

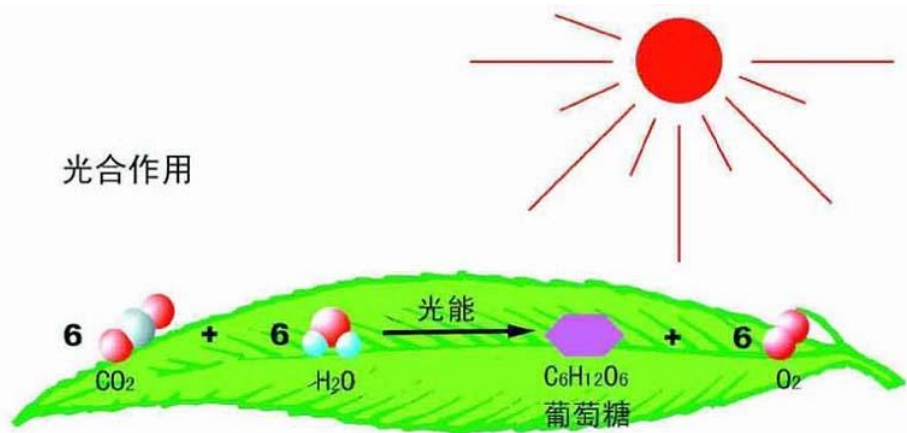


实 验

绿叶中叶绿素和 类胡萝卜素的提取和测定



植物光合作用是自然界最重要的现象，在把光能转化为化学能的光合作用过程中，叶绿体色素起着重要的作用。

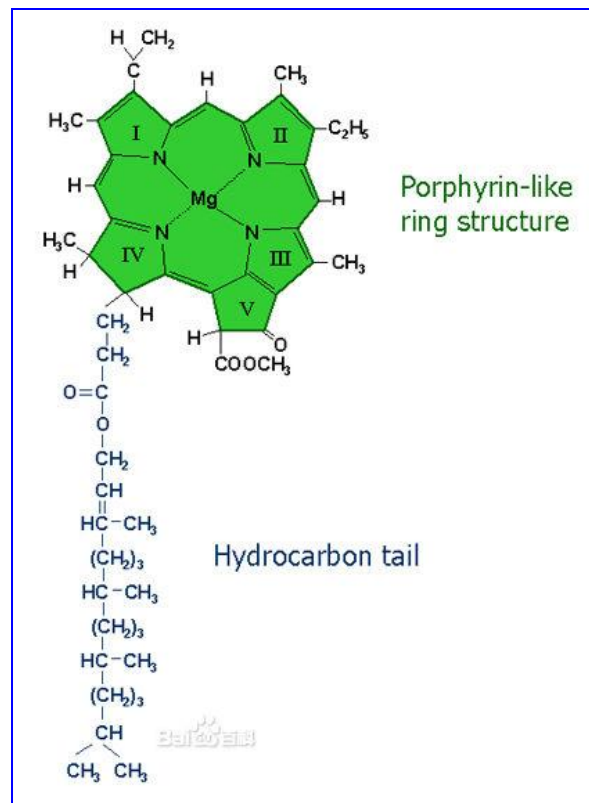


叶绿素在植物进行光合作用中吸收可见光，并将光能转化成化学能，是植物进行光合作用的必需的催化剂。

游离的叶绿素很不稳定，对光、热较敏感，易分解

高等植物体内的叶绿体色素有叶绿素和类胡萝卜素两类，主要包括叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素。

叶绿素吸收大部分的红光和紫光但反射绿光，所以叶绿素呈现绿色。

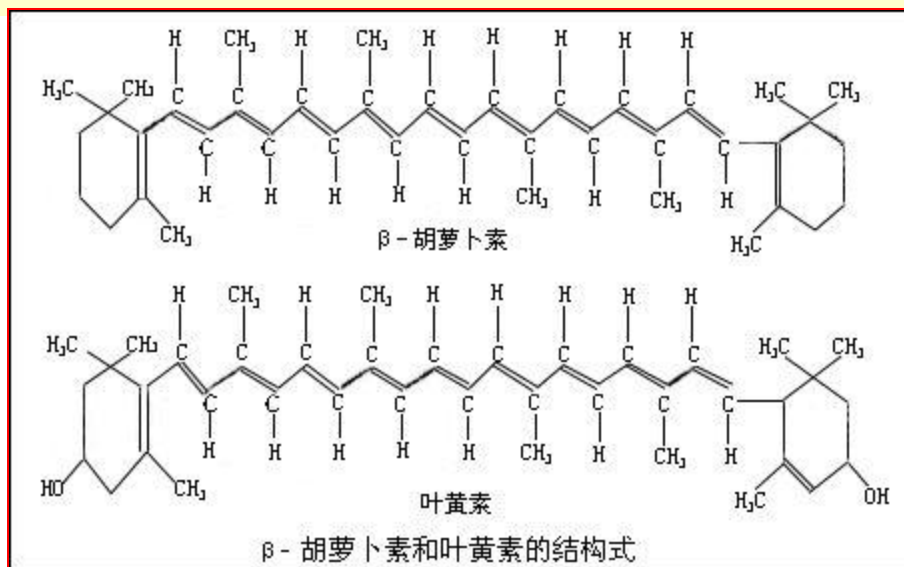


叶绿素为镁卟啉化合物



类胡萝卜素能将吸收的光能传递给叶绿素a，是光合作用不可少的光合色素。

植物的类胡萝卜素存在于各种黄色质体或有色质体内；如秋季的黄叶，黄色花卉，黄色和红色的果实和黄色块根。





一、实验原理

叶绿素的色素都能溶解于有机溶剂中，可选择乙醇或丙酮提取色素。

根据叶绿素提取液对可见光谱的吸收，利用分光光度计在某一特定波长下测出吸光度，再用公式计算出提取液中各色素的含量。

光的吸收定律
——朗伯-比耳定律



$$A = k l c$$

叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素在95%的乙醇溶液中的最大吸收峰的波长分别为665nm、649nm和470nm。

A—吸光度

C—有色物质的浓度

l—比色皿的厚度 →

K—比例常数，与入射光的波长以及溶液的性质、温度等因素有关





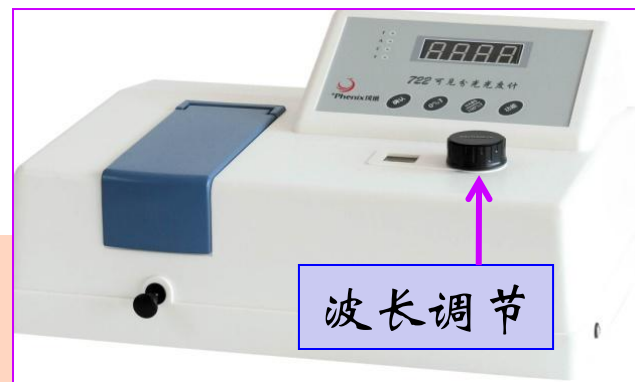
测定提取液在 665nm、649nm 和 470nm 波长处的吸光度A，根据经验公式计算，可得到叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素T和类胡萝卜素的含量。

浓度的计算公式：

$$c_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$$

$$c_b = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$$

$$c_{x-c} = (1000A_{470} - 2.05c_a - 114.8c_b) / 245$$



波长调节

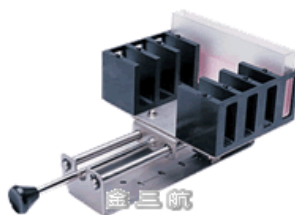
单位

— mg/L



二、仪器设备和材料

其他：称量纸、滤纸、卷筒纸、小玻棒
药勺、 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ 溶液、 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ 溶液、pH试纸





三、实验步骤

(1) 叶绿素和类胡萝卜素的提取和测定

1. 将研钵清洗后用纸擦干；将棕色容量瓶清洗后用乙醇润洗；
2. 取多种新鲜绿叶蔬菜，如菠菜、青菜等，洗净后弃去叶柄和中脉，然后用吸水纸将菜叶表面的水吸干；
3. 称取~0.1g样品于研钵中，扯成小片，加入少量碳酸钙粉末（0.1g左右），再加入1~2mL 95%的乙醇，充分研磨后倒入 25 mL容量瓶中，然后用少量乙醇洗涤研钵。重复洗涤3次，每次洗涤液都倒入容量瓶中。用95%的乙醇定容至25.00 mL，充分摇匀后，静置约5分钟。



4.从容量瓶中轻轻倒出 8mL左右液体放入离心管中，离心分离2分钟。取离心液的上层清液用分光光度计分别于波长为665nm、649nm和470nm处测定吸光度。并以95%乙醇作为空白对照，记下所测得的吸光度。

5.根据在不同波长处测定的吸光度值计算样品中叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素T 和类胡萝卜素的浓度。

★吸收池用蒸馏水冲洗后，用少量提取液润洗两次，测定前用纸擦干，手指捏在阴影面。空白放第一位。洗涤液倒入大烧杯。



(2) 叶绿素在酸、碱性介质中的稳定性试验

取 2mL 叶绿素
提取液到试管

两份

滴加 0.1 mol L^{-1}
NaOH 溶液

滴加 0.1 mol L^{-1}
HCl 溶液

观察提取液
颜色的变化

记录颜色
变化时的
pH 值

四、注意事项

1. 加入碳酸钙，可防止研磨过程中，由于渗出液呈酸性而破坏叶绿素。
2. 叶绿素见光会分解，操作时应在弱光下进行，研磨时间尽可能短些。
3. 叶绿素a和叶绿素b的吸收峰波长相差仅24nm，难以达到精确测定。

- ★ 1、实验结束后将容量瓶、离心管、试管洗净放回原位，桌面整理干净。
- 2、写出实验报告并上交。