

# Определение микроцистинов в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии с предварительной пробоподготовкой с помощью автоматизированной системы твердофазной экстракции серии ASPE от RayKol

Номер: RKAU-003

## 1. Обзор

С ускорением индустриализации люди в ходе промышленного и сельскохозяйственного производства сбрасывают в водоемы большие объемы азотсодержащих и фосфорсодержащих загрязняющих веществ, ускоряя эвтрофикацию водоемов. Одним из проявлений эвтрофикации водоемов является массовое размножение водорослей, причем выделяемые водорослями биотоксины - цианотоксины серьезно угрожают безопасности человека и других организмов. Среди них микроцистин LR является наиболее токсичным и вредным из известных в настоящее время токсинов пресноводных цианобактерий. Это гепатотоксин и канцероген, вызывающий рак печени. Поэтому крайне важно контролировать уровень микроцистина в питьевой воде.

В соответствии с GB/T 20466-2006 «Определение микроцистинов в воде» для проведения твердофазной экстракции использовалась автоматизированная система от RayKol ASPE Ultra 06. Для качественного и количественного обнаружения использовался метод ВЭЖХ-МС/МС. При уровне пикирования 0,1 мкг/л степень извлечения трех микроцистинов колебалась от 84,4% до 99,6%, а значения RSD составляли менее 10%, что указывает на преимущества этого метода в виде автоматизированной работы и высокой точности и воспроизводимости. Данный метод разработан для определения микроцистина в питьевой воде и поверхностных водах.

**Ключевые слова:** автоматизированная система твердофазной экстракции, высокопроизводительная жидкостная хроматография - тандемная масс-спектрометрия, микроцистин.

## 2. Оборудование и расходные материалы

### 2.1 Оборудование

Жидкостная хроматография: тандемная квадрупольная масс-спектрометрия: тройной квадрупольный тандемный масс-спектрометр

Автоматизированная система твердофазной экстракции: ASPE Ultra 06 от RayKol

Автоматический дозатор жидкости: AP-200 от RayKol

Картридж ТФЭ: C18 (RayCure, 500 мг/6 мл, кат. номер: RC-204-16004)

### 2.2 Реагенты

Метанол (ВЭЖХ), трифторуксусная кислота (AP)

Вода: сверхчистая вода, удельное сопротивление более 18,2 МОм.

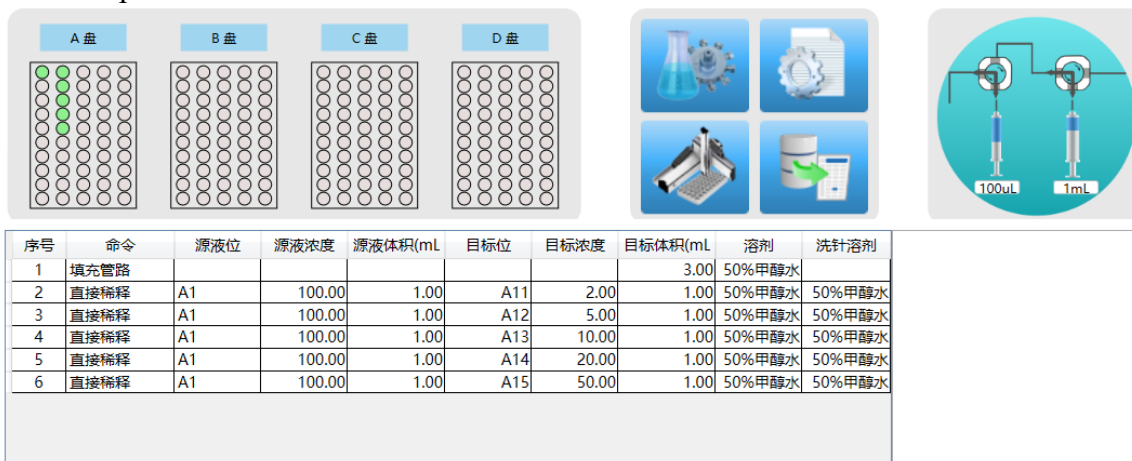
20% водный раствор метанола: 20 мл метанола, смешанного с 80 мл воды.

0,1% раствор трифторуксусной кислоты в метаноле: возьмите 0,1 мл трифторуксусной кислоты и разбавьте ее до 100 мл метанолом.

Стандартные материалы: Микроцистин-ЛР, Микроцистин-РР, Микроцистин-ЮР, чистота не менее 95%.

### 3. Построение калибровочной кривой

Возьмите стандартный раствор микроцистина 100 мкг/л, используйте 50% метаноловую воду в качестве раствора постоянного объема, сбалансируйте его при комнатной температуре и используйте AP200 для приготовления концентрации 2 мкг/л, 5 мкг/л, 10 мкг/л. и 20 мкг/л. Серию стандартов 50 мкг/л также можно составить в соответствии с чувствительностью прибора или целевой концентрацией.



| 序号 | 命令   | 源液位 | 源液浓度   | 源液体积(mL) | 目标位 | 目标浓度  | 目标体积(mL) | 溶剂     | 洗针溶剂   |
|----|------|-----|--------|----------|-----|-------|----------|--------|--------|
| 1  | 填充管路 |     |        |          |     |       | 3.00     | 50%甲醇水 |        |
| 2  | 直接稀释 | A1  | 100.00 | 1.00     | A11 | 2.00  | 1.00     | 50%甲醇水 | 50%甲醇水 |
| 3  | 直接稀释 | A1  | 100.00 | 1.00     | A12 | 5.00  | 1.00     | 50%甲醇水 | 50%甲醇水 |
| 4  | 直接稀释 | A1  | 100.00 | 1.00     | A13 | 10.00 | 1.00     | 50%甲醇水 | 50%甲醇水 |
| 5  | 直接稀释 | A1  | 100.00 | 1.00     | A14 | 20.00 | 1.00     | 50%甲醇水 | 50%甲醇水 |
| 6  | 直接稀释 | A1  | 100.00 | 1.00     | A15 | 50.00 | 1.00     | 50%甲醇水 | 50%甲醇水 |

Рисунок 1. Метод построения стандартной кривой микроцистина для AP 200.

### 4. Пробоподготовка

#### 4.1 Отбор и хранение проб

При отборе проб водопроводной воды сначала пропустите воду в течение примерно 2 минут, отрегулируйте расход воды до 500 мл/мин, соберите пробы воды с помощью бутылки для отбора проб, закройте бутылку. После отправки пробы в лабораторию добавьте около 40-50 мг сульфита натрия для удаления остаточного хлора (перед добавлением кислоты для корректировки pH необходимо провести дехлорирование), храните в холодильнике при температуре 4°C. При наличии в пробе примесей ее необходимо отфильтровать через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Все пробы должны быть подвергнуты твердофазной экстракции в течение 14 дней после отбора. Экстракционный раствор должен быть упакован в герметично закрывающуюся стеклянную бутылку. Храниться в защищенном от света месте, при температуре ниже 4°C. Анализ должен быть завершен в течение 30 дней с момента экстракции.

#### 4.2 Стандартные приготовления

Кондиционирование: 10 мл метанола и 10 мл воды соответственно со скоростью 5 мл/мин;  
 Экстрагирование: 1000 мл образца воды пропустите его через картридж ТФЭ со скоростью 10 мл/мин;

Элюирование: используйте 10 мл воды, пропустите пробу через картридж ТФЭ 10мл 20% водного раствора метанола. Элюируйте картридж ТФЭ 10 мл 0,1% раствора трифторуксусной кислоты в метаноле

Концентрирование: Упарьте 10 мл элюата азотом при 40°C досуха.

Конкретные параметры метода показаны на рисунке 2:

| этап                | растворитель                         | скорость потока (мл/мин) | время (сек) | СЛИВ      |
|---------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------|-----------|
| 1 кондиционирование | метанол                              | 5                        | 10.00       | слив орг. |
| 2 кондиционирование | вода                                 | 5                        | 10.00       | слив воды |
| 3 загрузка образца  |                                      | 10                       | 1020.00     | слив воды |
| 4 промывка          | вода                                 | 10                       | 10.00       | слив орг. |
| 5 промывка          | 20% р-р метанола                     | 10                       | 10.00       | слив воды |
| 6 продувка          |                                      | 80                       | 20.00       | слив воды |
| 7 сушка             | азот                                 |                          | 30.00       | 1200      |
| 8 очистка шприца    | 0,1% 3-фтор-уксусная к-та в метаноле |                          | 5.00        |           |
| 9 элюирование       | 0,1% 3-фтор-уксусная к-та в метаноле | 1                        | 10.00       | сбор      |
| 10 продувка         |                                      | 10                       | 10.00       | сбор      |
| 11 упаривание       |                                      |                          | 40.00       | 1800      |
| 12 конец программы  |                                      |                          |             |           |

Рисунок 2. Метод твердофазной экстракции микроцистинов в воде с помощью ASPE Ultra 06.

#### 4.3 Доведение до заданного объема

Извлеките пробирку для сбора экстракта, добавьте 1,0 мл 50% водного раствора метанола, перемешайте, отфильтруйте и перенесите в вials для проведения анализа.

## 5. Условия анализа

### 5.1 Хроматографические условия

Колонка: Agilent EC-C18 (3,0×50 мм, 2,7 мкм)

Градиент элюирования: Фаза А: чистая вода Фаза В: 0,1% ацетонитрил муравьиной кислоты

Таблица 1. Процедура градиентного элюирования

| время (мин) | А(%) | В(%) |
|-------------|------|------|
| 0.01        | 60   | 40   |
| 4           | 60   | 40   |
| 5           | 45   | 45   |
| 5.01        | 0    | 100  |
| 7.5         | 0    | 100  |
| 7.51        | 60   | 40   |
| 10          | 60   | 40   |

## 5.2 Условия масс-спектрометрии

Режим сбора данных: ESI+

Температура сушильного газа: 350 °C

Поток осушающего воздуха: 10 л/мин.

Давление распылителя: 15 фунтов на квадратный дюйм

Капиллярное напряжение: 4000 В

Контролируемые ионные параметры представлены в таблице 2.

Таблица 2. Условия характеристической ионной масс-спектрометрии трех микроцистинов

| Compound Name  | Precursor Ion | Product Ion | Dwell | Fragmentor | Collision Energy |
|----------------|---------------|-------------|-------|------------|------------------|
| Микроцистин-LR | 995.5         | 134.8*      | 110   | 60         | 90               |
|                |               | 212.9       | 110   | 60         | 70               |
| Микроцистин-ЮР | 1045.5        | 135.1*      | 110   | 300        | 90               |
|                |               | 212.6       | 110   | 300        | 80               |
| Микроцистин-РР | 519.8         | 134.8*      | 110   | 160        | 50               |
|                |               | 102.9       | 110   | 160        | 70               |

Примечание: \* указывает количественный ион.

## 5.3 Полная ионная хроматограмма

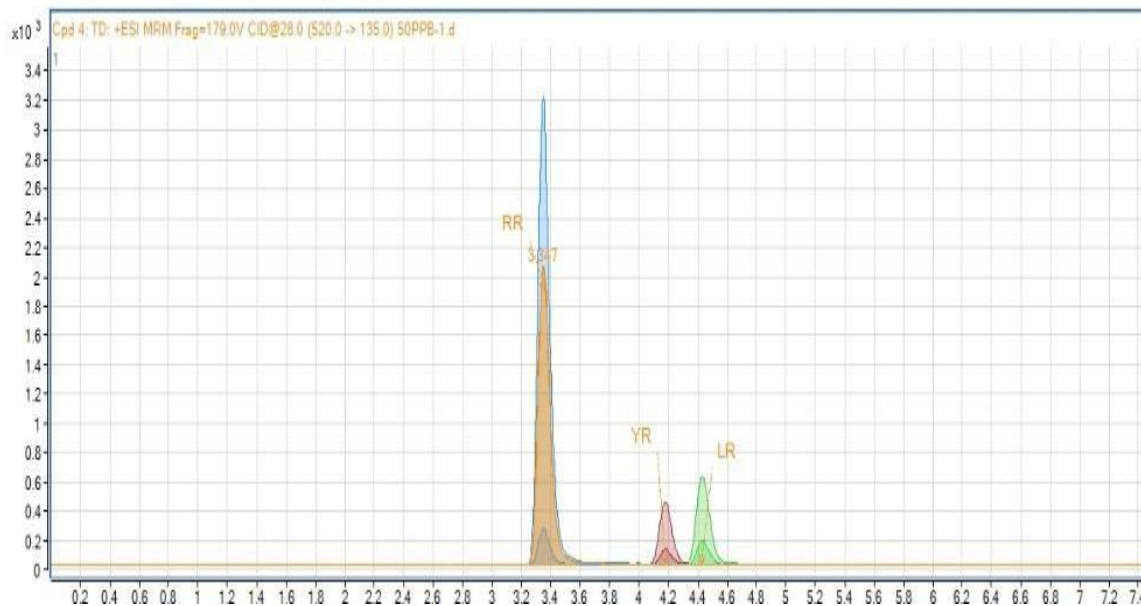


Рисунок 3. Хроматограмма микроцистина (50 мкг/л).

## 6. Проверка осуществимости метода

Чтобы проверить степень извлечения, в этом эксперименте к водопроводной воде (1000 мл) добавляли вышеупомянутый стандарт микроцистина (100 мкл, 1 мкг/мл) для проверки степени извлечения (n=3). При уровне пика 0,1 мкг/л степень извлечения трех соединений колебалась от 84,4% до 99,6%, а относительное стандартное отклонение составляло менее 10,0%, что соответствовало стандартным требованиям.

Таблица 3. Скорость восстановления трех стандартных добавок микроцистина (0,1 мкг/л)

| исходный | R <sub>1</sub> (%) | R <sub>2</sub> (%) | R <sub>3</sub> (%) | Avg (%) | RSD (%) |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|---------|---------|
| MCs-LR   | 99.6               | 89.2               | 93.4               | 94.1    | 5.2     |
| MCs-RR   | 84.4               | 91.6               | 96.4               | 90.8    | 6.1     |
| MCs-YR   | 87.8               | 89.1               | 97.9               | 91.6    | 5.5     |

## 7. Результаты и обсуждение

7.1 Использование тройного квадрупольного масс-спектрометра в качестве детектора имеет более высокую чувствительность метода и лучшую анти-интерференционную способность, чем метод чистой жидкой фазы в GB/T 20466-2006 «Определение микроцистинов в воде».

7.2 В этом эксперименте для всех стадий пробоподготовки (экстрагирования, элюирования и концентрирования проб воды) используется автоматизированная система твердофазной экстракции ASPE Ultra 06 от RayKol. Весь процесс выполняется автоматически, при этом достигаются прекрасные результаты степени извлечения и RSD. В автоматизированной системе твердофазной экстракции RayKol используется высокоточный шприцевой насос для контроля скорости потока в процессах активации, загрузки образца, промывки и элюирования, что позволяет избежать недостатков ручных устройств для твердофазной экстракции, которые не могут точно контролировать скорость потока, тем самым гарантируя, что весь эксперимент имеет лучшую точность и прецизионность.