

【化学测定方法】

固相萃取 HPLC 法测定太湖水中的 3 种微囊藻毒素

邵国健, 吴丹青, 余娟

(浙江省湖州市疾病预防控制中心, 浙江湖州 313000)

[摘要] 目的: 通过优化的固相萃取 HPLC 测定太湖水中的 MC-LR、RR、YR 3 种微囊藻毒素。方法: 水样中胞外和胞内的微囊藻毒素通过 C18 固相富集后, 以 0.08% 三氟乙酸的乙腈-水溶液 (42:58) 为流动相进行液相色谱分离, 紫外检测器检测, 外标法定量。结果: 3 种微囊藻毒素的线性范围为 $0.01 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1.00 \mu\text{g}/\text{mL}$, 回收率为 81.3% ~ 91.6%, *RSD* 为 0.95% ~ 2.95%, 定量检出限为 $0.005 \mu\text{g}/\text{L} \sim 0.01 \mu\text{g}/\text{L}$ 。结论: 该方法具有操作快速、灵敏、简便、实用等优点, 能够实际应用于太湖水中的微囊藻毒素的测定。

[关键词] 固相萃取; HPLC; 微囊藻毒素; 太湖水

[中图分类号] O657.7⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)01-0072-03

Determination of three microcystins in Taihu Lake by solid phase extraction-high performance liquid chromatography

SHAO Guo-jian, WU Dan-qing, YU Juan

(Huzhou Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang 313000, China)

[Abstract] **Objective** To determine the microcystins LR, RR and YR in Taihu Lake by solid phase extraction-high performance liquid chromatography. **Methods** The microcystins intra-cellular and extra-cellular in the water samples were enriched by C18 SPE, separated with C18 column with acetonitrile-water (42:58, v/v) - 0.08% TFA as mobile phase and detected at 238 nm. **Results** The linear range was $0.01 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1.00 \mu\text{g}/\text{mL}$ for MC-LR, RR and YR; the detection limit (LOD) was $0.005 \mu\text{g}/\text{L} \sim 0.01 \mu\text{g}/\text{L}$; the recoveries ranged from 81.3% to 91.6% and the relative standard deviation (*RSD*) was 0.95% ~ 2.95%. **Conclusion** This method was convenient, fast, sensitive and practical, which can be used for the detection of microcystins LR, RR and YR in Taihu Lake water.

[Key words] SPE; HPLC; microcystins; Taihu Lake

微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 是一种单环七肽, 性质稳定, 煮沸后不失活, 不挥发, 抗 pH 变化, 溶于水、甲醇或丙酮^[1]。微囊藻毒素为有害的蓝藻水华释放的一类具有强烈促癌作用的肝毒素^[2]。目前, 在 MC 中研究最多且毒性较大的有 MC-LR、RR 和 YR。世界卫生组织 (WHO) 及许多发达国家制定的饮用水标准和规范中规定, MC-LR 的含量标准不得超过 $1.0 \mu\text{g}/\text{L}$ ^[3], 我国 2006 年颁布的《生活饮用水卫生标准》(GB 5749-2006) 中规定 MC-LR 控制限值为 $1.0 \mu\text{g}/\text{L}$ 。

目前对 MC 常用的检测方法有酶联免疫法、高效液相色谱 (HPLC) 法和液质联用法等^[4], HPLC 法由于常规实验室都有装备, 且定量准确应用最普遍。本文通过优化实验条件, 运用高灵敏度的高效液相色谱检测 MC-LR、RR 和 YR, 并应用于太湖水的分析, 对加强藻毒素的污染控制具有实际意义。

1 材料与方法

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪 (SHIMADZU); Inertsil ODS-SP C18, $250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱; Bond Elut Plexa SPE (Varian, 60 mg , 3 mL); GF/C 玻璃纤维滤膜 (Whatman); Beckman 高速离心机、超声波萃取仪等。

1.2 试剂与材料

MC-RR (CAS111755-37-4); MC-YR (CAS101064-48-6); MC-LR (CAS 10143-37-2)。纯度均 $\geq 95.0\%$, 均购自 ALEXIS CORPORATION。甲醇、乙腈、三氟乙酸 (TFA)、二氯甲烷均为 HPLC 级 (TEDA 化学公司)。

1.3 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-SP C18, $250 \times 4.6 \text{ mm}$ i.d., $5 \mu\text{m}$ 色谱柱 (GL Sciences Inc.); 柱温: 40°C ; 标准进样体积: $20 \mu\text{L}$; 流动相: 含 0.08% 三氟乙酸的乙腈-水溶液 (42:58); 检测波长: 238 nm 。

1.4 试样制备

取 1 L 用 GF/C 玻璃纤维滤膜过滤。滤膜经 250 mL 5% 乙醇超声萃取 15 min 过滤, 合并两种滤液备用。SPE 柱依次用

[作者简介] 邵国健 (1975-), 男, 本科, 主管技师, 主要从事理化检验研究。

10 ml 1甲醇, 15 ml 水活化。将混合液以 1 ml/min~2 ml/min 的速度完全过柱后, 依次用 10 ml 水和 10 ml 20% 甲醇溶液淋洗。再用 10 ml 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液洗脱, 抽干 SPE 内溶液。用 10 ml 定量瓶接取洗脱液。40℃氮吹干, 用 50% 乙腈溶液定容至 1 ml, 涡流 1 min, 高速离心 10 min (12000 rpm) 后用于 HPLC 测定。3 种微囊藻毒素的分离图谱见图 1。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

甲醇-TFA, 乙腈-TFA, 甲醇-磷酸盐缓冲液是目前 HPLC 检测 MC 最常用的流动相^[5,6]。甲醇-磷酸盐缓冲液作为流动相出峰较慢, 且磷酸盐类流动相容易对柱子造成堵塞。流动相中加入 TFA 可以加强 MCs 多肽羧基团质子化过程, 且作为离子对可促进 MCs 的洗脱, 而在甲醇在 238 nm 波长吸收强于乙腈, 本底高^[7]。故选择乙腈-TFA 作为流动相。同时针对不同比例的乙腈-水流动相, 不同浓度 TFA 加入量作了比较, 实验表明当以乙腈/水/TFA (42:58:0.08 V/V), 流速以 1.0 ml/min 等度运行时, 3 种微囊藻毒素在 13 min 内得到基线分离, 分离图谱见图 1。

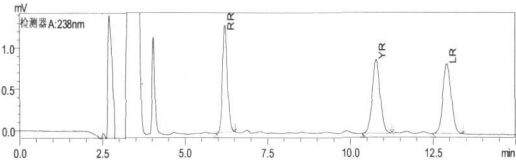


图 1 0.5 mg/ml 微囊藻毒素混标色谱图

2.2 柱温的选择

实验分别以 20℃、25℃、30℃、40℃、45℃、50℃ 的柱温进行 MCS 的分离, 在 40℃ 时能完全分离三种 MC, 且在 15 min 内完成分析, 当柱温在 45℃ 时, 出峰时间推迟。故选择 40℃ 柱温。

2.3 固相萃取条件改进

GB5750.8-2006 微囊藻毒素检测方法中以 100% 甲醇为洗脱溶液, 回收率能达到 60%, 本文分别研究了以 100% 甲醇、不同比例的 TFA 甲醇液和乙腈溶液为洗脱液的洗脱效果, 实验证明 0.1% TFA 乙腈溶液为洗脱液, 具有更强的洗脱能力, 能获得 85% 以上的回收率, 且不影响液相色谱的分离测定, 因此采用 0.1% TFA 为洗脱溶液。

2.4 胞内 MC 提取的改进

取已截留藻细胞的 GF/C 玻璃纤维滤膜, 进行胞内微囊藻毒素测定。对胞内毒素改用 5% 乙酸溶液超声萃取, 研究了不同超声时间对胞内 MC 的提取效果, 取 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min 超声, 超声 10 min MC 提取率已达 90%, 而至 15 min 藻细胞破碎 MC 提取率已至饱和, 故选择超声提取时间为 15 min。

2.5 线性范围和检出限

依次测定 0.01 μg/ml~1 μg/ml 浓度 MC 混标, 以峰面积 Y 对相应的进样浓度 (μg/ml) 进行线性回归, 具有良好的线性。当取样量为 1 L 时, 经过固相富集, 定容至 1.0 ml 进样量为 20 μl 时, 按照 10 倍信噪比计算定量检出限见表 1。

表 1 3 种微囊藻毒素的线性范围和定量下限

项目	保留时间	回归方程	线性范围 (μg/ml)	相关系数	定量检出限 (μg/L)
LR	5.87	Y = 49275.8X - 268.538	0.01~1.00	0.9998	0.01
RR	10.68	Y = 45035.2X - 81.3968	0.01~1.00	0.9999	0.005
YR	12.38	Y = 51783.4X - 269.461	0.01~1.00	0.9999	0.01

2.6 回收率和精密度

对加标太湖水样 (1 L 纯水中加入 10 ng MC 混标) 的回收率结果, 分别为 RR 88.8%, YR 88.9%, LR 90.2%。见表 2。

表 2 3 种微囊藻毒素的回收率和精密度

项目	加标量 (μg)	检测值 (μg)	回收率 (%)	RSD (%)
LR	0.25	0.213	85.3	2.95
	0.50	0.436	87.2	1.77
	1.00	0.902	90.2	1.45
RR	0.25	0.221	88.4	2.21
	0.50	0.446	89.2	1.52
	1.00	0.916	91.6	0.95
YR	0.25	0.214	85.8	2.58
	0.50	0.442	88.5	1.83
	1.00	0.908	90.8	1.35

2.7 太湖水测定

应用建立的分析方法, 监测了 2009 年 6 月-2009 年 12 月蓝藻高发时期太湖 XTG、XGK、WLZ 三个监测点的 MCs 含量。

表 3 三个监测点 MCs 的监测结果 (μg/L)

监测点	项目	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
XGK	MC-LR	-	-	-	-	-	0.01	-
	MC-RR	-	-	-	0.04	0.04	0.12	0.02
	MC-YR	-	-	-	-	0.03	0.01	-
XTG	MC-LR	0.03	0.08	1.91	7.07	0.02	0.12	-
	MC-RR	0.04	0.12	3.05	0.73	0.61	0.04	0.03
	MC-YR	-	-	0.32	1.19	-	-	0.04
WLZ	MC-LR	-	-	-	-	0.01	0.01	-
	MC-RR	-	-	-	0.12	0.14	0.14	0.02
	MC-YR	-	-	-	-	0.04	-	-

注: “-” 表示未检出

由表 3 可见, 太湖水中的 RR 检出率最高为 71.4%, 检出值在 0.01 μg/L~3.05 μg/L; 其次是 LR 检出率为 42.9%, 检出值在 0.01 μg/L~7.07 μg/L; YR 的检出率为 28.6%, 检出值在 0.01 μg/L~1.19 μg/L。太湖水中 XTG 9 月份图谱见图 2。

(下转第 75 页)

离子水, 40℃ ~ 60℃水浴保温, 5 min后从温水中取出放冷, 滴加 10% 盐酸羟胺溶液至高锰酸钾颜色褪尽。用去离子水定容。放置 15 min后测定标准曲线计算空白和尿样 Hg含量。

$m_{Hg} = (C_{Hg}/V) \times K$, 式中 m_{Hg} 代表空白或者尿样 Hg含量, C_{Hg} 代表检测的空白或者样品中 Hg含量, V 代表稀释尿样的原体积, K 是稀释倍数。

尿样实际 Hg含量为尿样 Hg含量减空白 Hg含量。

2 结果

2.1 标准曲线及线性范围

标准曲线在 0~ 10 μg/L范围内, 经多次试验, 该标准系列线性方程: $I = 159.3273 \times C - 21.9432$ 相关系数为 0.9994。

2.2 检出限

由 11次空白标准偏差算出检出限为 0.0016 μg/L, 计算公式为: $DL = 3S/k$ S 是 11次空白的标准偏差, k 是标准曲线的斜率。

2.3 精密度

实验测试了两个尿样, 两个样品 7次 RSD 分别为 2.3% 和 1.12%。

2.4 准确度

以加标回收率表示, 分别选本底为 1.8117 μg/L与 1.7559 μg/L的尿样和标准为 5 μg/L与 20 μg/L进行加标回收试验, 其回收率结果见表 1。

表 1 回收试验结果			
样品本底值 (μg/L)	不同加标量的测定值 (μg/L)		回收率 (%)
	5	20	
1.8117	6.6604	21.4408	97.0 98.2
1.7559	6.6884	21.5400	98.6 98.9

(上接第 73页)

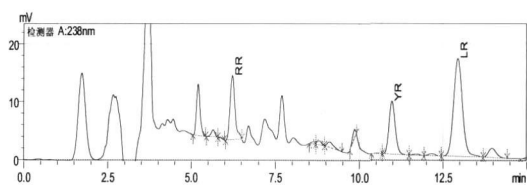


图 2 9月份 XTG 微囊藻毒素色谱图

三处采样点, XTG太湖水污染较严重, 三种藻毒素皆普遍存在。XGK和 WIZ太湖水, RR 检出率高。夏秋季节, MC浓度极高。其中 2009年 8月 - 9月 XTG太湖水 LR浓度为 7.07 μg/L, 远高于国家规定饮用水的 MC-LR控制限值 1.0 μg/L。

3 结论

通过优化实验条件, 建立了固相萃取 HPLC法快速测定水中的 3种微囊藻毒素检测方法, 其检出限完全能满足实际监测的要求, 并对三个太湖监测点进行了为期 6个月的监测。发监测现太湖水中 MC-LR、RR 普遍存在。其浓度随采样季节变化, 在夏末秋初易形成污染高峰, 并超过了生活饮用水标准规定的标准限值, 因此需要重点做好夏秋季微囊藻毒素的污染监测, 预防藻毒素引起饮用水源污染和中毒事故。

3 讨论

3.1 消解温度和时间选择

汞在常温下即可挥发, 消解温度过高极易损失, 用电炉或电热板消解温度波动较大, 不容易控制, 因此本法选用 40℃ ~ 60℃水浴保温 5 min。

3.2 盐酸羟胺的加入量

样品前处理过程中需要加入 10% 盐酸羟胺溶液, 加入量的多少对结果的影响很大。每加一滴都要用力振摇, 盐酸羟胺过量会使结果偏大。

3.3 酸度

气态物发生需要适当的酸度, 酸度增大荧光强度也明显增高, 但酸度太大时荧光强度呈现下降趋势; 过低的酸度将使汞的气态物无法形成。其他文献介绍用 5% 盐酸为宜。本试验用 5% 硫酸也收到很好的效果。

3.4 还原剂的浓度

在氢化物发生过程中, 硼氢化钾作为还原剂对方法的灵敏度、准确度和稳定性有很大影响。浓度过高, 产生大量的氢气具有稀释作用, 荧光强度降低, 方法灵敏度降低; 浓度过低, 还原能力差, 气态物难以形成, 灵敏度降低。试验证明, 当硼氢化钾浓度为 0.05% ~ 1.50% 时荧光强度较高。本试验中采用 1% 的硼氢化钾获得了令人满意的结果。

[参考文献]

- [1] 徐伯洪, 阎惠芳. 工作场所有害物质检测方法 [M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2003, 5(3): 328-334
 - [2] 杨福成. 微波消解 - 双道原子荧光光谱法同时测定尿中的汞和砷 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(3): 462-463, 494.
 - [3] 陈建文, 周荣荣, 丁凤兰, 等. 恒温消解 - 原子荧光法测定尿中总汞的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(8): 1436-1437.
- (收稿日期: 2010-10-19)

[参考文献]

- [1] Toivola DM, Eriksson JE. Toxins affecting cell signaling and a alteration of cytoskeletal structure [J]. Toxicology in Vitro 1999, 13(4-5): 521-530.
- [2] Kuninitsu K, Yoshizawa S, Matsushima R, et al. Chemistry and Toxicology of Cyclic Hepatopetide Toxins, the Microcystins from Cyanobacteria [J]. Microbiol Cult Coll 1994, 10: 5-33.
- [3] WHO. Guidelines for drinking-water quality. Second edition. Addendum to Volume 2 Health Criteria and Other Supporting Information [M]. Geneva World Health Organization, 1998: 95-110.
- [4] 谢秀红, 谷康定. 水环境中微囊藻毒素检测技术研究进展 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(4): 370-372.
- [5] Ikawa M, Phillips N, Haney JF, et al. Interference by plastic additives in the HPLC determination of microcystin-LR and -YR [J]. Toxicol, 1999, 37(6): 923-929.
- [6] 张立将, 伊立红, 浦跃朴, 等. 水中微囊藻毒素高效液相色谱检测和前处理优化 [J]. 东南大学学报, 2005, 35(3): 446-451.
- [7] 郑力行, 吴和岩, 施玮. 高效液相色谱法测定水中微囊藻毒素的含量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(5): 526-527.

(收稿日期: 2010-10-09)