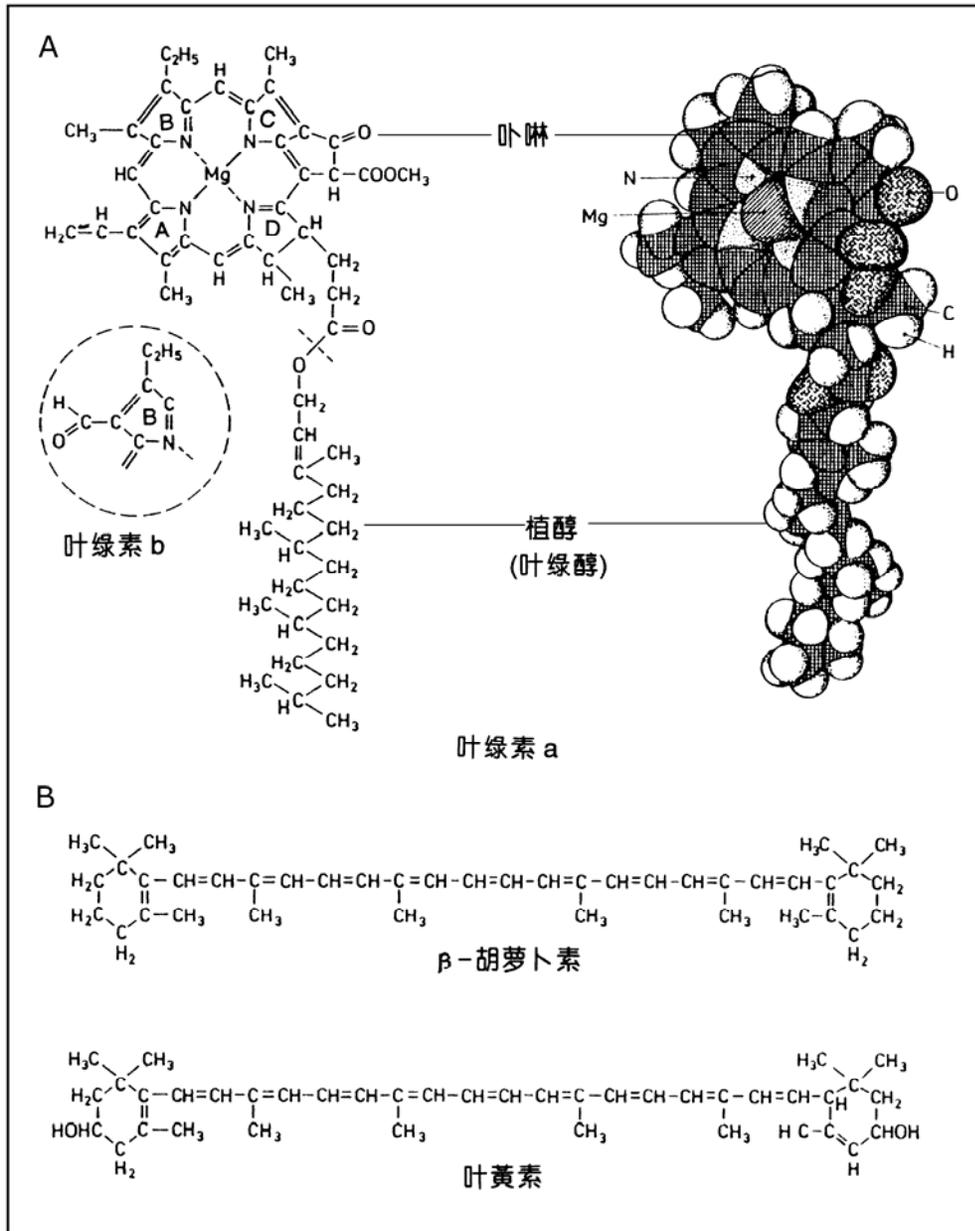
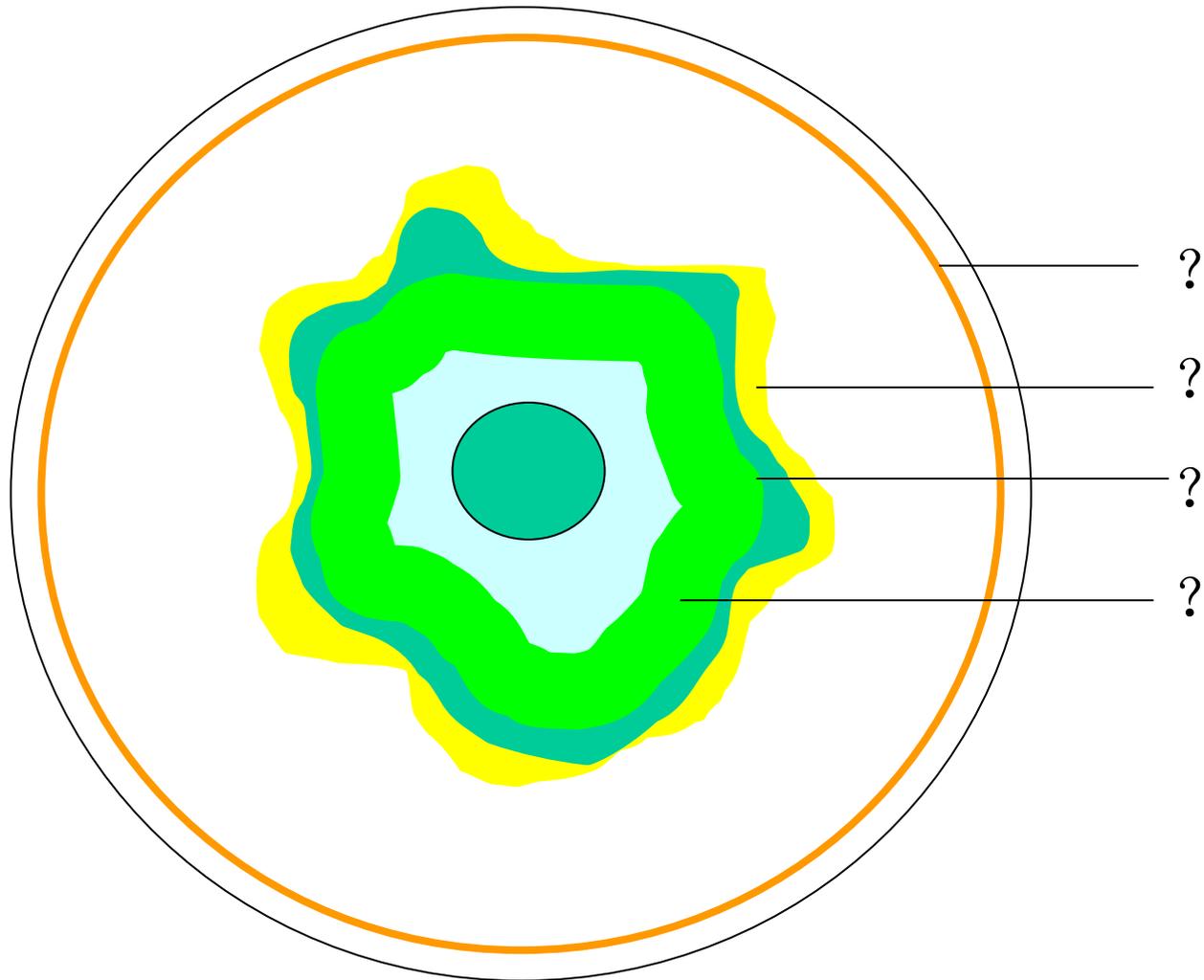


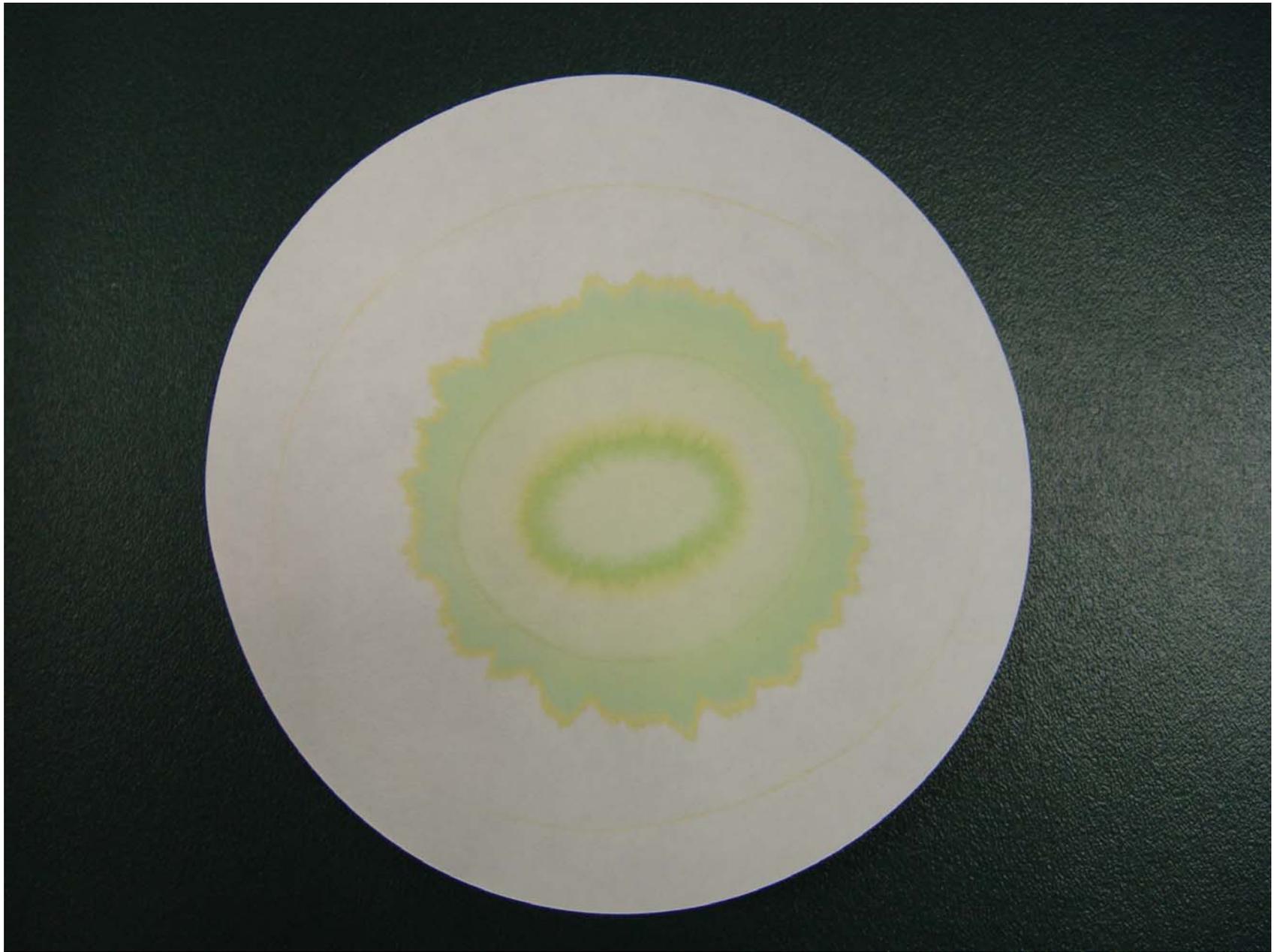
- 实验4 叶绿体色素的提取、分离、理化性质和叶绿素含量的测定
- 
- 实验目的：掌握植物中叶绿体色素的成分分离和定性、定量分析的原理和方法。
- 一、实验原理

1、溶解性。叶绿素和类胡萝卜素均不溶于水而溶于有机溶剂，常用95%的乙醇或80%的丙酮提取。

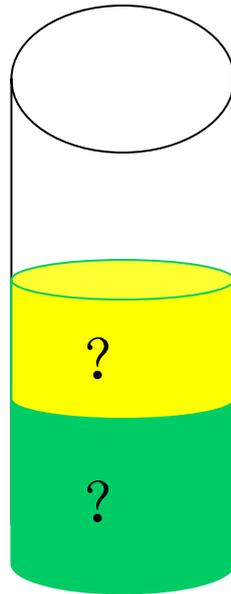
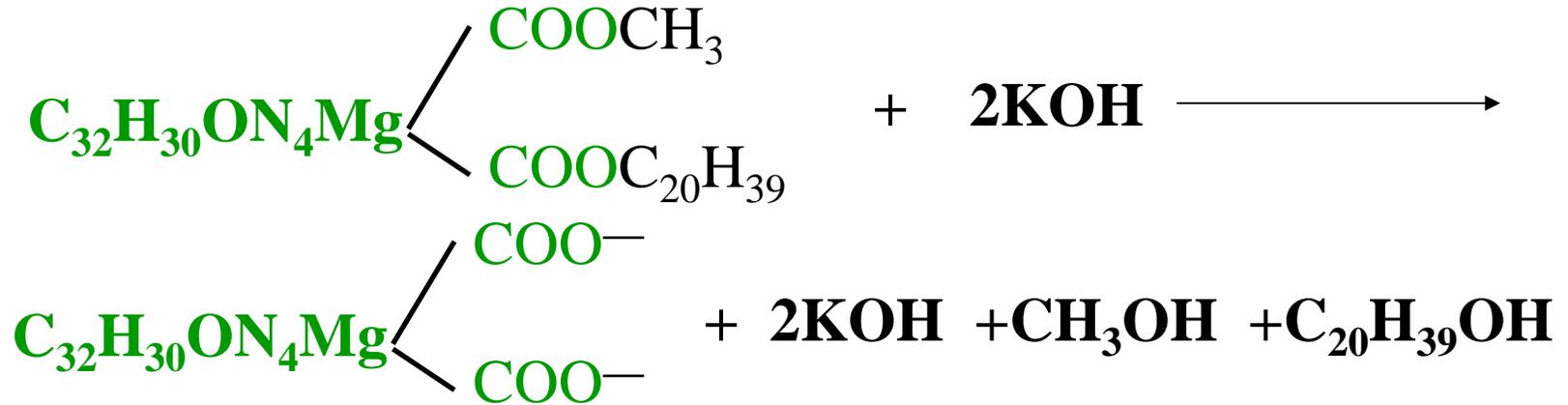


2、吸附性。滤纸对Chlb、Chla、叶黄素的胡萝卜素的吸附能力不同(?)，当用石油醚作推动剂时，其在滤纸上的移动速度不同，可相互分离。

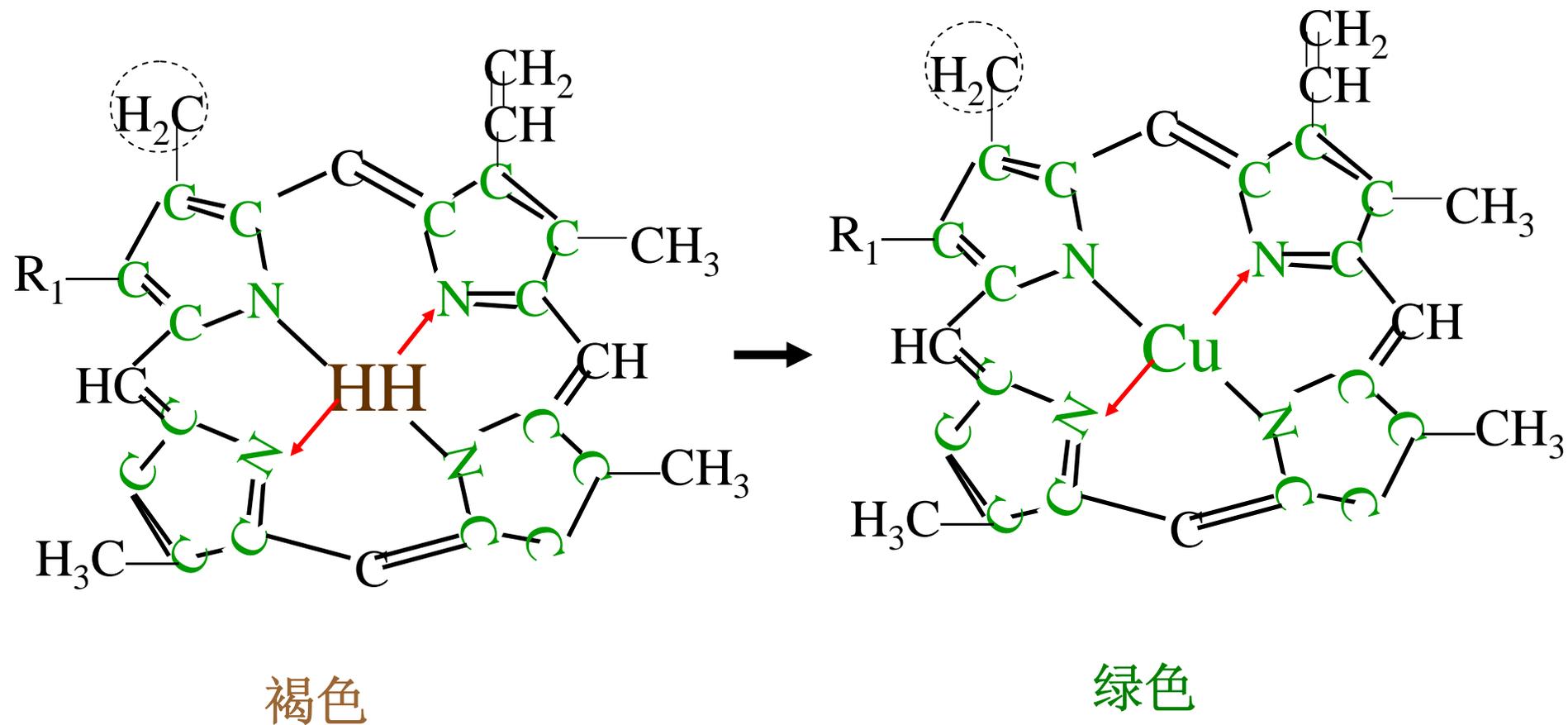




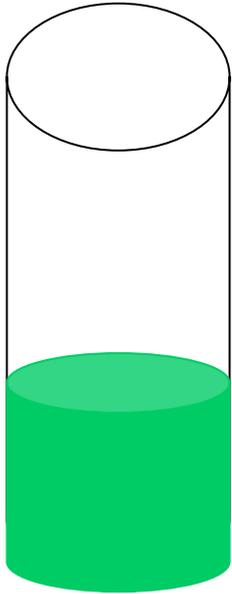
3、皂化反应。叶绿素是二羧酸酯，与强碱反应，形成绿色的可溶性叶绿素盐，就可与有机溶剂中的类胡萝卜素分开。



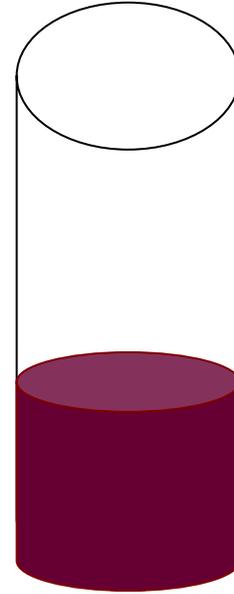
- 4、取代反应。 在酸性或加温条件下，叶绿素卟啉环中的 $Mg^{2+}$ 可依次被 $H^+$ 和 $Cu^{2+}$ 取代形成褐色的去镁叶绿素和绿色的铜代叶绿素。
- $H^+$ 取代 $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ( $Zn^{2+}$ )取代 $H^+$ 。



- 5、叶绿素受光激发，可发出红色荧光，反射光下可见红色荧光。

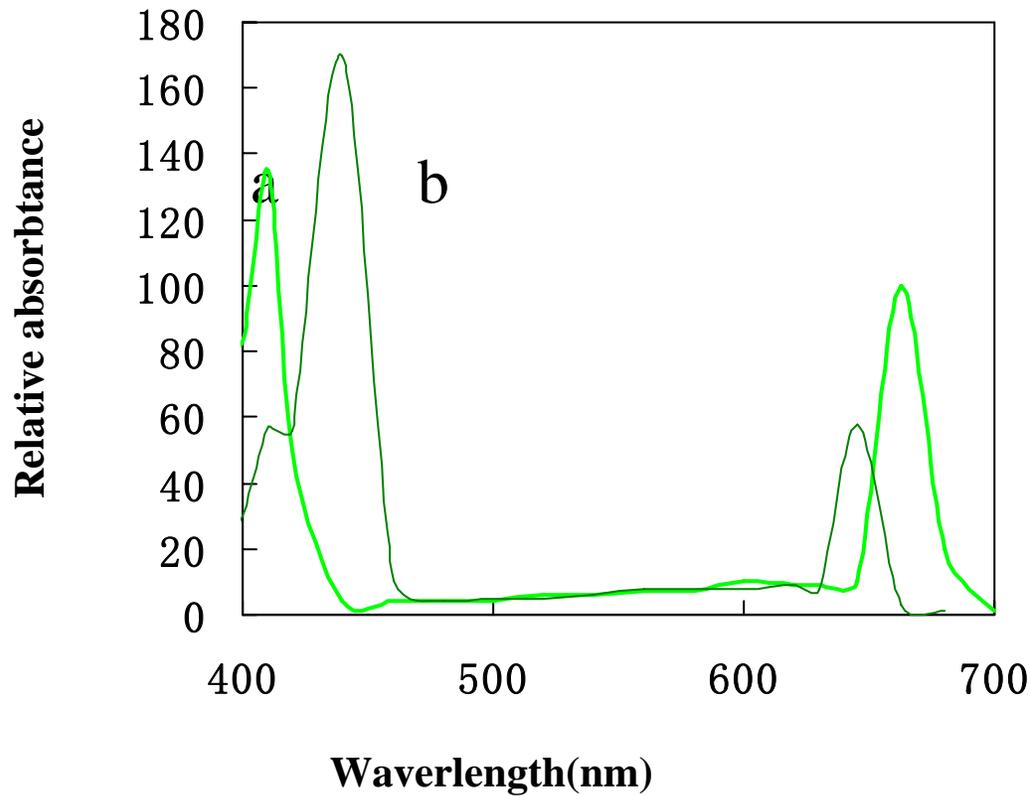


透射光下呈绿色



反射光下呈红色

6、定量分析。叶绿素吸收红光和兰紫光，红光区可用于定量分析，其中645和663用于定量叶绿素a,b及总量，而652可直接用于总量分析。

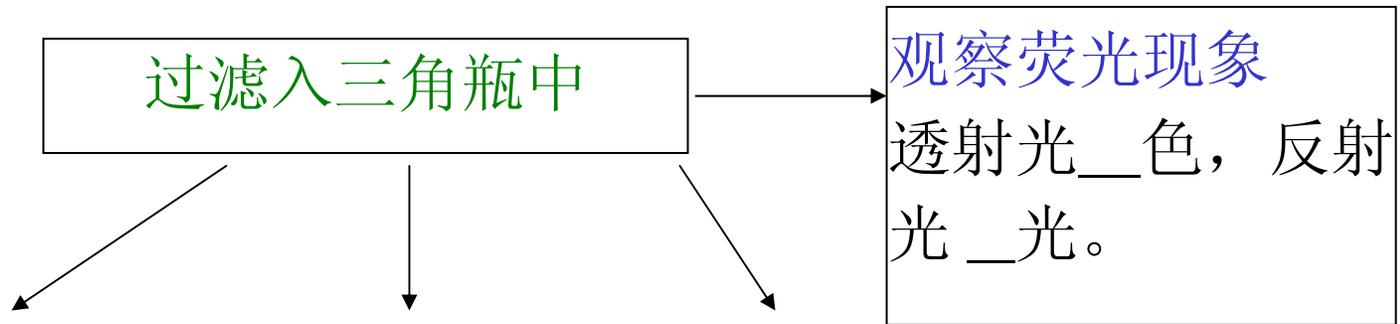


- 材料： 桑叶、小麦、菠菜等。

- 三、方法和结果：

- 1. 定性分析：

- 鲜叶5g+95%30ml（逐步加入），磨成匀浆



## 色素分离

在滤纸中心缓慢滴入30滴提取液

略干后滴入石油醚直到接近滤纸边缘

用笔注出成分和颜色结果附于实验报告中。

## 皂化反应

加KOH数片剧烈摇匀，加石油醚5ml和H<sub>2</sub>O 1ml  
分层后观察

上层呈\_\_\_\_\_色，  
为\_\_\_\_\_，吸收\_\_\_\_\_光。  
下层呈\_\_\_\_\_色。  
为\_\_\_\_\_。吸收\_\_\_\_\_光。

## 取代反应 (1)

加醋酸约2ml，变褐（\_\_\_\_\_叶绿素）  
取1/2加醋酸铜粉加热变\_\_\_\_\_色，  
为\_\_\_\_\_叶绿素。

## 取代反应 (2) :

鲜叶2-3cm<sup>2</sup>，加Ac-AcCu 20ml加热。  
观察：\_\_\_\_\_min变为色的\_\_\_\_\_叶绿素，  
min后，变为\_\_\_\_\_色的\_\_\_\_\_叶绿素。

# 叶绿素和类胡萝卜素的吸收光谱测定：

皂化反应的上层  
黄色石油醚溶液

反复粹取后并离心  
后的叶绿素盐

稀释到合适浓度

在400-700nm处扫描光谱，分别测定类胡萝卜素和叶绿素的吸收峰

- 2. 叶绿素定量分析:

- 鲜叶0.1g, 加1.9mlH<sub>2</sub>O, 磨成匀浆, 各取0.2ml加80%丙酮4.8ml, 摇匀, 4000转离心3min, 上清液在645, 652, 663测定OD, 计算Chla, Chlb 和Chl总量的值。

- 四、结果计算

- $C_{a(\text{mg/L})} = 12.7 \text{OD}_{663} - 2.69 \text{OD}_{645}$

- $C_{b(\text{mg/L})} = 22.9 \text{OD}_{645} - 4.68 \text{OD}_{663}$

- $C_{T(\text{mg/L})} = C_a + C_b$  或  $\text{OD}_{652} \times 1000 / 34.5$

- Chla含量(mg/g.FW)=  $(C_{a(\text{mg/L})}/1000)$
- $\times 2/0.1 \times 5/0.2$
- Chlb含量(mg/g.FW) =  $(C_{b(\text{mg/L})}/1000)$
- $\times 2/0.1 \times 5/0.2$
- Chl总含量(mg/g.FW) =  $(C_{T(\text{mg/L})}/1000)$
- $\times 2/0.1 \times 5/0.2$

## • 五、分析讨论

- 1、为什么叶绿素吸收红光和兰紫光？
- 2、为什么可用皂化叶绿素盐来测定叶绿素的吸收光谱？