

SPE 前处理-UHPLC-MS/MS 测定 MBR 中两种 N-酰基高丝氨酸内酯

黄瑾辉^{1,2†}, 胡熠^{1,2}, 顾岩岭^{1,2}, 史亚慧^{1,2}

(1. 湖南大学 环境科学与工程学院, 湖南 长沙 410082;

2. 环境生物与污染控制教育部重点实验室(湖南大学), 湖南 长沙 410082)

摘要: 选用 N-己基高丝氨酸内酯(C6-HSL)和 N-辛基高丝氨酸内酯(C8-HSL)两种酰基高丝氨酸内酯类(AHLs)为代表物, 建立了固相萃取(SPE)-超高效液相色谱串联三重四级杆质谱(UHPLC-MS/MS)分析膜生物反应器(MBR)活性污泥中 AHLs 的方法。研究表明 C6-HSL 和 C8-HSL 在 1~200 $\mu\text{g/L}$ 内有良好的线性关系($R^2 > 0.998$), 方法的检出限为 0.100 $\mu\text{g/L}$, 定量限为 1.000 $\mu\text{g/L}$, 在 3 个浓度水平下的平均加标回收率为 80.69%~83.75%, 相对标准偏差(RSD)为 4.71%~7.25%。方法精确度高、重复性好、基质效应弱, 适用于 MBR 活性污泥中痕量 AHLs 的测定。

关键词: 膜生物反应器; N-酰基高丝氨酸内酯; 固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱
中图分类号: X703 **文献标志码:** A

Quantitative Determination of two N-acylhomoserine Lactones in MBR by SPE Pre-processing-UHPLC-MS/MS

HUANG Jinhui^{1,2†}, HU Yi^{1,2}, GU Yanling^{1,2}, SHI Yahui^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China;

2. Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control(Hunan University),
Ministry of Education, Changsha 410082, China)

Abstract: A method was developed for the determination of AHLs (N-Hexanoyl-DL-homoserine lactone(C6-HSL) and N-Octanoyl-DL-homoserine lactone(C8-HSL) were chosen as the representatives) in activated sludge in MBRs by solid phase extraction(SPE) combined with ultrahigh pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The results showed that C6-HSL and C8-HSL presented good linear relations ($R^2 > 0.998$) in the range of 1~200 $\mu\text{g/L}$. The limit of detection and quantitation were 0.100 $\mu\text{g/L}$ and 1.000 $\mu\text{g/L}$, respectively. The average recoveries of AHLs at three spiked concentrations were in the range of 80.69%~83.75%, and the relative standard deviations(RSD) were 4.71%~7.25%. The developed method is sensitive, stable and has weak matrix effects, which is applicable to determine the trace AHLs in activated sludge in MBRs.

Key words: membrane bioreactor; N-acylhomoserine lactones; solid phase extraction; ultrahigh pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry

* 收稿日期:2018-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51578222), National Natural Science Foundation of China(51578222); 教育部科学研究项目(113049A), Project of Chinese Ministry of Education(113049A)

作者简介: 黄瑾辉(1973—), 女, 湖南邵阳人, 湖南大学教授, 博士生导师

† 通讯联系人, E-mail: huangjinhui_59@163.com

近年来,膜生物反应器(MBR)以其较低的占地面积和剩余污泥产量,以及较高的容积负荷和出水水质,在污水处理方面得到了广泛的应用^[1]。然而膜污染,尤其是生物污染,会极大地提高 MBR 运行的能耗,降低膜组件的使用寿命,成为 MBR 技术进一步推广的瓶颈^[2]。目前,许多研究证明,膜的生物污染受到群体感应(quorum sensing, QS)的调控。QS 是一种基于种群密度的细胞间交流方式,通过自诱导物来调控细菌的种群行为,如产生毒素、生成抗生素、产生孢子、生物发光、形成生物膜等^[3-4]。N-酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactones, AHLs)是革兰氏阴性菌群体感应系统中主要的信号分子,与 MBR 活性污泥中溶解性微生物产物(SMP)、胞外多聚物(EPS)的含量和成分,及生物膜的形成关系密切^[5]。通过降解活性污泥中的 AHLs(即群体感应淬灭)能显著减缓膜污染^[6-7]。因此,有效地监测 MBR 中的 AHLs 对控制膜污染、提高 MBR 的性能有着非常重要的意义。

目前,国内外对 AHLs 样品的前处理方法主要有液-液萃取(LLE)和固相萃取(SPE),SPE 法因其较好的重现性和较高的回收率,开始被应用于低浓度 AHLs 的提取^[8-9]。AHLs 的检测方法有薄层色谱(TLC)^[10-11]、气相色谱串联质谱(GC-MS)^[12-13]、高效液相色谱(HPLC)^[14]和高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS)^[15]等,但以上方法灵敏度低,检测限较高,难以适应 MBR 中基质成分复杂、AHLs 浓度较低的情况。Yu 等^[16]采用 UPLC-MS/MS 成功检测了实验室级 MBR 中 2 种 AHLs,但相关的方法优化、方法学评价和适用范围缺少报道。本研究采用 SPE 提取结合超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱(UHPLC-MS/MS)检测工厂级和实验室级 MBR 中的 AHLs,为进一步研究 MBR 中的群体感应及膜污染提供有效手段。

1 仪器和材料

1) 仪器:1290 液相色谱-G6460 三重四级杆质谱联用仪(美国安捷伦公司);12 位固相萃取装置(美国 Mediwax 公司);24 位负压干式氮吹仪(中国瑞诚仪器有限公司)。

2) 试剂和样品:N-己基高丝氨酸内酯(C6-HSL, ≥97%)和 N-辛基高丝氨酸内酯(C8-HSL, ≥97%) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇、乙腈(HPLC 级)购自德国默克公司;甲酸、甲酸铵(HPLC 级)、盐酸(分析纯)购自美国阿拉丁公司;0.22 μm

聚四氟乙烯(PTFE)滤膜从美国阿拉丁公司购得;固相萃取柱 Mega Bond Elut-C18 柱(500 mg, 6 cc)和 Oasis HLB 柱(500 mg, 6 cc)分别购自美国安捷伦公司和沃特世公司。

2 实验方法

2.1 标准液的配制

准确称取 1 mg 固体 AHL 标准品于 10 mL 棕色容量瓶中,以甲醇(0.1%(体积分数,下同)甲酸)定容,配置成 100 mg/L 标准贮备液,-20 °C 避光保存备用。外标法定量时,用甲醇-水溶液(体积比 1:1, 0.1%甲酸)稀释储备液配置成梯度浓度 AHLs 混标溶液,微滤后待测。

2.2 样品来源

样品取自长沙国祯污水处理厂和一个实验室级 MBR。长沙国祯污水处理厂处理量 140 000 m³/d,采用氧化沟+MBR 工艺,MBR 池污泥质量浓度(MLSS)5 000 mg/L ± 1 000 mg/L, pH 范围 7.0~7.5;实验室级 MBR 采用浸没式 MBR 工艺,处理量 17 L/d,污泥质量浓度 5 000 mg/L ± 1 000 mg/L, pH 范围 7.0~7.5。因 AHLs 分子大小在 100~1 000 Da,可完全透过工厂级和实验室级 2 种 MBR 滤膜(孔径均为 0.2 μm,截留分子量约 200 000 Da),可认为出水中 AHLs 浓度与 MBR 中浓度相同,实验时收集 MBR 池出水进行提取,为避免 AHLs 分解,用 1 mol/L 盐酸调节出水 pH=7±0.2。

2.3 SPE 前处理

从污水处理厂和实验室 MBR 取得的样品用 SPE 法提取浓缩,方法如下:SPE 提取在固相萃取装置上进行,SPE 柱经活化后进样,出水以 2.5 mL/min 的速率通过 SPE 柱。待水样完全通过,依次经过淋洗、洗脱,洗脱液收集于 10 mL 离心管。洗脱液用干式氮吹仪在 35 °C 下蒸发至近干,样品重新溶于 1 mL 甲醇-水溶液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$,0.1%甲酸)中,提取样在 UHPLC-MS/MS 检测之前经 0.22 μm 滤膜微滤。SPE 柱的性状和操作参数见表 1。经过 SPE 前处理,样品中 AHLs 浓缩至 1 000 倍。

2.4 UHPLC-MS/MS 条件

色谱条件:ZORBAX Eclipse Plus C18 柱(2.1×50 mm, 1.8 μm, 美国安捷伦公司);柱温:37 °C;进样量:10 μL;流速:0.2 mL/min;流动相 A:25 nmol/L 甲酸铵(0.1%甲酸),流动相 B:甲醇(0.1%甲酸);等度洗脱, $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{甲酸铵}}=90:10$ 。

质谱条件:电喷雾离子化(ESI);检测方式:多反应监测(MRM)采集模式(见表 2);干燥气(N_2)温度:350 °C,气流速度:10 L/min;雾化气压力:30 psi;毛细管电压:4 000 V.

表 1 反相 SPE 的性状及操作参数

Tab.1 Properties and operating parameters of selected reversed phase SPE

SPE 柱	活性物质	粒径/ μm	孔径/ nm	操作参数		
				活化	淋洗	洗脱
Mega Bond Elut C18	十八烷基硅烷键合硅胶	57	7.8	5 mL 甲醇、5 mL 水	12 mL ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=10:90$)	5 mL 乙腈
Oasis HLB	N-乙炔基吡咯烷酮-二乙炔基苯共聚物	60	6.0	—	5 mL ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=5:95$)	5 mL 甲醇

表 2 MRM 检测及最优 MS/MS 参数

Tab.2 MRM parameters used for AHL analysis

分析物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	离子源	驻留时间/ ms	破碎电压/ V	碰撞能量/ eV	极性
C6-HSL	200.2	98.9	ESI	300	70	8	Positive
		102.1				6	
C8-HSL	228.2	102.1	ESI	300	80	4	Positive
		127.1				5	

3 结果和讨论

3.1 提取方法选择

Mega bond Elut 柱和 Oasis HLB 柱分别被成功应用于提取细菌培养上清液和生物膜中的 AHLs^[9,17]. 实验比较了 2 种 SPE 柱对 MBR 中 AHLs 的提取效果,分别加标 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,平行测定 3 次计算回收率,结果如图 1 所示. Mega bond Elut 柱对 C6-HSL 和 C8-HSL 的回收率范围分别为 80.72%~89.20%和 76.63%~84.21%;Oasis HLB 柱对 C6-HSL 和 C8-HSL 的回收率范围分别为 42.30%~53.17%和 53.47%~66.14%. 在各加标浓度下 Mega Bond Elut 柱对 C6-HSL 和 C8-HSL 的平均回收率均高于 Oasis HLB 柱;计算回收率相对标准偏差(RSD),Mega Bond Elut 柱 RSD 为 4.71%~7.52%,Oasis HLB 柱 RSD 为 10.77%~11.85%. Mega Bond Elut 柱回收率高,重现性好,选用为本实验样品前处理 SPE 柱.

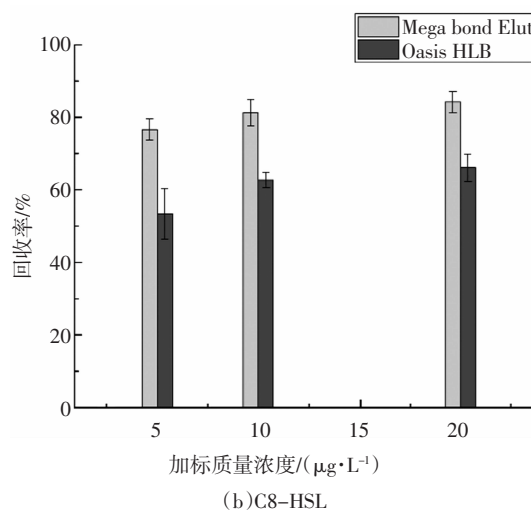
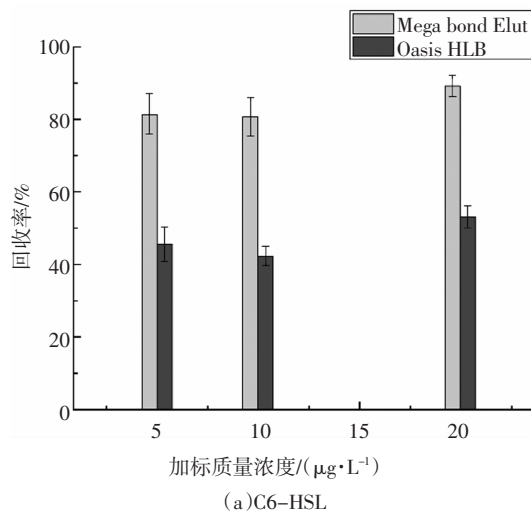


图 1 加标回收率

Fig.1 Recoveries of 2 AHLs

3.2 LC-MS/MS 条件优化

液相色谱优化的主要条件包括液相色谱柱、流动相种类和添加成分. 对比了 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱、TC C18 色谱柱和 wondasil C18 色谱柱对 AHLs 分离的效果. 结果表明,ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱和 wondasil C18 色谱柱对 AHLs 的分离效果较好,ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱的响应值最大. 考察了流动相种类和添加成分对检测的影响,对比了甲醇和乙腈作为有机相的色谱图,结果表明,以甲醇作为有机相时,色谱峰相对平滑,信号强度较高;为改善峰型,以甲酸铵作为水相,确定甲酸铵浓度在 25 mmol/L 时,基线稳定,峰型最佳;在流动相中添加 0.1%甲酸加强待测样品离子化效率,提高响应值.因此,最终确定 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱为本实验所用色谱柱,确定以甲醇(0.1%甲酸)和 25 mmol/L 甲酸铵(0.1%甲酸)作为流

动相。

质谱需要优化的主要参数包括子离子、碎裂电压和碰撞能量。在选择离子监测(MS2 SIM)采集模式下优化碎裂电压,在子离子扫描(Product Ion Scan)采集模式和 MRM 采集模式下确定定量和定性离子

及各子离子的碰撞能量(见表 2)。根据 UHPLC 流速(0.2 mL/min)优化雾化气压力、干燥气流速、温度和毛细管电压,得到最大灵敏度。2 种 AHLs 的 LC-MS/MS 谱图如图 2 所示。

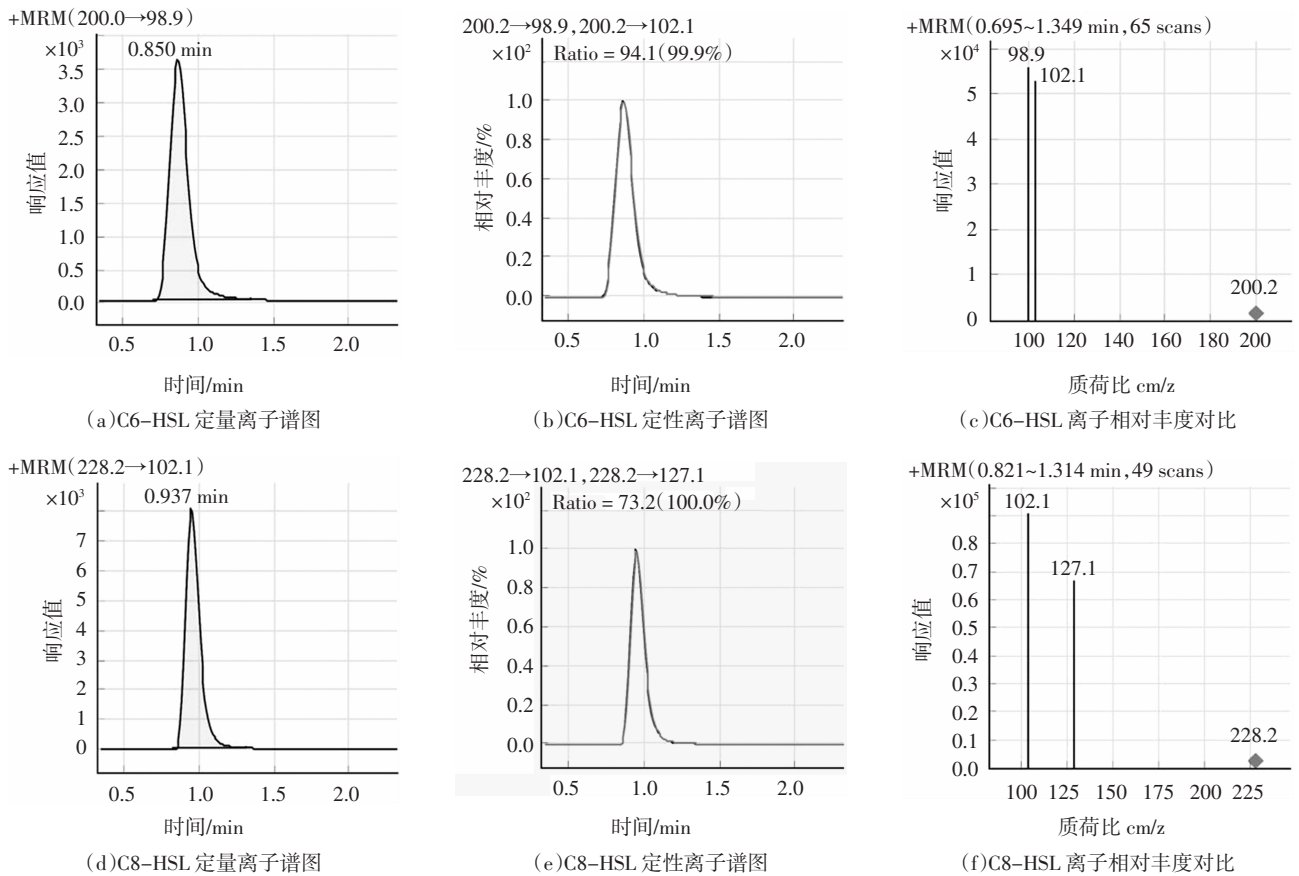


图 2 AHLs(100 µg/L)LC-MS/MS 谱图
Fig.2 LC-MS/MS chromatogram of AHLs(100 µg/L)

3.3 方法学评价

3.3.1 线性关系、检出限及定量限

配制梯度浓度混标溶液,按优化的 UHPLC-MS/MS 条件进样,在 MassHunter 工作站(美国安捷伦公司)上建立标准曲线,确定 2 种 AHLs 的线性范围、线性回归方程和相关系数,结果显示,2 种 AHLs 线性关系良好($R^2 > 0.998$)。根据信噪比(S/N)确定该方法的检出限 LOD(S/N>3)和定量限 LOQ(S/N>10),结果见表 3。

表 3 AHLs 的线性方程、LOD 和 LOQ

Tab.3 Linear equation, LOD and LOQ of AHLs

分析物	线性范围 $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	线性方程	R^2	$\omega_{\text{LOD}}/$ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\omega_{\text{LOQ}}/$ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
C6-HSL	1~200	$y=319.45x+1119.3$	0.998 6	0.100	1.000
C8-HSL	1~200	$y=541.23x+611.43$	0.998 1	0.100	1.000

3.3.2 方法精密度和重复性评估

取 AHLs 标准物按 2.1 节制备供试混合液,按优化的 UHPLC-MS/MS 条件连续进样 6 次,计算各组响应值 RSD (见表 4),C6-HSL 和 C8-HSL 的 RSD 分别为 1.96% 和 0.26%,表明仪器精密度良好;采集样品-4 °C 保存,分别在 0 d、5 d 和 10 d 按 2.3 节提取 AHLs,平行 3 份,测得 C6-HSL 和 C8-HSL 响应值 RSD 分别为 1.55% 和 1.29%,表明该方法重复性良好。

表 4 精密度和重复性测试参数

Tab.4 Parameters obtained within the precision and repeatability test

分析物	精密度测试		重复性测试	
	平均质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	RSD/%	平均质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	RSD/%
C6-HSL	98.12	1.96	140.41	1.55
C8-HSL	98.84	0.26	81.07	1.29

3.3.3 实际样品检测

用优化的分析方法在不同时间从长沙国祯污水处理厂和实验室级 MBR 中各提取 2 个样品进行检测,提取后的 AHLs 浓度均高于方法检出限。检出国祯污水处理厂 MBR 中 C6-HSL 质量浓度为 157.05~193.97 ng/L、C8-HSL 质量浓度为 2.96~5.47 ng/L; 实验室级 MBR 中 C6-HSL 质量浓度为 5.21~269.26 ng/L、C8-HSL 质量浓度为 8.68~29.70 ng/L。表明方法可用于 MBR 活性污泥中 AHLs 的检测。活性污泥中 AHLs 相关微生物群体(如变形菌门和拟杆菌门)的组成,是决定装置中 AHLs 浓度的主要因素^[18]。工厂级和实验室级 MBR 中 AHLs 浓度的差异可能是污泥驯化过程中活性污泥微生物群体的演化造成的。

4 结论

利用固相萃取(SPE)和超高效液相色谱/三重四级杆质谱联用仪(UHPLC-MS/MS),采用外标法定量测定 MBR 活性污泥中 2 种 AHLs。选定 Mega Bond Elut 柱提取浓缩 MBR 中的 AHLs,采用优化的 LC-MS/MS 条件能够有效地检测出工厂级和实验室级 MBR 中 C6-HSL 和 C8-HSL 的浓度。方法平均加标回收率为 80.69%~83.75%,相对标准偏差(RSD)为 4.71%~7.25%,检测限和定量限分别为 0.100 $\mu\text{g/L}$ 和 1.000 $\mu\text{g/L}$,基质效应弱,数据稳定可靠,能够满足活性污泥中痕量 AHLs 的测定。

参考文献

- [1] DENG L, GUO W, NGO H H, *et al.* Biofouling and control approaches in membrane bioreactors [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 221:656—665.
- [2] HUANG J, SHI Y, ZENG G, *et al.* Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing and quorum quenching hold promise to determine the performance of biological wastewater treatments: an overview [J]. *Chemosphere*, 2016, 157: 137—151.
- [3] FUQUA W C, WINANS S C, GREENBERG E P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators [J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(2):269—275.
- [4] BASSLER B L, LOSICK R. Bacterially speaking [J]. *Cell*, 2006, 125(2):237—246.
- [5] GU Y, HUANG J, ZENG G, *et al.* Quorum quenching activity of indigenous quorum quenching bacteria and its potential application in mitigation of membrane biofouling: membrane biofouling control by indigenous quorum quenching bacteria [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2018, 93(5):1394—1400.
- [6] YEON K M, CHEONG W S, OH H S, *et al.* Quorum sensing: a new biofouling control paradigm in a membrane bioreactor for advanced wastewater treatment [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(2):380—385.
- [7] SHI Y, HUANG J, ZENG G, *et al.* Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: an overview [J]. *Chemosphere*, 2017, 180:396—411.
- [8] TAN C H, KOH K S, XIE C, *et al.* The role of quorum sensing signalling in EPS production and the assembly of a sludge community into aerobic granules [J]. *Isme Journal*, 2014, 8(6):1186—1197.
- [9] WANG J, DING L, LI K, *et al.* Development of an extraction method and LC-MS analysis for N-acylated-L-homoserine lactones (AHLs) in wastewater treatment biofilms [J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2017, 1041:37—44.
- [10] 潘玉荣, 张彩丽, 朱素芹, 等. 一株凡纳滨对虾源鳃弧菌群体感应信号分子的检测 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32(3):142—147.
- [10] PAN Y R, ZHANG C L, ZHU S Q, *et al.* Detection of quorum sensing signal molecules in vibrio anguillarum isolated from litopenaeus vannamei [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(3):142—147. (In Chinese)
- [11] KIM S R, OH H S, JO S J, *et al.* Biofouling control with bead-entrapped quorum quenching bacteria in membrane bioreactors: physical and biological effects [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(2):836—842.
- [12] CHARLTON T S, DE NYS R, NETTING A, *et al.* A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography—mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm [J]. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(5):530.
- [13] 郭秀春, 郑立, 张魁英, 等. 气相色谱-质谱法检测细菌中 N-酰基高丝氨酸内酯类信号分子 [J]. *分析测试学报*, 2012, 31(3):347—350.
- [13] GUO X C, ZHENG L, ZHANG K Y, *et al.* Determination of N-acyl-homoserine lactones signal molecules by gas chromatography—mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2012, 31(3):347—350. (In Chinese)
- [14] REIMMANN C, BEYELER M, LATIFI A, *et al.* The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase [J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 24(2):309—319.
- [15] BIJTENHOORN P, SCHIPPER C, HORNING C, *et al.* BpiB05, a novel metagenome-derived hydrolase acting on N-acylhomoserine lactones [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155(1):86—94.
- [16] YU H, XU G, QU F, *et al.* Effect of solid retention time on membrane fouling in membrane bioreactor: from the perspective of quorum sensing and quorum quenching [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(18):7887—7897.
- [17] LI X, FEKETE A, ENGLMANN M, *et al.* Development and application of a method for the analysis of N-acylhomoserine lactones by solid-phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1134(1/2):186—193.
- [18] JO S J, KWON H, JEONG S Y, *et al.* Effects of quorum quenching on the microbial community of biofilm in an anoxic/oxic MBR for wastewater treatment [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(9):1593—1604.