# مقایسه روش‌های مختلف استخراج و اندازه‌گیری غلظت کلروفیل‌های a، b و کل در سبزی‌ها

سید محمد حسن مرتضوی [1*]، سلاله نجفی [2]، زهره مقیمی [3]، مریم بدوی [3]، ندا بستانی [3]، حمیده امیری [3]، امل مقدم [3]
1- استادیار. 2- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد. 3- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز.
* نویسنده مسؤول: mortazavi_mh@yahoo.com

## چکیده

کلروفیل مهم‌ترین رنگیزه گیاهی مؤثر در فتوسنتز و سنتز کربوهیدرات‌ها در گیاهان به شمار می‌رود. هر عامل تنش‌زایی که بر مقدار کلروفیل گیاهان اثر بگذارد می‌تواند کمیت و کیفیت محصول گیاه را تحت تأثیر قرار دهد. اندازه‌گیری مقدار کلروفیل بافت‌های گیاهی که از متداول‌ترین آنالیزهایی است که توسط دانش‌جویان فیزیولوژی گیاهی و علوم کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به دشواری های استخراج کلروفیل به روش عصاره‌گیری با حلال استون در هاون چینی، یافتن روش‌های ساده‌تر می‌تواند کمک مؤثری به محققین در این زمینه نماید. در این پژوهش 5 روش مختلف استخراج و اندازه‌گیری کلروفیل برای سه نوع سبزی اسفناج، شوید و جعفری مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که با قرار دادن نمونه گیاهی درون ظرف دربسته محتوی اتانول 96 درجه و در محیطی سرد و تاریک، کلروفیل نمونه به تدریج وارد حلال شده و پس از یک هفته نمونه گیاهی کاملاً سفید و حلال کاملاً سبز می‌شود. چنین نمونه‌هایی از مقدار کلروفیل بیشتری نسبت به روش متداول استخراج و اندازه‌گیری کلروفیل برخوردار بودند و می‌توان این روش را به عنوان روش جایگزینی آسان و مؤثر بدین منظور پیشنهاد نمود.

کلمات کلیدی: کلروفیل، روش استخراج، اندازه‌گیری، سبزی

## مقدمه

کلروفیل رنگیزه‌ای سبز است که به دلیل نقشی که در فتوسنتز دارد، برای رشد و تولید در گیاهان از اهمیت زیادی برخوردار است. این رنگیزه با جذب انرژی نور خورشید سبب تثبیت کربن هوا و تولید مواد قندی می‌شود. از نظر طیف رنگی نور، کلروفیل عمدتاً نور را در محدوده رنگ آبی و سپس رنگ قرمز جذب می‌کند. رنگیزه‌های کلروفیل در قالب فتوسیستم‌های نوری در غشای تیلاکوئید کلروپلاست‌ها قرار دارند که جداسازی و تفکیک عصاره برگی گیاهان نشان داده است که کلروفیل در دو نوع a و b در گیاهان وجود دارد. دو نوع مولکول کلروفیل موجود در گیاهان از نظر ساختاری بسیار به هم شبیه هستند (در کلروفیل a یکی از زنجیره‌های مولکول به $CH_3$– و در کلروفیل b به CHO– متصل است). هر دو نوع کلروفیل a وb ، گیرنده‌های نوری بسیار قوی هستند که طیف جذب آنها کمی متفاوت است ولی می‌توان گفت به عنوان مکمل هم عمل می‌کنند. به دلیل نقشی که کلروفیل در گیاهان دارد، اندازه‌گیری غلظت کلروفیل نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. هر عاملی که برای گیاهان، تنش‌زا باشد می‌تواند غلظت کلروفیل برگ‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل گزارش شده است که متداول‌ترین آنها استخراج عصاره نمونه با استون و قرائت میزان جذب نور در ناحیه نور قرمز و قرمز دور می‌باشد. اندازه‌گیری غلظت کلروفیل در نمونه‌های گیاهی معمولا یکی از پارامترهایی است که توسط دانشجویان رشته کشاورزی و فیزیولوژی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعیین غلظت کلروفیل به روش شیمیایی معمولاً با دشواری‌هایی همراه است. در موارد زیادی دیده شده است که به دلیل محدودیت زمانی برای آنالیز همزمان نمونه‌ها، محقق، نمونه گیاهی یا عصاره آن را در یخچال یا فریزر قرار داده تا در روزهای بعد بتدریج آنها را آنالیز نماید. همچنین با توجه به دشواری کار با هاون چینی برای عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی، دیده شده است که برخی محققین نمونه گیاهی را به مدت چند روز در لوله دربسته حاوی استون و در جای تاریک قرار می‌دهند تا طی چند روز به مرور کلروفیل نمونه وارد حلال شود. این آزمایش بر

اساس نیاز محققین کشاورزی و در جهت یافتن روشی مطمئن و قابل توصیه برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل نمونه‌های گیاهی طراحی و انجام گردید و طی آن روش‌های مختلفی که برای استخراج و اندازه‌گیری کلروفیل مورد استفاده قرار می‌گیرد، بررسی گردید.

## مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: نمونه‌های گیاهی مورد نیاز (شامل سه نوع سبزی اسفناج، جعفری و شوید) از مزرعه علوم باغبانی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه و به آزمایشگاه فیزیولوژی منتقل گردید. هر نمونه به مدت 5 دقیقه در ظرف محتوی آب و یک قطره مایع ظرفشویی خیسانده و پس از شستشو، در دمای اتاق خشک گردید. ساقه‌ها و قسمت‌های خشبی شاخه‌ها حذف و برگ‌های یکدست و سالم را برای آزمایش انتخاب شد. این آزمایش به صورت طرح آماری فاکتوریل با دو فاکتور نوع سبزی (در سه سطح) و روش عصاره‌گیری و اندازه‌گیری کلروفیل (در پنج سطح) بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. برای هر روش 4 تکرار در نظر گرفته شد و برای هر تکرار، برگ های یکدست با وزن تقریبی 20 گرم جدا گردید. پنج روش مورد استفاده برای عصاره‌گیری و اندازه‌گیری کلروفیل عبارت بودند از:

1) عصاره‌گیری از نمونه تازه و قرائت میزان جذب: نمونه مربوط به هر واحد آزمایشی با استفاده از میکسر مخلوط شد و 0/1 گرم از بافت گیاهی همگن شده با استون 80% سرد در هاون چینی عصاره‌گیری گردید. عصاره حاصله در 4000 دور در دقیقه، دمای 4 درجه سانتی‌گراد و به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد و میزان جذب روشناور در طول موج‌های 663 و 6450 نانومتر قرائت گردید.

2) عصاره‌گیری از نمونه تازه، فریز کردن عصاره و قرائت میزان جذب: پس از تهیه عصاره نمونه گیاهی به روش اول، روشناور نمونه‌ها جدا و بلافاصله به فریزر (دمای 18- درجه سانتی‌گراد) منتقل گردید (نمونه استونی در این دما یخ نمی‌زند). پس از گذشت 1 هفته، نمونه از فریزر خارج و میزان جذب آن در طول موج‌های 663 و 645 نانومتر قرائت شد.

3) قرار دادن طولانی‌مدت نمونه در استون 80% جهت عصاره‌گیری و سپس قرائت میزان جذب: نمونه مربوط به هر واحد آزمایشی با استفاده از میکسر مخلوط شد و 0/1 گرم از بافت گیاهی همگن شده به لوله فالکون 15 میلی‌لیتری منتقل گردید. پس از اضافه نمودن استون 80% به لوله فالکون حاوی نمونه، فالکون‌ها با پلاستیک سیاه پوشانده شده و دردمای 4 درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند (هر روز فالکون‌ها را به مدت 30 ثانیه تکان داده شد). پس از یک هفته از عصاره استونی رنگی حاصل از نمونه برای اندازه‌گیری کلروفیل استفاده شد و میزان جذب آنها در طول موج‌های 663 و 645 نانومتر قرائت شد.

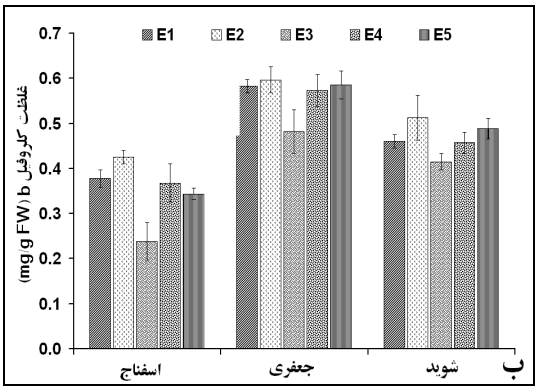
4) قرار دادن طولانی‌مدت نمونه در اتانول 96 درجه جهت عصاره‌گیری و سپس قرائت میزان جذب: نمونه مربوط به هر واحد آزمایشی با استفاده از میکسر مخلوط شد و 0/1 گرم از بافت گیاهی همگن شده به لوله فالکون 15 میلی‌لیتری منتقل گردید. پس از اضافه نمودن اتانول 96 درجه به لوله فالکون حاوی نمونه، فالکون‌ها با پلاستیک سیاه پوشانده شده و دردمای 4 درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند (هر روز فالکون‌ها را به مدت 30 ثانیه تکان داده شد). پس از یک هفته از عصاره اتانولی حاصل از نمونه برای اندازه‌گیری کلروفیل استفاده شد و میزان جذب آنها در طول موج‌های 663 و 645 نانومتر قرائت شد.

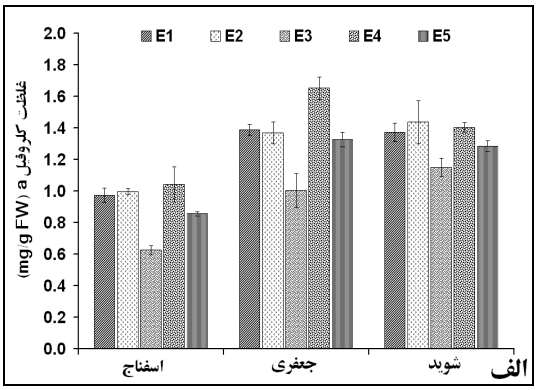
5) فریز کردن نمونه تازه، عصاره‌گیری از نمونه فریز شده و سپس قرائت میزان جذب: نمونه مربوط به هر واحد آزمایشی با استفاده از میکسر مخلوط شد و 0/1 گرم از بافت گیاهی همگن شده بلافاصله درون فویل آلومنیومی قرار گرفت و به فریزر 18- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. پس از گذشت یک هفته نمونه گیاهی از فریزر خارج شد و پس از عصاره‌گیری با استون 80% سرد، همچون روش اول میزان جذب آنها در طول موج‌های 663 و 645 نانومتر قرائت شد.

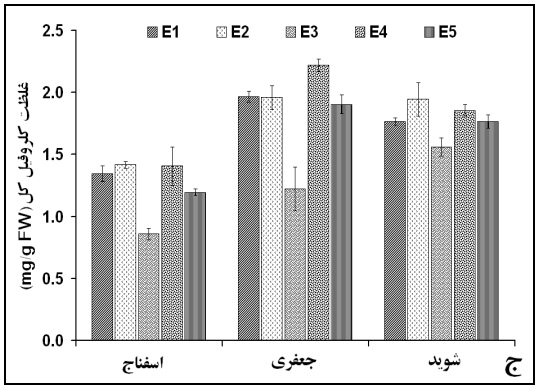
## نتایج

نتایج مندرج در شکل 1-الف، ب و ج نشان داد که سه نوع سبزی مورد بررسی از نظر مقدار کلروفیل‌های آ، ب و کل با هم اختلاف معنی‌داری دارند. جعفری از بیشترین مقدار کلروفیل کل برخوردار بود و پس از آن سبزی‌های شوید و اسفناج قرار داشتند. مقایسه 5 روش مختلف استخراج و اندازه‌گیری کلروفیل نشان داد که برای کلروفیل آ، روش : قرار دادن طولانی‌مدت نمونه در اتانول 96 درجه جهت عصاره‌گیری و سپس قرائت میزان جذب بیشترین مقادیر کلروفیل برای هر سه نوع سبزی را داشت (شکل 1-الف). مقدار کلروفیل ب، در روش عصاره‌گیری از نمونه تازه، فریز کردن عصاره و قرائت میزان جذب (E2) اندکی بیشتر از روش‌های دیگر بود (شکل 1-ب). همچنین مقایسه روش‌های مختلف استخراج و اندازه‌گیری کلروفیل کل (شکل 1-ج) نشان داد که بیشترین مقادیر کلروفیل در روش‌های E4 و E2 بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش می‌توان گفت که روش متداول اندازه‌گیری کلروفیل را می‌توان با تغییراتی مورد استفاده قرار داد به گونه‌ای که کار برای محقق ساده‌تر شود. در روش دوم اندازه‌گیری (عصاره‌گیری از نمونه تازه، فریز کردن عصاره و قرائت میزان جذب) می‌توان عصاره‌گیری نمونه‌ها را انجام داد و عصاره‌های استونی آنها را در فریزر قرار داد تا در زمان مناسب همه را به پای دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل نمود و مقدار جذب نمونه‌ها را اندازه‌گیری کرد. همچنین نتایج مربوط به روش چهارم اندازه‌گیری (قرار دادن طولانی‌مدت نمونه در اتانول 96 درجه جهت عصاره‌گیری و سپس قرائت میزان جذب) نشان داد که با قرار دادن نمونه گیاهی درون ظرف دربسته محتوی اتانول 96 درجه و در محیطی تاریک، کلروفیل نمونه به تدریج وارد حلال شده و پس از یک هفته نمونه گیاهی کاملاً سفید و حلال کاملاً سبز می‌شود. قرائت مقدار جذب عصاره‌های اتانولی حاکی از این بود که در این روش کلروفیل نمونه به نحو مؤثرتری وارد حلال می‌شود. آنچه که دور از انتظار بود نتایج مربوط به روش سوم (قرار دادن طولانی‌مدت نمونه در استون 80% جهت عصاره‌گیری و سپس قرائت میزان جذب) بود زیرا بر اساس نتایج بدست آمده، علیرغم قرار گرفتن نمونه به مدت یک هفته در استون 80% در محیطی تاریک و سرد، مقدار جذب بسیار کمتر از روش متداول استخراج (روش اول) بود. همچنین بر اساس نتایج مندرج در شکل 1، فریز کردن نمونه در دمای 18- درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته سبب کاهشی اندک در مقدار جذب آنها گردید به گونه‌ای که می‌توان گفت در مواردی که محقق ناچار به تجمع نمونه‌های گیاهی برای اندازه‌گیری کلروفیل آنها در فرصت زمانی مناسب‌تر است، بهتر است آن را فریز نماید هر چند به مقدار کمی، جذب کمتری برای آنها بدست می‌آورد.

به طور کلی و با مقایسه نتایج بدست آمده، می‌توان نگهداری در اتانول 96 درجه را به عنوان روشی آسان و مؤثر برای استخراج و اندازه‌گیری کلروفیل معرفی نمود که به دلیل حذف دردسرهای مربوط به عصاره‌گیری در هاون چینی و استفاده از حلال فراری مانند استون، محقق می‌تواند به کمک این روش به سادگی نمونه‌های زیاد گیاهی خود را توزین نموده و پس از قرار دادن وزن مشخصی از نمونه گیاهی در لوله فالکون محتوی اتانول 96 درجه، در زمانی که حجم کارهای دیگر مربوط به پژوهش کمتر شده است، عصاره اتانولی کلروفیل را از یخچال خارج نموده و نسبت به قرائت میزان جذب آنها و اندازه‌گیری کلروفیل اقدام نماید.




شکل 1- غلظت کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب) و کلروفیل کل (ج) در روش‌های مختلف عصاره‌گیری و اندازه‌گیری

E1: عصاره‌گیری از نمونه تازه و قرائت میزان جذب

E2: عصاره‌گیری از نمونه تازه، فریز کردن عصاره و قرائت میزان جذب

E3: قرار دادن طولانی‌مدت نمونه در استون 80% جهت عصاره‌گیری و سپس قرائت میزان جذب

E4: قرار دادن طولانی‌مدت نمونه در اتانول 96 درجه جهت عصاره‌گیری و سپس قرائت میزان جذب

E5: فریز کردن نمونه تازه، عصاره‌گیری از نمونه فریز شده و سپس قرائت میزان جذب

## منابع

Inskeep, W. P. and Bloom, P. R. (1985). Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. Plant Physiology, 77: 483-485.

Schoefs, B. (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. Trends in Food Science and Technology, 13: 361-371.

J. D. Hiscox, and G.F. Israelstam, " A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration". Canadian Journal of Botany, 1979, 57:1332-1334.

# The Evaluation of Different Extraction and Determination Methods for Chlorophylls a, b and Total in Vegetables

**S.M.H.Mortazavi*1, S. Najafi2, Z. Moghimi3, M. Badvi3, N. Bostani3, H. Amiri3 and E.Moghaddam3**

1- Assistant Prof., 2- Graduated M.Sc. student and 3- MSc students, of Dep. of Hort. Sci., Shahid Chamran Univ. of Ahwaz

*Corresponding author: mortazavi_mh@yahoo.com

**Abstract**

Chlrophyll is considered as the most important plant pigments in photosynthesis and carbohydrates synthesis of plants. Any stressful factor that affects the chlorophyll content of plants can affect the quantity and quality of plant products. Determination of chlorophyll content in plant tissues is a routine analyze, which is commonly used by plant physiologist and agricultural sciences students. According to the difficulties for chlrophyll extraction with acetone solvent in mortar finding simpler methods could provide researchers a great help in this field. In this research, five different extraction and determination of chlrophylls for three vegetable types i.e. dill, parsley and spinach were evaluted. The results showed that with inserting the plant sample in a tight tube containing ethalol 96° in a cold and dark place, the sample chlrophyll will extract gradually and after a week the plant sample become completely white and the solvent will become green. Such extracts had more chlrophyll in compare with extract obtained by routine method and can be supposed as an alternative, easy and effective method in this line.

Keyword: Date palm, Market acceptability, Packaging, Khuzestan