

微囊藻毒素-LR 的臭氧降解研究

缪恒锋, 陆新, 严群, 谢利娟, 阮文权*

(江南大学环境与土木工程学院, 无锡 214122)

摘要:采用不同的臭氧投加量, 考察了微囊藻毒素-LR(MC-LR)的降解效果, 并通过对臭氧氧化过程中产生的 8 种主要降解产物的相对分子质量分析, 推测其降解途径. 结果表明, 臭氧氧化降解 MC-LR 主要通过 Adda 途径和 Mdha 途径来完成对 MC-LR 的降解和脱毒作用. 臭氧氧化的 Adda 途径是通过对 MC-LR 上 Adda 侧链的进攻, 断开具有活性的 Adda 支链, 从而达到脱毒的目的; 臭氧氧化的 Mdha 途径是通过对 MCs 肽环上面 Mdha 和 Ala 的断键, 打开环状肽链, 使藻毒素失去活性, 在整个过程中 Adda 途径占主导地位. 在 $O_3:MC$ 为 6 时, MC-LR 的去除率最高可达到 92%.

关键词:微囊藻毒素-LR; 臭氧氧化; 降解途径

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)11-3288-05

Degradation of Microcystin-LR by Ozonation Process

MIAO Heng-feng, LU Xin, YAN Qun, XIE Li-juan, RUAN Wen-quan

(School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Degradation and byproducts of microcystin-LR (MC-LR) under different ozone dosages were investigated, and the pathway and mechanism for the degradation of MC-LR were also elucidated according to the molecular weight of 8 degradation byproducts during ozonation process in this paper. The results showed that there were two pathways for the degradation of MC-LR by ozone. The first one is that the diene structure in Adda side chain was attacked and cleaved, which was named as Adda degradation pathway. The second one is that the pathway of Mdha and Ala degradation, which was that the peptide bond between Mdha and Ala was attacked and cleaved. Adda degradation pathway was dominant and mainly responsible for the degradation of MC-LR by ozone. The removal of MC-LR by ozone could reach 92% when $O_3:MC$ is 6.

Key words: MC-LR; ozonation; degradation pathway

淡水水体富营养化的加剧引起了藻类水华的频繁发生, 产生和释放的藻毒素导致人、畜中毒事件也随之增多. 微囊藻毒素(microcystin, MC)是在全国范围内分布最广、影响最大的一类环状七肽化合物毒素^[1-3]. 它是由水华蓝藻产生的, 靶器官是肝脏, 它可以通过以下 3 种主要方式产生肝毒性: ①通过抑制蛋白磷酸酶活性, 导致动物肝细胞损伤、促瘤、出血等^[4]; ②激活肝细胞内核酸内切酶而损害 DNA, 引起 DNA 链的无规则断裂^[5,6]; ③脂质过氧化引起的氧化损伤作用^[7]. 在迄今发现的 70 多种 MCs 的异构体中, 微囊藻毒素-LR(MC-LR)是毒性最强的一种, 其相对分子质量为 995, 结构为环状(-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Z-Adda-D-Glu-Mdha-), 其中 MeAsp 为 D-赤- β -甲基天冬氨酸, Adda 为 (2S, 3S, 8S, 9S)-3-氨基- β -甲氧基-2, 6, 8-三甲基-10-苯基-4, 6-二烯酸, Mdha 为 N-脱氢丙氨酸(图 1)^[8]. 从 MC-LR 的分子结构可以看出, 由于环肽结构和侧链 Adda 的共轭双键, 在通常条件下 MC-LR 具有较强的稳定性. 由于它具有强毒性, 通常的生物处理效果不明显^[9,10]. 因此, 传统的水处理方法不能有效地去除 MC-LR.

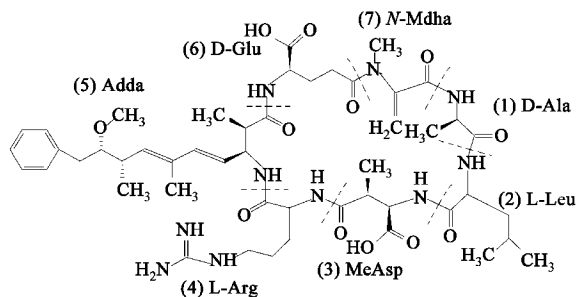


图 1 MC-LR(MW 995)的结构式

Fig.1 Structural formula for MC-LR(MW 995)

臭氧(O_3)氧化技术作为安全高效的水处理方法, 被广泛应用于有毒、有害、难降解有机物的去除和饮用水的深度处理. 臭氧是一种具有选择性的强氧化剂, 对水体中带有不饱和基团(具有供电性)的有机物有很好地去除效果. 臭氧在水溶液能够通过 2 种途径和有机物进行反应: 臭氧分子直接攻击和

收稿日期: 2008-12-25; 修订日期: 2009-03-20

基金项目: 高等学校科技创新工程重大项目培育基金项目(708048)

作者简介: 缪恒锋(1980~), 男, 博士, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: hfmmiao@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: wqruan@jiangnan.edu.cn

臭氧在溶液中产生一系列的活性自由基进行自由基反应.这 2 种方式都能有效地降解 MC-LR,脱除其毒性^[11~13].本研究以 MC-LR 为对象,利用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)通过分析在臭氧氧化过程中的降解产物的相对分子质量,探讨了 MC-LR 的臭氧氧化降解途径和机制,并在此基础上对产物量和毒性进行了初步探讨.

1 材料与方法

1.1 试验材料

MC-LR 标准品(分子式: $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$, MW = 995)购自 Alexis 公司(瑞士);甲醇、乙腈(色谱纯)购自 Merck 公司(德国);蛋白磷酸酶-1(PP-1)及其缓冲溶液购自组英伦生物技术有限公司(北京);其它试剂均为国产分析纯.

1.2 试验方法

1.2.1 臭氧氧化处理

MC-LR 的臭氧氧化反应采用序批的方式进行.首先使用微孔曝气的方法制备饱和臭氧水,使用靛蓝二磺酸钠分光光度法(IDS)^[14]确定其浓度为 $16.38\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,然后迅速使定量的臭氧水和 MC-LR 水溶液混合,充分摇晃 60 s,在 25°C 下静置 30 min 使其充分反应,最后定容至 1 mL.反应后样品直接使用 HPLC-MS 检测.本研究使用不同的反应比例(O_3 :MC,物质的量比,下同).1:1、2:1、4:1 和 6:1 考察 MC-LR 的降解以及副产物的产生情况.

1.2.2 检测方法

MC-LR 及其降解产物使用 HPLC-MS 检测.色谱条件为色谱柱:Sunfire C_{18} (150 mm $\times$ 2.1 mm I. D.);柱温: 30.0°C ;流动相:乙腈-水-三氟乙酸(体积比,35:65:0.1);流速: $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积:10 μL ;藻毒素定量检测波长:238 nm.质谱条件为电离方式:ESI(+);喷雾电压:3.7 kV;脱溶剂温度: 300°C ;源温: 120°C ;离子能量:1.0 V;扫描范围: m/z 100 ~ 1 200.

MC-LR 的毒性用 PP-1 抑制法确定^[15,16].PP-1 用 Buffer A($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 小牛血清, $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnCl_2 和 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巯基乙醇)稀释;对硝基苯磷酸盐使用 Buffer B($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnCl_2 和 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 小牛血清)溶解;用于 PP-1 检测的 MC-LR 样品(包括臭氧处理后的样品)用超纯水稀释 1 000 倍,在 96 孔板和 Buffer A 和 B 混合.空白样品不含 PP-1,用

Buffer A 代替.空白和对照均不含 MC-LR,用超纯水代替,其余均和样品孔相同.然后将 96 孔板置于 37°C 保温 1 h,在该过程中用酶标仪在 405 nm 测定对硝基苯的含量.最后,根据 MC-LR 标准曲线推算出水样中 MC-LR(和产物)的毒性.

2 结果与讨论

2.1 MC-LR 的臭氧氧化降解

对实验室用超纯水配置的纯 MC-LR 样品进行臭氧化处理,结果如图 2 所示.MC-LR 在不同臭氧投加量有不同程度的降解.在反应初始 MC-LR 浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下,投加同摩尔的臭氧可以达到 30% 的降解率,随着臭氧投加量的增大,在 6 倍物质量的臭氧投加条件下,MC-LR 的降解率可以高达 92%(HPLC 测定结果).这表明,臭氧氧化对 MC-LR 的降解效果比较明显.

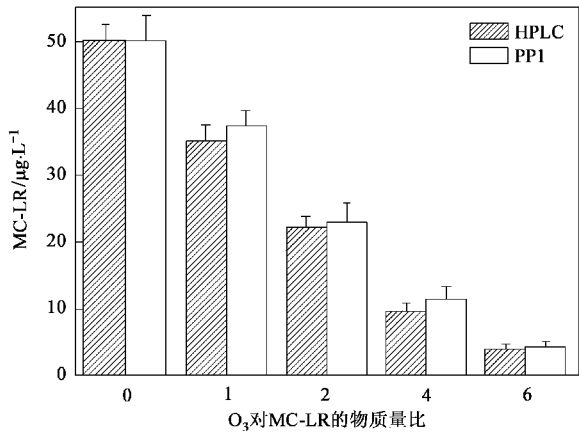


图 2 不同臭氧投加量对 MC-LR 的降解效果
Fig.2 MC-LR degradation under different ozone dosage

2.2 MC-LR 降解机制分析

通常认为,MC-LR 的毒性由它的侧链活性基团 Adda 表现出来,它是 MCs 致毒的主要原因^[17].另外,MCs 七肽环的结构和性质也能影响到 MCs 的毒性,比如 MC-LR 毒性要远远高于 MC-RR,但是它们都具有 Adda 基团,唯一的差别在于 MC-LR 在 2 号位是一个亮氨酸(L)(见图 1),而 MC-RR 的 2 号位氨基酸为精氨酸(R)^[18].本研究采用逐渐加大投加臭氧的方法,以产物相对分子质量来确定 MC-LR 臭氧氧化过程中的产物,从而来推断其降解途径.通过 LC-MS 检测发现的 7 种代表性副产物(见表 1),初步可以将其降解归纳为以下 2 种途径.

2.2.1 Adda 途径

臭氧分子或者其自由基攻击能够导致 MC-LR

表 1 臭氧氧化 MC-LR 过程中产物(HPLC-MS 检测)

Table 1 MC-LR and its byproducts during ozonation detected by HPLC-MS

化合物	相对分子质量	m/z	保留时间/min
MC-LR	995	$[M+H]^+ 996$	8.88
化合物 2、3	1 029	$[M+H]^+ 1 030$	8.45
化合物 4	835	$[M+H]^+ 836$	7.69
化合物 5	795	$[M+H]^+ 796$	7.37
化合物 6	811	$[M+H]^+ 812$	10.45
化合物 7	943	$[M+Na]^+ 966$	9.89
化合物 8	743	$[M+H]^+ 744$	8.22

的 Adda 侧链基团的断裂,从而去除 MC-LR 的活性.其途径可初步推算如图 3,在臭氧氧化体系下,MC-LR 首先在 Adda 侧链基团的 4~5 位或者 6~7 位断开共轭双键而产生二醇(化合物 2、3, MW 1029).不

稳定的二醇在自由基攻击下,在上述 2 个位置断键产生醛类物质.其中 MC-LR 的二醇类副产物在 4~5 位发生的断键反应产生化合物 4,相对分子质量 835;而在 6~7 位发生的断键反应产生的物质化合物 5,相对分子质量 795.当然,化合物 4 由于其在 6~7 位不饱和双键的还原性,在臭氧氧化体系下能够被进一步氧化分解形成化合物 5.

在整个反应过程中,由于化合物 5(醛)的化学结构不稳定(还原性),能够被进一步羟基化生成稳定的化合物 6(酸),相对分子质量为 811.Liu 等^[19]在研究使用 TiO₂ 光催化降解 MC-LR 过程中,也发现了类似的降解途径.本研究虽然使用了不同的高级氧化方法,但是就其机制而言,同样都是主要通过体系产生的·OH对目标有机化合物进攻来完成.

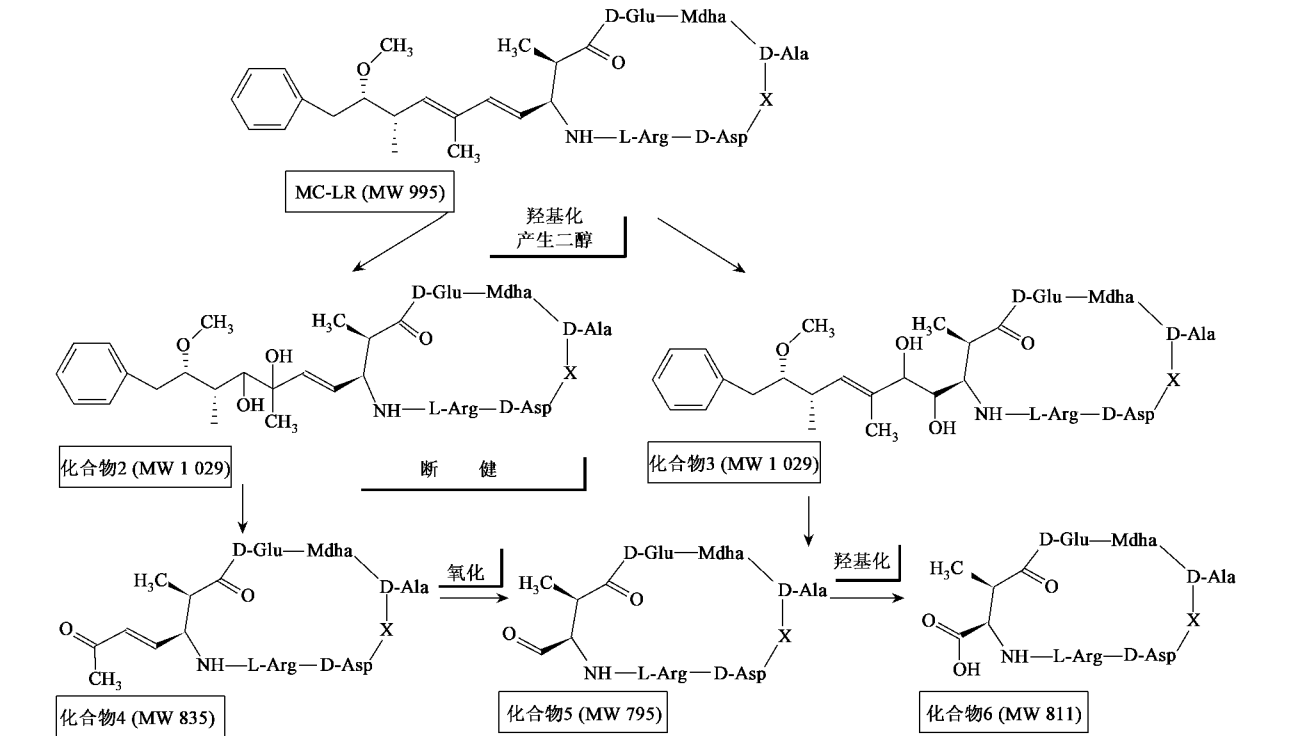


图 3 MC-LR 臭氧氧化降解的 Adda 途径

Fig.3 Byproducts and proposed reaction pathways for MC-LR degradation by ozone on the Adda side chain

2.2.2 Mdha 途径

研究还发现臭氧氧化过程中由于强氧化导致的 MC-LR 七肽环在特定位置的断裂,打开形成直链 MC(Mdha 途径).MC-LR 臭氧氧化降解的 Mdha 途径可由图 4 给出解释.可以看出,臭氧氧化体系中 MC-LR 的七肽环的断裂主要发生在 Mdha 和 Ala 之间,得到 1 个相对分子质量为 942 的直链化合物(化合物 7).同时,进一步对降解产物检索发现,得到化合

物 8(MW 743),它是一个不仅 Adda 侧链被切断而且七肽环被打开的直链 MC-LR 降解产物.这说明 Mdha 途径和 Adda 途径是相互联系的一个过程^[19].

本研究在分析 MC-LR 臭氧降解的 Mdha 途径过程中发现的化合物比较少.这可能有如下 2 个原因:①由于本研究实验过程中初始 MC-LR 量比较小;② MC-LR 的七肽环比较稳定,臭氧氧化对其的降解效果较差,从而导致其产物种类和量都比较少(低于检

测限)^[20,21].为此,对 MC-LR 的主要臭氧氧化降解产物进行了半定量分析(以离子强度比较其相对含量),从而确定反应的主导途径.

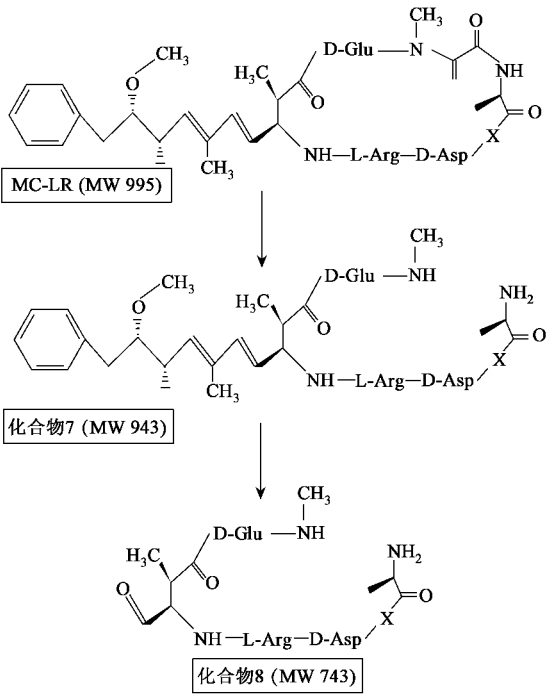


图 4 MC-LR 的臭氧氧化降解 Adda 途径

Fig.4 Byproducts from the MC-LR degradation by ozone on the peptide ring

2.2.3 降解产物量的分析

图 5 表明了 MC-LR 臭氧降解过程中 7 种主要降解产物的变化情况.该图以检测到的量最大的降解产物(O_3 :MC-LR 为 4,化合物 5)的总离子强度为基数 1 作为参照来确定产物比例.可以看出,相对分

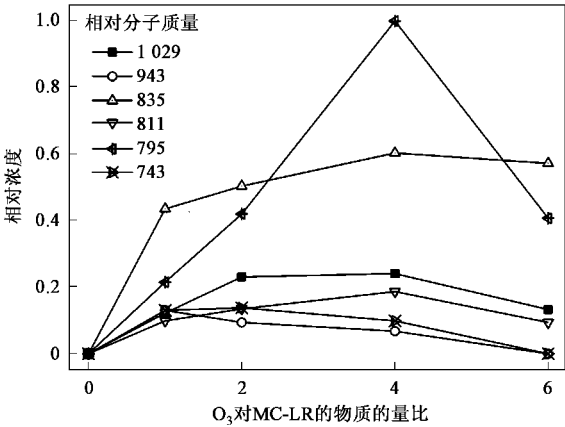


图 5 臭氧氧化 MC-LR 过程中的产物量的变化

Fig.5 Reaction profile of byproducts (list by MW) from degradation of MC-LR by ozone

子质量为 795(化合物 5)、835(化合物 4)和 1 029(化合物 2、3)的化合物检出的量占绝对优势.它们都是 MC-LR 的 Adda 降解途径的产物.这说明了在 MC-LR 的降解过程中,Adda 途径占主导地位.而 Mdha 途径产物不仅种类比较少,而且量也很低.另外,研究发现在臭氧投加量为 4:1 (O_3 :MCs)时,各降解产物的量都达到了最大.这可以解释为,臭氧氧化 MC-LR 过程中产物的出现是一个积累和反应的动态过程,这些产物在产生的同时又会进一步反应生成其它物质,在本试验过程中检测到的只不过是其中具有代表性的(稳定、量大)产物,并以此再推断反应的主要途径和方式^[22].

2.3 产物去毒效果分析

综上所述,臭氧氧化 MC-LR 能够产生一系列副产物,这些副产物主要可以分为 3 类:① Adda 侧链被破坏(羟基化或者断键)但是具有完整七环肽的化合物;② 七肽环被破坏但是 Adda 侧链完整的直链肽化合物;③ Adda 侧链基团和七环肽均被破坏的化合物.它们都是 MC-LR 臭氧氧化 2 种典型途径的产物.但是并不能证明这些被氧化降解的产物是否已经脱毒成功,能否达到饮用水安全要求.

为此,本研究同时使用 PP-1(毒性检测)和 HPLC (MC-LR 含量检测)方法来分析臭氧氧化对 MC-LR 的脱毒效果^[23,24](见图 2).结果表明,在不同臭氧使用量下,2 种检测方法结果比较一致,这说明 MCs 的副产物对蛋白磷酸酶没有抑制作用或者抑制作用不明显.其中,PP1 对 MCs 检测的毒素含量相比 HPLC 结果要稍大,但都在误差范围内.这也体现了 MCs 的降解产物体外毒性的消失或者降低,初步证明了臭氧氧化对 MCs 去毒的可靠性.

3 结论

(1) 臭氧氧化能够有效地降解 MC-LR,在 O_3 :MC-LR 为 6(物质的量比)的条件下,MC-LR 的去除率达到 92%.在降解的同时,通过蛋白磷酸酶-1 抑制毒性检测证实了其去毒作用的可靠性.

(2) 臭氧氧化降解 MCs 主要通过 Adda 途径和 Mdha 途径来完成对 MCs 的降解和脱毒.臭氧氧化的 Adda 途径是通过对其 Adda 侧链的进攻,断开具有活性的 Adda 直链,而达到去毒的目的;臭氧氧化的 Mdha 途径是通过对其 MCs 肽环上面 Mdha 和 Ala 的断键,打开环状肽链,使藻毒素失去活性.整个过程中 Adda 途径占主导作用.

参考文献:

- [1] Gouvea S P, Boyer G L, Twiss M R. Influence of ultraviolet radiation, copper, and zinc on microcystin content in *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) [J]. *Harmful Algae*, 2008, **7** (2): 194-205.
- [2] Hunter P R. Cyanobacterial toxins and human health [J]. *J Appl Microbiol Symp Suppl*, 1998, **84**: 35S-40S.
- [3] Hilborn E D, Carmichael W W, Soares R M, *et al.* Serologic evaluation of human microcystin exposure [J]. *Environ Toxicol*, 2007, **22** (5): 459-463.
- [4] Hudder A, Song W H, O'Shea K E, *et al.* Toxicogenomic evaluation of microcystin-LR treated with ultrasonic irradiation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, **220** (3): 357-364.
- [5] David E, Williams D E, Craig M, *et al.* Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae [J]. *Chem Res Toxicol*, 1999, **10**: 463-469.
- [6] 杨帆, 肖邦定, 陈晓国, 等. 鱼肉结合态 MCLR 的亚慢性毒性研究 [J]. *环境科学*, 2007, **28** (12): 2811-2815.
- [7] Ding W X, Shen H M, Zhuo H G, *et al.* Studies on oxidative damage induced by cyanobacterial extract in primary cultured rat hepatocytes [J]. *Environ Res*, 1998, **78** (1): 12-18.
- [8] Ding W X, Shen H M, Zhu H G, *et al.* Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China [J]. *Mutat Res*, 1999, **422**: 69-77.
- [9] 王金丽, 梁文艳, 马炎炎, 等. Ti/RuO₂ 电化学法降解藻毒素 MCLR 影响因素的研究 [J]. *中国环境科学*, 2008, **28** (8): 709-713.
- [10] Mazur-Marzec H, Meriluoto J, Plinski M. The degradation of the cyanobacterial hepatotoxin nodularin (NOD) by UV radiation [J]. *Chemosphere*, 2006, **65** (8): 1388-1395.
- [11] Al Momani F, Smith D W, El-Din M G. Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes [J]. *J Hazard Mater*, 2008, **150** (2): 238-249.
- [12] Al Momani F. Degradation of cyanobacteria anatoxin-a by advanced oxidation processes [J]. *Sep Purif Technol*, 2007, **57** (1): 85-93.
- [13] Thapsingkaew O, Kijjanapanich V, Ruangtutikarn W. Reduction of trihalomethane formation and detoxification of microcystins in tap water by ozonation [J]. *J Water Health*, 2008, **6** (2): 281-288.
- [14] Bader H, Hoigne J. Determination of ozone in water by the indigo method [J]. *Water Res*, 1981, **15**: 449-456.
- [15] Ortea P M, Allis O, Healy B M, *et al.* Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultraviolet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry [J]. *Chemosphere*, 2004, **55**: 1395-1402.
- [16] Heresztyn T, Nicholson B C. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay [J]. *Water Res*, 2001, **36** (13): 3049-3056.
- [17] Onstad G D, Strauch S, Meriluoto J, *et al.* Selective oxidation of key functional groups in cyanotoxins during drinking water ozonation [J]. *Environ Sci Technol*, 2007, **41**: 4397-4404.
- [18] Rodriguez E, Majado M E, Meriluoto J, *et al.* Oxidation of microcystins by permanganate: Reaction kinetics and implications for water treatment [J]. *Water Res*, 2007, **41**: 102-110.
- [19] Liu I, Lawton L A, Robertson P J. Mechanistic studies of the photocatalytic oxidation of Microcystin-LR: an investigation of byproducts of the decomposition process [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, **37**: 3214-3219.
- [20] Song W, De La Cruz A A, Rein K, *et al.* Ultrasonically induced degradation of Microcystin-LR and RR: identification of products, effect of pH, formation and destruction of peroxides [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, **40**: 3941-3946.
- [21] Kull T P, Backlund P H, Karlsson K M, *et al.* Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin Microcystin-LR by Chlorine Dioxide: reaction kinetics, characterization, and toxicity of reaction products [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, **38**: 6025-6031.
- [22] Antoniou M G, Shoemaker J A, De La Cruz A A, *et al.* LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR [J]. *Toxicon*, 2008, **51**: 1103-1118.
- [23] Gullledge B M, Aggen J B, Eng H, *et al.* Microcystin analogues comprised only of Adda and a single additional amino acid retain moderate activity as PP1/PP2A inhibitors [J]. *Bioorg Bioorganic and Med Chem Let*, 2003, **13**: 2907-2911.
- [24] Song W, Teshiba T, Rein K, *et al.* Ultrasonically induced degradation and detoxification of Microcystin-LR (cyanobacterial toxin) [J]. *Environ Sci Technol*, 2005, **39**: 6300-6305.