

安子涵, 张宏宇, 殷佳欣, 等. 基于 HPLC 和 MC-ICP-MS 的植物叶绿素镁同位素测试方法[J]. 岩矿测试, 2024, 43(3): 476–486. DOI: [10.15898/j.ykcs.202208300161](https://doi.org/10.15898/j.ykcs.202208300161).

AN Zihan, ZHANG Hongyu, YIN Jiaxin, et al. Determination of Magnesium Isotopic Composition of Plant Chlorophylls Based on HPLC and MC-ICP-MS[J]. Rock and Mineral Analysis, 2024, 43(3): 476–486. DOI: [10.15898/j.ykcs.202208300161](https://doi.org/10.15898/j.ykcs.202208300161).

基于 HPLC 和 MC-ICP-MS 的植物叶绿素镁同位素测试方法

安子涵¹, 张宏宇¹, 殷佳欣^{1,2}, 张攀¹, 姚敏¹, 黄康俊^{1*}

(1. 西北大学地质学系, 大陆动力学国家重点实验室, 陕西 西安 710069;

2. 中国科学院广州地球化学研究所, 同位素地球化学国家重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 是植物光合作用时吸收光能的主要色素, 其中叶绿素 *b* 能帮助叶绿素 *a* 扩展吸收光谱促使其吸收更多光能, 叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 比例的改变有助于植物适应光照变化。准确测定叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的镁同位素值对研究叶绿素形成过程中镁的生物合成路径等问题具有重要意义, 其中将叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 分离并收集是使用多接收电感耦合等离子体质谱仪 (MC-ICP-MS) 准确测定两者镁同位素值的关键。高效液相色谱 (HPLC) 是分离叶绿素的常用仪器, 但目前 HPLC 分离叶绿素的方法主要聚焦于细菌和藻类叶绿素分离。因此, 需开发一套能将植物叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 分离的方法, 且该方法分离的样品适用于 MC-ICP-MS 的镁同位素测定。本文基于 665nm 检测波长和 C18 色谱柱 (7.6mm×250mm, 5μm), 以三因素三水平正交设计优化 HPLC 条件, 分析影响样品运行因素间的关系, 得出符合要求的参数条件。经过优化的 HPLC 方法柱温为 25℃, 流速为 1mL/min, 流动相为甲醇-丙酮 (80:20, V/V)。结果表明: 通过外标法定量分析叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 所得标准曲线在 5~50mg/L 浓度范围内的相关系数均大于 0.9996, 检测限为 0.40~1.09mg/L, 定量限为 1.22~3.31mg/L, 相对标准偏差 (RSD) 小于 8.10%, 样品加标回收率介于 91.92%~111.11%。采用该方法对样品进行分离后, 再利用 MC-ICP-MS 对前处理后的样品进行镁同位素测定, 标准-样品间插法测定的数据表明镁同位素测试结果可靠, 证明本文建立的方法为植物叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的分离提供了技术支撑, 且分离样品可用于镁同位素测定。

关键词: 镁同位素; 标准-样品间插法; 高效液相色谱法; 流动相; 叶绿素 *a*; 叶绿素 *b*

要点:

(1) HPLC 正交试验中, 流动相中丙酮和甲醇的比例是影响叶绿素分离效果的最重要参数。

(2) 建立了叶绿素提取、HPLC 分离、镁同位素测定的方法。

(3) 碳三和碳四光合路径植物中, 叶绿素 *a* 的镁同位素值均大于叶绿素 *b* 的镁同位素值。

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

镁是植物必需营养元素^[1-2], 能维持光合作用的正常进行^[3-4]。镁还是组成叶绿素的中心原子^[5-6], 植物中的叶绿素可分为叶绿素 *a* 和叶绿素 *b*^[7-8], 叶绿素 *b* 能帮助叶绿素 *a* 扩展吸收光谱, 辅助叶绿素 *a* 吸收光能^[8-9]。叶绿素 *a/b* 比值的降低或增高, 分别能吸收更多光能或减少过度光照对光合作用抑

制, 这些过程受各种生物酶的控制^[8-9]。镁在叶绿素的合成过程中会发生同位素分馏^[10], 通过测定叶绿素的镁同位素能探究植物在生长过程中对镁的利用情况^[11]、叶绿素形成过程中镁的生物合成路径^[12], 所以叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的镁同位素分馏受植物本身 (光合作用能量需求、叶绿素合成和分

收稿日期: 2022-08-30; 修回日期: 2024-01-31; 接受日期: 2024-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (42373061, 41890845)

第一作者: 安子涵, 硕士研究生, 主要从事地球生物学方向研究。E-mail: 202021424@stumail.nwu.edu.cn。

通信作者: 黄康俊, 博士, 教授, 主要从事非传统稳定同位素地球化学研究。E-mail: hkj@nwu.edu.cn。

解)、环境变化(光照等)等因素影响,叶绿素镁同位素分馏变化具有重要生物学意义。

研究叶绿素镁同位素分馏机理,需要分离并测定叶绿素的镁同位素值,而目前叶绿素的分离方法仍存在不足。叶绿素的分离方法主要有 DEAE-Sepharose 柱和高效液相色谱 (HPLC) 两种。Black 等^[13-14]采用 DEAE-Sepharose 柱分离了藻类叶绿素 *a*、植物叶绿素 *a* 和叶绿素 *b*,但该方法分离叶绿素耗时较长,且分离时样品易受环境温度等影响。因此,耗时更短、稳定性好的 HPLC 被更多学者用于分离叶绿素;但 HPLC 方法仍存在耗时较长、未用于叶绿素 *b* 分离及其镁同位素测定的问题。使用 HPLC 分离样品,可选择单一或不同比例的混合溶剂作为流动相搭配色谱柱。利用被分离组分的性质和结构等差异,使各组分在色谱柱中的流速不同,实现对样品的分离。Ra 等^[15]用 HPLC 分离了藻类叶绿素 *a* 和叶绿素 *b*,但该实验在操作时未纯化叶绿素,导致在使用仪器分离叶绿素时需先将其他色素分离,耗时长达 30min。Pokharel 等^[16]、Isaji 等^[17]用 HPLC 分离细菌叶绿素前对其进行了纯化,而细菌叶绿素中不含叶绿素 *b*,无法确定该方法能否用于植物叶绿素分离;Wrobel 等^[11]用 HPLC 分离植物叶绿素后只测定了叶绿素 *a* 的镁同位素值,不确定该方法是否适合用来分离植物叶绿素 *b*。综上,在用于叶绿素镁同位素测定的叶绿素分离方法中,DEAE-Sepharose 柱耗时长且易受影响,HPLC 缺少测定叶绿素 *b* 镁同位素的分离方法,且分离叶绿素的方法中柱温、流速、流动相等参数存在较大差异。因此,为实现对叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的高效分离,需要开发一套分离叶绿素的方法,并验证该方法适用于镁同位素测定。

本文建立了一种适用于分离叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的 HPLC 方法。参考前人研究,先对植物叶绿素进行提取,再通过正交试验优化 HPLC 参数条件,以线性关系、检测限和定量限、精密性 (RSD)、样品加标回收率评价该方法的可靠性。然后使用该方法对叶绿素样品进行分析和分离,利用多接收电感耦合等离子体质谱仪 (MC-ICP-MS) 对样品进行镁同位素分析,证明该分离方法适用于镁同位素的测定。

1 实验部分

1.1 仪器

高速离心机 (TG16K 型,美国 ThermoFisher 公司);用于纯化叶绿素。

氮吹仪 [HX-GS-12 型,华熙昕瑞 (青岛) 分析仪器有限公司];用于吹干叶绿素萃取液。

色谱柱 (ODS-3 C18 型, 7.6mm×250mm, 5μm, 日本岛津公司);用于分离叶绿素。

液相色谱仪 (Alliance e2695 型,美国 Waters 公司,配有 2489 UV/Vis Detector 检测器);用于分离和测定叶绿素。

多接收电感耦合等离子体质谱仪 (Neptune Plus 型,美国 ThermoFisher 公司);用于测定样品的镁同位素值。

1.2 主要试剂

叶绿素的提取、分离和分析试剂:叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 标准样品 (纯度大于 95%,美国 Merck 公司);氯化钠 (优级纯,上海国药集团化学试剂有限公司);甲醇 (质谱纯,上海麦克林生化科技有限公司);正己烷 (色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司);丙酮 (色谱纯,上海国药集团化学试剂有限公司)。

叶绿素的镁同位素前处理所需试剂:过氧化氢 (美国 ThermoFisher 公司);硝酸、氢氟酸、盐酸 (优级纯,上海国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 实验样品

水稻和玉米分别是碳三和碳四植物^[18],且都是常用的模式植物 (指生长周期短、基因组小的植物)^[19],所以选择这两种植物作为实验材料来探究叶绿素镁同位素的分馏情况。使用霍格兰德营养液 (配方参考前人实验^[20]),将镁离子浓度调整为 0.001mol/L 水培种植水稻和玉米,每三天更换一次营养液,植物种植 50 天后收获整株植物。因为叶绿素受外界条件 (如温度) 影响会发生降解^[21-22],所以需将植物低温保存。在收获植物时,先将其浸泡于液氮中速冻,再放置于-30℃ 条件下保存^[11,16,23],后续处理时从样品中随机挑选出水稻和玉米的叶片进行实验。

1.4 实验方法

1.4.1 叶绿素的提取

(1) 叶绿素的萃取

叶绿素酶存在于植物细胞,能催化叶绿素水解生成脱植基叶绿素^[8,24-25],该反应会在萃取叶绿素时发生^[26]。为降低萃取过程中脱植基叶绿素生成,本实验将萃取温度设为-30℃^[26];选取甲醇作为萃取试剂^[16],每次萃取时长定为 24h。

具体步骤如下:①称取 2.5g 植物叶片移入玛瑙研钵并添加液氮磨成粉末^[27];②向叶片粉末添加预冷至-30℃ 的甲醇 25mL 并放置于-30℃ 冷冻室

萃取 24h,用真空过滤装置分离萃取液和叶片粉末,重复步骤②三次;③合并三次萃取溶液(总计约 75mL),保存于-30℃ 冷冻室。

(2) 叶绿素的纯化

基于前人研究成果,本实验先用甲醇萃取出植物中的叶绿素,再用正己烷萃取甲醇中的叶绿素以达到纯化叶绿素目的^[16-17]。

具体步骤如下:①按照甲醇-氯化钠溶液(20 : 1, V/V)的比例向甲醇萃取液中添加氯化钠溶液(5mol/L)并混匀;②添加 32mL 正己烷,倒置试管 2~3 次,在 4℃、6000r/min 条件下离心 5min 后收集正己烷,步骤②至少重复三次直至离心后的正己烷

相无色;③将收集的正己烷相移至新离心管后,先将该离心管移至-30℃ 冷冻室静置 2h,再从其底部抽取 2mL 正己烷溶液丢弃(去除离心管底部氯化钠等沉淀);④正己烷溶液用氮吹仪吹干,吹干后的叶绿素沉淀溶于 1.5mL 丙酮并移至色谱瓶。对样品分离前,色谱瓶保存于-30℃ 冷冻室。

1.4.2 叶绿素的分析分离条件试验

为开发一种分离度高和运行时间短的 HPLC 方法,本实验基于前人对 HPLC 应用^[11,15,17],采用正交试验法探究柱温、流速、流动相三种因素对植物叶绿素分离影响。每种因素选择三个不同条件,以此设计正交试验表(表 1)。根据表 1 对叶绿素 a 和叶

表 1 叶绿素分离条件正交试验设计与结果

Table 1 Designs and results of orthogonal test on chlorophyll separation conditions.

正交试验编号	影响因素			正交试验结果	
	A 柱温 (℃)	B 流速 (mL/min)	C 流动相 (V/V)	叶绿素 a 保留时间(min)	叶绿素 a 和叶绿素 b 分离度
1	A1:25	B1:0.8	C1:甲醇-丙酮 (90 : 10)	22.08	6.22
2	A1:25	B2:1.0	C2:甲醇-丙酮 (80 : 20)	13.34	4.60
3	A1:25	B3:1.2	C3:甲醇-丙酮 (70 : 30)	8.53	3.19
4	A2:30	B1:0.8	C2:甲醇-丙酮 (80 : 20)	15.16	4.85
5	A2:30	B2:1.0	C3:甲醇-丙酮 (70 : 30)	9.44	3.51
6	A2:30	B3:1.2	C1:甲醇-丙酮 (90 : 10)	13.42	4.99
7	A3:35	B1:0.8	C3:甲醇-丙酮 (70 : 30)	10.93	3.49
8	A3:35	B2:1.0	C1:甲醇-丙酮 (90 : 10)	14.77	5.40
9	A3:35	B3:1.2	C2:甲醇-丙酮 (80 : 20)	9.37	4.47
叶绿素 a 和叶绿素 b 分离度	T_1	14.01	14.56	16.61	
	T_2	13.35	13.51	13.92	
	T_3	13.36	12.65	10.19	
	$\bar{T}_1$	4.67	4.85	5.54	
	$\bar{T}_2$	4.45	4.50	4.64	
	$\bar{T}_3$	4.45	4.22	3.40	
	R	0.22	0.63	2.14	
叶绿素 a 保留时间	T_1	43.95	48.17	50.27	
	T_2	38.02	37.55	37.87	
	T_3	35.07	31.32	28.90	
	$\bar{T}_1$	14.65	16.06	16.76	
	$\bar{T}_2$	12.67	12.52	12.62	
	$\bar{T}_3$	11.69	10.44	9.63	
	R	2.96	5.62	7.13	

注: T_i 代表各因素相同水平实验结果之和, $\bar{T}_i$ 代表实验结果的平均值, 相同因素下 T_i 越大, 表明该水平对实验结果影响越大; R 代表极差, 是各水平最大平均值与最小平均值之差, R 值越大, 表明该因素对实验结果影响越大。

绿素 *b* 的混合标样进行分离, 每组实验重复三次并取所需数据平均值进行分析, 用 665nm 检测波长测定叶绿素^[13]。最终, 选择 25℃ 柱温, 1mL/min 流速, 甲醇-丙酮(80:20, *V/V*)流动相作为 HPLC 的分离条件。收集样品前先测得样品色谱图, 根据色谱图的样品出峰时间手动收集(在色谱柱出样端口连接一根导管收集), 多次进样获取足够样品。

1.4.3 叶绿素镁同位素前处理与测定

获得叶绿素样品后, 首先对其进行镁同位素前处理操作, 即样品消解和镁元素纯化。本实验采取湿法消解破坏样品有机物获得镁离子^[28-29], 将收集的样品(含叶绿素的丙酮和甲醇混合液)置于电热板低温烘干去除有机试剂, 使用过氧化氢和硝酸消解叶绿素^[16]; 样品消解结束后, 通过离子交换树脂法对其进行镁元素分离纯化。本文使用 Bao 等^[30]开发的方法, 分两个步骤去除杂质元素, 即先用 6mol/L 盐酸去除铁和钙元素, 再用混合的 1mol/L 硝酸和 0.5mol/L 氢氟酸去除铝、铁、钠、钛元素。样品中的镁元素经过纯化后, 利用 MC-ICP-MS 测定样品镁同位素值。测试时使用 0.4μg/mL 的 GSB 国家标准镁溶液, 信号约 5~8V, 背景信号为 10⁻³V。采用标准-样品间插法测定样品^[30-31], 以

$\delta^X\text{Mg}(\text{‰}) = [({}^X\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{样品}} / ({}^X\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{DSM3}} - 1] \times 1000$ 表示测试结果, 其中 *X* 代表 25 或 26, DSM3 代表国际标样。

2 结果

2.1 HPLC 正交试验指标和运行参数

HPLC 正交试验的色谱图如图 1 所示, 1~9 组正交试验分别对应 1~9 号色谱图。因为每组正交试验重复三次所得出峰时间等参数差别不大, 故将每组正交试验第一次进样时的色谱图汇总于图 1。

根据实验需要, 本实验将叶绿素 *a* 的保留时间、叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的分离度作为正交试验的试验指标。样品从进样到出现峰极大点时所经过的时间为保留时间^[32]。由图 1 和表 1 可知, 在每组正交试验中, 叶绿素 *a* 的保留时间均大于叶绿素 *b*, 因此叶绿素 *a* 保留时间决定了样品的运行时长。在 HPLC 方法中, 分离度是反映相邻两组分分离程度的指标, 其值越大, 说明两组分分离效果越好^[32]。如根据表 1 计算结果可知, 图 1 中的 1 号色谱图分离度(6.22)最大, 其叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的出峰时间差最大; 同理, 在分离度最小的 3 号色谱图(3.19)中, 其叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的出峰时间差最小。

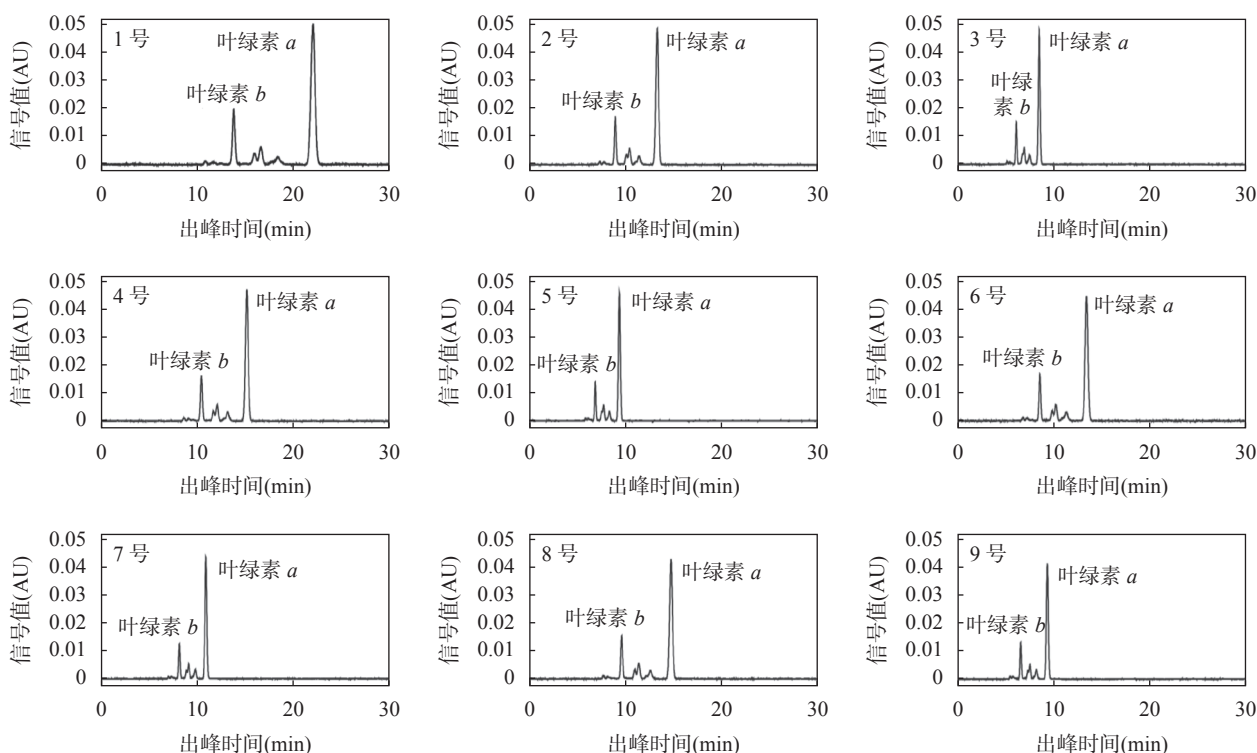


图1 叶绿素分离条件正交试验色谱图

Fig. 1 Chromatograms of orthogonal test for chlorophyll separation conditions.

本文根据液相色谱仪实际使用情况,选取了影响 HPLC 试验指标的三个运行参数,即柱温、流速、流动相。由表 1 可知,影响叶绿素 *a* 保留时间的三个因素 [A(柱温)、B(流速)、C(流动相)],极差 *R* 从大到小依次为 C、B、A 因素,因而因素 C 对叶绿素 *a* 保留时间的影响效果最大。同理,在影响叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 分离度的三个因素中,极差 *R* 从大到小依次为 C、B、A,因而因素 C 也是影响叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 分离度的最大影响因素。所以,流动相是影响 HPLC 运行状况最重要的因素。

2.2 HPLC 方法指标

本文参考前人研究^[33-34],使用以下方法指标衡量所选定的 HPLC 运行参数(见 1.4.2 节)是否可靠。

2.2.1 线性范围

用丙酮溶解叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 标准样品,配制 5、10、20、25、30、40、50mg/L 的混合标准溶液,将标准溶液移至色谱瓶进行测定,进样量为 50μL。以叶绿素浓度为横坐标,以峰面积响应值为纵坐标进行分析。结果显示叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 标准曲线线性回归方程分别为 $y=115888x+9504$ 和 $y=27570x-1302$,相关系数分别为 1.0000 和 0.9996,表明该 HPLC 方法能有效地测定 5~50mg/L 浓度范围内的叶绿素样品。

2.2.2 检测限和定量限

根据《中国药典》的定义,基于响应值偏差和标准曲线斜率,分别以公式 $LOD=3.3\delta/S$ 和 $LOQ=10\delta/S$ 计算检测限和定量限,公式中 δ 为标准曲线的剩余标准偏差,*S* 为标准曲线的斜率。结果如表 2 所示,表明该 HPLC 方法能检测出叶绿素含量较低的样品。

2.2.3 精密度

配制低、中、高三种浓度的标准溶液,每种浓度标准溶液准备 6 份平行样进行测定。以 2.2.1 节的线性回归方程计算叶绿素浓度,进而计算出叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 浓度数据的相对标准偏差(RSD),如表 3 所示,结果说明该 HPLC 方法所测定的叶绿素

含量数据较为准确,即精密度较好。

2.2.4 样品加标回收率

根据 1.3 节和 1.4.1 节的方法获得水稻和玉米的叶绿素样品,样品溶于丙酮后用 HPLC 测定其浓度。取叶绿素含量已知的水稻和玉米样品各 7 份,分别添加配制的叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 标准溶液,测定样品含量,最后计算样品加标回收率。如表 4 所示(表中取样量和加标量已换算为叶绿素的质量),叶绿素的样品加标回收率在 91.92%~111.11% 区间,说明该 HPLC 方法可靠,分析结果准确。

2.3 叶绿素的镁同位素组成

由表 5 可知,本实验所测海水样品镁同位素值在正常范围内,与前人测定结果基本一致^[35-36],表明样品从湿法消解步骤起未受到环境污染。通过海水和叶绿素的镁同位素组成的三同位素图(图 2)可知,所有样品基本位于斜率为 0.5214 的直线上,说明所有样品镁同位素符合质量分馏规律^[37]。

表 2 方法检测限和定量限

Table 2 Detection limit and quantification limit of the method.		
叶绿素类别	方法检测限 (mg/L)	方法定量限 (mg/L)
叶绿素 <i>a</i>	0.40	1.22
叶绿素 <i>b</i>	1.09	3.31

表 3 方法精密度

Table 3 Precision of the method.								
叶绿素类别	浓度 (mg/L)							RSD (%)
叶绿素 <i>a</i>	9.00	8.79	9.09	9.04	9.16	8.44		2.99
	16.86	16.31	16.07	14.44	17.58	14.94		7.32
	35.38	35.49	32.31	35.47	34.06	35.62		3.79
叶绿素 <i>b</i>	8.86	8.12	8.50	8.02	8.82	7.79		5.30
	15.33	14.71	14.11	12.71	15.45	13.05		8.10
	36.24	36.16	33.35	36.00	34.92	36.78		3.51

表 4 样品加标回收率

Table 4 Spiked recoveries of the samples.

植物种类	叶绿素种类	取样量 (μg)	加标量 (μg)	7 次实测值(μg)							样品加标回收率(%)						
水稻	叶绿素 <i>a</i>	2.11	2.50	4.80	4.82	4.87	4.82	4.78	4.87	4.81	107.60	108.40	110.40	108.40	106.80	110.40	108.00
	叶绿素 <i>b</i>	0.82	0.99	1.80	1.73	1.83	1.74	1.87	1.88	1.92	98.99	91.92	102.02	92.93	106.06	107.07	111.11
玉米	叶绿素 <i>a</i>	1.88	2.19	4.09	4.21	4.26	4.22	4.24	4.23	4.26	100.91	106.39	108.68	106.85	107.76	107.31	108.68
	叶绿素 <i>b</i>	0.48	0.66	1.14	1.12	1.16	1.21	1.19	1.17	1.18	100.00	96.97	103.03	110.61	107.58	104.55	106.06

表 5 本实验样品镁同位素值与文献报道值的对比

Table 5 Comparison of magnesium isotope values in this experiment and reported values in literatures.

样品类型	样品或叶绿素类别	序号	$\delta^{26}\text{Mg}(\text{‰})$	2SD(‰)	$\delta^{25}\text{Mg}(\text{‰})$	2SD(‰)	<i>n</i>	数据来源
海水	海水	1	-0.78	0.05	-0.41	0.02	3	本文实验
		2	-0.84	0.11	-0.42	0.09	4	[35]
		3	-0.83	0.05	/	/	3	[36]
水稻	叶绿素 <i>a</i>	4	-0.40	0.07	-0.22	0.06	3	本文实验
	叶绿素 <i>b</i>	5	-0.88	0.07	-0.48	0.05	3	本文实验
玉米	叶绿素 <i>a</i>	6	1.69	0.13	0.87	0.04	3	本文实验
	叶绿素 <i>b</i>	7	-0.64	0.06	-0.34	0.03	3	本文实验
水芹	叶绿素 <i>a</i>	8	-0.414	0.12	-0.21	0.08	5	[11]
		9	-0.440	0.19	-0.22	0.14	5	[11]
玉米	叶绿素 <i>a</i>	10	2.16	0.16	1.12	0.12	5	[11]
		11	2.75	0.20	1.56	0.16	5	[11]
常春藤	叶绿素 <i>a</i>	12	-0.022	0.119	-0.027	0.095	4	[14]
		13	0.014	0.029	-0.012	0.022	1	[14]
	叶绿素 <i>b</i>	14	-0.455	0.090	-0.262	0.074	4	[14]
		15	-0.380	0.029	-0.232	0.026	1	[14]

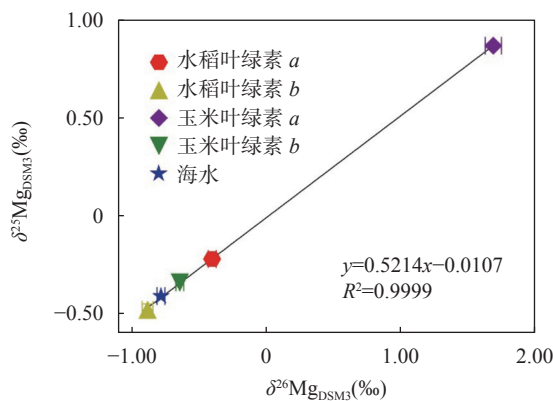


图2 叶绿素样品和海水样品的镁同位素值

Fig. 2 Magnesium isotope values of chlorophyll and seawater samples.

由图 2 可知,本实验测定的叶绿素镁同位素值与 Black 等 [14] 测定的碳三植物叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的镁同位素值、Wrobel 等 [11] 测定的碳三和碳四植物叶绿素 *a* 的镁同位素值规律一致,即碳三植物叶绿素 *a* 的镁同位素值大于叶绿素 *b* 的镁同位素值,碳四植物叶绿素 *a* 的镁同位素值大于碳三植物叶绿素 *a* 的镁同位素值。本实验数据还表明,碳四植物叶绿素 *a* 的镁同位素值也大于叶绿素 *b* 的镁同位素值。

3 讨论

3.1 HPLC 运行参数选择

本文基于 HPLC 实验试验指标,对其运行参数进行筛选,得出符合实验需求的方法。为减少实验

时间,提高叶绿素收集效率,叶绿素 *a* 保留时间宜取最小值。以叶绿素 *a* 保留时间为评定指标对表 1 数据进行 $\bar{T}_i$ 值分析,考虑到因素 A 对结果影响最小,因素 B 和 C 的影响更大,因而选择 A1B3C3、A2B3C3、A3B3C3 作为运行条件较为节约时间。同理,为降低实验过程中叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 间的相互影响,两种色素的分离度宜取较大值,因为因素 A 下不同水平 $\bar{T}_i$ 差别不大,所以可选 A1B1C1、A2B1C1、A3B1C1 作为仪器运行条件。

参考前人的正交试验 [32, 38-39], 可知本实验涉及的影响因素较少,本文能依据实验结果得出符合要求的方法。鉴于满足叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的分离度,叶绿素 *a* 保留时间的最佳搭配不一致,所以在选择时需兼顾这两种评定指标。影响叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的分离度以及叶绿素 *a* 保留时间的影响因素从大到小均为 C、B、A,所以因素 C 和因素 B 是影响评定指标最重要的两个因素。由于满足叶绿素 *a* 保留时间的最优条件 B3C3 与满足叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 分离度的最优条件 B1C1,刚好是较为极端的条件参数,故选择 B2C2 作为 HPLC 的流速和流动相运行条件。温度是影响评定指标的最小因素,而且色谱柱柱温维持在 10 ~ 30℃ 更有利于叶绿素分离 [40], 因此选择 A1 作为 HPLC 的温度运行条件。此外,由图 1 的 2 号色谱图可知在 A1B2C2 条件下叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 能完整分离。综上所述,HPLC 实验条件定为温度 25℃,流速 1mL/min,流动相甲醇-丙酮(80 : 20, *V/V*),分离叶绿素的过程耗时约 15min,满足实验需要。

3.2 HPLC方法有效性评价

在确定 HPLC 相应的参数条件后,需用叶绿素的标准曲线等指标评定 HPLC 方法是否可靠。标准曲线的相关系数越接近 1,其计算得出的数值越可靠,本实验标准曲线的相关系数大于 0.9996,表明仪器能准确测出相应浓度范围内的样品,后续实验可基于这两个标准曲线线性回归方程精确计算出待测样品叶绿素含量^[33,34]。检测限和定量限越低,仪器就能检测以及准确定量分析含量越低的样品,表明所建立分析方法越好。叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 检测限分别为 0.40mg/L 和 1.09mg/L,定量限分别为 1.22mg/L 和 3.31mg/L,满足本实验需要。对于精密度,RSD 越低表明测试结果的一致程度越高,由实验结果可知本文 RSD 小于 8.10%,满足本实验需求。叶绿素 *a* 的回收率主要介于 100.91%~110.40%,叶绿素 *b* 的回收率则介于 91.92%~111.11%。叶绿素 *b* 的回收率较叶绿素 *a* 相比稍微偏低,这可能是由于样品中叶绿素 *b* 的稳定性较低,在处理过程中发生了解解,但总体上叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的加标回收率都维持在较好水平。综上所述,通过对 HPLC 有效性指标的分析,判断该方法符合实验需要。

3.3 叶绿素的镁同位素值分析

本实验数据显示,在任一种光合路径植物中,叶绿素 *a* 的镁同位素值大于叶绿素 *b* 的镁同位素值。Black 等^[14]测定的碳三植物叶绿素 *a* 的镁同位素值大于叶绿素 *b* 的镁同位素值,与本文数据规律一致,说明光合路径的差异不影响叶绿素合成路径。

此外,本实验数据表明光合路径的差异会导致

碳四植物的叶绿素在合成过程中与碳三植物相比,更富集重镁同位素,这与 Wrobel 等^[11]的实验结果一致。推测可能是因为碳四植物中有更高的能量需求和腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)产生速率^[11],也可能是因为叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 之间相互转化^[41]或分解速率^[24]存在差异,导致碳四植物的叶绿素 *a* 镁同位素值远高于碳三植物的叶绿素 *a* 镁同位素值。

4 结论

建立了叶绿素提取、分离和叶绿素镁同位素测定的方法。在前人研究的基础上,重点优化 HPLC 分析和分离条件。与前人方法相比,本文方法缩短了叶绿素的保留时间,并提高叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的分离度避免二者间的相互影响。该方法线性关系良好,检测限、定量限、精密度满足实验需要,加标回收率合理。

本文还首次测定碳四植物的叶绿素 *b* 镁同位素值,丰富了叶绿素镁同位素值数据。在与前人研究结果比较中还发现,在同一种光合路径植物中,叶绿素 *a* 的镁同位素值恒大于叶绿素 *b* 的镁同位素值,而在碳三和碳四光合路径植物中,叶绿素 *a* 的镁同位素值会存在显著的差异。

致谢:在论文撰写过程中得到了西北大学马龙副教授、王琦、鞠鹏程、蒙泽坤、王振飞、郭元强、赵燕、路雅雯的帮助,在此致以诚挚的感谢!感谢西北大学生命科学学院提供仪器和实验场地。

Determination of Magnesium Isotopic Composition of Plant Chlorophylls Based on HPLC and MC-ICP-MS

AN Zihan¹, ZHANG Hongyu¹, YIN Jiaxin^{1,2}, ZHANG Pan¹, YAO Min¹, HUANG Kangjun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Continental Dynamics, Department of Geology, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. State Key Laboratory of Isotope Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

HIGHLIGHTS

- (1) In the HPLC orthogonal test, the ratio of acetone and methanol in mobile phase is the most important parameter affecting the chlorophyll separation effect.
- (2) A method for chlorophyll extraction, HPLC separation, and magnesium isotope determination is established.
- (3) The magnesium isotope values of chlorophyll *a* were higher than those of chlorophyll *b* in both C3 and C4 photosynthetic pathway plants.

ABSTRACT: The accurate determination of magnesium isotope values of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* is particularly important for the study of magnesium biosynthesis pathways during chlorophyll formation. HPLC is required before MC-ICP-MS can be utilized, but HPLC lacks a method for separating chlorophylls. Therefore, it is necessary to develop a set of methods for separating plant chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. The samples separated by this method are suitable for magnesium isotope determination by MC-ICP-MS. Based on the detection wavelength of 665nm and C18 column (7.6mm×250mm, 5μm), the HPLC conditions were optimized by three-factor and three-level orthogonal design to obtain the required parameters. The correlation coefficients of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* standard curves in the concentration range of 5–50mg/L were greater than 0.9996, the detection limits were 0.40–1.09mg/L, the quantification limits were 1.22–3.31mg/L, the relative standard deviation was less than 8.10%, and the recoveries were 91.92%–111.11%. The magnesium isotope data of the isolated samples also showed that the column temperature of 25°C, flow rate of 1mL/min, and methanol-acetone (80 : 20, *V/V*) mobile phase were reliable as HPLC separation conditions. The method established in this paper provides technical support for the separation of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in plants, and the separated samples can be used for magnesium isotope determination. The BRIEF REPORT is available for this paper at <http://www.ykcs.ac.cn/en/article/doi/10.15898/j.ykcs.202208300161>.

KEY WORDS: magnesium isotope; standard-sample-bracketing method; high performance liquid chromatography; mobile phase; chlorophyll *a*; chlorophyll *b*

BRIEF REPORT

Significance: Chlorophylls in plants can be divided into chlorophyll *a* and chlorophyll *b*^[7-8]. Magnesium is the central atom of chlorophylls, and isotopic fractionation occurs in the synthesis process of the two chlorophylls^[10]. The determination of magnesium isotopes of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* can be used to explore the utilization of magnesium in the growth process of plants^[11] and the biosynthesis path of magnesium in the formation of chlorophylls^[12]. Therefore, the accurate determination of magnesium isotope composition is of great significance to further study the fractionation mechanism of magnesium isotope in chlorophyll synthesis. The separation of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in plants is the first step to determine the magnesium isotope values of chlorophylls. At present, the separation methods of chlorophylls before the determination of magnesium isotopes of chlorophylls

mainly include DEAE-Sepharose column and high-performance liquid chromatography (HPLC). However, DEAE-Sepharose columns are time-consuming and vulnerable, and HPLC lacks a separation method suitable for magnesium isotope determination of chlorophyll *b*^[11,13-17]. Therefore, a separation method suitable for the determination of magnesium isotopes of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* can be developed based on HPLC.

Methods: Before the separation of chlorophylls by HPLC, it is necessary to extract chlorophylls from plants, which can be further divided into extraction and purification steps of chlorophylls. The extraction process was divided into the following steps: First, the liquid nitrogen was mixed with the leaves and ground into powder; Then methanol was added and extracted 3 times at -30°C for 24h each time. The purification process was divided into the following steps: sodium chloride solution (5mol/L) was added to the methanol extract and mixed; *n*-hexane centrifugation was added, *n*-hexane solution was collected, and the process was repeated many times until the *n*-hexane phase was colorless; Finally, the collected *n*-hexane solution was blown dry, dissolved in acetone and stored at -30°C .

After the extraction of the chlorophylls from the plant, a HPLC method for the separation of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* was developed. According to the previous application of HPLC^[11,15,17], an orthogonal test was used to explore the effects of column temperature, flow rate and mobile phase on plant chlorophyll separation. Three different conditions were selected for each factor to design the orthogonal test table (Table 1). The mixed standard samples of chlorophyll *a* and *b* were separated according to Table 1. Each group of experiments was repeated 3 times and the average values of required data were taken for analysis. The detection wavelength of 665nm was used to determine the chlorophylls. According to the experimental requirements, HPLC parameters were selected to test the effectiveness of the HPLC method. Chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in the samples were then separated using this HPLC method.

After the chlorophyll samples were separated, their magnesium isotope values were determined. Firstly, magnesium ions were obtained by destroying organic matter of the samples with wet chemical digestion^[28-29], then the method developed by Bao et al.^[30] was used to purify the magnesium element, and finally the magnesium isotope values of the samples^[30-31] were determined by sample-standard-bracketing based on MC-ICP-MS.

Data and Results: The retention time of chlorophyll *a* and the separation degree of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* were taken as the test indexes of the orthogonal test (Table 1). By comparing the range *R* corresponding to each factor under each test index, the influence degree of each factor on the experimental method was determined, and the HPLC operating conditions meeting the requirements were selected. It can be seen from Table 1 that factors affecting the separation degree of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* and the retention time of chlorophyll *a* are all factors C (mobile phase), B (flow rate) and A (temperature) from the largest to the smallest.

After the optimized HPLC operating conditions were obtained through orthogonal experiments, the linear range, detection limit, quantification limit, method precision and sample recovery rate were used to evaluate whether the improved HPLC method could meet the experimental requirements. In the concentration range of 5–50mg/L, the linear regression equations of the standard curves of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* were $y=115888x+9504$ and $y=27570x-1302$, and the correlation coefficients were 1.0000 and 0.9996, respectively. The detection limits of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* were 0.40mg/L and 1.09mg/L, and the quantification limits were 1.22mg/L and 3.31mg/L, respectively (Table 2). The relative standard deviations of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* were less than 8.10% (Table 3). The recoveries of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* ranged from 100.91% to 110.40% and 91.92% to 111.11%, respectively.

After confirming that the optimized HPLC method met the experimental requirements of chlorophyll separation, the magnesium isotope values of the samples were determined to further verify the proposed method. The isotope values of the seawater measured in this experiment were within the normal range. In the three-isotope diagram composed of magnesium isotopes of seawater and chlorophylls (Fig.2), most samples were located on a straight line with a slope of 0.5214.

参考文献

- [1] 刘金科, 韩贵琳. 镁同位素在森林生态系统研究中的应用[J]. *生态学杂志*, 2019, 38(3): 899–907.
Liu J K, Han G L. Research advances about magnesium isotope in forest ecosystems[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(3): 899–907.
- [2] 陈良碧, 蔡丹, 张林安, 等. 植物镁离子转运及镁胁迫响应机制研究进展[J]. *生命科学研究*, 2021, 25(5): 442–447.
Chen L B, Cai D, Zhang L A, et al. Advances in mechanisms of magnesium transport and response to magnesium stress in plants[J]. *Life Science Research*, 2021, 25(5): 442–447.
- [3] Tian X Y, He D D, Bai S, et al. Physiological and molecular advances in magnesium nutrition of plants[J]. *Plant and Soil*, 2021, 468(1-2): 1–17.
- [4] Kleczkowski L A, Igamberdiev A U. Magnesium signaling in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(3): 1159.
- [5] Xie K, Cakmak I, Wang S Y, et al. Synergistic and antagonistic interactions between potassium and magnesium in higher plants[J]. *The Crop Journal*, 2021, 9(2): 249–256.
- [6] Ishfaq M, Wang Y Q, Yan M W, et al. Physiological essence of magnesium in plants and its widespread deficiency in the farming system of China[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 802274.
- [7] 李佳佳, 于旭东, 蔡泽坪, 等. 高等植物叶绿素生物合成研究进展[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(18): 6013–6019.
Li J J, Yu X D, Cai Z P, et al. An overview of chlorophyll biosynthesis in higher plants[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(18): 6013–6019.
- [8] Hu X Y, Gu T Y, Khan I, et al. Research progress in the interconversion, turnover and degradation of chlorophyll[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3134.
- [9] Qiu N W, Jiang D C, Wang X S, et al. Advances in the members and biosynthesis of chlorophyll family[J]. *Photosynthetica*, 2019, 57(4): 974–984.
- [10] 黄康俊, 滕方振, 沈冰, 等. 镁同位素示踪表生地质过程的原理及应用[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2022, 41(2): 213–234, 201.
Huang K J, Teng F Z, Shen B, et al. Tracing surficial processes by magnesium isotopes: Principles and applications[J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2022, 41(2): 213–234, 201.
- [11] Wrobel K, Karasiński J, Tupys A, et al. Magnesium-isotope fractionation in chlorophyll-*a* extracted from two plants with different pathways of carbon fixation (C3, C4)[J]. *Molecules*, 2020, 25(7): 1644.
- [12] Moynier F, Fujii T. Theoretical isotopic fractionation of magnesium between chlorophylls[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 6973.
- [13] Black J R, Yin Q Z, Casey W H. An experimental study of magnesium-isotope fractionation in chlorophyll-*a* photosynthesis[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2006, 70(16): 4072–4079.
- [14] Black J R, Yin Q Z, Rustad J R, et al. Magnesium isotopic equilibrium in chlorophylls[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(28): 8690–8691.
- [15] Ra K, Kitagawa H. Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007, 22(7): 817–821.
- [16] Pokharel R, Gerrits R, Schuessler J A, et al. Magnesium stable isotope fractionation on a cellular level explored by cyanobacteria and black fungi with implications for higher plants[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(21): 12216–12224.
- [17] Isaji Y, Yoshimura T, Araoka D, et al. Magnesium isotope fractionation during synthesis of chlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *a* of benthic phototrophs in hypersaline environments[J]. *ACS Earth and Space Chemistry*, 2019, 3(6): 1073–1079.
- [18] Yamori W, Hikosaka K, Way D A. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: Temperature acclimation and temperature adaptation[J]. *Photosynthesis Research*, 2014, 119(1-2): 101–117.
- [19] 杨淑华, 巩志忠, 郭岩, 等. 中国植物应答环境变化研究的过去与未来[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(11): 1457–1478.
Yang S H, Gong Z Z, Guo Y, et al. Studies on plant responses to environmental change in China: The past and the future[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2019, 49(11): 1457–1478.
- [20] 张宏宇. 胡敏酸对水稻吸收硒和镉的影响研究[D]. 武汉: 中国地质大学(武汉), 2020: 24–25.
Zhang H Y. Effect of humic acid on selenium and cadmium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) [D]. Wuhan: China University of Geosciences (Wuhan), 2020: 24–25.
- [21] 丁跃, 吴刚, 郭长奎. 植物叶绿素降解机制研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(11): 1–9.
Ding Y, Wu G, Guo C K. Research advance on chlorophyll degradation in plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(11): 1–9.
- [22] 邱念伟, 王修顺, 杨发斌, 等. 叶绿素的快速提取与精密测定[J]. *植物学报*, 2016, 51(5): 667–678.
Qiu N W, Wang X S, Yang F B, et al. Fast extraction and precise determination of chlorophyll[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2016, 51(5): 667–678.

- [23] Pniewski F. HPLC separation of cyanobacterial and algal photosynthetic pigments[J]. *Biologia*, 2020, 75(2): 223–233.
- [24] Hu X Y, Khan I, Jiao Q S, et al. Chlorophyllase, a common plant hydrolase enzyme with a long history, is still a puzzle[J]. *Genes*, 2021, 12(12): 1871.
- [25] Barry C S. The stay-green revolution: Recent progress in deciphering the mechanisms of chlorophyll degradation in higher plants[J]. *Plant Science*, 2009, 176(3): 325–333.
- [26] Hu X, Tanaka A, Tanaka R. Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples[J]. *Plant Methods*, 2013, 9: 19.
- [27] 周武先, 段媛媛, 卢超, 等. 高效提取3种不同类型植物叶片色素的方法[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(1): 97–104.
Zhou W X, Duan Y Y, Lu C, et al. Efficient methods for extracting pigments from three different types of plant leaves[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2019, 28(1): 97–104.
- [28] 刘亚轩, 李晓静, 白金峰, 等. 植物样品中无机元素分析的样品前处理方法和测定技术[J]. *岩矿测试*, 2013, 32(5): 681–693.
Liu Y X, Li X J, Bai J F, et al. Review on sample pretreatment methods and determination techniques for inorganic elements in plant samples[J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2013, 32(5): 681–693.
- [29] 李杨子, 黄华宇, 贺茂勇, 等. 植物的非传统稳定同位素前处理及测定技术研究进展[J]. *地球环境学报*, 2023, 14(3): 284–296.
Li Y Z, Huang H Y, He M Y, et al. Advances in non-traditional stable isotope pretreatment and determination techniques for plants[J]. *Journal of Earth Environment*, 2023, 14(3): 284–296.
- [30] Bao Z A, Huang K J, Huang T Z, et al. Precise magnesium isotope analyses of high-K and low-Mg rocks by MC-ICP-MS[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2019, 34(5): 940–953.
- [31] 刘嘉文, 田世洪, 王玲. 镁同位素体系在重要地质过程中的应用[J]. *地学前缘*, 2023, 30(3): 399–424.
Liu J W, Tian S H, Wang L. Application of magnesium stable isotopes for studying important geological processes—A review[J]. *Earth Science Frontiers*, 2023, 30(3): 399–424.
- [32] 梁洁, 李栋, 王明达, 等. 利用正交实验法优化青藏高原湖泊沉积色素提取与分析[J]. *中国科学:地球科学*, 2016, 46(4): 497–511.
Liang J, Li D, Wang M D, et al. Application of orthogonal design to the extraction and HPLC analysis of sedimentary pigments from lakes of the Tibetan Plateau[J]. *Science China: Earth Sciences*, 2016, 46(4): 497–511.
- [33] 程红艳, 陈军辉, 张道来, 等. 超声波辅助提取 RP-HPLC 法测定浒苔中的叶绿素 *a*、*b*[J]. *海洋科学*, 2010, 34(2): 23–27.
Cheng H Y, Chen J H, Zhang D L, et al. Determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in *Enteromorpha prolifera* by ultrasound-assisted extraction with RP-HPLC[J]. *Marine Sciences*, 2010, 34(2): 23–27.
- [34] 江涛, 丛敏, 甘居利, 等. 高效液相色谱法测定海洋水体与沉积物中光合色素[J]. *分析化学*, 2012, 40(4): 517–522.
Jiang T, Cong M, Gan J L, et al. Determination of photosynthetic pigments in sea water and marine sediments by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(4): 517–522.
- [35] Bao Z A, Zong C L, Chen K Y, et al. Chromatographic purification of Ca and Mg from biological and geological samples for isotope analysis by MC-ICP-MS[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2020, 448: 116268.
- [36] Zhang P, Huang K J, Luo M, et al. Constraining the terminal Ediacaran seawater chemistry by Mg isotopes in dolostones from the Yangtze Platform, South China[J]. *Precambrian Research*, 2022, 377: 106700.
- [37] 王泽洲. 深部碳循环的 Zn-Mg 同位素示踪[D]. 北京: 中国地质大学(北京), 2020: 83–84.
Wang Z Z. Tracing the deep carbon cycle using Zn-Mg isotopes[D]. Beijing: China University of Geosciences (Beijing), 2020: 83–84.
- [38] 程方奎, 严家平, 范廷玉, 等. 基于正交试验法的景观水体叶绿素 *a* 最佳提取条件研究[J]. *生态科学*, 2014, 33(6): 1085–1090.
Cheng F K, Yan J P, Fan T Y, et al. Research on optimizing operation parameters for leaching chlorophyll-*a* of landscape water based on orthogonal experiments[J]. *Ecological Science*, 2014, 33(6): 1085–1090.
- [39] Zhao J, Yao P, Yu Z G, et al. Orthogonal design for optimization of pigment extraction from surface sediments of the Changjiang River Estuary[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 30(4): 33–42.
- [40] Vanheukelem L, Lewitus J, Kana T M, et al. Improved separations of phytoplankton pigments using temperature-controlled high performance liquid chromatography[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1994, 114(3): 303–313.
- [41] Tanaka R, Tanaka A. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2011, 1807(8): 968–976.