

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
Tunghai University

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master Thesis

指導教授：江文德 博士
高馥君 博士
Advisor : Wen-Dee Chiang, Ph. D.
Fuh-Juin Kao, Ph. D.

利用反應曲面法探討金針花一氧化氮清除活性成分
最適化乙醇萃取條件
Study on optimized ethanol extraction conditions for NO
scavenging activity components from daylily flower by response
surface methodology

研究生：劉虹每 撰
Graduate Student : Hung-Mei Liu

中華民國一百零二年七月
July, 2013

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
壹、 前言.....	1
貳、 文獻回顧.....	5
一、 金針花	5
二、 金針花機能性成分.....	6
(一) 多酚類化合物.....	6
(二) 類胡蘿蔔素.....	12
(三) 蔥醌類化合物.....	14
(四) 固醇類皂素.....	14
(五) 秋水仙素.....	17
三、 金針花機能性探討.....	17
(一) 抗氧化能力.....	19
(二) 抑制腫瘤細胞增生.....	20
(三) NO 清除率.....	20
(四) 改善睡眠、鎮靜及其他作用.....	24
四、 反應曲面法.....	24
(一) 簡介.....	24

(二) 原理.....	27
1. 極值點區域逼近.....	27
(1) 二水準因子設計.....	28
(2) 陡升路徑法.....	28
2. 反應曲面數學模式建立.....	28
(1) 中心複合實驗設計.....	30
3. 反應曲面模式適切性之統計檢驗.....	32
(1) 變異數分析法.....	33
(2) 檢定係數.....	33
4. 極值點決定.....	33
5. 因子影響效應分析.....	34
參、材料與方法.....	35
一、實驗材料.....	35
(一) 實驗樣品.....	35
(二) NO 清除活性成分所需試劑.....	35
(三) 酚類化合物組成分析所需試劑.....	35
(四) 溶劑.....	37
二、儀器設備.....	37
三、實驗方法.....	38

(一) 篩選高 NO 清除活性成分之金針花原料.....	38
1. 金針花乙醇萃取物之製備.....	39
2. NO 清除率測定.....	39
3. 總酚類化合物含量測定.....	40
4. 類黃酮含量測定.....	40
5. 酚類化合物組成分析.....	40
(二) 高 NO 清除活性成分最適化萃取條件探討.....	41
1. 金針花乙醇萃取物之製備.....	41
2. 陡升試驗.....	41
3. 實驗設計.....	42
4. 統計分析.....	42
肆、 結果與討論.....	44
一、 篩選高 NO 清除活性成分之金針花原料.....	44
(一) 金針花不同生長階段對 NO 清除率之影響.....	44
(二) 金針花不同生長階段 TPC 含量變化.....	46
(三) 金針花不同生長階段 TF 含量變化.....	49
(四) 金針花不同生長階段酚類化合物組成分析.....	49
二、 最適化萃取條件探討.....	54
(一) 陡升試驗.....	54

(二) 高 NO 清除率最適化萃取條件探討.....	54
(三) 高 TPC 最適化萃取條件探討.....	68
伍、 結論.....	78
陸、 參考文獻.....	79



圖目錄

圖一、類黃酮之基本結構圖.....	7
圖二、類黃酮之代表性膳食來源.....	9
圖三、特定膳食類胡蘿蔔素的化學結構.....	13
圖四、蔥醌類化合物的化學結構.....	15
圖五、固醇類皂素 hemeroside A(1) 及 hemeroside B(2) 化學結構.....	16
圖六、秋水仙素化學結構.....	18
圖七、藉由 L- arginine 生合成 NO 之路徑.....	22
圖八、反應曲面法流程圖.....	26
圖九、陡升路徑圖.....	29
圖十、三因子中心複合設計概念圖.....	31
圖十一、五個不同生長階段之金針花苞.....	36
圖十二、金針花不同生長階段對 NO 清除率之影響.....	45
圖十三、金針花不同生長階段之總酚類化合物含量變化.....	47
圖十四、NO 清除率與 TPC 含量之相關性.....	48
圖十五、金針花不同生長階段之類黃酮含量變化.....	50
圖十六、(a)278 nm(b)290 nm(c)340 nm 波長下酚類化合物的 HPLC 層析圖.....	51

圖十七、Catechin, EGCG, epicatechin, rutin 總量與 NO 清除率之相關性.....	55
圖十八、75 % 乙醇濃度下萃取時間與萃取溫度對NO清除率之影響.....	64
圖十九、萃取時間2.75 h下乙醇濃度與萃取溫度對NO清除率之影響.....	65
圖二十、萃取溫度60 °C下反應時間與酒精濃度對NO清除率之影響.....	66
圖二十一、75 % 乙醇濃度下萃取時間與萃取溫度對TPC含量之影響.....	73
圖二十二、萃取時間2.75 h下乙醇濃度與萃取溫度對TPC含量之影響.....	74
圖二十三、萃取溫度60 °C下反應時間與酒精濃度對TPC含量之影響.....	75

表目錄

表一、金針花不同生長階段之酚類化合物含量.....	52
表二、陡升試驗結果.....	56
表三、五階層三變數中心複合實驗設計最適萃取條件反應參數實驗 值之範圍.....	57
表四、開花階段金針花清除NO率及高TPC含量之五階層三變數中心 複合實設計與實驗數據.....	58
表五、實驗點NO清除率曲面之二次多項式及檢定係 數.....	59
表六、影響NO清除率相關變數之變異數分析.....	61
表七、聯合檢測中NO清除率變異分析.....	62
表八、NO清除率最適化模型驗證結果.....	67
表九、實驗點TPC含量曲面之二次多項式及檢定係數.....	69
表十、影響TPC含量相關變數之變異數分析.....	70
表十一、聯合檢測中TPC含量變異分析.....	72
表十二、TPC含量最適化模型驗證結果.....	77

摘要

本研究首先將金針花原料區分為 3、6、8、10 cm 花苞與開花等五個階段，經乙醇萃取後測定其抗發炎活性即一氧化氮(nitric oxide; NO)清除率及清除活性成分包括總酚類化合物(Total phenolic compounds; TPC)、總類黃酮(Total flavonoids; TF)及 11 種酚類化合物，以篩選出高 NO 清除活性成分之金針花，結果顯示開花組 NO 清除率達 63.38%，顯著高於其他組別($p < 0.05$)，而且 TPC 及 TF 也顯著高於其他組別($p < 0.05$)，分別可達 22.4 mg gallic acid equivalent /g dry weight 和 4.66 mg quercetin equivalent/g dry weight。其次，開花組的 caffeic acid, epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), chlorogenic acid 與 rutin 含量顯著高於其他組別($p < 0.05$)，分別高達 9.60、140.75、91.71、33.06 及 43.14 mg/100 g dry weight，這些酚類化合物含量多寡與抗發炎有高度相關性。最後以反應曲面法(Response surface methodology; RSM)分別探討開花組中高 NO 清除率及高 TPC 含量最適萃取條件，結果指出高 NO 清除率及高 TPC 含量最適化萃取條件皆為乙醇濃度 75%、萃取溫度 60 °C 以及萃取時間 2.75 h，兩者二次多項式適缺性(lack of fit)分析皆無顯著影響($p > 0.05$)，表示二階反應曲面都是適當的，此外，該模型之檢定係數 R^2 分別為 0.9381 及 0.9319，實驗結果與預測值相符。

Abstract

The aim of this research was first to screen daylily flower with high nitric oxide (NO) scavenging components from ethanol extracts of five growth stages of daylily flower sources including 3, 6, 8, 10 cm bud and flower by measuring their anti-inflammatory activity in term of NO scavenging and its components including total phenolic compounds (TPC), total flavonoids (TF) and 11 kinds of phenolic compounds. Flower stage showed significantly higher NO scavenging than the other stages ($p < 0.05$) up to 63.38%. TPC and TF content of flower stage were 22.4 mg GAE / g dry weight and 4.66 mg quercetin equivalent / g dry weight, respectively, which also showed significantly higher than the other stages ($p < 0.05$). Furthermore, caffeic acid, epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin(EC), chlorogenic acid, rutin content of flower stage were 9.60, 140.75, 91.71, 33.06 and 43.14 mg/100 g dry weight, respectively, which also reveal notably higher than other stages ($p < 0.05$). All the above phenolic compounds are positively correlation with anti-inflammatory activity. Finally, optimum extraction conditions of high NO scavenging and high TPC content from flower stage were investigated by response surface methodology (RSM). The optimum

extraction conditions for both high NO scavenging and high TPC were ethanol concentration of 75 %, extraction temperature of 60 °C as well as extraction time of 2.75 h. Each F-value for lack of fit was not significant ($p>0.05$), so the second order model was appropriate for the response surface. In addition, each model had a satisfactory of R^2 (0.9319-0.9381) and was verified experimentally.



壹、前言

金針花學名為 *Hemerocallis fulva*，為百合科多年生草本植物，為我國栽培已久的作物，別名萱草、忘憂草。除食用功能外，金針花還有調節人體生理機能及促進新陳代謝等藥用用途(傅懋潤、茅林春, 民 95)。所含生物活性成分，目前被證實的相關功能如治療發炎、抗氧化、鎮靜、抑制腫瘤細胞增生等功效(Cichewicz et al., 2004；傅懋潤、茅林春, 民 95；Que et al., 2007)，此外，金針花亦具有清除 NO 之能力(Bor et al., 2006)。人體在正常代謝過程中會產生活性氧、活性氮及相關自由基，當體內的多元不飽和脂肪酸受到自由基攻擊而氧化時，會形成更多的自由基。所產生的活性氧、活性氮及自由基會攻擊酵素、蛋白質、醣類、脂質、RNA 及 DNA 等分子，而造成細胞的傷害(Ames, 1990；Hartwig and Schlegel, 1995；Mahmoodi et al., 1995)。自由基在許多疾病的發展上扮演相當重要的角色，包括老化、癌症和心血管疾病等(Halliwell, 1993；Grisham, 1994；Jacob, 1994)。而含氧自由基對生物體細胞與分子的傷害與許多疾病有關(Que et al., 2007)，因此了解活性氧與自由基會造成體內分子何種傷害，在疾病的發生與預防上是相當重要的。其中，糖尿病、粥狀動脈硬化症、慢性發炎、多重血管硬化症、癌症(Stefanovic-Racic et al., 1993；Ohshima et al., 1994；Kroncke et al., 1997；

MacMicking et al., 1997 ; Murphy, 1999)可觀察到 inducible nitric oxide synthase(iNOS)的表現上升、大量 NO 累積在體內，容易引發發炎及其相關併發症(Malinski and Taha,1992 ; Wink and Mitchell, 1998)。因此由 iNOS 所催化生成的 NO，對許多慢性或急性發炎疾病具有指標性的關聯(陳姿廷，民 93)。如果可以清除 NO 或是抑制 NOS，則可以有效降低傷害(Arroyo et al., 1992 ; Chan et al., 1997)。

NO 是一種分子媒介物質，具有高度生物活性成分的自由基，參與廣泛的生理及病理作用。目前已知生物體內存有兩種不同的 NOS，其中一種為結構型 NOS(constitutive NOS ; cNOS)，可生成較少量 NO，具有生理調節效應，主要分佈在內皮細胞及神經組織中。另一種則是 iNOS，主要存在於免疫系統，正常生理情況下，iNOS 基因並不會表現，但可受免疫刺激而產生，如促發炎細胞激素(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)、細菌之產物、脂多醣(lipopolysaccharide ; LPS)等產生，可持續生成較多量之 NO 來進行免疫調節之功能(Stuehr and Marletta, 1987)。但是當急性或慢性發炎時，特別在發炎狀況(Moncada et al., 1991 ; Alderton et al., 2001 ; Bogdan et al., 2001 ; Dawn et al., 2002) 觀察到 iNOS 的表現上升、大量 NO 累積在體內，容易引發發炎及其相關併發症(Malinski and Taha, 1992 ; Wink and Mitchell, 1998)。因此由 iNOS 所催化生成的 NO，對許多慢性或急

性發炎疾病具有指標性的關聯(陳姿廷，民 93)。

酚類化合物如 catechin, epicatechin, EGCG, myricetin, kaempferol 等物質已被證實具有 NO 清除能力(Yoshimi & Masashi, 2013)，而金針花抗發炎活性與 catechin、rutin 有高度的相關性(Que et al., 2007；Yoshimi & Masashi, 2013)，在巨噬細胞模式系統中新鮮金針花可抑制由 LPS 誘導巨噬細胞生成 NO 的能力，且會影響 iNOS 活性與 iNOS 蛋白質表現量，因而抑制 NO 的生成(Bor et al., 2006)。許多報導亦指出不同生長階段之金針花對於其活性物質的組成及含量多寡扮演相當重要的角色(Russo & Howard, 2002；Vallejo et al., 2003)。

反應曲面法為一結合數學及統計之技術，將問題模式化並分析求出變數(variable)對系統反應值(response)的影響(Myers and Montgomery, 2002)。反應曲面法可以研究數個變數(或因子)組合所產生之反應值在何種變數組合條件下可獲得最適效果(optimum solution)。反應曲面法可同時探討兩個或兩個以上影響因子而產生一最適化反應條件。此方法已被廣泛應用於物理學、食品科學、農業化學及社會學等領域。相較於傳統一次實驗決定一個因子最適值，反應曲面法可提供實驗操作極大化之效益。

本研究目的為測定不同生長階段金針花抗發炎能力即NO清除率以及活性成分包括TPC, TF及11種酚類化合物組成，以篩選出最佳的

金針花原料，並利用RSM分別進行該原料高NO清除率及活性成分最適化萃取條件探討。



貳、文獻回顧

一、金針花

金針花是日常生活中常見的食物，原產於中國南部及日本，作為食品和傳統藥材已經有幾千年的歷史(Zhang et al., 2004)。中醫認為金針花具有消腫利尿、抗菌消炎、止血、鎮痛、健胃和安神等功能。(傅懋潤、茅林春，2006)。金針花植物學名為 *Hemerocallis fulva*，英文名字為 daylily flowers，乃因為生長期很短，從開始開花到花瓣凋謝只有 36 個小時(Lay-Yee et al., 1992；Guerrero et al., 1998)。屬於百合科多年生草本植物，別名萱草、黃花菜、忘憂菜、金針菜等。營養價值豐富，屬於高蛋白的蔬菜，每 100 g 鮮重含有蛋白質 1.8 g、膳食纖維 2.5 g、碳水化合物 6.2 g，只有少量的脂肪為 0.4 g。富含 Vitamin A, B₁ 與 B₂ 以及礦物質 Ca, P 與 Fe(行政院衛生署食品藥物管理局-台灣地區食品營養成分資料庫，2012)。金針花原產於中國大陸南方、日本與東南亞等地區。早期由大陸引入栽培，但在台灣受到氣溫與日照等影響，只有在北部海拔 400 公尺，中部與東部海拔 800-1000 公尺處才有穩定產量，主要生產在花東山區，如花蓮六十石山、赤柯山、台東太麻里、金針山、埔里、台中新社等地(王昭蓉，民 88)。每年 8-9 月為其盛產期，6、7、10 月份少量生產，其餘月份則不生產。所以金針花多半是做成加工乾製品供應全年所需。食

用方式包括鮮食與乾製品等，其中又以乾製品應用於金針花排骨湯較常見，而鮮食方面則是以未成熟的綠色花苞為主，可以油炒、煮湯等。金針花目前被證實的相關功能如抗氧化、鎮靜、抑制腫瘤細胞增生、改善睡眠、治療發炎反應與黃疸等功效。(Cichewicz et al., 2004; Que et al., 2007)。

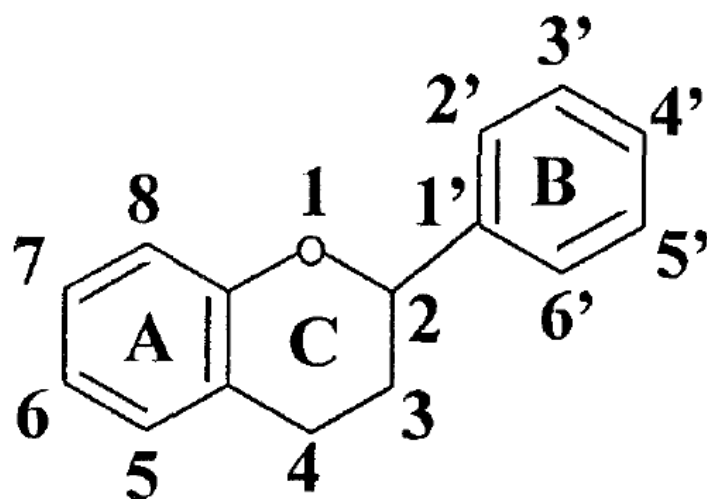
二、金針花機能性成分

(一) 多酚化合物(polyphenolic compounds)

多酚化合物為植物中廣泛存在的成分，已知種類至少超過 8000 種。其酚型構造上帶有數個羥基，此羥基與體內的抗氧化作用有關，主要包括酚酸(phenolic acids)、類黃酮及丹寧(tannins)等，以下就幾種主要酚類化合物介紹：

1. 類黃酮

類黃酮為花朵、果實、蔬菜及樹皮中所含的色素，廣泛地分佈於自然界，在植物體活細胞中以醣苷(glycosides)的狀態存在，對熱安定，若以酵素或酸處理則會降解為非醣苷(aglycone)及糖(sugar)。類黃酮目前已被證實具有極佳的抗氧化功效之抗氧化劑，其基本結構如圖一所示，類黃酮是由三個環狀結構的 diphenyl propane($C_6-C_3-C_6$)型式所構成，這兩個 C_6 一般形成苯環，屬於多酚類化合物的一種，依其結構性差異可分類如下(Pratt, 1990; 郝凱衡，



(Cook & Samman, 1996)

圖一、類黃酮之基本結構圖

Figure 1. Basic structure of flavonoids.

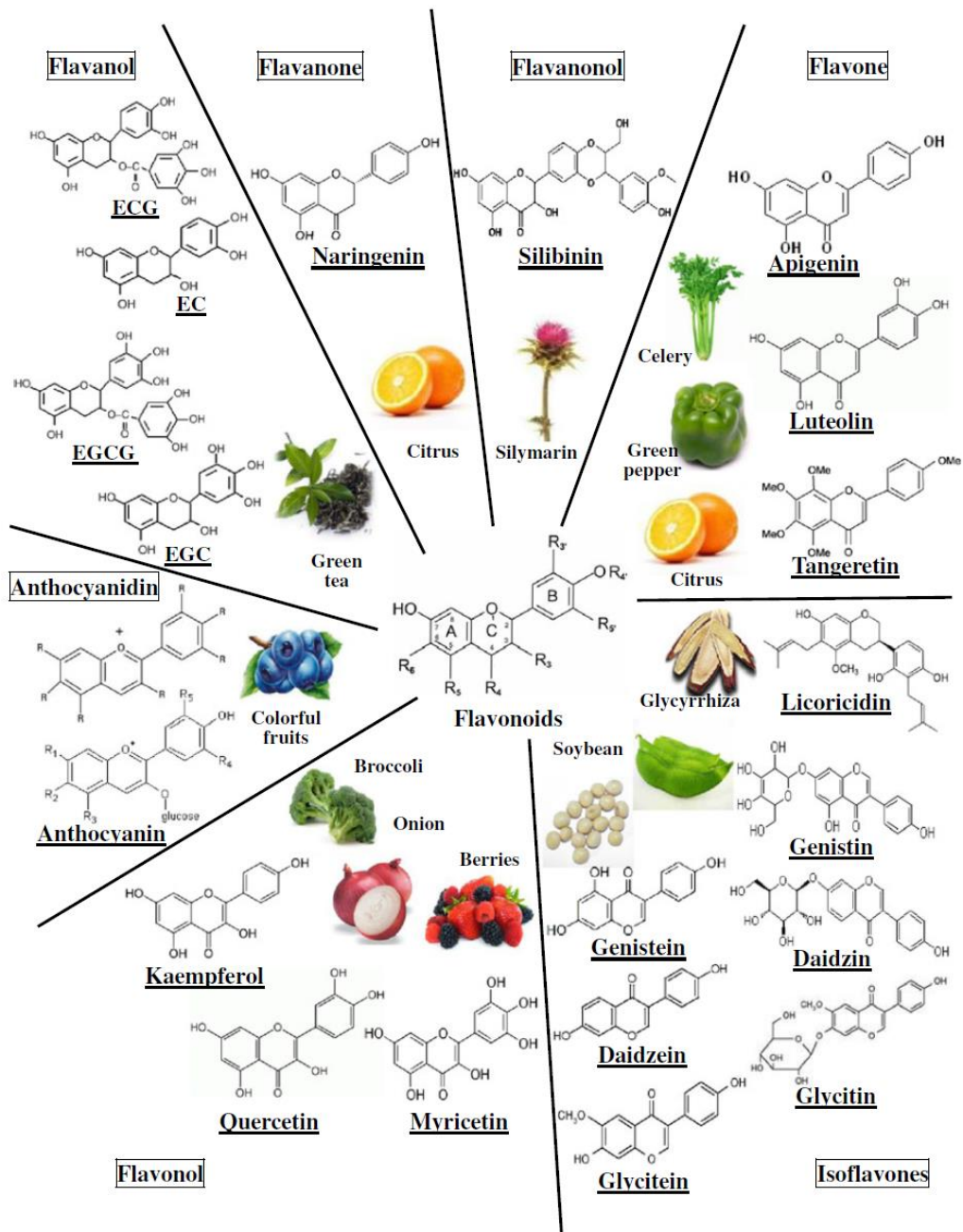
民88；蔡旻都、陳皓君，民95)，而富含類黃酮群的食物如圖二(郭智宏，民91；Weng & Yen, 2012)。

(1)黃酮(flavones)：為類黃酮的最基本的結構，此結構在C環之2,3號碳上有雙鍵，4號碳有酮基，但3號碳上沒有OH基團，具有抗氧化效果的衍生物如芹素(apigenin)、木犀草素(luteolin)、漆黃素(fisetin)、黃杉素(taxifolin)和刺槐亭(robinetin)等，食物來源如芹菜、青椒、荷蘭芹、柑橘類水果等。

(2)黃酮醇(flavonols)：黃酮環中的氫以羥基置換者，此結構在C環之2,3號碳上有雙鍵，4號碳有酮基且3號碳上有OH基團。如槲皮素(quercetin)、芸香素(rutin)、楊梅苷(myricetin)及山茶酚(kaempferol)等，食物來源如綠花椰菜、洋蔥、藍莓、茶葉等。

(3)黃烷酮(flavanones)：C環之2及3號位置的雙鍵變為單鍵者，具有抗氧化效果的衍生物，如：橘皮苷素(hesperidin)、柚苷素(naringenin)、苦橘苷(naringenin)等，食物來源如柑橘類水果、柑橘類果皮、葡萄柚等。

(4)異黃酮(isoflavones)：苯環不是結合於C環之2號位置，而是結合於3號者，抗氧化活性差，在天然產物中此類結構較少，如：大豆異黃酮苷(daidzin)、大豆異黃酮苷素(daidzein)、金雀異黃酮(genistein)等，食物來源如大豆。



(Weng & Yen, 2012)

圖二、類黃酮之代表性膳食來源

Figure 2. Flavonoids and their representative dietary sources.

(5)花青素配質(anthocyanidins)：花青素為類黃酮化合物中最具濃豔色彩的水溶性色素，構造上由anthocyanidin鍵結醣類而成，花青素A, B環間的氧原子為帶正電荷的oxonium，所有雙鍵皆共軛，因而呈現鮮豔色彩，僅A環上具-OH基團的花青素才存在於天然界中，天然存在的花青素配質主要有以下六種，如：天竺葵苷素(pelargonoidin)、矢車菊色素配質(cyanidin)、芍藥花青素(peonidin)、花翠配質(delphinidin)、矮牽牛苷配質(petunidin)、錦葵色素配質(malvidin)。主要食物來源如漿果類、櫻桃、葡萄、覆盆子、紅酒、草莓等顏色鮮豔的水果等，為蔬菜水果中重要的色素。

(6)黃烷醇(flavanols)：C環之4號位置之羰基以羥基取代，且2及3號位置雙鍵變為單鍵者，如：兒茶素(catechin; C)、表兒茶素(epicatechin)、表沒食子兒茶素沒食子酸(EGCG)、表沒食子兒茶素(epigallocatechin; EGC)、表兒茶素沒食子酸(epicatechin gallate; ECG)等，食物來源如綠茶或其他茶葉等。

(7)查酮(chalcones)：黃酮環中具有一開鍵結構者，2及3號位置為雙鍵，具有抗氧化效果的衍生物如紫柳花素(butein)、金雞菊查酮(okanin)、根皮素(phloretin)等。

2. 酚酸

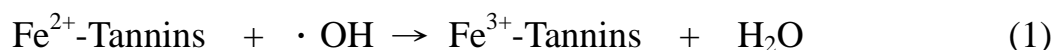
酚酸依其結構大致可分為苯甲酸(benzoic acid)與肉桂酸

(cinnamic acid)兩大類，兩者之羥基衍生物廣泛存在於植物中，且雙羥基衍生物之抗氧化活性優於單羥基衍生物，如 3,4-二羥基肉桂酸 (caffeic acid，咖啡酸)在多種抗氧化系統中皆顯示出強抗氧化力 (Milic et al., 1998)，若第二個羥基位於苯環的鄰位或對位上，其抗氧化性會增強。此外，研究顯示許多酚酸如 ferulic acid, caffeic acid 等皆具有抑制低密度脂蛋白(LDL)氧化的能力(Bors et al., 1990)。

3. 單寧

多酚類容易聚合形成單寧的聚合物，廣泛存在於多種植物性食品及動物飼料中，一般可分為水解型(hydrolysable tannin)及縮合型單寧(condensed tannin)兩大類，前者分子內因具有酯鍵，而會被酸、鹼所水解，屬於沒食子酸衍生物，如單寧酸；後者分子結構骨架完整，不會被水解，為兒茶素衍生物(茶的澀味成分)，如黃木素。研究指出單寧類不僅具有良好的抗氧化性，還具有其他生理活性，如抗癌作用和抗突變活性。植物中的 tannins 大多屬於水解型，其分子量約 500-3000 dalton，分子量低於 500 dalton 或高於 3000 dalton 的是不具功能的 tannins (Bate & Swain, 1962)。而水解型單寧與大部分的縮合型單寧皆為水溶性，而大分子的縮合型單寧則為非水溶性。其抗氧化活性來自於苯環上之羥基，可清除自由基防止脂質過氧化 (Yokozawa et al., 2000)，且容易與過渡金屬離子 Fe^{2+} , Fe^{3+} 螯合，所

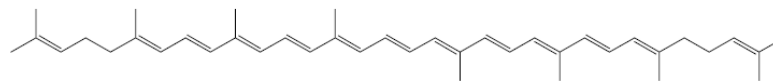
形成的 Fe^{2+} -Tannins 複合物可防止羥自由基的氧化傷害(George et al., 1999 ; Lodovici et al., 2001)。其反應式如下：



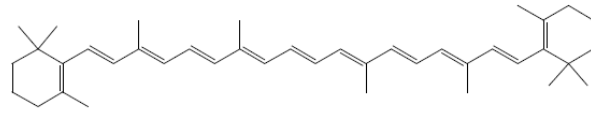
此外，亦有研究指出 tannins 與其水解物如鞣酸(tannic acid)、沒食子酸(gallic acid)及鞣花酸(ellagic acid)等具抗致突變性(Huang et al., 1985 ; Horn & Vargas, 2003)。

(二)類胡蘿蔔素(Carotenoids)

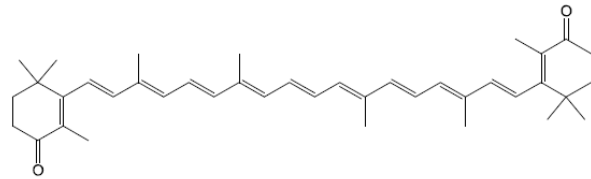
類胡蘿蔔素是廣泛存在於蔬果中的脂溶性色素(Goodwin, 1986 ; Brown et al., 1989)。依其結構可分為只含碳氫不含氧原子之化合物，稱為胡蘿蔔素類(carotenes)，以及含氧衍生物，稱為葉黃素類(xanthophylls) (Shi & Le, 2000 ; Stahl & Sies, 2005) (圖三)。植物的類胡蘿蔔素中最重要的是carotenes，其中以 β -胡蘿蔔素(β -carotene)最重要，因其在小腸內形成retinol(vitamin A)，故carotene亦稱provitamin A。而葉黃素(lutein)及玉米黃質(zeaxanthin)的主要構造與 β -胡蘿蔔素類似，屬葉黃素類，不具維生素A活性，但會大量的累積在人類視網膜黃斑部(Bone et al., 1988 ; Sharpe et al., 1998 ; Davies & Morland, 2004)。提高葉黃素與玉米黃質的攝取量會使兩者於血清及眼睛黃斑部之濃度增加(Kruger et al., 2002)，進而預防白內障(cataracts)及因老化造成的老年性黃斑部病變(aged-related macular degeneration ; AMD)



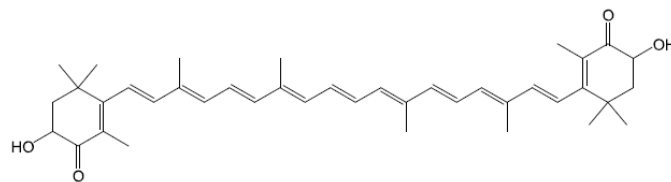
Lycopene (LYC)



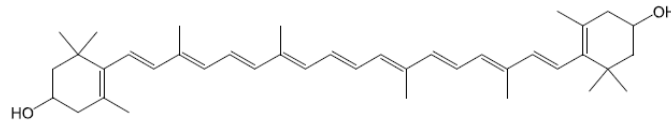
β -carotene (BCAR)



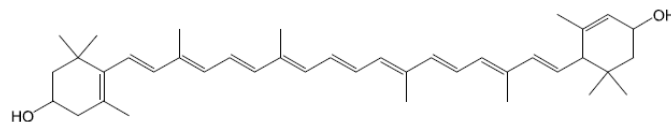
Canthaxanthin (CANTHA)



Astaxanthin (ASTA)



Zeaxanthin (ZEA)



Lutein (LUT)

(Cantrell et al., 2003)

圖三、特定膳食類胡蘿蔔素的化學結構

Figure 3. Chemical structures of specific dietary carotenoids.

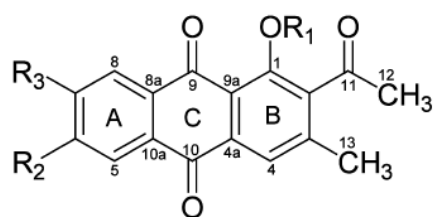
的發生(Olmedilla et al., 2001)，應用於食品中可作為抗氧化劑或營養補充劑。學者自金針花(*Hemerocallis disticha*)中分離出21種色素(Tai & Chen, 2000)，其中包括14種類胡蘿蔔素，含量最豐富的前四名依序為玉米黃質、隱黃素(β -cryptoxanthin)、 β -胡蘿蔔素、葉黃素。其中金針花的色澤主要是與 β -胡蘿蔔素、玉米黃質、葉黃素含量有關，且人類眼睛黃斑色素主要是源自於葉黃素與玉米黃質；可以延緩因老化造成之黃斑病變。至於隱黃素與 β -胡蘿蔔素則是合成維生素A的先質，也有抗氧化的功能，是重要的機能性成分。

(三) 蒽醌類化合物(anthraquinones)

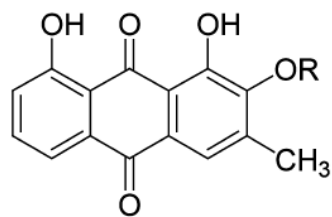
金針花的根部已分離出9種蒽醌類化合物(Cichewicz et al., 2002, 2004)，包含七種新的 kwanzoquinones A(1), B(2), C(4), D(5), E(6), F(7) 及 G(9)與兩種已知的蒽醌類化合物 2-hydroxychrysophanol(3)與 rhein(8) (圖四)，可抑制血吸蟲病(schistosomiasis)，是由寄生的血吸蟲所引起的一種疾病，會使人衰弱，世界衛生署組織估計，目前血吸蟲感染 200 萬人，容易引起皮膚的發炎反應或是肺部病變。在亞洲國家常使用金針花來治療血吸蟲病(傅懋潤、茅林春，民 95)。

(四) 固醇類皂素(steroidal-saponins)

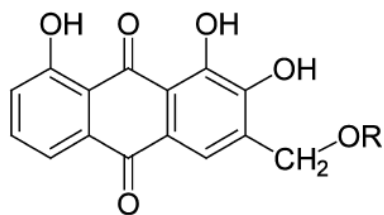
自金針花分離出兩種固醇類皂素，命名為 hemeroside A 及 hemeroside B (圖五)。皂素(saponins)或稱皂苷是由非糖基或稱皂元的



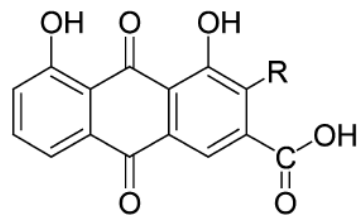
- 1** $R_1=H, R_2=CH_3, R_3=H$
1a $R_1=Ac, R_2=CH_3, R_3=H$
2 $R_1=H, R_2=H, R_3=CH_3$
2a $R_1=Ac, R_2=H, R_3=CH_3$



- 3** $R=H$
4 $R=\beta\text{-D-glucopyranoside}$
5 $R=\text{malonyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranoside}$



- 6** $R=H$
7 $R=\beta\text{-D-glucopyranoside}$



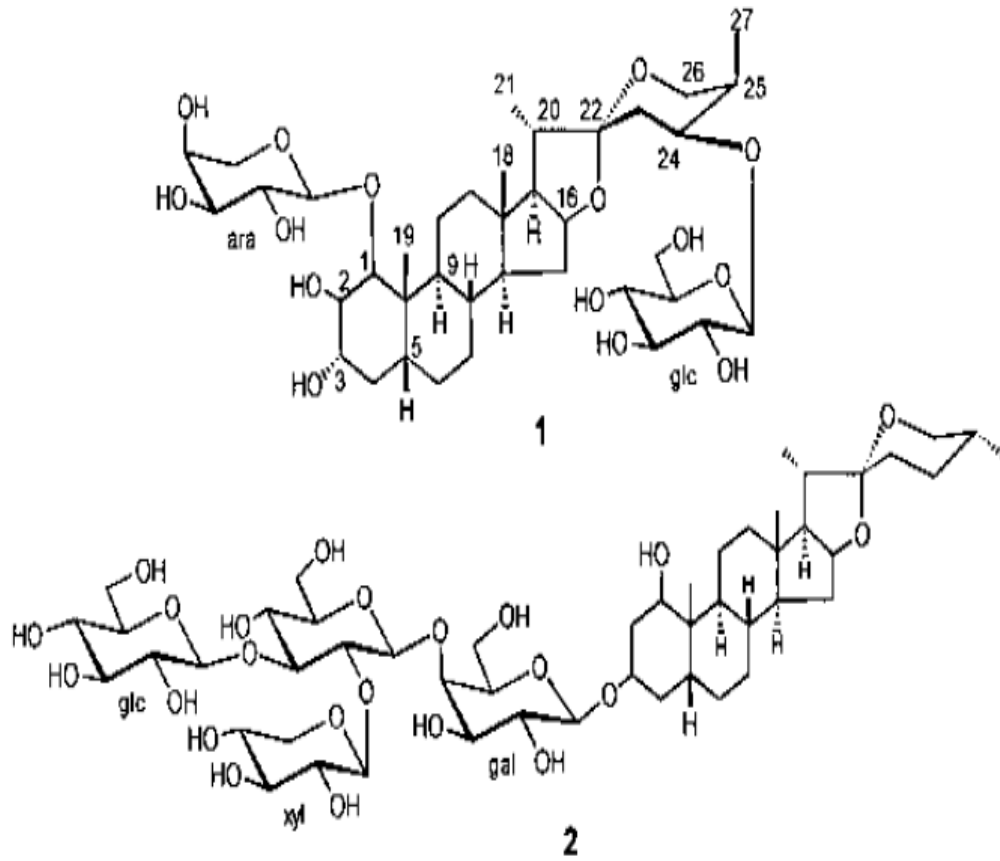
- 8** $R=H$
9 $R=CH_3$



(Robert et al., 2002)

圖四、蒽醌類化合物的化學結構

Figure 4. Chemical structures of anthraquinones.



(Konishi et al., 2001)

圖五、固醇類皂素 hemeroside A(1)及 hemeroside B(2)化學結構

Figure 5. Chemical structures of hemeroside A(1) and hemeroside B(2).

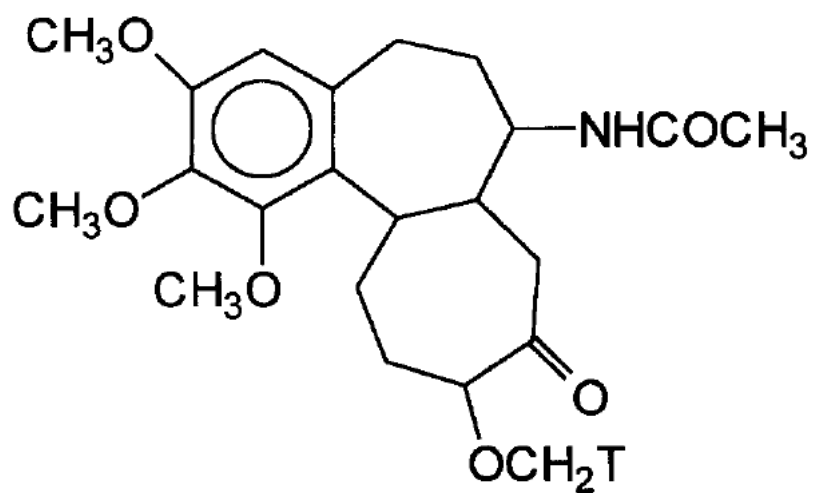
三萜類或固醇類和配醣體(glycosides)結合而成，屬於結構複雜的水溶性化合物。屬於非醣基的一種界面活性劑(黃慧琪、張麗杰、吳永昌、郭悅雄、郭曜豪，民 98)。皂素具有多樣性的生物活性作用如部份具有不同程度的親脂性，而配醣體具有較強的親水性，使其成為抗癌、免疫調節、抗血小板凝集、抗炎、殺螺、殺菌作用等(Vincken et al., 2007)。

(五) 秋水仙素(colchicine)

秋水仙素為一種植物鹼(圖六)，主要發現於植物秋水仙(*Colchicum autumnale*)中(蔡英仁，2002)。十九世紀時，因秋水仙素對於急性痛風發作所引起的劇烈疼痛可以有效的紓解，開啟了對秋水仙素的研究(Hartung, 1954)，秋水仙素在臨床上可用於治療痛風急性發作時的藥物(Roberts et al., 1987)，除此之外，文獻指出亦具有抗腫瘤(antitumor)的能力(*Chem. Eng. News*, 1959)。而秋水仙素在金針花的根、莖、葉和花中，均有很高的含量。雖然秋水仙素具有治療的功效，但是毒性作用亦高，易引起副作用如腹瀉、腹痛、噁心、嘔吐等腸胃不適問題，但秋水仙素對於乙醇、氯仿或是水有良好的溶解性，食用前經過適當的浸泡方式，可以有效降低其毒害作用。

三、 金針花機能性探討

早在 1986 年，金針花被證實含有多種活性成分(Jiangxi Medical



(Tateishi et al., 1997)

圖六、秋水仙素化學結構

Figure 6. Chemical structures of colchicine.

Collage, 1986), 包括萘醌類化合物 naphthalene, glycoside (Cichewicz et al., 2002)、固醇類皂素、內醯胺(lactams) (Inoue et al., 1990, 1994 ; Konishi et al., 1996)、類胡蘿蔔素、酚類物質、秋水仙素等物質。金針花不管在體內或體外都被證實有相當好的抗氧化活性(Que et al., 2007 ; Zhang et al., 2004), 以下就金針花已被證實之抗氧化能力 (antioxidant activity)、抑制腫瘤細胞增生 (inhibit cancer cell proliferation)、NO 清除能力(NO scavenging activity)、改善睡眠 (improve sleep)、鎮靜(sedation)及其他作用進行介紹。

(一) 抗氧化能力

金針花被證實所含之類黃酮有良好的自由基清除能力(Que et al., 2007), 其次在金針花中分離出一種新型固醇類皂素, 可表現出較強的抗氧化能力, 並具有抑制脂質氧化的能力(Cichewicz et al., 2002), 研究亦指出金針花具有清除 NO 能力(Bor et al., 2006), 另有探討金針花乙醇萃取物與水萃取物對體內及體外抗氧化活性分析之差異(Que et al., 2007), 實驗結果得知金針花之 gallic acid, (+)-catechin 及 rutin 對抗氧化活性有其高相關性, 且乙醇萃取物相較於水萃取物有較佳的抗氧化性, 並且將金針花乙醇萃取物餵食大鼠後, 可以顯著降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 有效抑制脂質過氧化反應發生, 並可顯著增加超氧歧化酶(superoxide dismutase,

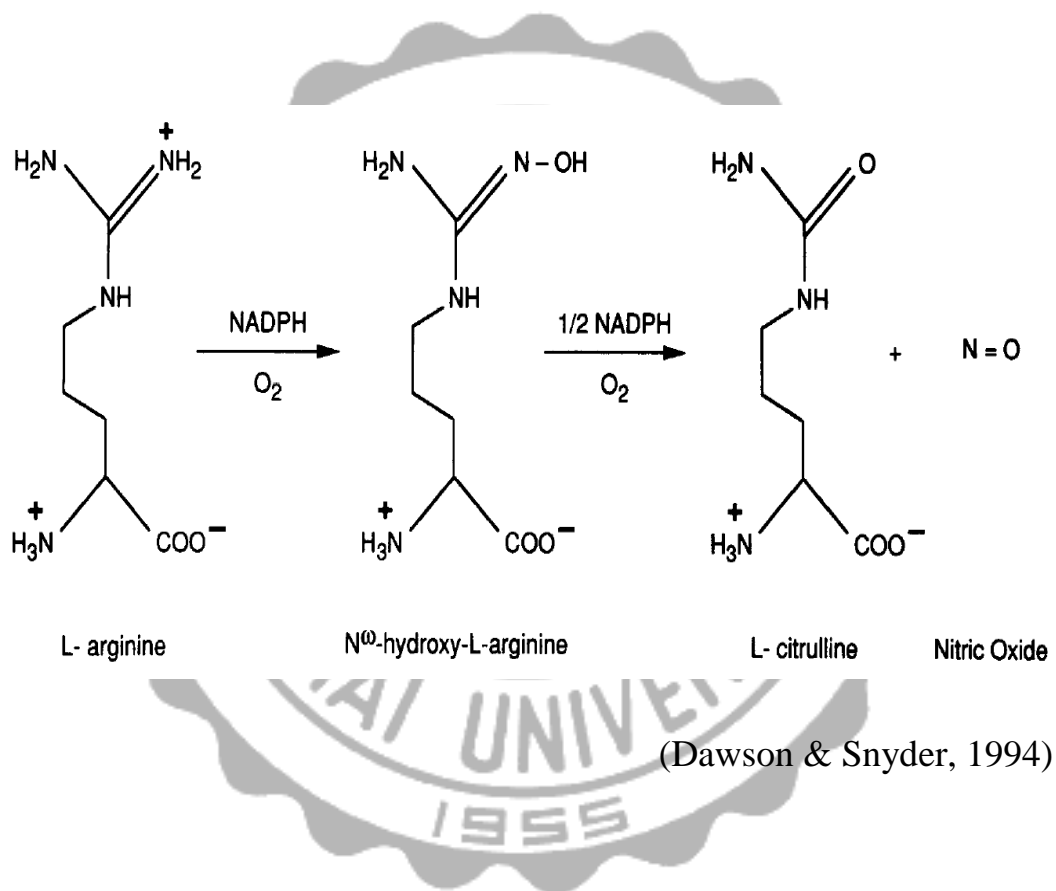
SOD)活性，達抗氧化目的。除此之外，有研究將金針花依據不同成熟階段區分為七階段進行抗氧化試驗(Fu et al., 2009)，結果得知第三階段金針花(flower opening)具有最高含量的 ascorbic acid(vitamin C)及酚類，其中 ascorbic acid 在抗氧化活性方面扮演重要角色，並隨著金針花成熟度增加其含量亦明顯增加。最後透過 HPLC 分析金針花中(+)-catechin, chlorogenic acid, rutin 及 quercetin，得知(+)-catechin 為金針花中主要的酚類，高達 74.11 %，且對於抗氧化活性有線性關係，表示 catechin 可能為主要的抗氧化物質來源。

(二) 抑制腫瘤細胞增生

許多研究指出金針花抑制腫瘤細胞增生能力主要來自於一些抗氧化物質，例如酚類(Cichewicz et al., 2004)、抗壞血酸(ascorbic acid)、 β -胡蘿蔔素(Diplock et al., 1998)。其次，金針花萃取物可抑制纖維原細胞的增生，阻止癌細胞的增殖(Hata et al., 1998)，包括 2-hydroxychrysophanol、rhein (Cichewicz et al., 2004)，這些物質對於乳腺癌、中樞神經系統病變、結腸癌和肺癌之 GI_{50} (growth inhibit)值為 1.8 to 21.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。自金針花根部分離得到抗癌性物質包括 kwanzoquinones A, B, C 及 E 以及 kwanzoquinone A 與 B monoacetates (1a and 2a)。

(三) NO 清除率

NO 是一種分子媒介物質，具有高度生物活性成分的自由基，參與廣泛的生理及病理作用，扮演相當重要的角色，並可調節許多細胞和組織的功能，在生理方面，具有調節神經、心血管、呼吸及免疫系統之功能；但過量的 NO 反而會對人體有害。其中合成 NO 的關鍵酵素為 NOS，其作用機制為以 L-arginine 之胍基(guanido group)為受質，利用 NADPH 當作電子提供者，藉由 FAD、FMN、Heme、H₄B 當作輔因子，共消耗五個電子而形成 L-citrulline 的過程中釋放出 NO (Dawson & Snyder, 1994) (圖七)。目前已知生物體內存有兩種不同的 NOS，其中一種為結構型 NOS (constitutive NOS；cNOS)，可生成較少量 NO，具有生理調節效應，主要分佈在內皮細胞及神經組織中。另一種則是誘導型 NOS (inducible NOS；iNOS)，主要存在於免疫系統，正常生理情況下，並不會表現，但可受免疫刺激所產生，如細胞激素、細菌之產物、LPS 等產生，可持續生成較多量之 NO 來進行免疫調節之功能(Stuehr and Marletta, 1987)。但是當急性或慢性發炎時，特別在發炎狀況(Moncada et al., 1991；Alderton et al., 2001；Bogdan et al., 2001；Dawn et al., 2002)例如糖尿病、粥狀動脈硬化症、慢性發炎、多重血管硬化症、癌症(Stefanovic-Racic et al., 1993；Ohshima & Bartsch, 1994；Kroncke et al., 1997；MacMicking et al., 1997；Murphy, 1999)可觀察到 iNOS



圖七、藉由 L- arginine 生合成 NO 之路徑

Figure 7. Biosynthesis of nitric oxide from L- arginine.

的表現上升、大量 NO 累積在體內，容易引發發炎及其相關併發症 (Malinski et al., 1997)。因此 NO 對許多慢性或急性發炎疾病具有指標性的關聯(陳姿廷，民 93)。如果可以清除 NO 或是抑制 NOS，則可以有效降低傷害(Arroyo et al., 1992；Chan et al., 1997)。許多食用或藥用植物具有清除 NO 之能力(Acker et al.,1995;Chan et al., 1997；Kim et al., 1998；Yoshimi & Masashi, 2013)，例如植物中所含的 quercetin, tocopherol 及 catechin 等物質可以抑制 NO 所造成的傷害 (Kawada et al., 1998)。研究亦指出綠茶所含之抗氧化物 EGCG，可抑制 NOS 基因的表現及酵素活性(Chan et al., 1997)。此外蔬菜、水果、茶葉、中草藥等水萃取物，可促使大鼠主動脈環內皮組織釋放 NO 而引起血管舒張(Fitzpatrick et al., 1995)，因此，在日常生活中可藉由攝取植物性食物來補充天然抗氧化物，以達抗氧化、抗衰老或是預防疾病的發生。其次在巨噬細胞模式系統中豆苗、茄子、絲瓜及新鮮金針花可抑制由 LPS 誘導巨噬細胞生成 NO 的能力(Bor et al., 2006)，其中絲瓜與新鮮金針花會影響 iNOS 活性與 iNOS 蛋白質表現量，而抑制 NO 的生成。另外研究證明 catechin, epicatechin, EGCG, myricetin 及 kaempferol 等物質可以清除 NO，其中 EGCG 兼具可以抑制 iNOS 表現之功效(Yoshimi & Masashi, 2013)。在金針花機能性成分中與抗發炎相關的是以酚類化合物為主，酚類化合物具有 NO

清除能力(Chan et al., 1997)、抑制 iNOS 表現(Bor et al., 2006)和抑制 COX-2(Kim et al., 1999 ; Cichewicz et al., 2000)。總而言之，金針花具有抑制活性氮化物之生理活性，在本研究中也會針對金針花萃取物的清除 NO 活性進行檢測。

(四) 改善睡眠作用、鎮靜及其他作用

金針花根部具有利尿以及消炎的功效之外，還可以有效的改善睡眠(Konishi et al., 2001)。研究發現金針花具有減輕失眠的作用(Uezu, 1997)，當餵食含有 0.4 % 金針花粉末的食物，可以延長老鼠在暗感期的慢波睡眠和痙攣睡眠時間，並且相較於對照組有顯著差異($p < 0.05$)。學者針對金針花水萃取物對老鼠活力的影響進行實驗(Hsieh et al., 1996)，結果發現金針花可以降低老鼠的活力，減少腦幹中的多巴胺和血清複合胺的量，而達到鎮靜的功效。另外金針花的根和葉有消炎、抗黃疸的作用(Cichewicz et al., 2004)，還具有抗憂鬱作用，因此在中國或日本又被稱為忘憂菜(Tobinaga, 1999)。

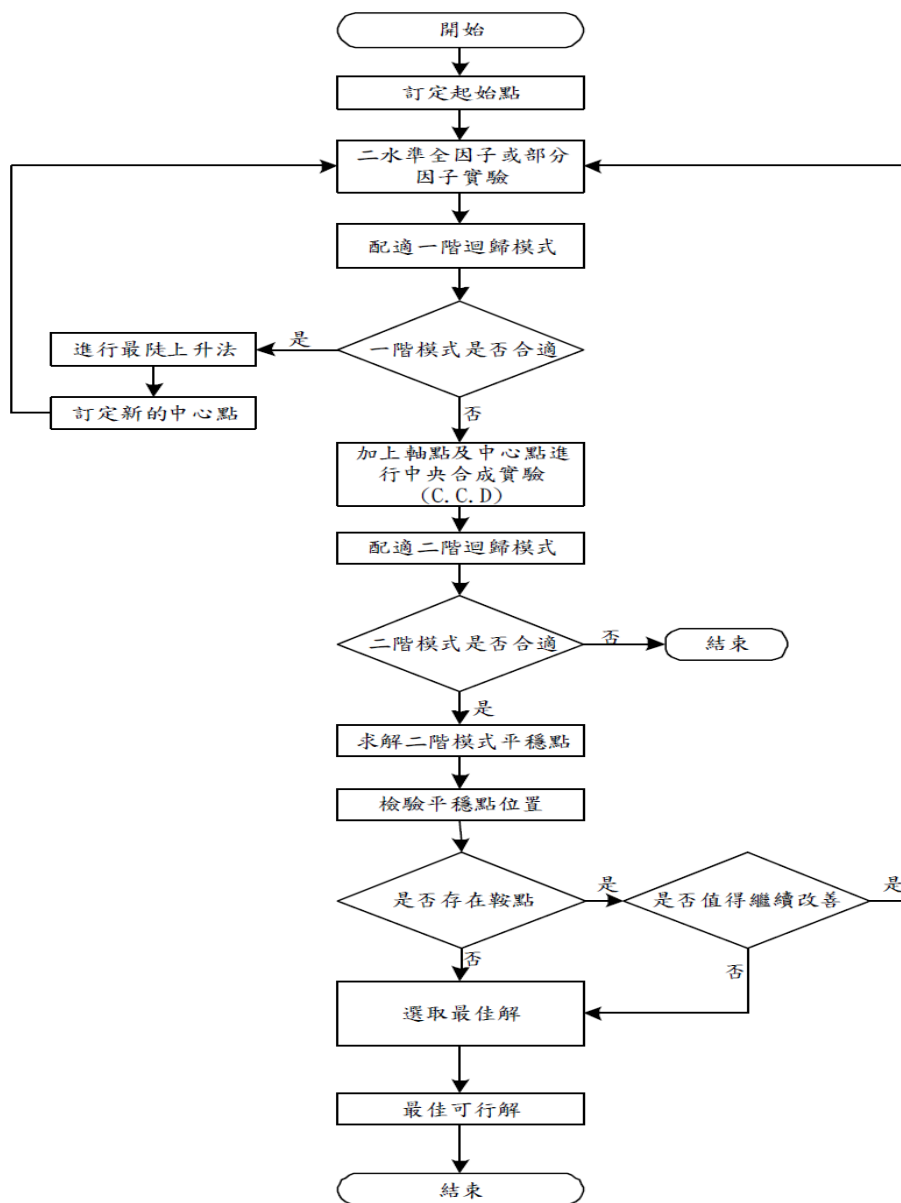
四、 反應曲面法

(一) 簡介

對於多變數因子系統的最適化，傳統上大多以一次實驗決定一個因子最適值(one-factor at a time)方法來尋找最適點。但是此種方法往往沒有考慮因子與因子之間的交互關聯效應(interactive effect)，即

使在考慮此一效應下，所需實驗次數也較多，使用上耗時與耗成本。此外，當因子間交互影響效應極為顯著時，往往無法得到真正的最適值。為了改善上述缺點，一些最適化方法如梯度法 (gradient method)、開展操作法 (evolutionary method)、三角點搜尋法 (simplex method) 及反應曲面法 (response surface methodology ; RSM) 等被發展出來 (Himmelblau, 1970)，並引用於不同程序操作條件的最適化。其中又以反應曲面法可同時測定各因子之間的交互影響，因此許多研究均採用此方法，其流程圖如圖八所示。

反應曲面法為一結合數學及統計之技術，將問題模式化並分析求出變數 (variable) 對系統反應值 (response) 的影響 (Myers & Montgomery, 2002)。反應曲面法可以研究數個變數 (或因子) 組合所產生之反應值在何種變數組合條件下可獲得最適效果 (optimum solution)。反應曲面法可同時探討兩個或兩個以上影響因子而產生一最適化反應條件。此方法已被廣泛應用於物理學、食品科學、農業化學及社會學等領域，近年來，更被成功地應用於生化程序，如植物油轉換程序 (Cheynier, 1983)、酒精發酵 (Chen, 1981 ; Bowman & Geiger, 1984 ; Zertuche and Zall, 1985) 及酵母菌菌體 (Moresi et al., 1980) 之生產等研究上。相較於傳統一次實驗決定一個因子最適值，反應曲面法可提供實驗更大效益，下面就其特性說明介紹：



(曾珞萍, 民 99)

圖八、反應曲面法流程圖

Figure 8. Flow chart of response surface methodology.

1. 經濟性及可行性：反應曲面法可使用部分因數設定，故可以較少的實驗成本及時間而獲得正確有用的資訊。
2. 系統化實驗設計：藉由一次實驗即可獲得多因子影響的反應極值以及因子影響程度。
3. 因子間的交互作用：可經由分析所得之統計資料和迴歸方程式來瞭解各因數間交互作用，可用於解釋多因數對於系統的貢獻及影響程度。
4. 可得最適化的技術條件：反應曲面法所得的迴歸方程式可以很快的被描繪成等高線圖（contour plot），並且可以快速的看出三度空間的曲面圖，經由圖形可以更有效且快速的看出最適化的條件所在。

(二) 原理

1951年，學者首先提出反應曲面法的設計概念(Box & Wilson, 1951)，其基本構想為結合統計實驗設計方法及數據契合技巧(data-fitting technique)，並依據實際實驗數據建立描述一群受測因子及目標函數（Objective function）間相互關係之數學模式，進而藉由此一模式探詢極值點所在位置。歸納其最適化步驟，反應曲面法主要包括下列五項：

1. 極值點區域逼近

根據現有文獻資料或是基礎實驗數據，從眾多因子選取適當的關鍵因子，推斷其有效範圍後，設定個因子合理的嘗試範圍。其次，利用二水準因子設計 (two-level factorial design) 及陡升路徑法 (method of path of steepest ascent) 來找尋極值點區域。

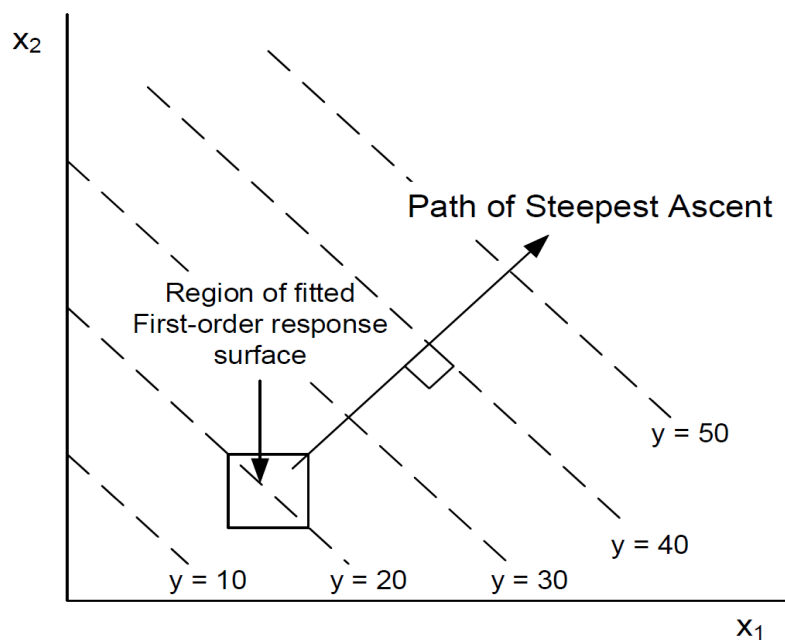
(1) 二水準因子設計

二水準因子設計實驗之數據可以用來分析各因子對目標函數的影響效應，並提供決定陡升路徑方向的資料。

(2) 陡升路徑法

依據陡升路徑進行實驗則可較迅速有效地搜尋極值點所在區域。但是一般來說，一試驗之最適條件之最初估值距離最適值差距極大，通常是會在 X 的一小段區域變化中配合一階模式，當作趨近最適值的方法，當我們欲求最大反應值時，沿著反應值遞增的方向，逐步修正試驗條件，逐次移動 X 向最佳組合區域逼近(圖九)，稱為陡升法 (the method of steepest ascent)。陡升路徑法是運用起始點 (P_0) 沿著各角度單位距離設定實驗點，得知此區域變化，藉由觀察各角度方向之反應值與起始點之反應值，找尋兩者反應值最大差距角度，再依此角度路徑持續延伸，直到實驗點之反應值下降為止，此時實驗點則相當接近極值區域(Myers & Montgomery, 2002)。

2. 反應曲面數學模式建立



(Montgomery, 2001)

圖九、陡升路徑圖

Figure 9. Path of steepest ascent.

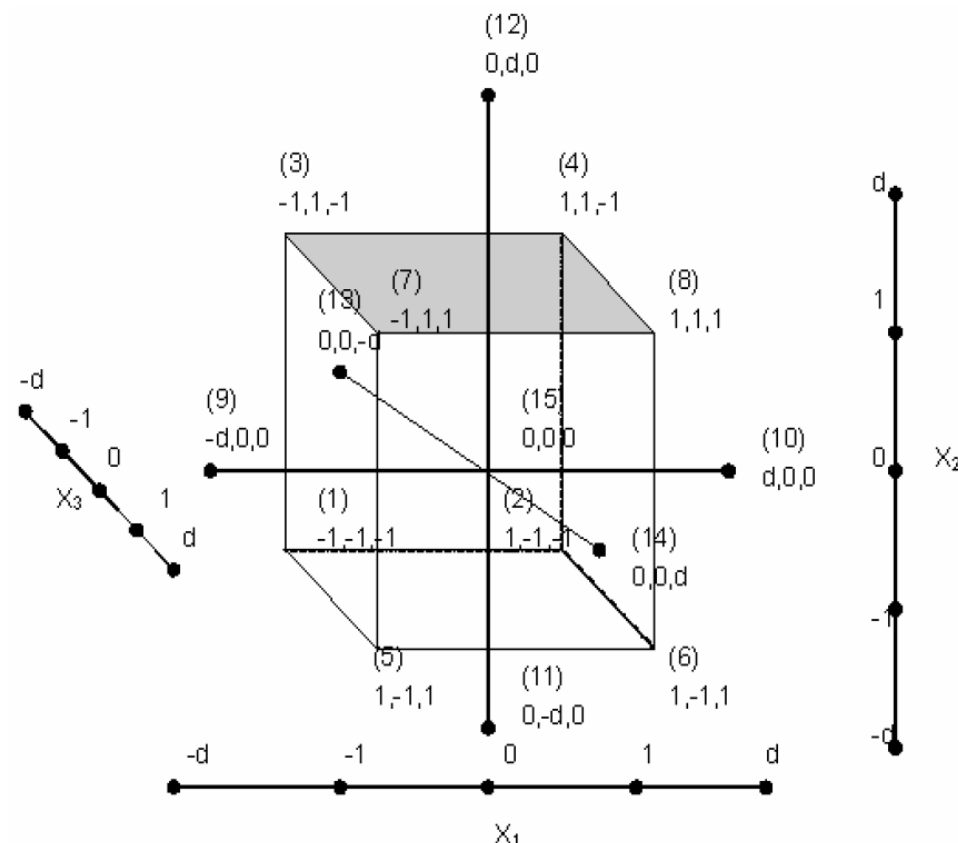
依照陡升路徑法的結果，當試驗已快達到最適值的邊緣，可由一階模式欠合性檢定(test of lack of fit)結果看出，當一階模式欠合性之 F 值達 5% 顯著水準時，其反應值就不再是直線。再利用中心複合實驗設計(central composite design ; CCD)給予補充星點(star point)、軸點(axis point)與中心點(central point)實驗，同時結合因子設計實驗之數據，利用多元迴歸(multiple regression)技巧進行二階模式的數據契合。

(1)中心複合實驗設計

利用陡升路徑法只能粗略找到極值點的所在區域，需再搭配中心複合試驗設計，依二階迴歸模式來尋找極值點。在二階層因子設計法中只有兩個測試水準，所以中心複合實驗設計利用中心點為起始點，以星點和軸點輔助下，以三度空間試驗設計來彌補測試水準的不足。先模擬出起點周圍區域的反應狀況，再藉由二階模型(second-order model) (2)模擬找尋出極值點座標：

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^n \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i < j=2}^n \sum \beta_{kij} x_i x_j \quad (2)$$

以三因子舉例(圖十)，星點是由原點沿著中心軸向外延伸，在適當距離下設定的實驗點。對此三因子系統而言，此適當距離是指設計點與原點的距離，相等於原點與立方體各頂點之距離。所以因子設計與星點的實驗點都在以原點為中心的球型表面上，而且彼此對稱



(Myers & Montgomery, 2002)

圖十、三因子中心複合設計概念圖

Figure 10. Concept graph of central composite design with three factors.

。依此原則，對於多變數因子系統而言，星點之延伸距離(d 值)等於 $N_f^{1/4}$ ，其中 N_f 為因子設計，包括完整或部份因子設計之總實驗點數 (Thomson, 1982)。星點之延伸距離為 N_f 為星點總數，軸點與原點之距離和星點與原點之距離相等，中心點則是在座標原點(0,0,0)進行重複試驗，其目的除了提供二階模式迴歸計算所需之數據外，另一方面可由重複試驗來估計由儀器與人為操作所造成的純實驗誤差 (pure error)。如此一來，各因子之測試範圍涵蓋中心點(0,0,0)、軸延伸點(-d, +d) 與立方體之頂點(-1, +1)等五個測試水準。依照中心複合實驗設計進行實驗所得之結果，透過 statistical analysis system (SAS)、Statistical Product and Service Solutions(SPSS)等統計軟體，以反應曲面迴歸分析進行二階模式契合，並以此二階模式來描述反應曲面之變化(Myers & Montgomery, 2002)。

3.反應曲面模式適切性之統計檢驗

由實驗數據進行統計迴歸而得的反應曲面模式對於表示數據的適切程度，可利用變異數分析法(analysis of variance ; AVONA)以及檢定係數(determination coefficient ; R^2)來檢驗。除了確認反應曲面法模式的可靠性外，亦可藉此統計檢驗步驟來說明實驗數據的規則性。同時，由中心複合設計的中心點重複試驗，也可估計純粹由實驗上所產生的誤差。

(1) 變異數分析法

欲檢驗某數學模式其迴歸係數是否為顯著時可由 F test 檢定。

$$F_0 = MS_{X1} / MS_E$$

其中， MS_E (residual mean of square) 為殘差之平均平方和

$$MS_{X1} = SS_{X1} / \nu_{X1} \text{ 則為模式之平均平方和}$$

SS_{X1} ($X1$ sum of square) 為模式之迴歸變異

ν_{X1} 為自由度

再以 F 分佈(F distribution) 來檢驗迴歸適切性，由 F 分佈表查出誤差率為 α ，相對自由度之 F 值，若 F_0 大於 F 值則可認定此數學模式之適切性檢驗上有 $(1-\alpha)$ 水準以上的顯著性。

(2) 檢定係數

模型之適切性亦可由檢定係數 R^2 來判斷，其定義為 $R^2 = SS_R / SS_T$ ，

即為迴歸模式對於實驗數據總變異所描述的比率；換言之，亦表示迴歸模式對其所描述的實驗數據之適切程度。

SS_R (regression sum of square) 為數學模式之迴歸變異， SS_T (total sum of square)

為實驗總變異。若 R^2 值越趨近 1，表示此數學模式可適切描述各

實驗數據；反之 R^2 值遠低於 1，表示此數學模式與各實驗數據總

偏差相當大。

4. 極值點之決定

極值點又稱逗留點(stationary point)，可能是最大反應值所在點

(point of maximum response)、最小反應值所在點(point of minimum response)或是鞍點(saddle point)，一般以正則分析(canonical analysis)進行判斷(Myers & Montgomery, 2002)。

5. 因子影響效應分析

系統中各因子對目標函數之影響雖可由一階或二階模式各項係數值大小作初步判斷，但各因子之影響程度以及影響效應是否顯著，則應以統計檢驗方式加以確定。欲了解各系數之影響差異則可利用 t test 檢驗分析。t test 主要是將各項因子的係數與對應之標準偏差(standard deviation; SD) 作比較，若該比值和 t table 中相對自由度下 t value 小，表示此因子對反應值並無顯著影響。若該項係數與 SD 比值大於 t value，則此因子對反應值有顯著影響 (Myers & Montgomery, 2002)。

參、材料與方法

一、實驗材料

(一) 實驗樣品

取自台灣花蓮六十石山之金針花，學名為*Hemerocallis fulva* L.，為百合科多年生宿根性草本植物，新鮮金針花苞在不同生長階段，顏色會由綠轉橘黃色且體長逐漸延伸，本研究將原產於花蓮的金針花苞依生長區分為五階段，長度分別為3、6、8、10 cm與開花(>10 cm)階段(圖十一)。

(二) NO清除活性成分所需試藥

HPLC 級 gallic acid 純度 98 % 以上、Folin-Ciocalteu's phenol reagent 購自Fluka公司。分析級sodium carbonate (Na_2CO_3)純度99.8%，aluminium chloride純度 ≥ 99.9 %、quercetin純度95 %、分析級sodium nitroprusside (SNP) 純度 ≥ 99.9 %、sulfanilamide 純度 ≥ 99 %、N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 純度 ≥ 98 %、sodium nitrite純度 ≥ 97 %均購自Sigma公司。phosphoric acid購自台灣聯工化學公司。

(三) 酚類化合物組成分析所需試藥

catechin純度 ≥ 99.2 %、rutin純度 ≥ 91.4 %、chlorogenic acid純度 ≥ 95.2 %、kaempferol純度 ≥ 97.7 %、epigallocatechin gallate, analyst



圖十一、五個不同生長階段之金針花苞

Figure 11. Different growth stages of daylily flower buds.

ical standard 純度 $\geq 98\%$ 、wogonin 純度 $\geq 98\%$ 、pinocembrin, analytical standard, 均購自 Chromadex 公司。benzoic acid 純度 $\geq 98.5\%$ 、caffeic acid 純度 $\geq 98\%$ 、epicatechin 純度 $\geq 98\%$ 、quercetin 純度 $\geq 98\%$ 、ellagic acid 純度 $\geq 95\%$ ，以上購自美國 Sigma 公司。myricetin 純度 $\geq 96\%$ 、chrysin 純度 $\geq 97\%$ 等購自美國 Sigma-aldrich 公司。

(四) 溶劑

HPLC 級 formic acid、分析級 dimethyl sulfoxide (DMSO) 以上購自美國 Sigma 公司。HPLC 級 methyl alcohol (MeOH) 購自 Mallinckrodt 公司。工業用 95% 酒精購自台灣景明化工公司。

二、儀器設備

(一) 高效率液相層析儀(HPLC)

管柱：購自美國 Agilent 公司，Eclipse Plus C₁₈ 管柱(4.6x250 mm)，

填充物顆粒大小 $5\mu\text{m}$

幫浦：日本 Shimadzu 公司 LC-10AT 型

自動注射器：日本 Shimadzu 公司 SIL-9A 型

光電二極體陣列偵測器：日本 Shimadzu 公司 SPD-M20A 型

線上自動除氣裝置：美國 Phenomenex 公司 DG-4400 型

資料處理：日本 Shimadzu 公司 Class-VP chromatography data

System 6.14

(二) 超高速離心機

台灣Hitachi公司himac CF-15R型

(三) 旋轉式減壓濃縮機

濃縮器：瑞士Buchi公司RE111型

水浴槽：瑞士Buchi 公司461型

抽真空幫浦：日本Tokyo Rikakikai公司A-3S型

冷卻循環機：台灣Firstek Scientific公司B403L型

(四) 超音波震盪機

澳洲Power Sonic公司420型

(五) 紫外-可見光分光光度計

日本Hitachi公司的U-2001 Spectrophotometer

(六) Vortex Mixer

美國Thermolyne公司產品，型號37600, Maxi Mix II

(七) 旋轉式磁石攪拌器

美國Corling公司產品

(八) ELISA Reader

美國Thermo公司產品，型號MRX II

三、實驗方法

(一) 篩選高NO清除活性成分之金針花原料

1. 金針花乙醇萃取物之製備

分別精秤約 0.5 g 已通過 70 mesh 篩網之冷凍乾燥金針花粉末，包括 3、6、8、10 cm 花苞與開花等五個階段，加入於 250 mL 之 95 % 乙醇溶劑中，於室溫、避光條件下以磁石攪拌 24 h，之後於 15,000 ×g，4°C 下離心 30 min(巫玉琳，民 97)。利用 90 mm 濾紙過濾之後收集上清液，以減壓濃縮的方式將乙醇抽乾，用乙醇定量至一定體積，此為不同生長階段金針花苞之乙醇萃取物。

2. NO清除率測定

分別取 12.5 μl 之 100 ppm 金針花乙醇萃取物加入 487.5 μl PBS 緩衝液(pH 7.4)以及 500 μl 之 25m M sodium nitroprusside(SNP)之 PBS 緩衝液，於室溫下反應 120 min 之後，取出 125 μl 反應液加入 75 μl 之 Griess reagent 混和均勻，控制組以 PBS 取代樣品，空白組以 PBS 取代反應液，利用分光光度計測量波長 570 nm 之吸光值(Bor et al., 2006)，吸光值越低，表示受測物對 NO 清除率越強。Nitrite 濃度則以 sodium nitrite 之標準曲線定量，以評估樣品清除 NO 之能力。

$$\text{Scavenging effects (\%)} = 1 - \left[\frac{\text{OD sample} - \text{OD blank}}{\text{OD control} - \text{OD blank}} \right] \quad (3)$$

OD sample: 樣品於波長 570 nm 之吸光值

OD control: 控制組於波長 570 nm 之吸光值

OD blank: 空白組於波長 570 nm 之吸光值

3. 總酚類化合物(Total phenolic compounds ; TPC)含量測定

分別取50 μL 樣品與不同濃度標準品gallic acid(GA)與500 μL 之Folin-Ciocalteu's reagent混合均勻，再加入1 mL H_2O 及2.5 mL之20% Na_2CO_3 溶液反應，反應後利用分光光度計測定波長735 nm之吸光值(Julkunen-Titto, 1985)。吸光值越高表示樣品總酚含量越多，由不同濃度之gallic acid所製成的標準曲線，計算樣品中總酚類化合物之含量，以mg GAE /g dry weight表示。

4. 類黃酮(Total flavonoid ; TF) 含量測定

類黃酮上相鄰的OH基會與氯化鋁反應生成紅棕色物質，可在波長430 nm下測定其最大吸收波峰(Isabel et al., 2011)，其生成紅棕色物質愈多，吸光質愈高，表示樣品中類黃酮含量愈多。將1 mL標準品quercetin與金針花乙醇萃取物分別加入1 mL之2 % AlCl_3 於室溫下反應15 min之後，利用分光光度計測量波長430 nm之吸光值。由不同濃度quercetin所製成的標準曲線，計算樣品中類黃酮含量，以mg quercetin equivalent/g dry weight表示。

5. 酚類化合物組成分析

取上述金針花乙醇萃取物3 g溶於2 mL DMSO中，以0.22 μm 小飛碟過濾後，取 20 μL 注入HPLC 分析。固定相是利用逆相 C_{18} 管柱(4.6 x 250 mm)，移動相包含 A沖提液5 % formic acid及 B沖提液100 % 甲

醇，沖提條件是在0 min時，A沖提液由70 %逐漸減少，B 沖提液則由30 %逐漸增加至20分鐘為40 %，30分鐘時為45 %，50分鐘時為60 %，52分鐘時為80 %，至60 min時A 沖提液為10 %，B 沖提液達到90 %，photodiode-array 偵測器在波長190-800 nm下進行分析(Yaoa et al., 2003)。所檢測的酚類化合物catechin, EGCG, epicatechin, wogonin, chrysin, caffeic acid, pinocembrin, rutin, chlorogenic acid, kaempferol, quercetin, myricetin及ellagic acid。

(二) 高NO清除活性成分最適化萃取條件探討

1. 金針花乙醇萃取物之製備

製備具有高抗發炎活性及成分之金針花原料，此篩選出來的原料與不同濃度乙醇的萃取比例1:15 (w/v)，依實驗設計條件下於不同的乙醇濃度(ethanol concentration; EtC) (%)、萃取溫度(extraction temperature; ExTe) (°C)以及萃取時間(extraction time; ExTi) (h)進行萃取，之後於 $15,000 \times g$ ， $4^{\circ}C$ 下離心 30 min。利用 90 mm 濾紙過濾之後收集上清液，用乙醇定量至一定體積，此為該金針花原料之乙醇萃取物。

2. 陡升試驗

先利用部分因子試驗得到一階模式之後，由中心點($X_1=0$, $X_2=0$, $X_3=0$)沿著陡升路徑向上移動，直到反應值開始減少為止，這時以最

大反應值之獨立變數點之前後重新配合一階模式，再經由變方分析表可得知直線迴歸不顯著($p>0.05$)，此時二次式迴歸則達顯著水準($p<0.05$)，表示此試驗結果為曲線關係，其真正曲面上最高點應在此試驗結果附近，這時再搭配 CCD 進行試驗，以便獲得更精確的最適值。

3. 實驗設計

本實驗採用三變數、五階層之 CCD，探討所篩選的金針花其最高 NO 清除活性成分最適化萃取條件。萃取變數包括：EtC、ExTe、ExTi，其五階層依陡升試驗之中心點設計之。

4. 統計分析

反應曲面法採用統計軟體 SAS (Statistical analysis system) 中反應曲面迴歸分析(response surface regression ; RSREG)的程序進行分析，以契合前述之二次多項式 (2)：

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^n \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i < j=2}^n \sum \beta_{kij} x_i x_j \quad (2)$$

Y為反應(response)分別為NO清除率(%)及清除活性成分(TPC)， β_{ki} 為一次式影響常數， β_{kij} 為交感作用影響常數， β_{kii} 為二次式影響常數， x_i 為獨立變數；採用Sigma(version: 10.0; Jandel Scientific, Erkrath, Germany)繪圖軟體，三變數中的一變數固定為常數項，進行兩變數

對反應值的曲面圖與等高線圖之繪製。

本實驗數據使用統計軟體 SAS 進行統計分析，以ANOVA程序做變異分析，並且以Duncan's multiple range test分析各樣品之間的影響差異。



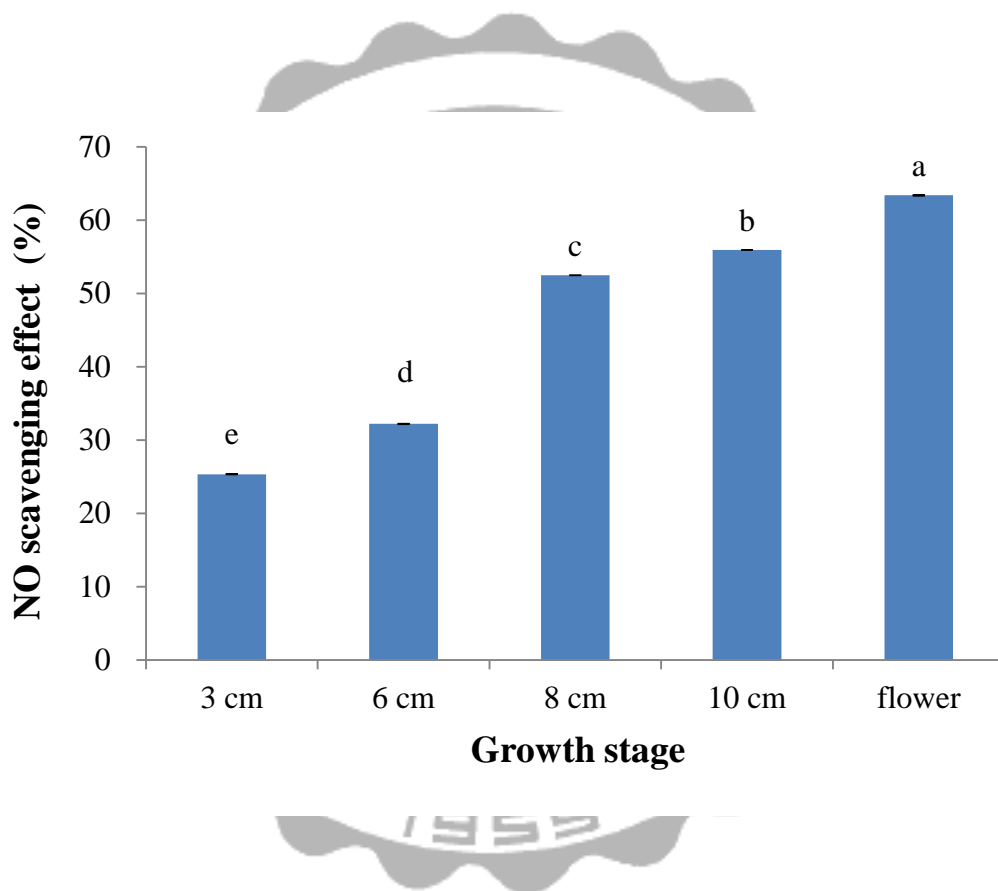
肆、 結果與討論

一、 篩選高 NO 清除活性成分之金針花原料

本研究所採用的金針花原料包括 3、6、8、10 cm 花苞與開花等五個階段，藉由各原料乙醇萃取物比較其 NO 清除率及清除活性成分含量包括 TPC、TF 及 11 種酚類化合物組成，以篩選出高 NO 清除活性成分的金針花原料。此篩選出的金針花將作為後續 RSM 最適萃取條件探討的起始原料。

(一) 金針花不同生長階段對 NO 清除率之影響

為了解不同生長階段金針花乙醇萃取物對 NO 清除能力的影響，故進一步進行由 SNP 生成 NO 之清除能力試驗。SNP 在水溶液中會釋放出 NO，於氧分子的存在下，可反應生成亞硝酸及硝酸化合物，因此 NO 清除愈多，產生的亞硝酸及硝酸化合物就愈少。圖十二為探討金針花不同生長階段對 NO 清除率之影響。結果指出，金針花 NO 清除率隨生長成熟而漸增可達 60 % 以上，其中以開花組顯著高於其他階段 ($p < 0.05$)，NO 清除率高達 63.38 %。而 Bor et al. (2006) 探討金針花時所得的 NO 清除率小於 40 %。此外，一些酚類化合物如 catechin, epicatechin, EGCG, myricetin, kaempferol 等物質已被報導可有效清除 NO (Bor et al., 2006; Yoshimi et al., 2013)，因此後續將測定 TPC、TF 含量及其組成。

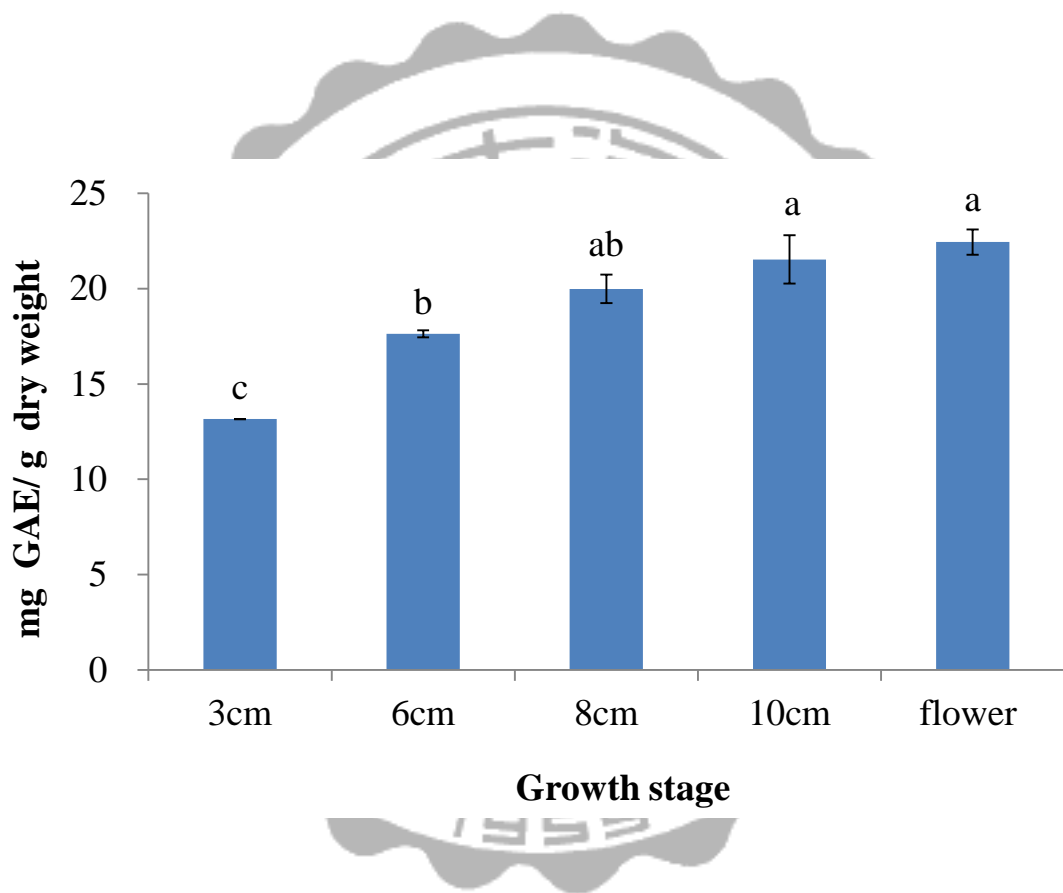


圖十二、金針花不同生長階段對 NO 清除率之影響

Figure 12. Effect of different growth stages of daylily flower on nitric oxide scavenging. Bars represent means \pm SD, n=3. Bars with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

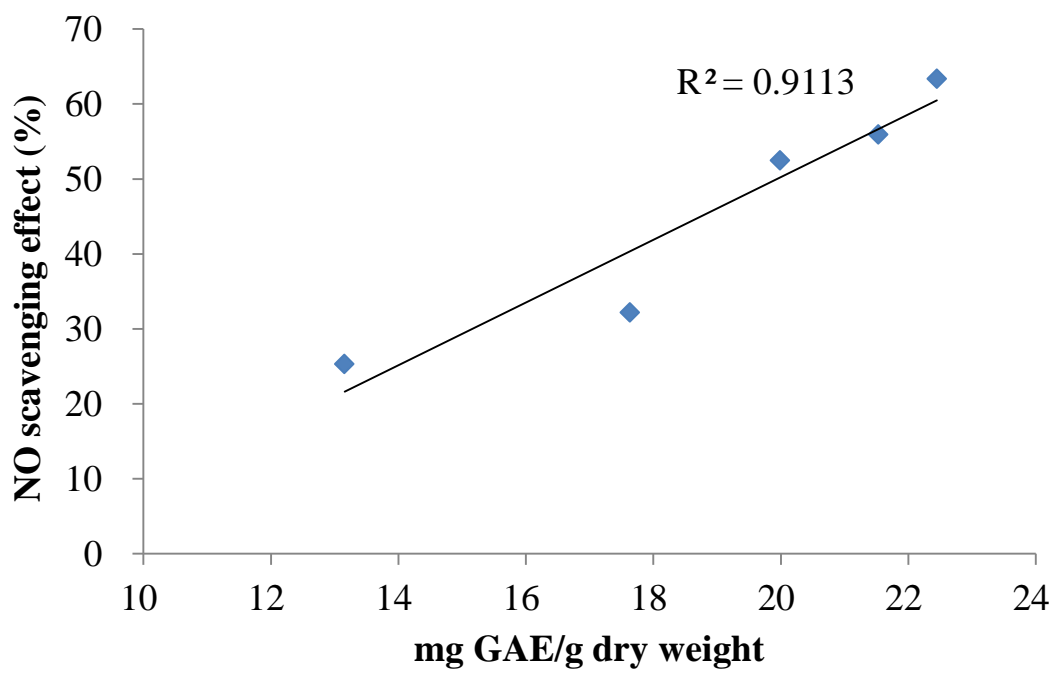
(二) 金針花不同生長階段 TPC 含量變化

植物具有抗氧化性、抗發炎及生物活性，其中所含的酚類化合物扮演重要角色(Kalt et al., 1999；Cichewicz et al., 2004)。膳食中主要具有抗氧化性質的酚類物質包括中性酚類化合物、酚酸以及類黃酮等，其中酚類化合物亦具有 NO 清除能力(Bor et al., 2006；Kim et al., 1999)。Folic-Ciocalteu's assay 為一種廣泛用於測量總酚類化合物的方法，可作用於酚類化合物結構上的 OH 基，並產生由黃色變藍色的呈色反應(Julkunen-Titto,1985)。許多文獻對於 TPC 含量測定多使用醇類作為萃取溶劑(Sun et al., 2009)，因此本研究所採用的萃取溶劑為乙醇，利用 GA 作為標準品，可計算出相對 GA 之當量以回推 TPC 含量，以 mg GAE/g dry weight 表示，GAE 數值愈高，表示樣品 TPC 含量愈多。圖十三為金針花不同生長階段 TPC 含量變化，結果顯示 TPC 含量隨金針花生長成熟而漸增，10 cm 和開花組含量均可達 20 mg GAE/g dry weight 以上，其中開花組有較高的趨勢，其 TPC 含量高達 22.4 mg GAE/g dry weight。圖十四為金針花不同生長階段之 NO 清除率與 TPC 含量之相關性，結果顯示 TPC 含量和 NO 清除 $R_2=0.9113$ ，具有高度相關。許多研究亦指出酚類化合物具有 NO 清除活性(Acker et al.,1995；Cichewicz et al., 2004；Bor et al., 2006)。



圖十三、金針花不同生長階段之總酚類化合物含量變化

Figure 13. Change of total phenolic compound content for different growth stages of daylily flower in terms of mg GA equivalent/g dry weight. Bars represent means \pm SD, $n=3$. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖十四、NO 清除率與 TPC 含量之相關性

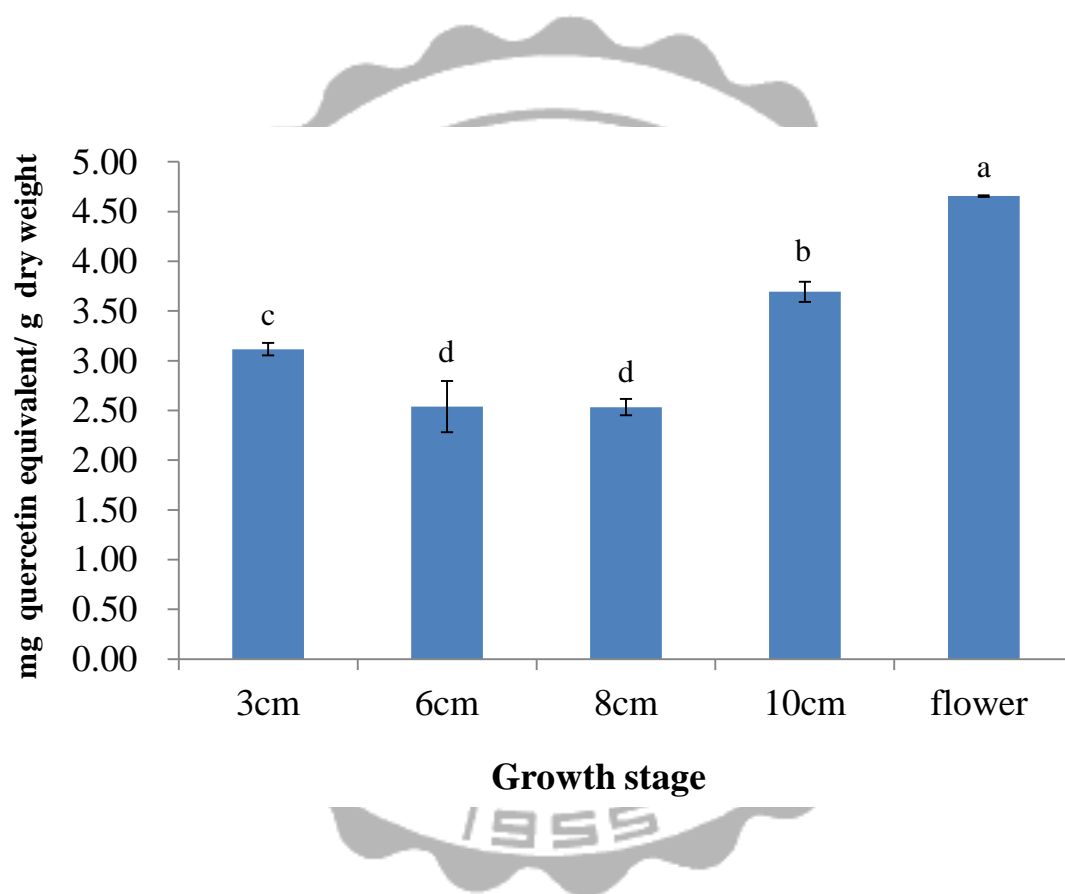
Figure 14. The correlation between NO scavenging effect (%) and total phenolic compounds . Means represent means \pm SD, n=3.

(三) 金針花不同生長階段 TF 含量變化

類黃酮亦屬於酚類化合物物質，存在於許多蔬果中，於鹼性環境下可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合物(Isabel et al., 2011)。本實驗以 quercetin 作為標準品，可計算出 quercetin 相對含量，以 mg quercetin equivalent /g dry weight 表示，其 quercetin 含量愈高，表示受測物 TF 含量愈多。圖十五為金針花不同生長階段 TF 含量變化，結果顯示 TF 含量以開花組顯著高於其他生長階段($p < 0.05$)，達 4.66 mg quercetin equivalent/g dry weight。

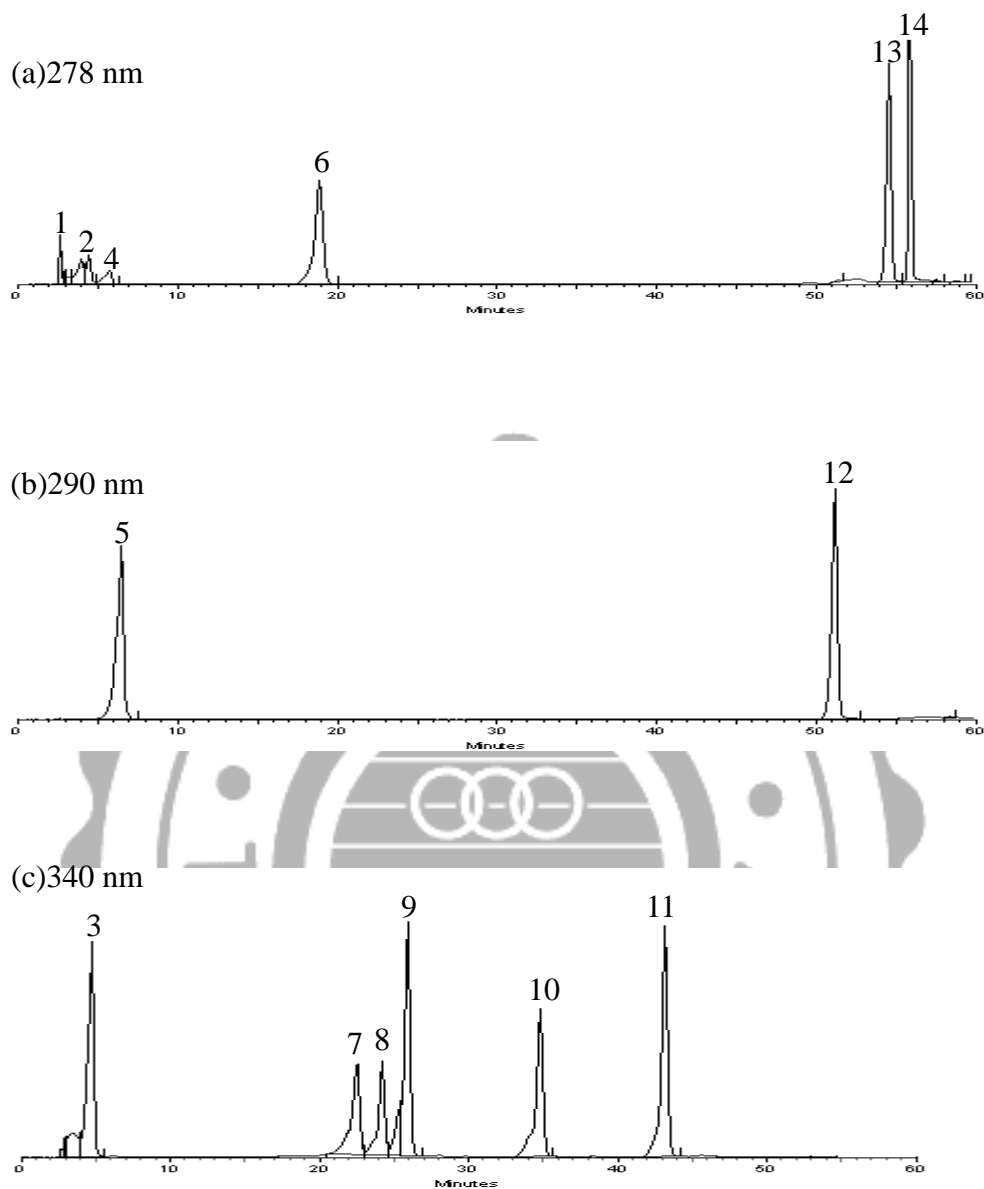
(四) 金針花不同生長階段酚類化合物組成分析

透過 NO 清除、TPC 及 TF 試驗得知金針花含有豐富酚類化合物、抗發炎能力，且酚類化合物含量與抗發炎相關(Acker et al., 1995)，因此進一步利用 HPLC 進行酚類化合物分析(Yaoa et al., 2003)。圖十六為不同波長下酚類化合物的 HPLC 層析圖，包括 278 nm 有 catechin, EGCG, epicatechin, wogonin, chrysin 及 benzoic acid(內標準品)，290 nm 有 caffeic acid, pinocembrin(內標準品)，340 nm 有 rutin, chlorogenic acid、kaempferol, quercetin, myricetin 及 ellagic acid(內標準品)。表一為金針花不同生長階段之酚類化合物分析，結果指出含量隨金針花生長成熟而漸增的包括 chlorogenic acid, epicatechin, caffeic acid 及 rutin，這些物質在開花組含量顯著高於其他樣品($p < 0.0$



圖十五、金針花不同生長階段之類黃酮含量變化

Figure 15. Change of total flavonoids contents for different growth stages of daylily flower in terms of mg quercetin equivalent/g dry weight. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖十六、(a)278nm(b)290nm(c)340nm 波長下酚類化合物的 HPLC 層析圖

Figure 16. HPLC chromatogram of phenolic compounds under (a)278 nm(b)290 nm(c)340 nm. 1, catechin;2, EGCG; 3, chlorogenic acid; 4, epicatechin; 5, caffeic acid;6, benzoic acid; 7, rutin; 8, ellagic acid; 9, myricetin; 10, quercetin ;11, kaempferol; 12, pinocembrin; 13, wogonin; 14, chrysin.

表一、金針花不同生長階段之酚類化合物含量

Table 1. Different growth stages of daylily flower of each identified phenolic compounds content (mg/100g dry weight). Means represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) in the same raw by Duncan's multiple range test

Phenolic compounds	Different growth stages				Flower
	Bud				
	3 cm	6 cm	8 cm	10 cm	
Catechin	68.80±3.67d	122.93±4.77b	126.50±3.24a	118.43±0.47b	107.78±2.17c
EGCG	59.82±3.47d	90.17±3.33c	110.04±0.35b	103.74±4.38b	140.75±7.67a
Chlorogenic acid	16.49±0.72c	24.68±0.73b	25.28±0.79b	23.59±0.78b	33.06±3.97a
Epicatechin	48.74±2.05d	60.98±2.63c	63.92±1.46c	75.54±9.98b	91.71±7.91a
Caffeic acid	3.35± 0.26d	6.80± 0.24c	8.21± 1.15b	8.70± 0.91b	9.60± 0.61a
Rutin	9.69±0.02e	14.26±1.35d	24.55±0.82c	39.90±1.94b	43.14±1.74a
Myricetin	1.25±0.06a	0.17±0.04c	0.17±0.03b	0.04±0.03d	0.31±0.04b
Quercetin	0.54±0.03a	0.17±0.02c	0.32±0.07b	0.56±0.04a	0.60±0.09a
Kaempferol	ND	ND	ND	ND	ND
Wogonin	0.89±0.05a	0.78±0.05b	0.66±0.06c	0.65±0.05c	0.60±0.05c
Chrysin	ND	ND	ND	ND	ND

5)，分別可達 33.06、91.71、9.60 及 43.14 mg/100 g dry weight。而含量隨金針花生長成熟而減少的有 wogonin，3 cm 含量顯著高於其他組別($p < 0.05$)，達 0.89 mg/100 g dry weight，至開花組則下降為 0.60 mg/100 g dry weight。其次，含量隨金針花生長成熟先增加後減少有 catechin 及 EGCG，其 catechin 含量由 3 cm 的 68.80 mg/100 g dry weight 增加至 8 cm 的 126.50 mg/100 g dry，且 8 cm 顯著高於其他樣品($p < 0.05$)，但是之後隨著生長成熟而減少，至開花組含量下降為 107.78 mg/100 g dry weight。而 EGCG 含量則是由 3 cm 的 59.82 mg/100 g dry weight 增加至 8 cm 的 110.04 mg/100 g dry，但 10 cm 則下降至 103.74 mg/100 g dry，其中以開花顯著高於其他樣品($p < 0.05$)，可達 140.75 mg/100 g dry。其他含量沒有隨著生長成熟而有增加趨勢或下降趨勢的有 myricetin 及 quercetin。myricetin 含量以 3 cm 顯著高於其他組別($p < 0.05$)，可達 1.25 mg/100 g dry weight，而 10 cm 顯著低於其他組別($p > 0.05$)，為 0.04 mg/100 g dry weight。quercetin 含量以 3 cm、10 cm 及開花顯著高於其他樣品($p < 0.05$)，含量可達 0.50 mg/100 g dry weight 以上。catechin, epicatechin, EGCG, myricetin, kaempferol 等物質已被證實具有 NO 清除能力(Yoshimi & Masashi, 2013)，且 catechin、rutin 與金針花抗發炎活性有高度的相關性 (Que et al., 2007)，而本研究開花組中 epicatechin、EGCG、rutin

這些物質含量均顯著高於其他組，圖十七為這四個酚類化合物總量與 NO 清除之相關性，其 R_2 達 0.87，表示有高度相關性。且開花組 catechin 含量雖少於 8 cm 組最高的 126.5mg/100 g dry weight，但仍可高達 107.78 mg/100 g dry weight，因此開花組較其他組顯現出最高的 NO 清除能力。

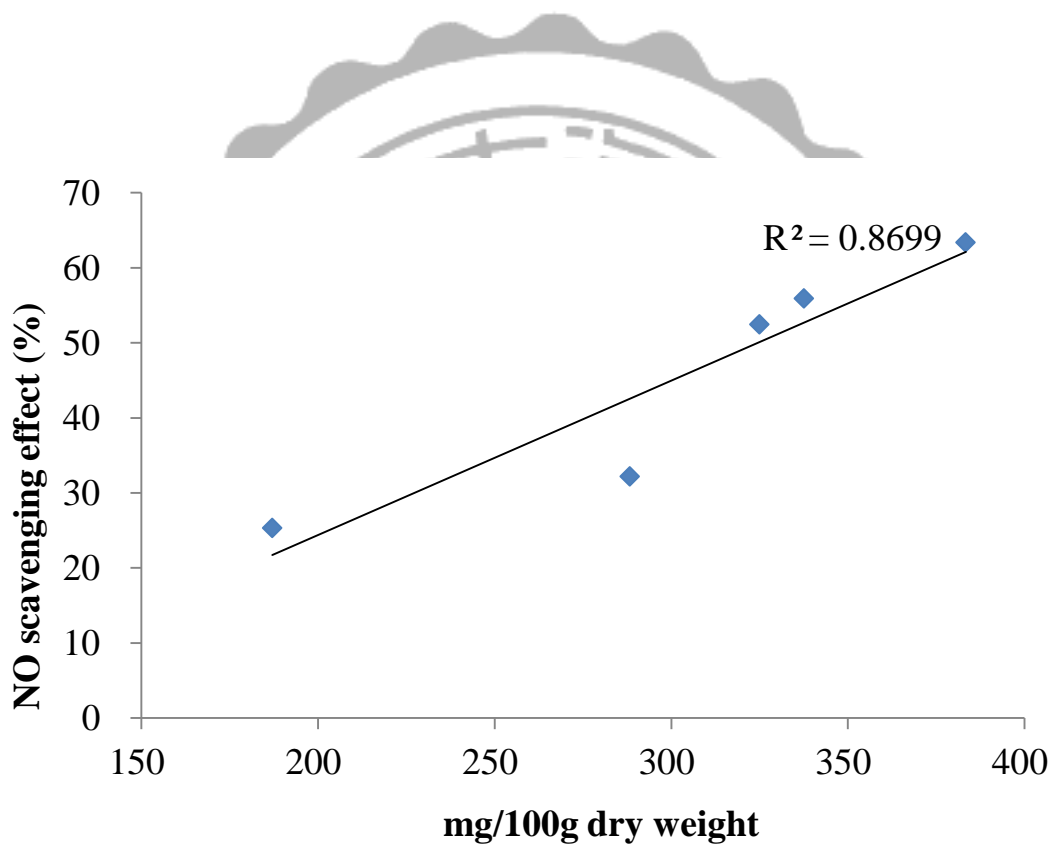
二、最適化萃取條件探討

(一) 陡升試驗

透過前面實驗篩選出金針花開花組具有高 NO 清除活性成分，作為後續最適萃取條件探討的起始原料。首先利用部分因子試驗得到一階模式之後，由中心點($X_1=0, X_2=0, X_3=0$)沿著陡升路徑向上移動，直到反應值開始下降。實驗共設計 8 個陡升階段如表二，陡升試驗結果顯示 NO 清除率呈現先增後減的趨勢，在第五階段可得最大反應值其 NO 清除率最高，此階段 EtC 為 75 %、ExTe 為 60 °C、ExTi 為 2.75 h，NO 清除率達 87.08 %，此初步結果可推知最高點應在此試驗結果附近，因此後續將以此條件為中心點，並搭配 CCD 進行試驗，以便獲得更精確的最適化萃取條件。

(二) 高 NO 清除率最適化萃取條件探討

表三為採用三變數、五階層之中心複合實驗設計(CCD)，探討開花金針花其最高 NO 清除活性成分最適化萃取條



圖十七、Catechin, EGCG, epicatechin, rutin 總量與 NO 清除率之相關性

Figure 17. The correlation between total content of catechin, EGCG, epicatechin, rutin (mg/100g dry weight) and NO scavenging effect (%). Means represent means \pm SD, n=3.

表二、陡升試驗結果

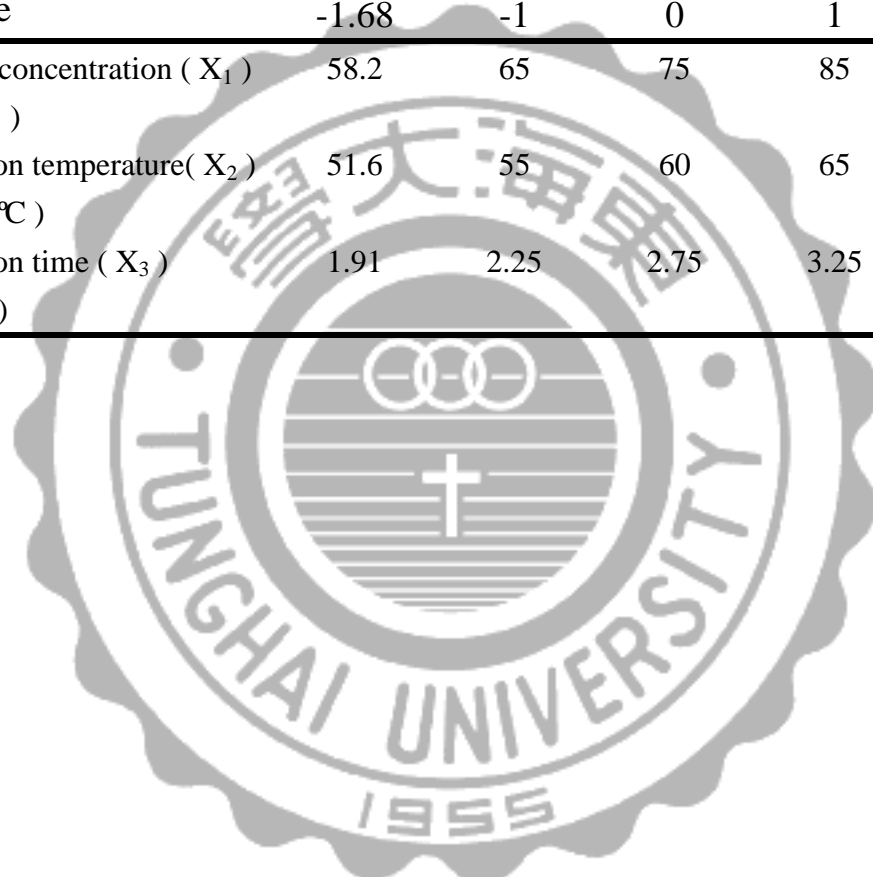
Table 2. Steepest ascent of response

stage	Factor			Response
	EtC (%)	ExTe (°C)	ExTi (h)	NO scavenging (%)
0	65	50.0	4.00	65.63
1	67	52	3.75	72.09
2	69	54	3.50	77.13
3	71	56	3.25	79.20
4	73	58	3.00	79.97
5	75	60	2.75	87.08
6	77	62	2.50	85.53
7	79	64	2.25	83.07
8	81	66	2.00	52.20

表三、五階層三變數中心複合實驗設計最適萃取條件反應參數實驗值之範圍

Table 3. The reaction parameters experiment range of five-level -three-factor central composite rotatable experimental design

Independent variable	Coded level of variable				
	-1.68	-1	0	1	1.68
Ethanol concentration (X_1) (EtC, %)	58.2	65	75	85	91.8
Extraction temperature(X_2) (ExTe, °C)	51.6	55	60	65	68.4
Extraction time (X_3) (ExTi, h)	1.91	2.25	2.75	3.25	3.59



表四、 開花階段金針花NO清除率及高TPC含量之五階層三變數中心
複合實設計與實驗數據

Table 4. 5-level-3-factor central composite design and experimental data
of nitric oxide scavenging effect and total phenolic compounds
in flower opening daylily flower

Treatment	Coded level of variable			nitric oxide scavenging effect(%)	TPC (mg GAE/ g dry weight)
	Ethanol concentration (X ₁)(EtC,%)	Extraction temperature(X ₂) (ExTe, °C)	Extraction time (X ₃) (ExTi, h)		
1	0	0	0	82.56	52.64
2	0	0	0	83.01	55.75
3	0	0	0	87.47	53.99
4	0	0	0	88.89	52.81
5	0	0	0	89.00	53.86
6	-1	-1	-1	70.54	48.35
7	-1	-1	1	56.59	37.68
8	-1	1	-1	62.10	38.75
9	-1	1	1	53.10	35.15
10	1	-1	-1	65.20	42.56
11	1	-1	1	79.33	44.57
12	1	1	-1	63.20	42.16
13	1	1	1	71.06	45.16
14	0	0	-1.68	68.48	45.19
15	0	0	1.68	67.57	42.58
16	0	-1.68	0	69.51	46.97
17	0	1.68	0	66.15	45.71
18	-1.68	0	0	64.21	40.15
19	1.68	0	0	64.92	35.39

表五、實驗點NO清除率曲面之二次多項式及檢定係數

Table 5. Second-order model equations for the response surfaces fitted to the experimental data points, as a function of nitric oxide scavenging effect respectively, coefficient of determination (R^2). ^a Y = nitric oxide scavenging effect, X_1 = ethanol concentration(%), X_2 = extraction temperature($^{\circ}$ C), X_3 = extraction time(h)

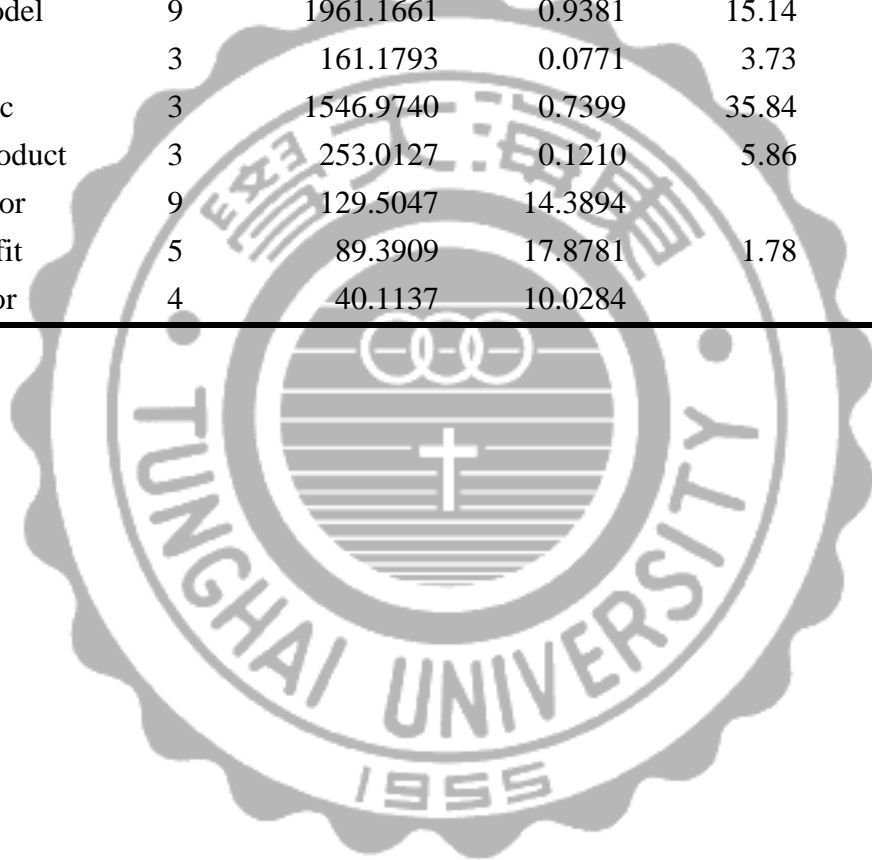
Model equations ^a	R^2
$Y = -1093.22 + 9.78X_1 + 25.38X_2 + 38.22X_3 - 0.066X_1^2 - 0.261X_2^2 - 31.025X_3^2 +$ $-0.0033X_1X_2 + 0.042X_1X_3 + 2.247X_2X_3$	0.9381

件。萃取變數包括：EtC 為 58.2-91.8 %、ExTe 為 51.6-68.4℃、ExTi 為 1.91-3.59 h，表四為五階層三因子的 CCD，探討開花階段金針花乙醇萃取物的十九個實驗點對 NO 清除率及 TPC 含量的影響。NO 清除率實驗結果顯示，八個星點與六個軸點之實驗點對 NO 清除效應介於 53.10-79.33 %，其中預設為最佳生產條件之中心點 (central point) 對 NO 清除率則介於 82.56-89.00 %，均高於其他實驗點，由此可推測最佳生產條件相當接近中心點。表五為將表三中十九個實驗點以統計分析軟體 SAS 中的反應曲面回歸分析(RSREG)，獲得其二次模型方程式、檢定係數(R^2)，由檢定係數 0.9381，表示此二次模型多項式具有良好的解釋力，並可適當呈現反應值與各變數之間實際關係。表六為二次多項式的變異數分析 (ANOVA) 結果，指出二次多項式(total model)於 F-test 顯示具有顯著影響 ($p<0.05$)，表示此二次模型多項式對 NO 清除率有高度相關性，其中又以二次式(quadratic)具顯著影響 ($p<0.05$)，而交互作用(cross product)亦呈現顯著差異 ($p<0.05$)，表示此實驗探討三個變數之間產生的交互作用具有顯著影響 NO 清除的效果。總誤差(total error) 分析中，此二次多項式適缺性(lack of fit) 無顯著影響 ($p>0.05$)，由此亦可得知此二次多項式所呈現的誤差無顯著影響，總誤差來源多來自實驗誤差 (pure error)。此外，表七進一步以聯合檢測分析了解三個反應變數對 NO 清除率之整體影響，結果顯

表六、影響NO清除率相關變數之變異數分析

Table 6. Variables analysis of variance for pertaining to the response of nitric oxide scavenging effect

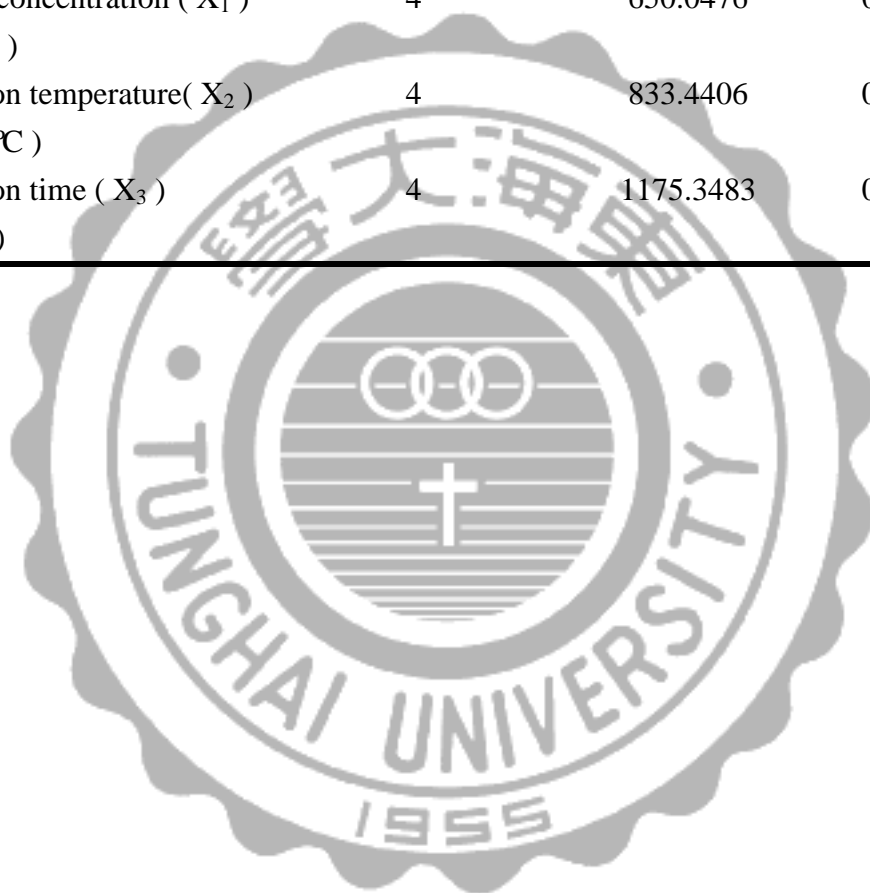
Source	Degree of freedom	Sum of Squares	Means of Squares	F-value	Prob > F
Total model	9	1961.1661	0.9381	15.14	0.0002
Linear	3	161.1793	0.0771	3.73	0.0542
Quadratic	3	1546.9740	0.7399	35.84	<.0001
Cross product	3	253.0127	0.1210	5.86	0.0168
Total error	9	129.5047	14.3894		
Lack of fit	5	89.3909	17.8781	1.78	0.2976
Pure error	4	40.1137	10.0284		



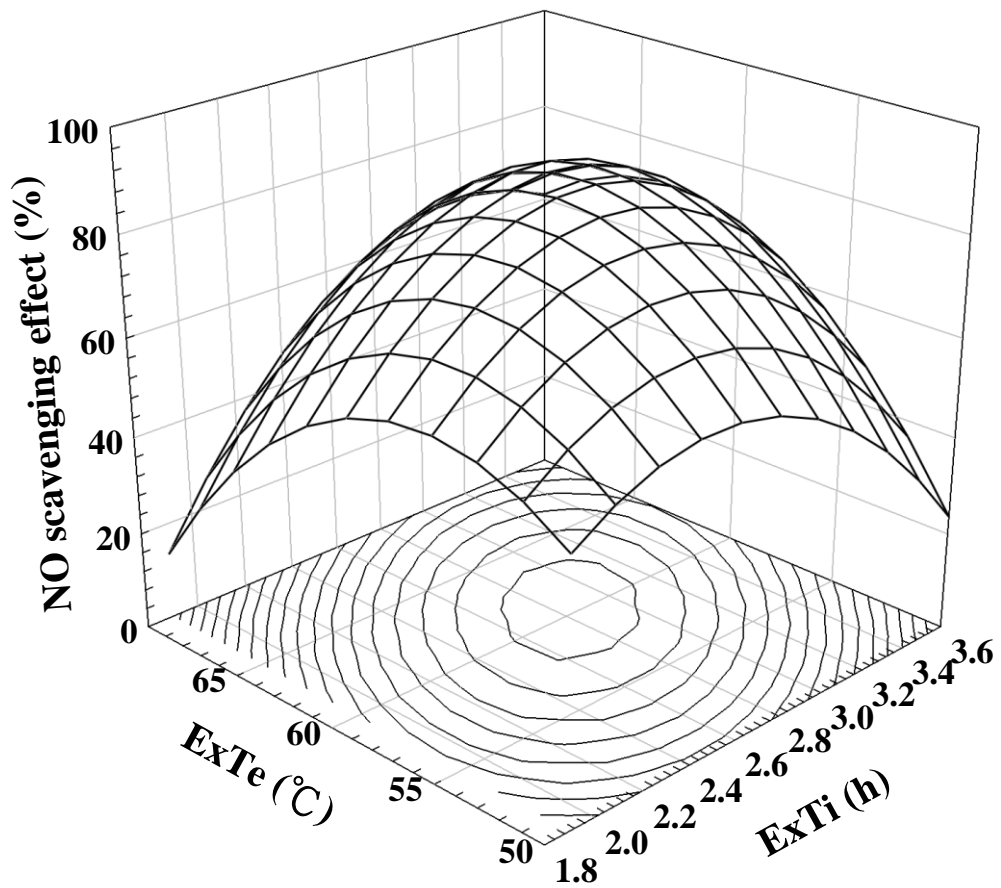
表七、聯合檢測中 NO 清除率變異分析

Table 7. Variance analysis of nitric oxide scavenging effect for joint detection

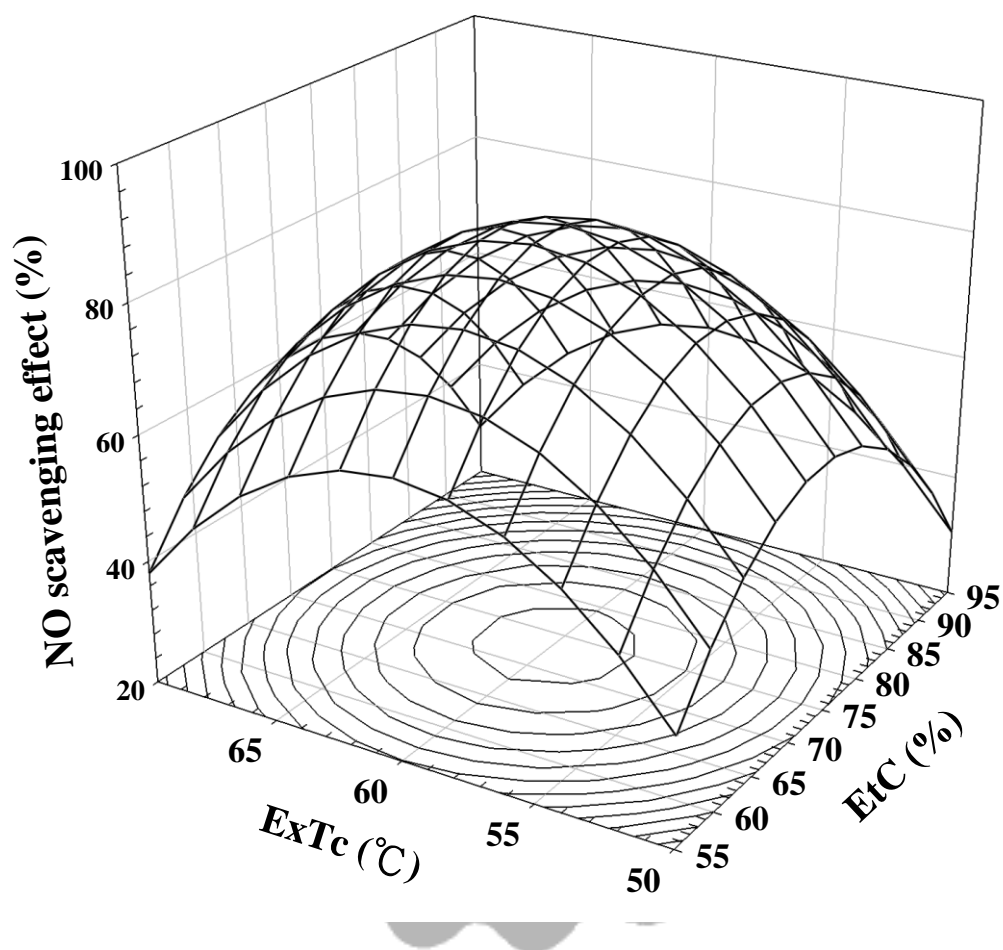
Factor	Degree of freedom	Sum of Squares	Prob > F
Ethanol concentration (X_1) (EtC, %)	4	650.0476	0.0015
Extraction temperature(X_2) (ExTe, °C)	4	833.4406	0.0006
Extraction time (X_3) (ExTi, h)	4	1175.3483	0.0002



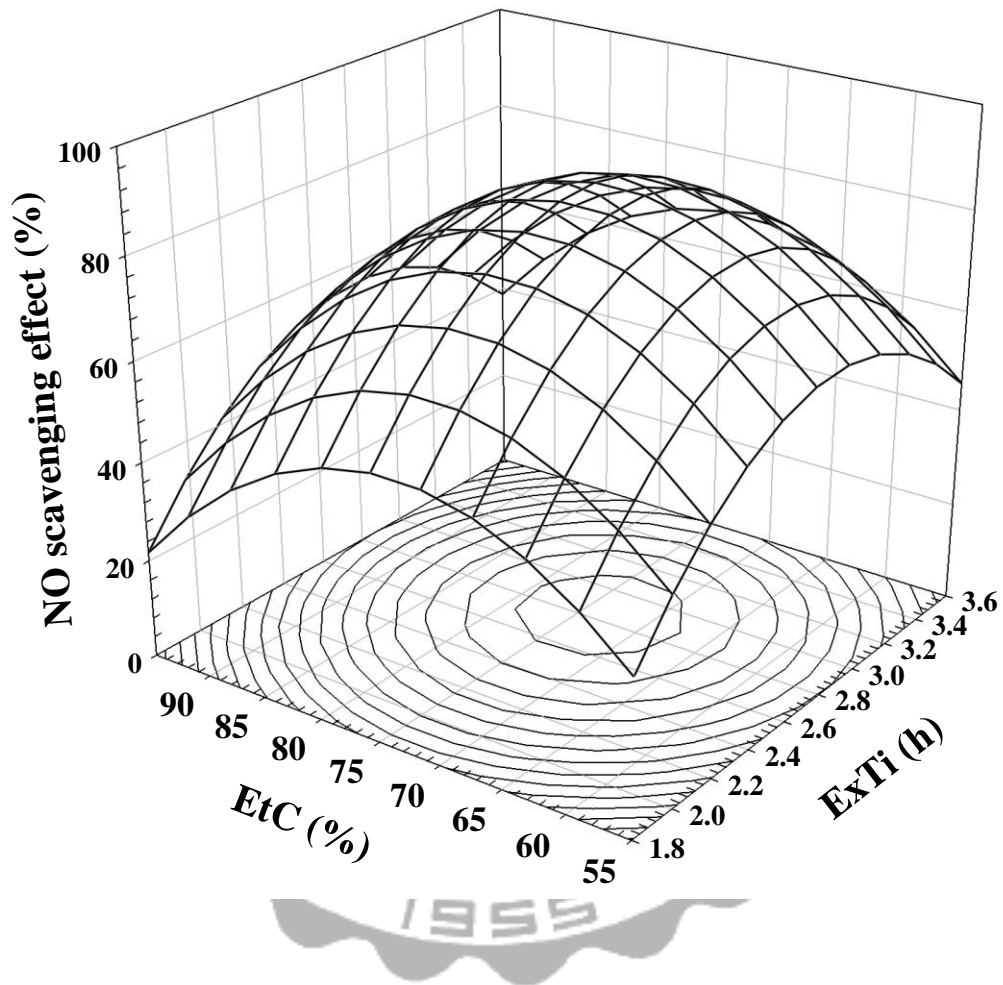
示乙醇濃度(X_1)與萃取溫度(X_2)、萃取時間(X_3)對NO清除率皆為顯著性影響因子($p < 0.05$)，表示乙醇濃度、萃取溫度除與萃取時間除了對萃取物有相當性影響，也同時反應在萃取NO清除率的表現，萃取時間越久可能會使樣品中有效物質減少，而高濃度的乙醇可能會影響萃取率；萃取溫度間亦是影響NO清除率的顯著影響因子。根據上述二次模型多項式，分別固定其中一變數，以其餘兩變數繪製出一系列曲面圖(圖十八至圖二十)，以了解各變數與NO清除率之間的關係。圖十八為固定乙醇濃度為75%，探討萃取時間與萃取溫度對NO清除率的影響，結果顯在萃取時間在2.6-2.8 h，具有最佳NO清除率，萃取溫度在55-60 °C之間，具有最佳NO清除率。圖十九為固定萃取時間為2.75 h時，乙醇濃度與萃取溫度對NO清除率的影響，乙醇濃度70-75%時與萃取溫度在55-60 °C之間，有最佳NO清除率萃。圖二十為固定萃取溫度為60 °C時，乙醇濃度與萃取時間對NO清除率的影響，顯示當乙醇濃度在70-75%時與萃取時間在2.6-2.8 h有最佳的NO清除率，應證了NO清除率與萃取溫度具有相關性。依照實驗結果所得之二次模型多項式，估計乙醇濃度為75%、萃取溫度為60 °C、萃取時間為2.75 h時，其開花組金針花具有最佳的NO清除率可達86.63%，依照上述預測最佳化的萃取條件進行五次獨立之三重複實驗，如表八所示，驗證結果顯示NO清除率實際值為83.96%，預測值亦坐落在實驗值的95



圖十八、75 % 乙醇濃度下萃取時間與萃取溫度對NO清除效應之影響
 Figure 18. Effect of extraction time and extraction temperature in 75 % ethanol concentration on nitric oxide scavenging effect.



圖十九、萃取時間2.75 h下乙醇濃度與萃取溫度對NO清除效應之影響
 Figure 19. Effect of ethanol concentration and extraction temperature in extraction time 2.75 hour on nitric oxide scavenging effect.

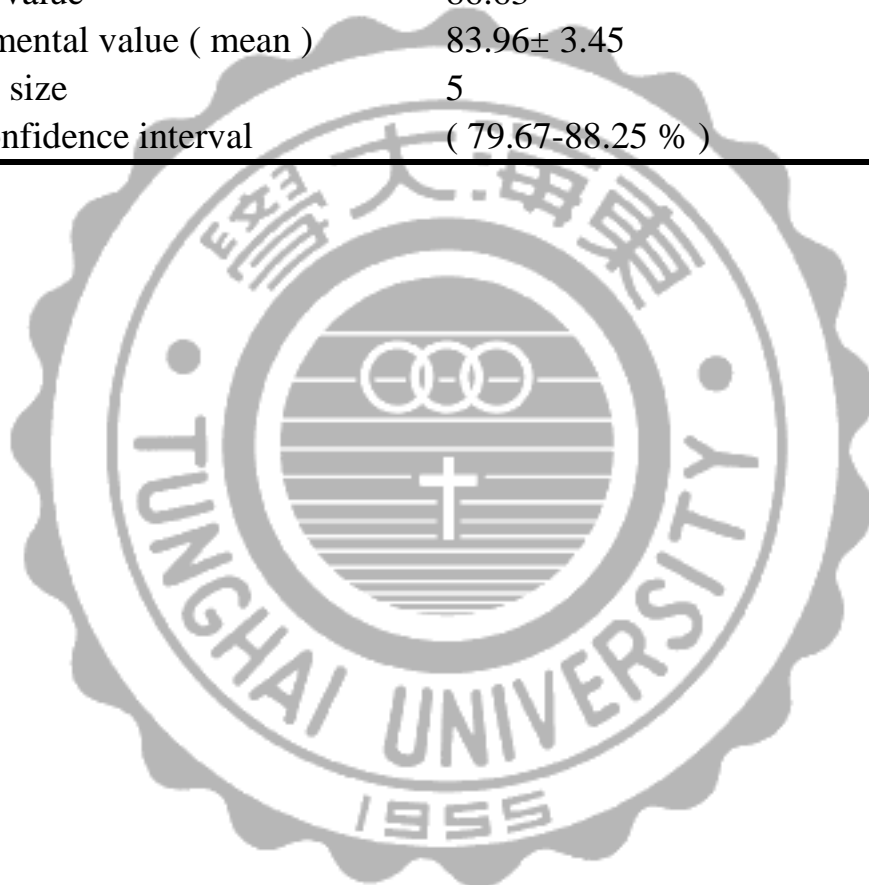


圖二十、萃取溫度60 °C下反應時間與乙醇濃度對NO清除之影響
 Figure 20. Effect of extraction time and ethanol concentration in extraction temperature 60 °C on nitric oxide scavenging effect.

表八、NO 清除率最適化模型驗證結果

Table 8. Results of verification tests for fitted model of nitric oxide scavenging effect

Response variables	NO scavenging effect (%)
Predict value	86.63
Experimental value (mean)	83.96± 3.45
Sample size	5
95% confidence interval	(79.67-88.25 %)



%信心區間(79.67-88.25 %), 表示依照最適萃取條件之金針花苞乙醇萃取物對NO清除率確實與預測結果相符。且金針花機能性成分中與抗發炎相關的是以酚類化合物為主, 酚類化合物具有NO清除能力(Chan et al., 1997)、抑制iNOS表現(Bor et al., 2006), 因此之後會探討高TPC含量最適化萃取條件。

(三) 高 TPC 最適化萃取條件探討

實驗指出 TPC 含量與 NO 清除有著正相關, 且金針花中酚類化合物與抗發炎有高度相關(Chan et al., 1997; Bor et al., 2006)。因此以篩選出高 NO 清除活性成分之開花原料, 進行高 TPC 最適化萃取條件探討。如前述表四所示, 表四為五階層三因子十九個實驗點對 TPC 含量的影響。TPC 含量實驗結果顯示, 八個星點與六個軸點之實驗點對 TPC 含量介於 35.15-44.57 mg GAE/g dry weight, 其中預設為最佳生產條件之中心點(central point)對 TPC 含量則介於 52.64-55.75 mg GAE/g dry weight, 由此可推測最佳生產條件相當接近中心點。表九為十九個實驗點以統計分析軟體 SAS 中的反應曲面迴歸(RSREG), 獲得其二次模型方程式、檢定係數(R^2), 由檢定係數 0.9319 得知此二次模型多項式具有重要的解釋力, 並可適當呈現反應值與各變數之間實際關係。二次多項式的變異數分析 (ANOVA) 結果如表十所示, 二次多項式(total model)於 F-test 顯示具有顯著影響 ($p < 0.05$), 表示此

表九、實驗點TPC含量曲面之二次多項式及檢定係數

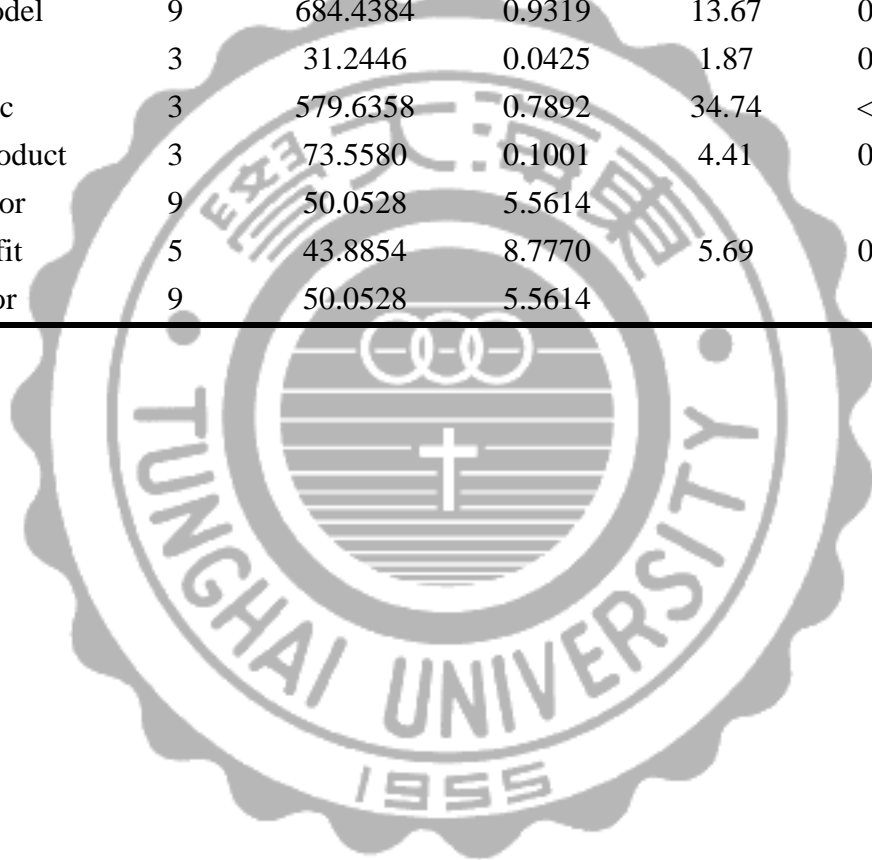
Table 9. Second-order model equations for the response surfaces fitted to the experimental data points, as a function of total phenolic compounds respectively, coefficient of determination (R^2). ^a Y = total phenolic compounds, X_1 =ethanol concentration(%), X_2 = extraction temperature($^{\circ}\text{C}$), X_3 =extraction time(h)

Model equations ^a	R^2
$Y = -451.19 + 1.864364X_1 + 12.687747X_2 + 45.82X_3 - 0.026823X_1^2 - 0.142083X_2^2 - 22.874714X_3^2 + 0.020150X_1X_2 + 0.308000X_1X_3 + 0.964000X_2X_3$	0.9319

表十、 影響TPC含量相關變數之變異數分析

Table 10. Variance analysis of for variables pertaining to the response of total phenolic compounds

Source	Degree of freedom	Sum of Squares	Means of Squares	F-value	Prob > F
Total model	9	684.4384	0.9319	13.67	0.0003
Linear	3	31.2446	0.0425	1.87	0.2046
Quadratic	3	579.6358	0.7892	34.74	<.0001
Cross product	3	73.5580	0.1001	4.41	0.0362
Total error	9	50.0528	5.5614		
Lack of fit	5	43.8854	8.7770	5.69	0.0584
Pure error	9	50.0528	5.5614		

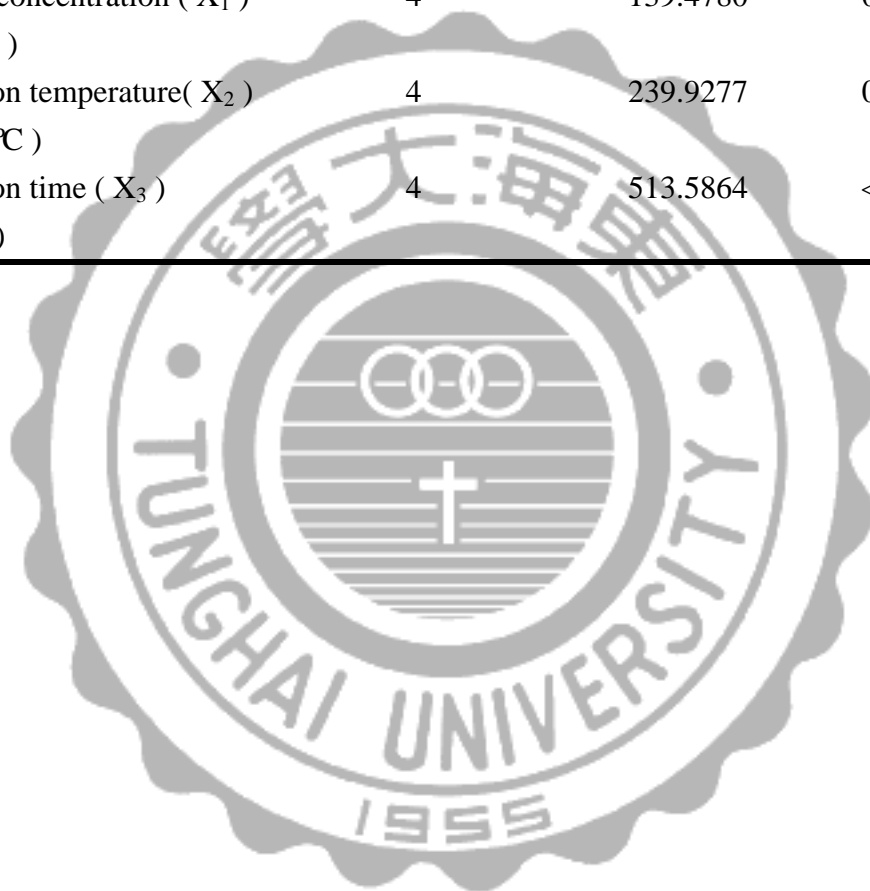


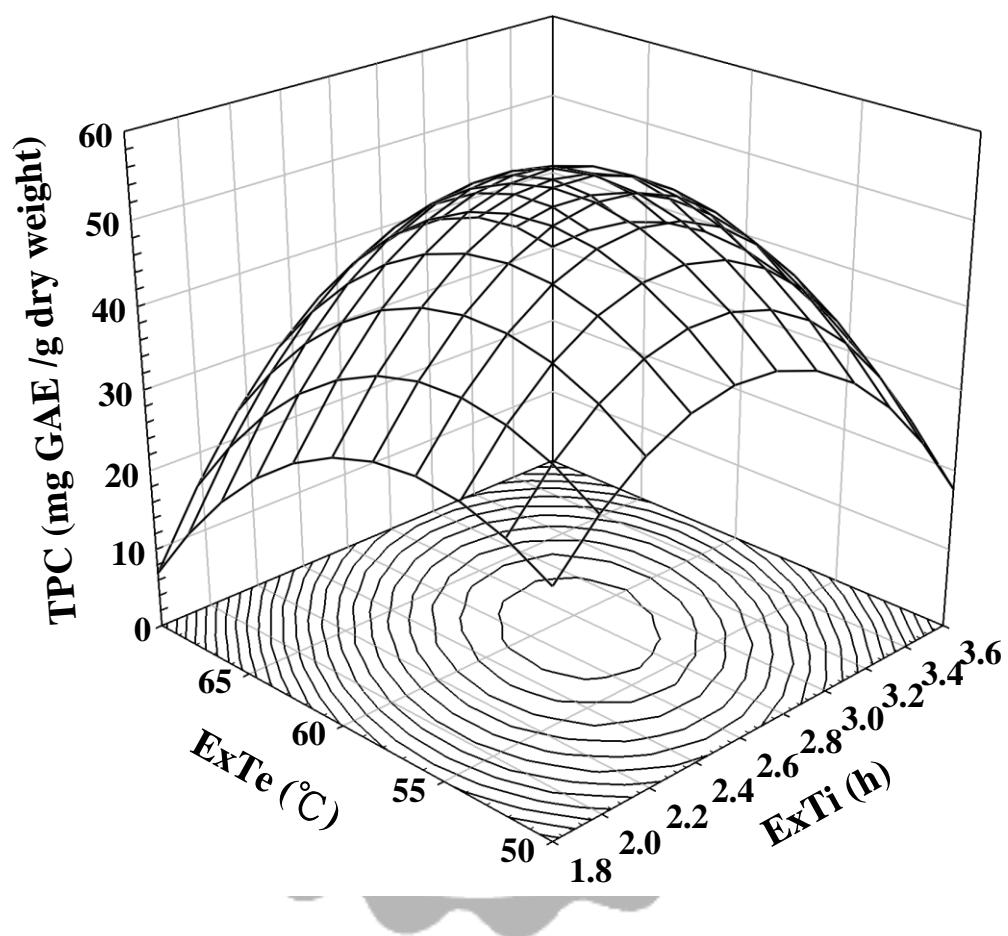
二次模型多項式對 TPC 含量有高度相關性，其中又以二次式(quadratic)具顯著影響 ($p < 0.05$)，而交互作用(cross product)亦呈現顯著差異 ($p < 0.05$)，表示此實驗探討三個變數之間產生的交互作用具有顯著影響 TPC 含量的效果。總誤差(total error) 分析中，此二次多項式適缺性 (lack of fit) 無顯著影響 ($p > 0.05$)，由此亦可得知此二次多項式所呈現的誤差無顯著影響，總誤差來源多來自實驗誤差(pure error)。此外，進一步以聯合檢測分析(表十一)了解三個反應變數對 TPC 之整體影響，結果顯示乙醇濃度(X_1)、萃取溫度(X_2)與萃取時間(X_3)對總酚類化合物含量皆為顯著性影響因子($p < 0.05$)，表示乙醇濃度、萃取溫度與萃取時間除了對萃取物有相當性影響，也同時反應在 TPC 含量的表現，萃取時間越久可能會使樣品中有效物質減少，推測因為長時間萃取會使酚類化合物聚合而使相對活性降低。而高濃度的乙醇可能會影響萃取率；萃取溫度間亦是影響 TPC 含量的顯著影響因子。根據上述二次模型多項式，分別固定其中一變數，以其餘兩變數繪製出一系列曲面圖(圖二十一至圖二十三)，以了解各變數與 TPC 含量之間的關係。圖二十一為固定乙醇濃度為 75 %，探討萃取時間與萃取溫度對 TPC 含量的影響，結果顯在萃取時間在 2.6-2.8 h 及萃取溫度在 55-60 °C 之間，具有最佳 TPC 含量。圖二十二為固定萃取時間為 2.75 h 時，乙醇濃度與萃取溫度對 TPC 含量的影響，乙醇濃度 70-75 % 時

表十一、 聯合檢測中 TPC 含量變異分析

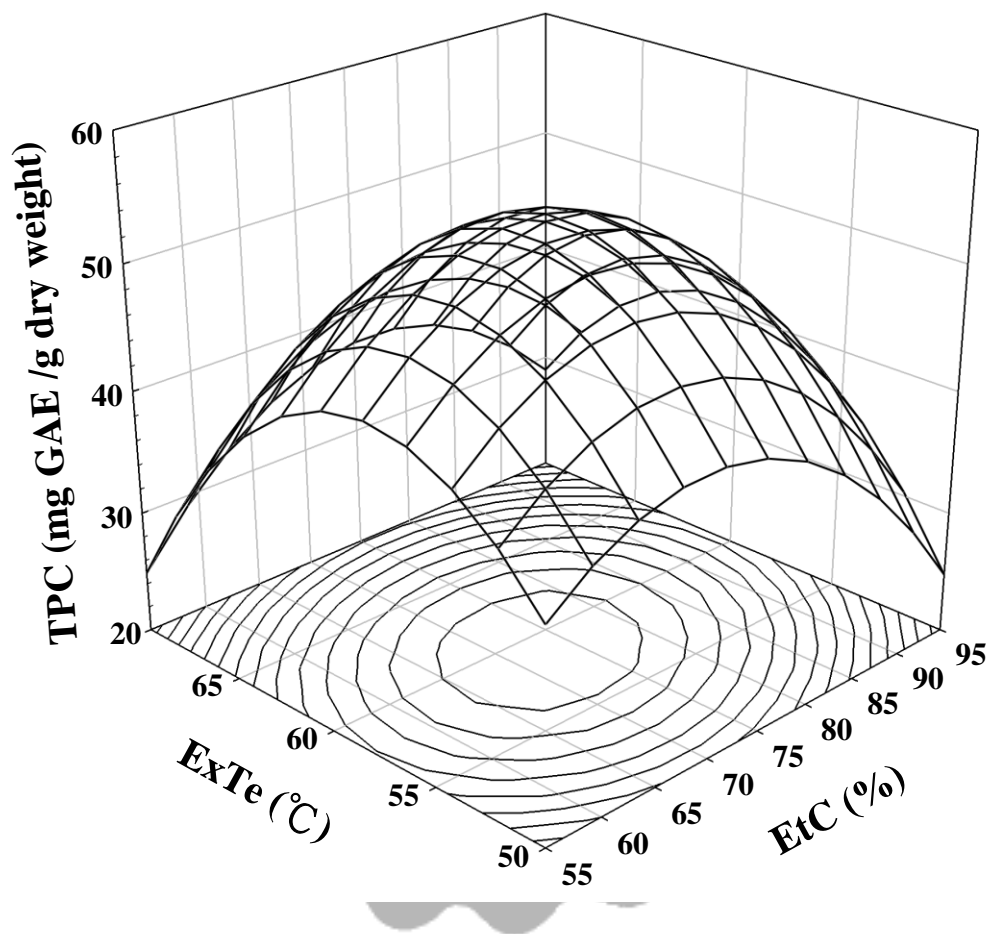
Table 11. Variance analysis of total phenolic compounds for joint detection

Factor	Degree of freedom	Sum of Squares	Prob > F
Ethanol concentration (X_1) (EtC, %)	4	139.4780	0.0108
Extraction temperature(X_2) (ExTe, °C)	4	239.9277	0.0017
Extraction time (X_3) (ExTi, h)	4	513.5864	<.0001

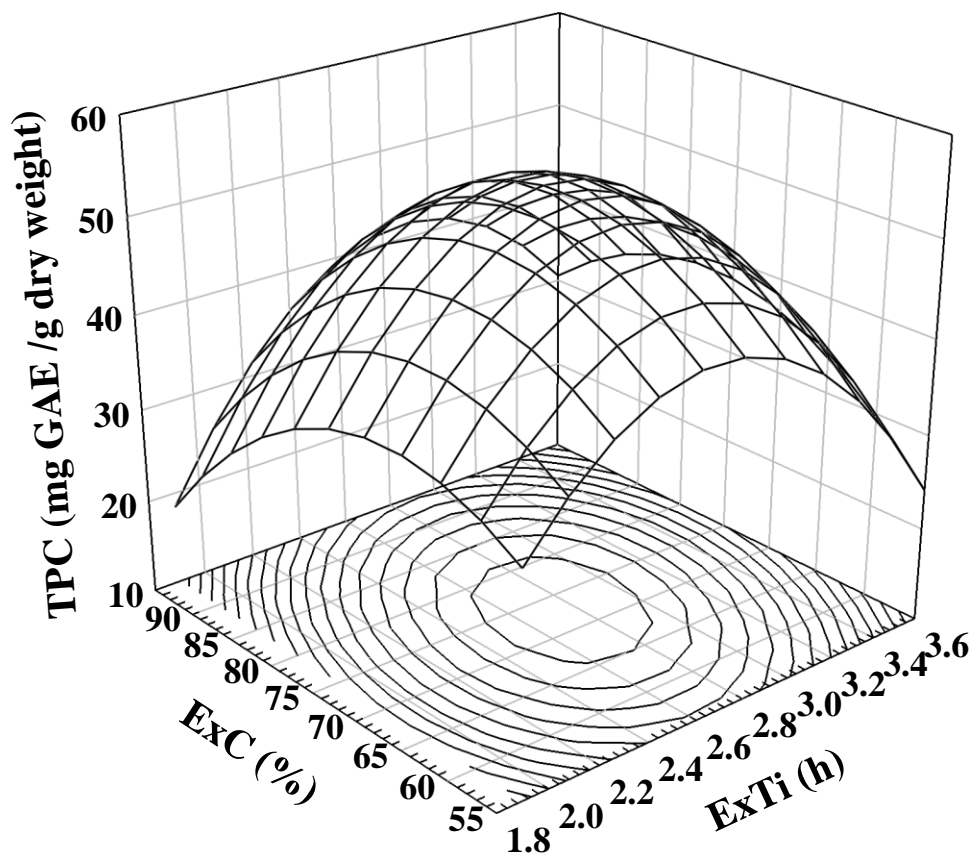




圖二十一、75 % 乙醇濃度下萃取時間與萃取溫度對TPC含量之影響
 Figure 21. Effect of extraction time and extraction temperature in 75 % ethanol concentration on total phenolic compounds.



圖二十二、萃取時間2.75 h下乙醇濃度與萃取溫度對TPC含量之影響
 Figure 22. Effect of ethanol concentration and extraction temperature in extraction time 2.75 hour on total phenolic compounds.



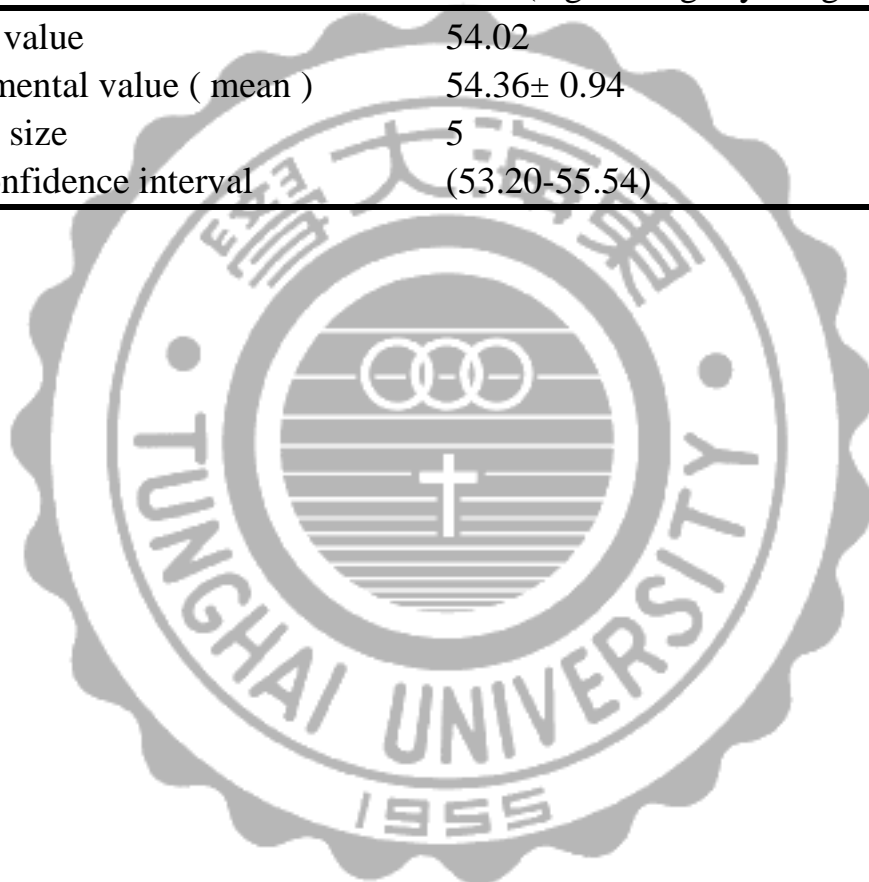
圖二十三、萃取溫度60 °C下反應時間與乙醇濃度對TPC含量之影響
 Figure 23. Effect of extraction time and ethanol concentration in extraction temperature 60 °C on total phenolic compounds.

與萃取溫度在 55-60°C 之間，有最佳 TPC 含量。使清除能力下降。圖二十三為固定萃取溫度為 60 °C 時，乙醇濃度與萃取時間對 TPC 含量的影響，顯示當乙醇濃度在 70-75 % 時與萃取時間在 2.6-2.8 h 有最佳的 TPC 含量，應證了 TPC 含量與萃取溫度具有相關性。依照實驗結果所得之二次模型多項式，估計萃取時間為 2.75 h、乙醇濃度為 75%、萃取溫度為 60 °C 時，其開花組金針花有最大的 TPC 含量，可達 54.02 mg GAE/g dry weight，依照上述預測最佳化的萃取條件進行五次獨立之三重複實驗，如表十二所示，驗證結果顯示 TPC 含量實際值為 54.36 mg GAE/g dry weight，預測值亦坐落在實驗值的 95 % 信心區間 (53.20-55.54)，表示依照最適萃取條件之金針花苞乙醇萃取物對 TPC 含量確實與預測結果相符。

表十二、TPC 含量最適化模型驗證結果

Table 12. Results of verification tests for fitted model of total phenolic compounds

Response variables	TPC (mg GAE/g dry weight)
Predict value	54.02
Experimental value (mean)	54.36± 0.94
Sample size	5
95% confidence interval	(53.20-55.54)



伍、 結論

本研究首先探討金針花不同生長階段之 NO 清除率與清除活性成分，包括 TPC、TF 和 11 種酚類化合物組成，以獲得最佳高 NO 清除活性成分之金針花乙醇萃取物，結果顯示開花組 NO 清除率、TPC 及 TF 均顯著高於其他組別($p < 0.05$)，開花組具有最高的 NO 清除能力與其高含量的 caffeic acid, EGCG, epicatechin, chlorogenic acid, rutin 有高度相關。因此後續以開花組作為起始原料探討高 NO 清除率及高 TPC 含量之最適萃取條件，結果顯示兩者的 R^2 分別為 0.9381 與 0.9319，表示此次實驗設計具有高解釋度；變異數分析(ANOVA)顯示二次多項式(total model)具有顯著影響性 ($p < 0.05$)，然而對於二次多項式的適缺性(lack of fit)的影響並不顯著($p > 0.05$)，再次證實本實驗設計的高度解釋能力；聯合分析亦顯示此次實驗探討的萃取變數皆對 NO 清除率及 TPC 含量具有顯著影響。高 NO 清除率及高 TPC 含量最適萃取條件皆為乙醇濃度 75 %、萃取溫度 60 °C 與萃取時間 2.75 h，在此條件下萃取所得萃取物其 NO 清除率最高可達 86.63 % 及 TPC 含量最高可達 54.02 mg GAE/g dry weight。高 NO 清除率與高 TPC 含量最適化萃取條件完全相同，可得知 NO 清除與酚類化合物相關，推測是因為總酚中含有高比例的特殊成分如 catechin, EGCG, epicatechin, chlorogenic acid, rutin 等物質。

陸、參考文獻

- 王昭蓉 (1999) 看不盡漫山遍野金針花。行遍天下 96:132-136。
- 行政院衛生署食品藥物管理局-營養成份標示(2012)。
- 巫玉琳 (2008) 香菜萃出物對脂多醣體誘發小鼠 RAW264.7 巨噬細胞發炎反應之探討。中國醫藥大學營養科學研究所碩士論文。
- 洪哲穎、陳國誠 (1992) 回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上之應用。化工專論 39:3-18。
- 郁凱衡 (1999) 天然酚類抗氧化劑。科學與技術 31:43-51。
- 高豪駿 (2010) 促脂解活性大豆肽最適水解條件探討、純化及定序。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- 陳姿廷 (2004) Quercetin 及其衍生物抑制 RAW 264.7 細胞因 LPS 刺激而產生的 NO 與其結構-活性關係。台北醫藥大學藥理學研究所論文。
- 郭智宏 (2002) 類黃酮與腸道菌叢。食品工業發展研究所 35:40-53。
- 黃秀梅 (2002) 利用微透析技術探討秋水仙素在大白鼠藥物動力學的研究。國立陽明大學藥理學研究所碩士論文。
- 曾珞萍 (2000) 以反應曲面法尋找多目標模擬式之最佳解-以半導體體封裝廠印字區為例。國立成功大學製造工程研究所碩士論文。
- 張書涵 (2009) 省產金針花抗氧化活性及番薯葉中類胡蘿蔔素之研究。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- 黃慧琪、張麗杰、吳永昌、郭悅雄及郭曜豪 (2009) 皂素的生物活性與化學成分之探討 化學 67:1-12。
- 傅懋潤、茅林春 (2006) 黃花菜的保健功效及化學成分研究進展。食品發酵與工業 (32): 108-111。
- 蔡旻都、陳皓君 (2006) 蔬菜中類黃酮之抗氧化作用及與生物活性。國立中正大學化學暨生物化學研究所碩士論文。
- 蔡英仁 (2002) 秋水仙素的合成與研究。國立東華大學東化學研究所碩士論文。
- 薄榮怡 (2001) 蔬菜對活性氮化物生物效應影響之研究。中興大學食品科學系碩士論文。
- Acker, S. A. B. E., Tromp, M. N. J. L., Haenen, G. R. M. M., Vijgh, W. J.F. and Bast, A. (1995) Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. Biochem. Biophys. Res. Commun. 214: 755-759.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochemical. J. 357:593-615.
- Ames, B. N. (1990) Endogenous oxidative DNA damage, aging and

- cancer. *Free Rad. Res. Commun.* 7: 121-128.
- Arroyo, P. L., Hatch-Pigott, V., Mower, H. F. and Cooney, R. V. (1992) Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants. *Mutat. Res.* 281:193-202.
- Bate-Smith, E. and Swaim, T. (1962) Flavonoid compounds. *Comparative Biochem.* 3:75-809.
- Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2:907-16.
- Bohm, F., Edge, R., McGarvey, D. J. and Truscott, T. G. (1998) β -Carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against Nox. *FEBS Lett.* 436:387-389.
- Bone, R. A., Landrum, J. T., Fernandez, L. and Tarsis, S. L. (1988) Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29: 843–849.
- Bor, J. Y., Chen, H. Y. and Yen G. C. (2006) Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1680-1686.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186:343-355.
- Bowman, L. and Geiger, E. (1984) Optimization of fermentation conditions for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 26:1492-1497.
- Box, G. E. and Wilson, K. B. (1951) On the experimental attainment optimum conditions. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* 13:1-45.
- Brown, E. D., Micozzi, M. S., Craft, N. E., Bieri, J. G., Beecher, G., Edwards, B. K., Rose, A., Taylor, P. R. and Smith, J. C. (1989) Plasma carotenoids in normal men after a single ingestion of vegetables or purified beta-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 49:1258-1265.
- Burns, J., Gardner, P. T., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D. B., Lister, C., Matthews, D., MacLean, M. R., Lean, M. E. J., Duthie, G. G. and Crozier, A. (2000) Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 48: 220-30.
- Cantrell, A., McGarvey, D. J. Truscott, T. G., Rancan, F. and Bohmb, F. (2003) Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model

- membrane environment. *Biochem. Biophys.* 412:47-54.
- Chan, M. M. Y., Chan, D., Ho, C. T., Huang, H. I., Chan M. M., Fong, D., Ho, C. and Huang, H. (1997) Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem. Pharm.* 54: 1281-1286.
- Chan, M.M., Fong D., Ho C.T. and Huang H.T. (1999) Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol* 54: 1281–1286.
- Chem. Eng. News* (1959) 37-67
- Chen, S. L. (1981) Optimization of batch alcoholic fermentation of glucose syrup substrate. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1827-1836.
- Cheyrier, V., Feinberg, M., Chararas, C. and Ducauze, C. (1983) Application of response surface methodology to evaluation of bioconversion experimental conditions. *Applied and environmental microbiol.* 45:634-639.
- Cichewicz, R. H., Lim, K. C., McKerrow, J. H. and Nair, M. G. (2002) Kwanzoquinones A-G and other constituents of *Hemerocallis fulva* 'Kwanzo' roots and their activity against the human pathogenic trematode *Schistosoma mansoni*. *Tetrahedron* 58:8597-8606.
- Cichewicz, R. H., Zhang, Y., Seeram, N. P. and Nair, M. G. (2004) Inhibition of human tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies. *Life Sci.* 14:1791-1799.
- Conforti, F., Statti, G. A. and Menichini, F. (2007) Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chem.* 102,:1096-1104.
- Cook, N.C. and Samman, S. (1996) Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.* 7:66-76.
- Davies, N. P. and Morland, A. B. (2004) Macular pigments: their characteristics and putative role. *Prog. Retin. Eye Res.* 23: 533–559.
- Dawn, B. and Bolli, R. (2002) Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Annals of The New York Academy of Sciences* 962:18-41.
- Dawson, T. M. and Snyder, S. H.(1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neuroscience.*

M(9):5147-5159.

- De Marino, S., Iorizzi, M., Zollo, F., Minale, L., Amsler, C. D., Baker, B. J. and McClintock, J. B. (1997) Isolation, structure elucidation, and biological activity of the steroid oligoglycosides and polyhydroxysteroids from the antarctic starfish *acodontaster conspicuus*. *J. Nat. Prod.* 60:959-966.
- Deepa, N., Kaur, C., George, B., Singh, B. and Kapoor, H. C. (2007) Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT-Food Sci. and Technol.* 40:121-129.
- Diplock, A. T., Charuleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C. and Roberfroid, M. (1998) Functional food science and defense against reactive oxidative species. *British J. Nutr.* 80:77-112.
- EI-Nasr, E., Seif, M. M., Soliman, F. M. and Nazif, N. M. (1981) Anthraquinones of *Hemerocallis aurantiaca*. *Fitoterapia* 52 (3): 141-144.
- Fitzpatrick, D. F., Hirschfield, S. L., Ricci, T., Jantzen, P. and Coffey, R.G. (1995) Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J. Cardio. Pharmacol.* 26:90-95.
- Francis, J.A., Rumbeiha, W. and Nair, M. G. (2004) Constituents in easter lily flowers with medicinal activity. *Life Sci.* 2004, 76, 671-683.
- Fu, M., He, Z., Zhao, Y., Yang, J. and Mao, L. (2009) Antioxidant properties and involved compounds of daylily flowers in relation to maturity. *Food Chem.* 114: 1192-1197.
- George, K.B., Herbert, M. and Marcelo H. L. (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1472:142-152.
- Goodwin, T. W. (1986) Metabolism, nutrition and function of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.* 6: 273-297.
- Guerrero, C., de la Calle, M., Reid, M. S. and Valpuesta, V. (1998) Analysis of the expression of two thiolprotease genes from daylily (*Hemerocallis* spp.) during flower senescence. *Plant Mol. Biol.* 36: 565-571.
- Grisham, M. B. (1994) Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 344: 859-861.
- Halliwell, B. (1993) The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 23: 118.

- Hartung, E. F.(1954) History of the colchicum and related medicaments in gout with suggestions for further research. *Ann Rheum Dis.* 13: 190-200.
- Hartwig, A. and Schlepegrell, R. (1995) Induction of oxidative DNA damage by ferric iron in mammalian cells. *Carcinogenesis* 16:3009-3013.
- Hata, K., Ishikawa, K. and Hori, K. (1998) Differentiation-inducing activities of human leukemia cell line (HL60) by extracts of edible wild plants in Akita. *Nat.Med.* 52:269-272.
- He, X. G., Yu, Q. L., Zhao, Z. Y. and Song, G. Q.(1982) Isolation and structure of a new anthraquinone from the roots of *Hemerocallis citrina* Baroni (Liliaceae). *Zhiwu Xuebao* 24(2):154-158.
- Heng, L., Vincken, J. P., van Koningsveld, G. A., Legger, L., Gruppen, H., van Boekel, M. A. J. S., Roozen, J. P. and Voragen, A. G. (2006) Bitterness of saponins and their content in dry peas *J. Sci. Food Agric.* 86:1225-1231.
- Himmelblau, D. M. (1970) *Process analysis by statistical methods.* John Wiley and Sons, New York. 230-292.
- Horn, R. C. and Vargas, V. M. (2003) Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis* 18(2):113-118.
- Hsieh, M. T., Ho, Y. F. and Peng, W. H. (1996) Effects of *Hemerocallis tiara* on motor activity and the concentration of central monoamines and its metabolites in rats. *J. Ethnopharm.* 52:71-76.
- Huang, M.T., Chang, R.L., Wood, A.W., Newmark, H. L., Sayer, J. M., Yagi, H., Jerina, D.M. and Conney, A.H. (1985) Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. *J. Carcinogenesis* 6:237-242.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V, Dolara, P. (2001) Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine. *Eur. J. Nutr.* 40: 74-77.
- Inoue, T., Iwagoe, K., Konishi, T., Kiyosawa, S. and Fujiwara, Y. (1990) Novel 2,5-dihydrofuryl-h-lactam derivatives from *Hemerocallis fulva* L, var. Kwanzo Regel. *Chem. Pharm. Bull.* 38(11):3187–3189.
- Inoue, T., Konishi, T., Kiyosawa, S. and Fujiwara, Y. (1994) 2,5-dihydrofuryl-h-lactam derivatives from *Hemerocallis fulva* L, var.

- Kwanso Regel. II. Chem. Pharm. Bull. 42(1):154–155.
- Isabel, S., Carvalho, T. and Maria, B. (2011) Phenolic composition and antioxidant capacity of six artemisia species. *Industrial Crops and Products*. 382-388.
- Jacob, R. A. (1994) Nutrition, health and antioxidants. *Inform* 5:1271-1275.
- Jiangxi Medical College (1986) Dictionary of Chinese traditional medicine. p 2327-2329.
- Julkunen-Titto, R. (1985) Phenolic constituents in the leaves of Northern willows Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33:213-217.
- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A. and Prior, R. L. (1999) Antioxidant capacity, Vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47:4638-4644.
- Kawada, N., Seki, S. and Kuroki, T. (1998) Effect of antioxidants resveratrol, quercetin and N-acetylcystein, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and kupfer cells. *Hepatology*. 27:1265-1274.
- Kim, H.K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y., Kim, H. P. (1999) Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line Raw 264.7 and their structure–activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 58:759–765.
- Kim, O. K., Murakami, A., Nakamura, Y. and Ohigashi, H. (1998) Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. *Cancer Lett.* 125:199-207.
- Kim, Y. H., Chung, C. B., Kim, J. G., Ko, K. I., Park, S. H., Kim, J. H., Eom, S. Y., Kim, Y. S., Hwang, Y. I. and Kim, K.H. (2008) Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:303-311.
- Kitagawa, I. (2002) Licorice root. A natural sweetener and important ingredient in Chinese medicine. *Pure Appl. Chem.* 74:1189-1198.
- Konishi, T., Fujiwara, Y., Konoshima, T., Kiyosawa, S., Nishi, M., and Miyahara, K. (2001) Steroidal saponins from *Hemerocallis fulva* var. *Chem. Pharm. Bull.* 49:318-320.
- Konishi, T., Inoue, T., Kiyosawa, S. and Fujiwara, Y. (1996) A 2,5-dimethoxytetrahydrofuran from *Hemerocallis fulva*, var. *Chem. Pharm. Bull.* 318-320.

- Konishi, T., Fujiwara, Y., Konoshima, T., Kiyosawa, S., Nishi, M. and Miyahara, K. (2001) Steroidal saponins from *Hemerocallis fulva* var. Kwanso. Chem. Pharm. Bull. 49 (3):318-320.
- Krol W., Czuba Z. P., Threadgill M. D., Cunningham B.D., and Pietse G. (1995) Inhibition of nitric oxide (NO) production in murine macrophages by flavones. Biochem Pharmacol 50:1031–1035.
- Kroncke, K., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1997) Nitric Oxide:cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? Nitric Oxide 1(2):107-120.
- Kruger, C., Murphy, L., DeFreitas, M., Pfannkuch, Z. and Heimbach, F. J. (2002) An innovative approach to the determination of safety for a dietary ingredient derived from a new source: case study using a crystalline lutein product. Food Chem. Toxicol. 40:1535–1549.
- Lay-Yee, M., Stead, A. D. and Reid, M. S.(1992) Flower senescence in daylily (*Hemerocallis*). Physiol. Plant. 86:308-314.
- Leval, X. D., Delarge, J., Somers, F., Tullio, P. D., Yves, H., Bernard, P. and Jean-Michel, D. (2000) Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. Current Medicinal Chemistry 7:1041-1062.
- Lin, Y.L and Lin, J.K. (1997) (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthesis by down-regulating lipopolysaccharide- induced activity of transcription factor nuclear factor-kB. Mol Pharmacol 52: 464–472.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V. and Dolara, V. (2001) Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine. J. Nutr. 2:74-77
- Lopes, G. K., Schulman, H. M. and Hermes-Lima, M.(1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. Biochim. Biophys. Acta. 1472:142-152.
- MacMicking, J., Xie, Q.W. and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. Annual Review of Immunology 15:323-50.
- Magae, Y. and Ohara, S. (2006) Structure-activity relationships of triterpenoid saponins on fruiting body induction in pleurotus ostreatus. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 1979-1982.
- Mahmoodi, H., Hadley, M., Chang, Y. X. and Draper, H. H. (1995) Increased formation and degradation of malondialdehyde-modified proteins under conditions of peroxidative stress. Lipids 30: 936-963.

- Malinski, T. and Taha, Z. (1992) Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 358 :676-678.
- Milic, B. L., Djilas, S. M. and anadanovicÂ -Brunet J. M. C. (1998) Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chem.* 61(4)443-447.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharm. Rev.* 43(2):109-142.
- Montgomery, D. C.(2001) *Design and Analysis of Experiments.* 5th edition, USA, John Wiley and Sons.
- Moresi. M., Colicchio, A. and Sansovini, F. (1980) Optimization of whey fermentation in a jar fermenter. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9:173-183.
- Murphy, M. P. (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411: 401-414.
- Myers, R. H. and Montgomery, D. C. (2002) *Response surface methodology* (2nd. ed.) John Wiley and Sons. New York.
- Ohshima, H. and Bartsch, H. (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research* 305: 253-64.
- Oleszek, W. and Marston, A.(2000) *Saponins in Food, in Feedstuffs and Medicinal Plants.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p 95.
- Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Vaquero, M. and Cajigal, C. (2001) Lutein in patients with caracts and ago-related macular degeneration: a long-term supplementation study. *J. Sci. Food Agric.* 81:904-909.
- Pandjaitan, N., Howard, L. R., Morelock, T. and Gil, M. I. (2005) Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *Journal of Agric. Food Chem.* 53:8618-8623.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Yokoyama, R., Shibata, T., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (1996) Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) -induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:4565-4571.
- Que, F., Mao, L. C. and Zheng, X. J. (2007) In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds. *Asia Pacific J. Clinical Nutr.* 16(1):196–203.

- Radomski, M. W. and Salas, E. (1995) Nitric oxide – biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 118: S69-S80.
- Roberts, W. N., Liang, M. H. and Stern, S. H. (1987) Colchicine in acute gout. *JAMA*. 257:1920-1922.
- Robert, H., Cichewicz, K.C., Lim, J. H., Mc, K. and Muraleedharan, G. N. (2002) Kwanzoquinones A–G and other constituents of *Hemerocallis fulva* ‘Kwanzo’ roots and their activity against the human pathogenic trematode *Schistosoma mansoni*. *Tetrahedron* 58 8597–8606.
- Pratt, R.G. (1990) Inverse theory applied to multi-source cross-hole tomography. Part II: elastic wave-equation method, *Geophys. Prospect.*, 38:311-330.
- Russo, V. M. and Howard, L. R. (2002) Carotenoids in pungent and nonpungent peppers at various developmental stages grown in the field and glass house. *J. Sci. Food Agric.* 82:614-615.
- Sadowska-Krowicka H., Mannick E. E., Oliver PD, Sandoval M., Zhang X. J., Eloby-Chiless S., Clark D. A., and Miller M.S. (1998). Genistein and gut inflammation: Role of nitric oxide. *Proc. SocExp Biol Med* 217: 351–357
- Sanchez-Moreno, C., Satus-Gracia, M. T. and Frankel, E. N. (2000) Antioxidant activity of selected Spanish wines in corn oil emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5581-5587.
- Sarg, T. M., Salem, S. A., Farrag, N. M., Abdel-Aal, M. M. and Ateya, A. M. (1990) Phytochemical and antimicrobial investigation of *Hemerocallis fulva* L. grown in Egypt. *Int. J. Crude Drug Res.* 28 (2): 153-156.
- Sharpe, L. T., Stockman, A., Knau, H. and Jagle, H. (1998) Macular pigment densities derived from central and peripheral spectral sensitivity differences. *Vision Res.* 38:3233–3239.
- Shi, J. and Le, M. M. (2000) Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40(1):1-42.
- Stahl, W. and Sies, H. (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *1740*:101-107.
- Stefanovic-Racic, M., Stadler, J. and Evans, C.H. (1993) Nitric oxide and arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 36:1036-44.
- Stuehr, D.J. and Marletta, M.A. (1987) Synthesis of nitrite and nitrate in

- murine macrophage cell lines. *Cancer Res.* 47: 5590-5594.
- Sun, Y. P., Chou, C. C. and YU, R. C. (2009) Antioxidant activity of lactic-fermented Chinese cabbage. *Food Chem.* 115: 912-917.
- Tai, C.Y. and Chen, B. H. (2000) Analysis and stability of carotenoids in the flowers of daylily(*Heemerocallis disticha*) as affected by various treatments. *J. Agric. Food Chem.* 48:5962-5968.
- Tateishi, T., Tateishi, P., Caraco, Y., Guengerich, F. P. and Wood, A. J. J. (1997) Colchicine biotransformation by human liver microsomes: Identification of cyp3a4 as the major isoform responsible for colchicine demethylation. *Biochem. Pharm.* 53:111-116.
- Thomson, D. (1982) Response surface experimentation. *J. Food Processing and Preservation* 6:155-188.
- Tobinaga, S. (1999) From my ethnopharmacochemical studies. *Yakugaku Zasshi.* 119(3):185-198.
- Uezu, E.A. (1997) Philological and experimental investigation of effects of *hemerocallis* as food in man and ddy mice. *Bull Coll Educ Univ Ryukyus.* 54:231-238.
- Vallejo, F., Garcl'a-Viguera, C. and Tomas-Barberan, F. A. (2003) Changes in broccoli(*Brassica oleracea* L. var. italica) health promoting compounds with inflorescence development. *J. Agric. Food Chem.* 51:3776-3782.
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A. and Gruppen, H. (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochem.* 68:275-297.
- Wang, Q. and Yang, J. X. (1990) Determination of anthraquinones and chrysophanol in radix *Heemerocallis*. *Zhongcaoyao* 21(1):12-13.
- Wang, S. Y., Chen, C. T. and Wang, C. Y. (2009) The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chem.* 112:676-684.
- Weng, C. J. and Yen, G. C. (2012) Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev.* 31:323-351.
- Wink, D. A. and Mitchell, J. B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25(4):434-456.
- Xiu, S., Ma, H., Wang, X., Shi, J. and Zhuang, Y. (1982) Study on active constituents in the roots of Xiao Xuan Cao (*Heemerocallis minor*

- Mill*). *Zhongcaoyao* 13(2):1-4.
- Yaoa, L. Nivedita, D., Francisco, A., Tom, B., Federico, F., Isabel, M. and Riantong, S. (2003) Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chem* 18:159–168.
- Yokozawa, T., Cho E. J., Hara, Y. and Kitani, K. (2000) Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* 48:5068-5073.
- Yoshimi, S. and Masashi, H. (2013) Nitric oxide scavenging rates of solubilized resveratrol and flavonoids. *Nitric Oxide* 29:25–29.
- Zertuche , L. and Zall, R. R. (1985) Optimizing alcohol production from whey using computer technology. *Biotechnol. Bioeng.* 27:547-554.
- Zhang, Y., Cichewicz, R. H. and Nair, M. G. (2004) Lipid peroxidation inhibitory compounds from daylily (*Hemerocallis fulva*) leaves. *Life Sci.* 75:753-763.

