

# 高效液相色谱-二极管阵列检测法和超高效液相色谱-串联质谱法检测鱼腥藻毒素的比较研究

王素钦<sup>1,2</sup>, 陶思依<sup>1</sup>, 宋立荣<sup>1</sup>, 甘南琴<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 湖南文理学院, 环洞庭湖水产健康养殖及加工湖南省重点实验室, 水生动物重要疫病分子免疫技术湖南省重点实验室, 常德 415000)

**摘要:** **目的** 比较高效液相色谱-二极管阵列检测法(high performance liquid chromatography-photodiode array detector, HPLC-PDA)和超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)对鱼腥藻毒素的检测。**方法** 样品经酸性甲醇提取后使用超滤管去除杂质, 采用HPLC-PDA和UPLC-MS/MS检测样品中鱼腥藻毒素 AnTX-a 及 HAnTX-a 的含量。**结果** 2种方法均能有效分离分析 AnTX-a 及 HAnTX-a, 且均能排除样品中 L-苯丙氨酸的干扰。HPLC-PDA 检测法对 AnTX-a 及 HAnTX-a 的检测限分别为 0.052 和 0.070  $\mu\text{g/mL}$ ; UPLC-MS/MS 检测法对 AnTX-a 及 HAnTX-a 的检测限均为 0.010  $\text{ng/mL}$ 。**结论** 2种方法准确、灵敏度高, UPLC-MS/MS 较 HPLC-PDA 检测法具有高灵敏度、高检测效率的优势, 但 HPLC-PDA 检测法更具普遍适用性。

**关键词:** 鱼腥藻毒素; 高效液相色谱-二极管阵列检测法; 超高效液相色谱-串联质谱法

## Comparison study on the determination of anatoxins by high performance liquid chromatography-photodiode array detector and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Su-Qin<sup>1,2</sup>, TAO Si-Yi<sup>1</sup>, SONG Li-Rong<sup>1</sup>, GAN Nan-Qin<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Fresh Water Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for Health Aquaculture and Product Processing in Dongting Lake Area, Hunan Provincial Key Laboratory for Molecular Immunity Technology of Aquatic Animal Diseases, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To compare the determination of anatoxins by high performance liquid chromatography-photodiode array detector (HPLC-PDA) and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted by acidified methanol, then purified by ultrafiltration tube to remove the impurities, and the content of AnTX-a and HAnTX-a was detected by HPLC-PDA and UPLC-MS/MS, respectively. **Results** Both of the 2 methods could effectively separate and analyze AnTX-a and HAnTX-a, and could eliminate the interference of L-phenylalanine in the sample. The detection limit of HPLC-PDA

基金项目: 中国科学院水生生物研究所特色所项目(Y85Z061601)、湖南文理学院博士启动基金(18BSQD18)

**Fund:** Supported by the Featured Institute Service Projects from Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences (Y85Z061601), PhD research startup foundation of Hunan University of Arts and Science (18BSQD18)

\*通讯作者: 甘南琴, 研究员, 主要研究方向为蓝藻生物毒素学。E-mail: gannq@ihb.ac.cn

\*Corresponding author: GAN Nan-Qin, Professor, State Key Laboratory of Fresh Water Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China. E-mail: gannq@ihb.ac.cn

for AnTX-a and HAnTX-a were 0.052 and 0.070  $\mu\text{g/mL}$ , while the detection limit of UPLC-MS/MS for both AnTX-a and HAnTX-a were 0.010  $\text{ng/mL}$ . **Conclusion** The 2 methods are accurate and sensitive. UPLC-MS/MS has the advantages of high sensitivity and high detection efficiency compared with HPLC-PDA, but HPLC-PDA is more universal.

**KEY WORDS:** anatoxins; high performance liquid chromatography- photodiode array detector; ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

## 1 引言

近年来, 由于水体富营养化, 蓝藻水华现象在湖泊、水库及河流等水体中频繁暴发, 一些水华蓝藻能够产生蓝藻毒素, 对淡水生态系统和人类健康造成了严重的威胁。鱼腥藻毒素(anatoxins, AnTX)是一类由蓝藻产生的具有神经毒性的小分子生物碱。AnTX-a 化学名为 2-乙酰基-9-氮杂双环[4, 2, 1]-壬-2-烯, 分子式为  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$ , 分子量为 165<sup>[1]</sup>; AnTX-a 异构体 homoanatoxin-a(HAnTX-a) 是 AnTX-a 侧链上的乙酰基被丙酰基所替代形成, 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$ , 分子量为 179<sup>[2]</sup>(图 1)。AnTX-a 和 HAnTX-a 是最常报道的 2 种鱼腥藻毒素类型, AnTX 主要由鱼腥藻(*Anabaena*)<sup>[3]</sup>、束丝藻(*Aphanizomenon*)<sup>[4]</sup>、及颤藻(*Oscillatoria*)<sup>[5]</sup>、常丝藻属(*Tychonema*)<sup>[6]</sup>和拟柱孢藻属(*Cylindrospermum*)<sup>[7]</sup>等丝状蓝藻产生。

作为神经递质乙酰胆碱的结构类似物, AnTX 可作用于神经细胞突触后膜与乙酰胆碱受体结合, 但因其不能被胆碱酯酶酶解, 从而持续地传导神经冲动, 造成神经传导阻滞<sup>[8]</sup>。AnTX-a 作用于小白鼠后会使其表现出抽搐、痉挛、气喘、肌肉僵直、呼吸麻痹的中毒症状, 数分钟后死亡。AnTX-a 对小鼠的半数致死量(lethal dose 50%,  $LD_{50}$ )值为 200  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[8]</sup>, HAnTX-a 对小鼠的  $LD_{50}$  值为 250  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[2]</sup>。AnTX 已成为多起陆生动物(牛、狗、火烈鸟)中毒事件的元凶, 不慎接触或通过饮用污染水等途径均可能导致中毒。2001 年肯尼亚 Bogoria 湖产鱼腥藻毒素席藻(*Phormidium*) 导致火烈鸟大量中毒死亡, 研究者在死亡火烈鸟的胃、肠道、粪便中分别检测到了 4.35、0.76 和 0.25  $\mu\text{g/g}$  的 AnTX-a 含量<sup>[9]</sup>; 2017 年, 柏林的 Tegel 湖发生了至少 12 条狗急性神经中毒的事件, 研究者在狗的胃里检测到 8700  $\mu\text{g/L}$  的 AnTX-a, 随后在该湖的常丝藻(*Tychonema*)中检测到了 1870  $\mu\text{g/L}$  的 AnTX-a<sup>[10]</sup>; 在新西兰, 自 2005 年起, 因误食河中产毒的底栖藻已导致约 100 条狗死亡, 其中在 2014 年一条死亡的狗尸体的胃部检测到了 36  $\mu\text{g/kg}$  的 AnTX-a<sup>[11]</sup>。暴露在 AnTX-a 水体中的鱼类免疫细胞活力下降, 免疫系统失调<sup>[12,13]</sup>; AnTX-a 还可引起水生植物金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)和浮萍(*Lemna minor*)细胞的氧化胁迫反应, 降低其叶绿素、类胡萝卜素含量<sup>[14,15]</sup>; 此外, AnTX-a 与常见的微囊藻毒素 MC-LR 还会产生协同毒性作

用<sup>[16,17]</sup>。饮用水的 AnTX-a 安全标准水平建议不超过 1  $\mu\text{g/L}$ <sup>[18]</sup>。鉴于鱼腥藻毒素对人体健康及水生态系统的危害, 建立快速、灵敏、准确的鱼腥藻毒素检测方法对于研究我国蓝藻种类的产鱼腥藻毒素特性以及监测评估湖泊水体鱼腥藻毒素污染风险十分必要。

本研究建立高效液相色谱-二极管阵列检测联用法(high performance liquid chromatography-photodiode array detector method, HPLC-PDA)和超高效液相色谱-质谱联用法(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测鱼腥藻毒素 AnTX-a 和 HAnTX-a 的分析方法, 并比较研究这 2 种方法的优缺点, 为检测鱼腥藻毒素提供方法技术参考。

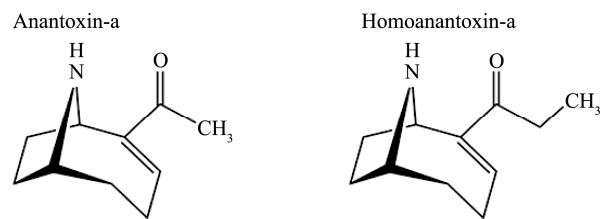


图 1 anatoxin-a 及 homoanatoxin-a 化学结构图  
Fig.1 Chemical structures of anatoxin-a and homoanatoxin-a

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 主要仪器与试剂

Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); Centrifuge 5804 大型离心机、Concentrator plus 真空离心浓缩仪(德国 Eppendorf 公司); FreeZone 真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司); 78-1 型磁力加热搅拌器(江苏中大仪器厂); BT125D 十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters Acquity UPLC-H-class-Xevo-Tadem Quadrupole 超高效液相色谱-串联质谱(美国 Waters 公司)。

3 kDa 超滤管(美国 Millipore 公司); AnTX-a 标准品(5  $\mu\text{g/mL}$ , 加拿大 National Research Council); HAnTX-a 标准品(10  $\mu\text{g/mL}$ , 法国 Novakits 公司); L-苯丙氨酸(L-Phenylalanine, Phe)(色谱纯, 美国 Sigma 公司); 乙醇、甲醇、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 三氟乙酸(色谱纯,

上海阿拉丁公司)。

### 2.1.2 实验藻株

实验所用藻株 *Aphanizomenon gracile* FACHB-1039、*Aphanizomenon gracile* FACHB-1040 和 *Cuspidothrix issatschenkoi* FACHB-2454 均来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology, FACHB-Collection)。藻株静置培养于 BG-11 培养基<sup>[19]</sup>中,光照强度为 25  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,光暗周期比为 12 h:12 h,温度为(20 ± 1) °C,藻株培养至对数生长期。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 鱼腥藻毒素标准溶液的配制

使用 20% 甲醇(V/V)为稀释溶剂,分别将 5.0  $\mu\text{g/mL}$  AnTX-a 和 10.0  $\mu\text{g/mL}$  HAnTX-a 储备标准溶液按照表 1 浓度进行系列梯度稀释。*L*-苯丙氨酸(Phe)配制浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液。

### 2.2.2 蓝藻毒素样品前处理

蓝藻毒素的提取方法参考 Rellán 等<sup>[20]</sup>的方法,略有修改,具体步骤如下:

- 收集处于生长对数期藻细胞,6500 r/min 离心 10 min,弃去上清液。冷冻干燥约 24 h;
- 取约 10 mg 干藻粉反复冻融 3 次,加入 3 mL 甲醇(0.1%甲酸),再加入小磁子置于磁力搅拌器上搅拌 40 min,5000 r/min 离心 10 min,收集上清液;
- 向沉淀部分再加入 3 mL 甲醇(0.1%甲酸),重复上述操作 2 次,离心,合并上清液;
- 合并的上清液置于真空离心浓缩仪上 30 °C 浓缩至近干;
- 加入 1 mL ddH<sub>2</sub>O 重新溶解,于 4 °C 12000 r/min 离心 30 min;
- 使用 3 kDa 超滤管于 4 °C 12000 r/min 离心 15 min,过滤除去大于 3 kDa 的大分子物干扰物;
- 所得滤液加入终浓度 0.1% 甲酸,混匀后于 -20 °C 保存,待 UPLC-MS/MS 法对蓝藻毒素提取物进行测定。

### 2.2.3 鱼腥藻毒素 HPLC-PDA 检测条件

#### (1) 仪器配置

仪器型号: Alliance Waters<sup>TM</sup> e2695; 检测器: Waters 二极管阵列检测器; 色谱柱型号: Water Symmetry C<sub>18</sub>

column(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 数据采集分析工作站: Empower 3 软件。

#### (2) 色谱条件

流动相 A: 超纯水(0.05% 三氟乙酸, V/V); 流动相 B: 乙腈; 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ ; 监测波长范围: 200~400 nm。

### 2.2.4 鱼腥藻毒素 UPLC-MS/MS 检测条件

#### (1) 仪器配置

色谱仪: Waters Acquity UPLC-H-class-Xevo; 质谱仪: Tadem Quadrupole(Triple Quadrupole); 色谱柱型号: Waters ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm × 50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 数据采集分析工作站: MassLynx V4.1 软件。

#### (2) 色谱条件

流动相 A: 超纯水(0.1% 甲酸, V/V); 流动相 B: 乙腈(0.1%, V/V); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。

#### (3) 质谱条件:

电喷雾模式: 电喷雾电离正离子(positive electrospray ionization, ESI<sup>+</sup>); 离子源温度: 150 °C; 毛细管电压: 1.50 kV; 碰撞气体: 氩气, 0.12 mL/min; 去溶剂气体: 氮气, 650 L/h; 锥孔气: 氮气, 20 L/h; 检测模式: 多反应监测模式(multiple reaction monitoring mode, MRM), 质谱分析参数见表 2。

### 2.2.5 2 种检测方法的加标回收率的比较

用已建立的毒素提取方法进行加标回收实验验证此方法的准确性。根据 2 种毒素检测方法的标曲浓度范围各设置了低、中、高 3 个标样浓度,每个浓度 6 个平行。按照 2.2.2 的方法处理加标样品,然后分别利用 HPLC-PDA 和 UPLC-MS/MS 检测法上机检测。

## 3 结果与分析

### 3.1 鱼腥藻毒素的 HPLC-PDA 检测

鱼腥藻毒素 AnTX-a 和 HAnTX-a 分子极性较大,利用 Water Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱进行洗脱条件优化时,低比例有机相即可将目标化合物洗脱下来。本实验设置 5%~15% 乙腈来分离目标化合物,随后升高乙腈比例至 100% 用以洗脱样品中的杂质。采用最佳洗脱条件为: 0~2 min, 5% B; 2~15 min, 5%~15% B; 15~20 min, 15%~100% B; 20~21 min 100% B; 21~23 min, 100%~5% B。

表 1 2 种检测方法中使用的标准品系列浓度( $\mu\text{g/mL}$ )  
Table 1 Concentration of the standard series of 2 methods( $\mu\text{g/mL}$ )

	标准品	标 1	标 2	标 3	标 4	标 5	标 6	标 7
HPLC-PDA 标准系列溶液	AnTX-a	2.50	1.25	0.625	0.313	0.156		
	HAnTX-a	5.00	2.50	1.250	0.625	0.313		
UPLC-MS/MS 标准系列溶液	AnTX-a	0.10	0.05	0.020	0.004	0.0008	0.00016	0.000032
	HAnTX-a	0.10	0.05	0.020	0.004	0.0008	0.00016	0.000032

表 2 多反应监测离子模式下鱼腥藻毒素质谱分析参数  
Table 2 MS parameters for anatoxins in multiple reaction monitoring mode

化合物	母离子( $m/z$ )	子离子( $m/z$ )	锥孔电压/V	碰撞电压/eV
AnTX-a	166.09*	131.05*	25	18
AnTX-a	166.09	149.01	25	25
HAnTX-a	180.10*	163.10*	25	20
HAnTX-a	180.10	145.10	25	18

注: \*为定量离子, 其他的离子为定性离子。

鱼腥藻毒素和 *L*-苯丙氨酸标准品在上述 HPLC-PDA 条件下的分析结果如图 2 所示, 可以看出 AnTX-a、HAnTX-a 和 Phe 色谱峰在该条件下能够完全分离开来, 3 者的保留时间依次分别为 6.6、11.5 和 10.0 min, 3 者的最大紫外吸收峰依次为 228、228 和 242 nm(图 3), 色谱保留时间及特征波长可以用来作为 AnTX-a 和 HAnTX-a 的定性依据。

### 3.2 鱼腥藻毒素的 UPLC-MS/MS 检测

鱼腥藻毒素 AnTX-a 和 HAnTX-a 为极性分子, 所采用的 Acquity UPLC HSS T3 能显著增强对极性分子的反向保留能力, 适用于高比例水相的分析。采用最佳洗脱条件为 0~2.0 min, 20%B; 2.0~2.1 min, 20%~90%B; 2.1~3.2 min, 90%B; 3.2~3.3 min, 90%~20%B; 3.3~6.5 min, 20%B。结果显示本实验条件下 AnTX-a 能够与 HAnTX-a 和 Phe 分离开来, 3 种化合物标准品在色谱柱上的保留时间依次为 1.67、2.79 和 2.81 min(图 4), AnTX-a 和 HAnTX-a 二级质

谱的碎片离子峰如图 5 所示。色谱保留时间及特征离子为 AnTX-a 和 HAnTX-a 的定性依据。

### 3.3 鱼腥藻毒素 HPLC-PDA 和 UPLC-MS/MS 检测法比较

#### 3.3.1 2 种检测方法的线性范围、回归方程、相关系数( $r^2$ )和检测限的比较

各梯度标准品经 HPLC-PDA 和 UPLC-MS/MS 测定分析完成后, 以已知标准品浓度为横坐标, 以对应的峰面积为纵坐标建立 AnTX-a 和 HAnTX-a 标准曲线, 得到目标化合物的线性范围、线性方程和相关系数( $r^2$ )(表 3)。可知 AnTX-a 和 HAnTX-a 在其各自的线性范围内具有良好的线性关系( $r^2 > 0.995$ )。由表 3 可知, UPLC-MS/MS 方法的检测限、检测范围低于 HPLC-PDA 方法, 说明 UPLC-MS/MS 方法灵敏度高, 适合分析毒素样品含量低或总样品量少的水样、组织样品等, 但 HPLC-PDA 方法的普遍适用性更高。

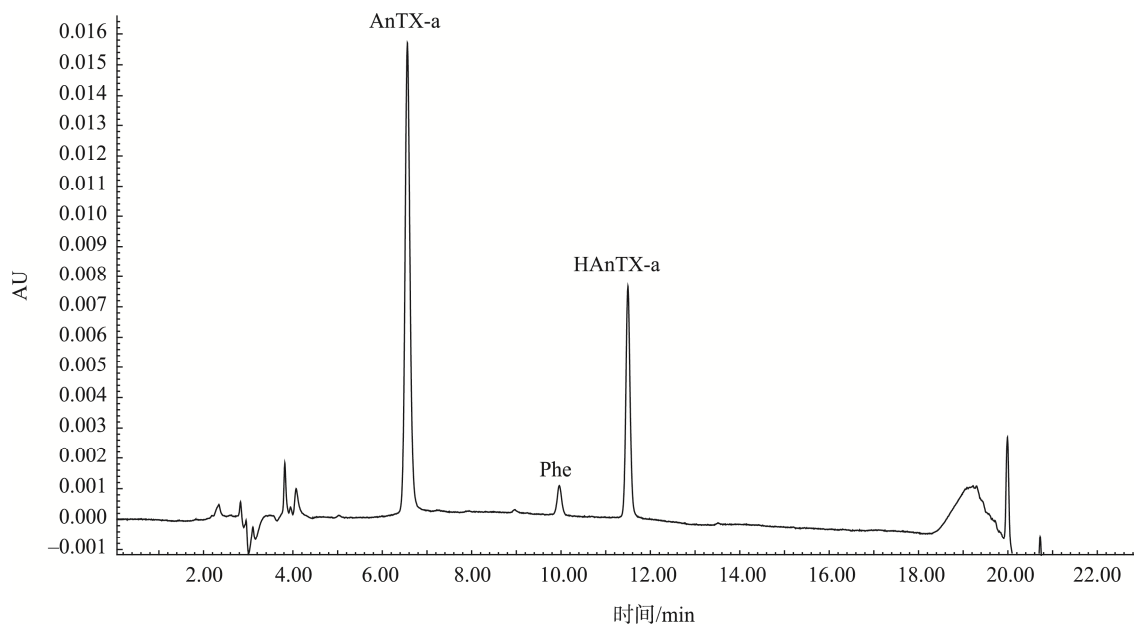


图 2 AnTX-a、HAnTX-a 和 Phe 混合标准品的 HPLC-PDA 分析图  
Fig.2 HPLC-PDA analysis of mixed standards of AnTX-a, HAnTX-a and Phe

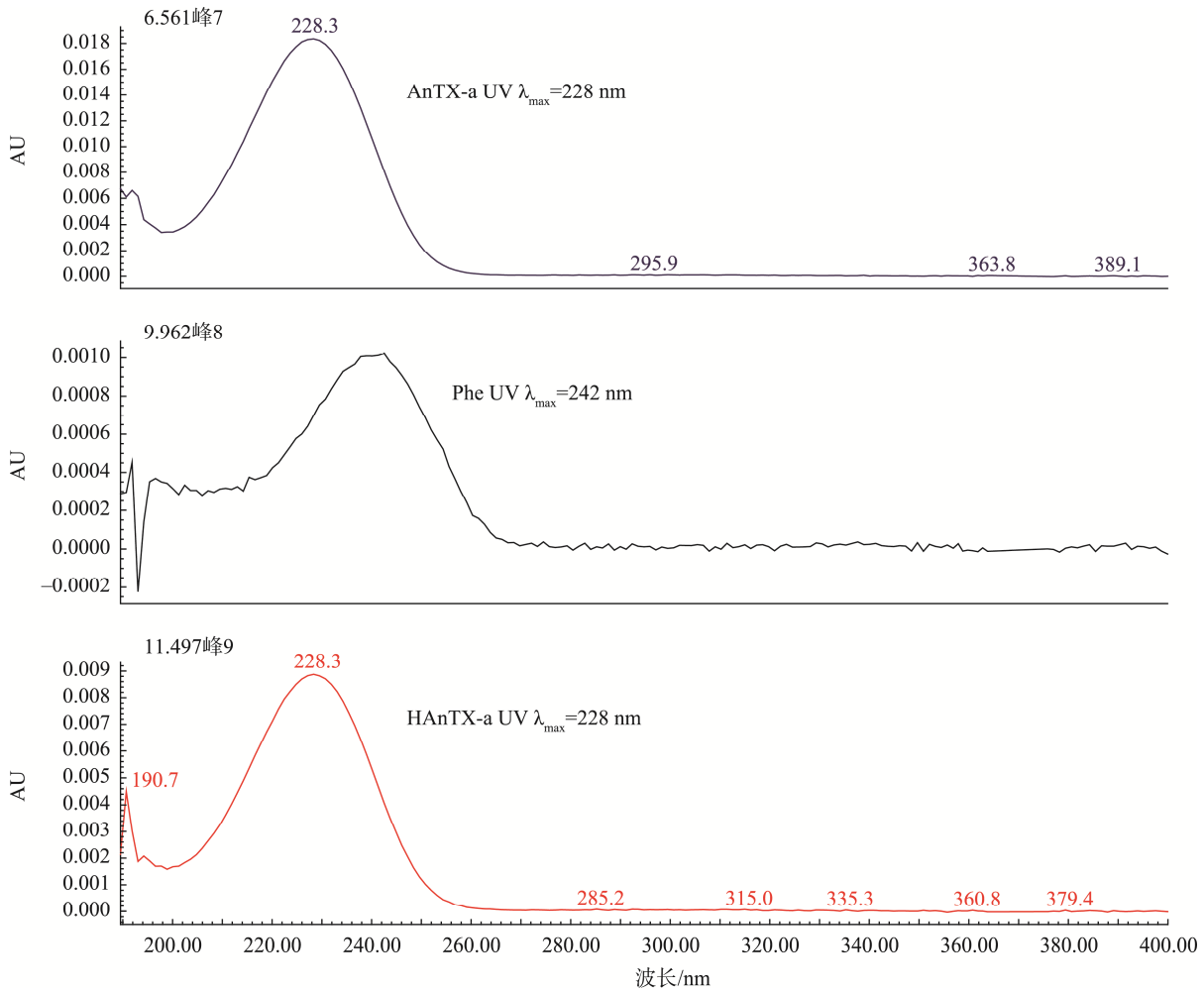


图 3 AnTX-a、HAnTX-a 和 Phe 的最大紫外吸收峰  
Fig.3 Maximum ultraviolet absorption peaks of AnTX-a, HAnTX-a and Phe

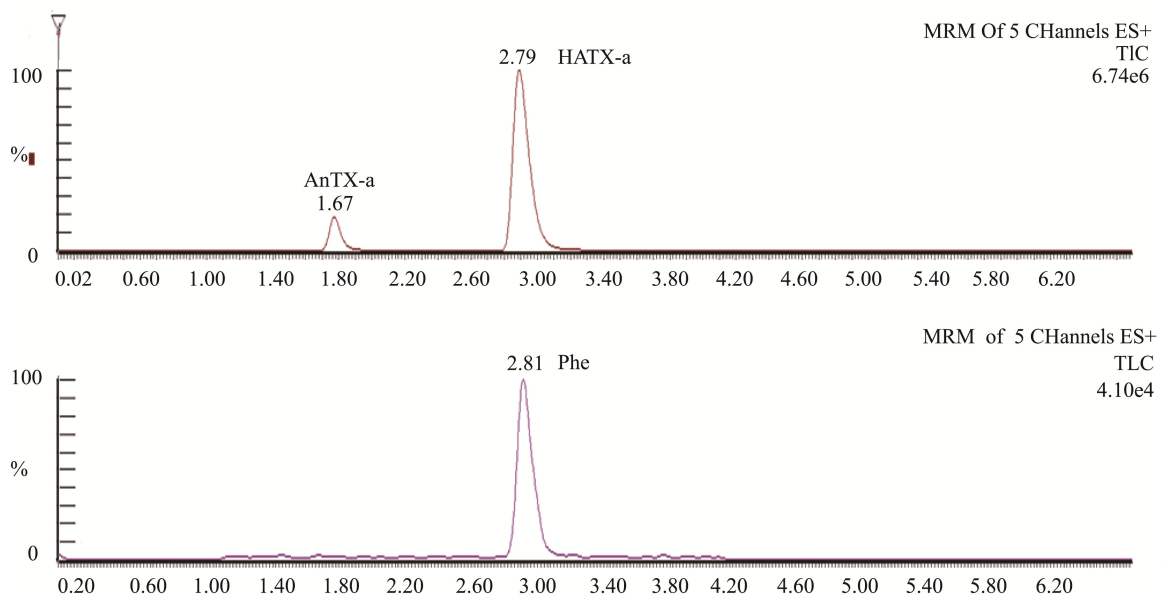
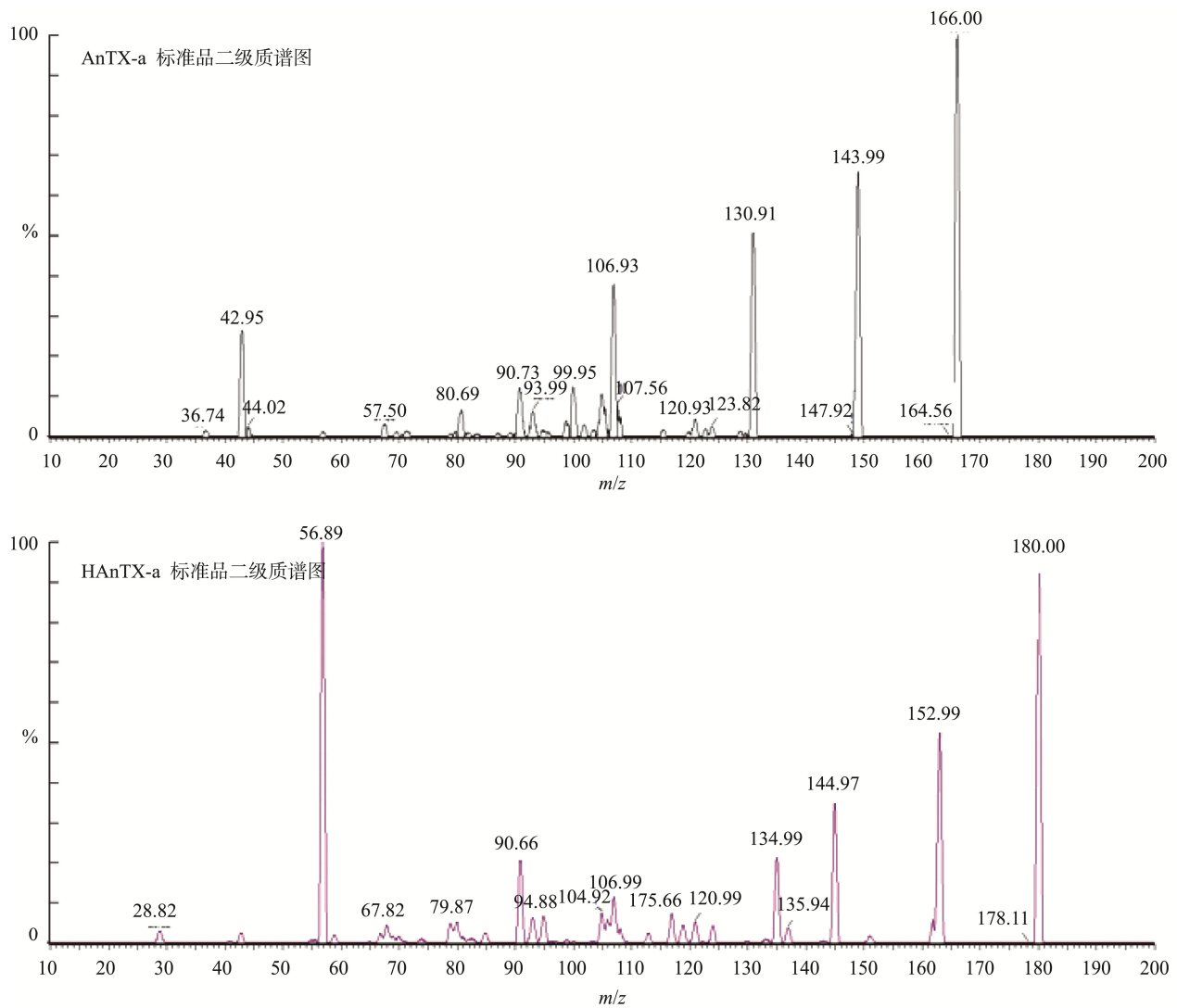


图 4 AnTX-a、HAnTX-a 和 Phe 混合标准品离子色谱图  
Fig.4 Ion chromatograms of AnTX-a, HAnTX-a and Phe standards

图 5 AnTX-a(166  $m/z$ )和 HAnTX-a(180  $m/z$ )二级离子质谱图Fig.5 MS<sup>2</sup> fragmentation patterns of the protonated AnTX-a (166  $m/z$ ) ions and HAnTX-a (180  $m/z$ ) ions表 3 2 种检测方法的线性范围、回归方程、相关系数( $r^2$ )和检测限Table 3 Linear ranges, regression equations and correlation coefficients ( $r^2$ ) and detection limits of the 2 methods

检测方法	AnTX	线性范围/( $\mu\text{g/mL}$ )	回归方程	$r^2$	检测限/( $\mu\text{g/mL}$ )
HPLC-PDA	AnTX-a	0.156~2.5	$Y=35537X-1553.00$	0.998	0.052
	HAnTX-a	0.313~5	$Y=13589X-1123.30$	0.997	0.070
UPLC-MS/MS	AnTX-a	0.000032~0.1	$Y=2E+06X+451.17$	0.999	0.000010
	HAnTX-a	0.000032~0.1	$Y=919603X+68.11$	1.000	0.000010

## 3.3.2 2 种检测方法加标回收率的比较

分别用 2 种蓝藻毒素在 2 种检测方法之下进行 3 个浓度的加标回收实验, 每个浓度设置 6 个平行, 测得的加标回收率见表 4。在选定的标样浓度范围内, 这 2 种检测方法的回收率均较高, HPLC-PDA 检测法对 2 种蓝藻毒素的回收率范围为 97.2%~128.8%, UPLC-MS/MS 检测法对 2 种

蓝藻毒素的回收率范围为 85.3%~134.8%。HPLC-PDA 检测法的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.1%~2.9%; UPLC-MS/MS 检测法的 RSD 值为 0.3%~5.1%。由实验数据可知, HPLC-PDA 检测法的回收率的 RSD 值比 UPLC-MS/MS 检测法的低, 因此 HPLC-PDA 检测法比 UPLC-MS/MS 检测法系统误差小, 实验可靠性高。

## 3.3.3 2 种检测方法对蓝藻毒素样品检测结果的比较

应用所建立的 2 种检测方法分别对 3 份蓝藻毒素样品进行了分析, 结果如表 5 所示。HPLC-PDA 和 UPLC-MS/MS 检测法对 3 份蓝藻样品的鱼腥藻毒素含量的色谱图结果分别如图 6 和 7 所示。HPLC-PDA 结果显示 *Aphanizomenon gracile* FACHB-1039 和 FACHB-1040 的毒素样品仅检测出 AnTX-a, 藻株 *Cuspidothrix issatschenkoi*

FACHB-2454 毒素样品仅检测出 HAnTX-a; 与 HPLC-PDA 结果不同, UPLC-MS/MS 结果显示藻株 *A. gracile* FACHB-1039 和 *A. gracile* FACHB-1040 除检出 AnTX-a 外, 还检出微量 HAnTX-a, 藻株 *C. issatschenkoi* FACHB-2454 除检出 HAnTX-a 外还检出微量 AnTX-a(表 5), 2 种检测方法计算得出各样品中 AnTX-a 和 HAnTX-a 含量相吻合, 无显著性差异( $P>0.05$ )。

表 4 2 种蓝藻毒素检测方法的加标回收率结果( $\bar{x} \pm s$ )( $n = 6$ )  
Table 4 Results of the recovery of 2 AnTX determination methods ( $\bar{x} \pm s$ )( $n = 6$ )

方法	AnTX	加标浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	测定浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	回收率/%	RSD/%
HPLC-PDA	AnTX-a	1.250	1.306 $\pm$ 0.014	104.4 $\pm$ 1.1	1.1
		0.625	0.805 $\pm$ 0.012	128.8 $\pm$ 1.9	1.4
		0.156	0.194 $\pm$ 0.020	124.2 $\pm$ 12.9	1.9
	HAnTX-a	2.50	2.430 $\pm$ 0.043	97.2 $\pm$ 1.7	2.1
		1.250	1.325 $\pm$ 0.026	106.0 $\pm$ 2.1	1.7
		0.313	0.414 $\pm$ 0.176	98.7 $\pm$ 12.7	2.9
UPLC-MS/MS	AnTX-a	0.100	0.105 $\pm$ 0.001	105.3 $\pm$ 1.5	1.4
		0.004	0.004 $\pm$ 0.000	94.7 $\pm$ 9.4	0.3
	HAnTX-a	0.00016	0.0001 $\pm$ 0.000	85.3 $\pm$ 6.6	5.1
		0.100	0.096 $\pm$ 0.004	96.5 $\pm$ 3.8	3.9
		0.004	0.004 $\pm$ 0.001	107.2 $\pm$ 28.0	0.6
		0.00016	0.0002 $\pm$ 0.000	134.8 $\pm$ 2.8	2.0

表 5 2 种方法对蓝藻样品中鱼腥藻毒素含量的检测结果  
Table 5 Detection results of anatoxins content in cyanobacterial samples by 2 methods

样品名	HPLC-PDA 检测结果/( $\mu\text{g}/\text{g}$ dry weight)		UPLC-MS/MS 检测结果/( $\mu\text{g}/\text{g}$ dry weight)	
	AnTX-a	HAnTX-a	AnTX-a	HAnTX-a
<i>A. gracile</i> FACHB-1039	149.3 $\pm$ 3.8	/	135.2 $\pm$ 9.1	2.7 $\pm$ 0.2
<i>A. gracile</i> FACHB-1040	1467.0 $\pm$ 106.7	/	1510.0 $\pm$ 80.7	30.1 $\pm$ 2.7
<i>C. issatschenkoi</i> FACHB-2454	/	14489.1 $\pm$ 136.62	102.0 $\pm$ 3.6	15003.0 $\pm$ 291.2

注: “/”表示未检出

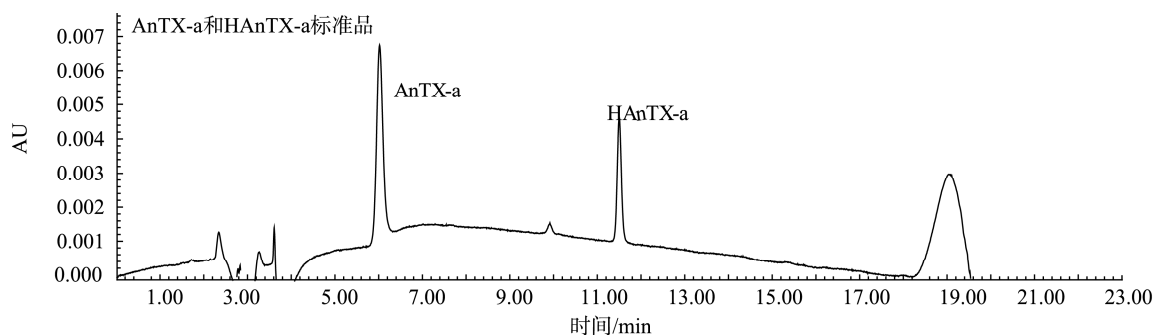
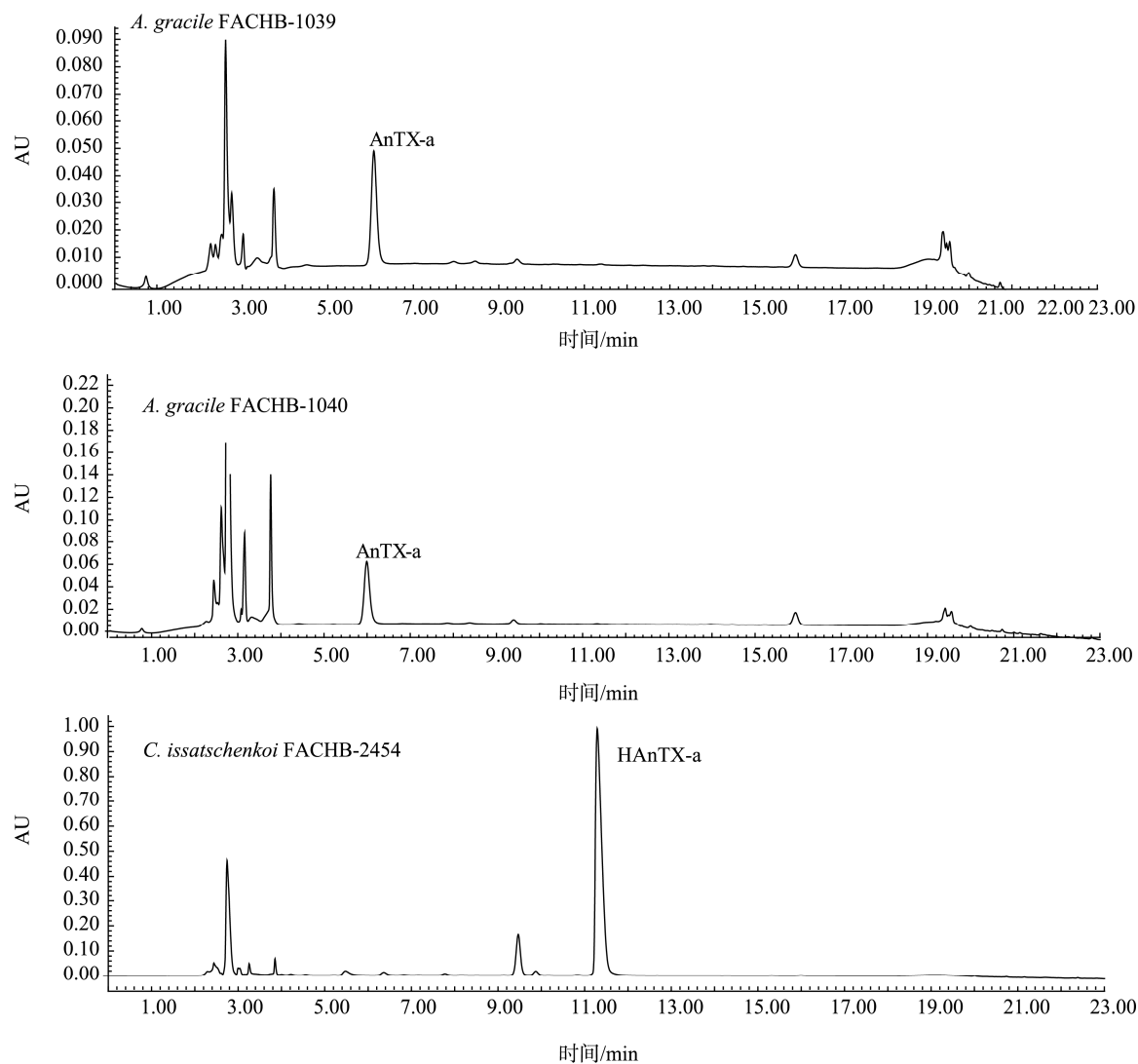


图 6 藻株 *A. gracile* FACHB-1039、FACHB-1040 和 *C. issatschenkoi* FACHB-2454 的鱼腥藻毒素 HPLC-PDA 分析色谱图

Fig.6 Chromatograms of anatoxins from *A. gracile* FACHB-1039, FACHB-1040 and *C. issatschenkoi* FACHB-2454 by HPLC-PDA analysis



续图 6 藻株 *A. gracile* FACHB-1039、FACHB-1040 和 *C. issatschenkoi* FACHB-2454 的鱼腥藻毒素 HPLC-PDA 分析色谱图

Fig.6 Chromatograms of anatoxins from *A. gracile* FACHB-1039, FACHB-1040 and *C. issatschenkoi* FACHB-2454 by HPLC-PDA analysis

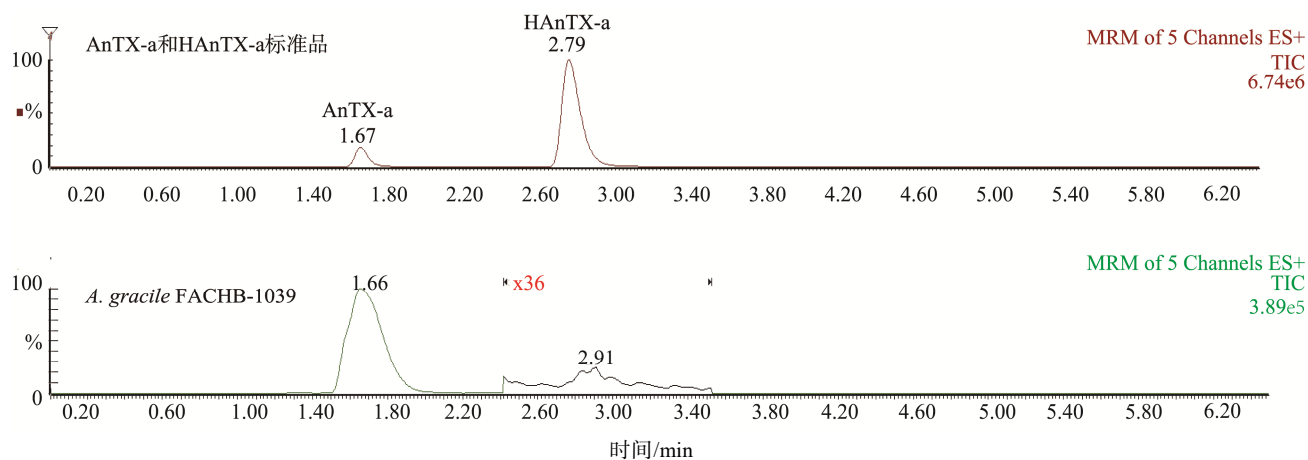
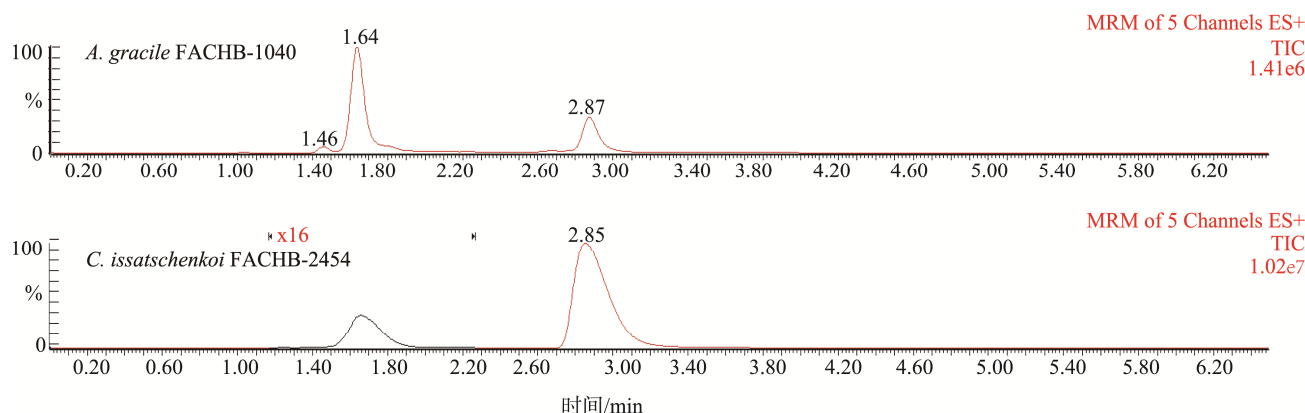


图 7 藻株 *A. gracile* FACHB-1039、FACHB-1040 和 *C. issatschenkoi* FACHB-2454 的 UPLC-MS/MS 分析总离子色谱图

Fig.7 Total ions chromatograms of anatoxins from *A. gracile* FACHB-1039, FACHB-1040 and *C. issatschenkoi* FACHB-2454 by UPLC-MS/MS analysis





续图 7 藻株 *A. gracile* FACHB-1039、FACHB-1040 和 *C. issatschenkoi* FACHB-2454 的 UPLC-MS/MS 分析总离子色谱图

Fig.7 Total ions chromatograms of anatoxins from *A. gracile* FACHB-1039, FACHB-1040 and *C. issatschenkoi* FACHB-2454 by UPLC-MS/MS analysis

#### 4 结论与讨论

本研究对 HPLC-PDA 和 UPLC-MS/MS 检测鱼腥藻毒素进行比较分析, 2 种方法均可以实现对 AnTX-a 和 HAnTX-a 同时定量分析, 且均能排除同分异构体的干扰。HPLC-PDA 方法对 AnTX-a 和 HAnTX-a 的最低检测限分别为 0.052 和 0.070  $\mu\text{g/mL}$ , UPLC-MS/MS 方法对 AnTX-a 和 HAnTX-a 的检测限可达 0.010  $\text{ng/mL}$ , 方法灵敏度高。2 种方法的加标回收率结果良好, HPLC-PDA 检测法对 AnTX 回收率为 97.2%~128.8%, UPLC-MS/MS 检测法回收率为 85.3%~134.8%。

2 种检测法各有优缺点, HPLC-PDA 的分析法的优点在于仪器设备费用相对低, 一般分析人员均可操作, 加标回收实验表明, HPLC-PDA 检测法的实验重现性和可靠性更高, 但检测的灵敏度较低, 存在对低浓度毒素的漏检情况, 此外单个样品分析时间较长(23 min), 当处理大批量样品时耗费时间较长。UPLC-MS/MS 具有高灵敏度, 适合于分析水环境样品、动物组织样品等其它毒素浓度较低的样品检测, 单个样品检测时间短(6.5 min), 当处理大批量样品时优势凸显, 但 UPLC-MS/MS 仪器设备昂贵, 对分析人员的技术要求较高。

本研究从蓝藻中提取鱼腥藻毒素的方法改进自 Rellán 等的方法<sup>[20]</sup>, 原方法采用含 1 mol/L 盐酸的甲醇作为萃取试剂, 通过氮吹的方式浓缩藻毒素粗提物, 然后再通过  $\text{C}_{18}$  萃取小柱进一步纯化。本研究中使用弱酸甲酸代替强酸盐酸, 在维持酸性的萃取条件以避免鱼腥藻毒素降解的同时, 可以避免强酸在后续浓缩步骤中对仪器的腐蚀破坏。使用真空浓缩法代替氮吹法一方面可以提高样品的浓缩效率, 另一方面还可降低样品间的交叉污染, 3 kDa 超滤管对鱼腥藻毒素的吸附率较低, 可以方便有效的去除毒素粗提物中的干扰杂质, 提高检测结果的准确性, 可以为

检测鱼腥藻毒素提供技术参考。

#### 参考文献

- [1] Verma S, Sillanpää M. Degradation of anatoxin-a by UV-C LED and UV-C LED/ $\text{H}_2\text{O}_2$  advanced oxidation processes [J]. Chem Eng J, 2015, (274): 274–281.
- [2] Skulberg OM, Skulberg R, Carmichael WW, et al. Investigations of a neurotoxic oscillatorialean strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a [J]. Environ Toxicol Chem, 1992, 11(3): 321–329.
- [3] Qian ZY, Ma J, Sun CL, et al. Using stable isotope labeling to study the nitrogen metabolism in *Anabaena flos-aquae* growth and anatoxin biosynthesis [J]. Water Res, 2017, 127(15): 223–229.
- [4] Ballot A, Fastner J, Lentz M, et al. First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in northeastern Germany [J]. Toxicon, 2010, 56(6): 964–971.
- [5] Mann S, Cohen M, Chapuis-Hugon F, et al. Synthesis, configuration assignment, and simultaneous quantification by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, of dihydroanatoxin-a and dihydrohomoanatoxin-a together with the parent toxins, in axenic cyanobacterial strains and in environmental samples [J]. Toxicon, 2012, 60(8): 1404–1414.
- [6] Shams S, Capelli C, Cerasino L, et al. Anatoxin-a producing *Tychonema* (cyanobacteria) in European waterbodies [J]. Water Res, 2015, 69(1): 68–79.
- [7] Méjean A, Paci G, Gautier V, et al. Biosynthesis of anatoxin-a and analogues (anatoxins) in cyanobacteria [J]. Toxicon, 2014, 91(12): 15–22.
- [8] Carmichael WW, Gorham PR. Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western Canada [J]. Sil Commun, 1978, 21(1): 285–295.
- [9] Krienitz L, Ballot A, Kotut K, et al. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of *Lesser Flamingos* at Lake Bogoria, Kenya [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 43(2): 141–148.
- [10] Jutta F, Camilla B, Britta G, et al. Fatal neurotoxicosis in dogs associated

- with tychoplanktic, anatoxin-a producing *Tychonema* sp. in Mesotrophic Lake Tegel, Berlin [J]. *Toxins*, 2018, 10(2): 60.
- [11] Wood S, Puddick J, Fleming R, *et al.* Detection of anatoxin-producing *Phormidium* in a New Zealand farm pond and an associated dog death [J]. *New Zealand J Botany*, 2016, 55(1): 36–46.
- [12] Wiegand C, Pflugmacher S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: A short review [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 203(3): 201–218.
- [13] Zhong YC, Shen LL, Ye XP, *et al.* Neurotoxic anatoxin-a can also exert immunotoxicity by the induction of apoptosis on *Carassius auratus* Lymphocytes *in vitro* when exposed to environmentally relevant concentrations [J]. *Front Physiol*, 2020, (11): 316.
- [14] Ha MH, Pflugmacher S. Phytotoxic effects of the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a: morphological, physiological and biochemical responses in aquatic macrophyte, *Ceratophyllum demersum* [J]. *Toxicon*, 2013, 70(8): 1–8.
- [15] Mitrovic SM, Pflugmacher S, James KJ, *et al.* Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants [J]. *Aqua Toxicol*, 2004, 68(2): 185–192.
- [16] Chia MA, Kramer BJ, Jankowiak JG, *et al.* The individual and combined effects of the cyanotoxins, anatoxin-a and microcystin-LR on the growth, toxin production and nitrogen fixation of prokaryotic and eukaryotic algae [J]. *Toxins*, 2019, 11(1): 43.
- [17] Li Q, Gu P, Zhang C, *et al.* Combined toxic effects of anatoxin-a and microcystin-LR on submerged macrophytes and biofilms [J]. *J Hazard Mater*, 2020, (389): 122053.
- [18] Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, *et al.* The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR [J]. *Human Exp Toxicol*, 1999, 18(3): 162–167.
- [19] Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria [J]. *J Gen Microbiol*, 1979, 111(1): 1–61.
- [20] Rellán S, Osswald J, Vasconcelos V, *et al.* Analysis of anatoxin-a in biological samples using liquid chromatography with fluorescence detection after solid phase extraction and solid phase microextraction [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1156(1–2): 134–140.

(责任编辑: 李磅礴)

## 作者简介



王素钦, 讲师, 主要研究方向为蓝藻毒素毒理学。

E-mail: suqinwanghn@outlook.com



甘南琴, 研究员, 主要研究方向为蓝藻生物毒素学。

E-mail: gannq@ihb.ac.cn