

银杏叶叶绿素荧光特性及其含量测定研究

王卓渊¹, 林香凤² (1. 省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室, 广西师范大学, 广西桂林 541004; 2. 广西师范大学环境与资源学院, 广西桂林 541004)

摘要 [目的]研究银杏叶叶绿素的荧光特征及其含量的变化规律。[方法]以新鲜银杏叶为材料, 采用混合有机溶剂进行萃取, 并用分光光度法对银杏叶叶绿素的含量进行测定, 通过比较不同月份银杏叶叶绿素的含量, 得到叶绿素含量的变化规律, 同时研究银杏叶叶绿素的特征荧光发射峰和磷光寿命。[结果]银杏叶叶绿素有2个特征荧光发射峰, 分别位于691和718 nm处, 在2个发射峰处的磷光寿命分别为8.61和8.21 μs; 在不同月份的银杏叶中, 叶绿素含量从大到小依次为7月、4月、11月, 但叶绿素a/b比值从大到小依次为4月、11月、7月。[结论]该研究为银杏叶叶绿素的进一步研究提供参考。

关键词 银杏叶; 叶绿素; 荧光特征; 含量测定; 分光光度法

中图分类号 S792.95; R282 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)31-0134-03

Study on Fluorescence Characteristics and Content of Chlorophyll in Ginkgo Leaves

WANG Zhuo-yuan¹, LIN Xiang-feng² (1. State Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004; 2. College of Environment and Resources, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract [Objective] The research aimed to study fluorescence characteristics and content variance of chlorophyll in ginkgo leaves. [Method] Fresh ginkgo leaves were used as raw material, chlorophyll was extracted by mixed organic solvent and its content was measured with spectrophotometry. Chlorophyll contents in ginkgo leaves in different months were compared to obtain variance of chlorophyll content, and characteristic fluorescence peaks and phosphorescence lifetimes of chlorophyll were studied. [Result] The chlorophyll of ginkgo leaves had two characteristic fluorescence peaks and they were located at 691 nm and 718 nm, and the phosphorescence lifetimes of chlorophyll of ginkgo leaves were 8.61 and 8.21 μs at two emission peaks respectively. The chlorophyll content in ginkgo leaves in July was the highest, and that in April ranked the second, and that in November was the lowest. However, the order of chlorophyll a/b value in different months was April > November > July. [Conclusion] This study provides guidance for further research of chlorophyll in ginkgo leaves.

Key words Ginkgo leaves; Chlorophyll; Fluorescence characteristics; Content determination; Spectrophotometry

叶绿素是植物叶片中重要的活性物质, 在植物生长发育过程的光合作用中起着关键的作用, 直接参与光能的吸收、传递和转化等过程。植物叶片中叶绿素a、b的含量和叶绿素总含量与叶片净光合速率有直接关系^[1-2], 叶绿素含量与作物的产量呈正相关^[3-4], 通过选择高叶绿素含量的作物品种, 就可能成为提高作物产量的探索方法。

与叶绿素光合作用密切相关的是叶绿素荧光性质, 它是植物吸收光能的传递、分配和转化的另一种途径, 叶绿素光合作用和叶绿素荧光都需要光的能量。叶绿素的荧光性质与叶绿素的含量密切相关^[5], 叶绿素的荧光参数可以用于表征植物对光能的利用效率^[6]。药理研究表明, 植物叶绿素及其衍生物具有抗菌消炎功能, 可用于治疗口腔溃疡^[7]; 具有抗突变和抗癌等活性^[8], 广泛应用于医药和医疗中, 日益受到人们的重视。笔者采用混合有机溶剂, 萃取了银杏叶中叶绿素, 并利用分光光度法测定银杏叶中叶绿素的含量, 分析了不同月份银杏叶中叶绿素含量的变化规律, 同时研究了银杏叶中叶绿素的特征荧光发射峰和磷光寿命, 为银杏叶叶绿素的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料。银杏叶采自桂林市育才路广西师范大学校园内, 生长期为3年以上, 采样时间为4—11月, 所采集的银杏叶是当时银杏树下部相对最成熟的叶片。

作者简介 王卓渊(1975—), 男, 广东梅州人, 高级实验师, 从事药物研究。

收稿日期 2017-09-13

1.1.2 主要仪器。法国Jobin Yvon Fluorolog-3时间分辨荧光光谱仪, 上海佑科721可见分光光度计。

1.1.3 主要试剂。所用丙酮和无水乙醇均为分析纯, 试验用水为蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 叶绿素的提取及含量测定方法。将采集的新鲜银杏叶洗净, 用滤纸吸干, 去掉叶梗, 剪碎。采用万分之一天平, 准确称取样品0.1000 g左右, 放入比色管中, 加入10 mL体积比为1:2的丙酮与无水乙醇混合溶剂, 在室温下避光浸泡24 h, 将提取溶液过滤。准确移取滤液, 置于光径为1.0 cm的比色皿中, 以丙酮与无水乙醇混合溶剂为参比, 在可见分光光度计中测定吸光度, 再根据提取溶液在645和663 nm处的吸光度, 由Amon公式^[9]计算叶绿素a和叶绿素b的含量:

$$C_a (\text{mg/g}) = (12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}) \times V / (1000W)$$

$$C_b (\text{mg/g}) = (22.7 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}) \times V / (1000W)$$

$$C_{\Sigma} (\text{mg/g}) = C_a + C_b$$

式中, A_{645} 和 A_{663} 分别为波长在645和663 nm处的吸光度值, C_a 和 C_b 分别为叶绿素a和叶绿素b的含量, C_{Σ} 为叶绿素的总含量, V 为提取溶液的体积, W 为叶片样品的质量。

1.2.2 叶绿素荧光光谱测定方法。将银杏叶叶绿素提取溶液置于荧光比色皿中, 采用时间分辨荧光光谱仪, 测定提取溶液中叶绿素的荧光激发谱, 再以荧光激发谱中各个激发峰所处波长为激发波长, 测定叶绿素的荧光发射谱。

1.2.3 叶绿素磷光寿命测定方法。采用时间分辨荧光光谱仪, 按照荧光发射峰所对应的激发波长和发射波长, 设置激发单色仪的波长和发射单色仪的波长, 测定提取溶液中银杏

叶绿素的磷光衰减曲线,再以单指数函数进行拟合计算,求得叶绿素的磷光寿命。

2 结果与分析

2.1 银杏叶叶绿素的吸收光谱特征 采用 Origin 7.0 软件,处理银杏叶叶绿素提取溶液的吸光度数据,得到银杏叶叶绿素的吸收光谱,如图 1 所示。从图 1 可看出,在蓝紫光区的 400 ~ 460 nm 和红光光区的 640 ~ 680 nm,银杏叶叶绿素有 2 个强吸收谱带,吸收峰分别位于 431 和 661 nm 处,与桑叶叶绿素的吸收光谱^[10]非常相似。

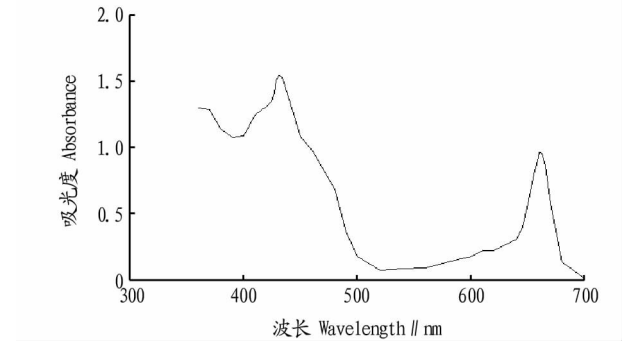


图 1 叶绿素的吸收光谱
Fig. 1 Absorption spectrum of chlorophyll

2.2 不同月份银杏叶中叶绿素含量的变化 银杏是落叶植物,在不同的月份,因温度和所受光照强度不同,银杏叶片的发育成熟程度不同,其中叶绿素的含量也有所不同,测定结果见表 1。从表 1 可看到,7 月份银杏叶中叶绿素的含量最高,但叶绿素 a/b 的比值最低,为 2.03;4 月份银杏叶中叶绿素的含量稍低,叶绿素 a/b 的比值最高,为 2.32;11 月份银杏叶中叶绿素的含量最低,叶绿素 a/b 的比值居中,为 2.15。显然,与 4 月份的银杏叶相比,7 月份的银杏叶发育更加成熟完善,具有较高的叶绿素含量和较低的叶绿素 a/b 比值,这是曾经引起人们关注的问题^[2],主要是由于叶绿素 b 的含量很低,它的微小变化更容易调节叶绿素 a 与叶绿素 b 的比例关系,在改变叶绿素 a/b 比值时起着关键的作用。

表 1 银杏叶叶绿素的含量				
Table 1	Chlorophyll contents in ginkgo leaves			
采样月份 Sampling month	C_a mg/g	C_b mg/g	$C_{总}$ mg/g	C_a/C_b
4	2.09	0.90	2.99	2.32
7	2.60	1.28	3.88	2.03
11	0.56	0.26	0.82	2.15

2.3 银杏叶叶绿素的荧光光谱 从图 2 可看出,在可见光区有 2 个激发谱带与图 1 的吸收谱带相对应。银杏叶叶绿素的特征荧光激发峰位于 524、544 和 687 nm 处,以各个激发峰所处波长为激发波长,测定荧光发射谱,所得的荧光发射谱均有 2 个特征荧光发射峰,而且发射峰的位置相同,如图 3 所示。

由图 3 可知,银杏叶叶绿素的特征荧光发射峰在红光波段位于 691 nm 处,在远红光波段位于 718 nm 处。银杏叶叶绿素的荧光发射谱与桑叶叶绿素的荧光发射谱^[10]很相似,

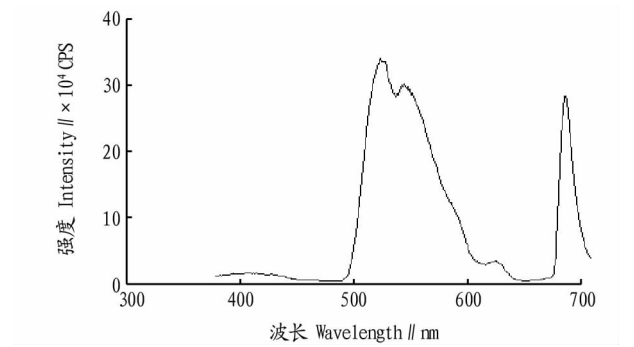


图 2 叶绿素的荧光激发谱
Fig. 2 Fluorescence excitation spectrum of chlorophyll
是典型的高等植物叶绿素的荧光发射谱。

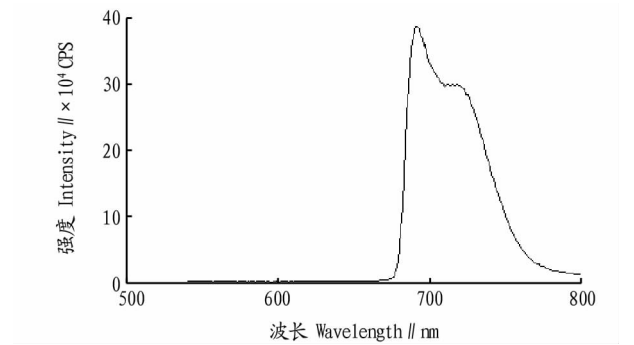


图 3 叶绿素的荧光发射谱
Fig. 3 Fluorescence emission spectrum of chlorophyll

2.4 银杏叶叶绿素的磷光寿命 在银杏叶叶绿素的 691 和 718 nm 2 个发射峰处,分别测得银杏叶叶绿素的磷光衰减曲线,结果发现(图 4),2 条衰减曲线相互交错,几乎重叠。采用单指数函数进行拟合,当拟合参数 R^2 为 0.902 2 时,求得银杏叶叶绿素在 691 nm 峰处的磷光寿命为 8.61 μs ;当 R^2 为 0.913 2 时,得到银杏叶叶绿素在 718 nm 峰处的磷光寿命为 8.21 μs ,二者非常相近。

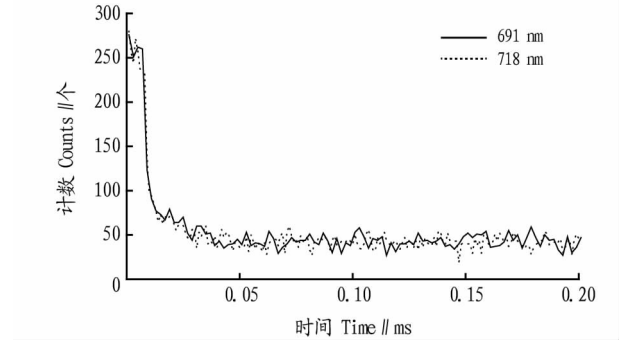


图 4 叶绿素的磷光衰减曲线
Fig. 4 Fluorescence decay curves of chlorophyll

3 结论与讨论

对叶绿素含量进行准确测定是植物生理学研究的重要内容,叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量及叶绿素总含量的多少直接影响净光合速率的大小,叶绿素 a/b 比值也能在一定程度上反映光合速率,作物具有较高的光合速率,就可能有较高的产量,叶绿素的含量与作物的产量呈正相关。另外,叶绿素的荧光性质与叶绿素含量密切相关,叶绿素的荧光参数

反映植物光合机构内部变化和生理调节能力,可用于表征植物对光能的利用效率。

该研究结果表明,以丙酮和无水乙醇混合溶剂,可成功提取银杏叶叶绿素,采用分光光度法测定和 Amon 公式计算,得到银杏叶中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量。在不同月份中,7 月份银杏叶中叶绿素的含量最高,但叶绿素 a/b 的比值却最低,而 4 月份银杏叶中叶绿素的含量较低和叶绿素 a/b 的比值最高,这可能与银杏叶发育成熟程度的变化有关。银杏叶叶绿素具有 2 个特征荧光发射峰,分别位于 691 和 718 nm 处,它是良好的红色荧光材料。银杏叶叶绿素在 2 个发射峰处的磷光寿命分别为 8.61 和 8.21 μs ,它具有良好的磷光性质。

参考文献

[1] 金孝芳,贾尚智,石亚亚,等.不同绿茶品种(系)光合特性及叶绿素含

量的比较研究[J].西南农业学报,2013,26(2):520-523.

- [2] 孟军,陈温福,徐正进,等.水稻剑叶净光合速率与叶绿素含量的研究初报[J].沈阳农业大学学报,2001,32(4):247-249.
- [3] 刘红艳,赵应忠.芝麻花期叶绿素含量变化及其与产量性状的相关分析[J].中国油料作物学报,2007,29(3):443-447.
- [4] 王继安,宁海龙,罗秋香,等.大豆品种间叶绿素含量、RUBP 活性、希尔反应活力及其与产量间的关系[J].东北农业大学学报,2004,35(2):129-134.
- [5] 赖善聪,余志媛,石零珊,等.杉木幼苗不同叶位叶绿素含量及荧光特性差异[J].莆田学院学报,2015,22(5):28-31.
- [6] 马帅鹏,庞振才,李静,等.菠萝不同品种叶片叶绿素含量和荧光特性[J].江苏农业科学,2015,43(6):175-176.
- [7] 李丽贤,陈新,崔健,等.叶绿素口腔溃疡膜的制备与应用[J].长春中医药大学学报,2004,20(4):41.
- [8] 柳新平,王新明,周开文,等.叶绿素在肿瘤防治中的应用研究进展[J].中国肿瘤临床与康复,2007,14(3):269-271.
- [9] 于相丽,胡秋变,黄宇.牡丹叶叶绿素的提取及其性质研究[J].洛阳师范学院学报,2005,24(5):107-109.
- [10] 王卓渊,林香凤.桑叶叶绿素的提取及其荧光性质[J].化工技术与开发,2016,45(10):27-29.

(上接第 131 页)

3.4 四级地 主要分布于牟定县安乐乡、凤屯镇、共和镇、江坡镇、蟠猫乡、新桥镇、戊街乡 7 个乡镇。其中,江坡镇 1 107.06 hm^2 ,占一级地 23.34%。土壤质地主要为中壤、砂壤、和轻壤;剖面构型主要是 A-B-C,占四级地面积的 56.81%,年平均气温 16~18 $^{\circ}\text{C}$ 的面积占 16.84%; $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 有效积温时数 4 000~5 000 h 的面积占 80.96%,年降雨量均在 1 100~1 200 mm。土壤 pH 为 6.56,全氮 1.64 g/kg,有机质 32.26 g/kg,碱解氮 143.75 g/kg,有效磷 14.70 mg/kg,速效钾 105.11 mg/kg,交换性镁 276.07 mg/kg,有效硫 77.97 mg/kg,有效锰 52.33 mg/kg,有效锌 1.88 mg/kg,水溶态硼 0.45 mg/kg。四级土壤肥力中等,水、肥、气、热基本协调,宜种作物广,可耕性一般;但多数土壤缺硼,部分土壤缺钾,部分土壤酸化。该级耕地土壤可通过坡改梯、提高土壤保水保肥能力、种植绿肥、增施有机肥提高土壤肥力;坚持用地、养地相结合,在开展测土配方施肥的基础上,注意施用微量元素硼肥,适当施用生理碱性肥料,提高作物产量。

3.5 五级地 主要分布于牟定县安乐乡、凤屯镇、共和镇、江坡镇、蟠猫乡、新桥镇、戊街乡 7 个乡镇。其中新桥镇 1 153.54 hm^2 ,占五级地 27.86%。主要土种有红紫泥土、紫泥土、棕紫泥土、红紫砂土;耕层厚度 20~25 cm 的占五级地面积的 66.36%;土壤质地主要为中壤和轻壤;剖面构型主要是 A-B-C 和 A-B,分别占五级地面积的 82.95%、12.94%,年平均气温 14~18 $^{\circ}\text{C}$ 的面积占 98.17%; $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 有效积温时数 4 000~5 000 h 的面积占 80.18%,5 000~6 000 h 的面积占 11.66%;年降雨量均在 1 100~1 200 mm。土壤 pH 为 6.69,全氮 1.66 g/kg,有机质 31.92 g/kg,碱解氮 144.26 g/kg,有效磷 15.29 mg/kg,速效钾 116.19 mg/kg,交换性镁 284.43 mg/kg,有效硫 85.77 mg/kg,有效锰 52.00 mg/kg,有效锌 2.02 mg/kg,水溶态硼 0.46 mg/kg。五级土壤肥力较差,宜种作物广,产量不稳定,可耕性较差,土地利用受到限制。多数土壤缺硼,部分土壤缺磷、钾、氮,部分土壤酸化。该级耕地土壤可采取坡改梯、提高土壤保水保

肥能力、种植绿肥、增施有机肥等措施;坚持用地、养地相结合,在开展测土配方施肥的基础上,注意施用微量元素硼肥,适当施用生理碱性肥料,提高作物产量。

3.6 六级地 主要分布于牟定县安乐乡、凤屯镇、共和镇、江坡镇、蟠猫乡、新桥镇、戊街乡 7 个乡镇。其中,新桥镇 1 105.34 hm^2 ,占六级地 31.21%。主要土种红紫泥土、紫泥土、棕紫泥土、紫砂泥田;耕层厚度 20~25 cm 的占六级地面积的 56.32%;土壤质地主要为中壤、砂土和轻壤;剖面构型主要是 A-B-C,占六级地面积的 92.22%,年平均气温 14~18 $^{\circ}\text{C}$ 的面积占 96.79%; $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 有效积温时数 4 000~5 000 h 的面积占 82.87%,5 000~6 000 h 的面积占 9.33%;年降雨量均在 1 100~1 200 mm。土壤 pH 为 6.84,全氮 1.58 g/kg,有机质 30.01 g/kg,碱解氮 135.53 g/kg,有效磷 14.53 mg/kg,速效钾 109.33 mg/kg,交换性镁 285.37 mg/kg,有效硫 82.24 mg/kg,有效锰 48.87 mg/kg,有效锌 1.89 mg/kg,水溶态硼 0.43 mg/kg。六级土壤肥力较差,农业生产受到很大限制,对农作物选择性较强,宜发展经济林果。多数土壤缺硼,部分土壤缺磷、钾、氮、硫,部分土壤酸化。该级耕地土壤可采取坡改梯、提高土壤保水保肥能力、种植绿肥、增施有机肥等措施;坚持用地、养地相结合,培肥和熟化土壤,在开展测土配方施肥的基础上,注意施用微量元素硼肥,适当施用生理碱性肥料,提高作物产量。

参考文献

- [1] 楚雄州土壤普查办公室,牟定县土壤普查办公室.牟定土壤(内部资料)[Z].1996.
- [2] 全国农业技术推广服务中心.耕地地力调查与质量评价技术培训教材[Z].2005.
- [3] 田有国,辛景树,栗铁申.耕地地力评价指南[M].北京:中国农业科学技术出版社,2006.
- [3] 王蓉芳,曹富友,彭世琪,等.全国耕地类型、耕地地力等级划分:NY/T 309—1996[S].北京:中国标准出版社,1997.
- [4] 张炳宁,彭世琪,张月平.县域耕地资源管理信息系统数据字典[M].2版.北京:中国农业出版社,2008.
- [5] 刘念祖,陆景陵.土壤肥科学:上、下[M].北京:中央广播电视大学出版社,1990.
- [6] 楚雄彝族自治州土壤普查办公室.楚雄彝族自治州土壤(内部资料)[Z].1986.
- [7] 唐启义,冯明光.实用统计分析及计算机处理平台[M].北京:中国农业大学出版社,1990.