

以干藻粉为原料的 MC-LR 提取试验研究

陈冬,蔡庆庆,黄彬,陈泽慧,张文艺*

(常州大学环境与安全工程学院,江苏常州 213164)

摘要:针对实验室进行藻毒素(MC)相关研究过程中MC样品昂贵且难以获取这一难题,以太湖水体中的蓝藻干藻粉为研究对象,分别以甲醇、乙醇、乙酸和丁醇-甲醇-水混合溶液为提取剂进行MC提取试验。考察了提取剂种类、干藻粉研磨时间、提取剂体积分数、搅拌时间、微波消解工艺条件对MC提取量的影响。结果表明:4种提取剂都可以提取MC-LR,提取量约为250~300 $\mu\text{g/g}$ 。而以甲醇为提取剂,研磨90 min,甲醇体积分数为60%,搅拌时间为2 h,微波消解1 min时,MC-LR提取量最多约为300 $\mu\text{g/g}$ 左右。该方法可为实验室从事藻毒素毒性、化学或生物降解机制等研究工作提供便利,也可为藻泥的商品化提供参考。

关键词:蓝藻;干藻粉;藻毒素;提取

中图分类号:X522

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2017)06-0084-03

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2017.06.019

Experimental study on extraction of MC-LR from dry algae powder

CHEN Dong, CAI Qing-qing, HUANG Bin, CHEN Ze-hui, ZHANG Wen-yi*

(School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: Microcystin (MC-LR) samples are very expensive and difficult to obtain in experimental studies about MC. To solve this problem, the dry algae powder of blue-green algae collected from Taihu Lake is used to carry out experimental extraction of MC with methanol, ethanol, acetic acid and the solution of butanol and methanol as extracting agent respectively. Effects of extracting agent, grinding time of dry algae powder, concentration of extracting agent, stirring time and microwave digestion on the extraction of MC-LR are investigated. The results show that MC-LR can be extracted from dry algae powder in the presence of four extracting agents, and the extraction amount is about 250–300 $\mu\text{g/g}$. The maximum extraction amount of MC-LR is up to 300 $\mu\text{g/g}$ when methanol is used as extracting agent alone, grinding time is 90 min, methanol volume concentration being 60%, stirring time 2 h and microwave digestion 1 min. This method can provide convenience for the laboratory study on MC toxicity, chemical or biological degradation mechanism of MC-LR, and also provide reference for the commercial production of algae mud.

Key words: blue-green algae; dry algae powder; microcystin (MC); extraction

水体富营养化使得蓝藻水华大面积爆发,引起的藻毒素(MC)污染问题,日益引起人们的关注^[1-2],使得有关MC的研究成为当今环保、生物、医学等领域的热点问题之一^[3-4]。蓝藻多发生在夏季,但研究工作需全年开展,有的实验室远离湖泊,获取蓝藻困难,实验室培养的蓝藻相对较少,难以获取足够量的MC。商品化的藻毒素标样(纯品)昂贵,高达3 000元/ μg ^[5-6],使得实验室研究难以开展。常州位于太湖西北角,是太湖蓝藻主要聚集区域,每年夏秋2季打捞数千万吨的藻浆,经脱水后产生近万吨藻泥。国内外有关微囊藻毒素(Microcystins, MCs)的提取、提纯已有相关报道,如1982年Bote等^[7]首先研究了MCs的提取、提纯方法。李耕^[8]用50 mL乙酸溶液超声震荡萃取10 min,微囊藻毒素MC-LR提取量约为15 $\mu\text{g}/(\text{g湿藻浆})$ 。闫海、潘纲等^[9-10]采用40%甲醇溶液,超声震荡1 h,从滇池水华蓝藻中提取出至少1 260 $\mu\text{g/g}$ 的微囊藻毒素

MC-RR和840 $\mu\text{g/g}$ 的微囊藻毒素MC-LR(干藻)。

基于藻泥的资源化,笔者将这种脱水藻泥制成干藻粉,筛选合适提取剂(甲醇、乙醇、乙酸、丁醇-甲醇-水混合溶液),优化MC提取工艺参数,建立了一套“藻泥干化-干藻粉研磨-提取-富集-检测”提取路线。

1 材料与方法

1.1 材料

实验设备:JY96型超声波细胞粉碎机;RE-52AA型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-D循环水式真空泵;QM-1SP行星式球磨机;SORVALL多用途高速台式离心机;XH-C漩涡混合器;微孔滤膜(尺寸为60 mm,孔径为0.45 μm);微波炉。

实验试剂:MC-LR藻毒素标准样品,上海酶联生物科技有限公司生产;甲醇,色谱纯;乙醇,色谱

收稿日期:2016-12-09

基金项目:国家自然科学基金(41571471);江苏省及常州市科技支撑项目(BE2016653、WS201621)

作者简介:陈冬(1991-),男,硕士研究生,研究方向为水污染控制,544715595@qq.com;张文艺(1968-),男,博士,教授,研究方向为水污染控制,通讯联系人,zhangwenyi888@sina.com。

纯;乙酸,色谱纯;丁醇,色谱纯;纯净水等。

1.2 实验方法

1.2.1 蓝藻的采集与保存

太湖蓝藻爆发时期(每年6~9月),从太湖蓝藻站收集脱水后的藻泥,置于太阳下晒干后保存。

1.2.2 藻粉的制备

取120 g晒干的蓝藻,置于球磨罐中,加入磨球15个(直径 $r = 15$ mm),转速为400 r/min,研磨90 min,过60目筛,得藻粉。

1.2.3 MC-LR的提取

取1 g藻粉放入100 mL锥形瓶中,加入60 mL提取剂,加入搅拌机放在磁力搅拌器上搅拌2 h,再将混合溶液超声振荡20 min,然后再离心10 min(转速为4 000 r/min),得到上清液。重复2次,将得到的上清液合并,于55℃真空旋转蒸发,去除溶液中的提取剂。在粗提液中加入稀盐酸调节pH至4,静置4 h,可明显看到溶液中有絮状沉淀物,离心10 min去除絮状物(4 000 r/min),得到浅黄色上清液^[11-13]。在循环水式真空泵抽提下过0.45 μm滤膜,用稀氨水(5%)调节pH为7,得到较为理想的粗提液。

1.2.4 MC-LR的纯化和富集

用50 mL的玻璃注射器吸取10 mL 100%甲醇溶液,然后缓慢注入到C18固相萃取小柱,自然滴下,当甲醇液面快要到萃取小柱上层筛片时,立即加入10 mL超纯水活化C18固相萃取小柱,活化过程中不能使C18小柱变干,将小柱和SPE固相萃取装置连接;将稀释1 000倍的粗提液缓慢流过固相萃取小柱,富集浓缩,控制流速为4 mL/min。富集结束后先用5 mL 10%甲醇溶液淋洗C18小柱,再用10 mL洗脱溶液(用甲醇将三氟乙酸定容到100 mL容量瓶中)洗脱MC-LR^[14-15]。洗脱液用氮气缓缓吹干,用5 mL超纯水溶解,用注射器吸取溶液经过一次性0.45 μm针头式过滤器,测定MC-LR提取量。

1.3 检测方法

MC-LR提取量测定方法:采用《微囊藻毒素(MC)酶联免疫分析》(上海酶联生物科技有限公司)中所述方法,详细步骤参考试剂盒使用说明书。

2 结果与讨论

2.1 提取剂对MC-LR提取量的影响

用60%的甲醇、60%的乙醇、5%的乙酸以及5:20:75(体积比)的丁醇-甲醇-水混合溶液作提取剂

对MC-LR进行提取,结果如表1所示。由表1可以看出,4种提取剂提取MC-LR的提取量约为250~300 μg/g。而以甲醇为提取剂时MC-LR提取量最多,达到297.38 μg/g。乙醇为提取剂时MC-LR提取量相对较少,为289.20 μg/g。由此可见,4种提取剂均能有效提取MC-LR,其提取量顺序是:甲醇>丁醇-甲醇-水>乙酸>乙醇。

表1 提取剂对MC-LR提取量的影响

提取剂	甲醇	乙醇	乙酸	混合溶液
藻毒素提取量/(μg·g ⁻¹)	297.38	289.21	289.20	293.29

2.2 研磨时间对MC-LR提取量的影响

研磨时间短,藻粉粒径大,比表面积小,与提取液的接触面积小,溶出效率低;研磨时间长,粒径小,比表面积大,与提取液接触面积大,溶出效率高,但能耗较高,样品处理时间延长,增加了样品处理工作量。取研磨30、60、90 min以及120 min的藻粉各1 g放入锥形瓶中,按上述方法测定藻毒素提取量,结果如表2所示。由表2可以看出,随着研磨时间的增加,MC-LR提取量也在增加,在90 min后提取量达到平衡,为296.15 μg/g。因此,适宜的研磨时间为90 min。

表2 研磨时间对MC-LR提取量的影响

研磨时间/min	30	60	90	120
藻毒素提取量/(μg·g ⁻¹)	276.13	286.51	296.15	295.85

2.3 甲醇溶液体积分数对MC-LR提取量的影响

20%、40%、60%以及80%的甲醇溶液对MC-LR提取量的影响如表3所示。由表3可以看出,20%的甲醇为提取剂时提取效率相对较低,为282.64 μg/g。随着提取液体积分数的增加,MC-LR提取量也相应增加;当提取液体积分数为60%时,MC-LR提取量最大,为296.42 μg/g;甲醇提取液体积分数继续增大时,MC-LR提取量开始减少,这是由于甲醇体积分数太高改变了MC-LR的性质。因此,60%的甲醇提取剂能够最大限度地提取出MC-LR。

表3 甲醇体积分数对MC-LR提取量的影响

甲醇质量分数/%	20	40	60	80
藻毒素含量/(μg·g ⁻¹)	282.64	284.71	296.42	289.61

2.4 搅拌时间对MC-LR提取量的影响

取1 g藻粉5份置于锥形瓶中,分别搅拌30、60、90、120 min以及150 min,考察搅拌时间对MC-

LR 提取量的影响,结果如表 4 所示。由表 4 可以看出,搅拌时间越长,MC-LR 的提取量越高,在搅拌 120 min 后 MC-LR 提取量达到平衡,为 297.38 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。因此,适宜的搅拌时间为 120 min。

表 4 搅拌时间对 MC-LR 提取量的影响

搅拌时间/min	30	60	90	120	150
藻毒素含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	275.31	284.71	289.61	298.61	297.38

2.5 微波消解对 MC-LR 提取量的影响

微波消解是利用提取剂与藻粉混合液中的极性分子在微波产生的磁场作用下产生键的振动、撕裂以及离子间的相互摩擦碰撞产生大量热能,促使提取剂与藻粉更好地接触和反应;另一方面混合液比藻粉表面高几个数量级的热能,产生热对流,搅动并清除不活泼的表面层,不断产生新的接触表面^[16],从而加速有机质的溶解。取 1 g 藻粉 4 份分别置于锥形瓶中,放入 60 mL 60% 甲醇提取剂按上述方法进行试验,在超声振荡 20 min 后,把锥形瓶放入微波炉中,分别消解 0、1、3、5 min。由于采用普通微波炉消解,消解 3、5 min 的提取液基本蒸发。消解 1 min 的样品,MC-LR 提取量提高约 10 $\mu\text{g}/\text{g}$,可见,微波消解可以促进 MC-LR 的提取。

2.6 经济效益测算

以 4 种提取剂提取 1 kg 藻粉中的 MC-LR 进行成本测算,结果如表 5 所示。由表 5 可以看出,甲醇、乙醇、乙酸、丁醇-甲醇总金额分别为 100.8 元、144 元、15 元、51 元。1 kg 藻粉市场价按 20 元计,则以甲醇作为提取剂提取 1 g 藻毒素的成本为 402.67 元。大大降低了实验室研究藻毒素的成本,同时为实验室研究微生物降解藻毒素实验提供了材料来源。若按 1 年处理 10 t 藻粉计,需投入成本约为 120.8 万元,产生近 900 万元产值,可见其商业价值还是非常可观的。

表 5 4 种提取剂提取 MC-LR 的成本

序号	提取剂	用量/L	价格/ $(\text{元}\cdot\text{L}^{-1})$	总金额/元
1	甲醇	36	2.8	100.8
2	乙醇	36	4.0	144.0
3	乙酸	3	5.0	15.0
4	丁醇-甲醇	3~12	5.8~2.8	51.0

注:总金额=提取剂用量×价格。

3 结论

(1) 甲醇、乙醇、乙酸、5:20:75 的丁醇-甲醇-

水均能从蓝藻干藻粉中提取出 MC-LR,提取量约为 250~300 $\mu\text{g}/(\text{g}$ 干藻粉)。以甲醇作为提取剂的最佳参数条件是:研磨 90 min,甲醇体积分数为 60%,搅拌时间为 2 h,微波加热时间为 1 min 时,MC-LR 提取量最多,约为 300 $\mu\text{g}/(\text{g}$ 干藻粉)。

(2) 以蓝藻干藻粉为原料,甲醇等为提取剂的藻毒素提取方法,可为实验室从事藻毒素毒性、化学或生物降解机制等研究工作提供了便利。经测算,以甲醇为提取剂提取 1 g 藻毒素的成本仅 402.67 元。

参考文献

- [1] 张容.基于荧光定量技术的微囊藻毒素预测性监测方法研究[D].上海:东华大学,2014:1-3.
- [2] Farada K.Recent advances of toxic cyanobacterial bloom problems in Australian waters;Risks and impacts on human health[J].Phycologia,2001,40(3):228-233.
- [3] 宋立荣,雷腊梅.滇池水华蓝藻铜绿微囊藻和绿色微囊藻的生长生理特征及毒性分析[J].水生生物学报,1999,(s1):402-408.
- [4] Gromov B V,Vepriksy A A,Mamkaeva K A,et al.A Survey of toxicity of cyanobacterial blooms in Lake Ladoga and adjacent water bodies[J].Hydrobiologia,1996,322:149-151.
- [5] 杨再荣.饮用水源水及自来水厂微囊藻毒素的变化和去除方法的研究[D].贵阳:贵州师范大学,2009:2-8.
- [6] 卫涛,向铮,冯小刚,等.微囊藻毒素的分离、纯化和制备[J].江苏环境技术,2007,5:1-5.
- [7] Bote D P,Kruger H,Viljoen C C.Isolation and characterization of 4 toxins from blue-green-alga. Microcystis-aeruginosa [J]. Toxicon,1982,20(6):945-954.
- [8] 李耕.微囊藻毒素-LR 的提取与测定[J].环境科学与技术,2005,7(4):46-47.
- [9] 王俊峰,闫海,等.微囊藻毒素-RR 的提取和臭氧氧化降解[J].环境工程学报,2014,4(4):1081-1086.
- [10] 闫海,潘纲,张明明,等.微囊藻毒素的提取和提纯研究[J].环境科学学报,2004,(2):355-359.
- [11] 袁媛.巢湖蓝藻藻蓝蛋白提取纯化及微囊藻毒素-LR 去除研究[D].合肥:安徽大学,2014:15-28.
- [12] 张维昊,肖邦定,方涛,等.天然水华蓝藻中微囊藻毒素的提取和净化研究[J].环境污染与防治,2003,(5):265-267.
- [13] 张维昊,张光明,张锡辉,等.微囊藻毒素的提取提纯方法比较[J].中山大学学报(自然科学版),2003,(s1):144-146.
- [14] 陈晴,许克,居君彪,等.微囊藻毒素提取与分析方法研究进展[J].污染防治技术,2012,(2):19-22.
- [15] Spool L,Meriluoto J.Rapid separation of microcystins and nodularin using a monolithic silica C18 column[J].J of Chromatography A,2002,947:237-254.
- [16] 关晓彤,于大伟,李良,等.微波消解在环境样品分析中的应用[J].江苏地质,2008,32(1):55-59.■