

分光光度法测定海水中叶绿素含量的研究

金霞, 金志芳, 孙光举, 陈曦

(龙岩市产品质量监督检验所, 福建 龙岩 364000)

摘要:近年来,海洋污染日益成为世界各国严重关切的问题。叶绿素 a 是环保部门监测水质状况的重要指标之一,可通过海水中叶绿素 a 浓度来估算海洋初级生产力。文章系统比较了三种常用有机萃取溶剂:90%丙酮、90%热乙醇、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)以及不同萃取时间对叶绿素 a 的萃取效果,结果显示 DMF 做萃取剂萃取较为完全,且所用时间短,其中测定的变异系数 RSD-DMF 为 2.9%,满足叶绿素 a 含量检测的要求。

关键词:叶绿素 a;分光光度法;DMF

Detection the Content of Chlorophyll in Seawater by Spectrophotometric Method

JIN Xia, JIN Zhi-fang, SUN Guang-ju, CHEN Xi

(Longyan Product Quality Supervision and Institute, Fujian Longyan 364000, China)

Abstract: Marine pollution became a global problem that all the countries were deeply concerned about in recent years. So chlorophyll a (Chla) was one of the important indicators of water quality monitored by the department of environmental protection. In addition, the content of Chla in seawater can also be taken as the estimation for the elementary productivity of ocean. By comparing with the 90% acetone, 90% ethanol and N,N-dimethylformamide(DMF), and the effect of extraitiom of chlorophyll a (Chla) at different times, the results of experiments indicated that the N,N-dimethylformamide (DMF) had an excellent extraction effect, coefficient of variability of DMF was 2.9%, and satisfied the requirement of the detection of chlorophyll content.

Key words: chlorophyll a; spectrophotometric method; DMF

近年来,海洋污染日益成为世界各国严重关切的问题^[1]。在我国由于污染导致海水水质恶化和海洋生态系统的严重破坏,大面积赤潮爆发等事件时有发生^[2-4],一些地区的海水污染成为制约海洋经济发展的重要因素。其中叶绿素 a 是广泛存在于藻类和植物体内的绿色色素,因此,叶绿素 a 不仅是海洋生态调查中必不可少的调查项目,而且还是测量最频繁的生化参数之一。

目前测定叶绿素 a 多采用分光光度法,分光光度法是基于物质分子对光具有选择吸收的特性而建立起来的分析方法,属于光度法的一种。分光光度法是比色法的发展,比色法只限于在可见光区,而分光光度法则可以扩展到紫外光区和红外光区,该方法被广泛应用于物质特性研究和定量分析领域。

大多数叶绿素含量的测定是通过分光光度计法得到的。叶绿素 a 的提取原理是利用有机溶剂渗透到细胞内,使叶绿素溶于其中,从而将叶绿素提取出来^[5]。常用的光合色素提取试剂有乙醇、丙酮、DMF 等。研究考察了 90%丙酮,乙醇,DMF 三种不同萃取溶剂对叶绿素的萃取效果。结果显示 DMF 做萃取剂提取完全,重现性好,满足叶绿素 a 含量检测的要求。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

DU-7400 型紫外-可见分光光度计,美国 Beckman 公司;0.7 μm Whatman GF/F 玻璃纤维滤膜,日本进口;台式离心机(800-1 型),江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;循环水式多用真空泵(SHB-III 型),郑州长城科工贸有限公司。

N,N-二甲基甲酰胺、丙酮、乙醇、碳酸镁,分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司;90%乙醇溶液:取 450 mL 乙醇,加入 50 mL 一次水混合均匀;90%丙酮溶液:取 450 mL 丙酮,加入 50 mL 一次水混合均匀;碳酸镁悬浊液(1%):称取 1.0 g 无水 MgCO₃于烧杯内,加水部分溶解后定容至 100 mL;实验用水为一次蒸馏水。

1.2 实验参数

Measurement type: Wavelength Scan; Start WL: 600 nm; End WL: 750 nm; Interval: 10.00sec; Read average time: 0.50sec.

1.3 实验原理

分光光度法测定叶绿素 a 含量的原理是:以有机溶剂直接提取浮游生物浓缩样中的叶绿素,测定其吸光度,根据叶绿素 a

在特定波长的吸光度,用公式计算其含量。

1.4 样品前处理

- (1)取富营养海水 1000 mL,等待抽滤;
- (2)过滤水样:在抽滤器上装好玻璃纤维滤膜,抽滤离心前在滤膜上滴加少量碳酸镁悬浊液,倒入定量体积的水样,抽滤;
- (3)过滤结束后用镊子将截留了藻类的滤膜从过滤器上取下来,向内侧折叠一次,并用滤纸覆盖在其上轻捏,以吸干滤膜上的水分,最后将滤膜放在带盖的培养皿中或其他容器中。

1.5 叶绿素不同提取方法的实验

(1)90%丙酮萃取分光光度法:该方法采用国家环境保护总局推荐的测试方法,将滤膜放入组织研磨器中,加入少量MgCO₃粉末和2~3 mL 90%体积分数丙酮水溶液浸泡研磨,以500 r/min的速度研磨1 min。将研磨后的浆液倒入带盖的离心管中,并用90%丙酮清洗组织研磨器,清洗液一并倒入离心管,最终将离心管中的萃取液准确加至10 mL,遮光放置。

(2)热乙醇萃取分光光度法:带样品的滤纸经过冰箱冷冻室冷冻12 h以上,取出后迅速用90%的热乙醇(80℃)于80℃热水浴萃取2 min,再用超声波清洗机超声振荡处理10 min,于暗处静置萃取24 h后,置于医用离心机中3500 r/min,离心30 min得上清液定容到10 mL,遮光放置。

(3)DMF萃取分光光度法:将抽滤后的样品放入具塞刻度的离心试管中,并不停摇动直至全部溶于DMF液中,然后在冰箱4℃下黑暗静置12 h,进行萃取,4000 r/min离心10 min,重复萃取两次,最终将离心管中的萃取液定容到10 mL,遮光放置。

1.6 叶绿素的提取时间实验

用以上三种纯溶剂做参比,分别取上述提取液在600~750 nm波长范围内扫描,确定其最大吸收峰的位置,每种溶剂做双样,每份样品测定3次,将3种提取液分别在0.5 h、1 h、2 h、3 h、6 h、12 h和24 h时取样,在其吸收峰相对应的波长下,测定其吸光度值,从而确定每种溶剂的最佳提取时间。

1.7 测定及数据处理方法

分别以相应的纯溶剂作为空白,扫描测定各种叶绿素提取液在600~750 nm的吸收光谱。

(1)90%丙酮法扫描波长750 nm,664 nm,645 nm和630 nm处的吸光度,叶绿素a结果计算公式为:

$$Chla = \left[\begin{matrix} 11.85 \times (E_{664} - E_{750}) \\ -1.54 \times (E_{647} - E_{750}) \\ -0.08 \times (E_{630} - E_{750}) \end{matrix} \right] \times V_{\text{丙酮}} / V_{\text{水样}} \cdot \delta \quad (1)$$

其中,Chla为丙酮法测定的叶绿素a含量(μg/L);E₇₅₀、

E₆₄₅、E₆₃₀、E₆₆₄分别为丙酮萃取液于波长750nm、664nm、645nm、630 nm的吸光度;V丙酮为丙酮萃取液的体积(mL);V水样为水样过滤的体积(L);δ为比色皿光程(cm)。

(2)由于90%体积分数乙醇的比吸光系数为87,而90%体积分数丙酮的比吸光系数为89,因此用式(1)乘以1.023(即89/87)得到如下式:

$$Chla = \left[\begin{matrix} 12.12 \times (E_{664} - E_{750}) \\ -1.58 \times (E_{647} - E_{750}) \\ -0.08 \times (E_{630} - E_{750}) \end{matrix} \right] \times V_{\text{乙醇}} / V_{\text{水样}} \cdot \delta \quad (2)$$

所示的计算公式;式中符号意义同前。

(3)DMF法扫描750 nm,664 nm,647 nm和630 nm下的测量吸光度,计算公式同公式(1)。

2 结果讨论

2.1 叶绿素提取液的吸收光谱

三种叶绿素提取液的吸收光谱见图1。

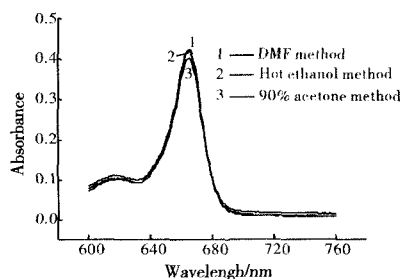


图1 不同提取液的吸收光谱

从图1可以看出,三种不同提取液的吸收光谱在扫描范围内基本相似,但是DMF法测的最高吸光度大于其余两种方法。

2.2 萃取溶剂的比较

叶绿素在海藻细胞结构中位于细胞质的叶绿体中,细胞壁内层是纤维素,外层是果胶质或藻胶质。所选溶剂最好能溶解或破坏细胞壁,使叶绿素溶出,而且不改变叶绿素的结构和性质。三种溶剂相比较,DMF挥发性较丙酮低,刺激性和蒸汽压也较低,渗透性较强。

2.3 萃取时间对结果的影响

在室温避光条件下用DMF法分别萃取1、2、3、6、9、16、24 h,以各萃取液原液为空白对照,在721型分光光度计上测量波段范围600~750 nm吸光度。测量结果如表1所示:

表1 不同提取液的叶绿素含量

提取溶剂	叶绿素含量/(μg/L)							
	1 h	2 h	3 h	6 h	9 h	16 h	24 h	叶绿素总量
90% 丙酮	0.21	0.225	0.231	0.249	0.261	0.273	0.291	0.3
	951	1126	1154	1247	1298	1392	1450	1500
热乙醇	0.229	0.237	0.251	0.263	0.271	0.292	0.293	0.31
	1113	1161	1214	1305	1321	1403	1412	1500
DMF	0.243	0.261	0.285	0.311	0.318	0.32	0.314	0.32
	1140	1257	1415	1461	1482	1500	1470	1500

参考文献

[1] 中药大辞典[M]. 上海:上海科技出版社,1985:951.
 [2] 中国药典 2005 版一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:380.
 [3] 周征,魏京京. 毛细管气相色谱法测定无极膏中薄荷脑、樟脑、水杨酸甲酯、冰片及麝香草酚的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(7):

1072 - 1074.

[4] 梁燕,李蓉. 三黄油中冰片的含量测定[J]. 时珍国医国药,2007,18(5):1132 - 1133.
 [5] 徐华,刘伟华,杨少芳. 气相色谱法测定肤康软膏中冰片的含量[J]. 中国医院药学杂志,2005,25(8):743 - 745.

(上接第 133 页)

不同提取溶剂提取叶绿素速度差异较大,提取完全程度也不同(表 1)提取速度最快的是 DMF,叶绿素经过 9 h 已经基本提取完全,滤纸变白。其次是 90 % 的丙酮,而 80 % 丙酮提取速度最慢,后两者在 24 h 内没有完全提取出叶绿素。从提取速度来看,DMF 要优于 90 % 乙醇和 80 % 丙酮。叶绿素 a 经 DMF 两小时就基本提取完全,大大加快了叶绿素提取速度。

2.4 三种萃取方法测定结果比较

表 2 为测量结果,在同一浓度培养藻类的 9 次平行水样,对三种方法所得的结果进行统计:

平均值: $X_{丙酮} = 1460 \mu\text{g/L}$; $X_{乙醇} = 1764 \mu\text{g/L}$; $X_{DMF} = 1850 \mu\text{g/L}$
 方差: $RSD_{乙醇} = 2.8\%$; $RSD_{丙酮} = 12.4\%$; $RSD_{DMF} = 2.9\%$
 标准差: $S_{乙醇} = 41.1$; $S_{丙酮} = 217.9$; $S_{DMF} = 52.9$

表 2 不同提取方法的叶绿素含量

萃取方法	1	2	3	4	5	6	7	8	9
90 % 丙酮法	1425	1488	1462	1387	1455	1532	1462	1484	1440
热乙醇法	1801	1557	1917	1730	1748	1610	2099	1414	1999
DMF 法	1811	1866	1837	1960	1765	1856	1853	1876	1830

比较叶绿素 a 含量测定的三种萃取方法操作过程可以看出,三种方法结果平均值具极显著差异,DMF 法测定的结果高于丙酮法和热乙醇法的结果,在统计意义上说明 DMF 法对浮游植物的叶绿素 a 萃取较为完全。

丙酮法测定结果低于热乙醇法和 DMF 测定的结果,说明丙酮法萃取不完全,测的数值偏低,萃取比较繁杂,其中样品研磨需花费一定的时间和精力,并且此过程还会有一定样品损失。乙醇法样品经过冷冻和快速热水浴提取,运用冷热差将浮游植物细胞破碎,再加上超声波的粉碎作用,细胞破碎效果较好,但由于乙醇溶液的性质决定了其萃取效率不高,同时热乙醇法方差远远大于其它两种萃取方法也说明该方法条件不好控制。另外,过高的温度还会破坏叶绿素 a,在操作时水浴温度(80℃)和热萃取时间(2min)的掌握十分困难,过高的温度破坏了叶绿素 a 而使测定结果偏低。而 DMF 性能稳定,蒸气压低,不易挥发,极性惰性溶剂,叶绿素在其中萃取完全且可稳定保存。

3 结论

叶绿素是水质监测的重要指标之一,采用简单、快速的方法

测定海水中活体藻类的叶绿素具有重大意义。采用分光光度法定量活体藻类强中叶绿素的浓度,萃取溶剂选取 DMF,方法采用直接浸取法,萃取时间确定为 9h。该方法提取较为完全,重现性好, $RSD = 2.9\%$, 满足叶绿素 a 含量检测的要求。

参考文献

[1] 金海龙. 基于荧光机理的海藻识别方法与实验研究[D]. 北京:燕山大学,2005.
 [2] 吴瑞贞,马毅. 近 20a 南海赤潮的时空分布特征及原因分析[J]. 海洋环境科学,2008,27(1):30 - 32.
 [3] 孙伟,王诗成. 山东半岛海域赤潮灾害研究[J]. 齐鲁渔业,2008,25(4):58 - 60.
 [4] 蔡励勋. 厦门海域赤潮发生规律初探[J]. 福建水产,2008,2:75 - 79.
 [5] 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,2002,15(2):31.