

固相萃取-LC-MS 定性分析微生物呼吸醌方法的建立*

高孟春¹⁾ 杨敏^{1**} 邵兵²⁾ 李红岩¹⁾ 胡建英²⁾

(1 中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京, 100085;

2 北京大学环境学院, 北京, 100871)

摘要 以 UQ-6, UQ-10 和 Vitamin K₁ 作为研究对象, 建立了固相萃取 LC-MS 定性分析微生物呼吸甲基萘醌 (MK-*n*(H_x)) 和泛醌 (UQ-*n*(H_x)) 的方法, 并用此法定性分析了厌氧活性污泥中的微生物呼吸醌。该方法具有选择性强、灵敏度高的优点, 是一种非常有效的微生物种群分析方法。

关键词 甲基萘醌, 泛醌, 固相萃取, LC-MS.

随着微生物化学分类法的发展和人们对微生物呼吸醌认识的不断深入^[1-3], 微生物呼吸醌逐渐被应用到了污水处理系统的微生物化学分类中, 成为一种非常有吸引力的分析微生物种群结构的方法。目前, 环境样品中的微生物呼吸醌主要采用 LC-UV 法测定, 但是由于环境杂质的干扰以及标准样品种类的有限性, 大大地限制了呼吸醌的测定, 因此, 需要建立一种灵敏度高、选择性好、分离效果佳、具有特异性的微生物呼吸醌的分析方法。

本文建立了固相萃取-LC-MS 定性分析微生物呼吸醌的方法, 并用此方法分析了厌氧活性污泥中的甲基萘醌 (MK-*n*(H_x)) 和泛醌 (UQ-*n*(H_x))。

1 实验部分

1.1 实验方法

标准样品 UQ-6, UQ-10 及 Vitamin K₁ 均购自美国 Sigma 化学公司。

取约 0.2g 样品 (干重) 在冷冻离心机中离心, 去掉水层, 再加入 10ml 超纯水和 20ml 三氯甲烷-甲醇的混合液 (2:1, V/V), 振荡后离心。离心管内的液体分成三层, 去掉上面水层, 用 Whatman No. 2 滤纸过滤, 滤液收集到棕色瓶 A。滤饼和滤纸放入棕色瓶 B 中, 加入 30ml 三氯甲烷-甲醇混合液, 振荡过滤, 重复 3 次, 滤液都收集到瓶 A。用真空旋转蒸发仪把瓶 A 的滤液蒸发到几乎干燥, 加入 10ml 超纯水, 用 20ml 己烷提取两次, 提取液放入棕色瓶 C。将棕色瓶 C 的提取液通过己烷活化 Sep-Pak Plus 硅胶萃取柱 (内径 10mm, 长 20mm, 硅胶量 600mg, 粒径 55-105μm, 美国 Waters 公司), 上样速度约为 5ml·min⁻¹, 然后分别用 20ml 2% 和 10% 的乙醚己烷溶液洗脱硅胶柱中的甲基萘

2003 年 11 月 25 日收稿。

*国家自然科学基金联合资助基金 (50238050), 中国科学院知识创新项目 (KZCX1-SW-12-02)。**通讯联系人。

醌和泛醌，洗脱液在温和的氮气流下吹干，用丙酮定容^[4]。

1.2 LC-MS 分析

Waters 2690 液相色谱仪：采用 C18 预柱（内径 4.6mm，长 20mm，美国安捷伦公司）和 Zorbax-ODS 分离柱（内径 4.6mm，长 250mm，美国安捷伦公司），甲醇-异丙醚（83/17，V/V）为流动相，流速为 $0.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ，进样 $20 \mu\text{l}$ ，柱温 30°C 。

Micromass ZMD 质谱仪 MS 条件通过流动注射进化优化，大气压化学电离源（APCI）；扫描范围 200—1000（m/z）。

2 结果与讨论

2.1 大气压化学电离源电离模式的选择

图 1 分别是醌标准混合液（UQ-6，UQ-10 和 Vitamin K₁ 的浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ，进样量 $20 \mu\text{l}$ ）在正离子模式（PI）和负离子模式（NI）下的选择离子色谱图。从图 1 可见，三种物质在正负离子模式下都能电离，但比较各自响应强度发现：负离子模式的灵敏度明显地高于正离子模式。

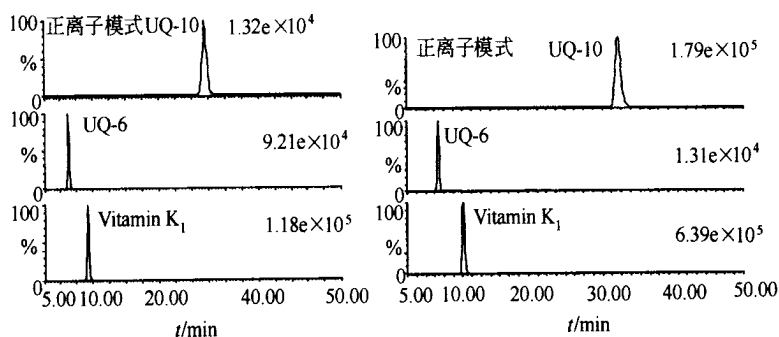


图 1 UQ-6, UQ-10 和 Vitamin K₁ 混合液的选择离子色谱

Fig. 1 Selective ion chromatography of mixed liquid (UQ-6, UQ-10 and Vitamin K₁)

2.2 NF-APCI 质谱条件的确定

将浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的 UQ-6，UQ-10 和 Vitamin K₁ 的单标直接注入质谱仪中，分别考察了脱溶剂气流量、脱溶剂温度、锥孔气流量、毛细管电压、锥孔电压、源温度等参数对灵敏度的影响（图 2）。

从图 2 可以看出，脱溶剂气流量从 $200 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 变化到 $400 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 的过程中，UQ-6，UQ-10 和 Vitamin K₁ 的峰面积是逐渐增加的，即在一定的脱溶剂气流量范围内，检测灵敏度随着脱溶剂气流量的增加而逐渐提高。但是当脱溶剂气流量增加到 $400 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 以后，峰面积变化程度不大。考虑到脱溶剂气流量太高会导致氮气的过度浪费以及本研究中流动相的流速比较大的原因，本实验选择脱溶剂气流量为 $400 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

同样地，毛细管电压从 2kV 变化到 3.5kV 的过程中，UQ-6，UQ-10 和 Vitamin K₁ 的峰面积是逐渐增加的，即在一定的毛细管电压范围内，检测灵敏度随着毛细管电压的增加在逐渐提高，但是毛细管电压增加到 3.5kV 以后，峰面积逐渐减少，说明检测灵敏度

在逐渐降低, 故本实验选择毛细管电压为 3.5kV.

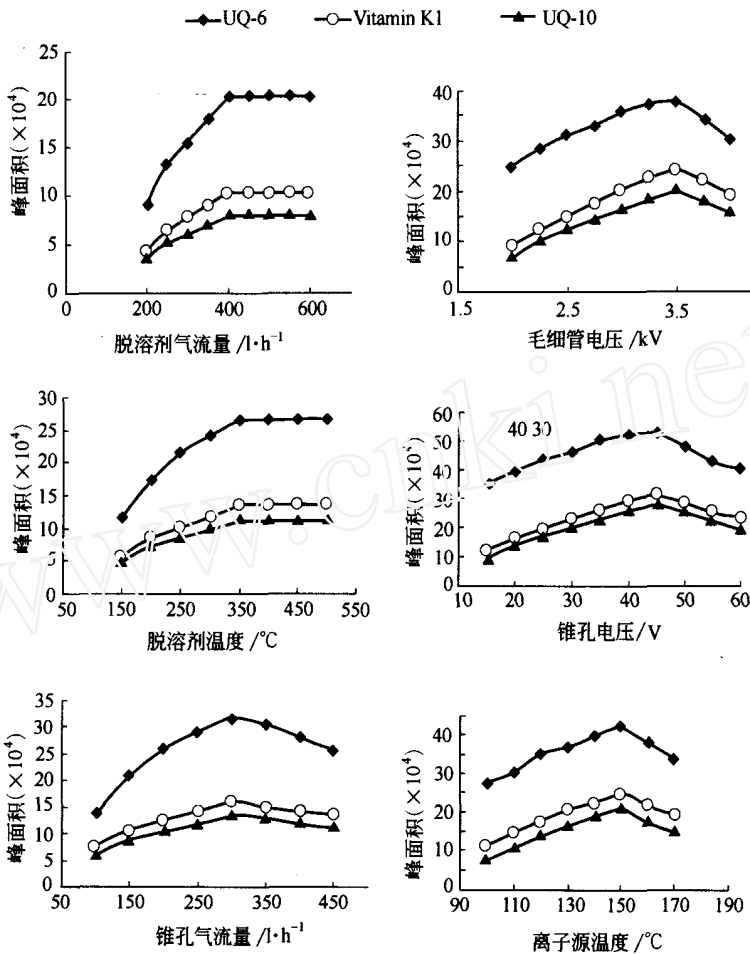


图2 脱溶剂气流量、毛细管电压、脱溶剂温度、锥孔电压、锥孔气流量及离子源温度对灵敏度的影响

Fig. 2 Effect of desolvation gas flow, capillary voltage, desolvation temperature, cone voltage, cone gas flow and source block temperature on sensitivity

按照上面方法的分析, 可以得到其它 NFAPCI 的质谱条件: 锥孔电压: 45V; 离子源温度: 150 ; 脱溶剂温度: 350 ; 锥孔气流量: 300L h⁻¹.

2.3 质谱分析

实验中发现, 锥孔电压对质谱的影响比较大, 通过改变锥孔电压, 分别对 UQ-6 及 Vitamin K₁ 的质谱信息进行了研究.

图 3 是 UQ-6 在锥孔电压 45V 和 80V 条件下的 NFAPCI 质谱图. 从图 3 可以看出, 最大丰度离子是荷质比 (m/z) 为 590.4 的分子离子峰 $[M]^{-0}$, 没有发现任何碎片离子. 当电压加至 80V, 观察到 m/z 为 590.4 的分子离子峰 $[M]^{-0}$, m/z 为 575.4 的基峰离子 $[M-CH_3]^{-0}$ 和 m/z 为 560.4 的碎片离子 $[M-CH_2O]^{-0}$.

同样地, 甲基萘醌 Vitamin K₁ 在锥孔电压为 45V 时, 也只获得了 m/z 为 590.4 的分

子离子峰 $[M]^{-0}$ ，而没有获得任何碎片离子信息。当锥孔电压加至 80 伏时，从图 4 可以发现，除了分子离子峰外，还有 m/z 为 210.5 和 m/z 为 225.5 的碎片离子。锥孔电压加至 100V，碎片离子的丰度开始逐渐增强， m/z 为 210.5 的碎片离子峰成为基峰。

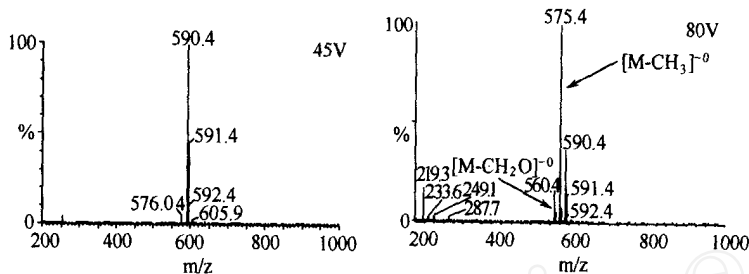


图 3 UQ-6 在不同锥孔电压条件下的 NF-PACFMS 质谱图

Fig. 3 NF-PACFMS mass spectra of UQ-6 at different cone voltage

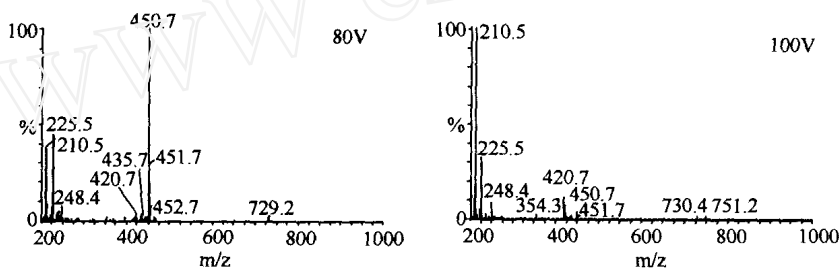


图 4 Vitamin K₁ 在不同锥孔电压条件下的 NF-PACFMS 质谱图

Fig. 4 NF-PACFMS mass spectra of Vitamin K₁ at different cone voltage

2.4 回收率、精密度和方法检测限

通过标准添加实验 (0.5mg 添加)，对 UQ-6，UQ-10 和 Vitamin K₁ 在环境样品中的平均回收率、多次测定的标准偏差及方法检测限进行了研究。从表 1 可知，该方法的灵敏度明显地高于 frit-FAB-LC-MS 法^[5]。尽管存在环境基质的干扰，多次加标实验的相对标准偏差 (RSDs) 为 6—12%。对同一样品在 5d 内进行重复测定，结果表明，每次分析结果之间的相对标准偏差小于 12%。

表 1 UQ-6、UQ-10 和 Vitamin K₁ 的平均回收率、精密度和方法检测限^{*}

Table 1 Average recovery, precision and method detection limits of UQ-6, UQ-10 and Vitamin K₁

	回收率/ %	标准偏差/ ± %	方法检测限/ $\mu\text{g g}^{-1}$
UQ-6	93	12	0.40
UQ-10	95	6	5.00
Vitamin K ₁	98	10	0.12

* 质谱条件：毛细管电压 3.5kV；锥孔电压 45V；离子源温度 150；脱溶剂温度 350；脱溶剂气流量 400 L h⁻¹；锥孔气流量 300L h⁻¹。

2.5 环境样品分析

图 5 为北京市高碑店污水处理厂消化池污泥中呼吸醌的 LC-NFAPCFMS 色谱图 (进样量为 20 μ l)。根据上面建立的分析方法,对色谱中出现的峰,分别通过分子离子、碎片离子进行确认,其中泛醌有 5 种,分别为 UQ-6, UQ-7, UQ-8, UQ-9 和 UQ-10。甲基萘醌有 11 种,分别为 MK-6, MK-7, MK-8, MK-9, MK-10, MK-7(H₂), MK-8(H₂), MK-9(H₂), MK-10(H₂), MK-8(H₄) 和 MK-9(H₄)。分析结果表明,与 LC-UV 分析法相比,LC-NFAPCFMS 不仅使甲基萘醌和泛醌很好地分离,而且能够分析出 UQ-6, MK-10(H₂) 等微量醌,这说明了该方法具有灵敏度高和选择性强的特点。

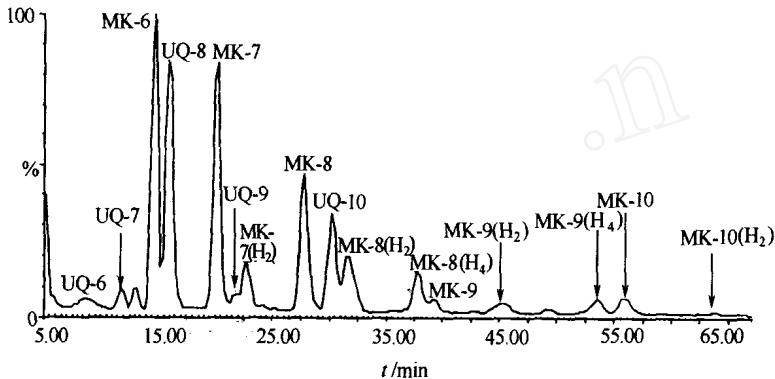


图 5 活性污泥提取物的 LC-NFAPCFMS 色谱图

Fig. 5 LC-NFAPCFMS chromatography of activated sludge

3 结论

利用异丙醚和甲醇作为流动相 (17/83), Zorbax-ODS 分离柱作为分析柱的 LC-NFAPCFMS 方法,分析环境样品中的甲基萘醌和泛醌可以获得较好的分离效果,并且分析结果重复性好、灵敏度高、具有非常好的可信度。该方法通过质谱中的分子离子、碎片离子以及各自相应的 UV 特征色谱确定样品中的甲基萘醌和泛醌,既解决了高效液相色谱易受环境干扰物质影响的问题,也克服了 frit-FAB-LC-MS 法灵敏度低的缺陷。

参 考 文 献

- [1] Hiraishi A, Application of Chemotaxonomic and Molecular Genetic Methods for In-Situ Identification of Microbial Populations in the Environment. *Proc. Adv. Tech. Conf.*, 1990, 3: 21—28
- [2] Bousfield J, Smith GL, Dandot R et al., Numerical Analysis of Total Acid Profiles in the Identification of Coryneform, Nocadioform and Some Other Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1983, 129: 375—394
- [3] Collins MD, Jones D, Distribution of Isoprenoid Quinone Structural Types and Their Taxonomic Implications. *Microbiol. Rev.*, 1981, 45: 316—364
- [4] H Y Hu, Fujie K, Urano K, Development of a Novel Solid Phase Extraction Method for the Analysis of Bacterial Quinones in Activated Sludge with a Higher Reliability. *J. Biosci. Bioeng.*, 1999, 87 (3): 378—382
- [5] Nishijima M, Araki-Sakai M, Sano H, Identification of Isoprenoid Quinones by Frit-FAB Liquid Chromatography-mass Spectrometry for the Chemotaxonomy of Microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 1997, 28: 113—122

ESTABLISHMENT OF QUALITATIVELY ANALYTICAL METHOD ON MICROBIAL RESPIRATORY QUINONE USING SOLID PHASE EXTRACTION-LC-MS

GAO Meng-chun¹⁾ YANG Min¹⁾ SHAO Bing²⁾ LI Hong-yan¹⁾ HU Jian-ying²⁾

(1 State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085; 2 College of Environmental Science, Peking University, Beijing, 100871)

ABSTRACT

In this study, by optimizing and analyzing the conditions of mass spectrum, a sensitive qualitative analytical method has been developed for identification of ubiquinone (UQ- n (H_x)) and menaquinone (MK- n (H_x)) by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry in negative mode (LC-NFAPCFMS) using standard samples UQ-6, UQ-10 and Vitamin K₁. By analyzing the respiratory quinones of anaerobic activated sludge, it was validated that solid phase extraction-LC-NFAPCFMS has a very high sensitivity and selectivity on analyzing environmental sample.

Key words: menaquinone, ubiquinone, solid phase extraction, LC-MS.