

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00740

高效液相色谱法检测水体中微囊藻毒素

梁丽丽¹ 弓爱君^{*1} 李红梅² 曹艳秋¹ 李宝芹¹

¹ (北京科技大学, 北京 100083) ² (中国计量科学研究院, 北京 100013)

摘要 建立了高效液相色谱检测水体中微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 的方法。选择 XAD-2 树脂为富集树脂, 采用四氯化碳-10%乙醇-10%丙酮连续淋洗, 获得较好的杂质去除效果, 采用 90% 甲醇可以将树脂柱上的 MCs 完全洗脱。HPLC 采用 $V(0.1\% \text{ TFA}) : V(\text{甲醇}) = 42 : 58$ 混合溶液为流动相进行等度洗脱, MC-RR 和 MC-LR 取得较好分离效果, 回收率均达到 90% 以上。水样富集 2000 倍后, 方法的检出限为 $0.05 \mu\text{g/L}$ 。本方法操作简便、灵敏度高、检测速度快。

关键词 微囊藻毒素; 高效液相色谱

1 引言

随着工农业的迅速发展以及污水排放量的增加, 水体富营养化日益严重, 频繁暴发蓝藻水华, 微囊藻毒素是在蓝藻水华污染中出现频率最高、产量最大、造成危害最严重的藻毒素。最常见的有微囊藻毒素-RR (Microcystins-RR, MC-RR) 和微囊藻毒素-LR (Microcystins-LR, MC-LR)。MCs 具有明显的肝毒性, 会导致肝癌的发生。

目前, 检测水体中 MCs 的常用方法有 HPLC-UV 法^[1,3,5] 和 LC-MS 法^[2,4,6-8]。其中质谱法检出限低, 测定结果准确, 但是价格昂贵。由于天然水体中 MCs 的含量低, 因此在进样检测之前需要对其进行富集, 文献中主要采用固相萃取柱 (SPE)^[2-5,8] 和免疫亲和层析柱 (IC)^[1] 进行富集, 但是这些柱子成本过高, 且不能重复使用。本研究采用 XAD-2 大孔吸附树脂富集 MCs, 成本低, 且树脂经活化后可以重复使用。

本研究以 MC-LR 和 MC-RR 为对象, 对色谱检测条件以及水样前处理过程中使用的富集柱、淋洗液和洗脱液进行了选择, 建立并且优化了 XAD-2 树脂富集-HPLC-UV 检测水体中的微囊藻毒素的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

L7110 型高效液相色谱仪 (日本日立公司); 浙江大学 N2000 色谱工作站 (浙江大学智达公司); XAD-2 树脂 (Signa Amberlite 公司); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 超纯水机 (美国 Millipore 公司); $0.45 \mu\text{m}$ 混合纤维素酯微孔滤膜 (天津津腾实验设备有限公司)。MC-RR 和 MC-LR 标准品 (Alexis 公司); 甲醇和三氟乙酸均为分析纯。藻粉: 北京市玉渊潭公园的水华蓝藻经干燥、粉碎制得。

2.2 色谱条件

Inertil ODS-3 色谱柱 ($416 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 柱温 25°C , 流动相: $V(0.1\% \text{ TFA}) : V(\text{甲醇}) = 42 : 58$, 流速: 1 mL/min , 进样量: $20 \mu\text{L}$, 检测波长为 239 nm 。

2.3 MC-RR、MC-LR 标准曲线的绘制

取 MC-RR 和 MC-LR 的标准品分别配成浓度梯度为 $5.0, 10.0, 20.0$ 和 25.0 mg/L 的标准溶液, 在上述色谱条件下用 HPLC 进行检测, 以峰面积 Y 对标准品浓度 $X (\text{mg/L})$ 绘制标准曲线。

2.4 样品前处理

2.4.1 XAD-2 树脂的预处理 取 40 g XAD-2 树脂, 采用湿法装柱, 柱床高约 45 cm , 装柱后依次用甲醇和水清洗, 除去杂质, 赶走可能吸附于树脂上的空气泡, 备用。

2009-10-15 收稿; 2009-12-29 接受

本文系国家标准物质资源共享平台建设项目 (No. 2005DKA21501) 和北京市教委产学研项目资助

* E-mail: gongaijun@sas.usth.edu.cn

2.4.2 微囊藻毒素的富集与净化 取 2 L 水样,用滤纸过滤后,通过富集柱进行富集,依次用 90 mL 四氯化碳、90 mL 10%乙醇和 90 mL 10%丙酮连续淋洗,去除杂质后,用 150 mL 90%甲醇溶液洗脱。将洗脱液旋转蒸发后用氮气吹至体积小于 1 mL,用纯甲醇定容至 1 mL,过 0.45 μm 滤膜,以 HPLC 检测。若不及时进样,将样品密封,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。

3 结果与讨论

3.1 色谱分析条件的优化

以甲醇-TFA 水体系作为流动相并进行等度洗脱,实验成本低,实验后色谱柱容易清洗,对实验人员的危害小。考察了流动相中 0.1% TFA 与甲醇的体积比 (30:70, 40:60, 48:52 和 50:50) 对分离的影响。结果表明, $V(0.1\% \text{ TFA})/V(\text{甲醇}) = 30:70$ 和 $40:60$, MC-RR 和 MC-LR 的保留时间短,但在 MC-RR 出峰处有干扰; $V(0.1\% \text{ TFA})/V(\text{甲醇}) = 50:50$, 干扰不明显,但在 35~40 min 内出峰才能完成。 $V(0.1\% \text{ TFA})/V(\text{甲醇}) = 48:52$, 在 25 min 内完成出峰,避开了 MC-RR 出峰处的干扰。

将计算所得的 MCs 的容量因子对甲醇的浓度作图 (图 1)。从图 1 可以看出, MC-LR 比 MC-RR 的容量因子大,柱子对前者吸附能力较强。藻毒素的容量因子受流动相中甲醇比例的影响,随着甲醇比例的增加,两种 MCs 的容量因子变小,并且 MC-LR 较 MC-RR 变化得更快。

3.2 洗脱液的选择

根据文献报道以及实验结果中 MCs 的回收率和色谱峰的干扰情况,采用 90% 甲醇作为洗脱液。

将藻粉用 50% 甲醇反复冻溶、进行超声提取,得到藻毒素提取液,加水配制成 20.6 和 7.1 $\mu\text{g/L}$ 的模拟水样。将水样过 XAD-2 树脂柱富集,用 90% 甲醇洗脱,每流出 10 mL 洗脱液作为一个样品,连续收集,依次编号。将样品浓缩至 1 mL,用 HPLC 检测每个样品中 MCs 的含量,绘制 MC-RR 和 MC-LR 的洗脱曲线 (图 2)。由图 2 可见,90 mL 洗脱液即可完全洗脱 MC-RR 和 MC-LR。考虑到实际水样中含有的 MCs 可能高于模拟水样,本实验采用 150 mL 90% 甲醇作为洗脱液。

3.3 淋洗液的选择

XAD-2 树脂富集柱在洗脱前用适当的淋洗液进行淋洗,可以减少杂质及其对分析的干扰。

使用未检出 MCs 的天然水样添加蓝藻提取液配制成 MC-RR 和 MC-LR 分别为 20.6 和 7.1 $\mu\text{g/L}$ 的模拟水样。此模拟水样富集后,尝试以四氯化碳、10%乙醇、10%丙酮、10%乙酸、正己烷和正丁醇作为淋洗液,再用 90% 甲醇洗脱 MCs,杂质淋洗液和 MCs 的洗脱液分别进样分析,对比不同淋洗液的淋洗效果。谱图分析发现,正己烷和正丁醇对杂质几乎没有洗脱效果。乙酸对杂质洗脱效果明显,但是同时会洗下较多的藻毒素。综合考虑淋洗杂质及回收率,本实验采用 CCl_4 -10%乙醇-10%丙酮进行梯度淋洗,其杂质淋洗效果见图 3。在上述前处理以及色谱条件下,得出微囊藻毒素的典型色谱图如图 4。

3.5 标准曲线、回收率、精密度及检出限

MC-RR 的标准曲线为: $Y = 24263X - 18094$, $r = 0.9997$; MC-LR 的标准曲线为: $Y = 22190X - 19309$, $r = 0.9999$ 。两者的线性范围均为 5.0~25.0 mg/L。在信噪比 (S/N) 为 3 时,检出限可达 0.1 mg/L。将藻毒素提取液加入未检出微囊藻毒素的天然水体,配制成 3 种浓度的模拟水样:高浓度:

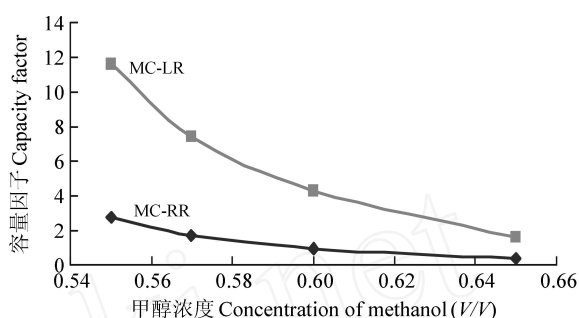


图 1 藻毒素的容量因子随甲醇比例的变化趋势

Fig 1 Capacity factors of microcystins (MCs) change along with the ratio of methanol

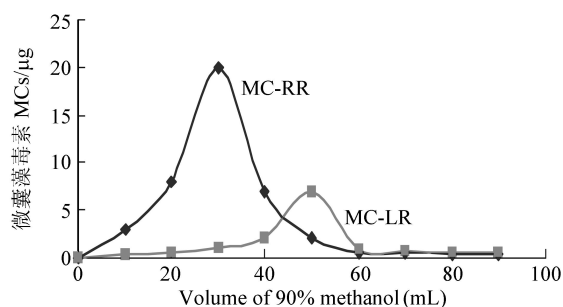


图 2 MC-RR 和 MC-LR 的洗脱曲线

Fig 2 Elution curves of microcystins RR (MC-RR) and microcystins LR (MC-LR)

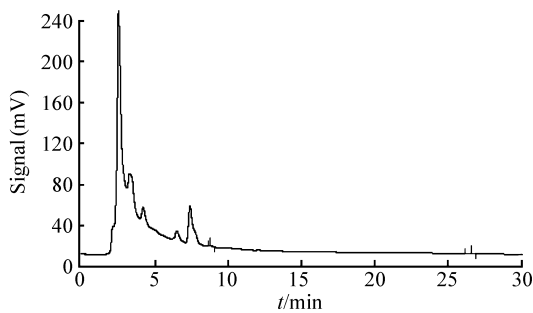


图 3 CCl_4 -10%乙醇-10%丙酮的杂质淋洗效果

Fig 3 Leaching effect of impurity in Carbon tetrachloride-10% ethanol-10% acetone rinse solution

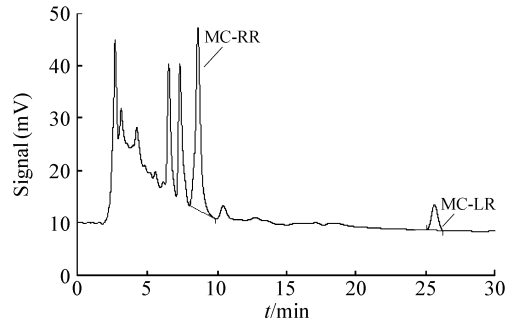


图 4 MC-RR 和 MC-LR 的典型 HPLC 谱图

Fig 4 Typical HPLC chromatogram of MC-RR and MC-LR

41. $2 \mu\text{g/L}$ MC-RR, $14.2 \mu\text{g/L}$ MC-LR; 中浓度: $13.7 \mu\text{g/L}$ MC-RR, $4.73 \mu\text{g/L}$ MC-LR; 低浓度: $4.12 \mu\text{g/L}$ MC-RR, $1.42 \mu\text{g/L}$ MC-LR。采用优化后条件分别对 3 种浓度的水样进行重复测定 5 次。结果显示: 3 种浓度下 MC-RR 和 MC-LR 的回收率均大于 90%, 相对标准偏差小于均 1.4%, 说明本方法具有较好的重现性。在信噪比 (S/N) 为 3, 富集倍数为 2000 时, 水体中两者的检出限均为 $0.05 \mu\text{g/L}$ 。

References

- XIAO Fu-Gang (肖付刚), ZHAO Xiao-Lian (赵晓联), TANG Jian (汤坚), GU Xiao-Hong (顾小红), ZHANG Jing-Ping (张敬平), NIU Wei-Min (钮伟民). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(1): 99 ~ 102
- XIAO Fu-Gang (肖付刚), ZHAO Xiao-Lian (赵晓联), TANG Jian (汤坚), GU Xiao-Hong (顾小红), ZHANG Jing-Ping (张敬平), NIU Wei-Min (钮伟民). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(3): 369 ~ 372
- LU Bi-Bo (刘碧波), XIAO Bang-Ding (肖邦定), LU Jian-Tong (刘剑彤), FANG Tao (方涛), LU Yong-Ding (刘永定). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2005**, 33(11): 1577 ~ 1579
- YU Rui-Peng (虞锐鹏), TAO Guan-Jun (陶冠军), QN Fang (秦方), CHEN Yan (陈艳), TANG Jian (汤坚). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2003**, 31(12): 1462 ~ 1464
- ZHANG Wei-Hao (张维昊), XU Xiao-Qing (徐小清). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2001**, 29(5): 522 ~ 525
- Yuan M, Carmichael W W. *Toxicon*, **2004**, 44(5): 561 ~ 570
- Ruangyuttikam W, Miksik I, Pekkoh J, Peerapompisal Y, Deyl Z. *J. Chromatogr B*, **2004**, 800(1-2): 315 ~ 319
- Dai M, Xie P, Liang G D, Chen J, Lei H H. *J. Chromatogr B*, **2008**, 862(1-2): 43 ~ 50

Determination of Microcystins in Aquatic Environment with High Performance Liquid Chromatography

LIANG Li-Li¹, GONG Ai-Jun^{*1}, LI Hong-Mei², CAO Yan-Qiu¹, LI Bao-Qin¹

¹ (University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083)

² (China National Measuring Science Research Institute, Beijing 100013)

Abstract The determination method for microcystins (MCs) in aquatic environment with high-performance liquid chromatography was improved. The results showed that good effects on the rinse of impurity was obtained by using carbon tetrachloride-10% ethanol-10% acetone as the eluate, and all the MCs in XAD-2 resin column could be eluted by 90% methanol-water solution. In the experiment, MC-RR and MC-LR could be totally separated at isocratic elution with mobile phase $V(0.1\% \text{ trifluoroacetic acid})/V(\text{methanol}) = 42/58$ and the recoveries both reached 90%. The detection limits for both of the MCs were $0.1 \mu\text{g/L}$ after the water samples were condensed 6000 times. The detection method is simple, sensitive and fast.

Keywords Microcystins; High performance liquid chromatography

(Received 15 October 2009; accepted 29 December 2009)