

參、材料與方法

一、實驗材料

(一) 實驗樣品

台灣花蓮縣盛產金針花，學名 *Hemerocallis fulva* L. 是百合科多年生宿根性草本植物，共收集由綠色至黃色不同生長階段的金針花苞；橘色甜椒(*Capsicum annuum* L.)、番薯葉(*Ipomoea batatas* (L.)Lam.)購自台中市西屯區傳統市場；枸杞(*Lycium barbarum* L.)購自松青超市。

(二) 類胡蘿蔔素所需試藥

類胡蘿蔔素標準品，包括有 all-trans lutein 純度 90 %，購自 Fluka 公司；all-trans zeaxanthin 購自 Extrasynthese 公司；all-trans β -carotene 純度 95 % 以上，購自 Sigma 公司。分析級 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) 純度 99 %，購自 Sigma 公司。Ambersep 900 OH 為鹼性樹脂 (strong basic resin)，購自 Fluka 公司。

(三) 抗氧化分析所需試藥

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 %，Hydrogen peroxide solution (H_2O_2) 純度 30 %，購自 Riedel-de Haën 公司。Peroxidase from horseradish 單位為 1280 unit/mg solid、2,2'-azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6- sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 純度 98 % 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (Trolox) 純度 97 % Linoleic acid 純度 99 %、polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20)、ammonium thiocyanate (NH_4SCN)、 α -tocopherol (Vitamin E) 純度 95 %、試藥級 ascorbic acid (Vitamin C)、分析級 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) 純度 99 %，3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt (Ferrozine)、ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA) 純度 99

%，以上購自 Sigma 公司。試藥級 Iron(II) chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 純度 95 %，試藥級 Iron(II) chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 純度 95 %，購自林純藥工業株事會。分析級 sodium phosphate, monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 純度 99.6 %，購自 J.T. Baker 公司。

(四) 細胞培養所需藥品

本實驗採用 3T3-L1 前脂肪細胞株購自食品工業研究所(Hsinchu, Taiwan)；胎牛血清(fetal bovine serum, Lot : 015428) 購自 Biological Industries (Kibbutz, Israel)；Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM-0) 購自 Gibco(New York, USA)；Gentamicin sulfate、potassium chloride、potassium phosphate monobasic、sodium bicarbonate、sodium phosphate、HEPES 均購自 Sigma(St. Louis, MO, USA)。

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)購自 Invitrogen (OR, USA)；Dimethyl sulfoxide minimum (DMSO) 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。

(五) 溶劑

HPLC 級 acetonitrile、ethanol、chloroform 購自 Merck 公司。HPLC 級 methyl alcohol (MeOH) 購自 Mallinckrodt 公司。HPLC 級 methyl-tert-butyl ether (MTBE) 購自 Tedia 公司。HPLC 級 petroleum ether(PE)、n-hexane、tetrahydrofuran(THF)購自 J.T. Baker。分析級 acetone 購自 Fluka 公司。試藥級 hydrochloric acid (HCl) 純度 35 %以上、試藥級 di-ethyl ether，購自台灣聯工化學公司。

二、儀器設備

(一) 高效率液相層析儀(HPLC)

管柱：美國 YMCTM/Waters 公司 C₃₀ 多聚合物逆相類胡蘿蔔素管柱 (4.6mm×250mm I.D.)，充填物顆粒大小 5 μm

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,

(二) 高速均質機

瑞士 Kinematica AG 公司 PT-3000 型

(三) 超高速離心機

台灣 Hitachi 公司 himac CF-15R 型

(四) 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

(五) 超音波震盪機

澳洲 Power sonic 公司 420 型

(六) 恆溫培養箱

台灣 Firstek Scientific 公司 S300 型

(七) 紫外-可見光分光光度計

日本 Hitachi 公司的 U-2001 Spectrophotometer

(八) 冷凍乾燥機

台灣宏誠科儀公司製作

(九) Vortex Mixer

美國 Thermolyne 公司型號 37600, Maxi Mix II

(十) 充填樹脂

氧化鋁樹脂(70-230mesh):購自 MN 公司(Macherey-Nagel)

(十一) 自動收集器 (Fraction collector)

Gilson 公司，FC203B 型

(十二) 照度計 (Digital Lux meter)

三淵企業有限公司(台灣)，型號為 DX-100

三、實驗方法

(一) 熱加工處理對不同生長階段金針花苞中類胡蘿蔔素含量之影響

1. 不同熱處理方法

當金針花苞樣品運送到時，以花苞平均長度 3cm、6cm、8cm、10cm 進行區分，分別稱為第一、二、三及四生長階段。分別秤約 5 g 不同生長階段金針花苞進行 3 種熱加工處理，(1)水煮 (boiled)，秤取 5 g 金針花苞放入 200 mL 的 100 °C 沸水中，水煮 1 min；(2)油炒 (stir-fried)，取 1 mL 大豆沙拉油放入炒鍋中加熱至 160–180 °C，再放入 5 g 蔬菜快炒 1 min；(3)油炸 (deep - fried)，取 5 g 金針花苞放入 200 mL 的 190 - 200 °C 大豆沙拉油中，油炸 2 sec。

2. 不同水煮時間

秤約 5 g 不同生長階段金針花苞，放入 200 mL 的 100°C 沸水中，各別水煮 0、1、5、10、20、30 min，處理後將水瀝乾存放於 4°C 冰箱中。不同生長階段金針花苞經過以上加工過程後，將加工後的不同生長階段金針花苞以鹼性樹脂(Ambersep 900 OH)皂化法進行樣品製備，再以梯度沖提系統在偵測波長 450 nm 下，進行 HPLC 分析，根據全反式葉黃素、玉米黃質及 β -胡蘿蔔素標準曲線之回歸方程式，計算出加工後的不同生長階段金針花苞中之類胡蘿蔔素的順/反異構物含量。

(二) 熱加工處理對不同生長階段金針花苞的抗氧化活性之影響

1. 樣品製備

秤約 5 g 不同生長階段金針花苞，放入 200 mL 的 100°C 沸水中，

各別水煮 0、1、5、10、20、30 min 後，置放於均質機中，加入 20 mL 乙醇，室溫下避光均質 1 min 後，靜置 20 min，再於 10000 rpm 下離心 5 min，收集上清液，將沉澱物復溶於 20 mL 的乙醇中，重複均質與離心的步驟，直至殘渣變成無色。將所有上清液以減壓濃縮機濃縮至快乾後，用乙醇定容至 20 mL，此為該不同生長階段金針花苞之乙醇萃取物，儲存於-20°C 下備用。

2. 抗氧化成分分析

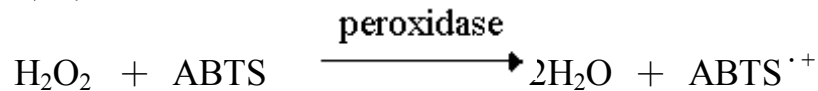
由於抗氧化活性評估時，大部分是以醇類作為萃取溶劑(Sun et al.,2009；Gabrie et al.,2009)，因此在抗氧化成分分析實驗中，將樣品以乙醇為萃取溶液進行萃取。除了將不同時期金針花苞之乙醇萃取物在偵測波長 450 nm 下，以 HPLC 定量其中類胡蘿蔔素含量。並參考 Julkunen-Titto et al. (1985) 方法作總酚類化合物 (total phenolic compounds) 含量之測定，其方法是將不同階段金針花苞之乙醇萃取物及不同濃度的 gallic acid 如 31.25、62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ 各取 50 μL ，加 1 mL 去離子水及 0.5 mL 100 % Folin-Ciocalteau's phenol reagent，混合均勻後再加入 2.5 mL 20 % Na_2CO_3 ，再次混合均勻後於室溫下靜置 20 min，於 735 nm 下測定吸光值，吸光值愈高表示萃取物所含之總酚類化合物含量愈多。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，以每克不同時期金針花苞之 gallic acid 當量微毫克數表示。

3. 抗氧化活性測定

(1) Trolox 當量抗氧化能力(Trolox equivalent antioxidant capacity；TEAC)之測定

TEAC 測定原理為混合 2，2'-Azino-bis -(3-ethylbenthiiazoline sulfonic acid)(ABTS)、peroxidase 及 H_2O_2 時會產生陽離子之自由基

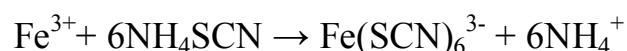
ABTS^{•+}，其反應如下。ABTS^{•+}為一相當穩定藍綠色物質，於波長 734 nm 有吸收波峰。抗氧化劑的加入會抑制此顏色的產生 (Miller et al., 1993)。Trolox 是一種結構類似維他命 E 的水溶性抗氧化劑，許多研究皆已證實其具有良好之抗氧化力，因此本研究中以 Trolox 為評估抗氧化能力的標準，計算樣品的自由基清除能力相當於多少 μg Trolox 之清除能力，此即為樣品的 TEAC。



參考 Peng et al. (2003) 方法，取 peroxidase (44 unit/ml) 0.25 mL、 H_2O_2 (500 μM) 0.25 mL、ABTS (1000 μM) 0.25 mL 與去離子水 1.5 mL 混合均勻，室溫下進行避光反應 1 hr，待生成穩定藍綠色之 ABTS^{•+}後，隨即加入 0.25 mL 不同時期和不同熱加工條件下的金針花苞乙醇萃取物或不同濃度 trolox 標準品 (5、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，反應 10 min 於 734 nm 下測定吸收光值，由不同濃度之 trolox 作成之標準曲線，換算樣品之 trolox 當量濃度 (μg trolox/g dry weight)。TEAC 值愈高，代表化合物的抗氧化性愈高。

(2) 抑制脂質氫過氧化物形成能力之測定

脂質氫過氧化物測定其原理是利用硫氰酸鐵法 (Ferric thiocyanate method) 來測定亞麻油酸乳化系統 (linoleic acid emulsion system) 中之過氧化物，由於脂質氧化初期會生成氫過氧化物，將 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ， Fe^{3+} 再與 SCN^- 反應生成紅色的硫氰酸鐵錯合物 $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$ ，此錯合物於 500 nm 波長有最大吸收波峰。其反應如下：



參考 Zainol et al. (2003) 方法，將配製成濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BHT、ascorbic acid 及 α -tocopherol 的乙醇溶液或不同時期和不同熱加工條件

下的金針花苞乙醇萃取物各取 0.5 mL，而對照組為等量的乙醇 0.5 mL，再依序分別加入 0.02 M 之 linoleic acid emulsion 2.5 mL 及 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 2 mL，之後放入有蓋的指形瓶中混合均勻後，置於 37 °C 之恆溫培養箱內，每隔 24 hr 取上述之混合液 0.1 mL，再依序加入 75 % 之乙醇溶液 4.7 mL，30 % 之 ammonium thiocyanate 0.1 mL 及 0.02 M 的溶在 3.5 % HCl 之 iron (II) chloride tetrahydrate 0.1 mL，振盪均勻。靜置 3 min 後，以分光光度計測其在 500 nm 波長下之吸光值。當置於 37 °C 恆溫培養箱時間愈長，脂質氧化程度就愈高，氫過氧化物之生成量亦愈多，呈色也跟著加深。但加入抗氧化劑時會抑制氫过氧化物的產生，使呈色速度降低，吸光值亦愈低，表示加入抗氧化劑之抗氧化力愈強，藉此比較抗氧化劑的抗氧化能力，以 IP % 表示，IP % 愈高表示油脂愈安定，加入樣品的抗氧化性愈強。

* 抑制脂質過氧化物率 (Inhibition of peroxidation % ; IP %) = [1 - (樣品於 500 nm 的吸光值) / (等量乙醇之對照組於 500 nm 的吸光值)] × 100 %

* Linoleic acid emulsion (pH 7.0) 之配製方法為，於 50 mL 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 中加入 0.2804 g 之 linoleic acid 及 0.2804 g 之 Tween 20，以磁石攪拌成乳狀液即可，此乳狀液必須新鮮配製。

(3) 螯合亞鐵離子能力之測定

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，只要少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行。在多種金屬離子中，Fe²⁺ 是最具影響力的助氧化劑，利用 Fe²⁺ 與 ferrozine 的複合物在 562 nm 之呈色反應，反應如下，可測得樣品對 Fe²⁺ 離子的螯合能力。當樣品螯合 Fe²⁺ 離子時，會造成 562 nm 吸光值的降低。



參考 Dinis et al. (1994) 方法，將不同時期和不同熱加工條件下的金針花苞乙醇萃取物 0.25 mL，並以等量乙醇 0.25 mL 作為對照組，依序分別加入乙醇 0.8 mL 及 2 mM 的 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mL，以 Vortex Mixer 震盪 30 sec，再加入 5 mM 之 ferrozine 0.05 mL，震盪均勻後，放置在室溫下靜置 10 min 後，立即以分光光度計測定於波長 562 nm 下之吸光值。吸光值愈低表示螯合金屬離子之效果愈強。

*螯合亞鐵能力百分比(chelating effects %) = $[1 - (\text{樣品於 } 562 \text{ nm 的吸光值}) / (\text{等量乙醇之對照組於 } 562 \text{ nm 的吸光值})] \times 100\%$ 。為了避免誤差，樣品於 562 nm 的吸光值 = 反應後樣品於 562 nm 之吸光值 - 反應前樣品於 562 nm 之吸光值。

(三) 樣品前處理

1. 新鮮樣品

使用當天購買的蔬菜，買回立即清洗、挑除不可食用部分如粗莖或根等，剩下可食部份再將葉、莖分開各別秤重，之後依其葉、莖比例進行取樣。

2. 凍乾樣品

使用當天購買的蔬菜，買回立即清洗、挑除不可食用部分如粗莖或根等，剩下可食部份放進 -20°C 冷凍至隔天，再送進冷凍乾燥機進行乾燥，接著以均質機粉碎均質後，放進 -20°C 冷凍儲存用。

(四) 評估不同溶劑對不同原料中類胡蘿蔔素之萃取能力比較

1. 新鮮樣品之萃取

參考 Larsen and Christensen (2005) 方法。秤取 2 g 新鮮番薯葉蔬菜，加入 25 mL 溶劑中如冰丙酮、乙醚、乙醇等，於室溫下使用均質

機避光均質 1 min，之後靜置 20 min，再於 10000 rpm(16000*g)下離心 5 min，收集上清液，將沉澱物復溶於 20 mL 的冰丙酮中，重複均質與離心的步驟三次。收集上清液以減壓濃縮機濃縮至乾後，再復溶於冰丙酮中定容至 10 mL，於此萃取液中加入 1 g Ambersep 900 OH 鹼性樹脂，室溫下以磁石避光攪拌 30 min 進行皂化反應，皂化後以 0.45 μ m 濾膜 (nylon filter) 進行過濾，濾液進行 HPLC 分析。

2. 冷凍乾燥樣品之萃取

參考 Larsen and Christensen (2005)方法。秤取 0.5 g 凍乾番薯葉，加入 25 mL 溶劑中如冰丙酮、乙醚、乙醇等，於室溫下使用均質機避光均質 1 min，之後靜置 20 min，再於 10000 rpm 下離心 5 min，收集上清液，將沉澱物復溶於 20 mL 的冰丙酮中，重複均質與離心的步驟三次。收集上清液以減壓濃縮機濃縮至乾後，再復溶於冰丙酮中定容至 10 mL，於此萃取液中加入 1 g Ambersep 900 OH 鹼性樹脂，室溫下以磁石避光攪拌 30 min 進行皂化反應，皂化後以 0.45 μ m 濾膜 (nylon filter) 進行過濾，濾液進行 HPLC 分析。

(五) 番薯葉類胡蘿蔔素之萃取、分離及純化

1. 溶劑萃取

將 25g 冷凍乾燥並粉碎的番薯葉置入深棕色血清瓶中，將 2000ml THF (Tetra-hydrofuran)分四次，每次 500ml 浸泡萃取 24hr，所得萃取液在低溫避光下減壓濃縮而得濃縮液，置入 4°C 避光低溫保存。待四次減壓濃縮後以丙酮溶劑定量至 25ml，每 2ml 分別存放於 10ml 保存瓶中抽氣、沖氮氣後置於 4°C 冰箱中避光低溫保存備用。

2. 開放式管柱沖填與收集

參考 Lakshminarayana(2005)方法。取氧化鋁膠體 80ml 浸泡於正己烷:丙酮=9:1 中，以超音波震盪 30min 後，將膠體填充至開放式管柱中，

一天後再以正己烷與丙酮溶液進行梯度沖提。

將上述低溫保存備用的樣品定量至 10ml 裝填至管柱後，分別以正己烷:丙酮=9:1、7:3、5:5 之混合溶劑及 100%丙酮各 250ml 作為沖提溶劑，以自動分液收集器每 8ml 收集一管，待全部收集完畢後以紫外光-可見光吸光光譜儀檢測其在波長 450nm 下之吸光值。

(六) HPLC 沖提條件

1. 類胡蘿蔔素含量分析

參考 Sander et al. (1994) 方法，固定相是利用逆相 C₃₀ 管柱(4.6 mm × 250 mm I.D.)，移動相包含 A 沖提液 MeOH:MTBE: H₂O = 81:15:4 及 B 沖提液 MeOH:MTBE = 6:90，梯度沖提條件是在 0 min 時，A 沖提液由 100 % 逐漸減少，B 沖提液則由 0 % 逐漸增加，至 90 min 時 A 沖提液為 0 %，B 沖提液達到 100 %，流速為每分鐘 1 mL，注射量為 10 μL，以 photodiode-array 偵測器在 300-800 nm 波長下進行分析。

2. 葉黃素類酯鏈分析

參考 Breithaupt et al. (2002) 方法，固定相是利用逆相 C₃₀ 管柱(4.6 mm × 250 mm I.D.)，移動相包含 A 沖提液 MeOH:MTBE: H₂O = 81:15:4 及 B 沖提液 MeOH:MTBE = 6:90，梯度沖提條件是在前 10 min 時，A 沖提液 100 %，接下來至 40min，B 沖提液則逐漸增加到 50 %，接著 B 沖提液在 50 min 達到 100%，55 min A 沖提液 100 % 維持至 60 min，流速為每分鐘 1 mL，注射量為 20 μL，以 photodiode-array 偵測器在 300-800 nm 波長下進行分析。

(七) 類胡蘿蔔素及其異構物之鑑定

1. 以紫外光燈照射標準品進行異構化：

類胡蘿蔔素異構物是將全反式葉黃素、玉米黃質及及 β-胡蘿蔔素

標準品，溶於氯仿(chloroform)，配成濃度 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，個別置於紫外光燈下照射 0、1、3、5、10、20 min 後進行 HPLC 分析，之後將照射紫外光 1、3、5、10、20 min 後與照射前的全反式葉黃素、玉米黃質及 β -胡蘿蔔素標準品之 HPLC 分析結果做比對，且參考 (Updike and Schwartz, 2003) 結果，以產生異構物數量最多且濃度最高來判斷是否產生異構化，在照射一開始，順式異構物會隨照射時間增長而增加，當順式異構物量達到最高，為最適異構化照射時間，照射後所得之標準品用氮氣吹乾，儲存於 -20°C 下以備用。

* 紫外光照射條件：紫外光燈管一支 (管長 436 mm \times 管徑 25.5 mm)，光照功率 15 瓦 (Watts)，光照電流 0.300 安培 (Ampere)，照射距離 40 cm。

2. 順/反式異構物之鑑定：

樣品萃取液中的全反式葉黃素、玉米黃質及 β -胡蘿蔔素可直接與標準品的滯留時間及吸收光譜做比對鑑定，而葉黃素、玉米黃質及 β -胡蘿蔔素的順式異構物鑑定則是先利用 photodiode-array 偵測器，對上述經紫外光燈照射的全反式標準品所產生各個順式異構物波峰進行掃描分析，得到各順式異構物吸收光譜，並與文獻資料做比對，判定出各個順式異構物(Updike and Schwartz, 2003; Chen and Lin, 2003)，再比對樣品萃取液與標準品之順式異構物在偵測波長 450 nm 下的滯留時間及吸收光譜，加以鑑定之。

3. 類胡蘿蔔素標準檢量線製作

將類胡蘿蔔素標準品溶於氯仿，配成全反式葉黃素濃度 1、5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，全反式玉米黃質為 0.04、0.4、2、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，及全反式 β -胡蘿蔔素為 0.4、2、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，將上述 3 種溶液各取 10 μL ，在偵測波長 450 nm 下進行 HPLC 分析，以各標準品之波峰積分面積為橫軸，類胡蘿蔔素濃度為縱軸，可得各標準曲線之迴歸方

程式與相關係數 (correlation coefficient, R^2)。

(八) 蔬菜水分含量分析

依照蔬菜原本的葉、莖比例進行取樣 10 g，放進-20 °C 冷凍至隔天，再送進冷凍乾燥機進行乾燥，再秤量其乾物重。公式如下：

$$\text{水分含量}\% = (10 - \text{乾物重}) / 10 \times 100\%$$

(九) MTT 細胞毒殺試驗

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 為一種水溶性、呈現黃色的 terazolium 鹽類，常用於分析細胞增生(cell proliferation)、存活率(percent of viable cells)和細胞毒性(cytotoxicity)的分析方法(Mosmann, 1983)。其原理是利用檢測細胞內粒線體的琥珀酸去氫酶(succinate-tetrazolium reductase)活性，進而得知相對存活的細胞比例此去氫酶可將 MTT 轉化為藍色結晶的 formazan，只有活細胞的粒線體中含有此具活性的去氫酶，故所測得的吸光值與細胞存活率成正比，當細胞中粒線體內的粒線體去氫酶活性愈高，代謝 MTT 能力亦愈強，因此 formazan 生成量與活細胞數目成正比，可作為細胞存活率的指標(Mosmann, 1983)。

本實驗使用第 11 代 3T3-L1 前脂肪細胞(peradipocytes)，注入 1×10^5 cell/well 於 10cm 培養盤(10cm² dish)中；以含有 10%FBS 的 DMEM 為培養液，培養 37°C、5%CO₂ 的環境中，每兩天更換培養液。待細胞培養增殖後以 trypsin 切下，注入 2×10^3 cell/well 96 孔盤中，待培養兩天後，分別添加不同濃度的葉黃素和 β-胡蘿蔔素的區分物，1 天後除去培養基並以 PBS 洗滌兩次，再加入 100μL(0.5 mg/ml PBS)MTT 繼續培養 4h 進行反應，4h 後去除 MTT 試劑並加入 DMSO 20min，目的為打破細胞溶解出 formazan 結晶，並終止 MTT 反應，使用 ELISA reader 測定 590nm 的吸光值。

(十) 儲藏安定性實驗

參考 Cole 和 Kapur (1957)、Sharma 和 Magure (1996) 及 Lin 和 Chen(2005)的方法，將 50ml 蕃薯葉 THF 萃取液中葉黃素及 β -胡蘿蔔素區分物分裝於微量離心管(eppendorf)中將溶劑以抽氣幫浦抽乾後，至於恆溫培養箱。將樣品區分為照光組及避光組，避光組以鋁箔紙蓋著，在這兩組中再分為沖氮氣(N_2)及暴露於空氣組，接著分別置於 $4\pm 3^\circ C$ 、 $25\pm 3^\circ C$ 、 $35\pm 3^\circ C$ 的恆溫箱中儲存 4 週，每週取樣一次。恆溫箱中裝有日光燈管，照度為 900~1200 Lux。每隔一週取出 2 個，以 2 重複進行試驗，樣品共 192 個。樣品取出後溶於 1 ml 丙酮，經 $0.45\ \mu m$ 的濾膜過濾，經自動注射器取 $10\ \mu L$ 以 HPLC 分析。

四、統計分析

以上實驗均以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示，以 SAS (Statistical Analysis System) 8.0 軟體系統進行統計分析，再以鄧式多變域測驗法 (Duncan's multiple range test) 比較各因子之差異程度，顯著差異水準為 0.05。