

中華民國第四十七屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

040716

眼見不為憑：光合色素的濾紙層析分離

學校名稱：臺中縣立大里高級中學

作者： 高二 李依儒 高二 簡君芳 高二 許喬婷 高二 張育哲	指導老師： 沈鴻明
---	--------------

關鍵詞：光合色素 濾紙層析分離 葉黃素

作品名稱

眼見不為憑：光合色素的濾紙層析分離

摘要

本研究使用非洲鳳仙花葉片為材料，萃取其色素進行光合色素濾紙層析分離實驗，研究不同展開液比例、不同材料處理方式、不同氣溫下的色素展開情形。結果發現：

1. 展開液中丙酮、石油醚、水三者的比例適當，即有良好的色素分離效果。
2. 色素的移動距離是胡蘿蔔素 > 色素 X > 葉綠素 a > 葉綠素 b > 葉黃素。
3. 在 15°C 以下，使用 90% 丙酮：石油醚 = 2：8 或 80% 丙酮：石油醚 = 2：8 展開液可分離出葉黃素。
4. 以新鮮材料萃取色素較麻煩費時，但結果較無色素衍生物，顏色亦較為鮮明。
5. 濾紙層析大約進行十五分鐘就可以分離出四種色素。
6. 同一層析實驗中，各種色素的 R_f 值並非定值，而是隨著時間改變。
7. 在 20°C 至 30°C，展開液在濾紙上升的高度皆隨溫度的上升而減少。不同的溫度下，色素展開效果及各色素的 R_f 值不同。

壹、 研究動機：

九十一學年度大學入學指定科目考試有一道試題：以丙酮、石油醚、水做濾紙層析，結果色素的移動距離是胡蘿蔔素 > 葉綠素 a > 葉綠素 b > 葉黃素。然而大部分坊間參考書則認為濾紙層析的結果是胡蘿蔔素 > 葉黃素 > 葉綠素 a > 葉綠素 b。是不是在不同濃度比例的展開液中有可能使色素產生不同的層析順序？這個指考的考古題帶給我們莫大的興趣，想對光合色素一探究竟。我們的動機很單純，不能改善環境，不能協助產業，只不過要弄清楚一題指考的考古題而已。

貳、 研究目的：

我們想藉由本研究解答下列問題：

1. 使用不同濃度的丙酮，結果有何差異？
2. 丙酮與石油醚以不同比例混合，結果有何差異？
3. 不同的展開液是否會造成色素的順序不同？
4. 使用新鮮材料和烘乾材料，結果有何差異？
5. 層析時間多久的效果最佳？是否展開液上升得越高效果越佳？
6. 色素的 Rf 值隨時間是否會改變？如果會，會怎樣變化？
7. 在不同氣溫下實驗，結果有何差異？

參、 研究設備及器材：

一、 研究設備：

- | | | |
|-------|-------------------|-------|
| 1 恆溫箱 | 2 電子天秤 | 3 吹風機 |
| 4 烘箱 | 5 數位相機(有自動間隔拍攝功能) | |

二、 研究器材：

- | | | |
|-----------------|-----------|------------------------------|
| 1 非洲鳳仙花葉片 | 2 100ml量筒 | 3 玻棒 |
| 4 漏斗 | 5 研鉢 | 6 蒸餾水 |
| 7 丙酮 | 8 石油醚 | 9 圓形濾紙($\phi=11\text{cm}$) |
| 10 長條濾紙(40×2cm) | 11 鋁箔紙 | 12 稱量紙 |
| 13 毛細管 | 14 滴管 | 15 試管 |
| 16 試管架 | 17 紙、筆、尺 | 18 手錶 |

肆、 研究過程或方法：

一、 純液在濾紙的上升情形

1. 取長條濾紙，從濾紙底端開始算起，在 1.5 公分處剪成尖形，3 公分之後以 0.1 公分為最小單位畫上刻度。
2. 將 10ml 的水、丙酮、石油醚分別倒入量筒內，以鋁箔紙密封，靜置十分鐘。
3. 將長條濾紙放入量筒，使濾紙 1.5 公分高處浸至液面，固定濾紙，再用鋁箔紙密封。
4. 展開劑上升至 3 公分處開始計時，每隔 5 分鐘紀錄展開劑上升的高度，至 60 分鐘。
5. 將紀錄結果繪製成圖表。

二、 不同濃度比例展開液的展開效果

1. 秤取非洲鳳仙花新鮮葉片 10g，置入研钵加入 20ml 丙酮研磨成泥狀後，倒入漏斗，以 20ml 丙酮將色素溶出並過濾。
2. 以毛細管吸取色素液，點在距濾紙尖端 3 公分處。每濾紙以毛細管取三次色素液點上，並打開吹風機讓溶劑更迅速乾掉。
3. 以 100% 丙酮、90% 丙酮、80% 丙酮分別與石油醚以整數比例，配製不同展開液各 10ml。
4. 在室溫下進行色層分析，展開液通過色素點 30 分鐘取出濾紙。

三、 烘乾材料的展開效果

1. 秤取非洲鳳仙花新鮮葉片 10g，以 80°C 烘乾八小時後，取出磨碎並以丙酮萃取色素。
2. 將色素液滴在長條濾紙上。利用實驗二所得的展開液比例進行色素層析。
3. 記錄結果，並與實驗二結果比較。

四、 Rf 值的變化

1. 同實驗一在長條濾紙上畫上刻度，接著滴上色素液。
2. 利用實驗二的結果調配不同比例的展開液，進行色層分析實驗。
3. 自展開液通過色素點時開始，每隔五分鐘拍照一次，共一小時
4. 觀察數位影像，記錄各時間展開液及各種色素的上升距離，並求出 Rf 值以分析。

五、不同溫度下的展開效果

1. 利用實驗二的結果，準備可明顯分離色素的展開液。
2. 在恆溫箱中，分別以 10°C，15°C，20°C，25°C，30°C 進行色層分析實驗。當恆溫箱達實驗溫度時，將含展開液量筒置先於恆溫箱中靜置 10 分鐘。
3. 迅速放入長條濾紙並封口，在展開液通過色素點 30 分鐘時，取出濾紙觀察色素分離的情形，並求出各色素的 Rf 值。

伍、 研究結果：

一、 純液在濾紙的上升情形

丙酮、石油醚、水在濾紙的上升情形如表 1.及圖 1。上升最快的是丙酮，其次是石油醚，水則最慢。三者上升的速率不固定，最初 10 分鐘左右速度較快，其後逐漸變慢。在 30 分鐘後，三者的時間-高度曲線趨於直線，表示上升的速度都趨於穩定。

表1. 丙酮、石油醚、水在濾紙上升的距離與時間關係(單位：mm)

時間(分)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
丙酮	1	0.0	47.0	70.0	86.0	99.0	109.0	118.0	126.0	132.0	138.0	143.0	147.0	151.0
	2	0.0	53.0	77.0	95.0	107.0	119.0	129.0	138.0	147.0	155.0	163.0	170.0	177.0
	平均	0.0	50.0	73.5	90.5	103.0	114.0	123.5	132.0	139.5	146.5	153.0	158.5	164.0
石油醚	1	0.0	45.0	63.0	76.0	86.0	93.0	100.0	105.0	110.0	115.0	119.0	122.0	124.0
	2	0.0	54.0	77.0	93.0	104.0	113.0	121.0	129.0	133.0	138.0	142.0	145.0	149.0
	平均	0.0	49.5	70.0	84.5	95.0	103.0	110.5	117.0	121.5	126.5	130.5	133.5	136.5
水	1	0.0	16.0	29.0	39.0	48.0	56.0	64.0	70.0	78.0	85.0	91.0	98.0	103.0
	2	0.0	25.0	44.0	57.0	67.0	76.0	83.0	90.0	97.0	103.0	109.0	115.0	120.0
	平均	0.0	20.5	36.5	48.0	57.5	66.0	73.5	80.0	87.5	94.0	100.0	106.5	111.5

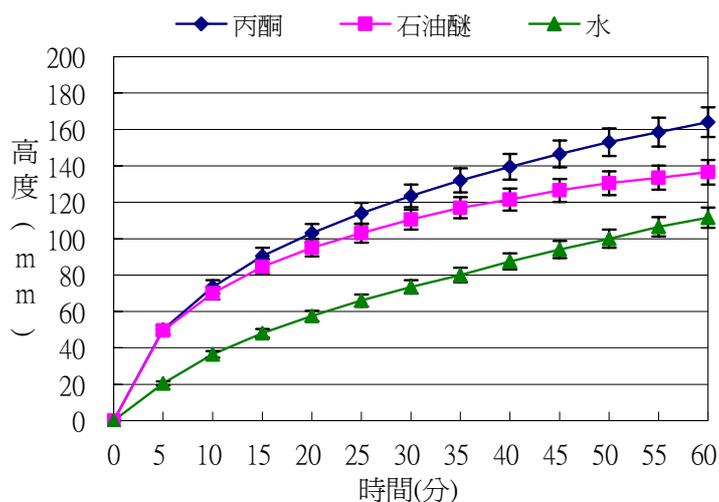


圖1.丙酮、石油醚、水在濾紙上升高度與時間關係

二、 不同濃度比例展開液的展開效果

以 100% 丙酮與石油醚配製展開液，結果如圖 2。若展開液中丙酮含量大於 30%，所有色素隨著展開液前端前進。100% 丙酮：石油醚=1：9 的展開液，色素分離效果最好。色素的排列順序都是橙黃色的胡蘿蔔素、黃色、青綠色的葉綠素 a、和黃綠色的葉綠素 b。

若只用石油醚做展開液，則只有胡蘿蔔素位於展開液的最前緣，其餘色素都集中在起點附近。



圖2.以100%丙酮與石油醚以不同比例配製展開液的色素層析結果。圖下數字為丙酮與石油醚的比

以 90% 丙酮配製展開液，結果如圖 3。90% 丙酮與石油醚的含量比例大於 3 : 7 時無法分離色素。90% 丙酮：石油醚 = 2 : 8 及 1 : 9 展開液色素分離效果最好。



圖3. 以90%丙酮與石油醚以不同比例配製展開液的色素層析結果。圖下數字為丙酮與石油醚的比

以 80% 丙酮配製展開液，結果如圖 4。90% 丙酮與石油醚的含量比例大於 5 : 5 時無法分離色素。90% 丙酮：石油醚 = 2 : 8 展開液的效果較佳，其餘比例展開液雖可分離色素，但仍有部分色素重疊。

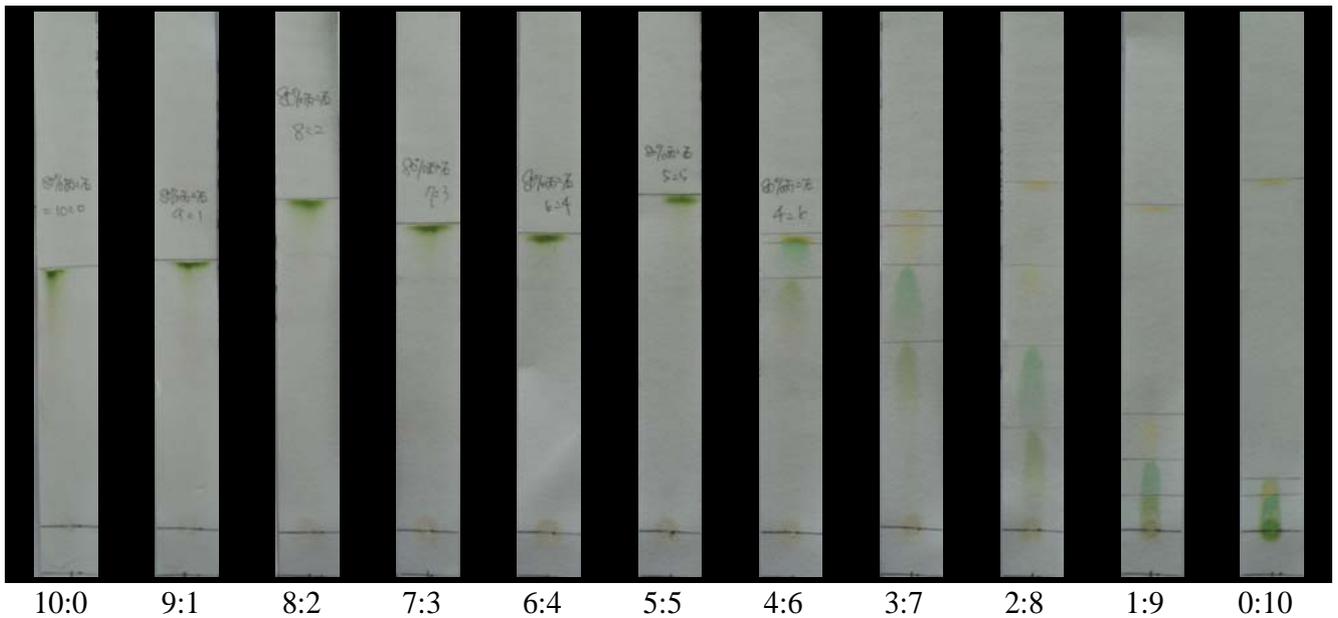


圖4. 以80%丙酮與石油醚以不同比例配製展開液的色素層析結果。圖下數字為丙酮與石油醚的比

綜合上面實驗結果，我們把不同濃度及比例展開液的色素展開效果整理成表 2.：

表2. 不同濃度丙酮與石油醚以不同比例配製展開液的色素展開效果

丙酮：石油醚	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10
100%丙酮	×	×	×	×	×	×	×	×	○	★	△
90%丙酮	×	×	×	×	×	×	×	×	★	★	△
80%丙酮	×	×	×	×	×	×	△	○	★	○	△

★：可以清楚分離四種色素。○：可分辨出四種色素，但部分色素的位置較為接近

△：只能分離出二或三種色素。×：完全無法分離色素。

三、 烘乾材料的展開效果

以烘乾的材料做濾紙層析，實驗結果如圖 5。在胡蘿蔔素和 X 之間，以及在葉綠素 b 的下方都發現了顏色較深的色帶，色素的顏色也比較黯淡。

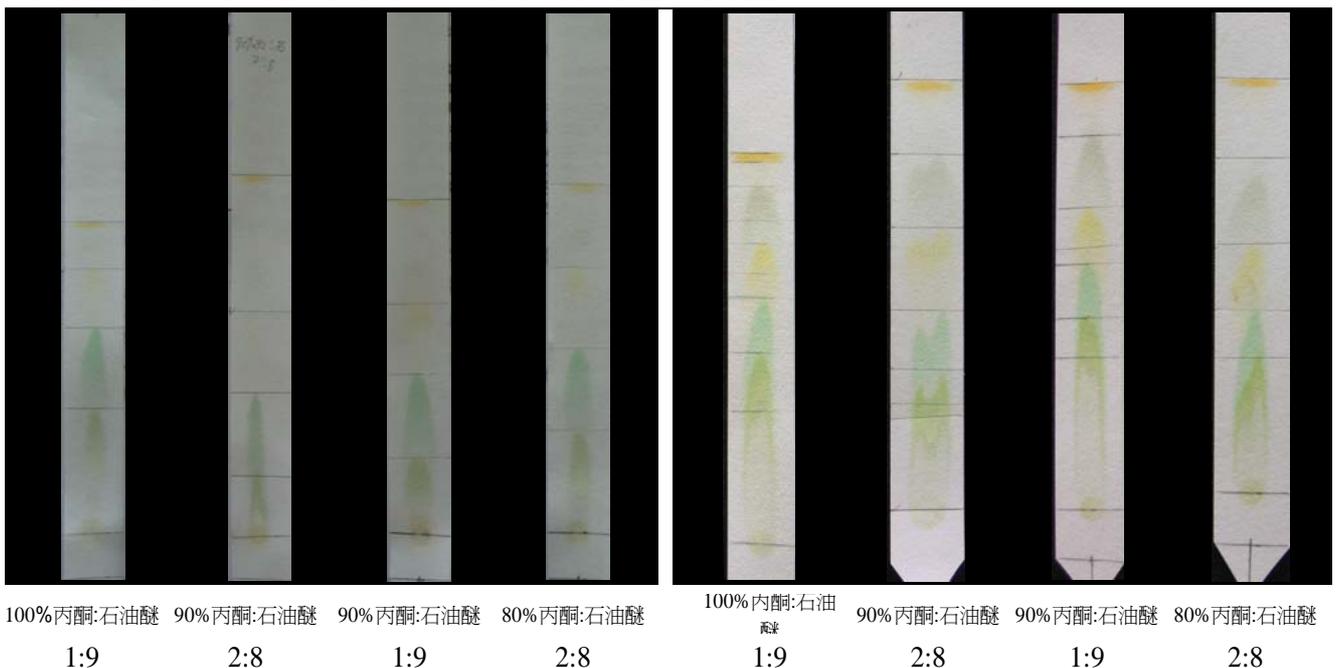


圖5. 新鮮材料與烘乾材料的展開效果比較。左方四圖使用新鮮材料，右方四圖採用烘乾材料。

四、Rf 值的變化

(一)100%丙酮：石油醚=1：9 展開液

實驗照片如圖 6。實驗開始五分鐘，就能區分四種色素，但色素部分重疊，並沒有完全分離。

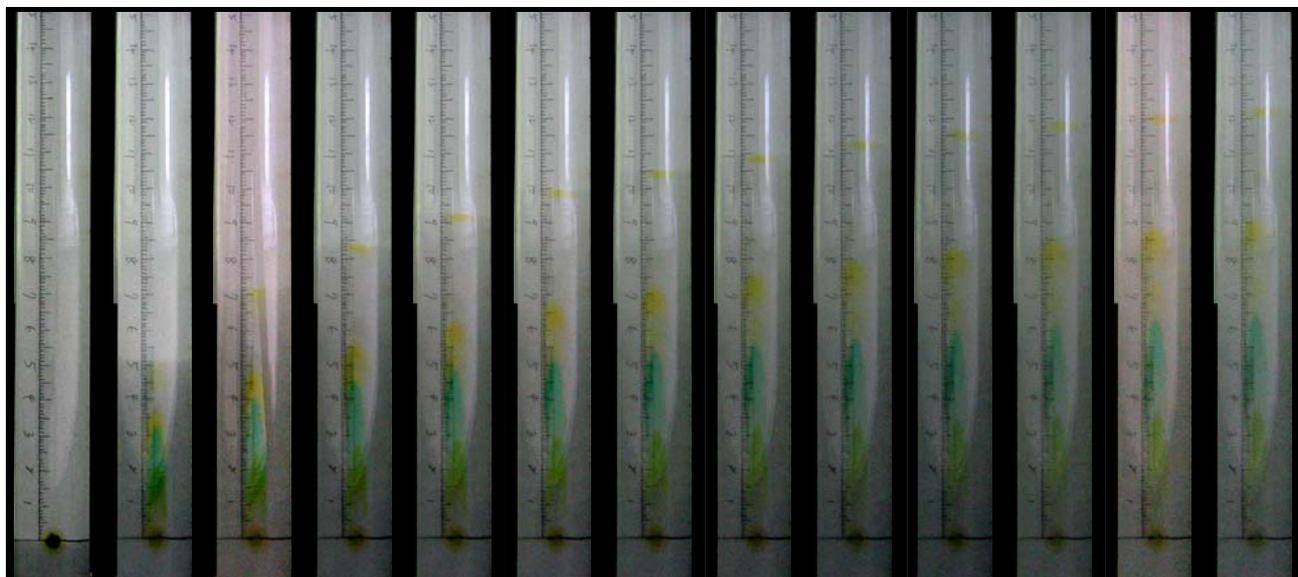


圖6. 100%丙酮：石油醚=1：9展開液的實驗結果，由最左方開始，每張照片間隔五分鐘

記錄展開液與各色素的上升距離，並計算 Rf 值，得表 3：

表3. 以100%丙酮：石油醚=1：9為展開液，所得色素上升距離及各色素的Rf值

時間	上升距離(mm)					Rf			
	展開液	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b
5	51	51	36	32	21	1	0.71	0.63	0.41
10	72	72	48	40	25	1	0.67	0.56	0.35
15	84	84	56	45	27	1	0.67	0.54	0.32
20	93	93	62	48	28	1	0.67	0.52	0.3
25	99	99	67	51	30	1	0.68	0.52	0.3
30	105	105	71	54	31	1	0.68	0.51	0.3
35	109	109	76	56	32	1	0.7	0.51	0.29
40	113	113	80	58	33	1	0.71	0.51	0.29
45	116	116	83	60	35	1	0.72	0.52	0.3
50	119	119	86	62	36	1	0.72	0.52	0.3
55	121	121	89	63	37	1	0.74	0.52	0.31
60	123	123	91	64	38	1	0.74	0.52	0.31

將上表數值繪出關係圖，如圖 7 和圖 8。胡蘿蔔素的 Rf 值一直維持在 1.0。X 的 Rf 值在 5 分鐘時是 0.71，10 分鐘時降至 0.67，維持到 20 分鐘，之後便緩慢上升。葉綠素 a 的 Rf 值在 5 分鐘時是 0.63，30 分鐘時降至 0.51，維持到 40 分，40 分至 60 分則維持在 0.52。葉綠素 b 的 Rf 值在 5 分鐘時是 0.41，20 分鐘時降至 0.30，維持到 30 分鐘，35 至 40 分鐘又降至 0.29，之後的數值又再緩慢上升。

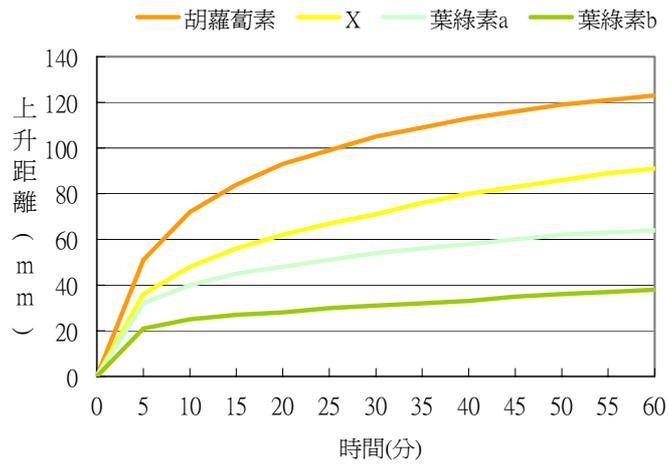


圖7. 100%丙酮：石油醚=1：9展開液，色素高度與時間關係

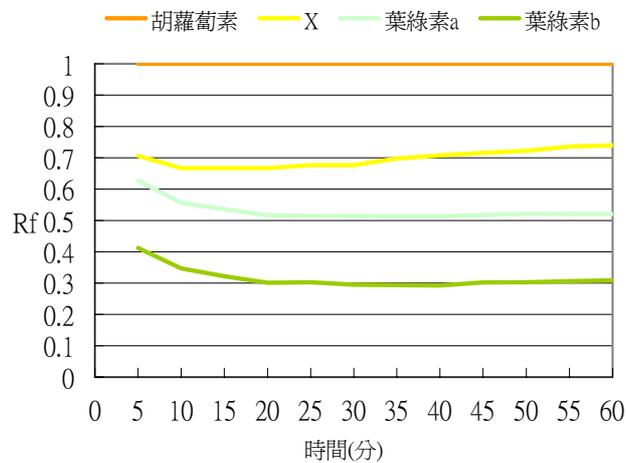


圖8. 100%丙酮：石油醚=1：9展開液，色素Rf值與時間關係

(二)100%丙酮：石油醚=2：8 展開液

實驗照片如圖 9。實驗開始五分鐘，能區分三種顏色，不過至實驗結束，仍維持三個顏色。最前端應該是胡蘿蔔素和 X 集中成一條窄色帶。

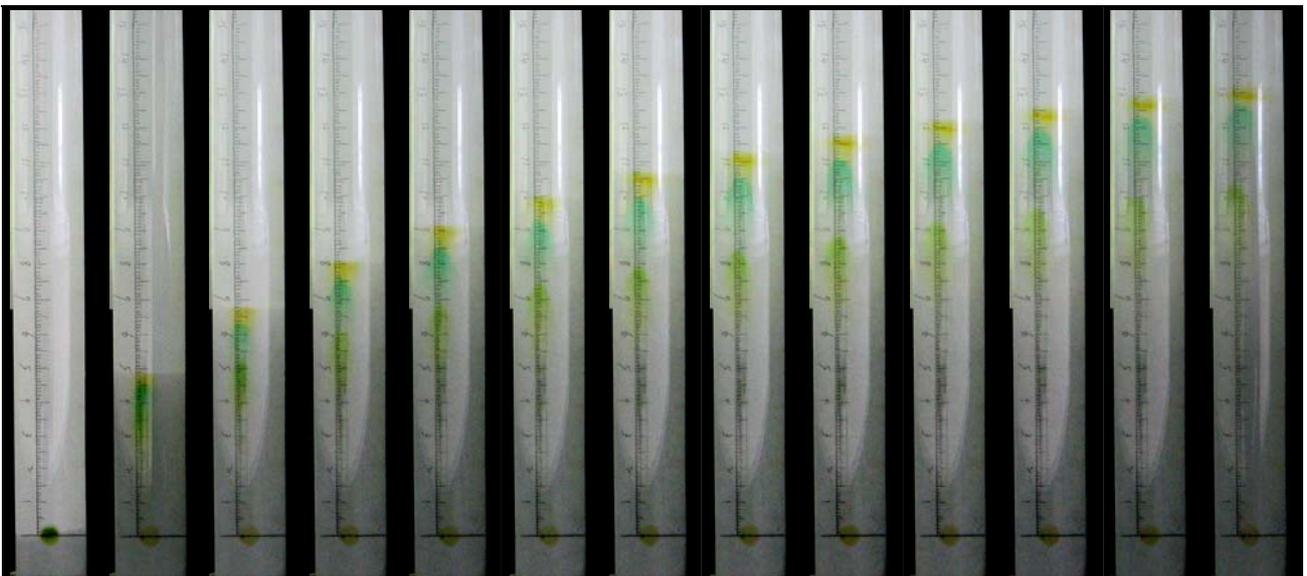


圖9. 100%丙酮：石油醚=2：8展開液的實驗結果，由最左方開始，每張照片間隔五分鐘

記錄展開液與各色素的上升距離，並計算 Rf 值，得表 4：

表4. 以100%丙酮：石油醚=2：8為展開液，所得色素上升距離及各色素的Rf值

時間	上升距離(mm)					Rf			
	展開液	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b
5	49	49	49*	45	37	1	1.00*	0.92	0.76
10	68	68	68*	64	52	1	1.00*	0.94	0.76
15	81	81	81*	76	61	1	1.00*	0.94	0.75
20	91	91	91*	85	68	1	1.00*	0.93	0.75
25	100	100	100*	93	74	1	1.00*	0.93	0.74
30	107	107	107*	100	79	1	1.00*	0.93	0.74
35	113	113	113*	106	85	1	1.00*	0.94	0.75
40	118	118	118*	111	89	1	1.00*	0.94	0.75
45	122	122	122*	116	92	1	1.00*	0.95	0.75
50	126	126	126*	120	96	1	1.00*	0.95	0.76
55	129	129	129*	123	100	1	1.00*	0.95	0.78
60	132	132	132*	126	103	1	1.00*	0.95	0.78

*胡蘿蔔素與X無法區別，僅列出供參考

將上表數值繪出關係圖，如圖 10 和圖 11。葉綠素 a 和葉綠素 b 的 Rf 值亦有下降、維持再緩慢上升的情形。

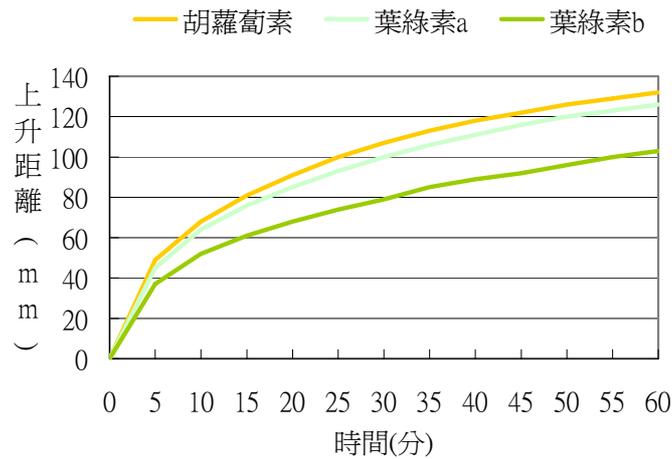


圖10. 100%丙酮：石油醚=2：8為展開液，色素上升高度與時間關係

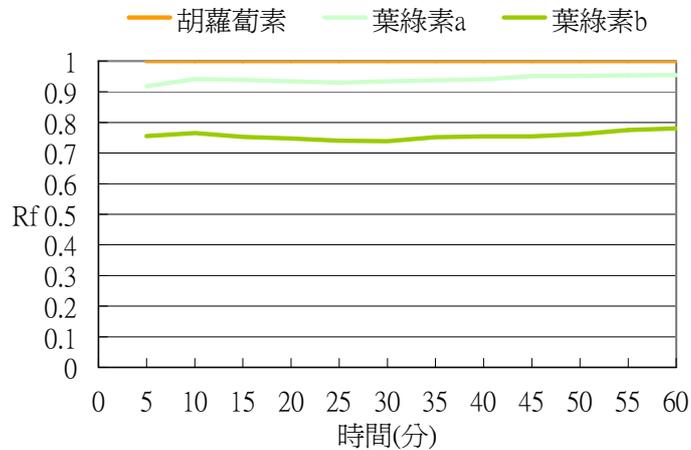


圖11. 100%丙酮：石油醚=2：8為展開液，色素Rf值與時間的關係

(三)90%丙酮：石油醚=1：9 展開液

實驗照片如圖 12。實驗開始 5 分鐘，就能區分四種色素，30 分鐘時四種色素完全分離。

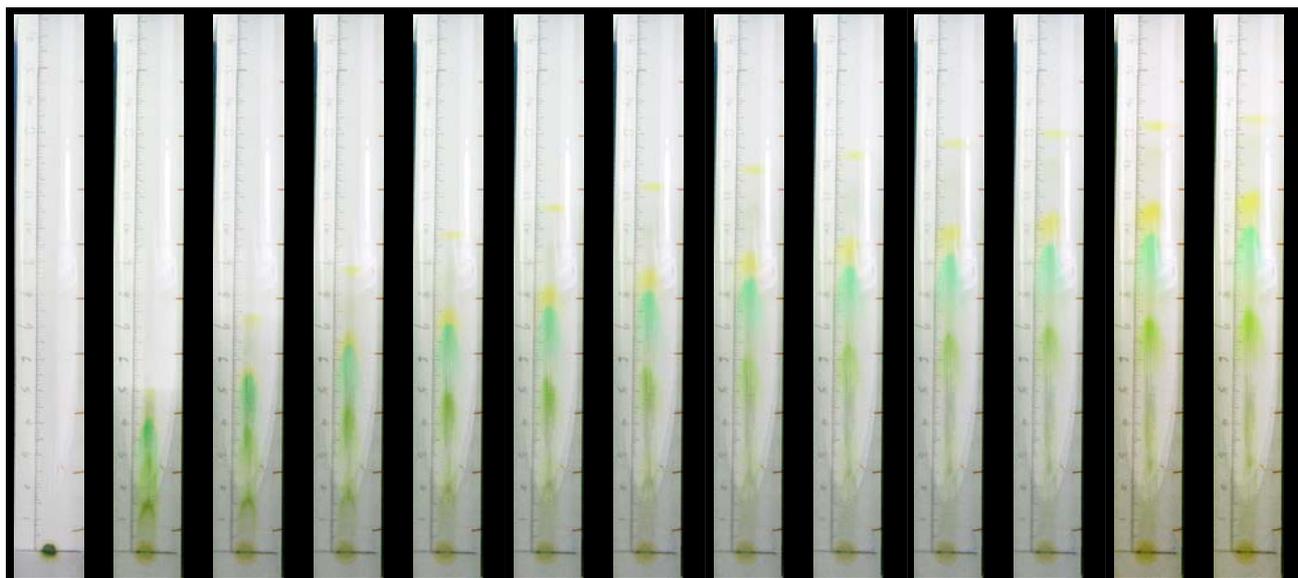


圖12.90%丙酮：石油醚=1：9的實驗結果，由最左方開始，每張照片間隔五分鐘

記錄展開液與各色素的上升距離，計算 Rf 值，得表 5。將表 5 數值繪出關係圖，得圖 13 和圖 14。胡蘿蔔素的 Rf 值一直維持在 1.0。其它色素的 Rf 值則持續下降，X 在 35 分鐘時 Rf 值趨於穩定，葉綠素 a 的 Rf 值在 50 分鐘時趨於穩定，而葉綠素 b 則 Rf 值一直在緩慢下降。

表5. 以90%丙酮：石油醚=1：9為展開液，所得色素上升距離及各色素的Rf值

時間	上升距離(mm)					Rf			
	展開液	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b
5	50	50	44	43	35	1.00	0.88	0.86	0.70
10	72	72	56	54	39	1.00	0.78	0.75	0.54
15	90	90	65	61	42	1.00	0.72	0.68	0.47
20	104	104	72	65	44	1.00	0.69	0.63	0.42
25	116	116	78	69	45	1.00	0.67	0.59	0.39
30	125	125	82	72	46	1.00	0.66	0.58	0.37
35	134	134	86	74	48	1.00	0.64	0.55	0.36
40	141	141	90	76	49	1.00	0.64	0.54	0.35
45	147	147	94	78	50	1.00	0.64	0.53	0.34
50	153	153	96	80	51	1.00	0.63	0.52	0.33
55	157	157	99	82	52	1.00	0.63	0.52	0.33
60	161	161	102	83	52	1.00	0.63	0.52	0.32

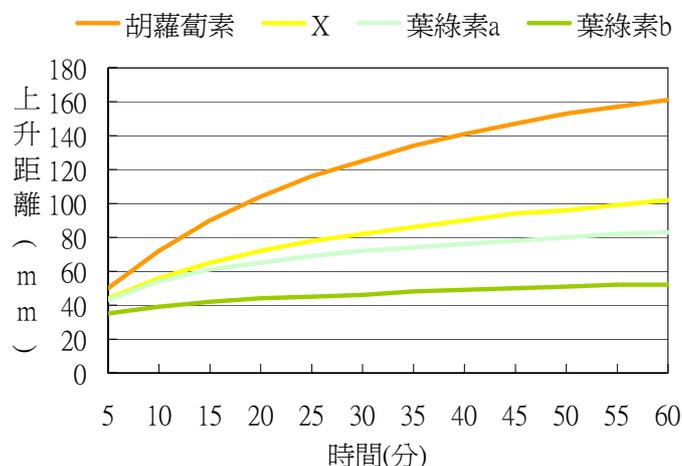


圖13. 90%丙酮：石油醚=1：9展開液，色素上升高度與時間關係

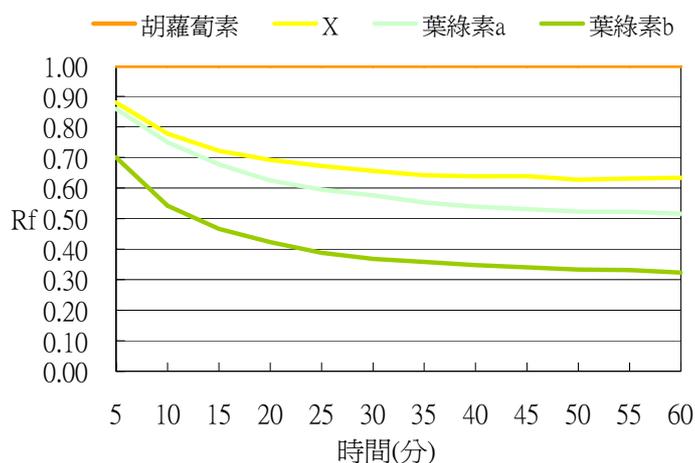


圖14. 90%丙酮：石油醚=1：9展開液，色素Rf值與時間關係

(四) 90%丙酮：石油醚=2：8 展開液

實驗照片如圖 15。實驗開始 10 分鐘，能區分四種色素，30 分鐘時四種色素完全分離。

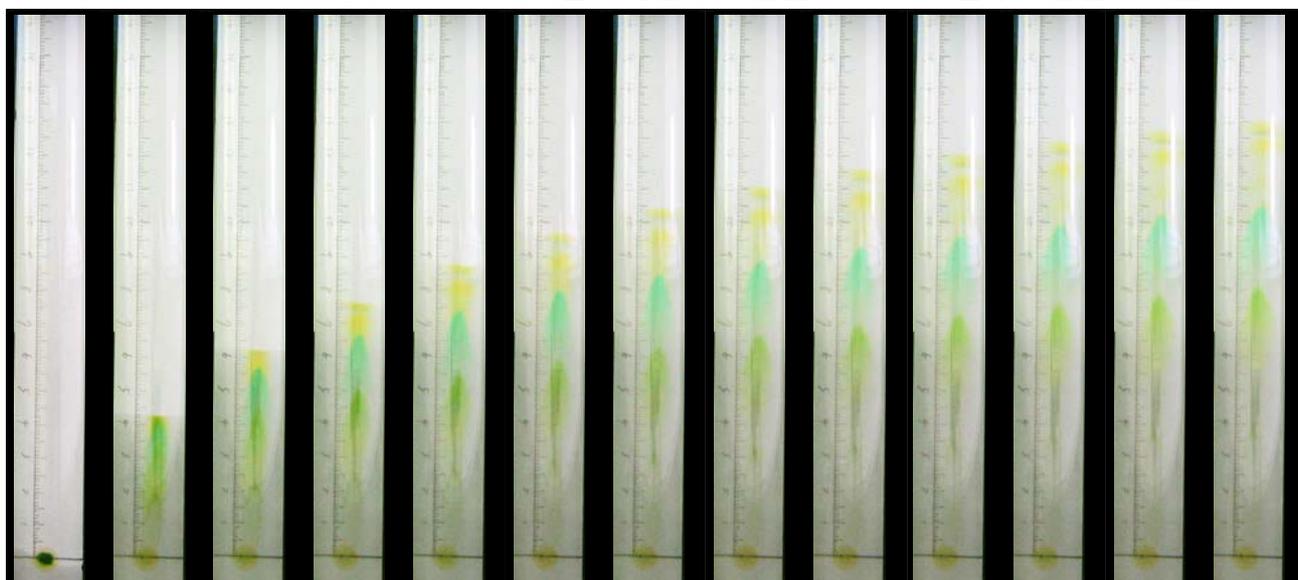


圖15. 90%丙酮：石油醚=2：8的實驗結果，由最左方開始，每張照片間隔五分鐘

記錄展開液與各色素的上升距離，並計算出 Rf 值，得表 6。

表6. 以90%丙酮：石油醚=2：8為展開液，所得色素上升距離及各色素的Rf值

時間	上升距離(mm)					Rf			
	展開液	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b
5	43	43	43	43	35	1.00	1.00	1.00	0.81
10	62	62	60	57	45	1.00	0.97	0.92	0.73
15	76	76	73	66	50	1.00	0.96	0.87	0.66
20	88	88	83	74	56	1.00	0.94	0.84	0.64
25	97	97	91	80	60	1.00	0.94	0.82	0.62
30	104	104	98	85	63	1.00	0.94	0.82	0.61
35	111	111	104	89	66	1.00	0.94	0.80	0.59
40	116	116	109	93	69	1.00	0.94	0.80	0.59
45	120	120	114	96	72	1.00	0.95	0.80	0.60
50	124	124	118	99	75	1.00	0.95	0.80	0.60
55	127	127	122	102	78	1.00	0.96	0.80	0.61
60	130	130	125	104	80	1.00	0.96	0.80	0.62

將表 6 數值繪出關係圖，得圖 16 和圖 17。胡蘿蔔素的 Rf 值一直維持在 1.0。X 的 Rf 值在前 20 分鐘下降，維持到 40 分鐘，45 分鐘之後有上升的趨勢。葉綠素 a 的 Rf 值在前 35 分鐘由 1.00 降至 0.80，維持到實驗結束。葉綠素 b 則 Rf 值在 35 分鐘時降至最低，維持到 40 分鐘，45 分鐘起數值又再上升。

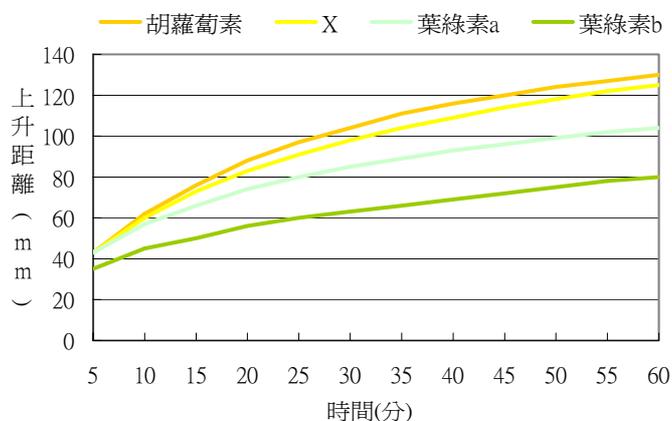


圖16. 90%丙酮：石油醚=2：8展開液，色素上升高度與時間關係

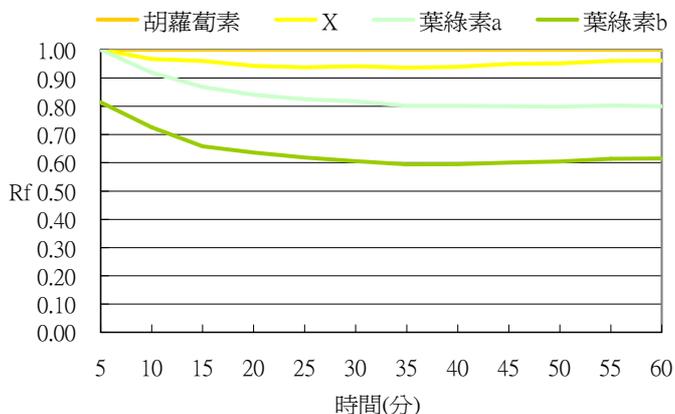


圖17. 90%丙酮：石油醚=2：8展開液，色素Rf值與時間關係

(五)80%丙酮：石油醚=1：9 展開液

實驗照片如圖 18。

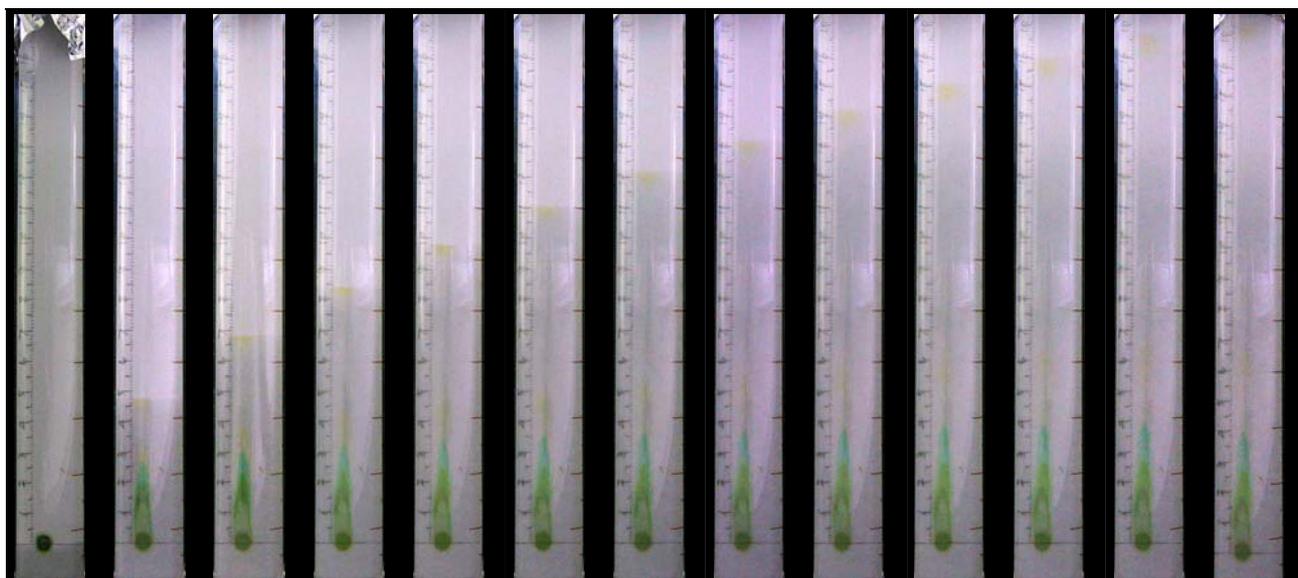


圖18. 80%丙酮：石油醚=1：9展開液的實驗結果，由最左方開始，每張照片間隔五分鐘

實驗開始 5 分鐘，能區分四種色素。胡蘿蔔素隨展開液前緣上升，其它色素上升不明顯，沒有完全分開。

記錄展開液與各色素的上升距離，並計算 Rf 值，得表 7。將表 7 數值繪出關係圖，得圖 19 和圖 20。胡蘿蔔素的 Rf 值維持在 1.0。其它色素的 Rf 值偏低，在展開過程中持續下降。

表7. 以80%丙酮：石油醚=1：9為展開液，所得色素上升距離及各色素的Rf值

時間	上升距離(mm)					rf			
	展開液	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b
5	47	47	32	27	20	1.00	0.68	0.57	0.43
10	68	68	38	30	23	1.00	0.56	0.44	0.34
15	84	84	42	32	24	1.00	0.50	0.38	0.29
20	98	98	46	33	25	1.00	0.47	0.34	0.26
25	110	110	49	35	25	1.00	0.45	0.32	0.23
30	122	122	53	36	26	1.00	0.43	0.30	0.21
35	132	132	55	37	27	1.00	0.42	0.28	0.20
40	142	142	58	38	27	1.00	0.41	0.27	0.19
45	151	151	60	38	27	1.00	0.40	0.25	0.18
50	160	160	63	38	27	1.00	0.39	0.24	0.17
55	167	167	65	38	27	1.00	0.39	0.23	0.16
60	175	175	67	38	27	1.00	0.38	0.22	0.15

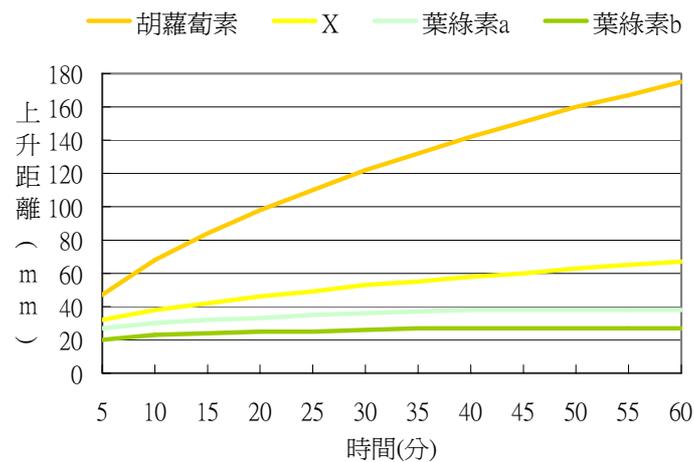


圖19. 80%丙酮：石油醚=1：9展開液，色素上升高度與時間關係

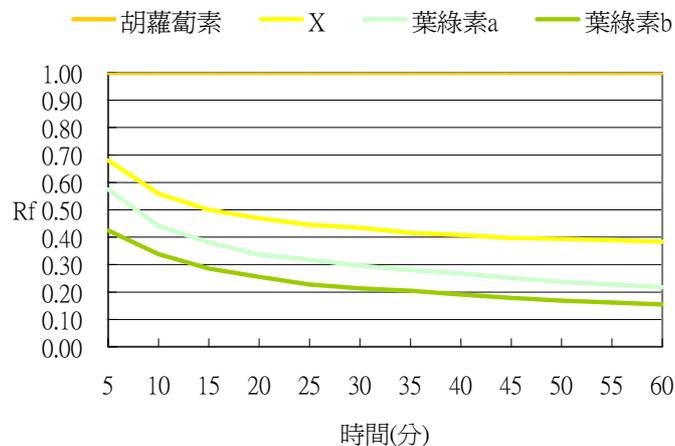


圖20.80%丙酮：石油醚=1：9展開液中色素上升高度隨時間變化

(六)80%丙酮：石油醚=2：8 展開液

實驗照片如圖 21。實驗開始五分鐘，能區分四種顏色，20 分鐘時 X 與葉綠素 a 分離。不過葉綠素 a 和葉綠素 b 都維持部分區域重疊。

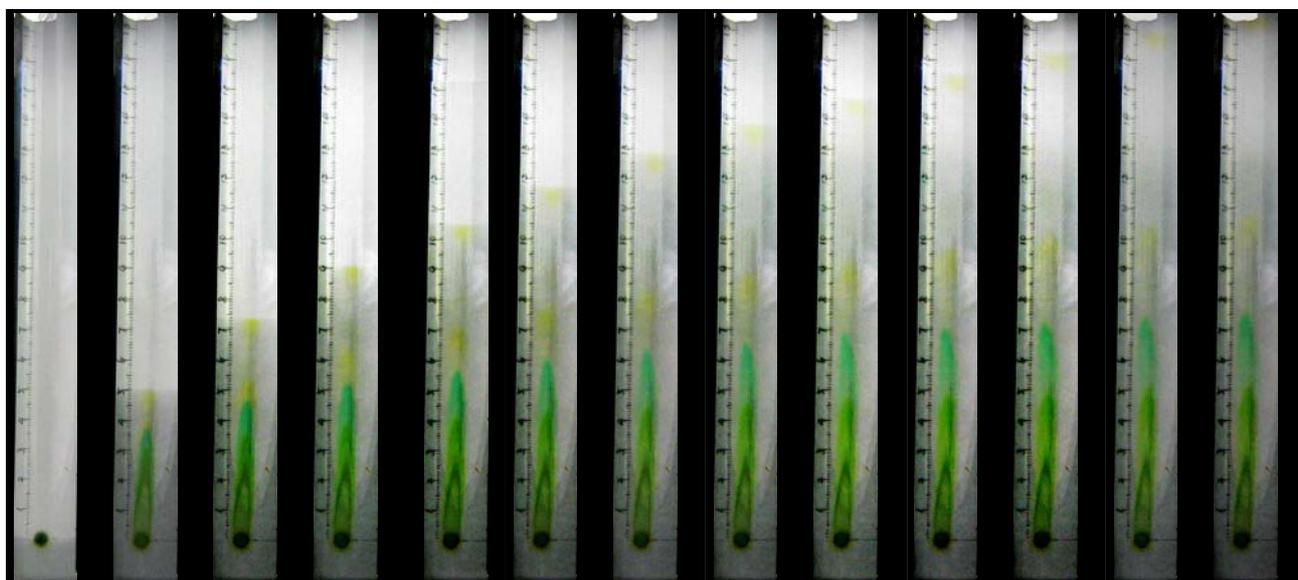


圖21. 80%丙酮：石油醚=2：8展開液的實驗結果，由最左方開始，每張照片間隔五分鐘記錄展開液與各色素的上升距離，計算 Rf 值，得表 8。

表8. 以80%丙酮：石油醚=2：8為展開液，所得色素上升距離及各色素的Rf值

時間	上升距離(mm)					rf			
	展開液	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b	胡蘿蔔素	X	葉綠素a	葉綠素b
5	50	50	39	37	30	1.00	0.78	0.74	0.60
10	74	74	54	46	34	1.00	0.73	0.62	0.46
15	91	91	62	52	38	1.00	0.68	0.57	0.42
20	105	105	71	56	40	1.00	0.68	0.53	0.38
25	118	118	77	60	43	1.00	0.65	0.51	0.36
30	128	128	82	64	45	1.00	0.64	0.50	0.35
35	138	138	87	66	46	1.00	0.63	0.48	0.33
40	147	147	92	68	47	1.00	0.63	0.46	0.32
45	155	155	97	71	48	1.00	0.63	0.46	0.31
50	163	163	101	73	50	1.00	0.62	0.45	0.31
55	169	169	104	74	52	1.00	0.62	0.44	0.31
60	175	175	107	76	54	1.00	0.61	0.43	0.31

將表 8 數值繪出關係圖，得圖 22 和圖 23。胡蘿蔔素的 Rf 值維持在 1.0。其它色素的 Rf 值則持續下降，X 在 35 分鐘時 Rf 值趨於穩定，50 分鐘時又再度下降。葉綠素 a 的 Rf 值在 40 分鐘時下降趨於緩慢，而葉綠素 b 的 Rf 值則在 45 分鐘時呈現穩定。

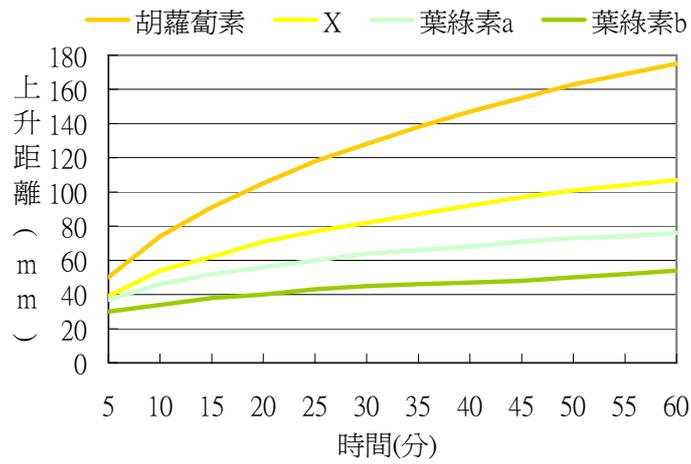


圖22. 80%丙酮：石油醚=2：8展開液，色素上升高度與時間關係

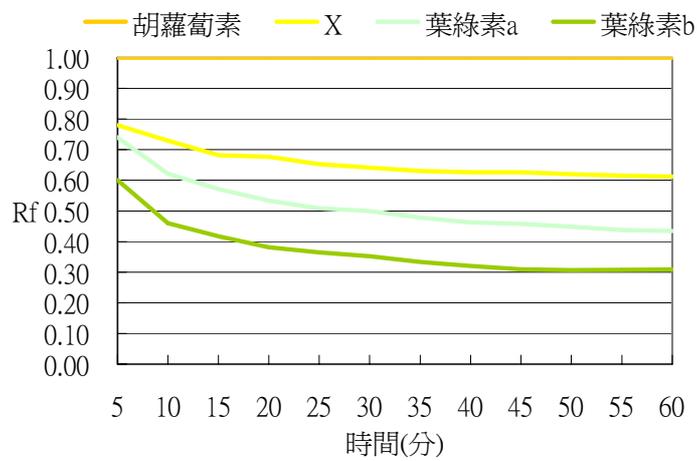


圖23. 80%丙酮：石油醚=2：8展開液，色素Rf值與時間關係

五、不同溫度下的展開效果

(一)以 100%丙酮：石油醚=1：9 為展開液

以 100%丙酮：石油醚=1：9 為展開液在不同溫度下的實驗結果各舉一例如圖 24。

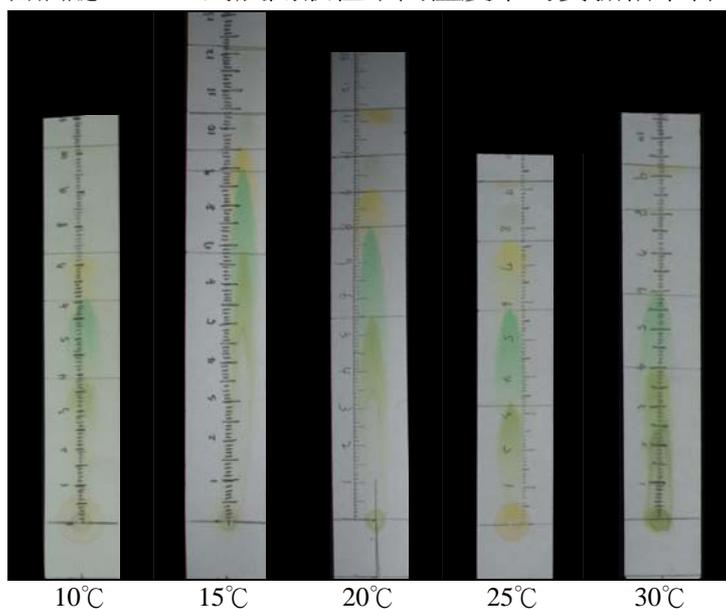


圖24. 以100%丙酮：石油醚=1：9為展開液在不同溫度下的實驗結果

將各次實驗結果記錄後，計算出各種色素的 Rf 值，求其平均得表 9，再製成關係圖如圖 25。胡蘿蔔素的 Rf 值皆為 1.0。X 在 20°C 至 30°C 間，Rf 值隨著溫度上升而上升。葉綠素在 15°C 至 25°C 間，Rf 值隨溫度上升而下降。在 20°C 以下，X 和葉綠素 a 較為接近；30°C 時 X 和胡蘿蔔素較為接近。25°C 時各各素的 Rf 值最為平均分散。

表9. 100%丙酮：石油醚=1：9展開液在不同溫度所得色素之平均Rf值

溫度	10	15	20	25	30
胡蘿蔔素	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
X	0.66	0.79	0.76	0.83	0.88
葉綠素 a	0.56	0.75	0.66	0.64	0.65
葉綠素 b	0.36	0.55	0.43	0.37	0.46

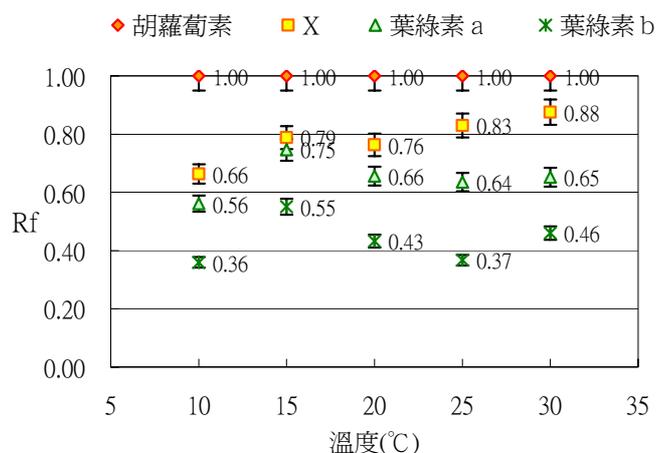


圖25. 100%丙酮：石油醚=1：9展開液在不同溫度的色素Rf值

(二)以 90%丙酮：石油醚=1：9 為展開液

以 90%丙酮：石油醚=1：9 為展開液在不同溫度下的實驗結果各舉一例如圖 26。

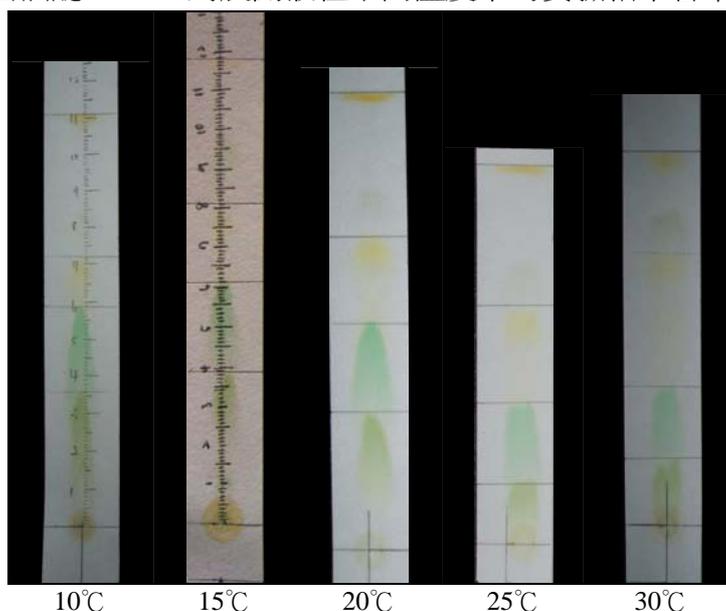


圖26. 以90%丙酮：石油醚=1：9為展開液在不同溫度下的實驗結果

將各次實驗結果記錄後，計算出各種色素的 Rf 值，求其平均得表 10，再製成圖 27。

胡蘿蔔素的 Rf 值皆為 1.0。X 的 Rf 值隨溫度的上升而些微上升。葉綠素 a 和葉綠素 b 的 Rf 值則是隨溫度上升而下降。此展開液在 10°C 至 30°C 皆有良好的色素展開效果。

表10. 90%丙酮：石油醚=1：9展開液在不同溫度所得色素之平均Rf值

溫度	10	15	20	25	30
胡蘿蔔素	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
X	0.64	0.68	0.68	0.68	0.72
葉綠素 a	0.50	0.52	0.37	0.36	0.35
葉綠素 b	0.33	0.33	0.23	0.19	0.16

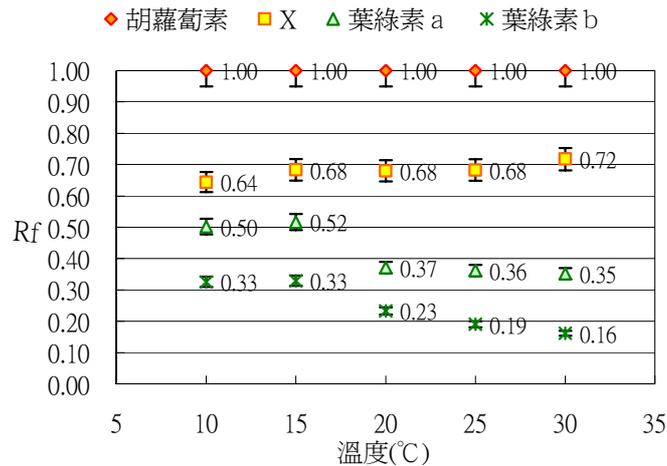


圖27. 90%丙酮：石油醚=1：9展開液在不同溫度的色素Rf值

(三)以 90%丙酮：石油醚=2:8 為展開液

以 90%丙酮：石油醚=2：8 為展開液在不同溫度下的實驗結果各舉一例如圖 28。

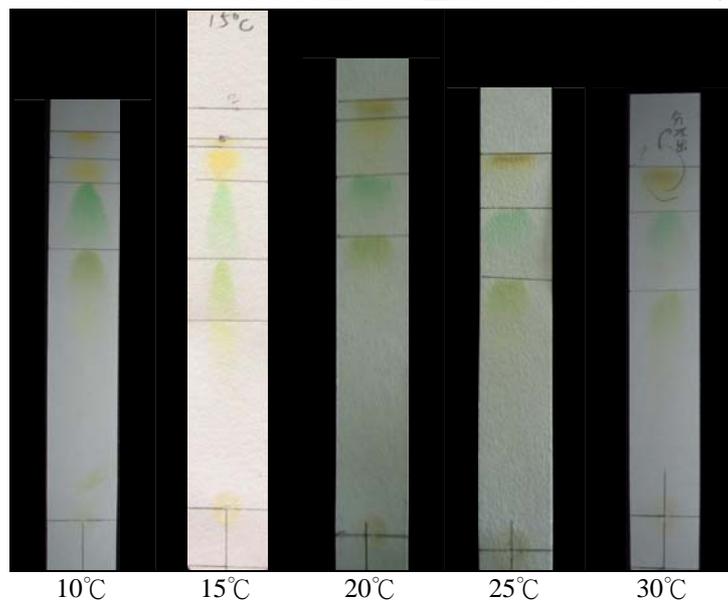


圖28. 以90%丙酮：石油醚=2：8為展開液在不同溫度下的實驗結果

將各次實驗結果記錄後，計算出各種色素的 Rf 值，求其平均得表 11，再製成圖 29。

胡蘿蔔素的 Rf 值皆為 1.0。X 的 Rf 值非常接近胡蘿蔔素，在 25°C 以上與胡蘿蔔素無法

區分。在 10°C 和 15°C 的實驗結果中，葉綠素 b 的下方出現黃色的斑塊，應該是葉黃素。此黃色斑塊沒有明顯的色素前緣，在 10°C 的結果中，此色塊未與其它色素重疊，但顏色很淡；在 15°C 的結果中，則幾乎與葉綠素相連。20°C 以上則未發現此黃色斑塊。

表11. 90%丙酮：石油醚=2：8展開液在不同溫度所得色素之平均Rf值

溫度	10	15	20	25	30
胡蘿蔔素	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
X	0.93	0.95	0.95	1.00	1.00
葉綠素 a	0.87	0.87	0.81	0.83	0.82
葉綠素 b	0.70	0.69	0.67	0.71	0.59

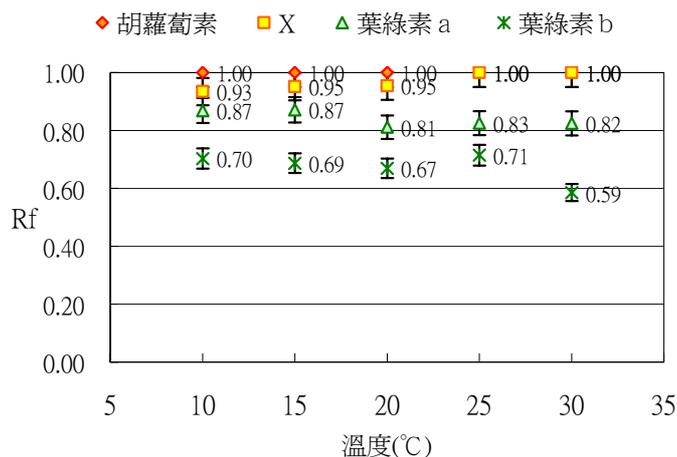


圖29. 90%丙酮：石油醚=2：8展開液在不同溫度的色素Rf值

(四)以 80%丙酮：石油醚=2：8 為展開液

以 80%丙酮：石油醚=2：8 為展開液在不同溫度下的實驗結果各舉一例如圖 30。

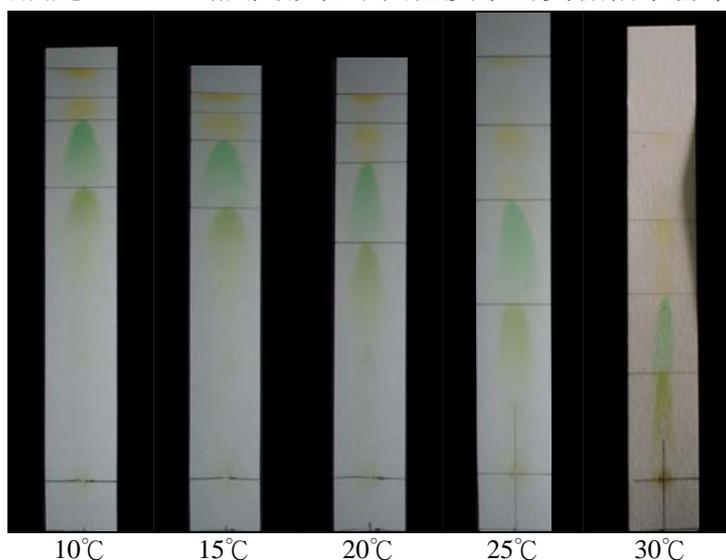


圖30. 以80%丙酮：石油醚=2：8為展開液在不同溫度下的實驗結果

將各次實驗結果記錄後，計算出各種色素的 Rf 值，求其平均得表 12，再製成圖 31。

胡蘿蔔素的 Rf 值皆為 1.0。在 10°C 及 15°C 時各色素的 Rf 值非常接近。除胡蘿蔔素外，其它色素的 Rf 值大致上都是隨著溫度上升而下降。20°C 以上相鄰色素的 Rf 值差較大而能區分色素，其中以 30°C 時的色素分離效果最佳。在 10°C 和 15°C 的實驗結果中，葉綠素 b 的

方出現黃色的葉黃素斑塊，分布的情形與 90% 丙酮：石油醚 = 2:8 展開液的實驗結果相似。20 °C 以上亦未發現此黃色斑塊。

表12. 80%丙酮：石油醚 = 2：8 展開液在不同溫度所得色素之平均Rf值

溫度	10	15	20	25	30
胡蘿蔔素	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
X	0.92	0.94	0.88	0.86	0.74
葉綠素 a	0.86	0.86	0.74	0.69	0.52
葉綠素 b	0.70	0.66	0.55	0.45	0.29

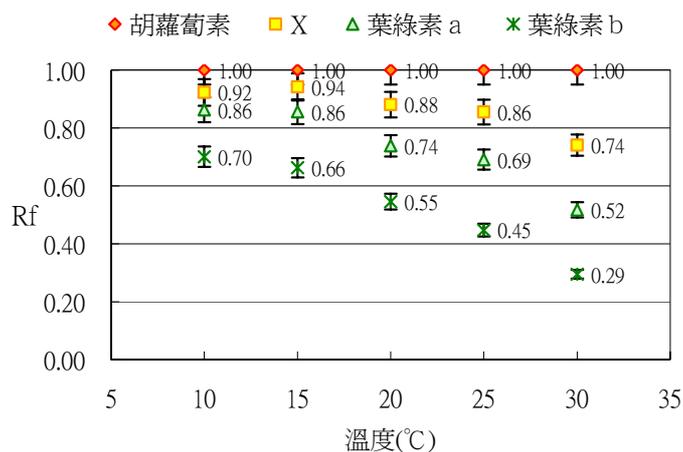


圖31. 80%丙酮：石油醚 = 2：8 展開液在不同溫度的色素Rf值

陸、討論：

一、 純液在濾紙的上升情形

1. 龍騰版生物課本中有關色素層析的實驗操作，是在展開液上升至 100ml 量筒高度的 90%時取出濾紙，100ml 量筒高度的 90%大約是 20 公分，展開液上升 20 公分的時間超過一個小時。我們決定折衷採用 30 分鐘為未來的實驗觀察時間。
2. 丙酮在濾紙的上升速度最快，我們推測展開液中丙酮的含量愈高，則展開液上升的速度就愈快。

二、 不同濃度比例展開液的展開效果

1. 濾紙末端如果不剪成尖形，在將濾紙置入量筒時，容易因濾紙搖動使展開液以非水平前緣上行，造成色素以斜方向上升，如所附照片。剪成尖形後即使在濾紙置入量筒時有輕微的搖動，仍能使展開液通過色素點時有水平的前緣。
2. 據王月雲等人所著植物生理學實驗，以薄層分析法利用丙酮：石油醚=1:3 的展開液所得到的結果，移動距離最短的是葉黃素，最快的是 α 胡蘿蔔素，其次是黃色的 β 胡蘿蔔素。而根據大考中心九十一年對指考試題的解釋，介於胡蘿蔔素和葉綠素 a 之間的斑帶是葉綠素 a 的衍生物。因此並無法確定該色素是何種色素，故先稱它為 X。
3. 以 80%丙酮：石油醚=4：6、3：7 及 2：8 的展開液所得色層分離結果，葉綠素 b 末端有顏色轉黃的趨勢，但無法確認是葉綠素 b 或是另一色素。
4. 部分參考書認為色素的分離是因為分子量差異造成擴散速率的不同，然而如果只是因為分子量不同，應該在不同的展開液中會有相同的展開結果。由實驗結果可以推論，石油醚則對胡蘿蔔素有最佳溶解力，其它色素不溶於石油醚，故石油醚只能展開胡蘿蔔素，而其它的色素則是隨丙酮展開。
5. 丙酮的含量比例愈高，色素的位置就愈靠近展開液前緣，丙酮含量比例愈低，胡蘿蔔素與 X 的距離愈遠。依此觀點，90%丙酮：石油醚=2：8 展開液（如圖 3）的結果應該是不合理的，有可能是實驗操作或展開液配製的失誤造成。



三、 烘乾材料的展開效果

1. 以烘乾材料做濾紙層析的結果，除了色素的顏色沒那麼鮮豔之外，在胡蘿蔔素和 X 中間出現了一個灰色的色帶，在葉綠素的下方也多了一個顏色較深的色帶。依據王月雲等人所著植物生理學實驗，呈現灰色的有葉綠素 a 的氧化態和葉綠素 b 的氧化態。
2. 新鮮材料比較不容易磨成泥狀，濃稠的組織碎片也會讓過濾的時間拉長。舊課程生物教師手冊也提到，為了避免產生色素衍生物，所以使用烘乾後不會變色的菠菜。如果有充足的實驗操作時間的話，新鮮材料的實驗效果比較好。

四、 Rf 值的變化

1. 綜合所有的連續拍照結果，能區分出四種色素的最短時間都在 5 到 10 分鐘。
2. 能讓色素完全分離且位置平均分散展開液比例只有 90% 丙酮：石油醚=1：9 和 90% 丙酮：石油醚=2：8。
3. 色素的 Rf 值在實驗開始後都呈下降。Rf 值降到最低後再度上升時，色素最後方就幾乎不再往上升。如果此色素的 Rf 值保持穩定，色素帶比較不會拖長；若 Rf 值上升較快，色素帶就會拉長。
4. 相鄰兩色素的 Rf 值的差值如果隨時間減少，會造成後方的色素追上前面的色素，而使兩色素重疊，例如 80% 丙酮：石油醚=1：9 和 80% 丙酮：石油醚=2：8 展開液實驗結果，葉綠素 a 和葉綠素 b 重疊。
5. 各種色素的 Rf 值並不是維持一個定值，而是隨著時間改變的。色素的 Rf 值會先下降再上升。而最佳的實驗觀察點則是 Rf 值降到最低保持穩定時。若是 Rf 值再度上升後再觀察，會發生色素拖長的現象。各相鄰色素的 Rf 值差值若持續增加，色素才能完全分開，若是 Rf 值的差值隨著時間減少，會造成後方的色素追上前面的色素，而使兩色素重疊。

五、 不同溫度下的展開效果

1. 我們發現在比較高的溫度下做濾紙層析，展開液上升的高度比較低。將本實驗的展開液上升高度與溫度的關係做成圖 32。展開液在濾紙上升的高度，有的隨溫度的升高而減少（例如 90% 丙酮：石油醚=1：9、80% 丙酮：石油醚=2：8 展開液），有的隨溫度先增加再減少（例如 100% 丙酮：石油醚=1：9 展開液），有的則是先下降再上升再下降（例如 90% 丙酮：石油醚=2：8 展開液）。共同之處是，在 20 度至 30 度的範圍內，隨著溫度的上升，各種展開液在濾紙上升的高度皆減少。

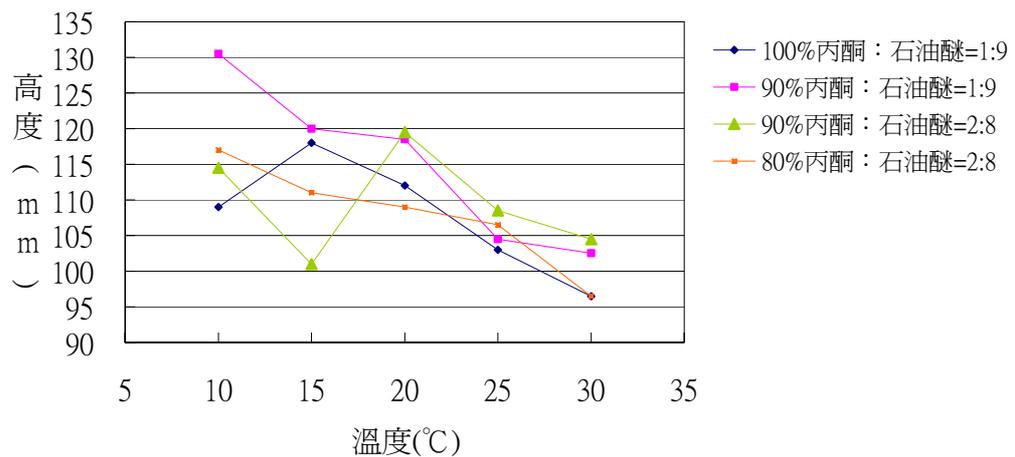


圖32. 展開液在不同溫度的上升高度

2. 石油醚的沸點較低，所以較容易蒸發，在濾紙上的石油醚可能還來不及上升就蒸發了，導致展開液上升的高度隨著氣溫的上升而減少。
3. 石油醚因蒸發而減緩上升，丙酮及水的上升受溫度的影響較小，則 X 與胡蘿蔔素間的距離會因而減少，X 的 Rf 值就會上升。

4. 因為水有較強極性，會吸引同樣具有極性的濾紙和丙酮，因此含水量多反而不利丙酮的上升。比較 100% 丙酮：石油醚 = 1：9 和 90% 丙酮：石油醚 = 1：9 展開液的實驗結果，前者因不含水，丙酮較易上升，相同溫度下各色素 Rf 值都比含水的後者高。隨著溫度上升，前者 X 的 Rf 值明顯有上升的趨勢，後者則只有些微的上升；前者的葉綠素 Rf 值下降並不明顯，後者則明顯下降。此結果顯示溫度上升也減緩丙酮的上升。
5. 再比較 90% 丙酮：石油醚 = 2：8 和 80% 丙酮：石油醚 = 2：8 展開液的實驗結果，前者 X 的 Rf 值隨溫度升高而上升，後者則明顯隨溫度升高而下降。前者葉綠素的 Rf 值沒有明顯的升降趨勢，後者則隨溫度下降，甚至在 30°C 時也可以把四種色素分散。因此，即使丙酮的含量高使色素向前緊靠，只要提高展開液中含水的比例，再加上較高的溫度，亦可以有不錯的展開結果。
6. 90% 丙酮：石油醚 = 2：8 和 80% 丙酮：石油醚 = 2：8 展開液在 10°C 和 15°C 出現了葉黃素！由葉黃素與葉綠素 b 的距離隨著溫度上升而減少，我們推測在 20°C 以上葉黃素與葉綠素 b 會因為重疊而無法辨別。在其它的展開液濃度下並沒有發現葉黃素存在，可能是因為丙酮的比例過低使葉黃素沒有明顯上升。
7. 我們重新檢視所有做過的實驗照片，把看得到葉黃素的照片整理圖 33。這些可以看到最下方黃色斑塊的實驗結果，展開液比例都是 80% 丙酮：石油醚 = 2：8 和 90% 丙酮：石油醚 = 2：8，而實驗溫度也都是 10°C 和 15°C，支持了我們上面的推論。

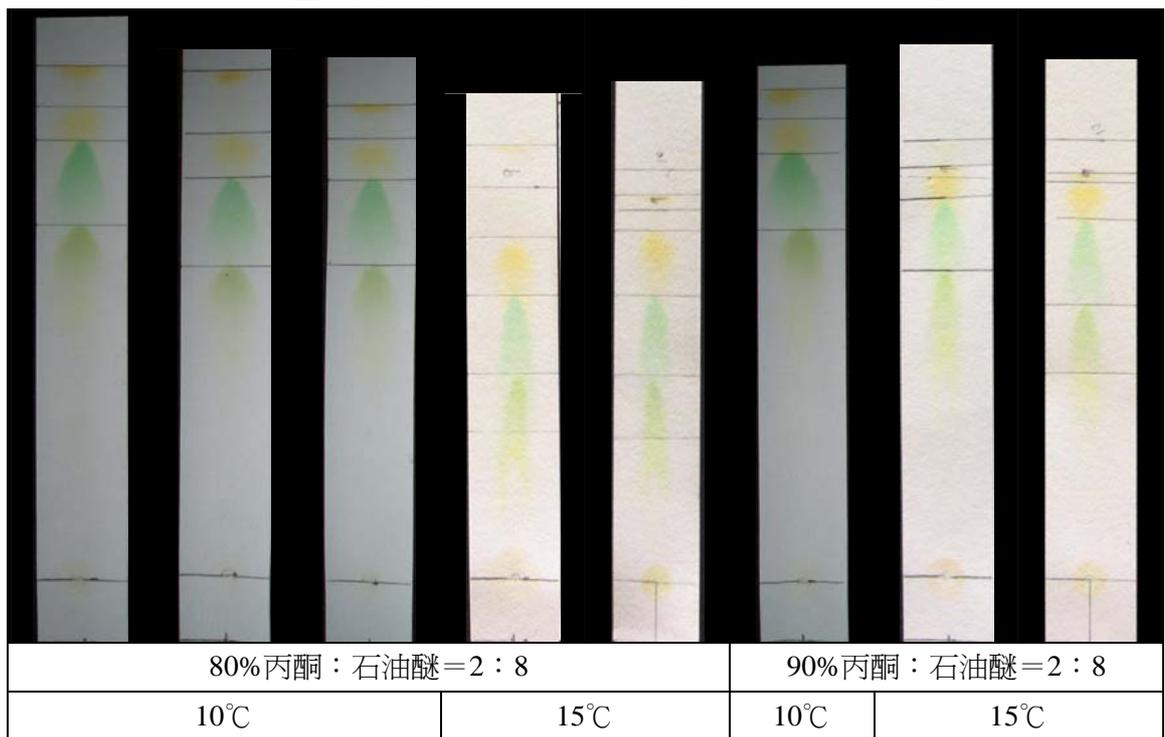


圖33. 出現葉黃素的所有實驗結果

六、 綜合討論

1. 四種光合色素的結構式及分子式、分子量如圖 34。

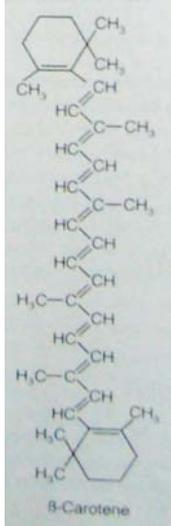
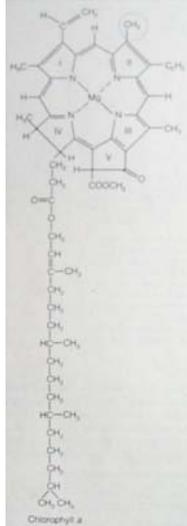
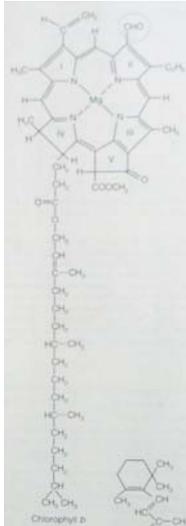
	胡蘿蔔素	葉黃素	葉綠素 a	葉綠素 b
分子式	$C_{40}H_{56}$	$C_{40}H_{56}O_2$	$C_{55}H_{72}MgN_4O_5$	$C_{55}H_{70}MgN_4O_6$
分子量	536	568	893	907
結構式				

圖34. 光合色素的結構式及分子式、分子量

3. 類胡蘿蔔素有數種衍生物，與本實驗相關的物質如圖 35。 α 胡蘿蔔素和 β 胡蘿蔔素是構異物，差異僅在末端的環基上的雙鍵位置，以 β -胡蘿蔔素較為常見。葉黃素是胡蘿蔔素的氧化態，兩端環上各加一個氧原子。圖中兩個葉黃素為立體異構物。

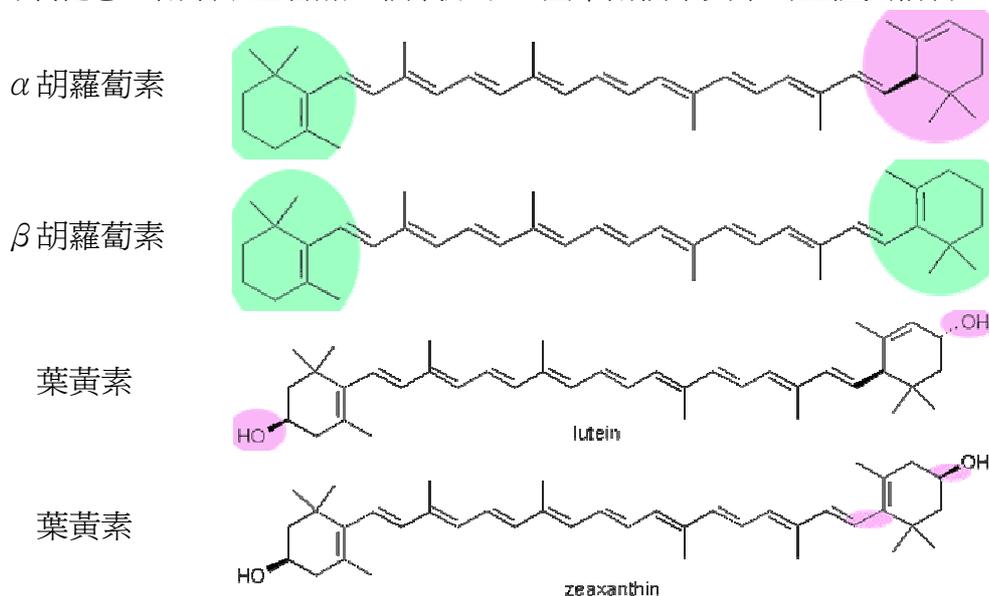


圖35. 四種類胡蘿蔔素的結構式，著色部分為其差異

4. 由實驗結果，色素移動距離與分子量大小並不一致。色素因為同類互溶，非極性的胡蘿蔔素易溶於非極性的石油醚中，其餘色素則都是極性分子，溶於丙酮中。石油醚的極性小，在濾紙的上升速度快，所以非極性的胡蘿蔔素上升得最快。葉黃素極性最大，所以被極性的丙酮和水留在最後面，除非展開液中的丙酮濃度高到足以將之溶解並向

上帶，否則葉黃素有可能一直停留在原點而不上升。

5. 萃取色素時，剛開始丙酮的濃度較低，只能溶解黃色的色素（應該是胡蘿蔔素和 X），丙酮濃度漸漸升高後，才能溶解綠色的葉綠素 a 和葉綠素 b（還有葉黃素）。由量筒中取出濾紙時，我們也發現了濾紙靠近原點處較濕，離原點遠處較乾，因此推論展開液在濾紙不同高度會含有不等量的丙酮，當在濾紙上升的丙酮量足以溶解色素時，色素會被上升的丙酮向上帶，當丙酮因蒸發而減少到不足以溶解色素時，色素便析出留在濾紙上。而丙酮上升則與含水量、蒸發量有關，含水量與展開液中使用的丙酮濃度及調配比例有關，蒸發量則與溫度有關。
6. 由於量筒內的蒸氣會影響濾紙上展開液的蒸發，所以實驗時一不小心就會影響到量筒內蒸氣的穩定，例如量筒壁上沾了展開液、實驗前靜置不夠久、鋁箔破損而無法密封、實驗過程中的搖晃、甚至是氣溫些微的改變，這些都會影響實驗的正確性。
7. 受限於時間以及能力，本次的實驗沒有好好的深究葉黃素的 Rf 值，而且也沒有弄清楚 X 究竟是什麼色素，實在是兩大憾事，希望未來有機會，能夠好好的探討一番。

柒、結論：

1. 只要調出適當的比例，使用不同濃度的丙酮，亦可以有良好的效果。例如 100% 丙酮：石油醚 = 1：9、90% 丙酮：石油醚 = 1：9、90% 丙酮：石油醚 = 2：8、80% 丙酮：石油醚 = 2：8 等展開液都有不錯的結果。
2. 丙酮的含量愈高，色素愈往展開液前端集中，不含丙酮的展開液只能將胡蘿蔔素分開，只有在丙酮、石油醚、水三者的比例適當時，才有最佳色素分離效果。
3. 使用丙酮、石油醚、水三者調製展開液，色素的排列順序都是胡蘿蔔素 > 色素 X > 葉綠素 a > 葉綠素 b > 葉黃素。此結果與指考答案相符。其中的色素 X 可能是 β 胡蘿蔔素，也有可能是葉綠素衍生。
4. 葉黃素要在 15°C 以下，使用 90% 丙酮：石油醚 = 2：8 或 80% 丙酮：石油醚 = 2：8 的展開液才能被分離，而且因顏色很淡，需要很仔細觀察。
5. 以新鮮材料萃取色素較費時，但結果顏色較為鮮明；以烘乾材料萃取色素較省時簡便，但結果顏色較不鮮明，容易產生衍生物而影響結果的觀察。
6. 濾紙層析大約進行十五分鐘就可以看出四種色素的分離，而不必等到展開液上升到量筒高度的 90%。
7. 同一展開實驗中，各種色素的 Rf 值並不是維持一個定值，而是隨著時間改變的。色素的 Rf 值會先下降再上升。而最佳的實驗觀察點則是 Rf 值降到最低且保持穩定時。若是 Rf 值再度上升後再觀察，會發生色素拖長的現象。各相鄰色素的 Rf 值差值若持續增加，色素才能完全分開，若是 Rf 值的差值隨著時間減少，會造成後方的色素追上前面的色素，而發生兩色素重疊的情形。
8. 在 20 度至 30 度的範圍內，隨著溫度的上升，各種展開液在濾紙上升的高度皆減少。同一展開液在不同的溫度下，也會讓色素有不同的 Rf 值及展開效果。

捌、參考資料及其他：

參考資料

王月雲、陳是瑩、童武夫(1998)植物生理學實驗。臺北：藝軒。

國立臺灣師範大學科學教育中心(1994)高級中學生物教師手冊，第一冊。臺北：國立編譯館。

國立臺灣師範大學科學教育中心(1994)高級中學生物第一冊。臺北：國立編譯館。

楊冠政(2005)高級中學生物上冊。臺北：龍騰。

楊冠政(2005)高級中學生物上冊教學手冊。臺北：龍騰。

溫永福、鄭湧涇、郭麗香、周雪美(1989)生物學實驗。臺北：藝軒。

魏耀揮(1990)生物化學原理，下冊。臺北：大中國。

Taiz, L. and Zaiger, E.(1991)Plant Physiology. California: The Benjamin/Cummings.

網頁資料

大學入學考試中心(2002)九十一學年度大學入學指定科目考試生物科試題。取自：

<http://www.ceec.edu.tw/AppointExam/AppointExamPaper/91ApExamPaper/91bio.pdf>

大學入學考試中心(2002)九十一學年度大學入學指定科目考試解答。取自：

<http://www.ceec.edu.tw/AppointExam/AppointExamPaper/91ApExamPaper/91ans.pdf>

Alpha carotene 和beta carotene的比較，取自：http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_carotene

Carotenoids，取自：http://www.herbalchem.net/Carotenoids_Intermediate.htm

Xanthophyll，取自：<http://www.answers.com/topic/Xanthophyll>

Xanthophyll及beta-carotene，取自：<http://chemfinder.cambridgesoft.com/>

【評語】 040716 眼見不為憑：光合色素的濾紙層析分離

本研究計畫擬探討光合色素(葉子之萃取)在層析分析之特性。作者們(共四位)用多種溶劑的不同組合，在不同溫度下觀察四種色素之分離效兼，本研究作實驗設計及操作方面相當用心。可惜所研究的問早已有大量的文獻紀錄，而本研究的結果又未具有「突破性」的進展。