

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 生物科

030303

「柿」不可擋-柿子的抗氧化力之探討

學校名稱：新竹市私立曙光女子高級中學(附設國中)

作者： 國二 李紘彤 國二 趙梓丞	指導老師： 蘇曉霓 黃麗燕
---------------------------------	-----------------------------

關鍵詞：柿子、萃取條件、抗氧化力

摘要

柿子為新竹在地水果，富含豐富養分且含有許多具抗氧化功能的成分。我們想針對柿子的抗氧化力進行實驗，希望可以研究柿子不同部位及生、熟果的抗氧化力，找到萃取出抗氧化物質的最佳的條件，並試著分離出抗氧化效果較佳的物質進行更深入的研究探討。結果發現柿子 6 個部位(枝條、葉、生果肉、生果皮、熟果肉、熟果皮)，分別以水、50%酒精、95%酒精萃取下，生果肉 50%酒精萃取液最具抗氧化潛力，且在 50-75°C 處理下，耐熱至少 2h；在 100°C 處理下，耐熱至少 1h。利用管柱層析（矽膠 60），分離出 3 管最具抗氧化效果的分離管，並由 TLC 結果可知，分離管內成分複雜，極性介於水及 50% 酒萃，其中應具多種抗氧化潛力之柿子生果肉萃取物。

壹、文獻探討及研究動機

新竹是台灣柿子栽種面積最大的鄉鎮，對成長於新竹的我們，柿子是從小吃到大的美味記憶，每年總期待著秋天的到來，柿果、柿餅上市，讓我們一飽口福。因為地利之便，近郊的柿子觀光果園也是我們假日的好去處，印象深刻的是柿子園一盤盤正在曬柿餅及滿樹黃澄澄的柿果，有種數大便是美的震撼，也引發我們想要對柿子有更進一步的了解，

在搜尋相關資料後，整理了柿子相關的資料如下：

柿子原產於中國，依照果實的甜澀、果肉有無褐斑、脫澀與種子形成的關係，可分為【完全澀柿】、【不完全澀柿】、【不完全甜柿】、【完美甜柿】等四大類。新竹縣主要栽培的為石柿柿樹，石柿在分類上為完全澀柿，因而需經脫澀後才可食用。另外石柿柿樹之樹勢中等、樹型直立，葉呈卵形或廣卵形，花為單生雌花、無雄花。果實小，平均果重在 100 克以下，果實大小均勻，果實略成方形，果蒂凹陷淺，果皮無縱溝且橙黃色，果肉淡黃色肉質硬。放任自然受粉的情況下，每顆果實含有 1-3 粒種子。成熟期稍晚，柿果採收期大約在 9 月中旬至 10 月下旬。

現代醫學疾病預防與治療研究發現柿子有許多功效，整理如下

- (一) 含有豐富的維生素 C（每百公克柿子有七十毫克維他命 C，比柑橘高出 3~4 倍），具有抑制身體氧化的抗氧化、抗老化等作用；而柿子中的維生素 A，可增加皮膚與黏膜的抵抗力。抵抗外在環境對皮膚的傷害，維生素 A、C 協同作用，美膚功效更顯著。
- (二) 含有大量的碘適合甲狀腺疾病患者食用，可治療甲狀腺腫大的問題。
- (三) 含有豐富的果膠，可以緩解便秘。

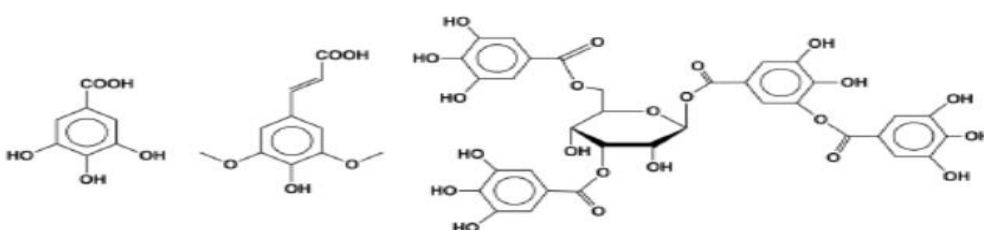
- (四) 能促進血液中乙醇的氧化，幫助人體對酒精的排泄，減少酒精對人體的傷害，適宜長期飲酒者食用。
- (五) 具抗癌、抗氧化及美膚功效：柿子含有類黃酮、單寧、樺木酸和柿澀酸等成分，其中樺木酸和柿澀酸可對抗癌症腫瘤，而豐富的類黃酮則能防止 DNA 突變。
- (六) 美國的動物實驗間接支持，在合理的攝取量之下，柿子有助於改善血脂、降低血壓、降低膽固醇、調整血液中的抗氧化因子等，藉此保護心血管。
- (七) 日本東洋食品科學研究所曾經過老鼠實驗發現，柿子果皮所含的澀單寧能有效改善胰島素阻抗，顯示柿子具有緩解糖尿病的能力。

柿子未成熟的果實中含有強烈澀味，主要是因為果肉中含有大量可溶性單寧，食用有澀味感，主是因為舌頭上之味蕾會和分子量小的可溶性單寧分子結合，而成熟時轉換為不溶性單寧，呈凝膠狀大分子，味蕾無法與之結合，所以感覺不到澀味。一般柿子果實可溶性單寧含量降到 0.5% 以下就可食用，脫澀程度可用 5% FeCl₃ 溶液 浸染 Whatman No.1 濾紙，陰乾製成單寧試紙測試。而將單寧由可溶性狀態聚合變成不可溶性凝膠狀的過程，一般稱為脫澀。

脫澀可在果實成熟時自然進行，在成熟過程中，可溶性單寧會逐漸聚合成不可溶單寧。澀柿完熟軟化時，會自然脫澀；此外，澀柿亦可用不同人工脫澀處理，人工脫澀大致分直接作用和間接作用兩種：所謂直接作用，是指用酒精、石灰水、食鹽等化學物質，滲入細胞中，這些物質與單寧作用，使可溶性單寧發生沉澱，變成不溶性單寧而脫澀。而間接作用則是將柿子置一含於水、二氧化碳、乙烯氣體之密閉環境中，由於呼吸作用，先把容器內的氧消耗掉，在無氧條件下使果肉細胞進行無氧呼吸，產生的乙醇及二氧化碳與可溶性單寧結合，變為不溶性單寧則可脫澀。

單寧酸為黃色或棕黃色無定形鬆散粉末，在空氣中顏色逐漸變深，有強吸濕性，不溶於乙醚、苯、氯仿，易溶於水、乙醇、丙酮，水溶液有澀味，且是多酚中高度聚合的化合物，它們能與蛋白質和消化酶形成難溶於水的複合物，影響食物的吸收消化。可分為水解單寧和縮合單寧，兩者常共存，後者也稱原花青素，而一般植物中，包含柿子，多為縮合單寧。

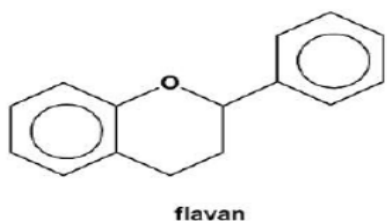
(一) 水解單寧：以沒食子酸為組成成分的水解性單寧，由水解而產生沒食子酸和芥子酸的化合物。沒食子酸亦稱五倍子酸，是一種有機酸，可見於五倍子、漆樹、茶等植物中。易溶於水、醇和醚。



←單寧的結構

-由左至右分別為：
沒食子酸、芥子酸、
水解單寧

(二)縮合單寧：縮合單寧又稱為原花青素，簡稱 PC，由 2 至 50 個或更多類黃酮素，以碳與碳間的鍵結所縮合而成，屬生物類黃酮，已知是具高抗氧化力的葡萄籽中重要的多酚類物質，大多數的縮合單寧可溶於水，少數是難溶於水的。



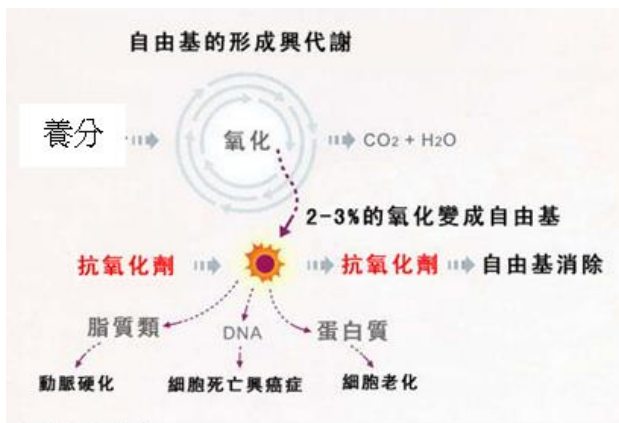
←黃烷(flavan)是類黃酮(黃酮類物質)分子結構的基礎

柿子相關的資料中提到柿子具抗氧化效果，什麼是抗氧化？自然界有什麼抗氧化物？我們也進行了資料的搜尋：

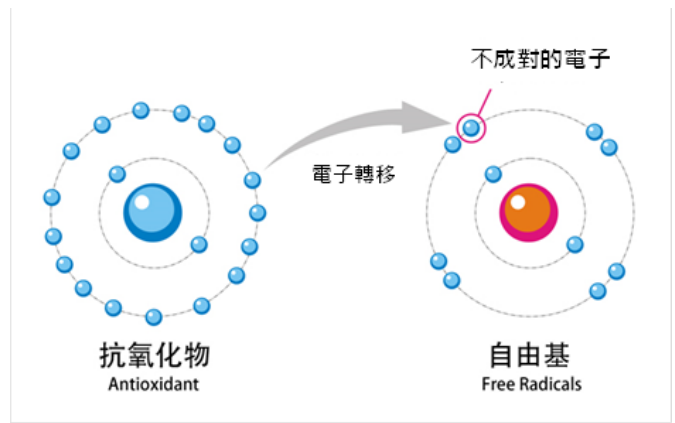
抗氧化物質是指能減緩或防止氧化作用的分子（常專指生物體中）。抗氧化物質有些是偏水溶性(極性較大)的，例如:維他命C、類黃酮、兒茶素、多酚、花青素等；有些是偏脂溶性(極性較小)的，例如：維他命E、蕃茄紅素、 β -胡蘿蔔素等。氧化是一種使電子自物質轉移至氧化劑的化學反應，過程中可生成自由基，進而引發連鎖反應，使細胞受到破壞或凋亡。抗氧化劑則能去除自由基，終止連鎖反應並且抑制其它氧化反應，同時其本身被氧化。可代替身體細胞被自由基等物質氧化，進而保護我們體內的細胞。自然的飲食中，被稱為三大抗氧化物質的是維他命 C、維生素 E 和 β -胡蘿蔔素。

自由基(free radicals)是一種極活潑、不穩定、生命週期短的化合物，因為不穩定，所以會和體內的細胞組織產生化學反應，這個化學反應可統稱為氧化，會使組織細胞失去正常功能，甚至破壞DNA，造成損害或突變，引起癌症。細胞由原子組成，每個原子都有一個中心（核心），外面圍繞著電子。通常電子是成對的。當原子或分子含有一個或更多的不成對的電子時即成為自由基。生物性氧化也就是製造能量的過程，它包含了將電子從一個氧分子移動到下一個的動作。有時電子也有逃脫的時候，這個帶不對稱電子的氧分子就叫自由基。

自由基為致癌主因之一，研究顯示自由基會促使正常細胞發生病變，降低細胞修補機制引發癌症發生機率。雖然自由基並非完全造成癌症發生之原因，但卻有研究指出多攝取富含抗氧化物質的蔬果類食物如多酚物質、類黃酮和類胡蘿蔔素等，對於降低癌症發生機率是有正面性的效應。也有研究指出老化是非常複雜生物反應模式且老化與自由基作用是有密切關連性，藉由補充抗氧化物質包含有維生素C、多酚類及類黃酮等抗氧化物質是可以降低自由基所造成之衰老現象。



圖片來源：
<http://blog.xuite.net/ryan1214/Oya/33375707>



圖片來源：
<http://www.andrecao.com/?p=1084>

綜合以上的資料，我們的研究對象-石柿，是屬於需要經脫澀後香甜美味的澀柿品種，含有維生素 C、類黃酮、單寧等強大的抗氧化物，具有抗癌、抗老化潛力。我們很好奇除了柿子的果肉，柿子的果皮、葉子、枝條是否也具抗氧化效果？哪一個抗氧化效果較好？而果實的生、熟，在抗氧化效果上是否有差異呢？而各種抗氧化成分的性質不同，所以，本研究將利用不同溶劑，考量毒性及設備，選用水、50%酒精、95%酒精來萃取柿子不同部位及生與熟果實，針對各條件萃取液之抗氧化力進行初步的研究探討，希望找到抗氧化力較佳的部位及萃取條件，試著分離出萃取液中較具抗氧化效果的成分，未來也許可以進一步研究是否有其獨特性及應用性。










貳、研究目的

- 一、確認在各種抗氧化測試法下，抗氧化物濃度與抗氧化力的相關性-正控制組
 - (一)碘滴定法
 - (二)DPPH 清除率測試
- 二、探討不同萃取溶劑(水、50%酒精、95%酒精)之柿子各部位萃取液的抗氧化力
- 三、針對所選取柿子部位及萃取溶劑，進行不同萃取條件下，抗氧化力之優化測試
 - (一)不同萃取重量的柿子萃取液之抗氧化測試
 - (二)不同萃取時間的柿子萃取液之抗氧化測試
- 四、針對所選取萃取條件之柿子萃取液，探討溫度對其抗氧化力之影響
- 五、針對所選取萃取條件之柿子萃取液進行管柱層析分離，研究不同分離管的抗氧化力
- 六、利用薄層色層分析(TLC)，探討柿子萃取液及管柱層析之分離管其成分之極性分布

參、實驗設備及器材

一、實驗主題原料：柿子




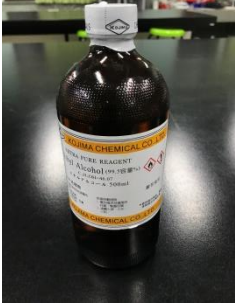
柿子各部位樣本(枝條、葉、生果肉、生果皮、熟果肉、熟果皮)照片

		
葉子+枝條	生果實-青黃、硬澀 (摘下後冰箱保存 2 週)	熟果實-橙紅、軟甜 (摘下後室溫保存 4 週)
		
枝條	葉子	生果肉
		
生果皮	熟果肉	熟果皮

二、器具與材料：

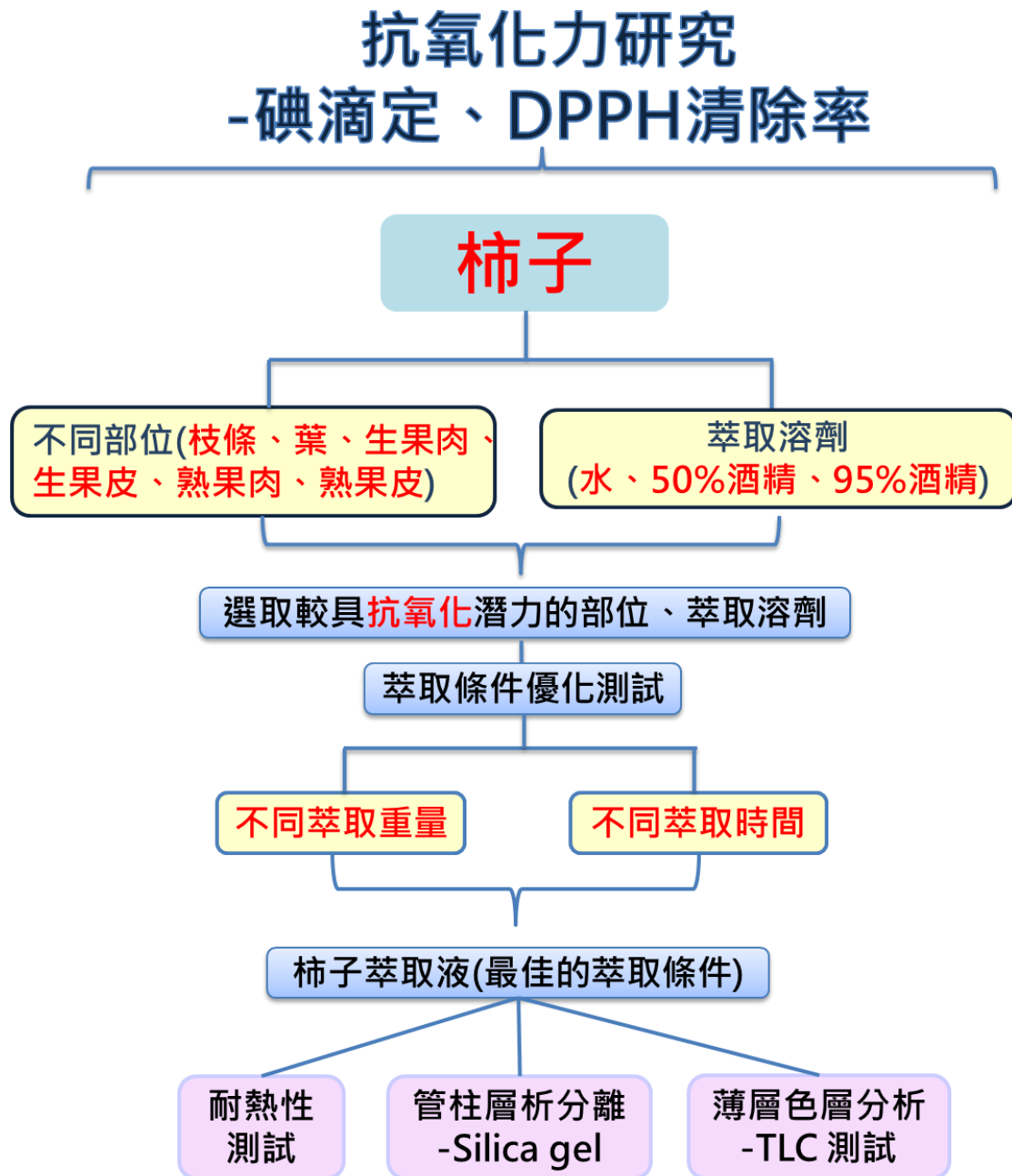
量筒、燒杯、錐形瓶、漏斗、比色管、剪刀、藥勺、秤藥紙、玻棒、漏斗、紗布、滴定管、滴定夾、滴管、試管、試管架、洗瓶、蒸餾水、離心管架、毛細管、TLC 片(矽膠-含螢光)。

三、設備與藥品：

			
<p>分光光度計 WPA Biowave DNA 80-3004-70</p>	<p>磨粉機 POLAR 普樂 PL-7120</p>	<p>恆溫培養箱 JS-H CHERNG HUEI TLT-501</p>	<p>食物烘乾機 MiLEik MYS-903</p>
			
<p>高速離心機 Eppendorf 5424R</p>	<p>電子天平 PS360.R2</p>	<p>水浴槽 JYU-10kg</p>	<p>加熱攪拌器 JLL ISANN</p>
			
<p>pH meter pH/mV/Temp Waterproof Tester Model:7011</p>	<p>紫外燈 Analytikjena UVP UVGL-25 254/365nm</p>	<p>微量吸取器 DLAB (0.5-10μL、20-200μL、100-1000μL)</p>	<p>DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl 95%) Alfa Aesar</p>
			
<p>諾鈣 C 維生素 C 1000mg (+鈣 260mg)</p>	<p>碘溶液 SHIMAKYU' S PURE CHEMICALS</p>	<p>無水酒精 (99.5%) KOJIMA CHEMICAL</p>	<p>優質酒精 (95%) 台灣菸酒公司</p>

肆、研究過程及方法

一、實驗架構圖

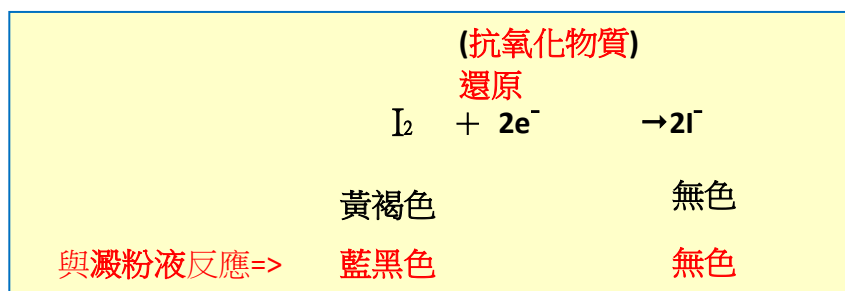


三、實驗原理-抗氧化力測試：

(一)利用碘液滴定法

1. 原理：利用抗氧化物質將碘分子還原成碘離子的特性($I_2 + 2e^- \rightarrow 2I^-$)，測試其抗氧化力。碘液中的碘分子 I_2 與預先加入的澱粉指示劑，產生藍黑色錯合物，碘分子被抗氧化物質完全還原成碘離子時，呈現無色，可知已達到滴定終點。所以，**樣本滴定的量越少**，代表抗氧化物質愈濃，抗氧化效果越好。

2. 圖示：碘分子與抗氧化劑反應被還原成碘離子，其還原半反應如下列反應式：

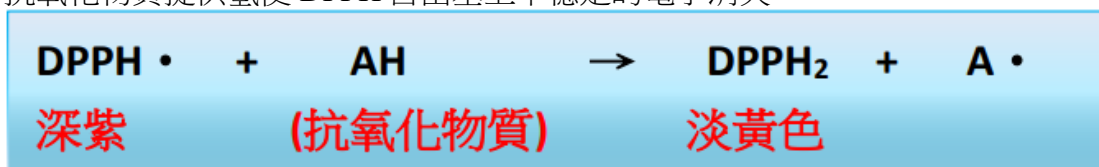


(二)清除 DPPH 自由基能力

1. 原理：DPPH 自由基之乙醇溶液為深紫色，於波長 517nm 下有最大之吸光值，常用來評估抗氧化物其提供氫的能力。當樣本具有抗氧化能力時，則能清除 DPPH 自由基，而顏色會由深紫色變為淡黃色，吸光值就會下降。若 DPPH 自由基被消除越多，則吸收光值就會下降的越多，表示樣品清除 DPPH 自由基的能力就越強。利用 DPPH 清除率(相對於對照組-水之吸光值下降百分比)，可判斷樣品消除 DPPH 自由基能力之強弱。

DPPH 清除率愈高，消除 DPPH 自由基的能力越強，抗氧化力就越佳。

2. 圖示：抗氧化物質提供氫使 DPPH 自由基上不穩定的電子消失。



(三)管柱層析

1. 原理：屬於液相層析法的一種，欲分離的混合物中的各組成份分配在固定相和移動相之間，化合物被固定相吸附愈強，該化合物存在於流動相中就愈少，沿沖提液移動的距離就愈小。藉著沖提作用及吸附劑同時對溶劑及溶質吸附力大小而使之成為差別移動，進而將混合物中各組成分離。管柱層析法作用類似多次萃取，其萃取次數與管柱高度成正比，利用混合物中各組成份在固定相及移動相不同的吸附力（萃取中的分配係數）而分離。一般極性大的的物質被吸附較多，而極性較小的物質因不易被吸，因此較易向下流動。

(三) 薄層色層分析(Thin layer chromatography，簡稱 TLC)

1. 原理：薄膜層析法屬於吸附層析的一種。由於混合物中的各個組成份對固定相 (Stationary phase) 的吸附能力不同，當移動相 (沖提液，Mobilphase) 流經固定相時，便會發生無數次的吸附和解吸，吸附力弱的的組成份隨流動相迅速向前移動，吸附力強的組成份滯留在後，由於各組成份具有不同的移動速率，最後得以在固定相上分離。

(TLC 片上的暗點，越上方跑得較快的物質，屬於極性較小的物質，越下方跑得較慢的物質，屬於極性較大的物質。

(1)Rf 值 (Rate of flow) :

一個化合物在薄層板上升的高度與展開劑上昇高度的比值稱為該化合物 Rf 值。

(2)展開劑 (沖提液, elution, 移動相)

如果展開劑的極性遠大於混合物中各組成份的極性, 則最後展開劑將代替各個組成份而被固定相吸附, 各個組份將幾乎完全存在流動相中, 各個組份具有較高的 Rf 值。如果展開劑的極性遠低於混合物中各個組成份, 則最後各組成份將被吸附在固定相中, 而無法被展開劑所遷移, 即 $Rf=0$ 。

①一般常用展開劑極性大小: 由小到大

正己烷 < 四氯化碳 < 甲苯 < 苯 < 二氯甲烷 < 乙醚 < 氯仿 < 乙酸乙酯 < 丙酮 < 乙醇 < 甲醇。

②化合物官能基之極性大小: 由小到大

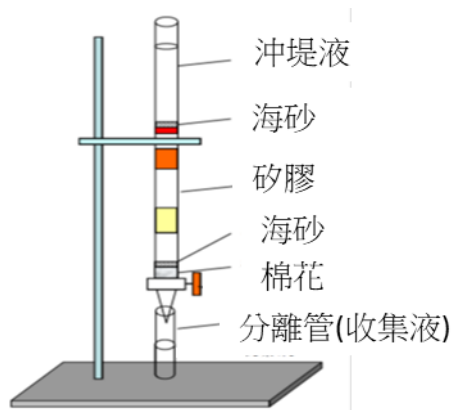
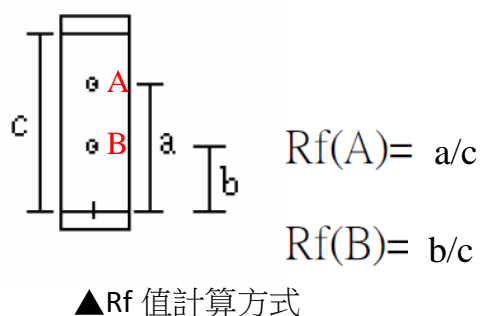
烷類 < 鹵化烷類 < 烯類 < 雙烯類 < 鹵芳香族 < 醚類 < 酯類 < 酮類 < 醛類 < 胺類 < 醇類 < 酚類 < 羧酸類 < 硫酸。

(3)固定相:

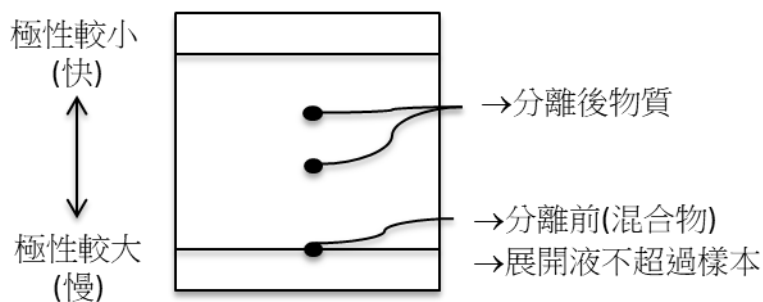
為固定不動的吸附劑其成分可分為兩種——矽膠及氧化鋁。矽膠適用於分離極性較大的化合物; 相反的, 氧化鋁適用於分離極性較小的化合物。

(4)TLC 的用途:

- ①決定混合物中化合物的個數。
- ②鑑定兩種或以上的化合物是否為同一物。
- ③監控反應進行的程度。
- ④確定純化的效果
- ⑤決定管柱層析法的沖提液極性比例。



▲管柱層析裝置示意圖



▲薄層色層分析示意圖

四、實驗方法

(一)樣本處理：柿子各部位(枝條、葉、生果肉、生果皮、熟果肉、熟果皮)均先擦拭去除髒污，處理成小塊後放進食物乾燥機烘乾至脆，利用磨粉機分別研磨成粉末狀，置於防潮箱備用。

(二)柿子萃取液的製備

1.萃取：

- (1)秤取適量的樣本置於三角錐形瓶。
- (2)量取 50mL 的萃取溶劑放入(1)之三角錐瓶中。
- (3)將三角錐瓶置於設定好 25°C 之恆溫培養箱中，以 150rpm 的搖晃速度進行萃取。

*備註：

樣本：柿子各部位(枝條、葉、生果肉、生果皮、熟果肉、熟果皮)粉末
萃取溶劑(50mL)：水、50%酒精、95%酒精
萃取比例：0.5g、1g、2g（初始條件）、3g、4g
萃取時間：4h、8h、12h、24h（初始條件）、48h

(三)柿子萃取液—不同溫度處理

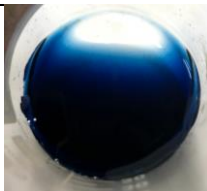


1. 將選定之柿子萃取液置於離心管中，分別利用不同的溫度(0、25、50、75、100°C)進行處理，每半個小時吸取 2mL 處理後之柿子萃取液，收集至 2 小時，共得 4 個時間點(0.5、1、1.5、2 小時)。
2. 所收集之柿子萃取液保存於-20°C 冰箱，待後續進行抗氧化測試。

(四)抗氧化力測試

1. 碘滴定測量方法:

- (1)滴定管中放入待測樣本，紀錄液面刻度。
- (2)取 5mL 稀釋 100X 的碘液和 250 μ l 的 2%澱粉液加入燒杯中。
- (3)將燒杯中的碘液及澱粉液攪拌均勻，溶液呈藍黑色。
- (4)將樣本慢慢滴入燒杯中，觀察顏色變至透明無色，並維持 30 秒，作為滴定終點。
- (5)記錄滴定管上的刻度。滴定前後的刻度相減，即得樣本的體積。(每個樣本進行 3 重複)

*備註：維生素 C 為正控制組；萃取溶劑為對照組(下圖)。

		
碘液+澱粉液+水 2.5cc	碘液+澱粉液+酒精 50%2.5cc	碘液+澱粉液+酒精 95%2.5cc
▲水、50%酒精、95%酒精無抗氧化效果，滴定於碘澱粉深藍色錯合物達 2.5mL，均無法達到滴定終點。		

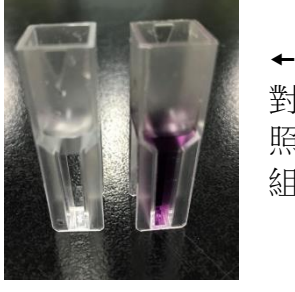
2. 清除 DPPH 自由基

(1) 微量離心管中加入 0.2 μ M DPPH 及待測樣本，兩者體積比例為 1 : 1。

*對照組：將待測樣本改為水

(2) 放置避光處 10 分鐘。

(3) 利用分光光度計測試波長 517nm 的吸光值。

	<p>備註：</p> <ol style="list-style-type: none">1. 以水進行歸零，對照組波長 517nm 的吸光值約為 1.0~1.2。2. 每個樣本進行 3 重複，樣本須先以 15000rpm 離心 1 分鐘，取上清液進行測試；若背景 > 0.1，樣本需稀釋後再進行測試。（稀釋樣本表示方式：10X 為稀釋 10 倍）3. DPPH 清除率(%) = [(對照組的吸光度 - 樣本吸光度) / 對照組的吸光度] * 100。
---	--

***分光光度計原理：**分光光度計是利用分光光度法對物質進行定量定性分析的儀器，通過測定被測物質在特定波長處或一定波長範圍內光的吸收度，對該物質進行定性和定量分析。利用可見光及紫外光之燈管 (Lamp) 做為光源，通過濾光鏡調整色調後，經聚焦後通過單色光分光狹縫光稜鏡，再經選擇波長，使成單一且特定波長之光線，而後射入樣品管中之樣品，最後射入光電管中將光能轉換為電器訊號，藉由樣本及空白水樣間所吸收之光能量差，與標準液之能量吸收值相比較，便可測定樣本中之濃度。

(五) 管柱層析法-silica gel 分離

1. 管柱先填充棉花、加入 0.1 公分厚的海沙。
2. 加入 50% 酒精做為沖提液，並將浸泡在 50% 酒精的靜相-矽膠 60 (silica gel 70-230 mesh) 沿著玻璃棒輕輕倒入管柱中，過程中應避免氣泡產生。
3. 矽膠 60 填充管柱 10cm 後，再加入約 0.1 公分厚的海沙。
4. 當沖提液落至填充靜相(矽膠 60) 頂端水平時，用滴管抽取待分離試樣溶液，靠近填充海沙的表面，沿著管柱壁小心加入已經填充好靜相的管柱中。
5. 加入沖提液至玻璃管柱的頂端，準備 12 支收集用的試管，置於試管架，開始以試管收集沖提液，每 3 mL 換一支試管，注意記錄在這一連串動作中管柱上所觀察到的顏色變化，收集到管柱中有顏色的試樣均被沖提出來。沖提過程要注意隨時補充沖提液不可讓沖提液沒入矽膠靜相，最後利用薄層層析法分析收集到的溶液，以判定分離效果。

*備註：進行分離時可能會稀釋樣本的濃度而無法測出抗氧化效果，故先濃縮後再進行分離。

*樣本濃縮置備：取 30mL 待分離的樣本，至於玻璃培養皿中，放置 25°C 培養箱一個晚上，待自然風乾後以 3mL 50%酒精回溶，收集濃稠的樣本，以 15000rpm 離心 1 分鐘，取上清液 1 mL 加入管柱進行分離。

(六)薄層色層分離(Thin layer chromatography，簡稱 TLC)

1.點樣：

(1)畫起始線先用鉛筆在層析片上距底端約 0.5 公分處輕輕畫一橫線作為起始線，再畫一短線垂直於起始線，作為試樣的起始點。2 個相鄰的試樣點及距離層析片左右邊界均應至少保持約 0.3 公分距離，以避免展開時因擴散現象而導致樣品重疊。

(2)觸點試樣：使用毛細管插入樣本溶液中以吸取試樣溶液，而後在層析片上起始點處以垂直的角度快速、輕巧地點觸之後，移開毛細管，讓溶劑揮發，可在同一位置重覆點樣數次，以提高濃度。

***未進行管柱分離濃縮的樣本：5 次；管柱分離後樣本：60 次；1%單寧酸：1 次**

2.展開

(1)以燒杯蓋上鋁箔紙作為展開槽，在展開槽側壁放一張剪裁過的長形濾紙，加入高度約為 0.2 公分的展開劑，讓濾紙的下端浸泡在展開劑中，並使濾紙潤濕，這樣可使槽內的蒸氣很快地達到氣液平衡，加速展開劑的上升。(*本實驗的展開液為 50%酒精)

(2)確定層析片上試樣點的溶劑已經揮發後，使用鑷子將層析片有起始線的一端向下放入展開槽中心位置，並使層析片頂端依靠在槽壁，斜立於槽中，兩邊不要碰觸到器壁或濾紙，以免產生邊際效應使試樣展開歪斜影響展開結果。注意試樣點必須高於展開劑的水平線約 0.3 公分，以避免試樣點溶入下方的展開劑中。

(3)展開迅速蓋上蓋子，保持氣密，讓展開劑以毛細作用向上爬升。當展開劑上升到接近層析片的頂端適當距離時取出層析片，並立即以鉛筆標出展開劑的前沿位置，待展開劑揮發後，以顯像法觀察試樣點的位置。

3.顯像：本研究 TLC 片為混有螢光劑的矽膠，可利用手持紫外分析儀，在短波長 254nm 下照射，呈現一暗點處為具化合物的位置。

4.計算暗點的 Rf 值。








五、藥品配置：

(一) 2%澱粉液：稱取 2 克澱粉加入 100mL 一次水，加熱攪拌至澱粉完全溶解。

(二) DPPH 溶液：取 DPPH 溶於無水酒精，配置成 10 μ M DPPH 溶液，冰於-20°C 保存。

(三)維他命 C 標準溶液配製：以維生素 C 發泡錠(1000 mg/錠)，加入 500 mL 一次水，待其完全溶解，此為 2000 ppm 的維生素 C 溶液，稀釋至需要的濃度進行測試。

三、實驗操作照片

		
<p>採集-柿子葉及枝條</p>	<p>採集-柿子果實</p>	<p>處理果實-皮肉分開</p>
		
<p>柿子各部位烘乾</p>	<p>烘乾後的皮及肉</p>	<p>磨粉</p>
		
<p>柿子萃取液-溫度處理</p>	<p>萃取</p>	<p>碘滴定設備</p>
		
<p>下方為滴定終點(透明)</p>	<p>進行 TLC 實驗</p>	<p>柿子各部位液萃取</p>

伍、實驗結果

一、確認在各種抗氧化測試法下，抗氧化物濃度與抗氧化力的相關性-正控制組

(一)碘滴定法

(二)DPPH 清除率測試

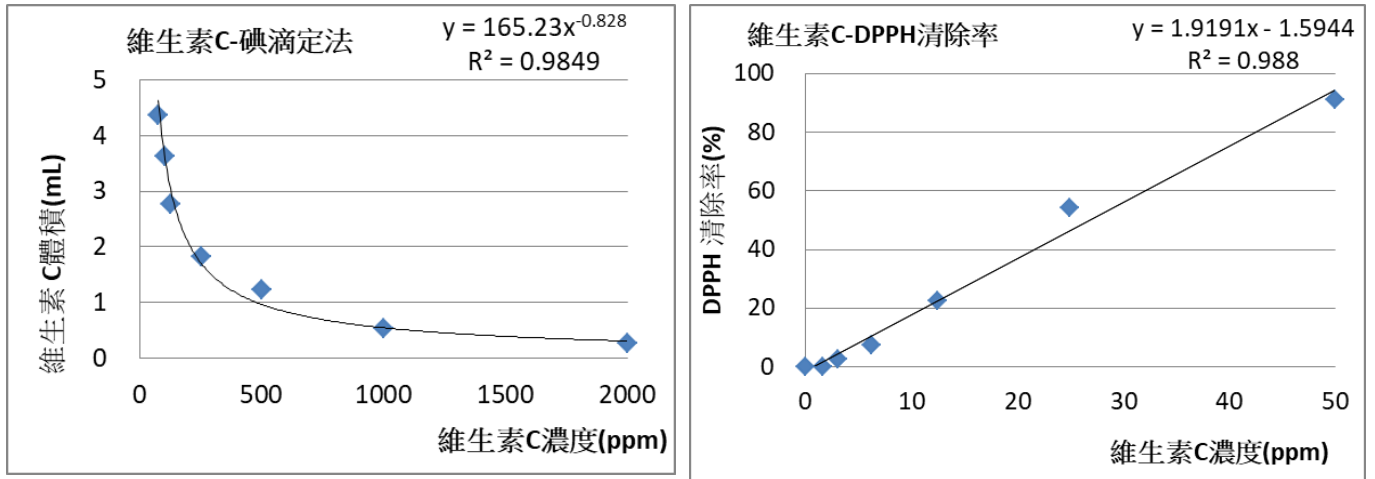
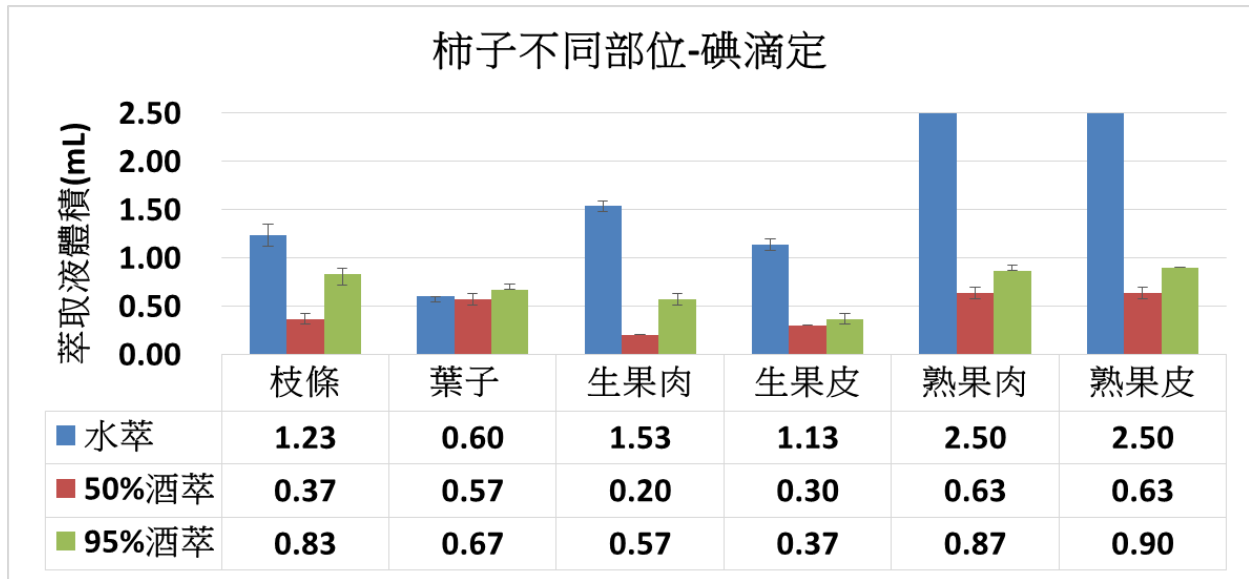


圖. 1 不同濃度的維他命 C 之抗氧化力。(左：碘滴定法；右：DPPH 清除率)

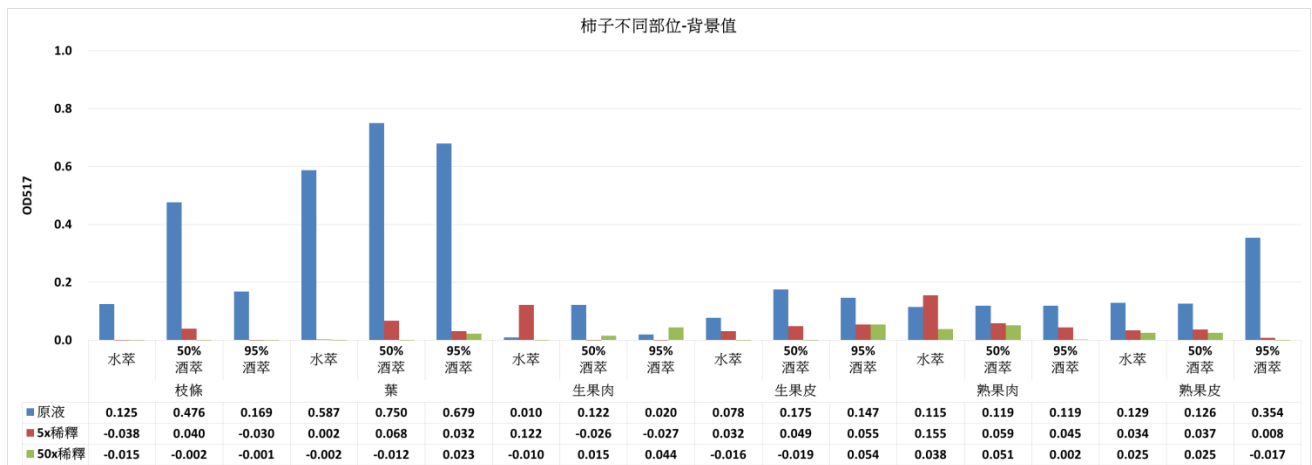
實驗數據分析：(附錄表 1-1、1-2)

維他命 C 是已知具抗氧化效果的物質，故以維他命 C 作為正控制組。在碘滴定法及 DPPH 清除率的實驗中，確認抗氧化力與抗氧化物濃度的相關性。在碘滴定結果中，維生素 C 濃度越高，還原碘澱粉藍色錯合物轉為透明所需要的體積越小，呈濃度趨勢；而 DPPH 清除率的結果中，維生素 C 的濃度越高，DPPH 清除率越高，50ppm 的維生素 C 之 DPPH 清除率可達 90%。結果如預期，維他命 C 的濃度越高，抗氧化效果越佳，且維他命 C 的濃度與抗氧化效果呈正相關，相關係數(R^2)>0.9 以上，以正控制組確定碘液滴定法及 DPPH 清除率測試抗氧化效果的可行性並確認實驗過程無異常狀況。

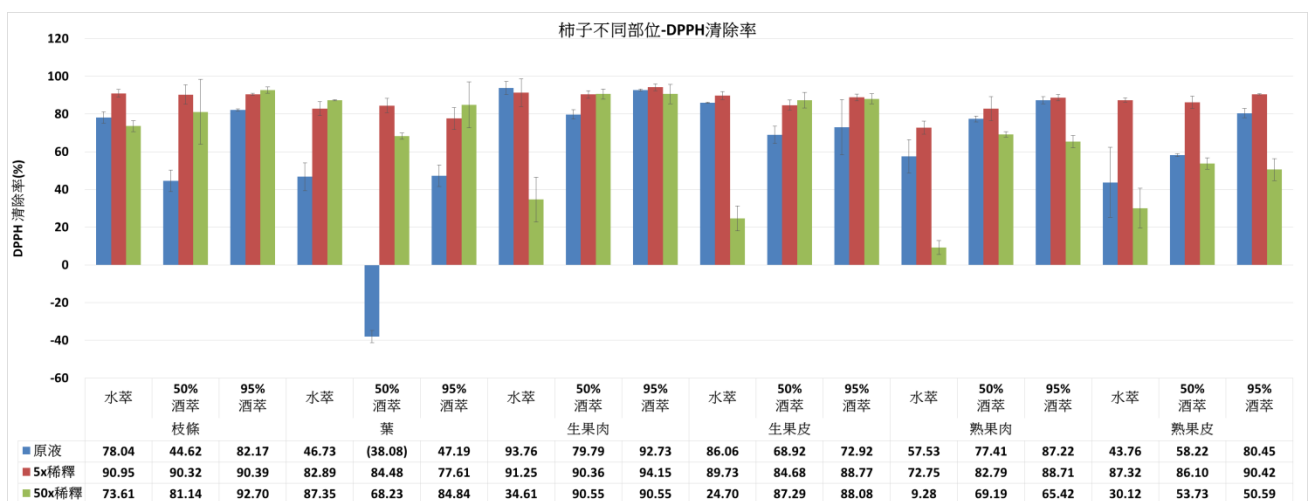
二、探討不同萃取溶劑(水、50%酒精、95%酒精)之柿子各部位萃取液的抗氧化力



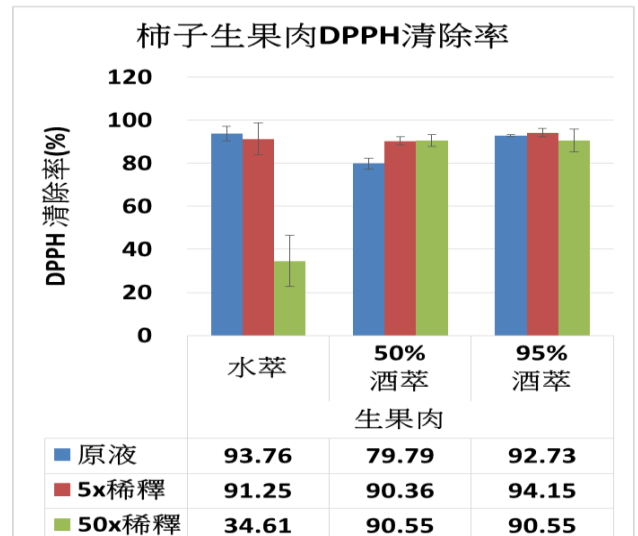
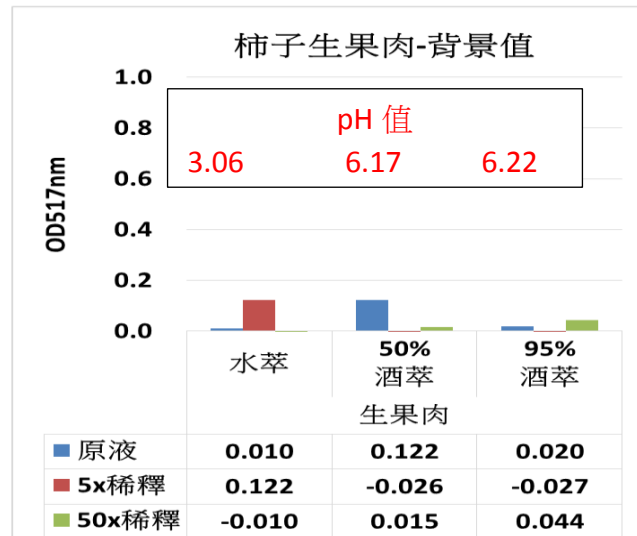
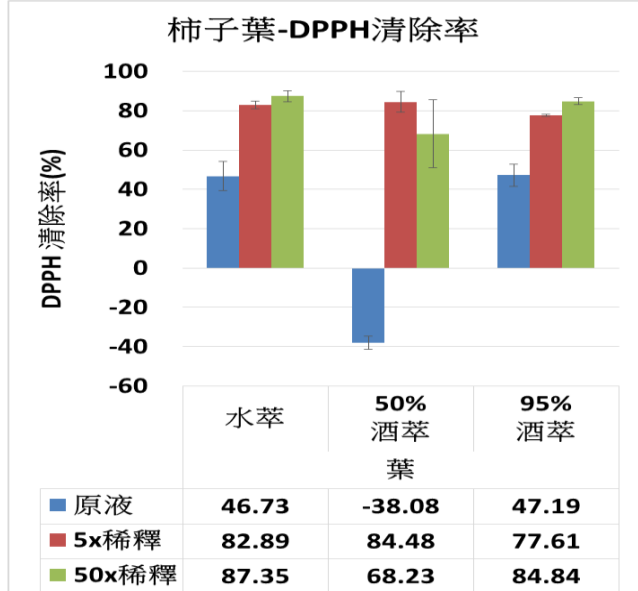
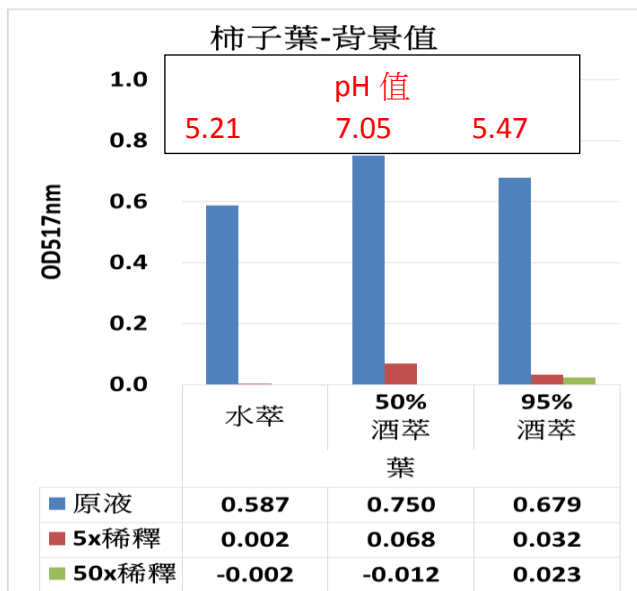
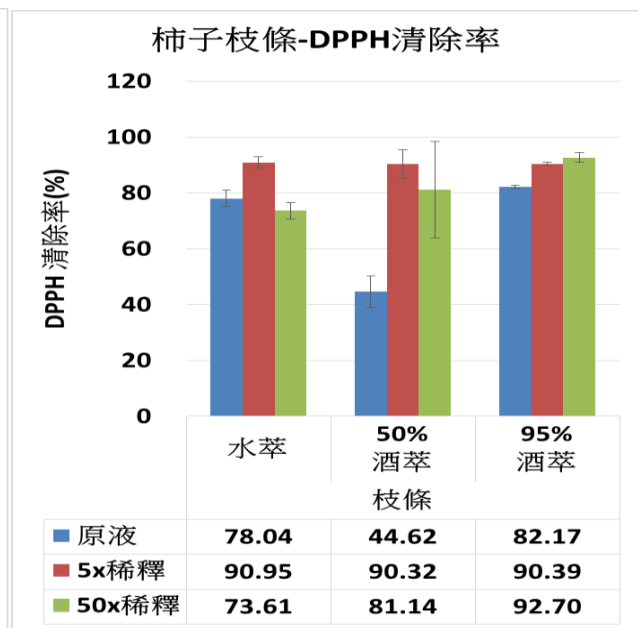
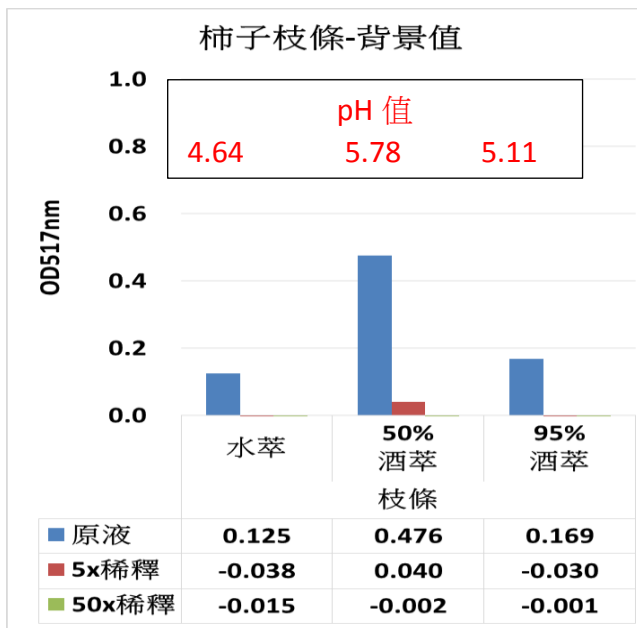
【圖 2-1】不同萃取溶劑之柿子各部位萃取液的抗氧化力測試-碘滴定法



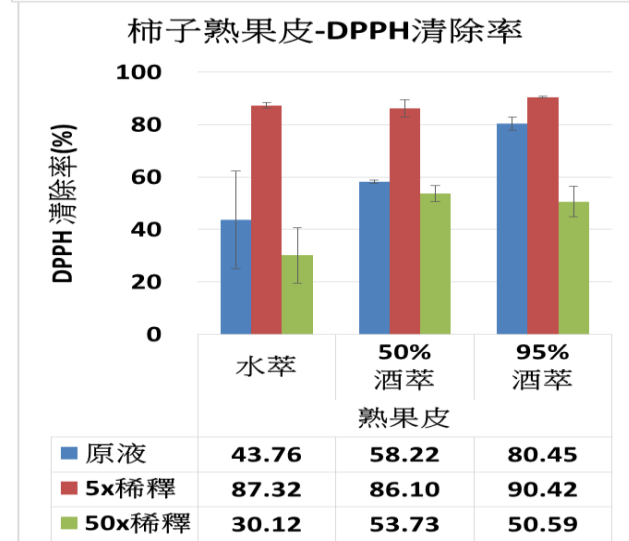
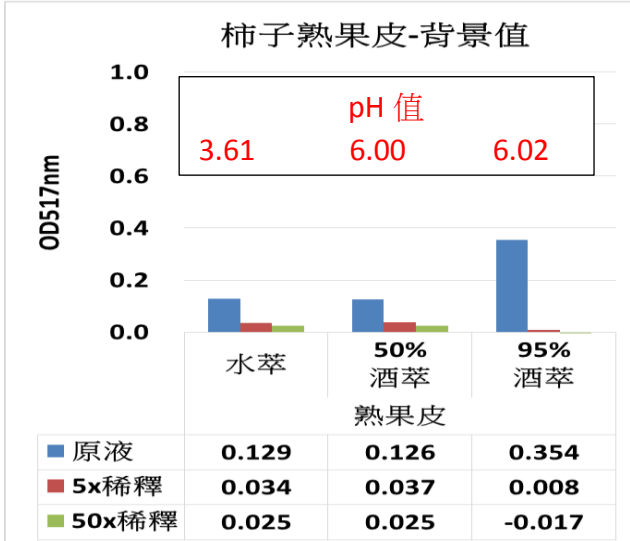
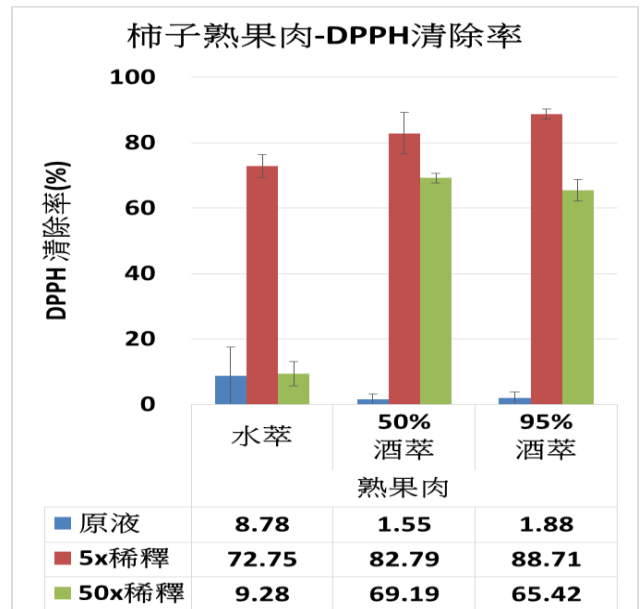
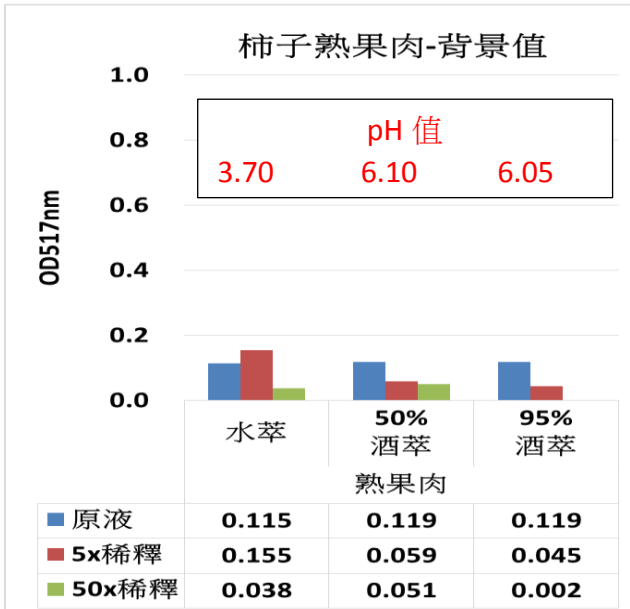
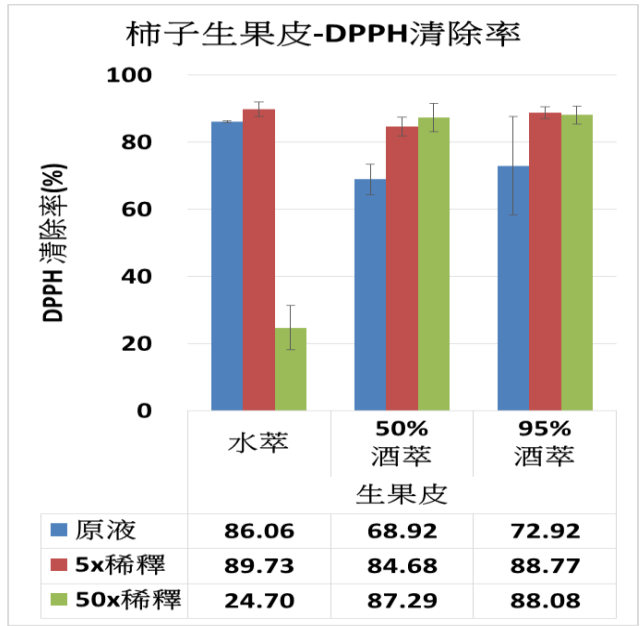
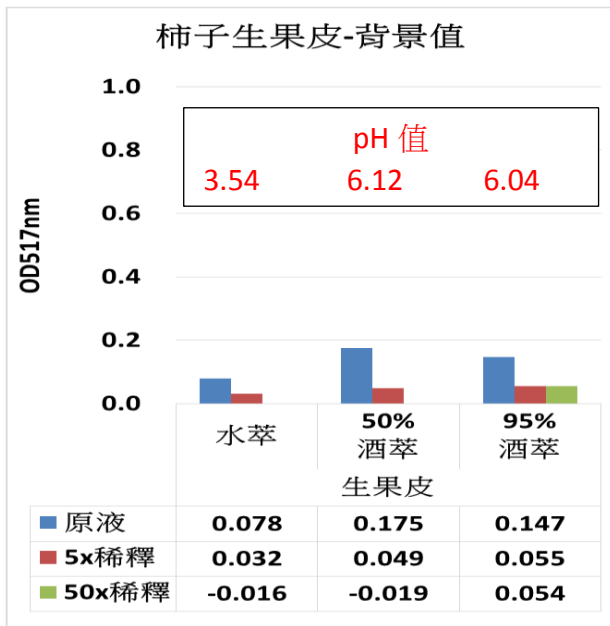
【圖 2-2】不同萃取溶劑之柿子各部位萃取液-OD517 背景值



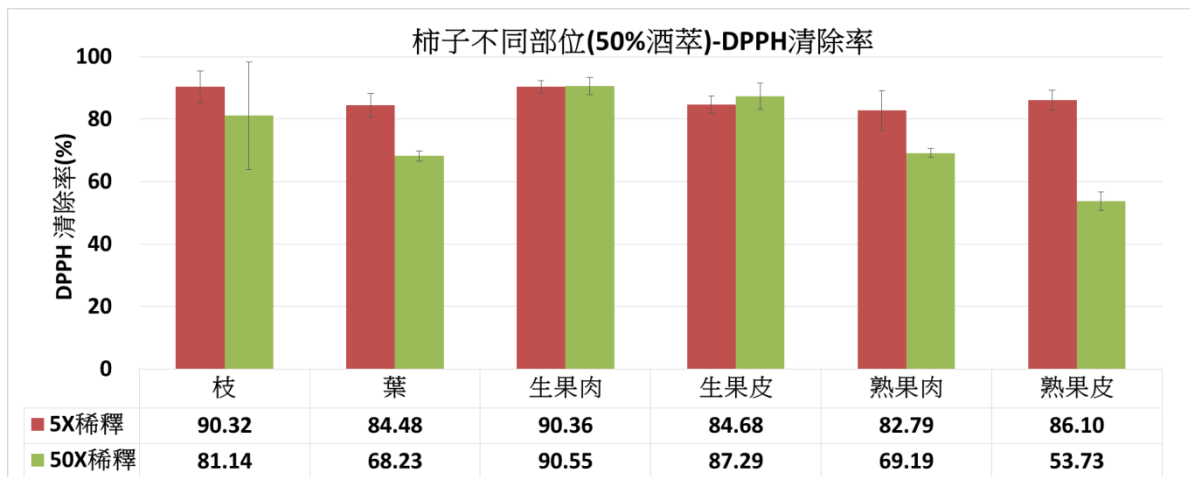
【圖 2-3】不同萃取溶劑之柿子各部位萃取液的抗氧化力測試-DPPH 清除率



【圖 2-4】不同萃取溶劑之柿子（枝條、葉、生果肉）萃取液
 （左：OD517 背景值；右：抗氧化測試—DPPH 清除率）



【圖 2-5】不同萃取溶劑之柿子（生果皮、熟果肉、熟果皮）萃取液
（左：OD517 背景值；右：抗氧化測試—DPPH 清除率）



【圖 2-6】50%酒精萃取之柿子各部位萃取液的抗氧化力測試-DPPH 清除率

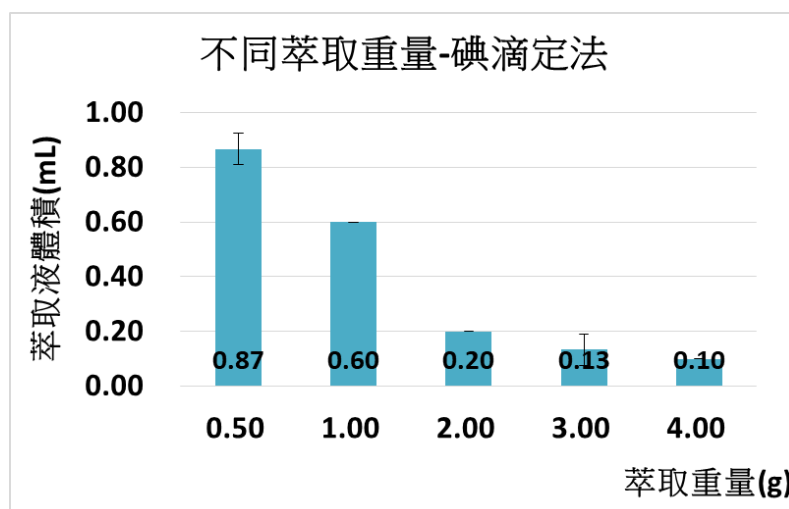
實驗數據分析：（附錄表 2-1、2-2、2-3）

- 1.由碘滴定的結果【圖 2-1】，枝條、生果肉、生果皮、熟果肉、熟果皮均以 50%酒精萃取的萃取液抗氧化力較水萃及 95%酒精萃取佳，葉則在 3 種溶劑萃取下，抗氧化力差異不大，且在 50%酒精萃取下，各萃取液的抗氧化力：生果肉>生果皮>枝條>葉>熟果肉=熟果皮。
- 2.由 DPPH 清除率的結果【圖 2-2~2-6】，【圖 2-2~2-3】為 6 個部位統整圖，【圖 2-4~2-5】為 6 個部位分開整理的圖。由圖可知，除了生果肉，大部分的萃取液原液的背景值>0.1，會干擾結果的判讀，而各萃取液在 5X 及 50X 稀釋下，OD517 背景值均<0.1，5X 稀釋萃取液抗氧化力差異不大，透過 50X 稀釋萃取液的 DPPH 清除率結果可知，除了葉，枝條，生果肉、生果皮、熟果肉、熟果皮均是水萃抗氧化力較差，50%酒精萃取最佳；在 50%酒精萃取下【圖 2-6】，各萃取液的抗氧化力：生果肉>生果皮>枝條>葉=熟果肉>熟果皮，與碘滴定結果一致。
- 3.除了葉 50%酒精萃取液 pH 值為 7.05，接近中性，其餘各部位不同溶劑萃取液之 pH 值為 3-6 之間，均呈酸性。

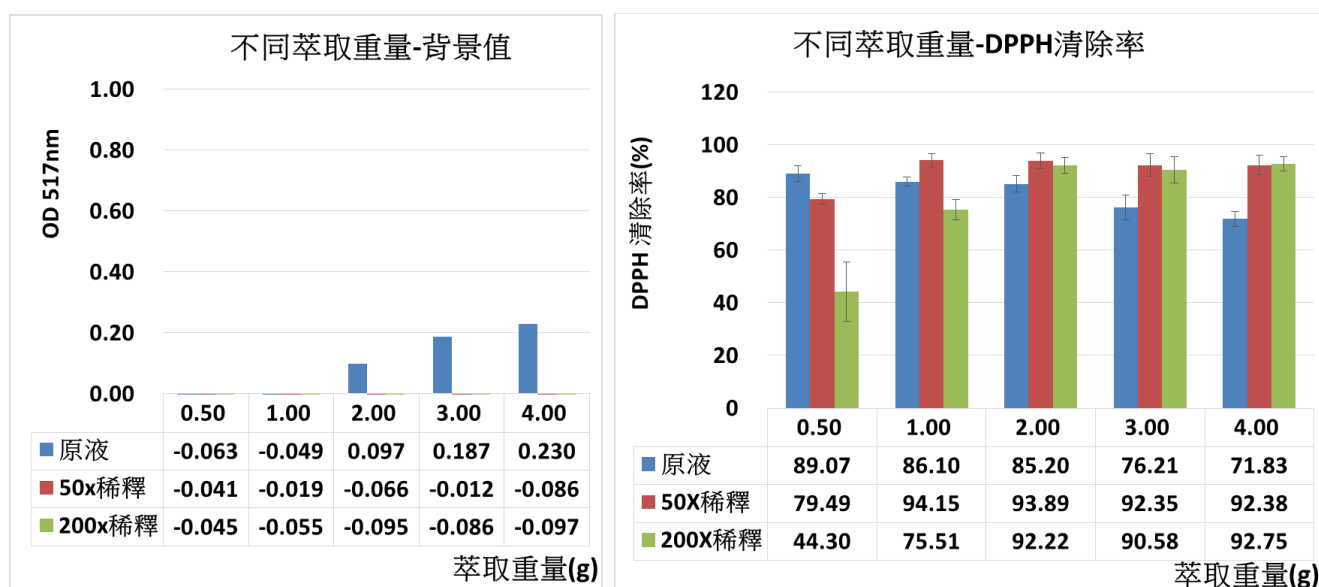
由碘滴定及 DPPH 清除率的結果，50%酒精萃取柿子生果肉最具抗氧化效果，選取此部位及萃取溶劑，以進行不同萃取條件（比例及時間）下，抗氧化力之優化測試，希望可以找到最佳的萃取條件。因萃取液原液背景值>0.1，會干擾 DPPH 清除率的計算及 5X 稀釋萃取液抗氧化力差異不大，故後續實驗以 50X 稀釋及 200X 稀釋萃取液進行。

三、針對所選取柿子部位及萃取溶劑，進行不同萃取條件下，抗氧化力之優化測試

(一)不同萃取重量的柿子萃取液之抗氧化測試



【圖 3-1-1】不同萃取重量的柿子萃取液之抗氧化測試－碘滴定法



【圖 3-1-2】不同萃取重量的柿子萃取液之抗氧化測試

(左：OD517 背景值；右：抗氧化測試－DPPH 清除率)

實驗數據分析：(附錄表 3-1-1、3-1-2)

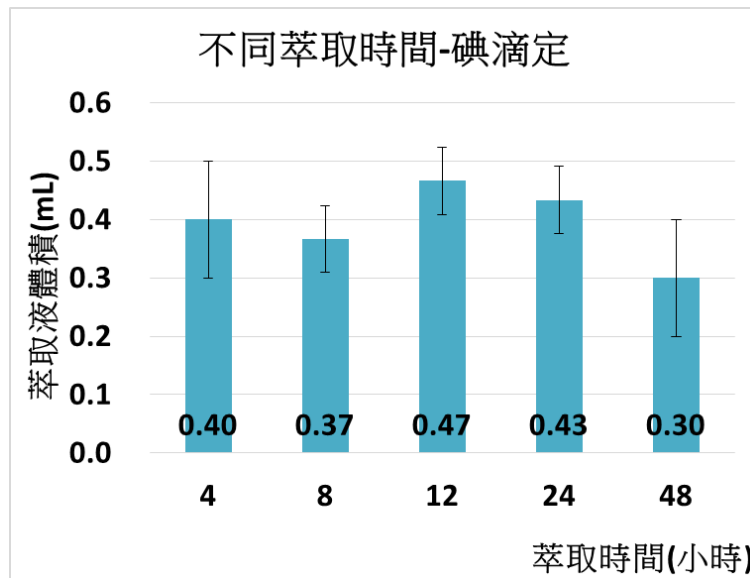
1.由碘滴定的結果【圖 3-1-1】，在相同體積(50 mL)的萃取液下，抗氧化力 $4g=3g=2g>1g>0.5g$ 。

2.由 DPPH 清除率的結果【圖 3-1-2】，萃取液原液的 OD517 背景值偏高，以 50X 及 200X 稀釋的萃取液之抗氧化力來分析，在相同體積(50 mL)的萃取液下，抗氧化效果

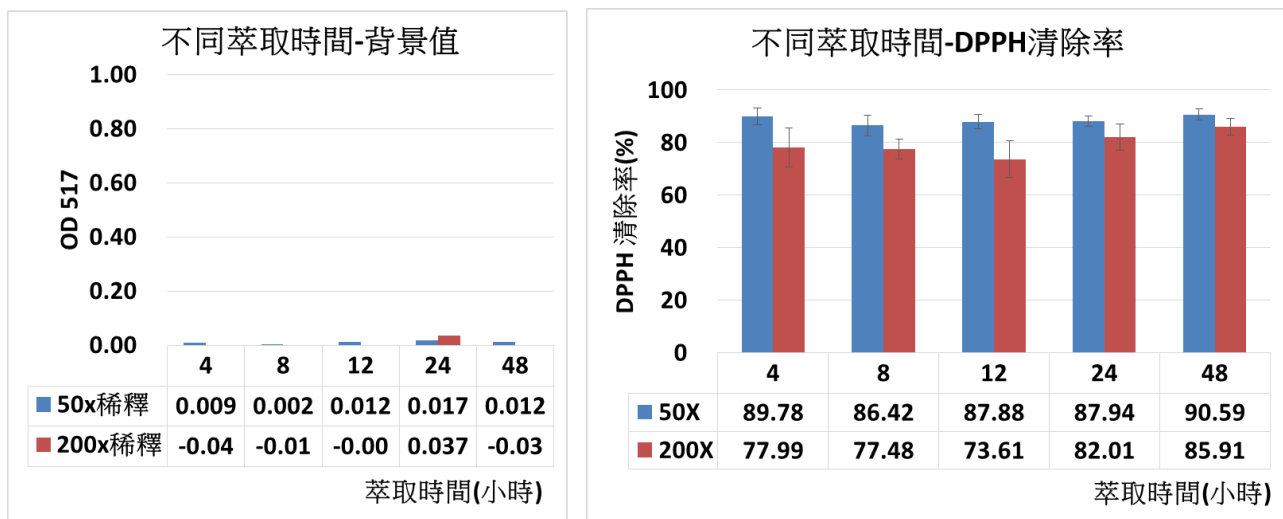
$4g=3g=2g>1g>0.5g$ 。

=>由碘滴定及 DPPH 清除率的結果，隨著柿子生果肉粉末越多，抗氧化效果越好，但到了 2g 抗氧化效果與 3g、4g 萃取無差異，推測萃取效果已達到飽和，之後的實驗將以 2g 柿子生果肉粉末進行。

(二) 不同萃取時間的柿子萃取液之抗氧化測試



【圖 3-2-1】不同萃取時間的柿子萃取液之抗氧化測試－碘滴定法



【圖 3-2-2】不同萃取時間的柿子萃取液之抗氧化測試

(左：OD517 背景值；右：抗氧化測試－DPPH 清除率)

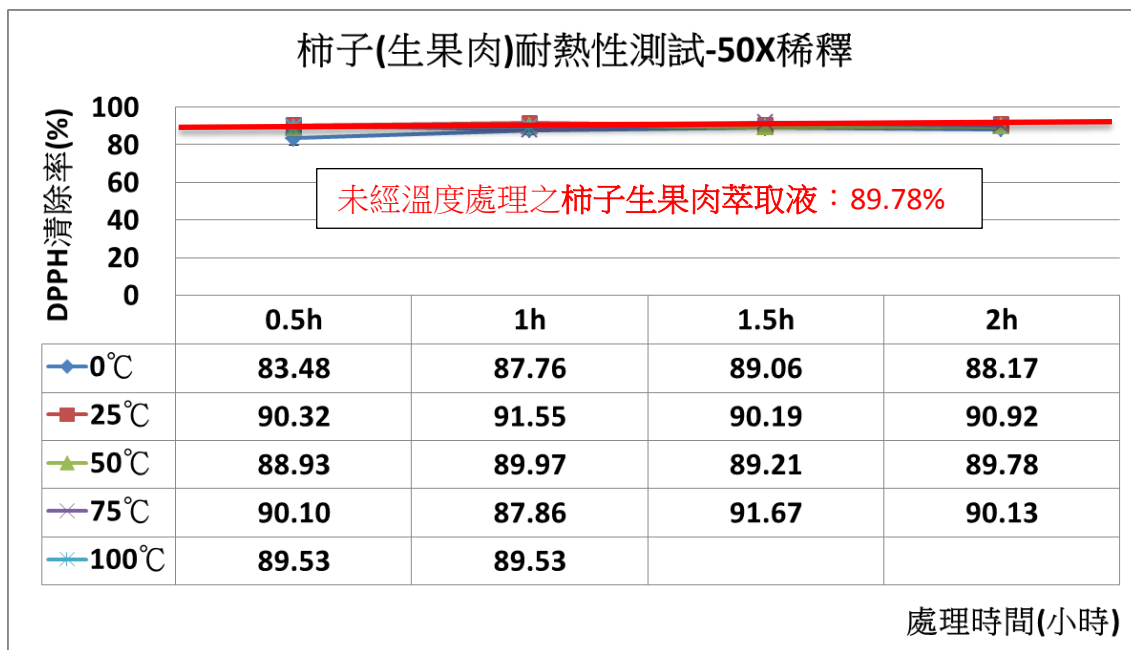
實驗數據分析：(附錄表 3-2-1、3-2-2)

1. 由碘滴定的結果【圖 3-2-1】萃取不同的時間，柿子生果肉 50%酒精萃取液的抗氧化效果，各萃取時間下，整體抗氧化力差異不大。
2. 由 DPPH 清除率的結果【圖 3-2-2】，無論在測試的各萃取時間下，柿子 50%酒精萃取液的抗氧化效果均差異不大。

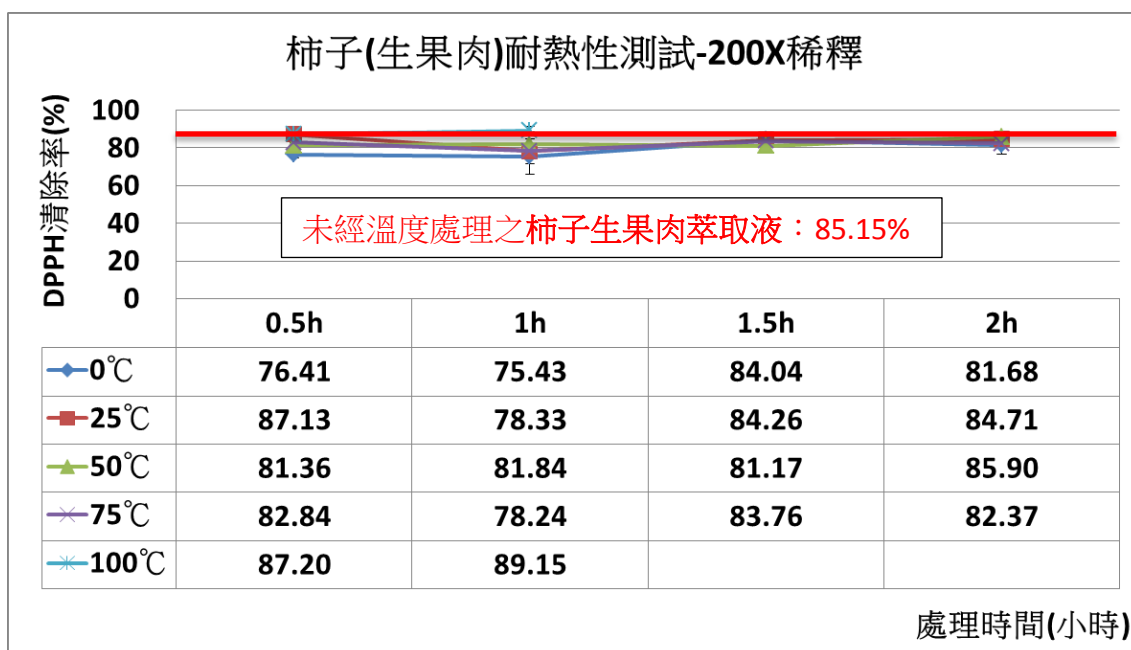
=>由碘滴定及 DPPH 清除率的結果，只需萃取 4h 即可將柿子生果肉中的抗氧化成分萃出，推測已達飽和。

透過前兩個實驗，發現柿子生果肉的抗氧化效果較佳，並測試出萃取時間 4 小時，以 2g 置於 50mL 的 50%酒精進行萃取已有很好的抗氧化效果。針對此條件的萃取液(考量作息，之後還是利用萃取時間 24h 來進行實驗)，接下來我們想了解溫度對其抗氧化力的影響。因為碘滴定需要目測滴定終點，較容易產生誤差，故之後的測試均只以 DPPH 清除率進行。

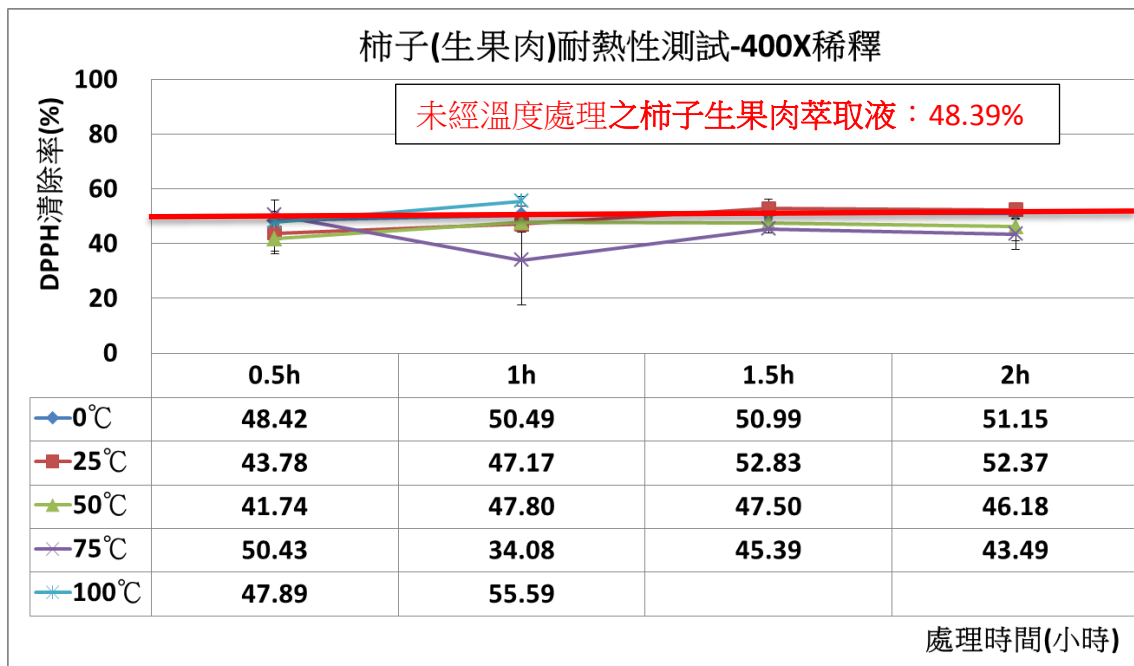
四、針對所選取萃取條件之柿子萃取液，探討溫度對其抗氧化力之影響



【圖 4-1】不同溫度對柿子生果肉 50%酒精萃取液之抗氧化的影響－50X 稀釋



【圖 4-2】不同溫度對柿子生果肉 50%酒精萃取液之抗氧化的影響－200X 稀釋

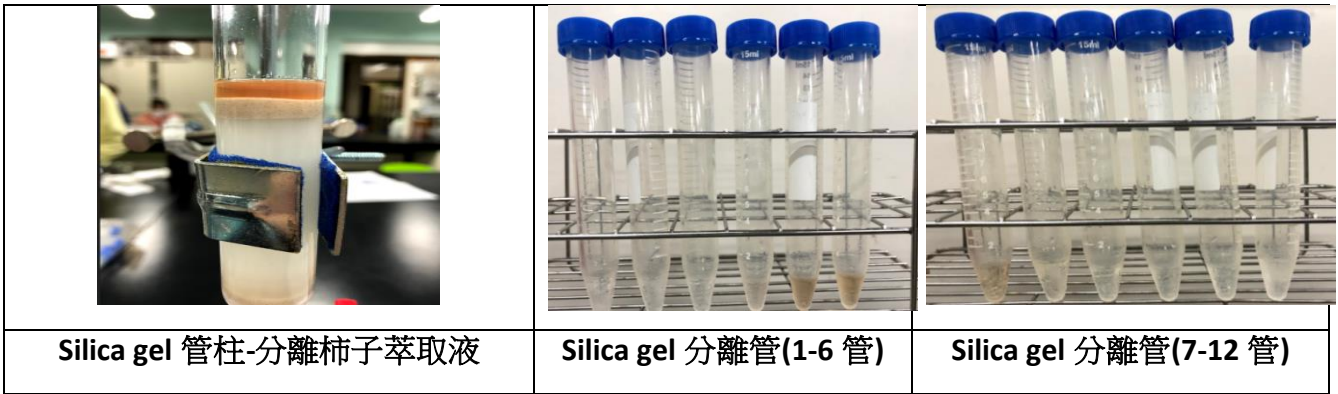


【圖 4-3】不同溫度對柿子生果肉 50%酒精萃取液之抗氧化的影響—400X 稀釋
實驗數據分析：（附錄表 4）

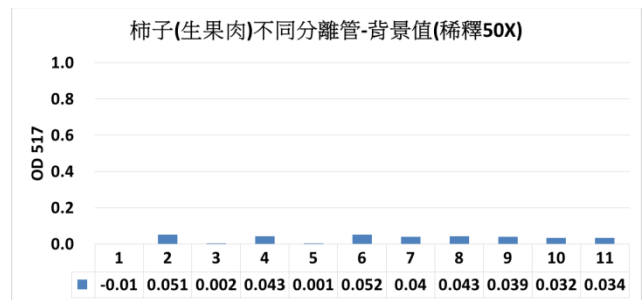
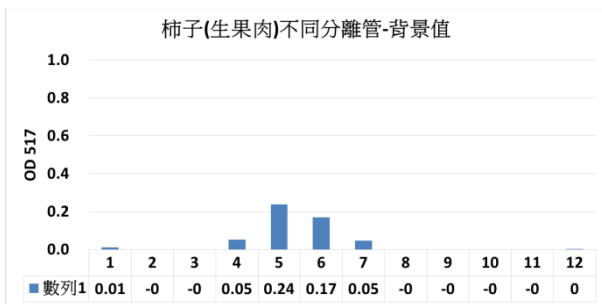
1. 由 50X【圖 4-1】及 200X【圖 4-2】稀釋的結果可知，在 0、25、50、75、100°C 處理下，每 0.5h 進行一次 DPPH 清除率萃測試，最多進行 2h，抗氧化效果差異不大，均為 85-90% 左右，且在高溫(50-100°C)處理下，隨著時間抗氧化效果並沒有變得更差的趨勢，與未加熱處理之柿子生果肉 50%酒精萃取液結果差異不大。因是利用 50%酒精當作溶劑進行萃取，利用 100°C 處理下萃取液時，會因為酒精揮發，產生大量的蒸汽而噴發，導致只進行到 1h 就無法繼續進行溫度處理。
2. 為避免 50X【圖 4-1】及 200X【圖 4-2】稀釋下，抗氧化效果太好而無法區分出差異，且可能稀釋時樣本吸取量非常小，因而誤差較大，故將萃取液稀釋 400X，並以序列稀釋的方式進行稀釋，再進行測試，結果到 400X【圖 4-3】，各溫度處理的萃取液之 DPPH 清除率下降到 45-50%左右，各溫度處理下差異不大，且在高溫(50-100°C)處理下，隨著時間抗氧化效果也沒有而變得更差，與未加熱處理之柿子生果肉 50%酒精萃取液結果差異不大。

經由上述的測試，我們想進一步了解柿子生果肉 50%酒精萃取液中所含物質的特性及試著分離出主要的具抗氧化效果的物質，故以 silica gel(70-230 mesh)當作靜相填充管柱，進行液相層析，並以薄層色層分析(TLC)確認分離的效果及觀察柿子生果肉 50%酒精萃取液中成分之極性分布。

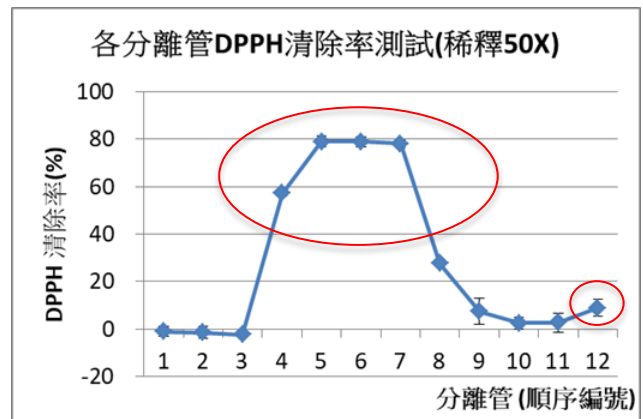
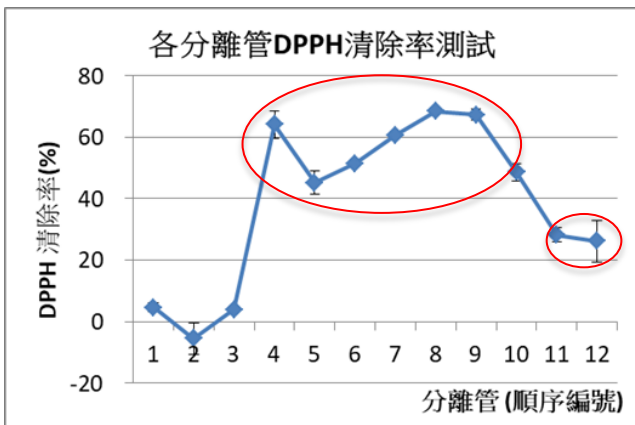
五、針對所選取萃取條件之柿子萃取液進行管柱層析分離，研究不同分離管的抗氧化力



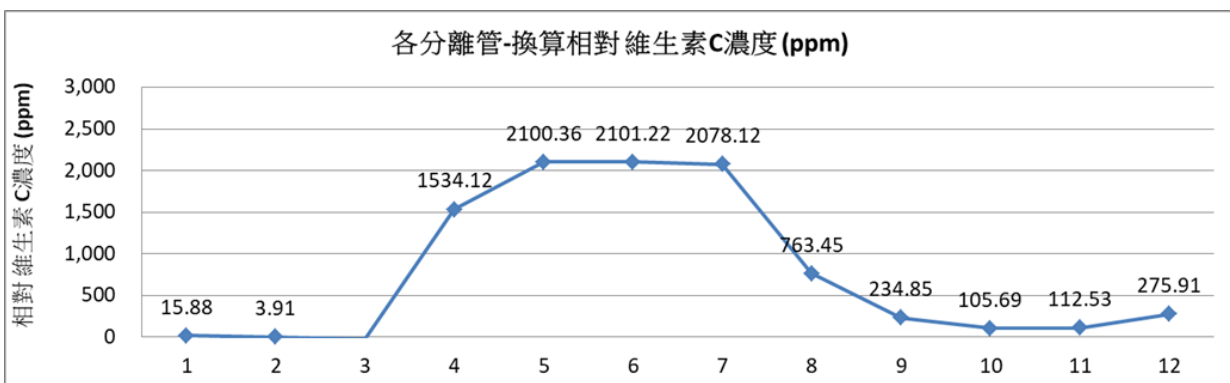
【圖 5-1】管柱層析—各分離管的收集



【圖 5-2】管柱層析—各分離管 OD517 背景值(左：原液、右：稀釋 50X)



【圖 5-3】管柱層析各分離管之抗氧化測試(左：原液、右：稀釋 50X)

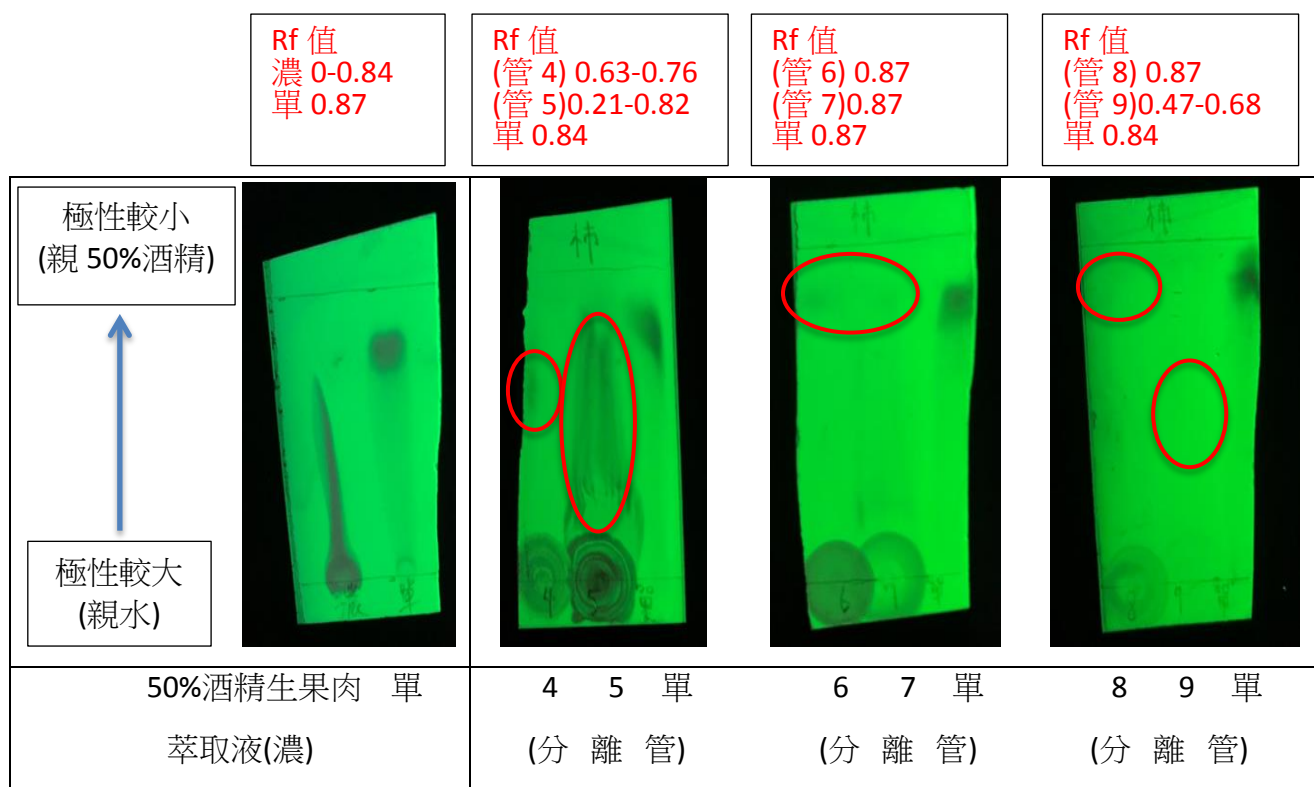


【圖 5-4】管柱層析各分離管之抗氧化測試-換算成相對維生素 C 之抗氧化力

實驗數據分析：（附錄表 5-1、5-2）

1. 【圖 5-1】利用 50%酒精作為衝提液，每 3mL 收集成一管，大約在第 4-7 管主要具顏色的萃取物質被分離出來。
 2. 【圖 5-2】【圖 5-3】分離管 5-6 背景值很高，會影響 DPPH 清除率的判讀，故稀釋 50X 再測試，結果顯示各分離管稀釋 50X 後，背景均<0.1，分離管 4-7 之 DPPH 清除率為 60-80%左右，到分離管 8 的抗氧化效果逐漸下降。若將 DPPH 清除率換算成相對維生素 C 抗氧化力，可以發現分離管 5-7 的抗氧化最強，相當於維生素 C 2000ppm 的抗氧化力。
- 根據以上的實驗，挑選較具抗氧化效果的分離管 4-9，利用薄層色層分析(TLC)確認分離的效果及觀察柿子生果肉 50%酒精萃取液中成分之極性分布。

六、利用薄層色層分析(TLC)，探討柿子萃取液及管柱層析之分離管其成分之極性分布



【圖 6-1】 柿子生果肉 50%酒精萃取液(左)及管柱層析分離管 4-9(右)薄層色層分析(TLC)測試

*備註：單為單寧酸，作為對照。

實驗數據分析：（附錄表 6）

1. 【圖 6-1 左】柿子生果肉 50%酒精萃取液中的成分為混合物，所含物質的 Rf 值由 0-0.84 均存在，代表存在從極性小到大的多種物質，但多為極性較單寧酸(Rf 值=0.87)大一些的物质。
2. 【圖 6-1 右】分離管 4 之 Rf 值為 0.63-0.76、分離管 5 之 Rf 值為 0.21-0.82、分離管 6-8 之 Rf 值均落在為 0.87 左右、分離管 9 之 Rf 值為 0.47-0.68 間。

陸、討論

一、確認在各種抗氧化測試法(碘滴定法、DPPH 清除率)下，抗氧化物濃度與抗氧化力的相關性-正控制組

(一)維他命 C 的濃度越高，抗氧化效果越佳，且維他命 C 的濃度與抗氧化效果呈正相關，故可利用維他命 C 濃度與碘滴定法中的滴定所需維他命 C 體積及 DPPH 清除率的迴歸方程式，來推估柿子萃取液中的抗氧化力約相當於多少維他命 C 的濃度(ppm)。因為維他命 C 之 DPPH 清除率的迴歸方程式為一元一次，為方便計算且考量不同的抗氧化成分可能屬於不同方向的抗氧化能力，為避免比較上的複雜，故報告中只以 DPPH 清除率的結果來呈現相對維他命 C 濃度(ppm)的換算，作為量化的參考。

以 DPPH 清除率的數據來計算：

$$\text{各樣本相對維他命 C 的濃度(ppm)} = (\text{各樣本碘滴定體積} + 1.5944) / 1.9191$$

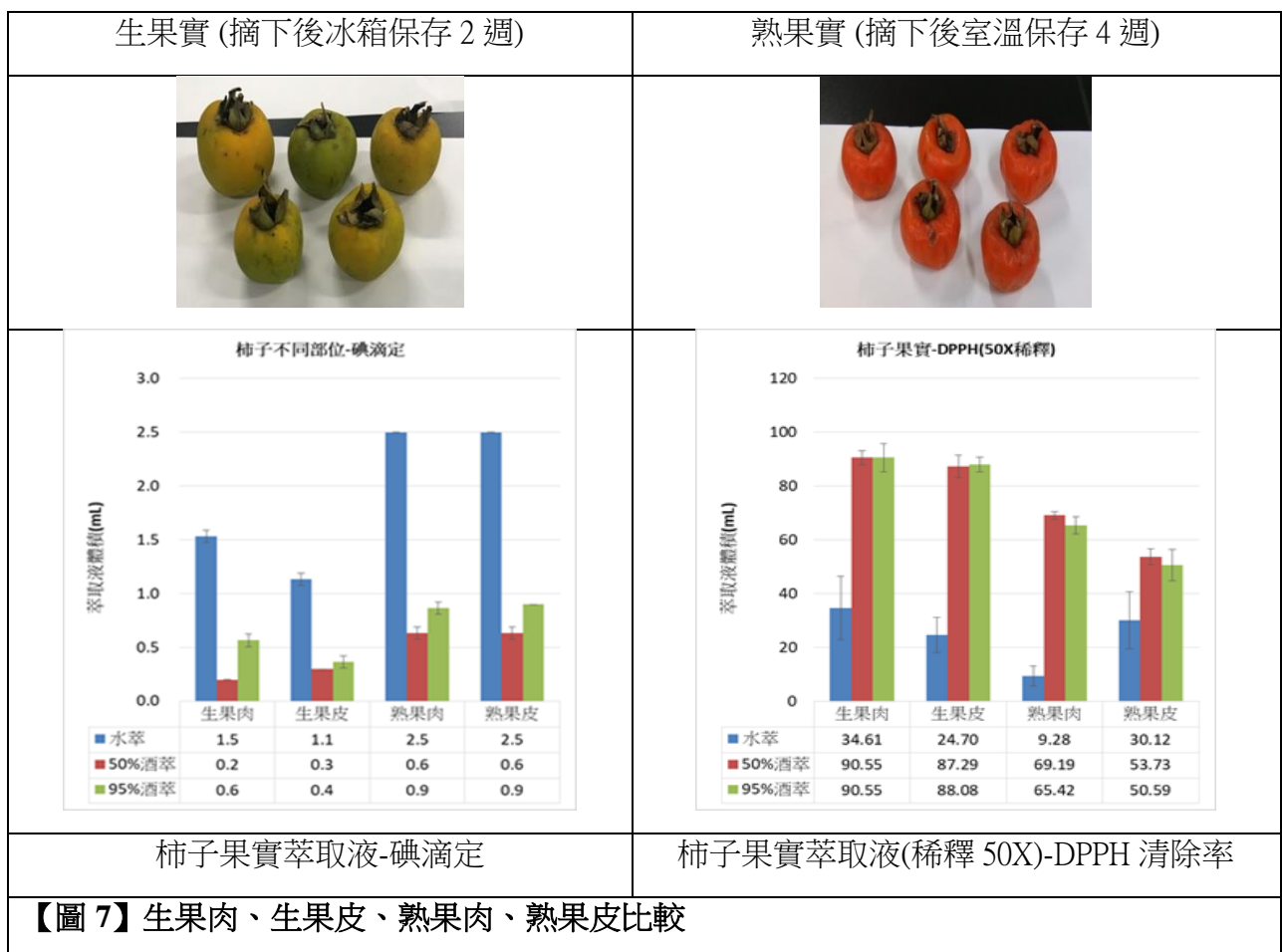
(二)抗氧化力的檢測方式有許多種，例如：清除超氧陰離子能力、螯合亞鐵離子、普魯士藍還原力測試等，考量時間及設備材料，我們選用 DPPH 清除率及碘滴定法(還原碘分子)兩種方式測試抗氧化效果，也許之後可更進一步利用其他方式探討柿子萃取液之抗氧化力。而碘滴定法的缺點是判斷滴定終點時，容易因萃取液本身的顏色干擾，產生主觀上的誤差，而萃取液的抗氧化物質有時需要時間來進行抗氧化的作用，有些測試需要達到滴定終點的時間較長，故難以精確判斷，故我們利用 30 秒變透明作為最後判斷滴定終點的標準，且均以同一為組員來進行判斷，以減少實驗的誤差。而我們也發現 DPPH 清除率測試抗氧化力的範圍較窄，50ppm 的維他命 C 其 DPPH 的清除率已達 90%，若樣本的抗氧化力超過 50ppm 之維生素 C，需要稀釋後再進行 DPPH 清除率的測試，才能比較出抗氧化力的差別。

二、探討不同萃取溶劑(水、50%酒精、95%酒精)之柿子各部位萃取液的抗氧化力

(一)目前已發現許多自然界具抗氧化能力物質，有些為水溶性(極性較大)，例如：維他命 C、類黃酮、花青素等；有些為脂溶性(極性較小)，例如：維他命 E、 β 胡蘿蔔素等。水與酒精雖然都屬於極性相對較大的溶劑，但水(H₂O)的極性大於酒精(C₂H₅OH)，還是有所差異，酒精除了溶出極性分子外，其氫基(CH-)部分也可以使之萃取出一些非極性分子(較疏水的物質)，所以，水萃、50%酒精、95%酒精萃取的柿子萃取液中所含的物質，可能有些相同，但會有些差異。而若要萃取出極性更小(疏水性)的物質，可能需要使用非極性的溶劑，例如：丙酮、己烷等。但非極性溶劑揮發性高，且多具毒性，故未選擇使用來作為本研究的萃取溶劑。

(二)我們所進行測試的柿子各部位(枝條、葉、生果肉、生果皮、熟果肉、熟果皮)都具有抗氧化力，其中以 50%酒精生果肉萃取液在碘滴定法及 DPPH 清除率較果最佳。因為時間有限，故本次研究僅挑選 50%酒精來萃取柿子生果肉，進行後續的深入探討，若能進一步了解柿子生果肉中的抗氧化成分並進行萃取，相信能有更好的發展與應用，而其他 5 個部位相信也具有可以深入探討的潛力。

(四) 生的柿子會因為可溶的單寧酸較多，而產生澀的感覺，而經過脫澀，單寧酸被轉換成不可溶的單寧酸，就不會產生澀的感覺，自然熟成可以達到脫澀的效果，我們想瞭解熟成脫澀是否會對柿子的抗氧化力有所影響，因為實驗時間與採集時間有些差距，我們希望比較生果實的皮、肉及熟果實的皮、肉的抗氧化力是否有差別，所以利用放在冰箱減緩熟成的時間及放置室溫讓柿子成熟，如下方圖生果實為摘下後冰箱保存 2 週的柿子，熟果實為摘下後室溫保存 4 週的柿子，以外觀顏色及嘗起來是否有澀味或香甜來區分生熟。在碘滴定法及 DPPH 清除率的結果可知，生果肉及生果皮在 50%酒萃、95%酒萃下，都較熟果肉與熟果皮好；而果肉與果皮結果差異不大。是否因為單寧酸的轉化造成此結果差異需要進一步證實。也許未來可以進行不同熟度的柿子抗氧化力與單寧酸含量或改變的相關性研究，而利用不同的方法脫澀是否會影響柿子抗氧化也是我們想進一步了解的方向。



三、針對所選取柿子部位及萃取溶劑，進行不同萃取條件下，抗氧化力之優化測試

由之前的實驗，我們選擇了抗氧化效果最佳的柿子生果肉，以 50% 酒精萃取進行後續抗氧化力之優化測試。

(一)不同萃取重量的柿子萃取液之抗氧化測試

如預期地，在相同萃取溶劑的體積下，隨著柿子生果肉粉末越多，抗氧化效果越好，但到了 2g 似乎達到飽和，抗氧化效果與 3g、4g 萃取無差異。表示柿子生果肉內的可被溶劑萃出的物質已達飽和，故之後的測試只需要以 50% 酒精 50mL 來萃取 2g 的柿子生果肉粉末的比例來進行即可達到很好的抗氧化效果。

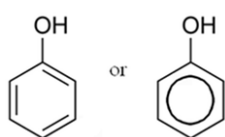
(二) 不同萃取時間的柿子萃取液之抗氧化測試

碘滴定及 DPPH 清除率在各時間萃取時間下，抗氧化效果差異不大，推測 4h 的萃取時間已能將大部分可溶於 50% 酒精之抗氧化物質萃取出，考量作息，之後的實驗還是利用萃取時間 24h 來進行實驗。

綜合以上的測試，雖找到萃取達飽和的條件，但在各萃取條件下，實際萃取率需進一步研究計算。

四、針對所選取萃取條件之柿子萃取液，探討溫度對其抗氧化力之影響

極性較大的抗氧化物質很多，例如：維生素 C、多酚、類黃酮、單寧酸...等，有些耐熱，有些不耐熱，維生素 C 已知不耐熱，而多酚則有不同程度的耐熱特性，文獻中提到柿子中富含 β -胡蘿蔔素、維生素 A 及 C、單寧酸、酚類。另外，柿子也已知含有兒茶素、原花青素等強大的抗氧化物。根據文獻只要含有酚結構的化合物都可以歸為多酚類，而酚結構的數量和特徵構成了該類特定成員獨特的物理、化學、生物特性，單寧酸、類黃酮、花青素在廣義的分類下，也屬於多酚，雖然我們無法得知目前所用的萃取條件下，萃取出來的抗氧化物質是什麼，但我們很好奇柿子生果肉 50% 酒精萃取液中的成分是否具耐熱性，結果發現在 0、25、50、75、100°C 的作用下，25°C 以下的低溫不會影響抗氧化力，而 50°C 以上的高溫，似乎也對抗氧化力沒有影響，所以，我們認為生果肉 50% 酒精萃取液中的成分具耐熱性，可耐 50~75°C 達 2h，100°C 達 1h，是否能耐熱更長的時間，也許未來可以進一步探討，由結果也可以知道柿子生果肉 50% 酒精萃取液的抗氧化成分應不是不耐熱的維生素 C。



↑ 苯酚-最簡單的酚類化合物

五、針對所選取萃取條件之柿子萃取液進行管柱層析分離，研究不同分離層的抗氧化力

利用矽膠 60(silica gel 70-230 mesh)作為管柱層析的靜相，利用 50%酒精做為沖提液，試著將柿子生果肉 50%酒精萃取液內的物質依極性不同進行分離，越早分離出來極性越小(極性應與 50%酒精較近)，越晚分離出來的極性越大(極性與水較近)，我們分離出 12 管分離管，前 1-3 管約 9mL 應是原管柱中的沖提液，無抗氧化效果，第 4-7 管開始，具顏色的物質被分離出，其中 5-7 的抗氧化最強，相當於 2000ppm 維生素 C 的抗氧化力，分離管 8 開始抗氧化力下降，但分離管 12 又發現抗氧化效果些微上升的狀況，也許存在極性相對大且微量的抗氧化物質最後才被分離出來。

六、利用薄層色層分析(TLC)，探討柿子萃取液及管柱層析之分離管其成分之極性分布

(一) 我們利用 TLC 片來觀察柿子生果肉 50%酒精萃取液及在管柱層析中分離出具有抗氧化效果的分離管 4-9 中成分的極性分布，單寧酸為已知柿子中具有的成分，作為極性位置對照。結果可知，柿子生果肉 50%酒精萃取液中的成分很多，極性分布介於水及 50%酒精之間，從小到大都有 (TLC 有拖尾現象)，但多為極性較單寧酸大一些的物質。

(二) TLC 結果中，Rf 值越小，極性越大，Rf 值越大極性越小，依管柱層析順序，分離管 4-5 應該為極性相對小的物質，但 Rf 值分別落在 0.63-0.76 及 0.21-0.82 間，極性分布範圍大，可能是因為物質多樣且極性接近而照成拖尾的現象，而分離管 6-8 地成分似乎較單純，均落在 Rf 值 0.87 左右，相對單寧酸 Rf 值約 0.84-0.87 間的位置，而分離管 9 成分較雜，Rf 值約 0.47-0.68 間，相對極性較分離管 6-8 大，除了分離管 4-5，其餘符合管柱層析越後面的分離管 Rf 值越高的趨勢，也許我們所選用的沖提液及分離條件在管柱層析時，沒有將其中的物質有效分開，或者抗氧化物質成分複雜，極性的分布也較廣，所以拖尾嚴重影響判讀，也可能是 TLC 操作時，未選用到適當的展開液，導致分離效果不佳造成，未來可以進一步測試管柱層析及 TLC 更適合的條件，以達更好的分離效果。

(三) 抗氧化效果最佳的分離管 6-8 中的抗氧化物質是否為單寧酸、或者是其他具抗氧化的物質，還需進一步證實。若能進一步大量萃取分離，並確認其構造、成分，將能更深入探討，且進一步利用在生活當中。

柒、結論

- 一、柿子 6 個部位(枝條、葉、生果肉、生果皮、熟果肉、熟果皮)，分別以水、50%酒精、95%酒精萃取下，生果肉 50%酒精萃取液最具抗氧化潛力。
- 二、柿子 50%酒精萃取下，隨著柿子生果肉所佔的比例高，抗氧化效果越佳，到 2g 已達飽和；而萃取時間到 4h 即可將可溶出的物質萃取出來。
- 三、柿子生果肉 50%酒精萃取液在 50-75°C 處理下，具耐熱性至少 2h；在 100°C 處理下，具耐熱性至少 1h。
- 四、利用管柱層析（矽膠 60），我們分離出 3 管最具抗氧化效果的分離管(5-7)。
- 五、由 TLC 結果可知，分離管 5 內成分複雜；分離管 6-7 內成分單純，極性介於水及 50%酒精，其中應具多種抗氧化潛力之柿子生果肉萃取物。

捌、未來展望

- 一、研究生果肉之外，其他柿子部位的抗氧化萃取條件的優化測試及其抗氧化成分的分離。
- 二、進一步針對生果肉 50%酒精萃取物進行以下研究：
 - （一）測試更具分離效果的管柱層析及薄層色層分析的條件
 - （二）萃取率的計算及優化
 - （三）確認最具抗氧化力的成分之構造。
 - （四）增加抗氧化物質的萃取率。
 - （五）其他可應用性的研發。
- 三、進行不同熟度的柿子抗氧化力與單寧酸含量或改變的相關性研究。
- 四、不同脫澀方法對柿子抗氧化力的影響。

玖、參考文獻

- 一、趙強 (1997) 對抗疾病與老化的新發現--自由基與抗氧化物質，馬偕紀念醫院美食天下 第 64 期。取自：<http://www2.mmh.org.tw/nutrition/chao/064antioxid.htm>
- 二、對抗疾病與老化的新發現-自由基與抗氧化物質。取自
<http://www.mmh.org.tw/nutrition/chao/064antioxid.htm>
- 三、健康百科—有健康網:抗氧化。取自：<http://www.uuwell.com/mytag.php?id=37132>
- 四、林恩仕等 (2007)常見十四種植物萃取物之抗氧化功效評估，萬能科技大學 萬能學報 第 29 期 P.179-188。
- 五、茶花萃取液之抗氧化能力及其生活上之應用研究。中華民國第 54 屆中小學科學展覽會 國中組化學科第三名科展作品說明書
- 六、海梨柑的另一片天。中華民國第 57 屆中小學科學展覽會國中組生物科科展作品說明書
- 七、柿可而止。新竹市第 37 屆中小學科學展覽會國中組生物科科展作品說明書
- 八、醫學百科-柿子。取自 <http://cht.a-hospital.com/w/%E6%9F%BF%E5%AD%90>
- 九、每日頭條-柿子的六大健康和營養益處。取自 <https://kknews.cc/food/jj5m9vp.html>
- 十、台灣癌症基金會-柿子的營養成分。取自 <https://www.canceraway.org.tw/page.asp?IDno=2962>
- 十一、樂活營養師-柿子。取自 <http://www.foodcare.com.tw/label.aspx?article=1396>
- 十二、柿子介紹。取自行政院農委會網頁 <https://kmweb.coa.gov.tw/subject/index.php?id=104>
- 十三、【圖解】甜柿、澀柿、硬柿、軟柿差在哪？取自：<https://food.ltn.com.tw/article/6864>
- 十四、秋天到了！柿子又稱「神仙果實」！它的 3 大好處，居然更勝蘋果、奇異果~太驚人了！取自：<https://www.peakme.cc/post/641274>
- 十五、抗癌、降血脂、抗氧化？柿子的秘密都在這。取自：
<https://health.businessweekly.com.tw/AArticle.aspx?id=ARTL000075175>
- 十六、多酚。取自：<https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E5%A4%9A%E9%85%9A>
- 十七、層析法。取自 <https://www.ch.ntu.edu.tw/~genchem99/doc/demonstration/chromatography.pdf>
- 十八、層析法原理。取自 <http://orglab.thu.edu.tw/Exp1-22/exp05.pdf>

【評語】 030303

本研究為現象確立型研究，以數種方法尋找柿子產生最多抗氧化劑的部位。學生分別萃取生柿子與熟柿子的皮與果肉，再以水、50%酒精、95%酒精進行內容物的萃取，並利用碘滴定及 DPPH 清除率作為抗氧化物的定量方式。其中生果肉 50%酒精萃取液最具抗氧化潛力。工作內容繁多，能仔細完成分析實屬不易，值得鼓勵。本研究主題具實用性，但僅為初期結果尚不能支持結論。

優點：該研究所採取的萃取方式及抗氧化物定量策略雖然簡便，但考量中學生的研究時間以及設備的限制，該成果已屬不易。本研究之實驗觀測及紀錄完善，值得鼓勵。

建議：

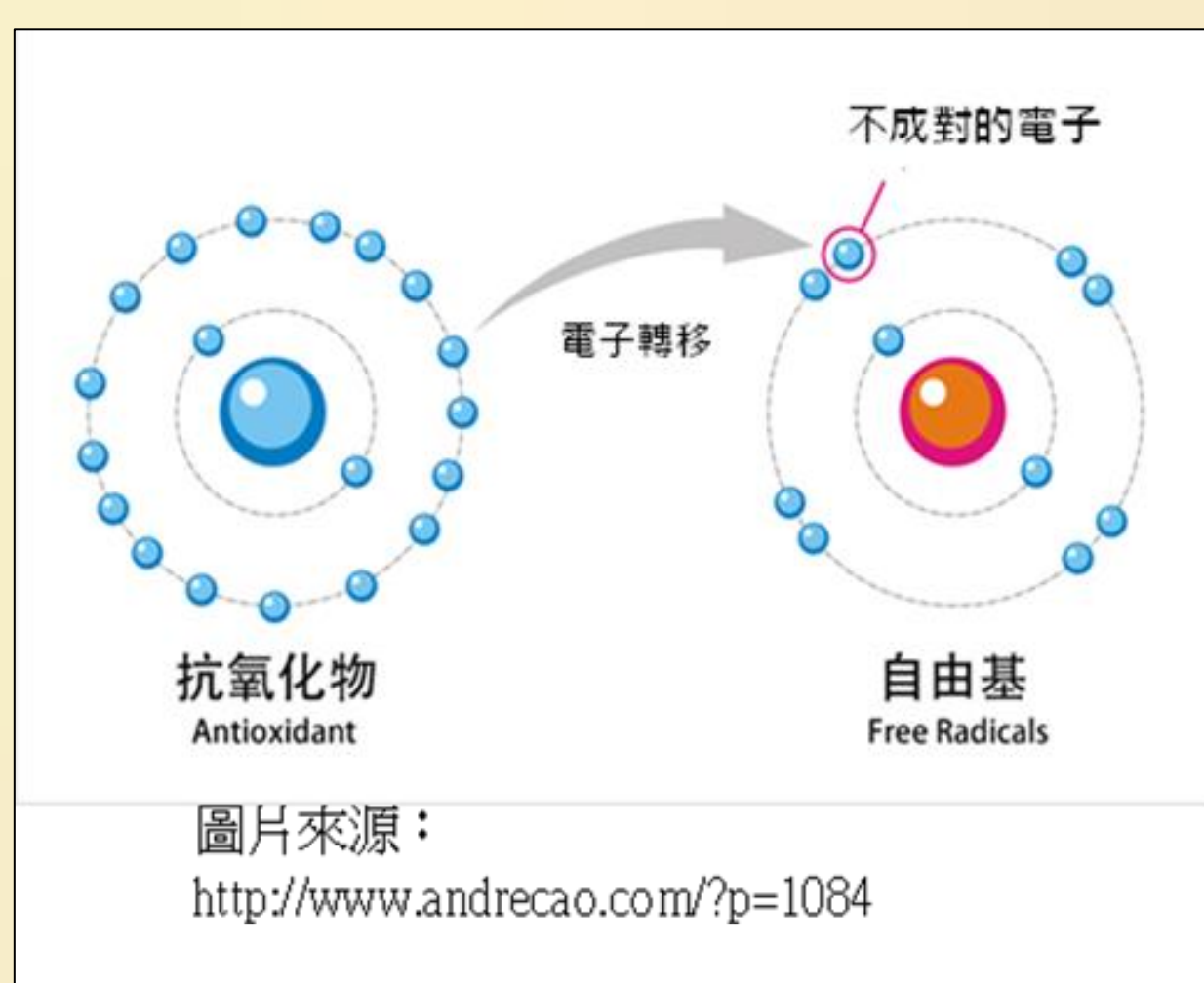
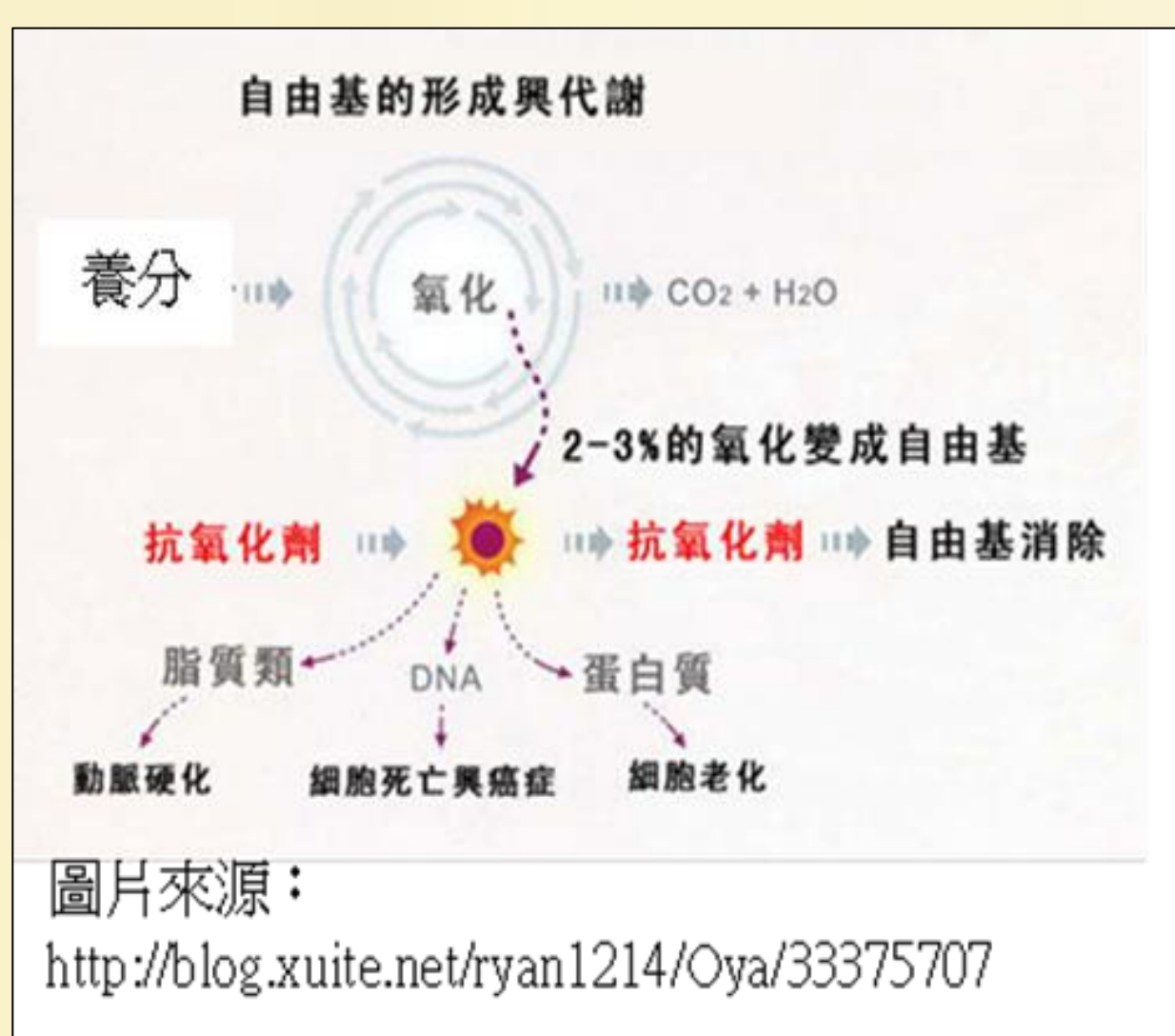
1. 在研究中學生有利用維生素作為測試抗氧化物測量的標準曲線測定。由於已經知道柿子內含的抗氧化物除了維生素 C 之外，可能還有單寧、類黃酮、花青素、維他命 E、 β 胡蘿蔔等，若能進一步分析或是比較不同萃取物中特定抗氧化物的含量，或是比較不同保存方式下特定抗氧化物的穩定性及後續的萃取效率，會增加這個研究的深度。
2. 實驗目的必須明確，第四頁所列之目的實為實驗方法，利用這些方法測得的結果目的何在？對於柿子的市場或生產繁殖有何助益，需深入探討說明，而非單純僅測得一堆數據。

作品海報

摘要

柿子為新竹在地水果，富含豐富養分且含有許多具抗氧化功能的成分。我們想針對柿子的抗氧化力進行實驗，希望可以研究柿子不同部位及生、熟果的抗氧化力，找到萃取出抗氧化物質的最佳的條件，並試著分離出抗氧化效果較佳的物質進行更深入的研究探討。結果發現柿子6個部位(枝條、葉、生果肉、生果皮、熟果肉、熟果皮)，分別以水、50%酒精、95%酒精萃取下，**生果肉50%酒精萃取液最具抗氧化潛力，且在50-75°C處理下，耐熱至少2h；在100°C處理下，耐熱至少1h。**利用管柱層析(矽膠60)，分離出3管最具抗氧化效果的分離管，並由TLC結果可知，分離管內成分複雜，極性介於水及50%酒萃，其中應具多種抗氧化潛力之柿子生果肉萃取物。

壹、抗氧化的重要性

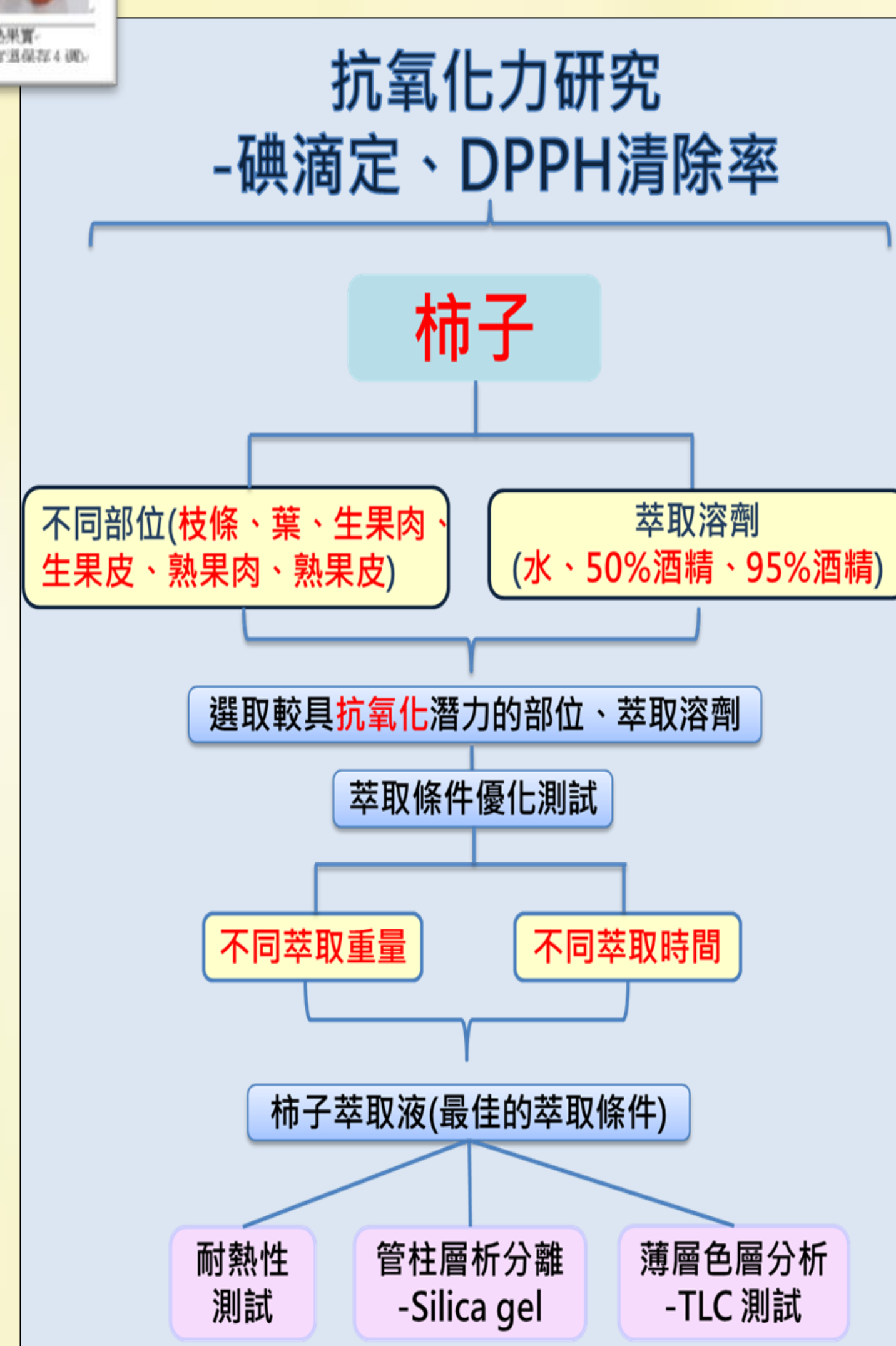


貳、研究目的

- 一、確認在各種抗氧化測試法下，**抗氧化物濃度與抗氧化力的相關性-正控制組**
(一)碘滴定法；(二)DPPH清除率測試
- 二、探討**不同萃取溶劑之柿子各部位**萃取液的抗氧化力
- 三、針對所選取柿子部位及萃取溶劑，進行**不同萃取條件下，抗氧化力之優化測試**
(一)不同**萃取重量**的柿子萃取液
(二)不同**萃取時間**的柿子萃取液
- 四、針對所選取萃取條件之柿子萃取液，**探討溫度對其抗氧化力之影響**
- 五、針對所選取萃取條件之柿子萃取液，進行管柱層析分離，研究**不同分離管的抗氧化力**
- 六、利用**薄層色層分析(TLC)**，探討柿子萃取液及管柱層析分離管其**成分之極性分布**



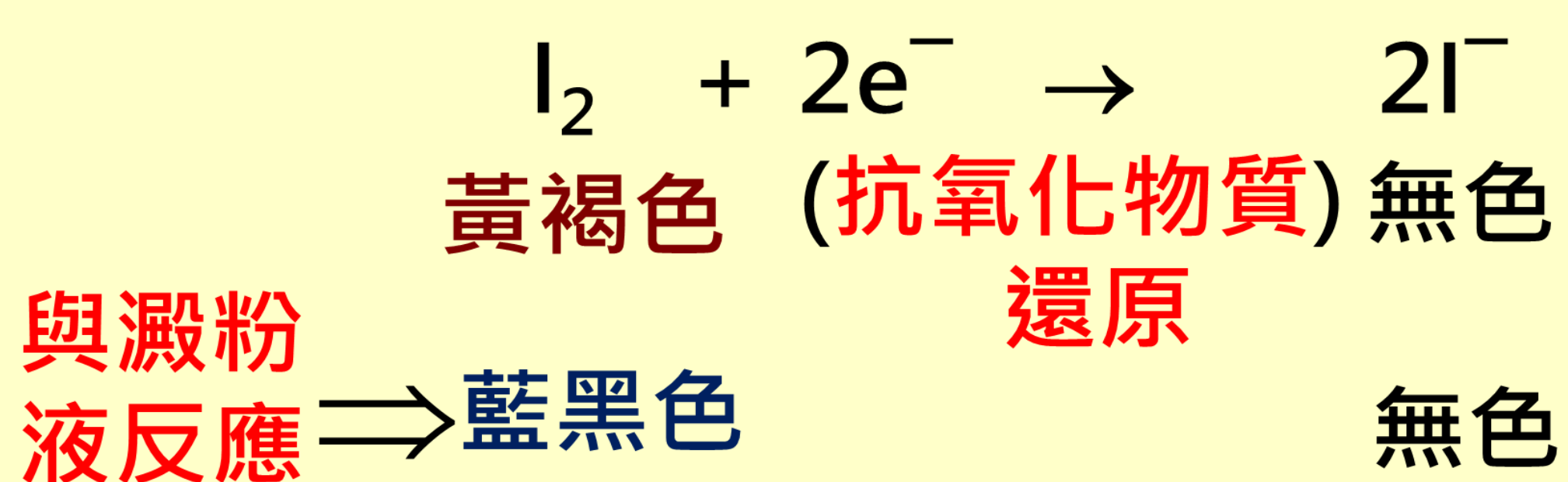
參、實驗架構



肆、實驗原理

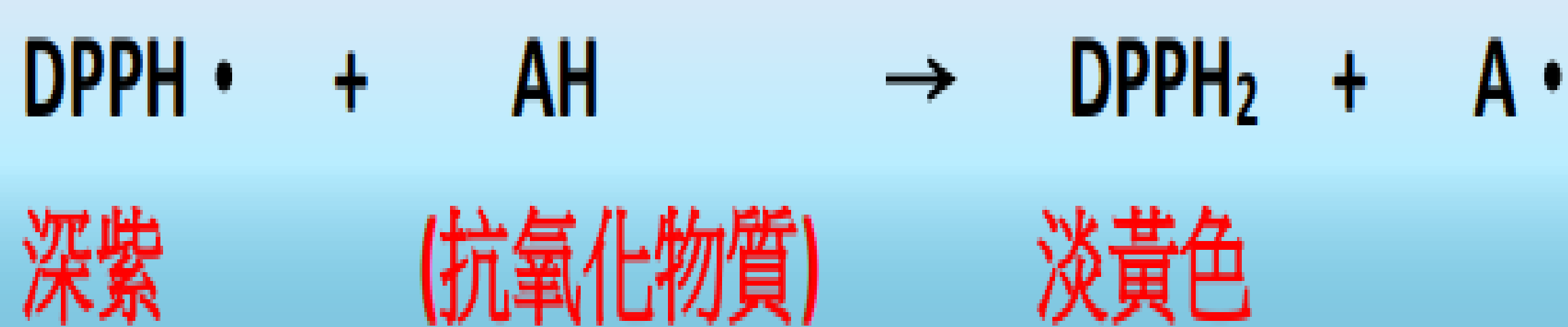
一、碘液滴定法

利用抗氧化物質將碘分子還原成碘離子的特性，測試其抗氧化力。



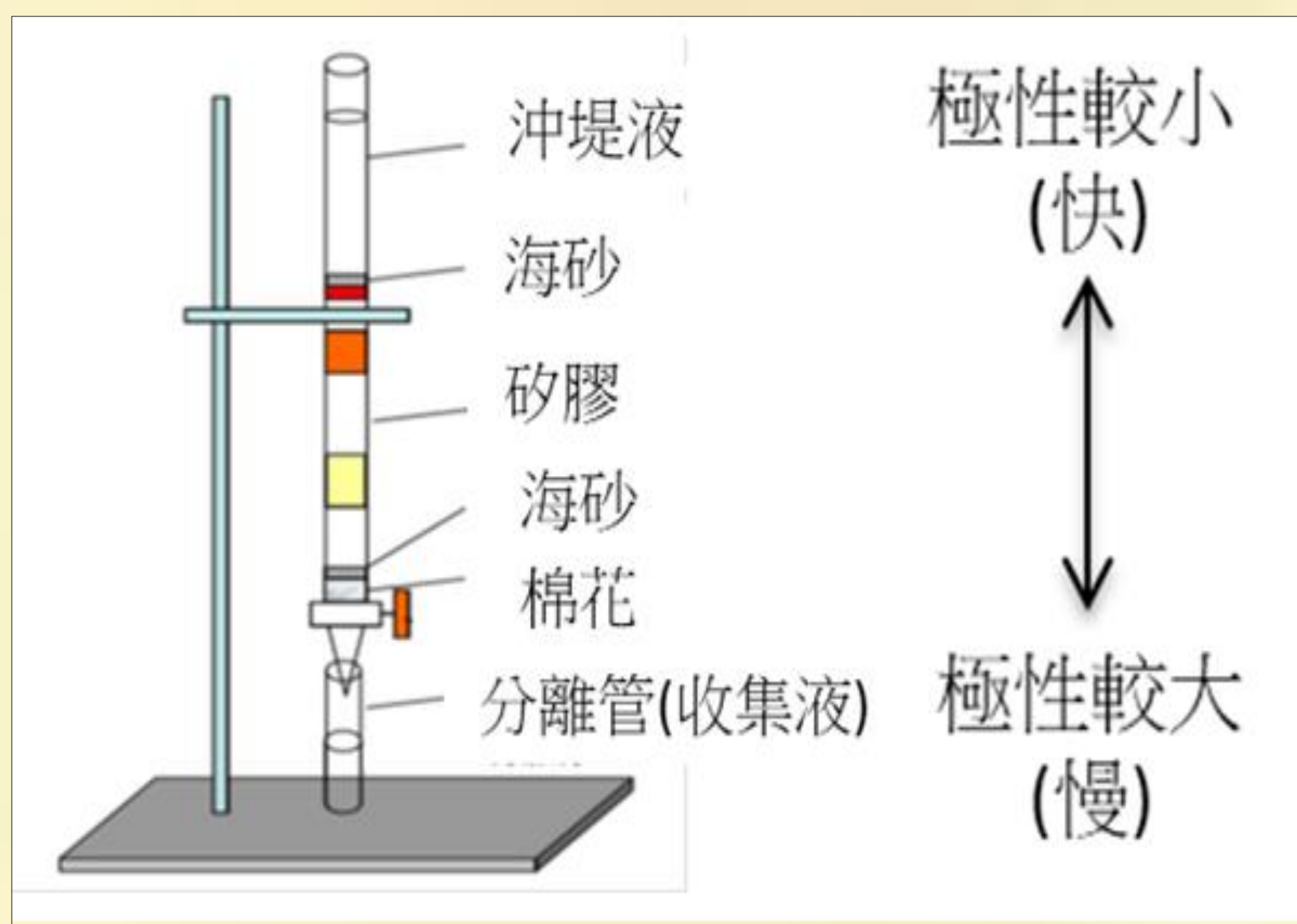
二、清除DPPH自由基能力 (OD 517nm)

利用DPPH清除率(相對於對照組-水之吸光值下降百分比)，判斷樣品消除DPPH自由基能力之強弱。



三、管柱層析法

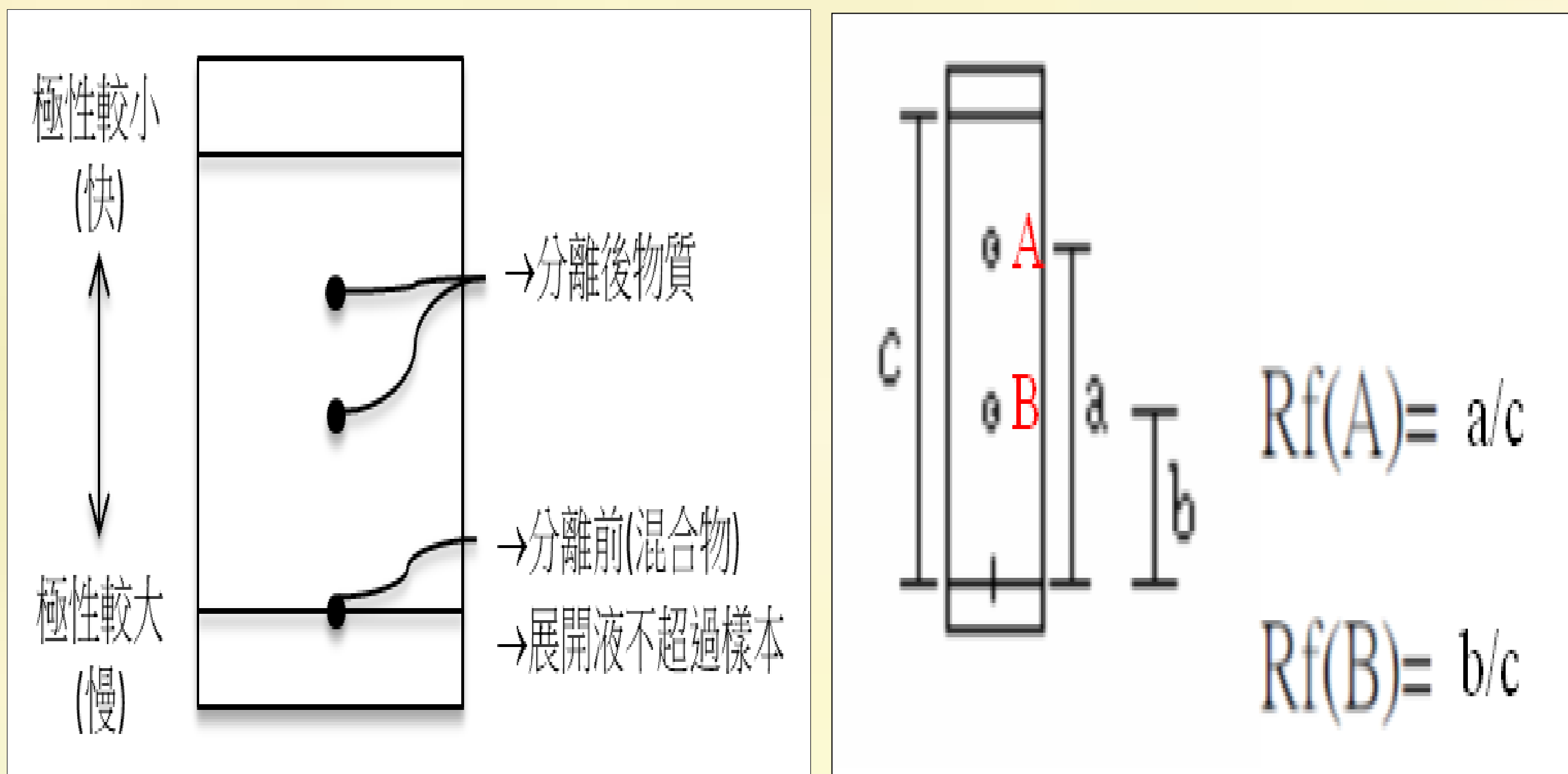
利用沖提作用及吸附劑同時對溶劑及溶質吸附力大小而使之成為差別移動，進而將混合物中各組成分離。



四、薄層色層分析法(TLC)

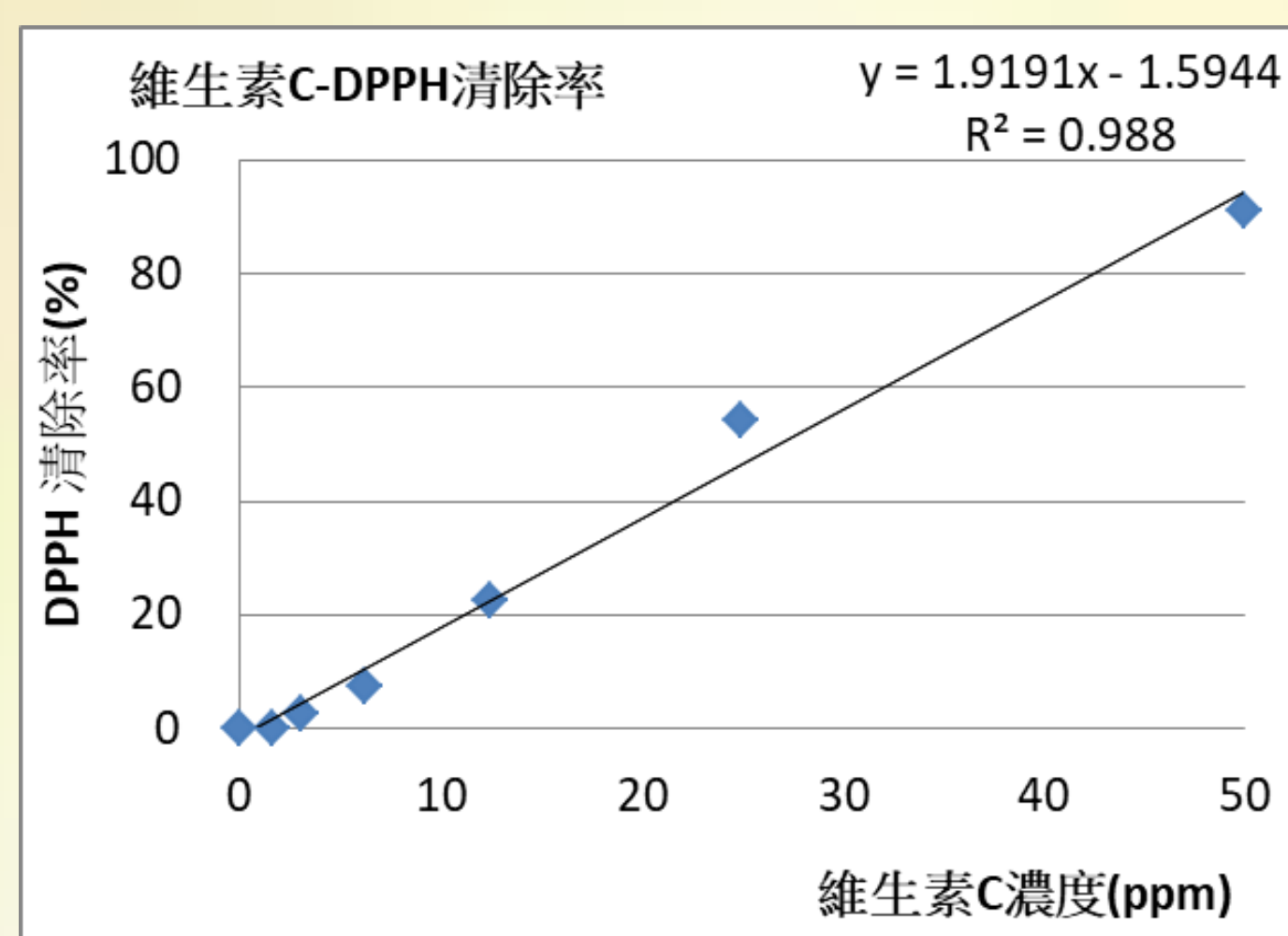
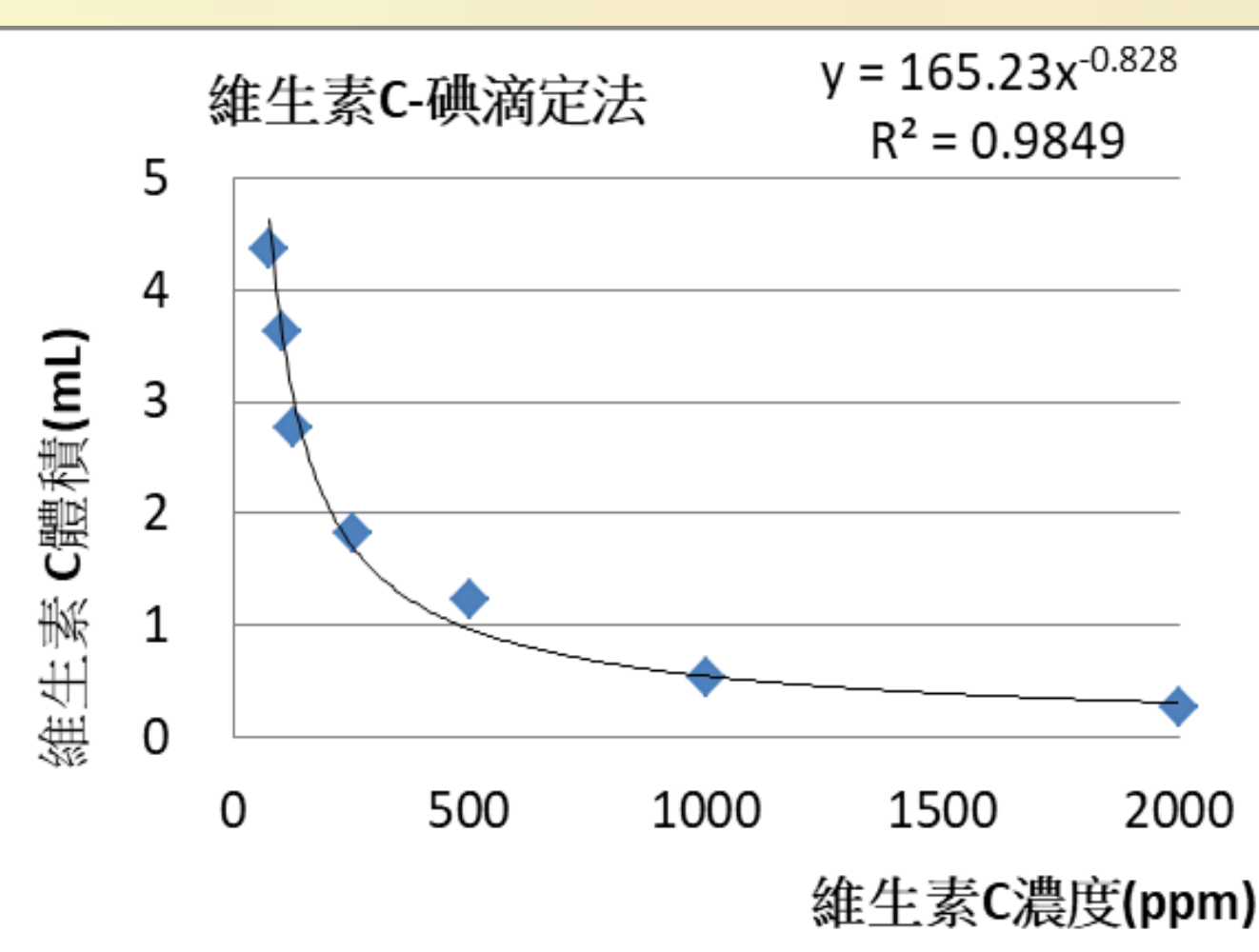
利用混合物中的各個成份對固定相的吸附能力不同，測試其極性分布範圍。

*R_f值：一化合物在薄層板上升的高度與展開劑上升高度的比值。



伍、實驗結果

一、確認在各種抗氧化測試法下，抗氧化物濃度與抗氧化力的相關性-正控制組



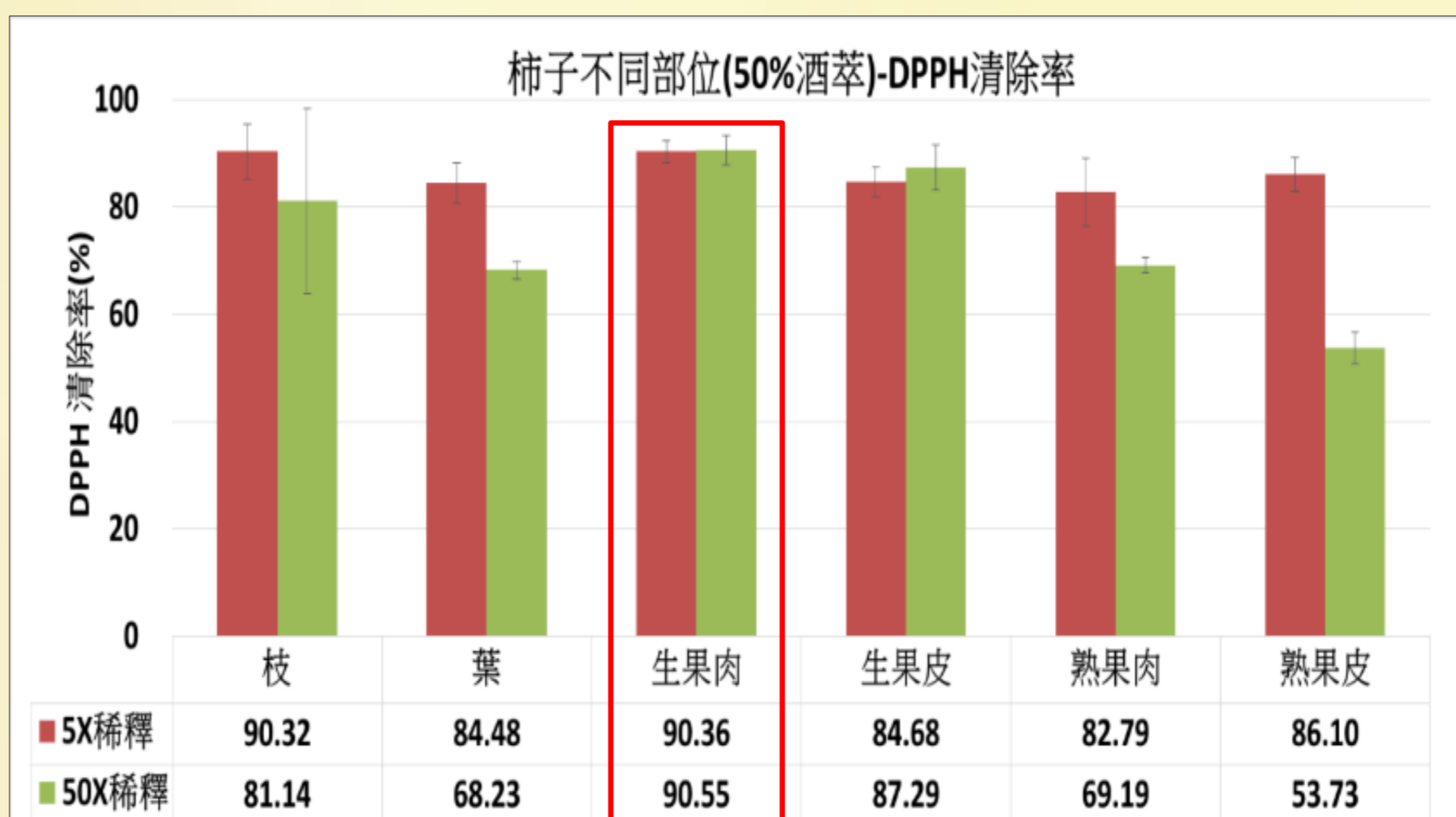
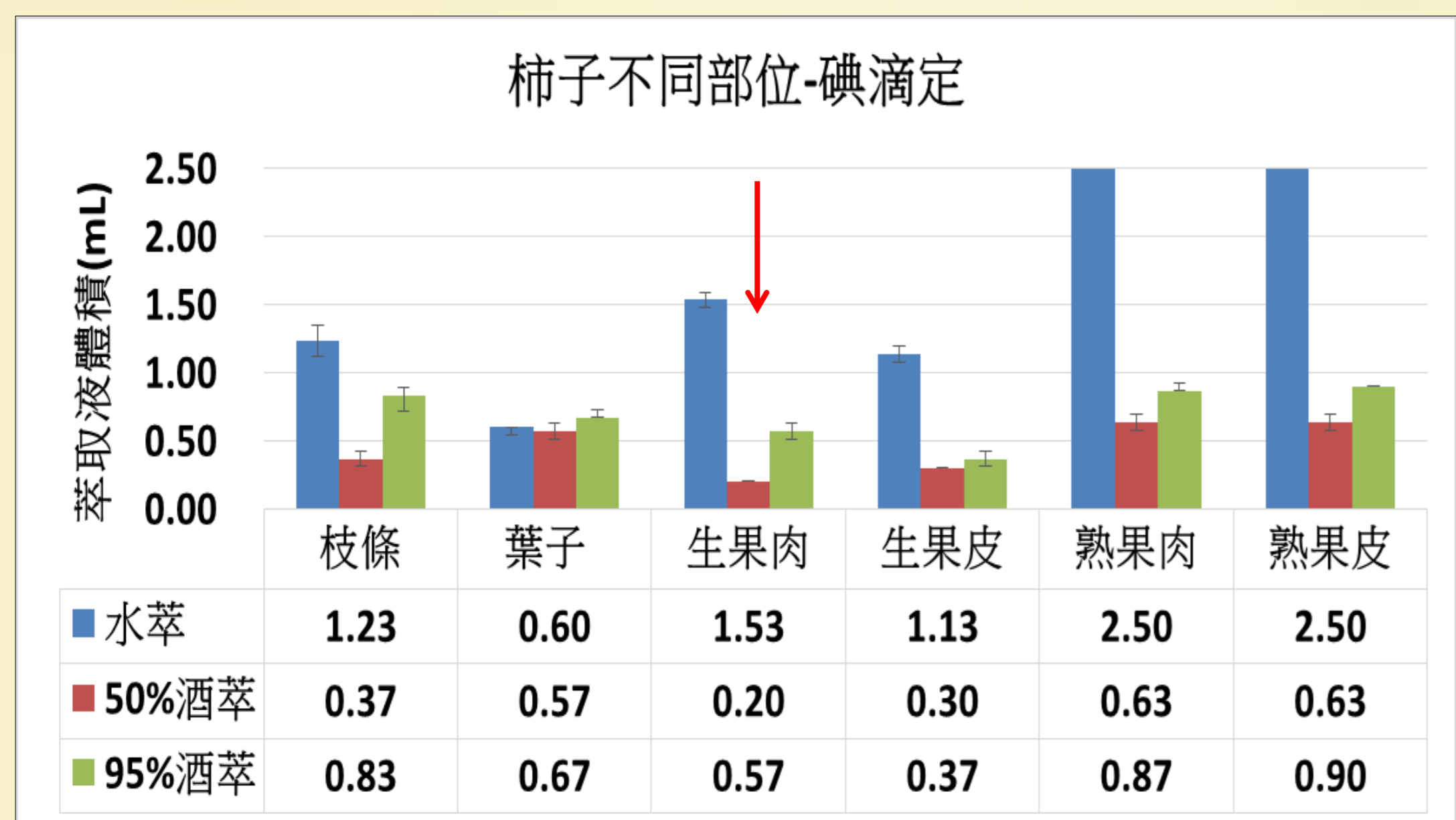
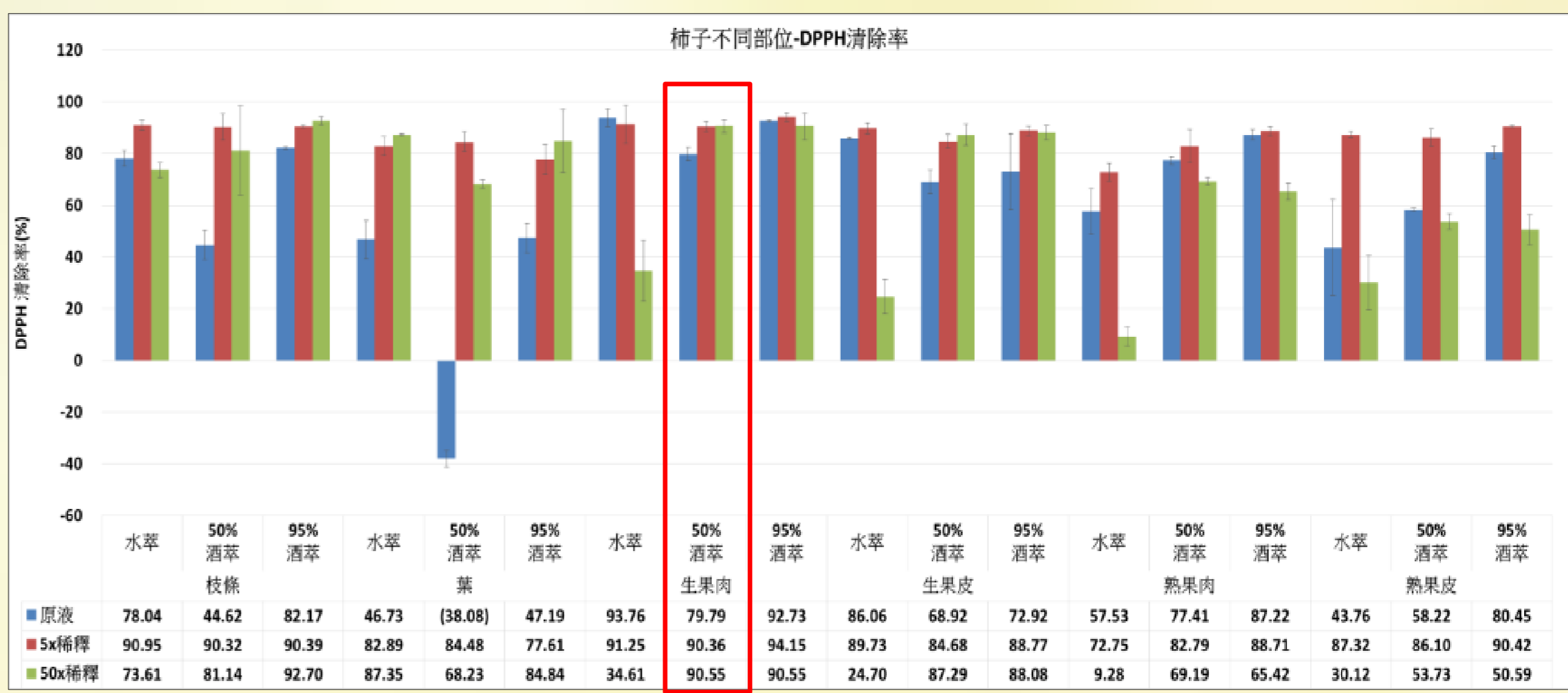
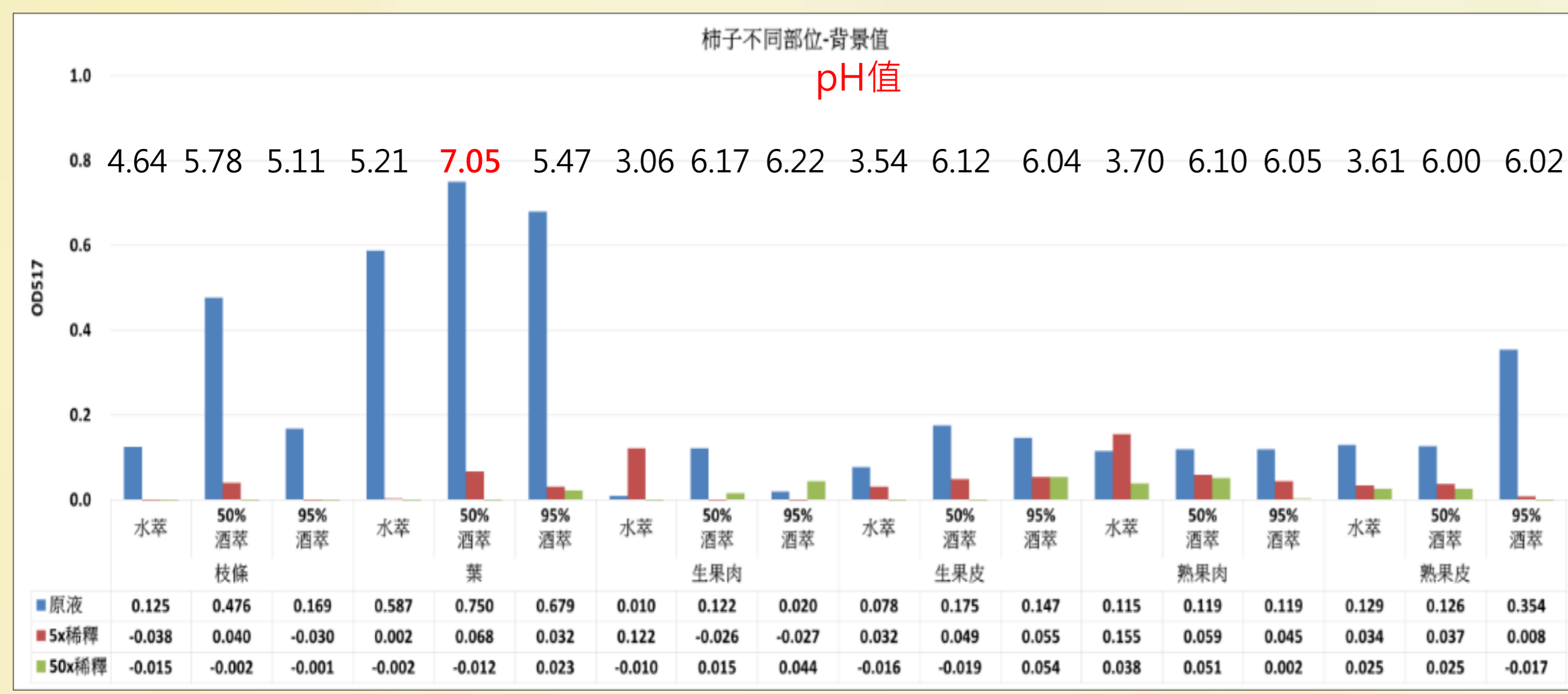
實驗數據分析：

維他命C的濃度越高，抗氧化效果越佳，且**維他命C的濃度與抗氧化效果呈正相關**，相關係數(R²)>0.9以上，以正控制組確定碘液滴定法及DPPH清除率測試抗氧化效果的可行性並確認實驗過程無異常狀況。

(一)碘滴定法

(二)DPPH清除率測試

二、探討不同萃取溶劑之柿子各部位萃取液的抗氧化力

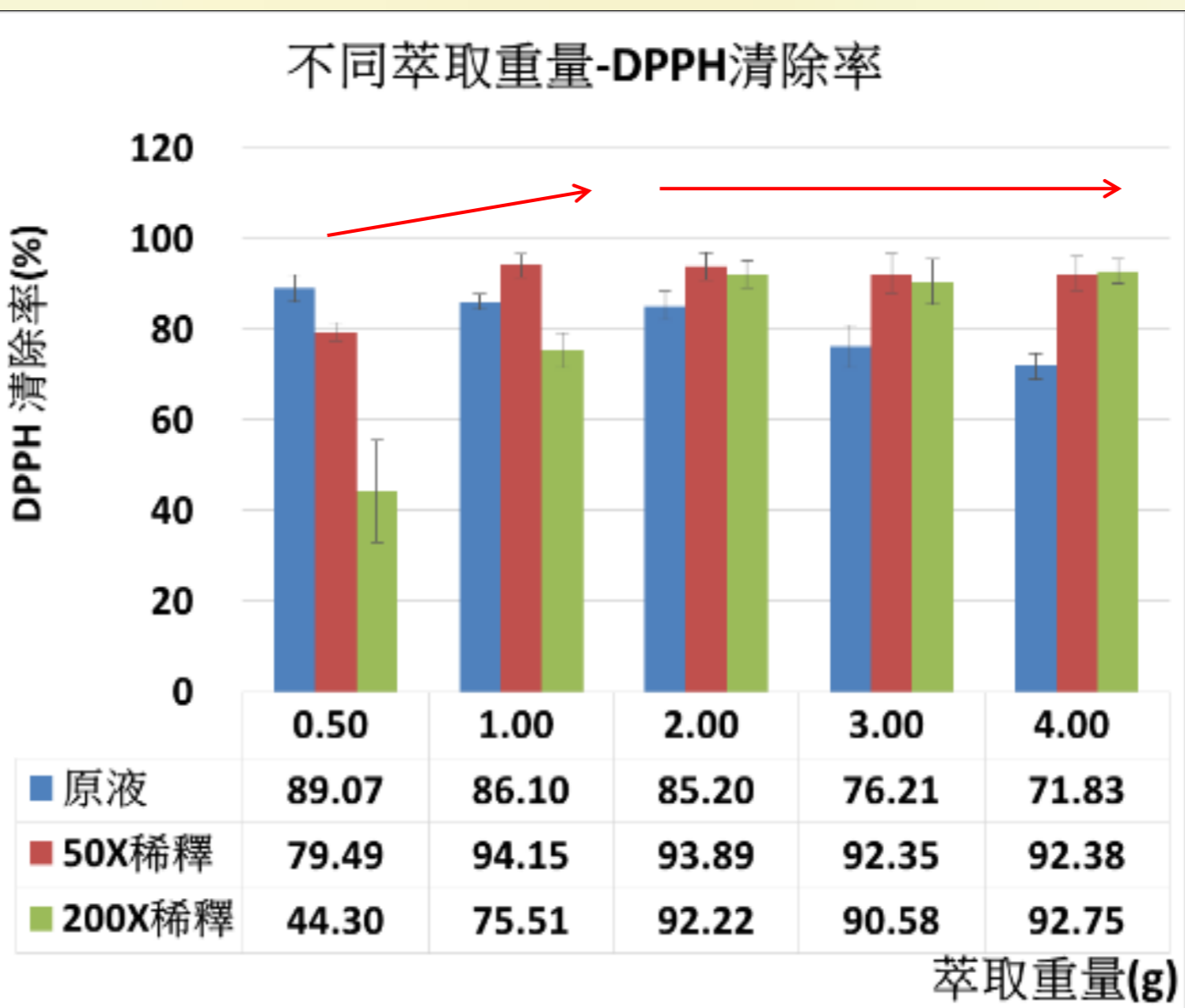
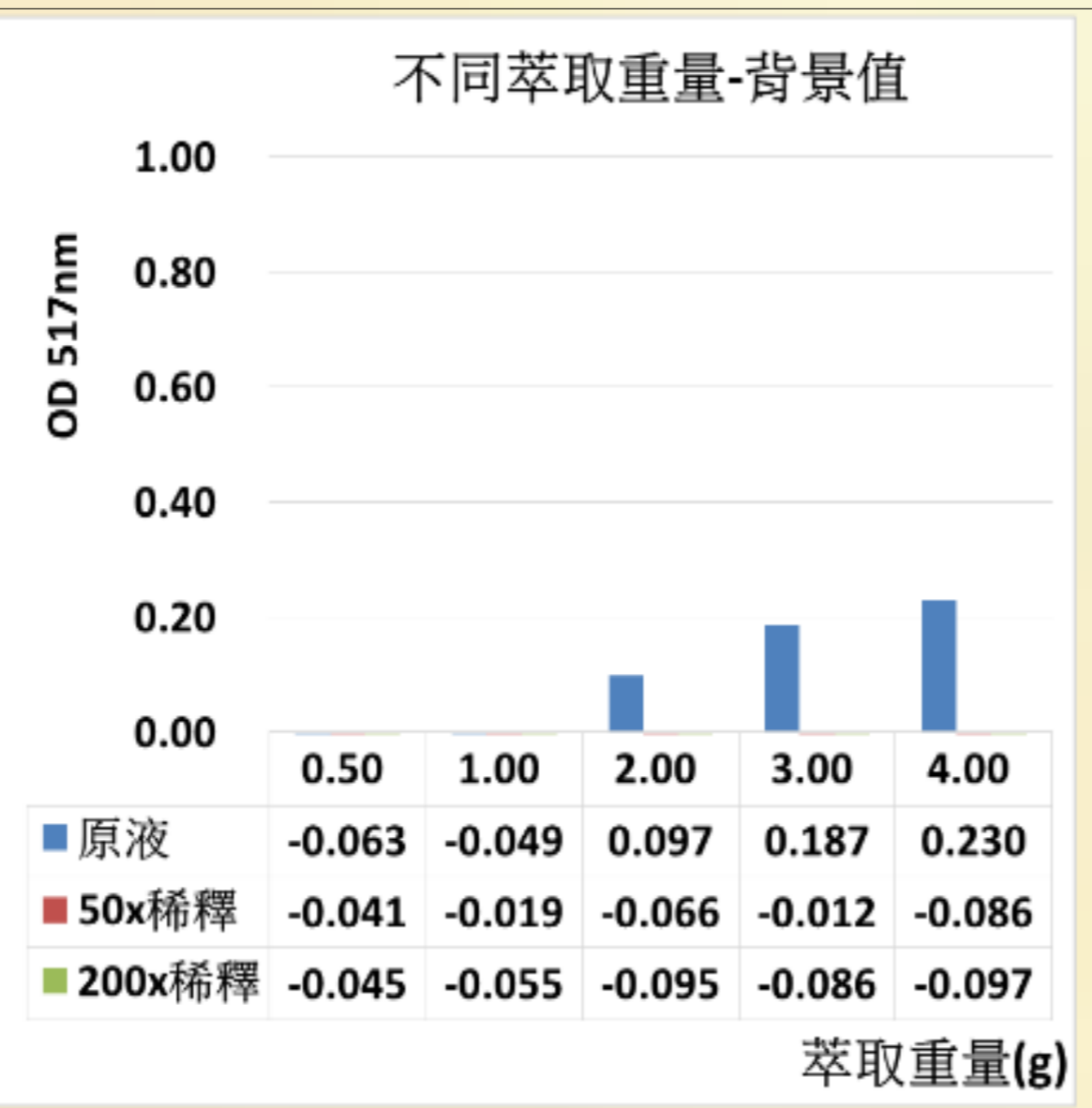
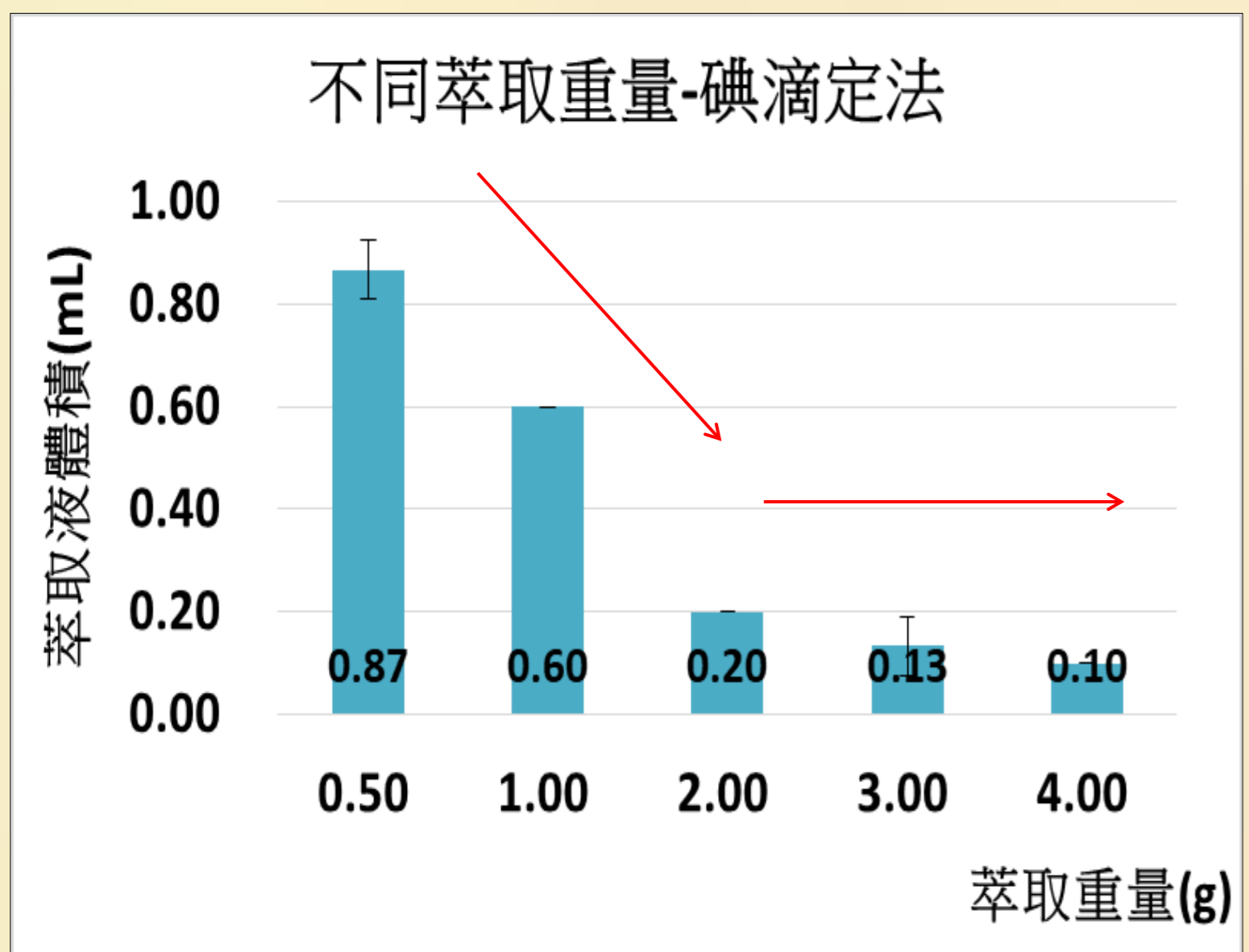


實驗數據分析：
50%酒精萃取柿子生果肉最具抗氧化效果，且除葉50%酒精萃取液pH值接近中性，其餘各部位之pH值均呈酸性。

*因原液在DPPH清除率會有背景值，故之後的實驗將直接以50X及200X進行測試。

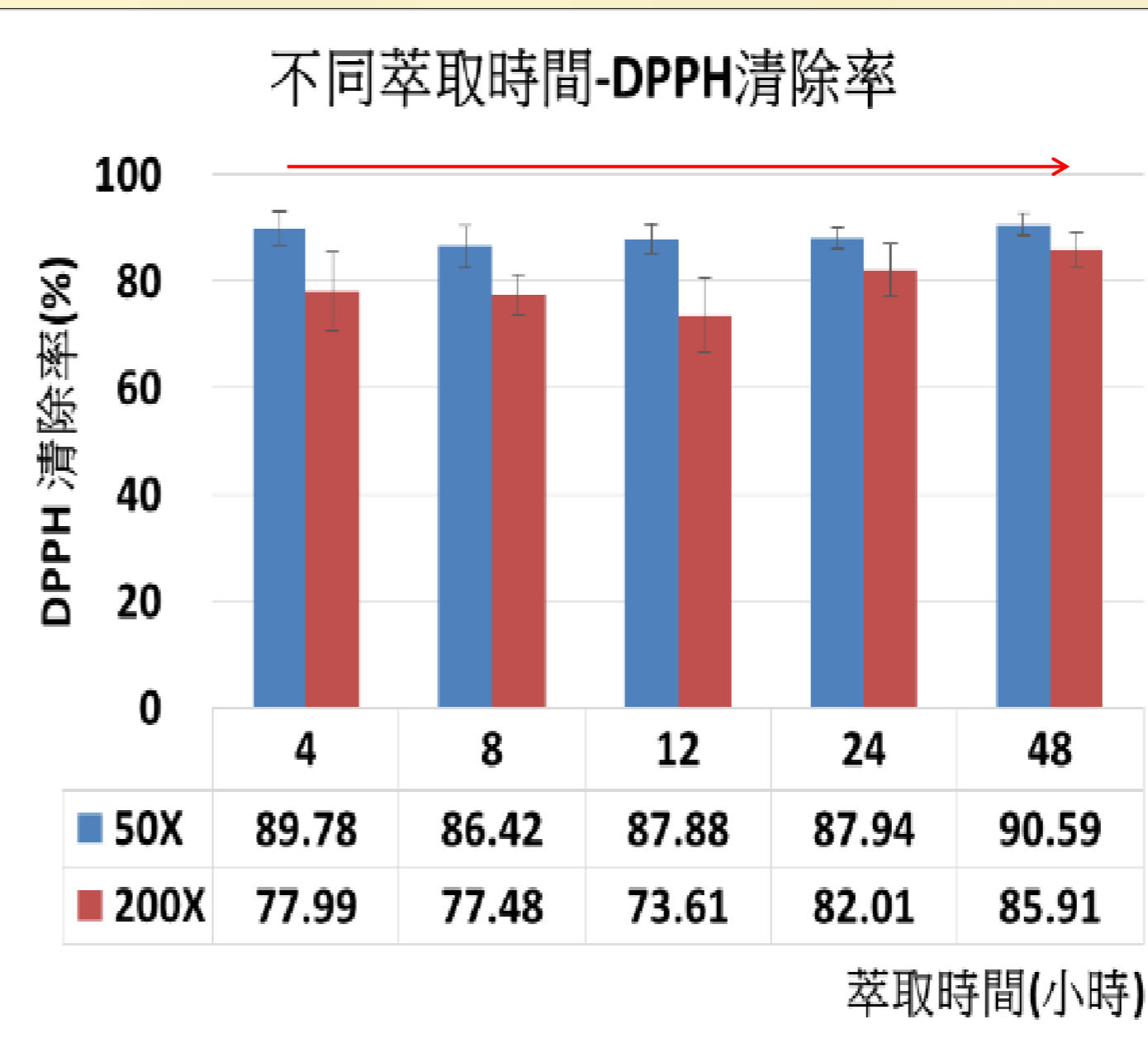
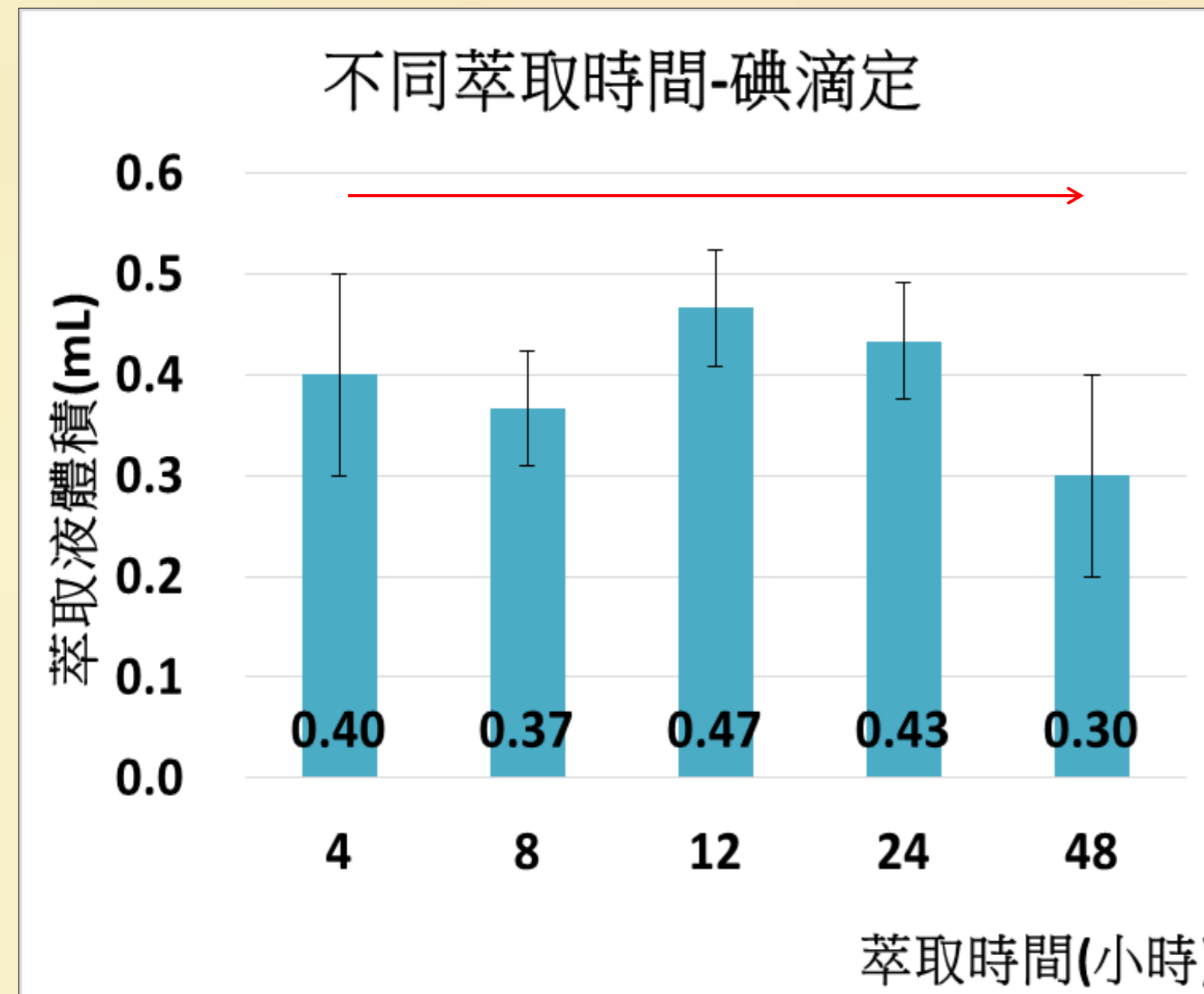
三、針對所選取柿子部位及萃取溶劑，進行不同萃取條件下，抗氧化力之優化測試-生果肉

(一) 不同萃取重量的柿子生果肉萃取液之抗氧化測試



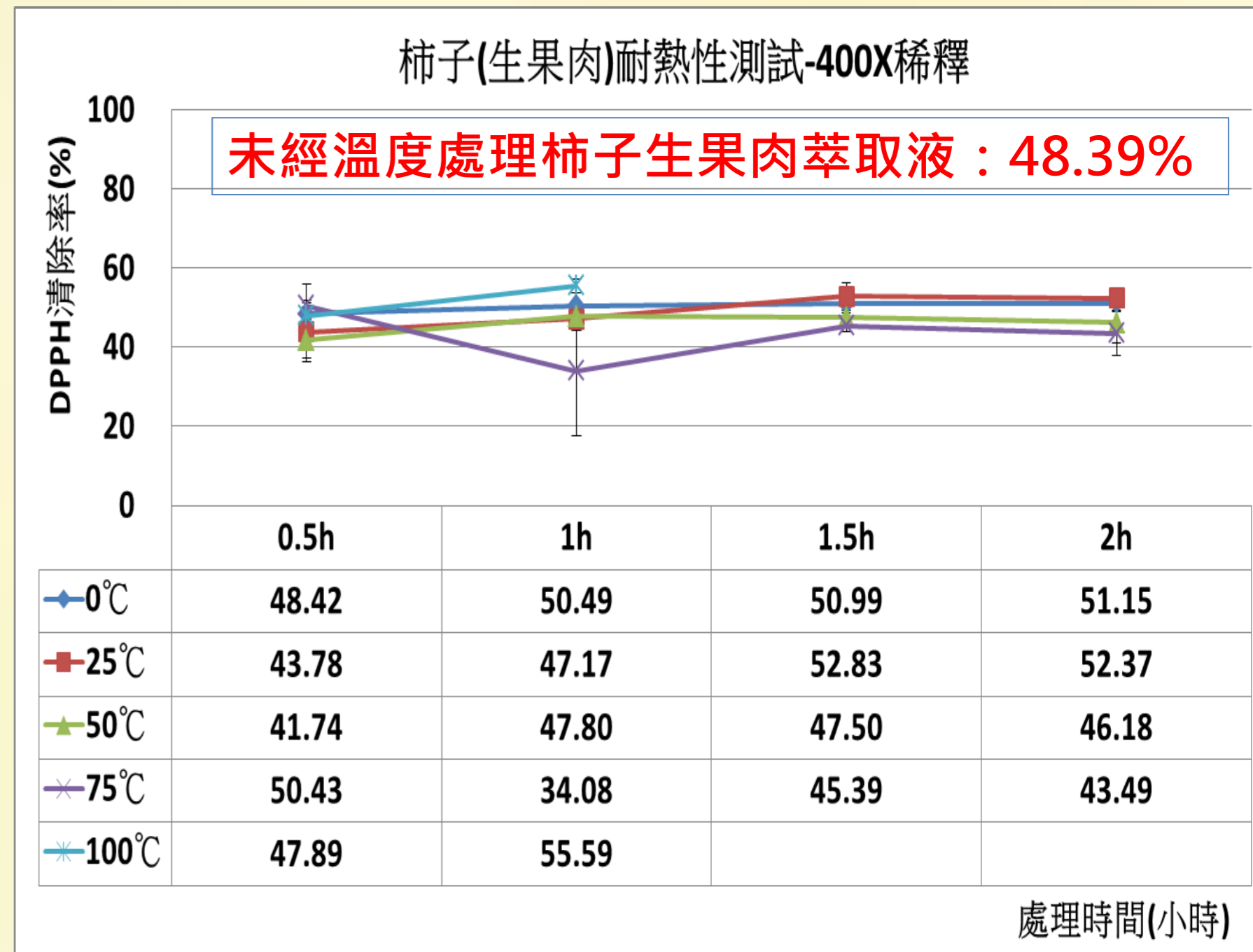
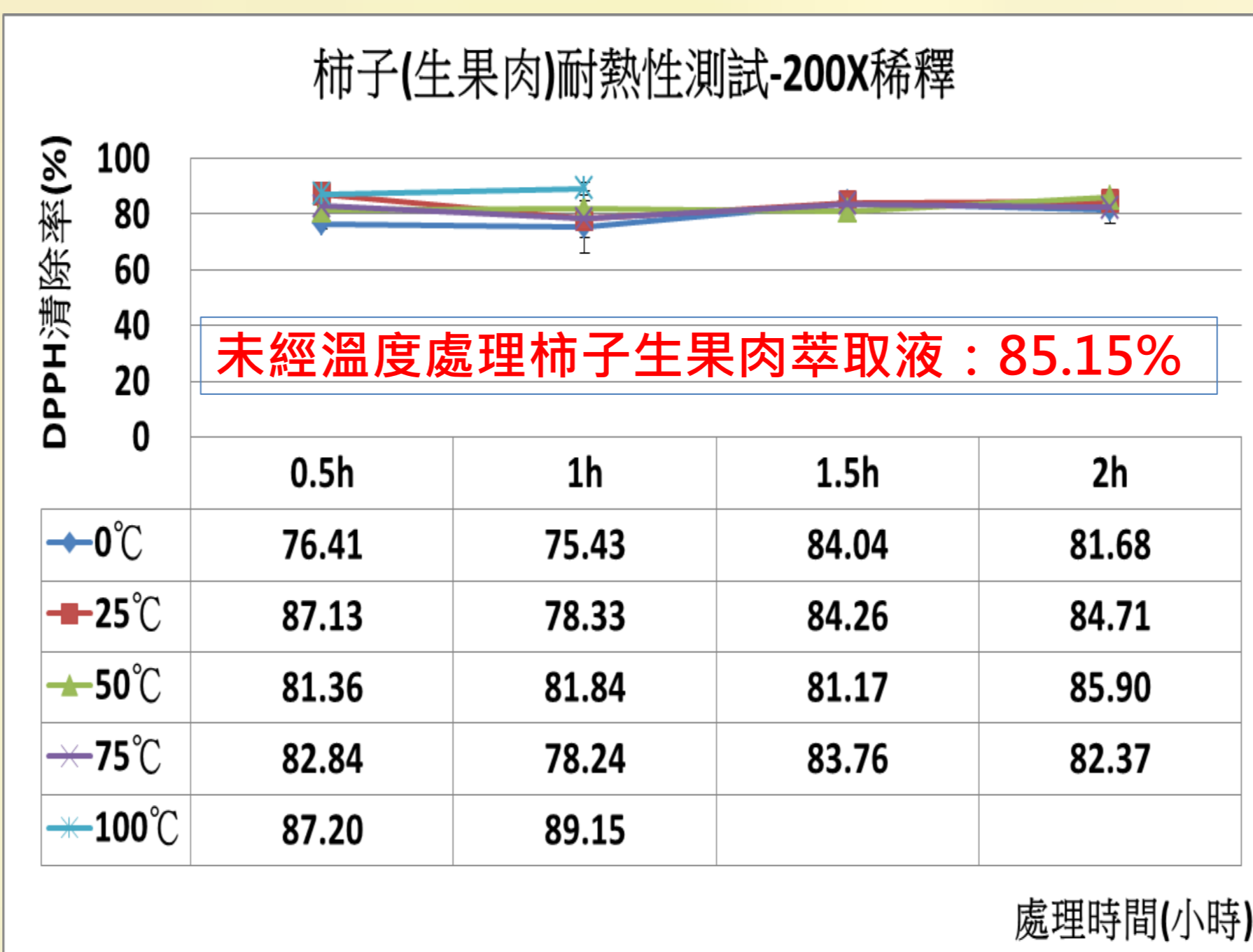
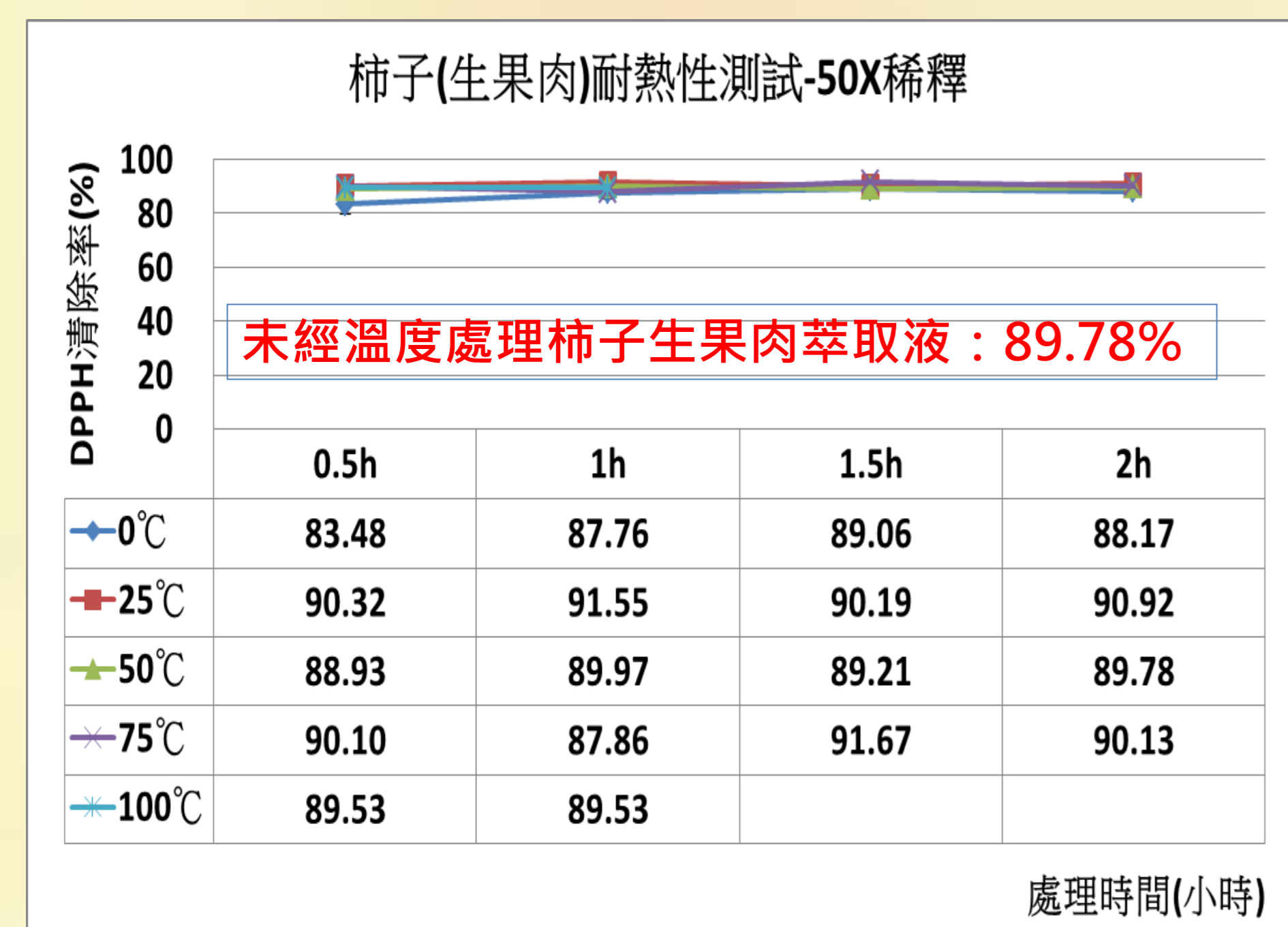
實驗數據分析：
由碘滴定和DPPH清除率結果，在50 mL的萃取液下，抗氧化效果為4g=3g=2g>1g>0.5g。到了2g似乎達到飽和，抗氧化效果與3g、4g無差異。

(二) 不同時間的柿子生果肉萃取液之抗氧化測試



實驗數據分析：
只需萃取4h即飽和。(考量作息，之後的實驗，仍以24h進行萃取)
=>針對上述最佳條件的萃取液，我們想進一步了解溫度對其抗氧化力的影響。

四、針對所選取萃取條件之柿子萃取液，探討溫度對其抗氧化力之影響

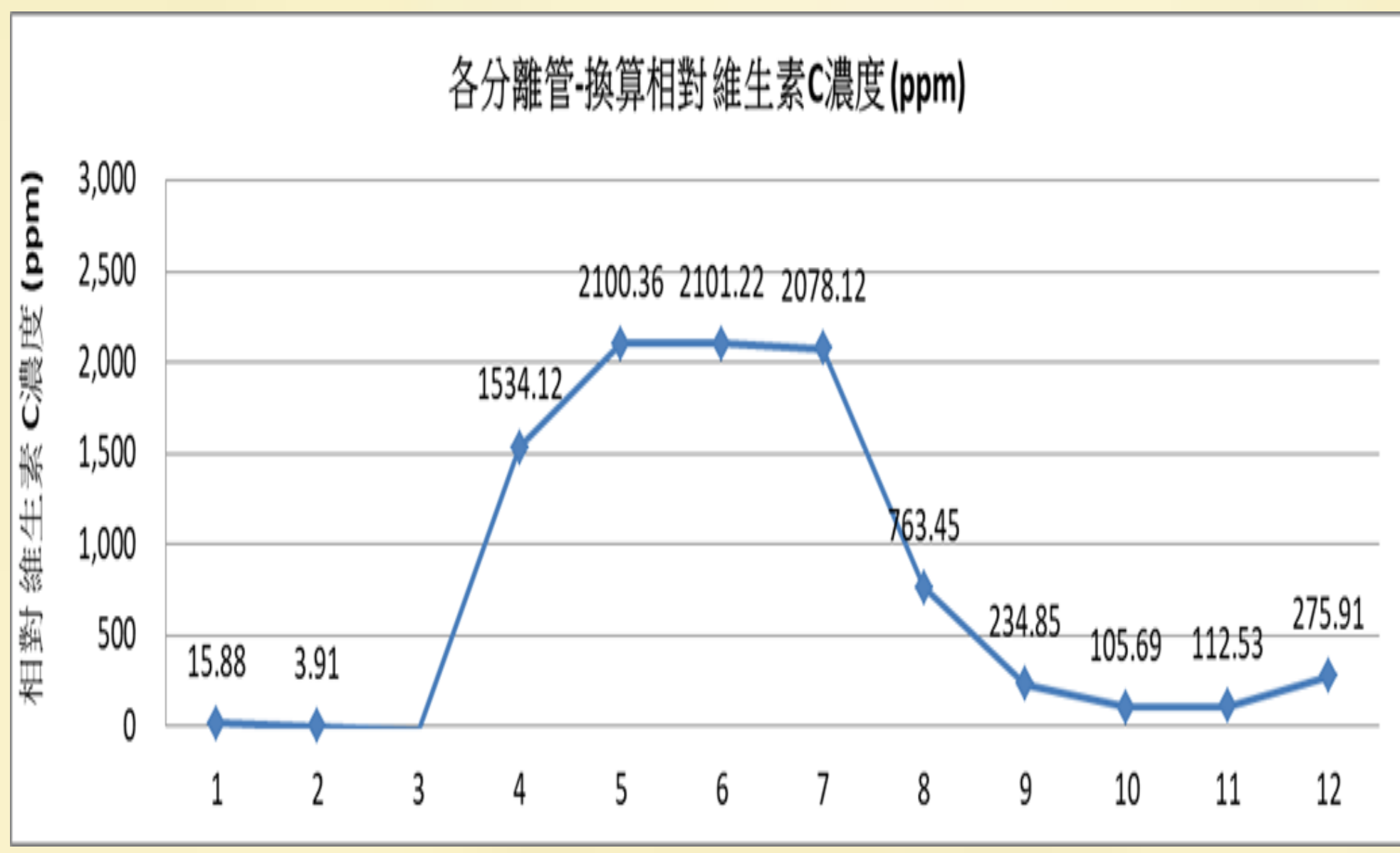
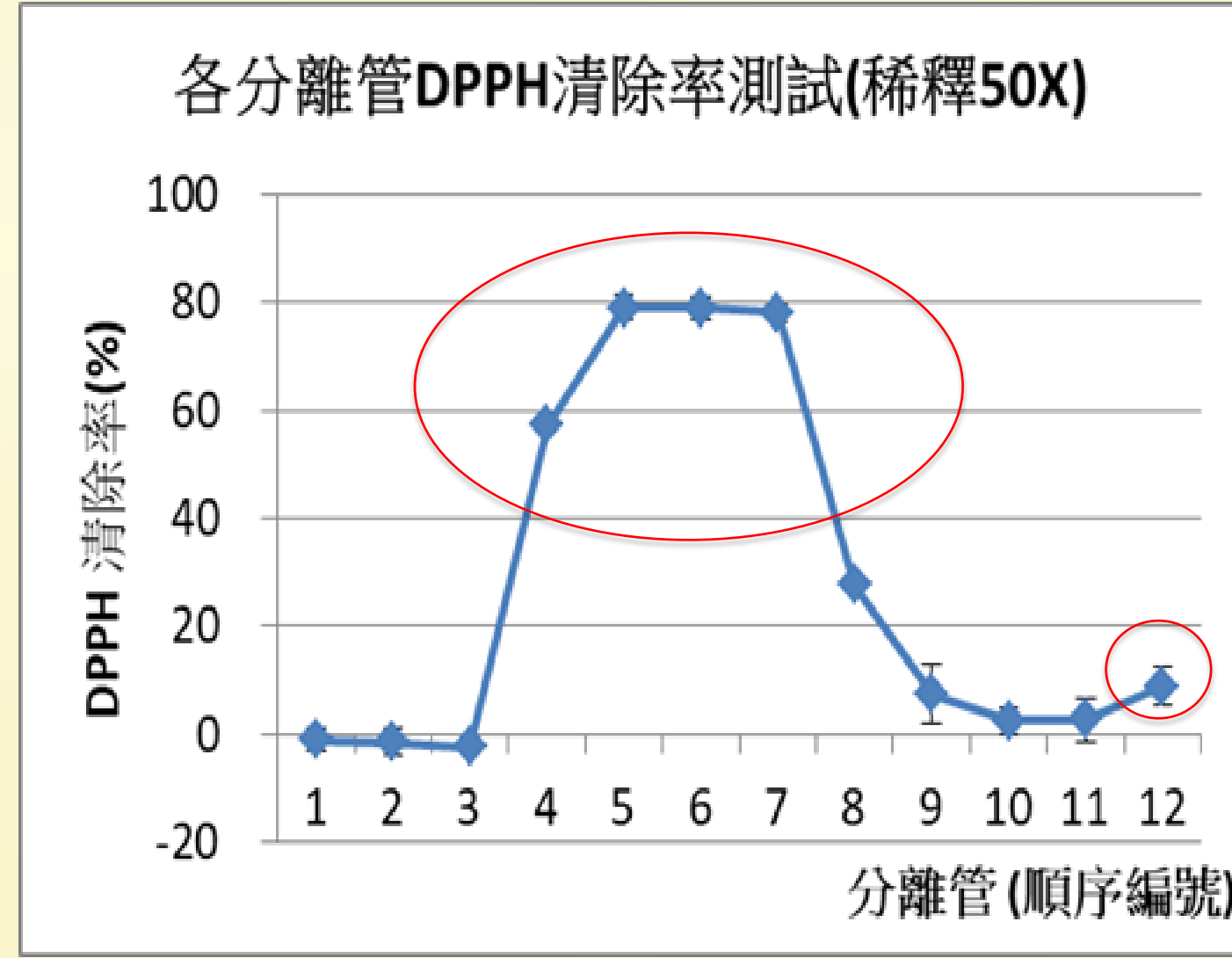
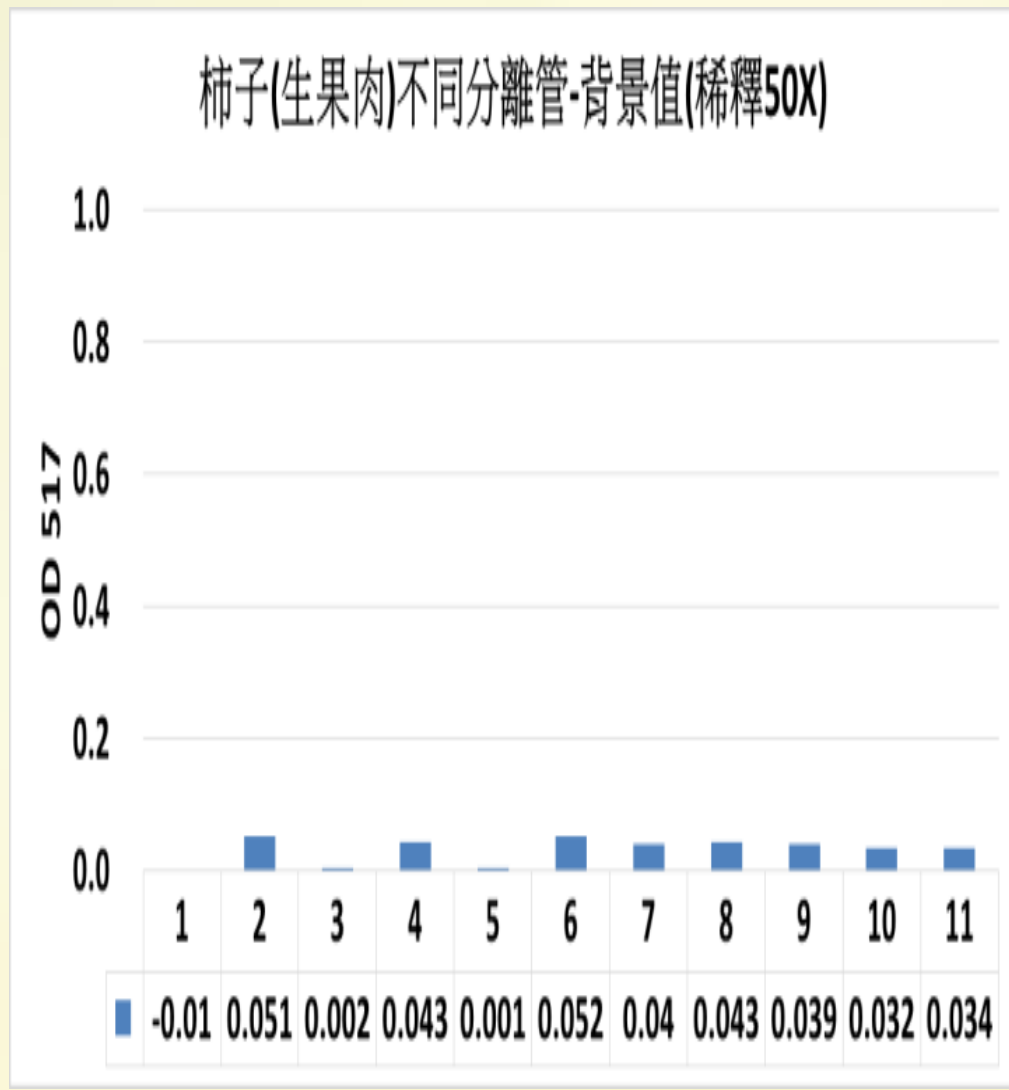
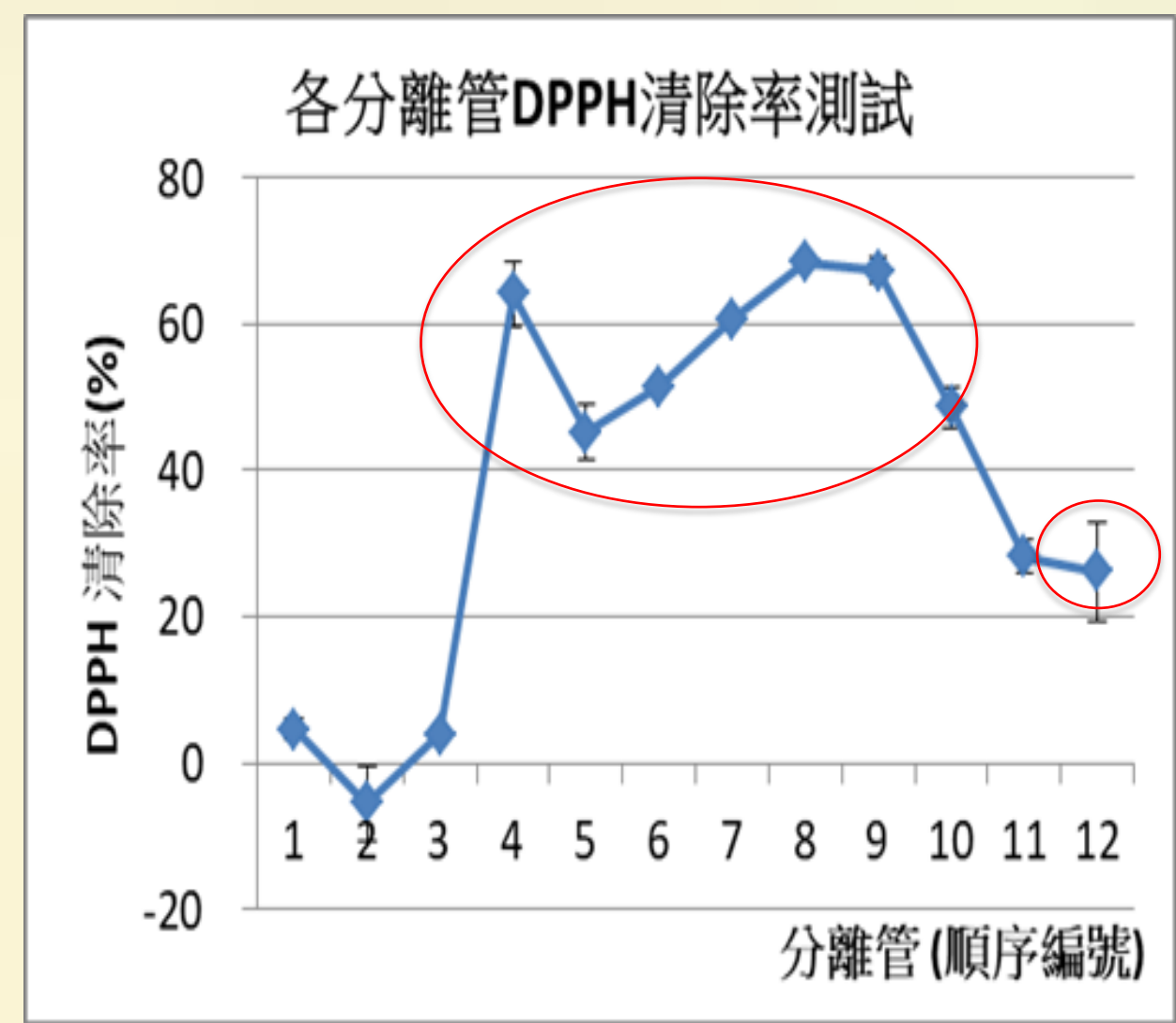
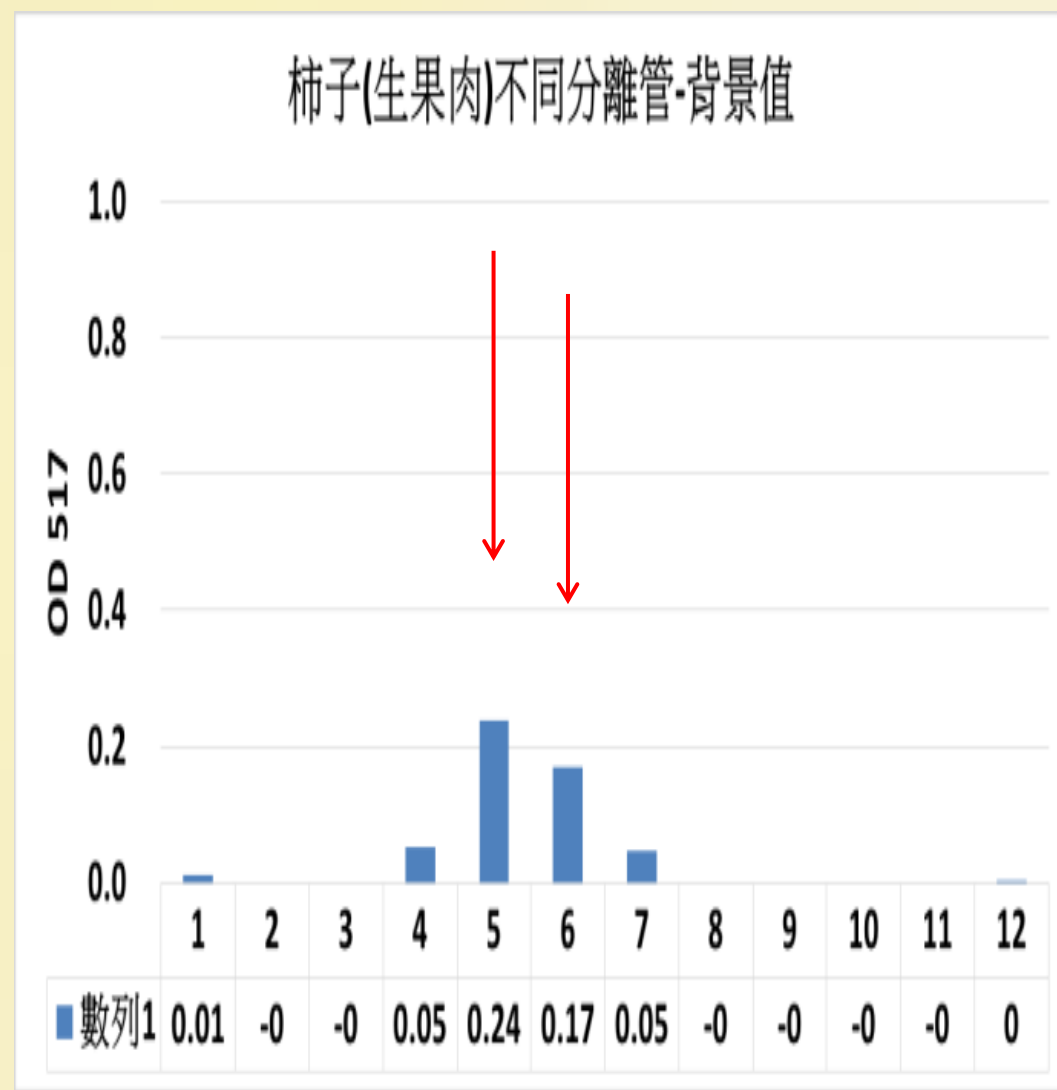


實驗數據分析：

- 由50X及200X稀釋的結果可知，在0-100°C間，不同溫度處理下，抗氧化效果差異不大，均為85-90%左右，且在50-100°C處理下，沒有隨著時間抗氧化效果變得更差的趨勢。
- 由400X稀釋的結果可知，DPPH清除率各溫度處理下差異不大，且在50-100°C處理下，也沒有隨著時間而變得更差的趨勢，且與未加熱處理之柿子生果肉50%酒精萃取液結果差異不大。

=> 柿子生果肉50%酒精萃取出的成分，有耐高溫的特性，其中抗氧化物質應該不是不耐熱的維生素C。

五、50%酒精柿子生果肉萃取液不同分離層的抗氧化力 -管柱層析(silica gel ; 沖提液：50%酒精)



實驗數據分析：

1. 分離管5-6背景值超過0.1，會影響DPPH清除率的判讀，故統一稀釋50X再測試比較。
2. 將DPPH清除率換算成相對維生素C抗氧化力，分離管5-7的抗氧化力最強，相當於維生素C 2000 ppm 的抗氧化力。

*相對維他命C的濃度(ppm)

$$= (\text{各樣本DPPH清除率} + 1.5944) / 1.9191$$

六、探討50%酒精萃取柿子生果肉萃取液之成分極性分布

-薄層色層分析(TLC)測試(展開液：50%酒精)

Rf值	濃單	(管4) 0.63-0.76 (管5) 0.21-0.82 單 0.84	(管6) 0.87 (管7) 0.87 單 0.87	(管8) 0.87 (管9) 0.47-0.68 單 0.84
極性小 (親50%酒精)				
極性大 (親水)				
萃取液：5滴 分離管：60滴 單寧酸：1滴	柿子生果肉 50%酒精 萃取液	4 5 單 (分離管)	6 7 單 (分離管)	8 9 單 (分離管)

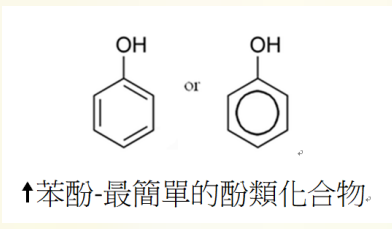
實驗數據分析：

1. 柿子生果肉50%酒精萃取液中的成分為混合物，從極性小到大均存在，但多為極性較單寧酸大一些的物质。
2. 抗氧化效果最好的分離管5成分多樣，從極性大到接近50%酒精都有；分離管6-8在相對單寧酸極性較小位置，有些微暗點，可能為極性相對小且單純的物质，也有很多留在原點跑不動極性大的物质。

=> 利用管柱分離的效果似乎沒有將各種抗氧化成分有效的分開，或者抗氧化物質成分複雜，極性的分布也較廣。

陸、綜合討論

- 一、水與酒精雖然都屬於極性較大的溶劑，但水(H₂O)的極性大於酒精(C₂H₅OH)。酒精除了溶出極性分子外，其烴基(CH-)部分也可以使之萃取出一些非極性分子(較疏水的物質)，所以，柿子水萃及不同濃度酒精萃取液所含的物質不完全相同。
- 二、生的柿子因可溶的單寧酸較多，而產生澀的感覺，經過脫澀，單寧酸轉換成不可溶的形式，澀的感覺就消失了。自然熟成可以脫澀，由結果生果肉及生果皮在50%酒萃、95%酒萃下，都較熟果肉與熟果皮好；而果肉與果皮結果差異不大。可推測柿子熟成脫澀會對柿子的抗氧化力有所影響，是否因為單寧酸的轉化造成，需要進一步證實。
- 三、我們分離出抗氧化較佳的分離層(5-7)，極性較大介於水與50%酒精之間且耐高溫。根據文獻，多酚類(具酚結構，單寧酸、類黃酮、花青素等)，屬於極性較大的物質，有些可耐高溫，且常存在於天然植物中，推測柿子具抗氧化有效成分可能屬於多酚類。



柒、結論

- 一、柿子生果肉50%酒精萃取液最具抗氧化潛力。
- 二、柿子50%酒精萃取下，隨著柿子生果肉所佔的比例高，抗氧化效果越佳，到2g已達飽和；而萃取時間到4h即可將大部分可溶出的物質萃取出來。
- 三、柿子生果肉50%酒精萃取液在50-75°C處理下，具耐熱性至少2h；在100°C處理下，具耐熱性至少1h。
- 四、利用管柱層析(矽膠60)，我們分離出最具抗氧化效果的分離管(5-7)，抗氧化力相當於2000 ppm 的維生素C。
- 五、由TLC結果可知，分離管5內成分複雜；分離管6-7內成分單純，極性介於水及50%酒萃，其中應具多種抗氧化潛力之柿子生果肉萃取物。

捌、未來展望

- 一、研究生果肉之外，其他柿子部位的抗氧化萃取條件的優化測試及其抗氧化成分的分離。
- 二、針對生果肉50%酒精萃取物進行以下研究：
 - (一) 確認最具抗氧化力的成分之構造。
 - (二) 增加抗氧化物質的萃取率。
 - (三) 其他可應用性的研發。
- 三、進行不同熟度的柿子抗氧化力與單寧酸含量或改變的相關性研究。
- 四、不同脫澀方法對柿子抗氧化力的影響。