

植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进*

刘俊¹⁾ 吕波 徐朗莱

(南京农业大学理学院, 南京 210095)

摘要 Ti(IV)-H₂O₂ 比色法因背景物质干扰而测得的植物叶片内 H₂O₂ 含量偏高, 5% 三氯乙酸抽提, 活性炭脱色, Ti(IV)-4-(2-吡啶偶氮) 间苯二酚 (PAR) 比色法测得的 H₂O₂ 含量偏低. 萃取法有效地脱去丙酮提液中的色素, 且 H₂O₂ 的回收率在 95% 以上. 用过氧化氢酶 (CAT) 处理作空白对照, 利用 H₂O₂ 与 Ti(IV)-PAR 的显色反应, 建立了一种简便、快速、准确的植物叶片内的 H₂O₂ 含量测定方法, H₂O₂ 的最低检测浓度为 0.25 μmol·L⁻¹. 用该方法测得多种植物叶片中 H₂O₂ 的含量在 0.1~0.8 μmol·g⁻¹.

关键词 H₂O₂, 植物叶片, Ti(IV), 4-(2-吡啶偶氮) 间苯二酚 (PAR), 萃取

学科分类号 06655.11

文献报道的植物体内 H₂O₂ 含量的测定方法主要有三种: Ferguson 等^[1] 用丙酮抽提, Ti(IV)-H₂O₂ 比色法, 测得黄瓜子叶中 H₂O₂ 含量为 8.53~22.35 mmol·L⁻¹; Patterson 等^[2] 用 5% 三氯乙酸 (TCA) 溶液抽提, 活性炭脱色, Ti(IV)-4-(2-吡啶偶氮) 间苯二酚 (PAR) 比色法测得多种植物叶片中 H₂O₂ 含量在 0.13~0.75 mmol·L⁻¹; Chen 等^[3] 用化学发光法测得烟草叶片中 H₂O₂ 含量在 0.12~0.44 mmol·L⁻¹. 虽然不同植物材料中 H₂O₂ 的含量可能有所不同, 但文献报道植物材料中 H₂O₂ 含量相差很大, 我们在实验中也发现用不同方法测定植物叶片中 H₂O₂ 含量差异甚大. 然而 H₂O₂ 含量的准确定量在研究植物体内 H₂O₂ 的生理作用及其机理时非常重要, 这就有必要对植物叶片中 H₂O₂ 含量测定方法进行改进.

本文以小麦叶片为材料, 研究了 H₂O₂ 的抽提方法, 抽提液的脱色方法以及 H₂O₂ 定量测定方法, 建立了一种快速、简便、准确的植物材料中 H₂O₂ 含量的测定方法——丙酮抽提, 萃取脱色, Ti(IV)-PAR 比色法.

1 材料和方法

1.1 植物材料

扬麦 5 号 (*T. aestivum* L. Var Yan Mai No. 5) 小麦叶片, 取自温室盆栽. H₂O₂, PAR, TiCl₄ 等试剂均为分析纯.

1.2 H₂O₂ 的标定

参照 Aebi (1974 年) 方法^[4].

1.3 Ti(IV)-PAR 试剂配制

参照 Mastubara 等 (1983 年) 的方法^[5].

1.4 小麦叶片中 H₂O₂ 的提取与测定

1.4.1 丙酮抽提, Ti(IV)-PAR 比色法, 参照 Ferguson 等^[1] 方法.

1.4.2 5% TCA 抽提, Ti(IV)-PAR 比色法, 参照 Patterson 等^[2] 方法.

1.4.3 丙酮抽提, 萃取脱色, Ti(IV)-PAR 比色法.

取 1.5 g 小麦叶片, 剪碎后加 3 ml 冷丙酮匀浆, 4℃ 离心 (10 000 g × 10 min), 取 1 ml 上清液, 加 3 ml 萃取剂 (CCl₄: CHCl₃ = 3: 1, 体积比) 混匀, 再加 5 ml 蒸馏水, 混匀, 离心 (4 000 r/min, 1 min), 上层水相为 H₂O₂ 待测液. 各取 1 ml 待测液, 一份作空白, 加入终浓度为 3U·ml⁻¹ 的过氧化氢酶 (CAT), 30℃ 保温 10 min; 另一份待测液, 加等体积高温灭活的 CAT 酶液. 两组分别加 1 ml 0.2 mol·L⁻¹, pH 7.8 的磷酸缓冲溶液, 再加 1 ml 0.2 mmol·L⁻¹ 的 Ti(IV)-PAR 显色剂, 45℃ 水浴保温 20 min, 静置 1 h 至室温, 测 508 nm 的吸光值. 根据 ΔA₅₀₈ 值计算 H₂O₂ 的含量. 同方法做 H₂O₂ 的标准曲线.

1.5 活性炭对 H₂O₂ 吸附分析

在 Patterson 方法的抽提液、H₂O₂ 标准溶液和加有 H₂O₂ 标准溶液的抽提液中, 分别加入活性炭

* 国家自然科学基金资助项目 (39770072).

¹⁾ 杭州华东基因技术研究所, 杭州 310000.

Tel: (025) 4396061, E-mail: LirJun@telekbird.com.cn

收稿日期: 1999-10-12, 修回日期: 2000-05-15

($0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 以不加活性炭为空白, 用 Ti(IV)-PAR 方法测定 H_2O_2 含量, 并计算它们的回收率.

1.6 不同萃取剂脱色效果比较以及对水相体积的影响

各取 1 ml 丙酮抽提液加 3 ml 各类萃取剂, 混匀后加 5 ml H_2O , 摇匀离心后, 取水相测 508 nm 的吸光值, 并观察水相的液位, 测量水相体积.

2 结果与讨论

2.1 植物材料中 H_2O_2 的抽提液的选择

Ferguson 的方法用冷丙酮作抽提液, Patterson 法用 5% 三氯乙酸 (TCA) 溶液作抽提液, 二者均有效抑制了体系中过氧化氢酶 (CAT) 活性, 有利于 H_2O_2 的抽提. 然而二种抽提液由于抽提体系的不同, 其效果也不相同, 我们用 Ti(IV)-PAR 法对两种方法的 H_2O_2 回收率进行了比较, 结果见表 1.

由表 1 结果可见, 5% TCA 抽提 H_2O_2 的回收率仅在 81% ~ 86% 之间, 而丙酮抽提 H_2O_2 的回收

率在 95% 以上, 后者大大提高了 H_2O_2 的抽提率, 因此选用冷丙酮作 H_2O_2 的抽提液为好.

2.2 H_2O_2 抽提液脱色方法的选择

植物材料 H_2O_2 抽提液中含有大量的色素, 这些色素在测定波长 (508 nm) 处有较大的吸光值, 影响 H_2O_2 含量的准确测定^[2,3]. 文献报道中共有三种脱色方法: 丙酮洗脱脱色法^[1], 活性炭吸附脱色法^[2]和离子交换树脂脱色法^[3]. 丙酮洗脱法不仅消耗大量试剂, 而且多次丙酮洗脱后, 体系中仍有少量色素干扰测定结果^[1]. 离子交换树脂脱色法经两次柱分离后, 测定波长下尚有 0.05 的吸光值^[3], 而且 H_2O_2 是一易分解的极性小分子, 样品处理时间越长, 结果偏差越大. 活性炭吸附脱色法, 虽然脱色效果较好, 但活性炭对 H_2O_2 有较强的吸附, 影响 H_2O_2 含量的准确测定. 结果见表 2.

由表 2 结果可见, 活性炭对 H_2O_2 有较强吸附, 其回收率低于 60%, 而萃取脱色, H_2O_2 的回收率可达 95% 以上. 因此, 脱色采用萃取脱色法为好.

表 1 两种方法中 H_2O_2 回收率的比较

$c(\text{外源 } \text{H}_2\text{O}_2) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ΔA_{508}		回收率 / %	ΔA_{508}	
	H_2O_2	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{TCA}$		$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{丙酮}$	回收率 / %
0	0.000	0.154 ± 0.011		0.165 ± 0.011	
2	0.072 ± 0.010	0.214 ± 0.021	84 ± 4.1	0.236 ± 0.017	99 ± 4.3
4	0.144 ± 0.012	0.271 ± 0.022	81 ± 6.2	0.304 ± 0.021	97 ± 4.1
8	0.273 ± 0.018	0.393 ± 0.031	86 ± 7.1	0.429 ± 0.025	97 ± 3.6

表 2 活性炭脱色与萃取脱色 H_2O_2 回收率的比较

$c(\text{外源 } \text{H}_2\text{O}_2) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ΔA_{508}		回收率 / %	ΔA_{508}	
	H_2O_2	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{活性炭}$		$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{抽提液} + \text{萃取剂}$	回收率 / %
0	0.000	0.046 ± 0.006		0.165 ± 0.011	
2	0.072 ± 0.010	0.071 ± 0.008	35 ± 3.2	0.236 ± 0.017	99 ± 4.3
4	0.144 ± 0.012	0.102 ± 0.011	39 ± 3.1	0.304 ± 0.021	97 ± 4.1
8	0.273 ± 0.018	0.199 ± 0.018	55 ± 4.3	0.429 ± 0.025	97 ± 3.6

2.3 萃取剂的选择

2.3.1 不同萃取剂脱色比较: 根据抽提液丙酮的特性, 我们选用了非极性溶剂 CCl_4 、石油醚和弱极性的 CHCl_3 做萃取剂, 并按一定比例试验, 结果见表 3.

由表 3 结果可知, 四氯化碳+ 三氯甲烷 (3: 1)

混合液萃取效果最好, 而且水相位于上层, 更利于取样测定.

从各萃取后水相的 A_{508} 值还可见, 极性稍大的萃取剂效果较好, 但考虑到极性萃取剂会影响水相体积时, 故选用惰性的四氯化碳与弱极性的三氯甲烷按 3: 1 比例的混合液做萃取剂.

表 3 不同萃取剂脱色效果的比较及水相的位置

萃取剂 (体积比)	A ₅₀₈	水相位置
CCl ₄	0.004	上层
CHCl ₃	0.002	上层
石油醚	0.110	下层
CCl ₄ + CHCl ₃ (3:1)	0.001	上层
CCl ₄ + CHCl ₃ (1:1)	0.002	上层
CCl ₄ + 石油醚 (3:1)	0.004	上层
CHCl ₃ + 石油醚 (3:1)	0.005	下层

2.3.2 萃取剂用量对水相体积变化的影响: 萃取剂的用量对萃取后水相体积有一定的影响, 表 4 是萃取剂不同用量对水相体积的影响.

表 4 萃取剂不同用量对水相体积和脱色效果的影响

萃取剂 [CCl ₄ + CHCl ₃ (3:1)] / 丙酮抽提液的体积比	V (水) / ml	A ₅₀₈	V(水相) / ml
0.5	5.00	0.025	5.50
1	5.00	0.020	5.34
2	5.00	0.005	5.15
2.5	5.00	0.002	5.07
3	5.00	0.001	5.00

由表 4 结果可见, 当萃取剂用量为 3 ml, 丙酮抽提液为 1 ml, 水相体积与加入的水体积相同, 此时丙酮完全溶于有机相, 这样有利于 H₂O₂ 的准确测定.

2.4 工作曲线与检测下限

H₂O₂ 浓度在 0~ 30 μmol·L⁻¹ 范围内服从朗伯-比尔定律, 线性相关系数为 r = 0.999, 线性回归方程 Y = 0.034X + 4.25 × 10⁻³, 有色复合物在 508 nm 处的摩尔吸光系数为 3.6 × 10⁴ mol⁻¹·cm⁻¹, 检测限为 0.25 μmol·L⁻¹.

2.5 不同方法测定小麦叶片中 H₂O₂ 含量的结果比较

取扬麦 5 号小麦叶片, 剪碎混匀后, 称取等量小麦叶片, 分别用 Ferguson 方法、Patterson 方法和萃取脱色 Ti (IV) -PAR 法测定 H₂O₂ 的含量, 结果见表 5.

表 5 不同方法测定小麦叶片中 H₂O₂ 含量的结果比较

方法	抽提液	脱色法	H ₂ O ₂ 含量/μmol·g ⁻¹
Ferguson 法	丙酮	丙酮洗脱	11.5 ± 1.21
Patterson 法	5% TCA	活性炭吸附	0.11 ± 0.02
Ti(IV)-PAR 法	丙酮	萃取脱色	0.27 ± 0.01

由表 5 可见, Patterson 法的结果比新建方法

低, 仅为其 41%, 其原因是 H₂O₂ 的抽提方法和活性炭对 H₂O₂ 的吸附作用所致. 后者是主要原因; 而 Ferguson 法则远远高于新建方法, 约为其 42.6 倍, 这主要是测定体系无法消除背景物对 H₂O₂ 测定的干扰.

2.6 几种植物叶片中 H₂O₂ 含量

利用丙酮抽提, 萃取脱色, CAT 处理为空白, Ti (IV) -PAR 比色法测定下列各种植物叶片 H₂O₂ 的含量. 结果见表 6 (三次测量的平均值).

表 6 几种植物叶片中 H₂O₂ 含量

样品	H ₂ O ₂ 含量/μmol·g ⁻¹
小麦旗叶	0.23 ± 0.02
大麦老叶	0.45 ± 0.03
油菜幼叶	0.14 ± 0.01
水稻幼叶	0.26 ± 0.02
蚕豆老叶	0.74 ± 0.04
小麦老叶	0.58 ± 0.05

从表 6 可见, 各种植物叶片 H₂O₂ 的含量在 0.1~ 0.8 μmol·g⁻¹ 之间.

3 结 论

新建方法既克服了 Ferguson 方法的背景物质的干扰, 又避免了 Patterson 方法的活性炭吸附脱色对 H₂O₂ 定量测定的影响, 同时此方法所用试剂和仪器较为简单, 避免了化学发光法^[3] 所需的复杂的试剂和昂贵的仪器需求, 它更适宜普通实验室对植物材料中的 H₂O₂ 含量的测量. 新建方法在其检测范围内, 测量结果具有良好的重复性和高回收率. 用它测出的植物叶片中 H₂O₂ 的含量与化学发光法^[3] 的结果基本一致, 故此方法具有快速、简便、准确的特点.

参 考 文 献

- 1 Ferguson I B, Watkins C B, Harman J E. Inhibition by calcium of senescence of detached cucumber cotyledons. *Plant physiol*, 1983, **71** (1): 182~ 186
- 2 Patterson B D, Macrae E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Analytical Biochemistry*, 1984, **139** (3): 187~ 492
- 3 Chen Z, Silra H, Klessing D F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993, **262** (5): 1883~ 1886
- 4 Aebi H. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press, 1974. 673~ 684

- 5 Mastubara C, Nishikawa Y, Yoshida Y, *et al.* A spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme a synthetase and acyl-coenzyme a oxidase. *Analytical Biochemistry*, 1983, **130** (1): 128~133

An Improved Method for The Determination of Hydrogen Peroxide in Leaves. LIU Jun, LÜ Bo, XU Lang-Lai (College of Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China).

Abstract Levels of hydrogen peroxide in plant extracts were overestimated by the method of only using titanium (IV) because of the interference of pigments and other materials while underestimated by the method of adding activated charcoal (A. C.) in 5% trichloroacetic acid extracts to remove pigments.

These problems were avoided by a developed method of extraction, which could not only remove the pigments in acetone extracts conveniently but also get a high recovery more than 95%. Hydrogen peroxide was determined by its reaction with the complex of titanium (IV) and 4-(2-pyridylazo) resorcinol against references catalase-treated. The minimum concentration of hydrogen peroxide determined in this essay was $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Levels of hydrogen peroxide in leaves of some plant species ranged from $0.1 \sim 0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$.

Key words hydrogen peroxide, plant leaves, titanium (IV), 4-(2-pyridylazo) resorcinol, extraction

褐藻叶绿体的制备

李爱芬¹⁾ 陈敏

(烟台大学生物化学系, 烟台 264005)

周百成

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 在4℃条件下, 采用CaCl₂溶液浸泡褐藻裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 的叶状体, 观察CaCl₂溶液的浓度和浸泡时间对裙带菜叶绿体提取率及其荧光特性的影响. 结果表明, 裙带菜的叶状体经过CaCl₂溶液浸泡后, 其叶绿体的提取率有明显地提高. 根据裙带菜叶绿体的提取率和室温荧光发射光谱的测定结果, 认为最适的方法是采用0.2 mol/L的CaCl₂溶液浸泡10 min. 在这种条件下, 裙带菜叶绿体的提取率是传统制备方法的5倍. 室温荧光发射光谱的测定结果说明叶绿体的完整性较好.

关键词 褐藻, 叶绿体, 提取率, 荧光发射光谱

学科分类号 Q946

叶绿体是植物进行光合作用的场所, 其类囊体膜是一种光能转换膜. 长期以来, 叶绿体类囊体膜的结构与功能的研究一直是光合作用机理研究的核心问题之一. 目前, 叶绿体的提取方法是将植物组织破碎, 过滤后离心分离. 该方法在绿色植物叶绿体两个光系统的结构与功能的研究中得到了广泛的应用. 褐藻是含有叶绿素c的杂色植物, 其叶状体含有大量的褐藻胶质, 它是由β-D-甘露糖醛酸和α-L-古罗糖醛酸单体通过1-4糖苷键连接而成的线形嵌段共聚物, 分子质量很大, 结构也非常复杂, 具有很高的粘稠度, 以致于褐藻叶绿体的提取率很低. 文献报道, 褐藻胶质与二价金属离子有很强的结合能力, 在Ca²⁺的存在下能形成凝胶^[1]. 基于上述原因, 我们以褐藻裙带菜 (*Undaria*

pinnatifida) 为材料, 选择了适宜的氯化钙浓度浸泡其叶状体, 叶绿体的提取率明显提高, 可以达到大量制备褐藻叶绿体的目的.

1 材料与方法

1.1 裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)

采自烟台金沟寨海边低潮带石沼, 洗净后置冰箱内保存或置于海水中通气保存备用.

1.2 叶绿体的制备

按Chu等^[2]的方法并稍加修改, 分离介质为Tris-硼酸 (pH 8.5) 溶液.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0535) 6902116, E-mail: lafhm@sea.ytu.edu.cn

收稿日期: 1999-10-12, 修回日期: 2000-02-28