

# 高效液相色谱-串联质谱法测定五种微囊藻毒素

刘飞 王勇为 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

**摘要：**建立了高效液相色谱/串联质谱法(LC-MS/MS)同时定量检测微囊藻毒素(MC-RR, YR, LR, LW, LF)的方法。该法检出限(LOD)为0.2 μg/kg, 定量限(LOQ)为0.7 μg/kg, 标准曲线的线性相关系数均大于0.99, 回收率为85.3% - 101.3%, 该方法操作简便且灵敏度较高。

## 引言

近几十年由于水体富营养化程度的日益加剧, 涉及范围不断扩大, 包括水源水库水在内的淡水水体经常发生蓝藻水华。有害藻类水华的频繁发生已成为国内外普遍关注的环境问题。据2004年资料, 已从不同藻株中分离、鉴定了70多种微囊藻毒素<sup>[1]</sup>。在已发现的蓝藻毒素中, 微囊藻毒(Microcystins, MCs)是一种在蓝藻水华污染中出现频率最高、造成危害最严重的藻毒素种类<sup>[2]</sup>。

MCs的一般结构为环(D-丙氨酸-L-X-赤-β-甲基-D-异天冬氨酸-L-Z-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸)。其中, Adda(3-氨基-9-甲氧基-2, 6, 8-三甲基-10-苯基-4, 6-二烯酸)是一种特殊的氨基酸<sup>[3]</sup>。在已发现的MCs异构体中, MC-LR, RR, YR毒性最强(L、R、Y分别代表亮氨酸、精氨酸、色氨酸)。MCs是一种水溶性肝毒素<sup>[4-5]</sup>, 它对动物和人类健康的潜在危害逐渐引起关注。

由于藻毒素可通过食物链累积, 供食用的水产品如鱼类、贝类等也可能携带藻毒素危害人类健康。为防止藻毒素对人类的进一步危害, 需进行更广泛而深入的研究。目前WHO仅规定了饮用水中微囊藻毒素可耐受量1.0 μg/L, 及暂定的微囊藻毒素临时可耐受的每日摄取量0.04 μg/(kg•d BW)<sup>[6]</sup>。

越来越多的分析技术用于MCs的检测当中, 水体中MCs中的检测方法已相对较完善<sup>[7-8]</sup>。本文报道了同时对MC-RR, YR, LR, LW, LF进行定量分析的高效液相色谱/串联质谱(LC-MS/MS)分析方法, 这些毒素可产生典型的离子谱, 质谱仪对藻毒素有最佳分辨效果, LC-MS/MS方法由于其优良的选择性, 对样品的纯化步骤要求不高, 能够在混合物中同时实现多种藻类毒素的分离和鉴定。

## 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

液质联用仪由Surveyor液相色谱系统和Thermo Fisher TSQ Quantum三重四极杆串联质谱组成; 氮气吹干仪(美

国Zymark公司); MilliQ去离子水发生器(美国Millipore公司); Sartorius冷冻离心机; WH-861漩涡混合器。

二次去离子水; 甲醇(色谱纯); Oasis HLB固相萃取柱(Waters公司, 60 mg, 3 mL); 标准品: 微囊藻毒素-LR(MC-RR), 微囊藻毒素-LF(MC-YR), 微囊藻毒素-YR(MC-LR), 微囊藻毒素-RR(MC-LW), 微囊藻毒素-LW(MC-LF), 纯度不低于95%;

分别准确称取标准品各10.00 mg, 至10 mL棕色容量瓶, 用甲醇定容, 20 °C避光保存。再用甲醇稀释上述标准储备液, 配制成1.0 μg/mL的混合标准溶液, 于4 °C避光保存1个月。

### 2.2 液相色谱和质谱条件

#### 2.2.1 液相色谱条件

色谱柱: Polaris C18色谱柱(150 mm×2.1 mm×5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%(体积分数)甲酸水溶液; 流速: 0.25 mL/min; 梯度洗脱程序: 0.00 min(20%甲醇, 80%甲酸水溶液), 4.00 min(95%甲醇, 5%甲酸水溶液), 8.00 min(95%甲醇, 5%甲酸水溶液), 8.10 min(20%甲醇, 80%甲酸水溶液), 10.00 min(20%甲醇, 80%甲酸水溶液); 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

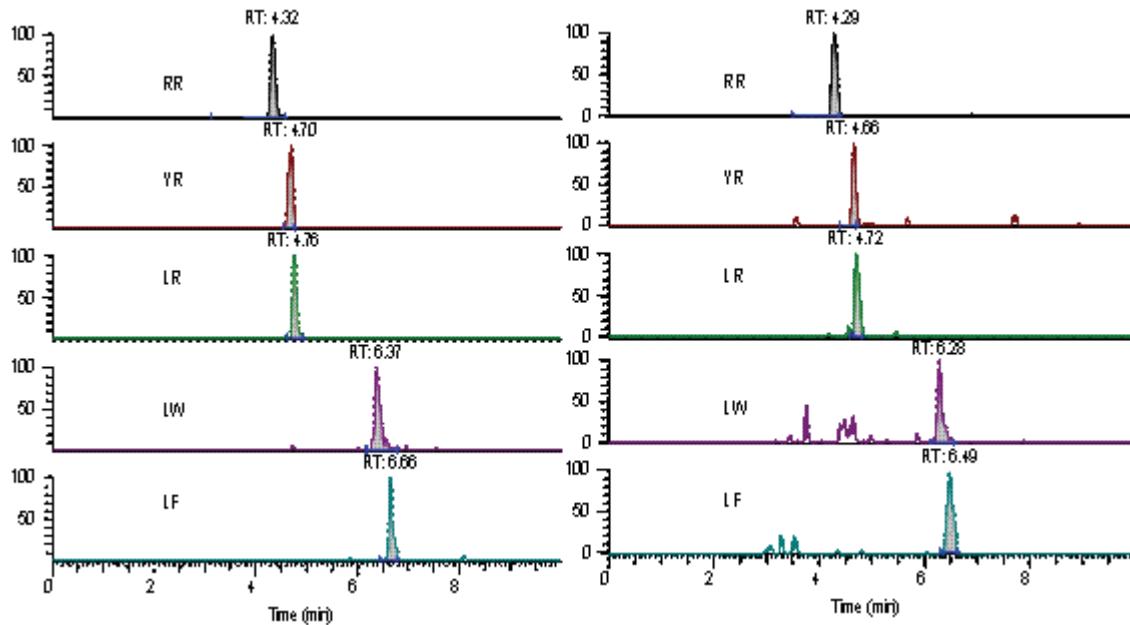
#### 2.2.2 质谱条件

电离方式为电喷雾电离源(ESI+); 选择反应监测(SRM); 毛细管温度300 °C; 喷雾电压(spray voltage)3.5 kV; 鞘气(N2)流量: 6 L/min; 辅助气(N2)流量: 2 L/min; 碰撞气(N2)压力: 1.5 mTorr。

表1 MCs的母离子/子离子离子及碰撞能量

化合物 Compounds	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	碰撞能量 Collision energy (eV)
MC-RR	519.8[M+2H] <sup>2+</sup>	135.0 *	30
		440.4	25
MC-YR	1045.6[M+H] <sup>+</sup>	135.0 *	60
		375.0	45
MC-LR	995.6[M+H] <sup>+</sup>	135.0 *	56
		553.0	45
		375.0 *	30
MC-LW	1025.6[M+H] <sup>+</sup>	135.0	60
		375.0 *	43
		135.0	50
MC-LF	986.6[M+H] <sup>+</sup>	135.0	22
		375.0 *	

\* 定量离子 (quantitative ion)



## 结果与讨论

### 3.1线性范围、定量限和检出限

将MC- RR, YR, LR, LW, LF逐级稀释配置成1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL系列浓度的混合标样，在1.0~50.0 ng/mL内线性良好，当信噪比(S/N)为3时，方法检出限分别为0.2, 0.3, 0.3, 0.4, 0.4 μg/kg。以3倍信噪比、10倍信噪比分别计算检出限和定量限，结果见表2，相关系数均大于0.99，显示了良好的相关性。MC- RR, YR, LR, LW, LF的检出限分别为0.7, 1.0, 0.8, 1.2, 1.3。

图1 5种MCs标准品及加标样品5μg/kg的LC/MS/MS谱图  
Fig 1 LC-MS/MS chromatograms of matrix spiked with 5 μg/kg and five MCs standards

## 参考文献

- [1]Ming Dai, Ping Xie, Gaodao Liang. Simultaneous determination of microcystin-LR and its glutathione conjugate in fish tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Journal of chromatography B. 2008, 862: 43-50
- [2]聂晶晶，李元，李琴.微囊藻毒素检测方法的研究进展[J].中国环境检测.2007, 23(2): 43-48
- [3]Humberto Vieira Frias, Maria Anita Mendes, Karina Helena Morais Cardozo.Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006, 344: 741-746
- [4]郑明岚.微囊藻毒素无害化处理的研究进展[J].卫生研究.2007, 36(1):114-116
- [5]赵建伟，黄廷林.高效液相色谱法测定饮用水中的微囊藻毒素RR和LR [J].中国环境检测.2006, 22(3):12-14
- [6]WHO. Guidelines for drinking - water quality [M].3ed. Geneva :World Health Organization , 2004 :407 - 408
- [7]Wei Xu, Qi Chen, Ting Zhang. 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: 28-36
- [8]Jing Wang, Xiaolu Pang. An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China [J]. Toxicon. 2007, 49:1120-1128
- [9]Liming Cong, Baifen Huang, Qi Chen. Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta. 2006,569: 157-168