

研究简报

同步荧光分析法同时测定
叶绿素a和叶绿素b*

黄贤智 许金钩 蔡挺**

(厦门大学化学系)

众所周知,叶绿素a和叶绿素b(分别用Chl a和Chl b表示)在绿色植物的光合作用中起着极重要的作用。它们的测定通常用于不同波长处测量吸光度^[1,2]或在不同激发-发射波长下测量荧光强度^[3,4],而后解联立方程的光度法。分光光度法的灵敏度以 $A=0.001$ 计Chl a为10ppb, Chl b为20ppb。自Lloyd^[5]提出同步荧光法以来,该法已成功地应用于多组分荧光物质的同时分析^[6-8]。本文作者应用其原理建立Chl a和Chl b的同步荧光分析法,方法灵敏度为0.4ppb;测定范围Chl a为0.5—200ppb, Chl b为0.5—150ppb;准确度Chl a为3.5%, Chl b为5.5%。方法简便快速。

实验部分

1. 仪器与试剂

(1)荧光分光光度计:日立850型(日本),使用时激发和发射单色仪带通为5nm,扫描速度为100nm/min。

(2)分光光度计:DU8B(美国)。

(3)Chl a和Chl b标准溶液:按文献^[2]所述的方法制备和测定其浓度(分光光度法),然后用90%丙酮稀释成所需的浓度并放置于暗处。当天配制当天使用。

(4)丙酮:90%丙酮溶液,用三次蒸馏水配制。

2. 条件试验

(1)激发光谱和发射光谱的测绘:取Chl a和Chl b的标准溶液,分别用90%丙酮稀释成0.2ppm。分别以 $\lambda_{ex}=427\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=666\text{nm}$ 和 $\lambda_{ex}=455\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=648\text{nm}$ 测绘Chl a和Chl b的荧光激发光谱与发射光谱,结果如图1。

(2)Chl a测定时 $\Delta\lambda$ 的选择:由图1可知,Chl a的发射峰与其在短波长处的主、次激发峰的波长差 $\Delta\lambda$ 分别为239nm(666—427)和258nm(666—408)。实验表明采用 $\Delta\lambda=239\text{nm}$ 时可得到较强的同步荧光信号,然而在消除Chl b影响的效果方面不如采用 $\Delta\lambda=258\text{nm}$ 。为此本实验采用 $\Delta\lambda=258\text{nm}$ 作为Chl a测定的同步扫描波长差。实验结果如图2(a)和(b),在此条件下,Chl b对Chl a的影响可忽略不计。

(3)Chl b测定时 $\Delta\lambda$ 的选择:由图1可知,Chl b的发射峰与其在短波长处的激发峰的波长差为193nm(648—455)。选用 $\Delta\lambda=193\text{nm}$ 作为Chl b测定的同步扫描波长

本文于1985年10月29日收到。

* 中国科学院科学基金资助课题。 ** 85届毕业生。

差时, 实验结果如图 2 (c)和(d), 可见Chl a 对 Chl b 的干扰亦可忽略不计。

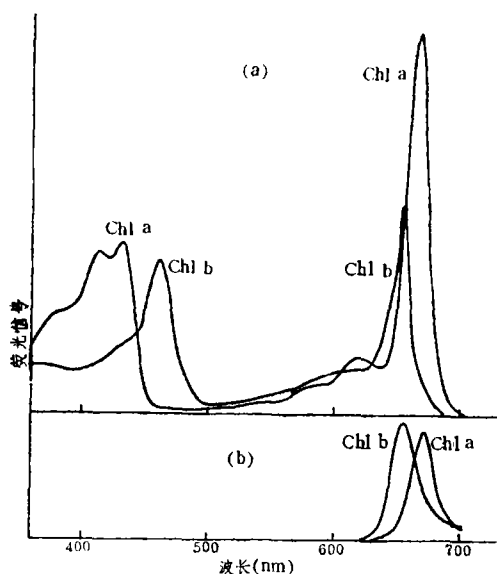


图 1 Chl a和Chl b的激发光谱(a)和发射光谱(b)

(介质: 90%丙酮)

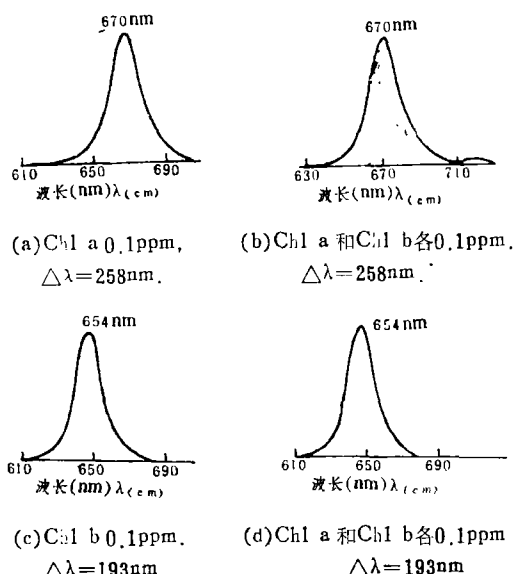


图 2 Chl a和Chl b 的同步荧光光谱 (介质: 90%丙酮)

(4) 浓度效应试验: 由图 1 可见, Chl b 的发射光谱及其长波长区的激发光谱与 Chl a 相应的光谱有较大程度的重叠, 亦即 Chl b 的第一电子激发态的最低振动能层 S_1^0 略高于 Chl a 的 S_1^0 , 由此可预见 Chl b 荧光的熄灭将随 Chl a 的浓度提高而明显增加。实验表明, 当 Chl b 浓度为 42ppb 而 Chl a 的浓度由 0 增至 133ppb 时, Chl b 荧光熄灭程度将由 0 增至 5.5%。同理可预见, 在一般的测定条件下, Chl b 的浓度对 Chl a 的荧光将没有明显的影响, 实验证实了这种预测。

(5) 工作曲线的绘制: 移取 Chl a 标准溶液, 用 90% 丙酮稀释成含 Chl a 为 0—200ppb 的标准系列, 用荧光分光光度计以 $\Delta\lambda = 258\text{nm}$ 进行同步扫描, 由同步荧光峰信号对浓度绘制成工作曲线, 其线性范围为 0.5—200ppb (图 3 (a))。Chl b 工作曲线绘制方法同 Chl a, 唯 $\Delta\lambda$ 改用 193nm, 其线性范围为 0.5—150ppb (图 3 (b))。

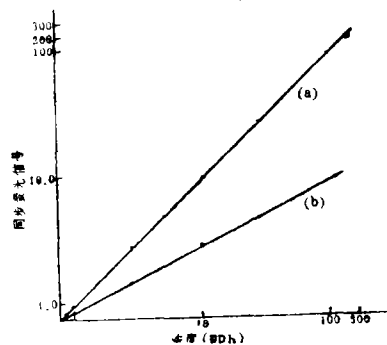


图 3 Chl a和Chl b的工作曲线

(6) 同步荧光法与分光光度法^[2]的对照试验: 取干净新鲜油菜叶 0.5g, 剪碎置于研钵, 加入 0.1g MgCO_3 、2—3ml 丙酮, 研磨至浆状, 过滤。用少许丙酮多次洗涤, 丙酮萃取液收集于 250ml 容量瓶中, 用 90% 丙酮稀释至刻度, 摇匀。移取 0.20、1.00 和 1.50ml 上述制备的溶液, 用 90% 丙酮稀释至 10ml, 分别用分光光度法和同步荧光法进行测定, 结果见表 1。当 Chl a 和 Chl b 浓度分别为 2.8ppb 和 1.2ppb 时, 分光光度法无法检出, 而同步荧光法尚能加以测量。

表1 同步荧光法与分光光度法对照试验(测得值ppb)

样品数(ml)	同步荧光法		分光光度法 ^[2]	
	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b
0.20	2.8	1.2	未检出	未检出
1.00	14.3	6.2	14.0	5.9
1.50	21.3	9.1	21.9	8.5

参 考 文 献

- [1] Jeffrey, S. W., Humphrey, G. F., *Biochem. Physiol. Plantar.*, 167(2), 191(1975).
 [2] 波德诺克, X. H. 著, 荆家海、丁钟荣译, 植物生物化学分析方法, 231, 科学出版社, 1981年.
 [3] Eoto, K. G., Eunt, J. S., *Anal. Chem.*, 50, 393(1978).
 [4] Usui, R., *et al.*, *Yakugaku*, 32(6), 321(1983); *Chem. Abstr.*, 99, 68872(1983).
 [5] Lloyd, J. B. F., *Nature (Phys. Sci.)*, 231, 64(1971).
 [6] Vo-Dinh, T., *Anal. Chem.*, 50, 396(1978).
 [7] 黄贤智、谢平、黄凤斌, 光学与光谱技术, (4), 31(1985).
 [8] 许金仙、黄贤智、黄凤斌、陆春娟, 医药工业, (11), 17(1985).

(责任编辑: 李桂英)

Simultaneous Determination of Chlorophyll a and Chlorophyll b by Synchronous Fluorimetry

Huang Xianzhi, Xu Jingou and Cai Ting

(Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen)

This paper reports a method for simultaneous determination of chlorophyll a and chlorophyll b by synchronous fluorimetry. The scanning wavelength intervals ($\Delta\lambda$) of 258nm and 193nm were used and the wavelengths of maximum emission in synchronous spectra were at 670nm and 654nm for chlorophyll a and chlorophyll b, respectively. This method is simple and rapid, and the ranges of determination were 0.5—200 ppb, and 0.5—150 ppb, for chlorophyll a and chlorophyll b, respectively. Accuracy of determination was about 5%.