

## STANOVENÍ MICROCYSTINŮ VE TKÁNÍCH POMOCÍ LC-MS/MS

Jiří Kohoutek<sup>1</sup>, Ondřej Adamovský<sup>1,2</sup>, Michal Oravec<sup>1</sup>, Zdeněk Šimek<sup>1</sup>,

Miroslava Palíková<sup>3</sup>, Radovan Kopp<sup>1,4</sup>, Luděk Bláha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí,  
Kamenice 126/3, 625 00 Brno

<sup>2</sup>Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny, Botanický ústav AV ČR, Lidická 25/27, 657 20 Brno

<sup>3</sup>Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno

<sup>4</sup>Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno

### Abstrakt

Microcystiny jsou cyklické heptapeptidy s hepatotoxickými vlastnostmi. Jsou často a v poměrně značném množství produkovány různými druhy sladkovodních sinic. Literární záznamy dokládají akumulaci v různých vodních organismech včetně ryb, a také možný přenos kontaminovanými potravinami až k člověku. Cílem této práce bylo porovnání citlivosti a selektivity dvou hmotnostně-spektrometrických metod (jednoduché a tandemové MS detekce) využitelných pro analýzu a kvantifikaci těchto toxinů v živočišných tkáních. Jednoduchá hmotnostní detekce (single MS; sledování molekulárních iontů m/z 519.5 pro MC-RR a 995.5 pro MC-LR) často vykazovala falešně pozitivní výsledky, čímž docházelo k nadhodnocování koncentrací toxinů ve tkáních. Selektivnější tandemová detekce (tandem MS) poskytovala mnohem spolehlivější výsledky. Koncentrace získané touto metodou u ryb z kontrolované expozice byly o více než 50% nižší ve srovnání s daty získanými pomocí jednoduché MS detekce. Analýzy svaloviny ryb (N=148, 8 druhů ryb z pěti nádrží s intenzivním rozvojem toxických sinic během sezóny) neprokázaly kontaminaci microcystiny. Koncentrace ve všech analyzovaných vzorcích byly pod limitem detekce (LOD = 1.2 - 5.4 ng/g čerstvé váhy pro MC-RR, -YR a -LR v MRM módu). Naše výsledky prokazují minimální akumulaci microcystinů ve tkáních ryb.

### Úvod

Microcystiny jsou peptidové toxiny produkovány mnoha rody sladkovodních sinic, např. *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*) [1]. Tyto toxiny působí jako inhibitory proteinfosfatáz PP1 a 2A a vykazují silné hepatotoxické účinky. V organismu jsou detoxifikovány pomocí konjugace s cysteinem (CYS) nebo glutathionem (GSH) [2]. Microcystiny mohou způsobit vážné zdravotní problémy a v literatuře existují záznamy o intoxikacích lidí i zvířat. Na základě těchto poznatků a dat o toxicitě microcystinů byla Světovou zdravotnickou organizací (WHO) stanovena hodnota tolerovatelného denního příjmu (TDI = 0.04 µg/kg tělesné hmotnosti) [3].

Microcystiny jsou produkovány masivně v celosvětovém měřítku a Česká republika není v tomto ohledu žádnou výjimkou. Přibližně 80% nádrží v ČR (včetně vodárenských) obsahuje microcystiny v měřitelných koncentracích [4]. Během masivního výskytu sinic mohou být toxiny zasaženy i ostatní organismy žijící ve vodě a byly prokázány případy bioakumulace toxinů a také jejich přenos v potravních řetězcích [5]. Někteří autoři uvádějí poměrně vysoké koncentrace microcystinů především ve tkáních ryb [6]. Analýzy microcystinů v potravinách a potravinových doplňcích jsou proto kritické pro stanovení potenciálních rizik vyplývajících z konzumace takovýchto produktů.

Pro analýzu microcystinů v biotických maticích lze využít celou řadu analytických metod, počínaje biochemickými/imunochemickými (PPIA, ELISA) a konče instrumentálními analytickými metodami založenými převážně na chromatografické separaci analytů s různými typy detekce (fotometrická, hmotnostní). Nicméně především biologické a také tradiční instrumentální metody jsou do značné míry ovlivněny velkým množstvím interferujících látek, které se ve vzorcích nacházejí. Použití velmi selektivních metod je tedy naprosto nezbytné pro správné stanovení microcystinů v biotických maticích. Požadavky na vysokou selektivitu a zároveň robustnost a reprodukovatelnost splňuje především metoda kapalinové chromatografie kombinovaná s hmotnostní detekcí (LC-MS).

Ačkoli existuje množství studií využívajících LC-MS, není dostupné žádné přímé porovnání spolehlivosti jednoduché (MS) a tandemové (MS/MS) hmotnostní detekce v případě analýz biotických matic. Mnoho prací vychází z dat získaných pomocí jednoduché MS detekce. Cílem této práce bylo srovnat spolehlivost MS a MS/MS metody pro detekci microcystinů ve vzorcích tkání ryb z laboratorních pokusů a také z volných vod.

## **Materiál and metody**

### Chemikálie a standardy

Standardy microcystinů (MC-LR, -RR, -YR) byly získány od Alexis Biochemicals (Läufelfingen, Switzerland). Rozpouštědla pro přípravu mobilních fází (LC/MS grade) dodala Sigma-Aldrich (Praha, ČR). Deionizovaná voda byla připravena pomocí výrobce Millipore Simplicity 185 system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### Experimentální design

Vzorky tkání pro srovnávací studii byly získány během laboratorních experimentů a během terénních odběrů. Během krátkodobých laboratorních experimentů byly ryby (kapr, *Cyprinus carpio*; 500±15 g) intraperitoneálně exponovány vysokým koncentracím toxinů (248 µg/kg váhy, injektovaný objem 500 µL) a přítomnost těchto látek, včetně jejich metabolitů, byla sledována v hepatopankreatu. Směs microcystinů pro i.p. aplikaci obsahovala 56% MC-RR, 38% MC-LR a 6% MC-YR. Kontrolní ryby byly injektovány 500 µL PBS. Po 3h byly odebrány vzorky tkáně a skladovány až do analýzy při -80°C.

V dalším experimentu byla studována akumulace microcystinů v přirozených podmínkách po dobu 9 týdnů. Ryby (kapr, m= 32±7 g, n=10) byly chovány ve dvou experimentálních nádržích. Nádrž A obsahovala značné množství sinic (*Microcystis aeruginosa*, koncentrace toxinů 10.1 - 15.4 µg/L během celého experimentu). Nádrž B také obsahovala sinice, ale ve velmi malém množství (koncentrace toxinů nikdy nepřekročila 2 µg/L). Během experimentu nebyly ryby nijak krmeny a nevyšly žádné případy mortality.

Kromě těchto kontrolovaných pokusů byly odebrány také vzorky tkání ryb z volných vod. Detaily k těmto vzorkům jsou uvedeny ve výsledcích.

### Extrakce vzorků

Zamrazené vzorky (0.5 g čerstvé hmotnosti) byly homogenizovány v methanolu (3 mL), následně sonikovány na ultrazvukové lázni (30 min) a centrifugovány při 4,000 g po 10 min. Extrakce byla provedena 4x. Supernatanty byly sloučeny, 3x extrahovány hexanem (odstranění lipidů), následně byl methanol odpařen a vzorky znovu rozpuštěny v 300 µL 50% vodného methanolu (v/v) a analyzovány LC-MS.

### LC-MS analýza

Stanovení bylo prováděno pomocí kapalinového chromatografu Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Byla použita kolona Supelcosil ABZ+Plus RP-18 endcapped (5 µm) 150 x 4.6 mm i.d. (Supelco) s předkolonou SecureGuard C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Mobilní fáze se skládala z 5 mM octanu amonného ve vodě, pH 4 (A) a acetonitrilu (B). Nelineární gradient měl následující průběh: (0 min - 12.00 min, 32% - 40% B, lineární nárůst; 12.01 min - 20.00 min, 40% - 42% B, lineární nárůst; 20.01 min - 30.00 min, 90% B); průtok 0.4 mL/min; nástřik 20 µL vzorku.

Detektorem byl hmotnostní spektrometr Agilent 6410 Triple Quad mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s ionizací elektrosprejem (ESI). Ionty byly detekovány v pozitivním módu. Parametry iontového zdroje byly následující: kapilární napětí, 5.5 kV; teplota sušícího plynu, 350 deg.C; průtok, 11 L/min. V módu "selected ion monitoring" (SIM, jednoduchá MS detekce) byly monitorovány tyto hmoty (m/z): MC-RR [M+2H]<sup>2+</sup> 519.8, MC-YR [M+H]<sup>+</sup> 1045.5, MCLR [M+H]<sup>+</sup> 995.5, MC-RR-GSH [M+2H]<sup>2+</sup> 673.8, MC-LR-GSH [M+H]<sup>+</sup> 1302.5, MC-RR-CYS [M+2H]<sup>2+</sup> 580.8, MC-LR-CYS [M+H]<sup>+</sup> 1116.5. Přečty z protonovaných molekulárních iontů na fragment aminokyseliny Adda s m/z 135.2 a fragment s hmotou m/z 127.1 byly monitorovány v módu "multiple reaction monitoring" (MRM, tandemová MS detekce). Kolizní energie (CE, V) použité pro fragmentaci: MC-RR a příslušné konjugáty, CE= 50V; MC-YR a -LR a příslušné konjugáty, CE= 40V). Kvantifikace byla založena na externích standardech MC-RR, MC-YR, MC-LR v matrici (extrakt tkáně bez microcystinů). Detekční limit metody (MDL; ng/g tkáně, čerstvá hmotnost) byl 1.2 ng/g (S.D.=5%) pro MC-RR a 5.4 ng/g (S.D.= 10%) pro MC-YR a -LR v MRM módu. V SIM módu byl MDL 3.0 ng/g (S.D.=5%) pro MC-RR a 27.0 ng/g (S.D.=7%) pro MC-YR a -LR.

## **Výsledky a diskuze**

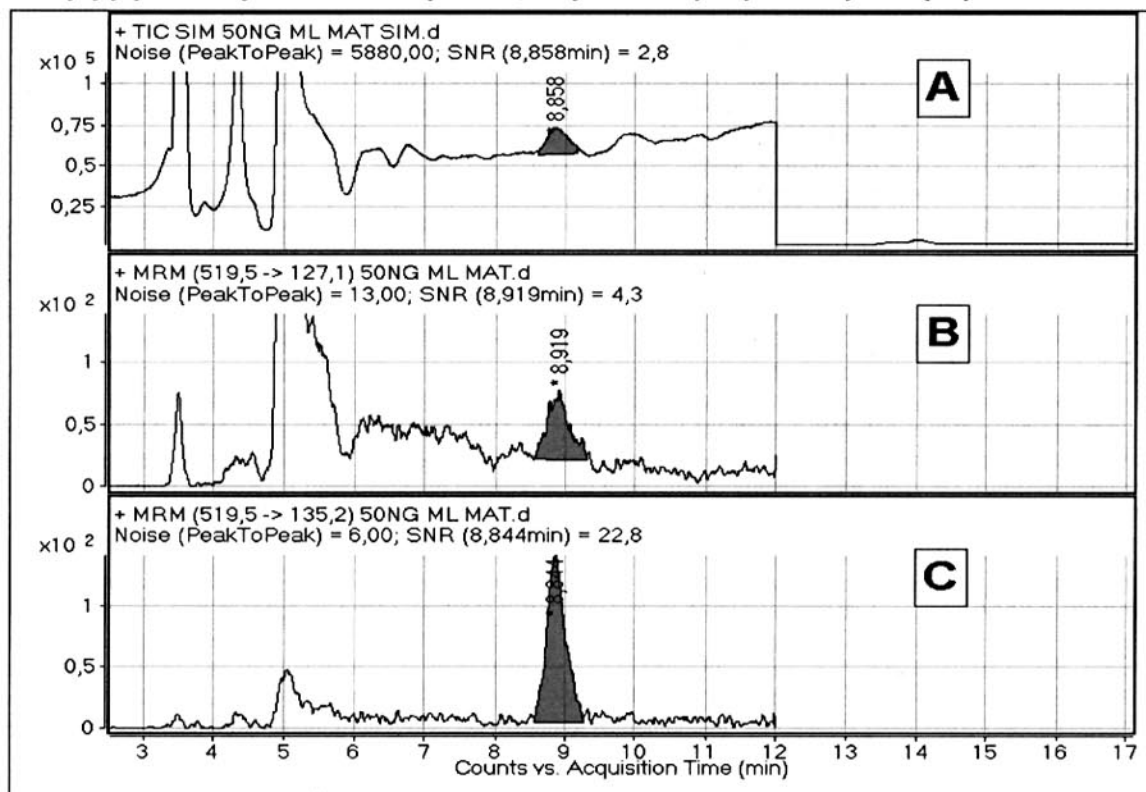
Některé studie, které pro stanovení využívají metodu ELISA nebo LC-MS uvádějí koncentrace microcystinů ve tkáních ryb mezi 5 - 18000 ng/g (Tabulka 1). Nicméně naše předchozí experimenty založené na kontrolovaných laboratorních experimentech vykazovaly mnohem nižší koncentrace, ačkoli podmínky byly shodné s literárními údaji. Tento fakt nás přiměl k provedení předkládané studie.

**Tab. 1:** Koncentrace microcystinů v biologických maticích uváděné v literatuře.

\* FW - fresh weight (čerstvá váha), DW – dry weight (sušina).

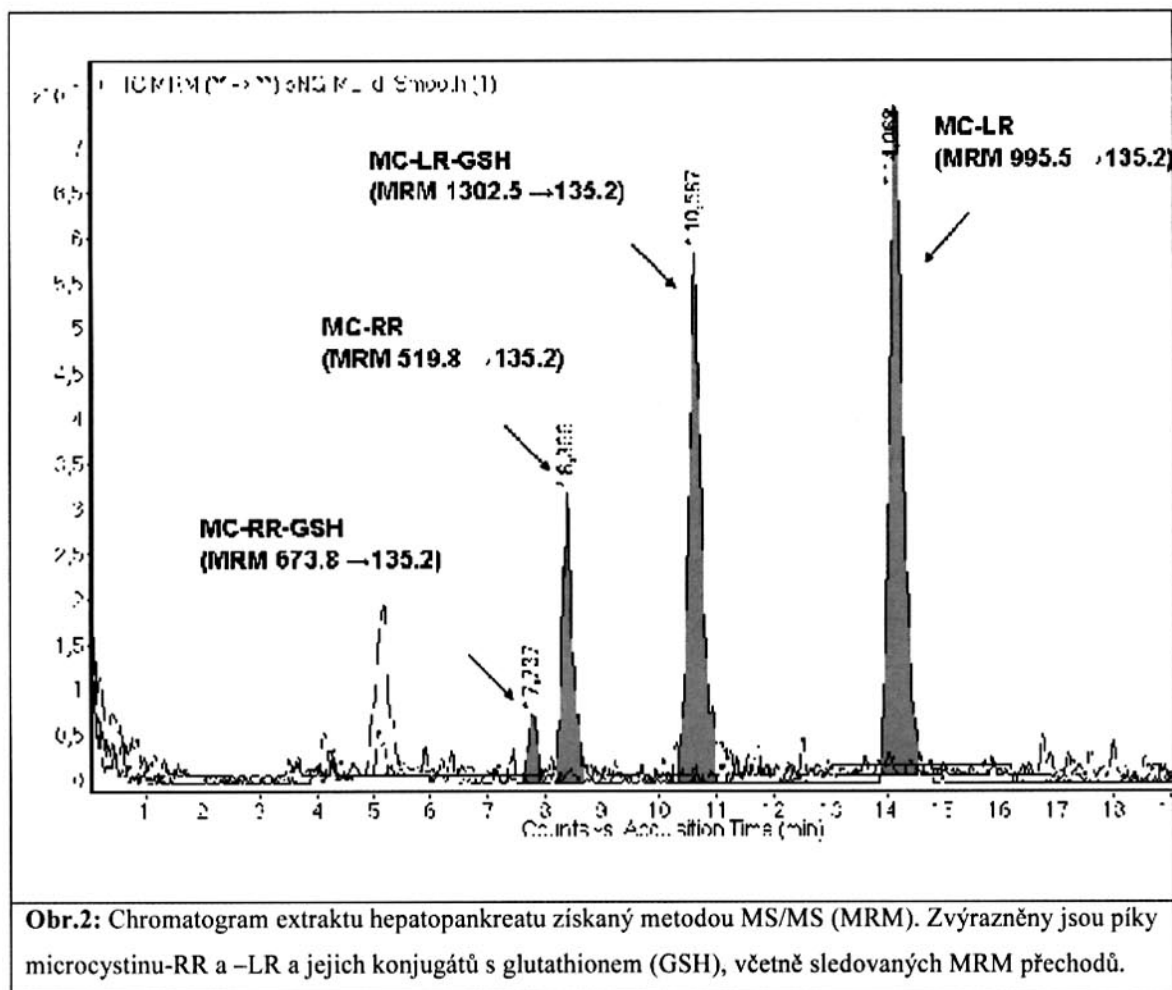
Druh ryby	Typ vzorku	Koncentrace (MC-LR/g tkáně)	Analytická technika	Zdroj
<i>Tilapia sp.</i>	sval	3–337 ng/g FW*	ELISA	Magalhaes 2001
<i>Tilapia sp.</i>	sval	100 ng/g FW	ELISA	Mohamed 2003
<i>Tilapia sp.</i>	sval	100 ng/g DW*	ELISA	Soares 2004
<i>Hypophthalmichthys sp.</i>	hepatopankreas	7000–17800 ng/g DW	LC/MS	Xie 2004
<i>Hypophthalmichthys sp.</i>	sval	500–1700 ng/g DW	LC/MS	
<i>Hypophthalmichthys sp.</i>	sval , hepatopankreas	1800–7700 ng/g DW	LC/MS	
<i>Cyprinus sp.</i>	sval	4.4–29 ng/g FW	ELISA	Adamovsky 2007
<i>Cyprinus sp.</i>	sval	5.8–19 ng/g FW	ELISA	

V prvním experimentu jsme sledovali schopnost obou hmotnostně-spektrometrických přístupů detekovat microcystiny a jejich metabolity ve vzorcích tkání. Na obrázku č.1 je chromatogram extraktu tkáně obsahující MC-RR získaný v SIM (MS) a MRM (MS/MS)módu. V SIM módu je vidět velmi vysoký šum pozadí charakterizovaný nízkým poměrem signál/šum. Tento fakt výrazně zvyšuje limit detekce metody (MDL) a omezuje její použití. Zejména u vzorků z prostředí, kde jsou microcystiny obsaženy ve stopových koncentracích.



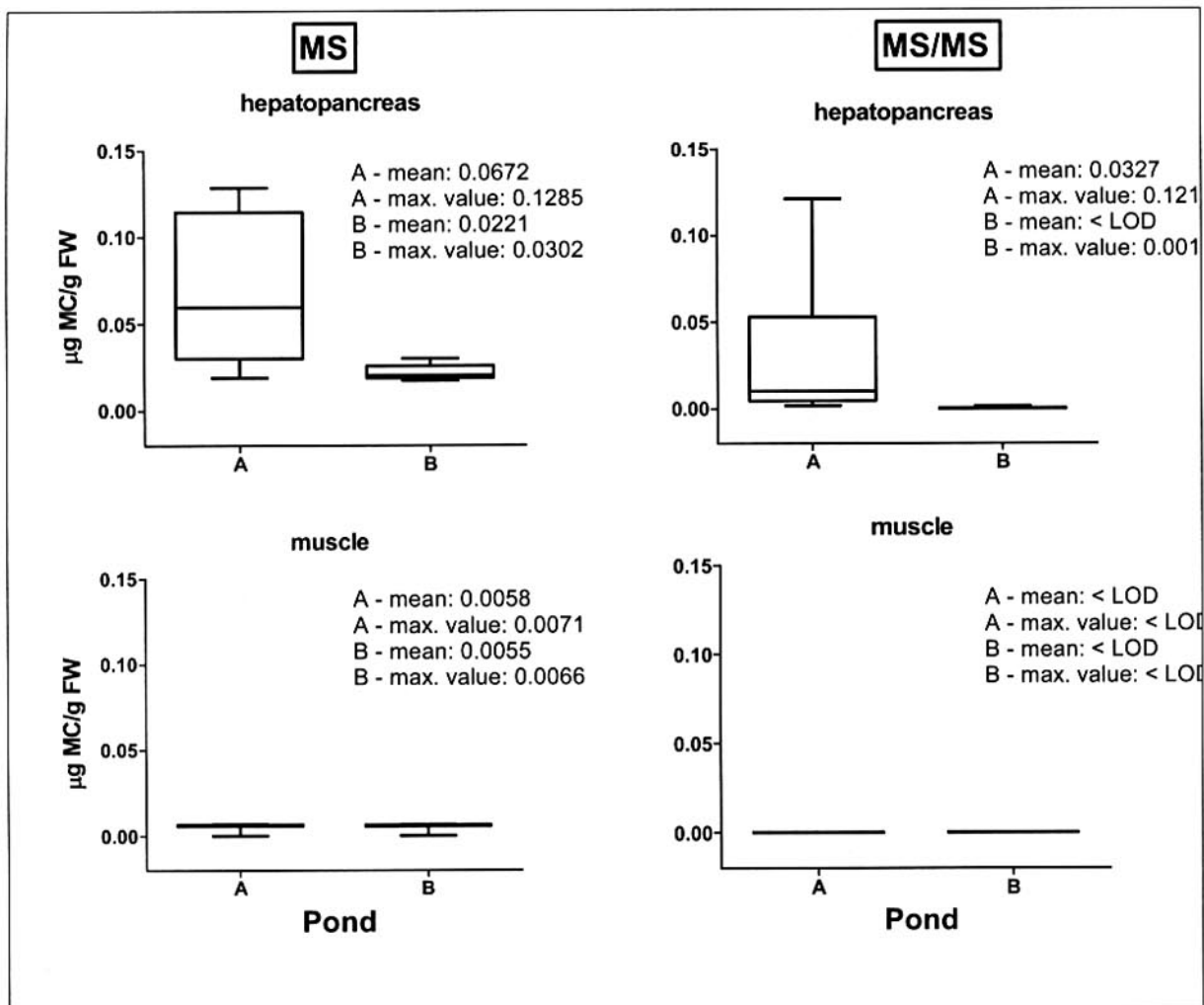
Obr.1: Chromatogram MC-RR získaný v SIM (A) a MRM (dva charakteristické fragmenty microcystinu; B 519.5->127.1, C 519.5->135.2) módu. V SIM módu je vidět velmi vysoký šum pozadí charakterizovaný nízkým poměrem signál/šum (viz. hodnota SNR ve všech grafech).

Šum základní linie v MRM módu je mnohem nižší a metoda umožňuje i spolehlivé stanovení a konfirmaci metabolitů microcystinu (GSH nebo CYS konjugáty; Obr.č.2).



**Obr.2:** Chromatogram extraktu hepatopankreatu získaný metodou MS/MS (MRM). Zvýrazněny jsou píky microcystinu-RR a -LR a jejich konjugátů s glutathionem (GSH), včetně sledovaných MRM přechodů.

V následující fázi studie jsme srovnávali výsledky MS a MS/MS stanovení microcystinů ve vzorcích tkání ryb získaných v přírodních podmínkách. Obrázek č.3 ukazuje koncentraci microcystinů ve tkáních ryb chovaných po dobu 9 týdnů ve vodě s vysokým obsahem cyanotoxinů v porovnání s negativní kontrolou (ryby chované ve vodě s minimálním množstvím microcystinů).



**Obr.3:** Koncentrace microcystinů (suma MC-RR a MC-LR) detekovaných jednoduchou (“single”)

a tandemovou MS metodou v hepatopankreasu (horní grafy) a svalovině (spodní grafy) ryb.

Vzorky tkání ryb byly analyzovány po 9 týdenní akumulaci microcystinů v přirozených podmínkách ve dvou nádržích. Nádrž A (Pond A) obsahovala značné množství sinic po celou dobu experimentu (koncentrace rozpuštěných microcystinů se pohybovaly mezi 10-15 µg/L); nádrž B (Pond B) obsahovala minimální množství sinic a toxinů. Číselné hodnoty v grafech ukazují medián a maximální hodnotu pro každou variantu (<LOD – méně než limit detekce; LOD = 1.2 ng/g pro MC-RR a 5.4 ng/g pro MC-YR a -LR).

Při použití jednoduché MS detekce (SIM mód), se v chromatogramu objevují píky s hmotou ( $m/z$ ) i retenčním časem microcystinu ( $m/z$  519.5 pro MC-RR a 995.5 pro MC-LR). Koncentrace v hepatopankreasu se potom pohybují v rozmezí 6.0 – 129.0 ng/g tkáně (FW). Ve vzorcích svalů jsou množství MC nízká a pohybují se kolem 8.0 ng/g FW. V SIM módu se také objevují falešně pozitivní výsledky u ryb, které vůbec nebyly exponovány microcystiny. Detailnější analýza pomocí tandemové MS detekce potom prokázala v těchto vzorcích nepřítomnost MC. Žádné toxiny také nebyly touto metodou prokázány ve vzorcích svalů. Přítomnost microcystinů byla potvrze pouze v hepatopankreatu ryb exponovaných vysokým dávkám toxinů. Koncentrace stanovené pomocí MS/MS metody se pohybovaly mezi 14.0 – 123.0 ng/g FW, což je hodnota o 50% nižší než ta, která byla u stejných vzorků získána jednoduchou MS detekcí v SIM módu.

Na závěr studie byly analyzovány (MS/MS) vzorky svaloviny ryb (N=148, 8 druhů) získaných z pěti lokalit s výskytem masivního vodního květu sinic v průběhu sezóny. Výsledky jsou zachyceny v tabulce 2.

Lokalita	Doba trvání vodního květu (měsíce roku)	Koncentrace MC ve vodě (µg/L)	Druh ryby	Počet vzorků	Koncentrace MC ve svalovině µg/g FW (±S.D.)
Novoveský	V. - VII.	0.638–4.485	bolen	10	<LOD
			sumec	10	<LOD
			kapr	10	<LOD
			úhoř	1	<LOD
			amur	10	<LOD
			candát	10	<LOD
Sykovec	VIII. - IX.	0.125–1.358	kapr	10	<LOD
			okoun	10	<LOD
			síh	10	<LOD
Medlov	VII. - IX.	0.200–0.741	kapr	10	<LOD
			okoun	10	<LOD
			síh	10	<LOD
Plumlov	VI. - VIII.	0.212–0.505	cejn	18	<LOD
			okoun	6	<LOD
Vír	VI. - VIII.	0.000–1.201	cejn	13	<LOD

Žádný ze vzorků neobsahoval microcystiny ani jejich metabolity v detekovatelném množství. Naše výsledky tak ukazují, že běžně používané metody zaořené na jednoduché MS detekci mohou poskytovat falešně pozitivní výsledky a nadhodnocovat tedy koncentrace microcystinů v biotických matricích. Na druhé straně metoda tandemové MS detekce se zdá být velmi vhodná pro analýzu těchto látek i jejich metabolitů v složitých matricích, kterými jsou např. biotické tkáně.

#### Poděkování

Tato studie byla zařtita projekty Ministerstva zemědělství ČR (projekt QH71015) a Ministerstva mládeže a tělovýchovy (MSM6215712402 a MSM0021622412). Infrastruktura je podporována projektem CETOCOEN (no. CZ.1.05/2.1.00/01.0001).

#### Použitá literatura

- [1] WHO (1998) In: Guidelines for Safe Recreational-water Environments, Volume 1: Coastal and Freshwaters, Draft for Consultation. World Health Organization
- [2] PFLUGMACHER S, WIEGAND C (2001) In: Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences. Springer-Verlag, Berlin
- [3] WHO (1998) Guidelines for drinking water quality. World Health Organisation, Geneva
- [4] BLAHOVA L, BABICA P, MARSALKOVA E, MARSALEK B, BLAHA L (2007) CLEAN - Soil, Air, Water. 35: 348–354
- [5] MAGALHAES VF, MARINHO MM, DOMINGOS P, OLIVEIRA AC, COSTA SM, AZEVEDO LO, AZEVEDO SMFO (2003) Toxicon. 42: 289–295
- [6] XIE LQ, XIE P, GUO LG, LI L, MIYABARA Y, PARK HD (2005) Environmental Toxicology. 20: 293–300