

丙酮萃取分光光度法测定水中叶绿素 a 实验条件的优化

李旭冉, 梅鹏蔚, 王琳, 姜伟

(天津市环境监测中心, 天津 300191)

摘要:基于丙酮萃取分光光度法,对叶绿素 a 测定方法进行深入研究,并通过单因素重复试验对冻存时间、冻存温度、萃取时间、萃取温度、细胞破碎方式、萃取剂浓度及萃取混合液提取方式等 7 方面的测定条件进行优化。优化后的实验条件为:水样经过抽滤后,置于 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中冻存 12 h 后取出,在常温下加入分析纯丙酮,用力振摇 2 min 至滤膜充分粉碎后定容到 10 mL,静置不超过 0.5 h,在离心机内以 4000 r/min 的速度离心,取上清进行比色。

关键词:叶绿素 a;丙酮萃取;分光光度法

中图分类号:O657.32

文献标识码:B

文章编号:1674-6732(2016)03-0025-03

Optimization of the Experimental Parameters in the Determination of Chlorophyll-a in Water using Acetone Extraction Spectrophotometry

LI Xu-ran, MEI Peng-wei, WANG lin, JIANG Wei

(Tianjin Environmental Monitoring Center, Tianjin 300191, China)

Abstract:Based on acetone extraction spectrophotometry, the determination of chlorophyll-a was investigated in depth. Seven experimental parameters were optimized through single factor repeat experiments, including freezing time, extraction time and temperature, cell lysis approaches, extractant concentrations and extraction approaches. The optimized experimental procedures were as follows. Water samples were filtered and stored at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 12 h. The samples were then allowed to restore to room temperature before adding acetone and shaken vigorously for 2 min until the membrane was crushed completely. Samples were diluted to 10 mL and rested aside for less than 0.5 h. Finally, the samples were centrifuged at 4000 r/min and taken the supernatant for colorimetry.

Key words: Chlorophyll-a; Acetone extraction; Spectrophotometry

在养料丰富、流动缓慢的水中,浮游植物的大量繁殖及死亡是水体富营养化、水生生态系统失衡的主要诱因^[1-3]。叶绿素 a 含量是反应浮游植物生物量和初级生产力水平最直接有效的指标^[1]。故叶绿素 a 含量可作为评价湖泊富营养化的指标之一。

叶绿素 a 的测定方法主要有高效液相色谱法、荧光光度法和分光光度法等。环境领域应用最广的是丙酮萃取分光光度法^[4]。该法灵敏度高,仪器设备简单,操作也简便。但存在在反复研磨过程中叶绿素 a 易发生光解,丙酮极易挥发并污染环境,浸提保存的时间和温度规定范围过于宽泛,具体操作的约束条件不够严格统一等问题,从而易引入较大误差,影响测定结果的准确性^[5]。已有研究显示,用丙酮萃取叶绿素 a,不同的萃取时间、萃

取剂配比、萃取温度以及过滤方式均对叶绿素 a 的测定结果有影响^[6-8]。因此,对丙酮萃取分光光度法分析叶绿素 a 的实验条件进行优化,对于提高测定结果的准确性具有重要的现实意义。

1 实验部分

1.1 实验仪器及试剂

DR6000 型分光光度计(美国哈希);LD4-8 型低速离心机(雷勃尔);DJP-2001-1 型真空泵(北京国环高科自动化技术研究所);GLC-6 型多联不锈钢过滤器(北京国环高科自动化技术研究所);组织匀浆器;乙酸钠纤维滤膜(孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$)。

收稿日期:2015-10-18;修订日期:2016-03-21

作者简介:李旭冉(1985—),男,工程师,硕士,主要从事环境监测工作。

碳酸镁粉末,丙酮(分析纯)。

1.2 样品采集

按照国家地表水相关水样采集技术规范采集水样。采样地点为天津市水上公园东湖,每批样品采集不少于5个平行样,单个水样体积不少于1L,采样后立即加入1%的碳酸镁试液固定,并在4h内进行制样。

1.3 样品制备

通过抽滤,将水样中的浮游植物浓缩于乙酸纤维素滤膜上后,将带有浮游植物的滤膜冻存一定时间,取出滤膜,在90%丙酮中通过研磨、静置等方式提取叶绿素 a,然后通过离心、过滤等方式纯化萃取液,将上清液汇入容量瓶中定容后待测。

1.4 样品测定

将上清液置于1 cm光程的比色皿中,分别读取750,663,645和630 nm波长处的吸光度,并以90%的丙酮作空白吸光度测定,对样品吸光度进行校正。根据文献[9]计算水中叶绿素 a 质量浓度。

2 实验条件的优化

2.1 冻存时间

同批次采集30个平行样,随机分为6组,分别在-25℃冻存0,6,12,24,48和72 h,测得叶绿素 a 的结果见图1。由图1可见,冻存12 h叶绿素 a 的测定结果最大,标准偏差最小。这是因为冻存12 h,滤膜中剩余的水分已大部分升华,而浮游植物细胞的酶解反应尚未明显增强,故而对叶绿素 a 提取量的影响较小。因此,确定冻存时间为12 h。

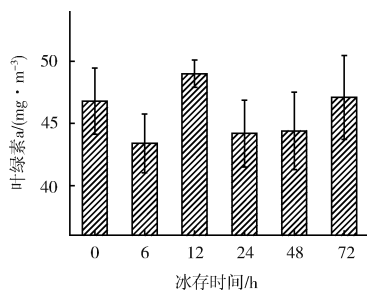


图1 不同冻存时间下叶绿素 a 的测定结果

2.2 冻存温度

同批次采集15个平行样,随机分为3组,分别在-16,-20和-25℃冻存6 h,叶绿素 a 测定结果见图2。由图2可见,样品在-25℃冻存比在-16和-20℃冻存,叶绿素 a 的测定值更高,标准偏

差更小。这是由于-25℃滤膜中浮游植物细胞内的酶活性被进一步抑制,酶解反应进一步减缓,减少了叶绿素 a 的损失。说明在更低温度下进行样品的冻存有助于得到更加满意的叶绿素 a 提取结果。故选择冻存温度为-25℃。

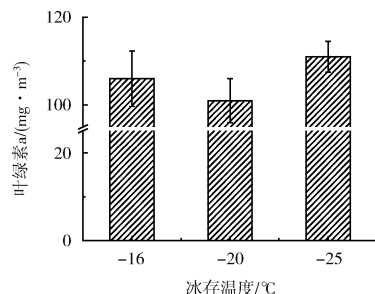


图2 不同冻存温度下叶绿素 a 的测定结果

2.3 萃取时间

同批次采集25个平行样,随机分为5组,分别在常温条件下用90%丙酮萃取10 min,0.5,1,2和4 h,叶绿素 a 测定结果见图3。由图3可见,当萃取时间在0.5 h以内时,测定结果相对稳定,标准偏差较小;当萃取时间超过0.5 h后,样品中叶绿素 a 的提取量明显降低,其测定结果也越来越不稳定,标准偏差均较大。故萃取时间不宜超过0.5 h。

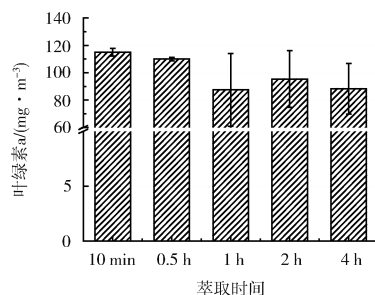


图3 不同萃取时间下叶绿素 a 的测定结果

2.4 萃取温度

同批次采集10个平行样,随机分为2组,分别在常温[(20±5)℃]和50℃水浴条件下用90%丙酮萃取10 min,测定结果见表4。由表4可见,常温下叶绿素 a 的测定值更高,相对标准偏差更小。说明升高萃取温度并不能提高叶绿素 a 的萃取效率,相反,萃取温度升高到50℃左右时,会加速丙酮的挥发,并破坏叶绿素 a 的分子结构,降低方法的稳定性。故确定萃取温度为常温,即(20±5)℃。

表4 不同萃取温度下叶绿素 a 的测定结果

萃取温度	测定值/(mg·m ⁻³)					平均值/ (mg·m ⁻³)	相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5		
常温	106	115	113	108	114	111	3.5
50℃	113	98.2	95.2	111	95.6	103	8.6

2.5 细胞破碎方式

同批次采集 15 个平行样,随机分为 3 组,分别采用组织匀浆器研磨、大功率超声仪超声处理 30 min 和盖严盖子后在比色管中用力振摇 2 min 3 种方式进行细胞破碎,叶绿素 a 测定结果见表 5。由表 5 可知,3 种细胞破碎方式所得结果无明显差异,相对标准偏差均 < 5%,表明 3 种细胞破碎方式均具有较高的方法稳定性及精密度。只处理一个样品时,超声法耗时最长,手摇振荡法最短,组织匀浆器法操作更加剧烈,易使溶剂飞溅,造成玷污。因此,当样品量较少时,手动振荡 2 min 方式最省时,当样品量较大时,超声 30 min 更便于对样品进行批量处理。

表5 不同细胞破碎方式下叶绿素 a 的测定结果

细胞破碎方式	测定值/(mg·m ⁻³)					平均值/ (mg·m ⁻³)	相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5		
组织匀浆器	7.60	5.69	5.11	6.23	6.50	6.22	0.9
超声 30 min	5.94	7.94	6.40	5.28	5.55	6.13	3.6
手摇振荡 2 min	5.78	4.83	8.23	7.66	7.25	6.75	1.4

2.6 萃取剂浓度

同批次采集 10 个平行样,随机分为 2 组,分别以 90% 丙酮溶液和分析纯丙酮作为萃取剂,二者对应叶绿素 a 的测定结果无明显差异(见表 6)。由此可推知,在对水中浮游植物体内的叶绿素 a 进行提取时,二者在萃取效率、萃取体系的稳定性等方面均比较接近。因此,可以尝试以分析纯丙酮代替 90% 丙酮对此类样品进行叶绿素 a 的提取。

表6 不同萃取剂浓度下叶绿素 a 的测定结果

萃取剂	测定值/(mg·m ⁻³)					平均值/ (mg·m ⁻³)	相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5		
90% 丙酮	7.60	5.69	5.11	6.23	6.50	6.63	8.9
分析纯丙酮	6.66	7.25	6.94	7.08	6.28	6.84	5.6

2.7 萃取液提取纯化方式

同批次采集 10 个平行样,随机分为 2 组,分别

通过 4 000 r/min 离心和 0.45 μm 滤膜过滤的方式得到萃取物上清液,对应叶绿素 a 测定结果见表 7。由表 7 可见,滤膜过滤法的相对标准偏差更大 (> 10%),这说明通过 0.45 μm 滤膜滤去萃取体系中残渣的方式较不稳定。这可能是由于滤膜中的某些物质与丙酮溶剂相互作用,使滤膜部分溶解,使进行比色的滤液浊度明显增高而导致的。

表7 不同萃取液纯化方式下叶绿素 a 的测定结果

萃取液纯化方式	测定值/(mg·m ⁻³)					平均值/ (mg·m ⁻³)	相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5		
离心	40.7	37.3	43.3	42.8	40.4	40.9	5.8
滤膜过滤	41.6	34.4	45.6	37.5	35.4	38.9	11.9

3 结果讨论

叶绿素 a 测定值的偏低主要由叶绿素 a 的降解引起。当细胞完全干燥时,引起降解的因素主要为光解和酶解^[10]。通常状态下,叶绿素酶是一种潜状态酶,这种潜状态是由叶绿素酶与其底物叶绿素在空间位置上的隔离造成的^[11]。当浮游植物细胞在体外尚未完全干燥时,过量的活性氧会加重细胞膜脂的过氧化程度和膜通透性,从而破坏这种“隔离”。“隔离”的崩坏促使叶绿素酶催化叶绿素及其衍生物侧链酯键进行水解,从而开启叶绿素酶促降解代谢过程^[12]。

含叶绿素 a 的滤膜在经过抽滤和冻存后,仍含有少量的水分,在后续处理(如细胞破碎、萃取等)中发挥作用,使部分叶绿素降解,从而降低测定结果的准确性。这一影响会在样品低温干燥时,因水分随着时间的延长逐渐升华而逐渐减弱。与此同时,随冻存时间的延长,受酶解反应影响,冻存中的浮游植物的组织细胞结构越来越不稳定,其所含的叶绿素 a 损失量也越来越多。故叶绿素 a 的提取量主要受冻存温度和冻存时间的共同影响。

基于以上研究可知,优化细化操作步骤和实验条件可以有效提升丙酮萃取分光光度法测定叶绿素 a 的提取效率,增加方法的稳定性。

4 结语

通过单因素重复试验的方式,基于丙酮萃取分光光度法,在冻存时间、冻存温度、萃取时间、萃取温度、细胞破碎方式、萃取剂浓度、萃取液分离提纯方式等 7 个方面对叶绿素 a 测定方法进行了深入

(下转第 42 页)

- 235.

- [6] LI L, WAN N, GAN N Q, et al. Annual dynamics and origins of the odorous compounds in the pilot experimental area of Lake Dianchi, China [J]. *Water Science and Technology*, 2007, 55(5):43-50.
- [7] 范苓, 秦宏兵, 张晓赟. 顶空固相微萃取-气相色谱/质谱法同时测定富营养化水体中9种异味物质[J]. *江南大学学报(自然科学版)*, 2014, 13(3):355-359.
- [8] 齐敏, 孙小雪, 邓绪伟. 太湖不同形态异味物质含量、相互关系及其与环境因子关系的探讨[J]. *湖泊科学*, 2013, 25(1):31-38.
- [9] WATSON S. B. Cyanobacterial and eukaryotic algal odour compounds: signals or by-products? A review of their biological activity [J]. *Phycologia* 42(4):332-350
- [10] SMITH J L, GREGL B, ZIMMER P V. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites Impacts and management alternatives in aquaculture [J]. *Aquaculture*, 2008, 280:5-20.
- [11] WATSONS B, RIDAL J, BOYER G L. Taste and odor and cyanobacterial toxins: impairment, prediction, and management in the Great Lakes[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2008, 65:1779-1796.
- [12] 申哲民, 张涛, 马晶. 富营养化与温度因素对太湖藻类生长的

影响研究[J]. *环境监控与预警*, 2011, 3(2):1-4.

- [13] 王亚超, 徐恒省, 王国祥. 氮、磷等环境因子对太湖微囊藻与水华鱼腥藻生长的影响[J]. *环境监控与预警*, 2013(1), 7-10.
- [14] 李钦钦, 邓建才, 胡维平, 等. 太湖金墅湾水源地浮游植物群落结构及其与环境因子的关系[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(7):1844-1850.
- [15] 朱春伟, 张锡辉, 王凌云. 水源藻类和底泥对典型臭味物质的耦合影响[J]. *中国给水排水*, 2008, 24(5):14-17.
- [16] TUNG S C, LIN T F, YANG F C, et al. Seasonal change and correlation with environmental parameters for 2-MIB in Feng-Shen Reservoir, Taiwan [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2008, 145:407-416.
- [17] UWINS H K, TEASDALE P, STRATTON H. A case study investigating the occurrence of geosmin and 2-methylisoborneol (MIB) in the surface waters of the Hinze Dam, Gold Coast, Australia [J]. *Water Science and Technology*, 2007, 55(5):231-238.
- [18] WESTERHOFF P, RODRIGUEZ-HERNANDEZ M, BAKER L, et al. Seasonal occurrence and degradation of 2-methylisoborneol in water supply reservoirs [J]. *Water Research*, 2005, 39:4899-4912.

(上接第27页)

探讨。建议采用如下途径进行叶绿素 a 的测定:水样经过抽滤后,置于 -25℃ 低温冰箱中冻存 12 h 后取出,在常温下加入分析纯丙酮,用力振摇至滤膜充分粉碎后定容到 10 mL,静置不超过 0.5 h,在离心机内以 4000 r/min 的速度离心,取上清液进行比色。

手动剧烈振摇对滤膜中浮游植物细胞进行破碎,在样品量较少的情况下有效的提高了试验效率。

优化后的实验条件有效降低了滤膜中残存水分及所含杂质对叶绿素 a 测定的影响。后续研究,将尝试以冻干机内的快速冷冻干燥替代冰箱内冻存的步骤,进一步提高叶绿素 a 的提取效率。

[参考文献]

- [1] 万修志. 提取测定淡水早中叶绿素 a 的方法研究[D]. 山东建筑大学, 2013.
- [2] 闰海, 潘纲, 张明明. 微囊藻毒素研究进展[J]. *生态学报*, 2002, 22(11):1968-1975.
- [3] INGRID C, JAMIE B. Toxic cyanobacteria in water[M]. Lon-

don and New York: E & FN Spon Publisher, 1999.

- [4] 翁笑艳, 林美爱, 颖颖. 地表水浮游植物叶绿素 a 测定方法比较研究[J]. *中国环境监测*, 2009, 25(3):36-38.
- [5] 杨玉珍, 夏未铭, 杨瑾, 等. 水体中叶绿素 a 测定方法的研究[J]. *中国环境监测*, 2011, 27(5):24-27.
- [6] 洪法水, 魏正贵, 赵贵文, 等. 金属叶绿素 a 配位结构的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(3):381-387.
- [7] 丁红兵. 新型超声波克藻技术治理水环境[J]. *建设科技*, 2006(13):52-53.
- [8] 施建乐, 朱明新, 蒋皎梅, 等. 海洋硅藻叶绿素 a 测定方法的改进[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(23):14233-14234, 14252.
- [9] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002:722-723.
- [10] 陈科伟. 青花椒干燥时叶绿素的酶降解机理及其护色技术的研究[D]. 西南大学, 2012.
- [11] 甘志军, 王晓云. 叶绿素酶的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2002, 6(S1):21-24.
- [12] 唐学玺, 颜挺近, 李永祺. 久效磷对扁藻的损伤作用 I. 扁藻细胞的活性氧伤害作用[J]. *应用生态学报*. 1998, 9(6):627-630.