

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 植物學科

052103

葉綠素酒精冷萃取法

學校名稱：國立彰化高級商業職業學校

作者： 職二 王奇隆 高二 王秉謙 高二 許丞蔚	指導老師： 施錫昌
---	------------------

關鍵詞：酒精冷萃取法、葉綠素、遮光

摘要

為何葉片顏色會有深有淺呢？為瞭解光照與葉片葉綠素含量的關係，利用自製比色計，分析葉綠素萃取液。本研究開發**酒精冷萃取法**，藉此取代所學的酒精熱萃取法可能造成葉綠素成分破壞進而影響分析結果。酒精冷萃取法還能處理大量樣本，並解決因榕樹葉片角質層較厚而不易萃取的問題。

結果顯示，光照強度會影響榕樹成熟葉之葉綠素含量，光照充足而**弱光時葉綠素含量會較高**。光照不足時，葉綠素含量則會先增再減；此變化係因海綿組織光照不足所致。**無光時，葉綠素含量也會先增再減**，甚至到35天時葉片黃化、落葉，落葉前測得葉綠素含量低至遮光前的22.59%。

另外經酒精冷萃取法萃取後的葉錠亦可進行光合作用產物—澱粉測試，實驗結果與酒精熱萃取法的結果相符。

壹、研究動機

校園中常常見到一些美化用的植株，如果仔細觀察，有時候會發現較下層（光照較不足的區域）的葉子比較綠，而葉片中的葉綠素也是綠色的，理論上色素含量越高，葉片越綠。當時很好奇為什麼會有這樣的結果？生物課本曾提到葉綠素的功能是進行光合作用產生葡萄糖，當時各組光合作用實驗時用酒精脫色所得的綠色液體也深淺不同。因此我們便猜測這些在暗處的葉子是不是為了能像亮處的葉片一樣獲得足以生存的養分，而必須有較多的葉綠素存在於這些葉片，提高生產效率？於是我們就著手進行了此研究。

貳、研究目的

以下為本研究之研究目的：

- 一、了解光照對葉片之葉綠素含量的影響。
- 二、擬訂酒精冷萃取法的標準操作程序，並與教科書中利用酒精熱處理法的實驗進行比較。
- 三、探討使用酒精冷萃取法脫色的葉錠，能否用於檢驗澱粉實驗。

參、研究設備及器材

為了瞭解光照對植物葉綠素濃度的影響，本研究以榕樹葉片為研究材料，觀察葉綠素溶出之情形。以下為本實驗需要用到的實驗器材：






表一 研究設備及器材

損耗材料			
物品	數量	物品	數量
酒精(95%)	適量	膠帶	一捲
鋁箔	適量	迴紋針	三盒

使用工具			
相機	一台	光度計	一組
燈泡(磨砂燈泡 60W/115V)	一個	燈泡座、電線、調光器	一組
複式顯微鏡	一台	刮鬍刀片(切片用)	適量
打洞器(取葉錠用)	數個	美工刀	數支
剪刀	一支	鉛筆(做記號用)	一支
天平	一台	紙箱	兩個
遮光布	一片	遮光用黑紗網(遮光率60%)	一片
燒杯(50ml、100ml、200ml)	各數個	試管	數支
橡皮塞	數個	試管架	一個
滴管	數支	錐形瓶	數個



圖一 透光度實驗的器材、設備及裝有冷萃取液之錐形瓶

自製比色計		
樣本瓶放入前	樣本瓶放入後	
		
樣本填充前、後以及放置後的照片		
裝樣本的錐形瓶和樣本瓶	裝入葉綠素酒精的樣本瓶	管道和樣本瓶
		

肆、研究流程及方法

一、榕樹葉片之葉綠素含量測定方法

(一) 酒精冷萃取法

為比較葉片的葉綠素濃度，並節省實驗操作的冗長步驟，更能一次處理大量樣品，我們採用不同於課本實驗以加熱酒精萃取葉綠素的過程，設計了一個直接浸泡葉錠的萃取方法，將葉錠置於酒精，並放在無光照條件下靜置(避免因加熱或光照而破壞葉綠素)，以此獲得葉綠素的萃取液。以下為酒精冷萃取法的標準操作程序：

1. 摘下葉片，清洗陰乾。
2. 以打洞機在葉脈的左右兩邊各打三個洞，取得「葉錠」(各取三個葉片樣品)。
3. 將用打洞機取得的「葉錠」分別投入裝有50ml酒精的錐形瓶。
4. 放於暗處靜置一週，避免光解。

(二) 酒精萃取液之透光度測定

以自製比色計測量溶液透光度，再以此求得相對濃度，測定方法如下：將酒精萃取液裝入樣本瓶內，再把樣本瓶置入儀器中，包上一層鋁箔，以隔絕外來光源。樣本瓶放入後，以遮光布阻隔光源(裡面還是有微量背景光 1Lux)。

由於考慮到燈泡耗損，還有微量背景光的影響，必須每測完一個樣本就以酒精校正，確保實驗準確性。校正時，把酒精的透光度做為基準值，使光度計上的數值為 100Lux。下圖為自製比色計操作時之狀況，紙箱為比色計本體。以此測得葉綠素酒精溶液透光度對酒精的透光度。



圖二 自製比色計之實際操作狀況

本研究以立意取樣法採集高 95cm 榕樹之成熟葉，再以打洞機取得 500 片葉錠，以酒精冷萃法，得到一瓶高濃度的葉綠素酒精溶液，並以此高濃度的樣本做為基準，分別測量 100%、80%、60%、40%、20%、0%溶液的透光度(0%表示酒精中沒有葉綠素)，即可以葉綠素溶液的透光度對於酒精的透光度來取得其相對濃度。

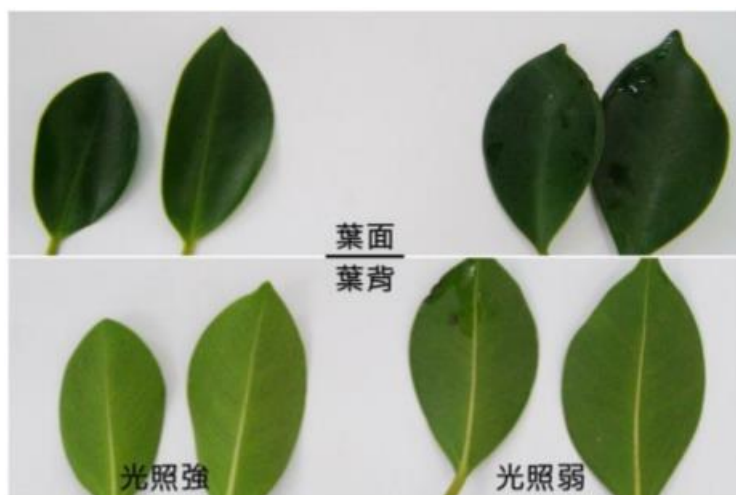
伍、研究結果與討論

一、榕樹葉片的觀察

我們觀察到一棵榕樹的葉片會有不同的顏色，在光照充足的樹冠層，淺色葉片(幼葉)集中於枝條的前端，而深色的葉片(成熟葉)靠近枝條的基部；而在光照較弱的內側區域幾乎沒發現淺色葉片，幾乎是深色的葉片(成熟葉)。

再比較成熟葉的差異，葉面並無明顯差異，但觀察葉背光照強的顏色會較光照弱的淺。

另外，葉片的生長密度也有明顯差異，在光照充足的樹冠層葉片數量明顯多於光照較弱的內側區域，觀察結果如下所示：



圖三 榕樹葉片成熟葉之差異



圖四 榕樹枝條在光照強弱處之差異

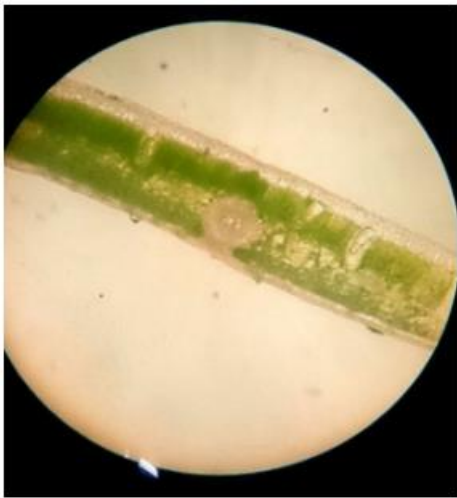
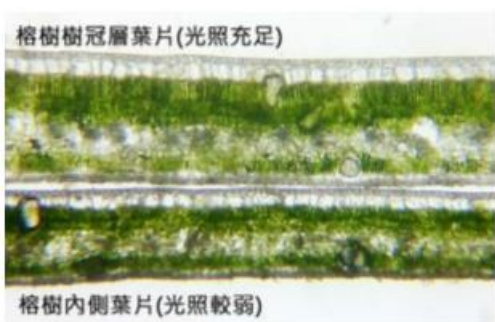
	成熟葉數量 (片)	成熟葉平均厚度 (mm)	幼葉數量 (片)	幼葉平均厚度 (mm)	枝條 分枝數	果實數量 (顆)
光照強	67	0.396	86	0.318	12	6
光照弱	25	0.261	0	0	6	0

表二 光照強度對榕樹樹葉生長情形之比較

由上所述，光照強的區域在葉片數量、葉片厚度、枝條分支、果實數量，都優於光照弱的內側區域。在一年級的自然課學過，「葉綠素」是做為光合作用的重要角色。有鑑於此，本研究遂以成熟葉為觀察對象，比較光照強弱對葉綠素濃度的影響。

二、榕樹葉片之切片觀察

為觀察光照強弱對榕樹葉片中葉綠素的影響，故進行榕樹葉片的顯微切片觀察，切片觀察結果如下：

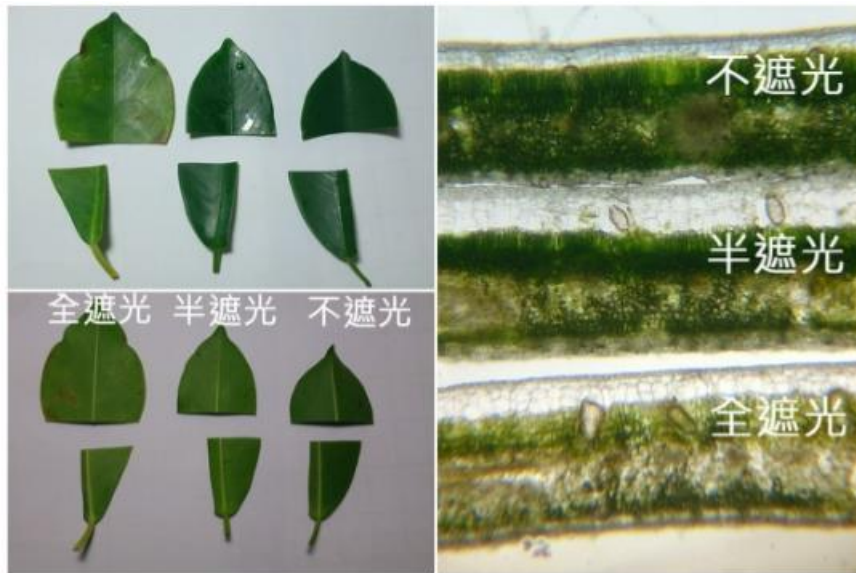
拍攝部位	照片	說明
橫切面 100x		<ol style="list-style-type: none"> 1. 外層有透明的表皮組織，內有具葉綠體的葉肉組織(呈綠色)，中間還有維管束(葉脈)。葉綠素集中於葉肉組織。 2. 葉肉組織分為上層的柵狀組織與下層的海綿組織。 3. 可以發現，葉綠素以上層的柵狀組織濃度較高。葉片外層的角質層也較厚，以至於在使用教科書內所述之酒精加熱萃取法不容易進行脫色處理。
榕樹樹冠層與內側葉片橫切面比較 80x		<ol style="list-style-type: none"> 1. 樹冠層生長的葉片較厚，葉肉組織的顏色較淺。 2. 榕樹內側生長的葉片較薄，葉肉組織的顏色較深。

表三 榕樹葉片橫切面構造說

	葉面顏色	葉背顏色	柵狀組織	海綿組織
不遮光(榕樹內側)	深	深	深	深
半遮光(42天)	深	淺	深	淺*
全遮光(35天)	淺	淺	淺*	淺*

*: 葉肉細胞中的葉綠素含量低於不遮光的葉肉細胞

表四 葉片切片結果說明



圖五 不同光照強度之葉片切片(80X)

由切片結果可知，葉面的顏色與柵狀組織之葉綠素濃度有關，葉背顏色與海綿組織之葉綠素濃度有關。

從全遮光的切片結果，可推論長期遮光會讓葉綠素濃度下降。而由半遮光的切片結果可推論，葉背的海綿組織因為光照不足也同樣出現葉綠素濃度較低的情形。而葉面因光照較充足而仍維持高濃度的葉綠素。

三、葉綠素從葉錠中溶出的情形

我們使用打洞機直接在榕樹葉片上打出一片一片的葉錠，除了用來計算樣品的數量，更以此增加與酒精的接觸面積，提高萃取的效率。

下表是葉綠素從葉錠中溶出的情形，葉綠素的濃度越高，顏色越深。此現象可由連續稀釋法用的高濃度葉綠素酒精溶液與其他萃取溶液的比較中得知。

樣品	實際狀況		說明
	浸泡第1天	浸泡第7天	
遮光組 (遮光12天) 96片葉錠溶於 50ml 酒精			遮光組、無遮光組以及作為標準濃度樣品的葉綠素萃取結果。第一天：一開始放入時，酒精是無色透明的，且葉錠是翠綠色的。第七天：葉錠浸泡一周後，葉錠由綠色變為黃褐色；酒精則由無色變為翠綠色。其中濃度較高的組別，萃取出的葉綠素濃度也較高。
無遮光組 96片葉錠 溶於50ml酒精			
相對濃度之標準品 500片葉錠溶於50ml酒精			

表五 酒精冷萃取法前後比較

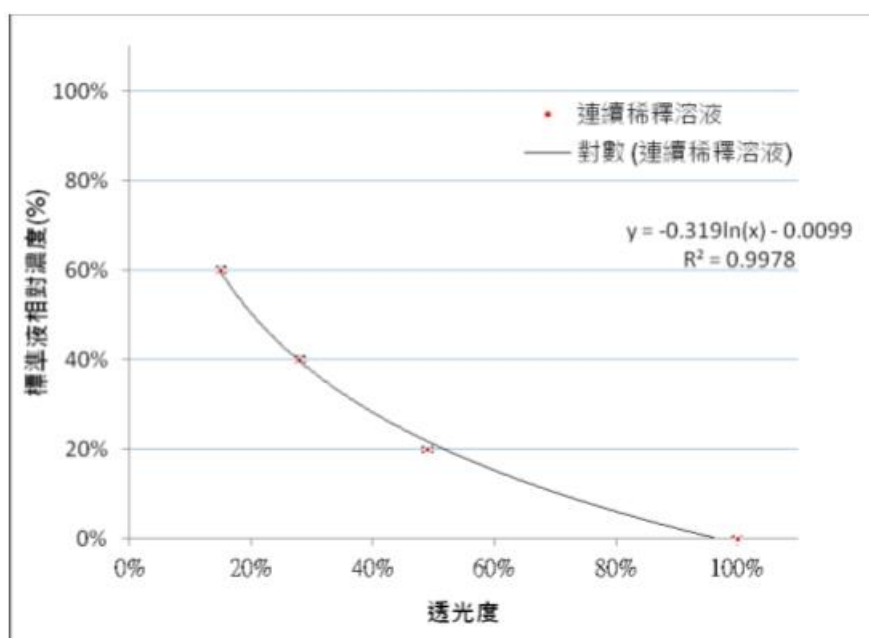
實驗心得小結論：實驗至此我們發現，葉綠素濃度越高，顏色越深。另外，由於萃取過之錠呈黃褐色，與課本實驗之結果一致，故判斷也可以此方式進行課本中加熱萃取法之葉片脫色。

四、連續稀釋溶液的透光度測量結果：

根據以上結果，**葉綠素濃度越高，溶液顏色越深**。一般而言，溶液顏色越深，透光度越低。我們將溶液濃度與酒精的透光度的關係製成表格，並求出檢量線，進一步了解二者間的函數對應關係，實驗結果如下。另外，由於光度計在量測高濃度萃取液（相對濃度 100%、80%）時，量測誤差很大，因此取相對濃度 0%~60% 的數據，以求得檢量線。

連續稀釋溶液的相對濃度（溶液濃度100%=500片葉錠(4.1g)+40g酒精)	0%	20%	40%	60%	80%	100%
透光度平均值 (100%=酒精的透光度)	28%	49%	28%	15%	14%	9%

表六 連續稀釋溶液的相對濃度



圖六 連續稀釋溶液與透光度之關係(檢量線)

五、光照強弱對葉綠素濃度的影響：

將測定所得之酒精萃取液樣本透光度，以檢量線計算後得到的相對濃度如下表所示。研究結果顯示，遮光時間會影響葉綠素的濃度，且在 12 天內，隨著遮光時間的增加，葉片葉綠素含量也會逐漸增加。

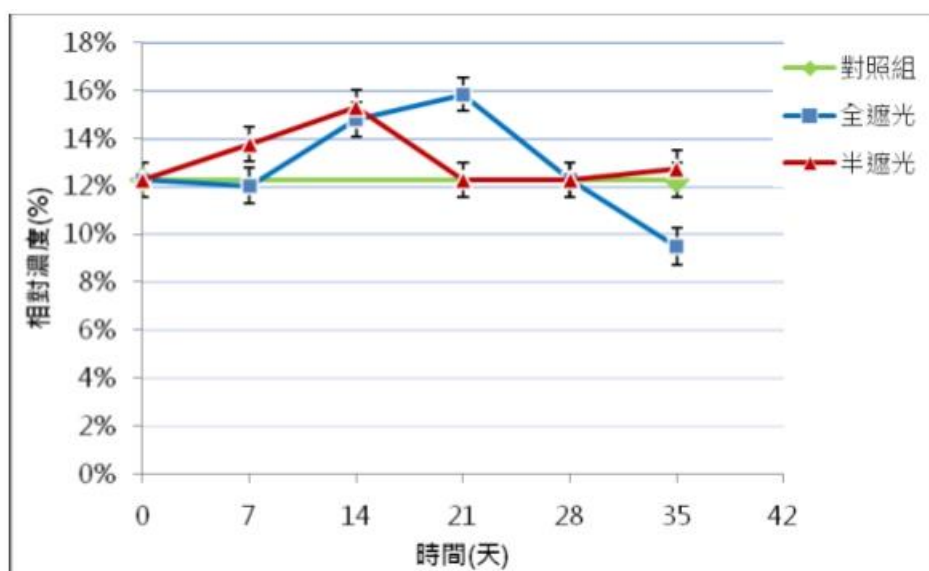
樣品	透光度	溶液的相對濃度	說明
未包鋁箔的葉錠96片(0.9g) + 酒精50ml (40g)	47.5%	22.76%	遮光時間越長，葉片葉綠素含量越高。
包5天鋁箔的葉錠96片(0.9g) +酒精50ml (40g)	46.0%	23.78%	
包12天鋁箔的葉錠96片(0.9g) +酒精50ml (40g)	43.0%	25.93%	

表七 樣本透光度及的濃度結果

上述這個 12 天的研究結果與我從前的觀察經驗並不相符，以前曾觀察到長期遮光的葉片最後會黃化(葉綠素變少)。因此我增加遮光時間，進行更長時間的觀察，並且增加半遮光的實驗組(光照強度約為榕樹內側的一半)，藉以觀察微弱光線下葉綠素含量的變化，所得到的觀察結果如下：

時間	全遮光		半遮光		對照組(無遮光)		說明
	相對濃度 (%)	濃度變化 (相較於0天的變化)	相對濃度 (%)	濃度變化 (相較於0天的變化)	相對濃度 (%)	濃度變化 (相較於0天的變化)	
0天	12.26	0.00%	12.26	0.00%	12.26	0.00%	1. 全遮光與半遮光的組別，其葉綠素含量隨會遮光時間而變化，會先增加再減少。 2. 無遮光的葉片作為對照組則無變化。
7天	12.02	-1.96%	13.75	12.15%	-	-	
14天	14.78	20.55%	15.31	24.88%	-	-	
21天	15.84	29.20%	12.26	0.00%	-	-	
28天	12.26	0.00%	12.26	0.00%	-	-	
35天	9.49	-22.59%	12.75	4.00%	12.26	0.00%	

表八 遮光時間對葉綠素相對濃度的影響



圖七 遮光時間對葉綠素相對濃度的影響

實驗結果顯示，全遮光組別的榕樹葉綠素濃度在21天前會逐漸增加，當時的濃度較遮光前高出29.2%，而21天後則會逐漸減少，甚至在實驗進行至35天後，全遮光的葉片開始黃化甚至落葉，落葉前觀察到的葉綠素濃度較遮光前低22.59%。判斷全遮光的條件最終會讓葉片無法維持正常運作而落葉。配合35天的全遮光葉片顯微切片結果顯示，柵狀組織與海綿組織葉綠素含量都明顯減少(圖五)。

而半遮光組別的葉綠素濃度也有先增加而後減少的趨勢，但葉綠素濃度不會持續下降，而是維持在一低限。配合42天的半遮光葉片顯微切片結果(圖五)，其海綿組織之葉綠素含量明顯較少，而柵狀組織則無明顯差異。所以推論在半遮光狀態下葉綠素含量先增加而後減少到一低限的趨勢，主要來自於海綿組織內葉綠素含量的變化。

實驗心得小結論：綜合以上實驗結果，可以發現光照強度會影響榕樹葉片的葉綠素含量。觀察榕樹內側的成熟葉，當光照較弱，而葉片尚未凋亡時，葉綠素含量會增加(表三、圖六)。以至於在外觀上會較光照充足的樹冠層的成熟葉顏色要深。當以鋁箔包覆整片葉片，光照嚴重不足時，榕樹葉片中的葉綠素含量，在初期會增加至遮光前的 29.2%，但直至黃化落葉前會持續減少(圖七)。而觀察半遮光的葉片切片，靠近葉面的柵狀組織，葉綠素含量與自然光照時並無明顯差異，但靠近葉背的海綿組織則因光照不足而有明顯變化(圖六)。配合半遮光狀態下葉綠素濃度會先增加而後減少到一低限的變化，可以推論葉綠素含量的變化主要來自光照不足的海綿組織(圖七)。

六、葉錠的沉澱情形：

為了檢驗萃取完的葉錠可否用來檢驗澱粉，故先進行葉錠漂洗。漂洗時，發現有些葉錠會漂浮在水上。後來發現有些葉子慢慢沉下去，於是大家一起做了這個實驗，以了解葉錠與水的密度關係。

由下表可知，有些葉錠較慢下沉，所以可以知道葉錠的密度略大於水。(葉錠下沉代表葉錠的密度大於水，而移動速度慢代表葉錠的密度相近於水)

時間	照片	說明
實驗剛開始		剛搖晃後有許多葉錠漂浮著。
11分鐘後		葉錠慢慢沉澱。
27分鐘後		到最後，只有少數葉錠漂浮。漂浮的葉錠擠壓後發現會下沉，判斷是水慢慢進入葉錠中的氣室所致。

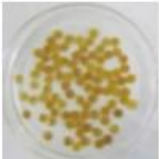
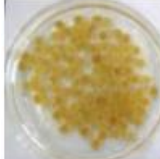
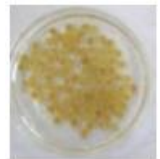
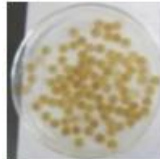










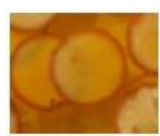





表九 葉錠的沉澱情形 (內含 500 片葉錠的水)

七、測試脫色後的葉錠有無澱粉

為了解本研究萃取後的葉錠是否能用來檢驗澱粉，我們將萃取葉綠素後的葉錠滴上碘液，進行澱粉含量檢測，以下為本實驗的操作方法：

1. 漂洗已析出葉綠素的葉錠，並放入培養皿。
2. 滴入碘液並隔一段時間觀察並記錄顏色變化。
3. 由碘液顏色變化比較葉錠中的澱粉濃度。

研究結果如下表所示，可以發現遮光時間越長，碘液反應越不明顯，與教科書內的實驗結果一致。若使用榕樹葉錠滴入碘液後之觀察建議時間為 30 分鐘。

時間	遮光 (5天組)	無遮光 (5天組對照)	遮光 (12天組)	無遮光 (12天組對照)	說明
實驗 開始					將葉錠置於培養皿內，再滴入碘液。
22 分					無遮光的組別，葉錠邊緣開始變色。
30 分					無遮光的組別，葉錠邊緣變色明顯。
42 分					遮光5天的葉錠邊緣出現微量澱粉反應，遮光12天的葉錠邊緣則無澱粉反應。
62 分					無遮光的組別明顯出現澱粉反應，與教科書內容一致。

表十 榕樹葉錠澱粉含量檢驗結果

陸、結論

本研究得到以下結論：

- 一、光照強度會影響榕樹成熟葉之葉綠素含量，弱光時葉綠素含量會增加。
- 二、光照不足時，榕樹成熟葉之葉綠素含量初期會逐漸增加，會高出正常光照時的24.88%，但其後會逐漸減少。而葉綠素含量的變化主要來自光照不足的海綿組織。
- 三、無光照時，榕樹成熟葉之葉綠素含量初期也會逐漸增加，至多高出正常光照時的29.2%，隔絕光照21天後榕樹成熟葉之葉綠素濃度會逐漸減少，最終黃化、落葉，落葉前測得之葉綠素含量低至遮光前的22.59%。不同光照條件下榕樹成熟葉的葉綠素含量變化說明，如表十一所示。
- 四、酒精冷萃取法可以同時處理大量樣品，也可以用於酒精熱萃取法較難處理之樣品，雖然萃取前後時間較酒精熱萃取法要長，但實際操作時間比熱萃取法要短得多。酒精冷萃取法只要將取得的葉錠直接浸泡於酒精即可，酒精熱萃取法在面對難處理的樣品還需要冗長的加熱時間，加熱過程中還得注意酒精快速蒸發的問題。
- 五、酒精冷萃取法與教科書內的酒精加熱萃取法同樣可獲得葉綠素萃取液，且經酒精冷萃取法脫色的葉錠同樣可作為檢驗光合作用產物(澱粉)的實驗材料，二者澱粉檢驗結果一致。

條件	光照*	說明
自然光照強 (榕樹樹冠層)	21633 LUX	光線充足時，榕樹葉片在葉片數量、葉片厚度、枝條分支、果實數量皆優於榕樹內側。
自然光照弱 (榕樹內側)	4813 LUX	長期弱光時，觀察榕樹葉片之切片，葉肉細胞較小，葉綠素含量會較光線充足者高，所以外觀看起來較深綠。
半遮光	2087 LUX	光照不足時，葉片中的葉綠素含量會先增加而減少到一低限，此趨勢由切片結果可推論主要來自於海綿組織的葉綠素變化。
全遮光	0 LUX	無光時，葉片中的葉綠素含量初期會上升，接著會逐漸減少，直至落葉凋亡。

*使用光度計取得之平均照度

表十一 不同光照條件下榕樹成熟葉的葉綠素含量變化說明

本實驗使用的酒精冷萃取法與課本提供的酒精熱萃取法有許多差異，兩者各有利弊，下表為酒精冷萃取法的標準操作步驟與酒精熱萃取法的優缺點比較。

	酒精冷萃取法	酒精熱萃取法
步驟	<ol style="list-style-type: none"> 1. 進行實驗前一周左右在植株上選擇數片葉片(實驗組)，以鋁箔紙完全包覆，並以迴紋針固定。 2. 將葉片摘下，同時摘取等量未遮光的葉片做為對照組。 3. 以打洞機在葉脈的左右兩邊各打三個洞，獲得圓形葉錠。 4. 將圓形葉錠投入錐形瓶中，並加入50ml酒精，蓋上橡皮塞，靜置一周。 5. 碘液檢驗時，取出葉片，再以水漂洗。 6. 將碘液滴在葉片上，觀察呈色反應。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 進行實驗前一周在植株上選擇一片葉片，以鋁箔包住葉片的中間，並以迴紋針固定。 2. 將處理過的葉片摘下，除去上面的鋁箔紙，放入裝有熱水的燒杯中加熱。數分鐘後取出葉片，改放入裝有酒精的100ml燒杯中。 3. 再把100ml燒杯放入250ml燒杯內，隔水加熱。 4. 待葉片脫色，將葉片取出，改放到燒杯內的熱水漂洗。 5. 取出葉片，平放在培養皿上，將碘液滴在葉片上，檢視是否有澱粉反應。
優點	<ol style="list-style-type: none"> 1. 可以用來處理角質層較厚，較難脫色的葉片(例如：榕樹)。 2. 操作時間短，一次可處理大量樣品，增加實驗效率。 3. 由文獻資料可知，使用酒精冷萃取法較不會破壞酒精中的葉綠素，葉綠素溶液也可以拿去做其他實驗，較不會浪費樣本。 4. 整個實驗過程不會用到酒精燈，減少能源損耗。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 若僅處理少量，容易處理之樣品，實驗總時間較短。
缺點	<ol style="list-style-type: none"> 1. 靜置萃取時間至少一周，實驗總時間較長。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 需使用酒精燈，增加能源損耗。 2. 不易處理角質層較厚的葉片，例如：榕樹葉片處理時間很長，以葉錠加熱萃取時間至少2小時，且過程中需要不斷添加酒精，2小時之酒精蒸發量為120ml。

表十二 酒精冷萃取法與課本實驗之比較

柒、參考資料

- 一、 田中修、吳佩俞，(2009)，不可思議的葉子。
- 二、 郭重吉，(2009)，國民中學自然與生活科技 第一冊 1上。
- 三、 黃志能，(2009)，葉綠素在乙醇溶液中的顏色穩定性之研究，臺灣大學食品科技研究所學位論文，未出版，台北市。
<http://ppt.cc/8HfC>
- 四、 快樂小藥師，(2009)，關於葉綠素及葉黃素還有類胡蘿蔔素
<http://ppt.cc/L3MY>
- 五、 張秉茜、顏韶緯，(2010)交錯的深淺色彩－遮光對光合作用產物儲存位置之影響。
<http://science.ntsec.edu.tw/Science-Content.aspx?sid=5463>

【評語】 052103

1. 以榕樹為材料，具鄉土相關性。
2. 本研究的實驗方式簡易，偏向單純性之方法測試，較缺重要性之發現。
3. 實驗偏重觀察，較缺創意，結論大都為常識範圍，無突破性論點。
4. 應進行與熱萃取法之結果有對應比較。
5. 實驗記錄不夠周詳，文獻收集亦待加強。

摘要

為何葉片顏色會有深有淺呢？為瞭解光照與葉片葉綠素含量的關係，利用自製比色計，分析葉綠素萃取液。本研究開發酒精冷萃取法，藉此取代所學的酒熱萃取法可能造成葉綠素成分破壞進而影響分析結果。酒精冷萃取法還能處理大量樣本，並解決因榕樹葉片角質層較厚而不易萃取的問題。

結果顯示，光照強度會影響榕樹成熟葉之葉綠素含量，光照充足而弱光時葉綠素含量會較高。光照不足時，葉綠素含量則會先增再減；此變化係因海綿組織光照不足所致。無光時，葉綠素含量也會先增再減，甚至到35天時葉片黃化、落葉，落葉前測得葉綠素含量低至遮光前的22.59%。

另外經酒精冷萃取法萃取後的葉錠亦可進行光合作用產物—澱粉測試，實驗結果與酒精熱萃取法的結果相符。

壹、研究動機

校園中常常見到一些美化用的植株，如果仔細觀察，有時候會發現較下層（光照較不足的區域）的葉子比較綠，而葉片中的葉綠素也是綠色的，理論上色素含量越高，葉片越綠。當時很好奇為什麼會有這樣的結果？生物課本曾提到葉綠素的功能是進行光合作用產生葡萄糖，當時各組光合作用實驗時用酒精脫色所得的綠色液體也深淺不同。因此我們便猜測這些在暗處的葉子是不是為了能像亮處的葉片一樣獲得足以生存的養分，而必須有較多的葉綠素存在於這些葉片，提高生產效率？於是我們就著手進行了此研究。

貳、研究目的

以下為本研究之研究目的：

- 一、了解光照對葉片之葉綠素含量的影響。
- 二、擬訂酒精冷萃取法的標準操作程序，並與教科書中利用酒精熱處理法的實驗進行比較。
- 三、探討使用酒精冷萃取法脫色的葉錠，能否用於檢驗澱粉實驗。

參、研究器材

為了瞭解光照對植物葉綠素濃度的影響，本研究以榕樹葉片為研究材料，觀察葉綠素溶出之情形。以下為本實驗需要用到的實驗器材：

表一 研究設備及器材

損耗材料			
物品	數量	物品	數量
酒精(95%)	適量	膠帶	一卷
鋁箔	適量	迴紋針	三盒
使用工具			
相機	一台	光度計	一組
燈泡(磨砂燈泡 60W/115V)	一個	燈泡座、電線、調光器	一組
複式顯微鏡	一台	刮鬍刀片(切片用)	適量
打洞器(取葉錠用)	數個	美工刀	數支
剪刀	一支	鉛筆(做記號用)	一支
天平	一台	紙箱	兩個
遮光布	一片	遮光用黑紗網(遮光率60%)	一片
燒杯(50ml、100ml、200ml)	各數個	試管	數支
橡皮塞	數個	試管架	一個
滴管	數支	錐形瓶	數個



肆、研究流程及方法

一、榕樹葉片之葉綠素含量測定方法

(一) 酒精冷萃取法

為比較葉片的葉綠素濃度，並節省實驗操作的冗長步驟，更能一次處理大量樣品，我採用不同於課本實驗以加熱酒精萃取葉綠素的過程，設計了一個直接浸泡葉錠的萃取方法，將葉錠置於酒精，並放在無光照條件下靜置(避免因加熱或光照而破壞葉綠素)，以此獲得葉綠素的萃取液。以下為酒精冷萃取法的標準操作程序：

1. 摘下葉片，清洗陰乾。
2. 以打洞機在葉脈的左右兩邊各打三個洞，取得「葉錠」(各取三個葉片樣品)。
3. 將用打洞機取得的「葉錠」分別投入裝有50ml酒精的錐形瓶。
4. 放於暗處靜置一週，避免光解。

(二) 酒精萃取液之透光度測定

以自製比色計測量溶液透光度，再以此求得相對濃度，測定方法如下：將酒精萃取液裝入樣本瓶內，再把樣本瓶置入儀器中，包上一層鋁箔，以隔絕外來光源。樣本瓶放入後，以遮光布阻隔光源(裡面還是有微量背景光 1Lux)。

由於考慮到燈泡耗損，還有微量背景光的影響，必須每測完一個樣本就以酒精校正，確保實驗準確性。校正時，把酒精的透光度做為基準值，使光度計上的數值為100Lux。下圖為自製比色計操作時之狀況，紙箱為比色計本體。以此測得葉綠素酒精溶液透光度對酒精的透光度。



葉綠素冷翠取法

伍、實驗結果與討論

一、榕樹葉片的觀察

我們觀察到一棵榕樹的葉片會有不同的顏色，在光照充足的樹冠層，淺色葉片(幼葉)集中於枝條的前端，而深色的葉片(成熟葉)靠近枝條的基部；而在光照較弱的內側區域幾乎沒發現淺色葉片，幾乎是深色的葉片(成熟葉)。

再比較成熟葉的差異，葉面並無明顯差異，但觀察葉背光照強的顏色會較光照弱的淺。

另外，葉片的生長密度也有明顯差異，在光照充足的樹冠層葉片數量明顯多於光照較弱的內側區域，觀察結果如下所示：



榕樹枝條在光照強弱處之差異

	成熟葉數量 (片)	成熟葉平均厚度 (mm)	幼葉數量 (片)	幼葉平均厚度 (mm)	枝條 分枝數	果實數量 (顆)
光照強	67	0.396	86	0.318	12	6
光照弱	25	0.261	0	0	6	0

由上所述，光照強的區域在葉片數量、葉片厚度、枝條分支、果實數量，都優於光照弱的內側區域。在一年級的自然課學過，「葉綠素」是做為光合作用的重要角色。有鑑於此，本研究遂以成熟葉為觀察對象，比較光照強弱對葉綠素濃度的影響。

二、榕樹葉片之切片觀察

為觀察光照強弱對榕樹葉片中葉綠素的影響，故進行榕樹葉片的顯微切片觀察，切片觀察結果如下：

拍攝部位	照片	說明
橫切面 100x		<ol style="list-style-type: none"> 外層有透明的表皮組織，內有具葉綠體的葉肉組織(呈綠色)，中間還有維管束(葉脈)。葉綠素集中於葉肉組織。 葉肉組織分為上層的柵狀組織與下層的海綿組織。 可以發現，葉綠素以上層的柵狀組織濃度較高。葉片外層的角質層也較厚，以至於在使用教科書內所述之酒精加熱萃取法不容易進行脫色處理。
榕樹樹冠層與內側葉片橫切面比較 80x	<p>榕樹樹冠層葉片(光照充足)</p> <p>榕樹內側葉片(光照較弱)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 樹冠層生長的葉片較厚，葉肉組織的顏色較淺。 榕樹內側生長的葉片較薄，葉肉組織的顏色較深。

	葉面顏色	葉背顏色	柵狀組織	海綿組織
不遮光(榕樹內側)	深	深	深	深
半遮光(42天)	深	淺	深	淺*
全遮光(35天)	淺	淺	淺*	淺*

由切片結果可知，葉面的顏色與柵狀組織之葉綠素濃度有關，葉背顏色與海綿組織之葉綠素濃度有關。從全遮光的切片結果，可推論長期遮光會讓葉綠素濃度下降。而由半遮光的切片結果可推論，葉背的海綿組織因為光照不足也同樣出現葉綠素濃度較低的情形。而葉面因光照較充足而仍維持高濃度的葉綠素。

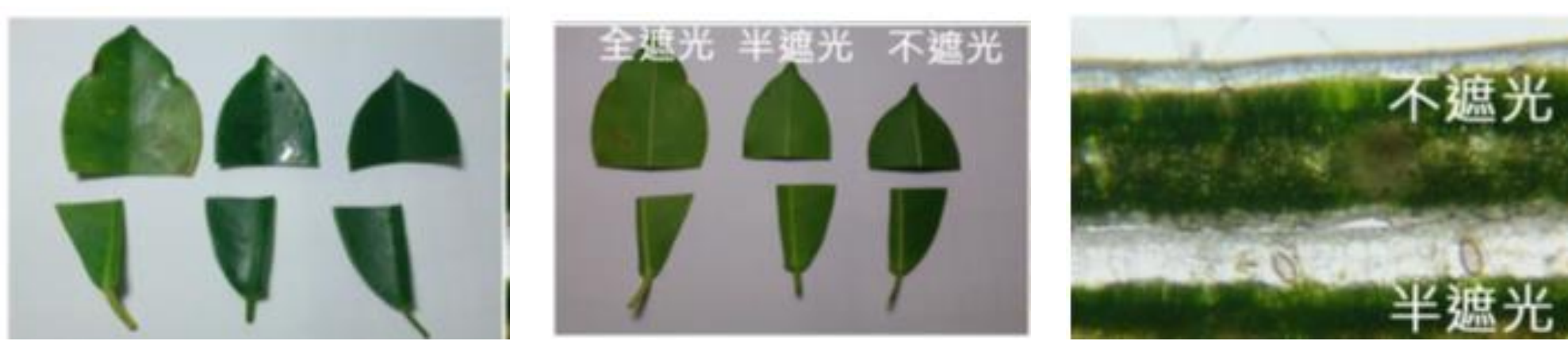
三、葉綠素從葉錠中溶出的情形

我使用打洞機直接在榕樹葉片上打出一片一片的葉錠，除了用來計算樣品的數量，更以此增加與酒精的接觸面積，提高萃取的效率。

下表是葉綠素從葉錠中溶出的情形，葉綠素的濃度越高，顏色越深。此現象可由連續稀釋法用的高濃度葉綠素酒精溶液與其他萃取溶液的比較中得知。

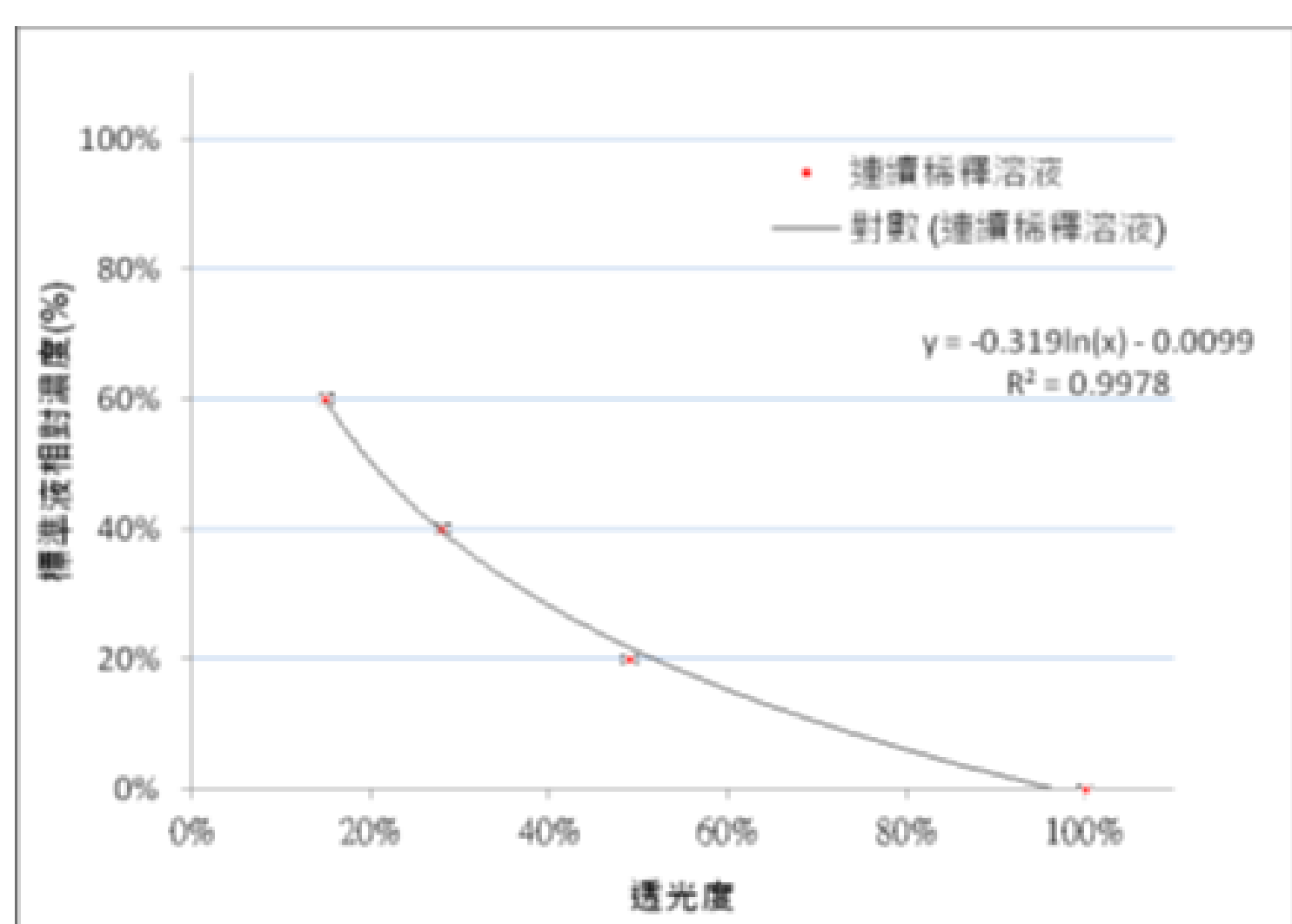
樣品	實際狀況		說明
	浸泡第1天	浸泡第7天	
遮光組(遮光12天) 96片葉錠溶於50ml酒精			遮光組、無遮光組以及作為標準濃度樣品的葉綠素萃取結果。 第一天：一開始放入時，酒精是無色透明的，且葉錠是翠綠色的。 第七天：葉錠浸泡一周後，葉錠由綠色變為黃褐色；酒精則由無色變為翠綠色。其中濃度較高的組別，萃取出的葉綠素濃度也較高。
無遮光組 96片葉錠溶於50ml酒精			
相對濃度之標準品 500片葉錠溶於50ml酒精			

實驗心得小結論：實驗至此我們發現，葉綠素濃度越高，顏色越深。另外，由於萃取過之錠呈黃褐色，與課本實驗之結果一致，故判斷也可以此方式進行課本中加熱萃取法之葉片脫色。



四、連續稀釋溶液的透光度測量結果：

根據以上結果，葉綠素濃度越高，溶液顏色越深。一般而言，溶液顏色越深，透光度越低。我將溶液濃度與酒精的透光度的關係製成表格，並求出檢量線，進一步了解二者間的函數對應關係，實驗結果如下。另外，由於光度計在量測高濃度萃取液(相對濃度100%、80%)時，量測誤差很大，因此取相對濃度0%~60%的數據，以求得檢量線。



連續稀釋溶液的相對濃度(溶液濃度100%=500片葉錠(4.1g)+40g酒精)	0%	20%	40%	60%	80%	100%
透光度平均值(100%=酒精的透光度)	28%	49%	28%	15%	14%	9%



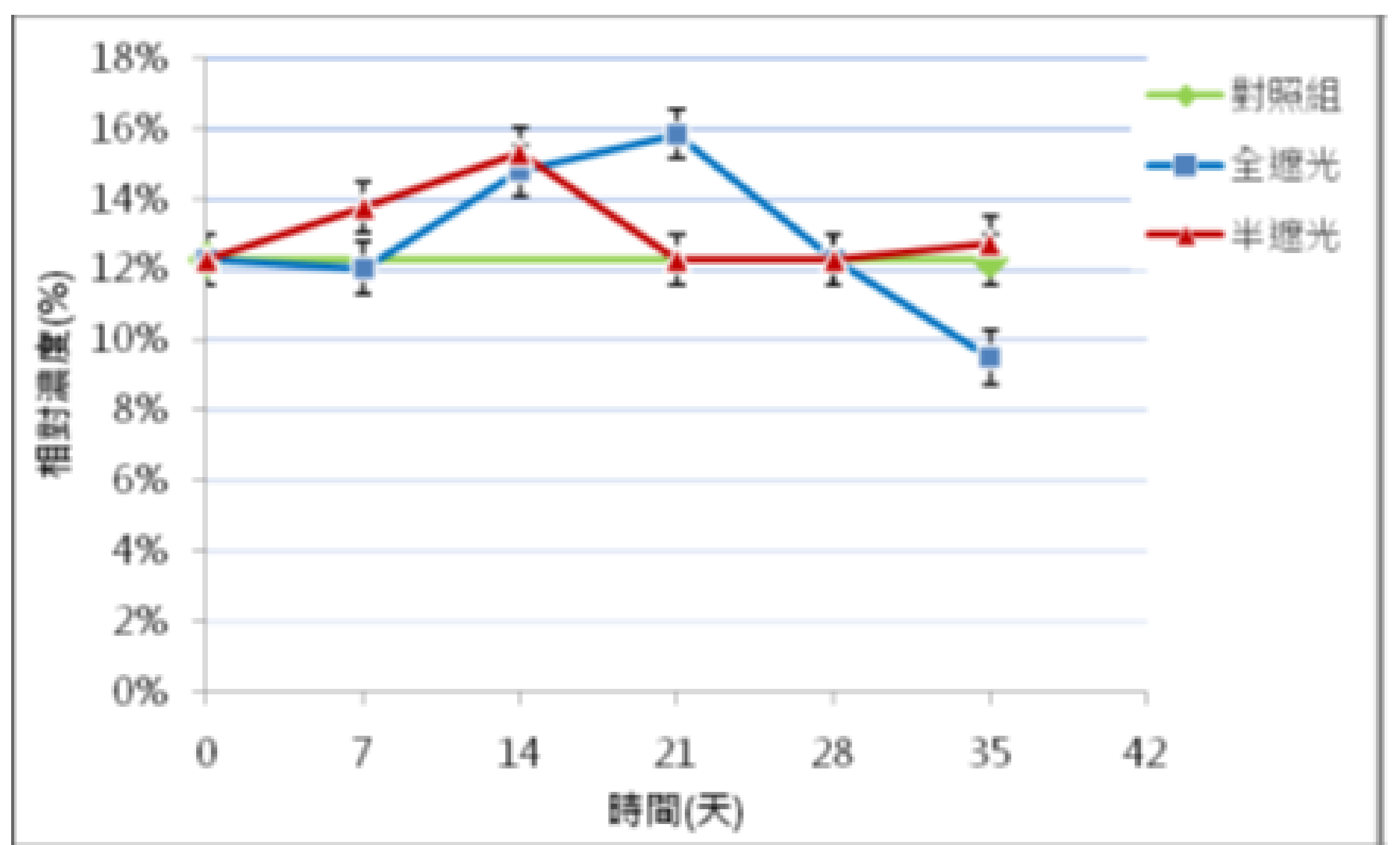
五、光照強弱對葉綠素濃度的影響：

將測定所得之酒精萃取液樣本透光度，以檢量線計算後得到的相對濃度如下表所示。研究結果顯示，遮光

時間會影響葉綠素的濃度，且在12天內，隨著遮光時間的增加，葉片葉綠素含量也會逐漸增加。

樣品	透光度	溶液的相對濃度	說明
未包鋁箔的葉錠96片(0.9g)+酒精50ml(40g)	47.5%	22.76%	遮光時間越長，葉片葉綠素含量越高。
包5天鋁箔的葉錠96片(0.9g)+酒精50ml(40g)	46.0%	23.78%	
包12天鋁箔的葉錠96片(0.9g)+酒精50ml(40g)	43.0%	25.93%	




時間	全遮光		半遮光		對照組(無遮光)		說明
	相對濃度(%)	濃度變化(相較於0天的變化)	相對濃度(%)	濃度變化(相較於0天的變化)	相對濃度(%)	濃度變化(相較於0天的變化)	
0天	12.26	0.00%	12.26	0.00%	12.26	0.00%	1.全遮光與半遮光的組別，其葉綠素含量隨遮光時間而變化，會先增加再減少。 2.無遮光的葉片作為對照組則無變化。
7天	12.02	-1.96%	13.75	12.15%	-	-	
14天	14.78	20.55%	15.31	24.88%	-	-	
21天	15.84	29.20%	12.26	0.00%	-	-	
28天	12.26	0.00%	12.26	0.00%	-	-	
35天	9.49	-22.59%	12.75	4.00%	12.26	0.00%	



六、葉錠的沉澱情形：

為了檢驗萃取完的葉錠可否用來檢驗澱粉，故先進行葉錠漂洗。漂洗時，發現有些葉錠會漂浮在水上。後來發現有些葉子慢慢沉下去，於是大家一起做了這個實驗，以了解葉錠與水的密度關係。

由下表可知，有些葉錠較慢下沉，所以可以知道葉錠的密度略大於水。（葉錠下沉代表葉錠的密度大於水，而移動速度慢代表葉錠的密度相近於水）

時間	照片	說明
實驗剛開始		剛搖晃後有許多葉錠漂浮著。
11分鐘後		葉錠慢慢沉澱。
27分鐘後		到最後，只有少數葉錠漂浮。漂浮的葉錠擠壓後發現會下沉，判斷是水慢慢進入葉錠中的氣室所致。

陸、結論

本研究得到以下結論：

- 光照強度會影響榕樹成熟葉之葉綠素含量，弱光時葉綠素含量會增加。
- 光照不足時，榕樹成熟葉之葉綠素含量初期會逐漸增加，會高出正常光照時的24.88%，但其後會逐漸減少。而葉綠素含量的變化主要來自光照不足的海綿組織。
- 無光照時，榕樹成熟葉之葉綠素含量初期也會逐漸增加，至多高出正常光照時的29.2%，隔絕光照21天後榕樹成熟葉之葉綠素濃度會逐漸減少，最終黃化、落葉，落葉前測得之葉綠素含量低至遮光前的22.59%。不同光照條件下榕樹成熟葉的葉綠素含量變化說明，如表十所示。
- 酒精冷萃取法可以同時處理大量樣品，也可以用於酒精熱萃取法較難處理之樣品，雖然萃取前後時間較酒精熱萃取法要長，但實際操作時間比熱萃取法要短得多。酒精冷萃取法只要將取得的葉錠直接浸泡於酒精即可，酒精熱萃取法在面對難處理的樣品還需要冗長的加熱時間，加熱過程中還得注意酒精快速蒸發的問題。
- 酒精冷萃取法與教科書內的酒精加熱萃取法同樣可獲得葉綠素萃取液，且經酒精冷萃取法脫色的葉錠同樣可作為檢驗光合作用產物(澱粉)的實驗材料，二者澱粉檢驗結果一致。

條件	光照*	說明
自然光照強(榕樹樹冠層)	21633 LUX	光線充足時，榕樹葉片在葉片數量、葉片厚度、枝條分支、果實數量皆優於榕樹內側。
自然光照弱(榕樹內側)	4813 LUX	長期弱光時，觀察榕樹葉片之切片，葉肉細胞較小，葉綠素含量會較光線充足者高，所以外觀看起來較深綠。
半遮光	2087 LUX	光照不足時，葉片中的葉綠素含量會先增加而減少到一低限，此趨勢由切片結果可推論主要來自於海綿組織的葉綠素變化。
全遮光	0 LUX	無光時，葉片中的葉綠素含量初期會上升，接著會逐漸減少，直至落葉凋亡。

柒、參考資料

- 田中修、吳佩俞，(2009)，不可思議的葉子。
- 郭重吉，(2009)，國民中學自然與生活科技 第一冊 1上。
- 黃志能，(2009)，葉綠素在乙醇溶液中的顏色穩定性之研究，臺灣大學食品科技研究所學位論文，未出版，台北市。