits of detection and quantification for MC-RR and MC-LR

藻毒素	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	标准曲线	相关系数 (r^2)	检出限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
MC-RR	0.2—10.0	$Y=0.0235X-0.3019$	0.9999	0.002	0.006
MC-LR	0.1—5.0	$Y=0.1618X-0.0153$	0.9998	0.001	0.003

注: Y 为 MC_s 浓度, X 为峰面积。

2.3.3 精密度试验

取浓度为 8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MC-RR 和 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MC-LR 标样。每个浓度的样品取 3 份, 测定日内精密度时, 一天内重复测定 6 次, 测定日间精密度时, 每天测定 1 次, 共持续测定 5 d, 根据“1.2 节”中的色谱与质谱方法测定。日内和日间精密度试验结果表明, 本文所建立的 UPLC-MS/MS 方法测定 MC-RR 和 MC-LR 的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) 均低于 3% (表 3), 说明本方法定量准确。

表 3 MC-RR 和 MC-LR 的日内精密度和日间精密度

Table 3 Intra- and inter-day precision of MC-RR and MC-LR

	日内精密度		日间精密度 ($n=5$)	
	MC-RR (8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	MC-LR (4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	MC-RR (8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	MC-LR (4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
RSD/%	2.03	2.33	2.77	2.85

2.3.4 回收率试验

取阴性水样, 分别加入 0.5、1.0、10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-RR 和 0.2、0.5、5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR, 样品按“1.2 节”的色谱和质谱条件进行测定, 根据加标量和实际测定值计算空白加标回收率。结果可知, 3 种浓度梯度下 MC-RR 的回收率在 98.9% 到 106.5% 之间, MC-LR 在 98.4% 至 101.5% 之间 (表 4)。精密度与回收率实验结果表明, 本文所建立的方法准确可靠, 重现性好。

表 4 MC-RR 和 MC-LR 的加标回收率

Table 4 Recovery for method validation of MC-RR and MC-LR

加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	MC-RR			MC-LR		
	0.5	1.0	10.0	0.2	0.5	5.0
检测量/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.49±0.01	1.07±0.01	9.89±0.02	0.20±0.02	0.49±0.01	5.01±0.01
回收率/%	99.4	106.5	98.9	101.5	98.4	100.2

2.4 实际水样的测定

取藻华爆发期与未爆发期的太湖梅梁湾水样, 按“1.3 节”所示方法将水样富集不同倍数后, 根据“1.2 节”所示色谱和质谱条件进行测定。另取与“2.3.1”所描述的 MC-RR 与 MC-LR 标样, 加入 100 μL 浓度为 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亮氨酸脑腈肽, 经 UPLC-MS/MS 测定后以 MC_s 峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, 以 MC_s 浓度为横坐标^[20], 得标准曲线 (MC-RR: $Y=0.0235X-0.3019$; MC-LR: $Y=0.1618X-0.0153$, 相关系数 R^2 均大于 0.998)。当所采集的水样中加入了内标时, 以 MC_s 峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, MC_s 浓度为横坐标, 在上述标准曲线上计算; 未加内标的以 MC_s 峰面积为纵坐标, MC_s 浓度为横坐标, 利用“2.3.1”所示标准曲线计算。

对于未爆发藻华水样 (样品 1), 不加入内标时, 随着富集水样体积的增加, 检测到的 MC-RR 和

MC-LR的浓度随之增加,未富集相比于1000倍的富集,MC-RR和MC-LR浓度分别低50.24%和57.19%(表5),差异显著($P < 0.05$).但向水样加入内标后,未富集样品与富集10、100、1000倍处理共12次测定的MC-RR浓度为 $0.19 \pm 0.01 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、MC-LR为 $0.06 \pm 0.01 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,RSD分别为1.15%和2.77%,未富集与不同富集体积下测定的MC-RR和MC-LR浓度差异不显著($P > 0.05$),说明定量准确,此时浓度分别为本方法定量限的30和20倍.对样品2的测定结果表明,不添加内标时未富集与富集不同体积处理下共12次测定的MC-RR为 $5.13 \pm 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、MC-LR为 $0.82 \pm 0.03 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,添加内标时12次测定的MC-RR为 $5.14 \pm 0.03 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,MC-LR为 $0.84 \pm 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (表5),添加内标对测定结果无显著影响($P < 0.05$).对该样品共24次测定MC-RR和MC-LR的RSD分别为0.6%和3.5%,低于5%,说明定量准确,此时MC-RR和MC-LR的浓度分别达仪器定量限的830倍和280倍,说明当待测物浓度远高于仪器定量限时,水样不经富集且不添加内标物,可用UPLC-MS/MS方法进行准确测定.

表5 太湖梅梁湾水样在不同富集倍数下MC-RR和MC-LR的浓度($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

Table 5 Concentration of MC-RR and MC-LR in water samples from Meiliang Bay, Taihu, under different preconcentration volumes

样品		不添加内标				添加内标			
		不富集	富集10倍	富集100倍	富集1000倍	不富集	富集10倍	富集100倍	富集1000倍
1	MC-RR	0.09±0.02	0.10±0.02	0.16±0.03	0.18±0.01	0.18±0.02	0.20±0.02	0.19±0.01	0.20±0.01
	MC-LR	0.03±0.01	0.04±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.05±0.02	0.06±0.02	0.07±0.01
2	MC-RR	5.12±0.02	5.14±0.02	5.16±0.03	5.11±0.02	5.14±0.02	5.16±0.04	5.13±0.04	5.17±0.03
	MC-LR	0.85±0.03	0.79±0.05	0.83±0.02	0.85±0.04	0.84±0.05	0.85±0.04	0.87±0.03	0.82±0.02

注:表中数据为根据所富集水样体积换算的水体中MCs浓度的最终值.

目前文献报道的用HPLC-MS/MS和UPLC-MS/MS测定MCs的方法大多通过外标法定量^[10,14-15],由于外标法易受环境及仪器条件变化的影响,同时含MCs的水体中存在的有机质和其他污染物可能对质谱产生干扰^[17-18],进而影响MCs测定的准确性.为了减弱测定过程中的其他有机物对检测结果的影响,水样通常进行1000倍左右的富集来提高待测物在质谱中的信号^[11-12],这增加了检测的时间和分析成本,同时水样中MCs在富集过程中的损失也无法定量.本文中,对于水体中痕量MCs的测定(样品1),不富集和1000 mL富集体积下所测的MCs浓度差异显著(表5),这可能是因为不富集时水体中其他有机物抑制了MCs在质谱中的响应,随着富集体积的增加,待测物的信号增强,从而实现较为准确的定量.通过向水样中加入内标,可以校正和消除其他有机物对结果产生的影响^[17-18,21],因此样品1在加入内标后可不经富集而直接准确定量.

本文研究结果表明,当实际水样MCs浓度达方法定量限20倍时,水样在加入内标后,可不经富集(避免了样品预处理过程中的损失)而准确测定.Song等发现MCs在藻华爆发的太湖五里湖地区(6月到10月)浓度在 $0.5\text{--}6.7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[2],在滇池,水体中MCs(5月到10月)处于 $0.61\text{--}1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[22],此期间MCs的最低浓度达本文所建立的UPLC-MS/MS法定定量限的近80倍,所以在加入内标后,所采集的水样可不经水样富集直接用于测定.但对MCs浓度更低的水样(即浓度低于方法定量限20倍)的直接测定,以及内标对测定准确度的影响还需进一步的实验分析.

3 结论

(1) 以乙腈和水(均含0.1%甲酸)为流动相时,MC-RR和MC-LR在Acquity UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm i.d. 粒径1.7 μm,孔径130 Å)上能在4 min内完全分离.

(2) 在本文设定的色谱、质谱条件下,UPLC-MS/MS对MC-RR和MC-LR检测的定量限分别达 $6.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,回收率分别为98.9%—106.5%、98.4%—101.5%.

(3) 通过引入内标,且水样中MC-RR和MC-LR的浓度达UPLC-MS/MS测定MCs的定量限20倍时,可不经水体的富集而直接对水体中的藻毒素进行准确测定.

参 考 文 献

- [1] 程子波,邹华,向丽,等.叶绿素作用下微囊藻毒素 LR 的光降解[J].环境化学,2009,28(5):683-686
- [2] Song L, Chen W, Peng L, et al. Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: A systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu [J]. Water Research, 2007, 41 (13): 2853-2864
- [3] Chen J, Xie P, Li L, et al. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage[J]. Toxicological Sciences, 2009, 108(1): 81-89
- [4] Park H, Namikoshi M, Brittain S M, et al. D-Leu(1) microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake[J]. Toxicon, 2001, 39(6): 855-862
- [5] 郑西强,刘群,陈云峰.活性炭纤维对水中微囊藻毒素的吸附性能[J].环境工程学报,2013,7(10):3802-3806
- [6] 李铮,杜克久,赵兴茹,等.高效液相色谱法测定天然水体中微囊藻毒素方法优化[J].环境化学,2012, 31(4):545-551
- [7] 张明,唐访良,徐建芬,等.固相萃取-高效液相色谱法同时测定地表水中 9 种微囊藻毒素[J].环境化学,2013,32(6): 1096-1097
- [8] Churchwell M I, Twaddle N C, Meeker L R, et al. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 825(2): 134-143
- [9] Xu W, Chen Q, Zhang T, et al. Development and application of ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 626(1): 28-36
- [10] 茅海琼,翁燕波,傅晓钦,等.超高效液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱法快速分析水中微囊藻毒素 LR[J].中国环境监测,2009,25(6):19-22
- [11] Yen H K, Lin T F, Liao P C. Simultaneous detection of nine cyanotoxins in drinking water using dual solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Toxicon, 2011, 58(2): 209-218
- [12] Xiao F G, Zhao X L, Tang J, et al. Determination of Microcystin-LR in Water from Lake Tai, China [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 82(2): 230-233
- [13] 梁丽丽,弓爱君,李红梅,等.高效液相色谱法检测水体中微囊藻毒素[J].分析化学,2010,38(5):740-742
- [14] Wang J, Pang X, Ge F, et al. An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China[J]. Toxicon, 2007, 49(8): 1120-1128
- [15] 张春燕,赵兴茹,郑学忠.在线固相萃取超高效液相色谱串联质谱法测定水中微囊藻毒素[J].环境化学,2012, 31(10):1663-1664
- [16] Li W, Duan J, Niu C, et al. Determination of microcystin-Lr in drinking water using uplc tandem mass spectrometry-matrix effects and measurement[J]. Journal of Chromatographic Science, 2011, 49(9): 665-670
- [17] Tan A, Lévesque I A, Lévesque I M, et al. Analyte and internal standard cross signal contributions and their impact on quantitation in LC-MS based bioanalysis[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(21): 1954-1960
- [18] Zenkevich I G, Makarov E D. Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation: Application of the modified method of double internal standard[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1150(1/2): 117-123
- [19] Oehrle S A, Southwell B, Westrick J. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Toxicon, 2010, 55(5): 965-972
- [20] 杨叶,乔善磊,陈景衡,等.同位素内标超高效液相色谱-串联质谱法检测大鼠血清中丙烯酰胺和环氧丙酰胺[J].分析化学研究简报,2010,38(10):1487-1491
- [21] 黄玉娟,陈永山,骆永明,等.气相色谱-质谱联用内标法测定土壤中 11 种酞酸酯[J].环境化学,2013,32(4):659-665
- [22] Zhang J, Wang Z, Song Z, et al. Bioaccumulation of microcystins in two freshwater gastropods from a cyanobacteria-bloom plateau lake, Lake Dianchi[J]. Environmental Pollution, 2012, 164: 227-234