嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

結合高效率液相層析法及電化學偵測法對茄紅素順反異購物分離偵測之研究

計畫類別：V 個別型計畫　　□整合型計畫
計畫編號：CNPH92-03
執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計畫主持人：王四切
共同主持人：
計畫參與人員：唐自強、游慧美、蕭鈞旭

執行單位：藥學系

中華民國 92 年 2 月 26 日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

結合高效率液相層析法及電化學偵測法對茄紅素順反異構物分離偵測之研究

計畫編號：CNPH 92-03
執行期限：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日
主持人：王四切　　嘉南藥理科技大學 藥學系

一、中文摘要

本研究計畫以高效率液相層析法結合靈敏之電化學偵測法，對蕃茄中茄紅素（lycopene）之順反異構物進行分離及偵測，以開發快速方便且高靈敏度、低偵測極限之分析機制，提供其他學者一種有效快速的分析工具。

在本實驗中分別使用 C18 及 C30 層析分離管柱，結合電化學之脈波安培法對蕃茄糊中萃取之茄紅素（lycopene）順、反異構物進行偵測，獲得初步成果。

關鍵詞： 蕃茄，茄紅素，順、反異構物，HPLC，脈波安培法。

二、緣由與目的

根據文獻指出：茄紅素（lycopene）是強力的抗氧化劑，其抗氧化能力比β-carotene 大兩倍以上【1】；像維它命 C 一樣，也能夠對於心血管疾病與某些癌症（如攝護腺癌）具有保健的效力【2】。此外又有研究指出：茄紅素可以對抗自由基，用來保護免疫細胞白血球所產生的大量自由基。因此近年來對於茄紅素在人體內之各種生理作用，以及分析偵測，引起許多學者的研究興趣。

對於食物及生化樣品中 Lycopene 含量偵測的分析方法有 UV-Vis Spectrophotometry【3】、LC/ESI-MS【4】、APCI-MS【5】、CF FAB-MS【6】、超臨界流體層析【7】、MALDI MS【8】、LC-Spectrophotometry 【9-12】等，其中以 LC-Spectrophotometry 之分析研究最廣為學者運用，而質譜分析則因花費昂貴，所以相關文獻較為少見。近年來 M. G. Ferruzzi 等人【13】以電化學分析法之序列式電量偵測法(coulometric array detection)結合 LC 層析分離裝置，對於生化微量樣品中 Lycopene 之各式立體異構物進行分析研究，所得偵測極限比一般 LC-UV-Vis 吸收度法降低 10 至 100 倍，顯示電化學偵測法對微量樣品中的 Lycopene 具有良好的分析偵測能力。

然而對於 lycopene 各種順反式異構物抗氧化能力之差異，目前尚無相關文獻報導；而對於其順反式異構物之分析研究也

相當有限【14-16】，因此發展方便快速，又具有高靈敏度、低偵測極限之 lycopene 順反式異構物分析方法，可作為進一步對其抗氧化能力之差異研究的工具。

本研究計畫擬發展以高效率液相層析法結合靈敏之電化學偵測法，對番茄中茄紅素之順反異構物進行分離及偵測，以開發快速方便且高靈敏度、低偵測極限之分析機制，提供其他學者一種有效快速的分析工具。

三、結果與討論

本研究計畫參考文獻【13】實驗條件分別配合使用非極性之 C18 及 C30 分離管柱進行逆向層析分離番茄糊中之 lycopene 順反異構物，結合電化學之脈波安培測定法，使用白金工作電極進行偵測。

根據文獻指出，序列式電量偵測法(coulometric array detection)所得偵測極限比一般 LC-UV/Vis 吸收度法降低 10 至 100 倍，而應用序列式電量偵測法前須先對工作電極施加+0.8V 電位，以清潔、活化電極，提高偵測靈敏度。

脈波安培法則是在工作電極偵測進行中，重複性施加特定電位於工作電極上，以進行電極表面處理（condition）、偵測，而獲得最佳之偵測靈敏度與偵測極限。

本實驗所使用之脈波電位及所施加之時間序列如圖一所示，分別在 E2 電位進行電量偵測（氧化電流積分），而在 E3 電位對工作電極作清潔活化之處理，E1 與 E4 電位則為偵測前之電極表面穩定處理。

表一為分離蕃茄糊之 lycopene 萃取物所使用之動相溶液各種組成，圖二為所得層析分離之結果。由圖二可知使用 MeOH:THF=75:25 之動相溶液組成，對於蕃茄糊中 lycopene 萃取物之分析，可得較佳之分離效果。

四、計畫成果自評

使用白金工作電極應用脈波安培電化學偵測系統對 lycopene 及 β-carotene 之偵測，初步證實與序列式電量偵測法亦有相同之偵測結果，其脈波電位施加時，於偵測電位（E2）以數值積分方式對電流進行積分（亦即作電量測定）可獲得良好之偵測靈敏度與偵測極限，而在再生電位（E3）施加時，則可對工作電極進行清除工作，使工作電極持續保持高靈敏度，增加其長使用期之穩定度（long term stability）。

本研究計畫因時間及經費受限，目前暫時進行至蕃茄糊中 lycopene 及 β-carotene 之初步分離及偵測，所獲得之成果可供爾後以 HPLC 結合質譜分析法（LC-MS）作為結構測定之先驅實驗。將來若能再進一步與質譜法之結構判定相配合，必能更加證明以電化學偵測法結合 HPLC 分離系統對 lycopene 順反異構物偵測之適用性。

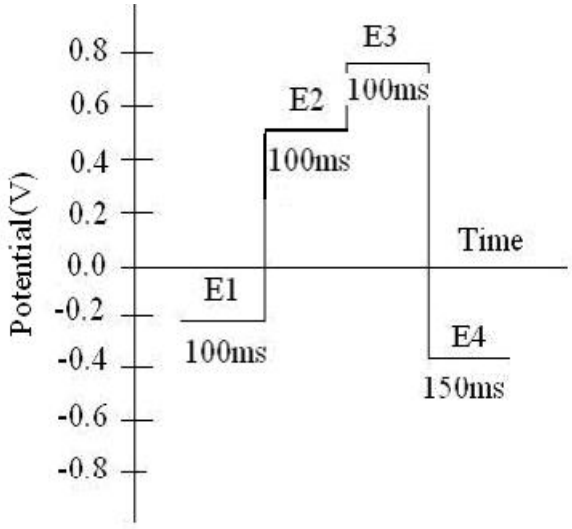

Fig. 1 脈波電位及其施加時間。E1 = -0.20V (100ms)，E2 = +0.50V (100ms)，E3 = +0.79V (100ms)，E4 = -0.40V (150ms)

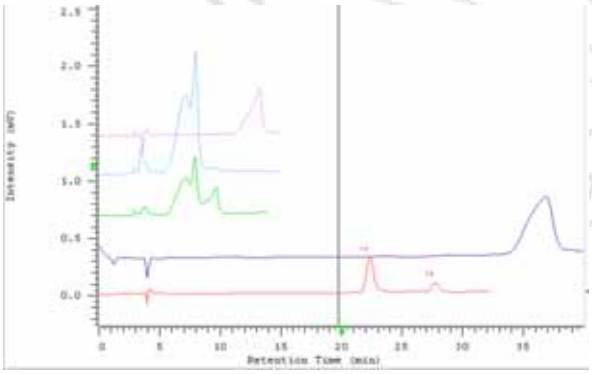

Fig 2 蕃茄糊中 Lycopene 萃取物與 β-carotene 之 HPLC 層析圖

Tab 1 HPLC 動相組成表

MeOH	THF	Sample
------90	10	lycopene +β-carotene
------95	5	lycopene +β-carotene
------75	25	lycopene +β-carotene
------80	20	lycopene
------80	20	lycopene +β-carotene

五、參考文獻

1 P.,Di Mascio, S.P.,Kaiser, H.,Sies, Arch. Biochem. Biophys. 274(1989) 532-538

2 R.G. Ziegler, Am. J. Clin. Nutr. 53(1991) 51S

3 H. Otteneder, D. Lebensm, Rundsch. 82(1986)14

4 C. Rentel, S. Srohschein, K. Albert, E. Bayer, Anal. Chem.70 (1998) 4394

5 T. Hagiwara, T. Yasuno, K. Funayama, S. Suzuki, J.Chromatogr. B Biomed. Appl. 708 (1998) 67.

6 R. van Breemen, H. Schmitz, S. Schwartz, Anal. Chem. 65(1993) 965.

7 E. Ibanez, S. Lopez-Sebastian, J. Tabera, G. Reglero, J.Chromatogr. 823 (1998) 313.

8 R. Kaufman, T. Wingerath, D. Kirsch, W. Stahl, H. Sies, Anal. Biochem. 238 (1996) 117.

9 Z. Li, J. Wu, J. Tang, Sepu 10 (1992) 184.

10 F. Khachik, G. Beecher, M. Goli, W. Lusby, J. Smith, Anal.Chem. 64 (1992) 2111.

11 O. Sommerburg, L. Zang, F. van Kuijk, J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 695 (1997) 71.

12 Q. Su, K. Rowley, K. O'Dea, J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 729 (1999) 191

13 M. G. Ferruzzi , M. L. Nguyen , L. C. Sander , C. L. Rock , S. J. Schwartz, J. Chromatogr. B,760 (2001) 289–299

14 M. G. Ferruzzi , M. L. Nguyen , L. C.

Sander , C. L. Rock , S. J. Schwartz, J. Chromatogr. B,760 (2001) 289–299
15 C. Emenhiser, L. C. Sander, S. J. Schwartz, J. Chromatogr. A, 707(1995)205
16 J.P. Steghens, A. L. van Kappel, E. Riboli, C. Collombel, J. Chromatogr. B. 694(1997)71

嘉南大學