

第十二屆國際生物奧林匹亞競賽

布魯塞爾 比利時

July 8-15,2001

實驗部分

實驗三：植物色素分析

在實作測驗中，期望你證明對生物學基本方法，操作技術的熟悉度，且能運用在實驗中。

此部份測驗將包含一系列試題，組成四個不同的實驗如下：

實驗一：植物解剖、形態及分類

實驗二：動物解剖、形態

實驗三：植物色素分析

實驗四：行為學

你大約在 60 分鐘內完成每一個實驗。每一實驗最高可得 50 分，及整個實作測驗總分為 200 分。如果有些試題你答錯某些選項，同時也答對某些選項，你將會被倒扣。

光合作用色素之逆向薄層色層分析

『引言』【注意！非常重要，不可略過】

薄層色層分析是分析分子的重要技術。生物學家與生化學家如何能對如蛋白質、脂質及植物色素有如此深入的了解？答案是他們已經分離、分析並研究這些分子超過一世紀。而分析這些分子最重要的技術之一，就是薄層色層分析（TLC）。此技術能依據分子對親水性的固定相與厭水性的移動相的相對親和力，將不同的分子分開。固定相經常是附在玻璃或金屬板上的一層矽膠薄膜。而移動相則是適當溶劑的混合液。雖然 TLC 已經逐漸被一些新穎、高效率、高精確的技術所取代，TLC 仍然是初步定性分析植物色素最簡單有效的方法。

分析光合作用色素時可能產生一些問題，例如色素可能與 H_2SiO_3 分子反應，產生去鎂葉綠素雜在矽膠中；此實驗上的問題可以用改良過的矽膠解決，即將極性功能基加上 18C 的長鏈使其飽和，如此產生一種非極性的矽膠，此一技術特別稱之為「逆向」TLC（RP-TLC），並配合適當的溶劑為移動相（例如：含乙酸醋酸、甲醇及水的混合溶液）。

每位學生有的器材藥品

1. 色層分析槽 (200/250 毫升燒杯，盛有少量但足夠體積的溶劑，並蓋上培養皿)
2. 40x100mm 大小的 TLC 片，在 60~80°C 中至少乾燥 360 分鐘 (1 片備用)
3. 鉛筆
4. 尺
5. 1 片鋁箔
6. 3 支 20ml 玻璃試管
7. 10ml 量筒
8. 化學試劑：石油醚 40~60% (A 瓶)；丙酮 100% (B 瓶)
9. 蒸餾水 (在試管中)
10. 細砂 (在試管中)
11. 研鉢和杵
12. 2 根 20 μ l 毛細管
13. 豆科植物
14. 含實驗步驟的試題
15. 選擇題
16. 答案紙

題組一

1. 利用逆向 TLC 分離並辨認植物色素
2. 回答有關 TLC 及植物色素的選擇題 (使用 1 號答案紙)
3. 在 2 號答案紙中空格填上答案

完成本節實驗後，每位學生需交出 2 份答案卷及 1 片 TLC 片。

問題一：以逆向 TLC 分離並辨識色素

準備工作 (約需 15 分鐘)

1. 取約 8cm² 之植物檢體
2. 在研鉢中加入植物組織及少量砂粒研磨
3. 加入 100% 丙酮 (約 10ml) (B 瓶)
4. 將檢體倒入試管中，使沈澱約 5 分鐘 (此時你可以準備 TLC 片，參考步驟 7)
5. 加入約 20 滴石油醚 (A 瓶) 和約 5ml 蒸餾水
6. 充分搖擺混合，靜置約 1 分鐘，使之分為兩層
7. 取一片 TLC，用鉛筆小心在離底部 1.5 公分處劃上一條起始線。

點上檢體 (約需 5 分鐘)

1. 用小毛細管將色素萃取物點在起始線上，共點 3 個位置 (小心，勿刮壞 TLC 片)

2. 輕輕吹乾
3. 重複 4 至 5 次

進行實驗（約需 5 分鐘）

1. 將 TLC 片放在槽中，將色層分析槽蓋上鋁箔，在置於暗處展開。
注意：利用這段時間解答選擇題（問題 2）
2. 約 20 分鐘後，取出 TLC 片；或在液體上升至離頂端 1 公分時即取出 TLC 片。

解釋實驗解果

1. 標記展開液前緣（用鉛筆）。
2. 在答案上劃出你 TLC 板上展開的情形，包括前緣即起始線，以及所看到的色素。
3. 計算出你分離之光合色素的 Rf 值。

『注釋』：Rf 值大於或等於 0.4 的光合作用，色素可能會很淡。以此 RP-TLC 為例：

新葉黃素 Rf=0.6

紫葉黃素 Rf=0.5

黃體素 Rf=0.4

儘管再小心，pheophytins 也可能出現，如果它真的出先在 TLC 上，顏色應該是灰藍色的昏影。我們不應該將 pheophytins 視為光合作用色素，因為它是光合色素經化學作用產生的衍生物。

4. 在你劃出的 TLC 結果圖中，標示出每一看到的光合作用色素；並以數目字代表每一點，以 Rf 最小的一種為 No. 1，以此類推。試著分辨出 4 種光合作用色素。
5. 用鋁箔包住你的 TLC 片，以防色素顏色褪色。
6. 利用選擇題上所提供的所有資料，將答案填在 2 號答案紙上。

題組二

請回答下述與 TLC 及植物色素相關之題目（單選題，請選出最適合的答案）。

評分方式

正確答案 +2 分

錯誤答案 -1 分

無作答 無分數

請把答案填寫於 1 號答案紙

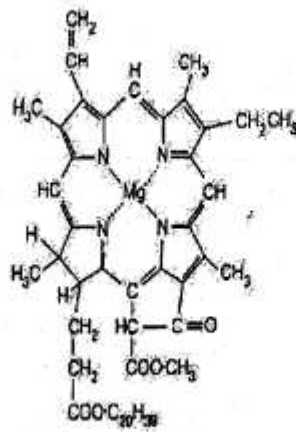
- 下列何者為正確之敘述
 - 植物因具有葉綠體，因此可以在只有粒線體的狀況下存活。
 - 葉綠素及血基質均具備一個很強的雙價鍵鍵結系統，使它們可以吸收可見光。
 - 葉綠素在光合作用中扮演的角色與血基質在粒線體中電子傳遞作用所扮演的角色相仿。
 - 上述各項均為錯誤的敘述。
- 研究主要植物色素的分子構造，藉以預測這些植物色素在極性及非極性溶劑中的相對溶解度（請參閱 10 頁中之圖示）；去推論這些植物色素的量，下列何種原子最適合？
 - 氫原子的數量
 - 氮原子的數量
 - 碳原子的數量
 - 氧原子的數量
- 丙酮十分適合用於葉綠體中萃取植物色素，請選出支持此項說法的正確答案
 - 非極性的分子只能溶解於非極性溶劑中
 - 葉綠體的膜是一種具有極性的構造
 - 非極性的分子只能溶解於極性溶劑中
 - 葉綠體的基質中含有大量的非極性分子

植物色素分析

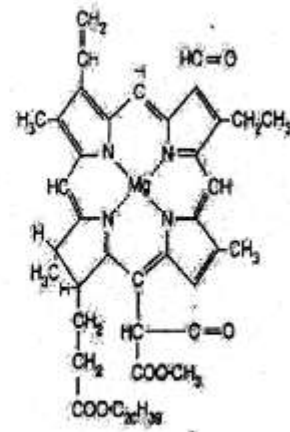
- 植物成份中常含有紅色色素，這些紅色色素的構造顯示出它們在光合作用中並無功能，此外它們可溶解於水中，在植物細胞中這些色素最適合位於下述哪個位置？
 - 葉綠體的膜中
 - 粒線體的膜中
 - 液泡的腔中

- (D) 細胞的細胞質中
5. 葉綠素具有複雜的分子構造，在它的 porphyrin 環中，嵌有一個鎂原子，此種構造與血紅素基質的 porphyrin 環中嵌有一個鐵原子的構造十分相似，下列何者為正確的敘述且可對此種分子構造作出更完整的功能描述
- (A) porphyrin 環的鍵結構造中的電子吸收光線而 porphyrin 的長親水尾端幫助把葉綠體固定於囊體膜上。
 - (B) porphyrin 環其親水性尾端鍵結構造中的電子吸收光線而 porphyrin 的構造幫助把葉綠體固定於囊體膜上。
 - (C) porphyrin 環的鍵結構造中的電子吸收光線而 porphyrin 的長厭水性尾端幫助把葉綠體固定於囊體膜。
 - (D) porphyrin 環極長厭水性尾端鍵結構造中的電子吸收光線，而 porphyrin 的構造幫助把葉綠體固定於囊體膜上。
6. 某研究人員剛發現一種新菌種具有一種獨特的與光合作用有關的色素分子，利用 TLC 進行分析，此種色素分子呈現黃中帶紅的顏色，據此推論，此種色素不吸收光譜中哪一種顏色？
- (A) 紅與黃
 - (B) 藍與紫
 - (C) 綠與黃
 - (D) 藍、綠與紅
7. 假如你已經知道某種植物色素分子的吸收光譜，你可以合理的推論出下述何者？
- (A) 此色素分子可吸收之可見光之波長
 - (B) 此色素分子可反射之可見光之波長
 - (C) 此色素分子可吸收及反射之可見光之波長
 - (D) 上述各項皆正確

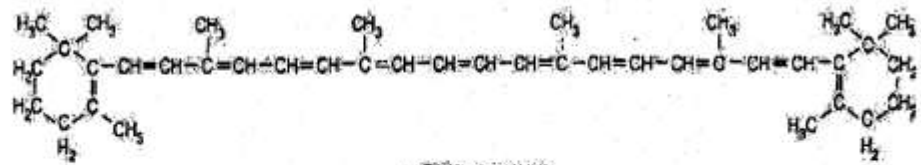
Figure



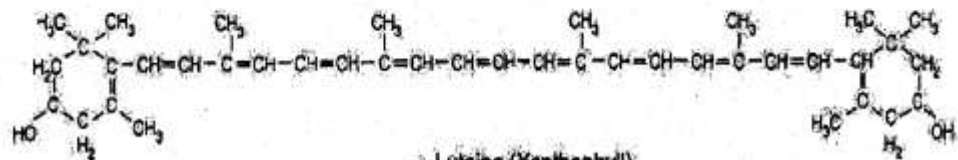
a. Chlorophyll a



b. Chlorophyll b



c. Beta carotene



d. Luteine (Xanthophyll)

答案紙 1 號：選擇題

第一題

(A) (B) (C) (D)

第二題

(A) (B) (C) (D)

第三題

(A) (B) (C) (D)

第四題

(A) (B) (C) (D)

第五題

(A) (B) (C) (D)

第六題

(A) (B) (C) (D)

第七題

(A) (B) (C) (D)

答案紙 2 號

Fill in for RP-TLC task evaluation

TLC plate no. _____

Photosynthetic pigment no. 1

name : _____ (3 分)

Rf-value : _____ (3 分)

Photosynthetic pigment no. 2

name : _____ (3 分)

Rf-value : _____ (3 分)

Photosynthetic pigment no. 3

name : _____ (3 分)

Rf-value : _____ (3 分)

Photosynthetic pigment no. 4

name : _____ (3 分)

Rf-value : _____ (3 分)

在方格中正確地描繪出 TLC 片上的結果，將明顯的光合作用色素標上適當的編號。



將答案紙 1 號、2 號及你的 TLC 片交給監考老師，將編號寫在你包的 TLC 的鋁箔上。