

海洋沉积物中光合色素的萃取方法研究

滕德强¹, 崔振昂¹, 杨楠¹, 江涛², 吕颂辉²

(1. 广州海洋地质调查局, 广东广州 510760; 2. 暨南大学赤潮与水环境研究中心, 广东广州 510632)

摘要 在前人研究的基础上, 结合国内外研究进展, 使用 HPLC 的色素分析技术, 从萃取剂的选择、样品干燥与否、静置时间以及超声方式等方面逐步优化沉积物中光合色素的萃取方法, 完善海洋沉积物中 18 种光合色素的前处理技术。

关键词 光合色素; 沉积物; 萃取; 高效液相

中图分类号 S931.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)31-10864-03

Research of Extraction Methods for Photosynthetic Pigments in Sediments

TENG De-qiang¹, CUI Zhen-ang¹, YANG Nan¹ et al (Guangzhou Marine Geological Survey, Guangzhou, Guangdong 510760)

Abstract Combined with the research progress both at home and abroad on the basis of previous studies, using HPLC pigment analysis technology, the sediments of the photosynthetic pigment extraction method, was optimized from the selection of extraction agent, dry samples or not, incubation time and ultrasonic method, etc. The marine sediments of 18 kinds of photosynthetic pigment preparation technology was improved.

Key words Photosynthetic pigments; Sediments; Extraction; HPLC

海洋沉积物中光合色素(藻类色素、其他植物色素、细菌色素)能表征特定生物的种类和来源, 作为一种重要的化学生物标志物, 即使埋藏到沉积物甚至发生某些变化后仍保留其源信息^[1]。在过去的几十年, 随着科学技术的发展, 海洋沉积物在地球化学、海洋科学等领域起着越来越重要的作用^[2-3]。

然而, 在沉积色素分析的过程中, 将色素从样品中定性、定量地提取到合适的溶剂中起着至关重要的作用。国内外有诸多学者对沉积色素的提取做过相关的研究。Zapata 等^[4]在探讨含吡啶组分的流动相分析方法时, 采用的萃取剂是浓度 95% 甲醇。Fuco 等^[3-4]建议不采用冷冻干燥, 应直接对样品进行萃取, 认为冷冻干燥会使沉积物中的一部分色素降解^[3-4]。Chen 等^[5]对沉积物提取色素时, 为了萃取更加完整, 加入萃取剂以后, 在 -20 °C 的冰箱中静置一夜(约 12 h)。Buffan-Dubau 等^[6]也对沉积色素的提取方法进行了研究, 但由于沉积物类型的多样性, 并没有适合所有类型沉积物的统一的色素提取方法^[7]。笔者在前人的基础上对 18 种沉积色素的提取方法进行了优化。

1 材料与方 法

1.1 样品采集 根据《海洋调查规范》的表层沉积物均采用抓斗式采泥器采集, 采样时间为 2011 年 4 月, 地点为东海海域(E122°45', N29°28'59.9", 2011 年 4 月在长江口采集的样品, za5 站位), 取 0~4 cm 厚的表层沉积物, 用锡纸小心包裹后用封口袋封装, 并且保存于 -20 °C 冰柜内。

1.2 HPLC 参数设置 光合色素 HPLC 方法参考 Zapata 等^[4]方法, 选择二元梯度洗脱程序, 2 个流动相分别为 A、B, 流动相 A 为甲醇: 乙腈: 吡啶(50: 25: 25, 体积比), 流动相 B

为甲醇: 乙腈: 丙酮(20: 60: 20, 体积比), 流动相配制完成后经过全玻璃过滤系统的过滤, 滤膜为 0.2 μm 的有机相过滤膜。其中, 流动相 A 中吡啶溶液的配制方法如下: 取 900 ml Milli-Q 水至 1 L 烧杯中, 加入 10 ml 醋酸和 20 ml 吡啶, 并且用磁力搅拌器搅拌(转速 1 500 r/m), 之后逐滴加入醋酸, 使 pH 达到 5.0, 再转移到 1 L 容量瓶中, 并用 Milli-Q 水定容至 1 L。在流动相 A 配制完成后, 一般选择在 14 d 内使用。

进样量为 100 μl, 柱温箱设置 25 °C, 保持柱温恒定, 二极管阵列检测器(DAD)检测波长为 430、440 和 450 nm, 设置带宽为 8 nm。荧光检测器(FLD)的激发吸收波长分别为 440 和 650 nm。梯度洗脱程序如表 1 所示, 整个洗脱程序的运行需要 47 min。在运行过程中系统流速始终是 1 ml/min。

表 1 HPLC 梯度洗脱程序

时间 min	流动相 A // %	流动相 B // %	流速 ml/min
0.00	0	100	1
22.00	40	60	1
28.00	95	5	1
39.00	95	5	1
39.10	0	100	1
47.00	0	100	1

1.3 试验方案 选用长江口的一个表层沉积物为研究对象, 把样品完全溶化后混匀, 分成等份, 每份 2 g(下述试验中均使用此等份样品), 冷藏备用。所有样品的萃取程序相同, 取出每份 2 g 样品, 加入萃取剂之后进行超声萃取, 然后冷冻静置一段时间, 离心后取上清液, 再把提取物经 0.45 μm PT-FE 滤膜(聚四氟乙烯滤膜)针筒过滤器过滤, 上机测定(每个条件下均有 3 个平行样)。所有操作均在弱光环境中进行, 以避免色素降解。

1.3.1 萃取剂的选择。 取出冷藏样品, 分别用 3 ml 浓度 80%、90%、95% 以及 100% 的丙酮和浓度 80%、90%、95% 以及 100% 的甲醇萃取。除了选取的萃取剂不同, 其余萃取程序过程相同, 萃取过滤后上机测定。

基金项目 国土资源公益性行业科研专项“典型海岸带地质环境监测关键技术与评价方法”(201011019-04); 国家自然科学基金项目(NO.41106090)。

作者简介 滕德强(1984-), 男, 安徽阜阳人, 助理工程师, 硕士, 从事海洋地质环境和水环境评价方面的研究。

收稿日期 2014-09-22

1.3.2 干法与湿法的比较。取出冷藏的备用样品,其中一半在 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥机里冷冻干燥,并且分别用 3 ml 浓度 95% 丙酮对冷冻干燥和非冷冻干燥的样品进行萃取,其余萃取程序过程相同,萃取过滤后上机测定。

1.3.3 静置时间的比较。取出冷藏备用样品,每份均加入 3 ml 浓度 95% 丙酮试剂,加入萃取剂之后避光冷藏保存 0、3、6、12、24 以及 36 h,再经离心、过滤等处理后,上机测定各色素含量。

1.3.4 探头超声与水浴超声对比。取出冷藏备用样品,每份均加入 3 ml 浓度 95% 丙酮试剂,加入萃取剂之后,分别对样品超声萃取。超声分为水浴超声和探头超声,其中水浴超声时间梯度为 2.5、5.0、7.5 和 10.0 min 4 个时段。探头超声时间梯度为 30、60、120 和 240 s 4 个时段。无论是探头超声还是水浴超声,在超声时均要在冰水混合物中进行,除了超声方式和超声时间另外设置外,其余萃取程序过程相同,萃取过滤后上机测定。

2 结果与分析

2.1 萃取剂的选择 由图 1~3 可知,在丙酮的 4 个梯度,除浓度 90% 丙酮对 19-Hex-fucoanthin 和 pheophytin a 以及浓度 100% 丙酮对叶绿素 a 的萃取效率略高于浓度 95% 丙酮萃取效率外,其他色素在浓度 95% 丙酮中萃取效果最好,其次是浓度 90% 丙酮、浓度 80% 丙酮与浓度 100% 丙酮萃取效果最差;在甲醇的 4 个梯度中,整体而言浓度 90% 甲醇的萃取效果最好,尽管青绿黄素、硅藻黄素、叶黄素以及叶绿素 a 和脱镁叶绿素 a 在浓度 100% 甲醇中萃取效果更好,浓度 95% 甲醇与浓度 100% 甲醇的萃取效果相当,但次于浓度 90% 甲醇的萃取效果,而浓度 80% 甲醇的萃取效果最差。通过对比丙酮和甲醇的提取效率,发现浓度 95% 丙酮在丙酮梯度中萃取效果最好,而浓度 90% 甲醇在甲醇梯度中萃取效果最好,但整体效果而言浓度 95% 丙酮要远胜于浓度 90% 甲醇的萃取效果(青绿黄素和硅甲藻黄素除外),尤其是紫黄素、叶绿素 a 等极性较强的色素,浓度 95% 丙酮的萃取效率远高于浓度 90% 甲醇。因此,该研究最终所选取的萃取剂为浓度 95% 丙酮。

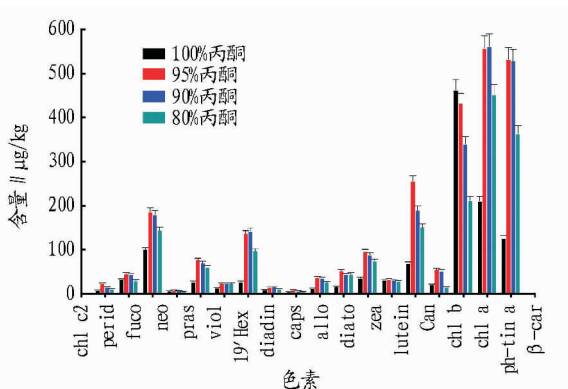


图 1 不同浓度的丙酮萃取效果

2.2 干法与湿法的比较 由图 4 可知,叶绿素 c2、叶绿素 a 以及紫黄素不采用冷冻干燥,直接进行萃取的效果要好,经干燥处理后这三种色素含量有一定的下降趋势,但其他色素

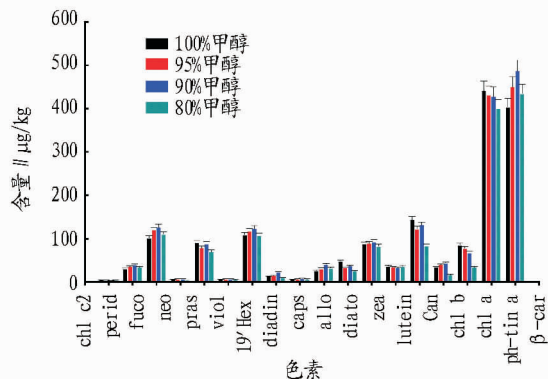


图 2 不同浓度的甲醇萃取效果

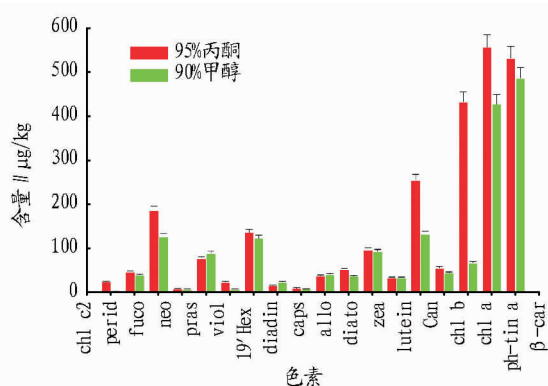


图 3 95% 丙酮与 90% 甲醇萃取效果比较

在冷冻干燥后萃取效果显著改善。叶绿素 c2、叶绿素 a 以及紫黄素经冷冻干燥后萃取效率降低的原因可能是它们极性较强,在冷冻干燥过程中接触到空气,发生氧化分解等降解反应。至于总体上冷冻干燥后样品的萃取效率远高于湿沉积物的直接萃取,原因可能是湿沉积物含有大量的水分,致使丙酮不易穿透水膜,沉积物里面的色素得不到完全的萃取。根据试验结果分析,该研究在沉积色素的前处理过程中采用冷冻干燥法处理样品。

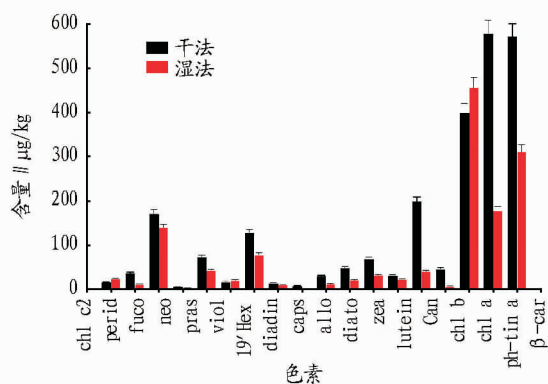


图 4 干法与湿法萃取效果比较

2.3 静置时间的比较 由图 5 可知,具有一定极性的叶绿素 c2、叶绿素 a、紫黄素和硅甲藻黄素在静置 12 h 时效果最好,超过 12 h 时检测到的色素含量明显降低。多甲藻黄素和新黄素在静置 6 h 时萃取效果最好,在静置 12 h 时色素含量降低,色素有所损失。玉米黄素静置 6 h 效果已达到最好,随着静置时间的增加,色素含量趋于平稳。而脱镁叶绿素 a 和

β 胡萝卜素在静置 24 h 时才达到最大值,其余色素如岩藻黄素、青绿黄素、19'-乙酞基氧化岩藻黄素、capsanthin、别藻黄素、硅藻黄素和叶绿素 b 等色素在静置 12 h 时效果已达最好,但超过 12 时叶绿素 c₂、叶绿素 a、紫黄素等出现降解现象,因此 12 h 是最理想的静置时间。

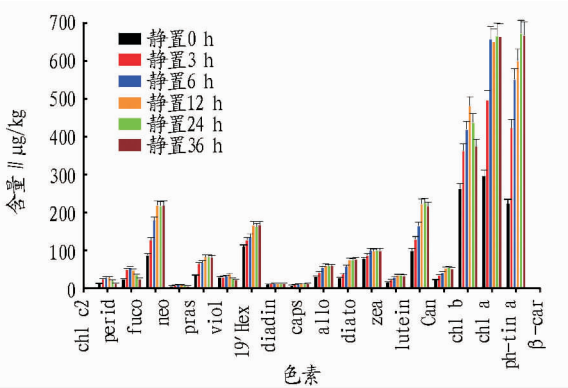


图5 不同色素静置时间比较

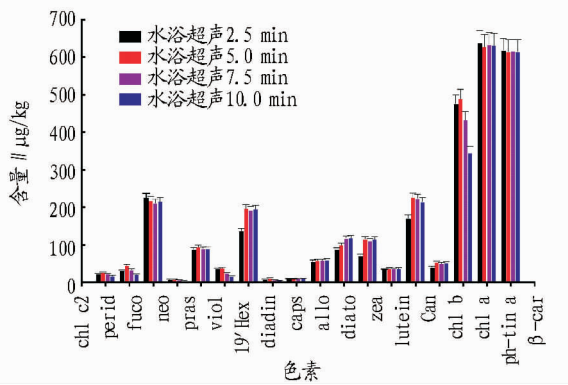


图6 不同色素水浴超声时间对比

2.4 探头超声与水浴超声对比 由图 6~8 可知,叶绿素 c₂、多甲藻黄素、新黄素、紫黄素、硅藻黄素以及叶绿素 a 等色素可能因为此色素具有一定的极性,随着水浴超声时间的延长,在水浴 5 min 时萃取效果最好,但超过 5 min 萃取效率降低;19'-乙酞基氧化岩藻黄素、玉米黄素、canthaxanthin 和叶绿素 b 在水浴 5 min 时效果最好,即使水浴时间延长,其含量也没有发生变化;硅藻黄素在水浴 7.5 min 时效果最好;而岩藻黄素、青绿黄素、capsanthin、别藻黄素、叶黄素、脱镁叶绿素 a 和 β 胡萝卜素受时间的影响较小,随着时间的增加其含量并没有增加或减少。整体而言,水浴 5 min 效果最好。在探头超声的试验中,同样是极性较强的色素在 30 s 时萃取效果最好,且随着时间的增加其含量降低,尤其是叶绿素 c₂、多甲藻黄素和叶绿素 a 色素含量降低较显著;而青绿黄素、capsanthin、别藻黄素、硅藻黄素、canthaxanthin、叶绿素 b、脱镁叶绿素 a 和 β 胡萝卜素等色素在探头超声 60 s 时效果最好,之后随着时间的增加其含量无变化;而岩藻黄素、19'-乙酞基氧化岩藻黄素、玉米黄素和叶黄素不受时间的影响,色素含量随时间的变化并没有发生明显的变化;从整体分析来

看,探头超声 60 s 时萃取效果最好。在水浴超声中 5 min 水浴超声效果最好,在探头超声中 60 s 探头超声效果最好;对二者进行比较,除个别色素外,5 min 水浴超声的效果远比 60 s 探头超声的效果要好。这可能是探头超声中的探头要与样品接触,并且在超声时空气会与样品接触,导致样品中的色素随探头拿出而损失或因空气的接触而降解。因此,该研究在前处理过程中选取超声萃取方式为水浴超声 5 min。

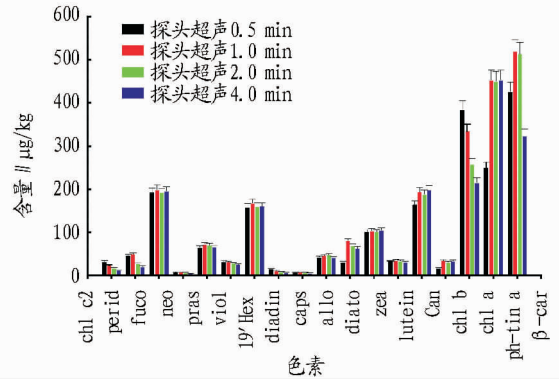


图7 不同色素探头超声时间对比

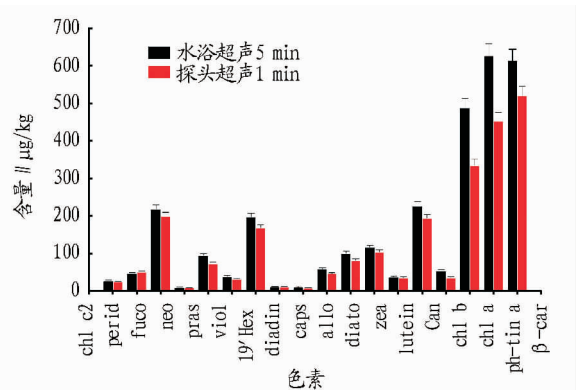


图8 水浴超声与探头超声结果比较

参考文献

- [1] MEYERS P A. Applications of organic geochemistry to paleolimnological reconstructions: A summary of examples from the Laurentian great lakes [J]. *Organic Geochemistry*, 2003, 34(2): 261-289.
- [2] HARRIS P G, ZHAO M, ROSELL MELE A, et al. Chlorin accumulation rate as a proxy for Quaternary marine primary productivity [J]. *Nature*, 1996, 383(6595): 63-65.
- [3] BIANCHI T S, ALLISON M A. Large-river delta-front estuaries as natural "recorders" of global environmental change [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2009, 106(20): 8085-8092.
- [4] ZAPATA M, RODRIGUEZ F, GARRIDO J L. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using reversed phase C8 column and phridine containing mobile phases [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 195: 29-45.
- [5] CHEN N H, BIANCHI T S, MCKEE B A, et al. Historical trends of hypoxia on the Louisiana shelf: application of pigments as biomarkers [J]. *Organic Geochemistry*, 2001, 32: 543-561.
- [6] BUFFAN-DUBAU E, CARN AN K R. Extraction of benthic microalgal pigments for HPLC analyses [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 204: 293-297.
- [7] BROTAS V, PLANTE-CUNY M R. The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities [J]. *Acta Oecologica*, 2003, 24 (S1): 109-115.