

水中微囊藻毒素的氧化水解产物 2-甲基-3-甲氧基-4-苯基丁酸的气相色谱-质谱检测研究

沈菊芳¹, 房新宇¹, 戴艺², 卢大胜³

摘要: [目的] 采用衍生化建立一个便捷和高效的水中微囊藻毒素(MC)氧化产物 2-甲基-3-甲氧基-4-苯基丁酸(MMPB)气相色谱-质谱仪联用(GC-MS)的检测方法。[方法] 高锰酸钾氧化水样,正己烷萃取,浓缩,六氟异丙醇-二乙胺 N, N'-二异丙基碳酰二亚胺(HFIP-DIC)衍生化,GC-MS 检测,内标法定量。[结果] 通过对水样氧化水解和 MMPB 衍生化条件的优化,以 GC-MS 检测 MMPB 的方法检测限(MDL)为 0.101 $\mu\text{g/L}$ (浓度均以总 MC 计),线性范围为 0.2~10.0 $\mu\text{g/L}$,具有良好的准确度(80%~120%)、精密度(RSD<15%)和重复性(RSD<15%),样品监测浓度水平为 <0.101~3.090 $\mu\text{g/L}$ 。[结论] 本方法对水中 MC 总量的分析提供了快速、简便、可靠的方法,能用于对日常水质中 MC 总量的监测分析研究。

关键词: 微囊藻毒素; 2-甲基-3-甲氧基-4-苯基丁酸; 六氟异丙醇-二乙胺 N, N'-二异丙基碳酰二亚胺; 衍生化; 气相色谱-质谱仪

Determination of 2-Methyl-3-Methoxy-4-Phenylbutanoic Acid Derived from Oxidation and Hydrolyzation of Microcystin in Water by Gas Chromatograph Mass Spectrometry SHEN Ju-fang¹, FANG Xin-yu¹, DAI Yi², LU Da-sheng³ (1. Yangpu District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200082, China; 2. Jing'an District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200041, China; 3. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China) · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To develop a method for simple and rapid determination of 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB), an oxidation and hydrolyzation product of microcystin (MC) in water using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Methods] Samples were oxidized with potassium permanganate, extracted using n-hexane, then derivatized with hexafluoroisopropanol (HFIP)/N, N'-diisopropylcarbodiimide (DIC), and finally detected by GC-MS and quantified using internal standard method. [Results] The method was validated in terms of method detection limit (MDL) (0.101 $\mu\text{g/L}$), linearity range (0.2-10.0 $\mu\text{g/L}$), accuracy (80%-120%), precision (relative standard deviation, RSD<15%), and repeatability (RSD<15%). The representative samples were successfully detected with concentrations between < MDL and 3.090 $\mu\text{g/L}$. [Conclusion] The proposed method as an alternative method of HPLC-MS/MS is practicable for the routine analysis of total microcystins in water.

Key Words: microcystin; MMPB; HFIP/DIC; derivatization; GC-MS

在微囊藻毒素(microcystin, MC)的分析中,传统的技术主要为色谱分析法,即采用高效液相色谱-二极管矩阵检测器(HPLC-DAD)和高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测,HPLC-DAD存在着严重基质干扰问题^[1],尽管HPLC-MS/MS能解决这些基质干扰问题^[1-2],但该技术由于受仪器的限制无法在普通实验室推广,另外该技术目前也仅用于代表性MC的分析^[2]。MC是一类具有生物活性的七肽结构化合物,目前多达70个化合物已被鉴定,这些化合物具有一个共性化学特征,即

在高锰酸钾(KMnO_4)及高碘酸钠(NaIO_4)氧化剂存在的条件下能选择性地氧化MC分子中不饱和双键,产生氧化物2-甲基-3-甲氧基-4-苯基丁酸(MMPB)^[1,3-4]。利用这一特性,一种替代传统测定总MC的方法,即采用高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)或气相色谱-质谱(GC-MS)等仪器分析MC的氧化产物MMPB的方法,在文献报道中得到确证和应用^[4-10]。然而,这些研究方法的灵敏度相对较低,主要集中于MC高污染或高暴露水平的样品基质,如污泥^[5]、水^[6]、鱼和其它水生生物^[7-8]、暴露人群血样^[9]和动物组织^[10],不适合低浓度水平如饮用水中MC的检测。

本研究针对低MC污染水平的饮用水,拟通过优化氧化饮用水中MC生成MMPB的条件,以及采用六氟异丙醇-二乙胺 N, N'-二异丙基碳酰二亚胺(HFIP-DIC)衍生化处理来提高GC-MS分析MMPB的峰形和灵敏度,使该方法检测限达到ng级,

[作者简介] 沈菊芳(1959—),女,学士,主管技师;研究方向:食品和环境污染物分析;E-mail: wjr3318@sina.com

[作者单位] 1. 杨浦区疾病预防控制中心,上海 200082; 2. 静安区疾病预防控制中心,上海 200041; 3. 上海市疾病预防控制中心,上海 200336

以满足正常饮用水中总 MC 的检测。从而建立一种简单、快速, 而且仪器硬件水平配置要求低, 能满足一般区(县)级政府和水厂实验室实施饮用水中总 MC 的监测的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

岛津 QP-2010 GC-MS, 配有 AOC-20i 自动进样器和 DB-5MS 毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 100 μL 气密性注射器(Agilent); Reacti-Therm III 型氮吹浓缩仪(PIERCE)。

内标 4-PBA 和标准微囊藻毒素(Microcystin-LR, MC-LR)均购自 Alexis 公司; 衍生化试剂——六氟丙醇(HFIP, 99%)和衍生化催化剂——二乙胺 N, N-二异丙基碳酸酐二亚胺(DIC, 99%)购自阿法埃莎公司(Alfa Aesar); 正己烷(农残级)购自默克公司(Merck); 甲醇和乙腈购自 CNW; 高锰酸钾、高碘酸钠、亚硫酸氢钾和碳酸氢钠均为分析纯; 浓硫酸(95%~98%)优级纯。

1.2 仪器分析条件

进样口温度为 250℃, 采用不分流进样; 载气为 He(99.999%), 其总流量和柱流量分别为 50.0 mL/min 和 1.5 mL/min; 柱温采用程序升温, 90℃(1 min) → 130℃(2 min) → 250℃(1 min); 接口温度为 250℃; 离子源温度为 200℃; 溶剂切割时间为 4.5 min; 扫描方式为单离子检测模式(SIM), MMPB 的特征离子为 m/z 326(定量离子)、267 和 211, 内标 4-丙基丁胺(内标 4-PBA)的特征离子为 m/z 314、147 和 104(图 1)。

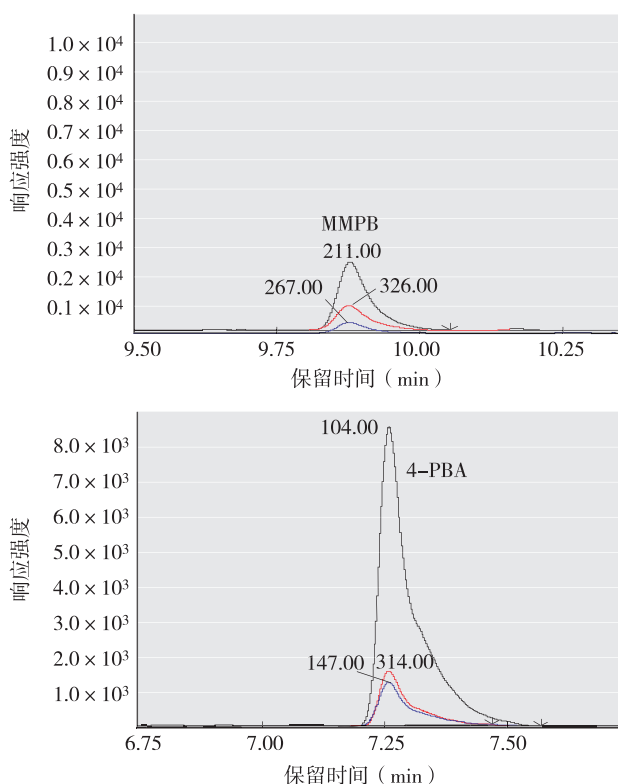


图 1 MMPB 和其内标 4-PBA 衍生化产物的提取离子图谱

1.3 实验方法和过程

1.3.1 样品前处理

取 10 mL 水样于具塞瓶中, 用碳酸氢钠溶

液(1.0 mol/L)调 pH ≈ 9, 加入 10 mL 高锰酸钾(0.156 mol/L)-饱和高碘酸钠溶液, 摇匀, 在 4℃ 下放置 1 h 后继续在 30℃ 下放置 4 h。然后加入亚硫酸氢钾溶液(100 g/L), 水解溶液变为无色, 用硫酸溶液(10 mol/L)调节 pH 3 左右, 加入 4 g NaCl 振荡溶解后, 加入 2 倍水样体积的正己烷, 震荡 2 min, 静置分层, 旋转蒸发器浓缩萃取液。当萃取液体积小于 0.5 mL 后, 转移到 GC 进样瓶中, 用氮气吹干。在吹干的进样瓶中加入 100 μL 乙腈, 超声波溶解, 加入 30 μL HFIP 和 20 μL DIC, 密闭瓶盖, 超声波混匀, 室温(25~30℃)反应 15 min。然后加入 200 μL 的正己烷和 1 mL 的碳酸氢钠溶液(1.0 mol/L), 震荡 5 min, 分层, 吸出有机相, 按照“1.2”进行 GC-MS 分析。

1.3.2 标准曲线 MC 的各种化合物的相对分子质量相当(约为 1000), 本方法以 MC-LR 代替总 MC 进行标准曲线制作和计算。吸取适量的 MC-LR 标准和内标 4-PBA 用甲醇稀释后溶解于空白水样中, 配制标准浓度系列: 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μg/L, 内标均为 0.5 μg/L, 按“1.3.1”的方法处理分析, 内标法绘制标准曲线。

1.3.3 方法检测限(MDL) 采用 20 个加标浓度为 0.2 μg/L 的水样, 按照“1.3.1”和“1.2”所述方法进行样品前处理和 GC-MS 分析后, 对分析结果进行标准偏差(SD)计算, 然后参照美国环保局方法(U.S. EPA Method 502.2)进行统计分析, 方法的 MDL 计算公式为:

$MDL = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} \times SD$, 其中 $t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$ 是自由度为 $n-1$ 置信度为 99% 的 t 检验值, 这里 $n=20$, 对应的查表值: $t=2.861$ 。

2 结果

2.1 MC 氧化产物 MMPB 的衍生化及其 GC-MS 定性分析

MC 类化合物在高锰酸钾-饱和高碘酸钠溶液中发生双键氧化反应形成 MC 特异性的支链化合物 MMPB, 该化合物在 DIC 的催化下与 HFIP 发生酯化反应形成待测衍生化产物(MMPB-HFIP)(图 2)。MMPB 的 HFIP 的衍生化优化主要是衍生化试剂的量(包括 10~50 μL)、衍生化试剂与催化剂 DIC 的比例(包括 6:1~1:1)、反应时间(5~25 min)和反应温度, 实验发现, 当 HFIP 的量达到 15 μL 和 HFIP 与 DIC 的体积比达到 3:1, MMPB 衍生物的响应达到最大, 考虑到方法稳定性, 适当增加了衍生化试剂的量和催化试剂的比例, 即在本方法中采用 30 μL HFIP 和 20 μL DIC。另外该衍生化反应在 10 min 便达到反应平衡, 该方法采用 15 min。另外实验发现反应温度是该衍生化反应的至关重要的参数, 当温度低于 15℃, 衍生化效率会降低甚至不发生反应, 最适温度为室温(25~30℃)。

MMPB-HFIP 的 GC-MS 定性基于空白对照和质谱分析, 最后确定为图 1 中的图谱。该衍生化产物在电子电离源(EI)电离下易脱去甲氧基、苄基以及发生羰基的 α 裂解, 分别形成 m/z 326、267 和 211 等特征碎片离子(图 3)。

2.2 氧化水解和提取条件的优化

MC 在氧化水解 MMPA 的过程中, 由于氧化条件的剧烈, 因此在 MMPB 生成的过程中, 它可能继续被氧化破坏, 因此该氧化水解条件的优化在整个方法研究中至关重要^[4-9]。研究的条件因素主要包括水解体系的 pH、氧化剂的使用量、反应温

度和反应时间。其中水解体系的 pH 和氧化剂的使用量基于以往的研究报道^[3-4, 6]并验证其最佳条件是(1) pH ≈ 9 反应体系; (2) 样品和高锰酸钾 (0.156 mol/L)、饱和高碘酸钠的混合液的体积比为 1 : 1。

在反应温度的研究中, 根据文献^[3-10]设计 3 个研究温度: 25、30、35℃, 其中反应时间均为 3 h, 实验结果见图 4, 通过图谱可以看出, 在 30℃ 时, MMPB 生成效率最高, 而随着反应温度的提高, MMPB 量则下降, 表明温度是影响 MMPB 生成的一个重要的因素。在本实验方法中, MC 经氧化生成的 MMPB 最

合适的反应温度是 30℃。

在反应时间的研究中, 选取最佳的反应温度 30℃, 进行不同反应时间 (2~5 h, 间隔为 1 h) 的研究。研究结果显示, 当反应达到 4 h 时, MMPB 的生成量最大, 但继续反应时, 可能氧化剂对 MMPB 的破坏大于它的生成, 从而 MMPB 的绝对生成量逐渐减少, 因此本方法的最佳反应时间为 4 h, 见图 4。

在样品提取中加入 NaCl 使水溶液离子化而有助于提高提取效率, 实验发现与不加 NaCl (平均 0.23 μg/L, n=2) 相比, 加入 NaCl (平均 0.31 μg/L, n=2) 能提高 34.7% 的提取效率。

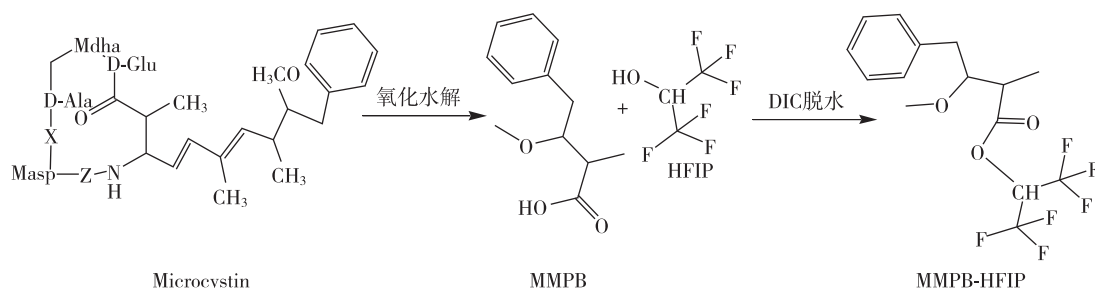


图 2 藻毒素的氧化水解和衍生化过程图

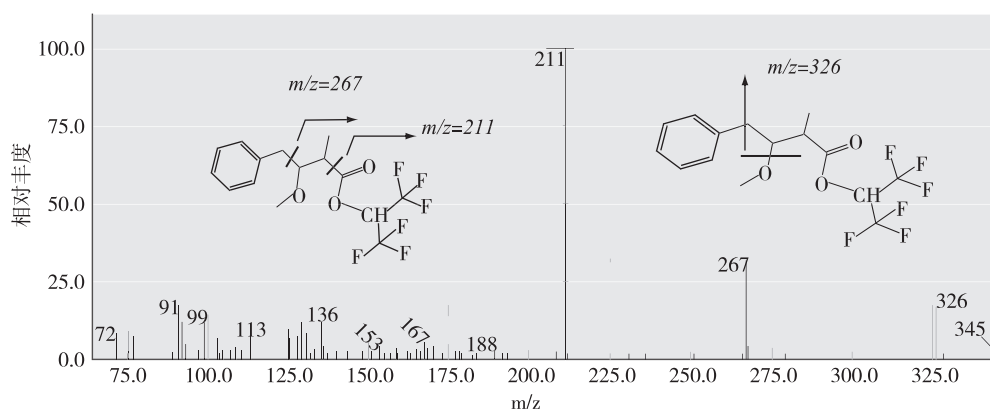


图 3 MMPB 的 EI 质谱图谱和质谱解析

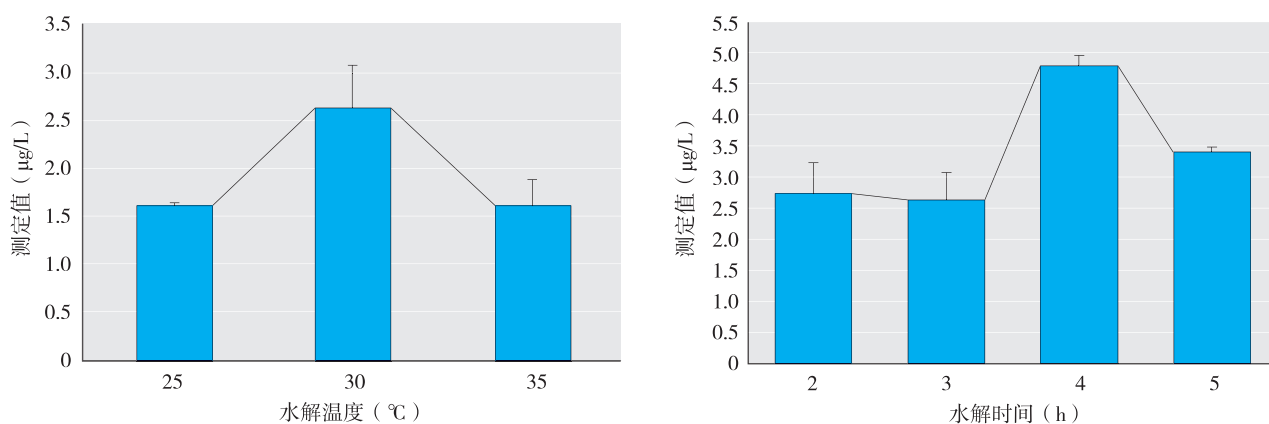


图 4 MMPB 氧化形成的反应温度和时间的影响 (n=2)

2.3 方法学验证

方法学验证包括标准曲线线性、方法 MDL、准确度、精密度、重复性和不确定度等。在 0.2~10.0 μg/L 的范围内, 标准曲线线性良好, 变异系数 (R^2) 大于 0.998, 各个浓度点的相对标

准残差值 (%-Error) 均小于 15%, 完全满足实际检测的需求。

参照“1.3.3”, MMPB 的测定平均浓度和标准偏差 (SD) 分别为 0.245 μg/L 和 0.035 3 μg/L, 对应的 MDL 为 0.101 μg/L, 能满足正常饮用水的监测。

对水样进行高低两个浓度(1 µg/L 和 5 µg/L)加标分析。每个浓度 5 个平行样,连续测定 5 d,表 1 是连续 5 d 的准确度和精密度实验结果,从表中可以看出目标分析物的回收率在 80%~120% 之间,相对标准偏差(RSD)均小于 15%,表明该方法准确度和稳定性较好。

表 1 日内和日间回收率和相对标准偏差(RSD)统计结果(n=5)

名称	浓度 (µg/L)	日内回收率/RSD(%)					日间回收率/ RSD(%)
		第 1 日	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 5 日	
MC	1	112.0/5.4	86.9/9.8	119.9/3.3	117.6/5.0	105.2/3.1	108.3/11.0
	5	99.4/9.6	90.0/8.7	114.0/7.0	99.5/6.0	91.8/7.7	99.0/8.5

测定 1 µg/L 的加标水样,参照标准^[11]计算 MMPB 的不确定度,扩展不确定度和测量值分别为 0.24、1.03 µg/L,对应的不确定度为 0.25 µg/L。

2.4 实际样品监测

采集出厂水和水源水按照本方法监测,其总 MC 浓度范围为 <0.101~3.090 µg/L。

3 讨论

本方法所采用 HFIP 衍生 MMPB 形成氟化酯,一方面显著改善了 GC 色谱分离的峰形(MMPB 具有羧基,直接 GC 分析易被进样口和柱前端活性位点吸附以及出现色谱峰变宽和拖尾等现象);另一方面提高了 MS 分析的灵敏度,与以往文献报道的直接 GC(LOD: 22.5 ng MC)分析^[6]和甲基衍生化后 SPME-GC-MS(LOD: 0.04 µg/g MMPB ≈ 0.2 µg/g MC,取样量为 2 g)^[7]方法比较,本方法(MDL: 0.101 µg/L MC,取样量、最后定容体积和进样量分别为 10.0 mL、0.2 mL 和 1 µL)的检测灵敏度分别提高了 220 和 12.5 倍,能满足饮用水中痕量 MC 的监测。另外该 MMPB 衍生化方法在国内外文献中未见报道。

本研究采用高锰酸钾氧化剂水解水中 MC 形成 MMPB 的优化研究结果与文献报道的其他样品基质结果类似^[3-10],与臭氧(O₃)和低温进行氧化^[12-13]相比,该方法具有实验室条件要求低和稳定可靠等优点。在提取前加入 NaCl 能显著提高提取效率,在以往的文献中未见报到^[6-7]。另外本方法的检测限、准确度、精密度和重复性均能满足检测方法学验证的要求,并在实际样品监测中得到应用。因为目前传统有关 MC 测定的方法局限于单一(如 MC-LR)或几种代表性的 MC,所以 MMPB 作为一种替代测定总 MC 的方法在实验室测定的可行性和 MC 的健康风险评价监测具有一定的意义,为不具备液相色谱—质谱联用仪的实验室开展水中的 MC 检测分析提供了一个有效的手段。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] JUSSI AO MERILUOTO, LISA EM SPOOF. Chapter 21: Cyanotoxins:

sampling, sample processing and toxin uptake. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 619: 483-499.

[2] 金玉娥,汪国权,马佳鸣,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中 7 种微囊藻毒素[J]. *环境与职业医学*, 2012, 29(6): 343-346.

[3] WU X, XIAO B, GONG Y, et al. Kinetic study of the 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic acid produced by oxidation of microcystin in aqueous solutions[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2008, 27(10): 2019-2026.

[4] WU X, XIAO B, LI R, et al. Rapid quantification of total microcystins in cyanobacterial samples by periodate-permanganate oxidation and reversed-phase liquid chromatography[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 651(2): 241-247.

[5] WU X, WANG C, XIAO B, et al. Optimal strategies for determination of free/extractable and total microcystins in lake sediment[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 709: 66-72.

[6] 樊洁,肖邦定,邓南圣. 微囊藻毒素的 2-甲基-3-甲氧基-4-苯基丁酸检测方法的研究[J]. *分析科学学报*, 2006, 22(4): 377-380.

[7] SUCHY P, BERRY J. Detection of total microcystin in fish tissues based on lemieux oxidation and recovery of 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic acid(MMPB) by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry(SPME-GC/MS)[J]. *Int J Environ Anal Chem*, 2012, 92(12): 1443-1456.

[8] BIECZYNSKI F, BIANCHI V A, LUQUET C M, et al. Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) fed with the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2013, 39(5): 1309-1321.

[9] HILBORN E D, CARMICHAEL W W, SOARES R M, et al. Serologic evaluation of human microcystin exposure[J]. *Environ Toxicol*, 2007, 22(5): 459-463.

[10] OTT J L, CARMICHAEL W W. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues[J]. *Toxicon*, 2006, 47(7): 734-741.

[11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. JJF 1335—2005 化学分析测量不确定度评定[S]. 北京: 中国计量出版社, 2005.

[12] KAYA K, SANO T. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d₃)-4-phenylbutyric acid(MMPB-d₃) as the internal standard[J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 386(1-2): 107-112.

[13] RIVASSEAU C, MARTINS S, HENNION M C, et al. Determination of some physiochemical parameters of microcystins(cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1998, 799(1-2): 155-169.

(收稿日期: 2013-03-04)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 郑轻舟; 校对: 徐新春)