

# 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 農業與食品學科

052203

探討不同環境下大蒜清除自由基能力

學校名稱：國立花蓮女子高級中學

作者： 高二 林心荷 高二 李 雙	指導老師： 陳玉時 閻國中
-------------------------	---------------------

關鍵詞：大蒜、自由基、DPPH

## 摘要

本研究以不同方式處理大蒜，探究其清除 DPPH 自由基的能力，利用 DPPH 在 517nm 吸光值的減少程度來計算大蒜之自由基清除能力。大蒜萃取液經過 60°C 隔水加熱後有最佳的自由基清除力(65.2%)；蒜末冷藏保存三週後自由基清除率開始明顯降低；在開放環境下，存放 8 小時後的蒜末之自由基清除率較新鮮蒜末低了約 11%；模擬蒜液進入人體消化道時，加入 pH=2(胃部)的緩衝溶液清除率最佳(74.3%)；市售黑蒜與自製黑蒜之自由基清除率相近，皆優於一般大蒜；重量百分濃度 0.9%的市售黑蒜萃取液自由基清除能力最佳。

## 壹、研究動機

在一本健康生活類月刊上偶然看到一篇有關於大蒜的文章，內容提到食用大蒜的各種功效，引起我們的興趣，於是我們便開始搜尋相關的文獻。在我們找到的文獻中，多篇研究顯示大蒜有清除自由基<sup>(1)</sup>、降低血壓<sup>(2)</sup>及血脂肪的功能<sup>(3)</sup>。由於癌症為國人十大死因之首，自由基又是高中化學課程之一，大蒜也許能透過清除自由基的能力協助我們預防癌症，因此我們選用一般超市販售之大蒜作為研究主體，期望找出清除自由基效果最好的環境，並期望在日後能提供科學研究一些基礎的參考。

## 貳、研究目的

比較不同環境之大蒜清除自由基能力：

- 一、不同溫度大蒜萃取液之自由基清除能力的探討
- 二、不同溫度密封保存（室溫／冷藏）對大蒜清除自由基能力的影響
- 三、蒜末於開放環境下放置時間對大蒜清除自由基能力的影響
- 四、不同酸鹼值大蒜萃取液之自由基清除能力的探討
- 五、一般大蒜、市售黑蒜與自製黑蒜之自由基清除能力的探討

## 參、研究器材與藥品

### 一、器材與設備：

名稱	規格(廠牌)	名稱	規格(廠牌)
分光光度計	DR600(HACH)	電動碎蒜機	
離心機		手持酸鹼度計	G&B Instruments
微量吸管	0.5-5mL 100-1000 $\mu$ L		

### 二、藥品：

藥品名稱	化學式/廠牌
DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$ /Alfa Aesar
95%乙醇	$C_2H_5OH$ /Shin
磷酸二氫鈉	$NaH_2PO_4$ /Shimakyu
磷酸氫二鈉	$Na_2HPO_4$ /Wako
氫氧化鈉	$NaOH$ /Shimakyu
鹽酸	$HCl$ /Shimakyu
磷酸	$H_3PO_4$ /日本試藥工業株式會社

三、大蒜來源：全聯福利中心，阿根廷進口。黑蒜來源：全聯福利中心，展拓農場。

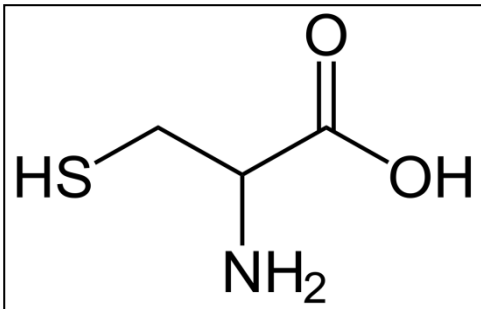
## 肆、研究方法

### 一、文獻探討：

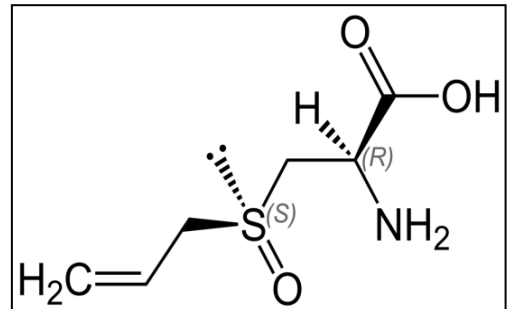
#### (一)大蒜、蒜胺酸與大蒜素

大蒜（學名：*Allium sativum*），為百合科的多年生草本作物，漢朝時由張騫自西域引進。大蒜是蔬果中含硫比例最高的，其氣味也和其中許多的硫化物有關<sup>(4)</sup>。在生活中，大蒜主要的角色為調味料，也可入藥，是中華飲食文化不可或缺的元素。

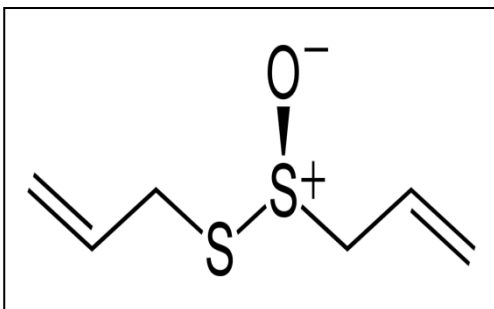
蒜頭內有蒜胺酸及蒜胺酸酶，蒜胺酸的化學式為  $C_6H_{11}NO_3S$ （圖二），是大蒜中獨有的含硫胺基酸，易溶於水。蒜胺酸的前驅物為半胱胺酸（圖一）。大蒜被搗碎或破壞時，蒜胺酸會被蒜胺酸酶分解成大蒜素<sup>(5)</sup>，大蒜的辛辣味就來自大蒜素（圖三），其在 289nm 下有明顯吸光高峰（圖四）。半胱胺酸和大蒜素經研究顯示，都含有顯著的抗氧化力<sup>(6)</sup>和清除 DPPH 自由基的能力<sup>(7)</sup>。



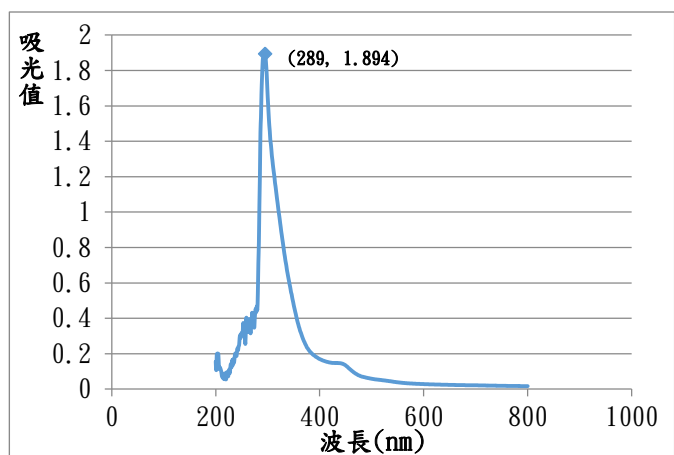
圖一 半胱胺酸的結構



圖二 蒜胺酸的結構



圖三 大蒜素的結構



圖四 大蒜素之吸光值

## (二) 自由基

自由基 (Free Radical)，又稱為游離基，是指具有不成對電子的原子或基團的化合物，自由基可以透過分子在光熱等外界條件下，共價鍵均裂或是氧化還原反應來形成，大多數的自由基都具有較高的化學活性。

由於自由基的高活性，過量的自由基會在體內細胞及組織產生化學反應，會使其化學結構被改變而失去正常功能，甚至破壞 DNA，造成損害或突變，引起癌症等等。

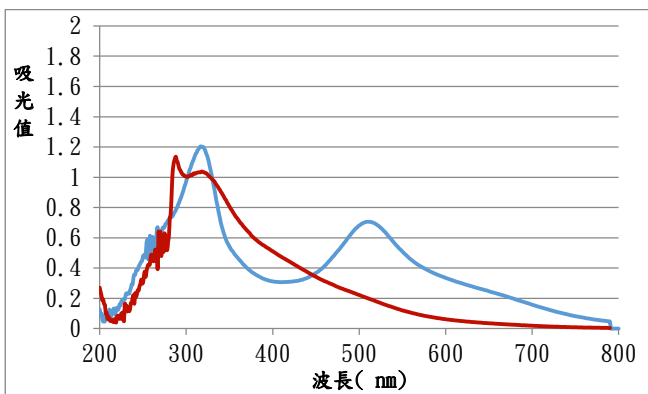
## (三) DPPH：2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

2, 2-二苯-1-三硝苯肼 (圖六)，化學式為  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ，常簡稱為 DPPH，是一種穩定的自由基分子，它的穩定性主要來自於 3 個苯環的共振穩定作用及空間障礙，並廣泛用於去自由基能力的測定實驗。

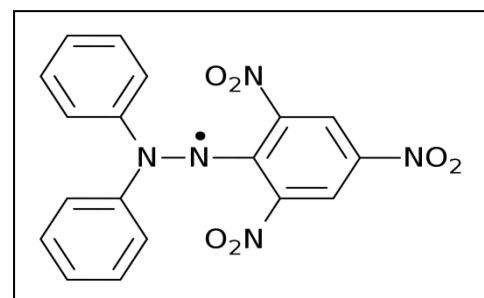
DPPH 的醇溶液呈現深紫色，在 517nm 處有明顯的吸收高峰，而自由基清除劑能使單電子配對，進而使 517nm 處的吸光值降低，其吸光值如圖五所示。因此，我們可以藉由分光光度計測量 517nm 下吸光值的變化來計算樣品之自由基清除率<sup>(8)</sup>。

自由基清除率之計算公式：

$$\text{清除率}(\%) = \frac{(\text{反應前}517\text{nm 吸光值} - \text{反應後}517\text{nm 吸光值}) * 100 \%}{\text{反應前}517\text{nm 吸光值}}$$



圖六 DPPH 的吸光值  
(藍線為反應前，紅線為反應後)



圖五 DPPH 的結構

## 二、實驗步驟：

### (一)實驗前準備

#### 1. 配製 0.1mM DPPH 乙醇溶液

- (1) 秤取 DPPH 粉末 0.0196g 並以 95% 乙醇溶液溶解。
- (2) 將溶液倒入 500mL 容量瓶中，添加乙醇溶液至刻度線。
- (3) 將 DPPH 溶液倒進棕色瓶中避光冷藏保存。

#### 2. 配製 0.1M 磷酸緩衝溶液 (以 pH7.4 為例)

- (1) 秤取磷酸二氫鈉 3.05g 和磷酸氫二鈉 10.90g 於燒杯中並加入蒸餾水 350mL。
- (2) 持續攪拌使其完全溶解。
- (3) 用電子酸鹼計檢測其 pH 值 (未到 pH7.4 時輔以 3M 氫氧化鈉或 3M 鹽酸調整)。
- (4) 將溶液倒入 500mL 容量瓶中，加入蒸餾水至刻度線。
- (5) 將溶液倒入血清瓶中，並冷藏保存。

#### 3. 配製 0.2M 磷酸緩衝溶液 (以 pH7.4 為例)

- (1) 秤取磷酸二氫鈉 6.10g 和磷酸氫二鈉 21.80g 於燒杯中並加入蒸餾水 350mL。
- (2) 重複 2 的步驟(2)~步驟(5)

### (二)清除 DPPH 自由基實驗

1. 取 0.5mL 蒜液與 2.5mL 的 0.1mM DPPH 乙醇溶液混合，加入磁石並密封，暗室反應 (37°C, 180 rpm) 30 分鐘。
2. 將反應完的溶液以 3500 rpm 離心 4 分鐘。
3. 取上清液倒入比色管，使用分光光度計測量其在 517nm 下的吸光值。
4. 配製對照組：
  - (1) 將 0.5mL 蒸餾水與 2.5mL 的 0.1mM DPPH 乙醇溶液混合，加入磁石並密封，暗室反應 (37°C, 180 rpm) 30 分鐘。
  - (2) 將反應完的溶液以 3500 rpm 離心 4 分鐘。
  - (3) 取上清液倒入比色管，使用分光光度計測量其在 517nm 下的吸光值(將此視為反應前吸光值)。

### (三)大蒜萃取液濃度高低對大蒜清除自由基能力的影響

1. 將大蒜球剝成小蒜瓣，把蒜皮剝下。
2. 去皮後的蒜瓣置入電動碎蒜機，打 5 秒，停 10 秒（避免過熱），重複 8 次，共耗時 2 分鐘。
3. 取出蒜末，秤取 24g 蒜末並加入 176mL 蒸餾水，加入磁石並密封，在 37°C 下加熱攪拌使其萃取 20 分鐘（180 rpm）。
4. 抽濾後將濾液加水稀釋為重量百分濃度 2%、5%、8%、10% 之大蒜萃取液。
5. 將不同濃度之大蒜萃取液進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算清除率。

### (四)不同溫度下萃取大蒜對大蒜清除自由基能力的影響

1. 重複(三)的步驟 1~步驟 2。
2. 取出蒜末，秤取 1g 蒜末並加入 9mL 蒸餾水，加入磁石並密封，分別在室溫、40°C、60°C、80°C、100°C 下加熱攪拌使其萃取 20 分鐘（180 rpm）。
3. 抽濾後使濾液回溫。
4. 將濾液分別倒入比色管內，使用分光光度計測量其在 289nm 下的吸光值（大蒜素於 289nm 下有明顯吸收高峰）。
5. 以此蒜液進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算清除率。

### (五)不同溫度加熱大蒜萃取液對大蒜清除自由基能力的影響

1. 重複(三)的步驟 1~步驟 2。
2. 秤取 1g 蒜末並加入 9mL 蒸餾水，在室溫下加入磁石，使其萃取 20 分鐘(180rpm)。
3. 抽濾後將濾液加入磁石並密封，分別在室溫、40°C、60°C、80°C、100°C 下隔水加熱 20 分鐘。
4. 使濾液回溫，並將濾液分別倒入比色管內，使用分光光度計測量其 289nm 下的吸光值。
5. 將回溫的濾液分別進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算清除率。

(六)不同溫度密封保存(室溫/冷藏)對大蒜清除自由基能力的影響

1. 重複(三)的步驟1~步驟2。
2. 分別秤取足量蒜末並裝入兩夾鏈袋內，分為室溫組與冷藏組，將冷藏組置於冰箱(4°C)內，室溫組置於室溫下，兩者皆避光保存。
3. 將室溫組進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算其初始清除率。
4. 每隔一週，將室溫組及冷藏組取出，並使冷藏組於室溫下回溫 30 分鐘。
5. 分別秤取室溫組及冷藏組的蒜末各 1g，並加入 9mL 水，靜置使其萃取 20 分鐘。
6. 將抽濾後所得濾液進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算清除率。

(七)蒜末於開放環境下放置時間對大蒜清除自由基能力的影響

1. 重複(三)的步驟1~步驟2。
2. 分別秤取 1g 蒜末置入各燒杯中鋪平靜置。
3. 每隔 1 小時，取一份蒜末，加入 9mL 蒸餾水，於 37°C 下萃取 20 分鐘(180 rpm)。
4. 抽濾後，以此濾液進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算清除率。

(八)不同酸鹼值下萃取大蒜對大蒜清除自由基能力的影響

1. 重複(三)的步驟1~步驟2。
2. 秤取 1g 蒜末，分別加入 9mL 0.1M 緩衝溶液(pH=2、pH=4、pH=6.5、pH=7.4、pH=8.3)，在 37°C 下加熱攪拌使其萃取 20 分鐘(180 rpm)。
3. 抽濾後，以此濾液進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算清除率。
4. 配製對照組：
  - (1)將 0.5mL 緩衝溶液(pH=2、pH=4、pH=6.5、pH=7.4、pH=8.3)與 2.5mL 的 0.1mM DPPH 乙醇溶液混合，加入磁石並密封，暗室反應(37°C，180 rpm) 30 分鐘。
  - (2)將反應完的溶液以 3500 rpm 離心 4 分鐘。
  - (3)取上清液倒入比色管，使用分光光度計測量其在 517nm 下的吸光值(將此視為反應前吸光值)。



(九)大蒜萃取液添加不同酸鹼值之緩衝溶液對大蒜清除自由基能力的影響

1. 重複(三)的步驟 1~步驟 2。
2. 秤取 1g 蒜末並加入 9mL 蒸餾水，在 37°C 下加入磁石(180rpm)，使其萃取 20 分鐘。
3. 抽濾後，吸取 10mL 濾液加入 10mL 0.2M 緩衝溶液 (pH=2、pH=4、pH=6.5、pH=7.4、pH=8.3)，在 37°C 下隔水加熱 20 分鐘 (180 rpm)。
4. 以此溶液進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算清除率。
5. 配製對照組：
  - (1)將 0.5mL 0.1M 緩衝溶液 (pH=2、pH=4、pH=6.5、pH=7.4、pH=8.3) 與 2.5mL 的 0.1mM DPPH 乙醇溶液混合，加入磁石並密封，暗室反應 (37°C，180 rpm) 30 分鐘。
  - (2)將反應完的溶液以 3500 rpm 離心 4 分鐘。
  - (3)取上清液倒入比色管，使用分光光度計測量其在 517nm 下的吸光值 (將此視為反應前吸光值)。

(十)一般大蒜、市售黑蒜與自製黑蒜之清除自由基能力的比較

1. 秤量一般大蒜蒜球的重量並記錄，將此蒜球置於雙層燒杯之內層，外層裝水並包上保鮮膜，內層蓋上表玻璃 (圖七)，將此裝置置於 60°C 烘箱內，並適時補水。



圖七 自製黑蒜烘烤裝置(左為俯視圖，右為側視圖)

2. 烘烤一個月後，從烘箱內取出自製黑蒜。
3. 分別將一般大蒜、市售黑蒜及自製黑蒜進行(三)的步驟 1~步驟 2。
4. 調整蒜末萃取重量：
  - (1)市售黑蒜：選取與市售黑蒜蒜球大小相似之一般蒜球，去皮打碎後將蒜末等分為 34.25 份 (使其一份含量等同於 1g 一般大蒜)。

- (2)自製黑蒜：秤取蒜球烘烤前重量（32.81g），欲得每份含 1g 蒜末需等分為 32.81 份，烘烤完成後，將自製黑蒜（20.49g）去皮打碎後等分為 32.81 份。
5. 取出蒜末，並加水至重量為 10g，加入磁石並密封，使其在 37°C 下萃取 20 分鐘（180 rpm）。
  6. 抽濾後，以此濾液進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算清除率。
  7. 取 0.2mL 濾液與 1mL DPPH 溶液混合，迅速搖晃、倒入比色管內並密封，使用分光光度計每 3 秒測量一次其在 517nm 下的吸光值，歷時 900 秒。

#### (十一)黑蒜萃取液濃度高低對黑蒜清除自由基能力的影響

1. 使用黑蒜為樣品，重複(三)的步驟 1~步驟 3。
2. 抽濾後將濾液加水稀釋為重量百分濃度 0.2%、0.35%、0.5%、0.7%、0.9%、10%之大蒜萃取液。
3. 將不同濃度之黑蒜萃取液進行清除 DPPH 自由基實驗，並計算清除率。

## 伍、結果與討論

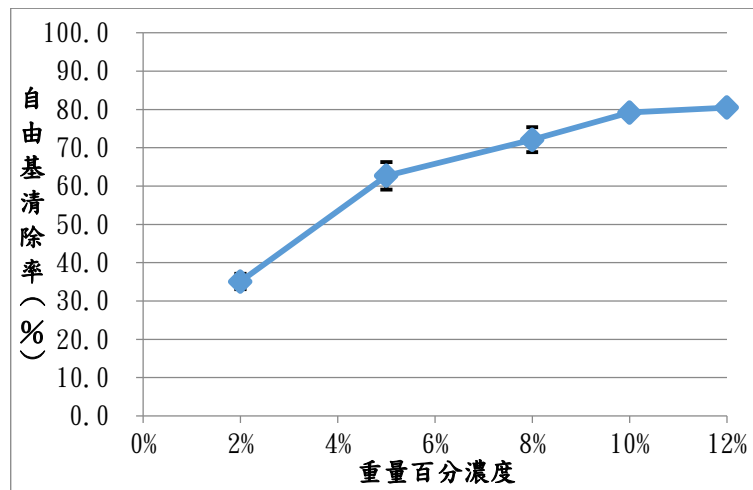
### 一、大蒜萃取液濃度高低對大蒜清除自由基能力的影響

為了使大蒜萃取液達到最好的自由基清除效果，並統一所有實驗中大蒜萃取液的濃度，分別將 2%、5%、8%、10%及 12%的大蒜萃取液在 37°C 進行清除 DPPH 自由基實驗，求出其 DPPH 自由基清除率，如表一及圖八。

表一 不同濃度大蒜萃取液之自由基清除率

編號 濃度	1	2	3	4	平均	清除率
2%	0.614	0.574	0.593	0.611	0.598	35.1%
5%	0.384	0.358	0.314	0.319	0.344	62.7%
8%	0.244	0.244	0.302	0.238	0.257	72.1%
10%	0.196	0.189	0.193	0.188	0.192	79.2%
12%	0.176	0.184	0.175	0.184	0.180	80.5%

\*反應前 DPPH 吸光值：0.921



圖八 不同濃度大蒜萃取液之自由基清除率

大蒜萃取液濃度小於 10% 時，自由基清除率隨著濃度上升而增加；在濃度為 10%~12% 時，大蒜萃取液之自由基清除率相似，自由基清除率隨濃度上升的程度減少，上升趨勢平緩，因此採用 10% 做為以下實驗中大蒜萃取液的濃度。

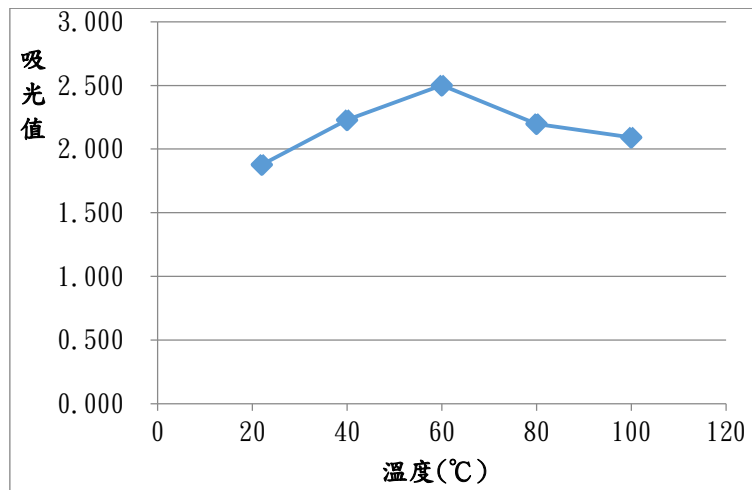
## 二、溫度對大蒜清除自由基能力的影響

### (一) 不同溫度下萃取大蒜對大蒜清除自由基能力的影響

將蒜末在不同溫度下（室溫~100°C）進行萃取，並偵測大蒜素在 289nm 的吸光值（大蒜素在 289nm 下有最高吸收峰，如圖四），以了解萃取狀況，結果如表二，並將萃取液於 37°C 進行清除 DPPH 自由基實驗，求出其 DPPH 自由基清除率，如表三。

表二 不同溫度下萃取之蒜液在 289nm 下的吸光值

溫度(°C)	室溫	40	60	80	100
編號					
1	1.985	2.369	2.509	1.986	2.143
2	1.956	2.318	2.492	2.411	2.144
3	1.692	2.000	2.500	2.198	1.990
平均	1.878	2.229	2.500	2.198	2.092

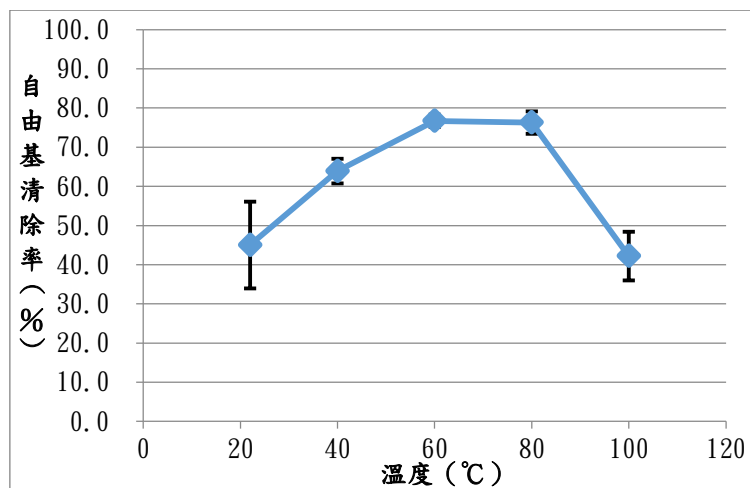


圖九 不同溫度下萃取之蒜液在 289nm 下的平均吸光值

表三 不同溫度下萃取之蒜液之自由基清除率

溫度(°C)	室溫	40	60	80	100
編號					
1	0.383	0.345	0.216	0.230	0.526
2	0.576	0.298	0.188	0.181	0.440
3	0.475	0.298	0.202	0.206	0.540
平均吸光值	0.478	0.314	0.202	0.206	0.502
平均清除率	45.0%	63.9%	76.7%	76.3%	42.2%

\*反應前 DPPH 吸光值：0.869



圖十 不同溫度下萃取之蒜液之自由基清除率

1. 本實驗偵測蒜液在 289nm 下的吸光值，以此作為大蒜素含量的依據，由圖九看出萃取溫度在 60°C 以內時，萃取溫度越高，萃取所得的大蒜素含量愈多。

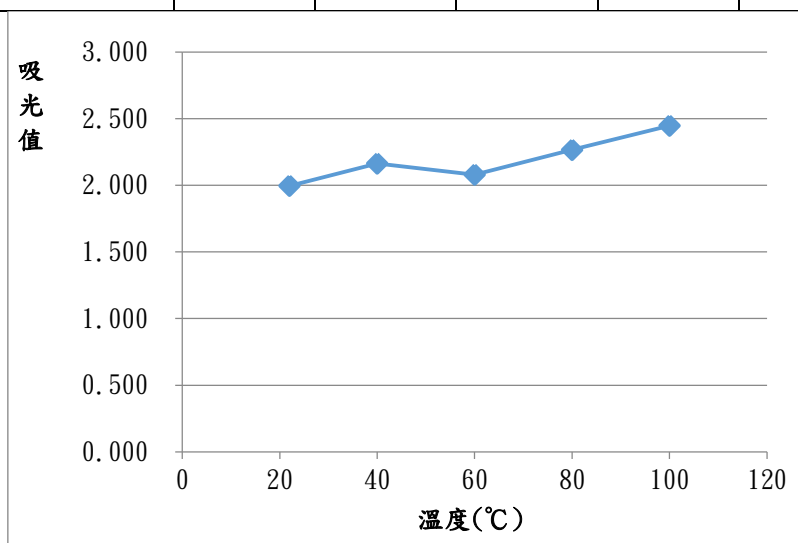
2. 根據圖十，萃取溫度在 60°C 以內時，萃取溫度越高，DPPH 自由基清除效果越好。
3. 大蒜在 80°C 下萃取之萃取液在 289nm 下的吸光值低於 60°C 下萃取之萃取液，對 DPPH 自由基清除率卻與 60°C 下萃取之萃取液相似，故本實驗無法推論自由基清除率與大蒜素含量有關。
4. 原本預期 100°C 之萃取液在 289nm 下應有較高吸光值，後來由文獻資料得知，大蒜素之熱穩定性不佳，可能是造成吸光值偏低的原因，也間接使得自由基清除率偏低。

## (二)不同溫度加熱大蒜萃取液對大蒜清除自由基能力的影響

在不同溫度萃取的實驗中，溫度可能影響萃取效果，但溫度亦可影響大蒜素穩定性，因此修改實驗方式，將同一溫度下萃取之萃取液於不同溫度加熱，觀察其在 289nm 之吸光值，並由 517nm 之吸光值的變化計算自由基清除率，結果如表四以及表五。

表四 經不同溫度加熱之大蒜萃取液在 289nm 下的吸光值

溫度(°C)	室溫	40	60	80	100
編號					
1	1.985	2.216	2.131	2.590	2.623
2	2.048	2.255	2.050	1.971	2.318
3	1.956	2.020	2.059	2.236	2.401
平均	1.996	2.164	2.080	2.266	2.447

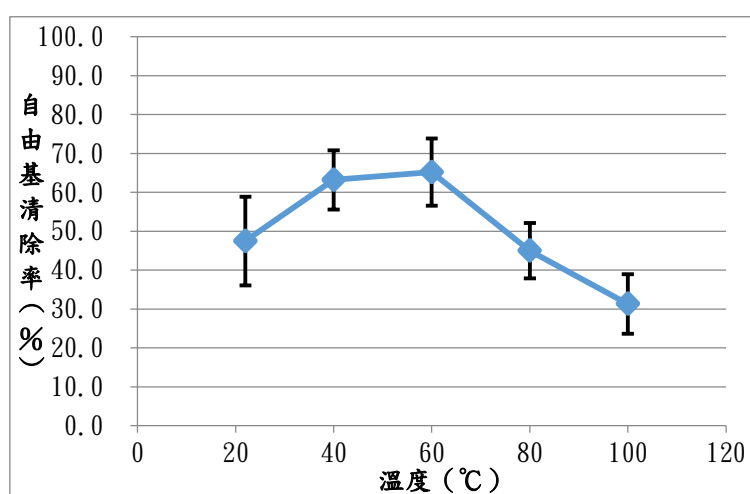


圖十一 經不同溫度加熱之大蒜萃取液在 289nm 下的吸光值

表五 經不同溫度加熱之大蒜萃取液之 DPPH 自由基清除率

溫度(°C)	室溫	40	60	80	100
編號					
1	0.383	0.267	0.358	0.532	0.661
2	0.440	0.399	0.223	0.516	0.535
3	0.576	0.316	0.347	0.417	0.635
平均吸光值	0.466	0.327	0.309	0.488	0.610
平均清除率	47.5%	63.2%	65.2%	45.0%	31.3%

\*反應前 DPPH 吸光值：0.888



圖十二 經不同溫度加熱之大蒜萃取液之 DPPH 自由基清除率

1. 根據圖十一的結果顯示，加熱並未使 289nm 的吸光值降低，與我們原先認知的大蒜素熱穩定性不佳似乎未呈現相關性。
2. 大蒜萃取液經 60°C 加熱後的 DPPH 自由基清除能力最佳。
3. 由圖十二的結果顯示，加熱溫度低於 60°C 時升溫處理過的蒜液，其自由基清除率並未有太大的差異。但經 80°C 與 100°C 加熱過的蒜液，則明顯呈現出較差的自由基清除率。
4. 原本我們想利用 289nm 的吸光值來判斷大蒜素的濃度高低，並由此推測自由基清除率高低。在 80°C 與 100°C 加熱的樣品中，289nm 吸光值較大，但自由基清除率卻較低，推測是蒜液加熱至 80°C 以上時，反應產生之物質亦會吸收 289nm 的光，而此生成物卻無法與 DPPH 作用，造成 289nm 吸光值偏高，但自由基清除率卻偏低的結果。

### 三、清除自由基前後 289nm 吸光值變化與自由基清除率的關係

(一) 為了解清除 DPPH 自由基的物質是否為大蒜素，本實驗將試著偵測蒜液與 DPPH 反應前後之 289nm 的吸光值變化。由於 DPPH 溶液使用酒精配製，大蒜萃取液與其反應時可能會受到酒精影響，故先測試酒精是否會使大蒜萃取液在 289nm 下的吸光值產生變化，結果如表六。

表六 酒精對大蒜萃取液在 289nm 下的吸光值的影響

編號 樣品	1	2	3	4	平均
萃取液+水	0.353	0.318	0.337	0.333	0.335
萃取液+酒精	1.633	1.651	1.673	1.585	1.635

表六顯示大蒜萃取液加入酒精在 289nm 下的吸光值明顯大於其加入水的吸光值，且酒精與萃取液混合時溶液明顯變混濁，須經離心後方能吸取澄清液進行 UV 測定。因此推測酒精與大蒜萃取液反應會產生能吸收波長 289nm 光的物質。

為了解萃取液與 DPPH 反應後 289nm 吸光值的變化，我們設計了以下實驗：

[ 萃取液+酒精 ] = A (視為與 DPPH 反應前的大蒜素)

[ 萃取液+DPPH<sub>(Alc)</sub> ] = B (視為與 DPPH 反應後大蒜素+DPPH)

[ 水+DPPH<sub>(Alc)</sub> ] = C (視為反應前 DPPH 在 289nm 的吸光值)

將 ABC 三種溶液均於 37°C 反應 30 分鐘後離心，取澄清液進行 289nm 吸光值測定，並將 B 扣除 C 的結果視為反應後大蒜素的 289nm 吸光值，所得結果如表七。

表七 DPPH 對大蒜萃取液在 289nm 下的吸光值的影響

編號 樣品	1	2	3	4	平均
萃取液+酒精 (A)(反應前)	1.629	1.670	1.672	1.585	1.639
萃取液+DPPH <sub>(Alc)</sub> (B)	2.313	2.364	2.217	2.302	2.299
水+DPPH <sub>(Alc)</sub> (C)	0.741	0.833	0.837	0.847	0.814
D = B-C (視為反應後)					1.485

由表七看出 289nm 下的吸光值在反應前(A)與反應後(D)僅有些微的差異，與 DPPH 減少的幅度相差有點大，因此推測可能是大蒜素的量遠大於 DPPH 的量，而使大蒜素相對的消耗量過小，不易觀察。

(二)將萃取液濃度降為五分之一，重複進行前一個實驗，並將 DPPH 反應前後吸光值的差異列入考慮，因反應後溶液中的 DPPH 可能影響 289nm 下的吸光值，因此同時偵測反應前後 DPPH 在 517nm 下的吸光值變化，以此變化比例作為 DPPH 在 289nm 的吸光值變化比例。結果如表八及表九。

表八 蒜液加 DPPH 反應後 517nm 的吸光值與調整比例

樣品 \ 編號	517nm 吸光值	調整比例
水+DPPH <sub>(Alc)</sub>	0.816	1
蒜液+DPPH <sub>(Alc)</sub> 反應後	0.583	0.715

表九 酒精對大蒜萃取液在 289nm 下的吸光值的影響

樣品 \ 編號	1	2	3	4	平均
萃取液+酒精 (A)(反應前)	0.118	0.136	0.164	0.144	0.141
萃取液+DPPH <sub>(Alc)</sub> (B)	0.843	0.821	0.844	0.832	0.835
水+DPPH <sub>(Alc)</sub> (C)					0.759
D=B-C*調整比例 (視為反應後)	0.300	0.278	0.301	0.289	0.292

經過計算後，反應後 289nm 的吸光值(剩餘之大蒜素)0.292 > 反應前 289nm 的吸光值(原有之大蒜素)0.141。推測造成此結果的原因有：

1. DPPH 反應前後在 517nm 的吸光值變化狀況與 289nm 的變化狀況並未呈現比例關係，因此無法以 517nm 的變化比例來推測 DPPH 反應後在 289nm 應有若干吸光值。
2. 雖然由文獻得知大蒜素在 289nm 有吸收峰，但不代表大蒜萃取液在 289nm 的所有吸光現象均是由大蒜素所造成。

綜合上述兩點，289nm 的吸光值高低顯然與 DPPH 自由基清除率無明顯相關性，故往後實驗不再追蹤 289nm 的吸光值。

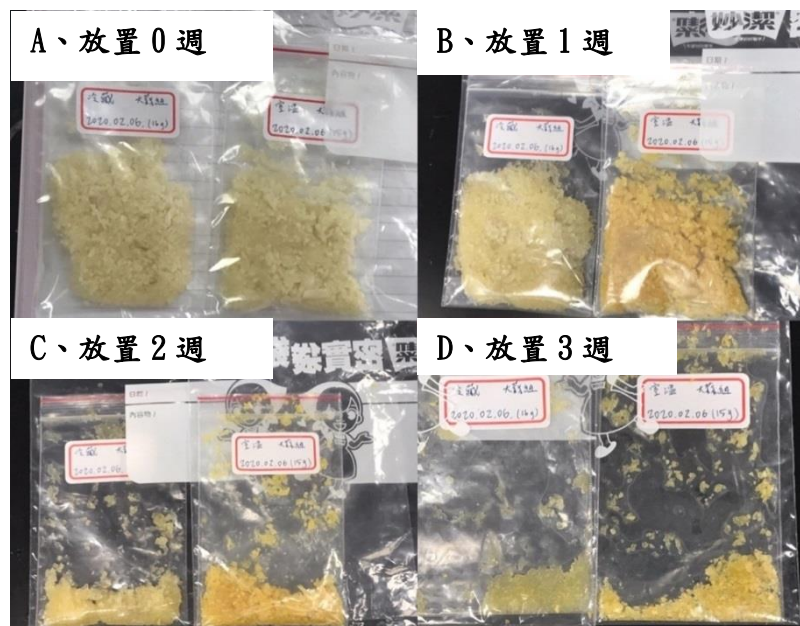


#### 四、不同溫度密封保存（室溫／冷藏）對大蒜清除自由基能力的影響

曾聽說有人會將蒜頭打成蒜末後冰在冰箱內備用，因此我們想知道這樣的保存方式對自由基清除能力是否造成影響。本實驗將打碎的大蒜末置入保鮮塑膠袋內，放置於室溫及4°C的冰箱冷藏，每隔一週追蹤其自由基清除率，並比較兩者差異，結果如表十。

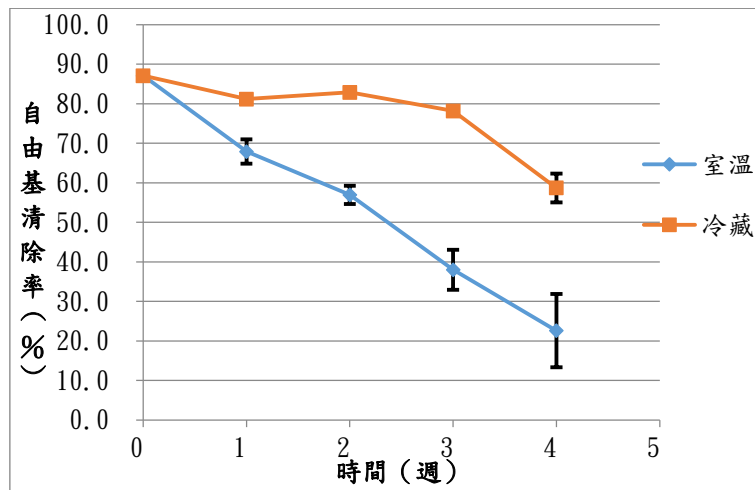
表十 蒜末保存於室溫及冷藏下之吸光值與自由基清除率

吸光值/清除率 週數	DPPH	室溫	室溫清除率	冷藏	冷藏清除率
0	0.924	0.120	87.1%	0.120	87.1%
1	0.833	0.267	67.9%	0.165	81.1%
2	0.909	0.391	56.9%	0.156	82.9%
3	0.825	0.512	38.0%	0.180	78.2%
4	0.751	0.582	22.6%	0.310	58.7%



圖十三 室溫與冷藏保存之蒜末顏色變化

（左為冷藏組，右為室溫組）



圖十四 蒜末保存於室溫及冷藏下之自由基清除率

1. 存放一週後，室溫保存的蒜末變為橘黃色且有濃烈刺鼻氣味，隨著週數增加其顏色略為變深；而冷藏保存的蒜末顏色未有明顯變化，氣味較新鮮蒜末不明顯（圖十三）。
2. 冷藏保存的蒜末之 DPPH 自由基清除率優於室溫下存放的蒜末，但存放時間超過三週後，大蒜萃取液對 DPPH 自由基清除率有明顯下降的趨勢，故建議蒜末於冰箱內保存時，應於三週內食用完畢，方能有較佳的自由基清除率。

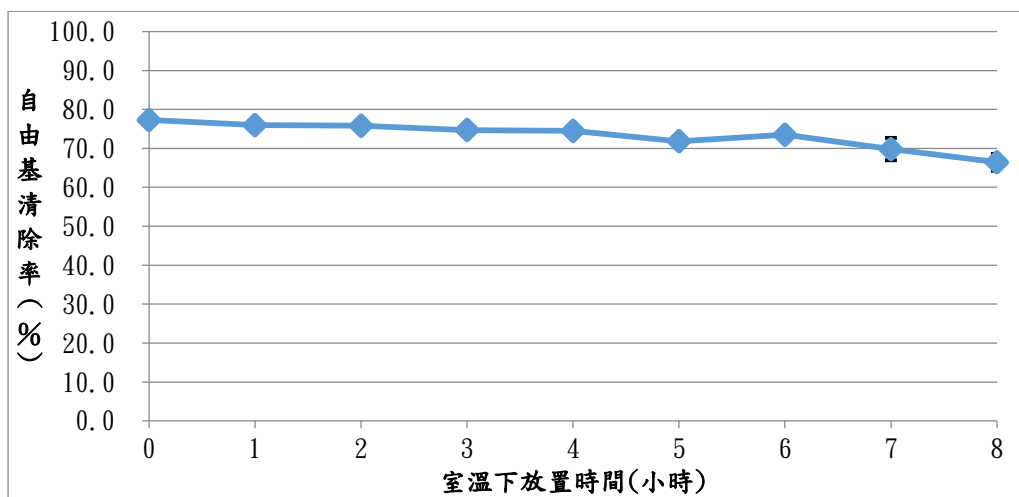
五、蒜末於開放環境下放置時間對大蒜清除自由基能力的影響

雖然前一個實驗結果顯示蒜末不適合室溫保存，但我們想得知蒜末會不會有類似冷凍肉品需一段時間熟成的狀況，期望能使更多蒜胺酸轉化成具自由基清除能力的大蒜素，因此將蒜末置於室溫開放環境，每隔一小時偵測其 DPPH 自由基清除率，所得結果如表十一。

表十一 開放環境放置時間對清除自由基能力的影響

編號 時間(hr)	1	2	3	4	平均	清除率
0	0.178	0.178	0.177	0.176	0.177	77.3%
1	0.188	0.187	0.188	0.189	0.188	76.0%
2	0.189	0.191	0.187	0.188	0.189	75.8%
3	0.199	0.204	0.197	0.189	0.197	74.7%
4	0.207	0.196	0.194	0.199	0.199	74.5%
5	0.220	0.215	0.210	0.234	0.220	71.8%
6	0.204	0.208	0.206	0.209	0.207	73.5%
7	0.227	0.269	0.221	0.225	0.236	69.8%
8	0.256	0.254	0.250	0.287	0.262	66.4%

\*反應前 DPPH 吸光值：0.780



圖十五 開放環境放置時間對清除自由基能力的影響

1. 蒜末於室溫開放環境下放置 0~8 小時內，清除率隨時間增加而逐漸下降，顯示在開放過程中，具有自由基清除能力的物質持續減少。根據文獻資料，半胱胺酸和大蒜素都含有顯著的抗氧化力<sup>(6)</sup>和清除 DPPH 自由基的能力<sup>(7)</sup>。大蒜被搗碎或破壞時，雖然蒜胺酸會被蒜胺酸酶分解成大蒜素<sup>(5)</sup>，但大蒜素的辛辣味會隨時間而揮發，因此造成自由基清除率逐漸下降。
2. 雖然自由基清除率下降幅度不大，但仍建議大蒜打碎後儘早食用。若一次需處理大量蒜末，建議密封於冷藏中保存。

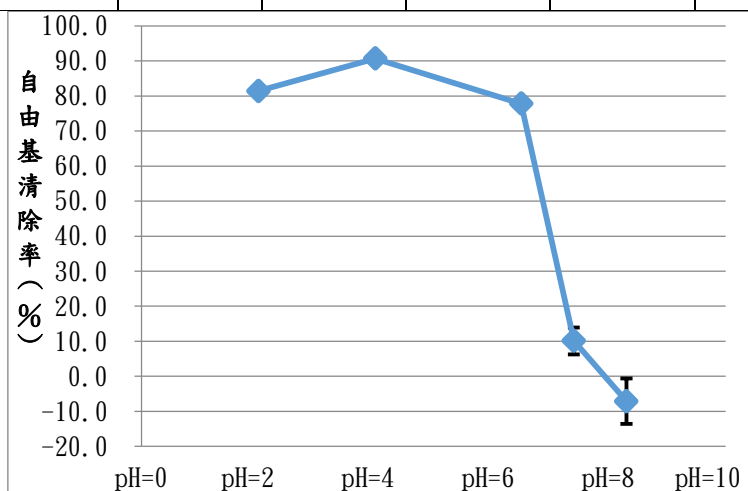
## 六、不同酸鹼值大蒜萃取液之自由基清除能力的探討

### (一)不同酸鹼值下萃取大蒜對大蒜清除自由基能力的影響

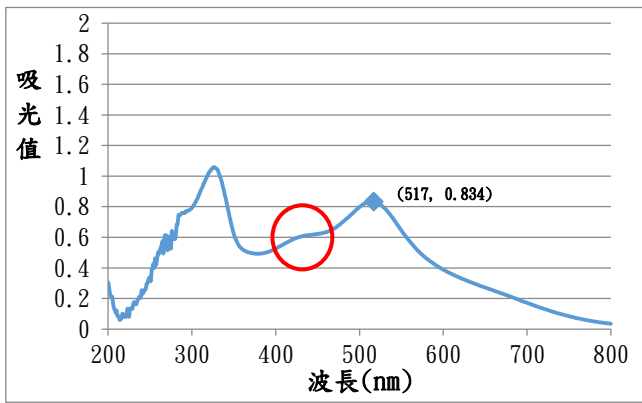
模擬人體內消化道：口腔 (pH=6.5)、胃 (pH=2)、小腸 (pH=8.3) 及人體組織 (pH=7.4)，將大蒜末置於不同酸鹼值的環境下進行萃取，並將萃取液於 37°C 進行清除 DPPH 自由基實驗，求出其 DPPH 自由基清除率，如表十二。

表十二 不同酸鹼值下的大蒜萃取液之清除率

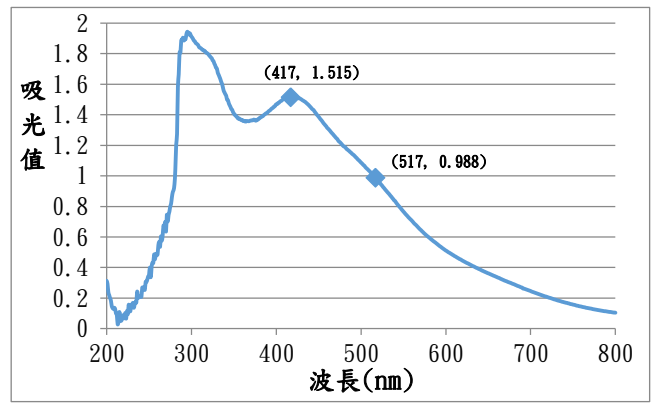
編號 pH 值	1	2	3	4	平均	DPPH	清除率
2	0.137	0.137	0.146	0.138	0.140	0.749	81.4%
4	0.071	0.070	0.069	0.069	0.070	0.753	90.7%
6.5	0.183	0.175	0.186	0.182	0.182	0.819	77.8%
7.4	0.680	0.613	0.638	0.644	0.644	0.716	10.1%
8.3	0.863	0.861	0.974	0.875	0.893	0.834	-7.1%



圖十六 不同酸鹼值下的大蒜萃取液之清除率



圖十七 DPPH 加 pH=8.3 之緩衝溶液的全波長光譜



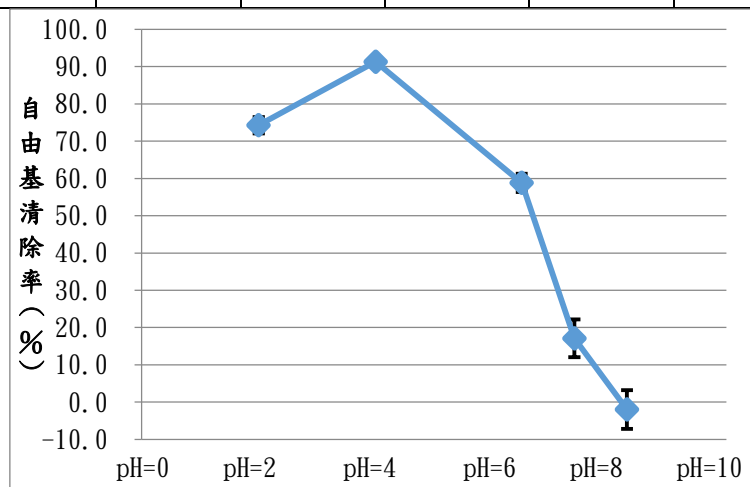
圖十八 DPPH 加 pH=8.3 之蒜液的全波長光譜

(二)大蒜萃取液添加不同酸鹼值之緩衝溶液對大蒜清除自由基能力的影響

為避免酸鹼值影響萃取效果，並模擬食用大蒜時人體內消化道對其自由基清除能力產生之影響，改將同一溫度下萃取之萃取液加入不同酸鹼值之緩衝溶液，並將萃取液於 37°C 進行清除 DPPH 自由基實驗，求出其 DPPH 自由基清除率，結果如表十三以及圖十九。

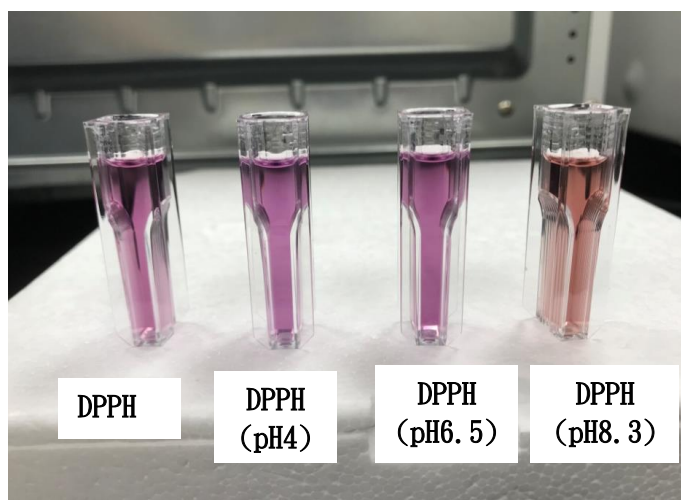
表十三 大蒜萃取液加入不同酸鹼值緩衝溶液之自由基清除率

編號 pH 值	1	2	3	4	DPPH	平均	清除率
2	0.206	0.187	0.175	0.171	0.719	0.185	74.3%
4	0.067	0.069	0.068	0.058	0.750	0.066	91.3%
6.5	0.376	0.336	0.330	0.344	0.840	0.347	58.8%
7.4	0.698	0.711	0.798	0.721	0.883	0.732	17.1%
8.3	0.877	0.821	0.921	0.842	0.848	0.865	-2.0%



圖十九 大蒜萃取液加入不同酸鹼值緩衝溶液之自由基清除率

1. 不論是在不同酸鹼度萃取，或是萃取後在不同酸鹼值下與 DPPH 反應，所得趨勢大致相同(圖十六及圖十九)，在 pH=4 時的自由基清除率最高。
2. pH=8.3 組的清除率在幾次實驗後皆為負值，在對溶液進行全波長掃描後，發現 DPPH 加入 pH=8.3 之緩衝溶液後在 400-500nm 間有起伏(如圖十七圈起處)；使用 pH=8.3 之蒜液與 DPPH 反應後於 417nm 產生吸收高峰(圖十八)，此與圖五的紅線明顯不同，溶液顏色亦產生明顯不同(圖二十)，此在 417nm 吸光之物質間接使 517nm 的吸光值增大，故計算所得之自由基清除率為負值。因此欲檢測鹼性物質之自由基清除率時，不宜使用 DPPH 進行實驗。



圖二十 不同酸鹼值 DPPH 溶液的顏色

#### 七、一般大蒜、市售黑蒜與自製黑蒜之清除自由基能力的比較

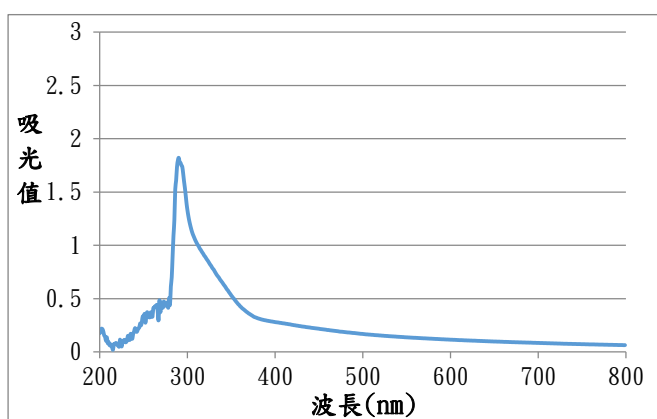
為了解新鮮大蒜與黑蒜之自由基清除能力，我們嘗試自製黑蒜，並至超市購買黑蒜來進行實驗，但因黑蒜的含水量明顯比新鮮大蒜少，若秤取 1g 固體加入 9g 水進行萃取，則黑蒜固體量較多，因此挑選大小相似的黑蒜與新鮮蒜球進行秤重，並依表十四之比例混合進行萃取後，比較其自由基清除率。

表十四 黑蒜萃取調整比例

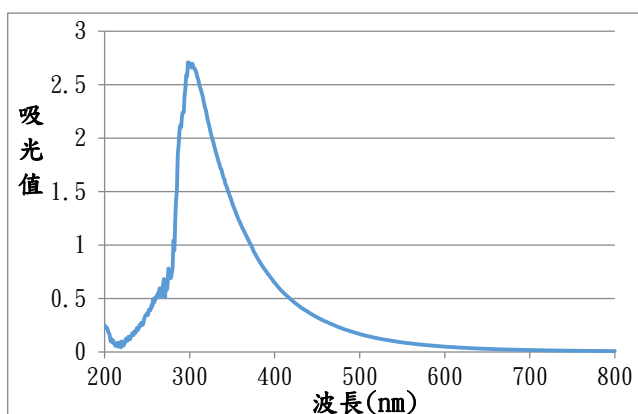
樣品	重量	總重	份數 (烘烤前重量)	每份克數	加入水量
一般大蒜		34.25g	34.25	1	9.00ml
市售黑蒜		23.54g	34.25	0.69	9.31ml
自製黑蒜		20.49g	32.81	0.62	9.38ml

依此比例所得萃取液與 DPPH 溶液混合，未經搖晃 DPPH 溶液即從紫色迅速褪為黃色（圖二十四），因此偵測與 DPPH 溶液反應前萃取液之全波長光譜（圖二十一、圖二十二及圖二十三）進行比較，並將萃取液稀釋 5 倍後與 DPPH 溶液進行暗室反應（37°C，180 rpm）30 分鐘後計算所得之清除率如表十五。

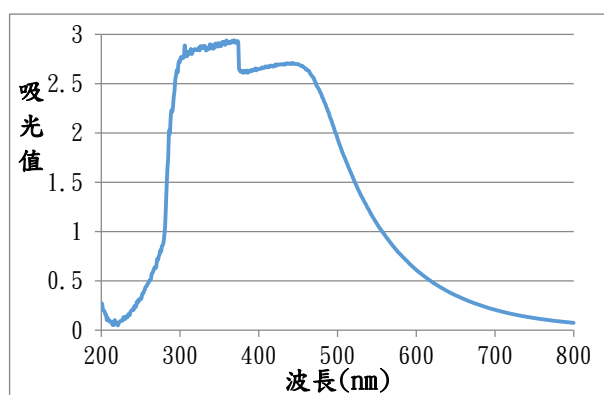
另取稀釋 5 倍後黑蒜萃取液與 DPPH 溶液混合，偵測其在 517nm 下吸光值隨時間的變化，結果如圖二十五，並計算出前 3 秒的清除率，比較三者自由基清除速率（表十六）。



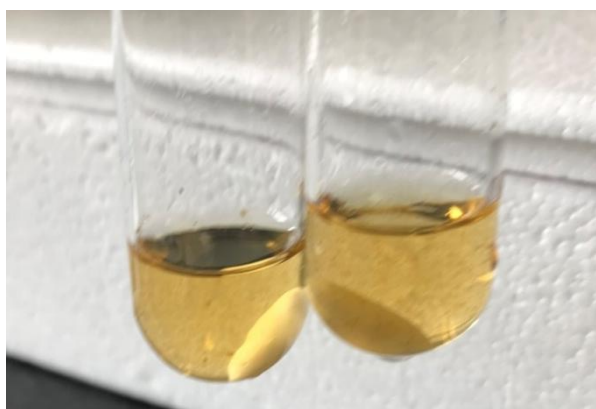
圖二十一 未稀釋之一般大蒜萃取液全波長光譜



圖二十二 未稀釋之自製黑蒜萃取液全波長光譜



圖二十三 未稀釋之市售黑蒜萃取液全波長光譜



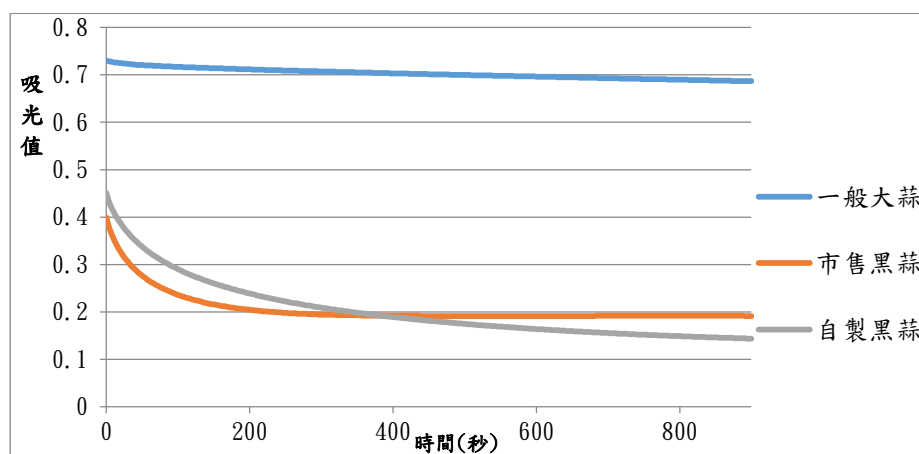
圖二十四 未稀釋之市售黑蒜萃取液與 DPPH 混合



表十五 市售黑蒜、自製黑蒜及一般大蒜之自由基清除率

樣品 \ 編號	1	2	3	4	平均	清除率
一般大蒜	0.594	0.58	0.575	0.539	0.572	27.8%
市售黑蒜	0.124	0.123	0.123	0.122	0.123	84.5%
自製黑蒜	0.123	0.112	0.114	0.111	0.115	85.5%

\*反應前 DPPH 吸光值：0.792



圖二十五 各樣品在 517nm 下吸光值隨時間的變化

表十六 市售黑蒜、自製黑蒜及一般大蒜之自由基清除速率

樣品 \ 吸光值/清除率	反應前 DPPH 吸光值	混合後第 3 秒 吸光值	混合後 3 秒之 清除率	自由基 清除速率
一般大蒜	0.792	0.73	7.8%	2.6%/s
市售黑蒜	0.792	0.399	49.6%	16.5%/s
自製黑蒜	0.792	0.451	43.1%	14.4%/s

1. 由表十五 市售黑蒜、自製黑蒜及一般大蒜之自由基清除率可看出市售黑蒜與自製黑蒜之自由基清除能力相當，約為一般大蒜的 3 倍。
2. 市售黑蒜的外觀較自製黑蒜黑，且蒜瓣潮濕、黏稠（圖二十六），比較兩者之全波長光譜後發現市售黑蒜在 400-500nm 間出現明顯的吸收峰，而自製黑蒜之全波長光譜則與一般大蒜相似，不過吸光值明顯較高。
3. 雖然市售黑蒜之全波長光譜明顯不同，但其自由基清除率卻與自製黑蒜相當，因此推測在 400-500nm 吸光之物質似乎不影響自由基清除率；但由表十七得知市售黑蒜在低濃度即有顯著的自由基清除率，此處之自由基清除率似乎已達最大值，若降低濃度進行實驗或許能比較出兩者間之差異。



4. 由圖二十五得知市售黑蒜初期反應速率較自製黑蒜快，在 200 秒時吸光值曲線已趨於平緩，而自製黑蒜之吸光值曲線仍持續下降；一般大蒜在 900 秒內吸光值未明顯下降。



圖二十六 自製黑蒜與市售黑蒜外觀

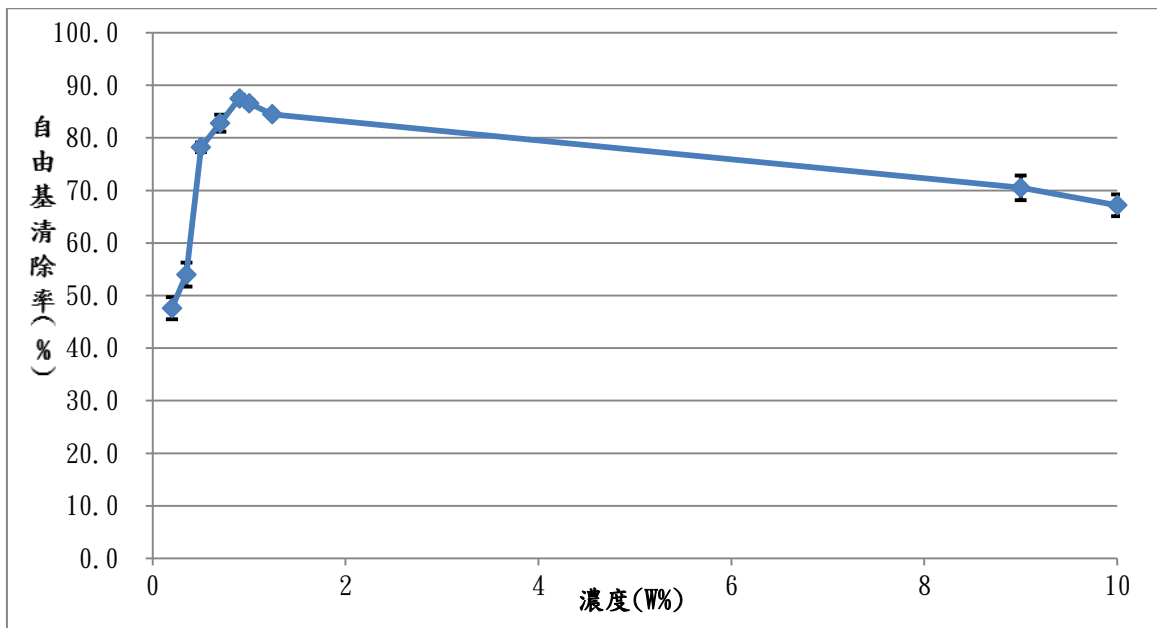
#### 八、黑蒜萃取液濃度高低對自由基清除能力的影響

本實驗直接秤取市售黑蒜之蒜泥，配成不同濃度的溶液，探討黑蒜萃取液濃度與自由基清除率的關係，結果如表十七及圖二十七。

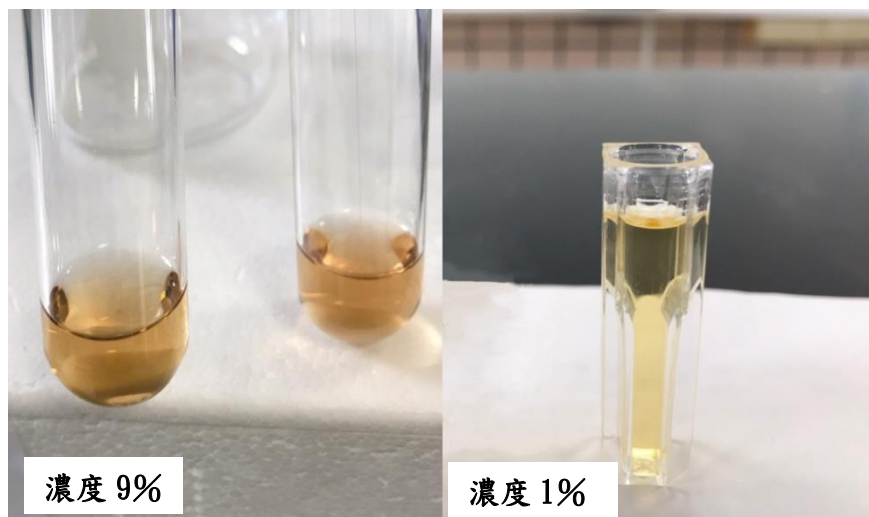
表十七 不同濃度市售黑蒜的萃取液之自由基清除率

編號 濃度(%)	1	2	3	4	平均	清除率
0.2	0.450	0.432	0.408	0.430	0.430	47.6%
0.35	0.339	0.378	0.367	0.380	0.378	54.0%
0.5	0.184	0.175	0.186	0.170	0.179	78.2%
0.7	0.139	0.159	0.140	0.127	0.141	82.8%
0.9	0.105	0.098	0.098	0.109	0.103	87.5%
1	0.111	0.115	0.103	0.112	0.110	86.6%
1.24	0.124	0.123	0.123	0.122	0.123	84.5%
9	0.257	0.224	0.238	0.267	0.230	70.5%
10	0.260	0.285	0.250	0.282	0.269	67.2%

\*反應前 DPPH 吸光值：0.820



圖二十七 不同濃度市售黑蒜的萃取液之自由基清除率



圖二十八 黑蒜萃取液與 DPPH 溶液反應後之顏色

1. 重量百分濃度 0.9%的萃取液自由基清除能力最佳；當濃度小於 0.9%，自由基清除率隨濃度增加而上升。
2. 濃度 9%以上的黑蒜萃取液與 DPPH 反應後溶液呈現黃褐色(圖二十八左)，與低濃度時的狀況明顯不同(圖二十八右)，可能是此褐色物質的干擾造成 517nm 的吸光值偏高，導致計算出的清除率降低。
3. 市售黑蒜在低濃度即有顯著的自由基清除率，也代表其擁有高抗氧化力，因此不宜過量食用。

## 陸、結論

- 一、在不同溫度下萃取時，蒜末萃取溫度在 60°C 以內時，萃取溫度越高，DPPH 自由基清除效果越好。
- 二、大蒜萃取液經 60°C 加熱後的 DPPH 自由基清除能力最佳；大蒜萃取液經 40°C-60°C 加熱後，其 DPPH 自由基清除率上升，若加熱溫度到達 80°C，則會使其 DPPH 自由基清除率下降。
- 三、冷藏密封保存的蒜末之 DPPH 自由基清除率優於室溫密封保存的蒜末，冷藏保存三週後自由基清除率開始明顯降低。
- 四、在室溫開放環境下放置蒜末 0-8 小時內清除率下降幅度不大，但放置時間越長 DPPH 自由基清除率越低。
- 五、以 pH=4 的緩衝溶液萃取之大蒜萃取液清除率最高；在模擬胃部(pH=2)的清除率最佳。
- 六、大蒜萃取液在 pH=4 的緩衝溶液內的清除率最高；而模擬人體環境時，在 pH=2(胃部)的緩衝溶液中之 DPPH 自由基清除率最佳。
- 七、市售黑蒜與自製黑蒜之 DPPH 自由基清除率相近，皆明顯優於一般大蒜。
- 八、市售黑蒜之萃取液濃度低於 0.9%時，DPPH 自由基清除率隨濃度增加而上升。

## 柒、未來展望

- 一、偵測花蓮特有之辛辣味較重之花蓮小蒜頭之自由基清除率。
- 二、偵測烘烤蒜片之自由基清除率。

## 捌、參考資料及其他

- 1.Noureddine Benkeblia.(2005). Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa*L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Braz. arch. biol. technol.* vol.48 no.5 Curitiba Sept. 2005. doi:10.1590/S1516-89132005000600011
- 2.Karin Ried, Oliver .R. Frank, Nigel P Stocks, Peter Fakler and, and Thomas Sullivan.(2008). Effect of garlic on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. [Monograph]. *BMC Cardiovascular Disorders* 2008 8/13. doi:10.1186/1471-2261-8-13

3. Ackermann R.T, Mulrow C.D, Ramirez G, Gardner C.D, Morbidoni L, and Lawrence V.A.(2001). Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. Arch Intern Med 2001;161:813-24. PMID: 11268223
4. 徐明達(2010)。大蒜的化學。科學人雜誌，99，66-67
5. 洪子涵(2011)。探討梅納反應對大蒜生理機能之影響：抗氧化及細胞減脂活性。國立宜蘭大學，宜蘭縣。
6. 洪玉娟(2004)。大蒜之五種水溶性含硫化合物在動物試驗中抗氧化活性之研究。私立中山醫學大學，臺中市。
7. 狄亞莉(2016)。大蒜水溶性成份之抗氧化活性研究。國立屏東科技大學，屏東縣。
8. Blois, M.S.(1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 29:1199 1200.
9. 韋獻雅，殷麗琴，鐘成，章明海，牛應澤(2014)。DPPH 法評價抗氧化活性研究進展。食品科學。2014, Vol. 35, No. 09, 317-322。
10. 許申鴻、杭 瑚(2000)。溶劑及 pH 值對 1,1-二苯基-2-苦肼基自由基分析法的影響。分析測試學報。2000, Vol. 19, No. 3, 50-52。

## 【評語】 052203

1. 本研究探討不同萃取及處理條件對大蒜萃取物清除 DPPH 自由基能力的影響。本報告有用心撰寫，但因為已知大蒜或大蒜素具有抗氧化功效，這個研究針對不同處理條件探討抗氧化的功效，新穎性較不高。
2. 摘要最後提到，"重量百分濃度 0.9% 的市售黑蒜萃取液自由基清除能力最佳"，但是達到多少？需要標示出來才知顯著性。摘要最後建議多加一句結語，較具完整性。
3. 實驗設計可適度修改，例如進行大量萃取之後精秤重量，在進行不同條件的測試。
4. 在 289 nm 有吸光的物質不少，隨加熱增加吸光值，表示有新物質的產生，吸光強度亦可能蓋住了大蒜素因加熱所產生的變化！
5. 這個研究最大的弱點是所測量的樣品為粗抽液，裡面成分複雜，可能有不少成分亦在 289 nm 有吸光，會干擾數據的判讀與解釋！！需要其他代表性的分析方法或標準品來確認大蒜素的存在與含量。
6. "酒精與萃取液混合時溶液明顯變混濁"，表示因為極性的改變造成成分析出。
7. DPPH 在不同 pH 值下化合物的穩定性會影響測試結果。除 DPPH 自由基以外，宜再探討清除其它種類自由基的能力，結果更具說服力。
8. 對實驗背景之理論基礎尚待加強，例如，黑蒜的製作方法、黑蒜之抗氧化性較大蒜為高之可能原因等背景知識。

## 作品海報



## 摘要

本研究以不同方式處理大蒜，探究其清除 DPPH 自由基的能力，利用DPPH在517nm吸光值的減少程度來計算大蒜之自由基清除能力。大蒜萃取液經過60°C隔水加熱後有最佳的自由基清除力(65.2%)；蒜末冷藏保存三週後自由基清除率開始明顯降低；開放環境下，存放8小時後的蒜末之自由基清除率較新鮮蒜末低了約11%；模擬蒜液進入人體環境時，加入pH=2(胃部)的緩衝溶液自由基清除率最佳(74.3%)；市售黑蒜與自製黑蒜之自由基清除率相近，皆優於一般大蒜；重量百分濃度0.9%的市售黑蒜萃取液自由基清除能力最佳。

## 壹、研究動機

在一本健康生活類月刊上偶然看到一篇有關於大蒜的文章，內容提到食用大蒜的各種功效，引起我們的興趣，於是我們便開始搜尋相關的文獻。在我們找到的文獻中，多篇研究顯示大蒜有清除自由基<sup>(1)</sup>、降低血壓<sup>(2)</sup>及血脂肪的功能<sup>(3)</sup>。由於癌症為國人十大死因之首，大蒜也許能透過清除自由基的能力協助我們預防癌症，因此我們選用一般超市販售之大蒜作為研究主體，期望找出清除自由基效果最好的環境，並期望在日後能提供科學研究一些基礎的參考。

## 貳、研究目的

比較不同環境之大蒜清除自由基能力：

- 一、探討不同溫度大蒜萃取液之自由基清除能力
- 二、不同溫度密封保存(室溫/冷藏)對大蒜清除自由基能力的影響
- 三、蒜末於開放環境下放置時間對大蒜清除自由基能力的影響
- 四、探討不同酸鹼值大蒜萃取液之自由基清除能力
- 五、探討一般大蒜、市售黑蒜與自製黑蒜之自由基清除能力

## 參、研究設備及器材

- 一、器材：分光光度計、離心機、電動碎蒜機、微量吸管、酸鹼度計
- 二、藥品：DPPH、95%乙醇、磷酸二氫鈉、磷酸氫二鈉、氫氧化鈉、鹽酸、磷酸
- 三、大蒜來源：全聯福利中心，阿根廷進口。  
黑蒜來源：全聯福利中心，展拓農場。

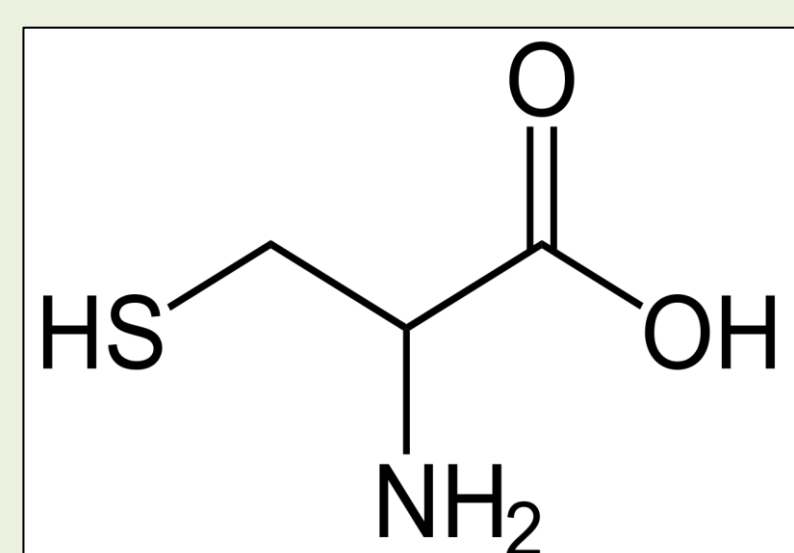
## 肆、研究過程與方法

一、文獻介紹：

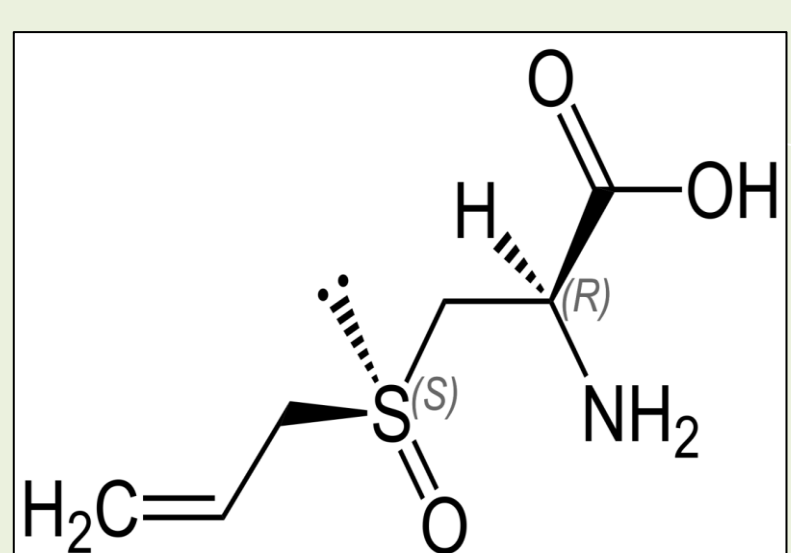
(一) 大蒜、蒜胺酸與大蒜素

大蒜(學名: *Allium sativum*)，為百合科的多年生草本作物。大蒜是蔬果中含硫比例最高的，其氣味也和其中許多的硫化物有關<sup>(4)</sup>。

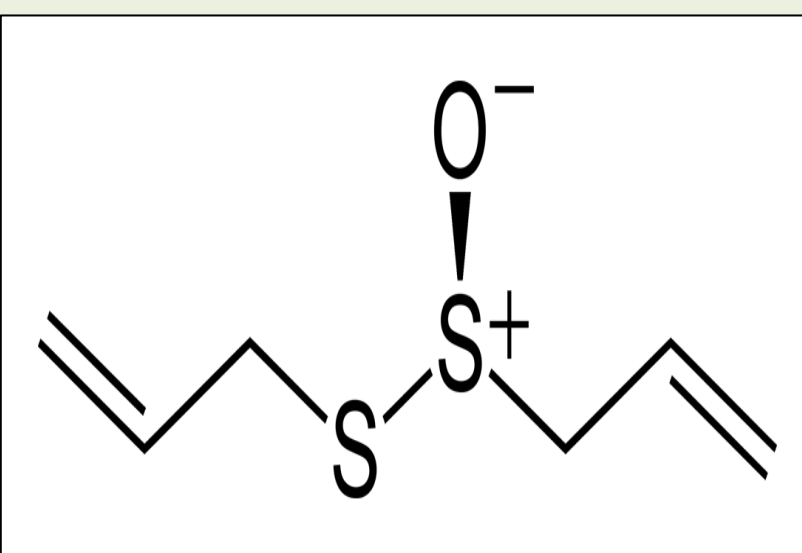
蒜頭內有蒜胺酸及蒜胺酸酶，蒜胺酸的化學式為C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>S(圖一)，是大蒜中獨有的含硫胺基酸，易溶於水。蒜胺酸的前驅物為半胱胺酸(圖二)。



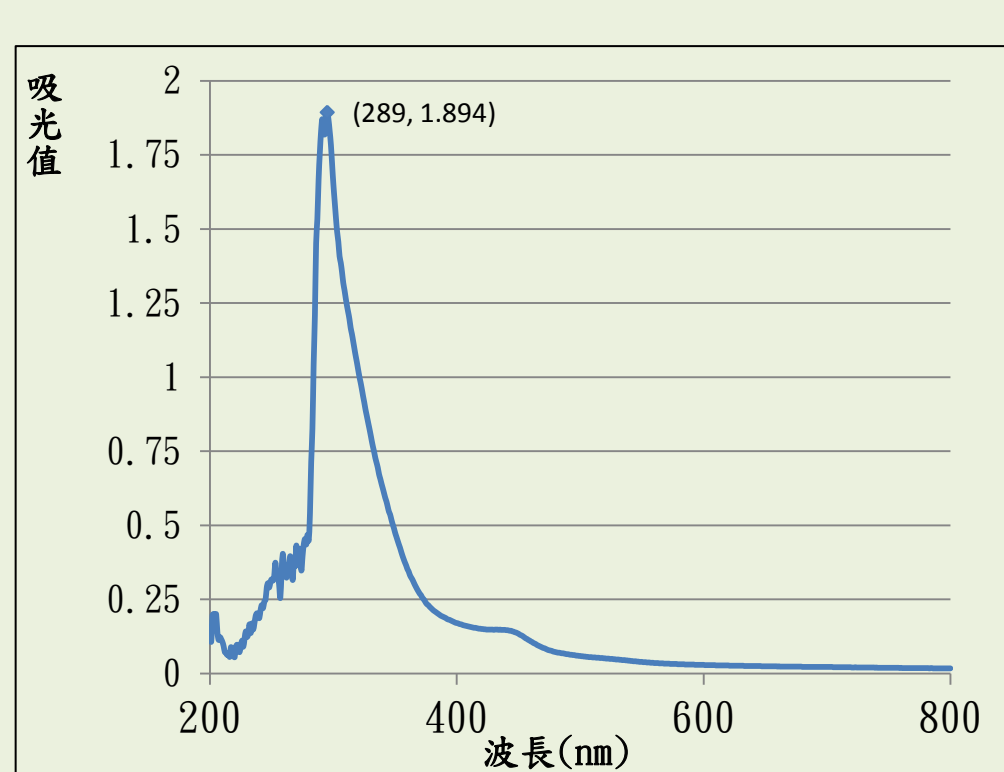
圖二 半胱胺酸的結構



圖一 蒜胺酸的結構



圖三 大蒜素的結構

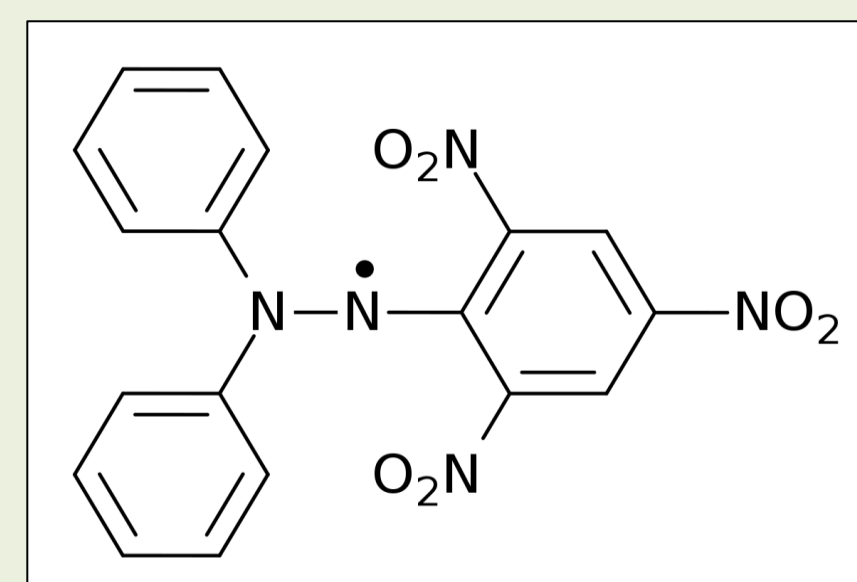


圖四 大蒜萃取液吸光值

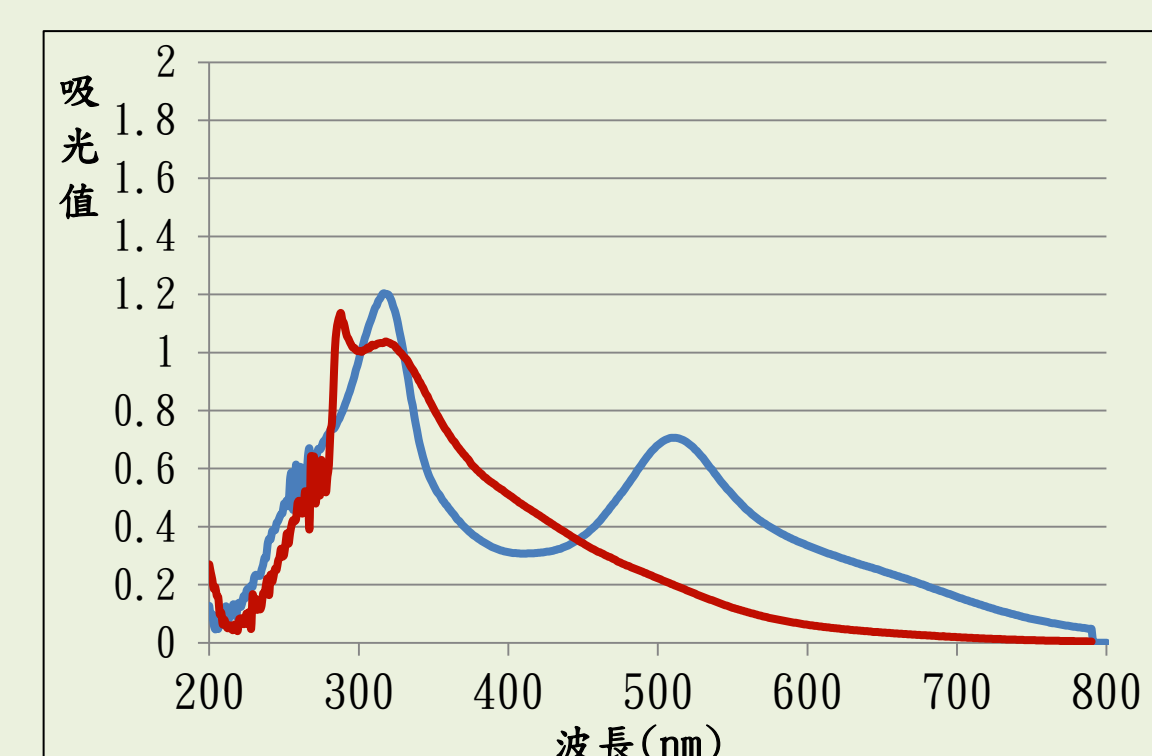
大蒜被破壞時，蒜胺酸會被蒜胺酸酶分解成大蒜素<sup>(5)</sup>，大蒜的辛辣味就來自大蒜素(圖三)，其在289nm下有明顯吸光高峰(圖四)。半胱胺酸和大蒜素經研究顯示，都含有顯著的抗氧化力<sup>(6)</sup>和清除DPPH自由基的能力<sup>(7)</sup>。

(二) DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

2,2-二苯-1-三硝基肼(圖五)，化學式為C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>，常簡稱為DPPH，是一種穩定的自由基分子，它的穩定性主要來自於3個苯環的共振穩定作用及空間障礙，並廣泛用於去自由基能力的測定實驗。



圖五 DPPH的結構



圖六 DPPH的吸光值  
(藍線為反應前，紅線為反應後)

自由基清除率之計算公式：

清除率(%) =

$$\frac{(\text{反應前}517\text{nm吸光值} - \text{反應後}517\text{nm吸光值}) \times 100\%}{\text{反應前}517\text{nm吸光值}}$$

二、實驗步驟：

(一) 實驗前準備

1. 配製0.1mM DPPH乙醇溶液

(1) 秤取DPPH粉末0.0196g 以95%乙醇溶解。

(2) 將溶液倒入500mL容量瓶中，添加乙醇溶液至刻度線。

(3) 倒入棕色瓶中避光冷藏保存。

2. 配製0.1M及0.2M磷酸緩衝溶液(以0.1M pH=7.4為例)

(1) 秤取磷酸二氫鈉3.05g和磷酸氫二鈉10.90g並加入蒸餾水350mL，持續攪拌使其完全溶解。

(2) 用電子酸鹼計檢測其pH值

(未到pH7.4時輔以3M氫氧化鈉或3M鹽酸調整)。

(3) 將溶液倒入500mL容量瓶，加蒸餾水至刻度線。

(二) 標準實驗步驟

1. 蒜瓣去皮後置入電動碎蒜機，打5秒，停10秒

(避免蒜末過熱)，重複8次。

2. 秤取1g蒜末並加入9mL蒸餾水，加入磁石並密封，在37°C下加熱攪拌使其萃取20分鐘(180 rpm)。

3. 進行抽濾，所得濾液即為大蒜萃取液。

4. 取0.5mL蒜液與2.5mL DPPH乙醇溶液混合，加入磁石並密封，暗室反應(37°C，180 rpm)30分鐘。

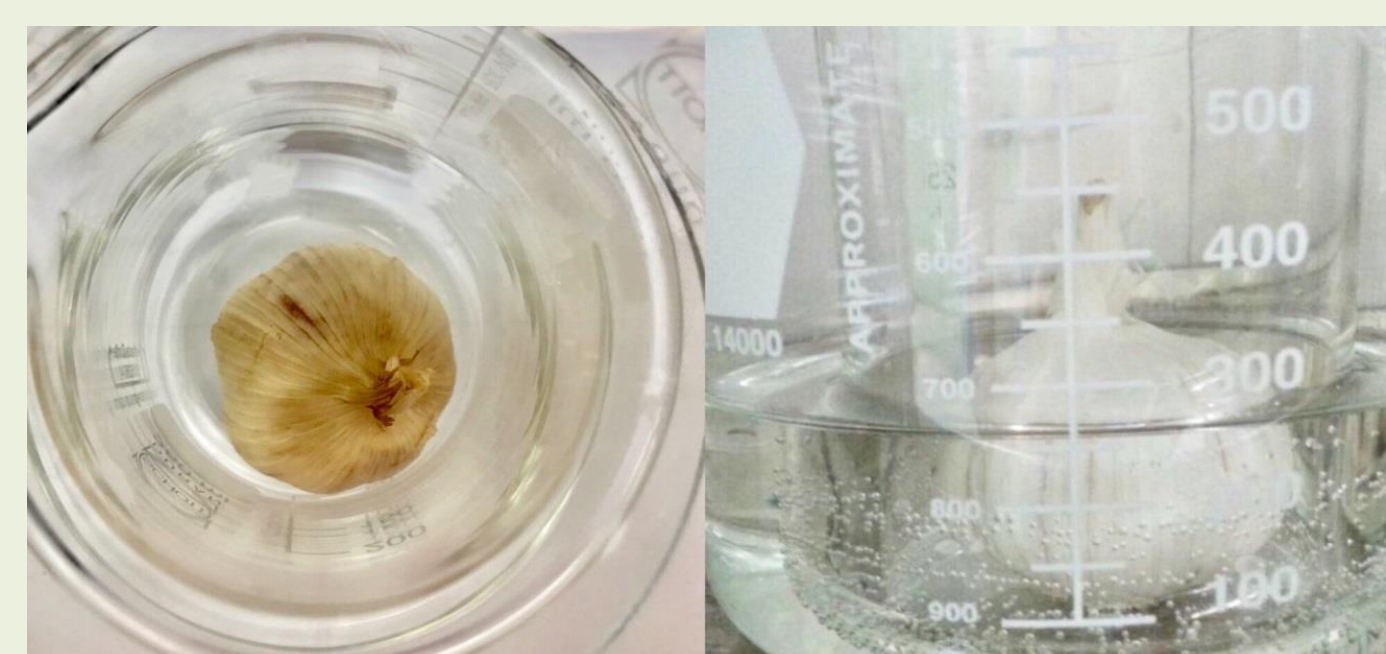
5. 反應完的溶液以3500rpm 離心4分鐘。

6. 取上清液倒入比色管，使用分光光度計測量其在517nm 下的吸光值。

(三) 自製黑蒜

1. 秤量一般大蒜蒜球的重量並記錄，將此蒜球置於圖七中烘烤裝置，置於60°C烘箱內，並適時補水。

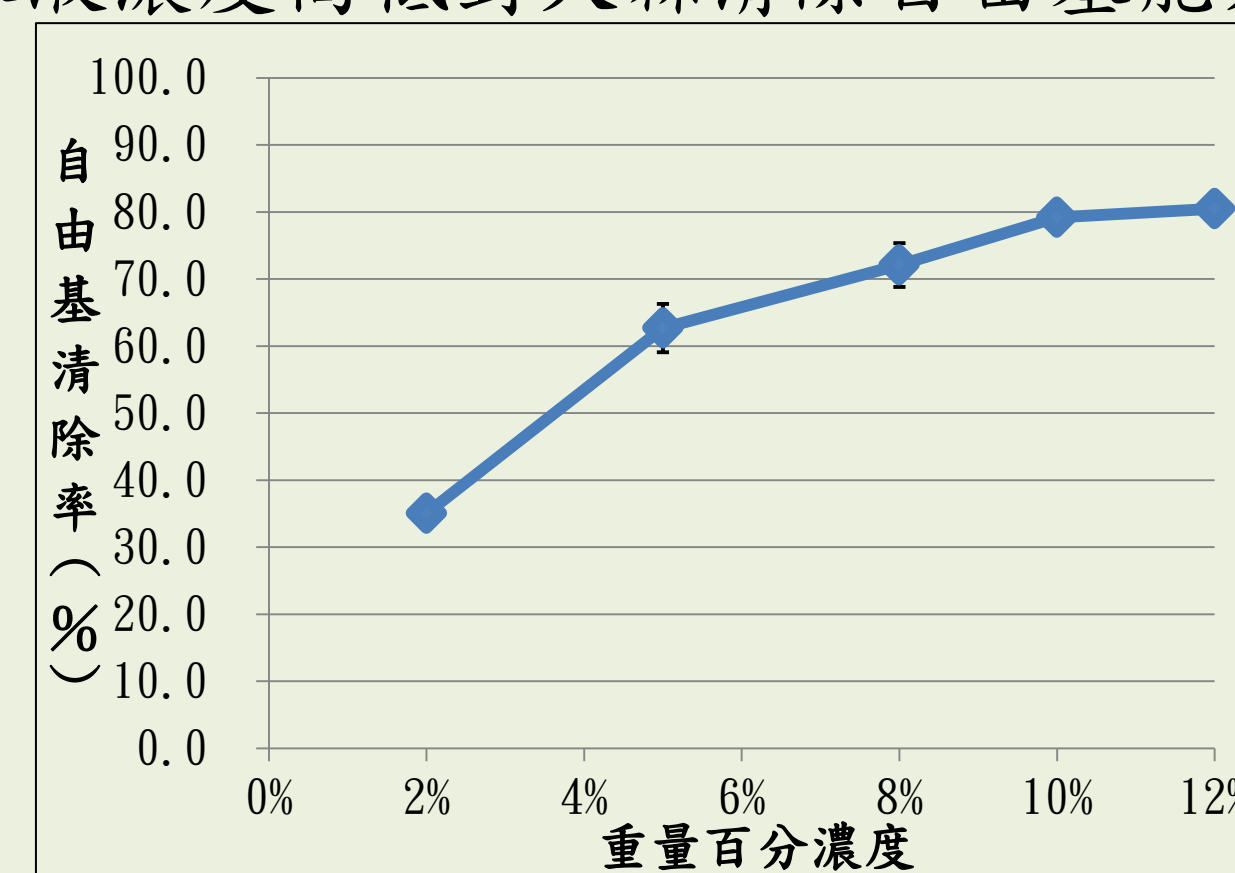
2. 烘烤一個月後，從烘箱內取出，即為自製黑蒜。



圖七 黑蒜烘烤裝置

## 伍、結果與討論

一、大蒜萃取液濃度高低對大蒜清除自由基能力的影響



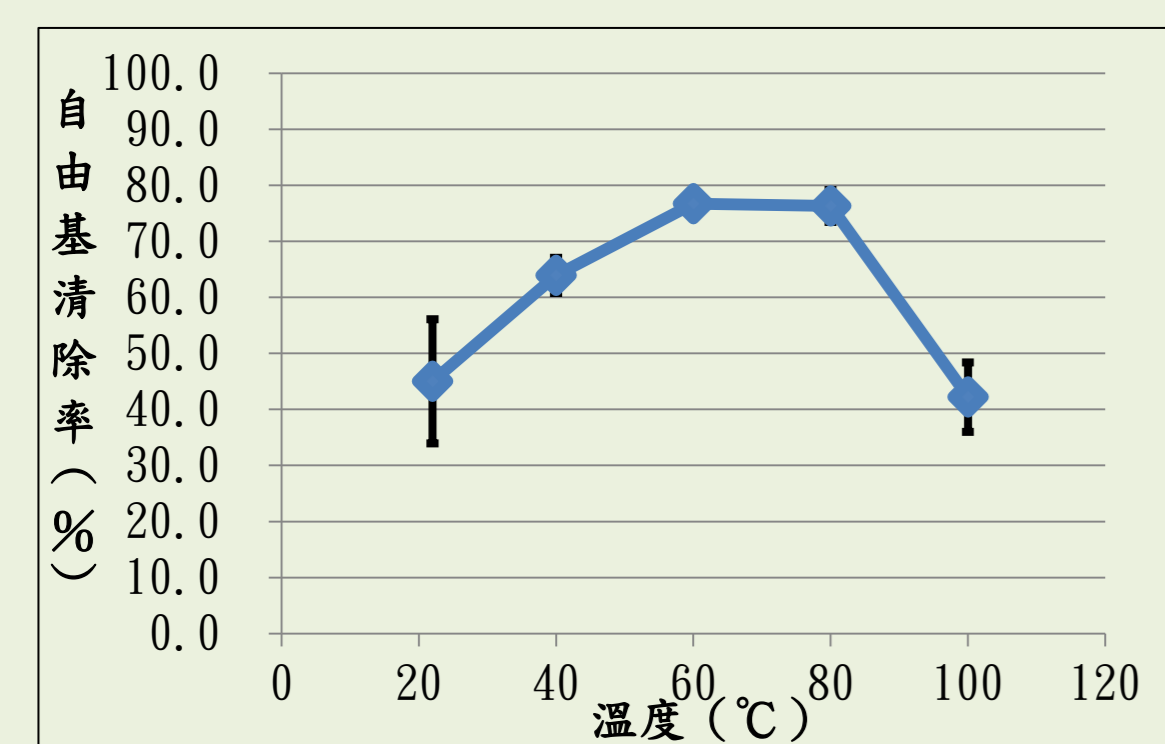
圖八 不同濃度大蒜萃取液之自由基清除率

大蒜萃取液濃度為10%~12%時，自由基清除率上升趨勢平緩，因此採用10%做為以下實驗中大蒜萃取液的濃度。

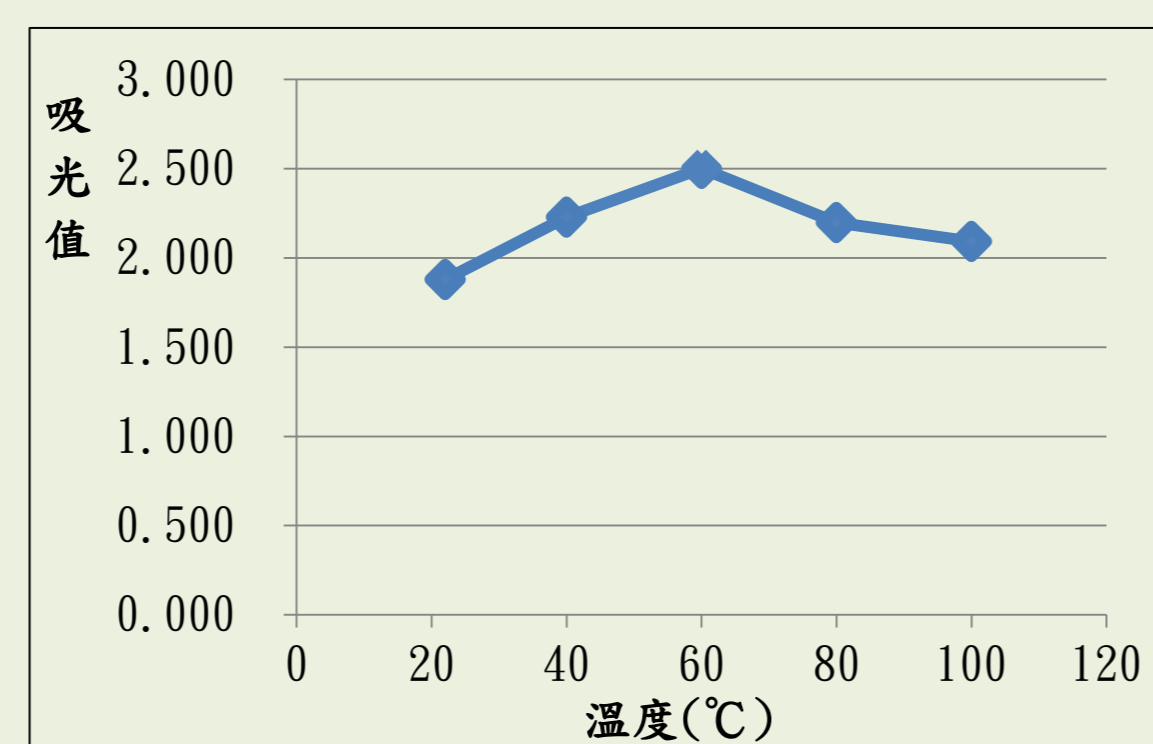


## 二、溫度對大蒜清除自由基能力的影響

### (一) 不同溫度下萃取大蒜對大蒜清除自由基能力的影響

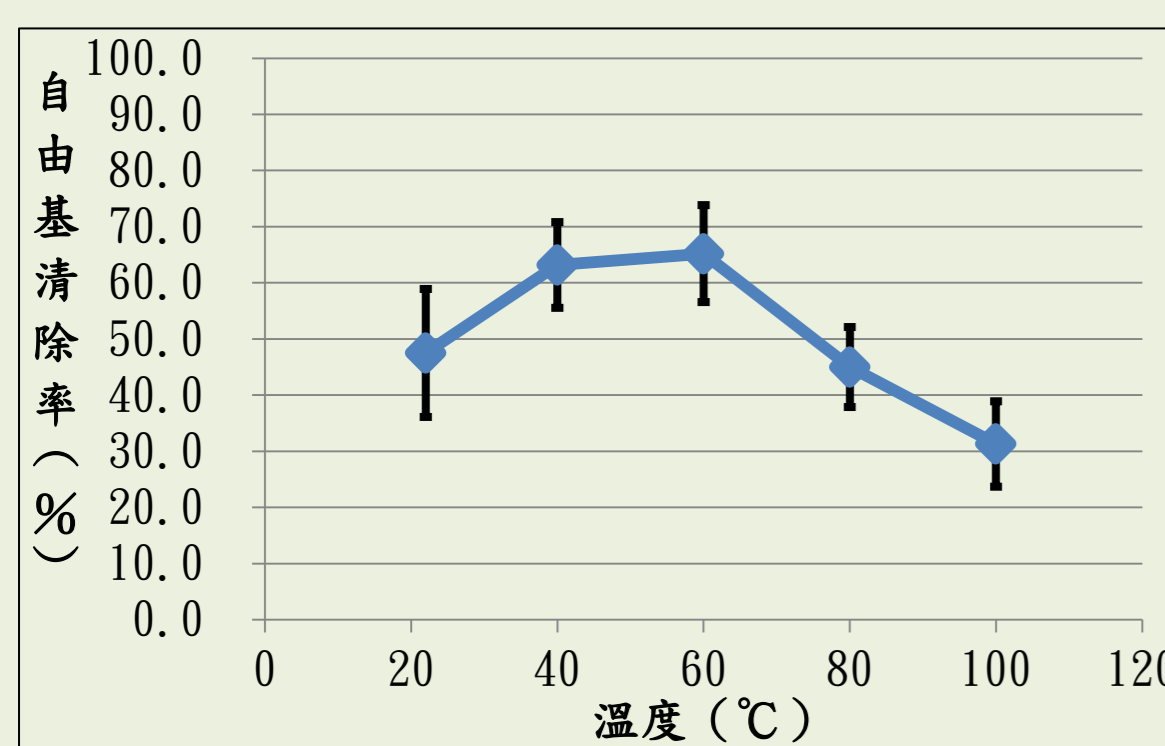


圖九 不同溫度下萃取之大蒜萃取液自由基清除率

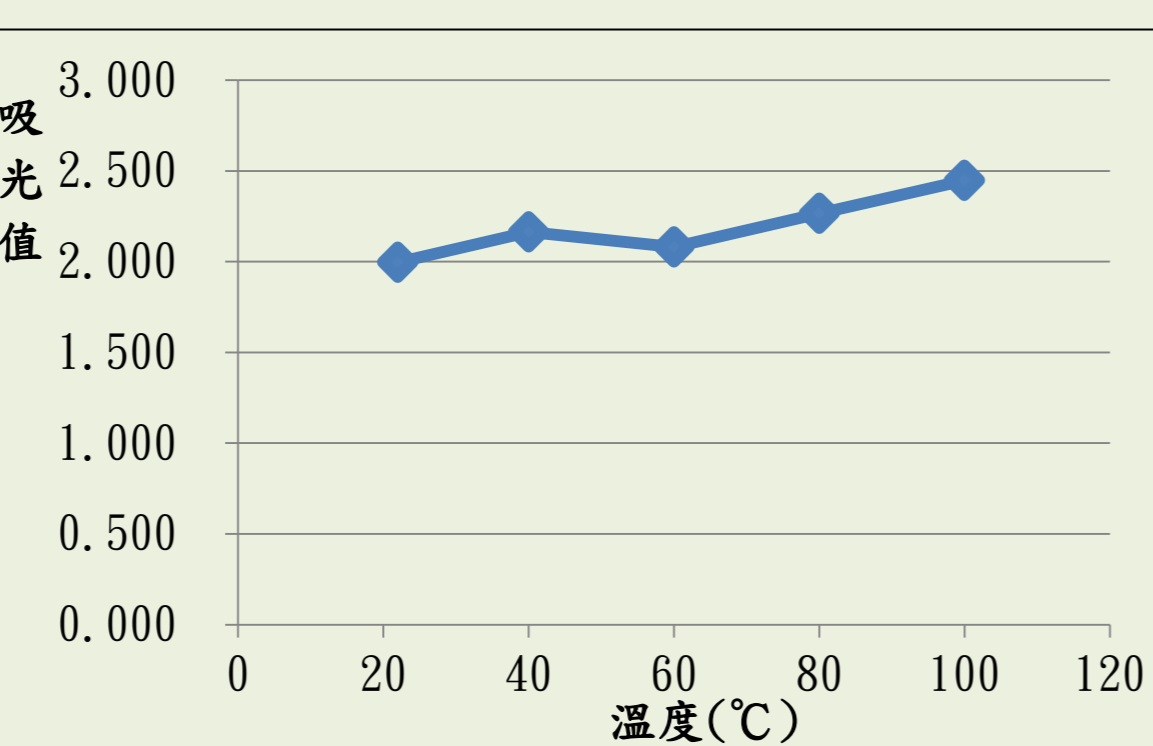


圖十 不同溫度下萃取之大蒜萃取液在289nm下吸光值

### (二) 不同溫度加熱大蒜萃取液對大蒜清除自由基能力的影響



圖十一 經不同溫度加熱之大蒜萃取液與DPPH反應後自由基清除率



圖十二 經不同溫度加熱之大蒜萃取液在289nm下吸光值

1. 不管是不同溫度萃取，或是同溫萃取後再對萃取液加熱，所得結果類似，以60°C萃取或加熱之蒜液自由基清除率最佳。
2. 本實驗以蒜液在289nm下的吸光值作為大蒜素含量的依據；原預期萃取溫度越高，289nm下吸光值也會越高，使自由基清除率上升，但圖十中並未發現此結果。
3. 後來由文獻資料得知，大蒜素之熱穩定性不佳，可能是造成吸光值偏低的原因，也間接使得自由基清除率偏低。但根據圖十二的結果顯示，加熱蒜液並未使289nm的吸光值降低，與我們原先認知的大蒜素熱穩定性不佳似乎未呈現相關性。

## 三、清除自由基前後289nm吸光值變化與自由基清除率的關係

(一) 為了解萃取液與DPPH反應後289nm吸光值的變化，我們設計了以下實驗：

- [ 萃取液+酒精 ] = A (視為與DPPH反應前的大蒜素)
- [ 萃取液+DPPH<sub>(alc)</sub> ] = B (視為與DPPH反應後大蒜素+DPPH)
- [ 水+DPPH<sub>(alc)</sub> ] = C (視為反應前DPPH在289nm的吸光值)

將ABC三種溶液均於37°C反應30分鐘後離心，取澄清液進行289nm吸光值測定，並將B扣除C的結果視為反應後大蒜素的289nm吸光值，所得結果如表一。

表一 DPPH對大蒜萃取液在289nm下的吸光值的影響

樣品	平均
(A) 萃取液+酒精(反應前)	1.639
(B) 萃取液+DPPH <sub>(alc)</sub>	2.299
(C) 水+DPPH <sub>(alc)</sub>	0.814
(D) = B - C (視為反應後)	1.485

由表一看出289nm下的吸光值在反應前(A)與反應後(D)僅有些微差異，與DPPH減少的幅度有些差距，故推測可能是大蒜素的量遠大於DPPH的量，而使大蒜素相對的消耗量過小，不易觀察。

(二) 將萃取液濃度降為五分之一，重複前一個實驗，並將DPPH反應前後吸光值的差異列入考慮，因反應後溶液中的DPPH可能影響289nm下的吸光值，因此同時偵測反應前後DPPH在517nm下的吸光值變化，以此變化比例作為DPPH在289nm的吸光值變化比例。結果如表二及表三。

表二 蒜液加DPPH反應後517nm的吸光值與調整比例

樣品	517nm吸光值	調整比例
水+DPPH <sub>(alc)</sub>	0.816	1
蒜液+DPPH <sub>(alc)</sub> 反應後	0.583	0.715

表三 酒精對大蒜萃取液在289nm下的吸光值的影響

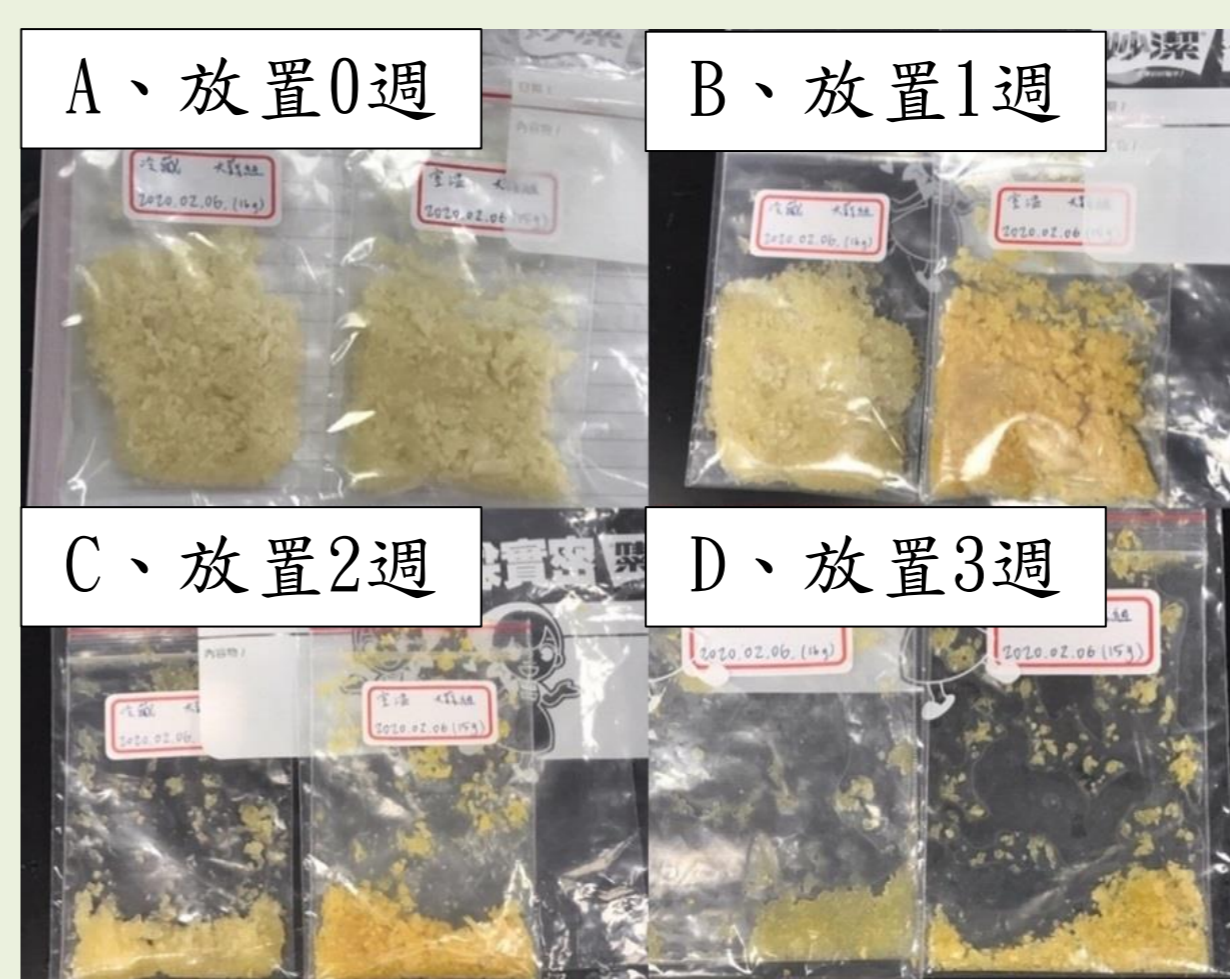
樣品	平均
(A) 萃取液+酒精(反應前)	0.141
(B) 萃取液+DPPH <sub>(alc)</sub>	0.835
(C) 水+DPPH <sub>(alc)</sub>	0.759
(D) = B - C * 調整比例(反應後)	0.292

經計算後，反應後289nm吸光值(剩餘之大蒜素)0.292大於反應前289nm吸光值(原有之大蒜素)0.141。推測造成此結果的原因有：

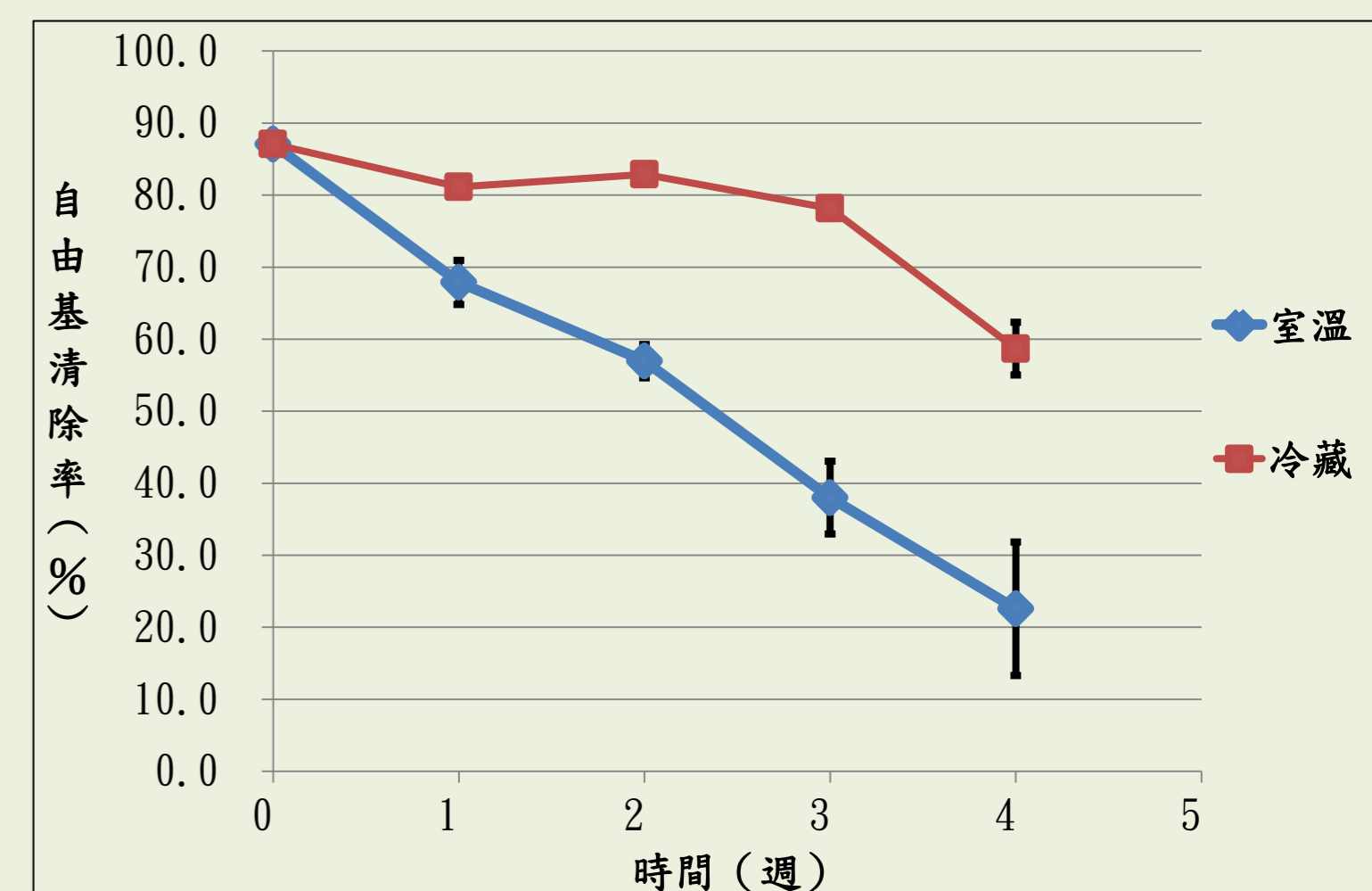
1. DPPH反應前後在517nm的吸光值變化與289nm的變化並未呈比例關係，因此無法以517nm的變化比例來推測DPPH反應後在289nm應有的吸光值。
2. 雖由文獻得知大蒜素在289nm有吸收峰，但不代表大蒜萃取液在289nm的所有吸光現象均是由大蒜素所造成。

綜合上述兩點，289nm的吸光值高低顯然與DPPH自由基清除率無明顯相關性，故往後實驗不再追蹤289nm的吸光值。

## 四、不同溫度密封保存(室溫/冷藏)對大蒜清除自由基能力的影響



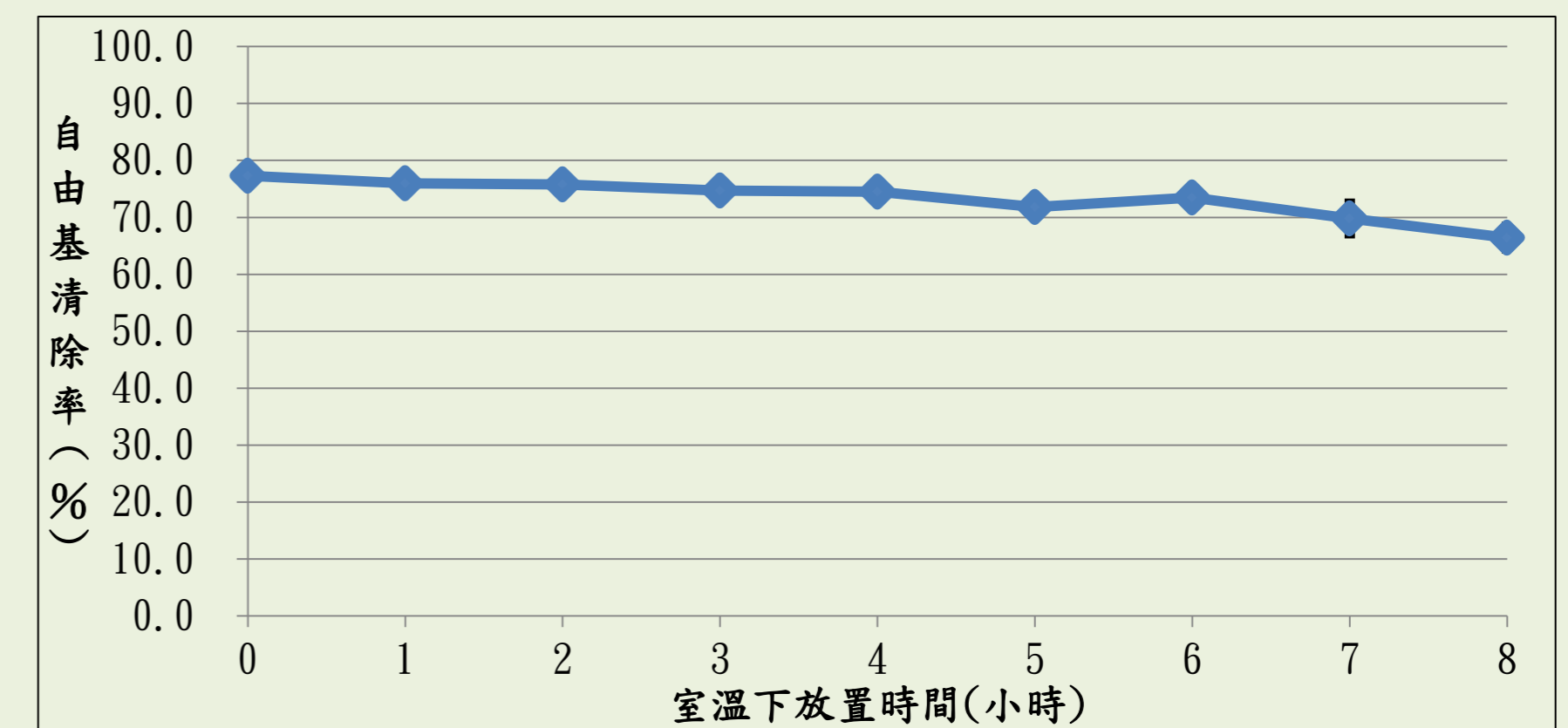
圖十三 室溫與冷藏保存之蒜末顏色變化(左為冷藏組，右為室溫組)



圖十四 蒜末保存於室溫及冷藏下之自由基清除率

1. 存放一週後，室溫保存的蒜末變為橘黃色且有濃烈刺鼻氣味，隨著週數增加其顏色略為變深；而冷藏保存的蒜末顏色未有明顯變化，氣味較新鮮蒜末不明顯(圖十三)。
2. 冷藏保存的蒜末其DPPH自由基清除率優於室溫下存放的蒜末，但存放時間超過三週後，大蒜萃取液對DPPH自由基清除率有明顯下降的趨勢，故建議蒜末若於冰箱內保存，應於三週內食用完畢，方能有較佳的自由基清除率。

## 五、蒜末於開放環境下放置時間對大蒜清除自由基能力的影響



圖十五 開放環境放置時間對清除自由基能力的影響

1. 蒜末於室溫開放環境下放置0~8小時內，清除率隨時間增加而逐漸下降，顯示在開放過程中，具有自由基清除能力的物質持續減少。根據文獻資料，半胱氨酸和大蒜素都含有顯著的抗氧化力<sup>(6)</sup>和清除DPPH自由基的能力<sup>(7)</sup>。大蒜被搗碎或破壞時，雖然蒜胺酸會被蒜胺酸酶分解成大蒜素<sup>(5)</sup>，但大蒜素的辛辣味會隨時間而揮發，推測此為造成自由基清除率逐漸下降的原因。
2. 雖然自由基清除率下降幅度不大，但仍建議大蒜打碎後儘早食用。若一次需處理大量蒜末，建議密封於冷藏中保存。

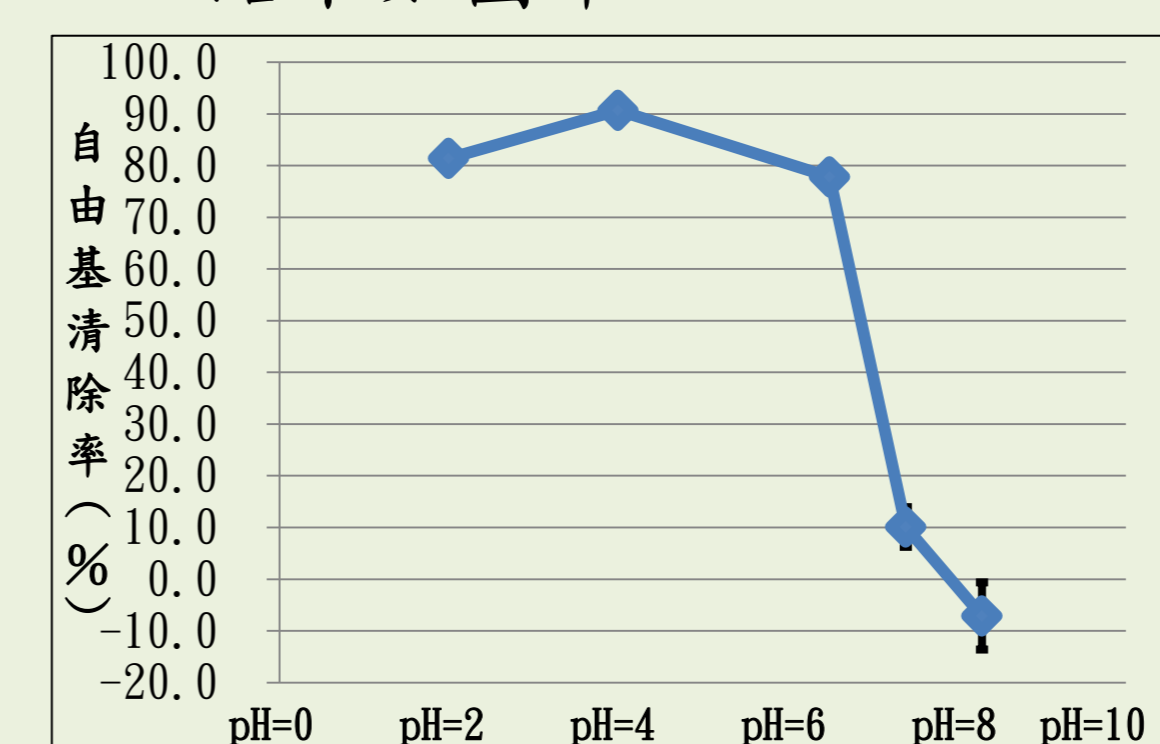
## 六、不同酸鹼值大蒜萃取液之自由基清除能力的探討

### (一) 不同酸鹼值下萃取大蒜對大蒜清除自由基能力的影響

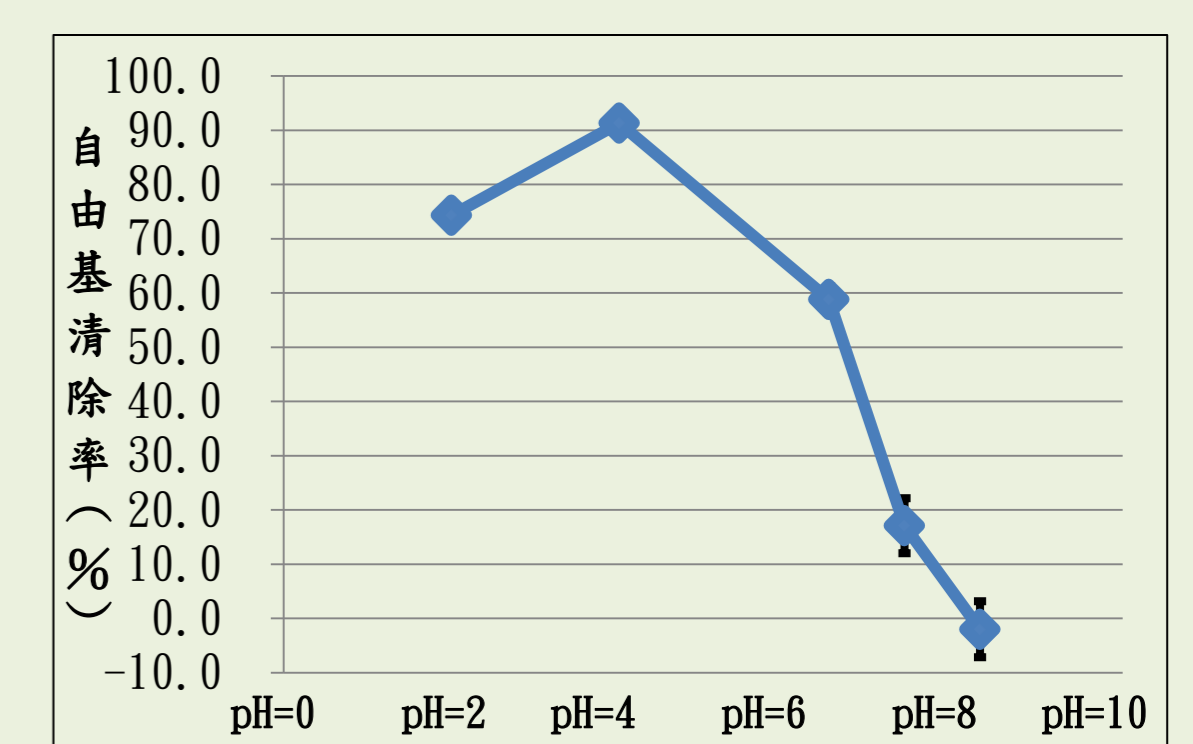
模擬人體內口腔(pH=6.5)、胃(pH=2)、小腸(pH=8.3)及人體組織(pH=7.4)，將大蒜末置於不同酸鹼值的環境下進行萃取，所得自由基清除率如圖十六。

### (二) 蒜液添加不同酸鹼值之緩衝溶液對自由基清除能力的影響

為避免酸鹼值影響萃取效果，改將同一溫度下萃取之萃取液加入不同酸鹼值之緩衝溶液進行自由基清除實驗，結果如圖十七。

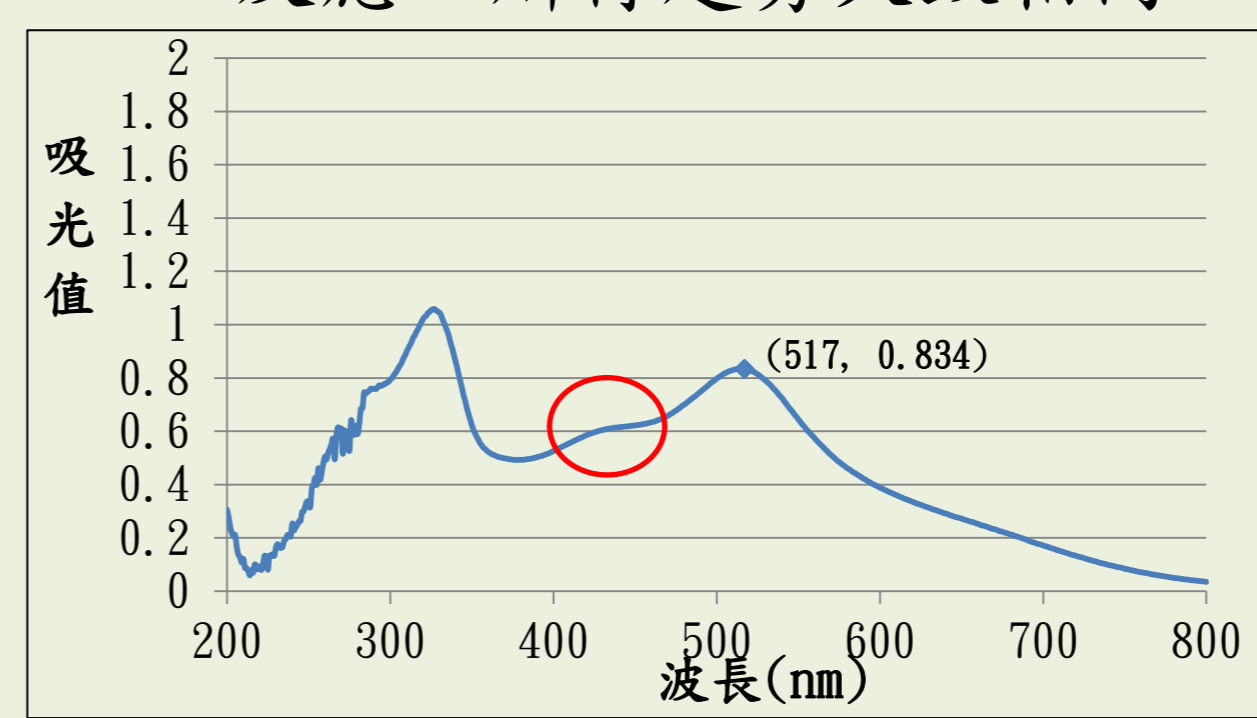


圖十六 不同酸鹼值下的蒜液之清除率

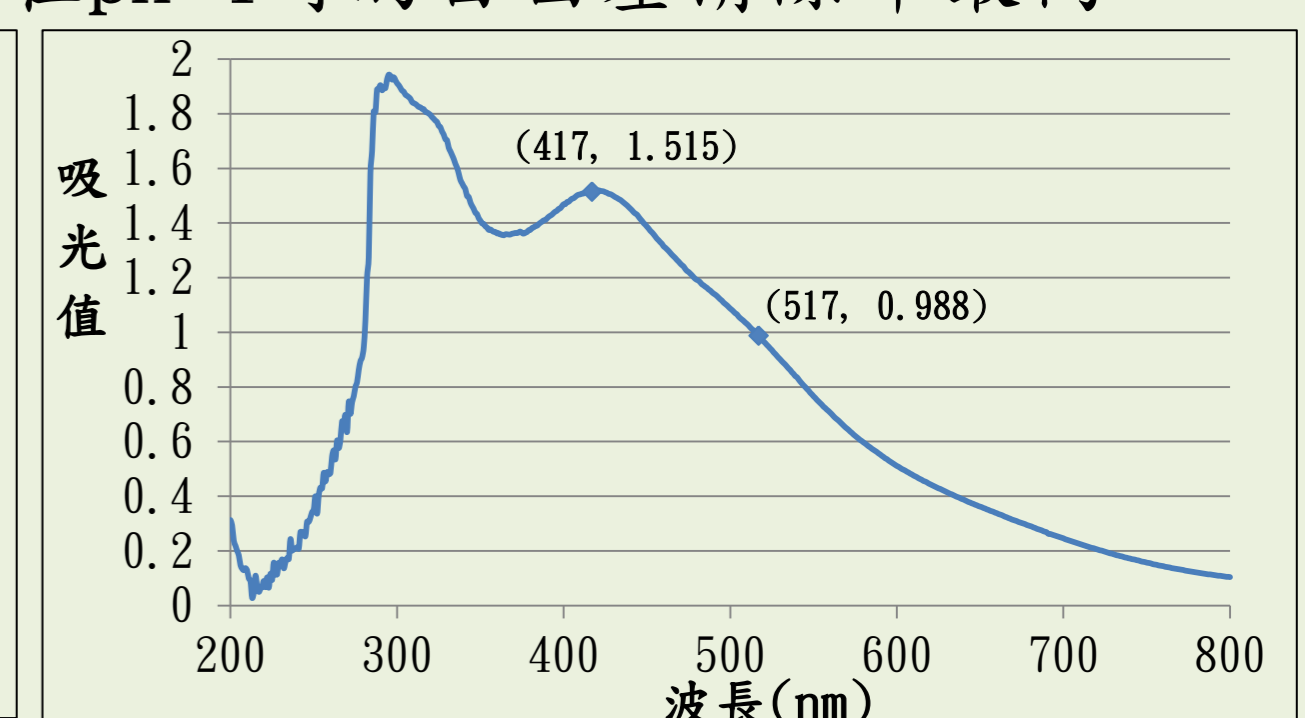


圖十七 蒜液加入不同酸鹼值緩衝溶液之自由基清除率

1. 不論是不同酸鹼度萃取，或是萃取後在不同酸鹼值下與DPPH反應，所得趨勢大致相同，在pH=4時的自由基清除率最高。

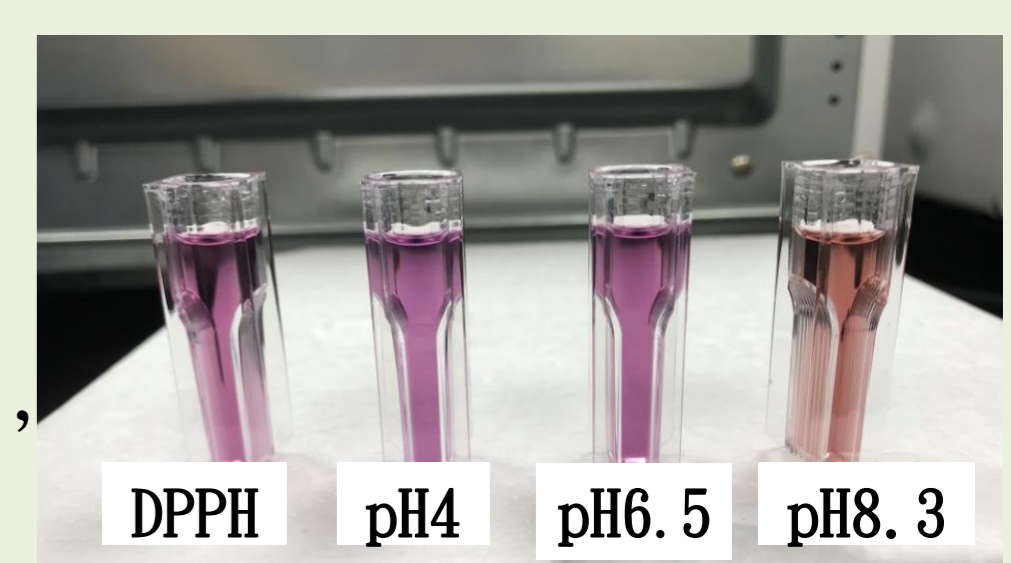


圖十八 DPPH加pH8.3緩衝溶液(反應前)



圖十九 DPPH加pH8.3緩衝溶液(反應後)

2. pH=8.3組的清除率在所有實驗中皆為負值，因此我們對溶液進行全波長掃描，發現DPPH加入pH=8.3之緩衝溶液後在400~500nm間有起伏(如圖十八圈起處)；使用pH=8.3之蒜液與DPPH反應後於417nm產生吸收高峰(圖十九)，此與圖六的紅線明顯不同，溶液顏色亦明顯不同(圖二十)，此在417nm吸光之物質間接使517nm的吸光值增大，故計算所得之自由基清除率為負值。因此欲檢測鹼性物質之自由基清除率時，不宜使用DPPH進行實驗。



圖二十 不同酸鹼值DPPH溶液的顏色



## 七、一般大蒜、市售黑蒜與自製黑蒜之清除自由基能力比較

黑蒜含水量較新鮮大蒜少，若皆秤取1g固體加入9g水進行萃取，則1g黑蒜之固體量較1g一般大蒜多。因此挑選與黑蒜大小相似的新鮮蒜球進行秤重，並依表四之比例混合進行萃取後，比較其自由基清除率。

表四 黑蒜萃取調整比例

樣品	總重	份數 (烘烤前重量)	每份克數	加入水量
一般大蒜	34.25g	34.25	1.00	9.00mL
市售黑蒜	23.54g	34.25	0.69	9.31mL
自製黑蒜	20.49g	32.81	0.62	9.38mL

依此比例所得之黑蒜萃取液與DPPH溶液混合，未經搖晃DPPH溶液即從紫色迅速褪為黃色（圖二十一），因此另取稀釋5倍後之一般大蒜、市售黑蒜及自製黑蒜萃取液與DPPH溶液混合，以降低反應速率，偵測其在517nm下吸光值隨時間的變化，結果如圖二十二，計算出前3秒的自由基清除速率，並比較三者在暗室反應30分鐘後自由基清除率（表五）。

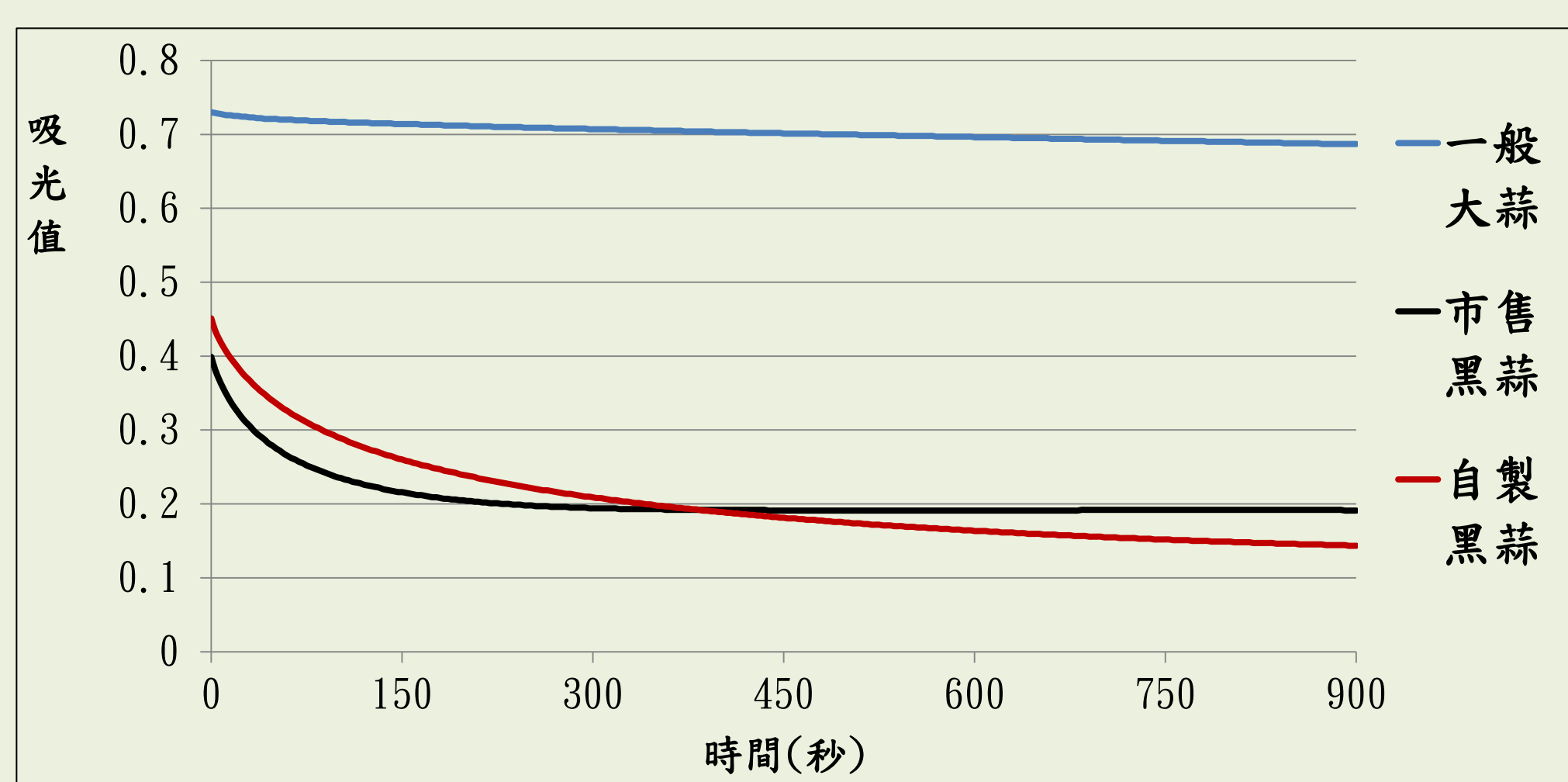
表五 市售黑蒜、自製黑蒜及一般大蒜之自由基清除率

樣品	一般大蒜	市售黑蒜	自製黑蒜
平均	0.572	0.123	0.115
清除率	27.8%	84.5%	85.5%



圖二十一 市售黑蒜萃取液（未稀釋）加入DPPH後

\*反應前DPPH吸光值：0.792



圖二十二 各樣品在517nm下吸光值隨時間的變化

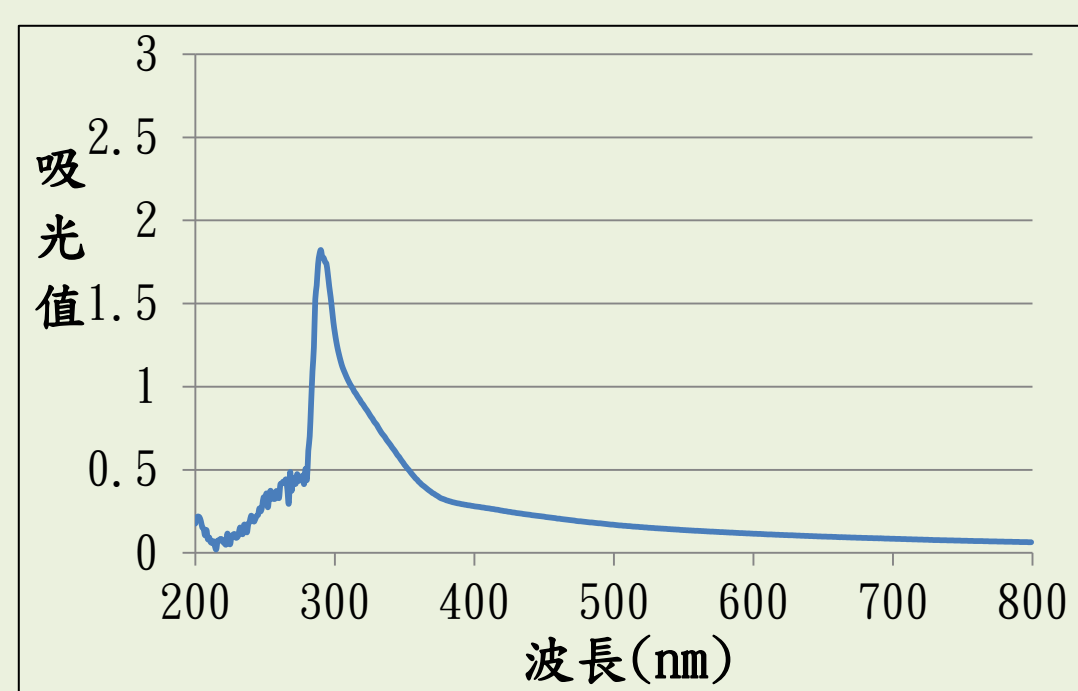
表六 市售黑蒜、自製黑蒜及一般大蒜之自由基清除速率

樣品	吸光值/ 清除率	反應前DPPH 吸光值	混合後第3 秒吸光值	混合後3秒 之清除率	自由基 清除速率
一般大蒜		0.792	0.730	7.8%	2.6%/s
市售黑蒜		0.792	0.399	49.6%	16.5%/s
自製黑蒜		0.792	0.451	43.1%	14.4%/s

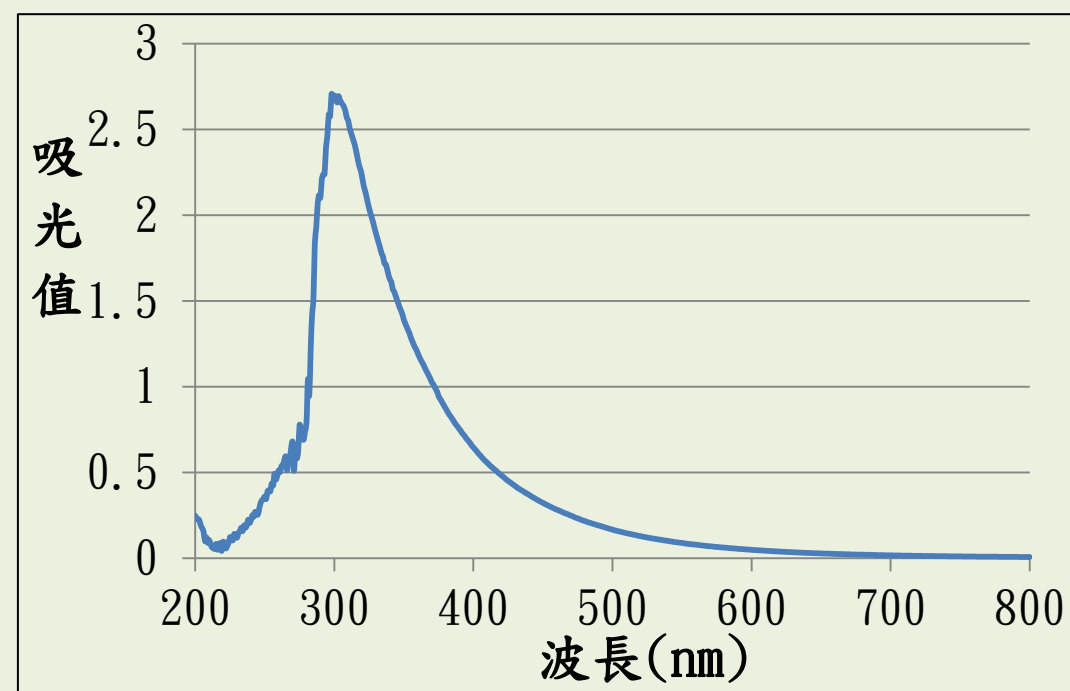
1. 黑蒜之自由基清除能力皆優於一般大蒜。
2. 由圖二十二得知市售黑蒜初期反應速率較自製黑蒜快，在200秒時吸光值曲線已趨於平緩，而自製黑蒜之吸光值曲線仍持續下降；一般大蒜在900秒內吸光值未明顯下降。
3. 市售黑蒜的外觀較自製黑蒜黑，且蒜瓣潮濕、黏稠（圖二十三），比較兩者之全波長光譜後發現市售黑蒜在400-500nm間出現明顯的吸收峰，而自製黑蒜之全波長光譜則與一般大蒜相似，不過吸光值明顯較高。



圖二十三 自製黑蒜/市售黑蒜外觀

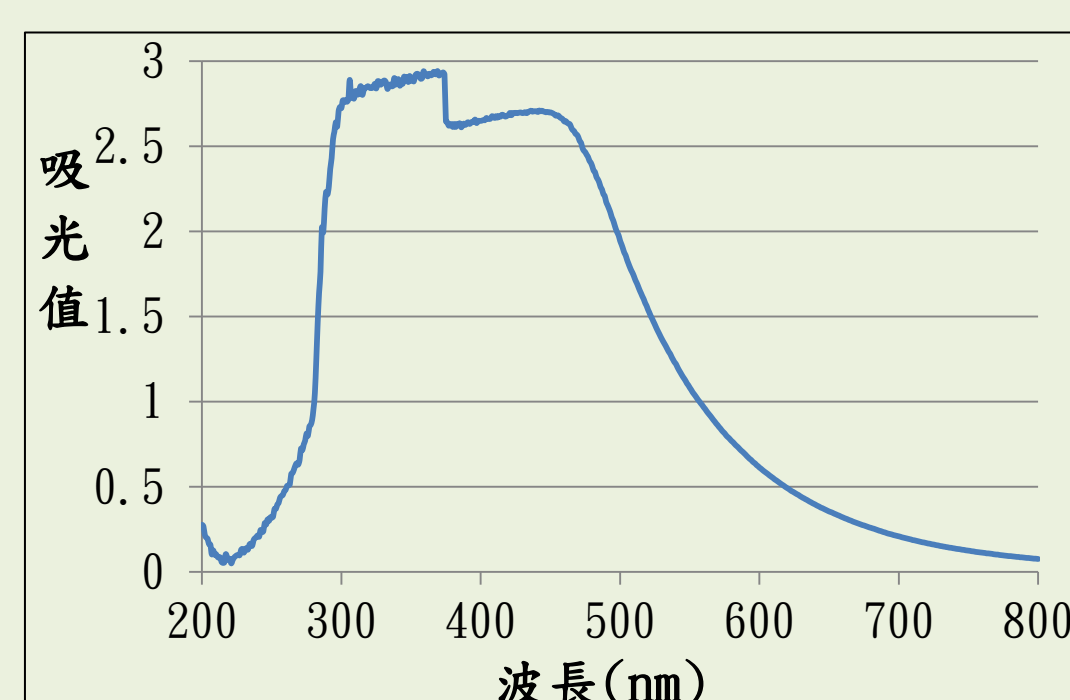


圖二十四 大蒜萃取液全波長光譜



圖二十五 自製黑蒜萃取液全波長光譜

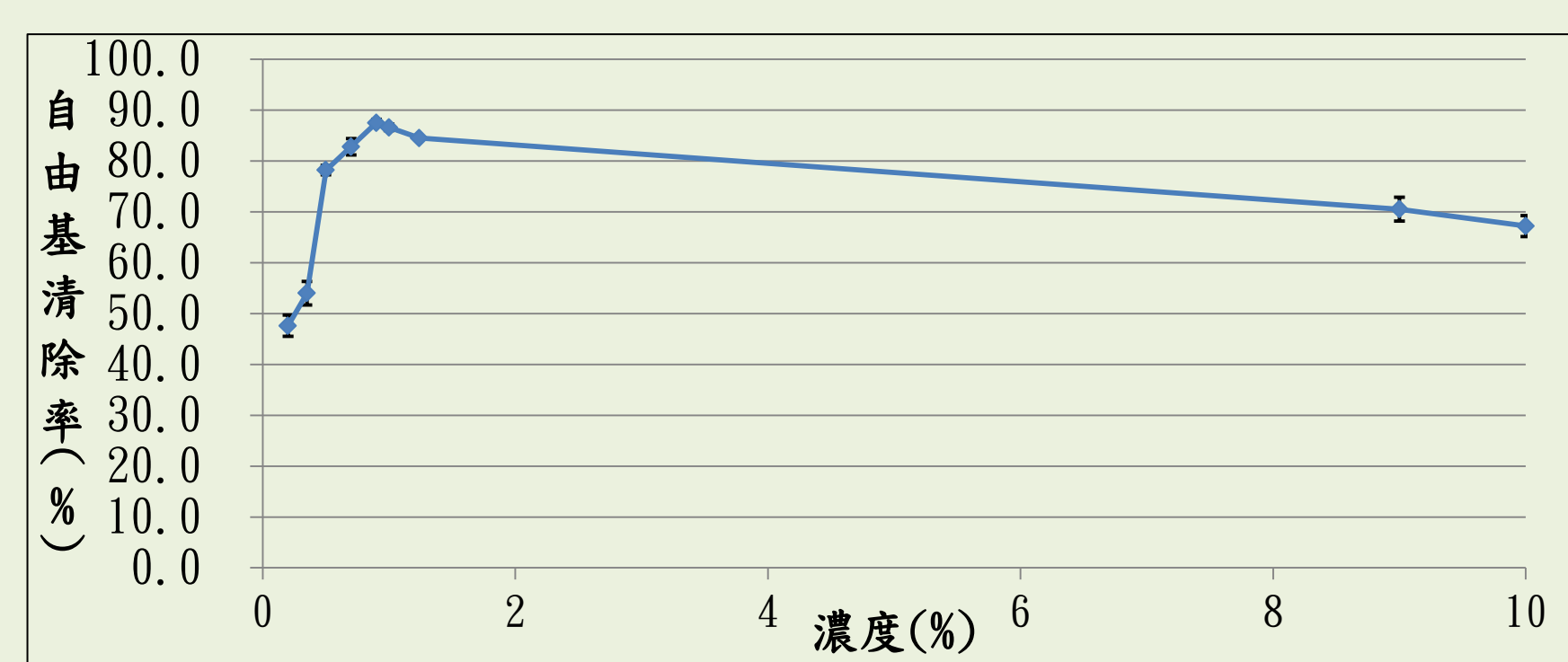
4. 市售黑蒜之全波長光譜（圖二十六）明顯與自製黑蒜不同，但其自由基清除率卻與自製黑蒜相當（表五），故推測在400-500nm吸光之物質不影響自由基清除率；但此處自由基清除率似乎已達最大值，若降低濃度進行實驗或許能比較出兩者間之差異。



圖二十六 市售黑蒜萃取液全波長光譜

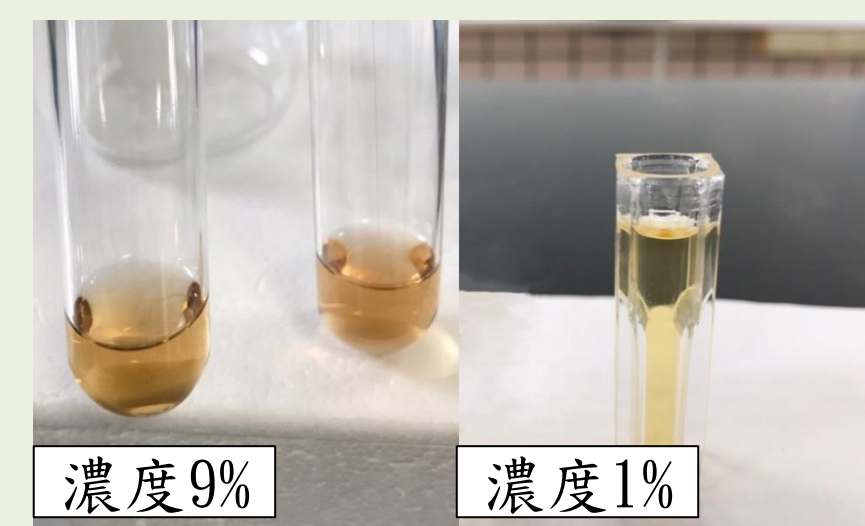
## 八、黑蒜萃取液濃度高低對自由基清除能力的影響

本實驗直接秤取市售黑蒜之蒜泥，配成不同濃度的溶液，探討黑蒜萃取液濃度與自由基清除率的關係，結果如圖二十七。



圖二十七 不同濃度市售黑蒜的萃取液之自由基清除率

1. 重量百分濃度小於0.9%，自由基清除率隨濃度增加而上升。
2. 濃度高於1%時，自由基清除率隨濃度上升而下降，濃度9%以上的黑蒜萃取液與DPPH反應後溶液呈現黃褐色（圖二十八左），與低濃度時的狀況明顯不同（圖二十八右），可能是此褐色物質的干擾造成517nm的吸光值偏高，導致計算出的清除率降低。
3. 市售黑蒜在低濃度即有顯著的自由基清除率，也代表其擁有高抗氧化力，因此不宜過量食用。



圖二十八 黑蒜萃取液與DPPH溶液反應後之顏色

## 陸、結論

- 一、在60°C時DPPH自由基清除效果最好。若溫度到達80°C，則使DPPH自由基清除率下降。
- 二、冷藏密封保存的蒜末之DPPH自由基清除率優於室溫密封保存的蒜末，冷藏保存三週後自由基清除率降低。
- 三、在室溫開放環境下放置蒜末0-8小時內清除率下降幅度不大，但放置時間越長DPPH自由基清除率越低。
- 四、大蒜萃取液pH=4的環境下DPPH自由基清除率最高；在模擬人體中，胃部(pH=2環境下)自由基清除率最佳。
- 五、市售黑蒜與自製黑蒜之DPPH自由基清除率相近，皆明顯優於一般大蒜。
- 六、市售黑蒜之萃取液濃度低於0.9%時，DPPH自由基清除率隨濃度增加而上升。

## 柒、未來展望

- 一、偵測花蓮特有辛辣味較重的花蓮小蒜頭之自由基清除率。
- 二、偵測烘烤蒜片之自由基清除率。

## 捌、參考資料及其他

1. Nouredine Benkeblia. (2005). Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa*L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Braz. arch. biol. technol.* vol.48 no.5 Curitiba Sept. 2005. doi:10.1590/S1516-89132005000600011
2. Karin Ried, Oliver .R. Frank, Nigel P Stocks, Peter Fakler and, and Thomas Sullivan. (2008). Effect of garlic on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. [Monograph]. *BMC Cardiovascular Disorders* 2008 8/13. doi:10.1186/1471-2261-8-13
3. Ackermann R. T, Mulrow C. D, Ramirez G, Gardner C. D, Morbidoni L, and Lawrence V. A. (2001). Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. *Arch Intern Med* 2001;161:813-24. PMID: 11268223
4. 徐明達(2010)。大蒜的化學。科學人雜誌，99，66-67
5. 洪子涵(2011)。探討梅納反應對大蒜生理機能之影響：抗氧化及細胞減脂活性。國立宜蘭大學，宜蘭縣。
6. 洪玉娟(2004)。大蒜之五種水溶性含硫化合物在動物試驗中抗氧化活性之研究。私立中山醫學大學，臺中市。
7. 狄亞莉(2016)。大蒜水溶性成份之抗氧化活性研究。國立屏東科技大學，屏東縣。
8. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 29:1199 1200.
9. 韋獻雅，殷麗琴，鐘成，章明海，牛應澤(2014)。DPPH法評價抗氧化活性研究進展。食品科學。2014, Vol. 35, No. 09, 317-322。
10. 許申鴻、杭 瑜(2000)。溶劑及pH值對1,1-二苯基-2-苦肼基自由基分析法的影響。分析測試學報。2000, Vol. 19, No. 3, 50-52。