

用高效液相色谱法检测天然水体中的微囊藻毒素

季林丹 刘慧刚 徐进 徐立红

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

DETECTION OF MICROCYSTINS IN NATURAL WATER BY
HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

JI Lin-Dan, LIU Hui-Gang, XU Jin and XU Li-Hong

(Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

关键词:水华;微囊藻;微囊藻毒素;高效液相色谱法**Key words:** Water bloom; Microcystis; Microcystin; HPLC**中图分类号:**Q-331 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2007)04-0604-03

由于大量氮、磷等物质释放到水体中,导致水体富营养化加剧,水华的发生已成为全球性环境问题。在长江、黄河、松花江等主要河流和太湖、滇池、巢湖等每年都有水华发生^[1]。因此建立快速、灵敏、可靠、简便可行的蓝藻毒素检测方法以对毒素进行早期检测和预报是保护水生生态系统和人类健康的关键措施之一。在过去的研究中已证实高效液相色谱法(HPLC)可对多种微囊藻毒素进行精确的定性定量测定,但其样品测定前的处理步骤较为繁琐,费时较长。因此,本文采用水样处理步骤简化后的高效液相色谱法对发生水华的杭州市华家池水样进行了检测,并对该水体中的藻种进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 仪器 Beckman Coulter 32 KaratTM高效液相色谱仪、166可编程紫外检测器、旋转挥发器 RE-52AA(上海振捷)、显微镜(Olympus DP50)。

1.2 试剂 两种微囊藻毒素标样 RR 与 LR(由日本名城大学原田健一教授赠送), Chromatorex ODS(100—200目)购于 Fuji Silysia Chemical 有限公司,其他试剂均为市售分析纯。

1.3 藻类鉴定 取华家池新鲜水样,静置 30min 后,用吸管吸取一滴悬浮的藻样细胞滴于载玻片上,用盖玻片推匀后在

显微镜(Olympus DP50)100×和400×下随机选取若干个视野观察其中藻细胞的形态和数量。

1.4 样品处理 取杭州市华家池水样用 GF/C(Whatman 公司)过滤,滤液进行以下处理:每个水样各 1L 滤液过 ODS 小柱(用 10mL 甲醇(色谱纯)和 10mL 高纯水活化);然后用 10mL 高纯水洗脱杂质,再用 5mL 甲醇收集于梨形烧瓶;5mL 甲醇洗脱液用旋转挥发器(39℃)将甲醇挥发干,剩余残渣用 1mL 高纯水溶解;置于 4℃ 保存,待测。

1.5 标样制备 RR 标样,0.05mg/mL RR(50% 甲醇);LR 标样,0.05mg/mL LR(50% 甲醇)。

1.6 色谱分析条件 色谱柱: COSMOSIL C18 柱,4.6 mm × 150mm (NACALAT TESQUE INC);流动相: 甲醇/0.05mol/L KH₂PO₄(pH = 3) = 58:42;柱温: 27℃;进样量: 5μL;流速: 1mL/min;检测波长: 238nm。

2 结果

2.1 高效液相色谱法结果

标准样品和浓缩水样各进样两次,其峰高(峰面积)、保留时间取均值计算,微囊藻毒素(MC-LR 和 MC-RR)的确定通过其各自保留时间 ± 0.05min 来确定。

结果显示 MC-LR 的保留时间为: 6.958min; MC-RR 的保

收稿日期: 2006-05-11; 修订日期: 2007-04-02

基金项目: 国家高技术研究发展规划(2001AA641030)资助

作者简介: 季林丹(1983—),女,浙江温州;硕士研究生;研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: jilindan@163.com

通讯作者: 徐立红, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

留时间为:4.450min。华家池水样中同时含有 MC-LR 和 MC-

RR;其含量分别为 21.008 $\mu\text{g/L}$ 和 23.800 $\mu\text{g/L}$ 。

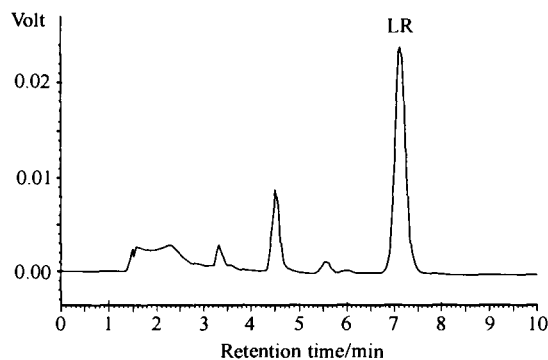
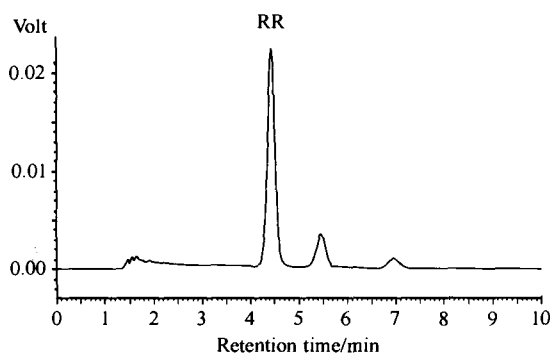


图 1 微囊藻毒素标样的高效液相色谱图

Fig.1 The High performance Liquid Chromatography of the standard samples of Microcystins

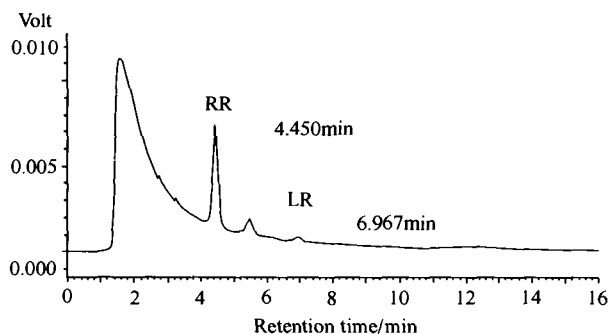


图 2 华家池水样的高效液相色谱图

Fig.2 The High performance Liquid Chromatography of the field sample from Huajia Pond

2.2 藻类鉴定结果

2005 年夏季,杭州天气炎热,杭州市华家池由于未与外界水域交通,同时水体中氮、磷等营养物质富余过多,出现了明显的水华,而且持续时间较长。经藻类鉴定,证明形成水华的优势藻类是铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)。

3 讨论

水体中微囊藻毒素对人体、家畜及野生动物存在着严重的健康危害^[2,3]。由某些蓝藻类(如微囊藻、鱼腥藻、念珠藻、颤藻)产生的肝脏毒素如微囊藻毒素(MCYST)和节藻毒素可与 Ser/Thr 蛋白磷酸酶^[4-6]结合并抑制其活性,是强烈的促肿瘤物质^[7]。微囊藻毒素和节藻毒素进入肝细胞后引起蛋白的过磷酸化、不可逆的细胞微丝重构及肝脏细胞的破坏从而产生肝脏毒性^[8-10]。在采集水样期间,可见华家池水体中浮起大量的死鱼,这很可能与微囊藻毒素的急性毒作用相关。

目前,实验室研究中对微囊藻毒素的主要检测方法有小鼠生物检测法、酶联免疫吸附试验、蛋白磷酸酶抑制法、高效液相色谱法等几种。小鼠生物检测法能粗略地区分毒素的毒作用特征,但无法进行准确的定性定量检测。酶联免疫吸

附试验对微囊藻毒素检测的灵敏度很高,但是对某些微囊藻毒素的异构体的交互反应性比较低。微囊藻毒素是极强的蛋白磷酸酶抑制剂,因此能用蛋白磷酸酶抑制法检测微囊藻毒素,目前已发展有同位素法、比色法和荧光法;但此法易受其他具有蛋白磷酸酶抑制活性的因素影响。高效液相色谱法在有各种毒素标准样品存在的情况下可对水样中各种微囊藻毒素进行定性定量检测,但其样品处理步骤较为繁琐,费时较长。本次研究中我们采取了简化的水样处理步骤——初始水样初滤后直接过 ODS 柱一次性进行清洗、浓缩,代替以往的先过硅胶柱再过 Sep-pak C18 柱的两次清洗、浓缩^[16];检测结果显示浓缩水样中杂质干扰较小,RR 和 LR 分离清楚;因此通过本次研究,我们认为微囊藻毒素检测的高效液相色谱法中水样的处理步骤简化是可行的,并且这一简化大大缩短了高效液相色谱法检测的总耗时,从而更适应于天然水体中微囊藻毒素的常规检测。

结合 HPLC 法和藻类鉴定,本研究证实华家池发生水华的水体中铜绿微囊藻是主要优势藻类,而对水样测定的结果表明水体中微囊藻毒素类物质的毒素水平已远远高于世界卫生组织所要求的饮用水中 LR < 1 $\mu\text{g/L}$ 的标准,这预示水华形成将对水质产生严重的影响,应该引起高度重视。

参考文献:

- [1] Shen J G, Zhang J. Pollution status, toxicity mechanism and detection assays of microcystin [J]. *Per. Med. Inf.*, 2001, (17):10—16 [沈建国,章建.微囊藻毒素的污染状况、毒性机理和检测方法.国外医学·卫生学分册,2001,(17):10—16]
- [2] Hrubec J. The handbook of environmental chemistry. V5 part C—Quality and treatment of drinking water II [C]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998, 53
- [3] Chorus I, Bartram J. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management [M]. Geneva: World Health Organization, 113
- [4] Goldberg J, Huang H B, Kwon Y G, et al. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1 [J]. *Nature*, 1995, 376: 745—752

- [5] Annala A, Lehtimäki J, Mattila K, *et al.* Solution structure of nodularin. An inhibitor of serine/threonine-specific protein phosphatases [J]. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**: 16695—16702
- [6] Trogen G B, Edlund U, Larsson G, *et al.* The solution NMR structure of a blue-green algae hepatotoxin, microcystin-RR-a comparison with the structure of microcystin-LR [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1998, **258**: 301—312
- [7] Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, *et al.* Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR [J]. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1992, **118**: 420—424
- [8] Falconer I R, Jackson A R B, Langley J, *et al.* Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* [J]. *Aust. J. Biol. Sci.*, 1981, **34**: 179—187
- [9] Eriksson J E, Paatero G I, Meriluoto J A, *et al.* Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin [J]. *Exp. Cell Res.*, 1989, **185**: 86—100
- [10] Falconer I R, Yeung D S. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins [J]. *Chem. Biol. Interact.*, 1992, **81**: 181—196
- [11] Lambert T W, Boland M P, Holmes C F B, *et al.* Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28**: 753—755
- [12] Codd G A, Jefferies T M, Keevil C W, *et al.* Detection methods for cyanobacterial toxins [M]. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1994, 90
- [13] An J, Carmichael W W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins [J]. *Toxicol.*, 1994, **32**: 1495—1507
- [14] Sim A T, Mudge L M. Protein phosphatase activity in cyanobacteria: consequences for microcystin toxicity analysis [J]. *Toxicol.*, 1993, **31**: 1179—1186
- [15] Codd G A, Jefferies T M, Keevil C W, *et al.* Detection methods for cyanobacterial toxins [M]. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1994, 100
- [16] Watanabe M F, Harada K, Carmichael W W, *et al.* Toxic microcystin [M]. CRC Press. 1996, 127—128