

微囊藻毒素-RR 的臭氧降解研究

缪恒锋¹, 周勤¹, 王志良², 严群¹, 阮文权^{1*}

(1. 江南大学环境与土木工程学院, 无锡 214122; 2. 江苏省环境科学研究院江苏省环境工程重点实验室, 南京 210036)

摘要:采用臭氧氧化的方法对微囊藻毒素-RR(MC-RR)进行降解. 结果表明, 在 O_3 : MC-RR(物质质量比)为6的条件下, MC-RR的去除率最高可达到83.0%; pH上升、水中NOM含量增加都能显著降低MC-RR的臭氧降解效果. 使用HPLC-MS考察了MC-RR的臭氧降解产物, 并在此基础上探讨了MC-RR的臭氧氧化降解途径: 主要通过Adda途径和Mdha途径来完成对MC-RR的降解和脱毒作用. 臭氧氧化的Adda途径是通过攻击MC-RR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, 其中Adda途径过程中的苯环羟基化作用对整个过程的促进作用; 臭氧氧化的Mdha途径是通过攻击MC-RR肽环上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.

关键词:微囊藻毒素-RR; 臭氧氧化; Adda; HPLC-MS

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)05-1239-07

Degradation of Microcystin-RR by Ozonation Process

MIAO Heng-feng¹, ZHOU Qin¹, WANG Zhi-liang², YAN Qun¹, RUAN Wen-quan¹

(1. School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Jiangsu Environmental Engineering, Jiangsu Provincial Academy of Environmental Science, Nanjing 210036, China)

Abstract: Degradation of algal toxin Microcystin-RR (MC-RR) by ozonation processes was investigated. The degradation rate of MC-RR reached 83.0% at ozone/MC-RR dosage of 6, and the degradation efficiency was decreased with increase of pH or NOM contents. Ozonation byproducts of MC-RR under different ozone dosages were detected by HPLC-MS to elucidate degradation mechanisms and pathways. The results showed that MC-RR degradation by attacking of ozone and hydrogen radicals mainly involved in substitution and cleavage of the Adda conjugated diene structure, cleavage of the peptide bond between Mdha and Ala. And Adda degradation pathway exerted a dominant position during the process.

Key words: MC-RR; ozonation; Adda; HPLC-MS

国内外微囊藻毒素(MCs)研究比较多的主要有2种: MC-LR和MC-RR, 其中MC-LR的毒性比较大, 小鼠半数致死剂量(LD_{50})为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左右^[1]; MC-RR毒性较小, LD_{50} 在 $235 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左右^[2], 但在太湖蓝藻水华中的含量比较大, 其检测到的含量大约是MC-LR的10倍左右. MC-RR相对分子质量为1037, 结构为环(-D-Ala-L-Arg-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)^[3]. 从MC-RR的分子结构可以看出, 由于七环肽结构和侧链Adda的共轭双键, 在通常条件下MC-RR具有较强的稳定性^[4]. 它含有多个羧基、氨基、酰胺基等极性官能团, 具有较好的溶解性, 在沸水中也能稳定存在; 它还能在不同pH条件下、光照降解过程中保持稳定; 另外由于它有较强的毒性, 一般的微生物处理效果也不明显^[5,6].

活性炭吸附可以有效地去除MC-RR, 但是不能

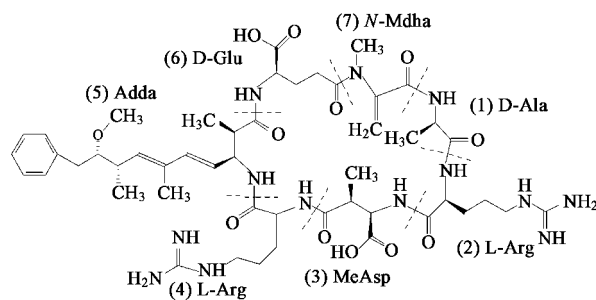


图1 MC-RR($M_r = 1037$)的结构式

Fig. 1 Structural formula for MC-RR($M_r = 1037$)

破坏其结构脱除其毒性, 而且由于活性炭吸附的无选择性, 水体中的杂质会通过竞争吸附作用影响MC-RR的去除效果. 化学氧化的方法能有效破坏MC-RR结构, 脱除其毒性. 通常使用的氧化方法有臭氧氧化^[7-9]、电化学氧化^[10]、超声氧化^[11]、光催

收稿日期: 2009-07-16; 修订日期: 2009-11-12

基金项目: 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(708048); 江苏省环境工程重点实验室开放基金项目(KF2009002)

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: hfmiao@yahoo.com.cn

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

化氧化^[12]以及不同氧化方法间的联用. 本研究采用臭氧氧化的方法,以 MC-RR 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-RR 的臭氧氧化降解机制,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 实验材料

MC-RR 标准品(分子式: $C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$, $M_r = 1037$)购自 Alexis 公司(瑞士);甲醇、乙腈(色谱纯)购自 Merk 公司(德国);蛋白磷酸酶-1(PP-1)及其缓冲溶液购自纽英伦生物技术有限公司(北京);其它试剂均为国产分析纯.

Waters ZMD 4000 高效液相色谱-质谱联用仪(Waters, 美国);Rotavapor R-200 旋转蒸发器(BUCHI, 瑞士);实验室用高浓度臭氧发生器(DHX-SS-O₃, 哈尔滨);全自动酶标仪(SPECTRA max 384 plus, 美国).

1.2 实验方法

1.2.1 臭氧氧化处理

MC-RR 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)^[13]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-RR 溶液混合,充分摇晃 60 s,然后静置 30 min 使其充分反应. 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 [$n(\text{O}_3):n(\text{MC})$] 为 1:1、2:1、4:1 和 6:1 及 pH 和 NOM 浓度考察 MC-RR 的降解以及副产物的产生情况.

1.2.2 检测方法

MC-RR 及其降解产物使用 HPLC-MS 检测. 色谱条件为色谱柱: Sunfire C₁₈ (150 mm × 2.1 mm I. D.);柱温: 30.0℃;流动相: 乙腈: 水: 三氟乙酸 = 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℃;源温: 120℃;离子能量: 1.0 V;扫描范围: m/z 100 ~ 1200.

MC-RR 的毒性用 PP-1 抑制法确定^[14,15]. 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, $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl₂ 和 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巯基乙醇)稀释;对硝基苯酚磷酸酯使用 Buffer B ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂、 0.2

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl₂ 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 1000 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-RR,用超纯水代替,其余均和样品孔相同. 然后将 96 孔板置于 37℃ 保温 1 h,在该过程中用酶标仪在 405 nm 测定对硝基苯酚磷酸酯降解产物的含量. 最后,根据 MC-RR 标准曲线推算出水样中 MC-RR(和产物)的毒性.

2 结果与讨论

2.1 MC-RR 的臭氧氧化降解

2.1.1 不同臭氧投加量对 MC-RR 降解的影响

对用超纯水配置的纯 MC-RR 样品进行臭氧氧化处理,结果如图 2 所示. MC-RR 在不同臭氧投加量有不同程度的降解. 在 MC-RR 反应初始浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下,投加同摩尔的臭氧可以达到 26.1% 的降解率,随着臭氧投加量的增大,在 6 倍物质的量臭氧投加条件下,MC-RR 的降解率可以高达 83.0% (HPLC 测定结果). 这表明,臭氧氧化对 MC-RR 有较好的降解效果.

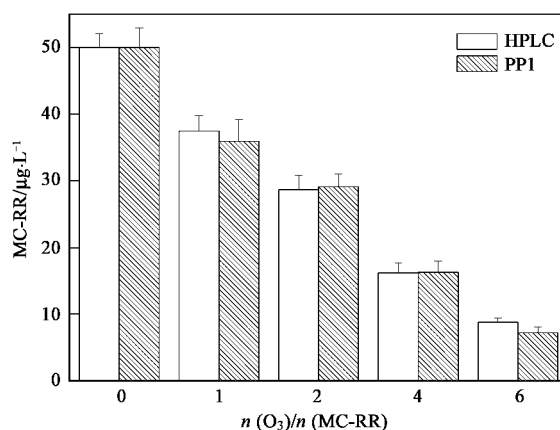


图2 不同臭氧投加量对 MC-RR 的降解效果
Fig. 2 MC-RR degradation under different ozone dosages

2.1.2 不同 pH 条件对 MC-RR 降解的影响

在污染物的臭氧氧化过程中,pH 的变化能够改变反应过程,并最终影响整个反应的降解速率^[7]. 本研究考察了 MC-RR 的纯水溶液在初始浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、臭氧投加比例为 4 倍物质的量的条件下,pH 在从 4.20 升高到 10.80 的过程中总降解率的变化,见表 1. 随着 pH 的上升,MC-RR 的降解率由酸性条件下的 96.4% 降低到碱性条件下的 28.5%,可

表 1 pH 对 MC-RR 臭氧降解的影响
Table 1 Effects of pH on the degradation of MC-RR by ozonation

pH	4. 20	5. 50	7. 00	8. 20	9. 50	10. 80
MC-RR 降解率/%	96. 4 ± 3. 5	82. 7 ± 1. 9	71. 0 ± 2. 6	55. 6 ± 1. 8	42. 3 ± 0. 8	28. 5 ± 1. 2

见 pH 是影响降解速率的重要因素之一. 在酸性条件下臭氧分子具有更高的氧化还原电位 (2. 07 V) 和稳定性,在纯水溶液中表现了更强的氧化降解能力. 在 pH 从 4. 20 升高到 10. 80 的过程中,MC-RR 的臭氧降解率降低了 70. 4% .

2. 1. 3 不同饮用水水质对 MC-RR 降解的影响

在常规的给水过程中,NOM 广泛存在于自然水体和水厂的不同处理工段. NOM 主要表现为腐殖质和藻类有机物,是 TOC 的主要表现物质,并产生 UV_{254} . 本研究考察了 MC-RR 在初始浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7. 0、臭氧投加比例为 4 倍物质的量的条件下,不同水质 (NOM 浓度) 条件对 MC-RR 臭氧氧化的影响. 由表 2 可知,原水中 NOM 浓度的升高 (表现为 TOC 浓度的升高),可以抑制臭氧对 MC-RR 的降解反应. 在原水中 TOC 从 0 升高到 $8. 31\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,MC-RR 降解率从原来的 71. 0% 减少到 19. 3% ,降低了 72. 8% . 说明 NOM 能够和臭氧进行反应,导致了它和 MC-RR 臭氧降解过程中的竞争作用.

表 2 NOM 对 MC-RR 臭氧降解的影响
Table 2 Effects of NOM on the degradation of MC-RR by ozonation

水样	TOC/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	UV_{254}/cm^{-1}	MC-RR 降解率/%
1	0	0. 012	71. 0 ± 2. 6
2	1. 45	0. 054	47. 8 ± 3. 3
3	2. 92	0. 076	29. 5 ± 1. 5
4	5. 38	0. 195	22. 0 ± 1. 7
5	8. 31	0. 213	19. 3 ± 1. 2

2. 2 MC-RR 降解机制分析

通常认为,MC-RR 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^[16]. 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,唯一的差别在于它们在 2 号位氨基酸残基的不同. MC-LR 在 2 号位是一个亮氨酸 (L),而 MC-RR 的 2 号位氨基酸为精氨酸 (R) (见图 1)^[17]. 本研究采用步进投加臭氧的方法,使用 HPLC-MS 检测,以分子量来确定 MC-RR 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 11 种代表性副产物 (见表 3),初步可以将其降解途径归纳如下.

2. 2. 1 Adda 途径

臭氧分子或者其自由基进攻能够导致 MC-RR 的 Adda 侧链基团的断裂,从而去除 MC-RR 的活性. 其途径可如图 3,在臭氧氧化体系下,MC-RR 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, $M_r = 1\ 071$). 紧接着,不稳定的二醇在自由基进攻下,在上述 2 个位置断键产生醛类物质. 其中 MC-RR 的二醇类副产物在 4-5 位发生的断键反应产生化合物 4,相对分子质量为 877;而在 6-7 位发生的断键反应产生的物质化合物 5,相对分子质量为 837. 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.

表 3 臭氧氧化 MC-LR 过程中产物 (HPLC-MS 检测)
Table 3 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-RR	1 037	$[M + 2H]^{2+} 520$	9. 09
化合物 2、3	1 071	$[M + 2H]^{2+} 537$	8. 38
化合物 4	877	$[M + 2H]^{2+} 440$	2. 73
化合物 5	837	$[M + 2H]^{2+} 420$	2. 52
化合物 6	853	$[M + 2H]^{2+} 428$	2. 24
化合物 7	1 069	$[M + 2H]^{2+} 536$	7. 73
化合物 8	1 053	$[M + 2H]^{2+} 528$	8. 54
化合物 9、10	1 087	$[M + 2H]^{2+} 566$	8. 77
化合物 11	985	$[M + H]^+ 986$	6. 27
化合物 12	785	$[M + H]^+ 786$	5. 03

在整个反应过程中,由于化合物 5 (醛) 的化学结构不稳定性 (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 853. Lawton 等^[12] 在研究使用 TiO_2 光催化降解 MCs 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 $\cdot\text{OH}$ 对目标有机化合物进攻来完成.

另外,对 MC-RR 的臭氧氧化研究还发现了

Adda 侧链降解过程中的苯环羟基化作用,见图 4. 首先,臭氧氧化的自由基途径能够和 Adda 侧链 1 号位上的苯环发生加成反应,使苯环带上 1 个或者 2 个羟基,其中带上 1 个羟基的物质为化合物 8,相对分子质量为 1 053,给出基峰为 528 (m/z) 的 $[M + 2H]^{2+}$ 离子峰;带上 2 个羟基的物质为化合物 7,相

对分子质量为 1 069,给出基峰为 536 (m/z) 的 $[M + 2H]^{2+}$ 离子峰. MC-RR 在经过苯环羟基化反应后,由于本身基团的供电性的增强,更加强了其在臭氧氧化反应体系中的活性,更有利于进一步按照 Adda 氧化途径反应生成其他副产物 9、10,最后断键成为副产物 5,具体见图 4.

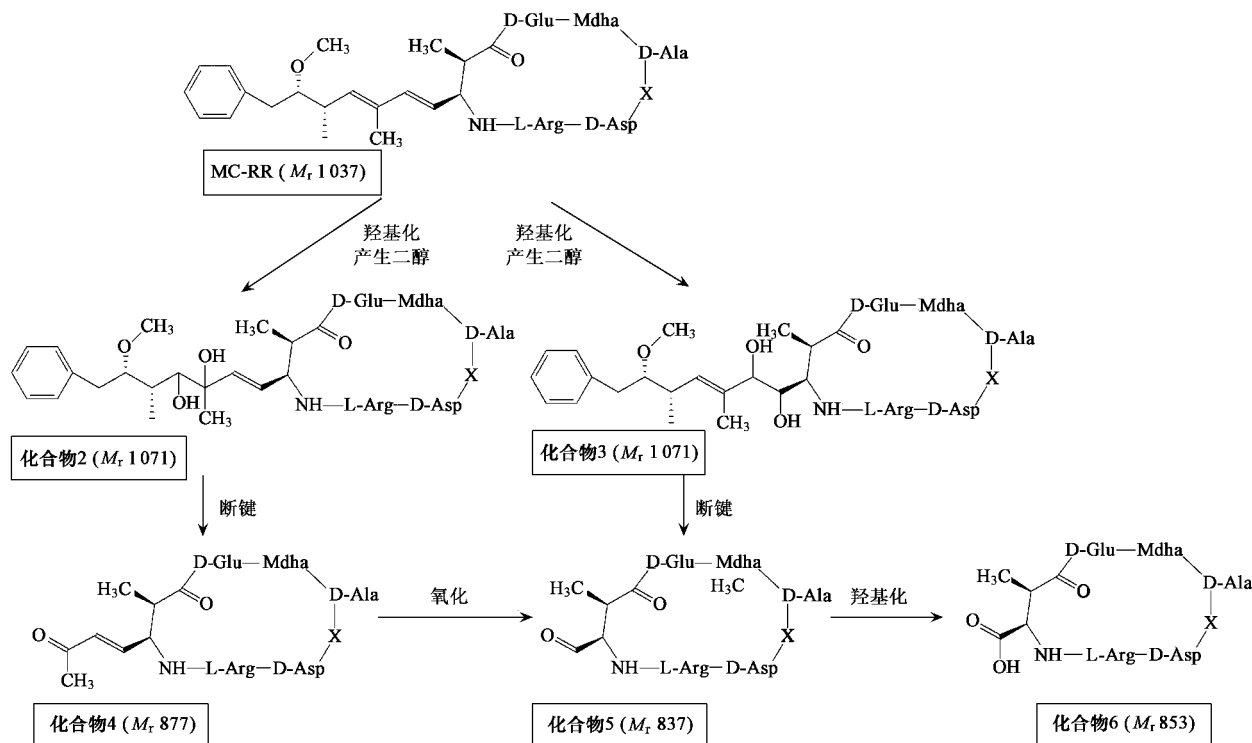


图 3 MC-RR 臭氧氧化降解的 Adda 途径

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

2.2.2 Mdha 途径

研究中笔者发现,臭氧氧化过程中由于强氧化导致的 MC-RR 七肽环在特定位置的断裂,打开形成直链 MC (Mdha 途径). MC-RR 臭氧氧化降解的 Mdha 途径见图 5. 由图 5 可以看出,臭氧氧化体系中 MC-RR 的七肽环的断裂主要发生在 Mdha 和 Ala 之间,得到一个相对分子质量为 986 的直链化合物 (化合物 11). 同时,进一步对降解产物检索发现,得到化合物 12 (M_r 785),它是一个不仅 Adda 侧链被切断而且七肽环被打开的直链 MC-RR 降解产物. 这说明 Mdha 途径和 Adda 途径是相互联系的一个过程^[18].

笔者在研究 MC-RR 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-RR 量比较小;②

MC-RR 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)^[19]. 为此,本研究对 MC-RR 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.

2.2.3 降解产物量的分析

图 6 说明了 MC-RR 臭氧降解过程中 11 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 [$n(O_3):n(\text{MC-RR})$ 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. 由图 6 可以看出,相对分子质量为 837 (化合物 5)、877 (化合物 4)、1053 (化合物 8) 和 1071 (化合物 2、3) 的化合物检出的量占绝对优势. 它们都是 MC-RR 的 Adda 降解途径的产物. 这说明在 MC-RR 的降解过程中, Adda 途径占主导地位. 而 Mdha 途径产物不仅

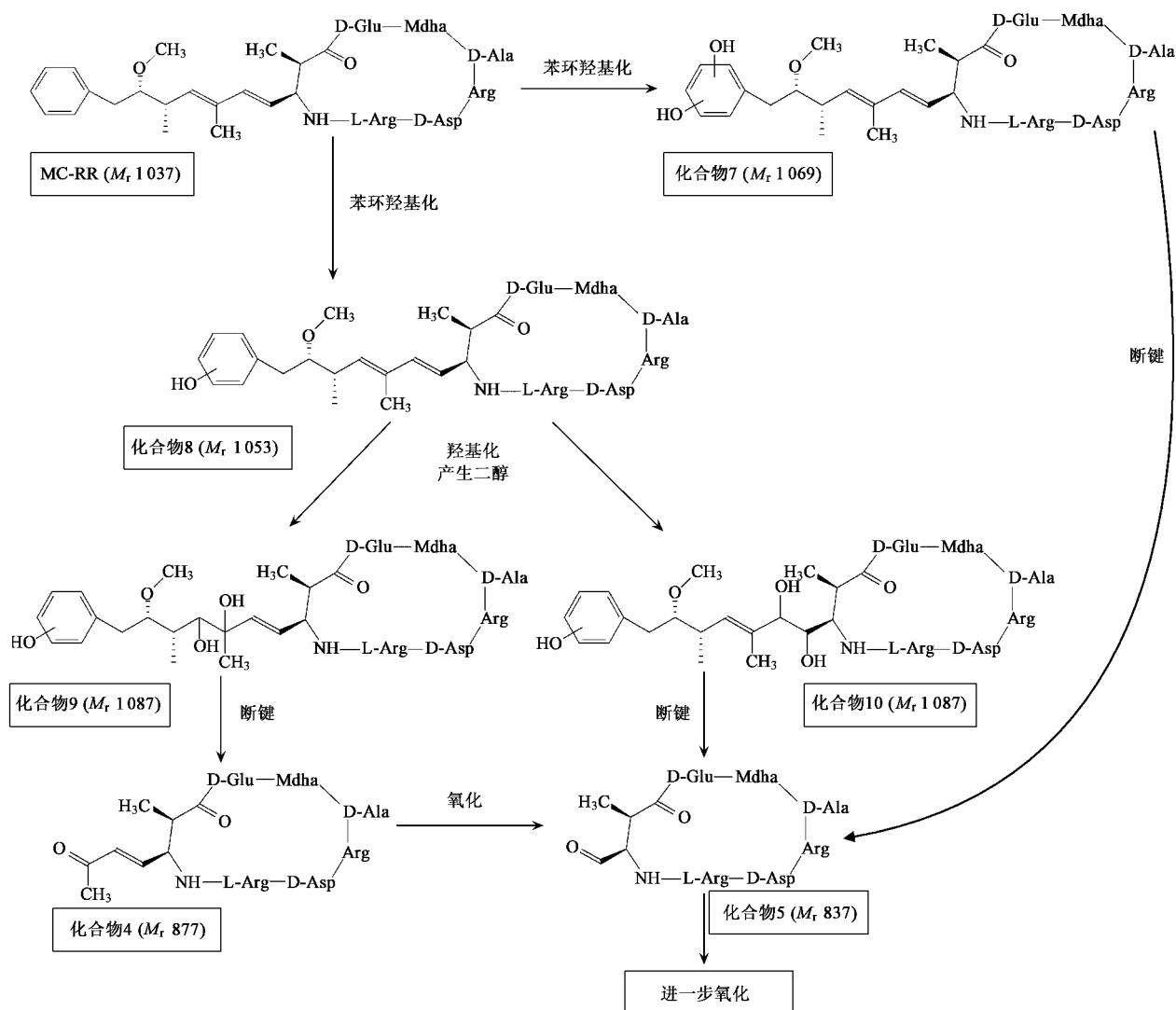


图4 MC-RR Adda 侧链降解过程中的苯环羟基化

Fig. 4 Ring hydroxylation pathways for MC-RR degradation by ozone on the Adda side chain

种类比较少,而且量也很低.另外,研究发现在臭氧投加量 $n(\text{O}_3):n(\text{MCs})$ 为 4:1 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-RR 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,笔者在实验过程中检测到的只不过是其中具有代表性的(稳定、量大)的产物,并以此来推断反应的主要途径和方式^[20].对于该部分工作,本研究会进一步深入,以阐明其途径.

2.3 产物去毒效果分析

综上所述,臭氧氧化 MC-RR 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-RR 臭氧氧化 2 种典型途径的产物,但是却不能了解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-RR 含量检测)方法来对照分析以确定臭氧氧化对 MC-RR 脱毒效果^[21,22] (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,但是都在误差范围内.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.

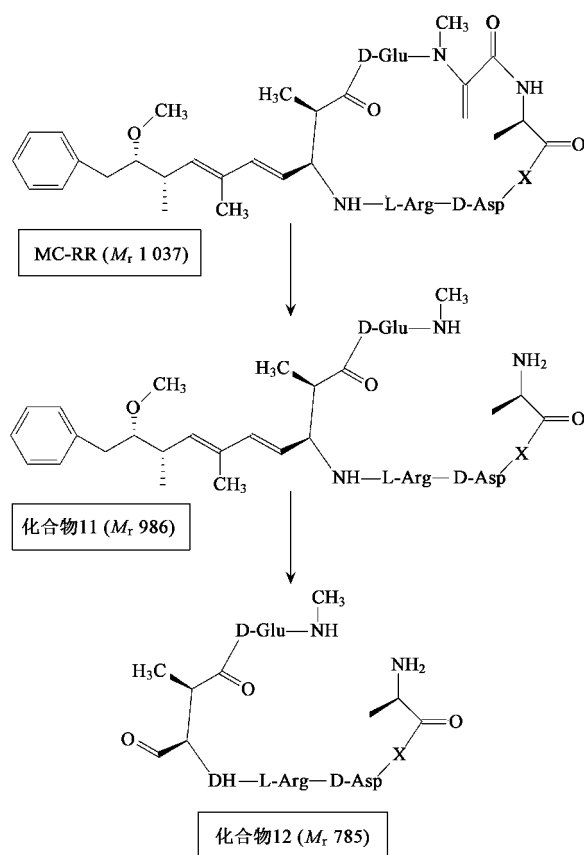


图5 MC-RR 的臭氧氧化降解 Adda 途径

Fig. 5 Byproducts from the MC-RR degradation by ozone on the peptide ring

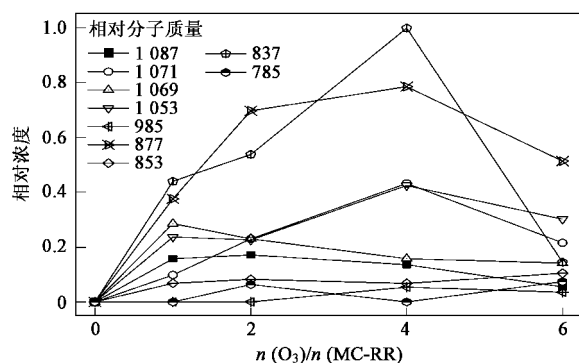


图6 臭氧氧化 MC-LR 过程中的产物量的变化

Fig. 6 Reaction profile of byproducts (list by M_r) from degradation of MC-LR by ozone

3 结论

(1) 臭氧氧化能够有效地降解 MC-RR, 在 $n(\text{O}_3):n(\text{MC-RR})$ 为 6 的条件下, MC-LR 的去除率达到 83%. 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. pH 从 4.20

升高到 10.80, MC-RR 降解率降低了 70.4%; 原水中 NOM (以 TOC 计) 从 0 升高到 $8.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MC-RR 降解率降低了 72.8%.

(2) 臭氧氧化降解 MC-RR 主要通过 Adda 途径和 MdhA 途径来完成对 MC-RR 的降解和脱毒作用. 臭氧氧化的 Adda 途径是通过破坏 MC-RR 上 Adda 侧链的进攻, 断具有活性的 Adda 直链, 从而达到去毒的目的; 臭氧氧化的 MdhA 途径是通过破坏 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. 整过程中 Adda 途径占主导作用.

参考文献:

- [1] Dawson R M. The toxicology of microcystins [J]. *Toxicol*, 1998, **36**: 953-962.
- [2] Chen Y M, Lee T H, Lee S J, *et al.* Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins [J]. *Toxicol*, 2006, **47**: 742-746.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 王金丽, 梁文艳, 马炎炎, 等. Ti/RuO₂ 电催化法降解藻毒素 MCLR 影响因素的研究 [J]. *中国环境科学*, 2008, **28** (8): 709-713.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] El-Din M G, Smith D W. Degradation of cyanobacteria anatoxin-a by advanced oxidation processes [J]. *Sep Purif Technol*, 2007, **57** (1): 85-93.
- [9] Thapsingkaew O, Kijjanapanich V, Ruanguttikarn W. Reduction of trihalomethane formation and detoxification of microcystins in tap water by ozonation [J]. *J Water Health*, 2008, **6** (2): 281-288.
- [10] Matsunaga T, Nakasono S, Kitajima Y, *et al.* Electrochemical disinfection of bacteria in drinking water using activated carbon fibers [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **43**: 429-433.
- [11] 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.
- [12] Lawton L A, Robertson P K J, Cornish B J P A, *et al.* Detoxification of microcystins (Cyanobacterial hepatotoxins) using TiO₂ photocatalytic oxidation [J]. *Environ Sci Technol*, 1999, **33**: 771-775.

- [13] Bader H, Hoigne J. Determination of ozone in water by the indigo method [J]. *Water Res*, 1981, **15**: 449-456.
- [14] Ortea P M, Allis O, Healy B M, *et al.* Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultra-violet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry [J]. *Chemosphere*, 2004, **55**: 1395-1402.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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 Med Chem Lett*, 2003, **13**: 2907-2911.
- [22] 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.