

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

製備級液相層析法分離精製水果中之花青素

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2622-E-002-009-CC3

執行期間：92年06月01日至93年09月30日

執行單位：國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人：黃世佑

計畫參與人員：盧秀青

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫為提升產業技術及人才培育研究計畫，不提供公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 30 日

國科會補助提升產業技術及人才培育研究計畫成果精簡報告

學門領域：化學工程

計畫名稱：製備級液相層析法分離精緻水果中之花青素

計畫編號：NSC92-2622-E-002-009-CC3

執行期間：92 年七月一日至 93 六月三十日

執行單位：台灣大學化學工程學系

主持人：黃世佑

參與學生：

姓名	年級 (大學部、碩士班、博士班)	已發表論文或已申請之專利 (含大學部專題研究論文、碩博士論文)	工作內容
盧秀青	碩士班		萃取、快速層析、FRAP、HPLC

合作企業簡介

合作企業名稱：嘉年生化產品有限公司

計畫聯絡人：林景寬

資本額：二千六百萬元

產品簡介：酵素、天然色素、微生物製劑、生化肥料、植物萃取物

網址：<http://cbcpclin.tripod.com/framec.htm>

電話：(04)23609036

研究摘要：

本研究從桑椹果中萃取分離出花青素，並進行抗氧化活性測定。將桑椹果之甲醇萃取液通入快速液相層析儀(Flash chromatograph)作初步分離，以 25% 甲醇(含 1% 醋酸)及 50% 甲醇(含 1% 醋酸)溶離出 F25、F50 兩部分，再利用 Reverse Phase Liquid Chromatography 分析其中之花青素，並以半製備級高效液相層析管柱分離純化出花青素，再經由 LC/MS 確認鑑定花青素之結構。抗氧化活性測定方面，以 FRAP(Ferric Reducing Ability of Plasma)及抑制 H₂O₂ 誘發老鼠腦漿脂質過氧化(Lipid peroxidation)等方法，評估甲醇粗萃取物及快速層析儀分離出的 F25 和 F50 之抗氧化活性。

人才培育成果說明：

參與學生能熟悉天然物萃取分離的操作、抗氧化活性能力的測定，及其中相關的原理。對於天然物的萃取分離方面，學生能運用溶劑的極性不同及 pH 值的差異萃取、分離目標化合物；在儀器操作方面，能熟悉快速層析儀、高效液相層析儀、分光光度計 等等相關儀器的操作及原理；在抗氧化活性測定方面，藉由了解自由基在人體的機制，明白

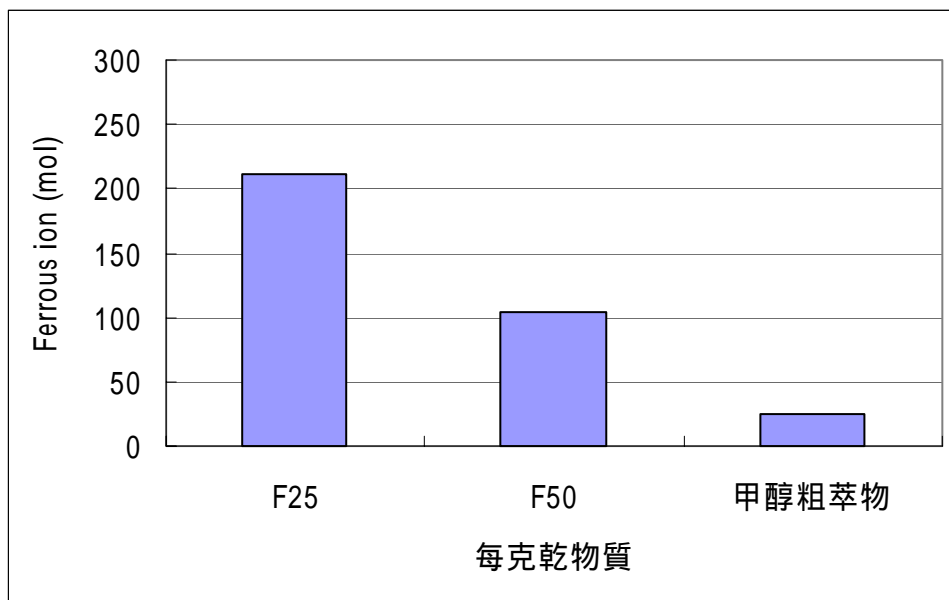
目前多種抗氧化活性測定方法的原理與操作，例如：FRAP、TEAC、ORAC 等等，在動物細胞的實驗上，亦有接觸了解的機會，例如，實驗中所使用的 H_2O_2 誘導老鼠腦部均質液過氧化的操作及原理。

技術研發成果說明：

1. 20 克新鮮桑椹果實使用 200ml 甲醇萃取，可得甲醇粗萃取物。甲醇粗萃物經快速液相層析作進一步分離，快速層析儀流動壓力設定為 0.05 MPa。先以 200ml 5% methanol (1% acetic acid) (Tedia, U.S.A.) 沖洗管柱，做預平衡，再將濃縮液通入填充有 Cosmosil 75C18-OPN gel (Nacalai Tesque, Japan) 120*40mm 的管柱中，以 250ml 5% methanol (1% acetic acid) 融離出醣類及其他水溶性化合物；再以 700ml 25% methanol (1% acetic acid) 融離，標示為 F25；其次以 450ml 50% methanol (1% acetic acid) 融離，標示為 F50；然後以 400ml 100% methanol (0.1% HCl) 清洗管柱，最後使用 500ml 50% methanol 進行管柱再生。粗萃物經由快速層析儀，可得 F25 111.4mg、F50 16.8mg。

2. FRAP : (Ferric Reducing Ability of Plasma)

利用 FRAP 測定 F25、F50、粗萃物之還原亞鐵離子能力。FRAP 是利用將 Fe^{3+} 和 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)(Sigma,U.S.A.) 的錯合物還原成 Fe^{2+} 的形式，且 Fe^{2+} 與 TPTZ 的錯合物在波長 593nm 時有最大吸收值。將樣品與 FRAP 試劑反應 4 分鐘後，測量其在 593nm 下吸收值的變化，與 Fe^{2+} 檢量線作比較，評估樣品還原 Fe^{3+} 的能力。結果顯示如圖一，每克 F25 乾粉末可還原 210.7 mol Fe^{2+} ，每克 F50 可還原 103.4 mol Fe^{2+} ，每克粗萃物可還原 25.4 mol Fe^{2+} 。



圖一、利用 FRAP 測定 F25、F50、粗萃物的結果

3. H_2O_2 -Induced Lipid Peroxidation in Rat Brain Homogenate :

以 H_2O_2 誘導老鼠腦部均質液脂質過氧化，多元不飽和脂肪酸裂解產生

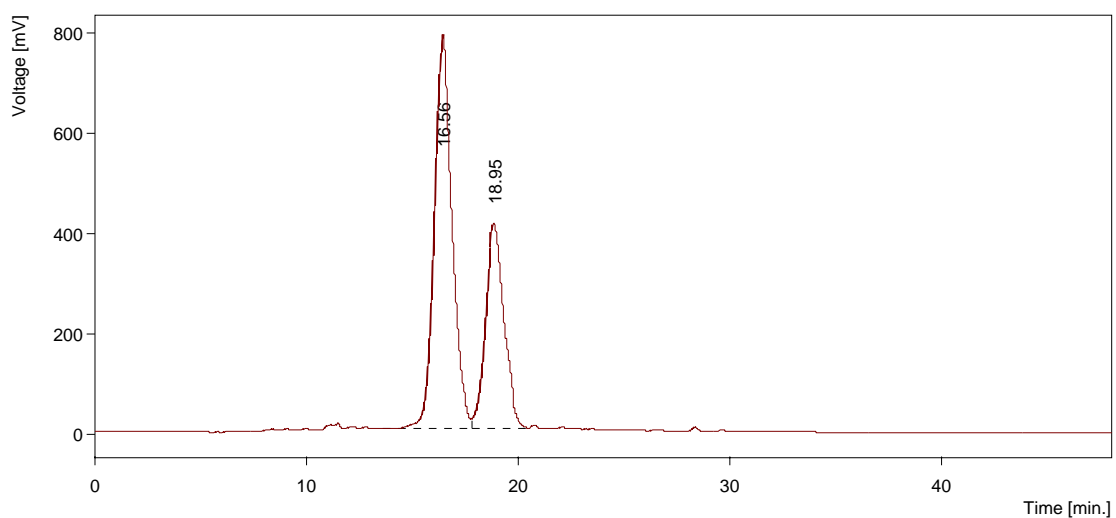
malonaldehyde(MDA), MDA 與 4-hydroxyalkenols (4-HAD)的反應生成物在 586nm 下有最大吸收值。利用吸收度的變化，評估花青素抑制脂質過氧化的能力。結果如表一所示。

表一、過氧化脂質抑制效果

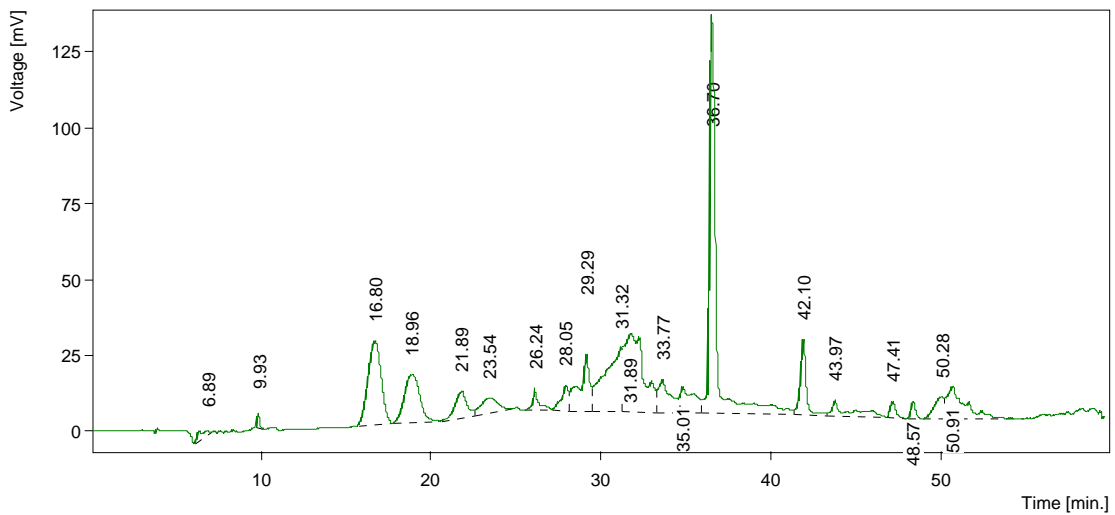
Sample	IC ₅₀ (μ g)
粗萃取物	41
F25	2
F50	1.7
Cyanidin chloride	0.4
Trolox	4.3

3. 利用 HPLC 分析 F25、F50 所含花青素：

分析級管柱 5C₁₈-AR-，4.6*250mm，注入量 10 μ l，流速 1ml/min，移動相組成 A：2% acetic acid，B：methanol，梯度 B：0 15%(5min) 18%(5min) 22%(5min) 24%(2min) 50%(28min) 100%(10min)；半製備級管柱 5C₁₈-AR-，20*250mm，注入量 0.5ml，流速 6ml/min，動相組成 A：2% acetic acid，B：methanol，梯度 B：0 15%(5min) 20%(10min) 35%(15min) 38%(5min) 50%(5min) 100%(5min)，溫度均為 30，偵測波長為 530nm，分析級 HPLC 圖譜如圖二、圖三所示。

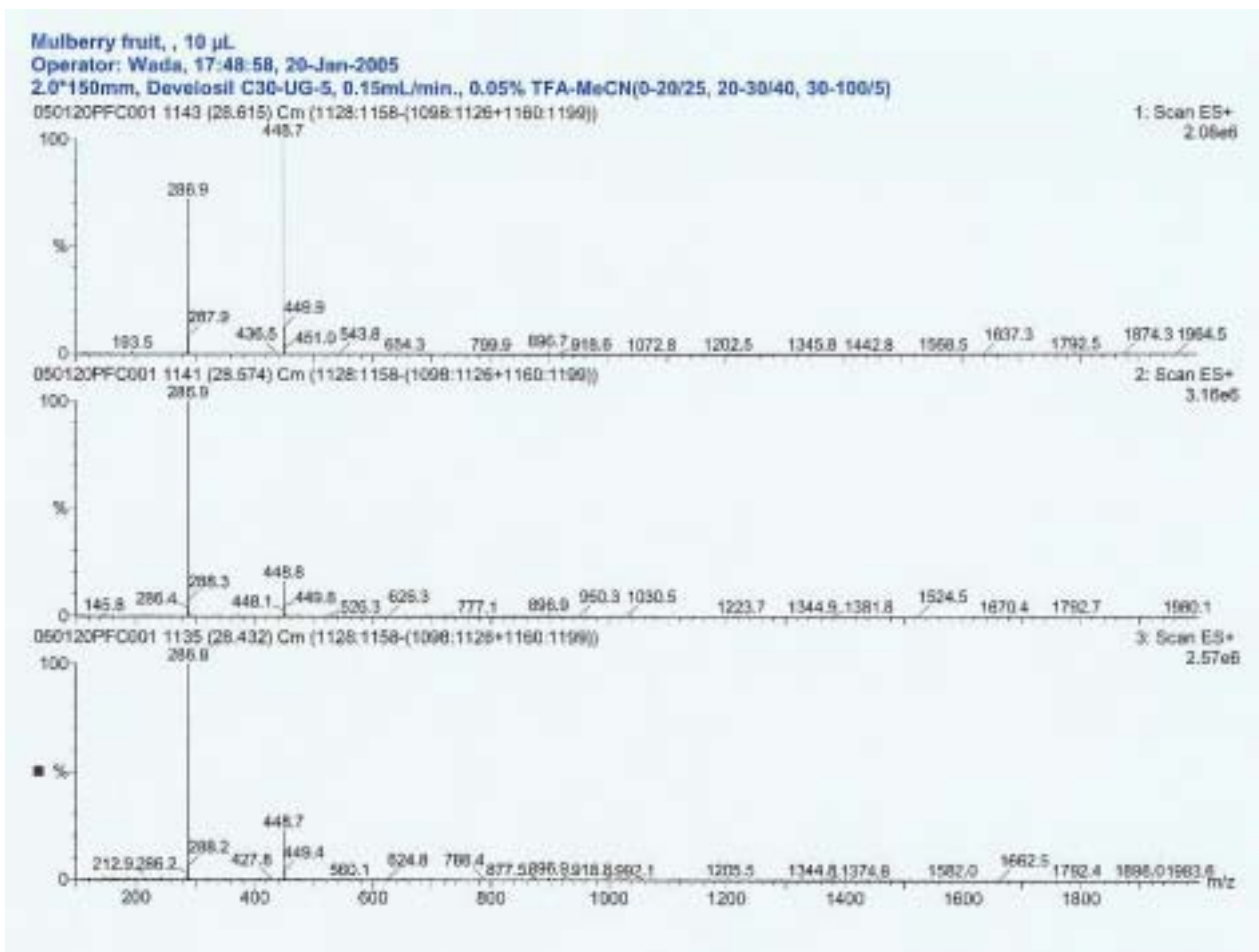


圖二、F25 之分析級 HPLC 圖譜，peak1(16.56min)為 cyanidin 3-glucoside，peak2(18.95min)為 cyanidin 3-glucoside-p-coumaric acid

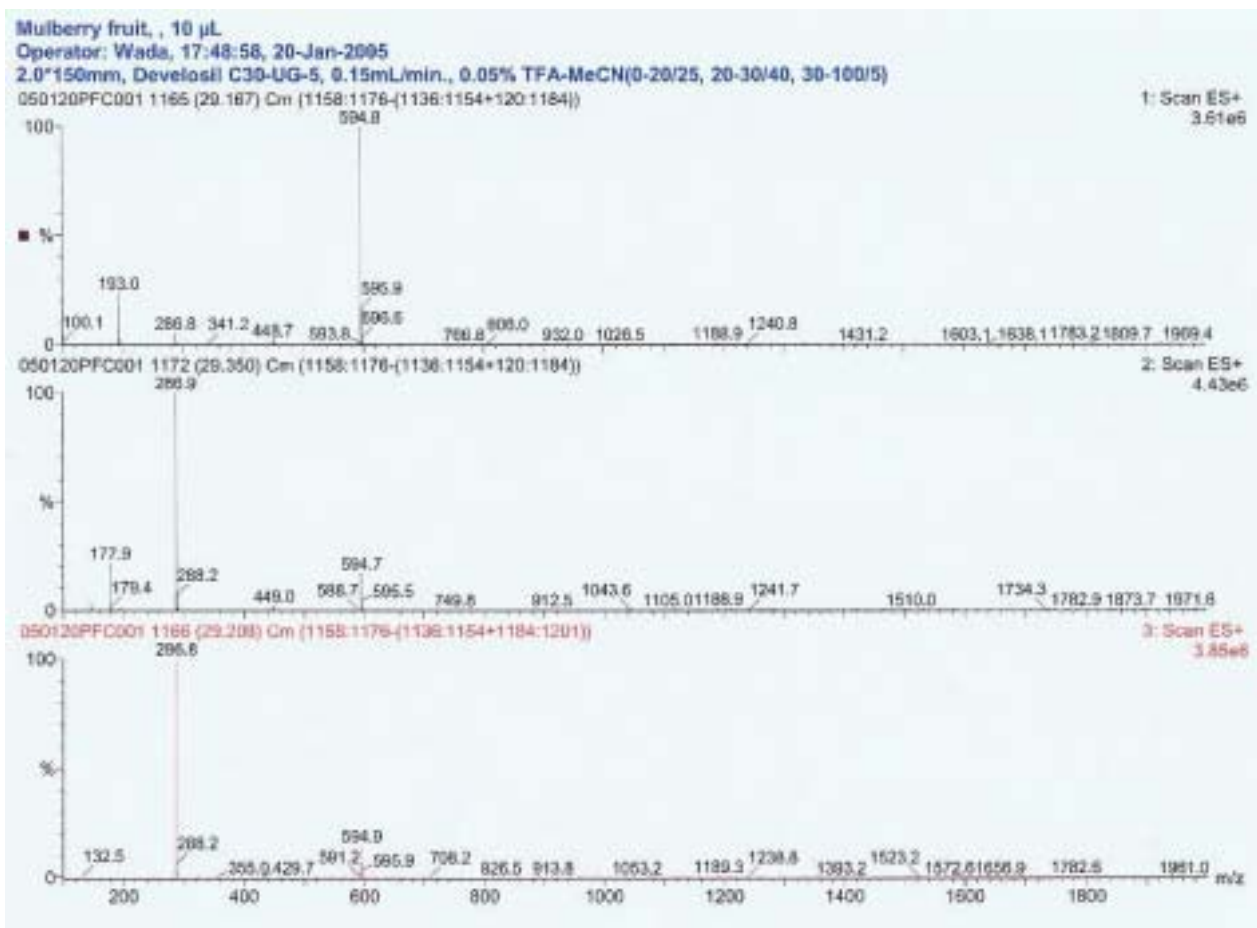


圖三、F50 之分析級 HPLC 圖譜

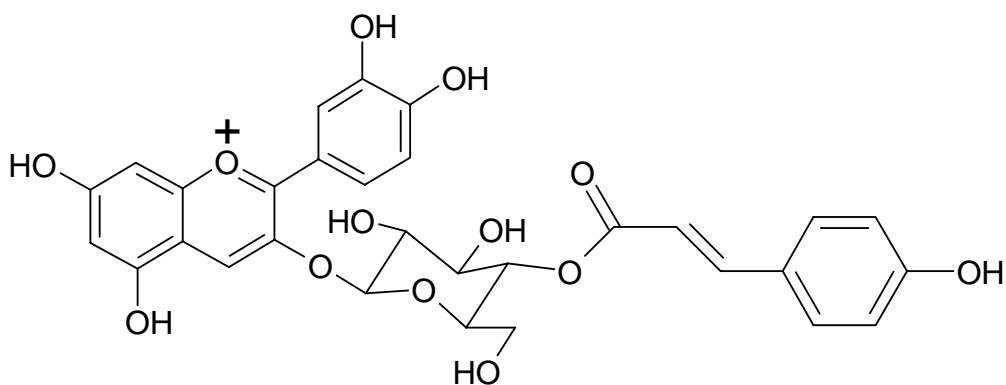
4. 利用 LC-MS 分析 F25 之花青素，結果如圖四、圖五所示。由圖四的資料顯示，peak1 為 cyanidin 3-glucoside。由圖五的資料顯示，peak2 為 cyanidin 3-glucoside 與 p-coumaric acid 脫掉一分子水所形成之化合物，結構式如圖六所示，此化合物為自然界中新發現之花青素結構。



圖四、Peak1 之 LC-MS 圖譜



圖五、Peak2 之 LC-MS 圖譜



圖六、Peak2 之結構式

技術特點說明：

經由快速層析可以大量且快速有效分離出花青素；快速層析所分離出之 F25 相較於粗萃物，FRAP 的表現上可提高 8.3 倍，在抑制 H₂O₂-Induced Lipid Peroxidation 的表現上，F25 及 F50 皆比粗萃物的抑制效果高 20 倍之多。

可利用之產業及可開發之產品：

花青素除為重要的食品呈色劑外，亦是當前備受關注之抗氧化活性劑。已有許多研究指出，花青素對於預防心血管疾病，減少 DNA 氧化傷害，防止突變，抑制癌細胞生長，治療眼部疾病及幫助胰島素分泌都有良好的效果。

推廣及運用的價值：

本研究對於業界大量製備花青素，提供了製備的條件與方法。在評估桑椹中花青素含量方面，也有實驗室初步的數據，對於未來開發生產桑椹相關之保健食品，提供了一個有用的參考資料。研究結果中也顯示，在抑制 H₂O₂-Induced Lipid Peroxidation 的實驗裡，經由快速層析所分離出之 F25、F50 效果皆優於 Trolox (維他命 E)，且為 Trolox 的兩倍。

已發表論文：

I. Matsushita, T. Kaneyuki, K. Yao and S. Y. Huang, "The Preparation Method of Flash Chromatography and HPLC," J. Japanese Soci. Of Food Engineering, 24(2), 51-56 (2004)