

# 玉米叶片叶绿素快速浸提方法研究

李得孝, 侯万伟, 员海燕

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 以玉米叶片为材料, 研究了体积分数80%丙酮、体积分数95%乙醇、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、乙醇-丙酮(体积比1:1)混合液4种浸提液, 不同光温条件和不同样品预处理方式对叶绿素浸提的影响。结果表明, 浸提液以乙醇-丙酮混合液效果最好, 避光和50℃的提取温度有利于叶绿素提取; 样品冷冻处理不利于叶绿素a的提取, 而有利于叶绿素b的提取, 总叶绿素以鲜样提取为宜。在大样本试验中浸提叶片叶绿素较适宜的方法是: 将新鲜(或冷冻)玉米叶片放入50℃乙醇-丙酮混合液(体积比1:1)中避光提取1.5h。

**[关键词]** 玉米; 叶片; 叶绿素; 浸提

**[中图分类号]** Q94-33; S513

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2006)11-0065-03

叶绿素提取是分光光度法测定植物叶片叶绿素含量的重要步骤, 其中色素提取效率和提取液的稳定性是衡量提取方法的两个重要方面。最早广泛应用丙酮研磨法(Arnon法)提取叶绿素<sup>[1]</sup>, 但该方法步骤繁琐, 工作量大, 客观上难以做到避光操作, 因而色素提取效率不高。目前, 主要采用丙酮浸提法, 但由于提取液不稳定, 在室温下长时间提取的测量误差较大。吴志旭<sup>[2]</sup>改用热丙酮浸提叶绿素, 使浸提时间缩短为1.5~2.5h。其他研究者也尝试用不同的溶剂浸提叶绿素, 如Hiscox等<sup>[3]</sup>用二甲亚砜(DMSO)在65℃条件下直接浸提植物叶片叶绿素, 但叶绿素的光谱吸收峰有一定后移, 用Arnon公式计算的叶绿素含量存在一定误差; Lichtenthaler等<sup>[4]</sup>也提出了利用甲醇、乙醇、乙醚等有机溶剂测定叶绿素的方法和计算公式; Moran等<sup>[5]</sup>用N,N-二甲基甲酰胺(DMF)提取叶绿素, 由于DMF具有与丙酮相同抑制叶绿素酶活性的效果, 对绝大部分色素均有良好的提取效果, 但其毒性较强, 对实验室的安全条件要求较高, 故DMF适宜在光合色素组成的高效液相分析中用作提取剂<sup>[6]</sup>。陈福明等<sup>[7]</sup>和张宪政<sup>[8]</sup>提出了叶绿素混合液浸提法, 认为利用丙酮乙醇混合液浸提叶绿素的效率和提取液的色素稳定性均较好, 为普通试验条件下测定叶绿素含量提供了可行的方法。

本研究对前人认为较好的叶绿素提取溶剂和提

取程序进行了系统比较, 以期为批量样品的叶绿素快速提取和测定提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 成熟期玉米叶片, 采自陕西杨凌西北农林科技大学农一站生产田。

1.1.2 提取液与仪器 (1)提取液。丙酮(体积分数80%)、乙醇(体积分数95%)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF, 分析纯)、乙醇-丙酮(体积比1:1)混合液。(2)仪器。包括分析天平、打孔器(直径5mm)、25mL具塞试管, 721-型可见分光光度计、恒温水浴锅。

### 1.2 叶绿素的提取及其测定方法

将新鲜玉米叶片洗净, 吸干水分后用打孔器打出小圆片并混匀, 按每份40片(约0.2g)取样品96份并编号, 准确称重后, 等分为两组: 其中一组(48份)作为冷冻样, 放入-20℃冰箱冷冻备用; 另一组作为鲜样, 立即进行后续操作。将样品分别剪碎后立即放入48支25mL具塞试管中, 分别加入丙酮、乙醇、DMF和乙醇-丙酮混合液4种提取液, 每种提取液各设4种提取条件: 避光高温快提(50℃, 1.5h)、见光高温快提、避光室温慢提(20℃, 18h)和见光室温慢提, 共计16个处理, 每处理重复3次, 浸提叶片叶绿素。用721-型可见分光光度计, 分别在645

· [收稿日期] 2005-10-25

[基金项目] 西北农林科技大学2003年青科技专项基金(080807)

[作者简介] 李得孝(1973-), 男, 青海西宁人, 讲师, 在职博士, 主要从事玉米遗传育种研究。

[通讯作者] 员海燕(1960-), 女, 陕西华阴人, 教授, 主要从事玉米遗传育种研究。

和663 nm 波长处测定浸提液的吸光度,用Arnon法的修正公式计算叶绿素含量<sup>[8]</sup>。

冷冻样也按同样的操作程序和方法浸提及测定叶绿素含量。试验结果进行方差分析和秩次分析<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取液提取叶绿素效果的比较

不同提取液提取叶绿素效果的比较如表1所示。

表1 不同提取液提取叶绿素效果的比较

Table 1 Comparison between soaking chlorophyll efficiency of different organic solvents mg/g

提取液 Solvent	叶绿素a Chl a	叶绿素b Chl b	总叶绿素 Total chlorophyll
丙酮-乙醇混合液 Acetone-Ethanol (1:1)	2.443 9 a	1.011 4 a	3.352 0 a
N,N-二甲基甲酰胺 N,N-dimethylformamide	2.296 9 b	0.823 1 b	3.120 0 b
乙醇 Ethanol	2.146 1 c	0.828 7 b	2.974 8 c
丙酮 Acetone	1.986 8 d	0.762 0 c	2.748 8 c

注:同列数据后标不同小写字母者表示在0.05水平上差异显著。下表同。

Note: Different letters in the columns means significant difference at 0.05 level. The same as below.

### 2.2 不同光温样处理提取叶绿素效果的比较

从表2可以看出,叶绿素a含量的变化幅度大于叶绿素b。其中在高温、鲜样条件下提取的叶绿素a含量较高,此时对光的要求不严格;在避光、室温、冻

样条件下提取叶绿素b含量最高,在见光、室温、鲜样条件下提取叶绿素b含量最低;总叶绿素含量以避光、室温、冷冻样,避光、高温、鲜样和见光、高温、鲜样3个处理提取效果较好。

表2 不同光温样处理提取叶绿素效果的比较

Table 2 Comparison between soaking chlorophyll efficiency with different treatments mg/g

处理组合 Treatment	叶绿素a Chl a	叶绿素b Chl b	总叶绿素 Total chlorophyll
L <sup>-</sup> T <sup>+</sup> F <sup>+</sup>	2.326 4 a	0.867 4 bc	3.193 7 a
L <sup>+</sup> T <sup>+</sup> F <sup>+</sup>	2.301 1 a	0.841 6 bc	3.142 6 ab
L <sup>-</sup> T <sup>-</sup> F <sup>-</sup>	2.288 5 ab	0.927 2 a	3.215 7 a
L <sup>-</sup> T <sup>-</sup> F <sup>+</sup>	2.239 2 bc	0.833 4 c	3.072 6 bc
L <sup>-</sup> T <sup>+</sup> F <sup>-</sup>	2.195 2 cd	0.878 4 b	3.073 6 bc
L <sup>+</sup> T <sup>+</sup> F <sup>-</sup>	2.144 5 de	0.855 1 bc	2.999 6 cd
L <sup>+</sup> T <sup>-</sup> F <sup>+</sup>	2.135 0 de	0.777 9 d	2.913 0 d
L <sup>+</sup> T <sup>-</sup> F <sup>-</sup>	2.117 7 e	0.869 5 bc	2.987 2 cd

注:L<sup>+</sup>,L<sup>-</sup>,T<sup>+</sup>,T<sup>-</sup>,F<sup>+</sup>和F<sup>-</sup>分别代表见光、避光、高温(50℃)、室温(20℃)、鲜样和冷冻样。

Note: Signals of L<sup>+</sup>,L<sup>-</sup>,T<sup>+</sup>,T<sup>-</sup>,F<sup>+</sup> and F<sup>-</sup> mean light, light-screening, 50℃, 20℃, fresh samples and frozen samples, respectively.

将表2整理成秩次分析表(表3),根据平均秩次可以分析各个处理因素对测定结果的影响。从表3可以看出,避光和高温处理平均秩次均低于相应的见光和室温处理,说明避光和适当提高温度均有利

于叶绿素的提取。而样品预处理(冷冻与否)情况较复杂:样品冷冻处理不利于叶绿素a提取,而有利于叶绿素b的提取,总叶绿素以鲜样提取为宜。

表3 不同光温样处理平均秩次比较

Table 3 A verage rank of light-temperature pre-treatments

条件 Condition	平均秩次 A verage rank		
	叶绿素a Chl a	叶绿素b Chl b	总叶绿素 Total chlorophyll
见光 Light	5.6	5.4	5.6
避光 Light-screening	3.4	3.6	3.4
高温(50℃) High temperature (50℃)	3.8	4.4	4.0
室温(20℃) Housing-temperature (20℃)	5.2	4.6	5.0
冻样 Frozen samples	5.2	3.5	4.8
鲜样 Fresh samples	3.8	5.5	4.2

### 3 讨 论

本试验从样品预处理、提取液选择、浸提条件等方面对叶绿素的浸提方法进行了研究。结果表明,不同提取液对叶绿素的提取效率影响较大。其中丙酮-乙醇(体积比 1:1)混合液提取效果最好,N,N-二甲基甲酰胺提取速度最快,其测定值较小可能是叶绿素降解所致。Furuya 等<sup>[10]</sup>研究表明,用N,N-二甲基甲酰胺作溶剂提取的色素在低温条件下较为稳定,但不适于做大批量样品叶绿素测定的提取介质。

本研究结果表明,避光、室温、冷冻样,避光、高温、鲜样和见光、高温、鲜样 3 个处理对总叶绿素提

取效果较好;叶绿素 a 含量的变化幅度大于叶绿素 b,所以叶绿素提取的关键是叶绿素 a 的提取效率。秩次分析结果也显示,样品冷冻处理不利于叶绿素 a 的提取,却有利于叶绿素 b 的提取,总叶绿素以鲜样提取为宜;避光处理和适当提高提取温度均有利于叶绿素的提取。

大批量样品的叶绿素测定要求操作程序简单、提取完全、误差小、效率高。就本试验而言,可以认为大量样本叶绿素浸提的较适宜方法是:将新鲜(或冷冻)玉米叶片放入 50℃ 丙酮-乙醇(体积比 1:1)混合液中避光提取 1.5 h。

#### [参考文献]

- [1] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts[J]. *Plant Physiology*, 1949, 24: 1-15
- [2] 吴志旭. 浮游植物体内叶绿素 a 测定方法的改进[J]. *化学分析计量*, 2002, 11(6): 37-38
- [3] Hiscox J D, Israelstam G F. A method of the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration[J]. *Can J Bot*, 1979, 57: 1332-1334
- [4] Lichtenthaler H K, Wellburn A R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents[J]. *Biochemical Society Transactions*, 1983, 11: 591-592
- [5] Moran R, Porath D. Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-dimethylformamide[J]. *Plant Physiology*, 1980, 65: 478-479
- [6] 陈纪新, 叶翔, 陈小鹏, 等. 有机试剂提取浮游植物光合色素的研究[J]. *厦门大学学报*, 2005, 44(1): 101-106
- [7] 陈福明, 陈顺伟. 混合法测定叶绿素含量的研究[J]. *林业科技通讯*, 1984(2): 4-8
- [8] 张宪政. 植物叶绿素含量的测定——丙酮乙醇混合法[J]. *辽宁农业科学*, 1986(3): 26-28
- [9] 荣廷昭, 李晚忱. 田间试验与统计分析[M]. 成都: 四川大学出版社, 2001.
- [10] Furuya K, Hayashi M Y. HPLC determination of phytoplankton pigments using N,N-dimethylformamide[J]. *Japan Oceanography*, 1998, 54: 199-203

## Fast-soaking methods of chlorophyll from maize leaf

LIDE-xiao, HOU Wan-wei, YUN Hai-yan

(College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Effect of four organic solvents, including acetone (90%), alcohol (95%), N, N-dimethylformamide and mixture solution of alcohol and acetone ( $V/V = 1:1$ ) under the different conditions of temperature and light and pretreatments of samples, was evaluated on the extraction efficiency of chlorophyll from maize leaves. The results showed that mixture solution of acetone and alcohol ( $V/V = 1:1$ ) was the best soaking solvent; light-screening and proper higher temperature (50℃) were preferable for the extraction of chlorophyll; sample-freezing was favorable to the extraction of chlorophyll a, but unfavorable to chlorophyll b. Considering total chlorophyll, fresh sample was preferred. In conclusion, the paper proposed that the chlorophyll fast-soaking method, i.e. mixture solution of alcohol and acetone ( $V/V = 1:1$ ) at the temperature of 50℃ for 1.5 h, meet the need of batch measurement of chlorophyll.

**Key words:** maize; leaf; chlorophyll; extraction