

根据 EPA 方法 545 使用三重四极杆 LCMS-8060NX 高灵敏度定量检测水中的柱孢藻毒素和类毒素 -a

02-SSI-LCMS-153-CN

Kate Xia, Evelyn Wang, Ruth Marfil-Vega
岛津科学仪器公司

特点描述

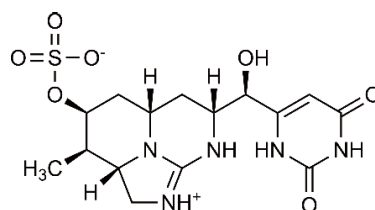
- ◆ 岛津 LCMS-8060NX 三重四极杆质谱仪可轻松实现 EPA 方法 545 对柱孢藻毒素和类毒素 -a 分析的定量要求
- ◆ 与 EPA 方法 545 中报告的结果相比, 该方法的 LOQ 更低, 动态范围更广, 因此无需额外的样品预处理 (浓缩或稀释), 即可在一个批次中对浓度范围更广的样品进行分析。
- ◆ 运行时间为 8 分钟, 同时确保良好的色谱分离和峰形。

■ 背景

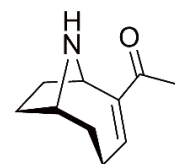
由于全球气温升高和富含营养化的环境, 蓝藻 (通常称为蓝绿藻) 和有害藻类在水体中大量繁殖的现象越来越频繁。它们有可能对水质产生重大影响, 因为它们会产生蓝藻毒素, 如柱孢藻毒素和类毒素 -a。暴露于蓝藻毒素会对人类和动物的健康造成一系列不良影响, 轻则出现皮疹, 重则导致严重疾病。

柱孢藻毒素可对肝脏、肾脏和其他器官造成损害。它以细胞毒性作用而闻名。¹ 根据美国 EPA 发布的饮用水健康建议, 对于六岁以下儿童, 饮用水中的柱孢藻毒素含量应小于 0.7 µg/L, 对于学龄儿童和成人, 应小于 3.0 µg/L。² 类毒素 -a 又称极速死亡因子 (VFDF), 是一种具有急性神经毒性的二级双环胺生物碱和蓝藻毒素。类毒素 -a 可导致协调能力丧失、肌肉抽搐、抽搐等症状, 并通常因呼吸麻痹而迅速死亡。³

由于这些蓝藻毒素对娱乐水域和饮用水都构成了严重威胁, 包括美国在内的各国都在积极开展监测和监管工作。这些举措旨在检测和处理蓝藻毒素的存在, 确保水源安全, 保护公众健康。监测实践和法规是水管理战略的重要组成部分, 以应对与有害藻华及其毒素相关的潜在危害。



柱孢藻毒素



类毒素 -a

■ 方法

柱孢藻毒素和类毒素 -a 购自 Enzo Life Science。内标尿嘧啶 -d4 和 L- 苯丙氨酸 -d5 来自 Toronto Research Chemicals。LC-MS 级溶剂 (乙酸、甲醇和水) 来自 Honeywell。



标准溶液制备: 将 1 mL 甲醇 / 水 (1:1) 直接加入生产商的小瓶中, 制备类毒素 -a 和柱孢藻毒素的标准品储备液。从而获得 1 mg/mL 富马酸类毒素 -a 和 100 µg/mL 柱孢藻毒素的标准品储备液。用甲醇 / 水 (1:1) 将初始标准品储备液进一步稀释至 1 µg/mL。使用含有样品保护剂 (1.0 g/L 硫酸氢钠和 0.10 g/L 抗坏血酸) 的 LC-MS 级水作为稀释剂, 用 1 µg/mL 的储备液制备一系列校准标准品溶液, 以获得类毒素 -a 的最终浓度为 0.02-20 ng/mL, 柱孢藻毒素的最终浓度为 0.005-10 ng/mL。

尿嘧啶 -d4 和 L- 苯丙氨酸 -d5 内标储备液的制备方法为: 称取 1 mg 固体物料至 HPLC 自动进样小瓶中, 用 LC-MS 级热水 (50°C) (尿嘧啶 -d4) 和甲醇 / 水 (1:1) (L- 苯丙氨酸 -d5) 稀释至刻度线。在校准标准品和样品中添加内标, L- 苯丙氨酸 -d5 的最终浓度为 0.1 ng/mL, 尿嘧啶 -d4 的最终浓度为 1.0 ng/mL。

样品制备: 样品的制备遵循 EPA 方法 545 中概述的程序。⁴ 收集并处理了五种不同的水样, 包括 LC-MS 级水、自来水 1、过滤后的自来水 2、一种来自当地溪流的水样和一种来自池塘 (哥伦比亚, 马里兰州) 的水样, 以展示该方法的适用性。样品中添加 1.0 g/L 硫酸氢钠和 0.10 g/L 抗坏血酸, 并通过 0.2 µm 孔径的 PVDF 膜过滤。

表 1: 流动相梯度时间程序

时间 (分钟)	%A	%B
0	98	2
1.0	80	20
3.5	60	40
3.51	40	60
4.0	40	60
4.01	98	2
8	98	2

流动相 A: 0.2% 醋酸水溶液

流动相 B: 甲醇

仪器参数: 采用岛津 LCMS-8060NX 三重四极杆质谱仪进行高灵敏度和稳健的分析。使用 Shim-pack GIST C18 色谱柱 (100×2.1 mm, 2.0 µm, PN: 227-30001-04) 仅用 8 分钟就完成了分析物和内标物的色谱分离。流动相流速为 0.3 mL/分钟, 进样量为 20 µL。柱温保持在 40°C。梯度条件详见表 1。

LCMS-8060NX 采用正离子模式和电喷雾离子化技术, 以多反应监测 (MRM) 模式运行。通过监测两个选择性 MRM 转换, 对目标分析物进行了定量和确认。表 2 和表 3 提供了所用参数的详细信息, 包括特定来源和特定化合物的信息。为避免保护剂污染质谱仪, 使用了一个分流阀, 将第一分钟的洗脱液排至废液中。

数据分析: 数据使用 LabSolutions 软件采集, 使用 LabSolutions Insight LCMS 进行分析, 并使用可定制的 QA 标志进行例外审查。Insight 具有快速数据处理和数据审查功能, 使科学家能够高效地分析数据。

表 2: MS 条件

离子化模式	: ESI
扫描模式	: MRM
采集模式	: 正离子模式
接口电压	: 1 kV
聚焦电压	: 2 kV
雾化气流量	: 3.0 L/min
加热气体流量	: 10.0 L/min
接口温度	: 300°C
DL 温度	: 250°C
加热模块温度	: 400°C
干燥气流量	: 10.0 L/min

表 3: 用于分析柱孢藻毒素和类毒素 -a 的详细 MRM 设置和指定内标

化合物	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	驻留时间 (秒)	Q1 (V)	碰撞能量 (V)	Q3 (V)	内标
柱孢藻毒素 (定量)	416.10	194.25	38	-16.0	-35.0	-21.0	尿嘧啶 -d4
柱孢藻毒素 (定性)	416.10	336.25	38	-16.0	-23.0	-12.0	尿嘧啶 -d4
类毒素 -a (定量)	166.00	131.20	38	-17.0	-20.0	-27.0	L- 苯丙氨酸 -d5
类毒素 -a (定性)	166.00	43.00	38	-17.0	-24.0	-17.0	L- 苯丙氨酸 -d5
L- 苯丙氨酸 -d5	171.10	125.30	59	-18.0	-14.0	-25.0	N/A
尿嘧啶 -d4	115.10	98.05	59	-21.0	-20.0	-19.0	N/A

■ 结果和讨论

色谱分离：利用 Shim-pack GIST C18 色谱柱和梯度条件，可以有效地保留分析物，并对目标分析物进行基线分离。在 8 分钟梯度条件下，柱孢藻毒素、类毒素 -a 和两种内标物实现了完全分离，如图 1 所示。

校准和 LOQ：柱孢藻毒素在 0.005-10 ng/mL 的浓度范围内的校准曲线成线性，而类毒素 -a 的校准范围为 0.02-20 ng/mL。图 2 显示了校准曲线的线性。在较宽的校准范围内，两种化合物的线性均非常好， R^2 均大于 0.99。每个校准点重复测定 3 次，以平均值绘制校准曲线，所有进样溶液的准确度都在 80% 至 120% 的范围内。对于这两种蓝藻毒素，所有校准溶液重复进样的浓度的 RSD% 均小于 10%，这表明该系统具有极佳的稳健性和重现性。在最高浓度校准溶液分析之后的空白进样中未观察到残留。

该方法的定量限 (LOQ) 为：柱孢藻毒素 0.005 ng/mL，类毒素 -a 0.02 ng/mL。LOQ 是根据准确度、重现性和 $S/N \geq 10$ 来确定的。LOQ 数据点的准确度在 80-120% 之间， $RSD\% < 7\%$ ，符合 EPA 方法 545 的要求。LOQ 进样中定量离子的代表性色谱图见图 3。

加标水样分析：为展示该方法的适用性，制备并处理了五种水样（LC-MS 级水、自来水 1、过滤后的自来水 2、溪水和池塘水（哥伦比亚，马里兰州）），以分析两种蓝藻毒素。在未加标样品中未发现可检测到的峰值，这表明原始水样中不含蓝藻毒素。通过在水样中添加两个浓度水平的柱孢藻毒素（0.05 和 0.25 $\mu\text{g/L}$ ）和类毒素 -a（0.2 和 1 $\mu\text{g/L}$ ），对准确度和精密度进行了评估。在所有水样的两个加标水平上，柱孢藻毒素和类毒素 -a 的准确度均在预期值的 25% 范围内，RSD% 值低于 10%（表 4）。结果在 EPA 545 列出的可接受限度内。

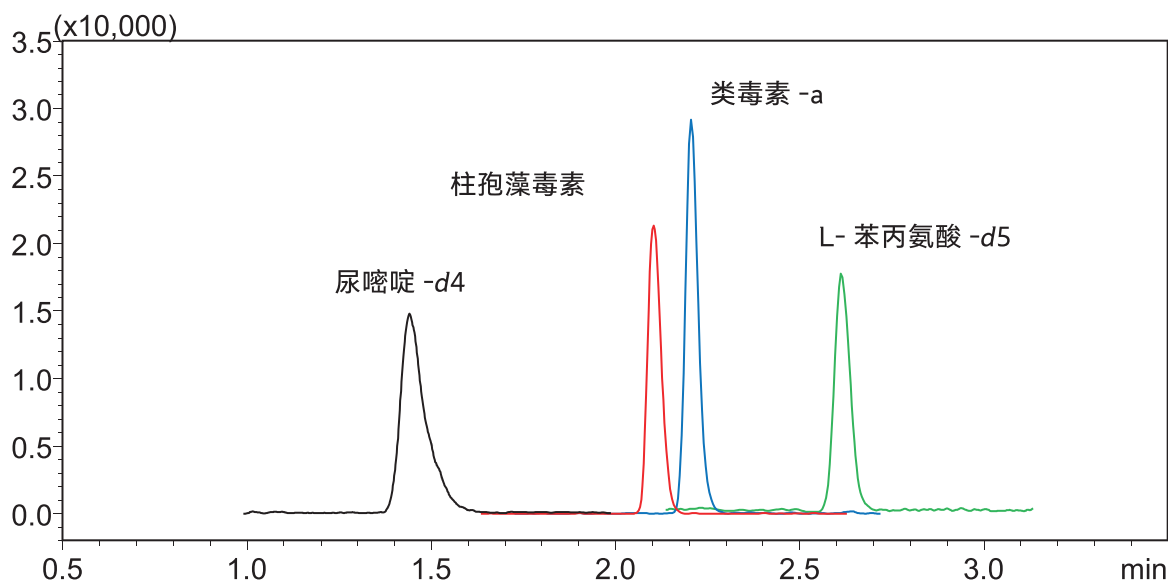


图 1：柱孢藻毒素（0.1 ng/mL）、类毒素 -a（0.4 ng/mL）、L- 苯丙氨酸 -d5（0.10 ng/mL）和尿嘧啶 -d4（1.0 ng/mL）的 MRM 定量离子色谱图。Shim-pack GIST C18 色谱柱成功地保留了化合物，同时表现出了有效的基线色谱分离。

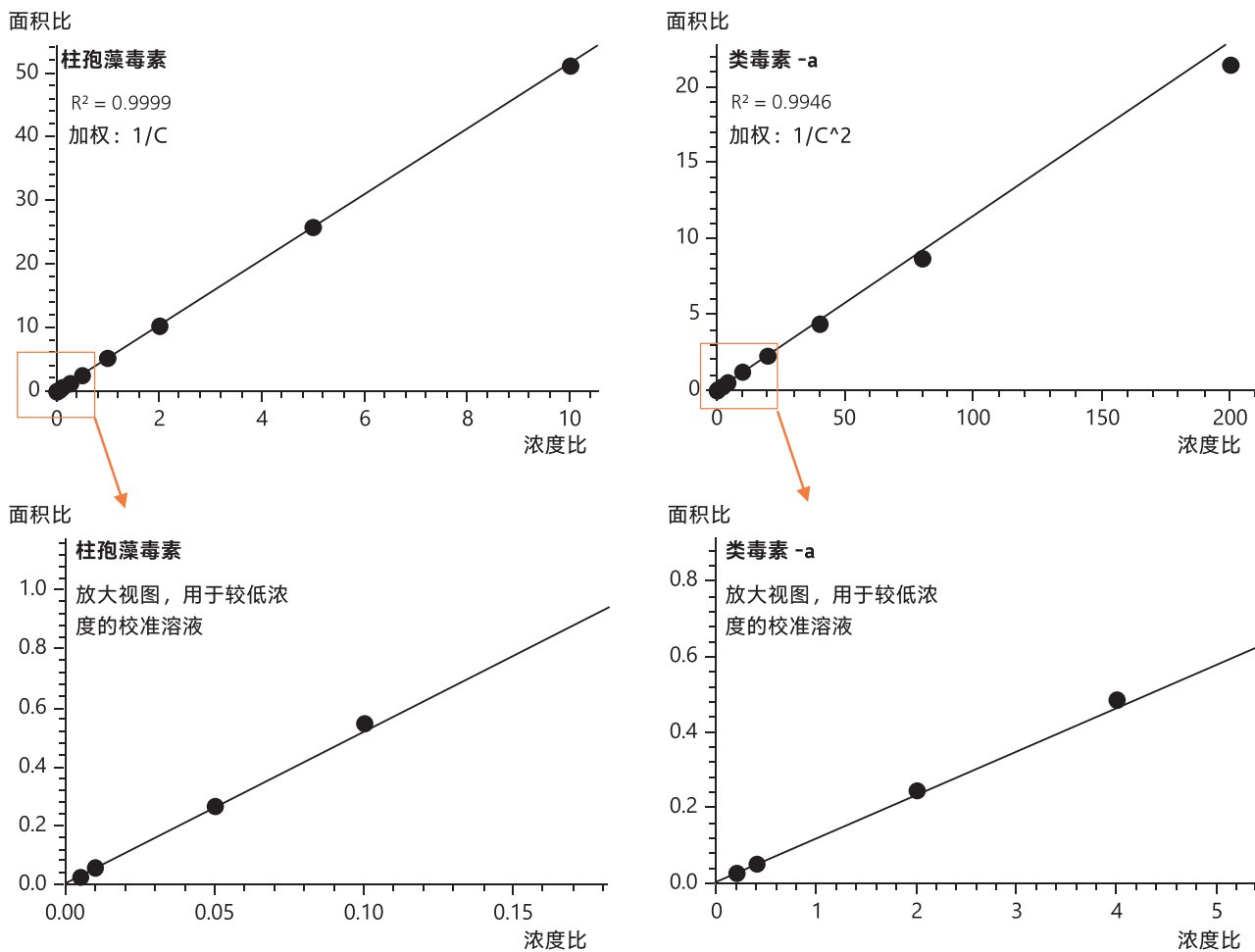


图 2: 柱孢藻毒素 (0.005-10 ng/mL) 和类毒素 -a (0.02 - 20 ng/mL) 的校准曲线, 以及较低浓度校准溶液的放大视图。

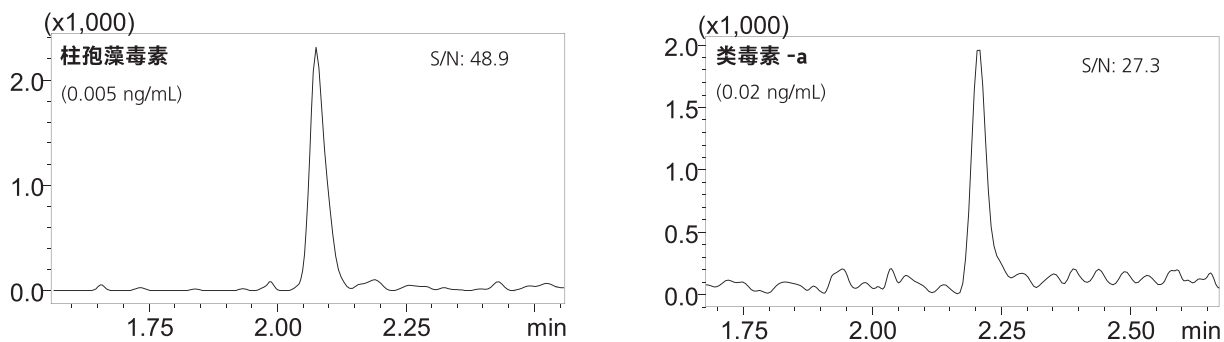


图 3: LOQ 进样中定量离子的代表性色谱图。

• 表 4. 分析水样中柱孢藻毒素和类毒素 -a 的精密度和准确度

重复编号	柱孢藻毒素 (0.05 µg/L)		类毒素 -a (0.2 µg/L)		柱孢藻毒素 (0.25 µg/L)		类毒素 -a (1.0 µg/L)	
	浓度 (µg/L)	准确度	浓度 (µg/L)	准确度	浓度 (µg/L)	准确度	浓度 (µg/L)	准确度
LC-MS 级水								
1	0.0496	99.2%	0.1909	95.4%	0.2505	100.2%	0.9720	97.2%
2	0.0502	100.3%	0.1845	92.3%	0.2495	99.8%	0.9615	96.2%
3	0.0500	99.9%	0.1913	95.7%	0.2477	99.1%	0.9601	96.0%
RSD% (浓度)	0.58		2.02		0.57		0.68	
自来水 1								
1	0.0418	83.7%	0.2478	123.9%	0.2023	80.9%	1.2180	121.8%
2	0.0405	81.1%	0.2449	122.4%	0.2018	80.7%	1.2353	123.5%
3	0.0400	80.0%	0.2435	121.8%	0.1999	80.0%	1.2393	123.9%
RSD% (浓度)	2.31		0.88		0.62		0.92	
过滤后的自来水 2								
1	0.0412	82.3%	0.2349	117.5%	0.2056	82.2%	1.2197	122.0%
2	0.0433	86.7%	0.2310	115.5%	0.2122	84.9%	1.233	123.3%
3	0.0406	81.2%	0.2357	117.9%	0.2100	84.0%	1.2161	121.6%
RSD% (浓度)	3.47		1.09		1.61		0.73	
溪水								
1	0.0461	92.1%	0.2405	120.3%	0.2210	88.4%	1.1899	119.0%
2	0.0432	86.5%	0.2411	120.6%	0.2226	89.1%	1.1842	118.4%
3	0.0422	84.5%	0.2259	113.0%	0.2255	90.2%	1.1191	111.9%
RSD% (浓度)	4.54		3.65		1.03		3.38	
池塘水								
1	0.0486	97.1%	0.2369	118.4%	0.2524	101.0%	1.1334	113.3%
2	0.0491	98.3%	0.2356	117.8%	0.2531	101.2%	1.1557	115.6%
3	0.0551	110.3%	0.2373	118.6%	0.2589	103.6%	1.1261	112.6%
RSD% (浓度)	7.15		0.36		1.41		1.36	

■ 结论

在该应用中，成功开发了一种快速 LCMS 方法，用于分析水中的柱孢藻毒素和类毒素 -a。使用 Shim-pack GIST C18 色谱柱仅需 8 分钟就能实现两种蓝藻毒素和内标物的完全分离。柱孢藻毒素 (0.005-10 ng/mL) 和类毒素 -a (0.02-20 ng/mL) 在较宽的校准曲线范围内呈线性， R^2 超过 0.99。

在五种不同的水样中以两个加标水平添加类毒素 -a 和柱孢藻毒素，验证了该方法的适用性，结果表明准确度均在 80-125% 之间，RSD% 小于 10%。该应用证明了岛津 LCMS-8060NX 在 EPA 方法 545 规定的 QA 限度内分析水中柱孢藻毒素和类毒素 -a 的灵敏度和重现性。

■ 参考文献

1. Health Effects Support Document for the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin. [Online]
<https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-06/documents/cylindrospermopsin-support-report-2015.pdf>
2. EPA Drinking Water Health Advisories for Cyanotoxins. [Online]
<https://www.epa.gov/cyanohabs/epa-drinking-water-health-advisories-cyanotoxins>
3. Health Effects Support Document for the Cyanobacterial Toxin Anatoxin-A. [Online]
<https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-06/documents/anatoxin-a-report-2015.pdf>
4. Method 545: Determination of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Drinking Water by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS). [Online]
https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-10/documents/epa_815-r-15-009_method_545.pdf

UAFMS

ULTRA FAST MASS SPECTROMETRY



LCMS-8045RX

LCMS-8050RX

LCMS-8060RX

LCMS-2020

LCMS-2050

Q-TOF LCMS-9030/9050

岛津制作所成立于1875年，始终秉持“以科学技术向社会做贡献”的理念，致力于引领先进技术的发展，积淀了丰厚的创新底蕴。岛津科学仪器（SSI）成立于1975年，是岛津制作所的美国子公司，致力于为整个北美、中美和南美洲部分地区的实验室提供全面的分析解决方案。SSI服务网络遍布全美，共设有10个区域办事处，东西海岸均开设应用实验室，我们的技术专家、服务和销售工程师可随时为您提供服务。

有关岛津科学仪器的更多信息，以及如何联系您当地的办事处，请访问我们的网站 www.ssi.shimadzu.com

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2024年7月