

計畫編號	本單位編號	G1-97-06
	研展會統一編號	0972302 (自)
		0972304 (委)

臺 灣 糖 業 公 司
研 究 試 驗 報 告

九 十 七 年 度

單 位 台糖公司砂糖事業部

題 目 糖蜜活性指標成分之分離及其總抗氧化力之測定 (新)

報 告 人
(計劃執行
人 員) 陳榮才、吳柏志

起 訖 日 期 97 年 1 月 至 97 年 12 月

試 驗 地 點 台南

內 容

一、摘要

本研究對虎尾糖蜜進行糖之回收及總抗氧化力評估，以 Amberlite XAD-16 型樹脂作為層析材料，水作為沖提液進行糖之回收，再依序以 25%及 95%乙醇沖提進行成分之分離。實驗結果得知糖回收率近 100 %，糖蜜水沖脫物各種糖之含量經 HPLC 定量分析結果為果糖：12.4 %，葡萄糖：4.5 %，蔗糖：67.3 %，其他糖類：15.9 %。將 25%與 95%乙醇沖脫物濃縮、冷凍乾燥後，分別測試各沖脫物之總酚量，經與標準品 catechin 比較各沖脫物之總酚量，得知 25%乙醇沖脫物在濃度 600 ppm 時其總酚含量為 275.8mg/g，95%乙醇沖脫物濃度在 600 ppm 時其總酚含量為 374.2mg/g，後者（95%乙醇沖脫物）之總酚含量較高；因此將 95 %乙醇沖脫物以 99.8%乙醇回溶，回溶物經 sephadex LH-20 管柱層析，共分離出 4 個酚類化合物 1，2，3 與 4，其結構式經光譜(IR, NMR)判定分別為 4-hydroxybenzoic acid (1)，vanillic acid (2)，syringic acid (3)與 3,4-dihydroxybenzoic acid (4)。95 %乙醇沖脫物之總抗氧化力，抑制 ABTS⁺ 之 IC₅₀ 為 310 ppm，99.8%乙醇回溶物之抗氧化力，抑制 ABTS⁺ 之 IC₅₀ 為 200 ppm。化合物 3 與 4 具有較強之抗氧化力，抑制 DPPH 有之 IC₅₀ 分別為 7.73 ppm (39.04 μM)及 2.92 ppm(18.95μM)。

二、前言

慢性疾病的不易根治及龐大醫療費用支出，使人畏懼而無奈，從而對具有預防及治療功效之健康食品的需求日益殷切，促成相關產業的產值快速攀升，因此開發此類產品有顯著的市場需求性，更是諸多產業轉型或升級的利基。

糖蜜為蔗糖產製之主要副產品，富含礦物質及有機物質，一般用於食品及飼料添加物或產製酒精等產品，唯此等產品價格不高，對糖業產值助益不大，糖蜜除了主要之糖類成分(一次代謝物，primary metabolite，為生物體維持生命之必需物質)外，尚有許多其他特有的二次代謝物(secondary metabolite，生物特有之防禦性物質)，其中不乏具有生物活性物質，若能從其中分離得到有益人體健康之物質，開發出高附加價值的糖蜜相關健康食品，將有利於糖業產值的提昇。

生物體(陸生動、植物、微生物及海洋生物)之二次代謝物會因物種不同而有明顯之差異性，其生物活性亦隨之而有差異性，例如：藥物方面有抗癌化療藥物太平洋紫杉醇(paclitaxel)屬於二萜類，青脆枝之喜樹鹼(camptothecin)屬於生物鹼及俗稱小紅莓之阿霉素(adriamycin)屬於蒽醌類，全球銷售額最高之降膽固醇藥物statins類是由麴菌中發現，銀杏中之黃酮及萜類內酯(terpene lactones)已開發成為防治老年失智症之處方藥，保肝功能的水飛薊(*Silybum marianum*)成分silymarins等均有極高的市佔率。健康食品方面截至97年10月31日已取得衛生署核可(衛署健食字，小綠人標章)之健康食品共108件，例如：靈芝中的靈芝三萜類及多糖體，人參中的人參皂苷(三萜配醣體)，洛神花中的類黃酮、多酚酸及花青素，紅麴中之statins成分，甘蔗原素(Sugar Cane Policosanol)及今年6月12日取得衛生署核可證書之台糖果寡醣等。經國家認證之健康食品，消費者會放心的購買食用，產品之價值及銷售額亦相對提高。

因此，生物之二次代謝物為製藥及食品業科學家找尋藥物及健康食品之重要來源，開發健康食品有相當好的利基性與市場佔有率。本研究以糖蜜中源自甘蔗之二次代謝物為標

的，分離出具生物活性物質，開發為相關之健康食品。

研究文獻顯示蔗汁中之二次代謝物有植物固醇、萜類、酚類及黃酮類等成分具有抑制癌細胞增生、免疫增強及抗氧化等生物活性。此類成分兼具疾病預防及治療功效，被視為健康食品的活性指標成分。基於甘蔗糖蜜源自於甘蔗，理應含有類似之二次代謝物，經預備實驗分析台糖糖蜜，發現糖蜜與蔗汁在二次代謝物之成分類別上相似性甚高；因此，從糖蜜中分離出具有活性之指標成分是預期可達成的。如此，從甘蔗糖蜜研發出高附加價值之健康食品，是可行且值得去投資的。

三、材料與方法

(一) 實驗材料

1.原料

台糖公司提供之虎尾糖蜜、小港糖蜜、南靖糖蜜、台糖營養糖蜜。

2.試藥

- (1) 3-Hydroxybenzoic acid (Alfa Aesar)
- (2) 3,4-Dihydroxybenzoic acid (Alfa Aesar)
- (3) Syringic acid (Alfa Aesar)
- (4) Vanillic acid (Fluka)
- (5) Gallic acid (Fluka)
- (6) *p*-Coumaric acid (Fluka)
- (7) Ferulic acid (Fluka)
- (8) Cinnamic acid (Fluka)
- (9) Ellagic acid (Fluka)
- (10) Sucrose crystal (SIGMA)
- (11) D-(+)-Glucose anhydrous (Fluka)
- (12) D-(+)-Fructose minimum 99% (SIGMA)
- (13) D-Mannitol minimum 98% (SIGMA-ALDRICH)
- (14) DPPH(2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) (SIGMA)
- (15) Trolox (ALDRICH)
- (16) Catechin (SIGMA)
- (17) ABTS⁺ (SIGMA)
- (18) Folin-dennis reagent
- (19) NaCO₃ (MERCK)

3.儀器設備

- (1) HPLC-ELSD及UV/Vis Detactor含周邊設備1套 (HITACHI UV/Vis Detactor L-7420, SEDEX75)
- (2) 冷凍乾燥機1台 (EYELA FD-5N)
- (3) 中壓式液相層析儀1台
- (4) 層析用分劃收集器(Fraction Colector) 2台 (TOKYO RIKAKIKAI)

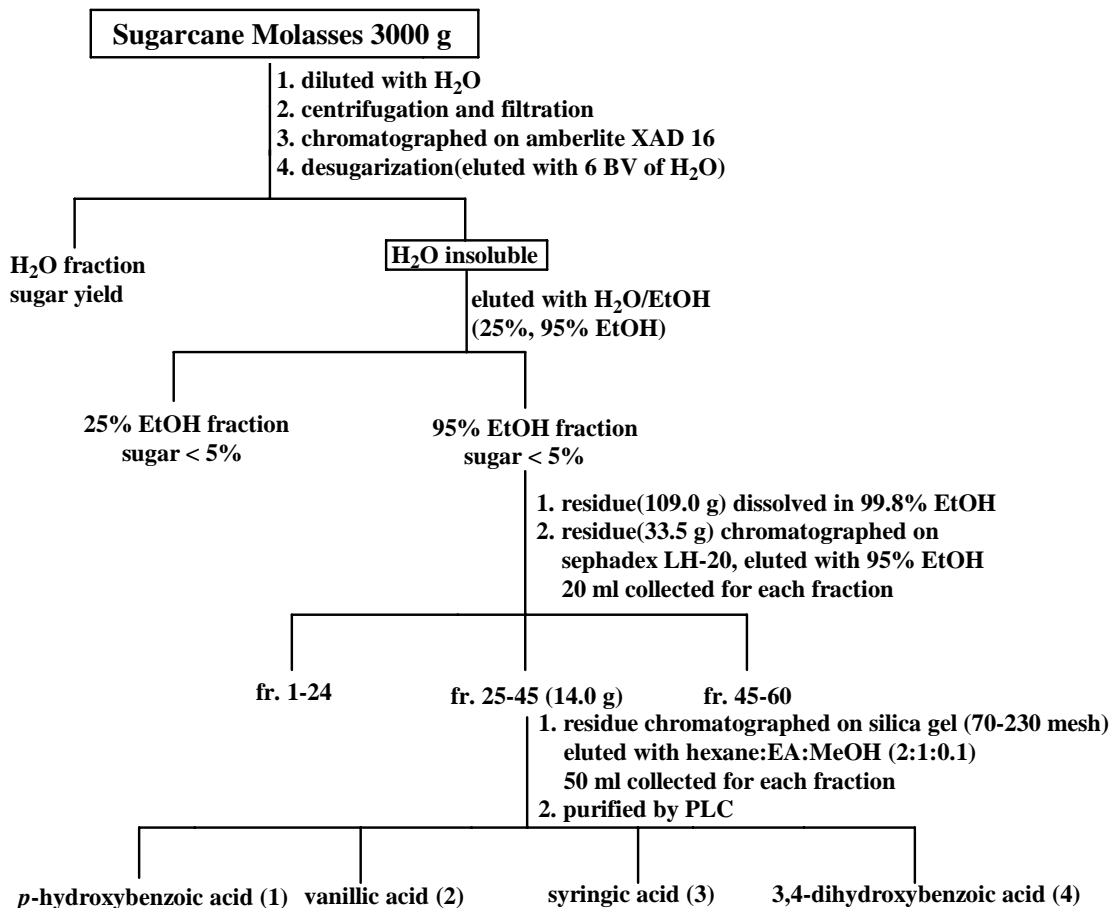
- (5) 溫控真空烘箱1台及烘箱1台 (CHENG SANG)
- (6) 濃縮機及周邊設備4套 (PANCHOM UP-Serise)
- (7) 高真空度馬達1台 (ULVAC GVD-050A)
- (8) 紫外光檢知器: 檢測TLC層析成分1台 (MODEL UVGL-25)
- (9) 各類層析(含HPLC)用管柱 (SCHOTT, APS-2 HYPERSIL)
- (10) 減壓式過濾裝置 1 套 (ADVANTEC)
- (11) UV-Visible spectrophotometer (CARY 1E)
- (12) 傅立葉紅外光線光譜儀(Perkin Elmer RX1)
- (13) 核磁共振光譜儀(Bruker *Avance* DPX-200 MHz NMR)
- (14) 層析材料: Silica gel(Kieselgel 60, 70~230 mesh, Merck); Sephadex LH-20 gel(Pharmacia);
薄層層析片: 製備級: Kieselgel 60, F 254 (1 mm, Merck), 分析級: Kieselgel 60, F 254
(0.25 mm, Merck)

(二) 糖蜜成分分離流程

取糖蜜以去離子水稀釋 8 倍，每次取 1200 毫升離心過濾，於 25 °C，3000 rpm 離心 10 mins，再利用濾紙過濾，取濾液作為分離抗氧化物用途。

將濾液以樹脂 Amberlite XAD-16 層析，取 XAD-16 樹脂浸置於 95 % 乙醇 20 mins 後，倒入半徑為 2.55 cm，長為 90 cm 的玻璃管柱中，分別以二次水 2 BV 清洗樹脂，洗滌後，加入糖蜜上清液進行管柱層析，再以 6 BV 的二次水進行糖蜜之去糖實驗，將其沖脫液保留一部份作為糖分之 HPLC 定量試驗，再分別以 25 % 及 95 % 乙醇各 4 BV 沖提，進行成分分離。將 95 % 乙醇沖脫物冷凍抽乾後之固體，再以 99.8 % 乙醇回溶三次，將其回溶液以 0.45 μ m 濾紙過濾，濾液濃縮、凍乾後得之固體，此固體以 95 % 乙醇溶解後經 Sephadex LH-20 樹脂進行層析，以自動收集器收集沖脫液，每 20 毫升收集一管，收集液進行薄層層析(TLC)，將含酚類之收集液合併(fractions 25~45)，濃縮冷凍抽乾後得到沖脫物，取一部份做活性測試，其餘沖脫物以 70~230 mesh 的 silica gel 進行管柱層析，沖提液為 hexane:ethyl acetate:MeOH (2 : 1 : 0.1)，每 50 毫升收集一瓶，經 TLC 層析，將性質相似之沖脫液合併。

其中 fractions 62-87 合併濃縮後，經製備型薄層層析(PLC)以 hexane:ethyl acetate:MeOH (1 : 1 : 0.1)為展開液，經分離純化後得化合物 1，fractions 254-277 合併濃縮後，經 PLC 以 hexane:ethyl acetate:MeOH (1 : 1 : 0.1)為展開液，經分離純化後得化合物 2，fractions 304-331 合併濃縮後，經製備型薄層層析(PLC)以 hexane:ethyl acetate:MeOH (1 : 1 : 0.1)為展開液，經分離純化後得化合物 3 與 4。分離流程：如圖一。



圖一、糖蜜分離流程圖

(三) 抗氧化活性及總酚量測定方法

1、DPPH 清除率試驗

(1) DPPH 之特性：

- 全名：2, 2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl.
- 深紫色粉末，在波長 517nm 有最強吸收。
- 加入有效物質後之顏色變化：紫色到黃色。

(2) DPPH 的配製：

取 0.04 g DPPH 粉末溶於甲醇後稀釋至 100 mL。

(3) 標準品之配置：

取 0.001 g 的 Trolox 溶於 DMSO 後稀釋至 1 mL。

(4) 樣品配置：

取 0.001 g 的 sample 溶於 DMSO 後稀釋至 1 mL。

(5) 實驗步驟：

加入 890 μ L 乙醇和 100 μ L DPPH 混合均勻。再加入樣品 10 μ L 震盪後放入水浴鍋加熱到 37°C，加熱 30 分鐘後取出再以分光光度計測量其吸光質。

(6) DPPH 抑制率(inhibition %)的計算方法：

$$\text{Inhibition \%} = (\text{control} - \text{sample}) / \text{control} \times 100 \%$$

2、多酚含量測定試驗

(1) 利用 catechin 作為標準曲線

- a. 精秤 catechin 0.05 g，溶在 1 mL 的二次水中，製成濃度為 50 mg/mL。
- b. 將第一步驟的 50 mg/mL 取 10 mL 後再用 490 μ L 的二次水稀釋至濃度為 1 mg/mL。
- c. 分別取步驟二濃度為 1 mg/mL，5 μ L、10 μ L、20 μ L、30 μ L，分別放入含有 800 μ L 二次水中的 eppendorf 中。
- d. 分別在加入 50 μ L 的 Folin-Dennis reagent 及 100 μ L 飽和的 Na_2CO_3 (0.35 g 溶在 1 mL 的二次水中) 在上述的 eppendorf 中。
- e. 分別將所有的 eppendorf 加入二次水至滿 1 mL (定量至 1 mL)。
- f. 反應 30 分鐘，測 OD760 nm，分別記錄下來，製做標準曲線。

(2) 樣品之多酚含量測試

- a. 取樣品各 1 μ L、20 μ L、50 μ L、100 μ L，濃度自訂，分別放入含有 700 μ L 的 eppendorf 中 (量可以情況而定)。
- b. 分別再加入 50 μ L 的 folin-dennis reagent 及 100 μ L 飽和的 Na_2CO_3 (0.35 g 溶在 1 mL 的二次水中) 在上述的 eppendorf 中。
- c. 分別將所有的 eppendorf 加二次水至滿 1 mL，Vortex。
- d. 反應 30 分鐘，測 OD760 nm，回推濃度，即可算出酚類含量。

(四) 台糖營養糖蜜壓濾試驗

實驗設計及流程—第 0、1、2 組為處理組，第 3 組為對照組。

第 0 組：台糖營養糖蜜用溫水稀釋到 15Brix，於尚未冷卻時先後以 10 μ m 及 1 μ m 濾板壓濾，取濾液經 800 rpm 離心 10 分鐘，觀察比較沉澱物量。

第 1 組：台糖營養糖蜜用溫水稀釋到 15Brix，放冷，以 1 μ m 過濾，取濾液經 800 rpm 離心 10 分鐘，觀察比較沉澱物量。

第 2 組：台糖營養糖蜜用溫水稀釋到 15Brix，添加 2% 矽藻土，放冷，先後以 10 μ m 和 1 μ m 濾板過濾，取濾液經 800 rpm 離心 10 分鐘，觀察比較沉澱物量。

第 3 組：對照組。台糖營養糖蜜用溫水稀釋到 15Brix，放冷，取濾液經 800 rpm 離心 10 分鐘，觀察比較沉澱物量。

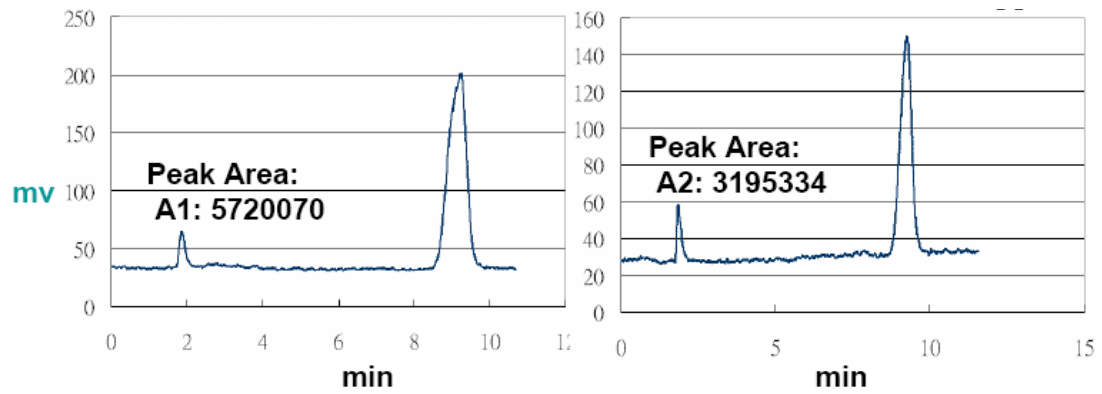
四、試驗結果

(一) 最適用樹脂材料之篩選

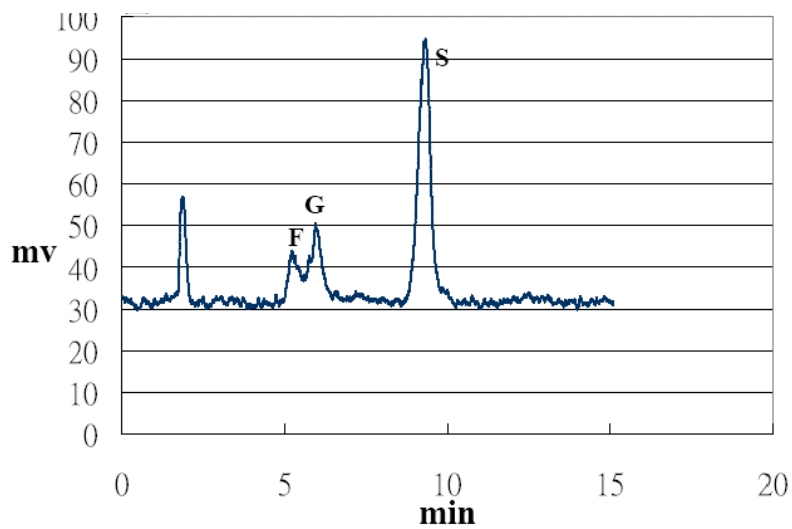
Amberlite XAD-2 及 XAD-16 樹脂對虎尾糖蜜中蔗糖回收率比較：

1. XAD-2 樹脂對蔗糖回收率 < 95%，沖脫用水量 5~6 BV (BV：樹脂之體積)。
2. XAD-16 樹脂對蔗糖回收率近 100%，沖脫用水量 4~5 BV (糖類 HPLC 層析圖，如圖二、三，糖含量分析結果，如表一、二)。

以上數據顯示 Amberlite XAD-16 型樹脂之層析效率較佳，因此選定以此樹脂為層析材料。



圖二、虎尾糖蜜水沖提液中蔗糖之 HPLC 層析圖（左圖），右圖是蔗糖標準品（500ppm）之 HPLC 層析圖



圖三、虎尾糖蜜中水沖提液的 HPLC 層析圖
 (S：蔗糖、G：葡萄糖、F：果糖)

表一、虎尾糖蜜各種沖提液（水、25%乙醇、95%乙醇）的糖含量

	重量 (wt, 克)	收率 (%)
水沖提液	70.1	46.7
25%乙醇沖提液	3.2	2.1
95%乙醇沖提液	5.5	3.6

表二、虎尾糖蜜水沖提液中各種糖類含量

	重量 (wt, 克)	%
糖總量	70.1	100
果糖	8.7	12.4
葡萄糖	3.2	4.5
蔗糖	47.1	67.2
其它糖類	11.1	15.9

(二) 確定最佳層析條件

1. 以 XAD-16 樹脂能吸附糖蜜之最適量：糖蜜／樹脂比例(W／W)=25/100~30/100。
2. 去糖之最佳層析條件：去糖所需之沖提用水之最適量為 4~5 BV。
3. 沖提液之最佳流速：2~3 BV／h。
4. 樹脂最佳再生條件及重複使用次數：視糖蜜清淨情形而定（虎尾糖蜜經上述實驗室前置處理【高速離心再過濾】得到的糖蜜濾液約可重複 20 次）。

(三) 糖蜜去糖化實驗

糖回收率：Amberlite XAD-16 樹脂對糖回收率接近 100%，最佳沖脫用水量 4~5 BV。

表三、小港、虎尾及南靖糖蜜之各種糖之含量比較

	小港糖蜜 (%)	虎尾糖蜜 (%)	南靖糖蜜 (%)
果糖	14.8	9.2	5.4
葡萄糖	5.4	5.2	8.7
蔗糖	79.8	85.5	85.9

(四) 活性指標成分之分離並評估產率及放大實驗規模效果

1. 虎尾糖蜜活性指標成分之分離

取自台糖虎尾廠製造之糖蜜（簡稱虎尾糖蜜），總重 3 公斤，經 8 倍稀釋後高速離心、過濾，取濾液經 Amberlite XAD-16 管柱層析，以 6 BV 水沖提進行糖之回收，再分別以 25 % 及 95 % 乙醇各 4 BV 沖提，水之沖提物以 HPLC 分析各種糖之含量，25 % 及 95 % 乙醇沖脫物濃縮後，分別測其總酚量及抗氧化力 (ABTS 與 DPPH 試驗)，95% 乙醇沖脫物經濃縮後，以 99.8% 乙醇回溶，回溶液經濃縮凍乾後，回溶物固體，以 Sephadex LH-20 管柱層析，將含酚類之沖脫物合併，濃縮凍乾後，其固體以矽膠管柱層析及 PLC（製備型薄層層析）分離純化，單離出各主要成分。共得到 4 個主要酚類成分，各成分之化學結構式經 NMR 及 IR 光譜判定，分別為 *p*-hydroxybenzoic acid(1)，vanillic acid(2)，syringic acid (3) 及 3,4-dihydroxybenzoic acid (4)。再將 99.8% 乙醇回溶物，Sephadex LH-20 管柱沖脫物及各化合物測量其抗氧化力(抑制 DPPH)。

2. 放大實驗規模評估

層析管柱內徑放大後(1cm, 2cm, 5cm)，去糖所需沖提用水量均為 5 BV，25% 乙醇沖提液及 95% 乙醇沖提液所需量亦均為 5 BV。結果可預估沖提液所需之 BV 數與層析管柱內徑大小無相關性。

3. 各種糖蜜(小港、南靖、虎尾糖蜜)之含酚種類比較：(以 TLC 分析)

小港糖蜜及虎尾糖蜜含酚種類較多且主要成分相似。南靖糖蜜含酚種類較少。

4. 各種糖蜜之雜質含量及雜質顏色比較：

雜質含量由多→少及雜質顏色深至淺依次為—

小港糖蜜(灰黑色) > 台糖營養糖蜜(小港糖蜜+虎尾糖蜜)(灰黑色) > 虎尾糖蜜(灰色) > 南靖糖蜜(淡灰色)。

5. 糖蜜用溫水稀釋，冷卻後以 1 μm 濾板壓濾，濾液經 800 rpm，離心 10 分鐘，仍有沉澱物殘留。此現象會影響管柱層析用樹脂(Amberlite XAD-16)之使用次數。糖蜜沉澱

物無法清除將會影響日後量產之成本。

6. 糖蜜稀釋液經高速離心(3000 rpm)後可去除糖蜜中大部分之灰泥雜質，再經 $0.45 \mu\text{m}$ 濾紙過濾可得比較澄清之糖蜜濾液（過濾不易）但糖蜜中仍有雜質會影響樹脂壽命，然而有經此處理已大幅降低樹脂傷害（只能減少對樹脂的損害，無法完全防止對樹脂的損害；完全沒前置處理的糖蜜對樹脂層析約只有 1-2 次壽命，經上述前置處理約 20 次，但仍與理想清淨狀態下可反覆使用 100 次相差甚大）。此法實驗室可執行之，但量產可能須投入昂貴機械設備。

（五）台糖營養糖蜜壓濾試驗

台糖營養糖蜜以壓濾機過濾後，濾液經 800 rpm 離心 10 分鐘，觀察其沉澱物量，圖四。各處理組與對照組（第 3 組）的沉澱物比較並無太明顯的差異，表示糖蜜沉澱物無法以上述方法清除，將會影響日後量產之成本。



圖四、糖蜜以壓濾機處理後離心結果

（六）以 TEAC 評估各分劃沖脫物之總抗氧化力（抑制 $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 及 DPPH）評估

1. 虎尾糖蜜各沖脫物之總酚量評估

經與標準品catechin比較各沖脫物之總酚量，得知25%乙醇沖脫物在濃度600 ppm時其總酚含量為275.8mg/g，95%乙醇沖脫物濃度在600 ppm時其總酚含量為374.2mg/g。

2. 虎尾糖蜜各沖提物之抗氧化力(抑制 $\text{ABTS}^{+\cdot}$)評估

95%乙醇沖脫物經99.8%乙醇回溶物之抗氧化力分析及此回溶物經 Sephadex LH-20管柱層析，含酚類沖脫物之抗氧化力分析。

(1) 95%乙醇沖脫物之抗氧化力，抑制 $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 之 IC_{50} 為 310 ppm。

(2) 99.8%乙醇回溶物之抗氧化力，抑制 $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 之 IC_{50} 為 200 ppm。

(3) 經 Sephadex LH-20 管柱層析，含酚類沖脫物之抗氧化力，抑制 $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 之 IC_{50} 為 150 ppm。

3. 虎尾糖蜜各沖提物及4個主要酚類成分之抗氧化力(抑制DPPH)評估

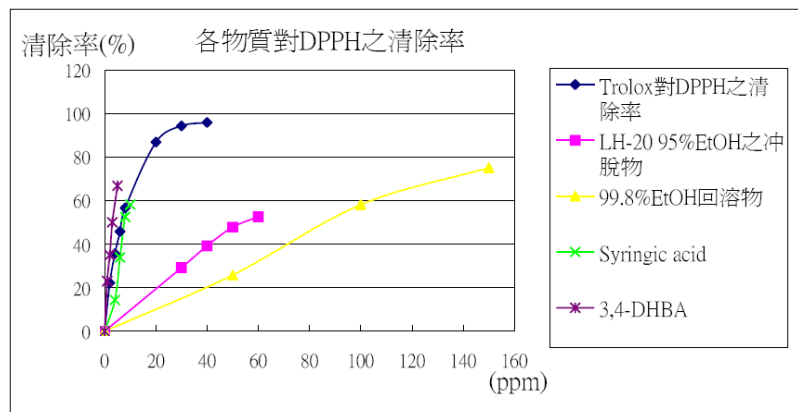
(1) Amberlite XAD-16層析後之95 %乙醇沖脫物以99.8 % 乙醇回溶，回溶物抑制DPPH之 IC_{50} 為94.72 ppm。99.8 %乙醇回溶物經Sephadex LH-20管柱層析，以95%乙醇沖提，含酚類之沖脫物合併後濃縮，濃縮物抑制DPPH之 IC_{50} 為54.50 ppm。

(2) 4個主要酚類成分 *p*-Hydroxybenzoic acid (1)及vanillic acid (2)抑制DPPH之 IC_{50} 均大於 $1000 \mu\text{M}$ ，syringic acid (3)及3,4-dihydroxybenzoic acid (4)則有較強之抗氧化力，

其抑制DPPH之 IC_{50} 分別為7.73 ppm (39.04 μ M)及2.92ppm (18.95 μ M)。標準品 Trolox之抗氧化力，抑制DPPH之 IC_{50} 為7.02ppm (28.08 μ M)。

表四、糖蜜層析後各沖脫物及 4 個主要酚類成分之抑制 DPPH 數據

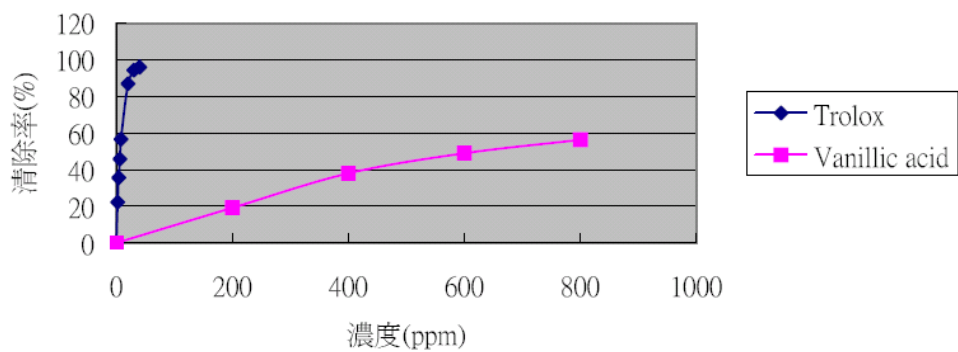
樣品	IC_{50} (ppm, μ g/ml)	IC_{50} (μ M)
99.8% 乙醇回溶物	94.72	
Sephadex LH-20 沖脫物	54.50	
4-Hydroxybenzoic acid (1)	> 1000	> 1000
Vanillic acid (2)	629.51	> 1000
Syringic acid (3)	7.73	39.04
3,4-Dihydroxybenzoic acid (4)	2.92	18.95
標準品(Trolox)	7.02	28.08



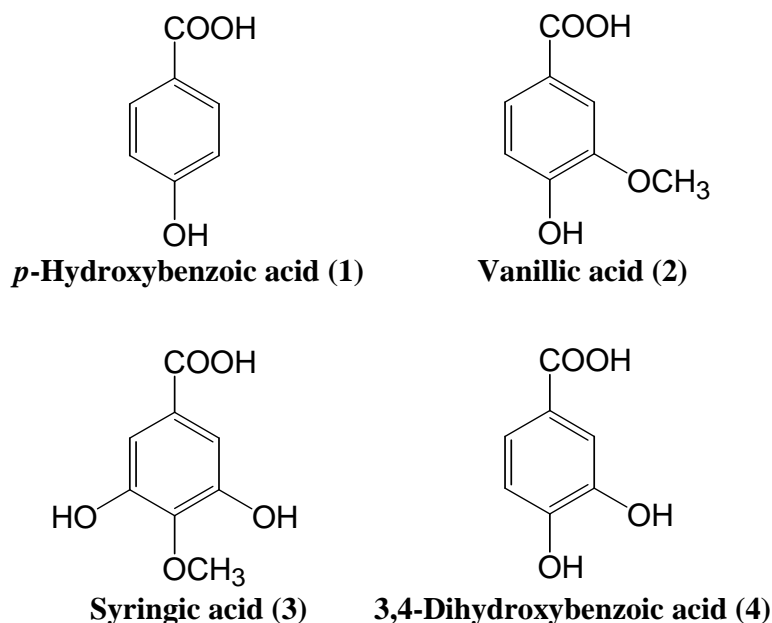
圖五、各物質對 DPPH 之清除率

註: 3,4-DHBA: 3,4-Dihydroxybenzoic acid

Vanillic acid對DPPH之清除率



圖六、 Vanillic acid 對 DPPH 之清除率



圖七、化合物 (1) - (4) 之化學結構式

* 虎尾糖蜜中抗氧化物化 (1) - (4) 化合物之光譜數據總整理

(1) 4-Hydroxybenzoic acid

無色針狀結晶、分子式： $C_7H_6O_3$ 、分子量：138

IR cm^{-1} : 3400, 3500~2500, 1680, 1620, 1600, 1500, 1450.

1H -NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) δ (ppm):

12.40 (1H, br s), 10.20 (1H, br s), 7.79 (2H, m), 6.82 (2H, m).

^{13}C -NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) δ (ppm):

167.5, 161.9, 131.6, 121.7, 115.4.

(2) Vanillic acid

無色針狀結晶、分子式： $C_8H_8O_4$ 、分子量：168

IR cm^{-1} : 3500, 3300~2500, 1690, 1600, 1530, 1480, 1440.

1H -NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) δ (ppm):

12.47 (1H, br s), 9.82 (1H, br s), 7.45 (2H, m), 6.84 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz), 3.80 (6H, s).

^{13}C -NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) δ (ppm):

167.5, 151.3, 147.4, 123.8, 121.9, 115.3, 112.9, 55.8.

(3) Syringic acid

無色針狀結晶、分子式： $C_9H_{10}O_5$ 、分子量：198

IR cm^{-1} : 3400, 3400~2800, 1700, 1620, 1530, 1470, 1410.

1H -NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) δ (ppm):

12.59 (1H, br s), 9.19 (1H, br s), 7.20 (2H, s), 3.80 (6H, s).

^{13}C -NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) δ (ppm):

167.4, 147.5, 140.3, 120.5, 107.0, 55.8.

(4) 3,4-Dihydroxybenzoic acid

無色針狀結晶、分子式： $C_7H_6O_4$ 、分子量：154

IR cm^{-1} : 3400, 3300~2900, 1700, 1600, 1560, 1470, 1420.

1H -NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ (ppm):

10.28 (1H, br s), 7.40 (1H, d, $J= 2.0$ Hz), 7.34 (1H, dd, $J= 8.0, 2.0$ Hz), 6.81 (1H, d, $J=8.0$, Hz)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ (ppm):

167.9, 150.4, 145.3, 122.6, 122.2, 117.1, 115.7.

五、討論

以上實驗結果證實，可用Amberlite XAD-16 樹脂為材料充分達成糖之回收及抗氧化活性成分之分離，沖脫物之總酚含量及其抗氧化活性結果，可證明虎尾糖蜜具有多酚類抗氧化物質。沖脫物共分離4個主要酚類成分 *p*-hydroxybenzoic acid (1)，vanillic acid (2)，syringic acid (3) 及3,4-dihydroxybenzoic acid (4)，其中成分3與4具有較強之DPPH抑制活性，其 IC_{50} 分別為7.73 ppm (39.04 μ M)及2.92 ppm (18.95 μ M)。成分3與4可視為虎尾糖蜜之抗氧化指標成分。

上述結果可作為生質能源副產品再利用及其提升附加價之依據，並進一步研發出附加價值較高之健康食品。

六、經濟效益

(一) 量化成果及效益

以 800 克 Amberlite XAD-16 樹脂為層析材料進行虎尾糖蜜糖及抗氧化物之回收，每次取 150 克蜜糖層析，重覆進行 20 次層析實驗，蜜糖總用量 3.0 公斤，其收率為：

- (1) 糖總收量 1.4 公斤(乾重)，糖總收率 46.7 %。
- (2) 抗氧化物(95%乙醇沖脫物)總收量 109.0 克(乾重)，總收率 3.6 %。
- (3) 因未量化且無類似上市商品，價值及成本尚無法評估。

(二) 非量化成果及效益

成果顯示95%乙醇沖脫物已具抗氧化活性，再經99.8%乙醇回溶，其回溶物有更佳之抗氧化力，進一步將回溶物層析，可分離出具有更佳抗氧化力之指標成分。此結果可作為糖蜜回收糖之再利用及其提升附加價之依據，並進一步研發出附加價值較高之保健食品或健康食品。

七、經費支出情形

費用支出部分：預算數 95 萬元（自辦 15 萬元、委辦 80 萬元）

實支數 93.4 萬元（自辦 13.4 萬元、委辦 80 萬元）

資本支出部分：預算數 0、實支數 0。

八、建議及其他

糖蜜用溫水稀釋，冷卻後以 1 μ m 濾板壓濾，濾液經 800 rpm，離心 10 分鐘後，仍有沉澱物

殘留。此現象會影響管柱層析用樹脂(Amberlite XAD-16)之使用次數。糖蜜沉澱物之無法清除將會影響日後量產之成本。

九、參考文獻

- (1) Liang, L., Zhang, Y.P., Zhang, L., Zhu, M.J., Liang, S.Z., Huang, Y.N., **2008**, Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 980-982.
- (2) Firkins, J. L. , Oldick, B. S. , Pantoja, J. , Reveneau, C., Gilligan, L. E. and Carver, L. **2008**, Efficacy of Liquid Feeds Varying in Concentration and Composition of Fat, Nonprotein Nitrogen, and Nonfiber Carbohydrates for Lactating Dairy Cows, *J. Dairy Sci.*, 91, 1969-1984.
- (3) Arthington, J. D., Pate, F. M. , Spears, J. W., **2003**, Effect of copper source and level on performance and copper status of cattle consuming molasses-based supplements, *J. Anim. Sci.* 81, 1357-1362.
- (4) Payet, B. , Shum, Cheong, Sing, A. , Smadja, J. **2006**, Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities, *Food Chem.* 54, 7270-7276.
- (5) Najafpour, G. D., Shan, C. P. **2003**, Enzymatic hydrolysis of molasses *Bioresource Technology*, 86, 91-94.
- (6) Takara, K., Wada, K., Iwasaki, H., Yamashita, M., Ushijima, K., **2007**, Phenolic compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J. Oleo. Sci.*, 56 (11) , 611-614.
- (7) Payet, B., Shum, Cheong, Sing, A., and Smadja, J., **2006**, Comparison of the concentrations of Phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7270-7276.
- (8) Takara, K., Otsuka, K., Wada, K., Iwasaki, H., Yamashita, M., **2007**, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory effects of constituents of sugarcane molasses, *Biosci. Biotechnol. Biochem* , 71, 183-191.
- (9) Takara, K., Wada, K., Iwasaki, H., Yamashita, M., Ushijima, K., **2007**, Phenolic compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J. Oleo. Sci.*, 56, 611-614.
- (10) McCord, J.M.; Fridovich, I. **1969**, Superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.*, 22, 6049-6055.
- (11) Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O.I., **1995**, Free radicals and antioxidants in food and in vivo : what they do and how they work., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 7-20.
- (12) 丁克祥, **1996**, SOD 生物學淺談論, 藝軒出版社, 台北市。
- (13) Hippeli, S., Elstner, E.F., **1997**, Transition metal ion catalyzed oxygen activation during pathogenesis processes. *FEBS. Letters*, 443, 1-7.
- (14) Imalay, J.A.; Lin, S. **1998**, A damage and oxygen radical toxicity, *Science*, 1302-1310.
- (15) Willians, W. B., Cuvelier, M.E., Berset C. **1995**, Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage, *Lebensm-Wiss. Technol.*, 28, 25-30.

- (16) Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J., **1998**, HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1201-1204.
- (17) Munteanu, F. D., Basto, C., Gubitza, G. M., Cavaco-Paulo, A., **2007**, Staining of wool using the reaction products of ABTS oxidation by laccase: synergetic effects of ultrasound and cyclic voltammetry, *Ultrason. Sonochem.*, 14, 363-367.