

校园常见植物叶绿素提取方法比较及其含量测定

何启平,陈莹

(菏泽学院 生命科学系,山东 菏泽 274015)

摘要:为筛选提取植物叶绿素的有效方法,以校园中 21 种植物叶片为材料,应用 80% 丙酮研磨法、80% 丙酮:95% 乙醇(1:1)混合液浸泡法及纯丙酮:无水乙醇(1:1)混合液浸泡法进行叶绿素提取,比较分析不同提取方法的差异及不同种类植物叶片叶绿素含量的差异。结果表明:混合液浸泡法效果较研磨法好,且纯丙酮:无水乙醇(1:1)混合液浸泡法效果最好;并分析比较了 21 种校园常见植物叶绿素含量的差异与其生长习性的关系。

关键词:叶绿素含量;丙酮研磨法;混合液浸泡法;阴生植物;阳生植物

中图分类号:Q94 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)10-0117-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.10.0117

叶绿素是高等植物中最重要的光合色素,在光合作用中光能的吸收、传递和转化中起着非常重要的作用。在生物相关专业本科生的植物生理实验教学中,“叶绿素含量的测定”是必需开设的一项实验^[1-2]。一般都采用 Arnon 法测定叶绿素含量,此方法是将刚采来的新鲜叶片去除灰尘之后在 80% 的丙酮溶液中充分研磨并过滤,通过测定提取液的吸光度值来计算叶绿素的含量。Arnon 方法由于研磨过滤时无法做到完全避光,提取液中的叶绿素容易受到光氧化的破坏,损耗较大,且操作麻烦,耗时较长,提取效果不理想^[3]。

陈福明等提出用丙酮乙醇混合液法提取叶绿素,此方法避免了叶绿素受光氧化破坏,且操作简单,并可用 Arnon 公式计算叶绿素的含量^[4]。为了研究研磨法与不同比例混合液浸泡法的优缺点,了解校园常见植物叶绿素的含量,本文采用 3 种方法即 80% 丙酮溶液研磨法、80% 丙酮:95% 乙醇(1:1)混合液浸泡法及纯丙酮:无水乙醇(1:1)混合液浸泡法来进行提取效果的比较研究,采集了校园中 21 种常见植物的叶片进行叶绿素含量的测定,以期实验教学和相关科研提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

选取校园内不同种类的 21 种植物的叶片,包括:银杏、牡丹、石楠、白蜡树、白杨树、水杉、紫花

酢浆草、紫羊茅、龙柏、雪松、黑松、垂柳、国槐树、法国冬青、枸骨、鸢尾、枇杷、凤尾丝兰、紫叶李、锦葵、玉米幼苗(实验室盆栽培养 20 d)。

1.2 方法

本试验采取了 3 种叶绿素提取方法,分别是丙酮研磨法^[5-6];80% 丙酮:95% 乙醇(1:1)混合液浸泡法^[7-8];纯丙酮:无水乙醇(1:1)混合液浸泡法^[7-8]。

2 结果与分析

2.1 叶绿素提取方法的比较

2.1.1 三种叶绿素提取方法之间的比较 选取银杏、牡丹、石楠、白蜡、白杨、紫花酢浆草、紫羊茅、凤尾丝兰、龙柏共 9 种植物的叶片,分别用 3 种方法进行了叶绿素含量的测定(见表 1)。

从表 1 可以看出,除叶片较厚的龙柏、凤尾丝兰这两种植物外,其它 7 种植物均是混合液浸泡法所提取的叶绿素含量高于丙酮研磨法,且纯丙酮:无水乙醇(1:1)混合液浸提的叶绿素含量均高于 80% 丙酮:95% 乙醇(1:1)混合液浸提的叶绿素含量。

由此可以看出,对于普通的绿叶植物(叶片较薄,容易浸提)混合液浸泡法的浸提效果要优于丙酮研磨法,纯丙酮:无水乙醇(1:1)混合液浸泡法的浸提效果要优于 80% 丙酮:95% 乙醇(1:1)混合液。但是对于角质层较厚、含水量较低的植物叶片,如龙柏、凤尾丝兰等,其叶片在两种混合液中的浸提效果均不如研磨法,特别是龙柏的针叶,在混合液中浸泡 72 h 后绿色仍未能完全褪去。说明这类植物不适用于用浸提法来提取叶绿素。

从叶绿素 a/b 值来看,除白杨树 80% 丙酮:95% 乙醇(1:1)混合液浸提,所测 9 种植物均是浸

收稿日期:2015-07-03

基金项目:菏泽学院科研基金资助项目(XYJJKY-2)

第一作者简介:何启平(1974-),女,山东省定陶县人,硕士,副教授,从事植物生理生化方面的研究。E-mail:he-1130@163.com。

提法高于研磨法,这表明研磨时叶绿素 a 的损失较叶绿素 b 大。

表 1 三种叶绿素提取方法的比较

Table 1 The comparison on three methods for chlorophyll extraction

植物 Plants	提取方法 Extraction methods	叶绿素 a 含量/ (mg·g ⁻¹) Content of chlorophyll a	叶绿素 b 含量/ (mg·g ⁻¹) Content of chlorophyll b	总叶绿素含量/ (mg·g ⁻¹) Content of total chlorophyll	叶绿素 a/b Chlorophyll a/b
银杏树	丙酮研磨法	0.5396	0.1980	0.7376	2.73
	80%丙酮:95%乙醇 1:1(20 h)	0.7476	0.2347	0.9823	3.19
	纯丙酮:无水乙醇1:1(20 h)	0.8423	0.2544	1.0967	3.31
白蜡树	丙酮研磨法	0.5541	0.2733	0.8274	2.03
	80%丙酮:95%乙醇 1:1	2.3594	0.6775	3.0370	3.48
	纯丙酮:无水乙醇1:1	2.5223	0.7187	3.2410	3.51
白杨树	丙酮研磨法	1.1019	0.4790	1.5809	2.30
	80%丙酮:95%乙醇 1:1	1.7290	0.7640	2.4930	2.26
	纯丙酮:无水乙醇1:1	1.8855	0.7636	2.6491	2.47
牡丹	丙酮研磨法	0.5396	0.1980	0.7376	2.73
	80%丙酮:95%乙醇 1:1	1.4044	0.4334	1.8378	3.23
	纯丙酮:无水乙醇1:1	1.6379	0.5581	2.1960	2.93
石楠	丙酮研磨法	0.4397	0.2036	0.6433	2.16
	80%丙酮:95%乙醇 1:1	0.9343	0.3506	1.2849	2.66
	纯丙酮:无水乙醇1:1	1.1731	0.4149	1.5880	2.83
紫羊茅	丙酮研磨法	1.1307	0.5971	1.7278	1.89
	80%丙酮:95%乙醇 1:1	1.9909	0.8423	2.8332	2.36
	纯丙酮:无水乙醇1:1	2.0637	0.8848	2.9486	2.33
紫花酢浆草	丙酮研磨法	0.3706	0.1963	0.5669	1.89
	80%丙酮:95%乙醇 1:1	0.8933	0.3402	1.2335	2.63
	纯丙酮:无水乙醇1:1	1.0879	0.3777	1.4656	2.88
龙柏	丙酮研磨法	0.6045	0.1990	0.8035	3.04
	80%丙酮:95%乙醇 1:1	0.1471	0.0434	0.1905	3.39
	纯丙酮:无水乙醇1:1(24 h)	0.2917	0.0790	0.3706	3.69
	纯丙酮:无水乙醇1:1(72 h)	0.5202	0.1459	0.6662	3.57
凤尾丝兰	丙酮研磨法	0.7252	0.3041	1.0294	2.38
	80%丙酮:95%乙醇 1:1	0.4013	0.1245	0.5258	3.22
	纯丙酮:无水乙醇1:1(72 h)	0.4708	0.1740	0.6447	2.71

“20 h”“24 h”或“72 h”表示植物材料浸泡的时间。
“20 h”“24 h”or“72 h”mean soaking time of plant materials.

2.1.2 浸泡提取法中浸泡时间与叶绿素含量的关系 为了探究丙酮乙醇混合液浸泡法的最适浸泡时间,了解浸泡时间对叶绿素含量的影响,以银杏树叶为材料,分别用两种混合液浸泡各 3 组,并从浸泡 12 h 后每 2 h 测定 1 次;第 1 组测定浸泡 12 h 和 14 h 后的吸光度值,第 2 组测定浸泡 16 h 和 18 h 后的吸光度值,第三组测定浸泡 20 h、22 h 和 24 h 后的吸光度值。

从表 2 可以看出,浸泡 12~24 h,两种丙酮乙

醇混合液每组浸提的叶绿素含量都有不同程度的增加,且与 12 h 的数据相比,增加的差值呈不断上升趋势。由此可以看出,一般的叶片要至少浸泡 24 h 才能提取完全,而且浸泡时间适当延长不会破坏叶绿素含量。

2.2 校园 21 种植物叶片叶绿素含量的测定

测定了校园内 21 种不同种类植物叶片的叶绿素含量(见表 3)。表中数据是在 3 种测定方法中测得叶绿素含量最高的方法所测得的数据。

表 2 混合液浸提时间与叶绿素含量的关系

Table 2 The relationship between mixture extraction time and chlorophyll content

混合液 Mixture	浸泡时间/h Extraction time	叶绿素 a 含量/ (mg·g ⁻¹) Content of chlorophyll a	叶绿素 b 含量/ (mg·g ⁻¹) Content of chlorophyll b	总叶绿素含量/ (mg·g ⁻¹) Content of total chlorophyll	差值(与 12 h 数据相比) Difference
80%丙酮:95% 乙醇(1:1)	12	0.6167	0.1798	0.7965	-
	14	0.6695	0.1925	0.8621	0.0656
	16	0.6666	0.1962	0.8628	0.0663
	18	0.6913	0.2096	0.9008	0.1043
	20	0.7476	0.2347	0.9823	0.1858
	22	0.7559	0.2384	0.9943	0.1978
	24	0.7582	0.2427	1.0008	0.2043
纯丙酮:无水 乙醇(1:1)	12	0.7815	0.2260	1.0075	-
	14	0.8646	0.2753	1.1399	0.1324
	16	0.8032	0.2376	1.0408	0.0333
	18	0.8826	0.2754	1.1581	0.1506
	20	0.8423	0.2544	1.0967	0.0892
	22	0.8860	0.2773	1.1633	0.1558
	24	0.9202	0.2949	1.2151	0.2076

表 3 21 种常见校园植物叶绿素含量的比较

Table 3 The comparison on chlorophyll content of 21 kinds of common campus plant

植物 Plants	叶绿素 a 含量/(mg·g ⁻¹) Content of chlorophyll a	叶绿素 b 含量/(mg·g ⁻¹) Content of chlorophyll b	总叶绿素含量/(mg·g ⁻¹) Content of total chlorophyll	叶绿素 a/b Chlorophyll a/b
银杏	0.8423	0.2544	1.0967	3.3109
白蜡树	2.5223	0.7187	3.2410	3.5095
白杨树	1.8855	0.7636	2.6491	2.4693
国槐	1.8141	0.5774	2.3915	3.1418
垂柳	1.7102	0.5093	2.2196	3.3579
水杉	2.0973	0.6457	2.7430	3.2480
龙柏	0.6045	0.1990	0.8035	3.0376
雪松	0.3366	0.0760	0.4127	4.4263
黑松	0.2717	0.0861	0.3578	3.1556
枇杷	1.4170	0.3988	1.8158	3.5529
紫叶李	1.1855	0.3669	1.5524	3.2311
石楠	1.1731	0.4149	1.5880	2.8272
法国冬青	0.7875	0.2482	1.0357	3.1773
枸骨	1.0688	0.3661	1.4349	2.9195
牡丹	1.6379	0.5581	2.1960	2.9348
凤尾丝兰	0.7252	0.3041	1.0294	2.3845
鸢尾	1.1654	0.3737	1.5392	3.1189
锦葵	2.5063	1.3020	3.8083	1.9250
紫羊茅	2.0637	0.8848	2.9486	2.3324
紫花酢浆草	1.0879	0.3777	1.4656	2.8804
玉米苗	2.1620	0.5699	2.7318	3.7938

由表 3 可以看出,叶绿素含量最高的植物是锦葵,为 3.808 3 mg·g⁻¹,其次是白蜡树,为 3.241 0 mg·g⁻¹;含量最低的植物是黑松,为 0.357 8 mg·g⁻¹,其次是雪松,为 0.412 7 mg·g⁻¹,龙柏的含量为 0.803 5 mg·g⁻¹,这 3 种植物叶片的总叶绿素含量均未达到 1 mg·g⁻¹。这种不同种

类间植物叶绿素含量的差异与其不同的生长特性相符。

叶绿素 a/b 值与植物利用强光和弱光的能力有关,一般阳生植物的叶绿素 a/b 值要高于阴生植物,测定结果也符合这一规律。叶绿素 a/b 值较高的植物有白蜡树、垂柳、枇杷、银杏、玉米苗、雪松,均超过 3.3;叶绿素 a/b 值 ≤ 2.5 的植物有白杨树、凤尾丝兰、锦葵、紫羊茅。

3 结论与讨论

3.1 关于叶绿素的提取方法

为了方便教学,叶绿素的定量测定一直采用耗时较短的 80% 丙酮研磨法,但是研磨法对叶绿素的损耗较大。根据本试验的研究结果,混合液浸泡法的效果要远远好于 80% 丙酮研磨法,且纯丙酮:无水乙醇(1:1)混合液浸泡法测得结果比 80% 丙酮研磨法测得结果高出最多,这在白蜡树和牡丹中表现最为明显,白蜡树叶片浸提法测得叶绿素总含量是研磨法的近 4 倍,牡丹是近 3 倍。

因此,在进行叶绿素含量与光合特性相关的研究中,建议采用纯丙酮:无水乙醇(1:1)混合液浸泡法测定叶绿素的含量,这样结果比较准确,而研磨法误差太大。可以第 1 天浸泡,第 2 天进行比色。所测叶片应充分洗净并吸干水分,尤其叶片上生有白色绒毛(如白杨、枇杷)的,应先把绒毛充分擦净,以避免影响实验结果。

本研究还表明,混合液浸泡法并不适合龙柏和凤尾丝兰,龙柏针叶较粗,叶表面角质层较厚;凤尾丝兰的叶片坚硬,表面具蜡质层,这两种叶片的浸泡效果均不理想。

3.2 关于雪松和锦葵两种植物的测定结果

本研究所测定的 21 种植物中,雪松的总叶绿素含量为 $0.4127 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,为倒数第二低,叶绿素

a/b 比值为 4.4263,为最高;锦葵的总叶绿素含量 $3.8083 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,为最高,叶绿素 a/b 比值为 1.9250,为最低。这说明在雪松的叶绿素 a 在总叶绿素含量中所占比重较大,叶绿素 b 所占比重较小,而锦葵则与之相反。这可能与其生长习性相关。

雪松属于典型的阳生植物,针叶角质层较厚,一般生活于开旷或向阳处^[9],属于常绿乔木。其叶绿素 a/b 值较高,可能与其利用强光能力强有关。锦葵叶片较大,质薄,色深^[10],叶绿素 b 所占比重较大,叶绿素 b 对蓝紫光的吸收能力大于叶绿素 a,可更好地利用荫蔽条件下占优势的漫射光(蓝紫光)^[11],且锦葵总叶绿素含量最高,可能与其生长势强,光合效率较高有关。

参考文献:

- [1] 许大全. 叶绿素含量的测定及其应用中的几个问题[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(9): 896-897.
- [2] 侯福林. 植物生理学实验教程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2010: 61-63.
- [3] 张宪政. 植物叶绿素含量测定[J]. 辽宁农业科学, 1989(3): 26-28.
- [4] 王得贤. 混合液法和 Arnon 法提取叶绿素的比较研究[J]. 青海畜牧兽医学院学报, 1994, 11(2): 24-27.
- [5] 陈琳. 植物生理学教程[M]. 2 版. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 276-278.
- [6] 孔祥生. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 77-80.
- [7] 陈福明. 混合液法测定叶绿素含量的研究[J]. 林业科技通讯, 1984(2): 4-8.
- [8] 李得孝, 吴海燕, 郭月霞, 等. 混合液浸提法测定玉米叶绿素含量的研究[J]. 玉米科学, 2006, 14(1): 117-119.
- [9] 黄秋蝉. 阳生植物和阴生植物叶绿素含量的比较分析[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(8): 1924-1929.
- [10] 邵世光. 阳生植物和阴生植物[J]. 生物学教学, 2007, 32(8): 68-69.
- [11] 韦友欢. 阴生植物与阳生植物色素含量的比较分析[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(5): 1126-1129.

Comparison on Different Extraction Techniques About Chlorophyll and Determination of Chlorophyll Content of Common Plants in Campus

HE Qi-ping, CHEN Ying

(Life Science Department of Heze University, Heze, Shandong 274015)

Abstract: In order to study the effective method to extract chlorophyll in plants the chlorophyll of collected 21 kind of leaves in the campus were extracted with 80% acetone grinding method, 80% acetone: 95% alcohol (1:1) mixture soaking method and pure acetone: anhydrous ethanol (1:1) mixture soaking method, chlorophyll content were comparative analyzed by spectrophotometry. The results showed that the ordinary blade in a mixture method effect was good and pure acetone: anhydrous ethanol (1:1) mixture immerse worked the best with soaking for 24 hours. Comparison on the relationship between 21 kind of campus common plant chlorophyll content was analyzed with their growth habit, which were judged shade plants or sun plants.

Keywords: chlorophyll content; method of acetone grinding; method of mixture immersion; shade plants; sun plants