

上海市地方标准

DB31/T 1178—2019

水源水中微囊藻毒素测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of microcystins in source water—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

2019-08-15 发布

2019-11-01 实施

上海市市场监督管理局 发布



目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 方法提要	2
6 试验条件	2
7 试剂与材料	2
8 仪器与设备	3
9 样品	3
10 测定条件.....	4
11 测定步骤.....	5
12 结果计算与数据处理.....	5
13 精密度与准确度.....	6
14 质量保证与质量控制.....	7
15 试验报告.....	7
附录 A (资料性附录) 6 种微囊藻毒素的色谱图、特征离子图	8
附录 B (资料性附录) 方法的性能	10

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由上海市水务局提出并组织实施。

本标准由上海市水务局归口。

本标准起草单位：上海城市水资源开发利用国家工程中心有限公司、上海市供水调度监测中心、上海市环境监测中心、上海市质量监督检验技术研究院。

本标准主要起草人：姜蕾、朱慧峰、蔡海芸、张东、施俭、钱静汝、童俊、周守毅、雷涛、秦宇、陈蕾、金磊、高炜、孙伟琳、景澍闽、舒诗湖。

水源水中微囊藻毒素测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了水源水中微囊藻毒素浓度的液相色谱-串联质谱测定方法的缩略语、方法提要、试验条件、试剂与材料、仪器与设备、样品、测定条件、测定步骤、结果计算与数据处理、精密度与准确度、质量保证与质量控制、试验报告等内容。

本标准适用于水源水中微囊藻毒素测定,地表水、娱乐用水和城市供水处理各工艺段的水质测定可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 15603 常用化学危险品贮存通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

精密度 precision

在规定的条件下,相互独立的测试结果之间的一致程度。用相对标准偏差表示。

3.2

准确度 accuracy

测定结果与被测量真值或参考值间的一致程度。用回收率表示。

3.3

检出限 detection limit

用特定分析方法在给定的置信度内可从样品中检出待测物质的最低浓度或最小值。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

MC-LR:微囊藻毒素-LR

MC-YR:微囊藻毒素-YR

MC-RR:微囊藻毒素-RR

MC-LA:微囊藻毒素-LA

MC-LF:微囊藻毒素-LF

MC-LY:微囊藻毒素-LY

5 方法提要

5.1 微囊藻毒素的分子式、相对分子质量与结构式

6 种微囊藻毒素的分子式、相对分子质量与结构式见表 1。

表 1 6 种微囊藻毒素的分子式、相对分子质量与结构式

化合物	CAS 号	X	Y	分子式	相对分子质量	结构式
MC-LR	101043-37-2	Leu	Arg	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$	995.2	
MC-YR	101064-48-6	Tyr	Arg	$C_{52}H_{72}N_{10}O_{13}$	1 045.2	
MC-RR	111755-37-4	Arg	Arg	$C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$	1 038.2	
MC-LA	96180-79-9	Leu	Ala	$C_{46}H_{67}N_7O_{12}$	910.1	
MC-LF	154037-70-4	Leu	Phe	$C_{52}H_{71}N_7O_{12}$	986.2	
MC-LY	123304-10-9	Leu	Tyr	$C_{52}H_{71}N_7O_{13}$	1 002.2	

5.2 方法原理

本方法采用液相色谱-串联质谱法测定水中 6 种微囊藻毒素。水样经过滤膜过滤后,采用液相色谱-串联质谱法测定;也可经过固相萃取对微囊藻毒素富集、浓缩后,采用液相色谱-串联质谱法测定。根据物质的保留时间、母离子和子离子进行定性,外标法定量。

6 试验条件

6.1 试验应满足仪器对环境的要求。实验室应控制环境温度在 15℃~25℃之间,湿度不高于 80%。

6.2 常用化学危险品贮存和处理的基本要求应按照 GB 15603 的规定执行。

7 试剂与材料

除非另有说明,测定宜使用色谱纯试剂,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

7.1 甲醇:色谱纯。

7.2 乙腈:色谱纯。

7.3 甲酸:色谱纯。

7.4 微囊藻毒素标准品:市售标准品或标准溶液,纯度均不小于 95%。MC-LR、MC-YR、MC-RR、MC-LA、MC-LF 和 MC-LY 的 CAS 号、分子式、相对分子质量、结构式参见表 1。

7.5 甲酸乙腈溶液(0.1%,体积分数):量取 1 mL 甲酸(7.3),与 1 L 乙腈(7.2)混合均匀。

7.6 甲酸水溶液(0.1%,体积分数):量取 1 mL 甲酸(7.3),与 1 L 水混合均匀。

7.7 甲醇水溶液(90%,体积分数):量取 900 mL 甲醇(7.1),与 100 mL 水混合均匀。

7.8 甲醇水溶液(50%,体积分数):量取 500 mL 甲醇(7.1),溶解于 500 mL 水中,混合均匀。

7.9 微囊藻毒素标准储备溶液(10 μg/mL):微囊藻毒素标准品(7.4)以甲醇(7.1)溶解,配制成 10 μg/mL 的标准储备液。-20℃保存。

7.10 微囊藻毒素混合标准工作溶液(1 μg/mL):分别准确移取 1 mL 微囊藻毒素标准储备溶液(7.9)

于 10 mL 容量瓶中,以甲醇(7.1)定容至刻度,配制成各种微囊藻毒素质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准工作溶液。现用现配。

7.11 玻璃纤维滤膜:0.7 μm 。

7.12 针式微孔滤膜:0.22 μm ,聚偏氟乙烯滤膜(PVDF)材质。

7.13 固相萃取小柱:HLB 固相萃取小柱,500 mg,6 mL。

7.14 注射器。

7.15 液相样品瓶。

8 仪器与设备

8.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

8.2 色谱柱:反相 C_{18} 色谱柱,或其他性能相当的色谱柱。

8.3 玻璃杯式滤器:配真空泵。

8.4 固相萃取装置:配真空泵和大体积进样器。

8.5 氮吹浓缩仪。

8.6 超声细胞破碎仪。

8.7 采样瓶:棕色玻璃瓶,具磨口塞。

8.8 具塞塑料离心管:50 mL。

9 样品

9.1 样品的采集、保存与前处理

用采水器采集 1.5 L~2 L 样品,贮于采样瓶(8.7)中,避光冷藏运输。取样品 1 L,经玻璃纤维滤膜(7.11)过滤,滤液(水样)和藻细胞(膜样)分别处理和测定,上述操作应在一天内完成。如水样和膜样不能当天处理,水样应在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,膜样应在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

9.2 水样处理

9.2.1 直接进样法

用注射器(7.14)吸取滤后水样(9.1),经针式微孔滤膜(7.12)过滤后,置于液相样品瓶(7.15),待测。样品应尽快测定。如不能立即测定,应于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,28 天内测定完毕。

9.2.2 固相萃取富集法

9.2.2.1 固相萃取小柱的活化

依次用 10 mL 甲醇(7.1)、15 mL 水活化固相萃取小柱(7.13),流速控制在 3 mL/min~5 mL/min。活化过程和活化后,应保持固相萃取小柱湿润,避免填料上方液面被抽干,一旦填料变干应重新活化。

9.2.2.2 水样的富集

取 1 L 滤后水样(9.1),使水样通过预先活化的固相萃取小柱进行微囊藻毒素的富集,流速控制在 5 mL/min~10 mL/min。水样富集完毕,用 10 mL 水淋洗固相萃取小柱,流速在 5 mL/min~10 mL/min。淋洗后,对固相萃取小柱进行氮吹,时间不少于 10 min。

9.2.2.3 洗脱

用 5 mL 的 90% 甲醇水溶液(7.7)洗脱固相萃取小柱上的微囊藻毒素,重复上述洗脱 1 次,合并 2 次洗脱液于浓缩管中,待浓缩。

9.2.2.4 浓缩与定容

洗脱液在室温下用氮吹浓缩仪(8.5)浓缩至 0.5 mL,以水定容至 1 mL。定容后的样品经针式微孔滤膜(7.12)过滤,置于液相样品瓶(7.15),待测。处理后样品应尽快测定。如不能立即完成,应于 -20 ℃ 保存,28 天内测定完毕。

9.3 膜样处理

将带有藻细胞的膜样(9.1)剪碎置于离心管(8.8)中,加入 15 mL 的 50% 甲醇溶液(7.8)。用超声细胞破碎仪(8.6)破碎细胞,功率为 150 W,时间为 20 min(破碎 5 s,间歇 5 s),超声时需冰浴。超声破碎后,取 1 mL 萃取液经针式微孔滤膜(7.12)过滤,置于液相样品瓶(7.15),待测。处理后样品应尽快测定。如不能立即完成,应于 -20 ℃ 保存,28 天内测定完毕。

10 测定条件

10.1 液相色谱条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱采用 C₁₈ 反相色谱柱,1.8 μm,50 mm×2.1 mm 或相当者;
- 柱温为 30 ℃;
- 流动相 A 为甲酸乙腈溶液(7.5),流动相 B 为甲酸水溶液(7.6);采用梯度洗脱,洗脱程序见表 2;
- 进样量为 20 μL。

表 2 梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.4	10	90
2.5	0.4	45	55
4.0	0.4	45	55
6.5	0.4	60	40
6.6	0.4	90	10
7.6	0.4	90	10
8.0	0.4	10	90
9.0	0.4	10	90

10.2 串联质谱条件

串联质谱参考条件如下:

- 电离方式为电喷雾电离;

- 扫描模式采用正离子模式(ESI+);
 - 干燥气温度为 350 ℃;
 - 干燥气流速为 10 L/min;
 - 毛细管电压为 4 000 V;
 - 雾化器压力为 0.24 MPa;
 - 监测模式采用多反应监测(MRM)或动态多反应监测(Dynamic MRM)。
- 6 种微囊藻毒素的质谱监测离子与主要参数值见表 3。

表 3 微囊藻毒素的质谱监测离子与主要参数值

化合物	母离子 <i>m/z</i>	定量离子		定性离子		去簇电压/V
		<i>m/z</i>	碰撞能/eV	<i>m/z</i>	碰撞能/eV	
MC-LR	995.4	135.1	75	127.2	110	240
MC-YR	1 045.5	135.1	80	107.0	110	250
MC-RR	520.3	135.1	35	127.2	52	160
MC-LA	910.5	135.1	70	127.1	90	160
MC-LF	986.3	135.0	56	163.2	74	210
MC-LY	1 002.5	135.0	80	127.1	112	220

11 测定步骤

11.1 样品制备

按照第 9 章进行样品采集、制备与保存。

11.2 仪器准备

打开仪器电源,按照仪器操作手册执行至仪器稳定状态。

11.3 样品测定

按照第 10 章的液相色谱条件和串联质谱条件,注入待测样品溶液,进行测定。

11.4 结果计算

按照 12.1 的定性分析和 12.2 的定量分析方法,计算得出样品中微囊藻毒素的质量浓度。

12 结果计算与数据处理

12.1 定性分析

根据化合物的保留时间、特征母离子和子离子对 MC-LR、MC-YR、MC-RR、MC-LA、MC-LF、MC-LY 进行定性分析。微囊藻毒素的标准色谱图、样品色谱图、特征离子图参见附录 A。

12.2 定量分析

12.2.1 标准曲线

12.2.1.1 标准曲线绘制:配制不少于 6 个质量浓度点(含空白)的标准系列溶液,质量浓度由低到高依

次测定,以响应峰面积为纵坐标,标准系列溶液的质量浓度为横坐标,绘制标准曲线和计算回归方程。待测样品中微囊藻毒素的质量浓度应在检测的线性范围内。

12.2.1.2 直接进样方法标准曲线的配制:依次吸取 0 μL、2 μL、5 μL、10 μL、20 μL、50 μL、100 μL、200 μL 微囊藻毒素标准工作溶液(7.10)于 10 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇水溶液(7.8)定容至刻度,配制质量浓度为 0 μg/L、0.20 μg/L、0.50 μg/L、1.00 μg/L、2.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L 的标准系列溶液。

12.2.1.3 固相萃取富集方法标准曲线的配制:依次吸取 0 μL、2 μL、5 μL、10 μL、20 μL、50 μL、100 μL、200 μL 微囊藻毒素标准工作溶液(7.10)于 1 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇水溶液(7.8)定容至刻度,配制质量浓度为 0 μg/L、2.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L、100 μg/L、200 μg/L 的标准系列溶液。

12.2.2 结果计算

根据样品峰面积在标准曲线上得出相应的质量浓度。样品中微囊藻毒素质量浓度为 ρ_i (μg/L),按式(1)进行计算:

$$\rho_i = \frac{\rho_{is}}{K} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ_i ——样品中微囊藻毒素的质量浓度,单位为微克每升(μg/L);

ρ_{is} ——由标准曲线得出的测试液中的微囊藻毒素质量浓度,单位为微克每升(μg/L);

K ——浓缩倍数。

注:水源水中溶解态微囊藻毒素的浓度为水样的测定结果,微囊藻毒素总量为水样和膜样测定结果之和。

12.2.3 结果表述

计算结果以微克每升(μg/L)表示,结果保留小数点后 2 位有效数字。

13 精密度与准确度

13.1 精密度

按照本标准直接进样方法对微囊藻毒素加标质量浓度为 1.00 μg/L~10.0 μg/L 的水源水进行重复测定,测定结果相对标准偏差 MC-LR 为 1.50%~14.91%,MC-YR 为 2.55%~9.75%,MC-RR 为 0.52%~6.22%,MC-LA 为 1.43%~11.36%,MC-LF 为 1.68%~7.91%,MC-LY 为 0.82%~6.58%。

按照本标准固相萃取法对加标质量浓度为 25.0 ng/L~100 ng/L 的水源水进行重复测定,测定结果相对标准偏差 MC-LR 为 1.20%~10.56%,MC-YR 为 1.40%~5.28%,MC-RR 为 0.51%~3.41%,MC-LA 为 0.58%~5.72%,MC-LF 为 0.45%~6.46%,MC-LY 为 0.65%~5.88%。

13.2 准确度

按照本标准直接进样方法对微囊藻毒素加标质量浓度为 1.00 μg/L~10.0 μg/L 的水源水进行重复测定,平均回收率 MC-LR 为 96.28%,MC-YR 为 100.14%,MC-RR 为 93.66%,MC-LA 为 94.49%,MC-LF 为 87.29%,MC-LY 为 95.25%。

按照本标准固相萃取法对加标质量浓度为 25.0 ng/L~100 ng/L 的水源水进行重复测定,平均回收率 MC-LR 为 105.00%,MC-YR 为 99.58%,MC-RR 为 65.04%,MC-LA 为 101.81%,MC-LF 为 81.96%,MC-LY 为 91.21%。

具体精密度和准确度参见附录 B。

14 质量保证与质量控制

14.1 空白试验

每 20 个样品或每批次(每批少于 20 个样品)样品应至少做一个纯水或试剂空白,空白样品中目标化合物的浓度应低于方法的检出限。

14.2 平行试验

对同一样品在相同条件下平行做两份试验,检验单项测定结果对平均值的偏离程度,反映批内测定结果的精密度,控制测定过程的稳定性,采用相对偏差表示。

每 20 个样品或每批次(每批少于 20 个样品)样品应进行不小于 10% 的平行试验。当样品测定结果不小于 $1\text{ }\mu\text{g/L}$ 时,平行双样测定相对偏差不得超过 20%;当样品测定结果小于 $1\text{ }\mu\text{g/L}$ 时,平行试验相对偏差不得超过 30%。

14.3 质控样品

测定已知浓度的质控样品,分析质控样测定结果与真值之间的差异,以确认标准曲线的准确性,检验测定结果的准确度,采用相对误差表示。

每批次样品测定时,至少同时测定一个质控样品。质控样的配制浓度应在标准曲线的中间值附近,质控样测定结果与配制浓度相对误差应在允许的范围内。

15 试验报告

试验报告至少应给出样品性状、所使用的标准、所使用的方法、结果、观察到的异常现象及试验日期。

附录 A
(资料性附录)

6 种微囊藻毒素的色谱图、特征离子图

6 种微囊藻毒素的色谱图、特征离子图见图 A.1~图 A.3。

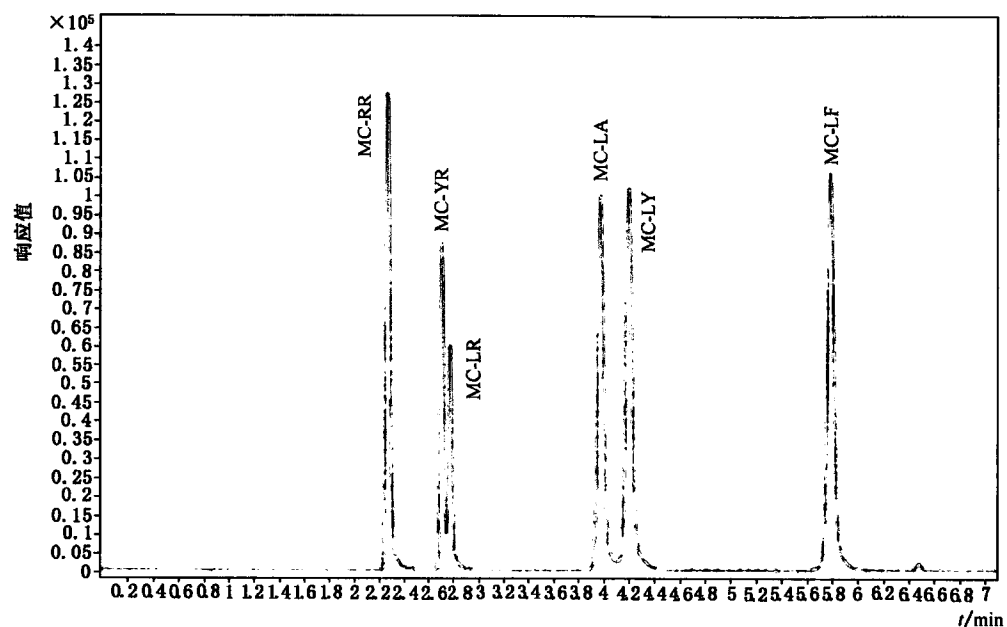


图 A.1 微囊藻毒素标准色谱图(MC-RR 质量浓度 5 $\mu\text{g/L}$, 其他物质 50 $\mu\text{g/L}$)

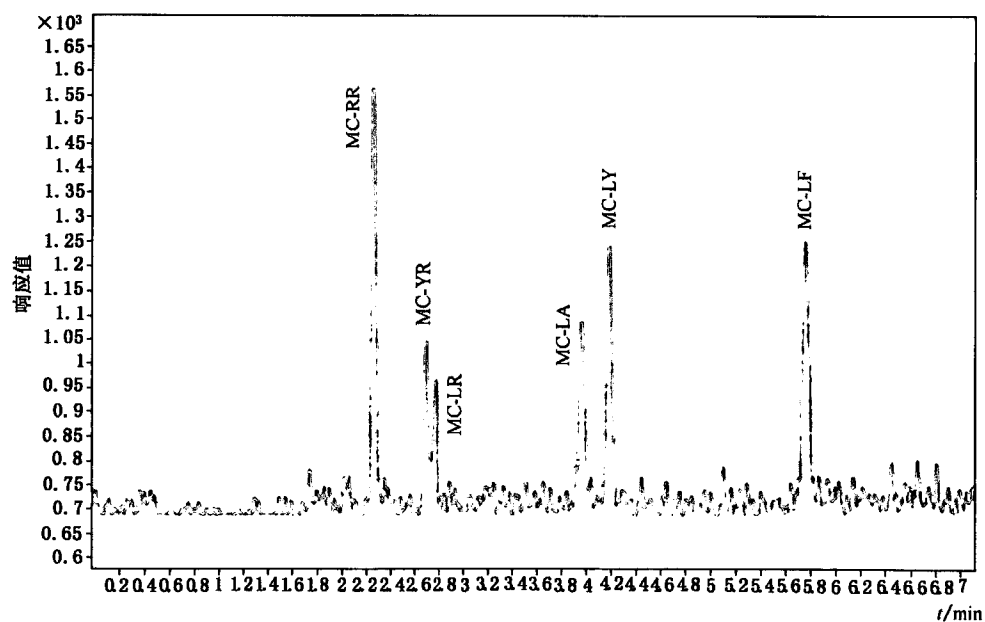


图 A.2 水源水的微囊藻毒素色谱图(加标质量浓度 MC-RR 0.05 $\mu\text{g/L}$, 其他物质 0.5 $\mu\text{g/L}$)

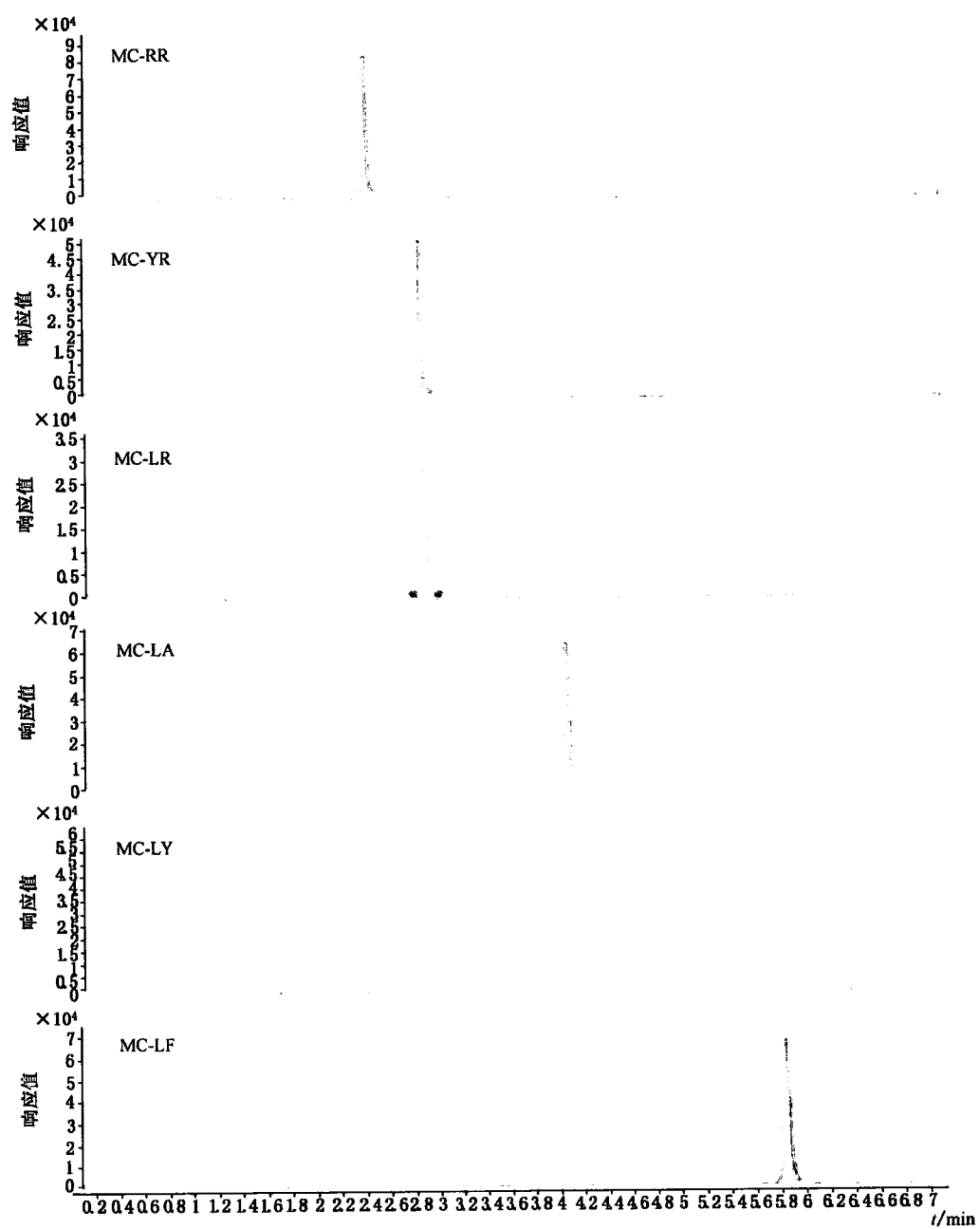


图 A.3 微囊藻毒素的特征离子图

附 录 B
(资料性附录)
方法的性能

表 B.1 和表 B.2 给出了采用直接进样法、固相萃取富集法测定水源水中 6 种微囊藻毒素的精密度和准确度的参考值。

表 B.3 给出了直接进样法、固相萃取富集法测定水源水中 6 种微囊藻毒素的方法检出限。

表 B.1 直接进样法的精密度和准确度

物质	加标质量浓度 1.00 $\mu\text{g/L}$		加标质量浓度 5.00 $\mu\text{g/L}$		加标质量浓度 10.0 $\mu\text{g/L}$	
	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
MC-LR	94.45~111.13	4.99~12.49	80.74~101.33	1.48~5.90	80.74~112.15	2.07~13.75
MC-YR	89.20~122.67	3.75~9.88	93.17~104.27	3.19~7.17	91.76~106.00	2.60~15.76
MC-RR	84.26~110.50	0.98~4.56	76.01~102.11	1.90~5.95	77.69~106.67	0.71~6.98
MC-LA	84.73~109.83	2.43~8.41	87.31~98.70	1.91~5.55	82.18~106.00	2.35~12.10
MC-LF	84.73~118.83	2.37~6.49	73.77~95.08	2.31~5.23	71.63~98.32	3.01~11.89
MC-LY	83.12~111.17	4.08~9.79	84.13~102.57	2.01~4.96	74.07~103.50	1.96~10.51

表 B.2 固相萃取富集法的精密度和准确度

物质	加标质量浓度 25.0 ng/L		加标质量浓度 50.0 ng/L		加标质量浓度 100 ng/L	
	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
MC-LR	75.10~117.63	2.36~10.56	84.33~113.80	1.80~6.78	88.90~105.70	1.20~8.57
MC-YR	90.20~107.85	2.66~5.28	93.53~123.20	1.40~4.59	92.28~113.00	1.70~4.65
MC-RR	55.60~83.75	1.44~2.97	65.31~72.33	1.40~3.82	66.12~74.41	1.40~5.84
MC-LA	76.97~125.62	1.41~4.40	95.50~109.60	1.00~3.62	74.64~100.48	1.00~5.05
MC-LF	70.89~97.51	2.11~7.94	85.20~98.49	1.10~3.77	75.56~108.00	1.10~4.20
MC-LY	73.13~104.47	2.10~3.44	77.20~110.40	1.30~4.56	75.80~90.88	1.30~5.20

表 B.3 水源水中 6 种微囊藻毒素测定方法检出限

物质	检出限/ $\mu\text{g/L}$	
	直接进样法	固相萃取富集法
MC-LR	0.20	0.004
MC-YR	0.15	0.006
MC-RR	0.050	0.004
MC-LA	0.20	0.003
MC-LF	0.15	0.003

表 B.3 (续)

物质	检出限/ $\mu\text{g/L}$	
	直接进样法	固相萃取富集法
MC-LY	0.20	0.003
注：直接进样法检出限以进样量为 20.0 μL 计。固相萃取富集法检出限以水样体积 1 000 mL、富集浓缩 1 000 倍、进样量 20.0 μL 计。		

上海市地方标准
水源水中微囊藻毒素测定
液相色谱-串联质谱法

DB31/T 1178—2019

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

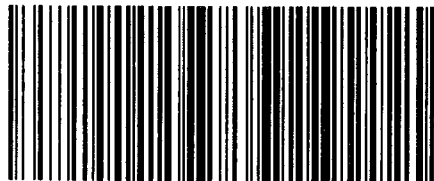
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字
2019年10月第一版 2019年10月第一次印刷

*

书号: 155066·5-1263 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



DB31/T 1178-2019