

Application News

No.A482

分光光度分析

使用岛津紫外可见分光光度计快速测定水中的微拟球藻微藻含量

矿物燃料燃烧引起的全球变暖已成为一个公认的问题，在矿物燃料的替代品中，近年已开展了从微藻类中提取燃料的研究。尽管微藻类的单位面积产量很高，并且全年均可收获，但是开发过程中存在巨大困难和挑战，必须克服这些挑战，才能将微藻类成为可行的替代燃料来源。目前正在对在生产过程中包括育种，栽培，收获和石油提取在内的各个阶段开展多项研究。在研究微藻类的过程中，每天测量生长量（浓度）至关重要。目前采用干重法进行测量，即用滤纸过滤样品，并在称重前干燥，这种方法繁琐耗时，需要找到一种更简单、更快速的方法来代替干重法。使用紫外可见分光光度计轻松测定微藻类浓度，使用一次性螺口样品瓶（或一次性比色皿）可以在大约一分钟内快速地完成单个样品的测量。本应用报告介绍了使用岛津紫外可见分光光度计测量微拟球藻微藻的实例。

■ 样品 – 微拟球藻微藻

将微拟球藻微藻样品（Higashimaru Co., Ltd., 100 亿个细胞/mL）稀释，制备了十二个 0~100% 浓度范围内的样品。图 1 为所制备样品的图片。将这些样品分为两组，一组为标准样品，另一组为验证样品。见表 1 和表 2。



图 1 微拟球藻微藻样品图片

表 1 标准样品

标准样品	浓度 (%)
①	100
②	90
③	80
⑤	60
⑥	50
⑦	40
⑨	20
⑩	10
⑫	0 (纯水)

表 2 验证样品

验证样品	浓度 (%)
④	70
⑧	30
⑪	5

■ 测量仪器

使用岛津 UV-2600 紫外可见分光光度计和积分球附件用于藻类分析。测量样品的反射率，将装有样品的一次性螺口样品瓶放置在积分球中，并测量每个样品的全反射率。安装的积分球附件的 UV-2600 如图 2 所示。使用一次性螺口样品瓶进行这些测量，无需清洗等操作，避免了交叉污染等问题。



图 2 安装积分球附件的 UV-2600

■ 测量结果

表 1 和表 2 中列出的 12 个样品的浓度，每个浓度的样品测量两次（12 个样品 × 2 = 总共 24 个数据集）。结果见图 3，分析条件见表 3。结果表明，浓度越高，反射率越大，浓度越低，反射率越低，反射率与浓度成线性关系，表明微藻细胞的数量越多，从液面反射光的程度就越大。

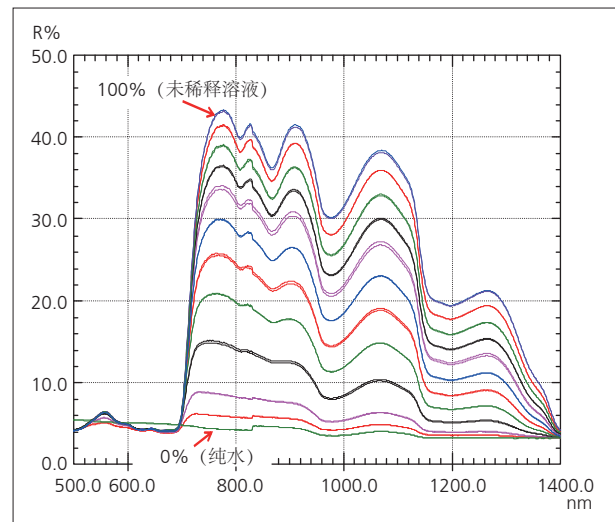


图 3 一次性螺口样品瓶中微藻类的反射光谱

表 3 分析条件

仪器	: UV-2600 紫外可见分光光度计 积分球附件
测量波长范围	: 500 nm – 1400 nm
扫描速度	: 中
采样间隔	: 1.0 nm
测试模式	: 反射率
狭缝宽	: 5 nm

定量分析结果

本实验中，我们尝试使用反射光谱对微藻进行定量。使用单一线性回归方法和多元分析多元线性回归方法进行定量，然后比较各自的定量精度。根据表 1 的样品，获得每个标准样品的校准曲线模型的回归表达式。使用多元线性回归方法时，将回归方程式输入到标准 UVProbe 软件的光度测量方法窗口中，如图 4 所示。通过此设置，软件将输出通过回归方程计算的每个测量样品的预测值。

表 4 显示了基于表 2 验证样品的测量值计算得出的浓度结果。对结果进行对比，很明显，使用多元线性回归方法取得的结果优于单一线性回归方法的结果。用这种方法，只需在标准 UVProbe 软件中输入回归方程，即可轻松完成未知样品的测量。

此外，使用多元线性回归法的回归方程式是通过 Microsoft Corporation 的 Excel 1) 电子制表软件中的“回归分析”函数来确定的。表 4 的 RMSEP 是指图 5 中定义的值，并且是表示预测值与实际值之间平均差异的指标。因此，RMSEP 值越小，预测精度越高。在单一线性回归方法中，使用 UVProbe 软件的标准校准功能进行定量。注：使用单一线性回归方法，根据在 910 nm 处获得的单一波长数据进行计算。在多元线性回归方法中，使用四个波长数据集进行计算，即 870 nm，910 nm，980 nm 和 1070 nm。

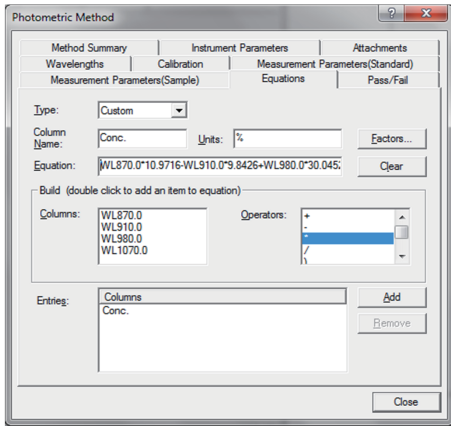


图 4 UVProbe 软件

表 4 根据不同校准模型计算出的验证样品浓度预测结果

验证样品	实际浓度 (%)	单一线性回归方法预测结果 (%)	多元线性回归方法预测结果 (%)
④ -1	70	72.9	69.2
④ -2	70	73.4	69.1
⑧ -1	30	32.4	28.3
⑧ -2	30	32.3	30.0
⑪ -1	5	1.4	5.3
⑪ -2	5	1.5	5.4
RMSEP		3.1	0.87

* RMSEP: 预测结果均方根误差

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y'_i - y_i)^2}{N}}$$

yi' 为预测值，yi 为实际值，

N 为验证样品的数量。

图 5 RMSEP 的定义方程式

吸收光谱的测量 (透射率测量)

当微藻类浓度低时，由于反射率低，因此难以进行准确定量。为了解决这个问题，我们对使用积分球进行透射率测量的方法进行了研究，从而能够测量包括直线透射光和散射透射光在内的总透射光的吸收光谱。

将包括表 1 和表 2 所列的测量样品均匀稀释 20 倍。使用一次性比色皿进行测量。图 6 为安装在积分球中装满样品的一次性比色皿 (光程长度为 10 mm)。每个样品测量两次 (12 个样品 × 2 = 总共 24 个数据集)。

测量结果见图 7，分析条件见表 5。图 8 为图 7 部分波长区域的放大图。结果表明吸光度与浓度成线性关系，浓度越高，吸光度越大，浓度越低，吸光度越低。应当注意，当通过透射法进行测量时，无需使用为藻类测量而设计的采用反射法的积分球附件，可以使用标准类型的积分球附件。

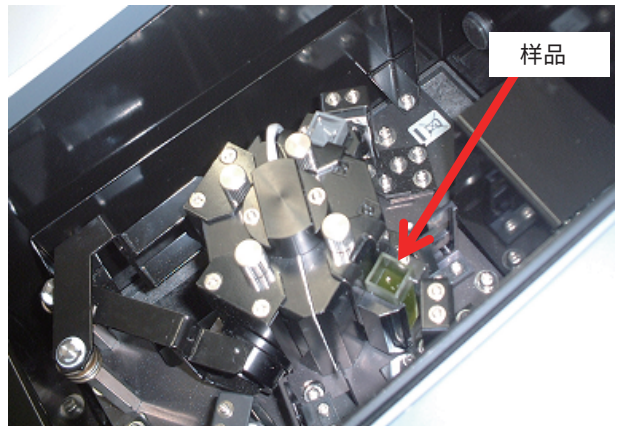


图 6 积分球附件中的一次性比色皿

表 5 分析条件

仪器	: UV-2600 紫外可见分光光度计 ISR-2600Plus 积分球附件
测量波长范围	: 300 nm – 800 nm
扫描速度	: 中
采样间隔	: 1.0 nm
测定方式	: 吸光度
狭缝宽	: 5 nm

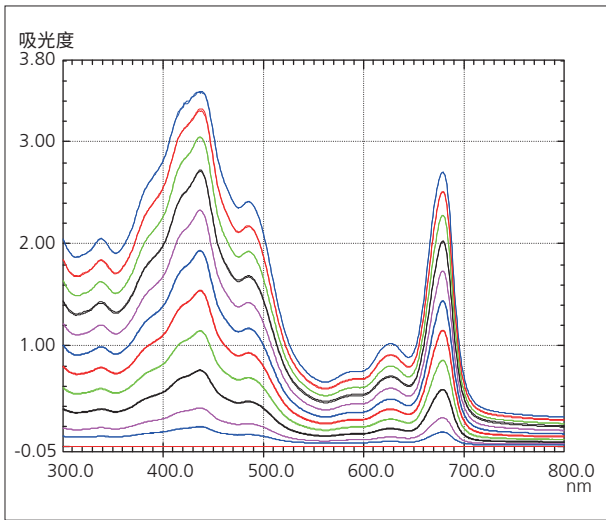


图 7 吸收光谱

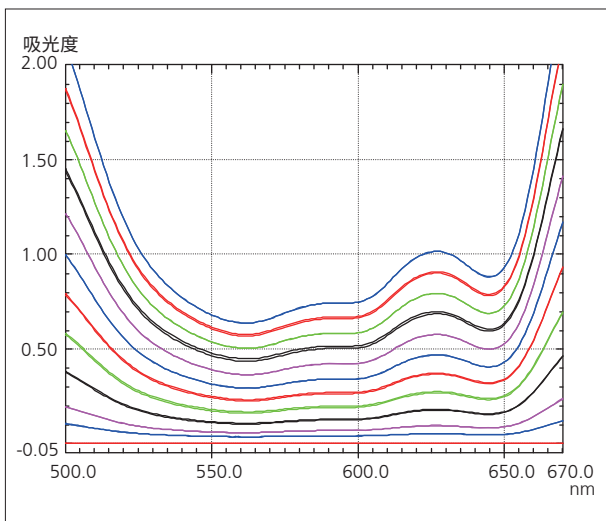


图 8 图 7 的放大图

定量分析结果（透射率测量）

我们尝试用吸收光谱对微藻类进行定量。与反射法相同，我们通过单一线性回归和多元线性回归方法进行了定量，并比较了定量准确性。结果见表 6。此处多元线性回归方法获得的结果依然更优。由于将反射法测定的所有样品均稀释 20 倍，因此表 6 中的“实际浓度 (%)”为表 2 中验证样品所示值的 1/20。

注：使用单一回归方法，根据在 625 nm 处获得的单一波长数据进行计算。在多元线性回归方法中，使用以下波长数据集进行计算：

580 nm、625 nm 和 660 nm。

表 6 使用不同校准模型计算的验证样品浓度的预测结果

验证样品	实际浓度 (%)	单一线性回归方法预测结果 (%)	多元线性回归方法预测结果 (%)
④ -1	3.5	3.52	3.52
④ -2	3.5	3.47	3.50
⑧ -1	1.5	1.42	1.50
⑧ -2	1.5	1.45	1.51
⑪ -1	0.25	0.35	0.25
⑪ -2	0.25	0.36	0.25
RMSEP		0.073	0.009

针对在微藻研究中其他分析仪器应用的研究

在微藻类的研究中，除了紫外可见（近红外）分光光度计（UV）以外，还使用了多种分析仪器。我们根据不同的研究目的对它们进行总结。

(1) 培养过程管理

当前，微藻类细胞质量（浓度）的监测主要通过干重法进行，但是所需的过滤和干燥操作繁琐且耗时。因此，现在采用 UV 和总有机碳分析（TOC）的简单方法。此外，TOC 还用于培养物和微藻的生理状态研究。

对微藻类产生的油脂和其他有机物质进行的定性分析通常需要借助气相色谱质谱仪（GCMS）或液相色谱质谱仪（LCMS）完成。为了进行定量，还需使用液相色谱仪（LC）或气相色谱仪（GC）等仪器。此外，还使用紫外可见（包括近红外）分光光度计，傅立叶变换红外分光光度计（FTIR）和荧光分光光度计（RF）等仪器进行简单的定性和定量分析。

目的	仪器
监测微藻类以及生成的有机物	TOC、UV
研究微藻类的生理状态	TOC
鉴定生成的有机物	GCMS、LCMS
对生成的有机物定量	GC、LC、GCMS、LCMS
对生成的有机物简单定量和定性	UV、FTIR、RF

(2) 提纯改性

由微藻类产生的有机物不适合用作燃料，首先需要先对其进行处理，如提纯和重组为低分子量物质。在完成此类杂质去除和重组工艺之后，可使用 LCMS 和 GCMS 对所得产物进行表征。

目的	仪器
重组后有机物的纯化、鉴定和定量	GCMS、LCMS

(3) 代谢组学

正在推进代谢通量分析和轮廓分析，以阐明微藻生成有用有机物的机制，并增加产量。目前需要借助 GCMS 和 LCMS 来开展行此类研究。

目的	仪器
代谢组学	GCMS、LCMS

(4) 有机物收获

藻类细胞的大小和硬度影响微藻类细胞收获的难易程度。目前正在考虑借助粒度分析仪（SALD）和扫描探针显微镜（SPM）进行这种评估。

目的	仪器
细胞表面硬度	扫描探针显微镜
细胞粒度分布	SALD

■ 结论

我们开发了一种可以轻松测量微藻类浓度的方法。

借助该方法，在样品浓度高时可利用反射率进行测量，而浓度低时则可使用透射率进行测量。反射法使用一次性螺口样品瓶，透射法使用一次性比色皿。

在微拟球藻微藻的定量实验中，RMSEP 值证明，使用反射法和透射法均获得了良好的结果。该技术可快速、简单的测定微藻类浓度。

此外，在微藻类研究中，除了监测细胞质量外，还需要进行多种测量和研究，比如培养过程管理，提纯重组，代谢组学研究以及收获方法评估等。多种分析手段可以进行有效研究，包括 UV、TOC、FTIR、GCMS、LCMS 等。

1) Excel 是 Microsoft Corporation 的注册商标或商标。

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2014年11月