

# 底栖绿藻叶绿素的二甲基亚砷 提取和测定法\*

谭桂英 周百成  
(中国科学院海洋研究所, 青岛)

**提要** 以缘管浒苔 (*Enteromorpha linza* (L.) J. Ag.)、孔石莼 (*Ulva pertusa* Kjellm) 和袋藻膜 (*Monostroma angicava* Kjellm) 三种底栖绿藻为材料, 用二甲基亚砷 (DMSO)/80% 丙酮 (1/2, v/v) 作溶剂, 提取和测定其叶绿素含量, 并同广泛应用的以 80% 丙酮为溶剂的 Arnon 法<sup>[1]</sup>作了比较, 所得主要结果如下。1. 等量色素的 DMSO/80% 丙酮溶液的叶绿素, 其红光吸收峰略高于 80% 丙酮溶液的吸收峰。用作定量测定的三个波长, 即 663, 652 和 645 nm 的吸光率分别比 80% 丙酮溶液高 6, 7 和 8%。2. 在 DMSO/80% 丙酮和 80% 丙酮中, 叶绿素的稳定性相同。3. 用 DMSO/80% 丙酮混合溶剂提取底栖绿藻的叶绿素的优点是, 可用藻体直接提取, 而且提取速度比用 80% 丙酮时要快。

Arnon<sup>[1]</sup> 的叶绿素提取和测定方法, 已被广泛应用于藻类、裸子植物和被子植物中。但是, 这种方法需经磨碎、过滤或离心等步骤, 要花较多的时间。Shoaf 和 Lium<sup>[4]</sup> 于 1976 年用二甲基亚砷 (DMSO)/90% 丙酮 (1/1, v/v) 提取 12 种微型藻类的叶绿素, 并与 Arnon 法进行比较, 试验结果表明, 用 DMSO/90% 丙酮和用 90% 丙酮提取同样可以估计叶绿素含量。Hiscox 等<sup>[2]</sup>, 于 1979 年用纯 DMSO 提取裸子植物和被子植物的叶绿素, 他们用叶片直接提取, 认为用纯 DMSO 提取叶绿素是简单、快速的方法。Seeley 等<sup>[3]</sup>认为, 用 DMSO 法能够很快地从大型底栖藻类——褐藻中提取叶绿素 C, 但他们没有进行吸收光谱和稳定性等方面的研究, 也没有与 Arnon 法进行比较。本试验以底栖绿藻为材料, 用 DMSO/80% 丙酮 (1/2, v/v) 作溶剂, 提取和测定其叶绿素含量, 并同广泛应用的以 80% 丙酮为溶剂的 Arnon 法作了比较。

## 一、材料和方法

从青岛太平角、中航码头等地采集缘管浒苔、孔石莼和袋藻膜。将采集的新鲜海藻用自来水洗净切碎, 用 DMSO/80% 丙酮 (1/2, v/v) 和 80% 丙酮提取。用岛津 uV-240 分光光度计测定其吸收光谱。提取速度试验用 72 型分光光度计测定吸光率。用数字式太阳辐射计测定光辐照度。

## 二、结果

### 1. 吸收光谱的比较

取 2 g 新鲜藻体叶片, 经磨碎、离心后, 用 15 ml 80% 丙酮提取, 得到色素提取液。以

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1412 号。  
文中的光谱测定及绘图均由臧汝波同志协助, 特此致谢。

此液作为原液,吸取 1 ml 原液加 5 ml 溶剂,配制成含等量色素的色素溶液,然后测定波长 645, 652 和 663 nm 的吸光率和波长 400—700 nm 范围的吸收光谱。

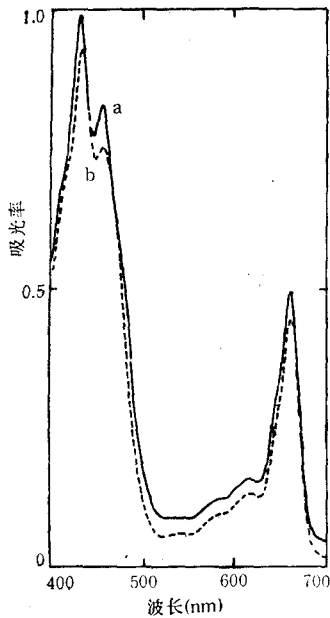


图 1 用两种溶剂提取缘管浒苔色素的吸收光谱比较

a. 缘管浒苔色素的 DMSO/80% 丙酮提取液的吸收光谱; b. 缘管浒苔色素的 80% 丙酮提取液的吸收光谱。

等量色素的叶绿素溶液,分别置于弱光(光辐照度为 0.2—0.3 mW/cm<sup>2</sup>)和强光(光辐照度为 1.9 mW/cm<sup>2</sup>)下,6 小时后测定其吸收光谱与吸光率。

试验结果表明,用两种溶剂提取的叶绿素的吸收光谱的形状与吸收峰的位置基本相同(图 1)。因此,用 DMSO/80% 丙酮提取的叶绿素可用 Arnon 公式计算其含量。但等量色素的 DMSO/80% 丙酮溶液的叶绿素的红光吸收峰,略高于 80% 丙酮溶液的,用作定量测定的 3 个波长即 663, 652 和 645 nm 的吸光率,分别比 80% 丙酮溶液高 6, 7 和 8% (表 1)。因此,用 Arnon 公式计算所得叶绿素含量将偏高,对其要作精确测定,则需对计算结果作修正。

## 2. 稳定性的比较

(1) 温度影响 方法同上。把配制成的含等量色素的叶绿素溶液,分别置于室温(14℃)和低温(5℃)条件下,均为黑暗保存。每两天测一次波长为 652 nm 的吸光率。然后,按照 Arnon 公式计算叶绿素总含量。试验结果表明,在上述温度条件下,保存 7 天,用两种溶剂提取的叶绿素,其稳定性是相同的,其含量均不受温度的影响,见表 2。

(2) 光照影响 方法同(1)。把配制好的含

表 1 用两种溶剂提取的叶绿素的吸光率比较

波长 (nm)	溶剂	
	80% 丙酮	DMSO/80% 丙酮
663	0.457	0.486
652	0.313	0.336
645	0.242	0.263

试验结果表明,用两种溶剂提取的叶绿素,在相同光照条件下,其稳定性相同。即在 0.2—0.3 mW/cm<sup>2</sup> 的弱光下经过 6 小时后,叶绿素总含量都减少约 20%,在 1.9 mW/cm<sup>2</sup> 的强光下,总含量都减少约 70% (表 3)。照光后,吸收光谱也发生变化,特别在强光照下,吸收光谱发生明显变化(图 2)。

## 3. 提取速度比较

把 0.1 g 新鲜藻体碎片放入盛有 6 ml 溶剂的带塞磨口试管中,然后每半小时测定一次吸光率。试验结果表明,用 DMSO/80% 丙酮直接提取比用 80% 丙酮提取速度要快得多(图 3)。从图 3 可以看出,用 DMSO/80% 丙酮提取缘管浒苔、孔石莼和袋藻膜的叶绿

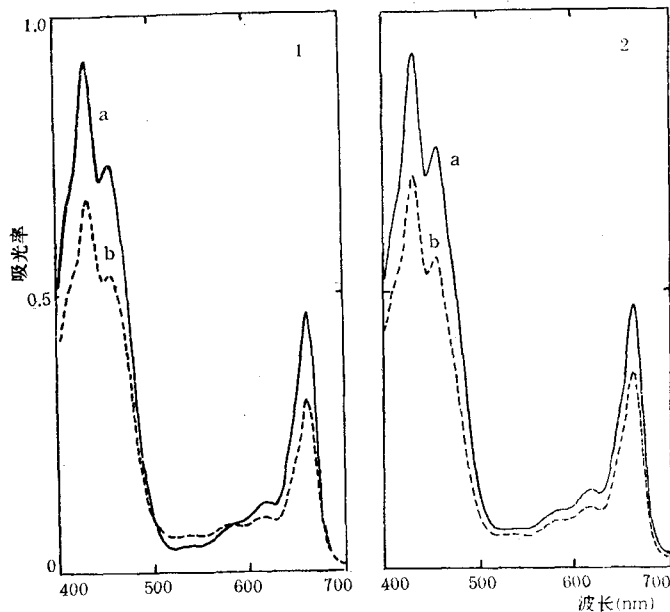


图 2:1—2 在低光照下缘管浒苔色素的两种提取液的吸收光谱变化

1. 溶剂为 80% 丙酮, 图 2:3 同; 2. 溶剂为 DMSO/80% 丙酮, 图 2:4 同。  
a. 照光前的吸收光谱; b. 照光 6 小时后的吸收光谱。图 2:3—4 同。

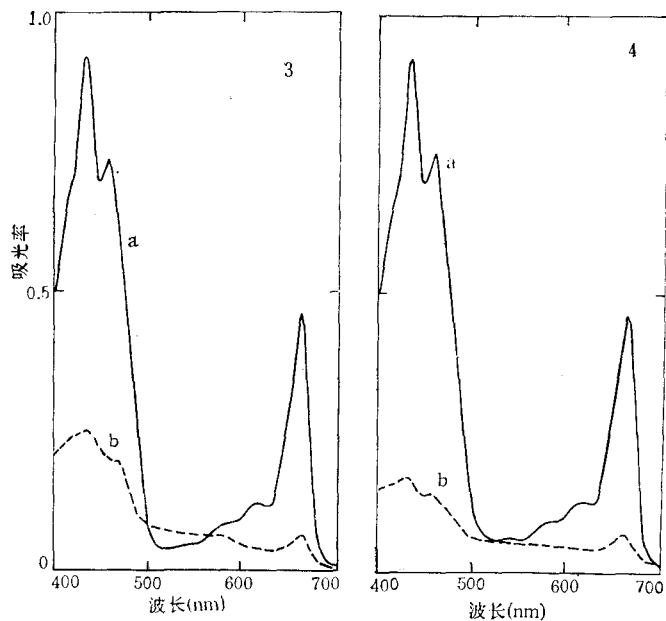


图 2:3—4 在强光照下缘管浒苔色素的两种提取液的吸收光谱的变化

素, 经过 1 小时就提取比较完全; 而用 80% 丙酮提取, 4 小时后提取的叶绿素含量缘管浒苔仅为前者的 12%, 孔石莼和袋藻膜均为前者的 5%。

表 2 在不同温度条件下叶绿素总含量的变化情况

叶绿素总含量 (mg/L)	溶剂 温度(°C)	80%丙酮		DMSO/80% 丙酮	
		室温(14)	低温(5)	室温(14)	低温(5)
		时间(天)			
0		12.43	12.32	13.25	13.28
2		12.72	12.81	13.33	13.25
4		12.96	12.96	12.90	13.13
6		12.96	12.93	13.54	13.80

表 3 不同光照条件下叶绿素总含量的变化情况

光辐照度 (mw/cm <sup>2</sup> )	溶剂 叶绿素总含量 (mg/L)	80%丙酮		DMSO/80% 丙酮	
		初 始	照光 6 小时后	初 始	照光 6 小时后
		时间(天)			
0.2-0.3		4.20	3.36	4.06	3.30
1.9		4.20	1.45	4.20	1.27

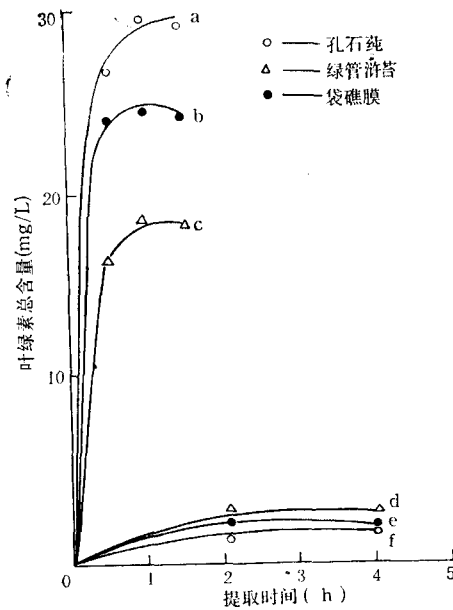


图 3 用两种溶剂提取三种底栖绿藻叶绿素的提取速度比较

a-c. 用 DMSO/80% 丙酮提取; d-f. 用 80% 丙酮提取。

### 三、讨 论

关于用两种方法提取叶绿素的吸收光谱的比较,早在 1976 年 Shoaf 等以微型藻类为材料,以 90% 丙酮与 DMSO/90% 丙酮 (1/1, v/v) 为溶剂,作了叶绿素 a 和 b 的吸收光谱。结果表明,在波长 600—700 nm 范围内吸收光谱是相同的。Hiscox 在 1979 年又以高

等植物为材料,以 DMSO 与丙酮为溶剂,作了叶绿素的吸收光谱。结果表明,在波长 600—700 nm 范围内的吸收光谱是相同的,而用 DMSO 提取的叶绿素的吸收峰略高于用丙酮提取的叶绿素的。

本试验以缘管浒苔为材料,用 DMSO 与 80% 丙酮作溶剂,发现 DMSO 的色素提取液的吸收光谱与 80% 丙酮的吸收光谱不完全相同。主要表现在蓝光吸收峰的两个肩峰位置不同(图4)。把两种溶剂按不同比例混合,以混合溶剂提取,结果发现,用 DMSO/80% 丙酮(1/2, v/v)和 80% 丙酮分别提取的色素,在波长 400—700 nm 范围内的吸收光谱是相同的;但叶绿素在前者的吸收峰比在后者要高,所以,当用 Arnon 公式估计叶绿素含量时,需进行校正。

关于用两种方法提取叶绿素的稳定性,Hiscox 曾用 DMSO 与丙酮分别提取豌豆叶子叶绿素,每隔 24 小时测定一次吸收率。结果发现,用 DMSO 提取的叶绿素,第五天的含量与初始值相同;而用丙酮提取的叶绿素,第五天的含量比初始值低得多。因此,他们认为,用 DMSO 提取的叶绿素在若干天内是稳定的。

本试验用 DMSO/80% 丙酮(1/2, v/v)与 80% 丙酮提取的叶绿素,在相同的光照与温度条件下其稳定性是相同的。本试验用 DMSO/80% 丙酮混合提取比用纯 DMSO 提取,更有优越性。因为 DMSO 的凝固点比较高(16—19℃),在低于此温度下操作容易产生结晶现象,不利于操作,更不适于室外操作。所以,用 DMSO/80% 丙酮混合提取,速度既快,又可避免结晶的产生。可以认为,用 DMSO/80% 丙酮提取底栖绿藻的叶绿素,是一种快速、简单、适应范围较广的方法。

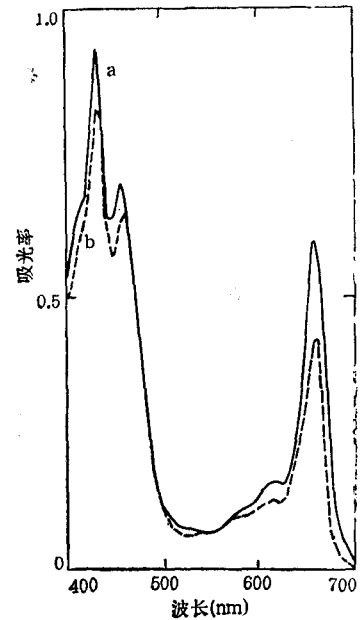


图4 缘管浒苔的纯 DMSO 与 80% 丙酮的色素提取液的吸收光谱比较 a 与 b 分别为纯 DMSO 和 80% 的色素提取液的吸收光谱。

### 参 考 文 献

- [1] Arnon, D. I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1—15.
- [2] Hiscox, J. D. and G. F. Israelstam, 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57(12): 1332—1334.
- [3] Seeley, G. R., M. J. Duncan and W. E. Vidaver, 1972. Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. *Mar. Biol.* 12: 184—188.
- [4] Shoaf, T. W. and B. W. Lium, 1976. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulphoxide. *Limnol. Oceanogr.* 21: 926—928.

## EXTRACTION AND DETERMINATION OF CHLOROPHYLL FROM BENTHIC GREEN ALGAE WITH DIMETHYL SULFOXIDE\*

Tan Guiying and Zhou Baicheng (B. C. Zhou)

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao*)

### ABSTRACT

Using dimethyl sulfoxide (DMSO) and 80% acetone (1/1, v/v) as solvent, chlorophylls of three species of benthic green algae, namely, *Enteromorpha linza* (L.) J. Ag., *Ulva pertusa* Kjellm and *Monostroma angicava* Kjellm, were extracted and determined. The method was compared with Arnon's (1949), in which 80% acetone was used as solvent.

The main results are as follows:

1. With equal amounts of chlorophyll, the absorption peaks in DMSO/80% acetone were 6, 7 and 8% higher than those in 80% acetone at wave lengths of 663, 652 and 645 nm respectively. Chlorophyll amounts would be overestimated if Arnon's formula was used. For exact determination, the figures must be corrected.
2. In DMSO/80% acetone and in 80% acetone, the stabilities of chlorophylls were identical. When chlorophylls were kept in the dark for seven days, at two different room temperatures of 14°C and 5°C, the values were basically unchanged. However, if chlorophylls were kept separately in dim (0.2—0.3 mW/cm<sup>2</sup>) and bright light (1.9 mW/cm<sup>2</sup>) for only 6 hours, the total amounts of chlorophylls were decreased by 20% and 70%, respectively. In this method, it is requisite that the solutions should be kept in dark.
3. The advantage of the method is that chlorophyll of benthic green algae can be extracted directly without grinding and centrifuging, it can be done in a much shorter time than Arnon's method. The present method is highly practicable for chlorophyll analysis of large number of samples.

---

\* Contribution No. 1412 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.