

叶绿素 a 和叶绿素 b 的快速鉴定

邵倩 邓思瑜 程亮* (上海交通大学附属中学 上海 200439)

摘要 利用微型质谱仪技术,开发了叶绿素 a 和叶绿素 b 的快速检测方法,在短时间内获得物质组分信息。通过微型质谱仪的实际操作,为学习内容引入分析化学、样品前处理以及色谱的概念。其方法高效快捷,更加精确地说明各色素分离条带中物质的性质。同时,该技术方法在研究中的引入,不仅拓展学生的知识眼界和探究活动,学生还可以更加深入地了解科学研究的过程和方法,提高科学素养,为将来的学习和发展打下坚实的基础。

关键词 叶绿体色素 微型质谱 快速鉴定

Rapid identification of chlorophyll a and chlorophyll b

SHAO Qian, DENG Siyu, CHENG Liang*

(High School Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200439, China)

Abstract A method for rapid identification of chlorophyll a and chlorophyll b was developed using the miniature mass spectrometer technology to obtain substance composition information in a short period of time. Through the operation of the miniature mass spectrometer, concepts of analytical chemistry, sample pretreatment, and chromatography were introduced into the learning. This method is efficient and speedy, providing a more accurate explanation of the properties of substances in the pigment separation bands. At the same time, the introduction of this technological method in study not only expands students' knowledge and exploration activities, but also allows students to gain insights into the process and methods of scientific research, improve their scientific literacy, and lay a solid foundation for future learning and development.

Keywords chloroplast pigments; miniature mass spectrometer; rapid identification

叶绿体色素的提取和分离及叶绿素含量的测定,是高中生物学必修 1 中的经典实验,也是高中生物学探究实验,通过实验验证叶绿体色素的种类及性质,可加深对光合作用的理解^[1]。脂类物质层析分离,通常是通过与标样的比对来确定物质名称。叶绿体各类色素本身带有颜色,因此在经典的叶绿体色素分离实验中,省略了比对,直接从各类物质所呈现的颜色来判断。这样的方法简单,但在精确的物质鉴定时,还需要有待测物质的特征参数共同确证。层析加质谱分析,是目前最常用的物质鉴定方法之一。本文引入微型质谱仪检测技术,基于 nESI 原位电离源和 Cell 微型质谱分析系统,短时间内对目标色素的实时快速检测,高效

课中探究、课后拓展等环节均凸显学生作为学习主体的地位。但值得注意的是,学习主体地位的凸显、科学概念的精准构建,都建立在前概念的精准调查上。但有研究者指出部分学生的认知结构仅能在直觉水平上加以应用,不能直接表现出来^[1]。因而,基于认知冲突的概念转变课堂教学中,如何精准掌握学生已有的认知结构将是下一阶段探索的主要方向。

(基金项目:2023 年度国家社会科学基金教育学一般项目:“表现性评价视域下高中生物学论证教学的

地分析叶绿素的特征,让学生更加直观地了解质谱分析的原理和过程。

1 实验原理

生物分子样品有其特定的分子结构。微型质谱仪的离子源在高真空条件下将样品中原子或分子离子化后,通过一系列电场和磁场进行加速和分离,形成母离子和子离子(叶绿素 a,叶绿素 b 由它们共同确定),经过离子透镜聚焦传输到质量分析器以及检测器,对物质的质荷比(离子质量/电荷, m/z)进行分析^[2],结果比对已知文献中离子对信息,达到鉴定的目的(图 1)。

2 试剂与器材

试剂:新鲜菠菜叶片;乙醇、甲醇、石油醚、碳酸钙、

应用研究”,No. BHA230120;2024 年宁波市基础教育教研规划课题:“基于 SSI 的论证式教学中表现性评价的应用研究”,No. LX202448;2024 年宁波市基础教育教研规划课题:“高中生物学实验教学视域下创新人才培养”,No. LX2024045)

主要参考文献

[1] 卢姗姗,毕华林.概念转变理论的发展及面临的挑战[J].化学教育,2016,37(13):1-5.◇

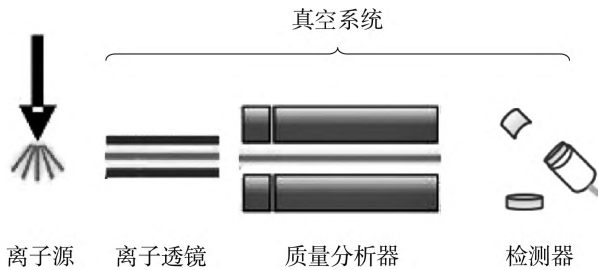


图 1 微型质谱仪内部分析系统

二氧化硅均是分析纯(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司);色素层析液(购自希格生科深圳有限公司)。

器材:研钵、分液漏斗、烧杯、锥形瓶、滤纸、铁架台、玻璃棒、点样毛细管、量筒、移液枪、天平、nESI 原位电离试剂盒、Cell 微型质谱分析仪(清谱科技)。

3 方法步骤

3.1 材料制备 ①取 5 g 新鲜菠菜叶片洗净,擦干表面,放入研钵中,加入少量二氧化硅粉末和碳酸钙粉末充分研磨;②研磨完成之后加入 5 mL 无水乙醇,充分挤压出菠菜中的汁水,使用漏斗过滤得到色素溶液(图 2a)。

3.2 叶绿体色素的萃取 ①取 2 mL 色素溶液加入试管中,再加入 2 mL 石油醚,用移液枪吹打使液体充分

混匀;②混合液静置 2 min 左右溶液出现分层,上层为石油醚和绿叶色素,下层为水和其他杂质;使用移液枪吸取上层萃取液至 2 mL 离心管中,萃取的目的是把一些蛋白、脂肪类等杂质去除(图 2b)。

3.3 用纸层析法分离色素 ①取一张滤纸将其剪成滤纸条(9.5 cm×3 cm),剪去滤纸条底部两个角,用毛细管吸取叶绿体色素萃取液在距底边约 1.5 cm 画线,使色素扩散的宽度限制在 0.5 cm 以内。风干后,再重复操作 3—5 次。②在烧杯中加入适量的层析液,将画线端朝下浸入层析液中,注意点样线不能进入或接触到层析液,用培养皿盖住烧杯进行层析。③当层析液前沿接近滤纸边缘时,取出滤纸风干,即可看到分离的各种色素,记录各种色素的位置和名称(图 2c)。

3.4 质谱分析 ①一级质谱图分析。将叶绿体色素经过提取、萃取后的溶液直接上样。②叶绿素 a 和叶绿素 b 分析。先将条带从滤纸条上剪下来,分别剪碎后置于 2 个离心管中,各加入 500 μL 甲醇溶液,浸提 2—3 min;用一次性滴管吸取浸提液,滴加 4—5 滴至试剂盒;将试剂盒插入 Cell 便携式质谱分析系统,使用 PMS Pro 软件设置质谱条件(监测离子对);设备识别出试剂盒后,点击“开始检测”;待检测完成后,查看报告(图 2d)。

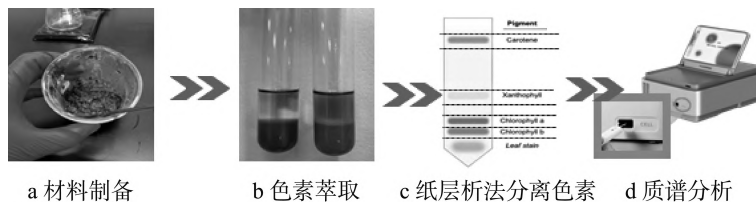


图 2 实验步骤

3.5 MS 条件 微型质谱对样品的气象离子扫描检测数据,与文献^[3,4]中报告的叶绿素 a 和 b 测试结果数据进行监测比对后分析,监测离子见表 1。

表 1 电离模式、监测离子

化合物中英文名称	电离模式	母离子 m/z	子离子 m/z
叶绿素 a (Chlorophyll a)	正模式	893.5	615.0, 555.0
叶绿素 b (Chlorophyll b)	正模式	907.5	629.0, 569.1

4 实验结果与分析

4.1 一级质谱图 图 3 为菠菜叶绿体色素萃取液的一级质谱图。从图中可以看到,有许多离子流峰,说明其成分非常复杂,无法具体鉴定叶绿素。原因是质谱仪灵敏度高,溶液中有一定含量的各组分均有响应,例

如含有多种黄酮化合物、萜类和鞣质类成分、有机酸类、多酚类、甾类和挥发油、氨基酸、维生素等化学成分。因此,鉴定物质时,一方面需先分离,另一方面质谱鉴定时,会用一级母离子,再加二级子离子,保证鉴定的准确性。

4.2 层析分离后叶绿素 a 和叶绿素 b 质谱分析 图 4 为蓝绿色条带(叶绿素 a)的质谱图。从图中可以看出叶绿素 a 分子特征的加电峰的 m/z 893.3(即母离子),碎片峰二级子离子 m/z 615.2,将二级碎片离子进一步碎裂,得到三级离子 m/z 555.2(仪器属于低分辨,0.5 Da 偏差,测试结果在仪器偏差范围内),与表 1 中数据匹配,可以说明蓝绿色条带中的色素成分为叶绿素 a。

图 5 为黄绿色条带(叶绿素 b)的质谱图,从图中可以看出分子的加电峰 m/z 907.0(即母离子)和叶绿素 b 分子的碎片峰 m/z 629.1 和 m/z 569.1(即二级子

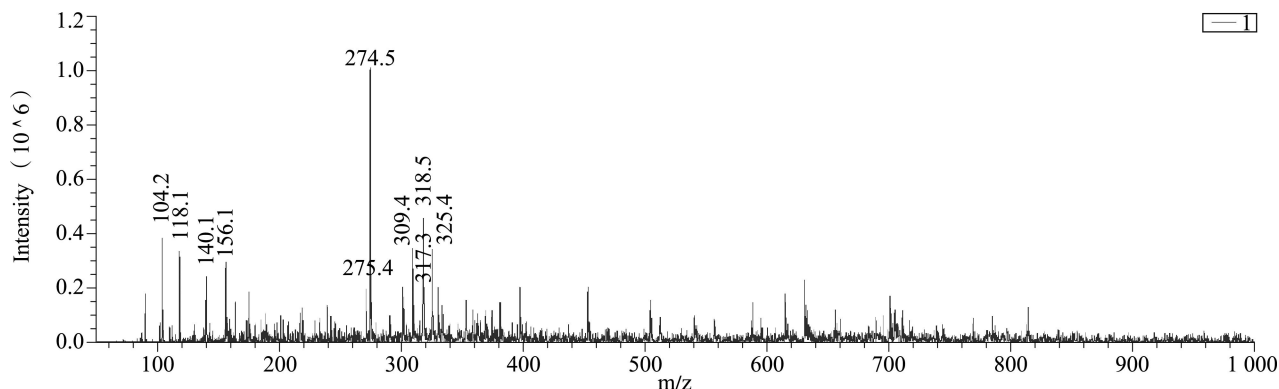


图 3 菠菜叶经提取-萃取后溶液的全扫描质谱图

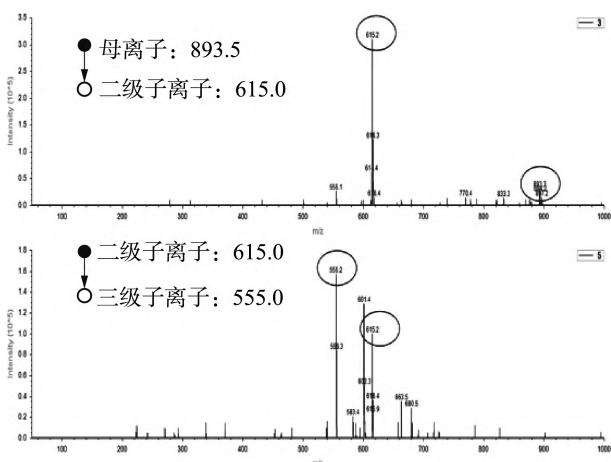


图 4 蓝绿色条带(叶绿素 a)质谱图

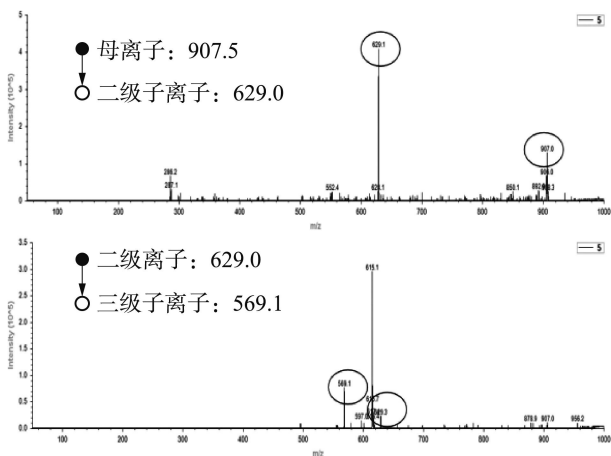


图 5 黄绿色条带(叶绿素 b)质谱图

离子和三级子离子)在图中明显可见,实测结果与理论一致,与表 1 中数据匹配,可以说明黄绿色条带中的色素成分为叶绿素 b。本样品在三级碎片图中还存在其他的离子峰,说明样品中还可能存在其他物质。在纸层析法分离叶绿素过程中,存在一些杂质,可能是色素的降解物^[3]。

5 讨论

质谱法是检测方法学中最接近物理本源的方法,通过母离子与碎裂后的子离子与标准谱库进行对比,从分子层面鉴定物质,确保了结果的准确性。质谱法是公认的检测生物样本中小分子的“金标准”。Cell 微型质谱分析系统有串联质谱功能,可去除基质中杂质的干扰,提升检测信噪比,并通过串联质谱特征峰比对增加结果准确性。

本实验质谱检测结果与文献报告的叶绿素 a 和 b 测试结果相似(表 1),可以断定,纸层析中蓝绿色条带为叶绿素 a,黄绿色条带中的色素成分为叶绿素 b。使用 Cell 微型质谱分析系统,与中学实验纸层析法结合建立的检测方法,能够更加高效快捷地对样品中目标色素进行检测与鉴定,准确性、稳定性良好。后期可以利用此方法检测叶绿体中的其他组分,例如可以进一步思考,类胡萝卜素条带会显示多条色素带,是否可以通过微型质谱分析得知其中所含物质,丰富学生拓展内容,帮助学生更好地理解 and 掌握所学知识,并培养学生的实践能力和创新能力。

(* 通信作者)

主要参考文献

- [1] 王洪钟, 谢莉萍, 李小明, 等. 叶绿体色素分离实验改进与拓展[J]. 生物学通报, 2012, 47(7): 52 - 53.
- [2] 高 舸. 质谱及其联用技术[M]. 成都, 四川大学出版社, 2014: 338.
- [3] MILENKOVIC SM, ZVEZDANOVIC JB, ANDELKOVIC TD, et al. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies [J]. Advanced Technologies, 2012, 1(1): 16 - 24.
- [4] 张晶晶. 海洋浮游植物色素 UHPLC - MS/MS 检测及应用研究 [D]. 烟台: 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所), 2018: 140. ◆