

# 亞洲大學

生活應用科學系

碩士論文

三葉五加抗氧化功能性評估之探討

Study on the Antioxidation Property of  
*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.

研究生：許倍嘉

指導教授：鄧正賢

共同指導教授：趙哲毅

中華民國九十六年六月

亞洲大學  
生活應用科學學系碩士班  
碩士論文

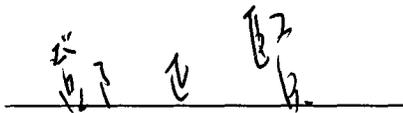
中文題目：三葉五加抗氧化功能性評估之探討

英文題目：Study on the Antioxidation Property of

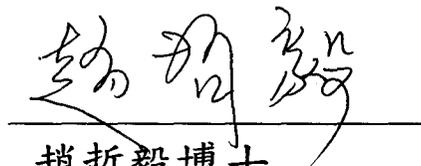
*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.

本論文業經審查及口試合格特此證明

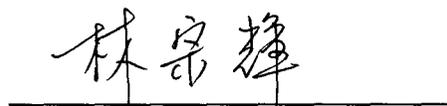
指導教授



論文口試委員



趙哲毅博士  
亞洲大學  
生活應用科學學系



林宗輝博士  
明道管理學院  
休閒保健學系

中華民國 96 年 6 月

# 亞洲大學博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文，為本人在亞洲大學所取得之博/碩士學位論文。茲（以下請擇一勾選）

- 同意立即校內校外開放
- 同意立即校內開放，校外於98年8月1日起開放，  
原因是：期刊投稿
- 同意校內於\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日起開放，校外於\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日起開放，原因是：\_\_\_\_\_
- 不同意校內校外開放，原因是：\_\_\_\_\_

以非專屬、無償授權亞洲大學與國家圖書館，基於推動「資源共享、學術交流」之理念，回饋社會與促進學術研究之目的，得不限地域、時間與次數，以紙本、光碟、網路或其它各種方法重製與發行，或再授權非營利機構以各種方法重製與利用，提供個人基於非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。上述授權方式，若未擇一勾選，視同「同意立即校內校外開放」。

論文名稱：三葉五加抗氧化功能性評估之探討

指導教授簽名：鄧進賢（提醒您，請預先告知指導教授授權狀況！）

系所：生活應用科學  博士班  碩士班

學號：94213011

研究生簽名：許信喜

日期：民國96年8月29日

備註：

1. 本授權書請正楷填寫並親筆簽名後，裝訂於各紙本論文封面後之次頁。
2. 請加印一份單張之授權書，填寫並親筆簽名後，於辦理離校時交圖書館。
3. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權。如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。

# 目 錄

標 題.....	i
目 錄.....	ii
圖目錄.....	v
表目錄.....	x
英文摘要.....	xi
中文摘要.....	xii
略字表.....	xiv
第一章 緒論.....	1
第一節 研究動機.....	1
第二節 研究目的.....	4
第三節 研究架構.....	6
第二章 文獻探討.....	7
第一節 三葉五加研究.....	7
一、三葉五加簡介.....	7
二、三葉五加相關藥理作用研究.....	14
第二節 自由基與抗氧化防禦系統.....	16

一、自由基來源.....	16
二、活性氧物質.....	16
三、自由基產生途徑.....	22
四、自由基對生物體傷害.....	24
五、生物體內抗氧化系統.....	28
第三節 運動與抗氧化相關性.....	34
第四節 抗氧化測定原理.....	37
一、DPPH 自由基清除能力之測定.....	37
二、還原力之測定.....	38
三、亞鐵離子螯合能力之測定.....	38
四、清除超氧陰離子能力之測定.....	39
五、抗油脂過氧化作用測定-硫氰酸鐵法.....	40
第三章 材料與方法.....	42
第一節 體外抗氧化實驗.....	42
一、實驗材料.....	42
二、材料製備與實驗方法.....	45
第二節 小鼠游泳實驗.....	51
一、實驗材料.....	51
二、材料製備與實驗方法.....	52

第四章 統計分析 .....	57
第五章 結果與討論 .....	58
第一節 體外抗氧化試驗.....	58
第二節 抗氧化活性成分之定量 .....	108
第三節 小鼠游泳實驗.....	110
第六章 結論.....	113
第一節 體外抗氧化試驗.....	113
第二節 小鼠游泳試驗.....	116
第七章 參考文獻 .....	117



## 圖目錄

圖一 實驗研究架構 .....	6
圖二 氧分子之氧化還原及激發狀態 .....	18
圖三 體內酵素性抗氧化防禦系統 .....	31
圖四 產地彰化縣田尾鄉三葉五加之莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自由 基清除能力之比較 .....	59
圖五 產地台中縣后里三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自 由基清除能力之比較 .....	60
圖六 產地花蓮三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自由基清 除能力之比較.....	61
圖七 產地台中縣后里刺五加之根、莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自由 基清除能力之比較 .....	62
圖八 產地花蓮毛脈三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自由 基清除能力之比較 .....	63
圖九 產地台中縣后里與花蓮三葉五加之根甲醇萃取液其 DPPH 自由 基清除能力之比較 .....	64
圖十 產地彰化縣田尾鄉、台中縣后里與花蓮三葉五加之莖甲醇萃取	

液其 DPPH 自由基清除能力之比較.....	65
圖十一 產地彰化縣田尾鄉、台中縣后里與花蓮三葉五加之葉甲醇萃 取液其 DPPH 自由基清除能力之比較.....	66
圖十二 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較.....	67
圖十三 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較.....	68
圖十四 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較.....	69
圖十五 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取液 其還原力比較.....	70
圖十六 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液 其還原力比較.....	71
圖十七 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取液 其還原力比較.....	72
圖十八 彰化縣田尾鄉三葉五加之莖、葉甲醇萃取液其還原力比較....	73
圖十九 台中后里三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其還原力比較....	74

圖二十 產地花蓮三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其還原力比較 ....	75
圖二十一 台中后里刺五加之根、莖、葉甲醇萃取液其還原力比較 ....	76
圖二十二 花蓮毛脈三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其還原力比較	77
圖二十三 不同產地三葉五加之根甲醇萃取液其還原力比較 .....	78
圖二十四 不同產地三葉五加之莖甲醇萃取液其還原力比較 .....	79
圖二十五 不同產地三葉五加之葉甲醇萃取液其還原力比較 .....	80
圖二十六 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取液其還原 力比較.....	81
圖二十七 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液其還原 力比較.....	82
圖二十八 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取液其還原 力比較.....	83
圖二十九 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取 液其亞鐵離子螯合能力之比較 .....	85
圖三十 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液 其亞鐵離子螯合能力之比較 .....	86
圖三十一 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取	

液其亞鐵離子螯合能力之比較 .....	87
圖三十二 彰化縣田尾鄉三葉五加之莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較.....	88
圖三十三 台中后里三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較.....	89
圖三十四 產地花蓮三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較.....	90
圖三十五 台中后里刺五加之根、莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較.....	91
圖三十六 花蓮毛脈三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較.....	92
圖三十七 不同產地三葉五加之根甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較.....	93
圖三十八 不同產地三葉五加之莖甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較.....	94
圖三十九 不同產地三葉五加之葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較.....	95
圖四十 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取液其亞鐵離	

子螯合能力之比較 .....	96
圖四十一 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液其亞鐵 離子螯合能力之比較 .....	97
圖四十二 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取液其亞鐵 離子螯合能力之比較 .....	98
圖四十三 同一濃度 3.2 mg/mL，不同產地之三葉五加、刺五加、毛 脈三葉五加根甲醇萃取物及 BHT 之抗油脂過氧化性比較 .....	102
圖四十四 同一濃度 3.2 mg/mL，不同產地之三葉五加、刺五加、毛 脈三葉五加莖甲醇萃取物及 BHT 之抗油脂過氧化性比較 .....	103
圖四十五 同一濃度 3.2 mg/mL，不同產地之三葉五加、刺五加、毛 脈三葉五加葉甲醇萃取物及 BHT 之抗油脂過氧化性比較 .....	104
圖四十六 同一濃度 3.2 mg/mL，三葉五加根、莖、葉甲醇萃取物之 抗油脂過氧化性比較 .....	105
圖四十七 同一濃度 3.2 mg/mL，刺五加根、莖、葉甲醇萃取物之抗 油脂過氧化性比較 .....	106
圖四十八 同一濃度 3.2 mg/mL，毛脈三葉五加根、莖、葉甲醇萃 取物之抗油脂過氧化性比較 .....	107

## 表目錄

表一 五加屬植物之化學成分研究 .....	8,9
表二 三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加之相關型態及分布 .....	11
表三 三葉五加之化學成分研究 .....	12
表四 五加科五加屬相關之藥理作用 .....	14
表五 不同產地之三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加簡寫及產地資料	43
表六 實驗動物分組 .....	53
表七 福壽實驗動物飼料組成 .....	55
表八 三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加之清除超氧陰離子能力測定	99
表九 不同產地三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加之根、莖、葉總酚 類化合物測定及類黃酮化合物定量分析 .....	109
表十 實驗前後體重變化及小鼠游泳試驗時間與生存數量 .....	112

## 英文摘要

The present paper presents the comparison on antioxidant capabilities of *Acanthopanax species*, including *Acanthopanax trifoliatus* (L.) M<sub>ERR.</sub>, *Acanthopanax trifoliatus* var. *setosus* and *Acanthopanax senticosus* R<sub>UPER.</sub> et M<sub>AXIM.</sub>. Previous pharmacological study on *A. senticosus* reported antiinflammatory, immunostimulatory and good antioxidant activity. *A. trifoliatus*, a species endemic to Taiwan, can be found in the Taiwan coteau and *Acanthopanax trifoliatus* var. *setosus* is another variety.

The antioxidative activities assays include 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging effect, Fe<sup>2+</sup> chelating power, reducing power and the inhibition of Butylated hydroxyanisole crystalline (BHT) induced lipid peroxidation in a liposome model system. Some extracts were good antioxidants by comparison with reference molecules, such as vitamin E and quercetin. Results indicated that the scavenging action of the DPPH free radical were just as efficient and effective as when the synthetic antioxidant BHT is used. As for the reducing actions of the extracts of *Acanthopanax trifoliatus* (L.) M<sub>ERR.</sub> and BHT as indicated by the formation of Prussian blue, extracts of optimum concentration displayed relative activity at 100% of BHT. The results showed that all extracts obtained antioxidative abilities and their abilities depended strongly on their concentrations.

## 中文摘要

三葉五加(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.)為唯一台灣產五加屬植物，毛脈三葉五加(*Acanthopanax trifoliatum* var. *setosum*)則為三葉五加的變種，三葉五加、毛脈三葉五加與刺五加 (*Acanthopanax senticosum* Harms)同屬五加科五加屬之植物，是中藥南五加皮原料之一，目前刺五加相關的研究報告中，已被得知刺五加具有抗血小板凝集、抗疲勞及抗緊張等藥理活性，五加科五加屬植物也有相似刺五加的化學成分，而較少針對三葉五加及毛脈三葉五加其抗氧化活性及植物的根、莖、葉部位上，是否有活性上的差別等做深入探討。

因此本研究針對台灣地區(田尾、后里、花蓮)之刺五加、三葉五加、毛脈三葉五加甲醇萃取液的抗氧化力及其相關活性加以探討。供測樣品之種類包括三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加三種植物不同部位之甲醇萃取液，並與人工合成抗氧化劑 Butylated hydroxyanisole crystalline (BHT)做抗氧化活性及抗氧化活性成分之定量分析比較，包括 DPPH 自由基清除能力測定、還原力的測定、亞鐵離子螯合能力之測定、清除超氧陰離子能力測定、抗油脂過氧化測定(硫氰酸鐵法)等。動物實驗方面將執行小鼠游泳試驗測定其抗疲勞之功效，測試樣品為三葉五加及刺五加植物莖的部位，並與咖啡因做比較。

實驗結果顯示，在 DPPH 自由基清除能力測定方面，三葉五加之根、莖、葉部位，清除能力皆比刺五加及毛脈三葉五加良好，當濃度達到 0.4 mg/mL 時，清除能力可達人工合成抗氧化劑 BHT 95% 以上。在還原力的測定方面，三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加之根、莖、葉部位，隨著待測物濃度升高，還原力也跟著上升，甚至可超過 BHT 的還原能力，且也顯示三葉五加之根、莖、葉部位還原力較佳。亞鐵離子螯合能力之測定方面，在根、莖、葉三個部位比較下，莖的部位較無明顯差異，根與葉都顯示三葉五加能力較佳，在濃度達到 0.8 mg/mL 時，亞鐵離子螯合能力可達標準品 Ethylenediaminetetracetic acid dipotassium salt (EDTA) 的 90% 以上。抗油脂過氧化測定(硫氰酸鐵法)隨著時驗時間增加，三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加之根、莖、葉，皆可以維持相當的抗油脂過氧化的能力，且與 BHT 能力相當。而在清除超氧陰離子能力測定，三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加及抗氧化劑 BHT 均無法顯示出有良好的清除超氧陰離子能力，可能與待測物的成分或溶劑屬脂溶性有關。在動物實驗結果方面，雖然無法顯示出有明顯的差異性，但仍值得再深入探討台灣產三葉五加的進一步功效，綜合以上之結果，證明三葉五加具有良好的抗氧化效果，並值得更深入探討研究使用在動物方面的功效。

## 略字表

GSH	Glutathione
SOD	Superoxide dismutase
GSH-Px	Glutathione peroxidase
ROS	Reactive oxygen species
MDA	Malondialdehyde
LPO	Lipid peroxidation
NO	Nitric oxide



# 第一章 緒論

## 第一節 研究動機

適量的運動可以促進身體健康、強健體魄，現今的競技訓練皆強調大運動量的訓練方法，但是當身體進行高強度的激烈運動時會導致體內系統的氧氣消耗量增加，特別是骨骼肌肉細胞會需要更多的氧氣代謝產生能量，也容易造成運動性疲勞、心肌、骨骼肌及粒線體膜脂質的過氧化物大量產生，在產生能量的過程中，身體會代謝產生超氧化物，增加體內氧化壓力，引起肌肉細胞損傷和疲勞，甚至降低肌肉細胞的功能，若長時間的進行高強度運動訓練，肌肉細胞在每次受到運動刺激後，即不斷的經歷損傷、清除受損組織、修補和再生的過程(1)。

當體內自由基增加，若抗氧化系統無法應付，氧化性壓力則隨之增加，氧化性傷害就會發生。這些代謝所產生的氧化反應作用，可能導致細胞的損傷。已知劇烈運動會增加自由基產生，可能導致氧化壓力及傷害，造成細胞傷害或使疲勞提前產生。體內的抗氧化系統會隨著運動而發生因應的變化，若抗氧化系統活性增加，可能有助於保護細胞組織，並促進疲勞的恢復。

人體的防禦系統將適量的氧自由基排除，而轉變為無害的水，排

出體外，防禦系統包括：過氧化物歧化酶(superoxide-dismutase，SOD)、過氧化氫酶(catalase，CAT)、麩胱甘肽過氧化物酶(glutathione peroxidase，GSH-Px)、麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase，GRd)。一般皆以測量氧自由基的最終產物脂質過氧化物：丙二醛(malondialdehyde，MDA)，或過氧化物歧化酶(SOD)、肌酸激酶(creatine kinase，CK)、乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase，LDH)來做為判斷氧化壓力(oxidative stress)和脂質過氧化作用後的指標。

許多前人的研究認為，高強度的激烈運動，將促使自由基的累積，會導致氧化傷害<sup>(2)</sup>，所以現在很多文獻探討何種中藥食補可以降低因運動產生的自由基傷害，或是加強疲勞恢復速度，倘若在營養方面給予抗氧化的補充劑，使其與體內內生性的抗氧化物質協同作用，加強體內抗氧化能力，也許能夠降低高強度運動所造成的氧化傷害，或是減少肌肉細胞修復所需的時間，加速修補肌肉纖維，降低氧化壓力，使骨骼肌肉能盡快回復其功能。體內的抗氧化系統會隨著運動而發生因應的變化，若抗氧化系統提高將有助於保護細胞組織，同時可以延遲老化的發生<sup>(3)</sup>。

三葉五加(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.)為唯一台灣產與刺五加(*Acanthopanax senticosus* Harms)同屬植物之植物，刺五加是中

藥五加皮原料之一<sup>(4-5)</sup>，具有活血去瘀、去風濕、壯筋骨、治療跌打損傷、風寒，近代研究<sup>(6-8)</sup>發現刺五加具有與人參相同的效果，可做為替代品，又稱為西伯利亞人參，並且具有比人參更佳的適應原(Adaptogen)樣作用，其藥理活性主要有止痛、抗血小板凝集、抗疲勞等作用<sup>(9)</sup>，而唯一台灣產三葉五加，是台灣民間用治跌打損傷、止痛等效果<sup>(10)</sup>，已經有許多化學成分被分離出<sup>(11-15)</sup>，唯有三葉五加的抗疲勞或是抗氧化活性作用尚未有人研究分析，我們將以同屬植物刺五加的藥理活性為基礎，探討三葉五加的補給對於衰竭運動引起氧化傷害的保護能力，以使台灣藥用植物資源能充分的開發及利用。



## 第二節 研究目的

五加皮為重要的中藥材之一，在現在醫療或是市面上使用的情形也相當頻繁，用於保健食品或是其他相關治療上，五加皮有分為南五加皮及北五加皮，南五加皮之基原植物主要為五加科五加屬，刺五加及三葉五加都是其中之一的植物，現今大部分都針對刺五加做探討研究，的確也發現刺五加有許多有效的藥理作用，如：以爬繩法測定小鼠疲勞程度，服用刺五加的耐疲勞程度明顯高於未服用刺五加組。另一採取游泳實驗，讓小鼠在 28-30°C 下游泳，給予刺五加補充者可延長其運動時間<sup>(16)</sup>。刺五加可顯著提高小鼠在缺氧環境中的存活率及較高的運動能力，研究指出讓小鼠在低氧的環境中分成實驗組與對照組，同時在不同的低氧環境中作游泳訓練，結果顯示攝取刺五加可明顯提升小鼠在較低的缺氧環境中，有較高缺氧耐受能力及運動能力並提高存活率<sup>(17)</sup>，而針對台灣產三葉五加之活性成分研究，實驗結果指出三葉五加之甲醇粗提取物及氯仿層，均可以明顯延長因 Hexobarbital 所誘發的睡眠時間，顯示這兩樣萃取出具有顯著增強巴比妥酸鹽增強作用，三葉五加之甲醇粗提取物、氯仿層、乙酸乙酯層、正丁醇層則對 Collagen 有抑制作用，三葉五加之甲醇粗提取物分出之氯仿層，同時具有巴比妥酸鹽增強作用及抗血小板凝集作用<sup>(9)</sup>，也因刺五加與三葉五加都為五加科五加屬植物，即想深入探討台灣產三葉

五加是否也有相同抗氧化或抗疲勞等藥理作用，因此，本研究為針對三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加做抗氧化性分析及動物實驗，藉此了解三葉五加的藥理功效，並能充分開發研究。



### 第三節 研究架構



圖一 實驗研究架構圖。

## 第二章 文獻探討

### 第一節 三葉五加研究

#### 一、三葉五加簡介

五加科植物約有 80 屬，900 多種，分布於兩半球熱帶至溫帶地區。中國有 22 屬約 160 多種，分布於全國各地；台灣地區有 10 屬約 16 種。南五加皮之基原植物為五加科 (Araliaceae) 五加屬 (*Acanthopanax*)，如：紀氏五加 (*Acanthopanax giraldii* H<sub>ARMS</sub>)、細柱五加 (*Acanthopanax gracilistylus* W. W. S<sub>MITH</sub>)、香五加 (*Acanthopanax henryi* H<sub>ARMS</sub>)、藤五加 (*Acanthopanax leucorrhizus* H<sub>ARMS</sub>)、刺五加 (*Acanthopanax senticosus* H<sub>ARMS</sub>)、三葉五加 (*Acanthopanax trifoliatum* (L.) M<sub>ERR.</sub>) 等及其變種，毛脈三葉五加 (*Acanthopanax trifoliatum* var. *setosum*) 則為三葉五加的另一個變種植物，總結五加皮藥能及主治方面，五加皮性味辛溫，祛風濕、壯筋骨、強腰膝，主治濕痺，腳氣、皮膚風濕、腰膝疼痛、陽萎及陰囊濕痒等症<sup>(10)</sup>。五加屬植物之化學成分研究詳述於表一<sup>(9, 18-19)</sup>。

表一 五加屬植物之化學成分研究<sup>(9, 18-19)</sup>。

Classify	Compound name
Inorganic	Cu
Vitamin	Ascorbic acid, Vitamin C, Vitamin E
Alkenyne	Falcarinol, Falcoridinol
Carotenoid	Carotene, $\beta$ - Carotene
Carbohydrate	Galactose, Glucose, $\alpha$ - Glucose, $\beta$ -Glucose, $\alpha$ -Maltose, $\beta$ - Maltose, Sucrose, Sucrose D, Polysaccharde, Eleutheroside C, Eleutherococcus, Polysaccharide pes-A, Polysaccharide pes-B, Eleuthrococcus, Eleutheran A-G
Benzenoid	3,4-dihydroxy-benzoic acid
Lipid	Steric acid, Hecacosanoic acid methyl ester, Limoleic acid, Linoleic acid methyl ester, Linolenic acid, Myristic acid, Oleic acid, Palmitic acid, Petroselinic acid, Arachidic acid, Myistic acid, Myristin
Coumarin	Elerutheroside B-1, Coumarin, Fraxidin
Protein	Alanine, Arginine, Aspartic acid, Cysteine, Glycine, Leucine, Methionine, Serine, Threonine, Tyrosine, Valine
Steroid	Daueosterol, $\beta$ -sitosterol, Campesterol, Daucosterol, Stigmasterol, Cholesterol
Ligan	Eleutheroside D, Eleutheroside E, Sesamin(+), Sesamin(-), Acanthoside D, Ariensin, Coniferin, Syringoside, Chlorogenic acid, Eleitheroside E-5, Eleitheroside E-6, Eleitheroside E-7, Eleitheroside E-8, Eleitheroside J, Eleitheroside K, Eleitheroside L, Syringaresinol-di-o-glucoside
Flavonoid	Hyperoside, Rutin, Afzekin, Delphinidin-3-xylosyl-galacoside, Kaempferol-3-o- $\alpha$ -L-galacoside, Kaempferol-3-rhamnoglucoside

續表一 五加屬植物之化學成分研究<sup>(9, 18-19)</sup>。

Classify	Compound name
Mono-terpene	Dihydro-carvone, Evcavone
Sesqui-terpene	$\alpha$ -Copaene, Cuparene
Diterpene	Kauran-19-oic acid, (-)Kur-16-en-19- oic acid, ENT Kur-16-en-19- oic acid, (-)Kauran-19-oic acid, 168-17-dihydroxu, NTT(-)Pimara-9(11)-15-dien-19-ol, (-)Pimara-9(11)-15-dien-19-ol, 19-acetyl, (-)Piamra-9(11)-15-diene, (-)Pimara-9(11)-diene-19-ol, Iso- Pimara-9(11)-15-dien-19-ol acid
Triterpene	Friedelin, Hederasaponin B, Mussennin B, Chiisanogenin, Chiisanoside, Chiisanoside, Divaroside, Acanthopanaxoside D, Oleanolic acid, Olean-12-20(29)-dien-28-oic acid, 3-o- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, Oleanolic acid, 3-o- $\alpha$ -L-Rhmnoy, Ciwujianoside, Ciwujianoside B, Ciwujianoside c-1, Ciwujianoside c-2, Ciwujianoside c-3, Ciwujianoside c-4, Ciwujianoside D-1, Ciwujianoside D-2, Ciwujianoside F, Ciwujianoside E, Senticoside A, Senticoside B, Senticoside C, Senticoside D, Senticoside E, Senticoside F, Acanthoside A, Acanthoside B, Acanthoside C, Acanthoside D, Acanthoside E

資料來源:

陳慧儀(1991),「台灣產三葉五加與市售五加皮類藥材之鑑別及活性成分之研究」,中國醫藥學院中國藥學研究所藥學碩士論文。

University of Illinois at Chicago (1989), “Napralert data base profiles on *Acanthopanax* and *Eleutherococcus*,” PCRPS, No. 30.

倪娜、劉向前(2006)，「五加科五加屬植物的研究進展」，中草藥，第三十七卷，第十二期，第1895-1900頁。

三葉五加為五加科植物，別名為三加皮、白筋、白筋遠、風黨筋、苦筋蔥、香藤刺，英文學名為 *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.，中文學名為三葉五加，主產地為台灣、日本、華南、華中，三葉五加的形態，為常綠藤蔓性灌木，高2~7公尺，全株及葉柄多散生小鉤刺，葉互生，3出複葉，柄光滑，長2~6公分，葉緣為鋸齒形且光滑，長3~8公分、寬2.5公分，8~9月為開花季節，花為白色、花瓣5片、萼5裂，9~10月結果實，漿果扁球形，徑3~4公厘，果梗長約2公分，藥理使用方面，其藥用功能及植物部位，在台灣為針對三葉五加根及莖，全年採根及幹曬乾，有祛風、止痛之功效，主治胃炎疼痛、跌打損傷，用量為20~40公克，在嶺南地區，根的部位可以治腫紅症、跌打傷、敷瘡，葉的部位可治勞傷<sup>(10,20)</sup>。

表二為三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加之相關型態及分布。針對已發表過三葉五加之化學成分研究為表三。

表二 三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加之相關型態及分布<sup>(21-22)</sup>。

學名	圖片	型態	分布
三葉五加 <i>Acanthopanax trifoliatum</i> (L.) MERR.		常綠蔓性灌木，全株及葉柄多散生小鈎刺、葉互生，3出複葉，柄光滑，葉緣鋸齒形，光滑，兩面均光滑。	台灣、中國之常綠蔓性灌木，分布於日本、印度、菲律賓。
刺五加 <i>Acanthopanax senticosum</i> RUPER. et MAXIM.		落葉灌木，直立而稍有分支，常密生有刺，小葉5枚，葉緣重鋸齒型，表面暗綠色有毛。	東北、華北諸省山地、韓國、日本、阿穆爾、烏蘇里、庫頁島。
毛脈三葉五加 <i>Acanthopanax trifoliatum</i> var. <i>setosum</i>		為三葉五加的另一變種，中肋及小葉脈上有剛毛，葉緣上也有剛毛狀鋸齒。	分布於高海拔之山區。

資料來源:

<http://www.liniuan.com.tw/AS.htm> ;

<http://my.so-net.net.tw/santakcool/2/014004.htm>

表三 三葉五加之化學成分研究<sup>(9, 19, 23)</sup>。

Compound	
Lipide	Arachidic acid
	Fatty acid
	Margaric acid
	Palmitic acid
	n-Pentadecanoic acid
	Stearic acid
Lignan	Syringin
Alkane	Dotriacontan-1-ol
	n-Dotriacontane
	n-Hentriacontane
	n-Nonacontane
	Triacontan-1-ol
	Triacontan-1-ol
	n-Triacontane
	n-Tritriocontane
	Inorganic
KNO	
Carbohydrate	Myoinositol
	Scyllitol
Steroid	Campesterol
	Cholesterol
	$\beta$ -Sitosterol
	Stigmasterol
Diterpene	Ent-kaur-16-en-19-oic acid
Triterpene	24-nor-3 $\alpha$ -11 $\alpha$ -dihydroxy-lup-20(29)-en-25-oic acid
	24-nor-3 $\alpha$ -11 $\alpha$ -dihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid
	3 $\alpha$ -11 $\alpha$ -23-trihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid
	3 $\alpha$ -11 $\alpha$ -dihydroxy-lup-20(29)-ene-28-oic acid
	3 $\alpha$ -11 $\alpha$ -dihydroxy-23-oxo- lup-20(29)-ene-28-oic acid
	Taraxerol
	Taraxerol acetate

資料來源:

陳慧儀(1991), 「台灣產三葉五加與市售五加皮類藥材之鑑別及活性

成分之研究」，中國醫藥學院中國藥學研究所藥學碩士論文。

倪娜、劉向前(2006)，「五加科五加屬植物的研究進展」，中草藥，

第三十七卷，第十二期，第1895-1900頁。

<http://www.spec-g.com.tw/twherb/HerbDetail.aspx?HID=7>



## 二、三葉五加相關藥理作用研究

表四為發表過之五加科五加屬相關之藥理作用<sup>(9, 18-19, 23)</sup>。

表四 五加科五加屬相關之藥理作用<sup>(9, 18-19, 23)</sup>。

Plant	Biological activity
<i>Acanthopanax chiisanensis</i>	Antihepatotoxic activity Antihistamine activity Antitoxic activity GOT inhibition GPT inhibition
<i>Acanthopanax gracilistylus</i>	Analgesic activity
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Antimutagenic activity Glutathione peroxidase stimulation Glutathione-S-transferase induction Lipid peroxide formation inhibition Superoxide stimulation Antiviral activity Antioestrogenic effect Antistress activity Cardiotonic activity Chronotropic effect positive CNS stimulant activity Coronary vasodilator activity Antihypertensive activity Non-specific resistance stimulation Oestrogenic effect Protein synthesis inhibition Vasoconstriction activity
<i>Acanthopanax sieboldianus</i>	Antiprogestosterone effect
<i>Acanthopanax spinosus</i>	Antiinflammatory activity Cytotoxic activity Oestrogenic effect Neuroleptic activity

資料來源:

陳慧儀(1991),「台灣產三葉五加與市售五加皮類藥材之鑑別及活性成分之研究」,中國醫藥學院中國藥學研究所藥學碩士論文。

University of Illinois at Chicago (1989), “Napralert data base profiles on *Acanthopanax* and *Eleutherococcus*,” PCRPS, No. 30.

倪娜、劉向前(2006),「五加科五加屬植物的研究進展」,中草藥,第三十七卷,第十二期,第1895-1900頁。

<http://www.spec-g.com.tw/twherb/HerbDetail.aspx?HID=7>



## 第二節 自由基與抗氧化防禦系統

### 一、自由基來源

生物體中的自由基來源可分為從內在及外在，內在來源包括粒腺體電子傳遞鏈、氧化反應、吞噬細胞的吞噬作用，例如吞噬細胞活化時即會釋放出  $H_2O_2$ ，或內質網內所含的 flavins、thiol groups、mixed function oxygenase 的自氧化過程也會產生活性氧；外在來源則是生物體受到傳染、輻射、香煙、藥物或化學毒物侵入後而產生的活性氧物質。活性氧物質經由自由基引發之連鎖反應，將攻擊胞內許多重要分子並且生成有毒之中間代謝產物，進而對生物體造成傷害。

### 二、活性氧物質

氧在生物體內的有氧代謝過程中會形成活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS)，如超氧陰離子自由基 (superoxide radical,  $\cdot O_2^-$ )、過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ) 及氫氧自由基 (hydroxyl radical,  $\cdot OH$ ) 等，許多活性氧物質屬於自由基 (free radical)，其電子軌域的外層軌道上含有未配對的電子或原子團，因此相當不安定，會攻擊體內許多重要分子，如 DNA、蛋白質、脂質等，為造成老化以及諸如癌症、動脈硬化、心肌梗塞與免疫系統疾病的主要原因之一。

## (一) 活性氧物質來源

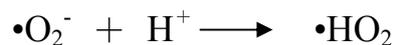
除了生物體內氧化還原反應及噬菌體細胞的吞噬作用外，主要來自於粒線體的電子傳遞鏈。在正常的代謝過程中，2 個氧原子可接受 4 個電子傳遞鏈來的電子，並和氫質子結合形成 2 分子的水；若 1 氧分子只接受 1 個電子則形成超氧陰離子自由基 (superoxide radical,  $\bullet\text{O}_2^-$ )；若接受 2 個電子和 2 個氫質子則形成過氧化氫(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )；接受 3 個電子則成為 2 分子的氫氧自由基 (hydroxyl radical,  $\bullet\text{OH}$ )，由於超氧陰離子自由基及氫氧自由基皆含有未鍵結的單一電子，會吸引周圍電子使其氧化並形成另一自由基，此新生成的自由基會繼續與其他周圍分子反應，若此連鎖反應不被適當且有效的控制，將對生物體造成嚴重傷害。如圖二為氧分子之氧化還原及激發狀態。



自由基衍生物如過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )等，經由引發自由基的連鎖反應，攻擊許多重要分子並且生成有毒之中間代謝產物，進而對生物體造成傷害。

### 1. 超氧陰離子自由基 (superoxide radical, $\bullet O_2^-$ )

為生物體最常見且產生最多的自由基，如體內巨噬細胞的吞噬作用及粒線體的電子傳遞鏈等均會產生，由於其半衰期短( $1 \times 10^{-5}$  sec)，因此很少造成生物體的傷害。在正常的生理條件下，不需酵素參與時，也可以快速歧化 (dismutation)成毒性較低的過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )。酸性 pH 值時， $\bullet O_2^-$ 會與氫質子形成氫雙氧自由基 (hydroperoxyl radical,  $\bullet HO_2$ )，此自由基活性較 $\bullet O_2^-$ 強，會攻擊生物膜上不飽和脂肪酸引發脂質過氧化反應。一旦產生過多的 $\bullet O_2^-$ 而代謝過程無法將其分解時，則 $\bullet O_2^-$ 可能與金屬離子結合，抑制了以金屬離子為活性中心的酵素活性，如 superoxide dismutase、catalase 及 glutathione peroxidase，使其無法分解  $H_2O_2$ 。



### 2. 過氧化氫 (hydrogen peroxide, $H_2O_2$ )

$H_2O_2$ 可經由超氧歧化酶(SOD)歧化而來，另外在體內吞噬細胞的

吞噬過程、脂肪酸的  $\beta$ -氧化及其他的氧化還原反應也會產生  $H_2O_2$ 。

因  $H_2O_2$  不具有未配對的電子，所以不屬於自由基，當氧被還原成水的過程中為最安定的中間物質，雖然  $H_2O_2$  不會立刻與生物分子作用，但是它會通過細胞膜，若  $H_2O_2$  與細胞膜外游離的金屬離子如：銅離子、鐵離子等結合，進行 Fenton reaction 將生成破壞力極大的氫氧自由基 (hydroxyl radical,  $\bullet OH$ )。

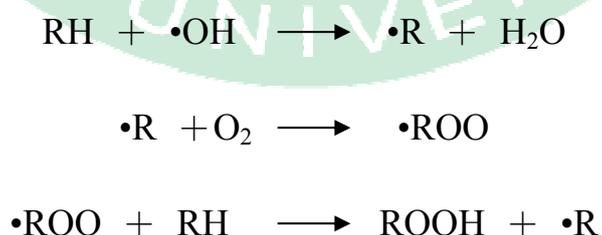


### 3. 氫氧自由基 (hydroxyl radical, $\bullet OH$ )

氫氧自由基是生物體內自由基中最活躍者，它對細胞所造成的破壞性也是所有自由基中最嚴重的一種，其來源可由  $H_2O_2$  在金屬離子如銅離子、鐵離子的催化下進行 Fenton reaction，當不穩定的狀況時會攻擊生物膜上的不飽和脂肪酸、粒線體的 DNA，使得膜上的蛋白質結構因此受到破壞，脂肪酸也氧化。當  $\bullet OH$  在 DNA 附近生成時  $\bullet OH$  不僅可與 DNA 上的鹼基結合，也可能從 DNA 螺旋結構中搶奪氫質子造成 DNA 結構改變；而當生物細胞膜上不飽和脂肪酸的雙鍵受到氫氧自由基攻擊而失去一個氫質子後，脂肪酸本身會成為脂質自由基(carbon-centered lipid radical,  $\bullet R$ )，此脂質自由基( $\bullet R$ )和  $O_2$  接觸後，形成脂質氧化自由基(alkoxyl radical,  $\bullet RO$ )及脂質過氧化自由基

(peroxyl radical,  $\cdot\text{ROO}$ )等脂質氧化連鎖反應，除了生成有害的脂質過氧化產物(lipid peroxide, LPO)，也會再分解生成醛類、醇類，其中以丙二醛(malondialdehyde, MDA)為常見的代謝產物。

脂質氧化連鎖反應也會使生物膜上的脂質、蛋白質結構受破壞，增加膜內物質的滲漏流失，也影響細胞膜上離子通道、接受體以及粒腺體的氧化磷酸化反應等正常的功能。當生物膜上的脂質結構遭受破壞，因而失去完整性，同時也會增加膜內物質的滲漏流失，細胞膜內的運輸、流動性以及膜電位皆會受到影響，生物膜上所連結的酵素及受器也因此失去活性。脂質氧化後所產生的過氧化產物經由氧化酵素分解後可生成醛類、醇類，其中丙二醛 (malondialdehyde, MDA)為極活潑的交聯劑 (cross linking agent)，會使細胞發生交聯而失去活性，同時MDA與老化、突變以及癌症也有極大關聯<sup>(25)</sup>，因此 $\cdot\text{OH}$ 為活性氧物質中對生物體最具威脅性。



### 三、自由基產生途徑

#### (一) 超氧自由基(superoxide radical, $\cdot\text{O}_2^-$ )

超氧自由基是指氧分子多了一個額外電子的超氧化物( $\cdot\text{O}_2^-$ )，它對人體生理的影響力極大，雖然很少直接對生物體造成傷害，但其所產生的二級或三級產物如過氧化氫( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、氫氧自由基( $\cdot\text{OH}$ )及單重氧( $^1\text{O}_2$ )等卻會造成生物體嚴重的損傷<sup>(26)</sup>。在生物體內超氧自由基的形成有幾個途徑<sup>(27)</sup>：

##### 1. 電子傳遞系統的漏洞：

為形成超氧自由基最主要的途徑，生物體內的電子輸送系統是發生在細胞內的粒腺體，當單個電子被流漏出而輸送給氧時就會產生超氧自由基。

##### 2. 血紅素(hemoglobin)的氧化：

血紅素分子中的血基質鐵是正二價( $\text{Fe}^{2+}$ )，當它與氧氣接合時，則一個電子會在鐵離子與  $\text{O}_2$  之間移動，而產生超氧自由基。



### 3. 吞噬細胞的活化：

當有外來病毒或細菌侵入人體時，單核細胞、嗜中性(neutrophils)、嗜酸性(eosinophils)產生 $\cdot\text{O}_2^-$ 會協助把外來物質破壞。雖然人體的免疫功能需要這種活性大而分子小的自由基協助抵抗病菌，然而當 $\cdot\text{O}_2^-$ 產生過量時，也會對正常細胞產生傷害。

### 4. 體內酵素的作用：

體內酵素多屬於氧化酶，如 xanthine oxidase 或 indoleamine dioxygenase 等，能在代謝過程中將氧分子變成超氧自由基。

#### (二) 過氧化氫(hydrogen peroxide, $\text{H}_2\text{O}_2$ )

在體內吞噬細胞的吞噬過程、脂肪酸的 $\beta$ -氧化及其他的氧化還原反應會產生  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，也可經由超氧歧化酶(SOD)歧化而來。 $\text{H}_2\text{O}_2$  對細胞的傷害較大，因為其能穿透細胞膜並與細胞液中的二價金屬發生 Fenton reaction，產生破壞性極大的 $\cdot\text{OH}$ ，對生物體造成嚴重的氧化性傷害。

#### (三) 氫氧自由基(hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$ )

生物體內自由基中最活躍者，它對細胞所造成的破壞性也是所有

自由基中最嚴重的一種，主要是超氧自由基經超氧歧化酶(SOD)歧解成  $H_2O_2$  後再經由下列三個途徑轉變而成<sup>(27)</sup>：

1. 高能量狀況：如紫外線照射，會發生在人體的視覺器官，是白內障的形成主因。
2. Fenton reaction：為二價鐵與 $H_2O_2$ 反應。
3. Harber-Weiss reaction：為超氧自由基與 $H_2O_2$ 於鐵觸媒下反應。

#### (四) 單重態氧(singlet oxygen, $^1O_2$ )

單重態氧屬於一個強氧化劑，雖然沒有未配對的電子，但是很多分子如多元不飽和脂肪酸可以與它結合，使它形成反應性較差的基態氧(ground state oxygen)。在體內主要是氧經紫外線照射而產生的激發態氧，單重態氧極易與氫反應，產生自由基或造成脂質的過氧化，另外在脂質過氧化反應中，單重態氧的產生也可藉由過氧化自由基( peroxy radical,  $\bullet ROO$ )的自反應而產生。

#### 四、自由基對生物體傷害

當細胞暴露於活性氧與自由基下，細胞內與細胞外的主要成分，蛋白質、酵素、醣類、脂質、DNA 和 RNA 都是活性氧和自由基攻擊的主要目標，而含氧自由基對生物體細胞和分子的傷害皆被證實與許

多疾病有關。

### (一) 對脂質之傷害

脂質和脂蛋白的不飽和脂肪酸對自由基引起了氧化特別敏感。細胞膜不飽和脂肪酸的氧化是人體內常發生的氧化現象，例如活性氧，特別是氫氧自由基的過量產生，非常容易引起細胞膜的脂質氧化。多元不飽和脂肪酸受到自由基攻擊後會形成脂質自由基，氧化並且與這些自由基反應而形成過氧化自由基( peroxy radicals)與氫過氧化物(hydroperoxide)，這些化合物會繼續進行連鎖反應而導致膜的損壞。一些毒性物質如四氯化碳也可以促進細胞內的脂質過氧化作用，而破壞細胞膜，且四氯化碳也會導致肝臟均質液微粒體(microsome)的氧化而形成丙二醛(malondialdehyde;MDA)。脂質過氧化不僅會破壞脂質，也會造成膜上蛋白質如接受體和酵素的破壞<sup>(28)</sup>。

許多包括癌症的許多疾病及促進老化的研究顯示，脂質過氧化和活性氧佔了相當重要的角色。脂質氧化的一些二級產物，特別是MDA，本身是相當具有活性，這些分子會與生物體組成如蛋白質、胺基酸和DNA反應。因此MDA與老化、致突變生成(mutagenesis)和致癌生成(carcinogenesis)皆有關聯。

## (二)對蛋白質之傷害

蛋白質在氧化狀態下，其胺基的酸殘基會受到多種的氧化修飾，如蛋白質羰基(carbonyls)的形成，而許多活性氧也可以氧化蛋白質上的-SH基，使許多重要的酵素不活化而失去功能。由於蛋白質上經常會結合過渡金屬離子，因而  $H_2O_2$  會在蛋白質的特定位置上形成  $OH\cdot$  使蛋白質形成攻擊目標。例如蛋白質在  $^{60}CO$  的照射及氧的存在下也會進行連鎖氧化反應，此現象可能導致細胞中自由基的產生增加數倍之多，並造成細胞的傷害甚至死亡<sup>(29)</sup>。

## (三)對DNA之傷害

在體內，DNA 是自由基攻擊的一個重要目標，當  $OH\cdot$  攻擊 DNA 時會造成多種化學性的改變，其會攻擊 DNA 所有的組成而造成 DNA 鹽基之修飾、交叉連結(cross-linking)、DNA 鹽基與蛋白質結合及 DNA 股斷裂等。例如 DNA 上的胸嘧啶(thymine)殘基受到  $OH\cdot$  攻擊時會形成 thymine glycol 或是 5-hydroxymethyluracil。而鳥糞嘌呤(guanine)殘基受到  $OH\cdot$  攻擊則形成 8-hydroxyguanine，8-hydroxyguanine 在 DNA 複製時會導致鹽基 G 變成 T 不正確的配對，而 thymine glycol 的形成則會阻斷 DNA 複製的進行。 $OH\cdot$  導致 DNA 的單股或是雙股斷裂對於細胞的傷害相當重要，特別是雙股 DNA 斷裂並無法由細胞修復。氫

氧自由基也可以攻擊核膜上的脂質，並產生過氧化基( peroxy) 、氧化烷基(alkoxy) 自由基及其他過氧化產物，之後再與 DNA 反應。在  $H_2O_2$  方面，由於  $H_2O_2$  有較長的半生期，因此在細胞中可以擴散至核，並與結合在 DNA 上的鐵反應形成  $OH\cdot$ ，進一步攻擊 DNA 而造成位置特異性之單股斷裂和鹽基修飾<sup>(30-32)</sup>。

研究測試  $KO_2$  所產生的  $\cdot O_2^-$  對細胞的影響，結果發現隨著  $O_2^-$  濃度的增加，DNA 斷裂的數目亦呈線性增加，且當在培養液中加入觸媒(catalase)時，幾乎可以完全抑制  $\cdot O_2^-$  所引起的 DNA 斷裂，而添加金屬螯合劑時也發現可以減低 DNA 的斷裂<sup>(33)</sup>，因此推測  $\cdot O_2^-$  在細胞中會進一步還原成  $H_2O_2$  或是  $OH\cdot$  而造成 DNA 的傷害。除了體內自由基的傷害之外，一些脂質過氧化產物或是外來物質也會直接或是間接造成 DNA 之傷害。如 MDA 會與鳥糞嘌呤(guanine)、腺嘌呤(adenine) 和胞嘧啶(cytosine) 鹽基形成加成物(adducts)，而誘導 G 形成 T、A 形成 G 和 C 形成 T 配對錯誤<sup>(34)</sup>。

這些 DNA 氧化產物可能會造成相當嚴重的後果，自由基對於 DNA 的傷害在癌症發展研究上也很受重視，尤其是由離子輻射所引起的傷害已有相當多的研究<sup>(35)</sup>，特別是 8-hydroxyguanine 的形成與致癌作用有密切的關係。

## 五、生物體內抗氧化系統

生物為了預防或降低氧化傷害，在體內有一套完整的抗氧化系統<sup>(36)</sup>，其中包括兩大部分，一是由具抗氧化能力的分子組成、另一則是由抗氧化酵素系統所組成<sup>(37)</sup>，抗氧化分子依溶解性可區分為脂溶性，包括維生素E和β-胡蘿蔔素，以及水溶性，包括麩胱甘肽 (glutathione, GSH)、維生素C、尿酸 (uric acid) 和膽紅素 (bilirubin) 等。而體內抗氧化酵素系統則由 SOD、CAT、GPX、GST 等所構成，透過這一完整抗氧化系統，讓生物在體內築起一道嚴密的防線，以防止細胞受到氧化傷害<sup>(36)</sup>。當體內自由基增加，氧化性壓力也就增加，此時若抗氧化系統無法應付，就會發生氧化傷害<sup>(38)</sup>。

### (一)脂質過氧化產物

脂質的氧化反應大致可分為三階段，分別為：起始步驟 (initiation phase)、增殖步驟 (Propagation phase) 及終止步驟 (termination phase)。因此，抗氧化劑的作用機制大致可區分為兩種：一是延長起始步驟所需的時間，另一是抑制增殖步驟的進行。抗氧化劑並無法完全阻斷氧化反應，只是延緩氧化反應的進行。自由基會觸發引起脂質過氧化的連鎖反應，將多元不飽和脂肪酸變為 lipid hydroperoxides，過氧化脂質可以再斷裂成其它自由基，形成醛類，最終產物是 MDA、

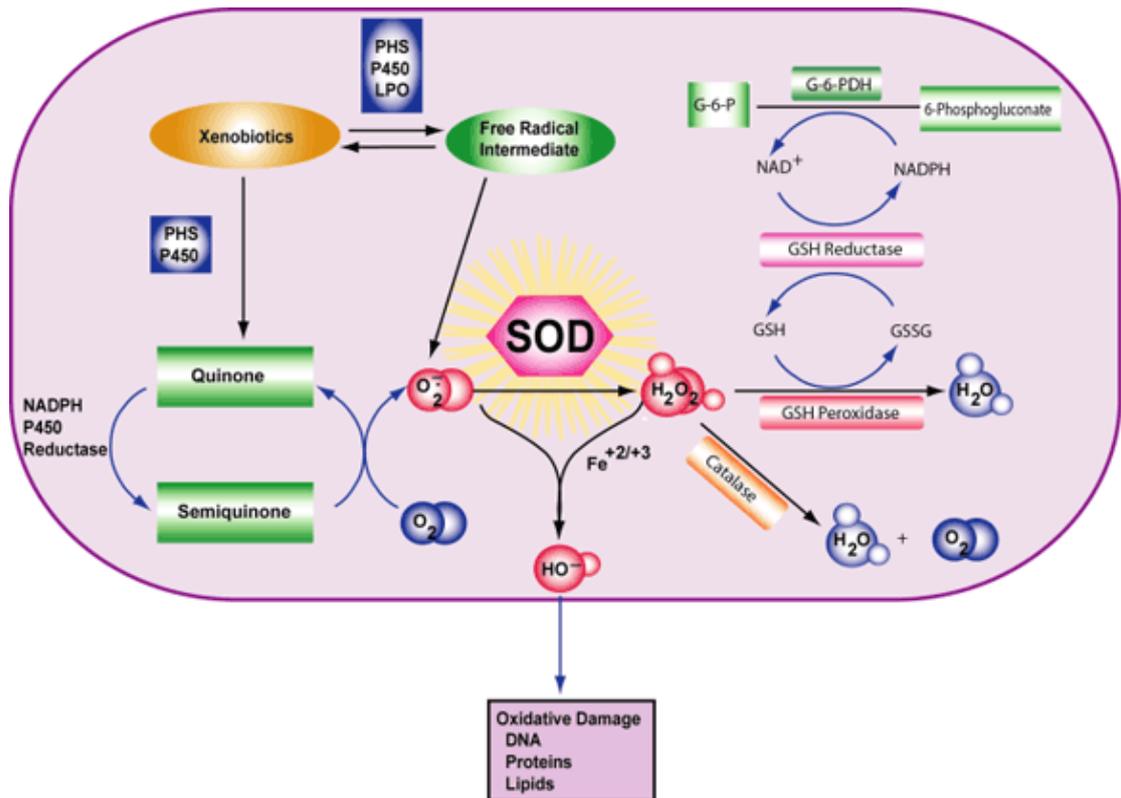
乙烷 (ethene) 、戊烷 (pentene) 等<sup>(39)</sup>，且過氧化脂質 (lipid peroxide) 是最多的自由基反應物，當不飽合脂肪酸被自由基氧化後會造成連鎖反應，所以會產生極多的自由基，因此 MDA 可作為生物體內脂質過氧化程度之指標，也可作為自由基對生物組織傷害之評估根據。若是細胞膜上的不飽合脂肪酸被過氧化，可能會導致細胞膜失去正常功能，另外，過氧化脂質也可以直接和蛋白質、酵素或核酸作用，造成細胞變性或死亡<sup>(40)</sup>。

## (二)體內酵素性抗氧化防禦系統

細胞在代謝的過程中會持續產生自由基 (free radicals)和活性氧物種 (reactive oxygen species, ROS)，其可經由體內的抗氧化系統消除，但是高強度的運動卻可能會使體內在 ROS 和抗氧化系統間的制衡失去平衡，因此在運動的過程中許多異化的荷爾蒙會增加，骨骼肌肉過度的收縮也會使自由基被釋放出來，其它像是細胞內外鈣離子的恆定和含鐵的蛋白質被破壞，都會促使 ROS 產生<sup>(41)</sup>。在高強度的運動下，身體氧氣的攝入大約會比休息時高出 20 倍<sup>(42)</sup>，而肌纖維氧氣的消耗甚至會上升約至 200 倍<sup>(43)</sup>。大多數的氧氣是在粒腺體 (mitochondria) 經由氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)過程代謝產生 ATP (adenosine 5'- triphosphate)，但是在這過程中，也可能會經

由電子傳遞鏈 (electron transfer chain, ETC) 產生超氧自由基 (superoxideradicals) ( $O_2\bullet$ )、氫過氧化物 (hydrogen peroxide) ( $H_2O_2$ )、羥自由基 (hydroxylradicals) ( $OH\bullet$ ) 這類的活性氧物種 (reactive oxygen species, ROS)。估計所有流經細胞色素鏈 (cytochrom chain) 的電流約有 2-5% 並不能完全代謝成水，而形成 ROS<sup>(44)</sup>，所以有許多以運動的氧化壓力為研究背景，在探討補充抗氧化劑對於降低運動的氧化傷害、加強抗氧化能力和促進運動表現之相關文獻報告<sup>(2)</sup>。

血液中的抗氧化酶作為判斷組織氧化受損的相關生化指標的活性，包括過氧化物歧化酶(SOD)、麩胱甘肽(GSH)、麩胱甘肽過氧化物酶(GSH-Px)及一氧化氮(NO)。圖三為體內酵素性抗氧化防禦系統。



圖三 體內酵素性抗氧化防禦系統<sup>(45)</sup>。

資料來源：

[http://www.sigmaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Biochemicals/Enzyme\\_Explorer/Cell\\_Signaling\\_Enzymes/Superoxide\\_Dismutase.html](http://www.sigmaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Cell_Signaling_Enzymes/Superoxide_Dismutase.html)

### 1. 過氧化物歧化酶(Superoxide dismutase;SOD)

在需氧生物中普遍存在的一種酶，它能催化超氧物陰離子自由基歧化反應而成為基態的氧分子和過氧化氫。SOD 屬於金屬酶，其性質不僅取決於蛋白質部分，而且還取決於結合到活性部位的金屬離子。按照結合的金屬離子種類不同，SOD 有 CuZn-SOD、Mn-SOD 和

Fe-SOD 三種。三種酶都可催化  $O_2^-$ ；歧化為  $H_2O_2$ ，與  $O_2$ ，但其性質有所不同，其中 CuZn-SOD 與其他兩種 SOD 的差別較大，而 Mn-SOD 與 Fe-SOD 之間差別卻較小<sup>(46)</sup>。

過氧化物歧化酶(SOD)代謝  $O_2^-$ 形成  $H_2O_2$  的反應如下：



## 2. 麩胱甘肽(Glutathione;GSH)

在細胞內抗氧化系統中扮演重要的角色<sup>(47)</sup>，麩胱甘肽是由三個氨基酸所構成的水溶性抗氧化分子，它的結構為  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly。廣泛分佈在動物、植物和微生物細胞中；在動物體內濃度可高達 0.5-10 mM，麩胱甘肽的生理功能很多，包括(1)維持膜蛋白硫醇完整性，並維持細胞正常之生理功能。(2)參與維生素 E 的再生。(3)參與細胞內的解毒代謝作用。(4)還原態的麩胱甘肽在細胞內扮演抗氧化劑的角色，利用麩胱甘肽過氧化酶(GSH-Px)來移除過氧化氫( $H_2O_2$ )，以減少氧化壓力對於細胞的傷害，反應如下<sup>(48)</sup>：



## 3. 麩胱甘肽過氧化酶(Glutathione peroxidase;GSH-Px)

麩胱甘肽過氧化物酶是機體細胞(尤其是紅血球)一個重要的對抗

氧化劑作用的防禦體系，它在細胞內能消除有害的氧化代謝產物，阻斷脂質過氧化連鎖反應，從而保護細胞膜結構和功能完整，缺乏時可致新生兒黃疸<sup>(49)</sup>。

#### 4. 一氧化氮(Nitric oxide; NO)

為一種自由基，因為它帶有奇數電子，比氧分子(O<sub>2</sub>)少了一個電子，是人體神經系統傳遞訊息的分子(messenger molecule)，對人體的免疫系統有極大的作用，當人體被外物侵犯時，免疫系統發動一氧化氮(NO)自由基去殺菌，也可以使人的血管鬆弛而達到降血壓的效果。人體內有兩種 NOS，分別為一氧化氮合成(constitutive NOS，簡稱 cNOS)及誘發一氧化氮合成(inducible NOS，簡稱 iNOS)，NOS 有細胞色素 P-450(cytochrome P-450)的基本結構，是含有鐵質的血基蛋白質，一氧化氮合成(cNOS)會保持一定的濃度，而誘發一氧化氮合成(iNOS)的含量則經常在變化，當身體需要量增加時，它的合成速率就會增加，兩者在體內分佈的部位也不同。

### 第三節 運動與抗氧化之相關性

自由基是具有不成對電子，體內自由基是相當活躍的分子，在身體內破壞力很大，許多因氧化壓力所造成的疾病多與自由基有著很大的相關性。自由基所造成的疾病傷害像是很多的慢性病，例如：癌、腦中風、心血管疾病等，其他如：關節炎、痛風、神經萎縮、免疫系統等慢性疾病<sup>(1)</sup>。由於身體長時期遭受過多的自由基傷害，造成身體老化的現象，經由長時間的累積，漸漸造成更嚴重的傷害。但是，人體中卻有一種非常微妙的保護機制，因為我們體內可以分泌抗氧化酵素，這些酵素可以消除自由基對我們細胞的傷害。但是，人體在老化的過程中，很多的代謝效率會漸漸地變差，如此一來很多的激素分泌或是酵素的產量也會全面的降低或是停止，這些因素更會使得體內抗氧化功能下降，進而引起器官功能的退化。

在人體安靜時約有 2-5%的氧會在電子轉換過程中產生氧自由基，體內產生一定量的自由基，但激烈運動中因人體對氧的需求量增加、粒線體電子傳遞鏈中電子流速增加與細胞色素氧化能力下降的結果，使體內的氧自由基的產量增加。當體內自由基增加，氧化性壓力也就增加，此時若抗氧化系統無法應付，氧化性傷害就會發生<sup>(50-52)</sup>。

自由基產生的原因除了運動增加耗氧量的結果外，抽煙、廢氣、

輻射、過度太陽曝曬、藥物、酒精及壓力過大時也容易產生自由基。另外，肌肉收縮時局部缺血與再填補(ischaemic-reperfusion)以及氧再生的結果也會產生自由基。而以電子旋轉共振法(electron spin resonance)測試也發現肌肉內自由基產量有增加的情形；還有運動中兒茶酚胺(catecholamine)產生的自動氧化也會出現自由基<sup>(53)</sup>。

各種自由基中以  $\text{OH}\cdot$  最具破壞性，因它會攻擊蛋白質、DNA 與細胞膜的多不飽和脂肪酸，體內大部份物質與它接觸都會產生變化。 $\text{OH}\cdot$  自由基係由過氧化自由基轉變而來，它會與細胞膜上的不飽和脂肪酸作用而形成脂質過氧化物。脂質过氧化物的形成會影響組織的聚合作用(polymerization)；聚合作用是紅血球進入微血管的重要途徑，若組織聚合作用不佳時，會破壞細胞膜的結構而使紅血球難以進入微血管。自由基也並不完全是有害的，例如氫氧自由基可作為控制細胞的傳遞物。這些傳遞物可以活化肌肉與細胞表面接受器。最著名的如 cAMP 在肝醣合成與分解過程中，需要靠氫氧自由基的作用而使腎上腺素與細胞膜的接受器結合達成肝醣合成與分解<sup>(54-55)</sup>。

人體中常見的自由基很多，氧自由基是其中之一，氧自由基與氫氧自由基又合稱為氧化自由基，在代謝的過程中得到的一個額外的電子而形成的自由基，在我們吸進的氧氣中，約有百分之三會轉變成氫

氧自由基。氧化自由基的活性很高，相對的對於人體的破壞性也很大。氧化自由基會將脂質（lipid）變成過氧化脂質（lipid peroxide），這過氧化脂質會破壞細胞的組織，以及 DNA 的完整性與功能，因此產生了許多疾病，如：關節炎、糖尿病、心臟病、腦中風等<sup>(56)</sup>。

雖然人體內會有自由基的產生，破壞身體的組織結構，但人體複雜的抗氧化酵素系統也會與有害的氧自由基結合，以保護人體組織器官，不受自由基的侵害。而運動可提昇體適能，也可提昇生活品質，然而過度的運動強度與超長運動時間卻會對人體組織造成傷害，包括脫水、虛脫、熱痙攣、中暑、氧化傷害及肌肉受損等現象<sup>(57)</sup>。因此藉由運動達到使血管舒張、血液通透的好處，卻也要避免因為運動而產生的自由基，對我們人體產生的傷害，所以運動的強度以及運動持續年限的長短，對於個體體內氧化狀況的變化具有極為關鍵的影響。

## 第四節 抗氧化活性測定原理

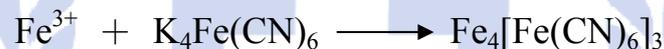
### 一、DPPH 自由基清除能力之測定

脂質在自氧化的過程中，於氧化誘導期間（initiation period）會產生烷基自由基，在連鎖引發期間（propagation period）會產生氫過氧化物及氫過氧自由基，當兩個自由基相互結合時，連鎖反應即終止。在抗氧化的研究上，通常使用 DPPH $\cdot$ （C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> $\cdot$ ）來評估抗氧化劑的供氫能力。DPPH $\cdot$ 為一相當安定的自由基，其甲醇溶液在 517 nm 下有強吸光，當 DPPH $\cdot$ 與抗氧化劑反應時其吸光值會消失，因此在 517 nm 的吸光值越低即表示抗氧化劑的供氫能力越強。常見的抗氧化物是藉由提供氫來清除脂質過氧化物自由基，進而達到抑制氧化連鎖反應之進行。

DPPH $\cdot$ 的甲醇溶液會隨著 pH 值的不同及時間長短而有所變化。DPPH $\cdot$ 的甲醇溶液在 pH 5.0~6.5 比較穩定而有適當的吸收，在鹼性時則不穩定，且 DPPH $\cdot$ 的甲醇溶液會隨時間的增長而逐漸劣化。BHA 及  $\alpha$ -生育醇皆能夠在短時間內有效的清除 DPPH 自由基，並阻止油脂的自氧化反應。

## 二、還原力之測定

還原力的測定主要以普魯士藍 (Prussian blue,  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) 的生成量為指標。原理為利用所加入的赤血鹽( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )提供  $\text{Fe}^{3+}$ ，當甲醇萃取物、BHT 與  $\text{Fe}^{3+}$  反應，將其還原成  $\text{Fe}^{2+}$  黃血鹽( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) 亞鐵氰錯離子，黃血鹽再與  $\text{FeCl}_3$  提供的  $\text{Fe}^{3+}$  反應形成亞鐵氰化鐵，即所謂的普魯士藍，並以分光光度計在 700 nm 偵測普魯士藍的含量，以得知其還原力，因此吸光值越高表示樣品的還原力越強。



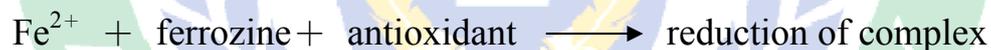
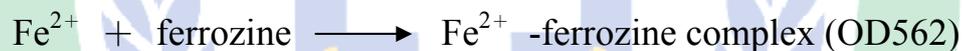
在藥用植物中的還原性物質 (morin、fetulic acid、glutathione 和 kaempferol) 可以明顯的抑制由活性氧所造成植物細胞衰老的現象。換言之，還原力對物質的抗氧化性有一定程度的貢獻<sup>(58)</sup>。

## 三、亞鐵離子螯合能力之測定

脂質氧化的起始反應一般由自由基來做為引發者 (initiator)，而此反應也可以由金屬離子直接催化而引發，且只要少量金屬離子便能產生大量的自由基，加速脂質氧化反應。金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質氧化的主要因素，藉由氧化還原循環的反應，只要少量的

金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行。

在多種金屬離子中， $\text{Fe}^{2+}$  經常是最具影響力的助氧化劑，其可促進脂質氧化作用的進行，雖然亞鐵離子可促使油脂的氧化，但脂質氧化開始後，亞鐵離子已非影響油脂氧化的單一因子。由脂質反應系統所衍生出來的過氧化物、自由基，都會造成油脂的連鎖反應，進而促進油脂的氧化。利用  $\text{Fe}^{2+}$  與 ferrozine 的複合物在 562 nm 之呈色反應，可測得樣品對  $\text{Fe}^{2+}$  離子的螯合能力。當樣品螯合  $\text{Fe}^{2+}$  離子時，會造成 562 nm 吸光值的降低，因此吸光值越低則表示對金屬離子的螯合能力越強。



#### 四、清除超氧陰離子能力之測定

超氧陰離子 (superoxide anion) 本身除具有氧化還原的能力外，也會繼續反應產生單重態氧 (singlet oxygen)、氫氧自由基 (hydroxy radical) 及過氧化氫 (hydrogen peroxide) 等，這些強氧化活性之分子在脂質氧化的氧化誘導反應和連鎖引發反應中扮演著重要的角色<sup>(59)</sup>。在體內，雖然 SOD 可藉由歧化反應 (dismutation reaction) 清除超氧陰離子，但 SOD 攝取後會在胃中遭到破壞，腸道中也不能吸收。

而部分類黃酮具有清除酵素系統及非酵素系統所產生的超氧陰離子之效果，清除超氧陰離子也是提供其抗氧化能力的來源之一，在非酵素系統中，利用 phenazine methosulfate (PMS) 及 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 作用生成超氧陰離子，而超氧陰離子會進一步將 nitroblue tetrazolium (NBT) 還原成 diformazan，此化合物在 560 nm 下有最大的吸光值，故可藉由偵測 560 nm 之吸光值，即可得知樣品清除超氧陰離子之能力，其吸光值越低表示清除超氧陰離子之能力越強。

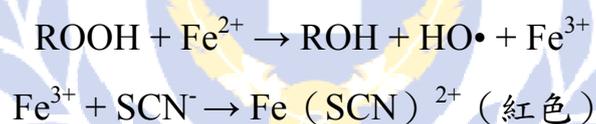
Kim 等人(1995)發現脂溶性抗氧化劑如 BHT、tocopherol、clove oil、flavone 及 sesamol 等物質會促進超氧陰離子的生成，而水溶性的抗氧化劑則具有清除能力<sup>(60)</sup>。Sato 等人(1996)檢測酒中多酚類含量與清除超氧陰離子能力的關係，發現多酚類含量愈高，清除超氧陰離子的能力也就愈高<sup>(61)</sup>。故由上述研究可得知多酚類的含量及結構與清除超氧陰離子的能力有關。Robak 及 Gryglewki (1988)認為類黃酮化合物清除超氧陰離子的能力對其抗氧化性有所影響<sup>(62)</sup>。

## 五、抗油脂過氧化作用之測定-硫氰酸鐵法

硫氰酸鐵法之原理為油脂在氧化的過程中，所產生的氫過氧化(hydroperoxides)會隨氧化反應的時間增長而增加，但當氫過氧化

物生成達一定時，則會開始分解成醛、酮、短鏈碳氫化合物等有機化合物，此時氫過氧化物開始減少。抗氧化活性測定方法，是利用硫氰酸鐵法（thiocyanate method）來評估樣品對亞麻油酸（linoleic acid）自氧化（autoxidation）的抑制能力。

亞麻油酸自氧化產生氫過氧化物，而此氫過氧化物將  $\text{Fe}^{2+}$  氧化成  $\text{Fe}^{3+}$ ， $\text{Fe}^{3+}$  再與  $\text{SCN}^-$  反應生成  $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$  的紅色複合物，此複合物在 500 nm 之波長之單色光下有極大的吸光值，因此油脂氧化程度越高、氫過氧化物越多時，其顏色也隨著加深，因此可由吸光值之大小得知氧化的情形。同時與最常用的天然抗氧化劑  $\alpha$ -生育醇，及最常用的合成抗氧化劑 BHT 做比較。其反應方程式如下：



## 第三章 材料與方法

### 第一節 體外抗氧化實驗

#### 一、實驗材料

(一) 本實驗所使用三葉五加(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.) 於 2006 年 5 月 25 日，購於雅馨園藝陳益炷先生(彰化縣田尾鄉饒平村富農路三段 161 巷 20 號)，后里七星農場陳炎龍先生於 2006 年 6 月 14 日提供三葉五加、刺五加(*Acanthopanax senticosum* Rupr. et Maxim.)，並由鄧正賢教授帶領摘採，毛脈三葉五加(*Acanthopanax trifoliatum* var. *setosum*)於 2006 年 6 月 23 日購自志學農場陳長宏先生(花蓮縣壽豐鄉志學村)。三葉五加、毛脈三葉五加及刺五加組織形態鑑定確認無誤。表五為不同產地三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加之根、莖、葉簡寫及來源地資料整理。

表五 不同產地三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加之根、莖、葉簡寫  
及來源地資料

項目	根	莖	葉
95/5/26 三葉五加 <i>Acanthopanax trifoliatum</i> (L.) MERR. Tianwei Township, Changhua County 522, Taiwan (R.O.C.)	※	ATCTS	ATCTL
95/6/14 三葉五加 <i>Acanthopanax trifoliatum</i> (L.) MERR. Houli Township, Taichung County 421, Taiwan (R.O.C.)	ATTHR	ATHS	ATHL
95/6/14 刺五加 <i>Acanthopanax senticosus</i> RUPER. et. MAXIM. Houli Township, Taichung County 421, Taiwan (R.O.C.)	ASTHR	ASTHS	ASTHL
95/6/23 毛脈三葉五加 <i>Acanthopanax trifoliatum</i> var. <i>setosum</i> Shoufong Township, Hualien County 974, Taiwan (R.O.C.)	ATVSHSR	ATVSHSS	ATVSHSL
95/6/23 三葉五加 <i>Acanthopanax trifoliatum</i> (L.) MERR. Shoufong Township, Hualien County 974, Taiwan (R.O.C.)	ATHSR	ATHSS	ATHSL

## (二) 藥品

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): SIGMA Chemical Co., USA。
2. Potassium ferricyanide ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ): 片山化學工業株式會社，日本。
3. Trichloroacetic acid: 純度99%。
4. Iron(III) chloride hexahydrate( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) : 純度97.0%，片山化學工業株式會社，日本。
5. Iron(II) chloride tetrahydrate ( $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ): 純度>99%，SIGMA Chemical Co., USA。
6. 3-(-2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1,2,3-triazine(ferrozine)

( $C_{20}H_{12}N_4Na_2O_6S_2 \cdot 3H_2O$ ): TCI-GR, 東京化成工業株式會社, 日本。

7. Phenazine methosulfate(PMS): 純度90%, SIGMA Chemical Co., USA。
8.  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide(NADH): SIGMA Chemical Co., USA。
9. Nitroblue tetrazolium(NBT): 純度98%, SIGMA Chemical Co., USA。
10. Linolenic acid ( $C_{18}H_{30}O_2$ ): 純度99%, SIGMA Chemical Co., USA。
11. Ammonium thiocyanate( $NH_4SCN$ ): SIGMA Chemical Co., USA。
12. Butylated hydroxyanisole crystalline (BHT): SIGMA Chemical Co., USA。
13. Ethylenediaminetetracetic acid dipotassium salt (EDTA): 純度  $\geq 98\%$ , SIGMA Chemical Co., USA。
14. Gallic acid: SIGMA Chemical Co., USA。
15. Folin & clostridium's phenol reagent: SIGMA Chemical Co., USA。
16. Quercetin dehydrate ( $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$ ): 純度98%, SIGMA Chemical Co., USA。
17. Aluminum chloride hexahydrate ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ): 純度99%, SIGMA Chemical Co., USA。

18. Potassium acetate ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ): 純度  $\geq 99\%$ , SIGMA Chemical Co., USA。

### (三) 實驗儀器

1. 真空減壓旋轉濃縮機。
2. 熱風烘箱。
3. 高速冷凍離心機。
4. 分光光度計。
5. 超音波洗淨機。
6. 粉碎機。
7. 恆溫水浴槽。

## 二、材料製備與實驗方法

### (一) 材料製備

刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加採摘購買後，立即清洗及秤重，並依根、莖、葉部位分開，置於陰涼處陰乾使重量不再變化，將各處理完後的樣品，以甲醇萃取分析刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加抗氧化性之變化。

### (二) 萃取液的製備

量取 100 mL 的甲醇溶劑，加入 5 g 的刺五加、三葉五加及毛脈

三葉五加乾燥樣品浸泡，將通過 filter paper 110 mm 的濾液，於真空減壓旋轉濃縮機中濃縮至無水狀態，使其樣品濃度分別為 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6 mg/mL，測其抗氧化性。

### (三) 抗氧化功能性評估

採用清除 DPPH 自由基能力、還原力、螯合亞鐵離子能力、清除超氧陰離子能力與硫氰酸鐵法的抗油脂過氧化性來做為評估刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加根、莖、葉之甲醇萃取液之抗氧化能力方法。以 EDTA 與 BHT 分別做為對照組。

#### 1. DPPH 自由基清除能力測定

參考 Shimada 等人(1992)的方法，取 5 mL 不同濃度之刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加根、莖、葉之甲醇萃取液，以及 BHT 之甲醇溶液，加入新鮮配製 1 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)之甲醇溶液 1 mL，均勻混合靜置 30 分鐘後，於 517 nm 測其吸光值。吸光值愈低表示清除能力愈強。以 $[1 - (\text{樣品吸光值} / \text{未加樣品之控制組吸光值})] * 100$ ，得到清除效應百分率。

#### 2. 還原力的測定

參考 Oyaizu (1986) 的方法，取 5 mL 不同濃度之刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加根、莖、葉之甲醇萃取液，以及 BHT 之甲醇溶液，加入 0.2 M、pH 6.6 之磷酸鈉緩衝液 1.25 mL 及 1% 赤血鹽 1.25 mL 於 50 °C 水浴反應 20 分鐘後急速冷卻，加入 10% 三氯醋酸液 1.25 mL，於 3000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液 2.5 mL，再加入蒸餾水 2.5 mL 及 0.1% 氯化鐵溶液 0.5 mL，混合均勻，10 分鐘後於 700 nm 測其吸光值。吸光值愈高表示還原力愈強。

### 3. 亞鐵離子螯合能力之測定

參考 Decker and Welch (1990) 的方法，取 5 mL 不同濃度之刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加根、莖、葉之甲醇萃取液，BHT 之甲醇溶液及試劑 EDTA，加入 2 mM  $\text{FeCl}_2$  溶液 0.1 mL 及 5 mM ferrozine 溶液 0.2 mL，反應 10 分鐘，於 562 nm 測其吸光值。 $\text{Fe}^{2+}$  與 ferrozine 所形成之複合物於 562 nm 有強的吸收，若吸光值越低，表示對鐵離子的螯合能力越強。以  $[1 - (\text{樣品吸光值} / \text{未加樣品之控制組吸光值})] * 100$ ，得到螯合能力百分率。

### 4. 清除超氧陰離子能力測定

參考 Robak 和 Gryglewski(1988)的方法，以 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 配製 120  $\mu\text{M}$  之 Phenazine methosulfate(PMS)、936  $\mu\text{M}$  之  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)、300  $\mu\text{M}$  之 Nitroblue tetrazolium(NBT)。然後取 2 mL 之不同濃度刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加根、莖、葉之甲醇萃取液，以及 BHT 之甲醇溶液，依序與等體積之 PMS、NADH、NBT 溶液混合均勻。在室溫下靜置 5 分鐘後，在 560 nm 測其吸光值。吸光值越低表示其清除超氧陰離子能力越強。 $[1 - (\text{樣品吸光值} / \text{未加樣品之控制組吸光值})] * 100$ ，表示清除超氧陰離子能力百分率。

#### 5. 抗油脂過氧化測定-硫氰酸鐵法

參考 Osawa and Namiki (1981)，取 5 mL 亞麻油酸乳化溶液 (linoleic acid emulsion, linoleic acid : methanol = 0.13 : 10 (v/v))，各別加入樣品 0.1 mL 之不同濃度刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加根、莖、葉之甲醇萃取液，以及 BHT 之甲醇溶液與 5 mL 0.05M pH 值為 7.0 磷酸緩衝溶液，振盪混合後於 37°C 恆溫作用 96 小時，每隔 24 小時取出，依硫鐵法 (Ferric thiocyanate) 測定其過氧化物。

取 0.1 ml 上述之樣品混合液，依序加入 75% 乙醇溶液 4.7 mL、30% Ammonium thiocyanate( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) 0.1 mL 及 0.02M Iron(II)

chloride tetrahydrate ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 0.1 mL (溶於 3.5% HCl) 溶液，振盪後 3 分鐘以分光光度計測定波長 500 nm 的吸光值，並與對照組比較之。吸光值愈低表其抗氧化力愈強。

#### (四) 抗氧化活性成分之定量分析

##### 1. 總酚類化合物之測定 (Total phenolic estimation)

參考 Ragazzi and Veronese (1973) 的方法，取樣品 0.1 mL 不同濃度之刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加根、莖、葉之甲醇萃取液，以及 BHT 之甲醇溶液，加入 0.9 mL 的蒸餾水，5 mL 0.2N Folin & cloacatleu's phenol reagent (Sigma, USA) 混合，加入 4 mL 的 75g/L 飽和碳酸鈉混合並搖勻，靜置 30 分鐘，用 680 nm 分光光度計測吸光值。同時用 Gallic acid 作為標準品，依 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/L 等不同濃度在 680 nm 分別測其吸光值，即為標準曲線。試驗為三重複，呈現數據為三者平均值。

##### 2. 類黃酮化合物之定量分析 (Flavonoid contents)

參考 Woisky and Salatino (1998) 之方法，取 0.5 mL 不同濃度之刺五加、三葉五加及毛脈三葉五加根、莖、葉之甲醇萃取液，以及 BHT 之甲醇溶液，加入 1.5 mL 95% 酒精，0.1 mL 10% Aluminum chloride hexahydrate ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )，0.1 mL 1M Potassium acetate

(CH<sub>3</sub>COOK)及 2.8 mL 蒸餾水，置於室溫中 30 分鐘，於 415 nm 測其吸光值，以 Quercetin dehydrate 作為標準品，依 0、5、10、25、50、100 µg/mL 等不同濃度，分別在 415 nm 測其吸光值，作為標準曲線。並與萃取液之吸光值對照，計算出萃取液中之 Flavonoids 含量。試驗為三重複，呈現數據為三者平均值。



## 第二節 小鼠游泳實驗

### 一、實驗材料

(一) 本實驗所使用三葉五加(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.) 於 2006 年 5 月 25 日，購於雅馨園藝陳益炷先生(彰化縣田尾鄉饒平村富農路三段 161 巷 20 號)，后里七星農場陳炎龍先生於 2006 年 6 月 14 日提供三葉五加、刺五加(*Acanthopanax senticosum* Rupr. et Maxim.)，並由鄧正賢教授帶領摘採，毛脈三葉五加(*Acanthopanax trifoliatum* var. *setosum*)於 2006 年 6 月 23 日購自志學農場陳長宏先生(花蓮縣壽豐鄉志學村)。

三葉五加、毛脈三葉五加及刺五加組織形態鑑定確認無誤。

### (二) 藥品

1. Caffeine: SIGMA Chemical Co., USA。
2. Carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC)
3. Ethyl ether anhydrous ( $C_2H_5OC_2H_5$ )

### (三) 實驗儀器

1. 解剖剪。
2. 1 mL 針筒。
3. 鑷子。
4. 餵管。

5. 定溫器。
6. 游泳槽 (直徑 15 cm，深 20 cm)。
7. 高速冷凍離心機。
8. 分光光度計。
9. 熱風烘箱。

## 二、材料製備與實驗方法

### (一)實驗動物

購自樂斯科生物科技股份有限公司(台北市南港區重陽路 316 號 3 樓)，ICR 品系，7 週齡，雄性之小白鼠，共 110 隻，飼養於國立中興大學生命科學院生命科學系實驗動物室，分成 4 組，使用餵管給予不同濃度之藥物，如表六所表示。

表六 實驗動物分組。

組別	
刺五加組	刺五加乾燥樣品 300 mg/kg (n=10)
	刺五加乾燥樣品 600 mg/kg (n=10)
	刺五加乾燥樣品 1500 mg/kg (n=10)
三葉五加組	三葉五加乾燥樣品 300 mg/kg (n=10)
	三葉五加乾燥樣品 600 mg/kg (n=10)
	三葉五加乾燥樣品 1500 mg/kg (n=10)
咖啡因組	咖啡因 30 mg/kg (n=10)
	咖啡因 60 mg/kg (n=10)
	咖啡因 90 mg/kg (n=10)
控制組	生理食鹽水(n=10)
	生理食鹽水(n=10)

## (二)實驗原料及飼料配置

刺五加與三葉五加採摘購買後，立即清洗及秤重，並依根、莖、葉部位分開，置於陰涼處陰乾使重量不再變化，將各處理完後的樣品，以甲醇萃取刺五加、三葉五加。

量取 100 mL 的甲醇溶劑，加入 5 g 的刺五加與三葉五加乾燥樣品浸泡，將通過紗布的濾液，於真空減壓旋轉濃縮機中濃縮後，置於熱風循環箱中，待重量無變化，使其乾燥樣品分別為 300、600、1500 mg/kg。

實驗期間利用餵管餵食不同劑量之刺五加、三葉五加及咖啡因，並給予實驗動物配合飼料(福壽實驗股份有限公司)及水分任意攝取，於飼養 1 週後，經由 24 小時絕食並游泳衰竭試驗，游泳衰竭定義為小鼠游泳沉沒於水中 5 秒後，再以頸動脈及冠狀動脈採血做各項分析。表六為福壽實驗動物飼料組成。



表七 福壽實驗動物飼料組成

Ingredient			
Calories / Kg	3500	Valine	1.1 %
Moisture	11.2 %	Vitamin A	20000 IU
Protein	23.5 %	Vitamin D	4000 IU
Fat	4.8 %	Vitamin E	50 IU
Ash	6.0 %	Vitamin K	2 mg
Fiber	3.8 %	Vitamin B1	10 mg
Calcium	1.0 %	Vitamin B2	8 mg
Phosphorus	0.8 %	Vitamin B6	10 mg
Salt	0.7 %	Vitamin B12	22 mg
Lysine	1.3 %	Folate	2 mg
Arginine	1.4 %	Niacin	60 ppm
Cysteine	0.4 %	Biotin	0.2 ppm
Histidine	0.6 %	Na	0.3 %
Isoleucine	1.2 %	K	0.8 %
Leucine	1.8 %	Mg	0.2 %
Lysine	1.3 %	Zn	70 ppm
Methionine	0.4 %	Cu	18 ppm
Phenylalanine	1.0 %	Fe	212 ppm
Threonine	0.9 %	Mn	66 ppm
Tryptophan	0.3 %	I	1.0 ppm
Tyrosine	0.7 %	Co	0.6 ppm

### (三)實驗方法

小鼠經由 24 小時絕食後，給予游泳試驗，待游泳運動衰竭後犧牲，計算每組小鼠平均游泳時間及收集血液離心後取其上清液分析 SOD、GSH、GSH-Px、LPO。



## 第四章 統計分析

本實驗所得之資料以單因子變異數分析 (one-way analysis of variance ; one-way ANOVA)，實驗結果數值皆以平均值  $\pm$  平均標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.M.) 表示，以檢定各組間之差異，當  $p < 0.05$  或  $p < 0.01$  或  $p < 0.001$  表示具有顯著性差異。



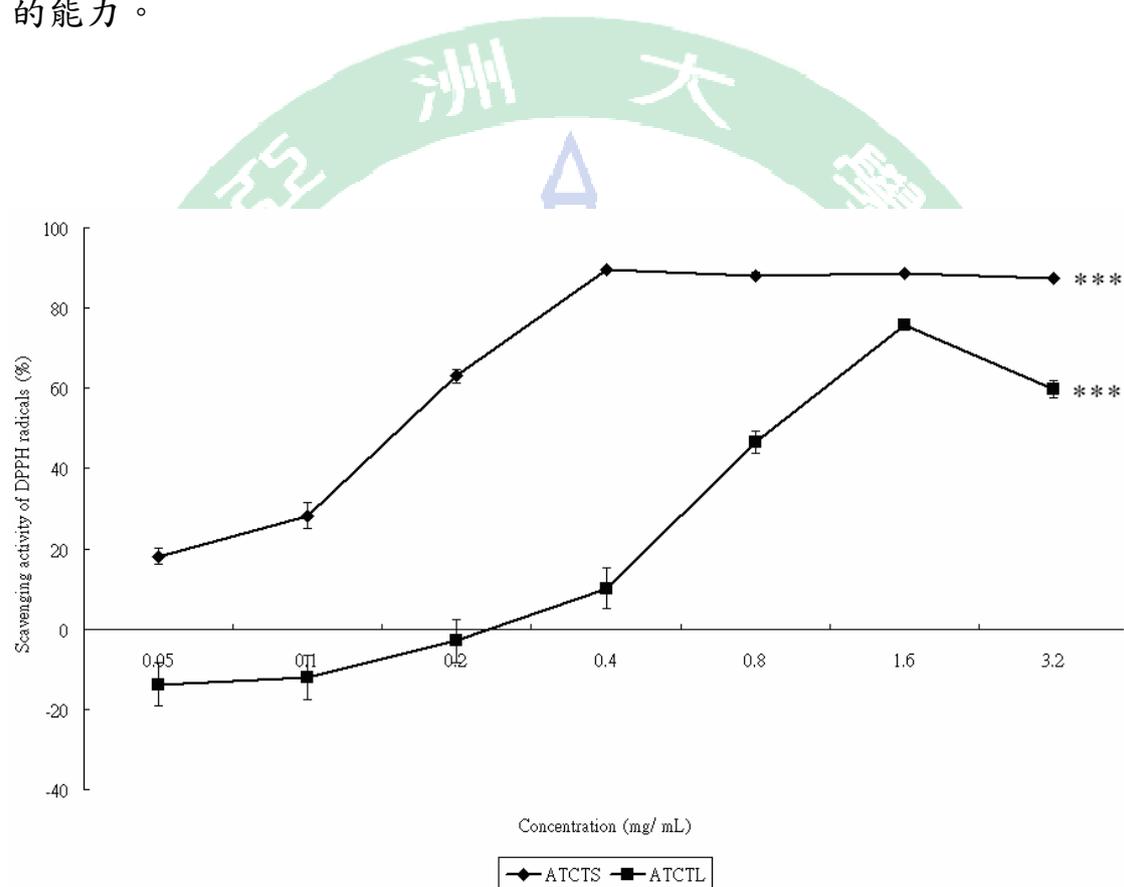
## 第五章 結果與討論

### 第一節 體外抗氧化性試驗

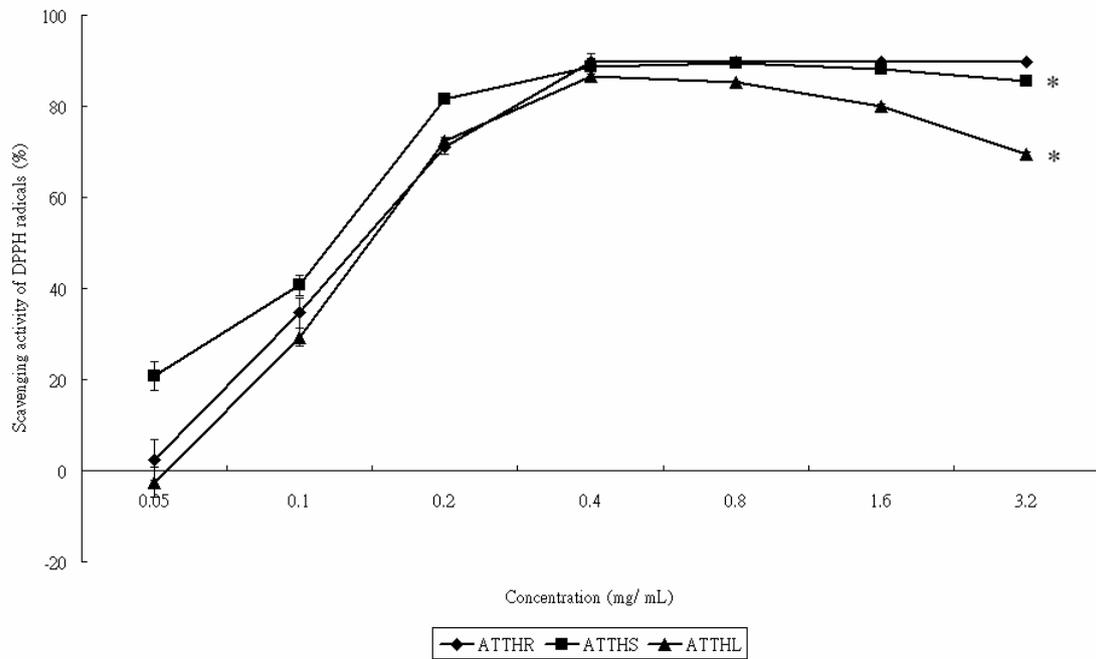
#### 一、DPPH 自由基清除能力測定

若測試樣品具有提供氫質子之效力以清除 DPPH 自由基，則在吸光值 517 nm 測試之下，吸光值越低表示樣品具有良好提供氫質子之能力，可以清除 DPPH 自由基。由圖四結果發現彰化縣田尾鄉的三葉五加，莖比葉的部位具有較高的 DPPH 自由基清除能力( $p < 0.001$ )，圖中顯示在莖的部位，當濃度於 0.4 mg/mL 已具有相當高的能力，其後則呈現持平狀態，並未再因濃度增加而清除能力增加的情形，而在葉的部份，當持續增加至濃度 1.6 mg/mL 達最高能力，之後則明顯下降，推測可能已達飽和狀態。圖五台中后里三葉五加，莖的部位比根具有較高的清除能力，葉的能力較其他部位低( $p < 0.05$ )，根、莖及葉當濃度 0.4 mg/mL 達最高的清除能力，其後則呈現持平狀態，葉的部位清除能力則有明顯下降。圖六為花蓮三葉五加，莖比葉的部位具有較高的 DPPH 自由基清除能力( $p < 0.05$ )，當濃度於 0.4 mg/mL 具有相當高的能力，高於此濃度後莖的部位則呈現持平狀態，葉則呈現清除能力下降，根的清除能力仍為最低。圖七結果呈現台中后里的刺五加，莖與根兩部位較葉有較良好的清除能力，當濃度 0.4 mg/mL 根、

莖、葉達最高的清除能力，之後呈現持平狀態，並未再因濃度增加而清除能力增加。圖八為產地花蓮的毛脈三葉五加，莖的清除能力較葉及根( $p < 0.05$ )良好。統整以上，結果顯現出各產地的三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加，DPPH 自由基清除能力都是以莖的部位具有較高的能力。

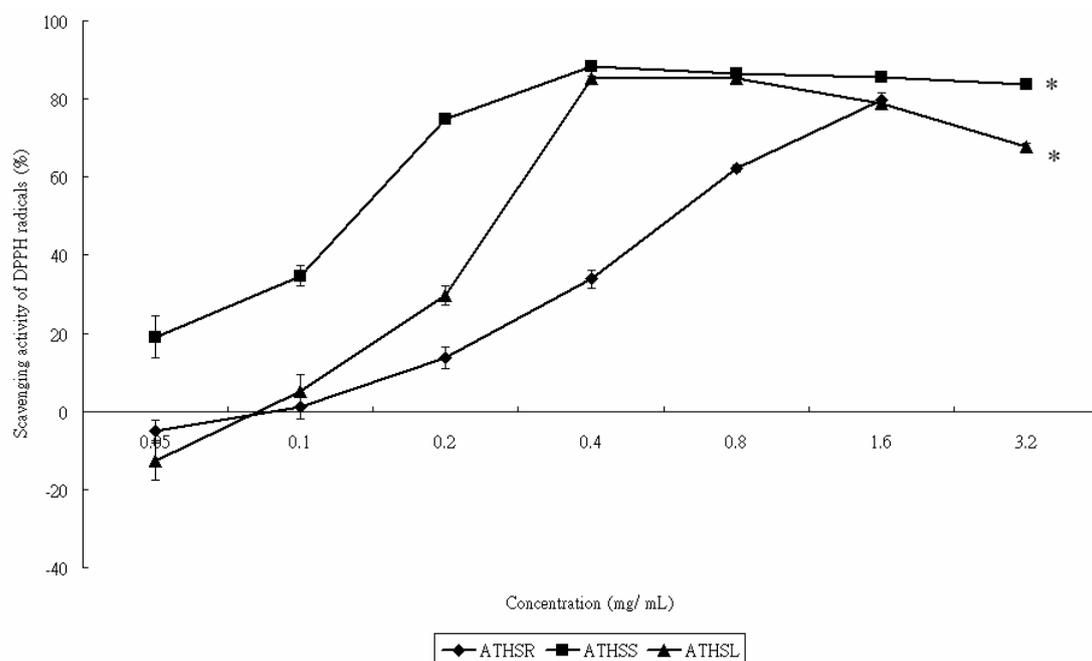


圖四 產地彰化縣田尾鄉三葉五加之莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。\*\*\* 為  $p < 0.001$ 。



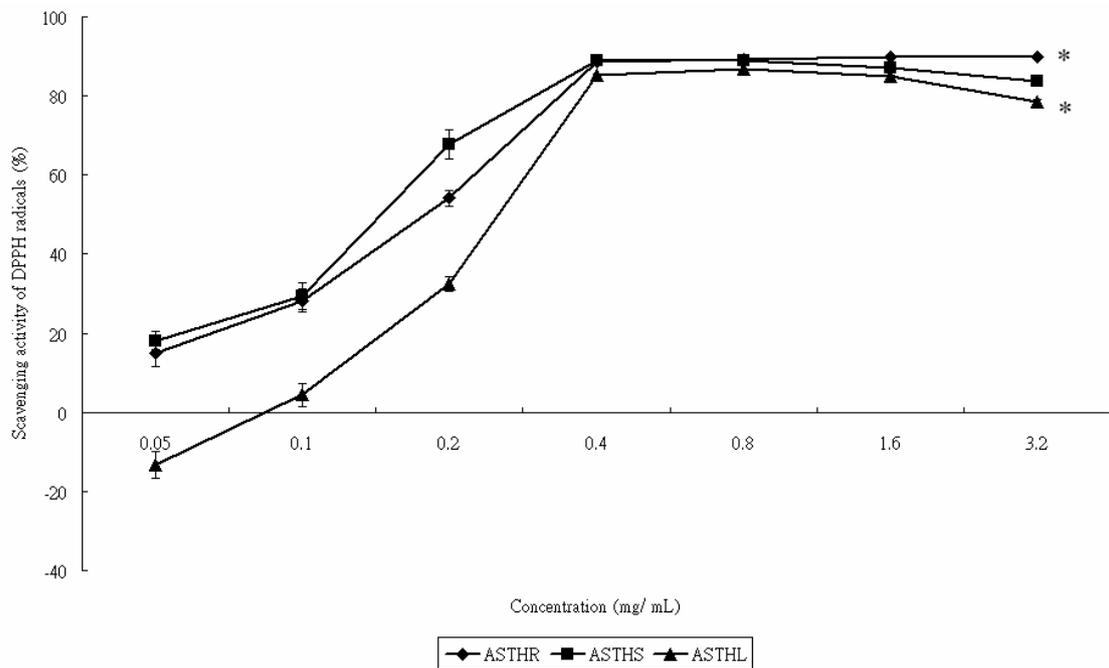
圖五 產地台中縣后里三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。





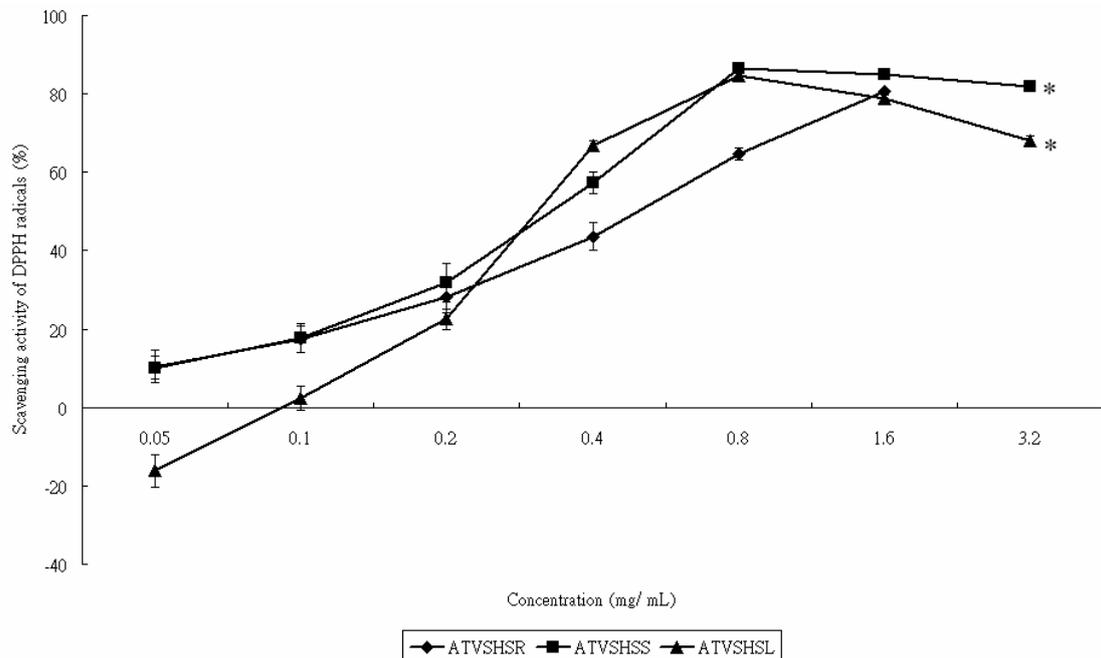
圖六 產地花蓮三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。





圖七 產地台中縣后里刺五加之根、莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。

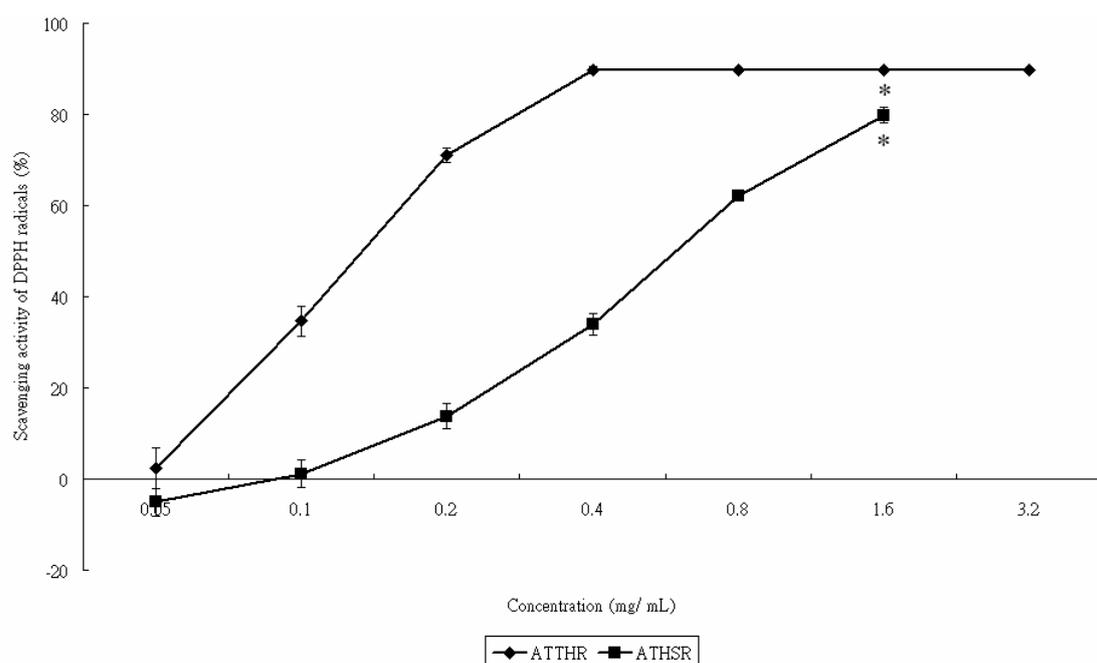




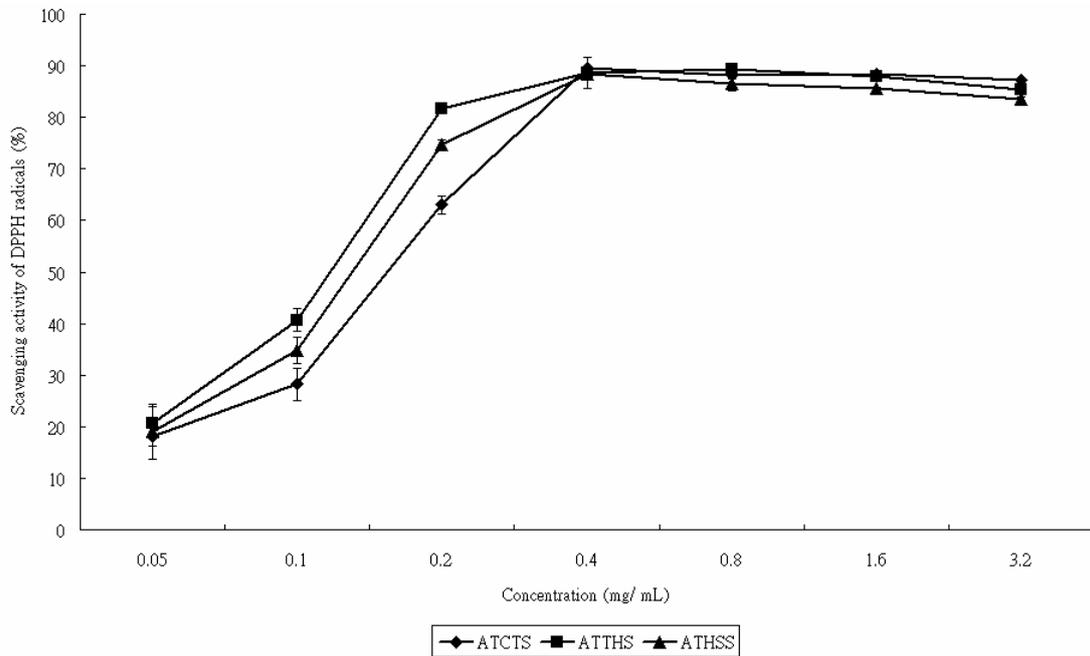
圖八 產地花蓮毛脈三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。

針對各產地三葉五加再做進一步分析，在根與葉的部位互相比較，由圖九及十一各表示出台中后里所植栽的三葉五加能力較高( $p < 0.05$ )，圖十顯示在莖的部位三個產地並無明顯的差異性，都有良好的清除能力。此後，針對三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加之間的清除能力做比較，圖十二、十三、十四結果顯示，三葉五加根、莖、葉三個部位的清除能力皆高於刺五加，毛脈三葉五加的清除能力為最低，三葉五加根、莖、葉三個部位與人工合成抗氧化劑 BHT 做比較，結

果呈現最佳清除能力皆可達到 BHT 的 95% 以上，顯示出三葉五加的  
確有 DPPH 自由基清除能力，且能力與人工合成抗氧化劑 BHT 相當。

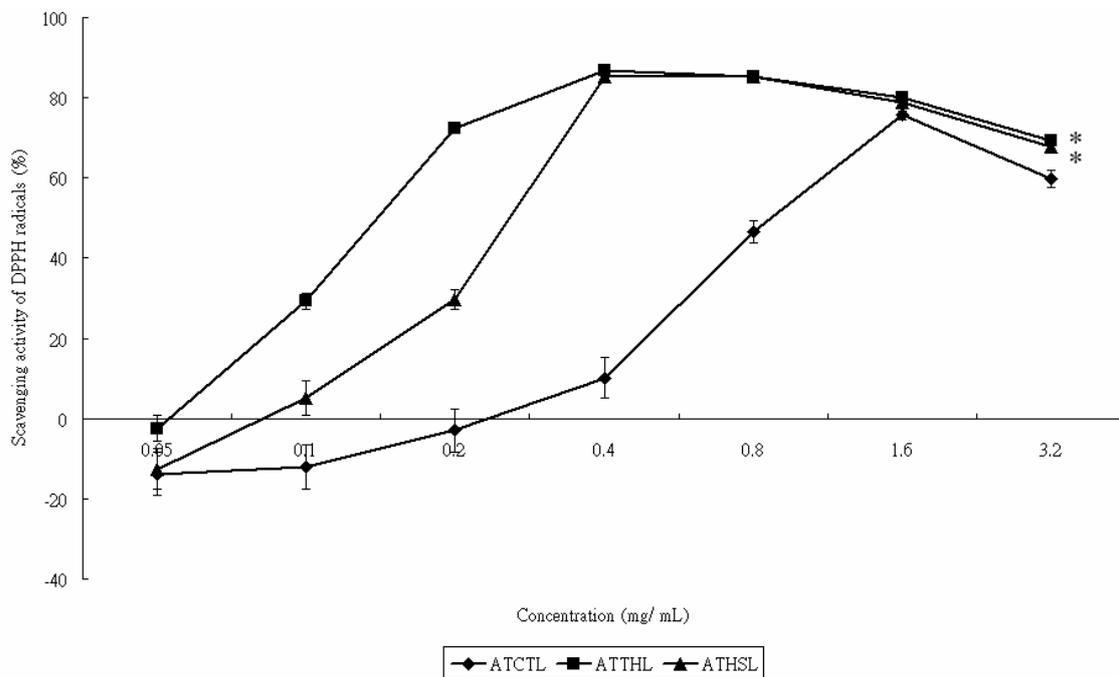


圖九 產地台中縣后里與花蓮三葉五加之根甲醇萃取液其 DPPH 自由  
基清除能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。

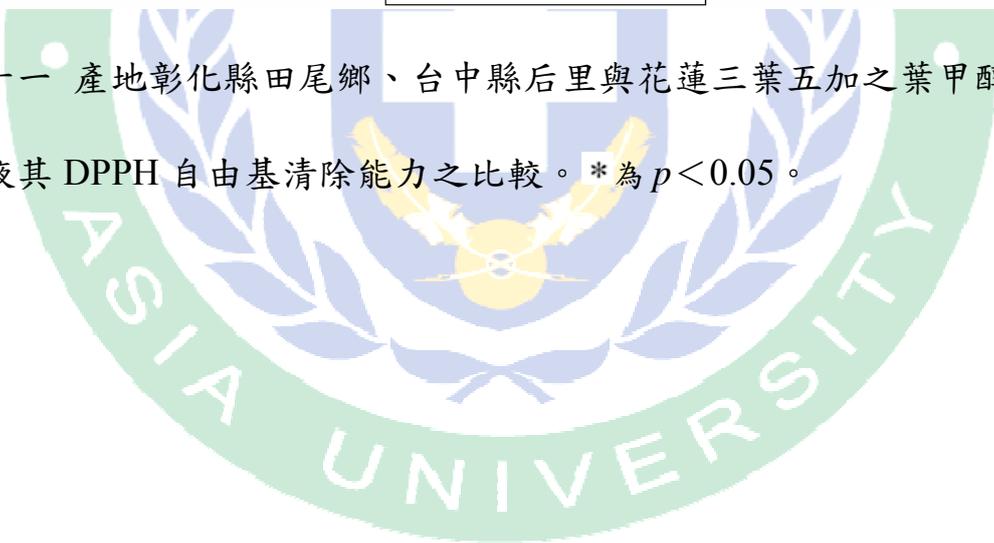


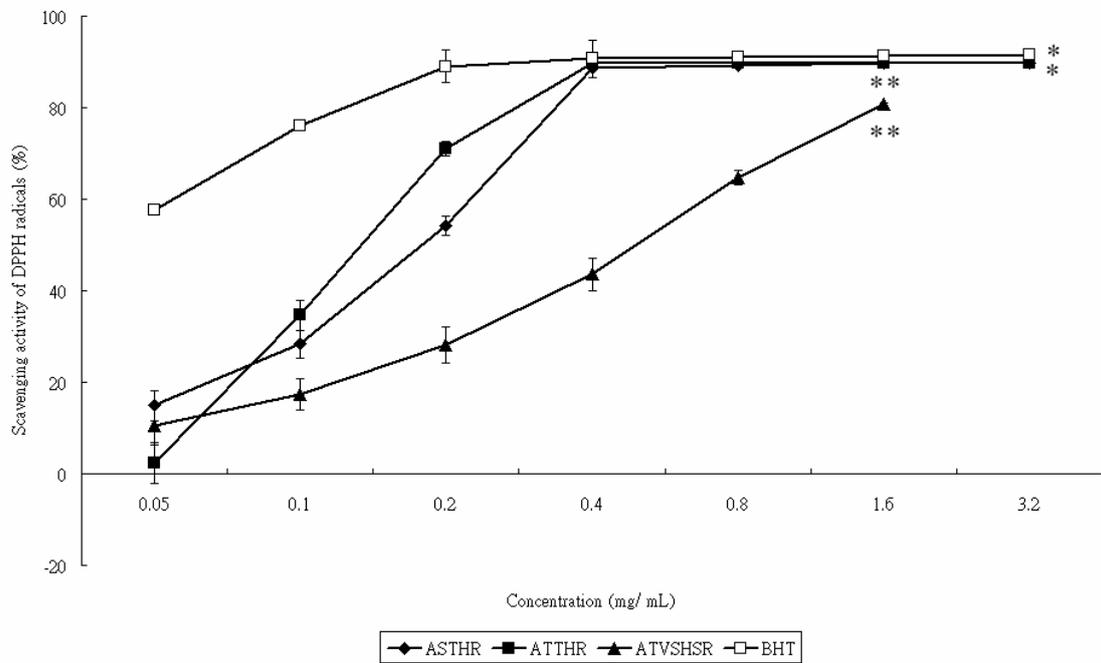
圖十 產地彰化縣田尾鄉、台中縣后里與花蓮三葉五加之莖甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。



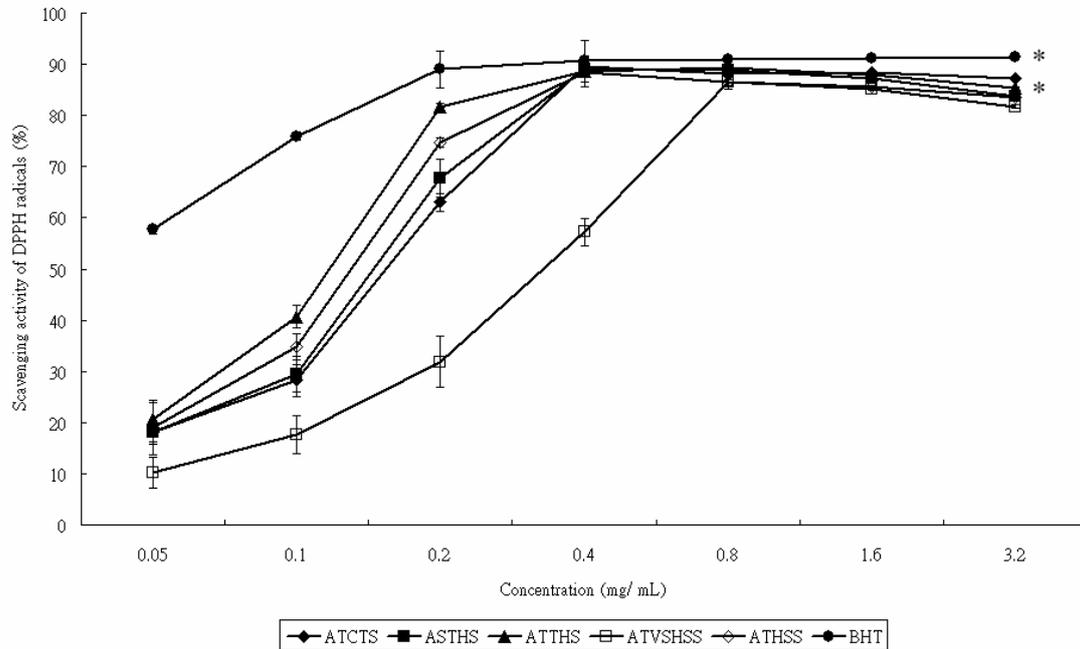


圖十一 產地彰化縣田尾鄉、台中縣后里與花蓮三葉五加之葉甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。\* 為  $p < 0.05$ 。



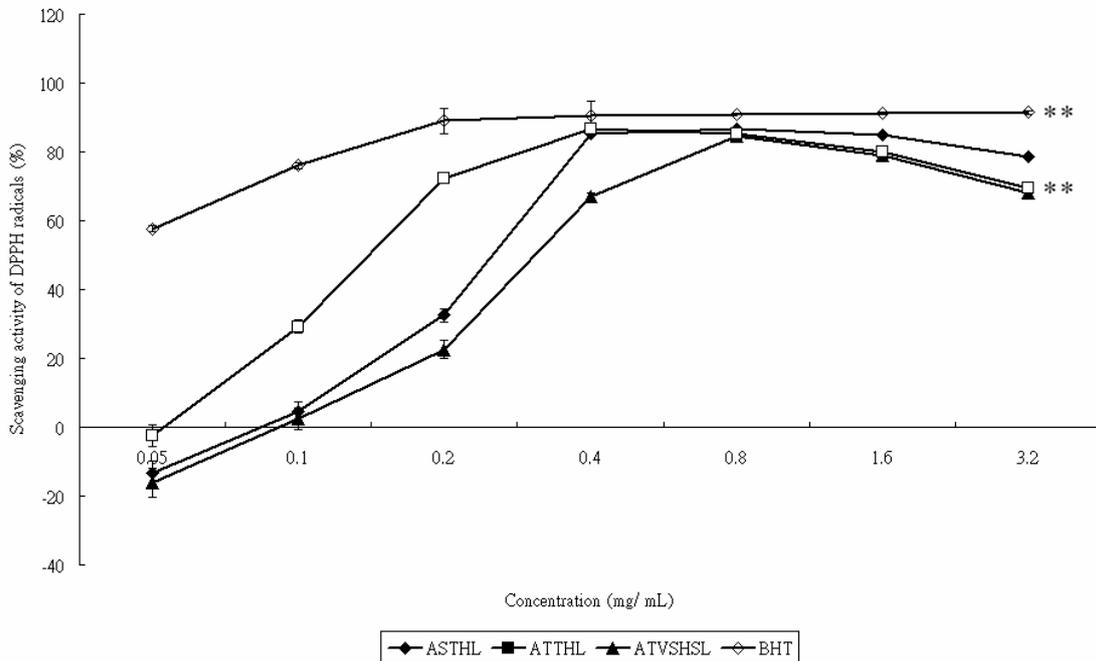


圖十二 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。\* 為  $p < 0.05$ 。\*\* 為  $p < 0.01$ 。



圖十三 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。



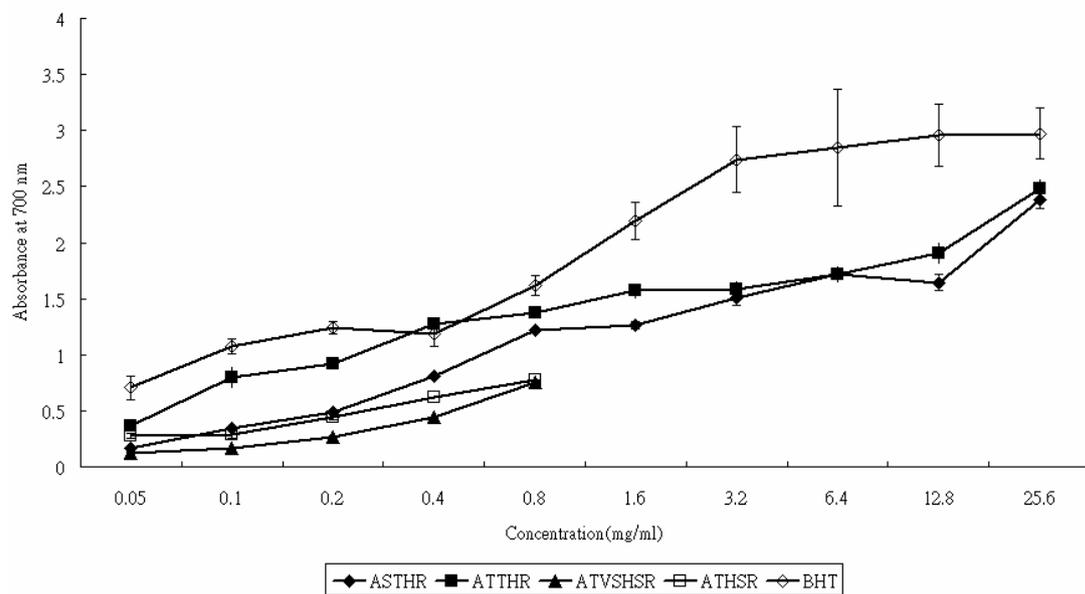


圖十四 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取液其 DPPH 自由基清除能力之比較。\*\*\*為  $p < 0.01$ 。

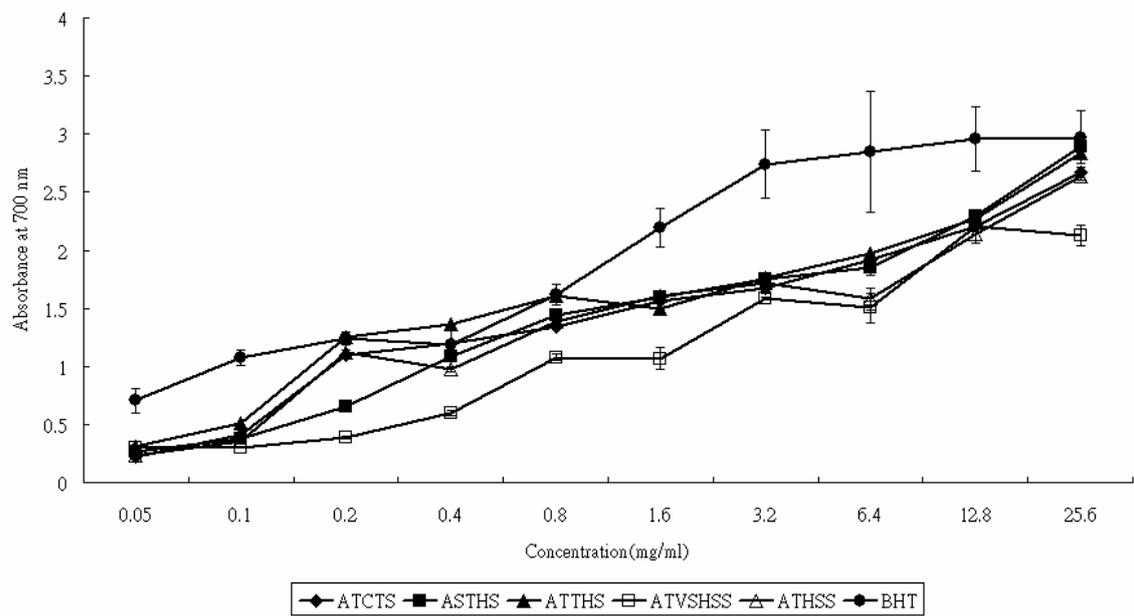
## 二、還原力的測定

以分光光度計在 700 nm 偵測普魯士藍的含量，以得知其還原力，因此吸光值越高表示樣品的還原力越強。圖十五為各產地的三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加根的部份之還原力，還原力仍隨樣品添加劑量增加而增加，但增加較莖與葉兩部位緩慢，圖十六為各產地的三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加莖的部份萃取物之還原力，還原力也是皆隨樣品添加劑量增加而增加，當最高濃度 25.6 mg/mL 時還原

力雖未高於 BHT 但仍有相當的還原能力。圖十七為各產地的三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加葉的部位之還原力，甲醇溶劑之三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加葉的部位萃取物，其還原力皆隨樣品添加劑量增加而增加，在最高濃度 25.6 mg/mL 還原力皆超越人工合成抗氧化劑 BHT，顯示三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加葉具有良好之還原力，即具有與抗氧化劑相當之還原力。由以上得知，甲醇溶劑之三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加根、莖、葉萃取物皆有良好的還原力，並且隨著劑量增加而增加，顯示具有與抗氧化劑相當之還原力。

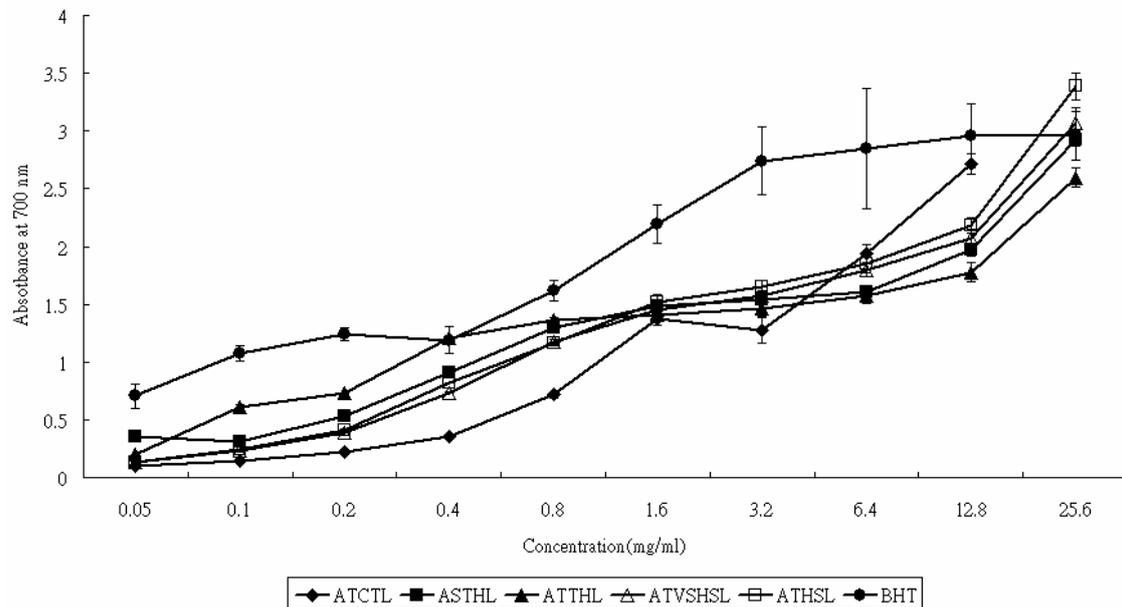


圖十五 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取液其還原力比較。



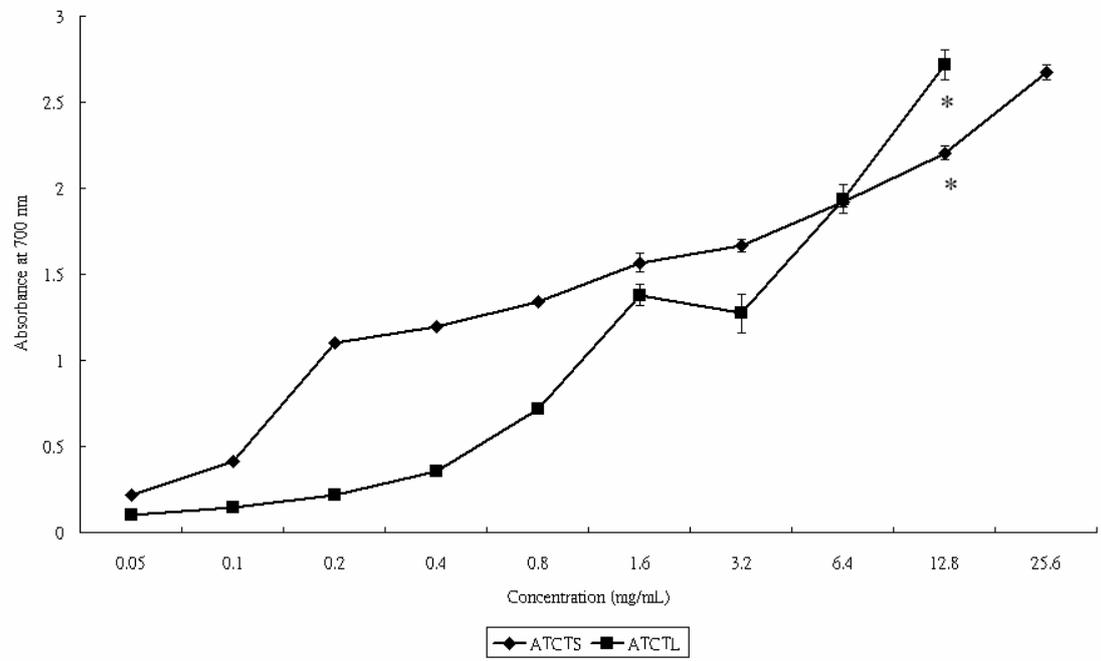
圖十六 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液其還原力比較。





圖十七 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取液其還原力比較。

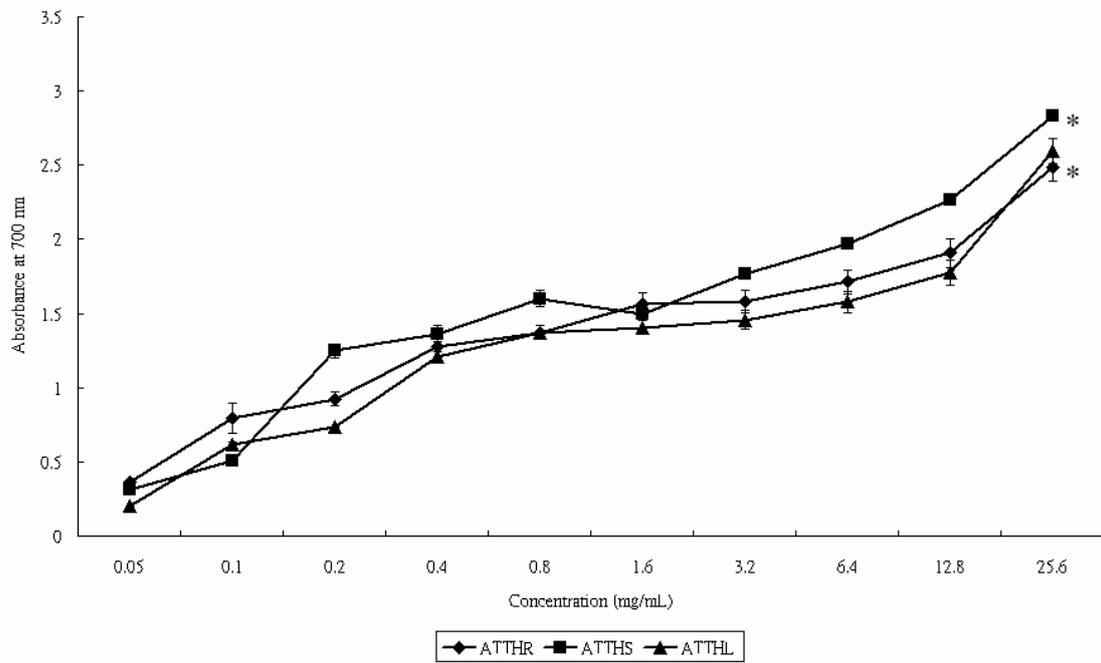
三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加根、莖、葉，在彰化田尾鄉三葉五加根、莖、葉方面，由圖十八中結果發現，莖的部位比葉有較佳的還原力( $p < 0.05$ )。由圖十九結果發現在產地台中后里的三葉五加，莖的還原能力也是最佳( $p < 0.05$ )。在圖二十中，產地花蓮的三葉五加，根、莖、葉還原力相當，統計上並無明顯差異。圖二十一中產地台中后里刺五加，莖的還原力大於根與葉( $p < 0.05$ )。



圖十八 彰化縣田尾鄉三葉五加之莖、葉甲醇萃取液其還原力比較。

\*為  $p < 0.05$ 。

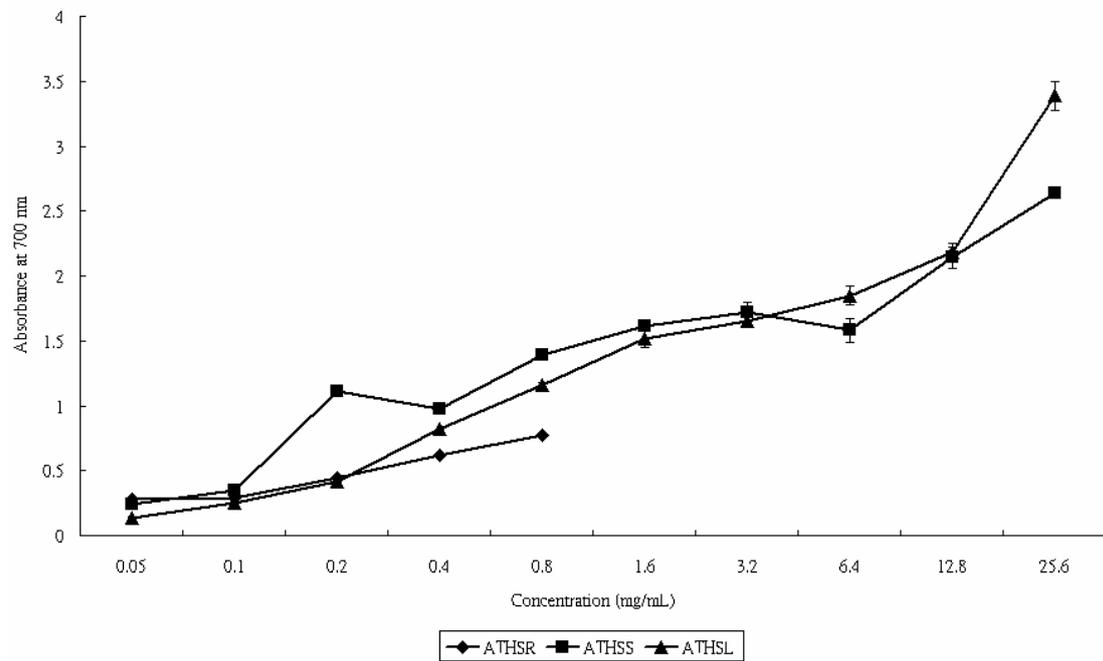




圖十九 台中后里三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其還原力比較。

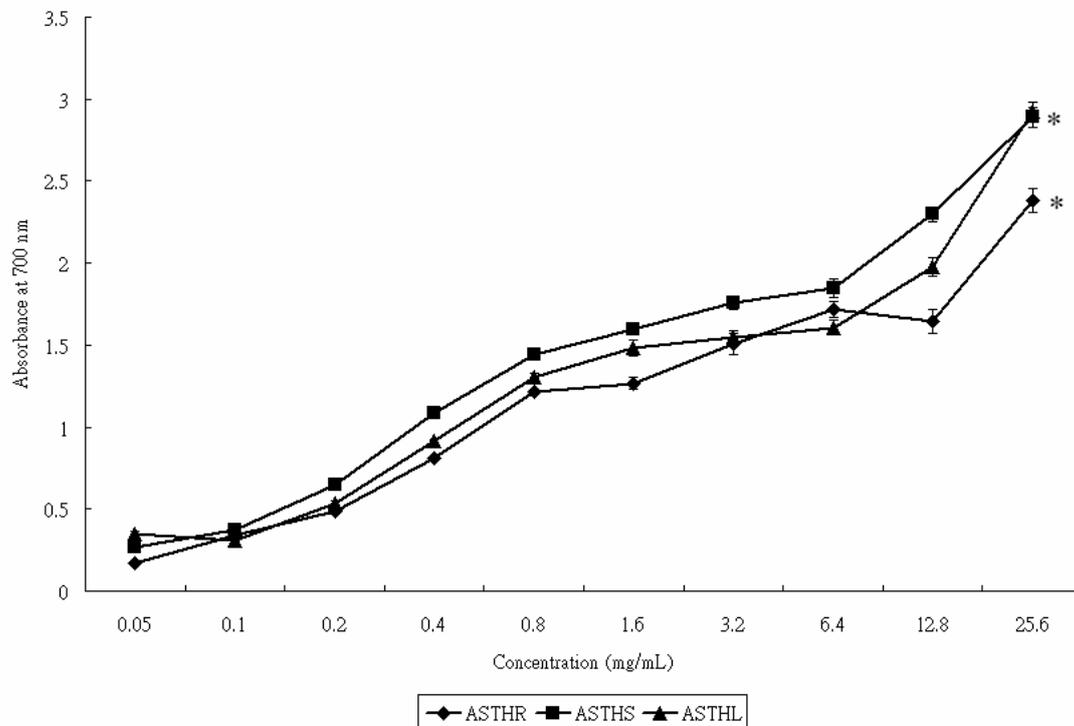
\*為  $p < 0.05$ 。





圖二十 產地花蓮三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其還原力比較。



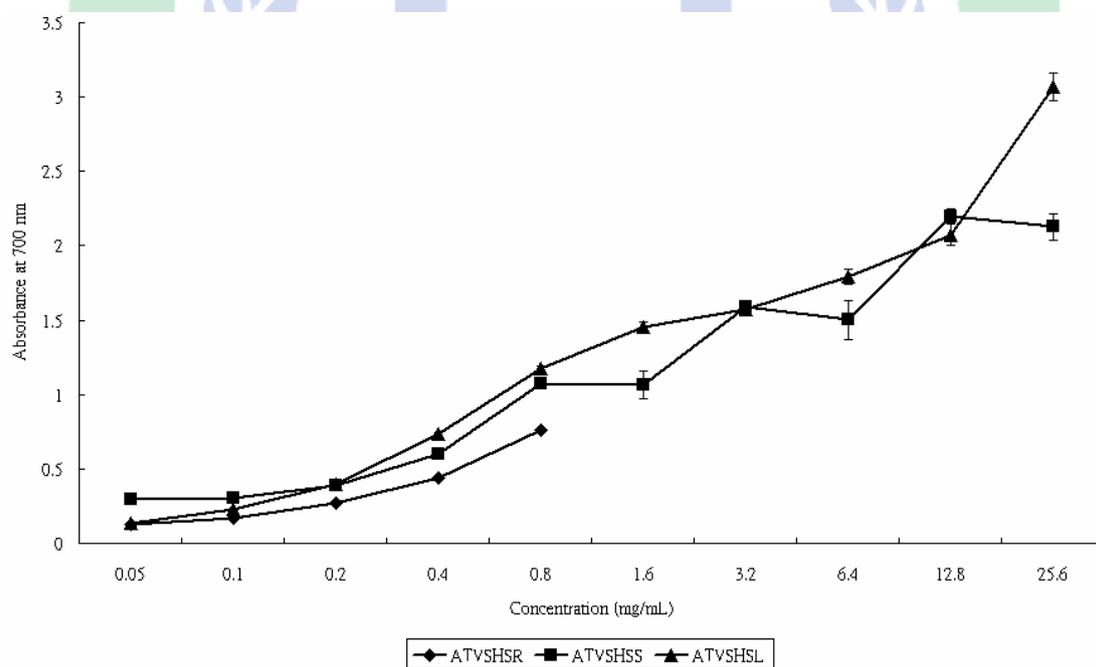


圖二十一 台中后里刺五加之根、莖、葉甲醇萃取液其還原力比較。

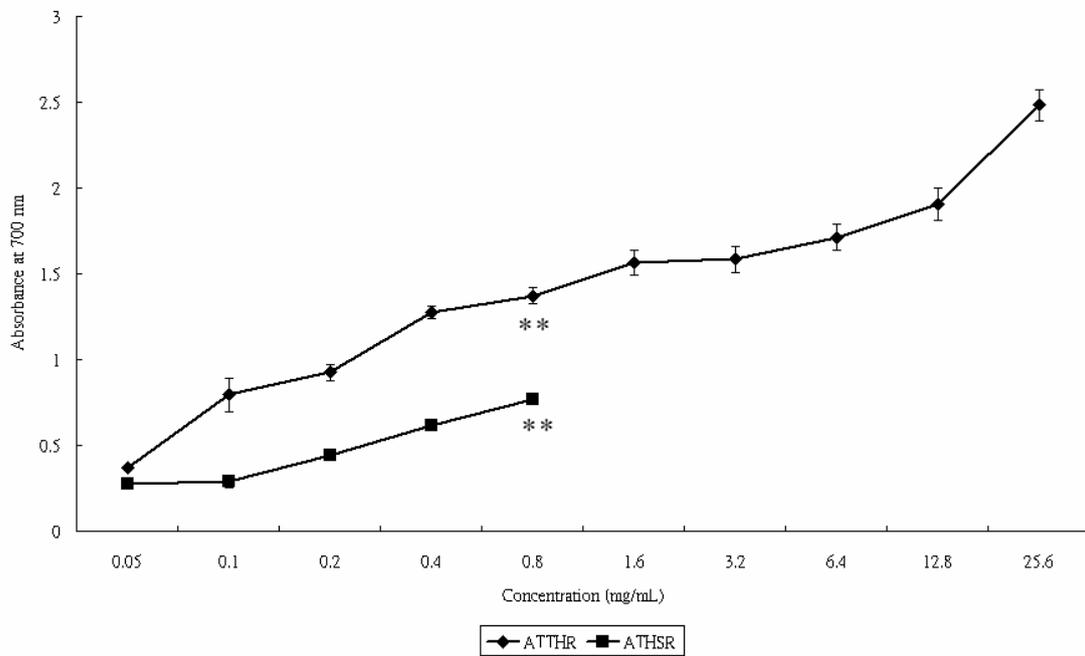
\*為  $p < 0.05$ 。

圖二十二中產地花蓮毛脈三葉五加，葉的部位還原力雖然比莖、根較佳，但在統計上並無明顯差異性。由上述得知，大部分仍是以莖的部位還原力較佳。在不同產地的三葉五加根、莖及葉，由圖二十三、二十四顯示在根與莖的比較，都是以產地在台中后里的三葉五加還原力較佳( $p < 0.01$ )，在葉的部分則是產地花蓮的三葉五加較良好，但是在統計上並無明顯差異圖二十五。圖二十六、二十七、二十八中比較

三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加根、莖、葉，結果皆發現產地為台中后里的三葉五加，在根與莖兩部位還原力都較刺五加、毛脈三葉五加良好( $p < 0.05$ )，與人工合成的抗氧化劑 BHT 比較，發現還原能力可達其 80%，在莖的部位甚至達 95%，在葉的部份則是產地花蓮的三葉五加能力較其他好( $p < 0.01$ )，還原能力與 BHT 相當。因此統整以上，三葉五加比刺五加、毛脈三葉五加還原力良好。



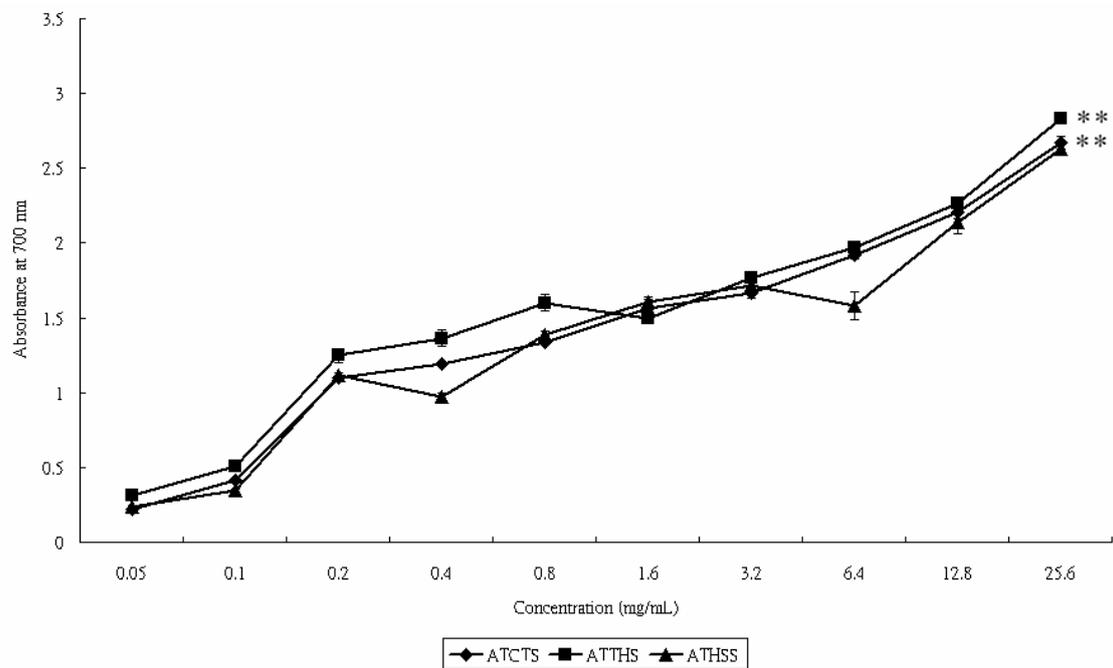
圖二十二 花蓮毛脈三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其還原力比較。



圖二十三 不同產地三葉五加之根甲醇萃取液其還原力比較。

\*\*為  $p < 0.01$ 。

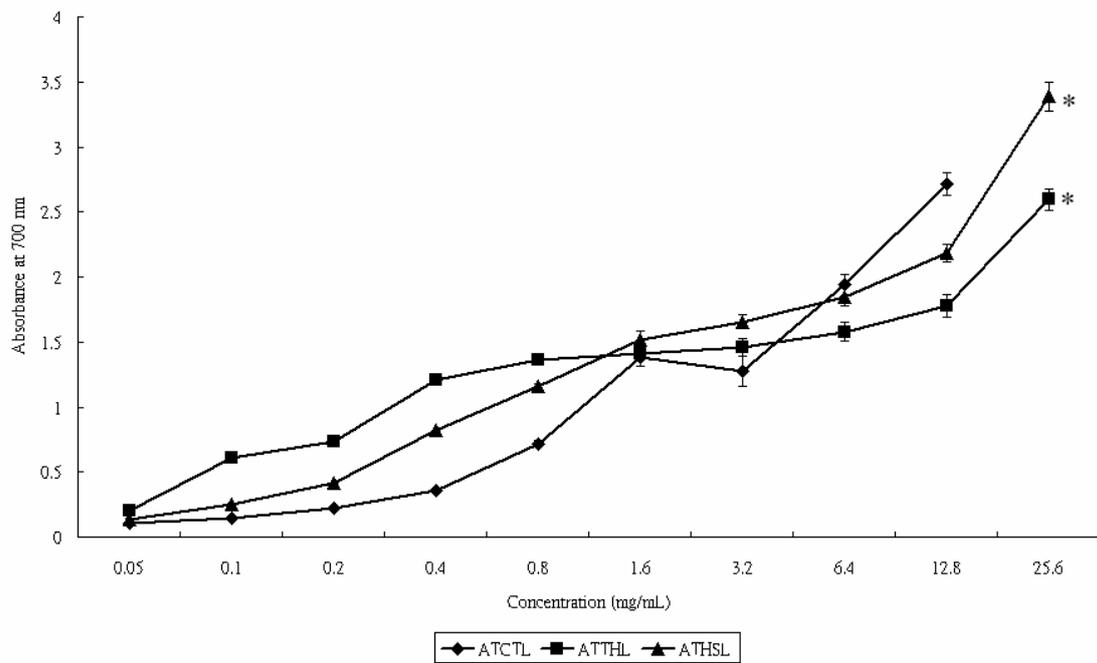




圖二十四 不同產地三葉五加之莖甲醇萃取液其還原力比較。

\*\*為  $p < 0.01$ 。

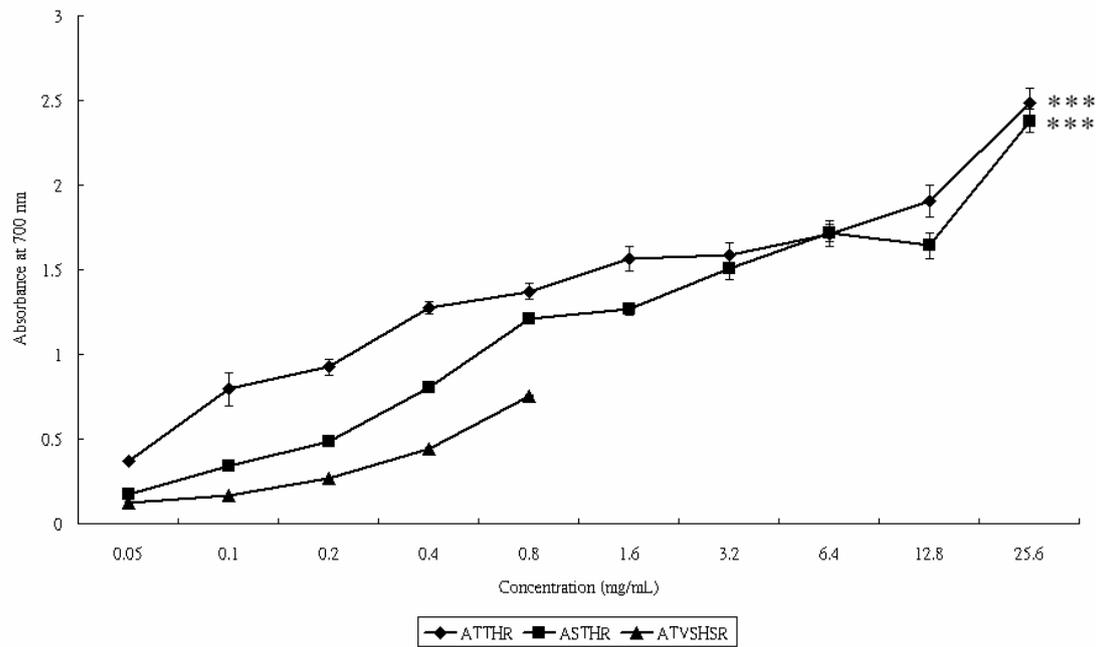




圖二十五 不同產地三葉五加之葉甲醇萃取液其還原力比較。

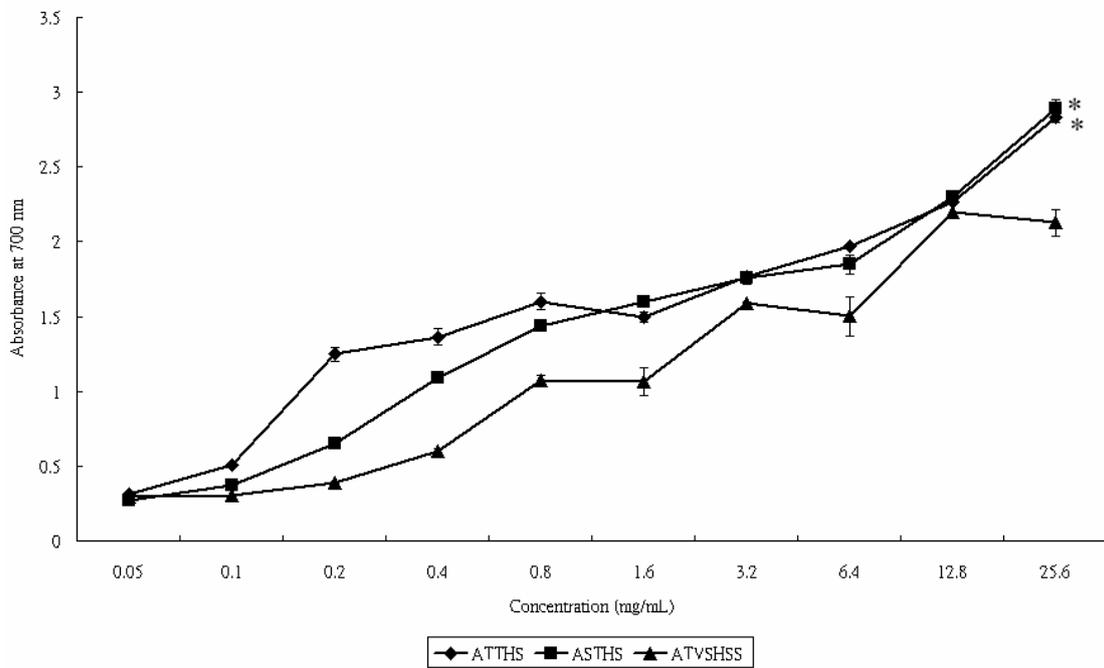
\*為  $p < 0.05$ 。





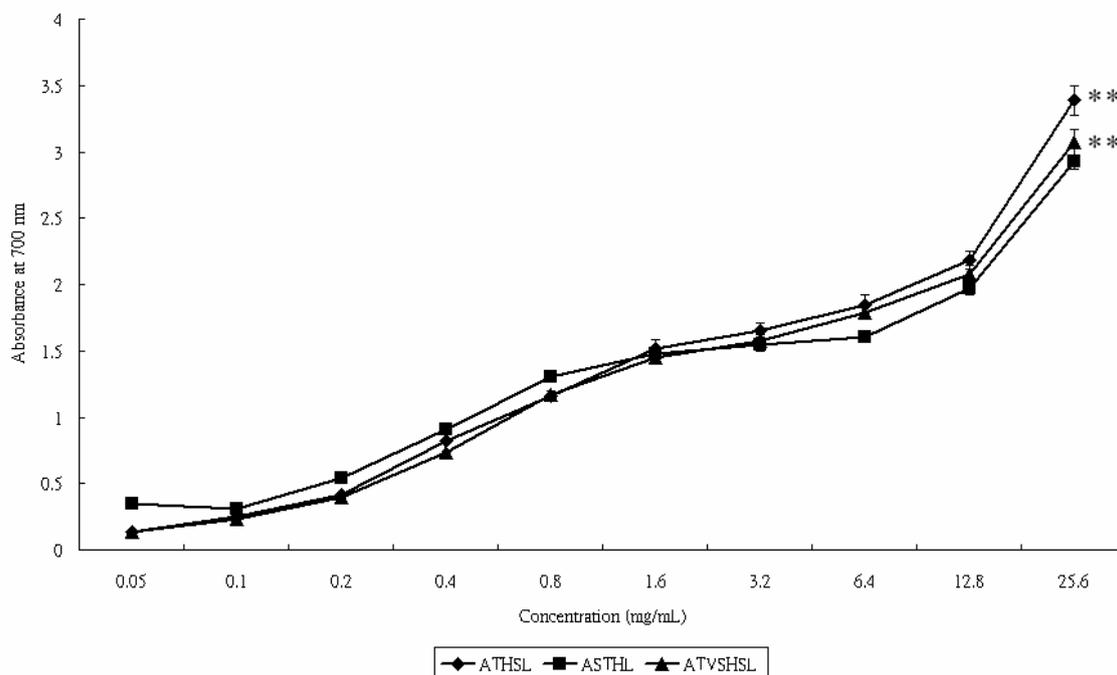
圖二十六 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取液其還原力比較。\*\*\* 為  $p < 0.001$ 。





圖二十七 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液其還原力比較。\*為  $p < 0.05$ 。



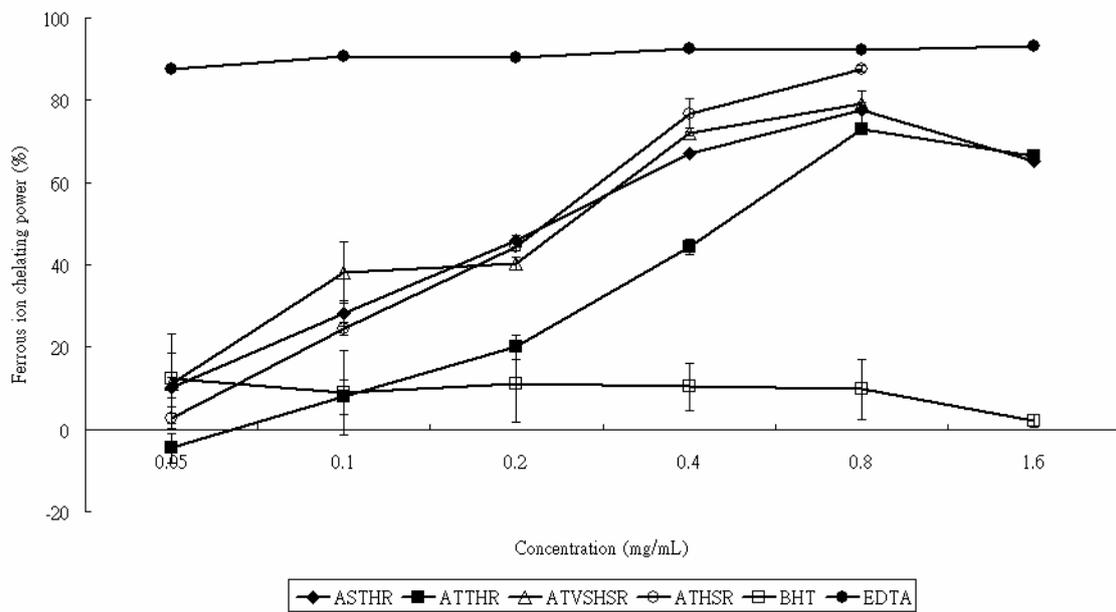


圖二十八 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取液其還原力比較。 \*\*為  $p < 0.01$ 。

### 三、亞鐵離子螯合能力之測定

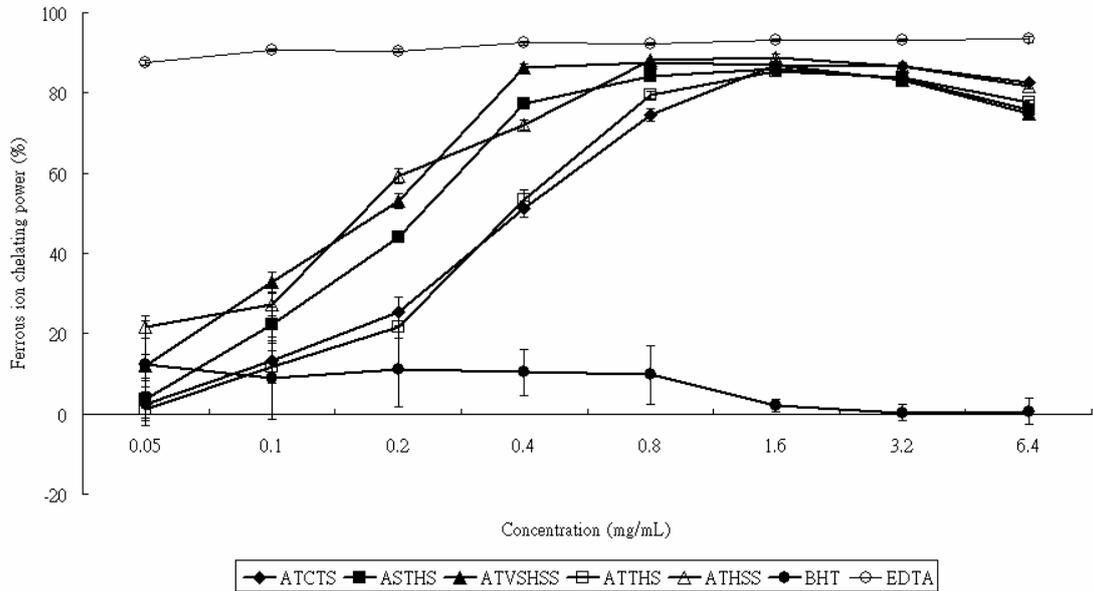
圖二十九、三十、三十一分別為甲醇溶劑之三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加的根、莖、葉萃取物比較，並與人工合成的抗氧化劑 BHT 及 EDTA 比較，發現 BHT 之甲醇溶液並無亞鐵離子螯合能力，原因為  $\text{Fe}^{2+}$  與  $\text{Cu}^{2+}$  在多種金屬離子中對於促進脂質氧化作用的進行，是最具有影響力的助抗氧化劑(Pro-oxidant)，而在人工合成抗氧化劑 BHT 結構中，並沒有螯合金屬離子的官能基所致，因此亞鐵離

子螯合能力幾乎是零。圖二十九中為不同產地三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加的根，當濃度達 0.8 mg/mL 最高後，隨濃度增加則亞鐵離子螯合能力隨之下降。圖三十中為不同產地三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加的莖萃取物，雖然沒標準品 EDTA 能力佳，但是在與三個部位比較之下，莖的部位亞鐵離子螯合能力較良好，當達到最良好的螯合能力後先呈現持平，之後增加樣品濃度但能力並未上升。比較不同產地三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加的根、莖、葉甲醇萃取物，圖三十二為產地彰化田尾鄉三葉五加，數據顯示莖的亞鐵離子螯合能力較佳( $p < 0.05$ )，莖與葉兩部位在當濃度達 1.6 mg/mL 後開始往下降。圖三十三為產地台中后里三葉五加，結果顯示莖的亞鐵離子螯合能力較高( $p < 0.05$ )，葉的部位最低。圖三十四為花蓮三葉五加，莖的亞鐵離子螯合能力較根、葉高，但在統計顯示上並不顯著。圖三十五為產地台中后里刺五加，結果顯示莖的亞鐵離子螯合能力較高，葉的部位最低( $p < 0.05$ )。圖三十六為毛脈三葉五加，結果顯示莖的亞鐵離子螯合能力較高。總和上述不同產地三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加，莖的部位亞鐵離子螯合能力皆較佳。



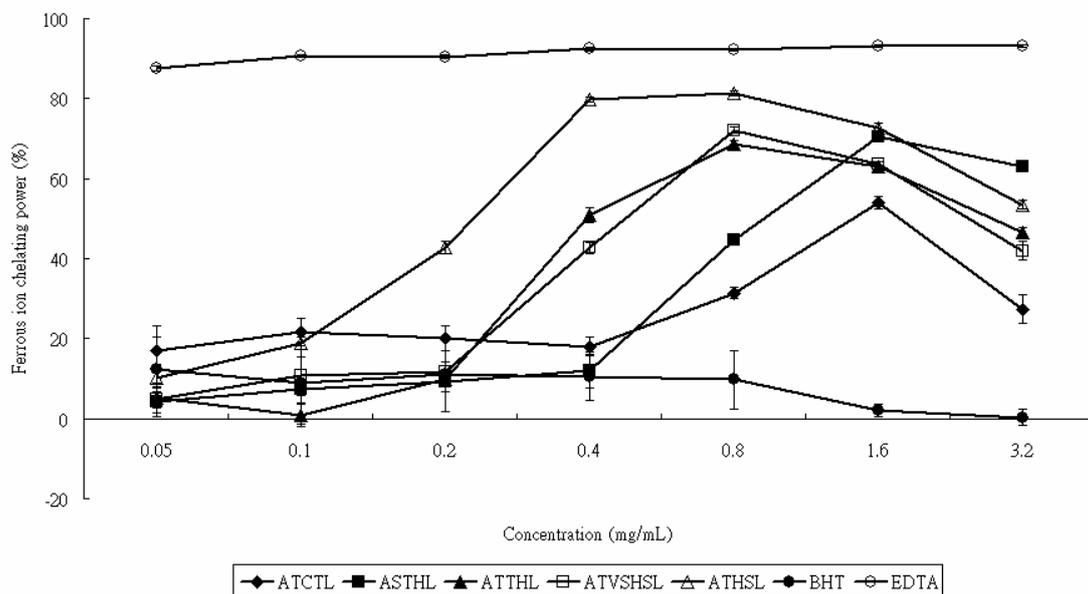
圖二十九 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。





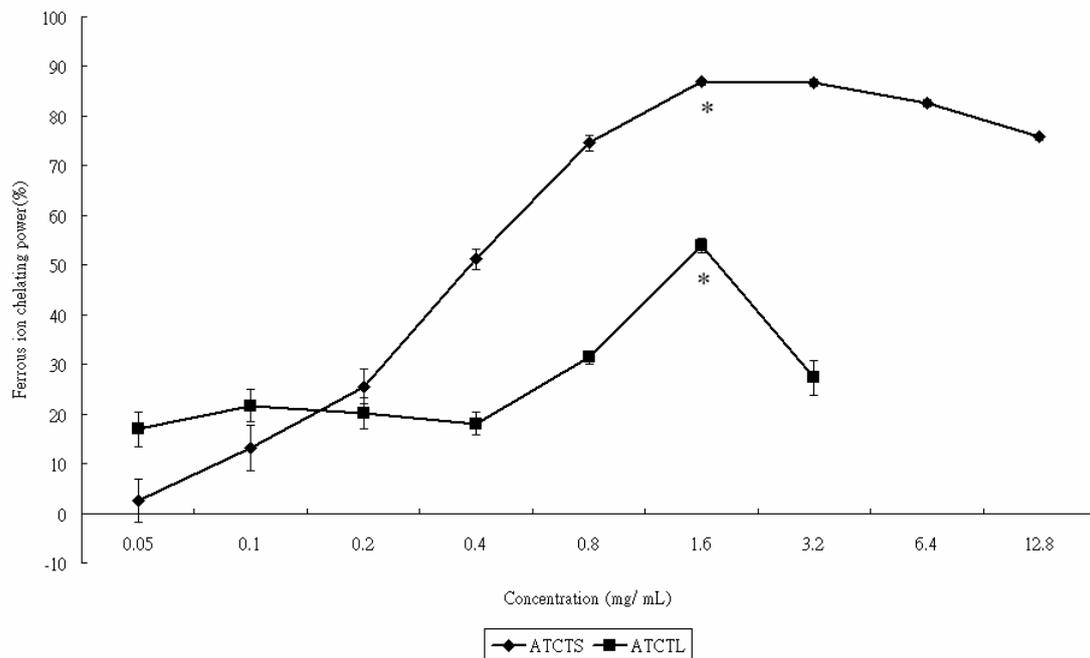
圖三十 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。





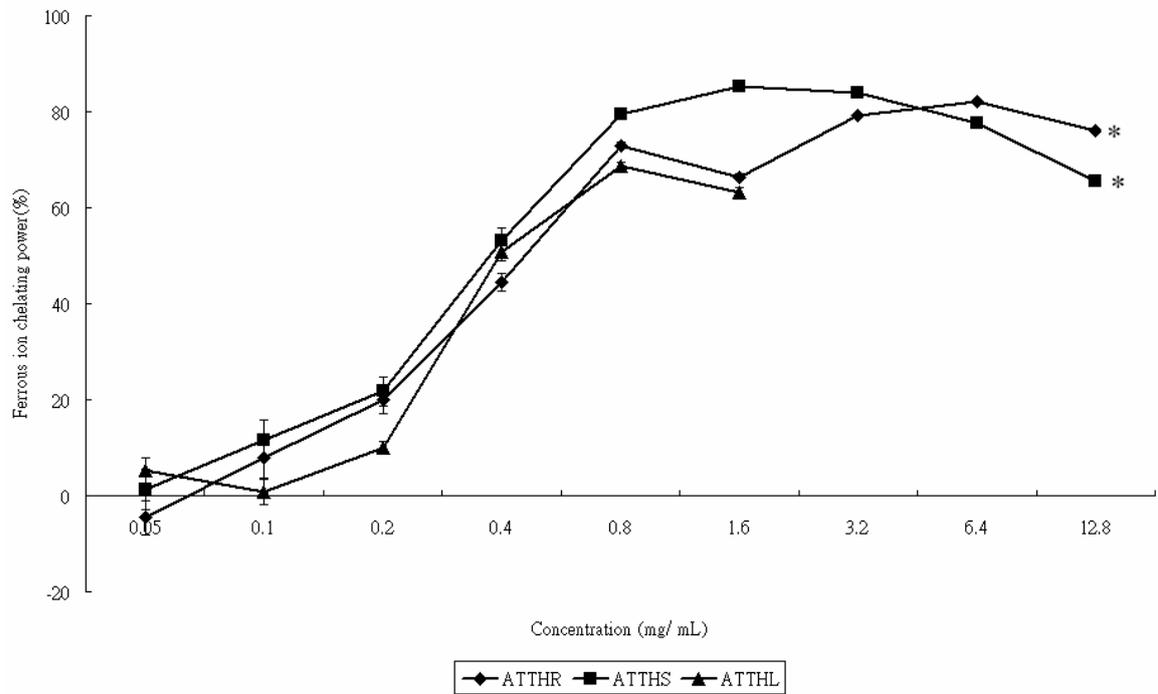
圖三十一 不同產地三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。





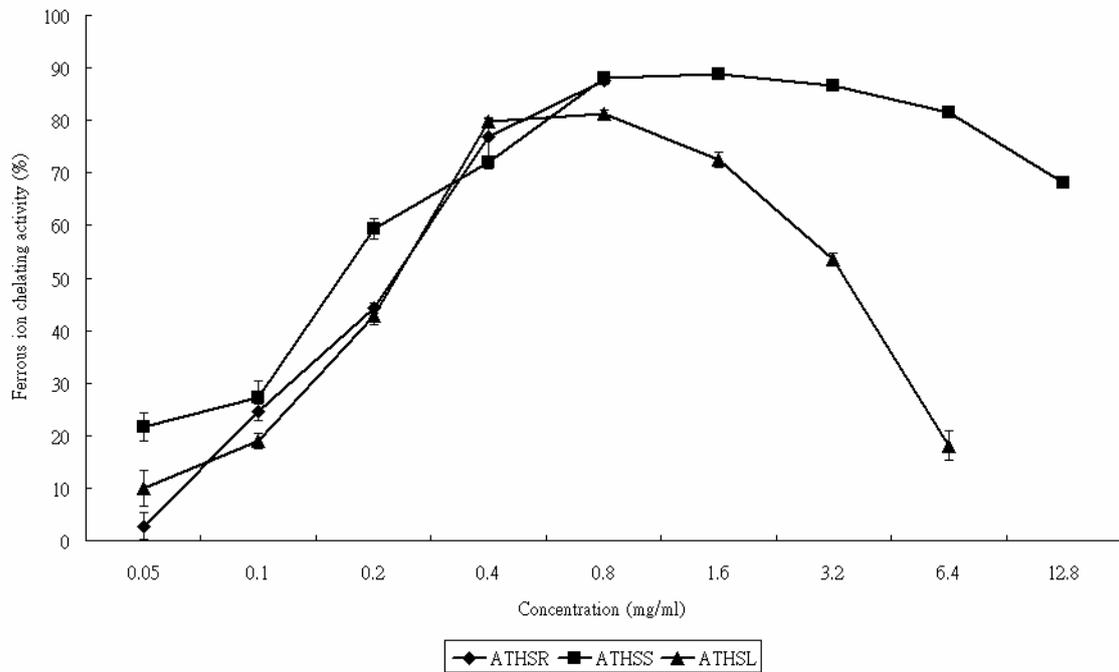
圖三十二 彰化縣田尾鄉三葉五加之莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。





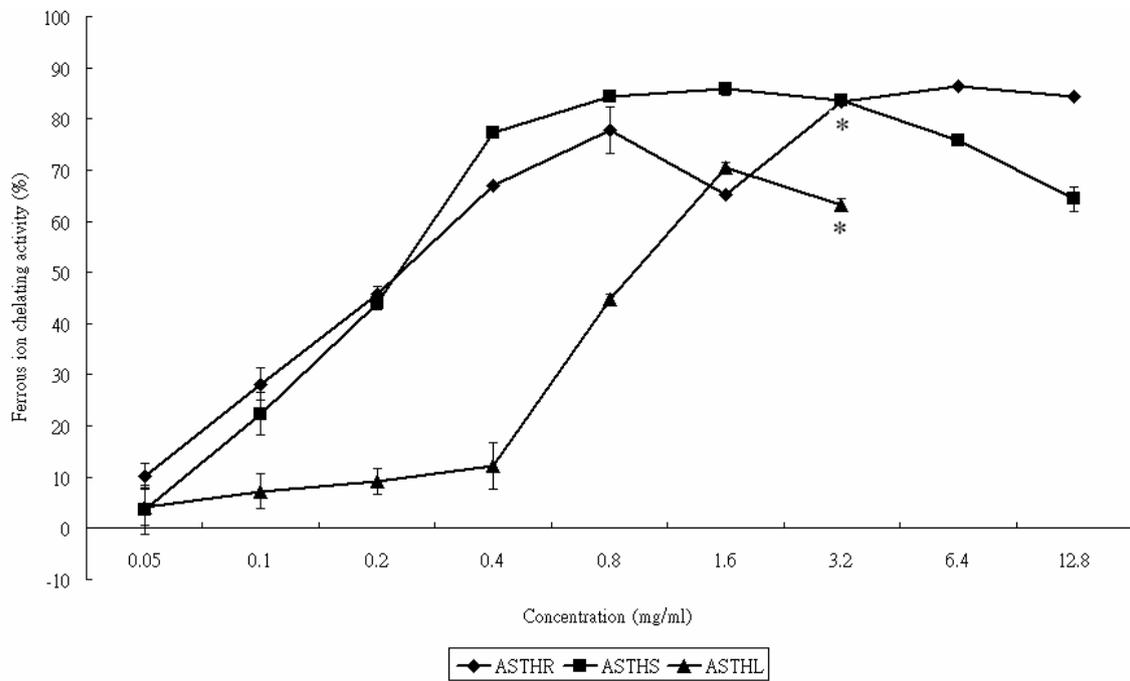
圖三十三 台中后里三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。





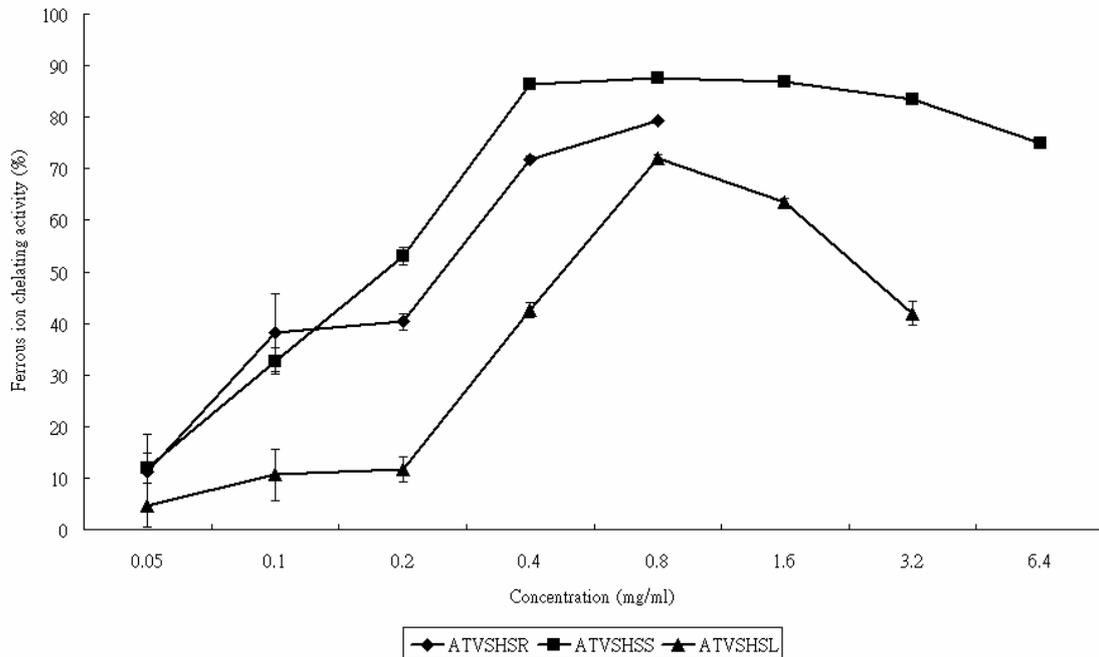
圖三十四 產地花蓮三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。





圖三十五 台中后里刺五加之根、莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。\*為 $p < 0.05$ 。

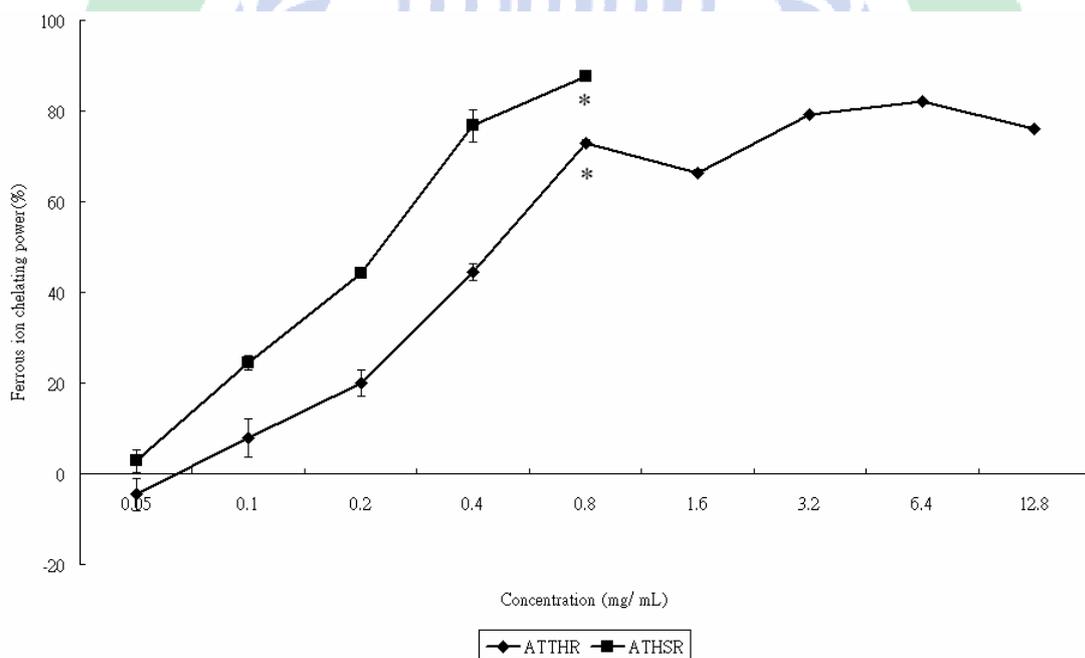




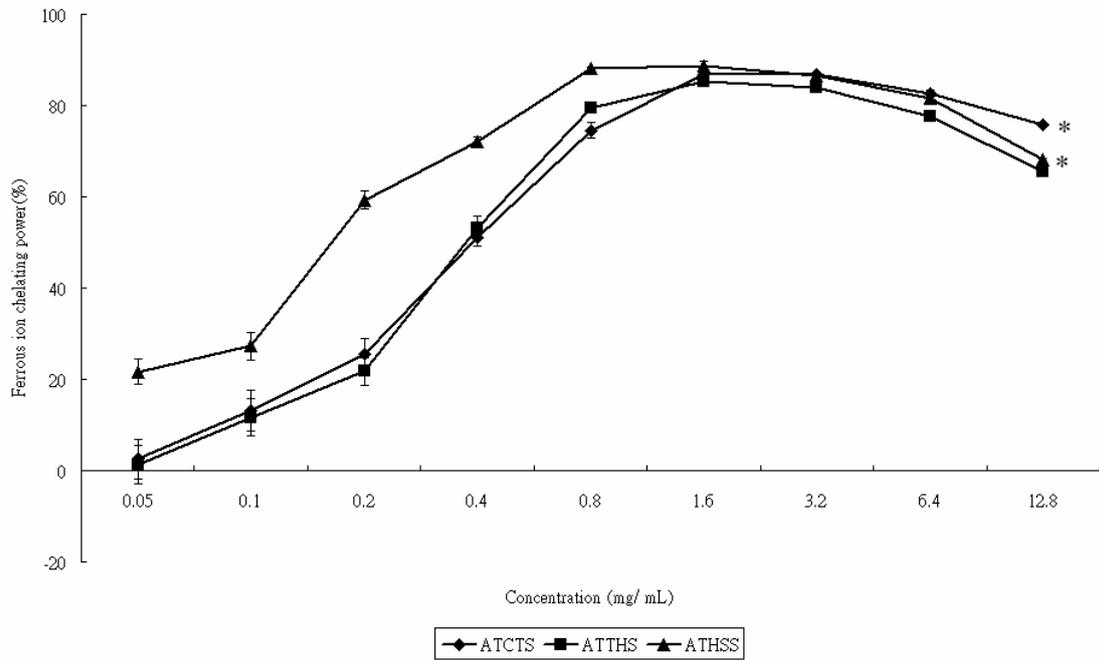
圖三十六 花蓮毛脈三葉五加之根、莖、葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。

為了區別不同產地三葉五加之根、莖、葉，分別在圖三十七、三十八、三十九中結果顯示，產地花蓮的三葉五加之根、莖、葉，其亞鐵離子螯合能力皆較其他產地佳( $p < 0.05$ )。此後針對三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加之根、莖、葉做比較，在圖四十中結果顯示，在根的部位為三葉五加能力最佳，最後為刺五加，三葉五加與標準品 EDTA 比較，其亞鐵離子螯合能力可達 EDTA 的 93%。圖四十一中三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加之莖的部位並無明顯差異性，三種樣

品亞鐵離子螯合能力與 EDTA 比較，能力也可達 94%。圖四十二中結果顯示三葉五加之葉的部位亞鐵離子螯合能力較佳，毛脈三葉五加次之，但若以葉的部位與標準品 EDTA 互相比較，其螯合能力約為其 77%，就根、莖、葉三個部位比較起來，能力較為低。由此實驗中發現，仍是屬三葉五加亞鐵離子螯合能力為最佳，而刺五加的能力較無高過其他兩者。

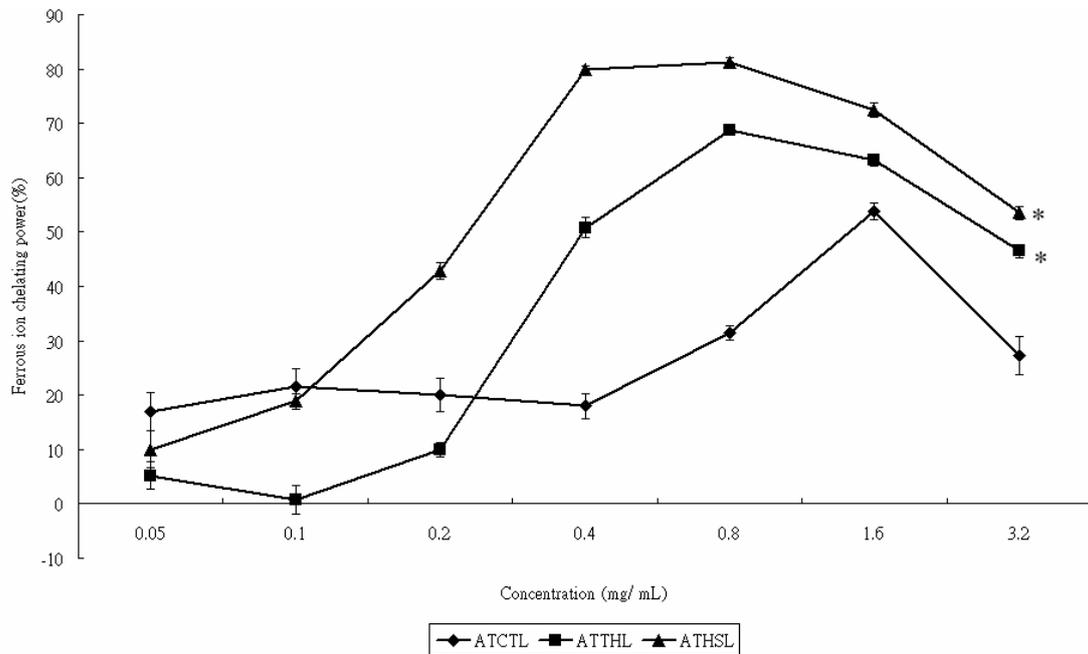


圖三十七 不同產地三葉五加之根甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。



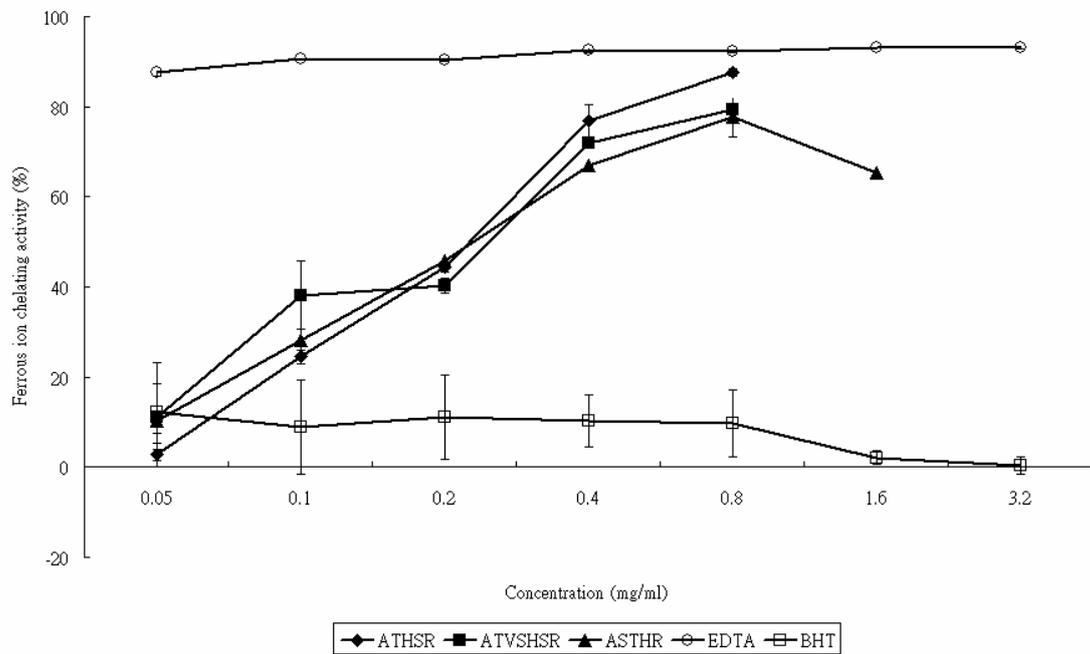
圖三十八 不同產地三葉五加之莖甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。





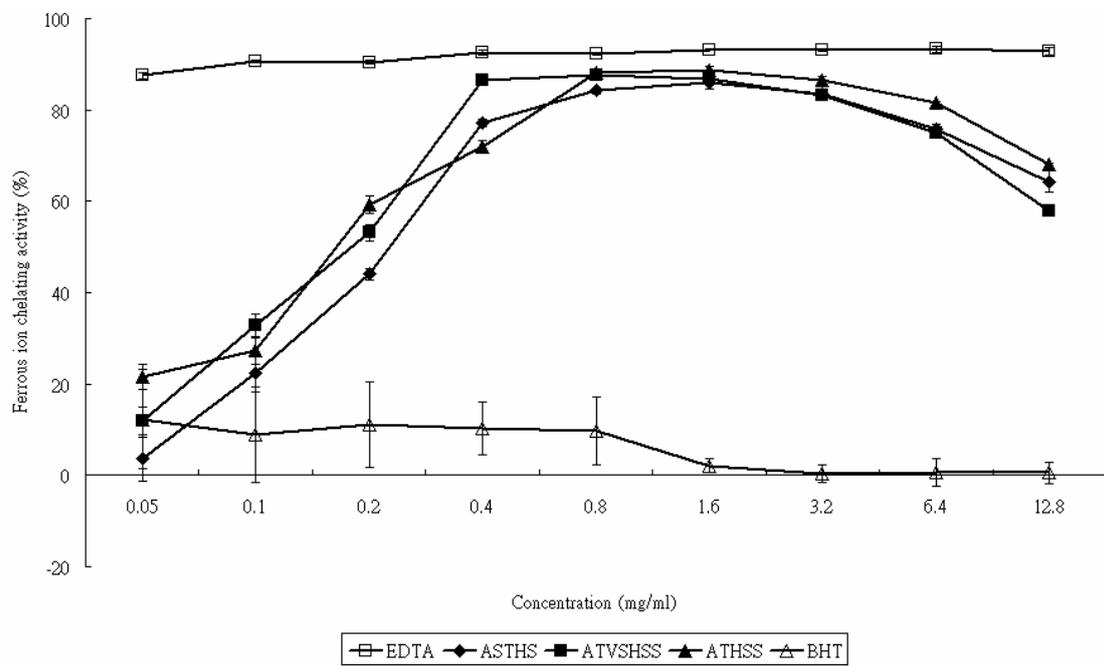
圖三十九 不同產地三葉五加之葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。\*為  $p < 0.05$ 。





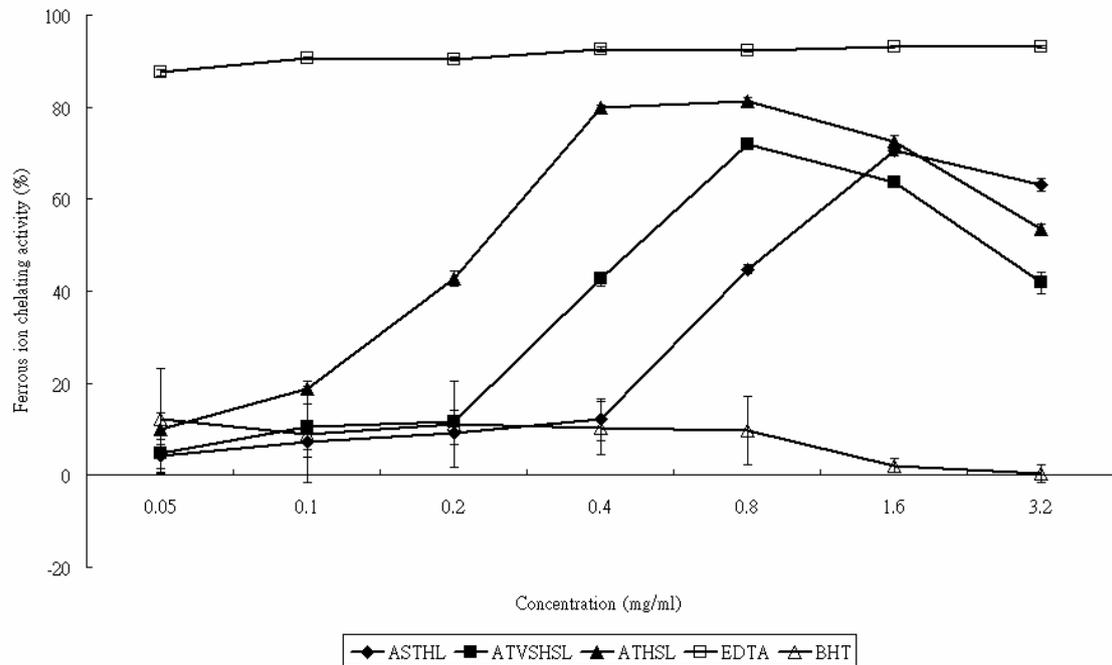
圖四十 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之根甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。





圖四十一 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之莖甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。





圖四十二 三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之葉甲醇萃取液其亞鐵離子螯合能力之比較。

#### 四、清除超氧陰離子能力測定

超氧陰離子自由基 (superoxide radical,  $\cdot\text{O}_2^-$ ) 為最常且產生量最多的活性氧物質，其會引發自由基的連鎖反應與生成有毒之氧化產物，進而對生物造成傷害。在對  $\cdot\text{O}_2^-$  之清除效力會隨著萃取溶劑極性大小的不同，其對  $\cdot\text{O}_2^-$  之清除效力也有所差異，不同極性大小的溶劑萃取出清除  $\cdot\text{O}_2^-$  的有效成分，以高極性溶劑(水)所萃取出清除  $\cdot\text{O}_2^-$  的有效成分含量最多，因此在表八中結果顯示，用甲醇萃取

溶劑萃取三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加，其萃取液不管在根、莖、葉皆無良好的清除超氧陰離子能力，而人工合成抗氧化劑 BHT 也無此能力。因此在抗氧化劑方面，無論是天然抗氧化劑維生素 E 或人工合成抗氧化劑 BHT 皆不具有清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 之效力，此清除超氧陰離子能力為 BHT 等抗氧化劑所缺乏的。水溶性抗氧化劑清除超氧陰離子的能力較佳，而脂溶性抗氧化劑如 BHT、 $\alpha$ -Tocopherol 等因為會促進超氧陰離子的形成，清除超氧陰離子的能力較差<sup>(60)</sup>。

表八 不同產地三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加之根、莖、葉清除超氧陰離子能力測定

Code name	Superoxide anion scavenging activity (%)
ATCTS	-51.56 ± 4.88
ATCTL	-69.53 ± 2.71
ATTHR	-123.44 ± 3.58
ATTHS	-73.44 ± 6.20
ATTHL	-203.13 ± 11.08
ASTHR	-39.06 ± 4.88
ASTHS	-89.84 ± 6.20
ASTHL	-95.31 ± 1.35
ATVSHSR	-45.31 ± 2.34
ATVSHSS	-107.03 ± 8.23
ATVSHSL	-96.88 ± 4.06
ATHSR	-42.97 ± 2.34
ATHSS	-101.56 ± 18.31
ATHSL	-46.88 ± 3.58
BHT	-31.25 ± 2.34

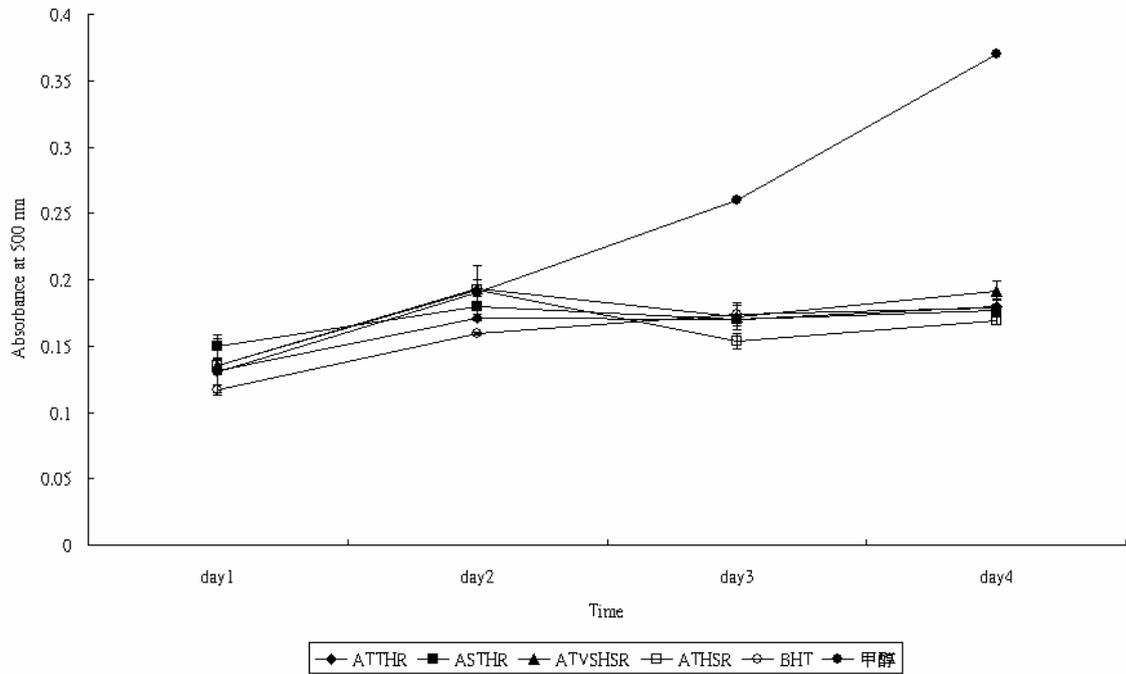
## 五、抗油脂過氧化作用測定-硫氰酸鐵法

以硫氰酸鐵法測定甲醇萃取三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加根、莖、葉萃取物及 BHT 抗亞麻油酸之過氧化情形，由於過氧化物並不安定，在氧氣充份供應下，會再進一步生成複雜之二次代謝產物而減緩過氧化物之累積，因此在圖上會發現有下降的情形。圖四十三中從實驗結果發現沒有添加抗氧化物之亞麻油酸在起始第一天後，過氧化物開始累積並持續達到高峰，在不同產地三葉五加之根的部位抗油脂過氧化的情形，及與刺五加、毛脈三葉五加、標準品 BHT 互相比較，其抗油脂過氧化能力與人工合成抗氧化劑 BHT 相當，因此在根的部位方面，三葉五加、刺五加及毛脈三葉五加都有相當好的抗油脂過氧化能力。

由圖四十四結果發現不同產地三葉五加之莖的部位，彼此之間抗油脂過氧化能力相當，並無明顯的差異性，三葉五加與刺五加抗油脂過氧化能力也相當，毛脈三葉五加則能力較低於刺五加( $p < 0.05$ )，與抗氧化劑 BHT 比較下，產地為台中后里三葉五加及刺五加比 BHT 能力稍低( $p < 0.05$ )，其他則無顯著的差異性。在圖四十五不同產地三葉五加之葉的部位，彼此之間抗油脂過氧化能力相當，並無顯著的差異性，三葉五加與刺五加、毛脈三葉五加三者之間抗油脂過氧化能力也

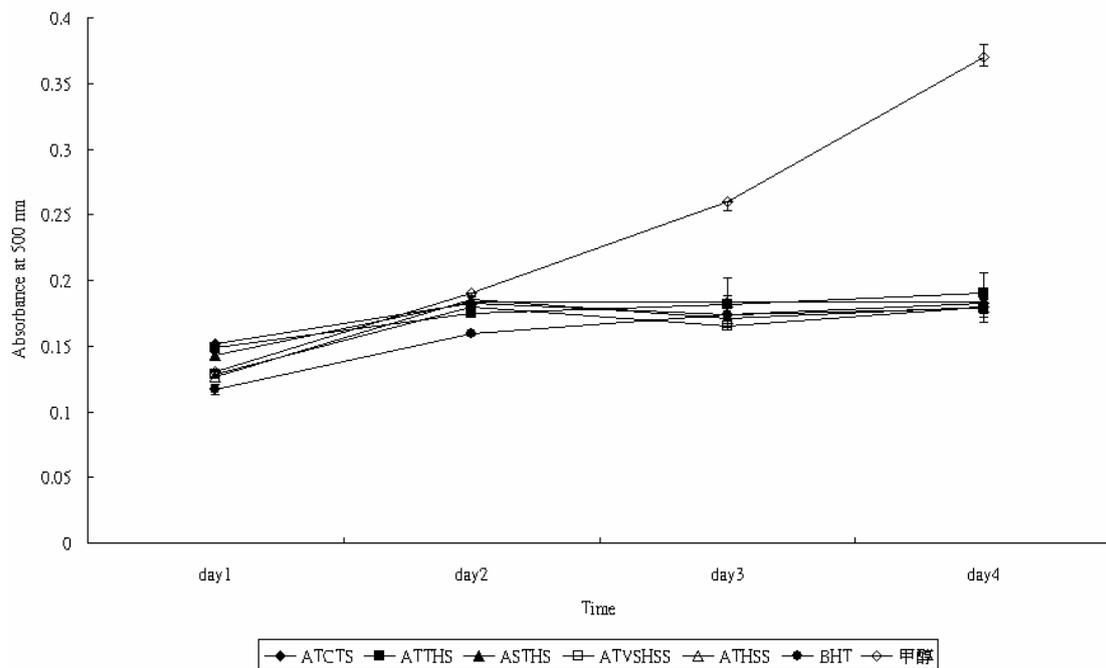
相當，與與抗氧化劑 BHT 比較下毛脈三葉五加抗油脂過氧化能力稍低( $p < 0.05$ )，而三葉五加及刺五加則無顯著的差異性，顯示與抗氧化劑抗油脂過氧化能力相當，綜合上述三葉五加之抗油脂過氧化與刺五加及 BHT 能力相當。圖四十六為比較三葉五加之根、莖、葉部位抗油脂過氧化能力，根的部位能力較莖、葉佳( $p < 0.01$ )。圖四十七則比較刺五加之根、莖、葉部位抗油脂過氧化能力，發現葉的能力較佳，根則次之，葉與莖兩部位有顯著性的差異( $p < 0.05$ )。圖四十八則比較毛脈三葉五加之根、莖、葉部位抗油脂過氧化能力，莖的部位能力較佳，根的能力稍低。



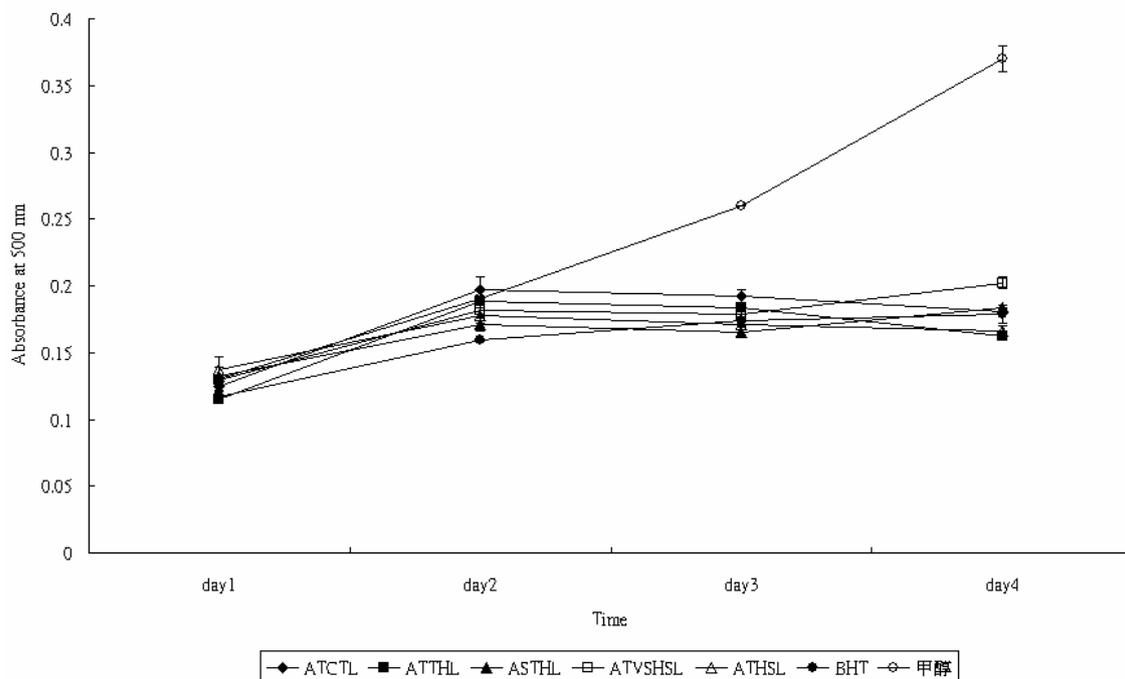


圖四十三 同一濃度3.2 mg/mL，不同產地之三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加根甲醇萃取物及BHT之抗油脂過氧化性比較。



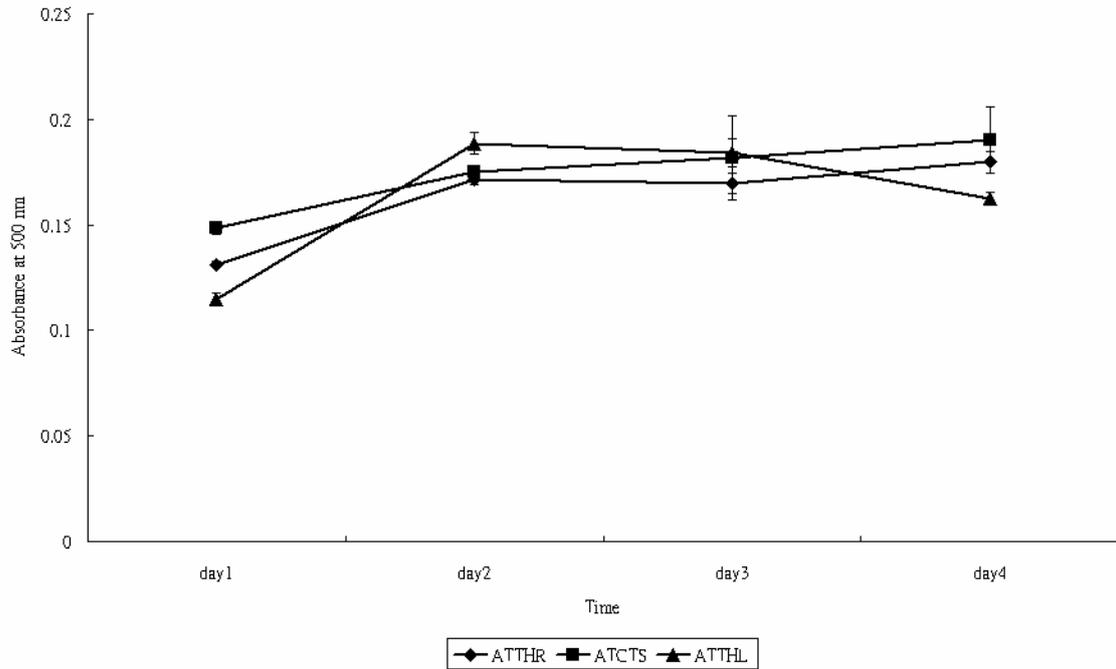


圖四十四 同一濃度3.2 mg/mL，不同產地之三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加莖甲醇萃取物及BHT之抗油脂過氧化性比較。



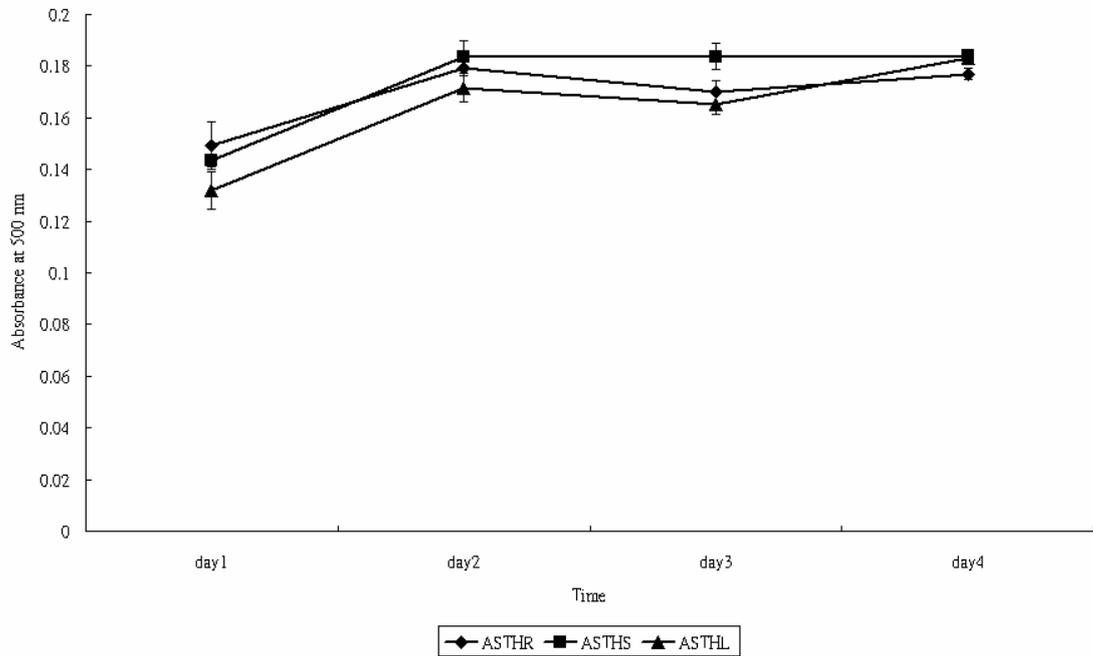
圖四十五 同一濃度3.2 mg/mL，不同產地之三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加葉甲醇萃取物及BHT之抗油脂過氧化性比較。





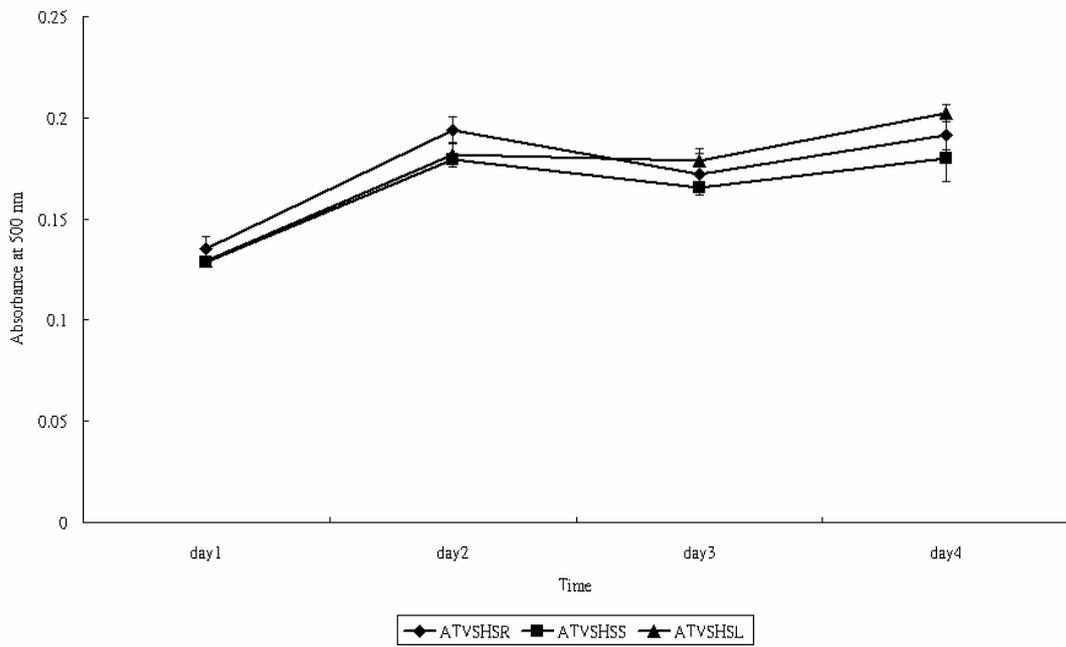
圖四十六 同一濃度3.2 mg/mL，三葉五加根、莖、葉甲醇萃取物之抗  
 油脂過氧化性比較。





圖四十七 同一濃度3.2 mg/mL，刺五加根、莖、葉甲醇萃取物之抗油脂過氧化性比較。





圖四十八 同一濃度3.2 mg/mL，毛脈三葉五加根、莖、葉甲醇萃取物之抗油脂過氧化性比較。



## 第二節 抗氧化活性成分之定量

總酚類化合物 (total phenolic compound) 包含類黃酮類 (isoflavone)、黃酮類 (flavones)、黃酮醇類 (flavonols)、黃烷酮醇類 (flavanols) 及花青素類 (anthocyanidin)，根據其苯環結構上所接之官能基的不同而具有不同之抗氧化活性<sup>(69)</sup>。總酚類化合物廣泛地存在於植物組織中，許多研究指出總酚類化合物具有良好之抗氧化、抗突變 (antimutagenic) 及抗腫瘤 (anticarcinogenic) 等特性<sup>(70-72)</sup>，其中抗氧化性如對 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)、超氧陰離子自由基的清除效力，甚至比常用之抗氧化劑維生素 C 及維生素 E 顯著<sup>(69,73-74)</sup>。

### 一、總酚類化合物之測定

Sato 等人 (1996) 研究不同種類葡萄生產的葡萄酒，發現其中多酚類含量越高者，則其清除超氧陰離子能力越強<sup>(61)</sup>。因此可知多酚類的含量與清除超氧陰離子能力有關，總酚類化合物亦具有對 $\cdot\text{O}_2^-$ 之清除效力<sup>(69,73-74)</sup>，由表八結果得知，產地台中后里之三葉五加葉的部位含有最多的多酚類含量，其次為刺五加之葉。

### 二、類黃酮化合物之定量分析

表九中結果呈現，在類黃酮化合物分析方面，產地台中后里之三

葉五加葉的部位含有較多的類黃酮化合物，其次為毛脈三葉五加及刺五加葉的部位。

表九 不同產地三葉五加、刺五加、毛脈三葉五加之根、莖、葉總酚類化合物測定及類黃酮化合物定量分析

Samples	Content(mg / mg dry sample)	Content(mg / 100 mg dry sample)
	polyphenols	flavonoids
ATCTS	7.04 ± 11.67	18.89 ± 0.39
ATCTL	9.30 ± 4.41	44.93 ± 1.93
ATTHR	13.18 ± 1.92	43.14 ± 1.36
ATTHS	3.91 ± 3.85	7.27 ± 0.26
ATTHL	46.08 ± 10.05	133.51 ± 0.97
ASTHR	12.86 ± 2.89	38.35 ± 2.83
ASTHS	5.68 ± 9.62	10.30 ± 1.77
ASTHL	41.80 ± 5.85	77.99 ± 1.60
ATVSHSR	4.34 ± 0.96	18.26 ± 0.69
ATVSHSS	2.07 ± 3.85	6.85 ± 1.90
ATVSHSL	16.61 ± 5.36	95.70 ± 0.59
ATHSR	3.32 ± 9.77	3.93 ± 0.46
ATHSS	3.43 ± 5.77	11.95 ± 3.84
ATHSL	17.31 ± 7.70	81.53 ± 1.23

### 第三節 小鼠游泳試驗

三葉五加及刺五加之莖萃取物對小白鼠其攝食效率與體重變化之影響，表十為餵食甲醇萃取三葉五加及刺五加之莖的部位後體重變化。餵食實驗藥物七天後進行游泳試驗，於表十中可得知，因實驗進行到後期，每組小鼠生存數量皆降低，甚至不達最低可統計的數量，因此在數據呈現方面，並無法證明是否有顯著性的差異，小鼠游泳時間差異性也很大，因此評估實驗進行中所可能引發小鼠死亡原因，屬人為因素的原因較大，導致在後期老鼠死亡率上升。

給予三葉五加、刺五加甲醇萃取莖之萃取物，因於實驗後其老鼠生存率下降，導致無法統計待測的數據，整體評估動物實驗過程，可能引發小鼠死亡率的原因如下：

一、技術不夠純熟導致，實驗後期動物可能有食道或是胃穿孔的情形，導致實驗藥物無法繼續供給。

二、實驗動物皆為成年公鼠，會有互相攻擊的情形，實驗小鼠因同籠數量較多，導致彼此攻擊受傷或死亡。

三、實驗藥物預先行安全劑量測試，雖然此次實驗劑量於換算後仍屬安全劑量範圍，但因低至高的劑量組別，有些動物分別都有些中毒後毛髮色澤的改變，但有時低劑量的組別有這情形發生，但高劑量組

也未必會如此，同一組別也有此情形發生，因此考慮是否有藥物毒性的可能。

為更仔細研究三葉五加藥效在動物體內的作用，此實驗仍會再次深入研究及探討。



表十 實驗前後體重變化及小鼠游泳試驗時間與生存數量

組別		體重(mg)		游泳時間 (min)	生存數(%)
		實驗前 (Day 0)	實驗後 (Day 14)		
三葉加	300 mg/kg	32.94 ± 0.98	31.13 ± 5.41	198	30
	600 mg/kg	32.96 ± 1.25	30.37 ± 1.43	16.5 ± 10.61	30
	1500 mg/kg	32.79 ± 0.92	32.26 ± 0.02	48	20
刺五加	300 mg/kg	31.68 ± 0.98	33.88 ± 0.64	76.67 ± 30.89	30
	600 mg/kg	32.11 ± 0.71	29.27 ± 1.57	88.67 ± 79.32	30
	1500 mg/kg	31.15 ± 0.41	31.31 ± 0.74	115	20
咖啡因	30 mg/kg	32.86 ± 0.89	32.8 ± 2.26	18 ± 7.07	20
	60 mg/kg	33.04 ± 1.04	36.26 ± 0.89	133 ± 176.78	20
	90 mg/kg	30.32 ± 0.49	29.33 ± 0.13	67 ± 67.88	20
控制組		31.04 ± 0.53	32.04 ± 2.64	12.8 ± 5.21	50
		32.75 ± 1.29	34.98 ± 5.46	-	60

## 第六章 結論

### 第一節 體外抗氧化測定

綜合以上實驗得知:

#### 一、DPPH 自由基清除能力測定

甲醇萃取三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之萃取物，在 DPPH 自由基清除能力測定上的確有能力，尤其以三葉五加能力為最佳，刺五加能力次之。以植物各部位之抗氧化比較下，以莖的部位抗氧化能力較強，根的能力則次之。與人工合成抗氧化劑 BHT 比較，呈現最佳清除能力皆可達到 BHT 的 95% 以上，能力與人工合成抗氧化劑 BHT 相當。

#### 二、還原力測定

還原力測定方面，結果顯示甲醇萃取三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之萃取物，隨著樣品濃度增加，還原力的能力就更增強，並以三葉五加能力為最佳，刺五加能力次之。以植物部位區分，則是以莖的能力優於其他部位，並與人工合成抗氧化劑 BHT 比較，莖的部位萃取物甚至可達 95%，葉的部分甚至於超越，因此三葉五加確實有良好的還原力。

### 三、亞鐵離子螯合能力測定

甲醇萃取三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之萃取物，實驗結果顯示三葉五加能力較佳，次之則是毛脈三葉五加，人工合成抗氧化劑 BHT 則幾乎沒有亞鐵離子螯合能力。區分植物各部位抗氧化能力，以莖的能力較佳於其他部位，根與莖兩部位之能力與標準品 EDTA 比較，可達其 90% 以上的能力，因此以三葉五加之莖的部位其亞鐵離子螯合能力最佳。

### 四、清除超氧陰離子能力測定

甲醇萃取三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之萃取物及人工合成抗氧化劑 BHT，實驗結果顯示皆沒有良好的清除超氧陰離子能力，根據其他相關研究指出，水溶性物質較有清除超氧陰離子的能力，脂溶性物質通常幾乎沒有能力，以甲醇有機物萃出之萃取物，並以甲醇當溶液配置，先推測甲醇當溶液可能會影響，因此又改用水溶性物質當溶液，測出來依然是沒有任何清除超氧陰離子能力，在推測因為以甲醇萃取出成分，因此有可能成份中以脂溶性成分為多，才會顯示此實驗結果，推測也未必是三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加都沒此能力。

## 五、抗油脂過氧化測定-硫氰酸鐵法

以連續 96 小時來測定亞麻油酸過氧化情形，顯示甲醇萃取三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之萃取物及人工合成抗氧化劑 BHT，皆有抗油脂過氧化能力，沒添加樣品或抗氧化劑則會隨著時間增加，油脂過氧化情形也隨之增加，實驗結果，三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加抗油脂過氧化能力與人工合成抗氧化劑 BHT 相當。

## 六、總酚類化合物之測定

相關研究指出多酚類的含量與清除超氧陰離子能力有關，總酚類化合物亦具有對 $\bullet\text{O}_2^-$ 之清除效力，針對甲醇萃取三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加之萃取物測定，產地台中后里之三葉五加葉的部位含有最多的多酚類含量，其次為刺五加之葉。以此實驗結果與清除超氧陰離子能力測定比較，雖然樣品在清除超氧陰離子能力測定並無結果，但是若以此相關研究來推論，的確不是三葉五加、刺五加與毛脈三葉五加本身沒有清除超氧陰離子能力，應該與甲醇萃取較有相關性。

## 七、類黃酮化合物之定量分析

在類黃酮化合物分析方面，產地台中后里之三葉五加葉的部位含有較多的類黃酮化合物，其次為毛脈三葉五加及刺五加葉的部位。

## 第二節 小鼠游泳試驗

因此經過此次動物實驗後，仍不能斷定三葉五加是否有良好的抗衰竭運動後保護身體自由基傷害的功能，必須再一次的進行測試，並且需納入更多考慮因素，才能夠更深入得知台灣產三葉五加在動物方面的功效。



## 第七章 參考文獻

1. 劉吉豐(2003),「生藥川芎秦及天然物蜂膠之藥理作用的研究」,台北醫學大學醫學研究所碩士論文。
2. 史雅中(2004),「補充葡萄籽萃取物對馬拉松運動所導致氧化壓力之影響」,國立體育學院運動科學研究所碩士論文。
3. 蘇亞萍(2001),「黃耆建中湯對肝臟細胞Hep-G2之作用機制探討」,中國文化大學應用化學研究所碩士論文。
4. 中藥大辭典編輯委員會(1981),「中藥大辭典」,昭人出版社發行。
5. 行政院衛生署(1981),「新編中藥大辭典上冊」,新文豐出版公司。
6. Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Soejarto, D. D. and Waller, D. Silberian (1985), “Current status as an adaptogen,” *Economic and Medicinal Plant Reserch*, Vol. 1, pp.146-217.
7. Halsted, B. W. and Hood, L. L. (1983), “*Eleutherococcus senticosus*, Siberian ginseng, an introduction to the adaptogenic medicine,” Long Beach , Oriental Healing Art Institute
8. Braekhman, I. I. and Kirillov, O. I. (1969), “Effect of *Eleutherococcus* on alarm-phase of stress,” *Life Sciences*, Vol. 8, pp.113-121.
9. 陳慧儀(1991),「台灣產三葉五加與市售五加皮類藥材之鑑別及活性成分之研究」,中國醫藥學院中國藥學研究所藥學碩士論文。
10. 甘偉松(1979),「藥用植物學」,國立中國藥學研究所。

11. Chen, F. C.; Lin, Y. M. and Lin, S. (1972), "Constituents of three leaved *Acanthopanax*," *Phytochemistry*, Vol. 11, pp.1496-1497.
12. Chen, F. C.; Lin, Y. M. and Yu, P. L. (1973), "Constituents of *Acanthopanax trifoliatus*," *Phytochemistry*, Vol. 12, pp.467-468.
13. Lischewski, M. and Kuttschabsky, L. (1985), "Two 24-nortriterpenoid Carboxylic acids from *Acanthopanax trifoliatus*," *Phytochemistry*, Vol. 24, pp.2355-2357.
14. Ty, P. D.; Lischewski, M.; Rhiet, H. V. and Preiss, A. (1984), "Two Triterpenoid Carboxylic acids from *Acanthopanax trifoliatus*," *Phytochemistry*, Vol. 23, pp.2889-2891.
15. Ty, P. D.; Lischewski, M.; Rhiet, H. V.; Preiss, A.; Nguyen, P. V. and Adam, G. (1985), "3- $\alpha$ , 11- $\alpha$ -dihydroxy-23-oxo-lup-lup-20 (29)-ene-28-oic acid from *Acanthopanax trifoliatus*," *Phytochemistry*, Vol. 24, pp.867-869.
16. Brekhman, I. I. and Dardymov, I. V. (1969), "Pharmacological Investigation of glycosides form ginseng and eleutherococcus," *Llyodia*, Vol. 32, pp.46-51.
17. 王筠默(1985),「中藥藥理學」,上海科學技術出版社。
18. University of Illinois at Chicago (1989), "Napralert data base profiles on *Acanthopanax* and *Eleutherococcus*," PCRPS, No. 30.
19. 倪娜、劉向前(2006),「五加科五加屬植物的研究進展」,中草藥,

第三十七卷，第十二期，第1895-1900頁。

20. 邱年永、張光雄(1992)，「原色臺灣藥用植物圖鑑」，南天書局。
21. <http://www.liniuan.com.tw/AS.htm>
22. <http://my.so-net.net.tw/santakcool/2/014004.htm>
23. <http://www.spec-g.com.tw/twherb/HerbDetail.aspx?HID=7>
24. 陳惠英、顏國欽(1998)，「自由基、抗氧化防禦與人體健康」，  
Nutritional Sciences Journal，第二十三卷，第一期，第105-121頁。
25. Gilbert W. (1981), "DNA sequencing and gene structure," Science, Vol. 214, pp. 1305-1312.
26. Anderson, D. and Phillips, B. J. (1999), "Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants," Food Chem. Toxicol., Vol. 37, pp. 1015-1025.
27. 林天送(1995)，「氧自由基：促使細胞的老化與死亡」，健康世界，第一百一十一卷，第9-14頁。
28. Ichinose, T.; Miller, M. G. and Shibamoto, T. (1994), "Determination of free malonaldehyde formed in liver microsomes upon  $CCl_4$  oxidation," J. Appl. Toxicol., Vol. 14, pp. 453-455.
29. Stadtman, E. R. and Oliver, C. N. (1991), "Metal-catalyzed oxidation of proteins," Physiological consequences. J. Biol. Chem., Vol. 266, pp.2005-2008.
30. Draper, H. H.; Agarwal, S.; Nelson, D. E.V.; Wee, J. J.; Ghoshal, A. K. and Farber, E. (1995), "Effects of peroxidative stress and age on the concentration of a deoxyguanosine-malondialdehyde adduct in rat

- DNA,” *Lipids*, Vol. 30, No. 10, pp.959-961.
31. Mahmoodi, H.; Hadley, M.; Chang, Y. X. and Draper, H. H. (1995), “Increased formation and degradation of malondialdehyde-modified proteins under conditions of peroxidative stress,” *Lipids*, Vol. 30, pp.963-936.
32. Wang, M. Y. and Liehr, J. G. (1995), “Lipid hydroperoxide-induced endogenous DNA adducts in hamsters: possible mechanism of lipid hydroperoxide-mediated carcinogenesis,” *Arch. Biochem. Biophys*, Vol. 316, pp.38-46.
33. Cunningham, M. L.; Peak, J. G. and Peak, M. J. (1987), “Single-strand DNA breaks in rodent and human cells produced by superoxide anion or its reduction products,” *Mutat. Res.*, Vol. 184, pp.217-222.
34. Cheng, K. C.; Cahill, D. S.; Kasai, H.; Nishimura, S. and Loeb, L. A. (1992), “8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes GT and AC substitution,” *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, pp.166-172.
35. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1990), “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease,” *Methods Enzymol.*, Vol. 186, pp.1-85.
36. Cotgreave I. A.; Moldeus P. and Orrenius S.(1988), “Host biochemical defense mechanisms against prooxidants,” *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Vol. 28, pp.189-212.

37. Ortenblad, N.; Madsen, K. and Djurhuus, M. S.(1997), "Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans," *American Journal of Physiology*, Vol. 272, pp.1258- 1263.
38. Smith, J. A.; Kolbuch-Braddon, M.; Gillam, I.; Telford, R. D. and Weidemann, M. J. (1995), "Changes in the susceptibility of red blood cells to oxidative and osmotic stress following submaximal exercise," *European Journal of Applied Physiology*, Vol. 70, No. 5, pp.427-436.
39. Halliwell, B. and Chirico, S. (1993), "Lipid peroxidation: its mechanism measurement and significance," *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 57, pp.715-725.
40. Francisco B. M.; Alicia S.; Manuel D. L. and Francisco R.(1996), "Lipid peroxidation products in human subretinal fluid," *Free radical biology and medicine*, Vol. 20, pp.899-903.
41. Sache ck, J. M. and Blumberg, J . B. (2001), "Role of vitamin E and oxidative stress in exercise," *Nutrition*, Vol. 17, No. 10, pp.809-814.
42. Brooks , G. A. and Fahey, T. (1984 ), "Human bioenergetics and its application," New York : Macmillan, pp.338.
43. Keul, J. and Doll, E.(1972), "Oxidative energy supply. E. Jokl(Ed .) *Energy Metabolism of Human Muscle*," Basel : Karger.
44. Sjodin , B.; Hellsten Westing Y. and Apple, F. S.(1990), "Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during

- exercise,” *Sports Medicine*, Vol. 10, No. 4, pp.236-254.
45. [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Biochemicals/Enzyme\\_Explorer/Cell\\_Signaling\\_Enzymes/Superoxide\\_Dismutase.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Cell_Signaling_Enzymes/Superoxide_Dismutase.html)
46. Fridovich I.(1995), “Superoxide radical and superoxide dismutases,” *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 64, pp.97-112.
47. Kosower N. S. and Kosower E. M.(1978), “The glutathione status of cell,” *Intl. Cytol.*, Vol. 54, pp.109-160.
48. Reed D. J. (1990), “Glutathione:Toxicological implications,” *Annu. Rev. pharmacol. Toxicol.*, Vol. 30, pp.603-631.
49. Neal G. E.; Nielschu, Judoh D. J. and Hulbert P. B.(1987), “Conjugation of model substrates or microsomally-activated aflatoxin B1 with reduced glutathione, catalysed by cytosolic glutathione-S-transferases in livers of rats, mice and guinea pigs,” *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 36, pp.4269-4276.
50. Boveris, A. and Chance, B.(1973), “The mitochondrial generation of hydrogen peroxide,” *Journal of Biochemistry*, Vol. 134, pp.707-718.
51. Jenkins, R. R. (1988), “Free radical biochemistry: Relationship to exercise,” *Sports Medicine*, Vol. 5, No. 2, pp.156-170.
52. Sjodin, B.; Westing, Y. H. and Apple, F. S.(1990), “Biochemical Mechanisms for oxygen free radical formation during exercise,” *Sports Medicine*, Vol. 10, No. 4, pp.236-254.
53. Singh, V. N. (1992), “A current perspective on nutrition and

- exercise,” *Journal of Nutrition*, Vol. 122, pp.760-765.
54. Nishizuka, Y. (1992), “Intracellular signals by hydrolysis of phospholipids and activation protein kinase C,” *Science*, Vol. 258, pp.607-614.
55. Schreck, R. and Baeuerle, P. A. (1991), “A role for oxygen radicals as second messengers,” *Trends Cell Biology*, Vol. 1, pp.39-42.
56. 林天送(1996), 「癌症與老化：從自由基對DNA的傷害談起」, 健康世界雜誌七月號, 第93-97頁。
57. 徐台閣、徐廣明、林明鈺、李建明、林孝義、謝伸裕(1999), 「中等強度運動對脂質過氧化的影響」, 大專體育學刊, 第一卷, 第一期, 第29-37頁。
58. Meir, S.; Kanner, J.; Akiri, B. and Philosoph-Hadas, S.(1995), “Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves,” *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 43, No.7, pp.1813-1819.
59. Okamoto G.; Hayase F. and Kato H.(1992), “Scavenging of active oxygen species by glycated proteins,” *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 56, No.4, pp.928-931.
60. Kim, S.; Han, D.; Moon, K. D. and Rhee, J. S.(1995), “Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants,” *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 59, No. 5, pp.822-826.

61. Sato, M.; Ramarathnam, N.; Suzuki, Y.; Ohkubo, T.; Takeuchi, M. and Ochi, H.(1996), "Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different source," J. Agric. Food Chem., Vol. 44, pp.37-41.
62. Robak, J. and Gryglewski, I. R.(1988), "Flavonoids are scavengers of superoxide anions," Biochem. Pharma., Vol. 37, pp.837-841.
63. Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K. and Nakamura, T.(1992), "Antioxidative properties of xanthane on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion," J. Agric. Food Chem., Vol. 40, pp.945.
64. Oyaizu, M.(1986), "Studies on products of browning\_ reaction:Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine," Jpn. J. Nutr., Vol 44, pp.307.
65. Decker, E. A. and Welch, B.(1990), "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food," J. Agric. Food Chem., Vol. 38, pp.674.
66. Osawa T. and Namiki M.(1981), "A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves," Agric. Boil. Chem., Vol. 45, pp.735-739.
67. Ragazzi, E. and G. Veronese.(1973), "Quantitative analysis of phenolics\_compounds after thin-layer chromatographic separation," J. Chromatogr., Vol. 77, pp.369-375.
68. Woisky, R. and Salatino, A.(1998), "Analysis of propolis : some

- parameters and procedures for chemical quality control,” J. Apic. Res., Vol. 37, pp.99-105.
69. Catherine A; Rice-Evans N. S.; Nicholas J. M. and George P.( 1997), “Antioxidant properties of phenolic compounds,” Trends Plant Sci., Vol. 2, pp.152-159.
70. May-Chien Kuo and Chi-Tang Ho(1992), “Volatile Constituents of the Solvent Extracts of Welsh Onions (*Allium fistulosum* L. Variety Maichuon) and Scallions (*A. fistulosum* L. Variety Caespitosum) ,” J. Agric. Food Chem., Vol. 40, pp.1906-1910.
71. Stavric B.(1994), “Quercetin in our diet: From potent mutagen to probable anticarcinogen,” Clin. Biochem., Vol. 27, pp. 245-248.
72. Osawa T.(1999), “Protective role of rice polyphenols in oxidative stress,” Anticancer Res., Vol. 19, pp. 3645-3650.
73. Bors W.; Heller W.; Michel C. and Saran M.(1990), “Flavonoids as antioxidants : determination of radical-scavenging efficiencies,” Methods Enzymo, Vol. 186, pp. 343-355.
74. Paul Cos.; Li Ying; Mario Calomme; Jia P. Hu; Kanyanga Cimanga; Bart Van Poel; Luc Pieters; Arnold J.; Vlietinck and Dirk Vanden Berghe(1998), “Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers,” J. Nat. Prod., Vol. 61, pp. 71-76.
75. 吳貴琮(2004), 「太極拳運動對中老年人抗氧化能力的影響」, 國立體育學院教練研究所碩士論文。
76. 林天送(1995), 「羥基自由基：毒性極高的破壞分子」, 健康世

界，第一百一十二卷，第6-10頁。

77. Neuzil, J.; Gebicki, J. M. and Stocker, R.(1993), “Radical-induced chain oxidation of protein and its inhibition by chain-breaking antioxidants,” *Biochem. J.*, Vol. 293, pp.601-606.
78. Blakeman, D. P.; Ryan, T. P.; Jolly, R. A. and Petry, T. W. (1995), “Diquat-dependent protein carbonyl formation. Identification of lipid-dependent and lipid-independent pathways,” *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 50, pp.929-935.
79. Saul, R. L. and Ames, B. N.(1986), “Background levels of DNA damage in the population,” *Basic. Life Sci.*, Vol. 38, pp.529-535.
80. Hartwig, A. and Schlepegrell, R.(1995), “Induction of oxidative DNA damage by ferric iron in mammalian cells,” *Carcinogenesis*, Vol. 16, pp.3009-3013.
81. Jacob R. A.(1995), “The integrated antioxidant system,” *Nutr. Res.*, Vol. 15, pp.755-766.
82. 謝錦城(1995)，「激烈運動與維他命E補充對心肌游離輻射物產生和排除酵素之影響」，中華民國體育學術研討專刊，第167-185頁。
83. 謝錦城(1997)，「耐力運動對人體骨骼肌抗氧化酶的影響」，中華民國體育學會學報，第22卷，第237-248頁。