**叶绿素、类胡萝卜素的测定**

一、原理

根据叶绿体色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测定其吸光度，即可用公式计算出提取液中各色素的含量。根据朗伯一比尔定律，某有色溶液的吸光度A与其中溶质浓度C和液层厚度L成正比，即A,αCL式中:α比例常数。当溶液浓度以百分浓度为单位，液层厚度为1cm时，α为该物质的吸光系数。各种有色物质溶液在不同波长下的吸光系数可通过测定已知浓度的纯物质在不同波长下的吸光度而求得。如果溶液中有数种吸光物质，则此混合液在某一波长下的总吸光度等于各组分在相应波长下吸光度的总和。这就是吸光度的加和性。今欲测定叶绿体色素混合提取液中叶绿素a、b和类胡萝卜素的含量，只需测定该提取液在三个特定波长下的吸光度A，并根据叶绿素a、b及类胡萝卜素在该波长下的吸光系数即可求出其浓度。在测定叶绿素a、b时为了排除类胡萝卜素的干扰，所用单色光的波长选择叶绿素在红光区的最大吸收峰。

二、材料、仪器设备及试剂

(一)材料:新鲜(或烘干)的植物叶片。

(二)仪器设备:1)分光光度计;2)电子顶载天平(感量0.01g);3)研钵;4)棕色容量瓶;5)小漏斗;6)定量滤纸;7)吸水纸;8)擦镜纸;9)滴管。

(三)试剂:1)95%乙醇(或80%丙酮)(v丙酮:v乙醇=2:1的95%水溶液);2)石英砂;3)碳酸钙粉。暗中 2h，0.5g，25ml

三、实验步骤

1）取新鲜植物叶片（或其它绿色组织）或干材料，擦净组织表面污物，剪碎（去掉中脉)，混匀。

2)将取好的样品放入25m1容量瓶中，加混合浸提液（无水乙醇:丙酮=5:5）20ml，放在黑暗条件下，浸泡至叶片发白，用浸提试剂定容至25ml，摇匀备用。

3）把叶绿体色素提取液倒入1cm光径的比色皿内，以浸提试剂为空白测定吸光度。选择波长663 646和470nm。

四、实验结果计算

叶绿素a的浓度=12.21 × OD663 - 2.81 × OD646

叶绿素b的浓度=20.13 ×OD646- 5.03× OD663

类胡萝卜素浓度=(1000A470-3.27Ca-104Cb)÷229单位 mg/L

C(mg/L)\*提取液总量(ml)

叶绿体色素含量（mg/g）=$\frac{C（mg/L）∗提取液总量（ml）}{烟叶重量（g)∗1000}$