

# شناسایی و اندازه‌گیری مقدار کلروفیل‌های a و b در سدهای کرج، طالقان و لتیان با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC/UV-VIS)

پریسا روزبه‌نیا<sup>۲</sup>

مریم سلیمی<sup>۲</sup>

اسفندیار جلیل‌زاده<sup>۱</sup>

پذیرش (۹۲/۴/۱۰)

(دریافت ۹۱/۷/۱۶)

## چکیده

در این تحقیق شناسایی و اندازه‌گیری مقدار کلروفیل‌های a و b با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (UV-VIS/HPLC) انجام شد. منحنی‌های کالیبراسیون برای کلروفیل‌های a و b از نوع خطی و با ضریب رگرسیون ( $r > 0.999$ ) به دست آمد. نمونه‌برداری از سدهای کرج، طالقان و لتیان از آذرماه ۱۳۹۰ تا آذرماه ۱۳۹۱ به صورت فصلی انجام شد. میانگین مقدار کلروفیل a و b طی چهار فصل سال در سد کرج به ترتیب ۴/۵ ppb و ۰/۲۸ ppb، طالقان ۲/۴ ppb و ۰/۰۴ ppb و لتیان ۳ ppb و ۰/۰۳ ppb به دست آمد. بنابراین روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یک روش معتبر و مطمئن برای اندازه‌گیری نمونه‌های دارای کلروفیل در حد ppb است.

**واژه‌های کلیدی:** سد، کلروفیل a و b، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

## Detection and Determination of Chlorophylls a and b in Karaj , Taleghan and Latian Reservoirs by High Performance Liquid Chromatography (HPLC/UV-VIS)

E. Jalilzadeh<sup>1</sup>

M. Salimi<sup>2</sup>

P. Roozbehnia<sup>3</sup>

(Received Oct. 7, 2012 Accepted July 1, 2013)

### Abstract

High performance liquid chromatography (HPLC/UV-VIS) was used to detect and measure chlorophylls a and b in Karaj, Taleghan, and Latian dam reservoirs. For this purpose, samples were collected in duplicates during 2012 to 2013. The calibration graphs were found to be linear with good correlation coefficients ( $r > 0.999$ ) for chlorophylls a and b. Average values of chlorophylls a and b, respectively, were 4.5 and 0.028  $\mu\text{g/l}$  at Karaj, 2.4, 0.04  $\mu\text{g/l}$  at Taleghan, and 3 and 0.03 at Latian; in some case, the average values were below the detection limit (LOD). Also, HPLC was found to be valid and effective for determining chlorophylls a and b in natural water samples at levels as low as  $\mu\text{g/l}$ .

**Keywords:** Dam, Chlorophylls a,b , High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

1. Expert of Social Medicine, Headmaster of Reference Laboratory, Tehran Water and Wastewater Co., Tehran
2. MSc of Chemistry, Reference Laboratory, Tehran Water and Wastewater Co., Tehran (Corresponding Author) (+98 21) 77887039 la\_info91@yahoo.com
3. MSc of Chemistry, Reference Laboratory, Tehran Water and Wastewater Co., Tehran

- ۱- متخصص پزشکی اجتماعی، مدیر آزمایشگاه مرجع، شرکت آب و فاضلاب استان تهران، تهران
- ۲- کارشناس ارشد شیمی، آزمایشگاه مرجع، شرکت آب و فاضلاب استان تهران، تهران (نویسنده مسئول) ۷۷۸۸۷۰۳۹ (۰۲۱) la\_info91@yahoo.com
- ۳- کارشناس ارشد شیمی، آزمایشگاه مرجع، شرکت آب و فاضلاب استان تهران، تهران

اسپکتروفتومتری و فلورومتری به‌طور معمول برای اندازه‌گیری کلروفیل a و b استفاده می‌شوند، ولی این روش‌ها از حساسیت پایین تری برخوردارند و صحت اندازه‌گیری بستگی به ماتریکس نمونه و به‌کارگیری معادلات تجربی برای اندازه‌گیری کلروفیل‌ها دارد [۸ و ۹]. در ایران به مطالعه شاپوری می‌توان اشاره نمود که میزان توده دهانه رود تجن را با استفاده از روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار داده است [۴].

تاکنون مطالعات زیادی روی شمارش جلبک‌ها با استفاده از روش میکروسکوپی انجام شده است. با این وجود، زمانی که نمونه، دانسیته و تراکم بالایی از جلبک‌ها داشته باشد، این روش نیاز به متخصصان با تجربه دارد و بسیاری از پیکوپلانکتون‌ها را نمی‌توان با این روش اندازه‌گیری نمود [۱۰]. بنابراین در سال‌های اخیر روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای اندازه‌گیری کلروفیل با صحت و دقت بالا مورد استفاده قرار گرفته است [۱۱]. آنچه که در اندازه‌گیری با مقادیر کم نقش مهمی دارد، برخورداری روش از صحت و دقت لازم است. هدف اصلی این تحقیق شناسایی و اندازه‌گیری کلروفیل‌های a و b به‌عنوان یک پارامتر مهم در تعیین کیفیت و طبقه‌بندی آب دریاچه‌ها با استفاده از روش HPLC به‌عنوان یک روش معتبر با دقت و صحت بود.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- روش نمونه‌برداری

در این تحقیق میزان کلروفیل a و b در سدهای کرج، طالقان و لتیان از آذرماه ۱۳۹۰ تا آذرماه ۱۳۹۱ مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری در چهار فصل مختلف سال و از هر سد انجام شد. به این منظور طی چهار فصل (۱۲ ماه) و هر ماه به تعداد دو نمونه از هر ایستگاه برداشته شد. کلیه نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای یک لیتری جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه توسط فیلتراسیون در خلاء در فشار ۲۰ کیلو پاسکال صاف شدند. فشارهای بالاتر ممکن است باعث از بین رفتن کلروفیل شود. پیش از برداشتن نمونه، ظرف به آرامی چندین بار تکان داده شد تا ذرات معلق شود. فیلتر توسط انبرک به همراه ذرات روی آن در پتری دیش قرار داده شد و ظرف با فویل آلومینیوم پوشانده شد تا فیتوپلانکتون‌ها در برابر نور محافظت شوند. سپس فیلتر در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت [۱۲].

فیتوپلانکتون‌ها، شاخص زیستی بالقوه‌ای برای کیفیت و تغییرات آب در برابر آلاینده‌های سمی، دما و تهاجم گونه‌ها به‌شمار می‌روند [۱]. اوتریفیکاسیون منجر به افزایش رشد گیاهان آبی و اغلب باعث شکوفایی جلبک‌ها می‌شود [۲]. اوتریفیکاسیون می‌تواند گونه‌های اکوسیستم را تغییر دهد و گونه‌های خاص جلبک می‌تواند باعث مشکلات در طعم و بوی آب شود [۳]. تغذیه‌گرایی فرایندی طبیعی است که در پیکره آب‌های سطحی رخ می‌دهد و معمولاً به توسعه بیش از حد ارگانسیم‌هایی مانند فیتوپلانکتون‌ها و گیاهان مربوط می‌شود. فعالیت‌های بشری از قبیل دفع فاضلاب شهری، کشاورزی و صنعتی، به‌طور قابل ملاحظه‌ای به این فرایند شتاب می‌دهد. پیکره‌های آبی بر اساس مقدار ماده مغذی در گروه‌های الیگوتروفیک (مواد مغذی کم)<sup>۱</sup> مزوتروفیک (مواد مغذی متوسط)<sup>۲</sup>، اوتروفیک (مواد مغذی زیاد)<sup>۳</sup> و هایپرتروفیک (مواد مغذی بسیار زیاد)<sup>۴</sup> طبقه‌بندی می‌شوند [۴].

مدل‌ها و شاخص‌های متعددی برای ارزیابی کیفیت آب و اوتریفیکاسیون در آبهای شیرین و آب دریا وجود دارد. کلروفیل a، جزء اصلی جلبک‌ها است و معرف مناسبی برای زیست توده جلبک به‌شمار می‌رود، زیرا جلبک چه به‌صورت مستقیم (شکوفایی جلبک) و چه به‌صورت غیر مستقیم (کاهش/افزایش اکسیژن محلول) سبب ایجاد مشکلات مرتبط با تغذیه‌گرایی می‌شود [۵].

در ایران بررسی روند اوتریفیکاسیون آبهای ایرانی دریای خزر بر اساس مدل تجربی شاخص تروفیکی مقیاسی و غیر مقیاسی توسط نصراله زاده ساروی انجام شده است [۶]. رشد و تکثیر جلبک‌ها به واکنش‌های فتوسنتزی آنها وابسته است و تمام گیاهان فتوسنتز کننده، دارای کلروفیل a هستند ولی وجود کلروفیل‌های فرعی مثل b، c و d بستگی به نوع گیاه دارد. هر دو کلروفیل a و b نور مرئی را در طول موج مشخصی بین ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر جذب می‌کنند [۷]. تفاوت ساختاری کلروفیل a با کلروفیل b در سومین کربن آنهاست. در کلروفیل a یک گروه متیل (CH<sub>3</sub>) به کربن شماره سه متصل است. در حالی که در کلروفیل b یک گروه آلئیدی (O=HC) به این کربن چسبیده است. روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری کلروفیل‌های a و b وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش‌های اسپکتروفتومتری، فلورومتری، میکروسکوپی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۵</sup> اشاره کرد.

<sup>1</sup> Oligotrophic

<sup>2</sup> Mesotrophic

<sup>3</sup> Eutrophic

<sup>4</sup> Hypertrophic

<sup>5</sup> High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

## ۲-۲- مواد شیمیایی و معرفها

استانداردهای کلروفیل a و b برای ساخت محلولهای استاندارد از شرکت سیگما-آلد ریچ<sup>۱</sup> آلمان و حلالهای مورد استفاده شامل آب، استونیتریل، متانول، اتیل استات و نمک آمونیوم استات با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد از نوع HPLC grade از شرکت مرک<sup>۲</sup> آلمان خریداری شد.

## ۳-۲- دستگاهها

نمونهها توسط یک سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل آجیلنت<sup>۳</sup>، مجهز به اتوسمپلر، ستون C18 به ابعاد (250mm×4.6mm) و دکتور UV-VIS در طول موج ۴۴۰ نانومتر شناسایی و اندازهگیری شدند.

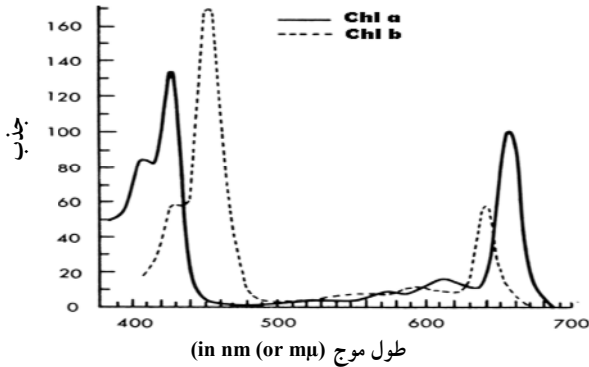
## ۳- روش آنالیز

برای استخراج نمونه طبق روش استاندارد، فیلترهای حاوی نمونه از فریزر خارج، و با ۱۰ میلی لیتر استون ۹۰ درصد به وسیله دستگاه گریندر مکانیکی خرد شد. محلول شیاره ای حاصل به مدت حداقل دو ساعت و حداکثر ۲۴ ساعت خیسانده شد و در لوله سانتریفیوژ دریچ دار به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و در نهایت ۱ میلی لیتر از سطح محلول توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر به داخل ویال تیره رنگ اتوسمپلر صاف شد [۱۲].

استانداردهای مورد نیاز مطابق با روش استاندارد، توسط اسپکتروفتومتر با استفاده از معادلات تری کروماتیک جفری-هامفورز<sup>۴</sup> تأیید شدند. شکل ۱ طیف اسپکتروفتومتر مربوط به استانداردهای کلروفیل a و b را نشان می دهد [۱۳].

رقت های مورد نظر برای رسم منحنی های کالیبراسیون از محلول های استاندارد استوک تهیه شد و مطابق با برنامه گرادینانت

فاز متحرک شامل Eluent A: متانول/آمونیم استات به نسبت (۸۰:۲۰)، Eluent B: استونیتریل: آب به نسبت (۹۰:۱۰) و Eluent C: اتیل استات ۱۰۰ درصد و با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در لیتر ظرف مدت ۲۵ دقیقه شناسایی و اندازه گیری انجام شد (جدول ۱).

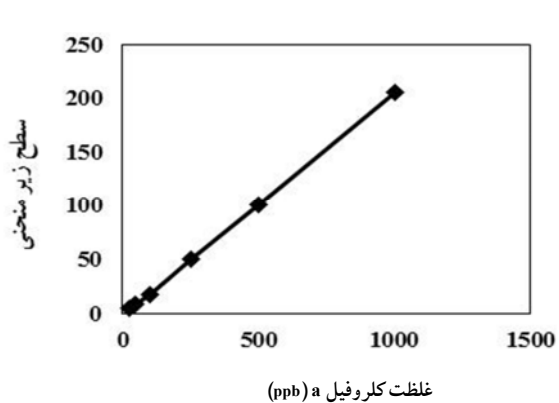
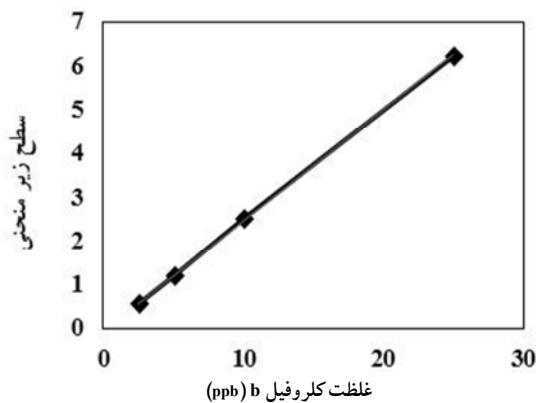


شکل ۱- طیف اسپکتروفتومتر استانداردهای کلروفیل a و b

جدول ۱- برنامه گرادینانت فاز متحرک

زمان (دقیقه)	%A	%B	%C
۰	۱۰۰	۰	۰
۲	۰	۱۰۰	۰
۲/۶	۰	۹۰	۱۰
۱۳/۶	۰	۶۵	۳۵
۲۰	۰	۳۱	۶۹
۲۲	۰	۱۰۰	۰
۲۵	۱۰۰	۰	۰
۳۰	۱۰۰	۰	۰

برای رسم منحنی کالیبراسیون ابتدا غلظت ها در محدوده (۲۵-۱۰۰۰ ppb) و (۵-۲۵ ppb) به ترتیب برای کلروفیل های a و b تهیه شد و نمودار کالیبراسیون از مساحت کروماتوگرام در مقابل غلظت استاندارد رسم شد (شکل ۲). در رسم نمودارها از



شکل ۲- منحنی های کالیبراسیون کلروفیل a و b

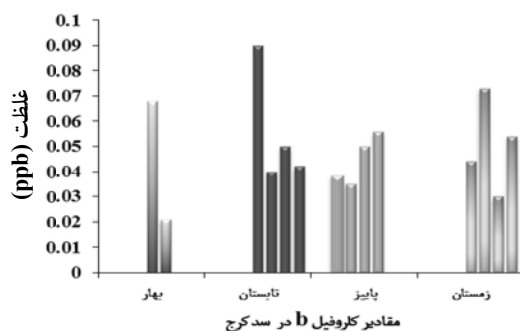
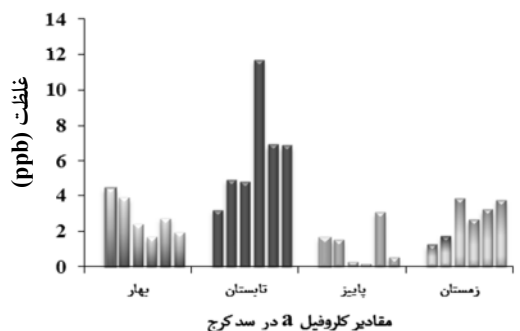
<sup>1</sup> Sigma -Aldrich

<sup>2</sup> Merck

<sup>3</sup> Agilent

<sup>4</sup> Jeffrey and Humphrey's Trichromatic Equations

غلظت کلروفیل a در فصل تابستان و کمترین آن در فصل پاییز است و بیشترین مقدار آن در فصل تابستان مشاهده شد. در اغلب موارد نیز هیچ غلظت قابل اندازه گیری در مورد کلروفیل b مشاهده نشد.



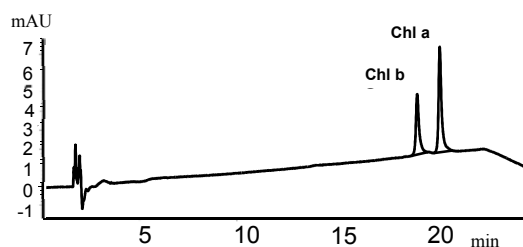
شکل ۵- غلظت کلروفیل a و b در سد کرج

شکل ۶ غلظت کلروفیل a و b را در سد طالقان از آذر ماه ۱۳۹۰ تا آذر ماه ۱۳۹۱ نشان می دهد. میانگین غلظت کلروفیل a در فصل بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۲/۹ ppb، ۳/۱۲ ppb، ۱/۱۱ ppb و ۲/۷ ppb بود. همچنین حداکثر مقدار کلروفیل a در فصل تابستان ۶/۲۶ ppb و کمترین مقدار آن در فصل پاییز ۰/۵ ppb به دست آمد. میانگین غلظت کلروفیل a در یک سال اندازه گیری ۲/۴ ppb بود. تغییرات چندانی در غلظت کلروفیل a در فصل زمستان و بهار مشاهده نشد. میانگین غلظت کلروفیل b در طی یکسال اندازه گیری ۰/۰۴ ppb بود و بیشترین مقدار آن در فصل تابستان دیده شد.

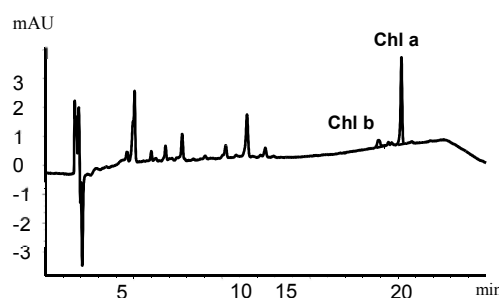
در شکل ۷ غلظت کلروفیل a و b در دریاچه سد لتیان از آذر ماه ۱۳۹۰ تا آذر ماه ۱۳۹۱ مورد بررسی قرار گرفته است. همانطور که مشاهده می شود، بالاترین غلظت کلروفیل a در فصل تابستان و کمترین آن در فصل پاییز مشاهده شد. میانگین غلظت کلروفیل a در فصل بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۲/۸۸ ppb، ۲/۷ ppb، ۱/۲ ppb و ۵/۵۱ ppb بود. غلظت کلروفیل b در طی یکسال بررسی ۰/۰۳ ppb بود و حداکثر مقدار آن در فصل تابستان مشاهده شد.

روش کمترین مربعات و نرم افزار اکسل ۲۰۰۷ استفاده شد و معادلات خط رگرسیون منحنی ها،  $(y=0.2522x-0.0626)$  و  $(y=0.2067x-1.7797)$  با ضریب تعیین  $(r^2 > 0.999)$  به دست آمد.

شکل ۳ کروماتوگرام استاندارد های کلروفیل a و b را نشان می دهد که زمان بازداری کلروفیل a، ۲۰/۴۲ دقیقه و کلروفیل b ۱۹/۲۶ دقیقه است. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود در نمونه سد کرج، زمان بازداری کلروفیل a، ۲۰/۳۰ دقیقه و کلروفیل b، ۱۹/۲۰ دقیقه است.



شکل ۳- کروماتوگرام استاندارد های کلروفیل a و b



شکل ۴- کروماتوگرام نمونه سد کرج

#### ۴- نتایج و بحث

نتایج حاصل از اندازه گیری کلروفیل های a و b در سدهای کرج، طالقان و لتیان در فصل های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. در شکل ۵ غلظت کلروفیل a و b در سد کرج از آذر ماه ۱۳۹۰ تا آذر ماه ۱۳۹۱ مورد بررسی قرار گرفته است. میانگین غلظت کلروفیل a در فصل بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۲/۸ ppb، ۶/۴ ppb، ۱/۲ ppb و ۲/۷ ppb بود. روند تغییرات غلظت کلروفیل a در فصل زمستان و بهار تقریباً ثابت بود. میانگین غلظت کلروفیل b در طی یکسال اندازه گیری، ۰/۰۲۸ ppb بود. بالاترین

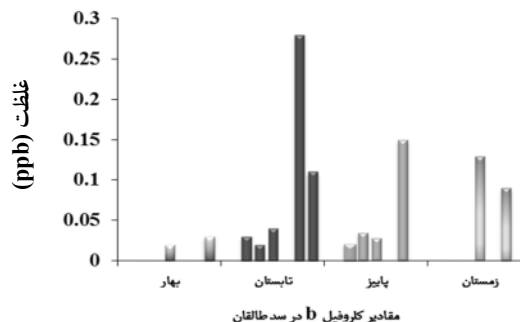
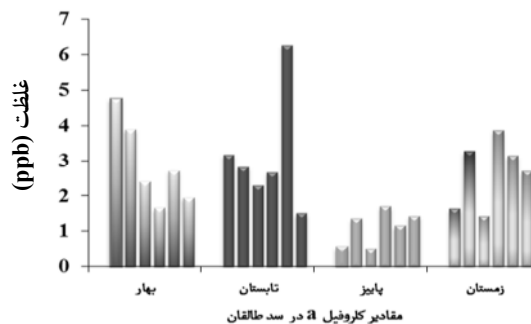
کلروفیل a به عنوان یک ماده رنگی مهم فتوسنتز در جلبک‌ها و سایر گیاهان مطرح است و به عنوان یکی از متغیرهای مهم در زمان تخمین ظرفیت فتوسنتز یک اکوسیستم مطرح می‌شود. بنابراین اندازه‌گیری کلروفیل a به عنوان یک شاخص مهم می‌تواند در ارزیابی کیفیت آب دریاچه‌ها و مشکلات ناشی از اوتروفیکاسیون مورد استفاده قرار گیرد.

از طرفی بین دمای سطح آب و غلظت کلروفیل همبستگی وجود داشته و دمای سطح آب به عنوان یکی از عوامل مهم در نحوه توزیع مکانی زمانی غلظت کلروفیل a محسوب می‌شود [۱۴]. طبق نتایج به دست آمده از بررسی سری زمانی غلظت کلروفیل a در سدهای کرج، طالقان و لتیان مشخص شد که تغییرات افزایشی غلظت کلروفیل a و دما معنی‌دار بوده است. به طوری که با افزایش یا کاهش دما در فصلهای گرم و سرد سال، میزان غلظت کلروفیل a نیز رفتار افزایشی یا کاهش‌ی را نشان داده است.

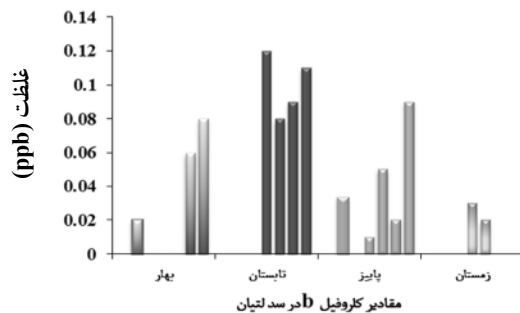
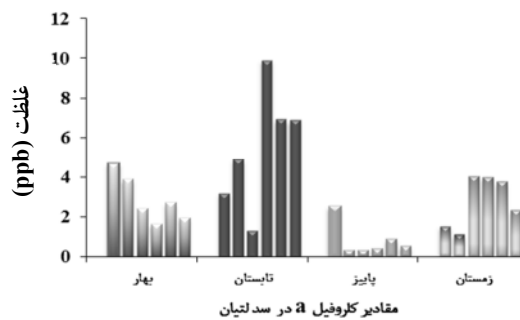
با در نظر گرفتن شاخص OECD که بر پایه غلظت کلروفیل a طراحی شده است، در صورت موجود بودن میانگین کلروفیل a، حالت تغذیه‌ای برای مقادیر کلروفیل  $1 < \text{Chla1} < 2$  اولیگوتروفیک،  $8 < \text{Chla1} < 2/5$  مزوتروفیک و  $25 < \text{Chla1} < 8$  یوتروفیک است [۱۵].

### ۵- نتیجه‌گیری

شناسایی و اندازه‌گیری کلروفیل a با استفاده از روشهای مختلف نظیر اسپکتروفتومتری، فلورومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا امکان‌پذیر است. هدف از این مطالعه اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل a و b با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بود. همچنین وضعیت سدهای کرج، طالقان و لتیان از نظر تغذیه‌گرایی با استفاده از شاخص OECD مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در سدهای مورد مطالعه نشان می‌دهد که وضعیت تغذیه‌ای این سدها در فصل‌های بهار و تابستان به حالت مزوتروفیک و در فصل‌های پاییز و زمستان حالت الیگوتروفیک است.



شکل ۶- غلظت کلروفیل a و b در سد طالقان، آذر ماه ۱۳۹۰ تا آذر ماه ۱۳۹۱



شکل ۷- غلظت کلروفیل a و b در سد لتیان، آذر ماه ۱۳۹۰ تا آذر ماه ۱۳۹۱

### ۶- مراجع

1. Rolland, A., Bertrand, F., Maumy, M., and Jacquet, S. (2009). "Assessing phytoplankton structure and spatiotemporal dynamic in freshwater ecosystem using powerful multiway statistical analysis." *J. Water Res.*, 43 (13), 3155-3168.

2. Monnavary, M., Noori, J., and Sohrabnia, N. (2012). "Phytoplankton assembly effect in Karaj reservoir water quality." *J. Water and Wastewater*, 86, 19-30. (In Persian)
3. Pasztaleniec, A., and Poinewozik, M. (2009). "Phytoplankton based assessment of the ecological statuses of four shallow lakes (eastern poland) according to water framework directive comparison of approach." *Limnologica*, 40, 251-259.
4. Shapoori, M., and Javanshir, A. (2006). "The study of chlorophyll a and biomass in mouth of Tajan river." *J. of Marine Biology*, 1 (3), 78-88. (In Persian)
5. WQRRSR. (2009). *Guidelines for water quality studies of large dam reservoirs*, No.313-a
6. Nasrollahzadeh Saravi, H., and Makhloogh, A. (2012). "Eutrophication trend of the Caspian sea water based on absolute trophic scaled (TRIXCS) and unscaled (UNTRIX)." *J. of Environmental Sciences*, 9, 49-60.
7. Sinclair, A. (2009). "Photodetection system for the measurement of chlorophyll concentration in water." EE 533 Photodetection & Photodetectors.
8. Jeffrey, S.W., and Humphrey, G.F. (1975). "New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton." *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 167, 191-194.
9. Lorenzen, C.J., and Jeffrey, S.W. (1980). *Determination of chlorophyll in seawater: Report of intercalibration test UNESCO*, Technical Papers in Marine Science 35 .
10. Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke, R., Waterbury, J.B., and Welschmeyer, J.B. (1988). "A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone." *Nature*, 334, 340-343.
11. Mantoura, R.F.C., and Llewellyn, C.A. (1983). "The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography." *Anal. Chim. Acta*, 151, 297-314.
12. EPA. (1997). *In vitro determination of chlorophylls a and b and identification of other pigments of interest in marine and freshwater algae using high performance liquid chromatography with visible wavelength detection*, version 1, USA.
13. EPA. Methods 446, (1997). *Determination of chlorophylls a and b ,c<sub>1</sub>+c<sub>2</sub> and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometer*, Revision 1.2, USA.
14. Harding, L. W., Meesoon, W., and Fisher, T. R. (1986). "Phytoplankton production in two east coast estuaries: Photosynthesis-light functions and pattern of carbon assimilation in Chesapeake and Delaware Bays." *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 23, 773-806.
15. Shahrban, M., and Shahidi, A. (2008). "Determination of water quality of the Caspian sea sauther coasts based on OECD method and traphic index (TRIX)." *J. of Environmental Science and Tech.*, 11 (3), 193-204.