

响应面法优化测定水体中微囊藻毒素

周世会^{1,2}, 陈海龙¹, 韩孟书³, 江帆¹, 李秋华^{1,2*}

(1. 贵州师范大学贵州省山地环境信息系统和生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001;

2. 贵州省国际合作研究基地水生生态国际联合研究中心, 贵州 贵阳 550001;

3. 贵州师范大学计算机重点实验室, 贵州 贵阳 550001)

摘要:针对水体中低浓度微囊藻毒素(MC-RR和MC-LR)的富集、淋洗、洗脱等前处理环节,采用单因素响应面优化法探讨微囊藻毒素前处理的最佳条件。结果表明:采用体积分数为25%的甲醇水溶液能够取得最佳淋洗效果,由One Factor设计优化得到体积分数为75%的甲醇水溶液作洗脱剂,MC-RR和MC-LR最佳回收率为89.4%和90.7%。方法在0.100 mg/L~5.00 mg/L范围内线性良好,MC-RR和MC-LR的检出限分别为0.07 $\mu\text{g/L}$ 和0.04 $\mu\text{g/L}$,实际水样加标回收率分别为80.6%和84.9%,平行测定结果的RSD分别为1.6%和2.4%。

关键词:微囊藻毒素;响应面法;高效液相色谱法;水质

中图分类号:O657.7⁺2

文献标志码:B

文章编号:1006-2009(2021)01-0043-04

Response Surface Method for Optimizing Microcystins Determination in Water

ZHOU Shi-hui^{1,2}, CHEN Hai-long¹, HAN Meng-shu³, JIANG Fan¹, LI Qiu-hua^{1,2*}

(1. Key Laboratory for Information System of Mountainous Area and Protection of Ecological Environment of Guizhou Province, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. International Joint Research Centre for Aquatic Ecology, Guiyang, Guizhou 550001, China; 3. Key Laboratory for Information and Computing Science of Guizhou Province, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001, China)

Abstract: In order to get optimum conditions, single-factor response surface optimization method was used in the pre-treatment process of enriching, leaching and eluting low concentration of microcystins (MC-RR and MC-LR) in water. The results showed that it could get the best leaching effect with 25% methanol solution, the best recoveries of MC-RR and MC-LR were 89.4% and 90.7% by using 75% methanol solution as eluent which optimized by One Factor design. The method had good linearity in the range of 0.100 mg/L to 5.00 mg/L, the detection limits of MC-RR and MC-LR were 0.07 $\mu\text{g/L}$ and 0.04 $\mu\text{g/L}$, the recoveries of actual water samples were between 80.6% and 84.9%, and the RSDs of duplicate detection were 1.6% and 2.4%, respectively.

Key words: Microcystins; Response surface method; HPLC; Water quality

微囊藻毒素(MCs)是在蓝藻水华中造成危害最严重的藻毒素^[1],MC-LR和MC-RR是两种毒性较大的结构^[2]。蓝藻水华产生并释放的MCs在自然环境中稳定性较好,对饮用水安全构成严重威胁^[3]。MCs在藻细胞破裂后被释放出来,长期饮用含微囊藻毒素的水会对人的肝脏造成损伤^[4]。目前,对MCs定量检测的方法有ELISA、LC-MS、薄层色谱法和磷酸酶分析法等^[5-7],不过

收稿日期:2020-02-20;修订日期:2020-12-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(U1612442);贵州省科技厅基金资助项目(黔科合平台人才[2018]5805);贵州省教育厅基金资助项目(黔教合KY字[2017]032);贵阳市科技计划基金资助项目(筑科合同[2019]2-9)

作者简介:周世会(1995—),女,贵州仁怀人,在读研究生,研究方向为环境分析化学。

*通信作者:李秋华 E-mail: qiu-hua2002@126.com

ELISA 需要特制的纯化抗体,磷酸酶分析法、薄层色谱法对样品制备要求高,LC-MS 仪器价格昂贵^[8],这些方法用于实验室日常监测成本较高。

高效液相色谱法是一种被广泛应用的方法,常用体积分数为 20% 的甲醇水溶液进行杂质淋洗,该淋洗液对杂质较少的环境样品有效,分析杂质较多的 MCs 环境样品时,测定的准确性会受到影响^[9]。因此,需要对样品前处理过程进行优化,以期 MCs 的日常监测提供更便捷可靠的方法^[10]。

为兼顾高效性和实用性的原则,今对 HPLC 法检测前处理过程中 C_{18} 固相萃取小柱富集、淋洗、洗脱等环节进行优化处理,筛选出 MCs 富集、洗脱的最佳条件,为该方法的普及和应用提供科学依据。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; C_{18} 色谱柱,菲罗门;Agilent Bond Elut C_{18} , Agilent Technologies;RE-2000A 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂。

Microcystin-LR 对照、Microcystin-RR 对照(纯度 $\geq 95\%$),ALGALCHEM Inc;三氟乙酸(分析纯),天津市密欧化学试剂有限公司;甲醇(分析纯),天津市富宇精细化工有限公司;乙腈(色谱纯),安徽天地高纯溶剂有限公司;娃哈哈纯净水,贵阳娃哈哈饮料有限公司。

水样:实验室培养 FACHB-905 型铜绿微囊藻除去藻细胞后水样、野外水库水样。

1.2 样品采集与前处理

实验室含 MCs 水样处理:将收集的 FACHB-905 型铜绿微囊藻培养液以 3 500 r/min 的转速离心 10 min,收集上清液用孔径为 0.45 μm 的玻璃纤维滤膜抽滤,收集抽滤液避光冷藏备用。

野外水库水样处理:将野外采集的水样用孔径为 0.45 μm 的玻璃纤维滤膜抽滤,收集抽滤液避光冷藏备用。

C_{18} 固相萃取小柱的活化:参考《水中微囊藻毒素的测定》(GB/T 20466—2006)活化 C_{18} 固相萃取小柱^[11]。

MCs 的富集:课题组设计了 MCs 富集装置(见图 1),A 部分为水样中 MCs 富集管路设计,B 部分作为固相萃取小柱的活化、淋洗、洗脱装置。富集

装置借助重力作用进行过柱,采用挤压管路达到水样流量的控制,用该装置将处理好的水样在预先活化的 C_{18} 固相萃取小柱上进行 MCs 富集。

1.3 色谱条件

流动相为体积分数为 0.02% 的 TFA-乙腈混合溶液;检测波长为 238 nm;流量为 1 mL/min;进样体积为 10 μL ;色谱柱恒温箱温度设定为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。依据样品保留时间定性,通过目标物与标准样品峰面积响应值之比确定样品中微囊藻毒素的质量浓度。

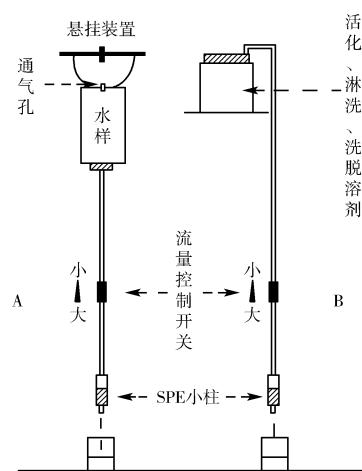


图1 富集装置

Fig. 1 Enrichment unit

1.4 响应面优化实验方法

淋洗液的优化:固相萃取小柱完成富集后,分别用 25 mL 纯水,体积分数为 25%、50%、75%、100% 的甲醇水溶液作为淋洗剂淋洗固相萃取小柱,将杂质淋洗液分别进样,对比不同甲醇含量的水溶液淋洗效果。

洗脱剂的优化:洗脱剂优化是基于向纯水中加入已知质量浓度的混合对照溶液(9.5 mg/L),以 MC-RR 和 MC-LR 的洗脱含量为评价标准。用不同甲醇含量的水溶液对已知质量浓度的水样进行洗脱,基于 Design Expert 软件,采用响应面项下 One Factor 实验设计,选取因子为甲醇体积分数,测定淋出液中 MCs 含量,分析洗脱剂对 MCs 的洗脱效果。

1.5 软件响应面设计原理

应用响应面设计原理,即利用 Design Expert 8.0.6.1 软件里响应面(Response Surface Methodology, RSM)中 One Factor 设计,采用多元非线性回

归方程来拟合因子($x_n, n=1, 2, 3 \dots n$)和响应值(E_y)之间的函数关系,再结合试验点估算出系数,完成需要的因子优化。

2 结果与讨论

2.1 MCs 富集优化结果

试验采用的富集装置可适应实验室连续性大量水样的测定,优化自然水体中 MCs 富集效果,实现同时进行多水样在线批量富集操作,使整个检测过程更为实用简便,同时降低检测成本。水样流量为 3 mL/min,保证水样与填料接触的时间,使填料对水样中 MCs 充分吸附。当试验水样为 1 L 时,用 C_{18} 萃取小柱富集的整个过程用时约为 6 h。

2.2 响应面优化试验结果

2.2.1 淋洗液优化结果

由淋洗试验结果通过 One Factor 设计优化,结果表明,当甲醇体积分数为 0(纯水)时,可淋洗出部分有色杂质,对 C_{18} 萃取小柱上吸附的 MCs 损失最小,MC-RR、MC-LR 响应值与理论值百分比均为 0;当甲醇体积分数为 25% 时,在淋出液中检测到毒素峰,MC-RR、MC-LR 响应值与理论值百分比分别为 0.38%、0.60%;当甲醇体积分数为 50% 时,淋出液中检测到毒素峰,MC-RR、MC-LR 响应值与理论值百分比分别为 9.36%、11.17%。说明随着甲醇体积分数的增大,MCs 的流失也越严重。考虑到其他杂质对 MCs 定性和定量的影响,优化得出最佳淋洗液甲醇体积分数为 25%。由于藻提取液中存在大量杂质,单次淋洗很难将杂质完全去除,优化最佳淋洗步骤为:依次用 25 mL 纯水淋洗除去极性较大杂质,再用 25 mL 体积分数为 25% 的甲醇水溶液淋洗除杂。

2.2.2 MCs 洗脱剂优化结果

基于单因素试验结果,选择甲醇体积分数作为自变量,利用 Design Expert 8.0.6.1 设计响应面试验方案,采用 Quadratic 模式进行试验设计优化,包含 6 个试验点,每个试验点重复 2 次估算,1 个中心试验点,共 7 个试验点。

采用体积分数为 25% 的甲醇水溶液作淋洗液,分别考察纯水和甲醇体积分数为 25%、50%、75%、100% 的甲醇水溶液的洗脱能力。试验表明,甲醇体积分数为 25% 的甲醇水溶液洗脱下 MCs 最少;体积分数为 50% 的甲醇水溶液能洗脱下少量 MCs;体积分数为 75% 的甲醇水溶液得到的洗脱液

中 MCs 值最高,MC-RR、MC-LR 响应值与理论值百分比分别为 89.4%、90.7%,能够最大限度将 MCs 洗脱下来;当甲醇体积分数达到 100% 时回收率较低,MC-RR、MC-LR 响应值与理论值百分比分别为 67.2%、79.6%。在保证回收率的情况下采用体积分数为 75% 的甲醇水溶液作为洗脱剂,洗脱溶剂用量控制在 25 mL 左右,便于后续浓缩。

2.3 模型建立与显著性检验

通过分析软件 Design Expert 8.0.6.1 对优化试验数据进行二次多项式回归拟合,得到 MC-RR、MC-LR 随甲醇体积分数变化的回归方程。

$$Y_{MC-RR} = 2.22 \times 10^{-15} + 0.02X - 1.46 \times 10^3 X^2 + 3.00 \times 10^{-5} X^3 - 1.70 \times 10^{-7} X^4$$

$$Y_{MC-LR} = 1.08 \times 10^{-15} + 0.02X - 1.35 \times 10^3 X^2 + 2.80 \times 10^{-5} X^3 - 1.58 \times 10^{-7} X^4$$

甲醇体积分数与响应值相关性显著,模型相关系数 $R^2(Y_{MC-RR})$ 为 99.99%、 $R^2(Y_{MC-LR})$ 为 99.996%;相对标准偏差分别为 4.3%、1.7%,试验数据的离散程度较小。校正决定系数 $Y_{MC-RR}: R^2 \text{ Adj}$ 为 99.87%, $Y_{MC-LR}: R^2 \text{ Adj}$ 为 99.98%,通过比较模型与实际试验的拟合效果,得出拟合效果良好,可用于实际微囊藻毒素前处理淋洗和洗脱试验。

2.4 方法效能验证

将 MCs 标准溶液逐级稀释配制成 0.100 mg/L、0.200 mg/L、0.500 mg/L、1.00 mg/L、2.00 mg/L、4.00 mg/L、5.00 mg/L 的标准系列,在 1.3 条件下测定。以质量浓度为横坐标,对应的峰面积响应值为纵坐标绘制工作曲线。得到 MC-RR 和 MC-LR 的回归方程分别为 $y = 1.15 \times 10^4 x + 811$ 和 $y = 2.00 \times 10^4 x + 1.64 \times 10^3$,相关系数 r 均为 0.999 9。

方法检出限根据公式 $MDL = S \times t_{(n-1, 0.99)}$ 计算,得到 MC-RR 和 MC-LR 的方法检出限分别为 0.07 $\mu\text{g/L}$ 和 0.04 $\mu\text{g/L}$ 。

在实际湖水样品中添加 9.5 mg/L 的混合标准溶液,按照 1.2 所述前处理,并在 1.3 条件下测定,每个水样平行试验 6 次,MC-RR 和 MC-LR 的回收率分别为 80.6% 和 84.9%,6 次测定结果的 RSD 分别为 1.6% 和 2.4%。

2.5 环境水样测定

采用优化后的前处理条件,选择实验室藻类培养基液体和野外水库所采水样 1 L(试验设 3 个平

行样)进行测定。结果表明,实验室藻类培养基液体未检出 MC-RR, 检测出 MC-LR 值分别为 0.702 $\mu\text{g/L}$ 、0.710 $\mu\text{g/L}$ 、0.702 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.705 $\mu\text{g/L}$ 。野外水库水样检测 MC-RR 值分别为 0.400 $\mu\text{g/L}$ 、0.375 $\mu\text{g/L}$ 、0.478 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.418 $\mu\text{g/L}$; MC-LR 测定值分别为 0.517 $\mu\text{g/L}$ 、0.516 $\mu\text{g/L}$ 、0.631 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.555 $\mu\text{g/L}$ 。微囊藻毒素混合标准溶液(4.75 mg/L)色谱峰见图2。

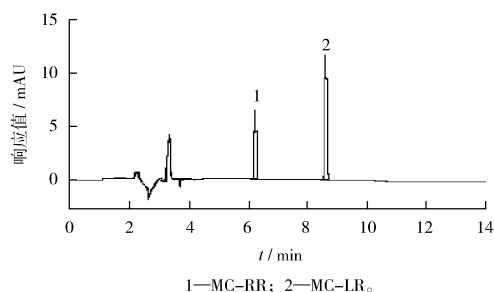


图2 微囊藻毒素混合标准溶液色谱峰

Fig.2 Chromatogram of microcystin mixed standard solution

3 结语

基于响应面优化结果对低含量 MCs 的水体进行试验验证,得知上述方法可实现一般实验室利用廉价材料进行分析测定。对于上述试验,如果能够利用 LC-MS 对环境水样中 MC-RR、MC-LR 进行分析测定,并且对固相萃取小柱的淋洗、洗脱流量、pH 值、环境温度控制进行试验设计,实现多因子可控操作,同时采用响应面法进行多变量试验考察,将能探索出更为完美的前处理条件。应用优化后的前处理条件分析环境水样,取得较为理想的分

析效果,对 Design of Experiments 方法进行 MCs 前处理条件优化技术的推广应用具有一定参考意义。

[参考文献]

- [1] 李婷,朱卫平,柳春晖.微囊藻毒素-LR HPLC/ESI-MS 法检测与前处理条件优化[J].中国测试,2015,41(2):42-45.
- [2] 乔瑞平.微污染水中微囊藻毒素的脱除技术研究[D].天津:南开大学,2005.
- [3] 潘禹,王华生,詹鸿峰,等.微囊藻毒素降解酶 MlrA 的生物学特征及催化机理研究进展[J].化工学报,2020,71(3):945-954.
- [4] 张俊,孟宪智,张世禄,等.海河流域地表水中微囊藻毒素的测定[J].环境监测管理与技术,2019,31(5):40-42.
- [5] 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.
- [6] CODD G A, METCALF J S, WARD C J, et al. Analysis of cyanobacterial toxins by physicochemical and biochemical methods[J]. AOAC International Journal, 2001, 84(5):1626-1635.
- [7] MAIZELS M, BUDDE W L. A LC/MS Method for the determination of cyanobacteria toxins in water[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(5):1342-1351.
- [8] 赵彬,王昭,张敏,等.超高效液相色谱/串联质谱法测定饮用水源水中多种藻毒素[J].环境监测管理与技术,2018,30(1):54-57.
- [9] 刘碧波,肖邦定,刘剑彤,等.天然水体中痕量微囊藻毒素的高效液相色谱测定方法优化[J].分析化学,2005,33(11):1577-1579.
- [10] 乔素兰.高效液相色谱法检测水中微囊藻毒素的实验条件优化[J].环境监测管理与技术,2007,19(6):44-46.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 20466—2006 水中微囊藻毒素的测定[S].北京:中国标准出版社,2006.

· 简讯 ·

《环境监测管理与技术》继续被中国科技核心期刊收录

由中国科学技术信息研究所主编的《2020 年中国科技核心期刊目录(自然科学卷)》日前发布,经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《环境监测管理与技术》继续被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊),有效期至 2021 年 12 月。

自 1987 年以来,中国科学技术信息研究所承担“中国科技论文统计与分析”工作,相关宏观统计数据编入国家统计局和国家科学技术部编制的《中国科技统计年鉴》,统计和分析研究成果被科技管理部门和学术界广泛关注和引用。中国科技核心期刊由中国科学技术信息研究所根据评定结果每年予以发布,动态调整。

《环境监测管理与技术》自 2008 年起已连续多年被中国科技核心期刊收录,同时还被中国科学引文数据库(CSCD)和《中国学术期刊影响因子年报》统计源期刊收录。编辑部将坚持“精品至上”的办刊理念,不断提升期刊的学术质量和影响力,为广大作者和读者提供优质服务。

本刊编辑部