

加速溶剂萃取-固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定沉积物中5种微囊藻毒素

张蓓蓓, 史震宇, 吴仲夏, 彭英, 杨雪

(国家环境保护地表水环境有机污染物监测分析重点实验室, 江苏省环境监测中心, 江苏 南京 210036)

摘要:建立了加速溶剂萃取-固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法同时测定沉积物中5种微囊藻毒素(MC-LR、MC-RR、MC-LW、MC-LF、MC-YR)的方法。选择甲醇-水(1:4, V/V)为ASE萃取溶剂,萃取温度和萃取压力分别为80℃和13.1 MPa,固相萃取过程以HLB小柱为萃取柱,采用液相色谱-串联质谱分析。方法在5种微囊藻毒素质量浓度5~100 μg/L内线性良好($r > 0.995$),回收率为76.0%~118%,相对标准偏差为1.9%~12.0%,检出限为2~3 μg/kg,定量下限为8~12 μg/kg。该方法已用于西太湖沉积物的检测,具有较好的方法适用性。

关键词:微囊藻毒素;超高效液相色谱-串联质谱;加速溶剂萃取;固相萃取;沉积物

中图分类号:0657.7

文献标志码:B

文章编号:1674-6732(2018)02-0019-04

Simultaneous Determination of Five Microcystins in Sediment by Accelerated Solvent Extraction, Solid Phase Extraction and Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Bei-bei, SHI Zhen-yu, WU Zhong-xia, PENG Ying, YANG Xue

(State Environmental Protection Key Laboratory of Monitoring and Analysis for Organic Pollutants in Surface Water, Jiangsu Environmental Monitoring Center, Nanjing, Jiangsu 210036, China)

Abstract: An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UPLC-MS/MS) method was developed for the analysis of five microcystins (MC-LR, MC-RR, MC-LW, MC-LF, MC-YR) in sediment by accelerated solvent extraction (ASE) and solid phase extraction (SPE). The analytes were extracted by ASE using methanol/water (1:4, by volume) as solution. The extraction temperature was 80℃ and the extraction pressure was 13.1 MPa. The extracts were enriched and purified by SPE with HLB column subsequently. The samples were finally analyzed by UPLC-MS/MS. The calibration curves of five microcystins were linear in the range of 5~100 μg/L with correlation coefficients more than 0.995, the recoveries of five compounds ranged from 76.0% to 118%, with RSDs ($n=6$) of 1.9%~12.0%. The limit of detection and quantitation were in the range of 2~3 and 8~12 μg/kg respectively. The method was successfully used to detect the sediment samples from West Taihu Lake.

Key words: Microcystins; UPLC-MS/MS; ASE; SPE; Sediment

微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是由水华蓝藻产生的一类细胞内毒素,其结构为单一环肽类物质,正常情况下很稳定,能够在水体中存在相当长一段时间,在一定条件下才会发生降解,如紫外、超声等。MCs具有强烈的肝毒性^[1],会导致人体肝脏损坏及肿瘤发生,还具有肾毒性、生殖毒性、遗传毒性和心脏毒性等,它还能使磷酸酶活性降低。在细胞结构破坏或细胞凋亡时,大量的藻毒素由细胞扩散到水体中从而危及生物体的健康。沉积物作

为水体中污染物的汇集地和污染源,监测其中的MCs具有重要的意义。

目前MCs的检测技术主要有生物分析法^[2]、细胞毒性检测法^[3]、酶联免疫吸附法(ELISA)^[4]、

收稿日期:2018-01-05;修订日期:2018-02-08

基金项目:江苏省太湖水环境综合治理科研基金资助项目(TH2016301),江苏省环境监测基金资助项目(1413;1210)

作者简介:张蓓蓓(1982—),女,高级工程师,硕士,从事环境中有毒有害污染物监测工作。

蛋白磷酸酶抑制法 (PPIA)^[5]、高效液相色谱法 (HPLC)^[6-9]、高效液相色谱/质谱法 (LC/MS)^[10-12] 等, 这些方法主要用于水体中 MCs 测定, 针对沉积物中 MCs 的监测文献则相对较少。田大军等^[13] 采用冰浴超声萃取和高效液相色谱法开展了淮河流域某县水体底泥中 MCs 的污染调查, 但未阐述方法检出限和回收率等技术指标。樊洁等^[14] 采用超声萃取和高效液相色谱法开展了滇池底泥中 MCs 的测定, 但方法回收率较低。Zastepa 等^[11] 则采用加速溶剂萃取-固相萃取-液相色谱-串联质谱法考察了沉积物和孔隙水中 MCs 的分布, 阐述了不同 MCs 对底泥的吸附能力。

现以沉积物中 MCs 为研究目标, 尝试建立加速溶剂萃取-固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法同时测定沉积物中 5 种 MCs 的分析方法, 并应用该方法分析太湖沉积物样品中的 MCs, 以期对环境监管提供一定的技术支撑和数据支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); AB SCIEX QTRAP 5500 三重四极杆串联质谱仪 (美国 AB 公司); Dionex ASE 200 加速溶剂萃取仪 (美国 Thermo 公司); AQUA Trace ASPE 799 自动固相萃取仪 (日本岛津公司); 真空冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司); 氮吹浓缩仪 (美国 Zymark 公司); 0.22 μm 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜针头式过滤器, Milli-Q 超纯水器 (美国 Millipore 公司); 涡旋混合器 (日本 LMS 公司)。

MC-LR、MC-RR、MC-LW、MC-LF、MC-YR 标准溶液 (10 mg/L, 美国 Sigma 公司); 甲醇 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 石英砂 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 硅藻土 (化学纯, 德国 Merck 公司); HLB 固相萃取小柱 (0.012 cc/mg, 美国 Waters 公司); 实验用水为 Millipore 超纯水 [$\rho(\text{TOC}) < 1 \mu\text{g/L}$]。

1.2 样品采集及处理

于西太湖采集 6 个 0~20 cm 的表层沉积物样品, 每个采样点采集沉积物量 $\geq 1 \text{ kg}$, 置于 250 mL 棕色玻璃瓶中加盖密封, 立即运回实验室于 -20°C 下保存至分析。

沉积物样品冷冻干燥磨细后过 40 目筛, 准确称量 (2.0 ± 0.2) g 样品, 与 25 g 硅藻土搅拌混匀

置于 ASE 萃取池中, 按照指定条件, 在加速溶剂萃取仪中萃取 5 min, 并循环萃取 2 次。

将萃取液转移至量筒中, 用水定容至 200 mL 后, 以 10 mL/min 的速度转移至活化的固相萃取小柱中, 以氮气吹干小柱, 然后用 10 mL 甲醇以 3 mL/min 的流速进行洗脱, 收集洗脱液, 将洗脱液氮吹至 0.5 mL 左右, 用甲醇定容至 1 mL 后, 涡旋振荡混匀, 过 0.22 μm PVDF 滤膜, 置于进样瓶中, 采用 UPLC-MS/MS 测定。固相萃取柱依次用 20 mL 甲醇和 20 mL 水以 5 mL/min 速度进行活化。

1.3 分析条件

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm , 美国 Waters 公司); 流动相为 0.2% 甲酸水溶液 (A) 和乙腈 (B), 采用梯度洗脱模式: 0 min, 20% B, 保持 2 min, 2~4 min, 线性增至 60% B, 4~5 min, 线性增至 50% B, 5~6 min, 线性增至 100% B, 并保持 1 min, 后恢复为 20% B, 平衡 1 min 结束; 流速 0.5 mL/min, 进样体积 5 μL ; 柱温 40°C ; 采用外标法定量。

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描方式扫描; 离子化电压 5 500 V; 离子源温度 500°C ; 气帘气压力 138 kPa; 喷雾气压力 414 kPa; 辅助加热气压力 414 kPa; 碰撞气流速中等, 驻留时间 20 ms。各物质离子对优化后的参数见表 1。

表 1 目标化合物的多离子反应监测参数^①

化合物	母离子	子离子	去簇电压/V	碰撞电压/V
MC-LR	995.7	213.3*	120	70
		375.1	120	66
MC-LW	1 025.6	135.2*	120	104
		213.0	120	53
MC-LF	986.8	375.3*	120	43
		135.2	120	93
MC-RR	520.0	135.1*	120	38
		213.1	120	43
MC-YR	1 045.7	213.3*	120	72
		135.1	120	82

①: * 表示定量离子

2 结果与讨论

2.1 加速溶剂萃取条件的优化

2.1.1 萃取溶剂的选择

由于 MCs 是一种易溶于水、极性较大的物质, 多用醇和水作为提取溶剂来萃取沉积物中的 MCs。故选择甲醇和水作为萃取溶剂, 研究不同比例下甲

醇-水萃取溶剂对沉积物中 MCs 的提取效率, 结果见表 2。结果表明, 不同比例甲醇-水溶剂对 MC-RR 的萃取效率影响较大, 以甲醇-水(1:4,

V/V)为萃取溶剂时, MC-RR 具有最好的萃取回收率。故选择甲醇-水(1:4, V/V)为萃取溶剂, 此时 5 种 MCs 均能获得满意的回收率。

表 2 萃取溶剂对 5 种 MCs 回收率的影响 (n=6)

萃取溶剂	MC-LR		MC-LW		MC-LF		MC-RR		MC-YR	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
纯水	93.5	2.3	82.1	10.5	77.6	8.2	71.4	5.6	75.7	4.4
甲醇:水=1:4	93.0	6.2	102	5.5	119	4.9	95.6	8.8	92.6	4.1
甲醇:水=2:3	92.3	10.3	116	8.6	132	7.2	46.8	11.3	81.9	7.5
甲醇:水=1:1	78.1	6.2	93.4	8.4	120	11.3	46.9	14.6	68.1	9.2
甲醇:水=3:2	81.4	5.1	105	7.7	126	8.2	41.7	6.5	69.7	4.3
甲醇:水=3:1	90.2	6.4	104	2.5	118	4.9	46.9	7.1	78.5	2.8
甲醇:水=4:1	98.3	5.1	94.0	3.3	125	9.2	36.3	13.1	89.3	2.6
纯甲醇	61.1	4.3	93.4	5.6	56.4	11.2	23.2	9.1	51.9	7.4

2.1.2 萃取温度和压力的优化

在加速溶剂萃取过程中, 萃取温度对目标物的回收率也会产生影响。选定萃取溶剂后, 设定萃取压力为 6.9 MPa, 比较不同萃取温度(50, 60, 70, 80, 90℃)对萃取结果的影响。结果表明, 各目标物回收率随温度的增加而提高, 80~90℃时达到平缓状态。因此选择 80℃作为萃取温度。

萃取温度定为 80℃, 考察 6.9, 10.3, 13.1, 15.8 和 18.6 MPa 等不同萃取压力对目标物回收率的影响。结果表明, 5 种目标物随着萃取压力升高回收率显著提高, 当萃取压力为 13.1 MPa 时回收率最佳, 萃取压力继续增加, 回收率则略有下降, 这可能是由于随着萃取压力的升高, 基质干扰物的萃取效率也提高, 萃取液颜色明显加深, 不利于净化效果, 从而对仪器分析产生不利影响。故确定萃取压力为 13.1 MPa。

2.2 固相萃取小柱的选择

样品经加速溶剂萃取后萃取液含有大量水, 直接进行浓缩比较困难。为实现对萃取液的进一步净化, 采用固相萃取方式继续进行富集和净化。

固相萃取小柱对萃取效果影响较大, 故考察了 C₁₈ 和 HLB 固相萃取小柱对模拟水样中 5 种 MCs 回收率的影响, 结果见图 1。由图 1 可知, HLB 小柱比 C₁₈ 柱具有更好的回收效果。因此选用 HLB 小柱进行富集净化。

2.3 方法性能指标

2.3.1 标准曲线、检出限与定量下限

在上述优化条件下, 配制 5 种 MCs 质量浓度为 5, 10, 20, 50 和 100 μg/L 的混合标准系列使用

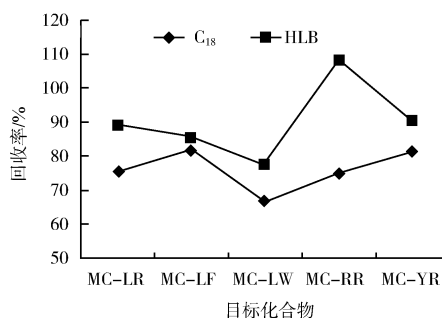


图 1 不同固相萃取小柱对 5 种 MCs 的回收率 (n=6)

液 1.0 mL。以目标化合物定量离子的峰面积(y)为纵坐标、目标化合物的质量浓度(x, μg/L)为横坐标进行线性回归, 结果见表 3。结果显示, 5 种目标物在质量浓度 5~100 μg/L 范围内线性良好, 相关系数(r)均 > 0.995。

根据《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168—2010)方法检出限测定要求, 配制质量比为 5 μg/kg 的 2 g 石英砂加标样 7 份, 按照样品分析过程进行测定, 计算 7 次平行测定的标准偏差 S, 以 3S 为方法检出限, 4 倍检出限为定量下限, 所得结果见表 3。结果表明, 5 种物质的检出限为 2~3 μg/kg, 定量下限为 8~12 μg/kg, 说明该方法具有较高的灵敏度, 可以满足底泥中 MCs 的分析测定要求。

2.3.2 精密度与回收率

配制低(5 μg/kg)、高(25 μg/kg)两个质量比的沉积物加标样各 6 份, 进行准确度和精密度实验, 得加标回收率和相对标准偏差结果见表 4。结

果表明,5 种目标物的回收率为 76.0% ~ 118%, RSD 为 1.9% ~ 12.0%。方法的准确度和精密度均符合痕量分析要求。

[参考文献]

表 3 5 种目标物的标准曲线、相关系数、方法检出限及定量下限

化合物	标准曲线方程	相关系数	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	定量下限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
MC-LR	$y = 471x + 269$	0.999 9	2	8
MC-LF	$y = 2\ 600x - 161$	0.997 9	2	8
MC-LW	$y = 1\ 860x - 127$	0.995 3	2	8
MC-RR	$y = 6\ 960x - 811$	0.999 9	3	12
MC-YR	$y = 1\ 090x + 107$	0.999 9	2	8

表 4 沉积物中 5 种目标物的回收率及精密度

化合物	测定值/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)		加标量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	加标回 收率/%	RSD/%
	加标前	加标后			
MC-LR	0	4	5	83.5	10.8
	0	21	25	85.6	3.9
MC-LF	0	6	5	118	10.0
	0	23	25	90.1	2.6
MC-LW	0	3	5	68.3	12.0
	0	21	25	85.4	2.3
MC-RR	4	8	5	76.0	7.3
	0	25	25	83.8	1.9
MC-YR	0	4	5	84.8	7.7
	0	22	25	88.5	3.2

2.4 实际样品分析

2017 年 5 月,采集了西太湖 6 个点位的沉积物样品,应用建立的分析方法进行分析测定,5 种目标物的检出情况见表 5。结果表明 MC-LR 和 MC-RR 在西太湖沉积物中检出率较高。

表 5 西太湖沉积物样品中 5 种 MCs 检出浓度

点位	测定值/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)				
	MC-LR	MC-LW	MC-LF	MC-RR	MC-YR
S1	70	—	—	130	11
S2	—	—	—	4	—
S3	5	—	—	8	—
S4	3	—	—	6	—
S5	11	—	—	11	—
S6	3	—	—	3	—

3 结语

建立了 ASE-SPE/UPLC-MS/MS 同时分析沉积物中 5 种 MCs 的方法,实际样品的测定表明,方法具有灵敏度高、准确、重现性好的特点,可以满足环境样品的监测要求。

[1] YANG M, LAM P K S, HUANG M, et al. Effects of microcystins on phosphorylase - a blinding to phosphatase - 2A; kinetic analysis by surface plasmon resonance biosensor[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1999, 1427(1):62-73.

[2] GEHRINGER M M, KEWADA V, COATES N, et al. The use of Lepidium stadium in a plant bioassay system for the detection of microcystin - LR[J]. Toxicon, 2003, 41(7):871-876.

[3] FLADMARK K E, SERRES M H, LARSEN N L, et al. Sensitive detection of apoptotic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes[J]. Toxicon, 1998, 36(8):1101-1114.

[4] YU F Y, LIU B H, CHOU H N, et al. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(15):4176-4182.

[5] ROBILLLOT C, HENNION M C. Issues arising when interpreting the results of the protein phosphatase 2A inhibition assay for the monitoring of microcystins[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 512(2):339-346.

[6] MERILUOTO J. Chromatography of microcystins[J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 352(1-3):277-298.

[7] WU X, WANG C, XIAO B, et al. Optimal strategies for determination of free/extractable and total microcystins in lake sediment[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 709(4):66-72.

[8] KONDO F, ITO Y, OKA H, et al. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column[J]. Toxicon, 2002, 40(7):893-899.

[9] HYENSTRAND P, METCALF J S, BEATTIE K A, et al. Effects of adsorption to plastics and solvent conditions in the analysis of the cyanobacterial toxin microcystin - LR by high performance liquid chromatography[J]. Water Research, 2001, 35(14):3508-3511.

[10] DELL'AVERSANO C, EAGLESHAM G K, QUILLIAM M A. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1028(1):155-164.

[11] ZASTEPA A, PICK F R, BLAIS J M, et al. Analysis of intracellular and extracellular microcystin variants in sediments and pore waters by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 872:26-34.

[12] 虞锐鹏,陶冠军,秦方,等.液相色谱-电喷雾电离质谱法测定水中的微囊藻毒素[J].分析化学研究简报,2003,31(12):1462-1464.

[13] 田大军,郑唯韡,韦霄,等.淮河流域某县水体富营养化及水体、底泥微囊藻毒素污染状况研究[J].卫生研究,2011,40(2):158-162.

[14] 樊洁,邓南圣,刘碧波,等.滇池沉积物中微囊藻毒素的 HPLC 检测[J].云南环境科学,2005,24(3):18-20.