

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (2) :218 - 228; 4 February 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsx.2014.02.011

替代标准品校正函数法定量分析不产氧光合细菌螺菌黄质系类胡萝卜素

赵春贵, 卓民权, 杨素萍*

华侨大学生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

摘要:【目的】针对不产氧光合细菌 (APB) 类胡萝卜素 (Car) 标准品缺乏的问题, 以替代标准品实现螺菌黄质系多种 Car 组分同步、快速、准确的定量分析。【方法】以沼泽红假单胞菌 CQV97 为材料, 采用吸收光谱、薄层层析和 HPLC 等方法制备螺菌黄质系 Car 标准品; 以柠檬黄和番茄红素为替代标准品, 采用 HPLC 法, 建立了螺菌黄质系 Car 多组分的定量方法。【结果】制备的 6 种 Car 标准品纯度达 95% 以上。确定了 Car 的 HPLC 分析条件, 以 Car 标准品为对照, 得到了螺菌黄质系 6 种 Car 组分的定性 HPLC 指纹图谱。在选择 HPLC 条件下, 测定了 6 种 Car 标准品和 2 种替代标准品的标准曲线, 确立了 2 种替代标准品分别与 6 种 Car 标准品之间的定量校正函数关系, 并用于实际样品 YL28 和 CQV97 菌株的 Car 定量分析。采用 Car 标准品法测定的 6 种 Car 含量的 RSD 小于 1.5%、回收率在 96% - 104%, 替代标准品法与 Car 标准品法测定结果吻合, 其相对误差小于 0.1%。【结论】通过替代标准品校正函数关系, 建立了 2 种准确定量分析螺菌黄质系 Car 多组分的方法。替代标准品柠檬黄和番茄红素均能准确地传递待测 Car 的量值关系, 实现了螺菌黄质系 6 种 Car 的同步、快速、准确的定量分析, 弥补了现有 Car 组分相对定量方法的不足。讨论了替代标准品法校正因子适用范围的局限性, 提出了校正函数关系的思路和方法。这为全面实现 APB 球形烯系、奥氏酮系等其它 Car 的快速、准确定量分析提供了借鉴和参考。

关键词: 定量分析, 类胡萝卜素, 螺菌黄质系, 替代标准品

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2014)01-0218-11

不产氧光合细菌 (APB) 含有丰富多样的类胡萝卜素 (Car)。除具有抗氧化和光保护作用外, Car 在光能的吸收、传递以及稳定光合作用机构-色素蛋白复合体 (PPC) 结构方面也具有举足轻重作用, 近年来, 它与光合作用效率的关系以及环境适应性调控机制备受关注^[1-4]; 此外, 在控制 APB 产品^[5-6] 质量方面, Car 也可作为重要评价指标, 因此, 系统开展 Car 分析在光合作用机理及应用研究中具有重要

意义。目前, 基于标准品的 HPLC 快速分析技术已应用于 Car 组分的定性和定量分析, 但主要集中在高等植物、真菌、藻类和蓝细菌等 Car 组分的测定^[7-8], 对于 APB Car 的测定, 目前仅局限于番茄红素、链孢红素、球形烯、奥氏酮、绿菌烯等少数几种^[7-10], 由于标准品的缺乏, 极大地限制了多组分 Car 的快速准确的定量。在标准品缺乏下, APB Car 组分的定性分析主要依赖于 HPLC、吸收光谱、质谱

基金项目: 国家自然科学基金 (31070054, 31270106); 福建省自然科学基金 (2010J01209, 2012J01136)

* 通信作者。Tel: +86-592-6166178; E-mail: yangsuping@hqu.edu.cn

作者简介: 赵春贵 (1964 -), 男, 河北新乐人, 博士, 研究方向为资源与环境微生物。

收稿日期: 2013-05-30; 修回日期: 2013-07-12

等多种技术的组合^[10-12], 尤其以参考菌株作为光合色素对照品的使用, 使多组分 Car 的定性分析更加方便快捷^[13]。与此相比, APB Car 多组分的定量分析则相对薄弱, 目前常用方法主要包括以一种 Car 对照品对各 Car 组分进行表观定量、基于 HPLC 色谱峰面积的相对定量、峰面积与摩尔消光系数 (ϵ_{\max}) 或平均 ϵ_{\max} 的比值的相对定量等^[11-14]。虽然这些方法在 APB 光合色素代谢与调控等研究中发挥了重要作用, 但尚未实现绝对定量。

替代标准品法亦称为“一测多评法”, 是解决对照品紧缺、难以获得、检测成本高等问题的良好策略, 已编入 2010 年版《中国药典》, 目前已用于中药材等有效成分组的分析, 例如以丹参素钠为替代标准品, 用于测定丹参中原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 等 4 种化合物^[15-18]。替代标准品法的原理是: 以替代标准品作为各待测组分的对照, 在一定的线性范围, 各待测组分的量与检测器响应信号成正比, 通过比较待测组分标准品与替代标准品的标准曲线, 求出替代标准品与各待测组分间的校正因子 (RCF), 并把它作为一个常数用于待测组分含量的测定^[15]。从方法的原理上分析, 替代标准品法能够解决 Car 标准品缺乏问题, 为 APB Car 多组分分析提供了可行性。但在 APB Car 分析过程中, 某些 Car 的标准曲线并不是过原点的直线, 采用校正因子 (RCF) 法测定的结果差异较大, 因此, 我们依据替代标准品法的思想, 提出了校正函数的方法, 其依据是: 假如 A 和 B 为 2 种物质, 在给定的测定条件下, 假如它们的标准曲线均为不过原点的直线, 其方程分别为 (1) $S_A = k_A \cdot m_A + b_A$ 和 (2) $S_B = k_B \cdot m_B + b_B$, 其中 S 、 m 、 k 和 b 分别为检测信号、物质的质量、线性方程的斜率和纵截距。假定 A 作为 B 的替代标准品, 当 $S_A = S_B$ 时, 通过方程 (1) 和 (2) 导出 m_A 与 m_B 的关系式, 即方程 (3) $m_B = k_A / k_B \cdot m_A + (b_A - b_B) \cdot k_B$, 这种函数关系仅在给定的条件下成立。当 B 物质测定时, 测定的检测信号值 (S_B), 通过 A 的标准曲线方程 (1) 求出相应的质量值 (m_A), 然后再通过方程 (3) 求得 B 的质量 (m_B)。当方程 (3) 的 b_A 和 b_B 均为 0 时, 则符合目前替代标准品校正因子的原理, 因此, 校正函数法弥补了现有替代标准品分析中校正因子适用性的不足, 拓宽了适用范围。

螺菌黄质系 Car 合成途径广泛分布于 APB 各种群中, 关于该系 Car 组分的定性和表观定量分析

已有较多报道^[11-14], 但尚未见到螺菌黄质系 Car 多组分绝对定量分析的系统报道。在前期研究中, 本课题组以光合色素定性的菌株为对照, 实现了光合色素的快速定性分析^[13]。在此基础上, 本文依据替代标准品的思想, 选择番茄红素和柠檬黄作为替代标准品, 以光合色素定性的 APB 菌株作为色素定性对照, 以自制的 Car 作为标准品, 确立了待测 Car 组分与替代标准品之间的定量校正函数关系, 能够更准确地传递待测组分的量值关系, 弥补了现有替代标准品分析中校正因子适用性的不足, 使适用范围更宽。通过替代标准品的校正函数关系, 建立 2 种 Car 多组分准确定量的方法, 实现了螺菌黄质系合成途径中 6 种 Car 的快速、准确的定性定量分析, 增添了替代标准品分析的新认识, 使替代标准品分析法更具普适性。这为全面实现 APB 不同途径 Car 的快速、准确定量分析提供了借鉴和参考, 也对光合色素代谢与调控研究水平的提高以及 APB 产品质量评价指标体系的提升等均具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) CQV97 和海洋着色菌 (*Marichromatium gracile*) YL28, GenBank 登录号分别为 EU882154 和 JF719917, 本实验室分离、鉴定并保存。

1.1.2 主要仪器、材料和试剂: CTO-20A 高效液相色谱仪 (SPD-M20A DAD Detector, Shimadzu)。UV-3200 PCS 紫外可见分光光度计 (MAPADA)。硅胶层析 G 板 (30 mm × 100 mm) 和 200 目层析硅胶 (青岛海洋化工厂)。柠檬黄标品 (Tartrazine, 简称 Tar, 上海染料研究所)。甲醇、乙腈及乙酸乙酯为色谱纯, 其它试剂为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 Car 样品的制备和回收率测定

按文献方法进行细菌培养和菌体收集^[13]。色素提取液的制备采用改良的丙酮甲醇法^[13]: 菌体细胞依次用甲醇和丙酮甲醇 (7:2, V/V) 和丙酮各提取 1 次, 合并提取液并定容, 40℃ 减压旋转蒸发浓缩, 即得色素提取液。色素提取液体积是通过测其浓缩前后 BChl *a* 的光密度 (OD_{770}) 来确定。Car 样品的制备采用硅胶柱层析法: 硅胶经石油醚浸泡装柱 (玻璃层析柱规格为 15 mm × 200 mm), 柱床体积为

20 mL,石油醚平衡层析柱,取 2.00 mL 色素提取液上样,流动相为石油醚:丙酮(9:2.5, V/V),收集第一个洗脱组分(19-39 mL),减压旋转蒸发浓缩,通过测定样品浓缩前后 Car 的 OD_{475} ,计算样品浓缩后的体积,确定菌体质量和样品体积的关系,即得 Car 样品。浓缩后样品体积的计算依据公式 $V_2 = V_1 \cdot OD_1 / OD_2$,其中 V_1 和 V_2 分别为浓缩前和浓缩后的体积, OD_1 和 OD_2 分别为浓缩前和浓缩后测定的光密度值。取 CQV97 湿菌体 0.207 g,经过色素提取和浓缩,得到 2.4473 mL 色素提取液,从中取 2.00 mL 进行硅胶柱层析,洗脱组分经浓缩得到 2.0992 mL Car 样品,其中含有 0.0169 g 菌体的 Car,即可到 0.0806 g/mL 菌体的 Car 样品。Car 提取回收率的测定是将制备的 Car 样品重复 3 次硅胶柱层析。Car 样品黑暗 4℃ 暂时储存,HPLC 分析前,经 10000 × g 离心 10 min,取上清液。

1.3 柠檬黄溶液的配制和稳定性测试

精确称取 0.0112 g 柠檬黄标品,超纯水溶解,定容至 10 mL,0.45 μm 滤膜过滤,其浓度由 426 nm 处光密度 (OD_{426}) 确定,摩尔消光系数 (ϵ_{\max}) 为 18200 L/(mol·cm),经标定柠檬黄标准液的浓度为 1.1043 mg/mL,4℃ 冰箱黑暗保存备用。将柠檬黄稀释至 20.0 mg/L,置于常温黑暗条件下,于 0、24、48、72 和 96 h 取样,测定其吸收光谱,观察柠檬黄溶液的暂时储存稳定性。

1.4 Car 标准品的制备、纯度鉴定和定量

将 1.2 制备的色素提取液,采用 TLC 方法制备 6 种 Car 标准品溶液^[13]。展层剂配方为石油醚:正己烷:异丙醇:丙酮:甲醇(8:0.75:0.2:0.8:0.2)。分别刮取 TLC 层析板上各 Car 条带溶于丙酮,10000 × g 离心 10 min 取上清进行 HPLC 纯度分析,得到 6 种纯 Car 溶液。若某种 Car 纯度不够,则再经 TLC 纯化。依据文献报道的 λ_{\max} 和 ϵ_{\max} ^[14, 19],分别对纯化 Car 进行定量,得到 6 种 Car 标准溶液(编号 H1-H6),于 4℃ 冰箱中黑暗保存备用。

1.5 HPLC 分析条件的确定和 Car 定性的 HPLC 指纹图谱

测定柠檬黄溶液和 6 种 Car 的吸收光谱,依据其吸收光谱确定 475nm 为 HPLC 检测波长。HPLC 分析采用反向 C18 柱(Shim-pack VP-ODS, 150 mm × 4.6 mm I. D, Shimadzu),DAD 检测器,柱温 30℃,进样量 20 μL,流动相 A 为 90% 乙腈水(V/V),流动相

B 为乙酸乙酯。经反复摸索,确定了能将 Car 组分良好分辨的 HPLC 梯度洗脱程序:0-5 min,0% - 45% B; 5-25 min 45% - 70% B,流速为 0.7 mL/min。以纯化的 6 种 Car 标准品为对照,获得了 CQV97 菌株 Car 的标准 HPLC 指纹图谱。待测样品中的多组分 Car 的定性分析是以 CQV97 菌株的 Car 为对照进行。除特殊说明外,本文样品的测定均采用该 HPLC 设定参数和条件。

1.6 样品测定的精密度和时间稳定性

依据 1.5 的 HPLC 分析条件进行样品精密测定:取 40.3 mg/mL 菌体的 Car 样品和 10.0 mg/L 柠檬黄样品 20 μL 进样,以保留时间和峰面积为检测指标,连续重复测定 6 次;时间稳定性和短时光照稳定性测定是将 4℃ 黑暗保存的样品,分别于 0、4、8、16、20 和 24 h 取样,每次取样前,样品以日光灯光源 300 lux 光照 2 min。

1.7 标准曲线制作和检出限

将 6 种 Car 和 Tar 标准液浓度(mg/L)分别稀释至 2.60、10.70、61.17、3.80、5.27、9.13 和 80.00,取 3-20 μL 上样。依据 1.5 的 HPLC 分析条件重复 3 次测定,取其均值,以峰面积对质量作图,绘制 6 种 Car 和柠檬黄的标准曲线,并进行线性拟合。依据信噪比(S/N)等于 3 的值确定待测样品的检出限。

1.8 Car 组分与替代标准品的定量关系

在选择检测波长和检测条件下,以柠檬黄和番茄红素分别为替代标准品,通过待测组分标准曲线和替代标准品的标准曲线,建立替代标准品与待测标准品之间的函数关系,当待测组分与替代标准品峰面积相等时,待测组分与替代标准品的质量之间呈特定的关系。采用消元法解联立方程,导出各待测组分与替代标准柠檬黄和番茄红素含量之间的校正函数关系。

1.9 样品的加标回收率

将 Car 样品配制成含 0.0403 g/mL 菌体的色素溶液,同时配制 Car 的加标样品,在选择参数和条件下进行 HPLC 测定,重复 6 次,依据 Car 的标准曲线计算样品中各 Car 组分的含量,按公式:加标回收率(%) = $(\rho_2 - \rho_1) / \rho_0 \times 100$ 计算 6 种 Car 的加标回收率,其中 ρ_0 、 ρ_1 和 ρ_2 分别为加入标准的浓度、样品的浓度和加标样品的浓度。

1.10 实际样品测定和方法比较

选定 *R. palustris* CQV97 和 *M. gracile* YL28 为

待测样品。各取菌体细胞 0.207 g 和 0.193 g, 分别制备成 0.0806 g/mL 和 0.0724 g/mL 菌体的 Car 样品。在选择的 HPLC 分析条件下, 以 CQV97 Car 样品作为定性对照, 取 20 μ L 待测样品上样, 样品稀释倍数为 2, 重复测定 6 次。分别用柠檬黄替代标准品 (S_{td1}) 法和番茄红素替代标准品 (S_{td2}) 法计算样品中 Car 成分的含量, 与待测 Car 标准品 (S_{td0}) 法进行比较。替代标准品法: 测定的各 Car 组分的峰面积, 通过替代标准品标准曲线得到各测定组分相当于替代标准品质量的值 (mS_{td1} 和 mS_{td2}), 再通过 S_{td1} 和 S_{td2} 与待测 Car 组分之间的校正函数关系, 求出各测定组分的质量 (m), 根据公式 (1) 计算 Car 组分的浓度 (ρ_i , μ g/mL)。

$$\rho_i = m/V_s \cdot f \quad \text{公式 (1)}$$

其中, f 和 V_s 分别为稀释倍数和进样体积 (μ L)。再按公式 (2) 计算菌体样品中各 Car 成分的含量 (W_i , μ g/g)。

$$W_i = \rho_i/\rho_0 \quad \text{公式 (2)}$$

其中 ρ_0 为每毫升 Car 样品中相当于湿菌体的浓度 (g/mL)。比较 S_{td0} 、 S_{td1} 、 S_{td2} 和相对峰面积 4 种方法计算 Car 组分的相对含量。

2 结果和分析

2.1 Car 样品的制备和回收率测定

采用硅胶柱层析制备的 Car 样品, 其吸收光谱呈现 Car 典型的三指峰, 特征吸收峰为 407、475 和 507 nm, 未见明显的细菌叶绿素吸收峰。重复测定 3 次, Car 组分的回收率为 94.84%, 其 RSD 为

1.49%, 表明硅胶柱层析能将 Car 组分稳定高效回收, 制备的 Car 样品能够满足 Car 组分含量测定的要求。

2.2 柠檬黄溶液的稳定性

柠檬黄溶液的吸收光谱如图 1-A 所示。柠檬黄在 256 nm 和 426 nm 呈现特征吸收峰, 室温黑暗条件下放置 96 h 内, 期间 5 次取样测定, 柠檬黄溶液 350–500 nm 吸收光谱重叠在一起, 未发生明显变化。结果表明: 在常温黑暗条件下, 在 350–500 nm 进行光谱测定, 柠檬黄能够满足其作为替代标准品测定的要求。

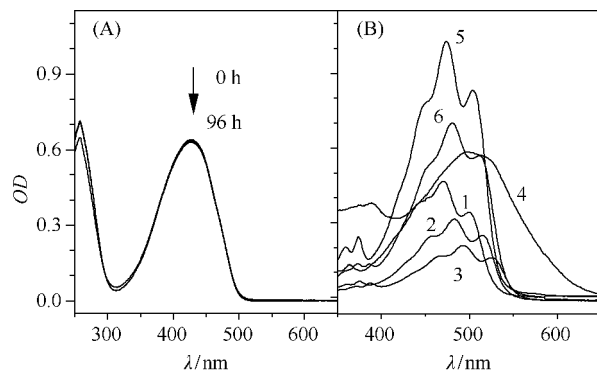


图 1. 柠檬黄 (A) 和 6 种 Car 纯组分 (B) 的吸收光谱

Figure 1. Absorption spectra of tartrazine (A) and six carotenoids (B) obtained from strain CQV97. 20.0 mg/L Tartrazine. 1–6: Lycopene, Anhydrorhodovibrin, Spirilloxanthin, Rhodovibrin, Rhodopin, 3,4-didehydrorhodopin. The concentration (mg/L) of 1 to 6: 1.49, 3.81, 2.41, 0.71, 1.62 and 1.26.

2.3 Car 标准品的制备、纯度鉴定和定量分析

CQV97 菌体细胞色素 TLC 指纹图谱和制备的 6 种 Car 的 HPLC 分析如图 2 所示, TLC 制备的 6 种

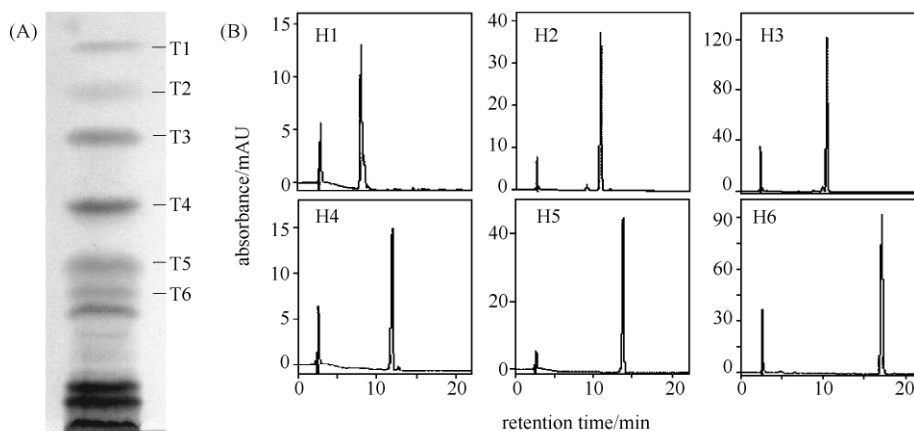


图 2. CQV97 菌体色素 TLC 指纹图谱 (A) 和制备的 6 种 Car (H1-H6) 标准品的 HPLC 纯度分析 (B)

Figure 2. TLC profile of pigments (A) and HPLC profiles (B) of six carotenoid standards obtained from strain CQV97.

Car 的编号、名称和 R_f 值, 以及 HPLC 保留时间 (R_t) 和纯度见表 1。结果表明: 制备的 Car 组分纯度较高, 均达 95% 以上, 且彼此出峰时间不重叠, 能够满足 Car 标准品的要求。利用各 Car 的最大吸收波长

λ_{\max} 和摩尔消光系数 ε_{\max} (表 1), 测定 6 种 Car 在相应溶剂中的含量, 即得 Car 标准溶液, 其浓度 (ρ) 见表 1。

表 1. 制备的 Car 标准品的保留时间、纯度、 ε_{\max} 、 λ_{\max} 和 Car 标准溶液的浓度

Table 1. R_t , purity, ε_{\max} and λ_{\max} of carotenoid standards and the concentration of carotenoid standard solutions

No.	No.		R_f	R_t (min)	purity /	$\varepsilon_{\text{petroleum ether}}^{[14]}$ /	λ_{\max} /	ρ /
HPLC	TLC	components	TLC	HPLC	%	[L/(mol·cm)]	(nm)	(mg/L)
H1	T4	rhodovibrin	0.59	7.545	97.7	152800	494	115.55
H2	T6	3,4-didehydrorhodopin	0.37	10.517	98.3	132000 ^b	482	475.55
H3	T5	rhodopin	0.44	11.104	95.5	165600	474	2718.67
H4	T3	spirilloxanthin	0.80	11.867	97.9	147200 ^a	494	168.89
H5	T2	anhydrorhodovibrin	0.90	13.854	99.5	152800	482	234.22
H6	T1	lycopene	0.97	17.183	98.0	184900	472	405.78

Note: a, $\varepsilon_{\text{benzene}}$; b, mean molar extinction coefficient, data from literature [19].

2.4 HPLC 分析参数和 Car 标准 HPLC 图谱

柠檬黄和 6 种 Car 的吸收光谱见图 1-A 和图 1-B, 它们的最大吸收峰 (λ_{\max}) 有较大差异, HPLC 分析可以选定每种色素的 λ_{\max} 作为检测波长, 测定的灵敏度高, DAD 检测器虽然容易实现, 但由于 Car 组分较多, 若选择多个检测波长, 在非 DAD 检测器的 HPLC 分析中, 工作量较大且繁琐。虽然柠檬黄和 6 种 Car λ_{\max} 有较大差异, 但它们在 475 nm 均有较强的光吸收, 而且文献中也常用 475 nm 进行 HPLC 分析, 为了测定简便, 将 HPLC 分析的波长选定为 475 nm。在选择条件下, HPLC 能够良好分辨 CQV97 样品的 6 种 Car。因此, 采用该 HPLC 条

件进行螺菌黄质系 Car 的定性定量分析。以制备的 6 种 Car 纯品为对照, 得到了螺菌黄质系 Car 的 HPLC 定性指纹图谱, 数据见表 2。

2.5 样品测定的重复性和时间稳定性

柠檬黄 HPLC 分析图谱呈现单一色谱峰, 柠檬黄和 Car 样品的重复性和 24 h 内样品的稳定性如表 2 所示。HPLC 重复测定各组分的保留时间 (R_t) 和峰面积 (S) 的 RSD (%) 均不大于 2.1, 24 h 内 6 次取样分析, 其 RSD 均不大于 2.5%。结果表明: 在 24 h 内重复测定, 即使是短时间光照, 光强低于 300 lux, 柠檬黄标准液和制备的 Car 样品稳定性较好。

表 2. 样品色素组分测定的重复稳定性 ($n=6$) 和时间稳定性 (0-24h)

Table 2. Repeatability and time stability of individual carotenoid component

samples	No.	components	R_t (min)		S			time stability
			x	RSD	x	R/%	RSD	(RSD_{R_t}/RSD_S)
Car	H1	Rhodovibrin	7.603	0.02	528439	10.68	1.8	0.8/2.1
	H2	3,4-didehydrorhodopin	10.552	0.02	1293154	26.13	2.1	0.5/1.7
	H3	Rhodopin	11.109	0.02	2076102	41.95	2.1	0.6/1.4
	H4	Spirilloxanthin	11.815	0.2	178620	3.61	1.4	0.6/2.4
	H5	Anhydrorhodovibrin	13.875	0.2	460964	9.32	1.4	0.4/1.4
	H6	Lycopene	17.192	0.2	411166	8.31	1.3	0.3/1.9
Tar		Tartrazine	1.814	1.3	403212	-	1.9	1.6/2.0

R_t , retention time. S, peak area. R, relative peak area. RSD, relative standard deviation, (%). x , mean.

2.6 标准曲线制作和检出限

HPLC 分析的标准曲线见图 3, 各标准品标准曲线的拟合方程、检出限及线性范围见表 3, 其中 m 和 S 分别表示各标准品进样体积中的质量和峰面积。采用线性拟合, 各标准曲线均良好地符合

线性方程 $y = ax + b$ ($R^2 > 0.999$), 若采用正比函数关系拟合, 仅有柠檬黄的标准曲线能够良好地符合方程 $y = ax$ ($R^2 > 0.999$), 而 6 种 Car 标准曲线拟合方程的 R^2 相对较低, 尤其是 H4、H5 和 H6, 拟合方程的 R^2 约为 0.9。由此可见, 检测组分的含

量与检测的峰面积之间呈良好的线性关系, 但不是近似过原点的直线, 不符合替代标准品法计算

校正因子的原理^[15], 因此需要深入地分析思考它们之间的定量关系。

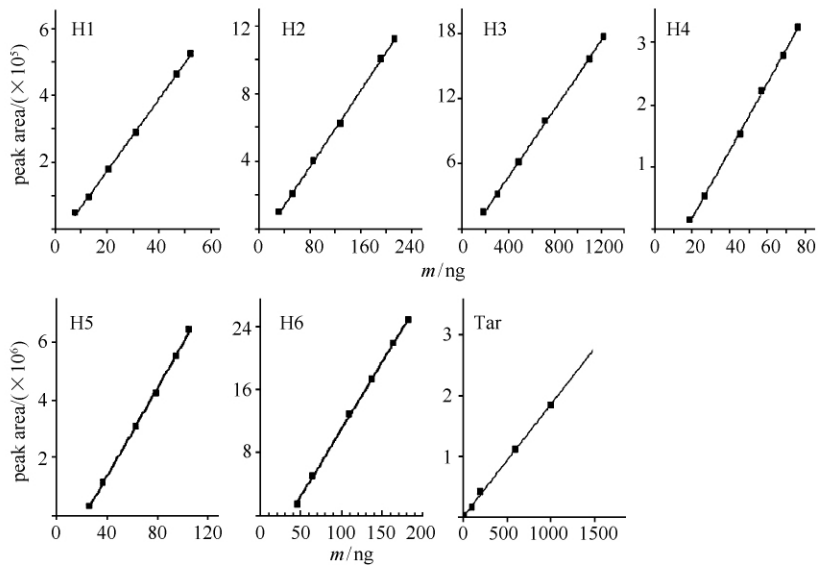


图 3. 6 种 Car (H1 - H6) 和柠檬黄 (Tar) 的标准曲线

Figure 3. Standard curves of six carotenoids (H1 - H6) and tartrazine (Tar).

表 3. 标准曲线拟合方程、检出限和线性范围

Table 3. Fitting equations, detection limit and linear range of standard curves

No.	components	equations $y = ax + b$	R^2	detection limit	linear range ng	equations $y = ax$	R^2
H1	rhodovibrin	$S = 10751m - 41631.2$	0.9992	2.25 ng	7.8 - 52	$S = 9656.6m$	0.9854
H2	3,4-didehydrorhodopin	$S = 56616.8m - 912477$	0.9996	1.55 ng	32.1 - 214	$S = 50790m$	0.9855
H3	rhodopin	$S = 15652.5m - 1477603$	0.9996	4.67 ng	183 - 1223	$S = 14061m$	0.986
H4	spirilloxanthin	$S = 5429.4m - 91595$	0.9994	5.09 ng	19.0 - 76	$S = 3839.0m$	0.8981
H5	anhydrorhodovibrin	$S = 7672.9m - 174188$	0.9993	8.12 ng	26.3 - 105	$S = 5492.6m$	0.904
H6	lycopene	$S = 17083m - 619018$	0.9995	8.86 ng	45.6 - 182	$S = 12609m$	0.9186
Tar	tartrazine	$S = 1842.9m + 4394.2$	0.9996	9.42 ng	10.0 - 1600	$S = 1846.8m$	0.9996

2.7 替代标准品和待测组分的校正关系

在特定的检测波长和检测条件下, 当检测信号 (峰面积) 相等时, 替代标准品的质量分别与 6 种待测 Car 质量之间呈特定的函数关系。以 m_{Tar} 和 m_{Lyc} 和 m_i 分别表示替代标准品柠檬黄 (S_{id1})、替代标准品番茄红素 (S_{id2}) 和待测 Car 的质量, 替代标准品的标准曲线和待测 Car 标准品的标准曲线通过消元法解联立方程, 分别确定了替代标准品质量与各待测 Car 的质量之间的校正关系, 如表 4 所示。样品测定时, 以替代标准品制作标准曲线, 通过替代标准品

的标准曲线求得各待测 Car 组分相对于替代标准品的量值 (m_{Tar} 或 m_{Lyc}), 再通过相应的校正关系求出各待测组分的量 (m_i)。

2.8 样品的加标回收率

Car 标准品法测定的 Car 样品各组分的加标回收率如表 5 所示, CQV97 菌体样品中积累的 6 种 Car 的加标回收率在 96% - 104% 之间, 采用 2 种替代标准品法计算的加标回收率与 Car 标准品法测定的结果相一致, 误差小于 0.1%。表明样品中影响 Car 测定的干扰因素较小。

表 4. 待测组分与替代标准品含量之间的校正关系

Table 4. Content calibration relationship between tested samples and substitute standards

No.	component	calibration equations		R ²	calibration equations		R ²
		(S _{td0} and S _{td1})			(S _{td0} and S _{td2})		
H1	thodovibrin	m _i = 0.1714 m _{Tar} + 4.2812		1	m _i = 1.589 m _{Lyc} - 53.71		1
H2	3,4-didehydrohodopin	m _i = 0.0326 m _{Tar} + 16.194		1	m _i = 0.3017 m _{Lyc} + 5.183		1
H3	rhodopin	m _i = 0.1177 m _{Tar} + 94.681		1	m _i = 1.091 m _{Lyc} + 54.85		1
H4	spirilloxanthin	m _i = 0.3394 m _{Tar} + 17.680		1	m _i = 3.146 m _{Lyc} - 97.14		1
H5	anhydrohodovibrin	m _i = 0.2402 m _{Tar} + 23.274		1	m _i = 2.226 m _{Lyc} - 57.97		1
H6	lycopene	m _i = 0.1079 m _{Tar} + 36.493		1	m _i = m _{Lyc}		1

2.9 实际样品中类胡萝卜素组分和含量的测定

供试样品 Car 组分 HPLC 分析, CQV97 菌株积累 6 种 Car (H1-H6), 以 CQV97 为 Car 定性标准, YL28 菌株主要积累 3 种 Car, 分别为 H3、H5 和 H6。各 Car 组分含量分析如表 6 和表 7 所示, Car 标准品法 (S_{td0}) 测定: CQV97 积累的 Car 各组分含量 (μg/g) 在 61.75 - 281.71 之间, 其中 Rhodopin 含量最高, 占 Car 总量的 44.35%; YL28 主要积累 Rhodopin, 占 Car 总量的 70.26%; 供试样品中各 Car 组分含量测定的 RSD 不大于 1.5。2 种替代标准品 (S_{td1} 和 S_{td2}) 法测定的供试样品中 Car 各组分含量、

相对含量和 RSD 与 Car 标准品 (S_{td0}) 法测定的结果良好地吻合, 其相对标准误差小于 0.1%。结果表明: 柠檬黄或番茄红素作为 Car 组分的替代标准品准确可靠, 能准确地传递待测 Car 组分之间的量值关系。Car 标准品法与替代标准品法计算的 CQV97 菌体中积累 Car 组分的相对含量与相对峰面积法计算的结果相比有较大差异。究其原因, 峰面积并不是含量, 虽然峰面积与含量成正相关关系, 但各组分峰面积与含量之间的关系系数不尽相同, 是造成测定结果差异的重要原因。

表 5. Car 样品各组分加标回收率的测定 (n = 6)

Table 5. Recovery determination of tested samples (n = 6)

No.	adding standards ρ / (μg/mL)	peak area		dilution factor (f)	ρ / (μg/mL)		recovery / %	
		x	RSD / %		x	RSD / %	x	RSD
H1	-	528430	1.8	1	2.6512	1.7	96.7	2.4
	2.3111	483641	1.7	2	4.8858	1.6		
H2	-	1293154	2.1	1	1.9479	1.2	96.9	2.1
	9.5111	11726997	1.9	1	11.1623	1.7		
H3	-	2075102	2.1	1	11.3487	1.2	97.4	2.4
	54.3733	18647818	2.1	1	64.2882	1.9		
H4	-	178620	1.4	1	2.4884	0.9	97.6	2.1
	3.3777	536554	1.4	1	5.7847	1.2		
H5	-	460964	1.4	1	4.1389	1.0	100.9	2.2
	4.6844	1186155	1.4	1	8.8646	1.2		
H6	-	411166	1.1	1	3.0152	0.5	103.3	1.5
	8.1156	3276282	1.3	1	11.4011	1.1		

表 6. 4 种方法分析 CQV97 菌株 Car 组分的比较 (n = 6)

Table 6. Comparison of individual carotenoid from strain CQV97 by four different methods (n = 6)

No.	S _{td0}			S _{td1}			S _{td2}			relative area / %	
	Wi / (μg/g)	R / %	RSD / %	Wi / (μg/g)	R / %	RSD / %	Wi / (μg/g)	R / %	RSD / %	x	RSD
H1	65.79	10.36	1.3	65.78	10.36	1.3	65.79	10.36	1.3	10.68	1.8
H2	48.34	7.61	1.5	48.38	7.62	1.5	48.32	7.61	1.5	26.13	2.1
H3	281.71	44.35	1.5	281.66	44.35	1.5	281.68	44.36	1.5	41.96	2.1
H4	61.75	9.72	1.1	61.75	9.72	1.1	61.73	9.72	1.1	3.61	1.4
H5	102.71	16.17	1.2	102.72	16.17	1.2	102.66	16.17	1.2	9.32	1.4
H6	74.83	11.78	1.1	74.83	11.78	1.1	74.83	11.79	1.1	8.31	1.3
sum	635.13	100	-	635.12	100	-	635.01	100	-	100	-

表 7. 3 种方法分析 YL28 菌株 Car 组分的比较 (n = 6)

Table 7. Comparison of individual carotenoid from strain YL28 by three different methods (n = 6)

No.	S _{id0}			S _{id1}			S _{id2}		
	Wi / (μg/g)	R / %	RSD / %	Wi / (μg/g)	R / %	RSD / %	Wi / (μg/g)	R / %	RSD / %
H3	290.06	70.26	1.1	290.012	70.26	1.1	289.983	70.26	1.1
H5	52.21	12.65	1.4	52.211	12.65	1.4	52.192	12.65	1.4
H6	70.57	17.09	1.2	70.569	17.10	1.2	70.565	17.10	1.2
sum	412.84	100	-	412.792	100.00	-	412.740	100.00	-

3 讨论

样品的稳定性是实现高准确度定量分析的关键。APB 菌体中同时含有 Car 和 BChl 两类色素, 由于样品中含 BChl, 多次测定 Car 组分的偏差较大, 其原因是 HPLC 进样等过程中很难完全避光, 样品中的 BChl 见光可产生单线态氧 (1O_2), 导致样品中 Car 易光解^[20]。因此, 我们采用硅胶层析法去除了样品中的 BChl, 样品 Car 回收率高且稳定。制备的 Car 样品即使给予 300 lux 短时间光照, 24 h 内 HPLC 重复测定稳定性好, 样品的稳定性能够满足 HPLC 分析要求。

替代标准品法定量分析, 首先要求对测定组分进行定性分析。HPLC、UV-Vis 和 MS 数据综合分析, 是目前 APB Car 定性的主流方法, 但该方法对操作者要求高, 而且质谱仪昂贵, 检测成本较高。与文献中报道的 HPLC 指纹图谱比较也是 Car 定性分析的可行方法, 但由于图谱中保留时间相近色谱峰的缺失以及不同批次操作之间的差异, 若没有标准对照, 有时则难以鉴别, 例如: YL28 色素的 HPLC 图谱中缺失 H2 和 H4 色谱峰, H3 很难辨认, 若同时与 CQV97 Car 色谱图比较, 则容易鉴别。鉴于 CQV97 稳定地积累螺菌黄质系 6 种 Car, 而且各组分的色谱峰清晰可辨, 因此我们建议, 在样品定性和定量分析时, 应同时以 CQV97 的 Car 作对照。

替代标准品的优势和校正因子法的局限性。替代标准品法也称“一测多评法”, 是解决对照品紧缺、多组分同步测定和降低检测成本的良好策略。通过替代标准品与多个测定组分量值之间的校正因子 (RCF), 实现了待测样品中多测定组分的同步测定^[15-18]。但我们在测定过程中, 与相应的标准曲线相比, 采用 RCF 校正的误差较大, 待测 Car 组分不

同, 误差不同, 其中 H4 的相对误差最大。经过仔细分析, 除了替代标准品柠檬黄的标准曲线近似地经过原点, 待测组分的标准曲线是不经过原点的直线, 尤其是 H4, 若强制过原点, 其标准曲线拟合的 R^2 甚至小于 0.9。由此可见: 替代标准品校正因子法, 仅适合于标准曲线过原点或近似过原点的情况, 而对于不过原点的标准曲线之间, 则不能简单地套用替代标准品的方法确定替代标准品与待测样品之间的校正关系。鉴于这种情况, 我们尝试了替代标准品校正函数法进行了 Car 组分的定量分析, 其原理是: 在给定条件下, 各个待测组分的含量与检测器响应信号呈线性关系, 那么各待测组分之间的响应信号和含量之间也应该具有固有的相关关系, 换句话说, 当检测信号的值相等时, 待测组分含量 (浓度或质量) 的值之间呈现特定的函数关系, 当待测组分的含量相等时, 它们之间的检测信号值呈现特定的函数关系。依据这一原理, 我们以替代标准品与待测组分的标准曲线为基础, 以响应信号 (峰面积) 为媒介, 尝试消元法解联立方程, 假定响应信号相等, 建立了待测组分和替代标准品之间量值的校正函数关系, 通过函数关系校正替代标准品与待测组分的量值关系。鉴于此, 在本文确定的 HPLC 测定条件下, 我们分别以柠檬黄和番茄红素为替代标准品, 依据其标准曲线, 逐一建立了替代标准品与 6 种 Car 之间的量值校正关系曲线。通过替代标准品校正关系测定的各 Car 组分的含量、相对含量、RSD 和回收率均与标准曲线法测定的结果良好地吻合, 其相对标准误差小于 0.1%, 其误差来源主要是由于校正函数关系的有效数字取舍产生的。表明替代标准品柠檬黄和番茄红素校正函数法准确度高, 能准确地传递待测组分之间的量值关系。为了与 RCF 相区别, 我们将之称为校正函数法, 由于直线方程包括经过原点的直线方程, 校正函数法原则上适合于任何相

关系的校正,也适用于目前的替代标准品校正因子,弥补了现有 RCF 的不足。

综上所述:采用 HPLC 方法,分别以柠檬黄和番茄红素为替代标准品,分别建立了这 2 种替代标准品与 6 种 Car 组分的定量校正函数关系,以 CQV97 的 Car 组分做定性对照,实现了光合细菌螺菌黄质系 Car 组分的定性定量分析。与待测物标准曲线法相比,替代标准品校正函数法同样具有准确度高、重复性好、稳定性好的优点。与多组分标准品法相比,替代标准品法更加简单、快速、成本低廉。本文建立的方法为 APB 光合色素代谢的定量分析提供了思路和方法的保障。现有替代标准品 RCF 校正法,仅适合于标准曲线过原点或近似过原点的情况,若标准曲线不过原点,则误差较大,不具有普适性。而校正函数法基于测定的标准曲线,通过理论推导建立了替代标准品与待测组分之间量的校正函数关系,弥补了现有 RCF 的不足,使替代标准品与待测组分之间的量值的传递更加能准确,误差更小,进一步完善了替代标准品法的思想,提高了替代标准品法的普适性。

参考文献

- [1] Brotsudarmo TH, Collins AM, Gall A, Roszak AW, Gardiner AT, Blankenship RE, Cogdell RJ. The light intensity under which cells are grown controls the type of peripheral light-harvesting complexes that are assembled in a purple photosynthetic bacterium. *Biochemical Journal*, 2011, 440: 51-61.
- [2] Kuo FS, Chien YH, Chen CJ. Effects of light sources on growth and carotenoid content of photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Bioresource Technology*, 2012, 113: 315-318.
- [3] Woronowicz K, Niederman RA. Proteomic analysis of the developing intracytoplasmic membrane in *Rhodobacter sphaeroides* during adaptation to low light intensity. *Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes*, 2010, 675 (3): 161-178.
- [4] Moskalenko AA, Makhneva ZK. Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochromatium minutissimum* assembled without carotenoids. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012, 108: 1-7.
- [5] Guang D, Li J, Shen D, Cao F, Li L, Jiang X. Identification and quantification of photosynthetic bacteria by PCR method. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2008, 14 (5): 699-704. (in Chinese).
- 关大伟,李俊,沈德龙,曹凤明,李力,姜昕.光合细菌 PCR 检测技术的建立与应用.应用与环境生物学报,2008,14(5):699-704.
- [6] Shen T, Liu S, Fu L, Zheng J, Li W. Application and mechanism of photosynthetic bacteria in fish culture. *Fisheries Science*, 2012, 31 (2): 114-117. (in Chinese).
- 沈涛,刘斯开,傅罗琴,郑佳佳,李卫芬.光合细菌在鱼类养殖上的应用及其作用机理.水产科学,2012,31(2):114-117.
- [7] Korthals H, Steenbergen C. Separation and quantification of pigments from natural phototrophic microbial populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 1985, 31(3): 177-185.
- [8] Mitrowska K, Vincent U, von Holst C. Separation and quantification of 15 carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection with isosbestic wavelength approach. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1233: 44-53.
- [9] Qian W, Wang Z, Han B, Xiao M, Du G, Li Y. Studies of lycopene from photosynthetic bacteria. *Journal of Shandong University*, 2004, 39 (3): 111-115. (in Chinese).
- 钱卫,王肇颖,韩波,肖敏,杜桂彩,李永贵.光合细菌中番茄红素的研究.山东大学学报,2004,39(3):111-115.
- [10] Zhang J, Lu L, Yin L, Xie S, Xiao M. Carotenogenesis gene cluster and phytoene desaturase catalyzing both three- and four-step desaturations from *Rhodobacter azotofomans*. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 333 (2): 138-145.
- [11] Takaichi S, Sasikala Ch, Ramana ChV, Okamura K, Hiraishi A. Carotenoids in *Rhodospirillum rubrum* species: variation of compositions and substrate specificity of predicted carotenogenesis enzymes. *Current Microbiology*, 2012, 65 (2): 150-155.
- [12] Mizoguchi T, Isaji M, Harada J, Tamiaki H.

- Identification of 3, 4-didehydrorhodopin as major carotenoid in *Rhodospseudomonas* species. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2008, 7 (4) : 492-497.
- [13] Zhuo M, Zhao C, Chen Q, Yang S, Qu Y. Fingerprinting analysis of photopigments in purple bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (6) : 760-768. (in Chinese).
- 卓民权, 赵春贵, 程茜茹, 杨素萍, 曲音波. 紫细菌光合色素指纹图谱的建立与色素分析. *微生物学报*, 2012, 52 (6) : 760-768.
- [14] Qian P, Saiki K, Mizoguchi T, Hara K, Sashima T, Fujii R, Koyama Y. Time-dependent changes in the carotenoid composition and preferential binding of spirilloxanthin to the reaction center and anhydrorhodovibrin to the LH1 antenna complex in *Rhodobium marinum*. *Photochemistry and Photobiology*, 2001, 74 (3) : 444-452.
- [15] Wang Z, Qian Z, Zhang Q, Zhu J, Gao H, Wang Z. Technique guide for quantitative analysis of multi-components by single marker. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36 (6) : 657-658. (in Chinese).
- 王智民, 钱忠直, 张启伟, 朱晶晶, 高慧敏, 王峥涛. 一测多评法建立的技术指南. *中国中药杂志*, 2011, 36 (6) : 657-658.
- [16] He F, Li S, Zhao Z, Dong J, Liu W, Su R. Simultaneous quantitative analysis of four lignanoids in *Schisandra chinensis* by quantitative analysis of multi-components by single marker. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47 (7) : 930-933. (in Chinese).
- 贺凤成, 李守信, 赵志全, 董金平, 刘武占, 苏瑞强. 一测多评法测定五味子中 4 种木脂素类成分的含量. *药学学报*, 2012, 47 (7) : 930-933.
- [17] Xu J, Jin H, Sun L. Determination of loureirin A and loureirin B in *Dracaena cochinchinensis* by substitute reference substance. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011, 31 (11) : 2058-2062. (in Chinese).
- 许佳, 金红宇, 孙磊. 替代对照品法测定龙血竭原料中龙血素 A 和 B 的含量. *药物分析杂志*, 2011, 31 (11) : 2058-2062.
- [18] Yuan Y, Gu J, Hang T, Qian W, Chen J, Zhang Z. High performance liquid chromatographic method for the determination of allicin using ethylparaben as substitute of allicin reference standard. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36 (8) : 1083-1088. (in Chinese).
- 袁耀佐, 顾洁, 杭太俊, 钱文, 陈坚, 张正行. 用替代对照品羟苯乙酯高效液相色谱方法测定大蒜辣素. *分析化学*, 2008, 36 (8) : 1083-1088.
- [19] Gall A, Henry S, Takaichi S, Robert B, Cogdell RJ. Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions. *Photosynthesis Research*, 2005, 86 (1) : 25-35.
- [20] Fiedor J, Fiedor L, Winkler J, Scherz A, Scheer H. Photodynamics of the bacteriochlorophyll-carotenoid system 1. Bacteriochlorophyll-photosensitized oxygenation of beta-carotene in acetone. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 76 (2) : 145-152.

Quantification of carotenoids of spirilloxanthin series from anoxygenic phototrophic bacteria by substitute reference standard calibration function method

Chungui Zhao, Minquan Zhuo, Suping Yang*

Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] In this study, we developed a strategy for accurate, rapid and simultaneous quantification of six carotenoids by substitute reference standard. [Methods] We prepared six carotenoid standards of spirilloxanthin series from *Rhodospirillum rubrum* CQV97 by spectrophotometry, thin layer chromatography and HPLC. The simultaneous quantification method for six carotenoids was established by HPLC using tartrazine and lycopene as substitute reference standards. [Results] We established the HPLC fingerprinting of carotenoids of spirilloxanthin series. The quantitative calibration function relationships between two substitute reference standards and six carotenoids were explored. Based on the quantitative calibration function relationships, we quantitatively analyzed carotenoid contents of two samples of CQV97 and YL28 strains. The RSD and recovery of carotenoid contents determined by substitute reference standards method were consistent with quantitative analysis of carotenoid standards method. [Conclusion] The substitute reference standards were capable of accurately transmitting the quantitative relationship of tested samples. The method could realize the simultaneous quantification of six carotenoids.

Keywords: quantification, carotenoids, spirilloxanthin series, substitute reference standard

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070054, 31270106) and by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2010J01209, 2012J01136)

* Corresponding author. Tel: +86-592-6166178; E-mail: yangsuping@hqu.edu.cn

Received: 30 May 2013/Revised: 12 July 2013

《微生物学报》EndNote Style

EndNote 文献管理软件能够帮助科研人员更好地进行学术研究、学习以及论文的撰写,这已经被越来越多的人熟悉、接受。为了方便作者写作与投稿,我们编制了“《微生物学报》EndNote Style”文件。利用 EndNote 轻松调取收集的文献,自动按照《微生物学报》的格式生成论文的参考文献。

1. 建议作者在投稿本刊时使用“《微生物学报》EndNote Style”文件,这会让您在写作过程中更加轻松快乐。请到本刊网站的“下载专区”中获取这个文件。

2. 将“《微生物学报》EndNote Style”文件下载后,复制到 EndNote 安装文件夹下面的 Style 子目录中。

3. 在使用 EndNote 文献管理软件插入文献后,投稿前,请用 EndNote 软件的“Convert to Plain Text”功能,将文章中的参考文献转化成 Plain Text 格式,以便于编辑修改。【注:本刊的这个文件是在 EndNote X5 环境下编制的,因此无法在低于 X5 版本的环境打开和使用。】

4. 因本刊是中文期刊,需要作者对 3 处手工调节。具体写法参见本刊网站“投稿须知”中的“参考文献”。

(1) 西文刊名:2009 年开始西文刊名需要全拼,为的是保证刊名的书写准确。

(2) 非英文的期刊:以尊重原始文种为主,2012 年底开始采用双语表述。先英文文献后原文献,并在英文文献的后面标出“文种”。

(3) 译著:需要给出外国作者的原姓名。

致谢:“《微生物学报》EndNote Style”是在本刊副主编、中国军事医学科学院微生物流行病学研究所杨瑞馥先生的建议下开始的,杨老师实验室的崔玉军博士按照《微生物学报》的要求编辑了该文件。在此,谨向他们表示衷心地感谢!