

测定浮游植物中色素的高效液相色谱与二极管阵列分光光度计联用的方法

胡晗华^{1,2,*} (¹中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

Method for Determining Phytoplankton Pigments by High-performance Liquid Chromatography and Diode Array Detector

HU Han-Hua^{1,2,*} (¹ State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080; ² School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

摘要 建立了高效液相色谱与二极管阵列分光光度计联用分析浮游植物中色素的方法。采用 90% 的丙酮提取藻类中的类胡萝卜素和叶绿素后在反相 C₁₈柱上分离, 流动相选用甲醇/醋酸铵/丙酮, 流速为 2.0 mL·min⁻¹。用可见光检测器检测, 波长为 440 nm。在线的二极管阵列检测器对色素峰的扫描(400~700 nm)得到各色素峰的吸收光谱的结果显示, 保留时间相同的色素峰, 吸收光谱可能不同。根据色素峰吸收的光谱特性确定色素的种类, 可以避免色素峰保留时间相同而造成的判断误差, 从而提高了分辨的准确性。

关键词 二极管阵列检测器; 高效液相色谱法; 浮游植物; 色素; 吸收光谱

植物光合色素的分析方法有许多种, 经典的方法有纸层析和薄层层析, 薄层层析又根据吸附剂不同而分成几种类型。吸附剂的类型有: 硅胶、硅藻土、糖类、纤维素和聚酰胺等。层析后的各个色素斑点剪下并用相应的溶剂溶解后测定其吸收光谱, 对照文献资料再确定色素的种类^[1]。上述方法较简便, 但准确性不高。近几年随着高效液相色谱技术的发展, 有人已将它应用于植物色素特别是藻类色素的分析中^[2~4]。尽管柱的规格不同, 但通常用于色素分析的色谱柱均为反向 C₁₈柱, 也有少数其他类型的柱^[5]。流动相的选用差别不大, 多为甲醇、丙酮、醋酸铵和乙酸乙酯等, 采用二元或三元梯度洗脱系统。色素峰通过可见光(波长多设定为 440 nm)检测器或荧光检测器(用于检测叶绿素及其代谢产物)检测。色素的定性依据色谱图上的保留时间和已知色素标准品对照确定。色素的高效液相色谱法与经典的层析相比具有快速、准确的特点。但藻类的色素种类繁多, 根据色素的保留时间以及色素标准品确定色素种类不但在数量上存在一定的局限性, 而且对于不常见色素的分析, 其可靠性也值得怀疑。近年来, 随着二极管阵列检测器的引入, 色素的种类可以通过吸收光谱的特性确定, 从而大大提高了分析结果的可靠性。

材料与方 法

实验所用藻种为两种单细胞藻类, 微小多甲藻 (*Peridinium pusillum*) 和 *Nannochloropsis* sp.。以 f/2 为培养基, 在温度为 22℃、光强约为 50 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照周期为 14 h 光/10 h 暗的植物生长箱内培养。藻生长进入对数期后收获, 用于实

验。藻液经离心(3 000 × g, 5 min)后加入适量冰冷的 90% 丙酮, 超声(300 W, KS-600, 宁波科生仪器厂)1~2 min, 于暗中低温(-20℃)萃取 24 h, 萃取液离心后取上清液, 过滤后即可用高效液相色谱仪(Agilent 1100, Hewlett-Packard)进行分析。色谱柱为反相 C₁₈柱(Hypersil ODS-C18, 5 μm; 25 cm × 4 mm 内径, Hewlett-Packard); 流动相选用甲醇/醋酸铵/丙酮, 其中, 溶液 A 为 65% 甲醇 + 20% 0.5 mol·L⁻¹ 醋酸铵(pH 7.2) + 15% 丙酮(体积比), 溶液 B 为 60% 甲醇 + 40% 丙酮(体积比)。梯度洗脱流程为: 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, 并维持 12 min, 流速为 2.0 mL·min⁻¹。在波长为 440 nm 处检测色素吸收值。根据色素峰的保留时间和在线的二极管阵列检测器(1040A, Hewlett-Packard)对色素峰扫描(400~700 nm), 确定色素的种类。由于不同色素的吸收光谱不同, 因此可根据吸收光谱鉴定色素的类型。如叶绿素类的最大吸收峰位于蓝光和红光带, 而各种叶绿素除了最大吸收峰的波长不同外, 蓝光最大吸收峰值和红光最大吸收峰值的比例(ratio blue/red)也不同。绝大多数类胡萝卜素在可见光范围内有 3 个吸收峰, 根据波长由小到大分别称为峰₁、峰₂和峰₃。峰₁通常是一个肩峰, 多数不明显。峰₂/峰₁(%)比值在各种类胡萝卜素中的差异也是区分色素的一个重要指标。Rowan^[6]曾对藻类叶绿素和类胡萝卜素的吸收光谱特性作过详细报道, 各色素即可通过实验得到的吸收光谱与文献中报道的吸收光谱对比而确定。

收稿 2003-03-17 修定 2003-06-09

* E-mail: hhhhu@home.ipe.ac.cn, Tel: 010-82627074

实验结果

从图1可以看出,基线极为理想,各种色素的峰有良好的分离。根据色素峰的保留时间、在线的二极管阵列检测器对色素峰的扫描以及甲藻和 *Nannochloropsis* 属色素的组成特点,即可以确定两种藻类所含的主要色素。表1表明,两种藻类均含有叶绿素 a (chlorophyll a, 峰9) 和 β -胡萝卜素 (β -carotene, 峰11)。除了保留时间分别相同外,两种色素在微小多甲藻和 *Nannochloropsis* sp. 中的光谱特性也分别是一致的。微小多甲藻还含有叶绿素 c (chlorophyll c, 峰1) 以及多甲藻素 (peridinin, 峰2)、硅甲藻黄素 (diadinoxanthin, 峰4) 和硅藻黄

素 (diatoxanthin, 峰8) 等甲藻的特征色素。*Nannochloropsis* sp. 的色素组成,除了一些小峰和未知峰外,共有6种主要光合色素,其中叶绿素只有叶绿素 a (峰9)。根据各色素峰的吸收图谱,确定 *Nannochloropsis* sp. 含有的主要类胡萝卜素有紫黄素 (violaxanthin, 峰3)、无隔藻黄素 (vaucherixanthin, 峰6)、玉米黄素 (zeaxanthin, 峰7)、海胆酮 (echinenone, 峰10) 和 β -胡萝卜素 (峰11)。其中紫黄素和无隔藻黄素是 *Nannochloropsis* 属种类的特征色素。

图1中,微小多甲藻和 *Nannochloropsis* sp. 的色谱图中有两个保留时间相同的色素峰(峰2和峰4)。峰2是仅次于叶绿素c的峰之后洗脱下来

表1 微小多甲藻和 *Nannochloropsis* sp. 的色素组成、保留时间及其吸收光谱特性

峰号	色素		保留时间/ min	最大吸收值/ nm	峰 / 峰 (%)
	微小多甲藻	<i>Nannochloropsis</i> sp.			
1	叶绿素 c	-	4.69	448, 584, 634	-
2	多甲藻素	-	5.04	474	-
		类紫黄素	5.04	418, 440, 470	94
3	-	紫黄素	7.94	418, 440, 470	98
4	硅甲藻黄素	-	9.12	446, 476	90
		类紫黄素	9.13	418, 442, 470	95
5	-	未知色素	10.11	414, 436, 465	97
6	-	无隔藻黄素	11.32	445, 473	94
7	-	玉米黄素	12.48	442, 470	96
8	硅藻黄素	-	13.12	452, 480	89
9	叶绿素 a	-	16.86	432, 618, 664	-
		叶绿素 a	16.86	431, 618, 664	-
10	-	海胆酮	17.23	466, 666	8
11	β -胡萝卜素	-	19.45	452, 476	88
		β -胡萝卜素	19.45	452, 478	88

的峰,显示出很强的极性。峰2的吸收光谱图(图2a和b)显示,在微小多甲藻中该色素的最大吸收峰在474 nm处(图2a),显然,该色素为多甲藻素,是多数甲藻的最主要辅助色素,含量很高。*Nannochloropsis* sp. 中的峰2同样是一个强极性的色素,它的吸收光谱图(图2b)表明,该色素为一种类胡萝卜素,其最大吸收峰在418、440和470 nm,与紫黄素的吸收光谱类似,是类紫黄素(violaxanthin-like)的类胡萝卜素。该色素峰在同属中的其他种类也有报道,但其种类均未确定^[7],它的含量较低,不是该属主要的类胡萝卜素。除峰2外,两种藻的色谱图中还有一个保留时间相同的峰——峰4。根据色素的吸收光谱图(图2c和d),微小多甲藻中的峰4被确定为硅甲藻黄素,它的最大吸收峰在446和476 nm(图2c)。作为辅助色素,硅甲藻

黄素在甲藻中的重要性仅次于多甲藻素,其含量也很高。与此不同的是,*Nannochloropsis* sp. 图谱中峰4的保留时间虽然与微小多甲藻图谱中的峰4相当,但从其含量上看,显然不是该属的主要类胡萝卜素。*Nannochloropsis* sp. 中峰4的吸收光谱图(图2d)显示,色素的最大吸收峰在418、442和470 nm处,也是一种类紫黄素的类胡萝卜素。

另外,在 *Nannochloropsis* sp. 色谱图中峰5是一个未知洗脱峰,其含量较高。峰5所洗脱下来色素的最大吸收峰为414、436和465 nm。此色素在同属中其他种类藻中没有检出过。由于未曾有过报道,因而根据吸收光谱无法确定该色素类型。

讨 论

作为反向色谱柱,极性强的色素最先被洗脱下

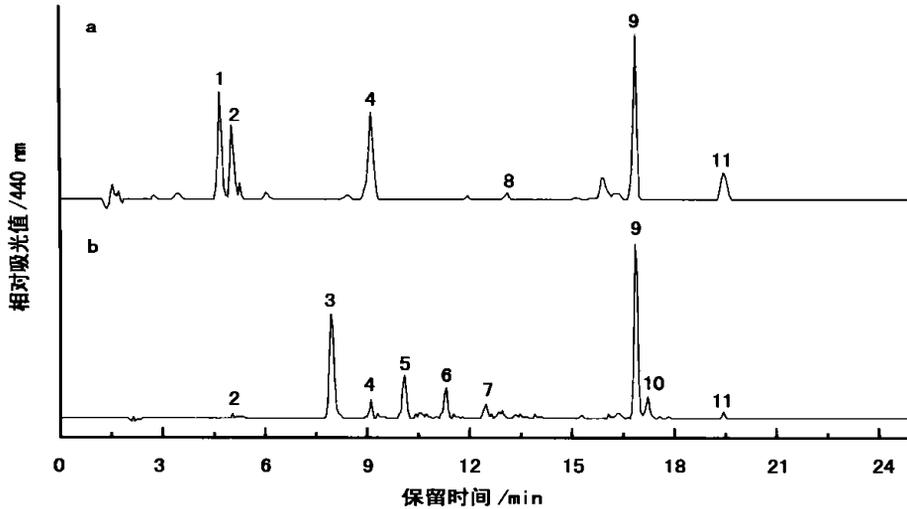


图 1 微小多甲藻(a)和 *Nannochloropsis* sp. (b) 的 HPLC 色谱(440 nm)

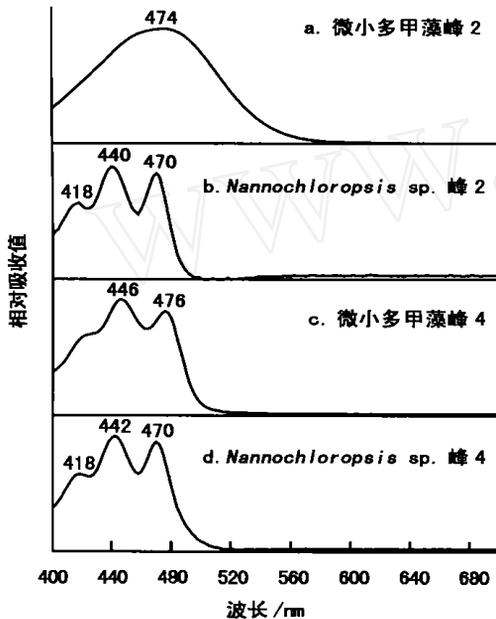


图 2 多甲藻素(a)、硅甲藻黄素(c)和两种类紫黄类胡萝卜素(b和d)的吸收光谱(400~700 nm)

来,出现在色谱图的前端。这类色素依极性强弱顺序主要有:脱植基叶绿素 b、脱植基叶绿素 a 和叶绿素 c 等。图谱中部为中等极性的光合色素,主要是各门藻类的特征类胡萝卜素。其中极性最强的类胡萝卜素是多甲藻素,以后依次为管藻黄素、岩藻黄素、紫黄素、硅甲藻黄素、硅藻黄素和叶黄素等。图谱非极性一端主要是叶绿素 b、叶绿素 a、脱镁叶绿素 b、脱镁叶绿素 a 和各种胡萝卜素等^[2]。根据这一基本规律,从色谱图中我们可以很容易地鉴定出分别代表甲藻和 *Nannochloropsis* 属两个类群的特征色素。如作为甲藻特征色素的多甲藻素、

硅甲藻黄素和硅藻黄素在微小多甲藻中均能检测到,而 *Nannochloropsis* 属的特征色素紫黄素和无隔藻黄素在 *Nannochloropsis* sp. 中也有很高的含量。由此可见,根据色素峰的保留时间和色素吸收光谱特性确定色素的种类的准确性较高,至少可以作为藻类分类的一个手段^[6]。但是由于色素峰的保留时间相同只说明两者的极性相同,所以,从检测藻类色素组成的角度来说,仅根据保留时间还不足以作为判断色素类别的依据。本文中的两个例子即很好地说明了这个问题。

在色素的定性方面,利用色素标准品或已知色素组成的纯种藻作为色素标准的来源是通常采用的方法^[4],有一定的准确性。近年来,光电二极管阵列分光光度计逐渐成为 HPLC 色素分析的标准配置检测器,它大大提高了色素分析的可靠性。本文中根据色素的吸收光谱特性对藻类色素进行定性分析准确可靠,并具有很强的可操作性。

参考文献

- 1 潘俊敏,张宪孔. 藻类叶绿素和类胡萝卜素的快速薄板层析. 植物生理学通讯, 1990, 26(3): 51~53
- 2 Wright SW, Jeffrey SW, Mantoura RFC *et al.* Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser*, 1991, 77: 183~196
- 3 袁建平, 张义明, 史贤明等. 高效液相色谱法测定藻类中的类胡萝卜素和叶绿素. 色谱, 1997, 15(2): 133~135
- 4 王海黎, 洪华生, 徐立. 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. 海洋科学, 1999, (4): 6~9
- 5 Schmid H, Stich HB. HPLC-analysis of algal pigments: comparison of columns, column properties and eluents. *J Appl Phycol*, 1995, 7: 487~494
- 6 Rowan KS. *Photosynthetic Pigments of Algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 235~255
- 7 Krienitz L, Hepperle D, Stich HB *et al.* *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia*, 2000, 39: 219~227