

烤烟叶片叶绿素提取及其稳定性研究

却志群

(宜春学院 生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000)

摘要: 为了探讨不同提取剂对烤烟叶片叶绿素提取效率的影响以及维持烤烟叶绿素稳定性的最佳条件,以烤烟叶片叶绿素提取量为衡量指标,研究了7种提取剂及其不同用量对烤烟叶片叶绿素提取效果的影响,并测定了叶绿素在不同光照时间、不同温度下的稳定性。结果表明:烤烟叶片叶绿素提取效果最好的方法是80%丙酮和95%乙醇混合液($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}=1:1$)浸提法,最佳提取时间约为18 h,最适的提取剂使用量为20 mL,最佳提取温度为60℃。

关键词: 烤烟; 叶绿素含量; 提取; 稳定性

中图分类号: S572 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)07-0047-04

Extraction and Stability of Chlorophyll in Flue-cured Tobacco

QUE Zhi-qun

(College of Life Sciences, Resources and Environment Sciences, Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract: To compare the extraction efficiency of different extracting liquids of chlorophyll in flue-cured tobacco and explore the best conditions of keeping chlorophyll stable, this experiment studied the influence of seven different extracting methods on chlorophyll concentration, and tested the stability of chlorophyll under different illumination time, temperature and solvent volume, taking the concentration of chlorophyll extract as index. The results showed that the extracting liquid mixed 1 volume of acetone with 1 volume of ethanol was the best solvent for extracting chlorophyll. And the optimum extraction conditions were as follows: the chlorophyll was extracted in 20 mL extraction reagent for 18 hours at 60℃.

Key words: flue-cure tobacco; concentration of chlorophyll; extraction; stability

叶绿素在光合作用中扮演着重要的角色,它是植物光合作用中光能吸收、传递、分配和转化等过程中的主要参与者,从某种意义上讲,植物叶绿素含量可以视为衡量植物生物量以及产量的重要生理指标之一^[1-5]。研究植物叶绿素的提取方法具有重要意义。当前,最常用的植物叶绿素提取方法是有机溶剂萃取法,包括 Arnon 法,丙酮浸提法,不同配比丙酮与乙醇混合液提取法,不同配比丙酮、乙醇和水的混合液浸提法等^[6-11]。然而,同一植物材料,采用不同叶绿素提取方法所获得的叶绿素含量存在较大

差异^[7],同时,不同植物材料的最适叶绿素提取方法也有所不同,而且浸提混合液各成分的浓度配比不同也会对叶绿素提取结果产生较大影响^[8-11]。由于天然叶绿素具有不溶于水,且遇热、光、酸、碱易分解等特点,所以在植物叶绿素提取过程中,有必要对不同处理条件下叶绿素的稳定性进行研究。鉴于此,以烤烟叶片为试验材料,分析不同提取剂对烤烟叶片叶绿素提取含量的影响以及不同光照时间及温度对烤烟叶片叶绿素稳定性的影响,探讨适合烤烟叶片叶绿素提取和维持叶绿素稳定的最适条件,以期

收稿日期: 2011-12-07

基金项目: 宜春学院校级课题(2011028)

作者简介: 却志群(1980-),女,湖北仙桃人,讲师,硕士,主要从事植物组织培养与遗传工程方面的研究。

E-mail: zhiquanque@163.com

为烤烟叶绿素的进一步研究提供参考数据。

1 材料和方法

1.1 试验材料和主要仪器

供试烤烟品种为 K326。

主要仪器:UV-8000 型紫外/可见分光光度计,由上海元析仪器有限公司生产;双列四孔式电热恒温水浴锅,由上虞市鑫达试验设备厂生产;BS224S 型电子天平,由德国赛多利斯公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 叶绿素提取方法 取烤烟中部幼嫩叶片,去除叶脉后剪碎,称取约 0.25 g,加入 5 mL 80% 丙酮,同时添加少许碳酸钙和石英砂,研成匀浆后过滤,即为叶绿素浓缩液。然后再加入不同的提取液 15 mL,浸泡叶片一段时间,最后用滤纸过滤到 25 mL 比色管中,同时滴洗研钵及滤纸至无绿色为止,定容至刻度,摇匀,即得叶绿素提取液^[12]。

1.2.2 提取剂的配比 提取剂选用 80% 的丙酮、95% 的乙醇、80% 丙酮和 95% 乙醇混合液(体积比分别为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3),共设计 7 个处理,每个处理重复 3 次。

1.2.3 叶绿素的测定方法 取待测液,分别在波长 663 nm、645 nm 处用 UV-8000 型紫外/可见分光光度计测定吸光度值,并按照 Arnon 公式计算叶绿素 a 和叶绿素 b 及叶绿素的总含量^[13]。其计算公式如下:

叶绿素 a 含量(mg/g) = $(12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}) \times V / (1\,000 \times W)$;

叶绿素 b 含量(mg/g) = $(22.7 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}) \times V / (1\,000 \times W)$;

叶绿素总含量(mg/g) = 叶绿素 a 含量 + 叶绿素 b 含量。

式中, A_{663} 、 A_{645} 分别为 663 nm、645 nm 波长下的光密度值, V 为提取液体积, W 为所取叶片质量。

1.2.4 不同光照时间和不同温度处理下叶绿素的稳定性试验 不同光照时间处理:用 25 mL 比色管量取 5 mL 叶绿素浓缩液,并用 95% 乙醇和 80% 丙酮混合液($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 1 : 1$)进行定容、摇匀,放在自然光条件下,从 2 h 开始,每隔 2 h 用紫外/可见分光光度计测定波长为 645 nm、663 nm 下的光密度值。

不同温度处理:用 25 mL 比色管移取 5 mL 叶绿素浓缩液,并用 95% 乙醇和 80% 丙酮混合液($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 1 : 1$)进行定容并摇匀,分别放在温度为 20、40、60、80、100 °C 的水浴中 30 min,而后测

定其叶绿素含量,重复 3 次。

1.2.5 提取剂不同用量选择试验 用 50 mL 比色管移取 5 mL 叶绿素浓缩液,分别加入 95% 乙醇和 80% 丙酮混合液($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 1 : 1$)10、15、20、25、30 mL,摇匀,放在自然光条件下浸提 18 h 左右,分别在波长为 645 nm、663 nm 下进行光密度值测定。

2 结果与分析

2.1 不同提取剂对烤烟叶片叶绿素提取量的影响

由表 1 可知,在烤烟叶片叶绿素的提取中,不同提取剂提取的叶绿素含量有较大差别。以 80% 丙酮和 95% 乙醇混合液($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 1 : 1$)作为提取剂时,叶绿素的提取量最高,可达 3.599 mg/g,且明显高于其他几种处理;用 95% 乙醇提取的叶绿素含量最低,仅为 2.666 mg/g。因此,在以下的试验分析中,均选取 80% 丙酮和 95% 乙醇混合液($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 1 : 1$)作为提取剂。

表 1 不同提取剂对叶绿素提取量的影响 mg/g

提取剂	叶绿素 a 含量	叶绿素 b 含量	叶绿素总含量
80% 丙酮	2.408	0.762	3.170
95% 乙醇	2.034	0.632	2.666
80% 丙酮和 95% 乙醇混合液 ($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 3 : 1$)	2.154	0.687	2.841
80% 丙酮和 95% 乙醇混合液 ($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 2 : 1$)	2.401	0.698	3.099
80% 丙酮和 95% 乙醇混合液 ($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 1 : 1$)	2.764	0.835	3.599
80% 丙酮和 95% 乙醇混合液 ($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 1 : 2$)	2.546	0.792	3.338
80% 丙酮和 95% 乙醇混合液 ($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 1 : 3$)	2.487	0.783	3.270

2.2 不同光照时间对烤烟叶片叶绿素稳定性的影响

为了分析不同光照时间对所提取烤烟叶片叶绿素稳定性的影响,从而确定叶绿素的最佳浸提时间,在室内自然光照条件下,从叶绿素提取后 2 h 开始,每隔 2 h 分别测定波长 645 nm、663 nm 下的光密度值,计算叶绿素含量。由图 1 可知,用 80% 丙酮和 95% 乙醇混合液($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{丙酮}} = 1 : 1$)浸提时,在 18 h 以内,烤烟叶片的叶绿素总提取量随着提取时间的延长而逐渐增加,当浸提 18 h 时,叶绿素含量达到最大,其值为 3.60 mg/g,18 h 后叶绿素含量达到比较稳定的状态,其值在 3.51~3.60 mg/g 变动。说明浸提叶绿素的最佳时间为 18 h,此时叶绿素的含量最高。

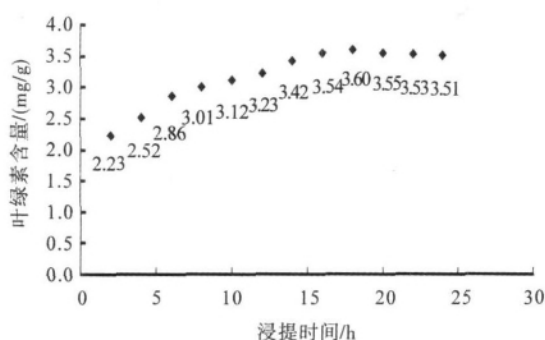


图 1 不同光照时间对烤烟叶片叶绿素提取量的影响

2.3 不同温度对烤烟叶片叶绿素稳定性的影响

从图 2 可以看出,提取温度对烤烟叶绿素的提取量有一定影响。当温度处于 20~60 °C 时,浸提 18 h,叶绿素含量随提取温度的升高而不断增加,并在 60 °C 时提取量达到最大值(叶绿素总含量达 3.728 mg/g);当温度继续上升,叶绿素的提取量则下降,当提取温度达到 100 °C 时,叶绿素总含量明显减少,含量为 3.323 mg/g,相比 60 °C 时的叶绿素提取总量,减幅达 10% 左右。

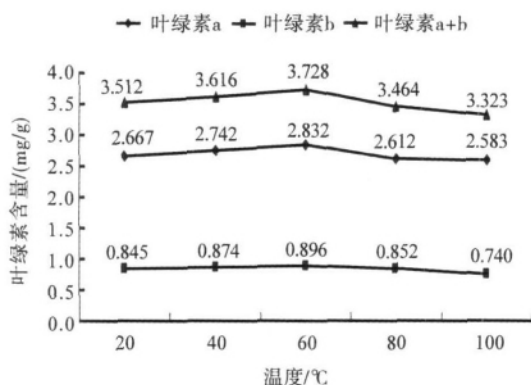


图 2 不同提取温度对烤烟叶片叶绿素提取量的影响

2.4 提取剂的不同用量对烤烟叶片叶绿素提取量的影响

由图 3 可知,当提取剂用量小于 20 mL 时,叶绿素 a、b 的提取量以及叶绿素提取总量均随提取剂用量的增加而增加,其中叶绿素 a、b 提取量的增幅

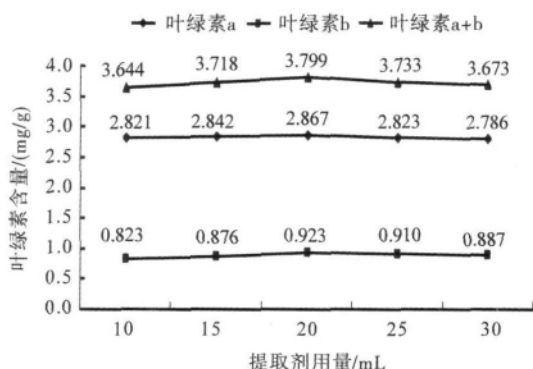


图 3 提取剂用量对烤烟叶片叶绿素提取量的影响

小于叶绿素提取总量的增幅;而当提取剂用量为 20 mL 时,叶绿素 a、b 和叶绿素总提取量均达到最大值,分别为 2.867、0.923、3.799 mg/g。当提取剂的用量超过 20 mL,叶绿素提取量则有所降低。

3 结论与讨论

通过对比分析不同提取剂浸提烤烟叶片中的叶绿素含量发现,用 80% 丙酮和 95% 乙醇混合液($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}=1:1$)提取叶绿素含量高于其他处理,为 3.599 mg/g;用 95% 乙醇提取时叶绿素含量最低,为 2.666 mg/g。这一研究结果与洪法水等^[10]的结果一致,说明丙酮与乙醇混合液对于叶绿素的提取产生协同效应,最好的提取效果是二者等体积混合。

在光照对烤烟叶片叶绿素稳定性的影响方面,用 80% 丙酮和 95% 乙醇混合液($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}=1:1$)浸提,随着时间的延长,叶绿素含量呈现增加的趋势,18 h 时叶绿素含量达到最大,18 h 后叶绿素含量基本保持稳定,变化不大。这与曾家豫等^[14]报道的叶绿素在长时间光照下会不断降解的结果有所不同,一方面可能是本试验浸提所用的时间还不够长,另一方面可能是因为烤烟 K326 与紫萁叶属于不同的植物门,二者的叶绿素在某些结构性质上可能有所不同造成的。

在温度对叶绿素稳定性的影响方面,随着温度的增加,叶绿素含量增加,60 °C 时提取量达到最大值;当温度继续上升,叶绿素的提取量则逐渐下降,这与李得孝等^[15]的研究结果一致。其原因可能有 2 个方面:一是随着温度升高叶绿素降解速度加快;二是高温使得叶绿素卟啉环结构中心的 Mg^{2+} 发生脱落,从而导致叶绿素脱色^[14]。

就提取剂 95% 乙醇和 80% 丙酮混合液(体积比为 1:1)的不同用量对烟叶叶绿素提取量的影响而言,本研究发现,当 95% 乙醇和 80% 丙酮混合液为 20 mL 时,叶绿素 a、b 的提取量以及叶绿素提取总量分别达到最大值,这可能是因为,该提取剂用量过小会导致叶绿素提取不完全,而用量过大又会使提取液中水的比例加大,从而降低了单位体积中叶绿素的含量^[16-17]。

综上所述,本研究确定烤烟叶绿素提取的较优条件为:提取液 80% 丙酮和 95% 乙醇混合液($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}=1:1$),提取时间约为 18 h 左右,该提取剂的最佳使用量为 20 mL,提取的最佳温度为 60 °C。

(下转第 53 页)

够明显改善移栽初期烟株的营养吸收状况,而且对烟株整个大田期的生长也具有重要影响,这可能是由于提苗肥促进了烟株早生快发,培育了壮苗,促进了烟株地上、地下部的正常发育,增强了烟株的抗逆能力。

本试验还表明,施用提苗肥调节了烟株大田生长期的碳氮代谢,使烟株的碳氮代谢平衡向着更加有利于形成优质烟叶的方向发展,2个提苗肥处理不仅明显改善了烟叶的内在化学成分,使烟叶化学成分更加协调,而且提高了烤后烟叶综合品质。

总体来看, T_1 处理(磷酸二氢钾 15 kg/hm^2 、硫酸铜 7.5 kg/hm^2 、硝铵磷 60 kg/hm^2 对水 $7\ 500\text{ kg/hm}^2$ 左右溶解,在移栽后 $5\sim 7\text{ d}$ 灌根施用)对烟株大田生长及烤后烟叶品质的影响优于 T_2 处理(硝铵磷 60 kg/hm^2 对水 $7\ 500\text{ kg/hm}^2$ 左右溶解,在移栽后 $5\sim 7\text{ d}$ 灌根施用),这可能是由于 T_1 处理不仅增施了提苗所需要的氮、磷、钾素营养,而且配施的硫酸铜对减轻移栽初期的病虫害也起到了一定的效果,更加有利于培育壮苗和促进烟株正常的生长发育。

参考文献:

- [1] 刘建军,符云鹏,张常兴,等.氮肥基追比对烤烟生长及产量和品质的影响[J].河南农业科学,2011,40(4):74-77.
- [2] 王家顺,赵承,陆引罡.生物有机无机复混肥对烤烟产

量和品质的影响[J].华北农学报,2009,24(B08):303-306.

- [3] 邱慧慧,史宏志,张国显,等.不同肥力水平对烤烟各部位烟叶中性香气成分含量的影响[J].河南农业大学学报,2010,44(3):259-260.
- [4] 郑宪滨,刘国顺,邢国强,等.分次施用钾肥对烤烟产量和品质的影响[J].河南农业大学学报,2007,41(2):138-141.
- [5] 胡国松,韩锦峰,穆琳.烤烟烟碱积累特点研究[J].福建烟草,1999(2):31-32.
- [6] 曹志洪,李仲林,周秀如,等.烤烟干物质的累积及土壤环境对烟碱含量的影响[J].烟草科技,1989(5):29-33.
- [7] 左天觉,朱尊权.烟草的生产、生理和生物化学[M].上海:远东出版社,1993.
- [8] 巨晓堂,晁逢春,李春俭,等.土壤后期供氮对烤烟产量和烟碱含量的影响[J].中国烟草学报,2003,9(B11):48-53.
- [9] 龙秋蓉,杨通隆.烤烟品质特征与生态条件和栽培条件关系的研究[J].天津农业科学,2010,16(4):99-101.
- [10] 鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2005.
- [11] 史宏志,韩锦峰,刘国顺,等.烤烟碳氮代谢与烟叶香吃味关系的研究[J].中国烟草学报,1998,4(2):56-74.
- [12] 饶学明.不同氮素形态配比对烤烟根系生长发育的影响[D].郑州:河南农业大学,2003.
- [13] 刘国顺.烟草栽培学[M].北京:中国农业出版社,2003.

(上接第49页)

参考文献:

- [1] 邓祥元,高坤,张丽娟.桑叶绿素光谱特征及其含量测定的初步研究[J].安徽农业科学,2010,38(31):17423-17424,17426.
- [2] 王晶,徐志英,盛云燕.低温对绿萝幼苗叶片氮素及叶绿素含量的影响[J].现代农业科技,2011(15):208-209.
- [3] 董建力,许兴,李树华,等.旱胁迫对不同春小麦叶绿素含量的影响及与抗旱性的关系[J].华北农学报,2011,26(3):120-123.
- [4] 朱延姝,于丽姣,樊金娟,等.玉米幼苗叶片叶绿素荧光参数变化规律研究[J].河南农业科学,2011,40(6):36-38,42.
- [5] 徐芬芬,叶利民,徐卫红,等.小白菜叶绿素含量的测定方法比较[J].北方园艺,2010(23):32-34.
- [6] 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.
- [7] 徐邦发,徐雅丽.棉花叶片的叶绿素含量测定[J].塔里木农垦大学学报,1995,7(2):29-31.

- [8] 陈明福,称顺伟.混合液法测定叶绿素含量的研究[J].林业科技通讯,1984(2):4-8.
- [9] 刘绚霞,董振生,刘创社,等.油菜叶绿素提取方法研究[J].中国农学通报,2004,20(4):62-63.
- [10] 洪法水,魏正贵,赵贵文.菠菜叶绿素的浸提和协同萃取反应[J].应用化学,2001,8(7):532-535.
- [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] 朱广廉,钟诲文,张爱琴.植物生理学试验[M].北京:北京大学出版社,1990.
- [13] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts phenoloxidases in beta vulgaris[J]. Plant Physiol, 1949,24:1-15.
- [14] 曾家豫,杨国兵,张继,等.紫萁叶绿素稳定性的研究[J].食品工业科技,2008,29(1):241-244.
- [15] 李得孝,郭月霞,员海燕,等.玉米叶绿素含量测定方法研究[J].中国农学通报,2005,25(6):153-155.
- [16] 谌素华,王维,蔡清.绿藻石莼叶绿素提取工艺的研究[J].食品科技,2008(2):172-175.
- [17] 刘玲玲.仙人掌叶绿素的提取及叶绿素铜钠盐的制备工艺研究[J].食品工业科技,2009(6):240-242.