

MC-Transaction on Biotechnology, 2014, Vol. 6, No. 1, e1

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

乙醇萃取白肉火龍果及紅肉火龍果的清除自由基能力比較

鄭建瑋^a、謝宗哲^b、何殷熾^b、張毓芳^b、翁悅容^b、梁致遠^{b*}

^a 實踐大學 餐飲管理學系 (中華民國 台灣 台北)

^b 銘傳大學 健康科技學院 生物科技學系 (中華民國 台灣 桃園)

中文摘要

以乙醇萃取白肉火龍果及紅肉火龍果，比較體外清除自由基的能力。結果顯示，紅肉火龍果的總多酚、還原力、清除 DPPH 自由基及清除超氧陰離子能力都優於白肉火龍果。紅肉火龍果含有高量的甜菜紅色素，是造成紅肉火龍果的抗氧化活性高於白肉火龍果的主要原因。

關鍵字：火龍果、抗氧化

通訊作者：梁致遠 [liang121@mail.mcu.edu.tw]

收稿：2013-12-28 接受：2014-1-2 線上發表：2014-1-17

前 言

抗氧化劑能捕獲自由基，終止自由基的連續反應。多酚類化合物是植物二次代謝產物，是天然植物中萃取的多羥基酚類衍生物，近年廣受歡迎。傳統的藥用植物已有報導酚類化合物和抗氧化呈正相關^[1]。還原力表示其捐贈電子的能力，能和自由基反應，變成穩定的代謝物，終止自由基的反應鏈^[2]。清除自由基的能力及還原力可測得抗氧化活性。

超氧陰離子(superoxide anions)是氧化與還原反應的中間產物，具毒性，能形成羥基自由基及過氧化氫化合物(hydroperoxide)，造成細胞受損、發炎、動脈粥狀硬化及老化^[3, 4]。超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)廣泛存於生物體中的金屬酶，能催化超氧陰離子轉為 H₂O₂ 及 O₂，進而清除細胞所產生的超氧陰離子。超氧歧化酶可防止膜脂質的氧化，達到保護的效果^[5]。

火龍果(*Hylocereus* sp.) 屬仙人掌科，是多年生攀緣性肉質植物，已是台灣常見的水果之一，白肉火龍果的學名為 *Hylocereus undatus*，俗稱火龍果，紅肉火龍果的學名為 *Hylocereus polyrhizus*，其成熟的果實為紅色皮，果肉為紅肉，俗稱紅龍果。紅色果肉火龍果，因具有鮮豔的紅紫色，在以色列被用於乳製品及果汁飲料。

顏色不同的葡萄具有不同的意義，深色葡萄品種的總多酚類物質含量高於白色及淺色葡萄。製作紅酒，是含葡萄皮榨汁，因此有大量的花青素，而白酒則不含花青素，紅酒對LDL氧化的抑制效果比白酒高^[6]。趙等人^[7]首先以白肉及紅肉火龍果比較其抗氧化活性，多酚類含量並無顯著差異，兩者在清除超氧陰離子的能力都較弱。Wu等人^[8]以台灣埔里的紅肉火龍果，研究紅肉火龍果與果皮中的色素，紅色的果肉及果皮富含多酚類，具有清除DPPH自由基的能力且是良好抗氧化劑。

Wybraniec 等人^[9]證實紅肉火龍果所含之紅色色素確實與紅甜菜相同，為甜菜紅色素(betacyanin)。紫紅色的甜菜紅色素是由 betalamic acid 與 cyclo-Dopa 結合而成，因為含有 cyclo-Dopa 的結構，使甜菜紅色素在紫外光不可見光 270-280 nm 有一吸收波峰，而可見光之最大吸收波峰約在 535-538 nm 之間^[10]。García-Cruz 等人^[11]以紅色及橙色果肉的火龍果作彼此間色素的比較，指出紅色火龍果有五種甜菜色素(betalains)，而橙色火龍果僅有四種，可能是導致其物種間不同顏色的原因。

本研究的目的，是選取白肉的火龍果及紅肉的火龍果，釐清不同顏色果肉的火龍果總多酚含量、抗氧化活性差異，進而比較清除體外自由基的能力，以期作為之後保健食品開發的基礎。

材料與方法

材料

1. 火龍果的來源：

白肉及紅肉火龍果購自桃園市商業市場(見圖一)。

2. 果肉的製備：

取出新鮮的火龍果的果肉並切碎，經冷凍乾燥、磨碎及通過 60 mesh 篩網過篩，於-20°C 冰箱保存。



圖一、紅肉火龍果與白肉火龍果的外形與果肉

3. 藥品：

硝基藍四氮唑(NBT)購自 Bio Basic Inc. (Markham Ontario, Canada)。核黃素 (riboflavin)、L-甲硫胺酸(L-methionine)、磷酸氫一鉀及磷酸氫二鉀、Folin-Ciocalten 試劑、碳酸鈉、沒食子酸 (gallic acid)、赤血鹽 (potassium ferricyanide)、三氯化鐵(ferric chloride)、DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)、均為 Sigma 公司產品。本實驗使用 Milli-Q system 製作的超純水作為溶劑。

4. 儀器：

ELISA reader (Thermo LabSystems Multiskan EX)，分光光度計 (PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis spectrometer)。

實驗方法

1. 置備乙醇萃取樣品 (Preparation of ethanol extract solution)

以一克火龍果粉末添加5 mL的70%乙醇至離心管中，經vortex振盪，再以超音波振盪20分鐘，以4°C，3,000 rpm 離心10分鐘，收集上清液，再以5 mL的70%乙醇經vortex振盪，以超音波振盪20分鐘。以4°C，3,000 rpm 離心10分鐘，

收集兩次上清液並定量至10 mL，做總多酚含量、還原力活性及清除DPPH自由基的測試。

2. 總多酚分析(Determination of total phenolics)

以修改 Folin-Ciocalteu方法^[12]測試，取250 μ L的70%乙醇萃取液及同體積的Folin-Ciocalteu試劑混合5分鐘後，再加500 μ L 20%碳酸鈉及4 mL的純水，在常溫下反應25分鐘後，以25 $^{\circ}$ C，5,000 rpm離心10分鐘，以分光光度計於730 nm偵測吸光度。以沒食子酸(gallic acid)製作檢量線，計算樣品之總多酚濃度(以 μ g/g表示)。

3. 還原力活性(Reducing power activity)

使用 $K_3Fe(CN)_6-FeCl_3$ 方法進行還原力的分析^[13]。取200 μ L70%乙醇萃取液，加入同體積的磷酸鈉緩衝溶液(0.2 M, pH 6.6)及1%赤血鹽(potassium ferricyanide)，混合液在50 $^{\circ}$ C下孵育20分鐘，迅速將測定樣品置於0 $^{\circ}$ C冰浴5分鐘。加入同體積10%三氯醋酸溶液(trichloroacetic acid)，3,000 rpm 離心10分鐘。上清液與蒸餾水及0.1%三氯化鐵(ferric chloride)以5:5:1混合均勻，反應10分鐘，以分光光度計於700 nm偵測吸光度。吸光度越高，表示還原能力越強。

4. 清除1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力(Capacity of scavenging DPPH radical)

取100 μ L不同濃度之70%乙醇萃取液，加入新鮮配製之0.16 mM DPPH 甲醇溶液1.2 mL於1.5 mL升之試管中，混合均勻，在避光室溫下靜置30分鐘後，測517 nm之吸光度^[14]。以 IC_{50} 表示去除50%DPPH 自由基的濃度。

清除 DPPH 自由基能力(%) = $[1 - (A_{517 \text{ nm, sample}}/A_{517 \text{ nm, blank}})]$
(以mg/g所具有之清除DPPH 自由基能力表示)。

5. 清除超氧陰離子的測試(Superoxide anions scavenging activity)

取經冷凍乾燥後的火龍果粉末以50 mM的磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.8)配製為1、2、3、4、5 mg/mL的溶液，超音波震盪30分鐘後，以3,000 rpm、4 $^{\circ}$ C離心10分鐘，取上清液為粗酶液。

超氧陰離子的清除測試則參考Beauchamp與Fridovich的方法^[15]經修飾而成，取109.3 mg L-甲硫胺酸加入73.23 mL 50 mM的磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.8)，待其充分溶解後再加10 mg的硝基藍四氮唑(NBT)，充分溶解成A液。以4.4 mg核黃素加至100 mL磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.8)，充分溶解成B液。藥品皆新鮮配製。分析測定時，取1.53 mL的B液入A液成為反應液。

取 5 μL 的火龍果的粗酶液至含 300 μL 反應液的 96 孔盤中，於 4,000 Lux 螢光燈下進行 20 分鐘光照還原反應，以 ELISA reader 在 560 nm 偵測吸光值。不加粗酶液的照光試管為對照組。以 IC_{50} 表示去除 50%超氧陰離子的濃度。

超氧陰離子的清除率： $(A_0-A)/A_0 \times 100\%$

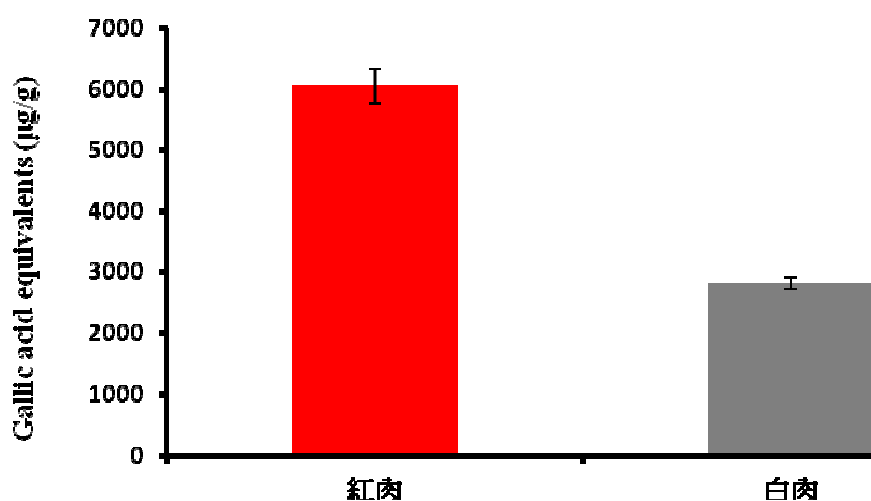
式中： A_0 為對照組試管吸光值； A 為測定試管吸光值。

6. 火龍果果肉的吸收光譜

取經冷凍乾燥後的火龍果粉末以 50 mM 的磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.8)配製為 1 mg/mL 的溶液，超音波震盪 30 分鐘後，以 3,000 rpm、4°C 離心 10 分鐘，取上清液，以分光光度計於 400-800 nm 偵測吸光度。

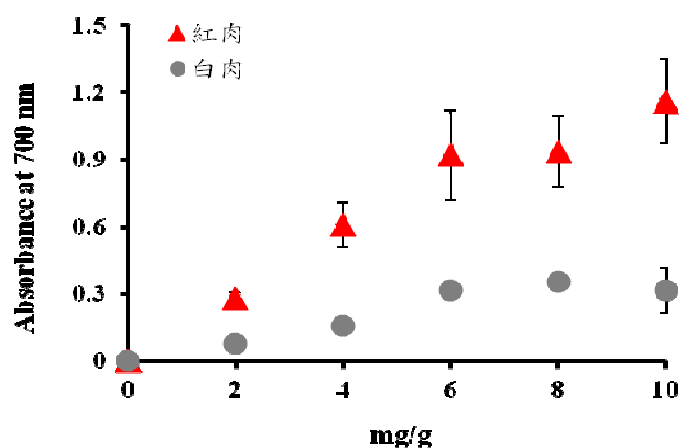
結 果

圖二是以乙醇作為萃取液，不同顏色果肉的火龍果的總多酚含量。由圖二，紅肉火龍果的總多酚為 6,000 $\mu\text{g GAE/g}$ ，較白肉火龍果總多酚含量多出近一倍以上。

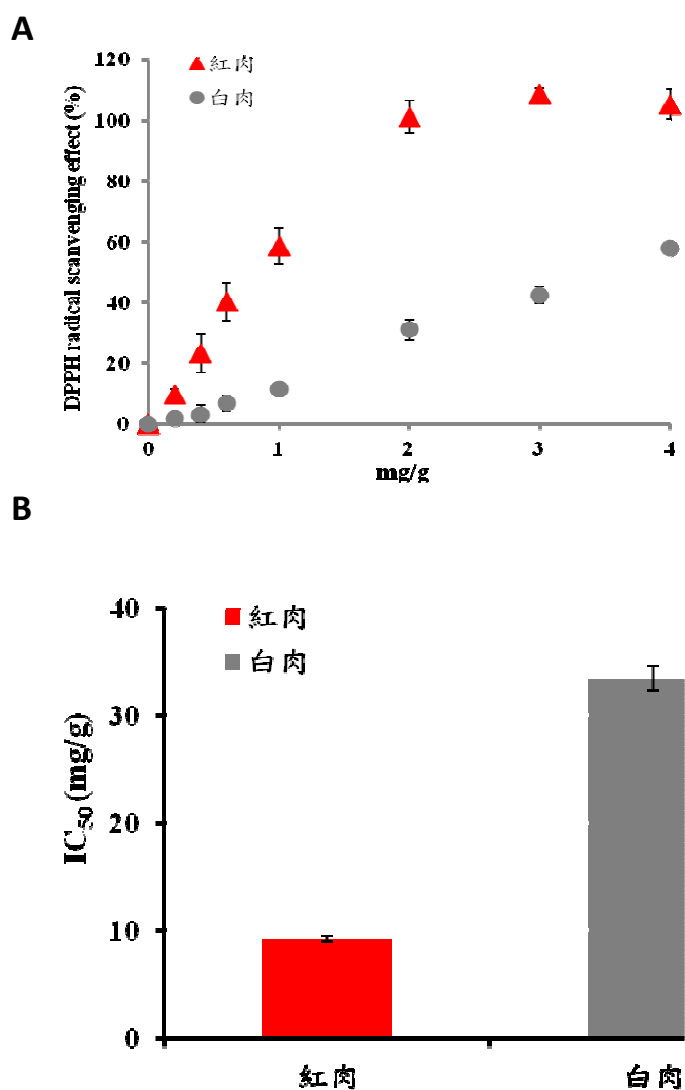


圖二、不同顏色果肉的火龍果總多酚含量

圖三是不同顏色果肉的火龍果的還原力，吸光值越高，表示還原能力越強。將還原力的吸光值與各處理濃度作一比值，可算出斜率，斜率愈高，還原力愈強。紅肉龍果的還原力的斜率為 0.115，白肉火龍果的還原力的斜率為 0.037，紅肉火龍果的還原力較白肉火龍果高出近 2 倍。

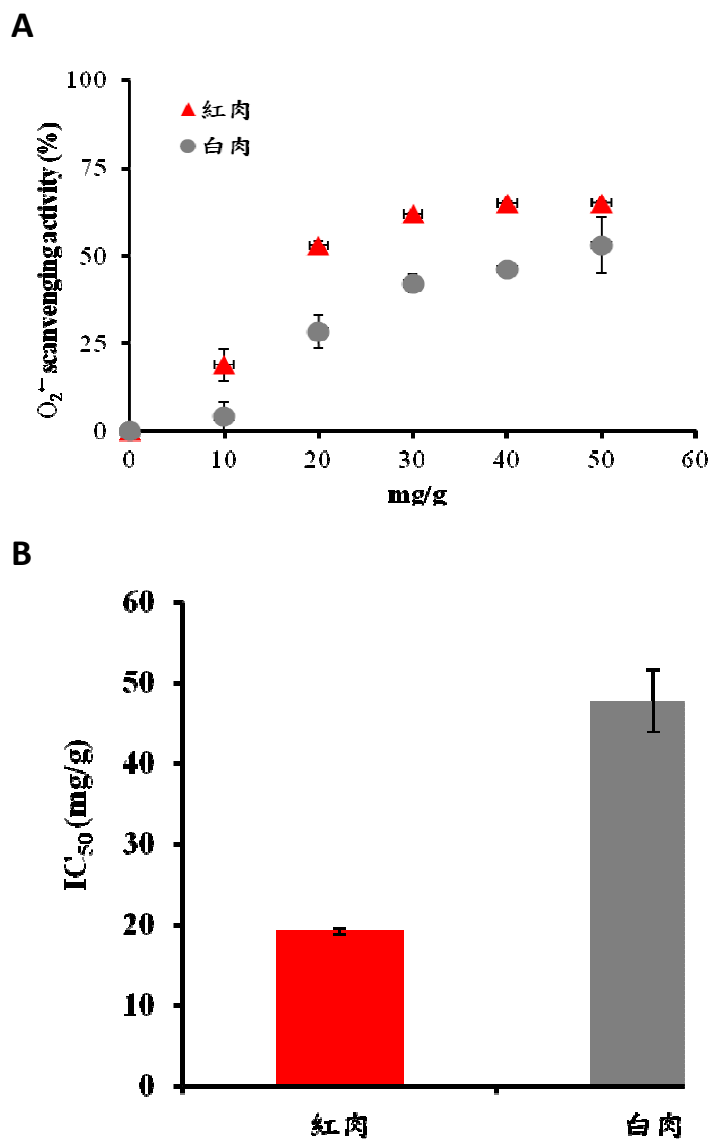


圖三、不同顏色果肉的火龍果還原力比較



圖四、(A)不同顏色果肉的火龍果清除 DPPH 自由基能力的比較(B)不同顏色果肉的火龍果清除一半 DPPH 自由基的濃度(IC₅₀)

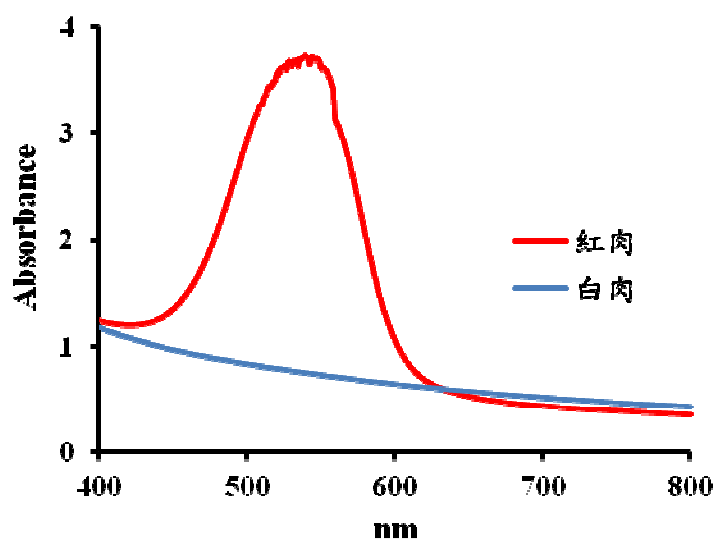
DPPH 是一穩定的自由基，清除 DPPH 自由基一半的濃度(IC_{50})表示清除 DPPH 自由基的能力， IC_{50} 的數值愈小，表示清除 DPPH 自由基能力愈高。紅肉火龍果清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 約為 9.2 mg/g，白肉火龍果的 IC_{50} 約為 33.4 mg/g，紅肉火龍果清除 DPPH 自由基的能力較白肉火龍果高出近 2.5 倍(圖四)。



圖五、(A)不同顏色果肉的火龍果清除超氧陰離子能力的比較(B)不同顏色果肉的火龍果清除一半超氧陰離子的濃度(IC_{50})

超氧歧化酶(SOD)能催化超氧陰離子轉為 H_2O_2 及 O_2 ，進而清除細胞所產生的超氧陰離子。清除超氧陰離子一半的濃度(IC_{50})表示清除超氧陰離子的能力， IC_{50} 的數值愈小，表示清除超氧陰離子能力愈高。紅肉火龍果清除超氧陰離子的 IC_{50} 約為 19.2 mg/g，白肉火龍果的 IC_{50} 約為 47.7 mg/g，紅肉火龍果清除超氧陰離子能力較白肉火龍果高出近 1.5 倍(圖五)。

圖六是不同顏色果肉的火龍果在 400-800 nm 的吸收光譜圖，紅肉紅龍果在 539 nm 處有一明顯的吸收峰，而白肉火龍果則無。



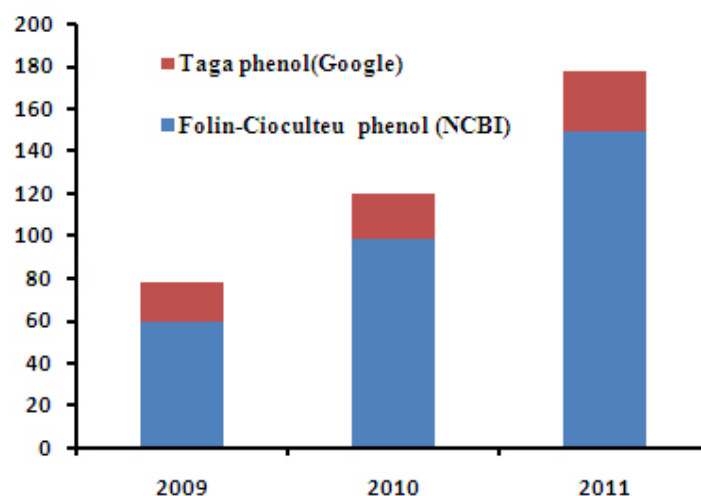
圖六、不同顏色果肉的火龍果的吸收光譜圖

討 論

由圖二可知紅肉火龍果的總多酚含量遠高於白肉火龍果，但趙等人^[7]以白肉及紅肉火龍果比較其抗氧化活性，多酚類含量並無顯著差異。趙等人使用 Folin-Ciocalteu 方法，是以 Taga 等人^[16]發展的方法測定總多酚含量，主要在檢驗過程中先加碳酸鈉後加 Folin-Ciocalteu 試劑。圖七是以 NCBI 及 Google Scholar 搜尋的結果，引用 Taga 等人的方法測定總多酚量的方法，近年約佔 Folin-Ciocalteu 方法的 20%左右。陳等人^[17]曾經討論 Folin-Ciocalteu 比色法中碳酸鈉添加順序對檢測總多酚的影響，指出當 20%碳酸鈉添加的步驟在 Folin-Ciocalteu 試劑之前，沒食子酸(gallic acid)因鹼而形成不可逆的化合物，直接影響到 Folin-Ciocalteu 試劑的還原反應效率，進而對總多酚定量檢測造成顯著的干擾，因此以 Taga 等人的方法量測總多酚，由於鹼對其標準品及酚上的羥基化合物，產生氧化及縮合作用，降低 Folin-Ciocalteu 試劑對酚類的反應，導致紅肉火龍果與白肉火龍果定量上的差異。

由圖六可知紅肉的火龍果在 539 nm 處有一明顯的吸收峰，而白肉的火龍果則無，Wybraniec 等人^[9]證實紅肉火龍果所含之紅色色素確實與紅甜菜相同，為甜菜紅色素(betacyanin)，Stuppner 及 Egger (1996)指出紫紅色的甜菜紅色素，可見光之最大吸收波峰約在 535-538 nm 之間^[10]。在本研究中紅肉火龍果的總多酚量較白肉火龍果高出一倍、還原力高出二倍、清除 DPPH 自由基及超氧陰離子高出

約 2.5 及 1.5 倍，究其原因，應是紅肉火龍果含有高量的甜菜紅色素，造成紅肉火龍果的抗氧化活性高於白肉火龍果。



圖七、近三年 Taga 方法量測總多酚類含量佔 Folin - Ciocalteu 方法的比例

致 謝

本文非常感謝銘傳大學生物科技系的基金支持。並感謝銘傳大學生物科技系 AA402 研究室的邱建維、蔡復淳等同學的協助。

參考文獻

- [1] Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H: Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 2004, 74: 2157-2184.
- [2] Yen GC, Chen HY: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 1995, 43: 27-32.
- [3] 黃政弘、陳惠婷、涂瑞澤：三種SOD活性測定法之比較。大葉學報1999，8:101-109。
- [4] Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987, 107:526-545.
- [5] Zimmermann R, Flohe L, Weser U, Hartmann HJ: Inhibition of lipid peroxidation in

isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase. FEBS Lett 1973, 29:117-120.

[6] 錢明賽：蔬果中之抗氧化物質。食品工業月刊。1998，30:21-34。

[7] 趙璧玉、林碧秀、張恬慈、蔡旻汎、楊棋明：白肉火龍果與紅肉火龍果抗氧化性之研究。華岡農科學報，2003，11: 13-28。

[8] Wu LC, Hsu HW, Chen YC, Chiu CC, Lin YI, Ho JA.: Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. Food chem 2006, 95: 319-27.

[9] Wybraniec S, Platzner I, Geresh S, Gottlieb HE, Haimberg M, Mogilnitzki M, Mizrahi Y: Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. Phytochem 2001, 58: 1209-1212.

[10] Stuppner H, Egger R: Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from *Beta vulgaris*. J Chromatogr A 1996, 735:409-413.

[11] García-Cruz L, Valle-Guadarrama S, Salinas-Moreno Y, Joaquín-Cruz E: Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) Fruits. Plant Foods Hum Nutr 2013, 68,:403-410.

[12] Gahler S, Otto K, Bohm V: Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. J Agric Food Chem 2003, 51: 7962-7968.

[13] Oyaizu M: Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nutr 1986, 44: 307-315.

[14] Hou WC, Lin RD, Cheng KT, Hung YT, Cho CH, Chen CH, Hwang SY, Lee MH: Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. Phytomedicine 2003, 10: 170-175.

[15] Beauchamp C, Fridovich I: Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 1971, 44: 276-287.

[16] Taga MS, Miller EE, Pratt DE: Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants,

J Am Oil Chem Soc 1984, 61: 928–931.

[17] 陳良宇、鄭建瑋、王志玄、林志璋、張云力、李瑞玲、游欣、梁致遠：鹼催化對 Folin-Ciocalteu 試劑檢測總多酚含量的影響。生技學報，2012，4：10-19。

In *Vitro* Radical Scavenging Activity of Methanol Extracts of Red and White Flesh Pitaya

Chien-Wei Cheng^a, Zong-Jhe Hsieh^b, Yin-Chih Ho^b, Yu-Fang Chang^b, Yue-Rong Wong^b, and Ji-Yuan Liang^{b*}

^aDepartment of Restaurant and Institutional Management, Shih-Chien University, Taipei, Taiwan, R.O.C

^bBiotechnology Department, School of Health Technology, Ming Chuan University, 333 Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

Abstract

Red and white flesh pitaya were evaluated to compare their in vitro radical scavenging activity. The results show that the total polyphenols, reducing power, scavenging DPPH radical activity and scavenging superoxide anions of red flesh pitaya is far superior to the white flesh pitaya. Red flesh pitaya is abundant of betacyanin, and showed the higher antioxidant activity than white flesh pitaya.

Keyword: pitaya, antioxidant activity

Corresponding author: Ji-Yuan Liang [liang121@mail.mcu.edu.tw]

Received 12-28-2013 / Accepted 1-2-2014 / Online published 1-17-2014

MC-Transaction on Biotechnology, 2014, Vol. 6, No. 1, e1

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.