

# 海藻光合色素的提取、分离和鉴定的研究进展

王根源 张坤诚

(国家海洋局第一海洋研究所)

## 一、研究海藻光合色素的意义

藻类的光合色素直接参与藻体的光合作用。因此,分离与鉴定藻体中光合色素的含量,在一定程度上可以反映该藻的光合作用强度,从而推算出藻体在特定条件下所合成的有机物的量。这一点在海洋初级生产力的调查与研究中,显示了它简便准确的独特的优越性。

此外,藻类色素组成的不同,往往可以反映分类学、生态条件的不同和藻类本身对环境的适应性,这对确定某种藻在分类学及进化史上的地位有重要意义。

值得注意的是,分离提纯的藻类光合色素和陆生高等植物一样,在工业、医药和食品等方面有着重要的应用价值,如叶绿素a可用于红宝石激光器的调Q作用,叶绿素a的无水乙醇针剂可治疗胰腺炎和肾炎,叶绿素及其衍生物有消炎、杀菌和生新的作用,故可治疗肝炎、烧伤及溃疡等症;在食品上可作染色剂和增色剂,色泽鲜艳而无毒。

海藻光合色素的提取、分离与鉴定研究,已有近百年的历史。近年来,由于技术和方法的不断改进和发展,使这一领域的研究日益深入,应用的材料也日益广泛,应用范围也不断扩大。已有不少专著和论述。本文就近年来的进展作一概述。

## 二、分布和性质

为了深入了解和研究藻类的光合色素,必须进行色素的分离、提纯和鉴定,而这一技术的建立和发展是以对光合色素的分布及其有关性质的认识为基础。

叶绿素a作为光合作用的主要色素而广泛

地分布于藻类中,而且它在各种藻体细胞中含量占藻体干重的0.3%—2.0%之间。它溶于乙醇、乙醚、苯和丙酮,但不溶于水。纯叶绿素a只微溶于石油醚,如要把它转移到石油醚中,必须先将它溶于少量丙酮或甲醇中。叶绿素a在663和430nm处有两个最大吸收峰。

叶绿素b不同程度地分布在绿藻纲和裸藻纲等藻类中,叶绿素b本身作为吸收光能的一种色素,将吸收的光能转移给起主要光化学作用的叶绿素a。叶绿素a与b在藻体内存在的比例为2:1—3:1之间。其溶解性与叶绿素a相似。它的光谱特征是在丙酮或甲醇中为645和435nm二条最大吸收谱带,其比率约为2.85。

叶绿素C通常存在于隐藻纲、甲藻纲和金藻纲等构成所谓的“褐藻系”的有机体中。叶绿素C又可分为叶绿素C<sub>1</sub>与C<sub>2</sub>。它们二者共存于以上这些藻中。叶绿素C在硅藻和褐藻中参与光系统II起辅助色素的作用。叶绿素C与a在藻内的含量比是1:1.2—1:5.5。它可溶于乙醚、丙酮、甲醇和乙酸乙酯,而不溶于石油醚,叶绿素C<sub>1</sub>和C<sub>2</sub>的晶体不完全溶于以上溶剂,但可溶于吡啶。它们的光谱特征是,甲醇中叶绿素C<sub>1</sub>为634、583、444nm;叶绿素C<sub>2</sub>为635、586、452nm。

红藻纲等提取液中有少量叶绿素d,尽管它在红毛菜中已明显检出,但它是否参与光合作用尚不清楚。它可溶于乙醚、丙酮、乙醇和苯,微溶于石油醚。它的吸收峰在696、456和400nm。

## 三、技术和方法的进展

光合色素的提取、分离和鉴定的研究取决

于分析手段和仪器的不断完善和改进。自从十九世纪初期开始,许多从事色素研究的工作者相继用溶剂抽提、色谱、光密度法和荧光法等对叶绿素作了大量的分析研究。目前为进行大面积、高速度的现场叶绿素测定,以及在实验室对光合作用机制的研究,各国采用全自动高压液相色谱仪来分离、测定微克量级的色素。此法与光谱分析法和荧光法比较,可以消除后两种方法定量测定所存在的误差,而且这种方法用于船上分析时,可提高样品分析的灵敏度。这将极大地推动这一研究领域的深入发展。

### 1. 提取和分离方法

近年来,许多作者用不同的提取和分离手段从许多海藻中得到了所需要的某些光合色素。下面介绍几种常用方法。

(1) 提取:要从海藻中提取叶绿素,必须选择适当的溶剂。

叶绿素的提取剂以90%或100%丙酮较为普遍,有时甲醇也可定量提取。用丙酮提取的好处在于:叶绿素在丙酮中稳定,而且在红光区的吸收峰较尖,消光系数高。就材料而论,不同材料可用不同浓度。一般说来,提取新鲜材料或水样中叶绿素时,最好选用100%丙酮培养物或干品的提取则用90%丙酮。这是因为藻体内叶绿素与卵磷脂结合部分需用非极性溶剂解离,对叶绿素与蛋白质结合部分要用含少量水的非极性溶剂来解离。如果事先能预料海藻中有活性酶存在,则必须用无水溶剂提取,以避免叶绿素的降解。离体叶绿素易溶于非极性溶剂,一般选用无过氧化物存在的乙醚。

为了避免脱镁叶绿素的形成和光氧化作用的发生,新鲜材料要在碱性条件下,并置于黑暗的环境中迅速提取。提取液的浓缩,可用氮气吹管的方法,避免用空气。浓缩物中残留水份可用固体氯化钠吸除,而不能用硫酸钠,因为后者能吸附部分色素。

(2) 色谱分离:用于叶绿素分离的色谱法目前有柱色谱、薄层色谱和纸色谱等。大量制备叶绿素多用柱色谱和薄层色谱。如果仅为了定性鉴定,则可以在纸上作双向色谱或用定

性薄层色谱。这里值得一提的是纸色谱还有它独到之处,即把滤纸做成筒便“色谱盒”,用于海上色素分析。实践证明,即使在狂风巨浪的情况下仍可作纸上色谱分析。这是因为溶剂在纸上移动,无需在稳定的平面上。要使色谱分离获得成功,涉及到许多技术和理论问题,这里就几点技术问题加以讨论。

叶绿素的分离可以用硅胶G、蔗糖粉、葡萄糖粉、纤维素粉等作吸附剂。Jeffrey于1968年曾提出,蔗糖粉对叶绿素的微量分析是最佳吸附剂。这种吸附剂与色素不起任何化学反应,蔗糖本身不含干扰色素测定的物质,且绝大部分色素均可在此系统中得到分离。此外,薄板上的斑点易于洗脱,回收率较高。但必须注意,这种板的制备要十分仔细,配制蔗糖的溶剂要无水的,否则就不能获得良好的薄板表面。

色素分离的重要环节是展开剂的选择。要得到满意的分离结果,必须根据具体情况,反复试验。经验表明:展开剂不能陈旧,配好即用。展开剂的极性更值得注意,极性过强,溶剂移动太快,致使色素分离不好;反之极性太弱,不但色素色泽不好,而且产生重迭,浪费时间并造成色素的损失。用于蔗糖板色谱的溶剂系统以含0.8%正丙醇的石油醚(60—80℃)作为第一向展开;含20%氯仿的石油醚(60—80℃)作为第二向较为理想。

展开以后,迅速记录各斑点的位置、颜色,用适当溶剂洗脱,通常叶绿素a、b及脱镁叶绿素a、b用丙酮洗脱,叶绿素c用甲醇洗脱,类胡萝卜素用石油醚洗脱,叶黄素用乙醇洗脱。

色谱分离光合色素,不但以上几方面要认真选择,还必须对某些条件加以控制。譬如,活化薄板的温度和时间应根据吸附剂类型加以严格控制,纤维素板在90℃下干燥1小时,硅胶板在110℃下活化1小时,蔗糖板在使用前于室温下平衡30分钟。点样量的多少和板上样品圆点面积大小也将明显影响分离效果。一般根据薄板厚度吸取点样量,太少不易检出,太

多斑点互相重叠,或产生严重拖尾。面积大小以直径为0.2—0.3mm为宜。温度应控制在18—23°C。需要强调的是,分离的全过程中务必置于暗处,以防止色素的光氧化作用。

(3) 直接萃取法:除上述方法外,可直接利用叶绿素之间溶解度的不同,用一系列溶剂依次萃取、纯化,也可以得到单一色素。Madgwick 1965年用甲醇、正己烷、乙醚等一系列溶剂对硅藻和绿色鞭毛藻中的叶绿素a、b和c进行提取。此法最大优点是速度较快,适于大量萃取。但由于各种溶剂对某种色素溶解度不是绝对的,该法的应用价值受到一定限制。

## 2. 鉴定和估算

鉴定是根据色素斑点颜色的不同以及展开距离的差别和已知标准样品的相应参数对照,进而用分光光度计分别测定各斑点洗脱液的最大吸收波长,并与纯物质的特征吸收光谱对照来确定属何种色素。在用分光光度法作测定时,如叶绿素中存在某些脱镁产物,则将产生固有误差。因此,通常要用荧光法对分光光度法作校正。荧光法不仅可排除其它附属色素存在的干扰,而且更为灵敏、迅速、准确。Mihael 等于1971年提出荧光计采用复式滤光片装置可以对复杂混合物的提取液进行定量测定。这是目前叶绿素研究中值得重视和推广的方法。

叶绿素浓度通常用溶剂中叶绿素的比消光系数来求得。比消光系数以公式  $d = D/dc$  表示。这里D为提取液的吸收率或光密度,d是比色杯的内径(cm),c是色素的浓度(克/升)。比消光系数单位为升/克·厘米。下表列

出的是特定溶剂中各种色素的最大吸收波长和比消光系数。

就含单一叶绿素的提取液而论,可直接应用比消光系数来计算该叶绿素浓度;如果同时含有几种叶绿素的提取液,可根据表中比消光系数建立三色方程,求解得到各叶绿素的浓度值。自然浮游植物群落的甲醇和丙酮提取液在750nm处经常产生一个高的消光值(浊度)。其主要原因是盐的存在,这种盐是在过滤海水样品时从微孔滤膜带入的,以聚乙酰硝化纤维素为材料的微孔滤膜对90%丙酮中的盐离子非常敏感,所以存在于滤膜上的含盐量,哪怕是微量也能引起750nm波长上消光值的明显差别,尤其是用10cm厚的比色杯进行光密度测定时,其浊度更明显。校正方法:重新把它们从甲醇和丙酮中转移到乙醚中;在计算时,要减去在750nm波长处测定的这部分消光值。目前比较通用的计算叶绿素a、b方程有:

### 90%丙酮中

$$\text{总Chl (mg/l)} = 25.5D_{650} + 4.0D_{665}$$

$$\text{Chl a (mg/l)} = 16.5D_{665} - 8.3D_{650}$$

$$\text{Chl b (mg/l)} = 33.8D_{650} - 12.5D_{665}$$

### 80—90%丙酮中

$$\text{总Chl (mg/l)} = 20.2D_{645} + 8.02D_{663}$$

$$\text{Chl a (mg/l)} = 12.7D_{663} - 2.69D_{645}$$

$$\text{Chl b (mg/l)} = 22.9D_{645} - 4.64D_{663}$$

### 乙醚中

$$\text{总Chl (mg/l)} = 7.12D_{660} + 16.8D_{642.5}$$

$$\text{Chl a (mg/l)} = 9.92D_{660} - 0.77D_{642.5}$$

$$\text{Chl b (mg/l)} = 17.6D_{642.5} - 2.81D_{660}$$

测定叶绿素c浓度的方法是由Parson等1963年发表的。该法是将叶绿素c酸化,使其

特定溶剂中各色素的最大吸收波长(nm)和比消光系数表

溶 剂	Chl a	Chl b	Chl c	Chl c <sub>1</sub>	Chl c <sub>2</sub>	Chl d
80—95%丙酮	663(84.0)	645(51.8)	630(19.5)	630.6(44.8)	630.9(40.4)	—
90%甲醇	665(76.07)	650(36.4)	635(15.2)	—	—	—
乙 醚	662(100.9)	644(62.0)	628(15.8)	—	—	688(110.4)
N,N-二甲胺	665(72.114)	—	—	—	—	—

注:Chl为叶绿素。括号中数据是比消光系数。

变成脱镁叶绿素c, 然后在 450nm 处测定吸收值的变化。但此种方法比较复杂, 倒不如利用 Parson 和 Strickland 1963 年发表的下述方程来进行估算。

90%丙酮中

$$\text{Chl a (mg/l)} = 11.6D_{665} - 0.14D_{630} - 1.31D_{645}$$

$$\text{Chl b (mg/l)} = 20.7D_{645} - 4.34D_{665} - 4.42D_{630}$$

$$\text{Chl c (mg/l)} = 55.0D_{630} - 16.30D_{645} - 4.64D_{665}$$

该方程最普遍地应用于浮游植物中叶绿素 a、b 和 c 浓度的分析。

(参考文献略)