

中華民國第四十三屆中小學科學展覽會參展作品專輯

高中組

## 化學科

科別：化學科

組別：高中組

作品名稱：趕走自由基，健康有生機～抗氧化就從蔬菜  
湯、糙米茶做起

關鍵詞：抗氧化、蔬菜湯、糙米茶

編號：040211

學校名稱：

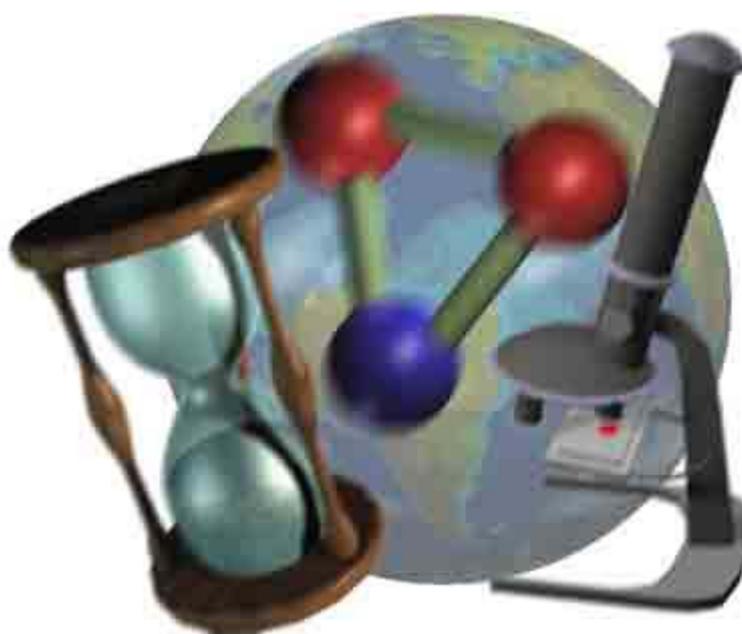
國立台中女子高級中學

作者姓名：

何宣瑩、林韋寧、周怡君、紀乃榕

指導老師：

李霽芳、王若文



## 摘要

本研究以 DPPH 自由基清除率、TEAC 總抗氧化力及抑制紅血球溶血等試驗模式，探討蔬菜湯與糙米茶水萃取物之抗氧化性表現，並評估該兩項水萃取物經等比例 (1:1) 混合後，其抗氧化性是否有相乘或相減之效果。結果顯示，蔬菜湯及糙米茶水萃取物其清除 DPPH 自由基能力以糙米茶較佳，而自製與市售蔬菜湯水萃物之 DPPH 清除率並無明顯差異。此外，比較蔬菜湯之個別組成 (紅蘿蔔、白蘿蔔、白蘿蔔葉、牛蒡、香菇)，其中以白蘿蔔葉之 DPPH 清除率最高 (74%)。在總抗氧化力表現方面，糙米茶之 TEAC 值高於蔬菜湯，自製蔬菜湯優於市售樣品，蔬菜湯之個別組成以白蘿蔔葉最佳 ( $0.089 \pm 0.001$ )。蔬菜湯與糙米茶水萃取物抑制 AAPH 誘導人類紅血球細胞溶血之系統，自製蔬菜湯可抑制 85% 紅血球溶血，為所有樣品中最高者。此外，本研究亦針對蔬菜湯與糙米茶水萃取物中可能之抗氧化成分進行分析，其中以白蘿蔔葉之總多酚化合物 (71.1 mg/g) 及類黃酮化合物 (19.3 mg/g) 含量最高，可解釋其抗氧化力最佳的原因。

## 壹、研究動機

幾千年前人們就已知道，食用某些特定的食物會改善人體的健康狀態，身體的健康與否，與其所選擇的食物和飲食方式絕有關。中國傳統養生之道和現代科學告訴我們，正確的飲食方式、均衡的營養能改善體質，增進人體的健康。一個人如果吃了好的食物，不僅體質、腦力得到改善，創造力與思考力也會隨之改變。隨著各種健康食品與營養資源的研究與開發，提供了更多食物增進健康的新證據，因此如何善加利用，是食物增進健康的主要關鍵。西元前四世紀，希臘醫生布皮克拉底 (Hippocrates) 就曉得以食用動物的肝臟來預防夜盲症的發生，但其真正的作用成分—維生素 A，卻一直到 1913 年才經由化學分析鑑定出來。如今，科學上已衍生出一系列的研發技術，使得學者們得以一窺蘊含於日常膳食中保健功效的潛力。

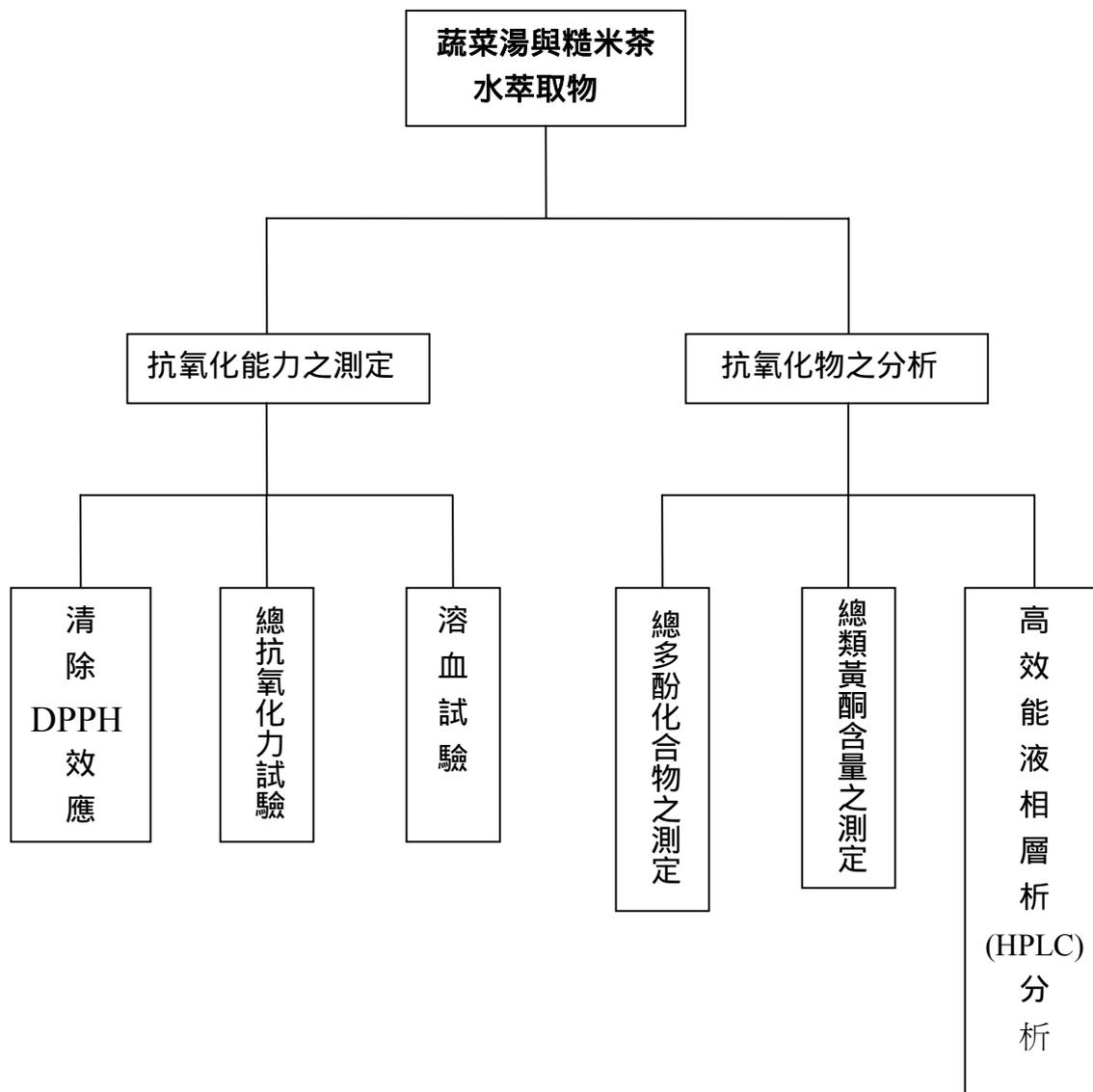
由於自由基生物醫學的發展，目前已有證據顯示自由基與一百多種人體疾病有關，其中如動脈硬化、腦中風、心臟病、白內障、肺氣腫、糖尿病、男性功能障礙及多種癌症等，都是人們較為耳熟能詳的。我們身體每天有成千上萬個自由基不斷產生，其中有些是好的自由基，可維持正常的生理機能，但大多而言卻是對人體有害！近年有學者提出存在於天然植物中的成分，例如多酚類 (polyphenols)、類黃酮 (flavonoids)，可以防止動物體受到自由基和活性氧的氧化傷害。數種膳食的抗氧化劑可以經由飲食的攝取達到抗氧化的目的，如維生素 E、維生素 C、 $\beta$ -胡蘿蔔素。因此是否可經由膳食來補充抗氧化劑以調節生理機能，健全體內抗氧化系統，是目前一個重要的研究課題 (Halliwell and Gutteridge, 1996)。

班上有位注重健康的同學每日固定飲用蔬菜湯與糙米茶，令人好奇，便向她詢問有關飲用蔬菜湯及糙米茶後的個人生理狀況，得知其似乎具有多種有益身體的保健功效！於是我們便上網及到圖書館找尋相關的文獻資料，有趣的是，得知其似乎具有延遲細胞老化的作用，與我們所接觸到的抗氧化知識息息相關，且目前對此兩種食材之抗氧化特性仍無完整的文獻可循；此外，坊間流傳蔬菜湯與糙米茶同時飲用會對人體產生拮抗的效果，基於此，我們便擬定就蔬菜湯及糙米茶進行抗氧化性之評估，並探討其混合物之抗氧化性表現是否有相乘或相減的表現，希望此研究結果，可作為日後發展健康食品之參考。

## 貳、研究目的

本研究之目的在探討蔬菜湯與糙米茶之抗氧化特性，實驗樣品分為實驗室製備及市售茶包兩種，並比較蔬菜湯與糙米茶混合後其抗氧化性是否有相乘或相減的效果，實驗架構如圖

一所示，研究成果將可提供作為飲食保健之參考。



圖一、實驗架構

## 參、研究設備及器材

### 一、 實驗樣品

市售蔬菜湯茶包與市售糙米茶茶包 (購自台灣捷美利食品廠)。紅蘿蔔、白蘿蔔、白蘿蔔葉、香菇、牛蒡及糙米等購自傳統市場。

### 二、 血液來源

由台中捐血中心提供。

### 三、 實驗藥品

- (一)  $\alpha, \alpha$ -Diphenyl  $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH)
- (二) Peroxidase 過氧化酶
- (三) 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)
- (四)  $\beta$ -phycoerythrin  $\beta$ -藻紅素
- (五) Gallic acid 沒食子酸
- (六) Quercetin 槲固酮
- (七) Folin-Ciocalteu solution
- (八) Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 過氧化氫
- (九) 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)
- (十) Sodium carbonate 碳酸鈉
- (十一) Sodium nitrite 亞硝酸鈉
- (十二) Sodium hydroxide 氫氧化鈉
- (十三) 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox)
- (十四) Aluminum chloride 氯化鋁

上述藥品(一)~(六)購自美國 Sigma 公司；(七)~(十二) 購自日本 Wako 公司；(十三)~(十四)購自美國 Aldrich 化學公司。

### 四、 實驗器材：

- (一) 燒杯
- (二) 量筒
- (三) 試管

- (四) 加熱板
- (五) 磁石
- (六) 試管震盪攪拌器
- (七) 定量吸管
- (八) 濾紙 Whatman No. 2
- (九) 真空抽氣過濾幫浦
- (十) 減壓濃縮機(德國 BUCHI 公司出品)
- (十一) 冷凍乾燥機(美國 Labconco 公司出品)
- (十二) 微量天平
- (十三) 分光光度計 (U-3000,日本 Hitachi 公司出品)
- (十四) 桌上型離心機
- (十五) 高效能液相層析儀 (HPLC,日本 Hitachi 公司出品)

## 肆、 研究過程或方法

### 一、 樣品製備：

- (一) 自製蔬菜湯：取新鮮香菇 21.6 g、紅蘿蔔 100 g、白蘿蔔 200 g、蘿蔔葉 100 g 及牛蒡 100 g，經洗淨、瀝乾及切碎，加入 1.5 L 去離子水，於 100°C 下恆溫萃取 2 小時（立石和，1997），所得之萃取液經 Whatman #2 濾紙過濾，濾液經減壓濃縮、冷凍乾燥，秤重，保存於-20°C 下備用。
- (二) 市售蔬菜湯茶包：取六包市售之蔬菜湯茶包，放入 1.2 L 去離子水，於 100 °C 下恆溫萃取 30 分鐘，所得之萃取液經 Whatman #2 濾紙過濾，濾液經減壓濃縮、冷凍乾燥，秤重，保存於 -20°C 下備用。
- (三) 市售糙米茶茶包：取六包市售之糙米茶茶包，放入 1.2L 的去離子水，於 100 °C 下熬煮 30 分鐘，經 4°C、3000 rpm 離心 10 分鐘，所得之萃取液經 Whatman #2 濾紙過濾，濾液經減壓濃縮、冷凍乾燥，秤重，保存於 -20°C 下備用。
- (四) 自製紅蘿蔔湯：取新鮮紅蘿蔔 100 g，經洗淨、瀝乾及切碎，加入 1 L 去離子水，於 100°C 下熬煮 30 分鐘，所得之萃取液經 Whatman #2 濾紙過濾，濾

液經減壓濃縮、冷凍乾燥，秤重，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  下備用。

- (五) 自製白蘿蔔湯：取新鮮白蘿蔔 200 g，經洗淨、瀝乾及切碎，加入 2L 去離子水，於  $100^{\circ}\text{C}$  下熬煮 30 分鐘，所得之萃取液經 Whatman #2 濾紙過濾，濾液經減壓濃縮、冷凍乾燥，秤重，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  下備用。
- (六) 自製蘿蔔葉湯：取新鮮蘿蔔葉 100 g，經洗淨、瀝乾及切碎，加入 1L 去離子水，於  $100^{\circ}\text{C}$  下熬煮 30 分鐘，所得之萃取液經 Whatman #2 濾紙過濾，濾液經減壓濃縮、冷凍乾燥，秤重，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  下備用。
- (七) 自製牛蒡湯：取新鮮牛蒡 100 g，經洗淨、瀝乾及切碎，加入 1L 去離子水，於  $100^{\circ}\text{C}$  下熬煮 30 分鐘，所得之萃取液經 Whatman #2 濾紙過濾，濾液經減壓濃縮、冷凍乾燥，秤重，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  下備用。
- (八) 自製香菇湯：取新鮮香菇 21.6 g，經洗淨、瀝乾及切碎，加入 1L 去離子水，於  $100^{\circ}\text{C}$  下熬煮 30 分鐘，所得之萃取液經 Whatman #2 濾紙過濾，濾液經減壓濃縮、冷凍乾燥，秤重，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  下備用。

## 二、 $\alpha, \alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基清除能力之測定

依 Parejo 等(2003)之方法。取 4 mL 蔬菜乾燥物溶液 ( $200 \mu\text{g/ml}$ )，加入新鮮配製 1 mM DPPH 之甲醇溶液 1 mL，混合均勻靜置 30 分鐘後，以分光光度計測其 517nm 之吸光值。吸光值越低表示其清除能力愈強。

## 三、 總抗氧化能力之測定 (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC)

依 Arnao (1996) 等之方法並做修飾。將 0.25 mL peroxidase ( $4.4 \text{ U/mL}$ )、0.25 mL 2,2-azino-bis[3-ethyl- benzthiazoline- 6-sulfonic acid] (ABTS,  $100 \mu\text{M}$ )、0.25 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $50 \mu\text{M}$ ) 以及 1.5 mL 去離子水混合均勻，反應 10 分鐘產生安定藍綠色之  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  陽離子自由基後，加入不同濃度之蔬菜湯水萃取物反應 10 分鐘，測 734 nm 吸光值。另外，以不同濃度的 Trolox 清除  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  陽離子自由基之能力作一清除率標準曲線，測樣品清除  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  陽離子自由基的能力，以 Trolox 濃度 (mM) 來表示。

#### 四、 蔬菜湯與糙米茶水萃取物抑制 AAPH 誘導人類紅血球細胞溶血之效應

本實驗參考 Hseu 等 (2002) 之方法。取人體新鮮靜脈血，以等體積磷酸緩衝液 (phosphate buffer saline, pH 7.4) 稀釋，經 1500 rpm 離心 10 分鐘沈澱紅血球，並重複上述步驟清洗細胞三次。將收集之紅血球以含 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  Penicillin-Streptomycin solution 之 PBS 調整成 5% 血比容，並與蔬菜湯及糙米茶水萃取物於 37°C 預培養 30 分鐘，最後加入 AAPH (50 mM) 於 37°C 反應 4 小時誘導紅血球完全溶血。取 2 mL 紅血球反應液於 3000 rpm 離心 2 分鐘，取上清液偵測 540 nm 吸光值。

#### 五、 總多酚化合物含量之測定

根據 Simonetti 等 (1997) 的方法，標準品 (gallic acid) 及試驗樣品分別以 0.3% HCl 酸化的 methanol/water (60:40, v/v) 溶液溶解至一定的濃度。各取 100  $\mu\text{L}$  加入 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2mL) 放置 2 分鐘後再加入 2ml 50% Folin-Ciocalteu reagent 混合均勻，在室溫下放置 30 分鐘，於 750nm 下測定吸光值。以沒食子酸 (gallic acid) 的標準曲線來計算樣品總酚類化合物的含量。

#### 六、 總類黃酮含量之測定

參考 Jia 等 (1999) 的方法並加以修飾。取 1 mL 之 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的試驗樣品，依序加入 5.7 mL 去離子水及 0.1 M  $\text{NaNO}_2$  (0.3 mL) 反應 5 分鐘後，再加入 0.1 M  $\text{AlCl}_3$  (3 mL) 並反應 6 分鐘，振盪混合均勻後，取出 2 mL 反應液，加入 2 mL 1 N NaOH，測試 510 nm 之吸光值。以槲固酮 (quercetin) 的標準曲線來計算樣品類黃酮化合物的含量。

#### 七、 蔬菜湯及糙米茶水萃取物酚酸化合物之分析與定量

參考 Hakkinen 等(1999)的方法。先將待測樣品乾燥粉末以去離子水定量成 10 mg/mL，經 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後。再以 HPLC 進行分析定量，並與類黃酮及酚酸標準品 quercetin、kaempferol、naringenin、rutin、resveratrol、protocatechuic acid、gallic acid、caffeic

acid、catechin、epicatechin、*p*-hydroxybenzoic acid、*p*-coumaric acid、syringic acid、chlorogenic acid 及 ferulic acid 以光二極體列陣光譜偵測器 (photo-diode array detector) 確認化合物，並以此化合物吸收波峰(peak)之相對滯留時間 (retention time, RT) 及 UV-Vis 光譜分析與標準品比對，而以 caffeic acid 及 quercetin 作標準曲線進行定量，其線性函數分別為  $Y = 5253404.3 X - 4811128.5$  ( $r^2 = 0.978$ ) 及  $Y = 808871.3 X - 447701$  ( $r^2 = 0.987$ )。

HPLC 的分析條件：

管 柱：LiChrospher RP-18(250×10 mm, 5 $\mu$ m), 德國 E. Merck Co.

移動相：A : 50 mM ammonium dihydrogen phosphate (pH 2.6)

B : 0.2 mM ortho-phosphoric acid (pH 1.5)

C : 20 % A solution in 80 % acetonitrile

流 速：1 ml/min, at ambient temperature

偵測器：L-3000 photo-diode array detector ; 260, 280, 320, 340 nm 梯 度：

0-10 分鐘，A 液由 100 % 降至 92 %，C 液由 0 % 升至 8 %

10.1-80 分鐘，B 液由 92 % 降至 20 %，C 液由 8 % 升至 80 %

## 伍、研究結果

### 一、蔬菜湯與糙米茶之萃取率

蔬菜湯與糙米茶經沸水萃取，其萃取率如表一所示。自製蔬菜湯之萃取率高於市售之茶包，可見新鮮製備之蔬菜湯可萃取出較多的成分。蔬菜湯個別組成中，以牛蒡之萃取率最高，每 100g 可獲得 15.6g，而白蘿蔔葉最低僅 2.48g。

### 二、蔬菜湯與糙米茶水萃取物抗氧化性之測定

圖二為蔬菜湯、糙米茶及其混合物 (以下簡稱 MIX) 清除 DPPH 自由基之能力，結果顯示，各種試驗樣品清除 DPPH 自由基之能力依序為糙米茶 > MIX > 蔬菜湯，但市售蔬菜湯及自製蔬菜湯在此系統下效果並無明顯差異。此外，四種樣品在系統濃度為 20-100  $\mu$ g/mL 時可看出有差異性存在，但較高濃度 (> 100  $\mu$ g/mL) 時，其對 DPPH 自由基清除能力並無隨濃度增加而增加的趨勢。此實驗可知糙米茶在高濃度時，清除率可達 55%。

圖三為蔬菜湯各成分清除 DPPH 自由基的能力，於 200  $\mu$ g/mL 時，其清除能力的大小為：白蘿蔔葉 > 香菇 > 牛蒡 > 白蘿蔔 > 紅蘿蔔。其中白蘿蔔葉在最高濃度時清除效果可達 74%，且在各濃度效果均明顯高於其他四種蔬菜，紅蘿蔔在此系統中則無好的清除效果。

表二為蔬菜湯與糙米茶水萃取物之總抗氧化力，在此系統中，總抗氧化力：MIX > 糙米茶 > 自製蔬菜湯 = 市售蔬菜湯；白蘿蔔葉 > 牛蒡 > 香菇 > 白蘿蔔 > 紅蘿蔔。其中白蘿蔔葉的總抗氧化力高出其他四種蔬菜許多，甚至高於 MIX。

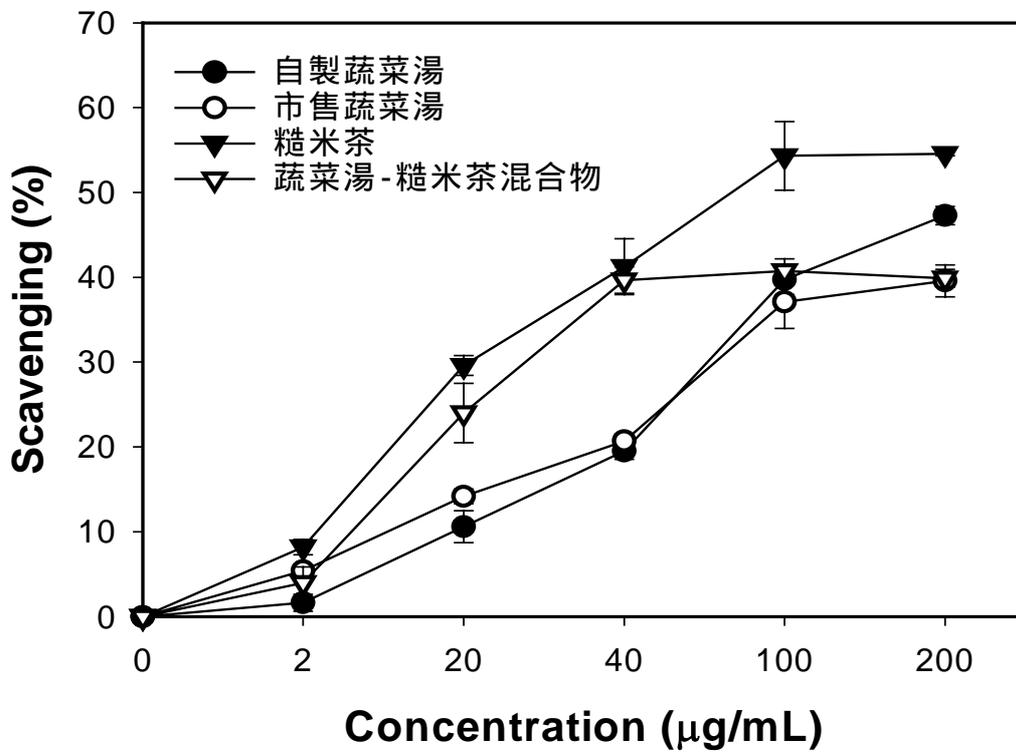
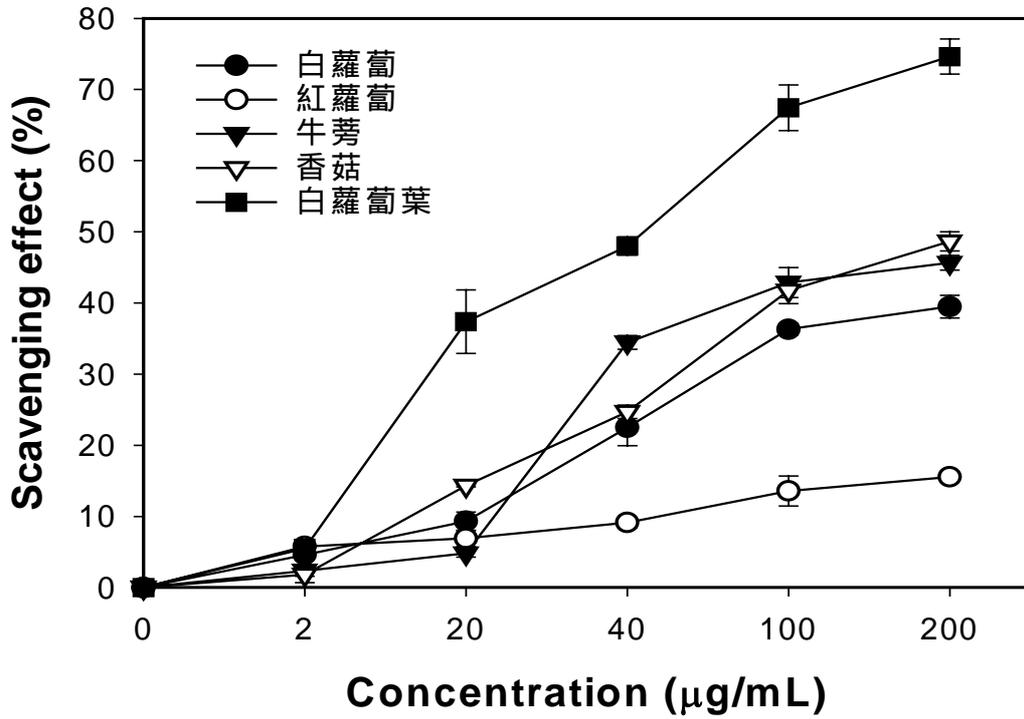
圖四為蔬菜湯與糙米茶水萃物對 AAPH 誘導人類紅血球細胞溶血之抑制效應。結果顯示，自製蔬菜湯具顯著之抑制效果，其溶血抑制率可達 85%，然而市售蔬菜湯樣品卻僅有 27% 之抑制率，顯示兩者間必定含有不同之抗氧化成分組成。蔬菜湯中之五種組成成分除牛蒡效果偏低外，其餘四種蔬菜之抑制率均高於市售蔬菜湯與糙米茶。此外，MIX 亦高於市售蔬菜湯與糙米茶之水萃取物。

表 一、蔬菜湯與糙米茶之萃取率

樣品*	萃取率 (%)
<b>蔬菜湯</b>	
自製	4.55
市售	3.78
<b>蔬菜湯成分</b>	
白蘿蔔	3.55
紅蘿蔔	6.97
牛蒡	15.6
香菇	3.75
白蘿蔔葉	2.48
<b>糙米茶</b>	1.28

\* 取 100 克樣品於沸水中萃取，萃取液經過濾及冷凍乾燥後儲存於 -20°C 備用。

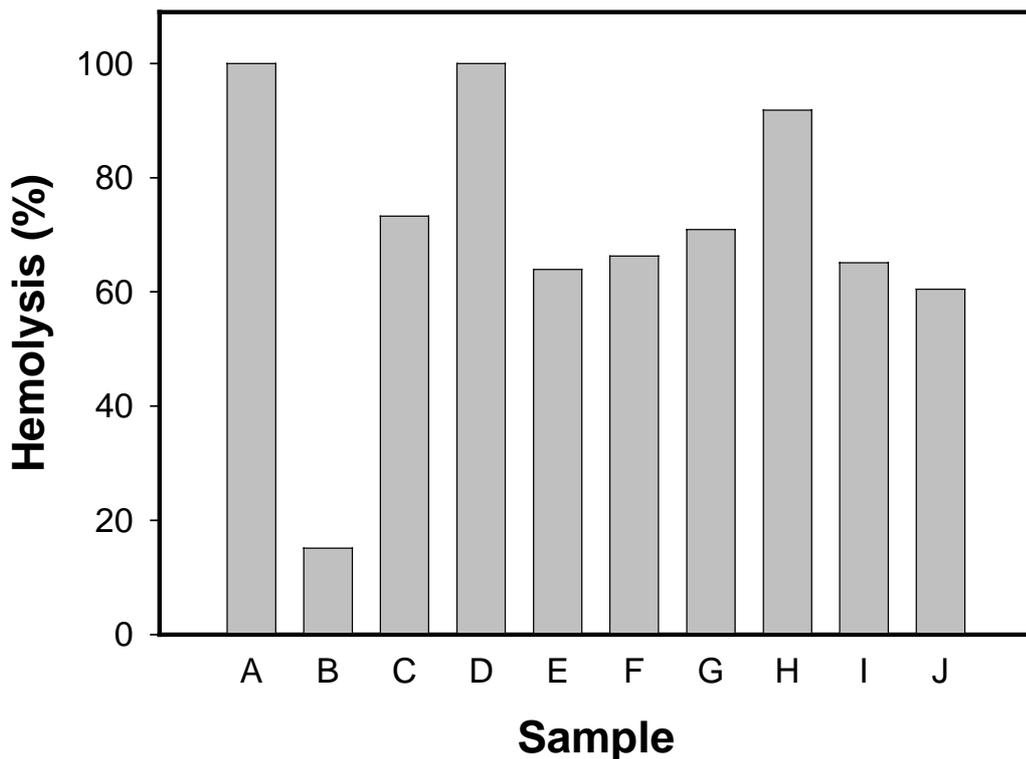
圖二、蔬菜湯、糙米茶及其混合物之DPPH自由基清除效應



圖三、蔬菜湯個別組成之DPPH自由基清除效應

表 二、蔬菜湯與糙米茶水萃取物之總抗氧化

樣品 (500 µg/mL)	Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, mM)
<b>蔬菜湯</b>	
自製	0.045 ± 0.001
市售	0.043 ± 0.001
<b>糙米茶</b>	0.063 ± 0.001
<b>市售蔬菜湯、糙米茶混合物</b>	0.073 ± 0.001
<b>蔬菜湯個別組成</b>	
紅蘿蔔	0.032 ± 0.002
白蘿蔔	0.035 ± 0.005
牛蒡	0.041 ± 0.002
香菇	0.040 ± 0.002
白蘿蔔葉	0.089 ± 0.001



- |   |          |   |       |   |       |   |     |
|---|----------|---|-------|---|-------|---|-----|
| A | AAPH 對照組 | B | 自製蔬菜湯 | C | 市售蔬菜湯 | D | 糙米茶 |
| E | MIX      | F | 紅蘿蔔   | G | 白蘿蔔   | H | 牛蒡  |
| I | 香菇       | J | 白蘿蔔葉  |   |       |   |     |

圖 四、蔬菜湯、糙米茶水萃取物對 AAPH 自由基誘導人類紅血球細胞溶血之抑制效應

### 三、蔬菜湯與糙米茶水萃取物中之總多酚類及類黃酮含量分析

表三為蔬菜湯與糙米茶水萃取物中抗氧化物之分析。結果顯示，白蘿蔔葉是所有樣品中總多酚化合物含量第二多者，僅次於自製蔬菜湯，紅蘿蔔及白蘿蔔的含量則皆不高。總多酚含量：自製蔬菜湯 > 市售蔬菜湯 > 糙米茶。蔬菜湯個別組成中之總多酚含量依序為：白蘿蔔葉 > 香菇 > 牛蒡 > 白蘿蔔 > 紅蘿蔔。類黃酮含量則分別為：自製蔬菜湯 > 市售蔬菜湯 > 糙米茶，類黃酮含量多寡相似於其總多酚化合物含量趨勢；而蔬菜湯個別組成中類黃酮含量為白蘿蔔葉最多，牛蒡次之，其後之順序分別為香菇、紅蘿蔔與白蘿蔔。

#### 四、蔬菜湯與糙米茶水萃取物之多酚類化合物高效能液相層析圖譜

由以上結果得知，蔬菜湯、糙米茶與白蘿蔔葉水萃取物具有較佳之抗氧化性，且含有豐富之總多酚類及類黃酮成分，因此本實驗乃進一步針對上述三種水萃取物進行多酚類組成之高效能液相層析 (HPLC) 分析，結果如圖五至圖八所示。圖五為十五種多酚類之標準品 HPLC 圖譜及其波峰滯留時間 (retention time, RT)，經全波長掃描及 RT 時間比對，可發現自製蔬菜湯水萃取物之多酚類組成含有沒食子酸 (gallic acid)、綠原酸 (chlorogenic acid)、原兒茶酸 (protocatechulic acid) 及阿魏酸 (ferulic acid) (圖六)。白蘿蔔葉則含有綠原酸 (chlorogenic acid) (圖七)。至於糙米茶則含有顯著之沒食子酸 (gallic acid) (圖八)。

表 三、蔬菜湯與糙米茶水萃取物中抗氧化物之分析

樣品	總多酚含量 (mg/g)	類黃酮含量 (mg/g)
自製蔬菜湯	72.4	7.7
市售蔬菜湯	64.5	6.2
糙米茶	54.5	4.1
<b>蔬菜湯個別組成</b>		
白蘿蔔	44.2	1.4
紅蘿蔔	41.3	1.5
牛蒡	50.0	10.8

---

香菇

68.2

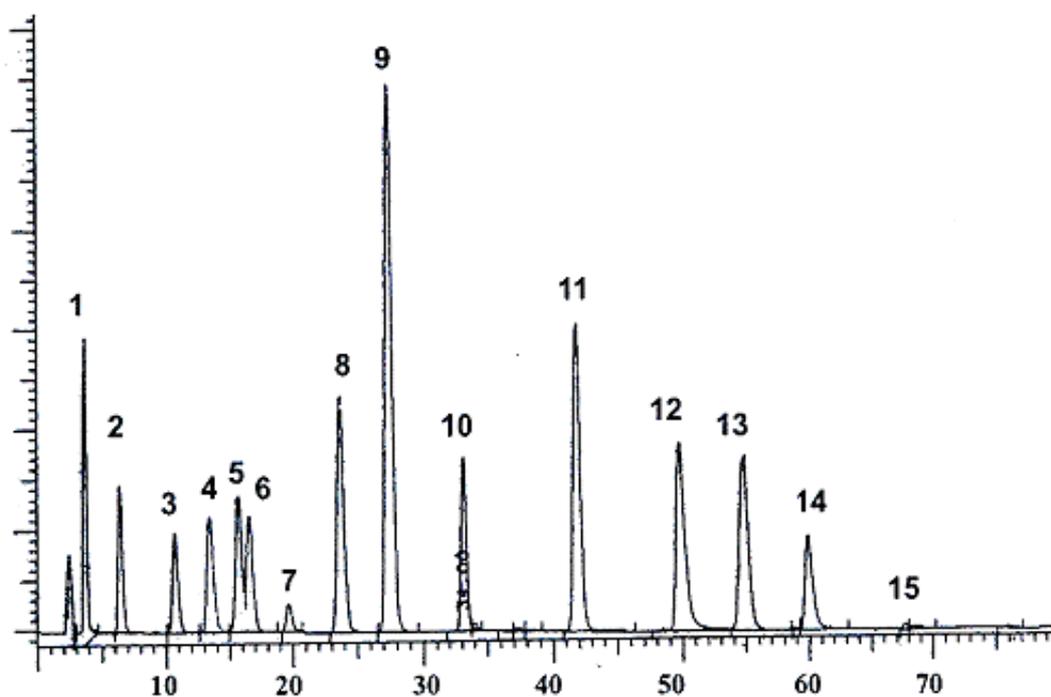
4.2

白蘿蔔葉

71.1

19.3

---



圖五、多酚類化合物標準品之高效能液相層析圖

1=gallic acid

2=protocatechuic acid

3=*p*-hydroxybenzoic acid

4=catechin

5=chlorogenic acid

6=caffeic acid

7=syringic acid

8=epicatechin

9=*p*-coumaric acid

10=ferulic acid

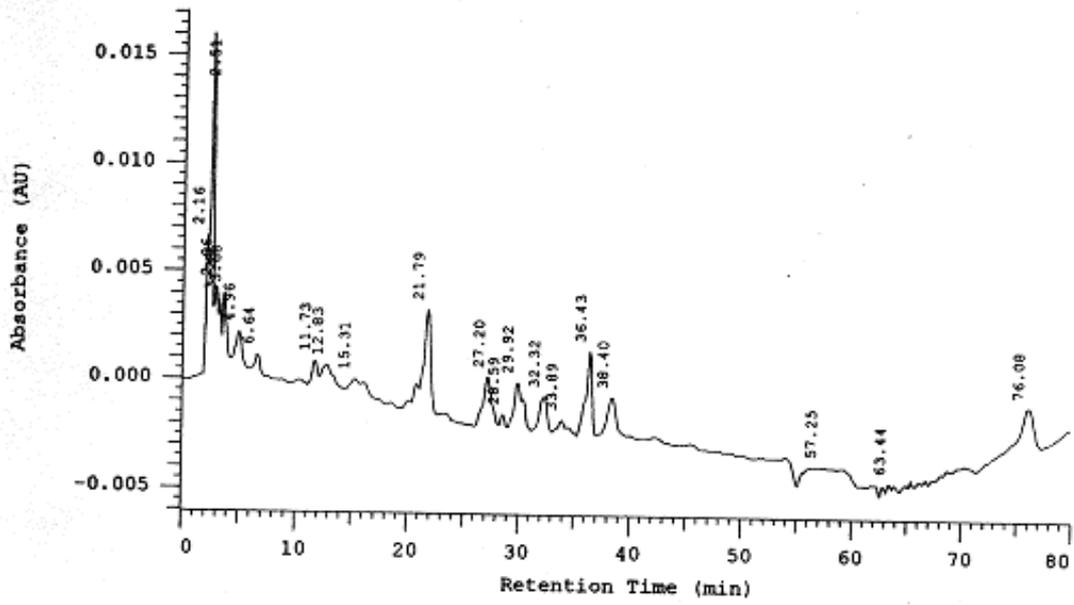
11=rutin

12=quercetin

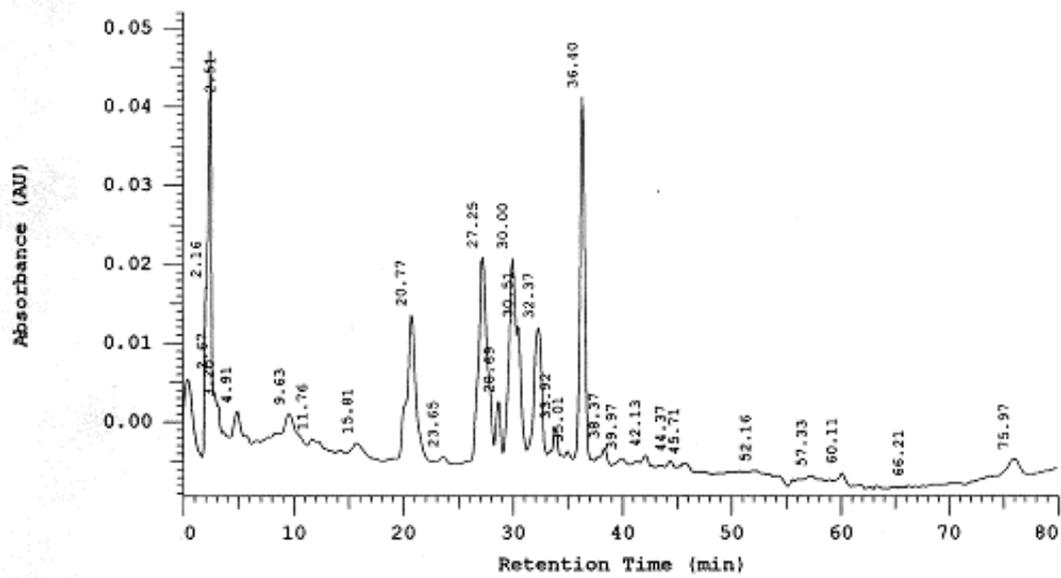
13=naringenin

14=kaempferol

15=resveratrol



圖六、自製蔬菜湯之高效能液相層析圖



圖七、白蘿蔔葉之高效能液相層析圖



複雜，我們決定對其個別成分進行抗氧化性之研究，以探討其對蔬菜湯整體抗氧化性之貢獻。在此系統中，白蘿蔔葉效果特別好，紅蘿蔔則特別差。Cao 等 (1996) 指出蔬菜具有不錯的清除過氧化自由基( peroxy radical) 及氫氧自由基 (hydroxyl radical) 的能力，故若能從蔬菜中多攝取天然的抗氧化物，應能抵抗體內抗氧化壓力 (oxidative stress) 的形成。由於抗氧化物之極性 (易受色素影響)、離子狀態、立體空間障礙及酵素抑制活性，均會影響其清除自由基的能力及抗氧化性 (Salah et al., 1995)。因此不同的蔬菜水萃取物在不同的模式系統，對自由基之清除能力可能會受到限制，進而影響抗氧化表現。

## (二) 總抗氧化能力之測定 (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC)

本試驗方法以 peroxidase/ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系統來誘導 ABTS 產生藍綠色的 ABTS<sup>·+</sup> 陽離子自由基，若是測試樣品使藍綠色脫色程度越明顯，表示樣品抗氧化效果越好，以此評估樣品總抗氧化力 (Re et al., 1999)，並以 Trolox 來作為評估的標準，計算出樣品清除 ABTS<sup>·+</sup> 的能力相當於多少 mM 濃度的 Trolox 清除 ABTS<sup>·+</sup> 的能力，此即為樣品的 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)。Trolox 是一種結構類似維他命 E 的水溶性抗氧化劑，許多研究皆已證實其具有良好之抗氧化力，因此為評估未知樣品抗氧化力之標準依據。

在本試驗中，樣品之 TEAC 值反應其於水相系統中清除 ABTS<sup>·+</sup> 陽離子自由基的能力表現，由結果得知，糙米茶之 TEAC 值高於蔬菜湯，總抗氧化力表現較佳。在蔬菜湯方面，自製的蔬菜湯優於市售的樣品，且蔬菜湯個別組成中又以白蘿蔔葉之 TEAC 值最高。Vinson (1998) 指出，蔬菜中富含多酚類等抗氧化物質，但這些物質在萃取過程中極易流失，因此，該因素或許為蔬菜湯水萃取物總抗氧化力表現低於糙米茶的原因之一。

## (三) 蔬菜湯與糙米茶水萃取物抑制 AAPH 誘導人類紅血球細胞溶血之效應

AAPH 為一種穩定之自由基，可誘發紅血球細胞溶血。本試驗乃將紅血球與蔬菜湯或糙米茶水萃取物預培養 30 分鐘後，再以 AAPH 誘發溶血反應，若實驗樣品具有清除 AAPH 自由基的效果，便可保護紅血球細胞膜免於遭受氧化裂解之溶血效應。

在此系統中，以自製蔬菜湯之抗溶血效應最佳，顯著高於糙米茶、市售蔬菜湯或其他個別組成。儘管自製蔬菜湯與市售樣品有相似之組成，但由本試驗結果得知，市售蔬菜湯之溶血抑制活性卻遠低於自製樣品，其原因可能為自製蔬菜湯為新鮮材料製備而成，相較於市售茶包內容物之較長時間乾燥儲藏，可保存較多之抗氧化物質，此結果由表三之抗氧化物分析中亦能得到相關的驗證。

綜合以上三項實驗結果，在 DPPH 自由基清除能力之測定及總抗氧化能力之測定系統中，糙米茶之效果均佳於兩種蔬菜湯，但是在抑制 AAPH 誘導人類紅血球細胞溶血之系統中，兩種蔬菜湯之抑制率均比糙米茶高，糙米茶為何僅在此系統中看不出效果，推測可能與其成分在上述三項分析系統之作用機制不同有關。DPPH 為評估一抗氧化物之供氫能力強弱，而 TEAC 為反應樣品是否具清除  $ABTS \cdot^+$  陽離子自由基之特性，至於 AAPH 誘導紅血球細胞膜脂質過氧化之溶血效應，則為探討真核細胞環境中，樣品是否具清除過氧化自由基 (peroxyl radical) 與提升相關細胞抗氧化防禦酵素系統的綜合表現。是以，蔬菜湯及糙米茶水萃取物於不同分析系統中之不同抗氧化性表現，乃取決於該樣品本身具有之抗氧化特質。

此外，本實驗亦探討自製蔬菜湯與糙米茶等比例混合物之抗氧化性表現，結果顯示，糙米茶與蔬菜湯混合後對其抗氧化性表現並無明顯相乘效果。

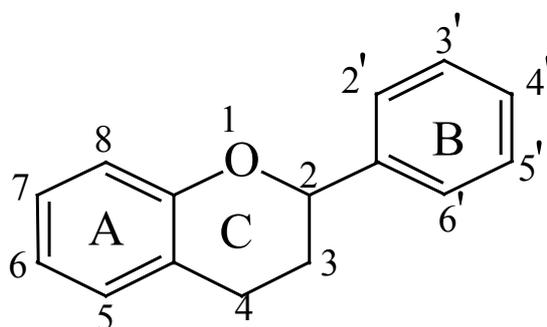
## 二、 蔬菜湯與糙米茶水萃取物中抗氧化物含量之測定

一般而言，植物中提供抗氧化能力的化合物或單體可分成下列幾種：多酚類化合物 (polyphenolic compounds)、類黃酮 (flavonoids)、維生素 (vitamins)、類胡蘿蔔素 (carotenoids) 單寧 (tannins) 和微量元素 (minerals) 等物質，能提供不同機制之抗氧化能力 (Jacob and Burri, 1996)，而多酚類及類黃酮化合物為植物化學成分 (phytochemicals) 中的主要成分，其具有抗氧化性、抗致突變性、抗發炎性及抗腫瘤性等，能抑制動脈硬化及癌症等疾病 (Ness and Powles, 1997; Meng et al., 1999)，故可用來預防疾病 (Weisburger, 2000)。這些物質的存在是由於植物終日暴露在可見光、紫外線及輻射的照射下，其對於活性氧及氧毒性 (oxygen toxicity) 的傷害特別敏感，因此植物組織中的成分便需扮演對抗氧自由基及激態分子 (excited molecules) 的角色，以防止組織受到傷害。這些物質的抗氧化作用，有的是能直接清除自由基或活性氧，有的是可以鉗合金屬，有的是可促使生物體本身的抗氧化防禦系統提高或恢復功能，有的是構成抗氧化成分所必須

的物質。由於抗氧化物的含量會影響到抗氧化的效果及特性，而它們的含量則會因為植物種類不同而有所差異，因此在本實驗中分別測定蔬菜湯與糙米茶水萃取物中總多酚化合物及類黃酮之含量，以進一步了解這些物質對其抗氧化能力之影響。

#### (一) 總多酚及類黃酮化合物含量之測定

近年來學者專家提出植物中除了維生素 C、E 及類胡蘿蔔素外，多酚類或類黃酮化合物對於抗氧化性與其生物活性亦扮演著相當重要之角色 (Castelluccio et al., 1995)。流行病學研究顯示，攝取高量的多酚化合物有助於降低癌症及心血管疾病的發生率。一般來說，類黃酮是由三個環狀結構以 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 的形式所組成的化合物，基本結構如下：



Flavonoid basic structure

研究證實，多酚類化合物因可清除 OH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、O<sub>2</sub><sup>-</sup>、HOCl 等活性氧及螯合金屬離子 (Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>) (Lotito and Fraga, 1998) 等，因而具有良好之抗氧化性 (Yang et al, 2001)。Moller 等(1999)及 Vinson 等(1998)指出，樣品中總多酚化合物含量的多寡與其抗氧化性有密切的相關。因此在探討植物性水萃取物抗氧化性的同時，分析其多酚類 (酚酸及類黃酮化合物等) 含量的多寡與組成，在闡明不同樣品間抗氧化力之差異上，必定有其正面的意義。

此外，由化學上觀點，多酚類為一種具有氧化還原性質之結構，若在酚類的苯環上存有拉電子之基團，則其抗氧化的能力較差，若在鄰位或對位位置上有釋放電子基之結構，則抗氧化能力較佳 (Lotito and Fraga, 1998)。另一方面，若抗氧化劑的苯環上具有對位或鄰位雙羥基，其抗氧化能力會比在間位位置來的好。

由本研究結果 (表三)，可進一步推測樣品中總多酚化合物及類黃酮含量對其抗氧化力之貢獻。蔬菜湯或糙米茶水萃取物分別含有不同比例之類黃酮化合物，自製蔬菜湯之總多酚及類黃酮化合物含量均大於市售蔬菜湯，可能與自製蔬菜湯之抗氧化力較佳有關。五種蔬菜湯個別組成中，以白蘿蔔葉含量最高，每克水萃取物含 19.3 毫克的類黃酮，此應為其在各系統中呈現較佳抗氧化力的原因。同理，紅蘿蔔及白

蘿蔔總多酚化合物及類黃酮之含量均偏低，亦與其抗氧化能力較低之結果相呼應。研究顯示，紅蘿蔔中之主要抗氧化成分為胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)，但本實驗為模擬一般民眾熱水沖泡茶包的飲用方式，因此應無法將脂溶性之類胡蘿蔔素有效萃取出來，此或許與其在 DPPH 自由基之清除系統中效果較差的現象有關，但並不表示紅蘿蔔缺少具有抗氧化性之物質。此外值得注意的是，糙米茶總多酚及類黃酮化合物含量均偏低，但在 DPPH 及 TEAC 系統中卻有良好的抗氧化效果，我們推測其抗氧化力可能與酚類化合物之貢獻較無直接的相關。

## (二) 蔬菜湯與糙米茶水萃取物之多酚類化合物 HPLC 分析

為了進一步確定樣品中對抗氧化能力有貢獻的為哪一種酚酸或類黃酮，我們選取在抗氧化力測試系統中效果較佳的自製蔬菜湯、糙米茶及白蘿蔔葉進行高效能液相層析分析。層析的發展迄今已有 80 餘年的歷史，最初是利用在植物色素的分離，但並沒有引起當時科學家太多的注意，直到 30 年代才有薄層層析 (TLC) 及離子交換層析的存在，40 年代則有了分配 (partition) 層析，及濾紙 (paper) 層析，及氣相層析的發展，到 50 年代才發展出氣液相層析，真正的液相層析直到 60 年代中期才出現，但是其發展的速度卻非常驚人，不久即發展出高速液相層析，其目前發展的程度遠超過氣相層析，且仍舊以驚人的速度在進步中。目前高效能液相層析已成為應用最廣泛且最快速的分析方法之一。它可應用於有機化學、無機化學及一般的化學分析，甚至可以應用在生化方面，譬如酵素、蛋白質的分析，而且由於細小管柱的利用，使得高效能液相層析進入更微量的分析領域。

從表三的的實驗結果得知，自製蔬菜湯總多酚化合物含量很高，由其 HPLC 圖譜可比對出沒食子酸 (gallic acid)、綠原酸(chlorogenic acid)、原兒茶酸(protocatechuelic acid)與阿魏酸 (ferulic acid)；白蘿蔔葉可分析比對出綠原酸 (chlorogenic acid)，至於糙米茶則含有較高量之沒食子酸 (gallic acid)。然而，本實驗僅選定 15 種多酚類化合物，且 RT 範圍設定於 80 分鐘內，因此並不排除尚有其他較低極性酚類物質未被分析出來。

## 柒、結論

綜合本研究結果，糙米茶之抗氧化力高於自製及市售之蔬菜湯，糙米茶之抗氧化性應與其多酚類含量無明顯相關。蔬菜湯水萃取物之抗氧化特性主要應來自於白蘿蔔葉的貢獻，而自製蔬菜湯與市售樣品間總多酚類含量之差異，與其抗氧化力呈正相關。此外，蔬菜湯與糙米茶之等比例混合物在其抗氧化性的表現上並無明顯之相乘效果。蔬菜湯與糙米茶為目前市面上蔚為風行之保健食品，本實驗亦提供其可能之抗氧化特性，因此，我們平日可由日常飲食中多攝取蔬菜、五穀，補充多酚類化合物，以提高人體之抗氧化能力。

## 捌、參考資料及其他

楊寶旺，高中物質科學化學篇，龍騰文化事業股份有限公司，50-72，2003。

立石和，元祖蔬菜湯強健法，1997，世茂出版社。

Arnao, M. B., Cano, A., Hernandez-Ruiz, J., Garcia-Canovas, F. and Acosta, M. 1996. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Anal. Biochem.* 236(2): 255-261.

Cao, G., Sofic, E. and Prior, R. L. 1997. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3426-3431.

Castelluccio, C., Paganga, G., Melikian, N., Bolwell, G. P., Pridham, J., Sampson, J. and Rice-Evans, C. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.* 368(1): 188-192.

Hakkinen, S., Heinonen, M., Karenlampi, S., Mykkanen, H., Ruuskanen, J. and Torronm, R. 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food research international* 32: 345-353.

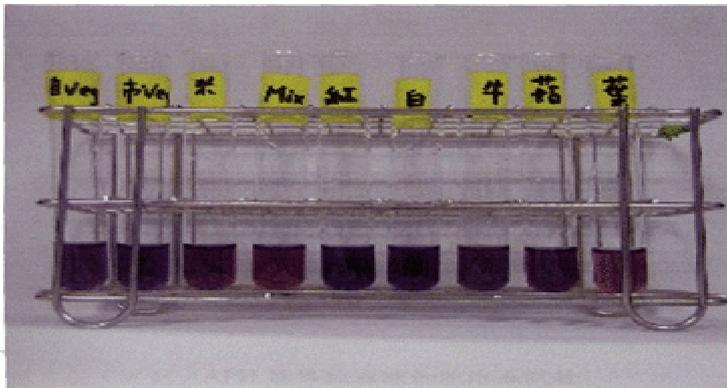
Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1996. *Free Radicals in Biology and Medicine*, eds. by B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge. Clarendon Press, Oxford.

Hseu, Y. C., Chang, W. C., Hseu, Y. T., Lee, C. Y., Yech, Y. J., Chen, P. C., Chen, J. Y. and Yang, H. L. 2002. Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Sci.* 71(4): 469-482.

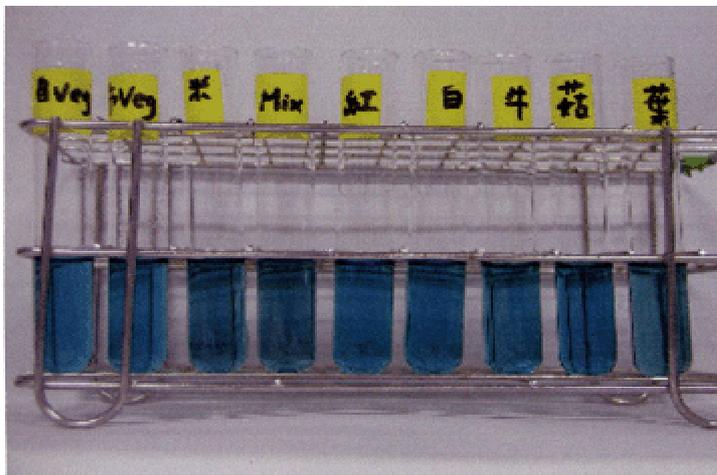
Jacob, R. A. and Burri, B. J. 1996. Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.* 63(6): 985S-990S.

- Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64 : 555-559.
- Lotito, S. B. and Fraga, C. G. 1998. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 24 : 435-441.
- Meng, Q. H., Lewis, P., Wahala, K., Adlercreutz, H. and Tikkanen, M. J. 1999. Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1438: 369-376.
- Moller, J. K. S., Madsen, H. L., Aaltonen, T. and Skibsted, L. H. 1999. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chem.* 64 : 215-219.
- Ness, A. R. and Powles, J. W. 1997. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease. *Int J Epidemiol.* 26: 1-13.
- Parejo, Irene; Viladomat, Francesc; Bastida, Jaume; Rosas-Romero, Alfredo and Saavedra, Gloria. 2003. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci.* 73(13): 1667-1681.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P. and Rice-Evans, C. A. 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 322 : 339-346.
- Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X. and Zubik, L. 1998. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3630-3634.
- Weisburger, J. H. 2000. Eat to live, not live to eat. 2000. *Nutrition* 16(9): 767-773.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T. and Newmark, H. L. 2001. *Annu Rev Nutr.* Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. 21: 381-406.

## 玖、附圖



照片一、DPPH 自由基清除效應



照片二、總抗氧化力試驗(TEAC)



照片三、抑制 AAPH 誘導紅血球細胞溶血試驗

## 評語

- 1 採用多種測試方法作交互確認，頗具科學精神。
- 2 團隊精神良好，能充分分工合作。
- 3 應思考能否用學校的基本設備去做觀察及驗證。
- 4 作品內容與學校現有教材的關聯性應再加強。