

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會

作品說明書

國小組 化學科

080210

「葉」！「螢」在起跑點！～葉綠素的螢光強度與抗氧化力強弱的研究(以地瓜葉為例)

學校名稱：臺中市南屯區大新國民小學

作者：	指導老師：
小六 廖彥甯	童進昌
小六 陳怜安	彭士峯
小五 陳颯羽	
小五 張語珊	
小五 杜凱欣	

關鍵詞：葉綠素、螢光、抗氧化力

摘要

上自然課時提到葉綠素使我們產生好奇，我們改進前人拍攝激發光譜的儀器開始做探究，結果成功組裝出讓激發光譜可直接拍攝的儀器，而不需長時間曝光 60 秒以上，改良了研究上的方便性，我們以酒精萃取地瓜葉的葉綠素，透過臭氧氧化葉綠素與碘滴定的方式，驗證葉綠素具有抗氧化力，並在所拍攝的穿透光譜與激發光譜中看到葉綠素濃度與螢光強度的變化，發現葉綠素具有螢光自體吸收的現象，而使螢光強度並不見得濃度越高而螢光強度就越大。最後我們綜合穿透光譜、激發光譜及碘滴定的方式發現葉綠素遇到酸、鹼、加熱和照射紫外光時都會影響葉綠素螢光強度與抗氧化力強弱。

(相關單元：自然與生活科技，康軒版，5 上第二單元，植物世界面面觀)

壹、前言

我們在自然課中上關於植物的課程時，有提到植物能行光合作用是因為有葉綠素的關係，知道葉綠素能夠吸收紫外光有保護植物的功用，而我們在查詢資料時發現一篇關於地瓜葉抗氧化力的研究，其中對於地瓜葉汁印象深刻，也引起了我們的好奇，作品中記載抗氧化力的第一名為地瓜葉，僅次於地瓜葉的是深綠色植物，我們發現這些植物的葉綠素含量都不少，因此我們思考葉綠素是抗氧化的主要成分嗎？對於這樣的一個疑問，我們開始了關於葉綠素與抗氧化力的研究。

再者，葉綠素有著在 UV 光下激發出紅色螢光的特性，我們以地瓜葉為例想嘗試著萃取出葉綠素，並透過這個研究希望能找出不同條件下地瓜葉的葉綠素螢光變化與抗氧化力的變化情形。

貳、研究目的

- 一、找出最佳拍攝葉綠素激發光譜的條件
- 二、探究地瓜葉的葉綠素是否具有抗氧化力
- 三、探究不同條件下地瓜葉的葉綠素螢光變化與抗氧化力的變化情形

參、研究設備與器材

T8 日光燈管、UV 手電筒、藍光雷射、分光光度計(科學 MAKER 取得)、偏光片、比色管、IPHONE 5、滴管、燒杯、量筒、研鉢、漏斗、濾紙、玻棒、樣品瓶、錐形瓶、支架、廣用酸鹼試紙、臭氧產生器、酒精、小蘇打、醋酸、氫氧化鈉、地瓜葉、胡蘿蔔、優碘、玉米粉。

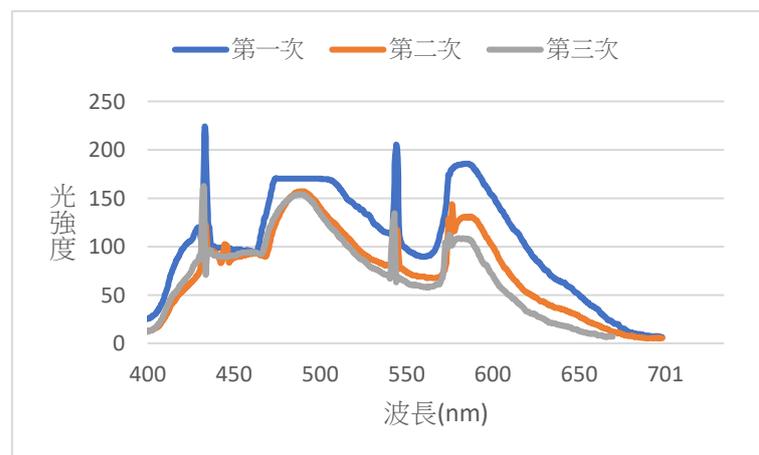
肆、研究過程與結果

一、找出最佳拍攝葉綠素激發光譜的條件

實驗一：以光譜儀拍攝穿透光譜的校正與改良

說明：所謂的穿透光譜是由光源穿透樣品經由分光鏡後拍攝而得的圖片，經過 ImageJ 軟體處理後，所得的光譜圖形，我們可由穿透光譜知道光穿透樣品後不同波長的穿透狀況，高度較低的代表這波長的光大部分被吸收，因此穿透的光較少，強度較低，相反的，越高代表大部分的光不被吸收，表示大部分的光都穿過樣品，因此光的強度較高。

發現：為了要能夠拍攝葉綠素的相關光譜，我們參考科展作品(致命藍色吸「螢」力。全國科展 59 屆國小組化學科。)拍攝穿透光譜的儀器發現(如圖一)，該儀器背景所拍攝的光量每次都不太一樣，因此我們先在光的強度上做控制，希望能夠每次拍攝的條件都相同，以利後續的研究。

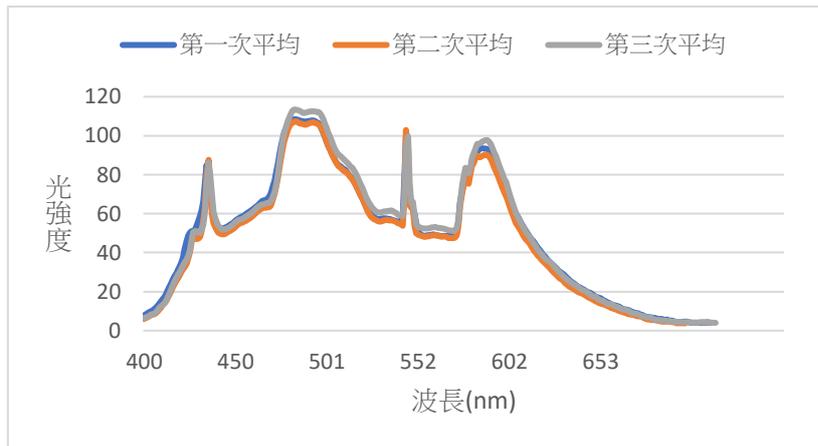


圖一：未校正的儀器拍出的穿透光譜

設計：我們將拍攝光譜的儀器予以改良與校正，在儀器前面加入偏光片(由國立自然科學博物館的立體劇場使用過的眼鏡拆下來)，透過兩個偏光片不同的夾角來控制光線進入的多少，並測試儀器的穩定性。

作法：1. 加入偏光片在燈源和分光光度計之間
2. 以此光譜儀拍攝背景 5 次
3. 以 ImageJ 取出數值並加以平均
4. 在不同時間重複步驟 1-3，共三次資料。
5. 以 Excel 繪圖

結果：如圖二



圖二：經校正後所拍出的穿透光譜

討論：經過增加偏光片控制光量後，在不同時間所拍攝的背景都能很穩定，因此加入偏光片的儀器拍攝的光譜是較可信的。

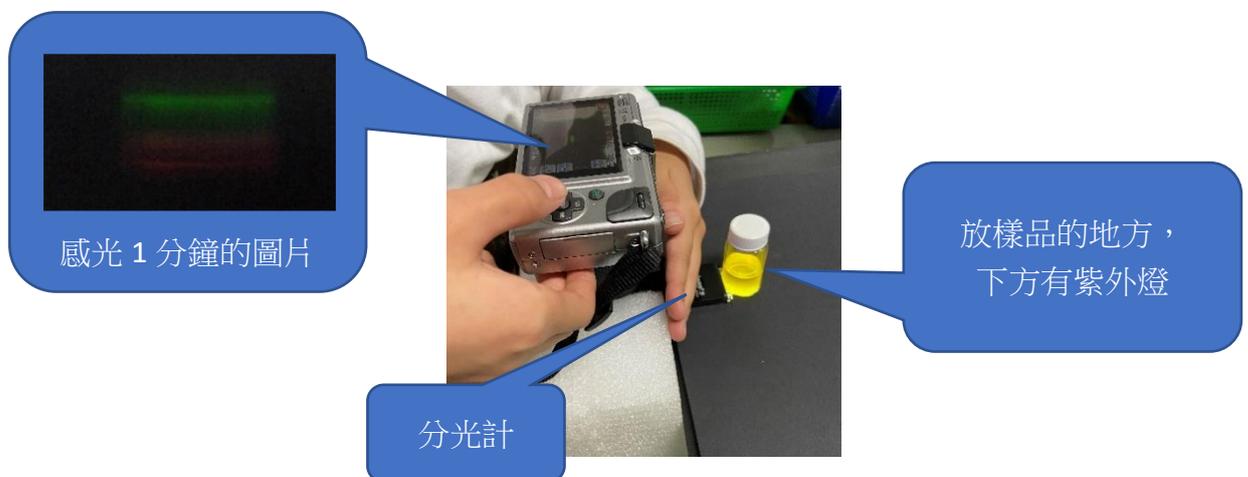
實驗二、以光譜儀拍攝螢光激發光譜的改良

說明：所謂的激發光譜是指透過 UV 光與分光鏡垂直 90 度的方向照射樣品，能夠被激發出螢光的樣品可由分光鏡中拍攝到螢光的激發圖片，透過 ImageJ 的處理後，可得到螢光波長位置對強度的光譜，就是激發光譜。

2-1 單眼相機的拍攝儀器

想法：胡蘿蔔萃取物的螢光一般來說比較微弱，因此我們先嘗試拍攝胡蘿蔔的螢光激發光譜，希望能夠找到拍攝的條件。

作法：我們參考資料上的儀器方式，設計了以下的拍攝螢光激發光譜的儀器，並參考前述作品以胡蘿蔔：沙拉油=1g：2.3ml 的比例萃取，當成拍攝螢光樣品。



圖三：以數位單眼相機拍攝到微弱螢光

結果：如上圖三，我們發現可以拍攝到微弱的螢光

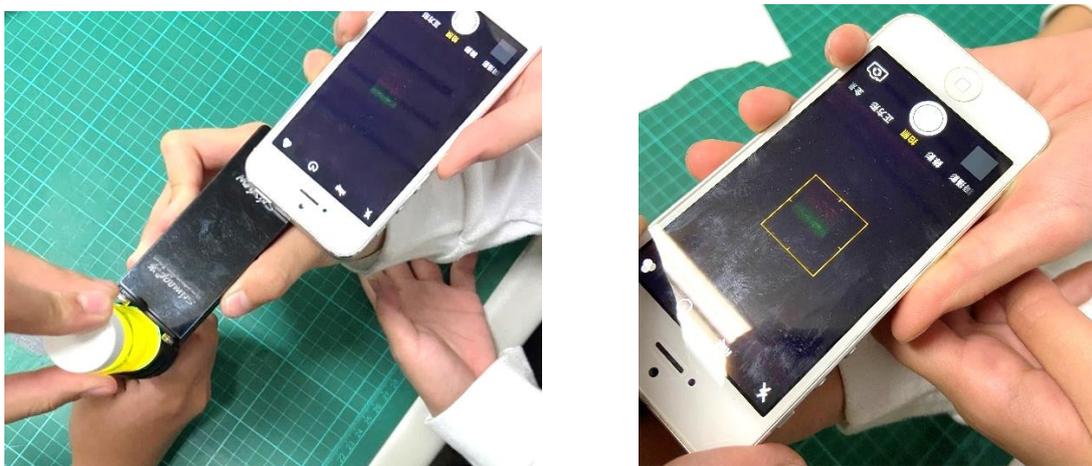
討論：我們從結果發現確實能夠拍攝到微弱的螢光圖片，但是過程中我們發現了幾個問題：1. 相機的感光度要達 ISO=1600 以上，因此拍出的圖形顆粒較大，相片容易模糊不清楚。

2. 曝光時間要達 30 秒以上，因此實驗樣品多時相對費時。

3. 數位相機在拍攝過程中對焦不易，因此常常拍攝失敗。所以用這樣的方式來拍攝螢光激發光譜，除了要用相機的功能較完備的數位單眼相機外，拍攝的效果也不理想，因此我們想要改進拍攝螢光激發光譜的條件，試著找看看有沒有更快更方便的方式。

2-2 探究以手機透過光譜儀拍攝螢光的可能性

想法：因為現在手機汰換的頻率高，且汰換後的手機都有不錯的照相功能，因此我們以 2013 年的汰換的 iPhone5，試著看看是否能用手機直接看到 UV 激發的螢光呢？



圖四：以手機嘗試拍攝螢光激發光譜，發現能即時看到結果不需等待 30 秒

發現：我們將樣品直接放在分光鏡前，在手機中就能看到微弱的螢光了，代表以手機確實可能代替數位相機拍攝出螢光的圖形。

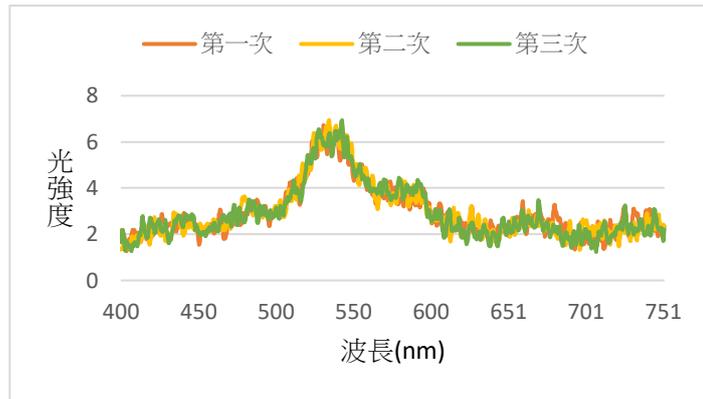
設計：因為我們的光譜儀已經固定，在不破壞原來的儀器下，為了加入 UV 的這個設計，我們將 UV 光直接由上方垂直分光鏡的方向照射樣品，讓原本的儀器除了能夠拍攝穿透光譜外，還能夠透過 UV 拍攝螢光的激發光譜。

作法：1. 以胡蘿蔔：沙拉油=1g：2.3ml，萃取胡蘿蔔的螢光樣品。

2. 取螢光樣品注入拍攝螢光的小試管中

3. 放入自製的光譜儀拍攝

結果：如圖五



圖五：嘗試直接拍攝胡蘿蔔萃取液的激發光譜

討論：在實驗過程中，我們發現由於 UV 燈是由上往下照的，由於 UV 的穿透力不好，因此觀察到試管中產生螢光最強的地方僅在樣品液面附近，因此我們想如果將螢光強度最強的部份對著分光鏡的開口，讓這個螢光能夠進入分光鏡中，手機才可能拍攝到較好的螢光圖形，至於多少的樣品量會能測到最好的螢光強度，我們則以下個實驗繼續探究。

2-3 探究以手機透過光譜儀拍攝螢光的最佳量

作法：1. 將樣品取 0.5ml 放入小試管中。

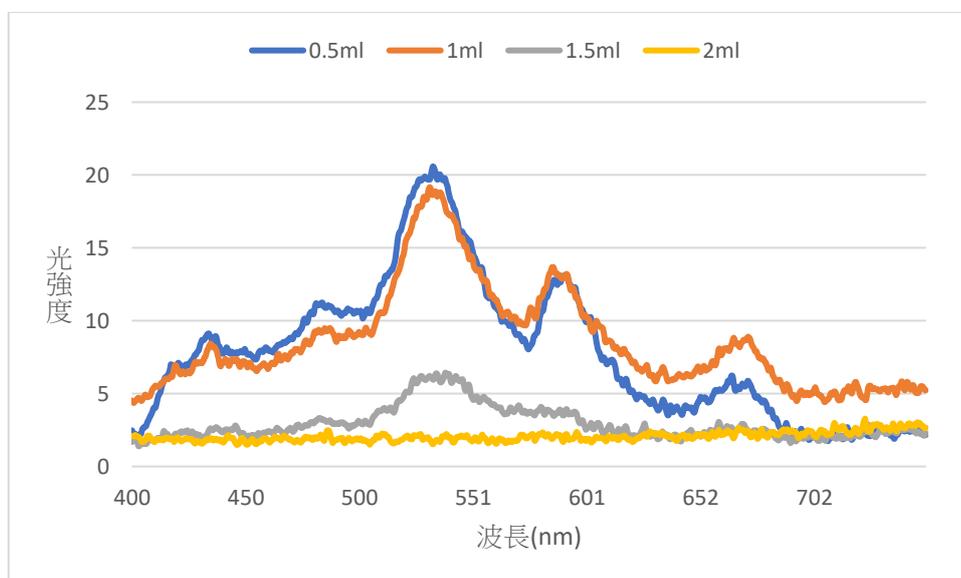
2. 放入儀器拍攝螢光激發光譜。

3. 拍攝三次後，以 ImageJ 處理數據後加以平均

4. 改成 1ml、1.5ml、2ml 並重複步驟 1-3

5. 將數據以 EXCEL 繪圖加以比較。

結果：如圖六。



圖六：胡蘿蔔萃取液不同溶液體積的激發光譜

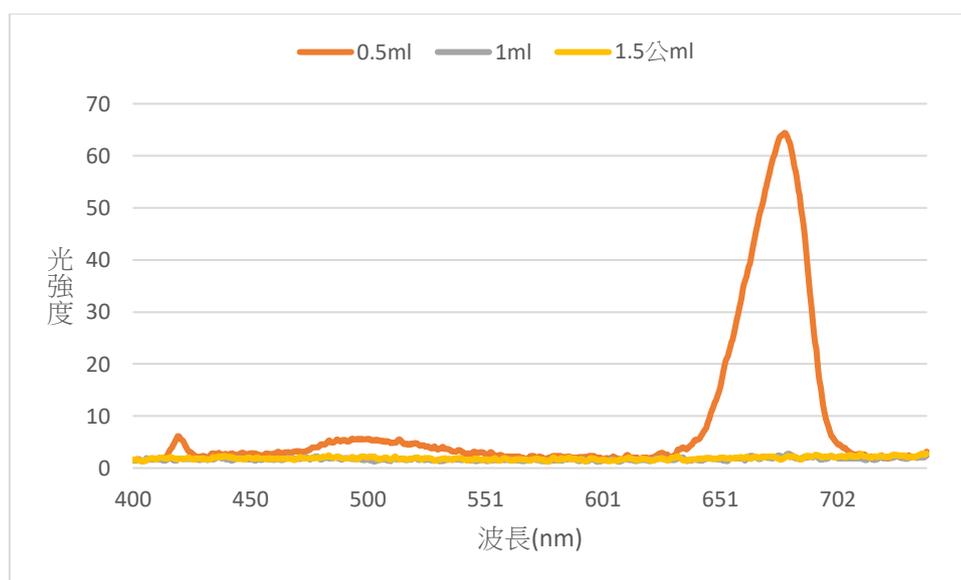
發現：我們發現透過 UV 光激發的胡蘿蔔萃取物的螢光，只要能夠靠近分光光度計，用 iPhone5 的一般相機模式，且樣品的量不能夠太多，約 0.5-1ml，就能夠拍到較好的螢光激發光譜。

實驗三、以改良的光譜儀實際拍攝地瓜葉葉綠素的螢光光譜

想法：由前面的實驗我們的儀器已經能夠很快且精確地拍攝胡蘿蔔的螢光激發光譜，接著我們要以相同的條件來拍攝地瓜葉的螢光激發光譜，實驗前我們先以酒精(4ml)萃取地瓜葉(1g)的葉綠素，再將萃取的酒精溶液以改良的光譜儀拍攝螢光光譜，我們發現以肉眼可以看得見紅色的螢光，但是在光譜儀中拍攝到微弱的訊號，因此我們再思考是否所萃取的葉綠素太濃了，因此我們逐步稀釋萃取液就能在光譜儀中就可以看到葉綠素的螢光。

3-1 固定濃度的葉綠素下拍攝螢光激發光譜的最佳量

- 作法：
1. 取稀釋的酒精萃取液 0.5ml 放到光譜儀中。
 2. 拍攝螢光激發光譜 3 次。
 3. 以 Image J 處理後將三次數據加以平均。
 4. 改變酒精萃取液 1ml、1.5ml，重複步驟 1-3。
 5. 將平均的結果繪成圖形分析。



圖七：葉綠素萃取液不同體積的激發光譜

結果：如圖七。

討論：在固定濃度的情況下，0.5ml 是最好的拍攝條件，至於怎麼樣的濃度會使得手機有最好的拍攝效果，以下以濃度作為後續的討論。

3-2 固定溶液 0.5ml 下葉綠素的濃度對於拍攝的螢光激發光譜的影響

作法：1. 將 1g 地瓜葉以 4ml 酒精萃取。

2. 取酒精萃取液：酒精=1:1 稀釋後濃度為 1/2。

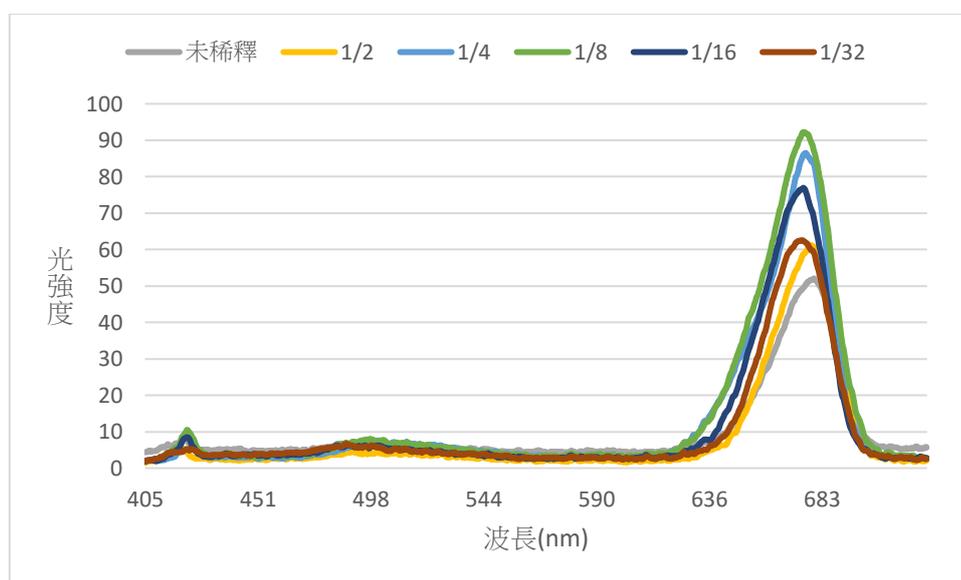
3. 取 0.5ml 放入儀器中，並拍攝螢光激發光譜 3 次。

4. 以 Image J 處理後將三次數據加以平均。

5. 改變稀釋的濃度為 1/4、1/8、1/16、1/32，重複步驟 1-4。

6. 將平均的結果繪成圖形比較。

結果：如圖八。



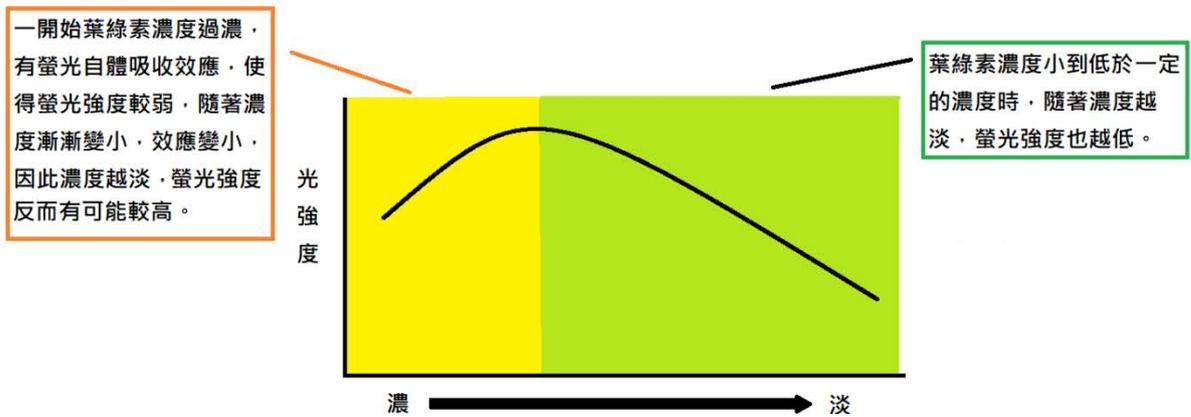
圖八：葉綠素萃取液不同稀釋濃度的激發光譜

討論：1. 為了方便判讀，我們對波長=600-700nm 間的最高值資料再繪一張圖(如圖九)，由圖可以發現酒精萃取液的濃度並不是越濃越好，太過於濃的萃取液會影響光譜的表現，我們推測是因為 UV 燈無法穿透全部的樣品，因此造成強度變弱。而過於淡的濃度會因為葉綠素過少，因此造成螢光的強度變弱，因此在地瓜葉：酒精=1g：4ml 的萃取液中，還要再稀釋為體積的 1/8。



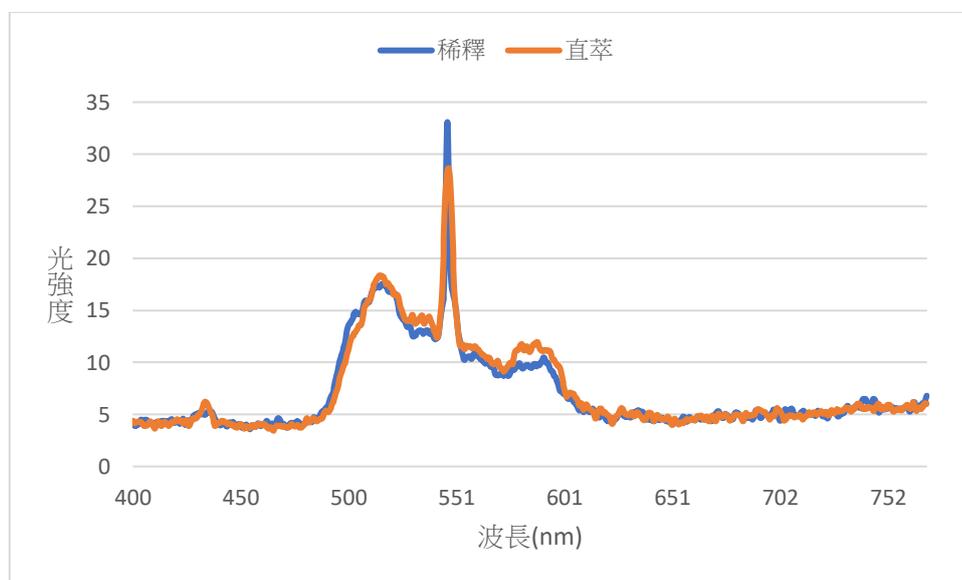
圖九：不同稀釋濃度的螢光(波長=600-700nm)的強度最高值比較

2. 為什麼濃度越濃的葉綠素酒精萃取液的螢光反而強度變弱？這個部分與我們所預期的不同，我們經過查資料後發現，葉綠素可以吸收波長 450nm 的藍光部分和波長 650nm 的紅光部分，當葉綠素過濃時葉綠素會吸收 450nm 的藍光放出 650nm 附近的紅光，而此時葉綠素會吸收紅光變成熱量，而使得紅色的螢光部分變弱，因此當葉綠素濃度太濃時，葉綠素反而會吸收葉綠素自己被激發出的紅色螢光，而使得紅色的螢光強度下降，稱為螢光自體吸收(如下圖)，因此在萃取的稀釋濃度上以 1/8 較佳。

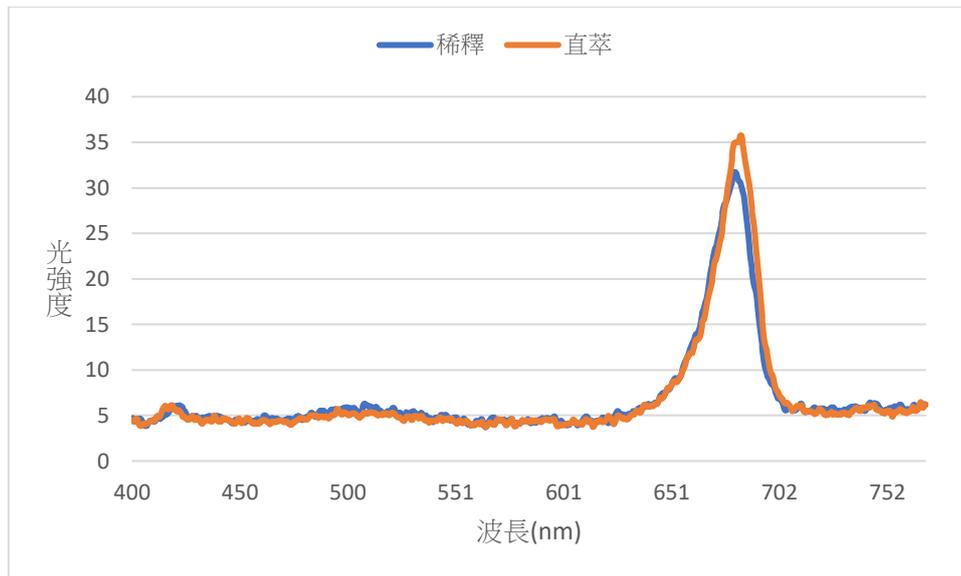


圖十：推測螢光激發光譜強度與葉綠素濃度之間的關係圖

3. 我們在想如果直接以地瓜葉：酒精=1g：32ml 當成是我們萃取樣品的條件，是否能在儀器中達到與地瓜葉：酒精=1g：4ml 萃取液稀釋為 1/8 濃度有相同的差不多拍設效果？因此我們將兩者直接做光譜的比較(如圖十一、十二)，發現兩者在同一次的萃取中幾乎相同，因此我們簡化以地瓜葉：酒精=1g：32ml 當成是我們萃取樣品的條件，每次取萃取的樣品 0.5ml 當成是螢光激發光譜的最佳拍攝條件。

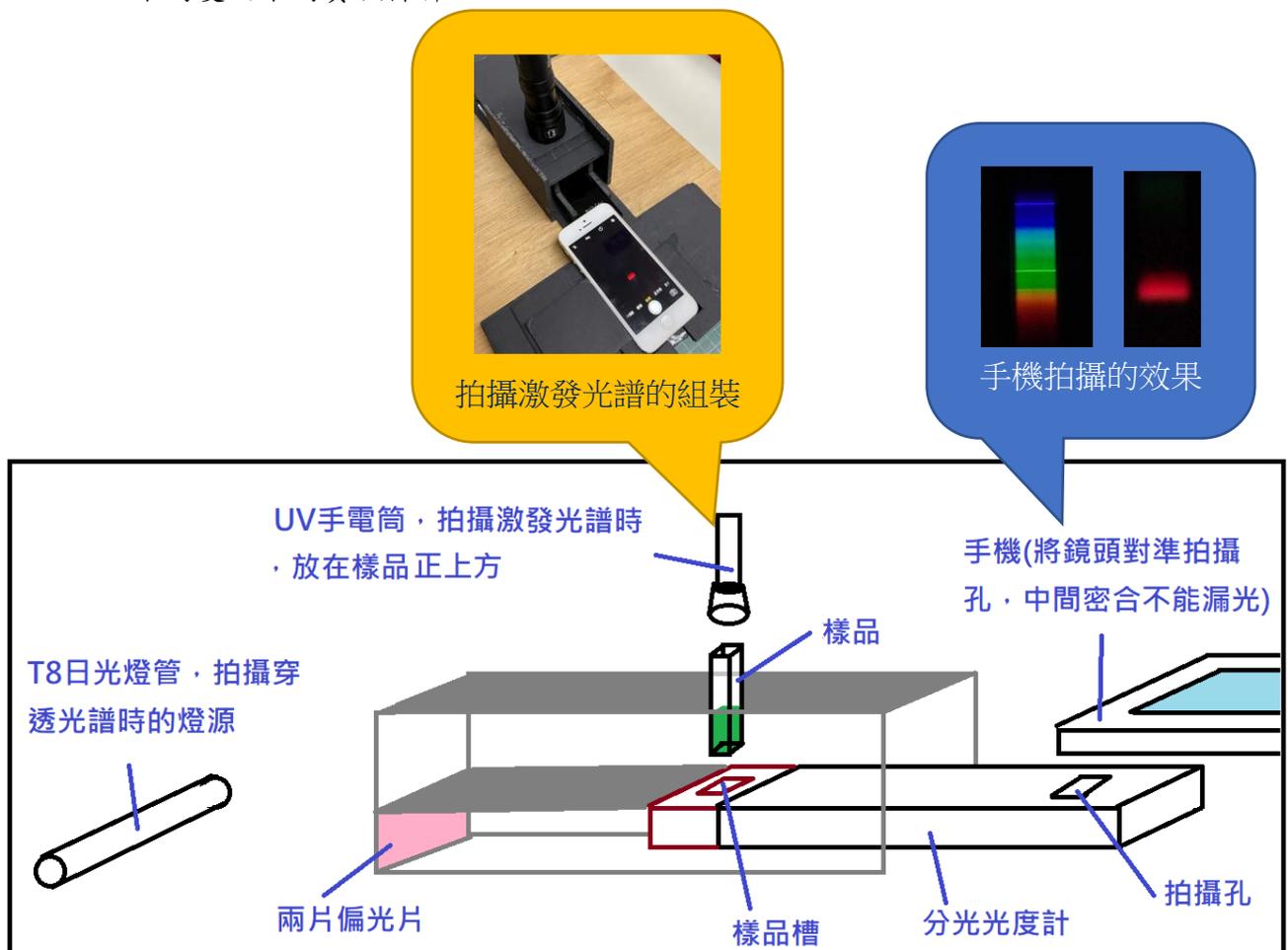


圖十一：不同製備葉綠素萃取液樣品的穿透光譜



圖十二：不同製備葉綠素萃取液樣品的激發光譜

小結：綜合上述的探究結果，我們將實驗拍攝光譜的儀器設計如下圖，而拍攝螢光激發光譜時，每次取樣 0.5ml 的酒精地瓜葉萃取液(地瓜葉：酒精=1g：32ml)作為探究不同變因下的實驗條件。



圖十三：改良後光譜儀的操作示意圖

實驗四：天數效應

想法：我們以上述的裝置及研究方法，針對地瓜葉放置的天數做螢光的探究測試。

作法：1. 取同株的地瓜葉。

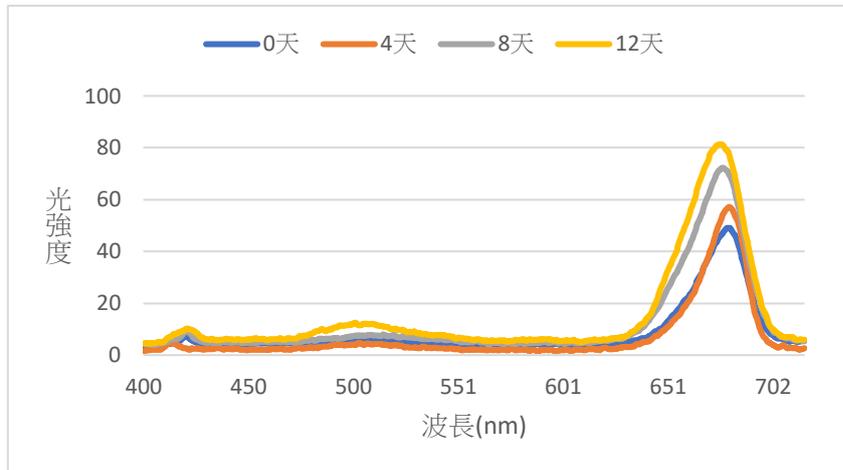
2. 依照前述萃取比例與方式製成樣品。

3. 取萃取液 0.5ml 拍攝光譜。

4. 將剩下的地瓜葉包於夾鏈袋中，在室溫下儲存 4 天。

5. 重複步驟 2-4，完成 8 天、12 天的光譜

6. 以 ImageJ 分析數據並以 Excel 繪製成圖形分析。



圖十四：常溫下保持不同天數的地瓜葉萃取液激發光譜

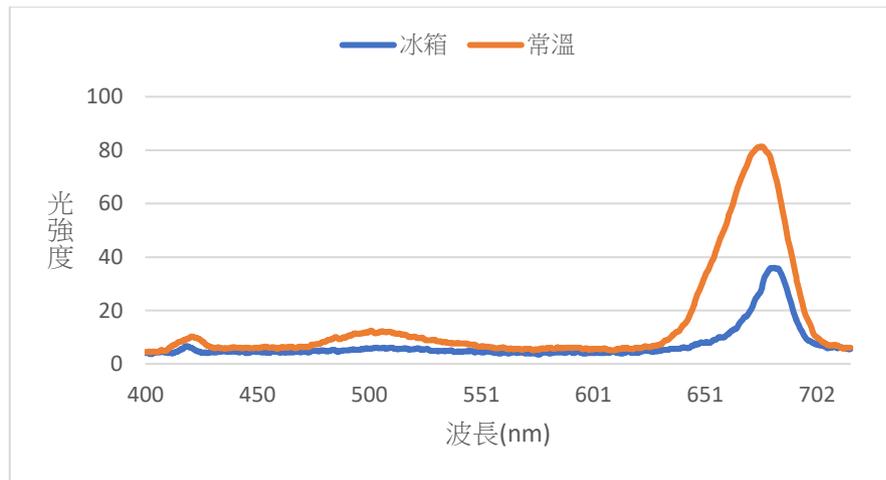
結果：如圖十四

討論：1. 我們由圖十四看到的結果是放置 12 天的強度較強，所以放置 12 天後的葉綠素會較多，但這樣與我們常識中知道的不同，加上實際看到 12 天樣品的葉綠素顏色比第一天明顯變淡，所以我們推測在這樣萃取的濃度下，會存在螢光自體吸收的效應。

2. 為了進一步驗證可能存在螢光自體吸收的可能性，我們進一步比較地瓜葉存放在室溫及冷藏下 12 天後的差異，如右圖可發現冷藏 12 天的葉綠素確實比常溫之下較濃，再由兩者的激發光譜如圖十六的強度比較中可以看到，冰在冰箱的樣品強度明顯較低，也就是存在濃度越濃而螢光強度越低的現象，因此在這樣的萃取濃度下，也有螢光自體吸收的效應後，由此可以知道在這樣的萃取比例下，會存在螢光自體吸收的效應，也就因為葉綠素較濃時，檢視到的螢光強度反而會有較低的現象。



圖十五：不同溫度的葉綠素萃取液的外觀。



圖十六：常溫與冰箱保存 12 天的地瓜葉萃取液激發光譜

二、探究地瓜葉的葉綠素是否具有抗氧化力

實驗五：葉綠素有抗氧化力嗎？

5-1：以碘液測試葉綠素是否具有抗氧化力

想法：在參考資料中，我們參考常用的碘滴定的方式進行氧化力的測量，當優碘碰到澱粉時會呈現藍色，而當我們將葉綠素的酒精萃取液滴入時，如果有氧化力時會將碘還原成碘離子，碘離子無法與澱粉作用產生顏色，而使得藍色變成無色，從滴定的滴數越少我們可以知道抗氧化力越強。

作法：1. 將 4g 玉米粉加 200ml 的水煮沸，冷卻後成澱粉液。

2. 以 1 滴優碘+3 滴澱粉液+50ml 水的比例調製成指示劑 500ml。

3. 取指示劑 10ml，滴入不同濃度的葉綠素酒精萃取液，直到變成無色。

4. 重複上述步驟 3，滴定三次取平均。

結果：如表一。

表一：不同酒精地瓜葉萃取液濃度的優碘平均滴定數比較

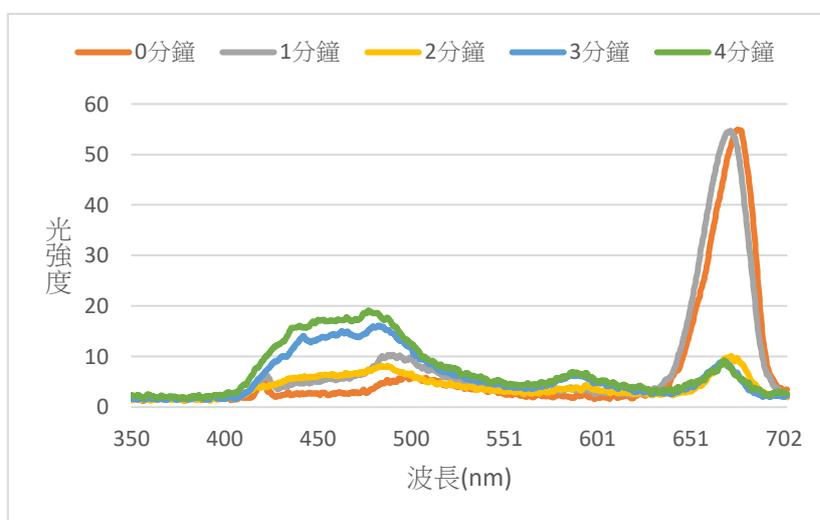
濃度	未稀釋	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
優碘平均滴定數(滴)	2.6	5.6	9	17.6	31.33	57.6

討論：發現葉綠素的萃取液濃度越濃時，滴定的滴數越少，可見葉綠素濃度越濃時，具有的抗氧化力越大。

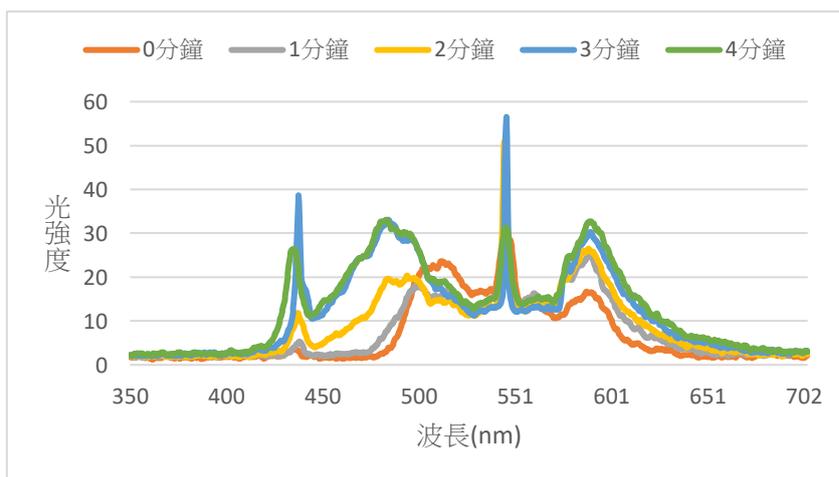
5-2：以臭氧測試葉綠素是否具有抗氧化力

想法：我們想將萃取的葉綠素實際氧化看看，我們知道臭氧是很強的氧化劑，我們運用通入臭氧的方式，來氧化葉綠素看看葉綠素是否能真的與氧作用，透過本身進行反應來達到抗氧化的功用。

- 作法：1. 將地瓜葉：酒精=1g：32ml 萃取後過濾得到乾淨的濾液。
 2. 取萃取液 0.5ml 拍攝光譜。
 3. 將濾液通入臭氧 1 分鐘。
 4. 取濾液 0.5ml 再拍攝光譜。
 5. 重複步驟 3-4，依次做出通臭氧總計 2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘的樣品光譜。
 6. 以 ImageJ 處理數據後，以 excel 繪圖分析。



圖十七：通入不同臭氧時間的葉綠素萃取液的激發光譜

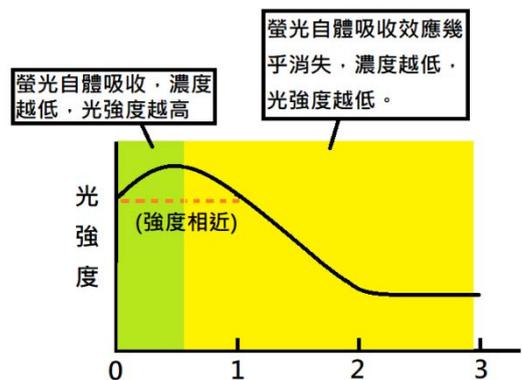


圖十八：通入不同臭氧時間的葉綠素萃取液的穿透光譜

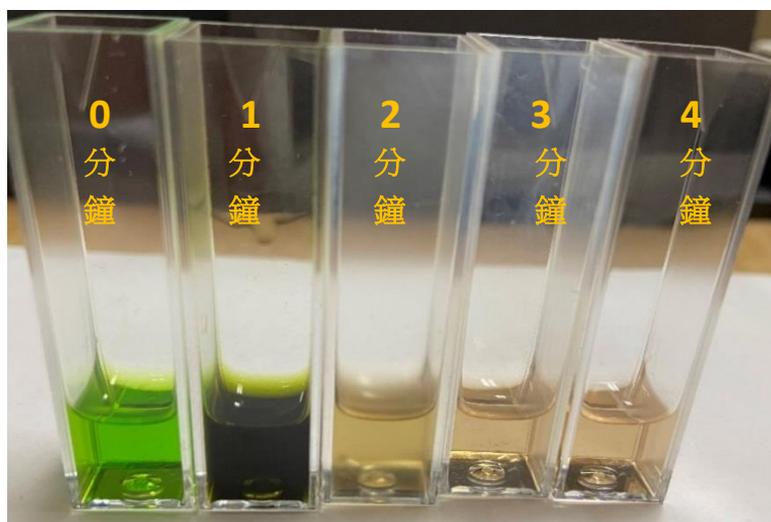
結果：如圖十七、圖十八

討論：1. 從前面實驗我們知道，濃度較濃時會有螢光自體吸收的效應，就是濃度較低時反而強度可能越強，但是當濃度低到一定程度時，強度會越來越低，我們推測在1分鐘時葉綠素濃度可能與臭氧反應而較低了，而濃度較低時的強度恰與0分鐘時相近(如右圖)。

2. 我們發現不同時間的萃取液在外觀上有很大的差別，再通入1分鐘後的溶液顏色較偏向深綠，而穿透光譜上可以發現藍色的部分增多了，因此產生深綠的顏色。而2分鐘後溶液呈現淺褐色，且之後的溶液顏色目視下已經沒有明顯的變化。



圖十九：推測螢光強度相同的示意圖。



圖二十：通入臭氧不同時間的酒精萃取液的外觀變化

3. 最後我們再碘滴定發現0分鐘、1分鐘、4分鐘的平均滴定數分別為12.6滴、19.3滴、24.3滴，可以再次驗證葉綠素會被臭氧氧化，而使葉綠素濃度降低，因此葉綠素具有抗氧化的能力。

小結：我們以常見的碘滴定的方式來作地瓜葉酒精萃取出來葉綠素的抗氧化力實驗，發現地瓜葉中葉綠素的成分本身是具有抗氧力的，所以我們可以推論當葉綠素的濃度越濃時，滴定數會比較少，因此抗氧化力會比較強，再用臭氧的方式加以驗證，葉綠素氧化後以肉眼直接觀察會看到綠色不見，取而代之變成淺褐色透明溶液，而此時在激發光譜中紅色光部分則沒有出現強度訊號，後續在實驗中探究抗氧化力的情形則以較常見的優碘滴定的方式為主。

三、探究不同條件下地瓜葉的葉綠素螢光變化與抗氧化力的變化情形

實驗六：酸對於葉綠素螢光與抗氧化力的影響

6-1：浸泡過酸的地瓜葉對於酒精萃取葉綠素中葉綠素螢光與抗氧化力的影響

作法：1. 取同株的地瓜葉。

2. 取地瓜葉 1g，浸泡在 50%的乙酸溶液中 1 分鐘。

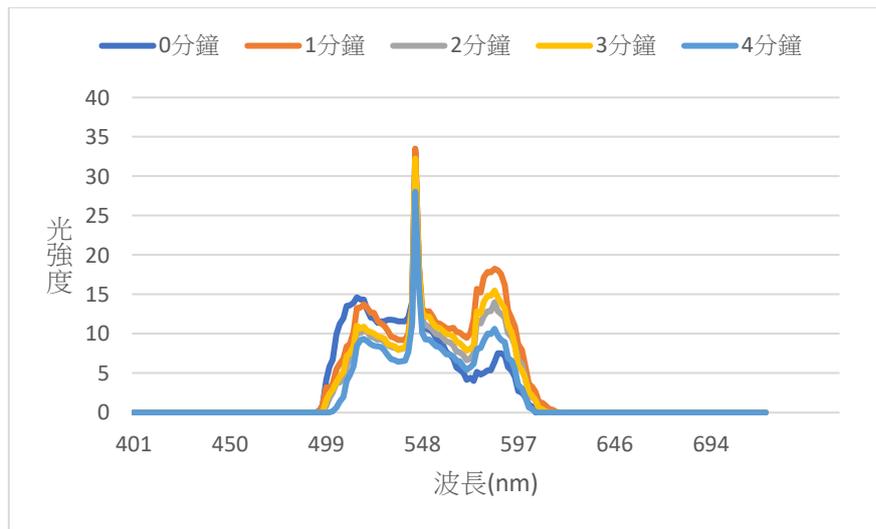
3. 時間到將地瓜葉撈起以地瓜葉：酒精=1g：32ml 萃取，過濾後得澄清萃取液。

4. 重複步 2、3，時間依序為 2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘。

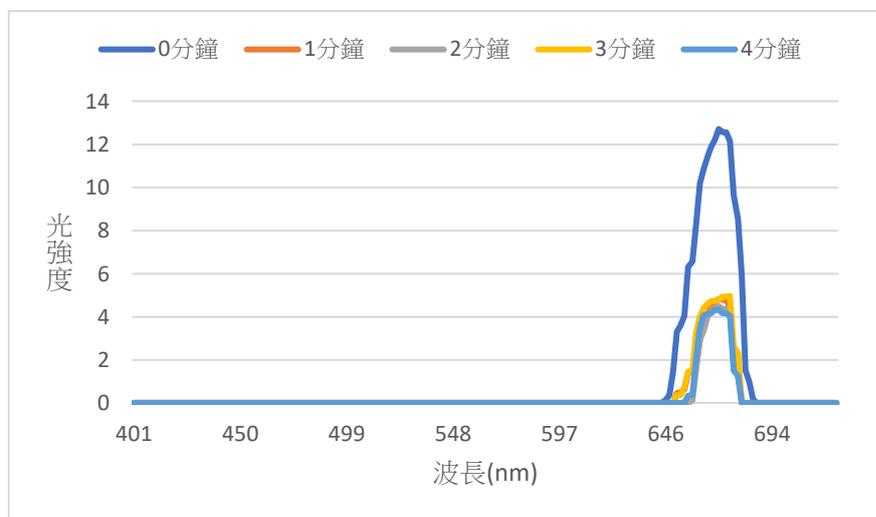
5. 以 ImageJ 分析數據並以 Excel 繪製成圖形分析。

6. 以優碘滴定來比較不同樣品的抗氧化力。

結果：如圖二十一、圖二十二、表二



圖二十一：不同浸泡酸時間地瓜葉的酒精萃取液的穿透光譜



圖二十二：不同浸泡酸時間地瓜葉的酒精萃取液的激發光譜

表二：不同浸泡酸時間地瓜葉的酒精萃取液優碘平均滴定數

浸泡時間	0 分鐘	1 分鐘	2 分鐘	3 分鐘	4 分鐘
優碘平均滴定數	29.3 滴	32 滴	36 滴	40.3 滴	42.3 滴

- 討論：1. 穿透光譜中在 520nm 綠色光附近隨著與酸浸泡的時間增加而降低，而 580nm 黃色部分則較沒規則，但是可以看到黃色的部分都較沒有浸泡酸的來得多，可見浸泡過酸的地瓜葉會影響酒精對葉綠素的萃取。
2. 以激發光譜來看，沒浸泡酸的紅色光部分明顯較浸泡過酸的萃取液來得高，因此我們可以推論浸泡過酸的地瓜葉確實會影響葉綠素的萃取，而且從 1 分鐘後的激發光譜相同大概能知道酸的反應時間非常短，1 分鐘內就反應完畢了。
3. 我們以優碘滴定確認樣品的氧化力，發現被浸泡過酸的樣品平均的滴定數較多，推測酸有可能有破壞了葉綠素，因此造成葉綠素的濃度降低，所以 0 分鐘的葉綠素濃度應該是最濃的。
4. 由前面討論知道，較濃的葉綠素會因為螢光自體吸收而使紅色的螢光強度較低，但是由實驗知道 0 分鐘的葉綠素最濃，因此紅色螢光強度應該要較低，但是螢光強度卻是最高的，這部分與我們的推測不符，但從優碘滴定的實驗可以推測，酸破壞葉綠素使葉綠素濃度降到極低，因此無法激發出紅色螢光，造成螢光強度更低，當然或許另有其他因素？為了更直接的討論酸對於葉綠素影響的這個問題，因此我們改以葉綠素的萃取液來與酸交互作用，來更直接探討酸對於葉綠素的影響，並以優碘滴定的方式來確認開始與最後樣品的抗氧化力的變化情形。

6-2 不同濃度的酸對於酒精萃取葉綠素中葉綠素螢光與抗氧化力的影響

作法：1. 以地瓜葉：酒精=1g：32ml 萃取地瓜葉並過濾成酒精葉綠素萃取液。

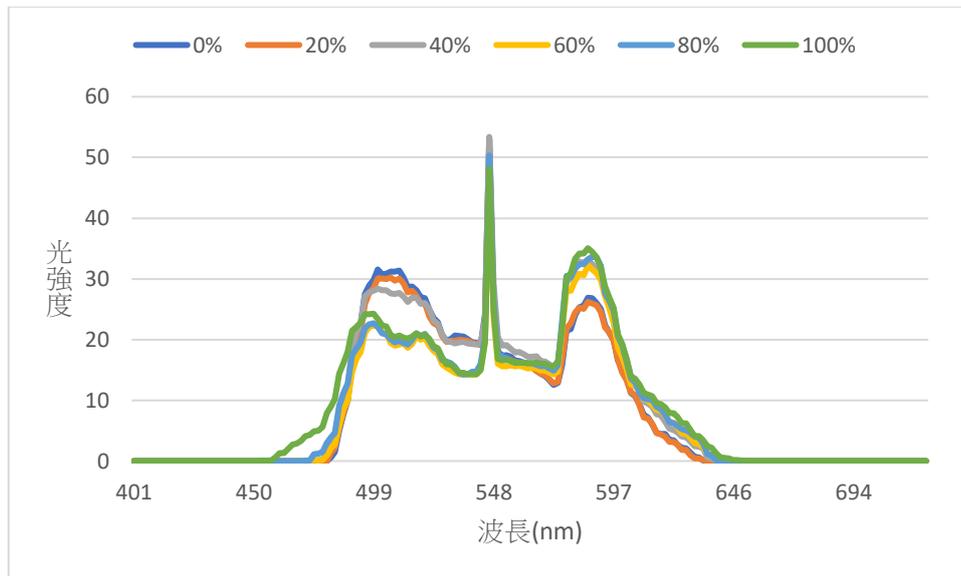
2. 取酒精萃取液 10ml，加入酒精：乙酸=5ml：0ml(乙酸濃度 0%)。

3. 重複步驟 2，依序加入酒精：乙酸=4ml：1ml、3ml：2ml、2ml：3ml、1ml：4ml、0ml：5ml。(乙酸濃度依次為 20%、40%、60%、80%、100%)

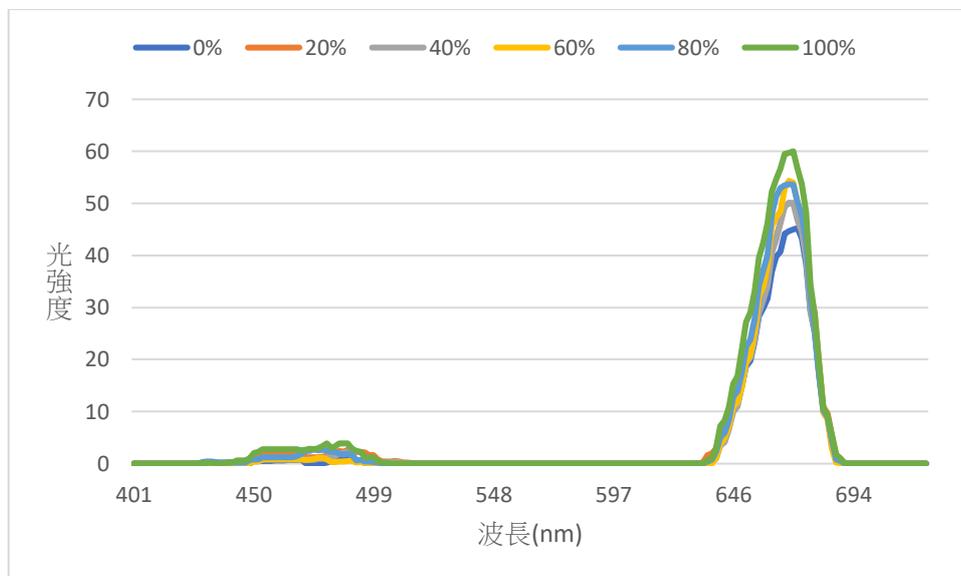
4. 將與酸混和後的萃取液依序測光譜，並以 ImageJ 繪圖與分析。

5. 用優碘滴定比較開始與最後樣品的抗氧化力強弱變化。

結果：如圖二十三、圖二十四、表三



圖二十三：地瓜葉酒精萃取液加入同體積不同濃度酸後的穿透光譜



圖二十四：地瓜葉酒精萃取液加入同體積不同濃度酸後的激發光譜

表三：地瓜葉酒精萃取液加入同體積不同濃度酸後的優碘平均滴定數

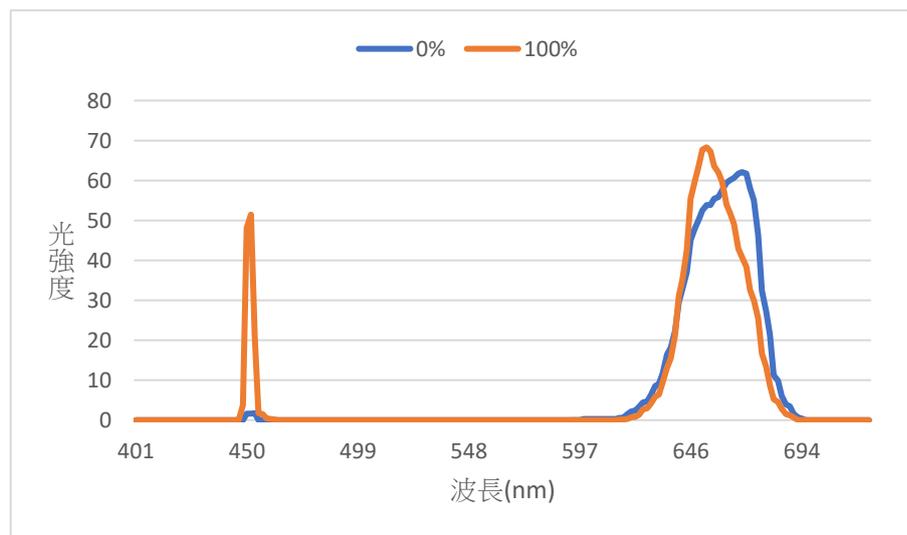
加入乙酸濃度	0%	100%
優碘平均滴定數	28 滴	34 滴

討論：1. 由穿透光譜可以看到藍色光的部分隨著酸的濃度增加而漸漸地減少，黃色光的部分則是漸漸增加，由實驗結果發現葉綠素的萃取液會偏向黃綠色。由激發光譜發現紅色光的強度是漸漸增加的，我們能推測葉綠素濃度較高，因螢光自體吸收所以紅光的強度較弱一些，另外，我們以優碘滴定的方式，發現加入 100% 乙酸的樣品的滴數(34 滴)較加入 0% 乙酸的滴數(28 滴)來的略多，因此酸確實破壞了葉綠素而使氧化力下降。為了再次確認這樣的結果是否正確，我們改以

藍光雷射為光源，拍攝螢光激發光譜的方式發現下面的結果(圖二十六)，0%的樣品在紅光高度略低一些，但是在藍色光的部分卻是幾乎全部吸收，但是強度卻不如加入 100%酸的樣品，而 100%的樣品在紅光的高度略高，但是藍光部分還存在一定的強度，因此能再次驗證我們認為葉綠素在酸的環境下被破壞而使濃度較低，因此藍光吸收得較少，但也因為濃度較低的關係，所以沒有螢光自體吸收而使得螢光強度較強。



圖二十五：地瓜葉酒精萃取液加入同體積不同濃度酸後的外觀



圖二十六：以藍光雷射激發加入同體積不同濃度酸的酒精萃取液的激發光譜

2. 實驗中調製不同乙酸濃度以酒精為溶劑調製，開始時我們以水當溶劑時，發現葉綠素萃液無法激發出紅光，經過資料查詢後發現，藍紫光的波段對水的穿透度不好，大部分會被水吸收，經過我們測試只要加入的水超過酒精葉綠素萃液體積的 7/10(10ml 酒精葉綠素萃液加入 7ml 水)，螢光就會被影響(如右圖)，較不容易觀察到葉綠素激發的紅色螢光，因此在實驗設計上若能以溶劑能取代水則盡可能取代，避免紫外光被水吸收的情形發生。



圖二十七：原來會激發出紅色螢光的萃取液(左圖)，再加入水的體積超過一定量時，就會無法激發出紅色螢光(右圖)

實驗七：鹼對於葉綠素螢光與抗氧化力的影響

7-1 浸泡過鹼的地瓜葉對於酒精萃取葉綠素中葉綠素螢光與抗氧化力的影響

作法：1. 取同株的地瓜葉。

2. 取地瓜葉 1g，浸泡在飽和的小蘇打溶液中 1 分鐘。

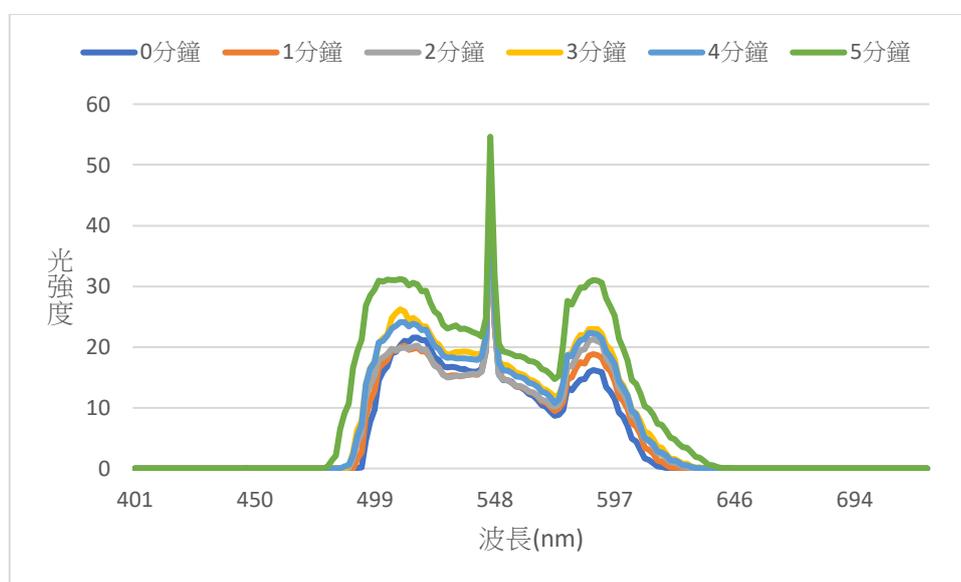
3. 將地瓜葉撈起，以地瓜葉：酒精=1g：32ml 萃取，過濾後得澄清萃取液。

4. 重複步驟 2、3，時間依序為 2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘、5 分鐘。

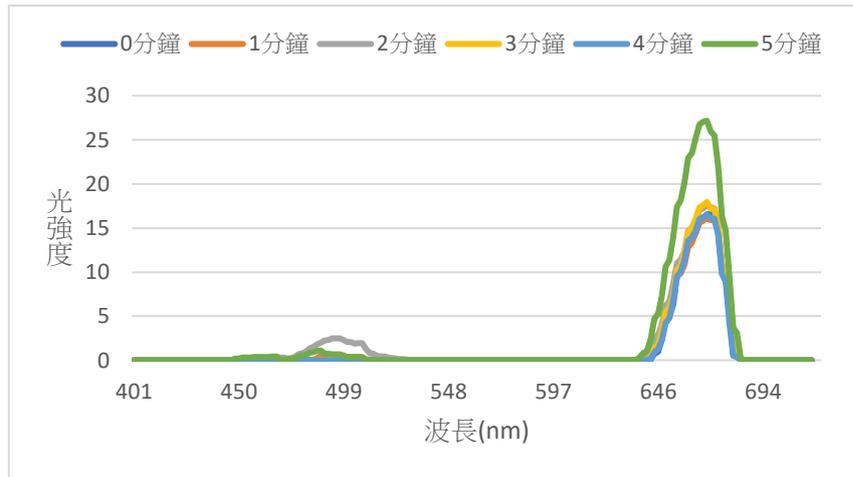
5. 以 ImageJ 分析數據並以 Excel 繪製成圖形分析。

6. 用優碘滴定比較開始與最後樣品的抗氧化力強弱變化。

結果：如圖二十八、圖二十九、表四。



圖二十八：不同浸泡鹼時間地瓜葉的酒精萃取液的穿透光譜



圖二十九：不同浸泡鹼時間地瓜葉的酒精萃取液的激發光譜

表四：不同浸泡鹼時間地瓜葉的酒精萃取液優碘平均滴定數

浸泡時間	0 分鐘	5 分鐘
優碘平均滴定數	17 滴	26.3 滴

- 討論：
1. 由透光譜中可以看到，整體強度隨時間漸漸增加，可以知道泡過鹼的地瓜葉萃取的葉綠素濃度較少，因此光譜的強度漸增，但是由於藍光與黃光的比例差不多，所以萃取液呈現為綠色，並不會有太大的差別。
 2. 在激發光譜中可以看到 5 分鐘時明顯的較強，而在濃度較濃時，考慮自體螢光吸收的現象，紅色光的強度較弱可能代表濃度較濃。由優碘滴定的實驗可知道，0 分鐘時滴定為 17 滴，5 分鐘的樣品為 26.3 滴，因此，鹼會影響地瓜葉中的葉綠素使萃取的葉綠素濃度下降，但是藍光和黃光的比例差不多，因此萃取液的顏色仍是綠色。
 3. 實驗前我們發現配製小蘇打水在常溫下溶解度無法達到 50%，因此我們以飽和小蘇打水過濾後的濾液來做此實驗。
 4. 為了更直接地知道葉綠素在鹼環境中的影響，因此我們將葉綠素的酒精萃取液直接與鹼交互作用並觀察其變化。

7-2 不同濃度的氫氧化鈉對於酒精萃取葉綠素中葉綠素螢光與抗氧化力的影響

作法：1. 以地瓜葉：酒精=1g：32ml 萃取地瓜葉並過濾成酒精葉綠素萃取液。

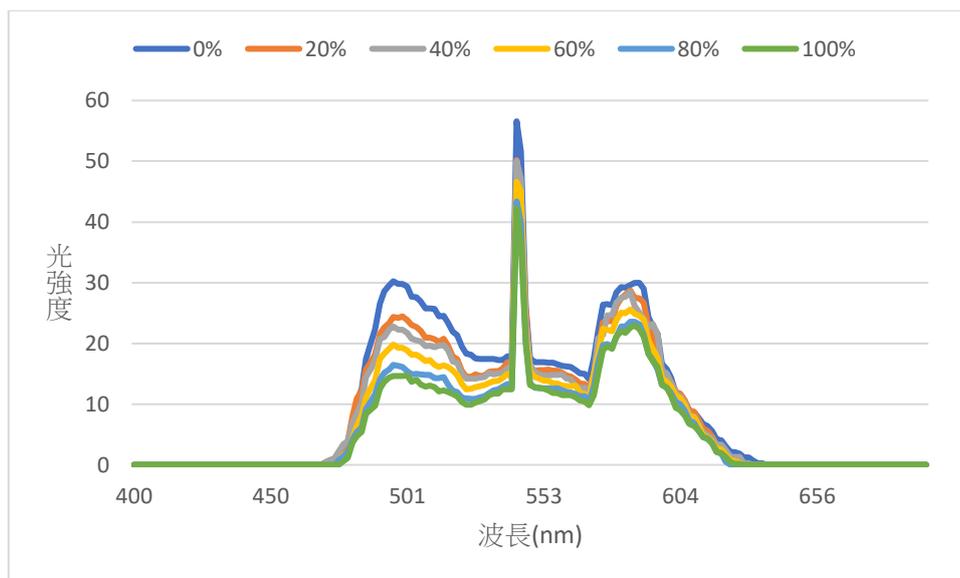
2. 取酒精萃取液 10ml，加入水：0.1M 氫氧化鈉水溶液=5ml：0ml (0.1M 氫氧化鈉濃度 0%)。

3. 重複步驟 2，依序加入酒精：0.1M 氫氧化鈉水溶液=4ml：1ml、3ml：2ml、2ml：3ml、1ml：4ml、0ml：5ml。(0.1M 氫氧化鈉濃度依次為 20%、40%、60%、80%、100%)

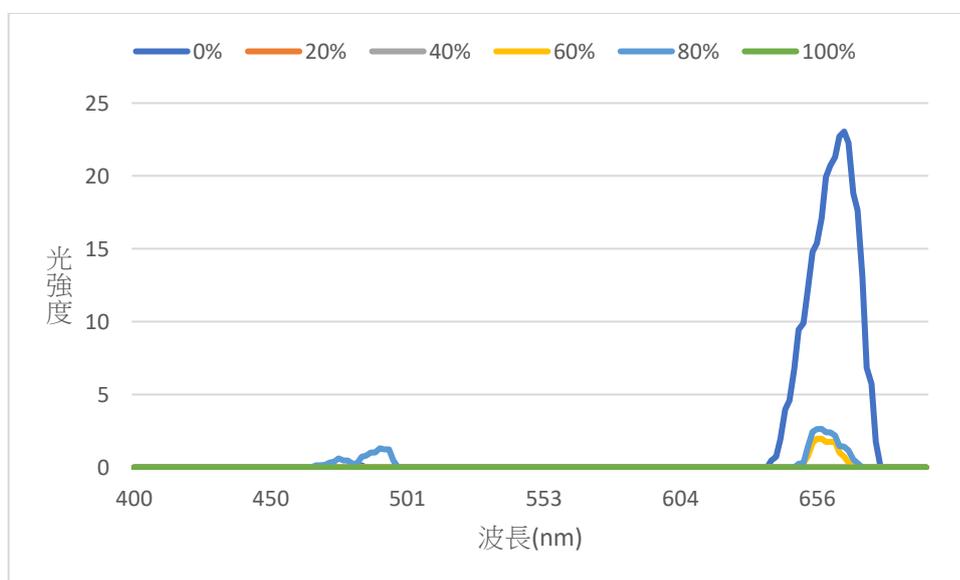
4. 將與鹼混和後的萃取液依序測光譜，並以 ImageJ 繪圖與分析。

5. 用優碘滴定比較開始與最後樣品的抗氧化力強弱變化。

結果:如圖三十、圖三十一、表五



圖三十：地瓜葉酒精萃取液加入同體積不同濃度鹼後的穿透光譜

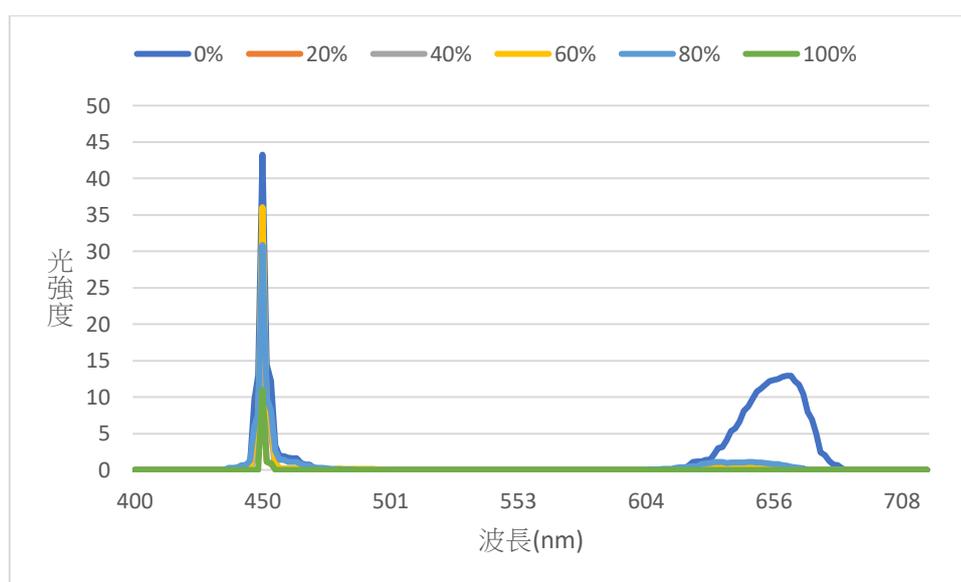


圖三十一：地瓜葉酒精萃取液加入同體積不同濃度鹼後的激發光譜

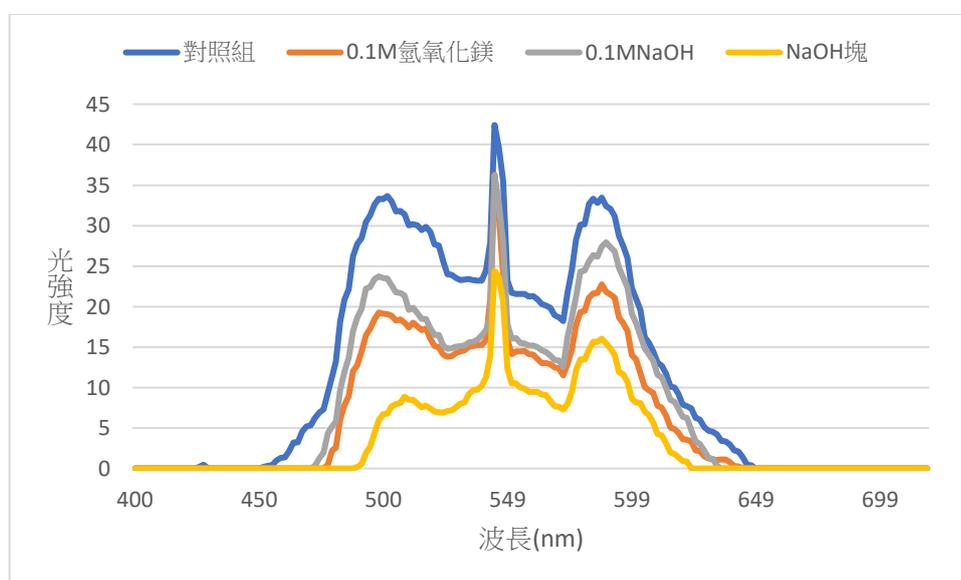
表五：地瓜葉酒精萃取液加入同體積不同濃度鹼後的優碘平均滴定數

氫氧化鈉濃度	0%	100%
優碘平均滴定數	28 滴	13.6 滴

討論：1. 由穿透光譜來看可以發現強度漸漸減弱，因為萃取液中的葉綠素是固定的，因此我們排除是因為加入氫氧化鈉而使得葉綠素變濃的可能性，我們從激發光譜來看，可以看到強度變得很弱，猜測可能是葉綠素的濃度變淡了，所以螢光強度變低，我們改用藍光雷射再檢測看看，結果如下圖，我們發現加入 100% 氫氧化鈉的樣品會吸收藍光，但是卻沒辦法激發出紅色螢光，所以推測氫氧化鈉可能會破壞葉綠素，但是顏色卻不會有太大的改變。而鹼加入使葉綠素萃取液後，由穿透光譜中強度下降會以為有葉綠素變濃的現象。我們進一步以加入 0.1M 的氫氧化鎂、0.1M 的氫氧化鈉以及將氫氧化鈉直接投入萃取液，從它們的穿透光譜變化(圖三十三)，發現加入鹼確實會使葉綠素的穿透光譜的強度下降看起來像是濃度變濃的假象，但是實際上葉綠素就像前面討論的是被破壞的。



圖三十二：以藍光雷射激發加入同體積不同濃度鹼的酒精萃取液的激發光譜



圖三十三：加入不同鹼的酒精萃取液的穿透光譜

2. 我們進一步由滴定來檢驗，發現沒有加氫氧化鈉的樣品以優碘滴定平均是 28 滴，但是加入 100% 氫氧化鈉的樣品以優碘滴定平均是 13.6 滴，這個結果與我們預測的完全相反，我們猜測會不會是氫氧化鈉的關係使得樣品的氧化力變強，所以我們以氫氧化鈉直接做滴定，發現只要兩滴就能夠完全還原優碘指示劑。為了確認我們的想法，我們進一步檢測發現 20%、40%、60% 的滴定平均數依次為 19 滴、17.8 滴、14.3 滴，可以知道再加入 20% (1ml, 0.1M 氫氧化鈉) 的樣品中就殘留許多氫氧化鈉，最後我們取相同 10ml 酒精葉綠素萃取液，比較沒有加入氫氧化鈉、加入 5 滴 0.1M 氫氧化鈉、加入 10 滴 0.1M 氫氧化鈉的滴定數，依序為 21 滴、25 滴、21 滴，可見樣品在加入 10 滴 0.1M 氫氧化鈉時，樣品中的葉綠素都已經反應完成，因此可以推測氫氧化鈉就已經過量了。才會導致滴定數與預期的相反，也能解釋為什麼第二個樣品後都沒有螢光反應了。

3. 剛開始時我們使用小蘇打水當作鹼作實驗，結果發現會產生白色沉澱(如圖三十四左)，溶液中的葉綠素顏色較淡，但在 UV 燈下依然會產生紅色螢光(如圖三十四右)。所以我們改用氫氧化鈉當鹼作實驗。



圖三十四：小蘇打加入萃液有沉澱

4. 至於為什麼會產生白色沉澱物呢？由於小蘇打與酒精的溶解度不太好，因此可能在加入時讓飽和小蘇打水的小蘇打析出，我們猜測這個白色物質可能是小蘇打粉。為了驗證這個想法，我們知道用酸和小蘇打反應會產生二氧化碳，因此我們將沉澱物收集起來然後用醋酸試驗看看，結果發現會產生氣泡，用點燃的線香檢驗發現會馬上熄滅，收集氣體以澄清石灰水檢驗發現會變白色混濁，加上以焰色實驗測試，發現出現明顯的黃色焰光，因此我們推測這個白色沉澱物應該是小蘇打。



圖三十五：過濾白色沉澱物的檢測，證明了白色沉澱為小蘇打。

實驗八：加熱對於葉綠素螢光與抗氧化力的影響

8-1 地瓜葉的加熱時間對於酒精萃取葉綠素中葉綠素螢光與抗氧化力的影響

作法：1. 取同株的地瓜葉。

2. 取地瓜葉 1g，浸泡 100°C 熱水中 1 分鐘。

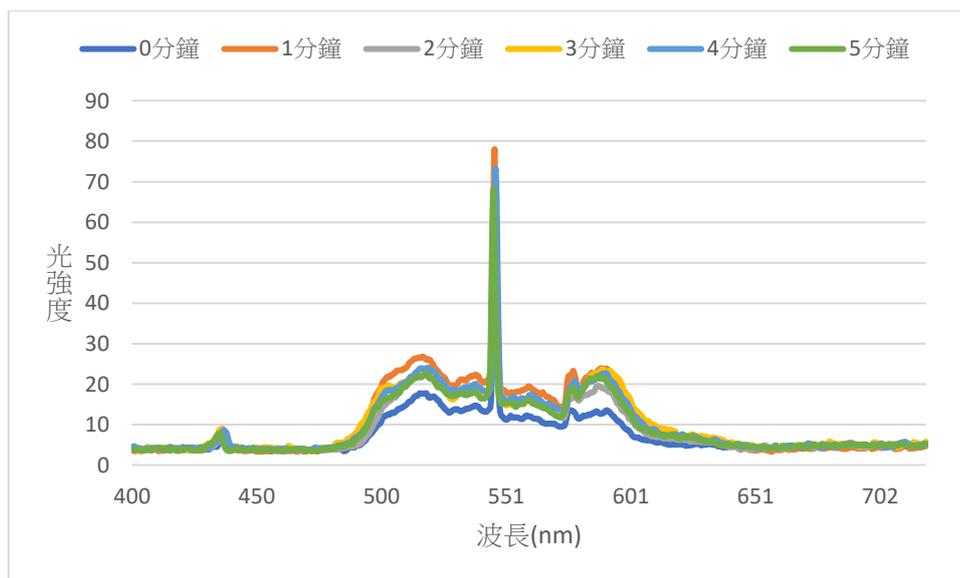
3. 將地瓜葉撈起以地瓜葉：酒精=1g：32ml 萃取，過濾後得到澄清萃取液。

4. 重複步驟 2、3，時間依序為 2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘、5 分鐘。

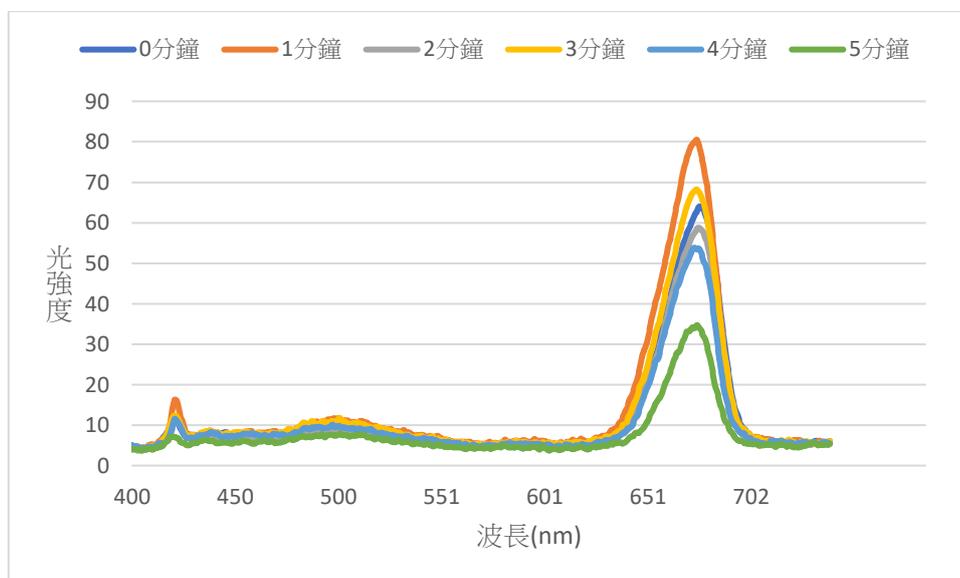
5. 以 ImageJ 分析數據並以 Excel 繪製成圖形分析。

6. 用優碘滴定比較開始與最後樣品的抗氧化力強弱變化。

結果：如圖三十六、圖三十七、表六



圖三十六：不同加熱時間地瓜葉的酒精萃取液的穿透光譜



圖三十七：不同加熱時間地瓜葉的酒精萃取液的激發光譜

表六：不同加熱時間地瓜葉的酒精萃取液的優碘平均滴定數

加熱時間	0 分鐘	5 分鐘
優碘平均滴定數	29.3 滴	40 滴

- 討論：1. 由穿透光譜可以發現 0 分鐘的整體強度較少，推測是葉綠素的萃液濃度較濃，1-5 分鐘的強度較 0 分鐘多，濃度相對較淡。
2. 激發光譜的部分較沒有一致性，可能是加熱萃取的問題，或是 5 分鐘後萃取的濃度真的變淡了，而我們優碘滴定來佐證發現加熱 0 分鐘時，平均是 29.3 滴，而 5 分鐘平均是 40 滴，可見加熱還是會影響萃取葉綠素的濃度。
3. 在實驗中我們觀察到加熱後的地瓜葉在萃取的磨碎過程中，變得比較黏稠且更容易破碎，可見加熱會影響地瓜葉是否也因此影響了萃取而造成光譜上的變動，因此我們想更直接知道加熱對酒精萃取液中葉綠素的影響，因此以酒精的葉綠素萃取液直接討論。

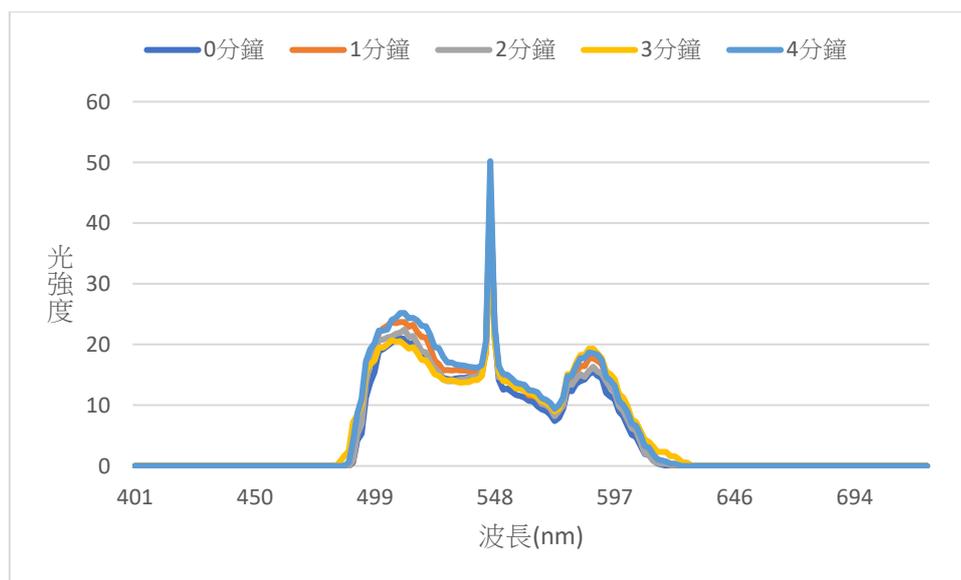
8-2 不同的加熱時間對於酒精萃取葉綠素中葉綠素螢光與抗氧化力的影響

作法：1. 各取酒精葉綠素萃取液 10ml，分別裝入樣品瓶子各 5 瓶。

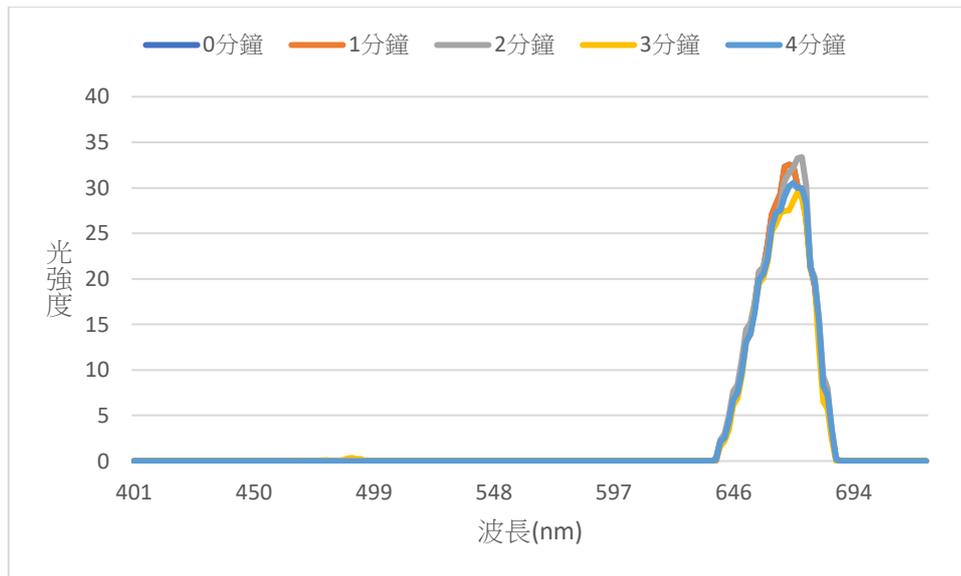
2. 在 100°C 的沸水中分別隔水加熱 0 分鐘、1 分鐘、2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘。

3. 將完成的萃取液依序測光譜，並以 ImageJ 繪圖與分析。

結果：如圖三十八、圖三十九

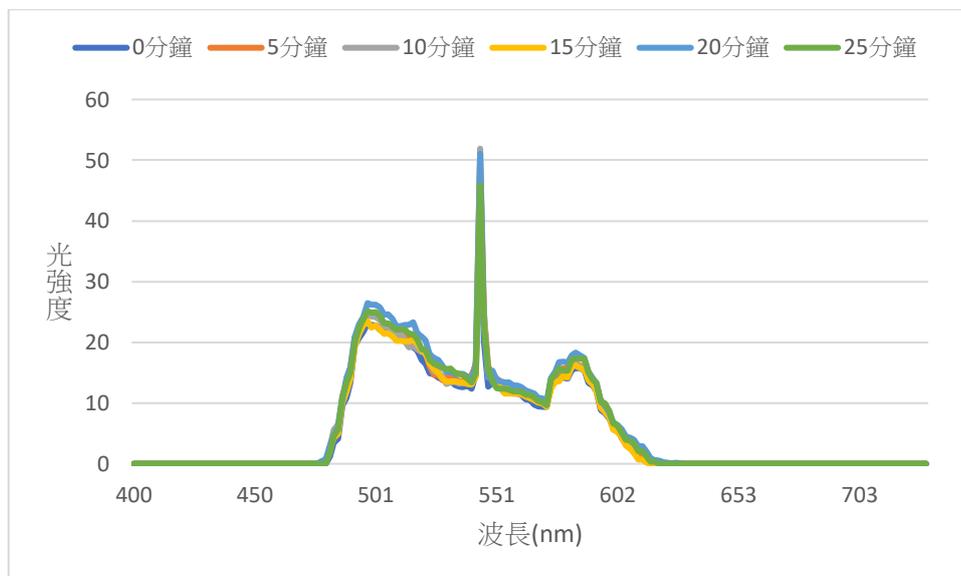


圖三十八：不同的加熱時間酒精萃取液的穿透光譜

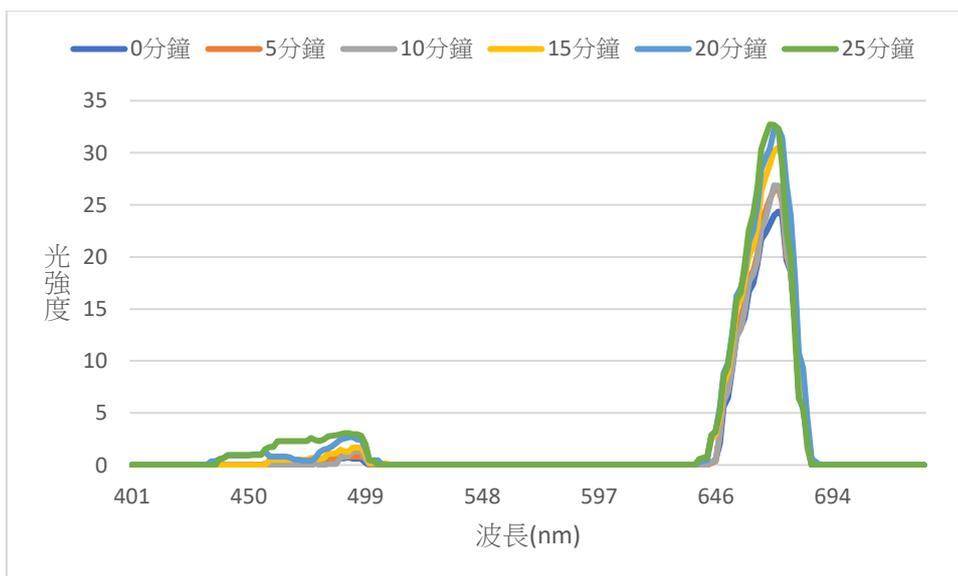


圖三十九：不同的加熱時間酒精萃取液的激發光譜

討論：1. 從透光光譜可以看到強度差不多，由螢光激發光譜中看到的強度也相差不多，可能加熱對於葉綠素是沒影響的，也可能是隔水加熱時間過短傳導的較慢，所以影響葉綠素萃取液的幅度不大，也許隨著加熱時間增加，會出現更明顯的變化。為了驗證這個部分，我們改以 5 分鐘為一個時間單位，隔水加熱到 25 分鐘，實驗結果如下，發現透光光譜差不多，在激發光譜中可以看到加熱 25 分鐘後強度較 0 分鐘稍強，加上以優碘滴定佐證加熱 0 分鐘平均是 21 滴，25 分鐘則到了 33 滴，可知顏色雖沒有明顯的變化，但是葉綠素的濃度慢慢變淡了。



圖四十：增加加熱時間後不同的加熱時間酒精萃取液的透光光譜



圖四十一：增加加熱時間後不同的加熱時間酒精萃取液的激發光譜

表七：增加加熱時間後不同的加熱時間酒精萃取液的優碘平均滴定數

加熱時間	0 分鐘	25 分鐘
優碘平均滴定數	21 滴	33 滴

實驗九：不同的紫外燈照射時間對於酒精萃取葉綠素中葉綠素螢光與抗氧化力的影響

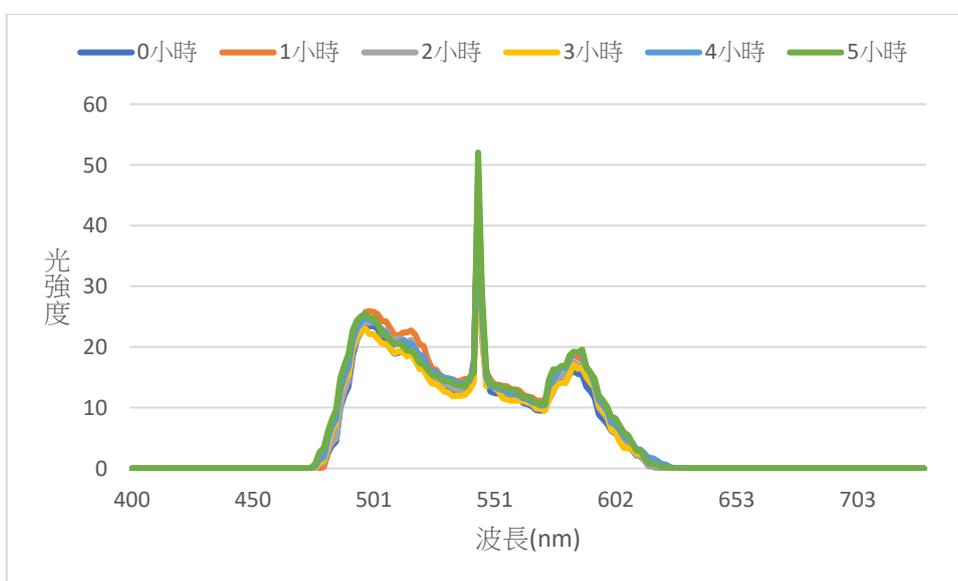
作法：1. 各取酒精葉綠素萃取液 10ml，分別裝入樣品瓶子各 5 瓶。

2. 放在箱中的 UV 燈前，分別照 0、1、2、3、4、5 小時。

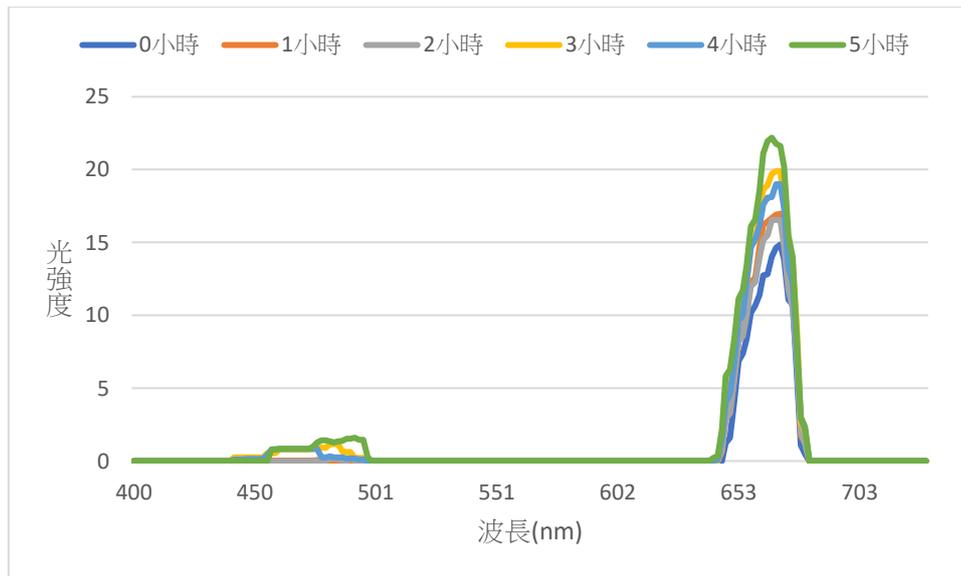
3. 將完成的萃取液依序測光譜，並以 ImageJ 繪圖與分析。

4. 用優碘滴定比較開始與最後樣品的抗氧化力強弱變化。

結果：如圖四十二、圖四十三、表八



圖四十二：照射不同紫外光時間地瓜葉酒精萃取液的穿透光譜

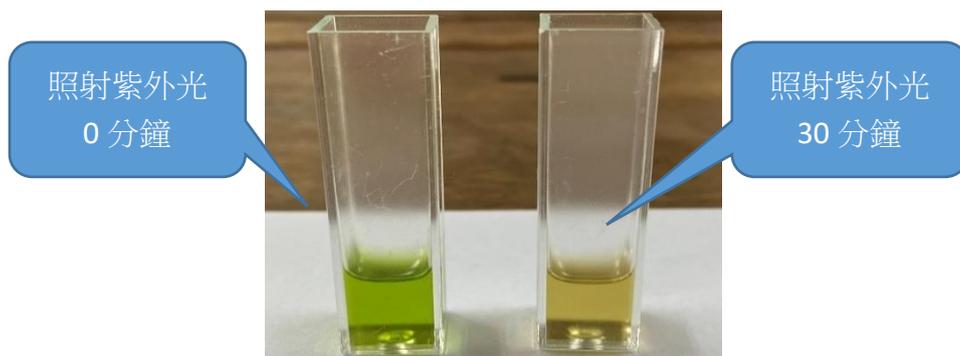


圖四十三：照射不同紫外光時間地瓜葉酒精萃取液的激發光譜

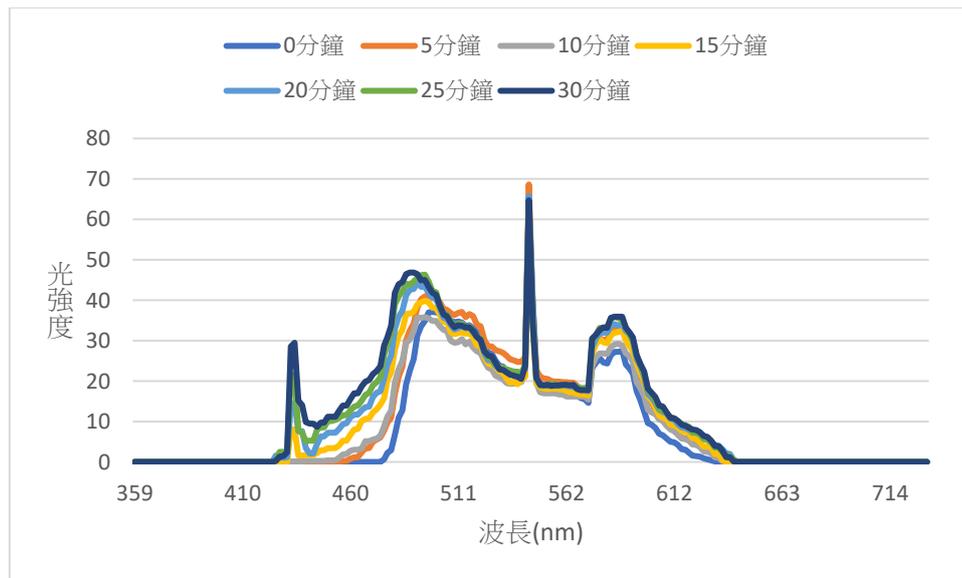
表八：照射不同紫外光時間地瓜葉酒精萃取液的優碘平均滴定數

紫外光照射時間	0 小時	5 小時
優碘平均滴定數	21 滴	28.3 滴

- 討論：1. 我們從透光光譜看到 0 小時到 5 小時的光譜圖形幾乎重疊，因此看起來好像沒什麼改變，但在螢光激發下可以看到從 0 小時到 5 小時有漸漸變強，因此可以推測濃度漸漸變小，可見葉綠素在紫外光的照射下有漸漸被破壞，加上滴定資料 0 小時 21 滴、5 小時為 28.3 滴，更加可以證明葉綠素在紫外光的照射下隨著時間有漸漸被破壞的情形，因此造成葉綠素濃度變淡。
2. 從 5 小時透光光譜幾乎沒有看到什麼變化，我們懷疑是否是紫外光真的能讓葉綠素產生變化呢？我們查詢發現我們一般用的紫外光燈管所產生的光強度太少，因此我們改以紫外光強度較強的紫外光手電筒輔以微量 0.5ml 來做實驗，每五分鐘記錄全光譜的變化，從最後結果(圖四十五)可以看到酒精萃取液中的葉綠素明顯的產生了變化，從透光光譜也能看到強度變得較強，因此可輔以說明紫外光會破壞葉綠素這個推論。



圖四十四：0.5ml 葉綠素萃取液在強紫外光 LED 下的外觀改變



圖四十五：地瓜葉酒精萃取液以較強紫外光照射不同時間後的穿透光譜

伍、結論

一、找出最佳拍攝葉綠素激發光譜的條件

1. 以偏光片控制光源，使拍攝的穿透光譜的光強度能夠一致。
2. 以二手手機代替數位單眼相機，當作拍攝的儀器，就能拍攝出激發光譜。具有省時、圖片清晰、儀器製作便宜的優點。
3. 以 UV 手電筒做光源，在地瓜葉：酒精=1g：32ml 的萃取液中，每次取樣 0.5 ml 就是拍攝激發光譜的最佳條件。
4. 葉綠素的激發光譜會有螢光自體吸收的效應，進而影響激發光譜中的螢光強度。
5. 地瓜葉放置的天數越久，所萃取的濃度越淡，相同的放置天數時，常溫保存的地瓜葉較冰箱低溫中保存的地瓜葉所萃取到的葉綠素濃度淡。

二、探究地瓜葉的葉綠素是否具有抗氧化力

1. 以碘滴定與臭氧氧化的方式驗證酒精地瓜葉萃取液中的葉綠素具有抗氧化力。
2. 以臭氧氧化葉綠素時，顏色會隨時間由綠色轉為較深墨綠色，通入更久後會變成淺褐色透明溶液，而抗氧化力也隨時間下降。

三、探究不同條件下地瓜葉的葉綠素螢光變化與抗氧化力的變化情形

1. 加入酸後的葉綠素萃取液，外觀會由綠色變成黃綠色，從穿透光譜中可發現藍色波段的吸收變強，以藍光雷射為光源的激發光譜和碘滴定的資料，可說明酸會破壞葉綠素使抗氧化力降低。
2. 加入鹼後的葉綠素萃取液，外觀變化不大，從穿透光譜中可發現加入鹼的濃度越多，整體的光強度下降，以藍光雷射為光源的激發光譜與加入不同鹼的資料，可說明鹼會破壞葉綠素使抗氧化力降低(此時碘滴定法因為鹼會與碘作用而使資料無法參考)。
3. 加熱後的葉綠素萃取液，外觀變化不大，穿透光譜變化不大，以激發光譜和碘滴定的資料，可說明加熱會破壞葉綠素使抗氧化力降低。
4. 照射紫外光後的葉綠素萃取液，外觀會由綠色變成黃綠色，從穿透光譜中可發現強度變強，由激發光譜和碘滴定的資料，可說明照射紫外光燈會破壞葉綠素使抗氧化力降低。

陸、參考資料

1. 我是「地」一名—地瓜葉抗氧化力之探討。全國科展 50 屆國小組化學科。
2. 致命藍色吸「螢」力。全國科展 59 屆國小組化學科。
3. 「量點」中的「亮點」-自製螢光光譜儀研究量子點之螢光性質。全國科展 57 屆國中組化學科。
4. 蔬中求螢-蔬果中螢光物質的探討與應用。全國科展 53 屆國小組化學科。
5. 點亮黑夜的小精靈---探究紅蘿蔔中的螢光。全國科展 47 屆國小組自然科。

【評語】 080210

研究螢光與抗氧力，主題有趣並自製螢光光譜儀研究地瓜葉螢光強度與抗氧化力強弱之間的關聯性，在光譜儀製作上面相當令人驚艷，以臭氧氧化葉綠素再進行碘滴定也相當有有趣。請說明為何選擇這些不同條件，以及說明為何以比法測抗氧化，內頁格式為新細明體，作品使用標楷體，學生對於實驗內容的掌握度須加強。

作品簡報

「葉」！「螢」在起跑點！

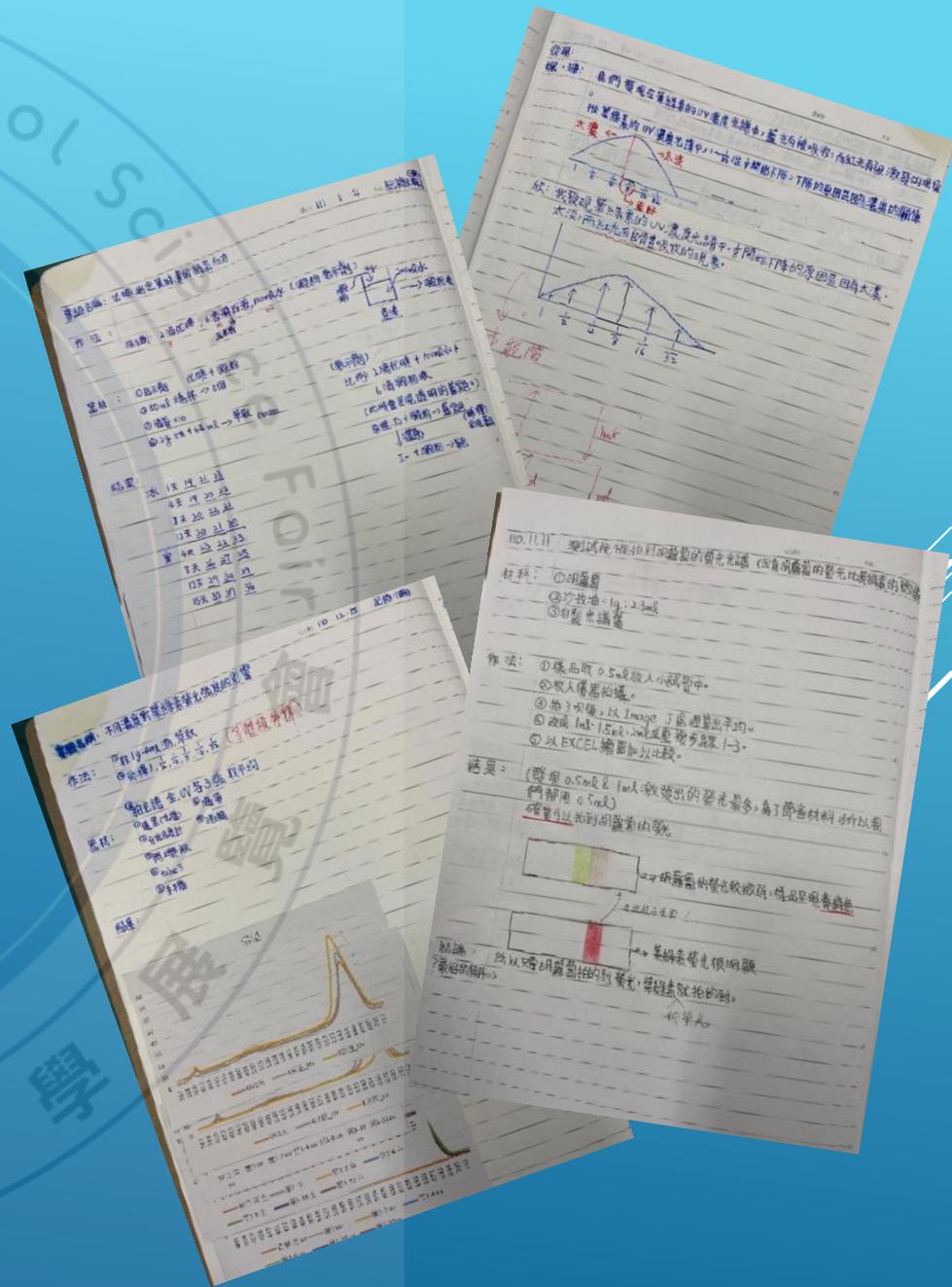
~ 葉綠素的螢光強度與抗氧化力強弱的研究(以地瓜葉為例)

前言

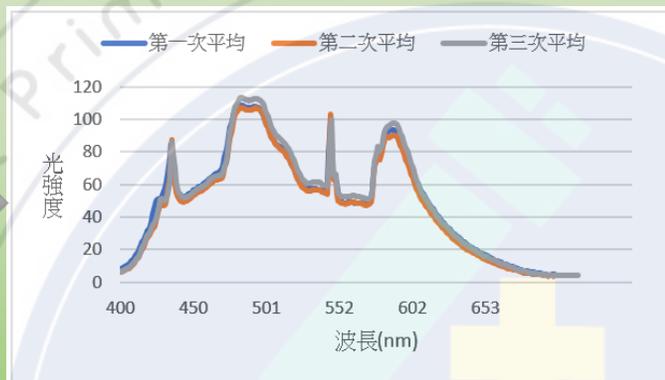
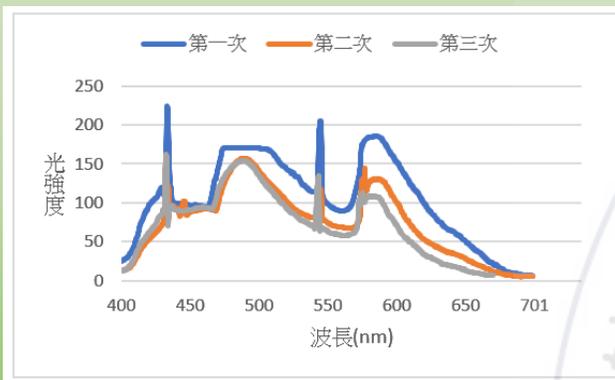
自然課中上關於植物的課程時，有提到植物能行光合作用是因為有葉綠素的關係。50屆化學作品“我是「地」一名”指出抗氧化力第一名為地瓜葉，僅次於地瓜葉的是深綠色植物，我們思考葉綠素是抗氧化的主要成分嗎？再者，葉綠素有著在UV光下激發出紅色螢光的特性，我們以地瓜葉為例，希望研究在不同條件下地瓜葉的葉綠素螢光變化與抗氧化力的變化情形。

研究目的

- 一、找出最佳拍攝葉綠素激發光譜的條件
- 二、探究地瓜葉的葉綠素是否具有抗氧化力
- 三、探究不同條件下地瓜葉的葉綠素螢光變化與抗氧化力的變化情形

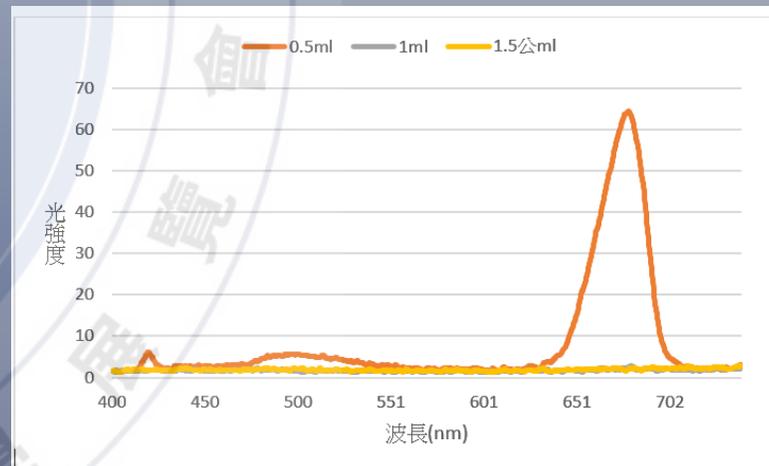
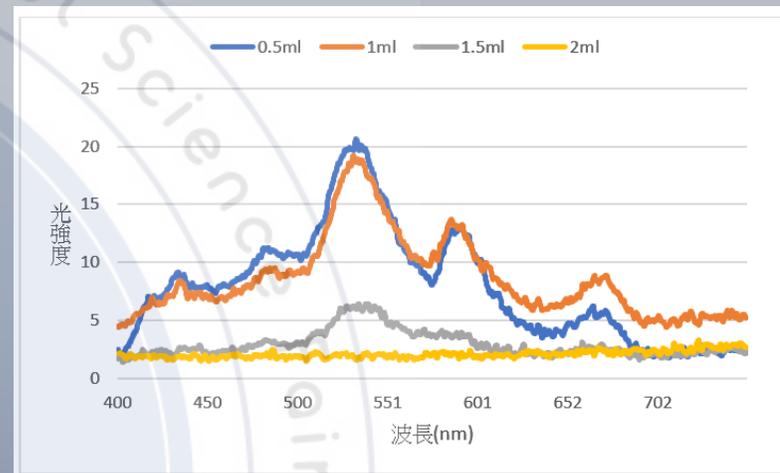


研究方法 光譜儀的校正與改良



參考以往科展作品的儀器

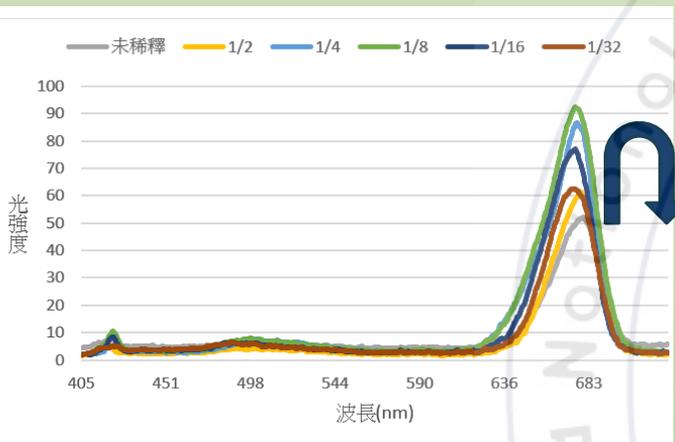
儀器前面加入偏光片
增加儀器的穩定。



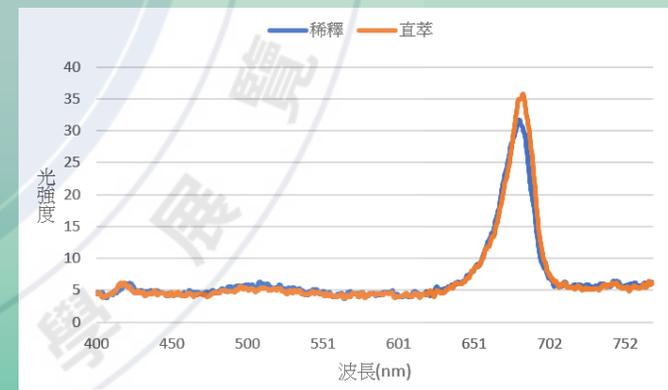
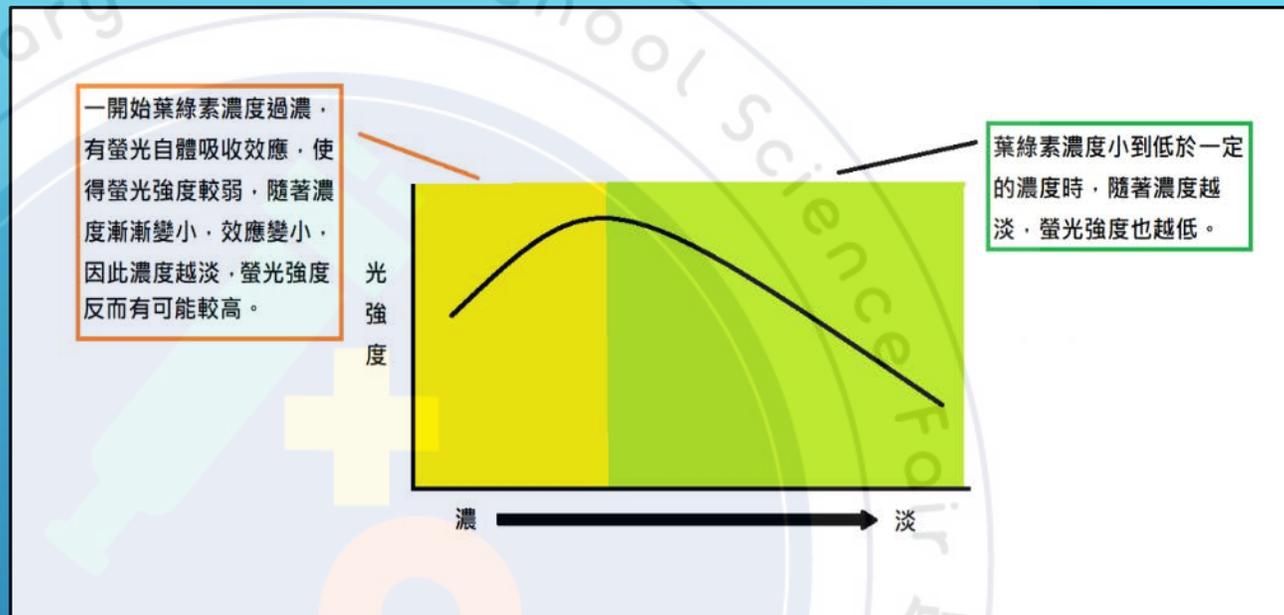
將以往數位單眼相機改為手機拍攝激發光譜
感光更快、畫面更清晰、設備更便宜

拍攝螢光激發光譜的最佳條件
(上：胡蘿蔔；下：地瓜葉)

研究方法 光譜儀的校正與改良



不同濃度的螢光激發光譜



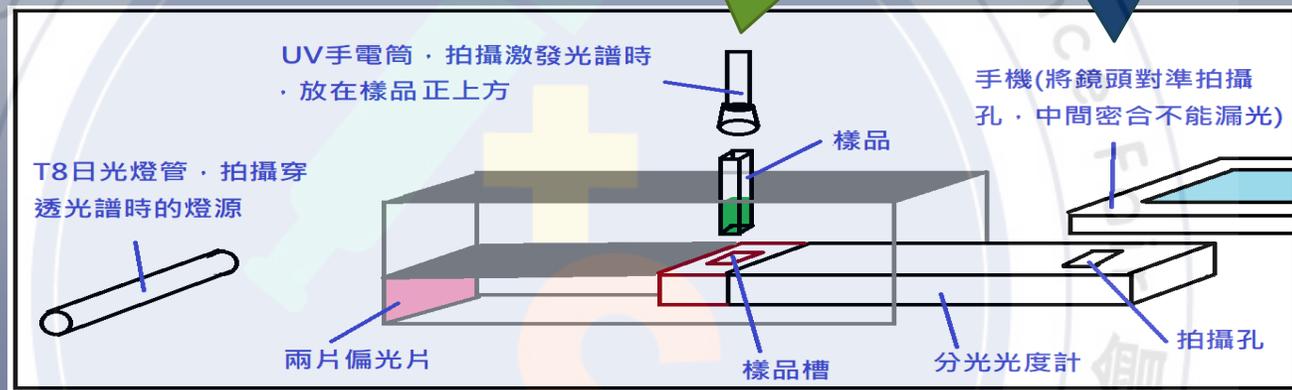
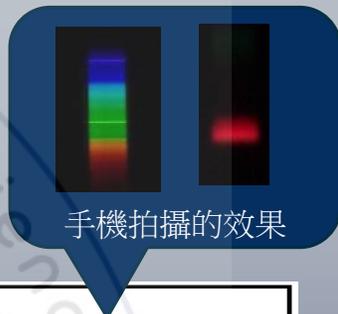
葉綠素的直接萃取與萃取後稀釋的光譜比較

研究方法

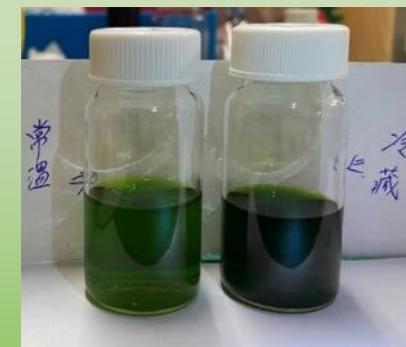
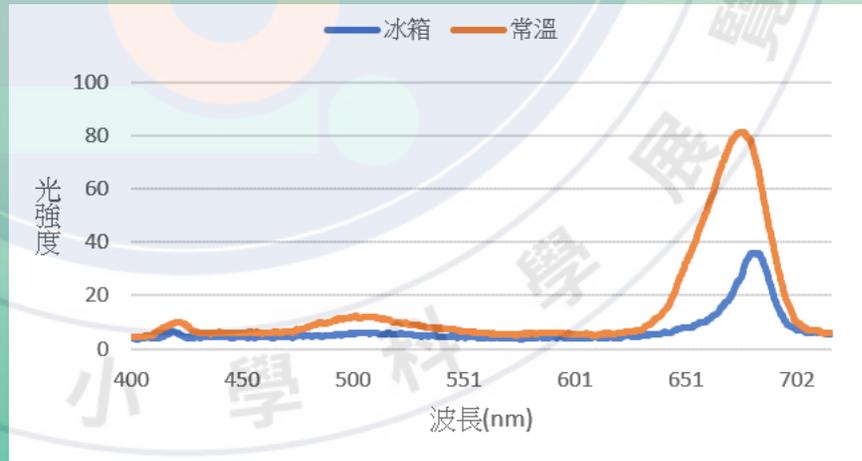
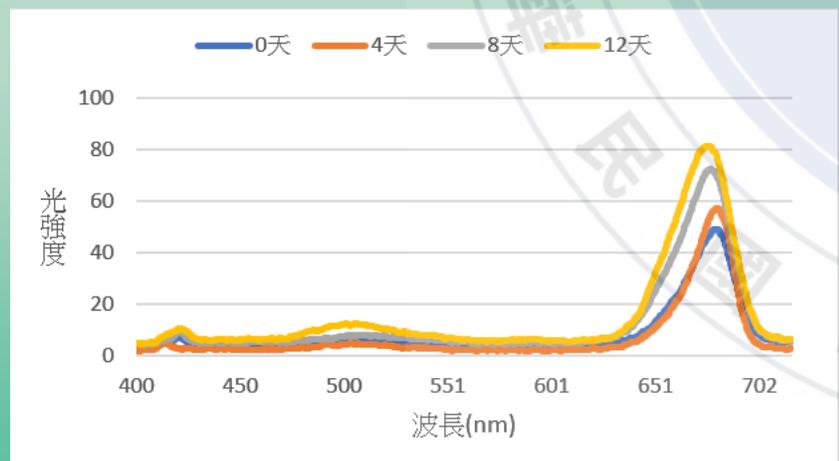
光譜儀的校正與改良

最佳拍攝葉綠素激發光譜的條件

1. 地瓜葉：酒精 = 1g : 32ml
2. 取0.5ml
3. UV光由上方照下



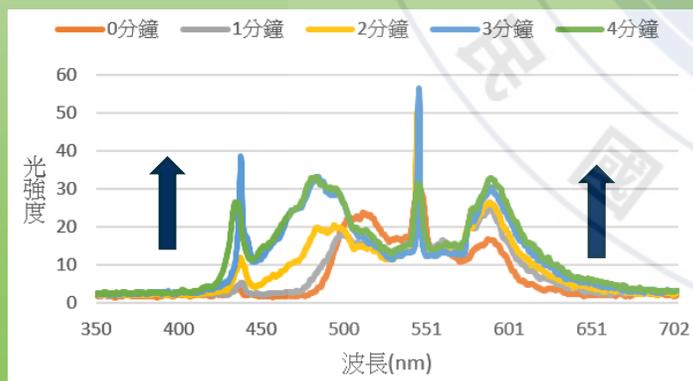
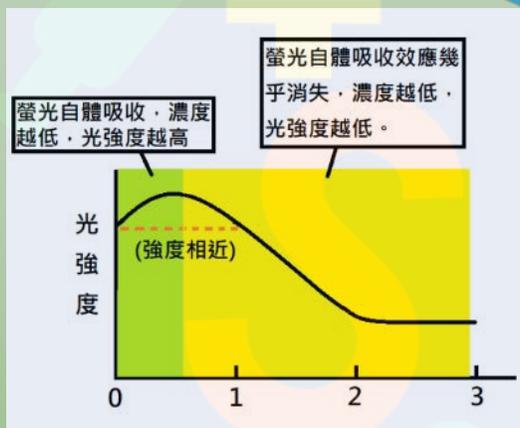
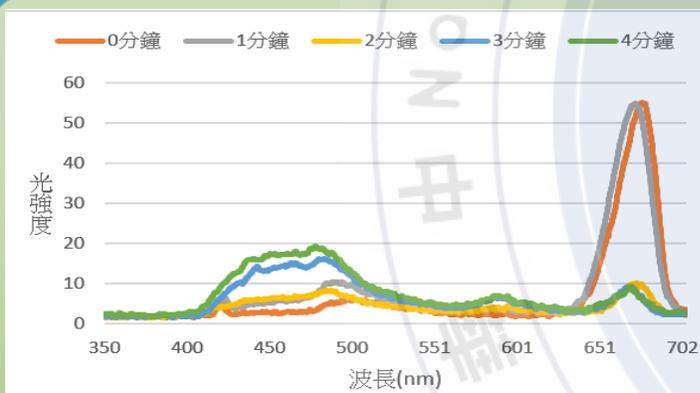
儀器示意圖



研究結果 葉綠素具有抗氧化力嗎

不同酒精地瓜葉萃取液濃度的優碘平均滴定數比較

濃度	未稀釋	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
優碘平均滴定數(滴)	2.6	5.6	9	17.6	31.33	57.6



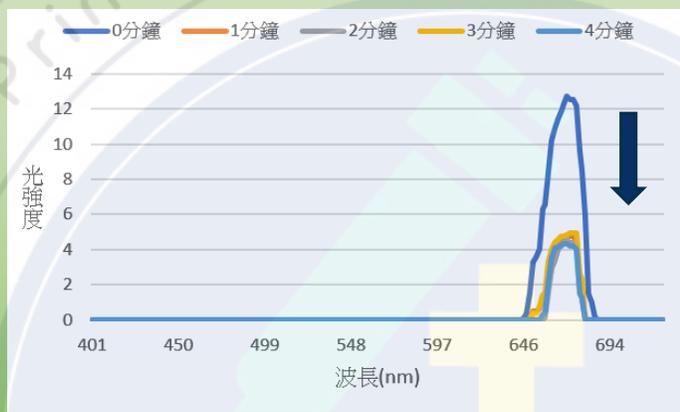
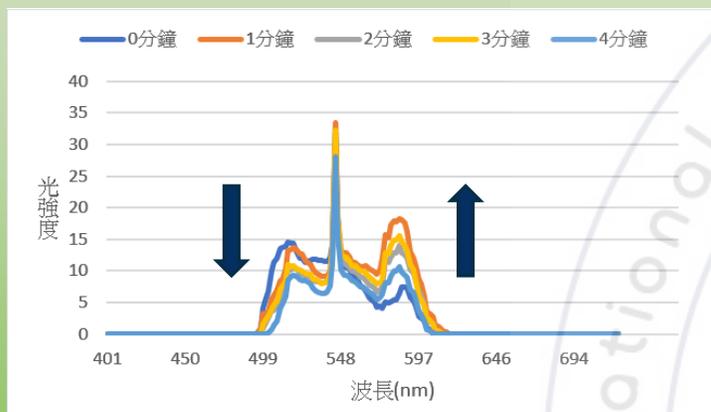
葉綠素具抗氧化力



研究結果

酸對葉綠素的影響

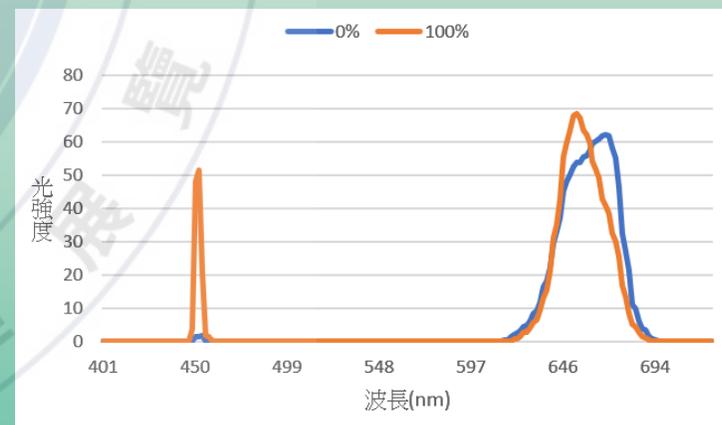
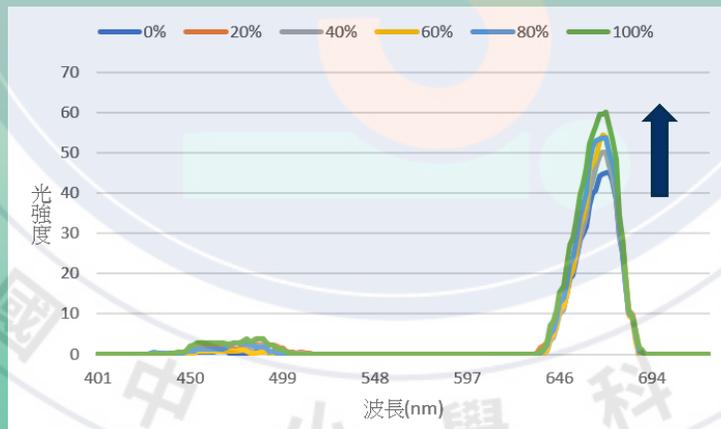
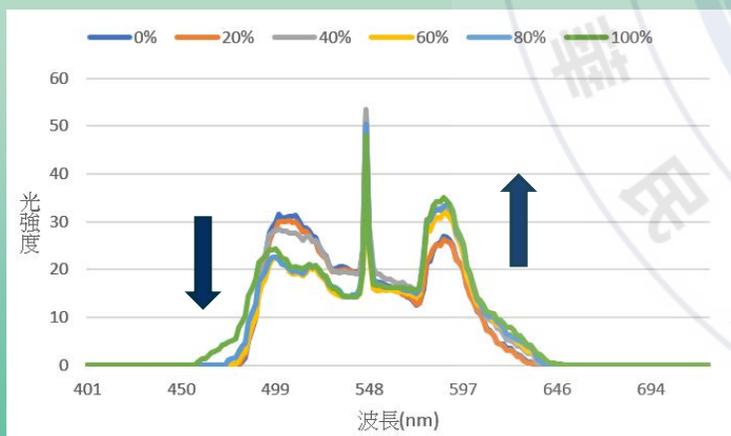
地瓜葉浸泡酸



浸泡時間	0分鐘	1分鐘	2分鐘	3分鐘	4分鐘
優碘平均滴定數	29.3滴	32滴	36滴	40.3滴	42.3滴



葉綠素萃取液加酸

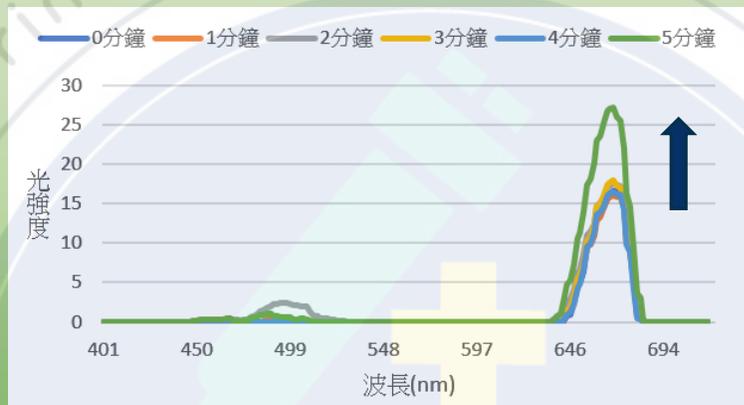
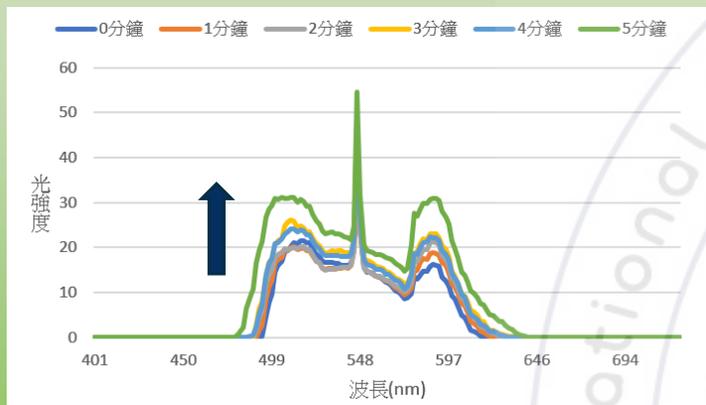


加入乙酸濃度	0%	100%
優碘平均滴定數	28滴	34滴

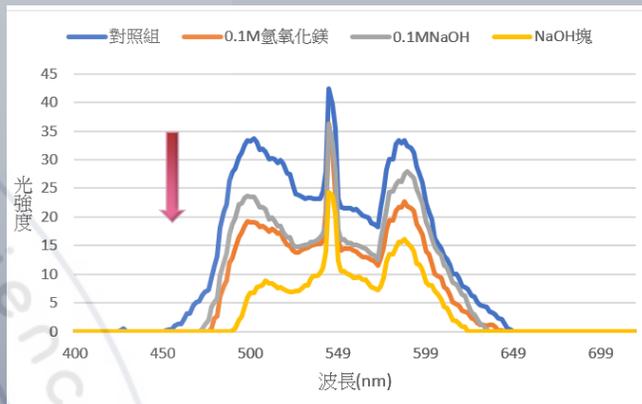
研究結果

鹼對葉綠素的影響

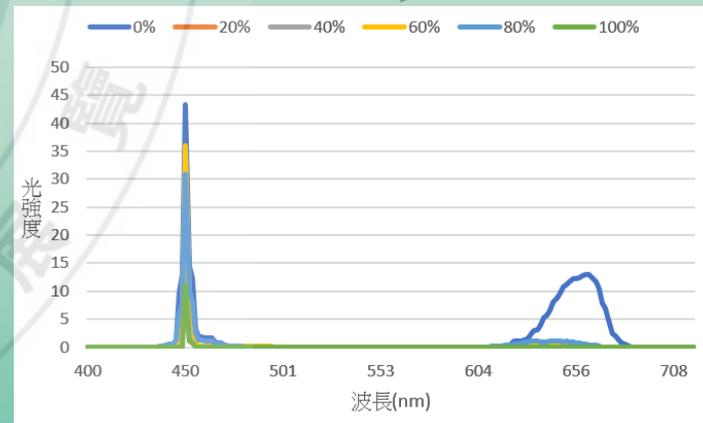
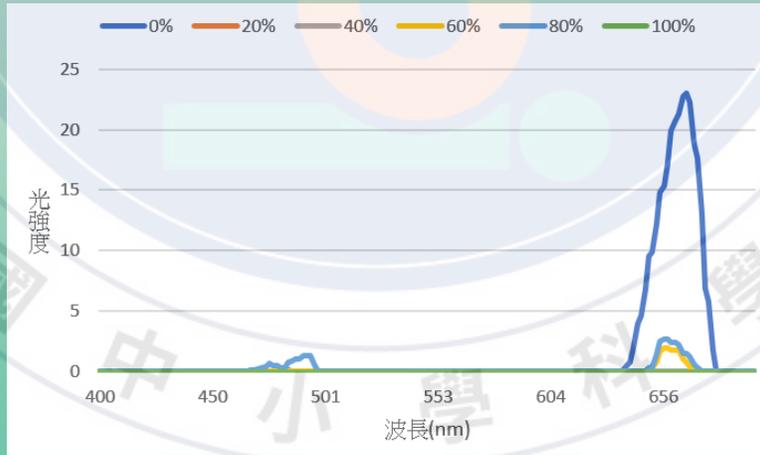
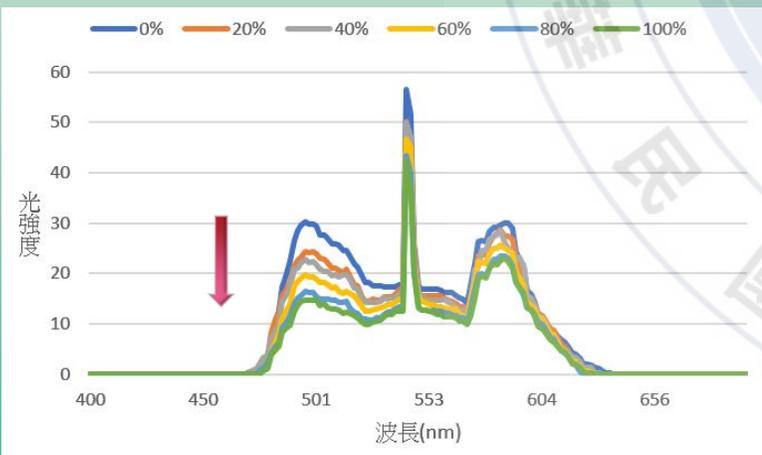
地瓜葉浸泡鹼



浸泡時間	0分鐘	5分鐘
優碘平均滴定數	17滴	26.3滴



葉綠素萃取液加鹼

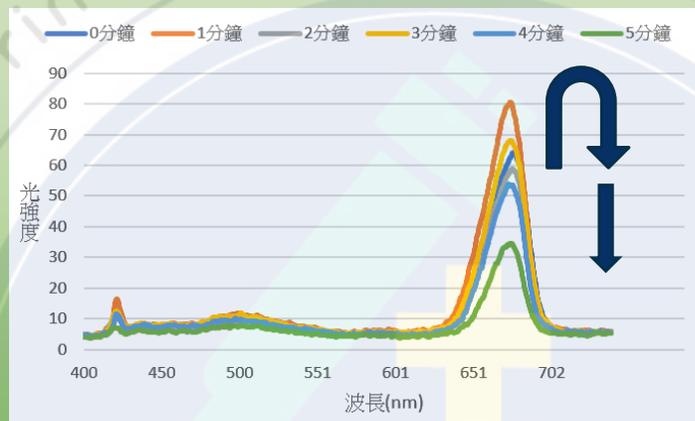
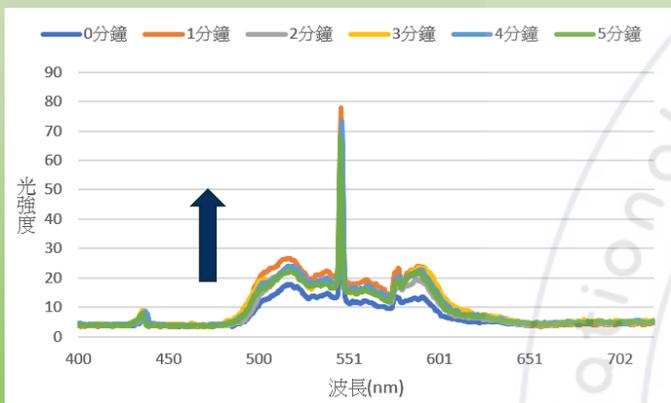


氫氧化鈉濃度	0%	100%
優碘平均滴定數	28滴	13.6滴

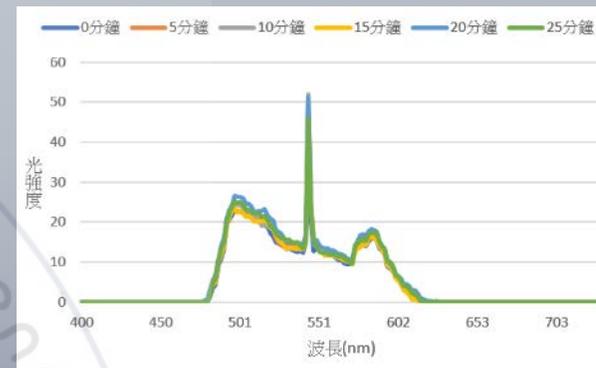
研究結果

加熱對葉綠素的影響

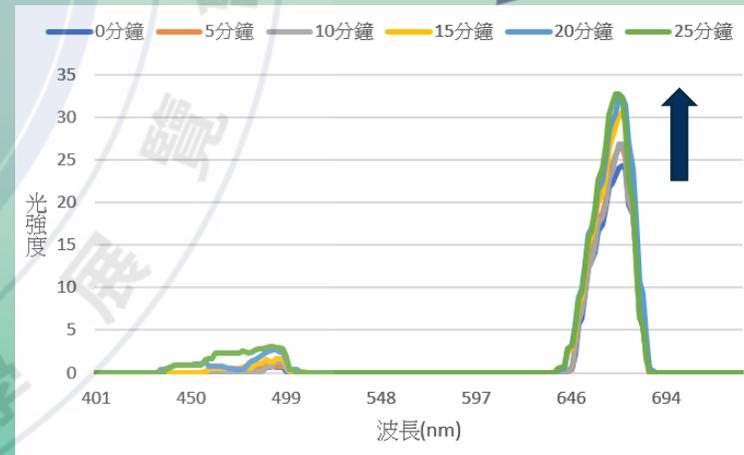
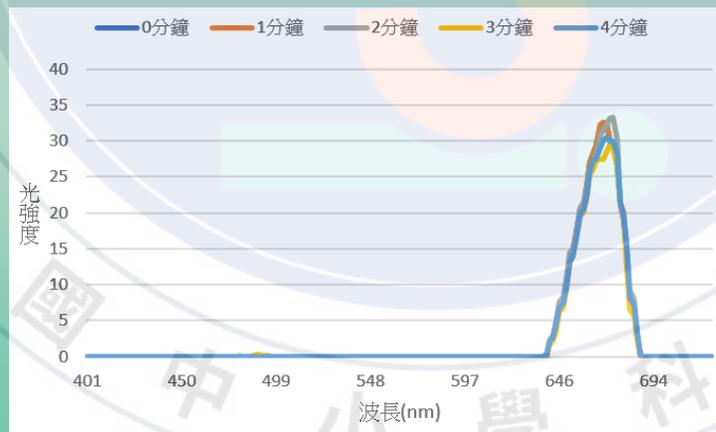
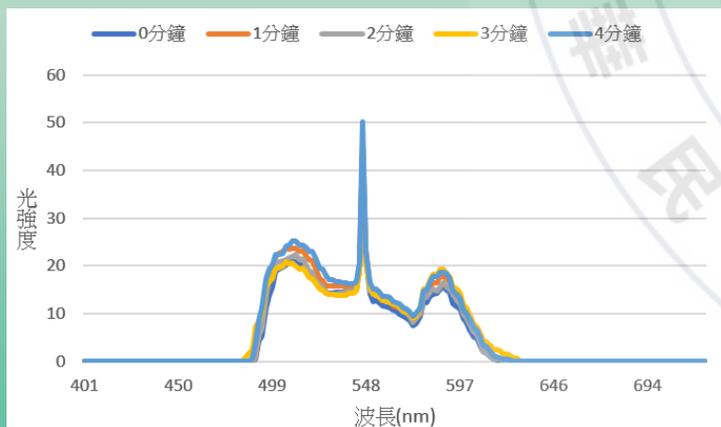
地瓜葉加熱



加熱時間	0分鐘	5分鐘
優碘平均滴定數	29.3滴	40滴



葉綠素萃取液加熱

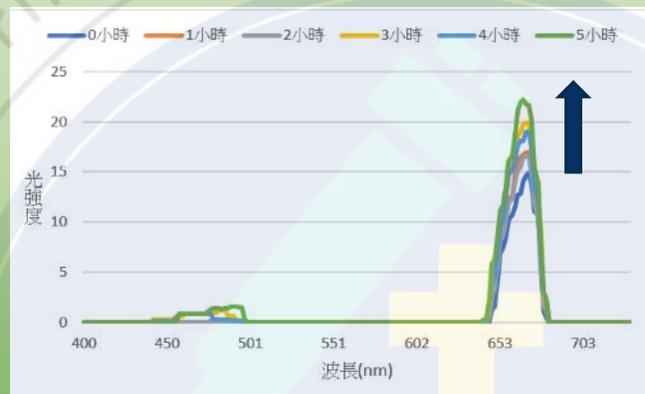
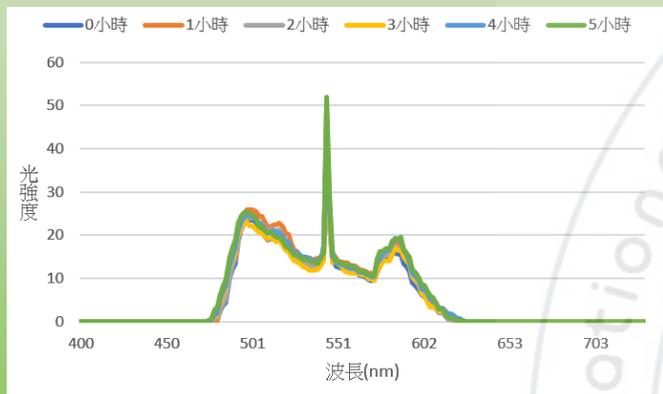


加熱時間	0分鐘	25分鐘
優碘平均滴定數	21滴	33滴

研究結果

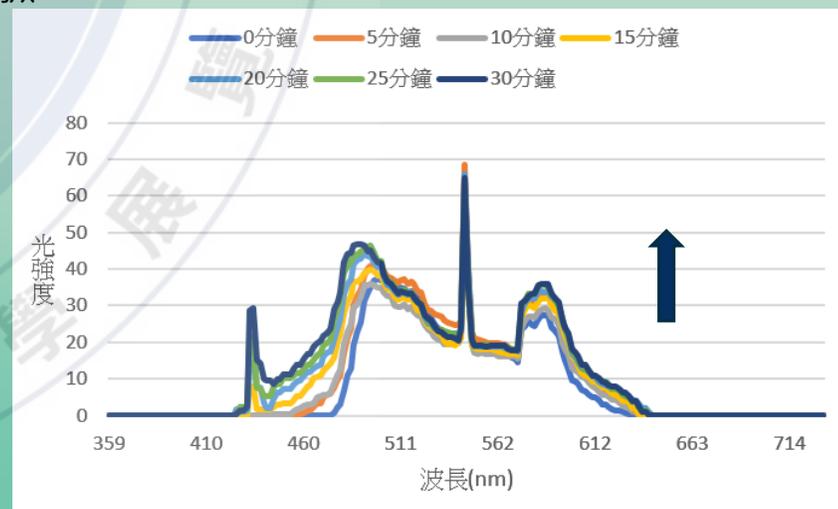
紫外光對葉綠素的影響

紫外光實驗



紫外光照射時間	0小時	5小時
優碘平均滴定數	21滴	28.3滴

紫外光微量實驗



一、找出最佳拍攝葉綠素激發光譜的條件

- 1.以二手手機代替數位單眼相機，當作拍攝的儀器，就能拍攝出激發光譜。具有省時、圖片清晰、儀器製作便宜的優點。
- 2.以UV手電筒做光源，在地瓜葉：酒精=1g：32ml的萃取液中，每次取樣0.5 ml就是拍攝激發光譜的最佳條件。

二、探究地瓜葉的葉綠素是否具有抗氧化力

- 1.以碘滴定與臭氧氧化的方式驗證，結果說明酒精地瓜葉萃取液中的葉綠素具有抗氧化力。
- 2.臭氧實驗，顏色隨時間由綠色轉為較深墨綠色最會變成淺褐色透明溶液，抗氧化力也隨時間下降。

三、探究不同條件下地瓜葉的葉綠素螢光變化與抗氧化力的變化情形

- 1.加入酸後的葉綠素萃取液，外觀會由綠色變成黃綠色，從穿透光譜、藍光雷射激發光譜和碘滴定的資料，可說明酸會破壞葉綠素使抗氧化力降低。
- 2.加入鹼後的葉綠素萃取液，外觀變化不大，從穿透光譜中可發現加入鹼的濃度越多，整體的光強度下降，以藍光雷射的激發光譜可說明鹼會破壞葉綠素使抗氧化力降低
- 3.加熱後的葉綠素萃取液，外觀變化不大，穿透光譜變化不大，以激發光譜和碘滴定的資料，可說明加熱會破壞葉綠素使抗氧化力降低。
- 4.照射紫外光後的葉綠素萃取液，外觀會由綠色變成黃綠色，由激發光譜和碘滴定的資料，可說明照射紫外光燈會破壞葉綠素使抗氧化力降低。

1. 我是「地」一名-地瓜葉抗氧化力之探討。全國科展50屆國小組化學科。
2. 致命藍色吸「螢」力。全國科展59屆國小組化學科。
3. 「量點」中的「亮點」-自製螢光光譜儀研究量子點之螢光性質。全國科展57屆國中組化學科。
4. 蔬中求螢-蔬果中螢光物質的探討與應用。全國科展53屆國小組化學科。
5. 點亮黑夜的小精靈---探究紅蘿蔔中的螢光。全國科展47屆國小組自然科。

