

研究简报

高效液相色谱 - 串联质谱法研究氯对水中藻毒素 MC - LR 的降解作用

赵建伟^{1,2}, 黄廷林², 何文杰^{1,2}, 韩宏大¹

(1. 天津自来水集团有限公司, 天津 300072; 2. 西安建筑科技大学
环境与市政工程学院, 陕西 西安 710054)

摘要: 选择目前最常用的预氧化剂——氯作为研究对象, 利用液相色谱 - 串联质谱的检测手段, 展开了有效氯对 MC - LR 降解作用的研究。结果表明, HPLC - MS 方法可靠、灵敏度高, 在 5 ~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, MC - LR 浓度与 HPLC - MS 峰面积呈线性关系, 相关系数 r 为 0.999 3; 在常规的氧化剂投加量和反应时间条件下, 有效氯对 MC - LR 表现出良好的降解作用, 降解反应符合一级动力学模式; 通过对质谱图的分析, 确定了降解产物的相对分子质量, 由此进一步探讨了 MC - LR 的氯化降解机理。

关键词: 微囊藻毒素 MC - LR; 氯; 氧化机理; 高效液相色谱 - 质谱

中图分类号: O657.63; S946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)05 - 0647 - 04

Mechanism Studies of Chlorine Degradation of Microcystin - LR in Water Using High-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

ZHAO Jian-wei^{1,2}, HUANG Ting-lin², HE Wen-jie^{1,2}, HAN Hong-da¹

(1. Tianjin Water Works Group Co. Ltd., Tianjin 300072, China; 2. School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xi'an 710054, China)

Abstract: The presence of Microcystins (MCs) in water has the potential to adversely affect human health. Among various isomers of MCs, MC - LR has the strongest toxicity and is most harmful. At present, several pre-oxidants, which are commonly used in water treatment processes, are effective to remove MC - LR. However, the degeneration mechanism has remained unclear. Chlorine was selected in the present work since it is used worldwide for preoxidation treatment. Using a method based on HPLC - MS, we conducted studies on the chlorine degeneration of MC - LR. The results indicated that HPLC - MS is creditable and sensitive. It was also found that there was a linear relationship between the concentration of MC - LR and peak area in the range of 5 - 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ with a correlation coefficient (r) of 0.999 3. Under the general condition of oxidant dose and reaction time, MC - LR was degraded rapidly by active chlorine and the degradation reaction followed the first-order kinetics. The relative molecular mass of the degradation product was determined through analyzing the full-scan mass spectrum of MC - LR and the oxidative degradation mechanism of MC - LR was further discussed.

Key words: Microcystin - LR; Chlorine; Oxidation mechanistic; HPLC - MS

富营养化水体中的蓝藻水华可导致水中微囊藻毒素 (microcystins, 简称 MCs) 含量升高, MCs 为七肽环状毒素, 水中 MCs 的存在对人类健康构成潜在危害, 目前已从不同的微囊藻藻株中分离鉴定出 70 多种藻毒素异构体^[1], 存在最普遍也是含量较多的是 MC - LR、MC - RR、MC - YR^[2], 其中 MC - LR 是毒性最强、危害最严重的一种, 致死量 LD_{50} 为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3], 它在不同的位置含有亮氨酸 (L) 和精氨酸 (R)。MC - LR 的毒性已被证实是由于其对人体重要调节酶 (蛋白质磷酸酶 1 和 2A) 潜在的抑制作用, 导致急性和慢性中毒^[4]。另外, MC - LR 的促肿瘤作用也引起了广泛的关注。许多国家根据 WHO 推荐值建立了饮用水中 MC - LR 限制标准^[5], 最高允许含量为 $1.0 \mu\text{g}/\text{L}$ 。我国的“生活饮用水卫生规

收稿日期: 2006 - 07 - 18; 修回日期: 2006 - 08 - 23

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA601140)

作者简介: 赵建伟 (1977 -), 男, 山东平度人, 博士; 黄廷林, 联系人, Tel: 029 - 82201514, E-mail: huangtinglin@263.net

范和“城市供水水质标准”中都规定 MC-LR 最高含量为 $1.0 \mu\text{g/L}$ 。

MC-LR 的环状结构使其化学性质相当稳定, 常规的水处理工艺对其去除率很低, 一般在 50% 以下, 有时甚至出现负去除率。因此, 在常规处理之前寻求有效去除 MC-LR 的预处理方法, 对于饮用水的安全保障具有重要意义。本研究选择了目前广泛应用于预氧化过程中的氯^[6]为研究对象, 利用高效液相色谱-串联质谱法^[7-8], 展开了有效氯对 MC-LR 去除效果和降解动力学的研究, 并通过分析降解产物的相对分子质量, 进一步探讨了 MC-LR 的氧化降解机理。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Finnigan 公司 LCQ Advantage MAX 型高效液相色谱/电喷雾质谱联用仪 (美国热电公司), JB-3 型恒温磁力搅拌器 (上海雷磁); HPLC 级甲醇、乙腈 (德国默克公司), 去离子水, 分析纯甲酸、次氯酸钠 (含有效氯 5%); 藻毒素 MC-LR 标准品 (分子式: $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$, $M_r = 995.17$, Alexis 公司, 美国)。

1.2 液相色谱与质谱条件

色谱柱: Symmetry C18, $2.1 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ (美国 Waters 公司); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液-乙腈 (体积比 70:30); 柱温 35°C ; 检测波长 238 nm ; 流速: 0.2 mL/min ; 进样体积: $20 \mu\text{L}$ 。

电离方式: ESI(+); 电离电流: $1.5 \mu\text{A}$; 电离电压: 4.5 kV ; 毛细管电压: 10 V ; 毛细管温度: 300°C ; 鞘气流速: 450 mL/min ; 辅助气流速: 60 mL/min ; 扫描范围: $m/z 400 \sim 1500$; 选择离子: $m/z 995$ 。

1.3 预氧化反应条件

模拟反应器由 250 mL 的烧杯和恒温磁力搅拌器构成, 反应温度设为 25°C , 转速设为 120 r/min ; 氧化剂有效氯分别选取 2.0 、 3.0 、 3.5 、 4.0 mg/L 4 个投加量。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

将 MC-LR 标准品储备液逐级稀释成 500 、 250 、 100 、 50 、 25 、 $5 \mu\text{g/L}$, 在上述实验条件下进行测定。以 $m/z 995$ 为选择离子, 选择离子流色谱图如图 1 所示, 以峰面积为纵坐标, 对应标准样质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标进行线性回归, 回归方程为 $Y = (0.426 X + 3.3433) \times 10^6$, 相关系数 $r = 0.9993$ 。结果表明 MC-LR 在 $0 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性范围内, 测量结果准确可靠, 灵敏度较高, 绝对检出限低达 0.1 ng 。

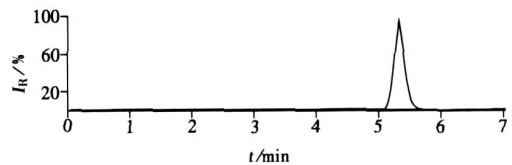


图 1 $100 \mu\text{g/L}$ MC-LR 标样的选择性离子流谱图

Fig. 1 The selective ion spectrogram of $100 \mu\text{g/L}$ MC-LR

2.2 氯对 MC-LR 的氧化动力学

量取 $100 \mu\text{g/L}$ 的 MC-LR 水溶液 200 mL 于 250 mL 烧杯中, 放到磁力搅拌器上, 投加不同浓度的氧化剂后在设定的条件下开始搅拌反应, 分别在 0 、 5 、 10 、 20 、 35 、 60 min 时取样, 并利用 LC-MS 直接对所取水样进行测定, 得到 MC-LR 浓度变化结果如图 2 所示。结果显示, 藻毒素 MC-LR 在有效氯的作用下迅速降解, 随着有效氯浓度和反应时间的增加, MC-LR 的去除率也不断增加。该实验条件下, MC-LR 的半衰期均小于 10 min , 在有效氯投加量超过 3.0 mg/L 时, 反应 20 min 后, MC-LR 的去除率即在 80% 以上。

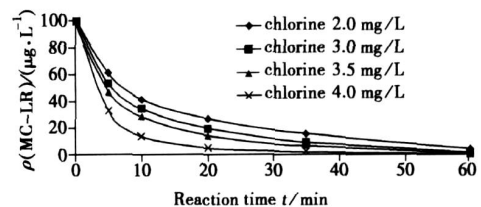


图 2 不同浓度有效氯对藻毒素的降解曲线

Fig. 2 MC-LR degradation curves at four initial chlorine concentrations

在不同有效氯投加量单因素实验的基础上, 用一元线性回归方程对不同氧化降解时间后 MC-LR 的相

对残余浓度对时间的相关性进行分析 (见表 1), 结果表明, 一级回归方程的相关系数大于临界相关系数 ($r > 0.95$), MC - LR 的降解反应符合一级动力学模式, 即 $\ln(c/c_0) = -kt + a$, 其中 c_0 是 MC - LR 的起始浓度 ($\mu\text{g/L}$), k 为反应速率常数, t 为反应时间, c 为 t 时刻对应的 MC - LR 浓度 ($\mu\text{g/L}$)。

表 1 不同氧化剂浓度下的 MC - LR 降解动力学方程

Table 1 Degradation kinetic equation of MC - LR at different chlorine concentrations

Dose of activity chlorine ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Kinetic equation	Rate constant k/min^{-1}	Correlation coefficient r
2.0	$\ln(c/c_0) = -0.048t - 0.235$	0.048	0.9908
3.0	$\ln(c/c_0) = -0.062t - 0.2718$	0.062	0.9932
3.5	$\ln(c/c_0) = -0.068t - 0.3753$	0.068	0.9890
4.0	$\ln(c/c_0) = -0.101t - 0.6057$	0.101	0.9853

2.3 MC - LR 的氯化降解机理

对经有效氯氧化后的 MC - LR 溶液进行质谱扫描结果如图 3 所示, 从扫描图上可以看出, 除检测到相对分子质量为 994 的藻毒素 MC - LR (见图 3B) 外还检测到两种主要的反应产物, 其中一种产物 $[M + H]^+$ 和 $[M + 2H]^{2+}$ 的质荷比 (m/z) 分别为 1047 和 524 (见图 3A), 由此可知此产物的相对分子质量为 1046, 分析认为它是溶液中的次氯酸分子 HOCl 与藻毒素 ADDA 基团 (3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6-二烯酸) 中的不饱和键发生不对称加成反应生成如图 4a 所示的中间产物, 而 ADDA 是微囊藻毒素生物活性表达所必须的^[9], 破坏或去除 ADDA 后藻毒素的毒性降低^[10]。另一种产物 $[M + H]^+$ 和 $[M + 2H]^{2+}$ 的质荷比 (m/z) 分别为 1029 和 515 (见图 3C), 由此可确定此产物的相对分子质量为 1028, 推断其为图 4b 所示的二羟基 - MC。由以上结果可推断 MC - LR 的氧化降解机理为: 有效氯溶于水形成次氯酸, 次氯酸可被依次质子化变成一种强力的亲电子物质, 随后与 MC - LR 分子中 ADDA 基团上的不饱和键反应生成氯乙醇 (相对分子质量 1046), 氯乙醇中的氯经过与溶液的亲质子置换反应后生成了二羟基 - MC (相对分子质量 1028), 从而消除了 MC - LR 的毒性^[11]。

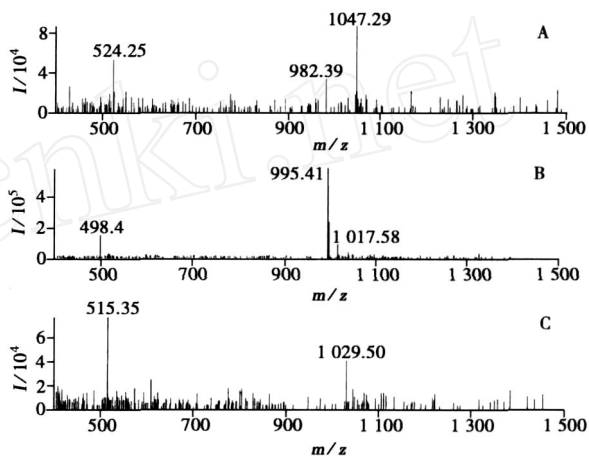


图 3 氯化后 MC - LR 溶液的质谱扫描图
Fig. 3 Full-scan mass spectrum of MC - LR solution by chlorination
A. the intermediate product (chlorohydrin);
B. ML - LR; C. dihydroxy - MC

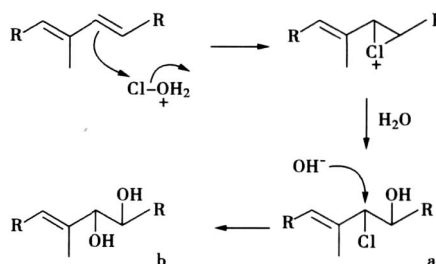


图 4 氯降解藻毒素机理图
Fig. 4 Decomposition of MC - LR by chlorine
a. chlorohydrin; b. dihydroxy - ML

3 结 论

(1) 用高效液相色谱 - 串联质谱法对 MC - LR 的测定结果显示, 该方法具有操作简单, 灵敏度高, 准确可靠等特点, 绝对检出限可达 0.1 ng, 适合用于检测水体中痕量 MC - LR 的含量。

(2) 有效氯对 MC - LR 表现出很好的降解效果, 随着有效氯投加量和反应时间的增加, MC - LR 的去除率也不断增加, 在有效氯投加量超过 3.0 mg/L 时, 反应 20 min 后, MC - LR 的去除率即在 80% 以上。

(3) 对降解时间和 MC - LR 的相对残余浓度相关性分析结果显示, 不同浓度有效氯对 MC - LR 的降解反应均符合一级动力学模式, 一级回归方程的相关系数远高于临近相关系数 ($r > 0.95$)。

(4) 有效氯可先与 MC - LR 的不饱和键反应生成氯乙醇类有机物, 氯乙醇中的氯可与溶液中的亲

质子发生置换反应, 再进一步生成二羟基 - MC - LR, 从而消除了 MC - LR 的毒性。

参考文献:

- [1] SPOOF L, VESTERKVIST P, LINDHOLM T, et al Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography - electrospray ionisation mass spectrometry[J]. *J Chromatogr, A*, 2003, 1020(1): 105 - 119.
- [2] PARK H, NAMIKOSHIM, BRITTAN SM, et al [D - Leu1] microcystin - LR, a new microcystin isolated from water bloom in a Canadian prairie lake[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 855 - 862.
- [3] DAWSON R M. The toxicology of microcystins[J]. *Toxicon*, 1998, 36(7): 953 - 962.
- [4] KUNIMITSU K, YOSHIZAWA S, MATSUMAR, et al Chemistry and toxicology of cyclic heptapeptide toxins, the microcystins from cyanobacteria[J]. *Microbiol Cult Coll*, 1994, 10: 5.
- [5] WHO. Guidelines for drinking-water quality[M]. Third edition Geneva: World Health Organization, 2004: 195.
- [6] JUAN L A, EVAR, JUSSIM. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins[J]. *Water Res*, 2005, 39(3): 1628 - 1638.
- [7] HARADA K I, NAKANO T, FUJII K, et al Comprehensive analysis system using liquid chromatography - mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria[J]. *J Chromatogr, A*, 2004, 1033: 107 - 113.
- [8] 张 昱, 杨 敏, 李宗来, 等. 液相色谱 - 电离质谱法测定微囊藻毒素 [J]. *中国给水排水*, 2005, 21(4): 94 - 96.
- [9] SENOGLES - DERHAM P J, SEAWRIGHT A, SHAW G, et al Toxicological aspects of treatment to remove cyanobacterial toxins from drinking water determined using the heterozygous P53 transgenic mouse model[J]. *Toxicon*, 2003, 41(8): 979 - 988.
- [10] CARMICHAEL W W, BEASLEY V R, BUNNER D L, et al Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue - green algae) [J]. *Toxicon*, 1998, 26: 1213 - 1217.
- [11] LAWTON L A, ROBERTSON P K J. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins from potable waters[J]. *Chem Soc Rev*, 1999, 28: 217 - 224.

《分析化学》(2008年)

邮发代号 12 - 6 本刊承办广告业务

《分析化学》(ISSN 0253 - 3820, CODEN FHHHDT, CN 22 - 1125/O6)是中国科学院和中国化学会共同主办的专业性学术期刊, 主要报道我国分析化学创新性研究成果, 反映国内外分析化学学科前沿和进展。刊物设有研究报告、研究简报、评述与进展、仪器装置与实验技术、来稿摘登等栏目。读者对象为从事分析化学研究和测试的科技人员及大专院校师生。本刊也是有关图书、情报等部门必不可少的信息来源。

《分析化学》目前是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊, 1999年荣获首届国家期刊奖, 2000年获中国科学院优秀期刊特别奖, 2001年入选“中国期刊方阵 高知名度、高学术水平的“双高”期刊, 2002年又荣获第二届国家期刊奖和第三届中国科协优秀科技期刊奖。论文已被包括美、英、日、俄的国内外 30余种刊物和检索系统收录。根据中国科技信息研究所历年来发布的“中国科技期刊引证报告”获悉, 本刊总被引频次和影响因子均居中国科技期刊排序前列, 本刊逐年被选入美国权威文摘《化学文摘》(CA)摘引量最大的 1000种期刊(简称“CA千种表”)中, 并居我国入选“CA千种表”期刊的前列。从 1999年第 27卷第 1期开始被美国科学信息研究所(Institute for Scientific Information)正式收入《科学引文索引扩大版》(Science Citation Index Expanded, SCIE, also known as SciSearch), 同时还被收入《Research Alert》和《Chemistry Citation Index》等 ISI 系列。本刊是我国发行量、报道容量和国内外影响较大的科技学术期刊之一。

本刊为月刊, 160页(大 16开), 由科学出版社出版。国内单价 15.00元, 全年 180.00元。邮发代号 12 - 6, 全国各地邮局订阅, 国外代号 M336, 中国国际书店订购, 漏订读者, 可与编辑部联系。

编辑部地址: 长春市人民大街 5625号 邮政编码: 130022

电话: 0431 - 85262017/85262018 传真: 0431 - 85262018

E - mail: fxhx@ciac.jl.cn

网址: <http://www.analchem.cn>