

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИАНОТОКСИНОВ В ВОДНОЙ МАТРИЦЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ - МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Санкт-Петербургский Научно-исследовательский Центр экологической безопасности Российской академии наук, 197110 Санкт-Петербург, Корпусная ул., 18,

*В статье представлен разработанный авторами метод одновременного обнаружения, идентификации и количественного определения цианотоксинов, относящихся к различным группам (нейро- и гепатотоксины). Приводятся первые результаты, полученные при комплексном исследовании проб воды озера Сестрорецкий Разлив, начиная с 2008г.*

**Ключевые слова:** качество воды, «цветение» воды, цианобактерии, цианотоксины (анатоксин-а, микроцистин-RR), хроматография, масс-спектрометрия, озеро Сестрорецкий Разлив

Эвтрофикация водоемов, сопровождающаяся активной вегетацией одного или нескольких видов водорослей («цветение» водоемов) и выделением в окружающую среду природных токсинов, представляет серьезную угрозу для водных экосистем. Проблема «цветения» воды уже давно стала актуальной для Северо-Запада России. Это явление возникает при нарушении баланса экосистемы и характеризуется активной вегетацией одного или нескольких видов водорослей, обитающих в водной толще. Качество пресной воды водоемов Северо-Западного региона Российской Федерации, особенно в летний период, в значительной степени зависит от активной вегетации синезеленых водорослей (цианобактерий). Периоды увеличения биомассы цианобактерий заканчиваются массовым отмиранием клеток и последующим выбросом внутриклеточных токсинов в воду. С массовой вегетацией синезеленых водорослей связывают онкологические и кишечные заболевания, аллергические дерматиты. В организм человека токсины попадают в результате употребления загрязненной воды или зараженных морепродуктов [1-3].

Применяемые в настоящее время меры по предотвращению цветений являются малоэффективными, поскольку остановить начавшееся цветение практически невозможно. При всей серьезности проблемы, в Российской Федерации отсутствуют санитарно-гигиенические нормативы допустимого уровня содержания цианотоксинов в воде водоемов.

В настоящее время «цветут» практически все водоемы Северо-Запада России, в которых обнаружено более 20 потенциально-токсичных видов цианобактерий. Для Финского залива и пресных вод Северо-Западного региона (в том числе Ладожского озера) наибольшее значение имеют виды *Microcystis aeruginosa* и *Aphanizomenon flos-aquae*. [1]. Планктонные формы именно этих цианобактерий, главным образом, и образуют ядовитые вещества. Известно, что при наличии в планктоне видов *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* и *Aphanizomenon* весьма вероятно появление цианотоксинов в воде [4-6].

Присутствующие в водоемах Северо-Западного региона цианобактерии синтезируют в основном цианотоксины двух типов – нейротоксины и гепатотоксины, названные по соответствующим клиническим синдромам отравления [1, 7, 8].

Нейротоксины представляют собой низкомолекулярные алкалоиды, действующие на нервную систему. К этому классу токсинов относятся анатоксин-а, гомоанатоксин и анатоксин-а(s) (рисунок 1). Показатель LD<sub>50</sub> для мышей для соединений анатоксина-а и гомоанатоксина – 200-250 мкг/кг, для анатоксина-а(s) – 20 мкг/кг [6, 7].

<sup>1</sup> Русских Яна Владимировна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр., yanarusk@gmail.com

<sup>2</sup> Чернова Екатерина Николаевна, науч. сотр., s3561389@yandex.ru

<sup>3</sup> Воякина Екатерина Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., katerina-voyakina@rambler.ru

<sup>4</sup> Никифоров Владимир Александрович, канд. хим. наук, зав. лабораторией, vovanikiforov@yahoo.co.uk

<sup>5</sup> Жаковская Зоя Андреевна, канд. биол. наук, зав. отделом, viktorovskiy@inbox.ru

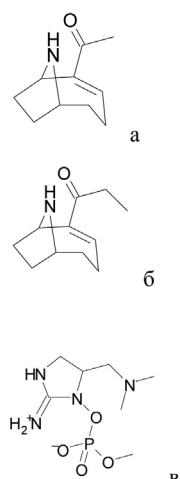


Рисунок 1. Цианобактериальные нейротоксины: а - анатоксин-а, б - гомоанатоксин, в - анатоксин-а(с)

К гепатотоксинам относятся более 80 циклических, содержащих редкие аминокислоты, гепта- (микроцистины) или пентапептидов (нодуларины) с молекулярной массой в интервале 800-1100 Да. Микроцистины состоят из семи аминокислот, пять из которых постоянны в составе соединений этого класса, а две L-аминокислоты – вариабельны. Фармакологическое действие микроцистинов обусловлено наличием АДДА – фрагмента: 3-амино-9-метокси-10-фенил-1,2,6,8-триметилдека-4,6-диеновой кислоты (рисунок 2), который является характеристичным для данного класса соединений. Гепатотоксины, попавшие в организм животного или человека, вызывают разрушение печени. Из известных представителей этого класса соединений наиболее токсичным является микроцистин-LR (показатель LD<sub>50</sub> для мышей 50 мкг/кг). Другое достаточно распространенное соединение – микроцистин-RR – менее токсично (показатель LD<sub>50</sub> для мышей 600 мкг/кг) [6, 7, 9].

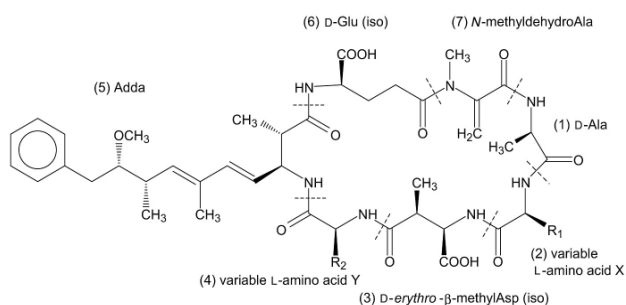


Рисунок 2. Структура микроцистинов –LR и –RR, где R1 и R2 – вариабельные L-аминокислоты. Для MC-RR: R1 = Arg, R2 = Arg; MC-LR: R1 = Arg, R2 = Leu. [9].

Для определения присутствия цианотоксинов применяются различные методы химического и биологического анализа. Для скринингового неселективного определения используют иммуоферментный анализ и исследование ингибирования фосфатазной активности белков.

Для индивидуального определения рассматриваемых токсичных соединений необходимо применение хроматографических методов. Их эффективность зависит от типа используемого детектора [6-8, 10, 11]. Например, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием может быть недостаточно селективным, поскольку микроцистины имеют сходные спектры поглощения, а анатоксины слабо поглощают в УФ-области

[12, 13]. Кроме того, в матрице могут присутствовать другие соединения, также поглощающие в соответствующей области УФ-спектров, что может способствовать перепредделению аналитов. В связи с тем, что методы жидкостной хроматографии базируются на времени удерживания, для идентификации и количественного определения микроцистинов требуются стандарты [13]. Однако, коммерчески доступен лишь ограниченный перечень сертифицированных стандартов микроцистинов.

Отмеченных недостатков лишен метод жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии, особенно в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС<sup>n</sup>) высокого разрешения, применяемый для определения малых количеств нелетучих соединений, к которым относятся рассматриваемые токсичные вещества [18]. Данный метод широко применяется при анализе и изучении цианотоксинов в последние годы [6, 14-16]. В этом случае надежность идентификации достигается комбинацией данных жидкостной хроматографии – времен удерживания аналитов и данных масс-спектрометрии – точных значений молекулярных масс, избирательно характеризующих определяемые соединения.

## Экспериментальная часть

В качестве модельного объекта для изучения процессов «цветения» и образования токсинов в природной воде было выбрано озеро Сестрорецкий Разлив – самый крупный водоем в черте Санкт-Петербурга. Площадь озера – 11,0 км<sup>2</sup>, средняя глубина не превышает 1,6 м. Этот водоем находится в рекреационной зоне и расположен в пределах водосборного бассейна в непосредственной близости от Финского залива. Значительная антропогенная нагрузка способствует усилению процессов цветения и ухудшению качества воды [17]. Поэтому вода в озере в период «цветения» может представлять серьезную угрозу для жителей г. Санкт-Петербурга. В связи с этим возникла необходимость исследования динамики содержания цианотоксинов в воде.

Пробы воды отбирали с поверхности в приплотинной части озера Сестрорецкий Разлив (координаты: 60°05'05" с.ш. 29°59'05" в.д./60.084722° с.ш. 29.984722° в.д.) в летний период начиная с 2008 г.

*Лимнологические методы исследования.* Количественные пробы фитопланктона объемом 1л отбирали простым зачерпыванием с поверхности воды. Для фиксации использовали кислый раствор Люголя в модификации Усачева с дальнейшей дофисацией 40 %-ным формалином, концентрировали осадочным методом [19]. Подсчет численности водорослей производили в камере Нажотта (0,01 мл). Биомассу определяли расчетным общепринятым способом, объем водорослей – методом геометрического подобия [19].

*Материалы и методы исследований.* Используемые реактивы: ацетонитрил сорта «0» (Криохром); метанол марки LC-MS CHROMASOLV (Fluka); вода, очищенная с помощью системы Direct-Q (Millipore, электропроводность 0,056 μS/см при 25°C); трифторуксусная кислота (ТФУ), очищенная перегонкой. Аналитические стандарты: анатоксин-а фумарат (A.G. Scientific, Inc. CA u TOCRIS bio-science UK), микроцистин-RR (Alexis Biochemicals).

Обработка метода осуществлялась на растворах стандартов и модельных системах, которые представляют собой растворы смеси стандартных веществ с известной концентрацией в дистиллированной воде. С целью исследования влияния матричных эффектов использовали растворы смеси стандартных веществ в природной воде, не содержащей исследуемых соединений [20].

Предварительно были получены УФ, а также полные и тандемные масс-спектры стандартов анатоксина-а и микроцистина-RR (рисунки 3, 4). Подробно полу-

ченные спектры стандартов описаны в нашей предыдущей статье [20]. Кратко, для анатоксина-а кроме положительно-заряженного молекулярного иона с  $m/z$  166.12, характеристичными являются ион-продукты с  $m/z$  149.10 и 131.08. Данные осколки образуются при потере родительским ионом  $NH_3$  и дальнейшим отщеплением молекулы воды [21]. Микроцистин-RR определяли по двухзарядному молекулярному иону с  $m/z$  519.79, так как его структура содержит два остатка аргинина с легко протонируемыми фрагментами гуанидина [21, 22]. В  $MS^2$ -спектрах микроцистинов наблюдали также ион-продукт с  $m/z$  135.08, который является характеристичным ионом, присутствующим в спектрах всех микроцистинов и соответствует Adda-фрагменту конечного распада микроцистинов – эритро-2-метил-3-метокси-4-фенилмасляной кислоты [15, 23].

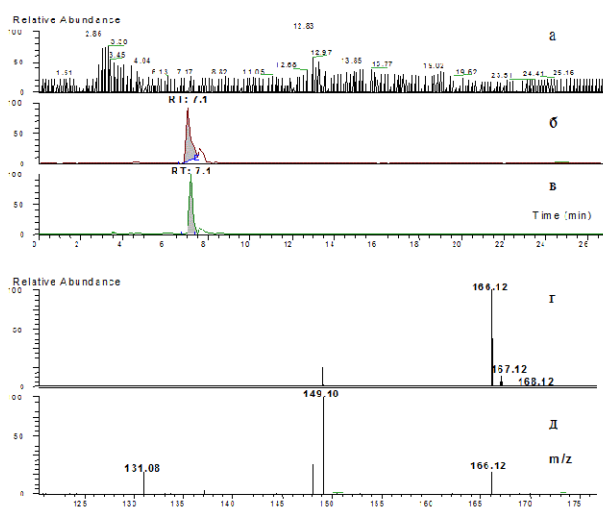


Рисунок 3. Типичные масс-хроматограммы (а, б, в) и масс-спектры высокого разрешения (г, д) экстракта водной пробы, зарегистрированные для ионов  $[M+H]^+$  анатоксина-а ( $m/z$  166.1232).

масс-хроматограммы анатоксина-а:  
а) полного ионного тока; б) выделенного молекулярного иона; в) ион-продуктов;  
масс-спектры анатоксина-а:  
г) полный масс-спектр молекулярного протонированного иона, д) тандемный масс-спектр ион-продуктов.

Аналитическое определение цианотоксинов в воде проводили не более чем через 24 ч. после отбора проб [24]. Для выделения определяемых веществ, пробу воды объемом 500 мл фильтровали («Владипор», 0,45 мкм). Фильтрат подщелачивали (до pH10) добавлением 1M раствора NaOH. Так как внеклеточные токсины присутствуют в пробах воды в довольно низких концентрациях, на этапе пробоподготовки проводили их концентрирование. Для этого, а также для уменьшения матричных эффектов использовали метод твердофазной экстракции (ENVI-18 DSK, диаметр 47 мм, Supelco) [24-26]. После экстракции ENVI-диски сушили в токе воздуха до постоянного веса и элюировали 50 мл метанола в течение 15 мин. Элюат упаривали до влажного остатка на роторном испарителе и переращивали в 1мл водно-ацетонитрильной (95:5) смеси, содержащей 0,01 % ТФУ. Полученный экстракт анализировали.

Параллельно с исследованием природной воды, начиная с 2009 года, изучали одновременно отбираемую с водной пробой биомассу цианобактерий. Анализ биомассы проводили по методике, описанной в [27]. Для экстракции внутриклеточных токсинов из образцов биомассы необходимо разрушение клеточной стенки бактерий, что достигается либо лиофилизацией [28, 29], либо многократным

замораживанием-размораживанием образца [12, 31] с последующей экстракцией. В нашем случае лиофилизат биомассы известной навески экстрагировали двумя порциями комплексного элюента (ацетонитрил-вода-ТФУ) при помощи ультразвука. Полученный экстракт центрифугировали и анализировали по методу, используемому для определения токсинов в пробах воды.

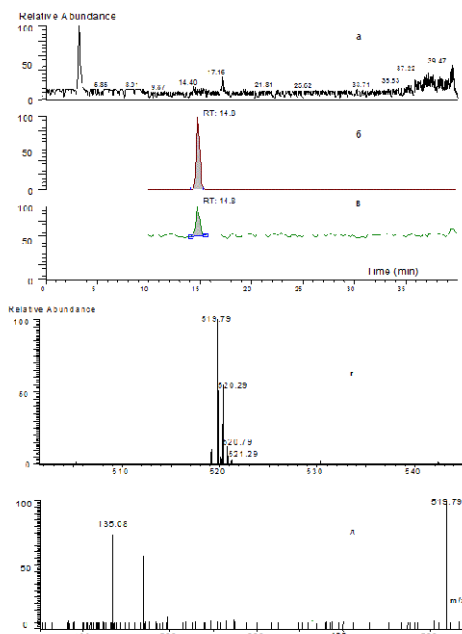


Рисунок 4. Типичные масс-хроматограммы (а, б, в) и масс-спектры высокого разрешения экстракта водной пробы, зарегистрированные для ионов  $[M+2H]^{2+}$  микроцистина-RR ( $m/z$  519.7908).

масс-хроматограммы микроцистина-RR:  
а) полного ионного тока; б) выделенного молекулярного двухзарядного иона; в) ион-продуктов,  
масс-спектры микроцистина-RR  
г) молекулярного двухзарядного иона, д) тандемный масс-спектр ион-продуктов.

В 2008-2009г.г. исследования проводили с использованием хромато-масс-спектрометра LCMS-IT-TOF (фирмы "Shimadzu"). Начиная с 2010г. анализ выполняли с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа-масс-спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap (Thermo). Сравнение результатов хромато-масс-спектрометрического определения цианобактериальных токсинов на примере анатоксина-а (Ana-a) и микроцистина-RR (MC-RR), полученных на обоих приборах приведено в статье [20].

Хроматографическое разделение смеси аналитов достигнуто на обратнофазной колонке (Thermo Hypersil Gold 100x3 mm, 3 мкм) с использованием градиентного режима хроматографирования при скорости потока 0,2 мл/мин. Элюент А: 0,01 % раствор ТФУ в воде. Элюент В: 0,01 % раствор ТФУ в ацетонитриле. Градиент от 5 до 75 % В.

Масс-спектрометрический анализ проводили в условиях электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов. Сканируемый диапазон масс ( $m/z$ ) составлял 100-1200.

В ряде случаев пики аналитов на полученных масс-хроматограммах отделены от химического шума даже на масс-спектрах полного ионного тока. Но в большинстве случаев спектры аналитов образцов природной воды частично включают или перекрываются фоновыми сигналами, что видно по масс-спектрам при соответствующем

ющих временах удерживания. Поэтому для определения анатоксина-а с 2010г. стали применять режим детектирования выбранных ионов (SIM) с получением характеристических ионов-продуктов в tandemном режиме. Идентификацию других метаболитов (различных форм микроцистинов) подтверждали с использованием tandemных спектров при энергии разбиения 25 %, при которой были получены максимальные значения интенсивностей ион-продуктов.

Полученная концентрационная зависимость аналитов (анатоксина-а и микроцистина-RR) была линейна в интервале концентраций растворов от 5 нг/мл до 100 нг/мл экстракта на обоих приборах. Порог устойчивого обнаружения микроцистина-RR из растворов стандарта составлял 0,5нг на ввод для LCMS-IT-TOF и 0,1нг на ввод – для LTQ "Orbitrap". Для анатоксина-а эти величины составили 0,25 и 0,05 нг на ввод в SIM-режиме, соответственно [20]. Для исследуемых соединений установлены пределы обнаружения токсинов были ниже безопасных уровней их содержания в воде водоемов рекреационных зон, принятых в некоторых странах (таблица 1) [32-35].

Таблица 1. Рекомендуемые (ориентировочные) безопасные уровни содержания цианотоксинов в водоемах [32-35]

Страна, регион или организация	Аналит	Вода	Уровень, мкг/л
Штаты США, ВОЗ	анатоксин-а	озера, рекреационная зона	1-20
ВОЗ	микроцистины	питьевая вода	1*
ВОЗ		водоемы рекреационной зоны	4

\* Уровень 1-1,5 мкг/л принят в качестве нормативного для микроцистинов (микроцистина LR) в законодательстве различных стран Европы, Южной Америки и Тихоокеанского бассейна.

Количественное определение проводили методом внешней калибровки.

## Результаты исследований и их обсуждение

В составе фитопланктона и цианобактерий оз. Сестрорецкий Разлив было обнаружено 108 таксонов рангом ниже рода. По видовому богатству преобладали зеленые, диатомовые водоросли и цианобактерии, что типично для водоемов Северо-Запада России.

Чаще всего для сезонной динамики фитопланктона было характерно наличие одного ярко выраженного пика, обусловленного активной вегетацией цианобактерий. За время исследования отмечались высокие биомассы фитопланктона в течение всего летнего периода, обусловленные массовой вегетацией цианобактерий. В то же время в разные годы основной вклад в вегетацию вносили разные виды синезеленых водорослей, что в свою очередь определяло спектр и концентрацию токсинов в воде. Показатели обилия фитопланктона варьировали в широком диапазоне. Значения численности фитопланктона варьировали от 0,3 до 1126,8 млн. кл/л (среднее значение 345,9 млн. кл/л), биомассы – от 0,1 до 75,3 мг/л (среднее – 35,9 мг/л).

В 2008 г. наблюдались высокие показатели биомассы фитопланктона в течение всего летнего периода, обусловленные массовой вегетацией цианобактерий. В течение сезона наблюдалась активная вегетация фитопланктона, среднее значение численности было 485,9 млн. кл/л, биомассы – 42,0 мг/л.

В период «цветения» в июле и августе монодоминантом был токсигенный вид – *Planktothrix agardhii*, на

его долю приходилось более 70 % биомассы. В 2008 г. анатоксин-а был обнаружен лишь в трех пробах воды. Определенные хромато-масс-спектрометрическим методом концентрации анатоксина-а в озере варьировали от 0,8 до 5,0 мкг/л (таблица 2). Максимальная концентрация анатоксина-а была отмечена в августе в период максимальной вегетации синезеленых водорослей (биомасса *P. agardhii* – 46,9 мг/л).

Таблица 2. Результаты анализа проб воды 2008-2011 гг. Сестрорецкий Разлив (концентрация в мкг/л)

Название	Брутто-формула	[M+H] <sup>+</sup>	2008	2009	2010	2011
MC-LR	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	995.55658	ND	ND	0,04	0,02-0,2
Demethyl-MC-LR	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	981.54095	ND	ND	ND	0,02
MC-RR	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	519.79077	ND	0,02	0,06	0,01-0,09
Demethyl-MC-RR	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	1024.55798	ND	ND	ND	0,01-0,04
MC-YR	C <sub>52</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	1045.53589	ND	ND	0,02	0,01
Anatoxin-a	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO	166.12318	0,8-4,8	ND	ND	ND

В 2009 г. по-прежнему отмечалась активная вегетация фитопланктона, среднее значение численности составило 206 млн. кл./л, биомассы – 29,8 мг/л. Максимальные значения показателей обилия отмечены в середине июля (69,5 мг/л). В течение лета основной вклад в вегетацию фитопланктона по-прежнему вносили синезеленые водоросли, создавая от 23 до 93 % от общей биомассы. Большую часть сезона в планктоне доминировали потенциально токсичные виды *Planktothrix agardhii* и *Aphanizomenon flos-aquae*.

Несмотря на активную вегетацию цианобактерий в 2009 г., в оз. Сестрорецкий Разлив не было обнаружено анатоксина-а. Возможно, это связано с неблагоприятными погодными условиями. Микроцистин-RR в незначительном количестве (0,02 мкг/л) был обнаружен только один раз в начале июня (таблица 2).

В 2010 г. среднее значение биомассы фитопланктона составило 30,8 мг/л. Максимальные значения были отмечены в начале августа (75,3 мг/л). В планктоне доминировали виды рода *Anabaena* (*A. planctonica*, *A. flos-aquae*, *A. spiroides*). В этот же период однократно были обнаружены микроцистин-LR (0,04 мг/л) и микроцистин-RR (0,06 мг/л).

В оз. Сестрорецкий Разлив в течение сезона 2011 г. наблюдалась активная вегетация фитопланктона, численность водорослей варьировала от 18,8 до 794,2 млн. кл/л (среднее значение – 175,6 млн. кл./л), биомасса изменялась от 5,27 до 62,9 мг/л (среднее значение – 18,30 мг/л). Минимальные значения показателей обилия были отмечены в конце августа (5,3 мг/л), максимальные – в середине июля (62,9 мг/л). Основной вклад в вегетацию фитопланктона вносили синезеленые водоросли, создавая от 30 до 99 % от общей биомассы. В течение сезона в планктоне наблюдали: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix agardhii* и *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *M. viridis*).

В 2011г. в большинстве проб воды было зафиксировано присутствие цианотоксинов. Максимальные суммарные концентрации микроцистинов (341,0 нг/л) были отмечены в середине июля при максимальных показателях обилия цианобактерий. Анатоксин-а в летний период 2011 г. не был обнаружен. По-видимому, это связано с монодоминированием в планктоне видов рода *Microcystis*, продуцирующих различные микроцистины, но не анатоксины.

Анализ биомассы проводили, начиная с 2009г., при этом оценка содержания всех детектированных метаболитов цианобактерий осуществлялась качественно. Во всех лиофилизатах биомассы, отбираемой одновременно с пробами воды в 2009-2010г.г., обнаружен практически

одинаковый набор цианобактериальных токсинов (перечень обнаруженных соединений приведен в таблице 3). Вероятно, это связано с доминированием одного вида цианобактерий – *Planktothrix agardhii*, на долю которого приходилось до 70 % биомассы в указанные годы. Для детектированных цианобактериальных токсинов в пробах биомассы выполнен тандемный анализ, что позволило подтвердить их идентификацию.

Таблица 3. Результаты качественного анализа проб биомассы из озера Сестрорецкий Разлив 2008-2011 гг.

Название	Брутто-формула	[M+H] <sup>+</sup>	2008	2009	2010	2011
MC-LR	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	995,55658	+	+	+	+
Demethyl-MC-LR	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	981,54095	+	+	+	+
DiDemethyl-MC-LR	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	967,52533	ND	ND	+	ND
[L-Ser <sup>7</sup> ]MC-LR	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	999,55151	+	+	ND	ND
Dehydro-MC-LR	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	997,57227	ND	+	+	ND
[D-Glu-OCH <sub>3</sub> <sup>5</sup> ] -MC-LR	C <sub>50</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	1009,57227	ND	ND	ND	+
MC-RR	C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	519,79077	+	+	+	+
Demethyl-MC-RR	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1024,55798	+	+	+	+
DiDemethyl-MC-RR	C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1010,54236	+	+	ND	ND
*-Ser-MC-RR	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	1042,56860	ND	ND	+	ND
MC-WR	C <sub>54</sub> H <sub>73</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	1068,55188	ND	ND	ND	+
(Dha <sup>7</sup> )MC-YR	C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	1031,52026	+	+	+	ND
Microcystin-YA	C <sub>49</sub> H <sub>65</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	960,47192	ND	ND	+	ND
MC-YR	C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	1045,53589	+	+	+	+
MC-FR	C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	1029,54102	ND	ND	ND	+
Microcystin-LW	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>8</sub> O <sub>12</sub>	1025,53479	ND	ND	ND	+
Anatoxin-a	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO	166,12318	ND	ND	ND	ND

### Выводы

Разработан и апробирован высокоселективный и чувствительный метод определения цианотоксинов в природной воде, основанный на жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии высокого разрешения. В результате комплексного исследования впервые в водоеме Северо-Западного региона РФ в период «цветения» воды обнаружены цианотоксины. Отдельные пробы содержали нейротоксин – анатоксин-а на пределе безопасного уровня его содержания для некоторых стран и гепатотоксины в количествах ниже безопасного уровня [32-35]. Проведенные исследования показывают, что состав токсинов четко связан с комплексом доминирующих видов цианобактерий. Полученные данные согласуются с результатами исследований в других странах [4, 36, 37].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-05-01067.

### Литература

1. Белякова Р.Н., Волошко Л.Н., Гаврилова О.В. Водоросли, вызывающие «цветение» водоемов Северо-Запада России. М.: Товарищество науч. изд. КМК, 2006. 367 с.
2. Falconer I.R. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria // *Phycologia*. 1996. 35 suppl. P. 6-11.
3. Grosse Y, Baan R, Straif K, [et al.]. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. // *The Lancet Oncology*. 2006. V. 7. P. 628-629.
4. Fastner J., Neumann U., Wirsing B. [et al.]. Microcystins (Hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. // *Environ Toxicol.*, 1999. V. 14. P. 13-22.
5. Svrcek C., Smith, D.W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. // *J. Environ. Eng. Sci.* 2004. V. 3. P. 155-185.
6. Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection. Second Edition. / Ed. by Luis M.Botana, University of Santiago, Lugo, Spain: CRC Press, 2008. 960 p.
7. Chorus I., Bartram J. (Eds.). Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: WHO, 1999. 432 p.
8. Hudnell H.K. (Ed). Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. N.Y.: Springer, 2008. 949 p.
9. Zeck A., Weller M.G., Bursillb D., Niessner R. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. // *Analyst*. 2001. V. 126, P. 2002-2007.
10. McElhiney J., Lawton L.A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005. V. 203. No. 3. P. 219-230.
11. Perez S., Aga D.S. Recent advances in the sample preparation, liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water // *Trends Anal. Chem.* 2005. V. 24. No. 7. P. 658-670.
12. Lawton, L.A., Edwards, C., Codd, G.A.: Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. // *Analyst*. 1994. V. 119, P. 1525-1530
13. Harada K-I, Kondo F, Lawton L, in I. Chorus, J.Bartram (Eds), Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management, London: E.&F.N. Spon, 1999. P. 369.
14. James K.J., Crowley J., Hamilton B., [et al.]. Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. V. 19. No. 9. P. 1167-1175.
15. Diehnelt C.W., Peterman S.M., Budde W.L. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry and accurate m/z measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins // *Trends Anal. Chem.* 2005. Vol. 24. No. 7. P. 622-634.
16. Merel S., LeBot B., Clément M., [et al.]. MS identification of microcystin-LR chlorination by-products // *Chemosphere*. 2009. Vol. 74. No. 6. P. 832-839.
17. Кондратьев С.А., Гронская Т.П. Водоемы Санкт-Петербурга – общие сведения: в сб. Водные объекты Санкт-Петербурга. / Ред. С.А. Кондратьев, Г.Т. Фрумин. СПб.: 2002. С. 88-93.
18. Ardrey B. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: an introduction. Chichester: Wiley, 2003. 296 p.
19. Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Фитопланктон и его

продукция. / Ред. Г.Г. Винберг, Г.М. Лаврентьева. Л.: ГосНИОРХ, ЗИН АН СССР, 1988. 32 с.

20. Русских Я.В., Чернова Е.Н., Некрасова Л.В., [и др.]. Сравнение результатов определения цианотоксинов (анатоксина-а и микроцистина-RR) методом хромато-масс-спектрометрии, полученных с помощью приборов с различными типами ионных ловушек // Научное приборостроение, 2010, Т. 20, № 4. С. 100-107.

21. Maizels M., Budde W.L. A LC/MS Method for the Determination of Cyanobacteria Toxins in Water. // Anal. Chem. 2004. V. 76, P.1342-1351.

22. Camean Ana, Moreno I. M., Ruiz M.J. [et al.]. Determination of microcystins in natural blooms and cyanobacterial strain cultures by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. // Anal. Bioanal. Chem. 2004. V. 380. P. 537-544.

23. Metcalf J.S., Codd G.A. FWR: Cyanobacterial toxins in the water environment. A Review of Current Knowledge. University of Dundee. FR/R0009. Foundation for Water Research. Marlow, Bucks SL7 FD, UK, February 2004. 36 p. URL: <http://www.fwr.org/cyanotox.pdf> (дата обращения: 29.01.2012).

24. 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. // Journal of Chromatography A. 2003. V. 1020. P. 105-119.

25. Hummert, C., Dahlmann, J., Reinhardt, K., [et al.]. Liquid Chromatography- Mass Spectrometry Identification of Microcystins in Microcystis aeruginosa Strain from Lake Thanh Cong, Hanoi, Vietnam. // Chromatographia. 2001. V. 54. P. 569-575.

26. Edwards C., Lawton L.A., Beattie K.A. [et al.]. Analysis of microcystins from cyanobacteria by liquid-chromatography with mass-spectrometry using atmospheric pressure ionization. // Rapid Commun. Mass Spec. 1993. V. 7(8). P. 714-721.

27. Мильман Б.Л., Русских Я.В., Некрасова Л.В. [и др.]. Подход к масс-спектрометрической идентификации цианобактериальных пептидов. Пример деметилмикроцистина-LR // Масс-спектрометрия. 2011.Т. 8, N 1. С. 51-60.

28. Jayatissa L.P., Silva E.I.L., McElhiney J., Lawton L.A. Occurrence of toxigenic cyanobacterial bloom in freshwaters of Sri Lanka. // Syst. and Appl. Microbiol. 2006. 29, № 2, P. 156-164.

29. Mountfort D.O., Holland P., and Sprosen, J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. // Toxicon. 2005. V. 45(2). P. 199-206.

30. Lawton L.A., Edwards, C., and Codd, G.A., Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. // Analyst 1994. V. 119. P. 1525-1530.

31. 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. // Chemosphere. 2004. V. 55. P. 1395-1402.

32. Hardy, J. Washington State Recreational Guidance for Microcystins (Provisional) and Anatoxin-a (Interim/Provisional): Final Report. Washington State Department of Health, Olympia, WA. DOH 334-177. 2008. 19 p.

33. Falconer I.R., Humpage A.R. Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins in Drinking Water // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2005. V. 2. No. 1. P. 43-50.

34. Chorus I. Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Berlin: Federal Environmental Agency, 2005. 119 p.

35. WHO, Guidelines for safe recreational water environments. Coastal and Fresh Waters, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2003. Vol.1. 219 p.

36. Messineo, V., Bogialli, S., Melchiorre, S., [et al.]. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. // Limnologica 2009. V. 39. P. 95-106.

37. Sherlock I.R., James K.J., Caudwell F.B. [et al.]. First identification of microcystins in Irish lakes aided by a new derivatisation procedure for electrospray mass spectrometric analysis. // Natural Toxins. 1997. V. 5. P. 247-254.