

水中低含量微囊藻毒素（RR）高效液相色谱法检测

摘要：本文用高效液相色谱法检测水中微囊藻毒素（RR），针对水中微囊藻毒素含量低，难检出问题，对常规高效液相色谱做了两种优化改进，在线富集进样、大定量进样，大大降低了检出限，获得了满意的结果。

关键词：液相色谱；在线富集；大定量进样；微囊藻毒素检出限

前言

微囊藻毒素（RR）具有较强的毒性及危害性。随着中国水体富营养化程度加剧，蓝藻水华和赤潮的发生逐渐增加。80%的蓝藻水华都可以检测出次生代谢产物——微囊藻毒素（microcystins, MCs），它对水体环境和人群健康的危害已成为全球关注的重大环境问题之一。

环境改善，检测、防控和治理是必不可少的工作内容。本文主要介绍水中低含量微囊藻毒素（RR）的检测方法。

本方法检出限低或超低，主要针对水中低含量微囊藻毒素（RR）高效液相色谱法检测，适用于饮用水、湖泊水、河水、地表水等水样检测。

本方法参考《GB/T 5750.8-2006 生活饮用水标准检验方法有机物指标》中第13部分微囊藻毒素，优化出两种检测方案。

实验部分

方案一：

在线富集高效液相色谱法检测。

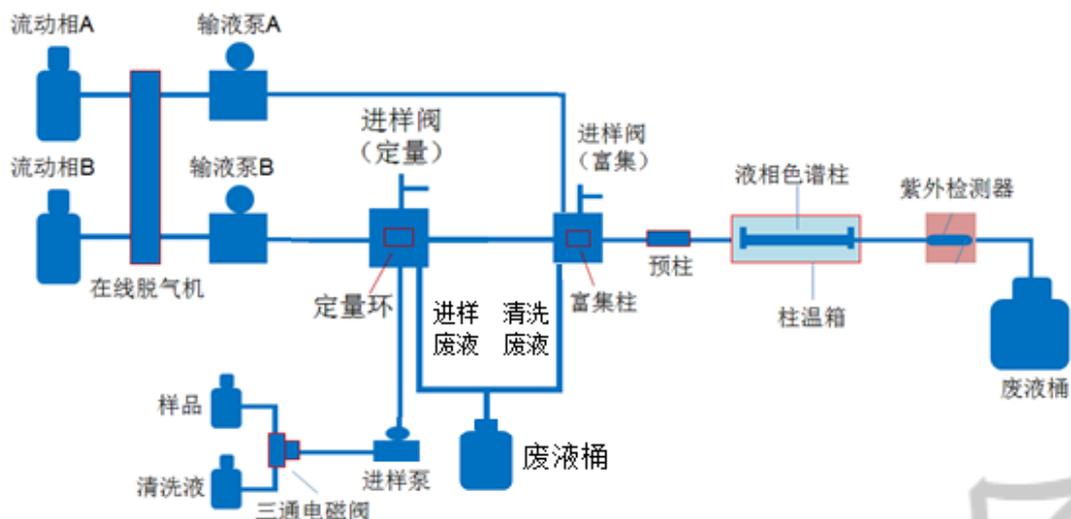


图 1 在线富集高效液相色谱法检测流程图

1 仪器配置

高压输液泵 2 台，在线脱气机（两路以上脱气）1 台，六通自动进样阀 2 个（1 个带 2ml 定量环 1 套，一个带富集柱 1 根），预柱 1 根，色谱柱 1 根，柱温箱 1 台，紫外检测器 1 台，三通电磁阀 1 个，进样泵（或高效液相色谱自动进样器）1 台，工作站 1 套，配件 1 套（包括废液桶、管路、接头等）。

2 核心部件

核心部件 1：进样系统。进样系统包括两个进样阀，一个在定量环处连接适当的管路作为定量环，负责定量进样，另一个在定量环处连接富集柱，负责把大量的样品富集到富集柱这样一个小的容积内。两个进样阀的切换由程序按照进样过程时间表时间控制。



六通自动进样阀

定量环

图 2 六通自动进样阀

核心部件 2: 富集柱。富集柱有分体的和一体的, 分体富集柱市面上较常见, 包括柱体、柱芯, 柱芯污染或故障后可随时更换, 具有较好的性价比。选择和色谱柱相同或相近类型填料 (粒径 $3.5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$, 长度 3 cm 左右), 能大量富集低浓度水样品。

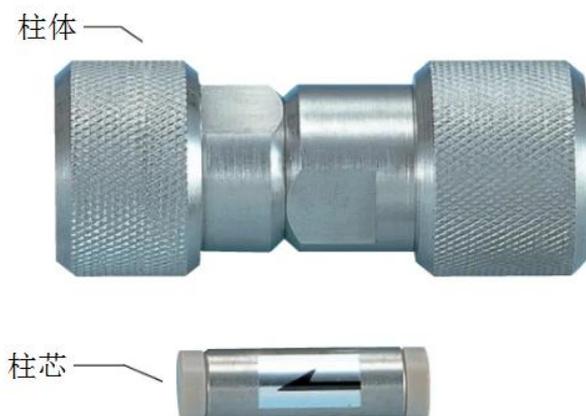


图 3 富集柱

核心部件 3: 色谱柱。该检测方法对色谱柱要求较高, 要求色谱柱耐污染能力强, 耐水性, 分离速度快, 分离效果好, 色谱峰形好等。本文选择的这款色谱柱通过对孔径、比表面和碳含量等色谱参数的优化, 绝佳的平衡了保留、分离度、耐污染关系, 寿命较长。



图 4 色谱柱

3 色谱条件

色谱柱: ODS C18 色谱柱, Venusil XBP (L) $4.6\text{mm}\times 150\text{mm}\times 5\mu\text{m}$

流动相:

流动相 A (色谱洗脱液): 乙腈: 水: 三氟乙酸 = 40%: 60%: 0.05%

流动相 B (富集液): 甲醇: 水 = 15%: 85%

进样过程 (以 2ml 进样体积为例) 时间表, A、B 输液泵保持持续运行

时间 (min)	进样状态	进样过程
0	装样, 进样泵启动	样品由进样泵注入定量进样阀定量环中
1	富集, 进样泵停止	切换定量进样阀, 样品由输液泵 B 带入富集进样

		阀富集柱中
4	进样	切换富集进样阀，富集柱中样品由输液泵 A 带入色谱柱，样品进入色谱柱由洗脱液（流动相 A）洗脱后进入检测器检测，最后排入废液桶中
14	定量、富集进样阀	通过切换进样泵前三通电磁阀，进样泵将清洗液恢复初始状态，进 注入定量进样阀，清洗定量环
	样泵启动	
15	进样泵停止	该进样、检测周期完成

流速：1ml/min

检测器：紫外检测器

检测波长：238nm

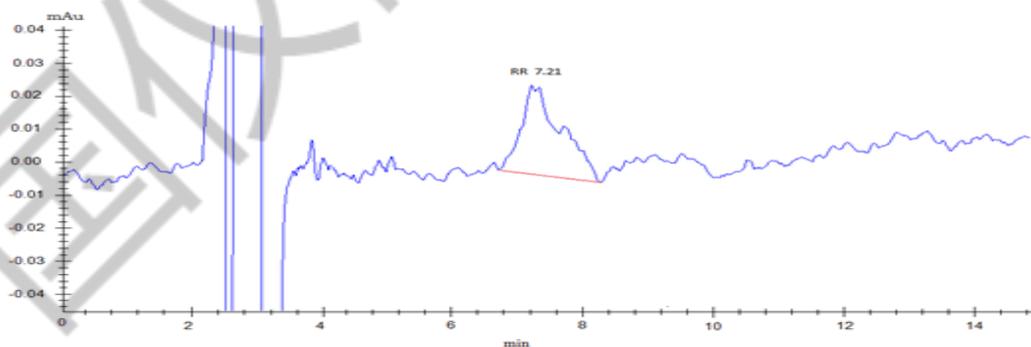
柱温：35℃

4 工作流程

输赢泵 A、B 保持正常运行。进样泵向定量进样阀注入处理好的样品，定量后切换该进样阀，样品由流动相 B（富集液，来自输液泵 B）带入富集进样阀富集柱，富集在富集柱中。切换富集进样阀，样品由流动相 A（洗脱液，来自输液泵 A）经过预柱后带入色谱柱，样品在色谱柱中经过流动相 A 洗脱逐渐分离，分离后的样品由流动相 A 带入紫外检测器检测，检测谱图及结果在电脑工作站中显示储存，检测完成后样品及流动相 A 流入废液桶中。进样泵完成对管路及进样阀清洗后各工作单元恢复初始，该检测周期完成。

试验对比（进样量相同，进样体积不同）：

直接进样 20 μ l，标准样品浓度 20ng/ml，色谱图情况



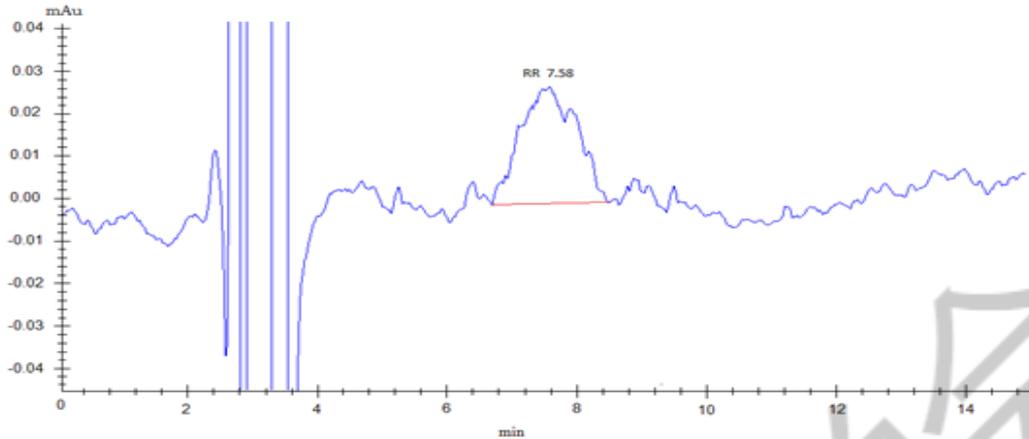
积分结果

峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.21	32	694	BB	14297

图 5 微囊藻毒素（RR）标准样品浓度 20ng/ml 色谱图

该检测方法噪声约 $3.6\mu\text{Au}$ ，样品峰高 $32\mu\text{Au}$ ，标准样品浓度 20ng/ml ，按 3 倍噪声计算检出限，检出限约 6.75ng/ml 。

在线富集进样 2ml ，标准样品浓度 0.2ng/ml ，色谱图情况



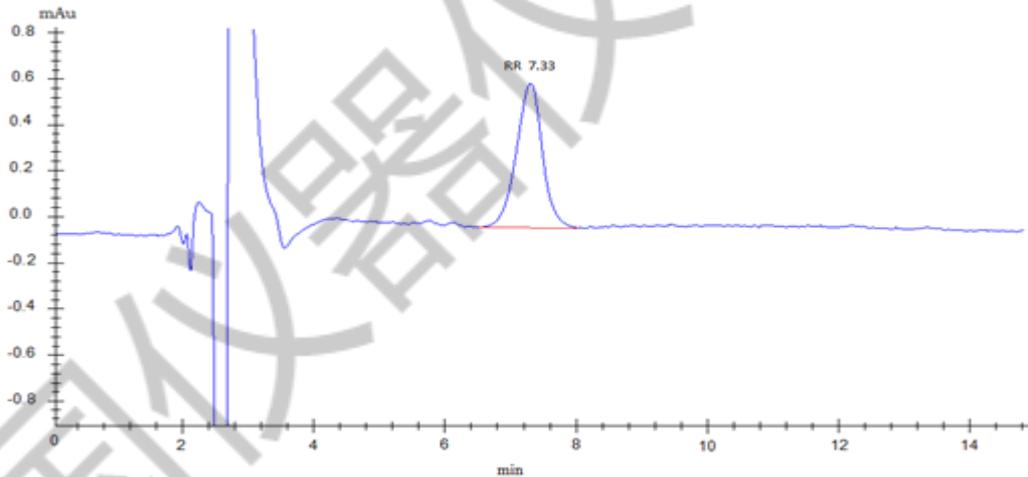
积分结果

峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.58	28	667	BB	11909

图 6 微囊藻毒素 (RR) 标准样品浓度 0.2ng/ml 色谱图

该检测方法噪声约 $3.5\mu\text{Au}$ ，样品峰高 $28\mu\text{Au}$ ，标准样品浓度 0.2ng/ml ，按 3 倍噪声计算检出限，检出限约 0.073ng/ml 。

直接进样 $20\mu\text{l}$ ，标准样品浓度 400ng/ml ，色谱图情况



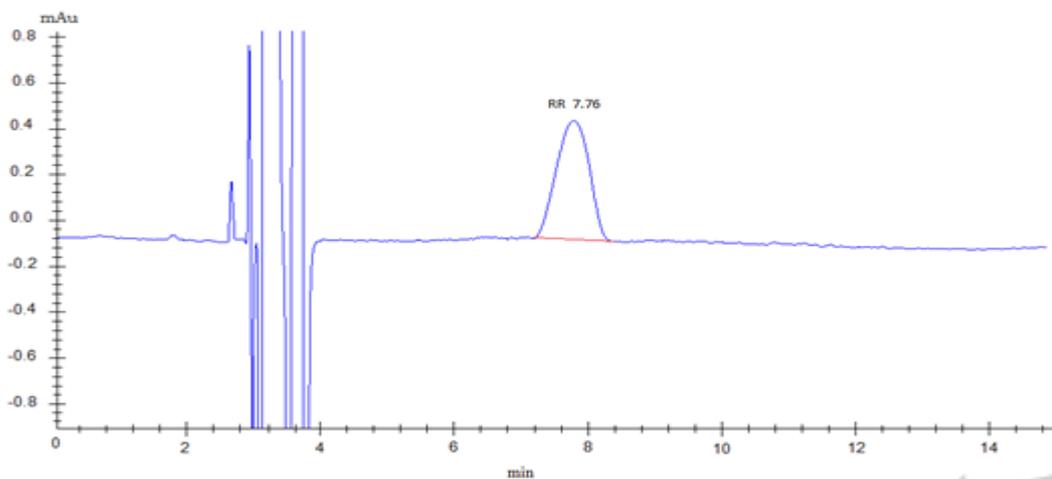
积分结果

峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.33	631	13205	BB	15133

图 7 微囊藻毒素 (RR) 标准样品浓度 400ng/ml 色谱图

该检测方法检测 400ng/ml 微囊藻毒素 (RR)，保留时间 7.33min ，峰高 631 ，峰面积 13205 。

在线富集进样 2ml ，标准样品浓度 4ng/ml ，色谱图情况



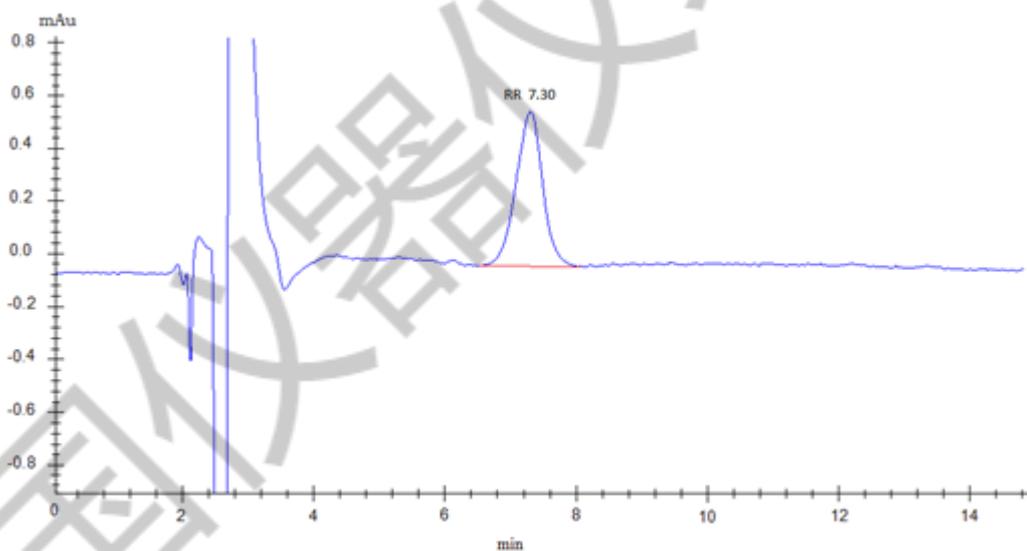
积分结果

峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.76	542	12541	BB	15001

图 8 微囊藻毒素 (RR) 标准样品浓度 4ng/ml 色谱图

该检测方法检测 4ng/ml 微囊藻毒素 (RR), 保留时间 7.76min, 峰高 542, 峰面积 12541。峰高比直接进样 (等效进样量) 略低, 峰面积相当于直接进样的 94.97%。

4ng/ml 样品经过固相萃取、氮气吹干、定量等前处理富集后直接进样 20 μ l, 样品浓度等效直接进样 400ng/ml, 色谱图情况



积分结果

峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.30	615	11495	BB	14867

图 9 微囊藻毒素 (RR) 标准样品经过固相萃取等前处理色谱图

该检测方法检测，保留时间 7.30min，峰高 615，峰面积 11495。峰高比直接进样（等效进样量）略低，峰面积相当于直接进样的 87.05%。

5 小结

直接进样 20 μ l，检出限约 6.75ng/ml；在线富集进样 2ml，检出限约 0.073ng/ml，检出限比直接进样低 92.47 倍（进样量相同，进样体积相当于 100 倍），实现更低检出限（进样体积还可以更大，检出限会更低）检测。直接进样 20 μ l，样品浓度 400ng/ml，色谱峰面积 13205；在线富集进样 2ml，样品浓度 4ng/ml，色谱峰面积 12541，等效进样量峰面积是直接进样峰面积的 94.97%（该处介绍的是富集过程中样品损耗情况。色谱检测标准品和样品在同一色谱系统中进行，采用外标法分析，外标法对检测结果影响很小）；经固相萃取、氮气吹干等前处理后进样 20 μ l，样品浓度等效 400ng/ml（不考虑前处理损耗），色谱峰面积 11495，等效进样量峰面积是直接进样峰面积的 87.05%。

在线富集高效液相色谱法检出限低，富集过程中的损耗较实验室富集前处理损耗低，可实现水中低含量甚至超低含量微囊藻毒素（RR）高效液相色谱法在线检测。

该方案的优势

检出限非常低。样品中微囊藻毒素含量如果非常低的话，常规高效液相色谱法是根本无法检测出来的（国标《GB/T 5750.8-2006 生活饮用水标准检验方法有机物指标》是在实验室样品经过前处理，将 5L 水样浓缩到 1ml，进样量 20 μ l，检出限为 0.06 μ g/L，不考虑前处理，直接进样检出限相当于 6ng/ml，这个检出限在常规方法中算是低的）。该方法可根据样品中微囊藻毒素的含量选择适当的进样量，进样量 0.01ml~1000ml（甚至更大）可选，进样体积由所安装的定量环容积决定。检出限能降低几十、几百、甚至几千倍，是低含量尤其是在线低含量微囊藻毒素水样检测的好方法。

方案二：

大定量进样高效液相色谱法检测。

在检测允许范围内进样量尽可能大（只针对低含量样品），保证色谱峰高足够高，以减小分析误差。液相色谱法分析，进样量大会影响色谱峰宽及色谱峰形，所以进样量也只能在一个合理的范围，不能无限大。既要保证进样量大又要保证色谱峰宽及色谱峰形，色谱条件的选择非常关键，尤其是色谱柱和流动相。

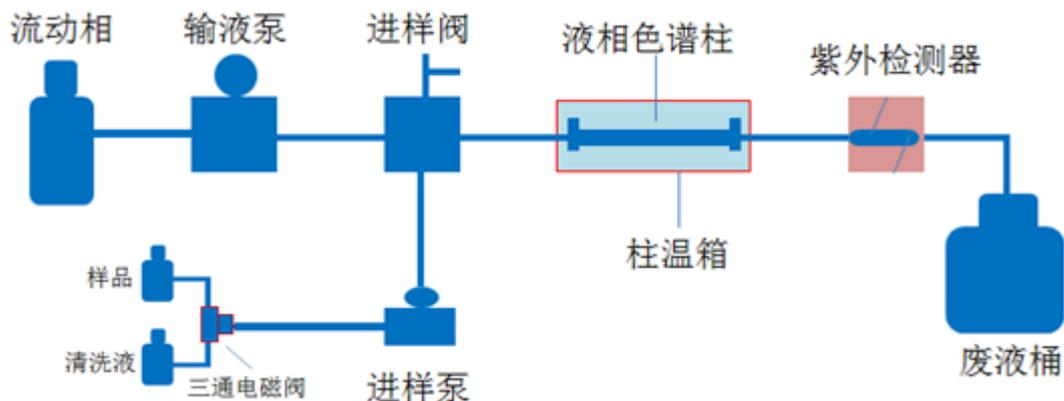


图 10 大定量进样高效液相色谱法检测流程图

1 仪器配置

高压输液泵 1 台，六通自动进样阀 1 个（带 1 套 0.5ml 定量环），色谱柱 1 根，柱温箱 1 台，紫外检测器 1 台，三通电磁阀 1 个，进样泵（或高效液相色谱自动进样器）1 台，工作站 1 套，配件 1 套（包括废液桶、管路、接头等）。

2 核心部件

色谱柱。该检测方法对色谱柱要求较高，要求色谱柱耐污染能力强，耐水性，分离速度快，分离效果好，色谱峰形好等。本文选择的这款色谱柱通过对孔径、比表面和碳含量等色谱参数的优化，绝佳的平衡了保留、分离度、耐污染关系，寿命较长。



图 11 色谱柱

3 色谱条件

色谱柱：ODS C18 色谱柱，Venusil XBP (L)4.6mm×150mm×5μm

流动相：乙腈：水：三氟乙酸=40%：60%：0.05%

进样过程（以 0.5ml 进样体积为例）时间表：

时间 (min)	进样状态	进样过程
0	装样, 进样泵启动	样品由进样泵注入进样阀定量环中
1	进样, 进样泵停止	切换定量进样阀, 样品由输液泵带入色谱柱中, 样品进入色谱柱由流动相洗脱后进入检测器检

测，最后排入废液桶中

- | | | |
|----|---------------------------|--|
| 14 | 定量进样阀恢复
初始状态,进样泵
启动 | 通过切换进样泵前三通电磁阀,进样泵将清洗液
注入定量进样阀,清洗定量环 |
| 15 | 进样泵停止 | 该进样、检测周期完成 |

流速: 1ml/min

检测器: 紫外检测器

检测波长: 238nm

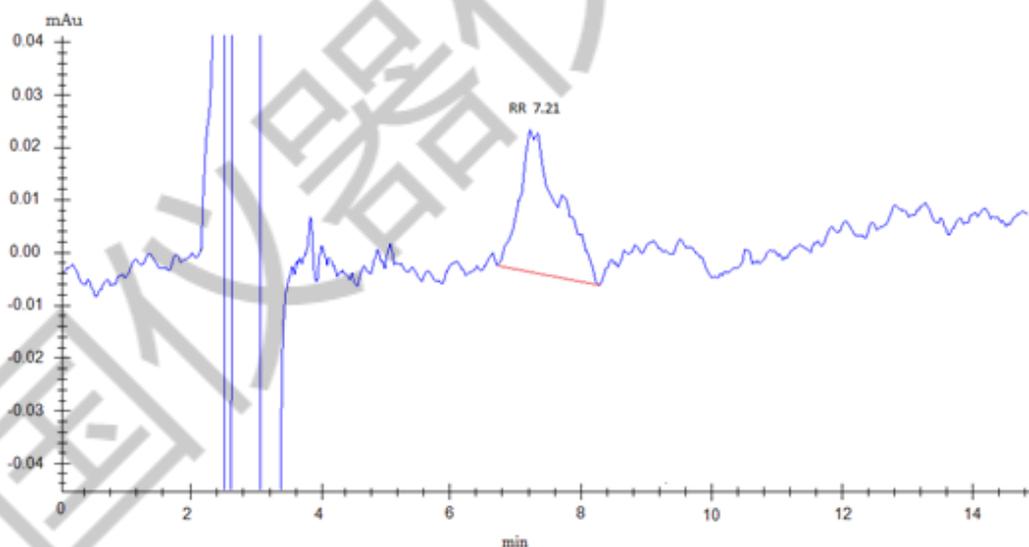
柱温: 35°C

4 工作流程

输液泵保持正常运行。进样泵向进样阀注入处理好的样品,定量后切换该进样阀,样品由流动相(来自输液泵)带入色谱柱,样品在色谱柱中经过流动相洗脱逐渐分离,分离后的样品由流动相带入紫外检测器检测,检测谱图及结果在电脑工作站中显示储存,检测完成后样品及流动相流入废液桶中。进样泵完成对管路及进样阀清洗后各工作单元恢复初始,该检测周期完成。

试验对比(进样量相同,进样体积不同):

直接进样 20 μ l,标准样品浓度 20ng/ml,色谱图情况



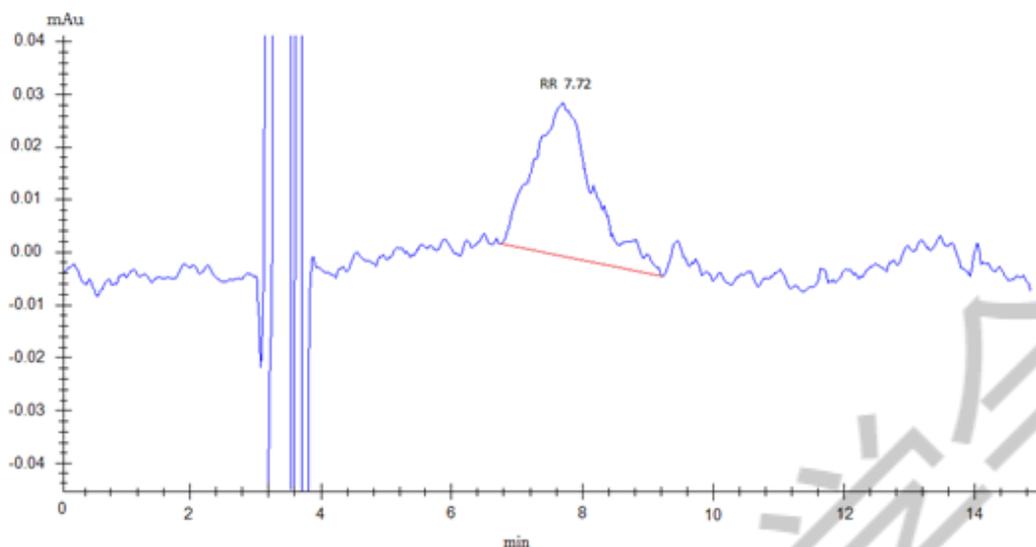
积分结果

峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.21	32	694	BB	14297

图 12 微囊藻毒素 (RR) 标准样品浓度 20ng/ml 色谱图

该检测方法噪声约 3.6 μ Au，样品峰高 32 μ Au，标准样品浓度 20ng/ml，按 3 倍噪声计算检出限，检出限约 6.75ng/ml。

大定量进样 0.5ml，标准样品浓度 0.8ng/ml，色谱图情况



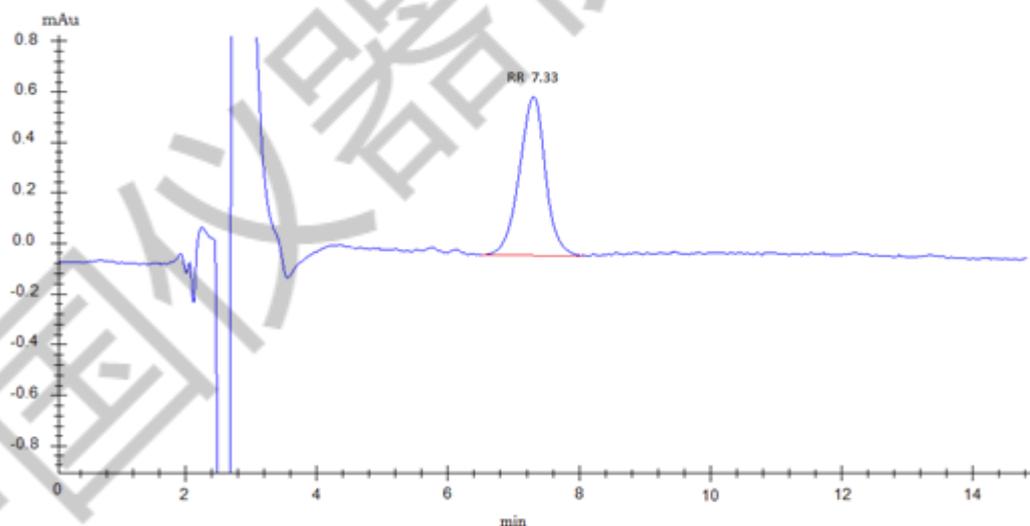
积分结果

峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.72	33	753	BB	15743

图 13 微囊藻毒素 (RR) 标准样品浓度 0.8ng/ml 色谱图

该检测方法噪声约 3.8 μ Au，样品峰高 33 μ Au，标准样品浓度 0.8ng/ml，按 3 倍噪声计算检出限，检出限约 0.28ng/ml。

直接进样 20 μ l，标准样品浓度 400ng/ml，色谱图情况



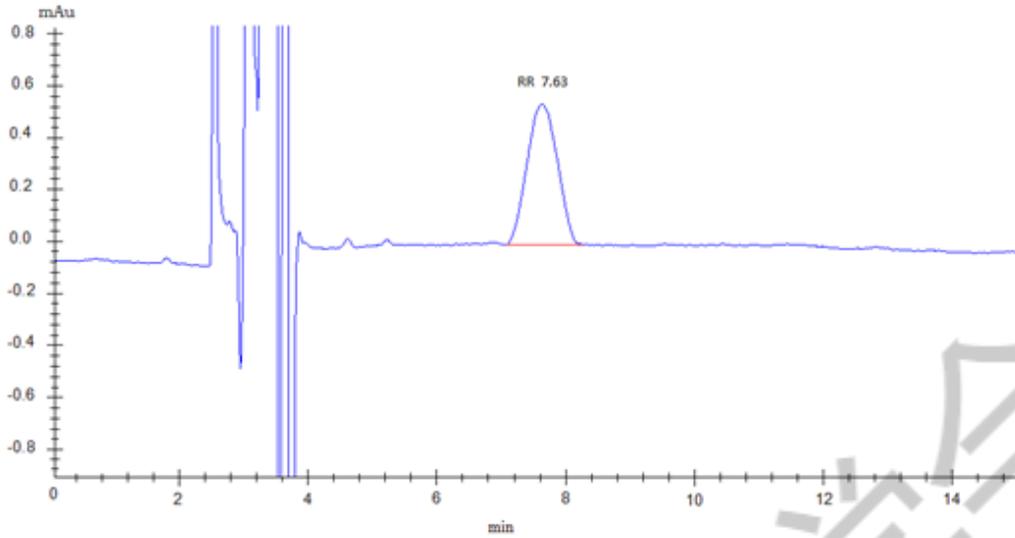
积分结果

峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.33	631	13205	BB	15133

图 14 微囊藻毒素 (RR) 标准样品浓度 400ng/ml 色谱图

该检测方法检测 400ng/ml 微囊藻毒素(RR), 保留时间 7.33min, 峰高 631, 峰面积 13205。

大定量进样 0.5ml, 标准样品浓度 16ng/ml, 色谱图情况



积分结果

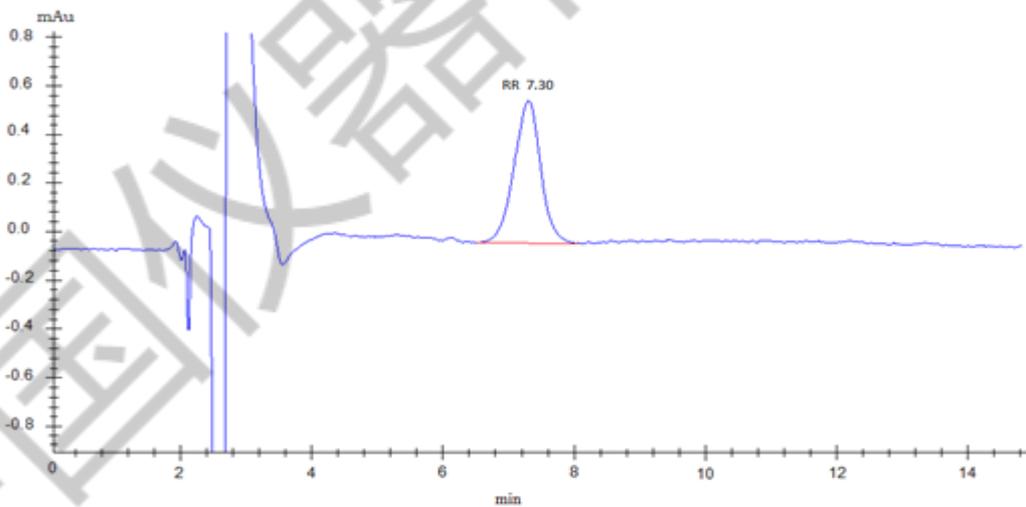
峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.63	568	12779	BB	12247

图 15 微囊藻毒素 (RR) 标准样品浓度 16ng/ml 色谱图

该检测方法检测 16ng/ml 微囊藻毒素(RR), 保留时间 7.63min, 峰高 568, 峰面积 12779。

峰高比直接进样 (等效进样量) 略低, 峰面积相当于直接进样的 96.77%。

4ng/ml 样品经过固相萃取、氮气吹干、定量等前处理富集后直接进样 20 μ l, 样品浓度等效直接进样 400ng/ml, 色谱图情况



积分结果

峰号	组分名	保留时间 (min)	峰高	峰面积	峰类型	理论塔板数
1	微囊藻毒素 RR	7.30	615	11495	BB	14867

图 16 微囊藻毒素 (RR) 标准样品经过固相萃取等前处理色谱图

该检测方法检测，保留时间 7.30min，峰高 615，峰面积 11495。峰高比直接进样（等效进样量）略低，峰面积相当于直接进样的 87.05%。

5 小结

直接进样 20 μ l，检出限约 6.75ng/ml；大定量进样 0.5ml，检出限约 0.28ng/ml，检出限比直接进样低 24.11 倍（进样量相同，进样体积相当于 25 倍），实现更低检出限检测。直接进样 20 μ l，样品浓度 400ng/ml，色谱峰面积 13205；大定量进样 0.5ml，样品浓度 16ng/ml，色谱峰面积 12779，等效进样量峰面积是直接进样峰面积的 96.77%（该处介绍的是常规进样和大定量进样检测的差别。色谱检测标准品和样品在同一色谱系统中进行，采用外标法分析，外标法对检测结果影响很小）。

大定量进样高效液相色谱法检出限低，进样过程中的损耗较实验室富集前处理损耗低，可实现水中低含量微囊藻毒素（RR）高效液相色谱法在线检测。

优势

检出限低。样品中微囊藻毒素（RR）含量较低，常规高效液相色谱法无法检出。该方法可根据样品中微囊藻毒素的含量选择适当的进样量（定量环），进样量在 0.02ml~0.6ml 范围可选。这样检出限就能降低几倍到几十倍。仪器配置相对简单，成本低很多。该方法是样品中微囊藻毒素（RR）含量较低时比较理想（可以优先考虑）的检测方法。

6 结论

以上两种检测方案都能较好的检测含量较低微囊藻毒素（RR）样品，区别是第一种方案进样量更大检出限更低，更适用于超低含量检测，但仪器配置较复杂，成本较高。第二种方案检出限没有第一种低，但仪器配置较简单，成本较低，适用于较低含量检测。具体检测时可根据实际情况选择理想的检测方法，从而达到更满意的结果。

以上两种方法检出限均较低，可供其它低含量样品高效液相色谱法检测（在线富集进样或大定量进样）参考。

参考文献：

- [1] GB/T 5750.8-2006 生活饮用水标准检验方法有机物指标.
- [2] GB/T 20466-2006 水中微囊藻毒素的测定.
- [3] 在线固相萃取-高效液相色谱法测定水体中的多环芳烃 陈静等 分析化学 (FENXI HUA XUE) 研究报告 2014: 1785-1790.

中国文物艺术品拍卖学会