

LC-MS/MS 法测定活性污泥中 11 种信号分子

LCMSMS-949

摘要： 本文利用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了活性污泥中 11 种酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) 信号分子的分析方法。样品经过 SPE 浓缩，转溶，MRM 模式测定，11 种 AHLs 在 0.05~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内建立校准曲线，线性关系良好，相关系数 r 均大于等于 0.995。检出限 0.01-0.12 $\mu\text{g/L}$ ，定量限 0.02-0.35 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词： 三重四极杆液相色谱质谱联用仪 AHLs 信号分子 污水处理 群体感应

技术特点：

- ❖ 优化色谱、质谱参数，线性范围低限至 0.05 $\mu\text{g/L}$ ，灵敏度高；
- ❖ 优化色谱分离条件，11 种 AHLs 分离良好，避免同系物的通道干扰。

活性污泥好氧颗粒，是污水处理中的一种新技术手段，近年来，酰基高丝氨酸内酯 (Acyl Homoserine Lactone, AHL) 介导的微生物群感效应 (Quorum Sensing, QS) 成为活性污泥领域的研究热点。群感效应是微生物通过分泌、积累和感知信号分子来协调其基因表达的现象，群感效应具有控制微生物行为的能力，如生物膜形成、生物发光、胞外酶分泌和抗生素合成等，它可以通过传递信号分子来实现。有研究报道，硝化菌、反硝化菌和厌氧氨氧化菌能产生、释放和感知某些化学信号分子，当信号分子浓度达到一定阈值时，就会被这些氮转化功能菌识别，并在群体水平上调控相关基因的表达，从而调节其代

谢行为并对不同环境做出反应。AHLs 的链长是影响 AHLs 调节微生物除氮性能的一个关键因素，常见的 AHLs 碳链长度 C4-C14，长碳链 (C12~C14) 具有更强的疏水性、耐水解性和生物黏附性。研究表明，QS AHLs 的细菌 QS 阈值为 10 ng/L ~ 10 $\mu\text{g/L}$ 。

目前，AHLs 的检测方法包括微生物传感菌检测、微生物传感菌与薄层层析结合和高效液相色谱串联质谱等方法。

本文采用 LC-MS/MS 法，建立了实验室 SBR(序批式活性污泥法) 装置中 11 种常见 AHLs 分析方法，该方法灵敏度高，分析速度快，可供污水处理、微生物腐败、发酵与生物合成等相关领域参考。

■ 实验条件

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera LC-40B XR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置如下：

系统控制器：	CBM-40	柱温箱：	CTO-40S
输液泵：	LC-40B XR	三重四极杆质谱仪：	LCMS-8045
自动进样器：	SIL-40C XR	色谱工作站：	LabSolutions Ver 5.120

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST HP (100 mm×2.1 mm, 3 μm)
PN: 227-30039-04, 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液
B 相 - 乙腈 -0.1% 甲酸水溶液

柱温：40°C

流速：0.3 mL/min

进样体积：5 μ L (co-injection, 10 μ L 水)

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 10%，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	Command	Value
0.50	泵	B. Conc	10
6.00	泵	B. Conc	95
7.50	泵	B. Conc	95
7.60	泵	B. Conc	10
10.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子源：ESI+

DL 管温度：250°C

接口电压：1.5 kV

加热模块温度：400°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

接口温度：350°C

干燥气：氮气 5 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

加热气：空气 15 L/min

MRM 参数：见表 2

碰撞气：氩气 (230 kPa)

表 2 MRM 参数

序号	目标物	保留时间 (min)	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	Q1 Pre Bias	CE (eV)	Q3 Pre Bias
1	C4-HSL	1.282	172.1	102.1*	-19	-12	-20
				154.1	-20	-9	-26
2	3-OH-C4-HSL	1.255	188.1	74*	-10	-22	-29
				56	-10	-22	-29
3	C6-HSL	2.752	200.1	99.1*	-10	-11	-10
				102.1	-10	-11	-21
4	3-oxo-C6-HSL	0.985	214.2	102.1*	-24	-11	-20
				74.2	-15	-22	-30
5	C8-HSL	4.194	228.2	127.1*	-28	-12	-25
				210.1	-18	-10	-22
6	3-oxo-C8-HSL	3.202	242.2	102.1*	-29	-12	-10
				141.2	-12	-13	-26
7	C10-HSL	5.273	256.2	102.1*	-30	-12	-16
				238.1	-13	-10	-11
8	3-oxo-C10-HSL	4.454	270.2	102.1*	-14	-13	-21
				127.2	-10	-16	-30
9	C12-HSL	6.265	284.3	102.0*	-14	-12	-19
				266.3	-14	-11	-17

10	C14-HSL	7.153	312.3	102.1*	-15	-13	-18
				294.1	-16	-13	-13
11	3-oxo-C14-HSL	6.393	326.3	102.1*	-17	-13	-27
				74.2	-24	-26	-14

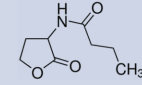
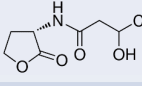
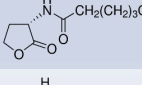
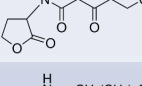
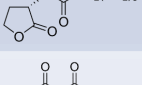
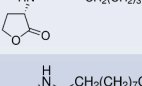
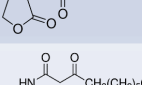
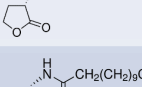
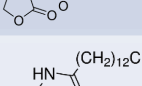
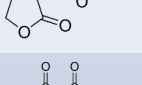
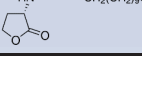
* 表示定量离子

1.3 混合标准品工作溶液的制备

取 11 个 AHLs 混标母液适量，以甲醇稀释定容，即为中间工作液 1000 µg/L。

以甲醇逐级稀释，配制浓度为 0.05、0.1、0.5、1、5、10、100 µg/L 系列标准溶液。

表 3 AHLs 基本信息

序号	简写	中文名	英文名	结构式	化学式	分子量
1	C4-HSL	N-丁酰基-L-高丝氨酸内酯	N-Butanoyl-L-homoserine lactone		C ₈ H ₁₃ NO ₃	171.19
2	3-OH-C4-HSL	HC4-N-(3-羟基丁酰基)-L-高丝氨酸内酯	HC4-N-(3-hydroxybutyryl)-L-homoserine lactone		C ₈ H ₁₃ NO ₄	187.19
3	C6-HSL	N-己酰-L-高丝氨酸	N-hexanoyl-L-homoserine		C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	199.25
4	3-oxo-C6-HSL	N-(3-氧代己酰基)-DL-高丝氨酸内酯	N-(3-oxo-hexanoyl)-DL-homoserine lactone		C ₁₀ H ₁₅ NO ₄	213.23
5	C8-HSL	N-辛酰基-L-高丝氨酸内酯	N-Octanoyl-L-homoserine lactone		C ₁₂ H ₂₁ NO ₃	227.30
6	3-oxo-C8-HSL	N-3-氧代-辛酰基-L-高丝氨酸内酯	N-3-oxo-octanoyl-L-Homoserine lactone		C ₁₂ H ₁₉ NO ₄	241.28
7	C10-HSL	N-癸酰基-L-高丝氨酸内酯	N-Decanoyl-L-homoserine lactone		C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	255.35
8	3-oxo-C10-HSL	N-(3-氧代十二烷酰基)-L-高丝氨酸内酯	N-(3-Oxodecanoyl)-L-homoserine lactone		C ₁₄ H ₂₃ NO ₄	269.34
9	C12-HSL	N-十二烷酰基-L-高丝氨酸内酯	N-Dodecanoyl-L-homoserine lactone		C ₁₆ H ₂₉ NO ₃	283.41
10	C14-HSL	N-十四烷酰基-DL-高丝氨酸内酯	N-tetradecanoyl-DL-Homoserine lactone		C ₁₈ H ₃₃ NO ₃	311.46
11	3-oxo-C14-HSL	N-(3-氧代叔丁酰基)-L-高丝氨酸内酯	N-(3-Oxotetradecanoyl)-L-homoserine lactone		C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	325.44

1.4 样品处理

活性污泥沉淀 30 min，取 200 mL 上清液，离心，过 0.45 µm 的醋酸纤维素膜，加 1 mol/L 的盐酸适量，调节 pH=2.0，上 HLB SPE 柱净化，洗脱液氮吹浓缩，甲醇定容至 1.0 mL，待测。

■ 结果与讨论

2.1 质谱条件确认及优化

AHLs为高丝氨酸内酯,在ESI模式下观测到 $[M+H]^+$ 峰,CID碎裂易从酰胺键断裂,形成 m/z 102、 $[M+H-101]^+$ 、 $[M+H-18(H_2O)]^+$ 、 $[M+H-28(CO)]^+$ 的特征碎片。使用LabSolutions软件MRM方法优化功能,对碰撞能、Q1和Q3预四极杆电压进行了优化。典型二级质谱图及碎裂规律如下图所示。此外,对离子源参数进行了考察,接口温度、加热气设定值大一些,接口电压小一些AHLs信号强度更高,优化后的参数见“1.2分析条件”。

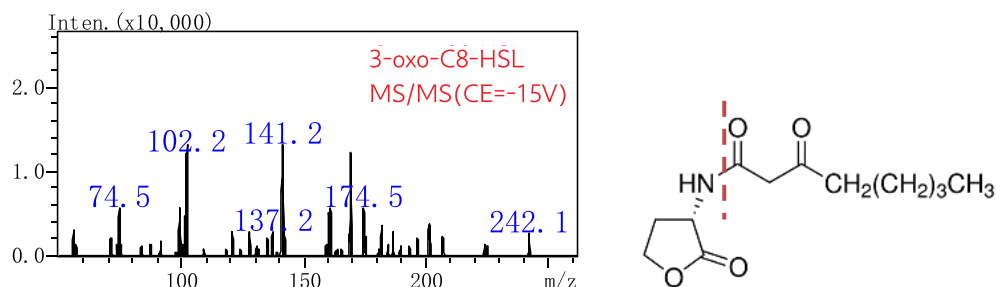


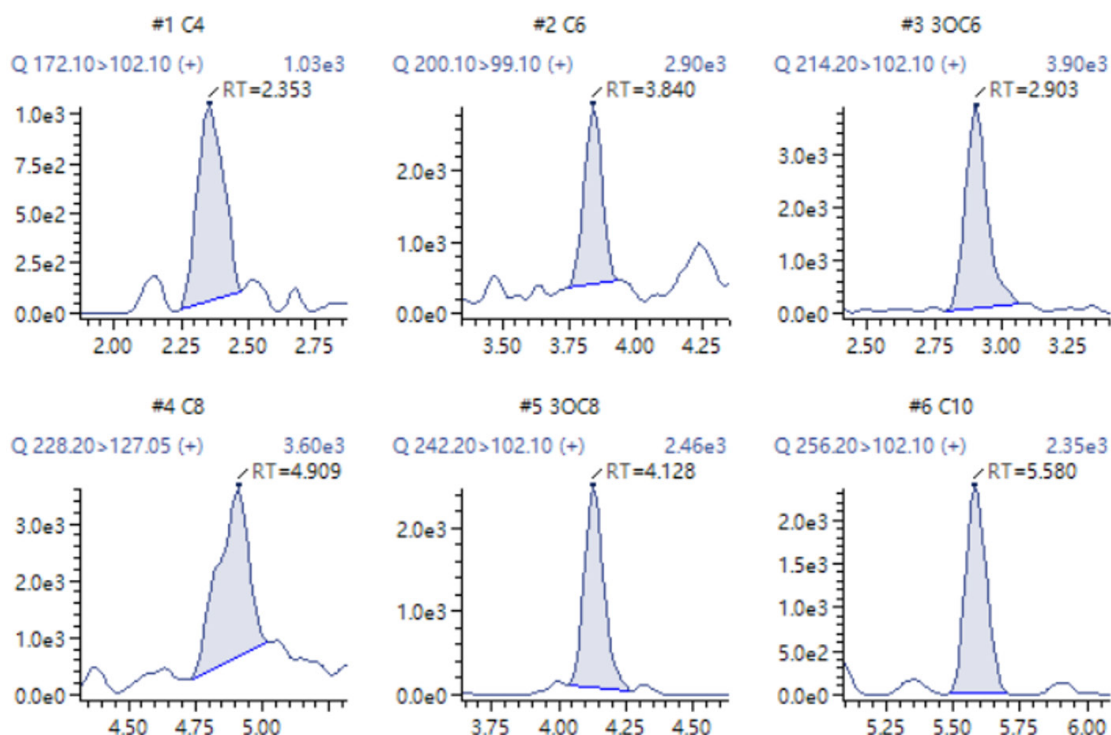
图1 3-oxo-C8-HSL 二级质谱图及碎裂示意图

2.2 流动相优化

分别考察了水-甲醇,0.1%甲酸水-甲醇,0.1%甲酸水-0.1%甲酸乙腈,0.1%甲酸水-0.1%甲酸甲醇。结果显示,甲醇通道干扰明显,3-OH-C4-HSL基线低,噪音小;乙腈通道无明显干扰,但C12,C14响应较甲醇低一个数量级,乙腈加酸后响应提升显著,有效弥补电离劣势。因此最终选择用0.1%甲酸水-0.1%甲酸乙腈。

2.3 灵敏度色谱图

0.1 $\mu\text{g/L}$ 的11种AHLs混标色谱图如下所示。



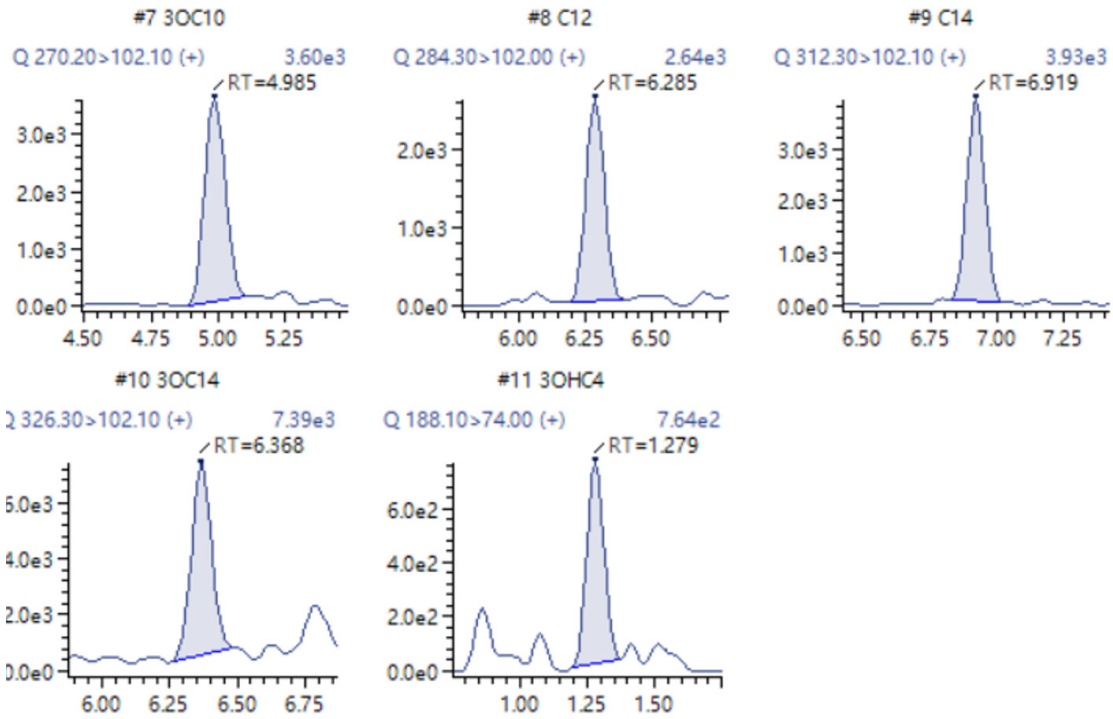


图 2 11 种 AHLs 色谱图 (0.1 $\mu\text{g/L}$)

2.4 校准曲线及灵敏度

将 0.05-100 $\mu\text{g/L}$ 系列校准曲线溶液按照前述条件进样，记录峰面积，绘制外标曲线，结果见图 3、表 4。标曲相关系数 R 均 ≥ 0.995 。检出限 0.01-0.12 $\mu\text{g/L}$ ，定量限 0.02-0.35 $\mu\text{g/L}$ 。

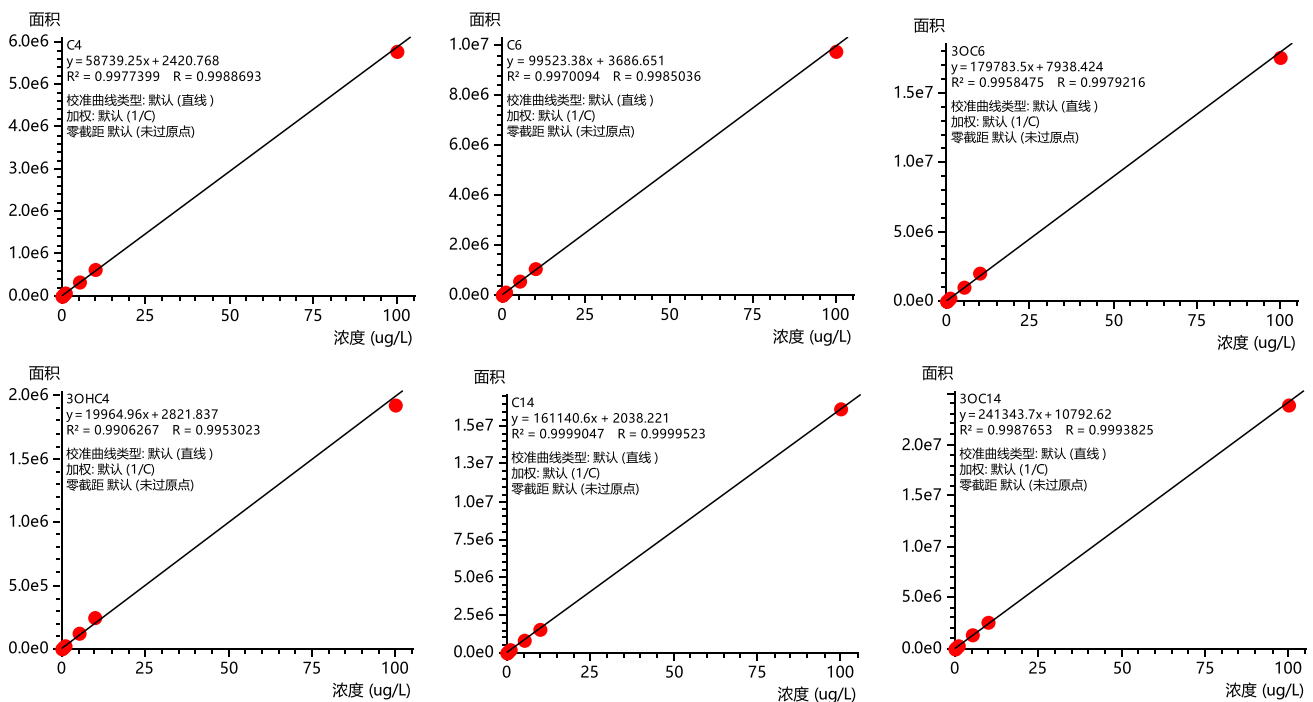


图 3 AHLs 校准曲线图 (部分)

表4 校准曲线结果

序号	目标物	线性方程	相关系数	检出限 (µg/L)	定量限 (µg/L)
1	C4-HSL	Y=58739.25X+2420.768	0.9989	0.08	0.23
2	3-OH-C4-HSL	Y=19964.96X+2821.837	0.9953	0.05	0.17
3	C6-HSL	Y=99523.38X+3686.651	0.9985	0.07	0.22
4	3-oxo-C6-HSL	Y=179783.5X+7938.424	0.9979	0.05	0.16
5	C8-HSL	Y=56671.71X+72376.22	0.9969	0.12	0.35
6	3-oxo-C8-HSL	Y=108622.3X+4077.564	0.9989	0.03	0.1
7	C10-HSL	Y=84261.41X+3785.23	0.9992	0.02	0.05
8	3-oxo-C10-HSL	Y=164156.8X+6661.441	0.9993	0.01	0.02
9	C12-HSL	Y=96864.29X+3422.547	0.9998	0.01	0.04
10	C14-HSL	Y=161140.6X+2038.221	0.9999	0.02	0.06
11	3-oxo-C14-HSL	Y=241343.7X+10792.62	0.9994	0.04	0.12

2.5 样品测定

取不同时间点的 SBR 反应器样品, 按前述条件, 进行测定, 校准曲线定量结果如下表 5, 样品 1 和样品 2 中主要检出 3-OH-C4-HSL 和 C6-HSL 两种信号分子, 浓度为 0.02~0.43 µg/L。

表5 实际样品测定结果

序号	目标物	样品 1-1 (µg/L)	样品 1-2 (µg/L)	样品 1-3 (µg/L)	样品 2-1 (µg/L)	样品 2-2 (µg/L)	样品 2-3 (µg/L)
1	C4-HSL	-	-	-	-	-	-
2	3-OH-C4-HSL	-	-	-	0.1250	0.0209	0.1042
3	C6-HSL	0.1492	0.1453	0.1120	0.3664	0.3232	0.4315
4	3-oxo-C6-HSL	-	-	-	-	-	-
5	C8-HSL	-	-	-	-	-	-
6	3-oxo-C8-HSL	-	-	-	-	-	-
7	C10-HSL	-	-	-	-	-	-
8	3-oxo-C10-HSL	-	-	-	-	-	-
9	C12-HSL	-	-	-	-	-	-
10	C14-HSL	-	-	-	-	-	-
11	3-oxo-C14-HSL	-	-	-	-	-	-

“-”表示未检出

结论

本文利用三重四极杆液质联用仪建立了 11 种 AHLs 分子的测定方法。在 0.05~100.0 µg/L 浓度范围内建立校准曲线, 线性关系良好, 相关系数 r 均大于等于 0.995。检出限 0.01-0.12 µg/L, 定量限 0.02-0.35 µg/L。对 SBR 反应器 2 份样品测定, 主要检出 3-OH-C4-HSL 和 C6-HSL 两种信号分子, 浓度为 0.02~0.43 µg/L。该方法适用于活性污泥 AHLs 信号分子分析。

岛津应用云

