

反相高效液相色谱法分离、测定海洋浮游植物的叶绿素和类胡萝卜素*

SEPARATION AND DETERMINATION OF CHLOROPHYLLS AND CAROTENOIDS FROM MARINE PHYTOPLANKTON BY RP-HPLC

王海黎¹ 洪华生² 徐立²

(¹ 北京大学城市与环境学系 100871)

(² 厦门大学国家教委海洋生态环境开放研究实验室 361005)

在海洋环境研究和监测中,经常要测定水体中光合色素及其降解产物的含量,最常用的是分光法和荧光法,该方法操作简便、快速,灵敏度较高,但最大的局限是无法区分多种色素的混合物。Millie 等 1993 年指出,在天然样品中,常常会有多达 20 种的特征色素存在。而某些特征色素的鉴定,对阐明传统生物分类方法所遇到的难题,常常起到很好的辅助及借鉴作用^[1]。80 年代以来, Mantoura 等 1983 年、Suzuki 等 1993 年和 Wright 等 1991 年相继建立了分析海洋浮游植物光合色素组成的高效液相色谱法。在这种背景下,国外有关学者在这一领域开展了大量的研究。但是,此类工作在国内尚未见报道。很关键的一点,就是缺乏可操作性强的分析方法。本文介绍现场研究中建立的 HPLC 方法,主要包括方法的详细步骤、系统构成、主要指标,并对该方法存在的一些问题进行讨论。

1 材料和方法

1.1 藻种及其培养

为帮助色素的定性研究,选用 6 种单胞藻作为参考藻种。它们分属于 6 个不同的纲:硅藻纲(Bacillariophyceae); *Skeletonema costatum*, 双鞭甲藻纲(Dinophyceae); *Prorocentrum cassubicum*, 定金藻纲(Prymnesiophyceae); *Isochrysis galbana*, 绿藻纲(Chlorophyceae); *Dunaliella salina*, 蓝藻纲(Cyanophyceae); *Spirulina platensis*, 红藻纲(Rhodophyceae); *Porphyridium aeruginum*。以 f/2 培养基在 20 °C 下培养,光照强度约为 12 000 lx,光暗周期为 12 : 12 h。藻生长进入指数生长期后收获,以备 HPLC 测定。

1.2 样品的现场采集

用有机玻璃采水器采集各标准层海水,先通过 130 μm 筛绢去除浮游动物,量取 2.0 L 过滤到玻璃纤

维滤膜上,将滤膜折叠,于船上迅速冰冻保存(< -20 °C)。

1.3 样品预处理

返航后立即将滤膜放入 5 ml 具塞刻度试管中,加入 5 ml 分析纯丙酮,超声 3~5 min,于暗处低温(-20 °C)萃取 24 h。萃取液用玻璃纤维滤膜过滤后,吹氮气浓缩至一定体积(一般不多于 2.0 ml),待分析。整个操作过程在低的光照强度下进行,以最大限度地减少色素的光降解。

1.4 HPLC 分析

分析所用的 HPLC 系统为 Waters 208 型高效液相色谱仪,主要包括:两台 M510 型高压泵、M680 型自动梯度控制仪、U6K 进样器、μBondapak C₁₈ 反相柱、M481 型可变波长 UV-VIS 检测器和 CHROMATOGRAPHY-DEII 型色谱数据处理系统。

所有的叶绿素和类胡萝卜素均在 440 nm 下检测。流动相 A 为甲醇:0.5 mol/L 醋酸铵缓冲液:丙酮 = 65 : 20 : 15 (体积比,以下同), pH=7.2; 流动相 B 为甲醇:丙酮 = 60 : 40。所用的试剂中,甲醇为 HPLC 级,丙酮和醋酸铵为分析纯级。梯度洗脱程序:从起始至 15 min,由流动相 A 按线性梯度变化过渡到流动相 B,并继续保持 12 min。每一次运行完成后,再回到初始条件,平衡 2~3 min,等待下一次进样。整个过程约需 35 min。

1.5 色素的定性和定量

光合色素的定性依据是色谱图上的保留时间。已有的色素标准品为叶绿素 a(Chl a), 叶绿素 b(Chl b)(中国科学院上海植物生理研究所),β-胡萝卜素(β-carotene)(Sigma 化学公司,产品代号:C-0126)。其

* 国家教委重点基金[1993]178 和福建省自然科学基金 94-Z-4 资助项目。

收稿日期:1998-07-11;修回日期:1999-01-13

他色素的谱峰位置通过对比参考藻种的谱图与相关文献中的谱图得以确定。

利用每一种色素的色谱峰面积进行定量。Chl a, Chl b, β -carotene 的定量可通过外标法由工作曲线求得,其他色素的质量由下式表示:

$$W = kA/E_{1\%}$$

其中, W 为色素的质量, μg ; A 为色素峰面积, $\text{mV} \cdot \text{min}$; $E_{1\%}$ 为 440 nm 下的比消光系数, $\text{ml}/(\text{g} \cdot \text{cm})$; k 为换算系数, $\text{ml}/(\text{cm} \cdot \text{mV} \cdot \text{min})$ 。各种色素的 $E_{1\%}$ 值文献中可以查得。 k 值则由标准色素求得。

表 1 3 种色素标准的工作曲线(PA 为峰面积)

工作曲线	相关系数	标准偏差(ng)	样本数	p
$\text{Chl a} = 7.93 \times 10^{-2} \text{ PA} - 0.03$	0.998	35	6	<0.000 1
$\text{Chl b} = 2.63 \times 10^{-2} \text{ PA} - 0.017$	0.999	15	6	<0.000 1
$\beta\text{-carotene} = 1.21 \times 10^{-2} \text{ PA} - 0.013$	0.999	21	6	<0.000 1

表 2 色素的柱保留时间和峰面积的重现性

进样 次序	Chl a (2.5 μg)		Chl b (1.0 μg)		β -Carotene (1.5 μg)	
	保留时间 (min)	峰面积 ($\text{mV} \cdot \text{min}$)	保留时间 (min)	峰面积 ($\text{mV} \cdot \text{min}$)	保留时间 (min)	峰面积 ($\text{mV} \cdot \text{min}$)
1	22.41	33.22	21.22	28.95	25.34	85.05
2	22.45	32.73	21.23	29.02	25.41	85.42
3	22.37	32.55	21.21	28.74	25.32	87.07
4	22.47	32.51	21.19	28.98	25.55	86.88
5	22.47	31.95	21.18	28.95	25.47	85.52
6	22.42	32.67	21.20	29.09	25.47	86.69
7	22.51	32.59	21.22	29.04	25.39	85.72
8	22.45	32.73	21.23	28.91	25.36	85.68
平均值	22.44 \pm 0.03	32.62 \pm 0.22	21.21 \pm 0.01	28.96 \pm 0.07	25.41 \pm 0.06	86.00 \pm 0.66
相对偏差(%)	0.15	0.67	0.071	0.25	0.24	0.76
方差	0.001 6	0.106	0.000 3	0.009 8	0.005 3	0.505 7

2 结果

2.1 检测限

以 Chl a, Chl b, β -carotene 为色素外标进行定量。3 种色素均配制一系列浓度的标准溶液,以相同体积(20 μl)进样。由色素质量与色谱峰面积做工作曲线(表 1)。可以看出,各条工作曲线均具有相当良好的线性。若以 3 倍的标准偏差(SD)确定检测限(DL),并考虑到现场采样过程中,过滤水样的体积为 2.0 L,则该方法对 Chl a, Chl b, β -carotene 的检测限分别可达 50, 20, 30 ng/L。

2.2 重现性

在建立实验方法过程中,还利用上述 3 种标准色素对柱保留时间(RT)、色谱峰面积(PA)的重现性进行了检验。Chl a, Chl b, β -carotene 均是重复进样 8 次,进样量分别为 2.5, 1.0, 1.5 mg。结果表明,3 种色素的 RT 和 PA 的相对偏差均小于 1%。其中尤以

Chl b 的重现性更佳(表 2)。

2.3 分离与鉴定的色素

图 1 所示为 6 种单胞藻的 HPLC 谱图,每一种代表一个纲。每一纲的特征色素在该分析方案下,都得到了较好的分离。由反相柱分离出的光合色素,在谱图中都具有比较理想的峰型。经计算,该色谱柱的实际塔板数最高可达到 $>10^5$ 塔板/m。据此,本研究中所用的 RP-HPLC 法可以有效分离并确定至少 16 种在化学分类上较重要的叶绿素和类胡萝卜素(表 3)。在色谱图上,极性较强的一端,脱植基叶绿素 a, c 族叶绿素可被分离和鉴定。但 Chl c_1 和 Chl c_2 不能得到有效分离,合成一峰被洗脱出来。谱图中部为中等极性光合色素。主要是各门类单胞藻的特征类胡萝卜素。现有方法可将多甲藻素(Peridinin)、岩藻黄素(Fucoxanthin)、紫黄素(Violaxanthin)、叶黄素(Lutein)、玉米黄素(Zeaxanthin)等分离开来。谱图的非极性一端,对 Chl b, Chl a, 脱镁叶绿素 a, β -carotene 可实现完全分离。

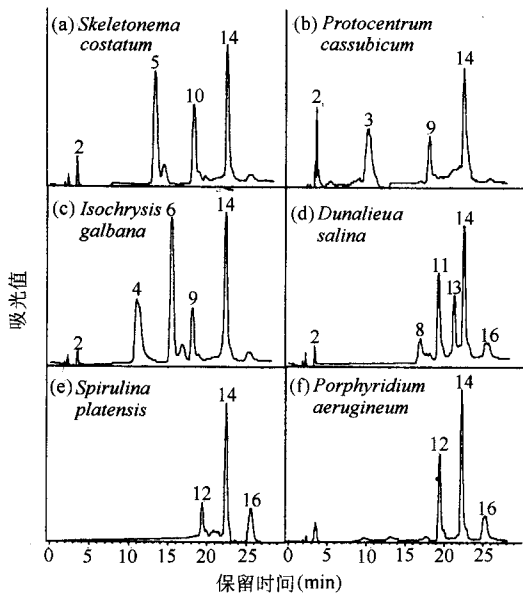


图 1 6 种单胞藻的 HPLC 谱

表 3 本方法可分离和鉴定的色素

峰号	保留时间 (min)	色素	$E_{1\%}^{1cm}$
1	2.28	脱植基叶绿素 a	687
2	3.58	叶绿素 $c_1 + c_2$	3 460
3	10.28	多甲藻素	1 126
4	10.90	19'-丁酰基氧化岩藻黄素	1 369
5	13.25	岩藻黄素	1 016
6	15.27	19'-己酰基氧化岩藻黄素	1 369
7	16.22	脱镁叶绿素 a	713
8	16.89	紫黄素, 莖菜黄素	2 550
9	18.06	硅甲藻黄素	2 325
10	18.24	硅藻黄素	1 634
11	19.23	叶黄素	2 393
12	19.42	玉米黄素	2 000
13	21.21	叶绿素 b	853
14	22.44	叶绿素 a	687
15	24.84	脱镁叶绿素 a	713
16	25.41	β -胡萝卜素	2 209

3 讨论

3.1 流动相组成

起先采用的流动相是在 Nelson 方案的基础上稍作些改动。组成为: 流动相不变, 甲醇: 醋酸铵缓冲溶液 = 80 : 20; 流动相 B 由甲醇: 丙酮 = 70 : 30 改

变为 60 : 40, 目的是在分离程序的后半段降低流动相极性, 以利于类胡萝卜素的分离。但是, 当按此初始方案进行预实验时, 发现所走的基线不理想(图 2-A)。在 9~13 min 时, 光吸收值发生突增。在将所有有机溶剂多次重蒸、醋酸铵重结晶提纯后仍未见改观。对比流动相所用的 3 种组分甲醇、醋酸铵缓冲溶液和丙酮占流动相体积百分比的变化, 发现突变区(图中阴影部分)处在这 3 种组分的线性变化区。如果是试剂中存在杂质, 则基线变化应遵循朗伯-比耳定律, 即同样是一种线性变化, 因此基本上可排除溶剂中有检测波长下严重吸光的杂质这一假设。推测是在此时间区段内, 流动相的光学性质发生突变。

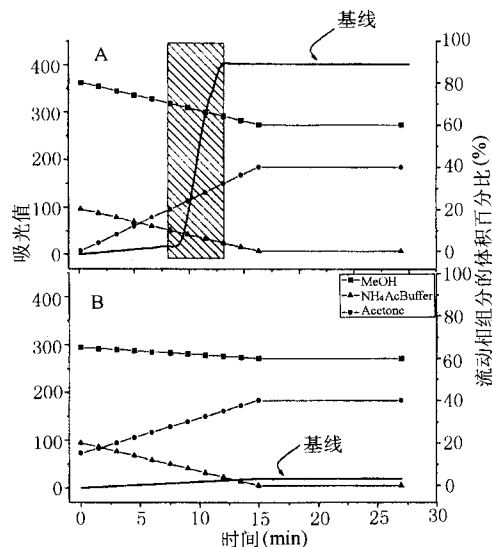


图 2 基线和流动相组分的变化
(A: 原方案; B: 现行方案)

有鉴于此, 在流动相 A 中加入一定比例的丙酮以改善基线。发现直到丙酮的体积比例达到 15% 时, 基线才较为理想(图 2-B)。这样, 现行方案的流动相变为“1.4”所示的组成。3 种组分所占流动相的体积比例随时间变化情况如图 2-B 所示。这样的变化, 使得分析程序前半段(0~15 min)流动相的极性减弱, 对强极性光合色素的分离产生不利影响。但考虑到主要的色素, 尤其是作为特征色素的类胡萝卜素类化合物多在 15 min 后被洗脱出来, 因此, 这样的改变也是可以接受的。

3.2 定性与定量

在定性方面, 市售的色素标准太少。Mantoura 等 1983 年、Bidigare 等 1991 年利用薄层色谱(TLC)或者

高效薄层色谱(HPTLC)从单胞藻种中分离、纯化某些特征类胡萝卜素。海洋研究科学委员会(SCOR)第78工作组曾经建议:利用已知色素组成的特有单胞藻种作为色素标准的来源。近年来,光电二极管阵列分光光度计(PDAS)逐渐成为HPLC的标准配置检测器,它为色素定性提供了方便。本方案中,因不具备PDAS,必须挑选多种门类浮游植物的代表种进行室内培养、收集、样品处理和HPLC分离分析,这无疑加大了工作量。所以,将PDAS作为检测器是现行方法的改进方向之一。

Wright等1984,1991年指出,在定量上,UV-VIS检测器灵敏度稍低。若采用PDAS作为检测器,灵敏度可达1 µg/L左右甚至更低。不过,研究发现PDAS检测Chl a和Chl b时,会比普通单色器分光光度计分别低估6%和9%^[2]。

此外,通过改进流动相组成或提高柱性能,也有助于一些特定色素组分的分离。比如,用含有吡啶的流动相,能将Chl a和二乙烯Chl a有效分离^[3]。

3.3 可比性

本实验方案与国际上通行的同类方法具有较高的可比性。美国全球联合通量研究计划(US Joint Global Flux Study Program, US-JGOFS)曾对来自美国、德国、荷兰和加拿大的参与HPLC色素组成分析的8家著名实验室进行色素分析互校检查^[2]。这8个实验室全部采用C₁₈反相柱、梯度洗脱和可见光检测。再从流速、柱体积、柱填料和分光检测波长4项指标

上比较,8个实验室中,分别有5家、4家、5家和8家与本研究方案的设置相同或非常相近。目前,该方法已经应用到台湾海峡和厦门西海域浮游植物光合色素的现场研究中。

4 小结

在现有仪器设备的基础上,发展了适用于海洋浮游植物光合色素分离分析的RP-HPLC-VIS方法。该方法简便、经济、快速、重现性好,与国际上通行的分析方案的可比性强。对Chl a, Chl b, β-carotene的方法检测限分别为50, 20, 30 µg/L;色素的柱保留时间和峰面积的相对偏差小于1%;用此方案可分离并鉴定至少16种在化学分类上较为重要的叶绿素和类胡萝卜素。本章还讨论了现行方案进一步改进和提高的方向,主要包括:(1)改善强极性色素的分离效果;(2)改用PDAS作为检测器,提高定性分析能力。

参考文献

- 1 Thomsen, H. A. & Buck, K. R. . *Deep-Sea Res.* , 1998, 45: 1 687~1 707
- 2 Latasa, M. , *et al.* , *Mar. Chem.* , 1996, 51: 315~324
- 3 Garrido, J. L. & Zapata, M. . *Chromatographia* , 1997, 44: 43~49