DOI:10.11829/j.issn.1001－0629.2017－0418
胡秉芬,黄华梨,季元祖,赵晓芳,戚建莉,张露荷,张广忠.分光光度法测定叶绿素含量的提取液的适宜浓度.草业科学,2018,35(8):1965-1974.
HU B F,HUANG H L,JI Y Z,ZHAO X F,QI J L,ZHANG L H,ZHANG G Z.Evaluation of the optimum concentration of chlorophyll extract for determination of chlorophyll content by spectrophotometry.Pratacultural Science,2018,35(8):1965-1974.

分光光度法测定叶绿素含量的提取液的适宜浓度

胡秉芬,黄华梨,季元祖,赵晓芳,戚建莉,张露荷,张广忠
(甘肃省林业科学研究院经济林研究所,甘肃 兰州 730020)

摘要:分光光度法是测定叶绿素含量的最常用方法之一,但是运用该方法所测得叶绿素含量往往随叶绿素提取液浓度的变化而波动,进而影响对叶绿素含量测定的准确性。因此,使用适宜浓度的叶绿素提取液浓度,对准确测定叶绿素含量至关重要。本研究为了探索问题,以枣树(*Ziziphus jujuba*)"金昌一号"叶片为材料,用乙醇和丙酮－乙醇混合液(1∶1)分别提取叶片叶绿素,将叶绿素提取液稀释成不同的浓度梯度,用分光光度法测定叶绿素含量。研究发现在叶绿素提取液浓度低于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$(或 14.67 $mg \cdot mL^{-1}$)时,所测得叶绿素含量趋于平稳,与 Excel 二次曲线拟合分析结果基本一致。这表明运用分光光度法测定枣树叶绿素含量的提取液适宜浓度应低于该浓度。而且还发现吸光度(A)比值的平稳性与叶绿素含量测定的准确性密切相关;叶绿素提取液浓度越低,吸光度越稳定,当提取液浓度低于 0.68 $cm^2 \cdot mL^{-1}$时,吸光度不再变化。

关键词:枣树;叶绿素;分光光度法;提取液浓度;二次曲线拟合;吸光度;差异分析
中图分类号:Q945.11 **文献标志码**:A **文章编号**:1001－0629(2018)08-1965-10*

Evaluation of the optimum concentration of chlorophyll extract for determination of chlorophyll content by spectrophotometry

HU Bingfen, HUANG Huali, JI Yuanzu, ZHAO Xiaofang, QI Jianli, ZHANG Luhe, ZHANG Guangzhong
(Forest Research Institute, Academy of Forestry Science, Lanzhou 730020, Gansu, China)

Abstract: To evaluate the optimum concentration of chlorophyll extract for determination of chlorophyll content, chlorophyll was extracted from "Jinchang No.1" jujuba leaves using ethanol and acetone－ethanol mixture (1∶1). Chlorophyll extract was diluted to obtain different concentration gradients, and the content was determined using spectrophotometry. Our results showed that the optimum concentration of chlorophyll extract should be less than 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$(equal to 14.67 $mg \cdot mL^{-1}$), which was consistent with the results from a two curve fitting analysis performed in Excel. The stability of absorbance (A) ratio was directly related to accuracy of chlorophyll content; the lower the concentration of chlorophyll extract, the more stable were the values of A. The values of A did not change when the concentration of chlorophyll extract was lower than 0.681 $cm^2 \cdot mL^{-1}$.

Keywords: *Ziziphus jujuba*; chlorophyll; spectrophotometry; extract concentration; two times curve fitting; absorbance; variance analysis

Corresponding author: HUANG Huali E-mail:gshhl@hotmail.com

* 收稿日期:2017-08-16 接受日期:2017-12-15
基金项目:林业公益性行业科研专项(201304702);林业公益性行业科研专项——甘肃沿黄灌区枣产业升级关键技术研究与示范(201304702)
第一作者:胡秉芬(1969-),女,甘肃景泰人,副研究员,博士,主要从事经济林育种研究工作。E-mail:bf9134hu@163.com
通信作者:黄华梨(1963-),男,四川广元人,正高级工程师,本科,主要从事经济林和自然保护管理与研究工作。E-mail:gshhl@hotmail.com

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

叶绿素含量是反映植物光合组织生理状况的一个基本指标，植物生理研究中经常涉及叶绿素含量的测定。叶绿素含量的测定方法主要有分光光度法、荧光分析法、活体叶绿素仪法、光声光谱法和高效液相色谱法等[1]。其中，应用最广泛的是分光光度法，即根据叶绿素对可见光的吸收光谱，在某一特定波长下，测定其吸光度(A)，然后利用公式计算叶绿素含量。吸光度是光线通过溶液后用来衡量光被溶质吸收程度的一个物理量。光的吸收程度与叶绿素提取液的浓度、液层的厚度以及入射及反射光的强度等因素有关。实际上，在进行比色分析时，因采用同样质料、相同规格的比色皿，反射光的强度相同，它们的影响可以相抵消。Beer定律是比色分析的理论基础，它适用于低浓度溶液，一般采用每升含溶质1 g的浓度(1 mg·mL^{-1})，液层厚度为1 cm。许大全[2]认为用于比色测定的叶绿素提取液的浓度过高，会导致叶绿素a/b比值的明显降低。舒展等[3]也认为叶绿素a/b比值的高低与用于比色的叶绿素提取液浓度有密切关系；当叶绿素提取液浓度在3.50～6.00 cm^2·mL^{-1}时，a/b比值变化不大，而在这个范围之外时，a/b比值随提取液浓度的降低而升高。笔者在以往试验中，使用分光光度法测定小麦(*Triticum aestivum*)叶片叶绿素含量时发现，取同一叶片对等部位厚度相同的两份等面积材料，用不同容积乙醇－丙酮混合液(1∶1)浸提叶片叶绿素，结果是材料相同、浓度不同的叶绿素提取液所测得的叶绿素含量不同。此外，在比色读数时吸光度经常波动不稳定，特别在665和663 nm长波点，表现尤为明显。因此，运用适宜浓度的叶绿素提取液对准确测定其叶绿素含量至关重要。鉴于此，本研究采用枣树(*Ziziphus jujuba*)“金昌一号”叶片为材料，分别以乙醇和乙醇－丙酮混合液(1∶1)浸提枣树叶片叶绿素，将浸提液稀释成一定浓度梯度后，用紫外可见分光光度计比色读取吸光度，然后测定计算叶绿素a、叶绿素b、叶绿素a/b的比值和叶绿素总量(a＋b)，并观察吸光度的稳定情况，进而探讨叶绿素含量稳定时浸提液的浓度问题，以期为分光光度法有效测定叶绿素含量提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为4年生枣树“金昌一号”的叶片，于2016年5月12日采自甘肃省林业科学研究院靖远县双龙乡新建枣树示范园。其他仪器试剂：紫外可见分光光度计(UV-1600PC型，上海美谱达仪器有限公司)、80%丙酮、95%乙醇及乙醇－丙酮混合液(按体积比配制的提取液1∶1)等。

1.2 试验方法

在枣树树冠中部外围东、西、南、北4个方位选取两年生二次枝，于其上4～6节着生的枣吊中部各采2片叶，擦净叶片表面污物，在8片重叠的枣树叶片主脉两侧对应部位各取2 cm×1 cm叶样，称重后剪成细丝，无损地放入具塞三角瓶中，加入乙醇－丙酮混合液(1∶1)定容至20 mL，封口后室温、暗处浸泡提取。采用同样的方法，用95%酒精作提取液再浸提一份。待材料完全变白后，取清液用紫外可见分光光度计比色测定吸光度。

由于丙酮溶液中的叶绿素a、b在长波光方面的最大吸收峰位于663和645 nm处，而乙醇溶液中的叶绿素a、b在长波光方面的最大吸收峰位于665和649 nm处[4]。因此试验设计3个方案：方案1，乙醇叶绿素提取液在665和649 nm波长点比色，测得的叶绿素a、b及吸光度分别用a_1、b_1、$1A_{665}$、$1A_{649}$表示；方案2，乙醇－丙酮叶绿素提取液在665和649 nm波长点比色，测得的叶绿素a、b及吸光度分别用a_2、b_2、$2A_{665}$、$2A_{649}$表示；方案3，乙醇－丙酮叶绿素提取液在663和645 nm波长点比色，测得的叶绿素a、b及吸光度分别用a_3、b_3、A_{663}、A_{645}表示。方案1和方案2的提取液不同，比色波长点及叶绿素含量的计算公式均相同；方案1和方案3提取液、比色波长点及叶绿素含量的计算公式均不同，方案1是乙醇叶绿素提取液在A_{665}和A_{649}波长下读取吸光度后用Arnon的修正公式[5]计算叶绿素含量；方案3则是乙醇－丙酮叶绿素提取液在A_{663}和A_{645}波长下读取吸光度，由于其叶绿素提取液的吸收光谱和丙酮叶绿素提取液的吸收光谱相同[4]，故用Arnon公式计算叶绿素含量。

每一次比色后将比色皿中叶绿素提取液倒回原三角瓶，加5 mL相应提取液稀释后取清液再次测定吸光度。以此类推，共稀释成19个浓度梯度(1.600、1.280、1.067、0.914、0.800、0.711、0.681、0.653、0.627、0.604、0.582、0.533、0.492、0.457、0.427、0.400、0.376、0.337、0.305 cm^2·mL^{-1})，全部比色并记录数据。枣树“金昌一号”叶片约重18.33 mg·cm^{-2}，所以cm^2·mL^{-1}与mg·mL^{-1}之间可以互算。

1.3 数据分析

分别以提取液作空白，用紫外可见分光光度计在663和645 nm波长下测定吸光度，并依据Arnon公式[6]计算叶绿素含量(mg·dm^{-2})。

叶绿素a含量＝$(12.7A_{663}-2.69A_{645})\times[V/$

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(1 000×W)];

叶绿素 b 含量=(22.9A_{645} − 4.68A_{663})×[V/(1 000×W)];

叶绿素总量=叶绿素 a 含量+叶绿素 b 含量=(20.21 A_{645}+8.02 A_{663})×[V/(1 000×W)]。

在 665 和 649 nm 波长下测定吸光度,并用以下修正的 Arnon 公式[5]计算叶绿素含量(mg·dm^{-2})。

叶绿素 a 含量=(13.7A_{665} − 5.76A_{649})×[V/(1 000×W)];

叶绿素 b 含量=(25.8A_{649} − 7.6A_{665})×[V/(1 000×W)];

叶绿素总量=叶绿素 a 含量+叶绿素 b 含量=(6.10A_{665}+20.04A_{649})×[V/(1 000×W)]。

式中:A_{663}、A_{645}、A_{665}、A_{649}分别为 663、645、665 和 649 nm 波长下的吸光度,V 为提取液的体积(mL),W 为叶片鲜重(g)或叶面积(cm^2)。

采用 Excel 2003 处理数据,制作图表,曲线拟合分析;采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析和 Duncan 法多重比较,比较显著性水平设定为 P=0.05。

2　结果与分析

2.1　叶绿素 a 含量随叶绿素提取液浓度的变化

两种不同提取液浸提的叶绿素溶液中,叶绿素 a 含量均随叶绿素提取液浓度的降低呈现先升高后逐渐平稳的变化趋势(图 1,表 1、2、3)。当溶液浓度高于 0.80 cm^2·mL^{-1},a_1,a_2 和 a_3 均随溶液浓度的降低而升高;而当浓度低于 0.80 cm^2·mL^{-1},三者均表现出基本一致的平稳曲线,a_3>a_2>a_1。

方差分析和多重比较(表 4)表明,a_3 显著高于 a_1 和 a_2(P<0.05),说明乙醇−丙酮叶绿素提取液在 663 和 645 nm 波长下测得的叶绿素 a 含量与在 665 和 649 nm 波长下测得的叶绿素 a 含量差异显著,其与乙醇叶绿素提取液在 665 和 649 nm 波长下测得的叶绿素 a 含量差异也显著;a_2 与 a_1 差异不显著(P>0.05),这说明两种叶绿素提取液在相同波长点 665 和 649 nm 处测得的叶绿素 a 含量基本相同。表明,测定叶绿素 a 含量的叶绿素提取液适宜浓度应低于 0.80 cm^2·mL^{-1}。

对 a_1、a_2 和 a_3 这 3 条曲线进行二次曲线拟合(表 5),相关系数分别为0.996 1、0.997 2和 0.996 2,这表明所做的曲线拟合是合理的。由于叶绿素提取液浓度低于 0.80 cm^2·mL^{-1},3 条叶绿素 a 变化曲线均处于平稳状态,取该浓度叶绿素提取液所测得的叶绿素 a 含量为 y 值,根据相应的拟合公式,对应的 x 值分别为 0.75、0.78 和 0.77,这进一步说明测定叶绿素 a 含量的叶绿素提取液浓度应低于0.80 cm^2·mL^{-1}。

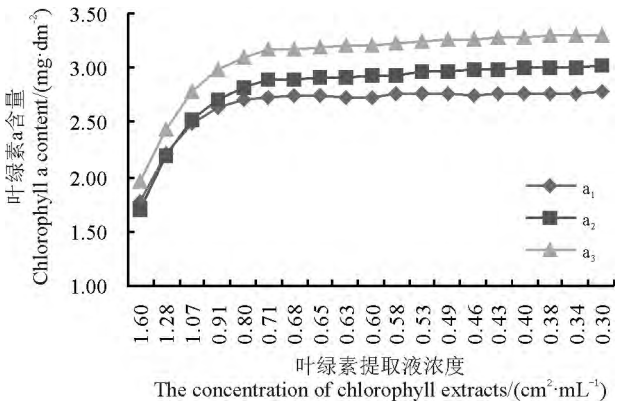

图 1　叶绿素 a 含量随叶绿素提取液浓度的变化

Fig. 1　The changes of chlorophyll a content with the concentration of chlorophyll extracts

a_1、a_2 和 a_3 分别表示 3 个方案中不同浓度梯度叶绿素提取液中的叶绿素 a 含量。

a_1, a_2 and a_3 respectively represent the chlorophyll a contents in chlorophyll extracts from three different programmes.

2.2　叶绿素 b 含量随叶绿素提取液浓度的变化

两种不同提取液浸提的叶绿素溶液中,叶绿素 b 含量均随叶绿素提取液浓度的降低呈现先降低后逐渐平稳的变化趋势(图 2,表 1、2、3)。当溶液浓度高于 0.80 cm^2·mL^{-1},b_1,b_2 和 b_3 均随溶液浓度降低而快速降低;而当浓度低于 0.80 cm^2·mL^{-1},三者均表现出基本一致的平稳曲线,b_2>b_3>b_1。

方差分析和多重比较(表 4)表明,b_1、b_2 和 b_3 彼此间差异显著(P<0.05),说明乙醇−丙酮叶绿素提取液在 665 和 649 nm 波长下测得的叶绿素 b 含量与在 663 和 645 nm 波长下测得的叶绿素 b 含量不同,两种叶绿素提取液在相同波长点 665 和 649 nm 处测得的叶绿素 b 含量也完全不同。表明,测定叶绿素 b 含量的叶绿素提取液适宜浓度应低于 0.80 cm^2·mL^{-1}。

对 b_1、b_2 和 b_3 这 3 条曲线进行二次曲线拟合(表 5),相关系数分别为 0.996、0.990和 0.992,这表明所做的曲线拟合是合理的。由于叶绿素提取液浓度低于 0.80 cm^2·mL^{-1},3 条叶绿素 b 变化曲线均处于平稳状态,取该浓度叶绿素提取液所测得的叶绿素 b 含量为 y 值,根据相应的拟合公式,对应的 x 值分别为 0.80、0.80 和 0.81,进一步说明测定叶绿素 b 含量的叶绿素提取液浓度应低于 0.80 cm^2·mL^{-1}。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 乙醇提取液提取枣树叶绿素含量(665/649 nm)

Table 1 The extraction of chlorophyll content from jujube tree by ethanol extraction(665/649 nm)

序号 Number	浓度 Concentration		吸光值 OD value			叶绿素 Chlorophyll/(mg·dm^{-2})			叶绿素 a/b Chlorophyll a/b
	cm^2·mL^{-1}	mg·mL^{-1}	A_{665}	A_{649}	A_{665}/A_{649}	a	b	a+b	
1	1.600	29.328	2.761	1.626	1.698	1.779	1.310	3.089	1.357
2	1.280	23.462	2.624	1.306	2.009	2.221	1.074	3.295	2.067
3	1.067	19.552	2.393	1.087	2.201	2.487	0.924	3.411	2.691
4	0.914	16.759	2.150	0.942	2.282	2.628	0.871	3.499	3.017
5	0.800	14.664	1.926	0.828	2.326	2.702	0.841	3.543	3.215
6	0.711	13.035	1.728	0.736	2.348	2.733	0.824	3.556	3.319
7	0.681	12.480	1.658	0.703	2.358	2.741	0.813	3.555	3.371
8	0.653	11.971	1.589	0.674	2.358	2.739	0.814	3.552	3.367
9	0.627	11.501	1.521	0.644	2.362	2.730	0.806	3.536	3.388
10	0.604	11.067	1.462	0.617	2.370	2.729	0.796	3.525	3.427
11	0.582	10.665	1.425	0.603	2.363	2.758	0.813	3.571	3.395
12	0.533	9.776	1.305	0.552	2.364	2.756	0.811	3.567	3.400
13	0.492	9.024	1.206	0.511	2.360	2.758	0.816	3.574	3.379
14	0.457	8.379	1.119	0.475	2.356	2.755	0.820	3.575	3.358
15	0.427	7.821	1.047	0.443	2.363	2.764	0.814	3.578	3.396
16	0.400	7.332	0.981	0.416	2.358	2.761	0.819	3.580	3.370
17	0.376	6.901	0.923	0.391	2.361	2.761	0.816	3.577	3.382
18	0.337	6.174	0.874	0.370	2.362	2.768	0.817	3.585	3.390
19	0.305	5.586	0.790	0.335	2.358	2.779	0.825	3.604	3.370

表 2 乙醇－丙酮提取液提取枣树叶绿素含量(665/649 nm)

Table 2 The extraction of chlorophyll content from jujube tree by ethanol and acetone extraction(665/649 nm)

序号 Number	浓度 Concentration		吸光值 OD value			叶绿素 Chlorophyll/(mg·dm^{-2})			叶绿素 a/b Chlorophyll a/b
	cm^2·mL^{-1}	mg·mL^{-1}	A_{665}	A_{649}	A_{665}/A_{649}	a	b	a+b	
1	1.600	29.328	2.779	1.870	1.486	1.706	1.695	3.402	1.006
2	1.280	23.462	2.678	1.507	1.777	2.188	1.447	3.636	1.512
3	1.067	19.552	2.513	1.288	1.951	2.532	1.325	3.857	1.911
4	0.914	16.759	2.277	1.107	2.057	2.715	1.231	3.946	2.205
5	0.800	14.664	2.058	0.979	2.102	2.819	1.202	4.022	2.345
6	0.711	13.035	1.867	0.873	2.139	2.890	1.172	4.062	2.466
7	0.681	12.480	1.792	0.836	2.144	2.899	1.168	4.066	2.483
8	0.653	11.971	1.726	0.803	2.149	2.913	1.164	4.076	2.503
9	0.627	11.501	1.657	0.773	2.144	2.908	1.171	4.080	2.483
10	0.604	11.067	1.602	0.743	2.156	2.926	1.158	4.085	2.526
11	0.582	10.665	1.549	0.719	2.154	2.936	1.165	4.101	2.520
12	0.533	9.776	1.431	0.663	2.158	2.960	1.168	4.128	2.534
13	0.492	9.024	1.324	0.621	2.132	2.958	1.211	4.168	2.444
14	0.457	8.379	1.235	0.571	2.163	2.982	1.169	4.151	2.550
15	0.427	7.821	1.157	0.535	2.163	2.993	1.174	4.167	2.549
16	0.400	7.332	1.087	0.502	2.165	3.000	1.173	4.173	2.558
17	0.376	6.901	1.025	0.475	2.158	3.003	1.186	4.189	2.532
18	0.337	6.174	0.918	0.424	2.165	3.009	1.176	4.185	2.558
19	0.305	5.586	0.833	0.386	2.158	3.015	1.190	4.205	2.533

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　乙醇－丙酮提取液提取枣树叶绿素含量(663/645 nm)

Table 3　The extraction of chlorophyll content from jujube tree by ethanol and acetone extraction(663/645 nm)

序号 Number	浓度 Concentration		吸光值 OD value			叶绿素 Chlorophyll/(mg・dm^{-2})			叶绿素 a/b Chlorophyll a/b
	cm^2・mL^{-1}	mg・mL^{-1}	A_{663}	A_{645}	A_{663}/A_{645}	a	b	a+b	
1	1.600	29.328	2.786	1.497	1.861	1.960	1.328	3.287	1.476
2	1.280	23.462	2.699	1.193	2.262	2.427	1.148	3.575	2.115
3	1.067	19.552	2.554	1.017	2.511	2.784	1.063	3.847	2.620
4	0.914	16.759	2.328	0.872	2.670	2.977	0.992	3.970	3.000
5	0.800	14.664	2.114	0.772	2.738	3.096	0.973	4.070	3.182
6	0.711	13.035	1.919	0.684	2.806	3.168	0.940	4.108	3.372
7	0.681	12.480	1.841	0.660	2.789	3.173	0.954	4.128	3.325
8	0.653	11.971	1.776	0.632	2.810	3.193	0.943	4.137	3.385
9	0.627	11.501	1.709	0.609	2.806	3.198	0.948	4.146	3.374
10	0.604	11.067	1.648	0.586	2.812	3.205	0.945	4.151	3.391
11	0.582	10.665	1.594	0.567	2.811	3.217	0.950	4.167	3.388
12	0.533	9.776	1.472	0.522	2.820	3.242	0.950	4.192	3.414
13	0.492	9.024	1.364	0.484	2.818	3.254	0.955	4.209	3.409
14	0.457	8.379	1.272	0.450	2.827	3.269	0.952	4.221	3.434
15	0.427	7.821	1.192	0.422	2.825	3.282	0.957	4.239	3.428
16	0.400	7.332	1.119	0.397	2.819	3.286	0.964	4.249	3.410
17	0.376	6.901	1.056	0.375	2.816	3.294	0.968	4.263	3.402
18	0.337	6.174	0.946	0.335	2.824	3.299	0.963	4.262	3.425
19	0.305	5.586	0.858	0.305	2.813	3.306	0.974	4.280	3.394

表 4　枣树叶绿素含量方差分析结果

Table 4　The results of variance analysis of chlorophyll content in jujube tree leaves

方案 Programme	叶绿素 a Chlorophyll a	叶绿素 b Chlorophyll b	叶绿素 a/b Chlorophyll a/b	叶绿素 a+b Chlorophyll a+b
1	2.650±0.072b	0.864±0.027c	3.140±0.115a	3.514±0.047b
2	2.808±0.072b	1.229±0.027a	2.327±0.115b	4.037±0.047a
3	3.086±0.072a	0.993±0.027b	3.155±0.115a	4.079±0.047a

同列不同小写字母者表示不同方案叶绿素含量间差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters within the same column indicate significant differences between different programmes at the 0.05 level.

2.3　叶绿素 a/b 比值随叶绿素提取液浓度的变化

两种不同提取液浸提的叶绿素溶液中,叶绿素a/b比值均随叶绿素提取液浓度的降低呈现先升高后逐渐平稳的变化趋势(图 3,表 1、2、3)。当溶液浓度高于 0.80 cm^2・mL^{-1},a_1/b_1,a_2/b_2 及 a_3/b_3 比值均随溶液浓度降低而升高;而当浓度低于 0.80 cm^2・mL^{-1},三者均表现出基本一致的平稳曲线。

在方案 1 和方案 3 中虽然叶绿素提取液、比色波长点及叶绿素含量的计算公式均不同,但 a_1/b_1 和 a_3/b_3 比值的曲线几乎完全吻合。SPSS 方差分析和 Duncan 多重比较(表 4)表明,a_1/b_1 和 a_3/b_3 间差异不显著($P>0.05$)。这说明乙醇叶绿素提取液在长波光最大吸收峰 665 和 649 nm 波长下测得的 a/b 比值与乙醇－丙酮叶绿素提取液在长波光最大吸收峰 A_{663} 和 A_{645} 波长下测得的 a/b 比值完全相同。此外,a_3/b_3 比值显著高于 a_2/b_2 比值($P<0.05$),说明乙醇－丙酮叶绿素提取液在 663 和 645 nm 波长下测得的叶绿素 a/b比值高于在 665 和 649 nm 波长下测得的。这表明测定叶绿素 a/b 比值的叶绿素提取液适宜浓度应低于0.80 cm^2・mL^{-1}。

对 a_1/b_1,a_2/b_2 及 a_3/b_3 比值的 3 条曲线进行二次曲线拟合(表 5),相关系数分别为 0.986、0.983 和 0.983,这表明所做的曲线拟合是合理的。由于叶绿素提取液浓度低于 0.80 cm^2・mL^{-1},3 条叶绿素 a/b 比值变化曲线均处于平稳状态,取该浓度叶绿素提取液所测得的叶绿素a/b比值为 y 值,根据相应的拟合公

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 5 Excel 曲线拟合分析结果

Table 5 Excel curve fitting analysis results

叶绿素 Chlorophyll	y/ (mg·dm^{-2})	二次多项曲线拟合方程(n=19) Two times multinomial curve fitting equation	相关系数(R^2) Correlation coefficient	x/ (cm^2·mL^{-1})
a_1	2.702	$y=-0.757x^2+0.684x+2.615$	0.996	0.75
a_2	2.819	$y=-0.752x^2+0.404x+2.959$	0.997	0.78
a_3	3.096	$y=-0.737x^2+0.336x+3.275$	0.996	0.77
b_1	0.841	$y=0.443x^2-0.469x+0.931$	0.996	0.80
b_2	1.202	$y=0.465x^2-0.489x+1.297$	0.990	0.80
b_3	0.973	$y=0.354x^2-0.391x+1.058$	0.992	0.81
a_1/b_1	3.215*	$y=-1.539x^2+1.276x+3.146$	0.986	0.77
a_2/b_2	2.345*	$y=-0.980x^2+0.599x+2.476$	0.983	0.78
a_3/b_3	3.182*	$y=-1.294x^2+0.854x+3.308$	0.983	0.78
a_1+b_1	3.543	$y=-0.314x^2+0.215x+3.546$	0.986	0.70
a_2+b_2	4.022	$y=-0.286x^2-0.085x+4.256$	0.995	0.77
a_3+b_3	4.070	$y=-0.383x^2-0.055x+4.333$	0.995	0.76

y 是叶绿素变化曲线稳定时的叶绿素浓度，* 表示 a/b 比值；x 是根据相应二次多项曲线拟合方程，与 y 对应的 x 值。

y is the chlorophyll concentration when the chlorophyll change curve is stable, * is a/b ratio; x is the x value corresponding to y according to the two multinomial curve fitting equation.

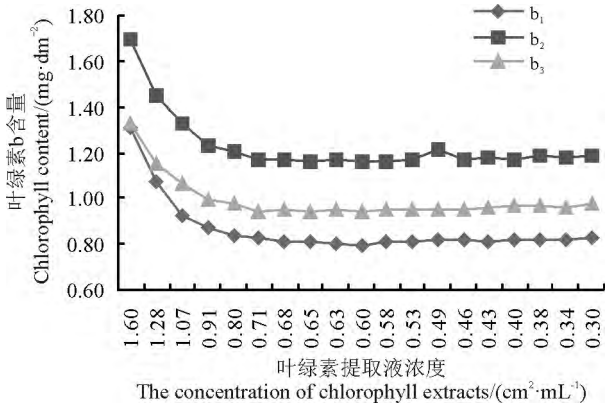

图 2 叶绿素 b 含量随叶绿素提取液浓度的变化

Fig. 2 The changes of chlorophyll b content with the concentration of chlorophyll extracts

b_1、b_2 和 b_3 分别表示 3 个方案中不同浓度梯度叶绿素提取液中的叶绿素 b 含量。

b_1, b_2 and b_3 respectively represent the chlorophyll b contents in chlorophyll extracts from three different programmes.

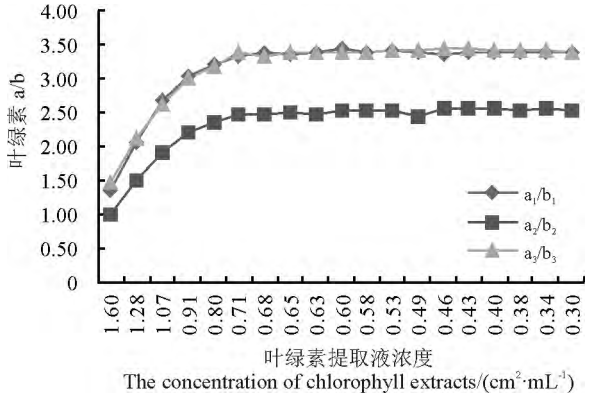

图 3 叶绿素 a/b 比值随叶绿素提取液浓度的变化

Fig. 3 The changes of the ratio of chlorophyll a and b with the concentration of chlorophyll extracts

a_1/b_1、a_2/b_2 和 a_3/b_3 分别表示 3 个方案中不同浓度梯度叶绿素提取液中的叶绿素 a/b。

a_1/b_1, a_2/b_2 和 a_3/b_3 respectively represent the chlorophyll a/b in chlorophyll extracts from three different programmes.

式，对应的 x 值分别为0.77、0.78 和 0.78，进一步说明测定叶绿素 a/b 比值的叶绿素提取液浓度应低于 0.80 cm^2·mL^{-1}。

在低于 0.80 cm^2·mL^{-1}的浓度范围内，乙醇叶绿素提取液的 a_1/b_1 比值均在 3.379 左右(表 1)；乙醇—丙酮叶绿素提取液的 a_2/b_2 和 a_3/b_3 比值均分别在 2.517和 3.396 左右(表 2、3)。这个结果与 C_3 植物 a/b 理论值约为 3[7]的结论基本一致。而当溶液浓度高于 0.80 cm^2·mL^{-1}时，a_1/b_1、a_2/b_2及a_3/b_3比值均随着浓度的降低迅速降低，这也说明测定叶绿素 a/b 比值的叶绿素提取液适宜浓度应低于0.80 cm^2·mL^{-1}。

2.4 叶绿素总含量 (a+b)随叶绿素提取液浓度的变化

两种不同提取液浸提的叶绿素溶液中，叶绿素总量均随叶绿素提取液浓度的降低呈现先升高后逐渐平稳的变化趋势(图 4，表 1、2、3)。当溶液浓度高于 0.80 cm^2·mL^{-1}，a_1+b_1，a_2+b_2 和 a_3+b_3 均随溶液浓度降低而升高；而当浓度低于 0.80 cm^2·mL^{-1}，三者均

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表现出基本一致的平稳曲线。此外,a_2+b_2 和 a_3+b_3 的曲线基本相吻合,这说明乙醇－丙酮叶绿素提取液在 665 和 649 nm 波长下测得的叶绿素总量与 663 和 645 nm 波长下测得的总量完全相同。乙醇提取液浸提的叶绿素总量相对前两者较低,差异明显,这可能与不同叶片厚度的差异,甚至同一叶片不同部位厚度的差异以及人为操作产生的误差有关,这些因素均会导致单位叶面积叶绿素含量的不同。这表明,测定叶绿素总量的叶绿素提取液适宜浓度应低于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$。

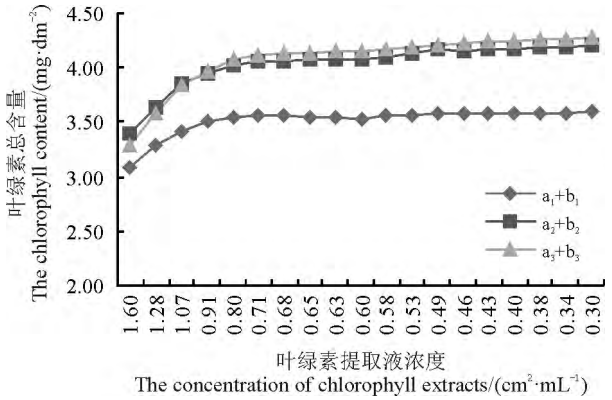

图 4　叶绿素总量随叶绿素提取液浓度的变化

Fig. 4　The changes of total chlorophyll content with the concentration of chlorophyll extracts

a_1+b_1、a_2+b_2 和 a_3+b_3 分别表示 3 个方案中不同浓度梯度叶绿素提取液中的叶绿素总量。

a_1+b_1, a_2+b_2 and a_3+b_3 respectively represent the chlorophyll (a+b) contents in chlorophyll extracts from three different programmes.

对 a_1+b_1,a_2+b_2 和 a_3+b_3 这 3 条曲线进行二次曲线拟合(表 5),相关系数分别为 0.986、0.995 和 0.995,这表明所做的曲线拟合是合理的。由于叶绿素提取液浓度低于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$,3 条叶绿素总量变化曲线均处于平稳状态,取该浓度叶绿素提取液所测得的叶绿素总量为 y 值,根据相应的拟合公式,对应的 x 值分别为 0.70、0.77 和 0.76,进一步说明测定叶绿素总量的叶绿素提取液浓度应低于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$。

2.5　吸光度及其比值随叶绿素提取液浓度的变化

两种不同提取液浸提的叶绿素溶液中,吸光度均随叶绿素提取液浓度的降低而降低(图 5,表 1、2、3)。其中,A_{665} 与 A_{663} 的变化趋势一致,A_{649} 与 A_{645} 的变化趋势一致。此外,A_{665}/A_{649} 和 A_{663}/A_{645} 比值均随叶绿素提取液浓度的降低呈现先升高后逐渐平稳的变化趋势。当溶液浓度高于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$ 时,A_{665}/A_{649} 和 A_{663}/A_{645} 比值均随溶液浓度降低而升高;而当浓度低于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$ 后,其与叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a/b 及叶绿素 a 总量呈现出完全一致的平稳曲线。结果表明,A_{665}/A_{649} 和 A_{663}/A_{645} 比值达到稳定时的提取液浓度范围与测定叶绿素含量的适宜浓度范围完全一致;也就是说,吸光度比值是否平稳与能否准确测定叶绿素含量密切相关,通过吸光度比值的稳定状况可直接了解测得的叶绿素含量的可靠性。

2.6　吸光度的稳定性

通过多次比色观察表明,本研究中不同浓度梯度的叶绿素提取液在 649 与 645 nm 波长下的吸光度读数稳定;在 665、663 nm 波长下比色读数时,高浓度溶液的吸光度读数波动不稳定,但随着溶液浓度的降低吸光度读数逐步趋于稳定。此外,当乙醇叶绿素提取液稀释到 0.71 $cm^2 \cdot mL^{-1}$ 时,在 665 nm 波长下的吸光度读数较稳定;当进一步稀释到 0.681 $cm^2 \cdot mL^{-1}$(相当于 48 $mg \cdot mL^{-1}$)以后,两种叶绿素提取液在 665 和 649、663 和 645 nm 波长下的吸光度读数均不再变化。

3　讨论与结论

本研究中的叶绿素含量测定结果表明,不论是乙醇叶绿素提取液还是乙醇－丙酮叶绿素提取液,当浓度低于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$(或 14.67 $mg \cdot mL^{-1}$)时,叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量、叶绿素 a/b 比值及叶绿素总量均处于稳定水平,说明测定叶绿素含量的提取液适宜浓度应低于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$(或 14.67 $mg \cdot mL^{-1}$)。对整个浓度范围(0.304～1.6 $cm^2 \cdot mL^{-1}$)内测定的结果进行二次曲线拟合,叶绿素 a、b、a/b 比值及叶绿素 a+b 总量的拟合方程相关系数均高于 0.98,这充分说明所做的曲线拟合是合理的,依据这些拟合方程求得的值可以采用。以浓度为 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$ 的叶绿素提取液所测得的叶绿素 a、b、a/b 比值及叶绿素 a+b 总量,根据拟合公式,求得的 x 值均等于或接近 0.8(表 5),这进一步说明测定叶绿素含量的叶绿素提取液浓度应低于0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$。

比色分析的基本原理是 Beer 定律,它适用于低浓度溶液。枣树“金昌一号”叶片浸提液 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$ 相当于 14.67 $mg \cdot mL^{-1}$,这个浓度是比较低的,符合 Beer 定律的要求。本研究中叶绿素 a/b 比值的测定结果与许大全[2]的研究结果一致,他认为

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

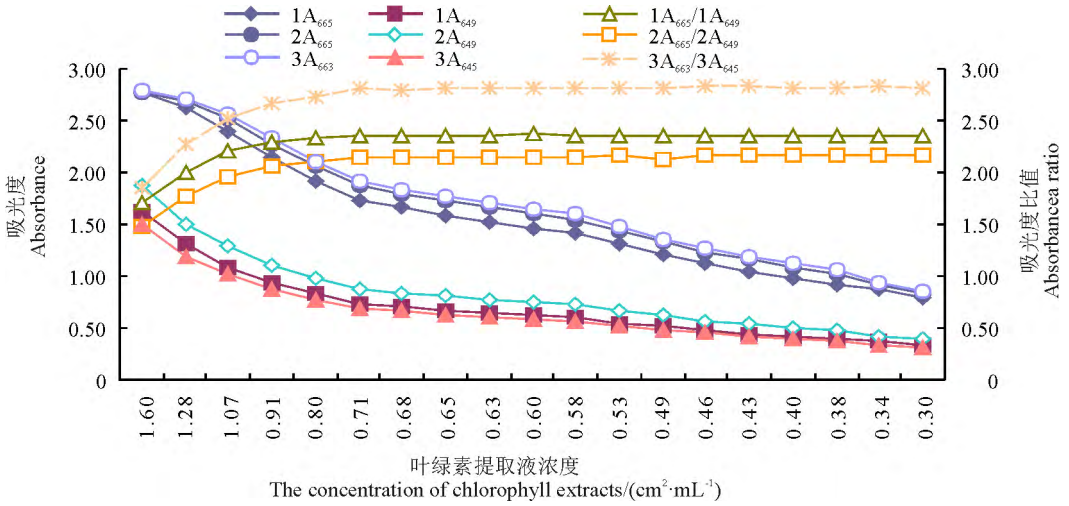

图 5 吸光度(A)及其比值随叶绿素提取液浓度的变化

Fig. 5 The changes of absorbance (A) and their ratio with the concentration of chlorophyll extracts

$1A_{665}$、$1A_{649}$和 $1A_{665}/1A_{649}$分别表示方案 1 中不同浓度梯度叶绿素提取液在 665 和 649 nm 波长点的吸光度及其比值；$2A_{665}$、$2A_{649}$和 $2A_{665}/2A_{649}$分别表示方案 2 中不同浓度梯度叶绿素提取液在 665 和 649 nm 波长点的吸光度及其比值；A_{663}、A_{645}和 A_{663}/A_{645}分别表示方案 3 中不同浓度梯度叶绿素提取液在 663 和 645 nm 波长点的吸光度及其比值。

$1A_{665}$, $1A_{649}$ and $1A_{665}/1A_{649}$ respectively represent the absorbances and their ratios of different concentration chlorophyll extracts at 665 nm and 649 nm in programme 1; $2A_{665}$, $2A_{649}$ and $2A_{665}/2A_{649}$ respectively represent the absorbances and their ratios of different concentration chlorophyll extracts at 665 and 649 nm in programme 2; A_{663}, A_{645} and A_{663}/A_{645} respectively represent the absorbances and their ratios of different concentration chlorophyll extracts at 663 and 645 nm in programme 3.

用于比色测定的叶绿素提取液的浓度过高，会导致叶绿素 a/b 比值的明显降低。舒展等[3]也认为叶绿素 a/b 比值的高低与用于比色的叶绿素提取液浓度有密切关系；当叶绿素提取液浓度在 3.50 ～ 6.00 $cm^2 \cdot mL^{-1}$之间时，a/b 比值变化不大，而在这个范围之外，a/b 比值随提取液浓度的降低而升高，这与本研究结果不完全一致。许大全[2]认为除了氮肥缺乏、缺少叶绿素的突变体、患失绿症或叶片衰老等特殊情况外，绝大多数叶片的叶绿素含量均在 400 ～ 600 $mg \cdot cm^{-2}$ 范围内。本研究发现，在低于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$的浓度范围内，乙醇叶绿素提取液的叶绿素 a_1+b_1 含量均在 356.7 $mg \cdot cm^{-2}$左右，乙醇－丙酮叶绿素提取液的 a_2+b_2 和 a_3+b_3 含量均分别在 413 和 420 $mg \cdot cm^{-2}$左右。而当溶液浓度高于0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$，a_1+b_1、a_2+b_2 和 a_3+b_3 含量均迅速降低，这也说明测定叶绿素总量的提取液适宜浓度应低于0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$。那么，叶绿素提取液的最低浓度是多少时才能测出准确的叶绿素含量？陈守建[8]采用分光光度法对低浓度区域的测定值进行了分析，认为，当被测物含量很低时，分析数据是否具有意义是数据质量的一个重要方面，任何一个分析过程，不论使用何种精确的方法或高级仪器，都不能产生无限低的有意义的数据，根据统计学的概念，他把低浓度范围的检出划分为定性和定量两种，以银的分光光度法为例，定性检出限约为 0.08 $\mu g \cdot mL^{-1}$，定量检测限为 0.12 $\mu g \cdot mL^{-1}$。

大量资料显示，浸提法测定植物叶绿素含量多采用乙醇与丙酮混合液（不同体积比混合）作提取液[9-12]，也有单纯采用乙醇溶液[13-15]或丙酮溶液[16-17]作浸提液的。杨振德[18]认为，采用分光光度法测定的植物材料叶绿素含量根据提取液的不同而呈现不同的结果。刘彩云[19]则认为叶绿素提取时，待测植物材料本身对提取试剂并无特异性，好的提取方法、试剂对不同植物材料均适用。本研究结果表明，以枣树“金昌一号”叶片为试材，乙醇和乙醇－丙酮两种浸提液在相同的最大吸收峰 665 和 649 nm 处测得的叶绿素 a 基本相同，两种浸提液分别在不同的最大吸收峰 665 和 649 nm 处和 663 和 645 nm 处测得的叶绿素 a/b 比值（a_1/b_1 与 a_3/b_3 间差异不显著，$P>0.05$）也相同，乙醇－丙酮浸提液在不同的最大吸收峰 665 和 649 nm 处和 663 和 645 nm 处测得的叶绿素 a＋b 总量（a_2+b_2 与 a_3+b_3 间差异不显著，$P>0.05$）几乎完全相同；在同等条件下，两种浸提液测得的叶绿素 b（b_1、b_2 和 b_3 彼此间差异显著，$P<0.05$）均不相同，乙醇－丙酮浸提液在 663 和 645 nm 处测得的 a_3 分别与在 665 和 649 nm 处测得的 a_2 和乙醇浸提液在 665 和 649 nm

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

处测得的 a_1 间、乙醇－丙酮浸提液在 665 和 649 nm 处测得 a_2/b_2 分别与在 663 和 645 nm 处测得的 a_3/b_3 和乙醇浸提液在 665 和 649 nm 处测得的 a_1/b_1 间、乙醇浸提液在 665 和 649 nm 处测得的 a_1+b_1 分别与乙醇－丙酮浸提液在两大吸收峰处测得的 a_2/b_2 和 a_3/b_3 间均差异显著（$P<0.05$）。因此，本研究结果与杨振德的试材相同，提取液不同，测定结果就不同的研究结果不完全一致。

本研究结果还表明，用紫外分光光度计比色时，叶绿素提取液浓度越低，吸光度读数越稳定；当浓度低于 0.681 $cm^2 \cdot mL^{-1}$（或 12.48 $mg \cdot mL^{-1}$）时，在 665、649 nm 波长下的吸光度读数与 663、645 nm 波长下的读数均趋于稳定。当叶绿素提取液浓度低于 0.80 $cm^2 \cdot mL^{-1}$ 时，A_{665}/A_{649} 和 A_{663}/A_{645} 比值与叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a/b 比值及叶绿素 a＋b 总量均表现出完全相似的平稳特征，说明 A_{665}/A_{649} 和 A_{663}/A_{645} 比值的稳定与准确测定叶绿素含量密切相关。

长期以来，人们测定植物叶片叶绿素含量时，通常以质量单位（g）或面积单位（cm^2）所含叶绿素多少（mg）来表示叶片叶绿素含量，由于不同物种叶片叶绿素含量不同，或相同物种不同叶片厚度不同，甚至同一叶片不同部位厚度不同，都会产生试验误差。以质量单位测定叶绿素含量，试验操作繁琐人为误差较大，以面积单位测定叶绿素含量，在叶片主脉两侧对应部位以面积单位取材，操作简便人为误差相对较小。采用面积单位测定不同枣树品种叶片叶绿素含量在枣树整个生长期具有一致的变化规律[20]，尤其用不同溶剂提取相同枣树品种叶片的叶绿素含量完全相同[21]。

参考文献 References：

[1] 关锦毅，郝再彬，张达.叶绿素提取与检测及生物学功效的研究进展.东北农业学报，2009，40(12)：130-134.
GUAN J Y，HAO Z B，ZHANG D.Advances in extraction and detection of chlorophyll and biological effects.Northeast Agricultural Journal，2009，40(12)：130-134.

[2] 许大全.叶绿素含量的测定及其应用中的几个问题.植物生理学通讯，2009，45(9)：896-898.
XU D Q.Determination of chlorophyll content and some problems in its application.Plant Physiology Communications，2009，45(9)：896-898.

[3] 舒展，张晓素，陈娟.叶绿素含量测定的简化.植物生理学通讯，2010，46(4)：399-402.
SHU Z，ZHANG X S，CHEN J.Simplification of chlorophyll content.Plant Physiology Communications，2010，46(4)：399-402.

[4] 张宪政.植物叶绿素含量测定：丙酮乙醇混合液法.辽宁农业科学，1986(3)：26-28.
ZHANG X Z.Determination of chlorophyll content in plants：Acetone and ethanol mixture method.Liaoning Agricultural Science，1986(3)：26-28.

[5] 张宪政.植物叶绿素含量测定方法比较研究.沈阳农学院学报，1985，26(4)：82-84.
ZHANG X Z.Comparative study on methods for measuring chlorophyll content in plants.Journal of Shenyang Agricultural College，1985，26(4)：82-84.

[6] 李合生.植物生理生化实验原理和技术.北京：高等教育出版社，2000：35-160.
LI H S.Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiment.Beijing：Higher Education Press，2000：35-160.

[7] 袁方，李鑫，余君萍.分光光度法测定叶绿素含量及其比值问题的探讨.植物生理学通讯，2009，45(1)：63-66.
YUAN F，LI X，YU J P.Discussion on the determination of chlorophyll content and its ratio by spectrophotometry.Plant Physiology Communications，2009，45(1)：63-66.

[8] 陈守建.分光光度法低浓度区域测定值的确定.环境监测管理与技术，1989，1(2)：13-16.
CHEN S J.Determination of low concentration areas by spectrophotometry.The Administration and Technique of Environmental Monitoring，1989，1(2)：13-16.

[9] 洪法水，魏正贵，赵贵文.菠菜叶绿素的浸提和协同萃取反应.应用化学，2001，7(18)：532-535.
HONG F S，WEI Z G，ZHAO G W.Soaking and synergistic extracting reaction of chlorophyll from spinach.Chinese Journal of Applied Chemistry，2001，7(18)：532-535.

[10] 卢建男，张琼，刘铁军，贾儒康，郭辉，刘金荣.不同改良剂对盐碱地土壤及草地早熟禾生长的影响.草业科学，2017，34(6)：1141-1148.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

LU J N,ZHANG Q,LIU T J,JIA R K,GUO H,LIU J R.Effect of soil conditioners on saline-alkali soil and growth of Kentucky bluegrass.Pratacultural Science,2017,34(6):1141-1148.

[11] **郑柳,贺雪莲,邱文敏,韩小娇,刘明英,何正权,卓仁英.镉处理后两种景天的光合相关参数变化.草业科学**,2017,34(5):1024-1031.

ZHENG L,HE X L,QIU W M,HAN X J,LIU M Y,HE Z Q,ZHUO R Y.Variation in photosynthesis related paraweters in two kinds of Sedum after cadmium treatment.Pratacultural Science,2017,34(5):1024-1031.

[12] **刘新星,罗俊杰.豌豆幼苗在盐胁迫下的生理生态响应.草业科学**,2010,27(7):88-93.

LIU X X,LUO J J.Eco-physiological responses of pea seedlings under salt stress.Pratacultural Science,2010,27(7):88-93.

[13] **何淼,王欢,徐鹏飞,刘长乐,周蕴薇.模拟复合盐碱胁迫对芒幼苗生理特性的影响.草业科学**,2016,33(7):1342-1352.

HE M,WANG H,XU P F,LIU C L,ZHOU Y W.Research on the physiological characteristics of *Miscanthus sinensis* seedlings under the treatments of complex saline-alkaloid stress.Pratacultural Science,2016,33(7):1342-1352.

[14] **张彦妮,雷蕾,夏斌.干旱胁迫及复水对黄连花幼苗生长和生理特性的影响.草业科学**,2016,33(9):1681-1689.

ZHANG Y N,LEI L,XIA B.Effects of drought stress and rewatering on seedling growth and physiological characteristics of *Lysimachia davurica*.Pratacultural Science,2016,33(9):1681-1689.

[15] **孙善军,邹长明,张晓红,赵敏,何涛.遮阴对两个绿豆品种光合作用和生长发育的影响.草业科学**,2014,34(6):1247-1254.

SUN S J,ZOU C M,ZHANG X H,ZHAO M,HE T.Effect of shading on photosynthesis and growth in two *Phaseolus aureus* varieties.Pratacultural Science,2017,34(6):1247-1254.

[16] **徐邦发,徐雅丽.棉花叶片的叶绿素含量测定.塔里木农垦大学学报**,1995,7(2):29-31.

XU B F,XU Y L.Determination of chlorophyll content in cotton leaves.Journal of Tarim University of Agricultural Reclamation,1915,7(2):29-31.

[17] **王碧霞,黎云祥.葎草幼苗对盐胁迫响应的性别差异.草业科学**,2017,34(7):1487-1495.

WANG B X,LI Y X.Gender differences of Humulus scandens seedlings in response to NaCl stress.Pratacultural Science,2017,34(7):1487-1495.

[18] **杨振德.分光光度法测定叶绿素含量的探讨.广西农业大学学报**,1996,15(2):145-150.

YANG Z D.Determination of chlorophyll content by spectrophotometry.Journal of Guangxi Agricultural University,1996,15(2):145-150.

[19] **刘彩云.提取方法、试剂对不同高等植物叶片叶绿素提取效果的比较分析.潍坊学院学报**,2014,14(2):74-76.

LIU C Y.Comparison of extraction methods and reagents for chlorophyll extraction from leaves of different plants.Journal of Weifang University,2014,14(2):74-76.

[20] **胡秉芬,黄华梨,赵晓芳,季元祖,张露荷,戚建莉,张广忠.甘肃沿黄灌区枣树叶片中叶绿素年变化规律研究.西北林学院学报**,2018,33(2):48-55.

HU B F,HUANG H L,ZHAO X F,JI Y Z,ZHANG L H,QI J L,ZHANG G Z.Study on the change of chlorophyll content of Jujube leaves in Gansu Yellow River irrigation area.Journal of Northwest University,2018,33(2):48-55.

[21] **胡秉芬,黄华梨,季元祖,赵晓芳,戚建莉,张露荷,张广忠.不同溶剂浸提枣树叶片叶绿素效果的研究.黑龙江农业科学**,2017(11):48-54.

HU B F,HUANG H L,JI Y Z,ZHAO X F,QI J L,ZHANG L H,ZHANG G Z.Effects of different solutions on chlorophyll extraction from Jujuba leaves.Heilongjiang Agrcultural Sciences,2017(11):48-54.

(责任编辑 张瑾)

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net