中国科学: 地球科学 2016 年 第 46 卷 第 4 期: 497 ~ 508
SCIENTIA SINICA Terrae earth.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

论 文 生物有机指标在气候和环境变化研究中的应用进展专题

利用正交实验法优化青藏高原湖泊沉积色素提取与分析

梁洁[①②], 李栋[③④⑤⑥], 王明达[①②], 张鑫雨[⑦⑧], 侯居峙[①*]

① 中国科学院青藏高原研究所环境变化与地表过程重点实验室, 北京 100101;
② 中国科学院大学地球科学学院, 北京 100049;
③ 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 青岛 266100;
④ 中国海洋大学化学化工学院, 青岛 266100;
⑤ 国家海洋局第二海洋研究所, 杭州 310012;
⑥ 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室, 杭州 310012;
⑦ 北京大学地表过程重点实验室, 北京 100871;
⑧ 北京大学城市与环境学院, 北京 100871
* 通讯作者, E-mail: houjz@itpcas.ac.cn

收稿日期: 2015-08-03; 接受日期: 2015-10-30; 网络版发表日期: 2016-03-25
国家重点基础研究发展计划项目(编号: 2012CB956100)和国家自然科学基金项目(批准号: 41072120, 41321061)资助

摘要 沉积色素已经成为反映浮游植物生物量和群落结构的有效指标, 被广泛应用到研究过去湖泊和海洋生态系统初级生产力变化及其对气候变化与人类活动的响应中. 但是由于色素的特殊化学属性, 不同的提取和分析方法对不同介质中的色素具有明显的选择性. 因此, 在不同区域, 为获得浮游植物生物量和群落结构等信息, 需要选择合适的色素提取和分析方法. 本文利用 $L_9(3^4)$正交实验方案, 对青藏高原中部典型半对流型湖泊(达则错)和双季对流型湖泊(江错)表层沉积物进行对比研究, 选择适用于青藏高原湖泊沉积色素的提取和分析方法. 对比发现提取试剂的类型及含量、色谱柱和流动相分别是影响湖泊沉积色素提取与分析过程中的关键因素. 利用丙酮:甲醇:水混合试剂(80:15:5, 体积比), 冰浴超声 30s 并低温静置 6h 对于青藏高原湖泊沉积色素提取具有最佳提取效率. 在进行色素分析时, 反相高效液相色谱(RP-HPLC)系统中采用 Eclipse Plus C_8 色谱柱(150mm×4.6mm, 粒径为 3.5μm), 流动相 A 为甲醇:乙腈:0.25m 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 A 的 pH 利用醋酸调节为 6, 柱温保持 40℃时, 色素分离效果最好. 本研究为进一步利用青藏高原湖泊沉积色素研究湖泊初级生产力变化和湖泊生态系统对气候变化和人类活动的响应提供了实验基础.

关键词 青藏高原, 湖泊沉积色素, 色素提取, 色素分析, 正交实验

中文引用格式: 梁洁, 李栋, 王明达, 张鑫雨, 侯居峙. 2016. 利用正交实验法优化青藏高原湖泊沉积色素提取与分析. 中国科学: 地球科学, 46: 497–508, doi: 10.1360/N072015-00270
英文引用格式: Liang J, Li D, Wang M D, Zhang X Y, Hou J Z. 2016. Application of orthogonal design to the extraction and HPLC analysis of sedimentary pigments from lakes of the Tibetan Plateau. Science China Earth Sciences, 59, doi: 10.1007/s11430-015-5240-1

© 2016《中国科学》杂志社 www.scichina.com

1 引言

沉积色素(sedimentary pigments)主要由水体中浮游植物、细菌和高等植物等产生并保存在沉积物中(Leavitt和Hodgson, 2001). 湖泊沉积色素是反映浮游植物群落的有效指标(Sanger和Crowl, 1979; Swain, 1985), 可以反映湖泊生态系统初级生产力变化(Harris等, 1996; Nara等, 2005; McGowan等, 2011)、藻类群落构成(McGowan等, 2005; Salmaso, 2010)、食物网结构改变(Leavitt等, 1994; Lake等, 2011)以及生物多样性的变化(Lucas和Holligan, 1999).

沉积色素的研究已经有70余年的历史(Fox, 1944), 目前有很多种色素的提取与分析方法(表1), 主要是利用有机试剂从生物体或沉积物中提取, 然后利用高效液相色谱(HPLC)进行分离, 并利用二极管阵列检测器(DAD)或荧光检测器(FLD)检测色素的种类和含量(Leavitt和Hodgson, 2001). 在色素提取过程中, 试剂种类和提取时间等对一些特征色素(如叶绿素*a*)会产生不同程度的降解与破坏并影响提取效率(Wright和Jeffrey, 2006). 另外在仪器分析中HPLC色谱柱和流动相等因素对色素分离度也有明显的影响(Van Heukelem和Thomas, 2001). 目前已有不同学者针对这些因素对色素分析结果的影响进行了较好的研究, 例如提取试剂的选择, 与利用甲醇提取色素相比, 丙酮比甲醇更易挥发, 而利用甲醇提取的色素尤其是极性色素更容易在HPLC仪器上产生尖锐的峰形. 但是使用甲醇提取色素会产生叶绿素的同系物, 对实验结果产生影响(Bowles等, 1985; Buffan-Dubau和Carman, 2000; Latasa等, 2001). 不同的静置提取时间对于极性与非极性色素的提取效率影响也是不同的(Schiedt和Liaaen-Jensen, 1995), 过长的静置提取时间有助于叶绿素*a*的提取但是并不会提高其他色素的提取效率(Buffan-Dubau和Carman, 2000). 总的来说, 色素提取过程应当满足以下几个方面: 色素具有较高的提取效率; 色素在HPLC仪器上具有较高的可识别性; 色素在提取试剂中具有较高的稳定性, 提取试剂具有较高的安全性等(Wright和Jeffrey, 2006).

色素分析时采用的HPLC系统参数对色素分离度也有较为明显的影响(Jeffrey等, 1997), 例如不同色谱柱会对不同极性的色素进行选择性分离, 使用C_8色谱柱对于叶绿素*c*系列的色素分离要优于使用C_{18}色谱柱(Zapata等, 2000; Van Heukelem和Thomas, 2001). 流动相及修饰剂的变化也会提高色素的分离度, 利用吡啶、醋酸铵和四丁基醋酸铵等做修饰剂可以显著提高色谱峰的分离度(Wright, 1991; Zapata等, 2000; Van Heukelem和Thomas, 2001; Garrido等, 2011), 同时柱温的变化对保留时间也会产生影响(Wolcott 等, 2000). 在这些研究中, 研究者通常利用因子实验设计研究每一种因素对色素提取效率和仪器分离效果的影响, 针对不同的介质选择不同的色素提取与分析方法(表1). 但随着影响因素数量增加, 因子实验设计方法所需实验次数会成倍增加, 使得优化条件实验难度加大. 因此在一个新的研究地区对色素进行探索研究时, 需要结合数理统计方法建立一个快捷的色素优化实验方案. 正交实验设计可以通过较少的实验次数, 探索最优或较优的实验方案, 被广泛用于优化实验研究中(张里千和罗鹏, 2012). 在正交实验表中, 每种因素出现的次数相同且不同因素对分析结果的影响均衡, 因此可被用于研究不同影响因素对色素提取和HPLC分析的优化研究中(Zhao等, 2011).

青藏高原平均海拔在4500m以上, 该地区大于1km^{2}的湖泊超过1000个(郑绵平, 1989; 王苏民和窦鸿身, 1998; 马荣华等, 2011), 其中许多湖泊属于半对流型湖泊(Li等, 2001; Wang等, 2014). 半对流型湖泊的湖水常年分层, 下层水体温度极低(一般为2℃左右), 且溶解氧含量几乎为零, 非常适合色素保存. 目前绝大多数青藏高原湖泊几乎没有直接受到人类活动的影响, 因此适合用于研究湖泊生态系统对气候变化的响应(Choudhary等, 2009; Hu等, 2014). 前人获得的色素提取和分析方法主要应用于海洋海水、海洋沉积物以及培养藻类色素等(Ruivo等, 2014), 而湖泊沉积色素研究主要集中在北美、南极等区域(Reuss和Conley, 2005; Wright和Jeffrey, 2006; Leavitt和Hodgson, 2001). 目前对青藏高原湖泊沉积色素尚缺乏系统的研究, 对不同因素在色素提取分析过程中的影响还缺乏了解, 因此传统的方法并不一定适合于青藏高原湖泊沉积物. 本文通过对青藏高原典型湖泊表层沉积物进行研究, 结合$L_9(3^4)$正交实验方法, 分析如下: (1) 青藏高原湖泊沉积色素提取过程中试剂种类、试剂含量、辅助超声提取及静置提取时间等对不同极性色素提取效率的影响; (2) 在高效液相色

表 1 色素提取分析方法总结 [a)]

研究介质	提取试剂	超声	静置时间	试剂v/w	色谱柱	柱温	pH	流动相	修饰剂	参考文献
藻类	ACE, 乙醇	NR	NR	NR	C_8	60	NR	MeOH	TBAA	Van Heukelem和Thomas(2001)
藻类、水样	95%meOH	5min	NR	5	C_8	25	5	MeOH, ACE, AN	Pridine	Zapata等(2000)
藻类	NR	NR	NR	NR	C_8	25	5	MeOH, ACE, AN	Pridine	Latasa等(2001)
水样	MeOH	30s	NR	1.5	C_{18}	NR	7.2	MeOH, AN, EAC	NH_4AC	Wright(1991)
藻类	90%ACE	NR	NR	3	C_{18}	NR	7.2	MeOH, AN, EAC	NH_4AC	Wright(1991)
沉积物	100%ACE	NR	12h	3	C_{18}	NR	NR	MeOH, AN, EAC	NH_4AC	Chen等(2001)
藻类、沉积物	MeOH buffer	NR	15min	2~3	C_{18}	NR	NR	MeOH, AN, EAC	NH_4AC	Brotas和Plante-Cuny(2003)
藻类	90%ACE	30s×2	48h	5	C_{18}	28	NR	MeOH, AN, EAC	NH_4AC	Van Leeuwe等(2006)
湖泊沉积物	100%ACE	40s	12h	5	C_{18}	NR	7.2	MeOH, AN, EAC	NH_4AC	Reuss和Conley(2005)
湖泊沉积物	MIX	NR	12h	50	NR	NR	NR	NR	NR	Leavitt和Hodgson(2001)
海洋沉积物	MIX	NR	3h+9h	3	C_{18}	NR	NR	MeOH, AN, EAC	NH_4AC	Zhao等(2011)
湖泊沉积物	MIX	30s	6h	10	C_8	40	C	MeOH, ACE, AN	Pridine	本研究

a) NH_4AC, 醋酸铵; MeOH, 甲醇; AN, 乙腈; EAC, 乙酸乙酯; ACE, 丙酮; TBAA, 四丁基醋酸铵; Pridine, 吡啶; MeOH buffer, 2%醋酸铵+98%甲醇; MIX, 80%丙酮+15%甲醇+5%水; NR, 未提; C, 未调节pH; v/w, 试剂体积与样品质量比

谱(HPLC)分析中不同色谱柱、柱温和流动相等对色素分离度的影响; (3) 建立高原湖泊沉积物色素提取和分析的最佳方法, 为进一步利用湖泊沉积色素研究高原湖泊生态系统对气候变化和人类活动响应提供实验分析基础.

2 材料与方法

2.1 研究区域与样品采集

本研究选择青藏高原中部两个典型湖泊进行研究. 达则错(31°49′~31°59′N, 87°25′~87°39′E, 4450m asl)位于尼玛县城东25km. 湖泊最大水深约38m, 面积为245km^2. 前期研究发现, 在20m水深以下湖水与上层湖水不发生混合, 水体的盐度从表层为14.69g/L到底部21.41g/L, 拥有明显的盐度梯度, 是典型的半对流型湖泊(Wang等, 2014).

江错(31°30′~31°35′, 90°46′~90°51′E, 4610m asl)位于那曲西约120km处. 湖泊最大水深22m, 面积约40km^2. 2013年8月和2014年7月野外考察时利用YSI测量发现湖水没有明显的垂直盐度梯度, 平均为14.2g/L. 江错湖水在每年5月中旬和11月上旬湖水发生对流, 是典型的双季对流型湖泊.

2014年7月中旬在达则错和江错利用Ekman-Birge采泥器采集了湖泊表层沉积物样品(0~1cm), 在避光状况下将沉积物样品装入whirl-pak无颗粒样品袋中, 立即用铝箔包裹并放–20℃冰柜中冷冻保存, 直至2014年11月进行分析, 期间于2014年8月用干冰保存从拉萨运回北京, 在运输过程中沉积物样品一直处于冷冻状态. 沉积物样品的采集、运输和储存参照Reuss等(2005)方法, 尽量避免对色素的后续分析产生影响. 在避光条件下, 湖泊表层沉积物样品经冷冻干燥后进行色素分析.

2.2 实验设计

2.2.1 沉积色素提取正交实验

本文利用正交实验法设计研究不同因素对湖泊沉积色素提取的影响. 根据前人对沉积色素研究的基础上(Wright等, 1997; Leavitt和Hodgson, 2001; Zhao等, 2011), 本文主要研究提取试剂种类(A)、试剂体积与样品质量比(B)、超声辅助提取时间(C)和静置提取时间(D)四种因素对沉积色素提取效率的影响, 每种因素选择3个不同条件(表2). 如色素提取试剂种类(A)选择A1(丙酮(Chen等, 2001))、A2(甲醇∶0.5m醋酸铵(98∶2, 体积比)的甲醇缓冲液(Brotas和Plante-Cuny, 2003))、A3(丙酮∶甲醇∶水(80∶15∶5, 体积比)混合试剂(Leavitt和Hodgson, 2001)); 提取过程中试剂体积与样品质量比(B)分别选择3、5和10mL/g(Zapata等,

表 2　色素提取与 HPLC 分析正交实验方案 [a)]

实验编号	提取方法正交实验			
	A	B	C	D
	提取试剂	v/m (mL/g)	超声时间(s)	静置时间(h)
1	A1:ACE	B2:5	C2:30	D2:6
2	A1:ACE	B1:3	C3:50	D1:3
3	A1:ACE	B3:10	C1:0	D3:12
4	A2:MeOH	B3:10	C3:50	D2:6
5	A2:MeOH	B2:5	C1:0	D1:3
6	A2:MeOH	B1:3	C2:30	D3:12
7	A3:MIX	B1:3	C1:0	D2:6
8	A3:MIX	B3:10	C2:30	D1:3
9	A3:MIX	B2:5	C3:50	D3:12
实验编号	HPLC正交实验			
	色谱柱	柱温(℃)	流动相	pH
1	A1:C_{18}	B2:40	C3	D3:未调节
2	A1:C_{18}	B1:20	C3	D1:pH=4
3	A1:C_{18}	B3:60	C3	D2:pH=6
4	A2:C_8	B3:60	C1	D3:未调节
5	A2:C_8	B1:20	C1	D2:pH=6
6	A2:C_8	B2:40	C1	D1:pH=4
7	A2:C_8	B1:20	C2	D3:未调节
8	A2:C_8	B2:40	C2	D2:pH=6
9	A2:C_8	B3:60	C2	D1:pH=4

a) ACE, 丙酮; MeOH, 甲醇:0.5M醋酸铵(98:2, 体积比); Mix, 丙酮:甲醇: 水(80:15:5, 体积比). 流动相C1(VanHeukelem和Thomas等, 2001), 持续时间为22min; 流动相A为甲醇:28mM四丁基醋酸铵(70:30, 体积比); 流动相B为甲醇. 流动相C2采用Zapata等(2000)方法, 持续时间为40min, 流动相组成为: 流动相A为甲醇:乙腈:0.25M吡(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C3采用Wright(1991)方法, 持续时间为29min, 流动相组成为: 流动相A为甲醇:0.5m醋酸铵(80:20, 体积比); 流动相B为乙腈:水(90:10, 体积比); 流动相C为乙酸乙酯. 具体梯度设置见网络版附表S1(http://earth.scichina.com, 余同)

2000; Leavitt和Hodgson, 2001; Reuss和Conley, 2005); 超声辅助提取的时间(C)分别选择无超声处理(0s), 超声30s和超声50s三种(Wright, 1991; Van Leeuwe等, 2006); 在–4℃静置提取时间(D)分别为3、6和12h (Buffan-Dubau和Carman, 2000; Chen等, 2001; Van Leeuwe等, 2006)(表2). 由表2可以看出, 通过9次试验即可研究四种因素在各自三种水平上对色素提取效率的影响.

按照表2正交实验设计方案分为9组条件实验对达则错和江错表层沉积物进行色素提取. 在9组条件实验中, 每组实验包含3个平行样, 分别称取两个湖泊表层沉积物1g(误差小于0.1g)放置于PTFE离心管中. 按照表2设计方案加入相应试剂及对样品超声处理, 所有样品完成静置提取. 如第一组实验中, 提取试剂为A1(丙酮, ACE), 试剂体积与样品质量比B2(5:1), 超声辅助提取时为C2(30s), 低温静置提取时间为D2(6h). 提取完成之后, 将所有样品离心10min(2500r/min), 随后取出上清液并用PTFE滤膜(孔径0.22μm)过滤, 将滤液用氮气吹干, 用90%甲醇经3~4次溶解转移到加有8μg内标化合物(trans-β-apo-8′-carotenal)的2mL棕色样品瓶中. 以上所有操作均在弱光下进行. 样品立即在Agilent 1200 HPLC-发光二级阵列检测器(DAD)系统测试, HPLC分析方法参照Wright(1991). 样品中色素的种类鉴定和定量通过与色素标准品(购买自丹麦DHI公司)中最大吸收波长(440、620nm)、保留时间以及特征波长下的出峰面积对比计算得出.

本研究所用色素标准品采用丹麦DHI公司的藻类色素标准, 包括叶绿素*c*3(Chlorophyll *c*3, Chl *c*3)、叶绿素*a*(Chlorophyll *a*, Chl *a*)、叶绿素*b*(Chlorophyll *b*, Chl *b*)、藻胆素(Echinenone, Echin)、别黄素(Alloxanthin, Allo)、脱镁叶绿酸*a*(Phaeophorbide *a*, Pheide *a*)以及混合标准包括*β*-胡萝卜素(*β*, *β*-Carotene, *β*-Car)、多甲藻黄素(Peridinin, Peri)、19′-butanoyloxyfucoxanthin(But-fuco)、岩藻黄素(Fucoxanthin, Fuco)、19′-hexanoyloxyfucoxanthin(Hex-fuco)、新黄素(Neoxanthin, Neo)、青绿素(prasinoxanthin, Pras)、紫黄素(Violaxanthin, Viola)、硅甲藻黄素(Diadinoxanthin, Diadino)、硅藻黄素(Diatoxanthin, Diato)、叶黄素(Lutein, Lut)、玉米黄素(Zeaxanthin, Zea)、隐藻黄素(Crocoxanthin, Croco)、二乙烯基叶绿素*a*(Divinyl Chlorophyll *a*, DV chl *a*)、脱植基叶绿素*a*(Chllorophyllide *a*, Chlide *a*)和脱镁叶绿素*a*(Pheophytin *a*, Phe *a*). 内标(trans-β-apo-8'-carotenal)购买于Sigma-Aldrich公司.

2.2.2　沉积色素 HPLC 分析正交实验

对HPLC分离条件的优化, 目的是探索分离度高且可检出更多的色素的方法. 我们利用在色素提取正交实验中获得的最优方法重新提取达则错和江错

表层沉积物, 利用上述正交实验设计方案进行9组HPLC分析正交优化实验. HPLC的正交实验设计方案选择研究色谱柱(A)、柱温(B)、流动相(C)以及流动相pH(D)对色素在HPLC分离的影响(表2). 色谱柱(A)选择C_{18}和C_8两种, C_{18}色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C_{18}(150mm×4.6mm×5μm), 孔径为80Å, 碳载量为10%, 温度上限为60℃, pH范围为2~9; C_8色谱柱为Zorbax Eclipse Plus C_8(150mm×4.6mm×3.5 μm), 孔径为95Å, 碳载量为8%, 温度上限为60℃, pH范围为2~8. 分析过程中色谱柱温度(B)分别选择20、40、60℃. 流动相(C)选用的三种常用的流动相设置(包括不同流动相试剂和不同洗脱时间梯度, 网络版附表S1), 流动相设置1采用Van Heukelem和Thomas (2001), 持续时间为22min: 流动相A为甲醇∶28mM四丁基醋酸铵(70∶30, 体积比); 流动相B为甲醇. 流动相设置2采用Zapata等(2000), 持续时间为40min, 流动相组成为: 流动相A为甲醇∶乙腈∶0.25m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). 流动相设置3采用Wright(1991), 持续时间为29min, 流动相组成为: 流动相A为甲醇∶0.5m醋酸铵(80∶20, 体积比); 流动相B为乙腈∶水(90∶10, 体积比); 流动相C为乙酸乙酯. 其中流动相条件1和2用于C_8色谱柱, 条件3用于C_{18}色谱柱. 每组流动相设置中流动相A的pH(D)条件实验也分为三个水平, 其中条件1和条件2分别利用醋酸调节pH为4和6, 条件3未做任何调节(表2). 如第二组实验中, 采用C_{18}色谱柱, 柱温保持在20℃, 流动相设置选择条件3, 其中流动相A的pH为4. HPLC仪器中设置流速均为1mL/min, 进样量均为100μL.

2.3 数据分析

实验数据结果利用IBM ® SPSS(Version 16.0)软件进行统计分析. 色素提取优化的正交实验方案中的提取试剂、样品与试剂质量与体积比、辅助超声以及提取静置时间的不同极性色素含量和HPLC的优化正交实验方案中的色谱柱、流动相、柱温以及流动相pH对分离度的结果均用单因素方差分析(One Way ANOVA)进行比较, 色素数据经过log(X+1)标准化. 所有数据在做显著性检验前均进行方差齐性检验(Levene test).

色谱峰之间的分离度R_s数据通过Agilent 1200液相色谱中的ChemStation色谱工作站获得, 并根据式(1)计算而得

$$R_s=2(Rt_1-Rt_2)/(W_1+W_2), \quad (1)$$

式中, Rt_1和Rt_2分别表示相邻两个峰的保留时间, W_1, 和W_2表示该峰的峰宽.

色素的检测限(LOD)和定量限(LOQ)的计算是根据ChemStation色谱工作站中的信噪比(SNR)分别乘以3和10(Hooker等, 2005).

3 结果

$L_9(3^4)$正交实验结果如表3所示. 其结果通过极差分析进行评价, 根据每种因素包含的3个水平条件分别将每种水平下的结果相加, 得出每种水平的结果K(式(2)), 比较相同因素下3个水平条件中最大的K值可确定最优的水平条件.

$$K_i^X = Polar_i^X + Intermediate_i^X + Nonpolar_i^X, \quad (2)$$

式中, X(因素)=A、B、C或者D; i(水平)=1、2或者3. *Polar*表示极性色素, *Intermediate*表示中性色素, *Nonpolar*表示非极性色素.

极差R为相同因素下最大的K值与最小K值之差(式(3)). R可以反映在该因素下不同水平变动对最终结果的影响以及排列出因素的主次顺序.

$$R^X = \mathrm{Max}\left(\sum K_i^X\right) - \mathrm{Min}\left(\sum K_i^X\right), \quad (3)$$

式中, X(因素)=A, B, C或者D; i(水平)=1、2或者3.

在达则错和江错两个湖泊的表层沉积物色素提取正交实验结果中, 以所提取出的单位质量沉积物中的色素含量(包含极性色素、非极性色素和中间极性色素)作为评价提取方法的指标. 极性色素为chl *c*3、chl *c*2、MgDVP、chlorophyllide *a* 4种色素含量之和; 中性色素为peridinin、But-fuco、fucoxanthin、neoxanthin、prasinoxanthin、Hex-fuco、diadinoxanthin, dinoxanthin、alloxanthin、diatoxanthin, lutein、zeaxanthin、canthaxanthin色素含量之和; 非极性色素为chl *b*、echinenone、chl *a*、α-carotene和β-carotene色素含量之和. 在HPLC分析正交实验中, 利用色谱峰之间的分离度R_s(式(1))作为评价HPLC方法的指标.

3.1 沉积色素提取正交实验结果

(ⅰ) 提取试剂(A). 通过9次正交实验结果对比

表 3　色素提取与 HPLC 分析正交实验结果 [a)]

水平	提取方法正交实验色素含量(μg/g)-达则错				提取方法正交实验色素含量(μg/g)-江错			
	A	B	C	D	A	B	C	D
	提取试剂	v/m比	超声处理	提取时间	提取试剂	v/m比	超声处理	提取时间
K_1	279	267.3	312.7	335	46.2	61.1	67.9	59.2
K_2	313.8	310.1	*346.6*	*350.9*	70.2	51.6	*68.6*	63
K_3	*393.2*	*408.6*	326.7	300.1	*71.6*	*75.3*	51.5	*65.8*
优选	Mix	10mL/g	30s	6h	Mix	10mL/g	30s	12h
R	114.2	141.3	33.9	50.8	25.4	23.7	17.1	6.6
重要性	B>A>D>C				A>B>C>D			
	HPLC正交实验-达则错				HPLC正交实验-江错			
水平	A	B	C	D	A	B	C	D
	色谱柱	柱温	流动相	pH	色谱柱	柱温	流动相	pH
K_1	9.45	10.05	10.23	10.16	9.69	10.48	11.06	10.54
K_2	10.23	*10.42*	*10.83*	10.09	11.06	*10.99*	*11.32*	*10.77*
K_3	*10.83*	10.04	9.45	*10.26*	*11.32*	10.6	9.69	10.76
优选	C_8	40℃	2	C	C_8	40℃	2	6
R	1.38	0.38	1.38	0.17	1.63	0.51	1.63	0.23
重要性	A=C>B>D				A=C>B>D			

a) 下画线斜体字代表该条件下最优提取条件

分析丙酮, 甲醇缓冲液和丙酮:甲醇:水混合试剂所提取的色素含量(表3), 发现在两个湖泊沉积物样品中, 提取色素总含量最高的试剂是混合试剂(Mix)(图1), 其中Mix试剂提取的中性类的色素(类胡萝卜素)含量最多(网络版附表S2、S3), 尤其别藻黄素(Allo)岩藻黄质(Diato)、玉米黄素(Zea)等色素. 表3中极差R检验结果表明, 试剂的选择对于色素提取结果的重要性分别位于第二(达则错)、第一位(江错). 方差分析结果表明, 选择不同的试剂提取湖泊沉积色素时, 对于非极性色素叶绿素有显著影响的(表4). 因此, 综合两个湖泊沉积物结果发现: 提取试剂的选择是沉积色素提取的关键影响因子, 使用混合试剂提取色素的总含量最高.

(ⅱ) 试剂体积与样品质量比(B). Grinham等(2007)研究发现当提取试剂体积与沉积物质量的比例是2:1时, 对底栖微藻的色素提取效率最高. 但是在实际实验中, 不同研究中加入试剂的体积与样品质量比也相差很大, 从3~50都有涉及(Zapata等, 2000; Leavitt和Hodgson, 2001; Reuss和Conley, 2005). 本研究9次正交实验结果表明提取色素的含量随体积与样品质量比(v/m)的比值增加而升高(表3和图1), 其中使用10mL试剂三次提取色素的总含量(达则错为408.6μg, 江错为75.3 μg, 三次样品质量总和约为3g)要明显高于使用3mL(267.3μg; 61.1μg)和5mL(310.1μg; 51.6μg). 同时极差结果显示, 试剂的体积与样品质量比(v/m)也是四个因素中重要的影响因素.

(ⅲ) 辅助超声萃取处理(C). 沉积物样品在超声过程中产生的热量可能会造成色素的降解(Leavitt和Hodgson, 2001). 本研究极差*R*结果显示, 超声处理是四个因素中影响色素含量的最小的因素(表3). 三种水平超声处理(无超声、超声30s和超声50s)的色素的提取总量在达则错湖泊沉积物中依次为312.7、346.6和326.7μg, 江错湖泊沉积物中色素的总量依次为67.9、68.6和51.5μg. 两个湖泊均显示超声30s的色素提取总量略高于其他两种处理, 但是总体来看色素含量差别不大(图1). 但是理论上不做超声处理或者超声时间过长对色素提取均存在不同的问题, 超声时间过长会破坏类胡萝卜素中的长链结构等; 如果不做超声处理的话, 也不利于提取色素.

(ⅳ) 静置提取时间(D). 在达则错湖泊沉积色素结果中静置6h的色素含量要比3h和12h高, 但在江错的沉积色素结果中发现, 却是12h提取出的总色素

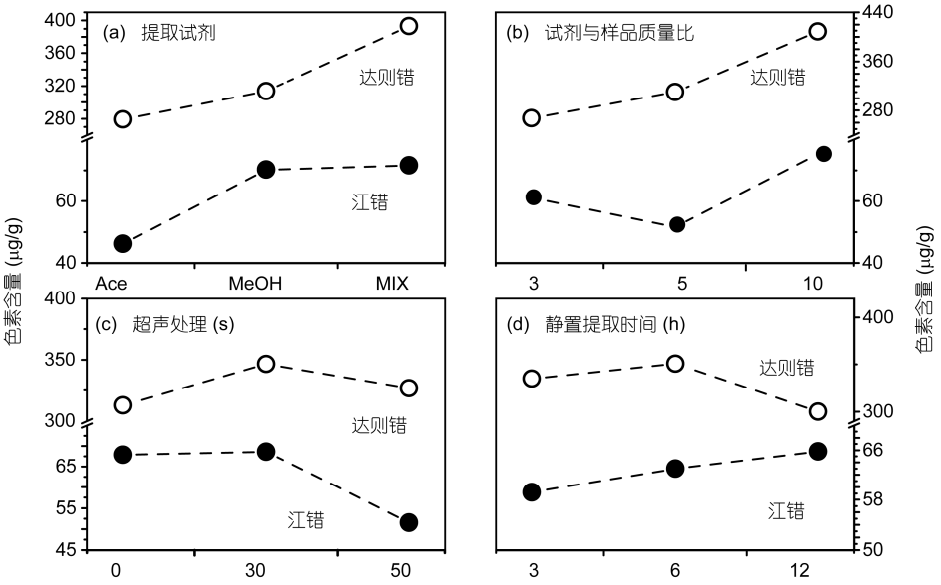

图 1　不同因素对达则错和江错表层沉积物色素提取效率的影响

表 4　不同影响因素的方差显著性检验结果 a)

提取方法one-way ANOVA				
	试剂	v/w	超声	静置时间
极性色素	0.11	0.78	0.98	0.80
中性色素	0.76	0.76	0.95	0.99
非极性色素	***0.007***	0.55	0.80	0.15
总色素含量	0.429	0.96	0.98	0.983
仪器方法one-way ANOVA				
	色谱柱	温度	溶液	pH
分离度	***0.002***	0.66	***0.002***	0.96

a) one-way ANOVA检验, $P<0.05$为显著, 斜体字代表该条件具有显著作用

含量要高于3、6h(图1), 两个湖泊沉积色素的最优提取时间不一致. 在正交实验的第9组提取方法中, 利用混合试剂提取静置3h后, 达则错与江错沉积物中的中性色素的提取含量是9组实验中最高的(网络版附表S2, S3); 换言之, 对于类胡萝卜素等中性色素静置3h后基本可以从沉积物中完全提取出来(Zhao等, 2011). 而对于非极性色素(如叶绿素*a*等)而言, 需要更长的时间才可以彻底将其提取(Buffan-Dubau和Carman, 2000), 但过长的静置时间中性色素会发生降解.

综上所述, 提取试剂的选择和试剂体积与样品质量比是影响色素提取结果的重要因素, 静置提取时间与超声辅助处理属于次要因素. 在两个湖泊中, 1g沉积物样品加入10mL混合试剂, 即丙酮:甲醇:水混合试剂(80∶15∶5, 体积比), 冰浴超声30s, 这些处理较其他实验处理可以提取出的色素含量更多. 但达则错沉积色素含量最高的静置提取时间为6h, 江错最佳静置提取时间为12h.

3.2　沉积色素 HPLC 分析正交实验结果

(ⅰ) 色谱柱(A)以及柱温(B).　将每个湖泊在9次不同的HPLC实验条件下色谱峰发分离度(图2)对比发现: Zorbax Eclipse Plus C_8色谱柱提取出的色素分离度明显高于Zorbax Eclipse XDB C_{18}色谱柱. 高

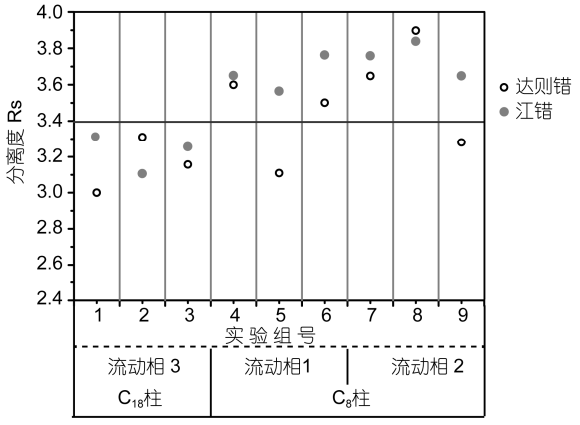

图 2　HPLC 正交优化实验分离度图

效液相色谱HPLC色谱峰的分离度对于温度的变化是敏感的, 即使变化5℃都会对洗脱出来色素的峰都会产生变化(Van Heukelem和Thomas, 2001). 不同厂商的HPLC仪器, 柱子加热的程序是差别很大, 导致即使同一个方法在不同的仪器上分离度也不相同(Wolcott等, 2000). 但本研究中在同一个HPLC下三种柱温条件下不同色素的分离度差别很小(表3), 当柱温为40℃时分离度较高.

(ⅱ) 流动相(C). 伴随着HPLC仪器中C_8、C_{18}色谱柱的改变, 流动相相应地发生了改变, 同时利用极差分析发现流动相是色素HPLC分析中最重要的影响因素. 将三种流动相所测得的水平值K进行对比, 发现利用条件2的梯度洗脱条件(Zapata等, 2000)在两个湖泊沉积色素分析中分离度都最高(表3). 方差分析结果也显示流动相的改变对色素分离度具有显著的影响(表4, P=0.002).

(ⅲ) 流动相pH(D). 虽然酸性流动相有利于叶绿素的分离, 但是目前研究中所用流动相的pH范围从5~7.5均有涉及(Wright, 1991; Zapata等, 2000). 将本次研究中不同pH条件下色素分离度相加, 用于达则错湖泊沉积色素的流动相A为未经醋酸调节的色素分离效率最高, 而在江错中为利用醋酸调节至pH=6时分离效率更高. 但是总体来讲将3个pH条件下, 两个湖泊中色谱峰分离度的极差分别为0.17和0.23(表3), 小于其他因素(色谱柱、流动相和柱温)对分离度的影响, 因此pH对色素HPLC分析结果的影响是最小的.

综上所述, 色谱柱与流动相组成是影响色素HPLC分析中分离度结果的重要因素, 其次是柱温与流动相pH. 在两个湖泊中, 采用Eclipse Plus C_8色谱柱(150mm×4.6mm, 粒径为3.5μm), 流动相: 流动相A为甲醇∶乙腈∶0.25m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), 将流动相A的pH利用醋酸调节为6, 柱温保持40℃时, 色素分离效果最好.

4 讨论

青藏高原湖泊类型很多, 但大都是贫营养的, 初级生产力低, 将本研究确定的湖泊沉积色素最优提取与分析方法与已有的其他湖泊沉积色素方法相比, 本研究所确定的方法在青藏高原湖泊沉积物中具有较高的提取与分析效率. 虽然达则错与江错湖泊表层沉积物色素提取的正交实验中, 最优提取时间在两个湖中表现出不一致. 这主要因为长的提取时间可以提高沉积物中叶绿素a的提取效率, 但对其他色素并无明显优势(Buffan-Dubau和Carman, 2000). 两个湖泊表层沉积物的极性色素(chl c3、chl c2、Chlide a和MgDVP)与非极性色素(chl a、chl b、echin和α、β-Car)所占总色素含量的比例不同(网络版附表S2、S3), 对于达则错而言, 极性色素占总色素的3%, 非极性色素仅占0.2%; 而在江错沉积物样品, 极性色素占总色素的1%, 非极性色素却高达10%. 因此, 随着静置提取时间的延长, 江错中非极性的沉积色素含量的增加对总色素含量的影响要高于达则错湖泊, 进而表现出江错湖泊沉积色素的最优提取时间要长于达则错湖泊沉积色素的结果.

对比两个湖泊表层沉积物利用甲醇缓冲液和丙酮的提取结果发现, 利用甲醇缓冲液提取的效果要好于利用丙酮(图1). 这是因为甲醇对浮游植物色素进行提取对色素具有较好的提取效果, 并且与用丙酮提取的色素相比, 甲醇提取的色素在HPLC分析时极性色素可以获得更好的峰形和分析结果(Wright等, 1997). 但是在甲醇中低温静置提取时间越长, 色素的降解速率要高于利用丙酮提取的样品(Latasa等, 2001). 因此运用包含甲醇与丙酮的混合试剂提取, 不仅可以避免色素快速地降解, 又可以保证色谱峰的峰形.

随着HPLC分析技术的发展, 新色谱柱出现也不断提高不同化合物的分离效果. 不同的研究中, 色素进行HPLC分析时所用的色谱柱差别很大(表5). 不同厂商生产的色谱柱之间也存在很大的差异, 因此研究者通常利用柱子-比较的函数F_S(Snyder等, 2004)找出相似的柱子, 再利用改进的梯度方法进行分析.

$$F_S=\left\{\left[12.5\left(H_2-H_1\right)\right]^2+\left[100\left(S_2^*-S_1^*\right)\right]^2+\left[30\left(A_2-A_1\right)\right]^2+\left[143\left(B_2-B_1\right)\right]^2+\left[30\left(C_2-C_1\right)\right]^2\right\}^{1/2}, \quad (4)$$

式中, H代表疏水性; S*代表空间位阻作用, 或固定相对于较大体积分子的穿透能力; A代表H-B酸性; B代表H-B碱性; C代表离子交换能力或静电作用力. F_S的值越小意味着两个色谱柱的选择性越相近, 根据表5中列有常用于色素HPLC分析的色谱柱, 计算出F_S的

表 5　色素 HPLC 分析所用色谱柱性质

色谱柱	H	S*	A	B	C(2.8)	C(7.0)	Kref b	参考文献
Zorbax Eclipse XDB-C_8	0.918	0.026	−0.221	−0.009	0.002	0.011	6.7	Van Heukelem和Thomas(2001)
Zorbax Eclipse Plus C_8	0.88	0.01	−0.17	0	−0.04	0.05	5.2	本研究
Zorbax Eclipse XDB-C_{18}	1.077	0.024	−0.064	−0.033	0.054	0.088	9.1	本研究
Spherisorb ODS-2	0.962	−0.074	0.07	0.033	0.908	1.263	8.3	Wright(1991)
Symmetry C_8	0.894	0.047	−0.204	0.02	−0.507	0.284	7	Zapata等(2000)
Supelcosil LC-18	1.019	−0.046	0.185	0.158	1.599	1.756	5.9	Ruivo等(2014)
LiChrospher 100 RP-18	1.006	−0.021	0.183	−0.036	0.646	0.896	9.5	Giovannetti等(2013)
Hypersil ODS	0.974	−0.027	−0.124	0.017	0.912	0.973	5.5	
Vydac 201TP	0.9	−0.019	0.407	−0.006	0.395	1.027	2.1	Carreto等(2003)
Adsorbosphere (C_{18})	0.986	−0.069	0.06	−0.05	1.492	1.679	7.7	Chen等(2001)

值从7~138不等, 其中本研究中选用的Zorbax Eclipse Plus C_8与Zorbax Eclipse XDB C_{18}色谱柱的差异性指数F_S为10, 与表5中其他色谱柱相比差异较小. 因此整个9次正交实验结果显示(表3), 即使HPLC其他影响因素有很大的调整, 但是色谱峰的分离度及分离出的色素个数也相差不大. 虽然Van Heukelem 和Thomas (2001)通过对比9种不同的柱子, 发现Eclipse XDB C_8(150mm×4.6mm, 粒径为3.5μm)色谱柱对于色素HPLC分析效果较好, 但是我们的研究发现在Eclipse XDB C_8色谱柱基础上改进的Eclipse Plus C_8色谱柱, 除了保留了Eclipse XDB C_8色谱柱的性能外, 还增强了对碱性化合物的分离, 这对于碱性的类胡萝卜素的分离效果的影响也是显著的(网络版附表S4、S5). 同时在相同的洗脱程序下, 改变柱温导致色素在流动相与固定相之间的分配系数发生变化, 改善分离色谱峰的分离效果(本研究9组HPLC分析的正交实验色素响应时间参见网络版附表S6).

我们还发现适用于海水、海洋沉积物和实验室培养的纯种藻色素的分析方法并不一定适合于青藏高原湖泊沉积物. 例如, 当研究海水以及纯种藻类的色素HPLC分离方法时认为柱温维持在25℃时效果较好(Zapata等, 2000). 但是我们利用同样的HPLC洗脱条件将青藏高原湖泊表层沉积物研究发现分离效果在柱温40℃时要好于25℃(图3). 在HPLC分析中, 流动相中溶剂的黏度会影响溶质在流动相中的扩散系数以及分析时间, 在不同温度下, 不同比例的溶剂黏度呈非线性变化(Snyder, 1974). 通常溶剂的黏度应保持在0.4m Pa·s以下. 根据本次正交实验研究结果(选用流动相设置2, 柱温为40℃)对比原方法(Zapata等, 2000) (选用流动相设置2, 柱温为25℃)发现, 在25℃时, 流动相A的50%甲醇黏度系数为1.62, 30%乙腈的黏度系数为0.98, 但在40℃, 50%甲醇黏度系数为1.12, 30%乙腈的黏度系数为0.68, 远远小于25℃(Colin等, 1978). 因此, 柱温调节至40℃时, 不仅保证了溶剂黏度, 同时加强了色谱柱的渗透性, 提高了分析效率. 研究发现吡啶作为流动相修饰剂对于色素的HPLC分离, 尤其是中性类胡萝卜素的分离, 起到重要的作用.

将本研究确定的青藏高原湖泊主要包括双季对流型湖泊(江错)和半对流型湖泊(达则错)的沉积色素最优提取与分析方法与其他方法进行比较, 发现适合于其他介质色素提取与分析的方法并不一定适合于青藏高原湖泊沉积物. 绝大多数青藏高原湖泊为双季对流型湖泊与半对流型湖泊, 并且这两类湖泊沉积物的色素组成具有明显区别. 作为两类湖泊的典型代表, 本研究对青藏高原湖泊以及高原以外的湖泊沉积色素的提取与分析方法的选择具有一定的参考价值. 此外, 利用本方法对达则错表层沉积物进行色素分析, 获得的色素所指示的浮游植物种类与在湖水中采集的浮游植物种类相互对应. 2012年在达则错浮游植物调查中发现水体中包含有绿藻门(卵囊藻、胶囊藻、单针藻、浮球藻、绿球藻、鼓藻)、硅藻门(脆杆藻、异极藻、小环藻)、甲藻门(飞燕角甲藻、拟多甲藻)、蓝藻门(蓝纤维藻、泽丝藻)和金藻门(单鞭金藻)(胡韧, 未发表数据). 相应地, 在达则错沉积物中发现了指示硅藻和金藻的岩藻黄素(Fucoxanthin)色素, 指示硅藻的硅藻黄素(Ditoxanthin)色素, 指示绿藻的叶绿素*b*(Chlorophyll *b*)以及指示蓝藻的海胆酮(Echinenone)等. 沉积色素所指示的藻类不仅

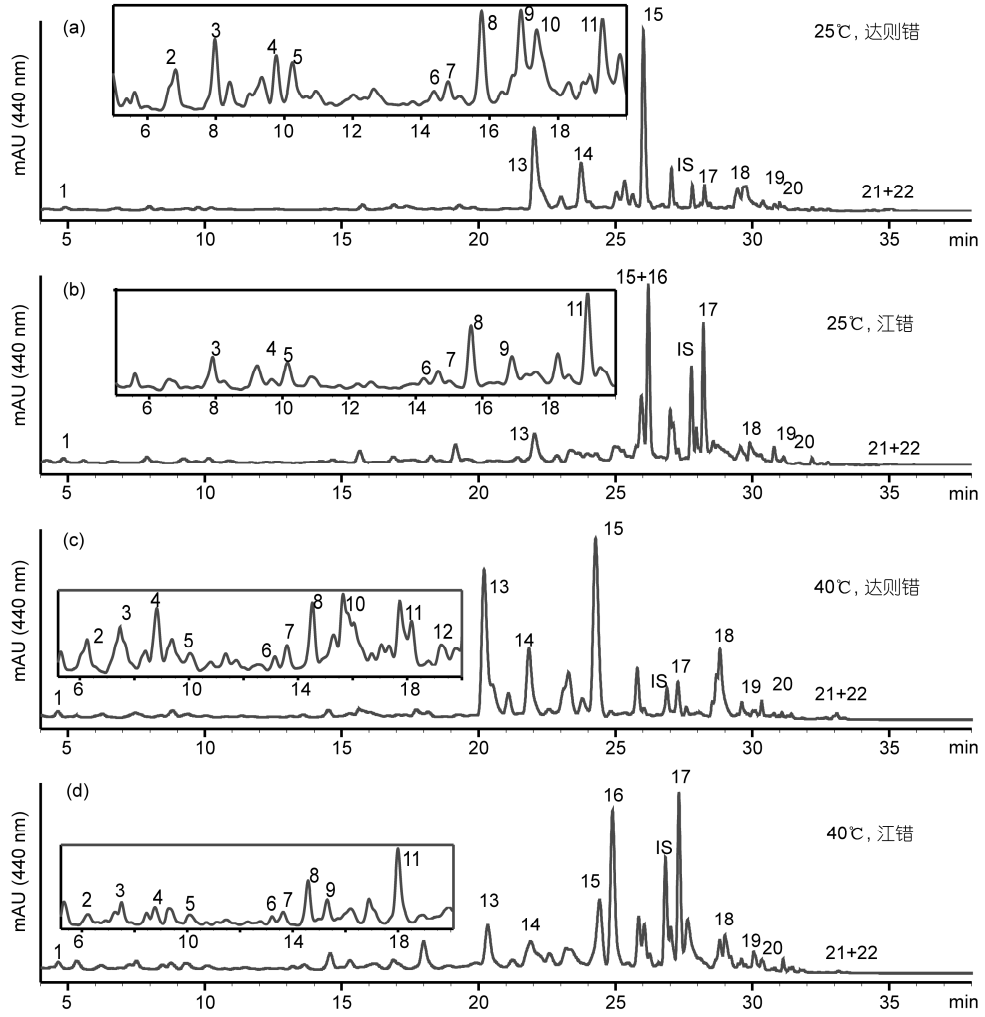

图 3　色谱图

利用 Eclipse plus C8 色谱柱分别在柱温为 25℃((a), (b))和 40℃((c), (d))条件下进行色素分析, HPLC 设置参照 C2 方法. 色谱图中数字代表不同的色素, 1, 叶绿素 c3(chl c3); 2, 叶绿素 c2(chl c2); 3, Mg-2, 4-二乙烯基脱镁卟啉 a5 单甲酯(MgDVP); 4, 脱植基叶绿素 a(Chlide a); 5, 多甲藻素(Peri); 6, 19′-丁酰氧基岩藻黄素(But-fuco); 7, 岩藻黄素(Fuco); 8, 新黄素(Neo); 9, 青绿素(Pras); 10, 19′-己酰氧基岩藻黄素(Hex-fuco);11, 硅甲藻黄素(Diadino); 12, 甲藻黄素(Diano); 13, 别黄素(Allo); 14, 硅藻黄素(Diato); 15, 叶黄素(Lut); 16, 玉米黄素(Zea); 17, 角黄素(Cantha); 18, 叶绿素 b(chl b); 19, 海胆酮(Echin); 20, 叶绿素 a(Chl *a*); 21, α-胡萝卜素(α-Car); 22, β-胡萝卜素(β-Car); 其中 IS 为内标 trans-β-apo-8′-carotenal(8′-阿朴-β-胡萝卜醛)

与已鉴定到的浮游植物具有很好的相关性, 而且也包含有未能通过光学显微镜所识别出的隐藻门的指示色素, 如别藻黄素(Alloxanthin), 这表明本研究获得方法对利用沉积色素重建青藏高原湖泊浮游植物群落结构变化非常有效.

5　结论

利用正交实验对青藏高原两个湖泊的表层沉积物色素进行研究发现, 在色素提取过程中, 加入试剂的含量和试剂的类型对沉积物提取影响最大, 其次是沉积物与试剂的静置时间, 超声对色素提取的影响很小. 综合考虑到青藏高原湖泊沉积物中色素的特点, 认为向避光冻干的1g沉积物样品加入10mL混合试剂, 即丙酮∶甲醇∶水混合试剂(80∶15∶5, 体积比), 冰浴超声30s后放入–4℃静置6h, 之后取出离心10min(2500r/min), 并取上清液通过PTFE(0.22μm, 疏水性)滤膜过滤, 吹干重新定容上机, 此方法提取

效果最好. 若以叶绿素*a*为研究目标时, 静置12h提取叶绿素的含量要好于静置提取6h.

对于HPLC分析, 色谱柱与流动相是影响色素分离效果的主要因素, 因此在对色素进行仪器分析时, 应当着重注意选择合适的色谱柱及流动相. 研究表明流动相的pH的改变并没有显著提高酸性叶绿素或碱性类胡萝卜素的的分离效果. 采用Eclipse Plus C_8色谱柱(150mm×4.6mm, 粒径为3.5μm), 利用三元梯度洗脱即流动相A为甲醇∶乙腈∶0.25m吡啶(50∶25∶25, 体积比), 并用醋酸调节至pH=6; 流动相B为甲醇∶乙腈∶丙酮(20∶60∶20, 体积比), HPLC柱温为40℃, 流速为1mL/min, 进样量为100μL, 色谱峰分离效果较好.

致谢 感谢蔡忠银博士及两名审稿专家提出的宝贵意见及建议.

参考文献

马荣华, 杨桂山, 段洪涛, 姜加虎, 王苏民, 冯学智, 李爱农, 孔繁翔, 薛滨, 吴敬禄, 李世杰. 2011. 中国湖泊的数量, 面积与空间分布. 中国科学: 地球科学, 41: 394–401

王苏民, 窦鸿身. 1998. 中国湖泊志. 北京: 科学出版社

张里千, 罗鹏. 2012. 实用选优法. 北京: 科学出版社

郑绵平. 1989. 青藏高原盐湖. 北京: 科学技术出版社

Bowles N D, Paerl H W, Tucker J. 1985. Effective solvents and extraction periods employed in phytoplankton carotenoid and chlorophyll determinations. Can J Fish Aquat Sci, 42: 1127–1131

Brotas V, Plante-Cuny M R. 2003. The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities. Acta Oecol, 24: S109–S115

Buffan-Dubau E, Carman K R. 2000. Extraction of benthic microalgal pigments for HPLC analyses. Mar Ecol-Prog Ser, 204: 293–297

Carreto J, Montoya N, Benavides H, Guerrero R, Carignan M. 2003. Characterization of spring phytoplankton communities in the RÃ-o de La Plata maritime front using pigment signatures and cell microscopy. Mar Biol, 143: 1013–1027

Chen N H, Bianchi T S, Mckee B A, Bland J M. 2001. Historical trends of hypoxia on the Louisiana shelf: Application of pigments as biomarkers. Org Geochem, 32: 543–561

Choudhary P, Routh J, Chakrapani G J. 2009. An environmental record of changes in sedimentary organic matter from Lake Sattal in Kumaun Himalayas, India. Sci Total Environ, 407: 2783–2795

Colin H, Diez-Masa J C, Guiochon G, Czjkowska T, Miedziak I. 1978. The role of the temperature in reversed-phase high-performance liquid chromatography using pyrocarbon-containing adsorbents. J Chromatogr A, 167: 41–65

Fox D L. 1944. Biochemical fossils. Science, 100: 111–113

Garrido J, Airs R, Rodríguez F, Van Heukelem L, Zapata M. 2011. New HPLC separation techniques. In: Roy S, Liewellyn C A, Egeland E S, Johnsen G, eds. Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy, and Applications in Oceanography. Cambridge: Cambridge University Press. 165–194

Giovannetti R, Alibabaei L, Zannotti M, Ferraro S, Petetta L. 2013. HPLC-DAD-ESI/MS identification of light harvesting and light screening pigments in the lake sediments at edmonson point. Sci World J, 11:1653–1656

Grinham A R, Carruthers T J, Fisher P L, Udy J W, Dennison W C. 2007. Accurately measuring the abundance of benthic microalgae in spatially variable habitats. Limnol Oceanogr: Methods, 5: 119–125

Harris P G, Zhao M, Rosell-Mele A, Tiedemann R, Sarnthein M, Maxwell J R. 1996. Chlorin accumulation rate as a proxy for quaternary marine primary productivity. Nature, 383: 63–65

Hooker S, Van Heukelem L, Thomas C, Claustre H, Ras J, Barlow R, Sessions H, Schluter L, Perl J, Trees C. 2005. The second SeaWiFS HPLC analysis round-robin experiment (SeaHARRE-2). NASA: Technical Memorandum NASA/TM-2005-212787: 28

Hu Z J, Anderson N J, Yang X D, McGowan S. 2014. Catchment-mediated atmospheric nitrogen deosition drives ecological change in two alpine lakes in SE Tibet. Glob Change Biol, 20: 1614–1628

Jeffrey S W, Mantoura R F C, Wright S W. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography. Paris: UNESCO. 661

Lake B A, Wigdahl C R, Strock K E, Saros J E, Amirbahman A. 2011. Multi-proxy paleolimnological assessment of biogeochemical versus food web controls on the trophic states of two shallow, mesotrophic lakes. J Paleolimn, 46: 45–57

Latasa M, Van Lenning K, Garrido J, Scharek R, Estrada M, Rodríguez F, Zapata M. 2001. Losses of chlorophylls and carotenoids in aqueous acetone and methanol extracts prepared for RPHPLC analysis of pigments. Chromatographia, 53: 385–391

Leavitt P R, Schindler D E, Paul A J, Hardie A K, Schindler D W. 1994. Fossil pigment records of phytoplankton in trout-stocked alpine lakes. Can J Fish Aquat Sci, 51: 2411–2423

Leavitt P R, Hodgson D A. 2001. Sedimentary Pigments. Vol. 3. Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. Berlin: Springer. 295–325

Li W C, Li S J, Yin Y, Ji J, Pu P M. 2001. Meromixis in Zige Tangco, central Tibetan Plateau—Discovery and significance. Sci China Ser D-Earth Sci, 44: 338–342

Lucas C H, Holligan P M. 1999. Nature and ecological implications of algal. Mar Ecol-Prog Ser, 180: 51–64

McGowan S, Leavitt P R, Hall R I, Anderson N J, Jeppesen E, Odgaard B V. 2005. Controls of algal abundance and community composition during ecosystem state change. Ecology, 86: 2200– 2211

McGowan S, Leavitt P R, Hall R I, Wolfe B B, Edwards T W, Karst-Riddoch T, Vardy S R. 2011. Interdecadal declines in flood

frequency increase primary production in lakes of a northern river delta. Glob Change Biol, 17: 1212–1224

Nara F, Tani Y, Soma Y, Soma M, Naraoka H, Watanabe T, Horiuchi K, Kawai T, Oda T, Nakamura T. 2005. Response of phytoplankton productivity to climate change recorded by sedimentary photosynthetic pigments in Lake Hovsgol (Mongolia) for the last 23000 years. Quat Int, 136: 71–81

Reuss N, Conley D J. 2005. Effects of sediment storage conditions on pigment analyses. Limnol Oceanogr: Methods, 3: 477–487

Ruivo M, Cartaxana P, Cardoso M I, Tenreiro A, Tenreiro R, Jesus B. 2014. Extraction and quantification of pigments in aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. Limnol Oceanogr: Methods, 12: 338–350

Salmaso N. 2010. Long-term phytoplankton community changes in a deep subalpine lake: Responses to nutrient availability and climatic fluctuations. Freshw Bio, 55: 825–846

Sanger J E, Crowl G. 1979. Fossil pigments as a guide to the paleolimnology of browns lake, Ohio. Quat Res, 11: 342–352

Schiedt K, Liaaen-Jensen S. 1995. Isolation and analysis. Carotenoids, 1: 81–108

Snyder L R. 1974. Classification of the solvent properties of common liquids. J Chromatogr A, 92: 223–230

Snyder L, Dolan J, Carr P. 2004. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. J Chromatogr A, 1060: 77–116

Swain B E. 1985. Measurement and interpretation of sedimentary pigments. Freshw Biol, 15: 53–75

Van Heukelem L, Thomas C S. 2001. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. J Chromatogr A, 910: 31–49

Van Leeuwe M, Villerius L, Roggeveld J, Visser R, Stefels J. 2006. An optimized method for automated analysis of algal pigments by HPLC. Mar Chem, 102: 267–275

Wang M D, Hou J Z, Lei Y B. 2014. Classification of Tibetan lakes based on variations in seasonal lake water temperature. Chin Sci Bull, 59: 4847–4855

Wolcott R G, Dolan J W, Snyder L R, Bakalyar S R, Arnold M A, Nichols J A. 2000. Control of column temperature in reversed-phase liquid chromatography. J Chromatogr A, 869: 211–230

Wright S W. 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Mar Ecol-Prog Ser, 77: 183–196

Wright S W, Jeffrey S W, Mantoura R F C. 1997. Evaluation ot methods and solvents for pigment extraction in phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods. Paris: UNESCO Publishing. 261–282

Wright S W, Jeffrey S W. 2006. Pigment markers for phytoplankton production. Marine organic matter: Biomarkers, isotopes and DNA. Springer: 71–104

Zapata M, Rodriguez F, Garrido J L. 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: A new HPLC method using a reversed phase C_8 column and pyridine-containing mobile phases. Mar Ecol-Prog Ser, 195: 29–45

Zhao J, Yao P, Yu Z G, Bianchi T S. 2011. Orthogonal design for optimization of pigment extraction from surface sediments of the Changjiang River Estuary. Acta Geol Sin-Engl Ed, 30: 33–42

附表

表 S1 正交实验表流动相设置 a)

时间(min)	%A	%B	%C	条件
	C1: (Van Heukelem and Thomas, 2001)			
	MeOH:28mM TBAA(7∶3, 体积比)	100% MeOH		
0	95	5		Injection
22	5	95		Graduent
	C2: (Zapata 等, 2000)			
	MeOH∶AN∶0.25M Pyrine (5∶2.5∶2.5, 体积比)	MeOH∶AN∶ACE (2∶6∶2, 体积比)		
0	100	0		Injection
22	60	40		Graduent
28	5	95		Graduent
38	5	95		Graduent
40	100	0		Graduent
	C3: (Wright, 1991)			
	MeOH∶0.5M NH_4AC (9∶1, 体积比)	90% AN	100% EAC	
0	100			Injection
4		100		Graduent
18		20	80	Graduent
21		100		Graduent
24	100			Graduent
29	100			Equilibration

a) MeOH: 甲醇; AN: 乙腈; Pyrine: 吡啶; ACE: 丙酮; NH_4AC: 醋酸铵; EAC: 乙酸乙酯

表 S2 达则错提取方法正交实验方案与结果 a)

实验次数	A	B	C	D	色素含量(μg/g)		
	提取试剂	v/m (ml/g)	超声处理 (s)	静置时间 (h)	极性	中性	非极性
1	A1∶ACE	B2: 5	C2: 30	D2 : 6	0.5±0.004	97.2±1.672	2.5±0.055
2	A1∶ACE	B1: 3	C3: 50	D1 : 3	0.3±0.003	72.2±0.757	1.5±0.024
3	A1∶ACE	B3: 10	C1: 0	D3: 12	0.6±0.006	102.9±1.33	1.3±0.108
4	A2∶MeOH	B3: 10	C3: 50	D2 : 6	3.9±0.007	133.8±1.54	0.3±0.021
5	A2∶MeOH	B2: 5	C1: 0	D1 : 3	2.6±0.004	92.4±1.183	0.2±0.005
6	A2∶MeOH	B1: 3	C2: 30	D3: 12	2±0.004	78.4±0.726	0.2±0.001
7	A∶MIX	B1: 3	C1: 0	D2 : 6	0.6±0.003	110.2±1.311	1.9±0.09
8	A3∶MIX	B3: 10	C2: 30	D1 : 3	1±0.003	164.2±1.321	0.6±0.025
9	A3∶MIX	B2: 5	C3: 50	D3: 12	0.7±0.002	113±1.536	1±0.030
K_1	279	267.3	312.7	335			
K_2	313.8	310.1	***346.6***	***350.9***			
K_3	***393.2***	***408.6***	326.7	300.1			
优选	Mix	10 ml/g	30 s	6 h			
R	114.2	141.3	33.9	50.8			
重要性	B>A>D>C						

a) 极性色素为叶绿素 c3, 叶绿素 c2, MgDVP, 脱植基叶绿素 a 等 4 种色素含量之和; 中性色素为多甲藻黄素, But-fuco, 岩藻黄素, 新黄素, 青绿素, Hex-fuco, 硅甲藻黄素, 硅藻黄素, 别黄素, 叶黄素, 玉米黄素等色素含量之和; 非极性色素为叶绿素 b,echinenone, 藻胆素, 叶绿素 a, α-胡萝卜素, β-胡萝卜素等色素含量之和. 下划线斜体字代表该条件下最优提取条件

表 S3　江错提取方法正交实验方案与结果 [a)]

实验次数	A	B	C	D	色素含量(μg/g)		
	提取试剂	v/m (ml/g)	超声处理 (s)	静置时间 (h)	极性	中性	非极性
1	A1：ACE	B2：5	C2：30	D2：6	0.8±0.033	11.3±0.328	1.7±0.068
2	A1：ACE	B1：3	C3：50	D1：3	0.7±0.029	8.7±0.272	0.6±0.25
3	A1：ACE	B3：10	C1v0	D3：12	0.8±0.033	21.1±0.493	0.5±0.021
4	A2：MeOH	B3：10	C3：50	D2：6	0.6±0.025	23±0.519	0.4±0.017
5	A2：MeOH	B2：5	C1：0	D1：3	0.4±0.017	19.7±0.473	0.2±0.008
6	A2：MeOH	B1：3	C2：30	D3：12	0.4±0.017	24.8±0.542	0.7±0.029
7	A3：MIX	B1：3	C1：0	D2：6	0.8±0.033	23±0.519	1.4±0.057
8	A3：MIX	B3：10	C2：30	D1：3	0.4±0.017	27.9±0.579	0.6±0.025
9	A3：MIX	B2：5	C3：50	D3：12	0.3±0.013	16.7±0.427	0.5±0.021
K_1	46.2	61.1	67.9	59.2			
K_2	70.2	51.6	***68.6***	63			
K_3	***71.6***	***75.3***	51.5	***65.8***			
优选	Mix	10 ml/g	30 s	12 h			
R	25.4	23.7	17.1	6.6			
重要性	A>B>C>D						

a) 极性色素为叶绿素 c3, 叶绿素 c2, MgDVP, 脱植基叶绿素 a 等 4 种色素含量之和; 中性色素为多甲藻黄素, But-fuco, 岩藻黄素, 新黄素, 青绿素, Hex-fuco, 硅甲藻黄素, 硅藻黄素, 别黄素, 叶黄素, 玉米黄素等色素含量之和; 非极性色素为叶绿素 b, echinenone, 藻胆素, 叶绿素 a, α-胡萝卜素, β-胡萝卜素等色素含量之和. 下划线斜体字代表该条件下最优提取条件

表 S4　达则错 HPLC 分析正交实验方案与结果 [a)]

实验次数	色谱柱		流动相		
	类型(A)	柱温(B)	试剂(C)	pH(D)	R_s
1	A1：C18	B2：40°C	C3	D3：未调节	3
2	A1：C18	B1：20°C	C3	D1：pH=4	3.31
3	A1：C18	B3：60°C	C3	D2：pH=6	3.14
4	A2：C8	B3：60°C	C1	D3：未调节	3.6
5	A2：C8	B1：20°C	C1	D2：pH=6	3.08
6	A2：C8	B2：40°C	C1	D1：pH=4	3.55
7	A2：C8	B1：20°C	C2	D3：未调节	3.66
8	A2：C8	B2：40°C	C2	D2：pH=6	3.87
9	A2：C8	B3：60°C	C2	D1：pH=4	3.3
K_1	9.45	10.05	10.23	10.16	
K_2	10.23	***10.42***	***10.83***	10.09	
K_3	***10.83***	10.04	9.45	***10.26***	
优选	C8	40°C	2	C	
R	1.38	0.38	1.38	0.17	
重要性	A=C>B>D				

a) 下划线斜体字代表该条件下最优提取条件

表 S5　江错 HPLC 分析正交实验方案与结果 [a)]

实验次数	色谱柱		流动相		
	类型(A)	柱温(B)	试剂(C)	pH(D)	R_s
1	A1:C18	B2:40°C	C3	D3:未调节	3.31
2	A1:C18	B1:20°C	C3	D1:pH=4	3.1
3	A1:C18	B3:60°C	C3	D2:pH=6	3.28
4	A2:C8	B3:60°C	C1	D3:未调节	3.67
5	A2:C8	B1:20°C	C1	D2:pH=6	3.6
6	A2:C8	B2:40°C	C1	D1:pH=4	3.79
7	A2:C8	B1:20°C	C2	D3:未调节	3.78
8	A2:C8	B2:40°C	C2	D2:pH=6	3.89
9	A2:C8	B3:60°C	C2	D1:pH=4	3.65
K_1	9.69	10.48	11.06	10.54	
K_2	11.06	***10.99***	***11.32***	***10.77***	
K_3	***11.32***	10.6	9.69	10.76	
优选	C8	40°C	2	C	
R	1.63	0.51	1.63	0.23	
重要性	A=C>B>D				

a) 下划线斜体字代表该条件下最优提取条件

表 S6　9 组 HPLC 分析正交实验色素保留时间 [a)]

No	色素名称	t_R (min)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	chlorophyll c3	4.25	4.5	3.79	4.2	5.2	5.9	5.3	4.63	3.24
2	chlorophyll c2	4.86	5.23	4.39	5.7	8.3	8.4	7.59	6.27	3.6
3	MgDVP	5.1	5.39	4.74	6.6	8.8	9.2	8.82	7.47	4
4	chlorophyllide a	5.27	5.69	4.99	7.6	9.4	9.5	9.36	8.82	4.47
5	peridinin	5.9	6.32	5.19	8.3	10.3	10	10.37	9.38	4.73
6	But-fuco	6.97	7.19	5.53	11.1	13.1	13.45	11.4	13.15	5.83
7	fucoxanthin	7.12	7.37	5.71	11.7	13.6	13.66	12.1	13.59	8.1
8	neoxanthin	7.33	7.77	5.94	11.8	13.9	14.21	14.1	14.52	8.55
9	prasinoxanthin	7.67	8.74	6.4	11.7	14.4	14.76	16.35	16.05	9.49
10	Hex-fuco	7.97	9.06	6.6	11.8	14.9	14.92	17.3	17.73	10.62
11	diadinoxanthin	8.23	9.64	6.78	12.7	15.6	15.81	20.57	18.16	10.99
12	dinoxanthin	8.45	10.06	7.01	12.8	15.8	15.97	20.98	19.25	11.26
13	alloxanthin	9.2	10.32	7.65	13.9	16.9	16.93	23.78	20.2	12.92
14	diatoxanthin	9.6	11.02	8.2	14.9	17.9	17.83	25.36	21.84	14.31
15	lutein	10.1	11.5	8.71	15.9	19	18.8	26.96	24.28	16.29
16	zeaxanthin	10.5	12.3	9.3	16.2	19.8	19.4	27.3	24.7	16.73
IS	trans-β-apo-8'-carotenal	12.96	14.3	11.13	18	19.9	20.14	28.41	26.88	20
17	Canthaxanthin	13.31	14.58	11.57	18.4	20.3	20.92	28.87	27.28	20.51
18	chl b	13.85	14.91	11.81	20.2	23.2	22.68	29.94	28.82	25.41
19	echinenone	14.9	15.79	12.8	22	24	23.4	30.81	30.1	27.08
20	chl a	15.18	16.19	13.15	22.3	24.2	24.05	31.25	30.34	27.45
21	alpha carotene	18.04	19.23	16.53	24.9	29	27.16	36.29	33.35	30.91
22	beta carotene	18.52	19.73	17.02	25.3	29.54	27.67	36.82	33.92	31.52

a) 1~4 为极性色素; 5~17 为中性色素; 18~22 为非极性色素; IS 为内标