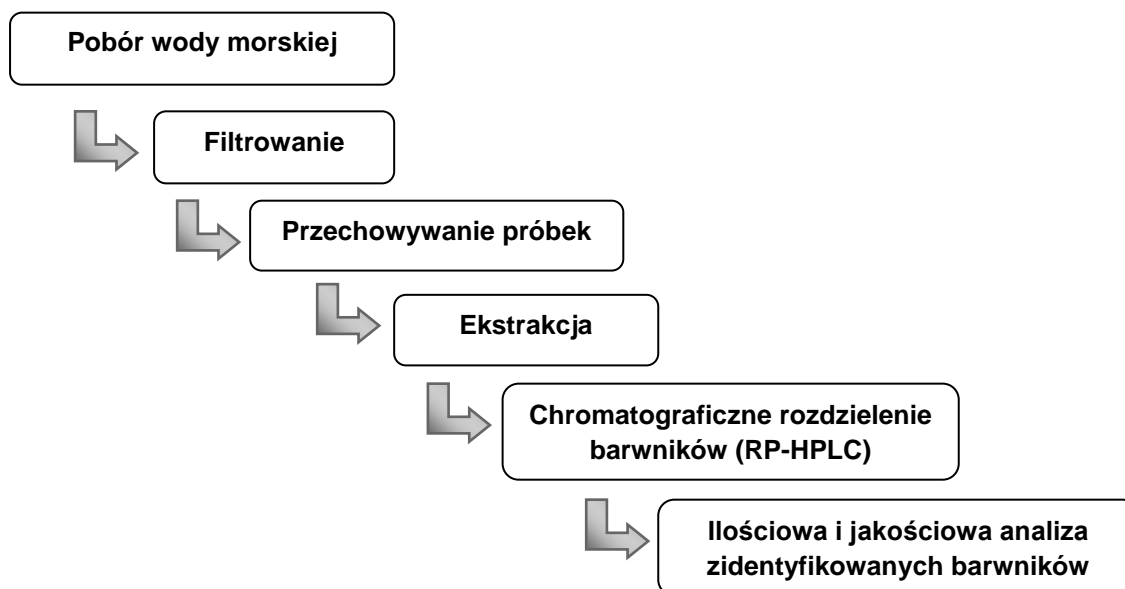


Wyznaczanie koncentracji chlorofili i karotenoidów akcesoryjnych w próbkach fitoplanktonu metodą chromatograficzną (RP-HPLC)

źródło: Joanna Stoń-Egiert "Szczegółowy opis stosowanych procedur metodycznych i pomiarowych w celu wyznaczenia fizycznych i biogeochemicznych charakterystyk wody morskiej", raport naukowy opracowany w ramach projektu UDA-POIG.01.01.02-22-011/09 *Satelitarna Kontrola Środowiska Morza Bałtyckiego (SatBałtyk)*, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, archiwum projektu SatBałtyk, IO PAN, 37 pp.

Na schemacie (rys.1) przedstawione zostały kolejne etapy przygotowania próbek wody morskiej w celu określenia zawartości chlorofili i karotenoidów przy wykorzystaniu metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej RP-HPLC. W zamieszczonych poniżej podrozdziałach opisane zostały kolejne kroki metodyczne.



Rys.1. Schemat przygotowania próbek wody morskiej do analiz zawartości chlorofili i karotenoidów w próbkach fitoplanktonu bałtyckiego.

Pobór wody morskiej. Wodę morską należy pobrać z powierzchni i dodatkowych głębokości batometrem (w IO PAN wykorzystywany jest batometr typu SBE 32). Wybór głębokości poboru próbek jest uzależniony od aktualnej sytuacji biologicznej i hydrologicznej w rejonie badań. Najczęściej woda pobierana jest z 5 poziomów uwzględniających zmiany w głębokowodnym rozkładzie materii organicznej (ocenianej na podstawie pomiarów flourymetrycznych).

Filtrowanie. Filtrowanie wody morskiej powinno być przeprowadzone natychmiast po jej poborze, przez sączi z włókna szklanego GF/F (Whatman) o średnicy $\phi = 25$ mm pod ciśnieniem nie przekraczającym 0.4 atm, gdyż większe mogłyby spowodować zniszczenie komórek fitoplanktonu. Czas od poboru wody do zakończenia filtracji nie powinien przekraczać 1 godziny. Objętość filtrowanej wody morskiej jest uzależniona od zawartości zawiesiny organicznej, zwykle w wodach bałtyckich filtruje się objętości od 0.2 do 2 dm³. Po zakończonej filtracji należy usunąć nadmiar wody morskiej pozostałej w materiale sączi (poprzez położenie sączi na bibule). Następnie sączi należy złożyć (materiałem biologicznym do środka), zawinąć w kartkę z opisem i folię aluminiową opisaną w sposób umożliwiający jednoznaczny identyfikację i zamrozić w ciekłym azocie (-196 °C).

Przechowywanie próbek. Pobrane w ten sposób próbki fitoplanktonu należy przechowywać w ciekłym azocie (-196 °C, dewar) lub w warunkach głębokiego mrożenia (-80 °C) do czasu podjęcia analiz laboratoryjnych.

Ekstrakcja. Pigmenty są ekstrahowane z komórek fitoplanktonu przy użyciu 90% wodnego roztworu acetonu (Strickland i Parsons 1972, Parsons i in. 1984). Zamrożone sączi należy umieścić w plastikowych fiolkach i zalać 3 cm³ 90% acetonu. Proces ekstrakcji powinien przebiegać w ciemności w temperaturze 4 °C przez 2 godziny. Barwniki są ekstrahowane z komórek glonów poprzez homogenizację mechaniczną (rozcieranie sączi szklaną bagietką w obecności rozpuszczalnika) wspomaganą ultradźwiękami (2 min, 20 kHz). Do tego celu w IO PAN wykorzystywany jest sonikator Cole Parmer, 4710 Series. Następnie, ekstrakt należy odwirować (20 min., 5 °C, 4000 rpm, w IO PAN wykorzystywana jest wirówka Beckman, GS-6R) w celu usunięcia cząstek filtrów i pozostałości komórkowych. Tak oczyszczony ekstrakt jest poddawany analizie chromatograficznego rozdzielania barwników metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej RP-HPLC.

Chromatograficzne rozdzielanie barwników (opis metodyki i aparatury wykorzystywanej w analizach przeprowadzanych w IO PAN).

Pigmenty są rozdzielane przy zastosowaniu techniki RP-HPLC, czyli wysokosprawnej chromatografii cieczowej odwróconych faz - powszechnie wykorzystywanej do analiz próbek środowiskowych, w których badane związki charakteryzują się szerokim zakresem polarności.

Aparatura

System chromatograficzny HP1200 (Agilent, Perlan Technologies) wykorzystywany do izolacji i separacji barwników jest wyposażony w: pompę z degazerem (nr kat. G1354A), detektor absorpcji z matrycą diodową (nr kat. G1315D), detektor fluorescencji (nr kat. G1321A), autosampler (nr kat. G1329A) z termostatem (nr kat. G1330B). Do rozdzielania barwników wykorzystywane są kolumny analityczne typu C₁₈ - LichroCART™ LiChrospher™ 100 RP18e (Merck) o wymiarach zewnętrznych 250 x 4 mm, rozmiarze ziarna 5 μm i porów 100 Å. Kolumna jest połączona z systemem chromatograficznym poprzez prekolumnę zawierającą takie samo wypełnienie jak kolumna.

Warunki chromatograficznego rozdzielania barwników

Oczyszczony ekstrakt jest mieszany z reagentem tworzącym pary jonowe (1 M octanem amonu) w proporcjach 1:1 (500 μl ekstraktu + 500 μl 1 M octanu amonu) 1 min przed naniesieniem na kolumnę. Obecność 1 M octanu amonu zarówno w próbce jak i w fazie ruchomej jest rekomendowana przez wielu badaczy, gdyż poprawia separację pigmentów i zmniejsza dysocjację izolowanych związków (Mantoura i Llewellyn 1983; Wright i in. 1991). 100 μl tak przygotowanego roztworu jest poddawane analizie chromatograficznego rozdzielania barwników.

Jako faza ruchoma wykorzystywane są rozpuszczalniki organiczne: aceton i metanol, oraz dodatkowo 1 M octan amonu – odpowiednio przygotowywane przed analizami (filtrowane i odpowietrzone). Separacja barwników jest przeprowadzana przy zmiennym w czasie składzie wymienionych rozpuszczalników i przy stałej prędkości przepływu wynoszącej 0.8 cm³min⁻¹. Ich skład zmienia się w następujący sposób: 100% mieszaniny składającej się z metanolu i 1 M octan amonu (zmieszanych w proporcjach objętościowych 80% : 20%) przechodzi w liniowym gradiencie w 100% mieszaniny składającej się metanolu i acetonu (zmieszanych w proporcjach objętościowych 60% : 40%) w czasie 10 minut i tak trwa do końca analizy. Czas pojedynczego rozdziału wynosi 32 minuty. Układ chromatograficzny osiąga stan równowagi po 10 minutach od zakończenia analizy. Przedstawiona procedura izolacji barwników została wprowadzona przez Mantoura i współpracowników (Mantoura i Llewellyn 1983), a w latach późniejszych - zaadoptowana i zmodyfikowana przez innych badaczy (Barlow i in. 1993; Stoń i Kosakowska 2002, Stoń-Egiert i Kosakowska 2005).

Detekcja pigmentów opiera się na pomiarze absorpcji w $\lambda = 440$ nm. Dodatkowo, podczas każdej analizy detektor 'dad' skanuje widmo w zakresie 350 – 700 nm w sposób ciągły z krokiem 1 nm i rozdzielczością czasową 0,4 sek. Równoległe prowadzony jest pomiar fluorescencji z parametrami wzbudzenia $\lambda_{ex} = 431$ nm i emisji $\lambda_{em} = 660$ nm, co pozwala na potwierdzenie obecności chloropigmentów w analizowanej próbce.

Wzorce barwników i kalibracja metody HPLC

Kalibracja stosowanej metody i systemu chromatograficznego została przeprowadzona na bazie komercyjnie dostępnych wzorców barwników (The International Agency for ¹⁴C Determination DHI Institute for Water and Environment w Danii). Lista wzorców chlorofili i karotenoidów izolowanych z monokultur referencyjnych, w których pełnią rolę chemotaksonomicznych markerów, zamieszczona została w tabeli 1.

Ilościowa i jakościowa analiza zidentyfikowanych barwników

Jakościowa analiza barwników polega na identyfikacji eluowanego związku poprzez porównanie jego czasu retencji i widma absorpcji z wzorcowymi oraz poprzez ko-elucję z odpowiednim wzorcem (Wright i Shearer 1984). Ilościowa analiza barwników zidentyfikowanych w ekstrakcie z próbki pochodzenia naturalnego jest oparta na wykorzystaniu równania tzw. 'zewnętrznej standaryzacji' (Mantoura i Repeta 1997) łączącego dane uzyskane w chromatograficznym rozdzielaniu barwników i dane związane z poborem i przygotowaniem próbki do analizy.

Ma ono poniższą postać:

$$C_i = \frac{A_p f_p v_{ext} 10^3}{v_{inj} v_{filt} B}$$

gdzie:

C_i – stężenie analizowanego barwnika [ng dm^{-3}],

A_p – pole powierzchni pod pikiem [mAU s],

f_p – nachylenie krzywej wzorcowej, tzw. 'współczynnik odpowiedzi' [ng (mAU s)^{-1}],

v_{filt} ; v_{ext} ; v_{inj} – objętości kolejno: filtrowanej wody morskiej [dm^3], rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji [cm^3], ekstraktu naniesionego na kolumnę chromatograficzną [μl],

B – współczynnik rozcieńczenia ekstraktu buforem (<1), wartość bezwymiarowa. Jest równy stosunkowi objętości rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji do sumy objętości rozpuszczalnika i objętości buforu dodanego do próbki przed naniesieniem na kolumnę.

Wykorzystywana metoda pozwala na rozdzielanie chlorofili i karotenoidów występujących w próbkach naturalnych z precyzją $2,9\% \pm 1,5\%$ i powtarzalnością wynoszącą $9,7\% \pm 6,4\%$ (Stoń-Egiert 2007).

Tabela 1. Lista wzorców barwników izolowanych z monokultur referencyjnych lub syntetycznych pochodzących z The International Agency for ¹⁴C Determination DHI Institute for Water and Environment w Denmark wykorzystanych do kalibracji metody HPLC wykorzystywanej w analizach wykonywanych w IO PAN.

Lp	Barwnik	Źródło pochodzenia	Lp	Barwnik	Źródło pochodzenia
1	19'but-fukoksantyna	<i>Pelagophyceae</i>	18	diwinył chlorofil <i>a</i>	<i>Prochlorococcus sp.</i>
2	19'hex-fukoksantyna	<i>Prymnesiophyceae</i>	19	[3,8-diwinył]- protochlorofylid (Mg DVP)	<i>Prasinophyceae</i>
3	α-karoten	<i>Cryptophyceae</i>	20	echinenon	<i>Cyanophyceae</i>
4	α-kryptoksantyna	syntetyczny	21	feofityna <i>a</i>	<i>Prymnesiophyceae</i>
5	afanizofil	<i>Cyanophyceae</i>	22	feoforbid <i>a</i>	<i>Bacillariophyceae</i>
6	alloksantyna	<i>Cryptophyceae</i>	23	fukoksantyna	<i>Bacillariophyceae</i>
7	anteraksantyna	<i>Chlorophyceae</i>	24	gyroxanthin-diester	<i>Dinophyceae</i>
8	(3S,3'S)-astaksantyna	syntetyczny	25	kantaksantyna	<i>Cynophyceae</i>
9	β-karoten	<i>Cynophyceae</i>	26	krokoksantyna	<i>Cryptophyceae</i>
10	β-kryptoksantyna	syntetyczny	27	luteina	<i>Chlorophyceae</i>
11	chlorofil <i>a</i>	<i>Cynophyceae</i>	28	myksoksantofil	<i>Cyanophyceae</i>
12	chlorofil <i>b</i>	<i>Chlorophyceae</i>	28	neoksantyna	<i>Chlorophyceae</i>
13	chlorofil <i>c2</i>	<i>Cryptophyceae</i>	30	peridynina	<i>Dinophyceae</i>
14	chlorofil <i>c3</i>	<i>Prymnesiophyceae</i>	31	prazinoksantyna	<i>Prasinophyceae</i>
15	chlorofilid <i>a</i>	<i>Bacillariophyceae</i>	32	wiolaksantyna	<i>Chlorophyceae</i>
16	diadinoksantyna	<i>Bacillariophyceae</i>	33	zeaksantyna	<i>Cyanophyceae</i>
17	diatoksantyna	<i>Bacillariophyceae</i>			

Osoba wykonująca pomiary w IO PAN – dr Joanna Stoń-Egiert (aston@iopan.gda.pl)

Literatura

- Barlow R.G., Mantoura R.F.C., Gough M.A., Fileman T.W., 1993, *Pigment signatures of the phytoplankton composition in the north-eastern Atlantic during the 1990 spring bloom*, Deep-Sea Res. II, 40 (1/2), 459-477
- Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., 1983, *The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta, 151, 297-314
- Mantoura R.F.C., Repeta D.J., 1997, *Calibration methods for HPLC*, [w:] *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (red), UNESCO Publishing, Paris, 407-428
- Parsons T.R., Maita Y., Lalli C.M., 1984, *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*, Pergamon Press, Oxford, 173
- Stoń J., Kosakowska A., 2002, *Phytoplankton pigments designation – an application of RP-HPLC in qualitative and quantitative analysis*, J. Appl. Phycol., 14, 205-210
- Stoń-Egiert J., Kosakowska A., 2005, *RP-HPLC determination of phytoplankton pigments – comparison of calibration results for two columns*, Mar. Bio., 147, 251-260

- Stoń-Egiert J., 2007, *Główne środowiskowe uwarunkowania składu i zasobów pigmentu fitoplanktonu w akwenach bałtyckich*, rozprawa doktorska, IOPAN Sopot, pp. 210
- Strickland J.D.H., Parsons T.R., 1972, *A practical handbook of seawater analysis*, 2nd ed. Bull. Fish. Res. Bd. Can. No. 167, 310
- Wright S.W., Shearer J.D., 1984, *Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton*, J. Chromatogr., 294, 281-29
- Wright S.W., Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., Bjornland T., Repeta D., Welschmeyer N., 1991, *Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton*, Mar. Ecol. Prog. Ser., 77, 183-196