

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

杏鮑菇麥角硫因萃取方法與純化之探討及其抗氧化性質評估

Extraction and Purification of Ergothioneine from  
*Pleurotus eryngii* and evaluating their antioxidant activity

胡予捷

Yu-Chen Hu

指導教授：梁志弘 博士

Advisor: Chih-Hung Liang, Ph.D.

中華民國一百零五年六月

July, 2016

# 碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 胡予捷 君所提之論文

杏鮑菇麥角硫因萃取方法與純化之探討

及其抗氧化性質評估

Extraction and Purification of Ergothioneine from  
*Pleurotus eryngii* and evaluating their antioxidant activity

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任

梁志弘

指導教授

梁志弘

中華民國一零五年七月六日

# 碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 胡予捷 君所提之論文

杏鮑菇麥角硫因萃取方法與純化之探討  
及其抗氧化性質評估

Extraction and Purification of Ergothioneine from  
*Pleurotus eryngii* and evaluating their antioxidant activity

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

蔣煥男 國立中興大學食品暨生物應用科技學系助理教授

梁志欽 大葉大學生物資源系教授

指導教授：梁志弘

中華民國一零五年七月六日

## 謝誌

首先感謝恩師 梁志弘博士於進入研究室以來的悉心指導及教誨，並於論文撰寫期間對於架構、格式及內容的細心審閱及斧正，施恩浩瀚，特誌卷首，深表感謝。研究期間，感謝蔣慎思老師的教導與實驗過程改善之建議、邏輯思考與鼓勵。

論文初成之際，承蒙梁志欽博士與蔣慎思博士逾百忙之中逐字詳加審閱，指正疏漏，並於口試時給予諸多指導及提供許多寶貴意見，論文使課完成而更臻完善。另外，感謝系上王琴女士、陳淑渝助教、林怡君助教及系上所有教授，總是不吝嗇關心及叮嚀我，尤其蔡正宗教授指導我進行純化實驗，並慷慨給予我許多設備幫助我，使我實驗得以順利進行，由衷感謝。

研究期間，感謝呂明興、林漢文、鄭文華、李貫中、林琮為及陳昱華等學長姊於實驗上的悉心指導。感謝陳柏凱、招有容、陳怡臻、傅宥勝、張萬宇、許家豪、王祥雲和游佳茵等同學與學弟妹，一路上的幫助與相互扶持。感謝管理組的李俊賢、林祐生學長，同學董欣瑜、陳伶瑄，總是在我實驗遇到難關時帶給我歡笑與動力。

特別感謝實驗室的學長姊紀彥甫、陳容蓉、郭盈吟與王毓琪，從我進研究室當專題生以來不斷教導我儀器操作及實驗技巧；夥伴黃柏璋、涂庭瑋的彼此鼓勵與交流，以及學弟妹郭芸禎、陳懋碩、呂仲雯、林純蕙和費皓元的陪伴與口試上的協助。在此獻上最深的感謝。

感謝黃健峰、楊孟蓉、湯儒碩和徐榮駿等學長姊與戰友，在研究所的生涯中，總是會遇到許多挫折與困難，但因為有你們在，使我能面對每一個挑戰，回想起在食加場一起熬夜爆炸的日子，或是寫論文的痛苦哀號，每個印象深刻的回憶都是你們陪我一起創造的，在東海的日子很高興能有你們的相伴，雖然很不捨，但我在這時再待太久了(笑)，該是時候該離開了。

最後，感謝我的父母、奶奶還有哥哥，給予我最大的支持、鼓勵及關心，讓我無後顧之憂地完成學業。將此論文獻給我的家人、師長及朋友。

胡予捷 謹致於  
東海大學食品科學系  
中華民國一百零五年七月

## 摘要

微波輔助萃取 (Microwave extraction, ME) 及超音波輔助萃取 (Ultrasonic extraction, UE) 是新式之萃取方法，具有縮短萃取時間、減少萃取溶劑和增加萃取效率等優點。文獻指出杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) 含有高量麥角硫因(Ergothioneine)，它是一種天然抗氧化劑，體內無法自行合成，僅能由食物攝取。本研究利用微波及超音波萃取方法來探討杏鮑菇子實體中麥角硫因之萃取量，並與傳統萃取方式 (熱水萃取及常溫乙醇萃取) 進行比較，另亦進行麥角硫因之純化，所得之純化物與上述四種萃取物進行抗氧化能力測定。

研究結果顯示，在杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量方面，當微波萃取功率為 600W、時間 40 min、固液比 1:40 g/mL、溫度為 100°C 時，可得麥角硫因之萃取量為  $1.64 \pm 0.69$  mg/g；另當超音波萃取功率為 640W、時間 10 min、固液比 1:30、溫度 30°C，可得麥角硫因之萃取量為  $1.35 \pm 0.05$  mg/g；結果顯示微波萃取方法優於超音波萃取、傳統熱水萃取 ( $1.33 \pm 0.07$  mg/g) 與乙醇萃取 ( $0.20 \pm 0.01$  mg/g)。此外，在其他機能性成分方面，超音波萃取方式明顯優於其他萃取方式，腺苷、總酚和多糖之萃取量分別為 3.74、0.30 和 445.13 mg/g dw。

在麥角硫因純化方面，取微波萃取液進行後續麥角硫因純化，結果顯示杏鮑菇子實體粉末微波萃取液之麥角硫因純度為 24.48%，經 80% 酒精沉澱後，純度略升為 25.46%，再經 HyperClone® 製備型 RP-C18 管柱純化後，麥角硫因純度則可達 99.7%，但產率僅為 28.06%；最後經由 UPLC/Q-TOF/MS 鑑定，確定純化物為麥角硫因。

在抗氧化性質方面，當萃取物濃度 20 mg/mL 時，DPPH 自由基清除能力依序為乙醇萃取物(90.33%)>熱水萃取物(80.83)≐微波萃取物(80.58%)>超音波萃取物(78.21%)；還原力方面，則以熱水萃取物效果最好(1.04)，其他依序為微波萃取物(1.03)≐超音波萃取物(1.03)>乙醇萃取物(0.62)；另在螯合亞鐵離子方面，依序為乙醇萃取物(88.15%)>超音波萃取物(85.59%)≐微波萃取物(83.97%)>熱水萃取物(77.04%)。另外，麥角硫因

純化物當濃度為 1 mg/mL 時，DPPH 清除率為 78.70%，還原力為 0.77，螯合亞鐵離子能力則為 70.08%。在總抗氧化力方面，乙醇萃取物之 TEAC 抗氧化力為 758.73  $\mu\text{mole Trolox/g}$ ，顯著高於微波萃取物(142.66  $\mu\text{mole Trolox/g}$ )、超音波萃取物(144.97  $\mu\text{mole Trolox/g}$ )和熱水萃取物(188.64  $\mu\text{mole Trolox/g}$ )。此外，由  $\text{EC}_{50}$  值可得知，麥角硫因純化物及超音波萃取物在清除 DPPH 自由基及螯合亞鐵能力方面有較佳效果，而熱水萃取物則在清除 DPPH 自由基及還原力方面效果較佳。

綜上述結果得知，以微波萃取方式來萃取杏鮑菇子實體，可獲得較高之麥角硫因；另超音波萃取則可得較高量之腺苷、總酚和多醣等機能性成分；可見新式萃取方式對杏鮑菇子實體機能性成分有不錯之萃取效果。此外，超音波和微波萃取方式，所得萃取物之抗氧化能力並不遜於傳統萃取方式，但時間上可縮短許多；因此，新式萃取方法應可應用在菇類機能性成分之萃取。

關鍵字：杏鮑菇、麥角硫因、微波萃取、超音波萃取、抗氧化性質

## Abstract

Microwave extraction (ME) and ultrasonic extraction (UE) are new extraction technology; they has many advantages, such as shorter extraction time, less solvent consumption and higher extraction rate. Some researchers discovered higher content of ergothioneine in *Pleurotus eryngii*. Ergothioneine is a kind of natural antioxidant which cannot be composed by mammals itself, only can be absorbed from the diet. Therefore, this research was to investigate the effect of different extraction (microwave, ultrasound, hot water and ethanol extraction) on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder. The objective of this study was to investigate the antioxidant activity of four method extracted and purified of ergothioneine.

The result in one-factor-at-a-time show that microwave optimum extraction conditions of ergothioneine microwave power was 600 W, extraction time was 40 min, solid to liquid ratio was 1:40 g/mL and extraction temperature was 100°C, which the extraction content were 1.64 mg/g dw ; the result in one-factor-at-a-time show that ultrasound optimum extraction conditions of ergothioneine microwave power was 640 W, extraction time was 10 min, solid to liquid ratio was 1:30 and extraction temperature was 30°C, which the extraction content were 1.35 mg/g dw. However, the extraction content of ergothioneine of microwave extract (MEP) were butter than ultrasound extract (UEP), hot water extract (HWEP) (1.33 mg/g dw) and ethanol extract (EEP) (0.2 mg/g dw).

With regard to functional components, the content of adenosine, total phenols and polysaccharide of ultrasound extract (3.74, 0.30 and 445.13 mg/g dw) were higher than other extraction methods.

MEP, which had most ergothioneine content, was further separated successively by 80% ethanol precipitated and reversed HyperClone® HPLC column to obtain ergothioneine. The purity of ergothioneine in MEP is 24.48%, less than 80% ethanol precipitated (25.46%). The purity of ergothioneine in

reversed HPLC column step is 99.7 but recovery only has 28.06%. Using UPLC/Q-TOF/MS examination purified, the results show that compound in this product is ergothioneine.

On the antioxidant activity, at 20 mg/mL, scavenging ability on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals were in the order: EEP (90.33%) > HWEP (80.83%)  $\approx$  MEP (80.58%) > UEP (78.21%). The purified ergothioneine at the concentration of 1 mg/mL, the scavenging ability on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals was 78.21%. The reducing power of HWEP (1.04) was highest at 20 mg/mL and the other were in the order: MEP (1.03)  $\approx$  UEP (1.03) > EEP (0.62). The purified ergothioneine at the concentration of 1 mg/mL, reducing power was 0.77. With regard to chelating ability on ferrous ions, the chelating abilities of MEP, UEP, HWEP and EEP at the 20 mg/mL were in the order: EEP (88.15%) > UEP (85.59%)  $\approx$  MEP (83.97%) > HWEP (77.04%). The chelating ability on ferrous ions of purified ergothioneine was 70.08% at 1 mg/mL. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of EEP (758.73  $\mu$ mole Trolox/g) was significant higher than MEP (142.66  $\mu$ mole Trolox/g), UEP (144.97  $\mu$ mole Trolox/g) and HWEP (188.64  $\mu$ mole Trolox/g).

The purified ergothioneine and UEP were more effective than HWEP, MEP and EEP from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder in scavenging ability on DPPH and chelating ability on ferrous ions as evidenced by lower EC<sub>50</sub> values. And HWEP were more effective than UEP, MEP and EEP from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder in scavenging ability on DPPH and reducing power as evidenced by lower EC<sub>50</sub> values.

In conclusion, functional components such as ergothioneine, adenosine, total phenols and polysaccharide prepared from new extraction technology have higher extraction rate and better antioxidant activity.

Keywords: *Pleurotus eryngii*, ergothioneine, microwave extraction, ultrasonic extraction, antioxidant activity



# 目錄

謝誌.....	I
摘要.....	II
Abstract.....	IV
第一章 前言 .....	1
第二章 文獻回顧 .....	3
一、 新式萃取技術介紹 .....	3
(一) 微波輔助萃取 .....	3
(二) 超音波輔助萃取 .....	8
二、 抗氧化系統 .....	12
(一) 抗氧化劑的抗氧化原理 .....	14
(二) 常用抗氧化劑 .....	15
三、 杏鮑菇簡介 .....	18
(一) 杏鮑菇 .....	18
(二) 杏鮑菇之分佈與生長特性 .....	18
(三) 杏鮑菇之機能性成分 .....	19
四、 麥角硫因簡介 .....	20
(一) 麥角硫因之分布及理化特性 .....	20
(二) 麥角硫因的生物合成 .....	25
(三) 麥角硫因之生理活性 .....	25
實驗架構.....	32
第三章 材料方法 .....	33
一、 實驗材料 .....	33

二、	實驗藥品 .....	33
三、	樣品製備 .....	34
四、	一般成分分析 .....	34
五、	新式萃取方式之條件探討 .....	36
(一)	微波輔助萃取一次一因子條件探討 .....	36
(二)	超音波萃取一次一因子條件探討 .....	36
六、	傳統萃取方式探討 .....	37
(一)	熱水萃取 .....	37
(二)	乙醇萃取 .....	37
七、	機能性成分分析 .....	37
(一)	麥角硫因 .....	37
(二)	腺苷 .....	38
(三)	總酚類含量測定 .....	38
(四)	多醣體含量 .....	38
(五)	多醣分子量之測定 .....	39
八、	麥角硫因純化方法 .....	39
九、	麥角硫因鑑定方法 .....	40
十、	不同萃取方式之抗氧化評估 .....	40
(一)	還原力 .....	40
(二)	清除 1,1-二苯基-2-苦味肼基團能力 .....	41
(三)	螯合亞鐵離子能力 .....	41
(四)	總抗氧化力 .....	42
十一、	統計分析 .....	42

第四章	結果與討論 .....	43
一、	一般組成成分分析 .....	43
(一)	水分 .....	43
(二)	碳水化合物 .....	43
(三)	粗灰分 .....	43
(四)	粗脂肪 .....	45
(五)	粗蛋白 .....	45
二、	杏鮑菇子實體粉末麥角硫因之新式萃取方法條件探討 .....	45
(一)	微波萃取條件探討 .....	46
(二)	超音波萃取條件探討 .....	56
三、	新式與傳統萃取方式之機能性成分含量比較 .....	63
四、	新式與傳統萃取方法所得多醣分子量之比較 .....	65
五、	麥角硫因之純化 .....	70
六、	麥角硫因純化物之質譜儀鑑定 .....	73
七、	抗氧化性質分析 .....	75
(一)	杏鮑菇子實體各種萃取方法之萃取率 .....	75
(二)	杏鮑菇子實體粉末各種萃取物與麥角硫因純化物之抗氧化性質 .....	75
第五章	結論 .....	91
第六章	參考文獻 .....	92

## 表次

附表一、幾種典型樣品萃取技術之比較 .....	13
附表二、特定食物及飲品中麥角硫因含量 .....	21
附表三、食藥用菇類子實體麥角硫因之含量 .....	23
附表四、食藥用菇菌絲體麥角硫因之含量 .....	24
表一、杏鮑菇子實體粉末之一般成分組成 .....	44
表二、乙醇濃度對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響 .....	47
表三、微波萃取條件對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響 .....	51
表四、超音波萃取條件對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響 .....	58
表五、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水和乙醇萃取法麥角硫因、 腺苷、總酚和多醣萃取量之比較 .....	64
表六、不同分子量多醣體標準品在膠體滲透層析之滯留時間 .....	66
表七、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水、乙醇萃取之多醣分子量 .....	68
表八、麥角硫因分離純化總表 .....	72
表九、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取之萃取率 .....	76
表十、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫因 純化物之清除 1,1-二苯基-2-苦味胍基團能力 .....	79
表十一、杏鮑菇子實體粉末微波萃取、超音波萃取、熱水萃取及乙醇萃 取物和麥角硫因純化物之還原力 .....	82
表十二、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫 因純化物對亞鐵離子之螯合能力 .....	84
表十三、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫 因純化物之抗氧化性質 EC <sub>50</sub> .....	86
表十四、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物中 Trolox 當量抗氧化能力 .....	88
表十五、機能性成分與抗氧化力測定之相關係數 .....	90

## 圖次

附圖一、微波輔助萃取裝置之密閉式與開放式萃取法示意圖 .....	5
附圖二、傳統加熱與微波加熱之機制 .....	6
附圖三、超音波萃取機制與原理.....	9
附圖四、超音波空化效應示意圖.....	11
附圖五、飲食抗氧化防禦系統.....	16
附圖六、麥角硫因之結構.....	26
附圖七、麥角硫因之生物合成.....	27
附圖八、麥角硫因之硫醇和硫酮結構 .....	28
圖一、乙醇濃度對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響 .....	47
圖二、微波功率對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響 .....	49
圖三、微波萃取時間對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響 .....	52
圖四、微波萃取固液比對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響 .....	54
圖五、微波萃取溫度對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響 .....	55
圖六、超音波功率對杏鮑菇子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 .....	57
圖七、超音波萃取時間對杏鮑菇子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 ..	59
圖八、超音波萃取固液比對杏鮑菇子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 .....	61
圖九、超音波萃取溫度對杏鮑菇子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 ..	62
圖十、杏鮑菇子實體粉末微波 (A) 及超音波 (B) 萃取物之膠體滲透層析 圖譜 .....	67
圖十一、杏鮑菇子實體粉末熱水 (A) 及乙醇 (B) 萃取物之膠體滲透層析 圖譜 .....	69
圖十二、杏鮑菇子實體粉末微波萃取後 (A) 及經微波萃取和管柱純化後 (B) 之 HPLC 圖譜 .....	71
圖十三、麥角硫因標準品 (A) 及純化物 (B) 之 Q-TOF/MS 質譜圖.....	74
圖十四、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫	

因純化物清除 1,1-二苯基-2-苦味肼基團自由基能力.....	78
圖十五、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫 因純化物之還原力 .....	81
圖十六、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫 因純化物對亞鐵離子之螯合能力 .....	83



## 第一章 前言

微波萃取 (Microwave extraction; ME) 和超音波萃取 (Ultrasound extraction; UE) 為新式萃取方式，近年來廣泛用於天然植物活性成分萃取，相較於傳統萃取，微波及超音波具有萃取效率好、萃取時間短、萃取溶劑消耗較少等優點(Herrero *et al.*, 2010; Ondruschka & Asghari, 2006; Wang & Weller, 2006)。本研究利用不同萃取方式探討杏鮑菇子實體麥角硫因萃取量，並純化萃取液中麥角硫因，進行抗氧化性質之探討。

食用及藥用菇類除了營養價值高之外，還富含許多具有生物活性的代謝產物，例如凝集素 (lectins)、蛋白質、多醣、糖苷類、生物鹼、生育酚、類胡蘿蔔素、酚類、黃酮類、三萜類、麥角固醇及揮發性有機化合物等，而這也是菇類具有藥用價值的原因 (Kalač, 2013; Kim *et al.*, 2015)。由自然界中發現或是在實驗室中合成新的生物活性化合物越來越困難，因此，具有生物活性物質潛在來源的藥用菇類，近年來引起了許多學者的關注，並進行研究與探討。

杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) 別名刺芹側耳，日本中文名稱為雪茸，具有高分解木質纖維素的能力(Gómez-Toribio *et al.*, 2001)，因其味道媲美鮑魚且具有杏仁味而得名 (陳等, 2010; 廖, 2008)。杏鮑菇富含多種機能性成分如麥角硫因 (Ergothioneine)、腺苷 (Adenosine)、總酚 (Total phenols) 和多醣 (Polysaccharides) 等，且具有降空腹血糖 (Huang *et al.*, 2012)、降膽固醇 (Huang *et al.*, 2012)、調節免疫系統 (Ribeiro, 1995; Wong *et al.*, 2011)及抗氧化(Dubost *et al.*, 2007b)等生理活性。麥角硫因為無色無味、安定、低分子量及高水溶性且人體不可自行合成之胺基酸；菇類中以杏鮑菇等蠔菇屬具有較多麥角硫因含量 (Chen *et al.*, 2012)。麥角硫因具有抗氧化(Aruoma *et al.*, 1999; Asmus *et al.*, 1996; Franzoni *et al.*, 2006; Halliwell *et al.*, 1995)、抗發炎(Rahman *et al.*, 2003)、保護神經 (Yang *et al.*, 2012) 和抗致突變 (Hartman &

Hartman, 1987) 等生理活性。

本論文探討重點如下：

1. 微波、超音波萃取針對萃取溶劑、功率、時間、溫度及固液比五因子，進行一次一因子麥角硫因萃取較適含量探討，並與傳統萃取方式（熱水及常溫乙醇萃取）比較。
2. 杏鮑菇子實體萃取液中麥角硫因分離純化，以 UPLC/Q-TOF/MS 進行鑑定。
3. 四種萃取方式所獲得之萃取物與麥角硫因純化物之抗氧化性質評估。





## 第二章 文獻回顧

### 一、新式萃取技術介紹

萃取是指利用溶劑將樣品中特定成分溶出之步驟，而傳統萃取技術包括浸泡、浸漬、水滲透和索式萃取等。這些技術通常需要較長的萃取時間，會增加不耐熱活性化合物降解之風險 (De Castro & García-Ayuso, 1998)。近年來，各種新穎的萃取技術已陸續被開發應用，這些新技術具有萃取效率好、萃取時間短和溶劑消耗少等優點 (Herrero *et al.*, 2010; Ondruschka & Asghari, 2006; Wang & Weller, 2006)，包括微波輔助萃取 (Ultrasound-assisted extraction, UAE)、超臨界流體萃取 (Supercritical fluid extraction, SFE) 和加壓溶劑萃取 (Pressurized solvent extraction, PSE) 等。

以下就本研究使用到之微波輔助萃取及超音波輔助萃取方法進行介紹：

#### (一) 微波輔助萃取 (Microwave-assisted extraction, MAE)

微波輔助萃取目前已廣泛應用在各研究領域，尤其是藥用植物方面，主要是因其相較於超臨界萃取、加速溶劑萃取等其他新式萃取方式具有成本低和在大氣壓力下萃取效果佳之優點 (Eskilsson & Björklund, 2000; Howard, 1995；李等人，2003)。

Ganzler 等人(1986)曾利用家用微波爐進行萃取，發現與索式萃取方法相比，可得較多的極性化合物；另為了避免目標萃取物被降解，在萃取過程中，使用多次短時間加熱和冷卻循環方式來進行。此後陸續有研究者使用微波技術來進行萃取，包括批次的循環模式 (Onuska & Terry, 1993; Xiao *et al.*, 2008) 及可持續進料的連續模式 (Freitag & John, 1990; Nakazato *et al.*, 2006)。1990 年之後商用微波設備被開發後，便廣泛應用於樣品前處理的步驟 (De Castro & García-Ayuso, 1998)。

商用微波萃取的裝置一般是由爐艙、磁控管、萃取瓶、壓力和溫度感測器所組成，在操控方面具有功率、溫度、時間和壓力選擇的功能。

微波輔助萃取依萃取罐的類型可分為兩大類，分別為密閉式微波輔助萃取 (Close-vessel microwave-assisted extraction) 和開放式微波輔助萃取 (Open-vessel microwave-assisted extraction) (附圖一)。

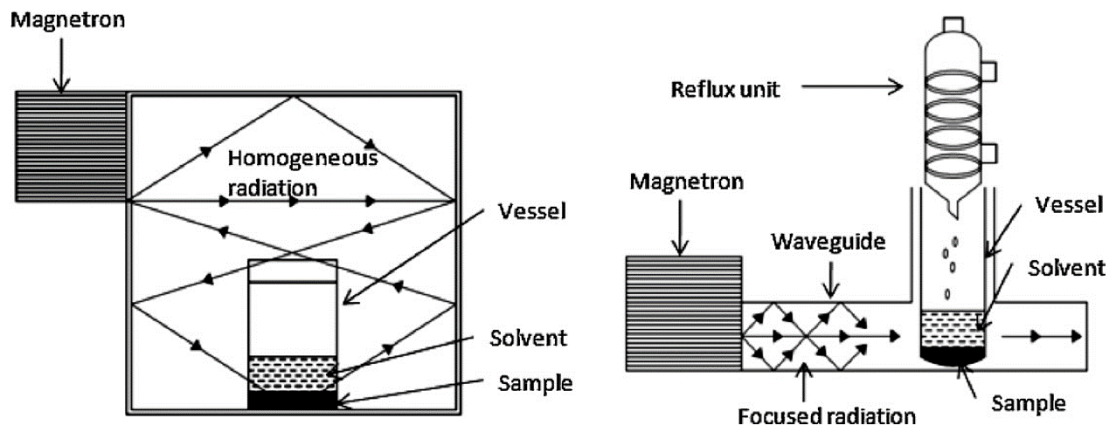
## 1. 微波輔助萃取原理

微波是一種電磁波，頻率介於 0.3~300 GHz 間，是一種能量而非熱量，於介質中才會轉換為熱量的形式(楊等人，2005)。微波加熱之原理主要是因偶極轉動和離子傳導，在微波電場下，偶極分子會由隨機雜亂的排列轉變成依電場方向規律的排列，每秒以 24.5 億次的速度改變電場方向，產生離子傳導和分子間高頻率的摩擦，進而在短時間內快速升溫；但微波只對極性分子（如食品中的水和蛋白質）作用，所以微波對樣品中的目標物具有高度的選擇性 (Chan *et al.*, 2011；李等人，2003)。

微波輔助萃取之原理即利用微波加熱特性來進行，微波可穿透介質到達萃取物內部，內部細胞吸收微波後，溫度會迅速上升，造成細胞壓力變大，當壓力大於細胞壁所能承受之範圍時，會促使細胞破裂，使得細胞內部有效成分釋出，因此，即使在較低溫度下亦能利用微波將有效成分萃出；一般在微波的作用下，細胞內之有效成分可快速擴散於萃取溶劑中，大大的縮短了萃取之時間 (王和孫，2008)。

傳統加熱是以熱對流、傳導和輻射等原理，使熱量由外向內傳遞，會有過度加熱與加熱不均等問題；相較於傳統加熱，微波是透過內部偶極分子快速來回轉動所產生之摩擦熱能，不需要再經過傳導，物質內外同時加熱升溫，故可明顯減少反應時間和提高產物的產率，兩者加熱機制如附圖二所示 (Gude *et al.*, 2013)。

微波萃取相較於一般萃取法（如索式萃取法）具有選擇性萃取、萃取時間短、溶劑用量少、操作簡便及有利於環境等優點，但微波萃取亦有些缺點，如相較於傳統萃取方式，微波萃取所需之設備成本較高等(李等人，2003；Ballard *et al.*, 2010)。



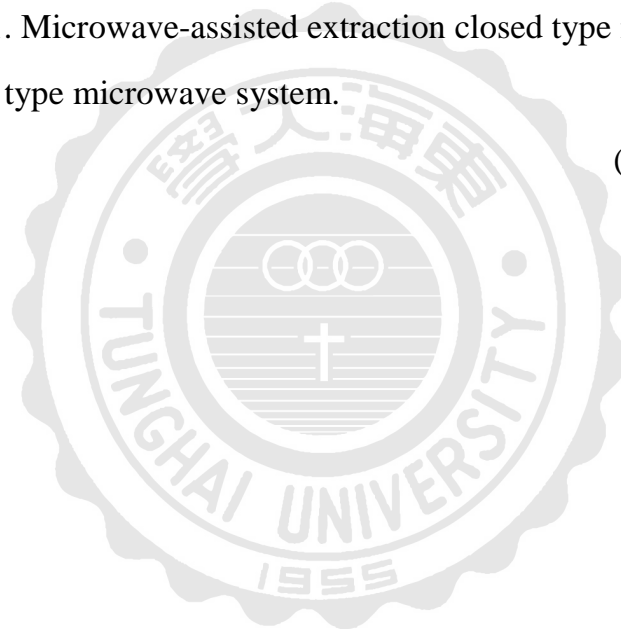
(1) Closed type microwave system

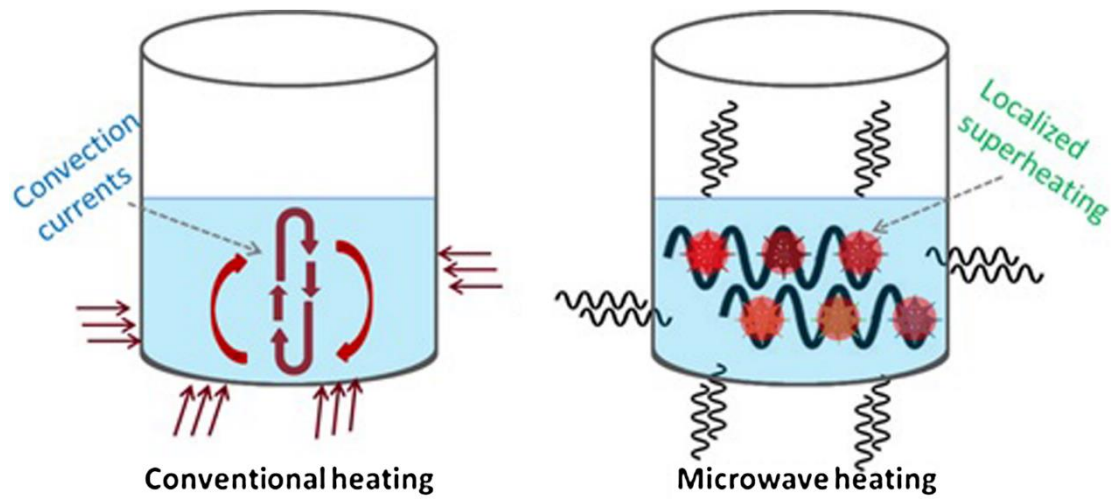
(2) Open type microwave system

附圖一、微波輔助萃取裝置之密閉式與開放式萃取法示意圖

Referred figure 1. Microwave-assisted extraction closed type microwave system and open type microwave system.

(Chan *et al.*, 2011)





附圖二、傳統加熱與微波加熱之機制

Referred figure 2. Conventional and microwave heating mechanisms.

(Gude *et al.*, 2013)



## 2. 影響微波萃取的因素

微波萃取效率，與條件參數的選擇有極大的關係 (Dean, 2012; 張等人, 2006) 一般會影響微波萃取的因素有下列幾項：

- (1) 溶劑：依萃取目標物的性質來挑選適合溶劑，陳 (2013) 以不同萃取溶劑對靈芝粗三萜萃取量進行探討，結果顯示溶劑的選用對粗三萜的萃取量具有顯著的影響。
- (2) 樣品顆粒大小：當樣品顆粒越細時，與萃取溶劑接觸表面積會越大，進而可增加萃取效率 (Chupin *et al.*, 2015)。
- (3) 微波功率：當微波功率越高，則升溫速度越快，可縮短萃取時間，但也容易造成目標萃取物之熱降解 (Maran *et al.*, 2015)。
- (4) 萃取時間：樣品中之目標萃取物若耐熱性不佳，當長時間萃取，會導致其熱降解，反而會減少萃取產量 (Zeng *et al.*, 2015)。
- (5) 萃取溫度：溫度之選擇取決於欲萃取目標物是否為熱敏感化合物，如目標物位於細胞核中且為耐熱之化合物時，可使用較高溫度進行萃取，以增加其萃取效率；若為非耐熱之化合物，高溫則會造成熱降解 (Xiao *et al.*, 2012)。

## 3. 微波輔助萃取的應用

目前微波萃取技術，可應用在很多方面，有研究指出將微波輔助萃取技術應用在香桃木 (*Myrtus communis*) 葉子之萃取，結果發現其單寧和總黃酮含量及抗氧化活性皆高於超音波輔助萃取和一般溶劑萃取 (Dahmoune *et al.*, 2015)。另有研究利用微波輔助萃取技術來萃取王不留行 (*Vaccaria segetalis*) 種子之黃酮苷 (Vaccarin)，並與浸漬萃取、超音波輔助萃取及加熱迴流萃取等方法進行比較，結果發現以微波輔助萃取對王不留行黃酮苷的萃取效率最好，另萃取物對自由基之清除活性亦有不錯表現 (Yuan *et al.*, 2014)。此外，亦有研究利用微波輔助萃取技術用於黑木耳 (*Auricularia auricular*) 多醣之萃取，並進行

抗氧化活性探討，結果發現微波輔助萃取物，在清除 ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) )、DPPH 和超氧陰離子自由基及脂質過氧化和還原力試驗等方面，均有不錯之抗氧化活性 (Zeng *et al.*, 2012)。

## (二) 超音波輔助萃取 (Ultrasonic-assisted extraction, UAE)

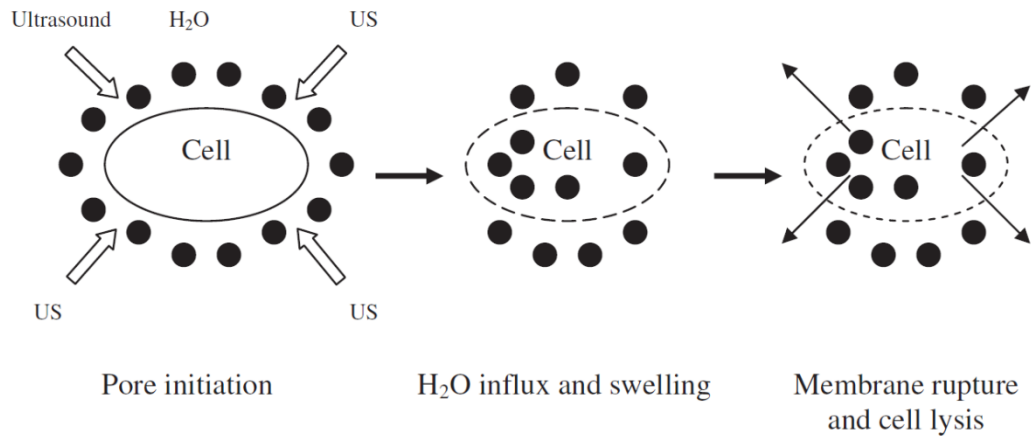
超音波中以頻率範圍又可分為兩類，一為低頻 (20-100 kHz) 高功率 (10-1000 W/cm<sup>2</sup>) 超音波 (又稱為功率超音波)，由於其傳送能量較大，應用範圍非常廣，通常可以用來改變食品的物理或化學性質；另一類為高頻 (100 kHz-1 MHz) 低功率 (小於 1 W/cm<sup>2</sup>) 超音波，最近大多數應用在食品科技牽涉到非破壞性的分析，提供食品在物理化學性質之資訊，像是硬度、熟度、酸度和糖含量等，可用於食品的品质評估 (Zhou *et al.*, 2013)。

### 1. 超音波萃取機制與原理

超音波輔助萃取 (ultrasound-assisted extraction, UAE) 係利用超音波的機械、空化與熱效應。超音波在介質中是一個能量的傳播和擴散過程，能量傳輸會造成連續波型移動，導致介質粒子的壓縮與膨脹運動，受頻率與振幅影響，會引起許多物理、化學與生化效應 (附圖三)；依據功率強度會產生機械、熱與空化效應 (Bendicho *et al.*, 2012)，分別簡述如下：

#### (1) 機械作用 (mechanical effect)

一定強度的超音波在介質內傳播過程中，介質質點交替壓縮與伸張形成交變聲壓，可使介質質點在其傳播空間內受到交變壓力產生共振、加速度衝擊、聲壓剪切等力作用，可加速渦流的產生及內部擴散，從而強化介質的擴散、質傳另可以促使溶劑快速滲透進入樣品基質中 (Rostagno *et al.*, 2003)。



附圖三、超音波萃取機制與原理

Referred figure 3. Ultrasonic extraction mechanisms and principles

(Chemat *et al.*, 2011)



## (2) 熱效應 (thermal effect)

超音波作用於物質時可產生熱，主要是組織吸收聲能的結果，從而使介質本身和物質組織溫度短暫升高，提高有效成分的溶解度。熱效應具高剪切的壓力波會增加萃取物的質傳、滲透與輸送，可透過增大介質分子的運動速度來增強介質的穿透力，並增加固液相接觸面積，提高活性成分溶解在萃取溶劑中；另可破壞細胞壁，使物質組織破裂，以提高萃取效率(Chemat *et al.*, 2011)。

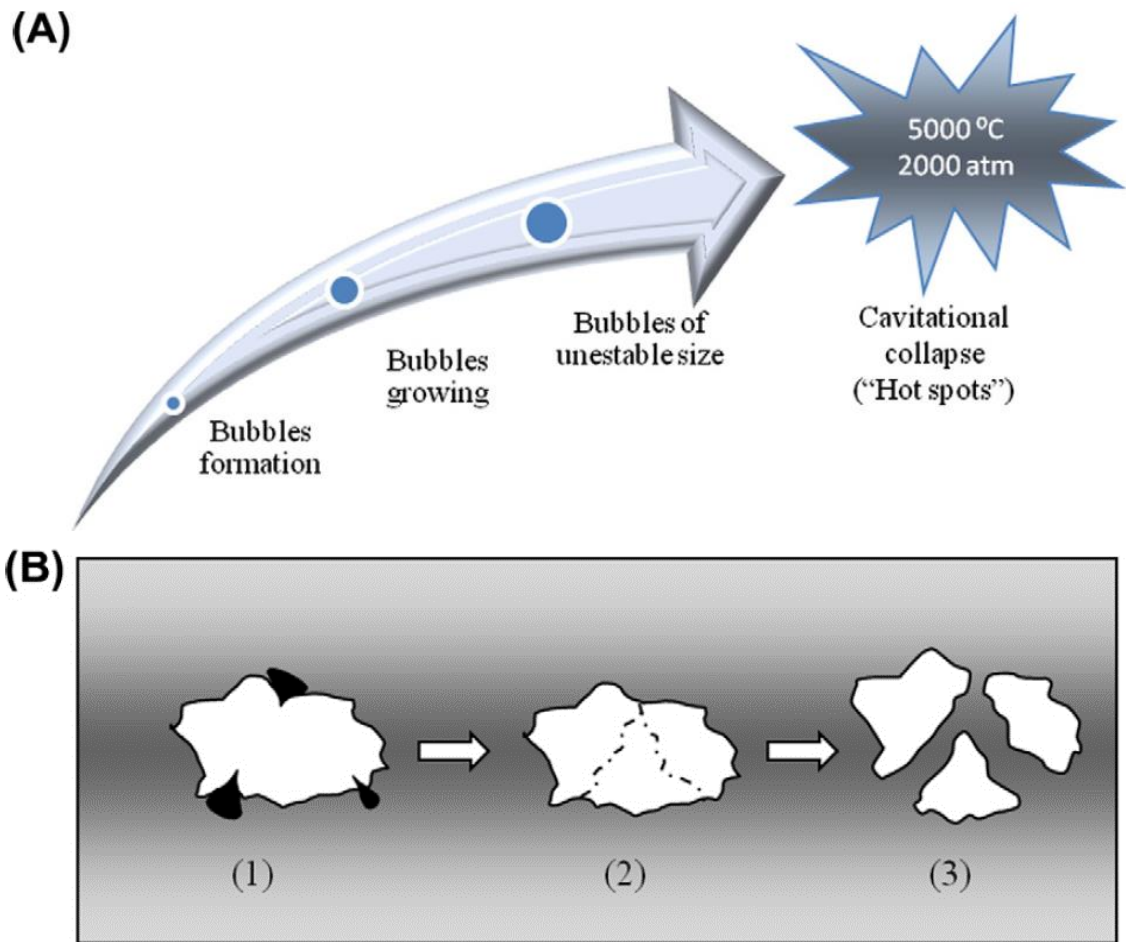
## (3) 空化效應 (cavitation effect)

高強度超音波傳播過程中最重要的一個作用，即當一定強度的超音波以介質為傳播載體，在介質中的傳播過程存在一個正負壓的交變週期，介質在交替的正負壓牆下受到擠壓和衝擊，當足夠大振幅的超音波處於粒子懸浮體系時，在負壓區內之介質分子間的平均距離增加，介質會斷裂，行成微泡 (micro bubble)，微泡進一步長大會成為空化氣泡。這些氣泡一方面可能破裂崩解，伴隨能量的釋放使之重新溶解於液體介質中、也可能上浮並消失、也可能脫離超音波的共振相位而產生塌陷，這種空化氣泡在液體介質中產生、破裂、潰陷或消失的現象叫空化作用(Chemat *et al.*, 2011)。

Chemat 於 2011 年指出，空泡不斷的被壓縮、膨脹以致潰陷時的一瞬間，使周圍及小空間內產生局部的高溫高壓，稱之為熱點，熱點的整個生命週期低於百萬分之一秒，加熱及冷卻速率高於  $1 \times 10^{11}$  S。此時產生微量的熱可高達約  $5000^{\circ}\text{C}$ 、2000 大氣壓，這也是超音波化學反應的主要來源 (圖四 A)。且空化作用會產生巨大的衝擊力和微射流，使得在一般情形下難以發生的化學現象得以實現，可以加速反應速率，或是造成物質組織的破裂，而且整個破裂過程在瞬間完成，有利於有效成分的釋出 (圖四 B)。

若樣品受質是乾燥狀態時，超音波作用可以在不加熱的狀態下作為幫助膨脹、水合及產生細胞壁孔洞增大的效果，改善擴散與滲透作





附圖四、超音波空化效應示意圖

Referred figure 4. Schematic diagram ultrasonic extraction cavitation effect  
(Bendicho *et al.*, 2012)

用，使可溶性成分發生質傳由原料進入溶劑中，進而縮短萃取時間 (Vinatoru, 2001)。

## 2. 超音波萃取之優點

與傳統萃取方法相比，由於超音波頻率高、波長短，穿透力強，因此能使萃取液達到充分混合接觸，加速物質與溶劑之膨潤與水合，促進溶劑滲透、縮短目標活性成分的溶解平衡時間、提高活性成分的擴散速率，改善傳統溶劑萃取的缺點，可有效縮短萃取時間；並可降低溶劑使用量，節約成本，是一種對環境友善的萃取方法(Galanakis, 2013)。Bendicho (2012)研究指出，超音波萃取操作過程可在低溫常壓下操作，避免低沸點物質揮發，適用於熱敏性物質萃取，可以最大限度地保留萃取物中生物活性物質及各種營養成分的天然結構，避免了高溫處理的熱效應，引起有效成分的變化、損失、破壞及生理活性的降低等問題，提高活性成分的萃取率與品質，增加萃取效果，且在安全性和操作方便性方面亦較其他萃取方式來得高 (附表一)。Azmira 等人(2013)亦指出，高強度超音波相較於傳統萃取與微波、超臨界流體、分子蒸餾萃取方法而言，是一種低成本、可重複性、操作簡單且有效的萃取方法。Bendicho (2012)認為超音波萃取技術可應用在食品、天然植物或中草藥等生物活性物質之萃取，可提高其萃取量及經濟效益。

## 二、抗氧化系統

雖然活性氧與自由基會造成生物體分子的損傷，甚至導致疾病產生，但在正常狀況下，生物體中具有抗氧化防禦系統，包括抗氧化酵素及抗氧化物來移除活性氧與自由基，並由修復系統修補自由基所引發的傷害(Neill *et al.*, 2002)。生物體抗氧化防禦系統可分為酵素系統 (enzymatic system) 與非酵素系統 (non-enzymatic system) 兩類 (朱, 2003)。在酵素系統包含有麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 代謝

附表一、幾種典型樣品萃取技術之比較

Referred table 1. Comparison of typical sample extraction techniques

萃取方法	時間	能量	安全性	溶劑
索氏萃取	6~24 小時	高耗能	暴露於有機蒸汽中	150~1500 mL 有機溶劑
微波輔助萃取	10~30 分鐘	適度耗能	密閉溶劑存在爆裂危險	10~40 mL 有機溶劑
超臨界流體萃取	10~60 分鐘	適度耗能	高壓高溫	2~5 mL 超臨界 CO <sub>2</sub> 做萃取
加速溶劑萃取	10~20 分鐘	適度耗能	高壓高溫	10~40 mL 有機溶劑
超音波輔助萃取 (水浴槽式)	<1 小時	適度耗能	安全，於常溫常壓下進行	使用濃無機酸或有機酸進行萃取
超音波輔助萃取 (探針式)	<5 分鐘	適度耗能	安全，於常溫常壓下進行	使用 1~15 mL 有機酸或無機酸進行萃取

(Bendicho *et al.*, 2012)

相關酵素，包括麩胱甘肽過氧化酶（GSH peroxidase, GSH-Px）及麩胱甘肽還原酶（GSH reductase, GSH-Rd）、超氧歧化酶和觸酶等；在非酵素系統中則有如類蘿蔔素、維生素C及維生素E等物質（莊，2006）。一般生物體需靠抗氧化劑、體內抗氧化系統及天然的抗氧化物來預防氧化傷害的發生。

### （一） 抗氧化劑的抗氧化原理

理想的食品抗氧化劑需具備以下條件：對生理無傷害、不能有特殊顏色味道、在低濃度下就有相當好的氧化效果、容易使用、穩定性佳和迅速有效。

抗氧化劑作用原理主要有下列四種（林，2008）：

#### 1. 自由基終止劑（Free radical terminator）

此型抗氧化劑會釋放出氫氧基上的氫原子，而提供一個電子或直接提供一個氫原子與脂質氧化生成之自由基作用，使自由基成為較穩定的型式，而本身形成穩定的共振結構，終止氧化反應的進行，此類型之合成抗氧化劑以BHA、BHT及TBHQ為代表，而天然之抗氧化劑則以酚類化合物為代表（Giese, 1996; Shahidi & Wanasundara, 1992）。

#### 2. 還原劑或氧清除劑（Reducing agent and Oxygen scavenger）

此類型的抗氧化劑之作用機制為捕捉氧分子或還原已氧化之過氧化物，以減緩氧化之進行。氧分子活化所形成之活性氧，如超氧陰離子（ $O_2^-$ ）及氫氧自由基（ $\bullet OH$ ）等激發態氧分子，或是非自由基類的過氧化氫（ $H_2O_2$ ）都具起始及加速脂質氧化反應進行的能力（林，2008）。其中氫氧自由基是一種不安定的氧化劑，對脂質氧化有很強的促進作用，也會造成氧中毒（oxygen toxicity），導致細胞發生突變和癌化的現象，因此，活性氧的捕捉對降低脂質氧化及生理會有助益。此類抗氧化劑以抗壞血酸（ascorbic acid）為典型代表，其可還原失去氫原子之酚類自由基，而本身被氧化成dehydroascorbic acid，因而

達到增強抗氧化能力之目的 (王, 2009)。

### 3. 金屬螯合劑 (Chelating agent)

金屬離子能促進自由基的生成，加速氧化情形的發生，而在多種金屬離子中，以鐵離子和銅離子的促氧化效果最強 (林, 2008)。若抗氧化劑具有螯合及捕捉金屬離子的作用，即可達到延緩氧化反應進行之目的，此類型抗氧化劑以檸檬酸、磷酸和EDTA為代表。

### 4. 單重態氧抑制劑 (Singlet oxygen inhibitor)

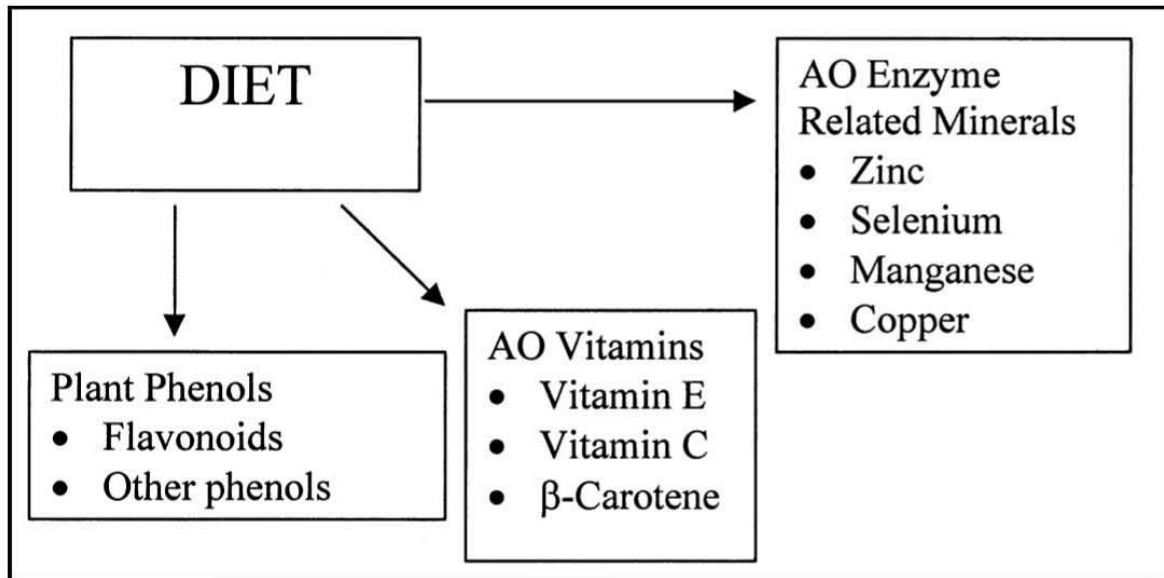
可破壞單重態氧 ( $^1\text{O}_2$ ) 而抑制光氧化的進行，常見的有胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene) 和三乙胺 (triethylamine)。由於胡蘿蔔素屬於光敏感物質，會吸收環境中的光能而不繼續將能量傳遞給氧分子，使得光氧化無法進行 (何, 2009)。

## (二) 常用抗氧化劑

抗氧化劑是指藉上述作用原理來抑制或延緩氧化損傷，而避免疾病產生之化合物。除體內存在的酵素系統外，在飲食中可多攝取富含抗氧化物質 (如植物酚類、類黃酮、抗氧化相關的維生素及礦物質) 之水果和蔬菜 (附圖五)。維生素 C、E、 $\beta$ -胡蘿蔔素為抗氧化劑，其作用主要為自由基清除劑，可預防和修復 ROS 引起的損害，可增強免疫防禦、降低罹患癌症和退化性疾病的風險 (Pham-Huy *et al.*, 2008)。另在許多植物原料，特別是草藥、種子和水果中，其類黃酮及酚類化合物具有螯合金屬及清除自由基的能力 (Terao & Piskula, 1997)。以下列出維生素 C、E 及酚類化合物予以介紹：

#### (1) 維生素 C (Ascorbic acid; vitamin C)

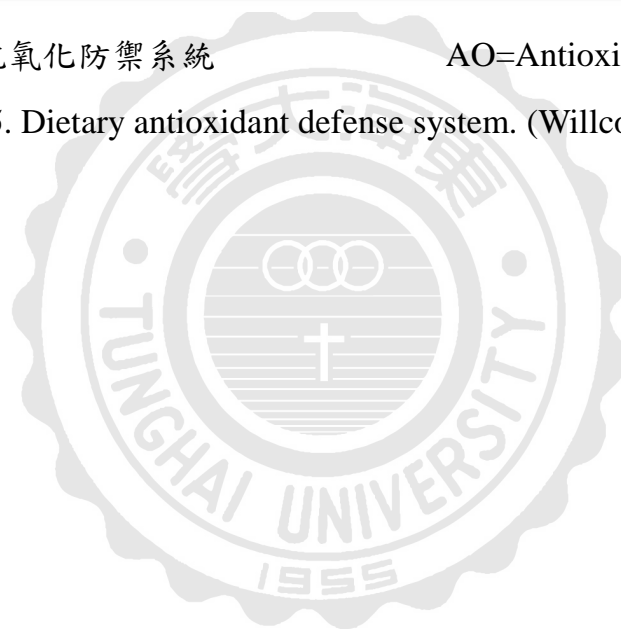
維生素 C 為水溶性維生素，具右旋 (D-form) 及左旋 (L-form) 兩種型態，在自然界中僅左旋具生物活性，飲食中約有 85% 維生素 C



附圖五、飲食抗氧化防禦系統

AO=Antioxidant 抗氧化劑

Referred figure 5. Dietary antioxidant defense system. (Willcox *et al.*, 2004)



是由蔬菜及水果提供。維生素 C 易失去電子，為電子的提供者，可供給自由基和活性氧族電子，而使其不易與氧作用，並可有效消除活性氧、捕捉單重態氧、超氧陰離子及羥自由基，產生抗壞血酸自由基（陳，2007），故可做為抗氧化劑（Frenich *et al.*, 2005; Shui & Leong, 2004）。

### (2) 維生素 E (tocopherol ; vitamin E)

維生素E為脂溶性維生素，又稱生育醇 (tocopherol)，溶於有機溶劑或油脂中，易被紫外線所破壞，在鹼性及有氧環境下易被氧化 (Marinova *et al.*, 2008)。維生素E可分成具有飽和植基側鏈 (phytyl side chain) 的生育醇 (tocopherols) 和不飽和異戊二烯側鏈 (isoprenoid side chain) 的生育三醇 (tocotrienols)。根據二氫吡喃環 (chromanol ring) 上甲基數目與位置可分為 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 四種異構物。 $\alpha$ -生育 ( $\alpha$ -tocopherol) 為維生素E中活性最大且生物利用性最佳之化合物 (蘇，2010；邱，2007；Marinova *et al.*, 2008)。維生素E可作為中止連鎖反應的抗氧化物質並可抑制脂質過氧化自由基產生活性氧，預防磷脂膜上的不飽和脂肪酸、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL)、核蛋白及DNA被氧化 (Traber & Atkinson, 2007)。

### (3) 酚類化合物 (phenolic compounds)

酚類化合物是植物體內主要的二次代謝產物，其定義為結構中帶有一個或數個 OH 基的芳香環及其衍生物。主要經由莽草酸路徑 (shikimate pathway) 及醋酸-丙二酸路徑 (acetate-malonate pathway) 而生成 (蘇，2010)。酚類化合物依碳骨架結構可分為酚酸 (phenolic acid)、類黃酮 (flavonoid)、二苯乙烯 (stilbene) 和木聚糖 (lignan) 四大類 (Karakaya, 2004)。Nielsen 等(1999)指出，於飲食中提供多酚類化合物芹菜素 (apigenin)，可增加紅血球中抗氧化酵素之

穀胱甘肽還原酶及超氧歧化酶含量；另亦可提高過氧化氫酶及穀胱甘肽過氧化酶之活性。酚類化合物具有抗氧化、抗癌、抗菌、抗病毒、抗突變、抗血栓及預防心血管疾病等生理功能，但仍以抗氧化功能最被重視，食物中以蔬菜、水果、茶及紅酒為多酚類之主要來源 (Chirinos *et al.*, 2007)。

### 三、杏鮑菇簡介

#### (一) 杏鮑菇

杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) 屬於擔子菌類，傘菌目 (Agaricales)、口蘑科 (Tricholomataceae)、側耳屬 (*Pleurotus*) (陳, 1993)，別名刺芹側耳，日本中文名稱為雪茸，具有高分解木質纖維素的能力 (Gómez-Toribio *et al.*, 2001)，因其味道媲美鮑魚且具有杏仁味而得名 (陳等, 2010；廖, 2008)。

杏鮑菇菌肉厚，開傘慢，柄組織細密結實，雪白粗長，孢子少，質地脆嫩，味道鮮美，口感極佳，是側耳屬中味道最好的一種，故被譽為“平菇王” (king oyster)。多數食用菇柄含較多纖維，口感不佳，但杏鮑菇柄卻是消費者最喜歡食用的部分；杏鮑菇是符合聯合國糧農組織 (FAO) 和世界衛生組織 (WHO) 標準，具有“天然、營養、保健”三種特徵的十八種珍稀食用菌之一 (何, 2009)。杏鮑菇除有獨特風味外，另具有耐儲存、耐運性及貨架壽命長等特性，也是受市場歡迎的重要原因之一 (Yildiz *et al.*, 2002)。

#### (二) 杏鮑菇之分佈與生長特性

野生杏鮑菇屬於叢生，分布於歐洲南部、非洲北部及中亞地區高山、草原和沙漠地帶；成熟菌傘直徑約 2.0~11.0 公分，成寬凹狀，俯視為圓形或扇形，表面呈淺黃色，菌褶為乳白色，邊緣及兩側平滑；菌柄長 2.0~8.0 公分，直徑為 0.5~3.0 公分，表面平滑，中央實心有



肉，無菌環或蓋膜 (王和趙，1994)。

### (三) 杏鮑菇之機能性成分

菇類富含之機能性成分，除廣為人知的多醣外，另包括二次代謝產物如腺苷和總酚。

#### 1. 多醣

Huang等(2012)研究指出，以鏈脲佐菌素 (STZ) 誘發糖尿病大鼠，經餵食杏鮑菇多醣8周後，其空腹血糖和糖化血紅蛋白 (HbA1c) 含量會明顯降低，而血清胰島素會上升；另以高脂飼料誘導高血脂大鼠，經餵食杏鮑菇多醣8周後，總膽固醇及低密度脂蛋白分別減少23%及21%。另Wong等人 (2011) 研究指出，將熱水及超音波萃取之杏鮑菇多醣，注射入健康的BALB/c小鼠與裸鼠腹腔10天，結果發現會增加脾臟重量，並會透過細胞激素作用，激活免疫細胞和T細胞，以達到免疫調節效果。此外，Kim等人 (2006) 研究發現，杏鮑菇多醣可提升骨母細胞之鹼性磷酸酶活性、刺激骨細胞形成及抑制蝕骨細胞生成與活性，顯見具有骨質保健效果；另在切除大鼠卵巢以誘發骨質疏鬆症的模式中，亦發現杏鮑菇多醣可減少大鼠骨質流失。

#### 2. 腺苷 (Adenosine)

腺苷是由核糖及部分腺嘌呤經 $\beta$ -N9-糖苷鍵鍵結而成，為中樞神經系統及體內平衡之重要調節劑，具有多種生理活性，包括治療慢性心臟衰竭(Kitakaze & Hori, 2000)、調節免疫系統(Ribeiro, 1995)、促睡眠作用(Basheer *et al.*, 2004)、抗憂鬱 (Carlezon *et al.*, 2005)、增加記憶 (Vinadé *et al.*, 2003)、預防癲癇發作 (Vinadé *et al.*, 2003)、減緩腦部缺血之損傷 (Gomes *et al.*, 2011)及調控血管擴張與刺激末梢神經 (Tabrizchi & Bedi, 2001)等功效。

### 3. 總酚

總酚廣泛存在於食物中，如蔬菜、水果、茶葉和咖啡等 (Huang & Ferraro, 1992)。總酚是由一個或數個羥基芳香環所組成，範圍可從低分子量如酚酸、類苯基丙烷及類黃酮，到高度聚合之化合物如木質素、黑色素及單寧(Bravo, 1998)，是一類重要的抗氧化物質(Rice-Evans *et al.*, 1996)。

## 四、麥角硫因 (Ergothioneine) 簡介

菇類除含有上述之機能性成分外，Dubost 等人(2007a)研究發現菇類中富含一種獨特之天然抗氧化劑—麥角硫因，在生物體內對氧化壓力傷害之預防扮演著重要角色 (Aruoma *et al.*, 1999; Chaudière & Ferrari-Iliou, 1999; Hartman, 1990)。以下針對麥角硫因之分布、理化特性及生理功能加以敘述：

### (一) 麥角硫因之分布及理化特性

麥角硫因 (Ergothioneine; 2-mercaptohistidine trimethylbetaine) 是一種真菌之代謝產物，廣泛發現存在於植物及動物組織中 (Aruoma *et al.*, 1999; Melville & Eich, 1956)；當其被哺乳動物吸收後，會存在於肝、腎、心臟、肺、中樞神經系統、眼睛和骨骼肌等組織中 (Bao *et al.*, 2009; Ey *et al.*, 2007; Hartman, 1990; Kawano *et al.*, 1982; Reglinski *et al.*, 1988)，其存在於人體之濃度約為 1~2 mM (Brummel, 1985; Dubost *et al.*, 2007b; Melville, 1959)。麥角硫因在體內無法被合成，僅能由食物來提供(Dubost *et al.*, 2007a)，各種常見食物中之麥角硫因含量如附表二 (Ey *et al.*, 2007)所示；另 Chen 等人 (2012) 分析台灣常見食藥用菇類其子實體和菌絲體麥角硫因之含量分別如附表三及附表四所示，其中杏鮑菇子實體基座與菌柄麥角硫因含量分別為  $624.5 \pm 30.3$  及  $840.4 \pm 19.7$  mg/g，而菌絲體高達有  $1514.6 \pm 15.7$  mg/g。

附表二、特定食物及飲品中麥角硫因含量

Referred table 2. Ergothioneine concentration in selected foods and beverages  
(Ey *et al.*, 2007)

Food groups with selected food items	Ergothioneine (mg/kg wet weight or mg/mL)
Mushrooms	
King bolete ( <i>Boletus edulis</i> )	528.13
Oyster mushroom ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	118.91
Protabella mushroom ( <i>Agaricus bisporus</i> , brown strain)	0.93
Button mushroom ( <i>Agaricus bisporus</i> , white strain)	0.46
Chanterelle ( <i>Cantharellus cibarius</i> )	0.06
Grains and Grains products	
Oat bran	4.41
Pumpkin seed	1.49
Wheat bran	0.84
Wheat germ	0.63
Spelt	0.61
Whole grain wheat bread	0.53
Whole grain rye bread	0.47
Brown rice	0.04
Wheat flour (refined), rye flour (refined), barley flour (refined), cornmeal (refined), oatmeal (refined), rye bread, white bread, biscuit, durum wheat, sorghum, white rice, walnut, peanut, chestnut, coconut	b.l.d.

b.l.d., below limit of detection

附表二、特定食物及飲品中麥角硫因含量 (續)

Referred table 2. Ergothioneine concentration in selected foods and beverages (continued) (Ey *et al.*, 2007)

Food groups with selected food items	Ergothioneine (mg/kg wet weight or mg/mL)
Vegetable, Fruits	
Black turtle bean	13.49
Red kidney bean	4.52
Garlic	3.11
Broccoli	0.24
Onion	0.23
Spinach	0.11
Celery	0.08
Green beans, white beans, green peas, lentils, tomato, potato, carrot, beetroot, red and green bell pepper, cabbage, turnip, horseradish, white and green asparagus, cauliflower, Brussel sprouts, eggplant, lettuce, soja beans, avocado, capers (canned) , green and black olive (canned) , parsley, apple, pear, apricot, plum, orange, lemon, lime, grapefruit, red and white grape, banana, pineapple, mango, papaya, cherry, strawberry, raspberry, blackberry, blueberry, fig	b.l.d.
Beverages	
Beer	0.02
Coffee, black tea, green tea, cocoa, cola, red wine, white wine, purple grape juice, orang juice, apple juice, cherry juice, tomato juice	b.l.d.

b.l.d., below limit of detection

附表三、食藥用菇類子實體麥角硫因之含量

Referred table 3. Contents of Ergothioneine in fruiting bodies of edible and medicinal mushroom (Chen *et al.*, 2012)

Sample	mg ERG/kg dw of powder <sup>a</sup>
<i>Agaricus bisporus</i>	932.7 ± 5.0 E
<i>Auricularia mesenterica</i>	149.4 ± 1.0 L
<i>Boletus edulis</i>	494.4 ± 1.0 HI
<i>Clitocybe maxima</i> (cap)	991.2 ± 29.8 E
<i>Clitocybe maxima</i> (stipe)	664.4 ± 3.6 G
<i>Flammulina velutipes</i>	454.5 ± 2.4 IJ
<i>Grifola frondosa</i>	553.2 ± 1.3 H
<i>Hypsizigus marmoreus</i> (normal)	409.5 ± 15.0 J
<i>Inonotus obliquus</i>	47.7 ± 0.6 M
<i>Lentinula edodes</i>	412.3 ± 9.2 J
<i>Pholiota nameko</i>	228.8 ± 7.8 K
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	2850.7 ± 10.6 A
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	258.9 ± 12.4 K
<i>Pleurotus eryngii</i> (base)	624.5 ± 30.3 G
<i>Pleurotus eryngii</i> (sporophore)	840.4 ± 19.7 F
<i>Pleurotus ferulae</i>	464.1 ± 6.9 IJ
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Japan)	944.1 ± 43.1 E
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Korea)	1829.4 ± 49.9 B
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Taiwan)	1458.4 ± 35.3 C
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	1245.0 ± 48.7 D

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SE (n=3) . Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ ) .

附表四、食藥用菇菌絲體麥角硫因之含量

Referred table 4. Contents of Ergothioneine in edible and medicinal mushroom mycelia (Chen *et al.*, 2012)

Sample	mg ERG/kg dw powder <sup>a</sup>
<i>Agaricus blazei</i>	79.6 ± 7.3 KLM
<i>Agrocybe cylindracea</i>	279.4 ± 7.3 FG
<i>Antrodia camphorate</i>	281.6 ± 3.8 FG
<i>Antrodia salmonea</i>	7.6 ± 0.5 M
<i>Armillariella mellea</i>	219.6 ± 9.3 FGH
<i>Coprinus comatus</i>	399.0 ± 4.6 D
<i>Cordyceps cicadae</i>	588.0 ± 42.3 C
<i>Cordyceps militaris</i> (strain cm1)	215.0 ± 10.5 FGH
<i>Cordyceps militaris</i> (strain cm5)	785.1 ± 9.4 B
<i>Cordyceps militaris</i> (strain 419)	123.4 ± 12.7 JKL
<i>Cordyceps sinensis</i>	142.0 ± 38.5 IJK
<i>Coriolus versicolor</i>	13.0 ± 1.9 M
<i>Ganoderma lucidum</i>	16.5 ± 2.0 M
<i>Grifola frondosa</i>	296.2 ± 25.1 EF
<i>Hericium erinaceus</i>	376.2 ± 36.7 DE
<i>Hypsizigus marmoreus</i> (white)	221.4 ± 4.6 FGH
<i>Hypsizigus marmoreus</i> (normal)	206.7 ± 12.6 GHI
<i>Inonotus obliquus</i>	252.1 ± 5.5 FGH
<i>Phellinus linteus</i>	181.8 ± 16.7 HIJ
<i>Pleurotus eryngii</i>	1514.6 ± 15.7 A

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SE (n=3) . Means with different letters within a column are significantly different ( $p<0.05$ ) .

麥角硫因為一種無色、無味、低分子量及高水溶性之 2-thioimidazole 胺基酸，不溶於非極性溶劑，結構如附圖六所示 (Franzoni *et al.*, 2006)；其化學式為  $C_9H_{15}N_3O_2S$ ，分子量為 229，pKa 為 10.8，是一種非常安定的抗氧化劑。麥角硫因一般在生理 pH 值下不會發生自氧化，其在鹼性環境下非常安定 (Carlsson *et al.*, 1974)。

## (二) 麥角硫因的生物合成

麥角硫因在動物體內無法合成，(Askari & Melville, 1962) 研究發現真菌可先利用組胺酸 (histidine) 與甲硫胺酸 (methionine) 合成麥角硫因前驅物—三甲基內鹽 (hercynine)，再與半胱胺酸 (cysteine) 形成麥角硫因；亦可先利用組胺酸與半胱胺酸合成硫醇組胺酸 (thiohistidine)，再與甲硫胺酸形成麥角硫因 (附圖七)；另黏菌 (*Physarum polycephalum*) 也具有麥角硫因合成能力。此外，Genghof (1964) 研究亦發現在真菌及放線菌中可生成麥角硫因及其前驅物—三甲基內鹽。此外，麥角硫因在自然界會以 thione 和 thiol form 存在，水溶液下則以 thione form 為主 (附圖八) (Franzoni *et al.*, 2006)。

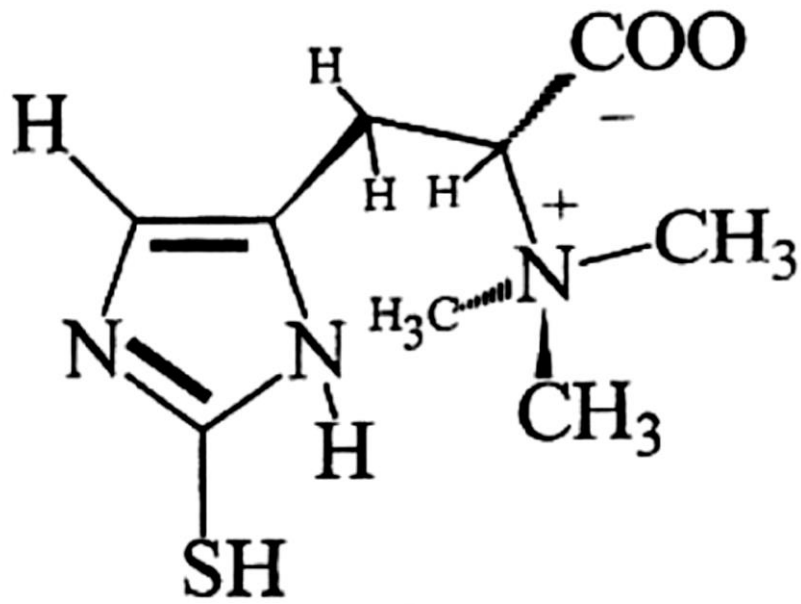
## (三) 麥角硫因之生理活性

麥角硫因為菇類中一種獨特的二次代謝產物，在生物體內對氧化傷害之預防扮演重要角色 (Aruoma *et al.*, 1999; Chaudière & Ferrari-Iliou, 1999; Hartman, 1990)，以下整理出麥角硫因的抗氧化、抗發炎、保護神經與致突變等生理活性：

### 1. 抗氧化作用

#### (1) 自由基或活性氧/氮系列之捕捉劑

在人體內存在有害之活性氧及活性氮，主要是過氧化物 ( $ROO\cdot$ )、羥自由基 ( $HO\cdot$ )、過氧化氫 ( $H_2O_2$ )、超氧陰離子 ( $O_2^-$ )、單線態氧 ( $^1O_2$ ) 及亞硝酸過氧化物 ( $ONOO^-$ ) (Halliwell *et al.*, 1995)。



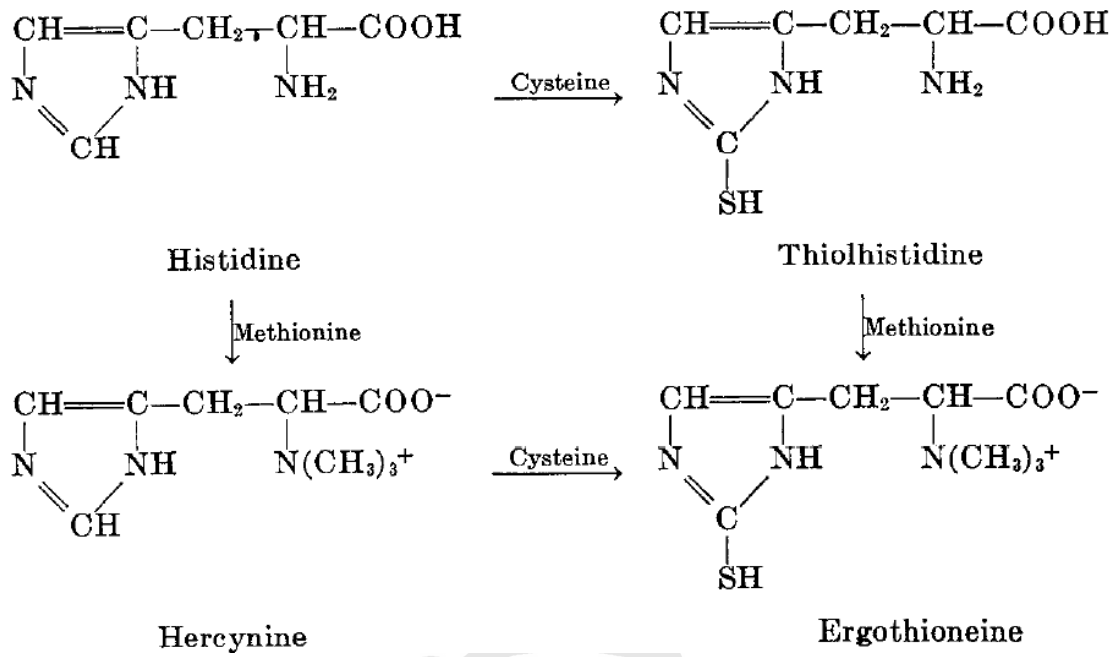
附圖六、麥角硫因之結構

Referred figure 6. Structure of ergothioneine.

(Franzoni *et al.*, 2006)



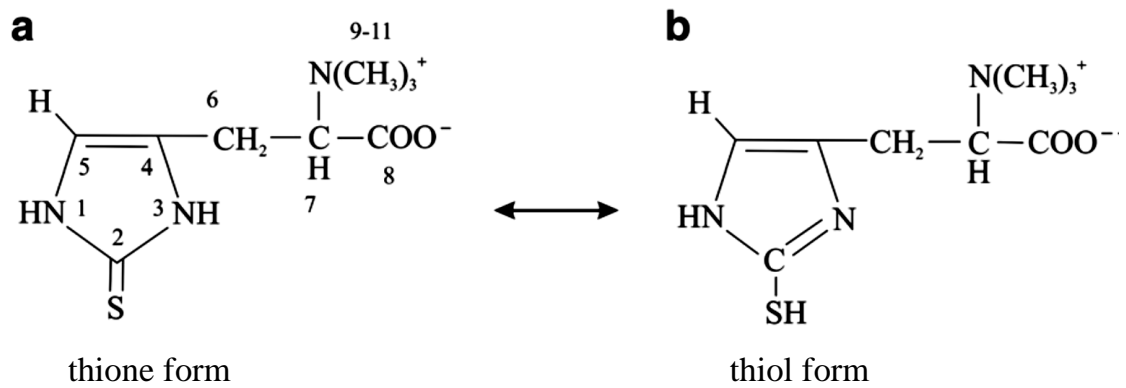




附圖七、麥角硫因之生物合成

Referred figure 7. The reaction sequence in ergothioneine biosynthesis.

(Askari & Melville, 1962)



附圖八、麥角硫因之硫醇和硫酮結構

Referred figure 8. The structure of ergothioneine's thione form and thiol form.

(Franzoni *et al.*, 2006)



研究發現麥角硫因是羥 ( $\text{OH}\cdot$ )、過氧化物 ( $\text{ROO}\cdot$ ) 及亞硝酸過氧化物自由基 ( $\text{ONOO}^-$ ) 之強捕捉劑(Aruoma *et al.*, 1999; Asmus *et al.*, 1996; Franzoni *et al.*, 2006), 另亦會捕捉單線態氧(Dahl *et al.*, 1988)。

過氧化氫在鐵及銅離子存在下，會轉化為破壞力更強之羥自由基，而麥角硫因可抑制其反應進行 (Akanmu *et al.*, 1991)；另麥角硫因可保護細胞避免因過氧化氫誘導而造成死亡(Aruoma *et al.*, 1999)。此外，研究亦發現麥角硫因可有效抑制老鼠肝臟脂質過氧化物之生成 (Kawano *et al.*, 1983)。當補充麥角硫因除可保護老鼠肝及腎臟免於氧化傷害外，還可減少其體內穀胱甘肽 (glutathione) 及 $\alpha$ -生育醇之消耗 (Deiana *et al.*, 2004)。

Bao 等人 (2008 & 2009) 利用金針菇麥角硫因萃取液對牛絞肉、大目鮪及黃尾鯪肉進行抑制褐變反應天數測試，結果顯示牛絞肉與大目鮪若添加金針菇麥角硫因萃取液，則可維持肉品顏色 12 天與 7 天 (未添加萃取液之對照組保色天數為 7 天與 2 天)；另添加 10% 萃取液在  $0\sim 2^{\circ}\text{C}$  下，可多延長黃尾鯪魚肉褐變反應 4 天。此外，Encarnacion 等 (2010) 研究指出，金針菇麥角硫因萃取液可抑制日本斑節蝦之變色、脂質過氧化和黑色素活性，以保存收獲後的甲殼類動物。

## (2) 螯合二價金屬離子

已知二價金屬離子如銅及鋅會參與活性氧系列之生成，而麥角硫因是二價金屬離子之螯合劑，尤其是銅與鋅離子 (Hanlon, 1971; Motohashi *et al.*, 1976)。另麥角硫因可抑制銅離子依賴型氧合血紅蛋白之氧化，透過形成 Ergothioneine-Cu 複合物，來保護 DNA 和蛋白質免於受到二價銅離子和過氧化氫所造成的氧化傷害 (Akanmu *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 2011)。此外，在動物和人類精液中含有高濃度麥角硫因，已

被證實能防止銅離子抑制精子活力 (Mann & Leone, 1953; Speisky *et al.*, 2008)。

### (3) 減緩血紅蛋白和肌紅蛋白之氧化

血紅蛋白 (hemoglobin, 血紅素蛋白質) 之暴露是體內活性氧來源之一，如氧合血紅蛋白和過氧化氫反應產生高氧化狀態鐵系列 ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) 稱為 ferryl-hemoglobin，此物在紅血球脂質過氧化中扮演重要角色；同樣地肌紅蛋白暴露在過氧化氫下亦會引起紅血球脂質過氧化，麥角硫因會降低 ferryl-hemoglobin 變成變性血紅蛋白 (methemoglobin)，亦會降低 ferryl-myoglobin 轉變成變性肌紅蛋白 (metmyoglobin)，藉由麥角硫因添加可抑制脂質過氧化；此外，麥角硫因亦可以延緩亞硝酸造成之氧合血紅蛋白之氧化 (Arduini *et al.*, 1992)。

## 2. 抗發炎

Rahman 等人(2003) 研究發現當肺泡上皮細胞 (A549 cell) 當以  $\text{TNF-}\alpha$  處理會明顯促進  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  之活化；若 A549 細胞與  $\text{TNF-}\alpha$  及麥角硫因共培養時，則會抑制  $\text{TNF-}\alpha$  誘導  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  之活化；此結果顯示麥角硫因具有抗發炎之作用。

## 3. 保護神經

Jang 等人 (2004) 發現麥角硫因具有保護神經之功效，可減少大鼠嗜鉻腫瘤細胞 (pheochromocytoma 12 cell, PC12 cell) 受到  $\text{A}\beta$  之毒性傷害，而降低凋亡程度進而保護神經細胞。另有文獻指出雄性 Wistar 大鼠餵食麥角硫因後，肝及腎之脂質過氧化物有下降趨勢，並可減少  $\alpha$ -生育醇 ( $\alpha$ -tocopherol) 及穀胱甘肽 (glutathione) 之消耗 (Deiana *et al.*, 2004)。此外，在  $\text{A}\beta$  誘導小鼠試驗中，餵食麥角硫因可減少小鼠腦中

MDA 含量，並可增加穀胱甘肽/氧化型穀胱甘肽 (glutathione/glutathione disulfide, GSH/GSSG) 比值及 SOD 活性 (Yang *et al.*, 2012)。

#### 4. 其他

Guijarro 等人 (2002) 研究發現在懷孕之糖尿病鼠實驗中，若於懷孕初期每天補充麥角硫因，可防止其神經管缺陷之發展，進而降低胚胎畸形之機率。此外，麥角硫因亦具有抗致突變作用 (Hartman & Hartman, 1987)。



# 實驗架構

乾燥杏鮑菇子實體

磨粉，過篩 (60 mesh)

杏鮑菇子實體粉末

微波輔助萃取

新型萃取方式

傳統萃取方式

酒精沉澱

微波輔助萃取

超音波輔助萃取

熱水萃取

乙醇萃取

HyperClon®管柱純化

一次一因子條件探討  
(萃取溶劑、功率、  
時間、溫度、固液比)

純化物

微波輔助萃取物

超音波輔助萃取物

熱水萃取物

乙醇萃取物

鑑定

抗氧化力分析

機能性成分分析

多醣分子量分布

UPLC/Q-TOF/MS

清除 1,1-二苯基-2-苦味肼基團能力  
總抗氧化力  
還原力  
亞鐵離子之螯合能力

麥角硫因  
腺苷  
總酚  
多醣

## 第三章材料方法

### 一、實驗材料

本研究試驗使用之乾燥杏鮑菇子實體 (*Pleurotus eryngii*) 於 2014 年 7 月購自天下第一菇。台中，台灣。

### 二、實驗藥品

3,5 - 二硝基水楊酸 (3,5-Dinitrosalicylic acid,DNS)、葡萄糖 (Glucose)購自美國 Sigma 公司。硼酸 (Boric acid)、乙醚 (Ethyl ether)、鹽酸 (Hydrochloric acid)、氫氧化鈉 (Sodium hydroxide) 和硫酸 (Sulfuric acid) 購自台灣聯工公司、雙氧水 (Hydrogen peroxide) 和酒石酸鉀鈉 (Sodium potassium tartrate) 購自日本和光純藥工業株式會社。甲基紅 (Methyl red) 購自日本東京化成公司。丁基羥基苯甲醚 (Butylated hydroxyl-anisole, BHA)、(ethylenediaminetetra acetic acid, EDTA)、沒食子酸(Gallic acid)、亞麻油酸 (Linoleic acid)和生育酚 (Tocopherol)、2,2 -二苯基-1 -苦基苯肼 (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)、檸檬酸 (Citric acid) 購自 Sigma 公司，St. Louis, MI, 美國。偏磷酸 (Metaphosphoric acid) 購自關東化學株式會社，東京，日本。磷酸二氫鈉 (Sodium phosphate monobasic) 和磷酸氫二鈉 (Disodium hydrogen phosphate)、酒石酸鉀鈉 (Potassium Sodium Tartrate) 購自 Katayama Chemical 公司，日本。乙腈 (Acetonitrile) 購自 J. T. Baker 公司，歐洲，甲醇 (Methanol)、正己烷 (*n*-Hexane) 購自 macron 公司，美國。甲苯(Toluene) 購自 burdick & Jackson 公司，美國，乙醇 (Ethanol) 購自恩加有限公司。2,6 -二氯靛酚 (2,6-Dichloroindophenol)、鄰苯三酚 (Pyrogallic Acid)、氫氧化鉀(Potassium hydroxide)、福林試劑 Folin & Ciocalteu's phenol reagent、購自 Panreac 公司，歐洲。β-胡蘿蔔素(β-Carotene) 購自 Cayman Chemical 公司，美國。ferrozine 購自 Alfa Aesar 公司，美國、抗壞血酸 (Ascorbic acid)、

無水碳酸鈉(Sodium carbonate anhydrous)、三氯乙酸 ( Trichloroacetic acid, TCA) 購自 Riedel 公司，美國，鐵氰化鉀 (Potassium ferricyanide, PFC) 購自 Shimakyu's Pure Chemicals 公司，日本。氯化鐵(III) chloride anhydrous) 購自 panreac 公司，歐洲。氯化亞鐵 (Iron (II) chloride tetrahydrate) 購自恩加有限公司。麥角硫因 (Ergothioneine)、腺苷 (Adenosine) 購自恩加有限公司。

### 三、 樣品製備

將市售乾燥杏鮑菇子實體以磨粉機粉碎後過篩 (60 mesh)，即得杏鮑菇子實體粉末。

### 四、 一般成分分析

#### 5. 水分

取樣品乾燥後之粉末精稱 1~2 g ( $W_1$ )，置於經洗淨恆重後之稱量瓶 ( $W$ ) 中，以常壓加熱乾燥法，於烘箱中反覆乾燥、冷卻，稱至恆重 ( $W_2$ )，由樣品重量之損失量除以原樣品重可得該樣品之水分含量。樣品粉末水分含量之計算如下：

$$\text{水分含量 (\%)} = \left[ \frac{W_1 - (W_2 - W)}{W_1} \right] \times 100$$

#### 6. 灰分

取樣品乾燥粉末精稱 2~5 克 ( $W$ ) 放入已洗淨且恆重後之坩堝 ( $W_1$ ) 中，並於 105°C 烘箱中乾燥，去除部分水分，再放入灰化爐中灰化 (575 ± 25°C) 至樣品粉末呈白灰色，當烘箱溫度降至 200°C 時，移至玻璃乾燥器中繼續冷卻至室溫時稱重 ( $W_2$ )。樣品粉末灰分含量之計算如下：

$$\text{灰分含量 (\%)} = \left[ \frac{W_2 - W_1}{W} \right] \times 100$$



## 7. 粗脂質

樣品乾燥粉末精稱 2~3 g 置於圓筒濾紙中，頂部用脫脂棉蓋好，於 95~98 °C 烘箱內乾燥 2~3 小時後稱重 (W)，圓底燒瓶亦如上述步驟乾燥後稱重 (W<sub>1</sub>)。圓筒濾紙裝入 Soxhlet 萃取裝置之萃取管中，且將圓底燒瓶加入 8 分滿之乙醚接於其下，置於 55 °C 恆溫水浴中連續萃取 16~18 小時。萃取完畢後，卸下冷凝管取出圓筒濾紙，將大部分乙醚蒸餾至萃取管中回收，再將圓底燒瓶置於水浴中繼續加熱使乙醚蒸發至乾。最後將圓底燒瓶置於 95~98 °C 烘箱中乾燥，每隔半小時稱重一次，取重量微增加前之重量 (W<sub>2</sub>)。樣品粉末脂質含量之計算如下：

$$\text{粉末脂質含量 (\%)} = [(W_2 - W_1) / W] \times 100$$

## 8. 粗蛋白

樣品乾燥粉末精稱 1.0 g (W) 置入消化分解管中，加入 25 mL 濃硫酸及少許蛋白質催化劑，加熱分解至溶液澄清為止，再直接裝入凱氏氮蒸餾裝置 (Gerhardt Vapodest 20) 內進行蒸餾，並添加 15 mL 之鹼液 (35% 氫氧化鈉溶液)，反應 30 秒後蒸餾 10 分鐘，出口用含有混合指示劑 (bromocresol green 和 methyl red) 的硼酸溶液 (4%，25 mL) 來接收，最後以 0.1 N 之鹽酸標準溶液滴定至桃紅色出現為止，記錄消耗的鹽酸毫升數 (V<sub>1</sub>)。並做空白組且記錄消耗的鹽酸毫升數 (V<sub>2</sub>)。蛋白質含量之計算如下：

$$\text{蛋白質含量 (\%)} = [4.38^* \times 0.014^{**} \times (V_1 - V_2) \times M / W] \times 100$$

M : Molarity of HCl

\* 菇類之氮係數 (Chang & Hayes, 1978)

\*\* 相當於 1 mL 之 1 N 鹽酸溶液的氮量 (g)

## 9. 碳水化合物

$$\text{碳水化合物 (\%)} = 100 - (\text{水分} + \text{灰分} + \text{粗脂質} + \text{粗蛋白})$$

## 五、新式萃取方式之條件探討

### (一) 微波輔助萃取一次一因子條件探討

採用 Milestone STARTD 微波設備進行本研究之萃取實驗。實驗方法依據郭（2015）進行修飾，精秤 60 mesh 杏鮑菇子實體樣品粉末，加入蒸餾水於 500 mL 圓底萃取瓶中，進行微波萃取條件之一次一因子試驗的探討，加熱方式採直接升溫至指定溫度後進行萃取，萃取液於 10°C，13500 rpm 離心，使懸浮物沉澱後以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾，所得之濾液於 50°C 下減壓濃縮至一定量，再以蒸餾水定量至 250 mL，經 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾，儲存於 4°C 冰箱中待成品分析，欲探討因子即條件如下：

1. 功率：100、200、300、400、500、600 W。
2. 時間：10、20、30、40、50、60 min。
3. 固液比：1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 (g/mL)。
4. 溫度：70、80、90、100、110°C。

### (二) 超音波萃取一次一因子條件探討

採用 BANDELIN DL 510 H 超音波設備進行本研究之萃取實驗。萃取方式同微波萃取，濾液於 50°C 下減壓濃縮，最終定量於 50 mL，經 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾，儲存於 4°C 冰箱中待成品分析，欲探討因子即條件如下：

1. 功率：256、384、512、640 W。
2. 時間：1、5、10、30、40 min。
3. 固液比：1:10、1:20、1:30、1:40 (g/mL)。
4. 溫度：30、50、70°C。

## 六、傳統萃取方式探討

### (一) 熱水萃取

秤樣品粉末 10 g，置入 250 mL 錐形瓶中，加入 200 mL 去蒸餾水，於 100°C 下隔水加熱方式萃取 2 小時。再以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾，所得濾渣以同樣條件萃取一次，收集其濾液至於濃縮瓶中，於 50°C 下減壓濃縮至一定量，再以蒸餾水定量至 250 mL，儲存於 -20°C 下備用。

### (二) 乙醇萃取

精稱樣品粉末 10 g，置入 250 mL 錐形瓶中，加入 100 mL 95% 乙醇，於 25°C 下，150 rpm 震盪萃取 24 小時，然後以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾。所得濾渣再以同樣條件萃取二次，三次收集之濾液以 50°C 減壓濃縮至乾，再以乙醇定量至一定濃度後，將所得之萃取物儲存於 -20°C 下保存備用。

## 七、機能性成分分析

### (一) 麥角硫因

經由微波、超音波、熱水和乙醇萃取，以 0.45  $\mu$ m 濾膜過濾後，以高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatograph, HPLC) 進行分析。並將不同濃度之標準品 (ergothionine) 注入 HPLC 中，由所得面積繪出檢量線，藉以計算樣品中麥角硫因含量。

高效能液相層析儀包括 HITACHI Chromaster 5110 泵浦，HITACHI Chromaster 5430 Photo Diode Array 檢測器，並連結數據處理之 Chromaster Sys 1。高效能液相層析條件如下 (Dubost *et al.*, 2006)：

1. 分離管柱：InertSustain 5  $\mu$ m C18 (4.6  $\times$  150 mm, GL Sciences)。
2. 注射量：10  $\mu$ L。
3. 檢測波長：254 nm。
4. 移動相：20 mM 磷酸氫二銨。
5. 流速：1 mL/min。

## (二) 腺苷

高效能液相層析儀包括 SHIMADZU LC-20AT 泵浦，SHIMADZU SPD-20A UV-VIS DETECTOR 可見光/紫外光檢測器，並連結數據處理之 SHIMADZU C-R6A Chromatopac。高效能液相層析條件如下孫和卜 (1999)：

1. 分離管柱：Kinetex 5  $\mu$ m C18 100A (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)。
2. 注射量：20  $\mu$ L。
3. 檢測波長：260 nm。
4. 移動相：甲醇：0.02M磷酸二氫鉀 =15：85 (v/v)。
5. 流速：0.8 mL/min。

## (三) 總酚類含量測定

取 100  $\mu$ L 的萃取液，分別加入 5 mL 含有 0.3 % 鹽酸溶液的酸化甲醇：水= 60：40 (v / v) 溶液溶解至一定濃度，然後各取 100  $\mu$ L 加入 2.0 mL，2% 碳酸鈉 (sodium carbonate)，混合均勻，放置 2 分鐘後再加入 50% Folin-Ciocalteau's reagent 100  $\mu$ L，混合均勻於室溫下放置於暗處 30 分鐘，使用分光光度計於 750 nm 下測定其吸光值。由沒食子酸 (gallic acid) 的標準曲線計算樣品總酚類化合物含量 (Taga *et al.*, 1984)。

## (四) 多醣體含量

取 20 mL 之杏鮑菇萃取液，置於殺菌釜中加熱，並於 15,000 rpm 下離心 10 min，所得上清液作為樣品。以透析膜 (MWCO 8000~10000) 透析 4 hr 以去除小分子。再用酚硫酸法於 490 nm 波長下，測其吸光值並與已知濃度之標準品 (葡萄糖溶液) 比對，計算出相對之總多醣濃度。

## (五) 多醣分子量之測定

參考呂等人 (2001) 之方法。多醣體分子量以膠體滲透層析 (gel permeation chromatography, GPC) 法進行分析。其固定相為孔徑大小相同的物質，可將移動相中不同分子量的物質經由其在固定相中所流動的路徑長短加以區分，大分子物質會因為難以進入孔徑內而隨著移動相在孔徑間隙流出，滯留時間短，較快被沖提出來；小分子物質則容易進入孔徑間隙，故滯留時間長，較慢被沖提出來，以達到分離不同分子量的效果，又稱為膠體過濾層析法 (gel filtration chromatography) 或分子排斥層析法 (size exclusion chromatography)。

萃取液以 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾，取 15  $\mu\text{L}$  濾液進行分子量分佈之分析，分析條件如下：

1. 分析管柱：PolySep-SEC-P 300  $\times$  7.80mm，(Phenomenex, model 5000)。
2. 管柱溫度：45 $^{\circ}\text{C}$
3. 移動相：去離子水
4. 流速：1.2 mL / min
5. 偵測器：HITACHI Chromaster 5450 RI detector (Bischoff, model 8110)
6. 標準品：pullulan(分子量6000、10000、21700、47300、113000、210000、366000及805000 Da)。

## 八、麥角硫因純化方法

將杏鮑菇微波萃取液利用萃取液：乙醇=1:4 (v/v) 比例，於 4 $^{\circ}\text{C}$  下沉澱 14~16 小時用以去除大部分的多醣，並用 13500 rpm 的轉速離心使懸浮物沉澱，再以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾，所得之濾液於 50 $^{\circ}\text{C}$  下減壓濃縮至 20 倍濃度，保存於 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中待純化。

使用 Phenomenex® 的 HyperClone RP-C18 管柱，搭配上分液收集器 (Fraction Collector)，於 24 分鐘開始收集區分液，直至 26 分鐘結

束，並利用上述麥角硫因分析方法確定所分離出之區分液中含有較純的麥角硫因。合併三次共 12 管收集液，並於 50°C 下減壓濃縮，再以蒸餾水定量至 5 mL。

純化條件如下：

1. 純化管柱：HyperClone 5  $\mu$ m RP-C18，(21.2  $\times$  250 mm, Phenomenex)。
2. 移動相：20 mM 磷酸氫二銨。
3. 流速：3 ml / min。
4. 分液收集管體積：1.5 mL/管。

#### 九、麥角硫因鑑定方法 (UPLC/Q-TOF/MS)

1. 型號：Bruker DIONEX UltiMate 3000 micrOTOF Q-III。
2. UPLC System 液相層析系統。
3. 質譜儀為 Q-TOF-MS System。
4. 離子源：電灑離子源 (Electrospray ionization, ESI)。
5. 掃描質量範圍：2000~500  $m/z$ 。

#### 十、不同萃取方式之抗氧化評估

##### (一) 還原力

本研究利用 Oyaizu 等(1986)的方法，取不同濃度之樣品萃取物 (0.75 mL) 與 0.2 M 磷酸鹽緩衝液 (0.75 mL, pH 6.6) 及 1% 赤血鹽 (0.75 mL, potassium ferricyanide) 經吸入試管中混合均勻後，置於水浴下作用 20 分鐘 (50°C)，而後以冰浴冷卻。加入 10% 三氯醋酸溶液 (TCA, 0.75 ml) 混合均勻後，將混合液以 3000 rpm 離心 10 分鐘。上清液 (1 mL) 與蒸餾水 (1.4 mL) 及 0.1% 氯化鐵溶液 (0.1 mL) 經混合均勻，反應 10 分鐘後，以分光光度計 (Hitachi U-5100 Spectrophotometer) 測定混合液在 700 nm 下之吸光值。所測得之吸光值愈高，則表示樣品之還原力愈強。EC<sub>50</sub>值 (mg/mL) 為還原力吸光值 0.5 之有效濃度即獲自線性迴歸

分析之內插計算。此外，以抗壞血酸 (ascorbic acid)、丁基羥基甲氧苯 (butylated hydroxyanisole, BHA) 及 $\alpha$ -生育酚 ( $\alpha$ -tocopherol) 作為樣品的對照組。

## (二) 清除 1,1-二苯基-2-苦味肼基團 (DPPH) 能力

本研究利用Shimada等(1992)的方法，取 4 mL 不同濃度之樣品萃取物與新鮮配製之0.5 mM DPPH之甲醇溶液 (1 mL) 吸入試管中均勻混合後，置於暗處 30 分鐘使其反應，而後以 (Hitachi U-5100 Spectrophotometer) 分光光度計，測定混合液在 517 nm下之吸光值。所測得之吸光值愈低，則表示樣品清除DPPH自由基之能力愈強。EC<sub>50</sub>值 (mg/mL) 為清除50%DPPH自由基之有效濃度即獲自線性迴歸分析之內插計算。此外，以抗壞血酸、丁基羥基甲氧苯及 $\alpha$ -生育酚作為樣品的對照組。

$$\text{Scavenging effect (\%)} = [1 - (A_{517 \text{ nm of sample}}) / (A_{517 \text{ nm of control}})] \times 100$$

## (三) 螯合亞鐵離子能力

本研究利用Dinis等(1994)的方法，取不同濃度 (0~20 mg/mL) 之樣品萃取物 (0.5 mL) 與甲醇 (1.85 mL) 及2 mM 氯化鐵 (0.05 mL) 經吸入試管中，反應30 秒後，再加入5 mM ferrozine (0.1 mL)，室溫下反應10 分鐘，以分光光度計Hitachi U-5100測定其在562 nm 下之吸光值。所測吸光值愈低，表示螯合亞鐵離子之能力愈強。EC<sub>50</sub>值 (mg/mL) 為螯合50%亞鐵離子之有效濃度即獲自線性迴歸分析之內插計算。此外，並以檸檬酸 (citric acid) 和乙二胺四乙酸 (EDTA) 作為樣品的對照組。

$$\text{Chelating effect (\%)} = [ (1 - (A_{562 \text{ nm of sample}}) / (A_{562 \text{ nm of control}}) ) ]$$

#### (四) 總抗氧化力

參考 Arts 等 (2004)及 Re 等 (1999) 的方法。不同濃度之萃取物 (100  $\mu$ L) 加入 2 mL ABTS 分析溶液。震盪後於暗室靜置 6 分鐘，以分光光度計 Hitachi U-5001 測定其在 734 nm 下之吸光值。並以不同濃度之 Trolox 標準品所得標準曲線，換算樣品中 Trolox 的含量。其中 ABTS stock 溶液為 40 mg ABTS 及 8 mg potassium peroxodisulfate ( $K_2S_2O_8$ ) 溶於 10 mL PBS buffer (0.01 M)，混合於 25 $^{\circ}$ C 避光反應 16 小時候備用，實驗時取 2 mL ABTS stock 溶液加入 18 mL 0.01M PBS buffer 即為 ABTS 分析溶液，當天新鮮配製和使用。

#### 十一、 統計分析

實驗數據皆以 mean  $\pm$  standard deviation (SD) 表示，使用 Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc., 2000) 軟體進行統計分析，以 ANOVA 程序作變異分析，並以鄧肯氏多變域試驗法  $p < 0.05$  下比較平均值之顯著性差異。



## 第四章 結果與討論

乾燥之杏鮑菇子實體經磨粉過篩後，所得杏鮑菇粉末分析其一般組成成分，項目包括水分、碳水化合物、粗灰分、粗脂肪及粗蛋白等。

### 一、一般組成成分分析

#### (一) 水分

新鮮菇類約含有 90% 左右之水分，經風乾後水分含量約為 5~20% (Breene, 1990)，菇類儲存時的溫度及濕度是影響水分含量的主要原因 (黃, 2000)。表一結果顯示，杏鮑菇水分含量為 8.34%，略低於俞等 (2003) 分析烘乾之杏鮑菇水分含量 (12.4%)，其原因可能是儲藏環境及烘乾時間不同所致。

#### (二) 碳水化合物

菇類主要成分碳水化合物約佔其乾物重的 40~70% (香川, 2004)，而 Chang 和 Miles (1989) 指出蠔菇屬菇類其碳水化合物含量約佔乾重之 50.7~81.8%，本研究結果顯示杏鮑菇子實體之碳水化合物含量約為 73.75% (表一)，與上述結果相符合；但高於俞等人 (2003) 分析所得之值 (64.24%)。不同培養基質所生產之杏鮑菇子實體具有不同碳水化合物含量；李等人 (2015) 研究指出，以玉米蕊作為碳源，杏鮑菇子實體所具有之碳水化合物顯著高於以木屑或棉籽殼作為碳源之培養基質。

#### (三) 粗灰分

粗灰分是食品中的無機成分，為食品經燃燒、灰化後的殘餘物。灰分多為食品中之金屬離子或維生素等成分。一般菇類灰分含量約為乾物重之 5~16%，其中磷、鉀、鈉、鈣和鎂占總灰分之 56~70% (Chang & Miles, 1989)。研究結果顯示杏鮑菇子實體灰分含量約為 6.24% (表一)，略高於黃 (2010) 之杏鮑菇子實體灰分含量 (5.81%)。

表一、杏鮑菇子實體粉末之一般成分組成

Table 1. Proximate composition of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Component	Content <sup>a</sup> (%)
	<i>Pleurotus eryngii</i> fruiting body powder
Moisture	8.34 ± 0.14
Dry matter	91.66 ± 0.14
Carbohydrate <sup>b</sup>	73.75 ± 0.28
Crude ash	6.24 ± 0.02
Crude fat	1.69 ± 0.01
Crude protein	18.32 ± 0.12

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3) . Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ) .

<sup>b</sup> The carbohydrate was calculated by subtracting the contents of crude ash, fat and protine from g/100 g of dry matter and expressed as % of dry mass.

#### (四) 粗脂肪

粗脂肪包括油脂 (triglycerides)、磷脂質、神經鞘脂、蠟、固醇類、三萜類和脂溶性維生素(James, 1995)。食用菇類脂肪含量低，且這些脂肪中不飽和脂肪酸比例較高 (黃，2007)。一般菇類總脂質約佔乾重的 1~8%左右 (水野和川合，1997)；另 Chang 和 Miles (1989) 亦指出蠔菇屬菇類之脂質含量約佔乾重的 1.1~2.2%。研究結果顯示杏鮑菇子實體粉末粗脂肪含量約為 1.69% (表一)，與上述結果相符合，但略高於黃 (2010) 測得之脂肪含量 (1.34%)。

#### (五) 粗蛋白

蛋白質是菇類主要成分之一，而菇類是良好之蛋白質來源，一般食用菇類乾燥後蛋白質含量約佔 20~50% (Chang & Hayes, 1978；香川芳子，2004)。菇類蛋白質所含胺基酸多達 18 種，在種類、數量及比例上都接近人體之必需胺基酸 (葉，2009)。研究指出菇類中所含之蛋白質量，約為一般蔬果的 3~6 倍；食藥用菇類蛋白質含量較動物性食品來得低，但高於一般食品，如米、玉米和牛奶 (左，2004)。Mori 等 (2008) 研究發現，每一百克新鮮杏鮑菇中含有 2.2 克的蛋白質；本研究結果發現杏鮑菇子實體乾物中蛋白質含量約為 18.32% (表一)，高於黃 (2010) 所測得之 11.18%，低於俞等人 (2003) 所測之 27.3%。李等人 (2015) 研究指出，利用不同培養基質來栽培杏鮑菇子實體，當碳和氮源比例一定，以單一木屑為主要碳源，其蛋白質含量高於單一玉米芯為主要碳源；另隨著木屑/玉米芯比值增加，蛋白質含量會隨之增加；由此可知杏鮑菇子實體蛋白質含量與栽培基質有明顯相關。

## 二、杏鮑菇子實體粉末麥角硫因之新式萃取方法條件探討

隨著綠色化學的興起，各種新穎的萃取技術已陸續被開發應用，這些新技術具有萃取效率好、萃取時間短、溶劑消耗少和能控制樣品

萃取條件等優點(Herrero *et al.*, 2010; Ondruschka & Asghari, 2006; Wang & Weller, 2006)，尤其是微波及超音波萃取技術，目前廣泛應用在食品、天然植物或中草藥等生物活性物質之萃取。本研究擬就這兩種萃取技術之條件進行探討：

### (一) 微波萃取條件探討

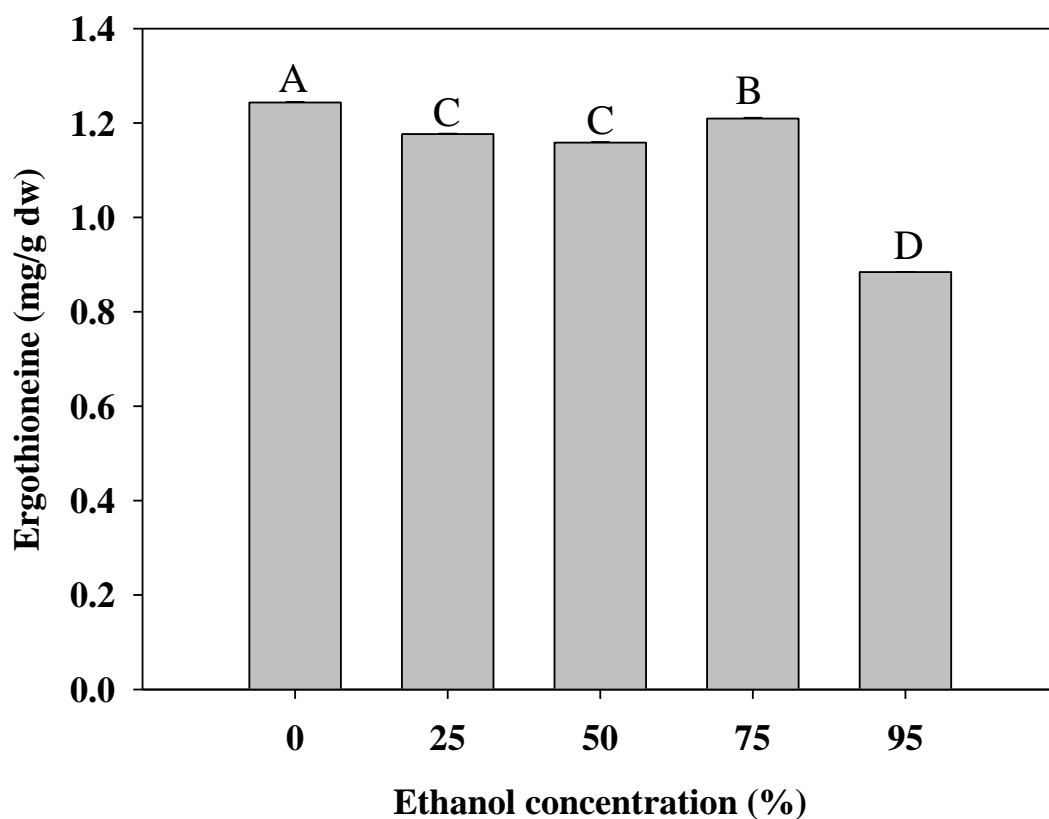
微波萃取之效率與條件參數的選擇有極大的關係 (Dean, 2012)，本研究擬就萃取溶劑、功率、時間、固液比和溫度等常見影響因子進行探討：

#### 1. 萃取溶劑

萃取溶劑的選擇需要考慮萃取溶劑對目標化合物的溶解性和對後續測定有無干擾問題，本研究先將微波萃取功率、時間及固液比固定為 600W、20 分鐘、1：40 g/mL，藉由改變純水和乙醇比例來探討杏鮑菇子實體粉末麥角硫因之萃取率。由圖一可知當萃取溶劑為純水時，有最高之麥角硫因萃取量，可達 1.243 mg/g dw (表二)；而當萃取溶劑中乙醇比例較高時，麥角硫因萃取率反而會下降；當乙醇比例為 95% 時，麥角硫因萃取量僅 0.884 mg/g dw，明顯低於純水為萃取溶劑。Franzoni (2006) 亦指出麥角硫因是一種無色、無味且高水溶性之胺基酸，不易溶於非極性溶劑中。因此，後續之微波及超音波萃取實驗皆以純水作為萃取溶劑。

#### 2. 萃取功率

Maran 等人(2015)指出當微波功率越高，可縮短萃取時間，但有時造成目標萃取物之熱降解。實驗中以純水作為萃取溶劑，萃取時間固定為 30 分鐘，固液比為 1：40 (g/mL)，探討微波功率 (100、200、300、400、500 和 600 W) 對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響。圖二結果顯示當微波功率為 600 W 時，有最高麥角硫因萃取量，其值為



圖一、乙醇濃度對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響

Figure 1. Effect of ethanol concentration on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

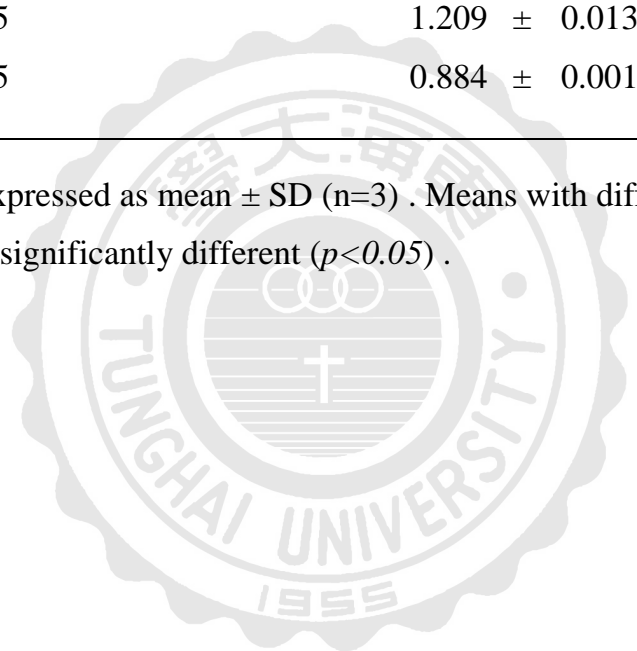
Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

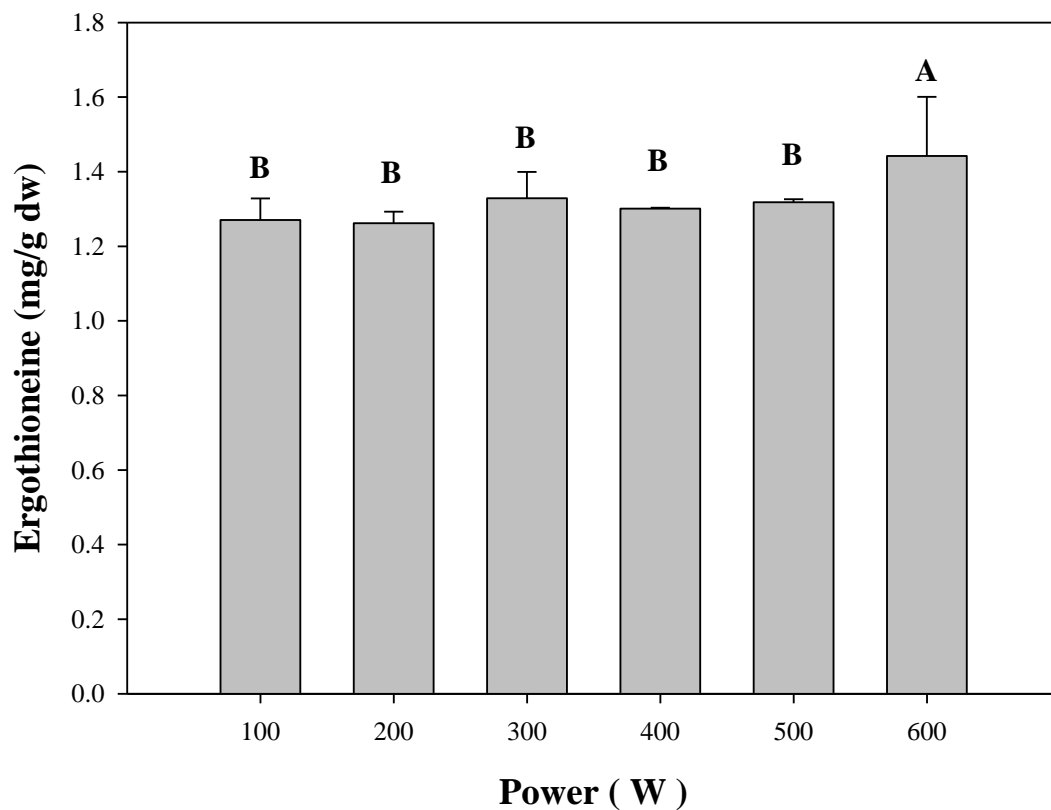
表二、乙醇濃度對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響

Table 2. Effect of ethanol concentration on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Ethanol percentage (%)	Yield (mg/g dw) <sup>a</sup>
0	1.243 ± 0.012 A
25	1.177 ± 0.009 C
50	1.158 ± 0.014 C
75	1.209 ± 0.013 B
95	0.884 ± 0.001 D

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3) . Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ) .





圖二、微波功率對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響

Figure 2. Effect of microwave power on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

1.442 mg/g dw (表三)；而當微波功率為 100-500 W 時，麥角硫因萃取量為 1.27~1.318 mg/g dw，明顯低於 600 W 之萃取量。吳等 (2006) 指出高溫蒸氣壓具有破壁之作用，可幫助細胞內物質釋出；另劉等 (2013) 亦指出麥角硫因具有硫醇和硫酮兩種互變異構體，會有較高的熱穩定性、pH 穩定性和水溶性，故麥角硫因可耐較高萃取功率，不致被破壞結構而導致降解。

本研究採用開放式微波萃取方式，裝置上方有洩壓管及冷凝管，冷凝管可讓微波加熱後產生之水蒸氣冷凝成水而流回萃取瓶中；但當微波功率過高 ( $\geq 700\text{W}$ ) 時，因高能量而沸騰產生過多之蒸氣，無法及時冷卻，致冷凝效果不佳，使得部分樣品萃取液會隨著蒸氣從洩壓管中流出；因此，無法繼續探討高功率 ( $\geq 700\text{W}$ ) 對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響。故後續實驗以 600 W 作為微波功率，利用一次一因子探討其他影響因子。

### 3. 萃取時間

萃取時間會影響目標成分之萃取率，當萃取時間不足時，目標成分則無法完全被萃取出來；而當萃取時間過長時，則對耐熱性較差之目標成分會有破壞作用，故微波萃取時間之適當與否，會進一步影響目標成分之萃取量 (Maran *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015)。另谷 (2010) 亦指出，微波萃取最重要兩大影響因素為萃取功率和萃取時間。

實驗中以純水作為萃取溶劑，萃取功率為 600 W，固液比為 1：40，探討不同萃取時間 (10、20、30、40 和 50 分鐘) 對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響。由圖三可知萃取時間為 40 和 50 分鐘時，麥角硫因有最好之萃取效果，萃取量分別為 1.256 及 1.252 mg/g dw (表三)；其次為 20 和 30 分鐘萃取時間，其萃取量分別為 1.229 及 1.253 mg/g dw；上述萃取時間 (20-50 分鐘) 並無統計差異。當萃取時間為 10 分鐘時，

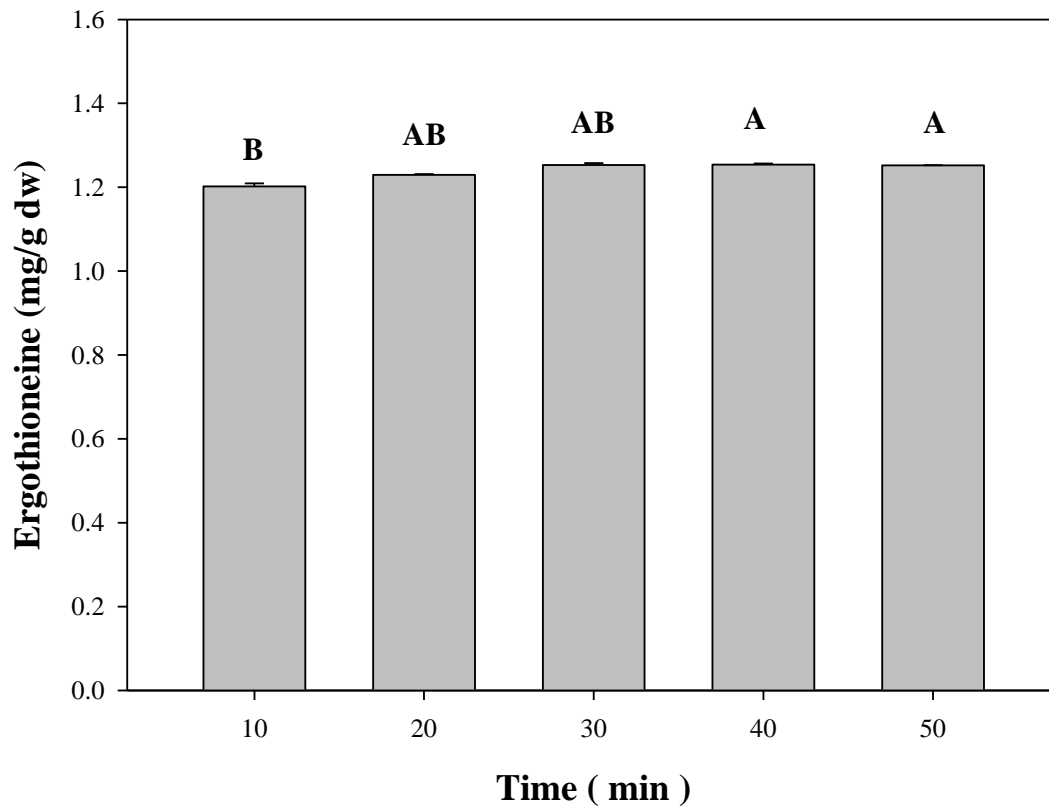


表三、微波萃取條件對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響

Table 3. The effect of microwave extraction conditions on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

	Yield (mg/g dw) <sup>a</sup>
<b>Power (W)</b>	
100	1.270 ± 0.058 B
200	1.262 ± 0.031 B
300	1.329 ± 0.070 B
400	1.301 ± 0.003 B
500	1.318 ± 0.008 B
600	1.442 ± 0.159 A
<b>Time (min)</b>	
10	1.202 ± 0.007 B
20	1.229 ± 0.002 AB
30	1.253 ± 0.005 AB
40	1.256 ± 0.015 A
50	1.252 ± 0.004 A
<b>Solid/liquid ratio (g/mL)</b>	
1:20	1.157 ± 0.025 C
1:30	1.351 ± 0.092 AB
1:40	1.403 ± 0.067 A
1:50	1.210 ± 0.032 C
1:60	1.268 ± 0.049 BC
<b>Temperature (°C)</b>	
70	1.225 ± 0.004 B
80	1.231 ± 0.004 B
90	1.226 ± 0.034 B
100	1.323 ± 0.021 A
110	1.246 ± 0.003 B

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3) . Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ) .



圖三、微波萃取時間對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響

Figure 3. The effect of microwave extracted time on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

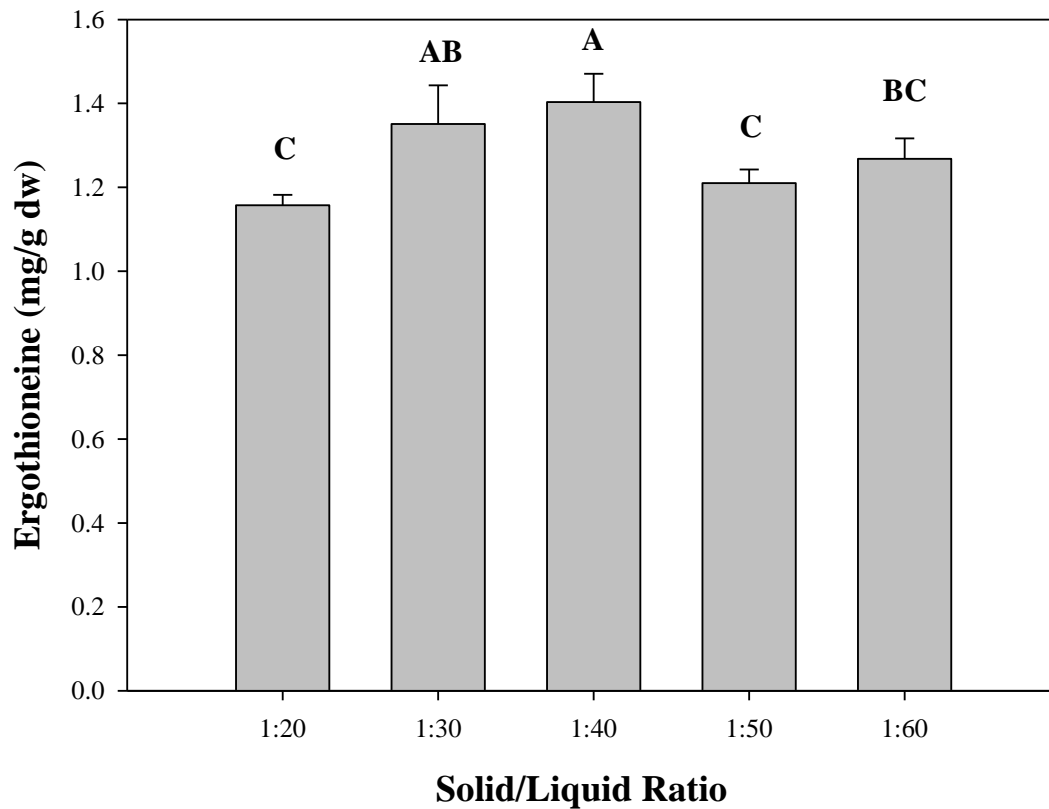
其麥角硫因萃取量較低 (1.202 mg/g dw)，明顯低於 40 和 50 分鐘，基於節能考量，選擇 40 分鐘以作為後續實驗探討。

#### 4. 固液比

樣品與溶劑之固液比亦會影響目標成分之萃取率，葛等人 (2015) 研究指出，利用微波萃取草菇之粗三萜，當固液比為 1:35 時，可得最大粗三萜之萃取量。實驗中以蒸餾水為萃取溶劑，功率固定為 600 W、時間為 40 分鐘，探討固液比 (1:20、1:30、1:40、1:50 和 1:60) 對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響。由圖四結果顯示，當固液比為 1:40 時，會有最高之萃取量，其值為 1.403 mg/g dw (表三)；而當固液比為 1:30 時，其萃取量為次高 (1.351 mg/g dw)，但兩者並無顯著差異。此外，其他三種比例 (1:20、1:50 和 1:60) 之萃取量分別為 1.157、1.210 和 1.268 mg/g dw。因此，之後以固液比為 1:40，進行後續實驗條件探討。

#### 5. 萃取溫度

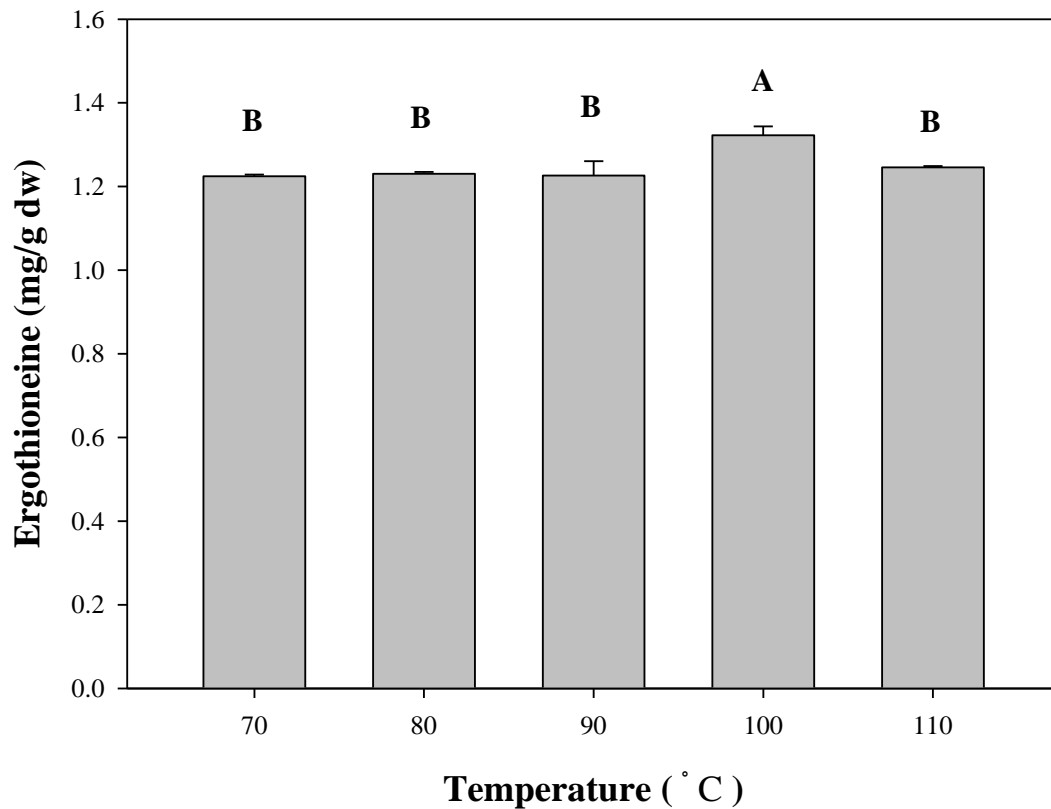
萃取溫度提高有助於目標成分溶出及細胞膜破碎之效果，但最適萃取溫度之選擇取決於目標物對熱敏感程度，若遇到熱敏感之化合物以高溫進行萃取，則會造成其熱降解 (Xiao *et al.*, 2012)。實驗中以蒸餾水作為萃取溶劑，萃取功率為 600 W、萃取時間為 40 分鐘、固液比為 1:40，探討微波萃取溫度 (70、80、90、100 和 110°C) 對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響。由圖五之結果顯示，當溫度為 100°C 時，麥角硫因有最高萃取量，值為 1.323 mg/g dw (表三)，明顯高於其他萃取溫度之值 (1.225~1.246 mg/g dw)。Carlsson 等 (1974) 指出麥角硫因是一種穩定的抗氧化劑；另劉等 (2013) 亦指出麥角硫因具有熱和 pH 穩定性，不會因為高溫而降解。



圖四、微波萃取固液比對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響

Figure 4. The effect of solid/liquid ratio on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).



圖五、微波萃取溫度對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量的影響

Figure 5. The effect of microwave extracted temperature on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

綜合上述一次一因子實驗結果，利用微波來萃取杏鮑菇子實體粉末之麥角硫因，萃取功率為 600W、時間為 40 分鐘、固液比為 1：40 和溫度為 100°C，可得較高之萃取量。

## (二) 超音波萃取條件探討

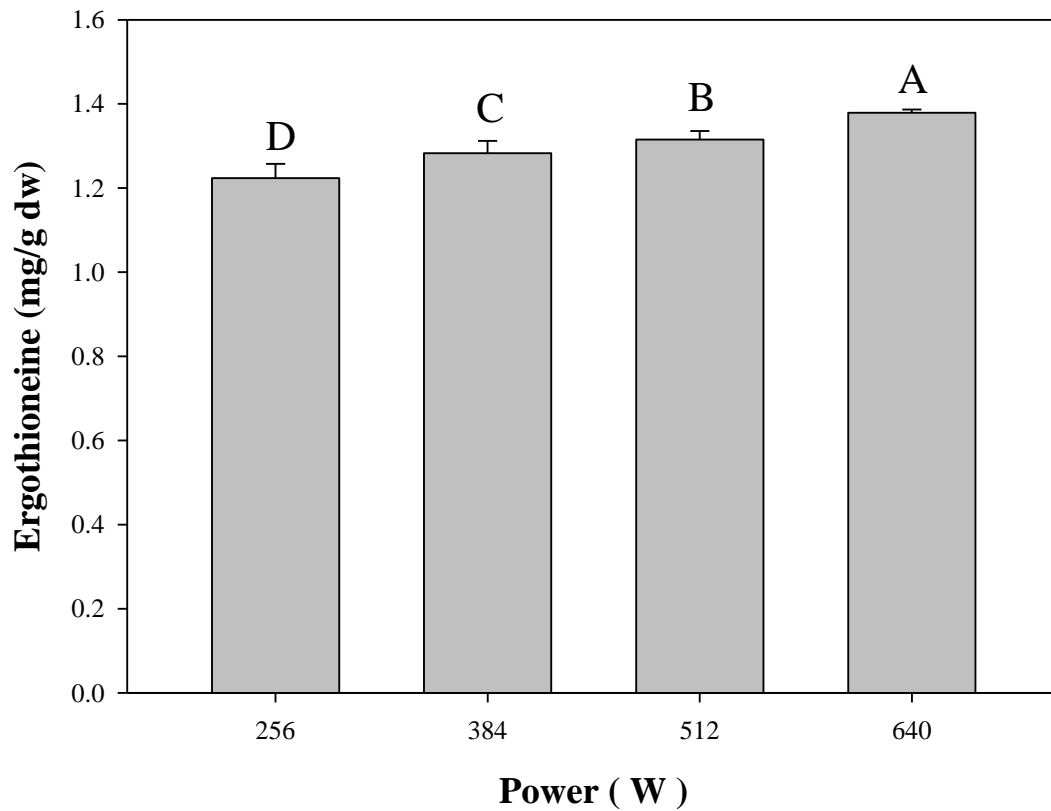
超音波萃取除具有萃取時間短和溶劑消耗少之優點外，另與微波萃取相較，其操作過程可在低溫常壓下進行，可適用於熱敏性物質之萃取及避免低沸點物質揮發，進而增加萃取效果(Bendicho *et al.*, 2012)。以下針對超音波萃取常見之影響因子，包括萃取功率、時間、固液比和溫度進行一次一因子條件探討。

### 1. 萃取功率

實驗中以蒸餾水為萃取溶劑，萃取時間為 30 分鐘、固液比為 1：40，探討不同萃取功率 (256、384、512 和 640 W) 對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響。由圖六結果顯示，隨著萃取功率之增加，麥角硫因萃取量亦會逐漸增加，當功率為 640 W 時，可得最高的麥角硫因萃取量，其值為 1.379 mg/g dw (表四)；其他依序為 512 W (1.315 mg/g dw) > 384W (1.283 mg/g dw) > 256 W (1.224 mg/g dw)。然因所使用之超音波萃取裝置，其最大功率為 640 W，故無法繼續往更大功率來進行探討；因此，之後以 640 W 作為萃取功率，進行後續實驗條件探討。

### 2. 萃取時間

萃取時間對於杏鮑菇子實體麥角硫因萃取量的影響，實驗中以蒸餾水為萃取溶劑，功率為 640 W 和固液比為 1：40，探討不同萃取時間 (1、5、10、30 和 40 分鐘) 對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響。由圖七結果顯示，隨著萃取時間之增加，麥角硫因萃取量亦



圖六、超音波功率對杏鮑菇子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響

Figure 6. Effect of ultrasound power on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

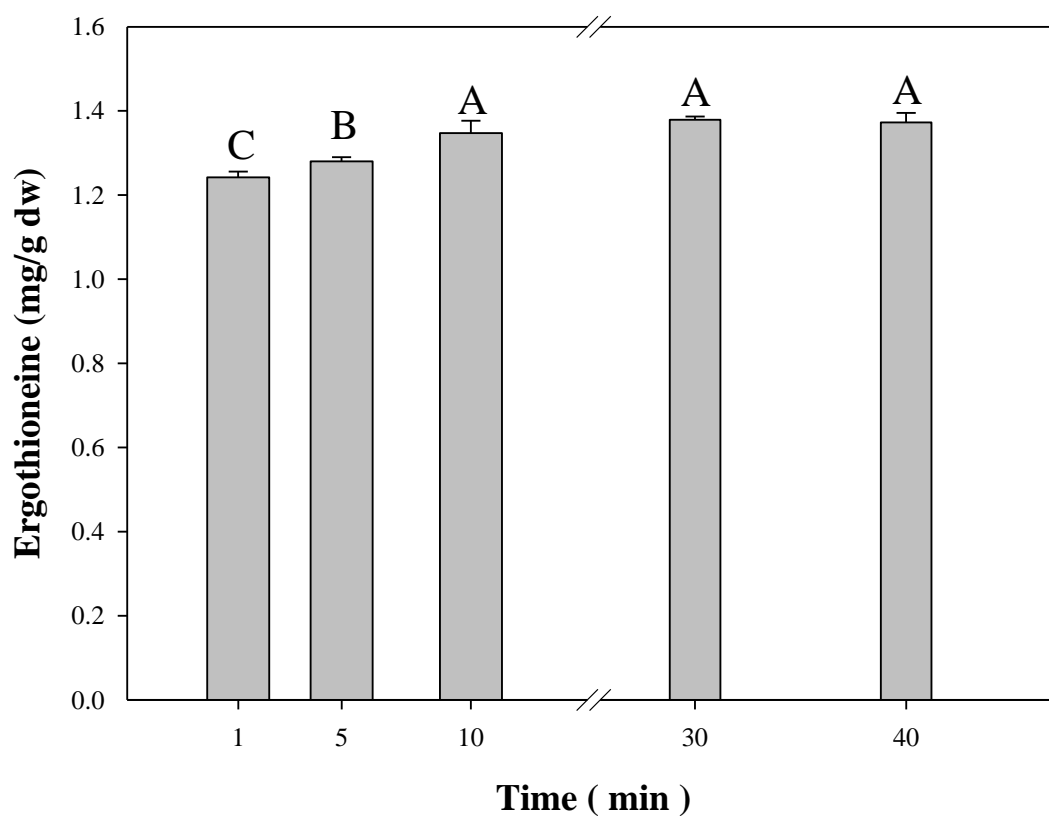
表四、超音波萃取條件對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響

Table 4. The effect of ultrasound extraction conditions on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

	Yield (mg/g dry weight) <sup>a</sup>
<b>Power (W)</b>	
256	1.224 ± 0.034 D
384	1.283 ± 0.030 C
512	1.315 ± 0.021 B
640	1.379 ± 0.008 A
<b>Time (min)</b>	
1	1.242 ± 0.014 C
5	1.280 ± 0.010 B
10	1.347 ± 0.029 A
30	1.379 ± 0.008 A
40	1.373 ± 0.023 A
<b>Solid/liquid ratio (g/mL)</b>	
1:10	1.165 ± 0.026 C
1:20	1.249 ± 0.019 B
1:30	1.349 ± 0.050 A
1:40	1.331 ± 0.041 A
<b>Temperature (°C)</b>	
30	1.349 ± 0.049 A
50	1.327 ± 0.036 A
70	1.386 ± 0.034 A

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3) . Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ) .





圖七、超音波萃取時間對杏鮑菇子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響

Figure 7. The effect of ultrasound extracted time on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

會逐漸增加，當萃取時間為30分鐘時，有最高之麥角硫因萃取量，值為 1.379 mg/g dw (表四)；但與10分鐘 (1.347 mg/g dw) 和40分鐘 (1.373 mg/g dw) 並無統計差異；另這三個萃取時間皆明顯高於5分鐘 (1.280 mg/g dw) 和1分鐘 (1.242 mg/g dw)。後續實驗考量時間成本，將選擇10分鐘作為超音波萃取時間。

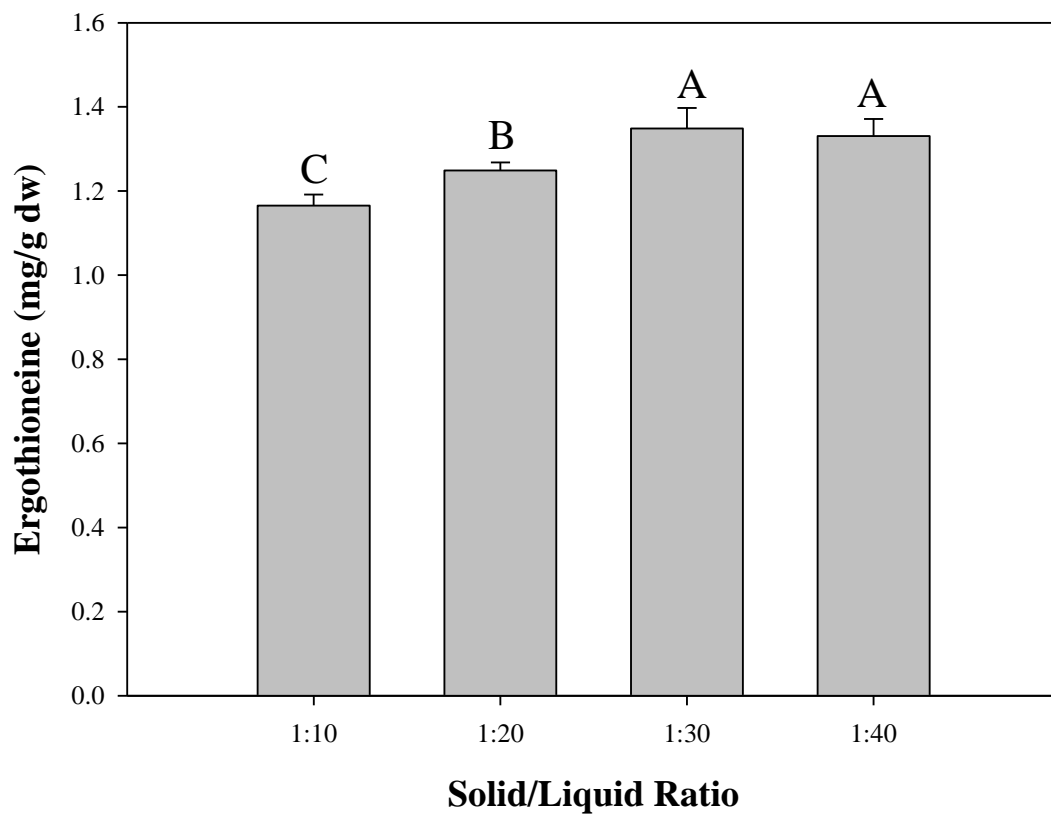
### 3. 固液比

實驗中以蒸餾水作為萃取溶劑，功率為 640 W 及萃取時間為 10 分鐘，探討不同固液比 (1:10、1:20、1:30 和 1:40) 對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響。由圖八結果顯示，當固液比為 1:30 時，具有最高麥角硫因萃取量，其值為 1.349 mg/g dw (表四)；其次為 1:40 (1.331 mg/g dw)，但兩者並無統計差異；另這兩者之萃取量皆明顯高於固液比為 1:20 (1.249 mg/g dw) 和 1:10 (1.165 mg/g dw)。故後續實驗以固液比為 1:30，作為杏鮑菇子實體粉末麥角硫因之超音波萃取條件。

### 4. 萃取溫度

劉等人 (2013) 指出麥角硫因具有熱穩定特性，而先前之微波萃取條件探討亦發現，當溫度為 100°C 時，有最高之麥角硫因萃取量。實驗中以蒸餾水作為萃取溶劑，功率為 640 W、萃取時間為 10 分鐘及固液比為 1:30，探討不同萃取溫度 (30、50 和 70°C) 對杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量之影響。由圖九結果顯示，萃取溫度無論是 30、50 或 70°C，杏鮑菇子實體粉末麥角硫因萃取量皆無顯著差異，其值為 1.327~1.386 mg/g dw (表四)。由結果可知萃取溫度 ( $\leq 70^\circ\text{C}$ ) 對超音波萃取杏鮑菇子實體粉末之麥角硫因萃取量並無影響，後續實驗以節約能源成本考量，將以 30°C 作為超音波萃取溫度條件。

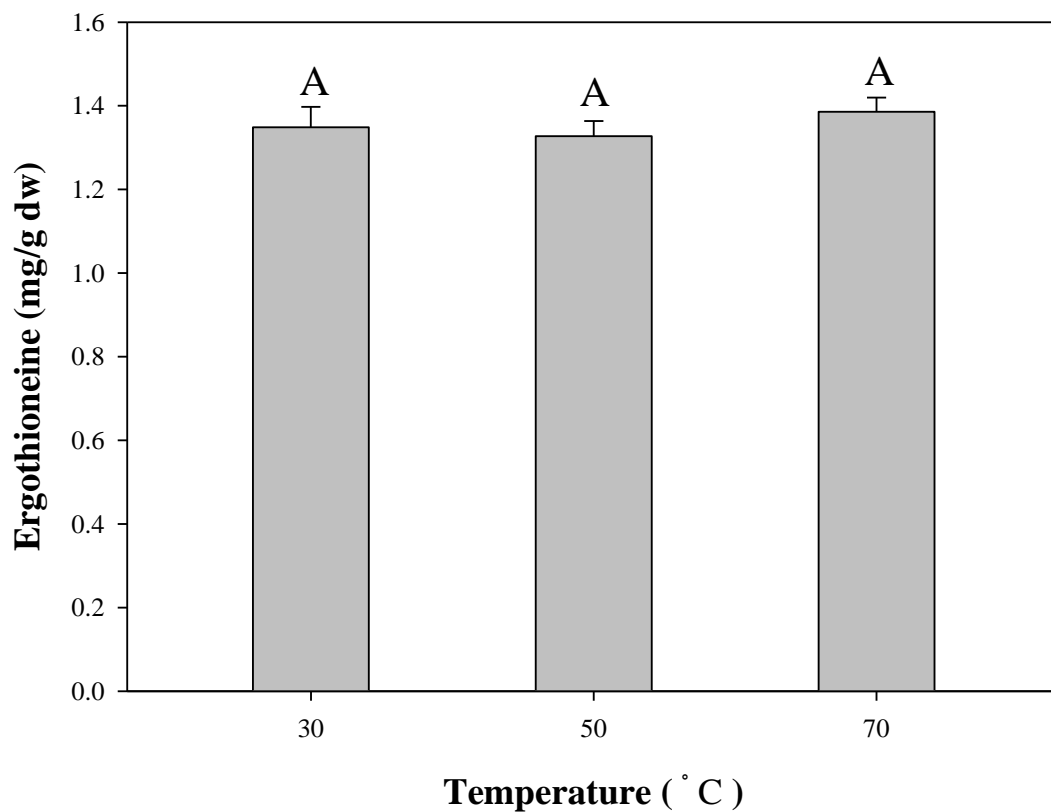
綜合上述一次一因子實驗結果，利用超音波來萃取杏鮑菇子實體粉末之麥角硫因，萃取功率為 640W、時間為 10 分鐘、固液比為 1:30 和溫度為 30°C，可得較高之萃取量。



圖八、超音波萃取固液比對杏鮑菇子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響

Figure 8. The effect of solid/liquid ratio on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)



圖九、超音波萃取溫度對杏鮑菇子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響

Figure 9. The effect of ultrasound extracted temperature on yield of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

### 三、新式與傳統萃取方式之機能性成分含量比較

傳統萃取方法以熱水和乙醇萃取最為常見，本研究採用紀 (2014) 之方法來進行萃取；並與先前探討麥角硫因較適萃取量之微波與超音波萃取條件，來進行機能性成分含量比較。由表五結果可知，在麥角硫因萃取量方面，以微波萃取方法所得麥角硫因萃取量 (1.639 mg/g dw) 最高；其次為超音波和熱水萃取方法，其麥角硫因萃取量分別為 1.349 和 1.332 mg/g dw，兩者並無顯著差異；而以常溫乙醇萃取方式所得麥角硫因萃取量 (0.195 mg/g dw) 最低。上述結果顯示熱對麥角硫因結構破壞影響並不大，故使用 100°C 之微波與熱水萃取方法，麥角硫因萃取量相對較高；而常溫乙醇萃取方法可能是因 95% 乙醇對麥角硫因溶解度較差，另震盪萃取不足以破壞杏鮑菇子實體粉末之細胞壁，致麥角硫因萃取量明顯較低。

在腺苷萃取量方面，由表五結果顯示，超音波萃取方法具有最高之萃取量 (3.742 mg/g dw)；其次是熱水及微波萃取方法，腺苷萃取量分別為 0.994 和 0.940 mg/g dw，兩者並無統計差異；另乙醇萃取方法所得之腺苷萃取量 (0.135 mg/g dw) 則明顯低於其他萃取方式。Li 等人(2015)曾指出在北蟲草機能性成分中，腺苷相對較不耐熱；另郭 (2015) 研究亦指出，微波萃取溫度為 60°C 時，可得最佳之腺苷萃取量，而當溫度達 70°C 時，腺苷萃取量明顯降低。本研究超音波萃取方法使用之溫度為 30°C，而熱水及微波萃取方法使用之溫度為 100°C，有可能因溫度較高破壞腺苷，造成萃取量之差異。

在總酚萃取量方面，則以超音波萃取方法所得總酚萃取量最高 (0.300 mg/g dw)；其他依序為熱水萃取法 (0.221 mg/g dw) > 微波萃取法 (0.214 mg/g dw) > 乙醇萃取法 (0.122 mg/g dw)。另在多醣萃取量方面，則以超音波萃取方法所得多醣萃取量最高 (445.130 mg/g dw)；其他依序為微波萃取法 (304.434 mg/g dw) > 熱水萃取法 (223.885 mg/g dw) >> 乙醇萃取法 (0.294 mg/g dw)。

表五、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水和乙醇萃取法麥角硫因、腺苷、總酚和多醣萃取量之比較

Table 5. Content of ergothioneine, adenosine, total phenols and polysaccharide in microwave, ultrasound, hot water and ethanol extract from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

	Content <sup>a</sup> (mg/g dw)			
	MEP <sup>b</sup>	UEP <sup>c</sup>	HWEP <sup>d</sup>	EEP <sup>e</sup>
Ergothioneine	1.639 ± 0.693 A	1.349 ± 0.049 B	1.332 ± 0.070 B	0.195 ± 0.009 C
Adenosine	0.940 ± 0.038 B	3.742 ± 0.168 A	0.994 ± 0.012 B	0.135 ± 0.011 C
Total phenols	0.214 ± 0.003 C	0.300 ± 0.002 A	0.221 ± 0.005 B	0.122 ± 0.002 D
Polysaccharide	304.434 ± 17.006 B	445.130 ± 0.690 A	223.885 ± 18.378 C	0.294 ± 0.027 D

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3) . Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ) .

<sup>b</sup> Microwave extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>c</sup> Ultrasound extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>e</sup> Ethanol extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

綜上所述，利用微波萃取可得最多的麥角硫因萃取量，而利用超音波萃取則可得最多之腺苷、總酚和多醣萃取量，可見微波和超音波這兩種新式萃取方法與熱水和乙醇這兩種傳統萃取方法相較，可萃取出較多杏鮑菇子實體粉末之機能性成分。

#### 四、新式與傳統萃取方法所得多醣分子量之比較

王等人 (1998) 指出多醣分子量在 3,000~5,000 左右者，具有降低血糖之功能；而分子量在 10,000~100,000 之間者，具消炎的作用；分子量在 30,000 以上者，則具有抗腫瘤作用，且分子量愈大效用愈佳。本研究利用膠體滲透層析法來探討新式與傳統萃取方法所得多醣分子量是否有差異。將不同分子量 (6000、10000、21700、47300、113000、210000、366000 及 805000 Da) 之多醣標準品 ( $\alpha$ -D-葡聚糖，pullulan) 打入膠體滲透層析管柱，表六為分子量與滯留時間之對應表，利用標準品分子量之對數值與其在管柱滯留時間繪製出標準曲線，樣品經膠體滲透層析法所得之滯留時間利用上述之標準曲線換算，便可得出樣品之分子量。若樣品中多醣分子量超過或低於標準曲線範圍，則以外插法來預估其分子量。

由圖十可知微波萃取物經膠體層析所得之滯留時間為 6.89 及 8.50 分鐘，經標準曲線換算多醣分子量分別為  $1.22 \times 10^5$  和  $3.06 \times 10^3$  Da (表七)；另超音波萃取物經膠體層析所得之滯留時間分別為 7.12 與 8.56 分鐘，換算得多醣分子量分別  $7.09 \times 10^4$  與  $2.65 \times 10^3$  Da；此兩種萃取方法之膠體層析圖譜類似且多醣分子量相近。由圖十一可知熱水萃取物經膠體層析所得之滯留時間為 7.28 及 8.54 分鐘，換算得多醣分子量分別  $4.96 \times 10^4$  與  $2.81 \times 10^3$  Da，其膠體層析圖譜與微波和超音波類似；另乙醇萃取物經膠體層析所得之滯留時間為 9.35 與 9.84 分鐘，由膠體層析圖譜發現與上述三種萃取法有明顯差異且分子量亦較小，可見乙醇萃取法大多會萃出小分子化合物。

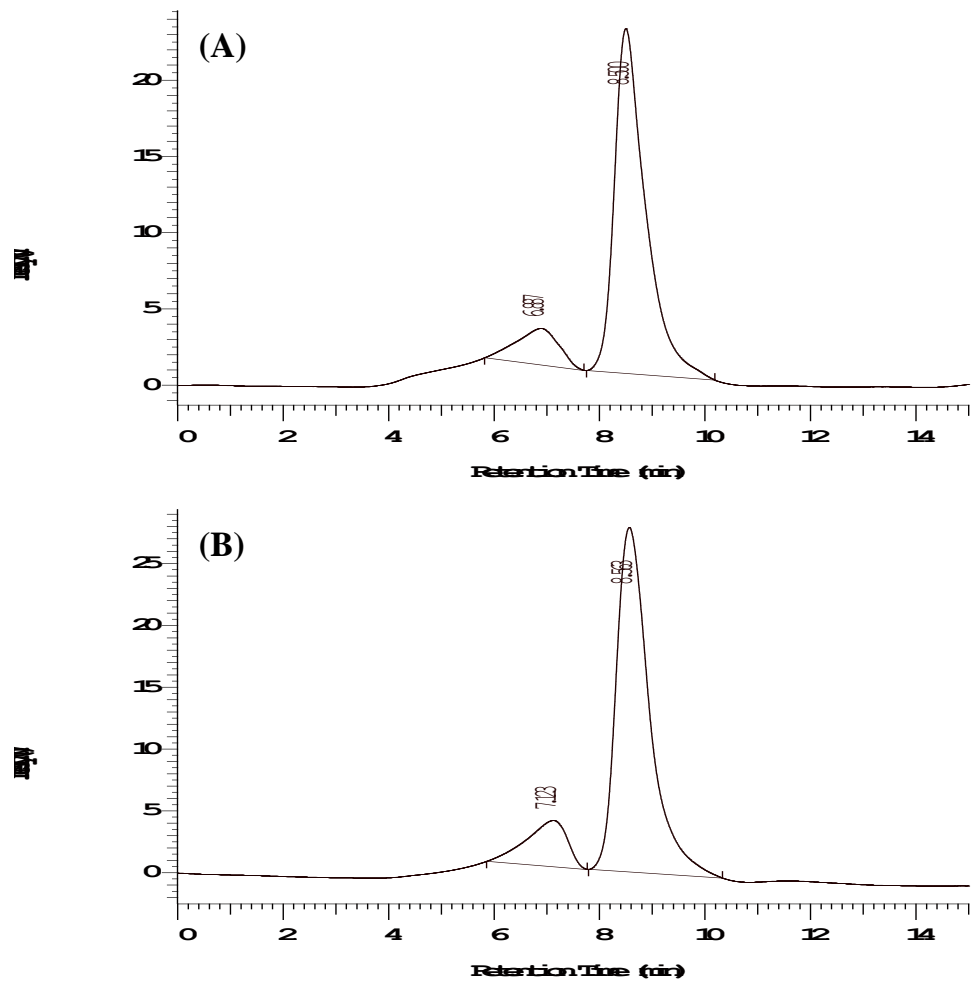
表六、不同分子量多醣體標準品在膠體滲透層析之滯留時間

Table 6. Retention times of standards with different molecular weights by gel permeation chromatography

Molecular weight (Da)	Retention time (min)	Log M.W. <sup>a</sup>
6000	8.030	3.78
10000	7.913	4.00
21700	7.723	4.34
47300	7.463	4.67
113000	7.100	5.05
210000	6.737	5.32
366000	6.313	5.56
805000	5.880	5.91

<sup>a</sup> Log molecular weight.





圖十、杏鮑菇子實體粉末微波 (A) 及超音波 (B) 萃提取物之膠體滲透層析圖譜

Figure 10. Chromatograms of microwave (A) and ultrasound (B) extract from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder by gel permeation chromatography

表七、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水、乙醇萃取之多醣分子量

Table 7. Estimation of molecular weights of polysaccharides from microwave, ultrasound, hot water and ethanol extract *Pleurotus eryngii* fruiting body powder by gel permeation chromatography

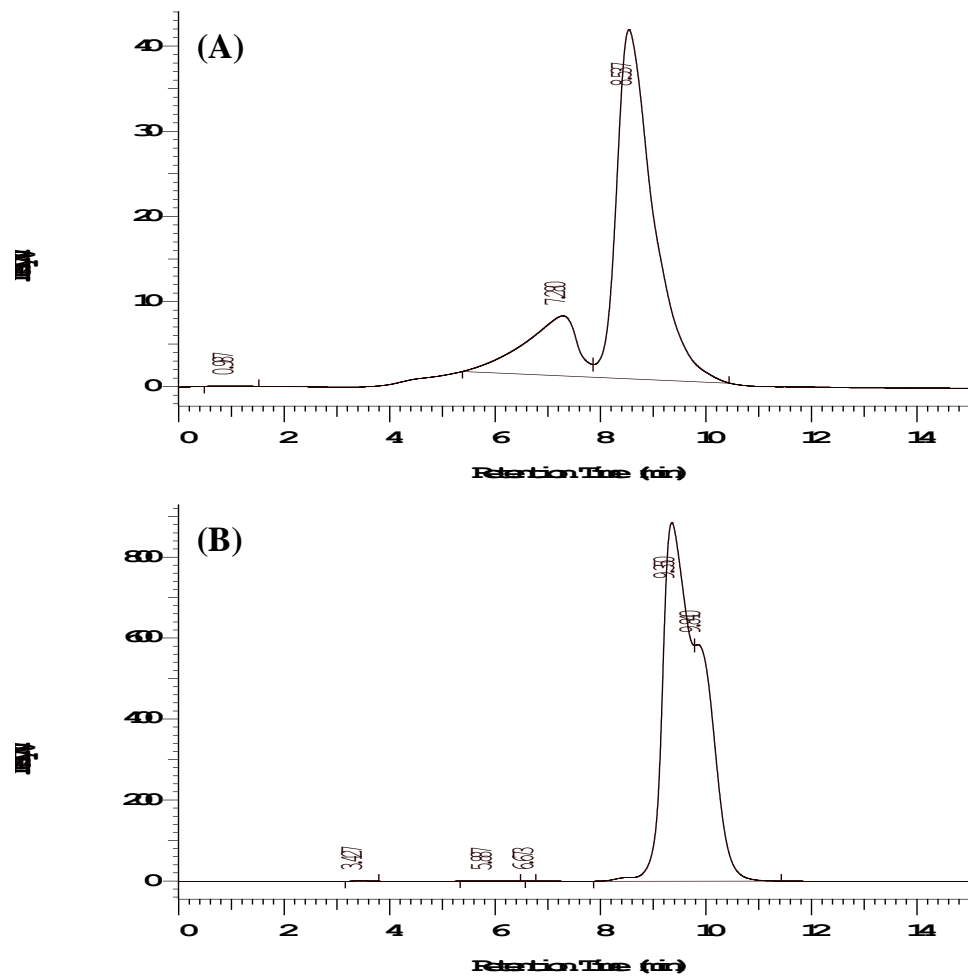
	Retention time (min)	Molecular weight (Da)
MEP <sup>a</sup>	6.89	$1.22 \times 10^5$
	8.50	$3.06 \times 10^3$
UEP <sup>b</sup>	7.12	$7.09 \times 10^4$
	8.56	$2.65 \times 10^3$
HWEP <sup>c</sup>	7.28	$4.96 \times 10^4$
	8.54	$2.81 \times 10^3$
EEP <sup>d</sup>	9.35	$4.39 \times 10^2$
	9.84	$1.43 \times 10^2$

<sup>a</sup> Microwave extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>b</sup> Ultrasound extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>c</sup> Hot water extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>d</sup> Ethanol extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.



圖十一、杏鮑菇子實體粉末熱水 (A) 及乙醇 (B) 萃取出之膠體滲透層析圖譜

Figure 11. Chromatograms of hot water (A) and ethanol (B) extract from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder by gel permeation chromatography

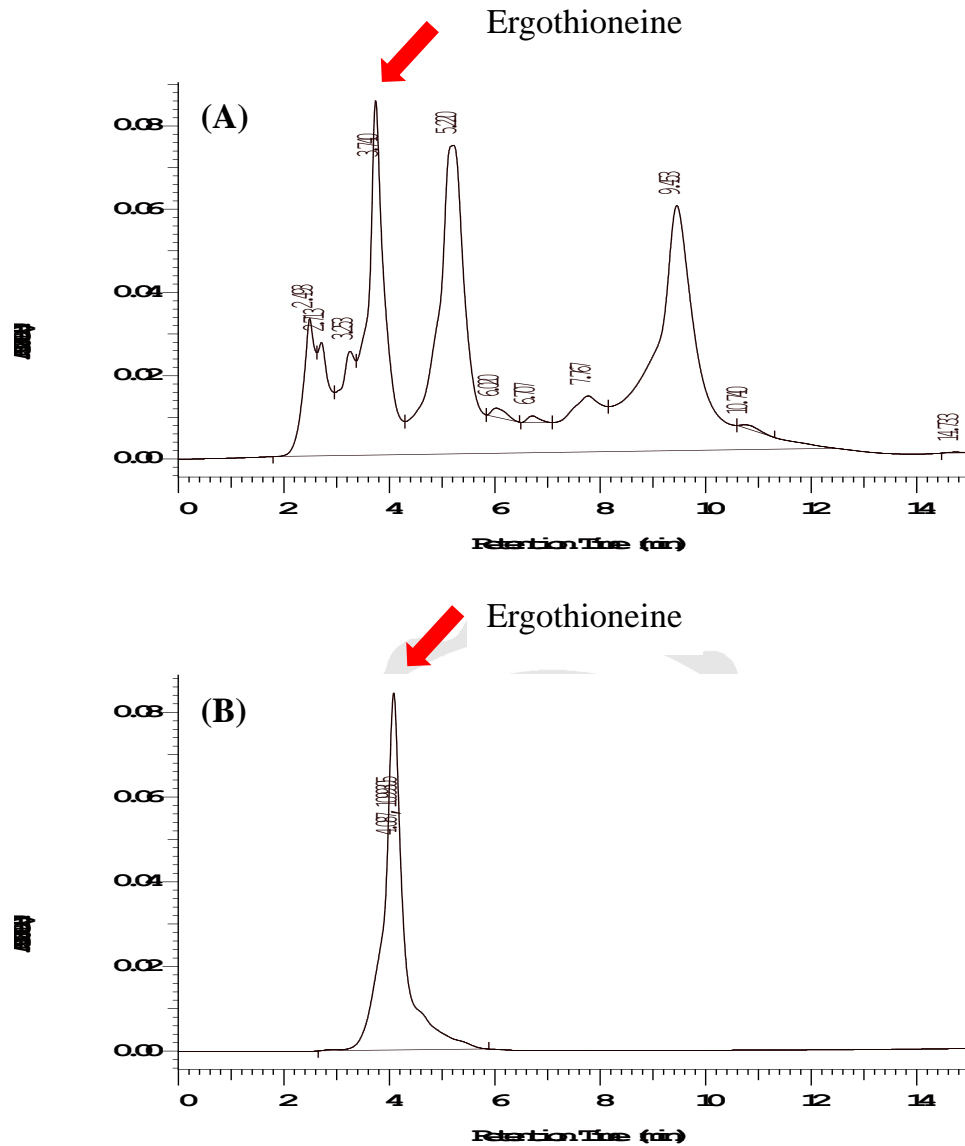
## 五、麥角硫因之純化

有文獻指出可利用酵素分解和特定孔徑之通透膜透析，來提高洋菇子實體乾燥粉末中麥角硫因含量(Cremades *et al.*, 2015)；但尚未有文獻對菇類麥角硫因進行純化及利用其標準品和純化物進行體外抗氧化性試驗。因此，本研究旨在建立麥角硫因純化方法，以提高萃取液中麥角硫因之純度。

由先前之結果可知微波萃取方法可獲得最高之麥角硫因萃取量(1.639 mg/g dw)，因此，選用微波萃取液作為純化之原液。圖十二 (A) 為合併四次微波萃取液之麥角硫因圖譜，由圖可知麥角硫因標準品之滯留時間為 3.8 分鐘左右 (紅色箭頭標示處)，另由圖可看出微波萃取液仍存在許多雜質。此外，由先前之表五可知在微波萃取液中約有 30% 多醣，因多醣具有極佳的保水性，使萃取液無法濃縮至更高濃度，故步驟中會於微波萃取液中加入 4 倍體積之 95% 乙醇，靜置隔夜讓多醣沉澱，以去除多醣。

利用酒精沉澱去掉大部分多醣，過濾後取上清液，於 50°C 下進行減壓濃縮，約濃縮 20 倍；以高濃縮液進行製備型管柱純化，較不會造成樣品擴散。麥角硫因在 HyperClone® 製備型管柱中之滯留時間約為 25 分鐘，故收集 25 分鐘左右之分液管，配合分析型管柱分析，將含麥角硫因之區分液收集，合併後再予以濃縮定量，即可得到麥角硫因純化物，由圖十二 (B) 可看出純化物之其他雜質幾乎都已去除。

表八顯示在不同純化步驟過程 (微波萃取、酒精沉澱與製備管柱純化) 之麥角硫因濃度、總量、純度及產率。20 克之杏鮑菇子實體粉末經微波萃取後，麥角硫因總量為 32.803 mg；經酒精沉澱及離心去除多醣與雜質後，麥角硫因總量為 32.316 mg；再經製備管柱純化後，麥角硫因總量為 9.204 mg，產率剩下 28.06%。產率驟降之可能原因有二：一是區分液收集過程流失，另一則可能是純化初期雜質多與麥角硫因滯留時間重疊造成高估。此外，在麥角硫因純度方面，純度是以高效



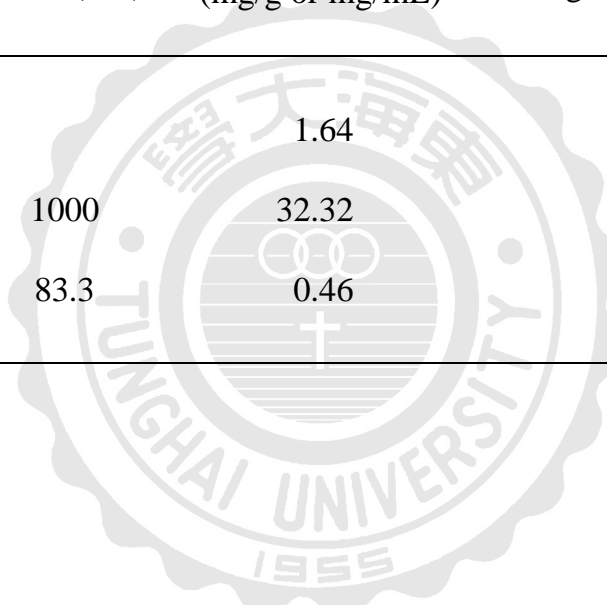
圖十二、杏鮑菇子實體粉末微波萃取後 (A) 及經微波萃取和管柱純化後 (B) 之 HPLC 圖譜

Figure 12. HPLC chromatograms of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder extract obtained by microwave extraction (A) and microwave extraction /HyperClone® column purification (B)

表八、麥角硫因分離純化總表

Table 9. Ergothioneine purity and yields of the different steps from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

	Dry weight (g)	Value (mL)	Ergothioneine (mg/g or mg/mL)	Ergothioneine (mg)	Purity (%)	Yield (%)
Microwave extraction	20.018		1.64	32.803	24.48	100
Ethanol precipitation		1000	32.32	32.316	25.46	98.51
HyperClone® column purification		83.3	0.46	9.204	99.7	28.06

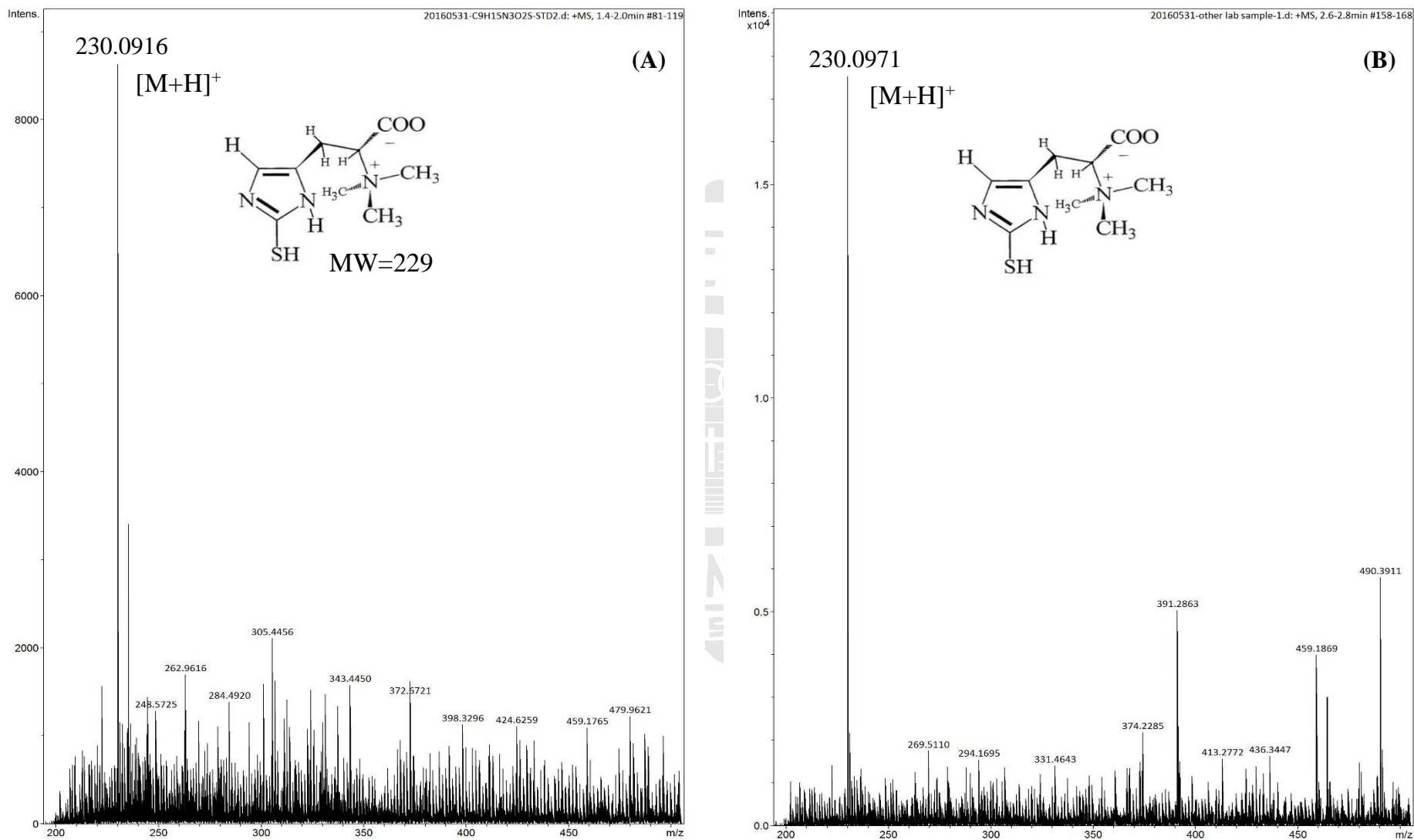


液相層析儀圖譜中麥角硫因面積與全部波峰面積之比值來計算。由表八可知杏鮑菇子實體粉末微波萃取後，麥角硫因純度為 24.48%；利用製備型管柱純化後，麥角硫因之純度則可提高到 99.7%。Cremades 等人 (2015) 利用酵素分解與透析膜分離洋菇粉末之麥角硫因，最後所獲得之凍乾及噴霧乾燥粉末分別含有 118.63 及 55.04 mg/g 麥角硫因，產率分別可達 79.37 和 78.22%；然在純度方面，凍乾和噴霧乾燥粉末則分別僅 11.86 和 5.5%。由上述可知利用透析膜雖能得到較高產率的麥角硫因，但在純度方面卻低於本研究所使用之製備型管柱。

## 六、麥角硫因純化物之 UPLC/Q-TOF 質譜儀鑑定

質譜分析技術係利用分析物種於真空內形成離子後，在電場和磁場之作用下，依照質荷比 ( $m/z$ ) 大小不同而分離；液相層析質譜儀是由液相層析儀、質譜儀與兩系統的介面整合 (interface) 三部分組成。麥角硫因標準品與純化物先以超高壓液相層析法 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 進行化學分離，接著將分離之化合物揮發、氣化形成離子後進入質譜儀，再以四極棒 (quadrupole) 進行離子分類，並串接飛行時間 (time-of-flight 或簡稱 TOF) 質量分析器，最後鑑定其質荷比。四極棒可選擇一定質量範圍之離子進入到 TOF 中，而 TOF 可增加訊號之解析度。因此，利用液相層析搭配質譜儀串接飛行時間質量分析器，針對麥角硫因標準品和純化物進行鑑定。

麥角硫因標準品選用適合於極性較高化合物之電灑法 (electrospray ionization, ESI)，進行選擇性掃描而得到的萃取離子層析圖 (extracted ion chromatogram)，掃描範圍為 0~500  $m/z$ 。由圖十三 A 可獲知麥角硫因標準品  $[M+H]^+$  離子之質荷比為 230.0916  $m/z$ ；另由圖十三 B 可獲知純化物  $[M+H]^+$  離子之質荷比為 230.0971  $m/z$ ；因採用正離子模式來進行分析，故可推知麥角硫因純化物分子量為 229，與標準品所標示之分子量一致，因此，推測純化物為麥角硫因。



圖十三、麥角硫因標準品 (A) 及純化物 (B) 之 Q-TOF/MS 質譜圖

Figure 13. Q-TOF/MS spectrum of ergothioneine standard (A) and purification (B)



## 七、 抗氧化性質分析

文獻指出麥角硫因、腺苷、總酚和多醣具有良好的抗氧化性，因此本實驗以微波、超音波、熱水和乙醇萃取液凍乾後取得的萃取物；以濃度為 0.1~20 mg/mL 進行四種抗氧化性質測定，包括清除 DPPH 自由基、還原力、螯合亞鐵離子能力和總抗氧化能力，並計算出 EC<sub>50</sub> 以比較萃取物之抗氧化力。此外，由四種萃取物機能性成分含量與抗氧化性質，得出兩者之相關性。

### (一) 杏鮑菇子實體各種萃取方法之萃取率

樣品的萃取率會因為萃取的溶劑種類、萃取方式、萃取時間及樣品本身的前處理不同而有所差異 (吳, 2006)。由表九可知杏鮑菇子實體之萃取率依序為超音波萃取>微波萃取>熱水萃取>乙醇萃取，其萃取率分別為 59.82%、49.70%、38.56% 和 10.56%。Bendicho (2012) 研究指出，超音波萃取具有減少不耐熱之機能性成分流失、提高萃取率和增加萃取效果等優點；另 (Gude *et al.*, 2013) 指出微波會透過內部偶極分子快速來回轉動所產生之摩擦熱能，物質內外同時加熱升溫，不需要再經過傳導，故可明顯減少反應時間和提高產物的產率。此外，蔡 (2006) 指出熱水萃取和乙醇萃取率不同可能是因為可溶性物質的極性及熱可破壞細胞壁結構；乙醇可能使細胞壁的醣蛋白變化，反而使可溶性物質不易溶出等因素所導致。

### (二) 杏鮑菇子實體粉末各種萃取物與麥角硫因純化物之抗氧化性質

由上述超音波萃取、微波萃取、熱水萃取及乙醇萃取所得之萃取物與純化所得之麥角硫因純化物，一起進行抗氧化性質探討；由於麥角硫因純化物含量較少，故麥角硫因測試之最高濃度為 1 mg/mL，其餘萃取物則為 20 mg/mL。

表九、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取之萃取率

Table 9. Extraction yield of microwave, ultrasound, hot water and ethanol extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

	Extraction (%) <sup>a</sup>
MEP <sup>b</sup>	49.70 ± 2.87 B
UEP <sup>c</sup>	59.82 ± 0.43 A
HWEP <sup>d</sup>	38.56 ± 0.62 C
EEP <sup>e</sup>	10.56 ± 0.36 D

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=4). Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Microwave extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

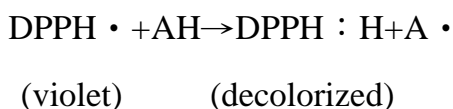
<sup>c</sup> Ultrasound extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>e</sup> Ethanol extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

## 1. 四種萃取物與麥角硫因純化物清除1,1-二苯基-2-苦味肼基團自由基能力

1,1-二苯基-2-苦味肼基團自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)是一種具有不成對電子的穩定自由基，它常被用於抗氧化的研究上。DPPH 的甲醇溶液在 517 nm 下具強吸光效果，一旦被抗氧化劑(AH) 或自由基(R·) 還原後，其吸光值會消失或降低(Brand-Williams *et al.*, 1995)。

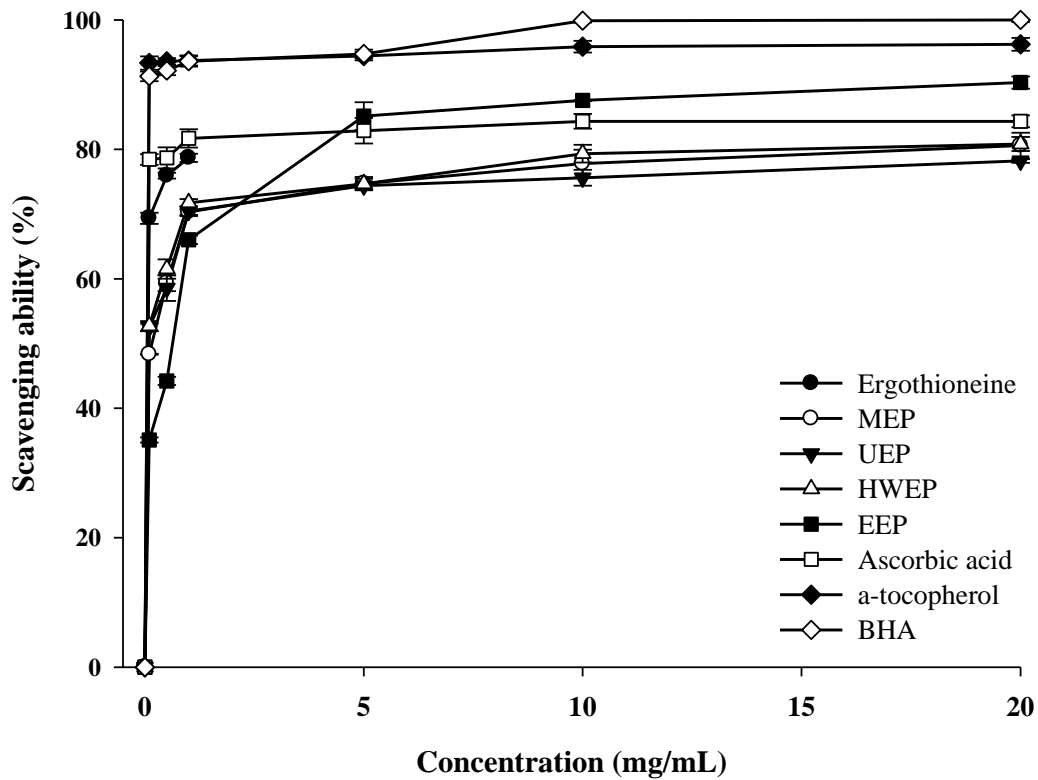


此方法可在短時間內測試大量樣品，且低濃度下仍具有極佳的靈敏度，藉由波長於 517 nm 下吸光值之變化，經由公式計算即可獲知待測樣品清除自由基的能力。此外，DPPH 甲醇溶液在 pH 5.0~6.5 較穩定而有適當的吸收，但在鹼性下較不穩定；另 DPPH 甲醇溶液會隨著儲存時間的增長而劣化，故每次進行實驗時需新鮮配置 (曾，2004)。

由圖十四和表十可知，四種萃取物之清除 DPPH 自由基之能力會隨著樣品濃度增加而隨之上升；當濃度為 1 mg/mL 時，DPPH 清除率依序為麥角純化物(78.70%)>熱水萃取物(52.70%)≡超音波萃取物(52.52%)>微波萃取物(48.35%)>乙醇萃取物(35.10%)。另當濃度為 20 mg/mL 時，乙醇萃取物之 DPPH 清除率效果最佳，依序為乙醇萃取物(90.33%)>微波萃取物(80.58%)≡熱水萃取物(80.83%)>超音波萃取物(78.21%)；乙醇萃取物效果優於抗壞血酸標準品(84.33%)。此外，麥角硫因純化物濃度為 1 mg/mL 時，其 DPPH 清除率為 78.70%，顯著高於乙醇等四種萃取物(66.03-71.73%)。

## 2. 四種萃取物與麥角硫因純化物之還原力

還原力之測定主要是藉由赤血鹽 (potassium ferricyanide,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) 還原成黃血鹽 ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) 後，再與三價鐵離子作用成普魯士藍(Prussian blue,  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ )，並於波長 700 nm 下，測普魯士



圖十四、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫因純化物清除 1,1-二苯基-2-苦味肼基團自由基能力

Figure 14. Scavenging ability of microwave, ultrasound, hot water and ethanol extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder and purified ergothioneine on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals.

Each value is expressed mean  $\pm$  SD (n=3).

表十、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫因純化物之清除 1,1-二苯基-2-苦味肼基團能力

Table 10. Scavenging ability of microwave, ultrasound, hot water and ethanol extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder and purified ergothioneine on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals.

Amount (mg/mL)	Scavenging ability (%) <sup>a</sup>							
	Ascorbic acid	$\alpha$ -tocopherol	BHA	Ergothioneine	MEP <sup>b</sup>	UEP <sup>c</sup>	HWEP <sup>d</sup>	EEP <sup>e</sup>
0.1	78.44 ± 0.84 C	93.35 ± 1.03 B	91.29 ± 0.75 A	69.36 ± 0.86 D	48.35 ± 0.06 F	52.52 ± 0.59 E	52.70 ± 0.77 E	35.10 ± 0.39 G
0.5	78.69 ± 1.62 B	93.60 ± 0.49 A	92.16 ± 0.71 A	75.94 ± 0.45 C	59.33 ± 1.23 E	58.55 ± 1.97 E	61.51 ± 1.50 D	44.22 ± 0.63 F
1	81.70 ± 1.42 B	93.73 ± 0.78 A	93.60 ± 0.81 A	78.70 ± 0.64 C	70.31 ± 0.45 E	70.46 ± 0.75 E	71.73 ± 0.60 D	66.03 ± 0.65 F
5	82.89 ± 1.98 C	74.42 ± 0.66 A	94.73 ± 0.67 A		74.71 ± 1.02 D	74.38 ± 0.41 D	74.66 ± 0.80 D	85.15 ± 2.14 B
10	84.33 ± 1.14 D	95.86 ± 0.91 B	99.87 ± 0.28 A		77.80 ± 2.15 E	75.61 ± 1.23 F	79.33 ± 1.37 E	87.55 ± 0.07 C
20	84.33 ± 0.92 D	96.24 ± 0.99 B	100.00 ± 0.32 A		80.58 ± 2.00 E	78.21 ± 0.30 F	80.83 ± 1.09 E	90.33 ± 0.94 C

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3). Means with different letters within a row are significantly different (P<0.05).

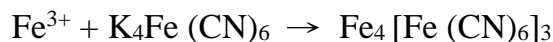
<sup>b</sup> Microwave extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>c</sup> Ultrasound extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>e</sup> Ethanol extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

藍之生成量；由普魯士藍的生成量來判定樣品的還原力，當樣品的吸光值越高，表示其還原力越強(Oyaizu, 1986)。其反應式如下：



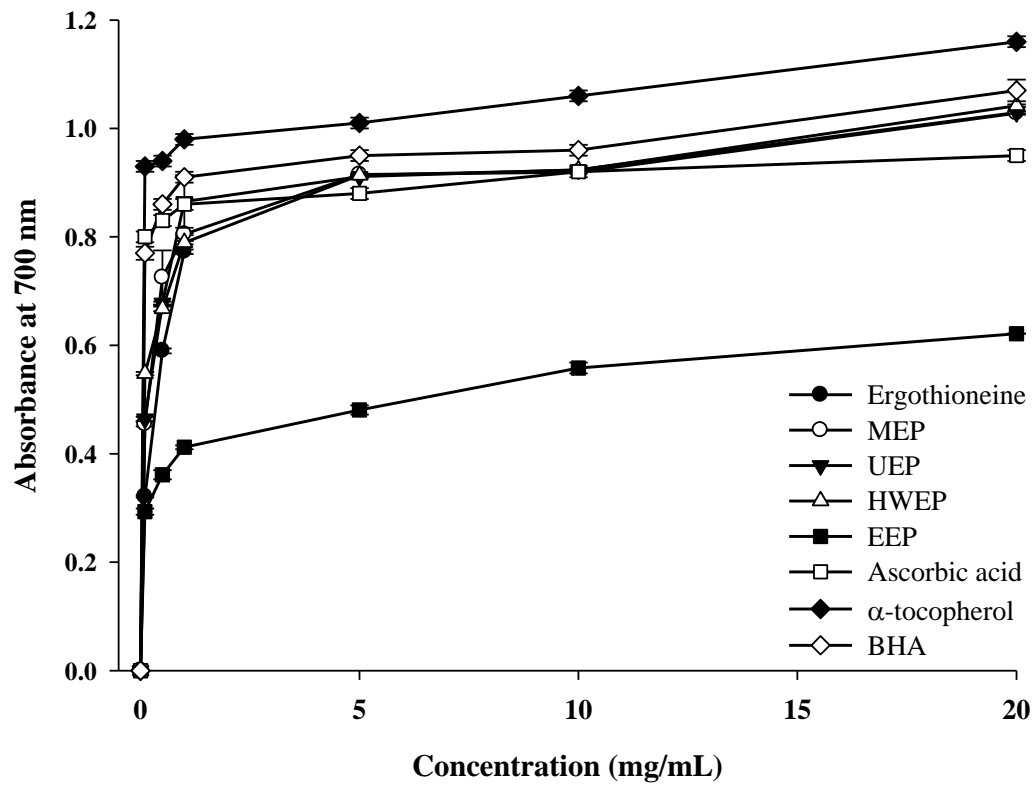
由圖十五及表十一可知，四種萃取物之還原力會隨著樣品濃度增加而隨之上升；當萃取物濃度為 1 mg/mL 時，其還原力依序為超音波萃取物(0.87)>微波萃取物(0.80)≐熱水萃取物(0.79)≐麥角硫因純化物(0.77)>>乙醇萃取物(0.41)；當濃度為 20 mg/mL 時，其還原力依序為超音波萃取物(1.04) ≐微波萃取物(1.03) ≐熱水萃取物(1.03) >乙醇萃取物(0.62)。此外，麥角硫因純化物濃度為 1 mg/mL 時，其還原力為 0.77，明顯高於乙醇萃取物(0.41)，與熱水萃取物相近(0.79)，另略低於超音波萃取物(0.87)和微波萃取物(0.80)。

### 3. 四種萃取物與麥角硫因純化物之螯合亞鐵能力

金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要因素之一，藉由 redox cycle 反應，只要少量的金屬離子存在便會產生自由基。脂質氧化的起始反應除可由自由基引發外，另亦可由金屬離子引發且只需少量即可產生大量自由基，加速脂質的氧化反應，進而對人體造成傷害 (Halliwell *et al.*, 1995)。當銅、鐵、鉛、鉻、鋅和錳等金屬離子存在時，對油脂氧化作用具有催化的效果，其中鐵離子是最具影響力之助氧化劑。本實驗利用  $\text{Fe}^{2+}$  與 ferrozine 形成之複合物，在 562 nm 下偵測其呈色反應，進而獲知樣品對  $\text{Fe}^{2+}$  離子之螯合能力，樣品若能螯合  $\text{Fe}^{2+}$  離子時，其吸光值會降低(Dinis *et al.*, 1994)。



由圖十六和表十二可知，四種萃取物之螯合亞鐵能力會隨著濃度之增加而提高，當濃度為 1 mg/mL 時，依序為微波萃取物(77.98%)>超音波萃取物(73.35%)>熱水萃取物(70.34%)>乙醇萃取物(41.40%)；另當



圖十五、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫因純化物之還原力

Figure 15. Reducing power of microwave, ultrasound, hot water and ethanol extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder and purified ergothioneine

Each value is expressed mean  $\pm$  SD (n=3).

表十一、杏鮑菇子實體粉末微波萃取、超音波萃取、熱水萃取及乙醇萃取物和麥角硫因純化物之還原力

Table 11. Reducing power of microwave, ultrasound, hot water and ethanol extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder and ergothioneine purified

Reducing power (Absorbance at 700 nm) <sup>a</sup>									
Amount (mg/mL)	Ascorbic acid	$\alpha$ -tocopherol	BHA	Ergothioneine	MEP <sup>b</sup>	UEP <sup>c</sup>	HWEP <sup>d</sup>	EEP <sup>e</sup>	
0.1	0.80 ± 0.01 B	0.93±0.01 A	0.77 ±0.01 C	0.32 ±0.01 G	0.45 ±0.01 F	0.46 ±0.01 E	0.55 ±0.01 D	0.29 ± 0.01 H	
0.5	0.83 ± 0.01 C	0.94±0.01 A	0.86 ±0.01 B	0.59 ±0.01 F	0.72 ±0.05 D	0.68 ±0.01 E	0.67 ±0.01 E	0.36 ± 0.01 G	
1	0.86 ± 0.01 C	0.98±0.01 A	0.91 ±0.01 B	0.77 ±0.01 E	0.80 ±0.01 D	0.87 ±0.05 C	0.79 ±0.01 DE	0.41 ± 0.01 F	
5	0.88 ± 0.01 E	1.01±0.01 A	0.95 ±0.01 B		0.91 ±0.01 C	0.91 ±0.01 D	0.91 ±0.01 D	0.48 ± 0.01 F	
10	0.92 ± 0.01 C	1.06±0.01 A	0.96 ±0.01 B		0.92 ±0.01 C	0.92 ±0.01 C	0.92 ±0.01 C	0.56 ± 0.01 D	
20	0.95 ± 0.01 E	1.16±0.01 A	1.07 ±0.02 B		1.03 ±0.01 D	1.03 ±0.01 D	1.04 ±0.01 C	0.62 ± 0.01 F	

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3). Means with different letters within a row are significantly different (P<0.05).

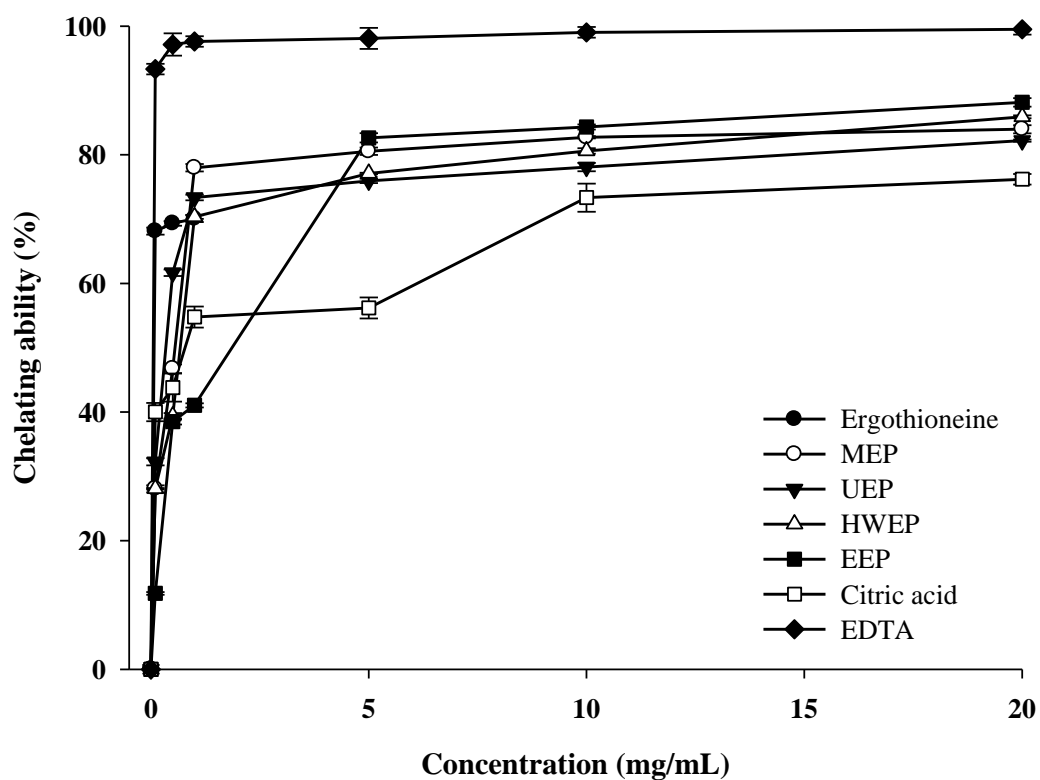
<sup>b</sup> Microwave extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>c</sup> Ultrasound extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>e</sup> Ethanol extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.





圖十六、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫因純化物對亞鐵離子之螯合能力

Figure 16. Chelating ability of microwave, ultrasound, hot water and ethanol extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder and purified ergothioneine on ferrous ions. Each value is expressed mean  $\pm$  SD (n=3).

表十二、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫因純化物對亞鐵離子之螯合能力

Table 12. Chelating ability of microwave, ultrasound, hot water and ethanol extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder and purified ergothioneine on ferrous ions

Amount		Chelating ability (%) <sup>a</sup>						
(mg/mL)	Citric acid	EDTA	Ergothioneine	MEP <sup>b</sup>	UEP <sup>c</sup>	HWEP <sup>d</sup>	EEP <sup>e</sup>	
0.1	40.00 ± 1.42 C	93.33 ± 0.82 A	68.13 ± 0.56 B	28.06 ± 0.55 E	32.26 ± 0.54 D	28.07 ± 0.10 E	11.80 ± 0.22 F	
0.5	43.80 ± 2.18 E	97.14 ± 1.74 B	69.32 ± 0.35 B	46.73 ± 0.67 D	61.67 ± 0.51 C	39.36 ± 0.47 F	38.52 ± 0.47 G	
1	54.76 ± 1.64 E	97.61 ± 0.82 A	70.08 ± 0.54 D	77.98 ± 0.58 B	73.35 ± 0.44 C	70.34 ± 0.30 D	41.04 ± 0.34 F	
5	56.19 ± 1.64 F	98.09 ± 1.64 A		80.55 ± 0.58 C	75.94 ± 0.35 E	77.10 ± 0.11 D	82.64 ± 0.72 B	
10	73.33 ± 2.18 F	99.04 ± 0.82 A		82.72 ± 0.18 C	76.85 ± 0.64 E	80.59 ± 0.42 D	84.32 ± 0.39 B	
20	76.19 ± 0.82 E	99.52 ± 0.82 A		83.97 ± 0.63 C	77.04 ± 0.16 D	85.89 ± 0.22 C	88.15 ± 0.66 B	

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3). Means with different letters within a row are significantly different (P<0.05).

<sup>b</sup> Microwave extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>c</sup> Ultrasound extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>e</sup> Ethanol extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

濃度為20 mg/mL時，則以乙醇萃取物效果最佳，依序為乙醇萃取物(88.15%)>熱水萃取物(85.89%)≡微波萃取物(83.97%)>超音波萃取物(77.04%)，這四種萃取物之螯合亞鐵能力皆高於檸檬酸標準品(76.19%)。此外，麥角硫因純化物濃度為1 mg/mL時，其螯合亞鐵能力為70.08%，高於乙醇萃取物(41.04%)，與熱水萃取物(70.34%)相近，另略低於微波萃取物(77.98%)和超音波萃取物(73.35%)；麥角硫因雖可螯合二價金屬離子，但文獻指出主要是以銅和鋅離子居多(Hanlon, 1971; Motohashi *et al.*, 1976)，故有可能在螯合亞鐵離子表現較弱或微波和超音波萃取物中含有較多螯合亞鐵離子成分。

#### 4. 四種萃取物與麥角硫因純化物之抗氧化性質EC<sub>50</sub>

EC<sub>50</sub> (Effective concentration)定義為抗氧化能力達50%所需之濃度，以內差法或外插法計算方式而得，EC<sub>50</sub>愈低表示抗氧化能力愈好(葉, 2009)。計算出萃取物之抗氧化性質EC<sub>50</sub>後，合併微波、超音波、熱水和乙醇等四種萃取方式之萃取率，得到杏鮑菇子實體粉末之抗氧化性質EC<sub>50</sub>。

表十三為四種萃取物和麥角硫因純化物之清除DPPH自由基、還原力與螯合亞鐵離子之EC<sub>50</sub>值。在清除DPPH自由基能力方面，EC<sub>50</sub>值依序為麥角硫因純化物(0.07 mg/mL)≡熱水萃取物(0.09 mg/mL) ≡超音波萃取物(0.10 mg/mL)>微波萃取物(0.16 mg/mL)>乙醇萃取物(0.63 mg/mL)。在還原力方面，EC<sub>50</sub>值依序為熱水萃取物(0.09 mg/mL) ≡微波萃取物(0.17 mg/mL) ≡超音波萃取物(0.17 mg/mL) >麥角硫因純化物(0.37 mg/mL) >乙醇萃取物(8.02 mg/mL)。在螯合亞鐵能力方面，EC<sub>50</sub>值依序為麥角硫因純化物(0.07 mg/mL) >超音波萃取物(0.34 mg/mL) >微波萃取物(0.55 mg/mL)>熱水萃取物(0.67 mg/mL) >乙醇萃取物(1.86 mg/mL)。綜上所述，麥角硫因純化物在清除DPPH自由基及螯合亞鐵能力方面有較佳效果，而超音波萃取物則在清除DPPH自由基及螯合亞鐵

表十三、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫因純化物之抗氧化性質 EC<sub>50</sub>

Table 13. EC<sub>50</sub> value of microwave, ultrasound, hot water and ethanol extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder and purified ergothioneine in antioxidant properties

	EC <sub>50</sub> value (extract mg/mL) <sup>ab</sup>					
	Ergothioneine	MEP <sup>c</sup>	UEP <sup>d</sup>	HWEP <sup>e</sup>	EEP <sup>f</sup>	
Scavenging ability on DPPH radicals	0.07 ± 0.01 C	0.16 ± 0.01 B	0.10 ± 0.01 C	0.09 ± 0.01 C	0.63 ± 0.01 A	
Reducing power	0.37 ± 0.01 B	0.17 ± 0.01 BC	0.17 ± 0.01 BC	0.09 ± 0.01 C	8.02 ± 0.25 A	
Chelating ability on ferrous ions	0.07 ± 0.01 E	0.55 ± 0.01 C	0.34 ± 0.01 D	0.67 ± 0.01 B	1.86 ± 0.03 A	

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3). Means with different letters within a row are significantly different (P<0.05).

<sup>b</sup> EC<sub>50</sub> value: the effective concentration at which the absorbance was 0.5 for reducing power; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals were scavenged by 50%; and freeous ions were chelated by 50%, respectively. EC<sub>50</sub> value was obtained by interpolation from linear regression analysis.

<sup>c</sup> Microwave extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>d</sup> Ultrasound extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>e</sup> Hot water extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>f</sup> Ethanol extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

離子能力有較佳之效果；另熱水萃取物則在清除 DPPH 自由基及還原力方面效果較佳。

## 5. 四種萃取物之總抗氧化力 (TEAC)

總抗氧化力 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TECA) 常用於測定生物樣品的抗氧化能力，總抗氧化力主要使用 ABTS 自由基來進行測試。ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ] 是一種穩定的自由基，在吸光值 734 nm 下可被偵測到(Loganathan *et al.*, 2008)。因 ABTS<sup>•+</sup> 自由基可溶於水及有機溶劑中且不被離子強度所影響，故總抗氧化力可用於親水性及親油性物質之抗氧化力測定 (Huang *et al.*, 2006; Robin *et al.*, 1999)。此方法是以 ABTS 與過硫酸鉀 (potassium peroxydisulfate, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 氧化後生成穩定的藍綠色陽離子自由基 ABTS<sup>•+</sup>，當加入含有抗氧化成分之樣品時，抗氧化成分會快速與 ABTS<sup>•+</sup> 發生反應而使 ABTS<sup>•+</sup> 褪色，然後在 734 nm 下檢測吸光值，以維他命 E 之衍生物 trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid) 作為標準品，進而換算出待測物質之總抗氧化能力 (Re *et al.*, 1999)。

由表十四可知，乙醇萃取物之 Trolox 當量抗氧化能力為 121.30 μmole Trolox/g，明顯高於微波萃取物 (46.48 μmole Trolox/g)、超音波萃取物 (45.55 μmole Trolox/g) 和熱水萃取物 (44.52 μmole Trolox/g)；梁 (2005) 指出蔬菜的 Trolox 當量抗氧化能力可分為三個等級：(1) 低等：TEAC 當量低於 3 mmole Trolox/g；(2) 中等：TEAC 當量介於 3~5 mmole Trolox/g；(3) 高等：TEAC 當量高於 5 mmole Trolox/g。若使用此分類，杏鮑菇子實體粉末之微波、超音波、熱水和乙醇萃取物，其 Trolox 當量抗氧化力均屬於低等。

表十四、杏鮑菇子實體粉末微波、超音波、熱水及乙醇萃取物中 Trolox 當量抗氧化能力

Table 14. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of microwave, ultrasound, hot water and ethanol extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting body powder

	TEAC ( $\mu\text{mole Trolox/g powder}$ ) <sup>a</sup>		
MEP <sup>b</sup>	142.66	$\pm$	0.06 C
UEP <sup>c</sup>	144.97	$\pm$	0.02 C
HWEP <sup>d</sup>	188.64	$\pm$	0.02 B
EEP <sup>e</sup>	758.73	$\pm$	0.09 A

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). Means with different letters within a row are significantly different (P<0.05).

<sup>b</sup> Microwave extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>c</sup> Ultrasound extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

<sup>e</sup> Ethanol extract of *Pleurotus eryngii* fruiting body powder.

## 6. 機能性成分與抗氧化力測定之相關係數

相關性可依相關係數大小分成高度、中度和低度相關 (毛, 2008), (1) 高度相關性:  $r \leq -0.7$  或  $r \geq 0.7$ , 但  $r^2 \geq 0.49$ ; (2) 中度相關性:  $-0.7 < r \leq -0.4$  或  $0.4 \leq r < 0.7$ , 但  $0.49 > r^2 \geq 0.16$ ; (3) 低度相關性:  $-0.4 < r < 0.4$ , 但不為 0。

由表十五中可看出, 麥角硫因、總酚和多醣與抗氧化力皆有不錯的相關係數, 僅腺苷與抗氧化力相關性較差, 仍具有中高度相關性。在麥角硫因方面, 與清除 DPPH 自由基、還原力、螯合亞鐵離子和 TEAC 之相關係數分別為 0.965、0.923、0.925 和 0.923。另在總酚方面, 與清除 DPPH 自由基、還原力、螯合亞鐵離子和 TEAC 之相關係數分別為 0.908、0.805、0.965 和 0.805。另外, 在多醣方面, 與清除 DPPH 自由基、還原力、螯合亞鐵離子和 TEAC 之相關係數分別為 0.850、0.722、0.984 和 0.722。此外, 在腺苷方面, 與清除 DPPH 自由基、還原力、螯合亞鐵離子和 TEAC 之相關係數分別為 -0.951、-0.580、-0.833 和 -0.761。

Lee 等人 (2007) 年發現樣品中抗氧化性質與其總酚含量呈現中度至高度相關 ( $r = 0.425 \sim 0.948$ ), 而 Tasi 等人 (2007) 指出樣品之抗氧化性質與其總酚具有中度到高度相關性 ( $r = 0.636 \sim 0.907$ )。Guo 等人 (2012) 研究指出杏鮑菇總酚含量與螯合亞鐵離子能力具有高度相關性 ( $r = 0.728$ ); 另杏鮑菇多醣與 TEAC 及螯合亞鐵之相關性較差, 但在杏鮑菇多醣於清除 DPPH 自由基方面具有不錯的效果 (Chen *et al.*, 2015)。

表十五、機能性成分與抗氧化力測定之相關係數

Table 15. Correlation between functional contents and antioxidant assays

	Scavenging ability on DPPH radicals	Reducing power	Chelating ability on ferrous ions	TEAC
Ergothioneine	0.889	0.923	0.965	-0.951
Adenosine	0.587	0.548	0.699	-0.580
Total phenols	0.817	0.805	0.908	-0.833
Polysaccharide	0.726	0.722	0.850	-0.761





## 第五章 結論

本研究主要探討杏鮑菇子實體麥角硫因之新型萃取方式，包括微波與超音波萃取方法，利用一次一因子方式來進行，並與傳統熱水與乙醇萃取方法比較；此外，亦利用製備型管柱來純化麥角硫因，並對上述四種萃取物和純化物之抗氧化性質進行評估。研究結果顯示，當杏鮑菇子實體微波萃取功率為 600W、時間 40 min、固液比 1：40 g/mL、溫度為 100°C 時，可得最高麥角硫因萃取量；另當超音波萃取功率為 640W、時間 10 min、固液比 1：30 g/mL、溫度為 30°C 時，可得最高麥角硫因萃取量。此外，本研究以杏鮑菇子實體粉末經微波萃取及製備型管柱純化，以獲得麥角硫因純化物，其純度和產率分別 99.7% 和 28.06%；純化物經 UPLC/Q-TOF/MS 鑑定，質荷比為 230.09  $m/z$ ，與標準品一致。

另本研究亦針對微波、超音波、熱水及乙醇萃取物和麥角硫因純化物進行抗氧化性質測定；當萃取物濃度為 20 mg/mL 時，在清除 DPPH 自由基、螯合亞鐵離子能力和總抗氧化能力方面，乙醇萃取物明顯高於其他萃取物；另還原力則以熱水萃取物效果最佳。而麥角硫因純化物於清除 DPPH 自由基能力具有不錯的表現，在還原力與螯合亞鐵離子能力中，低濃度之麥角硫因可達到過半抑制能力。此外，由  $EC_{50}$  值可得知，麥角硫因純化物及超音波萃取物在清除 DPPH 自由基及螯合亞鐵能力方面有較佳效果，而熱水萃取物則在清除 DPPH 自由基及還原力方面效果較佳。

## 第六章 參考文獻

- 方允中，鄭榮梁。2002。自由基生物學的理論與應用。北京科學出版社。北京，中國。
- 毛正倫。2008。實用統計技術。華騰出版社。台北。台灣。
- 水野卓、川合正允。賴慶亮譯。1997。菇類的化學、生化學。國立編譯館。台北。台灣。
- 王世遠、趙國強。1994。天然營養保健品—栗子磨。中國食用菌。
- 王伯徹、陳啟楨、華傑。1998。食藥用菇類的培養與應用。食品工業發展研究所報告。第M-87-019號，187頁。新竹。台灣。
- 王慶志、孫平。2008。微波技術在食品工業中的應用。河北農業科學，12 (12) : 54-55。
- 王曉捷。2009。脫脂淘汰雞胸肉與鵝胸肉水解物抗氧化性之探討。東海大學食品科學系碩士論文。台中。台灣。
- 左艷芳。2004。食品學。慧華圖書出版有限公司。台北。台灣。多醣分子量
- 朱洵維。2003。荷葉乙醇萃取物抗氧化性之探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北，台灣。
- 何公瑞。2009。以固態發酵製備麥角硫因含量知杏鮑菇穀類及其呈味性質與生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科系學系碩士論文。台中，台灣。
- 吳彩平。2006。以固態發酵製備樟芝米及其品質與抗氧化性質。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。台中。台灣。
- 吳瓊、鄭成、寧正祥、董華強、余麗靜。2006。微波輔助萃取銀耳多醣的研究。食品科技，31 (9) : 109-111。
- 呂淑芳，宮昭雲，傅偉光。2001。靈芝中之水溶性多醣分析方法之研究。台灣農業化學與食品科學。39 (2) : 153-161。
- 李核、李攻科、張展霞。2003。微波輔助萃取技術的進展。分析化學，10 : 1261-1268。
- 李曉貝、周峰、楊焱、馮傑、劉豔芳、馮濤。2015。栽培基質對杏鮑菇子實體蛋白質營養價值的影響。食品科學。36 (23) : 262-267。
- 谷絨。2010。超聲波和微波法對木耳多醣提取量的比較。食品研究與開發，31 (3) : 23-25。

- 周軍。2010。糖尿病肝損傷防治的初步研究。江蘇大學碩士論文。江蘇，中國。
- 孟慶華、於曉霞、張海鳳。2012。天然黃酮類化合物清除自由基機理及其應用進展。雲南民族大學學報自然科學版。21 (2) : 79-83。
- 林欣儀。2008。以固態發酵製備舞菇小麥及其品質與抗氧化性質。國立中興大學食品科學系碩士論文。台中，台灣。
- 邱家豪。2007。飼料中添加不同維生素 E 含量與類胡蘿蔔素對海鱺成長與體組成之影響。國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文。基隆，台灣。
- 俞苓、劉民勝、陳有容。2003。杏鮑菇子實體和菌絲體營養成分的比較。食用菌。25 (2) : 7-8。
- 紀彥甫。2014。以固態發酵製備蟬花米及其品質與抗氧化性質。東海大學食品科學系碩士論文。台中。台灣。
- 香川芳子。2004。五訂食品成分表。女子營養大學出版部。東京。日本。
- 孫月、卜寧。1999。蛹蟲草蟲草酸蟲草素含量測定與分析。中國食用菌，18 (6) : 19-19。
- 張自萍。2006。微波輔助提取技術在多醣研究中的應用。中草藥，37 (4) : 630-632。
- 張俊艷、賀陽。2012。超氧化物歧化酶研究與應用。食品工業。3: 119-120。
- 張衛國、趙雲濤、劉欣。2003。固體發酵 9519 紫芝菌絲體多醣分子量的分佈。韶關學院學報。24 : 70-72。
- 盛佛、方曉陽。2009。杏鮑菇菌絲體胞內與胞外多醣體外抗氧化活性研究。中國林副特產。1 : 7-10。
- 莊荃與。2006。利用固態發酵法生產超氧歧化酶之研究。國立屏東科技大學食品科學系碩士論文。屏東，台灣。
- 郭盈吟。2015。微波輔助萃取北蟲草機能性成分之最適化條件。東海大學食品科學系碩士論文。台中。台灣。
- 陳啟貞。1993。幾種具開發潛力的新興食用菇介紹。消費者食品資訊 21 : 2-6。
- 陳怡廷。2007。生長於含薑培養基之紅麴菌發酵產物的抗氧化力。實踐大學食品營養與保健生技研究所。台北，台灣。

- 陳美杏、呂昫陞、石信德。2010。新興菇類的栽培發展。科學發展。446：8-15。
- 陳淑德。2013。微波和射頻在菇類固態發酵產物的應用。農業推廣手冊。宜蘭。台灣。
- 陳榮、王學亮、徐環環、孫莉、鬱章玉。2013。菏澤學院學報。山東，中國。3(5)：44-49。
- 曾裕琇。2004。自不同栽培方法所得松杉靈芝產物之生理活性評估。國立中興大學食品科學系博士論文。台中。台灣。
- 黃婉莉。2007。香杉芝之培養及其生理活性與抗氧化性質。國立中興大學食品暨生物科技學系碩士論文。台中。台灣。
- 黃進、楊國宇、李宏基。2004。抗氧化劑作用機制研究進展。自然雜誌。26(2)：74-77。
- 黃鈴娟。2000。樟芝與姬松茸之抗氧化性及其多醣組成分析。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。台中。台灣。
- 黃齡誼。2010。高麥角硫因含量之杏鮑菇菌絲體深層培養及其生理活性。國立中興大學食品暨生物科技學系碩士論文。台中。台灣。
- 楊曉青、秦文峰、羅振中、賀躍輝。2005。微波加熱技術在鈹工業中的應用。中國鈹業，29(2)：43-46。
- 葉展均。2009。以固態發酵製備白樺茸胚芽米及其呈味特性與生理活性。國立中興大學食品暨生物科技學系碩士論文。台中。台灣。
- 葛飛、石貝杰、龔倩、昂安娜、李婉珍、桂林。2015。響應面法優化草菇液態發酵菌絲體中總三萜的微波提取工藝。食品工業科技。36(3)：270-274。
- 廖洪初。2008。杏鮑菇簡易工廠栽培技術。食用菌。37。
- 劉琦、劉琦、姜文俠、周濤。2013。麥角硫因的生物合成與降解代謝。第七屆中國工業生物技術發展高峰論壇論文集。天津。中國。
- 劉福文。2001。環境溫度與飼糧中添加維生素E或抗壞血酸對台灣土雞脂質代謝之影響。國立中興大學畜產學系碩士論文。台中，台灣。
- 蔡依潔。2014。超音波技術於植物性多醣萃取之應用。食品工業發展研究所。46(11)：56-70。
- 蔡淑瑤。2002。靈芝與柳松菇之抗氧化性質和其生理活性。國立中興大學食品科技學系碩士論文。台中，台灣。

- 蔡淑瑤。2006。雞腿菇和花松茸之液態培養及其生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系博士論文。台中。台灣。
- 遲桂榮、徐琳、吳繼衛、邢建欣。2006。杏鮑菇多醣的抗病毒、抗腫瘤研究。萊陽農業學院學報。23 (3) : 174-176。
- 遲桂榮。2007。杏鮑菇多醣對雞群免疫功能調節的研究。安徽農業科學。35 (15) : 4536-4566。
- 蘇素慧，2010。維生素E與辣木葉對炸油惡化小鼠結腸炎病程之影響。嘉南藥理科技大學保健營養系碩士論文。台南，台灣。

- Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O. I., & Halliwell, B. (1991). The antioxidant action of ergothioneine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(1), 10-16.
- Arduini, A., Mancinelli, G., Radatti, G. L., Hochstein, P., & Cadenas, E. (1992). Possible mechanism of inhibition of nitrite-induced oxidation of oxyhemoglobin by ergothioneine and uric acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294(2), 398-402.
- Arts, M. J. T. J., Dallinga, J. S., Voss, H. P., & Haenen, G. R. M. M. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, 88(4), 567-570.
- Aruoma, O. I., Spencer, J. P., & Mahmood, N. (1999). Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine. *Food and Chemical Toxicology*, 37(11), 1043-1053.
- Askari, A., & Melville, B. D. (1962). The Reaction Sequence in Ergothioneine Biosynthesis: Hercynine as an Intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 1615-1618.
- Asmus, K. D., Bensasson, R. V., Bernier, J. L., Houssin, R., & Land, E. J. (1996). One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C. *Biochemical Journal*, 315, 625-629.
- Azmira, J., Zaidula, I. S. M., Rahmana, M. M., Sharifa, K. M., Mohameda, F. Sahenab, A., Jahurulb, M. H. A., Ghafoorc, K., Norulainid, N. A. N., & Omarb, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food*

- Engineering*, 117(4), 426-436.
- Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., & O'Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120(4), 1185-1192.
- Bao, H. N., Ushio, H., & Ohshima, T. (2008). Antioxidative activity and antidiscoloration efficacy of ergothioneine in mushroom (*Flammulina velutipes*) extract added to beef and fish meats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications)*, 56, 10032-10040.
- Bao, H. N. D., Shinomiya, Y., Ikeda, H., & Ohshima, T. (2009). Preventing discoloration and lipid oxidation in dark muscle of yellowtail by feeding an extract prepared from mushroom (*Flammulina velutipes*) cultured medium. *Aquaculture*, 295(3-4), 243-249.
- Basheer, R., Strecker, R. E., Thakkar, M. M., & McCarley, R. W. (2004). Adenosine and sleep-wake regulation. *Progress in Neurobiology*, 73(6), 379-396.
- Bendicho, C., De La Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N., & Lavilla, I. (2012). Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 31, 50-60.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Breene, W. M. (1990). Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of food protection*, 53(10), 883-894.
- Brummel, M. C. (1985). In search of a physiological function for L-ergothioneine. *Medical Hypotheses*, 18(4), 351-370.
- Carlezon, J. W. A., Mague, S. D., & Parow, A. M. (2005). Antidepressant-like effects of uridine and omega-3 fatty acids are potentiated by combined treatment in rats. *Biological Psychiatry*, 57(4), 343-350.
- Carlsson, J., Kierstan, M. P., & Brocklehurst, K. (1974). Reactions of L-ergothioneine and some other aminothiones with 2,2'- and 4,4'-dipyridyl disulphides and of L-ergothioneine with iodoacetamide. 2-

- Mercaptoimidazoles, 2- and 4-thiopyridones, thiourea and thioacetamide as highly reactive neutral sulphur nucleophils. *biochem journal*, 139(1), 221-235.
- Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., & Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225.
- Chang, S. T., & Hayes, W. A. (1978). Nutritional value. In *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Academic Press, New York, 137-165.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (1989). *Edible mushrooms and their cultivation*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Chaudière, J., & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 949-962.
- Chemat, F., Huma, Z., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Chen, P., Yong, Y., Gu, Y., Wang, Z., Zhang, S., & Lu, L. (2015). Comparison of antioxidant and antiproliferation activities of polysaccharides from eight species of medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(3), 287-295.
- Chen, S. Y., Ho, K. J., Hsieh, Y. J., Wang, L. T., & Mau, J. L. (2012). Contents of lovastatin,  $\gamma$ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 274-278.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217-225.
- Chupin, L., Maunu, S. L., Reynaud, S., Pizzi, A., Charrier, B., & Charrier-El Bouhtoury, F. (2015). Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization. *Industrial Crops and Products*, 65, 142-149.
- Cremades, O., Diaz-Herrero, M. M., Carbonero-Aguilar, P., Gutierrez-Gil, J. F.,

- Fontiveros, E., & Bautista, J. (2015). White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. *Food Bioscience*, 10(1), 42-47.
- Dahl, T. A., Midden, W. R., & Hartman, P. E. (1988). Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochemistry and Photobiology*, 47(3), 357-362.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 166, 585-595.
- De Castro, M. D. L., & García-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1-10.
- Dean, J. R. (2012). 2.08 - Microwave Extraction. In Pawliszyn (Ed.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 135-149.
- Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Piga, R., Assunta Dessì, M., & Aruoma, O. I. (2004). L-ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of polyunsaturated fatty acids. *Clinical Nutrition*, 23(2), 183-193.
- Dinis, T. C., Maderia, V. M. C., & Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 315(1), 161-169.
- Dubost, N. J., Beelman, R. B., Peterson, D., & Royse, D. J. (2006). Identification and Quantification of Ergothioneine in Cultivated Mushrooms by Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy. 8(3), 215-222.
- Dubost, N. J., Beelman, R. B., & Royse, D. J. (2007a). Influence of Selected Cultural Factors and Postharvest Storage on Ergothioneine Content of Common Button Mushroom *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach (*Agaricomycetidae*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9(2), 163-176.
- Dubost, N. J., Ou, B., & Beelman, R. B. (2007b). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultured mushrooms and correlation to



- total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2), 727-735.
- Encarnacion, A. B., Fagutao, F., Hirono, I., Ushio, H., & Ohshima, T. (2010). Effects of ergothioneine from mushrooms (*Flammulina velutipes*) on melanosis and lipid oxidation of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications)*, 58, 2577-2585.
- Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Ey, J., Schömig, E., & Taubert, D. (2007). Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6466-6474.
- Franzoni, F., Colognato, R., Galetta, F., Laurenza, I., Barsotti, M., Di Stefano, R., Bocchetti, R., Regoli, F., Carpi, A., Balbarini, A., Migliore, L., & Santoro, G. (2006). An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(8), 453-457.
- Freitag, W., & John, O. (1990). Fast separation of stabilizers from polyolefins by microwave heating. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 175(1), 181-185.
- Frenich, A. G., Torres, M. E., Vega, A. B., Vidal, J. L., & Bolaños, P. P. (2005). Determination of ascorbic acid and carotenoids in food commodities by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7371-7376.
- Gómez-Toribio, V., Martínez, A. T., Martínez, M. J., & Guillén, F. (2001). Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and the influence of Mn<sup>2+</sup>. *European Journal of Biochemistry*, 268(17), 4787-4793.
- Galanakis, C. M. (2013). Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 575-579.
- Ganzler, K., Salgó, A., & Valkó, K. (1986). A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*, 371, 299-306.

- Genghof, D. S., & Damme, O. V. (1964). Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 87, 852-862.
- Giese, J. (1996). Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food technology*, 50(11), 73-81.
- Gomes, C. V., Kaster, M. P., Tomé, A. R., Agostinho, P. M., & Cunha, R. A. (2011). Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(5), 1380-1399.
- Gude, V. G., Patil, P., Martinez-Guerra, E., Deng, S., & Nirmalakhandan, N. (2013). Microwave energy potential for biodiesel production. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 5.
- Guijarro, M. V., Indart, A., Aruoma, O. I., Viana, M., & Bonet, B. (2002). Effects of ergothioneine on diabetic embryopathy in pregnant rats. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1751-1755.
- Guo, Y. J., Deng, G. F., Xu, X. R., Wu, S., Li, S., Xia, E. Q., Li, F., Chen, F., Linga, W. H., & Li, H. B. (2012). Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. *Food & Function*, 3(11), 1195-1205.
- Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., & Aruoma, O. I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1-2), 7-20.
- Hanlon, D. P. (1971). Interaction of ergothioneine with metal ions and metalloenzymes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 14(11), 1084-1087.
- Hartman, P. E. (1990). Ergothioneine as antioxidant. *Methods in Enzymology*, 186, 310-318.
- Hartman, Z., & Hartman, P. E. (1987). Interception of some direct-acting mutagens by ergothioneine. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 10(1), 3-15.
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495-2511.
- Howard, B. (1995). Microwave-assisted process-A promising extraction technique. *American laboratory*, 27(8), 24-26.
- Huang, H. Y., Korivi, M., Chaing, Y. Y., Chien, T. Y., & Tsai, Y. C. (2012).

- Pleurotus tuber-regium Polysaccharides Attenuate Hyperglycemia and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-8.
- Huang, M. T., & Ferraro, T. (1992). Phenolic Compounds in Food and Cancer Prevention. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*, 8-34.
- Huang, S. J., Tsai, S. Y., & Mau, J. L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. *Lwt-Food Science and Technology*, 39(4), 379-387.
- James, C. S. (1995). Analytical chemistry of foods. *Capmn and Hall, London*.
- Jang, J. H., Aruoma, O. I., Jen, L. S., Chung, H. Y., & and Surh, Y. J. (2004). Ergothioneine rescues PC12 cells from beta-amyloid- induced apoptotic death. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(3), 288-299.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453-464.
- Kawano, H., Murata, H., Iriguchi, S., Mayumi, T., & Hama, T. (1983). Studies on Ergothioneine. XI. Inhibitory Effect on Lipid Peroxide Formation in Mouse Liver. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 31(5), 1682-1687.
- Kawano, H., Otani, M., Takeyama, K., Kawai, Y., Mayumi, T., & Hama, T. (1982). Studies on ergothioneine. VI. Distribution and fluctuations of ergothioneine in rats. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 30(5), 1760-1765.
- Kim, S. W., Kim, H. G., Lee , B. E., Hwang, H. H., Baek, D. H., & Ko, S. Y. (2006). Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism. *Clinical Nutrition*, 25(1), 166-170.
- Kitakaze, M., & Hori, M. (2000). Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(11), 2519-2535.
- Lee, Y. Z., Huang, G. W., Liang, Z. C., & Mau, J. L. (2007). Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(5), 823-833.
- Li, J., Guan, M., & Li, Y. (2015). Effects of Cooking on the Contents of Adenosine and Cordycepin in *Cordyceps militaris*. *Procedia*

- Engineering*, 102, 485-491.
- Loganathan, K. J., Shenbhagaraman, R., Venkatakrishnan, V., & Kaviyarasan, V. (2008). Studies on the phytochemical, antioxidant and antimicrobial properties of three indigenous pleurotus species *Journal of Molecular Biology & Biotechnology*, 1, 20-29.
- Mann, T., & Leone, E. (1953). Studies on the metabolism of semen. VIII. Ergothioneine as a normal constituent of boar seminal plasma; purification and crystallization; site of formation and function. *biochem journal*, 53, 140-148.
- Maran, J. P., Swathi, K., Jeevitha, P., Jayalakshmi, J., & Ashvini, G. (2015). Microwave-assisted extraction of pectic polysaccharide from waste mango peel. *Carbohydrate Polymers*, 123(0), 67-71.
- Marinova, E., Toneva, A., & Yanishlieva, N. (2008). Synergistic antioxidant effect of [alpha]-tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry*, 106(2), 628-633.
- Melville, D. B. (1959). Ergothioneine. *Vitamins and Hormones*, 17, 155-204.
- Melville, D. B., & Eich, S. (1956). The occurrence of ergothioneine in plant material. *The Journal of Biological Chemistry*, 218(2), 647-651.
- Mori, K., Kobayashi, C., Tomita, T., Inatomi, S., & Ikeda, M. (2008). Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutrition Research*, 28(5), 335-342.
- Motohashi, N., Mori, I., & Sugiura, Y. (1976). Complexing of Copper Ion by Ergothioneine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 24(10), 2364-2368.
- Nakazato, T., Akasaka, M., & Tao, H. (2006). A rapid fractionation method for heavy metals in soil by continuous-flow sequential extraction assisted by focused microwaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(5), 1515-1523.
- Neill, S., Desikan, R., & Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), 388-395.
- Nielsen, S. E., Young, J.F., Daneshvar, B., Lauridsen, S.T., Knuthsen,

- P., Sandstrom, B. and Dragsted, L.O. (1999). Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *The British Journal of Nutrition*, 81(6), 447-455.
- Ondruschka, B., & Asghari, J. (2006). Microwave-Assisted Extraction—A State-of-the-Art Overview of Varieties. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 60(6), 321-325.
- Onuska, F., & Terry, K. (1993). Extraction of pesticides from sediments using a microwave technique. *Chromatographia*, 36(1), 191-194.
- Oyaizu, M. (1986). Antioxident activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35, 771-775.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.
- Rahman, I., Gilmour, P. S., Jimenez, L. A., Biswas, S. K., Antonicelli, F., & Aruoma, O. I. (2003). Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302(4), 860-864.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reglinski, J., Smith, W. E., & Sturrock, R. D. (1988). Spin-echo 1H NMR detected response of ergothioneine to oxidative stress in the intact human erythrocyte. *Magnetic Resonance in Medicine*, 6(2), 217-223.
- Ribeiro, J. A. (1995). Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol Toxicol*, 77(5), 299-305.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Robin, v. d. B., Guido, R. M. M. H., & Henk, v. d. B. B. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for

- evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4), 511-517.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119-128.
- Shahidi, F., & Wanasundara, P. K. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67-103.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945-948.
- Shui, G., & Leong, L. P. (2004). Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1022(1-2), 67-75.
- Speisky, H., Gomez, M., Carrasco-Pozo, C., Pastene, E., Lopez-Alarcon, C., & Olea-Azar, C. (2008). Cu(I)-glutathione complex: a potential source of superoxide radicals generation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 16, 6568-6574.
- Tabrizchi, R., & Bedi, S. (2001). Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacology & Therapeutics*, 91(2), 133-147.
- Taga, M. S., Miller, E., & Pratt, D. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), 928-931.
- Terao, J., & Piskula, M. K. (1997). Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In Rice-Evans CA and Packer L. (editor), *Flavonoids in health and disease*. New York, 277-295.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(1), 4-15.
- Tsai, S. Y., Tsai, H., L., & Mau, J. L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(8), 1392-1402.
- Vinadé, E. R., Schmidt, A. P., Frizzo, M. E., Izquierdo, I., Elisabetsky, E., & Souza, D. O. (2003). Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Research*, 977(1),

97-102.

- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303-313.
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275-295.
- Wong, K. H., Lai, C. K. M., & Cheung, P. C. K. (2011). Immunomodulatory activities of mushroom sclerotial polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 150-158.
- Xiao, W., Han, L., & Shi, B. (2008). Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix Astragali. *Separation and Purification Technology*, 62(3), 614-618.
- Xiao, X., Song, W., Wang, J., & Li, G. (2012). Microwave-assisted extraction performed in low temperature and in vacuo for the extraction of labile compounds in food samples. *Analytica Chimica Acta*, 712, 85-93.
- Yang, N. C., Lin, H. C., Wu, J. H., Ou, H. C., Chai, Y. C., Tseng, C. Y., Liao, J. W., & Song, T. Y. (2012). Ergothioneine protects against neuronal injury induced by  $\beta$ -amyloid in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 3902-3911.
- Yildiz, S., Yildiz, Ü. C., Gezer, E. D., & Temiz, A. (2002). Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochemistry*, 38(3), 301-306.
- Yuan, X.-H., Fu, L.-N., Gu, C.-B., Zhang, Y.-D., & Fu, Y.-J. (2014). Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of vaccarin from the seeds of *Vaccaria segetalis*. *Separation and Purification Technology*, 133, 91-98.
- Zeng, H., Zhang, Y., Lin, S., Jian, Y, Miao, S., & Zheng, B. (2015). Ultrasonic - microwave synergistic extraction (UMSE) and molecular weight

- distribution of polysaccharides from *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle. *Separation and Purification Technology*, 144(97-106).
- Zeng, W. C., Zhang, Z., Gao, H., Jia, L. R., & Chen, W. Y. (2012). Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 694-700.
- Zhou, C., Ma, H., Yu, X., Liu, B., Yagoub, A.-G., & Pan, Z. (2013). Pretreatment of defatted wheat germ proteins (by-products of flour mill industry) using ultrasonic horn and bath reactors: effect on structure and preparation of ACE-inhibitory peptides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(6), 1390-1400.
- Zhu, B., Z, Mao, L., Fan, R. M., Zhu, J. G., Zhang, Y. N., Wang, J., Kalyanaraman, B., & Frei, B. (2011). Ergothioneine prevents copper-induced oxidative damage to DNA and protein by forming a redox-inactive ergothioneine–copper complex. *Chemical Research in Toxicology*, 24, 30-34.

