

葉綠素的萃取及測定方法之比較

郭孟斯⁽¹⁾ 許博行⁽²⁾

【摘要】以 80%丙酮、DMF、DMSO 等三種溶劑萃取菠菜葉中葉綠素後，分別於黑暗及光照下置放不同時間即 (a) 黑暗下一立刻、一天、三天、七天 (b) 光照下一立刻、4hr、12hr、24hr、72hr；另於同樣黑暗及光照下，設定不同溫度儲存條件 (5 °C、15 °C、28 °C)，分別測定葉綠素衰降變化，以比較不同萃取溶劑對葉綠素的影響。經測試結果可發現，以 DMSO 為溶劑之萃取液，經萃取出之葉綠素含量置於不同環境條件下最為穩定。

【關鍵詞】葉綠素、萃取液、80%丙酮、DMF、DMSO。

Compartion of the methods for extraction and determination of chlorophyll from spinach leaf tissue

Meng-Sy Guo⁽¹⁾ Bor-Hung Sheu⁽²⁾

【 Abstract 】 Chlorophylls extracted by three kinds of solvent, acetone(80%), DMF(99%), and DMSO(99%) respectively from spinach leaf tissue are measured under different storage conditions. Chlorophyll that extracted by DMSO solvent can maint in the concentration for the longest period of time, no matter what it storage in light or in dark environments, comparing with that extracted by DMF or acetone solvent. From the results of this study, we recommend that use DMSO as the solvent for extracting chlorophyll is the best method.

【 key words 】 chlorophyll, extract, 80%acetone, DMF, DMSO

一、前言：

光合作用是植物重要生理機能，光合作用能力的大小經常是光合色素中用於判別植物活性及生理狀況的一種指標。而光合作用主要是以光合色素捕捉光能以進行光反應，因此光合色素的含量又是影響光合作用能力大小的重要因素。養分的獲得及環境之因素如（乾燥、鹽分、冷熱等）都會影響葉綠素的含量（Palta, 1990），因此在測定植物受環境逆壓（stress）影響大小時，葉綠素的定量亦為常用之方法。由於葉綠素是主要捕捉光能的色素，因此葉綠

(1) 國立中興大學森林研究所研究生。
Graduate, Department of Forestry, NCHU.

(2) 國立中興大學森林學系教授。
Professor, Department of Forestry, NCHU

素含量的測定經常被用於判別影響植物生理機能的因素之一。

葉綠素含量的測定自從 1941 年 Mackinney 提出以 80%丙酮萃取方法而經 1949 年 Arnon 修飾後，丙酮的萃取方法即一直被用為葉綠素的萃取及分析方法，但其缺點是在光照及高溫下會降低並迅速破壞葉綠素而影響測值。Inskip and Bloom (1985) 發展出以 DMF (N,N-methylformamide) 為萃取液以測定葉綠素，其結果被認為比丙酮理想，原因是萃取後的葉綠素在光照下較丙酮萃取者較穩定。最近 Barne 等 (1992) 另提出以 DMSO (dimethylsulphoxide) 為萃取液之測定方法，DMSO 是一種可以由藻類及一般高等植物中萃取葉綠素之有機溶劑，此種溶劑對於葉綠素可形成保護作用，使葉綠素不受外界光線干擾，且其萃取液在冷藏一星期後，對於葉綠素 a 及葉綠素 b 之含量也較不會有太顯著的影響 (Barne *et al.*, 1992)。

本實驗的目的即以菠菜為材料，比較三種方法在萃取後，葉綠素的衰降情形，以供為葉綠素萃取方法的參考。

二、材料與方法

(一) 材料

- 1、材料為選用常用於葉綠素測定之菠菜，測定用菠菜是當天購買自市場，且用為互相比較萃取結果之材料係選自同一植株。
- 2、萃取液分別採用 80%丙酮、DMF (N,N-methylformamide) 原液 99%及 DMSO (dimethylsulphoxide) 原液 99%。

(二) 方法

- 1、葉綠素的萃取：取菠菜葉片 0.2g，放於研鉢內加少許海砂及液態氮，經分別加上述三種萃取液 10ml 再研磨均勻，過濾後即為待測之樣品，再以下列置放處理求出其葉綠素含量：

黑暗下 (用錫箔紙包裹)：a. 立刻 b. 一天 c. 三天 d. 一星期；並分別於 5℃、15℃、常溫(28℃)下存放。

光照下 (日光燈管 $7.0 \mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$)：a. 立刻 b. 4hr c. 12hr d. 24hr e. 72hr。亦分別於 5℃、常溫(28℃)存放。

(共 $4 \times 3 + 5 \times 2$ 個處理，每個處理 5 個重複)

2、葉綠素含量之計算：

(1) 80%丙酮萃取法： $\text{Chl. a+b} = (20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}) \times (V/1000W)$ (Arnon, 1949)

(2) DMF 萃取法： $\text{Chl. a+b} = (17.9 \times A_{647} + 8.02 \times A_{664.5}) \times (V/1000W)$ (Inskip, 1985)

(3) DMSO 萃取法： $\text{Chl. a+b} = (7.49 \times A_{664.9} + 20.34 \times A_{648.2}) \times (V/1000W)$ (Barne, 1992)

(V = 萃取液體積(ml), W = 葉片重(g))

三、結果

經以 DMF、DMSO 及丙酮三種不同溶劑萃取葉綠素後，在光照下儲存不同時間後，葉綠素相對濃度的變化如圖 1.2 及 3 所示；在黑暗下，則如圖 4.5 及 6 所示。而其在黑暗下及在光照下葉綠素濃度的變化如附表一及附表二。

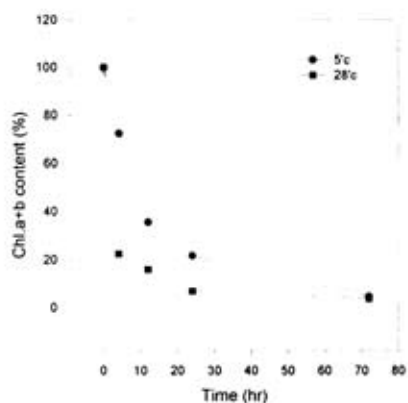


圖 1.以 DMF 為溶劑之萃取液在光照下不同儲存溫度之葉綠素相對濃度變化量。

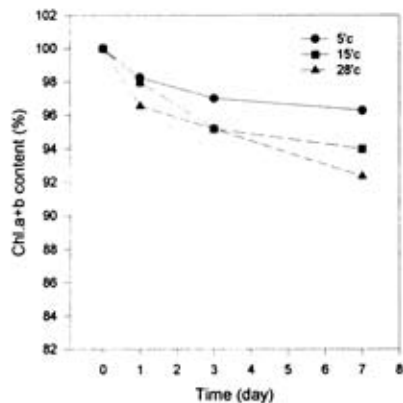


圖 4.以 DMF 為溶劑之萃取液在黑暗下不同儲存溫度之葉綠素相對濃度變化量。

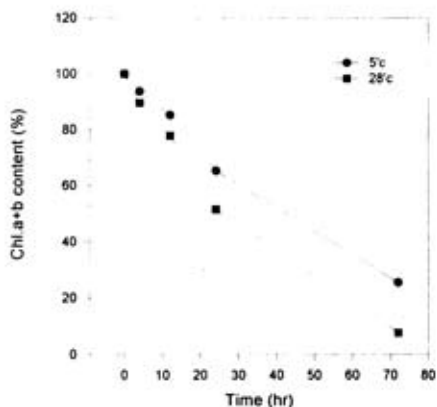


圖 2.以 DMSO 為溶劑之萃取液在光照下不同儲存溫度之葉綠素相對濃度變化量。

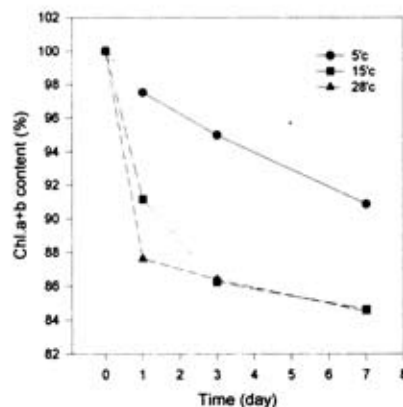


圖 5.以 DMSO 為溶劑之萃取液在黑暗下不同儲存溫度之葉綠素相對濃度變化量。

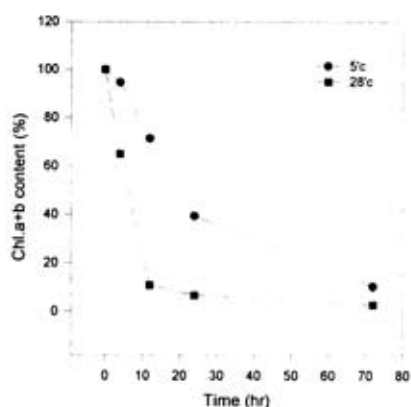


圖 3.以 80% 丙酮為溶劑之萃取液在光照下不同儲存溫度之葉綠素相對濃度變化量。

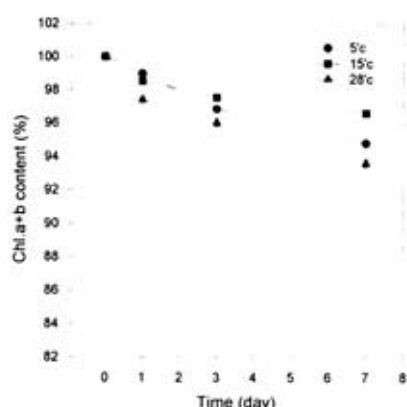


圖 6.以 80% 丙酮為溶劑之萃取液在黑暗下不同儲存溫度之葉綠素相對濃度變化量。

由上圖 1, 2 及 3 顯示, 以 DMSO 為溶劑, 在 5°C 低溫下, 葉綠素的衰降最慢, 在前 4 小時僅衰降至原濃度的 95%, 而以 DMF 及丙酮為溶劑之萃取液者, 則在 4 小時後已衰降至原濃度約 75% 及 90%, 在常溫(28°C)下, 則有類似的情形, 惟皆較低溫下衰降迅速, 且丙酮甚至衰降到約原濃度的 10%。圖 4, 5 及 6 中則顯示, 在黑暗而低溫(5°C)下, 三種溶劑之萃取液儲存一天後, 顯現出以丙酮為溶劑之萃取液只衰降至原萃取液之 99%; 以 DMF 為溶劑之萃取液衰降至 98%; 而以 DMSO 為溶劑之萃取液則衰降至 97%, 三種萃取液在低溫而黑暗下儲存, 其衰降情形雖略有差異, 惟差異並不顯著。然同樣置於黑暗中, 惟在高溫情形下, 則衰降的程度較明顯, 且儲存時間愈久, 衰降程度也愈大。

四、討論

由本實驗之結果在上列各圖可以看出, 葉綠素萃取液較易穩定儲存在低溫黑暗下。如在光照下則 DMF、DMSO 及 80% 丙酮三種溶劑之萃取液, 以 DMSO 為溶劑之萃取液最易保持穩定, 在低溫儲存 4 小時後只衰降至約 95%; 以 DMF 為溶劑之萃取液在 4 小時後衰降至 75%; 而以丙酮為溶劑之萃取液在低溫下卻只衰降至 70%, 在常溫(28°C) 儲存 4 小時後會衰降至 10%。因此在光照儲存下葉綠素萃取液不論高低溫皆最好以 DMSO 為溶劑最為穩定。在黑暗下時, 葉綠素萃取液在低溫下儲存一天後, 不論以何種溶劑為萃取液, 葉綠素的衰降皆甚小, 且三者差異不顯著, 然在高溫下即使在黑暗中衰降亦較速, 惟皆較光照下為慢。在光照下因光能之作用關係, 使葉綠素組成份子快速衰敗, 此因在光照下, 尤其是紫外光存在下, 會迅速漂白 (bleaching) 葉綠素 (Lyman *et al.*, 1961; Gibor and Granick, 1962), 而使顏色變淡。而 Pringsheim 及 Pringsheim (1952) 認為高溫對葉綠素亦有漂白作用。由本實驗亦可得知, 葉綠素易被光能及高溫所破壞。

在實驗過程中，因丙酮容易揮發，應設法克服之，才不致造成實驗之誤差。DMSO 及 DMF 則較不易揮發，但在 4 C 以下之低溫存放時，發現 DMSO 會結凍，因此以 DMSO 為溶劑時不宜在 4 C 低溫下操作。

五、結論

葉綠素之萃取方法以 DMSO 為最理想，其萃取環境以低溫為佳，如無法控制光照時，則應以 DMSO 為萃取液，如可在黑暗中萃取，則丙酮乃為一良好的方法，惟丙酮容易揮發，導致濃度的改變，應注意克服之。在萃取葉綠素時最好之條件為黑暗及低溫環境下，在此環境下 80% 丙酮、DMF 及 DMSO 三種溶劑之差異性不大，且葉綠素之萃取液亦較為穩定。

六、參考文獻

- Arnon, D.I. 1949 Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 24, 1-15
- Barnes, J.D., Balauger, L., Manrique, E., Elvirra, S. and Davison, A.W. 1992 A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. *Env. Exp. Bot.* 32 (2), 85-100
- Gibor, A. and Granick, S. 1962 (1) Ultraviolet sensitive factors in the cytoplasm that affect the differentiation of *Euglena* plastids. *J. Cell Biol.* 15, 599-603
- Inskip, W.P. and Bloom, P.R. 1985 Extraction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77, 483-485
- Lyman, H., Epstein, H. T., Schiff, J. A. 1961 Studies of chloroplast development in *Euglena*. I. Inactivation of green colony formation by ultraviolet light. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 50, 301-309
- Mackinney, G. 1941 Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140, 315-322
- Palta, J.P. 1990 Leaf chlorophyll content. *Rem. Sen. Rev.* 5 (1), 207-213
- Pringsheim, E. G. and Pringsheim, O. 1952 Elimination of chromatophores and eyespots in *Euglena gracilis*. *New Phytologist.* 51, 65-76

附表一、在黑暗下葉綠素濃度(mg/g)的變化

Time(天)	DMF			DMSO			Acetone		
	5 °C	15 °C	28 °C	5 °C	15 °C	28 °C	5 °C	15 °C	28 °C
0	1.199±0.04	1.326±0.05	1.287±0.07	1.188±0.08	1.255±0.20	1.916±0.10	1.809±0.20	1.356±0.06	1.255±0.05
1	1.178±0.03	1.299±0.07	1.242±0.06	1.083±0.08	1.099±0.10	1.868±0.08	1.762±0.20	1.343±0.06	1.237±0.04
3	1.141±0.04	1.286±0.07	1.225±0.06	1.025±0.07	1.084±0.10	1.819±0.10	1.737±0.20	1.313±0.06	1.224±0.04
7	1.127±0.05	1.277±0.07	1.188±0.06	1.006±0.07	1.060±0.10	1.741±0.09	1.693±0.20	1.286±0.06	1.213±0.04

附表二、在光照下葉綠素濃度(mg/g)的變化

Time(hr)	DMF		DMSO		Acetone	
	5 °C	28 °C	5 °C	28 °C	5 °C	28 °C
0	1.061±0.100	1.229±0.100	1.129±0.110	1.398±0.200	1.141±0.100	1.115±0.080
4	0.238±0.030	0.889±0.100	1.011±0.100	1.310±0.200	0.742±0.050	1.056±0.060
12	0.169±0.030	0.438±0.100	0.880±0.100	1.191±0.200	0.124±0.020	0.796±0.040
24	0.073±0.009	0.266±0.050	0.582±0.070	0.912±0.100	0.076±0.008	0.440±0.030
72	0.040±0.001	0.057±0.004	0.086±0.020	0.355±0.100	0.032±0.002	0.116±0.010