

## 根据 EPA 方法 544 使用三重四级杆 LCMS-8060NX 对水中的微囊藻毒素和节球藻毒素进行高灵敏度定量分析

02-SSI-LCMS-155-CN

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

### 特点描述

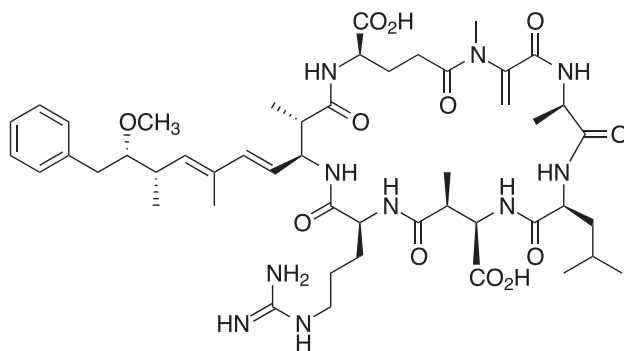
- ◆ 岛津 LCMS-8060NX 三重四级杆质谱仪可轻松实现 EPA 方法 544 中报告的微囊藻毒素和节球藻毒素分析的检测限。
- ◆ 与 EPA 方法 544（需要通过 SPE 进行样品预浓缩）报告的结果相比，该方法的 LOQ 至少低 10 倍，这表明可以在同一系统中对目标化合物进行直接进样分析。
- ◆ 在保持良好的色谱分离和分析物峰形的同时，运行时间缩短至 8 分钟。

### 背景

淡水和海洋环境中都可能栖息着被称为蓝藻或蓝绿藻的光合生物。多年来，藻华发生的频率和地点都在增加，人类向自然水系排入的磷和氮是导致全球有害藻华增加的重要因素。微囊藻毒素和节球藻毒素是由不同种类的蓝藻产生的强效肝毒素。这些毒素对牲畜和人类饮用水源都构成重大威胁，尤其是在淡水系统藻类大量繁殖时，微囊藻毒素和节球藻毒素会大量富集。

目前已知的微囊藻毒素至少有 80 种，其中微囊藻毒素 -LR (MC-LR) 被公认为毒性最强的变种之一。<sup>1</sup> 十多个国家已经制定了与饮用水和娱乐水域中的微囊藻毒素有关的法规或指导原则。这些饮用水指导原则大多源自世界卫生组织确定的暂定值，其中规定微囊藻毒素 -LR 的限度为 1.0 µg/L。<sup>2</sup> 根据美国 EPA 公布的建议，学龄前及以下儿童(6岁以下)饮用水中的微囊藻毒素含量应小于 0.3 µg/L，学龄儿童和成人应小于 1.6 µg/L。<sup>3</sup>

该应用展示了岛津 LCMS-8060NX 三重四级杆质谱仪根据 EPA 方法 544<sup>4</sup> 对六种微囊藻毒素 (MC-LR、MC-RR、MC-LA、MC-LF、MC-LY、MC-YR) 和节球藻毒素进行准确和灵敏的定量分析。



微囊藻毒素 -LR

### 方法

六种微囊藻毒素和节球藻毒素购自 Enzo Life Sciences。内标乙基化 D5 微囊藻毒素 -LR (MC-LR-C2D5) 由 Gold Standard Diagnostic 提供。LC-MS 级溶剂（甲酸、乙腈和水）来自 Honeywell。



**标准溶液制备:** 将 1 mL 甲醇直接加入生产商的小瓶中, 制备六种微囊藻毒素和节球藻毒素的标准品储备液。稀释后, 得到 100 µg/mL 的分析物标准品储备液。用甲醇 / 水 (1:1) 将初始标准品储备液进一步稀释至 1 µg/mL。使用甲醇 / 水 (1:1) 作为稀释剂, 制备了一系列最终浓度为 0.5-500 µg/L 的不同校准水平的校准标准溶液。在校准标准溶液和样品溶液中添加最终浓度为 25 µg/L 的内标 MC-LR-C2D5。

**仪器参数:** 采用岛津 LCMS-8060NX 三重四极杆质谱仪定量检测水中的微囊藻毒素和节球藻毒素。使用 Shim-pack Velox SP-C18 色谱柱 (2.1×100 mm, 2.7 µm, PN: 227-32003-03) 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 10 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。

**数据分析:** 数据使用 LabSolutions 软件采集, 并使用 LabSolutions Insight LCMS 进行分析。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 1: 流动相梯度时间程序

时间 (分钟)	%A	%B
0	85	15
0.50	85	15
5.00	10	90
6.50	10	90
6.51	85	15
8.00	85	15

流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液

流动相 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液

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: 用于分析微囊藻毒素和节球藻毒素的详细 MRM 设置。对于每种分析物, 上层产物离子表示定量片段离子, 而下层产物离子表示定性片段离子。

化合物	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	驻留时间 (ms)	Q1 (V)	碰撞能量 (V)	Q3 (V)	保留时间 (min)
MC-RR	520.00	135.20	32	-26.0	-30.0	-28.0	2.951
		103.25			-55.0	-20.0	
NOD	826.00	135.30	26	-22.0	-53.0	-27.0	3.216
		825.50			-15.0	-24.0	
MC-LR	995.50	135.35	26	-28.0	-54.0	-26.0	3.396
		244.30			-48.0	-17.0	
MC-YR	523.40	135.30	26	-26.0	-15.0	-15.0	3.314
		103.30			-50.0	-11.0	
MC-LA	910.40	135.30	26	-26.0	-53.0	-15.0	4.111
		163.30			-48.0	-11.0	
MC-LY	1002.60	135.30	26	-38.0	-55.0	-26.0	4.147
		868.50			-21.0	-20.0	
MC-LF	986.60	135.30	40	-22.0	-54.0	-23.0	4.586
		213.30			-45.0	-15.0	
MC-LR-C2D5	1028.60	135.30	26	-38.0	-54.0	-29.0	3.746
		163.30			-50.0	-18.0	

## ■ 结果和讨论

**色谱分离：**使用 Shim-pack Velox SP-C18 色谱柱，结合优化的梯度条件，可有效保留分析物，并在 8 分钟内实现大部分七种蓝藻毒素和内标物的基线分离，如图 1 所示。重叠的 MC-LA 和 MC-LY 信号具有不同的 MRM 通道，这确保了它们可以通过质谱进行识别和定量。

**校准和 LOQ：**MC-LR、MC-LA、MC-LY 和 NOD 在 0.5-200  $\mu\text{g/L}$  的浓度范围内实现了线性校准曲线，MC-LF 的校准范围为 1.0-200  $\mu\text{g/L}$ ，MC-RR 和 MC-YR 的校准范围为 0.5-500  $\mu\text{g/L}$ 。图 2 显示了校准曲线的线性。所有七种分析物的  $R^2$  值均超过 0.99，在较宽的校准范围内成功实现了极佳的线性。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 70% 至 130% 的范围内。在所有七种蓝藻毒素的所有校准物中，每个校准物的浓度 RSD% 均小于 15%，这表明该系统具有极佳的稳健性和重现性。

除 MC-LF (1.0  $\mu\text{g/L}$ ) 外，所有分析物的定量限 (LOQ) 均为 0.5  $\mu\text{g/L}$ 。LOQ 是根据准确度、重现性和  $S/N \geq 10$  来确定的。在 LOQ 处获得的数据点的准确度在 70-130% 之间， $RSD\% < 10\%$ ，符合 EPA 方法 544 的要求。LOQ 进样中定量离子的代表性色谱图见图 3。LOQ 比 EPA 方法 544 中报告的 LOQ 低 10 倍以上。如果按照 EPA 的样品制备流程，通过固相萃取 (SPE) 将水样预先浓缩 500 倍，我们的系统就可以测量水样中 1 ng/L (MC-LF 为 2 ng/L) 浓度的微囊藻毒素。

**加标水样分析：**为展示该方法的适用性，制备并处理了三份水样，以分析七种蓝藻毒素。通过在 LC-MS 级水中加标三个浓度水平 (8、25 和 80  $\mu\text{g/L}$ ) 的七种蓝藻毒素，对准确度和精密度进行了评估。在所有水样的三个加标浓度水平下，所有七种蓝藻毒素的准确度均在预期值的 20% 范围内，RSD% 值低于 10% (表 4)。在分析批期间或分析批结束时，空白进样中均未观察到残留。

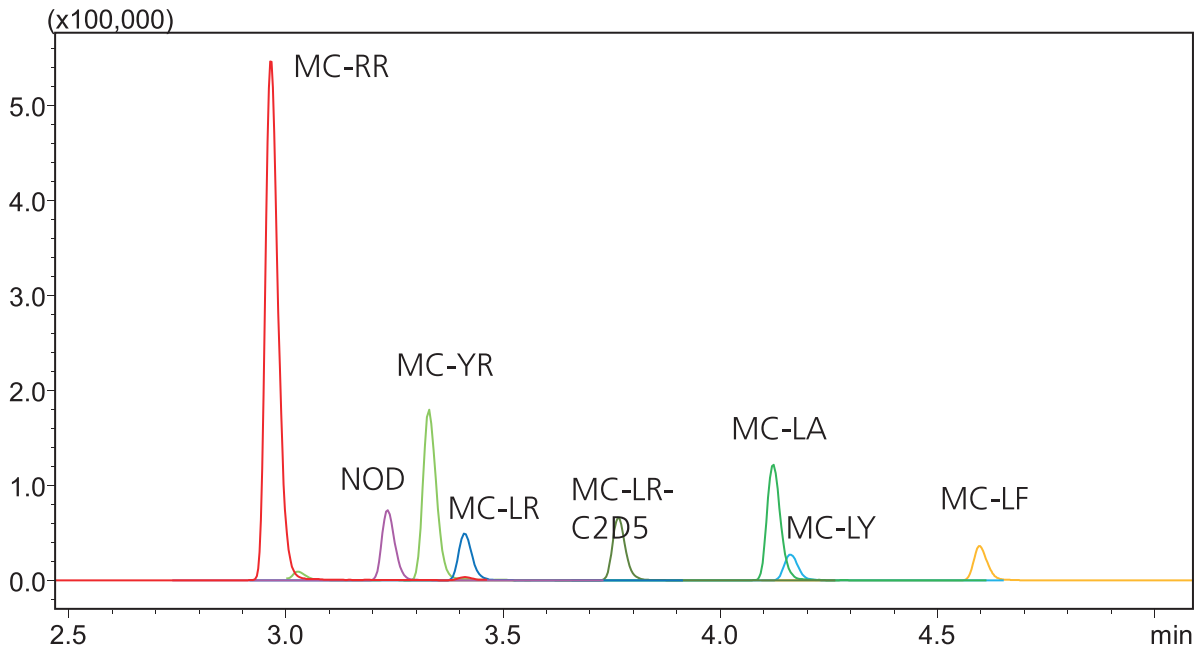


图 1: 20  $\mu\text{g/L}$  溶剂校准标准溶液中微囊藻毒素和节球藻毒素的 MRM 定量离子色谱图。内标 MC-LR-C2D5 的浓度为 25  $\mu\text{g/L}$ 。Shim-pack Velox SP-C18 色谱柱成功地保留了化合物，同时表现出了有效的基线色谱分离。

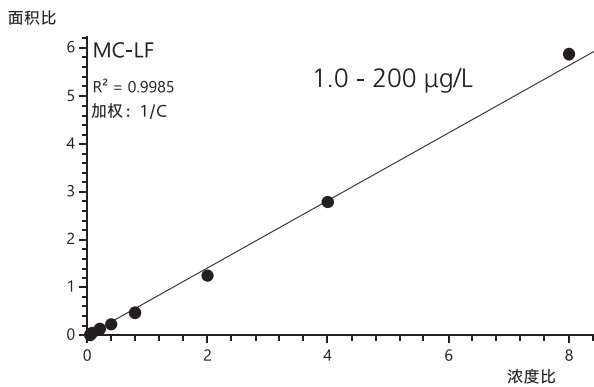
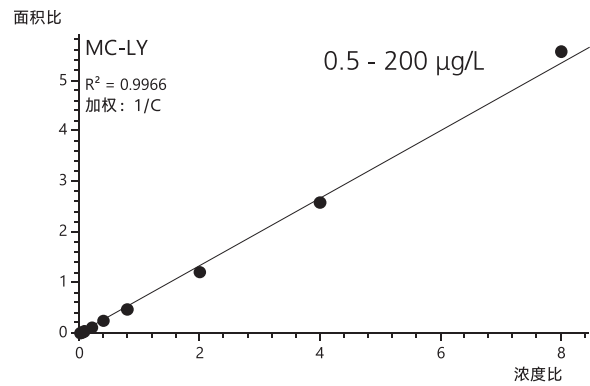
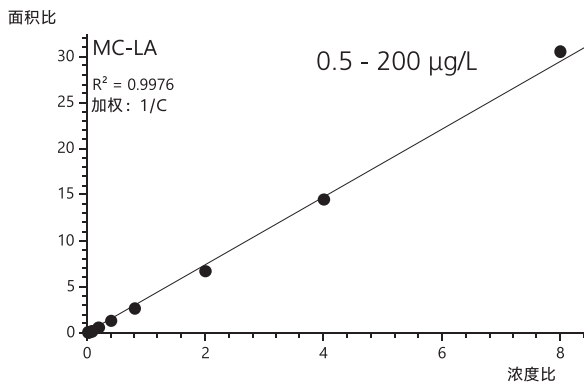
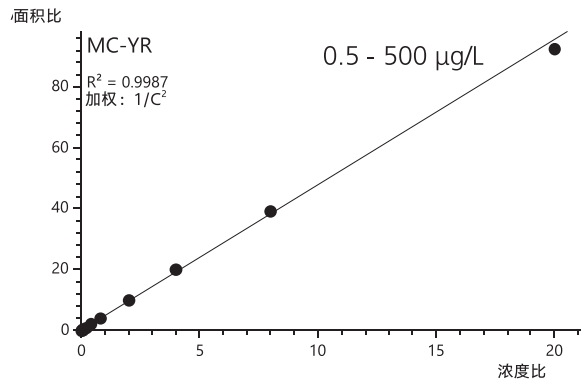
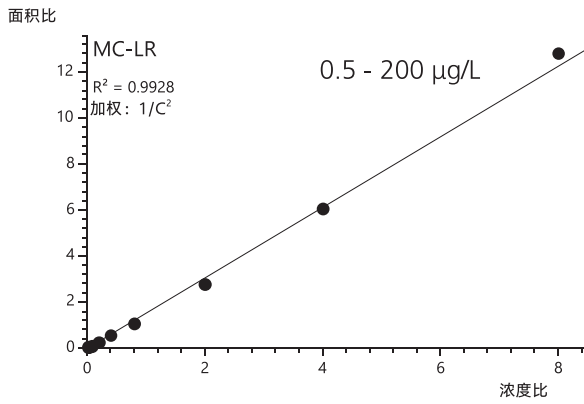
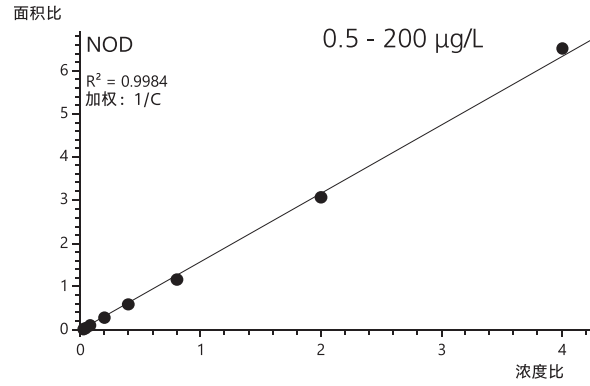
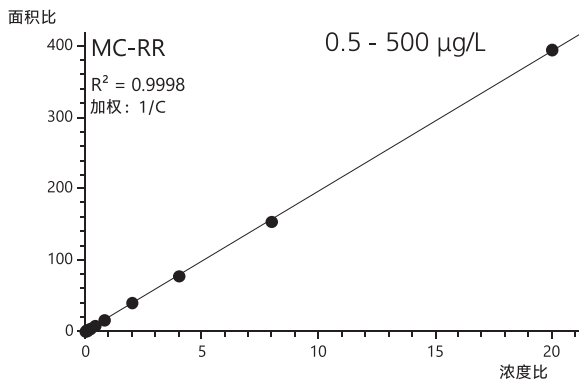


图 2: 微囊藻毒素和节球藻毒素的校准曲线。MC-LR、MC-LA、MC-LY 和 NOD 的校准范围为 0.5-200  $\mu\text{g/L}$ , MC-LF 为 1.0-200  $\mu\text{g/L}$ , MC-RR 和 MC-YR 为 0.5-500  $\mu\text{g/L}$ 。

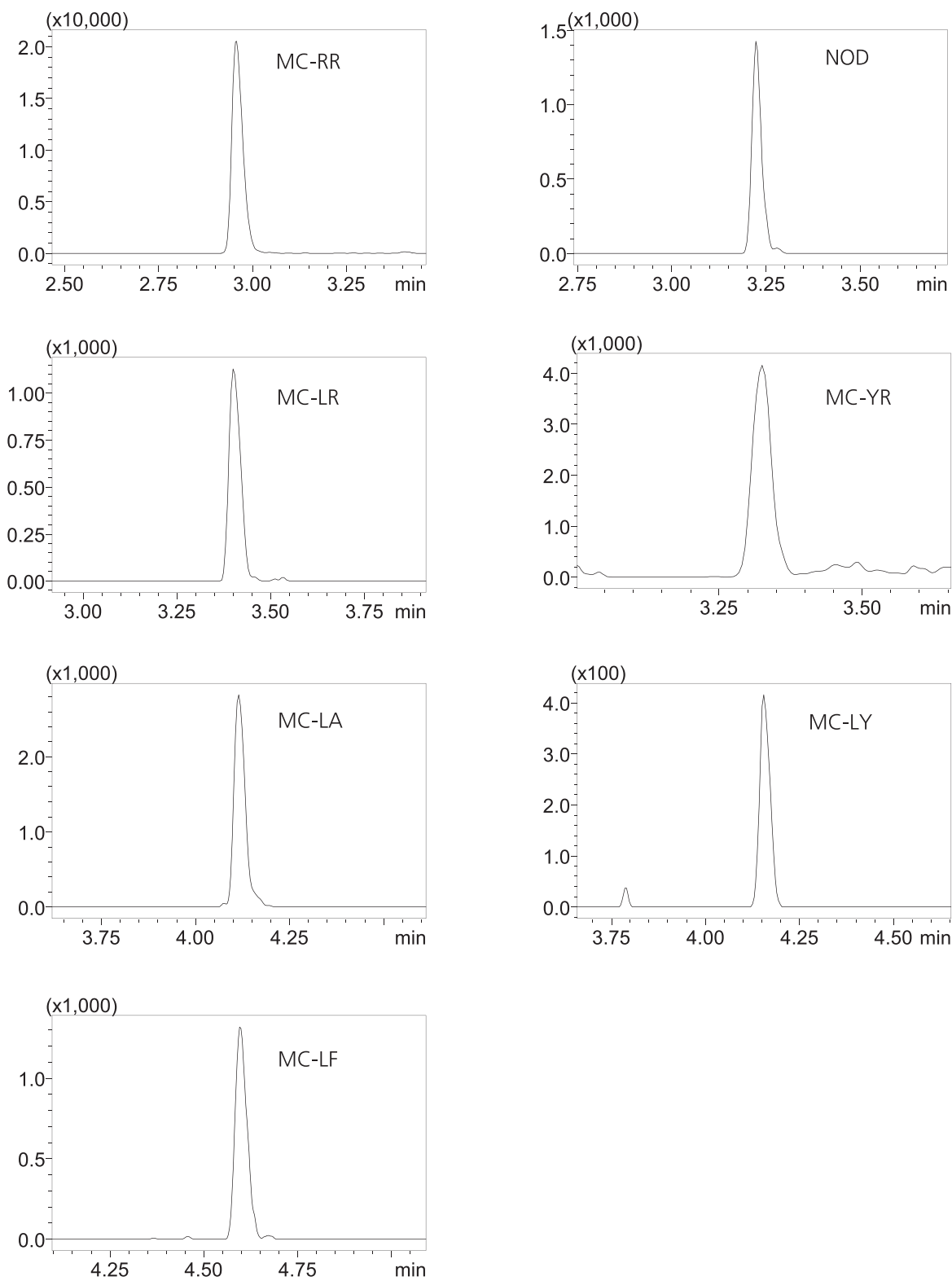


图 3: LOQ 进样中定量离子的代表性色谱图。

表 4. 分析水样中微囊藻毒素和节球藻毒素的精密度和准确度

重复编号	加标浓度					
	8 µg/L		25 µg/L		80 µg/L	
	浓度 (µg/L)	准确度	浓度 (µg/L)	准确度	浓度 (µg/L)	准确度
<b>MC-RR</b>						
1	8.3	103.4%	25.1	100.3%	83.5	104.4%
2	8.3	104.2%	23.5	94.1%	83.6	104.5%
3	7.7	95.8%	23.5	94.1%	78.2	97.7%
RSD% (浓度)	4.6		3.7		5.6	
<b>NOD</b>						
1	7.1	88.5%	23.3	93.4%	74.5	93.1%
2	7.4	93.1%	22.9	91.7%	75.9	94.9%
3	7.5	93.9%	23.8	95.2%	74.1	92.6%
RSD% (浓度)	3.1		1.8		1.3	
<b>MC-LR</b>						
1	7.5	94.0%	23.7	95.0%	77.4	96.8%
2	7.9	99.2%	23.9	95.6%	80.2	100.2%
3	7.3	91.1%	24.4	97.5%	80.1	100.1%
RSD% (浓度)	4.4		1.4		2.0	
<b>MC-YR</b>						
1	8.2	102.1%	26.4	105.8%	79.9	99.9%
2	8.5	106.1%	25.8	103.0%	81.1	101.3%
3	8.6	107.8%	26.5	106.0%	79.9	99.9%
RSD% (浓度)	2.8		1.6		0.8	
<b>MC-LA</b>						
1	7.5	93.8%	23.3818	93.5%	74.8	93.6%
2	7.2	90.4%	23.1467	92.6%	73.3	91.6%
3	7.6	94.7%	22.0432	88.2%	73.7	92.1%
RSD% (浓度)	2.4		3.1		1.1	
<b>MC-LY</b>						
1	7.2	90.6%	22.7	90.9%	70.0	87.5%
2	6.8	84.8%	21.9	87.6%	71.7	89.6%
3	7.3	91.0%	22.7	90.8%	74.2	92.7%
RSD% (浓度)	3.9		2.1		2.9	
<b>MC-LF</b>						
1	8.4	104.5%	25.7	102.9%	80.3	100.4%
2	8.3	103.1%	23.0	92.1%	81.4	101.8%
3	8.2	103.0%	25.2	100.8%	81.9	102.3%
RSD% (浓度)	0.8		5.8		1.0	

## ■ 结论

在这项应用中, 根据 EPA 544 标准, 成功开发了一种快速 LCMS 方法, 用于分析水中的六种微囊藻毒素和节球藻毒素。使用 Shim-pack Velox C18 色谱柱, 仅用 8 分钟就完成了七种蓝藻毒素和内标物的色谱分析。在较宽的校准范围内建立了较强的线性相关性,  $R^2$  值超过 0.99。通过在水样中加标三个加标水平的六种微囊藻毒素和节球藻毒素, 验证了该方法的适用性, 准确度结果均在 80-120% 之间, RSD% 小于 10%。

## ■ 参考文献

1. Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems [Online] [https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-08/documents/cyanobacteria\\_factsheet.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-08/documents/cyanobacteria_factsheet.pdf)
2. Cyanobacterial toxins: Microcystins - Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments. [Online] [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/microcystins-background-201223.pdf?sfvrsn=6d60aa6d\\_3](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/microcystins-background-201223.pdf?sfvrsn=6d60aa6d_3)
3. EPA Drinking Water Health Advisories for Cyanotoxins. [Online]. <https://www.epa.gov/cyanohabs/epa-drinking-water-health-advisories-cyanotoxins>
4. Method 544. Determination of Microcystins and Nodularin in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). [Online]. [https://cfpub.epa.gov/si/si\\_public\\_record\\_report.cfm?Lab=NERL&dirEntryId=306953](https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NERL&dirEntryId=306953)

该应用证明了岛津 LCMS-8060NX 在按照 EPA 方法 544 分析水中微囊藻毒素和节球藻毒素时的灵敏度和重现性。此外, LCMS-8060NX 所展示的性能使其适用于分析微囊藻毒素和节球藻毒素, 而无需 EPA 544 所要求的样品预浓缩步骤。

# 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](http://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