

# 檸檬葉甲醇萃取物抗氧化性之研究

Studies on Antioxidative Activity of Methanol Extracts from Lemon (*Citrus limon* Burm.) Leaves

張明照<sup>1</sup> 王子慶<sup>2</sup> 劉碧鵬<sup>2</sup> 吳明昌<sup>1</sup> 張鴻民<sup>3</sup> 廖俊旺<sup>4</sup>

by

Ming-Chow Chang<sup>1</sup>, Tzu-Ching Wang<sup>2</sup>, Pi-Chuan Liu<sup>2</sup>, Ming-Chang Wu<sup>1</sup>, Hung-Min Chang<sup>3</sup> and Jiunn-Wang Liao<sup>4</sup>

關鍵字：冷凍乾燥檸檬老齡葉甲醇萃取物、自由基、抗氧化性

Key words: Methanol extracts from freeze-dried lemon elder age leaves (MEFDL), free radical, antioxidative activity

**摘要：**本文旨在研究檸檬葉甲醇萃取物之抗氧化特性，探討其於不同脂質過氧化系統中對脂質過氧化之抑制效果，並分析其所含有之主要抗氧化成分。結果顯示，以甲醇萃取檸檬葉比其它溶劑萃取者具有較高的萃取率，並以檸檬老齡葉之萃取率為最好，且所得檸檬葉萃取物的抗氧化活性最高，而冷凍乾燥檸檬葉甲醇萃取物(MEFDL)的抗氧化能力又比熱風乾燥者高。MEFDL 對  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl 自由基、超氧陰離子及過氧化氫之清除效果分別可達到 63.1、67.9 及 75.6%，亦具有甚高之還原力與螯合銅離子之能力。在不同催化因子所催化之脂質過氧化系統中，則會表現出不同程度之抗氧化性，並以在自氧化系統中有最佳之抗氧化性，且在各系統中，較高濃度下均會表現出較佳之脂質過氧化抑制效果。由主要抗氧化成分分析得知，MEFDL 含有抗壞血酸、 $\alpha$ -tocopherol、 $\beta$ -carotene 及總多酚類分別為 0.93、0.8、1.69 及 2.8mg/g。

## 前 言

油脂或富含脂質的食品很容易發生氧化，若氧化作用會嚴重地影響加工的效果，使加工產品發生酸敗(rancidity)，以及造成其他品質之劣變，如維他命的裂解、營養物質的流失與變色等(Sherwin, 1978)。脂質的氧化不僅會降低食品品質與營養價值，並且與老化、細胞膜損傷、心臟病、癌症等有密切的關係(Cosgrove et al., 1987)，添加抗氧化劑是最直接有效阻止油脂氧化的方法，抗氧化劑可以延長食品的儲存壽命(Labuza, 1971)。人工合成的抗氧化劑，如 butylated hydroxyanisole (BHA)與 butylated

1. 國立屏東科技大學食品科學系前研究生、教授。Former graduate student and professor (Corresponding author), respectively. Dept. of Food Science and Technology, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, ROC.

2. 鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員。Assistant Researcher, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Station, TARI, Fengshan, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

3. 國立台灣大學食品科技研究所教授。Professor, Graduate Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

4. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所副研究員。Associate Researcher, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute Council of Agriculture (TACTRI/COA).

5. 本文於民國 91 年 7 月 17 日收到。Data received for publication: June 11, 2003.

hydroxytoluene(BHT), 因強效與價廉的因素, 故被廣泛地使用在食品工業上, 但在動物試驗中發現 BHA 和 BHT 會導致肝臟受損(Imaida et al., 1983)與引起染色體變異(Phillip et al., 1989), 故它們的安全性使人質疑(Namiki, 1990; Duh et al., 1997)。另有文獻指出, 膳食中的抗氧化劑可以提供生物體對於過氧化傷害的保護和可能扮演著防癌及延長壽命的重要角色(Culter, 1984; Culter, 1992; Osawa et al., 1990)。

檸檬樹(*Citrus limon* Burm.)為常綠小喬木, 在本省南部地區種植甚多, 然以果實加工利用居多, 如果汁與乾燥檸檬片, 對檸檬葉之加工則付之闕如, 而檸檬葉片除可全年採收外, 其在藥理上亦具有許多生理功能, 如主治化痰止咳、理氣、開胃、治咳喘、腹脹、泄瀉等(李等, 1976), 並含有類黃酮、有機酸及香豆精類等, 如 quercetin、phloretin、umbelliferone、scopoletin 與 esculetin, 本研究擬探討檸檬葉片之抗氧化性, 建立基本資料, 並對開發新天然抗氧化劑提供良好素材。

## 材料與方法

### 一、材料與試藥

#### (一)檸檬葉

本實驗所用之檸檬葉, 採自屏東縣九如鄉檸檬果園, 依當地農民建議, 以最高葉片以下 3-5 葉為幼齡葉, 5-12 葉為中齡葉, 12 葉之後皆為老齡葉。檸檬葉採摘後分類、洗淨、乾燥, 熱風乾燥溫度 50°C, 時間 48 小時, 冷凍乾燥溫度為零下 50°C, 時間 1-2 天, 分別經熱風乾燥與冷凍乾燥後之樣品於 -20°C 凍藏備用。

#### (二)檸檬葉抗氧化物質之製備

取上述乾燥之檸檬葉加以粉碎, 再以 80mesh 篩網過篩, 各秤取 10 克粉末, 分別以甲醇、乙醚、丙酮、正己烷各 100mL 於 25°C 下震盪(150rpm)萃取 24 小時, 再以 Whatmen#1 濾紙分別過濾後於 40°C 下減壓濃縮至乾, 秤取所得到之萃取物, 裝入褐色的樣品瓶中, 儲存於 4°C 暗處備用。

#### (三)試藥

所使用之藥品包括 linoleic acid、 $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH)、Butylated hydroxyanisole(BHA)、butylated hydroxytoluene(BHT)、ascorbic acid、phenazine methosulfate(PMS)、dihyronicotinamide-adenine dinucleotide(NADH) 和 nitro blue tetrazolium(NBT)購自美國 Sigma 公司。 $\alpha$ -tocopherol、potassium dihydrogen phosphate、ammonium thiocyanate、iron(III) chloride hexahydrate、hydrogen peroxide 及 potassium ferricyanide 購自德國 E. Merck 公司。甲醇購自日本林純試藥公司。iron(II) chloride tetrahydrate、Ethyl alcohol、chloroform 購自德國 Riedel-deHaen 公司。

### 二、方法

#### (一)萃取率測定

萃取率之測定是取 10 克乾燥檸檬葉樣品, 計算以不同溶劑萃取後所得萃取物之重量, 除以萃取前之重量而得萃取率。

#### (二)抗氧化特性研究

##### 1. 清除 $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH) 自由基能力測定

樣品清除 DPPH 自由基能力之測定是參考 Shimada 等(1992)之方法, 配製 100-1000  $\mu$ g/mL 系列濃度的檸檬葉甲醇萃取物 4mL, 加入 1mL 新鮮配製的 0.2mM DPPH 甲醇溶液, 混和均勻, 室溫靜置 30 分鐘, 以分光光度計(U-2000 Spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan)測其 517nm 之吸光值, 若吸光值愈低, 表示測試樣品清除 DPPH 自由基之能力愈強。Scavenging effect of DPPH(%) =  $[1 - (\text{absorbance of sample at 517 nm} / \text{absorbance of control at 517 nm})] \times 100$ , 若 Scavenging effect (%) 值愈高, 表示測試樣品清除 DPPH 之能力愈強。

## 2. 清除超氧陰離子(superoxide anion, $O_2^{\cdot -}$ )能力測定

樣品清除超氧陰離子能力測定是參考 Robak 和 Gryglewski (1988)之方法, 以 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)配製 120  $\mu$ M 之 phenazinemetosulfate (PMS)、936  $\mu$ M 之 dihydronicotinamidadenin dinucleotide (NADH)及 300  $\mu$ M 之 nitro blue tetrazolium (NBT)。配製 100-1000  $\mu$ g/mL 系列濃度的檸檬葉甲醇萃取物 1mL 與 PMS·NADH 及 NBT 溶液, 等體積均勻混和, 室溫靜置 5 分鐘, 立即以分光光度計測其 560nm 之吸光值, 若吸光值愈低, 表示測試樣品清除超氧陰離子之能力愈強。Scavenging effect of superoxide anion(%)=[ 1-(absorbance of sample at 560 nm/absorbance of control at 560 nm) ] $\times$ 100, 若 Scavenging effect (%)值愈高, 表示測試樣品清除超氧陰離子之能力愈強。

## 3. 清除過氧化氫(hydrogen peroxide)能力測定

樣品清除過氧化氫能力測定是參考 Ruch 等(1989)之方法, 取 0.86g NaCl 加入 phosphate buffer ( $NaH_2PO_4$ - $Na_2HPO_4$ )調整 pH 為 7.4, 並定量至 100mL, 即為 0.85%的 phosphate buffered saline(PBS)溶液。取 0.023mL 之 30% $H_2O_2$ , 以上述 PBS 定量至 100mL, 使  $H_2O_2$ 之最終濃度為 2mM。取 0.6mL 含  $H_2O_2$ 的 PBS 溶液, 並添加 100-1000  $\mu$ g/2mL 系列濃度的檸檬葉甲醇萃取物 2mL, 室溫靜置 10 分鐘, 立即以分光光度計測其 230nm 之吸光值, 再除以  $81M^{-1}cm^{-1}$ 之過氧化氫莫耳吸光係數(Molar extinction coefficient)即為過氧化氫最終濃度(Beers and Sizer, 1952), 若吸光值愈低, 表示測試樣品清除過氧化氫之能力愈強。Scavenging effect of hydrogen peroxide(%)=[ 1-(absorbance of sample at 230 nm/absorbance of control at 230 nm) ] $\times$ 100, 若 Scavenging effect (%)值愈高, 表示測試樣品清除過氧化氫之能力愈強。

## 4. 還原力(Reducing power)測定

樣品還原力測定是參考 Oyaizu (1986)之方法, 取 5mL 之檸檬葉甲醇萃取液(濃度 0-1mg/5mL), 加入 5mL 的 0.2M 磷酸緩衝溶液(pH6.0)及 5mL 1% potassium ferricyanide 於 50°C 水浴 20 分鐘後快速冷卻加入 5mL 10% trichloro acetic acid, 離心(3000rpm) 10 分鐘, 取上層液 5mL 並加入 5mL 蒸餾水及 1mL 0.1% ferric chloride, 混和均勻, 10 分鐘後, 測定 700nm 波長之吸光值, 若吸光值愈高, 表示測試樣品還原力愈強。

## 5. 螯合亞鐵離子或銅離子能力測定

樣品螯合亞鐵離子或銅離子能力之測定是參考 Shimada 等(1992)之方法, 取 2mL 之檸檬葉甲醇萃取液(濃度 0-100  $\mu$ g/2mL), 加入 2mL 10mM 之 hexamine buffer、10mM 之 potassium chloride(pH5.0)及 3mM 之 ferrous sulfate(或 copper sulfate)混合液 2mL, 然後加入 1mM 之 tetramethyl murexide 混合液 0.2mL, 於室溫下反應 3min, 立即以分光光度計測 480nm 波長之吸光值, 並以 citric acid 及 EDTA 為對照組, 若吸光值愈低, 表示測試樣品螯合金屬離子之能力愈強。

### (三)檸檬葉甲醇萃取物於不同脂質氧化系統中抗氧化性探討

#### 1. 於 $O_2$ 催化之 linoleic acid 自氧化系統中之抗氧化性

檸檬葉甲醇萃取物抗氧化性之測定是參考 Mitsuda 等(1966)之硫氰偵測法(thiocyanate method), 取 2.5ml、0.02M 之 linoleic acid emulsion, 各加入 1 mg 之檸檬葉甲醇萃取物以及 2mL、0.2M potassium phosphate buffer(pH 7.0), 混和均勻, 於 37°C 保溫培養, 於第 24 小時移出, 取混和液 0.1mL, 分別依序加入 4.7mL、75%乙醇溶液, 0.1mL、30% ammonium thiocyanate 及 0.1mL、0.02M iron(II) chloride tetrahydrate 溶液, 振盪使其混和均勻, 靜置 3 分鐘, 以分光光度計測其 500nm 之吸光值, 若吸光值愈低, 表示測試樣品抗氧化之能力愈強。該自氧化系統下之脂質過氧化抑制率計算如下: Inhibition of peroxidation(%)=[ 1-(absorbance of sample at 500nm)/(absorbance of control at 500nm) ] $\times$ 100, 若該值愈高, 表示測試樣品之抗氧化性愈強。

#### 2. 於 $FeCl_2/H_2O_2$ 催化之 linoleic acid 脂質過氧化系統中之抗氧化性

在 5mL 磷酸緩衝液(0.2M, pH 7.4)中,含有 0.1M 之 linoleic acid emulsion 溶液以及 0.4mM 的  $\text{FeCl}_2$  與  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 分別加入 100-1000  $\mu\text{g/mL}$  系列濃度的檸檬葉甲醇萃取物, 整個系統於 37°C 反應 24 小時後, 加入 1mL BHT(20mg/mL)終止反應, 再加入 1mL TBA(1%)以及 1mL HCl (10%), 混和均勻, 於 100°C 水浴 30 分鐘, 冰浴冷卻後, 加入 5mL 氯仿, 於 4000rpm 離心 20 分鐘, 取上清液測其 532nm 之吸光值, 若吸光值愈低, 表示測試樣品之抗氧化性愈強。該催化系統下之脂質過氧化抑制率計算如下:  $\text{Inhibition of peroxidation}(\%) = [1 - (\text{absorbance of sample at } 532\text{nm}) / (\text{absorbance of control at } 532\text{nm})] \times 100$ , 若該值愈高, 表示測試樣品之抗氧化性愈強。

### 3. 於 $\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ascorbic acid}$ 催化之 linoleic acid 脂質過氧化系統中之抗氧化性

在 5mL 磷酸緩衝液(0.2M, pH 7.4)中,含有 0.1M 之 linoleic acid emulsion 溶液以及 0.4mM 的  $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、與 ascorbic acid, 分別加入 100-1000  $\mu\text{g/mL}$  系列濃度的檸檬葉甲醇萃取物。整個反應系統如上述 2. 之方法進行反應、呈色及計算。

### 4. 於 $\text{FeCl}_2$ 催化之 linoleic acid 脂質過氧化系統中之抗氧化性

在 5mL 磷酸緩衝液(0.2M, pH 7.4)中,含有 0.1M 之 linoleic acid emulsion 溶液以及 0.4mM 的  $\text{FeCl}_2$ , 分別加入 100-1000  $\mu\text{g/mL}$  系列濃度的檸檬葉甲醇萃取物。整個反應系統如上述 2. 之方法進行反應、呈色及計算。

### 5. 於 $\text{FeCl}_3$ 催化之 linoleic acid 脂質過氧化系統中之抗氧化性

在 5mL 磷酸緩衝液(0.2M, pH 7.4), 含有 0.1M 之 linoleic acid emulsion 溶液以及 0.4mM 的  $\text{FeCl}_3$ , 分別加入 100-1000  $\mu\text{g/mL}$  系列濃度的檸檬葉甲醇萃取物。整個反應系統如上述 2. 之方法進行反應、呈色及計算。

## (四)檸檬葉甲醇萃取物抗氧化成分分析

### 1. 抗壞血酸(ascorbic acid, Vitamin C)

參考 Wilson 及 Shaw(1987)方法, 秤取 100mg 檸檬葉甲醇萃取物, 以 5% 偏磷酸溶解定量至 50mL, 加入 50mL 氯仿, 震盪 3min, 於 2°C 下離心(1000rpm)15min, 以 0.45  $\mu\text{m}$  過濾上清液, 取 20  $\mu\text{L}$  注入 HPLC 分析之, 並與抗壞血酸之標準曲線對照, 計算出樣品中抗壞血酸之含量。HPLC 分析條件為, 管柱: Lichrospher RP-18(250 $\times$ 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 移動相: 以偏磷酸調整 pH 2.8 之 2%( $\text{NH}_4$ ) $\text{H}_2\text{PO}_4$  buffer, 流速: 0.5mL/min, 偵測器: UV-Vis detector(偵測波長 254 nm)。

### 2. 生育醇( $\alpha$ -tocopherol)

參考 Carpenter(1979)之方法, 秤取 20mg 檸檬葉甲醇萃取物於 250mL 皂化瓶, 另取 5mL 標準品同時操作, 加入 0.8g 沒食子酸混和均勻, 加入 10mL 蒸餾水混和溶解, 再加入 7.5% 氫氧化鉀乙醇溶液 40mL, 於 100°C 皂化迴流 30min, 取出冷卻至室溫, 移入分液漏斗中以 0.2% 二丁基氨基甲苯之正己烷溶液萃取三次, 合併正己烷層, 並以蒸餾水沖洗至中性, 於 40°C 下水浴減壓濃縮至乾, 以 10mL 正己烷溶解並以 0.45  $\mu\text{m}$  濾紙過濾後, 取 20  $\mu\text{L}$  注入 HPLC 分析之。HPLC 分析條件為, 管柱: Lichrospher RP-18, 移動相: 甲醇:水=95:5(v/v), 流速: 1.0 mL/min, 偵測器: UV-Vis detector(偵測波長 295nm)。

### 3. $\beta$ -胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)

參考 Kitada 等(1989)之方法, 取 20 mg 檸檬葉甲醇萃取物, 加入含 1% pyrogallol 的 methanol-dichloromethane (1:1) 溶劑萃取, 過濾後定量至 10mL, 再以 0.45  $\mu\text{m}$  濾紙過濾後以 HPLC 分析之。HPLC 分析條件為, 管柱: Lichrospher RP-18, 移動相: acetone:methanol:acetonitrile=1:2:2(v/v/v), 流速: 0.7mL/min, 偵測器: UV-Vis detector(偵測波長 470nm)。

### 4. 總多酚類化合物(total phenol)

參考 Taga 等(1984)之方法, 秤取 20mg 檸檬葉甲醇萃取物分別以 0.3% HCl 酸化之

methanol/water(60:40, v/v)溶液溶解至一定濃度。取  $100 \mu\text{L}$  加入  $1 \text{ mL}$  2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，混和均勻，於室溫下放置 30 分鐘，以分光光度計測其  $750\text{nm}$  之吸光值，並與 gallic acid 之標準曲線對照，計算樣品總多酚含量。

#### (五)統計分析

本試驗測定數均為三重複，所得數據使用 Statistical Analysis System(SAS)軟體進行統計分析，以 ANOVA 程序作變異分析，並以 Duncan's Multiple Range tests 作顯著差異性之比較。

## 結果與討論

### 一、不同溶劑萃取對檸檬葉萃取率之影響

將經過冷凍乾燥或熱風乾燥的檸檬葉，分別各以甲醇、乙醚、丙酮、正己烷四種溶劑萃取後，發現不論是冷凍乾燥或熱風乾燥者均以甲醇萃取率最高，均約在 12.5% 左右，其他三種溶劑萃取率則均低於 2% (數據未列出)，由於甲醇是四種溶液中極性最大者，故檸檬葉甲醇萃取物成分應屬極性物質，而在萃取率方面亦以甲醇萃取者較高，此與 Coppen 等(1983)所述由於甲醇極性較大，具較佳的萃取率，因此常作為抗氧化物質之萃取溶媒的論點相符合。

### 二、不同乾燥方式及不同溶劑萃取之檸檬葉萃取物抗氧化活性比較

本研究以硫氰偵測法分別測定不同葉齡或以不同溶劑萃取冷凍乾燥或熱風乾燥檸檬老齡葉所得萃取物之抗氧化性，由圖 1 中可看出檸檬老齡葉之甲醇萃取物的抗氧化性較佳，由圖 2 可知同為冷凍或熱風乾燥者，其甲醇萃取物的抗氧化性會比以其它三種溶劑萃取者的抗氧化性高，此結果也再一次印證前述 Coppen 等(1983)所說的甲醇具有較大的極性，對主要抗氧化性物質較具萃取效果之論點。其中，冷凍乾燥檸檬老齡葉甲醇萃取物 (Methanol extracts from freeze-dried lemon elder age leaves, MEFDL) 在 linoleic acid 自氧化系統中之抗氧化性最佳(圖 2)，正己烷萃取物抗氧化性最低，推測其可能原因為檸檬葉中非極性成分或揮發性抗氧化物質在熱風乾燥過程中大量損失與降解。經由上述初步結果，因此本研究後續之試驗均以經冷凍乾燥或熱風乾燥後之檸檬老齡葉甲醇萃取物為研究對象。

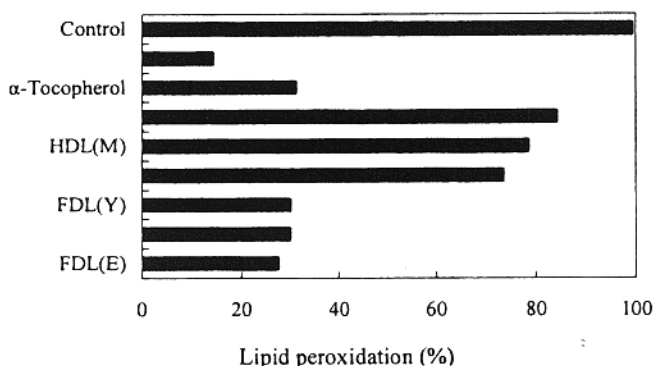


圖 1. 不同葉齡之冷凍乾燥和熱風乾燥檸檬葉甲醇萃取物、BHA 與  $\alpha$ -tocopherol 於 linoleic acid 自氧化系統中之抗氧化性

Fig.1. Antioxidative activity of methanol extracts from freeze-dried or hot air-dried lemon leaves for different leaf age, BHA  $\alpha$ -tocopherol in the linoleic acid autoxidation system as measured by the thiocyanate method. FDL: freeze-dried lemon leaves. HDL: hot air-dried lemon leaves. E: elder age. M: middle age. Y: young age.

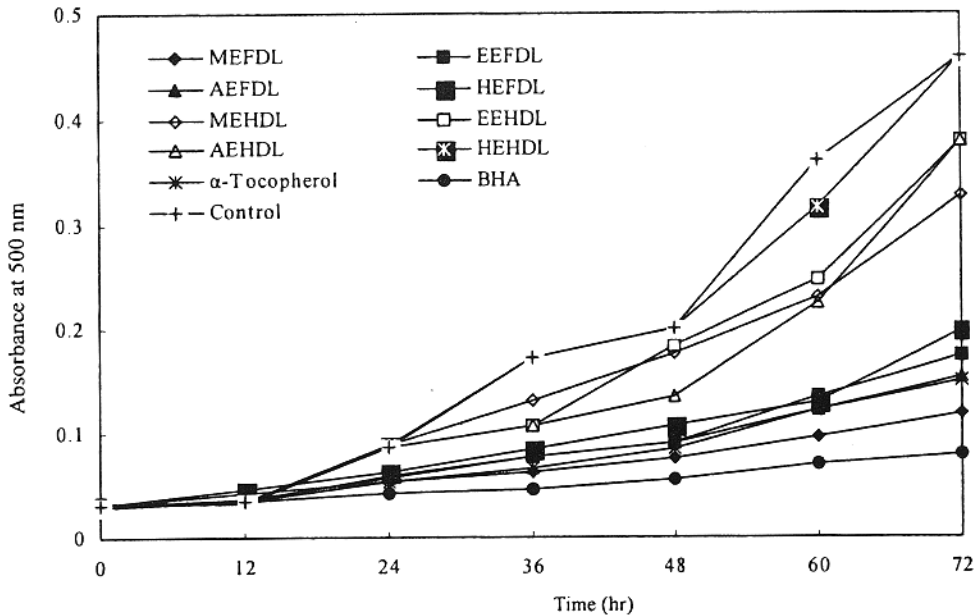


圖 2. 不同溶劑萃取之冷凍乾燥及熱風乾燥檸檬老齡葉萃取物、BHA 與  $\alpha$ -tocopherol 於 linoleic acid 自氧化系統中之抗氧化性

Fig.2. Antioxidative activity of various solvent extracts from freeze-dried or hot air-dried lemon elder age leaves, BHA  $\alpha$ -tocopherol in the linoleic acid autoxidation system as measured by the thiocyanate method. MEFDL, EEFDL, AEFDL, and HEFDL were the methanol, ethylether, acetone, and n-hexane extracts of freeze-dried lemon elder age leaves, respectively. MEHDL, EEHDL, AEHDL, and HEHDL were the methanol, ethylether, acetone, and n-hexane extracts of hot air-dried lemon elder age leaves, respectively.

### 三、檸檬老齡葉甲醇萃取物之抗氧化特性

#### (一)清除 DPPH 自由基能力

前人研究指出，植物終日曝露在可見光、紫外線及輻射之照射下，其對活性氧(reactive oxygen)及氧毒性(oxygen toxicity)特別敏感，並因此而產生各種不同形式之抗氧化物質，其中即包括類葉黃酮與葉綠素衍生物(chlorophyll derivatives) (Larson, 1988; Tsuda et al., 1994)，由於本試驗萃取物是得自檸檬葉片，因此推測亦含有該類物質，而葉綠素有四種形式，並以 chlorophyll a 之抗氧化性最佳，其在黑暗中抑制黃豆油氧化之效果，甚至比 BHT 還好，該抗氧化作用可能是藉由提供氫原子來清除過氧化自由基而抑制脂質過氧化(Endo et al., 1984)。MEFDL 與熱風乾燥檸檬老齡葉甲醇萃取物(Methanol extracts from hot air-dried lemon elder age leaves, MEHDL)清除 DPPH 自由基之能力均會隨濃度之提高而增強其清除效果(圖 3)，當濃度為  $1000 \mu\text{g}/4\text{mL}$  時，MEFDL 之清除效果可達到 63.1%，略低於  $\alpha$ -tocopherol 之 72%，但遠高於 MEHDL 之 43.7%。本試驗之檸檬葉甲醇萃取物可能即含有部份葉綠素或其衍生物，並於其後之抗氧化試驗中提供了部分的抗氧化能力，此外，推測後述檸檬葉所含有之抗氧化物質亦對清除 DPPH 自由基有所貢獻。

#### (二)清除超氧陰離子能力

超氧陰離子(superoxide anion)不但具有氧化還原之能力，更可繼續反應而生成如氫氧自由基(hydroxyl radical)、單重態氧(single oxygen)及過氧化氫(hydrogen peroxide)等強氧化活性分子，諸如此類之強氧化活性分子，在脂質過氧化之啓始反應與連鎖反應之過程中，扮演極其重要之角色(Okamoto et al., 1992)。MEFDL 與 MEHDL 清除超氧陰離子之能力均會隨濃度之提高而增強其清除效果(圖 4)，

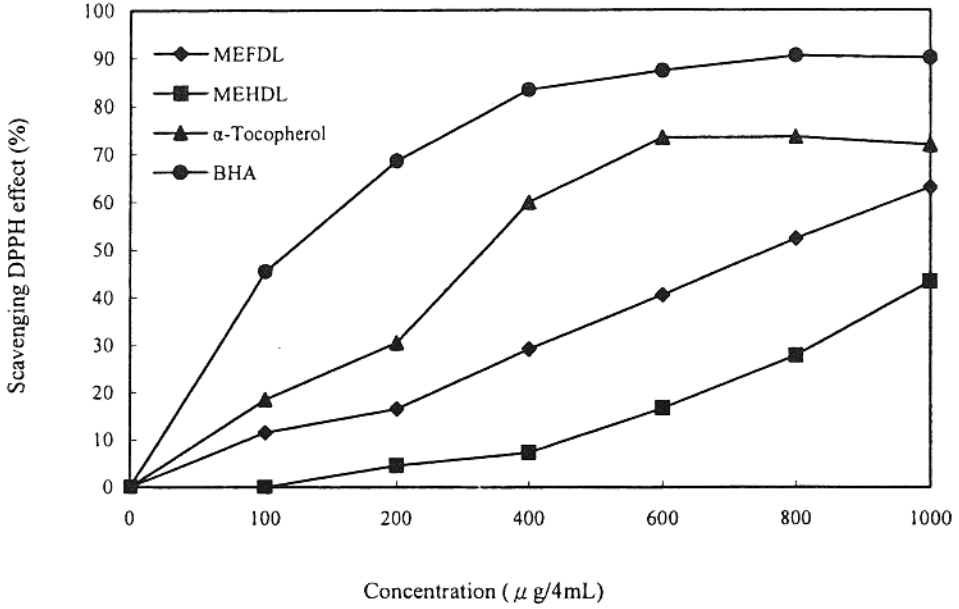


圖 3. 冷凍乾燥及熱風乾燥檸檬老齡葉甲醇萃取物對 DPPH 自由基清除之能力

Fig.3. Scavenging effect of methanol extracts from freeze-dried or hot air-dried lemon elder age leaves on  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical.

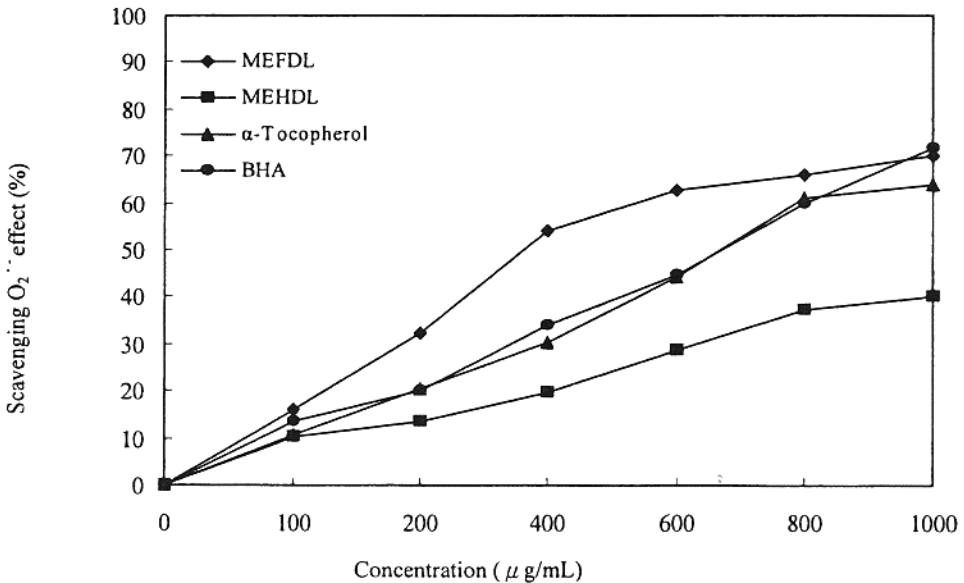


圖 4. 冷凍乾燥及熱風乾燥檸檬老齡葉甲醇萃取物對超氧陰離子清除之能力

Fig.4. Scavenging effect of methanol extracts from freeze-dried or hot air-dried lemon elder age leaves on superoxide anion.

以 MEFDL 之增強趨勢較明顯，且 MEFDL 清除效果甚至高於 BHA 與  $\alpha$ -tocopherol 者。清除超氧陰離子之能力和多酚類之含量有關，若多酚類含量越高，則清除超氧陰離子之能力越強(Sato et al., 1996)，此外，如 quercetin 等類黃酮化合物，亦能有效清除超氧陰離子(Hanasaki et al., 1994)，檸檬葉中亦含有該類質(李等, 1976)，而檸檬葉甲醇萃取物具有甚高之超氧陰離子清除能力，可能與含有該酚類物質有關。

### (三)清除過氧化氫能力

過氧化氫對脂質氧化之連鎖反應作用雖不大，但其會與亞鐵離子反應，產生氫氧自由基，而加速脂質之氧化作用(Namiki, 1990)。MEFDL 與 MEHDL 清除過氧化氫之能力均會隨濃度之提高而增強其對過氧化氫之清除效果(圖 5)，並以 MEFDL 比 MEHDL 之效果為佳，當濃度為 1000  $\mu$ g/mL 時，MEFDL 之清除效果可達到 75.6%，比 BHA 之 61.1%或  $\alpha$ -tocopherol 之 43%高，而 MEHDL 則僅有 21.8%之清除效果。由於檸檬葉甲醇萃取物具有清除過氧化氫之能力，因此，其對抑制脂質的氧化作用亦具有一定程度之貢獻。

### (四)還原力

在某些植物中，還原力對其抗氧化性有一定程度之貢獻(Philosoph-Hadas et al., 1994)，植物中所含之還原物質如 kaempferol 及 glutathione 等亦可明顯抑制細胞因活性氧所造成之老化現象(Meir et al., 1995)，Pitotti 等(1995)亦指出抗氧化力之強弱與所含之還原酮(reductone)有關。雖然，抗氧化性和還原力之表現有關(Yamaguchi et al., 1988)，但是，抗氧化性之高低並不完全決定於還原力之大小，而是各種抗氧化能力之綜合表現來決定，譬如，對活性氧之清除能力或對金屬離子之螯合作用等。MEFDL 與 MEHDL 之還原能力亦均會隨濃度之提高而增強之(圖 6)，但仍以 MEFDL 比 MEHDL 之效果為佳，MEFDL 之還原力雖低於 BHA 但高於  $\alpha$ -tocopherol。

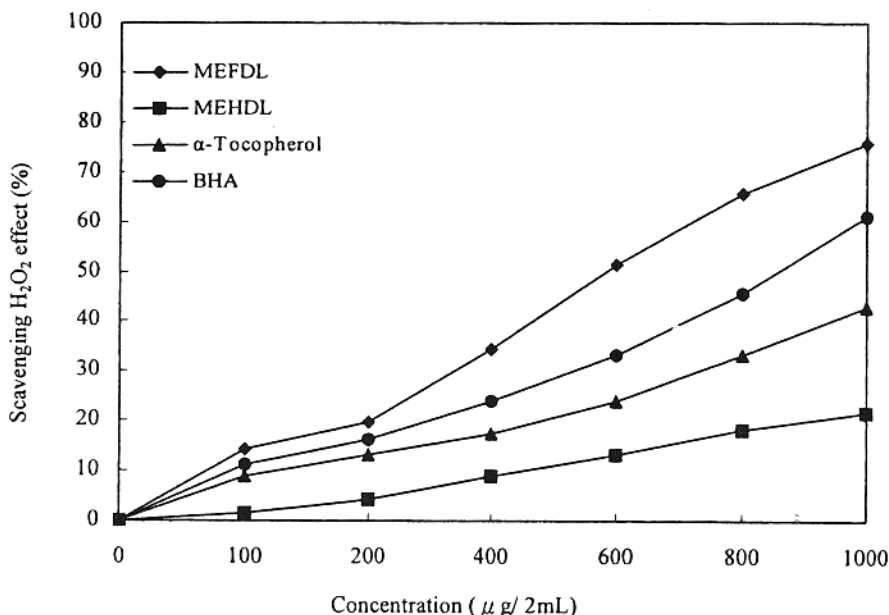


圖 5. 冷凍乾燥及熱風乾燥檸檬老齡葉甲醇萃取物對過氧化氫清除之能力

Fig.5. Scavenging effect of methanol extracts from freeze-dried or hot air-dried lemon elder age leaves on hydrogen peroxide.

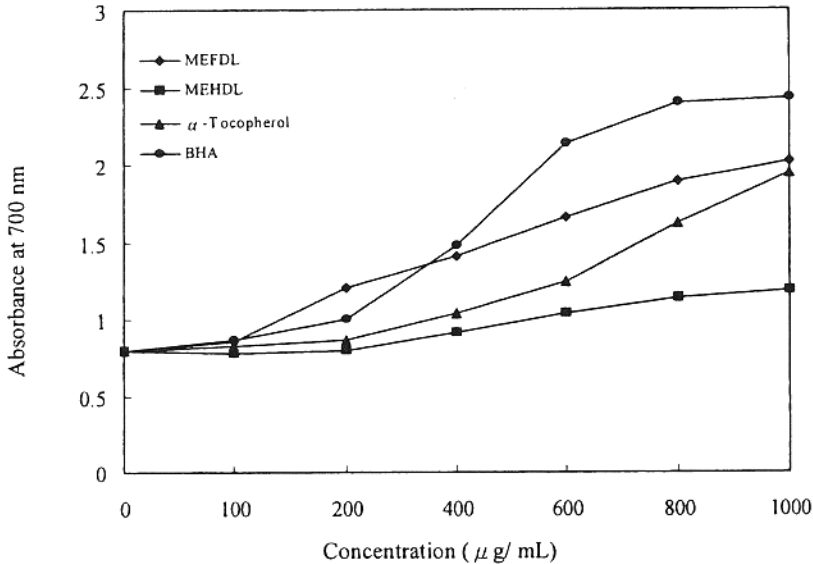


圖 6. 冷凍乾燥及熱風乾燥檸檬老齡葉甲醇萃取物之還原力

Fig.6. Reducing power of methanol extracts from freeze-dried or hot air-dried lemon elder age leaves.

#### (五) 螯合亞鐵離子或銅離子能力之測定

脂質氧化會因為少量之金屬離子如銅離子與亞鐵離子之存在而加速進行(Gordon, 1990), 其中又以亞鐵離子為最具影響力者(Yamaguchi et al., 1988), 其並會與 ADP、histidin 等結合, 造成蛋白質與細胞膜脂質受損(Sagai et al., 1984), 但此種作用會受到如類黃酮等多酚類物質之抑制, 類黃酮化合物廣存於植物組織中, 如花、葉及果實等組織中, 其生理活性有抗氧化、抗菌、抗病毒、抗突變及抑制酵素氧化(Torel et al., 1986)。類黃酮因可抑制 lipoxigenase 及 prostaglandin synthase 之活性, 故可防止酵素性過氧化作用(Larson, 1988)。MEFDL 與 MEHDL 之螯合亞鐵離子或銅離子之能力如表 1 所示, 雖然二者之螯合效果低於檸檬酸或 EDTA-Na 者, 以及對亞鐵離子無螯合效果, 但對銅離子卻有顯著( $p < 0.05$ )之螯合效果, 於同濃度下, 此種螯合效果在 MEFDL 與 MEHDL 之間無顯著( $p > 0.05$ )差異。本試驗所發現檸檬葉甲醇萃取物具有螯合銅離子之能力, 此與學者認為類黃酮可抑制銅離子氧化 LDL 特性(Vinson et al, 1995)之結論有類似之意義。

#### 四、檸檬老齡葉甲醇萃取物於不同脂質過氧化系統中之抗氧化性

不同濃度檸檬老齡葉甲醇萃取物於不同脂質過氧化催化系統中之脂質過氧化抑制率如表 2 所示, 由表中可知均以在自氧化系統中有最高之脂質過氧化抑制率, 並顯著( $p < 0.05$ )高於其他催化系統者, 且以 MEFDL 優於 MEHDL 者。而在其他催化系統中, 於 1000 µg/mL 濃度下, 則均以在 FeCl<sub>3</sub> 所催化之系統中具有較高的脂質過氧化抑制率; 而不論於 400 µg/mL 或 1000 µg/mL 濃度下, 均顯著( $p < 0.05$ )以 FeCl<sub>2</sub> 催化系統中的脂質過氧化抑制率最低, 推測是因為 Fe<sup>2+</sup> 具極強之氧化能力, 可以直接誘導脂質至初始期(initiation stage), 造成脂質之氧化連鎖反應所致(Ames, 1990)。本研究發現檸檬葉甲醇萃取物在各催化系統間之抗氧化性會因催化因子之不同而會有所差異, 在高濃度下, 各系統中檸檬葉甲醇萃取物之脂質過氧化抑制率會顯得較高, 此可能是萃取物未經過純化, 故需要較高之濃度方可達到較佳之抗氧化效果, 推測若經過進一步之純化過程後, 在較低之濃度應可展現較佳的抗氧化力。此外,

表 1. 冷凍乾燥與熱風乾燥檸檬老齡葉甲醇萃取物螯合亞鐵或銅離子之效果

Table 1. Chelating effects on  $Fe^{+2}$  and  $Cu^{+2}$  of methanol extracts from freeze-dried or hot air-dried lemon elder age leaves.

Sample ( $\mu$ g/2mL)	Absorbance at 480 nm	
	$Fe^{+2}$	$Cu^{+2}$
MEFDL <sup>z</sup>		
0		
5	0.434 c <sup>y</sup>	0.545 e
20	0.434 c	0.496 d
50	0.442 c	0.502 d
	0.444 c	0.467 c
MEHDL <sup>z</sup>		
0		
5	0.444 c	0.549 e
20	0.431 c	0.496 d
50	0.442 c	0.495 d
	0.442 c	0.463 c
Citric acid(50 $\mu$ g/2mL)	0.273 a	0.388 b
EDTA-Na(50 $\mu$ g/2mL)	0.306 b	0.344 a

<sup>z</sup> MEFDL: Methanol extracts of freeze-dried lemon elder age leaves. MEHDL: Methanol extracts of hot air-dried lemon elder age leaves.  
<sup>y</sup> Each column had 3 replicates. Duncan's multiple range tests, columns with the same letter were not significant at 5% level.

表 2. 檸檬老齡葉甲醇萃取物於不同促氧化因子催化系統中之過氧化抑制率

Table 2. Antioxidative activity of methanol extracts from freeze-dried or hot air-dried lemon elder age leaves in the linoleic acid system induced by different peroxidants.

I. S. <sup>z</sup>	I. P. <sup>y</sup>	MEFDL		MEHDL	
		400 $\mu$ g/mL	1000 $\mu$ g/mL	400 $\mu$ g/mL	1000 $\mu$ g/mL
Autoxidation		48.1 e <sup>x</sup>	84.7 e	13.5 d	37.7 e
$FeCl_2/H_2O_2$		33.5 d	43.2 c	13.0 d	24.1 d
$FeCl_2$		9.0 a	21.3 a	4.0 a	10.1 a
$FeCl_2/H_2O_2$ /ascorbic acid		13.1 b	25.3 b	6.8 b	14.5 b
$FeCl_3$		21.5 c	56.3 d	9.6 c	21.9 c

<sup>z</sup> I. S.: Induced system.

<sup>y</sup> I. P.: Inhibition of peroxidation (%).

<sup>x</sup> Each column had 3 replicates. Duncan's multiple range tests, columns with the same letter were not significant at 5% level.

表 3. 檸檬老齡葉甲醇萃取物之抗壞血酸、 $\alpha$ -tocopherol、 $\beta$ -carotene 及總多酚含量Table 3. The vitamin C,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene, and total phenol content of methanol extracts from freeze-dried or hot air-dried lemon elder age leaves.

Item	Vitamin C (mg/g)	$\alpha$ -Tocopherol (mg/g)	$\beta$ -Carotene (mg/g)	Total phenol (mg/g)
MEFDL	0.93	0.80	1.69	2.8
MEHDL	N.D.*	0.21	0.73	2.1

\*N.D.: Non-detectable.

檸檬葉甲醇萃取物亦含有多酚類物質(表 3)，而該多酚類物質具有抗氧化作用，推測該抗氧化作用應是藉由螯合金屬離子或提供氫原子以達到抗氧化效果的(Sies, 1991)，並且可能有部分是藉由直接與自由基反應而中止脂質連鎖反應。

#### 五、檸檬老齡葉甲醇萃取物抗氧化成分分析

前人研究指出，維生素 C 是一種水溶性抗氧化劑，每分子維生素 C 可提供一對未配對電子(unpaired electron)，故為一有效之含氧自由基清除劑，抗壞血酸並且可以再生  $\alpha$ -tocopherol，在高濃度之維生素 C 下，僅需低濃度之  $\alpha$ -tocopherol 即可提供良好的抗氧化保護效果(Machlin and Bendich, 1987; Jacob, 1994)。 $\alpha$ -tocopherol 廣泛存在於植物體中具有強抗氧化性在食品工業普遍應用，其酚環上之 OH-group 能與脂質過氧化自由基(peroxyl radical)作用形成穩定的  $\alpha$ -tocopherol radical，並終止脂質過氧化連鎖反應，此種作用機制屬於清除型抗氧化劑，可使活性氧喪失促氧化作用(Namiki, 1990)。 $\beta$ -carotene 則是單重態氧(singlet oxygen)之清除劑(Machlin and Bendich, 1987; Foote, 1976)，也能消除 peroxyl radical 以產生一個自由基中間產物(radical intermediate)而阻止油脂繼續氧化，故為一打斷脂質氧化連鎖(chain-breaking)反應之抗氧化劑(Burton, 1989)，並可進而提供生物體脂質組織抗氧化作用(Jacob, 1994)。多酚類之抗氧化性與其結構有關，其在鄰位與對位有釋放電子基者，會增加其抗氧化性，而此鄰位與對位若又具有二個羥基(hydroxy group)，則其抗氧化性會優於在間位者(Brand-Williams et al., 1995)。萃取物之成分與含量會受所使用之溶劑及萃取條件影響(Mattivi et al., 1996)，表 3 為 MEFDL 與 MEHDL 之抗氧化成分分析，由表中可知二者均含有  $\alpha$ -tocopherol、 $\beta$ -胡蘿蔔素和總多酚類，但均以 MEFDL 含量比 MEHDL 者高，MEFDL 並含有抗壞血酸，而 MEHDL 則無，推測可能是抗壞血酸在熱風乾燥過程中降解與氧化殆盡，而總多酚含量雖不及葡萄皮(王等, 2002)，但與抗氧化能力不錯之馬蹄決明子相近(陳, 1996)。

## 結 論

以甲醇萃取檸檬葉比其它溶劑具有更高的萃取率，且萃取物的抗氧化活性最高。MEFDL 的抗氧化性比 MEHDL 高，推測熱風乾燥會造成檸檬葉抗氧化能力下降。MEFDL 比 MEHDL 有較佳之清除 DPPH 自由基、超氧陰離子與過氧化氫之能力及較高之還原力，二者並均有螯合銅離子之能力，但對亞鐵離子無螯合效果。在以不同催化因子所催化之脂質過氧化系統中，MEFDL 比 MEHDL 有更好之抗氧化能力，二者並均以在自氧化系統中有最佳之脂質過氧化抑制效果，且在各催化系統中，較高濃度對脂質過氧化抑制效果較佳，經由分析發現，MEFDL 與 MEHDL 均含有  $\alpha$ -tocopherol、 $\beta$ -carotene 和總多酚類等抗氧化成分，唯前者含量均高於後者，且前者更含有抗壞血酸。綜合言之，檸檬葉甲醇萃取物均具有終止或延緩脂質連鎖反應、清除自由基與活性氧之能力，以及螯合銅離子之作用，因此，

可藉由不同之作用模式來達到抑制脂質氧化作用進行之目的，而檸檬葉抗氧化能力可能並非僅由單一抗氧化物質所貢獻，而應是各抗氧化成分協同作用的結果所致。

### 參考文獻

1. 王子慶、曾仁傑、駱秉明、徐德瑞、楊季清。2002. 黑后葡萄皮抗氧化性之研究. 國立屏東科技大學學報. 11:93-102.
2. 李東垣、張從政、葉天士、孫思邈。1976. 中國寶典. 檸部. p.1531-1532. 二仙堂中藥房印製. 中國.
3. 陳鴻文。1996. 決明子抗氧化特性之研究. 中興大學食科所碩士論文.
4. Ames, B. N. 1990. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Rad. Res. Commun.* 7:121-128.
5. Beers, R. F. and I. W. Sizer. 1952. A spectrofluorometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195:133-140.
6. Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of A free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. U. Technol.* 28:25-30.
7. Burton, G. W. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutri.* 119:109-111.
8. Carpenter, A. P. 1979. Determination of tocopherols in vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:668-672.
9. Coppen, P. P. 1983. Use of antioxidants, in rancidity in foods. p.67-93. In:Allen, J. C. and R. J. Hamilton. (eds.) *Applied science.* London.
10. Cosgrove, J. P., D. F. Church, and W. A. Pryor. 1987. The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22:299-304.
11. Culter, R. G. 1984. Antioxidants, aging and longevity. p.371-423. In: Pryor, W. A. (eds.) *Free radicals in biology.* Academic press. Orlando.
12. Culter, R. G. 1992. Genetic stability and oxidative stress: common mechanism in aging and cancer. p.31-46. In: Emerit, I. and B. Chance. (eds.) *Free radicals and aging.* Brrkhauser verlay. Basal. Switzerland.
13. Duh, P. D., W. J. Yen, and P. C. Duh. 1997. Antioxidant activity of hung bean hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1059-1063.
14. Endo, Y., R. Usuki, and T. Kaneda. 1984. Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidant of methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61:781-785.
15. Foote, L. S. 1976. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological system. p: 85-133. In: W. A. Pryor (ed.) *Free radical in biology.* Academic press. New York.
16. Gordon, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. p.1-18. In Hudson, B. J. F. (eds.) *Food antioxidant.* Elsevier applied science. London and New York.
17. Hanasaki, Y., S. Ogawa, and S. Fukui. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. & Med.* 15: 845-850.
18. Imaida, K., S. Fukushima, T. Shivai, M. Ohtani, K. Nakanishi, and N. Ito. 1983. Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of  $\gamma$ -glutamyl trans peptidase- positive foci development in the liver of rats. *Carcinogenesis.* 4:885-889.
19. Jacob, R. A. 1994. Nutrition, health and antioxidants. *INFORM.* 11:1271-1275.

20. Kitada, Y., K. Tamase, M. Sasaki, Y. Yamazoe, Y. Maeda, M. Yamamoto, and T. Yonetani. 1989. Determination of L-ascorbic acid, tocopherol, carotene and chlorophyll in various teas. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 36:927-933.
21. Labuza, T. P. 1971. Kinetics of lipid oxidation in food. *CRC. Cri. Rev. Food Tech.* 2: 355-405.
22. Larson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* 27: 969-978.
23. Machlin, L. J. and A. Bendich. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1:411-445.
24. Mattivi, F., F. Reniero, and S. Korhammer. 1995. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1820-1823.
25. Meir, S., J. Kanner, B. Akiri, and S. Philosoph-H. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* 43(7): 1813-1819.
26. Mitsuda, H., K. Yasumoto, and K. Iwami. 1966. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo.* 19:210-214.
27. Namiki, M. 1990. Antioxidants/ antimutagens in foods. *Cri. Rev. Food Sci. Nutr.* 29:281-300.
28. Okamoto, G., F. Hayase, and H. Kato. 1992. Scavenging of active oxygen species by glycosylated proteins. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:928-931.
29. Osawa, T., M. Namik, and S. Kawakisni. 1990. Role of dietary antioxidants in protection against oxidative damage. p.139-153. In: Kuroda, Y., P. M. Shankel, and M. D. Waters. (eds.) *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms.* Plenum publisher. New York.
30. Oyaizu, M. 1986. Antioxidative activity of browning product of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 35:771-775.
31. Phillip, B. J. P. A. Carroll, A. C. Tee, and P. Anderson. 1989. Microsome-mediated clastogenicity of butylated hydroxyanisole (BHA) in cultured chinese hamster ovary cell: the possible role of reactive oxygen species. *Mutat. Res.* 214 : 105-114.
32. Philosoph-Hadas, S., S. Meir, B. Akiri, and J. Kanner. 1994. Oxidative defense systems in leaves of three edible herb species in relation to their senescence rates. *J. Agric. Food Chem.* 42:2376-2381.
33. Pitotti, A., B. E. Elizalde, and M. Anese. 1995. Effect of caramelization and maillard reaction products on peroxidation activity. *J. Food Biochem.* 18: 445-457.
34. Robak, J. and R. J. Gryglewski. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmac.* 37:837-841.
35. Ruch, K. J., S. J. Cheng, and J. E. Klaunig. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catchin isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis.* 10:1003-1008.
36. Sagi, M., T. Ichinose, and K. Kuboka, 1984. Studies on the biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Relation between the change of lipid peroxidation and the antioxidative protective system in rat lungs upon life span exposure to low level of No2. *Toxicol. APPI. Pharmacol.* 73: 444-456.
37. Sato, M., N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi, and H. Ochi. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources *J. Agric. Food Chem.* 44:37-41.

38. Sherwin, E. R. 1978. Oxidation and antioxidant in fat and oil processing. J. Am. Oil Chem. Soc. 55:809-814.
39. Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara, and T. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40:945-948.
40. Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am. J. Med. 91:31-38.
41. Taga, M. S., E. E. Miller, and D. E. Pratt. 1984. Chia seeds as a sources of natural liquid antioxidant. J. Am. Oil Chem. 62:928-931.
42. Torel, J., J. Cillard, and P. Cillard. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radicals. Phytochem. 25:383-385.
43. Tsuda T., K. Ohshima, S. Kawakishi, and T. Osawa. 1994. Antioxidative pigment isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. J. Agric. Food. Chem. 42, 248-251.
44. Vinson, J. A., Y. A. Dabbagh, M. M. Serry, and J. Jang. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease . J. Agric. Food Chem. 43:2800-2802.
45. Wilson, C. W. and P. E. Shaw. 1987. High performance liquid chromatographic organ juice using ultraviolet and electrochemical detector. J. Agric. Food Chem. 35:329-331.
46. Yamaguchi, R., M. A. Tatsumi, K. Kato, and U. Yoshimisu. 1988. Effect of metal salts and fructose on the autoxidation of methyl linoleate in emulsions. Agric. Biol. Chem. 52:849-850.

### Abstract

The objectives of this research were to investigate the antioxidative properties of methanol extracts from lemon leaves. The study items included antioxidation, antioxidative activity in different lipid peroxidation systems, and contents of antioxidants. Results showed that the extraction by methanol had higher than those by other solvents. Antioxidant capacity of methanol extracts of both freeze-dried and hot-dried elder age lemon leaves were higher than those in middle or young age. Compared with methanol extracts from hot air-dried lemon leaves (MEHDL), we found methanol extracts from freeze-dried lemon leaves (MEFDL) had better antioxidant activity. MEFDL had 63.1, 67.9, and 75.6% scavenging effect on  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH), superoxide anion, and hydrogen peroxide, respectively. MEFDL also showed high reducing power and chealting ability with  $\text{Cu}^{+2}$ . MEFDL exhibited the highest antioxidative activity in autoxidation system than in other induced systems, and had higher inhibited peroxidation effects at higher dosage in any peroxidation systems. The primary antioxidant contents of ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene, and total phenol and in MEFDL were 0.93, 0.8, 1.69, and 2.8 mg/g, respectively.