

# 2022 年【全國科學探究競賽-這樣教我就懂】

## 高中（職）組 成果報告表單

題目名稱：你紅我紅故鄉的紅寶石

### 一、摘要：

花青素 (*Proanthocyanidins*) 是一種水溶性植物色素，屬於生物類黃酮，是一種黃酮醇的烷化物，也是一種多酚類。根據研究，花青素具有抑制細菌生長的效果。使用固液萃取(SPE, *Solid-Phase Extraction*)萃取出洛神花萃取液，其成分包含「類黃酮素」、「原兒茶酸」、「花青素」以及「異黃酮素」等。其中，花青素 (*Proanthocyanidins*)，是已知的天然抗氧化劑之一。

本次的探究實驗欲探討在不同變因下，對洛神花進行固液萃取，所萃取出花青素濃度的差異。並進一步以大腸桿菌作為生物指標，探討在不同變因之下，以水作為溶劑的洛神花萃取液的抑菌效果差異。因此我們期待能透過本次實驗找出萃取出最高濃度的洛神花萃取液的條件，並運用在食品工業等領域，達到延長食物保存期限等功效，進而減少防腐劑的使用。

### 二、探究題目與動機

洛神花 (學名 *Hibiscus sabdariffa*) 為台東在地特產，是台東最美的健康花種之一。有一次，偶然間瀏覽到了台灣大山生技股份有限公司網頁的洛神花介紹，其中提到：「洛神花含有蘋果酸、維生素 C 與醣類(半乳糖、葡萄糖與果糖)，也有豐富的果膠，及各種多酚類成分(主要有原花青素 PCA、花青素、類黃酮素及異黃酮素等四類)。花青素為多酚類的一種，功能主要為天然的抗氧化劑，具有強抗氧化能力，能抑制細菌的繁殖」。上述內容激發了我對本次探究實驗之動機，因此我們想要透過本實驗，來探討如何萃取出濃度最高的花青素萃取液，以及驗證花青素濃度的多寡與抑制細菌效果的關係。

### 三、探究目的與假設

#### 研究目的

- (一) 不同萃取時間對洛神花萃取液之花青素濃度影響
- (二) 以不同有機溶劑萃取對洛神花萃取液之花青素濃度影響
- (三) 不同萃取溫度對洛神花萃取液之花青素濃度影響
- (四) 不同洛神花萃取液(僅以水作為溶劑的萃取液)對大腸桿菌生長的抑制效果

#### 研究假設：

- (一) 我們推測萃取的時間越長，萃取出花青素濃度越高。
- (二) 我們推測乙醇的萃取性效果較佳。
- (三) 我們推測萃取溫度越高，萃取出花青素濃度越高。
- (四) 在以水作為溶劑的洛神花萃取液對大腸桿菌生長的抑制效果實驗中，我們推測花青素的濃度越高，對大腸桿菌生長的抑制效果越高。

#### 四、探究方法與驗證步驟

實驗器材：

洛神花

磁石攪拌器(Hot Plate Strrer)型號 JS-H

95%乙醇(Ethyl alcohol 95%)

99.87%丙酮(Aceton,99.87%)

RO 去離子水

恆溫水槽(往復式振盪水槽 BT-150D-BT-680D，裕德有限公司)

錐形瓶

分光光度儀

EZDO pH 測試筆

漏斗

鋁箔紙

電子天平

氯化鐵

試管

安全吸球

分度吸量管

Pipetman

培養皿

大腸桿菌(JM109)菌液

NB 培養基

實驗一、證明洛神花萃取液有花青素：

依據論文洛神葵花青素之研究 (曾永安) 中，我們得知：「氯化鐵使花青素變色產生錯合物而造成沈澱。」因此將進行以下實驗。吸取 30 毫升的萃取液及 5 毫升的氯化鐵，並靜置大約 5 至 10 分鐘。在前面有提及花青素屬於一種多酚類，與金屬離子反應後容易形成以金屬為中心的錯合物，含有苯酚的多酚類（花青素也是一種）和鐵離子反應後，鐵離子和多酚類產生錯合物，鐵離子提供空價軌域，而共價鍵的電子對全部由多酚類提供，而使多酚類和鐵離子以配位共價鍵鍵結而成。多酚類扮演了配位子的角色，而此錯合物的配位數為 6。

實驗二、洛神花萃取液製備

(一) 不同萃取時間

1. 取 5 公克洛神花並利用果汁機以每分鐘 10000 轉速率攪碎，再以固液比 1:10 的比例加入去

離子水 50 公克，以此比例調配三組。並維持溫度 100°C。調配好的洛神花與 RO 水的三組混合物分別萃取 45 分鐘、60 分鐘、75 分鐘

2. 調配好的洛神花與 RO 水的三組混合物分別萃取 45 分鐘、60 分鐘、75 分鐘

3. 將萃取液利用濾紙過濾便完成

#### (二) 不同溶劑萃取

1. 乙醇組:將乙醇水溶液的溫度維持在 50 °C，並改變乙醇溶液的濃度，調配四組洛神花，每一組皆約含有 5 公克的洛神花。共有四組：20%、40%、60%及 95%的乙醇溶液。

2. 丙酮組：丙酮水溶液溫度維持在 50 °C，做四組實驗，每一組皆約含有 5 公克的洛神花。共有四組：20 %、40 %、60 %及純丙酮。

#### (三) 不同溫度

本實驗將探討不同溫度對花青素濃度萃取之影響，我們將使用 60°C、80°C、100°C作為洛神花萃取的溫度。

1. 取 5 公克洛神花並利用果汁機以每分鐘 10000 轉速率攪碎，再以固液比 1:10 的比例加入去離子水 50 公克，以此比例調配三組。

2. 將調配好的洛神花與 RO 水的三組混合物分以 60°C、80°C、100°C的溫度進行萃取 50 分鐘

3. 將萃取液利用濾紙過濾便完成。

### 實驗三、洛神花萃取液的花青素濃度以及 pH 值的測定

#### (一) 酸鹼度差額法 ( pH different method )

將收集之萃取液，取兩份 5 ml 經適當稀釋後，以 1M 鹽酸或 1M 氫氧化鈉調整 pH，使一溶液 pH 為 1.0(最大吸光值)，另一溶液 pH 為 4.5(最小吸光值)，兩份稀釋萃取液以分光光度計分別測定其在 520 nm 的吸光值，得  $A_1$ (pH 1.0)與  $A_2$ (pH 4.5)。我們可以利用以下公式計算出花青素濃度 ( mg / 100 ml )

$$(A_2 - A_1) \times D.F \times Mw \times 1000 / e$$

各組洛神花 萃取液	pH 值	花青素濃度 ( mg / 100 ml) 測試第一次	花青素濃度 ( mg / 100 ml) 測試第二次	花青素濃度 ( mg / 100 ml) 測試第三次	平均花青素濃度 ( mg / 100 ml)
95%的乙醇 萃取液(50°C)	3.6	4.97	4.82	4.99	4.93
60%的乙醇 萃取液(50°C)	3.4	2.67	2.75	2.77	2.73
40%的乙醇 萃取液(50°C)	3.2	1.03	1.01	0.96	1.00

20%的乙醇 萃取液(50°C)	4.0	0.77	0.69	0.74	0.73
純丙酮 萃取液(50°C)	3.5	0.06	0.03	0.05	0.05
60%的丙酮 萃取液(50°C)	3.5	1.24	1.20	1.19	1.21
40%的丙酮 萃取液(50°C)	3.0	1.96	1.90	1.92	1.93
20%的丙酮 萃取液(50°C)	2.8	2.29	2.20	2.23	2.24
100°C的萃取液 (50 分鐘)	2.4	22.72	22.65	22.74	22.70
80°C的萃取液 (50 分鐘)	2.3	25.73	25.77	25.72	25.74
60°C的萃取液 (50 分鐘)	2.2	26.47	26.59	26.43	26.50
浸泡 75 分鐘的 萃取液(100°C)	2.5	27.54	27.59	27.51	27.55
浸泡 60 分鐘的 萃取液(100°C)	2.1	27.54	27.45	27.56	27.52
浸泡 45 分鐘的 萃取液(100°C)	2.5	21.28	21.30	21.22	21.27

#### 實驗四、大腸桿菌的培養與洛神花萃取液的抑菌效果

##### (一) NB 培養基的配置

1. 稱取營養瓊脂培養基 32.0g，加入蒸餾水或去離子水至 1L，121°C 高壓滅菌 15 分鐘，再分裝到培養皿中。
2. 劃線接種至營養瓊脂斜面中。
3. 37°C 培養 18~24 小時。
4. 觀察結果。

(二) 洛神花萃取液的滴加 ( 僅包含以水作為溶劑的洛神花萃取液 )

- 1 . 將配置好的 NB 培養基的盤蓋上以黑色麥克筆標記欲滴加的洛神花萃取液。
- 2 . 將以水作為溶劑的洛神花萃取液的組別 ( 不同的萃取溫度、不同的萃取時間為操縱變因的組別 ) 分別以 pipetman 各取 50  $\mu$ l , 並將其滴加於對應的培養基上。
- 3 . 待培養基上的洛神花萃取液被培養基完全吸收後 , 將盤蓋蓋上 , 進行大腸桿菌移植。

(三) 大腸桿菌的移植

- 1 . 以 pipetman 各取 100 $\mu$ l 的大腸桿菌菌液 , 取一個已滴加過洛神萃取液的培養基 , 將其置於不銹鋼旋轉台上。
- 2 . 將 100 $\mu$ l 的大腸桿菌萃取液滴加於培養基上。
- 3 . 用已消毒過的 L 型玻棒塗抹大腸桿菌菌液 , 同時轉動不銹鋼旋轉台 , 將菌液均勻塗抹於培養基上。

(四) 洛神花萃取液的花青素濃度與其抑菌圈直徑大小紀錄

洛神花萃取液名稱	花青素濃度(mg/100ml)	抑菌圈直徑(mm)
45 分鐘洛神花萃取液	21.27	200
60 分鐘洛神花萃取液	27.52	502
75 分鐘洛神花萃取液	27.55	510
60°C的洛神花萃取液	26.47	490
80°C的洛神花萃取液	25.73	463
100°C的洛神花萃取液	22.72	252

表：洛神花萃取液的花青素濃度(mg/100ml)與其抑菌圈直徑(mm)

## 五、結論與生活應用

結論：

### 一、洛神花萃取液中的花青素濃度

1. 隨著萃取時間上升，萃取出花青素濃度越高
2. 萃取使用的溶劑以乙醇萃取效果較佳，丙酮效果較差。雖然丙酮效果僅次於以乙醇作為溶劑萃取，但丙酮隨著濃度升高，萃取效果反而下降。
3. 60°C的萃取效果最好，75°C的萃取效果次之，100 °C的萃取效果則最差。

### 二、抑菌效果

花青素濃度越高，抑菌效果越好，抑菌圈直徑也越大。

未來應用：

透過本次的探究實驗我們可以得知花青素對於細菌具有抑制的效果。台東是盛產洛神花最大的都市，因此我們期待透過本次實驗找出能萃取出最高濃度花青素的洛神花萃取條件，而花青素可以抑制細菌，將洛神花添加於食品則可以達成抑制細菌生長的效果，且能延長室溫下的保存期限，是具有開發潛力的天然食品添加物。食品加工的主要目的之一為減少或消除病原性微生物，維持產品的機能活性與感官特性，同時延長產品的貨架期。

### 參考資料

張雅媛、李芳君、莊芳如 (2016)。當紅不讓 - 洛神葵花青素萃取及果凍製作。台中市：國立中興大學附屬臺中高級農業職業學校。

許馨云 (2013)。熱加工與高壓處理對莓類果汁加工安全性與花青素降解之研究。台北市：國立台灣大學食品科學研究所。

賴怡君 (2010)。洛神葵之應用。彰化縣：國立北港高級農工職業學校農場經營科。

林慧萱 (2007)。洛神花萃取物成份抗胃癌作用及分子機制之研究。台中市：中山醫學大學生化生物科技所。

高而仕 (2011)。超臨界二氧化碳萃取洛神花多酚類及其抗氧化活性之研究。彰化縣：美和科技大學美容系

葉品源、吳柏穎、李欣洋。洛神花的加工及顏色變化探討。台南市：國立台南高級海事水產職業學校水產食品科。

跟著鄭大師玩科學 (2015)。台北市。取自：

<http://www.masters.tw/67351/%E8%A6%8B%E9%BB%91%E5%B0%B1%E8%A3%9C>