

新鮮與老化葉菜類蔬菜抗氧化力之測定¹

王念慈²、王自存³、曹幸之³

摘 要

本研究以改良之TOSC (Total oxyradical scavenging capacity)法分析葉菜之總抗氧化能力，並以 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) 當量 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)值表示。將十七種常見葉菜分為三大群：第一群具高抗氧化能力(TEAC值在2.0 $\mu\text{mole/g}$ 以上)，包括莧菜、山芹菜、茺葵、角菜；第二群為具中抗氧化能力(TEAC值在1.1~2.0 $\mu\text{mole/g}$ 之間)，包括甘藷葉、芥藍、小白菜、葉萵苣、菠菜、落葵、油菜、芹菜；第三群為抗氧化能力較低者(TEAC值在1.1 $\mu\text{mole/g}$ 以下)，包括青梗白菜、皺葉萵苣、蕓菜、半結球萵苣、茼蒿。另以DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl)法分析葉菜甲醇萃取物之自由基清除能力 (以%表示)。以TOSC法與DPPH法所得之結果有所不同。兩種抗氧化力分析結果中，同樣屬於高抗氧化能力之葉菜有山芹菜與角菜，同樣屬於低抗氧化能力之葉菜有茼蒿、蕓菜及青梗白菜。莧菜與茺葵的Trolox當量高而DPPH自由基清除能力低；半結球萵苣與皺葉萵苣的Trolox當量低而DPPH自由基清除能力高。因此可知，由於反應原理與樣品準備方式不同，蔬菜之總抗氧化力以不同分析方法測定的結果，可能會有差異。葉菜類蔬菜在採後以乙烯誘導變黃、老化，其總抗氧化力之變化以TOSC法分析，結果顯示，葉萵苣、蕓菜、芥藍與紅鳳菜之總抗氧化能力有增高的趨勢，青梗白菜、莧菜、菠菜及甘藷葉於採後黃化或失去價值時的總抗氧化能力則較新鮮狀態為低。葉菜依採後總抗氧化能力之變化趨勢可分為採後下降型與採後上升型兩類。

關鍵字：自由基清除能力、總抗氧化力、蔬菜、老化、乙烯處理。

前 言

食物中的抗氧化物質可保護生物體內基質對抗或延遲氧化傷害，日常生活飲食中包含許多蔬菜水果，為大宗的抗氧化物質來源^(6,8)。以蔬果作為攝取抗氧化物質的來源具有便宜、易於取得、天然、具高抗氧化力等優點，且為各種抗氧化物質的良好組合。蔬果中主要的抗氧

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0720 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

³ 國立臺灣大學園藝學系副教授。

化物質有維生素C、維生素E、類胡蘿蔔素、酚類化合物、類黃酮、花青素等，其含量依種類而異。

利用植物粗萃取液對特定自由基的消除能力所發展出來的總抗氧化能力分析方法，是一種能簡便且快速評估蔬果產品抗氧化力的方法^(13,16)。其中TOSC法(Total oxyradical scavenging capacity)⁽¹⁷⁾是利用2,2'-azobis-amidino-propane (ABAP)作為自由基產生者，ABAP自由基與 α -keto- γ -methiol-butyric acid (KMBA)作用使KMBA轉換成乙烯。反應溶液中的抗氧化物質會與ABAP自由基作用，使KMBA受ABAP攻擊的量降低，乙烯生成量也減少。此法是以測定乙烯生成為原理的總抗氧化能力測定法，僅須微量樣品萃取液即可進行分析⁽¹¹⁾，測定清除生物體內最普遍的氧自由基之能力，是評估食物中抗氧化能力較好的指標。以DPPH(2,2'-diphenyl-1-picryl hydrazyl)自由基清除能力分析法是利用DPPH自由基在與抗氧化物質作用而失去自由基的性質時，同時也會失去本身藍紫色的特性，利用DPPH自由基在517 nm 之吸光值與空白對照組比較之下降百分率，作為植物樣品抗氧化能力之指標⁽¹²⁾。

蔬菜採收後仍然是活的組織，隨後會繼續發生變化，最後的衰老階段會經過一連串不可逆的反應導致降解，走向死亡⁽⁷⁾。葉片老化是葉片生長到最高點後，逐漸導致死亡之生理過程⁽²⁾。綠色葉菜老化過程中最明顯的徵狀就是黃化，主因葉綠素分解而含量減少⁽⁹⁾。其他伴隨老化產生的生理變化尚包括蛋白質降解、光合作用停止、脂質過氧化增加、膜的滲漏、胞器構造瓦解、DNA傷害或突變以及細胞死亡等⁽⁵⁾。由於葉片變黃是葉片老化最明顯的變化，研究者常用葉綠素含量的降低程度做為葉片老化的指標⁽²⁾。

蔬菜貯運環境中的乙烯會促進蔬果的呼吸作用、引發果實後熟、加速葉綠素分解，促進老化、增加貯藏時的生理障礙⁽³⁾。乙烯對綠色蔬菜的作用是加速葉綠素的分解，使其提早黃化而失去商品價值⁽¹⁵⁾。唐氏⁽¹⁾比較各種蔬菜在空氣中與在10 ppm乙烯中達到相同黃化程度所需的時間，將十三種綠色蔬菜依黃化速率的不同分成兩群：一群為對乙烯較敏感者，包括豆瓣菜、小白菜、蕹菜、芥藍、茼蒿；另一群為對乙烯較不敏感者，包括茼蒿、青蒜、韭菜、菠菜、葉萵苣、青梗白菜、豌豆苗、青花菜等。乙烯可藉由促進過氧化酶活性或增加葉綠素酶活性而加速黃化。

本研究以TOSC法分析市售各種葉菜類蔬菜的總抗氧化力，並與DPPH法分析葉菜DPPH自由基清除能力之分析結果比較，及探求各蔬菜老化後之抗氧化力變化。

材料與方法

一、試驗材料

供試材料有葉萵苣、半結球萵苣、皺葉萵苣、青梗白菜、小白菜、油菜、茼蒿、萵菜、角菜、芥藍、蕹菜、甘藷葉、落葵、菠菜、芹菜、山芹菜、茼蒿、紅鳳菜等18種葉菜類蔬菜。所有材料均於2004年4月間購自臺北市萬大路果菜市場，置於20°C平衡溫度後，選取無損傷、無病蟲害的植株進行實驗。葉萵苣、蕹菜、青梗白菜、萵菜、小白菜、油菜、紅鳳菜各選取葉片數7~8片且大小相近的植株，每株為一樣品，芥藍、落葵、甘藷葉以葉片數5~6片之植株

爲一樣品，菠菜以葉片數10~11片之植株爲一樣品，茼蒿、半結球萵苣、皺葉萵苣葉片相疊包覆成球狀，取形狀完整具有成熟外葉者爲樣品，芹菜、山芹菜、茺荑、角菜以一株爲一單位。

二、試驗方法

各種葉菜之樣品合置於170公升大型呼吸缸中，流通不含乙烯之新鮮空氣或含1 ppm乙烯的空氣。呼吸缸內置小盤水以加濕，整缸置於20°C 冷藏庫中，每天以目視觀察紀錄各葉菜之黃化分數。另取樣葉片部分測定總氧自由基清除能力以及DPPH自由基清除效力。

(一)以TOSC法測定葉菜之總抗氧化能力

分析植物組織之抗氧化能力係參考及修改MacLean等人⁽¹¹⁾之TOSC法。取內含700 μL potassium phosphate buffer (pH 7.4)與100 μL 0.2 mM KMBA的試管，加入0~100 μM 之一系列Trolox溶液(100 μL)，蓋上橡膠塞後，陸續將100 μL 20mM ABAP以針筒注入試管中，振盪5秒鐘，隨即置於39°C 恆溫的振盪水浴槽(每分鐘振盪30次)。熱水浴90分鐘。最後抽取出試管上部氣體，打入氣相層析儀，分析乙烯含量。由標準反應試管中Trolox當量對乙烯生成量之關係圖，可得線性回歸標準曲線。

將植物材料以鉢和杵磨碎後，秤取冷凍樣品0.1 g，加入10 mL potassium phosphate buffer (pH 7.4)萃取，繼以12,500 g離心10分鐘，取上清液經適當稀釋，取代Trolox溶液。反應結束時分析試管上部氣體中乙烯的當量，根據標準曲線方程式，求出相當於標準品Trolox之當量，再將此Trolox當量乘以稀釋倍率，換算出原本該植物組織的抗氧化能力。

(二)以DPPH自由基清除能力測定葉菜之抗氧化能力

參考Shimada⁽¹⁴⁾的方法分析DPPH自由基清除效應。秤取蔬菜冷凍樣品0.200 g，加入20 mL甲醇萃取，得甲醇萃取液。以4 mL甲醇萃取液(相當於10 mg sample / mL methanol)，加入1 mL 0.2 mM DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)溶液處理後，以分光光度計(UV-160A UV-Visible Recording Spectrophotometer, 日本Shimadzu公司)測定517 nm之吸光值。DPPH溶液是取0.0039 g DPPH粉末充分溶解於50 mL甲醇中，並於配置完成3小時以內使用。根據與空白對照組相較之吸光值下降百分比，判定各試驗樣品清除DPPH自由基之減弱程度，評估爲抗氧化能力。

(三)其他測定項目

測定各蔬菜樣品之呼吸速率係採用密閉系統，將每樣品依其體積分別放在2.0至9.4公升不等的呼吸缸中，以膠帶將呼吸缸密封二小時後，以1 mL塑膠製皮下注射針筒抽取呼吸缸內之氣體，再以氣相層析儀(Gas Chromatograph, Shimadzu GC-8A)配備熱傳導檢測器(Thermal Conductivity Detector, TCD)分析二氧化碳濃度。不銹鋼管柱(外徑1/8" ; 1/16" ; 長度192 cm) 內填充Porapak Q, 80-100 mesh，管柱和烘箱溫度爲40°C，注射口溫度爲80°C，以氫氣爲載行氣體，氣壓設定爲2 kg · cm⁻²。測得之二氧化碳濃度，以標定好濃度之二氧化碳爲標準，扣除空白值後，按缸內容積、葉菜重量及密封時間換算呼吸速率，以mg CO₂ · kg⁻¹ · hr⁻¹表示。每日定時測定，直到蔬菜全黃或全爛爲止。

另以葉綠素計測定各樣品之SPAD值，以肉眼觀察蔬菜樣品外觀顏色變化(黃化)，並記錄有無腐爛情形。黃化程度之評分有五等：1分爲全綠；2分爲淺綠；3分爲綠中帶黃；4分爲黃中帶綠；5分爲全黃。觀察葉萵苣、芥藍、青梗白菜、菠菜、茼蒿、小白菜、半結球萵苣、皺葉萵苣第一外葉葉片；蕹菜、莧菜、甘藷葉、落葵、油菜測定由頂端起算之第一片成熟葉片；芹菜、山芹菜、芫荽、角菜以選定之成熟葉片，進行黃化分數評分。紅鳳菜在觀察期間無黃化現象，只記錄外觀狀態變化。

結果與討論

一、以TOSC法與DPPH法測定葉菜之抗氧化能力

(一)以TOSC法測定葉菜之抗氧化能力

以TOSC法分析十七種葉菜之總抗氧化能力，並以Trolox當量Trolox equivalent (TE)值表示(表一)，依高低次序爲：莧菜、山芹菜、芫荽、角菜、甘藷葉、芥藍、小白菜、葉萵苣、菠菜、落葵、油菜、芹菜、青梗白菜、皺葉萵苣、蕹菜、半結球萵苣、茼蒿。將之分爲三大群：

- 1.高抗氧化能力：TE值大於 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 的蔬菜，此群計有莧菜、山芹菜、芫荽、角菜等4種。
- 2.中抗氧化能力：以TE值介於 1.1 與 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 的蔬菜爲抗氧化能力中等者，此群計有甘藷葉、芥藍、小白菜、葉萵苣、菠菜、落葵、油菜、芹菜等8種。
- 3.低抗氧化能力：TE值低於 $1.1 \mu\text{mol}/\text{g}$ 的蔬菜有青梗白菜、皺葉萵苣、蕹菜、半結球萵苣、茼蒿等5種。

偏野生的葉菜類如角菜、山芹菜等，抗氧化能力均高；同科蔬菜之抗氧化能力並不相同。菊科的幾種蔬菜中，角菜與葉萵苣之抗氧化能力高，而半結球萵苣與茼蒿之抗氧化能力較低。葉菜之總抗氧化能力除了因種類而異，可能也受栽培方式、季節、環境及植株型態影響。

(二)以DPPH法測定葉菜之抗氧化能力

以DPPH法分析葉菜之DPPH自由基清除能力(以%表示)，依高低次序爲：角菜、甘藷葉、山芹菜、葉萵苣、半結球萵苣、皺葉萵苣、芥藍、小白菜、莧菜、菠菜、芹菜、油菜、芫荽、青梗白菜、落葵、蕹菜、茼蒿(表一)。其中前五名的DPPH自由基清除能力集中在80~88%之間，其餘葉菜清除能力在15~75%之間。蕹菜與茼蒿以兩種測定方法都顯示屬抗氧化能力較低者。

(三)以TOSC法與DPPH法測定葉菜抗氧化能力之比較

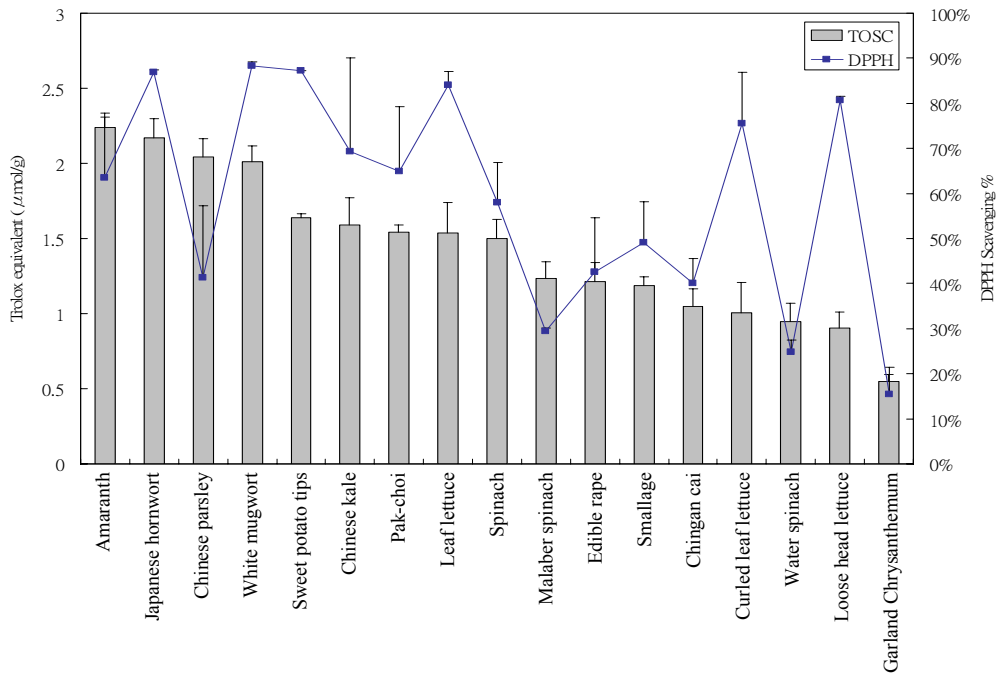
以TOSC法測定十七種常見葉菜總抗氧化能力之結果，與DPPH法之結果大致相似(圖一)。TE值高的蔬菜其DPPH值(%)也高，除角菜、甘藷葉、葉萵苣、皺葉萵苣、半結球萵苣之DPPH值特別高以及芫荽偏低外，DPPH自由基清除能力曲線隨TE值下降而呈下降趨勢(相關係數可達0.708，數據未顯示)。TOSC法與DPPH法的原理都是以樣品中抗氧化物質對

表一、新鮮葉菜 17 種之抗氧化能力及其排名

Table 1. Total antioxidant capacity and rank of 17 fresh leafy vegetables

Leaf vegetables	TOSC		DPPH	
	TEAC ($\mu\text{mol/g}$)	Rank	DPPH (%)	Rank
Amaranth	2.239 \pm 0.095 ¹	1	63.54 \pm 13.35	9
Japanese hornwort	2.173 \pm 0.127	2	86.84 \pm 0.52	3
Chinese parsley	2.044 \pm 0.120	3	41.25 \pm 15.93	13
White mugwort	2.008 \pm 0.107	4	88.24 \pm 1.03	1
Sweet potato tips	1.639 \pm 0.024	5	87.23 \pm 0.06	2
Chinese kale	1.591 \pm 0.182	6	69.29 \pm 20.82	7
Pak-choi	1.544 \pm 0.047	7	64.97 \pm 14.21	8
Leaf lettuce	1.540 \pm 0.199	8	84.06 \pm 2.94	4
Spinach	1.500 \pm 0.125	9	57.94 \pm 8.98	10
Malaber spinach	1.232 \pm 0.115	10	29.35 \pm 0.87	15
Edible rape	1.210 \pm 0.131	11	42.51 \pm 12.16	12
Smallage	1.185 \pm 0.061	12	49.16 \pm 8.97	11
Chingan cai	1.050 \pm 0.116	13	40.03 \pm 5.47	14
Curled leaf lettuce	1.004 \pm 0.202	14	75.50 \pm 11.33	6
Water spinach	0.949 \pm 0.121	15	24.80 \pm 2.68	16
Loose head lettuce	0.905 \pm 0.105	16	80.65 \pm 0.94	5
Garland Chrysanthemum	0.546 \pm 0.049	17	15.39 \pm 5.97	17

¹ Values presented are means \pm SE (n=3).



圖一、十七種葉菜之總抗氧化能力(以 Trolox 當量表示)與 DPPH 自由基清除能力(%)。

Fig. 1. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and DPPH radical scavenging activity (%) of 17 leafy vegetables.

反應溶液中既有自由基之清除能力作為抗氧化能力之指標，但兩種方法所使用的萃取液不同，故萃取出的成分組成也會不同。TOSC法以potassium phosphate buffer (pH 7.4)對植物組織進行萃取，可萃取出的植物成分可能會受到溶劑的限制，而多為水溶性的成分；DPPH法利用甲醇萃取，可萃取出較多的非極性成分。因之，萃取成分的差異也會使抗氧化能力之測定結果有所不同。本試驗中山芹菜、角菜及甘藷葉以兩種方法測定均顯示有高抗氧化能力，但皺葉萵苣、半結球萵苣及茼蒿以兩種方法測定的結果不同。角菜、萵苣類與山芹菜中可能有某些成分對於清除DPPH自由基特別有效果。Kaur and Kapoor⁽⁸⁾指出DPPH自由基之反應會因反應物構造不同而有差異。

抗氧化能力是一種綜合活性表現的結果，各種分析方法皆只能針對某一類特定物質或某一特定反應加以偵測。因此以不同的方法進行總抗氧化能力評估，各有其優缺點。類似本試驗以相同蔬菜進行不同測定方法所得結果之比較，有更多數據累積時或可找出穩定、簡便且具代表性的評估方法。

二、葉菜採後抗氧化能力變化

葉菜採後貯藏過程中仍然會進行生理代謝，最後走向衰老、死亡。隨著生物體逐漸老化，其體內的活性氧物種(reactive oxygen species, ROS)會持續產生，而植物也會產生防禦機制以因應，故葉菜採後之抗氧化能力應會改變。

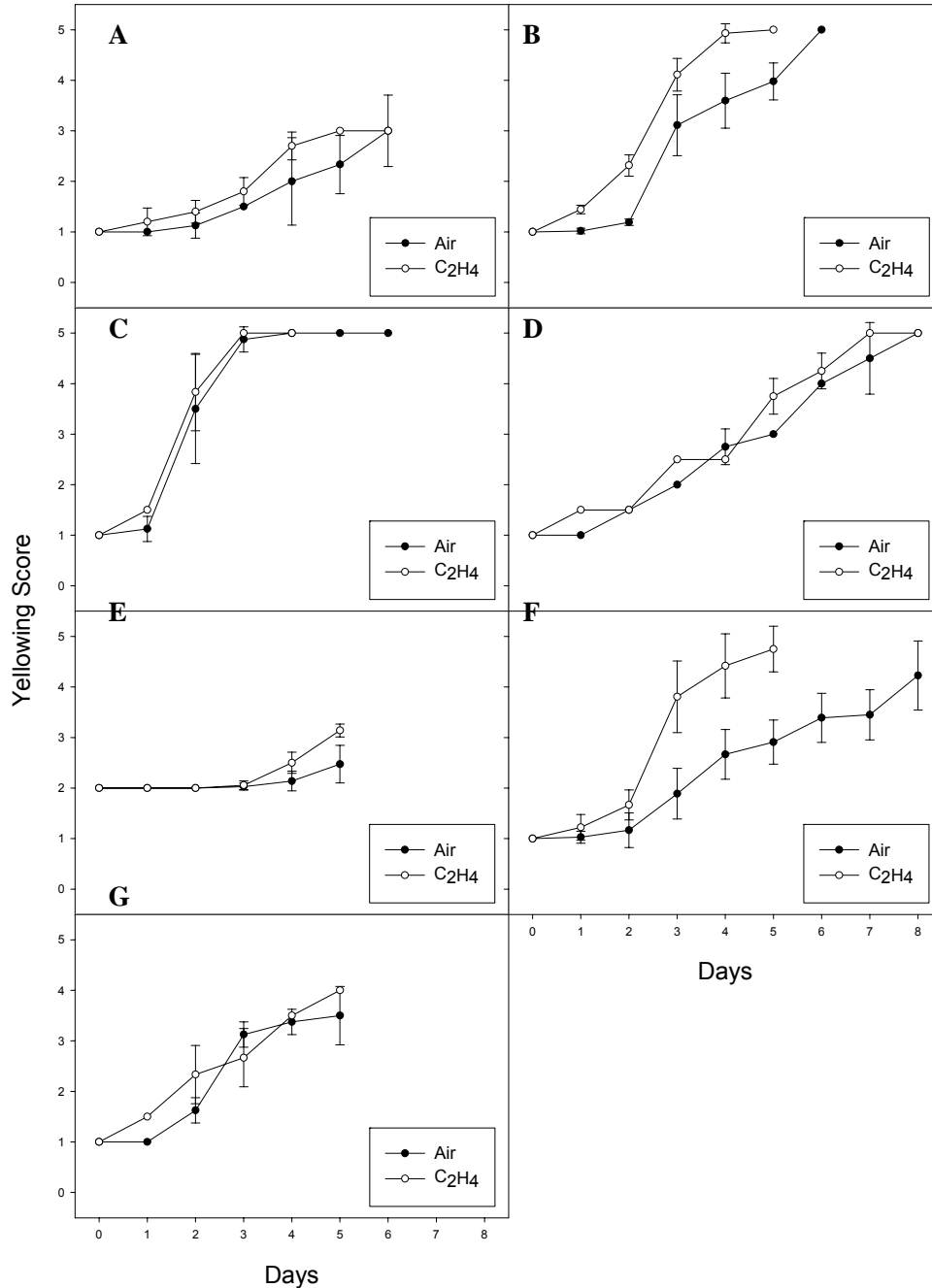
(一)八種葉菜在20°C中之呼吸速率與外觀變化

呼吸速率變化方面，每日定時測定萵菜、甘藷葉、芥藍、葉萵苣、菠菜、青梗白菜、紅鳳菜、蘿菜等八種葉菜之呼吸速率。八種蔬菜在空氣中之呼吸速率均在 $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 以下。其中，蘿菜呼吸速率較高，葉萵苣、芥藍、甘藷葉與菠菜呼吸速率中等，而青梗白菜、萵菜、紅鳳菜的呼吸速率低。蘿菜及甘藷葉在含1 ppm乙烯的空氣中呼吸速率增高最多，葉萵苣與紅鳳菜次之，芥藍、青梗白菜、萵菜、菠菜受乙烯影響較不明顯。葉片老化過程中初期呼吸速率恆定，後期呼吸速率增加，可能因1.不合成ATP，電子傳遞鍊進行速度增加，而增加了對氧氣的利用；2.老化時釋放出胺基酸，可作為呼吸作用的受質；以及3.老化時釋出之可溶性醣增加呼吸作用受質的量使得呼吸速率增加^(2,10)。

葉菜外觀變化方面，在20°C新鮮空氣中，葉萵苣的黃化速率較慢，第五天黃化分數才達到3分。芥藍黃化快，第二天即達3.5分；蘿菜及菠菜在第三天、青梗白菜及甘藷葉在第五天達到3分。萵菜葉片極易脫落，於第5天脫落時黃化分數為2.5分(圖二)。

在流通新鮮空氣中的葉萵苣於第四天葉緣開始出現圓形褐斑，第五天稍有腐爛，在第六天黃化分數達3.5時就腐爛了。蘿菜於第二天即由葉片基部開始黃化，第六天黃化分數達4.5時葉片全數掉落。芥藍黃化速率快，於第四天已達五分，第五天開始褐化。青梗白菜的第一外葉首先於第三天開始黃化，但整個貯藏過程中無腐爛，於第八天黃化分數達5分；第二外葉黃化較慢，第三外葉更慢。萵菜於第四天開始出現黃化，到第五天黃化分數達2.5分時葉片大半脫落。紅鳳菜採後3日內肉眼無法判別顏色是否有變化，但其SPAD值有下降趨勢，到第四天時可見葉背綠色變淡，葉片稍微萎凋有反捲情形，第七天出現褐化。菠菜

於第六天黃化分數達4分時出現腐爛情形。甘藷葉於第二天由葉緣開始出現黃化，第五天葉尖開始出現褐化；在未全面均勻黃化之前，褐化區域逐漸擴大。



圖二、七種葉菜在新鮮空氣及在含 1ppm 乙烯之空氣中貯藏期間黃化分數變化。
 (A)葉萵苣 (B)蕹菜 (C)芥藍 (D)青梗白菜 (E)莧菜 (F)甘藷葉 (G)菠菜。

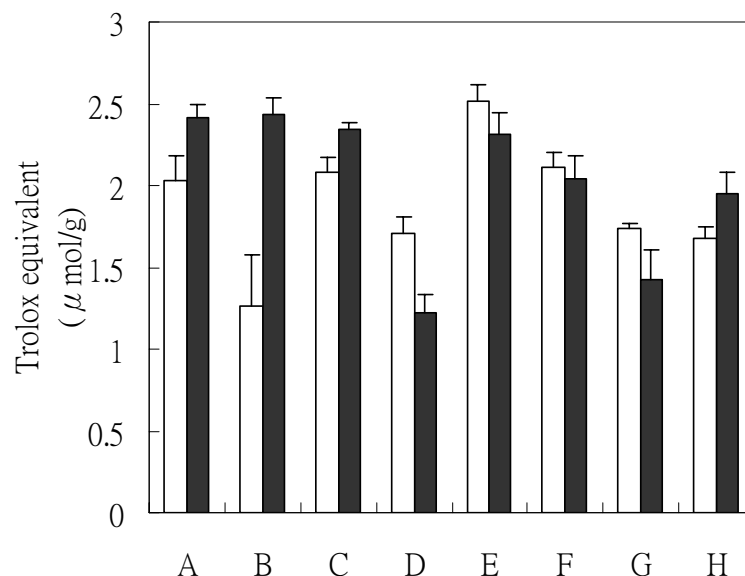
Fig. 2. Changes of yellowing score of seven vegetables stored in fresh air and in 1 ppm C₂H₄.
 (A) Leaf lettuce (B) Water spinach (C) Chinese kale (D) Chin-gan cai (E) Amaranth (F) Sweet potato tips (G) Spinach. Error bars represent the standard error of the mean (n=3).

(二)八種葉菜在20°C中老化時抗氧化能力之變化

八種葉菜於購回當日之總抗氧化能力以莧菜最高($2.033 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)，其次依序為甘藷葉、芥藍、葉萵苣、菠菜、青梗白菜、紅鳳菜、蕹菜。葉萵苣、蕹菜、芥藍與紅鳳菜在採後之總抗氧化能力有增高的趨勢；青梗白菜、莧菜、菠菜以及甘藷葉於採後黃化或失去價值時的總抗氧化能力則較新鮮時為低(圖三)。蕹菜採後在貯藏過程中，黃化分數漸增、總抗氧化能力漸增(圖四)，但青梗白菜則黃化分數漸增、總抗氧化能力漸減(圖五)。

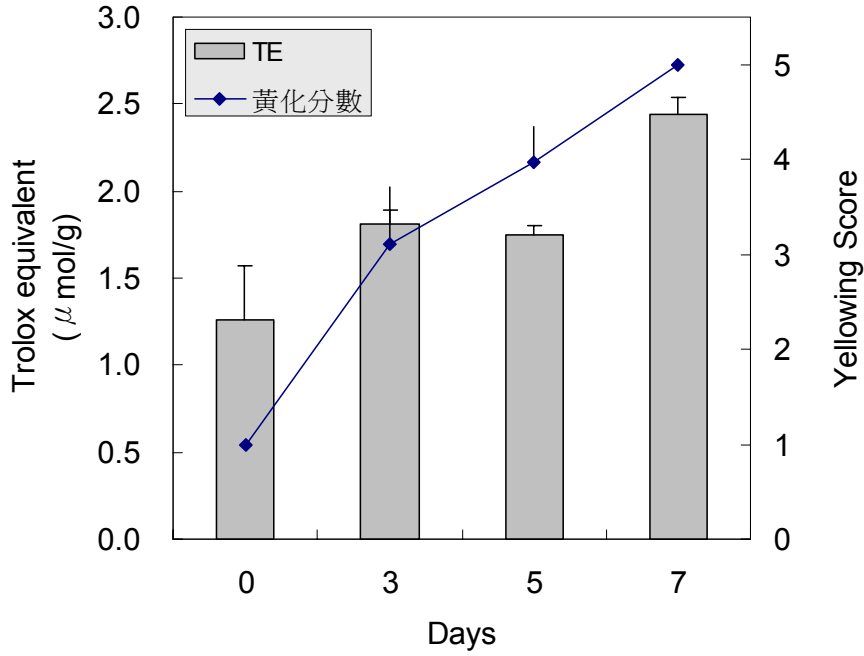
根據試驗結果可將葉菜依採後總抗氧化能力之變化趨勢大別為兩類：一類是下降型，即採後貯藏過程中抗氧化能力會逐漸下降；一類為上升型，即採後抗氧化能力會逐漸上升。下降型的葉菜符合一般人對於葉片老化的概念，即老化為細胞逐漸崩解走向死亡的過程⁽⁷⁾。上升型的葉菜如葉萵苣、蕹菜、芥藍與紅鳳菜，可能因為植物為抵抗衰老過程中的氧化傷害，產生調節機制來消除自由基或活性氧的產生。除酵素性的抗氧化防禦機制之外，也產生抗氧化物質如還原態ascorbate、還原態glutathione (GSH)、 α -tocopherol、及carotenoid等⁽⁴⁾。

一般認為蔬菜採收後，隨著貯藏時間增加，會逐漸劣變，漸漸失去營養價值，然而本研究顯示，部分蔬菜在採收後老化及黃化過程中，抗氧化能力有增加的趨勢，意即原本人們習慣挑去黃化的葉菜不食，今或可改變此一觀念成為：部分種類葉菜雖然黃化，並未降低抗氧化能力，仍具營養價值。



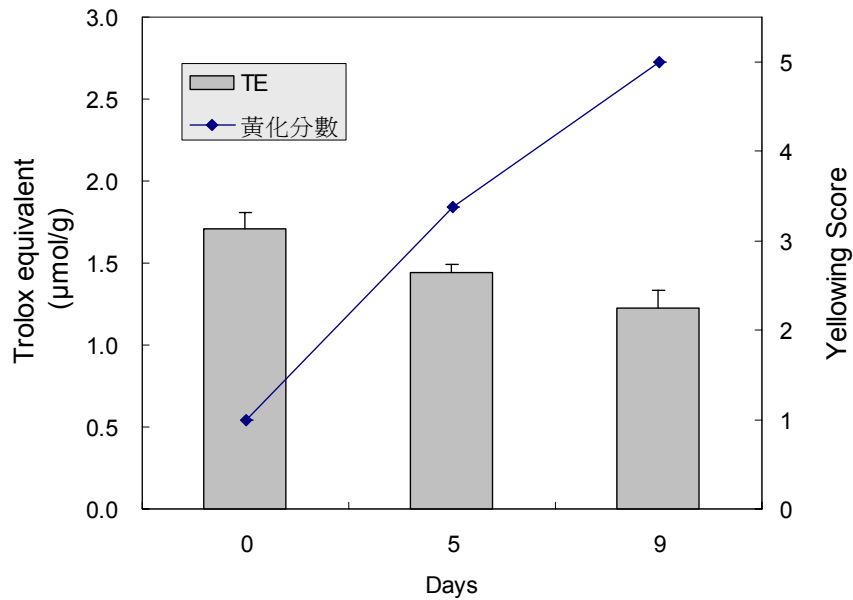
圖三、八種葉菜購回當日(□)與完全黃化或失去價值時(■)之總抗氧化能力(以 Trolox 當量表示)。(A) 葉萵苣 (B)蕹菜 (C)芥藍 (D)青梗白菜 (E)莧菜 (F)甘藷葉 (G)菠菜(H)紅鳳菜。

Fig. 3. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of 8 leaf vegetables on the day of purchase (□) and the day aged (■). (A) Leaf lettuce (B) Water spinach (C) Chinese kale (D) Chin-gan cai (E) Amaranth (F) Sweet potato vine (G) Spinach (H) Gynura. Error bars represent the standard error of the mean (n=3).



圖四、蕹菜老化過程中總抗氧化能力(以 Trolox 當量表示)之變化。

Fig. 4. Changes of Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in water spinach during leaf senescence.



圖五、青梗白菜老化過程中總抗氧化能力 (以 Trolox 當量表示) 之變化。

Fig. 5. Changes of TEAC (Trolox equivalent) in chingan-cai during leaf senescence.

(三) 乙烯處理的影響

各種蔬菜在1 ppm乙烯處理的貯藏過程中，外觀狀態之變化歷程與在空氣中者類似，只是變化較快。貯藏於1 ppm乙烯中的薺菜，黃化分數漸增，而總抗氧化能力也漸增(表二)，但青梗白菜則黃化分數漸增，而總抗氧化能力漸減(表三)。

表二、薺菜老化過程中抗氧化能力變化

Table 2. Changes of antioxidant capacity in water spinach during leaf senescence

Day	Air			C ₂ H ₄		
	YS ¹	TEAC ² ($\mu\text{mol/g}$)	DPPH ³ (%)	YS ¹	TEAC ² ($\mu\text{mol/g}$)	DPPH ³ (%)
0	1.0	1.260 \pm 0.315 ⁴	33.7 \pm 2.43	1.0	1.260 \pm 0.315	33.7 \pm 2.43
3	3.1	1.739 \pm 0.082	71.5 \pm 10.41	4.1	2.217 \pm 0.202	89.1 \pm 1.33
5	3.9	1.709 \pm 0.055	78.3 \pm 11.33	5.0	1.881 \pm 0.127	78.2 \pm 2.78
7	5.0	2.490 \pm 0.101	85.6 \pm 0.06	-	-	-

¹YS 黃化分數。Yellowing score.

²Trolox 當量之抗氧化能力。Trolox equivalent antioxidant activity.

³DPPH 自由基清除能力。DPPH free radical scavenging activity.

⁴Values presented are means \pm SE (n=3).

表三、青梗白菜老化過程中抗氧化能力變化

Table 3. Changes of antioxidant capacity in chingan-cai during leaf senescence

Day	Air			C ₂ H ₄		
	YS ¹	TEAC ² ($\mu\text{mol/g}$)	DPPH ³ (%)	YS ¹	TEAC ² ($\mu\text{mol/g}$)	DPPH ³ (%)
0	1.0	1.710 \pm 0.098 ⁴	82.4 \pm 0.52	1.0	1.710 \pm 0.098	82.9 \pm 0.52
5	3.0	1.441 \pm 0.053	48.2 \pm 8.47	3.75	1.311 \pm 0.185	38.2 \pm 5.68
9	5.0	1.224 \pm 0.111	10.5 \pm 2.04	5.0	1.494 \pm 0.131	36.4 \pm 1.87

¹YS 黃化分數。Yellowing score.

²Trolox 當量之抗氧化能力。Trolox equivalent antioxidant activity.

³DPPH 自由基清除能力。DPPH free radical scavenging activity.

⁴Values presented are means \pm SE (n=3).

外加乙烯可促進葉片老化⁽²⁾，不同葉菜對乙烯的敏感性不同⁽¹⁾。乙烯處理加速薺菜及青梗白菜之老化，使其黃化速率增加，抗氧化能力之變化也因而加速。貯藏於空氣中的薺菜，於第7天總抗氧化能力達2.490 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，而貯藏於1 ppm乙烯中的薺菜於第3天總抗氧化能力即達到2.217 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。乙烯處理之薺菜於第七天TE值下降，可能因為老化末期，細胞崩解，走向死亡。細胞內物質紛紛瓦解，造成抗氧化能力的下降。貯藏於空氣中的青梗白菜，於第9天總抗氧化能力下降至1.224 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，而貯藏於1 ppm乙烯中的青梗白菜於第9天總抗氧化能力才降到1.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 左右，與第5天之情形相仿，也許是青梗白菜對逆境乙烯之調適，使抗氧化能力維持在一定水準。

以採後到貯藏壽命結束間總抗氧化能力上升與下降最多的薤菜與青梗白菜(圖三)來探討葉菜類在老化過程中抗氧化能力之變化。薤菜採後會黃化，其總抗氧化能力也上升，可能是植物本身為抵抗衰老過程中氧化傷害而產生的調節機制，可能產生一些抗氧化物質⁽⁴⁾。青梗白菜第一外葉的總抗氧化能力隨著葉片老化黃化而降低，可能是細胞在逐漸崩解，為走向死亡的過程；另外青梗白菜葉片簇生，黃化時由最外面葉片開始，除因最外面葉片成熟度最高之原因外，也可能是最外面葉片之養分向內運輸、利用，造成第一外葉之總抗氧化能力降低。

三、老化速率與抗氧化能力之關係

不同種類蔬菜的老化速率不同。綠色葉菜老化過程中最明顯的徵狀就是黃化，因葉綠素分解而減少含量⁽⁹⁾。研究者常用葉綠素含量的降低程度來做為葉片老化的指標⁽²⁾。本研究以SPAD葉綠素計測定葉綠素指標值，再由SPAD值計算黃化(葉綠素下降)指數，作為葉菜老化的指標。

由葉萵苣、薤菜、芥藍、青梗白菜、莧菜、落葵、菠菜、甘藷葉、茼蒿、芹菜、山芹菜、半結球萵苣、皺葉萵苣、茺葵、角菜、小白菜、油菜等十七種葉菜之每日黃化(葉綠素下降)指數變化計算出其老化速率 (yellowing index (%) /d)，並測定總抗氧化能力，比較兩者之間的關係。

以Trolox當量 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 與老化速率(yellowing index (%) /d)10為界，17種葉菜分成四大群(圖六)。山芹菜與茺葵同屬繖形科、葉色深綠，總抗氧化能力高且老化速率慢；同科而葉色淺綠的芹菜則總抗氧化能力中等而老化速率高。莧菜也是屬於總抗氧化能力高且老化速率慢的葉菜。菠菜與落葵都是總抗氧化能力中等而老化速率慢的葉菜。角菜、葉萵苣、半結球萵苣與茼蒿均屬菊科，其中角菜老化速率中等、總抗氧化能力TE值可達 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ；葉萵苣同菠菜，總抗氧化能力中等，老化速率慢；半結球萵苣與茼蒿之總抗氧化能力較低，老化速率中等。十字花科蔬菜之總抗氧化能力均不高，其老化速率快。旋花科葉菜薤菜與甘藷葉的總抗氧化能力中等，兩者初期的葉綠素指標值均高，但葉綠素減少的速率很快。供試葉菜類多為黃化速率快、總抗氧化力中或低，也有部分葉菜抗氧化力較高，採後之老化速率也較低。葉菜的種類、品種、型態、栽培管理方式等，都會影響植物之總抗氧化能力與老化速率。

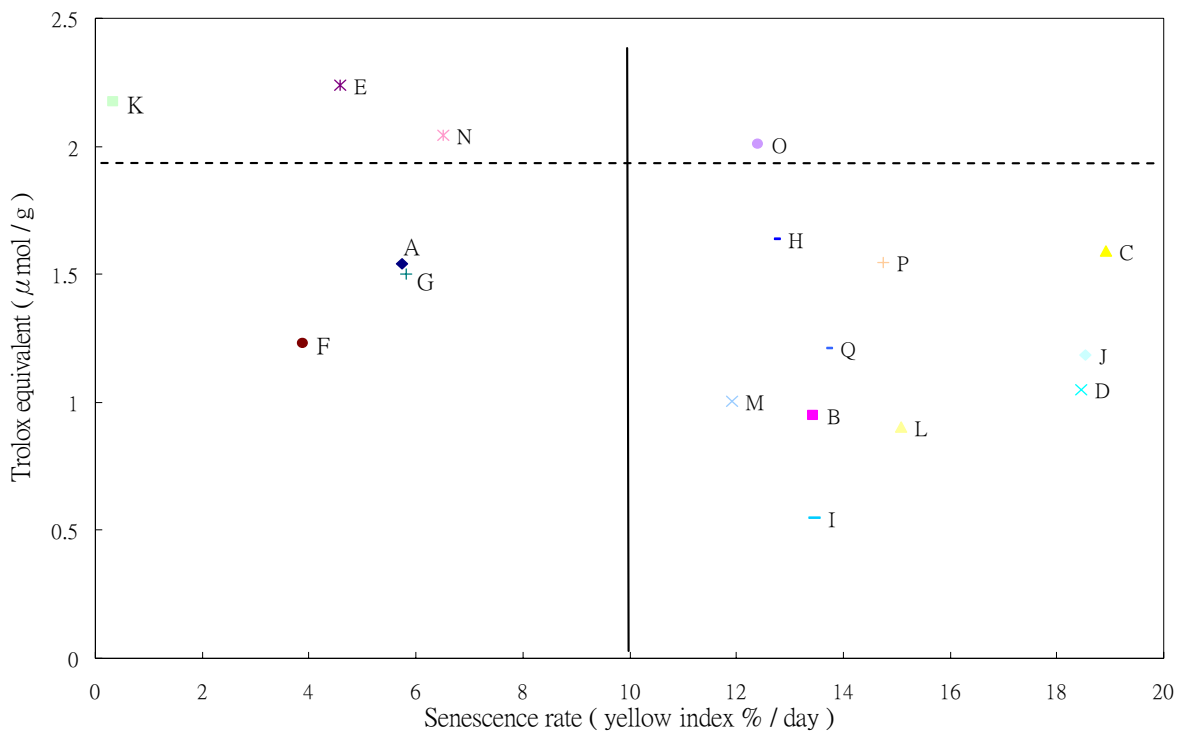
結 論

本研究改良MacLean等人⁽¹¹⁾提出之總抗氧化能力分析法(TOSC assay)，使成為更具可信度的方法據以測定常見蔬菜之抗氧化能力。

以TOSC法分析葉菜之總抗氧化能力，並以Trolox當量表示，可將十七種常見葉菜分為三大群：第一群具高抗氧化能力的，包括莧菜、山芹菜、茺葵、角菜。第二群為具中抗氧化能力的，包括甘藷葉、芥藍、小白菜、葉萵苣、菠菜、落葵、油菜、芹菜。第三群為較低抗氧化能力的，包括青梗白菜、皺葉萵苣、薤菜、半結球萵苣、茼蒿。以DPPH法分析葉菜之DPPH

自由基清除能力(以%表示)，依高低次序為：角菜、甘藷葉、山芹菜、葉萵苣、半結球萵苣、皺葉萵苣、芥藍、小白菜、莧菜、菠菜、芹菜、油菜、茼蒿、青梗白菜、落葵、蕹菜、茼蒿。其中，前五名的葉菜DPPH自由基清除能力集中在80~88%，其它葉菜介在15~75%。DPPH自由基清除能力曲線隨TE值下降而略呈下降趨勢，然而菊科中，除茼蒿外，萵苣、角菜及繖形科的山芹菜對於清除DPPH自由基特別有效果，它們的DPPH自由基清除能力(%)均高。

葉萵苣、蕹菜、芥藍與紅鳳菜之總抗氧化能力在採後儲放中有增加的趨勢；青梗白菜、莧菜、菠菜及甘藷葉的總抗氧化能力則於採後黃化或失去商品價值時較新鮮狀態為低。根據結果將葉菜依採後總抗氧化能力之變化趨勢區分為採後會下降與採後上升兩類。顯示部分葉菜黃化以後，抗氧化能力並未減少，仍具營養價值。乙烯處理加速蕹菜及青梗白菜之老化，增加其黃化速率，抗氧化能力之變化也因而加速。本試驗中十七種葉菜之老化速率大致與總抗氧化能力表現一致，即黃化速率較大的葉菜，其抗氧化能力不高。



圖六、十七種葉菜的老化速率與總抗氧化能力(以 Trolox 當量表示)之關係。(A)葉萵苣 (B)蕹菜 (C)芥藍 (D)青梗白菜 (E)莧菜 (F)落葵 (G)菠菜 (H)甘藷葉 (I)茼蒿 (J)芹菜 (K)山芹菜 (L)半結球萵苣 (M)皺葉萵苣 (N)茼蒿 (O)角菜 (P)小白菜 (Q)油菜。

Fig. 6. The relationship between senescence rate and Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) of 17 leafy vegetables. (A) Leaf lettuce (B) Water spinach (C) Chinese kale (D) Chingan cai (E) Amaranth (F) Malaber spinach (G) Spinach (H) Sweet potato tip (I) Garland Chrysanthemum (J) Smallage (K) Japanese hornwort (L) Loose head lettuce (M) Curled leaf lettuce (N) Chinese parsley (O) White mugwort (P) Pak-choi (Q) Edible rape. Senescence rate = (changes of yellowing index % / day).

蔬菜中含有許多不同的抗氧化成分，且各含量不一，每種蔬菜中主要貢獻抗氧化能力的物質應不盡相同，今後研究方向可朝個別抗氧化物質含量或貢獻方面繼續深入研究。此外，抗氧化能力是一種綜合活性表現的結果，以不同方法進行總抗氧化能力的評估，各有其優缺點，應找出穩定、簡便且具代表性的方法加以評估，作為營養上與育種上之參考。

參考文獻

1. 唐志婷 1997 低氧及乙烯處理對綠色蔬菜採後黃化之影響 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。
2. 高景輝 1987 植物生長與分化 pp.507-542 茂昌圖書有限公司。
3. 劉富文 1995 園產品採後處理與貯藏技術 第二版。
4. Alscher, R. G. and J. L. Hess. 2000. Antioxidants in higher plants. CRC Press, London.
5. Buchanan-Wollaston, V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199.
6. Halliwell, B. 1999. Food-derived antioxidants. Evaluating their importance in food and in vivo. *Food Sci. Agri. Chem.* 1: 67-109.
7. Kader, A. A. 2002. Postharvest technology of horticulture crops 3rd Ed. University of California, Division of Agriculture and Natural Resource. Publication 3311. p.39-40.
8. Kaur, C. and H. C. Kapoor. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36:703-725.
9. Lipton, W. J. 1987. Senescence of leafy vegetables. *HortScience* 22: 854-859.
10. Malik, N. S. and K. V. Thimann. 1980. Metabolism of oat leaves during senescence. VI. Changes in ATP levels. *Plant Physiol.* 65: 855-859.
11. MacLean, D. D., D. P. Murr and J. R. DeEll. 2003. A modified total oxyradical scavenging capacity assay for antioxidants in plant tissues. *Postharvest Biol. Technol.* 29: 183-194.
12. Naik, G. H., K. I. Priyadarsini, J. G. Satav, M. M. Banavalikar, D. P. Sohoni, M. K. Biyani and H. Mohan. 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry* 63: 97-104.
13. Prior, R. L. and G. Cao. 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *HortScience* 35: 588-592.
14. 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.
15. Tian, M. S., C. G. Downs, R. E. Lill and G. A. King. 1994. A role for ethylene in the yellowing of broccoli after harvest. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119: 276-281.

16. Wang, H., Cao, G. and R. L. Prior. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44: 701-705.
17. Winston, G. W., F, Regoll, A. J. Dugas and Jr. J. H. Fong. 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 480-493.

Determination of the Total Antioxidant Capacity in Fresh and Senescent Leafy Vegetables¹

Nien-Tzu Wang², Tsu-Tsuen Wang³ and Shing-Jy Tsao³

ABSTRACT

The antioxidant capacity of 18 common leafy vegetables were assayed by modified TOSC (Total oxyradical scavenging capacity) method and expressed as the Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) equivalent antioxidant capacity (TEAC). Based on the TEAC values, tested 17 leafy vegetables could be grouped into three. The first group, with TEAC values higher than $2.0 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1}$, includes amaranth, Japanese hornwort, Chinese parsley and white mugwort. The second and the largest group, with TEAC values between $1.1\text{-}2.0 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1}$, includes sweet potato tips, Chinese kale, pak-choi, leaf lettuce, spinach, malabar spinach, edible rape and smallage. The third group, with TEAC values less than $1.1 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1}$, includes chingan-cai, curled lettuce, water spinach, loose head lettuce and garland chrysanthemum.

The antioxidant capacity of the same 17 leafy vegetables were also measured by the DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, which measures the radical scavenging activity in methanol extracts of tissue samples. There were some differences between the results of the TOSC method and the DPPH method. Japanese hornwort and white mugwort were ranked high in antioxidant capacity by both methods. However, amaranth and Chinese parsley were ranked high in antioxidant capacity by the TOSC method but not by the DPPH method. Garland chrysanthemum, water spinach and chingan-cai were ranked low by both methods. Loose head lettuce and curled lettuce were ranked low by the TOSC method and high by the DPPH method. These are attributed to the differences in the nature of free radical scavenging reaction as well as the ways of sample preparation, and the vegetables may thus fall into different categories of antioxidant power in two tests.

¹Contribution No. 0720 from Taichung DARES, COA.

²Assistant Researcher of Taichung DARES, COA.

³Associate Professors, Department of Horticulture, National Taiwan University.

The antioxidant capacities of both fresh and senescent leaves of eight leafy vegetables were determined by the TOSC method. In leaf lettuce, water spinach, Chinese kale and gynura, their antioxidant capacities increased as they turned yellow or deteriorated. In leaves of chingan-cai, amaranth, spinach and sweet potato tips, their antioxidant capacities decreased upon senescent and yellowing. Accordingly, the patterns of change in antioxidant capacity of leafy vegetables during leaf senescence could be divided into two groups: the ascending antioxidant capacity type showed an increase in antioxidant capacity during leaf senescence, and the descending type showed a decrease in leaf antioxidant capacity.

Key words: radical scavenging activity, total antioxidant capacity, vegetables, senescent, ethylene treatment.