

水样中微囊藻毒素 - LR 的高效液相色谱分析

LC-068

摘要：本文使用岛津 LC-20A 高效液相色谱建立了水样中微囊藻毒素 -LR 的检测方法。本方法采用 C18 色谱柱，0.1% 三氟乙酸水溶液 / 甲醇 = 40/60(v/v) 为流动相，二极管阵列检测器特征波长为 238 nm。在 0.20~4.00 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内标准曲线的线性相关系数 $r = 0.9995$ ，线性关系良好。对浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品进行六次平行分析，重复性结果 (RSD% 表示)：0.5 $\mu\text{g/mL}$ 微囊藻毒素 -LR 的保留时间 RSD 为 0.18%，峰面积 RSD 为 0.82%；1.0 $\mu\text{g/mL}$ 微囊藻毒素 -LR 的保留时间 RSD 为 0.07%，峰面积 RSD 为 2.66%；2.0 $\mu\text{g/mL}$ 微囊藻毒素 -LR 的保留时间 RSD 为 0.07%，峰面积 RSD 为 0.78%，结果重复性良好。方法的检出限为 0.02 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 0.05 $\mu\text{g/L}$ ，具有可靠的检测灵敏度。

关键词：水微囊藻毒素 -LR 高效液相色谱

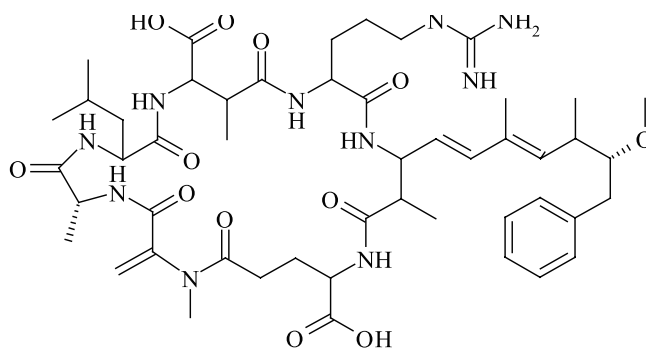
微囊藻毒素是一类具生物活性的单环七肽，这类毒素主要由淡水藻类铜绿微囊藻 (*Microcystins aeruginosa*) 产生。微囊藻毒素有不同的脂多糖和极性，毒性也不同，微囊藻毒素 -LR 是最早被阐明化学结构的藻毒素，在对藻毒素的研究中也多以它作为研究对象。

微囊藻毒素是一种肝毒素，能抑制蛋白质磷酸酯酶，从而帮助解除对细胞增殖的正常的制动作用，促进肿瘤的发育。微囊藻毒素虽然主要存在于藻细胞中，但研究表明藻细胞死亡解体后，不断有藻毒素释放到水体，对人类的饮用水源造成危害，肝癌高发率与饮用水源中的水华大量发生有关。

《GB/T 20466-2006 水中微囊藻毒素的测定》规定了高效液相色谱法测定水中微囊藻毒素 (环状七肽)。标准适用于饮用水、湖泊水、河水、地表水中微囊藻毒素的测定，检出限为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。

世界卫生组织 (WHO) 在其推荐的饮用水标准指导 (第二版) 中也增加了微囊藻毒素 (MC-LR, 1 $\mu\text{g/L}$) 等指标 (WHO, 1998)，其中都有关于微囊藻毒素 -LR 的检测。各国已有饮用水中的藻毒素含量标准一般都为微囊藻毒素 -LR 的含量。世界卫生组织 (WHO) 推荐的饮水中的藻毒素标准为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 。加拿大健康组织规定

饮水中可接受的藻毒素标准为 0.5 $\mu\text{g/L}$ (Guidelines for Canadian Drinking Water Quality, 1993)。



微囊藻毒素-LR的化学结构式

实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂：

甲醇：HPLC 级

水：超纯水

三氟乙酸 (TFA)：色谱纯

微囊藻毒素 -LR 标准储备液：10 $\mu\text{g/mL}$

1.1.2 仪器：

LC-20A，包括 CBM-20Alite 系统控制器；LC-20AD 高精度溶液输送泵 × 2；DGU-20A₅ 在线脱气机；SIL-20A 自动进样器；CTO-20A 柱温箱；SPD-M20A 二极管阵列检测器。

1.2 分析条件

色谱柱：Inertsil ODS-SP 5 μm 4.6 × 250 mm

流动相：A - 0.1% 三氟乙酸水溶液；

B - 甲醇 A/B=40/60 (v/v)

流速：1.0 mL/min

洗脱方式：等度洗脱

柱温：40

二极管阵列检测器波长：238 nm

进样量：20 μL

1.3 样品处理

1.3.1 微囊藻毒素-LR 标准系列浓度的配制

微囊藻毒素-LR 的标准储备液浓度为 10 μg/mL。取不同体积，用甲醇稀释，配制成浓度为 0.20、0.50、1.00、2.00 及 4.00 μg/mL 的标准系列，储存在棕色小瓶中，备用。

1.3.2 水样的制备

取水样 5000 mL 于杯式滤器中，经 0.45 μm 滤膜减压过滤。滤液中加 10 mL 甲醇混匀后过 C18 反相固相萃取柱。C18 反相固相萃取柱用前先用甲醇活化，再用超纯水活化。将水样以 5~10 mL/min 的流速流过固相萃取柱进行富集浓缩。装样完毕后，用体积分数 5 % 甲醇水溶液 10 mL 淋洗以净化样品，待固相萃取柱吹干，以 10 mL 甲醇洗脱并经过滤器过滤后收集于浓缩瓶内。洗脱液氮吹浓缩至 1.0 mL，上机测试。

结果讨论

2.1 微囊藻毒素-LR 校准曲线结果

图 1 是浓度为 1.0 μg/mL 的微囊藻毒素-LR 标准品色谱图。图 2 是五个不同浓度的标准溶液采集得到的色谱图。图 3 是微囊藻毒素-LR 的校准曲线及方程。曲线的相关系数为 r=0.9995。

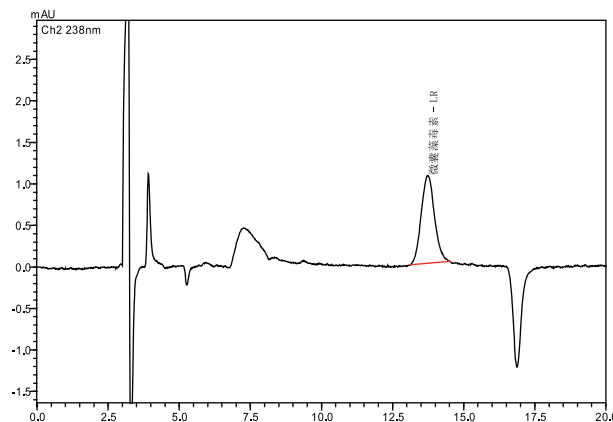


图1 微囊藻毒素-LR标准品1.0 μg/mL的色谱图

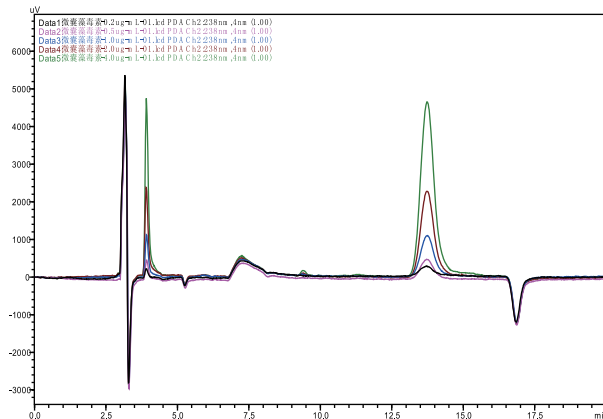


图2 五个不同浓度的微囊藻毒素-LR标准品的色谱图

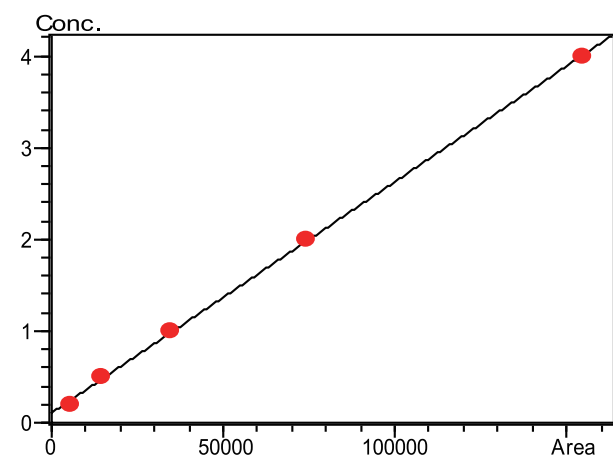


图3 微囊藻毒素-LR校准曲线
Y=2.52163e-005X r=0.9995

2.2 方法的重复性

为进一步考察该方法的重复性，本文分别对浓度为 0.5 μg/mL, 1.0 μg/mL, 2.0 μg/mL 的微囊藻毒素-LR 标准品进行 6 次平行实验，重复性结果 (RSD% 表示) 汇总如下表。

表1 微囊藻毒素-LR 0.5 μg/mL, 1.0 μg/mL, 2.0 μg/mL 标准溶液的保留时间和峰面积的重复性结果

No.	保留时间(min)			峰面积		
	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
浓度	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
数据 1	13.705	13.627	13.616	16284	35736	74960
数据 2	13.721	13.639	13.603	15991	33588	73920
数据 3	13.691	13.613	13.604	16204	35889	74695
数据 4	13.684	13.615	13.594	16350	34749	73997
数据 5	13.666	13.625	13.590	16348	33951	73393
数据 6	13.656	13.618	13.589	16214	35026	73860
平均	13.687	13.623	13.599	16232	34823	74138
RSD%	0.18	0.07	0.07	0.82	2.66	0.78

2.3 样品分析

按照 1.3.2 所述步骤处理水样，检测微囊藻毒素-LR。图 4 为水样色谱图，样品未检出微囊藻毒素-LR。图 5 为水样加标微囊藻毒素-LR 0.5 μg/mL 的色谱图。

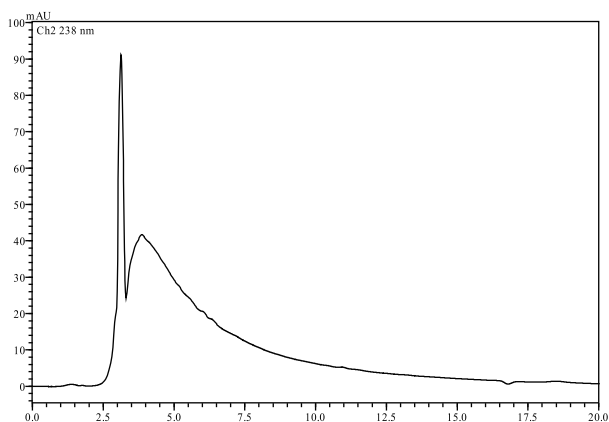


图4 水样色谱图

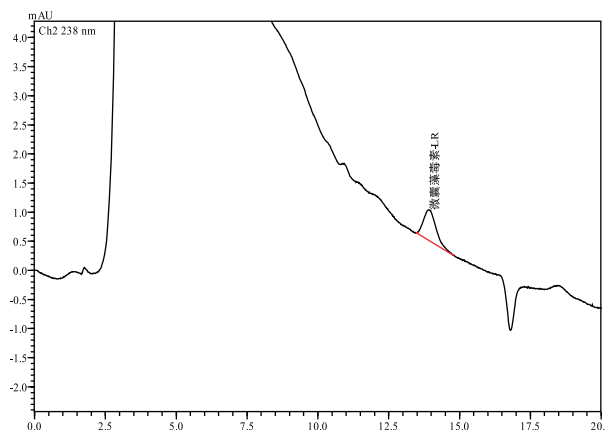


图5 水样加标微囊藻毒素-LR 0.5 μg/mL 色谱图

2.4 灵敏度考察

对浓度为 0.2 μg/mL 的微囊藻毒素-LR 标准品进行分析，得到色谱图如图 6 所示。信噪比为 13.11，经计算得到此分析方法的检出限为 0.02 μg/L，定量限为 0.05 μg/L。低于《GB/T 20466-2006 水中微囊藻毒素的测定》规定的 0.1 μg/L 标准限值。

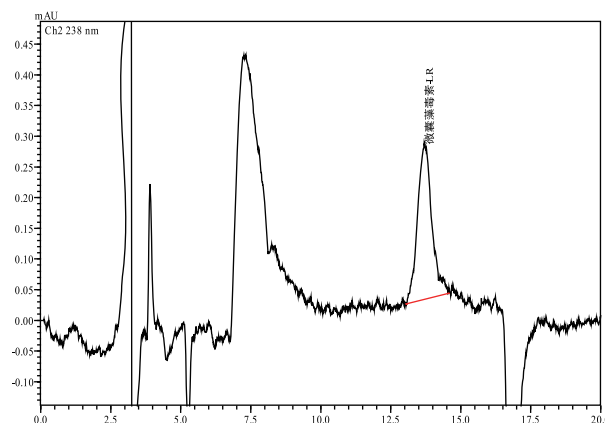


图6 浓度为0.2 μg/mL微囊藻毒素-LR标准品色谱图

结论

本实验中使用 LC-20A 液相色谱系统，开发了水样中微囊藻毒素-LR 的检测方法。本法具有便捷、线性、重复性好和灵敏度高等优点。