

官厅水库微囊藻毒素的 LC-ESI/MS 定性分析

史红星^{1, 2}, 曲久辉^{1*}

(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. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 在利用高效液相色谱方法研究的基础上, 采用液相色谱-电喷雾质谱(LC-ESI/MS)方法对相同的藻毒素样品进行了进一步的定性研究。结果表明, 官厅水库微囊藻产生的 5 种微囊藻毒素中 3 种分别是常见的 Microcystin RR, Microcystin LR 和 Microcystin YR, 分子量分别为 1 038, 995 和 1 045。另外 2 种分子量分别为 1 052 和 1 009, 分别与 Microcystin YY 和 Mglur LR 的分子量相同, 但完全的验证工作还有待更深入的研究。

关键词: 官厅水库; 蓝绿藻; 微囊藻毒素; 电喷雾质谱

中图分类号: X832 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)06-0097-04

Analysis of Microcystins by LC-ESI/MS in the Algal Cells Collected from Guanting Reservoir

SHI Hong-xing^{1, 2}, QU Jiu-hui¹

(1. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: Microcystins in the algal cells collected from the water bloom of the Guanting Reservoir were further investigated by LC-ESI/MS after they were studied by the method of HPLC. The results show that three of five microcystins contained in the algal cells of the blooms are frequent Microcystin RR, Microcystin LR and Microcystin YR, whose molecular weights are 1 038, 995 and 1 045 respectively. The molecular weights of the other two microcystins are 1 052 and 1 009, which are corresponding to the molecular weights of Microcystin YY and Mglur LR respectively, however the complete identification of both MCs have to be carried out further.

Key words: Guanting reservoir; cyanobacteria; microcystins; ESI/MS

微囊藻毒素(Microcystins, MCs)以其极高的毒性、较高的化学稳定性和水溶性对饮用水的安全提出了挑战。藻毒素是有毒蓝藻的代谢产物, 根据其化学结构可分为 3 类: 缩氨酸毒素、生物碱毒素和脂多糖毒素; 根据其伤害的器官可分为肝毒素、神经毒素和皮肤毒素。MCs 是蓝藻水华中出现频率最高、产量最大和危害最严重的一类环状七肽缩氨酸肝毒素, 通过抑制蛋白质磷酸酶的活性产生强烈的促肝癌作用, 肝脏是其对哺乳动物伤害的最主要的靶器官。MCs 因首先被从微囊藻(*Microcystis*)中分离出来而得名, 但除微囊藻以外的许多淡水蓝绿藻如鱼腥藻(*Anabaena*)、颤藻(*Oscillatoria*)、念珠藻(*Nostoc*)和项圈藻(*Anabaenopsis*)等也可产生该类毒素。它们一般存在于藻细胞内, 只有当细胞因各种原因破裂时才释放进入水中, 易于引起动物和人类中毒。绝大多数 MCs 的半数致死剂量 LD_{50} 通常报道为 $50 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 世界卫生组织(WHO)推荐饮用水中 MCs 的安全浓度为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ [1-9]。

近几年的实地监测结果表明官厅水库富营养化

问题较为严重 [10, 11]。2003-09 对官厅水库进行考察, 发现官厅水库大坝前水域存在着大量的蓝绿藻水华, 并对该水华藻类的胞内藻毒素进行了初步研究, 确定了 2 种藻毒素的性质和胞内含量。但由于国际市场上 MCs 标准品非常有限, 仍有 3 种藻毒素需要利用其它分析方法进一步研究 [12]。

本文利用 LC-ESI/MS 对此微囊藻毒素样品进行了进一步的分析研究, 以期获得更多关于官厅水库微囊藻毒素的信息, 为官厅水库的水质保护与功能恢复提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 藻类样品

藻类样品为 2003-09 取自官厅水库大坝前水域的水华蓝藻。样品利用 25 号浮游生物网直接收集,

收稿日期: 2004-11-29; 修订日期: 2005-03-03

基金项目: 国家杰出青年基金项目(50225824); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(G19999045710); 中国科学院研究生科技创新与社会实践资助专项(2004 年)

作者简介: 史红星(1971-), 男, 博士研究生, 主要研究富营养化水体藻毒素产生机制与去除技术。

* 通讯联系人

经清洗与浓缩后直接封装并于 -20°C 冷冻保存. 样品经中国科学院武汉水生所中国淡水藻种库鉴定, 微囊藻所占比例高达 97 % 以上.

1.2 藻毒素提取与纯化

取一定量蓝藻样品在温水中解冻, 在连续搅拌条件下加入一定量 100 % 甲醇, 调节 pH 值后用超声细胞粉碎仪在 400 W 条件下超声破碎 30 min, 在高速冷冻离心机上 12 000 r/min 离心 10 min, 合并离心分离所得的上清液, 在 $65 \sim 80^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下利用氮吹仪去除甲醇并浓缩毒素. 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜即得到一定浓度藻毒素的水溶液.

1.3 藻毒素标准品与其它试剂

用于藻毒素标准溶液配制的 MCs 标准品 Microcystin RR (简 MC-RR) 与 Microcystin-LR (简 MC-LR) 均购于瑞典 Alexis 公司, MC-RR 分子量 1 038.2, MC-LR 分子量 995.2, 纯度均高于 95 %. 乙腈和三氟乙酸为进口色谱纯, 甲醇为国产色谱纯, 用水为高纯水.

1.4 HPLC 分析

高效液相色谱仪为岛津 LC-10A, 色谱柱为安捷伦公司 $5 \mu\text{m}$ $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ZORBAX SB-C18 反相色谱柱, 光电二极管检测器设在 238 nm 波长进行毒素检测. 流动相为 40 % 乙腈与 60 % 含 0.05 % 三氟乙酸高纯水的混合物, 流量 1.0 mL/min [12-14]. 毒素测定进样量为 $20 \mu\text{L}$.

1.5 LC-ESI/MS 分析

LC-ESI/MS 分析在清华大学实验分析中心进行, 仪器为 API 3000 三级四极杆质谱, 电喷雾 (ESI) 电离, 正离子状态下测定, 电离电压 (IS) 5 000 V, 质谱扫描范围 $400 \sim 1\,200 \text{ u}$, 扫描步长 0.300 u , 驻留时间 1 ms. 液相色谱分离条件同前.

2 结果与讨论

提取藻毒素水溶液的 HPLC 测定结果如图 1 所示, 图中标记为 Peak 1 ~ Peak 5 的 5 个峰在 200 ~ 300 nm 波长都具有 MCs 的特征吸收峰, 它们对应的 LC-ESI/MS 分析结果如图 2 所示.

2.1 Peak 1

MC-RR 标准品分子量为 1 038.2, 带有 2 个精氨酸残基, 在电离条件下主要产生带有 2 个正电荷的离子. 其质谱结果中一般具有 2 个重要的特征离子, 一个为 $m/z = 520$ 的高丰度的双电荷离子, 一个为 $m/z = 1\,039$ 的低丰度的分子离子. LC-MS 分析中常利用质荷比 $m/z = 520$ 的离子 $[M + 2H]^{2+}$

来对 MC-RR 进行定性定量 [15-19].

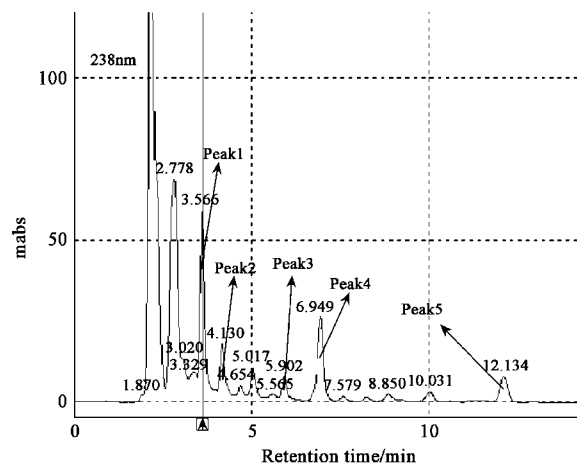


图 1 提取 MCs 的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC spectrum of extracted MCs

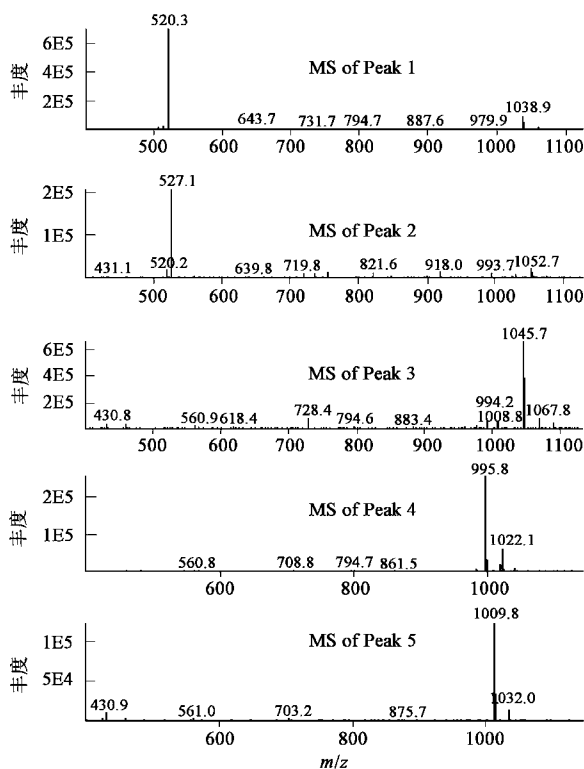


图 2 Peak 1 ~ Peak 5 的质谱

Fig. 2 Mass spectrum of Peak 1 ~ Peak 5

由图 2 中 Peak 1 的质谱可以看出, Peak 1 的质谱结果中有 2 个 m/z 分别为 520.3 和 1 038.9 的特征离子, 分子量为 1 038. 这一结果显示 Peak 1 为 MC-RR, 验证了以前工作 [12] 中利用 HPLC 方法对 Peak 1 定性的正确性.

2.2 Peak 2

由图 2 中可以看出, Peak 2 的质谱与 Peak 1 的质谱十分相似. Peak 1 (MC-RR) 的谱图中有 2 个特征峰, m/z 分别为 520.3 和 1 038.9, 分子量为

别为1 038,1 045,995.另外 2 种分子量为1 052和1 009,分别与 Microcystin YY 和 Mglu- LR 的分子量一致,在缺乏标准品和足够文献资料的条件下,这 2 种藻毒素的完全确认仍然有待用其它手段进一步研究.

致谢:在研究过程中得到了中国科学院武汉水生生物研究所研究员、中国淡水藻种库主任宋立荣老师的热心帮助,在此表示衷心的感谢.

参考文献:

- [1] 张维昊. 滇池微囊藻毒素的环境化学行为研究[D]. 武汉:中国科学院武汉水生生物研究所,2001.
- [2] 苑宝玲. 多功能高铁酸盐的除藻效能与机制研究[D]. 北京:中国科学院生态环境研究中心,2002.
- [3] 闫海. 微囊藻毒素的产生与生物降解研究[D]. 北京:中国科学院生态环境研究中心,2002.
- [4] 俞顺章,赵宁,饶晓林,等. 饮用水微囊藻毒素与我国原发性肝癌关系的研究[J]. 中华肿瘤杂志,2001,23 (2):96~99.
- [5] Dawson R M. The toxicology of microcystins[J]. Toxicon,1998,36 (7):953~962.
- [6] Nishiwaki Matsushima R, Ohtake T, Nishiwaki S, *et al.* Liver cancer promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR[J]. J. Cancer Res. Clin. Oncol.,1992,118:420~424.
- [7] Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, *et al.* Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay[J]. Carcinogenesis,1996,17:1317~1321.
- [8] Jochimsen E M, Carmichael W W, An J S, *et al.* Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil[J]. N. Engl. J. Med.,1998,338:873~878.
- [9] Corinne Rivasseau, Sophie Martins, Marie-Claire Hennion. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A,1998,799:155~169.
- [10] 袁博宇. 官厅水库水质现状及趋势分析[J]. 北京水利,2000,5:29~31.
- [11] 梁涛,张秀梅,章申. 官厅水库及永定河枯水期水体氮、磷和重金属含量分布规律[J]. 地理科学进展,2001,20 (4):341~346.
- [12] 史红星,曲久辉,王爱民,等. 官厅水库蓝绿藻及藻毒素初步研究[J]. 高等学校化学学报,2005,26(9):1653~1655.
- [13] Lawton L A, Christine Edwards. Purification of microcystins[J]. Journal of Chromatography A,2001,912:191~209.
- [14] Lawton L A, Edwards C. Codd G A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters[J]. Analyst,1994,119:1525~1530.
- [15] Jussi Meriluoto. Chromatography of Microcystins[J], Analytica

Chimica Acta,1997,352:277~298.

- [16] Ballot A, Stephan Pflugmacher, Claudia Wiegand, *et al.* Cyanobacterial toxins in Lake Baringo, Kenya[J]. Limnologia,2003,33:2~9.
- [17] Aparat mahakhant, Tomoharu Sano, Pannarat Ratanachot, *et al.* Detection of microcystins from cyanobacterial water blooms in Thailand fresh water[J]. Phycological research,1998,46 (Suppl.):25~29.
- [18] Craig M, McCready L, Luu H A, *et al.* Identification and characterization of hydrophobic microcystins in Canadian fresh water cyanobacteria[J]. Toxicon,1993,31:1541~1549.
- [19] Namikoshi M, Sivonen K, Evans W R, *et al.* Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom (Finland) [J]. Toxicon,1992,30:1473~1479.
- [20] Rudolph Böhner S, Mierke DF, Moroder L. Molecular structure of the cyanobacterial tumor promoting microcystins[J]. FEBS Lett,1994,349:319~323.
- [21] Botes D P, Wessels P L, Kruger H, *et al.* Structural studies on cyanoginosins LR-, YR-, YA-, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*[J]. J. Chem. Soc., Perkin Trans,1985,1:2747~2748.
- [22] Carmichael W W, Beasley V, Bunner D L, *et al.* Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae) [J]. Toxicon,1988,26:971~973.
- [23] Namikoshi M, Sun F, Choi B W, *et al.* Seven more microcystins from Homer lake cells: application of the general method for structure assignment of peptides containing α -dehydroamino acid unit(s) [J]. J. Org. Chem.,1995,60:3671~3679.
- [24] Luukkainen R, Namikoshi M, Sivonen K, *et al.* Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of *Microcystis* sp.: structure of a new hepatotoxin[J]. Toxicon,1994,32:133~139.
- [25] Luukkainen R, Rinehart, K. L. Structures of three new homotyrosine-containing microcystins and a new homophenylalanine variant from *Anabaena* sp. strain 66[J]. Chem. Res. Toxicol,1992,5:661~666.
- [26] Namikoshi M., Rinehart K L, Sakai R, *et al.* Identification of 12 hepatotoxins from a Homer lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Microcystis wesenbergii*; nine new microcystins[J]. J. Org. Chem.,1992,57:866~872.
- [27] Sivonen K, Namikoshi M, Evans W R, *et al.* Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*[J]. App. Env. Microbiol.,1992,58:2495~2500.
- [28] Namikoshi M, Sivonen K, Evans W R, *et al.* Two new L-serine variants of microcystins LR and -RR from *Anabaena* spp. strain 202 A1 and 202 A2[J]. Toxicon,1992,30:1457~1464.