2024年臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

作品編號　080006

參展科別　生物化學

作品名稱　防曬仙丹－矮仙丹花青素的抗UV功能及影響

就讀學校　國立潮州高級中學
指導教師　楊勝惠、洪育祥
作者姓名　林維德、楊輝騰

關鍵詞　花青素、抗 UV、活性氧

作者照片



摘要

為研究花青素在不同因素影響下的抗 UV 能力，選用矮仙丹作為研究對象。以矮仙丹花瓣的花青素，研究不同濃度及 pH 值的環境下，花青素的抗 UV 能力，以及在照射 UV 後，矮仙丹 SOD、POD 之濃度變化。由實驗得知，紅花的花青素含量大於粉花。對比了紅花及粉花的 UV-Vis 光譜圖後發現：在相同濃度下，紅花的吸光度大於粉花且兩者的最大吸收高峰皆位於約 510nm~520nm 處，由此推知矮仙丹的花瓣含有大量的花青素。而花青素在不同 pH 值環境下，會因為結構改變而呈現不同的顏色。我們測試在不同 pH 值緩衝液的花青素是否具有不同的抗 UV 能力，發現鹼性高於酸性。植物在代謝過程中容易產生具有毒害作用的活性氧，由於活性氧會對細胞造成傷害，於是演化出抗氧化酶，如 SOD、POD 等，用以清除活性氧，降低對植物的傷害。

Abstract

To investigate the UV resistance of anthocyanins under different factors, we selected Dwarf Ixora (Ixora williamsii) as the research subject. We studied the UV resistance of anthocyanins in petals of dwarf Ixora under different concentrations and pH values, as well as the changes in the concentrations of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) after UV exposure. Our study has shown that the anthocyanin content in the petal of red-flowered Dwarf Ixora was higher than pink-flowered one. After comparing the UV-Vis spectra of the red and pink flowers with same concentration of petal extract, it was found that the red flowers had higher absorbance, and both exhibited their maximum absorption peaks at around 510nm to 520nm, indicating a significant presence of anthocyanins in the petal of Dwarf Ixora. Furthermore, anthocyanins exhibit different colors under varying pH conditions due to structural changes. We tested whether anthocyanins in buffer solutions at different pH levels displayed varying UV resistance and found that they were more UV-resistant under alkaline conditions than under acidic conditions. Plants often produce toxic reactive oxygen species (ROS) during their metabolic processes. Since ROS can cause damage to cells, plants have evolved antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase and peroxidase, to eliminate ROS and reduce damage to the plant cells.

壹、前言

一、研究動機

隨著全球氣候變遷，臭氧層破洞的議題日益受到關注，是各大媒體及論壇經常討論的重要對象。臭氧層破洞會導致有更多的紫外線(UV)穿透到地表，並對生命體造成威脅。為了因應 UV 對生命體造成威脅，人們透過大量的研究，以找尋出能夠抵抗 UV 的相關物質。經過研究後發現，植物體內的花青素是一種天然、可抗 UV 之物質，若能應用在防曬上，是對人類的一大福祉。因此，在抗 UV 方面，花青素成了近年來被大量討論及研究的熱門主題。

矮仙丹是我國常見的園藝植物，大街小巷與校園皆可見其蹤影。除觀賞性佳之外，矮仙丹屬於長日照植物，富含著花青素。綜合以上兩點，為研究花青素受到不同因素影響下的抗 UV 能力，因此選用矮仙丹作為研究植株。透過取得矮仙丹花瓣內的花青素，並進行一系列相關研究。

二、研究目的

(一)研究不同濃度下，花青素的抗 UV 能力。

(二)實驗不同在 pH 值的環境下，花青素的抗 UV 之能力，並以結構的差異解釋原因。

(三)測量紅花、粉花的 POD 與 SOD 濃度，並探討 POD 與 SOD 濃度與花青素之關係。

三、文獻探討

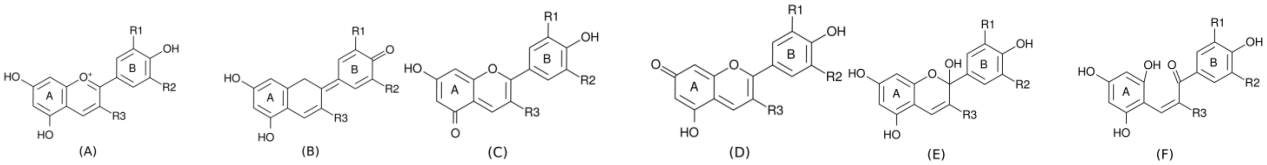
(一)UV

UV 可依據波段大小分為 UVA（315～400nm）、UVB（280～315nm）、UVC（220～280nm）。其中，UVC 能完全被臭氧層吸收，大部分的 UVB 能被臭氧層吸收，而大部分的 UVA 能夠直射地表。UVA 的波段較長，能量較低，會使皮膚曬黑、產生皺紋；UVB 的波段較短，能量較高，對身體的傷害也較高，會使皮膚曬傷、曬紅（盛建軍等，2019）

(二)花青素

花青素廣泛存在於自然界中，屬水溶性色素，儲存於植物細胞的液胞裡。花青素作為類黃酮的一種，屬於天然的抗氧化劑，可藉由電子(SET)的轉移，達到清除自由基的效果(Bianca Enaru *et al*., 2021)。除此之外，花青素也是一種天然的酸鹼指示劑。在不同 pH 值的環境下，花青素的結構會發生改變，並且會隨著 pH 值上升，而讓轉移電子至自由基上的速

度會增加(Olivier Dangles *et al.*, 2018)。在吸收光譜方面，花青素的吸收光譜約在 510～520nm 下有最大吸收高峰(Supradip Saha *et al.*, 2019)。 (A→F：pH 上升)



圖一、不同 pH 值下的花青素結構(來源：Changho Jhin *et al.*, 2014)

(三)抗氧化酶

植物在代謝過程中容易受到電子轉移而產生具有毒害作用的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)，如: $OH^{\bullet}$、$O_2^{\bullet-}$、H_2O_2 等，而植物細胞的葉綠體、粒線體和細胞膜等是產生活性氧的主要場所。為了減輕活性氧對細胞的破壞及維持體內活性氧的動態平衡，於是在演化過程中產生抗氧化酶，例如超氧化物歧化酶(SOD)、過氧化物酶(POD)等，其中 SOD 催化 $O_2^{\bullet-}$歧化反應生成 H_2O_2，POD 清除 $O_2^{\bullet-}$、H_2O_2 和其他過氧化物。這些抗氧化酶與植物的代謝與對抗逆境有密切關係。

1.SOD(超氧化物歧化酶)

超氧化物歧化酶(SOD: superoxide dismutase)是生物體系中抗氧化酶系的重要組成成員，廣泛分佈在微生物、植物和動物體內。在高等植物中，不同形式的超氧化物歧化酶定位於不同的細胞區室中。Mn-SOD 存在於粒線體和過氧化物酶體；Fe-SOD 主要位於葉綠體，但在過氧化物酶體中也能夠被檢測到；CuZn-SOD 則定位於原生質、葉綠體、過氧化物酶體和質外體(apoplast)中。該酶與植物的代謝及對抗衰老有密切關係，是植物體內重要的保護酶之一，因此 SOD 濃度的測定在研究植物衰老及抗逆機制中有著重要意義。(Cerqueira, J.V.A., de Andrade, M.T., Rafael, D.D. *et al.* 2023)

2.POD(過氧化物酶)

植物在正常生長情況下所產生的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)濃度非常低，但在逆境下(如：乾旱、照 UV、土壤鹽鹼化)，植物所產生之 ROS 濃度便會急速增加。ROS 包含了自由基類的 $OH^{\bullet}$、$O_2^{\bullet-}$及非自由基類的 H_2O_2，在細胞內進行一系列的氧化還原反應後，使蛋白質、DNA、RNA 受損。植物為了避免 ROS 累積於體內，使其與體內生物分子發生反應，因此演化出了抗氧化酵素清除系統。抗氧化酵素清除系統包含了超氧化歧酶(SOD)、過

氧化物酶(POD)等。隨著 ROS 的增加，抗氧化酵素的活性也會隨之增加。抗氧化酵素之間互相分工，透過一連串的氧化還原反應將體內的活性氧清除(蔣永正，2011)，其中，POD 可使 H_2O_2 作為電子供體，過氧化物酶可將 H_2O_2 催化為 H_2O。(Pontsho Patricia Twala *et al.*, 2020)

貳、研究方法與過程

一、實驗器材

(一)儀器：電子秤、研缽及研杵、離心機、分光光度計、筆電、恆溫往復式震盪水槽、複式顯微鏡、光學顯微鏡。

(二)材料：紅花矮仙丹、粉花矮仙丹、萬用試紙(MERCK)、UV燈、TLC片(MERCK)、毛細管、沖堤瓶、鑷子、試管、保鮮膜、鑷子、手套、培養皿、燒杯及玻棒、研缽及研杵、蓋玻片及載玻片、滴管、離心管、布氏漏斗、側枝三角錐形瓶、抽濾管、吸注器與吸注管。

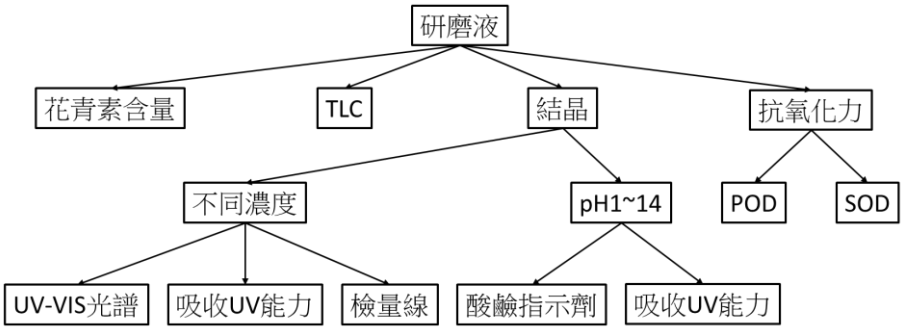
(三)藥品：正己烷、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、HCL、磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、過氧化氫、Guaiacol、甲硫氨酸、NitroBlue Tetrazolium、EDTA、核黃素、亞甲藍。

二、研究流程



圖二、研究流程圖(來源：研究者自製)

三、實驗步驟



圖三、實驗架構圖(來源：研究者自製)

(一)前置步驟：研磨液

1.製作 1%(v/v)鹽酸甲醇溶液 250mL(247.5mL 的 Methanol 加上 2.5mL 的 HCl)

2.採集紅色、粉色二種顏色的矮仙丹花朵，取花瓣各 2 克加上適當的 1%鹽酸甲醇溶液以杵缽研磨。

3.將研磨液倒入小燒杯加上 1%鹽酸甲醇溶液約至 20mL，以錫箔紙覆蓋後，放置恆溫往復式恆溫震盪水槽，溫度設定加熱至 60℃，震盪轉速設定 50 rpm，加熱浸提 60 分鐘。(崔麗霞等，2017)

(二)檢測紅花與粉花矮仙丹花青素含量

1.將適當紅色、粉色二種顏色的矮仙丹花研磨液倒入離心管，並置於離心機內，以 6000 轉離心 20 分鐘。

2.以 Pipette 吸取紅花、粉花上清液各 1.5mL 於比色管中，各管再加入 1mL 的 Methanol 1% HCl 並以分光光度計在波長 530nm 和 657nm 下進行檢測。

3.空白製作 2.5mL(Methanol 1% HCl)

4.以 $TA = \frac{(A_{600} - A_{657}) \times V}{M}$ 的公式進行花青素量的計算(TA 花青素總量、A 吸光度、V 萃取液(mL)、M 樣本重量(mg)。(Michael M. Neff *et al.*, 1998)

(三)以 TLC 偵測花青素

1.取適當紅色、粉色二種顏色的矮仙丹花研磨液倒入燒杯。

2.以毛細管吸附樣品溶液，滴於 TLC 片上，分別用正己烷、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇及不同比例混和液作為展開液，以薄層層析法，進行定性分析。

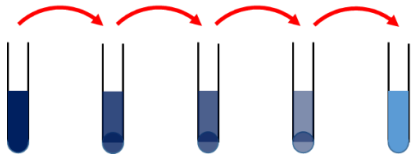
(四)紅花與粉花 UV-Vis 光譜圖

1.以減壓過濾方法提高研磨液的過濾效果。將布氏漏斗裝至側枝三角錐形瓶(抽濾瓶)上，側枝外接抽濾管，利用伯努力效應以高速的水流通過側管產生壓力，將研磨液快速過濾帶入錐形瓶內，而花瓣研磨殘渣會留在濾紙上方。此時再以鹽酸甲醇溶液對殘渣及濾紙進行洗滌至變白色。

2.以相對高溫及相對低壓方法將溶劑移除，並取得粉狀結晶。僅將減壓過濾裝置之布氏漏斗以橡皮塞取代，並將錐形瓶放置於裝有 80°C 熱水的鐵盆，水面略高於瓶內液面以

鐵夾固定，利用高溫及負壓，約 15 分鐘，可將過濾液內的溶劑移除，使結晶析出。

3.已知 $ppm=\frac{mg}{L}$ ，製作濃度 T_0 (ppm)之青花素溶液原液。取 (W_1-W_0) mg 加入 $X=\frac{W_1-W_0}{T_0}$ (L)的水製成原液。之後取 T_{i-1} (ppm)前液 A mL 再加入 $A\times\frac{T_{i-1}-T_i}{T_i}$ mL 水稀釋成 $T_i, i=1,2,3,...$ 濃度可得…



$T_0 ppm, T_1 ppm, T_2 ppm, T_3 ppm, T_4 ppm, ...$

圖四、移液示意圖(來源：研究者自製)

4.製作檢量線。

5.利用上面不同濃度的花青素，製作 UV-Vis 光譜圖。

(五)偵測不同濃度的花青素吸收 UV 的能力

1.將不同濃度的花青素 10mL 倒入培養皿，以 365nm 紫外光照射，偵測吸收 UV 的能力。

2.繪製濃度 ppm 與吸收 UV 量(mW/cm^2)的關係圖。

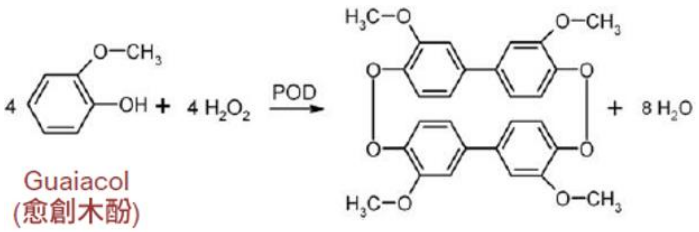
(六)偵測不同 pH 值的花青素吸收 UV 的能力

1.分別將試管倒入 pH=1~pH=14 的 7ml 緩衝液，並滴入 3ml 花青素溶液。觀察完變色反應後，將溶液加入培養皿。

2.以 365nm 紫外光照射，偵測吸收 UV 的能力並繪製濃度 ppm 與吸收 UV 量(mW/cm^2)的關係圖

(七)紅花與粉花的 POD 測試

矮仙丹經紫外光 UVA 照射後，觀察體內抗氧化酵素濃度的影響。利用愈創木酚與過氧化氫在過氧化酶(peroxidase, POD)的催化下會生成愈創木酚四聚體(紅棕色)之反應，以分光光度計 470nm 波長分別測量紅花與粉花，在單位時間中四聚體之增加量，以得知 POD 濃度大小。



圖五、愈創木酚加上 H_2O_2 後形成愈創木酚四聚體之反應

(來源：Michael Mitsch *et al*., 2020)

1.藥品準備

(1)Postassium phosphate buffer (0.5L,50mM,pH=5.8)

①在合適的容器中準備 400 mL 的蒸餾水 。

②將 254.342 mg 磷酸氫二鉀 K_2HPO_4(分子量 174.18)添加到溶液中。

③將 3.204 g 磷酸二氫鉀 KH_2PO_4(分子量 136.09)添加到溶液中。

④添加蒸餾水直至體積為 0.5 L。

(2)Guaiacol 癒創木酚(21.6mM)

①在合適的容器中準備 300 mL 的蒸餾水。

②將 1mLGuayacol 溶液(分子量：124.14 密度：1.13)加到溶液中。

③添加蒸餾水直至體積為 420mL。

(3)H_2O_2(39.2mM)

①在合適的容器中準備 300 mL 的蒸餾水。

②將 0.5mL H_2O_2 溶液(分子量：34；密度：1.1337)加到溶液中。

③添加蒸餾水直至體積為 425mL。

(4)POD activity buffer：以 $H_2O_2 : Guaiacol : Buffer = 810\mu L : 900\mu L : 900\mu L$ 配置。

2.樣品準備

(1)將 100mg 樣品加入 1ml Potassium phosphate buffer 以研缽及杵研磨後倒入離心管。

(2)再以 6000rpm 離心 20 分鐘後置於冰上保存備用。

3.實驗操作

(1)將 2610μL 的 POD activity buffer 加入比色管，並於分光光度計中架設完成。

(2)取離心後的樣品上清液 90μL 加入比色管中快速混勻。

(3)以分光光度計測量吸光值，測量 8 分鐘後並記錄每分鐘 470nm 的吸光度。

(Michael Mitsch *et al*., 2020)

(八)紅花與粉花的 SOD 測試

超氧化物歧化酶(SOD)濃度可以通過濃度測定和濃度凝膠來測量。在生化方法中，黃嘌呤-黃嘌呤氧化酶用於產生 $O_2^{\bullet-}$，硝基藍四唑(NBT) 還原用作 $O_2^{\bullet-}$產生的指示劑。SOD 將與 NBT 競爭 $O_2^{\bullet-}$；NBT 還原的抑制百分比是 SOD 存在量的量度。超氧化物歧化酶的酶單元，被定義為每減少 50%抑制色色素為 1 單位酶。

(1)磷酸鹽緩衝液 Potassium Phosphate (PP) (0.5L,50mM,pH 7.8)

①量取 400ml 蒸餾水置於玻璃容器中

②加入磷酸氫二鉀 3.724g(K_2HPO_4：174.18g/mol)

③加入磷酸二氫鉀 0.493g(KH_2PO_4：136.09g/mol)

④加蒸餾水定容至 500ml

(2)甲硫氨酸 Met(0.1L,130 mM)

①量取 80ml 磷酸鹽緩衝液置於玻璃容器中

②加入甲硫氨酸 1.9399 g (Met $C_5H_{11}NO_2S$：149.21g/mol)

③加磷酸鹽緩衝液定容至 100ml

(3)NitroBlue Tetrazolium (0.1L,750μM)

①量取 80ml 磷酸鹽緩衝液置於玻璃容器中

②測量 0.06133g 的 NBT(分子量 817.64)

③加磷酸鹽緩衝液定容至 100ml，避光保存

(4)EDTA (0.5L,0.1 mM)

①量取 400ml 磷酸鹽緩衝液置於玻璃容器中

②測量 0.0146g 的 EDTA(分子量 292)

③加磷酸鹽緩衝液至 500ml

(5)核黃素溶液(0.5L, 20 μM)

①量取 400ml 蒸餾水置於玻璃容器中

②稱取 0.0376g 核黃素(分子量 376.36)用磷酸緩衝液溶解

③加水定容至 500 mL，避光保存。

2.樣品準備

酶液提取：取矮仙丹花 0.5g 於研钵中，以 1ml 磷酸緩衝液研磨成漿，加緩衝液至 5ml 放置冰中浸提 20 分鐘。以離心機 6000rpm 離心 20min，上清液為 SOD 粗提液。

3.實驗操作

(1)取 5 支比色管，其中 3 支為測定管，2 支為對照管，每支分別先加入：

1.7 ml 磷酸緩衝液、0.3mlMET、0.3mlNBT、0.3mlEDTA、0.3ml 核黃素

(2)A、B 二支對照管加 0.1ml 蒸餾水、C、D、E 三支為測定管加 0.1ml 酶液。每支總體積為 3ml

(3)將 A 對照管至於暗處，其它 B、C、D、E 四管置於日光燈下反應 20 分鐘。

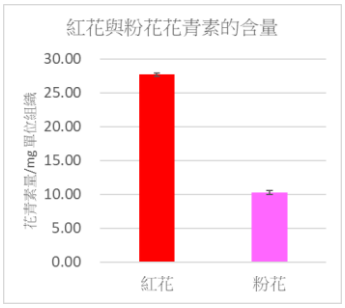
參、研究結果與討論

一、紅花與粉花的花青素含量

	紅花	紅花	紅花	粉花	粉花	粉花
530nm吸光度	2.804	2.764	2.842	1.025	1.081	1.035
657nm吸光度	0.042	0.021	0.037	0.020	0.009	0.019
V(mL)	10	10	10	10	10	10
M(g)	1	1	1	1	1	1
TA	27.62	27.43	28.05	10.05	10.72	10.16

	N=1	N=2	N=3	平均	標準差	T-test
紅花	27.62	27.43	28.05	27.70	0.259	
粉花	10.05	10.72	10.16	10.31	0.293	0.00000046

表一、紅花與粉花的花青素含量



圖六、花青素含量 (來源：研究者製)

根據實驗三數據可知，在 530nm、657nm 下，紅花萃取液之吸光度皆大於粉花萃取液。經計算後，「紅花萃取液的花青素含量高於粉花，且具有顯著差異」，可證在實驗一中，相同濃度的紅花萃取液之吸光度會遠高於粉花的吸光度。

二、紅花與粉花的 TLC 分析

乙酸乙酯	乙酸乙酯：丙酮：乙醇 =1：1：2	乙酸乙酯：丙酮：乙醇 =1：2：1	乙酸乙酯：丙酮：甲醇 =1：1：1
			

圖、紅花與粉花萃取液在不同展開液中的 TLC 測試(來源：研究者攝)

(一)乙酸乙酯：萃取液沒有被展開液帶至TLC片上方。

(二)乙酸乙酯：丙酮：乙醇(1：1：2)：萃取液被展開液帶至TLC片上方。

(三)乙酸乙酯：丙酮：乙醇(1：2：1)：萃取液被帶至展開液上方，且分離出黃綠色及紅色的物質。

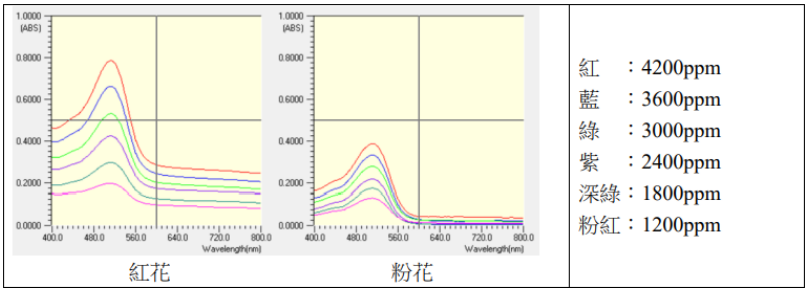
(四)乙酸乙酯：丙酮：甲醇(1：1：1)：萃取液被帶至展開液上方，且分離出黃綠色及紅色的物質。

結論：由 TLC 片展開結果可知，「萃取液中含有其他與花青素極性大小相似雜質」。

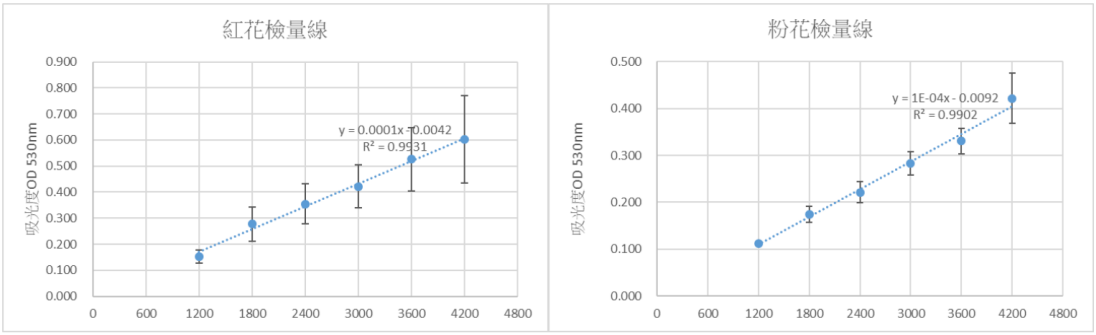
三、紅花與粉花的 UV—Vis 光譜圖

花青素約在波長 510~520nm 有最大的吸收量(Supradip Saha *et al.*, 2019)。根據實驗一，由分光光度計結果可知矮仙丹紅花與粉花的最大吸收波長(吸收光譜波峰)約為 520nm，與文獻記載吻合，由此可驗證「萃取液中物質含有花青素」。

不論是紅花或粉花，其吸收光譜的波峰會隨著濃度上升而增加，且吸光度與濃度之間的相關性呈「高度正相關」。除此之外，粉花 4200ppm 的花青素之吸收高峰數值與紅花 1800ppm 的花青素之吸收高峰數值相近，故推測紅花花青素在萃取液中所佔的濃度比例可能高於粉花(即粉花萃取液中，雜質佔比較紅花高)，其抗 UV 能力亦可能較佳。

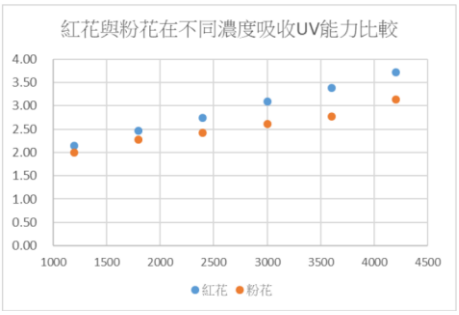


圖八、紅花與粉花的 UV—Vis 光譜圖(來源：研究者自製)



圖九、紅花、粉花在不同濃度的吸光值之檢量線(吸光度 OD530nm)(來源：研究者自製)

四、不同濃度的花青素溶液之 UV 吸收能力



ppm	紅花	粉花
4200	3.71	3.14
3600	3.39	2.77
3000	3.09	2.61
2400	2.75	2.42
1800	2.46	2.27
1200	2.14	2.00
T-test	對照組	0.00497

圖十一、不同濃度下，紅花、粉花花青素吸收 UV 能力之趨勢比較圖(來源：研究者自製)

經由實驗四數據發現，濃度與吸收 UV 之間的關係呈「高度正相關」，且隨著濃度增加，紅花的抗 UV 能力也顯著較粉花為佳。

五、pH=1~14 的花青素溶液吸收 UV 之能力

同種花瓣的花青素種類大抵相同，而花青素在不同 pH 值環境下，花青素會因為結構改變使其呈現出來的顏色不同(Dangles, & Fenger, 2018)。以下我們設計了在不同 pH 值環境下的實驗，觀察經結構改變的花青素是否具有不同的抗 UV 能力。

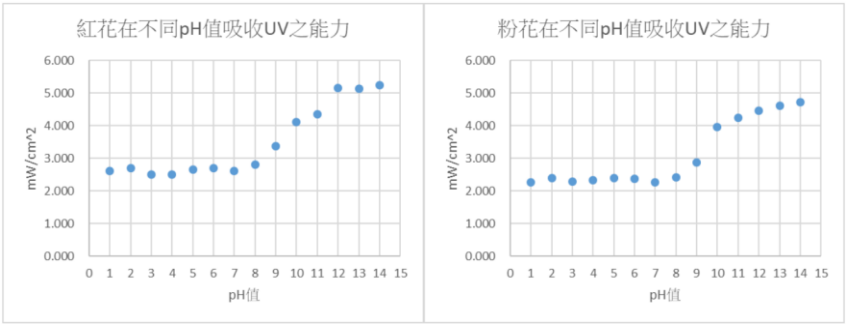
紅花					
pH	N=1	N=2	N=3	平均	標準差
1	2.45	2.68	2.69	2.607	0.111
2	2.53	2.85	2.69	2.690	0.131
3	2.28	2.64	2.60	2.507	0.161
4	2.28	2.60	2.60	2.493	0.151
5	2.28	3.01	2.65	2.647	0.298
6	2.32	3.01	2.77	2.700	0.286
7	2.28	3.05	2.52	2.617	0.322
8	2.53	3.17	2.73	2.810	0.267
9	2.61	3.82	3.66	3.363	0.537
10	4.48	3.86	3.99	4.110	0.267
11	4.52	4.23	4.31	4.353	0.122
12	4.97	5.28	5.21	5.153	0.133
13	5.13	5.36	4.92	5.137	0.180
14	5.30	5.53	4.92	5.250	0.252
相關	0.962	0.938	0.975		
係數	N=3,1	N=1,2	N=2,3		

粉花					
pH	N=1	N=2	N=3	平均	標準差
1	2.16	2.30	2.32	2.260	0.071
2	2.24	2.55	2.40	2.397	0.127
3	2.26	2.39	2.19	2.280	0.083
4	2.12	2.57	2.32	2.337	0.184
5	2.14	2.61	2.44	2.397	0.194
6	2.20	2.69	2.23	2.373	0.224
7	1.97	2.57	2.23	2.257	0.246
8	2.77	2.52	1.95	2.413	0.343
9	3.29	2.55	2.77	2.870	0.310
10	5.12	3.40	3.34	3.953	0.825
11	5.08	3.78	3.84	4.233	0.599
12	5.05	4.02	4.32	4.463	0.433
13	5.01	4.27	4.55	4.610	0.305
14	4.89	4.31	4.96	4.720	0.291
相關	0.901	0.916	0.976		
係數	N=3,1	N=1,2	N=2,3		

表二、不同 pH 值的紅花、粉花花青素吸收 UV(mW/cm^2)之數值(來源：研究者自製)



圖十二、花青素在不同 pH 值下的顏色變化(來源：研究者自製)



圖十三、pH1~14 的花青素溶液吸收 UV (mW/cm^2)之趨勢圖(來源：研究者自製)

由結果可知：在 pH1~8 之間，「花青素的吸收 UV 能力幾乎相同」。紅花吸收量(mW/cm^2)約為 2.6 mW/cm^2，粉花約為 2.3 mW/cm^2，紅花略高於粉花。在 pH8~12 之間，「隨著 pH 增加，花青素的吸收 UV 能力也增加」。紅花在此區段約增加 2.4 mW/cm^2，粉花約增

加 2.1 mW/cm^2，紅花增加的幅度較粉花大。在 pH12~14 之間，「花青素的吸收 UV 的能力趨於平緩」，紅花最終的 UV 吸收量約為 5.3 mW/cm^2，而粉花則約為 4.7 mW/cm^2。

實驗結果顯示：「花青素在鹼性緩衝液中的 UV 吸收能力較強，且隨著 pH 值上升而增加」。另外，也可以推論「紅花對 UV 吸收能力皆高於粉花，不受 pH 值的影響。」

六、紅花、粉花的 SOD 測試

(一)整體而言



圖十四、照射 0 分鐘~120 分鐘的 UV 後，其 SOD 之變化圖(來源：研究者自製)

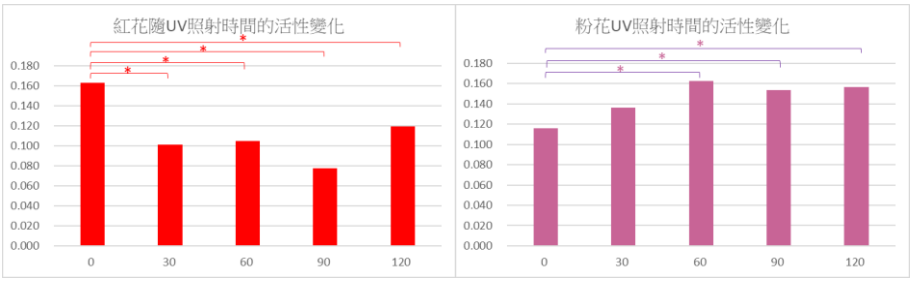
長期而言，經兩小時的UV照射後，SOD濃度與0分鐘相比，紅花為顯著下降，粉花為顯著上升。就變化趨勢而言，紅花為下降、微升、下降、又微升，而粉花則是先上升、微降、又微升。

若再將照射時間分為0~60分鐘為前期及60~120分鐘為後期，則粉花在前期為顯著上升，後期則略為下降，而紅花在前期的為顯著下降，後期則略有上升的趨勢。

(二)照射 UV 與未照射 UV 之比較

類別	時間	N=1	N=2	N=3	平均數	標準差	T-test 0-30	T-test 0-60	T-test 0-90	T-test 0-120
紅花	0	0.15906	0.18614	0.14425	0.16315	0.017345				
紅花	30	0.09347	0.10919	0.10133	0.10133	0.006419	0.0259			
紅花	60	0.11242	0.10691	0.09506	0.10480	0.007243		0.0276		
紅花	90	0.08316	0.08404	0.06599	0.07773	0.008308			0.0093	
紅花	120	0.11696	0.11464	0.12680	0.11947	0.005272				0.0601
粉花	0	0.12489	0.11976	0.10341	0.11602	0.009161				
粉花	30	0.15100	0.16313	0.09380	0.13598	0.030229	0.4530			
粉花	60	0.18396	0.15182	0.15138	0.16239	0.015257		0.0298		
粉花	90	0.14811	0.17297	0.14027	0.15378	0.013941			0.0404	
粉花	120	0.14598	0.16370	0.15969	0.15646	0.007584				0.0094

表三、紅花與粉花照射 0~120 分鐘的 UV 後，其 SOD 之數值(來源：研究者自製)



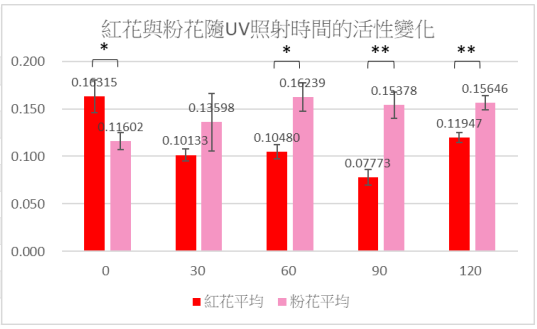
圖十五、紅花與粉花照射 0~120 分鐘的 UV 後，其 SOD 長條圖(來源：研究者自製)

以紅花而言，照射UV時間與未照射相比，照射30分鐘、60分鐘、90分鐘與照射120分鐘後其SOD濃度皆為顯著下降。

以粉花而言，照射UV時間與未照射相比，照射30分鐘後其SOD濃度上升；照射60分鐘、90分鐘與照射120分鐘後其SOD濃度皆為顯著上升。

(三)不同花種在相同照射 UV 時間時，其 SOD 之比較

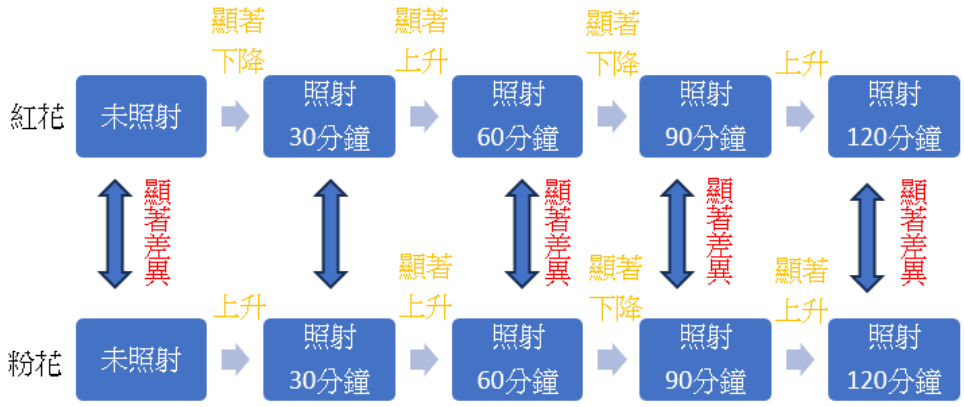
類別	時間	N=1	N=2	N=3	平均數	標準差	T-test
紅花	0	0.15906	0.18614	0.14425	0.16315	0.01734	
粉花	0	0.12489	0.11976	0.10341	0.11602	0.00916	0.04178
紅花	30	0.09347	0.10919	0.10133	0.10133	0.00642	
粉花	30	0.15100	0.16313	0.09380	0.13598	0.03023	0.243537
紅花	60	0.11242	0.10691	0.09506	0.10480	0.00724	
粉花	60	0.18396	0.15182	0.15138	0.162389	0.015257	0.01898
紅花	90	0.08316	0.08404	0.06599	0.07773	0.00831	
粉花	90	0.14811	0.17297	0.14027	0.15378	0.01394	0.00537
紅花	120	0.11696	0.11464	0.12680	0.11947	0.00527	
粉花	120	0.14598	0.16370	0.15969	0.15646	0.00758	0.00672



圖十六、紅花、粉花在不同照射時間下的 SOD 數值(來源：研究者自製)

在未照射 UV 時，紅花的 SOD 濃度大於粉花且有顯著差異。照射 30 分鐘期間，粉花的 SOD 濃度增加，紅花下降，至 30 分鐘時粉花 SOD 濃度大於紅花。30 至 60 分鐘期間，粉花的 SOD 濃度仍持續增加，紅花的 SOD 濃度也略有上升，至 60 分鐘時粉花的 SOD 濃度仍大於紅花且有顯著差異。照射 60 至 90 分鐘期間，粉花、紅花的 SOD 濃度皆下降，但紅花下降的趨勢大於粉花，至 90 分鐘時粉花 SOD 濃度仍高於紅花且有顯著差異。照射 90 至 120 分鐘期間，雖紅花 SOD 濃度大幅增加，粉花亦略增加，但至 120 分鐘時粉花的 SOD 濃度仍大於紅花且有顯著差異。

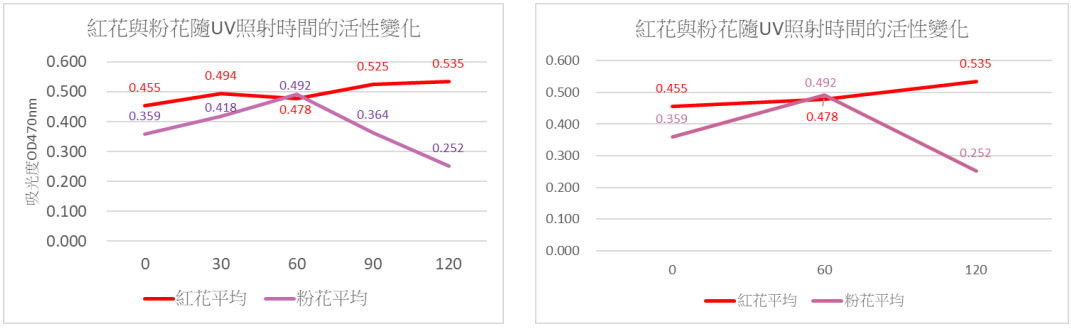
我們將上面討論內容，整理成以下圖表



圖十七、紅花、粉花照射 UV 後的 SOD 濃度變化之關係(來源：研究者自製)

七、紅花、粉花的 POD 測試

(一)整體而言



圖十八、照射 0 分鐘~120 分鐘的 UV 後，其 POD 之變化圖(來源：研究者自製)

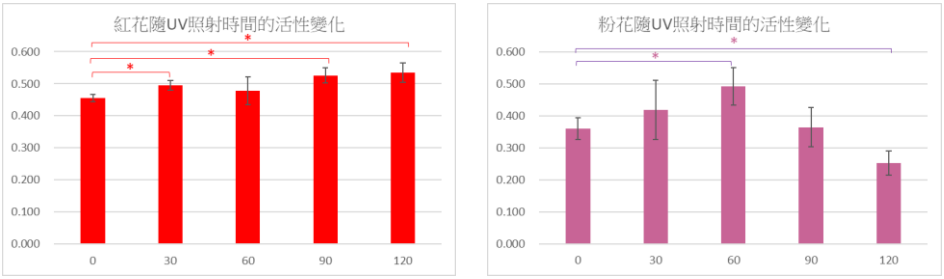
長期而言，經兩小時的UV照射後，POD濃度與0分鐘相比，紅花則為顯著上升，粉花則為顯著下降。就變化趨勢而言，紅花為先上升、再微降、再上升，而粉花則是先上升、再下降。

若再將照射時間分為0~60分鐘為前期及60~120分鐘為後期，則粉花在前期為顯著上升，後期則為顯著下降，而紅花在前期的變化沒有顯著差異，後期則略有上升的趨勢。

(二)照射 UV 與未照射 UV 之比較

類別	時間	N=1	N=2	N=3	平均	標準差	T-test 0-30	T-test 0-60	T-test 0-90	T-test 0-120
紅花	0	0.445	0.448	0.471	0.455	0.0114				
紅花	30	0.482	0.485	0.516	0.494	0.0153	0.0430			
紅花	60	0.417	0.508	0.510	0.478	0.0432		0.4984		
紅花	90	0.505	0.513	0.558	0.525	0.0235			0.0188	
紅花	120	0.493	0.547	0.564	0.535	0.0300				0.0245
粉花	0	0.352	0.403	0.321	0.359	0.0337				
粉花	30	0.288	0.496	0.471	0.418	0.0930	0.4448			
粉花	60	0.533	0.533	0.409	0.492	0.0585		0.0500		
粉花	90	0.279	0.389	0.423	0.364	0.0614			0.9290	
粉花	120	0.242	0.302	0.211	0.252	0.0374				0.0396

表四、照射 120 分鐘的 UV 後，其 POD 之數值，紅色表示有顯著差異 (來源：研究者自製)



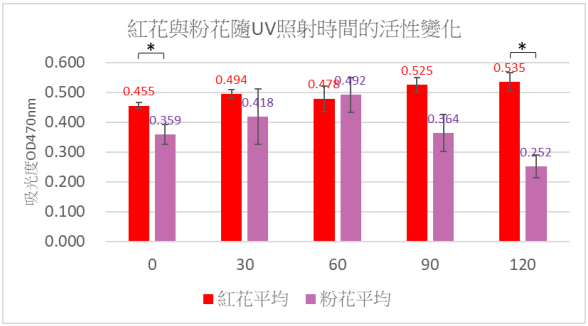
圖十九、紅花與粉花照射 0~120 分鐘的 UV 後，其 POD 長條圖(來源：研究者自製)

以紅花而言，照射UV時間與未照射相比，照射30分鐘後其POD濃度有顯著增加；照射60分鐘則無顯著差異；照射90分鐘與照射120分鐘皆有顯著增加。

以粉花而言，照射UV時間與未照射相比，照射30分鐘後其POD濃度增加；照射60分鐘則有顯著增加；照射90分鐘則無顯著差異；照射120分鐘則呈顯著減少。

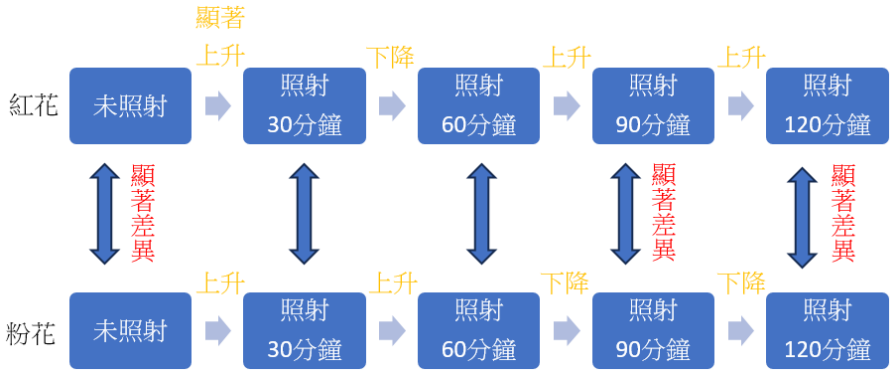
(三)不同花種在相同照射UV時間時，其POD之比較

類別	時間	N=1	N=2	N=3	平均	標準差	T-test
紅花	0	0.445	0.448	0.471	0.455	0.0114	
粉花	0	0.352	0.403	0.321	0.359	0.0337	0.0450
紅花	30	0.482	0.485	0.516	0.494	0.0153	
粉花	30	0.496	0.471	0.288	0.418	0.0930	0.3662
紅花	60	0.417	0.508	0.510	0.478	0.0432	
粉花	60	0.533	0.533	0.409	0.492	0.0585	0.8117
紅花	90	0.505	0.513	0.558	0.525	0.0235	
粉花	90	0.279	0.389	0.423	0.364	0.0614	0.0508
紅花	120	0.493	0.547	0.564	0.535	0.0300	
粉花	120	0.242	0.302	0.211	0.252	0.0374	0.0014



圖廿、紅花、粉花在不同照射時間下的 POD 數值(來源：研究者自製)

紅花與粉花未照紫外光時，紅花 POD 濃度較粉花高且有顯著差異；紅花與粉花同時照紫外光 30 分鐘後，紅花 POD 濃度高於粉花，兩者無顯著差異；紅花與粉花同時照紫外光 60 分鐘後，粉花 POD 濃度略高於紅花，兩者無顯著差異；紅花與粉花同時照紫外光 90 分鐘後，紅花 POD 濃度高於粉花，兩者無顯著差異；紅花與粉花同時照紫外光 120 分鐘後，紅花 POD 濃度較粉花高且有顯著差異。上面討論內容，整理成以下圖表。



圖廿一、紅花、粉花照射 UV 後的 POD 濃度變化之關係(來源：研究者自製)

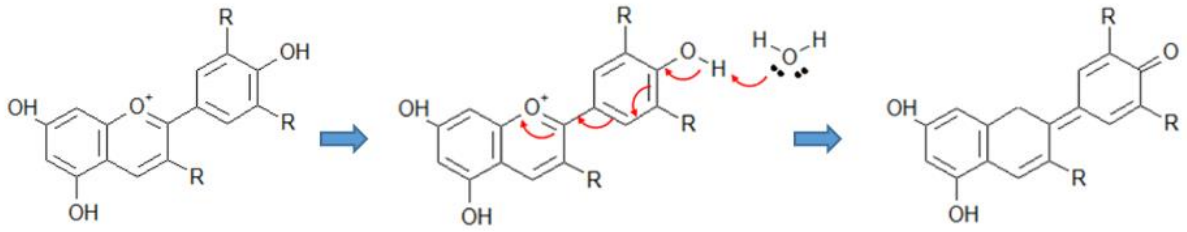
肆、結論與應用

一、花青素萃取液

在實驗一中，我們計算出紅花的花青素含量高於粉花；在實驗二中，我們用 TLC 檢測出萃取液中含有與花青素相關之雜質；在實驗三中，相同濃度的花青素萃取液中，紅花花青素吸光度較高，粉花吸光度較低。綜合上述的三個實驗結果，由於相同濃度的萃取液中，紅花萃取液所含有的雜質較低，且紅花所含花青素含量較粉花高，導致了相同濃度的紅花萃取液之吸光度較高。

二、紅花與粉花花青素在不同濃度、不同 pH 之下的抗 UV 能力

經過實驗四可證實，花青素確實具有抗 UV 之能力，且隨著濃度上升而增加。在不同 pH 值環境下，花青素結構發生改變。從酸性環境到鹼性環境，花青素的電荷密度提升，總電荷從＋1 價轉為電中性，親核基(OH^-)的數量也不斷增加，加上花青素的 OH^-及苯環上的 π 軌域之電子轉移至自由基上，達到清除自由基的效果，故可證實「隨著 pH 值上升，花青素轉移電子的速度會提升」。實驗五的結果再次驗證了在鹼性環境下，花青素轉移電子的速度會提升，抗 UV 的能力也會增加(Dangles, & Fenger, 2018)。

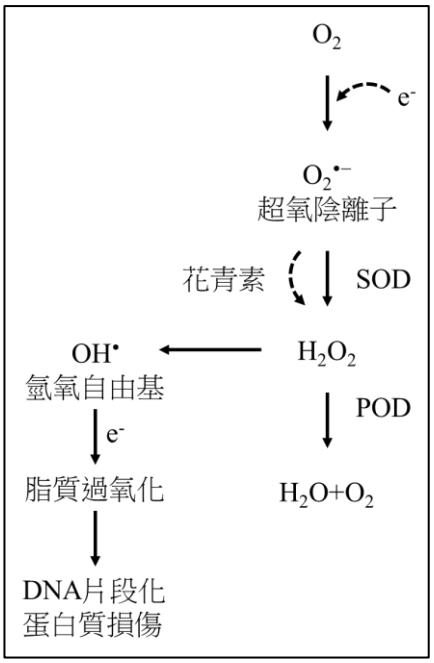


圖廿二、花青素在酸性溶液下，電子轉移示意圖(來源：研究者自製)

三、紅花與粉花花青素與其產生之 POD 與 SOD 之關係

(1)根據實驗六、七之結果，在未照射 UV 時，紅花之抗氧化酶(SOD 與 POD)濃度皆較粉花高。其可能原因為：在生存於自然界的情況下，因為紅花花青素較多，對植物的保護效果較佳，導致了紅花的抗氧化酶消耗量較少，使紅花在未照射 UV 的情況下所具有的抗氧化酶濃度高於粉花。

(2)在短期照射(0~60 分鐘)下，ROS 的濃度增加。根據勒沙特列原理，為使植物體內的 ROS 之生成速率與清除速率之間達成平衡，需消耗更多的抗氧化酶。紅花在 SOD 方面，因為花青素較多，產生的 ROS 較少，故只需消耗體內的抗氧化酶加上花青素的作用，即可使 ROS 的生成與清除趨於平衡，因此 SOD 的濃度顯著下降；在 POD 方面雖有上升，但無顯著差異，導致紅花與粉花的 POD 濃度之間的關係，從顯著差異變為無顯著差異。粉花因為花青素少，故植物的保護力較弱，在自然環境產生的抗氧化酶已不敷使用，因此粉花產生大量的抗氧化酶。由於生產速率大於消耗速率的因素，故 SOD 與 POD 濃度逐漸上升，且具有顯著差異。



(3)在長期照射(0~120 分鐘)下，由於紅花體內的 ROS 逐漸累積，故需產生大量的 SOD。因為 ROS 生成速率大於消耗速率，使 SOD 的濃度顯著上升；在 POD 的方面，其濃度雖上升，但不顯著。粉花花青素較少，導致 ROS 產生較多，加上長期累積的因素，使 SOD 上升以清除 ROS，再因歧化作用，導致粉花需消耗較多 POD 清除 SOD 副產物而下降。

四、未來展望

現代生活中，花青素多用於保健食品，具有護膚、防皺、促進新陳代謝、保護眼睛等功能，是長期於烈日下工作及經常使用 3C 產品的人們不可或缺的保健食品。此外，由實驗得知，隨著花青素濃度不斷提升，抗 UV 的效果越佳，且不同濃度及酸鹼度下的花青素呈現不同的抗 UV 效果，可說明花青素為一種天然的防曬物質。

另外，紅花、粉花中不同劑量的花青素也會影響花瓣組織的抗氧化力，在短期(60 分鐘)與長期(120 分鐘)照射 UV 的比較，發現抗氧化力有顯著變化。未來可利用花青素的特性開發出相關抗 UV 產品，或比較不同種類的花青素之抗氧化能力。

伍、參考文獻

一、期刊

1、Michael M. Neff, & Joanne Chor. (1998). Genetic Interactions between Phytochrome A, Phytochrome B, and Cryptochrome 1 during Arabidopsis Development. *Plant Physio, 118*, 27-36.

2、Changho Jhin, & Keum Taek Hwang. (2014). Prediction of Radical Scavenging Activities of Anthocyanins Applying Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System (ANFIS) with Quantum Chemical Descriptors. *International Journal of Molecular Sciences, 15*(8), 1-13.

3、Olivier Dangles, & Julie-Anne Fenger. (2018). The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition. *Advances in Anthocyanin Research 2018, 23*(8), 1-23.

4、盛建軍、李想、何永美、祖艷群、湛方棟、李元（2019）。UV-B 輻射對花青素合成代謝的影響及分子機理。植物生理學 Plant Physiology Journal，55，949-958。

5、Supradip Saha, Jashbir Singh, Anindita Paul, & Rohan Sarkar. (2019). Anthocyanin Profiling Using UV-Vis Spectroscopy and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International, 103*(1), 1-17.

6、Pontsho Patricia Twala, Alfred Mitema, Cindy Baburam, & Naser Aliye Feto. (2020). Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. *AIMS Microbiology, 6*(3), 1-20.

7、Michael Mitsch, & Bryan White. (2020). A Simple, Quantitative Peroxidase Assay Demonstrating Enzyme Inhibition with L-cysteine. *Biology Laboratory Education, 41*, 1-10.

8、Bianca Enaru, Georgiana Drescanu, Teodora Daria Pop, Andreea Stănilă, & Zorişa Diaconeasa. (2021). Anthocyanins:Factors Affecting Their Stability and Degradation. *Antioxidant Capacity of Anthocyanins and other Vegetal Pigments: Modern Assisted Extraction Methods and Analysis, 10*(12), 1-40.

9、Cerqueira, J.V.A., de Andrade, M.T., Rafael, D.D. *et al.* Anthocyanins and reactive oxygen species: a team of rivals regulating plant development?. *Plant Mol Biol* **112**, 213–223 (2023)

二、網路資料

1.蔣永正(2011 年)。植物對環境逆境之調控與應用。https://reurl.cc/m0yDeW

2.崔麗霞、張志軍、李曉君、李會真(2017 年 2 月 28 日)。花青素提取、分離純化技術研究進展。https://reurl.cc/5Od17M

【評語】080006

本研究選用矮仙丹花瓣的花青素，研究不同濃度及 pH 值的環境下，花青素的抗 UV 能力，以及在照射 UV 後，矮仙丹 SOD、POD 之濃度變化。由實驗推知矮仙丹的花瓣含有大量的花青素，亦發現花青素的抗 UV 能力在鹼性會高於酸性。

優點：

從事多項研究並由實驗結果得知矮仙丹的花瓣含有大量的花青素，也發現花青素的抗 UV 能力在鹼性時高於在酸性時。

建議：

1. 植物演化出抗氧化酶，如 SOD、POD 等，以清除活性氧，降低對植物的傷害，和花青素抗 UV 功能之相關性有待釐清。結論中提到的論述:「紅花在 SOD 方面，因為花青素較多，產生的 ROS 較少，故只需消耗體內的抗氧化酶加上花青素的作用，即可使 ROS 的生成與清除趨於平衡，因此 SOD 的濃度顯著下降」，應該證明在紅花或粉花真的有這些酵素存在，而非只測定酵素活性。
2. 有關花青素有抗氧化，清除自由基及天然的酸鹼指示劑的效果已經有很多報導，新穎性稍低。