



植物生理生化实验技术与原理

ZHIWU SHENGLI SHENGHUA SHIYAN JISHU YU YUANLI

王晶英 敖红 张杰 曲桂琴 编



东北林业大学出版社

植物生理生化实验 技术与原理

王晶英 敖红 张杰 曲桂琴 编

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物生理生化实验技术与原理/王晶英, 敖红, 张杰, 曲桂琴编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003.7

ISBN 7-81076-430-6

I. 植... II. ①王... ②敖... ③张... ④曲... III. ①植物生理学—实验—高等学校—教材②植物学: 生物化学—实验—高等学校—教材 IV. Q94-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 054738 号

责任编辑: 袁俊琦

封面设计: 叶 方



NEFUP

植物生理生化实验技术与原理

Zhiwu Shengli Shenghua Shiyan Jishu Yu Yuanli

王晶英 敖 红 张 杰 曲桂琴 编
东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

东北林业大学印刷厂印刷

开本 787 × 1092 1/16 印张 13 字数 299 千字

2003 年 8 月第 1 版 2003 年 8 月第 1 次印刷

印数 1—1 100 册

ISBN 7-81076-430-6
S·381 定价: 22.00 元

前 言

植物生理学和生物化学是研究植物生命活动规律、揭示植物生命现象本质的科学。植物生理生化的深入研究和发 展对植物生产、环境优化、生物圈的良性循环都会发生深刻而久远的影响。随着现代科学技术的发展,植物生命活动规律、机理及生命本质的研究涉及的科学或专业越来越多,包括生物、农学、林学、植物保护、园林、环境等。

为了适应以林为特色的各相关专业植物生理生化教学及科研的需要,我们编写了《植物生理生化实验技术与原理》一书。本书在编写过程中参考了大量的书籍,同时结合了编写者在教学和科学研究中的实践经验,本书的内容有严格的科学性,方法具有可靠性和可操作性。本书作为植物生理生化实验课教材,可以加深学生对实验基本理论的理解,锻炼学生的实验操作技能,培养严谨的科学态度,提高学生分析问题和解决问题的能力。所以本书既可以作为学生教材,又可以为科学研究工作者提供一本很好的实验工具书。

本书内容共分两篇:第一篇为实验技术部分,共收入了常用实验方法 70 余项,常用生理生化指标收录了多种测定方法,针对不同的实验目的和实验材料可以选用不同的方法。第二篇为实验原理部分,包括层析技术、光学分析技术、电泳技术、免疫分析技术——酶联免疫吸附测定法、红外线 CO_2 气体分析技术和气体测压技术。

本书由王晶英、敖红、张杰、曲桂琴编写,由孙广玉、王文章审。

由于编者的水平所限,编写时间比较仓促,书中难免有不足和错误,请读者和专家们给予指正。

编者

2003 年 6 月

目 录

第一篇 植物生理生化实验技术

第一章 细胞的生物化学	(1)
实验一 植物组织等电点的测定	(1)
实验二 植物组织有机酸含量测定	(2)
实验三 植物组织汁液浓度(可溶性固形物)的测定	(3)
实验四 抗坏血酸(维生素 C)含量的测定	(8)
实验五 可溶性糖含量测定	(11)
实验六 淀粉含量测定	(13)
实验七 植物组织中纤维素的测定	(16)
实验八 植物组织中游离氨基酸总量的测定——茚三酮法	(18)
实验九 蛋白质含量测定	(20)
实验十 粗脂肪的测定	(24)
实验十一 植物组织中 DNA 的提取与测定	(25)
实验十二 酶的基本性质	(28)
实验十三 脲酶 K_m 值的测定	(33)
实验十四 淀粉酶活性的测定	(35)
实验十五 植物组织 ATP 酶活性测定	(38)
实验十六 聚丙烯酰胺盘状电泳法分离过氧化物酶同工酶	(41)
实验十七 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量	(47)
第二章 光合作用	(51)
实验一 叶绿体色素的提取分离	(51)
实验二 叶绿素的定量测定	(52)
实验三 光合强度的测定——改良半叶法	(53)
实验四 RuBPcase 活性测定——分光光度法	(55)
实验五 PEP 羧化酶活性测定	(56)
实验六 红外线 CO_2 分析法测定植物的光合速率和呼吸速率	(58)
实验七 氧电极法测定植物的光合速率与呼吸速率	(66)
第三章 呼吸作用	(72)
实验一 植物呼吸速率测定——小篮子法	(72)
实验二 微量检压法测定植物的呼吸速率	(74)
实验三 过氧化物酶活性的测定	(79)
实验四 过氧化氢酶活性的测定	(82)
第四章 水分代谢	(84)

实验一	植物组织含水量的测定	(84)
实验二	植物组织自由水和束缚水含量测定	(85)
实验三	蒸腾强度的测定	(87)
实验四	植物组织水势的测定	(89)
实验五	植物叶片水势和渗透势的测定——露点法	(92)
实验六	植物细胞汁液渗透势测定	(93)
实验七	钾离子对气孔开度的影响	(98)
第五章	矿质营养	(99)
实验一	植物伤流量的测定	(99)
实验二	植物伤流液的收集及糖和氨基酸的鉴定	(99)
实验三	植物根系活力测定	(101)
实验四	植物组织 N、P、K 速测	(104)
实验五	培养液中 N、P、K 的定量测定	(106)
实验六	硝酸还原酶活力测定	(108)
第六章	植物的生长发育	(112)
实验一	植物内源激素脱落酸、赤霉素的分离及测定	(112)
实验二	酶联免疫吸附检测法测定植物激素含量	(115)
实验三	赤霉素对 α -淀粉酶的诱导形成	(117)
实验四	赤霉素促进种子萌发的试验	(118)
实验五	红松种子抑制物质的提取和生物鉴定	(119)
实验六	红松种子中的 ABA 的分离——柱层析法	(121)
实验七	细胞分裂素的抗衰老作用	(122)
实验八	生长刺激剂在插条生根上的应用	(123)
实验九	种子发芽率的快速测定	(125)
实验十	植物根系分泌物的观察	(128)
实验十一	植物春化现象的观察	(129)
实验十二	植物光周期现象的观察	(130)
第七章	抗性生理	(131)
实验一	植物组织水分饱和和亏缺测定	(131)
实验二	植物抗逆性的鉴定——电导仪法	(132)
实验三	植物组织游离脯氨酸含量的测定	(133)
实验四	植物组织中丙二醛含量测定	(135)
实验五	超氧化物歧化酶活性测定	(136)

第二篇 植物生理生化实验原理

第八章	层析技术	(139)
第一节	层析的原理和分类	(139)
第二节	吸附层析	(141)

第三节	离子交换层析·····	(145)
第四节	凝胶层析·····	(147)
第五节	亲和层析·····	(148)
第九章	光学分析技术·····	(151)
第一节	紫外光-可见光分光光度法·····	(151)
第二节	红外分光光度法·····	(155)
第三节	荧光分光光度法·····	(159)
第四节	原子吸收分光光度法·····	(164)
第十章	电泳技术·····	(167)
第一节	电泳的分类与基本原理·····	(167)
第二节	聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	(169)
第三节	琼脂糖凝胶电泳·····	(175)
第十一章	免疫分析技术——酶联免疫吸附测定法·····	(177)
第一节	抗原-抗体的反应概述·····	(177)
第二节	ELISA 的基本原理·····	(178)
第三节	特定免疫原的设计和合成·····	(179)
第四节	抗体的制备·····	(179)
第五节	标记抗体的制备·····	(180)
第六节	ELISA 检测程序·····	(181)
第十二章	红外线 CO ₂ 气体分析技术·····	(183)
第一节	红外线 CO ₂ 气体分析仪的结构工作原理·····	(183)
第二节	红外线 CO ₂ 气体分析仪的类型及工作原理·····	(185)
第三节	红外线 CO ₂ 气体分析技术的运用·····	(187)
第十三章	气体测压技术·····	(189)
第一节	气体测压技术的类型·····	(189)
第二节	微量定容测压法(华氏呼吸计)的原理、构造及使用·····	(189)
第三节	气体测压技术的应用·····	(193)
附录 1	硫酸铵饱和度常用表·····	(195)
附录 2	实验中常用酸、碱的相对密度和浓度的关系·····	(196)
附录 3	常用固态酸、碱、盐的物质的量浓度配制参考表·····	(196)
附录 4	常用缓冲溶液的配制·····	(197)
主要参考文献	·····	(200)

第一篇 植物生理生化实验技术

第一章 细胞的生物化学

实验一 植物组织等电点的测定

一、原理

由于溶液的 pH 值低于两性电解质的等电点时，碱式解离占优势，两性电解质带正电而吸引阴离子，这时，如果溶液中有带色的阴离子（如曙红等酸性染料的可有色离子是阴离子）存在，它们就将被吸引而将两性电解质染上颜色。反之，溶液的 pH 值高于两性电解质的等电点，那么两性电解质就将带负电而吸引阳离子，这时，如果溶液中有带色阳离子（如甲烯蓝等碱性染料的可有色离子是有色的）存在，它们会使两性电解质染上另一种颜色。这样，在不同 pH 值的溶液中，根据原生质被染色的情况，即可确定原生质或植物组织的等电点。

二、材料仪器设备及试剂

(1) 植物材料：萌发种子幼苗或树木嫩枝、叶柄。

(2) 仪器设备：小试管 8 支，试管架 1 个，表面皿 3 个，刀片 1 个，镊子 1 把，玻璃铅笔 1 支。

(3) 药品：

①磷酸盐——柠檬酸缓冲液（pH 值为 2.2、3.0、3.8、4.6、5.4、6.2、7.0、8.0）；
②70%酒精；③0.1%曙红溶液；④0.2%甲烯蓝溶液。

三、操作方法

(1) 取已萌发种子，在距根尖约 0.5 cm 处用刀片作横切片 25 片左右（做枝条、叶柄横切片），尽可能切得薄些，然后将这些切片放入盛有 70%酒精的表面皿中浸 5 min。

(2) 将 8 支小试管编号，并依次倒入 pH 值为 2.2、3.0、3.8、4.6、5.4、6.2、7.0、8.0 的 8 种缓冲液 5 ml 左右。

(3) 用镊子将在酒精中浸过 5 min 的切片取出，移入盛有 5 ml 左右 0.1%曙红溶液的表面皿中浸 10 min，这时所有的切片均被染成玫瑰红色。

(4) 将切片从曙红溶液中取出，不经洗涤就直接移入盛有 5 ml 左右 0.2% 甲烯蓝溶液的表面皿中也浸 10 min。

(5) 将切片从甲烯蓝溶液中取出，分别移入盛有不同 pH 值缓冲液的小试管中（每支试管中放 3 片左右）。

(6) 切片在缓冲液中浸 1 h 以后，根据切片着色情况用肉眼直接判断（或借助显微镜观察），确定等电点（在 pH 值高于等电点的缓冲液中被染上了蓝色，反之被染上红色。假若在相邻两个 pH 值缓冲液中，一试管的切片被染上红色，另一试管中的切片被染上蓝色，那么组织的等电点就在这两个 pH 值之间）。

四、试验结果

参照表 1-1 记录实验结果，确定出实验材料的等电点，并结合实验原理进行分析。

表 1-1 实验结果记录表

缓冲液 pH 值	2.2	3.0	3.8	4.6	5.4	6.2	7.0	8.0
叶片着色情况								

实验二 植物组织有机酸含量测定

一、原 理

植物体内的有机酸可用乙醇或蒸馏水浸提出来，浸出液呈酸性，可用碱溶液滴定。滴定结果可以用碱液的毫升数表示，也可以用材料中主要有机酸的质量分数表示。果实中的有机酸含量如柑橘类可换算成柠檬酸，葡萄可换算成酒石酸，苹果类则换算成苹果酸表示。如：0.1 mol·l⁻¹ 氢氧化钠标准液 1 ml 相当于柠檬酸 0.0064 g，相当于酒石酸 0.0075 g，相当于苹果酸 0.0067 g，相当于草酸 0.0045 g。

二、材料、仪器设备及试剂

(1) 材料：含有机酸的植物组织或果实。

(2) 仪器设备：研钵，三角瓶（250 ml、100 ml），恒温水浴，漏斗，碱式滴定管，酸度 pH 值计，量筒（50 ml）。

(3) 试剂：

① 0.1 mol·l⁻¹ 氢氧化钠标准液：取 10 g 分析纯氢氧化钠，溶于 500 ml 蒸馏水中（应煮沸以去除 CO₂），贮于塑料瓶内，放置数日。用时取上清液 200ml，加 4 倍去 CO₂ 水稀释，并用邻苯二甲酸氢钾标定。

$$0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{NaOH 的效价 } (f) = 10 w / 0.020414 a$$

式中： w ——邻苯二甲酸氢钾的克数；

a ——NaOH 毫升数。

② 酚酞指示剂：称取 1 g 酚酞，溶于 100 ml 的 95% 乙醇中。

③ 蓝色石蕊试纸。

三、方 法

(1) 样品中游离有机酸的提取：称取新鲜植物组织 5 ~ 10 g，置于研钵中研成糊状，用蒸馏水洗入 250 ml 三角瓶中，使体积在 100 ml 以内。于 80 °C 恒温水浴中浸提 30 min，不断搅拌。取出，冷却后过滤或离心，用蒸馏水冲洗残渣 2 ~ 3 次，合并滤液或上清液，用蒸馏水定容至 100 ml，混匀备用。

(2) 滴定：根据样品中有机酸含量多少，决定提取液的稀释程度。取稀释了的试液 20 ml，转入 100 ml 三角瓶中，加酚酞指示剂 2 ~ 3 滴，用 0.1 mol·l⁻¹ 氢氧化钠标准液滴定至浅粉红色不退为止。记录滴定用去的氢氧化钠标准液的毫升数。如果试液颜色影响滴定终点的确定，可在蓝色石蕊试纸上加 1 滴蒸馏水和 1 滴试液，当试纸不再变红时为终点。除此之外，还可以用酸度计测定，以避免试液颜色对确定终点的影响，

方法如下：

将酸度计的电极浸入试液中，边搅拌边滴加 0.1 mol·l⁻¹ 氢氧化钠标准液，记录 pH 值的变化。以滴加毫升数为横轴，以 pH 值为纵轴，作成中和滴定曲线。两个变曲点间的中点即为中和点。

四、结果计算

设滴定值为 a ml，0.1 mol·l⁻¹ 氢氧化钠的效价为 f ，稀释体积为 V ，则标准的 0.1 mol·l⁻¹ 氢氧化钠的滴定值 x (ml) 为：

$$x = a \cdot f$$

对于试液的滴定值 y (ml) 为：

$$y = a \cdot f \cdot V \text{ (滴定时取用试液毫升数)}^{-1}$$

一般水果蔬菜中的有机酸常以苹果酸为代表，1 ml 0.1 mol·l⁻¹ 氢氧化钠标准液相当于苹果酸 0.0067 g，由此可以计算有机酸含量的鲜重百分数。

$$\text{有机酸含量} = 0.67 a \cdot f \cdot v \cdot (w \cdot v)^{-1} \times 100\%$$

式中： v ——提取液总体积，ml；

v' ——滴定时取用试液毫升数；

w ——样品重量，g。

实验三 植物组织汁液浓度（可溶性固形物）的测定

一、原 理

溶液的折射率与溶液浓度有密切关系。溶液浓度越高，折射率越大。对于单一溶质

的溶液，可由折射率直接查出溶液浓度。溶液的折射率可以用折射仪或手持糖量计测得。手持糖量计是特为现场快速测定甘蔗或甜菜的含糖量而设计的折射仪，可直接读出汁液含糖量的百分率（无折射率标尺）。由于甘蔗、甜菜榨汁中的溶质以蔗糖为主，其他种类溶质（如无机盐等）数量很少，因此由这部分溶质产生的折射率均一并计入蔗糖浓度中去。

果品、蔬菜的溶质含量也可用细胞汁液浓度表示，称为可溶性固形物，是果蔬品质的重要指标。用折射仪或手持糖量计测量果品汁液浓度时，由于果汁中除糖以外，含酸量也很可观，因此测得数值实际上是糖、酸两部分（及少量其他物质）的总和，常以可溶性固形物表示之（不溶物质对溶液折射率无影响）。

二、材料、仪器设备及试剂

（1）材料：多汁植物叶片。

（2）仪器设备：阿贝折射仪或手持糖量计，榨汁机，温度计，擦镜纸，滴管（带橡皮头），纱布，打孔器。

三、方 法

（1）取材：选用多汁叶片、多汁果实或块根等为试验材料。

（2）材料的处理：待测洗净用吸水纸吸干，用打孔器在待测部位打出圆柱状组织，切下适当大小的小块，置榨汁钳上榨汁。小型多汁材料直接榨汁即可。如准备测定植物叶片汁液浓度，最好在田间进行，用纱布将待测叶片上的尘土擦净，取下后迅速将叶片折叠成方块状，置榨汁钳上榨汁。

（3）测量：用小滴管取1滴汁液，滴在折射仪棱镜的毛玻璃面上，关闭棱镜，读出折射率或相当于糖浓度的百分率。进行下次测定时，必须用蒸馏水将棱镜上的汁液洗净，再用擦镜纸擦干。

（4）记录：取相同部位叶片或大型果实，重复测定3~5次，记录结果。

注意事项：

（1）果实不同部位所含的可溶性固形物不同，所以对于大型果实需要固定取样部位，也可将整个果实榨汁混匀测定。

（2）对于含水量较低的器官，直接榨汁有困难，可包在塑料薄膜中置-30℃以下的低温冰箱中冷冻3h，取出融化后，即可榨出汁液。

（3）溶液折射率受温度影响很大。若需要精确测定和比较时，应使用阿贝折射仪，并将超级恒温水浴与折射仪上保温水接口相连接，利用恒温循环水控制折射仪棱镜温度。最好将温度调到20℃。

附注：

1. 阿贝折射仪的构造和使用方法

阿贝折射仪的外形如图1-1所示。它可测定介质的折光系数。折光系数视介质的种类及浓度而异，也因温度变化而不同。因此，在同一温度下，可以鉴别不同物质或同一物质的不同浓度。使用时把仪器放在光亮处，调节反光镜及棱镜，转动手轮5和消色散棱镜手轮7，

使望远镜中光线明亮，打开棱镜 3，滴上测定液 2~3 滴，并重新关紧棱镜使溶液在棱镜 3、4 间形成一薄层。此时在望远镜视野中可见到明暗不同的两个半圆，调节 7 消除因色散而产生的虹彩，只余黑白两色，再调节 5 使明暗交界线正通过十字交叉线的交点，如图 1-1B 所示。从标尺镜中读出折光系数或糖百分数，如图 1-1C 所示；查表 1-2，求出 20℃ 时含糖百分率；如温度不是 20℃，则应查表 1-3 加以校正。

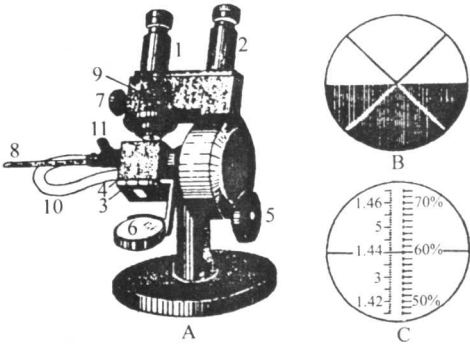


图 1-1 阿贝折射仪

1. 望远镜；2. 标尺镜；3、4. 棱镜；
5. 转动螺旋；6. 反光镜；7. 补偿棱镜调节器；
8. 温度计；9. 校正螺丝；10、11. 通水保温装置

表 1-2 根据 20℃ 时折射系数测定糖液中含糖量

折射系数	糖量/%	折射系数	糖量/%	折射系数	糖量/%	折射系数	糖量/%
1.333 0	0	1.346 8	9.5	1.362 0	19.0	1.378 4	28.5
1.333 7	0.5	1.347 5	10.0	1.362 8	19.5	1.379 2	29.0
1.334 4	1.0	1.348 3	10.5	1.363 7	20.0	1.380 1	29.5
1.335 1	1.5	1.349 1	11.0	1.364 5	20.5	1.381 0	30.0
1.335 8	2.0	1.349 9	11.5	1.365 4	21.0	1.381 9	30.5
1.336 5	2.5	1.350 7	12.0	1.366 2	21.5	1.382 8	31.0
1.337 2	3.0	1.351 5	12.5	1.367 1	22.0	1.383 8	31.5
1.337 9	3.5	1.352 3	13.0	1.367 9	22.5	1.384 7	32.0
1.338 6	4.0	1.353 1	13.5	1.368 7	23.0	1.385 7	32.5
1.339 3	4.5	1.353 9	14.0	1.369 6	23.5	1.386 5	33.0
1.340 0	5.0	1.354 7	14.5	1.370 4	24.0	1.387 4	33.5
1.340 8	5.5	1.355 5	15.0	1.371 3	24.5	1.388 4	34.0
1.341 5	6.0	1.356 3	15.5	1.372 1	25.0	1.389 4	34.5
1.342 3	6.5	1.357 1	16.0	1.373 0	25.5	1.390 4	35.0
1.343 0	7.0	1.357 9	16.5	1.373 9	26.0	1.391 4	35.5
1.343 8	7.5	1.358 7	17.0	1.374 8	26.5	1.392 4	36.0
1.344 5	8.0	1.359 6	17.5	1.375 7	27.0	1.393 4	36.5
1.345 3	8.5	1.360 4	18.0	1.376 6	27.5	1.394 4	37.0
1.346 0	9.0	1.361 2	18.5	1.377 5	28.0	1.395 4	37.5

表 1-3 折射仪含糖量读数的温度校正值

温度/℃	含糖量/%						
	5	10	15	20	30	40	50
含糖量减去以下数值							
15	0.25	0.27	0.31	0.31	0.34	0.35	0.36
16	0.21	0.23	0.26	0.27	0.29	0.31	0.31
17	0.16	0.18	0.20	0.20	0.22	0.23	0.23
18	0.11	0.14	0.14	0.14	0.15	0.16	0.16
19	0.06	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09
含糖量加上以下数值							
21	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
22	0.12	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
23	0.18	0.20	0.20	0.21	0.21	0.21	0.21
24	0.24	0.26	0.26	0.27	0.28	0.28	0.30
25	0.30	0.32	0.32	0.31	0.36	0.36	0.38
26	0.36	0.39	0.39	0.41	0.41	0.41	0.46
27	0.43	0.46	0.46	0.48	0.50	0.50	0.55
28	0.50	0.53	0.53	0.55	0.58	0.58	0.63
29	0.57	0.6	0.61	0.62	0.66	0.66	0.71
30	0.64	0.67	0.70	0.71	0.74	0.74	0.80

2. 手持糖量计的结构及使用方法

手持糖量计的设计原理与阿贝折射仪相同，为了测糖溶液时的方便，在读数标尺上只标出溶液折光率相当于蔗糖浓度的百分率，而无折光率的标度，用于快速检验糖料作物榨汁的浓度。其结构如图 1-2A 所示，共由如下各部分组成：照明棱镜盖板 1、折光棱镜 2、望远镜管 3、旋钮 4、眼罩（目镜视度圈）5、校正螺丝 6、进光窗 7。使用时掀开照明棱镜盖板 1，用柔软的绒布轻轻地将折光棱镜 2 拭净，注意勿划伤玻璃镜面。滴测定液数滴于进光窗 7 的镜面上，合上盖板 1，使溶液遍布于棱镜表面。将仪器进光窗 7 对向光源或明处，调节目镜视度圈 5，使视场内分划线清晰可见，于视场中所见明暗分界线处读数，即为汁液之浓度（含糖量）。当被测液之浓度低

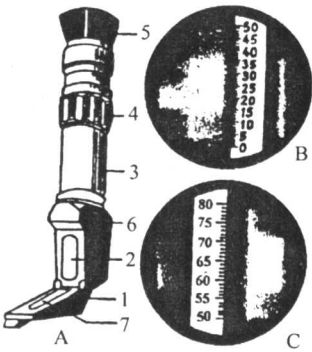


图 1-2 手持糖量计

于 50% 时，将旋扭 4 转动，使得在目镜半圆视场中的分划尺为 0 ~ 50%，如图 1 - 2B 所示；若含糖浓度高于 50%，则转动旋扭 4 使所示之刻线范围为 50% ~ 80%，如图 1 - 2C 所示；如测定温度不是 20 ℃，则应查表加以校正。计算方法是在原有读数上加上（或减去）温度修正值，见表 1 - 4。

表 1 - 4 手持糖量计读数的温度修正表

温度/℃	含糖量修正值/%											
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
含糖量减去以下数值												
10	0.50	0.54	0.58	0.61	0.64	0.66	0.68	0.70	0.72	0.73	0.74	0.75
11	0.46	0.49	0.53	0.55	0.58	0.60	0.62	0.64	0.65	0.66	0.67	0.68
12	0.42	0.45	0.48	0.50	0.52	0.54	0.56	0.57	0.58	0.59	0.60	0.61
13	0.37	0.40	0.42	0.44	0.46	0.48	0.49	0.50	0.51	0.52	0.53	0.54
14	0.33	0.35	0.37	0.39	0.40	0.41	0.42	0.43	0.44	0.45	0.45	0.46
16	0.22	0.24	0.25	0.26	0.27	0.28	0.28	0.29	0.30	0.30	0.30	0.31
17	0.17	0.18	0.19	0.20	0.21	0.21	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.23
18	0.12	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16
19	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
含糖量加上以下数值												
21	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
22	0.13	0.13	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16
23	0.19	0.20	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	0.24	0.24	0.24
24	0.26	0.27	0.28	0.29	0.30	0.30	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32
25	0.33	0.35	0.36	0.37	0.38	0.38	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
26	0.40	0.42	0.43	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
27	0.48	0.50	0.52	0.53	0.54	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
28	0.56	0.57	0.60	0.61	0.62	0.63	0.63	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
29	0.64	0.66	0.68	0.69	0.71	0.72	0.72	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73
30	0.72	0.74	0.77	0.78	0.79	0.80	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81

实验四 抗坏血酸（维生素 C）含量的测定

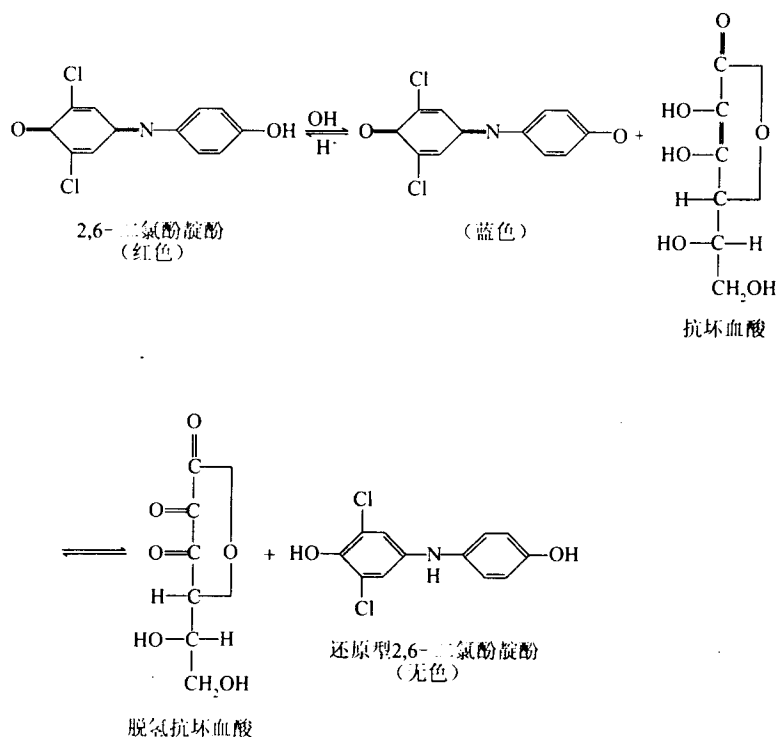
一、滴定法

维生素 C (vitamin C) 又称抗坏血酸，一般水果、蔬菜中维生素 C 的含量均较高，不同的水果、蔬菜品种，以及同一品种在不同栽培条件、不同成熟度等情况下，维生素 C 的含量都有所不同。测定的维生素 C 含量可以作为果蔬品质指标之一。

(一) 原理

维生素 C 具有很强的还原性，染料 2,6-二氯酚靛酚 (2,6-dichlorophenol indophenol) 具有较强的氧化性，且在酸性溶液中呈红色，在中性或碱性溶液中呈蓝色。因此，当用蓝色的碱性 2,6-二氯酚靛酚溶液滴定含有抗坏血酸的草酸溶液时，其中的抗坏血酸可以将 2,6-二氯酚靛酚还原成无色的还原型 2,4-二氯酚靛酚。但当溶液中的抗坏血酸完全被氧化之后，则再滴 2,6-二氯酚靛酚就会使溶液呈红色。借此可以指示滴定终点。根据滴定用去的标准 2,6-二氯酚靛酚溶液的量，可以计算出被测样品中抗坏血酸的含量。

反应如下：



(二) 材料、仪器设备及试剂

(1) 材料：新鲜水果或蔬菜。

(2) 仪器设备：蒸发皿，小研钵一套，移液管，漏斗，滤纸，容量瓶，微量滴定

管。

(3) 试剂:

①2%草酸。

②2, 6-二氯酚靛酚 (相对分子质量为 290): 将 50mg 2, 6-二氯酚靛酚染料溶解于 200 ml 含有 52 mg NaHCO_3 的热水中, 冷却后, 稀释至 250 ml, 装入棕色瓶内, 放在冰箱里保存 (因该染料性质不稳定, 配制后超过一周必须重新配制)。

③标准抗坏血酸溶液: 将 50 mg 纯抗坏血酸溶解于少量 2% 草酸溶液中, 然后用 2% 草酸溶液定容至 500 ml (使用前临时配制)。

(三) 实验步骤

(1) 称取水果和蔬菜样品 10 g, 放在研钵中加入 2% 草酸溶液约 5 ml 研碎。通过漏斗将研碎的样品倒入一只 100 ml 的容量瓶中, 研钵及作用 2% 草酸冲洗, 并将洗液一并倒入该容量瓶中, 最后用 2% 草酸定容到刻度, 过滤, 滤液备用。

(2) 染料的标定: 取 10 ml 标准抗坏血酸溶液至蒸发皿中, 以 2, 6-二氯酚靛酚溶液滴定至粉红色, 并在 30 s 内不退色为终点。计算 1 ml 染料相当于抗坏血酸的毫克数 (重复 3 次, 取平均值)。

(3) 取滤液 10 ml 于蒸发皿中, 用已标定过的 2, 6-二氯酚靛酚溶液滴定至粉红色, 并且在 30 s 内不退色为止, 记下染料的用量 (重复 3 次, 取平均值)。

(四) 计算

$$W = \frac{(y_0 - y_1) \times A}{B} \times \frac{Z}{X} \times 100$$

式中: W ——100 g 样品中含维生素 C 的毫克数;

y_0 ——滴定空白所用染料毫升数;

y_1 ——滴定样品所用染料毫升数;

A ——与 1 ml 染料溶液相当的抗坏血酸的毫克数;

B ——样品的克数;

X ——滴定时吸取样品溶液的体积, ml;

Z ——样品溶液定容后的总体积。

二、比色法

常规测定抗坏血酸的方法是采用 2, 6-二氯酚靛酚滴定法, 但因某些叶片中花青素量较高, 当用酸提取时呈红色, 因而无法滴定。该试验采用二甲苯萃取比色法, 则不受花青素的干扰。

(一) 原理

向一定量提取液中加入过量的 2, 6-二氯酚靛酚染料溶液与维生素 C 作用后, 多余染料用二甲苯萃取比色。待测液中抗坏血酸的含量与二甲苯萃取的颜色呈线性负相关, 即待测液中抗坏血酸含量越多, 未被还原的染料就越少, 二甲苯萃取的颜色也就越浅。由于水溶性的花青素不溶于二甲苯, 因而不影响测定结果。

(二) 材料、仪器设备及试剂

(1) 材料：新鲜叶片等。

(2) 仪器设备：722 型分光光度计、容量瓶、研钵、不锈钢刀片、具塞大试管。

(3) 试剂：

① 1% 草酸；

② 2% 草酸；

③ 30% 硫酸锌；

④ 15% 亚铁氰化钾；

⑤ 染料溶液：称取 100 mg 2, 6-二氯酚靛酚和 82 mg 碳酸氢钠溶于约 60 ml 热水中，过滤定容至 100 ml 容量瓶中，再倒入棕色试剂瓶并存放于冰箱内。使用时稀释 4 倍，此溶液每毫升约相当于 0.1 mg 的维生素 C。

⑥ 抗坏血酸标准溶液：精确称取 100 mg 分析纯抗坏血酸，溶于 1% 草酸，定容至 100 ml，再从中吸取 5 ml，用 1% 草酸再稀释至 100 ml，稀释后每毫升含抗坏血酸 0.05 mg（标准溶液在使用前临时配制）。

⑦ 二甲苯：分析纯（该法使用过的二甲苯可用 20% NaOH 中和后，蒸馏回收）。

(三) 实验步骤

1. 标准曲线

取具塞大试管 6 个，分别吸取抗坏血酸标准溶液 0 ml、1 ml、2 ml、2.5 ml、3 ml、4 ml，用 1% 草酸补充至 4 ml。各管中抗坏血酸含量相应为 0、0.05 mg、0.10 mg、0.125 mg、0.15 mg、0.20 mg。在各管中加入染料溶液 2 ml，随即加入二甲苯 5 ml，迅速摇动约 0.5 min，静置后二甲苯与水层分离，将上层二甲苯萃取液轻轻倒入 1 cm 比色杯，在 500 nm 波长下测定吸光度。以二甲苯作空白调零，求得标准系列抗坏血酸毫克数与相应的吸光度值的回归方程。

2. 样品提取

取新鲜材料洗净，擦干，在玻板上用不锈钢刀片切碎混匀。称取 2 g 样品放至研钵中，加入 3 ml 2% 草酸研磨至匀浆，然后将匀浆倒至 100 ml 容量瓶中，残渣用 1% 草酸冲洗，洗液一并倒至容量瓶中。在容量瓶中加入 1 ml 30% 硫酸锌，摇动，再加入 1 ml 15% 亚铁氰化钾，以除去脂溶性色素，再用 1% 草酸定容至刻度，摇匀后过滤到干净小烧杯中。

3. 测定

取上述提取液 4 ml（若抗坏血酸含量高，可适当减少取量，不足 4 ml 的可用 1% 草酸补足至 4 ml）至具塞大试管中，依次加入染料 2 ml、二甲苯 5 ml，按照标准曲线的方法测定吸光度。

(四) 计算

根据测定液的吸光度值，按回归方程计算出抗坏血酸的毫克数，然后按下式计算样品中的抗坏血酸的含量，以每百克鲜样含抗坏血酸毫克数 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 表示。

$$\text{每百克鲜样的抗坏血酸含量} = (X \cdot V_1 / V_2) / W$$

式中：X——4 ml 提取液中含抗坏血酸的毫克数；