

不同版本教材叶绿体色素提取和分离实验原理剖析

张金鑫¹ 李娟娟¹ 张秀珍² (1 上海市嘉定二中 上海 201802; 2 上海交通大学附属实验中学嘉定分校 上海 201802)

摘要 “叶绿体色素的提取和分离”是高中生物学非常重要的实验。但人教版和沪科版教材中该实验的操作方法有所不同,通过查阅资料,剖析这些不同操作方法的原理,为实验教学提供理论依据。

关键词 叶绿体色素 提取分离 人教版 沪科版

Analysis on experimental principles of chloroplast pigment extraction and separation in textbooks of different editions

ZHANG Jinxin¹, LI Juanjuan¹, ZHANG Xiuzhen²

(1 Jiading No. 2 Middle School, Shanghai 201802, China; 2 Jiading Branch of Shanghai Jiao Tong University Affiliated Experimental School, Shanghai 201802, China)

Abstract “Chloroplast Pigment Extraction and Separation” is a very important experiment in high school biology. However, the operation methods of this experiment in the textbooks of the PEP edition and Shanghai Science edition are different. By consulting relevant materials, the principles behind these different operation methods are analyzed to provide theoretical basis for experimental teaching.

Keywords chloroplast pigment; extraction and separation; PEP textbooks; Shanghai textbooks

人教版新教材和沪科版新教材中都设置了“叶绿体色素的提取和分离”这一经典学生实验,但 2 个版本教材在色素提取过程中材料处理、所用试剂、色素分离载体和分离结果、载体处理方式等方面都有所不同。本文通过对比 2 个版本教材在该实验中的差别,剖析不同操作方法的原理,为一线教师的教学提供一定参考。

1 人教版和沪科版叶绿体色素提取和分离实验的不同点对比

通过对人教版和沪科版高中生物学教材中叶绿体色素的提取和分离实验中的实验材料、实验试剂、实验过程和实验结果等分析比较,发现以下不同点(表 1)。

表 1 不同版本教材叶绿体色素提取和分离实验对比

人教版	沪科版
新鲜绿叶	干燥绿叶
加入 CaCO_3 和二氧化硅	不加 CaCO_3 和二氧化硅
石油醚、丙酮和苯混合物	95% 乙醇
滤纸条剪角	聚酰胺薄膜条不剪角
胡萝卜素、叶黄素、叶绿素 a、叶绿素 b(从上至下)	叶黄素、胡萝卜素、叶绿素 a、叶绿素 b(从上至下)
无定量分析	叶绿素含量测定

2 色素提取实验原理剖析

在色素提取实验步骤中,人教版教材要求在研钵

中加入新鲜绿叶、 CaCO_3 和二氧化硅,再加入无水乙醇,充分研磨;沪科版教材的要求是向研钵中加入干燥处理的叶片和 95% 乙醇,研磨成匀浆。实际上,叶绿体中的色素所处的环境具有微碱性。实验中由于研磨会使细胞结构遭到破坏,新鲜叶片细胞中的细胞液(具有微酸性)流出,酸性的细胞液就会直接与叶绿体中的色素接触,叶绿素分子中的镁易被氢离子、二价铜离子、锌离子等取代,致使叶绿素的分子结构遭到破坏。而碳酸钙是强碱弱酸盐,在水中的溶解度小,只少量溶解并电离成 Ca^{2+} 和 CO_3^{2-} ,其中 CO_3^{2-} 发生水解,释出微量的氢氧根离子(OH^-),可以使提取液的酸碱度保持在极弱的碱性状态,保护了叶绿素^[1]。因此加入少许 CaCO_3 是为了防止在研磨时叶绿体色素受到破坏。沪科版教材中所用的叶片不是新鲜绿叶,而是将新鲜绿叶干燥处理(65℃, 24 h),液泡中的细胞液在干燥处理后基本消失,不会与叶绿素接触破坏其分子结构,因此不需要加入 CaCO_3 。在研磨时加入二氧化硅,是为了增大研磨强度,加快叶绿体中的色素释放。叶片经过干燥后非常脆,很容易磨碎从而释放出色素,因此不需要加入二氧化硅。

3 色素分离实验原理剖析

3.1 层析结果不同原理分析 两个版本教材中分离色素的方法都是采用层析法。层析法是利用可溶物质的理化性质差异而建立起来的分离技术。层析系统由固定相和流动相组成:固定相是固体物质或者是固定

于固体物质上的成分;流动相,即可以流动的溶媒。当被分离的混合物随流动相通过固定相时,由于不同成分的理化性质差异,与两相发生相互吸附、溶解的能力不同,与固定相作用力小的成分,受到的阻滞作用小,向前移动的速度快;反之则移动速度慢。各组分不断地在两相中进行再分配,从而被分离^[2]。

人教版采用纸层析法,其流动相是指层析液(石油醚、丙酮和苯混合物),它能在滤纸纤维的毛细拉力作用下沿滤纸不断由下向上流动。固定相是指被束缚在滤纸纤维之间的水分,因不易扩散而成为固定相。在层析过程中,层析液在毛细拉力作用下,上升流经色素

滤液细线时,滤液细线上的色素就相继融入层析液并随其上升,发生再分配。类胡萝卜素极性极小,与固定相的吸附力较低,更易溶于流动相,随层析液向上移动得快,形成的色素带集中在滤纸的上部。叶绿素极性大且分子量较大,与固定相的吸附力强,随层析液向上移动得慢,形成的色素带集中在滤纸的下部。叶绿素 b 是将叶绿素 a 分子中的 $-\text{CH}_3$ 换成了极性大的 $-\text{CHO}$ (图 1),故展开速度比叶绿素 a 慢;叶黄素因为分子中含有 $-\text{OH}$ (图 1),极性大于胡萝卜素,故展开速度比胡萝卜素慢^[3]。因此,纸层析法的结果是从上至下的条带分别是胡萝卜素、叶黄素、叶绿素 a 和叶绿素 b。

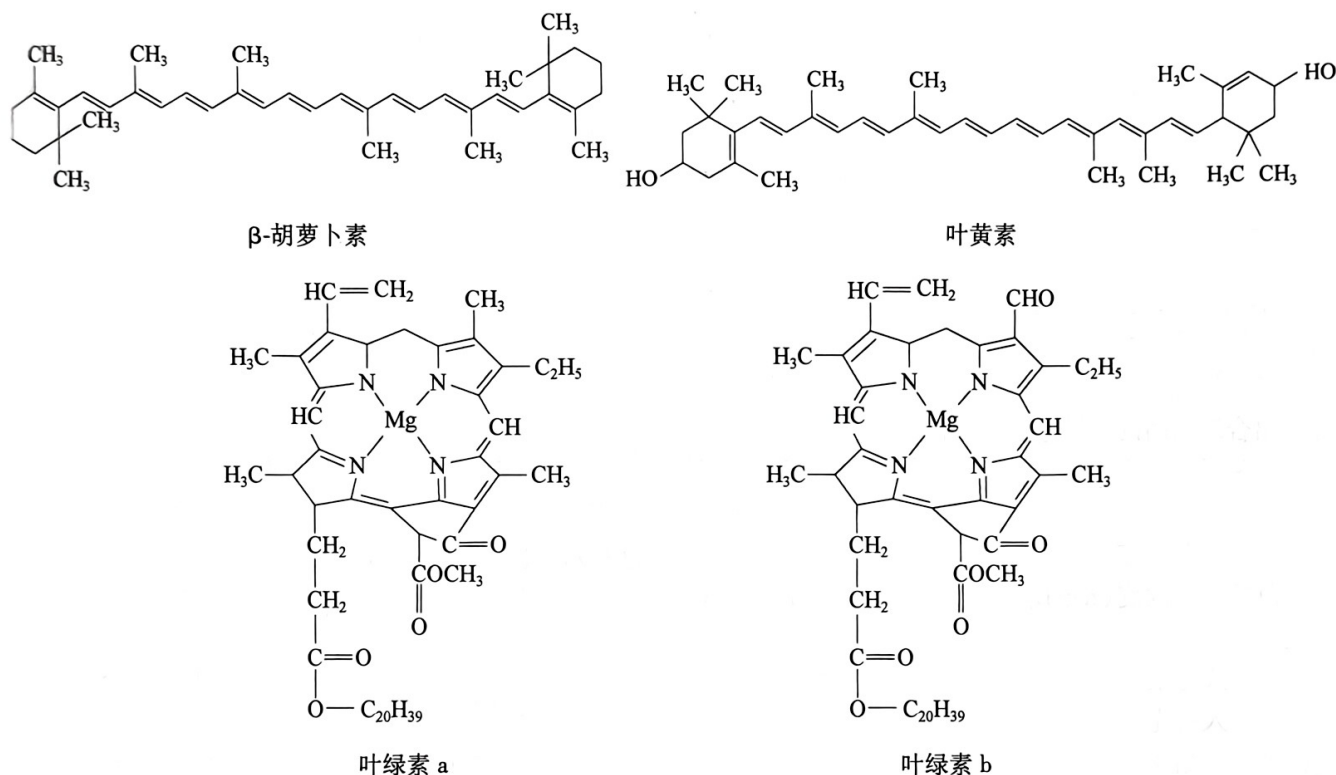


图 1 叶绿体色素分子结构图

沪科版教材中用聚酰胺薄膜和 95% 乙醇进行层析分离色素。其流动相是 95% 乙醇,固定相是聚酰胺薄膜上的聚酰胺。乙醇与聚酰胺都具有极性。类胡萝卜素不会和酰胺平面发生吸附作用,随乙醇向上移动得快;而叶绿素亲水头部会和酰胺平面发生相互吸引作用,随乙醇向上移动得慢,因此类胡萝卜素条带在聚酰胺薄膜的上端,叶绿素条带在聚酰胺薄膜的下端。叶黄素分子中的两个羟基使得其与流动相乙醇作用力更强,因此叶黄素条带在胡萝卜素条带之上;叶绿素 b 分子的甲醛基团和酰胺平面形成氢键,使得叶绿素 b 与固定相的吸附力强于叶绿素 a,因此叶绿素 b 的展开速度慢于叶绿素 a。最终的层析结果是从上至下的条带分别是叶黄素、胡萝卜素、叶绿素 a 和叶绿素 b。

3.2 不同载体是否剪角原理分析 人教版色素分离

实验中要求将滤纸条一端剪去两角,其目的是让层析线整齐。因为扩散的边缘效应,滤纸上的层析液扩散及蒸发速度均为边缘大于中心,剪角后边缘扩散速度虽快但路径加长,某一时间段内色素带会相对平齐。而沪科版教材所用的色素分离的吸附载体是聚酰胺薄膜,相比滤纸,聚酰胺薄膜没有边缘效应,层析液在薄膜的边缘和中心的扩散速度基本相等,因此不剪角也可以获得相对平齐的色素带。

4 叶绿素含量测定原理剖析

沪科版教材中引入了很多定量测定实验,在叶绿体色素提取和分离实验中也加入了叶绿素含量测定,使用的方法是利用分光光度计测定叶绿素在 665 nm 和 649 nm 波长下的吸光度,分别记为 $A_{665\text{nm}}$ 和 $A_{649\text{nm}}$ 。根据以下计算公式计算出叶绿素含量。

生物学批判性思维测评试题的解析

马 兰 李高峰* (陕西师范大学生命科学学院 西安 710119)

摘 要 围绕生物学知识与批判性思维目标,通过引用原题、整合改编、自主编制试题,分析生物学批判性思维测评试题,为批判性思维在生物学教学中的应用提供思路,为生物学批判性思维试题的开发研究提供参考。

关键词 批判性思维 试题开发 高中生物学

Analysis of the critical thinking in biology assessment questions

MA Lan, LI Gaofeng*

(School of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract Centering on the intersection of biological knowledge and critical thinking objectives, this article analyzes critical thinking assessment questions in biology by referencing original questions, integrating adaptations, and independently formulating questions to provide insights into the application of critical thinking in biology education and references for the development and research of critical thinking assessment questions in biology.

Keywords critical thinking; exam question development; high school biology

批判性思维是学生进行独立思考的重要方法,是科学思维的重要内容。在生物学中,批判性思维是基于科学证据对生物学现象、规律、观点等进行深入思考并做出合理判断的思维过程^[1]。将批判性思维具体落

实在生物学教学中^[2],有助于培养高中生分析、推理、评估等技能。本文基于剑桥评价对批判性思维能力的分类法,设计了“识别论点、识别论据、确定假设、得出结论、辨识推理谬误和判断可信度”6个指标^[3]。并围

$$\text{叶绿素 a 浓度 (mg/L)} = 13.7A_{665\text{ nm}} - 5.76A_{649\text{ nm}}$$

$$\text{叶绿素 b 浓度 (mg/L)} = 25.8A_{665\text{ nm}} - 7.6A_{649\text{ nm}}$$

总叶绿素浓度 (mg/L) = 叶绿素 a 浓度 + 叶绿素 b 浓度

该公式是根据郎伯-比耳 (Lambert-Beer) 定律推导而来。在入射光波长固定的情况下,被测物质的吸光度(A)与物质的透光(或吸光)系数、物质的浓度及物质的厚度成正比。当物质的透光系数固定时,同等厚度的物质,其吸光度之比即是其浓度之比。吸光度与浓度的定量关系可用郎伯-比耳定律表示: $A = KCL$ 。式中: K 为吸光系数, L 为光通过长度, C 为被测样品浓度。

叶绿素 a 和叶绿素 b 的吸收光谱中最大吸收峰有差异,但彼此有些重叠。在这种情况下可根据郎伯-比耳定律,通过代数方法,分别计算得到两种组分的含量。根据郎伯-比耳定律,最大吸收峰不同的两个组分(用 a 和 b 表示)的混合液,它们的浓度(C)与吸光度(A)之间的关系如下: $A_1 = C_a \cdot K_{a1} + C_b \cdot K_{b1}$; $A_2 = C_a \cdot K_{a2} + C_b \cdot K_{b2}$ 。

式中: C_a 为组分 a 的浓度(g/L); C_b 为组分 b 的浓度(g/L); A_1 为混合液在波长 λ_1 (即组分 a 的最大吸收峰波长)处的吸光度; A_2 为混合液在波长 λ_2 (即组分 b 的最大吸收峰波长)处的吸光度; K 为组分的比吸收系数,即当组分浓度为 1 g/L 时在特定波长下的吸光

度, K_{a1} 即为 1 g/L 组分 a 在波长 λ_1 处的吸光度, K_{b1} 即为 1 g/L 组分 b 在波长 λ_1 处的吸光度, K_{a2} 即为 1 g/L 组分 a 在波长 λ_2 处的吸光度, K_{b2} 即为 1 g/L 组分 b 在波长 λ_2 处的吸光度。

叶绿素 a 和叶绿素 b 在 95% 乙醇中的最大吸收波长分别为 665 nm 和 649 nm, 在 665 nm 下, 叶绿素 a 和叶绿素 b 的比吸收系数 K 值分别为 83.31 和 18.60, 在 649 nm 下, 叶绿素 a 和叶绿素 b 的比吸收系数 K 值分别为 24.54 和 44.24。将该数值代入以上公式得出:

$$A_{665\text{ nm}} = 83.31 \times C_a + 18.60 \times C_b;$$

$$A_{649\text{ nm}} = 24.54 \times C_a + 44.24 \times C_b$$

若将此公式中的浓度单位由 g/L 换算成 mg/L, 即可推导出以上叶绿素含量计算公式^[4]。

主要参考文献

- [1] 梁 珂. 叶绿体色素的提取、分离实验中的几个为什么及改良[J]. 铜仁学院学报, 2007(5): 103-105.
- [2] 杨建胜, 罗秀艳, 姜海燕. 再谈叶绿体色素提取及分离实验的原理与改进[J]. 生物学通报, 2011, 46(11): 44-46.
- [3] 纪平雄, 薛伟亮, 骆玉娟. 竹叶叶绿体色素的分离与鉴定[J]. 广东农业科学, 2011, 38(15): 80-82+99.
- [4] 赵云龙, 周忠良. 普通高中生物学教学参考资料必修 1 分子与细胞[M]. 上海: 科学技术出版社, 2021: 121-122. ◇