

微囊藻中叶绿素 a 提取方法的优化

李胜生^{1,2,3}, 董元华^{1,2,3}, 刘云^{1,2}, 张劲强^{1,2}

(1 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008;
2 中国科学院南京土壤研究所 - 香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室, 江苏 南京 210008;
3 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 用组织研磨、浸泡提取、热浴超声 3 种提取方法和丙酮、甲醇、乙醇 3 种提取溶剂, 从实验室纯培养微囊藻中提取叶绿素 a, 并以高效液相色谱法测定其质量浓度。结果表明, 经组织研磨破碎藻细胞后用甲醇提取的效果好于丙酮和乙醇, 经浸泡和超声破碎藻细胞后用乙醇的提取效果好于丙酮和甲醇; 使用乙醇 - 热浴超声法在所有的试验组合中获得最佳提取效果, 条件为: 乙醇温度为 50 ~ 55 °C, 超声 6 min ~ 8 min 后再静置提取 5 h ~ 6 h。

关键词: 微囊藻; 叶绿素 a; 提取方法

中图分类号: X835 **文献标识码:** C **文章编号:** 1006-2009(2008)04-0043-03

The Optimization of Extractive Methods for Chlorophyll-a from Microcystis

LI Sheng-sheng^{1,2,3}, DONG Yuan-hua^{1,2,3}, LIU Yun^{1,2}, ZHANG Jin-qiang^{1,2}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2 Soil and Environment Joint Open Laboratory between Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences and Hong Kong Baptist University, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 3 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The methods (tissue grinding, immersion, ultrasonic thermal bath) and solvents (acetone, methanol, ethanol) were tasted for chlorophyll-a extraction from microcystis. The results indicated that extraction effect of chlorophyll a by method of tissue grinding to break algae cells with methanol was higher than that with acetone or ethanol, and that by method of immersion or ultrasonic thermal bath with ethanol was better than with acetone or methanol. In all test groups, the best way was obtained by 6 min ~ 8 min ultrasonic treatment and then 5 h ~ 6 h static extraction in the 50 °C ~ 55 °C ethanol thermal bath.

Key words: Microcystis; Chlorophyll-a; Extraction method

叶绿素 a 是生物监测和水质评价中估算藻类生物量的重要指标^[1], 国内外有多种方法从浮游植物中提取叶绿素 a^[2-5], 为避免环境藻细胞色素和样品水量体积等干扰因素的影响, 现培养水华中常见的铜绿微囊藻进行试验, 比较不同的处理方式和提取溶剂间的组合差异, 以期获得最佳的提取方法。

1 材料和方法

丙酮和甲醇 (HPLC 级, 美国天地公司)、乙醇 (AR)、碳酸镁 (AR)、叶绿素 a (Sigma 公司, 纯度 ≥

96.0%)、超纯水 (由 Milli-Q 超纯水仪制备)、超声波发生器 (南京昕航科学仪器有限公司, AS 3120 型号, 40 kHz, 120 W)。

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 藻种由南京大学环境学院提供, BG-11 培养液高温灭菌,

收稿日期: 2008-01-29; 修订日期: 2008-03-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划基金资助项目 (2006BAD10B05); 中国科学院创新性基金资助项目 (KZCX2-YW-N-51-02, KZCX3-SW-435, ISSASIP0606)

作者简介: 李胜生 (1982—), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生, 从事环境持久性有机污染物的研究。

藻培养温度 25 ± 5 , 光照度 $E = 3\ 000\ \text{lx}$, 光暗比 $L:D = 12:12$, 取对数生长期的藻细胞试验。

叶绿素 a 标准溶液: 称取 $1.00\ \text{mg}$ 叶绿素 a 标准品用丙酮稀释至 $100.0\ \text{mg/L}$, 于 -20 保存; 工作溶液用甲醇稀释分别其质量浓度为 $1.0\ \text{mg/L}$ 、 $100.0\ \mu\text{g/L}$ 。

样品制备: 将实验藻液摇匀, 取 $10.0\ \text{mL}$, 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 醋酸纤维滤膜过滤, 将该滤膜于 -20 冷冻 $12\ \text{h}$ 。

提取方法: 分别将体积比为 $9:1$ 的丙酮/水、甲醇/水、乙醇/水 3 种提取溶剂和组织研磨^[2]、浸泡^[3]、超声处理^[4] 3 种提取方式组合, 设 9 个处理方法组, 各处理组提取溶剂均定容至 $10.0\ \text{mL}$, 每种处理方法重复 6 次。

乙醇-热浴超声法的提取条件优化: 提取时间为 $4\ \text{h}$, 乙醇温度 55 , 观察超声时间对叶绿素 a 提取效率的影响; 乙醇温度为 55 、超声时间 $5\ \text{min}$, 观察静置提取时间的影响; 提取时间为 $4\ \text{h}$, 超声时间 $5\ \text{min}$, 观察乙醇温度的影响。每种条件组合处理重复 6 次。

Waters Alliance 高效液相色谱仪 2695 分离单元, 配置 2475 荧光检测器和 Millinium 32 色谱工作站; Gemini C₁₈ 色谱柱 ($150\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}\ \text{I.D.}$, $5\ \mu\text{m}$); 流量 $1\ \text{mL/min}$; 柱温 30 ; 激发波长 $433\ \text{nm}$, 发射波长 $664\ \text{nm}$, 增益 10; 流动相 A 为甲醇, B 丙酮; 梯度淋洗, 程序运行 $10\ \text{min}$ 。外标法定量, 试验数据用 SPSS 软件统计处理, 单因素 ANOVA 方法统计检验。

2 结果与讨论

2.1 检测方法

用高效液相色谱法测定叶绿素 a, 分离效果好, 仪器的检测限为 $0.1\ \text{mg/L}$ 。叶绿素 a 的色谱图见图 1。

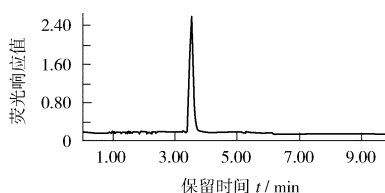


图 1 叶绿素 a HPLC 图谱

2.2 提取溶剂和提取方式组合

研磨法提取叶绿素 a, 不同提取溶剂 6 次测定的平均值分别为: 甲醇 $2.82\ \text{mg/L}$ 、乙醇 $2.04\ \text{mg/L}$ 、丙酮 $1.98\ \text{mg/L}$, 甲醇的提取效率高于丙酮和乙醇, 与 Sartory and Grobbleaar 等^[5] 的试验结果一致, 甲醇能较好地提取蓝藻中叶绿素 a; 用该法丙酮和乙醇的提取效率无显著性差异 ($P = 0.282 > 0.05$)。因为叶绿素 a 在甲醇中比在丙酮中容易降解, 应尽量缩短提取时间。

不同溶剂浸泡提取 6 次测定的平均值分别为: 乙醇 $1.51\ \text{mg/L}$ 、甲醇 $1.13\ \text{mg/L}$ 、丙酮 $0.99\ \text{mg/L}$, 不同提取溶剂间均有显著性差异。David Simon 等^[3] 研究表明, 甲醇和丙酮浸泡提取无显著性差别, 这可能与藻细胞所处生长阶段、不同定量方法等因素有关。林少君等^[6] 改进浸泡提取法, 采用多次冷热交替的冷冻-浸提方法, 提高藻细胞破碎率, 获得了与传统的丙酮-研磨法相当的提取效果。该次试验浸泡提取效果低于传统的研磨法, 表明单纯浸泡不能完全破碎藻细胞。同时样品处理时间延长, 降解作用会致叶绿素 a 部分损失。

超声提取法中不同溶剂的提取效率依次是: 乙醇 $3.58\ \text{mg/L}$ 、甲醇 $3.28\ \text{mg/L}$ 、丙酮 $2.41\ \text{mg/L}$, 各组间均有极显著性差异。超声波法利用超声波的空化作用和机械运动、扩散等次级作用, 能较完全破碎藻细胞, 此时提取效率取决于溶剂的萃取能力, 并和萃取时间长短有关。当萃取时间控制在 $4\ \text{h}$, 3 种溶剂的萃取效率由大到小依次为乙醇、甲醇和丙酮。各组间均有极显著性差异 ($P < 0.01$), 见图 2。

2.3 乙醇-热浴超声法的优化

在 $40\ \text{kHz}$ 强度下, 超声 $8\ \text{min}$, 提取效率最好, 随着超声时间延长, 叶绿素 a 含量逐渐降低。叶绿素 a 对温度和光的敏感导致其不稳定, 随超声时间的延长, 因超声介质升温 and 光的作用而降解。杨洪芳等^[7] 研究认为随着时间延长, 叶绿素 a 提取率有下降趋势。因此, 在实际操作过程中, 需严格控制超声时间, 在使得藻细胞破碎率最高的同时避免叶绿素 a 的降解。在 $40\ \text{kHz}$ 强度超声时, 时间控制在 $6\ \text{min} \sim 8\ \text{min}$ 内效果较佳 (图 3)。

待超声波破碎藻细胞后, 溶剂浸入细胞后需要一段时间提取出叶绿素 a, 随着时间的延长, 叶绿素 a 含量先增加, 然后逐渐降低。其原因可能是: 藻细胞内的叶绿素酶分解叶绿素 a; 叶绿素 a

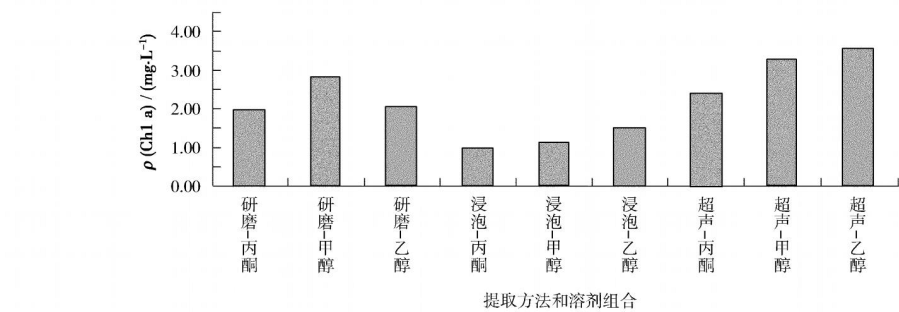


图 2 叶绿素 a 提取方法的比较

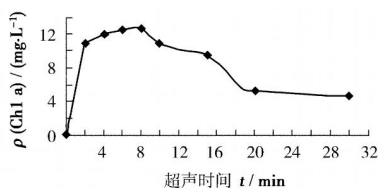


图 3 超声时间和提取效果

除了发生高温降解和光降解外,在室温下也会有暗降解。试验控制提取时间在 5 h ~ 6 h 内能较完全提取出叶绿素 a,同时降低叶绿素 a 的损失 (图 4)。

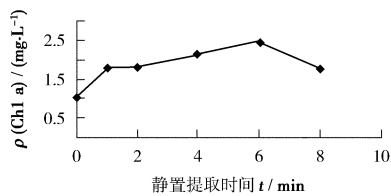


图 4 静置时间和提取效果

乙醇温度低导致萃取效率低,需延长萃取时间;温度高,叶绿素 a 则降解。试验控制温度应为 50 ~ 55 (图 5)。

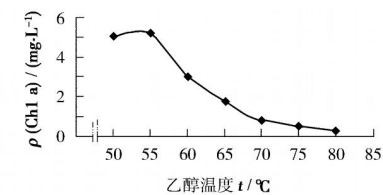


图 5 乙醇温度和提取效果

3 结论

分别将乙醇、甲醇和丙酮和研磨、单纯浸泡和超声提取方式组合试验,在此基础上优化了提取叶绿素 a 效率较高的乙醇 - 热浴超声法的操作条件。样品在乙醇 50 ~ 55 热浴、120 W 40 kHz 超声 6 min ~ 8 min,然后 5 h ~ 6 h 静置提取的条件下,可避免温度和光等因素所致叶绿素 a 提取过程中的降解。该方法提取的效果、花费的时间及相对简单的处理方式优于其他提取方法,适合大批量样品的监测分析。

[参考文献]

[1] 金相灿,屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范 [M]. 北京:中国环境科学出版社,1990.

[2] 张如美,孙晓斌. 对叶绿素 a 测定方法的改进 [J]. 环境监测管理与技术,2002,14(2): 31.

[3] SMON D, HELL WELL S. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae [J]. Water research, 1998, 32(7): 2220 - 2223.

[4] 陈宇炜,陈开宁,胡耀辉. 浮游植物叶绿素 a 测定的“热乙醇法”及其测定误差的探讨 [J]. 湖泊科学,2006,18(5): 550 - 552.

[5] SARTORY D. P, GROBBLEAAR J U. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis [J]. Hydrobiologia, 1984, 114: 177 - 187.

[6] 林少君,贺立静,黄沛生,等. 浮游植物中叶绿素 a 提取方法的比较与改进 [J]. 生态科学,2005,24(1): 9 - 11.

[7] 杨洪芳,丁峰元,陈德辉. 乙醇 - 超声法在浮游植物叶绿素 a 含量测定中的应用 [J]. 海洋渔业,2006,28(4): 309 - 313.