

## 提取测定大型海藻叶绿素 a 的新方法\*

## A NEW METHOD FOR DETERMINATION OF CHLOROPHYLL A CONCENTRATION IN MACROALGAE

于志刚 张 经 张耀红 刘素美

(青岛海洋大学 266003)

\* 提取测定海水中浮游植物的叶绿素,目前广泛应用的方法是将样品用 90% 丙酮研磨提取或在 4℃ 冰箱中放置过夜以浸泡提取,提取液用分光光度法测定,用 Jeffrey 和 Humphrey 公式计算<sup>[2]</sup>。但该方法需要研磨,因而费时费力,精密度也较差。Moran 和 Porath<sup>[3]</sup>, Suzuki 和 Ishimaru<sup>[4]</sup>等报道用 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 提取测定海洋浮游植物中的叶绿素 a; 焦念志<sup>[1]</sup>介绍了该方法并进行了实验对比。用 DMF 提取测定海洋浮游植物中叶绿素 a 的主要优点是可直接将滤膜置于 DMF 中浸提,样品不需研磨,提取时间短,溶剂挥发损失小,且 DMF 提取液与 90% 丙酮提取液的吸收光谱相似,最大吸收峰处的摩尔消光系数近乎相等(相差在 3% 以内),因此可直接用 Jeffrey 和 Humphrey 公式计算<sup>[1, 3-4]</sup>。本文将 DMF 用于大型海藻叶绿素 a 的测定,并与丙酮法进行了比较,结果令人满意。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

大型海藻取自青岛太平角潮间带,样品取回后以蒸馏水清洗干净,用吸水纸吸干水分。为保证样品均匀性,海藻均剪成约 0.5 cm × 0.5 cm 大小的小片,用镊子随机取样,在 Sartoris 电子天平上准确称取一定量样品,待测。

## 1.2 仪器与试剂

岛津-160A 型紫外-可见分光光度计; 750 型紫外-可见分光光度计丙酮; N, N-二甲基甲酰胺; MgCO<sub>3</sub>; 石英砂均为分析纯。

## 1.3 实验方法

1.3.1 丙酮提取法 将样品置玛瑙研钵中,加少许石英砂和 MgCO<sub>3</sub>,用约 5 ml 90% 丙酮在暗处冰浴中研磨提取。研磨所得匀浆转移到 10 ml 离心试管中离心,上清液转入 25 ml 比色管中;残渣继续提取 2

~ 3 次直至无绿色。提取液用 90% 丙酮定容到刻度,以 90% 丙酮为参比液,测定 664, 647 和 630 nm 处的消光值 E, 用 Jeffrey 和 Humphrey 公式计算叶绿素 a 含量:

对绿藻:

$$\text{叶绿素 a}(\mu\text{g/ml}) = 11.93 E_{664} - 1.93 E_{647} \quad (1)$$

对褐藻:

$$\text{叶绿素 a}(\mu\text{g/ml}) = 11.47 E_{664} - 0.40 E_{630} \quad (2)$$

对红藻,尚无专门计算公式,这里借用计算混合浮游植物叶绿素 a 含量的公式:

$$\begin{aligned} \text{叶绿素 a}(\mu\text{g/ml}) \\ = 11.85 E_{664} - 1.54 E_{647} - 0.08 E_{630} \quad (3) \end{aligned}$$

1.3.2 DMF 提取法 将样品置于装有 25 ml DMF 溶液的比色管中,暗处放置 2 h 后摇匀,倾出上清液,按上述同样方法测定并计算。

## 2 结果与讨论

## 2.1 用 DMF 浸提大型海藻中的叶绿素

测定了孔石莼、角叉藻、蜈蚣藻、海带、裙带菜、江蓠、鼠尾藻、刺松藻等 12 种青岛常见海藻中的叶绿素 a。每种海藻一式 3 份,重量相同,其中一份用 90% 丙酮研磨提取后测定 664 nm 处消光值 E<sub>664</sub>,另二份分别置于含有 25 ml DMF 和 90% 丙酮的比色管中,摇匀,置暗处,在不同时间测定溶液在 664 nm 处的消光值,以比较 90% 丙酮和 DMF 浸提大型海藻叶绿素 a 的效果。

结果表明,除刺松藻外,其他海藻在 DMF 中均迅速被浸出叶绿素,藻体迅速变为白色(绿藻)、浅红或棕色(红、褐藻),664 nm 消光值 1~2 h 后即达到 90% 丙酮研磨提取液的吸光值;但在 90% 丙酮中海藻被浸出叶绿素的速度十分缓慢,经 24 h 也难以将叶绿素浸

\* 国家自然科学基金资助项目 49206064 号。  
收稿日期:1996 年 7 月 3 日

提完全。图 1 为孔石莼的实验结果, 90 % 丙酮研磨提取液的消光值为 0.601。上述实验结果表明, 用 DMF 提取大型海藻的叶绿素一般只要在暗处浸提 2 h 即可提取完全, 无需研磨; 但刺松藻需稍加研磨。

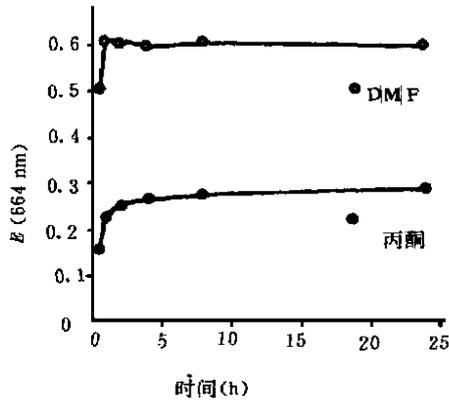


图 1 用 DMF 和丙酮浸提孔石莼中叶绿素 a 的提取效率比较

## 2.2 DMF 和 90 % 丙酮叶绿素提取液摩尔消光系数的比较

Stauffer<sup>[5]</sup>和 Moran<sup>[2]</sup>等报道, 用 DMF 从海洋浮游植物中提取的叶绿素溶液, 其在 664 nm 处的摩尔消光系数与同浓度的 90 % 丙酮提取液的几乎相同(相差小于 3%), 因而可直接用 Jeffrey 和 Humphrey 公式计算。作者用孔石莼(绿藻)、金膜藻(红藻)和海黍子(褐藻)作为实验材料, 测定了含相同浓度叶绿素的 DMF 提取液和 90 % 丙酮提取液在 664 nm 处消光值的比值  $E_{DMF}^{664}/E_{丙酮}^{664}$ , 结果分别为 1.03, 0.98 和 1.02, 也证实了这一点, 表明 Jeffrey 和 Humphrey 的

用于 90 % 丙酮提取液的计算公式确可直接用于 DMF 提取液。

表 1 两种方法的比较(表中数据为 2 份或 3 份测定结果平均值±标准偏差)

海藻种类	叶绿素含量( $\times 10^{-3}$ )		两种方法 相对偏差(%)
	90 % 丙酮研磨法	DMF 浸提法	
孔石莼	1.63±0.35	1.69±0.25	3.6
缘管浒苔	1.64±0.06	1.66±0.03	1.2
裙带菜	0.52±0.10	0.54±0.01	3.8
海黍子	1.71±0.08	1.72±0.09	0.6
角叉藻	0.40±0.05	0.44±0.03	9.5
蜈蚣藻	0.48±0.03	0.52±0.01	8.0

注: 含量均为鲜重。

## 2.3 两种方法的比较

对孔石莼等 6 种青岛常见海藻, 用 90 % 丙酮提取法和本文提出的 DMF 浸提法进行了测定, 并用 Jeffrey 和 Humphrey 公式计算叶绿素 a 含量, 结果如表 1。可见两种方法比较一致, DMF 测定值略高, 可能是 DMF 提取比较完全。从表 1 还可看到, DMF 法的精密程度一般也优于丙酮法。

## 参考文献

- [1] 焦念志, 1994. 海洋科学 3: 20.
- [2] Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F., 1975. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191-194.
- [3] Moran, R. and Porath, D., 1980. *Plant. Physiol.* 65: 478-479.
- [4] Suzuki, R. and Ishimaru, T., 1990. *J. Oceanogr. Soc.* 46(4): 190-194.
- [5] Stauffer, R. E., Lee, G. F. and Armstrong, D. E., 1979. *J. Fish. Res. Board. Can.* 36: 152-157.