

西葫芦叶片叶绿素提取方法的初步研究

尹 玲, 王长林, 王迎杰, 王艳玲

(中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要:以西葫芦叶片为试材,研究了提取液种类、提取温度、时间及料液比对叶绿素含量的影响。结果表明:提取液以丙酮:无水乙醇=1:1混合液的效果最好,总叶绿素含量最高。叶绿素 a、b 及叶绿素总含量与提取时间和温度有关,随着提取时间的延长,叶绿素 a、b 及叶绿素总含量都呈现先升后降的变化趋势。提取时间小于 24 h 时,低温条件下提取效果较好,叶绿素 a、b,总含量高于室温。在一定范围内,叶绿素 a/b 随着料液比的增加而变大。通过正交实验得到提取西葫芦叶绿素的最佳方法为:丙酮:无水乙醇=1:1混合液,料液比 1:40,室温提取 48 h。提取叶绿素的简便快速方法为:丙酮:无水乙醇=1:1混合液,料液比 1:40,低温提取 24 h。

关键词:西葫芦;叶绿素 a/b;Arnon 法;提取

中图分类号:S 642.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)12-0014-04

叶绿素是天然、无毒的色素,可溶于丙酮、乙醇和石油醚等有机溶剂^[1-2]。叶绿素参与光合作用^[3],具有重要的生物学功效^[4],广泛应用于食品、化工、园艺、医药^[5-7]等方面。目前,叶绿素的提取方法主要包括有机溶剂萃取法、吸附树脂萃取法、超临界 CO₂萃取法、超声波萃取法、微波萃取法等方法^[8-9]。

西葫芦(*Cucurbita pepo* L.),又称白瓜、番瓜、美洲南瓜。原产北美洲南部,现在广泛栽培^[10]。耐寒不耐高温,光照强度要求适中,较能耐弱光。现对西葫芦的叶绿素含量进行初步研究,旨在探讨测定西葫芦叶绿素含量的最佳方法以及测定大量样品叶绿素含量的简便快速方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

选取中国农业科学院蔬菜花卉所温室的西葫芦,2010年4~6月在葫芦科生理生化实验室进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 不同提取液的吸收光谱和叶绿素提取效果
将新鲜西葫芦叶片剪碎,称取叶片 0.2 g。选用 6 种提取液(丙酮:无水乙醇=3:1、丙酮:无水乙醇=2:1、丙酮:无水乙醇=1:1、丙酮:无水乙醇=1:2、丙酮:无水乙醇=1:3、80%丙酮),料液比 1:40,室温下分别提取 24 h。收集滤液,定容至 50 mL,稀释 10 倍,在波长 645 nm 和 663 nm 处测提取液的吸光度,绘制吸收光谱。

1.2.2 不同料液比的叶绿素提取效果
选用 5 种料液比(1:5、1:10、1:20、1:40、1:60),提取液为丙酮:无水乙醇=1:1,室温下分别提取 24 h。收集滤液,定容至 50 mL,稀释 10 倍,在波长 645 nm 和 663 nm 处测定提取液的吸光度。

1.2.3 不同提取时间和温度的叶绿素提取效果
选用 4 种提取时间(12、24、48、72 h),2 种温度(25、4℃),提取液丙酮:无水乙醇=1:1,料液比为 1:40。收集滤液,定容至 50 mL,稀释 10 倍,在波长 645 nm 和 663 nm 处测定提取液的吸光度。

1.3 正交实验设计
采用 L₈(4×2⁴)正交实验组合,对提取时间、提取温度和料液比等各因素进行正交实验(表 1),通过比较叶绿素 a、b、总含量及叶绿素 a/b 确定最优提取工艺条件。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 The factors and standards of orthogonal experimental design

水平 Level	因素 Factor		
	A 提取时间 Extraction time /h	B 提取温度 Extraction temperature /℃	C 料液比 Ratio of liquid to solid /w [*] w ⁻¹
1	12	25	1:40
2	24	4	1:60
3	48		
4	72		

第一作者简介:尹玲(1987-),女,在读硕士,研究方向为蔬菜育种。E-mail:1987.yinling@163.com.

责任作者:王长林(1969-),男,本科,副研究员,现主要从事南瓜遗传育种及相关技术研究工作。E-mail:wangchanglin@mail.caas.net.cn.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2009BA DB8B02);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目(2060302-2-08);农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室资助项目。

收稿日期:2011-04-01

1.4 数据处理

用 DPS v3.01、SPSS v 17.0 统计软件及 Microsoft Office Excel 2003 处理数据。用 3802 型可见分光光度计绘制 6 种提取液的吸收光谱。

2 结果与分析

2.1 不同提取液的吸收光谱

5种丙酮和无水乙醇混合提取液的吸收光谱与80%丙酮的吸收光谱基本相同,分别在波长433~434 nm和664~665 nm处有明显的吸收峰,其它不明显的峰谷所对应的波长也基本相同,469~470 nm(峰),629~630 nm(谷)。所以混合液提取法可以用Amon法的计算公式计算叶绿素a、b和叶绿素总含量^[11]。叶绿素a含量(mg/g)=[12.7A₆₆₃-2.69A₆₄₅]V/1 000×W;叶绿素b含量(mg/g)=[22.7A₆₄₅-4.68A₆₆₃]V/1 000×W;叶绿素总含量(mg/g)=[20.2A₆₄₅+8.0A₆₆₃]V/1 000×W;A₆₄₅、A₆₅₂和A₆₆₃分别为相应波长下的吸光度值,V为提取液的体积,W为叶片重量。

2.2 不同提取液对叶绿素提取率的影响

不同提取液对西葫芦叶片叶绿素a和总叶绿素提取率的影响具有极显著的差异(表2),对叶绿素b提取率的影响不显著。丙酮:无水乙醇=1:1与丙酮:无水乙醇=3:1对叶绿素a的提取率极显著高于其它提取液,总叶绿素的提取率也高于其它提取液。由于叶绿素的提取和测定一般均以总叶绿素的含量为重要指标,因此,丙酮:无水乙醇=1:1可以做为叶绿素提取的最佳提取液。

表2 提取液对西葫芦叶绿素提取的影响

Table 2 Effects of different solvents on determination of chlorophyll from *Cucurbita pepo* L.

提取液	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	叶绿素 a/b
Solvent	Chl. a	Chl. b	Total Chl	Chl. a/b
	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	
丙酮:无水乙醇=1:1 S1	2.132 Aa	1.011 Aa	3.143 Aa	2.12
丙酮:无水乙醇=3:1 S2	2.161 Aa	0.947 Aa	3.108 Aab	2.123
丙酮:无水乙醇=2:1 S3	2.074 Bb	0.885 Aa	2.96 ABabc	2.355
丙酮:无水乙醇=1:2 S4	1.964 Dd	0.949 Aa	2.912 ABabc	2.154
丙酮:无水乙醇=1:3 S5	2.015 Cc	0.862 Aa	2.877 ABbc	2.35
80%丙酮 S6	1.880 Ee	0.881 Aa	2.769 Bc	2.148

注:同列数据中标大写字母表示在0.01水平上有显著差异,不同小写字母表示在0.05水平上有显著差异,下表同。

Note: Different lowercase letters after the data means significant difference at 0.05 level, while different capital letters means significant difference at 0.01 level. The same as below.

2.3 不同料液比对叶绿素提取率的影响

不同料液比对西葫芦叶片叶绿素a的提取率具有极显著影响(表3),对叶绿素b和总叶绿素的提取率影响差异不显著,但提取率具有随着料液比的减小而上升的趋势。通过比较分析总叶绿素提取率的绝对数值,可知料液比1:40和1:60是较好的提取液料液比。

表3 不同的料液比对西葫芦叶绿素含量的影响

Table 3 Effects of different ratio of material to solvent on determination of chlorophyll from *Cucurbita pepo* L.

料液比	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	叶绿素 a/b
Ratio of material to solvent	Chl. a	Chl. b	Total Chl.	Chl. a/b
	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	
1:5	1.968 Aa	0.888 Aa	2.861 Aa	2.296
1:10	2.028 Aa	0.914 Aa	2.951 Aa	2.279
1:20	2.086 Bb	0.891 Aa	2.99 Aa	2.381
1:40	2.132 Cc	1.011 Aa	3.143 Aa	2.12
1:60	2.153 Dd	1.001 Aa	3.154 Aa	2.151

2.4 不同的提取时间和温度对叶绿素提取率的影响

从图1可看出,随着提取时间的延长,叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素均呈现出先上升后下降的变化趋势。不同的提取温度在不同的提取时间条件下表现出不同的影响效果。在室温条件下,提取时间为48h时,叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素的提取率最高,分别为2.213、1.134、3.347 mg/g;在低温条件下,提取时间为24h的提取率最高,叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素分别为:2.145、1.096、3.245 mg/g,较室温提取48h的提取率略低。由此可知,温度与提取时间具有一定的互作关系。

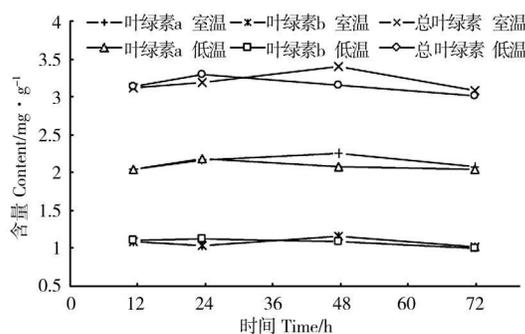


图1 温度和提取时间对西葫芦叶绿素提取的影响

Fig. 1 Effects of extraction time and temperature on the determination of chlorophyll from *Cucurbita pepo* L.

2.5 正交实验结果

由表4可知, R'_{A×B} > R'_A > R'_B > R'_C > R'_{A×C}。因素主次顺序为 A×B > A > B > C > A×C,表明 A×B 交互作用影响最大, A、B 影响其次,为重要考察因素; C 影响小,为次要因素, A×C 交互作用是由误差引起的,可以忽略。

A×B 中 A₃B₁ 总叶绿素含量最高;通过比较 k_{1c} 和 k_{2c} 的大小确定优水平为 C₁。由此,得到提取西葫芦叶绿素的最优组合, A₃B₁C₁, 即室温提取 48 h, 料液比 1:40。

表 4 正交实验结果

Table 4 The results of orthogonal experimental design

试验号	A	B	A×B	C	A×C	总叶绿素
1	1(12 h)	1(25℃)	1	1(1:40)	1	3.098
2	1	2(4℃)	2	2(1:60)	2	3.15
3	2(24 h)	1	1	2	2	3.194
4	2	2	2	1	1	3.245
5	3(48 h)	1	2	1	2	3.347
6	3	2	1	2	1	3.125
7	4(72 h)	1	2	2	1	3.113
8	4	2	1	1	2	2.975
K1	6.24	12.752	12.446	12.665	12.635	
K2	6.439	12.541	12.847	12.628	12.658	
K3	6.526					
K4	6.088					
k1	3.12	3.188	3.1115	3.1663	3.1588	
k2	3.2195	3.1353	3.2118	3.157	3.1645	
k3	3.263					
k4	3.044					
R	0.1755	0.0527	0.1002	0.0093	0.0057	
R'	0.1164	0.0748	0.1423	0.0131	0.0082	

注: $R' = dRr^{1/2}$, R' 为调整极差, d 为换算系数, R 为极差, r 为重复次数。水平数 $m=2$ 时, $d=0.71$; $m=4$ 时, $d=0.45$ 。

Note: $R' = dRr^{1/2}$, R' is adjustment range, d is conversion coefficient, R is range, r is replication frequency. When number of level is 2 conversion coefficient is 0.71. When number of level is 4, conversion coefficient is 0.45.

2.6 快速提取叶绿素的方法

通过 SPSS v17.0 进行统计分析, 发现室温条件下提取 48 h 测定的叶绿素总含量与低温提取 12、48、72 h 差异显著 ($P < 0.05$), 而与低温条件下提取 24 h 差异不显著(表 5)。因此, 快速提取叶绿素时, 可采用低温条件下提取 24 h, 丙酮: 无水乙醇 = 1:1 混合液作提取液, 料液比 1:40。

表 5 不同低温处理时间提取西葫芦总叶绿素含量的比较

Table 5 The comparison of the determination of total chlorophyll from *Cucurbita pepo* L. with different time in 4℃

对照 Contrast	处理 Treatment	均值 Meanvalue	标准误 Std. Error	显著性 Sig.
T1H3	T2H1	0.254	0.054	0.042
	T2H2	0.102	0.026	0.059
	T2H3	0.243	0.026	0.012
	T2H4	0.372	0.059	0.022

注: T1, T2, H1, H2, H3 和 H4 分别代表室温(25℃)、低温(4℃)、12、24、48 和 72 h。

Note: T1, T2, H1, H2, H3 and H4 denotes 25℃, 4℃; 12 h, 24 h, 48 h and 72 h separately.

3 结论与讨论

试验结果表明, 提取西葫芦叶片叶绿素的最佳方法为: 以丙酮: 无水乙醇 = 1:1 混合液为提取液, 料液比为 1:40, 室温条件下提取 48 h。

如果为了节约时间, 也可以采用与最佳方法相同

的提取液和料液比, 在低温条件下提取 24 h。这种提取方法获得的叶绿素提取率虽然较最佳方法略低, 但差异不显著, 可以用于西葫芦叶片叶绿素的快速提取。

试验中西葫芦叶片叶绿素提取的最佳提取液为丙酮: 无水乙醇 = 1:1 混合液, 这与杨云裳^[14]的结论一致, 而与麻明友等^[12]用丙酮: 无水乙醇 = 2:1 提取猕猴桃的叶绿素及罗祖友等^[13]用丙酮: 95% 乙醇 = 2:1 混合液提取姜叶叶绿素的研究结果不同, 这种差异可能是由作物种类不同而决定的。

低温和室温条件下, 叶绿素的含量变化趋势相同, 即先升高后下降, 这可能是由于前期叶绿体在提取溶剂的作用下, 大量释放叶绿素; 后期由于细胞衰老、体内自由基积累等诱发叶绿素迅速降解^[19]。试验的提取时间低于 24 h, 低温条件下的叶绿素提取效果优于室温; 高于 48 h, 室温条件下的叶绿素提取效果优于低温。这可能是由于低温具有促进叶绿体释放叶绿素的速度和叶绿素降解速度的作用。

参考文献

- [1] 唐银凤. 叶绿素含量测定中的误差分析[J]. 南京理工大学学报, 1997, 21(2): 130-132.
- [2] 范雅, 蔡红星, 李霜, 等. 叶绿素紫外吸收特性的分析研究[J]. 光散射学报, 2007, 20(4): 356-358.
- [3] 关锦毅, 郝再彬, 张达, 等. 叶绿素提取与检测及生物学功效的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(12): 130-134.
- [4] 黄光荣. 绿色蔬菜叶绿素含量与颜色的关系[J]. 江苏食品与发酵, 1999(4): 11-13.
- [5] 黄晓德, 钱骅, 赵伯涛. 西兰花叶叶绿素提取及叶绿素铜钠盐制备工艺研究[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(30): 45-47.
- [6] 施青红. 青菜中叶绿素含量的无损检测法研究[J]. 中国食品学报, 2007, 6(3): 127-131.
- [7] 柳新平, 王新明, 周开文, 等. 叶绿素在肿瘤防治中的应用研究进展[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2007, 14(3): 269-271.
- [8] 孟庆廷. 叶绿素提取方法及稳定性研究进展[J]. 河北化工, 2009, 32(3): 2-3.
- [9] 贾长英, 唐丽华, 张晓娟, 等. 青草叶绿素提取工艺的研究[J]. 杭州化工, 2008, 38(2): 16-17.
- [10] 李建友, 高兆波, 兰红玲, 等. 西葫芦主要产量相关性状的灰色系统分析[J]. 中国蔬菜, 2005(2): 24-25.
- [11] 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.
- [12] 麻明友, 麻成金, 肖桌柄, 等. 猕猴桃叶中叶绿素提取研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 140-143.
- [13] 罗祖友, 袁萍, 莫开菊. 姜叶叶绿素的提取及叶绿素铜钠的制备[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 361-364.
- [14] 杨云裳, 吕海丽, 张应鹏, 等. 小叶黄杨叶绿素的提取工艺及应用[J]. 印染助剂, 2007, 24(8): 14-15.
- [15] 王忠. 植物生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 131.
- [16] 曹慧, 陆相龙. 弱光逆境下活性氧的损伤对葡萄叶片叶绿素降解效应的影响[J]. 潍坊学院学报, 2010, 10(4): 86-88.

阿月浑子褐斑病防治药剂筛选

杨书宇¹, 苏淑钗¹, 樊桂敏¹, 何敬房², 冷平生²

(1. 北京林业大学 省部共建森林培育与保护重点实验室, 北京 100083; 2. 北京农学院 园林系, 北京 102206)

摘要: 通过离体叶片接种、形态学鉴定和分子鉴定, 确定阿月浑子褐斑病病原菌为链格孢 (*A. alternaria*)。并在离体条件下测定并比较了 5 种常用杀菌剂对该病原菌的抗菌活性。结果表明: 苯醚甲环唑对该病菌菌丝生长的抑制活性最高, 其 EC_{50} 为 0.924 mg/L, 其次是甲基托布津和代森锰锌; 百菌清对该病菌分生孢子萌发的抑制活性最高, 其 EC_{50} 为 0.272 mg/L, 其次是甲基托布津和代森锰锌; 多菌灵对病原菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑制活性均较低。

关键词: 阿月浑子; 褐斑病; 链格孢; 毒力测定

中图分类号: S 565.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)12-0017-04

阿月浑子是世界珍贵的干果及木本油料树种, 具有很高的经济价值, 坚果商品名为开心果。20 世纪 60 年代起, 我国开始阿月浑子引种工作, 从美国、伊朗、以色列等地引进阿月浑子优良品种。但是, 在引种过程中, 一直受到褐斑病的困扰。1959 年和 1963 年中国科学院植物所北京植物园, 先后从前苏联塔什干和新疆喀什引种子试种, 种子萌发很好, 幼苗生长茁壮, 但进

入夏季多雨季节, 由于受高温高湿影响, 生长衰弱, 叶片出现褐斑病, 严重者整叶枯萎而死, 进而植株整体死亡。在 20 世纪 70 年代伊朗首相赠送给我国带土 2 a 生苗木 10 株, 栽植后亦因夏雨高温高湿感染褐斑病而枯死^[1]。

20 世纪 90 年代, 我国将引种的阿月浑子优良品种嫁接在中国黄连木上获得成功, 并在甘肃、河北、北京等地建立了阿月浑子示范果园^[2]。阿月浑子原产地为中亚地区, 属地中海气候, 夏季干燥少雨。根据 Watchdog 2008~2010 年的气候因子记录, 北京、邢台 7~8 月的降雨量均达到 300 mm 以上, 是原产地的近 10 倍, 甘谷的降雨量相对较少, 7~8 月的降雨量为 114.5 mm, 是原产地的 3 倍多。由于引种地夏季高温潮湿, 且无具有针对性的病害防治措施, 阿月浑子褐斑病发病严重。该病害在多雨潮湿的季节易发病^[3], 主

第一作者简介: 杨书宇(1986-), 男, 在读硕士, 现主要从事阿月浑子病害防治研究工作。E-mail: yshuyv@126.com。

责任作者: 苏淑钗(1967-), 女, 博士, 教授, 现主要从事经济林栽培方面的研究工作。E-mail: sushuchai@sohu.com。

基金项目: 国家林业局“948”资助项目(96471-02)。

收稿日期: 2011-04-01

The Preliminary Study on Determination of Chorophll from Summer Squash

YIN Ling, WANG Chang-lin, WANG Ying-jie, WANG Yan-ling

(Institute of Vegetables and Flowers Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081)

Abstract: The influences of the kinds of extracting solvents, extraction temperature, extraction time and ratio of liquid to solid on the content of chorophll from summer squash leaves were studied. The results showed that method of acetone mixed with ethanol(1:1) was the best of all whose content of chorophll a+b was the highest. The content of chorophll a, b, a+b were related with the time and temperature of extraction. They increased at first and then decreased. When the soaking time was less than 24 h, the content of chorophll a, b, a+b extracted at 4 °C were higher than that in 25 °C. When the soaking time was more than 48 h, the content of chorophll a, b, a+b extracted at 4 °C were lower than that in 25 °C. Within certain scope, chorophll a/b increased with the rising of the best ratio of material to solvent. An optimum determination method of chorophll optimized by orthogonal experimental design was extracted at 25 °C for 48 h, V(acetone):V(ethanol)=1:1, the ratio of material to solvent=1:40. A simple and fast determination method of chorophll was extracted at 4 °C for 24 h, V(acetone):V(ethanol)=1:1, the ratio of material to solvent=1:40.

Key words: summer squash; chorophll a/b; amon method; extract