

抗氧化劑及常見之抗氧化 活性評估方法

臺北長庚紀念醫院中藥組藥師 沈馨仙、郭旻奇、張思平、鍾佳玲

林口長庚紀念醫院中醫藥劑部藥師 楊榮季

摘要

人體在正常代謝過程中會產生自由基 (free radical) 與活性氧，而自由基在人類所發生許多疾病的發展上，扮演重要的角色，換句話說，自由基所導致的氧化傷害對人體健康有相當大的影響。正常生理狀況下，自由基在身體中維持平衡狀態，不會對身體造成傷害，但當自由基不正常地累積時，就會使身體正常機能受到傷害並導致疾病，為了維持體內自由基的平衡，人體中有一套抗氧化系統幫助我們清除多餘的自由基，包含許多酶參與的酵素系統以及維他命C、E等相輔相成的作用，建構起人體的保護網。

目前常用於分析抗氧化活性的方法很多，本文簡要介紹了幾種評估方法，包括清除 xanthine / xanthine oxidase 所產生之超氧陰離子 (superoxide anion radical, O_2^-) 的作用、捕捉過氧化氫 (H_2O_2) 的能力測定、還原力測定、清除 DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 自由基能力測定、硫代巴比妥酸 (TBA) 法和生物化學發光法清除氧自由基能力評估等。

關鍵字：抗氧化物、自由基、超氧陰離子、antioxidant、free radical、superoxide anion radical

壹、前言

隨著醫學科技的昌明，許多傳染性疾病已被控制，但是在面對伴隨著年齡增長而來的慢性疾病與老化時，現代醫學仍然無法完全解釋這些現象的原因，更遑論控制或解決了。化學家早在1900年便發現自由基的存在，由於自由基具多變性，

其所引發的鏈鎖反應會造成人體極大的傷害，病理學家試圖去解開各種疾病的病因時，常發現自由基參與其中，而近年來更結合分子生物學、生物化學與臨床醫學的研究，陸續發現對抗自由基的物質，使自由基醫學的應用逐漸嶄露頭角。

貳、抗氧化物 (antioxidants) 之作用

抗氧化物是指能有效抑制或減緩自由基或自由基所產生之氧化鏈鎖反應之物質。在人體內有兩大抗氧化系統，一是抗氧化維生素系統，另一則是抗氧化酵素系統。

一、抗氧化維生素系統

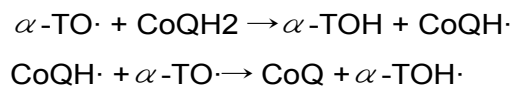
主要有類胡蘿蔔素 (β -carotene)、維他命 C、維他命 E、穀胱甘肽 (glutathione, GSH) 及輔酶Q10等。

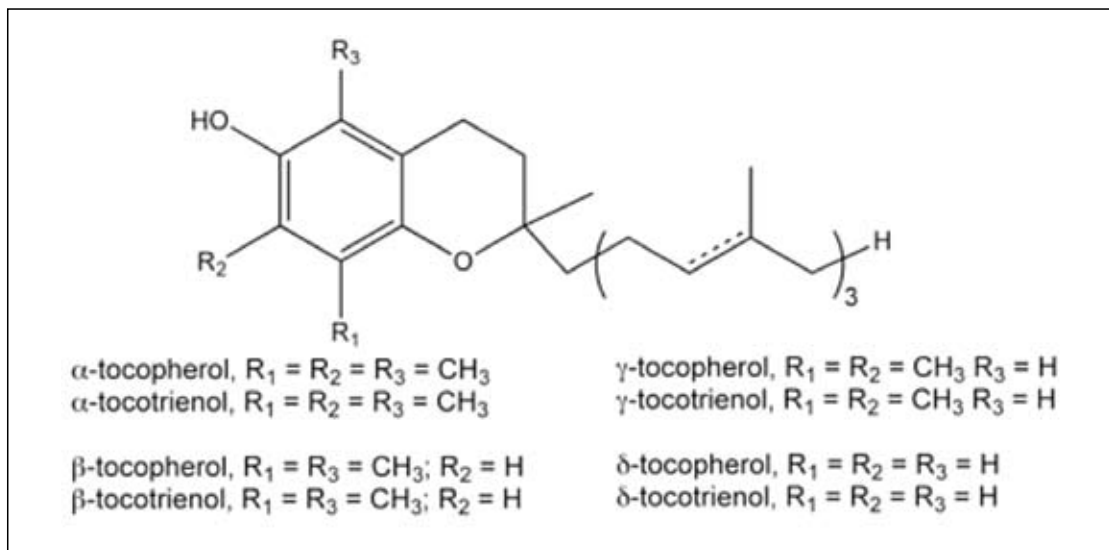
β -carotene是維生素A的前驅物，有很好的抗氧化性，能透過提供電子抑制活性氧的生成，達到清除自由基的目的，亦能清除單線態氧 (singlet oxygen, 1O_2)，減少光敏感作用¹。Vitamin C (ascorbate-抗壞血酸) 是一種簡單的六碳化合物，利用其分子上的OH·和自由基作用，其OH·會釋放出一個H⁺和一個電子，自由基得到電子後，成為較穩定的化合物，而維生素C上的OH·將變成O·，但由於其可產生共振，所以是能量較低，也較無破壞性的自由基。維他命C上有兩個羥基團可以和自由基反應，如果完全反應後，會變成更為穩定的氧化態，然後會被GSH-Px (glutathione peroxidase, 穀胱甘肽過氧化酶) 還原，一再循環重複利用；若單一羥基團參與反應的維他命C，則每兩個會產生自身氧化還原反應，一個會變成氧化型的維他命C，另一個則被還原成起初的維他命C，如此不停循環利用²。Vitamin E (tocopherol -生育酚) 包括 α 、 β 、 γ 、 δ - tocopherol及 α 、 β 、 γ 、 δ - tocotrienol八種異構體 (圖

一)，其中 α -tocopherol是已知生理活性最高的一種。Vit E可中和過氧化自由基 (ROO·)，使之變成ROOH，自己則變成tocopherol dimers (二價體生育醇) 或對苯三酮 (quinone)，結束ROO·的自由基鏈鎖反應，有效地抑制脂類過氧化作用，另外還能保護膜磷脂中的不飽和脂肪酸，穩定細胞膜結構，維持膜的正常功能³。

GSH是由穀胺酸 (glutamic acid)、半胱胺酸 (cysteine)、甘胺酸 (glycine) 組成的一帶有硫醇基 (-SH) 之三肽，富含於細胞質、核仁、粒線體中。它可以在GSH-Px的幫助下還原許多體內過氧化的有機分子，如：GSH會經GSH-Px，而被氧化成GSSG，同時將過氧化氫轉換成氧和水，之後氧化態的GSSG會再經由GSH reductase還原成GSH。不過GSH本身也可以不經酵素參與，直接當作一抗氧化劑與體內的自由基反應，產生GS·自由基，它可由其他抗氧化劑如維他命C還原成GSH或是由兩分子GS·自由基結合成GSSG，所以GSH也是人體中一種重要的抗氧化劑。

輔酶Q10 (ubiquinone) 是粒線體細胞呼吸傳遞鏈中不可或缺的電子轉運站，負責催化磷酸還原反應，讓細胞能量供應系統能夠快速恢復活化。輔酶Q10存在於體內各部位，其中以心臟、肝臟、腎臟及胰臟中最多，它的還原態 (ubiquinol)，有抗氧化的功能，可以清除自由基，也有助於維他命E的再生⁴，其反應機制如下：





圖一 Vitamin E之八種異構體

二、抗氧化酵素系統

主要有SOD (superoxide dismutase, 超氧化物歧化酶)、CAT (catalase, 過氧化氫酶)、GSH-Px等。先由SOD將超氧自由基轉化為過氧化氫，再由CAT及GSH-Px轉化成對人體無害的氧及水，其中內生性抗氧化物的作用模式，大都是利用金屬離子 (Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 等) 的價電子數改變來中和自由基電子，使用此方法可以有效的反覆利用體內的酵素⁵。

市面上所販售的抗氧化產品五花八門，抗氧化途徑也多種多樣，要怎麼選擇呢？一般人都會想，要用抗氧化能力最強的，但是卻忘了，適當的組合也是很重要的，不同的抗氧化劑能對抗不同的自由基，因此只選用一、兩種抗氧化劑是不周全的。如維他命E是脂溶性抗氧化劑，而維他命C是水溶性抗氧化劑，兩者對抗的自由基種類當然不一樣，要說維他命E抗

氧化能力是維他命C的幾百、幾千倍都沒問題，因為維他命C本來就無法對付維他命E能抵擋的自由基種類，同樣的維他命E也沒有維他命C有的能耐。因此，複方抗氧化產品必定是較單方抗氧化劑效果為佳，而且這樣的加成作用往往是很具經濟效益的。

目前國際流行用ORAC (oxygen radical absorption capacity, 氧自由基吸收能力) 來表示抗氧化能力，ORAC是以每100公克食物中所能吸收自由基的數量作為測量標準，所以我們可以說，ORAC值越高，則抑制自由基的抗氧化能力就越強。常見抗氧化劑的ORAC如下：維生素E-1350，維生素C-1890，魚油-1600，蜂膠-1800，銀杏葉提取物 (GBE) -2100，葡萄籽提取物 (OPC) -2200，歐洲藍莓提取物 (VMA) -2400等。FDA建議每人每天應從食物中攝取4000至6000 ORAC值，才

足以支援人體的抗氧化能力。故在選擇抗氧化產品時不應過於局限和單一，而應該是全面抗氧化，多種產品搭配使用，多種途徑多管齊下，才能達到最佳之抗氧化效果。

參、常見抗氧化活性的評估方法

抗氧化活性的評估方法隨著科學技術的發展和設備的更新而不斷的發展和改變。一些過程繁瑣，準確性不高的評估方法逐漸被淘汰，下面介紹一些常見的抗氧化活性評估方式。

一、清除xanthine/xanthine oxidase所產生之超氧陰離子的作用

以hypoxanthine與xanthine oxidase混合後，hypoxanthine會被xanthine oxidase轉變成uric acid，同時供給水溶液中的 O_2 分子一個電子產生superoxide (O_2^-)， O_2^- 進而與氧化型cytochrome C (Fe^{3+})反應，形成還原型cytochrome C (Fe^{2+})，後者於可見光550nm下可測的吸收值。由吸收值的變化即可推測 O_2^- 的濃度，此法稱為cytochrome C法。在實驗過程中，若加入不同濃度的抗氧化劑觀察其抑制吸收值的程度，即可推測抗氧化劑清除 O_2^- 之能力，進一步測定其IC50的濃度⁶。

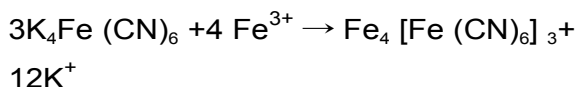
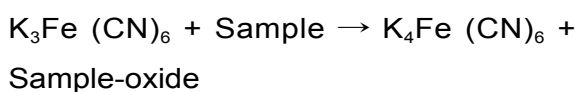
二、捕捉過氧化氫的能力測定

其原理為 H_2O_2 在230 nm波長時有最大吸光值，若與抗氧化劑反應時，其吸光值將會降低，因此其吸光值愈低，表示抗

氧化劑捕捉過氧化氫的能力愈強⁷。

三、還原力測定

抗氧化劑會將赤血鹽 ($K_3Fe(CN)_6$) 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，在700 nm波長測定吸光值，以檢測普魯士藍之生成量，作為抗氧化劑的還原力，吸光值愈高，表示抗氧化劑還原力愈強⁸。



四、清除DPPH (α, α -diphenyl- β -pricrylhydrazyl) 自由基能力測定

脂質在自行氧化的過程中會產生自由基而造成脂質酸敗，由抗氧化劑與DPPH自由基的反應式 ($DPPH\cdot + AH$ (抗氧化劑) $\rightarrow DPPH + HA\cdot$)，可知抗氧化劑在清除DPPH時會提供氫給DPPH 自由基，進而達到抑制氧化鏈鎖反應之進行。抗氧化的研究上，常使用DPPH來評估抗氧化物的供氫能力。DPPH之甲醇溶液在517 nm下有較強的吸光值，被抗氧化物還原時吸光值會降低，吸光值愈低，表示抗氧化物的供氫能力愈強⁹。

五、硫代巴比妥酸 (2-thiobarbituric acid, TBA) 法

不飽和脂肪酸linoleic acid或linolenic acid可被 $FeCl_2$ 氧化而產生過氧化脂質

(lipid peroxide)，過氧化脂質於加熱狀態下可被分解產生過氧化脂質代謝產物MDA，MDA在高溫下可與TBA試劑反應，形成紅色化合物，可在532 nm可見光下測定吸光度，此吸光度的強度與過氧化脂質的量成正比，此稱TBA法。實驗過程中加入抗氧化劑，由吸光度的減少程度，即可知其抑制脂質過氧化的作用。本實驗法可用tetramethoxypropane (TEP) 當標準品，作成標準曲線¹⁰。

TBA法是測量脂肪酸，細胞膜和生物組織脂質過氧化的最古老也是應用最多的方法。

六、生物化學發光法清除氧自由基能力評估

生物化學發光法測定氧自由基清除作用時，一定濃度範圍內發光強度 (CL) 與氧自由基數量呈量效關係。清除氧自由基的物質則可以降低CL，根據CL的下降則可以判斷某物質清除氧自由基的能力¹¹。流動注射化學發光技術具有靈敏度高、測定快速、操作簡單和重複性好等優點，因此常用於抗氧化活性藥物的篩選。

肆、結論

抗氧化劑目前在醫學界、預防醫學，甚至化妝品、食品等方面都已受到廣泛運用。我們可預測自由基清除物和避免自由基產生的物質將成為治療或預防疾病的新主流。抗氧化能力的分析技術很多，但其基本原理則大同小異，因抗氧化能力是許多抗氧化物質綜合反應的結果，所以抗氧

化能力的分析一般都是以待測樣品與指標抗氧化物質和自由基替代物混合反應後之結果來推算待測物之抗氧化能力，不同的分析方法是針對消除某特定自由基為標的或廣泛以消除數種自由基為標的之差別而已。因此，在比較抗氧化劑活性能力時要特別注意其完整性，如：在不同細胞內不同之抗氧化劑活性強度可能不盡相同；且不同之抗氧化劑清除不同自由基的效力也不見得一樣。所以抗氧化能力雖然是一種很好的指標，其分析方法也很多，但所代表的意義卻不盡相同，需視樣品的特性及其產生抗氧化能力的原因才能選擇出適合的分析方法。

參考資料：

1. Gerald F. Combs, JR.: The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health, 1992. Academic Press, inc. p181
2. Lester Packer, Jurgen Fuchs.: Vitamin C in Health and Disease, Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. Hong Kong 1997.
3. Lester Packer, Jurgen Fuchs.: Vitamin E in Health and Disease, Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. Hong Kong 1992.
4. Aruoma.: Ubiquinol-10 is an Effective Lipid-Soluble Antioxidant at Physiological Concentrations. Medical Sciences 1990; 87: 4879-4883.
5. John G. Scandalios: Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems, United States of America, Cold Spring Harbor Laboratory 1992.
6. McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase, An enzymic function for erythrocyte (hemo cuprein). J B C 1969; 244: 6049-6055.

7. 張明照：檸檬葉之抗氧化性。屏東科技大學食品科學系碩士論文1999。
8. 劉伯康、陳惠英、顏國欽：數種傳統食用植物甲醇萃取物抗氧化力之研究。中國農業化學會誌1999；37（1）：105-116。
9. 柳豔、李磊、趙鴻雁：丹酚酸B清除DPPH有機自由基活性及影響因素研究。時珍國醫國藥2006；17（12）：2406。
10. Nair V., Turner G.: The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation, structure of the adduct with malondialdehyde. Lipids 1984; 19(10): 804-805.
11. 王少敏、李萍、趙明強：生物化學發光法測定酸棗仁的抗氧化活性。中草藥2003；34（5）：417。

Evaluation Methods of Antioxidant Activity

Shin-Hsien Shen¹, Min-chi Kuo¹, Ssu-Ping Chang¹, Chia-Ling Chung¹, Rong-Chi Yang²

Department of Traditional Chinese Pharmacy, Chang Gung Memorial Hospital at Taipei, Taipei city, Taiwan¹

Department of Traditional Chinese Pharmacy, Chang Gung Memorial Hospital at Linkou, Taipei County, Taiwan²

Abstract

In the process of human metabolism, free radical and reactive oxygen arise normally. Free radicals play an important role in many human diseases development. In other words, oxidation induced by free radicals has high impact on human health. Under normal physiology, stable and balanced free radicals will do no harm to human body. However, abnormal accumulation of free radicals will affect regular human body functions and resulted in diseases. To keep free radicals in stability, an antioxidant system to remove excessive free radicals exists in human body. Along with the system composed of several enzymes and Vitamin C and E, all these interactions to build up the protection shield for human against diseases.

Currently, various methods are available for antioxidant activity evaluation. This article introduce following methods: scavenging of superoxide anion radical O_2^- caused by xanthine / xanthine oxidase, measurement of H_2O_2 captureability, restore ability, elimination of DPPH (α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) free radicals, TBA method and Biochemical luminescence.