

## 肆、結果與討論

### 第一部分

#### 金針花苞於不同生長階段與熱加工處理對其類胡蘿蔔素、 總酚類化合物及抗氧化活性的影響

##### 一、不同生長階段的金針花苞其類胡蘿蔔素、總酚類化合物及 抗氧化活性之探討

###### (一) 金針花苞於不同生長階段之乙醇萃取物中類胡蘿蔔素含量之變 化

新鮮金針花苞在不同生長階段，顏色會由綠轉黃，體長逐漸延伸，本研究以平均長度 3cm、6cm、8cm、10cm 分別稱為第一、二、三及四生長階段如圖三。由圖四結果顯示全反式葉黃素隨著金針花苞平均長度增加而顯著降低( $p < 0.05$ )，第二、三及四生長階段均與第一生長階段比較時，分別減少了 38.29%、64.71%及 85.48 %；相反的全反式玉米黃質則隨著金針花苞平均長度增加而顯著增加，分別增加了 53.17%、144.15%及 197.02 %，不同生長階段對全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素含量則沒有顯著影響。其原因可能是在第一生長階段時  $\epsilon$ -胡蘿蔔素水解酶含量較高，形成葉黃素能力較強，而後期則以  $\beta$ -胡蘿蔔素水解酶為高，因而合成較多玉米黃質，如附錄四(Alquzar, B., et al., 2008)。

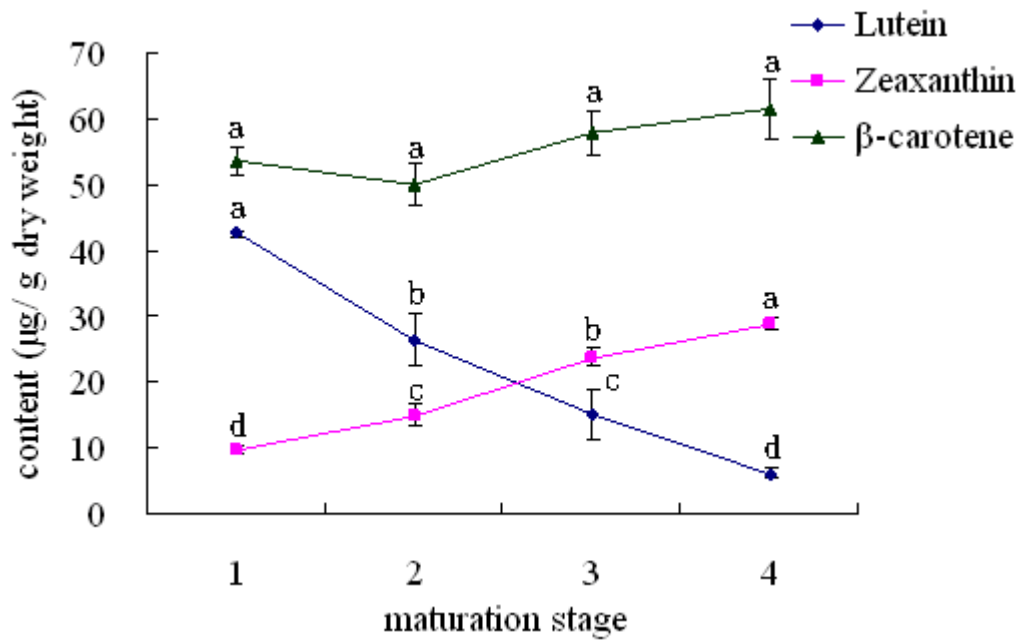
###### (二) 金針花苞於不同生長階段其乙醇萃取物皂化前後總酚類化合物 含量之變化

圖五評估四個不同生長階段金針花苞乙醇萃取物皂化前後對總酚類化合物含量之影響；結果顯示未皂化萃取物(NSE)的 TPC 含量會隨著生長成熟而漸增，將生長成熟的第四階段(NSE4)與第一階段(NSE1)



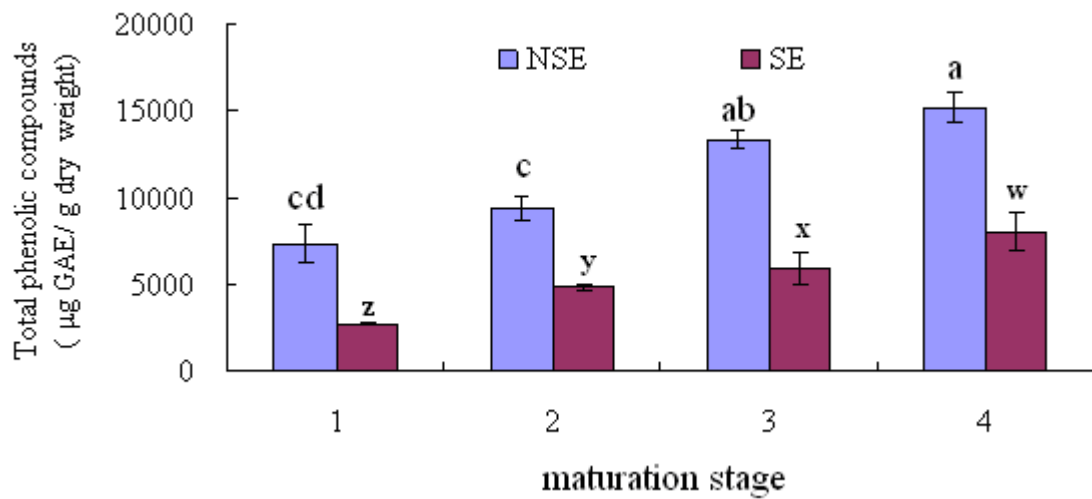
圖三、金針花苞四個生長階段的平均長度

Figure 3. Average length of daylily buds at four maturation stages.



圖四、金針花苞在不同生長階段其全反式 葉黃素、玉米黃質、β-胡蘿蔔素含量之變化

Figure 4. Content of all-trans lutein, zeaxanthin and β-carotene of daylily buds at four maturation stages. Bar represent mean ± SD, n =3. Means of IP % with different letters in the same treatment are significantly different (p<0.05).



圖五、不同生長階段金針花苞之乙醇萃取物未皂化前(NSE)及皂化後(SE)對總酚類化合物含量之影響

Figure 5. The effects of saponification of ethanol extract from four maturation stages of daylily buds on total phenolic compounds (TPC). Bar represent mean  $\pm$  SD, n =3. Means of IP % with different letters in the same treatment are significantly different ( $p < 0.05$ ).

比較，其總酚含量從 7371 增加到 15155  $\mu\text{gGAE/g dry weight}$ ，即增加了 2.06 倍。而各階段皂化萃取物(SE)其總酚類化合物含量亦隨著生長成熟而漸增，但各階段 SE 的總酚含量與 NSE 比較減少了 46-63%。

### (三) 金針花苞於不同生長階段其乙醇萃取物皂化前後之抗氧化活性探討

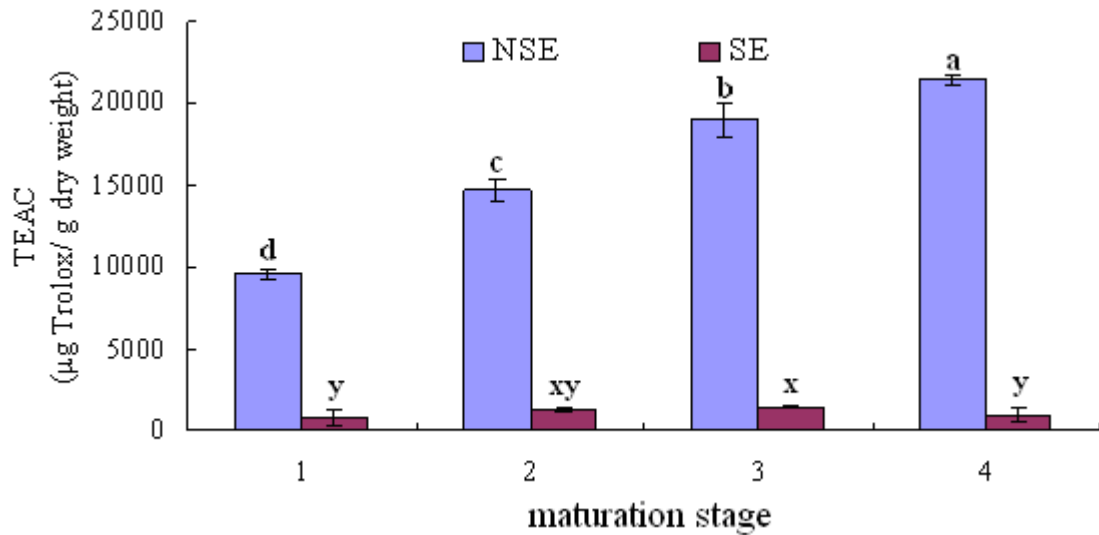
金針花苞的乙醇萃取物經皂化前後抗氧化活性的測定，包括 Trolox 當量抗氧化力(Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC)、抑制脂質過氧化物生成能力與螯合亞鐵離子能力等。

#### 1. Trolox 當量抗氧化能力之測定

Trolox 是一種結構類似維生素 E 的水溶性抗氧化劑，藉由樣品清除  $\text{ABTS}^+$  陽離子自由基的能力，評估樣品的總抗氧化活性。當樣品之 TEAC 值愈高，則表示其抗氧化活性愈佳。圖六為不同生長階段金針花苞的乙醇萃取物皂化前後抗氧化能力之探討，結果指出各階段 NSE 的 TEAC 均顯著高於 SE，隨著生長成熟 NSE 中的 TEAC 當量有顯著增加的趨勢，這與各生長階段所含 TPC 呈現正相關，其方程式為  $y = 1.4366x - 84.062$ 、 $R^2 = 0.9698$  如圖七，許多研究也指出酚類化合物可作為抗氧化力評估的指標(Castelluccio et al., 1995; Burns et al., 2000; Sanchez-Moreno et al., 2000)。

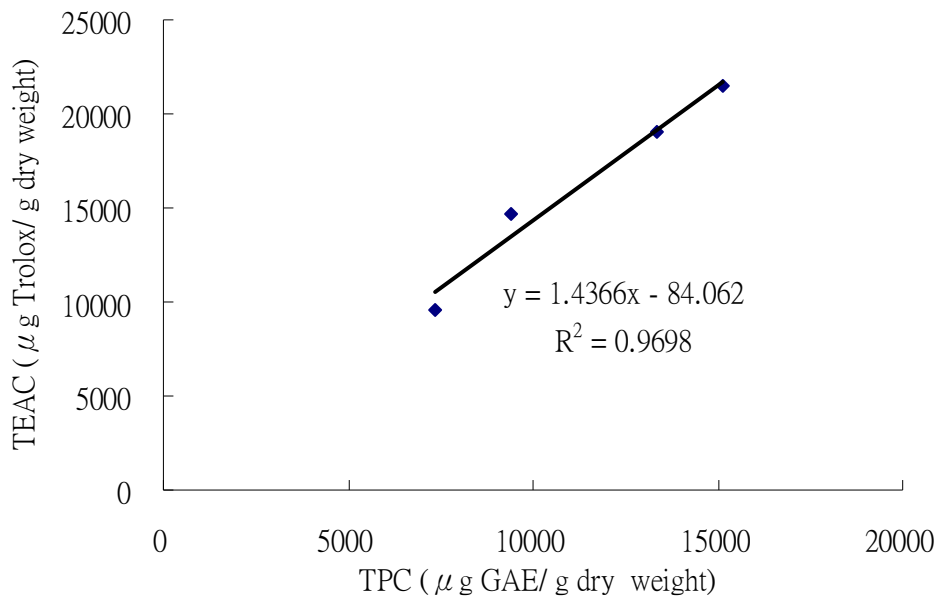
#### 2. 抑制脂質過氧化物生成能力之測定

抑制脂質過氧化物生成能力是利用硫氰酸鐵法 (Ferric thiocyanate method)，以評估樣品的抗氧化性，若加入的樣品具有抑制過氧化物生成的能力，則此系統所形成的紅色氰酸鐵錯合物濃度就會降低，隨著時間的延長，其呈色速率會減緩，降低吸光值的上升速率，而吸光值愈低表示抗氧化力愈強。由圖八可知各生長階段 NSE 其抗氧化活性由



圖六、不同生長階段金針花苞之乙醇萃取物皂化前(NSE)及皂化後(SE)對 TEAC 之影響

Figure 6. The effect of non-saponification and saponification of ethanol extract from four maturation stages of daylily buds on the TEAC value. Bar represent mean  $\pm$  SD, n =3. Means of IP % with different letters in the same treatment are significantly different (p<0.05).



圖七、TEAC 與 TPC 的相關性

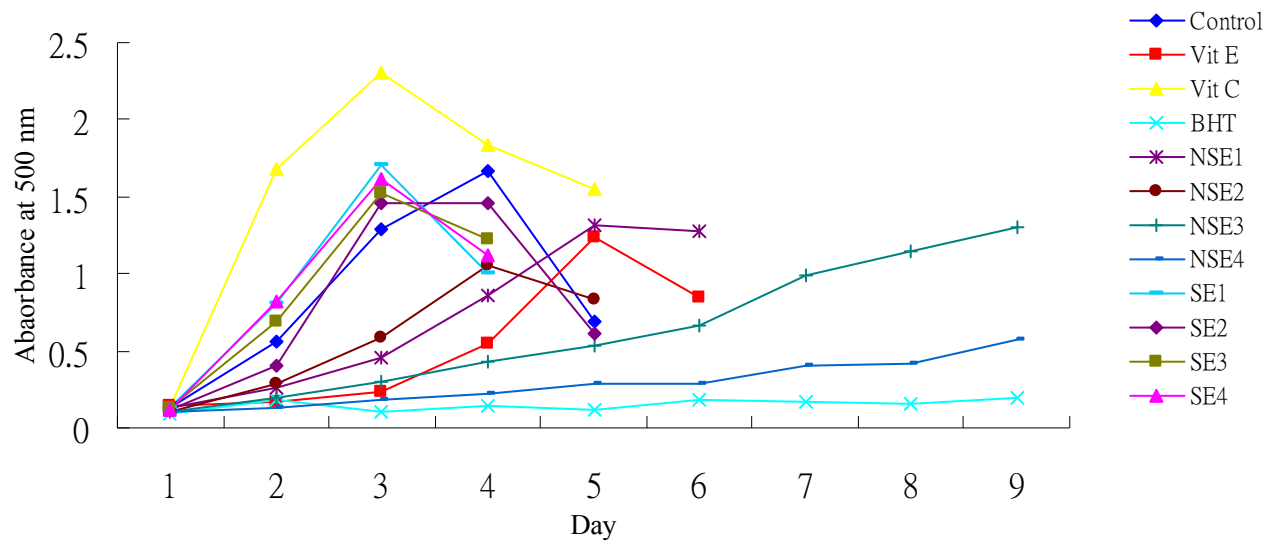
Figure 7. The correlation between TEAC and TPC

高至低小依序為 BHT > NSE4 > NSE3 > Vit E ( $\alpha$ -tocopherol) > NSE1  $\cong$  NSE2 > 控制組 > SE2 > SE3 > SE4 > SE1；金針花苞乙醇萃取物未經皂化時其抑制氫過氧化物生成的能力有增加的趨勢，其中以第四階段 NSE 的能力最高，其 10 倍稀釋液的抑制過氧化物形成的能力優於 50 ppm  $\alpha$ -tocopherol，而與 50 ppm BHT 相近。將圖八中金針花苞於亞麻油酸乳化系統中第二天之吸光值除以控制組，所得之抑制脂質過氧化物的形成能力以 IP % 表示 (IP : Inhibition of peroxidation)，IP % 愈高表示油脂愈安定，受測樣品的抗氧化活性即愈強 (Mitsuda et al., 1996)，如圖九所示，比較不同生長階段金針花苞之未皂化萃取物對 IP % 之影響，由於乙醇萃取物經過皂化 (SEs) 後不但降低其抗氧化力，甚至反而有促進脂質氧化的作用，使得 IP% 呈現負值。結果顯示 NSE1 與 NSE2 兩組 IP% 沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ )，而 NSE3 與 NSE4 與前兩階段相比有顯著增加，由 NSE1 的 41.94% 提升至 NSE4 的 62.95%，由此可知隨者生長時間的增加，會逐漸提升金針花苞的 IP %。由以上結果發現，NSEs 的抗氧化活性皆優於 SEs，且其中以生長成熟之第四階段 NSE 最好。由此可知為了避免葉綠素、酯化型類胡蘿蔔素及雜質在分析中所造成的干擾，可以藉由皂化去除，所以皂化在分析有其必要性；但在抗氧化活性上，皂化反而會去除金針花中某些抗氧化成分如總酚類化合物(如圖五)，因而造成總抗氧化能力降低。

### 3. 螯合亞鐵離子之測定

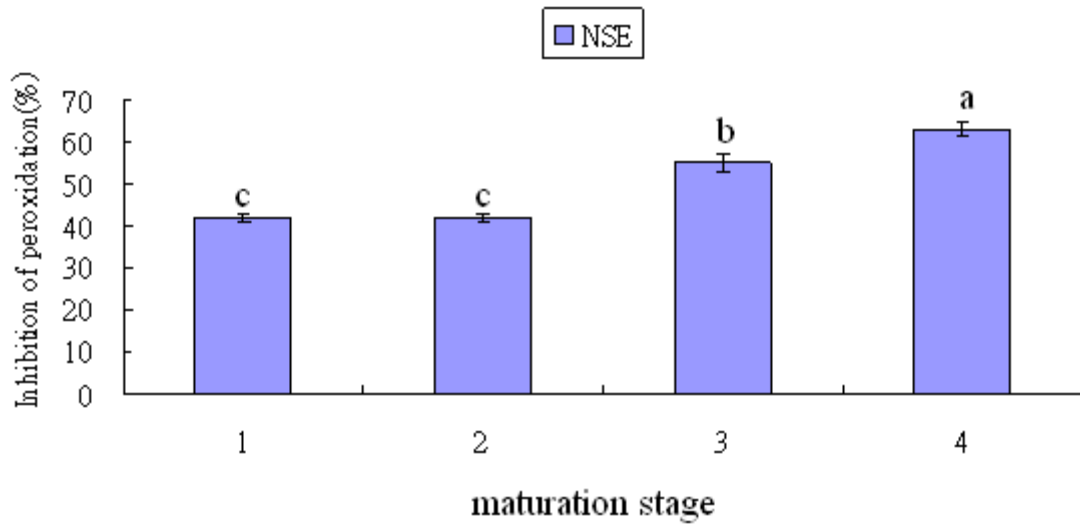
金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要原因，因為只需少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並且會加速脂質的氧化 (Dinis et al., 1994)，而亞鐵離子( $Fe^{2+}$ )是最具影響力的促氧化劑，若樣品具有螯合亞鐵離子時，會造成 562nm 吸光值的降低，吸光值越低代表樣品螯合亞鐵離子能力越強。圖十為各生長階段 NSE、SE 之螯合亞鐵離子能力，結果發現 NSE 均高於 SE 2-3 倍。可見皂化會破壞具有螯





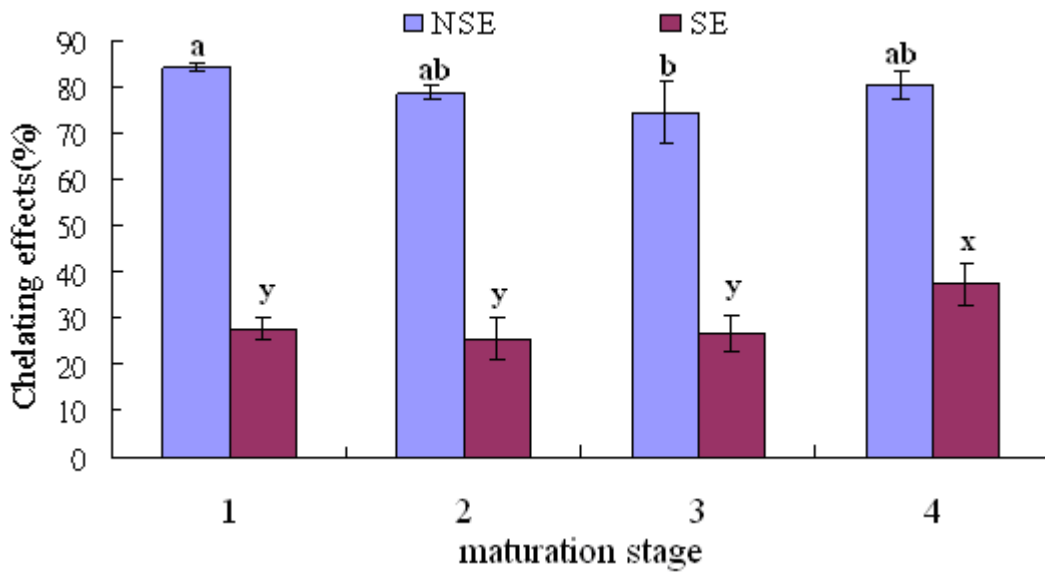
圖八、不同生長階段金針花之乙醇萃提取物皂化前(DSE)及皂化後(SE)對其抑制脂質氫過氧化物形成能力之影響

Figure 8. The effect of non-saponification and saponification of ethanol extract from four maturation stages of daylily buds on the absorbance at 500 nm in linoleic acid emulsion system during nine days.



圖九、不同生長階段金針花苞之未皂化乙醇萃取物(NSE)對抑制過氧化率(IP%)之影響

Figure 9. The effect of non-saponification and saponification of ethanol extract from four maturation stages of daylily buds on the inhibition of peroxidation. Bar represent mean  $\pm$  SD, n =3. Means of IP % with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖十、不同生長階段金針花之乙醇萃取物皂化前(NSE)及皂化後(SE)對其螯合亞鐵離子能力之影響

Figure 10. The effect of non-saponification and saponification of ethanol extract from four maturation stages of daylily buds on chelating effects. Bar represent mean  $\pm$  SD, n =3. Means of IP % with different letters in the same treatment are significantly different ( $p < 0.05$ ).

合鐵離子能力的分子，特別是有機酸，如抗壞血酸(Maorun et al.,2009)，然而各階段的 NSEs 或 SEs 之間並沒有顯著差異( $p < 0.05$ )，表示螯合亞鐵離子能力不受生長階段所影響。

雖然各生長階段金針花苞中葉黃素及玉米黃質含量互有消長，但總類胡蘿蔔素含量卻無顯著差異，因此無法以此判別金針花中所具有的抗氧化能力受其類胡蘿蔔素所影響。根據文獻指出金針花苞中的抗氧化活性受到其類胡蘿蔔素含量最高的  $\beta$ -胡蘿蔔素影響較少(Maorun et al.,2009)，但與所含的 TPC 有較大的關聯(董等, 2005；Burns et al., 2000；Sanchez-Moreno et al., 2000)，本研究結果亦指出金針花苞乙醇萃取物的未皂化物，其抗氧化活性 TEAC 及抑制脂質過氧化物生成能力，皆與 TPC 呈現正相關。綜合以上結果顯示，第四生長階段平均長度 10cm 的金針花苞，其乙醇萃取物的未皂化物具有最佳的抗氧化性，後續將再以此金針花苞探討不同加工方法對類胡蘿蔔素、總酚類化合物含量及抗氧化活性之影響

## 二、熱加工處理對第四階段金針花苞乙醇萃取物中類胡蘿蔔素、總酚類化合物及抗氧化活性之影響

### (一) 熱加工處理對第四階段金針花苞乙醇萃取物中類胡蘿蔔素含量之影響

表二為水煮 0、1、5、10、20 min 以及油炒 1 min 對第四階段金針花苞乙醇萃取物中類胡蘿蔔素包括葉黃素、玉米黃質、 $\beta$ -胡蘿蔔素及其異構物含量之影響，結果發現水煮後的金針花苞與新鮮的(水煮 0 min) 對照組比較，水煮時間的長短對其總類胡蘿蔔素含量均沒有顯著影響 ( $p > 0.05$ )，但花苞分別水煮 1min 和 5 min 後其總類胡蘿蔔素含量與對照組比較，稍微提升了 3.96 %與 2.70 %，水煮 10 和 20 min 則降低了 15.41 %與 18.67 %。全反式類胡蘿蔔素部分，水煮金針花 1 和 5 min 時，與對照組比較，全反式葉黃素含量，分別顯著增加 36.11%與 38.27

表二、熱處理對第四階段金針花類胡蘿蔔素含量之影響

Table 2. The effect of thermal processing on the carotenoids content at the fourth maturation stage of daylily buds

Treatment	Carotenoids isomers <sup>1,2</sup>										
	Total carotenoids <sup>3</sup>	All-trans L	13-cis-L	13'-cis-L	9-cis L	9'-cis L	all-trans Z	9-cis Z	all-trans - $\beta$	13-cis- $\beta$	9-cis- $\beta$
Boiling (min)	( $\mu\text{g}$ carotenoids / g dry weight)										
0	123.91 $\pm$ 22.68 <sup>a</sup>	6.01 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	1.53 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	— <sup>4</sup>	—	1.62 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	23.13 $\pm$ 6.30 <sup>b</sup>	2.29 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	45.79 $\pm$ 8.91 <sup>a</sup>	12.87 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	30.67 $\pm$ 5.79 <sup>a</sup>
1	128.82 $\pm$ 5.87 <sup>a</sup>	8.18 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	—	—	2.13 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	35.65 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup>	2.74 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	41.64 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>	13.17 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	23.16 $\pm$ 1.62 <sup>ab</sup>
5	127.26 $\pm$ 13.12 <sup>a</sup>	8.31 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	1.89 $\pm$ 0.43 <sup>ab</sup>	—	1.21 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	2.44 $\pm$ 0.36 <sup>ab</sup>	34.88 $\pm$ 4.84 <sup>a</sup>	3.34 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	38.82 $\pm$ 3.32 <sup>a</sup>	12.76 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	23.62 $\pm$ 2.31 <sup>ab</sup>
10	104.82 $\pm$ 22.22 <sup>a</sup>	5.41 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	1.17 $\pm$ 0.02 <sup>cd</sup>	—	1.26 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.81 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	30.26 $\pm$ 2.73 <sup>ab</sup>	3.56 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	29.24 $\pm$ 9.50 <sup>ab</sup>	12.63 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup>	18.48 $\pm$ 8.03 <sup>ab</sup>
20	100.77 $\pm$ 19.22 <sup>a</sup>	5.53 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	—	1.37 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.09 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	29.16 $\pm$ 1.89 <sup>ab</sup>	3.00 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	27.06 $\pm$ 6.21 <sup>b</sup>	12.18 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>	18.31 $\pm$ 7.40 <sup>ab</sup>
Stir-fried											
1	69.38 $\pm$ 3.42 <sup>b</sup>	4.99 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	1.46 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	—	—	1.21 $\pm$ 0.19 <sup>d</sup>	24.08 $\pm$ 0.96 <sup>b</sup>	2.23 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.49 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	11.29 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	11.42 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Data are based on the average of two duplicate experiments  $\pm$  SD. Values with the same letters in the same column are not significantly different ( $p < 0.05$ ) between samples.

<sup>2</sup>Concentrations are in micrograms per gram of dry vegetables tissue.

<sup>3</sup>Data are based on total isomers of lutein (L), zeaxanthin (Z) and  $\beta$ -carotene ( $\beta$ ).

<sup>4</sup> — “Not detectable.

%，水煮 10 和 20 min 則降低了 9.98 %與 7.99 %；全反式玉米黃質經水煮後均有顯著提高( $p < 0.05$ )，在 1 min 時達最高，增加了 54.13 %；全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素則經水煮 1-10 min 沒有顯著差異( $p > 0.05$ )，但含量與對照組比有下降的趨勢，水煮 20 min 後則顯著下降，與對照組比較降低了 36.14 %。順式異構物部分，13-順式葉黃素及 13-順式  $\beta$ -胡蘿蔔素皆於水煮 1 min 時達最高，分別增加了 41.18 %與 2.33 %，之後隨著時間增加而遞減，於水煮 20 min 達最低，分別減少了 30.72 %與 5.36 %。葉黃素與玉米黃質的 9-、9'-順式異構物經過水煮後，與對照組比較均提高其含量，而 9-順式  $\beta$ -胡蘿蔔素是隨著水煮時間增加而減少，於 20 min 達最低，降低了 40.30%。

至於油炒 1 min 對金針花的總類胡蘿蔔素含量有顯著之影響，與對照組比較降低了 44.01 %，其中全反式葉黃素及全反式玉米黃質經油炒後並沒有顯著差異，全反式  $\beta$ -類胡蘿蔔素則顯著減少 72.72 %，至於順式異構物部分，經油炒後含量均降低，其中 13-順式葉黃素、9'-順式葉黃素、9-順式玉米黃質、13-順式  $\beta$ -胡蘿蔔素及 9-順式  $\beta$ -胡蘿蔔素分別減少了 4.58、25.31、2.62、12.28 及 62.76 %。

而由以上結果發現，金針花苞經油炒後較水煮損失較多的類胡蘿蔔素，其可能原因為類胡蘿蔔素對光、熱與氧氣等非常敏感，所以一般熱處理蔬果會因氧化或加熱的作用，導致類胡蘿蔔素容易裂解(Chen et al., 1994)、或異構化(Chen et al., 1996；Updike and Schwartz, 2003)，加工過程中油脂的添加也會促進類胡蘿蔔素異構化反應的發生(Marx et al., 2003)；相較於全反式葉黃素及全反式玉米黃質經油炒後與對照組比較並沒有顯著差異，而全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素則會顯著降低，可能原因為葉黃素及玉米黃質結構上都帶有兩個羥基，所以與油脂的相容性沒有  $\beta$ -胡蘿蔔素好，因此油炸時  $\beta$ -胡蘿蔔素溶出量多，造成其含量顯著的降低。至於水煮對類胡蘿蔔素的影響，Liu et al. (2007) 分析煮過蔬菜的水，結果顯示並無葉黃素存在，進而證實蔬菜中的葉黃素不會經水煮後而流失於水中，且類胡蘿蔔素是油溶性色素，較不易溶於水中，本研究水煮處理花苞其類胡蘿蔔素含量變化亦無顯著差

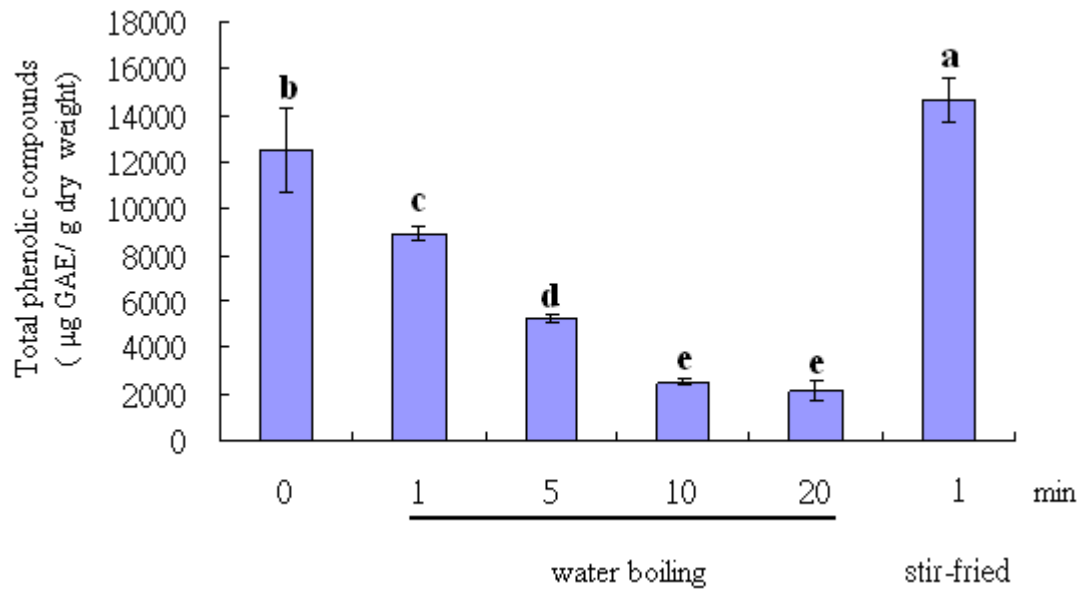
異，而且當水煮 1-5 min，花苞中之總類胡蘿蔔素含量反而增加，可能是在熱處理過程中蔬菜的氧化酵素失去活性、使組織軟化及破壞類胡蘿蔔素與蛋白質所形成複合物的結構，進而促使類胡蘿蔔素由組織中被釋放出來，增加萃取率，提高測定值 (Updike and Schwartz, 2003)，不過當類胡蘿蔔素釋放出來後又持續加熱，反而會造成類胡蘿蔔素之異構化而進一步發生裂解，使得類胡蘿蔔素含量下降。由此可知金針花苞在經過水煮 1 或 5 min 後，可提高花苞中的類胡蘿蔔素含量，使得在攝取時不但不會降低其營養價值，反而可能增加其生物可利用率。

### (二) 熱加工處理對第四階段金針花苞乙醇萃取物中總酚類化合物 (total phenolic compounds ; TPC) 含量之影響

圖十一為水煮 0、1、5、10、20 min 以及油炒 1 min 對第四階段金針花苞乙醇萃取物中的 TPC 含量之影響，結果發現花苞經水煮後與對照組比較，其 TPC 隨著水煮時間增加而逐漸減少，在水煮 20 min 時達到最低為  $2110 \pm 423 \mu\text{g GAE} / \text{g dry weight}$ ，減少了 83.08 %。Zhang and Hamauzu (2004) 指出，由於酚類化合物大多屬於水溶性物質，因此以水煮的熱加工處理容易使青花菜中的 TPC 溶於水中而流失，導致 TPC 含量降低。至於金針花經油炒 1 min 後與對照組比較，其 TPC 反而增加了 17.46 %，其可能原因為，加熱會使植物組織軟化，幫助酚類化合物由細胞組織中釋放，且 TPC 大多為水溶性化合物，不溶於油中，反而使 TPC 含量提高。

### (三) 熱加工處理對第四階段金針花苞乙醇萃取物中抗氧化活性之影響

比較熱加工處理對第四階段金針花苞乙醇萃取物之抗氧化活性如 Trolox 當量抗氧化能力、抑制脂質過氧化物形成及螯合亞鐵離子能力等影響，結果分述如下：



圖十一、熱加工處理對第四階段金針花總酚類化合物含量之影響

Figure 11. The effect of thermal processing of the fourth maturation stage of daylily buds on the total phenolic compounds . Bar represent mean  $\pm$  SD, n =3. Means of IP % with different letters in the same treatment are significantly different ( $p < 0.05$ ).

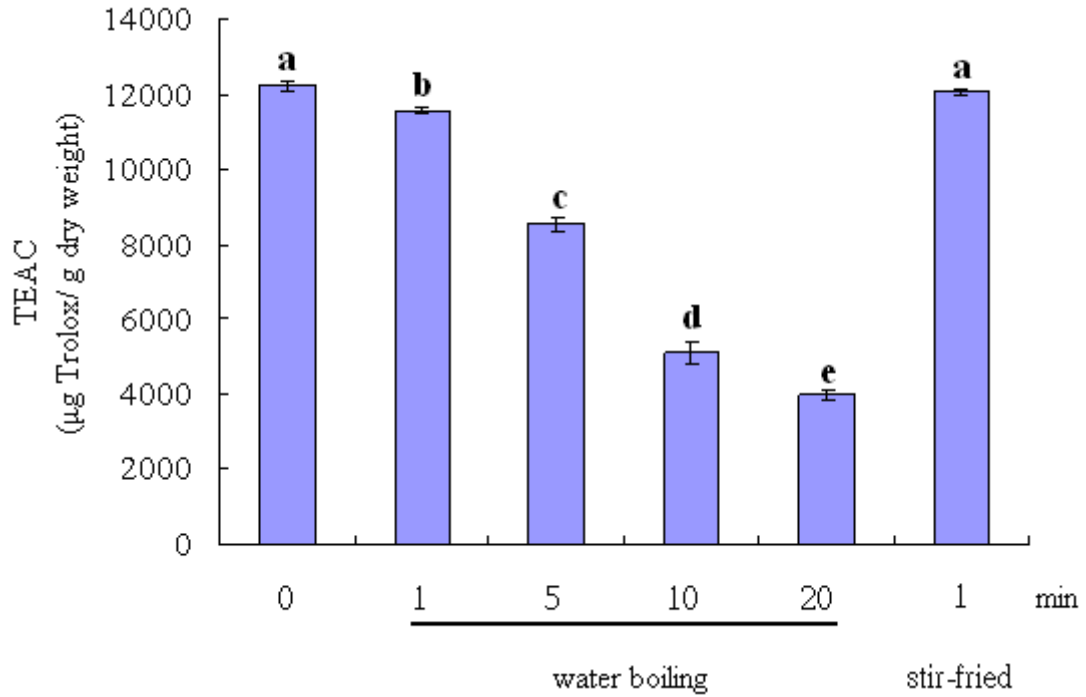


## 1. Trolox 當量抗氧化能力(Trolox equivalent antioxidant capacity ; TEAC)之測定

圖十二為比較水煮0、1、5、10、20 min以及油炒1 min對第四階段金針花苞的TEAC 值之影響，結果發現花苞經水煮後與對照組即新鮮的(水煮0 min)比較，其TEAC值隨著水煮時間增加而顯著減少，在水煮20 min時達最低為3982  $\mu$ g Trolox / g dry vegetables，減少了67.42 %。至於金針花苞經油炒1 min後與對照組比較，其TEAC值沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ )，只稍微減少1.36 %。由此可知金針花苞經油炒後較水煮可保留較多的TEAC之抗氧化能力，且TEAC值的增減與總酚含量的多寡有密切的關係，Velioglu et al. (1998) 發現酚類化合物是水果、蔬菜或穀物中抗氧化活性的主要來源，Zhang and Hamauzu (2004) 證實青花菜經過熱加工過後，其抗氧化活性是隨總酚含量降低而遞減，且比較本實驗中金針花之TEAC與TPC的相關性( $R^2 = 0.8559$ )如圖十三所示，可推測TEAC所評估的抗氧化能力，可能主要是由金針花中的總酚類化合物所提供。

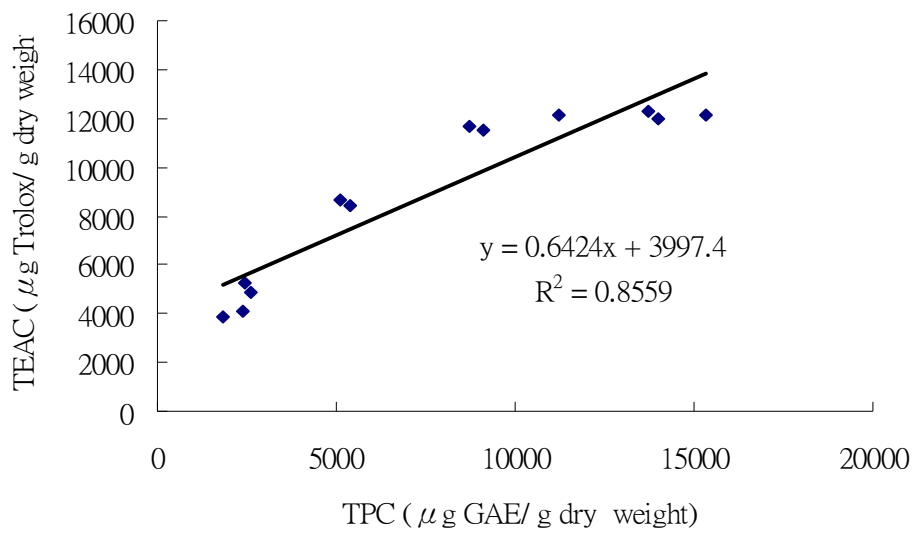
## 2. 抑制脂質過氧化物形成能力之測定

圖十四為比較水煮 0、1、5、10、20 min 以及油炒 1 min，對第四階段金針花苞乙醇萃取物添加於亞麻油酸乳化系統八天期間其吸光值之影響，吸光值愈高代表過氧化物形成愈多，當過氧化物之累積達到高峰，由於過氧化物並不安定，在氧氣充分供應下，會進一步生成二次代謝產物而減緩過氧化物之累積，使吸光值再度下降，於是當吸光值愈高且愈快達到高峰，表示抑制脂質過氧化物形成之能力愈差，即抗氧化活性愈差。從圖十四發現熱處理對金針花苞乙醇萃取物之抗氧化活性，由大至小依序為  $BHT > 0min \geq 1min > 5min > stir-fried > 10min > \alpha$ -tocopherol  $> 20min > Vit C >$  控制組，以上可知在金針花苞經水煮



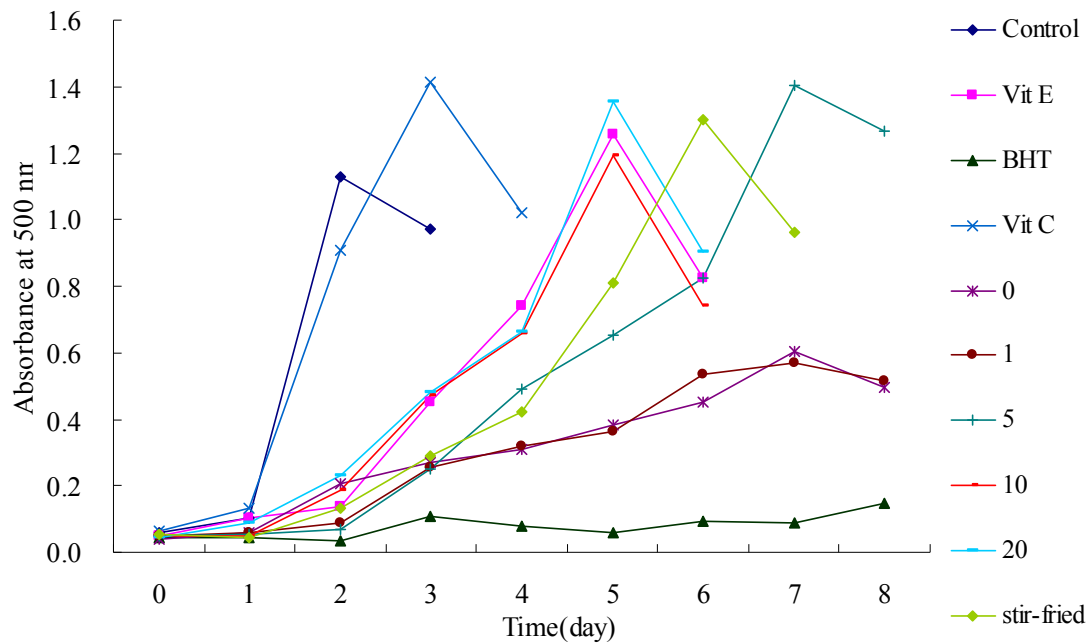
圖十二、熱加工處理對第四階段金針花 TEAC 之影響

Figure 12. The effect of thermal processing of the fourth maturation stage of daylily buds on the TEAC value. Bar represent mean  $\pm$  SD, n =3. Means of IP % with different letters in the same treatment are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖十三、TEAC 與 TPC 的相關性

Figure 13. The correlation between TEAC and TPC



圖十四、熱加工處理對第四階段金針花添加於亞麻油酸乳化系統八天期間其吸光值之影響

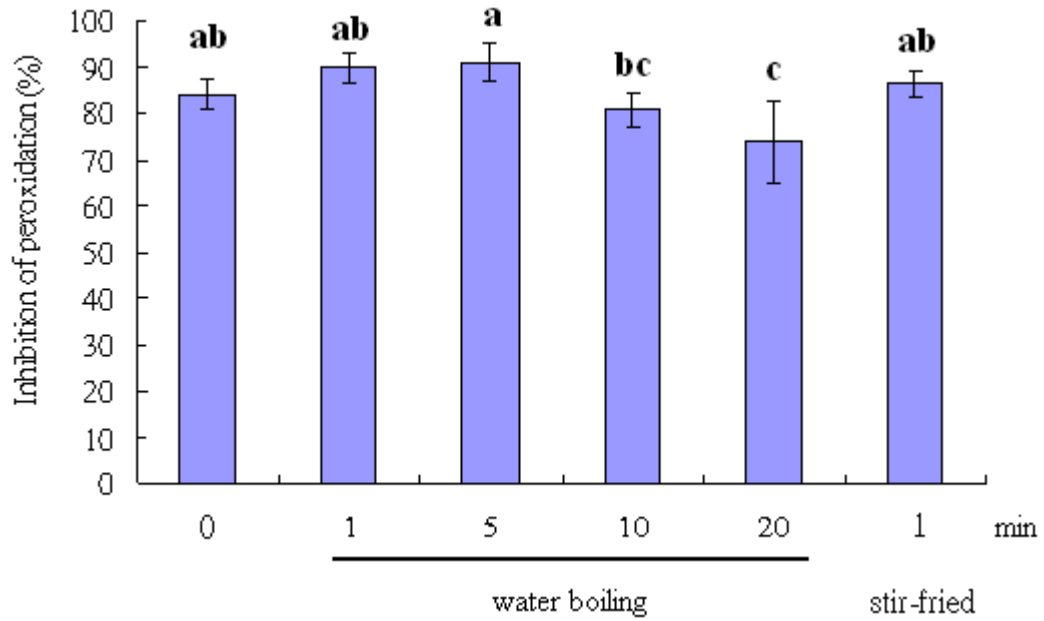
Figure 14. The effect of thermal processing of the fourth maturation stage of daylily buds in linoleic acid emulsion system during eight days (wavelength 500 nm).

0~1min 及油炒 1min 之抗氧化活性均優於  $\alpha$ -tocopherol (50ppm), 可是當水煮時間過長反而降低其抑制能力, 但仍優於控制組及 Vit C。控制組因沒有添加任何物質不具抗氧化效果, 在培養第二天時過氧化物之累積達到高峰, 將圖十四中金針花苞於亞麻油酸乳化系統中第二天之吸光值除上控制組, 所得之抑制脂質过氧化物的形成能力以 IP % 表示; 如圖十五所示, 比較熱處理對第四階段金針花苞 IP % 之影響, 結果顯示水煮 1、5、10 min 及油炒 1 min 與對照組比較沒有顯著差異( $p > 0.05$ ), 但有稍微提升金針花苞的 IP %, 而水煮 20 min 與新鮮相比有顯著減少, 由 84.04 % 降低為 73.69 %, 由此可知經過適當加工不會減少金針花苞的 IP %, 但當加工時間過長反而使金針花苞的抑制脂質过氧化能力降低。

### 3. 螯合亞鐵離子能力測定

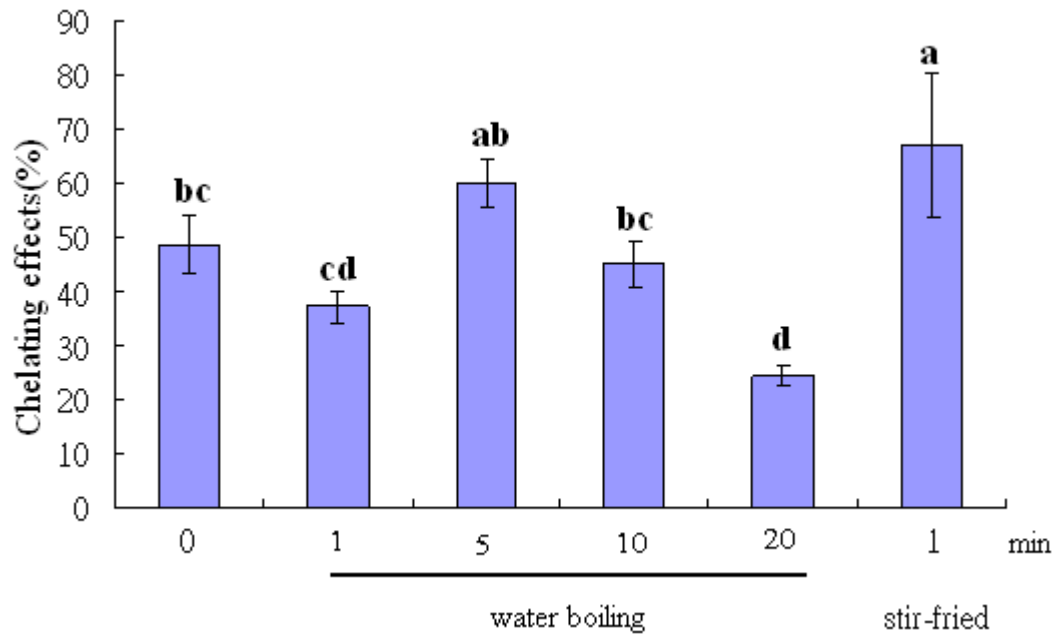
比較水煮 0、1、5、10、20 min 以及油炒 1 min, 對第四階段金針花苞乙醇萃取物的螯合亞鐵離子能力之影響如圖十六所示。由圖中可發現金針花苞經水煮 5 min 及油炒 1 min 後與對照組比較, 可提升其螯合亞鐵離子能力, 由一開始的 48.81 %, 分別提升至 60.26 % 及 67.09 %, 而水煮 1、10 及 20 min 則分別降低為 37.10 %、45.19 % 及 24.30 %。由於蔬菜中具有螯合亞鐵離子能力的成分, 如抗壞血酸 (ascorbic acid)、葉酸及一些水溶性酚類化合物等, 而 Fennema (1997) 指出水煮過程中, 蔬菜的抗壞血酸會大量流失, 而除抗壞血酸外, 葉酸及酚類化合物等水溶性成分亦容易在水煮過程中流失, 使金針花的螯合亞鐵離子的能力下降。然而這些水溶性抗氧化成分難溶於油中, 因此油炒 1 min 會使植物組織軟化, 抗氧化成分從細胞組織中被釋放, 反而顯著地提高金針花螯合亞鐵離子的能力。

植物中的天然抗氧化成分很多, 例如抗壞血酸、類胡蘿蔔素、生育醇 (tocopherols)、類黃酮 (flavonoids)、葉綠素衍生物 (chlorophyll



圖十五、熱處理對第四階段金針花抑制過氧化率(IP%)之影響

Figure 15. The effect of thermal processing of the fourth maturation stage of daylily buds on the inhibition of peroxidation. Bar represent mean  $\pm$  SD, n =3. Means of IP % with different letters in the same treatment are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖十六、熱加工處理對第四階段金針花螯合亞鐵離子能力之影響

Figure 16. The effect of thermal processing of the fourth maturation stage of daylily buds on chelating effects. Bar represent mean  $\pm$  SD, n =3. Means of IP % with different letters in the same treatment are significantly different ( $p < 0.05$ ).

derivatives)、生物鹼 (alkaloids)等 (Larson, 1988)，每種抗氧化成分的性質也不盡相同；綜合以上結果整理如表三，總類胡蘿蔔素含量與抗氧化能力並無相關，似乎與所使用的加工步驟有關，如隨著水煮時間的長短與總類胡蘿蔔素含量並無顯著差異，但總酚含量及 TEAC 值卻隨著時間的增長而下降；經過油炸 1min 的金針花與新鮮金針花相比，總類胡蘿蔔素含量顯著的減少，但總酚含量及 TEAC 值卻反而提高，甚至比水煮 1min 的金針花還要高；由於水溶性物質於水煮過程中容易由細胞中被釋放而流失，在油炸的過程中雖然藉由熱度破壞其結構，但是由於加熱介質為油脂，反而被封鎖於金針花苞中，所以由此推斷金針花苞的主要抗氧化物質並非類胡蘿蔔素而為水溶性物質居多。



表三、水煮時間及油炒對第四階段金針花之總類胡蘿蔔素、總酚類化合物及抗氧化活性的影響

Table 3. The effect of thermal processing on the carotenoids content、total phenolic compounds and antioxidation activity at the fourth maturation stage of daylily buds

treatment (min)	Total carotenoids <sup>1</sup> (µg carotenoids / g dry weight)	Total phenolic compounds <sup>2</sup> (µg GAE / g dry weight )	TEAC <sup>3</sup> (µg Trolox / g dry weight)	Chelating effects <sup>4</sup> %	Inhibition of peroxidation <sup>5</sup> %
boiling					
0	123.91±22.68 <sup>a</sup>	12476.45±1799.09 <sup>b</sup>	12224.36±132.54 <sup>a</sup>	48.81±5.42 <sup>bc</sup>	84.04±3.11 <sup>ab</sup>
1	128.82±5.87 <sup>a</sup>	8930.07±288.39 <sup>c</sup>	11575.22±100.83 <sup>b</sup>	37.10±3.16 <sup>cd</sup>	89.87±3.38 <sup>ab</sup>
5	127.26±13.12 <sup>a</sup>	5243.91±178.56 <sup>d</sup>	8558.95±182.14 <sup>c</sup>	60.26±4.38 <sup>ab</sup>	91.04±4.24 <sup>a</sup>
10	104.82±22.22 <sup>a</sup>	2513.23±104.87 <sup>e</sup>	5093.05±282.97 <sup>d</sup>	45.19±4.33 <sup>bc</sup>	80.89±3.61 <sup>bc</sup>
20	100.77±19.22 <sup>a</sup>	2110.89±423.02 <sup>e</sup>	3982.22±138.23 <sup>e</sup>	24.30±1.85 <sup>d</sup>	73.69±8.64 <sup>c</sup>
stir-fried					
1	69.38±3.42 <sup>b</sup>	14654.98±928.95 <sup>a</sup>	12058.20±63.42 <sup>a</sup>	67.09±13.32 <sup>a</sup>	86.34±2.61 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup>Data are based on total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene. Concentrations are in micrograms per gram of dry weight.

<sup>2</sup>Total phenolic compounds. Concentrations are in µg gallic acid equivalent g<sup>-1</sup> dry weight .

<sup>3</sup>Trolox equivalent antioxidant capacity. Concentrations are in µg trolox equivalent g<sup>-1</sup> dry weight.

<sup>4</sup>Capacity to chelating the ferrous ions.

<sup>5</sup>Capacity to inhibit the peroxide formation in linoleic acid at 48 hours.

Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Values with the same letter in the same column are not significantly different (p<0.05) between samples.

## 第二部分

### 番薯葉中類胡蘿蔔素萃取分離條件探討

#### 一、類胡蘿蔔素萃取條件探討

適當的樣品選擇與前處理除了可以提升類胡蘿蔔素的萃取效率，又可節省溶劑的使用，所以本研究首先探討樣品的前處理及不同極性溶劑的使用對類胡蘿蔔素萃出量之影響。

##### (一) 番薯葉冷凍乾燥前後經單一溶劑萃取對類胡蘿蔔素萃出量之比較

表四是以新鮮番薯葉(含水量 86.68%)為原料，評估各單一溶劑對類胡蘿蔔素萃出量的影響。從表中可看出除了四氫呋喃(tetrahydrofuran; THF)及乙酸乙酯(Ethyl acetate)之外，葉黃素(lutein)與玉米黃質(zeaxanthin)之萃出量是隨溶劑的極性指數(polarity index 附錄一)提高而逐漸增加，極性高的甲醇和乙醇對葉黃素及玉米黃質皆具最高的萃取效果。但是對 $\beta$ -胡蘿蔔素而言，其萃出量在新鮮番薯葉中，與溶劑極性之間並無明顯相關；由表中總類胡蘿蔔素(carotenoids)量可看出除異丙醇(Iso-propanol)及 THF 外，其類胡蘿蔔素的總量會隨著極性指數的提高而增加。

表五是以冷凍乾燥處理後的番薯葉探討單一溶劑對類胡蘿蔔素萃出量的影響。結果顯示除了 THF 及乙醚(di-Ethyl Ether)之外，葉黃素與玉米黃質之萃出量依舊是隨溶劑的極性指數提高而逐漸增加，極性高的乙醇對葉黃素及玉米黃質皆具最高的萃取效果。正己烷(n-hexane)、石油醚(petroleum ether; PE)、乙醚、異丙醇、THF 與乙醚等極性指數在 4.4 以下的溶劑對 $\beta$ -胡蘿蔔素皆具有很高的萃取效果，然在極性指數 4.4 以上的溶劑則隨溶劑極性指數的上升，對 $\beta$ -胡蘿蔔素的萃出量

表四、單一溶劑對新鮮番薯葉中類胡蘿蔔素萃出量的影響

Table 4. Effects of single solvent on the extraction concentrate of carotenoids in fresh sweet potato leaves <sup>1</sup>

Solvent	Polarity index	Lutein		Zeaxanthin		β-carotene		Total carotenoids <sup>2</sup>
		(µg/ g sample fresh basis)						
Petroleum ether	0	1.06 ± 0.06 <sup>d</sup>	0 ± 0 <sup>e</sup>	7.41 ± 0.38 <sup>d</sup>	8.46±0.45 <sup>e</sup>			
n-Hexane	0	1.84 ± 0.03 <sup>d</sup>	0 ± 0 <sup>e</sup>	5.91 ± 1.03 <sup>de</sup>	7.75±1.06 <sup>e</sup>			
di-Ethyl Ether	2.8	14.84 ± 2.10 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>d</sup>	12.43 ± 1.60 <sup>c</sup>	27.55±3.74 <sup>d</sup>			
Iso-propanol	3.9	46.73 ± 1.78 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>c</sup>	28.42 ± 1.65 <sup>a</sup>	75.64±3.47 <sup>ab</sup>			
Tetrahydrofuran	4.0	67.30 ± 10.09 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.07 <sup>a</sup>	5.31 ± 1.10 <sup>de</sup>	73.63±11.26 <sup>b</sup>			
Ethyl acetate	4.4	16.96 ± 0.25 <sup>c</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>d</sup>	13.34 ± 0.96 <sup>c</sup>	30.53±1.22 <sup>d</sup>			
Acetone	5.1	52.26 ± 7.52 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.03 <sup>b</sup>	2.89 ± 0.06 <sup>e</sup>	55.80±4.07 <sup>c</sup>			
Methanol	5.1	62.00 ± 0.67 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.07 <sup>b</sup>	11.08 ± 3.64 <sup>c</sup>	73.74±4.38 <sup>b</sup>			
Ethanol	5.2	59.39 ± 7.52 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.07 <sup>b</sup>	24.27 ± 0.37 <sup>b</sup>	84.33±7.96 <sup>a</sup>			

<sup>1</sup>Data are based on an average of two extractions from each lot. Each extraction was analyzed by HPLC in duplicate. The moisture content of sweet potato leaves is 89.36%

<sup>2</sup>Total carotenoids = Lutein + Zeaxanthin + β-carotene

Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Values with the same letter in the same column are not significantly different (p<0.05) between samples.

表五、單一溶劑對冷凍乾燥番薯葉中類胡蘿蔔素萃出量的影響

Table 5. Effects of single solvent on the extraction concentrate of carotenoids in freeze – dried sweet potato leaves <sup>1</sup>

Solvent	Polarity index	Lutein Zeaxanthin $\beta$ -carotene Total carotenoids <sup>2</sup>											
		(µg/ g sample fresh basis)											
n-Hexane	0.0	8.05	±	0.06 <sup>d</sup>	0	±	0 <sup>g</sup>	61.81	±	7.04 <sup>bc</sup>	69.87	±	7.09 <sup>d</sup>
Petroleum ether	0.0	7.48	±	0.11 <sup>d</sup>	0.24	±	0.00 <sup>f</sup>	69.81	±	3.17 <sup>ab</sup>	75.57	±	6.06 <sup>d</sup>
di-Ethyl Ether	2.8	59.22	±	1.32 <sup>a</sup>	0.69	±	0.05 <sup>a</sup>	63.62	±	2.00 <sup>abc</sup>	123.53	±	3.38 <sup>a</sup>
Iso-propanol	3.9	31.21	±	2.07 <sup>c</sup>	0.43	±	0.02 <sup>e</sup>	62.69	±	3.34 <sup>abc</sup>	92.45	±	8.31 <sup>c</sup>
Tetrahydrofuran	4.0	55.28	±	2.84 <sup>a</sup>	0.61	±	0.03 <sup>ab</sup>	71.31	±	4.18 <sup>a</sup>	127.21	±	7.05 <sup>a</sup>
Ethyl acetate	4.4	36.94	±	1.63 <sup>c</sup>	0.47	±	0.01 <sup>de</sup>	69.03	±	4.03 <sup>ab</sup>	106.44	±	5.67 <sup>b</sup>
Acetone	5.1	37.18	±	0.99 <sup>c</sup>	0.52	±	0.08 <sup>cd</sup>	56.59	±	1.18 <sup>cd</sup>	94.29	±	2.25 <sup>c</sup>
Methanol	5.1	36.74	±	5.14 <sup>c</sup>	0.47	±	0.04 <sup>de</sup>	50.89	±	4.52 <sup>d</sup>	88.09	±	9.70 <sup>c</sup>
Ethanol	5.2	53.96	±	3.20 <sup>b</sup>	0.59	±	0.03 <sup>bc</sup>	19.49	±	2.37 <sup>e</sup>	74.04	±	5.60 <sup>d</sup>

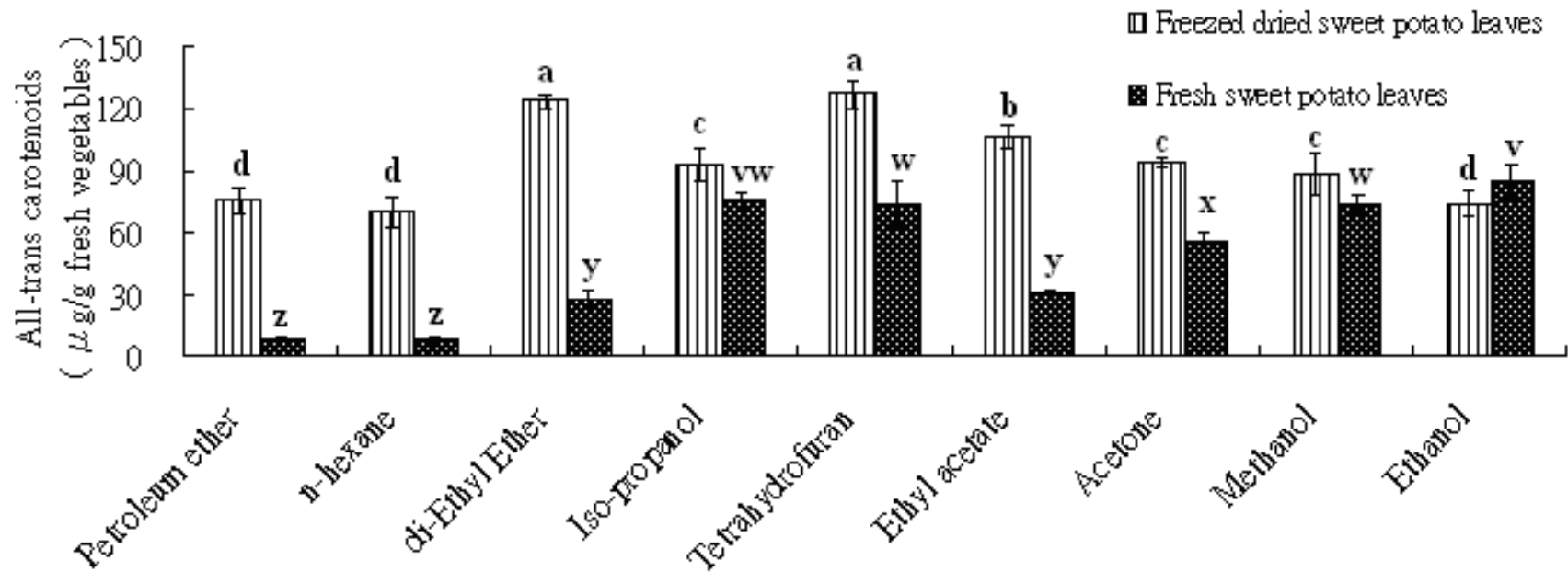
<sup>1</sup>Data are based on an average of two extractions from each lot. Each extraction was analyzed by HPLC in duplicate. The moisture content of sweet potato leaves is 89.36%

<sup>2</sup>Total carotenoids = Lutein + Zeaxanthin +  $\beta$ -carotene

Data are based on the average of three duplicate experiments  $\pm$  SD. Values with the same letter in the same column are not significantly different (p<0.05) between samples.

則逐漸降低；其中高極性指數的乙醇對  $\beta$ -胡蘿蔔素的萃取效果最差；由表中總類胡蘿蔔素的量則可看出除乙醚及 THF 外，其類胡蘿蔔素的萃出總量並無太大的變化；綜合以上結果顯示乙醚及 THF 對葉黃素、玉米黃質和  $\beta$ -胡蘿蔔素的萃出量均顯著高於其他溶劑，因此若以冷凍乾燥番薯葉為原料，以單一溶劑萃取時可採用這兩種溶劑做為考量。

比較表四及表五總類胡蘿蔔素萃出量，整理如圖十七，其結果顯示不論使用何種溶劑，冷凍乾燥番薯葉均較新鮮的有較高類胡蘿蔔素萃出量，且隨極性指數的逐漸上升，凍乾與新鮮番薯葉的總類胡蘿蔔素萃出量亦漸漸地接近；雖說類胡蘿蔔素為脂溶性物質，理應在中低極性指數的溶劑中有較高的萃出量，而一般類胡蘿蔔素的分析是將樣品石油醚(Park et al., 2007)、正己烷(Khachik, et al., 1986; Kull and Pfander, 1995; Lee and Castle 2001; Lessin et al., 1997; Saleh and Tan, 1991)、乙醚(Kull and Pfander, 1995)或乙酸乙酯等作為萃取溶劑，但比較圖中新鮮番薯葉總類胡蘿蔔素量發現，使用低極性指數的溶劑如石油醚、正己烷的含量卻遠低於使用高極性指數的溶劑，且新鮮番薯葉在實驗操作過程中，若使用極性指數較低的萃取溶劑如石油醚、正己烷及乙醚，或中極性指數的乙酸乙酯溶劑，在萃取過程中會發生樣品聚集成泥狀的現象，容易沾黏在器具上，不但操作困難且造成成分萃出量減少，而且因其水分較高，所需的減壓濃縮時間延長，使操作時間也拉長；董等人(2005)的實驗中指出非極性溶劑不容易進入含水量大於 50%的植物組織中；所以他們推測新鮮番薯葉由於水分高，相對的極性也較高，當使用低極性溶劑萃取時因與水不相容而造成排斥現象使得總類胡蘿蔔素萃出量減少。相反地，當使用較高極性指數(5.1 以上)如丙酮、甲醇及乙醇等溶劑萃取時就無排斥現象。此外若是以凍乾番薯葉為樣品，即便是使用低極性指數的溶劑萃取時聚集成泥狀的現象即有改善，不再有黏附在操作器具的問題，所以若以新鮮番薯葉為樣品時，則以如乙醇、甲醇等高極性指數溶劑較為適當。



圖十七、不同溶劑對冷凍乾燥及新鮮番薯葉中類胡蘿蔔素萃出量的影響

Figure 17. The effects of single solvent on the extraction concentrate of total carotenoids in freeze-dried and fresh sweet potato leaves. Concentrations are in micrograms per gram of fresh vegetables tissue. Bar represent mean  $\pm$  SD, n = 3. Means of IP % with different letters in the same type of potato leaves are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Su et al.(2002)的研究指出，要獲得較高的類胡蘿蔔素萃出量應隨樣品中含水量的高低選擇不同的萃取溶劑。因此本研究中對葉黃素與玉米黃質而言，新鮮番薯葉中除石油醚與正己烷的萃出量均顯著偏低外，其他溶劑的萃出量皆較冷凍乾燥後的番薯葉高，其中 THF 的葉黃素與玉米黃質萃出量最高分別可達  $67.30 \mu\text{g/g}$  和  $1.02 \mu\text{g/g}$ ，其次則是甲醇與乙醇的萃出量。各溶劑對新鮮番薯葉中  $\beta$ -胡蘿蔔素的萃出量反而普遍不及凍乾番薯葉，可能原因為新鮮番薯葉中水分含量高達 89.93%，不利於非極性  $\beta$ -胡蘿蔔素的溶解，所以造成  $\beta$ -胡蘿蔔素的萃出量偏低(董 et al., 2005)。由於新鮮番薯葉除了在保存上較為困難、體積較凍乾狀態下的番薯葉大很多外，其高含水量也不利於實驗後段的溶劑回收，所以在萃取葉黃素、玉米黃質及  $\beta$ -胡蘿蔔素等類胡蘿蔔素的過程中，基於總類胡蘿蔔素萃出物的總量、方便性、保存性及操作性的考量下，當以凍乾番薯葉為後續研究的主要原料，而單一萃取溶劑則以 THF 及乙醚為佳。

## (二)混合溶劑對冷凍乾燥番薯葉中類胡蘿蔔素萃出量的比較

表六是以冷凍乾燥番薯葉為原料，評估混合溶劑對類胡蘿蔔素萃出量的影響。根據表五結果得知除了 THF 及乙醚外，葉黃素萃出量在高極性指數的甲醇及乙醇中相當高；玉米黃質由於含量較低，所以不予討論； $\beta$ -胡蘿蔔素萃出量則是在極性指數 4.4 以下的溶劑中具有好的萃取效果，因此以此結果為基礎，及參考董等人(2005)指出對於葉黃素的萃取在中、高極性指數溶劑中的萃取效果較佳，因此選用高極性指數的甲醇(M)及乙醇(E)與低極性指數的正己烷(H)搭配成不同比例的萃取溶劑，結果顯示以 E: H=3:1 為萃取溶劑時葉黃素的萃出量顯著高於其他混和溶劑，而  $\beta$ -胡蘿蔔素萃出量在 E: H=1:1 及 M: H=1:3 中均顯著高於其他混和溶劑，由於甲醇與正己烷兩者極性差異大，有分層的現象，為了解上下層溶液中的成分是否有所不同，因此以 M: H=1:1

表六、混合溶劑對冷凍乾燥番薯葉中類胡蘿蔔素的影響

Table 6. Effects of mixed solvent on the extraction concentrate of carotenoids in freeze—dried sweet potato leaves <sup>1</sup>

Solvent	Lutein					Zeaxanthin					$\beta$ -carotene					Total carotenoids <sup>2</sup>				
	(μg/ g sample fresh basis)																			
Ethanol: n-Hexane =1:3	42.07	±	5.19 <sup>c</sup>	0.49	±	0.06 <sup>a</sup>	56.97	±	6.05 <sup>b</sup>	99.53±11.30 <sup>c</sup>										
Ethanol: n-Hexane =1:1	47.69	±	1.27 <sup>c</sup>	0.59	±	0.08 <sup>a</sup>	64.37	±	0.65 <sup>a</sup>	112.65±1.99 <sup>b</sup>										
Ethanol: n-Hexane =3:1	60.19	±	3.92 <sup>a</sup>	0	±	0 <sup>b</sup>	40.70	±	2.74 <sup>c</sup>	100.89±6.66 <sup>c</sup>										
Methanol: n-Hexane =1:3	54.11	±	3.87 <sup>b</sup>	0.59	±	0.04 <sup>a</sup>	68.57	±	2.94 <sup>a</sup>	123.27±6.86 <sup>a</sup>										
Methanol: Ethanol=1:3	47.76	±	1.29 <sup>c</sup>	0.53	±	0.02 <sup>a</sup>	41.91	±	2.12 <sup>c</sup>	90.19±3.43 <sup>c</sup>										
Methanol: n-Hexane =1:1(upper layer)	0.78	±	0.03 <sup>d</sup>	0	±	0 <sup>b</sup>	57.50	±	3.88 <sup>b</sup>	58.29±3.91 <sup>d</sup>										
Methanol: n-Hexane =1:1(lower layer)	45.99	±	1.52 <sup>c</sup>	0.50	±	0.02 <sup>a</sup>	4.52	±	0.21 <sup>d</sup>	51.01±1.75 <sup>d</sup>										

<sup>1</sup>Data are based on an average of two extractions from each lot. Each extraction was analyzed by HPLC in duplicate. The moisture content of sweet potato leaves is 89.36%

<sup>2</sup>Total carotenoids = Lutein + Zeaxanthin +  $\beta$ -carotene

Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Values with the same letter in the same column are not significantly different (p<0.05) between samples.



作為萃取溶劑，然後以分液漏斗將上面正己烷層與下面甲醇層區分後經減壓濃縮、定量，並以 HPLC 分析；由表六中可以清楚發現其正己烷層溶液中  $\beta$ -胡蘿蔔素的萃取量相較於甲醇層來得高，相對的甲醇層的葉黃素則比正己烷層多，所以可以此作為粗分溶劑，以減少分離純化的時間及溶劑用量，但若是以總類胡蘿蔔素萃出量為目的時還是以 M: H=1:3 為最佳溶劑比例。

綜合表五及表六的結果指出不論是葉黃素、玉米黃質或  $\beta$ -胡蘿蔔素，均以 THF、乙醚和 M: H=1:3 的萃出量顯著高於其他單一或混和溶劑，而且其總類胡蘿蔔素萃出量亦分居前三名。

由於葉黃素與玉米黃質兩個  $\beta$ -ionone 環上各帶有一個氫氧基，相較於碳氫類胡蘿蔔素(hydrocarbon - carotenoids)如 $\alpha$ 、 $\beta$ -胡蘿蔔素及蕃茄紅素，葉黃素與玉米黃質具較高的極性，因此對於石油醚、氯仿及二氯甲烷等極性低的溶劑溶解度較差，而極性較高的甲醇與乙醇則是常被用來萃取葉黃素的有機溶劑，此外正己烷、乙醚、乙酸乙酯、丙酮與異丙醇等亦是常用的有機溶劑 (Su, Q. et al., 2002)。由此可知當選擇與萃取目標物極性數值相當的溶劑做為萃取溶劑，方能得到最佳的萃取效果。上述結果亦指出，萃取葉黃素與玉米黃質的過程中，若以凍乾番薯葉為原料，則 THF、乙醚和 M: H=1:3 這三種都是相當適當的溶劑，但若以溶劑回收為考量，當以單一溶劑 THF 或乙醚較佳，若進一步考慮溶劑毒性及沸點，THF 的 LD<sub>50</sub> 為 1650 mg/kg，其毒性低於乙醚的 1215 mg/kg，且前者沸點為 66°C 高於後者的 35°C，在操作過程中較不會因快速揮發至空氣中，造成溶劑吸入過多、增加中毒危險的發生，因此採用 THF 為萃取溶劑。

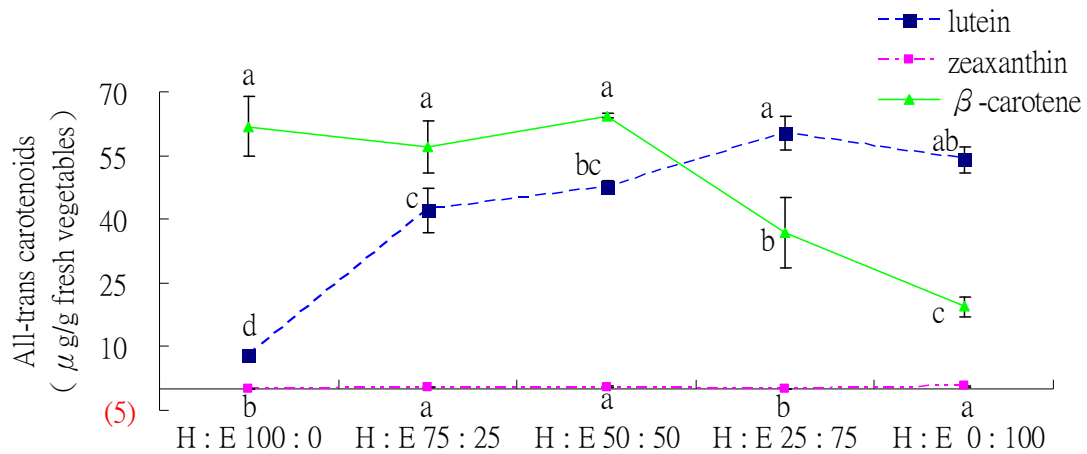
## 二、番薯葉 THF 萃取物中類胡蘿蔔素分離條件探討

將冷凍乾燥番薯葉經 THF 萃取而得萃取液即為凍乾番薯葉 THF 萃取物(THF 萃取物)。

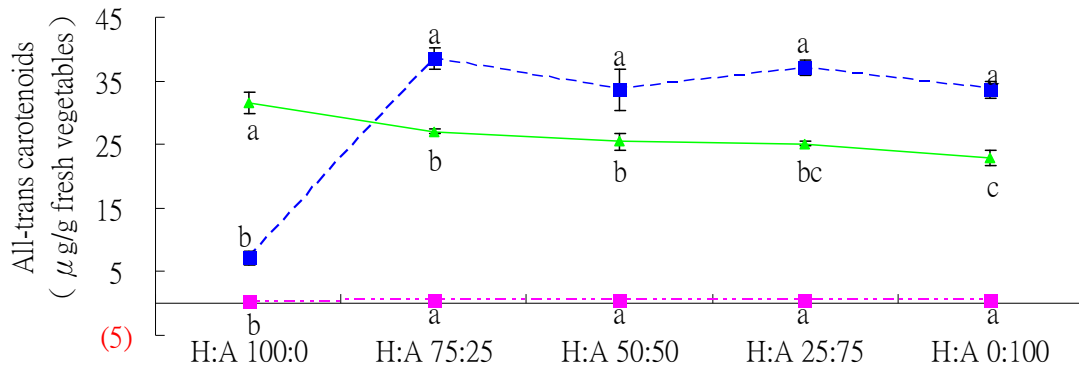
### (一) 沖提溶劑的篩選

根據表五結果指出，乙醇與正己烷分別對葉黃素及  $\beta$ -胡蘿蔔素有好的萃取效果；相反的乙醇對於  $\beta$ -胡蘿蔔素的萃取效果就相當有限，而正己烷對於葉黃素的萃取效果不佳；依上述結果探討不同組合溶劑對凍乾番薯葉 THF 萃取物的影響，第一種組合溶劑為正己烷(H)：乙醇(E)，其比例分別為 100:0、75:25、50:50、25:75、0:100(v:v)如圖十八(A)，由此可知葉黃素與玉米黃質萃出量由 H:E 為=100:0 轉換至 75:25 時就顯著增加，但最高峰卻要到 25:75 才達到，而  $\beta$ -胡蘿蔔素在 H:E 為 100:0、75:25、50:50 時其萃出量都沒有顯著差異，唯有到了 H:E = 25:75 才顯著降低；另外參考 Quackenbush (1961)的溶劑系統為正己烷:丙酮與正己烷:丙酮:甲醇的混合液，由於添加甲醇目的應是使溶劑的極性指數增加，所以經修飾後所採用的第二種組合溶劑為正己烷(H)：丙酮(A)，其比例分別為 100:0、75:25、50:50、25:75、0:100(v:v)如圖十八(B)，結果指出葉黃素、玉米黃質或  $\beta$ -胡蘿蔔素萃出量由 H:A =100:0 轉換至 H:A 75:25 時均有顯著差異，而且維持的相當穩定，如葉黃素與玉米黃質都是在 H:A =75:25 時達到最高萃取量，隨後其他比例都維持著穩定的萃取量，而  $\beta$ -胡蘿蔔素，則是在 H:A =100:0 中有最高萃出量，接下來其他比例也都維持在一定的低量，意即在此比例溶劑 H:A =75:25 中便已達到其最大萃出效果。雖然上述兩種組合對於葉黃素、玉米黃質與  $\beta$ -胡蘿蔔素都有達到分離的效果，但由於 LC 級無水乙醇的價格較高，而市售較便宜的 95% 乙醇與正己烷又會有分層的問題，且對於管柱而言並非為適當的沖提液，因此為了有更佳的分離效果採用 H 和 A 的混合液，其萃出量由 H:A =100:0 轉換至 75:25 時便有顯著差異，因此後續管柱沖提液將以 H:A = 100:0 為起始濃度比例，每一梯度增加丙酮比例 10%，增加至 H:A =50:50 為止，其組合沖提溶劑比例 H:A 分別為 100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50。

(A)



(B)



圖十八、不同的組合溶劑(A)正己烷與乙醇，(B) 正己烷與丙酮對凍乾番薯葉中類胡蘿蔔素萃出量的影響

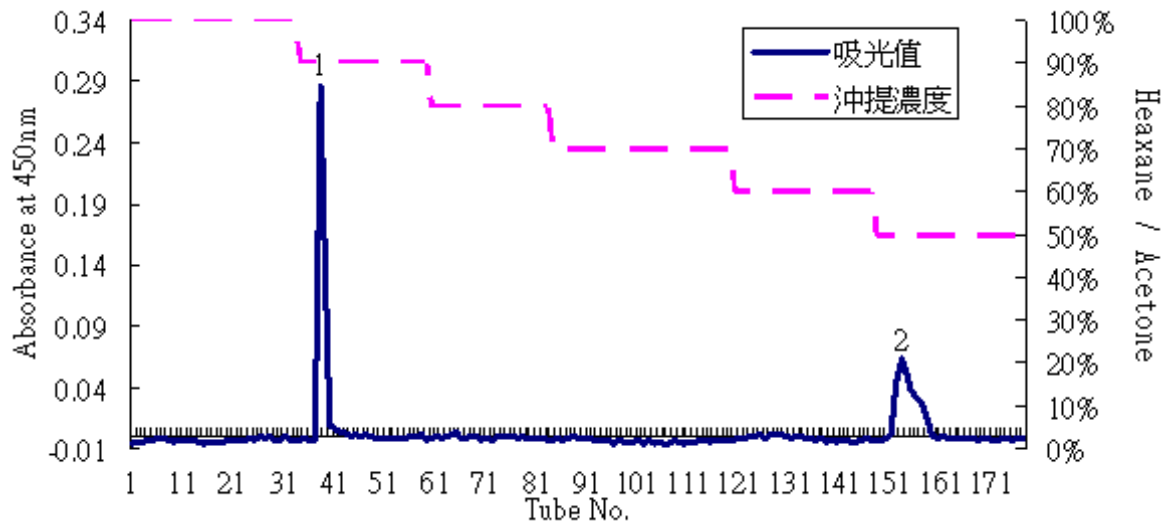
Figure 18. The effects of different ratio solvent varieties on the extractability of carotenoids in freeze-dried sweet potato leaves. (A) hexane and acetone (B) hexane and ethanol. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters in the same carotenoid are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## (二) 以氧化鋁( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )為吸附劑分離凍乾番薯葉中的類胡蘿蔔素

Mercadante et al.(1999)及 Lakshminarayana (2005) 使用氧化鋁為吸附劑分離番石榴與葉菜類中的類胡蘿蔔素，結果顯示使用氧化鋁為吸附劑時，可以有效的分離出 $\beta$ -胡蘿蔔素、蕃茄紅素、單酯型葉黃素類及大部分的極性類胡蘿蔔素，因此本研究也採用氧化鋁為充填於開放式管柱中的吸附劑進行類胡蘿蔔素的分離。THF 萃取物取 2ml 裝填於開放式管柱(20\*430mm)中，沖提溶劑使用本研究所篩選之組合溶劑 H:A 分別為 100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50...，由 100%正己烷開始沖提，每沖提 8ml 收集一管，每個梯度 240ml，每次提高丙酮比例 10%，每管收集液在 450nm 下進行吸光值測定其結果如圖十九；當 H:A 分別為 90:10 及 50:50 時均有明顯的吸收波峰，將這兩處分別收集進行 HPLC 分析，在 H:A=90:10 的 HPLC 圖譜如圖二十，主要有兩種物質，其一為全反式 $\beta$ -胡蘿蔔素，而另一物質與文獻(附錄二)的滯留時間比較推測為 9 順式 $\beta$ -胡蘿蔔素；當 H:A=50:50 時主要為葉黃素如圖二十一。由以上結果顯示以氧化鋁為吸附劑的管柱配合不同比例的 H 與 A 可以將 $\beta$ 胡蘿蔔素從葉黃素、玉米黃質中分離出來。在圖十九中可發現 $\beta$ -胡蘿蔔素是在 H:A=90:10 的時候被沖提出來，100%正己烷的沖提溶液中並沒有任何的吸光值，所以接下來的實驗將以 H:A=90:10 為起始沖提溶液，及樣品製備所需之溶液。

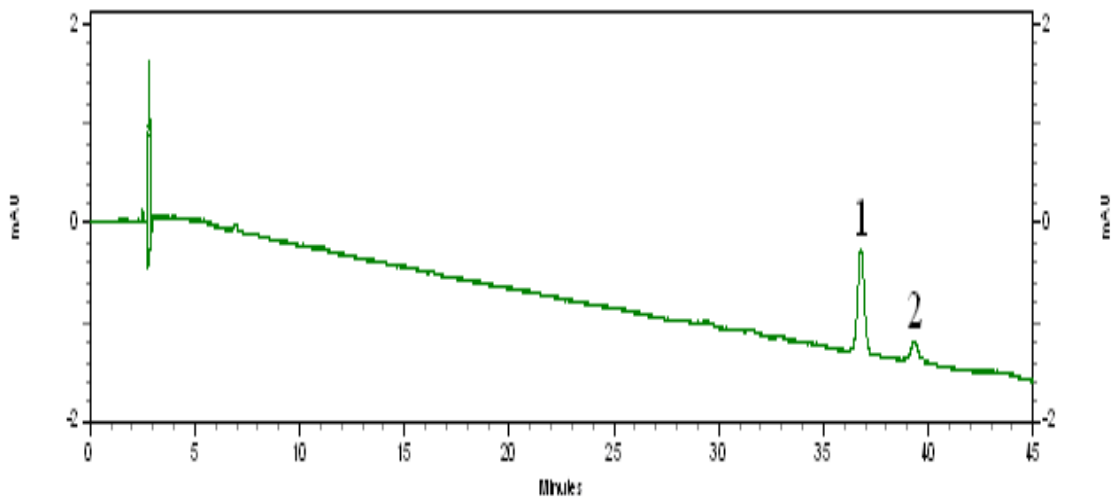
## (三) 比較 THF 萃取物經皂化前後對其類胡蘿蔔素分離之影響

根據上述實驗結果，進一步提升氧化鋁管柱中樣品的裝填量以比較萃取物皂化前後對其中類胡蘿蔔素分離之影響。將 THF 萃取物分為皂化組及非皂化組，分別取 2ml 皂化前後的樣品進行管柱分離，由 H:A=90:10 開始沖提，每沖提 8ml 收集一管，每個梯度 240ml，每次提高丙酮比例 10%，每管收集液在 450nm 下進行吸光值測定。圖二十二



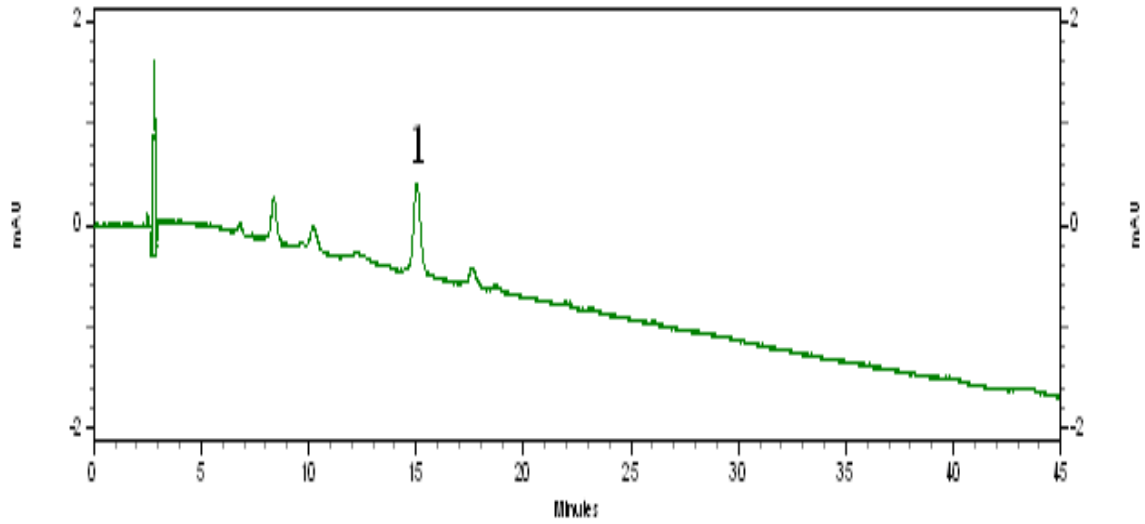
圖十九、以氧化鋁為吸附劑分離冷凍乾燥番薯葉的THF萃提取物經皂化後其液相管柱圖

Figure 19.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gel was used as the absorbent to separate the carotenoids in freeze-dried sweet potato leaves (detection wavelength : 450nm). Peaks:(1)  $\beta$ -carotene band,(2) Xanthophyll band



圖二十、以氧化鋁為吸附劑分離冷凍乾燥番薯葉中 $\beta$ -胡蘿蔔素色帶的管柱區分物的HPLC層析圖(偵測波長:450nm)

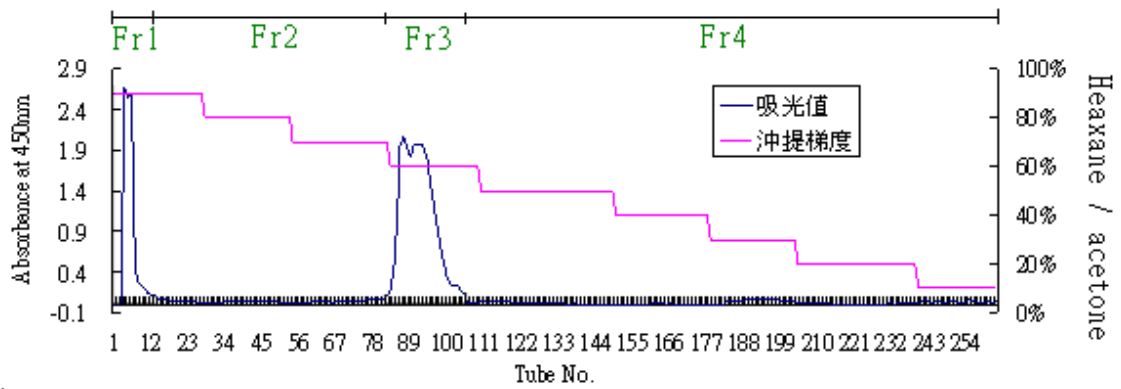
Figure 20. HPLC chromatogram of  $\beta$ -carotene band by  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gel was used as the absorbent to separate the carotenoids in freeze-dried sweet potato leaves (detection wavelength : 450nm) . Peaks:(1)all-trans  $\beta$ -carotene,(2) 9-cis  $\beta$ -carotene



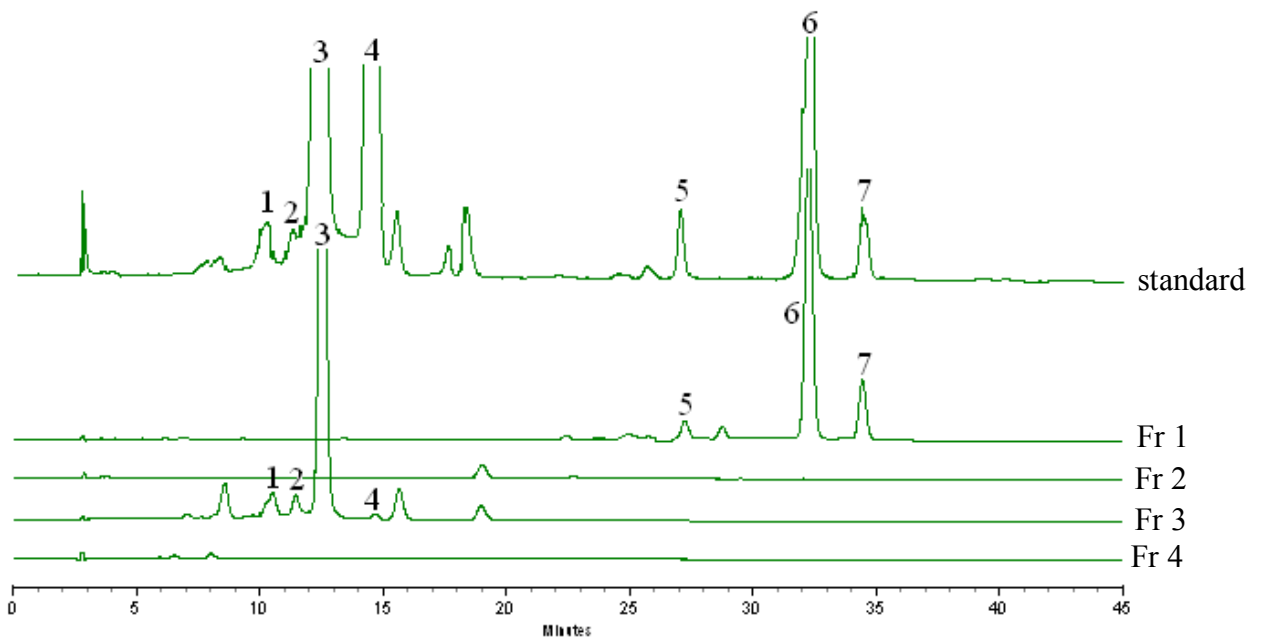
圖二十一、以氧化鋁為吸附劑分離冷凍乾燥番薯葉中葉黃素類色帶的管柱區分物的HPLC層析圖(偵測波長:450nm)

Figure 21. HPLC chromatogram of Xanthophyll band by  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gel was used as the absorbent to separate the carotenoids in freeze-dried sweet potato leaves (detection wavelength : 450nm) . Peak: (1)all-trans lutein.

(A)



(B)



圖二十二、冷凍乾燥番薯葉的THF萃取物經皂化後其氧化鋁液相管柱圖(A)及管柱區分物的HPLC層析圖(B)(偵測波長:450nm)

Figure 22. HPLC chromatogram of all fraction from extraction of saponificated freeze – dried sweet potato leaves under a gradient elution system (detection wavelength : 450nm). Peaks:(1) 13-cis-lutein, (2) 13' -cis lutein, (3) all-trans zeaxanthin, (4) 9-cis  $\beta$ -carotene, (5) all-trans lutein, (6) all-trans  $\beta$ -carotene (7) 13-cis  $\beta$ -carotene.



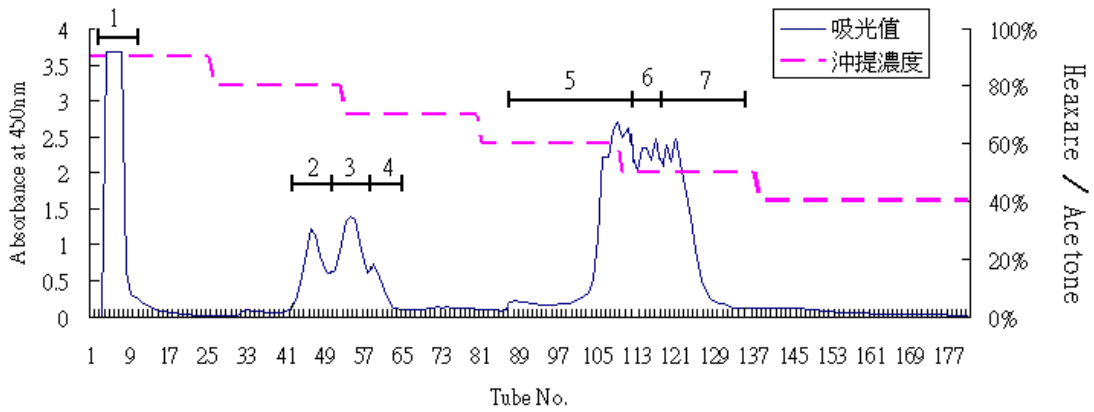
(A)為萃取液皂化後氧化鋁管柱液相層析圖；結果指出 H:A 為 90:10 及 60:40 時有吸收波的出現，為了瞭解各區分物中類胡蘿蔔素的組成，因此將收集物區分為四部份，分別為 Fraction1(Fr1；tube No.4-13)、2(Fr2；tube No.14-82)、3(Fr3；tube No.83-105)、4(Fr4；tube No.106-270)，各部份經減壓濃縮後進行 HPLC 分析如圖二十二(B)；結果顯示 Fr1 是在 H:A=90:10 時被沖提出來，所含類胡蘿蔔素中全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素占 75.88%，若加上其異構物則胡蘿蔔素類所佔的比例可達 96.53%；Fr2 是在 H:A=60:40 時被沖提出來，所含類胡蘿蔔素中全反式葉黃素及全反式玉米黃質所佔的比例分別為 82.79%及 4.10%，就總葉黃素類，包括全反式葉黃素、全反式玉米黃質及其異構物，(對照附錄二、三)則比例可達 94.35%，由此可知 THF 萃取物經皂化後進行氧化鋁管柱分離，可有效區分胡蘿蔔素和總葉黃素類。

圖二十三(A)為 THF 萃取物皂化前的氧化鋁管柱液相層析圖，結果發現當 H:A 分別為 90:10、75:25 及 50:50 時，在 450nm 吸光值下有明顯波峰，將所有區域區分為 Fraction 1(Fr 1；tube No.4-8)、2(Fr 2；tube No.45-50)、3(Fr 3；tube No.51-58)、4(Fr 4；tube No.59-65)、5(Fr 5；tube No.66-113)、6(Fr 6；tube No.113-118)、7(Fr 7；tube No.119-136)，根據 Achmad(1999)的文獻指出，單酯或雙酯型的葉黃素類對於光或熱等外在因素的保護性較自由型為佳，而大部分蔬果中葉黃素類主要是以單酯或雙酯這兩種構型存在 (Breithaupt et al., 2001; M'inguez-Mosquera et al.,1994)，為進一步了解 THF 萃取物中類胡蘿蔔素是哪一種構型，因此比較上述從未經皂化的 THF 萃取物所區分的七部份，探討每一部分皂化前後的 HPLC 分析圖譜如圖二十五-圖二十八。

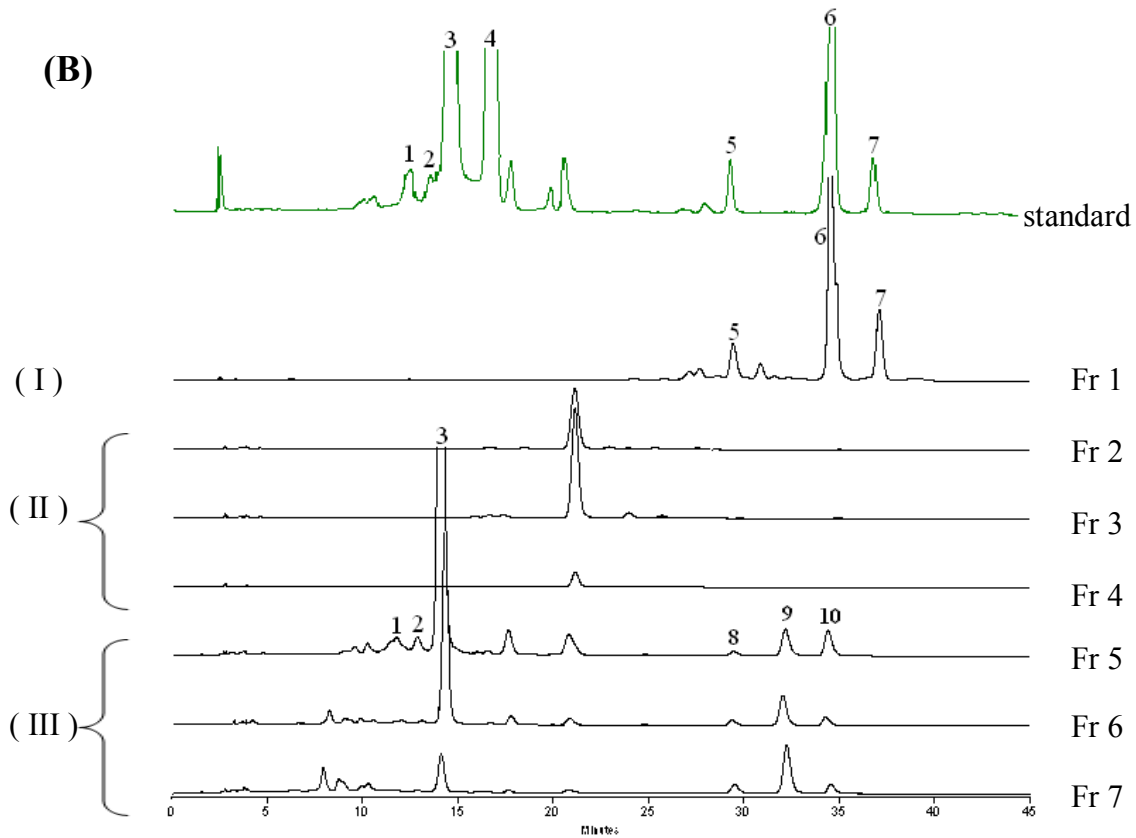
由圖二十三(B)皂化前之層析圖中發現 Fr 5-7 在大約 30、32 和 34 分鐘的時候有三個明顯的波峰其吸收光譜圖如圖二十四，與文獻 (Huang, et al., 2008)比較推測此三波峰應為葉綠素及其衍生物。

圖二十五為比較 Fr 1 皂化前後之 HPLC 層析圖，結果發現發現 Fr 1

(A)

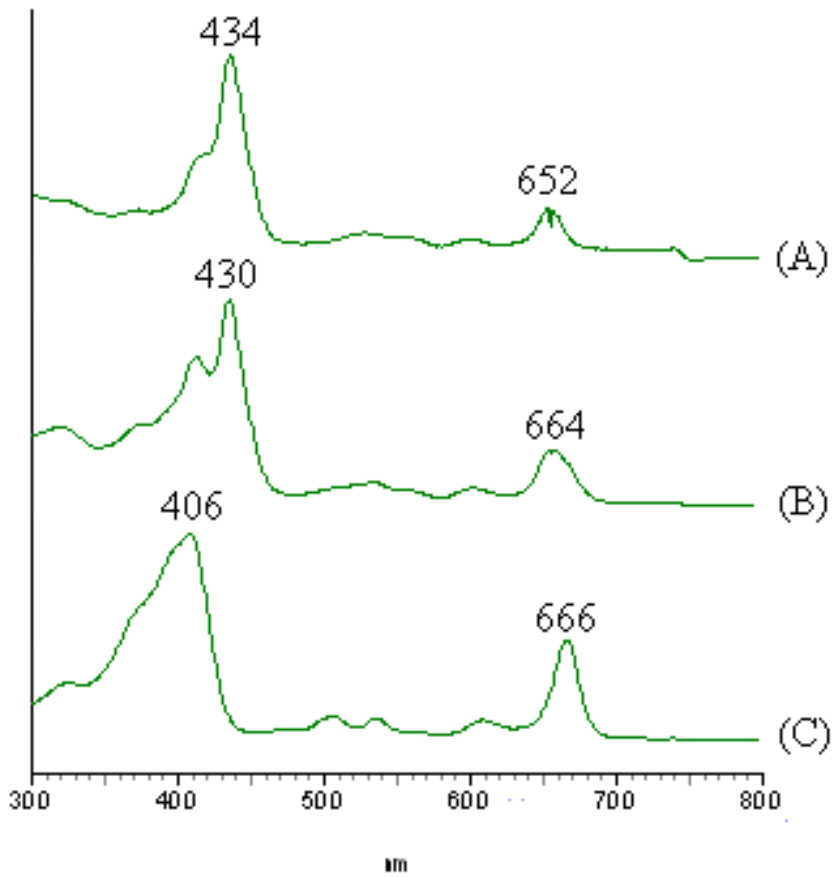


(B)



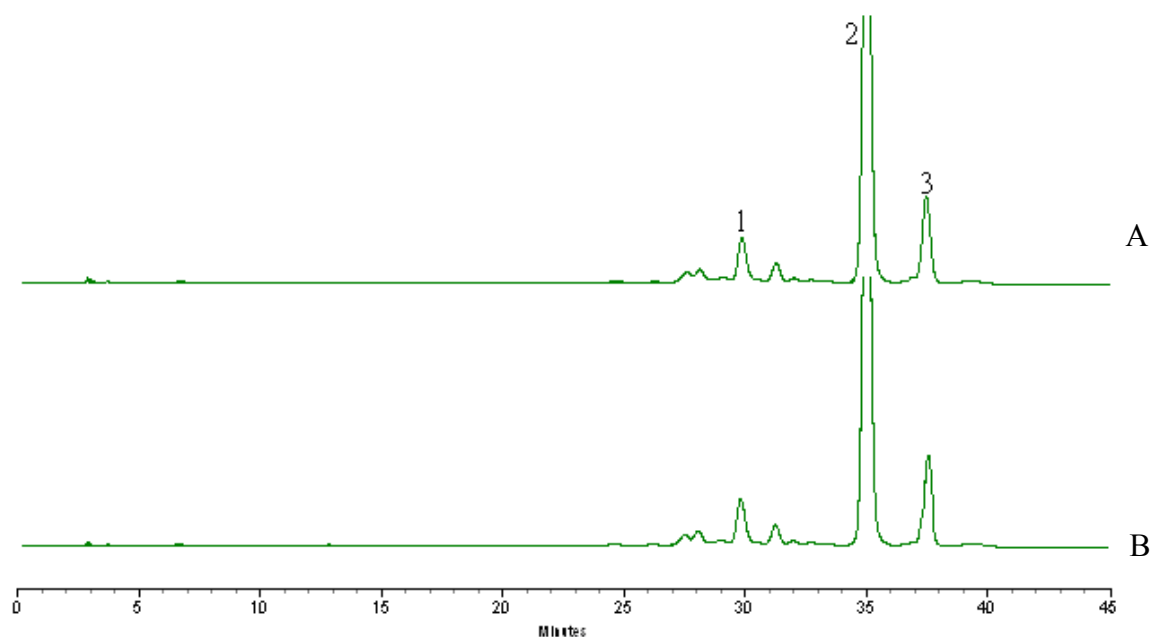
圖二十三、冷凍乾燥番薯葉的THF萃取物未經皂化時其氧化鋁液相管柱圖(A)及管柱區分物的HPLC層析圖(B)(偵測波長:450nm)

Figure 23. HPLC chromatogram of all fraction from extraction of non-saponificated freeze-dried sweet potato leaves under a gradient elution system (detection wavelength : 450nm). Peaks: (1) 13-cis-lutein, (2) 13' -cis lutein, (3) all-trans zeaxanthin, (4) 9-cis  $\beta$ -carotene, (5) all-trans lutein, (6) all-trans  $\beta$ -carotene, (7) 13-cis  $\beta$ -carotene.(8)unknown, (9) unknown, (10) unknown.



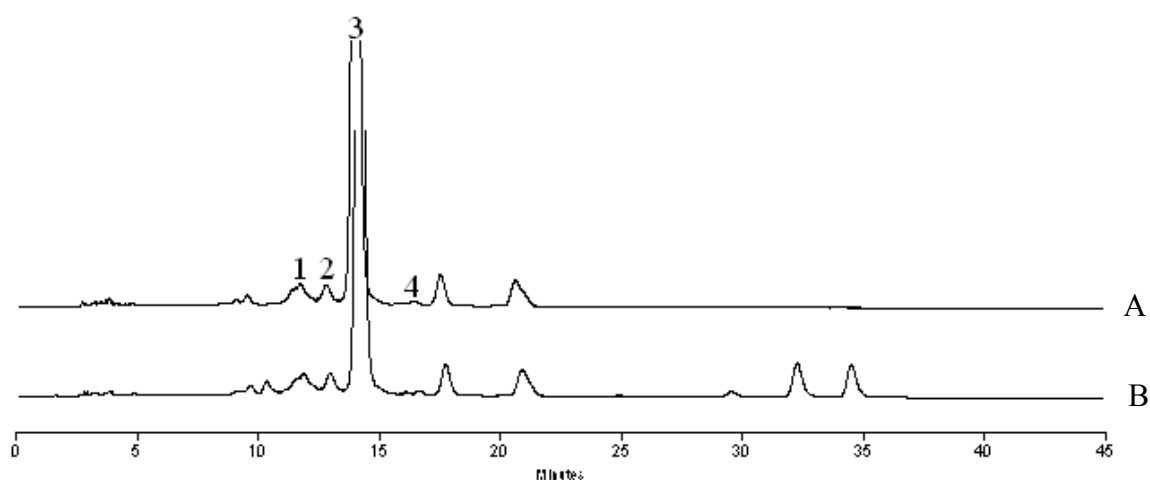
圖二十四、使用光電二極體陣列偵測器比較圖二十三(B)中Fr 5於HPLC層析圖中第8(A)、9(B)、10(C)的波峰吸收光譜

Figure 24. UV/VIS light absorption spectra of peak 8(A), peak 9(B), peak 10(C) by photodiarray.



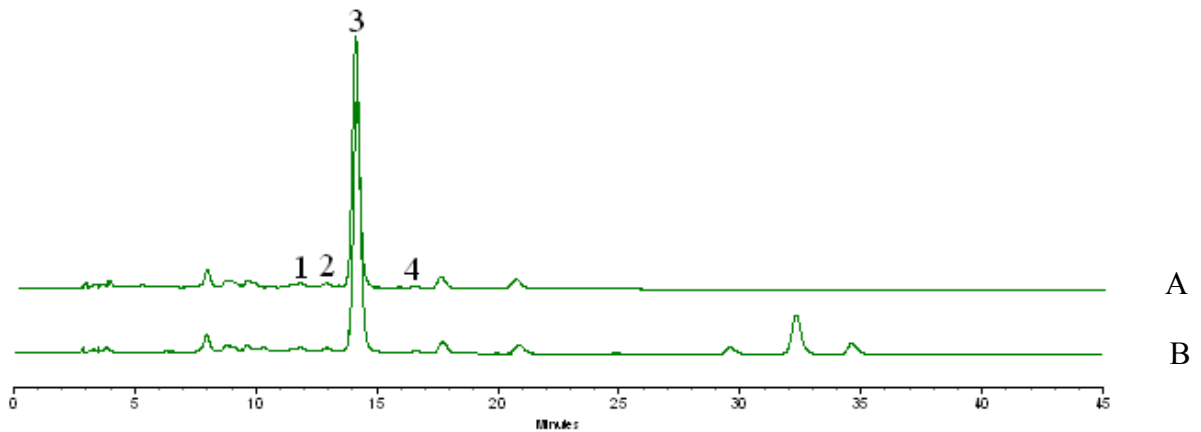
圖二十五、比較圖二十三(B)中Fr 1於HPLC分析前的皂化與否對其類胡蘿蔔素測定之影響(A)已皂化(B)無皂化

Figure 25. HPLC chromatogram of non-saponificated freeze-dried sweet potato leaves in fraction 1 under a gradient elution system (detection wavelength : 450nm).(A) saponification, (B) non-saponification before HPLC analysis. Peaks : (1) 9-cis  $\beta$ -carotene, (2) all-trans  $\beta$ -carotene, (3) 13-cis  $\beta$ -carotene.



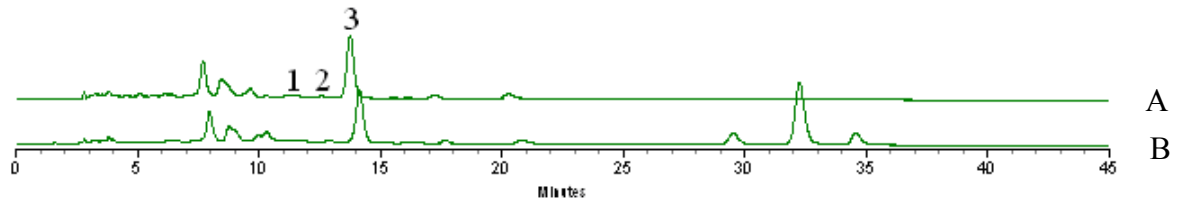
圖二十六、比較圖二十三(B)中Fr 5於HPLC分析前的皂化與否對其類胡蘿蔔素測定之影響(A)已皂化(B)無皂化

Figure 26. HPLC chromatogram of non-saponificated freeze-dried sweet potato leaves in fraction 5 under a gradient elution system (detection wavelength : 450nm). (A) saponification,(B) non-saponification before HPLC analysis. Peaks: (1)13'-cis lutein, (2)13-cis lutein, (3)all-trans lutein, (4) all-trans zeaxanthin.



圖二十七、比較圖二十三(B)中Fr 6於HPLC分析前的皂化與否對其類胡蘿蔔素測定之影響(A)已皂化(B)無皂化

Figure 27. HPLC chromatogram of non-saponificated freeze-dried sweet potato leaves in fraction 6 under a gradient elution system (detection wavelength : 450nm). (A) saponification,(B) non-saponificatition before HPLC analysis. Peaks: (1)13'-cis lutein, (2)13-cis lutein, (3)all-trans lutein, (4) all-trans zeaxanthin.



圖二十八、比較圖二十三(B)中Fr 7於HPLC分析前的皂化與否對其類胡蘿蔔素測定之影響(A)已皂化(B)無皂化

Figure 28. HPLC chromatogram of non-saponificated freeze-dried sweet potato leaves in fraction 7 under a gradient elution system (detection wavelength : 450nm). (A) saponification,(B) non-saponificatition before HPLC analysis. Peaks: (1)13' -cis lutein, (2)13-cis lutein, (3)all-trans lutein.

皂化前主要都是以 $\beta$ -胡蘿蔔素及其異構物 9-順式及 13-順式 $\beta$ 胡蘿蔔素為主，在此層析圖中全反式 $\beta$ -胡蘿蔔素佔全部面積 72.75%，對照附錄二、三後，加上其異構物 9 順式及 13 順式 $\beta$ 胡蘿蔔素，其所佔比例可達 90.31%；接著將 Fr 1 經過皂化後發現其反式 $\beta$ 胡蘿蔔素佔 67.63%，雖然有降低，但再加上其異構物 9-順式及 13-順式 $\beta$ 胡蘿蔔素，其所佔比例可達 88.54%，與皂化前相比並無太大的差異；至於 Fr 2~4 經 HPLC 分析比對並非游離態 $\beta$ -胡蘿蔔素、葉黃素、玉米黃質或其異構物，經過皂化後分析也未檢測出游離態的 $\beta$ -胡蘿蔔素、葉黃素或玉米黃質，因此推斷 Fr 2~4 也不是單酯或雙酯的構型，並非我們所要探討的類胡蘿蔔素，因此不再做進一步的討論。

圖二十六為比較 Fr 5 皂化前後之 HPLC 層析圖，發現 Fr 5 皂化前後均是以全反式葉黃素及其異構物 9-順式及 13-順式葉黃素和全反式玉米黃質為主；在皂化前之層析圖中全反式葉黃素佔全部面積 74.32%，加上其異構物 9-順式、13-順式葉黃素和全反式玉米黃質，其所佔比例則可達 80.57%；接著將 Fr 5 經過皂化後發現其全反式葉黃素佔 81.61%，再加上其異構物 9-順式、13-順式葉黃素和全反式玉米黃質所佔的比例可達 82.02%。

圖二十七為比較 Fr 6 皂化前後之 HPLC 層析圖，在皂化前之層析圖中全反式葉黃素佔全部面積 69.92%，再加上其異構物 9-順式、13-順式葉黃素和全反式玉米黃質，其所佔比例會增加至 68.33%；接著將 Fr 6 經過皂化後發現其全反式葉黃素佔 74.78%，再加上其異構物 9-順式、13-順式葉黃素和全反式玉米黃質所佔的比例可達 80.52%。

圖二十八為比較 Fr 7 皂化前後之 HPLC 層析圖，在皂化前之層析圖中全反式葉黃素佔全面積 23.95%，再加上其異構物 9-順式、13-順式葉黃素和全反式玉米黃質，其所佔比例會增加至 28.98%；接著將 Fr 6 經過皂化後發現其全反式葉黃素佔 42.44%，再加上其異構物 9-順式、13-順式葉黃素和全反式玉米黃質所佔的比例為 44.40%。



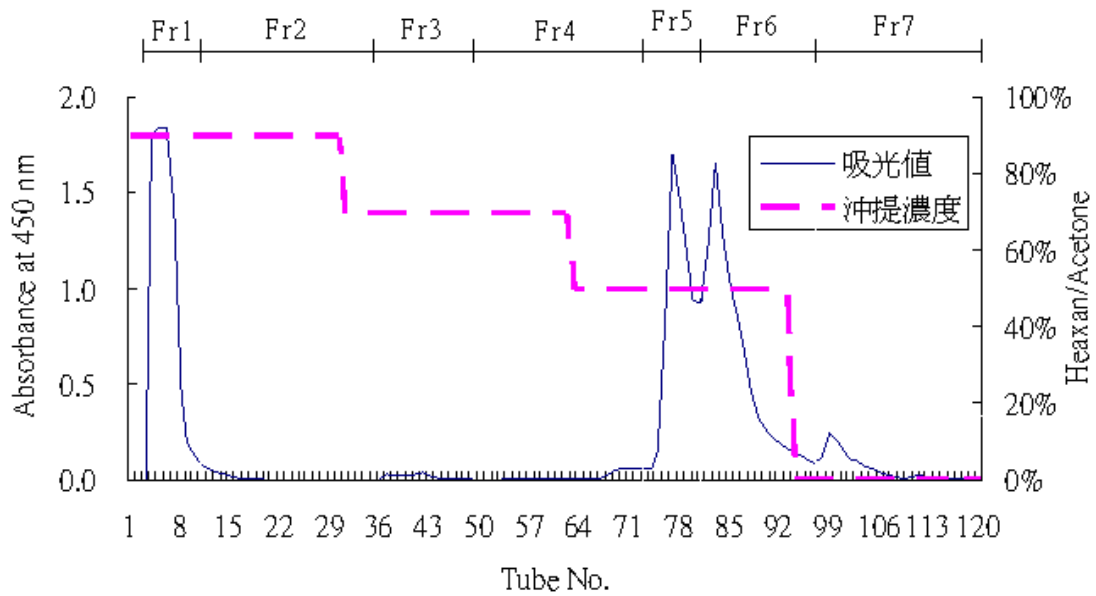
由圖二十六~二十六中面積換算其全反式葉黃素當量分別為 449.00  $\mu\text{g}$ 、146.35  $\mu\text{g}$  和 28.92  $\mu\text{g}$ ，即全反式葉黃素在 Fr5 有最高的含量；由總量可知，主要的全反式葉黃素在 Fr5 及 Fr6 就已分別沖提出總量的 71.92% 和 23.44%，兩者相加即為 95.36%；由圖二十六~二十六中皂化前之層析圖中發現在大約 30、32 和 34 分鐘的三個明顯的波峰與文獻比對後應為葉綠素衍生物，經皂化後就消失了，明顯提高葉黃素類在這三的區分物所佔的面積比例，由此可知，對 Fr5~7 而言，皂化去除葉綠素的步驟對提升葉黃素類所佔比例有所幫助。

由圖二十二(A)與圖二十三(A)中得知，第一、第二和第三波峰間都有相當大的距離，因為由圖二十三(A)發現 THF 萃取物即使沒有事先皂化，在此沖提條件下亦有分離的效果，因此修改圖二十三(A)的沖提條件，其主要的沖提位置分別為正己烷:丙酮=90:10、70:30 及 50:50，先使用這三個沖提條件，最後再以 100%丙酮為最後的沖提溶劑，亦可順便清洗管柱，並避免汙染或影響到下一批樣品的純化。此外由圖二十五~二十六發現，各個區分物的主要物質為全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素及全反式葉黃素，皂化前後其位置及高度並沒有明顯的移動或升降，若其中含有酯型類胡蘿蔔素，分析前的皂化反應會使酯化型類胡蘿蔔素水解為游離態類胡蘿蔔素釋放出來，進而提升偵測量，結果顯示  $\beta$ -胡蘿蔔素即葉黃素偵測量並未提升，因此証實 THF 萃取物中的  $\beta$ 胡蘿蔔素及葉黃素主要是以游離態的形式存在。後續將會以此與文獻比較做進一步確認其番薯葉中葉黃素類之主要成分是以單酯、雙酯抑或是游離態存在於植物體內。

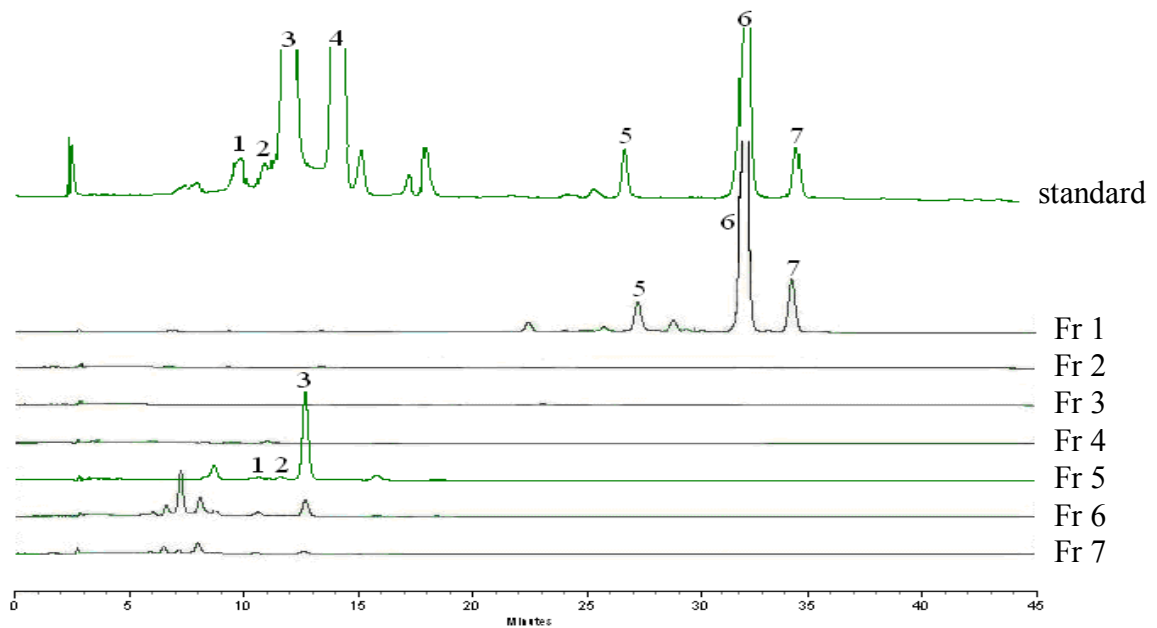
#### (四) 以篩選的沖提組合溶劑測試類胡蘿蔔素的分離效果

圖二十九(A)為未經皂化的THF萃取物，以H:A=90:10、70:30、50:50及丙酮100%為沖提液的氧化鋁管柱液相層析圖。結果發現當H:A為90:10、50:50及丙酮100%的梯度中，在450nm下的吸光值都明顯的提

(A)



(B)



圖二十九、冷凍乾燥番薯葉的THF萃取物未經皂化時其氧化鋁液相管柱圖(A)及管柱區分物的HPLC層析圖(B)(偵測波長:450nm)

Figure 29. HPLC chromatogram of all fraction from extraction of non-saponificated freeze-dried sweet potato leaves under a gradient elution system (detection wavelength : 450nm). Peaks: (1) 13-cis-lutein, (2) 13'-cis lutein, (3) all-trans zeaxanthin, (4) 9-cis $\beta$ -carotene, (5) all-trans lutein, (6) all-trans  $\beta$ -carotene (7) 13-cis  $\beta$ -carotene.

H:A=70:30也有些微的提高，由於這又是另一種沖提條件，為了要清楚了解此沖提液的分離效果，於是我們將全部分為七個fraction，分別為Fraction 1(Fr 1；tube No.4-12)、2(Fr 2；tube No.13-36)、3(Fr 3；tube No.37-47)、4(Fr 4；tube No.48-74)、5(Fr 5；tube No.75-81)、6(Fr 6；tube No.82-97)、7(Fr 7；tube No.98-120)如圖二十九(A)，進行HPLC分析，藉此計算其分離效果及萃取後所佔面積比例。

在沖提液H:A=90:10中所沖提出來的物質Fr 1及Fr 2，經由HPLC分析發現這兩個區分物與之前一樣主要是以全反式 $\beta$ -胡蘿蔔素及其異構物9順式和13順式 $\beta$ 胡蘿蔔素為主，而其中全反式 $\beta$ -胡蘿蔔素含量分別為600.49  $\mu$ g及3.34g，而在Fr 2之後的沖提液中並沒有全反式 $\beta$ -胡蘿蔔素如圖二十九(B)，亦即全反式 $\beta$ -胡蘿蔔素在Fr 1就已沖提出總量的99.45%；若由HPLC圖譜中換算面積的純度，在此沖提液中所沖提出來的兩個區分物Fr 1及Fr 2，其全反式 $\beta$ -胡蘿蔔素的純度分別為75.74%及26.01%，若是Fr 1再加上異構物9順式和13順式 $\beta$ -胡蘿蔔素則胡蘿蔔素所佔的面積可達93.21%，而Fr 2則沒有異構物，由此可知使用此沖提方式進行萃取可以在最先的兩個區分物得到100%全反式 $\beta$ 胡蘿蔔素含量，而且再第一個區分物即可得到含量及純度都相當高的產品。在Fr 3、4由圖二十九(B)可以看出並無明顯的波峰，於是便不予討論。

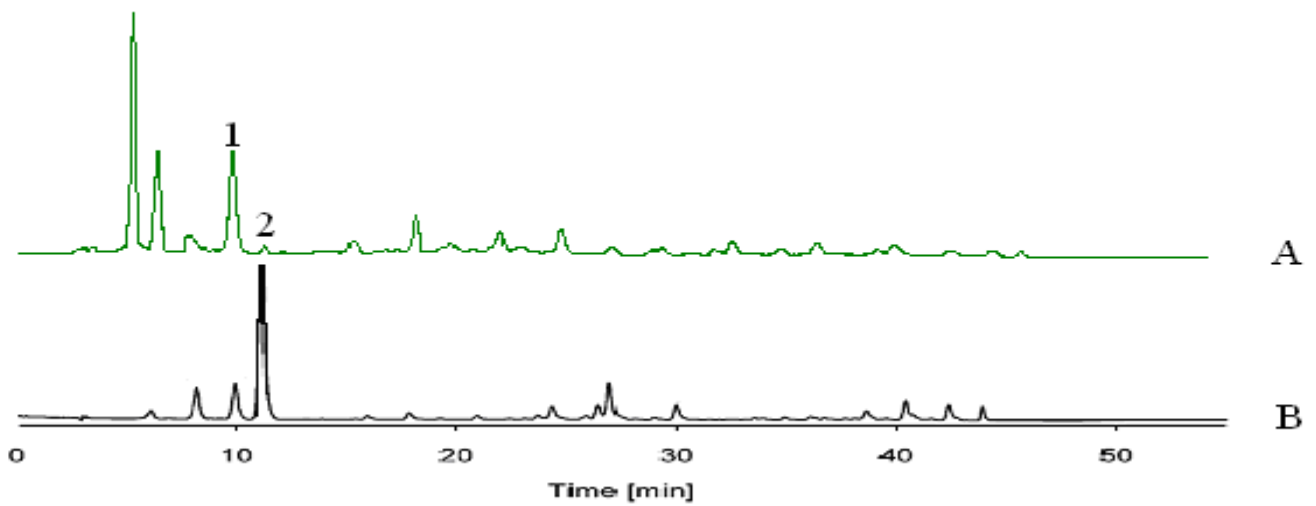
在沖提液H:A=50:50中所沖提出來的物質Fr 5~7，由圖二十九(B)可以發現全反式葉黃素波峰高度在Fr 5為最高，接著便逐漸下降，經由HPLC分析發現Fr 5及Fr 6這兩個區分物是以全反式葉黃素及其異構物13順式、13'順式葉黃素為主，而其中全反式葉黃素含量在Fr 5及Fr 6中分別為110.27  $\mu$ g及25.28  $\mu$ g，而在Fr 7的沖提液中並沒有任何全反式葉黃素如圖二十九(B)，亦即全反式葉黃素在Fr 5就已沖提出總量的81.35%；若由HPLC圖譜中換算面積的所佔的比例，在此沖提液中所沖提出來有葉黃素的兩個區分物Fr 5及Fr 6，其全反式葉黃素所佔的比例分別為67.85%及14.88%，若是分別再加上其異構物13順式、13'順式

葉黃素則純度可達83.04% 及24.42%，由圖二十九(B)中 Fr 7並沒有偵測出反式葉黃素及其異構物，由此可知使用此沖提方式進行萃取可以在沖提條件H:A=50:50中Fr 5及Fr 6得到樣品中全部的全反式葉黃素。

由圖二十九中發現，以未經皂化THF萃取物為樣品，並使用組合的沖提溶液H:A=90:10、70:30、50:50及100%丙酮作梯度沖提，只需收集Fr 1便可得到高含量的 $\beta$ -胡蘿蔔素，若要取得葉黃素類也只需收集Fr5、6即可；由圖二十九的Fr 5-7中發現在30、32或34分鐘並沒有吸收波峰，表示使用此沖提條件則不需皂化就可得到純度較高的類胡蘿蔔素，不受葉綠素干擾，於是本研究將以此萃取條件進行純化、分離葉黃素類，將所得區分物進行葉黃素類的酯鏈辨別、MTT細胞毒性試驗以及保存性實驗。

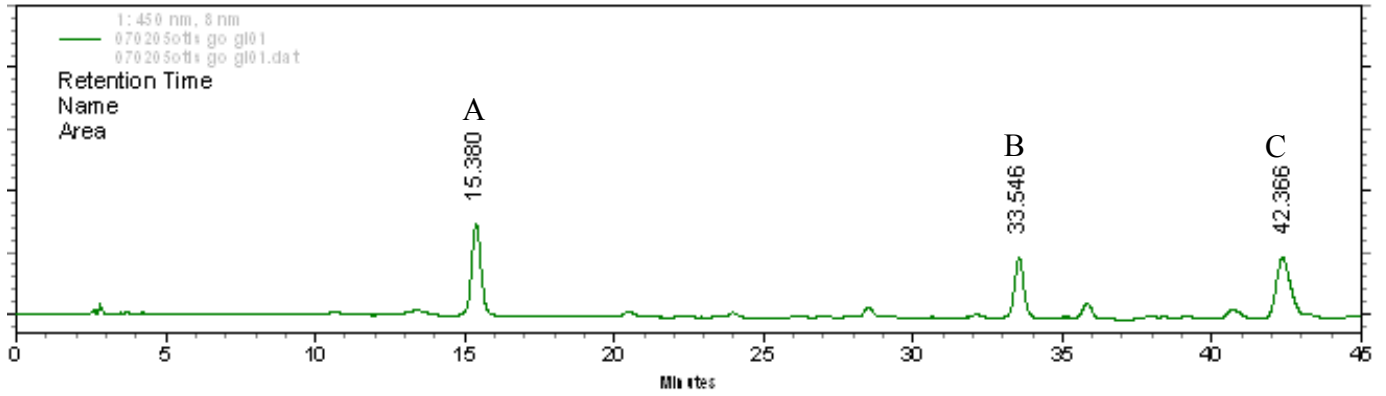
### 三、番薯葉中葉黃素酯化型辨別

Weller(2003)的研究指出，黃色甜椒(orange pepper)大部分是游離態的玉米黃質，還有少量的葉黃素以及以單酯或雙酯型存在的玉米黃質，本研究採用台灣的黃色甜椒進行萃取，以HPLC分析後與其比較如圖三十，結果發現，台灣的甜椒並非以玉米黃質為主，而是以葉黃素為主，而且其單酯或雙酯型的玉米黃質含量也偏低，Weller (2003) 的研究亦指出枸杞萃取物主要以雙酯為主，本研究也以枸杞為樣品進行萃取，如圖三十一，可以看出主要有三處明顯的波峰，首先於15 分鐘左右的波峰經過與標準品比對確定為游離態的玉米黃質，而其餘兩處經photodiode-array 偵測器測定如圖三十二所示，可以發現其圖譜都相當的類似，接下來以樹酯皂化後進行HPLC分析，了解是否會因皂化而使游離態玉米黃質含量上升，並與文獻比較其HPLC圖譜，藉此判定其餘兩處波峰是否為單酯或雙酯型的玉米黃質如圖三十三，結果發現其分佈與文獻相似，且枸杞萃取物皂化後在約50分鐘的第四波峰明顯下降了，由面積來看降低了64.34%，相對的31分鐘左右的第三波峰則是



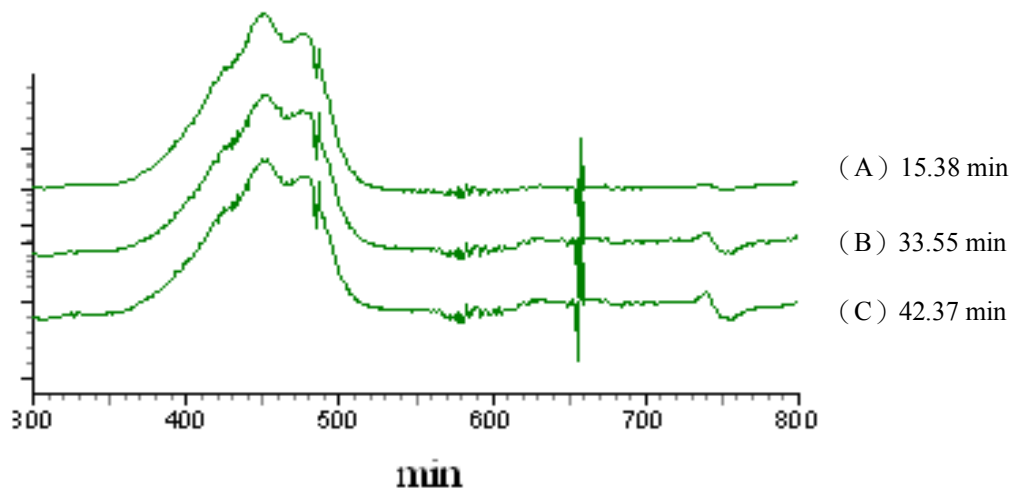
圖三十、在沖提梯度條件下黃色甜椒萃取物之HPLC層析圖(偵測波長：450nm) (1) 全反式葉黃素, (2) 全反式玉米黃質, (A) 台灣產黃色甜椒萃取物, (B) 文獻黃色甜椒萃取物 (Weller,2003)

Figure 30. HPLC chromatogram of extraction from orange pepper under a gradient elution system (detection wavelength : 450 nm). Peaks : (1) all-trans lutein, (2) all-trans zeaxanthin, (A) orange pepper extraction in Taiwan, (B) orange pepper extraction (Weller,2003)



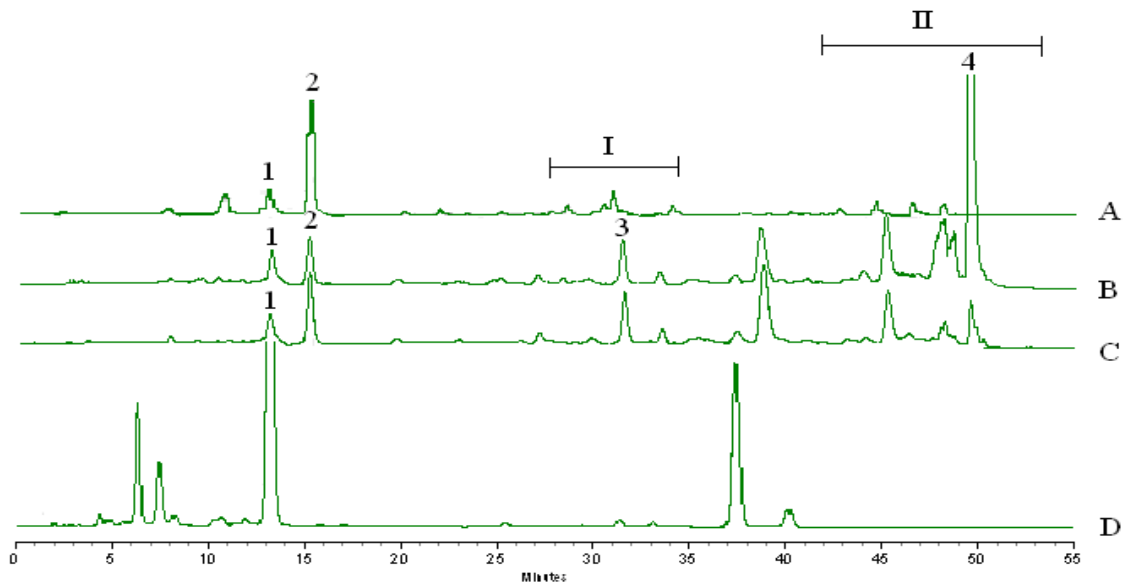
圖三十一、在沖提梯度條件下枸杞萃提取物之HPLC層析圖(偵測波長：450nm ) (A) 全反式玉米黃質，(B) unknown peak, (C)unknown peak.

Figure 31. HPLC chromatogram of extraction from wolfberry under a gradient elution system (detection wavelength : 450 nm). Peaks : (A) all-trans zeaxanthin, (B) unknown peak, (C)unknown peak.



圖三十二、枸杞萃取物三個不同時段的吸收光譜圖（偵測波長：300~800 nm）(A) 全反式玉米黃質，(B) unknown peak, (C) unknown peak.

Figure 32. Different time of UV/VIS light absorption spectra of extraction from wolfberry (detection wavelength : 300~800 nm). (A) 15.38 min, all trans-zeaxanthin, (B) 33.55 min, unknown peak, (C) 42.37 min, unknown peak.



圖三十三、在沖提梯度條件下各樣品之HPLC層析圖(偵測波長：450nm) (A) 文獻黃色甜椒萃取物, (B) 枸杞萃取物皂化前, (C) 枸杞萃取物皂化後, (D) 番薯葉THF萃取物, (I) 單酯型玉米黃質, (II) 雙酯型玉米黃質, (1) 全反式葉黃素, (2) 全反式玉米黃質。

Figure 33. HPLC chromatogram of extraction from orange pepper under a gradient elution system (detection wavelength : 450 nm). (A) orange pepper (*Ca. annuum L.*) extraction (Weller,2003), (B) wolfberry extraction, (C) saponificated wolfberry extraction, (D) sweet potato leaves extraction; Area : ( I ) mono-zeaxanthin, ( II ) diester form zeaxanthin, Peaks : (1) all-trans lutein, (2) all-trans zeaxanthin. (Weller,2003)

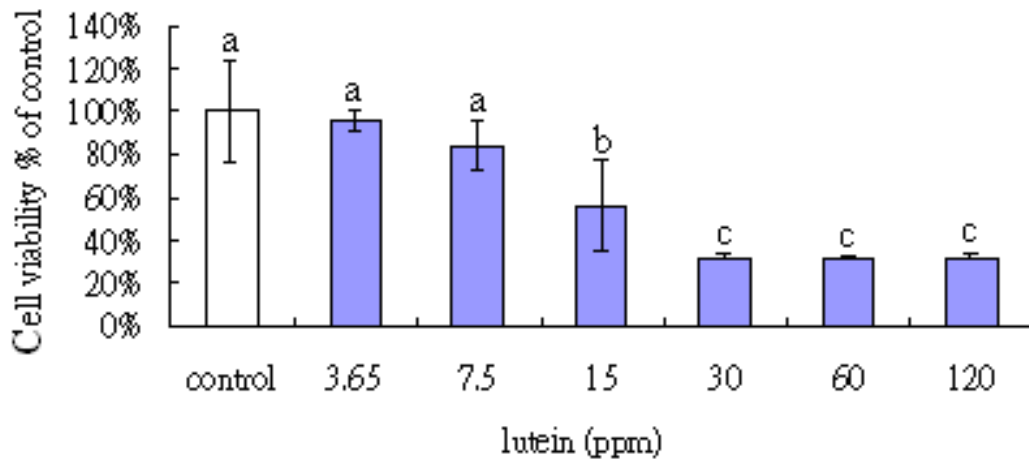


上升了 12.16%，另外在 15 分鐘左右的游離態玉米黃質卻上升了 83.01%，所以可以發現樹酯對於雙酯型玉米黃質有去酯化效果，但對於單酯型玉米黃質則應需更多的樹酯才有能達到完全的去酯化，另外，再與番薯葉萃取物比較後發現，番薯葉萃取物除游離態的全反式葉黃素及全反式玉米黃質外，在單酯或雙酯的區域並無吸光值，所以由此推斷番薯葉是以游離態葉黃素為主。

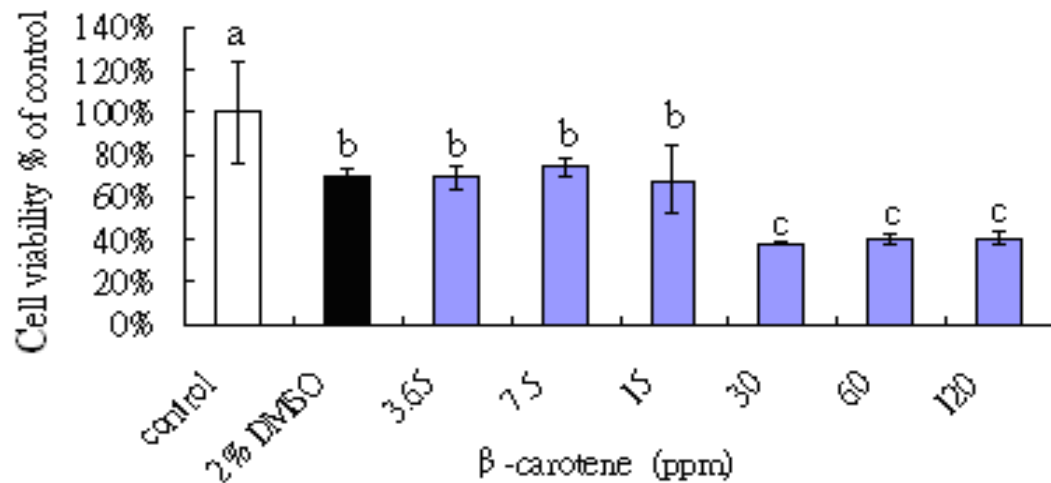
#### 四、葉黃素與 $\beta$ -胡蘿蔔素區分物安全性測試

圖三十四為葉黃素與  $\beta$ -胡蘿蔔素添加劑量對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響；對照組為未經添加任何葉黃素或  $\beta$ -胡蘿蔔素時細胞培養 24h 後的存活率訂為 100%，圖三十四(A)中發現葉黃素在濃度低於 7.5ppm 時細胞存活率與對照組比較無顯著差異( $p>0.05$ )，但添加劑量超過 15ppm 時則會有顯著下降，此結果可知 7.5ppm 以下的葉黃素不影響細胞的正常生長；Landrum et al.,(1997)和 Dagnelie et al.,(2000)指出若每人每天攝取 30mg 和 40mg 葉黃素，經換算每天約攝取 0.50 ppm 和 0.67ppm，並不會有任何的副作用，所以本實驗所生產葉黃素在上述濃度下並不會產生細胞毒性。而衛生署規定若葉黃素形態屬膠囊狀、錠狀且標示有每日攝取限量之食品中，其葉黃素之總含量不得高於 30mg 即 0.50ppm。因此本實驗所生產的葉黃素依衛生署規定使用時可安全食用。圖三十四(B)由於  $\beta$ -胡蘿蔔素本身屬非極性物質，因此  $\beta$ -胡蘿蔔素需溶解於 2% DMSO。圖中發現控制組與只有添加 2%DMSO 的組別其細胞存活率有顯著差異此為 DMSO 對細胞生理造成一定程度的影響，不同濃度的  $\beta$ -胡蘿蔔素的實驗組與 2 % DMSO 的樣品控制組比較，添加劑量低於 15ppm 時細胞存活率並沒有顯著差異( $p>0.05$ )，但添加劑量超過 30ppm 時則會有顯著下降，由此可知 15ppm 以下的  $\beta$ -胡蘿蔔素並無細胞毒性。Willett et al.(1983) 和 McLarty (1992 )指出若每人每天攝取 25 mg 或 50 mg  $\beta$ -胡蘿蔔素，換算後為 0.42 ppm 及 0.83ppm

(A)



(B)



圖三十四、葉黃素 (A)與 $\beta$ -胡蘿蔔素 (B)添加劑量對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率的影響。

Figure 34. Effect of lutein(A) and  $\beta$ -carotene (B) dosage on cell viability of 3T3-L1 preadipocytes. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

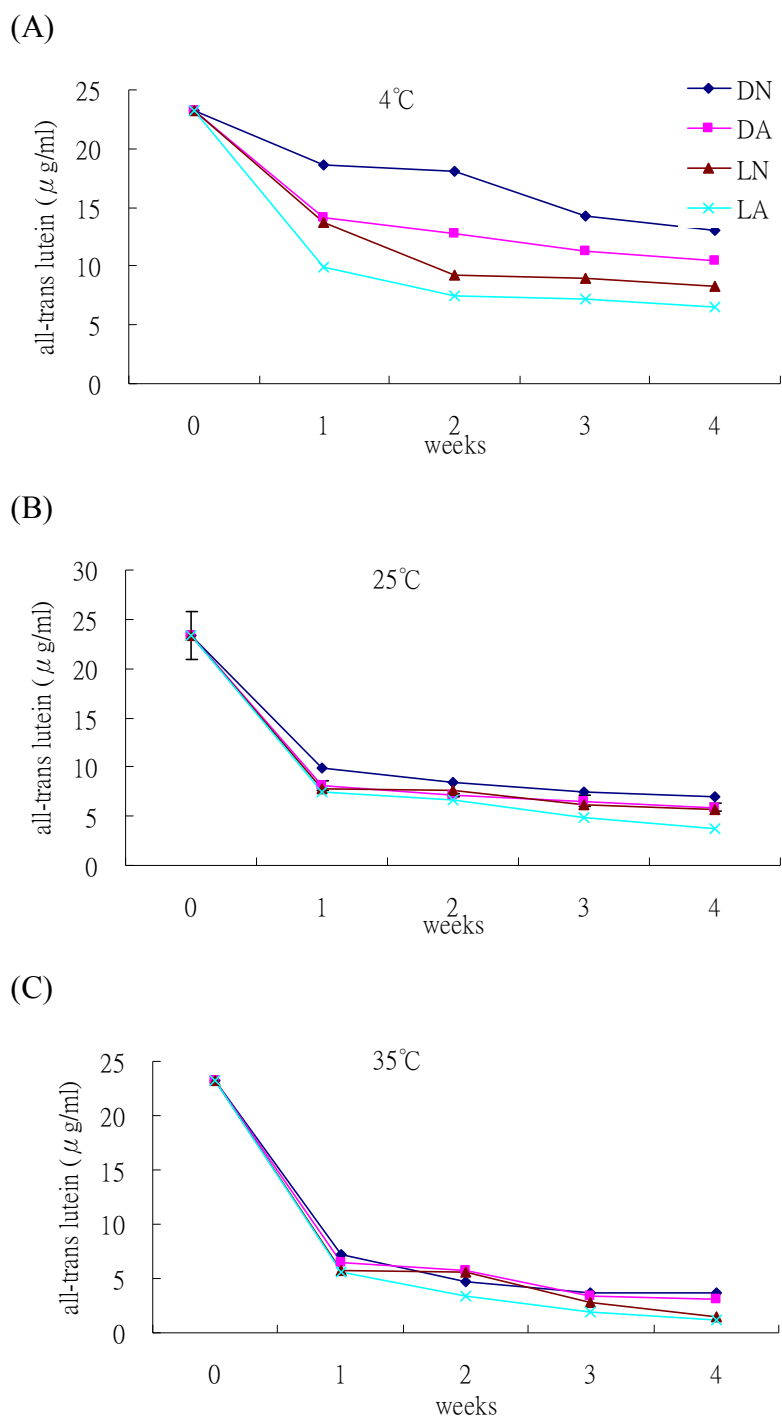
不具任何的副作用。由於目前衛生署對於  $\beta$ -胡蘿蔔素僅做為維生素 A 的前驅物，沒有建議攝取量，因此以維生素 A 的建議攝取量為  $600 \mu\text{g}$  換算為  $\beta$ -胡蘿蔔素為  $3.6\text{mg}$  即  $0.06\text{ppm}$ ，所以本實驗生產的  $\beta$ -胡蘿蔔素依國內維生素 A 建議攝取量攝取時應無安全的疑慮。

## 五、葉黃素與 $\beta$ -胡蘿蔔素儲存安定性評估

由於類胡蘿蔔素儲存期間可能會受到溫度、光照和氧氣的作用，導致類胡蘿蔔素於儲存期間裂解、氧化或異構化(Shi and Maguer, 2000)，因此本實驗將以上述三因素來探討儲存期間胡蘿蔔素的變化，進而了解較佳的儲存條件。

### (一)全反式葉黃素於儲存期間的安定性

圖三十五為葉黃素區分物儲存於 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ 和 $35^{\circ}\text{C}$ 三種不同溫度、有無避光及是否充填氮氣的狀態下，其全反式葉黃素含量的變化。由圖三十五(A)中可知，在 $4^{\circ}\text{C}$ 時，全反式葉黃素儲存性由高至低分別為避光且充氮氣(DN; dark and nitrogen)、避光而樣品暴露於空氣中(DA; dark and air)、不避光但充氮氣(LN; light and nitrogen)，其中保存性最差的是不避光又暴露於空氣中(LA; light and air)，有避光的組別DN及DA在經過四週的儲存後，其全反式葉黃素都還維持在 $10 \mu\text{g/ml}$ 以上；然而沒有避光的組別LN及LA在第四週則都低於 $8.5 \mu\text{g/ml}$ ，由此可知，在 $4^{\circ}\text{C}$ 時，光照對全反式葉黃素的破壞作用大於樣品所處的氣體條件。其次在避光下，DN都高於DA，在第四週時DA已經下降至 $10.45 \mu\text{g/ml}$ ，而DN為 $13.09 \mu\text{g/ml}$ ，且兩者有顯著差異( $p < 0.05$ )，由此可知，全反式葉黃素在經過四週的儲存後，以避光又充填氮氣者為最佳的儲存方式。圖三十五(B)及(C)中分別為全反式葉黃素在 $25^{\circ}\text{C}$ 和 $35^{\circ}\text{C}$ 兩種不同溫度下，光照和氣體成分對其影響變化。由圖三十五(B)及(C)中可以發現無論避光與否或充填氮氣與否，兩者的全反式葉黃素在第一週



圖三十五、全反式葉黃素於(A)4°C、(B)25°C 和(C)35°C 儲存溫度下其含量的變化

Figure 35. The effect of storage temperature at (A)4°C、(B)25°C and (C)35°C on all-trans lutein concentration. DN= dark and nitrogen, DA=dark and air, LN= light and nitrogen, LA= light and air. Bars represent mean±SD, n=2. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

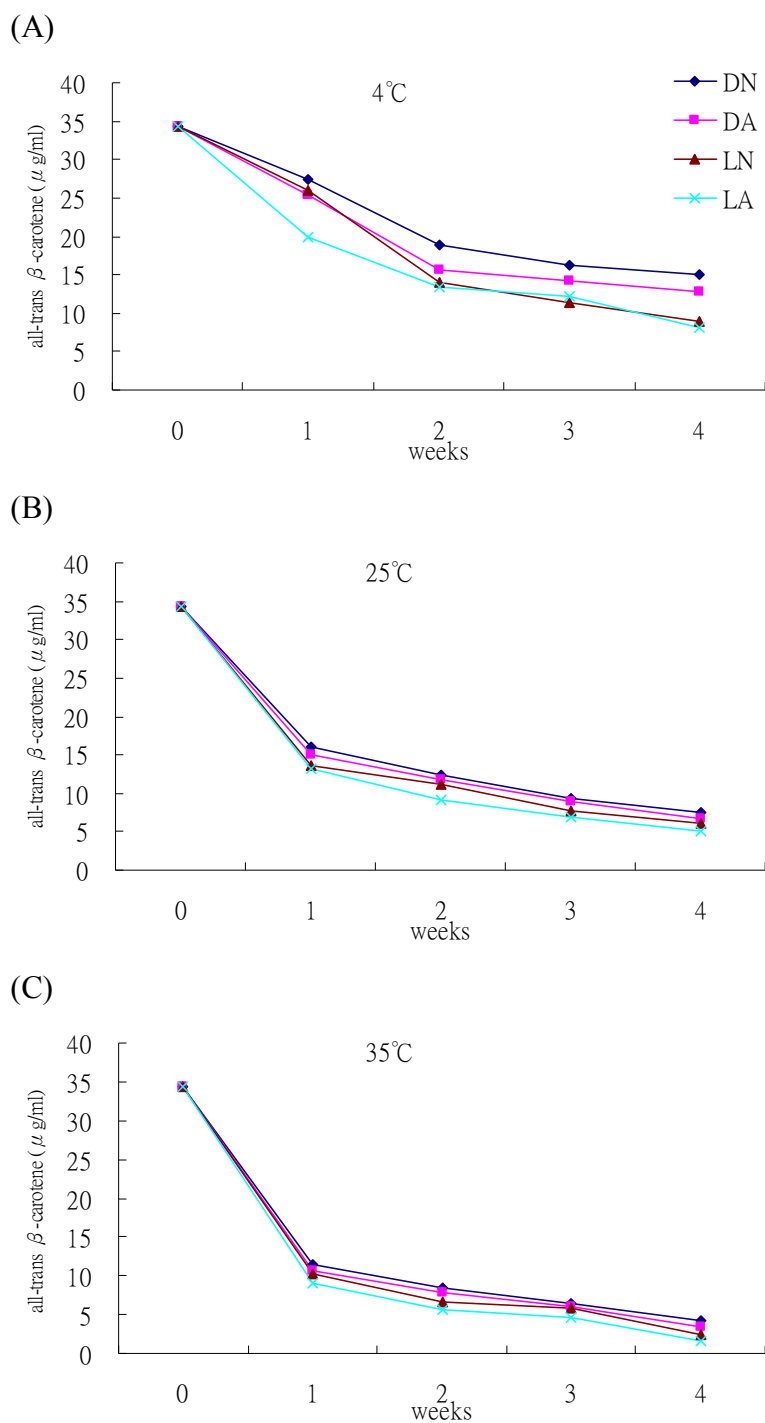
就都已明顯下降的趨勢，其中又以35°C下降幅度最大，由最初的23.30  $\mu$  g/ml，經過四週所有儲存條件下其全反式葉黃素含量均低於8  $\mu$  g/ml，降幅達65.67%；25°C雖然下降幅度小於35°C，但其全反式葉黃素也都低於10  $\mu$  g/ml，降幅達57.08%，經統計分析兩者有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，由以上得知，儲存溫度大於25°C時，即使在避光又充填氮氣的條件下，仍然會促使全反式葉黃素急速的被破壞。

## (二) 全反式 $\beta$ -胡蘿蔔素於儲存期間的安定性

圖三十六為  $\beta$ -胡蘿蔔素區分物儲存於 4°C、25°C 和 35°C 三種不同溫度、有無避光及是否充填氮氣的狀態下，其全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素含量的變化。由圖三十六 (A) 中可知，在 4°C 時，全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素儲存性與全反式葉黃素有相同的趨勢，皆是以避光且充氮氣儲存性最佳，不避光又暴露於空氣中的組別最差。首先探討有無避光對全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素的影響，由圖三十六(A)中發現，有避光的組別 DN 及 DA 經過四週的儲存後，全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素也都還維持在 12  $\mu$  g/ml 以上；然而沒有避光的組別 LN 及 LA 在第四週時則都在 9  $\mu$  g/ml 以下，由此可知，全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素與全反式葉黃素的情形一樣，在 4°C 時，光照對全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素的破壞作用大於充填的氣體條件大。在避光下一至四週 DN 都高於 DA，在第四週時 DA 已經下降至 12.85  $\mu$  g/ml，而 DN 卻還有 15.10  $\mu$  g/ml，經統計分析後，DN 與 DA 間有顯著差異，由此可知，在 4°C 溫度條件下，以避光又充填氮氣者為最佳的儲存方式。圖三十六(B)、(C)中分別為全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素在 25°C 和 35°C 兩種不同溫度下，光照和氣體成分對其影響變化。由圖中可以發現無論是避光或充填氮氣，兩者的  $\beta$ -胡蘿蔔素在第一週就都已有大幅下降的趨勢，且與全反式葉黃素的趨勢一樣，以 35°C 下降幅度最大，由最初的 34.41  $\mu$  g/ml，經過四週後就全部低於 4.5  $\mu$  g/ml，降幅達 86.92%；25°C 雖然下降幅度小於 35°C，但其經過四週的儲存後全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素含量亦全

部低於  $8 \mu\text{g/ml}$ ，降幅達 76.75%，由以上得知，在儲存溫度大於  $25^\circ\text{C}$  時，即使在避光又充填氮氣的條件下，仍然會促使全反式  $\beta$ -胡蘿蔔素急速的被破壞。

綜合以上結果顯示，無論是全反式葉黃素或  $\beta$ -胡蘿蔔素其最佳的儲存條件皆為  $4^\circ\text{C}$ 、避光且充填氮氣為佳。在  $25^\circ\text{C}$  及  $35^\circ\text{C}$  時類胡蘿蔔素的裂解在第一週就已達至高峰，且無論是避光抑或充填氮氣與否，似乎都無法有效抵抗溫度對類胡蘿蔔素的破壞，因此綜合光照、氣體組成和溫度對類胡蘿蔔素的影響，其促進裂解的主要因素應為溫度。



圖三十六、全反式 $\beta$ -胡蘿蔔素於(A)4°C、(B)25°C 和(C)35°C 儲存溫度下含量的變化

Figure 36. The effect of storage temperature at (A)4°C、(B)25°C and (C)35°C on all-trans  $\beta$ -carotene concentration. DN= dark and nitrogen, DA=dark and air, LN= light and nitrogen, LA= light and air. Bars represent mean $\pm$ SD, n=2. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.