

文章编号:1673-1689(2009)01-0097-05

高效液相色谱法测定太湖水中微囊藻毒素

戚莉莉, 程子波, 邹华*, 阮文权

(江南大学 环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:微囊藻毒素是有害的蓝藻水华释放的有毒代谢物。建立了有效准确的检测方法,对固相萃取-高效液相色谱测定水中痕量藻毒素的部分实验过程进行了优化处理。流动相体积分数:35%乙腈+65%水;体积流量:0.8~1.0 mL/min;紫外检测波长 239 nm;进样量 10 μ L;在该条件下,以 HPLC 测定 MC 的检测限值为 0.1 mg/L。应用该法分析了 2007 年太湖蓝藻爆发期间的水样,结果表明方法具有实用性。

关键词:微囊藻毒素;固相萃取;高效液相色谱;优化

中图分类号:X 823

文献标识码:A

HPLC Determination of Microcystin in Taihu Lake

Qi Li-ly, CHEN Zi-bo, ZOU Hua*, RUAN Wen-quan

(School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The potent toxin microcystin was frequently released during cyanobacterial blooms in eutrophic waters and made a risk to human health and environment. An efficient and accurate determination method is needed. This manuscript mainly focuses on the determination of Trace Level Microcystins in Water using Solid-phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography, and optimizes part of the experiment steps. The detection limite for MC in water system is 0.1 mg/L. This method described here has preferable value in practical application proved by analysis with natural water.

Key words: microcystin, Solid-phase Extraction, HPLC, optimize

太湖藻华连年爆发,其导致的微囊藻毒素(Microcystins, MC)污染对无锡等周边城市的饮用水安全构成了严重的威胁^[1-2],已受到了社会各界的广泛关注。

如何检测毒素国家尚未有一个标准方法,而且天然水体中通常微囊藻毒素的浓度较低,因此研究和建立低浓度藻毒素的分析鉴定方法以对其进行

监测十分重要。目前测定方法主要有色谱法^[3,5]、酶联免疫法^[4-6]、蛋白磷酸酶抑制法^[5-6]和极谱法^[7]等。酶联免疫法比较方便,容易掌握,但假阳性出现几率大,重现性差。蛋白磷酸酶抑制法灵敏度高、检测限较低,但该方法尚不够成熟,酶反应体系中的很多变量尚未进行量化和建立一个统一的标准,方法选择性较差,只能测定毒素总量,无法分

收稿日期:2008-01-16

基金项目:国家自然科学基金项目(20707007);江苏省自然科学基金项目(BK2006534)。

* 通讯作者:邹华(1972-),男,江苏无锡人,工学博士,副教授,主要从事环境生物技术和天然水体藻华污染治理方面的研究。Email:zouhua@jiangnan.edu.cn

别测定不同种类毒素的量。此外,蛋白磷酸酶价格很昂贵,若自己制备则对设备和操作人员的要求非常高。新开发的极谱法尚不成熟。可见,这些方法要实际应用于环境监测都存在较大困难。色谱法结果稳定可靠,操作简单,是目前应用最多的方法,有广阔的发展前景。

探讨了痕量微囊藻毒素的测定方法,通过考察痕量 MC 的富集方法,优化环境样品的前处理过程,对 HPLC 法分析 MC-RR 和 LR 环境样品的方法进行了优化。并对太湖的水样进行分析,获得了较为满意的效果。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

1) MC 标准样品 MC-LC 和 MC-RR,瑞士 Alexix 公司产品;三氟乙酸(TFA 分析纯);甲醇(色谱纯);乙腈(色谱纯);超纯水。

2) HP1100 高效液相色谱仪(HPLC);紫外检测器;SB-C₁₈(4.6 mm×150 mm,ZORBAX 5 μm)分析色谱柱(Agilent);

3) C₁₈ 固相萃取小柱(Supelco Envi218,容量 6 mL,填充 500 mg);0.45 μm 和 0.22 μm 混合纤维酯微孔滤膜。

1.2 色谱分析条件

流动相为乙腈-水(含质量分数 0.05% 三氟乙酸);体积流量:0.8~1.0 mL/min;进样量 10 μL,色谱柱恒温箱设为 30 ℃。

1.3 样品

水样、藻样取自太湖蓝藻爆发期间,放于冰箱中在 0 ℃ 的温度下保存,所有样品在 48 h 内完成萃取、净化和浓缩等处理过程。

1.4 C₁₈ 固相萃取柱的活化

用 10 mL 浓甲醇溶液分 3 次冲洗萃取柱;分别润洗 10,5,2 min;然后用 30 mL 纯水分 3 次浸洗 10,5,2 min。洗去萃取柱上的干扰杂质并使柱子的活性位释放。吹干密封,保存备用。

1.5 毒素的提纯

取一定量水样,于杯式抽滤器中经 0.45 μm 的微孔滤膜减压过滤。将水样液经活化过后的 C₁₈ 固相萃取柱净化富集,将水样以 5~10 mL/min 的体积流量流过固相萃取柱进行富集浓缩。最后用纯水 10 mL,体积分数 10% 甲醇 10 mL,及体积分数 20% 甲醇 5 mL 冲洗柱子,将杂质洗脱,抽掉空气干燥 2 min,最后用 10 mL 体积分数 100% 甲醇洗脱毒素,并旋转蒸发至干,残留物用 1 mL 纯水溶解。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

在 HPLC 上分别对 MC-RR 和 LR 标准品的出峰进行紫外吸收扫描,结果见图 1。

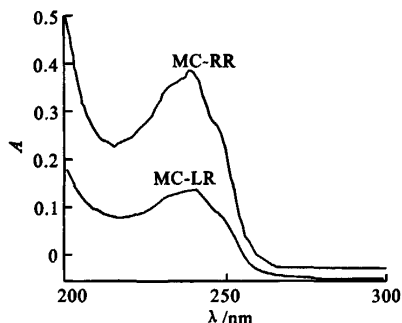


图1 MC-RR/LR 在 200~300 nm 紫外吸收扫描的谱图

Fig.1 Scanning profiles of absorbance of MC-RR/ LR in the ultraviolet range from 200 to 300 nm

无论是 MC-RR 还是 LR 都也在 239 nm 左右有最大的紫外吸收峰,与文献中所述的检测波长一致。因此选择了 239 nm 作为定量测定 MC-RR 和 LR 的紫外吸收波长。在水样的测定中,毒素峰的确定是以出峰物质的紫外吸收扫描图的特征和保留时间来确定。

2.2 流动相的选择

对于肽类化合物的 HPLC 分离,多采用甲醇-磷酸盐缓冲液^[8]或乙腈-水(三氟乙酸调节 pH 和做流动相)^[9]。考虑到甲醇-磷酸盐缓冲液体系由于盐浓度较高,分析后仪器管路不及时冲洗容易出现结晶,堵塞色谱柱而对仪器要求高,因而采用后者,色谱柱易清洗,可节约分析时间。选用含质量分数 0.05% 三氟乙酸的超纯水,与乙腈配比作为流动相。在水与乙腈的体积比例分别为 75:25、70:30、65:35、60:40 的条件下,考察 HPLC 对藻毒素的分离情况。实验表明 V(水):V(乙腈)=65:35 时,洗脱毒素 MC-RR 和 MC-LR 在色谱柱上取得了理想的分离和检测结果。HPLC 色谱图出峰效果较好,杂质影响不明显,MC-RR 的保留时间(RT)在 4.5 min 左右,MC-LR 的保留时间在 10.5 min 左右(见图 2),且两种毒素分离效果较好。

2.3 线性范围与检测限

将 MC-LR 和 MC-RR 标准样品逐级稀释配制 0.25、0.5、1.0、5.0、10.0、15.0、25.0 mg/L 一系列不同质量浓度的 MC-LR 和 MC-RR 标准溶液,

固定 10 μL 进样量,经 HPLC 上测定后,建立了峰面积($X, \text{mAU} \cdot \text{s}$)与质量浓度($Y, \text{mg/L}$)之间的一元线性回归方程:质量浓度 $y_{\text{LR}} = 0.0335x + 0.0521$ ($R^2 = 0.9993$) (图 3), $y_{\text{RR}} = 0.0313x + 0.1322$ ($R^2 = 0.9986$) (图 3)。在 0~25 mg/L 范围内,建立的方程较好地表达了 MC-LR 和 MC-RR 质量浓度与其对应峰面积之间的线性关系,测量结果准确可靠,灵敏度较高。在进样量 10 μL 的条件下,0.1 mg/L 的标准样品能够产生区别于基线噪声的色谱峰,信噪比(s/n)为 3 的条件下,绝对检测限达到 1 ng 。

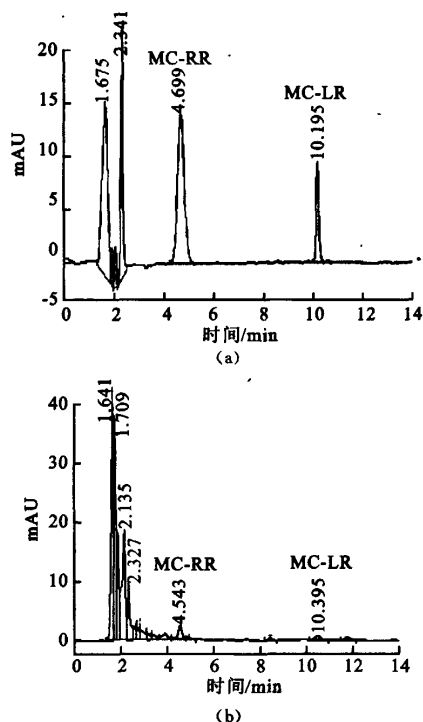


图 2 标样 (MC-LR 及 MC-RR) 和水样 (MC-LR 及 MC-RR) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of standard sample (MC-LR and MC-RR) and water sample (MC-LR and MC-RR)

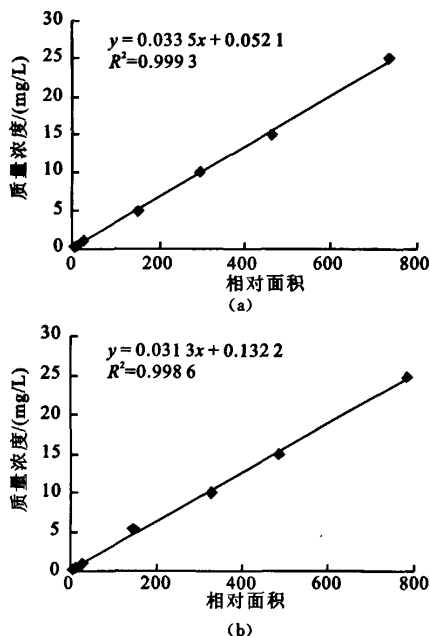


图 3 Microcystin-LR 线性方程

Fig. 3 Linear relationship between the peak areas and the concentrations of Microcystin-LR

2.4 藻毒素的提取、提纯

准确称取 0.500 g 干藻粉,按 3 种不同方法处理:1) 加入 50 mL 纯水,超声振荡 30 min;2) 加入 50 mL 体积分数 5% 乙酸,磁力搅拌 2 h。3) 加入 50 mL 体积分数 75% 甲醇,磁力搅拌 2 h。不同提取方式提取水平结果见表 1。

由表 1 可见,3 种提取方式都可以有效提取藻毒素,方法 1 需要超声设备,而且超声会使少部分毒素降解导致损失;方法 3 采用体积分数 75% 甲醇,提取率较高但甲醇易挥发,且有毒;方法 2 采用体积分数 5% 乙酸提取,能有满意的提取率,且操作简便。故在本实验中都采用体积分数 5% 乙酸提取胞内毒素(图 4 是乙酸提取毒素的 HPLC 色谱图)。

表 1 不同提取方式的提取量

Tab. 1 The extraction of microcystin-RR and LR extracted with different methods

提取方式	MC-RR($\mu\text{g/g}$ dry cells)				MC-LR($\mu\text{g/g}$ dry cells)			
	1	2	3	平均	1	2	3	平均
水+超声破碎	661.3	465.9	653.3	593.5	456.3	368.9	409.3	411.5
体积分数 5% 乙酸	780.8	745.2	669.6	731.9	523.6	459.3	499.5	494.1
体积分数 75% 甲醇	776.5	763.9	698.3	746.2	546.6	433.9	503.6	494.7

2.5 富集提纯

将 MC 粗提液配成已知质量浓度的 MC 水样，经过活化过的 SPE 小柱后进行洗脱。用 10 mL 体积分数分别是 10%、25%、50%、75%、90%、100% 的甲醇水溶液洗脱。

经过对不同体积分数的甲醇水溶液洗脱能力的比较(表 2)，发现体积分数 10% 的甲醇溶液只能洗下杂质，体积分数 25% 以上的甲醇就会有毒素洗脱，体积分数 75% 以上的甲醇可以较完全地将毒素洗脱下来。

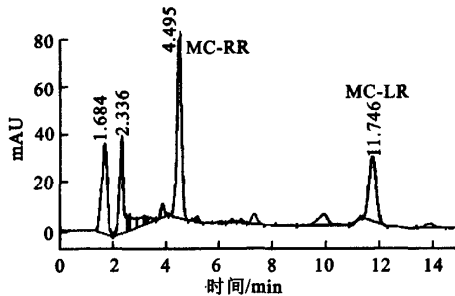


图 4 乙酸提取藻毒素

Fig. 4 HPLC chromatograms of MC-LR and MC-RR by acetic breaking method

表 2 不同体积分数甲醇洗脱液中 MC 质量浓度

Tab. 2 Concentration of microcystins(MCs) in rinse solution

甲醇 体积分数/%	MC-RR 质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	MC-LR 质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)
10	—	—
25	25	—
50	152	96
75	335	222
90	338	235

不同的文献中^[10,11]描述的最佳淋洗和洗脱的甲醇水溶液体积分数有较大差别，其原因应该是实验所使用的 SPE 小柱吸附性能不同所导致。故实验中可用体积分数 10% 和体积分数 20% 的甲醇水溶液淋洗杂质，用 75% 以上的甲醇洗脱毒素。可获得较好的洗脱结果。

2.6 太湖水样的分析

2007 年 6 月由于蓝藻水华的爆发，导致濒临太湖的城市的供水水质恶化。作者对水源水、自来水和江南大学生产的饮用净水，用建立的方法富集和分析了水中的 MC 含量。如图 5 所示。

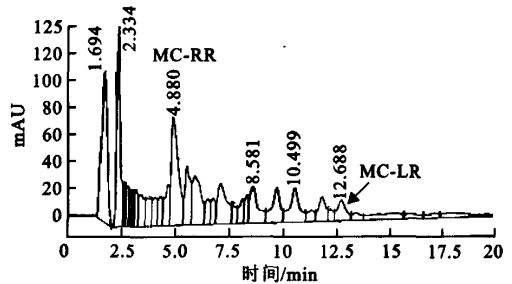


图 5 2007 年 6 月太湖水样经 C_{18} 柱富集 50 倍后藻毒素检测结果

Fig. 5 HPLC chromatograms of MC-RR and MC-LR in TaiHu Lake after 50 times concentration in June, 2007

结果表明，在水源水样中检测到 MC-LR 质量浓度为 0.30 mg/L 和 MC-RR 质量浓度为 1.16 mg/L(图 5)。而在自来水和饮用净水中未检出有 MC-LR 和 RR(含量在 0.01 $\mu\text{g/L}$ 以下)。

3 结 语

HPLC 法测定 MC-RR 和 LR 稳定可靠，可以准确定量测定水体中 MC-RR 和 LR 的质量浓度。HPLC 分析测定的条件是：流动相体积分数：35% 乙腈、65% 水(含有质量分数 0.05% 的三氟乙酸)；体积流量 0.8 mL/min；紫外检测波长 239 nm；进样量 10 μL 。

对于低质量浓度微囊藻毒素可以用 SPE-HPLC 方法富集测定，该法操作简便，灵敏度高，能够满足目前规定的 1.0 $\mu\text{g/L}$ 限值的分析要求，适合水质监测部门的应用。

从固相萃取柱洗脱毒素的同时会洗出对毒素峰有干扰的物质，可以通过用水和低体积分数甲醇淋洗，去除或降低干扰。

参考文献(References):

- [1] 秦伯强,王小冬,汤祥明,等.太湖富营养化与蓝藻水华引起的饮用水危机一原因与对策[J].地球科学进展. 2007,22(9): 896—906.
- QIN Bo-qiang, WANG Xiao-dong, TANG Xiang-ming, et al. Drinking water crisis caused by eutrophication and cyanobacterial bloom in lake taihu: cause and measurement[J]. *Advances in Earth Science*, 2007, 22(9): 896—906. (in Chinese)
- [2] 孔繁翔,胡维平,谷孝鸿,等.太湖梅梁湾 2007 年蓝藻水华形成及取水口污水团成因分析与应急措施建议[J].湖泊科学. 2007,19(4):357—358.

- KONG Fan-xiang, HU Wei-ping, GU Xiao-hong, et al. On the cause of cyanophyta bloom and pollution in water intake area and emergency measures in Meiliang Bay, Lake Taihu in 2007[J]. *Journal of Lake Science*, 2007, 19(4): 357—358. (in Chinese)
- [3] 郑雪琴, 苑宝玲, 邢核, 等. 高效液相色谱法测定蓝绿藻中微囊藻毒素[J]. 理化检验-化学分册, 2005, 41(2): 104—106.
ZHEN Xue-qin, YUAN Bao-ling, XING He, et al. HPLC determination of microcystin in microcystis aeruginosa[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B Chemical Analysis*, 2005, 41(2): 104—106. (in Chinese)
- [4] Dongjin Pyo, Jungae Lee, Euiyule Choi. Trace analysis of microcystins in water using enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Microchemical Journal*, 2005, 80(2): 165—169.
- [5] Jarkko Rapala, Kirsti Erkoma, Jaana Kukkonen. Detection of microcystins with protein phosphatase in hibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay comparison of methods [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 466: 213—231.
- [6] Jacqui Mc Elhiney, Linda A lawton. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 203: 219—230.
- [7] 刘斌, 周培疆, 宋立荣. 微囊藻毒素的极谱测定法[J]. 中国环境监测, 2005, 21(1): 33—37.
LIU Bin, ZHOU Pei-jiang, SONG Li-rong. Determination of microcystin in water with polarography[J]. *Environmental Monitoring In China*, 2005, 21(1): 33—37. (in Chinese)
- [8] 石亚伟, 崔丽方, 袁静明. 高效液相色谱法测定环二酰胺酶催化水解马来酰亚胺动力学参数[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 48—51.
SHI Ya-wei, CUI Li-fang, YUAN Jing-ming. Determination of kinetic parameters of a cyclic imidase hydrolyzing maleimide by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(2): 48—51. (in Chinese)
- [9] 王蕾, 李小艳, 张惠, 等. 高效液相色谱-质谱法测定蓝藻中的微囊藻毒素[J]. 食品工业科技, 2007, 28(3): 197—236.
WANG Lei, LI Xiao-yan, ZHANG Hui, et al. Determination of microcystins in cyanobacterial using HPLC-Mass spectrum method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(3): 197—236. (in Chinese)
- [10] 张维昊, 徐小清. 固相萃取高效液相色谱法测定水中痕量微囊藻毒素[J]. 分析化学, 2001, 29(5): 522—525.
ZHANG Wei-hao, XU Xiao-qing. Determination of trace level microcystins in water using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 29(5): 522—525. (in Chinese)
- [11] 刘碧波, 肖邦定, 刘剑彤, 等. 天然水体中痕量微囊藻毒素的高效液相色谱测定方法优化[J]. 分析化学, 2005, 33(11): 1577—1579.
LIU Bi-bo, XIAO Bang-ding, LIU Jian-tong, et al. The optimization of high performance liquid chromatographic method for analysis of trace microcystins in natural water bodies[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 33(11): 1577—1579. (in Chinese)

(责任编辑: 杨萌)

《食品与生物技术学报》被评为首届“中国精品科技期刊”

近日,从科技部在北京国际会议中心举行的“中国科技论文统计结果新闻发布会”上悉,《食品与生物技术学报》被评为首届“中国精品科技期刊”。

国家科技部自2000年以来,为提升中国科技期刊的整体水平,增强国际竞争能力,更好地为我国科技自主创新提供支撑和保障,提出了打造精品科技期刊的概念。通过建设精品科技期刊数据库平台、培育精品科技期刊等工作,凝聚和培养高水平编辑人才队伍,引领和带动我国科技期刊资源整体水平提高。

“中国精品科技期刊”经过公开征集社会各界意见和多次专家研讨及中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价,在6000多种科技期刊中评选出300种首批中国精品科技期刊。

另外,在2008年版中国科技期刊引证报告中,《食品与生物技术学报》在全国轻工,纺织类期刊中影响因子排名第五;在食品类期刊中,影响因子排名第一。