

综述(077~089)

水环境中微囊藻毒素分析技术新进展

尚晓艳¹, 劳文剑², 谭江坤¹, 常 芮¹, 纪仲胤¹, 孙志伟¹,
李 赞¹, 张世娟¹, 尤进茂^{1,3}

1. 山东省生命有机分析重点实验室, 曲阜师范大学 化学与化工学院, 山东 曲阜 273165;
2. 南加州海岸水环境研究所, 美国加利福尼亚州 科斯塔梅萨市 92626;
3. 中国科学院 西北高原生物研究所 藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810008)

摘要: 微囊藻毒素是常见的蓝藻毒素, 具有很强的肝脏神经系统和肾脏毒性。由于水的富营养化, 蓝藻会爆发产生大量的微囊藻毒素, 进而对水生生物和食用它们的人类构成巨大威胁。随着浓缩、富集、分离方法和仪器技术的进步, 定量分析微囊藻毒素的方法也在不断进步, 且应用越来越广泛。综述了水、沉积物和生物中微囊藻毒素的富集和检测方法, 结果显示: 目前常见的采样方法是主动采样法, 开发简便可靠和实用的被动采样方法是急需的研究方向之一。衍生化方法可以降低基质效应, 有利于使用不同的检测方法和试验观察, 因此开发一种高效、灵敏的衍生化方法检测微囊藻毒素将是重要的研究方向之一。

关键词: 微囊藻毒素; 被动采样; 衍生化; 暴露水平

中图分类号: O652.6

文献标志码: A

文章编号: 1006-3757(2021)02-0077-13

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2021.02.002

Recent Progress in Determination of Microcystins in Aquatic Environments

SHANG Xiao-yan¹, LAO Wen-jian², TAN Jiang-kun¹, CHANG Rui¹, JI Zhong-yin¹,
SUN Zhi-wei¹, LI Zan¹, ZHANG Shi-juan¹, YOU Jin-mao^{1,3}

1. Shandong Province Key Laboratory of Life-Organic Analysis, School of Chemistry and Chemical Engineering, Qufu Normal University, Qufu 273165, Shandong China;
2. Southern California Coast Water Research Project, Costa Mesa 92626, CA, USA;
3. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810008, China)

Abstract: Microcystins are common cyanobacterial toxins with strong toxicity to renal and hepatic nervous system. Due to the eutrophication of water, cyanobacteria will burst and produce large amounts of microcystins, posing a huge menace to aquatic organisms and people who eat them. With the advance of methods concentration and enrichment, separation and quantification, and instrument technology, quantitative methods for microcystins analysis have been improved and applied more and more widely. In the present study, the enrichment, detection and analysis methods of microcystins in water, sediments and organisms are reviewed. The results showed that the current common sampling method is an active sampling

收稿日期: 2021-02-08; 修订日期: 2021-03-26.

基金项目: 国家自然科学基金(21976105)项目资助 [National Natural Science Foundation of China (No. 21976105)]

作者简介: 尚晓艳(1995-) 女, 硕士研究生, 主要从事环境污染物的采样和分析方法研究, E-mail: shangxy2020@163.com

通信作者: 尤进茂(1963-) 男, 博士, 博士生导师, 主要从事色谱-质谱分析新试剂、新材料、新方法的研究, E-mail: jmyou6304

@163.com.

method. So the development of a simple, reliable and practical passive sampling method is one of the urgently needed research directions. Derivatizing method can reduce matrix effect and is conducive to the use of different detection methods and experimental observation. Therefore, the development of an efficient and sensitive derivatizing method for the detection of microcystins would be one of the important research methods.

Key words: microcystins; passive sampling; derivatization; aquatic environment occurrence

微囊藻毒素(microcystins, MCs)是目前已知有害藻华产生频率最高、产量最大、具有强有效多种器官毒性^[1-2]的蓝藻毒素。蓝藻细胞裂解和死亡后, MCs 被释放出来进入水、沉积物中,通过水生生物的呼吸作用、皮肤接触和食物链、食物网进入生物以及动物组织中,进而进入人体,对人类的生活健康造成巨大威胁^[3]。目前,已经有多起蓝藻毒素中毒事件被报道,因此分析检测 MCs 有着重要的现实意义。

分析环境中 MCs 的水平是研究和监测它们的重要部分。在这个领域,已经开发了多种方法并付诸应用,其中包括酶联免疫法^[4]和液相色谱法^[5]等。由于 MCs 的多样性,开发和应用富集、萃取、净化和分析环境介质中 MCs 的方法仍然是一个有吸引力的领域。除了不断发表的研究报告以外,也有一些文献综述发表^[6]。但是目前还没有有关利用被动采集方法富集和利用化学衍生化方法改善检测性的综述。本文在简要介绍 MCs 的来源、结构和理化性质

的基础上,综述了分析 MCs 的方法,重点介绍了近年来被动采样方法和化学衍生化方法分析环境中(水和沉积物) MCs 的方法进展,以期后续研究者提供参考。

1 MCs 的来源、结构和理化性质

MCs 是蓝藻衰败过程中产生的主要有害的蓝藻毒素, MCs 是由 5 个不变的氨基酸和 2 个可变的氨基酸组成的单环七肽,它的主要结构是环 *D*-丙氨酸(Ala)-*R*₁-*R*₂-赤-β-甲基-*D*-异天冬氨酸(MeAsp)-*L*-*Z*-Adda-*D*-异谷氨酸(Glu)-*N*-甲基脱氢丙氨酸(Mdha)^[7-8]。Adda(3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6-二烯)是一种特殊的 20 个碳原子的氨基酸,是生物活性表达所必需的基团^[9]。MCs 的命名是基于对两个可变氨基酸(*R*₁, *R*₂)的单字母编码^[10],具体结构如图 1 所示。由于 *R*₁和 *R*₂的不同及 3,7 位上氨基酸的甲基化或去甲基化,形成了多种

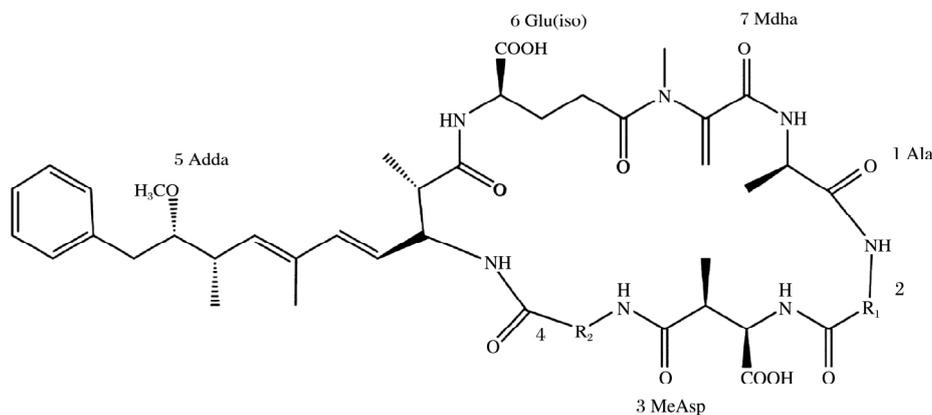


图 1 微囊藻毒素的一般结构
Fig. 1 Structure of microcystin

MCs 异构体,国内外研究较多的 MCs 种类为 MC-LR、MC-RR、MC-YR(L、R、Y 分别代表亮氨酸、精氨酸、酪氨酸)等^[11]。MCs 毒性大、分布广,其相对分子质量大约为 1 000,具有很强的亲水性和高耐热性,易溶于水,正常情况下其性质稳定,能够在水中存在相当长的时间,在一定条件下会发生降解,如紫外、超声等。

2 不同基质样品中 MCs 的采样、富集和净化

2.1 水样

传统的分析 MCs 的样品制备方法是基于在特定的单一时间点采集样品,样品经固相萃取进行浓缩和净化。一般地,水样(500~1 000 mL)经 0.7 μm

玻璃纤维滤膜过滤去除悬浮物,以固相萃取小柱(Oasis HLB 6 mL/500 mg 或 C18)对 MCs 进行富集。富集完毕,甲醇洗脱、氮吹浓缩,再经 0.22 μm 聚偏二氟乙烯(PVDF)滤膜过滤, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。传统的主动采样技术有几个缺点:(1)采用固相萃取小柱不能处理大体积的样品。(2)在环境中,MCs 的浓度可能随时间而变化,主动采样方法只能得到采样时的瞬时浓度,不能够反映 MCs 的平均水平。(3)所得到结果不是生物有效性浓度。

被动采样技术是把被动采样器放置在野外暴露数天或者数周后能有效地积累目标污染物的一种新技术,基于物质化学势梯度引起的被检测物质从环境本体到接受相(receiving phase)的自由传质,根据不同的目标污染物选择不同的接受相吸附剂、微孔膜等进行采样。被动采样技术可以弥补传统采样技术的缺点,它可以原位富集目标化合物,可以获得更低的检测限,可以测量时间加权平均(TWA)浓度和生物有效性浓度^[12-14]。目前分析 MCs 所采用的被动采样器主要有极性有机化合物一体化采样器(polar organic chemical integrative sampler, POCIS)、固相吸附毒素追踪技术(solid phase adsorption toxin tracking, SPATT)和有机-梯度扩散薄膜技术(organic-diffusive gradients in thin films, *o*-DGT)等。

POCIS 采样器^[15-16]是由包含吸附剂的两片圆形聚合物薄膜构成,聚醚砜薄膜和亲水亲脂平衡的逆相吸附剂(Oasis HLB)是最常用的配置^[17]。POCIS 取样器的最初设计是为了模拟水生生物与溶解的化学物质接触,消除新陈代谢、净化化学物质、避免污染区域和生物的死亡问题,主要是针对极性的($0 < \log K_{ow} < 5$)有机化合物。2004 年,Alvarez 等^[18]提出两种 POCIS 采样器,一种是采用质量比为 8:2 的聚苯乙烯-二乙烯苯树脂和碳质吸附剂,称为杀虫剂型(Pesticide-POCIS)采样器,适合农药和合成激素等极性物质的吸附。另一种是采用多聚相二乙烯苯结合极性基团形成的 Oasis HLB 吸附剂,称为药物型(Pharmaceutical-POCIS)采样器,适合一些强极性药物的吸附。同时,还采用聚醚砜膜,具有采样率高、受生物污染的程度低、采样寿命长的特点。目前 POCIS 采样器已广泛应用于检测水中的农药、内分泌干扰物、药物等^[19-20]。为了分析 MCs,2008 年, Kohoutek 等^[21]报道了对 POCIS 采样器的配置如多孔膜和吸附剂的研究,试验结果表明,检测水样中的 MCs 时,使用聚碳酸酯膜和 Oasis HLB 吸附剂,负

载 2.75 mg/cm^2 时,采样器对 MCs 的吸收非常好。紧接着在 2010 年,他们又报道了对这一采样器进行校准的研究。他们测量了在静止和湍流状态下水中 MC-LR 和 MC-RR 的采样率,并应用于测量水库中的含量。2019 年,Jaša 等^[22]又进一步对这种采样器进行在不同水流速度下(0、0.01、0.20 和 0.40 m/s)的校准,并应用于测量饮用水处理厂水中的 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR 的 TWA 浓度。同一年, Brophy 等^[23]也报道了使用 POCIS 测量加拿大一个湖水中 MC-LR 的含量。由于 POCIS 的采样率受环境(如水流、温度)的影响,针对特定的投放地点,应该采用原位测量的采样率,这使得很难得到一个准确的采样率。另一方面,POCIS 的特性表明绩效参考化合物(performance reference compound, PRC)一般不能够很好地校正采样率,因而准确定量仍然是一个困扰这种被动采样器应用的难题^[24]。

SPATT 技术^[25-26]使用包含吸附剂的袋子来被动富集水中的 MCs。该技术由 MacKenzie^[27]于 2004 年提出,是用于监测海水中生物毒素-扇贝毒素(pectenotoxins)和软海绵酸(okadaic acid)的水平,所采用的吸附剂是非极性的 DIAION HP20 树脂(苯乙烯-二乙烯基苯的共聚物)。随后 SPATT 技术被用来检测更多的藻毒素,例如大田软骨藻酸(domoic acid)、石房蛤毒素(saxitoxin)等^[28-29]。同时也考察了更多的吸附剂,譬如 SP700、L-439、XAD4、SP850 等。直到 2011 年,Miller 和 Kudela 等^[30]应用 HP20 SPATT 技术来研究海洋中 MCs 对水獭肝脏的损害。紧接着,Kudela^[31]进一步考察了 HP20 SPATT 作为被动采样技术富集淡水和海水中的 MCs,发现 HP20 SPATT 对 MC-RR、MC-YR、MC-LR、MC-LA 具有非常好的吸附和洗脱性能。随后,中国海洋大学的 Zhao 等^[32]也考察了 HP20 对 MC-LR 和^[Dha7]MC-LR 在淡水中的吸附和使用甲醇水溶液的洗脱性能,并和 SP700 吸附剂进行了比较,结果推荐使用 HP20 树脂作为 SPATT 的吸附剂。2014 年,Gibble 等^[33]报道了在美国加州蒙特利海湾的陆-海交界区,应用 SPATT 检测 MCs 的含量和随时间、营养物(氮磷)、碱度以及温度的变化关系。随后一直到现在,SPATT 更多地被人们应用在有关 MCs 的环境监测和风险评价的研究中。例如,Howard 等^[34]报道了在美国南加州的水体中应用 SPATT 检测 MCs,发现传统的单点采样方法低估了 MCs 的水平。Peacock 等^[35]应用其检测旧金山湾淡水和海洋藻类等毒素。Onofrio

等^[36]建立了从 SPATT 萃取液中,基于超高效液相色谱-串联质谱联用技术(UHPLC-MS/MS)检测和筛选多种藻毒素的方法。一般地,SPATT 袋由尼龙纱布(Bolt Cloth-Nitex, 100 μm 孔径)制成。SPATT 袋一般有两种外形,一种是类似茶叶袋的方形,另一种是用塑料刺绣箍做成的圆形。装有 HP20 树脂的 SPATT 袋子在 100% HPLC 级甲醇中浸泡 24 h 活化后,使用超纯水(Milli-Q)或二次蒸馏水冲洗以清除甲醇,然后保存在 4~6 $^{\circ}\text{C}$ 的 Milli-Q 中备用。现场使用时,将 SPATT 袋子固定在采样点位处数小时至数周。在回收 SPATT 袋时,将 SPATT 袋放入塑料袋中保存,然后在装有冰的袋子容器中运往实验室,在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存。吸附在 SPATT 吸附剂上的 MCs 使用 50% 的甲醇水溶液洗脱。HP20 的吸附适合使用 Freundlich 吸附曲线描述,但是由于吸附受吸附剂孔径、盐度的影响,还没有被很好的校准。因此,SPATT 目前还是一个半定量的方法。MCs 的浓度表示为纳克每克干树脂(ng/g dry resin),不能够直接转换成水浓度($\mu\text{g/L}$)。即便如此,不影响使用 SPATT 来表征 MCs 的相对含量和随时间的变化^[37]。此外,Kudela^[31]推荐使用 10 : 1 的比例来粗略估算水中浓度,即 SPATT 的 10 ng/g dry resin 相当于水中 1 $\mu\text{g/L}$ 的浓度。新的吸附材料、不同的洗脱和净化方法、室内和现场的校准定量以及规范化使用是 SPATT 继续发展的热点。

除了有外层的保护膜外,POCIS 和 SPATT 的一个共同点是都只有吸附剂作为被采样化合物的接受相,水中的自由溶解态化合物在穿过保护/过滤膜之后,直接被吸附剂吸附。而 *o*-DGT 技术在接受相(也叫固定膜或结合胶, binding gel)外面还有一层扩散胶层(diffusive gel),因而是一个两相系统。水中的自由溶解态化合物通过扩散,穿过扩散层到达接受相,随即被捕获进而富集起来。其定量基于菲克(Fick)扩散第一定律^[38],可以在原位状态下反映水体或土壤中目标化合物的存在状态和迁移行为^[39]。DGT 由 Davison 和 Zhang^[40]于 1994 年发明,最初是用来测定淡水中溶解的金属^[41-42],其接受相、扩散层以及外侧避免待测环境中的颗粒物进入装置的滤膜可以根据试验目的选择不同的材质。2011 年, Bondarenko 等^[43]首次把 DGT 应用于有机化合物的检测。2012 年, Chen 等^[44]首次使用 *o*-DGT 技术和 XAD18 接受相检测水中的抗生素。但是,直到近年才被用于检测水中 MCs 的浓度。2019 年 Yao 等^[45]

采用 HLB/琼脂糖凝胶作为接受相,琼脂糖凝胶作为扩散相的 DGT 装置对太湖梅良湾的 MC-LR 进行检测,并与传统的主动取样进行了比较。被动取样所测得的浓度在主动取样的最小与最大值之间,表明 HLB 与 DGT 结合适合检测水中的 MC-LR。同年, D' Angelo^[46]也考察了 DGT 技术检测淡水和海水中的 MC-LR,结合采用酶联免疫法测定 MC-LR,对三种吸附剂(HP20、SP700 和 XAD18)的吸附动力学、吸附容量和吸附效率进行了比较,也评价了两种保护膜(尼龙膜和聚醚砜膜)。结果显示, XAD18 接受相和聚醚砜膜扩散相是较好的 *o*-DGT 组成。通过 DGT 检测,可以得到水中化合物的质量浓度($\mu\text{g/L}$),但是它的定量依赖于目标化合物的扩散系数。因此测定扩散系数是建立 DGT 方法的重要步骤。目前只有 Yao 等^[45]试验测定了 MC-LR 的扩散系数。可以看出,目前利用 *o*-DGT 来分析水中的 MCs 的研究才刚刚起步,还有很多方面需要探索。

此外,其它类型的被动采样器或吸附剂也有报道。例如, Nyoni 等^[47]研究了硅膜/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 被动采样器,用于检测环境水中 MC-LR、MC-RR、MC-YR。Li 等^[48]研究了核壳结构的磁性金属-有机框架材料富集水中的 MC-LR。被动采样技术可以克服主动采样方法的不足,是对水和生物样品直接取样的补充。但被动采样器也有着不足之处,它只能测量水中自由溶解的 MCs 浓度,无法测量细胞或颗粒物中的 MCs。

2.2 沉积物

在水环境中,沉积物是 MCs 的一个重要的归趋场所。制备沉积物中 MCs 的样品主要有超声萃取和加速溶剂萃取(ASE)法。

Song 等^[49]采用超声萃取法提取沉积物中的 MCs,使用 SPE(Oasis HLB, 6 mL/500 mg)进行浓缩,保存至分析。Zastepa 等^[50]和张蓓蓓等^[51]采用加速萃取法提取沉积物样品中的 MCs。将沉积物样品与硅藻土搅拌混匀置于加速溶剂萃取池中,以甲醇-水为萃取溶剂,以 80 $^{\circ}\text{C}$ (各目标物回收率随温度的增加而提高,80~90 $^{\circ}\text{C}$ 达到平缓状态)和 13.1 MPa(目标物随着萃取压力升高回收率显著提高,13.1 MPa 时最佳。压力增大,基质干扰物的萃取效率提高,萃取液颜色明显加深,不利于净化效果,回收率略有下降)为萃取温度和压力进行萃取。将萃取液转移至活化的 HLB 固相萃取小柱进行富集净化,洗脱氮吹,过 0.22 μm PVDF 滤膜,保存至分析。

2.3 水生生物

水产品样品主要以水产动物的肌肉、鱼等食用组织样本为主。检测时要使用适当的溶剂和辅助手段将 MCs 从待测样本中转移至易于净化和分析的溶液中。为了使水产品组织中的 MCs 更好的溶于溶剂中,需将样本匀浆或冻干后研磨粉碎,以便于充分的提取。常用的提取剂主要有正丁醇-甲醇-水(体积比为 1:4:15)、不同浓度的甲醇水溶液、5%的醋酸水溶液、酸化的甲醇溶液等。辅助手段有漩涡、振荡、热水浴、微波辅助提取(MAE)和 ASE 等。

虞锐鹏等^[52]使用正丁醇-甲醇-水(体积比为 1:4:15)作为萃取剂,超声作为辅助萃取方式,氮吹浓缩后乙腈或者甲醇定容,经 0.22 μm 滤膜过滤后分析。吴振兴等^[53]采用 60%的甲醇水溶液提取,且离心分离后使用甲酸和稀氨水调节溶液的 pH。通过调节 pH 等手段去除色素和絮状物,降低样品的基质效应。张玲玲等^[54]采用的是 85% 甲醇水溶液作为提取剂,加速溶剂辅助萃取,氮吹浓缩后,35% 甲醇水溶液定容,再经 0.22 μm 滤膜过滤进行分析。Hu 等^[55]采用 5%的醋酸溶液与 80% 甲醇水溶液混合提取鱼组织中的 MCs。固相萃取柱浓缩,100% 甲醇洗脱,旋转蒸发干燥后水溶解保存至分析。

水产动物组织基质复杂,提取液经过离心或过滤等简单处理过程,不能完全去除脂肪、蛋白等大分子,需要进一步合理、可靠的净化手段获得纯度较高的净化液,以减少基质干扰带来的偏差和对精密分析仪器的污染。

3 MCs 的检测方法

MCs 目前有许多检测方法,免疫检测法如酶联免疫分析(ELISA)法^[56-57]和蛋白磷酸酶抑制分析(PPIA)法^[58],化学法如高效液相色谱(HPLC)法^[59]、液相色谱-质谱联用(LC-MS)^[60]、气相色谱-质谱联用(GC-MS)、2-甲基-3-甲氧基-4-苯丁酸(MMPB)法^[61-62]等。免疫检测法无法提供结构变异的信息,只能测 MCs 总量,但该方法会出现假阳性反应,导致含量偏高。HPLC、LC-MS、GC-MS 和 MMPB 检测法检测 MCs 大多依赖标准品,标准毒素的缺乏会低估毒素的含量,进而限制了这些方法的进一步使用。样品中的基质比较复杂,仅过滤和净化作用不强,可能会给仪器带来污染,造成响应下降。衍生化方法可以减少样品基质的影响,降低基质效应。且紫外分光光度法和荧光分光光度法成本较低,耗时较短,相比较来说比其他方法受欢迎。MCs 衍生反应位点共有 6 个,如图 2 所示。

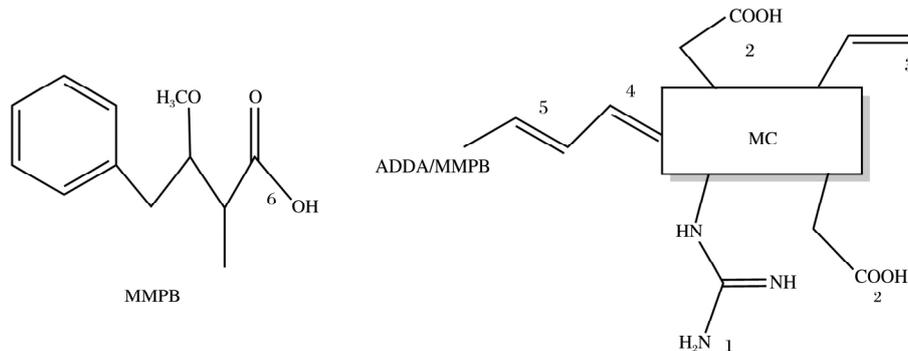


图 2 MCs 的 6 个衍生反应位点

Fig. 2 Six derived reaction sites of MCs

反应位点 1 为精氨酸末端的胍基基团。Grundler 等^[63]利用胍基的固有反应性以及巴顿碱能够匹配其反应性,保证能够完全的去质子化和对酰化剂的有效后续的亲核攻击,制备了 MCs 的生物素化化合物和重氮唑啉探针。次年,Grundler 等^[64]荧光标记 MC-LR 的精氨酸,得到 MC-LR-(5.6-FAM)、MC-LR-(Alexa-430)、MC-LR-(Texas Red)、MC-LR-(Alexa-488) 等 4 种衍生产物。再经 LC-MS

检测(如图 3 所示)。

反应位点 2 为 MCs 的两个羧基基团。Hayama 等^[65]采用固相萃取法预处理水样后,使用 4-(1-苊)丁酸肼(PBH)与羧基柱前衍生检测水中的 MCs,然后进行液相色谱-荧光检测。在准分子荧光波长(440~540 nm)上选择性地检测衍生物,试验结果表明,MCs 的检出限在 0.4~1.2 μg/L 之间,定量限在 1.4~3.9 μg/L 之间(如图 4 所示)。

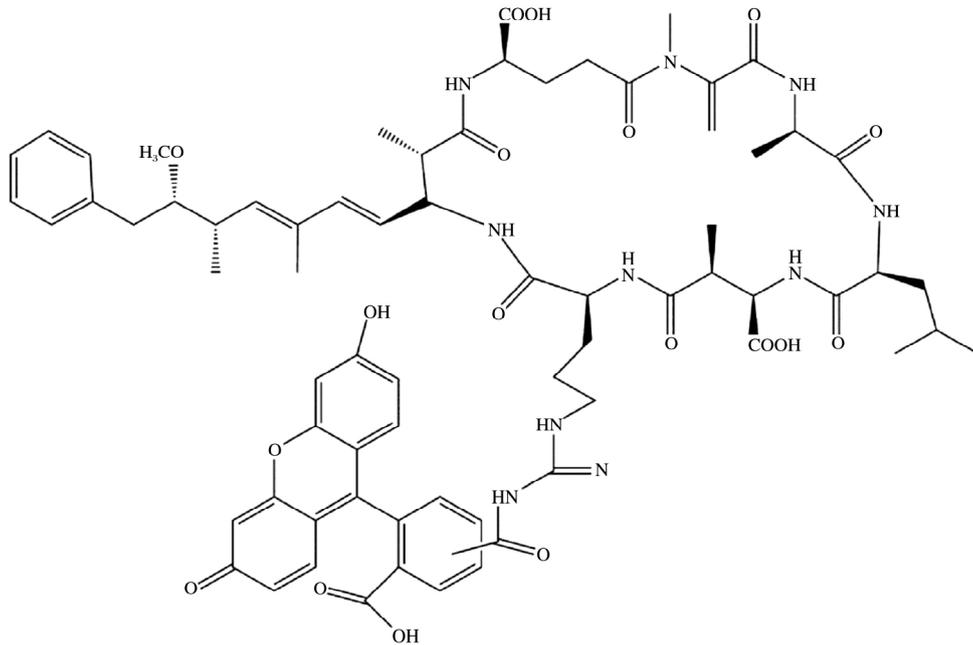


图 3 胍基反应的衍生物

Fig. 3 Guanidine reactive derivative

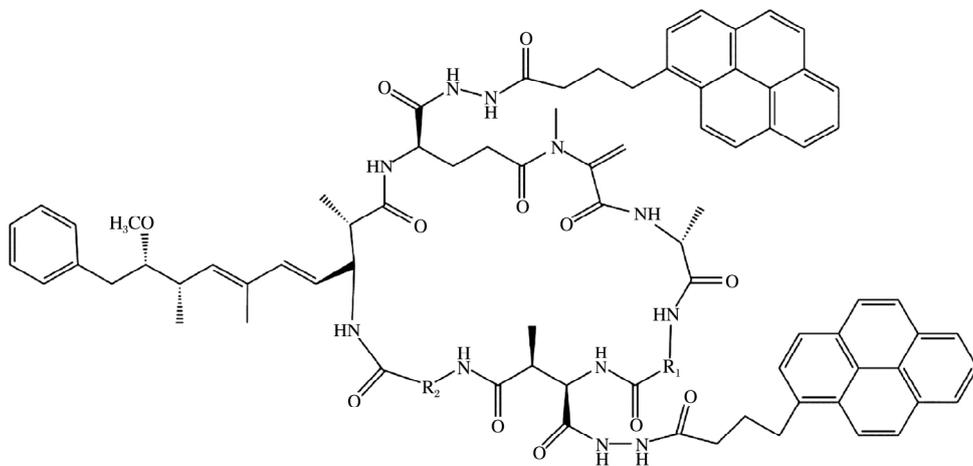


图 4 羧基反应的衍生物

Fig. 4 Carboxyl reactive derivative

反应位点 3 为末端双键. Murata 等^[66]建立了一种高效液相色谱过氧草酸酯类化学发光法 (HPLC-PO-CL) 检测衍生的 MCs. *N*-甲基脱氢丙氨酸的 α β -不饱和羰基与半胱氨酸的巯基进行亲和加成, 通过半胱氨酸引进了第三个羧基基团, 使其对 pH 的变化更加敏感. 该法检出限为 1.5×10^{-14} mol/L (S/N 为 10). Miles 等^[67-68]发现含有 Mdha 或 Dha 的 MCs 在碱性条件下可以与硫醇荧光团反应, 与不含带电基团且与 MCs 本身具有相似极性的硫醇进行衍生化,

得到的衍生物与相应的低浓度 MCs 具有相似的保留时间、电离和质谱裂解特性, 利用 LC-MS 进行定性分析, 很大程度不会受到干扰, 且会简化 LC-MS 色谱图 (如图 5 所示).

反应位点 4,5 为共轭二烯. Harada 等^[69]使用液相色谱荧光、化学发光检测衍生的 MCs. 衍生试剂 4-[2-(6,7-二甲氧基-4-甲基-3-氧-3,4-二氢喹啉基)乙基]1,2,4-三唑啉-3,5-二酮 (DMEQ-TAD) 与 Adda 基团的共轭二烯反应, 生成两个加合物的立体异构

体 通过 ODS 柱去除衍生后过量的试剂. 对 MC-LR、MC-RR 液相色谱荧光的检测限分别为 1.0×10^{-10} g、

6.5×10^{-11} g, 化学发光的检测限分别为 5.0×10^{-10} g、 2.5×10^{-9} g (如图 6 所示).

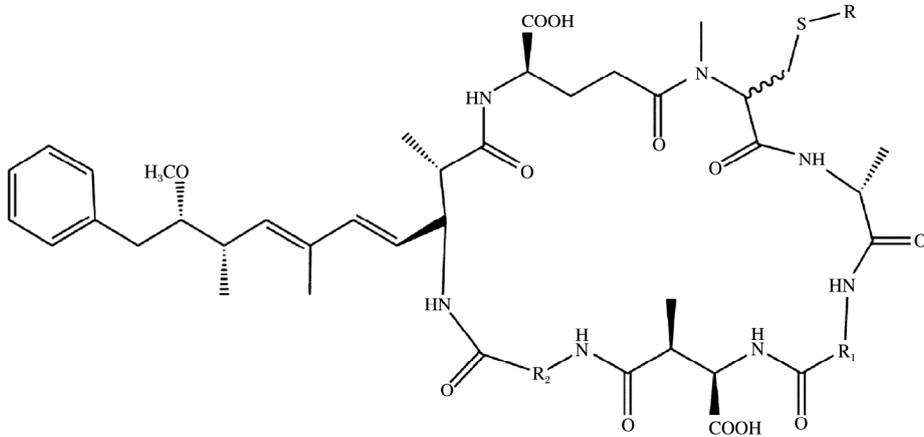


图 5 末端烯反应的衍生物

Fig. 5 Terminal ene reactive derivative

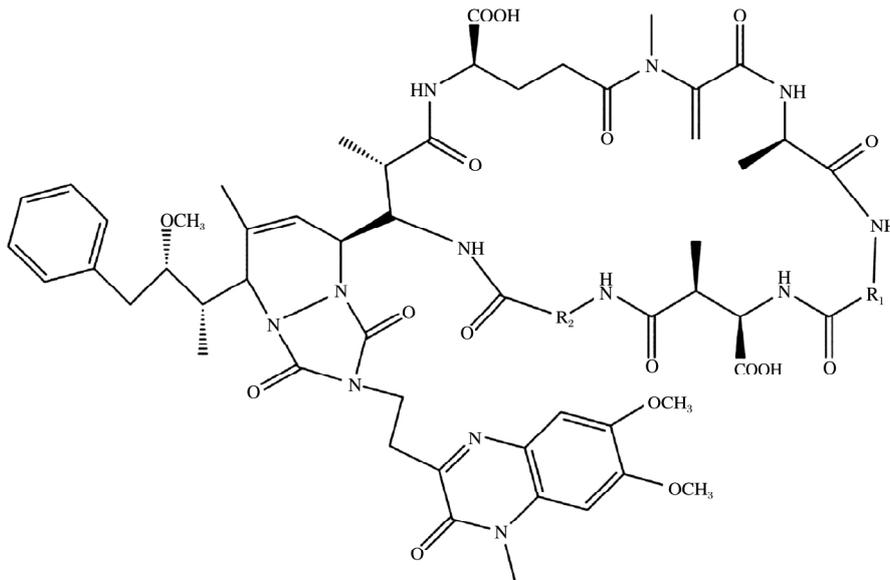


图 6 共轭二烯反应的衍生物

Fig. 6 Conjugated diene reactive derivative

将 MCs 的活泼双键(反应位点 5)氧化成 MMPB,再利用羧基基团(反应位点 6)进行衍生化反应也是检测 MCs 的常用衍生化方法. Sano 等^[70]采用高锰酸钾、偏碘酸钠等氧化剂将蓝藻中的 MCs 氧化成 MMPB,使用 2-(2,3-萘酰亚胺)三氟甲烷磺酸乙酯(NE-OTf)荧光标记后进行 HPLC 分析,测定了 fmol 浓度范围内的 MMPB.同时使用气相色谱法测定了利用 14%三氟硼酸甲醇溶液将 MMPB 转化成的 pmol 范围内的甲酯.两种方法都能有效的测定

MCs 的总含量. Tsuji 等^[71]采用了臭氧分解成 MMPB、14%的三氟化硼-甲醇衍生和 GC-MS 法分析沉积物中的 MCs,总分析时间短,分析结果良好. MC-LR、MC-YR、MC-RR 的回收率分别为 90.5%、91.7%、90.0%,检出限约为 0.1 $\mu\text{g/g}$. Zhang 等^[62]采用臭氧氧化成 MMPB,氯甲酸甲酯(MCF)甲基化和 GC-MS 法测水中的 MCs;线性范围宽,灵敏度高,检出限为 0.34 $\mu\text{g/L}$. Wang 等^[72]将水和沉积物中的 MCs 氧化成 MMPB 后浓缩,与 1,2-苯并-3,4-二氢卡

巴唑-9-乙基对甲苯磺酸 (BDETS) 衍生, 然后进行液相色谱荧光检测, 水和沉积物的定量限是 125 ng/L 和 100 ng/g (如图 7 所示)。

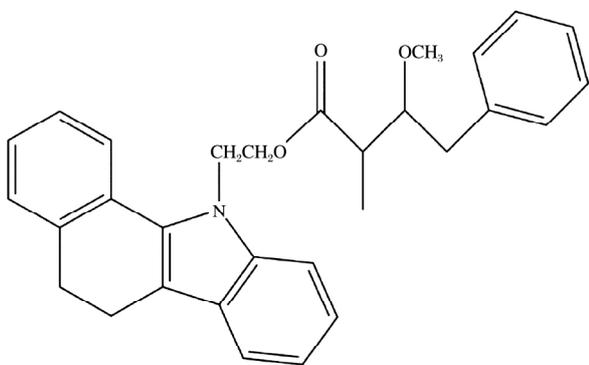


图 7 MMPB 羧基反应的衍生物

Fig. 7 MMPB carboxyl reactive derivative

4 结论与展望

水体中 MCs 的含量与藻类有关, 藻类生长的水温、氮磷营养盐等因素都会影响水体中 MCs 的浓度。不同地区、不同湖库由于其自身特征, 其环境差异会影响 MCs 的含量^[73-77]。日益严重的水体富营养化, 使得 MCs 的污染成为全球性环境问题, 世界卫生组织 (WHO) 规定饮用水中总 MC-LR 的限值为 1 μg/L。中国现行的《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006) 和《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002) 中规定 MC-LR 的限值为 0.001 mg/L。美国国家环境评估中心建议将饮用水指南值降低至 0.1 μg/L。

我国大部分地区如无锡太湖、云南滇池和太原市地表饮用水、饮用水体中^[78-80]的 MCs 含量低于中国现行的《生活饮用水卫生标准》和《地表水环境质量标准》中规定 MC-LR 的限值, 但气候和环境等各方面的变化会导致 MCs 含量的增加。国外水域环境中 MCs 污染情况也较为普遍, 如意大利撒丁岛卡里奇泻湖和卡布拉斯泻湖、埃塞俄比亚科卡水库、哥伦比亚安蒂奥基亚东部的三个水库、加拿大的地表水、芬兰湾等^[81-84]。陈瑾等^[85]应用物种敏感性分布方法 (SSD) 评估了 MCs 对淡水生物的生态风险浓度阈值 (HC5) 和复合潜在影响比例 (msPAF)。在大多数情况下, 受污染的水域中 MCs 的质量浓度小于 10 μg/L。该浓度下除甲壳类的其余物种的 PAF 值均小于 5%, MCs 对全部物种的 HC5 为 19.22 μg/L,

表明该浓度的水域中的 MCs 对淡水生物的影响很小。部分地区的 MCs 浓度较大, 会严重影响淡水生物, 进而影响人类健康。因此, 开发一种高效的、有选择性的被动采样技术及简单、灵敏的检测技术监测水体中 MCs 的残余量、评估水环境中的 MCs 的风险至关重要。

被动采样技术在采样过程更具灵活性和代表性, 可以连续采样, 不需要如传统方法采集大量样品, 大大降低了采样成本。被动采样技术不受一些外界因素, 如时间、突发污染事件等的限制, 可以及时收集污染物信息, 监控应对各种环境中的紧急污染状况。被动采样技术还可以避免在采样及转移过程中目标污染物的形态发生变化而影响分析结果的准确性。但其发展不完善, 存在着诸多的问题, 主要表现为: (1) 采样率受环境的影响, 无法获得准确的采样率。(2) 选择 PRC 校准物质困难。(3) 无法准确测定目标化合物的扩散系数。(4) 针对不同的目标污染物, 研发高选择性吸附剂困难。(5) 选择合适的洗脱和净化方法较困难。(6) 缺乏检测沉积物中的 MCs 的被动采样技术。因此被动采样技术的发展仍是环境监测工作中的一个重点。

和已有的一些非衍生化分析检测 MCs 的标准方法相比, 衍生化的分析方法可以减少样品基质的影响, 降低基质效应。但由于 MCs 的分子量过大, 衍生化试剂与其反应比较困难, 研发一种反应活性高、衍生化时间短、洗脱能力强的衍生化试剂对 MCs 的检测具有重要的现实意义。

声明 本文所阐述的是作者个人的观点, 不代表作者工作单位。

参考文献:

- [1] Buratti F M, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, Funari E. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation [J]. Archives of Toxicology, 2017, 91 (3): 1049-1130.
- [2] Zhao Y Y, Xue Q J, Su X M, Xie L Q, Yan Y J, Steinman A D. Microcystin-LR induced thyroid dysfunction and metabolic disorders in mice [J]. Toxicology, 2015, 328: 135-141.
- [3] Bownik A. Harmful algae: Effects of cyanobacterial cyclic peptides on aquatic invertebrates—a short review [J]. Toxicon, 2016, 124: 26-35.

- [4] Mountfort D O , Holland P , Sprosen J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS [J]. *Toxicon* , 2005 , 45(2) : 199-206.
- [5] 卢巧梅. 芯片液相色谱-质谱法高灵敏度检测水产品中微囊藻毒素[J]. *分析测试技术与仪器* , 2019 , 25(2) : 65-71. [LU Qiao-mei. Sensitive analysis of microcystins in aquatic products by nano-flow chip liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments* , 2019 , 25(2) : 65-71.]
- [6] 钟力,徐文琦,胡静文,张大海. 微囊藻毒素的危害及其分析方法进展 [J]. *分析化学进展* , 2018 , 8(3) : 91-102. [ZHONG Li , XU Wen-qi , HU Jing-wen , ZHANG Da-hai. The harmful effects of microcystins and the analytical methods [J]. *Advances in Analytical Chemistry* , 2018 , 8(3) : 91-102.]
- [7] Botes D P , Tuinman A A , Wessels P L , Viljoen C C , Kruger H , Williams D H , Santikarn S , Smith R J , Hammond S J. The structure of cyanoginosin-LA , a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Journal of the Chemical Society , Perkin Transactions 1* , 1984: 2311-2318.
- [8] 范赛,赵榕,李兵,刘伟,吴国华. 水产品中微囊藻毒素检测方法的研究进展 [J]. *色谱* , 2012 , 30(5) : 434-439. [FAN Sai , ZHAO Rong , LI Bing , LIU Wei , WU Guo-hua. Progress in techniques for determination of microcystins in aquatic products [J]. *Chinese Journal of Chromatography* , 2012 , 30(5) : 434-439.]
- [9] 国晓春,卢少勇,谢平,陈隼,刘晓晖. 微囊藻毒素的环境暴露、毒性和毒性作用机制研究进展 [J]. *生态毒理学报* , 2016 , 11(3) : 61-71. [GUO Xiao-chun , LU Shao-yong , XIE Ping , CHEN Jun , LIU Xiao-hui. Environmental exposure , toxicity and toxic mechanism of microcystins: a review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology* , 2016 , 11(3) : 61-71.]
- [10] Tillett D , Dittmann E , Erhard M , von Döhren H , Börner T , Neilan B A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system [J]. *Chemistry & Biology* , 2000 , 7 (10) : 753-764.
- [11] Kosiba J , Krztoń W , Wilk-Woźniak E. Effect of microcystins on proto- and metazooplankton is more evident in artificial than in natural waterbodies [J]. *Microbial Ecology* , 2018 , 75(2) : 293-302.
- [12] Zabiegała B , Kot-Wasik A , Urbanowicz M , Namieśnik J. Passive sampling as a tool for obtaining reliable analytical information in environmental quality monitoring [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 2010 , 396(1) : 273-296.
- [13] Rico A , Arenas-Sánchez A , Alonso-Alonso C , López-Heras I , Nozal L , Rivas-Tabares D , Vighi M. Identification of contaminants of concern in the upper Tagus river basin (central Spain) . Part I: Screening , quantitative analysis and comparison of sampling methods [J]. *Science of the Total Environment* , 2019 , 666: 1058-1070.
- [14] Guibal R , Lissalde S , Brizard Y , Guibaud G. Semi-continuous pharmaceutical and human tracer monitoring by POCIS sampling at the watershed-scale in an agricultural rural headwater river [J]. *Journal of Hazardous Materials* , 2018 , 360: 106-114.
- [15] Kohoutek J , Babica P , Bláha L , Maršálek B. A novel approach for monitoring of cyanobacterial toxins: development and evaluation of the passive sampler for microcystins [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 2008 , 390(4) : 1167-1172.
- [16] Djomte V T , Chen S , Chambliss C K. Effects of suspended sediment on POCIS sampling rates [J]. *Chemosphere* , 2020 , 241: 124972.
- [17] van Metre P C , Alvarez D A , Mahler B J , Nowell L , Sandstrom M , Moran P. Complex mixtures of Pesticides in Midwest US streams indicated by POCIS time-integrating samplers [J]. *Environmental Pollution* , 2017 , 220: 431-440.
- [18] Alvarez D A , Petty J D , Huckins J N , Jones-Lepp T L , Getting D T , Goddard J P , Manahan S E. Development of a passive , *in situ* , integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry* , 2004 , 23(7) : 1640-1648.
- [19] Godlewska K , Stepnowski P , Paszkiewicz M. Application of the polar organic chemical integrative sampler for isolation of environmental micropollutants-A review [J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* , 2020 , 50 (1) : 1-28.
- [20] 熊晶晶,李慧珍,马雪,张杰,游静. 极性有机物整合采样技术在监测水环境中农药的应用 [J]. *生态毒理学报* , 2017 , 12(4) : 2-14. [XIONG Jing-jing , LI Hui-zhen , MA Xue , ZHANG Jie , YOU Jing. Application of polar organic chemical integrative sampler on analyzing pesticides in water [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology* , 2017 , 12(4) : 2-14.]

- Journal of Ecotoxicology ,2017 ,12(4) : 2-14.]
- [21] Kohoutek J , Maršálek B , Bláha L. Evaluation of the novel passive sampler for cyanobacterial toxins microcystins under various conditions including field sampling[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry , 2010 ,397(2) : 823-828.
- [22] Jaša L , Sadílek J , Kohoutek J , Straková L , Maršálek B , Babica P. Application of passive sampling for sensitive time-integrative monitoring of cyanobacterial toxins microcystins in drinking water treatment plants [J]. Water Research , 2019 ,153: 108-120.
- [23] Brophy M J , Mackie A L , Park Y , Gagnon G A. Exploring the detection of microcystin-LR using polar organic chemical integrative samplers (POCIS) [J]. Environmental Science Processes & Impacts , 2019 ,21(4) : 659-666.
- [24] Vrana B , Urík J , Fedorova G , Švecová H , Grabicová K , Golovko O , Randák T , Grabic R. *In situ* calibration of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for monitoring of pharmaceuticals in surface waters [J]. Environmental Pollution , 2021 , 269: 116121-116161.
- [25] Roué M , Darius H , Chinain M. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) technology for the monitoring of aquatic toxins: a review[J]. Toxins ,2018 ,10(4) : 167.
- [26] Zendong Z , Herrenknecht C , Abadie E , Brissard C , Tixier C , Mondeguer F , Séchet V , Amzil Z , Hess P. Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins [J]. Toxicon ,2014 ,91: 57-68.
- [27] MacKenzie L , Beuzenberg V , Holland P , McNabb P , Selwood A. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) : a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves [J]. Toxicon ,2004 ,44(8) : 901-918.
- [28] Lane J Q , Roddam C M , Langlois G W , Kudela R M. Application of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) for field detection of the hydrophilic phycotoxins domoic acid and saxitoxin in coastal California[J]. Limnology and Oceanography: Methods , 2010 ,8(11) : 645-660.
- [29] MacKenzie L A. *In situ* passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool [J]. Current Opinion in Biotechnology ,2010 ,21(3) : 326-331.
- [30] Miller M A , Kudela R M , Mekebri A , Crane D , Oates S C , Tinker M T , Staedler M , Miller W A , Toy-
Choutka S , Dominik C , Hardin D , Langlois G , Murray M , Ward K , Jessup D A. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters [J]. PLoS One , 2010 ,5(9) : e12576-e12586.
- [31] Kudela R M. Characterization and deployment of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) resin for monitoring of microcystins in fresh and saltwater [J]. Harmful Algae , 2011 ,11: 117-125.
- [32] Zhao H , Qiu J B , Fan H , Li A F. Mechanism and application of solid phase adsorption toxin tracking for monitoring microcystins [J]. Journal of Chromatography A , 2013 ,1300: 159-164.
- [33] Gible C M , Kudela R M. Detection of persistent microcystin toxins at the land-sea interface in Monterey Bay , California [J]. Harmful Algae , 2014 ,39: 146-153.
- [34] Howard M , Nagoda C , Kudela R , Hayashi K , Tatters A , Caron D , Busse L , Brown J , Sutula M , Stein E. Microcystin prevalence throughout lentic waterbodies in coastal southern California [J]. Toxins , 2017 ,9(7) : 231.
- [35] Peacock M B , Gible C M , Senn D B , Cloern J E , Kudela R M. Blurred lines: Multiple freshwater and marine algal toxins at the land-sea interface of San Francisco Bay , California [J]. Harmful Algae , 2018 ,73: 138-147.
- [36] Onofrio M D , Mallet C R , Place A R , Smith J L. A screening tool for the direct analysis of marine and freshwater phycotoxins in organic SPATT extracts from the Chesapeake bay [J]. Toxins , 2020 ,12(5) : 322.
- [37] Kudela R M. Comprehensive analytical chemistry [M]. Netherlands: Elsevier , 2017: 379-409.
- [38] 罗军 , 王晓蓉 , 张昊 , Davison W. 梯度扩散薄膜技术(DGT) 的理论及其在环境中的应用 I: 工作原理、特性与在土壤中的应用 [J]. 农业环境科学学报 , 2011 ,30(2) : 205-213. [LUO Jun , WANG Xiao-rong , ZHANG Hao , Davison W. Theory and application of diffusive gradients in thin films in soils [J]. Journal of Agro-Environment Science , 2011 ,30(2) : 205-213.]
- [39] Zhang C S , Ding S M , Xu D , Tang Y , Wong M H. Bioavailability assessment of phosphorus and metals in soils and sediments: a review of diffusive gradients in thin films (DGT) [J]. Environmental Monitoring and Assessment , 2014 ,186(11) : 7367-7378.
- [40] Davison W , Zhang H. *In situ* speciation measurements

- of trace components in natural waters using thin-film gels [J]. *Nature*, 1994, 367(6463): 546-548.
- [41] Gao L, Gao B, Xu D Y, Liu L H. DGT: a promising technology for *in situ* measurement of metal speciation in the environment [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 715: 136810-136812.
- [42] Reichstädter M, Gao Y, Diviš P, Ma T H, Gaulier C, Leermakers M. Cysteine-modified silica resin in DGT samplers for mercury and trace metals assessment [J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128320-128322.
- [43] Bondarenko A, Sani D, Ruello M L. Design and calibration of an organic diffusive probe to extend the diffusion gradient technique to organic pollutants [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2011, 8(8): 3318-3332.
- [44] Chen C E, Zhang H, Jones K C. A novel passive water sampler for *in situ* sampling of antibiotics [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14(6): 1523-1530.
- [45] Yao L, Steinman A D, Wan X, Shu X B, Xie L Q. A new method based on diffusive gradients in thin films for *in situ* monitoring microcystin-LR in waters [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 17528-17535.
- [46] D' Angelo E. Development and evaluation of a sensitive, diffusive gradients in thin-films (DGT) method for determining microcystin-LR concentrations in freshwater and seawater [J]. *Harmful Algae*, 2019, 89: 101668-101676.
- [47] Nyoni H, Mamba B B, Msagati T A M. Calibration of a passive, *in situ*, integrative sampler for monitoring of microbial biotoxins in aquatic environments [J]. *Water Science and Technology-Water Supply*, 2015, 15(6): 1353-1367.
- [48] Li Z J, Gong C C, Huo P P, Deng C H, Pu S Z. Synthesis of magnetic core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{PDA}@ \text{Cu-MOFs}$ composites for enrichment of microcystin-LR by MALDI-TOF MS analysis [J]. *RSC Advances*, 2020, 10(49): 29061-29067.
- [49] Song H H, Coggins X C, Reichwaldt E S, Ghadouani A. The importance of lake sediments as a pathway for microcystin dynamics in shallow eutrophic lakes [J]. *Toxins*, 2015, 7(3): 900-918.
- [50] Zastepa A, Pick F R, Blais J M, Saleem A. Analysis of intracellular and extracellular microcystin variants in sediments and pore waters by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 872: 26-34.
- [51] 张蓓蓓, 史震宇, 吴仲夏, 彭英, 杨雪. 加速溶剂萃取-固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定沉积物中 5 种微囊藻毒素 [J]. *环境监控与预警*, 2018, 10(2): 19-22. [ZHANG Bei-bei, SHI Zhen-yu, WU Zhong-xia, PENG Ying, YANG Xue. Simultaneous determination of five microcystins in sediment by accelerated solvent extraction, solid phase extraction and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Environmental Monitoring and Forewarning*, 2018, 10(2): 19-22.]
- [52] 虞锐鹏, 杨健, 陈海燕, 何恩奇, 钮伟民, 陶冠军, 武铄, 徐夏叶. 一种水产品中痕量藻毒素含量的检测方法: CN102393435A [P]. 2012-03-28.
- [53] 吴振兴, 贾俊涛, 肖西志, 邓明俊, 静平, 许艳丽. 一种微囊藻毒素的液相色谱-串联质谱检测方法: CN103940921A [P]. 2014-07-23.
- [54] 张玲玲, 虞锐鹏, 陶冠军, 王利平, 吴胜芳, 宋启军. 加速溶剂萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定水产品中微囊藻毒素 [J]. *分析试验室*, 2016, 35(5): 604-607. [ZHANG Ling-ling, YU Rui-peng, TAO Guan-jun, WANG Li-ping, WU Sheng-fang, SONG Qi-jun. Determination of microcystins in aquatic products by accelerated solvent extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2016, 35(5): 604-607.]
- [55] Hu C L, Gan N Q, He Z K, Song L R. A novel chemiluminescent immunoassay for microcystin (MC) detection based on gold nanoparticles label and its application to MC analysis in aquatic environmental samples [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2008, 88(4): 267-277.
- [56] He X X, Stanford B D, Adams C, Rosenfeldt E J, Wert E C. Varied influence of microcystin structural difference on ELISA cross-reactivity and chlorination efficiency of congener mixtures [J]. *Water Research*, 2017, 126: 515-523.
- [57] Lu N, Ling L, Guan T, Wang L T, Wang D, Zhou J H, Ruan T, Shen X, Li X M, Sun Y M, Lei H T. Broad-specificity ELISA with a heterogeneous strategy for sensitive detection of microcystins and nodularin [J]. *Toxicon*, 2020, 175: 44-48.
- [58] Metcalf J S, Bell S G, Codd G A. Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria [J]. *Applied and Environmental*

- Microbiology, 2001, 67(2) : 904-909.
- [59] Spool L, Neffling M R, Meriluoto J. Fast separation of microcystins and nodularins on narrow-bore reversed-phase columns coupled to a conventional HPLC system [J]. Toxicon, 2010, 55(5) : 954-964.
- [60] Roy-Lachapelle A, Vo Duy S, Munoz G, Dinh Q T, Bahl E, Simon D F, Sauvé S. Analysis of multiclass cyanotoxins (microcystins, anabaenopeptins, cylindrospermopsin and anatoxins) in lake waters using on-line SPE liquid chromatography high-resolution Orbitrap mass spectrometry [J]. Analytical Methods, 2019, 11(41) : 5289-5300.
- [61] Anaraki M T, Shahmohamadloo R S, Sibley P K, MacPherson K, Bhavsar S P, Simpson A J, Ortiz Almirall X. Optimization of an MMPB Lemieux oxidation method for the quantitative analysis of microcystins in fish tissue by LC-QTOF MS [J]. Science of the Total Environment, 2020, 737: 140209-140248.
- [62] Zhang L L, Yu R P, Wang L P, Wu S F, Song Q J. Transformation of microcystins to 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid by room temperature ozone oxidation for rapid quantification of total microcystins [J]. Environmental Science Processes & Impacts, 2016, 18(4) : 493-499.
- [63] Grundler V, Gademann K. Direct arginine modification in native peptides and application to chemical probe development [J]. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2014, 5(12) : 1290-1295.
- [64] Grundler V, Faltermann S, Fent K, Gademann K. Preparation of fluorescent microcystin derivatives by direct arginine labelling and their biological evaluation [J]. ChemBioChem, 2015, 16 (11) : 1657-1662.
- [65] Hayama T, Katoh K, Aoki T, Itoyama M, Todoroki K, Yoshida H, Yamaguchi M, Nohta H. Liquid chromatographic determination of microcystins in water samples following pre-column excimer fluorescence derivatization with 4-(1-pyrene) butanoic acid hydrazide [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 755: 93-99.
- [66] Murata H, Shoji H, Oshikata M, Harada K I, Suzuki M, Kondo F, Goto H. High-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection of derivatized microcystins [J]. Journal of Chromatography A, 1995, 693(2) : 263-270.
- [67] Miles C O, Sandvik M, Nonga H E, Rundberget T, Wilkins A L, Rise F, Ballot A. Thiol derivatization for LC-MS identification of microcystins in complex matrices [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(16) : 8937-8944.
- [68] Miles C O, Sandvik M, Haande S, Nonga H, Ballot A. LC-MS Analysis with thiol derivatization to differentiate [Dhb(7)]- from [Mdha(7)]-microcystins: analysis of cyanobacterial blooms, planktothrix cultures and European crayfish from lake steinsfjorden, Norway [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(9) : 4080-4087.
- [69] Harada K I, Oshikata M, Shimada T, Nagata A, Ishikawa N, Suzuki M, Kondo F, Shimizu M, Yamada S. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins derivatized with a highly fluorescent dienophile [J]. Natural Toxins, 1997, 5(5) : 201-207.
- [70] Sano T, Nohara K, Shiraishi F, Kaya K. A method for micro-determination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green algae) [J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1992, 49(3) : 163-170.
- [71] Tsuji K, Masui H, Uemura H, Mori Y, Harada K I. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method [J]. Toxicon, 2001, 39(5) : 687-692.
- [72] Wang C, Tian C, Tian Y, Feng B, We S, Li Y, Wu X, Xiao B. A sensitive method for the determination of total microcystins in water and sediment samples by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Analytical Methods, 2015, 7(2) : 759-765.
- [73] Paerl H W, Gardner W S, Havens K E, Joyner A R, McCarthy M J, Newell S E, Qin B Q, Scott J T. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients [J]. Harmful Algae, 2016, 54: 213-222.
- [74] Visser P M, Verspagen J M H, Sandrini G, Stal L J, Matthijs H C P, Davis T W, Paerl H W, Huisman J. How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms [J]. Harmful Algae, 2016, 54: 145-159.
- [75] Xiao M, Li M, Reynolds C S. Colony formation in the cyanobacterium microcystis [J]. Biological Reviews, 2018, 93(3) : 1399-1420.
- [76] Paerl H W, Hall N S, Calandrino E S. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change [J]. Science of the Total Environment, 2011, 409(10) : 1739-1745.

- [77] Hu H C , Leung L R , Feng Z. Observed warm-season characteristics of MCS and non-MCS rainfall and their recent changes in the central United States [J]. *Geophysical Research Letters* , 2020 , 47 (6) : e2019GL086783.
- [78] 邵国健,张鹏,朱文涛,韩建康,付云. 自动固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定太湖水和饮用水中9种微囊藻毒素[J]. *中国卫生检验杂志* , 2018 , 28 (18) : 2193-2196. [SHAO Guo-jian , ZHANG Peng , ZHU Wen-tao , HAN Jian-kang , FU Yun. Simultaneous determination of 9 microcystins in Taihu Lake water and drinking water by automated solid phase extraction coupled with UPLC-MS/MS method [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* , 2018 , 28(18) : 2193-2196.]
- [79] Liu X Y , Gao S Q , Li X Y , Wang H , Ji X W , Zhang Z N. Determination of microcystins in environmental water samples with ionic liquid magnetic graphene [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 2019 , 176: 20-26.
- [80] 张国华. 高效液相色谱法测定饮用水中微囊藻毒素 (MC-LR) 的研究[J]. *山西科技* , 2018 , 33(2) : 45-48. [ZHANG Guo-hua. Research on determination of microcystin (MC-LR) in drinking water by high performance liquid chromatography [J]. *Shanxi Science and Technology* , 2018 , 33(2) : 45-48.]
- [81] Baralla E , Varoni M V , Sedda T , Pasciu V , Floris A , Demontis M P. Microcystins presence in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and water of two productive mediterranean ' s lagoons (Sardinia , Italy) [J]. *BioMed Research International* , 2017 , 2017: 1-7.
- [82] Major Y , Kifle D , Spoo L , Meriluoto J. Cyanobacteria and microcystins in Koka reservoir (Ethiopia) [J]. *Environmental Science and Pollution Research* , 2018 , 25(27) : 26861-26873.
- [83] León C , Peñuela G A. Detected cyanotoxins by UHPLC MS/MS technique in tropical reservoirs of northeastern Colombia [J]. *Toxicon* , 2019 , 167: 38-48.
- [84] Chernova E , Sidelev S , Russkikh I , Voyakina E , Zhakovskaya Z. First observation of microcystin- and anatoxin-a-producing cyanobacteria in the easternmost part of the Gulf of Finland (the Baltic Sea) [J]. *Toxicon* , 2019 , 157: 18-24.
- [85] 陈瑾,刘奕梅,张建英. 基于物种敏感性分布的微囊藻毒素与氮污染水体生态风险评估[J]. *应用生态学报* , 2014 , 25(4) : 1171-1180. [CHEN Jin , LIU Yi-mei , ZHANG Jian-ying. Aquatic ecological risk assessment of microcystins and nitrogen pollution based on species sensitivity distribution [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology* , 2014 , 25(4) : 1171-1180.]