

# 叶绿体色素的提取方法改进及其应用

武卫华, 刘忠荣, 黄先敏, 康道坤, 陈屏昭

(昭通师范高等专科学校 云南 昭通 657000)

**摘要:** 对叶绿体色素的提取和制备方法进行了改进。结果表明: 用改进后的方法测定叶绿素和类胡萝卜素的含量, 能有效的避免方法误差, 具有快速、准确、重现性好的特点。

**关键词:** 叶绿体色素; 叶绿素; 类胡萝卜素; 方法误差; 重现性

**中图分类号:** Q 943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0067-03

叶绿体色素的提取以及含量的测定是植物生理生化研究的重要试验。叶绿体色素大都为聚光天线色素<sup>[1]</sup>, 其含量不但直接影响叶绿体对光能的吸收、传递以及在 PSII、PSI 之间的分配和转化合成 ATP 与 NADPH 的量<sup>[2]</sup>, 而且也影响光合电子的传递、光合磷酸化和跨类囊体膜质子梯度  $\Delta pH^{[1,3]}$ , 进而影响净光合速率<sup>[4]</sup>。因此, 准确测定叶绿体色素含量, 对判断植株营养状况、发育生长状况、光合生理与逆境生理状况等具有重要意义。

叶绿体色素提取液中叶绿素易受光氧化和高温破坏使测定值偏低<sup>[5]</sup>。准确测定叶绿体色素含量的关键是快速、无损耗, 提取率高, 测定样液稳定性好。目前, 叶绿体色素含量的测定主要为分光光度法, 而依据叶样的处理方法和所用的提取溶剂的不同, 分光光度法又有多种测定方法<sup>[5-9]</sup>, 从而导致测定结果相差很大。现对叶绿体色素的提取、制备方法进行了改进, 在此基础上对叶绿素和类胡萝卜素含量的测定方法进行了探索, 以期同类研究提供参考。

## 1 叶绿体色素提取、制备方案

### 1.1 现行资料提供的叶绿体色素提取、制备方案

**1.1.1 方案 1(A 法)** 称取 1 g 鲜叶片, 切成小块, 放在研钵中加 80% 丙酮(V/V)40 mL, 把组织研磨成匀浆, 小心地将绿色液体通过漏斗过滤到 100 mL 容量瓶中; 再用 30 mL 80% 丙酮研磨成匀浆, 至滤液无色为止(注意冲洗漏斗边缘的叶绿素); 用 80% 的丙酮定容至 100 mL<sup>[7]</sup>。

第一作者简介: 武卫华(1957-), 男, 讲师, 现从事有机高分子教学和应用生物技术开发研究工作。E-mail: ztszwh@126.com。

通讯作者: 陈屏昭(1964-), 男, 教授, 现从事矿物元素分析及植物营养生理研究工作。E-mail: ztqz2005@126.com。

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金资助项目(09Y0448); 国家自然科学基金资助项目(30771497); 昭通师专教授、博士科研启动基金资助项目。

收稿日期: 2010-10-15

**1.1.2 方案 2(B 法)** 取新鲜植物叶片(或其它绿色组织)或干材料, 擦净组织表面污物, 剪碎(去掉中脉)、混匀; 称取剪碎的新鲜样品 0.2 g 共 3 份, 分别放入研钵中, 加入少量石英砂和碳酸钙粉及 2~3 mL 95%(或 80% 丙酮)的乙醇, 研磨成匀浆, 再加乙醇 10 mL, 继续研磨至组织变白。静置 3~5 min; 取滤纸 1 张, 置漏斗中, 用乙醇湿润, 沿玻棒把提取液倒入漏斗中, 过滤到 25 mL 棕色容量瓶中, 用少量乙醇冲洗研钵、研棒及残渣数次, 最后连同残渣一起倒入漏斗中; 用滴管吸取乙醇将滤纸上的叶绿素全部洗入容量瓶中, 直至滤纸和残渣中无绿色为止, 用乙醇定容至 25 mL, 摇匀<sup>[8-9]</sup>。

### 1.2 现行方案存在的问题

A 法和 B 法有一个共同特点: 在叶绿体色素提取液过滤后定容, 即定容前过滤。A 法和 B 法在操作上有 2 点不足: 一是不符合分析测定快速性原则, 因为制得的待测样液须全部过滤定容, 这需要花大量时间, 工作量大, 且滤纸的滤速不同所花时间也不一样。更为严重的是提取液中叶绿素易受光氧化破坏, 使测定值偏低, 测定大量样品时更易造成测定误差<sup>[5]</sup>。二是违反了分析测定准确性原则, 在过滤时待测样液被滤纸吸收, 且滤纸的滤速和直径大小不同, 吸收造成的溶液损失也不同。实践证明, 按文献[7-9]的要求用一定量的丙酮或乙醇洗涤研钵、研棒、残渣及滤纸边缘, 是不能保证将叶绿体色素全部洗入后定容的。即 A 法和 B 法不可避免会造成测定结果偏低。

### 1.3 叶绿体色素提取、制备方案改进(C 法)

取新鲜植物叶片(或其它绿色组织)或干材料, 擦净组织表面污物, 去中脉剪碎混匀, 准确称取鲜样 0.2 g, 3 次重复, 分别放入研钵中, 加入少量石英砂和碳酸钙粉及 2~3 mL 95% 的乙醇(或 80% 丙酮), 在弱光下的冰浴中研磨成匀浆, 转移至 50 mL 的烧杯中, 再将提取液转移至 50 mL 棕色容量瓶中, 用一定量的乙醇冲洗研钵、研棒、烧杯及残渣数次, 洗涤液连同残渣全部转移至容量瓶后定容。容量瓶置于 4℃ 的冰箱中提取 4~24 h。

测定时将容量瓶摇匀,干过滤于洁净干燥烧杯中(最初的少量滤液可用于润洗烧杯数次)。C 法在定容时没有溶液的损失,过滤时也不必全部滤完,只需要滤出能满足测定所需的部分溶液即可,赢得了时间,也避免了提取物受光氧化和热分解破坏等问题,符合分析测定的准确性和快速性原则,大大提高了分析测试工作的综合效率。

2 叶片叶绿素和类胡萝卜素含量测定方法比较

2.1 试验材料

试验于 2010 年 5 ~ 6 月在昭通师范高等专科学校新校区精密仪器分析实验室进行。预选昭通市农牧局苹果种植示范基地内、自然环境下长势基本一致的 5 a 生挂果红富士 (*Malus domestica* Borkh. cv. Red Fuji), 常规管理。

2.2 试验方法

试验分 4 组,每组 6 株,分别用 1.5、10 mmol/L 亚硫酸氢钠 (NaHSO<sub>3</sub>) 雾状液每 15 d 喷洒叶面 1 次,3 种处理,以自来水代替 NaHSO<sub>3</sub> 溶液为对照(以下各组分别简称 S1、S5、S10、S0)。处理 3 d 后采样,测定叶绿素和类胡萝卜素含量。结果用 Spss 软件处理。

2.3 分析测定方法

选取树冠中上部四周长势、叶位和生长方向基本一致的成熟叶片标记后,连同叶柄剪下,贮存于低温冰罐内。分别按 A、B 和 C 法提取叶绿体色素(称量时精确到 0.1 mg),C 法提取液置于 4℃ 的冰箱中 12 h,并用 UV-2802S 型紫外可见分光光度计测定提取液中的叶绿素 A (Chla)、叶绿素 B (Chlb) 和类胡萝卜素 (Car.) 含量,3 次重复。用 95% 乙醇作溶剂时,分别在 665、649、470 nm 下测定吸光度值,每种样液测定 3 次求平均值。单位质

量鲜叶片中 Chla、Chlb 和 Car. 的含量用下列公式计算<sup>[8-9]</sup> Chla = [ 13. 95A<sub>665</sub> - 6. 88A<sub>649</sub> ] ×  $\frac{V}{1000 W}$ ; Chlb =

$[ 24. 96A_{649} - 7. 32A_{665} ] \times \frac{V}{1\ 000\ W}$ ; Car. =  $\frac{1\ 000\ A_{470} - 2.05C_a - 114.8C_b}{245} \times \frac{V}{1\ 000\ W}$ 。用 80% 丙酮

作溶剂时,分别在 663、646、470 nm 下测定吸光度值,其单位质量鲜叶片中 Chla、Chlb 和 Car. 的含量用下式直接计算<sup>[7,9]</sup>。Chla、Chlb 和 Car. 浓度计算公式为: Chla =

$[ 12. 2A_{663} - 2. 81A_{646} ] \times \frac{V}{1\ 000\ W}$ ; Chlb =  $[ 20. 13A_{646} - 5.03A_{663} ] \times \frac{V}{1\ 000\ W}$ ; Car. =  $\frac{1\ 000A_{470} - 3.27C_a - 104C_b}{229} \times \frac{V}{1\ 000\ W}$ 。

3 结果与分析

3.1 苹果叶片不同溶剂提取液测定结果比较

选取对照组 (S0) 叶片,分别以 95% 乙醇和 80% 丙酮为溶剂,用 A、B、C 3 种方法提取色素,测定 Chla、Chlb 和 Car. 的含量(表 1)。由表 1 可知,对同一种叶绿体提取、制备方法,用 95% 乙醇和 80% 丙酮为提取溶剂,测定 Chla、Chlb 和 Car. 的结果无明显差异,说明不同的溶剂不会影响测定结果,即 95% 乙醇和 80% 丙酮具有同等的提取效率。对于同一种提取溶剂,用 A、B、C 3 种不同的方法提取、制备样液,测定的结果 A、B 之间无明显差异,而 A、B 与 C 之间差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )。进一步比较发现,A、B 法制备的同一样液的标准误差比较大,测定结果重现性较差,精密度偏低,而 C 法样液的测定结果重现性较好,精密度较高。A、B 法与 C 法测定结果的算术平均值存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

表 1		S0 组苹果叶片不同溶剂提取液测定结果						mg/g FW	
色素提取方法		95%乙醇提取液			80%丙酮提取液				
		Chla	Chlb	Car.	Chla	Chlb	Car.		
A	1. 70±0. 08a	0. 82±0. 11c	0. 78±0. 13b	1. 77±0. 05a	0. 93±0. 14a	0. 76±0. 10c			
	1. 51±0. 17b	0. 89±0. 16a	0. 79±0. 10 b	1. 62±0. 12c	0. 73±0. 09bc	0. 78±0. 11c			
	1. 44±0. 23bc	0. 77±0. 05c	0. 65±0. 22cd	1. 55±0. 19cd	0. 89±0. 17b	0. 75±0. 14c			
B	1. 57±0. 15b	0. 73±0. 07bc	0. 72±0. 13c	1. 63±0. 21c	0. 84±0. 14b	0. 78±0. 11c			
	1. 50±0. 13b	0. 93±0. 12a	0. 84±0. 17a	1. 47±0. 17cd	0. 74±0. 11bc	0. 60±0. 07cd			
	1. 68±0. 19a	0. 84±0. 18b	0. 71±0. 18 c	1. 53±0. 12bd	0. 90±0. 24a	0. 88±0. 18a			
C	1. 76±0. 05a	0. 95±0. 07a	0. 84±0. 05a	1. 78±0. 06a	0. 96±0. 07a	0. 86±0. 04a			
	1. 78±0. 07a	0. 94±0. 05a	0. 85±0. 0 6a	1. 79±0. 05a	0. 95±0. 05a	0. 91±0. 06a			
	1. 74±0. 04a	0. 91±0. 08a	0. 87±0. 08a	1. 83±0. 08a	0. 91±0. 06a	0. 87±0. 04a			

注:不同小写字母表示同列不同色素提取方法间差异达显著水平 ( $P < 0.05$ ),下同。

3.2 叶面喷洒 NaHSO<sub>3</sub> 溶液后 95%乙醇和 80%丙酮提取液测定结果比较

为避免试材的偶然误差,选取叶面喷洒 NaHSO<sub>3</sub> 溶液 3 d 后的 S1、S5、S10 组苹果叶片,分别以 95% 乙醇和 80% 丙酮为溶剂,用 A、B、C 方法提取色素,测定 Chla、Chlb 和 Car. 的含量(表 2、3)。结果表明,相同的试验材料和提取溶剂,A、B 法提取样液的测定结果与 C 法之间有显著差异 ( $P < 0.05$ )。而 A、B 法之间差异不显著,但结果的标准误差较大,重现性较差。

3.3 C 法不同溶剂不同时段重现性比较

为了检验改进后的叶绿体色素提取法的可靠性,对不同溶剂提取液中叶绿素和类胡萝卜素含量的测定,观测分析不同时段结果的重现性。同时,为了进一步优化改进后的叶绿体色素提取、测定方法,特别是测定大量样品时,要避免时间短提取不完全、或提取时间过长使色素组分分解以及测定时在时间上造成拥堵等问题,探索一个合适的提取、测定时间段是必要的。

表 2 NaHSO<sub>3</sub> 溶液处理后苹果叶片 95%乙醇提取液测定结果

方法	A			B			C		
	Chla	Chlb	Car.	Chla	Chlb	Car.	Chla	Chlb	Car.
S1	1.58±0.13bc	0.78±0.11bc	0.77±0.14b	1.63±0.10b	0.81±0.09b	0.80±0.13b	1.78±0.04a	0.91±0.05a	0.88±0.07a
S5	1.66±0.18b	0.84±0.10bc	0.78±0.08b	1.56±0.16bc	0.88±0.12b	0.79±0.09b	1.85±0.10a	0.98±0.06a	0.95±0.05a
S10	1.78±0.15b	0.92±0.12b	0.79±0.07b	1.81±0.13b	0.79±0.11c	0.80±0.10a	1.98±0.07	0.99±0.04a	0.96±0.06a

表 3 NaHSO<sub>3</sub> 溶液处理后苹果叶片 80%丙酮提取液测定结果

方法	A			B			C		
	Chla	Chlb	Car.	Chla	Chlb	Car.	Chla	Chlb	Car.
S1	1.51±0.18bc	0.80±0.17b	0.88±0.17a	1.73±0.14a	0.75±0.17cd	0.70±0.15b	1.79±0.06a	0.95±0.04a	0.90±0.07a
S5	1.62±0.17b	0.85±0.11b	0.82±0.18cd	1.66±0.20b	0.81±0.16bc	0.87±0.17	1.80±0.11a	0.95±0.07a	0.93±0.04a
S10	1.79±0.15bc	1.07±0.15b	0.88±0.14b	1.84±0.17b	0.87±0.11cd	0.88±0.12b	2.04±0.08a	0.99±0.04a	0.94±0.07a

对同一样品,采用改进后的叶绿体色素提取方法,分别用 95%乙醇和 80%丙酮为溶剂制备样液,在 4℃的冰箱中静置并在不同时段测定 Chla、Chlb、Car. 含量。结果表明,提取 1、2 h 测定数据间有显著差异 ( $P<0.05$ ),说明时间短提取不充分。4 h 以后,测定结果已无明显

差异,标准误差很小,说明改进后的方法重现性好,提取完全,样液的稳定性好,放置 48 h 后所测定的组分没有明显的分解(表 4)。同时也观测到 95%乙醇和 80%丙酮溶剂在各时段的提取率不存在明显差别;说明改进后的叶绿体色素提取方法可靠。

表 4 改进后的叶绿体色素提取法不同溶剂不同时段重现性比较

提取时间 /h	95%乙醇提取液			80%丙酮提取液		
	Chla	Chlb	Car.	Chla	Chlb	Car.
1	1.61±0.08b	0.81±0.05b	0.71±0.11c	1.67±0.05a	0.77±0.08c	0.68±0.10c
2	1.74±0.04a	0.84±0.05b	0.80±0.12b	1.75±0.06a	0.83±0.07b	0.77±0.06b
4	1.75±0.04a	0.91±0.06a	0.83±0.06a	1.74±0.08a	0.93±0.07a	0.81±0.07a
8	1.76±0.07a	0.88±0.03a	0.85±0.04a	1.73±0.05a	0.92±0.06a	0.82±0.05a
12	1.74±0.06a	0.92±0.04a	0.82±0.08a	1.74±0.09a	0.90±0.04a	0.85±0.08a
24	1.75±0.09a	0.90±0.07a	0.84±0.10a	1.75±0.07a	0.92±0.08a	0.84±0.06a
48	1.72±0.06a	0.92±0.09a	0.82±0.06a	1.71±0.10a	0.90±0.07a	0.81±0.09a

4 小结

试验结果表明,由于采用 C 法提取制备叶绿体色素样液是在避免过滤造成损失的前提下,在低温条件下进行的,避免了光照和高温对待测组分叶绿素和类胡萝卜素的破坏或分解,在 4~48 h 范围内,样液中待测组分稳定性较好。C 法能有效消除误差,测定快速,结果精密度较高,重现性好,更加接近真值,无论对如菠菜、菜豆等容易破碎的叶片还是苹果、柑橘等韧性好的顽拗性叶片均适用。

参考文献

[1] 弗里德 G H, 黑德莫诺斯 G J. 生物学[M]. 田青涑, 殷莹, 马湧, 等译. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.

[2] 陈屏昭, 何崛, 袁晓春. 喷施亚硫酸氢钠溶液对缺硫脐橙光合生理特性的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(2): 327-332.

[3] 陈屏昭, 武卫华, 田虹, 等. 柑橘光合作用的过剩能量耗散机制及其生理意义[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(5): 681-687.

[4] 陈屏昭, 王磊, 代勋, 等. 缺磷强光下脐橙的过剩能量耗散机制[J]. 应用生态学报, 2005, 16(6): 1061-1066.

[5] 苏正淑, 张宪政. 几种测定植物叶绿素含量的方法比较[J]. 植物生理学通讯, 1989(5): 77-78.

[6] 杨敏文. 快速测定植物叶片叶绿素含量方法的探讨[J]. 光谱实验室, 2002, 19(4): 478-481.

[7] 林宏辉, 赵云, 王茂林, 等. 现代生物学基础实验指导[M]. 成都: 四川大学出版社, 2003.

[8] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.

[9] 张以顺, 黄霞, 陈云凤. 植物生理学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.

(该文作者还有蔡兆翔, 张桦, 李祥, 单位同第一作者。)

(致谢: 昭通师范高等专科学校化学系生物教育专业 2008 级学生刘林, 化学教育专业 08 级学生李雪梅参与了该项目的试验材料准备和部分数据的测试工作, 在此表示感谢!)

Extract Method of Chloroplast Pigment and its Application

WU Wei-hua, LIU Zhong-rong, HUANG Xian-min, KANG Dao-kun, LI Xiang, CHEN ping-zhao  
(Zhaotong Normal University, Zhaotong, Yunnan 657000)

**Abstract:** Improved method of extraction and preparation about the chloroplast pigment. The results showed that the method can effectively avoid the methodic error and possess the character of high-speed, exactness, and repeatability, touse this method to measure the content of chloroplast and carotenoid.

**Key words:** chloroplast pigment; chlorophyll; carotenoid; methodic error; repeatability