

菠菜叶绿素的浸提和协同萃取反应

洪法水*

魏正贵 赵贵文

(苏州大学生物科学系 苏州 215151)

(中国科技大学化学系 合肥)

摘 要 比较了不同有机溶剂用直接浸提法和 Arnon法从菠菜叶片中提取叶绿素的效率. 结果表明,用丙酮、乙醇浸提法提取叶绿素的效率比丙酮、乙醇 Arnon法高,甲醇、乙醚浸提法提取叶绿素的效果明显不如丙酮、乙醇,而丙酮与乙醇等摩尔混合液浸提又比丙酮、乙醇液单独浸提的效率略高. 对这种混合浸提现象的研究表明,在分配比为最大 ($D_{\max}$)时的乙醇浓度与混合液的总摩尔比为 0.5 协萃系数 R 为 1.85,认为用丙酮与乙醇混合液提取叶绿素存在协同效应,并且在两者等摩尔混合提取时效果最好. 丙酮、乙醇及两者混合后与叶绿素的配位比均是 1:1.

关键词 叶绿素,菠菜,有机溶剂,萃取

中图分类号: O614

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2001)07-0532-04

植物叶片叶绿素含量与光合速率、植株生长速率有一定的相关性^[1]. 实验研究中常测定叶绿素含量以表征植物生长状态,生产中也往往根据叶色变化作为看苗诊断和采取施肥的重要指标^[2]. 长期以来,人们都应用 Arnon法^[3]测定叶绿素含量,利用叶绿素溶于有机溶剂的特性,将叶片在 80%丙酮溶液中研磨提取,经过滤或离心后,用分光光度计测定叶绿素提取液的光密度值 (OD),根据 Lamber-Beer 定律计算叶绿素含量. 但 Arnon法由于需要研磨和去残渣,对于田间实验大量样品的测定和大量叶绿素的提取带来很大的困难,而且,由于研磨和过滤时间较长,客观上又难以做到避光操作,会引起提取液中离体叶绿素的光分解,造成误差. Hiscox 等^[4]用二甲亚砜 (DMSO)直接浸提植物叶片中的叶绿素,再测定光密度值. 此法虽然省略了 Arnon法中研磨和去残渣两项步骤,但需要在 65℃的较高温度下提取, DMSO 又有难闻的臭味,且作为计算叶绿素含量的光谱吸收峰有一定后移,沿用 Arnon法公式计算必然存在一定误差. Lichtenthaler 等^[5]提出了用甲醇、乙醇、乙醚等有机溶剂的测定方法和计算公式,对 Arnon法提出了修正. 为了探讨最大限度的从植物叶片中提取出叶绿素并能尽量避免光分解,而且又适合大量样品的测定,大量叶绿素提取的可能性和科学性,本文在前人工作的基础上,对不同有机溶剂及其混合液提取菠菜叶绿

素作了研究,并对萃取反应机理进行了初步探讨.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 UV-160紫外可见分光光度计. 丙酮、乙醇、甲醇、乙醚、正己烷均为分析纯.

1.2 实验方法

不同有机溶剂提取叶绿素: 将从市场采购的菠菜洗净,除去叶脉,剪碎,混匀,称菠菜叶 2 g 放入棕色试剂瓶中,加入 60 mL 下列有机溶剂: 丙酮、乙醇、甲醇、乙醚. $n(\text{丙酮}) : n(\text{乙醇}) = 1 : 1$ 混合液,浸泡至发白,用 UV-Vis 测定光吸收,每隔 24 h 测 1 次,测 5 次后,光吸收不再增加,计算叶绿素含量,并在 350~700 nm 波段扫描吸收光谱. 同时称菠菜叶 2 g 按 Arnon法用丙酮或乙醇研磨并定容至 60 mL,过滤后测定光吸收,计算叶绿素含量^[6]. 比较不同有机溶剂直接浸提法和 Arnon法提取叶绿素的效率.

混合液提取叶绿素: 称菠菜叶 2 g 放入棕色试剂瓶中,加入 60 mL 不同摩尔比的丙酮和乙醇混合液. 浸泡至发白,用 UV-Vis 测定光吸收,每隔 24 h 测 1 次,测 5 次后,光吸收不再增加,计算叶绿素含量,并在 350~700 nm 波段扫描吸收光谱.

丙酮、乙醇和正己烷混合提取叶绿素: 称菠菜叶 2 g 放入棕色试剂瓶中,加入 50 mL 不同摩尔

比的丙酮、乙醇和正己烷混合液。浸泡至发白,用 UV-Vis测定光吸收,每隔 24 h测 1次,测 5次后,光吸收不再增加,计算叶绿素含量。
上述每次测定重复 3次。

2 结果与讨论

2.1 有机溶剂提取菠菜叶绿素效率的比较

不同溶剂提取菠菜叶绿素的效率列于表 1。

表 1 不同溶剂浸提法及 Arnon法提取叶绿素效率比较 (10⁶ mol/L)

Tab. 1 Extraction efficiency for chlorophyll by soaking method and Arnon method by using different solvents(10⁶mol/L)

Solvents and method	Chlorophyll ^a	Chlorophyll ^b	Chlorophyll
Acetone, Arnon	3.1±0.1	0.8±0.1	3.9±0.3
Ethanol, Arnon	2.7±0.1 [*]	0.8±0.1	3.5±0.2
Acetone, soaking	3.5±0.2	1.3±0.2	4.8±0.3 [*]
Ethanol, soaking	3.6±0.1 [*]	1.3±0.1 [*]	4.9±0.3 [*]
<i>n</i> (Acetone): <i>n</i> (Ethanol)= 1: 1, soaking	5.0±0.2 ^{**}	1.8±0.2 [*]	6.8±0.3 [*]
Methanol, soaking	3.1±0.1	1.2±0.1 [*]	4.3±0.3
Ether, soaking	0.7±0.1 [*]	0.3±0.1 [*]	1.0±0.02 [*]

Chlorophyll contents by Arnon method calculated from UV-Vis spectra of chlorophyll solutions were almost identical. Values with single star(^{*}) and double star(^{**}), the extraction efficiency for chlorophyll significantly at *p*= 0. 5 and *p*= 0. 01 level(*t* test) in the same rank.

2.2 丙酮与乙醇对叶绿素的协萃效应

为了判断丙酮与乙醇混合提取菠菜的叶绿素有无协萃效应,实验固定丙酮与乙醇的总体积为 60 mL,改变丙酮、乙醇摩尔浓度,测定叶绿素浓度(即分配比),结果见图 1。由图 1可读出下列数据: $D_{\text{acetone}}=17.03\times10^{-7}\text{ mol/L}$; $D_{\text{ethanol}}=20.3\times10^{-7}\text{ mol/L}$;而图中最大的分配比 $D_{\text{max}}=34.6\times10^{-7}\text{ mol/L}$ 时,乙醇与混合液的总摩尔比为 0. 5,即乙醇与丙酮等摩尔浓度混合时分配比最大。

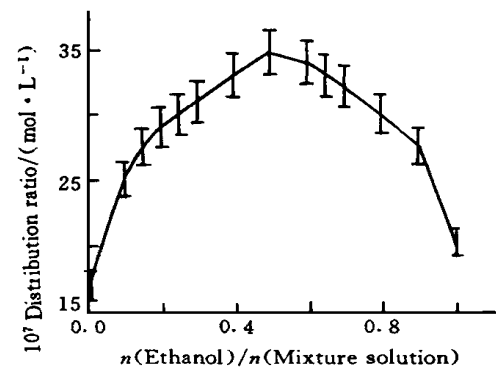


图 1 丙酮与乙醇对叶绿素的协萃图

Fig. 1 Plot of synergistic extraction for chlorophyll by a mixture of acetone and ethanol

上述体系中如无协同效应,则分配比 *D*可由

从表中看出,丙酮、乙醇 Arnon法与丙酮、乙醇浸提法提取叶绿素的效率有显著差异,直接浸提法明显高于 Arnon法(高 2% ~ 38%)。这可能就是 Arnon法在研磨、过滤时离体叶绿素易被光破坏所致^[7]。甲醇、乙醚浸提法提取叶绿素明显不如丙酮、乙醇的效果。而丙酮与乙醇等摩尔混合浸提又明显比丙酮、乙醇单独浸提的效率(高 39%),这种混合浸提效应可能是一种协萃现象。

简单的加和规则计算:

$$D_{\text{total}}=(D_{\text{acetone}}+D_{\text{ethanol}})\times0.5\text{ mol/L}=\\(17.03+20.3)\times0.5\text{ mol/L}=\\18.67\times10^{-7}\text{ mol/L}$$

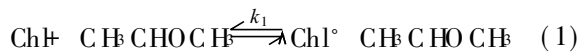
根据定义协萃系数 *R*为

$$R=D_{\text{synergistic}}/D_{\text{total}}=34.61/18.67=1.85$$

当 *R*> 1时为协同效应, *R*< 1时为反协同效应; *R*= 1时为无协同效应^[8]。由此可见用丙酮与乙醇混合提取叶绿素存在协同效应,并且在两者等摩尔浓度混合提取时效果最好。

2.3 丙酮与乙醇对叶绿素的萃取

当以丙酮单独浸提时,以 lg *C*_{acetone}对 lg *C*_{chl}作图得直线斜率为 0. 8862(图 2a 所示),故丙酮对叶绿素的萃取可以用下式表示:



$$k_1=\frac{[\text{Chl}^+\cdot\text{CH}_3\text{CHOCH}_3]}{[\text{Chl}][\text{CH}_3\text{CHOCH}_3]}\quad(2)$$

由于叶绿素存在于叶片中(固态),以 [*Chl*]= 1 mol/L计,故

$$k_1=[\text{Chl}^+\cdot\text{CH}_3\text{CHOCH}_3]/[\text{CH}_3\text{CHOCH}_3]\quad(3)$$

式(3)两边取对数得:

$$\lg k_1=\lg [\text{Chl}^+\cdot\text{CH}_3\text{CHOCH}_3]-\\ \lg [\text{CH}_3\text{CHOCH}_3]\quad(4)$$

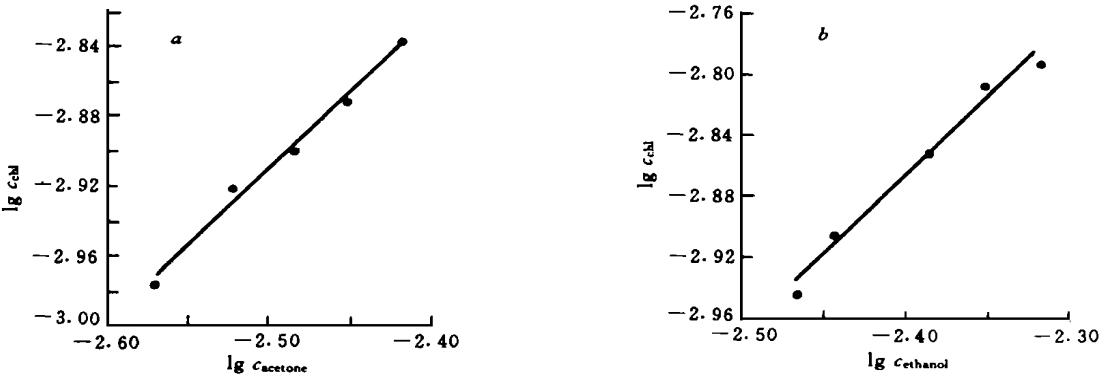


表 2 协萃反应的平衡常数
Tab. 2 Equilibrium constants of synergistic reaction

上述结果表明,用 $n(\text{丙酮}) : n(\text{乙醇}) = 1 : 1$ 的摩尔比混合浸提后,其萃取反应的平衡常数远大于丙酮-乙醇单独浸提的萃取反应平衡常数,因此用丙酮和乙醇混合浸提植物叶片叶绿素明显比丙酮-乙醇单独浸提的效率高. 用有机溶剂从叶片中直接提取叶绿素实际上是一种固-液萃取,而这种叶绿素的萃取反应研究鲜见报道,可能不同于液-液萃取,情况更复杂. 本文只是对萃取反应机理作了初步探讨,但用丙酮与乙醇混合液从叶片中直接提取叶绿素后效率明显提高,可以认为是一种协萃现象,值得在今后生物学实验研究中推广应用. 有关叶绿素萃取反应的机理尚需深入研究.

参 考 文 献

- 1 LIU Zhen-Qi(刘贞琦). *Zuowu Xuebao*(作物学报), 1984, **10**(1): 57
- 2 ZHU Geng-Hai(朱根海). *Zhiwu Shenglixue*

Tongxun(植物生理通讯), 1985, **11**(2): 9

- 3 Arnon D I. *Plant Physiol*, 1949, **24**: 1
- 4 Hiscox J D, Israelstam G F. *Canadian J Botany*, 1979, **57**: 1332
- 5 Ldchtenthaler H K, Wellburn A B. *Biochemical Society Transaction*, 1983, **603**: 591
- 6 ZHAN G Zhi-Liang(张志良) Chief-Ed(主编). *Plant Physiological Experimental Guide*(植物生理学实验指导). Beijing(北京): High Education Press(高等教育出版社), 1990: 88
- 7 ZHANG Qi-De(张其德). *Zhiwuxue Tongbao*(植物学通报), 1985, **3**(5): 60
- 8 XU Guang-Xian(徐光宪), WANG Wen-Qing(王文清), WU Jin-Guang(吴瑾光) Chief-Ed(主编). *Principles of Extraction Chemistry*(萃取化学原理). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社), 1984: 138

Soaking and Synergistic Extracting Reaction of Chlorophyll from Spinach

HONG Fa-Shui^{*}

(Department of Biological Science, Suzhou University, Suzhou 215151)

WEI Zheng-Gui, ZHAO Gui-Wen

(Department of Chemistry, China University of Science and Technology, Hefei)

Abstract The extraction efficiencies of chlorophyll from fresh spinach were compared on soaking method and Arnon methods using various organic solvents. The results showed that the extraction efficiencies of chlorophyll with soaking methods using acetone or ethanol were higher by 21% ~ 38% than that with Arnon method. The extraction efficiencies of chlorophyll with soaking methods by acetone or ethanol were higher than that by methanol or ether. Soaking method using a mixture of acetone and ethanol showed higher (by 39%) efficiency than using acetone or ethanol alone. The soaking method using mixture solution of acetone and ethanol shows synergistic character. The studies of synergistic extraction indicated that the mole ratio of ethanol in mixture solution was 0.5 and synergistic coefficient R was 1.85 at the maximum of distribution ratio, and coordination number was 1 for acetone, ethanol, and mixture of acetone and ethanol coordinated chlorophyll.

Keywords chlorophyll, spinach, organic solvent, extraction