

# 飲用水中微囊藻毒素化學檢測方法

## —固相萃取與高效液相層析/串聯式質譜儀法

中華民國 98 年 11 月 16 日環署檢字第 0980104441 號公告

自中華民國 99 年 2 月 15 日起實施

NIEA W539.50B

### 一、方法概要

本方法使用高效液相層析串聯式質譜儀 (HPLC/MS-MS) 檢測飲用水中的兩種微囊藻毒素 (Microcystins, 簡稱 MCs) MC-LR 及 MC-RR 予以定量。水樣調整 pH 至約 10.5, 經固相管柱萃取後, 收集沖提液, 以氮氣濃縮過濾後, 以 HPLC/MS-MS 分析。

### 二、適用範圍

- (一) 本方法適用於飲用水、淨水廠淨化後出水或清水等水樣中微囊藻毒素之檢測。(單一實驗室所測得 MDL: MC-LR 為 0.009 µg/L; MC-RR 為 0.004 µg/L。)
- (二) 本方法所使用之 HPLC/MS-MS 宜由具高效液相層析串聯式質譜儀分析經驗之人員, 或經由訓練通過認定者擔任。
- (三) 本方法係依效能為基準 (Performance-based), 可依使用的固相萃取管柱、前處理程序、高效液相層析儀、LC 層析管柱及串聯式質譜儀廠牌的不同, 分析人員可適當修改本方法之樣品前處理程序, 惟修改後之方法其執行檢測之所有步驟及程序, 應符合本方法所述品質管制規範。

### 三、干擾

- (一) 本方法的干擾可能來自於溶劑、試劑、玻璃器皿及樣品處理過程中所使用的硬體設備之污染, 干擾物質會導致層析圖基線之上移, 須執行空白樣品的測試, 以證明無干擾情形。
- (二) 所有使用之實驗器皿(包含玻璃器皿和塑膠器皿)必須謹慎清洗。實驗器皿應先用甲醇潤洗, 再以去離子水沖洗, 存放於乾淨之環境自然風乾。
- (三) 干擾物質可能是樣品中之其他物質, 基質干擾的程度隨樣品之

來源而不同。由於本方法所使用之偵測系統具選擇性，因此本方法所探討之基質中並無觀察到干擾物，如果有干擾發生，可用適當的 SPE 淨化去除。

- (四) 儀器必須將 MS-MS 的條件調整至最佳化，以達到要求的解析度及質量的準確度。在 HPLC/MS-MS 中如層析管柱材質、管柱的長度、內徑、層析的流速、移動相及添加劑的選擇，都足以影響分析效果及儀器感度。而電灑法又跟待測物、溶劑及流速的關係密切，所以需考量液體本身的電導係數及介電常數，以減少離子抑制的情況，以達到 MS-MS 分析效率的最佳化。

#### 四、設備

- (一) 採樣瓶：1 L，玻璃、PP 或 HDPE 採樣瓶，並附螺旋瓶蓋。使用前需先清洗並乾燥。
- (二) 定量瓶：棕色硼矽玻璃材質，10 mL 和 25 mL。
- (三) KD 管：硼矽玻璃材質，容量 15 mL，可定容 2.0 mL。
- (四) 分析天平：可精秤至 0.1 mg。
- (五) 天平：可精秤至 0.01 g。
- (六) 酸鹼度計：能測量 pH 值至 0.1 單位。
- (七) 純水裝置：Millipore 公司之 Milli-Q 型純水系統；或同級品。
- (八) 高效液相層析串聯式質譜儀 (HPLC/MS-MS) 裝置
  1. 高效液相層析儀：HPLC (Agilent 1100； 1200 型)；或同級品。
  2. 串聯式質譜儀：串聯式質譜儀 (ABI API 2000； API 3000 MS-MS)；或同級品。
  3. 數據處理系統：ABI 公司 Analyst 1.42 版；或其他能顯示分析物的滯留時間及尖峰面積之定性及定量系統。
- (九) 萃取裝置
  1. 固相萃取管柱：Oasis® HLB Cartridges 200 mg，6 mL；或 Supelco 填充 C18-E 1 g，6 mL；或同級品。

- 2.固相萃取裝置：Waters，SPE 萃取裝置；或同級品。
- 3.蠕動馬達：Gilson Minipuls 3 型；或其他類似之蠕動馬達，可調整流速。
- 4.真空幫浦：可調整真空度，可維持真空壓力至 8-10 mmHg。
- 5.氮氣吹乾裝置(N<sub>2</sub> Evaporator)：可調整加熱溫度和氮氣吹出量。
- 6.過濾膜：0.2 μm 孔徑，13 mm 直徑，Nylon 材質；或同級品。
- 7.過濾膜：0.45 μm 孔徑，47 mm 直徑，Nylon 材質；或同級品。

## 五、試劑

- (一) 試劑水：不含待測物之去離子水，其電阻應大於 18 MΩ-cm。
- (二) 甲醇(Methanol)： HPLC 級或 LC/MS 級；或更高純度。
- (三) 甲酸 (Formic acid)： GR 級；或更高純度。
- (四) 乙酸 (Acetic acid)： GR 級；或更高純度。
- (五) 氰甲烷 (Acetonitrile)： HPLC 級或 LC/MS 級；或更高純度。
- (六) 氨水：33% ，ACS 試藥級。
- (七) 含 0.1% 甲酸的試劑水： HPLC 級或 LC/MS 級。
- (八) 液態氮氣 (N<sub>2</sub>)：純度 99.99% 以上。
- (九) 儲備標準溶液

### 1.標準品購置來源 (註 1)：

- (1) Microcystin- LR ：購自 ZEN-U BIOTECHNOLOGY Co., LTD，純質，1 mg/瓶。
- (2) Microcystin- RR ：購自 ZEN-U BIOTECHNOLOGY Co., LTD，純質，1 mg/瓶。

### 2.儲備標準品溶液配製：

(1) 將 2.0 mL 甲醇加入標準品瓶中完全混合，即為 1 mg/2 mL=500 mg/L。

(2) 取上述溶液 20  $\mu$ L 加 10 mL 甲醇，即為 1 mg/L。

## 六、採樣與保存

(一) 使用乾淨的高密度聚乙烯 (HDPE)、聚丙烯 (PP) 材質容器瓶或棕色玻璃瓶進行水樣採集。

(二) 1L 水樣採集後，為避免分析物被微生物降解，須冷藏於  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  下，並在 14 天內完成萃取，萃取液如置於冷凍櫃中保存，應於一個月內完成儀器分析。

## 七、步驟

(一) 檢量線製備 (建議配製方式及濃度如下，使用者須依儀器廠牌的感度及線性範圍作適當的修正)

1. 檢量線溶液配製：取 1 mg/L 之 MC-LR 及 MC-RR 配製檢量線，檢量線建議濃度範圍為 1~500  $\mu\text{g/L}$ 。

2. 分析至少 5 個不同濃度，可參考由上述所製備的檢量線標準品溶液，最低一點濃度應與方法定量極限 (約為 3 倍方法偵測極限) 之濃度相當。

3. 檢量線的濃度範圍，需搭配使用的儀器偵測極限及感度範圍來決定。

(二) 水樣前處理

水樣中如果含有微粒或是不明混合物時，則需經過 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾；或以高轉速大體積之冷凍離心機 (5000 rpm) 離心去除懸浮微粒。

(三) 固相萃取 (SPE) 步驟：(以下是單一實驗室方法驗證時之操作條件，實驗室得依使用之萃尿管柱不同，適當修正之；建議操作流程圖如圖一所示)

1. 固相萃尿管柱必須經由 5 mL 甲醇流洗兩次後，再以 5 mL 試劑水流洗兩次。

- 2.取 200 mL 水樣放入 250 mL 玻璃血清瓶中，以 10% 氨水調整水樣 pH 值至約 10.5。
- 3.水樣以 6 mL/min 的流速流經固相萃取管柱後，並抽乾固相萃取管柱。
- 4.固相管柱內加入 5 mL 甲醇（含 0.1% 乙酸），重複 2 次，收集合併沖提液於 KD 管。
- 5.沖提液於 60°C 下氮氣 (N<sub>2</sub>) 吹至約 1 mL 後，以甲醇-水(含 0.1% 甲酸；50:50, v/v) 溶解振盪均勻，定容至 2 mL。
- 6.最後經由 0.2 μm 孔徑，Nylon 過濾膜過濾之。
- 7.取適量樣品以高效液相層析串聯式質譜儀分析。

(四) 儀器分析條件 (註 2)：

1. 高效液相層析建議條件：

- (1) 層析管柱：Phenomenex 公司之 Gemini 3μ C18 110 Å (100 × 2.0 mm)；或同級品。
- (2) 移動相 A 組成：水 (含 0.1% 甲酸)。
- (3) 移動相 B 組成：甲醇含 0.1% 甲酸；亦可使用氘甲烷 (ACN)。
- (4) 清洗溶劑：100% 甲醇 (Methanol)。
- (5) 流速：0.25 mL/min。
- (6) 樣品注入量：10 μL。
- (7) 管柱溫度：40°C。
- (8) 分析時間：25 min。
- (9) 層析條件：HPLC 層析條件如下：

步驟	時間(分)	A ( % )	B ( % )
1	0.1	90	10
2	1	90	10
3	6	20	80
4	16	20	80
5	17	90	10
6	25	90	10

2.串聯式質譜儀建議條件：

- (1) Ionization mode: 正離子電灑游離法模式(ESI+)
- (2) Ion Spray Voltage (IS): 5.0 kV
- (3) Curtain Gas (CUR): 10 psi
- (4) Gas1 (GS1): 60 psi
- (5) Gas2 (GS2): 50 psi
- (6) Temperature (TEM): 420°C
- (7) Interface Heater: ON
- (8) Collisionally Activated Dissociation (CAD): 4
- (9) MRM 離子對及其質譜參數如表一及表二（註3）所示

(五) 鑑定與分析（母子離子對層析圖如圖二所示）：

- 1.使用液相層析串聯質譜系統之多重反應監測模式(Multiple Reaction Monitoring mode, MRM)時，對每一種化合物監測其母離子/子離子之離子對兩對，以其中感度較高的母子離子對作為定量，另一母子離子對則作為定性的依據。MC-LR的分子量為994.548，其【M+H】<sup>+</sup>為996，MC-RR的分子量為1037.565，其【M+2H】<sup>+2</sup>為520，而其結構代表性的子離子分別為

135=PhCH<sub>2</sub>CH(OMe)<sup>+</sup>及213=[Glu-Mdha+H]<sup>+</sup>。

## 2.初步篩選與定量準則：

- (1)待測物之滯留時間須落在當天檢量線標準品平均滯留時間 ± 2.5% 範圍之內。
- (2)以待測物感度較高的監測母子離子對之面積來定量該待測物的含量。
- (3)當樣品中藻毒濃度初步篩選定量結果未超過法規管制標準二分之一時，即可出具報告；若超過法規管制標準二分之一時，須完整進行下節確認動作。

## 3.定性與定量準則：

- (1)待測物之兩監測母子離子對須同時出現，且兩母子離子對的訊噪比 (S/N) 必須大於 3。
- (2)待測物之滯留時間須落在當天檢量線標準品 (各點平均) 或標準添加樣品之標準品之滯留時間 ±2.5% 範圍之內。
- (3)以待測物感度較高的監測母子離子對之面積來定量該待測物的含量。
- (4)待測物之兩監測母子離子對 (積分面積或高度) 的相對比率 (Ion Ratio) 須落在可接受的離子比例範圍之內 (母子離子對比值的最大相對誤差表，如表三所示。)，其相對比率須以當天檢量線中點或標準添加樣品的母子離子對的比例為基準計算之。
- (5)當樣品待測物濃度超過檢量線時，應以甲醇稀釋後，重新上機分析。

## 八、結果處理

### (一) 線性回歸校正法

$$C (\mu\text{g} / \text{L}) = \frac{(C_a \times V_f)}{V_i}$$

$C$  = 水樣濃度， $\mu\text{g/L}$

$C_a$  = 由檢量線所求得之樣品濃度， $\mu\text{g/L}$

$V_f$  = 水樣濃縮後(沖提液)的體積， $\text{mL}$

$V_i$  = 水樣的體積， $\text{mL}$

(二) 報告濃度單位為  $\mu\text{g/L}$ 。樣品濃度  $1\mu\text{g/L}$  (含) 以上取 3 位有效位數；樣品濃度  $1\mu\text{g/L}$  以下，則取 2 位有效位數。

## 九、品質管制

- (一) 依本方法執行藻毒檢測之實驗室，必須有完整之品保品管程序，包括空白樣品分析、查核樣品分析、添加樣品分析及重複樣品分析等實驗室能力建立資料，據以持續評估實驗室之效能，以期執行樣品分析時能確實符合各項品管指標之規範。
- (二) 每批次分析樣品前，須確認試劑及儀器並無污染情形。
- (三) 檢量線應每日製作，檢量線以線性回歸校正法，其線性相關係數 ( $R$ ) 應  $\geq 0.995$ ，使用  $1/x$  加權。
- (四) 空白樣品分析：每 20 個樣品或每批次樣品，應執行空白樣品分析，空白樣品分析值應小於方法偵測極限值之 2 倍。
- (五) 查核樣品分析：每 20 個樣品或每批次樣品，應執行查核樣品樣品分析，其回收率應在 70 至 130% 範圍內。
- (六) 添加樣品分析：每 20 個樣品或每批次樣品，應執行基質添加樣品分析，其回收率應在 60 至 130% 範圍內。
- (七) 重複樣品分析：每 20 個或每批樣品至少執行一次重複樣品分析，其相對差異百分比應在 30% 內。

## 十、準確度與精密度

表四及表五為單一實驗室查核樣品與添加樣品分析之準確度與精密度的結果。

## 十一、參考資料



- (一) 潘復華、賴千豐、蕭美琪、莊士群等，飲用水水源及水質中微囊藻毒以 HPLC/MS-MS 之分析技術研究，環境檢驗所調查研究年報，第13號：p.177~192，2006。
- (二) 潘復華、黃壬瑰、蕭美琪、莊士群等，行政院環境保護署環境檢驗所，國內水庫水源水質中微囊藻及其藻毒調查與預警模式之建立 (1/2)，中華民國九十五年三月。
- (三) 潘復華、黃壬瑰、蕭美琪、莊士群等，行政院環境保護署環境檢驗所，國內水庫水源水質中微囊藻及其藻毒調查與預警模式之建立 (2/2)，中華民國九十六年三月。
- (四) 潘復華、黃壬瑰、趙春美、翁英明等，行政院環境保護署環境檢驗所，水源水質中藻類及其毒性調查研究，中華民國九十七年三月。
- (五) European Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food animal origin (2003/18/EC), Off. Eur. Commun. L71 (2003)

註 1：由於微囊藻毒素被視為化學武器，受聯合國管制列為管制物質，目前國內可買到的只有 MC-LR 及 MC-RR 兩種標準品，且無法取得可追溯一級標準品及第二來源標準品。

註 2：本方法建議之前處理條件、儀器最佳化及分析條件是以 HPLC (Agilent 1100 型) 和串聯式質譜儀 (ABI API 2000 HPLC/MS-MS) 所開發完成。

註 3：ABI API 2000 及 API 3000 微囊藻毒之相對應母子離子對離子表及質譜參數，如表一及表二所示。

表一、目標化合物其 MRM 離子對及其質譜參數 (API 2000)

Compound	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Dwell time (msec)	MS/MS parameters (volts)			
					DP	CEP	CE	CXP
MC-LR	16.53	996	135	100	115	38	105	1
			213		115	38	105	1
MC-RR	14.38	520	135	100	25	29	45	2
			213		25	29	45	2

DP : Declustering Potential (volts), EP : Entrance Potential (volts), CE : Collision Energy Potential (volts), CXP : Collision Cell Exit Potential (volts)

表二、目標化合物其 MRM 離子對及其質譜參數 (API 3000)

Compound	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Dwell time (msec)	MS/MS parameters (volts)			
					DP	EP	CE	CXP
MC-LR	16.53	996	135	100	148.8	15	105	7.6
			213		148.8	15	85	11.3
MC-RR	14.38	520	135	100	60	10	43	7.7
			213		24.2	10	39	8.4

DP : Declustering Potential (volts), EP : Entrance Potential (volts), CE : Collision Energy Potential (volts), CXP : Collision Cell Exit Potential (volts)

表三、HPLC/MS-MS 兩母子離子對比率 (Ion Ratio) 的最大相對誤差

相對強度 (% of Base Peak)	兩離子對比率的 最大允許誤差
>50%	±20%
>20% to 50%	±25%
>10% to 20%	±30%
≤10%	±50%

註：本表依據歐盟 2002/657/EC 中 2.3.3.2 節中表 4 訂定。

表四、單一實驗室查核樣品分析之準確度與精密度

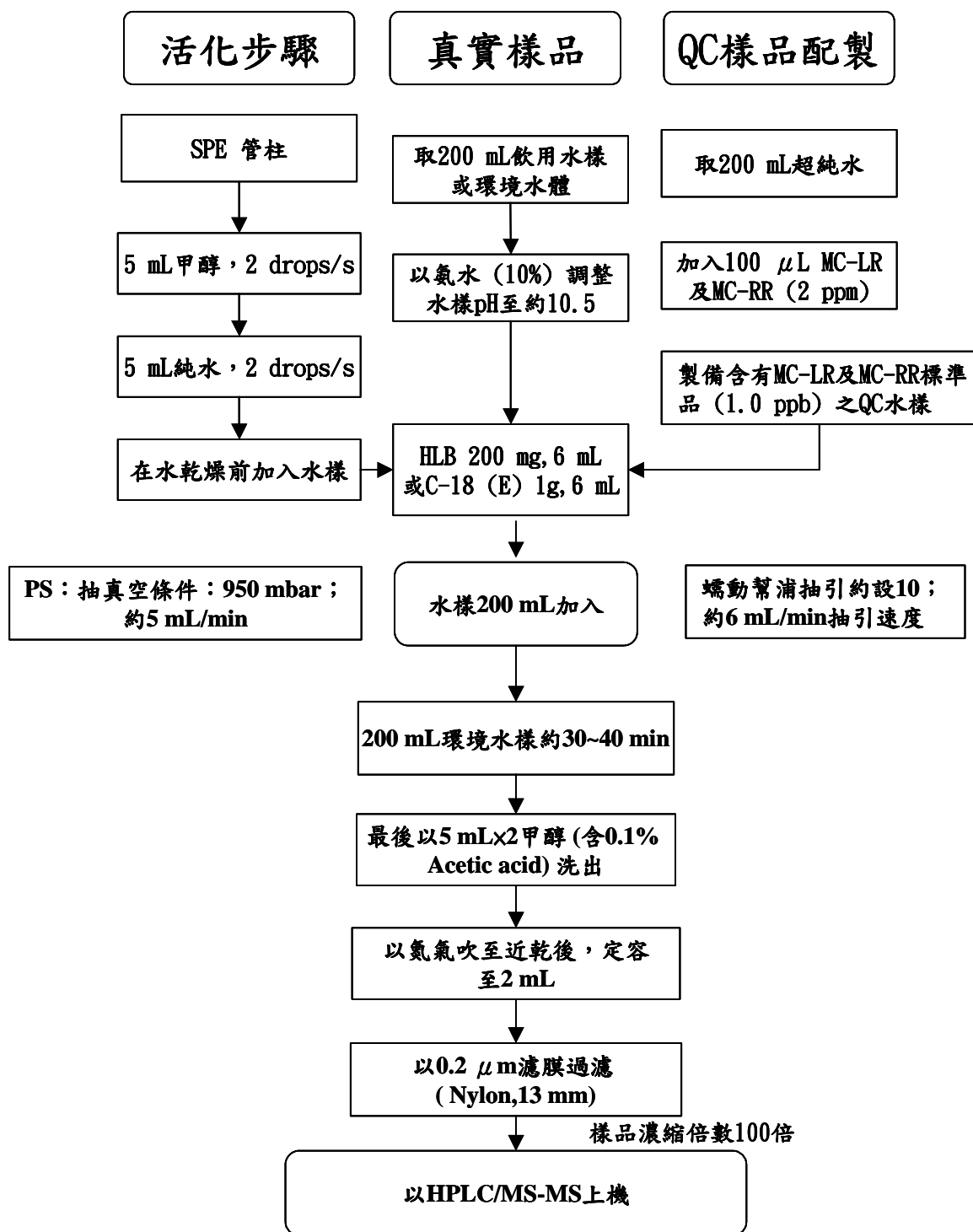
No	分析物	添加濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	標準偏差 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收率± 標準偏差 (%)	分析次數
1	MC-LR	100	92.0	10.9	92.0 ± 10.9	32
2	MC-RR	100	94.0	12.1	94.0 ± 12.1	32

註：單一實驗室所測得 MDL:MC-LR 為 0.009  $\mu\text{g/L}$ ; MC-RR 為 0.004  $\mu\text{g/L}$ 。

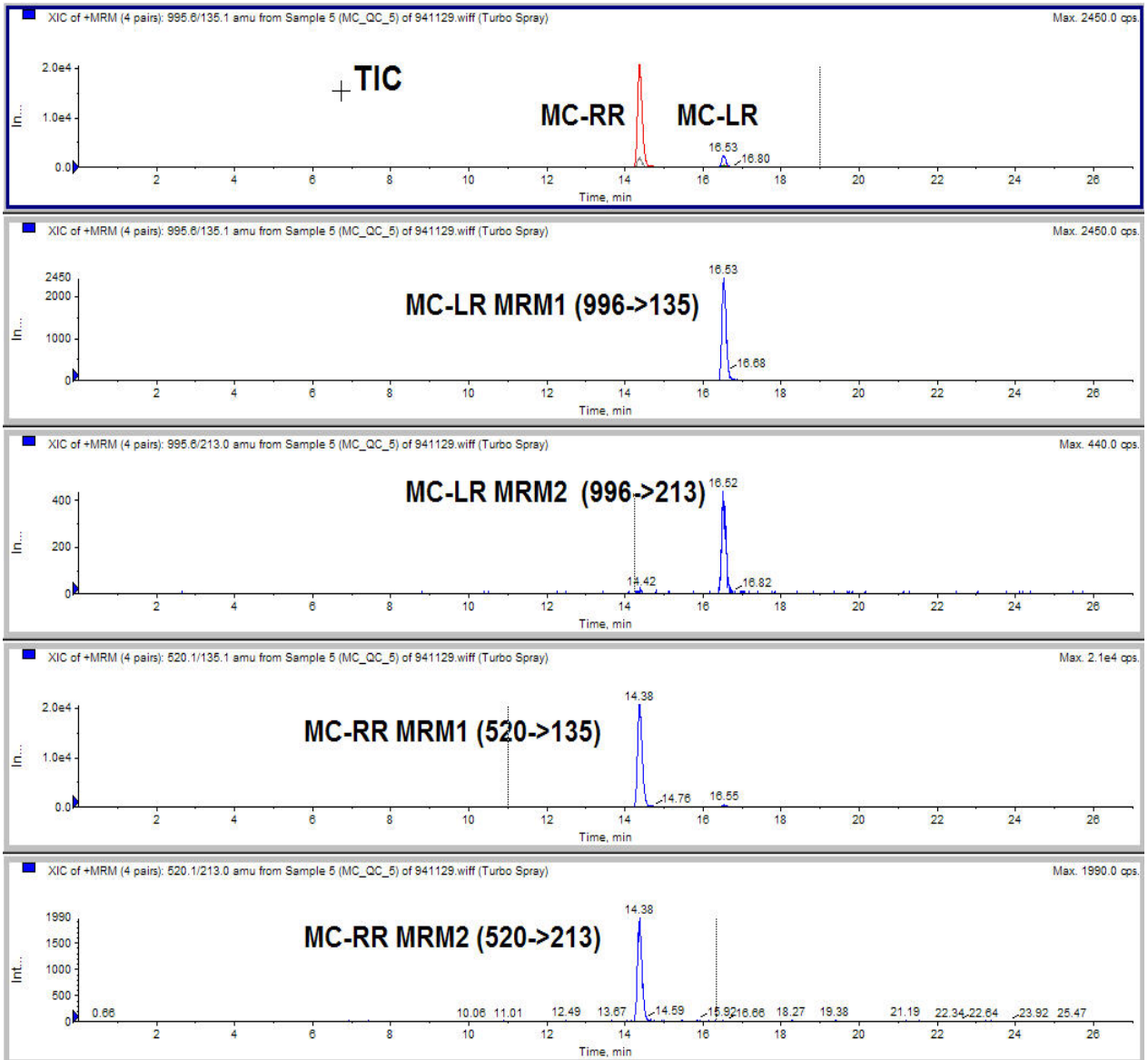
表五、單一實驗室添加樣品分析之準確度與精密度

No	分析物	添加濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	標準偏差 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收率± 標準偏差 (%)	分析次數
1	MC-LR	100	94.5	12.6	94.5 ± 12.6	32
2	MC-RR	100	94.0	12.0	94.0 ± 12.0	32

註：單一實驗室所測得 MDL:MC-LR 為 0.009  $\mu\text{g/L}$ ; MC-RR 為 0.004  $\mu\text{g/L}$ 。



圖一、飲用水中微囊藻毒固相萃取 (SPE) 分析流程圖



圖二、MC-LR 及 MC-RR 母子離子對 (MRM) 層析圖