



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101955517 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 201010524841. 4

(22) 申请日 2010. 10. 29

(71) 申请人 中国科学院水生生物研究所  
地址 430072 湖北省武汉市武昌东湖南路 7  
号

(72) 发明人 谢平 王文静 国晓春 梁高道  
吴来燕 张伟 戴明 张大文

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001  
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

C07K 14/405(2006. 01)

C07K 1/20(2006. 01)

C07K 1/16(2006. 01)

C07K 1/14(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种微囊藻毒素的提取和纯化方法

(57) 摘要

本发明公开了一种微囊藻毒素的提取和纯化方法,是一种以收获于野外的水华蓝藻的干粉为原料,从中提取高纯度的微囊藻毒素 MC-RR 与 MC-LR 的方法,步骤如下:A、甲醇粗提微囊藻毒素 MC-RR 与 MC-LR ;B、粗提液过 ODS 柱精提微囊藻毒素 MC-RR 与 MC-LR ;C、半制备色谱仪分离微囊藻毒素 MC-RR 与 MC-LR ;D、微囊藻毒素 MC-RR 与 MC-LR 保存。本发明方法原料来源广,成本低,操作过程简单,并且所提取出的微囊藻毒素的纯度均在 97% 以上,符合科研工作对毒素纯度的要求。

1. 一种微囊藻毒素的提取和纯化方法,步骤如下:

①、称取蓝藻藻粉,按 30-40ml/g 的比例加入 60v/v% 的甲醇溶解 8-20℃ 下 200rpm 摇床振荡 1h,再超声促溶处理 20min 后,移入离心管,离心使固液分离;

②、倾出上清液,步骤①中得到的沉淀再用 60v/v% 的甲醇重复提取一次,合并两次提取的上清液;

③、调节步骤②得到的上清液的 pH 至 4,静置 60min 后,移入离心管,离心后,倾出上清液,调节上清液的 pH 至 8;

④、将步骤③最后得到的溶液浓缩,每 3g 藻粉得到 40ml 粗提液;

⑤、每 10ml 粗提液注入一个 ODS 柱,每个 ODS 柱依次用 20v/v% 甲醇 30ml、30v/v% 甲醇 20ml、40v/v% 甲醇 10ml 冲洗;再用含有 0.02v/v% 三氟乙酸的 70v/v% 甲醇溶液 10ml 洗脱,弃去洗脱液;然后用含 0.02v/v% 三氟乙酸的 70v/v% 甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,直至洗脱液无色;

⑥、将步骤⑤中收集的洗脱液混合后,旋转蒸发至溶剂完全挥发;

⑦、按每 3g 藻粉原料加入 1.5ml 50v/v% 甲醇溶液溶解步骤⑥得到的固形物,离心后的上清液为精提液;

⑧、精提液注入 waters 半制备色谱仪,收集 MC-RR 和 MC-LR 峰,收集完后,分别合并从半制备色谱仪上收集到的 MC-RR 和 MC-LR 洗脱液,移入圆底烧瓶,旋转蒸发至干固,均加入甲醇溶解;

⑨、将步骤⑧得到的 MC-RR 和 MC-LR 的甲醇溶液分别挥干溶剂后,铝箔包裹,-80℃ 保存。

## 一种微囊藻毒素的提取和纯化方法

### 技术领域

[0001] 本发明方法涉及生化分离的技术领域,具体涉及一种微囊藻毒素的提取和纯化方法。本发明方法适用于从野外水华爆发时期的蓝藻中提取两种微囊藻毒素 MC-RR 和 MC-LR,并对其进行纯化。

### 背景技术

[0002] 近十余年来,随着水体污染和富营养化程度的加剧,我国淡水湖泊蓝藻水华现象越来越严重,其伴随产生的毒素与人类健康的关系受到了越来越多的关注。其中微囊藻毒素 (microcystin,以下简称 MC) 是已发现的各种不同蓝藻毒素中分布最广、危害最为严重的一类肝毒素,其通过强烈地抑制蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 的活性而导致机体肝损伤。此类毒素化学结构较稳定,它能够通过食物链给人体带来潜在的危害。

[0003] 随着对微囊藻毒素研究的广泛开展,科研领域对微囊藻毒素的纯标准样品的需求量越来越大。但受制于该毒素提取工艺耗时长、纯品价格昂贵的问题,许多研究工作无法深入开展。在这种背景下,研制开发微囊藻毒素纯品成为亟需解决的问题。目前国内外从微囊藻中提取纯化微囊藻毒素的方法主要有:采用薄层层析法进行分离(中国专利,一种微囊藻毒素的提取纯化方法,公开号 CN1401660A,申请日:2002.9.24),该方法用乙酸溶液和甲醇浸泡微囊藻,经除杂质、粗毒素的制备、毒素的分离、薄层层析技术等步骤提取和纯化微囊藻毒素,此方法存在薄层层析板仅能一次使用,成本较高且上样量较低的缺点;卫涛等(微囊藻毒素的提取纯化及制备方法研究.上海环境科学,27(1),2008)以天然水华蓝藻为原料,建立了以甲醇溶液提取、固相萃取和半制备色谱分离为主要步骤的微囊藻毒素提取、纯化和制备的方法。该方法虽价格相对较低且所制备的毒素纯度较高,但在过柱时没有充分洗脱造成毒素大量损失。

### 发明内容

[0004] 针对现有技术中存在的不足,本发明的目的在于提供了一种微囊藻毒素的提取和纯化方法,该方法以有毒的水华蓝藻为原料,通过固相萃取和半制备色谱分离技术分离纯化两种微囊藻毒素 MC-RR 和 MC-LR,方法简单,操作简便,成本低廉。

[0005] 为达到上述目的,本发明方法的技术方案如下:

一种微囊藻毒素的提取和纯化方法,步骤依次如下:

#### A、微囊藻毒素的提取

称取藻粉,按 30-40ml/g 的比例加入 60v/v% 的甲醇溶解,8-20℃下 200rpm 摇床振荡 1h,超声促溶处理 20min(功率无要求,温度不超过 30℃即可),移入塑料离心管,20℃下 12000rpm,离心 20min,倾出上清液;

然后,加 60v/v% 的甲醇重复提取一次;

合并两次提取的上清液,用 1mol/L 硫酸调节上清液 pH 至 4,静置 60min,移入离心管,20℃下 12000rpm,离心 20min,倾出上清液,用稀氨水调节其 pH 至 8;

用旋转蒸发器,将上清液浓缩,即得粗提液;

#### B、微囊藻毒素的纯化

将粗提液注入 ODS 柱,依次用 20v/v%、30v/v%、40v/v% 甲醇冲洗 ODS 柱;

用含有 0.02 v/v%TFA (三氟乙酸)的 70 v/v% 甲醇溶液洗脱,弃去洗脱液;

再用含有 0.02 v/v%TFA 的 70 v/v% 甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,直至洗脱液无色;

将洗脱液旋转蒸发至溶剂完全挥发,用 50v/v% 甲醇溶解后在 12000rpm 下离心 5min,上清液为精提液;

#### C、微囊藻毒素 MC-RR 与 MC-LR 的分离

取精提液注入半制备色谱仪,约 10min 时收集 MC-RR 峰,约 14min 时收集 MC-LR 峰,分别合并 MC-RR、MC-LR 洗脱液,移入圆底烧瓶,旋转蒸发至干固,分别加入甲醇溶液溶解;

#### D、微囊藻毒素 MC-RR 与 MC-LR 的定量与保存

采用 HPLC-UV 测定步骤 C 所提取的微囊藻毒素的质量和纯度。

[0006] 将步骤 C 最后获得的 MC-RR 和 MC-LR 的甲醇溶液挥干溶剂,铝箔包裹,-80℃ 保存。

[0007] 本发明方法与现有的微囊藻毒素提纯方法相比,具有以下优点和有益效果:

本发明方法的技术方案中,原料采用的自然环境水华发生时产生的蓝藻,藻粉处理过程简单,原料成本可以忽略不计。操作过程中采用的操作相对简单,藻粉的预处理对实验人员要求较低。

[0008] ODS 柱采用反相 C18 填料,可重复使用且对除杂效果的影响较低,增加了填料的利用率,降低了成本,操作简单并且分离的毒素的纯度很高,ODS 柱依次采用 20v/v%, 30v/v%, 40v/v% 的甲醇溶液淋洗,70v/v% 的甲醇溶液洗脱,此部分主要为色素,弃去。最后再用 70v/v% 的甲醇溶液洗脱,能够最大限度地洗脱微囊藻毒素,这样可以收集到纯度更高的 MC-RR, MC-LR;

采用半制备色谱仪更进一步纯化了所提取的微囊藻毒素,采用 HPLC 定量测定所提取的微囊藻毒素,纯度均在 97% 以上,符合科研工作对毒素纯度的要求。

### 附图说明

[0009] 图 1 为实施例 1 中的 MC-LR 与 MC-RR 分离纯化的半制备色谱图;

图 2 为实施例 1 中的 MC-RR 的 HPLC-UV 图;

图 3 为实施例 1 中的 MC-LR 的 HPLC-UV 图。

### 具体实施方式

[0010] 下面结合具体的实施例对本发明方法做进一步说明。

[0011] 本发明方法中用到的藻粉均为蓝藻干粉,为 2006 年于云南滇池野外收集的水华蓝藻经干燥、粉碎后常温保存,其外观蓝绿色或略带黄绿色,气味略带藻腥味。

[0012] 实施例 1

一种微囊藻毒素的提取和纯化方法,操作步骤如下:

1、称取 3.000g 藻粉,放入 250ml 锥形瓶,加入 90ml 60v/v% 的甲醇溶解,

8℃ 下 200rpm 摇床振荡 1h,再 20℃ 超声促溶处理 20min 后,移入 4 支 40ml 塑料离心管,20℃ 下 12000rpm,离心 20min;

2、倾出上清液合并至 200ml 烧杯,步骤 1 中得到的 4 份沉淀共用 50ml 60v/v% 甲醇浸泡清洗,随后将 50ml 清洗液全部移入原 250ml 锥形瓶中,8℃ 下 200rpm 摇床振荡 1h,再 20℃ 超声促溶处理 20min 后,移入 2 支 40ml 塑料离心管,在 20℃ 下 12000rpm 离心 20min,倾出上清液合并于上述的 200ml 烧杯中;

3、用 1mol/L 硫酸调节上述 6 份合并的上清液至 pH3.7,静置 60min (生成了大量絮状沉淀)后,移入离心管,20℃ 下 12000rpm 离心 20min,倾出上清液于 200ml 烧杯,用稀氨水 (14wt%) 调节 pH 至 7.8;

4、用旋转蒸发仪,将步骤 3 最后得到的溶液浓缩至 20~30ml,加水至 40ml,即得粗提液;

(取 100  $\mu$  L 粗提液梯度稀释 10、100、1000 倍,用 HPLC 测定稀释粗提液中两种微囊藻毒素的含量)。

[0013] MC-RR, MC-LR 标准品购于日本和光纯药(Wako)公司。

[0014] 色谱柱:5C<sub>18</sub>-AR-II, Type waters, 4.6\*150mm, 5  $\mu$  m;

柱温:35.0℃

流动相:水(含 0.05v/v%TFA)和甲醇(含 0.05v/v%TFA)体积比 1:1;

流速:1ml/min;紫外-检测器:波长 238nm;进样体积:10  $\mu$  l;

测得 3.000g 藻粉的粗提液中约含 MC-RR 3.091mg, MC-LR 1.945mg。

[0015] 5、每 10ml 粗提液注入一个 ODS (5g C18 粉填料,20mL VARIAN 塑料管)柱,依次用 20v/v% 甲醇 30ml、30v/v% 甲醇 20ml、40v/v% 甲醇 10ml 冲洗每个 ODS 柱;再用含有 0.02v/v%TFA 的 70 v/v% 甲醇溶液 10ml 洗脱,弃去洗脱液(这一步洗下的不是目标物);然后用含 0.02v/v%TFA 的 70 v/v% 甲醇溶液 30ml 洗脱,收集洗脱液,直至洗脱液无色;

6、将步骤 5 中收集的洗脱液混合后,移入 200ml 圆底烧瓶,旋转蒸发至溶剂完全挥发;

7、加入 1.5ml 50v/v% 甲醇溶液清洗圆底烧瓶,溶解固形物后,用移液器移入离心管,12000rpm 离心 5min,上清液为精提液;

8、取精提液 200  $\mu$  L,直接注入 waters 半制备色谱仪收集 MC-RR 和 MC-LR 峰(见图 1),收集完后,分别合并从半制备色谱仪上收集到的 MC-RR、MC-LR 洗脱液,移入圆底烧瓶,旋转蒸发至干固,均加入 1.5ml 50 v/v % 甲醇溶解;

Waters 半制备色谱仪的检测条件:

色谱柱:300\*7.8mmI.D C18 15  $\mu$  m 300A

检测器:波长 238nm AUF 2.000 柱温 35℃

流动相:甲醇相(含 0.05v/v%TFA 的纯甲醇)

水相(含 0.05v/v%TFA 的纯水)

时间 (min)	流速 (ml/min)	水相 (v/v %)	甲醇相 (v/v %)
0.00	2.90	50	50
18.00	2.90	28	72
18.01	2.90	0	100
25.00	2.90	50	50
29.99	2.90	50	50
30.00	0.00	50	50

9、分别取 100  $\mu$  L 步骤 8 最后得到的 MC-RR、MC-LR 的甲醇溶液,梯度稀释 10、100、1000 倍,用 HPLC-UV (方法同步骤 4) 测定稀释液中微囊藻毒素的含量并计算纯度;

MC-RR, MC-LR 标准品购于日本和光纯药(Wako)公司;

最后,通过色谱峰面积归一化法计算得到的微囊藻毒素的纯度,

所得 MC-RR 纯度约 98.5%, 质量约 430  $\mu$  g (见图 2);

MC-LR 纯度约 97.7%, 质量约 150  $\mu$  g (见图 3)。

[0016] 10、将步骤 8 得到的 MC-RR 和 MC-LR 的甲醇溶液分别通过旋转蒸发器挥干溶剂后,铝箔包裹, -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0017] 实施例 2

一种微囊藻毒素的提取和纯化方法,操作步骤如下:

1、称取 3.00g 藻粉,放入 250ml 锥形瓶,加入 100ml 60v/v% 的甲醇溶解,15 $^{\circ}$ C 下 200rpm 摇床振荡 1h,再 25 $^{\circ}$ C 超声促溶处理 20min 后,移入 4 支 40ml 塑料离心管,20 $^{\circ}$ C 下 12000rpm,离心 20min;

2、倾出上清液合并至 200ml 烧杯,步骤 1 中得到的 4 份沉淀共用 50ml 60v/v% 甲醇浸泡清洗,随后将 50ml 清洗液全部移入原 250ml 锥形瓶中,15 $^{\circ}$ C 下 200rpm 摇床振荡 1h,再 25 $^{\circ}$ C 超声促溶处理 20min 后,移入 2 支 40ml 塑料离心管,在 20 $^{\circ}$ C 下 12000rpm 离心 20min,倾出上清液合并于上述的 200ml 烧杯中;

3、用 1mol/L 硫酸调节上述 6 份合并的上清液至 pH 4.1,静置 60min 后,移入离心管,20 $^{\circ}$ C 下 12000rpm 离心 20min,倾出上清液于 200ml 烧杯,用稀氨水(14wt%)调节 pH 至 8.2;

4、用旋转蒸发器,将步骤 3 最后得到的溶液浓缩至 20~30ml,加水至 40ml,即得粗提液;

5、每 10ml 粗提液注入一个 ODS (5g C18 粉填料,20mL VARIAN 塑料管)柱,每个 ODS 柱依次用 20v/v% 甲醇 30ml、30v/v% 甲醇 20ml、40v/v% 甲醇 10ml 冲洗;再用含有 0.02v/v%TFA 的 70v/v% 甲醇溶液 10ml 洗脱,弃去洗脱液;然后用含 0.02v/v%TFA 的 70v/v% 甲醇溶液 30ml 洗脱,收集洗脱液,直至洗脱液无色;

6、将步骤 5 中收集的洗脱液混合后,移入 200ml 圆底烧瓶,旋转蒸发至溶剂完全挥发;

7、加入 1.5ml 50v/v% 甲醇溶液清洗圆底烧瓶,溶解固形物后,用移液器移入离心管,12000rpm 离心 5min,上清液为精提液;

8、取精提液 200  $\mu$  L,注入 waters 半制备色谱仪(实验条件同实施例 1),收集 MC-RR 和 MC-LR 峰,收集完后,分别合并从半制备色谱仪上收集到的 MC-RR、MC-LR 洗脱液,移入圆底烧瓶,旋转蒸发至干固,均加入 1.5ml 50 v/v % 甲醇溶解;

9、分别取 100  $\mu$  L 步骤 8 最后得到的甲醇溶解试样,梯度稀释 10、100、1000 倍,用 HPLC-UV 测定稀释液中微囊藻毒素的含量和纯度;

色谱柱:5C<sub>18</sub>-AR-II, Type waters, 4.6\*150mm, 5  $\mu$  m,

柱温 35.0 $^{\circ}$ C 流动相 水(含 0.05v/v%TFA)和甲醇(0.05v/v%TFA)体积比 1:1;

流速:1ml/min;紫外-检测器 238nm 液相进样体积:10  $\mu$  l

通过色谱峰面积归一化法计算得到的微囊藻毒素的纯度;

MC-RR 纯度约 98.1%, 质量约 468  $\mu$  g;

MC-LR 纯度约 97.3%, 质量约 160  $\mu$  g。

[0018] 10、将步骤 8 得到的 MC-RR 和 MC-LR 的甲醇溶液分别通过旋转蒸发器挥干溶剂后，铝箔包裹，-80℃保存。

[0019] 实施例 3

一种微囊藻毒素的提取和纯化方法，操作步骤如下：

1、称取 3.00g 藻粉，放入 250ml 锥形瓶，加入 120ml 60v/v% 的甲醇溶解，20℃下 200rpm 摇床振荡 1h，再 30℃超声促溶处理 20min 后，移入 4 支 40ml 塑料离心管，20℃下 12000rpm，离心 20min；

2、倾出上清液合并至 200ml 烧杯，步骤 1 中得到的 4 份沉淀共用 50ml 60v/v% 甲醇浸泡清洗，随后将 50ml 清洗液全部移入原 250ml 锥形瓶中，20℃下 200rpm 摇床振荡 1h，再 30℃超声促溶处理 20min 后，移入 2 支 40ml 塑料离心管，在 20℃下 12000rpm 离心 20min，倾出上清液合并于上述的 200ml 烧杯中；

3、用 1mol/L 硫酸调节上述 6 份合并的上清液至 pH4.0，静置 60min 后，移入离心管，20℃下 12000rpm 离心 20min，倾出上清液于 200ml 烧杯，用稀氨水(14wt%)调节 pH 至 8.0；

4、用旋转蒸发器，将步骤 3 最后得到的溶液浓缩至 20~30ml，加水至 40ml，即得粗提液；

5、粗提液过 ODS 柱(5g C18 粉填料，20mL VARIAN 塑料管)，每 10 ml 粗提液对应一个 ODS 柱，每个 ODS 柱依次用 20v/v% 甲醇 30ml、30v/v% 甲醇 20ml、40v/v% 甲醇 10ml 冲洗；用含有 0.02v/v%TFA 的 70v/v% 甲醇溶液 10ml 洗脱，弃去洗脱液；然后用含 0.02v/v%TFA 的 70v/v% 甲醇溶液 30ml 洗脱，收集洗脱液，直至洗脱液无色；

6、将步骤 5 中收集的洗脱液混合后，移入 200ml 圆底烧瓶，旋转蒸发至溶剂完全挥发；

7、加入 1.5ml 50v/v% 甲醇溶液清洗圆底烧瓶，溶解固形物后，用移液器移入离心管，12000rpm 离心 5min，上清液为精提液；

8、取精提液 200 μ L，注入 waters 半制备色谱仪(实验条件同实施例 1)，收集 MC-RR 和 MC-LR 峰，收集完后，分别合并从半制备色谱仪上收集到的 MC-RR、MC-LR 洗脱液，移入圆底烧瓶，旋转蒸发至干固，均加入 1.5ml 50 v/v % 甲醇溶解；

9、分别取 100 μ L 步骤 8 最后得到的甲醇溶解试样，梯度稀释 10、100、1000 倍，用 HPLC-UV 测定稀释液中微囊藻毒素的含量和纯度；

色谱柱 :5C<sub>18</sub>-AR-II, Type waters, 4.6\*150mm, 5 μ m,

柱温 :35.0℃

流动相 :水(含 0.05v/v%TFA)和甲醇(0.05v/v%TFA)体积比为为 1:1

流速 :0.5ml/min ;紫外 - 检测器 238nm 进样体积 :10 μ l ;

通过色谱峰面积归一化法计算得到的微囊藻毒素的纯度；

MC-RR 纯度约 97.1%，质量约 457 μ g；

MC-LR 纯度约 97.3%，质量约 173 μ g。

[0020] 10、将步骤 8 得到的 MC-RR 和 MC-LR 的甲醇溶液分别通过旋转蒸发器挥干溶剂后，铝箔包裹，-80℃保存。

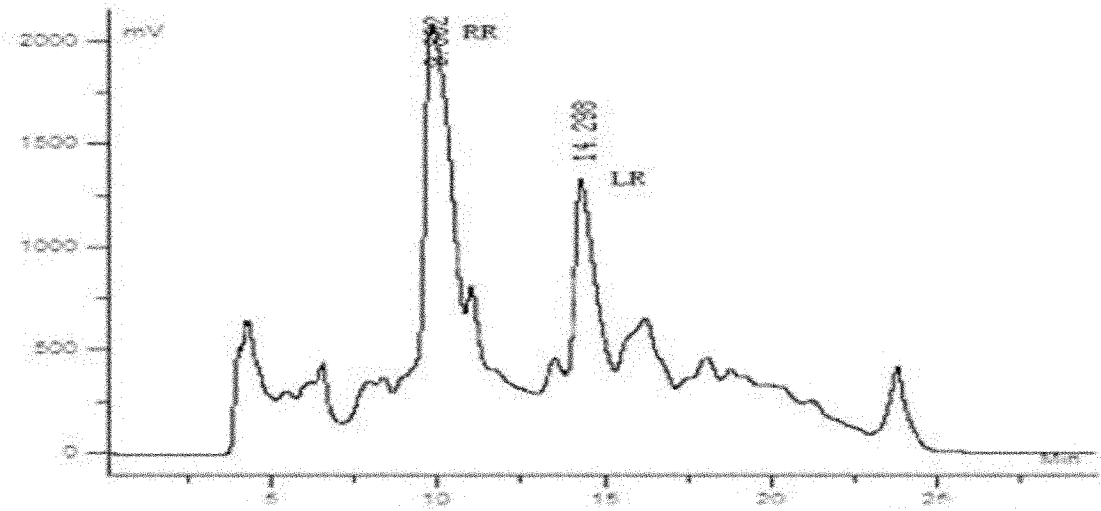


图 1

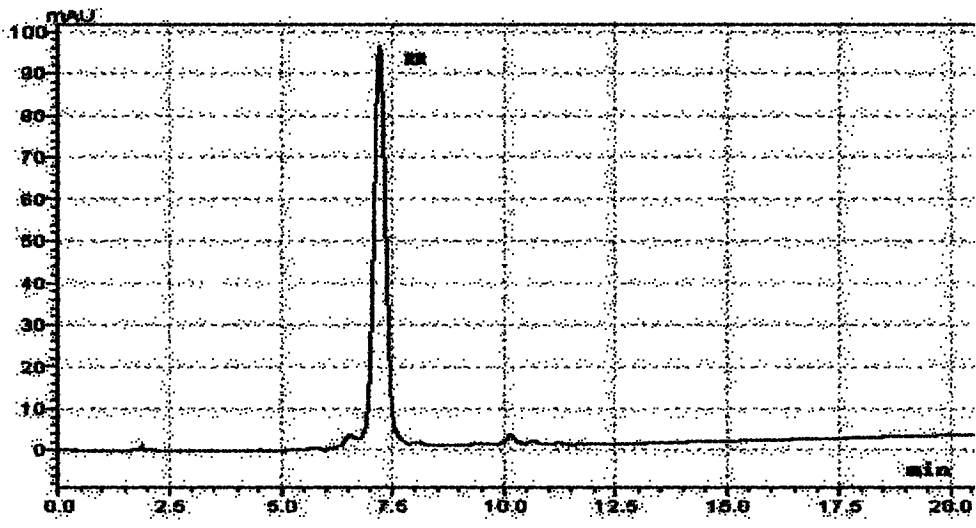


图 2



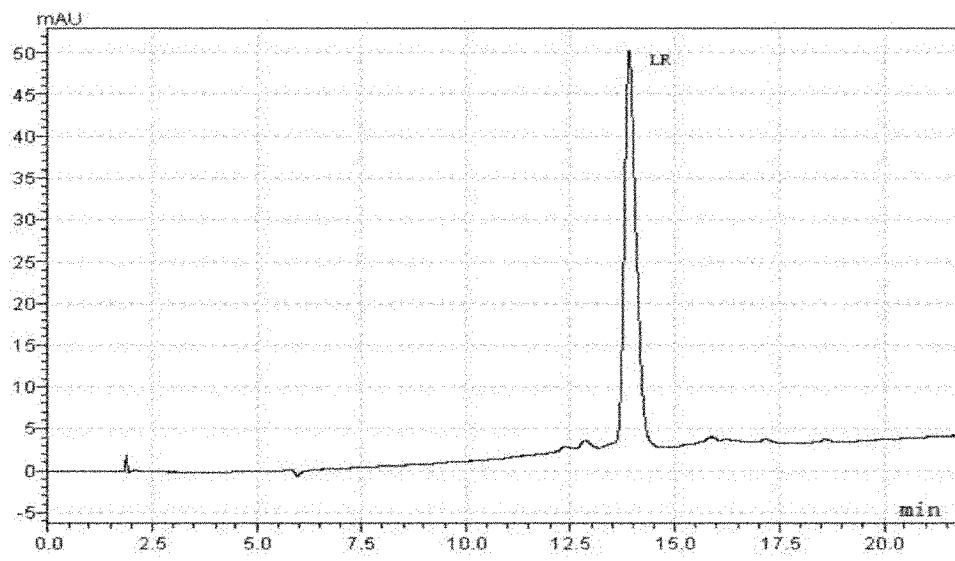


图 3