

中華民國第 59 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

052205

爭妍豆力-蝶豆花抗氧化能力探討及應用

學校名稱：國立臺南第一高級中學

作者： 高二 周科霖 高二 王羿雋	指導老師： 蔡佳怡 吳采縈
---------------------------------	-----------------------------

關鍵詞：蝶豆花、抗氧化活性、抗氧化物質

摘要

蝶豆花檢體採冷凍乾燥後研磨粉末及天然日曬乾燥花。粉末檢體經純水萃取，研究抗氧化活性：分別測定還原能力、清除 DPPH 自由基能力、螯合亞鐵離子能力；粉末檢體經 50% 乙醇萃取，研究萃取液內的組成抗氧化物質含量：分別測定總酚、總類黃酮、花青素含量。天然日曬乾燥花用來檢測沖泡時間、沖泡溫度、加糖與否對抗氧化活性的影響，以清除 DPPH 自由基能力為檢測標準，探討最適合的沖泡條件。另以類黃酮的定量，作為簡易自製儀器可行性的評估。實驗顯示：萃取液富含良好的抗氧化物質。最適宜的沖泡條件：溫度 80°C，時間 30 分鐘。加糖後清除 DPPH 自由基能力下降。自製簡易比色儀器在抗氧化物質定量應用是可行的。蝶豆花萃取液具抗氧化效果，製成手工皂及乳液。

壹、研究動機

家中長輩經常沖泡乾燥蝶豆花瓣做為養生飲品，這杯藍藍的花茶引起我們的好奇，經查看網路資訊也推崇蝶豆花具有良好抗氧化作用，在化學課學到氧化還原的課程，於是我們決定探討蝶豆花是否真具有抗氧化能力，也想量測實際所含抗氧化物質的含量，還有到底要怎麼沖泡蝶豆花才能達到最好的效果，希望能夠經由實驗進一步對蝶豆花有更深入的認識及瞭解。

相關教材：高中化學課程：有機化學、氧化還原反應

貳、研究目的

- 一、測定還原能力、清除 DPPH 自由基能力、螯合亞鐵離子能力，研究蝶豆花萃取液的抗氧化活性。
- 二、測定總酚、總類黃酮、花青素含量，研究蝶豆花萃取液內的組成抗氧化物質含量。
- 三、藉抗氧化活性的測定，探討市售日曬乾燥蝶豆花最適當的沖泡溫度。
- 四、藉抗氧化活性的測定，探討市售日曬乾燥蝶豆花最適當的沖泡時間。
- 五、藉抗氧化活性的測定，探討添加糖分對市售日曬乾燥蝶豆花沖泡液的抗氧化活性影響。
- 六、比較標準品的分光光度計吸光值檢量線與自製儀器的光敏電阻值檢量線，定量溶液濃度，探討自製儀器的可行性。
- 七、發展蝶豆花萃取液的應用產品。

參、研究設備及器材

一、藥品試劑：

赤血鹽 $K_3Fe(CN)_6$ 、磷酸緩衝溶液、磷酸氫二鈉($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)、磷酸二氫鈉($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)、三氯醋酸溶液、氯化鐵、DPPH、維他命 C (ascorbic acid)、乙醇、Ferrozine 試劑、 $FeCl_2$ 、甲醇、HCl、氯化鉀緩衝溶液、醋酸鈉緩衝溶液、Folin-Ciocalteu 試劑、 Na_2CO_3 、沒食子酸(Gallic acid)、三氯化鋁、槲皮素(Quercetin)、皂基、橄欖油、乳化劑、抗菌劑。

二、儀器設備：

分光光度計、微量天平、微量吸管、水浴槽、離心機、試管、定量瓶。

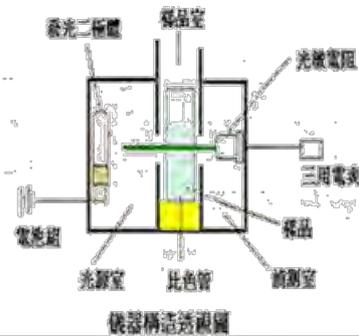
三、蝶豆花材料：

天然日曬乾燥蝶豆花 50 公克及新鮮蝶豆花 1000 公克均購自台南市龍崎區小燕子農莊。新鮮蝶豆花委託新北市八里區華國冷凍乾燥公司進行脫水乾燥處理，獲取 124 公克冷凍乾燥蝶豆花，再使用傳統研鉢磨成粉末，將成品粉末保存於零下 20 度冷凍庫。

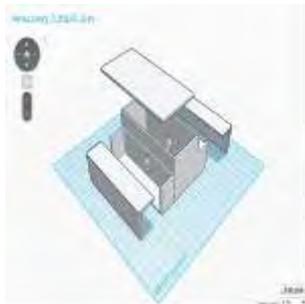
四、自製儀器製造：

利用木條 0.2*0.2*90 cm 和木片 0.15*20*60 cm 裁剪成需要的規格(長 9*寬 7*高 6 cm)，以木片做出隔間以區分光源室、偵測室，樣品室。樣品室做一凹槽可置放比色管(見圖)，光源室到樣品室間、樣品室到偵測室隔間都只留小狹縫，讓光束集中穿

過比色管。 兩端各嵌入發光二極體及光敏電阻，接上直流電源及三用電表，做密合度高蓋子後整台儀器塗黑色油漆，造成暗箱。再將完成的自製儀器，用 Tinkercad 軟體繪製 3D 設計圖，以 3D 印表機 (Kossel mini) ， 線材(PLA) 列印儀器成品。



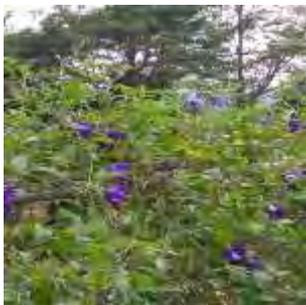
木造自製儀器



Tinkercad 3D 設計圖



3D 列印儀器成品



蝶豆花園



新鮮蝶豆花



日曬乾燥蝶豆花



商用冷凍乾燥機



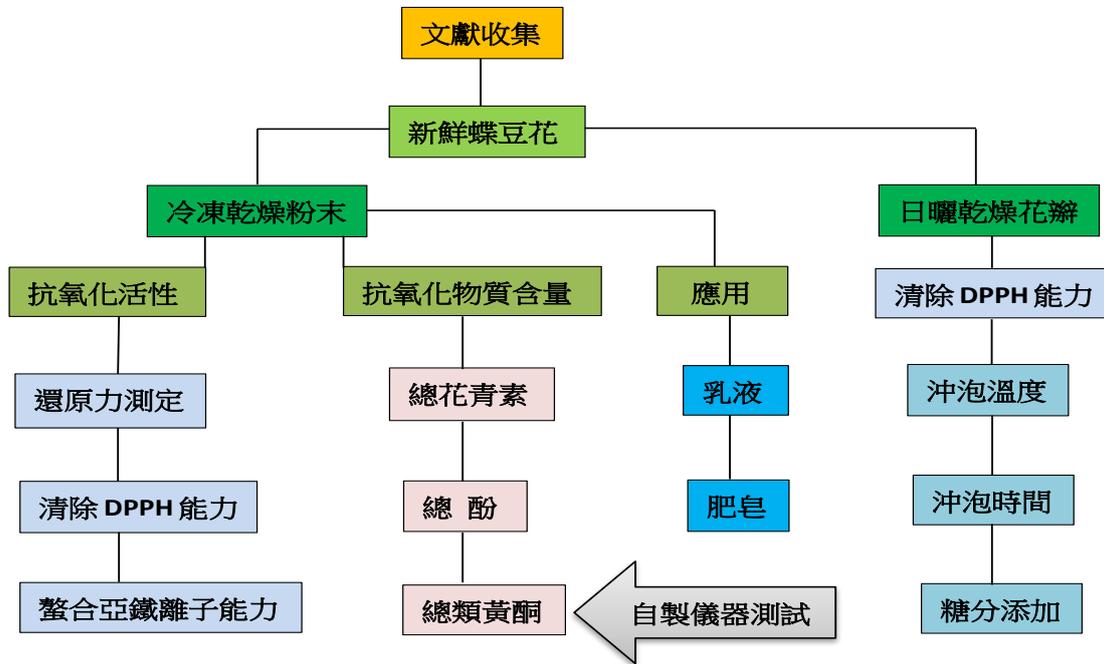
冷凍乾燥蝶豆花



研鉢細磨成粉末

肆、研究過程與方法

研究架構



文獻探討及研究方法原理：

一、蝶豆花簡介：

學名Clitoria ternatea，英文名:Butterfly pea 或Blue pea。屬於豆科(Fabaceae)，蝶豆屬(Clitoria)，是一種終年生長的草本豆科植物，花色呈深藍色，偶有白色的變種，花形像蝴蝶，花徑約4~5 公分⁽¹⁾。在東南亞國家被當作天然色素，添加到食品。台灣很早就有引進但只當綠肥及園藝綠化使用，近年來，成為國人養生飲品，漸成風潮，方興未艾。

二、酚類物質當作抗氧化劑的作用機制

1. 酚類的羥基是良好的氫提供者(hydrogen donor)：氫提供型的抗氧化劑會與活性氧、活性氮分子反應，造成終止反應，中斷新自由基的連鎖生成。抗氧化物和最起始的活性分子結合，生成比起始的自由基更具化學穩定性的抗氧化物自由基。其主因是酚類的羥基和苯環上 π - 電子的交互作用，會產生離域化(delocalization)，具有穩定自由基的能力，這些壽命長的自由基能夠修正自由基所主導的氧化過程。

2. 酚類會螯合和還原與自由基生成有關的金屬離子。

3. 酚類的化學結構和蛋白質之間有強力交互反應。藉由疏水性苯環和酚羥基的氫鍵結能力，使酚類當作抗氧化劑。藉此能力抑制涉及自由基生成的一些蛋白質酵素分子，諸如細胞色素P450異構型(cytochrome P450 isoforms)、脂氧合酶(lipoxygenases)、環氧合酶(cyclooxygenase) 與黃嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)。

4. 酚類和其它抗氧化劑之間具有協同作用(synergistic effects): 諸如與異抗壞血酸(ascorbic acid)、 β -胡蘿蔔素(β carotene)與 α -生育醇(α -tocopherol)之間的協同作用⁽²⁾。

三、植物抗氧化相關物質：

1. 多酚類物質

植物體內多酚類化合物為苯環上帶著一個以上的羥基(-OH)的物質總稱。自然界的植物進行光合作用過程中，所固定的碳約有20%進入苯丙烷途徑(phenylpropanoid pathway)成天然存在的多酚類(polyphenols)，屬於光合作用後的二級代謝產物(secondary metabolites)。分布廣泛，幾乎存在於所有的陸生植物。多酚類(polyphenols)可分成16大類，在植物體內的功能是防禦紫外線、抑制植物體過氧化作用。具有清除自由基的理想構造。常被當作植物抗氧化力的指標。越來越多的研究更指出多酚類對於人體健康具有正面效益。

2. Flavonoids(類黃酮類)

是多酚類(polyphenols)化合物的一種，是最普遍存在的多酚類化合物。大量存在於自然界植物中。具有很好的抗氧化能力，亦具有清除自由基能力，能和超氧自由基、羥基自由基和脂質過氧化物自由基作用，醫學研究顯示具有抗菌、抗病毒、抗突變、抗氧化及抑制酵素等生理活性。類黃酮類，如圖1-1，以一個苯基苯並吡喃(phenyl benzopyran)結構為特徵，一般是包括15碳(C6-C3-C6)骨架連接一個色滿環(chroman ring; benzopyran moiety)，雜環之苯並吡喃環稱C環，所融合的芳香族環稱A環，苯基組成物部分稱B環。依構造總共分成13類，其中以flavonols、flavanols、flavones、isoflavones、flavanones、和Anthocyanins/anthocyanidins花青素最重要。類黃酮物質大量存在於蔬果、堅果，柑桔類水果。

3.花青素苷類:是多酚類物質中的類黃酮家族之一，為水溶性植物色素。廣泛存在於花卉及蔬果中，和植物組織的藍、紫和紅色有關。分子量通常介於400至1200。是 flavylium (2-phenylbenzopyrylium)鹽的醣苷化多羥基與多甲氧基衍生物，醣苷鍵結通常發生在C環第3位置或B環第5及7位置，以單醣、二醣或三醣型式存在。雖很稀少，也可能在B環3'、4' 或5' 位置醣苷化。已知17種花青素(anthocyanidins)，僅6種廣泛存在自然界：矢車菊素cyanidin、花翠素/飛燕草素 delphinidin、矮牽牛花素petunidin、芍藥素peonidin、天竺葵素pelargonidin 和錦葵素malvidin⁽³⁾。

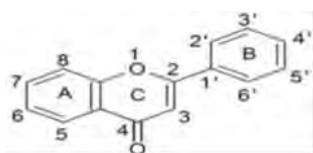


圖1-1 類黃酮類化合物基本結構

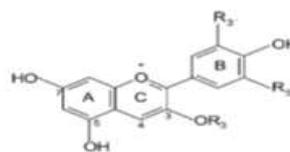


圖1-2 .花青素基本結構

四、光敏電阻：是利用光電導效應的一種特殊的電阻，簡稱光電阻，它的電阻和光線的強弱有直接關係。光強度增加，則電阻減小；光強度減小，則電阻增大。當有光線照射時電阻內原本處於穩定狀態的電子受到激發，成為自由電子。所以光線越強，產生的自由電子也就越多，電阻就會越小⁽⁴⁾。

五、分子吸收光譜法：主要用於試樣之定量分析。試樣溶液若有顏色，則會吸收特定範圍內的可見光，因此可以選擇可見光吸光測定法分析。無色的試樣溶液，可利用紫外光光譜法測定。分光光度計兩者皆可測定。分子吸收光譜的特性:不同顏色的試樣溶液會吸收不同波長的可見光，試樣溶液的顏色乃吸收特定顏色可見光後所顯現的互補色⁽⁵⁾。

研究過程：

第一部分、蝶豆花萃取液抗氧化活性測定

【實驗一】還原能力測定(Oyaizu Method, 1986)⁽⁶⁾

(一) 實驗原理：具有還原性的樣品，將赤血鹽 $K_3Fe(CN)_6$ 還原成黃血鹽 $K_4Fe(CN)_6$ ，黃血鹽再與 Fe^{+3} 作用，生成普魯士藍 $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ ，測定在 700nm 下的吸光值，普魯士藍生成量越多，吸光值越高，表示樣品還原力越強。

(二)萃取液配製：(N. M. Saptarini,2015)⁽⁷⁾

取 0.5 克冷凍乾燥後的蝶豆花粉末，加入 100 ml 的水中，置於 60 度，30 分鐘，萃取後過濾，以此萃取液當作 100%原液。再將原液稀釋成 80%(原液 16 ml+ 水 4ml)、60%(原液 12 ml+水 8 ml)、40%(原液 8 ml+水 12 ml)、20%的濃度(原液 4 ml+水 16ml)，進行之後的實驗。

(三)試劑配製:

0.2 M 磷酸緩衝溶液(pH 6.6):於定量瓶中加入 7.164 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($M=358.22$)，加入蒸餾水至刻度 100 ml。於定量瓶中加入 3.121g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M=156.03$)，加入蒸餾水至刻度 100 ml。取磷酸氫二鈉 37.5 ml 及磷酸二氫鈉 62.5 mL 溶液，混合成磷酸緩衝溶液。

(四)實驗步驟：

蝶豆花檢測液：以純水為溶劑，配製(v/v)20%、40%、60%、80%、100%的檢測液。

- 1.取 1500 μl 樣品萃取液，加入 0.2 M 磷酸緩衝溶液 750 μl 及 1%的赤血鹽溶液 750 μl 。
- 2.混合均勻後，於恆溫水浴槽 50°C 水浴 20 分鐘後，將其放入 4°C 水中靜置 5 分鐘，再加入 750 μl 的 10%三氯醋酸溶液，於 3200 rpm 離心 10 分鐘。
- 3.取上清液 1500 μl ，加入 1500 μL 的蒸餾水及 300 μl 之 0.1%氯化鐵溶液，混合均勻。於室溫避光反應 10 分鐘。
- 4.以分光光度計檢測 700 nm 的吸光值，吸光值愈高表示樣品還原力越強。以蒸餾水取代樣品作為對照組。

(五)實驗照片：



0.5g 蝶豆花粉末



恆溫槽控制溫度 60 度



調配各種濃度萃取液

【實驗二】清除 DPPH 自由基能力測定(Shimada Method, 1992)⁽⁸⁾

(一)實驗原理：DPPH 為穩定的自由基，DPPH 乙醇溶液為紫色，在 517nm 下有強吸光值。當 DPPH 被還原時，會變為淡黃色，於 517nm 波長的吸收值將變小，可藉此進行具有清除自由基特性之物質篩選。樣品溶液與 DPPH 結合，會降低吸光值，其吸光值愈低，表示清除 DPPH 自由基能力愈強。本檢測具備快速簡單、方便有效的特色，被廣泛使用在植物、蔬菜、水果及食物的生物化學領域的抗氧化活性研究⁽⁹⁾。

(二)萃取液配製:同實驗一。

(三)試劑配製:DPPH 19.7(M=394.32)mg，溶於乙醇定量成 250 ml

(四)實驗步驟:

- 1.用乙醇為溶劑配製 0.20mM DPPH 溶液。
- 2.純水為溶劑，配製 20%、40%、60%、80%、100%的萃取液。取 1g 維他命 C 加水定量成 100 ml，配成 10 mg/ml 溶液。再稀釋成 8 mg/ml、6 mg/ml、4 mg/ml、2 mg/ml。
- 3.取 0.20m(200u)M 的 DPPH 溶液 2000 ul、以及各濃度之試驗樣品 2000 ul，混合均勻後，室溫避光靜置 30 分鐘。
- 4.以分光光度計測 517nm 吸光值，重複實驗三次，以純水做空白實驗。
- 5.清除率(Scavenging effects) % =

$$[(\text{對照組的吸光值}-\text{樣品的吸光值})/\text{對照組的吸光值}]*100\%$$

(五)實驗照片：



DPPH 溶液



不同濃度萃取液



反應後的試樣

【實驗三】螯合亞鐵離子之能力測定(Dinis Method)

(一)實驗原理：甲醇溶液中， Fe^{+2} 與 Ferrozine 試劑螯合生成 Ferrozine- Fe^{+2} 錯化合物，呈鮮紅色，在 562nm 波長下測吸光值。若樣品與 Fe^{+2} 螯合，Ferozine- Fe^{+2} 錯化合物的生成就會減少，吸光值就會降低，吸光值越低，表示樣品螯合 Fe^{+2} 亞鐵離子的能力越強。

(二)萃取液配製:同實驗一。

(三)試劑配製

1.2mM FeCl_2 溶液：定量瓶加入 0.0400(0.03975)g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶於純水稀釋成 100 ml。

2.5mM Ferrozine 試劑：定量瓶中加入 0.2463g Ferrozine，溶於甲醇稀釋成 100 ml。

(四)實驗步驟(Dinis Method)：

1.取 1.00 ml 蝶豆花不同濃度檢測液，加入 3.2 ml 的甲醇，再加入 100 ul 2mM 的 FeCl_2 ，充分混合後靜置 30 秒。

2.再加入 200 ul 的 5 mM Ferrozine，避光靜置 10 分鐘後，檢測 562nm 的吸光值。吸光值越低，表示樣品螯合亞鐵離子的能力越強。重複實驗三次。並以純水做空白實驗。

3.計算螯合亞鐵離子能力(chelating effects)：

= (空白組於 562nm 吸光值 - 樣品反應後於 562nm 吸光值)

/(空白組於 562nm 吸光值)×100%

(五)實驗照片



萃取液過濾



配製試藥



反應後的試樣

第二部分、蝶豆花萃取液抗氧化物質含量測定

【實驗四】總酚測定(Julkunen-Titto, R. ,1985)⁽¹⁰⁾

(一)實驗原理：Folin-Ciocalteu 試劑中的磷鎢鉬酸與總多酚化合物反應，磷鎢鉬酸被還原，生成藍色化合物。樣品裡如有酚類化合物會跟試劑反應呈藍色，利用分光光度計測定在 735nm 之吸光值。

(二)萃取溶液製備(Nabila,2014)⁽¹¹⁾：取冷凍乾燥後的蝶豆花粉末 0.5 g 加入 100 ml 50% 乙醇浸漬，燒杯使用 Parafilm 封口，在室溫下避光放置 48 小時，萃取後過濾。分析時另取原液 5ml，加 5ml 乙醇，稀釋成 50% 溶液。

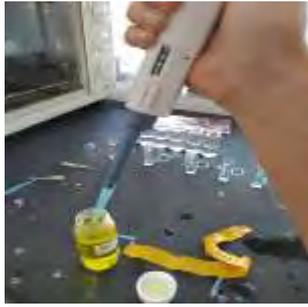
(三)實驗步驟：

1.製備 Gallic acid 標準品溶液:

取 0.05g Gallic acid，加 50%乙醇定量至 50mL，配製成 1000 ug/mL 儲存溶液，再取 5 ml 1000ug/mL 溶液，加入 45 ml 乙醇中，成為 100ug/mL 工作溶液。用工作液及乙醇依不同體積配製成總體積為 10 ml 的不同濃度 gallic acid 溶液。配製體積:工作液 ml+50%乙醇 mL = 1.0+9.0(10ug/ml)，2.0+8.0(20ug/ml)，3.0+7.0.(30ug/ml)，4.0+6.0(40ug/ml)，5.0+5.0(50ug/ml)。

2.取 50 ul 的 50%萃取液，加入 1 ml H₂O，0.5ml Folin-Ciocalteu's phenol reagent，再加入 2.5 ml 20% Na₂CO₃，均勻混合，在室溫下避光靜置 20 分鐘。以分光光度計測 735nm 之吸光值。調配完成的 Gallic acid 不同濃度標準品溶液，依此流程操作，製作檢量線。萃取液總酚含量由檢量線換算成 Gallic acid 之當量濃度，計算成 每克(乾重)蝶豆花之總酚類化合物含量。單位:每克樣品含 Gallic acid 之當量濃度(mg GAE/g sample)。均做三次檢測，採平均值。

(四)實驗照片：



取 Folin-Ciocalteu 液



不同濃度工作液



反應後試樣溶液

【實驗五】總類黃酮含量：(Willet Method modified by Kumar G. Patil , 2014)⁽¹²⁾

(一)實驗原理：三氯化鋁($AlCl_3$)與類黃酮物質反應後，會產生呈黃色的錯化合物，呈色可利用分光光度計測定在 415nm 之吸光值。

(二)萃取溶液製備：同實驗四。

(三)實驗步驟：

1.製備 Quercetin 標準品溶液:

取 0.05g Quercetin，加 50%乙醇定量至 50 ml，配製成 1000 ug/ml 儲存溶液，再取 5 ml 1000ug/ml 溶液，加入 45 ml 乙醇中，成為 100 ug/ml 工作溶液。用工作液及乙醇依不同體積配製成總體積為 10 ml 的不同濃度 quercetin 溶液。配製體積:工作液 ml+ 50%乙醇 mL = 1.0+9.0(10ug/ml)，2.0+8.0(20ug/ml)，3.0+7.0(30ug/ml)，4.0+6.0(40ug/ml)，5.0+5.0(50ug/ml)。

2.取 500 ul 的 50%萃取液，加入 10%氯化鋁($ALCL_3$)1500 ul，1M 醋酸鉀 100 ul，蒸餾水 2800 ul，室溫靜置 30 分鐘，測波長 415nm 下的吸光值。調配完成的槲皮素 (quercetin)不同濃度標準品溶液，依此流程操作，製作檢量線。另將以上分光光度計檢測完成的試樣在自製儀器檢測，自製儀器光源採涵蓋波長 415nm 的紫光(380~450nm)，記錄電阻值。萃取液總類黃酮含量由檢量線換算成 quercetin 之當量濃度，計算成每克(乾重)蝶豆花之總類黃酮含量。單位:每克樣品含 quercetin 之當量濃度(mg QE/g sample)。均做三次檢測，採平均值。

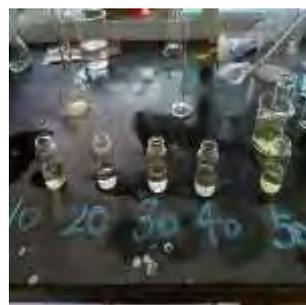
(四)實驗照片



配製工作液



配製 quercetin 溶液



不同濃度工作液



待測試樣



自製儀器檢測



讀取電阻值

【實驗六】總花青素測定：(J. Lee, 2005)⁽¹³⁾

(一)實驗原理：花青素，為類黃酮物質的一種，在 pH 1.0 時溶液呈紫色，在 pH 4.5 時溶液呈無色(圖 2-1)，其他的類黃酮物質，在這樣的條件下，溶液顏色無此變化。相同濃度花青素在不同 pH 值下，使用分光光度計測定其吸收波峰會有差異(圖 2-2)。利用這種相同波長下吸光值的差異可以計算出花青素的含量。

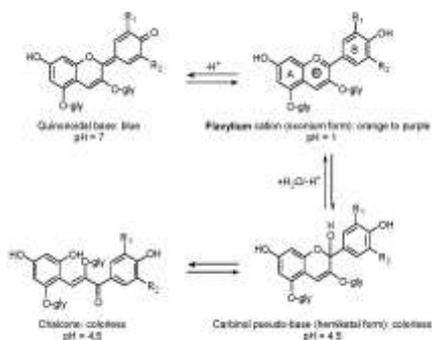


圖 2-1

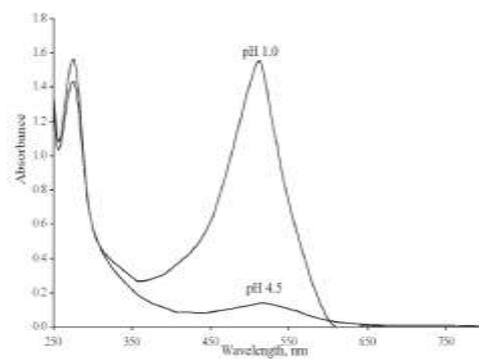


圖 2-2

(二)萃取液配製:同實驗四

(三)測定並計算總花青素含量

1.配製 0.025 M，pH 1.0 之氯化鉀緩衝溶液：

0.186 克氯化鉀溶於 90 ml 的水中，溶解後以濃 HCl 調整 pH 至 1.0，將此溶液放入定量瓶中，以水稀釋至 100ml 刻度。

2.配製 0.400 M，pH 4.5 之醋酸鈉緩衝溶液：

3.280 克醋酸鈉溶 90 ml 的水中，溶解後以濃 HCl 調整 pH 至 4.5，將此溶液放入定量瓶中，以水稀釋至 100 ml 刻度。

3.取適量「萃取液」X ml，溶於(10-X) ml 的 pH 1.0 緩衝溶液中，掃描 400~800nm 最大吸光值波長 λ_{max} 。且吸光值要符合落在 0.2~1.4 的範圍。dilution factor 稀釋倍數：DF= 10.0/X。

4.以 pH = 1.0 的緩衝液配稀釋溶液，為 A_{1.0} 溶液(取 x ml 萃取液，加入 10-x ml、pH = 1.0 的緩衝溶液，混合均勻即為 A_{1.0} 溶液)。

5.以 pH = 4.5 的緩衝液配稀釋溶液，為 B_{4.5} 溶液(取 x ml 萃取液，加入 10-x ml、pH = 4.5 的緩衝溶液，混合均勻即為 B_{4.5} 溶液)。

6.靜置約 15 分鐘，分別測量 A_{1.0}，B_{4.5} 在 500nm,700nm 的吸光值 A₅₀₀、A₇₀₀；B₅₀₀、B₇₀₀。

代入下列公式，將「蝶豆花萃取液」中花青素的總量以每公升中含多少毫克的 cyanidin-3-glucoside 表示。

公式：Anthocyanin pigment (mg/l) = A x MW x DF x 1000 ÷ (ε x l)

DF：dilution factor (稀釋倍數)

A = (A₅₀₀ - A₇₀₀) - (B₅₀₀ - B₇₀₀)

MW: cyanidin-3-glucoside 之分子量，449.2

ε：Molar Absorptivity 26,900

l:光通過的路徑，通常為 1 cm

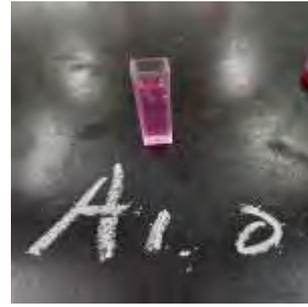
(四)實驗照片



配製緩衝溶液



A1.0 與 B4.5 溶液



A1.0 試樣溶液

第三部分、蝶豆花的日常應用與發展研究

【實驗七】市售日曬乾燥蝶豆花沖泡溫度之研究

(一)實驗步驟：

取市售乾燥蝶豆花瓣各 0.5 g，分別放入室溫 21°C、40°C、60°C、80°C、100°C 的 100 ml 蒸餾水中。5 分鐘後過濾，按實驗二步驟流程，測定清除 DPPH 自由基能力。樣品取 3 份檢測。

(二)實驗照片：



蝶豆花花瓣



秤取 0.5g 蝶豆花花瓣



恆溫浸泡

【實驗八】市售日曬乾燥蝶豆花沖泡時間之研究

(一)實驗步驟：

取市售乾燥蝶豆花瓣 0.5 g，放入 80 °C 的 100 ml 蒸餾水中。取 5、10、20、30、60 分鐘後浸泡液，按實驗二步驟，測定清除 DPPH 自由基能力。樣品取 3 份檢測。

(二) 實驗照片：



溫度控制(80°C)



不同時間浸泡液



不同沖泡時間試樣

【實驗九】添加糖分對市售日曬乾燥蝶豆花沖泡液抗氧化活性影響研究

(一) 實驗步驟：

取(1)市售乾燥蝶豆花瓣 0.5 g；(2) 市售乾燥蝶豆花瓣 0.5 g，加 5 g 蔗糖；(3)市售乾燥蝶豆花瓣 0.5 g，加 5 g 果糖，分別放入 80°C 的 100 ml 蒸餾水中。各取靜置 5 分鐘後的浸泡液，按實驗二步驟流程，測定清除 DPPH 自由基能力。樣品取 3 份檢測。

(二) 實驗照片：



蝶豆花萃取液



加入砂糖、果糖



待測試樣比色管

【實驗十】蝶豆花的應用與發展

(一) 實驗步驟：

1. 蝶豆花乳液：

取 55ml 蝶豆花萃取液與 15ml 橄欖油混和，攪拌後再加入乳化劑 2ml，與抗菌劑 1ml，混和均勻後即為成品。

2.蝶豆花肥皂：

秤取 120g 的皂基隔水加熱融化，加入 10 ml 蝶豆花萃取液，攪拌均勻後倒入模型盒，待冷卻後脫膜，放入紗袋內。

(三) 實驗照片：

1.乳液製作過程



蝶豆花萃取液

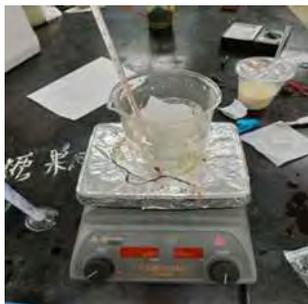


油與萃取液混合



加入乳化劑攪拌

2.手工皂製作過程



皂基隔水加熱



倒入模型



冷卻後脫模

伍、研究結果

【實驗一】還原赤血鹽能力測定

表 1 還原赤血鹽能力測定

萃取液濃度 %	各次實驗吸光值 A700nm			
	1	2	3	平均(標準差)
0	0.076	0.074	0.074	0.075(0.001)
20	0.242	0.244	0.242	0.243(0.001)
40	0.323	0.322	0.322	0.322(0.001)
60	0.525	0.524	0.521	0.523(0.002)
80	0.670	0.666	0.672	0.669(0.003)
100	0.832	0.840	0.835	0.836(0.004)

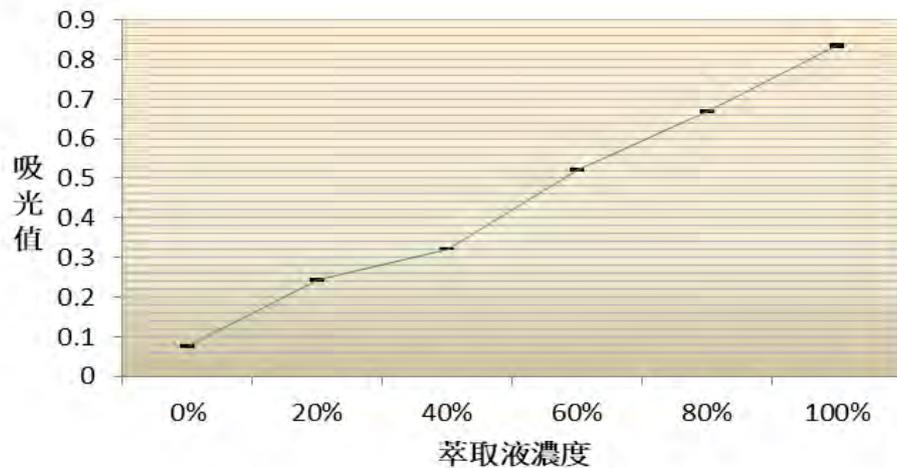


圖 3 還原赤血鹽能力測定

檢測結果：

萃取液 100%濃度的吸光值 0.836，80%濃度的吸光值 0.669，60%濃度的吸光值 0.523，40%濃度的吸光值 0.322，20%濃度的吸光值 0.243。顯示蝶豆花萃取液的濃度越高，還原赤血鹽能力越強，抗氧化的活性越強。

【實驗二】清除 DPPH 自由基能力測定

表 2-1 蝶豆花萃取液清除 DPPH 自由基能力

萃取液濃度 %	各次實驗吸光值 A517nm				清除 DPPH 能力 % 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
0	2.097	2.021	2.099	2.072	
20	0.509	0.504	0.508	0.507	75.5(0.132)
40	0.400	0.410	0.408	0.406	80.4(0.253)
60	0.387	0.384	0.389	0.387	81.3(0.121)
80	0.337	0.336	0.336	0.336	83.8(0.023)
100	0.259	0.260	0.259	0.259	87.5(0.029)

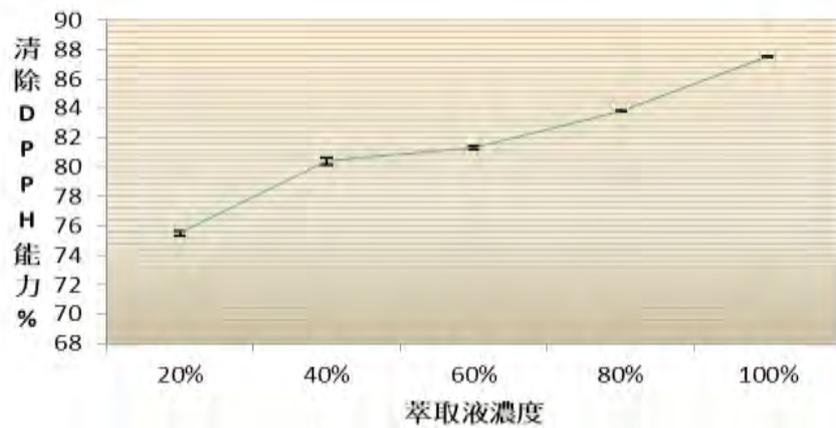


圖 4-1 蝶豆花萃取液清除 DPPH 自由基能力

表 2-2 維他命 C 溶液清除 DPPH 自由基能力

維他命 C 溶液 濃度 mg/ml	各次實驗吸光值 A517nm				清除 DPPH 能力 % 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
0	2.097	2.021	2.099	2.072	
2	1.387	1.389	1.391	1.389	32.9(0.095)
4	1.298	1.299	1.294	1.297	37.4(0.127)
6	0.922	0.920	0.921	0.921	55.6(0.022)
8	0.748	0.750	0.749	0.749	63.9(0.050)
10	0.544	0.547	0.544	0.545	73.7(0.087)

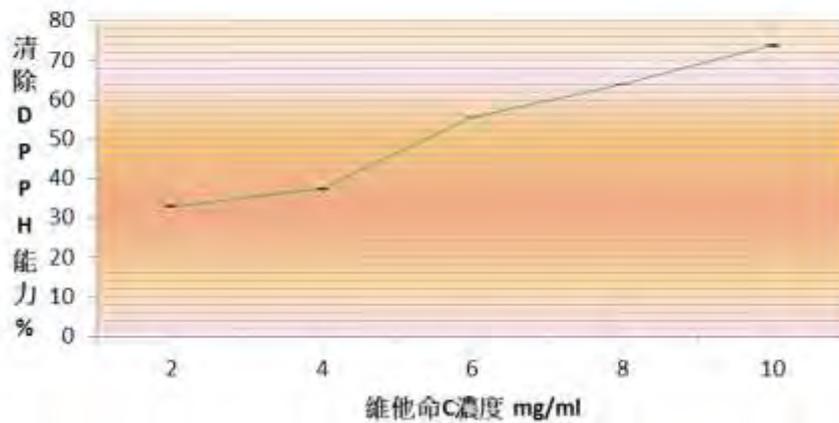


圖 4-2 維他命 C 溶液清除 DPPH 自由基能力

檢測結果：

清除 DPPH 自由基能力，萃取液 100%濃度為 87.5%，80%濃度為 83.8%，60%濃度為 81.3%，40%濃度為 80.4%，20%濃度為 75.5%。維他命 C 溶液濃度 10 mg/ml 為 73.7%，8 mg/ml 為 63.9%，6 mg/ml 為 55.6%，4 mg/ml 為 37.4%，2 mg/ml 為 32.9%。顯示蝶豆花萃取液與維他命 C 溶液的濃度越高，清除 DPPH 自由基能力越強。萃取液 20%濃度清除 DPPH 自由基能力相當於維他命 C 溶液 10 mg/ml 的清除力。

【實驗三】螯合亞鐵離子之能力測定法(Dinis Method)

表 3 蝶豆花萃取液螯合 Fe²⁺之能力

萃取液濃度 %	各次實驗吸光值 A562nm				螯合 Fe ²⁺ 能力 % 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
0	0.912	0.912	0.913	0.912	
20	0.775	0.779	0.780	0.778	14.7(0.291)
40	0.744	0.741	0.736	0.740	18.9(0.445)
60	0.693	0.693	0.690	0.692	24.1(0.191)
80	0.622	0.627	0.627	0.625	31.5(0.318)
100	0.616	0.628	0.629	0.624	31.6(0.796)

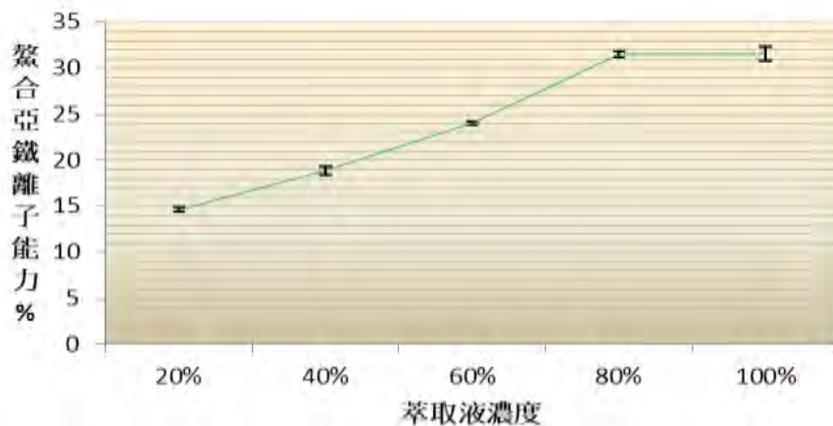


圖 5 蝶豆花萃取液螯合 Fe²⁺之能力

檢測結果：

螯合亞鐵離子能力，萃取液 100%濃度為 31.6%，80%濃度為 31.5%，60%濃度為 24.1%，40%濃度為 18.9%，20%濃度為 14.7%。顯示蝶豆花萃取液的濃度越高，螯合亞鐵離子之能力越強。

【實驗四】總酚測定

表 4 Gallic acid 檢量表

Gallic acid 濃度 ug/mL	各次實驗吸光值 A735nm			
	1	2	3	平均(標準差)
10	0.241	0.241	0.240	0.241(0.001)
20	0.378	0.374	0.374	0.375(0.002)
30	0.572	0.573	0.572	0.572(0.001)
40	0.794	0.794	0.792	0.793(0.001)
50	0.941	0.936	0.940	0.939(0.003)

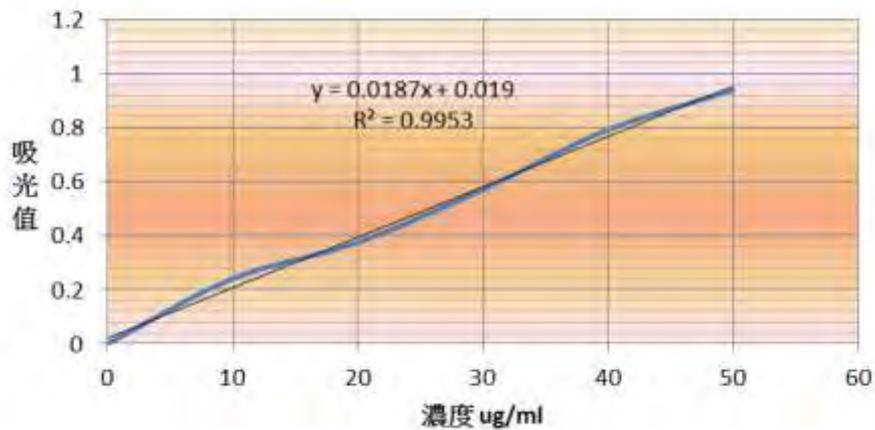


圖 5 Gallic acid 檢量線

表 5 蝶豆花總酚

各次實驗吸光值 A735nm	50 %萃取液			
	1	2	3	平均(標準差)
	0.851	0.852	0.854	0.852(0.002)
相當於 Gallic acid 含量	44.55(0.08)ug/mL			
總酚含量	17.82(0.32) mg/g 乾重			

檢測結果：

蝶豆花每 1 克乾重含有 17.82 mg 總酚(gallic acid 沒食子酸當量)。

【實驗五】總類黃酮含量

表 6-1 Quercetin 檢量表

Quercetin 濃度 ug/mL	各次實驗吸光值 A415nm			
	1	2	3	平均(標準差)
10	0.230	0.231	0.231	0.231(0.001)
20	0.410	0.409	0.409	0.409(0.001)
30	0.537	0.536	0.539	0.537(0.002)
40	0.718	0.719	0.718	0.718(0.001)
50	0.901	0.901	0.904	0.902(0.002)

表 6-2 Quercetin 檢量表

Quercetin 濃度 ug/mL	各次實驗電阻 kΩ			
	1	2	3	平均(標準差)
10	1.82	1.82	1.83	1.82(0.01)
20	2.42	2.44	2.42	2.43(0.01)
30	3.67	3.67	3.67	3.67(0.00)
40	4.08	4.07	4.09	4.07(0.01)
50	5.49	5.45	5.49	5.47(0.02)

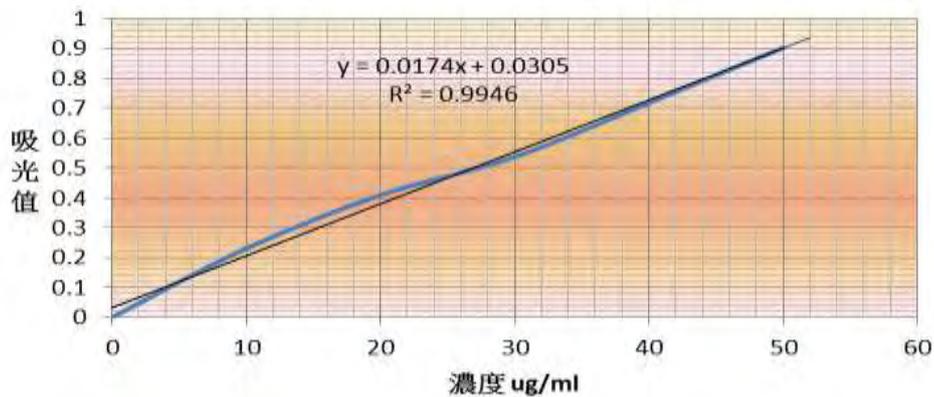


圖 6-1 Quercetin 檢量線

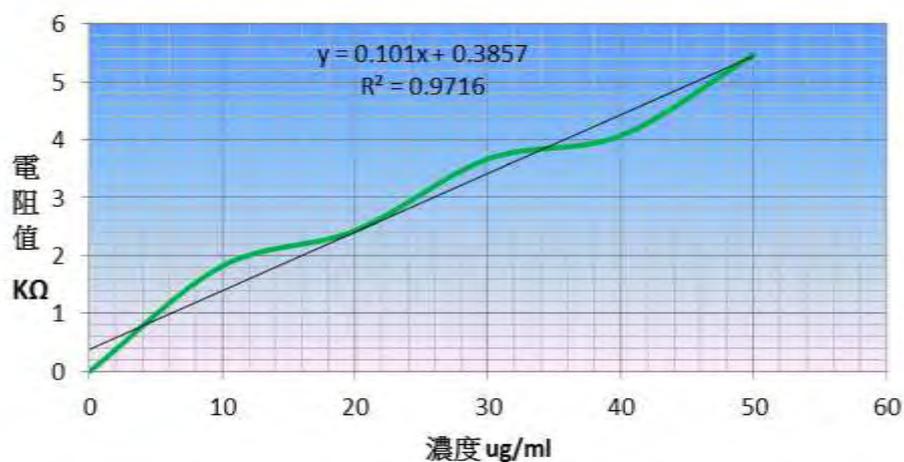


圖 6-2 Quercetin 檢量線

表 7-1 蝶豆花總類黃酮

各次實驗吸光值 A415nm	50%萃取液			
	1	2	3	平均(標準差)
	0.746	0.744	0.744	0.745(0.001)
相當於 Quercetin 含量	41.06(0.06) ug/mL			
總類黃酮含量	16.42(0.24) mg/g 乾重			

檢測結果

分光光度計檢測換算後，蝶豆花每 1 克乾重含有 16.42 mg 總類黃酮(槲皮素當量)。

表 7-2 蝶豆花總類黃酮

各次實驗電阻值 kΩ	50%萃取液			
	1	2	3	平均(標準差)
	4.64	4.66	4.66	4.65(0.01)
相當於 Quercetin 含量	42.22(0.12) ug/mL			
總類黃酮含量	16.88(0.48)mg/g 乾重			

檢測結果

自製儀器檢測換算後，蝶豆花每 1 克乾重含有 16.88 mg 總類黃酮(槲皮素當量)。

【實驗六】總花青素測定

表 8 總花青素測定

各次 實驗	A ₁₀ (PH 1.0) A ₅₀₀ - A ₇₀₀	B ₄₅ (PH 4.5) B ₅₀₀ - B ₇₀₀	(A ₅₀₀ - A ₇₀₀)- (B ₅₀₀ - B ₇₀₀)	Anthocyanin mg/g 蝶豆花粉末
1	0.514-0.225	0.285-0.214	0.218	7.28
2	0.514-0.224	0.284-0.216	0.222	7.41
3	0.515-0.225	0.284-0.214	0.220	7.34
平均(標準差)				7.34(0.07)

檢測結果：

蝶豆花每 1 克乾重含有 7.34 mg 花青素(cyanidin-3-glucoside 當量)。

【實驗七】市售日曬乾燥蝶豆花沖泡溫度之研究

表 9 市售乾燥蝶豆花不同溫度沖泡液，清除 DPPH 自由基能力

沖泡溫度 °C	各次實驗吸光值 A _{517nm}				清除 DPPH 能力 % 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
21(室溫)	0.899	0.887	0.869	0.885	57.3(0.730)
40	0.815	0.797	0.785	0.799	61.4(0.725)
60	0.654	0.640	0.632	0.642	69.0(0.536)
80	0.522	0.521	0.520	0.521	74.9(0.045)
100	0.592	0.587	0.591	0.590	71.5(0.127)

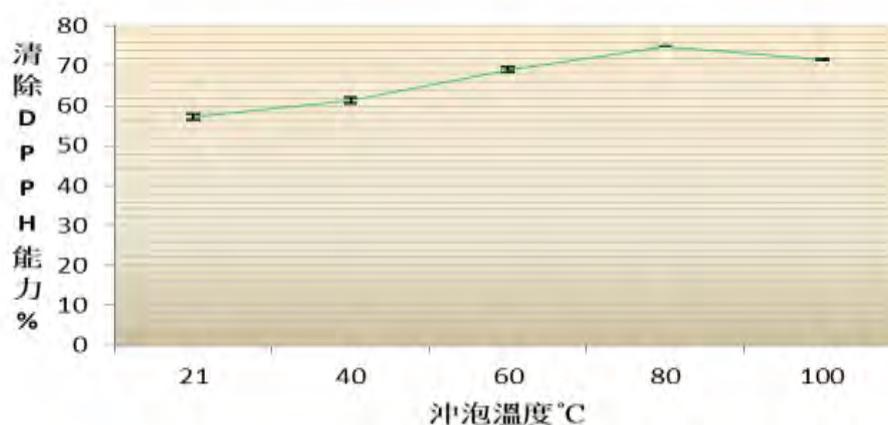


圖 8 不同溫度沖泡液，清除 DPPH 自由基能力

檢測結果：

市售日曬乾燥蝶豆花在各種不同溫度條件沖泡，清除 DPPH 自由基能力，21°C 室溫 57.3%，40°C 沖泡液 61.4%，60°C 69.0%，80°C 74.9%，100°C 71.5%。實驗數據顯示 80°C 沖泡市售蝶豆花有最好清除 DPPH 自由基效果，100°C 反而下降。

【實驗八】市售日曬乾燥蝶豆花沖泡時間之研究

表 10 市售乾燥蝶豆花不同時間沖泡液，清除 DPPH 自由基能力

沖泡時間 分	各次實驗吸光值 A517nm				清除 DPPH 能力 % 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
5	0.593	0.588	0.548	0.576	72.2(1.193)
10	0.551	0.555	0.548	0.551	73.4(0.171)
20	0.442	0.474	0.465	0.460	77.8(0.799)
30	0.314	0.354	0.332	0.333	83.9(0.967)
60	0.301	0.305	0.297	0.301	85.5(0.195)

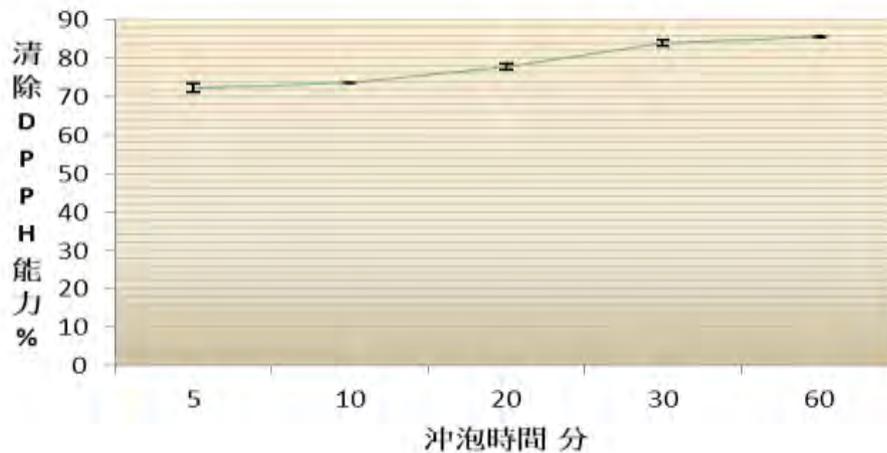


圖 7 不同時間沖泡液，清除 DPPH 自由基能力

檢測結果：

市售日曬乾燥蝶豆花在固定 80°C 條件下，不同沖泡時間，清除 DPPH 自由基能力，5 分鐘為 72.2%，10 分鐘為 73.4%，20 分鐘為 77.8%，30 分鐘為 83.9%，60 分鐘 85.5%。顯示在 80°C 下沖泡 30 分及 60 分鐘時間，清除 DPPH 自由基能力相對差別不多，建議沖泡 30 分即可獲得最好的清除體內自由基的效果。

【實驗九】添加糖分對市售日曬乾燥蝶豆花沖泡液抗氧化活性影響研究

表 11 不同糖分添加的市售乾燥蝶豆花沖泡液，清除 DPPH 自由基能力

沖泡條件	各次實驗吸光值 A517nm				清除 DPPH 能力 % 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
蝶豆花+水	0.616	0.616	0.614	0.615	70.3(0.058)
蝶豆花+水+蔗糖	0.995	0.992	0.994	0.993	52.1(0.071)
蝶豆花+水+果糖	0.865	0.864	0.864	0.864	58.3(0.029)

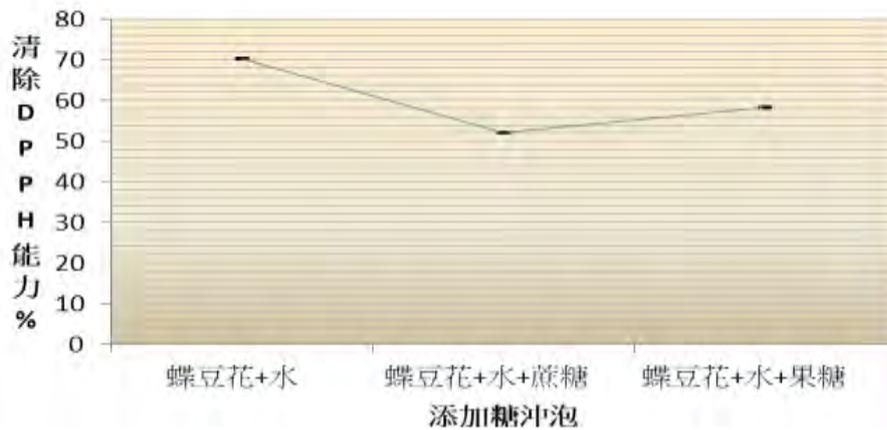


圖 10 不同糖分添加的沖泡液，清除 DPPH 自由基能力

實驗結果：

清除 DPPH 自由基能力蝶豆花+水為 70.3%；蔗糖+蝶豆花+水為 52.1%；果糖+蝶豆花+水為 58.3%。無論是加蔗糖或果糖清除 DPPH 自由基能力均下降。

【實驗十】蝶豆花的應用與發展

利用蝶豆花萃取液良好的抗氧化效果製造乳液及手工皂



蝶豆花乳液成品



手工皂成品



裝入紗袋美觀大方

陸、討論

【實驗一】還原赤血鹽能力測定

測定在波長 700nm 下的吸光值，普魯士藍生成量越多，吸光值越高，表示樣品還原力越強。檢測結果顯示，蝶豆花萃取液的濃度越高，還原赤血鹽能力越強，抗氧化的活性越強。

【實驗二】清除 DPPH 自由基能力測定

DPPH 乙醇溶液為紫色。當 DPPH 被還原時，會變為淡黃色，於 517nm 波長的吸光值將變小。樣品溶液與 DPPH 結合，會降低吸光值，其吸光值愈低，表示清除 DPPH 自由基能力愈強。結果顯示蝶豆花萃取液與維他命 C 溶液的濃度越高，清除 DPPH 自由基能力越強。維他命 C 是已經被證實的良好抗氧化物質，由實驗得知蝶豆花萃取液同樣具備良好的抗氧化活性。

【實驗三】螯合亞鐵離子之能力測定

Fe^{+2} 與 Ferrozine 試劑螯合生成 Ferrozine- Fe^{+2} 錯化合物，呈鮮紅色，在 562nm 波長下測吸光值。若樣品與 Fe^{+2} 螯合，Ferozine- Fe^{+2} 錯化合物的生成就會減少，吸光值就會降低，吸光值越低，表示樣品螯合 Fe^{+2} 亞鐵離子的能力越強。檢測結果顯示，蝶豆花萃取液的濃度越高，螯合亞鐵離子能力越強，具備良好的抗氧化活性。蝶豆花所含的抗氧化物有螯合亞鐵離子能力，可以幫助人體阻斷亞鐵離子引發自由基生成反應。

【實驗四】總酚測定

1. 本實驗使用 gallic acid 沒食子酸做為當量物質，是 16 大類之一的 phenolic acid 類的成員之一。
2. 酚類化合物會跟 Folin-Ciocalteu 試劑中的磷鎢鉬酸試劑反應呈藍色，利用分光光度計測定在波長 735nm 之吸光值。檢測結果：蝶豆花每克乾重含有 17.82 mg 總酚(gallic acid 沒食子酸當量)。

【實驗五】總類黃酮含量

1. 本實驗以 Quercetin 槲皮素作為當量物質，屬於 flavonol 類的成員。

- 2.本實驗嘗試探討自製儀器的簡便性與可行性。所有的檢測試樣同時使用分光光度計檢測及自製儀器檢測，自製儀器是以光敏電阻的原理組合而成，它的電阻和光線的強弱有直接關係。光強度增加，則電阻減小；光強度減小，則電阻增大。光源採涵蓋波長415nm的紫光(380~450nm)。由分光光度計檢測的檢量線 $R^2=0.9946$ ，由自製儀器檢測的檢量線 $R^2=0.9716$ 。
- 3.類黃酮物質與三氯化鋁($AlCl_3$)反應後，會產生呈黃色的錯化合物，呈色測在波長415nm之吸光值，依檢量線換算結果，蝶豆花每克乾重含有 16.42 mg 總類黃酮(槲皮素當量)。經採用紫色光源的自製儀器檢量線換算為每克乾重含有 16.88 mg 總類黃酮(槲皮素當量)。雖然精密度沒分光光度計準確，但自製儀器的確可以做為簡易方便的計量檢測工具。

【實驗六】總花青素測定

- 1.本次實驗，取檢測液 1.0 ml，pH 1.0的緩衝液 9.0 ml，稀釋 10 倍，稀釋液經掃描後得到 $\lambda_{max}=500nm$ ，吸光值為 0.514，落在 0.2~1.4的範圍。
- 2.花青素，為類黃酮物質的一種。本實驗採 6 種廣泛存在自然界之一的花青素：矢車菊素 cyanidin 當作參考當量物質。同樣濃度的花青素在不同 pH 值下，使用分光光度計測定其吸收波峰會有差異。花青素 PH 1.0 溶液呈橘-紫色，PH 4.5 呈無色溶液，利用這種相同波長下吸光值的差異可以計算出花青素的含量。檢測結果：蝶豆花每克乾重含有 7.34 mg 花青素(cyanidin-3-glucoside 當量)。依據依據 Xianli Wu & Gary R. Beecher⁽¹⁴⁾的報告，草莓每克含有 0.69 mg，櫻桃 1.77 mg，黑莓 3.53 mg，野生藍莓 7.05 mg 花青素。比較下顯示蝶豆花含有相當豐富的花青素。
- 3.本實驗檢測採最大吸光波長 $\lambda_{max}=500nm$ ，另選擇 700nm 當參考波長，可將溶液混濁因素的干擾排除。將最大吸光波長 500nm,參考波長 700nm 吸光值相減，在計算花青素含量時，可排除其他成分的干擾，讓實驗對花青素測定更有專一性。

【實驗七】市售日曬乾燥蝶豆花沖泡溫度之研究

因蝶豆花具有抗氧化的作用，近年來漸漸被國人當作養生飲品，根據國人沖泡蝶豆花瓣的習慣，採取 0.5 克(約 7 片蝶豆花)在 100mL 的水中沖泡。探討研究沖泡的溫

度及時間，尋找最適合的沖泡條件。採用快速簡單、方便有效的清除 DPPH 自由基能力作為檢測工具。由實驗數據顯示在 80°C 下沖泡市售蝶豆花能得到最好的清除 DPPH 自由基效果。100°C 下沖泡的市售蝶豆花 DPPH 自由基清除力下降，推測是在超過 80°C 以上抗氧化物質開始被破壞。

【實驗八】市售日曬乾燥蝶豆花沖泡時間之研究

顯示在 80°C 下沖泡 30 分鐘時間，清除 DPPH 自由基能力為 83.9 %，沖泡 60 分鐘時間，清除 DPPH 自由基能力為 85.5 %。推測在 30 分鐘時，蝶豆花內的所有抗氧化物質已將近完全溶出，所以不需浸泡達 60 分鐘。

【實驗九】添加糖分對市售日曬乾燥蝶豆花沖泡液抗氧化活性影響研究

實驗結果顯示，加了果糖或蔗糖的蝶豆花沖泡液，清除 DPPH 自由基能力反而下降，推測可能加果糖和蔗糖干擾了蝶豆花沖泡液的原有抗氧化物質的活性，對於以養生為訴求的消費者提供很好的參考依據。

【實驗十】蝶豆花的應用與發展

製作過程簡易且快速，方法簡易，適合居家製作天然肥皂與乳液，不只是天然顏色來源，再加上本實驗發現蝶豆花良好的抗氧化能力，製作手工皂與乳液，可供皮膚保養之用。

柒、結論

- 一、蝶豆花萃取液的濃度越高，還原赤血鹽能力越強，抗氧化的活性越強。
- 二、蝶豆花萃取液的濃度越高，清除 DPPH 自由基能力越強，20%低濃度都可達到 75.5%，顯示具備良好的抗氧化活性。
- 三、蝶豆花萃取液的濃度越高，螯合亞鐵離子之能力越強。蝶豆花所含的抗氧化物有螯合亞鐵離子能力.可以幫助人體阻斷亞鐵離子引發自由基生成反應。
- 四、蝶豆花每克乾重含有 17.82mg 總酚(gallic acid 沒食子酸當量)。
- 五、蝶豆花經分光光度計精密分析量測，每克乾重含有 16.42 mg 總類黃酮(樹皮素當量)。經

由自製儀器量測每克乾重含有 16.88 mg 總類黃酮(榭皮素當量)，兩者數值相近，顯示自製儀器的確可以做為簡易方便的計量檢測工具。

- 六、蝶豆花每克乾重含有 7.34 mg 花青素(cyanidin-3-glucoside 當量)。比較野生藍莓每克含 7.05 mg 花青素。證實蝶豆花含豐富的花青素。
- 七、80°C 下沖泡市售乾燥蝶豆花能得到最好的清除 DPPH 自由基 74.9%效果。超過 80°C 清除力開始下降，建議沖泡水溫不宜超過 80°C。
- 八、80°C 下沖泡市售乾燥蝶豆花 30 分鐘時間，可達清除 DPPH 自由基能力 83.9%的效果。
- 九、加糖會干擾蝶豆花沖泡液的原有抗氧化物質的活性，建議以蝶豆花沖泡液為養生飲品的使用者，在沖泡過程盡量不要加糖。
- 十、蝶豆花可當天然顏色來源，良好的抗氧化能力，使用蝶豆花萃取液做為自製手工皂與乳液的添加成分。

捌、參考資料

1. S. Michael Gomez(2003).Butterfly Pea(*Clitoria ternatea*):A nutritive multipurpose forage legume for the tropics:An overview. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(6),374-379
2. Pereira, D.M. et al.(2009).Phenolics:From Chemistry to Biology. *Molecules*,14:2202-2211.
3. Maria de Lourdes Reis Giada(2013).Food phenolic compounds:main classes,sources and their antioxidant power.In Jose A. Morales-Gonzalez,Oxidative stress and chronic degenerative diseases :A role for antioxidant(pp.:87-112).Rijeka.
4. 江賢龍等(2006)。光敏電阻。基礎電子實習下冊(206-211 頁)。台北市：台科大
5. 林志成等(2012)。第 4 章分子吸收光譜法。儀器分析 2 版。台北市:華格那出版社
6. Oyaizu M.(1986).Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44,307-315.
7. N. M. Saptarini et al.(2015). Application of Butterfly Pea (*Clitoria ternatea* Linn) extract as an indicator of acid-base titration .*Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*,7(2),275-280.
8. Shimada, K.et al. (1992). Antioxidative properties of Xanthan on the autoxidation of soybean oil

- in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948.
9. Sagar B. Kedare et al.(2011).Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay.J *Food Sci Technol*,48(4),412-422.
 10. Julkunen-Titto, R. (1985).Phenolic constituents in the leaves of northern willows:Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 213–217.
 11. Nabila et al.(2014).Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algeria plants.*Journal of Medical Plant Reserch* ,8(40),1198-1207.
 12. Kumar G. Patil et al.(2014).Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Property of *Crossandra*.*American Journal of Plant Sciences*, 2014, 5, 1133-1138.
 13. J. Lee et al.(2005).Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study.*J. AOAC Int*,88(5),1269-78.
 14. Xianli Wu& Gary R. Beecher(2006). Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption.*Journal of Agriculture and Food Chemistry*,54,4069-4075.
 - 15.王振瀾、許富蘭、李鴻麟(2006)・細葉山茶樹種抽出物之抗氧化性質探討・台灣林業科學，21(4)，559-65
 - 16.陳振義(2011)・不同水稻幼苗萃取液抗氧化能力之測定・台灣區農業改良場研究匯報，21，27-36

【評語】 052205

1. 用蝶豆花天然色素與其抗氧化性之應用，提供不同沖泡方式之選擇。
2. 實驗主題稍欠創意。
3. 作者對原料處理與組成分對抗氧化性影響宜再深入探討。
4. 實驗內容豐富性應可再加強。

作品摘要

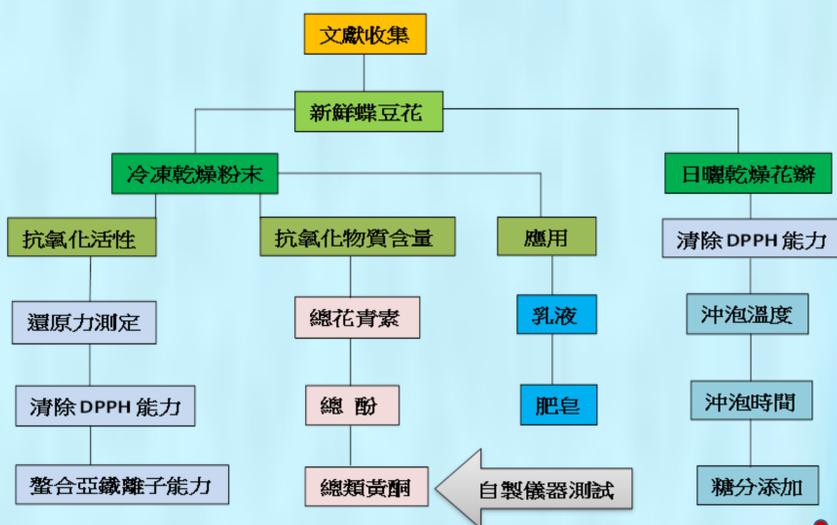
蝶豆花檢體採冷凍乾燥後研磨粉末及天然日曬乾燥花。粉末檢體經純水萃取，研究抗氧化活性：分別測定還原能力、清除DPPH自由基能力、螯合亞鐵離子能力；粉末檢體經50%乙醇萃取，研究萃取液內的組成抗氧化物質含量：分別測定總酚、總類黃酮、花青素含量。天然日曬乾燥花用來檢測沖泡時間、沖泡溫度、加糖與否對抗氧化活性的影響，以清除DPPH自由基能力為檢測標準，探討最適合的沖泡條件。另以類黃酮的定量，作為簡易自製儀器可行性的評估。實驗顯示：萃取液富含良好的抗氧化物質。最適宜的沖泡條件：溫度80°C，時間30分鐘，加糖後清除DPPH自由基能力下降。自製簡易比色儀器在抗氧化物質定量應用是可行的。蝶豆花萃取液具抗氧化效果，製成手工皂及乳液。

壹、研究動機

家中長輩經常沖泡乾燥蝶豆花瓣做為養生飲品，這杯藍藍的花茶引起我們的好奇，經查看網路資訊也推崇蝶豆花具有良好抗氧化作用，在化學課學到氧化還原的課程，於是我們決定探討蝶豆花是否真具有抗氧化能力，也想量測實際所含抗氧化物質的含量，還有到底要怎麼沖泡蝶豆花才能達到最好的效果，希望能夠經由實驗進一步對蝶豆花有更深入的了解。

貳、研究目的

- 一、測定還原能力測定、清除DPPH自由基能力、螯合亞鐵離子能力，研究蝶豆花萃取液的抗氧化活性。
- 二、測定總酚、總類黃酮、花青素含量，研究蝶豆花萃取液內的組成抗氧化物質含量。
- 三、藉抗氧化活性的測定，探討市售日曬乾燥蝶豆花最適宜的沖泡溫度以及時間。
- 四、藉抗氧化活性的測定，探討添加糖分對市售日曬乾燥蝶豆花沖泡液的抗氧化活性影響。
- 五、比較標準品的分光光度計吸光值檢量線與自製儀器的光敏電阻值檢量線，定量溶液濃度，探討自製儀器的可行性。
- 六、發展開發蝶豆花萃取液的應用產品。



參、研究藥品與材料

一、儀器設備：

分光光度計、微量天平、微量吸管、水浴槽、離心機、試管、定量瓶

二、蝶豆花材料：

天然日曬乾燥蝶豆花50公克、及新鮮蝶豆花1000公克新鮮蝶豆花委託冷凍乾燥公司進行脫水乾燥處理，獲取124公克冷凍乾燥蝶豆花，再使用傳統研鉢磨成粉末，將成品粉末保存於零下20度冷凍庫。

三、試劑配製：

實驗一

磷酸緩衝溶液(pH 6.6)：於定量瓶中加入7.164 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，加入蒸餾水至刻度100 ml。於定量瓶中加入3.121g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，加入蒸餾水至刻度100 ml。取磷酸氫二鈉37.5 ml及磷酸二氫鈉62.5 mL溶液，混合成磷酸緩衝溶液。

實驗二

0.20mM DPPH溶液：DPPH 19.7mg，溶於乙醇定量成250ml

實驗三

2mM FeCl_2 溶液：定量瓶加入0.0400(0.03975)g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶於純水稀釋成100 ml。

5mM Ferrozine試劑：定量瓶中加入0.2463g Ferrozine，溶於甲醇稀釋成100 ml。

實驗四

Gallic acid標準品溶液：取0.05g Gallic acid，加50%乙醇定量至50mL，配製成1000 ug/mL儲存溶液，再取5 ml 1000ug/mL溶液，加入45ml乙醇中，成為100ug/mL工作溶液。用工作液及乙醇依不同體積配製成總體積為10 ml的不同濃度gallic acid溶液。

實驗五

Quercetin標準品溶液：取0.05g Quercetin，加50%乙醇定量至50 ml，配製成1000 ug/ml儲存溶液，再取5 ml 1000ug/ml溶液，加入45 ml乙醇中，成為100 ug/ml工作溶液。用工作液及乙醇依不同體積配製成總體積為10 ml的不同濃度quercetin溶液。

實驗六

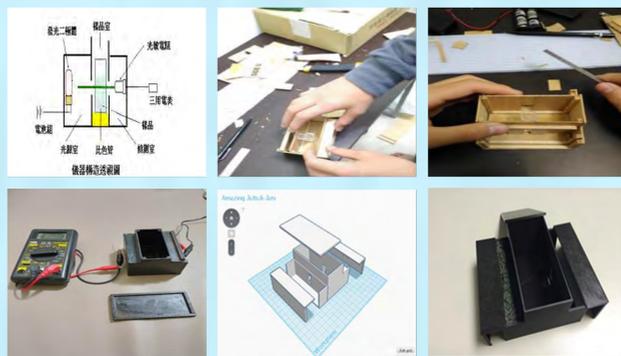
配製0.025 M，pH 1.0 之氯化鉀緩衝溶液：0.186 克氯化鉀溶於90 ml的水中，溶解後以濃 HCl 調整pH 至 1.0，將此溶液放入定量瓶中，以水稀釋至100ml刻度。

配製0.400 M，pH 4.5 之醋酸鈉緩衝溶液：3.280 克醋酸鈉溶於90 ml的水中，溶解後以濃 HCl 調整pH 至 4.5，將此溶液放入定量瓶中，以水稀釋至100 ml刻度。

肆、研究過程與方法

自製比色儀器製作：

利用木條和木片裁剪成長9*寬7*高6cm規格。以木片做出隔間以區分光源室、偵測室、樣品室。樣品室做一凹槽可置放比色管，兩端各嵌入發光二極體及光敏電阻，接上直流電源及三用電表，做密合度高蓋子後整台儀器塗黑色油漆，造成暗箱。再將完成的自製儀器，用Tinkercad軟體繪製3D設計圖，以3D印表機(Kossel mini)，線材(PLA)列印儀器成品。



第一部分、蝶豆花萃取液抗氧化活性測定

實驗一 還原能力測定

(一)萃取液配製：

取0.5克冷凍乾燥後的蝶豆花粉末，加入100 ml 的水中，置於恆溫槽60度，30 分鐘，萃取後過濾。

1%的赤血鹽溶液50 μl + 磷酸緩衝溶液750 μl + 1500 μl 樣品萃取液

恆溫水浴槽 50°C水浴20 分鐘後，將其放入4°C水中靜置5分鐘，再加入750 μl 的10%三氯醋酸溶液，於3200 rpm 離心10 分鐘

1. 取上清液1500 μl ，加入1500 μL 的蒸餾水及300 μl 之 0.1% 氯化鐵溶液，混合均勻。於室溫避光反應 10 分鐘。
2. 以分光光度計檢測700 nm 的吸光值，吸光值愈高表示樣品還原力越強。以蒸餾水取代樣品作為對照組。



0.5g蝶豆花粉末 恆溫槽控制溫度60度 各種濃度萃取液

實驗二 清除DPPH自由基能力測定

1. 用純水為溶劑，配製20、40、60、80、100的萃取液。取1g維他命C加水定量成100 ml，配成10 mg/ml溶液。再稀釋成8mg/ml、6 mg/ml、4 mg/ml、2 mg/ml。

DPPH溶液2000ul + 萃取液2000ul

2. 室溫避光靜置30分鐘。
3. 以分光光度計測517nm吸光值，重複實驗三次，純水空白實驗。
4. 清除率(Scavenging effects) % = $\frac{[\text{對照組的吸光值}-\text{樣品的吸光值}]}{\text{對照組的吸光值}} \times 100\%$



DPPH溶液 不同濃度萃取液 反應後試樣

實驗三 螯合亞鐵離子能力測定

1. 取1.00 ml蝶豆花不同濃度檢測液，加入3.2 ml的甲醇，再加入100 ul 2mM的 FeCl_2 ，充分混合後靜置30秒。
2. 再加入200 ul的 5 mM Ferrozine，避光靜置10分鐘後，檢測562nm的吸光值。吸光值越低，表示樣品螯合亞鐵離子的能力越強。重複實驗三次。並以純水做空白實驗。
3. 計算螯合亞鐵離子能力(chelating effects)： $\frac{(\text{空白組於562nm吸光值}-\text{樣品反應後於562nm吸光值})}{(\text{空白組於562nm吸光值})} \times 100\%$



萃取液過濾 配製藥品 反應後試樣

實驗四 總酚測定

(一)萃取液製備：

取冷凍乾燥後蝶豆花粉末0.5 g加入100 ml 50%乙醇浸漬，在室溫下避光放置48小時，萃取後過濾。分析時另取原液5ml，加5ml乙醇，稀釋成50%溶液。

(三)實驗步驟：

1. 取 50 ul 的50%萃取液，加入 1 ml H_2O ，0.5ml Folin-Ciocalteu's phenol reagent，再加入 2.5 ml 20% Na_2CO_3 ，均勻混合，在室溫下避光靜置20分鐘。以分光光度計測735nm之吸光值。調配完成的Gallic acid 不同濃度標準品溶液，依此流程操作，製作檢量線。萃取液總酚量由檢量線換算成Gallic acid之當量濃度，計算成每克(乾重)蝶豆花之總酚類化合物含量。

實驗九 添加糖分對市售日曬乾燥蝶豆花沖泡液抗氧化活性影響

實驗步驟：

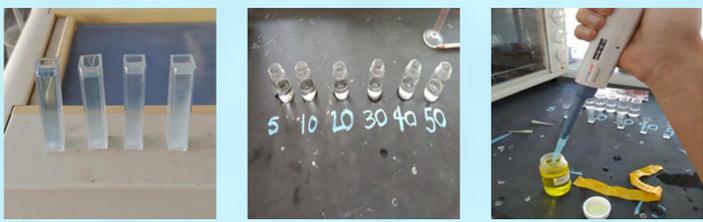
取(1)市售乾燥蝶豆花瓣0.5 g；(2)市售乾燥蝶豆花瓣0.5 g，加5 g蔗糖；(3)市售乾燥蝶豆花瓣0.5 g，加5 g果糖，分別放入80°C的100 ml蒸餾水中。各取靜置5分鐘後的浸泡液，按實驗二步驟流程，測定清除DPPH自由基能力。樣品取3份檢測。



蝶豆花萃取液

加入砂糖、果糖

待測試樣比色管



Folin-Ciocalteu液

不同濃度工作液

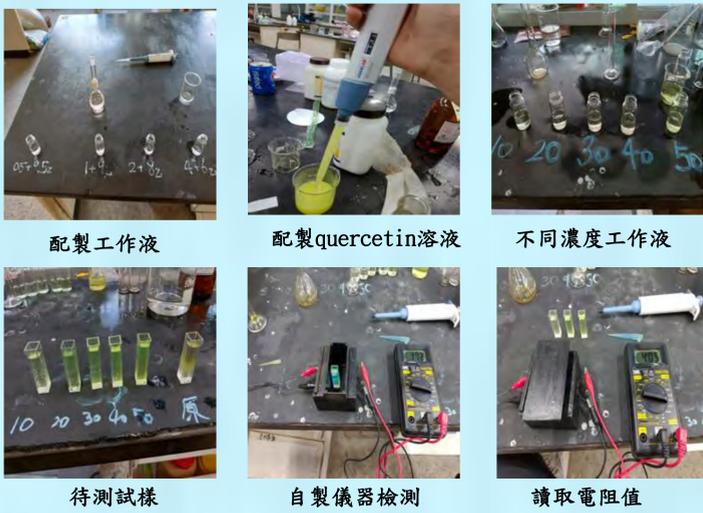
反應試樣

實驗五 總類黃酮含量

(一)萃取液製備：同實驗四。

(二)實驗步驟：

1. 取 500 ul 的50%萃取液，加入10%氯化鋁($AlCl_3$)1500 ul，1M 醋酸鉀 100 ul，蒸餾水2800 ul，室溫靜置30分鐘，測波長415nm下的吸光值。調配完成的樹皮素(quercetin)不同濃度標準品溶液，依此流程操作，製作檢量線。另將以上分光光度計檢測完成的試樣在自製儀器檢測，自製儀器光源採涵蓋波長415nm的紫光(380~450nm)，記錄電阻值。萃取液總類黃酮含量由檢量線換算成quercetin之當量濃度，計算成每克(乾重)蝶豆花之總類黃酮含量。單位：每克樣品含quercetin之當量濃度(mg QE/g sample)。三次檢測，採平均值。



配製工作液

配製quercetin溶液

不同濃度工作液

待測試樣

自製儀器檢測

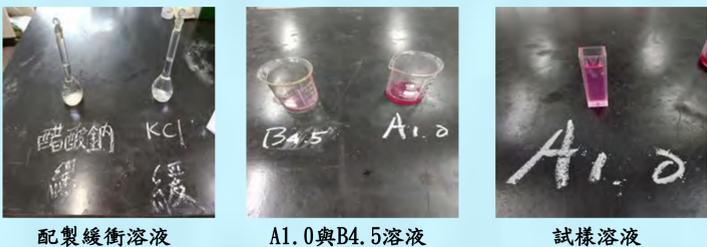
讀取電阻值

實驗六 總花青素測定

(一)萃取液配製：同實驗四

(二)測定並計算總花青素含量

1. 取適量「萃取液」1 ml，溶於9 ml的 pH 1.0緩衝溶液中，掃描400~800nm最大吸光值波長max500nm。且吸光值要符合落在0.2~1.4的範圍(0.514)。dilution factor稀釋倍數：DF= 10.0/1。
2. 以 pH = 1.0 的緩衝液配稀釋溶液，為 $A_{1.0}$ 溶液(取 x ml 萃取液，加入 10-x ml、pH = 1.0 的緩衝溶液，混合均勻即為 $A_{1.0}$ 溶液)。
3. 以 pH = 4.5 的緩衝液配稀釋溶液，為 $B_{4.5}$ 溶液(取 x ml 萃取液，加入 10-x ml、pH = 4.5 的緩衝溶液，混合均勻即為 $B_{4.5}$ 溶液)。
4. 靜置約 15 分鐘，分別測量 $A_{1.0}$ 、 $B_{4.5}$ 在 500nm, 700nm 的吸光值 A_{500} 、 A_{700} ； B_{500} 、 B_{700} 。代入花青素總量公式 Anthocyanin pigment (mg/l) = $A \times MW \times DF \times 1000 / (\epsilon \times l)$ ，DF: dilution factor (稀釋倍數)， $A = (A_{500} - A_{700}) - (B_{500} - B_{700})$ ，MW: cyanidin-3-glucoside 之分子量，449.2， ϵ : Molar Absorptivity 26,900，l: 光通過的路徑，通常為 1 cm



配製緩衝溶液

A1.0與B4.5溶液

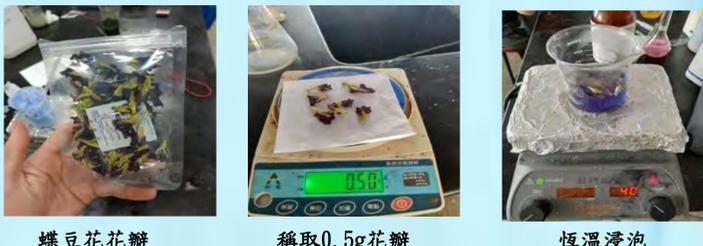
試樣溶液

第三部分、蝶豆花日常應用與發展研究

實驗七 市售日曬乾燥蝶豆花沖泡溫度之研究

實驗步驟：

取市售乾燥蝶豆花瓣各0.5 g，分別放入21°C、40°C、60°C、80°C、100°C的100 ml 蒸餾水中。5分鐘後過濾，按實驗二步驟流程，測定清除DPPH自由基能力。樣品取3份檢測。



蝶豆花花瓣

稱取0.5g花瓣

恆溫浸泡

實驗八 市售日曬乾燥蝶豆花沖泡時間之研究

實驗步驟：

取市售乾燥蝶豆花瓣各0.5 g，放入80°C的100 ml蒸餾水中。取5、10、20、30、60分鐘後的浸泡液，按實驗二步驟流程，測定清除DPPH自由基能力。樣品取3份檢測。



溫度控制(80°C)

不同時間浸泡液

不同沖泡時間試樣

實驗十 蝶豆花的應用與發展

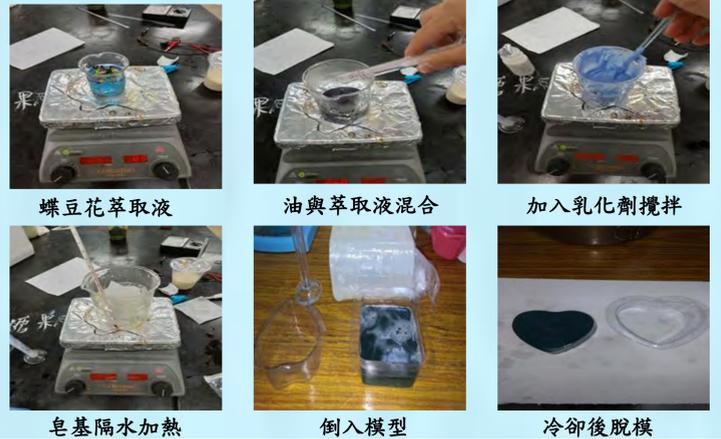
實驗步驟：

1. 蝶豆花乳液：

取55ml蝶豆花萃取液與15ml橄欖油混和，攪拌後再加入乳化劑2ml，與抗菌劑1ml，混和均勻後即為成品。

2. 蝶豆花肥皂：

秤取120g的皂基隔水加熱融化，加入10 ml蝶豆花萃取液，攪拌均勻後倒入模型盒，待冷卻後脫膜，放入紗袋內。



蝶豆花萃取液

油與萃取液混合

加入乳化劑攪拌

皂基隔水加熱

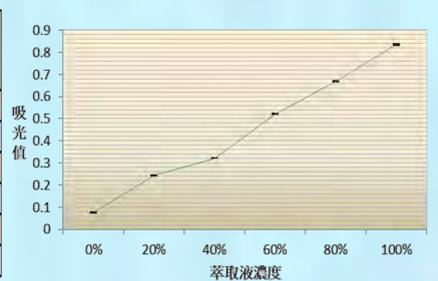
倒入模型

冷卻後脫膜

伍、研究結果與討論

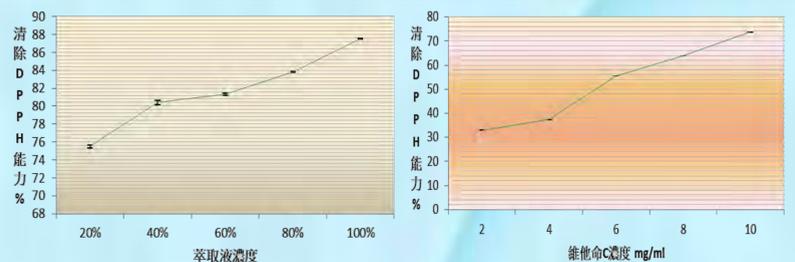
實驗一 還原赤血鹽能力測定

萃取液濃度 %	各次實驗吸光值A700nm			
	1	2	3	平均(標準差)
0	0.076	0.074	0.074	0.075(0.001)
20	0.242	0.244	0.242	0.243(0.001)
40	0.323	0.322	0.322	0.322(0.001)
60	0.525	0.524	0.521	0.523(0.002)
80	0.670	0.666	0.672	0.669(0.003)
100	0.832	0.840	0.835	0.836(0.004)



1. 萃取液100%濃度的吸光值0.836，80%濃度的吸光值0.669，60%濃度的吸光值0.523，40%濃度的吸光值0.322，20%濃度的吸光值0.243。
2. 測定在波長700nm下的吸光值，普魯士藍生成量越多，吸光值越高，表示樣品還原力越強。檢測結果顯示，蝶豆花萃取液的濃度越高，還原赤血鹽能力越強，抗氧化的活性越強。

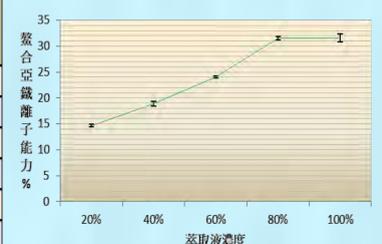
實驗二 清除DPPH自由基能力測定



1. 清除DPPH自由基能力，萃取液100%濃度為87.5%，80%濃度為83.8%，60%濃度為81.3%，40%濃度為80.4%，20%濃度為75.5%。維他命C溶液濃度10 mg/ml為73.7%，8 mg/ml為63.9%，6 mg/ml為55.6%，4mg/ml為37.4%，2 mg/ml為32.9%。顯示蝶豆花萃取液與維他命C溶液的濃度越高，清除DPPH自由基能力越強。萃取液20%濃度清除DPPH自由基能力相當於維他命C溶液10 mg/ml的清除力。
2. DPPH乙醇溶液為紫色。當DPPH被還原時，會變為淡黃色，於517nm波長的吸光值將變小。樣品溶液與DPPH結合，會降低吸光值，其吸光值愈低，表示清除DPPH自由基能力愈強。維他命C是已經被證實的良好抗氧化物質，由實驗得知蝶豆花萃取液同樣具備良好的抗氧化活性。

實驗三 整合亞鐵離子之能力測定

萃取液濃度 %	各次實驗吸光值A562nm				整合Fe ²⁺ 能力% 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
0	0.912	0.912	0.913	0.912	
20	0.775	0.779	0.780	0.778	14.7(0.291)
40	0.744	0.741	0.736	0.740	18.9(0.445)
60	0.693	0.693	0.690	0.692	24.1(0.191)
80	0.622	0.627	0.627	0.625	31.5(0.318)
100	0.616	0.628	0.629	0.624	31.6(0.796)

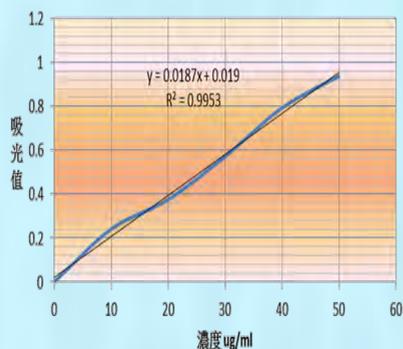


1. 整合亞鐵離子能力，萃取液100%濃度為31.6%，80%濃度為31.5%，60%濃度為24.1%，40%濃度為18.9%，20%濃度為14.7%。
2. Fe²⁺與Ferrozine試劑整合生成Ferrozine-Fe²⁺錯化合物，呈鮮紅色，562nm波長下測吸光值。若樣品與Fe²⁺整合，Ferrozine-Fe²⁺錯化合物的生成就會減少，吸光值就會降低，吸光值越低，表示樣品整合Fe²⁺亞鐵離子的能力越強。檢測結果顯示，蝶豆花萃取液的濃度越高，整合亞鐵離子之能力越強。

實驗四 總酚測定

Gallic acid濃度ug/ml	各次實驗吸光值A735nm			
	1	2	3	平均(標準差)
10	0.241	0.241	0.240	0.241(0.001)
20	0.378	0.374	0.374	0.375(0.002)
30	0.572	0.573	0.572	0.572(0.001)
40	0.794	0.794	0.792	0.793(0.001)
50	0.941	0.936	0.940	0.939(0.003)

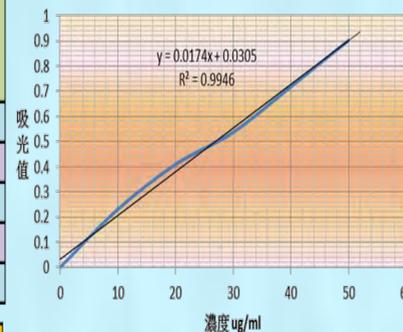
各次實驗吸光值A735nm	50%萃取液			
	1	2	3	平均(標準差)
	0.851	0.852	0.854	0.852(0.002)
相當於Gallic acid含量	44.55(0.08)ug/ml			
總酚含量	17.82(0.32)mg/g乾重			



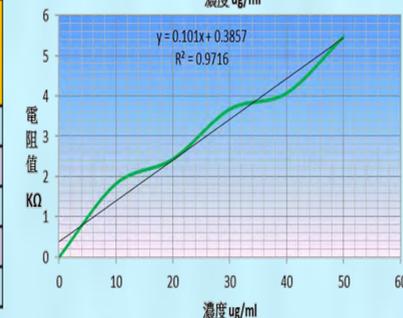
蝶豆花每1克乾重含有17.82 mg 總酚

實驗五 總類黃酮含量

Quercetin濃度ug/ml	各次實驗吸光值A415nm			
	1	2	3	平均(標準差)
10	0.230	0.231	0.231	0.231(0.001)
20	0.410	0.409	0.409	0.409(0.001)
30	0.537	0.536	0.539	0.537(0.002)
40	0.718	0.719	0.718	0.718(0.001)
50	0.901	0.901	0.904	0.902(0.002)



Quercetin濃度ug/ml	各次實驗電阻kΩ			
	1	2	3	平均(標準差)
10	1.82	1.82	1.83	1.82(0.01)
20	2.42	2.44	2.42	2.43(0.01)
30	3.67	3.67	3.67	3.67(0.00)
40	4.08	4.07	4.09	4.07(0.01)
50	5.49	5.45	5.49	5.47(0.02)



各次實驗吸光值A415nm	50%萃取液			
	1	2	3	平均(標準差)
	0.746	0.744	0.744	0.745(0.001)
相當於Quercetin含量	41.06(0.06)ug/ml			
總類黃酮含量	16.42(0.24)mg/g乾重			

各次實驗電阻值kΩ	50%萃取液			
	1	2	3	平均(標準差)
	4.64	4.66	4.66	4.65(0.01)
相當於Quercetin含量	42.22(0.12)ug/ml			
總類黃酮含量	16.88(0.48)mg/g乾重			

- 經分光光度計檢測換算後，蝶豆花每1克乾重含有16.42 mg總類黃酮(槲皮素當量)。經自製儀器檢測換算後，蝶豆花每1克乾重含有16.88 mg總類黃酮(槲皮素當量)。
- 光源採涵蓋波長415nm的紫光(380~450nm)。由分光光度計檢測的檢量線 $R^2=0.9946$ ，由自製儀器檢測的檢量線 $R^2=0.9716$ 。雖然精密度沒分光光度計準確，但自製儀器的確可以做為簡易方便的計量檢測工具。

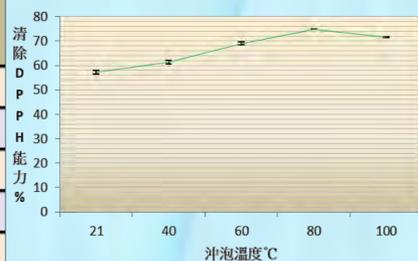
實驗六 總花青素測定

各次實驗	A ₁₀ (PH 1.0) A ₅₀₀ - A ₇₀₀	B ₄₅ (PH 4.5) B ₅₀₀ - B ₇₀₀	(A ₅₀₀ - A ₇₀₀)- (B ₅₀₀ - B ₇₀₀)	Anthocyanin mg/g 蝶豆花粉末
1	0.514-0.225	0.285-0.214	0.218	7.28
2	0.514-0.224	0.284-0.216	0.222	7.41
3	0.515-0.225	0.284-0.214	0.220	7.34
平均(標準差)				7.34(0.07)

- 最大吸光波長 $\lambda_{max}=500nm$ ，吸光值0.514。稀釋倍數DF=10倍。蝶豆花每1克乾重含有7.34 mg花青素(cyanidin-3-glucoside當量)
- 草莓每克含有0.69 mg，櫻桃1.77 mg，黑莓3.53 mg，野生藍莓7.05 mg花青素，比較下顯示蝶豆花含有相當豐富的花青素。
- 本實驗檢測採最大吸光波長 $\lambda_{max}=500nm$ ，另選擇700nm當參考波長，可以將溶液混濁因素的干擾排除。將最大吸光波長500nm，參考波長700nm吸光值相減，在計算花青素含量時，可以排除其他成分的干擾，讓實驗對花青素的測定更有專一性。

實驗七 市售日曬乾燥蝶豆花沖泡溫度之研究

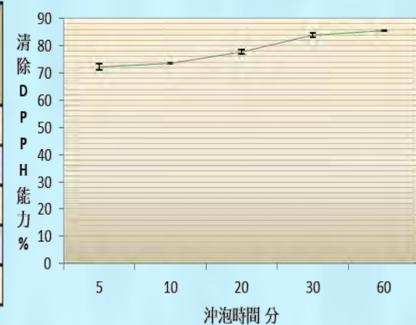
沖泡溫度 °C	各次實驗吸光值A517nm				清除DPPH能力% 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
21(室溫)	0.899	0.887	0.869	0.885	57.3(0.730)
40	0.815	0.797	0.785	0.799	61.4(0.725)
60	0.654	0.640	0.632	0.642	69.0(0.536)
80	0.522	0.521	0.520	0.521	74.9(0.045)
100	0.592	0.587	0.591	0.590	71.5(0.127)



清除DPPH自由基能力，21°C室溫為57.3%，40°C沖泡液為61.4%，60°C為69.0%，80°C為74.9%，100°C為71.5%。由實驗數據顯示在80°C下沖泡市售蝶豆花能得到最好的清除DPPH自由基效果，100°C反而下降。推測是在超過80°C以上抗氧化物質開始被破壞。

實驗八 市售日曬乾燥蝶豆花沖泡時間之研究

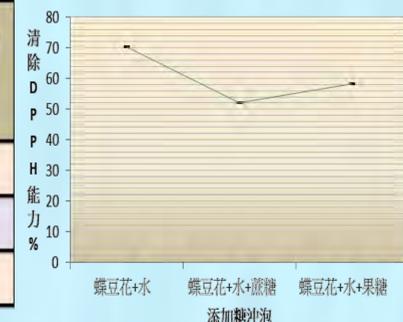
沖泡時間 分	各次實驗吸光值A517nm				清除DPPH能力% 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
5	0.593	0.588	0.548	0.576	72.2(1.193)
10	0.551	0.555	0.548	0.551	73.4(0.171)
20	0.442	0.474	0.465	0.460	77.8(0.799)
30	0.314	0.354	0.332	0.333	83.9(0.967)
60	0.301	0.305	0.297	0.301	85.5(0.195)



清除DPPH自基能力，5分鐘為72.2%，10分鐘為73.4%，20分鐘為77.8%，30分鐘為83.9%，60分鐘85.5%。推測在30分鐘時，蝶豆花內的所有抗氧化物質已將近完全溶出，所以不需浸泡達60分鐘。建議沖泡30分即可獲得良好的清除體內自由基的效果。

實驗九 添加糖分對市售日曬乾燥蝶豆花沖泡液抗氧化活性影響

沖泡條件	各次實驗吸光值A517nm				清除DPPH能力% 平均(標準差)
	1	2	3	平均	
蝶豆花+水	0.616	0.616	0.614	0.615	70.3(0.058)
蝶豆花+水+蔗糖	0.995	0.992	0.994	0.993	52.1(0.071)
蝶豆花+水+果糖	0.865	0.864	0.864	0.864	58.3(0.029)



- 清除DPPH自由基能力蝶豆花+水為70.3%；蔗糖+蝶豆花+水為52.1%；果糖+蝶豆花+水為58.3%。
- 推測可能加果糖和蔗糖干擾了蝶豆花沖泡液的原有抗氧化物質的活性。加糖對提供飲料的漸層多樣顏色的效果是有幫助，但對於抗氧化活性反而是阻礙。建議以蝶豆花沖泡液為養生飲品的使用者，在沖泡過程盡量不要加糖。

實驗十 蝶豆花的應用與發展



手工皂成品



蝶豆花乳液成品



裝入紗袋美觀大方

陸、結論

- 蝶豆花萃取液的濃度越高，還原赤血鹽能力越強，抗氧化的活性越強。
- 蝶豆花萃取液的濃度越高，清除DPPH自由基能力越強，20%低濃度都可達到75.5%，顯示具備良好的抗氧化活性。
- 蝶豆花萃取液的濃度越高，螯合亞鐵離子之能力越強。蝶豆花所含的抗氧化物有螯合亞鐵離子能力，可以幫助人體阻斷亞鐵離子引發自由基生成反應。
- 蝶豆花每克乾重含有17.82mg總酚(gallic acid當量)。
- 蝶豆花經分光光度計精密分析量測，每克乾重含有16.42 mg總類黃酮(槲皮素當量)。經由自製儀器量測每克乾重含有16.88 mg總類黃酮(槲皮素當量)，兩者數值相近，顯示自製儀器的確可以做為簡易方便的計量檢測工具。
- 蝶豆花每克乾重含有7.34 mg花青素(cyanidin-3-glucoside當量)。比較野生藍莓每克含7.05 mg花青素。證實蝶豆花含豐富的花青素。
- 80°C下沖泡市售乾燥蝶豆花能得到最好的清除DPPH自由基74.9%效果。超過80°C清除力開始下降，建議沖泡水溫不宜超過80°C。
- 80°C下沖泡市售乾燥蝶豆花30分鐘時間，可達清除DPPH自由基能力83.9%的效果。
- 加糖會干擾蝶豆花沖泡液的原有抗氧化物質的活性，建議以蝶豆花沖泡液為養生飲品的使用者，在沖泡過程不宜加糖。
- 蝶豆花可當天然顏色的來源，良好的抗氧化能力，做成的肥皂與乳液可做皮膚的保養品。

柒、參考資料

- S. Michael Gomez(2003). Butterfly Pea(Clitorea ternatea):A nutritive multipurpose forage legume for the tropics:An overview. Pakistan Journal of Nutrition, 2(6), 374-379
- Pereira, D. M. et al.(2009). Phenolics:From Chemistry to Biology. Molecules, 14:2202-2211.
- Maria de Lourdes Reis Giada(2013). Food phenolic compounds:main classes, sources and their antioxidant power. In Jose A. Morales-Gonzalez, Oxidative stress and chronic degenerative diseases :A role for antioxidant(pp. :87-112). Rijeka.
- 江賢龍(2006)。光敏電阻。基礎電子實習下冊(206-211頁)。台北市：台科大
- 林志成(2012)。第4章分子吸收光譜法。儀器分析2版。台北市：華格那出版社
- Sagar B. Kedare et al.(2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol, 48(4), 412-422.
- Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows:Methods for the analysis of certain phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33, 213-217.
- Kumar G. Patil et al.(2014). Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Property of Crossandra. American Journal of Plant Sciences, 2014, 5, 1133-1138.
- J. Lee et al.(2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. J. AOAC Int, 88(5), 1269-78.
- 王振瀾、許富蘭、李鴻麟(2006)。細葉山茶樹種抽出物之抗氧化性質探討。台灣林業科學, 21(4), 559-65
- 陳振義(2011)。不同水稻幼苗萃取液抗氧化能力之測定。台灣區農業改良場研究匯報, 21, 27-36