

努尔凯麦尔·木拉提, 杨亚杰, 帕尔哈提·阿布都克日木, 等. 小麦叶绿素含量测定方法比较[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(9): 156–159.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.09.028

小麦叶绿素含量测定方法比较

努尔凯麦尔·木拉提^{1,2}, 杨亚杰¹, 帕尔哈提·阿布都克日木¹, 玛依努尔·吾斯曼^{1,2}

(1. 喀什大学生命与地理科学学院, 新疆喀什 844006; 2. 新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室, 新疆喀什 844006)

摘要:测定植物叶绿素含量有多种方法, 以小麦为材料, 在前人研究的基础上, 验证长势相近的小麦叶片在同等试验条件之下, 比较测定叶绿素含量的 6 种方法。结果表明, 原子吸收光谱法所测得的叶绿素含量最高且结果最准确、可靠; 浸提法所得的叶绿素含量也较高但时间过长; 研磨法结果偏低且过程繁琐; 叶绿素仪法并不适合作为精确测量叶绿素含量的方法。所测叶绿素含量从高到低依次为原子吸收光谱法 > 无水乙醇浸提法 > 80% 乙醇浸泡法 > 95% 乙醇研磨 - 过滤法 > 95% 乙醇研磨 - 离心法 > 叶绿素仪法。此结论可为其他研究者提供一定的参考价值。

关键词:小麦; 叶绿素; 原子吸收光谱法; 浸泡法; 研磨法

中图分类号: S512.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)09-0156-04

小麦(*Triticum aestivum* L.) 是一种粮食作物, 其产量的提高可以极大地推动农业发展。而影响小麦产量最重要的因素是其中的叶绿素含量, 叶绿素含量常作为评定植物适应环境能力和生长状况的一个重要项目^[1]。因此小麦叶绿素含量测定的研究就显得格外重要, 其测定方法有很多, 但是对各种方法的比较却鲜见报道。针对这一现象, 笔者所在课题组把各种方法进行比较找出各自优缺点, 并在笔者所在实验室进行相关方法的叶绿素含量测定。以期为他人选择最适合的方法测定叶绿素含量提供参考, 为合理试验、科研奠定一定的基础。

收稿日期: 2020-06-30

基金项目: 喀什师范学院校内课题(编号: 142516)。

作者简介: 努尔凯麦尔·木拉提(1982—), 女, 维吾尔族, 新疆喀什人, 硕士, 讲师, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: 280104391@qq.com。

1 材料与方法

1.1 小麦种子的处理

取预先准备好的小麦种子, 从中选取颗粒饱满的种子, 自来水冲洗表面灰尘和杂质后备用; 用自来水将 120 mm 培养皿冲洗干净, 晾干, 放上 2~3 张滤纸, 用水打湿。将备用的小麦种子平铺在滤纸上, 放入 4~5 个培养皿中培养, 放到阳光充足、温度适宜的地方进行培养, 隔 3~4 h 浇 1 次水。观察小麦生长情况, 待小麦苗长至 5 cm 时移到花盆中进行后续生长, 待小麦叶片葱绿, 高度约 10 cm 时准备进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 95% 乙醇研磨 - 过滤法 取新鲜干净小麦叶片, 称量 0.4 g 于研钵中剪碎, 加入少许石英砂和碳酸钙粉及 4~6 mL 95% 乙醇, 研磨成匀浆, 继续加

[15] Sapers G M, Miller R L, Pilizota V, et al. Shelf-life extension of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(2): 362–366.

[16] Wiktor A, Sledz M, Nowacka M, et al. The influence of immersion and contact ultrasound treatment on selected properties of the apple tissue[J]. Applied Acoustics, 2016, 103(B): 136–142.

[17] Moreno J, Chiralt A, Escribá I. Effect of blanching/osmotic dehydration combined methods on quality and stability of minimally processed strawberries[J]. Food Research International, 2000, 33(7): 609–616.

[18] Tabtianga S, Prachayawarakonb S, Soponronnarita S. Effects of osmotic treatment and superheated steam puffing temperature on

drying characteristics and texture properties of banana slices[J]. Drying Technology, 2012, 30(1): 20–28.

[19] Karabulut I, Topcu A, Duran A, et al. Effect of hot air drying and sun drying on color values and β -carotene content of apricot (*Prunus armenica* L.) [J]. LWT – Food Science & Technology, 2007, 40(5): 753–758.

[20] Ihns R, Diamante L M, Savage G P, et al. Effect of temperature on the drying characteristics, colour, antioxidant and beta-carotene contents of two apricot varieties[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(2): 275–283.

[21] Pénicaud C, Achir N, Dhuique – Mayer C, et al. Degradation of β -carotene during fruits and vegetables processing or storage: reaction mechanisms and kinetics aspects[J]. Fruits, 2011, 66(6): 417–440.

入 95% 乙醇研磨至组织变为白色,静置一段时间,取 1 张干净滤纸放于漏斗内壁,用乙醇润湿,玻璃棒置于滤纸 3 层处,把匀浆沿玻璃棒引流,过滤到 50 mL 棕色容量瓶中,用乙醇洗研钵及玻璃棒,一并转入,最后用 95% 乙醇定容至 50 mL,重复 2 次。

取洁净比色皿(用手拿住比色皿的糙面),先用少量待测液清洗 2~3 次,然后将溶液倒入比色皿中(高度不得超过比色皿总高的 4/5),将洒出的溶液用滤纸吸掉,第 1 个比色皿中放 95% 乙醇溶液为空白对照。然后测定其在波长 663 nm 和 645 nm 处的吸光度。每个重复在不同波长下测 3 次,取平均值。

通过以下公式计算叶绿素含量。

$$\text{叶绿素 a 含量} = (12.7D_{663 \text{ nm}} - 2.69D_{645 \text{ nm}}) \times \frac{V}{1\,000 \times m}; \quad (1)$$

$$\text{叶绿素 b 含量} = (22.9D_{645 \text{ nm}} - 4.68D_{663 \text{ nm}}) \times \frac{V}{1\,000 \times m}; \quad (2)$$

$$\text{叶绿素总量} = (20.21D_{645 \text{ nm}} + 8.02D_{663 \text{ nm}}) \times \frac{V}{1\,000 \times m}。 \quad (3)$$

式中: $D_{663 \text{ nm}}$ 、 $D_{645 \text{ nm}}$ 分别为在 663、645 nm 下的吸光度; V 为待测液的体积(mL); m 为叶片鲜质量(g)或叶面积(cm^2)。

1.2.2 95% 乙醇研磨-离心法 取新鲜干净小麦叶片,称取 0.5 g 于研钵中剪碎,加入少许石英砂和碳酸钙粉及 3 mL 95% 乙醇,研磨成匀浆,再加 95% 乙醇 3~5 mL,静置一段时间,将匀浆转入 10 mL 离心管中,并用适量 95% 乙醇洗涤研钵,一并转入,然后以 4 000 r/min 离心 10 min 后,弃沉淀,上清液用 95% 乙醇定容至 10 mL,重复 2 次。

取上述色素提取液 2 mL,加 95% 乙醇 16 mL 稀释得到待测液;测定与计算方法同“1.2.1”节。

1.2.3 无水乙醇浸提法 称取新鲜干净小麦叶片 0.02 g,将其剪成长度约 5 mm、宽度约 1 mm 的细丝。将准备好的细丝等量分别放入 3 支试管中(试管用黑塑料袋包裹),滴加 10 mL 无水乙醇,室温下暗处浸泡提取 3 d 左右,期间加以摇晃可缩短浸泡时间,至小麦叶片无色或白色。

将提取液再次定容至 10 mL;测定与计算方法同“1.2.1”节,其中空白对照为无水乙醇。

1.2.4 80% 乙醇浸提法 步骤同“1.2.3”节,只需 80% 乙醇溶液替代无水乙醇即可。

1.2.5 叶绿素仪法 手持 CM-1000 叶绿素测量

仪,距离小麦叶片 30.5~183.0 cm,打开开关,即可进行扫描,等数据出现后进行记录,间隔 2 s 就可以进行下一次测量,重复 3 次取平均值。

1.2.6 原子吸收光谱法 镁标准曲线的绘制:将配制好的 1.000 mg/mL 镁储备液稀释至 10.00 $\mu\text{g/mL}$,得到镁标准溶液。移此溶液 0、0.5、1.5、2.5、3.5、5.0 mL 于 6 个 50 mL 的容量瓶中,再分别滴加 20 mL 0.8 mol/mL HCl 溶液,用蒸馏水定容。得浓度分别为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准液,以浓度为 0 的溶液作为空白对照,测定标准液在 285 nm 处的吸光度,分别为 0.015、0.116、0.245、0.418、0.552、0.743,绘制出标准曲线,线性函数为 $y = 0.7265x + 0.0333$,见图 1。

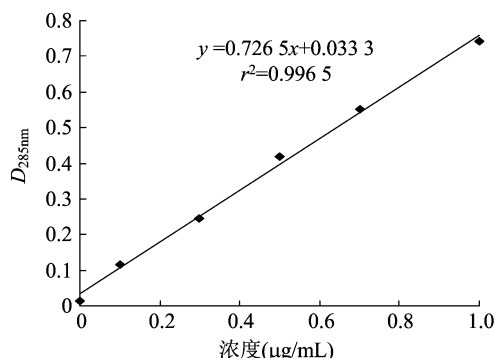


图1 镁的标准曲线

取新鲜干净小麦叶片,称取约 2.0 g 剪碎,加入少许石英砂和碳酸钙粉及 4~6 mL 无水乙醇,研磨成匀浆,继续加入无水乙醇研磨至组织变为白色,静置一段时间,取 1 张干净滤纸放于漏斗内壁,用乙醇润湿,玻璃棒置于滤纸 3 层处,把匀浆沿玻璃棒引流,过滤到 50 mL 棕色容量瓶中,用乙醇洗研钵及玻璃棒,一并转入,最后用无水乙醇定容至 50 mL,重复 2 次。得到小麦叶绿素提取液,置于避光处备用。

取上述叶绿素提取液 4.0 mL 于分液漏斗中,滴加 4.0 mL 石油醚,轻轻摇动;再加 4.0 mL NaCl 溶液,上下振荡;再加入 12.0 mL 蒸馏水,充分振荡以后静置分层,深绿色的石油醚层在上层,水-乙醇层在下层。从下面倒出水-乙醇层,再用 4.0 mL 石油醚重复萃取 2 次,然后合并 3 次所得到的石油醚相。于其中加入 20 mL 0.8 mol/L 的 HCl 溶液,充分振荡后放置分层,将水相转移到 50 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,得到待测液。

采用火焰原子吸收分光光度计 361MC 测定待测液中镁元素的吸光度。通过以下公式计算叶绿素含量:

叶绿素总量(mg/g) = $\frac{C \times V_1 \times M_1 \times V_3}{V_2 \times m \times M_2 \times 1\,000} = \frac{23.13 \times C}{m}$ 。(4)

式中: C 为待测液中的镁浓度($\mu\text{g/mL}$), m 为小麦称取的质量(g); V_1 为乙醇提取液的总体积(mL); V_2 为移取石油醚相的体积(mL); V_3 为返萃水相的定容体积(mL); M_1 为叶绿素 a(b) 的平均摩尔质量(g/mol); M_2 为镁的摩尔质量(g/mol)。

2 结果与分析

由表 1 可见,95% 乙醇研磨 - 过滤法所测得的叶绿素含量高于 95% 乙醇研磨 - 离心法;无水乙醇浸提法所测得的叶绿素含量高于 80% 乙醇浸提法;浸提法所测得的叶绿素含量均高于研磨法;叶绿素

仪法无法测出叶绿素 a、叶绿素 b 含量。原子吸收光谱法测得的叶绿素总量为(4.025 ± 0.110) mg/g,其所测得的叶绿素总量最高,且标准差也最小,所以此方法所测结果最准确,但缺点是无法测出叶绿素 a、叶绿素 b 的含量。

小麦叶片在经过 95% 乙醇溶液研磨之后,过滤法与离心法测得的叶绿素含量有明显差异。过滤法所测得的含量高于离心法,说明在离心的过程中,匀浆从研钵转移到离心管以及叶绿素提取液从离心管转移到试管的过程中,小麦叶绿素遭到光、氧的损伤,同时还存在溶液洒出的情况,导致离心法测得的含量偏低;而在过滤的过程中,并没有频繁的转移过程,直接过滤定容到容量瓶即可,可避免叶绿素的损失。

表 1 6 种方法的测定小麦叶绿素含量

方法	吸光度		叶绿素含量(mg/g)		
	663 nm	645 nm	叶绿素 a	叶绿素 b	总量
95% 乙醇研磨 - 过滤法	1.353 ± 0.022	0.529 ± 0.052	2.102 ± 0.212	0.760 ± 0.225	2.862 ± 0.226
95% 乙醇研磨 - 离心法	0.731 ± 0.128	0.296 ± 0.114	1.870 ± 0.302	0.676 ± 0.167	2.546 ± 0.356
无水乙醇浸提法	0.611 ± 0.018	0.237 ± 0.010	2.633 ± 0.116	1.065 ± 0.025	3.698 ± 0.153
80% 乙醇浸提法	0.528 ± 0.036	0.228 ± 0.011	2.439 ± 0.177	0.880 ± 0.074	3.319 ± 0.196
叶绿素仪法					1.962 ± 0.240
原子吸收光谱法					4.025 ± 0.110

注:表中的数据均为 3 次重复的平均值 ± 标准差。

乙醇作为提取剂来浸泡小麦叶片,不同浓度乙醇处理测得的叶绿素含量不同,可知提取剂浓度会影响叶绿素含量的测定。在相同条件之下,采用无水乙醇浸泡比 80% 乙醇浸泡测定效果更好,说明乙醇浓度越低其含水量越高,叶绿素在其提取剂中的溶解度降低,所以测得的叶绿素含量降低。

浸提法测得的数据均比研磨法高,说明浸提法对小麦叶片的损害较少。在研磨过程中,研磨时间过长使叶绿素受到光解,且过程比较繁琐,既要进行研磨,还有后续的过滤或离心处理,叶绿素含量会发生一定的减少。而浸提法只需将小麦叶片剪成细丝状就可以直接放入浸提液中反复浸泡,至叶丝变白或无色即可,过程较简单,且所测含量也较高。

叶绿素仪法测得的结果是最低的,因为在测量过程中,CM - 1000 叶绿素仪所要求的待测植物的面积直径最低应为 1.35 cm,而试验中所采用的小麦叶片由于生长时间较短,宽度仅为 0.2 ~ 0.4 cm;又因为使用叶绿素仪测定时,小麦叶片呈现一定程度的发黄现象,导致最终结果偏低。说明此方法无

法测出准确数据,但是它的整个试验过程极其简单,对待测样品也没有严格的处理要求,只需保持一定的距离进行扫描即可得出叶绿素含量。

原子吸收光谱法所测得的叶绿素总量为 4.025 mg/g,为 6 种方法中测得含量的最高值,且准确性也是最可靠的,因为通过间接测定叶绿素中镁元素的浓度进而测定叶绿素含量,在其过程中可以减少叶绿素的降解和损失问题。但试验过程中也存在一些误差,比如叶绿素提取液的制备采用的是研磨法,存在一定程度的光解。但是与其他方法相比,此方法所用的火焰原子吸收光光度计能够灵敏可靠地测定镁元素的吸光度,所以其准确性仍是最高,误差也最小。

3 结论与讨论

在测定小麦叶绿素含量的 6 种方法中,原子吸收光谱法虽不是直接测定叶绿素含量的方法,但是其测定过程是对叶绿素中镁元素进行直接测定,测定镁元素的吸光度与直接测定叶绿素吸光度相比,

其操作过程不存在叶绿素的降解,所以它的测定结果是最可靠、最准确的。无水乙醇浸提法所得结果较准确但时间最长;叶绿素仪法是粗略估计但时间最短;研磨法是传统方法且一直沿用至今,但是过程繁琐,需耗时耗力。另外,浸提法、研磨法以及原子吸收光谱法都是对待测样品进行离体检测,在此过程中也存在对待测样品不同程度的损伤,而叶绿素仪法则为活体检测,无需采摘;同时叶绿素仪法和原子吸收光谱法只能测出小麦的叶绿素总量,无法测出叶绿素 a、叶绿素 b 含量。

叶绿素含量是所有植物十分重要的生理指标之一^[2],一直以来以传统的研磨法应用最为广泛,深受各位研究者的青睐,本次研究也采用了研磨法,得知了其对待测样品含量的影响,以及其他方法对含量测定的影响。

在研磨-过滤和研磨-离心 2 种方法的操作过程中,考虑到过滤法比较耗时和乙醇挥发较快的原因,所以同时做了离心试验,结果发现,离心所测的含量比过滤法还要低。但总体来讲,研磨法与其他方法相比,表现为步骤琐碎、工作量大、在研磨过程中对小麦叶片易有损伤且很容易受光氧化分解,并且无法防止试验者不与挥发到四周空气中的药品接触,对身体有较大的伤害^[3]。所以,有人对此种方法进行了改进^[4],但是由于对待测样品的提取不彻底、效率低以及提取剂不稳定等因素而未被广泛使用^[5]。所以研磨法从严格意义上来说,其测量结果偏低,也比较麻烦,并不适宜用来测定叶绿素含量,但是它作为测量植物叶绿素含量的鼻祖,必将会一直沿用下去,并且对于教师的试验教学过程还是比较适宜的。

用浸提法来进行小麦叶绿素含量测定时,使用了 2 种不同浓度的同一种提取剂,结果发现,高浓度组所测的含量比较高且准确。但这并不能说明提取剂浓度与所测叶绿素含量表现为正相关关系,如果未来有机会,将会使用乙醇作为单一提取剂,作梯度浓度试验,以确定最佳乙醇浓度。同时本试验与洪法水等的丙酮乙醇混合液作为浸泡液的试验^[6]作比较,发现其效果相对偏低;与王文杰等的

二甲基亚砷法浸泡提取叶片叶绿素相比^[7],其时间相对较长。但是浸提法所测得的含量在 6 种方法当中也是明显较高的,且极易进行操作,对试验也没有药品暴露风险,个人觉得比较适合于本科及硕士课程的研究。

EYELHCM-1000 叶绿素仪法作为一种测定植物相对叶绿素含量极其简便的方法,由于结果不准确,故参考价值不大。但是此方法却很简单易测,并且仪器也很方便携带,同时也有研究表明,经过校正的叶绿素仪能对田间生长的植物的叶绿素含量进行准确快速的测定^[8]。若待测植物的叶片面积可以达到仪器的要求,那么用来测量抽穗期的小麦叶片叶绿素含量还是比较适宜的。

原子吸收光谱法由于是一种间接的方法,很多人并不采用,但是由于其试验过程很严谨,对药品的使用量有一定限度,只需把镁元素从叶绿素中萃取出来,它就不会有损失,如果采用直接方法测叶绿素含量,不可避免的会使待测液中叶绿素降解,导致含量降低。并且本试验结果也显示它所测得的含量最高、最准确,所以比较适用于科学研究。

参考文献:

- [1] 周小生,周月琴,庞磊,等. 叶绿素仪 CCM-200 在测定茶树叶片叶绿素和氮素含量上的应用[J]. 安徽农业大学学报,2012,39(1):150-153.
- [2] 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.
- [3] 黄帆,郭正元,徐珍. 测定浮萍叶绿素含量的方法研究[J]. 实验技术与管理,2007,24(5):29-31.
- [4] 陈福明,陈顺伟. 混合法测定叶绿素含量的研究[J]. 林业科技,1984(2):4-8.
- [5] 彭运生,刘恩. 关于提取叶绿素方法的比较研究[J]. 北京农业大学学报,1992,18(3):247-250.
- [6] 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,2001,18(7):532-535.
- [7] 王文杰,贺海升,关宇,等. 丙酮和二甲基亚砷法测定植物叶绿素和类胡萝卜素的方法学比较[J]. 植物研究,2009,29(2):224-229.
- [8] 张宪政. 植物叶绿素含量测定方法比较研究[J]. 沈阳农学院学报,1985,16(4):81-84.