

牟建梅, 张国芹, 刘凤军, 等. 白菜叶绿素含量的测定方法筛选[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 289–290.

白菜叶绿素含量的测定方法筛选

牟建梅, 张国芹, 刘凤军, 徐 君, 余旭东, 李 军, 徐 瑶

(江苏省苏州市农业科学院, 江苏苏州 215155)

摘要:以白菜品种苏州青、华王为试验材料, 研究 95% 乙醇, 80% 丙酮, $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}=1:1, 2:1, 1:2$, $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{水}}=4.5:4.5:1, 6$ 种提取液对白菜叶片叶绿素提取效果的影响, 并测定叶绿素在这 6 种不同提取液中的稳定性。结果表明, 叶绿素提取效果较好的为 $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}=1:1, 1:2$ 的浸提液。叶绿素的稳定性测定结果表明, 浸提 48 h 后稳定性较好, 提取最为充分。

关键词:白菜; 叶绿素; 稳定性; 浸提; 乙醇; 丙酮; 吸光度

中图分类号: S634.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0289-02

叶绿素是植物叶片进行光合作用的主要色素, 叶绿素含量是植物生理研究中的重要指标。生产中也往往根据叶色变化作为看苗诊断和采取施肥措施的重要指标。叶绿素含量测定方法主要有分光光度计法、活体叶绿素仪法和光声光谱法。但用手持叶绿素仪或光谱分析仪测得的是色素相对含量指标, 并且不同种类植物叶片中的色素指标与实际叶绿素含量之间的关系方程式不同, 即不能用同一种色素指标关系来转换不同植物的色素含量^[1]。在日常试验中以分光光度计法应用最为广泛。另外, 根据所用提取溶剂不同又有多种测定方法, 早期叶绿素测定广泛采用 Arnon 法。但该方法由于需要先研磨后除渣, 工作量大、步骤多且易受光氧化而引起偏差, 不适宜田间大量样品的提取和测定。张宪政提出了丙酮、乙醇混合液法浸提叶绿素, 证明利用混合液进行叶绿素浸提的可行性^[2]; 洪法水等发现, 丙酮与乙醇混合液提取叶绿素存在协同效应, 且二者在等摩尔混合时提取效果最好^[3]; 徐芬芬等研究认为, 丙酮与乙醇体积比 1:1 混合液浸提白菜叶绿素效果最好^[4]; 而麻明友等发现, 丙酮与乙醇体积比 2:1 的混合液浸提猕猴桃叶片叶绿素效果较好^[5]。

白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 别称不结球白菜、青菜、油菜等, 是原产于我国的、重要的叶菜类作物, 在长江中下游及以南广泛栽培, 可周年生产, 具有极大的经济价值。叶绿素是叶菜类作物重要生长指标, 准确地测定其含量可为叶菜类生长发育以及逆境胁迫等试验提供基础。为了探讨实现白菜叶片叶绿素提取并能尽量避免光分解, 建立适合大量样品的叶绿素提取及其含量测定方法的可能性和科学性, 本试验以苏州青、华王 2 个白菜品种为试材, 就不同比例的丙酮与乙醇混合溶液提取测定白菜叶片中叶绿素含量及其稳定性进行比较分析, 为白菜田间大样本叶绿素含量测定提

供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2 个白菜品种为苏州青和华王。将新鲜白菜叶片洗净, 用吸水纸吸干表面水分, 去除大叶脉后, 将叶片剪碎成约 0.2 cm × 1.0 cm 的小细丝, 混匀备用。

1.2 仪器与试剂

试验用 752s 紫外可见分光光度计测定吸光度。丙酮、乙醇等试剂均为分析纯, 试验用水为超纯水。

1.3 试验方法

1.3.1 浸提试验 按体积比配制浸提液, 设 6 个处理: 处理 1, 95% 乙醇; 处理 2, 80% 丙酮; 处理 3, 乙醇: 丙酮 = 1:1; 处理 4, 乙醇: 丙酮 = 2:1; 处理 5, 乙醇: 丙酮 = 1:2; 处理 6, 乙醇: 丙酮: 水 = 4.5:4.5:1。用 6 个提取液提取叶绿素, 3 次重复。浸提均在黑暗中进行, 每支试管加入浸提液 20 mL, 并不时摇动, 待叶片变白后测定其吸光度。样品分别于 645、663 nm 波长下测定吸光度, 由 Arnon 法进行修正, 公式为:

$$\text{叶绿素 a } (C_a) = (12.7 \times D_{663 \text{ nm}} - 2.69 \times D_{645 \text{ nm}}) \times V / (1000m)$$

$$\text{叶绿素 b } (C_b) = (22.9 \times D_{645 \text{ nm}} - 4.68 \times D_{663 \text{ nm}}) \times V / (1000m)$$

$$\text{叶绿素总含量 } (C_{a+b}) = C_a + C_b$$

式中: $D_{663 \text{ nm}}$ 、 $D_{645 \text{ nm}}$ 分别为相应波长下的吸光度; V 为提取液体积 (mL); m 为所取叶片质量 (g), C_a 、 C_b 、 C_{a+b} 的单位为 mg/g。

1.3.2 稳定性试验 室温条件下, 用不同浸提液浸提白菜叶片叶绿素, 待叶片变白后, 分别放置 24、48、72 h 后再次测定提取液中叶绿素含量, 比较叶绿素在不同提取液中的稳定性。

2 结果与分析

2.1 不同浸提液对白菜叶绿素提取效果的影响

表 1 显示, 在浸提 48 h 后, 不同处理对 2 种白菜叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量的提取效果存在较大差异。处理 3 与处理 5 间叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量差异不显著, 且提

收稿日期: 2013-12-12

基金项目: 江苏省苏州市应用基础研究计划 (编号: SYN201326)。

作者简介: 牟建梅 (1975—), 女, 辽宁康平人, 副研究员, 研究方向为蔬菜育种及安全高效生产技术。Tel: (0512) 65386213。E-mail: 244823091@qq.com。

通信作者: 张国芹, 助理研究员, 研究方向为蔬菜栽培生理。E-mail: guoqin1981@163.com。

表 1 不同提取液对白菜叶绿素提取效果的影响

处理 方法	叶绿素 a 含量 (mg/g)		叶绿素 b 含量 (mg/g)		叶绿素总量 (mg/g)	
	苏州青	华王	苏州青	华王	苏州青	华王
1	1.187cd	1.557c	0.364c	0.457d	1.550	2.014
2	1.148d	1.571c	0.403b	0.508bc	1.551	2.079
3	1.521a	1.991a	0.435a	0.541a	1.956	2.532
4	1.417ab	1.894ab	0.395b	0.495c	1.812	2.389
5	1.493a	2.022a	0.442a	0.549a	1.935	2.571
6	1.317bc	1.791b	0.414ab	0.525ab	1.731	2.315

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

取总叶绿素含量较高,苏州青分别为 1.956、1.935 mg/g,华王分别为 2.532、2.571 mg/g。而处理 1、处理 2 浸提得到的叶

表 2 不同提取液对白菜苏州青的叶绿素稳定性的影响

处理	第 1 天含量(mg/g)			第 2 天含量(mg/g)			第 3 天含量(mg/g)		
	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素
1	0.872c	0.280d	1.152	1.187cd	0.364c	1.550	0.923d	0.344c	1.267
2	0.920c	0.349c	1.269	1.148d	0.403b	1.551	0.949cd	0.397b	1.346
3	1.109a	0.386ab	1.495	1.521a	0.435a	1.956	1.216a	0.447a	1.663
4	1.047ab	0.358bc	1.406	1.417ab	0.395b	1.812	1.146ab	0.401b	1.547
5	1.104a	0.389a	1.493	1.493a	0.442a	1.935	1.213a	0.448a	1.661
6	0.999b	0.366abc	1.365	1.317bc	0.414ab	1.731	1.051bc	0.386b	1.437

表 3 不同提取液对白菜华王的叶绿素稳定性的影响

处理	第 1 天含量(mg/g)			第 2 天含量(mg/g)			第 3 天含量(mg/g)		
	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素
1	1.195b	0.407c	1.602	1.557c	0.457d	2.014	1.168c	0.439d	1.607
2	1.186b	0.463b	1.649	1.571c	0.508bc	2.079	1.146c	0.500c	1.646
3	1.392a	0.492ab	1.887	1.991a	0.541a	2.532	1.518a	0.580a	2.098
4	1.345a	0.470b	1.815	1.894ab	0.495c	2.389	1.442ab	0.539b	1.980
5	1.392a	0.514a	1.899	2.022a	0.549a	2.571	1.537a	0.590a	2.128
6	1.356a	0.483ab	1.839	1.791b	0.525ab	2.315	1.342b	0.525bc	1.867

3 结论与讨论

室温下,采用不同比例的丙酮、乙醇混合溶剂提取小白菜叶片中叶绿素。试验结果表明,混合液提取法所得叶绿素含量高于单一溶液提取,其中以混合液 $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}=1:1、1:2$ 效果最好,并且这 2 个处理间差异不显著。乙醇与丙酮混合液提取叶绿素存在协同效应,这与洪法水等在菠菜、猕猴桃及菜心上的研究结果一致^[3,5-6]。

随着测定时间的延长,叶绿素 a 降解值在各种提取液中均远远大于叶绿素 b。这与郭胜伟等的研究结果^[7]一致。由此可见,影响叶绿素提取的关键是叶绿素 a 的提取速度及其稳定性。稳定性测定结果表明,室温下白菜叶片中叶绿素在浸提 48 h 后的提取稳定性较好,提取最为充分。

试验结果表明,乙醇与丙酮体积比为 1:1 和 1:2 时均可作为白菜叶片叶绿素含量的快速测定方法。该方法省略了研磨、冲洗、离心或过滤等步骤,具有步骤简单、操作方便、节省时间的优点,这对于快速测定大批量白菜样品叶绿素含量

叶绿素总含量均较低,苏州青分别为 1.550、1.551 mg/g,华王分别为 2.014、2.079 mg/g。

由表 1 还可以看出,单一溶剂提取效果均不如混合液浸提效果好。这可能是因为乙醇和丙酮间存在协同萃取效应,促进了叶绿素的快速提取。

2.2 不同提取液对叶绿素稳定性的影响

用不同浸提溶剂提取白菜叶片叶绿素含量,其稳定性结果见表 2、表 3。从表 2、表 3 可以看出,2 种白菜的叶绿素 a 和总叶绿素含量均在第 2 天达到最大值。处理 3、处理 4、处理 5 中叶绿素 b 含量均在第 3 天达最大,但与第 2 天结果相差不大。苏州青叶绿素含量的测定结果显示,第 3 天叶绿素 a 含量比第 2 天低 17.3%~22.2%,致使总叶绿素含量均在第 3 天下降,说明叶绿素 a 相对容易降解。同时,试验也表明叶绿素提取液不适宜长时间放置。

具有重要意义。

参考文献:

[1] 明 华,胡春胜,张玉铭,等. 浸提法测定玉米叶绿素含量的改进[J]. 玉米科学,2007,15(4):93-95,99.
[2] 张宪政. 植物叶绿素含量测定——丙酮乙醇混合液法[J]. 辽宁农业科学,1986(3):26-28.
[3] 洪法水,魏正贵,赵贵文. 菠菜叶绿素的浸提和协同萃取反应[J]. 应用化学,2001,8(7):532-535.
[4] 徐芬芬,叶利民,徐卫红,等. 小白菜叶绿素含量的测定方法比较[J]. 北方园艺,2010(23):32-34.
[5] 麻明友,麻成金,肖桌柄,等. 猕猴桃叶中叶绿素的提取研究[J]. 食品工业科技,2006,27(6):140-143.
[6] 任 红,罗 丰,许 彦,等. 菜心叶绿素测定方法比较研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(3):1455-1456.
[7] 郭胜伟,高云东. 比色法测定中华芦荟叶片中叶绿素含量方法的研究[J]. 中医药学刊,2004,22(1):53-76.