

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
壹、 前言.....	1
貳、 文獻回顧.....	3
一、 類胡蘿蔔素的結構與特性.....	3
二、 類胡蘿蔔素的生理活性.....	3
三、 蔬菜中之類胡蘿蔔素.....	8
四、 加工過程對蔬菜中類胡蘿蔔素的影響.....	9
五、 類胡蘿蔔素的分析與鑑定.....	14
六、 抗氧化活性評估.....	20
(一) 終止自由基連鎖反應.....	20
(二) 抑制單重態氧.....	23
(三) 螯合金屬離子.....	23
參、 材料與方法.....	25
一、 實驗材料.....	25
(一) 實驗樣品.....	25
(二) 類胡蘿蔔素標準品及內標準品.....	25
(三) 試藥.....	25
(四) 溶劑.....	27
二、 儀器設備.....	28
三、 實驗方法.....	29

(一) 樣品前處理.....	29
(二) 比較皂化方法對蔬菜中類胡蘿蔔素測定值之影響.....	29
(三) HPLC 沖提條件之比較.....	30
(四) 類胡蘿蔔素及其異構物之鑑定.....	31
(五) 類胡蘿蔔素及其異構物的定量.....	32
(六) BHT 添加濃度對蔬菜中類胡蘿蔔素測定值之影響 ..	33
(七) 蔬菜水分含量分析.....	33
(八) 加工對蔬菜中類胡蘿蔔素含量之影響.....	34
(九) 加工對蔬菜的抗氧化活性之影響.....	34
四、 統計分析.....	38
肆、 結果與討論.....	39
一、 類胡蘿蔔素 HPLC 分析方法之建立.....	39
(一) HPLC 沖提系統之比較.....	39
(二) 類胡蘿蔔素及其異構物之初步鑑定.....	42
二、 皂化方法對類胡蘿蔔素測定值之影響.....	50
三、 BHT 添加濃度對類胡蘿蔔素測定值之影響.....	52
四、 省產蔬菜中全反式類胡蘿蔔素含量分析.....	52
五、 加工方法對蔬菜中類胡蘿蔔素含量之影響.....	58
六、 水煮時間對蔬菜中類胡蘿蔔素含量之影響.....	62
七、 水煮時間對蔬菜的抗氧化活性之影響.....	65
(一) Trolox 當量抗氧化能力之測定.....	68

(二) 抑制脂質氫過氧化物形成之能力.....	68
(三) 螯合亞鐵離子能力之測定.....	77
伍、 結論.....	80
陸、 參考文獻.....	82
柒、 附錄.....	88

圖目錄

圖一、極性和非極性類胡蘿蔔素的結構.....	4
圖二、 β -胡蘿蔔素形成維生素A機制.....	6
圖三、 β -胡蘿蔔素抑制脂質自氧化連鎖反應的機制.....	7
圖四、 β -胡蘿蔔素的各種異構物.....	12
圖五、葉黃素和玉米黃素的各種異構物.....	13
圖六、葉綠素與強鹼性樹脂 Ambersep 900 OH 之間的反應機制.....	16
圖七、單體及聚合碳 18 固定相之化學結構.....	18
圖八、類胡蘿蔔素標準品在單聚合碳 18、聚合物碳 18 及聚合物碳 30 管柱的層析分析圖(偵測波長：450 nm).....	19
圖九、在(A)單一沖提系統或(B)梯度沖提系統下之類胡蘿蔔素標準品 HPLC 層析圖 (偵測波長：450 nm).....	40
圖十、在梯度沖提系統下地瓜葉萃出液之類胡蘿蔔素 HPLC 層析圖(偵測波長：450 nm).....	41
圖十一、全反式葉黃素標準品受紫外光異構化前(A)異構化後(B)的 HPLC 層析圖 (偵測波長：450 nm).....	43
圖十二、全反式玉米黃素標準品受紫外光異構化前(A)異構化後(B)的 HPLC 層析圖 (偵測波長：450 nm).....	44
圖十三、全反式 β -胡蘿蔔素標準品受紫外光異構化前(A)異構化後(B)的 HPLC 層析圖 (偵測波長：450 nm).....	45
圖十四、在梯度沖提系統下葉黃素、玉米黃素、 β -胡蘿蔔素及其順式異構物之 HPLC 層析(偵測波長：450 nm).....	46
圖十五、葉黃素、玉米黃素及 β -胡蘿蔔素之順/反異構物的吸收光譜	

圖.....	48
圖十六、地瓜葉萃取液於以樹酯皂化前(A)與皂化後(B)之 HPLC 層析圖譜(偵測波長：450 nm).....	53
圖十七、省產蔬菜中全反式類胡蘿蔔素含量分布.....	56
圖十八、水煮時間對(A)香菜及(B)九層塔的 TEAC 值及總酚類化合物之影響.....	69
圖十九、水煮時間對(A)地瓜葉及(B)油菜的 TEAC 值及總酚類化合物之影響.....	70
圖二十、水煮時間對(A)香菜與(B)九層塔添加於亞麻油酸乳化系統十天期間其吸光值之影響.....	72
圖二十一、水煮時間對(A)地瓜葉與(B)油菜添加於亞麻油酸乳化系統十天期間其吸光值之影響.....	73
圖二十二、水煮時間對(A)香菜及(B)九層塔的抑制脂質過氧化率及總類胡蘿蔔素之影響.....	75
圖二十三、水煮時間對(A)地瓜葉及(B)油菜的抑制脂質過氧化率及總類胡蘿蔔素之影響.....	76
圖二十四、水煮時間對香菜、九層塔、地瓜葉及油菜的螯合亞鐵離子能力之影響.....	78

表目錄

表一、 蔬菜中類胡蘿蔔素含量.....	10
表二、 類胡蘿蔔素幾何異構物的最大吸收波長及分子量.....	21
表三、 台灣省產蔬菜的學名和英文名稱.....	26
表四、 圖十四中全反式葉黃素、 玉米黃素及 β -胡蘿蔔素及其所有順式異構物波峰之光譜初步鑑定結果.....	49
表五、 皂化方法對青花菜、 菠菜、 地瓜葉及芥藍中類胡蘿蔔素含量測定值之影響.....	51
表六、 BHT添加濃度對地瓜葉和芥藍菜中類胡蘿蔔素測定值之影響.....	54
表七、 本研究中青花菜、 菠菜及玉米中全反式類胡蘿蔔素含量與其他文獻相較結果.....	57
表八、 加工方法對蔬菜中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響.....	59
表九、 加工方法對蔬菜中類胡蘿蔔素及其異構物損失率或增加率之影響.....	61
表十、 水煮時間對香菜和九層塔中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響.....	63
表十一、 水煮時間對地瓜葉和油菜中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響.....	64
表十二、 水煮時間對香菜、 九層塔、 地瓜葉與油菜中總類胡蘿蔔素及總酚類化合物之影響.....	67

附錄目錄

附錄一、省產蔬菜中全反式類胡蘿蔔素含量分布.....	88
附錄二、加工方法對蔬菜中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響.....	89
附錄三、水煮時間對香菜和九層塔中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響.....	91
附錄四、水煮時間對地瓜葉和油菜中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響.....	93
附錄五、水煮時間對香菜和九層塔的總類胡蘿蔔素、總酚類化合物及抗氧化活性的影響.....	95
附錄六、水煮時間對地瓜葉和油菜的總類胡蘿蔔素、總酚類化合物及抗氧化活性的影響.....	96

壹、前言

類胡蘿蔔素 (carotenoids) 普遍存在於蔬果中，目前已有七百多種被分離與鑑定出來 (Willis and Wians, 2003)，就其結構而言，類胡蘿蔔素可分為兩大類，一類為只含碳氫的化合物，稱為胡蘿蔔素類 (carotene)，如； β -胡蘿蔔素 (β -carotene)，另一類為含氧之衍生物，稱為葉黃素類 (xanthophyll)，如；葉黃素 (lutein) 與玉米黃素 (zeaxanthin) (Shi and Maguar, 2000)。

類胡蘿蔔素因具有長鏈的共軛雙鍵 (long chain of conjugated carbon-carbon double bonds)，具有良好的抗氧化活性，能增強細胞對自由基及單重態氧的防禦 (Willis and Wians, 2003)，降低心血管疾病及癌症發生率 (Takashashi et al., 2003；Mares-Perlman et al., 2001；Bolton-Smith et al., 1992)。其中 β -胡蘿蔔素是維生素 A 的前驅物，一分子全反式 (all-trans) β -胡蘿蔔素，藉由人體腸道或肝臟中氧化酵素作用，可產生兩分子的維生素 A (Tee, 1992)。葉黃素與玉米黃素是人類眼睛內黃斑色素 (macular pigment) 的主要成分，兩者在人類血液及眼睛中黃斑部位之濃度，深受飲食中葉黃素與玉米黃素的含量所影響 (Kruger et al., 2002)。根據各種證據顯示，葉黃素與玉米黃素可過濾藍光，固具有防止視網膜受到由光所引起的氧化傷害 (Landrum and Bone, 2001)，能預防白內障 (cataracts) 及因老化造成的老年性黃斑部病變 (aged-related macular degeneration；AMD) (Olmedilla et al., 2001)，並能保護皮膚，減少因紫外線所造成的傷害 (Stahl. et al., 2000) 等功能。也可應用於食品中，做為抗氧化劑或營養補充劑。

自然界中的類胡蘿蔔存在有數種順/反式異構物 (cis/trans isomers)，不過多以全反式異構物為主 (Von Doering et al., 1995)。由於類胡蘿蔔素具有長鏈的共軛雙鍵，因此對氧、光、熱、酸與鹼都非

常敏感 (Chen et al., 1994), 容易因氧化、加熱、光照與酸鹼等處理而產生異構化與裂解等反應 (Chen et al., 1995; Mortensen and Skibsted, 2000; Updike and Schwartz, 2003)。再加上類胡蘿蔔素本身種類繁多, 目前的食品組成分析報告中, 無法提供完整的葉黃素、玉米黃素、 β -胡蘿蔔素及其順/反式異構物的含量資料。且於傳統的萃取與皂化過程中常會有異構化、氧化或裂解等反應的發生, 而影響到最後的分析結果, 因此本研究中擬使用逆相 C_{30} 管柱搭配光電二極體陣列偵測器 (photodiode-array detector), 來初步鑑定蔬菜中各個類胡蘿蔔素之順/反異構物, 並比較不同皂化法對類胡蘿蔔素測定值之影響。

人體由於無法自行合成類胡蘿蔔素, 必須經由飲食中獲得 (Semba and Dagnelie, 2003), 所以類胡蘿蔔素在蔬菜中的含量與分佈狀況, 是一項很重要的飲食指標。不過現今研究報告大部分是針對國外所生產的蔬果調查 (Hart and Scott, 1995), 以台灣省產蔬菜為主的調查報告並不多, 因此本研究除了將調查重要的類胡蘿蔔素如葉黃素、玉米黃素與 β -胡蘿蔔素含量在台灣省產之綠黃色蔬菜中分佈情形, 並探討不同熱加工處理對蔬菜中葉黃素、玉米黃素及 β -胡蘿蔔素之異構化程度及抗氧化活性之影響, 未來可作為國人飲食指南的重要參考資料。

貳、文獻回顧

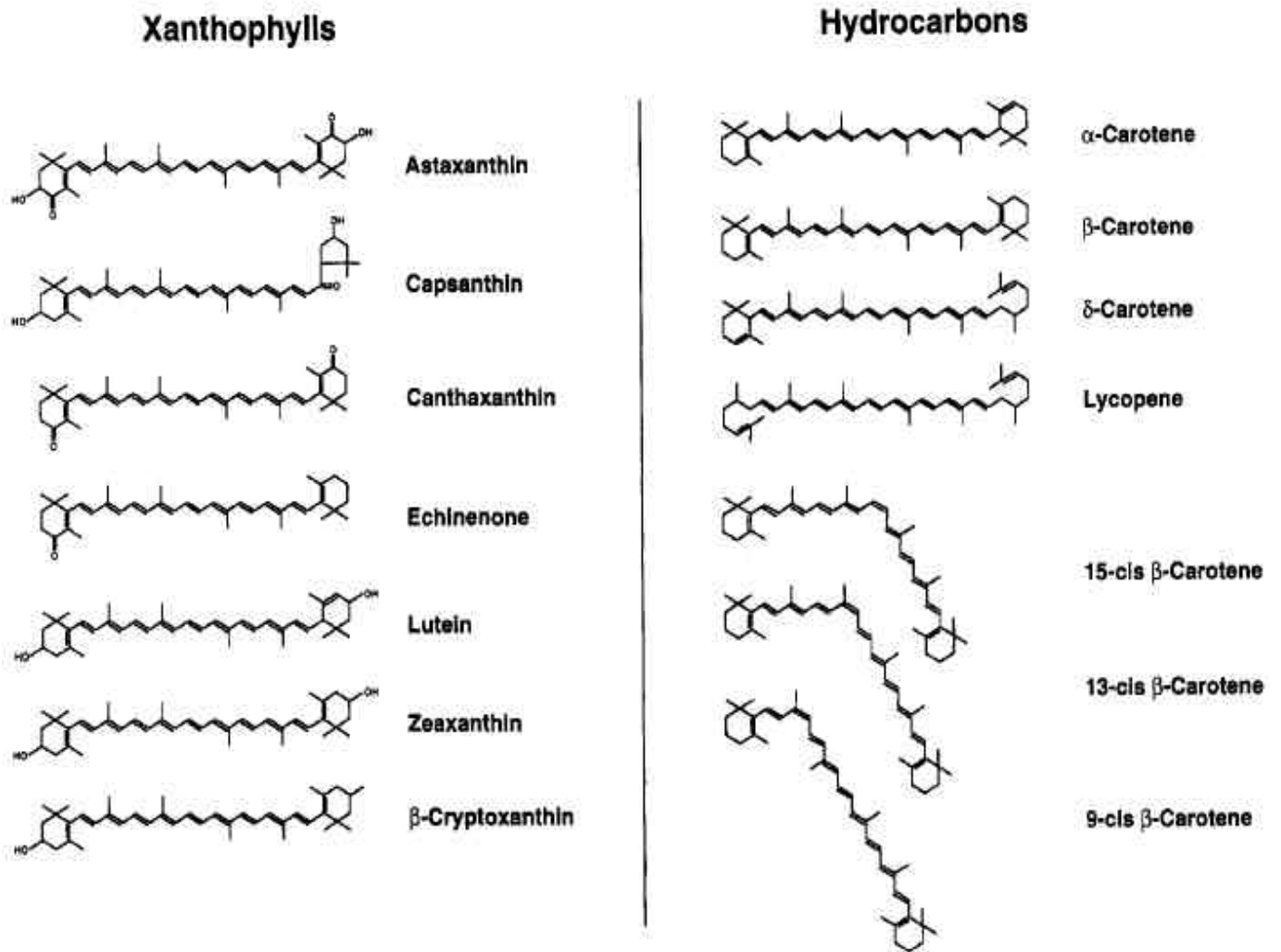
一、類胡蘿蔔素的結構與特性

類胡蘿蔔素 (carotenoids) 為存在於自然界之多功能色素 (Berg et al., 2000), 廣泛存在於蔬菜與水果中。至目前為止, 已有七百多種類胡蘿蔔素被發現 (Willis and Wians, 2003)。類胡蘿蔔素在分子構造上的共通性是; 皆由 8 個異戊二烯 (2-methyl-1,3-butadiene) 所組成, 在分子間形成長鏈的共軛雙鍵 (conjugated carbon-carbon double bonds) 之結構, 所以可吸收400-500 nm波長之光, 而在外觀上呈現紅、黃或橘色等 (Tee, 1992), 屬於脂溶性色素 (Goodwin, 1986)。類胡蘿蔔素依其結構可分為只含碳氫的化合物, 以及含氧的衍生物這兩大類, 前者稱為胡蘿蔔素(carotene), 為一般人熟知的有 β -胡蘿蔔素 (β -carotene) 及蕃茄紅素 (lycopene) 等, 結構上不含氧原子; 後者稱為葉黃素類 (xanthophylls), 例如葉黃素 (lutein) 及玉米黃素 (zeaxanthin) 等, 在結構尾端的 β -ionone環上含有一個或以上的氧化基團 (Shi and Maguar, 2000)。圖一為類胡蘿蔔素結構 (Sander et al., 1994)。由於類胡蘿蔔素具有長鏈的共軛不飽和雙鍵, 對以下環境因子, 如; 氧、光、熱、酸與鹼非常敏感, 易於發生異構化或氧化裂解反應 (Chen et al., 1994)。

二、類胡蘿蔔素的生理活性

類胡蘿蔔素對人體具有很多功能性, 如抗氧化、增強免疫力、幫助皮膚抵抗紫外線及保護眼睛等 (Berg et al., 2000; Stahl et al., 2000)。類胡蘿蔔素的良好抗氧化性質是因為具有長鏈共軛多烯 (conjugated polyene) 結構, 當三重態氧 (triplet oxygen) 受到光激發時, 由於能量轉移而形成反應性較強的單重態氧 (singlet oxygen), 此具有致突變性, 而類胡蘿蔔素則有清除單重態氧的作用, 且可捕捉過氧化自由基

Carotenoids



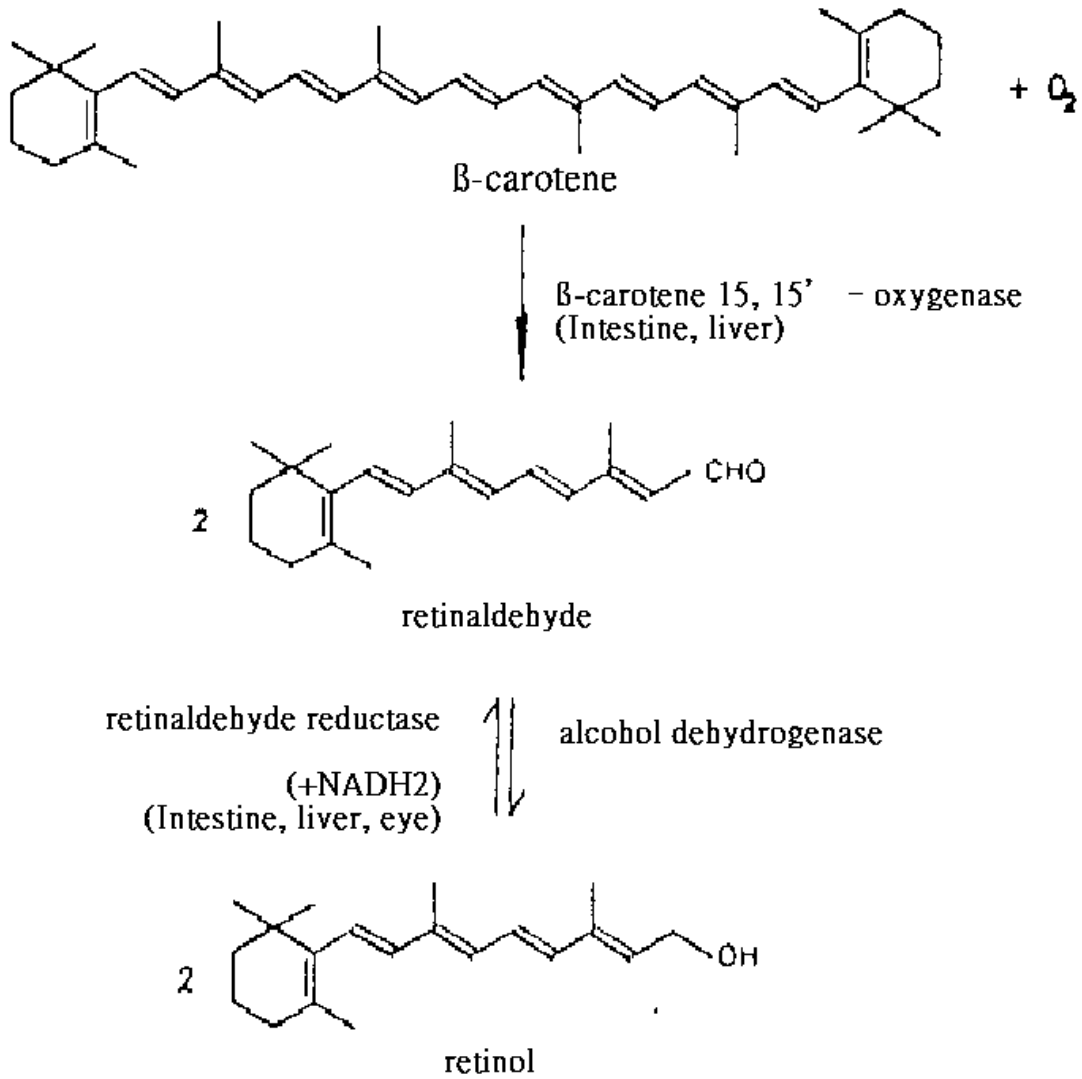
圖一、極性和非極性類胡蘿蔔素的結構

Figure 1. Structures of polar and nonpolar carotenoids

(Sander et al., 1994)

(free peroxy radicals ; ROO .) , 並能防止光氧化及脂質過氧化反應的發生。當類胡蘿蔔素在結構上之共軛雙鍵數愈多時, 其清除單重態氧能力愈強 (Anguelova and Warthsen, 2000) 。而其中某些類胡蘿蔔素是維生素 A 的前驅物 (Bauernfeind, 1981) , 在 700 種於自然界中被發現的類胡蘿蔔素中, 約只有 10 % 具有原維生素 A 的特性, 例如 α -carotene、 β -carotene 和 β -cryptoxanthin 等 (Rodriguez-Amaya, 1989) , 以 β -carotene 最重要, 理論上具對稱性的一分子全反式 β -胡蘿蔔素, 在人體內藉由腸道或肝臟中的 β -胡蘿蔔素-15,15'-oxygenase 作用, 可形成兩分子的維生素 A, 其機制如圖二 (Tee, 1992) , 具有 100% 維生素 A 活性, 且能抑制自由基及單重態氧 (Willis and Wians, 2003) , 將脂質氧化連鎖反應所產生的自由基, 穩定在 β -胡蘿蔔素分子間的共振結構中如圖三, 以減少細胞被攻擊的機會 (Burton and Ingold, 1984) , 加上 β -胡蘿蔔素可以保護白血球細胞免於自氧化, 或增加負責專一性免疫反應的細胞對自由基的防禦, 增加免疫力的功效, 已有相關研究指出血液中 β -胡蘿蔔素的含量與癌症有顯著的負相關, 血漿中 β -胡蘿蔔素的增加可以降低胃癌、攝護腺癌、子宮頸癌、乳癌、肺癌等癌症發生 (Takashashi et al., 2003 ; Willis and Wians, 2003)。

葉黃素及玉米黃素的分子構造與 β -胡蘿蔔素類似, 但因具有氫氧基, 所以不具維生素 A 活性, 不會在人體內轉換成維生素 A, 但是易累積在人類視網膜黃斑部 (macular lutea) , 是黃斑色素 (macular pigment) 中的主要色素 (Landrum and Bone, 2001) 。人體黃斑位於眼球視網膜中心, 直接接受通過晶狀體而來的太陽光線, 讓視網膜成像, 日光中的紫外線大部分能被眼角膜及晶狀體過濾掉, 但藍光卻可以直接穿透眼球直達視網膜及黃斑部。黃斑部的脂質會受到光激發所產生的單重態氧攻擊而形成過氧化物, 對視網膜或黃斑部傷害極大。而所攝取的大部分類胡蘿蔔素在被消化後, 主要是以脂蛋白 (lipoprotein) 運送到全身的組織中利用, 但其中只有葉黃素與玉米黃素能累積在視網膜黃斑



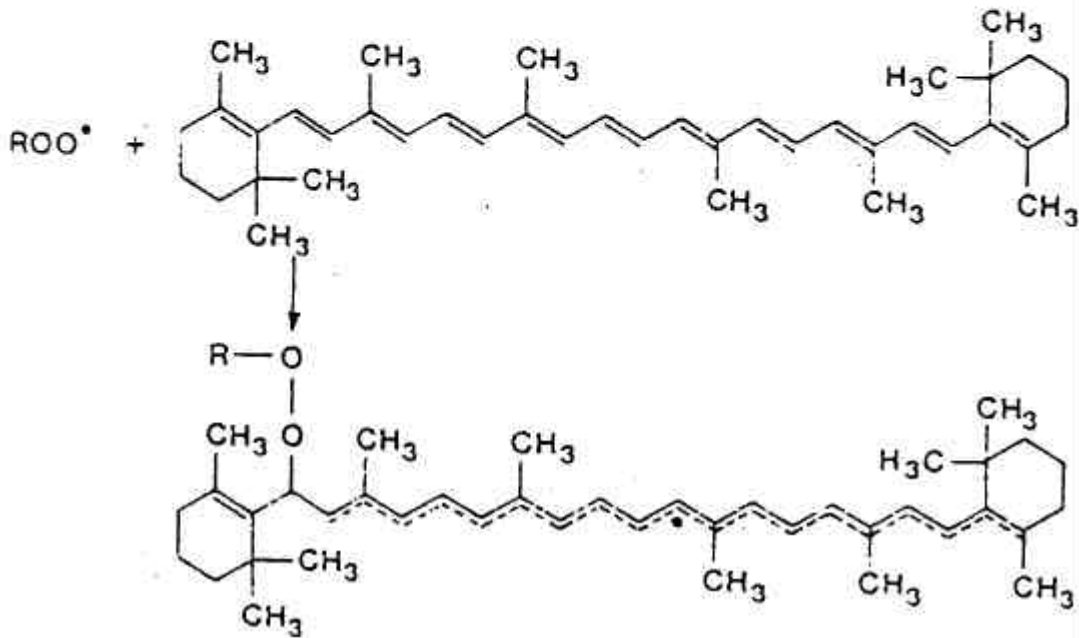
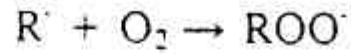
圖二、β-胡蘿蔔素形成維生素A機制

Figure 2. Biosynthesis of vitamin A from β-carotene.

(Tee, 1992)

Initiation: production of R[•] from
a molecular precursor

Propagation:



圖三、β-胡蘿蔔素抑制脂質自氧化連鎖反應的機制

Figure 3. The inhibition of oil autooxidation by β-carotene.

(Burton, 1984)

部，以過濾藍光，預防視網膜因受到光引起的氧化傷害 (light-initiated oxidative damage) (Landrum and Bone, 2001)，根據相關研究報告指出，增加葉黃素與玉米黃素的飲食攝取可增加兩者於血清及眼睛黃斑部之濃度 (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) (Olmedilla et al., 2001)。尚有其他學者實驗證實，蔬菜中所含葉黃素與玉米黃素能預防動脈硬化及血管堵塞，降低心血管疾病與癌症的發生機率 (Mares-Perlman et al., 2001; Bolton-Smith et al., 1992)，且能保護皮膚，防止因紫外線所造成的傷害 (Stahl et al., 2000)，也可應用於食品中當作抗氧化劑，當添加不同量葉黃素及玉米黃素在黃豆油中，隨著添加濃度愈高，所測得油脂過氧化價愈低 (Lee and Min, 1990)。

三、蔬菜中之類胡蘿蔔素

蔬果中主要的類胡蘿蔔素包括葉黃素、玉米黃素及 β -胡蘿蔔素等，在西方國家，胡蘿蔔 (carrots) 是 β -胡蘿蔔素最重要的來源，其他例如菠菜 (spinach) 和蕃薯 (sweet potatoes) 也含有相當多的 β -胡蘿蔔素 (Berg et al., 2000)；在熱帶或亞熱帶地區，芒果中也含有豐富的 β -胡蘿蔔素，但是綠色葉菜類蔬菜 (green leaf vegetable) 則是含大量的葉黃素，而甜玉米中則含有豐富的玉米黃素。這些化合物存在於植物細胞的葉綠體 (chloroplasts) 和色素體 (chromoplasts) 中。在葉綠體，類胡蘿蔔素會與蛋白質鍵結，主要是避免在光合作用時所產生的單重態氧或自由基所造成之光氧化傷害，可作為一種光保護色素及膜安定劑 (membrane stabilizers) (Havaux, 2003; Minguez-Mosquera et al., 2002)；而在色素體中類胡蘿蔔素則是以結晶或油滴形式存在，例如番茄或芒果。

在自然界中，類胡蘿蔔素多半以全反式 (all-trans) 型式存在，因其在熱力學上相較於其順式異構物 (cis-isomers) 有較高的穩定性

(Von Doering et al., 1995)。然而由於化學分析技術的提升，已有很多證據顯示，亦有少量的順式異構物存在於植物體內，尤其是在含有葉綠素的組織中 (Edelenbos et al., 2001; Humphries and Khachik, 2003)，另外在水果中，也發現有少許順式異構物存在 (Godoy and Rodriguez-Amaya, 1994)。

植物可生物合成類胡蘿蔔素，但人體則無法自行合成，必須經由飲食中獲得 (Semba and Dagnelie, 2003)，所以類胡蘿蔔素在食品中的含量與分佈狀況，是一項很重要的飲食指標。雖然目前有多篇報告，已對日常蔬果之類胡蘿蔔素含量作分析，不過 Chen and Chen (1992) 指出類胡蘿蔔素含量會受到蔬菜品種、部位、採收成熟度、種植條件等因素影響而有所不同，加上現今研究報告中大部分是針對國外的蔬果所做的含量調查 (表一) (Hart and Scott, 1995)，且多半以反式異構物含量分析為主，而以台灣省產蔬菜為主的調查報告並不多，於是本研究將針對台灣省產蔬菜中分布最廣和最重要的類胡蘿蔔素如葉黃素、玉米黃素與 β -胡蘿蔔之順/反式異構物含量做更詳盡的分析。

四、加工過程對蔬菜中類胡蘿蔔素的影響

加工會改變蔬菜的分子結構，其對類胡蘿蔔素的影響有正負兩面，類胡蘿蔔素具有長鏈的共軛雙鍵，故對氧、光、熱、酸與鹼都非常敏感 (Chen et al., 1994)，一般熱加工處理例如殺菁 (blanching)、滅菌 (pasteurization) 或製罐 (canning)，易導致類胡蘿蔔素產生裂解和異構化反應，及維生素 A 活性的降低。可是加熱也讓蔬菜中之氧化酵素失活、軟化蔬菜的結構組織或是破壞類胡蘿蔔素與蛋白質所形成之複合物，因而提升類胡蘿蔔素的萃取率 (Updike and Schwartz, 2003)。Chen 等人 (1995) 指出在 pH 4.0 時酸化胡蘿蔔汁，沒有顯著的順/反異構化反應產生，但在高濃度的強酸下就會促使胡蘿蔔素異構化反應的進行 (Mortensen and Skibsted, 2000)。胡蘿蔔汁在 100°C 下滅菌，會

表一、蔬菜中類胡蘿蔔素含量

Table 1. The carotenoid content of vegetables ($\mu\text{g}/100\text{g}$ 'wet weight' as eaten)

		Lutein	Zeax	β -cryp	Lyc	α -car	β -car	<i>cis</i> β -car
Brussels frozen	raw	610	—	—	—	—	441	112
Brussels frozen	cooked	621	—	—	—	—	411	144
Beans green frozen	raw	494	—	—	—	70	299	77
Beans green frozen	cooked	548	—	—	—	26	323	50
Beans baked T/S	canned	25	—	—	1659	—	30	nd
Beans broad	raw	506	—	—	—	—	215	46
Bean broad	cooked	620	34	—	—	—	358	48
Beans French	raw	479	—	—	—	—	306	77
Beans French	cooked	577	—	—	—	—	388	55
Beans runner	raw	555	—	—	—	33	277	66
Beans runner	cooked	632	—	—	—	Tr	490	48
Broccoli fresh	raw	1614	—	—	—	—	800	119
Broccoli fresh	cooked	1949	—	—	—	—	1125	256
Cabbage green	raw	80	—	—	—	—	51	8
Cabbage green	cooked	111	—	—	—	—	65	6
Cabbage Savoy	raw	103	—	—	—	—	50	nd
Cabbage Savoy	cooked	341	—	—	—	—	240	33
Carrots (May)	raw	170	—	—	—	2660	8521	76
Carrots (May)	cooked	149	—	—	—	2838	8831	228
Carrots (Sept)	raw	283	—	—	—	3610	10800	Tr
Carrots (Sept)	cooked	313	—	—	—	3767	10487	1815
Carrots frozen	raw	268	—	—	—	3268	8538	nd
Carrots frozen	cooked	300	—	—	—	3851	9907	nd
Cauliflower	raw	Tr	—	—	—	—	nd	nd
Cauliflower	cooked	Tr	—	—	—	—	nd	nd
Cucumber	raw	670	—	—	—	—	222	73
Greens	raw	3046	—	—	—	—	1663	286
Greens	cooked	4437	—	—	—	—	2700	405
Leeks	raw	161	—	—	—	—	69	18
Leeks	cooked	164	—	—	—	—	70	14
Lettuce iceberg	raw	110	—	—	—	—	74	17
Lettuce butterhead	raw	1611	—	—	—	—	1603	385
Marrow	raw	128	—	—	—	—	36	12
Marrow	cooked	135	—	—	—	—	44	9
Mixed veg frozen	raw	882	84	—	—	1045	3670	525
Mixed veg frozen	cooked	976	59	—	—	1045	3639	866
Parsley	raw	5812	—	—	—	—	3505	1018
Peas frozen	raw	1633	—	—	—	—	360	78
Peas frozen	cooked	1991	—	—	—	—	546	114
Pepper green	raw	660	—	—	—	—	235	63
Pepper green	fried	1023	—	—	—	—	496	47
Pepper green*	raw	1116	—	—	—	—	626	88
Pepper orange	raw	503	1608	90	—	167	219	197
Pepper orange*	raw	2492	8480	779	—	636	888	240
Sweetcorn frozen	raw	522	437	—	—	60	45	14
Sweetcorn frozen	cooked	444	375	—	—	33	24	nd
Spinach	raw	5869	—	—	—	—	3397	624
Spinach	cooked	7410	—	—	—	—	4461	1040
Spring onions	raw	255	—	—	—	—	112	30
Tomato	raw	78	—	—	2937	—	415	24
Tomato	cooked	120	—	—	3703	—	549	99
Tomatoes canned	in sauce	105	—	—	6205	—	353	70
Tomatoes canned	reheated	116	—	—	5613	—	258	Tr
Watercress	raw	10713	—	—	—	—	4777	1142
Cabbage Savoy	outside leaves	14457	—	—	—	—	10020	1829

* Saponified.

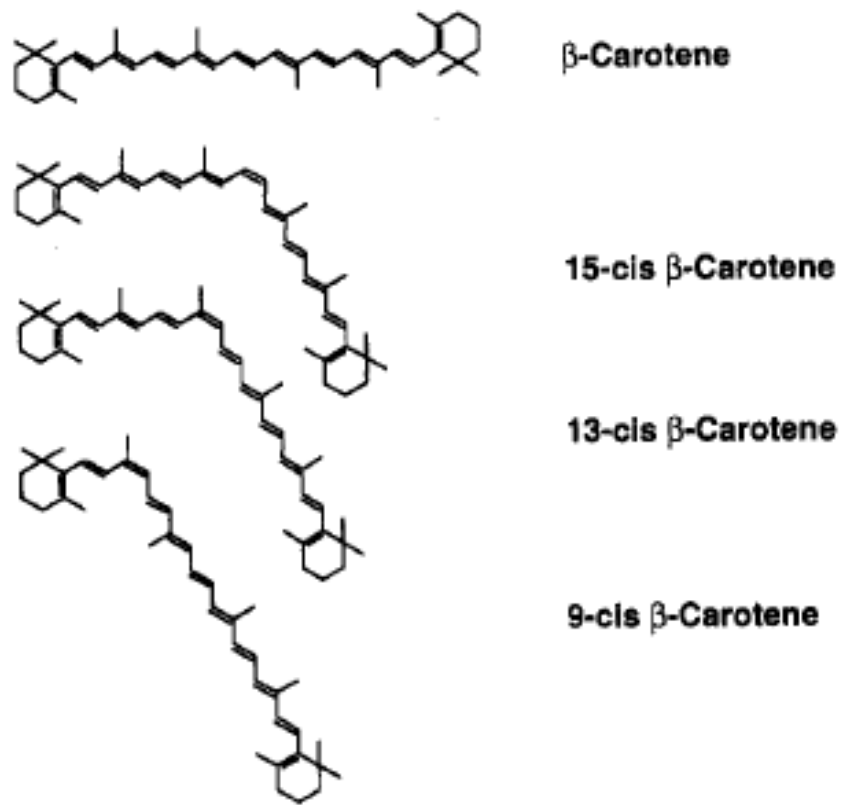
Tr = trace; — = not present or nd = not detected.

(Hart and Scott, 1995)

造成 β -胡蘿蔔素發生無或輕微的異構化反應 (Chen et al., 1995), 但於製罐過程中, 則有激烈的異構化反應發生, 會導致 9-cis β -carotene、13-cis β -carotene 或 15-cis β -carotene 等順式異構物產生如圖四 (Sander et al., 1994)。Chen 等人 (1996) 發現 121°C 下製罐, 使主要的順式異構物 13-cis- β -carotene 提升為原本的 30 %。

葉黃素與玉米黃素最近幾年的研究報告, 如; Updike and Schwartz (2003) 除了鑑定蔬菜中葉黃素與玉米黃素的順/反式異構物, 包括 all-trans lutein、13-cis lutein、13?-cis lutein、9-cis lutein、9?-cis lutein、all-trans zeaxanthin、13-cis zeaxanthin、9-cis zeaxanthin (如圖五), 並研究熱加工方式, 如微波及製罐對青花菜 (broccoli)、玉米、菠菜、甘藍 (kale)、青豆 (green peas)內的葉黃素與玉米黃素異構化的影響; 結果發現製罐加工方法讓蔬菜中的反式葉黃素與玉米黃素含量皆降低, 可是葉黃素的總順式異構物含量增加, 其中增加最多的是甘藍, 其總順式異構物由 0 提升至 22%, 又以 13-cis lutein 的量增加最多; 而製罐加工讓玉米中之玉米黃素的總順式異構物由 0.4 增加至 17 %, Aman et al. (2005) 實驗發現熱加工讓玉米中葉黃素和玉米黃素的順式異構物含量各別增加了 12 至 30 %及 7 至 25 %。

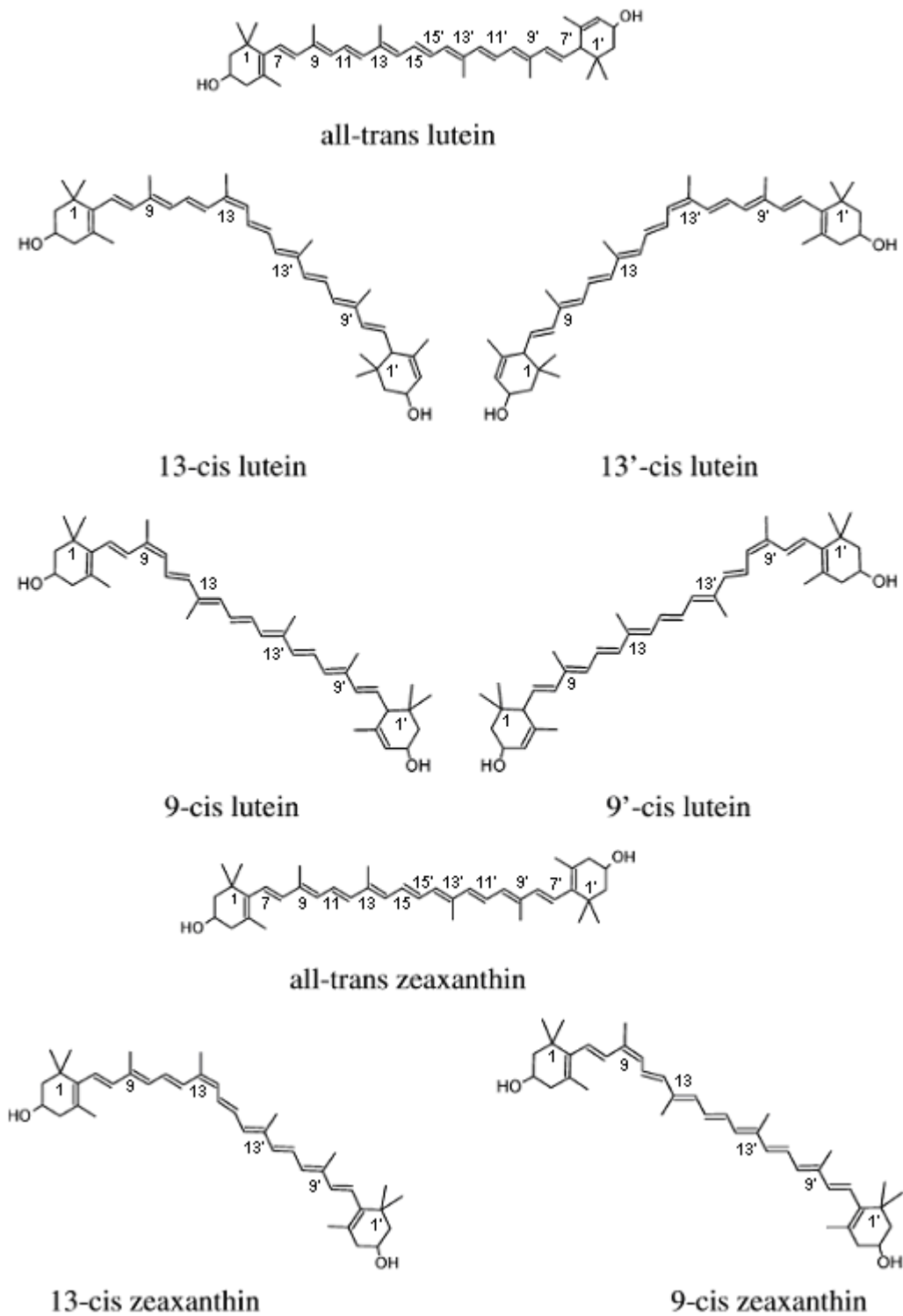
對具有維生素 A 活性的類胡蘿蔔素來說, 順式異構物的生成會降低維生素 A 活性, 例如 13-cis β -carotene 只具有 53 % 維生素 A 活性, 而 9-cis β -carotene 僅具有 38 % 維生素 A 活性 (Minguez-Mosquera et al., 2002)。而其他類胡蘿蔔素的生物利用率 (bioavailability) 也會受到順/反異構物之構型的改變而有所影響, Ben Amotz and Levy (1996) 提出; β -胡蘿蔔素的全反式異構物較順式異構物優先被人體所吸收, 動物試驗也證實 all-trans β -carotene 較 9-cis 和 13-cis β -carotene 有較高的生物利用率 (Deming, Teixeira and Erdman, 2002)。另外, 食品本身的成分組成也是影響生物利用率的一大因素; 因為類胡蘿蔔素是脂溶性色



圖四、β-胡蘿蔔素的各種異構物

Figure 4. Chemical structures of the geometrical isomers of β-carotene.

(Sander et al., 1994)



圖五、葉黃素和玉米黃素的各種異構物

Figure 5. Chemical structures of the geometrical isomers of lutein and zeaxanthin.

(Updike and Schwartz, 2003)

素，所以食品中油脂含量愈多以及加工過程中，因機械方式而破壞食品組織，都會增加類胡蘿蔔素的生物利用率 (Yeum and Russell, 2002)。

順/反異構化除了影響維生素A活性和生物利用率，也會影響類胡蘿蔔素的抗氧化能力 (antioxidant capacity)，相關文獻指出， β -胡蘿蔔素順式異構物清除單重態氧效率低於全反式 β -胡蘿蔔素 (Stahl and Sies, 1993)，Jimenez and Pick (1993) 進一步發現，將 β -胡蘿蔔素順反異構物暴露在活性氧之下，結果顯示13-cis β -carotene降解速度較all-trans β -carotene快，然而Bohm et al. (2002) 利用總抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC) 分析類胡蘿蔔素之抗氧化能力時發現； β -胡蘿蔔素順反異構物的TEAC值沒有顯著差異，蕃茄紅素順式異構物的TEAC值高於其全反式異構物，表示蕃茄紅素順式異構物有較好的總抗氧化力。

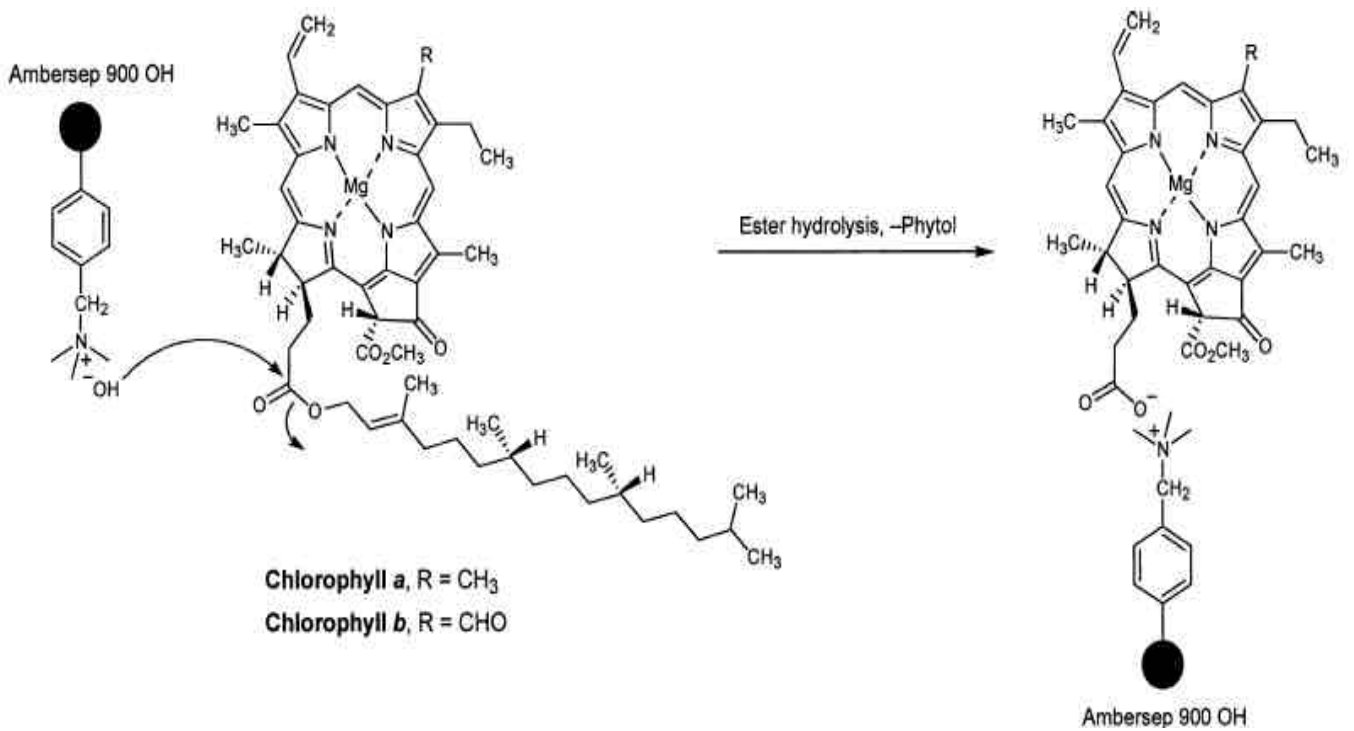
雖然已有多篇報告，探討加工過程對蔬菜中類胡蘿蔔素之順/反異構物含量分布及生理活性的影響，可是加工方式多為微波加熱、製罐與水煮等，且多以蕃茄紅素或 β -胡蘿蔔素的分析為主，針對葉黃素和玉米黃素的相關研究較為缺乏，再加上經 Khachik et al. (1997) 証實，在人類或猴子的視網膜中發現到有順式葉黃素及玉米黃素異構物的存在，因而推測順式葉黃素及玉米黃素是否可直接被人體所吸收，這更加提升了加工過程對蔬菜中葉黃素類之順反異構物分佈影響的重要性。因此本研究將針對台灣省產蔬菜中含量較多的葉黃素、玉米黃素及 β -胡蘿蔔素，進行中式烹調方式如水煮、油炒及油炸等，對其異構化程度及抗氧化活性的影響，以作為國人飲食指標。

五、類胡蘿蔔素的分析與鑑定

進行蔬菜中類胡蘿蔔素含量分析，首先最重要的是如何萃取植物中的類胡蘿蔔素，為了使萃取過程中，溶劑能夠滲入植物的親水基質

中，有利極性較大的葉黃素類之萃取，常採用比正己烷極性大的有機溶劑如丙酮、甲醇及乙醇，可單獨或混合使用。其他還包括四氫呋喃(tetrahydrofuran；THF)及石油醚等(顏, 1997)。在萃取過程中通常需要加入鹼性物質如KOH以進行皂化處理，其主要目的是為了要去除葉綠素、脂質或是一些類胡蘿蔔素酯化物等(Hark and Scott, 1995)，可避免之後的分析受到干擾。

此外，在萃取與皂化溶劑中，必須添加一些抗氧化劑如丁基羥基甲氧苯(Butylated hydroxyanisole；BHA)或丁基羥基甲苯(Butylated hydroxytoluene；BHT)，或充填氮氣，以減少類胡蘿蔔素與氧氣接觸，防止類胡蘿蔔素發生氧化以有效提高回收率。Chen and Yang (1992)實驗證實氮氣及抗氧化劑如BHT的加入，可提高胡蘿蔔素及葉黃素的測定值，分別為2 - 4%及19 - 30%。且傳統皂化過程，在皂化後為了將類胡蘿蔔素與葉綠素分離開來，需要使用大量有機溶劑和去離子水反覆進行分離，時間冗長，增加類胡蘿蔔素暴露於光線及空氣中的機會，因而導致氧化、裂解及異構化等反應的發生，因而造成樣品中類胡蘿蔔素含量被低估，於是Granado et al. (2001)進一步將皂化步驟改良，使皂化分離時間縮短，Larsen and Christensen (2005)則利用鹼性樹脂Ambersep 900代替KOH進行皂化，反應機制如圖六所示，葉綠素會先被鹼性樹脂Ambersep 900 OH水解去除植醇(phytol)，變成游離態再直接吸附在Ambersep 900 OH上，以達到去除葉綠素的效果，不用添加大量有機溶劑重複進行分離步驟，大大縮短分離時間及有機溶劑使用量。以上各位學者都是為了避免於萃取及皂化過程中，因類胡蘿蔔素的損失而低估了蔬菜中類胡蘿蔔素含量。HPLC在目前層析(chromatography)分析技術裡最常被廣泛使用，因為靈敏度高，能準確的定量，適用於分離非揮發性或熱不安定的物質，層析管柱內充填物幾乎都是以矽膠為基質的衍生物，以充填物屬極性或非極性，可區分為正相(normal-phase)及逆相(reversed-phase)管柱。類胡蘿蔔素的分



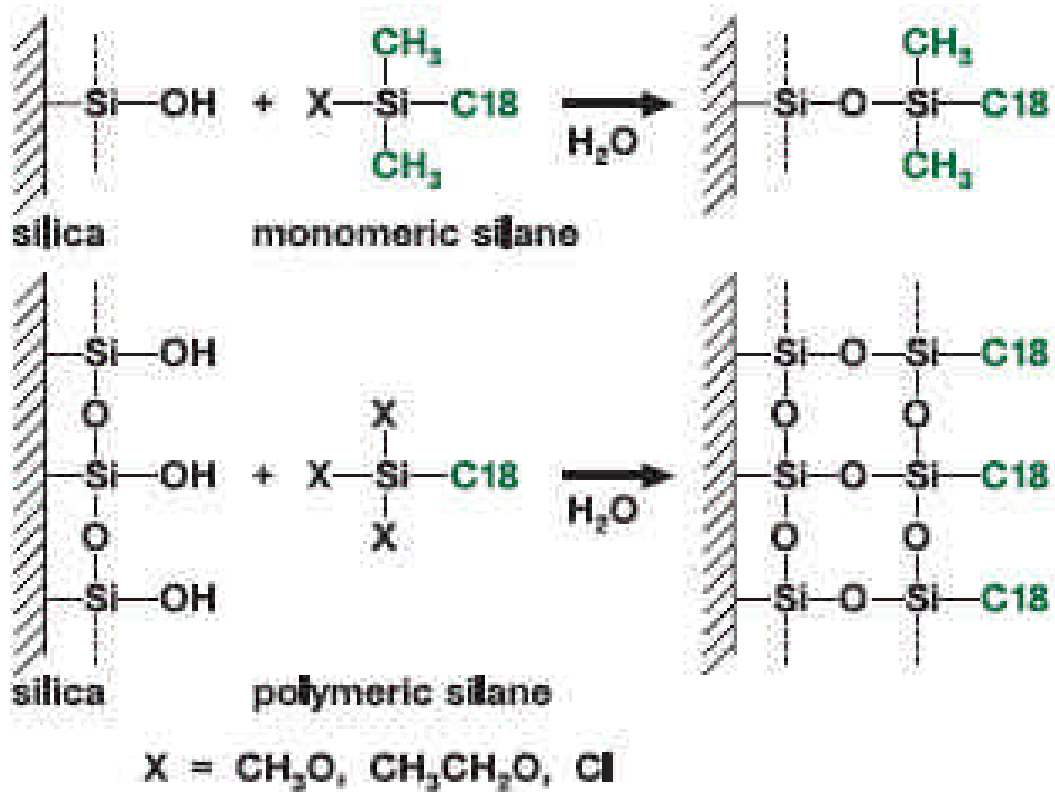
圖六、葉綠素與強鹼性樹脂 Ambersep 900 OH 之間的反應機制

Figure 6. The most likely reaction between chlorophylls and the strong basic resin Ambersep 900 OH, which is composed of a quaternary amine tyrene-divinylbenzene copolymer of the OH form.

(Larsen and Christensen, 2005)

析大都採用逆相碳 18 管柱 (reversed-phase C_{18} column), 依其固定相結構可分為聚合碳 18 管柱 (polymeric C_{18} column) 及單體碳 18 管柱 (monomeric C_{18} column) 如圖七 (Sander et al., 1994), 其中聚合碳 18 管柱分離極性相近或異構物效果比一般單體碳 18 管柱更佳。但類胡蘿蔔素包括非極性胡蘿蔔素 (carotenes) 及極性葉黃素類 (xanthophylls), 再加上立體異構物 (stereoisomers), 種類非常繁多, 而碳 18 管柱只能分析出大部分類胡蘿蔔素的全反式異構物, 於是發展出碳 30 管柱 (C_{30} column), 專門用於植物組織中色素的分析, 可廣泛用於測定極性和非極性類胡蘿蔔素及其順/反異構物。Sander et al. (1994) 比較單聚合碳 18、聚合物碳 18 及聚合物碳 30 管柱對類胡蘿蔔素及其順/反式異構物的分離效果; 結果顯示, 使用碳 30 層析管柱所分離出的類胡蘿蔔素之幾何異構物較其他兩者佳, 且極性類胡蘿蔔素包括葉黃素類及 β -胡蘿蔔素順反異構物均可清楚地區分出來如圖八所示, 但碳 30 管柱的缺點為滯留時間較長。之後又發展出結合 HPLC-MS (mass spectrometry) 及 HPLC-NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) 快速分離與鑑定方法 (Dachtler et al., 2001)。

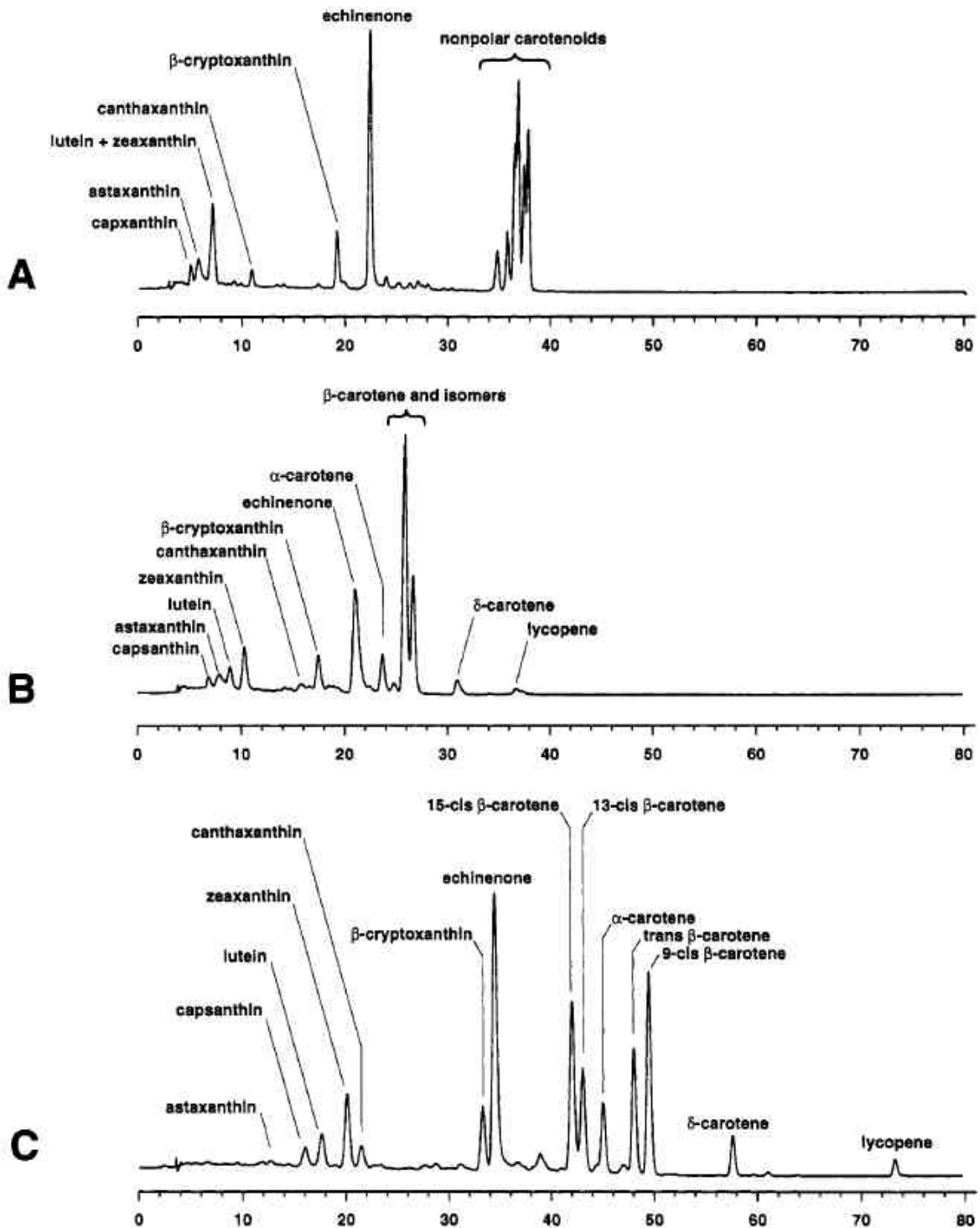
類胡蘿蔔素的鑑定一般是經由比對標準物質與未知物質在 HPLC 圖譜中的滯留時間及吸收光譜來判定, 可是類胡蘿蔔素的順式異構物種類眾多, 且在許多物化性質上與全反式異構物不同, 例如其顏色飽和度或明亮度較低, 熔點較低、吸光係數較小, 且吸收光譜在靠近紫外光區的部分約波長 330-350 nm 的位置會產生一個新的吸收波峰 (陳, 2000), 由於類胡蘿蔔素的順式異構物標準物質不易購得, 再加上種類眾多, 造成鑑定上的困難。近幾年發展出來的 HPLC 結合光電二極體陣列偵測器 (photodiode-array detector), 可利用其對層析圖的每個波峰作快速掃描分析, 可得到紫外光區吸收波峰與可見光區的最大和次要吸收波峰, 例如 all-trans zeaxanthin 的最大吸收波長是 450 nm, 另外在 478 nm 下也有一個吸收波峰, 而其順式異構物如 13-cis zeaxanthin 與 all-trans



圖七、單體及聚合碳18固定相之化學結構

Figure 7. Chemical structures of monomeric and polymeric C₁₈ stationary phases.

(Sander et al., 1994)



圖八、類胡蘿蔔素標準品在單聚合碳18、聚合物碳18及聚合物碳30管柱的層析分析圖

Figure 8. Separation of carotenoid standards on (A) monomeric C_{18} columns, (B) polymeric C_{18} columns, (C) polymeric C_{30} "carotenoid column". Separation conditions were as follows: 81: 15: 4 to 6: 90: 4 methanol / methyl-*tert*-butyl ether (MTBE) / water over 90 min; 1 mL/min; 20°C.

(Sander et al., 1994)

zeaxanthin 相比吸收波峰會下降 6-8 nm，最大吸收波長是 444 nm，次要吸收波峰是 470 nm，且靠近紫外光區約 338 nm 的位置會出現一個吸收波峰，這些資料可以初步鑑定類胡蘿蔔素的順反異構物如表二 (Updike and Schwartz, 2003)，此法只可作為暫時性的鑑定，若要進一步確認這些順式異構物，則需要收集更多量異構物再以核磁共振光譜儀 (NMR) 鑑定比對之。

六、抗氧化活性評估

抗氧化機制，依其抗氧化特性不同，主要有下列三種：

(一) 終止自由基連鎖反應

自氧化作用 (autoxidation)，為食品所含脂質於室溫下與空氣中的氧結合，初期產生氫過氧化物 (hydroperoxide)，然後再分解成醛類、酮類及低級脂肪酸等，此為油脂酸敗的原因，其反應機制以 Farmer et al. (1942) 所提出之自由基連鎖反應理論 (free radical chain reaction theory) 為主，分為 3 個基本階段：起始期 (initiation)、連鎖期 (propagation)、及終止期 (termination)。

起始期，不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acid; RH) 受到單重態氧、金屬、光、熱或自由基等高能量物質攻擊，脫去氫形成脂肪酸自由基 (fatty acid radical; R[•]) 其反應如下，此步驟通常非常緩慢，是自氧化速率的決定步驟。



脂肪酸自由基在連鎖期過程中與氧反應形成過氧化自由基 (peroxyl radical; ROO[•])，過氧化自由基再去攻擊其他不飽和脂肪酸，產生新的脂肪酸自由基與脂肪酸氫過氧化物 (fatty acid hydroperoxides; ROOH)，直至所有不飽和脂肪酸變成自由基。

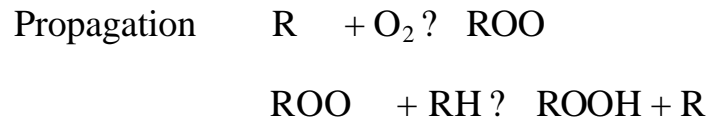
表二、類胡蘿蔔素幾何異構物的最大吸收波長及分子量

Table 2. Electronic absorption maxima and molecular weight of the geometrical isomers

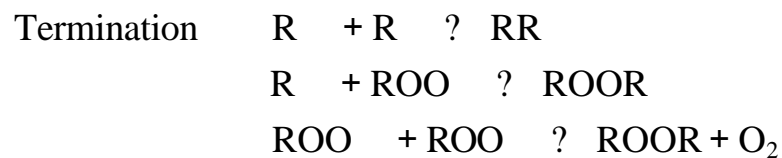
isomer	absorption maxima ^a (nm)	molecular mass (<i>m/z</i>)
all-trans lutein	331, (444), 473	568
13-cis + 13'-cis lutein	330, (439), 466	568
9-cis lutein	330, (440), 467	568
9'-cis lutein	330, (440), 468	568
all-trans zeaxanthin	(450), 478	568
13-cis zeaxanthin	338, (444), 470	568
9-cis zeaxanthin	338, (445), 472	

^a Measured in the LC mobile phase [methanol–MTBE (85:15)] using a photodiode array detector. Values in parentheses represent the main absorption maxima.

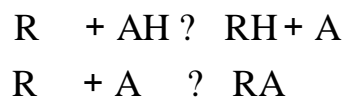
(Updike and Schwartz, 2003)



終止期，自由基相互結合產生非自由基產物而使反應終止，其反應如下所示。自氧化連鎖反應產生的氫過氧化物於熱力學上是非常不穩定，在此時期容易裂解形成醛、酮、醇、酸、環氧化物及碳氫化合物等低分子物質或聚合成二聚物 (dimer)、三聚物 (trimer)或多聚物 (polymer)等高分子物質。



一般酚型抗氧化劑 (antioxidant ; AH)為氫原子供應者或自由基接受者，其可能作用機制如下：

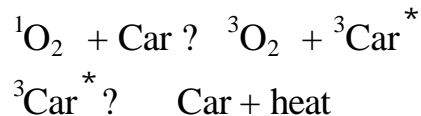


抗氧化劑 (AH)與自由基 (R)作用，會產生穩定化合物 (RH)，自身生成的自由基 (A)再與其他自由基結合成穩定化合物 (RA)，終止自由基之連鎖反應，抑制自氧化反應的進行。

天然物質中的酚類化合物多具有苯酚基 (phenolic hydroxyl group) 的結構，能夠做氫原子供應者，提供一個電子給自由基，而本身成為另一個自由基結構，此不成對電子在結構中會轉移而穩定在苯環的共振結構上 (Labuza, 1971)，類胡蘿蔔素因具有長鏈共軛雙鍵結構，可以和自由基作用，形成穩定共振結構，來避免脂質自氧化的發生 (Burton and Ingold, 1984)。人工合成抗氧化劑如 BHA、BHT 也有類似酚的共振結構。

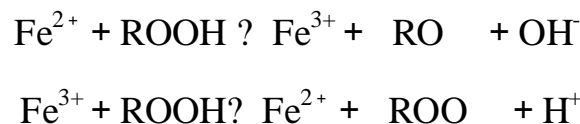
(二) 抑制單重態氧

光氧化作用 (photosensitized oxidation), 由於食品中的一些光增感劑 (photosensitiser) 如葉綠素及核黃素等吸收光能, 會從基態 (ground state) 轉變為激發態 (excited state), 而激發態的光增感劑會將安定的基態三重態氧 (triplet oxygen; $^3\text{O}_2$) 轉變為激發態的單重態氧 ($^1\text{O}_2$), 本身恢復基態。能量高且反應活性強的單重態氧, 極易與不飽和脂肪酸上的雙鍵反應, 可不經由脫氫作用便可促使脂質氧化, 所以光氧化速率較自氧化快。類胡蘿蔔素的長鏈共軛雙鍵使其具有高清除單重態氧的能力, 共軛雙鍵的數目會影響了它們清除能力。Bando et al. (2004) 發現了類胡蘿蔔素中的 β -胡蘿蔔素 (Car), 可藉由釋放激發態的能量, 將單重態氧 ($^1\text{O}_2$) 轉變為三重態氧 ($^3\text{O}_2$), 其可能反應如下:



(三) 螯合金屬離子

這類抗氧化劑本身不具備抗氧化的功能, 但能與促氧化物質如鐵、銅等二價金屬離子結合而抑制脂質的自氧化反應, 反應如下, 而利用例如檸檬酸 (citric acid) 或 EDTA 能螯合金屬離子, 減緩自由基的形成與氫过氧化物的分解, 達到抗氧化的目的。



以上是主要的抗氧化機制, 而具有抗氧化效果的天然物質因為成分複雜, 同時具有多種抗氧化機制, 例如 β -胡蘿蔔素除了可以吸收能量讓激發態的單重態氧轉變為三重態氧之外, 在甲基亞麻油酸 (methyl linoleate) 系統中亦可避免自氧化反應發生 (Burton, 1989)。

所以評估加工過程對蔬菜中抗氧化物質的影響時，不應只採用一種抗氧化分析方法來評估，因此本實驗會比較三種抗氧化分析方法，包括 Trolox 當量抗氧化活性測定 (trolox equivalent antioxidant capacity ; TEAC) , 抑制脂質過氧化物形成能力及螯合亞鐵離子能力之測定，來評估加工對蔬菜之抗氧化性及抗氧化機制為何。

參、材料與方法

一、實驗材料

(一) 實驗樣品

新鮮蔬菜購自台中市西屯區傳統市場，包括黃秋葵、韭菜、山蘇、龍鬚菜、油菜、青江菜、皇宮菜(又名落葵)、小白菜、芥藍、高麗菜、青花菜、青椒、茼蒿、香菜(又名芫荽)、過貓、金針花(青色未成熟)、金針花(黃色成熟)、空心菜、地瓜葉、萵苣(又名A菜)、大陸妹、川七、九層塔、菠菜與玉米，以上各種蔬菜學名和英文名稱見表三。

(二) 類胡蘿蔔素標準品及內標準品

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。內標準品 β -apo-8'-carotenal 純度 96% 以上，購自 Fluka 公司。

(三) 試藥

1. 類胡蘿蔔素含量分析所需試藥

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。

2. 抗氧化分析所需試藥

(1) 總酚類化合物含量測定 (Total phenolic compounds ; TPC)

HPLC 級 gallic acid 純度 98% 以上，購自 Fluka 公司。Folin-Ciocalteu's phenol reagent 購自 Fluka 公司。分析級 sodium carbonate (Na_2CO_3) 純度 99.8%，購自 Riedel-de Haën 公司。

表三、台灣省產蔬菜的學名和英文名稱

Table 3. The name of vegetables in Taiwan

植 物 學 名	英 名	中 文 名
<i>Abelmoschus esculentus</i> L.Moench	Okura, okra	黃秋葵
<i>Allium tuberosum</i> Rottl. Ex K. Sprengel	Chinese chive, leek	? 菜
<i>Asplenium nidus</i> L.	Nest fern, fern	山蘇
<i>Asparagus schoberioides</i> Kunth	Chaylte vine, gracilaria	龍鬚菜
<i>Brassica campestris</i> L. Japonica group	Rape	油菜
<i>Brassica chinensis</i> L. cv. <i>Ching-Geeng</i>	Ching-geeng, pak choi	青江菜
<i>Basella rubra</i> Linn.	Ceylon spinach	皇宮菜(落葵)
<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i>	Chinese white cabbage	小白菜
<i>Brassica oleracea</i> L. Alboglabra group	Chinese kale	芥藍
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Capitata</i> L.	Cabbage	高麗菜
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Broccoli	青花菜
<i>Capsicum annuum</i> L.	Green pepper	青椒
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	Garland chrysanthemum	茼蒿
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriander, parsly	香菜(芫荽)
<i>Diplazium esculentum</i> (Retz.) Sw	Vegetable fern	過貓
<i>Hemerocallis fulva</i> L.	Day lily	金針花(青)
<i>Ipomoea aquatica</i> Forsk.	Water convolvulus Water spinach	空心菜(蕹菜)
<i>Ipomoea batatas</i> (L.)Lam.	Sweet potato leaf	地瓜葉
<i>Lactuca sativa</i> L.	Garden lettuce	高苣(A 菜)
<i>Lettuce sativa</i> .	Lettuce	大陸妹
<i>Notoginseng radix</i>	Sanchi	川七
<i>Ocimum basilicum</i>	Basil	九層塔
<i>Spinacia oleracea</i> L.	Spinach	菠菜
<i>Zea mays</i> Li.	Corn	玉米

- (2) Trolox 當量抗氧化能力測定(Trolox equivalent antioxidant capacity ; TEAC)

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 % , 以上購自 Sigma 公司。 Hydrogen peroxide solution (H_2O_2) 純度 30 % , 購自 Riedel-de Haën 公司。

- (3) 抑制脂質氫過氧化物形成能力測定(Ferric thiocyanate method)

Linoleic acid 純度 99 % 、 polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20)、 ammonium thiocyanate (NH_4SCN)、 a-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 % , 以上試藥購自 Sigma 公司。 試藥級 Iron(II) chloride tetrahydrate ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) 純度 95 % , 購自林純藥工業株事會社。 分析級 sodium phosphate, monobasic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)純度 99.6 % , 購自 J.T. Baker 公司。

- (4) 螯合亞鐵離子能力之測定(Chelating the ferrous ions)

試藥級 Iron(II) chloride tetrahydrate ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) 純 95 % , 購自林純藥工業株事會。 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。

(四) 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, 分析級 acetone 購自 Fluka 公司。試藥級 hydrochloric acid (HCl) 純度 35 % 以上, 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 5μm

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

(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

美國 Varian 公司 50 Conc 型

(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) 紫外光燈管

日本 SANKYO DENKI 公司型號 GL15

三、實驗方法

(一) 樣品前處理

蔬菜於實驗當天購買，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。

(二) 比較皂化方法對蔬菜中類胡蘿蔔素測定值之影響

1. 傳統皂化方法 (“ Standard ” saponification method)

根據 Updike and Schwartz (2003) 方法。秤取 2 g 新鮮蔬菜，加入 20 mL 丙酮，於室溫下使用均質機避光均質 1 min，以 Whatman No. 42 號濾紙進行過濾且收集濾液。將殘留於濾紙上的殘渣復溶於 20 mL 的丙酮中，重複萃取與過濾的步驟，直至殘渣成為無色為止。將所收集到的濾液與 15 mL 30 % 之 methanolic KOH 溶液混合，之後於室溫下使用磁石避光攪拌 30 分鐘進行皂化，再加入 10 mL hexane: diethyl ether (70: 30, v/v) 溶液充份混合，將此溶液倒入至分液漏斗中，加入去離子水直至分成有機層與水層，收集上層包含類胡蘿蔔素的有機層，反覆以去離子水進行清洗；收集水層反覆以 hexane: diethyl ether (70: 30, v/v) 沖洗，洗至有機層呈無色，收集全部有機層溶液以減壓濃縮機濃縮至乾

後，復溶於甲醇溶劑中並定容至 10 mL，並以 0.2 μm 濾膜 (nylon filter) 進行過濾，濾液進行 HPLC 分析。

2. 快速皂化方法 (“Shortcut” saponification method)

參考 Granado et al. (2001) 方法並作一些修改。秤取 2 g 新鮮蔬菜，加入 20 mL 丙酮，於室溫下使用均質機避光均質 1 min，以 Whatman No. 42 號濾紙進行過濾且收集濾液。將殘留於濾紙上的殘渣復溶於 20 mL 的丙酮中，重複萃取與過濾的步驟，直至殘渣成為無色為止。將所收集到的濾液以減壓濃縮機濃縮至乾後，加入 2 mL 甲醇與 2 mL 40 % (w/v) methanolic KOH 溶劑，以 Vortex Mixer 快速震盪 3 min 進行快速皂化，再加入 4 mL 去離子水與 8 mL hexane/diethyl ether (70: 30 v/v) 之混合溶液，以 Vortex Mixer 快速震盪 30 sec 後於 10000 rpm 下離心 5 min 會分成有機層與水層，收集上層有機層並以減壓濃縮機將其減壓濃縮至乾，復溶於甲醇中並定容至 10 mL，以 0.2 μm 濾膜 (nylon filter) 進行過濾，濾液進行 HPLC 分析。

3. 樹脂皂化方法 (“Resin” saponification method)

參考 Larsen and Christensen (2005) 方法。秤取 2 g 新鮮蔬菜，加入 20 mL 冰丙酮，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，直至殘渣變成無色。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 0.2 μm 濾膜 (nylon filter) 進行過濾，濾液進行 HPLC 分析。

(三) HPLC 沖提條件之比較

本實驗使用單一和梯度沖提系統，配合逆相 C₃₀ 管柱，選擇最適當層析系統。

1. 單一沖提系統 (Updike and Schwatz, 2003)

固定相為逆相 C₃₀ 管柱 (4.6mm × 250mm I.D.)，以 MeOH (2 % ammonium acetate, pH 4.6) : MTBE = 85: 15 為單一移動相，流速為每分鐘 1 mL，注射量為 10 μL，以 photodiode -array 偵測器在 190-800 nm 波長下進行掃描分析。

2. 梯度沖提系統

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 190-800 nm 波長下進行分析。

(四) 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：

因為類胡蘿蔔素異構物沒有標準品，所以將 all-trans lutein、zeaxanthin 及 β-carotene 標準品，溶於氯仿 (chloroform)，配成濃度 150 μg/mL，個別置於紫外光燈下照射 0、1、3、5、10、20 min 後，取 10 μL 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 all-trans lutein、zeaxanthin 及 β-carotene 標準品之 HPLC 分析結果做比對，且參考 (Updike and Schwatz, 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 × 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 all-trans lutein, zeaxanthin 及 β -carotene 可以直接與標準品的滯留時間及吸收光譜做比對來鑑定之，而 lutein, zeaxanthin 及 β -carotene 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。

(五) 類胡蘿蔔素及其異構物的定量

1. 標準曲線製作

將類胡蘿蔔素標準品溶於氯仿 (chloroform)，配成 all-trans lutein 濃度 1、5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，all-trans zeaxanthin 為 0.04、0.4、2、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，及 all-trans β -carotene 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，相對類胡蘿蔔素濃度為縱軸，可得各標準曲線之回歸方程式與相關係數 (correlation coefficient, R^2)。

2. 萃取回收率之測定

參考 Khachik et al. (1992) 的做法，蔬菜在進行萃取步驟前，先行添加已知濃度的內標準品 β -apo-8'-carotenal 再進行萃取皂化，得到的萃出液在偵測波長 450 nm 下，以 HPLC 將萃出液中的 β -apo-8'-carotenal 作定量，並除於萃取前之 β -apo-8'-carotenal 的已知濃度，即可算出內標準品之回收率。

3. 類胡蘿蔔素順/反異構物的定量

樣品萃取液中的 all-trans lutein, zeaxanthin 及 β -carotene 的含量，是各自依其標準曲線之回歸方程式，計算出萃取液中 all-trans lutein, zeaxanthin 及 β -carotene 的含量。而 all-trans lutein, zeaxanthin 及 β -carotene 與其個別之順式異構物之吸光係數相似，故 lutein 順式異構物的含量是根據 all-trans lutein 之標準曲線來定量，以 all-trans lutein 當量來表示，zeaxanthin 及 β -carotene 順式異構物的定量方式也與上述方法相同，各以 all-trans zeaxanthin 及 β -carotene 當量來表示，最後再除上回收率，即為蔬菜中類胡蘿蔔素順/反式異構物之實際含量。

(六) BHT 添加濃度對蔬菜中的類胡蘿蔔素測定值之影響

為降低萃取及皂化過程中，因氧化作用而導致 lutein, zeaxanthin 及 β -carotene 含量的損失 (Chen and Yang 1992)，所以秤取 2 g 新鮮蔬菜如地瓜葉以鹼性樹酯皂化法進行萃取與皂化，過程中，萃取與皂化之溶劑中皆會添加不同濃度的 BHT，分別是 0.01、0.1、0.5 與 1%，最後以梯度沖提系統在偵測波長 450 nm 下，進行 HPLC 分析，比較類胡蘿蔔素測定值最多者，即為最佳 BHT 添加濃度。

(七) 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 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：

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

(八) 加工對蔬菜中類胡蘿蔔素含量之影響

1. 不同加工方法

精秤 5 g 同批蔬菜進行 3 種不同加工方法, (1)水煮 (boiled), 秤取 5 g 蔬菜放入 200 mL 的 100 沸水中, 水煮 1 min; (2)油炒 (stir-fried), 取 1 c.c.大豆沙拉油放入炒鍋中加熱至 160 – 180 , 再放入 5 g 蔬菜快炒 1 min; (3)油炸 (deep - fried), 取 5 g 蔬菜放入 200 mL 的 190 - 200 大豆沙拉油中, 油炸 2 sec。

2. 不同水煮時間

精秤 5 g 同批蔬菜, 放入 200 mL 的 100 沸水中, 各別水煮 0、1、5、10、20、30 min。

5 g 蔬菜經過以上加工過程後, 將加工後的蔬菜以上述鹼性樹酯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 all-trans lutein, zeaxanthin 及 β -carotene 標準曲線之回歸方程式, 計算出加工後的蔬菜中之類胡蘿蔔素的順/反異構物含量。

(九) 加工對蔬菜的抗氧化活性之影響

1. 樣品製備

精秤 5 g 同批蔬菜, 放入 200 mL 的 100 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, 重復均質與離心的步驟, 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, 此為該蔬菜之乙醇

萃取物，儲存於-20 °C 下備用。

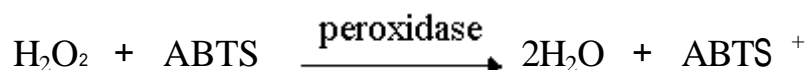
2. 抗氧化成分分析

除了將蔬菜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，其方法是將蔬菜之乙醇萃取物及不同濃度的 gallic acid 如 31.25、62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 各取 50 μL ，加 1 mL 去離子水及 0.5 mL 100 % Folin-Ciocalteu'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多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，以每克蔬菜之 gallic acid equivalent 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

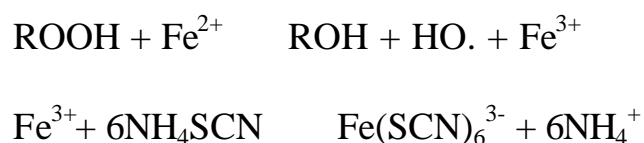
本實驗原理是當混合 ABTS、peroxidase 及 H_2O_2 時會產生陽離子之自由基 ABTS^+ ，其反應如下。 ABTS^+ 為一相當穩定藍綠色物質，於波長 734 nm 有吸收波峰。抗氧化劑的加入會抑制此顏色的產生，因此吸光值愈低，該抗氧化劑的抗氧化效果愈佳 (Miller et al.,1993)。本研究中以 Trolox 為評估抗氧化能力的標準，計算樣品的自由基清除能力相當於多少 μg Trolox 之清除能力，此即為樣品的 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)。Trolox 是一種結構類似維他命 E 的水溶性抗氧化劑，許多研究皆已證實其具有良好之抗氧化力，因此常被作為評估未知樣品的抗氧化力標準時之依據。



參考 Miller et al. (1993) 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 蔬菜之乙醇萃取物或不同濃度 trolox 標準品 (5、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$)，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，計算樣品中之 TEAC 值，以每克蔬菜之 trolox equivalent 微毫克數表示。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 Mitsuda et al. (1996) 方法，將未稀釋及稀釋 50 倍的蔬菜之乙醇萃取物及分別配製成濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 BHT、ascorbic acid 及 α -tocopherol 的乙醇溶液各取 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 $^\circ\text{C}$ 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 () 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 恆溫培養箱時間越長, 脂質氧化程度就越高, 氫過氧化物之生成量亦越多, 呈色也跟著加深。不過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, 吸光值亦越低, 表示加入抗氧化劑之抗氧化力越強, 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, Fe^{2+} 是最具影響力的助氧化劑, 利用 Fe^{2+} 與 ferrozine 的複合物在 562 nm 之呈色反應, 反應如下, 可測得樣品對 Fe^{2+} 離子的螯合能力。當樣品螯合 Fe^{2+} 離子時, 會造成 562 nm 吸光值的降低。



參考 Dinis et al. (1994) 方法，將各蔬菜之乙醇萃取物或 50 與 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EDTA 各 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。

四、 統計分析

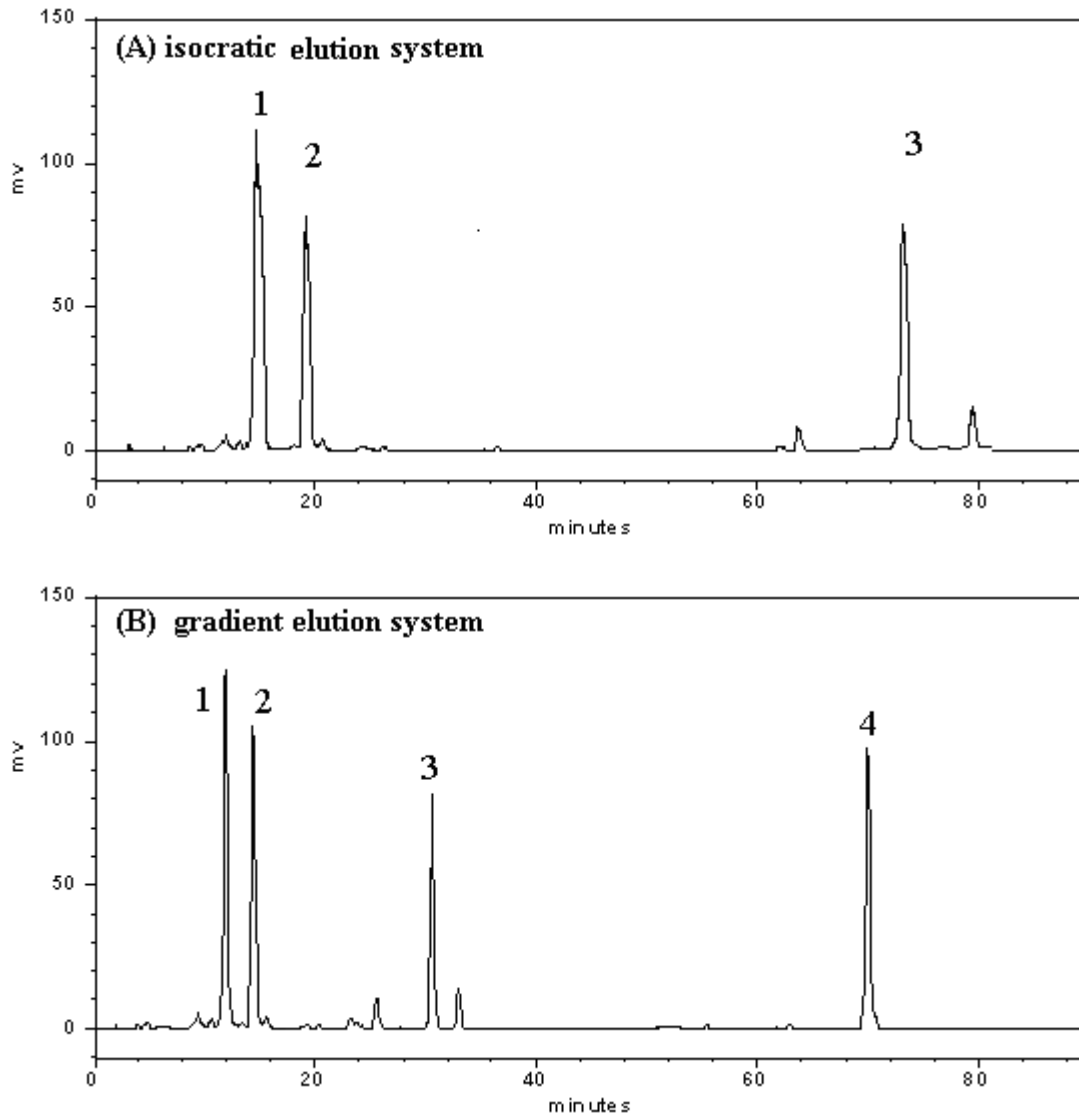
以上實驗均進行三重複試驗，以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示，以 SAS (Statistical Analysis System) 8.0 軟體系統進行統計分析，再以鄧式多變域測驗法 (Duncan's multiple range test) 比較各因子之差異程度，顯著差異水準為 0.05。

肆、結果與討論

一、類胡蘿蔔素 HPLC 分析方法之建立

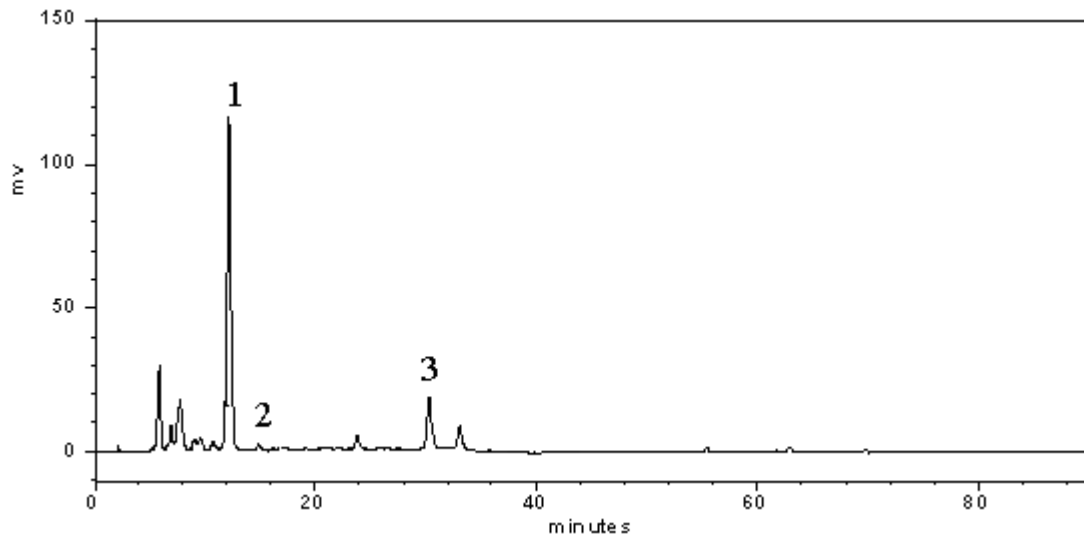
(一) HPLC 沖提系統之比較

適當的層析系統除了可以有好的分離效果，又可節省分析時間，所以本研究中首先探討單一沖提系統 (isocratic elution system) 與梯度沖提系統 (gradient elution system)，搭配 C₃₀ 管柱時對 lutein, zeaxanthin、 β -carotene 及 lycopene 4 種類胡蘿蔔素之分離效果。將 4 種標準品溶於氯仿中，分別以單一及梯度兩種沖提系統分析 4 種標準品之滯留時間與分離效果 (圖九)，結果顯示在梯度沖提系統下，lutein、zeaxanthin、 β -carotene 及 lycopene 之滯留時間分別為 12.7、14.8、30.7 與 70.2 min (圖九 B)，於單一沖提系統下，只有 lutein、zeaxanthin 及 β -carotene 出現於 HPLC 的分析圖譜中，滯留時間分別為 14.3、19.5 與 74.3 min，而 lycopene 則至 90 min 止仍未出現 (圖九 A)，因此本研究決定以梯度沖提系統做為 HPLC 之分析條件。此外，本研究主要是以綠色蔬菜為主，在過去的文獻中顯示，於青花菜、菠菜、萵苣及青椒等綠色蔬菜中，其 lycopene 含量極少或是幾乎不存在 (Hart and Scott, 1995 ; Larsen and Christensen, 2005)。於本研究中亦發現，當以 HPLC 配合梯度沖提系統下，分析地瓜葉、菠菜與青花菜中之類胡蘿蔔素含量時，同樣沒有偵測到 lycopene 的存在。以圖十之實驗為例；於地瓜葉之類胡蘿蔔素萃取液之 HPLC 層析圖譜中，自 45 min 以後，即沒有任何吸收波峰的存在，此說明；萃取液中並沒有 lycopene 的存在。因此於之後的實驗中，將 HPLC 分析的分析時間縮短至 45 min，以節省分析時間及溶劑成本。



圖九、 在(A)單一沖提系統或(B)梯度沖提系統下之類胡蘿蔔素標準品 HPLC 層析圖 (偵測波長：450 nm)

Figure 9.HPLC chromatogram of standard carotenoids under an (A) isocratic elution system or (B) gradient elution system (detection wavelength : 450 nm). Peaks : (1) lutein, (2) zeaxanthin, (3) β -carotene, (4) lycopene.



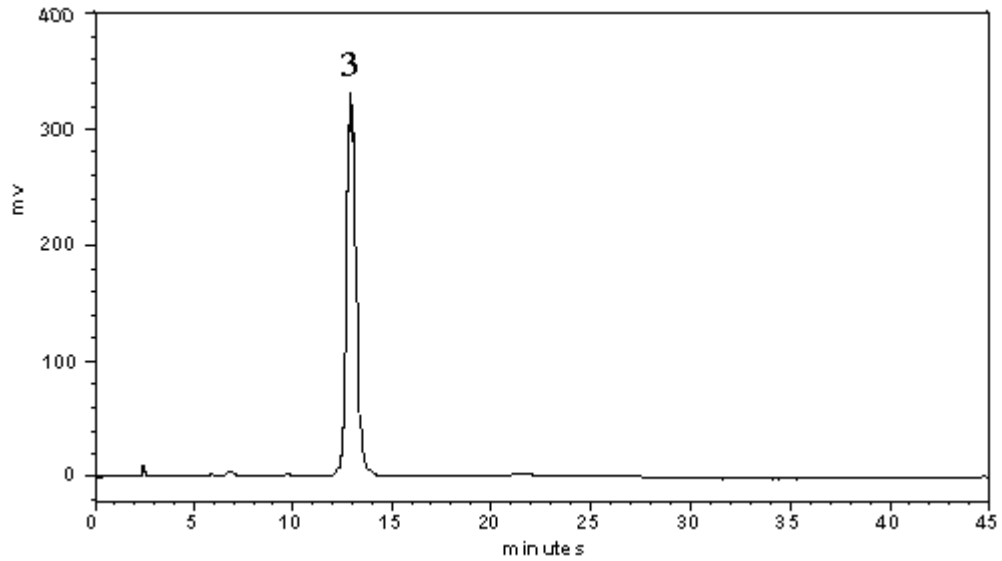
圖十、在梯度沖提系統下地瓜葉萃出液之類胡蘿蔔素 HPLC 層析圖
(偵測波長：450 nm)

Figure 10. HPLC chromatogram of carotenoids in extract obtained from sweet potato leaf under a gradient elution system (detection wavelength : 450 nm). Peaks: (1) lutein, (2) zeaxanthin, (3) β -carotene.

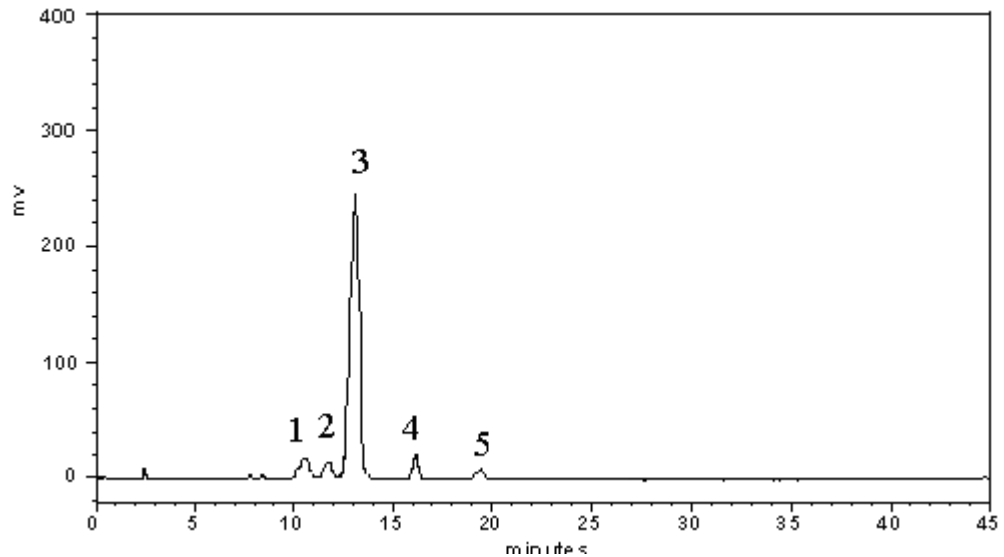
(二) 類胡蘿蔔素及其異構物之初步鑑定

全反式(all-trans) lutein、zeaxanthin 及 β -carotene 的鑑定是比對標準品與樣品的滯留時間及吸收光譜來決定，但類胡蘿蔔素之順式異構物種類眾多，且順式異構物的標準品不易購得，於是將全反式 lutein、zeaxanthin 及 β -carotene 置於紫外光下，經照射後因發生異構化反應而產生其順式異構物。由於照射時間長短會影響順式異構物的生成數量及濃度，因此選擇產生數量最多且濃度最高之照射時間，結果顯示全反式 lutein、zeaxanthin 及 β -carotene 的最適照射時間分別為 3、3 及 5 min。圖十一、十二、十三分別為全反式 lutein, zeaxanthin 及 β -carotene 經紫外光異構化前後的 HPLC 層析圖；從圖中發現全反式 lutein 與其他兩種類胡蘿蔔素相比，擁有較多的順式異構物，根據 Updike and Schwartz (2003) 指出 lutein 在結構上是屬於不對稱的，所以會比結構對稱的 zeaxanthin 擁有較多的順式異構物。在順式異構物的鑑定方面，Goodwin (1981) 將類胡蘿蔔素之順式異構物以光電二極體陣列光譜偵測器(photodiode-array detector) 做掃描分析，結果發現順式異構物的吸收光譜會向較短的波長移動，亦即波長會降低約 4 nm，即所謂淺色偏移 (hypsochromic shift)，且 13-cis 與 13'-cis 的類胡蘿蔔素之順式異構物在靠近紫外光譜區約 330-340nm 的位置會有一明顯吸收波峰出現，Khachik et al. (1986) 則更進一步證實；類胡蘿蔔素的其他 cis-異構物如 9-cis 與 9'-cis，因為具有立體阻礙效應，所以在 330-340 nm 位置的吸收波峰與 13-cis 及 13'-cis 相比之下，便顯得較不明顯。因此類胡蘿蔔素之順式異構物可以根據上述原則來作暫時性的鑑定。於是本研究將含有 all trans lutein, zeaxanthin 及 β -caroten 的氯仿溶液，在經過上述條件的紫外光照射後，以梯度沖提系統進行所有順/反式異構物之 HPLC 分析，其 HPLC 層析圖如圖十四所示。之後再將圖十一、十二、十三、十四中各波峰以 photodiode-array 偵測器做快速掃描分析，所

(A) Before isomerization



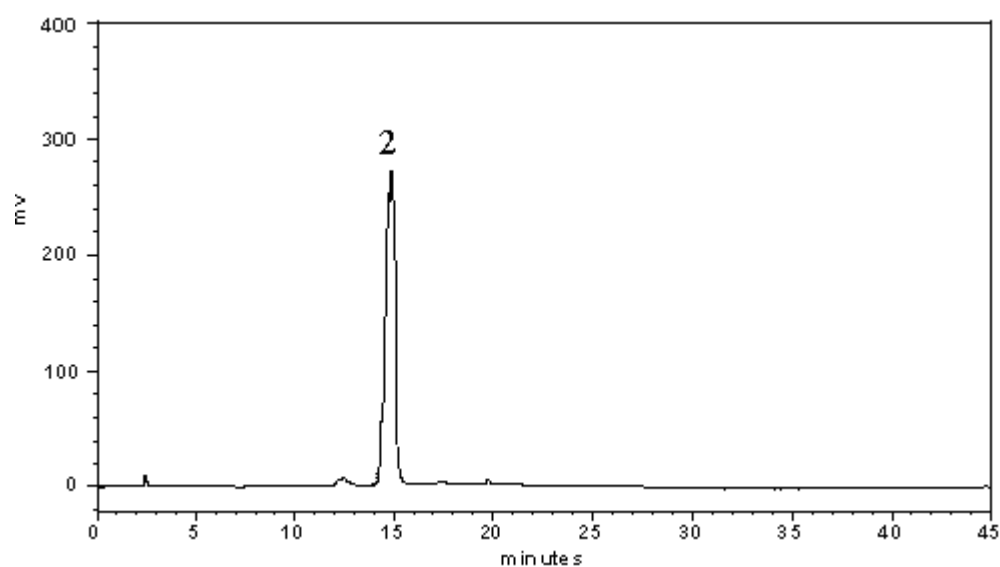
(B) After isomerization



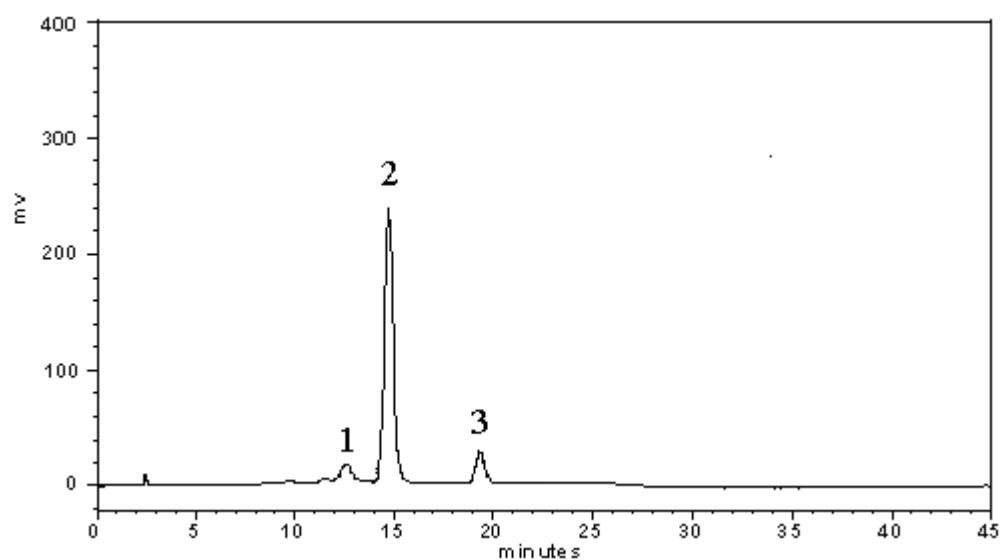
圖十一、全反式葉黃素標準品受紫外光異構化前(A)與異構化後(B)的HPLC 層析圖

Figure 11. HPLC chromatograms of all-trans lutein standard (A) before isomerization and (B) after isomerization with UV light. Peaks: (1) 13-cis lutein, (2) 13'-cis lutein, (3) all-trans lutein, (4) 9-cis lutein, (5) 9'-cis lutein.

(A) Before isomerization



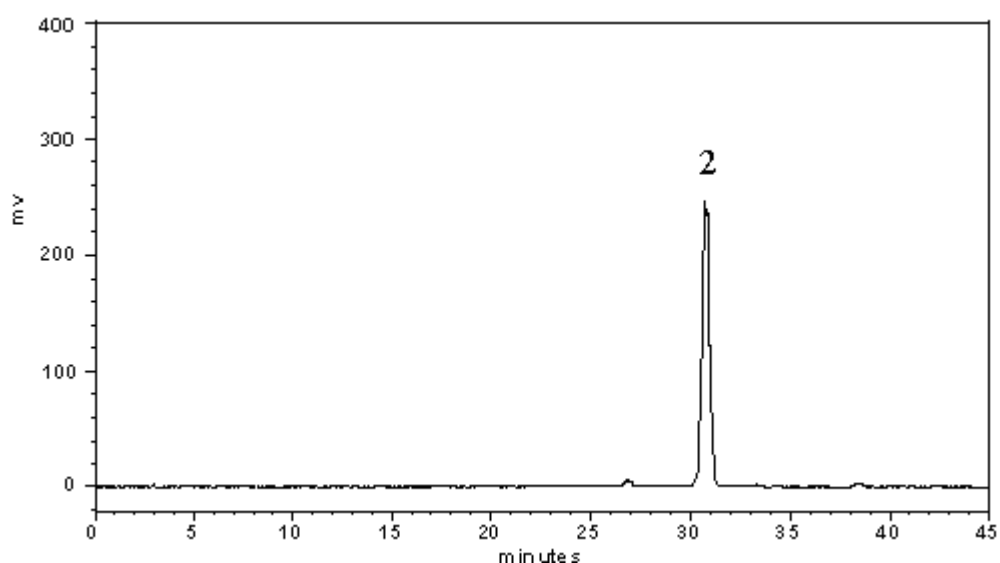
(B) After isomerization



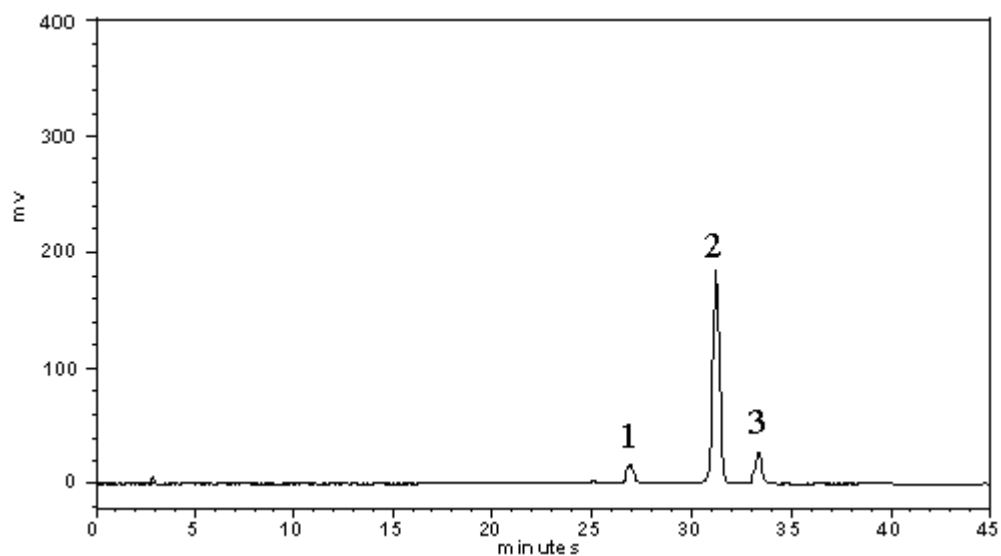
圖十二、全反式玉米黃素標準品受紫外光異構化前(A)異構化後(B)的 HPLC 層析圖 (偵測波長：450 nm)

Figure 12. HPLC chromatogram of all-trans zeaxanthin standard (A) before and (B) after isomerization with UV light (detection wavelength : 450 nm). Peaks: (1) 13-cis zeaxanthin, (2) all-trans zeaxanthin, (3) 9-cis zeaxanthin.

(A) Before isomerization

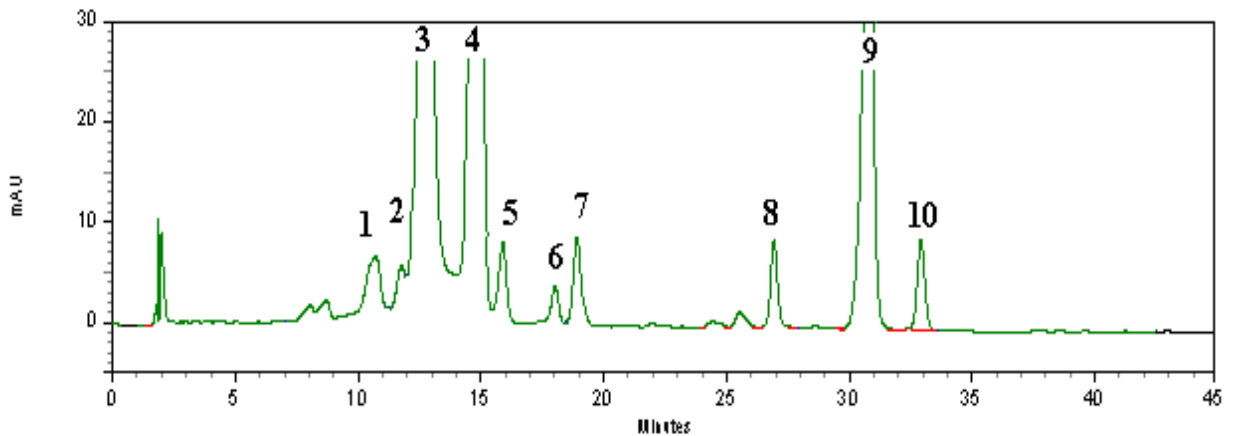


(B) After isomerization



圖十三 全反式 β -胡蘿蔔素標準品受紫外光異構化前(A)異構化後(B)的 HPLC 層析圖 (偵測波長：450 nm)

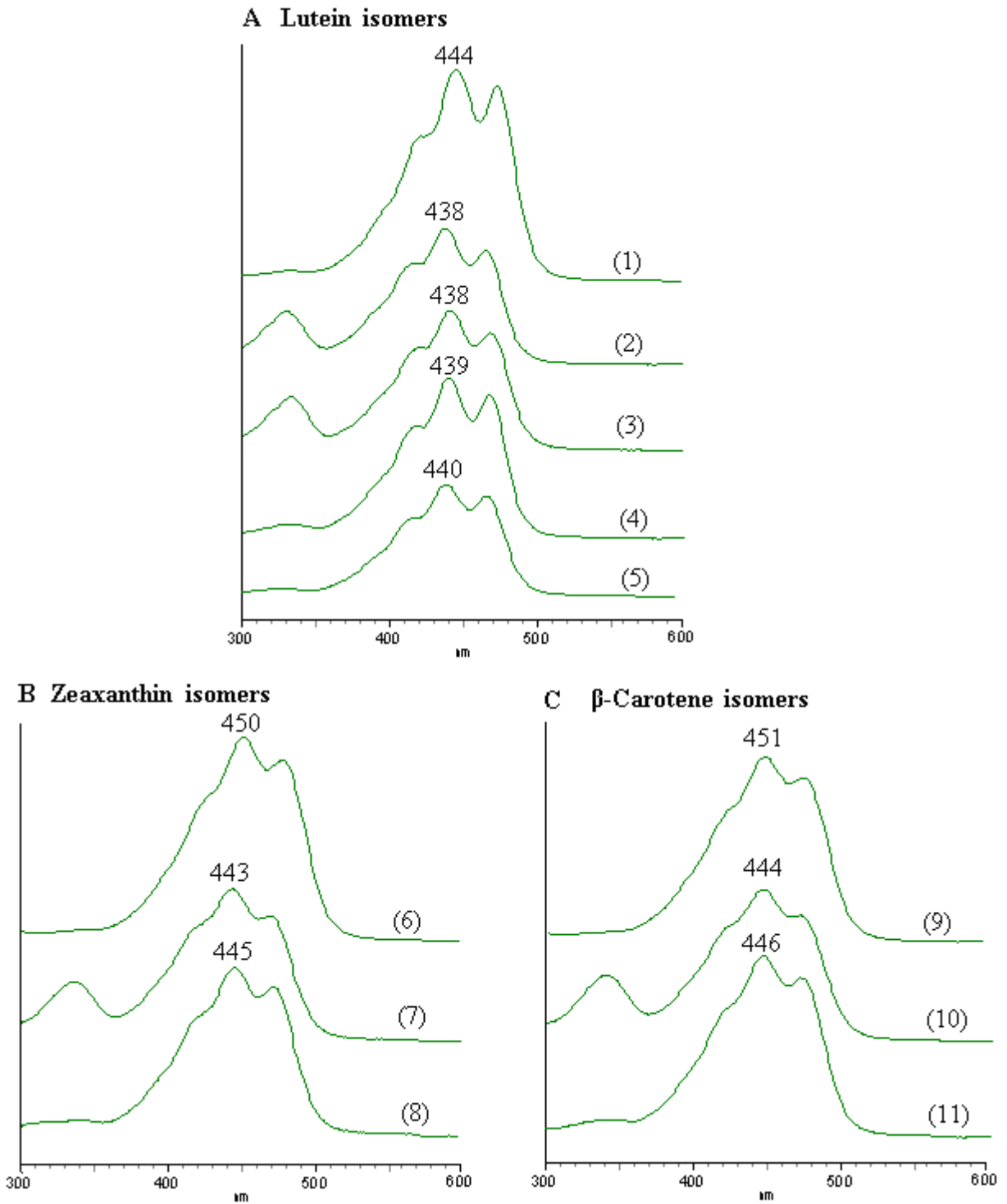
Figure 13. HPLC chromatogram of all-trans β -carotene standard (A) before and (B) after isomerization with UV light (detection wavelength : 450 nm). Peaks: (1) 13-cis β -carotene, (2) all-trans β -carotene, (3) 9-cis β -carotene.



圖十四、在梯度沖提系統下葉黃素、玉米黃素、β-胡蘿蔔素及其順式異構物之 HPLC 層析圖 (偵測波長：450 nm)

Figure 14. HPLC chromatogram of lutein, zeaxanthin, β-carotene and their stereoisomers under a gradient elution system (detection wavelength : 450 nm). Peaks: (1) 13-cis lutein, (2) 13'-cis lutein, (3) all-trans-lutein, (4) all-trans zeaxanthin, (5) 9-cis lutein, (6) 9'-cis lutein, (7) 9-cis zeaxanthin, (8) 13-cis β-carotene, (9) all-trans β-carotene, (10) 9-cis β-carotene.

得到的 lutein、 zeaxanthin 及 β -carotene 各個順/反式異構物的吸收光譜圖，如圖十五所示。根據文獻中的 hypsochromic shift 現象及靠近紫外光譜區出現的吸收波峰，初步鑑定出 lutein 的各順式異構物有；13-cis lutein, 13 β -cis lutein, 9-cis lutein 及 9 β -cis lutein (圖十一(B))；而 zeaxanthin 順式異構物則有 13-cis zeaxanthin 及 9-cis zeaxanthin (圖十二(B))； β -carotene 順式異構物則是 13-cis β -carotene 及 9-cis β -carotene (圖十三(B))。如圖十五所示，all-trans lutein 的最大吸收波長為 444nm，而其 13-cis、13 β -cis、9-cis 及 9 β -cis 順式異構物因為 hypsochromic shift 現象，所以與 all-trans lutein 相比吸收波長降低 4-6 nm，使得 13-cis 及 13 β -cis 順式異構物的最大吸收波長為 438 nm，9-cis 及 9 β -cis 的最大吸收波長為 439nm，且於紫外光區 329-330 nm 處有吸收波峰出現，其中 13-cis、13 β -cis lutein 的吸收波峰又較 9-cis、9 β -cis lutein 明顯(圖十五 A)；all-trans zeaxanthin 的最大吸收波長為 450 nm，13-cis 與 9-cis 順式異構物吸收波長降低 5-7 nm，13-cis 及 9-cis 順式異構物最大吸收波長分別為 443 與 445 nm，於紫外光區 339nm 處有吸收波峰，13-cis 亦較 9-cis zeaxanthin 有明顯的吸收波峰(圖十五 B)；all-trans β -carotene 最大吸收波長 451 nm，13-cis 與 9-cis 順式異構物吸收波長降低 5-7 nm，13-cis 及 9-cis 最大吸收波長分別為 444 與 446 nm，並於紫外光區 337-340 nm 處有吸收波峰，其 13-cis 亦較 9-cis β -carotene 有明顯的吸收波峰 (圖十五 C)。將圖十四中各波峰之滯留時間和吸收光譜與過去文獻做比對後，將對照結果列於表四；雖然不同的溶劑沖提系統可能會有產生些微的差異，但仍可分辨並能比對出各個波峰所代表的異構物，由圖十一(B)、圖十二(B)顯示 13-cis zeaxanthin 與 all-trans lutein 的滯留時間相近，所以當將異構化後之 lutein、zeaxanthin 及 β -carotene 標準品混合後發現，13-cis zeaxanthin 與 all-trans lutein 波峰因相互重疊而導致 13-cis zeaxanthin 波峰消失，如圖十四所示。Dachtler et al. (1998)



圖十五、葉黃素、玉米黃素及 β -胡蘿蔔素之順/反異構物的吸收光譜圖

Figure 15. UV/VIS light absorption spectra of (A) lutein isomers, (B) zeaxanthin isomers, (C) β -carotene isomers. Peaks: (1) all-trans lutein, (2) 13-cis lutein, (3) 13 β -cis lutein, (4) 9-cis lutein, (5) 9 β -cis lutein, (6) all-trans zeaxanthin, (7) 13-cis zeaxanthin, (8) 9-cis zeaxanthin, (9) all-trans β -carotene, (10) 13-cis β -carotene, (11) 9-cis β -carotene.

表四、圖十四中全反式葉黃素、玉米黃素及 β-胡蘿蔔素及其所有順式異構物波峰之光譜初步鑑定結果

Table 4. Tentative identification and chromatographic data for all-trans and cis forms of lutein, zeaxanthin and β-carotene standard in figure 14

Peak no.	Carotenoid	Retention time (min)	λ (nm)(in-line) ¹				λ(nm)(reported)			
			(? _{max}) ²				(? _{max})			
1	13-cis-lutein	10.748	330	417	(438)	465	330	–	(439)	466 ⁴
2	13?-cis-lutein	11.785	330	418	(438)	465	330	–	(439)	466 ⁴
3	all-trans-lutein	12.816	– ³	420	(444)	471	331	–	(444)	473 ⁴
4	all-trans-zeaxanthin	14.896	–	420	(450)	476	–	–	(450)	478 ⁴
5	9-cis-lutein	15.909	329	418	(439)	467	330	–	(440)	467 ⁴
6	9?-cis-lutein	18.040	329	420	(440)	468	330	–	(440)	468 ⁴
7	9-cis-zeaxanthin	18.932	339	418	(445)	471	338	–	(445)	472 ⁴
8	13-cis-β-Carotene	26.955	337	420	(444)	469	–	419	(447)	471 ⁵
9	all-trans-β-Carotene	30.836	–	–	(451)	477	–	429	(453)	477 ⁵
10	9-cis-β-Carotene	32.936	340	420	(446)	471	–	418	(447)	471 ⁵

¹A gradient mobile phase of MeOH: MTBE: H₂O = 81: 15: 4 and MeOH: MTBE = 6: 90 was used.

²Values in parentheses represent the main absorption maxima.

³ “ – ” Data not available

⁴An isocratic mobile phase of MeOH (2% ammonium acetate, pH 4.6): MTBE = 85: 15 was used by Updike and Schwatz (2003).

⁵A gradient mobile phase of methanol (100%) and methylene chloride (100%) was used by Rajendran and Chen (2007).

的文獻中亦發現類似的結果，因而以目前的沖提條件，暫時無法分析 13-cis zeaxanthin 之含量。

二、皂化方法對類胡蘿蔔素測定值之影響

在樣品製備的過程中通常需要進行皂化，主要目的是為了去除葉綠素、脂質並將類胡蘿蔔素的酯化物還原，可避免於類胡蘿蔔素在定量分析時受到干擾 (Hark and Scott 1995)。傳統皂化方法 (“ Standard ” saponification method) 中，是使用 KOH 處理 30分鐘，之後為了將類胡蘿蔔素與葉綠素分離開，必需要使用大量的有機溶劑和去離子水反覆進行類胡蘿蔔素與葉綠素的分離，過程十分冗長。而快速皂化方法 (“ Shortcut ” saponification method) 同樣是以 KOH 進行皂化處理，但時間只要 3 min，之後也只需要少量的有機溶劑進行類胡蘿蔔素與葉綠素的分離，與傳統皂化方法相比，不但縮短皂化時間更大量減少有機溶劑的使用量。樹脂皂化方法 (“ Resin ” saponification method) 是以 Ambersep 900 OH 鹼性樹脂代替 KOH 進行皂化，雖然皂化時間與傳統皂化同樣為 30 min，但皂化後游離態之葉綠素可直接吸附在 Ambersep 900 OH 上，不須再添加大量有機溶劑進行類胡蘿蔔素與葉綠素的分離，顯著縮短反應時間及有機溶劑的使用量。表五是比較傳統、快速及樹脂皂化法對青花菜、菠菜、地瓜葉及芥藍中全反式類胡蘿蔔素含量之測定值的影響。結果顯示三種皂化方法中，以傳統皂化法，所測得之類胡蘿蔔素之測定值是最低 ($p < 0.05$)。在 Chen and Yang (1992) 的研究中已證實；萃取及皂化時間過長會降低芥藍、甜椒、玉米與空心菜中葉黃素的測定值。原因是，皂化過程中，類胡蘿蔔素暴露於光線及氧氣中的時間增加，氧化與裂解等反應的發生機率提高，因而導致樣品中類胡蘿蔔素含量的減少，Granado et al. (2001) 也指出皂化時間、溫度及光線等因素，是導致樣品中類胡蘿蔔素發生變化的主要原因，因此可知樹脂皂化法及快速皂

表五、皂化方法對青花菜、菠菜、地瓜葉及芥藍中類胡蘿蔔素含量測定之影響

Table 5. Effect of saponification methods on determining values of all-trans carotenoids of broccoli, spinach, sweet potato leaf and Chinese kale

Vegetables	Moisture %	Saponification method	All-trans carotenoids ^{1,2}		
			Lutein	Zeaxanthin	β-carotene
Broccoli (青花菜)	88.73	Standard	9.25 ± 0.12 ^c	— ³	2.14 ± 0.08 ^c
		Shortcut	10.24 ± 0.09 ^b	—	6.78 ± 0.52 ^b
		Resin	12.04 ± 0.21 ^a	0.26 ± 0.01 ^a	7.16 ± 0.43 ^a
Spinach (菠菜)	93.56	Standard	30.33 ± 0.63 ^b	2.63 ± 0.04 ^c	9.78 ± 0.11 ^b
		Shortcut	35.11 ± 0.24 ^b	4.46 ± 0.07 ^a	10.22 ± 0.74 ^b
		Resin	41.93 ± 0.32 ^a	4.47 ± 0.06 ^a	13.63 ± 0.82 ^a
Sweet potato leaf (地瓜葉)	89.12	Standard	28.99 ± 0.35 ^c	0.58 ± 0.03 ^a	6.23 ± 0.10 ^b
		Shortcut	38.04 ± 0.32 ^b	0.56 ± 0.13 ^a	5.41 ± 0.22 ^b
		Resin	46.32 ± 0.24 ^a	0.59 ± 0.07 ^a	8.60 ± 0.67 ^a
Chinese kale (芥藍)	92.87	Standard	23.87 ± 0.20 ^c	—	15.74 ± 0.25 ^b
		Shortcut	29.87 ± 0.22 ^b	—	16.11 ± 0.23 ^b
		Resin	33.64 ± 0.18 ^a	—	22.43 ± 0.87 ^a

¹Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of same vegetable are significantly different (p<0.05)

²Concentrations are in micrograms per gram of fresh vegetables tissue.

³ “ — ” Not detectable.

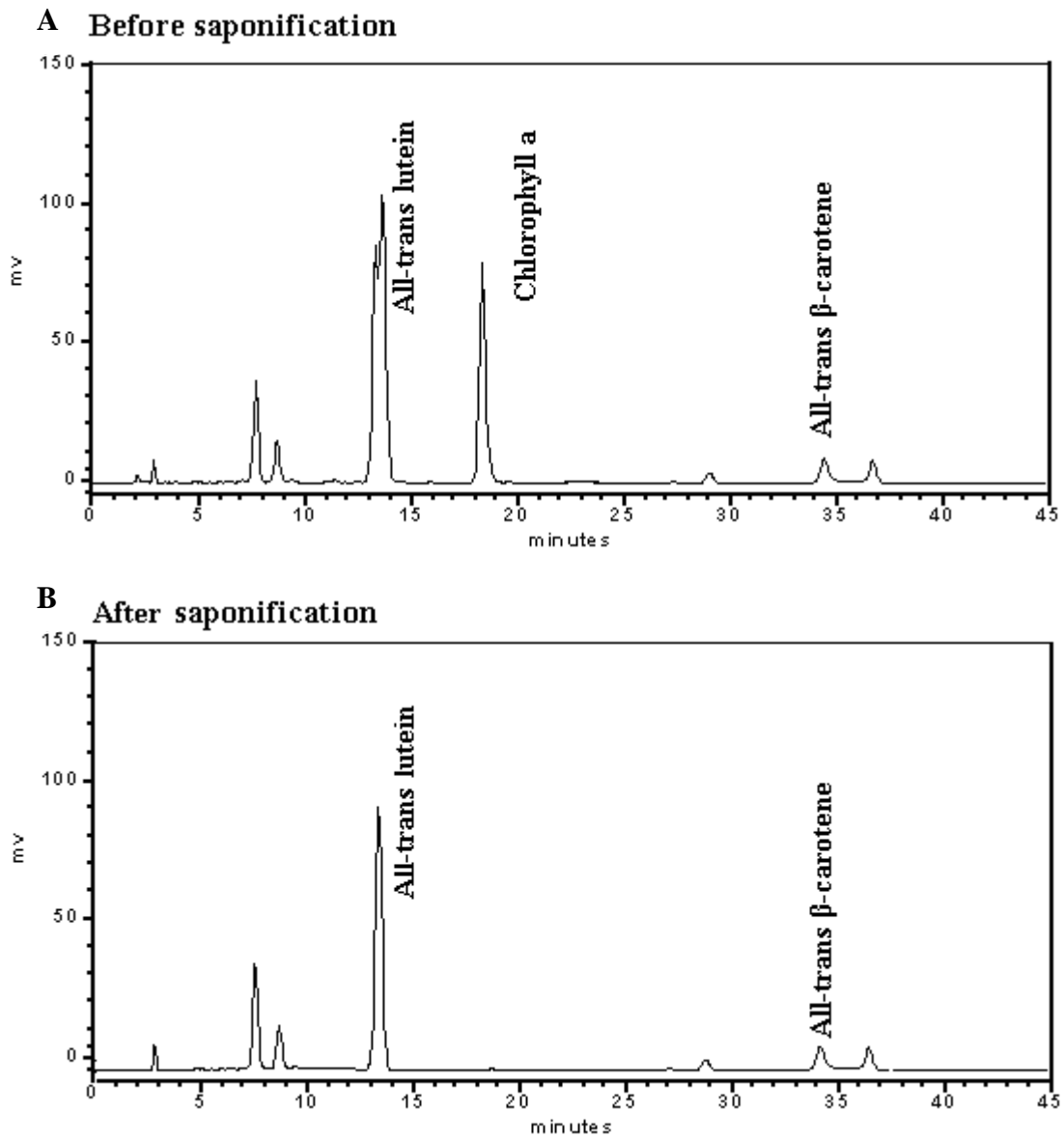
化法都能有效降低類胡蘿蔔素於皂化過程中發生變化的機率。此外，樹酯皂化法中所測定出三種類胡蘿蔔素的含量值亦高於快速皂化法(表五)，此表示樹酯皂化法較快速皂化法更能有效提升類胡蘿蔔素的回收率，因此後續的研究中皆以樹酯皂化法進行樣品的皂化處理。圖十六為以 Ambersep 900 OH 皂化前後之地瓜葉萃取液之HPLC 層析圖；由圖中可進一步證實 Ambersep 900 OH 樹酯，能確實有效清除葉綠素及一些干擾物質；圖十六(A)中，在滯留時間 18.3 min 時出現的波峰應該是chlorophyll a (Larsen and Christensen, 2005)，另外於13.3 min 時亦也出現了會干擾 all-trans lutein的波峰，因此證實；為避免干擾順/反式異構物的定量分析，在分析前樣品之皂化處理是有其必要性的。

三、BHT添加濃度對類胡蘿蔔素測定值之影響

在萃取與皂化過程中，必須添加一些抗氧化劑如BHA或BHT以減少因氧化作用而導致lutein, zeaxanthin及 β -carotene含量的損失，進而有效提高上述類胡蘿蔔素的回收率 (Chen and Yang, 1992)。表六為探討萃取與皂化過程中 BHT的添加濃度對地瓜葉及芥藍菜中全反式類胡蘿蔔素測定值之影響；結果顯示，添加BHT確實能有效提升地瓜葉及芥藍菜中全反式類胡蘿蔔素的測定值，當BHT添加濃度在0 % 至0.1 % (w/v) 之間時，兩種蔬菜中類胡蘿蔔素之測定值皆隨BHT 添加濃度的增加而逐漸上升，當BHT添加濃度為 0.1 % 時，三種類胡蘿蔔素的測定值皆達到最高，之後雖再繼續增加BHT的添加濃度至 1.0 %，地瓜葉中玉米黃素之測定值反有降低趨勢出現，但是芥藍菜之測定值則不隨BHT添加濃度的提高而有顯著的改變由以上結果可看出 BHT 的最適添加濃度為 0.1 % (w/v)。

四、省產蔬菜中全反式類胡蘿蔔素含量調查

以上述之最適類胡蘿蔔素的分析條件，進行省產二十五種蔬菜中全反式類胡蘿蔔素的含量調查，並於分析過程中添加內標準品



圖十六、地瓜葉萃取液於以樹脂(A)皂化前與(B)皂化後之 HPLC 層析圖譜 (偵測波長：450 nm)

Figure 16. HPLC chromatograms of carotenoids extract obtained from fresh sweet potato leaf (A) before saponification (B) and after saponification (detection wavelength : 450 nm).

表六、BHT 添加濃度對地瓜葉和芥藍菜中類胡蘿蔔素測定值之影響

Table 6. The effects of BHT concentration on determining values of all-trans carotenoids in sweet potato leaf and Chinese kale

Vegetables	Moisture %	BHT Concentration ³ %	All-trans carotenoids ^{1,2}		
			Lutein	Zeaxanthin	β-carotene
Sweet potato leaf (地瓜葉)	89.78	0.00	41.55 ± 0.03 ^c	0.61 ± 0.05 ^c	5.64 ± 0.12 ^c
		0.01	46.36 ± 1.25 ^b	0.68 ± 0.01 ^{bc}	8.93 ± 0.47 ^b
		0.10	53.75 ± 2.86 ^a	0.90 ± 0.04 ^a	12.63 ± 1.85 ^a
		0.50	49.00 ± 1.39 ^a	0.75 ± 0.01 ^b	8.90 ± 0.54 ^b
		1.00	40.05 ± 2.52 ^c	0.67 ± 0.01 ^{bc}	7.35 ± 0.16 ^{bc}
		Chinese kale (芥藍)	92.55	0.00	28.85 ± 3.53 ^b
		0.01	36.81 ± 1.02 ^a	—	28.94 ± 0.48 ^a
		0.10	39.35 ± 0.51 ^a	—	30.14 ± 1.85 ^a
		0.50	35.11 ± 2.59 ^a	—	27.62 ± 2.21 ^{ab}
		1.00	39.09 ± 2.89 ^a	—	30.68 ± 0.36 ^a

¹Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

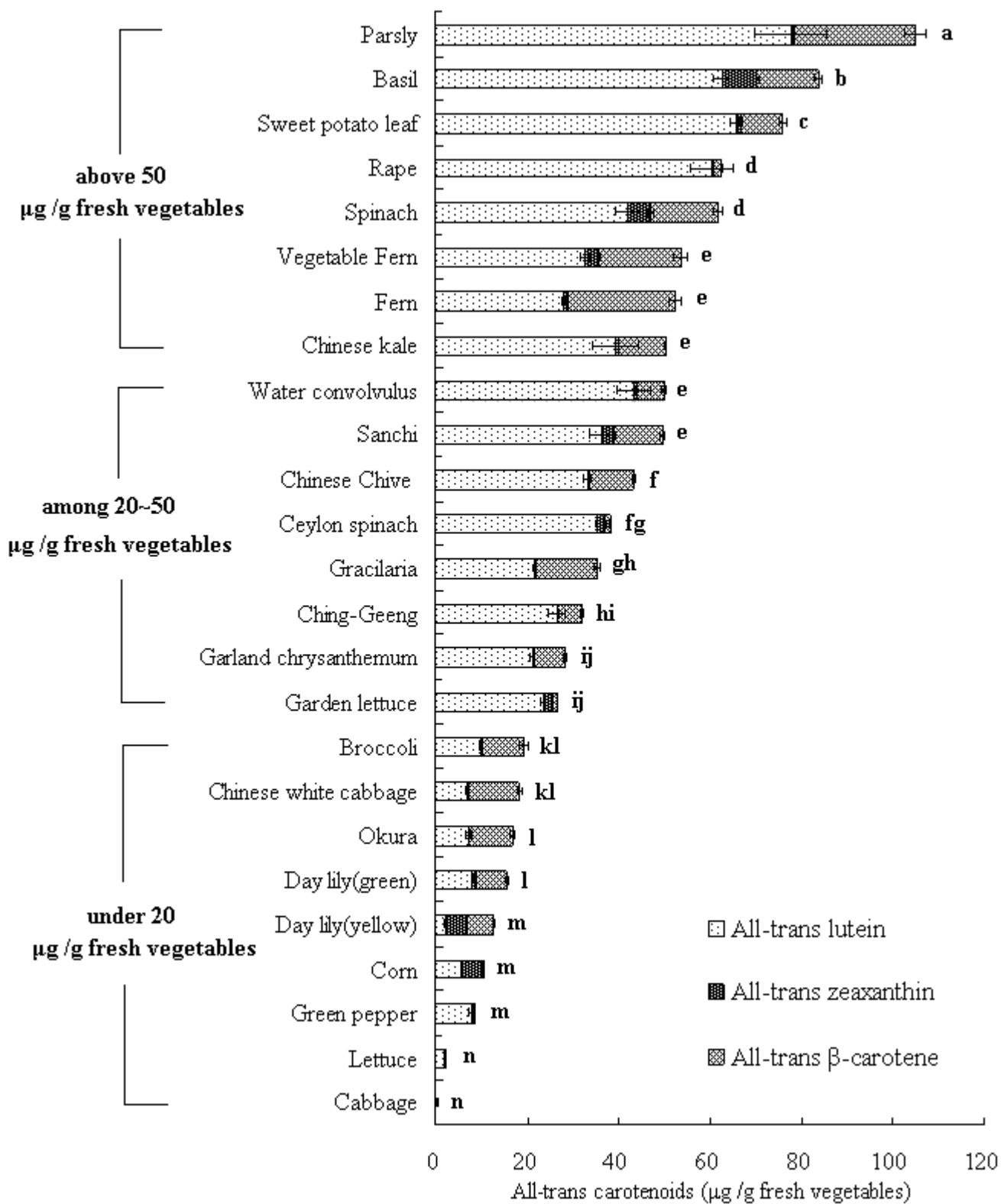
²Concentrations are in micrograms per gram of fresh vegetables tissue.

³BHT is added at the concentration of extracting solvent volume (w/v).

⁴ “ — ” Not detectable.

β -apo-8'-carotenal 以校正類胡蘿蔔素的測定值，結果如圖十七所示（詳細數據請見附錄一）。從結果發現大部分蔬菜中的天然類胡蘿蔔素都以 all-trans lutein 為主，且顏色愈深綠的蔬菜其 all-trans lutein 含量就愈高，其次是 all-trans β -carotene，all-trans zeaxanthin 含量是最少。不過色澤淺綠的小白菜(Chinese white cabbage) 與黃秋葵(okura) 中則以 β -carotene 含量最高，另外黃色金針花(day lily)中以則以 β -carotene 含量最高，次為 zeaxanthin，lutein 含量卻是最低。比較二十五種蔬菜中，all-trans lutein 含量最高的是香菜(parsly)，all-trans zeaxanthin 含量最高的則是黃色金針花；all-trans β -carotene 含量最高的仍是香菜。根據 3 種類胡蘿蔔素的總含量由高至低排序，依序為香菜、九層塔(basil)、地瓜葉(sweet potato leaf)、油菜(rape)、菠菜(spinach)、過貓(vegetable fern)、山蘇(fern)、芥藍菜(Chinese kale)，上述蔬菜之類胡蘿蔔素總含量皆超過 50 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables。而空心菜(water convolvulus)、川七(sanchi)、韭菜(Chinese chive)、皇宮菜(Ceylon spinach)、龍鬚菜(gracilaria)、青江菜(ching-geeng)、茼蒿(garland chrysanthemum) 與 A 菜(garden lettuce) 的總類胡蘿蔔素含量在 20~50 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables 之間，至於青花菜(broccoli)、小白菜、黃秋葵、金針花(day lily-green)、金針花(day lily-yellow)、玉米(corn)、青椒(green pepper)、大陸妹(lettuce)、高麗菜(cabbage) 等蔬菜之 3 種類胡蘿蔔素總含量則低於 20 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables。結果顯示，常做為香料使用的香菜與九層塔所含的總類胡蘿蔔素最豐富，其含量分別為 104.76 與 83.68 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables，而深綠色葉菜類蔬菜亦含有相當多的類胡蘿蔔素如地瓜葉及油菜，其總類胡蘿蔔素含量分別為 75.96 與 62.32 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables，此 4 種蔬菜將做進一步探討；加工方法與時間對類胡蘿蔔素含量分佈及對抗氧化活性影響之研究。

另外，將文獻中常被探討的蔬菜如青花菜、菠菜及玉米中類胡蘿蔔素之測定值 (Hart and Scott, 1995; Updike and Schwartz, 2003; Larsen and Christensen, 2005) 與本研究之測定值，經整理後共同列於表七，青花菜



圖十七、省產蔬菜中全反式類胡蘿蔔素含量分布

Figure 17. Quantitative distribution of various all-trans carotenoids in fresh vegetables commonly consumed in Taiwan. Bar represent mean \pm SD, n =3. Mean contents of total all-trans carotenoids in fresh vegetables with different letters are significantly different (p<0.05)

表七、本研究中青花菜、菠菜及玉米中全反式類胡蘿蔔素含量與其他文獻相較結果

Table 7. The all-trans carotenoids contents of broccoli, spinach and corn in study were comparable with references

Vegetables	All-trans carotenoids ¹			Extractive solvent	Saponification method	Source
	Lutein	Zeaxanthin	β-carotene			
Broccoli(青花菜)	16.14	— ²	8.00	THF/MeOH	KOH ³	Hart and Scott(1995)
					KOH ⁴	Updike and Schwartz (2003)
	10.13	—	—	Acetone, hexane/diethyl ether		
	33.00	—	17.50	Acetone	Resin ⁵	Larsen and Christensen (2005)
	9.81	0.35	8.87	Acetone	Resin ⁵	This study
Spinach (菠菜)	58.69	—	33.97	THF/MeOH	KOH ³	Hart and Scott(1995)
					KOH ⁴	Updike and Schwartz (2003)
	55.50	—	—	Acetone, hexane/diethyl ether		
	63.80	—	34.10	Acetone	Resin ⁵	Larsen and Christensen (2005)
	41.98	5.06	14.60	Acetone	Resin ⁵	This study
Corn(玉米)	5.22	4.37	0.45	THF/MeOH	KOH ³	Hart and Scott(1995)
					KOH ⁴	Updike and Schwartz (2003)
	2.74	5.43	—	Acetone, hexane/diethyl ether		
	5.71	4.48	0.21	Acetone	Resin ⁵	This study

¹Concentrations are in micrograms per gram of fresh vegetables tissue.

² “ — ” Not detectable.

³The extract was saponified with a 30% methanolic potassium hydroxide solution for 30 min at room temperature.

⁴The extract was saponified with a 5% methanolic potassium hydroxide solution for 30 min at room temperature.

⁵The extract was saponified with a strongly basic resin (Ambersep 900OH) for 30 min at room temperature.

之 all-trans lutein 在文獻中之測定值介於 10 ~ 33 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables , 菠菜與玉米分別介於 55 ~ 64 及 2.7 ~ 5.3 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables , 而本研究中所測得之青花菜 菠菜與玉米的 all-trans lutein 含量各為 9.81 41.98 及 5.71 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables ; 文獻中玉米之 all-trans zeaxanthin 含量介於 4.0 ~ 5.5 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables , 本研究中所測得含量則為 4.48 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables ; 青花菜之 all-trans β -carotene 在文獻中含量介於 8.0 ~ 17.5 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables、菠菜為 33.9 ~ 34.1 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables , 玉米為 0.2 ~ 0.5 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables , 而本研究之青花菜、菠菜與玉米所測得之 all-trans β - carotene 含量各為 8.87、14.60 及 0.21 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables。從以上結果發現, 本研究中青花菜、菠菜與玉米之全反式 lutein, zeaxanthin 及 β -carotene 的含量分佈與文獻資料不完全相符, 原因可能為蔬菜中類胡蘿蔔素的含量會因為蔬菜品種、部位、採收時間、種植條件與氣候等因素之影響而有所不同 (Chen and Chen, 1992 ; Hart and Scott, 1995)。

研究證實, 每天攝取 6 mg lutein , 能有效降低 43 % AMD 的發生機率 (Seddon et al., 1994) , 而以本研究所測得的地瓜葉為例, 其 all-trans lutein 含量為 65.52 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables , 此表示每天只要攝取 100 g 地瓜葉就可以獲得 6.55 mg all-trans lutein , 達到 lutein 的建議攝取量。因此本研究中, 針對台灣省產蔬菜之類胡蘿蔔素含量所做之調查報告是可以做為維護國人健康飲食的參考依據。

五、加工方法對蔬菜中類胡蘿蔔素含量之影響

將省產蔬菜經過總類胡蘿蔔素含量的篩選後, 選出含量最多的香菜、九層塔、地瓜葉及油菜為代表, 探討加工方法如水煮(boiled)、油炒(stir-fried)及油炸(deep-fried) 對蔬菜中 lutein zeaxanthin 及 β -carotene 順/反式異構物含量分佈的影響(表八)。其結果顯示; 新鮮未加工的蔬菜中也有順式異構物的存在, 其原因可能是受到蔬菜中葉綠素衍生物

表八、加工方法對蔬菜中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響

Table 8. The effects of processing methods on the contents of carotenoids and related geometrical isomers in vegetables

Vegetables	Carotenoids isomers ¹													
	Total carotenoids ²	Lutein isomers						Zeaxanthin isomers			β-Carotene isomers			
		total	all-trans	13-cis	13'-cis	9-cis	9'-cis	total	all-trans	9-cis	total	all-trans	13-cis	9-cis
Parsly (香菜)														
fresh	98.83 ^a	79.12 ^a	71.89 ^a	3.35 ^a	1.80 ^b	1.11 ^a	0.96 ^a	2.67 ^a	2.20 ^a	0.46 ^b	17.04 ^a	10.27 ^a	1.31 ^a	5.46 ^a
boiled	94.48 ^a	74.77 ^a	67.48 ^a	2.90 ^a	2.14 ^a	1.20 ^a	1.05 ^a	2.34 ^b	1.85 ^a	0.49 ^b	17.37 ^a	10.28 ^a	1.22 ^{ab}	5.88 ^a
stir-fried	66.60 ^b	55.52 ^b	49.75 ^b	1.59 ^b	1.57 ^c	1.41 ^a	1.21 ^a	2.13 ^b	1.51 ^b	0.62 ^a	8.94 ^b	4.86 ^b	1.12 ^b	2.96 ^b
Basil(九層塔)														
fresh	85.92 ^a	67.58 ^a	63.02 ^a	2.11 ^a	1.34 ^a	0.59 ^b	0.51 ^b	6.06 ^a	5.51 ^{ab}	0.55 ^{ab}	12.29 ^a	6.56 ^a	1.84 ^a	3.88 ^a
boiled	85.11 ^a	65.25 ^a	59.95 ^a	1.89 ^a	1.43 ^a	0.91 ^b	1.08 ^a	7.26 ^a	6.70 ^a	0.55 ^{ab}	12.61 ^a	7.22 ^a	1.57 ^b	3.81 ^a
stir-fried	73.25 ^b	60.92 ^a	57.16 ^a	1.00 ^b	1.17 ^b	0.85 ^b	0.75 ^{ab}	6.00 ^a	5.60 ^{ab}	0.40 ^b	6.33 ^b	3.52 ^b	1.30 ^c	1.51 ^b
deep-fried	54.15 ^c	47.36 ^b	41.67 ^b	1.94 ^a	1.06 ^b	1.86 ^a	0.83 ^{ab}	4.99 ^b	4.35 ^b	0.64 ^a	1.81 ^c	1.81 ^b	–	–
Sweet potato leaf (地瓜葉)														
fresh	79.77 ^a	69.84 ^a	66.07 ^a	1.69 ^a	1.04 ^a	0.66 ^a	0.48 ^a	0.92 ^a	0.78 ^a	0.14 ^b	8.91 ^a	4.39 ^a	1.38 ^b	3.14 ^b
boiled	71.37 ^b	60.90 ^b	57.04 ^b	1.58 ^a	1.00 ^a	0.68 ^a	0.60 ^a	0.83 ^a	0.70 ^a	0.13 ^b	9.64 ^a	4.05 ^{ab}	1.81 ^a	3.78 ^a
stir-fried	54.88 ^c	50.57 ^c	46.67 ^c	1.53 ^a	0.89 ^a	0.76 ^a	0.62 ^a	0.72 ^a	0.53 ^b	0.19 ^a	3.69 ^b	2.23 ^b	–	1.46 ^c
Rape (油菜)														
fresh	65.68 ^a	60.23 ^a	56.79 ^a	2.05 ^a	1.32 ^a	0.76 ^b	0.49 ^a	0.49 ^a	0.49 ^a	– ³	4.96 ^a	2.47 ^a	0.83 ^a	1.65 ^b
boiled	67.02 ^a	61.50 ^a	55.62 ^a	2.00 ^a	1.31 ^a	0.83 ^b	0.56 ^b	0.42 ^a	0.42 ^a	–	5.11 ^a	2.39 ^a	0.88 ^a	1.83 ^{ab}
stir-fried	43.55 ^b	40.01 ^b	35.82 ^b	1.29 ^b	0.88 ^b	1.23 ^a	0.79 ^c	0.31 ^b	0.31 ^b	–	3.23 ^b	0.78 ^b	0.47 ^b	1.98 ^a

¹ Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

² Data are based on total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

³ “ – ” Not detectable.

的誘導，將部分全反式類胡蘿蔔素異構化成順式異構物(O'Neil et al.,1995)，且其中以 13-及 13'-cis 異構物含量較 9-與 9'-cis 異構物多，與 Khachik et al. (1986) 實驗結果相符。將表八換算為加工方法對各類胡蘿蔔素成分的損失或增加率(表九)後發現；不管水煮、油炒或油炸都會造成香菜、九層塔及地瓜葉 3 種蔬菜中總類胡蘿蔔素(total carotenoids) 含量的降低，如九層塔經油炸後其總類胡蘿蔔素含量損失達 36.97%，其次是油炒損失 14.75%，水煮影響最小損失 0.94%。香菜、地瓜葉及油菜三種蔬菜亦是以油炒損失較大；總類胡蘿蔔素含量分別損失 32.61、31.20 及 33.69%，水煮則讓香菜及地瓜葉分別損失 4.40 與 10.53%，不過油菜經過水煮後，其總類胡蘿蔔素含量不但沒有損失反而增加 2.04%。造成蔬菜經油炒或油炸後總類胡蘿蔔素含量顯著降低的可能原因，是加熱溫度過高而導致類胡蘿蔔素發生降解。Marx et al. (2003) 的實驗中發現；加工過程中油脂的添加會促進類胡蘿蔔素異構化反應的發生機會。至於水煮對類胡蘿蔔素的影響，Liu et al. (2007) 針對煮過蔬菜的水進行分析，結果無葉黃素存在，進而証實葉黃素經水煮後不會流失水中，由於類胡蘿蔔素是油溶性色素較不易流失水中，因此水煮對總類胡蘿蔔素含量影響最小。而全反式類胡蘿蔔素總含量與總類胡蘿蔔素有相同之變化趨勢；水煮、油炒或油炸讓 4 種蔬菜的全反式類胡蘿蔔素總含量皆降低；至於順式類胡蘿蔔素總含量經過水煮後，香菜、九層塔、地瓜葉及油菜分別增加了 2.89、3.84、12.32 及 4.49%，可能是因為水煮使全反式類胡蘿蔔素產生異構化，由反式轉變成順式，造成全反式異構物含量降低，而順式異構物含量提高；在 Chen et al. (1996) 及 Updike and Schwartz (2003) 的研究中，也有此相似的發現。此外，類胡蘿蔔素因具有長鏈的共軛雙鍵，對氧、光與熱等非常敏感，一般熱加工處理因氧化或加熱的作用，容易導致類胡蘿蔔素裂解 (Chen et al., 1994)，所以當蔬菜經油炒或油炸時因加熱溫度過高，反而讓反式類胡蘿蔔素在轉變成順式異構物後繼續發生降解，導致油

表九、加工方法對蔬菜中類胡蘿蔔素及其異構物損失率或增加率之影響

Table 9. The effects of processing methods on the % loss or increase of carotenoids and related geometrical isomers in vegetables

vegetables	Carotenoids isomers (loss or increase %) ¹								
	Total carotenoids			Lutein		Zeaxanthin		β-Carotene	
	total ²	all-trans ³	total cis ⁴	all-trans	total cis	all-trans	total cis	all-trans	total cis
Parsly (香菜)									
boiled	-4.40	-5.65	2.89	-6.14	0.87	-16.17	6.25	0.06	4.82
stir-fried	-32.61	-33.48	-27.58	-30.80	-20.18	-31.41	34.38	-52.68	-39.72
Basil (九層塔)									
boiled	-0.94	-1.63	3.84	-4.88	16.33	21.52	1.63	10.04	-5.90
stir-fried	-14.75	-11.74	-35.63	-9.30	-17.41	1.56	-26.51	-46.32	-51.02
deep-fried	-36.97	-36.31	-41.60	-33.88	24.76	-21.09	16.51	-72.42	-100.0
Sweet potato leaf (地瓜葉)									
boiled	-10.53	-13.26	12.32	-13.67	-0.26	-10.26	-7.14	-7.71	23.71
stir-fried	-31.20	-30.62	-36.06	-29.36	-1.81	-32.05	35.71	-49.31	-67.63
Rape (油菜)									
boiled	2.04	-2.21	4.49	-2.06	2.04	-14.13	0	-3.19	9.04
stir-fried	-33.69	-38.23	-6.45	-36.93	-9.14	-36.41	0	-68.46	-1.46

¹Loss or increase % of carotenoids = (carotenoids_{processing} - carotenoids_{fresh}) / carotenoids_{fresh} × 100

²Data are based on total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

³Data are based on total all-trans isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

⁴Data are based on total cis isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

炒或油炸後的順式類胡蘿蔔素總含量不見提高反而減少。其次比較加工方式對各別全反式類胡蘿蔔素含量之影響中發現；油炒或油炸對 3 種全反式類胡蘿蔔素含量皆有減少的趨勢，其中又以 all-trans β -carotene 損失量最高；香菜、九層塔、地瓜葉及油菜於油炒後之 all-trans β -carotene 損失率分別為 52.68、46.32、49.31 及 68.46 %，九層塔在油炸後損失更高達 72.42 %，至於 all-trans lutein 與 all-trans zeaxanthin，除了九層塔經油炒後其分別減少 9.30 % 與增加 1.56 % 而相差較大，其他三種蔬菜此兩者間損失率相差不多，顯示出 all-trans lutein 與 all-trans zeaxanthin 對熱安定性相似而優於 all-trans β -carotene。Henry et al. (1998) 曾將不同之類胡蘿蔔素置於紅花籽油 (safflower seed oil) 中加熱，以探討其熱安定性，結果發現類胡蘿蔔素以裂解速度而言： $\text{lycopene} > \text{all-trans } \beta\text{-carotene} > 9\text{-cis } \beta\text{-carotene} > \text{lutein}$ ，顯示葉黃素類胡蘿蔔素相較不易發生裂解，與本研究結果相似。且由表八發現，不管是 lutein、zeaxanthin 或 β -carotene 的 9-、9'-cis 異構物經過水煮後大部分均提高，而經油炒或油炸後 lutein、zeaxanthin 的 9-、9'-cis 異構物含量也都提高，但 β -carotene 的 9-、9'-cis 異構物含量除了油菜之外反而都減少了，由上述 all-trans β -carotene 之裂解速度大於 lutein 的結果推測， β -carotene 的 9-、9'-cis 異構物相較於 lutein、zeaxanthin 之 9-、9'-cis 異構物較具熱敏感，因此在油炒或油炸過程中溫度較高容易產生降解。

由上述結果指出水煮造成蔬菜中類胡蘿蔔素的損失最小，且其順式類胡蘿蔔素總含量經過水煮後含量會提高，因此將以水煮為代表進一步比較不同水煮時間對蔬菜中類胡蘿蔔素含量之影響。

六、水煮時間對蔬菜中類胡蘿蔔素含量之影響

表十與十一為水煮時間對香菜、九層塔、地瓜葉及油菜等蔬菜中類胡蘿蔔素含量的影響，結果發現水煮 1 min 的蔬菜與新鮮的(水煮 0 min)相比，其總類胡蘿蔔素含量均沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，之後隨

表十、水煮時間對香菜和九層塔中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響

Table 10. The effects of boiling time on the contents of carotenoids and their related geometrical isomers in parsley and basil

Vegetables Time (min)	Carotenoids isomers ¹													
	Total carotenoids ²	Lutein isomers						Zeaxanthin isomers			β-Carotene isomers			
		total	all- trans	13-cis	13'-cis	9-cis	9'-cis	total	all- trans	13-cis	total	all- trans	13-cis	9-cis
Parsly (香菜)														
0	102.03 ^b	79.89 ^b	74.26 ^{ab}	2.99 ^b	1.40 ^d	0.81 ^e	0.44 ^c	1.67 ^a	1.28 ^a	0.39 ^d	20.48 ^c	15.83 ^a	0.96 ^b	3.69 ^b
1	101.41 ^b	79.17 ^b	73.94 ^b	2.69 ^b	1.56 ^{cd}	0.64 ^e	0.35 ^c	1.39 ^b	1.01 ^{bc}	0.38 ^d	20.85 ^c	15.12 ^b	1.23 ^b	4.50 ^b
5	111.14 ^a	87.93 ^a	81.05 ^a	3.41 ^a	1.72 ^{bc}	1.25 ^d	0.49 ^c	1.63 ^{ab}	1.19 ^{ab}	0.44 ^c	21.58 ^{bc}	16.07 ^a	1.16 ^b	4.36 ^b
10	112.71 ^a	86.01 ^{ab}	78.55 ^{ab}	2.67 ^b	2.12 ^a	1.95 ^c	0.72 ^b	1.71 ^a	1.25 ^a	0.46 ^c	24.98 ^a	16.27 ^a	1.58 ^a	7.13 ^a
20	91.73 ^c	67.10 ^c	60.51 ^c	2.09 ^c	1.45 ^d	2.25 ^b	0.79 ^b	1.54 ^{ab}	0.93 ^c	0.61 ^b	23.10 ^b	14.25 ^c	1.03 ^b	7.82 ^a
30	85.02 ^c	62.18 ^c	53.52 ^d	2.72 ^b	1.87 ^{ab}	3.02 ^a	1.05 ^a	1.59 ^{ab}	1.01 ^{bc}	0.58 ^a	21.24 ^c	12.58 ^d	0.54 ^c	8.12 ^a
Basil(九層塔)														
0	94.90 ^b	75.64 ^{ab}	69.80 ^a	1.86 ^c	2.24 ^{bc}	1.18 ^d	0.56 ^b	5.33 ^b	4.88 ^b	0.45 ^b	13.92 ^{bc}	7.69 ^{cd}	2.10 ^a	4.13 ^c
1	91.53 ^{bc}	73.67 ^b	67.49 ^a	1.92 ^c	2.51 ^b	1.12 ^d	0.63 ^b	5.29 ^b	4.78 ^b	0.50 ^b	12.57 ^c	7.15 ^{de}	1.45 ^c	3.97 ^c
5	103.34 ^a	80.46 ^a	72.59 ^a	2.58 ^a	3.00 ^a	1.59 ^c	0.70 ^b	6.02 ^a	5.42 ^a	0.60 ^a	16.86 ^a	9.77 ^a	1.77 ^b	5.32 ^b
10	83.88 ^c	65.82 ^c	57.73 ^b	2.17 ^b	2.95 ^a	2.06 ^b	0.92 ^a	3.53 ^c	2.94 ^c	0.59 ^a	14.53 ^{bc}	8.31 ^{bc}	0.88 ^d	5.34 ^b
20	68.01 ^d	49.46 ^d	41.75 ^c	1.95 ^c	1.92 ^c	2.81 ^a	1.02 ^a	2.62 ^d	2.23 ^d	0.38 ^c	15.93 ^b	9.03 ^{ab}	0.83 ^d	6.08 ^a
30	58.51 ^e	43.60 ^d	37.49 ^c	1.02 ^d	1.17 ^d	2.89 ^a	1.03 ^a	1.48 ^e	1.25 ^e	0.23 ^d	13.42 ^c	6.71 ^e	0.62 ^e	6.10 ^a

¹Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

²Data are based on a total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

表十一、水煮時間對地瓜葉和油菜中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響

Table 11. The effects of boiling time on the contents of carotenoids and their related geometrical isomers in sweet potato leaf and rape

Vegetables Time (min)	Total carotenoids ²	Carotenoids isomers ¹												
		Lutein isomers						Zeaxanthin isomers			β-Carotene isomers			
		total	all- trans	13-cis	13'-cis	9-cis	9'-cis	total	all- trans	13-cis	total	all trans	13-cis	9-cis
Sweet potato leaf (地瓜葉)														
0	80.37 ^b	67.97 ^c	63.50 ^c	1.81 ^{bc}	0.89 ^c	1.04 ^d	0.74 ^e	0.72 ^b	0.72 ^b	– ³	11.68 ^{cd}	6.62 ^d	1.78 ^a	3.29 ^b
1	88.15 ^b	76.26 ^b	70.13 ^{bc}	1.96 ^b	1.72 ^b	1.32 ^c	1.14 ^d	0.70 ^b	0.70 ^b	–	11.20 ^d	6.89 ^{cd}	1.26 ^b	3.05 ^b
5	101.89 ^a	85.52 ^a	76.81 ^{ab}	3.14 ^a	2.05 ^b	2.06 ^b	1.47 ^c	0.91 ^{ab}	0.91 ^{ab}	–	15.47 ^a	9.72 ^a	1.92 ^a	3.84 ^b
10	103.56 ^a	88.61 ^a	77.97 ^a	3.56 ^a	2.58 ^a	2.44 ^a	2.07 ^b	1.09 ^a	1.09 ^a	–	13.87 ^{abc}	8.13 ^b	0.89 ^c	4.86 ^a
20	66.36 ^c	51.69 ^d	44.56 ^d	1.45 ^{cd}	1.06 ^c	2.52 ^a	2.10 ^b	0.70 ^b	0.70 ^b	–	13.98 ^{ab}	7.79 ^{bc}	0.73 ^{cd}	5.46 ^a
30	50.19 ^d	36.71 ^e	29.54 ^e	1.07 ^d	0.84 ^c	2.48 ^a	2.79 ^a	0.42 ^c	0.42 ^c	–	13.07 ^{bcd}	6.67 ^d	0.60 ^d	5.80 ^a
Rape (油菜)														
0	71.81 ^{ab}	64.82 ^a	58.48 ^{ab}	3.86 ^a	1.14 ^b	0.86 ^d	0.47 ^d	0.46 ^a	0.46 ^a	–	6.52 ^c	4.10 ^d	0.88 ^b	1.54 ^d
1	73.55 ^a	65.94 ^a	60.00 ^a	3.39 ^b	1.13 ^b	0.98 ^{cd}	0.43 ^d	0.40 ^{ab}	0.40 ^{ab}	–	7.22 ^c	4.61 ^{cd}	1.00 ^{ab}	1.61 ^d
5	70.18 ^{ab}	60.93 ^{ab}	54.38 ^{bc}	3.50 ^b	1.18 ^b	1.30 ^{bc}	0.57 ^c	0.45 ^a	0.45 ^a	–	8.80 ^b	5.97 ^b	1.01 ^{ab}	1.82 ^d
10	68.57 ^b	57.60 ^b	51.96 ^c	2.36 ^d	1.20 ^b	1.48 ^b	0.59 ^c	0.44 ^a	0.44 ^a	–	10.53 ^a	6.95 ^a	1.27 ^a	2.31 ^c
20	57.42 ^c	47.89 ^c	41.69 ^d	2.11 ^e	1.21 ^b	2.00 ^a	0.88 ^b	0.39 ^{ab}	0.39 ^{ab}	–	9.14 ^b	5.14 ^c	1.09 ^{ab}	2.91 ^b
30	59.97 ^c	51.07 ^c	43.93 ^d	2.63 ^c	1.38 ^a	2.17 ^a	0.95 ^a	0.33 ^b	0.33 ^b	–	8.57 ^b	4.11 ^d	1.10 ^{ab}	3.36 ^a

¹ Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

² Data are based on a total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

³ “ – ” Not detectable.

著水煮時間延長，總類胡蘿蔔素含量即逐漸增加；香菜與地瓜葉均在水煮 10 min 後，其總類胡蘿蔔素含量達到最高，比新鮮之香菜與地瓜葉分別增加了 10.47 與 30.02 %；九層塔則於水煮 5 min 後，總類胡蘿蔔素含量達到最高，提升了 8.89 %；油菜水煮 1 min 含量即達到最高，增加了 2.44 %。雖然水煮一開始，一些全反式類胡蘿蔔素會因為異構化而造成含量的下降，也使總類胡蘿蔔素含量稍微下降，當水煮到達一定時間後，蔬菜中總類胡蘿蔔素含量卻增加，原因可能是加工過程會讓蔬菜中的氧化酵素失活、結構組織軟化及破壞類胡蘿蔔素與蛋白質間所形成之複合物，而促使類胡蘿蔔素從組織中被釋放出來，增加萃取率，進而提高其測定值 (Updike and Schwartz, 2003)，不過當類胡蘿蔔素在釋放出後，又因持續加熱，可能又會造成類胡蘿蔔素之異構化並進一步發生降解，使得總類胡蘿蔔素含量反而逐漸下降。由以上結果得知，所有蔬菜在達到最高的總類胡蘿蔔素含量後，就隨著水煮時間增加而逐漸減少，當總類胡蘿蔔素含量達最高時的水煮時間，即可代表為蔬菜的最適水煮時間。香菜、九層塔、地瓜葉及油菜的最適水煮時間分別為 10、5、10 及 1 min。由此可知蔬菜在經過適當的水煮處理後，由於提高了蔬菜中類胡蘿蔔素的釋放率，在攝取時不但不會降低其營養價值，反而增加其生物可利用率。

七、水煮時間對蔬菜的抗氧化活性之影響

由於類胡蘿蔔素具有長鏈的共軛雙鍵，能有效抑制單重態氧及自由基作用 (Anguelova and Warthsen, 2000；Willis and Wians, 2003)，而酚類化合物則主要為植物的二級代謝產物，具有苯酚基的結構，可提供一個電子給自由基，所形成的不成對電子，則可因苯環上的共振結構而穩定 (Labuza, 1971；Castelluccio et al., 1995)。目前已有多篇文獻指出類胡蘿蔔素與酚類化合物，是蔬菜中抗氧化活性成分的主要來源 (Byers and Perry, 1992；Velioglu et al., 1998)，於是先評估水煮時間對香

菜、九層塔、地瓜葉及油菜中之總類胡蘿蔔素及總酚類化合物之影響，但由於在做抗氧化活性之評估時，各參考文獻大部分是以醇類作為萃取溶劑，因此在接下來的實驗中，將全部以乙醇作為萃取溶劑，重新測定水煮後蔬菜中的總類胡蘿蔔素含量與總酚類化合物含量，結果如表十二所示。水煮前的 4 種新鮮蔬菜之乙醇萃取物中，總類胡蘿蔔素含量，由高至低為香菜 > 九層塔 > 地瓜葉 > 油菜，而水煮 1 min 其含量均沒有顯著差異($p > 0.05$)，之後隨著水煮時間延長，總類胡蘿蔔素含量則逐漸增加，當香菜水煮 10 min，九層塔、地瓜葉及油菜水煮 5 min 時，四種蔬菜中之總類胡蘿蔔素含量皆達到最高，分別增加了 27.30、34.88、15.72 及 7.27 %，總類胡蘿蔔素含量在達到最高後，則隨著水煮時間增加而逐漸減少。至於總酚類化合物含量，水煮前四種新鮮蔬菜中其含量，由高至低依序為地瓜葉 > 九層塔 > 香菜 > 油菜，其中香菜和油菜的總酚含量是隨水煮時間增加而逐漸遞減，分別在水煮 20 和 30 min 時達到最低，顯著降低了 83.14 %、85.21 %；九層塔則在水煮 1min 時，總酚含量顯著提高 14.66 %，之後隨水煮時間增加而逐漸降低，在水煮 30 min 時，顯著降低 73.82 %；地瓜葉於水煮 5 min 前，其總酚含量是遞增的，5 min 時達到最高，顯著增加 30.61 %，而之後隨水煮時間增加而逐漸遞減，水煮 30 min 時達最低，減少了 32.67 %。Zhang and Hamauzu (2004) 指出，水煮會使青花菜中的總酚類化合物流失於水中，而導致總酚含量的降低，至於本研究中九層塔與地瓜葉於一開始時，總酚含量會增加；可能原因是，加熱使植物組織軟化，而導致酚類化合物從細胞組織中釋放，但因尚未流失於水中，因此使總酚含量提高。綜合以上結果得知，4 種蔬菜之總類胡蘿蔔素含量與其總酚含量間沒有相關性，可是經過適當的水煮均可提升他們的萃取率。其次是比較水煮時間對香菜、九層塔、地瓜葉及油菜之抗氧化活性如 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：

表十二、水煮時間對香菜、九層塔、地瓜葉與油菜中總類胡蘿蔔素及總酚類化合物之影響

Table 12. The effects of boiling time on total carotenoids and phenolic compounds in parsley, basil, sweet potato leaf and rape

Vegetables	Time (min)	Total Carotenoids ¹ (µg /g wet vegetables)	Total polyphenols ² (µg GAE/g wet vegetables)
Parsly (香菜)			
	0	64.94 ±5.46 ^{bcd}	1496.44 ±99.94 ^a
	1	61.79 ±6.04 ^{cd}	1337.67 ±45.10 ^b
	5	67.65 ±3.24 ^{bc}	745.67 ±22.16 ^c
	10	82.67 ±4.22 ^a	568.78 ±9.27 ^d
	20	72.62 ±5.20 ^b	252.28 ±24.51 ^f
	30	58.13 ±4.30 ^d	391.56 ±3.14 ^e
Basil (九層塔)			
	0	64.05 ±3.16 ^b	1905.04 ±71.97 ^b
	1	65.95 ±6.43 ^{ab}	2232.33 ±47.86 ^a
	5	86.39 ±2.80 ^a	1892.11 ±102.92 ^b
	10	80.15 ±7.78 ^a	1324.89 ±8.17 ^c
	20	67.44 ±6.11 ^{ab}	627.56 ±6.91 ^d
	30	52.12 ±4.30 ^c	498.67 ±20.11 ^d
Sweet potato leaf (地瓜葉)			
	0	56.69 ±3.32 ^b	2027.33 ±104.98 ^c
	1	54.36 ±2.33 ^b	2639.67 ±87.03 ^b
	5	65.60 ±2.25 ^a	2921.50 ±95.57 ^a
	10	47.23 ±3.14 ^c	1755.17 ±88.96 ^d
	20	39.29 ±4.12 ^d	1566.83 ±77.18 ^e
	30	33.61 ±2.30 ^d	1365.00 ±52.91 ^f
Rape (油菜)			
	0	41.68 ±0.12 ^a	827.11 ±46.51 ^a
	1	39.03 ±5.11 ^a	673.78 ±27.18 ^b
	5	44.72 ±4.91 ^a	473.11 ±6.60 ^c
	10	43.02 ±1.17 ^a	194.56 ±1.58 ^d
	20	42.99 ±2.92 ^a	147.41 ±8.19 ^e
	30	43.65 ±1.18 ^a	122.37 ±3.41 ^e

¹Data are based on the total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

^{1,2}Data are the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

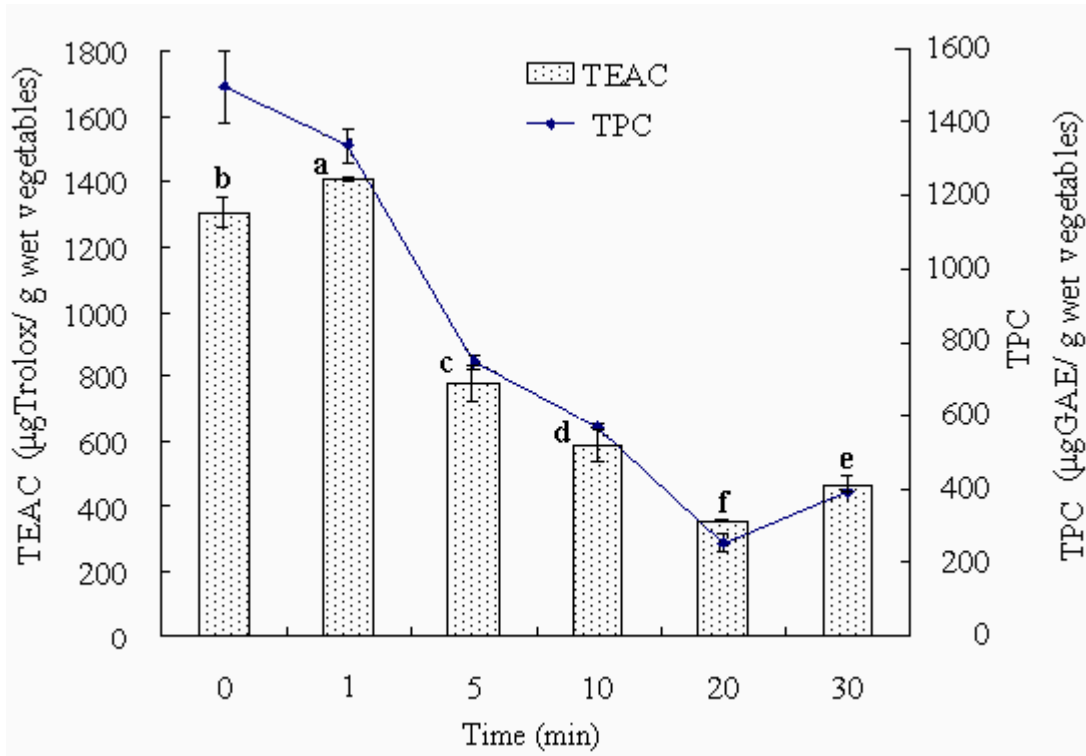
(一) Trolox 當量抗氧化能力(Trolox equivalent antioxidant capacity ; TEAC)之測定

Trolox是一種結構類似維生素E的水溶性抗氧化劑，具有良好之抗氧化力，可作為評估未知樣品抗氧化力之依據，所以當樣品之TEAC值愈高，則表示其抗氧化化活性愈佳。圖十八及圖十九（詳細數據見附錄五、六）為探討水煮時間對4種蔬菜的TEAC 值之影響，並與其總酚類化合物含量變化作比較。如圖所示水煮前新鮮的四種蔬菜其TEAC值由高至低為地瓜葉 > 九層塔 > 香菜 > 油菜，與其總酚化合物含量的變化趨勢相似，其中香菜水煮1 min，可使新鮮香菜之TEAC值由1303.30提升至1409.36 $\mu\text{g Trolox/g fresh vegetables}$ 顯著增加 7.53 %，之後隨著水煮時間增加反而逐漸遞減，水煮20 min 時其TEAC值最低為359.27 $\mu\text{g Trolox/g fresh vegetables}$ ，顯著減少了72.43 % (圖十八 A)；九層塔與地瓜葉也有相同趨勢，在水煮開始其TEAC值是漸增的，於 5 min時達最高，分別為1424.95與1666.43 $\mu\text{g Trolox/ g fresh vegetables}$ ，增加了3.76與7.59 %，之後隨水煮時間增加而逐漸減少，分別在 30與 20 min達到最低，分別為784.40 與 685.41 $\mu\text{g Trolox/g fresh vegetables}$ ，顯著降低了42.80及55.49 % (圖十八 B、十九 A)；油菜之TEAC值則於一開始便隨著水煮時間增加而逐漸減少，在水煮30 min時達到最低為419.63 $\mu\text{g Trolox/g fresh vegetables}$ ，顯著降低了66.70 % (圖十九 B)。以上結果顯示，香菜、九層塔與地瓜葉經 1~5 min的適當水煮後，反而可增加其TEAC值，且TEAC值的增減與總酚含量的變化趨勢有密切的關係，Zhang and Hamauzu (2004) 研究發現青花菜經過熱加工後其抗氧化活性是隨總酚含量降低而遞減，於是推測TEAC值所表現的抗氧化能力，主要是由蔬菜中總酚類化合物所提供。

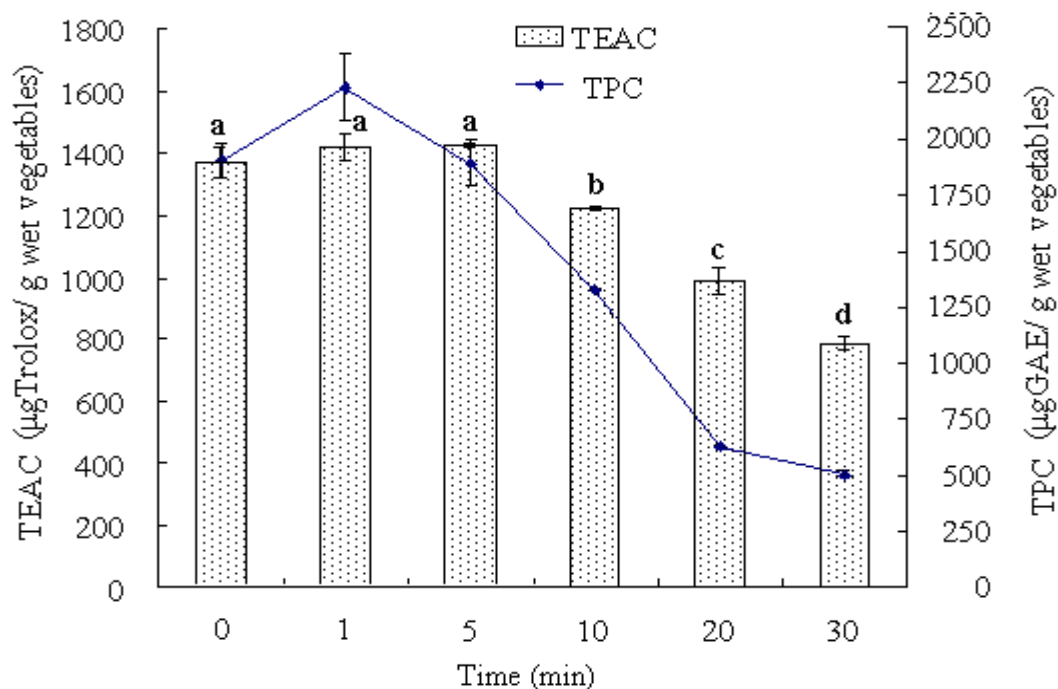
(二) 抑制脂質過氧化物形成能力之測定

抑制脂質過氧化物形成能力是利用硫氫酸鐵法 (Ferric

A Parsly



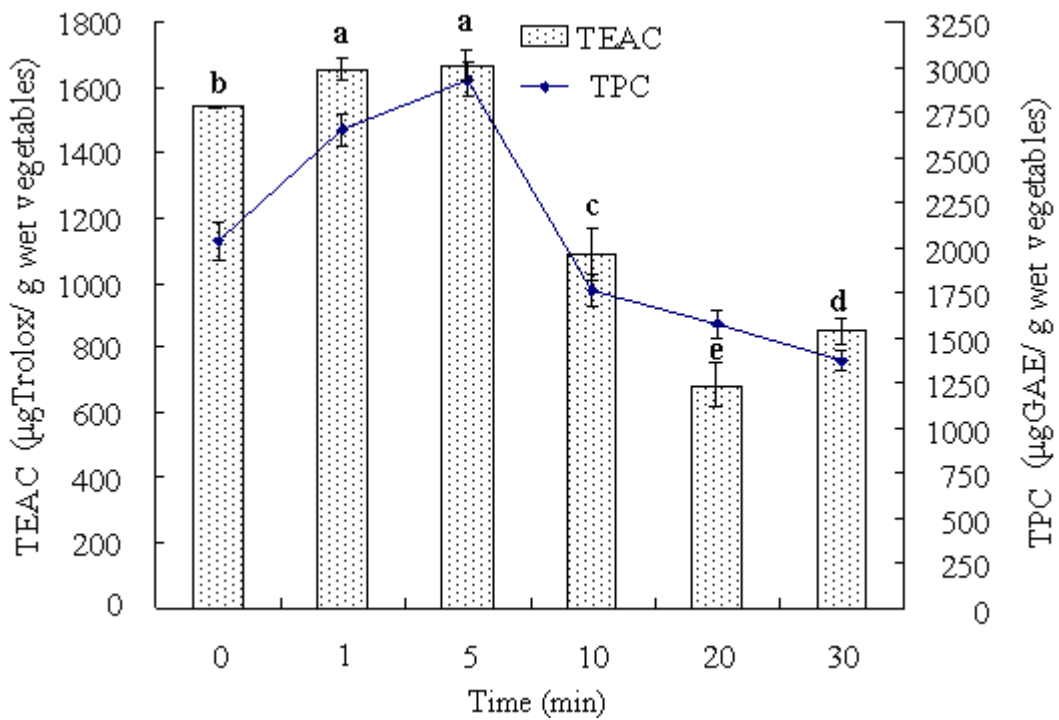
B Basil



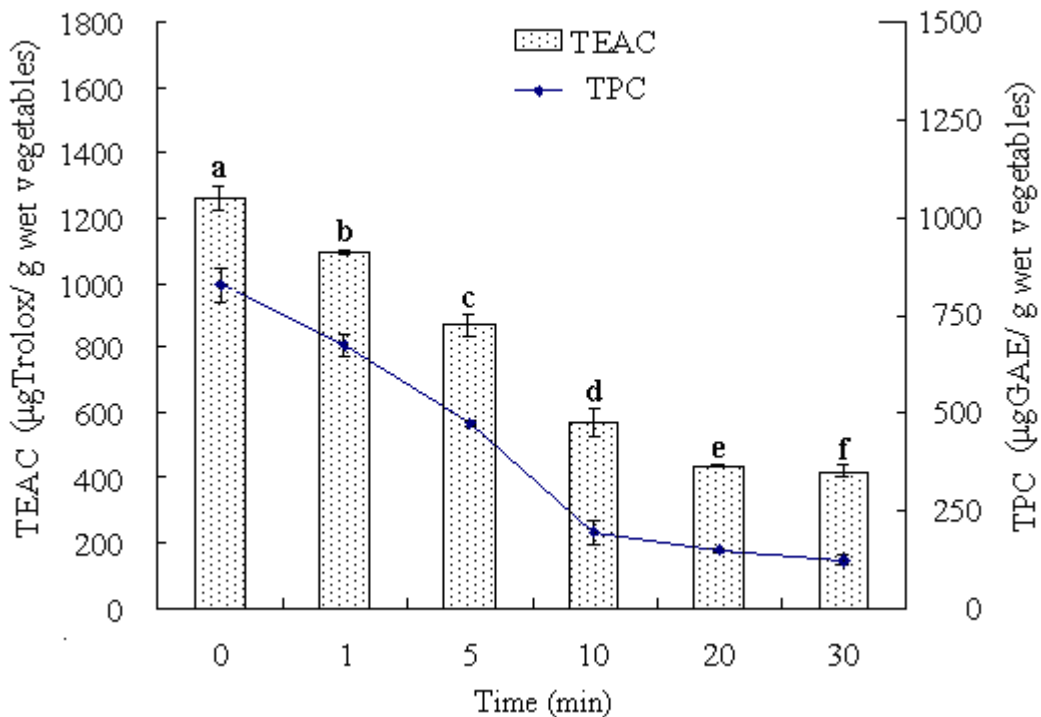
圖十八 水煮時間對(A)香菜及(B)九層塔的 TEAC 值及總酚類化合物之影響

Figure 18. The effects of boiling time on the TEAC value and total phenolic compounds (TPC) of (A) parsly and (B) basil. Bar represent mean \pm SD, n =3. Means of TEAC with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

A Sweet potato leaf



B Rape

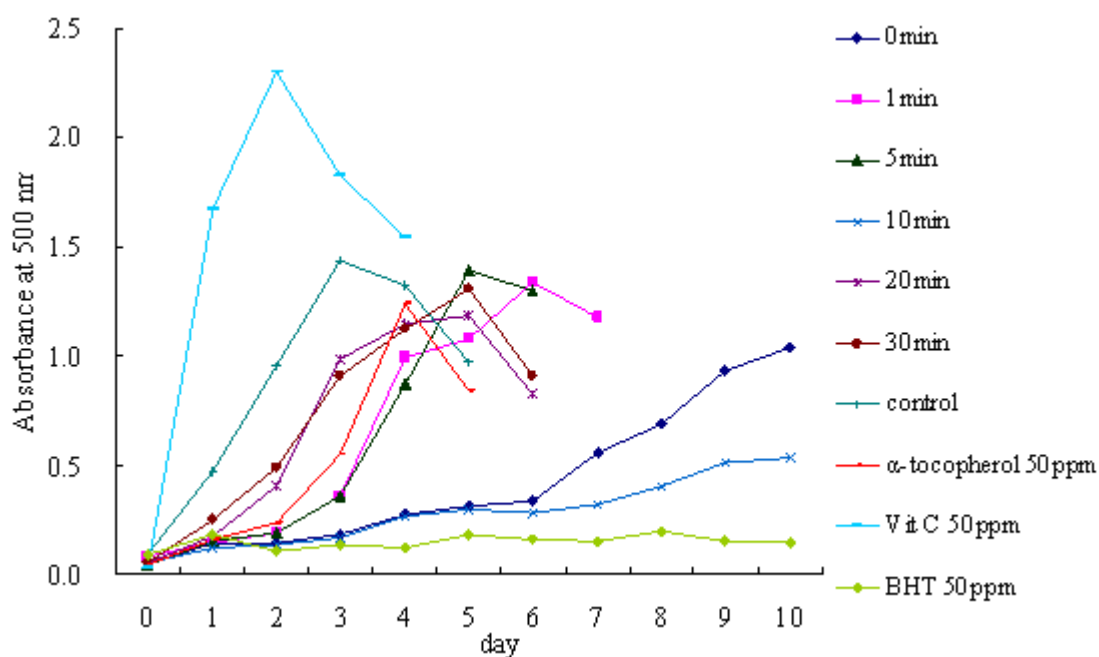


圖十九、水煮時間對(A)地瓜葉及(B)油菜的 TEAC 值及總酚類化合物之影響

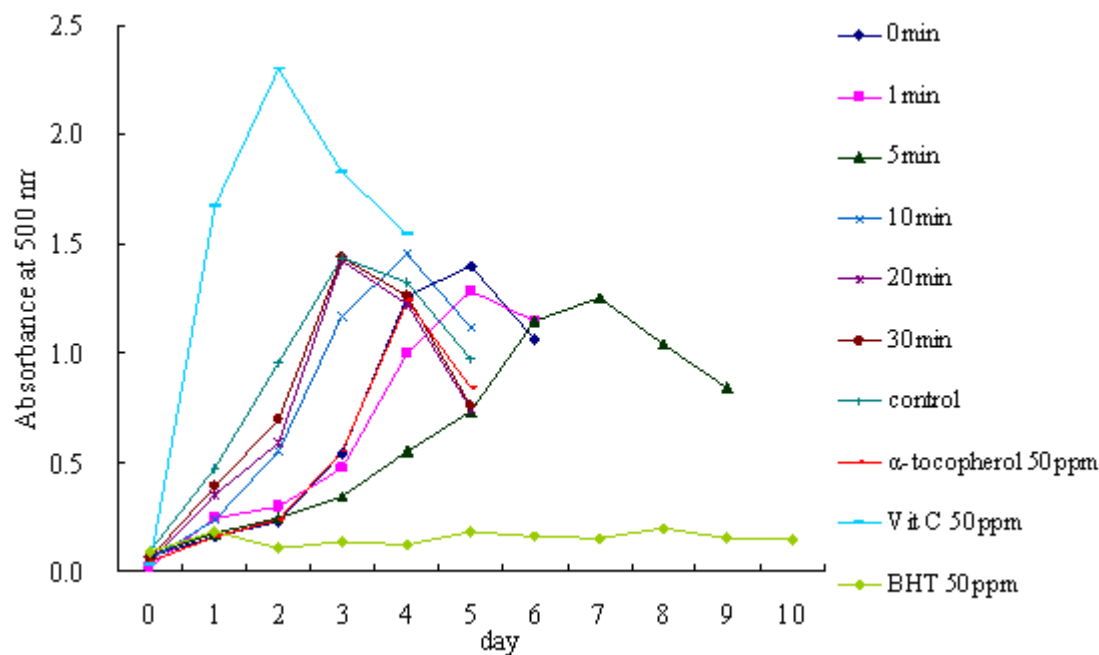
Figure 19. The effects of boiling time on TEAC and total phenolic compounds (TPC) of (A) sweet potato leaf and (B) rape. Bar represent mean \pm SD, n =3. Means of TEAC with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

thiocyanate method) 來測定亞麻油酸乳化系統 (linoleic acid emulsion system) 中過氧化物的形成量;若加入的樣品具有抑制過氧化物形成的能力,則此系統的呈色速率會減緩,降低吸光值的上升速率。抑制脂質过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)。由於未稀釋之香菜、九層塔、地瓜葉及油菜的乙醇萃取物濃度過高,直接添加於亞麻油酸乳化系統中,在觀察一個月以後,其呈色仍無加深的現象,表示具有極佳的抑制脂質过氧化物形成的能力。因此將萃取物在稀釋 50 倍之後,再添加於亞麻油酸乳化系統中,以測試抗氧化能力,其結果如圖二十及二十一所示;吸光值愈高,代表系統中过氧化物的形成量多,即抑制脂質过氧化物的形成能力低,表示抗氧化活性差。從圖二十 (A)中發現, Vit C 與沒有添加樣品的乙醇控制組,分別在添加第二及第三天後,其過氧化物之濃度達到最高峰,由於過氧化物並不安定,在氧氣充份的情況下,會再進一步生成二次代謝產物而降低过氧化物的濃度,因而導致吸光值的下降。當吸光值愈高且愈快達到高峰,表示抑制脂質过氧化物的形成能力愈低。若在亞麻油酸乳化系統中添加 BHT (50ppm),其吸光值在經過十天後,仍無明顯變化,表示在十天的期間內,BHT 能有效抑制脂質过氧化物的形成。從結果中發現不同水煮時間之香菜其抗氧化活性,由大至小依序為 BHT > 10 min > 0 min > 5 min > 1 min > a-tocopherol > 20 min > 30 min > 乙醇控制組 > Vit C,此說明水煮 10 min 之香菜在添加於亞麻油酸乳化系統中之初期的 1~3 天其吸光值與 BHT (50ppm) 相近,之後的吸光值即隨儲存天數的增加而增加,表示抗氧化效果減弱,水煮 0~10 min 之香菜其抗氧化活性均優於 a-tocopherol (50ppm),可是當水煮時間過長至 20~30 min,反會降低其抗氧化能力,不過仍比乙醇控制組及 Vit C (50ppm)高 (圖二十 A);不同水煮時間之九層塔的抗氧化活

A Parsly

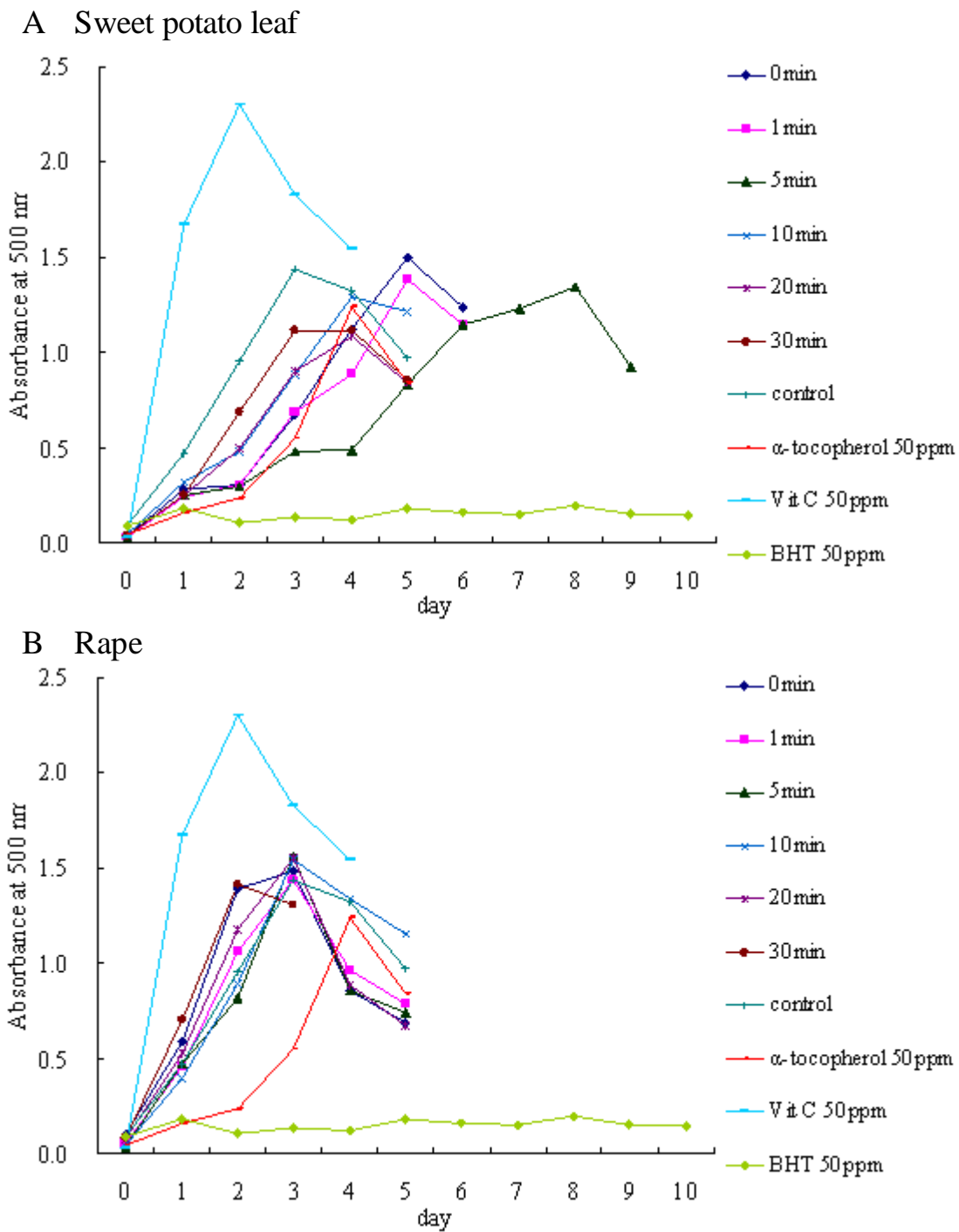


B Basil



圖二十、水煮時間對(A)香菜與(B)九層塔添加於亞麻油酸乳化系統十天期間其吸光值之影響

Figure 20. The effects of boiling time on the absorbance at 500 nm of (A) parsley and (B) basil in linoleic acid emulsion system during ten day.

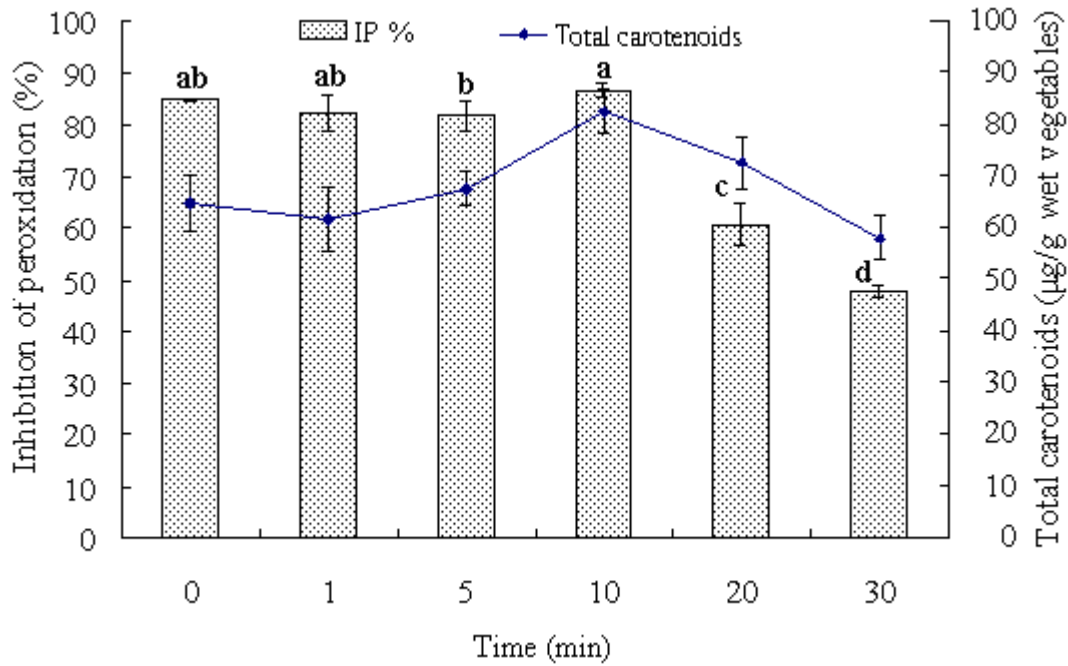


圖二十一、水煮時間對(A)地瓜葉與(B)油菜添加於亞麻油酸乳化系統十天期間其吸光值之影響

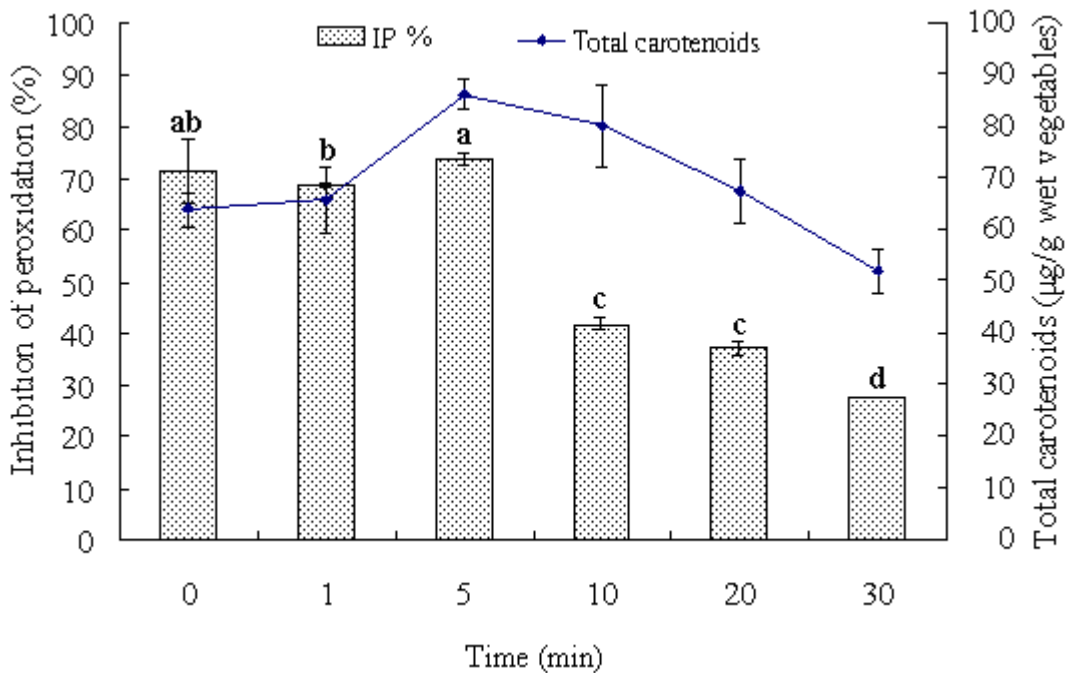
Figure 21. The effects of boiling time on the absorbance at 500 nm (A) sweet potato leaf and (B) rape in linoleic acid emulsion system during ten day.

性，由大至小依序為 BHT > 5 min > 1 min > 0 min a-tocopherol > 10 min > 20 min > 30 min 乙醇控制組 > Vit C；九層塔經水煮 1~5 min 後其抗氧化活性優於 a-tocopherol 及新鮮的九層塔，但當水煮時間超過 5 min，便逐漸降低其抗氧化活性，但仍優於乙醇控制組及 Vit C (圖二十 B)。水煮不同時間之地瓜葉其抗氧化活性，由大至小依序為 BHT > 5 min > a-tocopherol 1 min > 0 min > 20 min 10 min > 30 min > 乙醇控制組 > Vit C。地瓜葉之抗氧化活性與九層塔相似；經水煮 1~5 min 後，其抗氧化活性均較新鮮地瓜葉高，但水煮時間超過 5 min 後，反而降低其抗氧化活性，不過仍比乙醇控制高 (圖二十一 A)；不同水煮時間之油菜其抗氧化活性，由大至小依序為 BHT > a-tocopherol > 5 min 10 min 乙醇控制組 > 1 min > 0 min > 20 min > 30 min > Vit C，只有水煮 5、10 min 之油菜的乙醇萃取物具有抗氧化活性，且介於 a-tocopherol 及乙醇控制組之間，而水煮 0、1、20、30min 之油菜，不但不具有抗氧化性，與乙醇控制組相比，反有促進氧化的現象 (圖二十一 B)。將圖二十、二十一中，四種蔬菜在亞麻油酸乳化系統中第 2 天之吸光值除以控制組同天之吸光值，所得之抑制過氧化率 (IP %) 與其總類胡蘿蔔素含量變化作比較，如圖二十二、二十三所示 (詳細數據見附錄五、六)，結果顯示水煮前的四種蔬菜其 IP % 由高至低分別為香菜 > 九層塔 > 地瓜葉 > 油菜，與總類胡蘿蔔素含量高低排序相同。香菜於水煮 10 min，九層塔、地瓜葉及油菜在水煮 5 min 時，其總類胡蘿蔔素含量皆達到最高；同樣地，在香菜水煮 10 min，九層塔、地瓜葉及油菜於水煮 5 min 時，其 IP % 值也達最高，分別為 86.71、73.56、67.51、14.23 %。之後 IP % 值則隨水煮時間的增加而降低，皆於水煮 30 min 時，四種蔬菜之 IP % 值，皆達最低，分別為 47.68、27.55、29.12、-48.19 %。上述結果指出 4 種蔬菜之抑制脂質過氧化物形成之能力與其總類胡蘿蔔素含量是呈現正相關之趨勢。

A Parsly



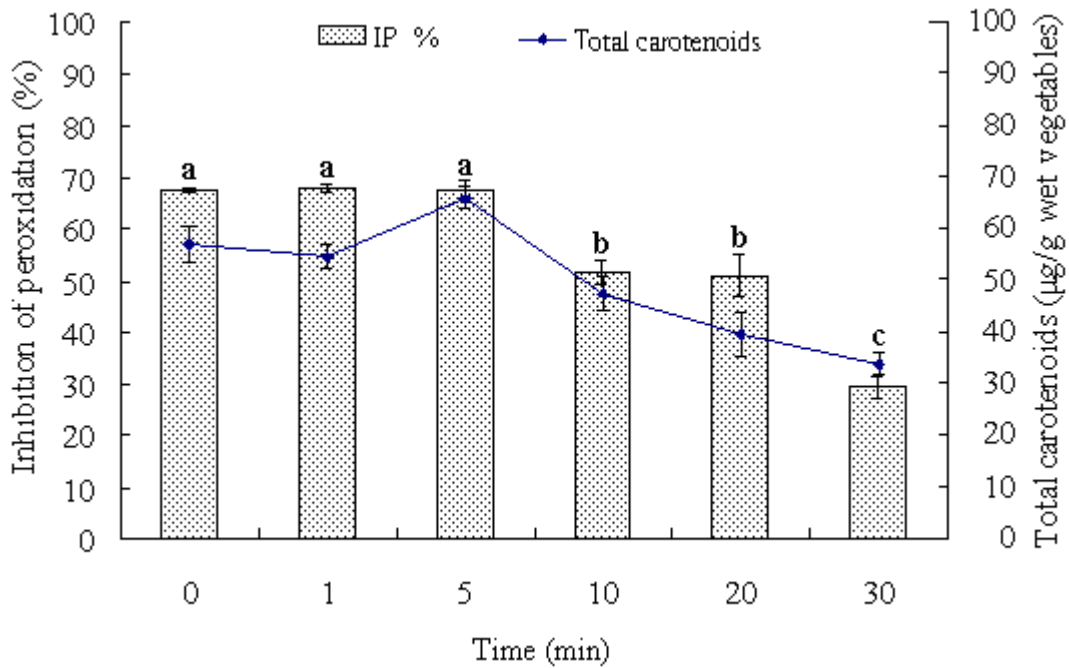
B Basil



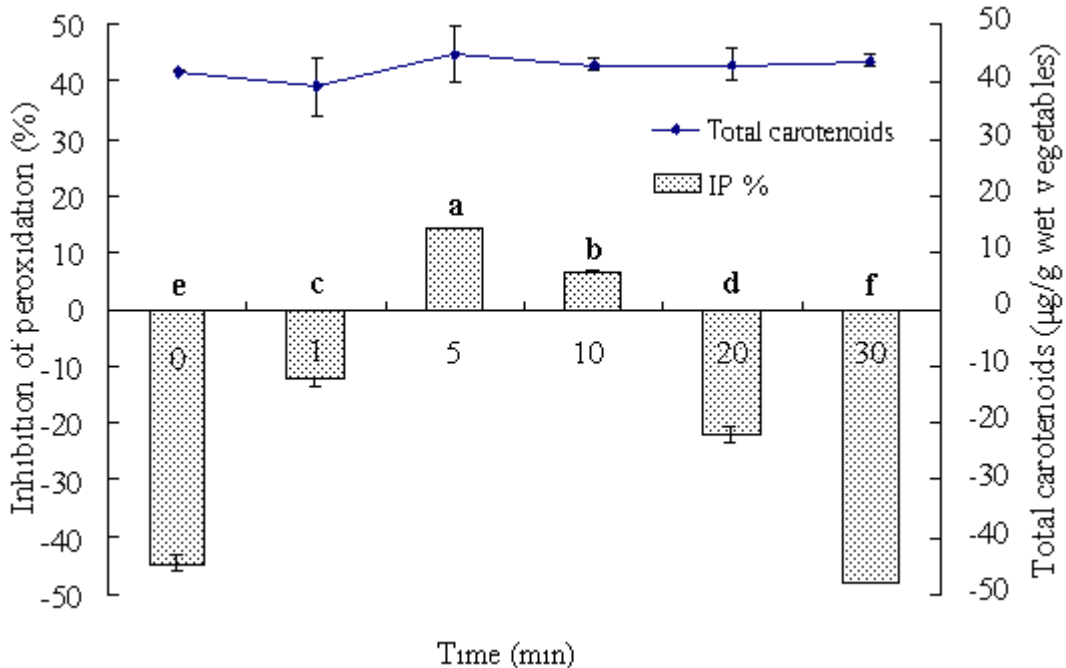
圖二十二、水煮時間對(A)香菜及(B)九層塔的抑制脂質過氧化率及總類胡蘿蔔素之影響

Figure 22. The effects of boiling time on the inhibition of peroxidation % (IP %) and total carotenoids of (A) parsly and (B) basil. IP % : Capacity to inhibit the peroxide formation in linoleic acid at 48 hours. Bar represent mean \pm SD, n =3. Means of IP % with different letters are significantly different (p<0.05).

A Sweet potato leaf



B Rape



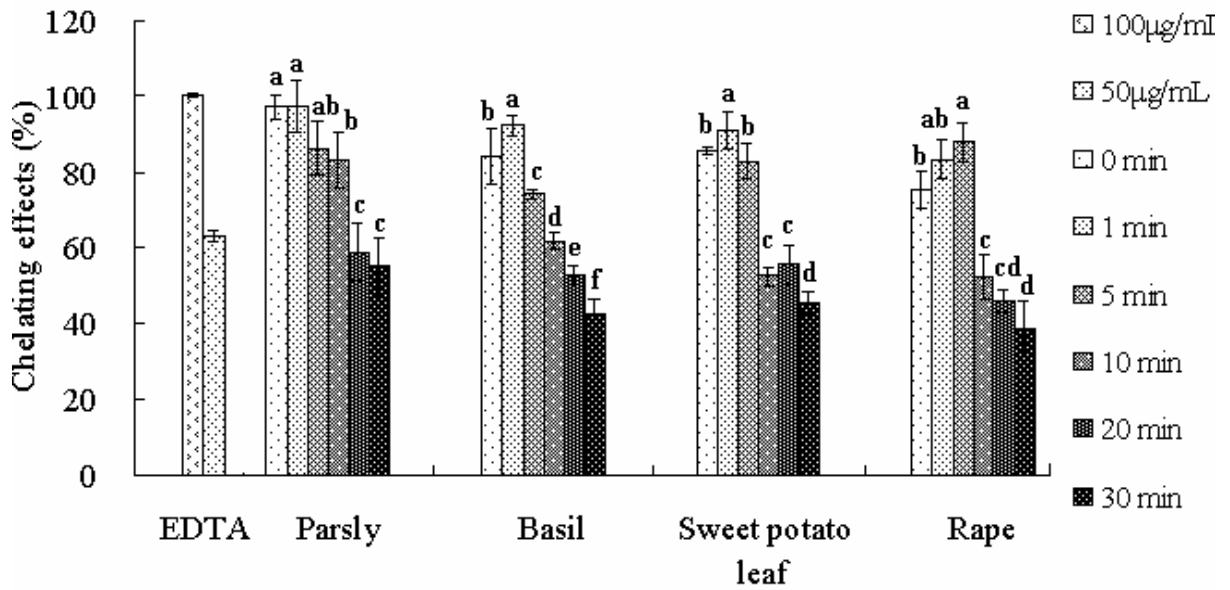
圖二十三 水煮時間對(A)地瓜葉及(B)油菜的抑制脂質過氧化率及總類胡蘿蔔素之影響

Figure 23. The effects of boiling time on the inhibition of peroxidation % (IP %) and total carotenoids of (A) sweet potato leaf and (B) rape. IP % : Capacity to inhibit the peroxide formation in linoleic acid at 48 hours. Bar represent mean \pm SD, n =3. Means of IP % with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

(三) 螯合亞鐵離子能力測定

由於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，因為只要有少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並能加速脂質的氧化 (Dinis et al., 1994)，於是比較經不同時間水煮後的蔬菜，其螯合亞鐵離子能力。如圖二十四 (詳細數據見附錄五、六) 所示，水煮前的 4 種蔬菜之螯合亞鐵能力由高至低分別為香菜 > 地瓜葉 > 九層塔 > 油菜，其中香菜、九層塔及地瓜葉經水煮 1min 後，其螯合亞鐵離子能力分由開始的 97.88、84.62 及 86.13 %，提升至 98.10、92.74 及 91.46 %，均接近標準品 EDTA (100ppm) 的螯合能力，但隨水煮時間增加其螯合能力反逐漸遞減，於第 30 min 時，螯合能力達到最低，分別為 55.53、43.03、45.81 %，油菜則是在水煮 5 min 前其螯合亞鐵離子能力是逐漸增加至 88.29 %，當加熱時間過長螯合亞鐵離子能力也隨之遞減至 38.87 %。Fennema (1997) 指出水煮過程會使蔬菜中 Vit C 大量流失，由於蔬菜中具有螯合亞鐵離子能力的成分，除了 Vit C 之外，可能還有葉酸及一些水溶性酚類等化合物，這些水溶性成分容易在水煮過程中流失，故導致萃取物的螯合亞鐵能力下降。

以上結果得知，蔬菜在經過適當的水煮後，可讓其中的類胡蘿蔔素及總酚類化合物含量增加，可以提升其抗氧化活性，目前已有文獻證實，蔬菜在經過適度加工後可以提升其生物利用性 (McEligot et al., 1999；Van het Hof et al., 2000)。可是植物中的天然抗氧化成分相當多，例如有抗壞血酸 (ascorbic acid)、類胡蘿蔔素、生育醇 (tocopherols)、類黃酮 (flavonoids)、葉綠素衍生物 (chlorophyll derivatives)、生物鹼 (alkaloids) 等 (Larson, 1988)，每種抗氧化成分所呈現的抗氧化機制都不同，因此用不同的抗氧化分析方法所得的分析結果也不盡相同，例如本研究中針對新鮮的 4 種蔬



圖二十四、水煮時間對香菜、九層塔、地瓜葉及油菜的螯合亞鐵離子能力之影響

Figure 24. The effects of boiling time on chelating effects of parsley, basil, sweet potato leaf and rape. Bar represent mean \pm SD, n = 3. Means of chelating effects with different letters are significantly different (p < 0.05).

菜之乙醇萃取物所測得之各別抗氧化活性: TEAC 由高至低分別為地瓜葉 > 九層塔 > 香菜 > 油菜; IP % 則為香菜 > 九層塔 > 地瓜葉 > 油菜; 螯合亞鐵能力為香菜 > 地瓜葉 > 九層塔 > 油菜, 趨勢都不儘相同。至於水煮時間對蔬菜抗氧化活性之影響, 其中以 TEAC 與總酚化合物含量呈現正相關, 但並不完全一致, 推測可能還受到其他水溶性抗氧化成分所影響。至於以硫氫酸鐵法來評估蔬菜之抗氧化活性, 因受測樣品是置於亞麻油酸乳化系統中, 所以主要受到油溶性抗氧化成分所影響, 從本研究結果中發現, IP % 變化趨勢與總類胡蘿蔔素總量呈現正相關。

伍、結論

以 HPLC 分析蔬菜中類胡蘿蔔素含量的最適當分析條件，是使用梯度沖提系統，並搭配逆相 C₃₀ 管柱為固定相，以 photodiode-array detector 在 450 nm 波長下進行偵測，可於 45 min 內分析出蔬菜中含有的 13-cis lutein、13[?]-cis lutein、all-trans lutein、9-cis lutein、9[?]-cis lutein、all-trans zeaxanthin、9-cis zeaxanthin、13-cis β -carotene、all-trans β -carotene 及 9-cis- β carotene 等共 10 種類胡蘿蔔素。至於 HPLC 分析前樣品的製備則是採用可節省時間及溶劑成本之樹酯皂化法來進行，於萃取與皂化過程中會添加 0.1 % BHT，以減少類胡蘿蔔素發生氧化的機會。

於上述最適之類胡蘿蔔素的分析條件，進行台灣省產二十五種蔬菜中全反式類胡蘿蔔素含量的分析，結果發現大部分蔬菜中的天然類胡蘿蔔素以 all-trans lutein 含量最多，其次是 all-trans β -carotene，最少是 all-trans zeaxanthin，總類胡蘿蔔素含量由高至低依序為香菜、九層塔、地瓜葉、油菜、菠菜、過貓、山蘇、芥藍、空心菜、川七、韭菜、皇宮菜、龍鬚菜、青江菜、茼蒿、A 菜、青花菜、小白菜、黃秋葵、金針花(青)、金針花(黃)、玉米、青椒、大陸妹、高麗菜等蔬菜，其中香菜、九層塔、地瓜葉與油菜所含的總類胡蘿蔔素最豐富，其含量分別為 104.76、83.68、75.96 與 62.32 $\mu\text{g/g}$ fresh vegetables，故以此 4 種蔬菜探討水煮、油炒和油炸等不同熱加工方法對類胡蘿蔔素含量影響之研究，結果顯示，三種加工方法皆讓 4 種蔬菜中全反式類胡蘿蔔素總含量下降，而水煮會使順式類胡蘿蔔素總含量增加，油炒或油炸則讓順式類胡蘿蔔素總含量減少，最後以總類胡蘿蔔素含量來看，水煮方法損失最少且沒有顯著差異，油炒香菜、九層塔、地瓜葉與油菜分別損失 32.61、14.75、31.20 與 33.69 %，油炸九層塔則損失 36.97 %。進一步探討水煮時間對上述四種蔬菜之總類胡蘿蔔素含量與總酚含量

之影響；總類胡蘿蔔素含量方面，隨水煮時間增長，總類胡蘿蔔素含量先增後減，表示一開始水煮可能促進類胡蘿蔔素的釋放，當水煮時間過長反而導致其發生降解，香菜、九層塔、地瓜葉與油菜分別在水煮 10、5、5 與 5 min 時總類胡蘿蔔素含量達最高，與新鮮蔬菜相比，分別增加了 27.30、34.88、15.72 與 7.27 %；總酚含量方面，香菜和油菜隨水煮時間增加而總酚含量逐漸減少，九層塔與地瓜葉則分別在水煮 1 與 5 min 時達到最高，增加了 14.66 與 30.61 %，之後隨水煮時間增加而遞減。

最後探討水煮時間對 4 種蔬菜之抗氧化活性之影響；抗氧化活性之評估方法包括 TEAC、抑制脂質過氧化物形成 (IP%) 及螯合亞鐵離子之能力；在 TEAC 方面，香菜水煮 1 min 與新鮮的相比，其 TEAC 顯著提升 7.53 %，九層塔與地瓜葉水煮 5 min，分別增加 3.76 % 及 7.59 %，但過度水煮反導致 TEAC 值之下降，油菜之 TEAC 值則隨水煮時間增加而逐漸遞減，TEAC 之變化趨勢是與總酚含量的變化趨勢相似；在抑制脂質過氧化物形成方面，水煮香菜 10 min，九層塔、地瓜葉及油菜則在 5 min 時，抑制脂質過氧化率達最高分別為 86.71、73.56、67.51 及 14.23 %，與其總類胡蘿蔔素含量成正相關；在螯合亞鐵離子能力方面，以水煮香菜、九層塔及地瓜葉 1min，油菜 5min 時最佳，分別為 98.10、92.74、91.46 及 88.29 %。由以上結果得知，當蔬菜經過適當的水煮後，可使其抗氧化活性達到最高，但之後均隨著水煮時間增加而逐漸遞減，約在 20 至 30 min 時達到最低，因此適當的水煮不但可提升蔬菜的類胡蘿蔔素和總酚類化合物含量，亦可增加其抗氧化活性。

陸、參考文獻

- 陳炳輝 (2000) 類胡蘿蔔素的特性與應用。科學發展月刊。28(8): 599-604
- 楊淑惠 (1990) 類胡蘿蔔素於萃取和烹調綠色蔬菜過程中的安定性探討。私立輔仁大學食品營養學系碩士論文。
- Aman, R., Biehl, J., Carle, R., Conrad, J., Beifuss, U., and Schieber, A. (2005) Application of HPLC coupled with DAD, ApcI-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. *Food Chem.* 92: 753-763.
- Anguelova, T., and Warthsen, J. (2000) Degradation of lycopene, α -carotene, and β -carotene during lipid peroxidation. *J. Food Sci.* 65: 71-75.
- Bando, N., Hayashi, H., Wakamatsu, S., Inakuma, T., Miyoshi, M., Nagao, A., Yamauchi, R., and Terao, J. 2004. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary β -carotene: an ex vivo study. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 1854-1863.
- Bauernfeind, J. C. (1981) Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. *Food Sci. Technol.* pp. 883.
- Ben-Amotz, A., and Levy, Y. (1996) Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans- β -carotene in human serum. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 729-734.
- Berg, H. V. D., Faulks, R., Grando, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandman, G., Southon, S., and Stahl, W. (2000) Review the potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agric.* 80: 880-912.
- Bohm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G., and Schwartz, S. J. (2002) Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J. Agri. Food Chem.* 50: 221-226.
- Bolton-Smith, C., Woodward, M., and Tunstall-Pedoe, H. (1992) The Scottish heart health study. Dietary intake by food frequency questionnaire and odds ratios for coronary heart disease risk I. Macronutrients. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46: 75-84.
- Burton, G. W., and Ingold, K. U. (1984) β -carotene : an unusual type of liquid antioxidant. *Sci.* 224: 569-573.
- Burton, G. W. (1989) Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.* 119: 109-111.
- Byers, T., and Perry, G. (1992) Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annual Review Nutr.* 12:

139-159.

- Castelluccio, C., Paganga G., Melikian N., Bolwell G., Pridham J., Sampson J., and Rice-Evans, C. A. (1995) Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.* 368: 188-192.
- Chasan-Taber, L., Willett, W. C., Seddon, J. M., Stampfer, M. J., Rosner, B., and Colditz, G. A. (1999) A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 509–516.
- Chen, B. H., Chen, T. M., and Chien, J. T. (1994) Kinetic model for studying isomerization of α - and β -carotene during heating and illumination. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2391-2397.
- Chen, B. H., and Lin, C. H. (2003) Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1012: 103-109.
- Chen, B. H., Peng, H. Y., and Chen, H. E. (1995) Changes of carotenoids, color, and vitamin A contents during processing of carrot juice. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1912-1918.
- Chen, H. E., Peng, H. Y., and Chen, B. H. (1996) Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice. *Food Chem.* 57:497-503.
- Chen, B. H., and Yang, S. H. (1992) An improved analytical method for the determination of carotenes and xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds. *Food Chem.* 44: 61-66.
- Conn, P. F., Schalch, W., and Truscott, T. G. (1991) The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J. Photochem. Photobio.* 11: 41-47.
- Dachtler, M., Glaser, T., Kohler, K., and Albert, K. (2001) Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Anal. Chem.* 73: 667-674.
- Dachtler, M., Kohler, K., and Albert, K. (1998) Reversed phase high-performance liquid chromatographic identification of lutein and zeaxanthin stereoisomers in bovine retina using a C₃₀ bonded phase. *J. Chromatogr. B.* 720: 211-216.
- Deming, D. M., Teixeira, S. R., and Erdman, J. W. (2002) All-trans β -carotene appears to be more bioavailable than 9-cis or 13-cis β -carotene in gerbils given single oral doses of each isomer. *J. Nutr.* 132: 2700-2708.
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., and Almeida, L. M. (1994) Action of phenolic derivative (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 161-169.
- Edelenbos, M., Christensen, L. P., and Grevsen, K. (2001) HPLC determination of chlorophyll and carotenoid pigments in processed

- green pea cultivars (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 49: 4768-4774.
- Farmer, E. H., Bloomfield, G. F., Sundralingam, A., and Sutton, D. A. (1942) The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. *Trans. Faraday Soc.* 38: 348-356.
- Fennema, O. (1997) Loss of vitamins in fresh and frozen foods. *Food Technol.* 31(12): 32-38.
- Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martinez, E., and Blanco, I. (2001) A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 14: 479-489
- Godoy, H. T., and Rodriguez-Amaya, D. B. (1994) Occurrence of cisomers of provitamin A in Brazilian fruits. *J. Agri. Food Chem.* 42: 1306-1313.
- Goodwin, T. W. (1981) *The biochemistry of carotenoids. Vol I.* Hapman and Hall, New York. NY.
- Goodwin, T. W. (1986) Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.* 6: 273-297.
- Hart, D.J., and Scott, K. J. (1995) Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoids content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* 54: 101-111.
- Havaux, M. (2003) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science.* 3: 147-151.
- Henry, L. K., Catignani, G. L., and Schwartz, S. J. (1998) Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans β -carotene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 823-829.
- Humphries, J. M., and Khachik, F. (2003) Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *J. Agri. Food Chem.* 51: 1322-1327.
- Jimenez, C., and Pick, U. (1993) Differential reactivity of β -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. *Plant Physi.* 101: 385-390.
- 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.
- Khachik, F., Beecher, G. R., and Whittaker, N. F. (1986) Separation, identification, and quantification of the major carotenoids and chlorophyll; constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34: 603-616.

- Khachik, F., Bernstein, P. S., and Garland, D. L. (1997) Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 1802-1811.
- Kopas-Lane, L. M., and Warthesen, J. J. (1995) Carotenoid photostability in raw spinach and carrots during cold storage. *J. Food Sci.* 60: 773-776.
- Kruger, C. L., Murphy, M., DeFreitas, Z., Pfannkunch, F., and Heimbach, 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.
- Labuza, T. P. (1971) Kinetics of lipid oxidation in foods. *Crit. Rev. Food Technol.* 355-396
- Landrum, J. T., and Bone, R. A. (2001) Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archi. Biochemi. Biophys.* 385: 28-40.
- Larsen, E., and Christensen L. P. (2005) Simple Saponification Method for the Quantitative Determination of Carotenoids in Green Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6598-6602.
- Larson, R. A. (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* 27: 969-978.
- Lee, B. L., Su, J., and Ong, C.N. (2004) Monomeric C₁₈ chromatographic method for the lipid chromatographic determination of lipophilic antioxidants in plants. *J. Chromatogr. A.* 1048: 263-267.
- Lee, S. H., and Min D. B. (1990) Effects, quenching mechanisms, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. *J. Agric. Food Chem.* 38(8): 1630-1634.
- Liu, Y., Perera, C. O., and Suresh, V. (2007) Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content. *Food Chem.* 101: 1533-1539.
- Mares-perlman, J. A., Fisher, A. I., Palta, M., Block, G., and Millen, A. E. (2001) Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey. *Am. J. Epidemiol.* 153: 424-432.
- Marx, M., Stuparic, M., Schieber, A., and Carle, R. (2003) Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. *Food Chem.* 83: 609-617.
- McEligot, A. J., Rock, C. L., Shanks, T. G., Flatt, S. W., Newman, V., and Faerber, S. (1999) Comparison of serum carotenoid responses between women consuming vegetable juice and women consuming raw or cooked vegetables. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 8: 227-231.
- Miller, L. N., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner,

- A. (1993) A novel method for measuring antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84: 407-412.
- Minguez-Mosquera, M. I., Hornero-Mendez, D., and Perez-Galvez, A. (2002) Carotenoids and provitamin A in functional foods. In W. J. Hurst (Ed.). *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. Boca Raton. London. New York. Washington. DC: CRC Press. pp. 101-157.
- Mitsuda, H., Yasumodo, K., and Iwami, K. (1996) Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo* 19: 210-214.
- Mortensen, A., and Skibsted, L. H. (2000) Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogenous solution. *J. Agri. Food Chem.* 48: 279-286.
- Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Vaquero, M., and Cajigal, C. (2001) Lutein in patients with cataracts and age-related macular degeneration: a long-term supplementation study. *J. Sci. Food Agric.* 81: 904-909.
- O'Neil, C. A., and Schwartz, S. J. (1995) Photoisomerization of β -Carotene by Photosensitization with Chlorophyll Derivatives as Sensitizers. *J. Agric. Food Chem.* 43: 631-635.
- Rajendran, V., and Chen, B. H. (2007) Isomerization of β -carotene by titanium tetrachloride catalyst. *J. Chem. Sci.* 119(3): 253-258.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1989) Critical review of provitamin A determination in plant foods. *J. Micronutrient Anal.* 5: 191-225.
- Sander, L. C., Sharpless, K. E., Craft, N. E., and Wise, S. A. (1994) Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Anal. Chem.* 66: 1667-1674.
- Seddon, J. M., Ajani, U. A., Sperduto, F. L. D., Hiller, R., Blair, N., and Burton, T. C. (1994) Dietary carotenoids, Vitamins C and E, and advanced age-related macular degeneration. *Eye Disease Case-Control Study Group* *JAMA*, 272, 1413-1420.
- Semba, R. D., and Dagnelie, G. (2003) Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health? *Med. Hypotheses.* 61(4): 465-472.
- Shi, J., and Maguer, M. L. (2000) Lycopene in tomatoes : chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40: 1-42.
- Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H., and Tronnier, H. (2000) Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 795-798.
- Stahl, W., Schwarz, W., and Sies, H. (1993) Human serum concentrations of all-trans- β - and α -carotene but not 9-cis- β -carotene increase upon ingestion of a natural mixture obtained from *Dunaliella salina*

- (Betatene). *J. Nutr.* 123: 173-177.
- Takashashi, Y., Sasaki, S., Takashashi, M., Okubo, S., Hayashi, M., and Tsugane, S. (2003) A population-based dietary intervention trial in a high-risk area for stomach cancer and stroke: changes in intakes and related biomarkers. *Prev. Med.* 37: 432-441.
- Tee, E. S. (1992) Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31(1/2): 103-163.
- Willis, M. S., and Wians, F. H. (2003) The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action various dietary substances. *Clin. Chim. Acta.* 330:57-83.
- Woodall, A. A., Lee, S. W., Weesie, R. J., Jackson, M. J., and Britton, G. (1997) Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1336: 33-42.
- Urdike, A. A., and Schwartz, S. J. (2003) Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxanthin. *J. Agri. Food Chem.* 51: 6184-6190.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Fernando Granado, H., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., and Stahl, W. (2000) The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agri.* 80: 880-912.
- Van het Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A., and Hautvast, J. G. A. J. (2000) Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J. Nutri.* 130: 503-506.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B. D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4113-4117.
- Von Doering, W. E., Sotiriou-Leventis, C., and Roth, W. R. (1995) Thermal interconversions among 15-cis, 13-cis, and all-trans- β -carotene: Kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-trans- β -carotene. *J. Am. Chem. Soci.* 117: 2747-2757.
- Yeum, K. J., and Russell, R. M. (2002) Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 483-504.
- Zhang, D., and Hamazu, Y. (2004) Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem.* 88: 503-509.

柒、附錄

附錄一、省產蔬菜中全反式類胡蘿蔔素含量分布

Appendix 1. Quantitative distribution of various all-trans carotenoids in fresh vegetables commonly consumed in Taiwan

Vegetables	Moisture %	Total carotenoids ³	All-trans carotenoids ^{1,2}		
			Lutein	Zeaxanthin	β-carotene
Basil	92.80	83.68 ± 3.39 ^b	62.65 ± 1.98 ^{bc}	7.59 ± 0.55 ^a	13.44 ± 0.86 ^{de}
Broccoli	89.33	19.03 ± 1.35 ^{kl}	9.81 ± 0.38 ^j	0.35 ± 0.03 ^{hij}	8.87 ± 0.94 ⁱ
Cabbage	93.66	0.48 ± 0.04 ⁿ	0.10 ± 0.01 ^l	—	0.38 ± 0.03 ^{mn}
Ceylon spinach	93.46	38.11 ± 0.60 ^{fg}	35.39 ± 0.53 ^{ef}	1.68 ± 0.03 ^e	1.04 ± 0.03 ^{mn}
Chinese Chive	90.67	43.15 ± 1.00 ^f	33.18 ± 0.71 ^f	0.29 ± 0.01 ^{hij}	9.68 ± 0.28 ^{ghi}
Chinese kale	93.63	50.29 ± 4.99 ^e	39.22 ± 4.89 ^d	0.66 ± 0.05 ^{egh}	10.41 ± 0.05 ^{fgh}
Chinese white cabbage	95.40	18.23 ± 1.01 ^{kl}	6.87 ± 0.41 ^j	0.25 ± 0.01 ^{ij}	11.11 ± 0.58 ^f
Ching-Geeng	94.64	32.02 ± 2.22 ^{hi}	26.59 ± 1.93 ^g	0.28 ± 0.01 ^{hij}	5.15 ± 0.29 ^{kl}
Corn	75.37	10.40 ± 0.14 ^m	5.71 ± 0.06 ^{jk}	4.48 ± 0.07 ^c	0.21 ± 0.01 ⁿ
Day lily (green)	82.61	15.50 ± 0.57 ^l	8.05 ± 0.08 ^j	0.92 ± 0.01 ^{fg}	6.53 ± 0.48 ^{jk}
Day lily (yellow)	88.22	12.67 ± 0.68 ^m	2.24 ± 0.21 ^k	4.55 ± 0.20 ^c	5.88 ± 0.27 ^k
Fern	92.66	52.46 ± 1.54 ^e	28.11 ± 0.32 ^g	1.05 ± 0.01 ^f	23.30 ± 1.21 ^b
Garden lettuce	95.07	26.61 ± 0.79 ^{ij}	23.87 ± 0.74 ^{gh}	1.93 ± 0.02 ^e	0.81 ± 0.03 ^{mn}
Garland chrysanthemum	94.91	28.32 ± 1.10 ^{ij}	20.95 ± 0.64 ^{hi}	0.60 ± 0.03 ^{ghi}	6.77 ± 0.43 ^j
Gracilaria	91.89	35.26 ± 1.08 ^{gh}	21.32 ± 0.27 ^{hi}	0.78 ± 0.07 ^{gf}	13.16 ± 0.74 ^e
Green pepper	93.86	8.49 ± 0.64 ^m	8.02 ± 0.62 ^j	0.27 ± 0.01 ^{ij}	0.20 ± 0.01 ⁿ
Lettuce	95.71	2.38 ± 0.12 ⁿ	1.95 ± 0.10 ^{kl}	0.14 ± 0.01 ^j	0.29 ± 0.02 ^{mn}
Okura	89.67	16.68 ± 1.17 ^l	7.28 ± 0.66 ^j	0.13 ± 0.01 ^j	9.27 ± 0.50 ^{hi}
Parsly	88.80	104.76 ± 10.09 ^a	77.65 ± 7.73 ^a	0.88 ± 0.03 ^{fg}	26.23 ± 2.34 ^a
Rape	93.70	62.32 ± 4.77 ^d	60.28 ± 4.58 ^c	0.38 ± 0.02 ^{hij}	1.67 ± 0.16 ^m
Sanchi	95.10	49.64 ± 3.38 ^e	36.19 ± 2.63 ^{ef}	2.67 ± 0.27 ^d	10.78 ± 0.48 ^{fg}
Spinach	94.33	61.63 ± 4.23 ^d	41.98 ± 2.61 ^d	5.06 ± 0.70 ^b	14.60 ± 0.91 ^d
Sweet potato leaf	89.98	75.96 ± 2.34 ^c	65.52 ± 1.38 ^b	0.94 ± 0.09 ^{fg}	9.51 ± 0.87 ^{ghi}
Vegetable Fern	90.43	53.62 ± 2.71 ^e	32.75 ± 0.99 ^f	2.83 ± 0.23 ^d	18.03 ± 1.48 ^c
Water convolvulus	93.03	49.98 ± 4.41 ^e	43.30 ± 3.86 ^d	0.40 ± 0.03 ^{hij}	6.28 ± 0.52 ^{jk}

¹Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters are significantly different (p<0.05).

²Concentrations are in micrograms per gram of fresh vegetables tissue.

³Data are based on a total of all-trans lutein, all-trans zeaxanthin and all-trans β-carotene.

⁴ “ - ” Not detectable.

附錄二、加工方法對蔬菜中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響

Appendix 2. The effects of processing methods on the contents of carotenoids and related geometrical isomers in vegetables

Vegetables	Moisture %	Carotenoids isomers ^{1,2}						
		Total carotenoids ³	Lutein isomers					
			total	all-trans	13-cis	13'-cis	9-cis	9'-cis
Parsly (香菜)	88.75							
Fresh		98.83 ±0.00 ^a	79.12 ±0.83 ^a	71.89 ±0.41 ^a	3.35 ±0.22 ^a	1.80 ±0.07 ^b	1.11 ±0.02 ^a	0.96 ±0.10 ^a
Boiled		94.48 ±6.61 ^a	74.77 ±5.25 ^a	67.48 ±4.83 ^a	2.90 ±0.18 ^a	2.14 ±0.10 ^a	1.20 ±0.13 ^a	1.05 ±0.02 ^a
stir-fried		66.60 ±4.14 ^b	55.52 ±3.54 ^b	49.75 ±3.18 ^b	1.59 ±0.03 ^b	1.57 ±0.10 ^c	1.41 ±0.13 ^a	1.21 ±0.09 ^a
Basil(九層塔)	91.99							
Fresh		85.92 ±3.09 ^a	67.58 ±0.97 ^a	63.02 ±0.68 ^a	2.11 ±0.03 ^a	1.34 ±0.07 ^a	0.59 ±0.18 ^b	0.51 ±0.01 ^b
Boiled		85.11 ±3.63 ^a	65.25 ±5.99 ^a	59.95 ±5.81 ^a	1.89 ±0.06 ^a	1.43 ±0.07 ^a	0.91 ±0.31 ^b	1.08 ±0.36 ^a
stir-fried		73.25 ±1.91 ^b	60.92 ±0.55 ^a	57.16 ±0.13 ^a	1.00 ±0.02 ^b	1.17 ±0.08 ^b	0.85 ±0.14 ^b	0.75 ±0.17 ^{ab}
deep-fried		54.15 ±2.62 ^c	47.36 ±2.07 ^b	41.67 ±1.32 ^b	1.94 ±0.11 ^a	1.06 ±0.01 ^b	1.86 ±0.45 ^a	0.83 ±0.18 ^{ab}
Sweet potato leaf (地瓜葉)	88.75							
Fresh		79.77 ±2.18 ^a	69.84 ±0.74 ^a	66.07 ±0.07 ^a	1.69 ±0.21 ^a	1.04 ±0.04 ^a	0.66 ±0.33 ^a	0.48 ±0.10 ^a
boiled		71.37 ±3.08 ^b	60.90 ±2.66 ^b	57.04 ±2.23 ^b	1.58 ±0.15 ^a	1.00 ±0.07 ^a	0.68 ±0.07 ^a	0.60 ±0.14 ^a
stir-fried		54.88 ±3.97 ^c	50.57 ±3.77 ^c	46.67 ±3.12 ^c	1.53 ±0.22 ^a	0.89 ±0.07 ^a	0.76 ±0.16 ^a	0.62 ±0.20 ^a
Rape (油菜)	92.86							
fresh		65.68 ±1.17 ^a	60.23 ±0.69 ^a	56.79 ±0.29 ^a	2.05 ±0.24 ^a	1.32 ±0.06 ^a	0.76 ±0.08 ^b	0.49 ±0.01 ^a
boiled		67.02 ±5.40 ^a	61.50 ±4.51 ^a	55.62 ±4.13 ^a	2.00 ±0.19 ^a	1.31 ±0.10 ^a	0.83 ±0.06 ^b	0.56 ±0.03 ^b
stir-fried		43.55 ±4.40 ^b	40.01 ±4.04 ^b	35.82 ±3.55 ^b	1.29 ±0.23 ^b	0.88 ±0.10 ^b	1.23 ±0.11 ^a	0.79 ±0.06 ^c

¹Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

²Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue.

³Data are based on total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

附錄二、(續)

Appendix 2. (Continued)

Vegetables	Carotenoids isomers ^{1,2}						
	Zeaxanthin isomers			β-Carotene isomers			
	total	all-trans	9-cis	total	all-trans	13-cis	9-cis
Parsly (香菜)							
fresh	2.67 ±0.23 ^a	2.20 ±0.15 ^a	0.46 ±0.08 ^b	17.04 ±1.94 ^a	10.27 ±1.59 ^a	1.31 ±0.07 ^a	5.46 ±0.29 ^a
boiled	2.34 ±0.24 ^b	1.85 ±0.17 ^a	0.49 ±0.06 ^b	17.37 ±1.13 ^a	10.28 ±0.65 ^a	1.22 ±0.17 ^{ab}	5.88 ±0.32 ^a
stir-fried	2.13 ±0.14 ^b	1.51 ±0.08 ^b	0.62 ±0.06 ^a	8.94 ±0.46 ^b	4.86 ±0.32 ^b	1.12 ±0.02 ^b	2.96 ±0.12 ^b
Basil(九層塔)							
fresh	6.06 ±0.95 ^a	5.51 ±0.88 ^{ab}	0.55 ±0.07 ^{ab}	12.29 ±1.17 ^a	6.56 ±0.91 ^a	1.84 ±0.09 ^a	3.88 ±0.17 ^a
boiled	7.26 ±1.03 ^a	6.70 ±0.96 ^a	0.55 ±0.06 ^{ab}	12.61 ±1.62 ^a	7.22 ±1.19 ^a	1.57 ±0.07 ^b	3.81 ±0.35 ^a
stir-fried	6.00 ±0.66 ^a	5.60 ±0.60 ^{ab}	0.40 ±0.06 ^b	6.33 ±0.71 ^b	3.52 ±0.61 ^b	1.30 ±0.01 ^c	1.51 ±0.08 ^b
deep-fried	4.99 ±0.36 ^b	4.35 ±0.17 ^b	0.64 ±0.19 ^a	1.81 ±0.19 ^c	1.81 ±0.19 ^b	–	–
Sweet potato leaf (地瓜葉)							
fresh	0.92 ±0.08 ^a	0.78 ±0.03 ^a	0.14 ±0.05 ^b	8.91 ±1.36 ^a	4.39 ±1.13 ^a	1.38 ±0.02 ^b	3.14 ±0.21 ^b
boiled	0.83 ±0.10 ^a	0.70 ±0.07 ^a	0.13 ±0.03 ^b	9.64 ±0.32 ^a	4.05 ±0.05 ^{ab}	1.81 ±0.13 ^a	3.78 ±0.14 ^a
stir-fried	0.72 ±0.11 ^a	0.53 ±0.07 ^b	0.19 ±0.04 ^a	3.69 ±0.09 ^b	2.23 ±0.01 ^b	–	1.46 ±0.08 ^c
Rape (油菜)							
fresh	0.49 ±0.07 ^a	0.49 ±0.07 ^a	– ³	4.96 ±0.41 ^a	2.47 ±0.16 ^a	0.83 ±0.05 ^a	1.65 ±0.20 ^b
boiled	0.42 ±0.02 ^a	0.42 ±0.02 ^a	–	5.11 ±0.87 ^a	2.39 ±0.10 ^a	0.88 ±0.07 ^a	1.83 ±0.17 ^{ab}
stir-fried	0.31 ±0.03 ^b	0.31 ±0.03 ^b	–	3.23 ±0.32 ^b	0.78 ±0.08 ^b	0.47 ±0.01 ^b	1.98 ±0.12 ^a

¹Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

²Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue.

³ “ – ” Not detectable.

附錄三、水煮時間對香菜和九層塔中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響

Appendix 3. The effects of boiling time on the contents of carotenoids and related geometrical isomers in parsley and basil

Vegetables	Moisture %	Carotenoids isomers ^{1,2}						
		Total carotenoids ³	Lutein isomers					
			total	all-trans	13-cis	13'-cis	9-cis	9'-cis
Parsly (香菜)	87.98							
0		102.03 ± 4.22 ^b	79.89 ± 3.99 ^b	74.26 ± 3.71 ^{ab}	2.99 ± 0.11 ^b	1.40 ± 0.11 ^d	0.81 ± 0.03 ^e	0.44 ± 0.03 ^c
1		101.41 ± 7.18 ^b	79.17 ± 7.05 ^b	73.94 ± 6.62 ^b	2.69 ± 0.31 ^b	1.56 ± 0.06 ^{cd}	0.64 ± 0.01 ^e	0.35 ± 0.06 ^c
5		111.14 ± 3.98 ^a	87.93 ± 3.22 ^a	81.05 ± 2.80 ^a	3.41 ± 0.25 ^a	1.72 ± 0.01 ^{bc}	1.25 ± 0.10 ^d	0.49 ± 0.06 ^c
10		112.71 ± 5.22 ^a	86.01 ± 3.05 ^{ab}	78.55 ± 2.64 ^{ab}	2.67 ± 0.16 ^b	2.12 ± 0.01 ^a	1.95 ± 0.15 ^c	0.72 ± 0.08 ^b
20		91.73 ± 2.34 ^c	67.10 ± 1.98 ^c	60.51 ± 1.46 ^c	2.09 ± 0.14 ^c	1.45 ± 0.11 ^d	2.25 ± 0.23 ^b	0.79 ± 0.03 ^b
30		85.02 ± 4.72 ^c	62.18 ± 3.59 ^c	53.52 ± 2.83 ^d	2.72 ± 0.23 ^b	1.87 ± 0.07 ^{ab}	3.02 ± 0.25 ^a	1.05 ± 0.20 ^a
Basil(九層塔)	91.96							
0		94.90 ± 4.61 ^b	75.64 ± 3.70 ^{ab}	69.80 ± 3.24 ^a	1.86 ± 0.15 ^c	2.24 ± 0.09 ^{bc}	1.18 ± 0.05 ^d	0.56 ± 0.18 ^b
1		91.53 ± 6.55 ^{bc}	73.67 ± 4.74 ^b	67.49 ± 4.37 ^a	1.92 ± 0.05 ^c	2.51 ± 0.13 ^b	1.12 ± 0.15 ^d	0.63 ± 0.05 ^b
5		103.34 ± 3.92 ^a	80.46 ± 1.94 ^a	72.59 ± 1.22 ^a	2.58 ± 0.14 ^a	3.00 ± 0.24 ^a	1.59 ± 0.24 ^c	0.70 ± 0.09 ^b
10		83.88 ± 6.37 ^c	65.82 ± 5.59 ^c	57.73 ± 4.71 ^b	2.17 ± 0.16 ^b	2.95 ± 0.31 ^a	2.06 ± 0.24 ^b	0.92 ± 0.17 ^a
20		68.01 ± 1.61 ^d	49.46 ± 0.62 ^d	41.75 ± 0.45 ^c	1.95 ± 0.02 ^c	1.92 ± 0.08 ^c	2.81 ± 0.03 ^a	1.02 ± 0.05 ^a
30		58.51 ± 2.81 ^e	43.60 ± 1.51 ^d	37.49 ± 1.22 ^c	1.02 ± 0.06 ^d	1.17 ± 0.08 ^d	2.89 ± 0.08 ^a	1.03 ± 0.07 ^a

¹Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

²Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue.

³Data are based on total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

附錄三、(續)

Appendix 3. (Continued)

Vegetables	Time (min)	Carotenoids isomers ^{1,2}						
		Zeaxanthin isomers			β-Carotene isomers			
		total	all-trans	9-cis	total	all-trans	13-cis	9-cis
Parsly (香菜)								
	0	1.67 ±0.02 ^a	1.28 ±0.02 ^a	0.39 ±0.01 ^d	20.48 ±0.21 ^c	15.83 ±0.07 ^a	0.96 ±0.09 ^b	3.69 ±0.05 ^b
	1	1.39 ±0.20 ^b	1.01 ±0.19 ^{bc}	0.38 ±0.02 ^d	20.85 ±0.43 ^c	15.12 ±0.17 ^b	1.23 ±0.16 ^b	4.50 ±0.10 ^b
	5	1.63 ±0.14 ^{ab}	1.19 ±0.13 ^{ab}	0.44 ±0.01 ^c	21.58 ±0.62 ^{bc}	16.07 ±0.23 ^a	1.16 ±0.18 ^b	4.36 ±0.22 ^b
	10	1.71 ±0.13 ^a	1.25 ±0.12 ^a	0.46 ±0.01 ^c	24.98 ±2.04 ^a	16.27 ±0.40 ^a	1.58 ±0.22 ^a	7.13 ±1.42 ^a
	20	1.54 ±0.10 ^{ab}	0.93 ±0.09 ^c	0.61 ±0.01 ^b	23.10 ±0.26 ^b	14.25 ±0.12 ^c	1.03 ±0.10 ^b	7.82 ±0.04 ^a
	30	1.59 ±0.15 ^{ab}	1.01 ±0.14 ^{bc}	0.58 ±0.01 ^a	21.24 ±0.98 ^c	12.58 ±0.45 ^d	0.54 ±0.10 ^c	8.12 ±0.43 ^a
Basil(九層塔)								
	0	5.33 ±0.15 ^b	4.88 ±0.13 ^b	0.45 ±0.02 ^b	13.92 ±0.76 ^{bc}	7.69 ±0.41 ^{cd}	2.10 ±0.15 ^a	4.13 ±0.20 ^c
	1	5.29 ±0.25 ^b	4.78 ±0.23 ^b	0.50 ±0.03 ^b	12.57 ±1.56 ^c	7.15 ±1.00 ^{de}	1.45 ±0.13 ^c	3.97 ±0.43 ^c
	5	6.02 ±0.06 ^a	5.42 ±0.01 ^a	0.60 ±0.05 ^a	16.86 ±1.92 ^a	9.77 ±0.55 ^a	1.77 ±0.09 ^b	5.32 ±1.29 ^b
	10	3.53 ±0.17 ^c	2.94 ±0.10 ^c	0.59 ±0.06 ^a	14.53 ±0.62 ^{bc}	8.31 ±0.22 ^{bc}	0.88 ±0.04 ^d	5.34 ±0.36 ^b
	20	2.62 ±0.09 ^d	2.23 ±0.08 ^d	0.38 ±0.02 ^c	15.93 ±0.89 ^b	9.03 ±0.09 ^{ab}	0.83 ±0.05 ^d	6.08 ±0.75 ^a
	30	1.48 ±0.31 ^e	1.25 ±0.29 ^e	0.23 ±0.02 ^d	13.42 ±0.99 ^c	6.71 ±0.04 ^e	0.62 ±0.05 ^e	6.10 ±0.90 ^a

¹Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

²Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue.

附錄四、水煮時間對地瓜葉和油菜中類胡蘿蔔素及其異構物含量之影響

Appendix 4. The effects of boiling time on the contents of carotenoids and related geometrical isomers in sweet potato leaf and rape

Vegetables	Moisture %	Carotenoids isomers ^{1,2}						
		Total carotenoids ³	Lutein isomers					
			total	all-trans	13-cis	13'-cis	9-cis	9'-cis
Sweet potato leaf (地瓜葉)	89.54							
0		80.37 ± 0.00 ^b	67.97 ± 0.26 ^c	63.50 ± 0.13 ^c	1.81 ± 0.03 ^{bc}	0.89 ± 0.02 ^c	1.04 ± 0.02 ^d	0.74 ± 0.06 ^e
1		88.15 ± 0.48 ^b	76.26 ± 0.77 ^b	70.13 ± 0.35 ^{bc}	1.96 ± 0.18 ^b	1.72 ± 0.11 ^b	1.32 ± 0.05 ^c	1.14 ± 0.08 ^d
5		101.89 ± 0.79 ^a	85.52 ± 0.59 ^a	76.81 ± 0.08 ^{ab}	3.14 ± 0.28 ^a	2.05 ± 0.07 ^b	2.06 ± 0.09 ^b	1.47 ± 0.07 ^c
10		103.56 ± 0.33 ^a	88.61 ± 0.83 ^a	77.97 ± 0.87 ^a	3.56 ± 0.27 ^a	2.58 ± 0.41 ^a	2.44 ± 0.13 ^a	2.07 ± 0.15 ^b
20		66.36 ± 0.41 ^c	51.69 ± 0.16 ^d	44.56 ± 0.19 ^d	1.45 ± 0.45 ^{cd}	1.06 ± 0.27 ^c	2.52 ± 0.08 ^a	2.10 ± 0.17 ^b
30		50.19 ± 0.68 ^d	36.71 ± 0.51 ^e	29.54 ± 0.22 ^e	1.07 ± 0.06 ^d	0.84 ± 0.08 ^c	2.48 ± 0.08 ^a	2.79 ± 0.07 ^a
Rape (油菜)	93.21							
0		71.81 ± 0.82 ^{ab}	64.82 ± 0.16 ^a	58.48 ± 0.79 ^{ab}	3.86 ± 0.16 ^a	1.14 ± 0.09 ^b	0.86 ± 0.10 ^d	0.47 ± 0.02 ^d
1		73.55 ± 0.19 ^a	65.94 ± 0.36 ^a	60.00 ± 0.93 ^a	3.39 ± 0.16 ^b	1.13 ± 0.11 ^b	0.98 ± 0.13 ^{cd}	0.43 ± 0.03 ^d
5		70.18 ± 0.16 ^{ab}	60.93 ± 0.80 ^{ab}	54.38 ± 0.17 ^{bc}	3.50 ± 0.22 ^b	1.18 ± 0.23 ^b	1.30 ± 0.14 ^{bc}	0.57 ± 0.04 ^c
10		68.57 ± 0.40 ^b	57.60 ± 0.01 ^b	51.96 ± 0.57 ^c	2.36 ± 0.02 ^d	1.20 ± 0.22 ^b	1.48 ± 0.16 ^b	0.59 ± 0.03 ^c
20		57.42 ± 0.29 ^c	47.89 ± 0.23 ^c	41.69 ± 0.74 ^d	2.11 ± 0.04 ^e	1.21 ± 0.14 ^b	2.00 ± 0.29 ^a	0.88 ± 0.03 ^b
30		59.97 ± 0.40 ^c	51.07 ± 0.72 ^c	43.93 ± 0.14 ^d	2.63 ± 0.05 ^c	1.38 ± 0.19 ^a	2.17 ± 0.31 ^a	0.95 ± 0.04 ^a

¹Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

²Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue.

³Data are based on total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene.

附錄四、(續)

Appendix 4. (Continued)

Vegetables	Time (min)	Carotenoids isomers ^{1,2}						
		Zeaxanthin isomers			β-Carotene isomers			
		total	all-trans	9-cis	total	all-trans	13-cis	9-cis
Sweet potato leaf (地瓜葉)								
	0	0.72 ±0.02 ^b	0.72 ±0.02 ^b	– ³	11.68 ±0.72 ^{cd}	6.62 ±0.12 ^d	1.78 ±0.17 ^a	3.29 ±0.43 ^b
	1	0.70 ±0.04 ^b	0.70 ±0.04 ^b	–	11.20 ±0.67 ^d	6.89 ±0.20 ^{cd}	1.26 ±0.15 ^b	3.05 ±0.32 ^b
	5	0.91 ±0.01 ^{ab}	0.91 ±0.01 ^{ab}	–	15.47 ±1.19 ^a	9.72 ±0.73 ^a	1.92 ±0.01 ^a	3.84 ±0.45 ^b
	10	1.09 ±0.35 ^a	1.09 ±0.35 ^a	–	13.87 ±1.15 ^{abc}	8.13 ±0.50 ^b	0.89 ±0.08 ^c	4.86 ±0.57 ^a
	20	0.70 ±0.00 ^b	0.70 ±0.00 ^b	–	13.98 ±1.85 ^{ab}	7.79 ±0.92 ^{bc}	0.73 ±0.06 ^{cd}	5.46 ±0.87 ^a
	30	0.42 ±0.03 ^c	0.42 ±0.03 ^c	–	13.07 ±1.14 ^{bcd}	6.67 ±0.65 ^d	0.60 ±0.04 ^d	5.80 ±0.45 ^a
Rape (油菜)								
	0	0.46 ±0.03 ^a	0.46 ±0.03 ^a	–	6.52 ±0.63 ^c	4.10 ±0.56 ^d	0.88 ±0.06 ^b	1.54 ±0.01 ^d
	1	0.40 ±0.04 ^{ab}	0.40 ±0.04 ^{ab}	–	7.22 ±0.80 ^c	4.61 ±0.64 ^{cd}	1.00 ±0.11 ^{ab}	1.61 ±0.05 ^d
	5	0.45 ±0.03 ^a	0.45 ±0.03 ^a	–	8.80 ±0.33 ^b	5.97 ±0.08 ^b	1.01 ±0.13 ^{ab}	1.82 ±0.12 ^d
	10	0.44 ±0.05 ^a	0.44 ±0.05 ^a	–	10.53 ±0.34 ^a	6.95 ±0.01 ^a	1.27 ±0.15 ^a	2.31 ±0.17 ^c
	20	0.39 ±0.01 ^{ab}	0.39 ±0.01 ^{ab}	–	9.14 ±1.05 ^b	5.14 ±0.47 ^c	1.09 ±0.18 ^{ab}	2.91 ±0.39 ^b
	30	0.33 ±0.08 ^b	0.33 ±0.08 ^b	–	8.57 ±0.60 ^b	4.11 ±0.31 ^d	1.10 ±0.18 ^{ab}	3.36 ±0.11 ^a

¹Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

²Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue.

³ “ – ” Not detectable.

附錄五、水煮時間對香菜和九層塔的總類胡蘿蔔素、總酚類化合物及抗氧化活性的影響

Appendix 5. The effects of boiling time on total carotenoids, polyphenols and the antioxidant activity of parsley and basil

Vegetables	Moisture %	Total Carotenoids ¹ (µg/ g wet vegetables)	TPC ² (µg GAE/ g wet vegetables)	TEAC ³ (µg Trolox/ g wet vegetables)	Chelating effects ⁴ %	Inhibition of peroxidation ⁵ %
Parsly (香菜)	88.45					
0		64.94 ± 5.46 ^{bcd}	1496.44 ± 99.94 ^a	1303.30 ± 81.14 ^b	97.88 ± 3.22 ^a	84.82 ± 3.66 ^{ab}
1		61.79 ± 6.04 ^{cd}	1337.67 ± 45.10 ^b	1409.36 ± 8.17 ^a	98.10 ± 6.86 ^a	82.22 ± 0.39 ^{ab}
5		67.65 ± 3.24 ^{bc}	745.67 ± 2.16 ^c	781.47 ± 55.01 ^c	86.96 ± 7.31 ^{ab}	81.77 ± 1.54 ^b
10		82.67 ± 4.22 ^a	568.78 ± 9.27 ^d	591.38 ± 6.97 ^d	83.70 ± 7.35 ^b	86.71 ± 0.56 ^a
20		72.62 ± 5.20 ^b	252.28 ± 4.51 ^f	359.27 ± 4.50 ^f	59.31 ± 7.51 ^c	60.72 ± 4.03 ^c
30		58.13 ± 4.30 ^d	391.56 ± 3.14 ^e	457.52 ± 4.07 ^e	55.53 ± 7.70 ^c	47.68 ± 1.00 ^d
Basil(九層塔)	92.05					
0		64.05 ± 3.16 ^b	1905.04 ± 71.97 ^b	1371.38 ± 8.14 ^a	84.62 ± 7.32 ^b	71.41 ± 6.23 ^{ab}
1		65.95 ± 6.43 ^{ab}	2232.33 ± 47.86 ^a	1420.92 ± 1.10 ^a	92.74 ± 2.53 ^a	68.63 ± 0.26 ^b
5		86.39 ± 2.80 ^a	1892.11 ± 102.92 ^b	1424.95 ± 3.94 ^a	74.74 ± 1.17 ^c	73.56 ± 1.03 ^a
10		80.15 ± 7.78 ^a	1324.89 ± 8.17 ^c	1223.49 ± 7.15 ^b	62.36 ± 2.57 ^d	41.80 ± 1.27 ^c
20		67.44 ± 6.11 ^{ab}	627.56 ± 6.91 ^d	987.89 ± 2.12 ^c	53.23 ± 2.51 ^e	37.21 ± 1.36 ^c
30		52.12 ± 4.30 ^c	498.67 ± 0.11 ^d	784.40 ± 1.06 ^d	43.03 ± 3.51 ^f	27.55 ± 0.05 ^d

¹Data are based on total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene. Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue.

²Total phenolic compounds. Concentrations are in µg gallic acid equivalent g⁻¹ wet vegetables tissue.

³Trolox equivalent antioxidant capacity. Concentrations are in µg trolox equivalent g⁻¹ wet vegetables tissue.

⁴Capacity to chelating the ferrous ions.

⁵Capacity to inhibit the peroxide formation in linoleic acid at 48 hours.

Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).

附錄六、水煮時間對地瓜葉和油菜的總類胡蘿蔔素、總酚類化合物及抗氧化活性的影響

Appendix 6. The effects of boiling time on total carotenoids, polyphenols and the antioxidant activity of sweet potato leaf and rape

Vegetables Time (min)	Moisture %	Total Carotenoids ¹ (µg/ g wet vegetables)	TPC ² (µg GAE/ g wet vegetables)	TEAC ³ (µg Trolox/ g wet vegetables)	Chelating effects ⁴ %	Inhibition of peroxidation ⁵ %
Sweet potato leaf (地瓜葉)						
	88.89					
0		56.69 ± 3.32 ^b	2027.33 ± 04.98 ^c	1539.96 ± 3.36 ^b	86.13 ± 1.15 ^{ab}	67.29 ± 0.44 ^a
1		54.36 ± 2.33 ^b	2639.67 ± 7.03 ^b	1654.71 ± 5.20 ^a	91.46 ± 4.86 ^a	67.51 ± 0.70 ^a
5		65.60 ± 2.25 ^a	2921.50 ± 5.57 ^a	1666.43 ± 5.65 ^a	83.33 ± 4.55 ^b	67.26 ± 2.15 ^a
10		47.23 ± 3.14 ^c	1755.17 ± 8.96 ^d	1086.78 ± 9.08 ^c	52.92 ± 2.35 ^c	51.22 ± 2.30 ^b
20		39.29 ± 4.12 ^d	1566.83 ± 7.18 ^e	685.41 ± 6.29 ^e	56.21 ± 5.28 ^c	50.56 ± 3.92 ^b
30		33.61 ± 2.30 ^d	1365.00 ± 2.91 ^f	849.00 ± 8.50 ^d	45.81 ± 3.17 ^d	29.12 ± 2.08 ^c
Rape (油菜)						
	93.08					
0		41.68 ± 0.12 ^a	827.11 ± 6.51 ^a	1260.18 ± 5.96 ^a	75.91 ± 4.91 ^b	-44.69 ± 1.39 ^e
1		39.03 ± 5.11 ^a	673.78 ± 7.18 ^b	1096.15 ± 6.26 ^b	83.54 ± 5.18 ^{ab}	-12.35 ± 1.10 ^c
5		44.72 ± 4.91 ^a	473.11 ± 6.60 ^c	871.01 ± 6.85 ^c	88.29 ± 5.19 ^a	-14.23 ± 0.14 ^a
10		43.02 ± 1.17 ^a	194.56 ± 1.58 ^d	569.17 ± 2.12 ^d	52.58 ± 6.13 ^c	-6.78 ± 0.30 ^b
20		42.99 ± 2.92 ^a	147.41 ± 8.19 ^e	434.50 ± 3.45 ^e	46.22 ± 2.82 ^{cd}	-21.97 ± 1.43 ^d
30		43.65 ± 1.18 ^a	122.37 ± 3.41 ^e	419.63 ± 8.43 ^e	38.87 ± 7.29 ^d	-48.19 ± 0.06 ^f

¹Data are based on total isomers of lutein, zeaxanthin and β-carotene. Concentrations are in micrograms per gram of wet vegetables tissue.

²Total phenolic compounds. Concentrations are in µg gallic acid equivalent g⁻¹ wet vegetables tissue.

³Trolox equivalent antioxidant capacity. Concentrations are in µg trolox equivalent g⁻¹ wet vegetables tissue.

⁴Capacity to chelating the ferrous ions.

⁵Capacity to inhibit the peroxide formation in linoleic acid at 48 hours.

Data are based on the average of three duplicate experiments ± SD. Different letters within column of the same vegetable are significantly different (p<0.05).