

微囊藻毒素[Dha⁷]MCRR 的制备及鉴定

陈晓国¹, 杨力力¹, 肖邦定^{2*}, 吴幸强², 董欣杨³

(1. 武汉理工大学资源与环境工程学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 3. 核工业北京化工冶金研究院, 北京 101149)

摘要:以野外收集的水华蓝藻为原料, 经过 75% 甲醇溶液浸提, 快速色谱分离和半制备色谱纯化, 从滇池水华蓝藻中分离纯化出 1 种微囊藻毒素变体. 电喷雾质谱、紫外分光光度计和 HPLC 检测结果表明, 所得毒素为[Dha⁷]MCRR, 是 MCRR 的 1 种去甲基化变体, 其纯度大于 95%. 该毒素的分子组成为环(Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Dha), 分子量为 1 023, 其紫外扫描光谱(200 ~ 300 nm)在 239 nm 处有特征吸收. [Dha⁷]MCRR 在滇池水华蓝藻中普遍存在, 有时会成为 MC 的主要种类.

关键词:[Dha⁷]MCRR; 纯化; 鉴定

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)09-2063-05

Preparative Purification and Characterization of [Dha⁷]Microcystin RR

CHEN Xiao-guo¹, YANG Li-li¹, XIAO Bang-ding², WU Xing-qiang², DONG Xin-yang³

(1. College of Resources and Environmental Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. Beijing Research Institute of Chemical Engineering and Metallurgy, Beijing 101149, China)

Abstract: One variant of microcystins was isolated and purified with cyanobacteria natural bloom as the starting material, which was collected in Dianchi Lake, China. The separation protocol involved extraction of cyanobacterial cells by 75% aqueous methanol, isolation by reversed-phase flash chromatography, and purification by reversed-phase semipreparative HPLC. The structure and purity of purified microcystin was identified with electrospray ionization mass spectrometry, UV spectrophotometer, and analytical HPLC. The purified microcystin was assigned as [Dha⁷]MCRR (purity > 95%), which was a demethylated variant of MCRR. The structure of purified microcystin was identified as cyclo-(Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Dha) with molecular weight of 1 023. There was a maximum absorbance at 239 nm in its UV spectrum (200 ~ 300 nm). This variant of microcystins occurred frequently, and sometimes could become the main variant in waterbloom from Dianchi Lake.

Key words: [Dha⁷]microcystin RR; purification; identification

微囊藻毒素(microcystin, MC)是一类环状七肽肝毒性物质, 其结构通式为环(Ala-X-MeAsp/Asp-Z-Adda-Glu-Mdha/Dha), 其中 X 和 Z 分别为 2 种可变的氨基酸. MC 经常出现在发生水华的淡水水体中^[1~5], 且具有较强的生物毒性^[6~8], 可以通过饮水或食物链进入人体而对健康造成危害^[9~11]. 因此世界卫生组织(WHO)推荐饮用水中 MCLR 浓度不高于 1 μg/L^[12]. 我国《生活饮用水水质卫生规范》(2001)也规定生活用水中 MCLR 标准值 ≤ 1 μg/L. 由于水质检测工作的需要以及 MC 相关研究的深入, MC 纯品的需求量和需求种类都不断增加.

国外在 MC 纯化方面起步较早, 但相关的研究报道并不多^[13]. 目前所报道的 MC 分离纯化方法都是建立在色谱技术基础上的, 所用的色谱技术包括尺寸排阻色谱^[14]、离子色谱^[15]、快速色谱^[16]、薄层色谱^[17]、半制备色谱和制备色谱^[18], 使用的色谱填料则包括树脂^[15]、硅胶^[17]和 C18 反相填料^[18]. 迄今为止, 经过鉴定的 MC 变体已有 70 余种^[19], 但是已经商品化的却只有 MCLR、MCRR 和 MCYR 等少数几

种, 因此 MC 纯化方面还需做大量工作.

国内进行 MC 纯化研究起步较晚. 郝赤等^[20]利用分析型 HPLC 纯化出了纯度较高的 MCLR, 但是纯化步骤繁琐且毒素获得量太低. 闫海等^[21]提出的纯化方法可以获得大量的 MCRR 和 MCLR, 方法也简单, 但所得毒素纯度只有 40% 左右. MC 纯品的匮乏, 不仅制约着国内相关研究的深入开展, 也影响了饮水安全检测工作的进行.

笔者利用快速色谱和半制备色谱从滇池水华蓝藻中分离纯化 MC, 一次可以获得数百 μg 纯度大于 95% 的 MCRR^[22]. 在纯化 MCRR 过程中, 发现滇池水华蓝藻中存在 1 种色谱保留行为与 MCRR 十分相似的 MC 变体, 并且用一般的色谱条件很难将其与

收稿日期: 2006-11-07; 修订日期: 2006-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(20607016); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2005AA60101005); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB412300)

作者简介: 陈晓国(1974 ~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境化学, E-mail: xiaoguo_chen@tom.com

* 通讯联系人, E-mail: bdxiao@ihb.ac.cn

MCRR 分离.为了获得该 MC 变体的纯品,以满足相关研究及水质检测的需要,本研究在对分离条件进行优化的基础上,利用快速色谱和半制备色谱对该 MC 变体进行了分离纯化,并且对其进行了初步鉴定.

1 材料与方法

1.1 试验材料及设备

提取 MC 所用原料来自云南滇池收集的水华蓝藻,晒干并粉碎后得到干藻粉.

配有 C18 半制备柱(10 μm , 19 mm $\times$ 300 mm)的 Waters 600E 型半制备高效液相色谱.配有自动进样器、四元梯度泵和二极阵列检测器的 Agilent 1100 型 HPLC.组装了 2 套快速色谱,分别由泵、C18 分离柱和管路组成.最大输液量为 10 mL/min,分离柱尺寸均为 25 mm $\times$ 360 mm,2 种 C18 填料粒径均为 40~60 μm .

LCQ^{Duo} 型液相色谱/质谱/质谱联用仪(Finnigan),TU-1800 型紫外可见分光光度计(北京普析).

1.2 试验方法

1.2.1 MC 的提取及纯化

MC 的提取和纯化采用文献[22]报道的方法.首先用 75% 甲醇水溶液对水华蓝藻进行提取,所得提取液经液-液萃取去除有机杂质^[23],然后依次通过 2 个快速色谱进行分离和初步纯化,获得的 MCRR 和未知 MC 混合组分利用半制备色谱进行纯化^[24].所得未知 MC 组分经 C18 SPE 柱富集并脱盐,甲醇洗脱后用氮气吹干,于 -20℃ 下保存.

1.2.2 纯化 MC 的鉴定

根据文献[22]报道的方法,利用 ESI MS/MS 和紫外分光光度计分别对纯化的 MC 进行质谱分析和光谱扫描分析.

利用 2 种 HPLC 色谱条件对纯化的 MC 进行测定,色谱条件分别为,A 分析柱为 Delta-pak C18(5 μm , 3.9 mm $\times$ 150 mm),流动相为甲醇:0.01% 三氟乙酸 = 50:50;B 分析柱为 Hypersil ODS-BP(5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm),流动相为甲醇:0.01% 三氟乙酸 = 68:32;流速均为 1 mL/min,检测波长为 238 nm.

2 结果与讨论

2.1 MC 的提取及分离纯化结果

研究了以不同浓度甲醇溶液作为提取剂对 MCRR 和未知 MC 的提取效率.结果表明,2 种 MC 的提取效率均随着提取剂中甲醇浓度的变化而变

化,但 2 种 MC 的提取率之比始终恒定,因此不能通过改变提取剂的方法将 2 种 MC 分别提取而达到将二者分离的目的.实验结果表明,75% 的甲醇溶液对 2 种 MC 均具有最高的提取效率.

快速色谱分离实验表明,MCRR 与未知 MC 在快速色谱中具有相同的色谱保留特性,因此,也不能通过快速色谱将 2 种 MC 分离.

为了获得单一组分的未知 MC,研究了不同色谱柱和流动相条件下未知 MC 与 MCRR 的色谱分离效果.结果表明,2 种 MC 在 Delta-pak C18 分析柱上的色谱峰完全重叠,改变流动相中三氟乙酸(TFA)和甲醇的含量均达不到分离效果.而在 Hypersil ODS-BP 分析柱上,当流动相中 TFA 含量较高时 2 种 MC 的色谱峰也是重叠的,但是随着流动相中 TFA 含量的降低,2 种 MC 的保留时间开始产生差异,当水相中 TFA 含量降低到 0.01% 时 2 种 MC 可以得到很好的分离,如图 1 所示.虽然进一步降低 TFA 含量可以使 2 种 MC 保留时间相差更大,但色谱峰会出现拖尾而不利于纯化,而且流动相的 pH 值过高会影响色谱柱的使用寿命,因此在纯化未知 MC 时流动相水中 TFA 含量选择 0.01% 较为合适.

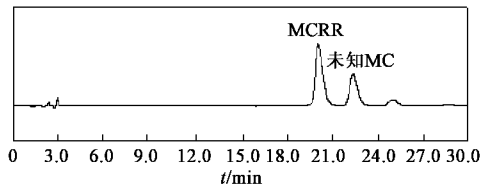


图 1 MCRR 与未知 MC 的 HPLC 分离效果
Fig.1 Separation of MCRR and unknown MC by HPLC

2.2 MC 的初步鉴定结果

2.2.1 纯化 MC 的质谱鉴定结果

图 2 是纯化的未知 MC 在 ESI 上的一级正离子质谱图.从图 2 可见,该 MC 变体的电离特征与 MCRR 非常相似^[22],均以二价正离子($[M+2H]^+$)为基峰,同时还有少量的一价正离子($[M+H]^+$)产生, m/z 分别为 513.1 和 1024.6,比 MCRR 的 m/z 分别小了 7 和 14.该 MC 的分子量为 1023,比 MCRR 的分子量小了 14.考虑到未知 MC 的色谱保留行为与 MCRR 非常相似,可以推测该毒素可能是 1 种比 MCRR 少 1 个甲基的 MC 变体.

为了进一步了解该毒素的分子组成,在 ESI 一级质谱解析的基础上,选取纯化 MC 的二价正离子($[M+2H]^+$, m/z 为 513.1)作为母体离子进行二级质谱检测,并与 MCRR 的检测结果进行对比.表 1 列

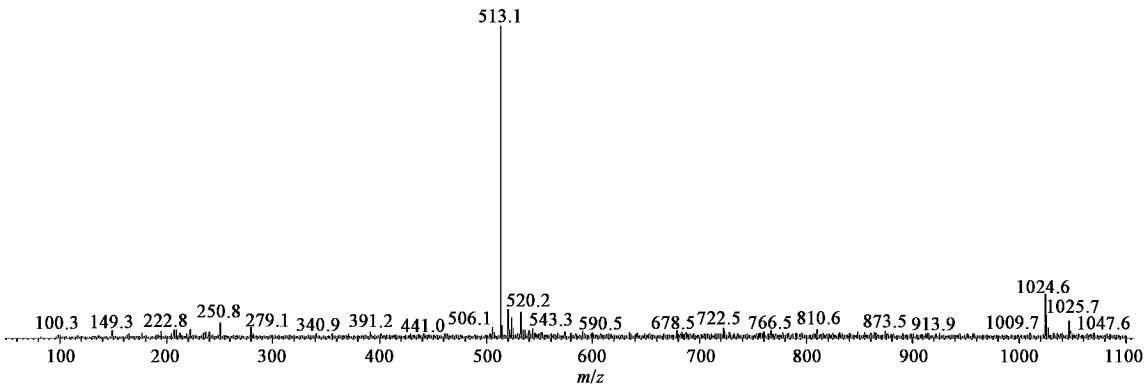


图 2 纯化 MC 的 ESI 一级正离子质谱图

Fig.2 ESI mass spectrum of purified MC

出了纯化 MC 和 MCRR 在 ESI 二级质谱上出现的主要碎片离子.由表 1 可见,纯化 MC 与 MCRR 具有非常相似的裂解规律,并且二者的主要二级质谱碎片离子的 m/z 之间具有确定的数学关系,均相差 0、7 或 14. 这些数据进一步说明,纯化 MC 与 MCRR 的分子结构之间存在着某种内在联系.考虑到 MC 分子的元素组成,可以推测纯化 MC 的 m/z 比 MCRR 小 14 可能是由于该毒素比 MCRR 少一个甲基造成的.

纯化 MC 与 MCRR 的二级质谱中均出现了 m/z 分别为 414.3 和 285.4 的碎片离子,说明该 MC 分子与 MCRR 均含有 Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda 基团,因此分子中第 1~5 位的氨基酸分别为 Ala、Arg、MeAsp、

Arg 和 Adda(图 3 和图 4).纯化 MC 中出现了 m/z 为 291.5 的峰而 MCRR 中出现了 298.5 的峰,说明纯化 MC 不同于 MCRR,分子中与 Ala 相连的第 7 位上的氨基酸为少 1 个甲基的 Dha,而不是 Mdha.纯化 MC 和 MCRR 中分别出现 m/z 为 315.3 和 329.3 的峰则说明 2 种 MC 与 Dha 或 Mdha 相连的第 6 位上的氨基酸均为 Glu.纯化 MC 中出现 m/z 为 448.5 和 477 的峰,而 MCRR 中出现 m/z 为 455.5 和 484.1 的峰,表明 2 种 MC 分子中第 5 位上的氨基酸(Adda)与第 6 位上的 Glu 是相连的.

综合上述信息可知,与 MCRR 相同,纯化 MC 也是 1 种环状七肽,二者的唯一区别在于纯化 MC 分

表 1 纯化 MC 在 ESI 二级质谱上的裂解特征

碎片离子成分	质荷比(m/z)		
	MCRR	纯化 MC	MCRR-纯化 MC
[M + 2H] ²⁺	520.3	513.3	7
[M + 2H-NH ₃] ²⁺	511.2	504.1	7
[M + 2H-CO] ²⁺	506.1	499.1	7
[M + 2H-MeOH] ²⁺	504.1	497.1	7
[Arg-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha/Dha + 2H] ²⁺	484.1	477	7
[Arg-Adda-Glu-Mdha/Dha-Ala-Arg + 2H] ²⁺	455.5	448.5	7
[M + 2H-134] ²⁺	453.0	446.1	7
[Mdha/Dha-Ala-Arg-MeAsp + H] ⁺ 或 [Glu-Mdha/Dha-Ala-Arg + H] ⁺	440.3	426.4	14
[Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda + 2H] ²⁺	414.0	414.3	0
	404.6	397.9	7
	385.0	378.0	7
[HCO-Glu-Mdha/Dha-Ala-NH ₂ + H] ⁺	329.3	315.3	14
	307.5	300.5	7
[Mdha/Dha-Ala-Arg-MeAsp-Arg + 2H] ²⁺	298.5	291.5	7
[MeAsp-Arg + H] ⁺	285.3	285.4	0
	265.3	265.3	0
	258.3	258.2	0
[Glu-Mdha/Dha + H] ⁺	213		
[C ₁₁ H ₁₄ O + H] ⁺	163.3	163.2	0

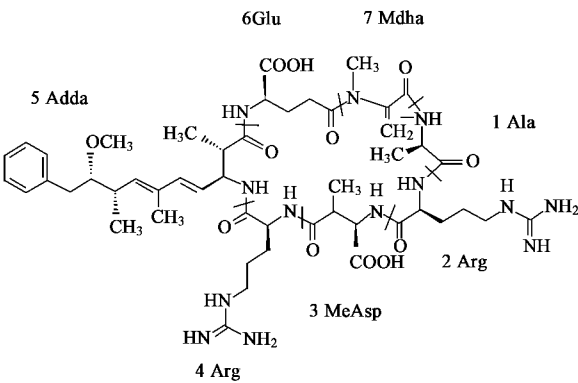


图 3 MCRR 的结构
Fig.3 Structures of MCRR

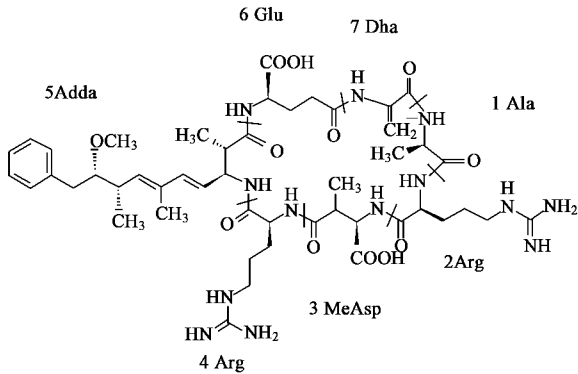


图 4 [Dha⁷]MCRR 的结构
Fig.4 Structures of [Dha⁷]MCRR

子第 7 位上的氨基酸少了 1 个甲基. 纯化 MC 的结构为环 (Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Dha), 与文献 [25] 报道的 [Dha⁷]MCRR 的结构相同.

2.2.2 纯化 [Dha⁷]MCRR 的紫外扫描光谱

由图 5 可见, 纯化 [Dha⁷]MCRR 的紫外扫描光谱与 MCRR 的扫描光谱非常相似 [22], 均在 239 nm 处

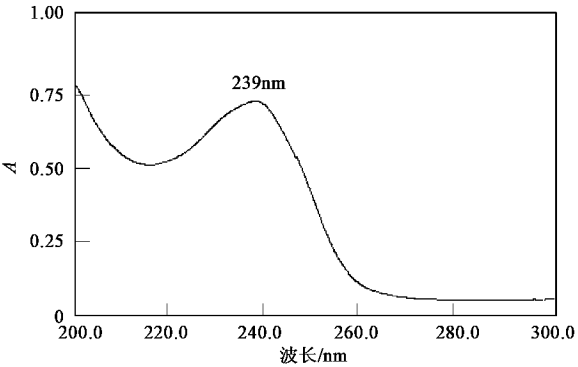


图 5 纯化 [Dha⁷]MCRR 的紫外扫描光谱

Fig.5 UV scan spectrum of purified [Dha⁷]MCRR

有特征吸收, 而在 238 nm 左右具有特征吸收是 MC 的一个重要标志 [26].

2.2.3 纯化 [Dha⁷]MCRR 的色谱检测结果

由于 [Dha⁷]MCRR 与 MCRR 结构非常相近, 且具有相似的吸光特征, 可以利用 MCRR 标样代替 [Dha⁷]MCRR 进行近似定量分析.

本研究选用 2 种色谱条件对提纯的 [Dha⁷]MCRR 进行了检测, 结果见图 6. 从图 6 可以看出, 2 种色谱条件下待测样品均呈现为单一主峰. 根据 [Dha⁷]MCRR 峰面积的百分比, 可以估算出 [Dha⁷]MCRR 的纯度在 95% 以上.

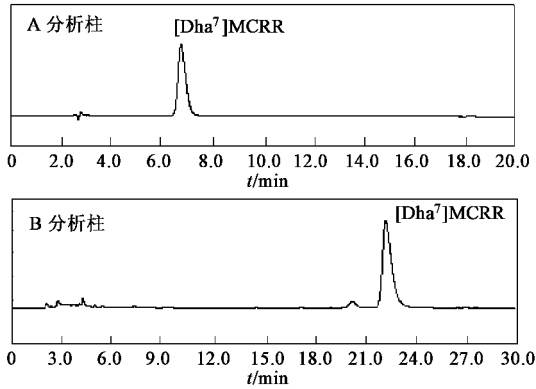


图 6 纯化 [Dha⁷]MCRR 在不同色谱条件下的检测结果
Fig.6 HPLC analysis of purified [Dha⁷]MCRR in different chromatography systems

2.3 讨论

尽管有报道从滇池分离纯化的绿色微囊藻可以产生 [Dha⁷]MCRR [27], 本研究也表明, 滇池水华蓝藻中确实存在大量 [Dha⁷]MCRR. 然而到目前为止, 国内鲜有关于水体或水华中检测到该 MC 的报道. 这一方面可能与缺乏 [Dha⁷]MCRR 标准品有关, 另一方面也与检测所用色谱条件有关. 如前所述, 由于 [Dha⁷]MCRR 与 MCRR 结构非常相似, 二者的色谱保留行为很接近, 在某些色谱柱上根本无法分离, 很容易被误认为是一种物质. 即使某些色谱柱可以将二者分离, 那也需要较高 pH 的流动相. 而国内检测 MC 所用的 HPLC 流动相多为 pH 3 左右的缓冲溶液, 该流动相无法将 [Dha⁷]MCRR 与 MCRR 分离. 因此, 建议在检测 MC 时选择合适的色谱柱和较高 pH 的流动相.

一直以来, 国内学者普遍认为 MCRR 和 MCLR 是我国水体出现的主要 MC 种类 [21]. 然而, 笔者对 2 批滇池水华蓝藻的检测结果表明, 1998 年收集的水华蓝藻中 MC 以 MCRR 为主, [Dha⁷]MCRR 与 MCRR

之比约为1:5;而 2002-07 的水华蓝藻中则以[Dha⁷]MCRR 为主,[Dha⁷]MCRR 与 MCRR 之比接近2:1.可见,不同时期滇池水华中主要 MC 种类的变化很大,而且主要种类不一定为 MCRR 或 MCLR.

随着我国淡水水体出现 MC 频率的增加,尤其是很多饮用水源中检测到了 MC,对水体尤其是饮用水进行 MC 检测已经开始提到议事日程,对各种 MC 变体进行提纯制备已经成为一项十分紧迫的任务.

3 结论

首次从滇池水华蓝藻中分离纯化出了[Dha⁷]MCRR,该 MC 的分子量为1 023,分子组成为环(Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Dha),与 MCRR 的区别仅在于第 7 位氨基酸上少了 1 个甲基,因此该 MC 的色谱保留特性和吸收光谱特征与 MCRR 非常相似.该 MC 在滇池水华蓝藻中含量较高,有时甚至会成为主要 MC 种类.

参考文献:

[1] Hirooka E Y, Pinotti M H P, Tsutsumi T, *et al.* Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Parana, Brazil using ELISA [J]. *Natural Toxins*, 1999, **7** (3): 103 ~ 109.

[2] Fromme H, Kohler A, Krause R, *et al.* Occurrence of cyanobacterial toxins-Microcystins and anatoxin-a-in Berlin water bodies with implications to human health and regulations [J]. *Environmental Toxicology*, 2000, **15** (2): 120 ~ 130.

[3] 连民,俞顺章,陈传炜,等. 淡水湖泊周围水厂源水及出厂水微囊藻毒素的季节性调查[J]. *中国公共卫生*, 2001, **17**(9): 797 ~ 798.

[4] Jung J M, Lee Y J, Park H G, *et al.* Changes in microcystin content and environmental parameters over the course of a toxic cyanobacteria bloom in a hypertrophic regulated river, South Korea [J]. *Journal of Environmental Biology*, 2005, **26** (1): 97 ~ 103.

[5] Vieira J M D, Azevedo M T D, Azevedo S M F D, *et al.* Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region [J]. *Toxicon*, 2005, **45** (7): 901 ~ 909.

[6] Ding W X, Shen H M, Ong C N. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2000, **108** (7): 605 ~ 609.

[7] Benson J M, Hutt J A, Rein K, *et al.* The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure [J]. *Toxicon*, 2005, **45**(6): 691 ~ 698.

[8] Sienska P, Bukowska B, Michalowicz J, *et al.* Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro [J]. *Toxicon*, 2006, **47** (4): 387 ~ 397.

[9] Schmidt W, Willmitzer H, Bommann K, *et al.* Production of drinking water from raw water containing cyanobacteria-Pilot plant studies for assessing the risk of microcystin breakthrough [J].

Environmental Toxicology, 2002, **17** (4): 375 ~ 385.

[10] Sipia V O, Kankaanpaa H T, Flinkman J, *et al.* Time-dependent accumulation of cyanobacterial hepatotoxins in flounders (*Platichthys flesus*) and mussels (*Mytilus edulis*) from the northern Baltic Sea [J]. *Environmental Toxicology*, 2001, **16** (4): 330 ~ 336.

[11] Smith J L, Haney J F. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) [J]. *Toxicon*, 2006, **48**(5): 580 ~ 589.

[12] Falconer I R. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water [J]. *Environmental Toxicology*, 1999, **14** (1): 5 ~ 12.

[13] Lawton L A, Edwards C. Purification of microcystins [J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, **912**(2): 191 ~ 209.

[14] Lee T H, Chou H N. Isolation and identification of seven microcystins from a cultured M.TN-2 strain of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2000, **41**(3): 197 ~ 202.

[15] Saito K, Ishii H, Nishida F, *et al.* Purification of microcystins by DEAE and C-18 cartridge chromatography [J]. *Toxicon*, 2002, **40** (1): 97 ~ 101.

[16] Lawton L A, McElhiney J, Edwards C. Purification of closely eluting hydrophobic microcystins (peptide cyanotoxins) by normal-phase and reversed-phase flash chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, **848** (1-2): 515 ~ 522.

[17] Sano T, Takagi H, Kaya K. A Dhb-microcystin from the filamentous cyanobacterium *Plankothrix rubescens* [J]. *Phytochemistry*, 2004, **65** (14): 2159 ~ 2162.

[18] Edwards C, Lawton L A, Coyle S M, *et al.* Automated purification of microcystins [J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, **734**(1): 175 ~ 182.

[19] Codd G A, Morrison L F, Metcalf J S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **203** (3): 264 ~ 272.

[20] 郝赤, Wilkins R M, Rajenderan C. 铜绿微囊藻细胞培养与藻毒素 LR 提取的研究[J]. *中国环境科学*, 2000, **20**(6): 544 ~ 546.

[21] 闫海,潘纲,张明明,等. 微囊藻毒素的提取和提纯研究[J]. *环境科学学报*, 2004, **24**(2): 355 ~ 359.

[22] 陈晓国,肖邦定,徐小清. 微囊藻毒素 RR 的制备及初步鉴定 [J]. *中国环境科学*, 2005, **25**(3): 267 ~ 270.

[23] 肖邦定,陈晓国,刘剑彤,等. 一种微囊藻毒素纯化的方法 [P]. 中国专利: ZL 200410012921.6, 2006-06.

[24] 肖邦定,陈晓国,刘剑彤,等. 一种微囊藻毒素分离纯化的方法 [P]. 中国专利: ZL 200410012920.1, 2006-03.

[25] Kiviranta J, Namikoshi M, Sivonen K, *et al.* Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205 [J]. *Toxicon*, 1992, **30**(9): 1093 ~ 1098.

[26] 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** (7): 1525 ~ 1530.

[27] 宋立荣,雷腊梅,何振荣,等. 滇池水华蓝藻铜锈微囊藻和绿色微囊藻的生长生理特性及毒素分析[J]. *水生生物学报*, 1999, **23**(5): 402 ~ 408.