

產學合作案結案報告書

華餐管 104 產學字第 005 號

食品中生理活性物質配合高效液 相層析快速篩檢方法之開發

甲方：雲集貿易有限公司

乙方：中華學校財團法人中華科技大學

餐飲管理系

計劃主持人：鍾成沛

摘要

我國許多精密儀器廠商長年進行儀器分析貿易，進口並販售諸多管柱、偵測器、自動進樣裝置或其他高效液相層析（high-performance liquid chromatography, HPLC）相關耗材，不時遭遇顧客詢問特定成分分析合適之條件及資訊，若可針對常見的分析項目進行分離條件整合，將可更快速提供顧客所需，並減少大量購進同性質或類似設備以降低成本，同時可藉由該等分析方式初步測試欲代理或進口部品之分離品質，更可掌握本身產品的特色及優勢。本計畫針對酚酸類、類黃酮類及固醇類化合物開發快速的分析方法，以可同時分析多項常見的標準品為出發，期廠商於演練或測試時可快速提供明確的產品優勢，且於反覆的分析方法嘗試中，增加研發、品管人員之職能，以達永續經營之理念。

關鍵字：高效液相層析、酚酸類、類黃酮類、固醇類

目錄

壹、前言·····	1
一、開發動機·····	1
二、預期成效·····	1
貳、開發程序·····	2
參、結果與討論·····	3
一、酚酸類化合物混合樣品分析條件開發·····	3
二、類黃酮類化合物混合樣品分析條件開發·····	5
三、植物固醇類化合物混合樣品分析條件開發·····	12
肆、總結·····	14
伍、參考文獻·····	15

壹、前言

一、開發動機：

高效液相層析法 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 是利用適當移動相以加壓沖提將混合物透過固定膠體將其分離的方法，因具有快速、準確且成本較為低廉等優點，使其成為目前分析食品中特定生理活性成分的主要方式之一。按目前衛生福利部或政府農業化學師學會 (Association of Official Agricultural Chemists, AOAC) 公告之檢驗方法，常針對特定單一成分進行規範或建議，惟食品中時常具有多種成分且組成複雜，倘有許多同類但結構相近的一群化合物（如阿魏酸、沒石子酸、肉桂酸等酚酸類），或同類化合物中的特定結構分支（如黃酮、黃烷醇、異黃酮等類黃酮類），若個別針對單一成分進行分析將耗費相當程度之人力、經費及時間，同時亦可能造成 HPLC 儀器常常需更改移動相比例、管柱類型或流洗時間等參數，進一步造成儀器設備、樣品或溶劑的耗損。

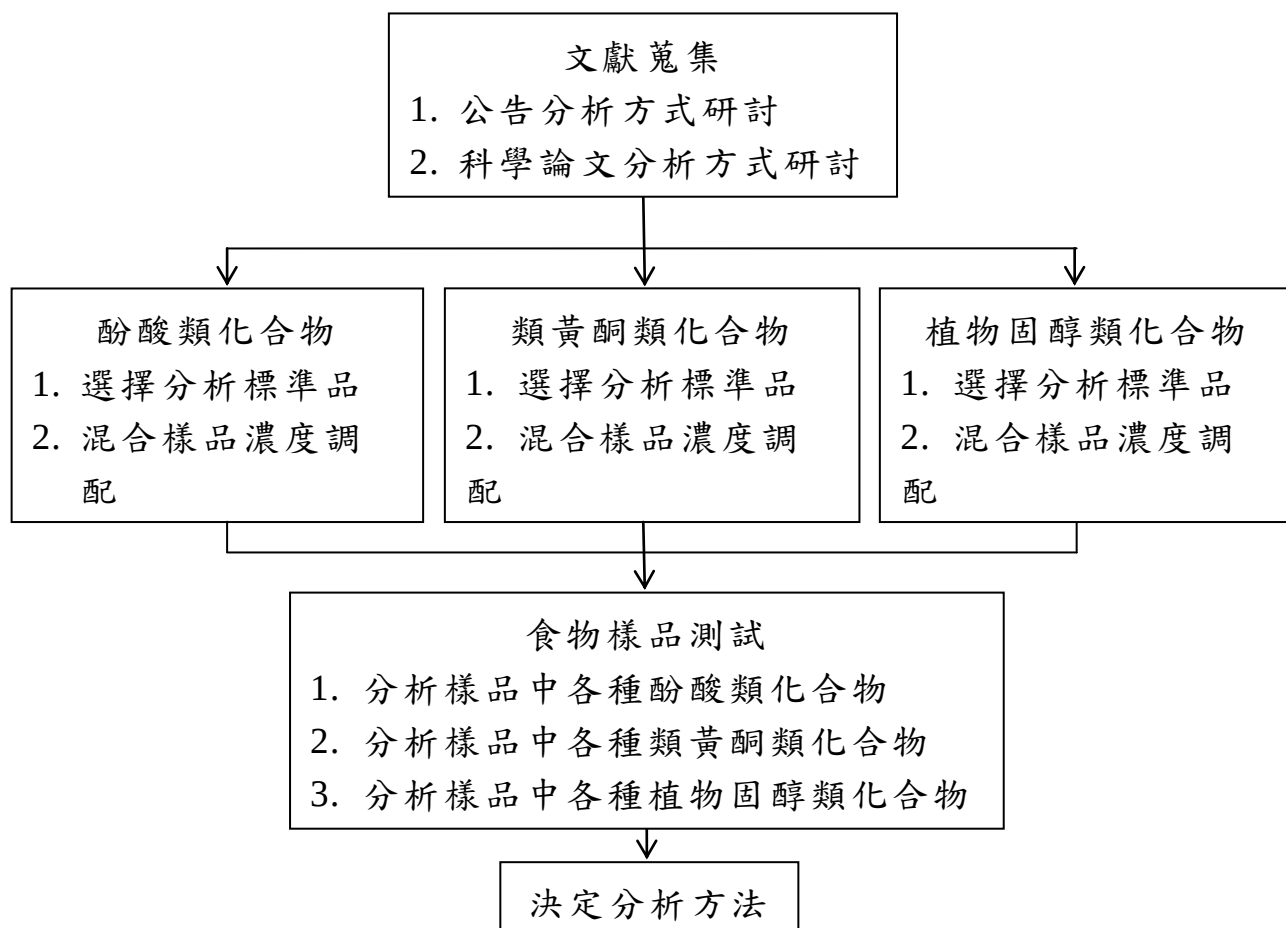
二、預期成效：

雲集貿易有限公司長年進行儀器分析貿易，進口並販售諸多管柱、偵測器、自動進樣裝置或其他 HPLC 相關耗材，不時遭遇顧客詢問特定成分分析合適之條件及資訊，若可針對常見的分析項目進行分離條件整合，將可更快速提供顧客所需，並減少大量購進同性質或類似設備以降低成本，同時可藉由該等分析方式初步測試欲代理或進口部品之分離品質，

更可掌握本身產品的特色及優勢。

貳、開發程序

目前市面上存在許多健康食品或機能性食品，酚類化合物因具有良好的抗氧化、抗發炎、抗老化等生理活性，常被水相的產品作為其有效成分或指標成分，另一方面，油相的產品則時常以植物固醇作為指標；這些生理活性物質通常均有其公告之分析方式，但有時該等方式無法同時包含數種結構類似物質的分離，故本研究擬針對酚酸類化合物、類黃酮類化合物及植物固醇類化合物開發快速分離方式，就標準品分離、分析時間、沖提梯度等面相進行改良。



參、結果與討論

一、 酚酸類化合物混合樣品分析條件開發：

1. 分析條件：

Reverse phase C18 column (250×4.6 mm i.d.; Kanto chemical CO., INC)

Column temperature: 37 °C

Chromatograms were extracted at 280 nm

Mobile phase:

A: 5 % acetic acid in water

B: 0.5 % acetic acid in water/100 % acetonitrile (1:1, v/v)

Gradient elution program

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	95	5
10	1.0	90	10
40	1.0	60	40
55	1.0	45	55
60	1.0	20	80
65	1.0	0	100
70	1.0	50	50
75	1.0	70	30
80	1.0	90	10
85	1.0	95	5

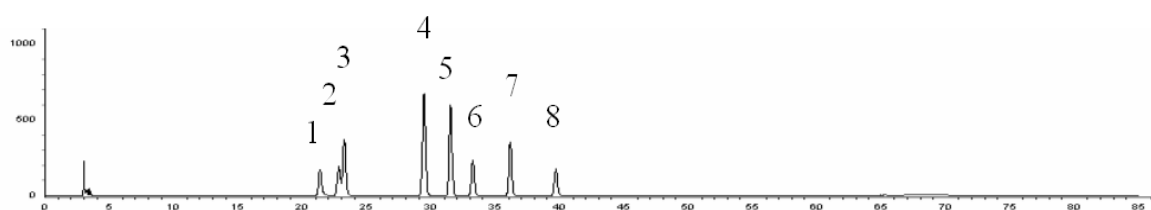
2. 標準曲線：

精確量取 chlorogenic acid、caffeic acid、protocatechuic acid、vanillic acid、p-comaric acid、syringaldehyde、ferulic acid、

4-hydroxyacetophenone、6-methoxy-2-benzoxazolinine 等各對照標準品，並分別添加適量之 DMSO 稀釋調配成各一系列不同濃度之標準品溶液，再經 0.45 μm 濾膜過濾後，便可供為製作標準曲線之試液。

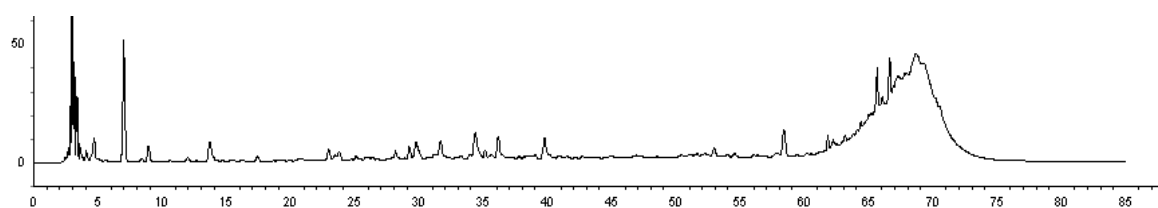
製作標準曲線時，則將一系列不同濃度之欲分析的標準品試液，每次以 20 μL 注入 HPLC 進行分析，以標準品波峰面積為 Y 軸及標準品之濃度為 X 軸，繪圖製作檢量線，並求得標準曲線之線性迴歸方程式 ($Y=aX+b$) 及相關係數 (γ)。

3. 混合標準品之高效液相層析圖譜：



Phenolic compound standards (100 $\mu\text{g/mL}$)		Retention time (min)
1	Chlorogenic acid	21.3
2	Vanillic acid	22.4
3	Caffeic acid	23.1
4	4-Hydroxyacetophenone	29.1
5	<i>p</i> -Coumaric acid	31.1
6	Syringaldehyde	32.7
7	Ferulic acid	35.6
8	6-Methoxy-2-benzoxazolinine	38.8

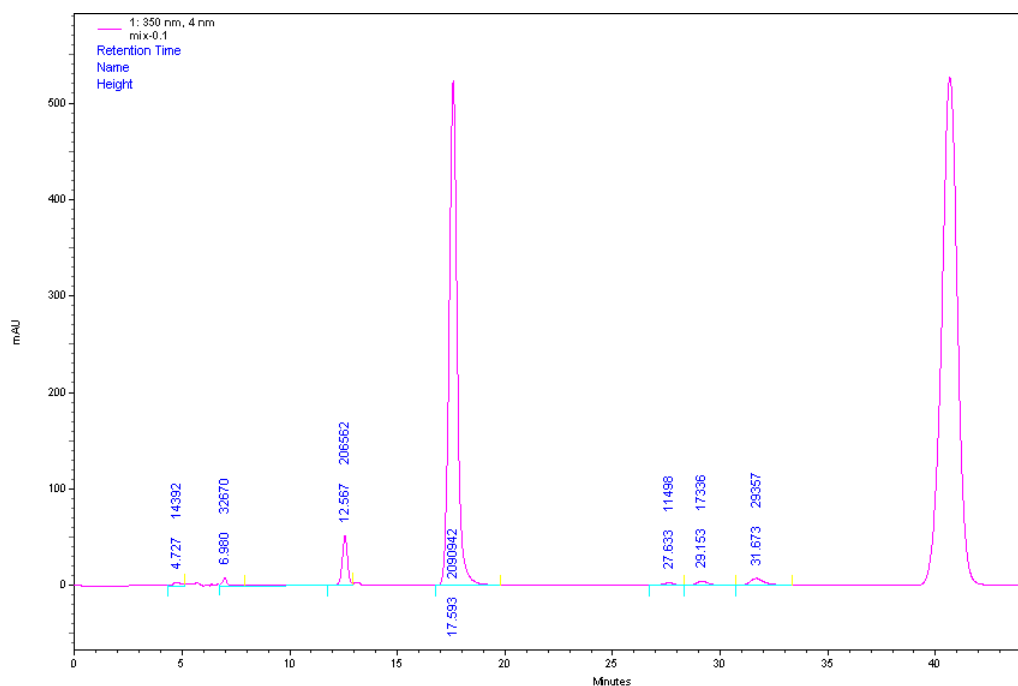
4. 樣品中多項酚酸類物質之分析圖譜：



二、類黃酮類化合物混合樣品分析條件開發：

1. 分析條件及標準曲線：自酚酸類之分析方法修改，惟因濃度高低影響波峰面積甚大，故須嘗試多種濃度。
2. 混合標準品之高效液相層析圖譜（標準品為廠商提供）：

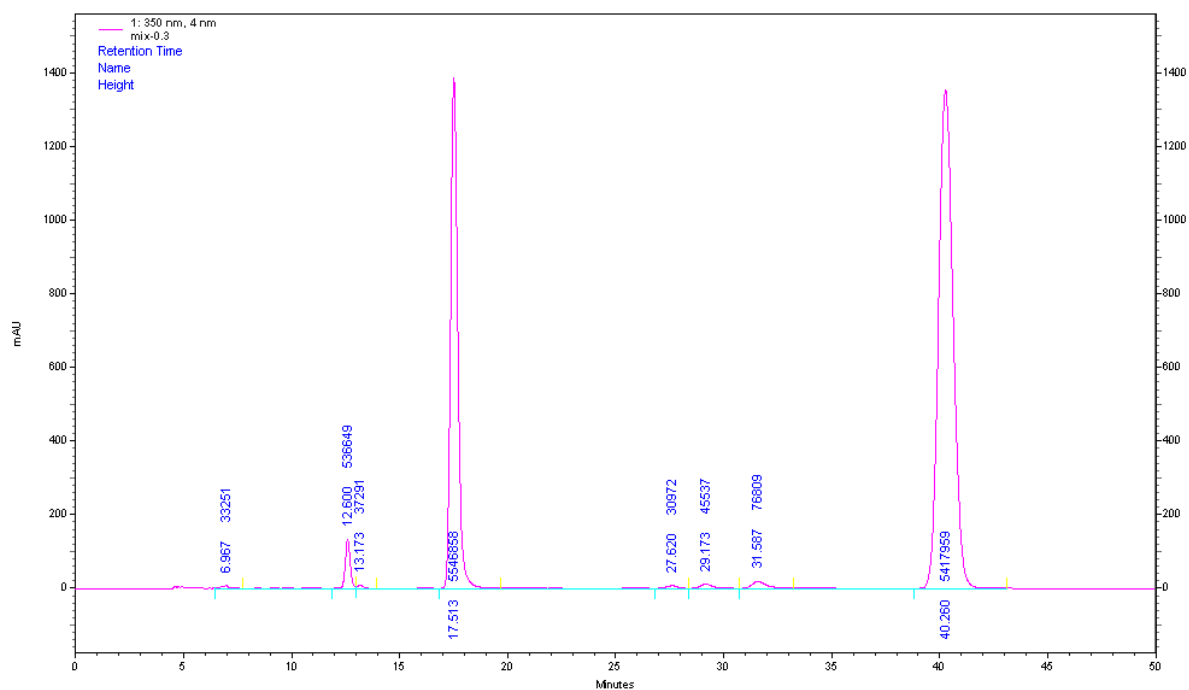
混合標準品 0.1mg：



1: 350 nm, 4 nm Results

Pk #	Retention Time	Area	Area Percent	Height	Width
1	4.727	376697	0.619	14392	0.75
2	6.980	542269	0.891	32670	1.15
3	12.567	3590136	5.899	206562	1.17
4	17.593	53691184	88.220	2090942	3.02
5	27.633	427820	0.703	11498	1.61
6	29.153	754171	1.239	17336	2.39
7	31.673	1478376	2.429	29357	2.65
Totals		60860653	100.000	2402757	

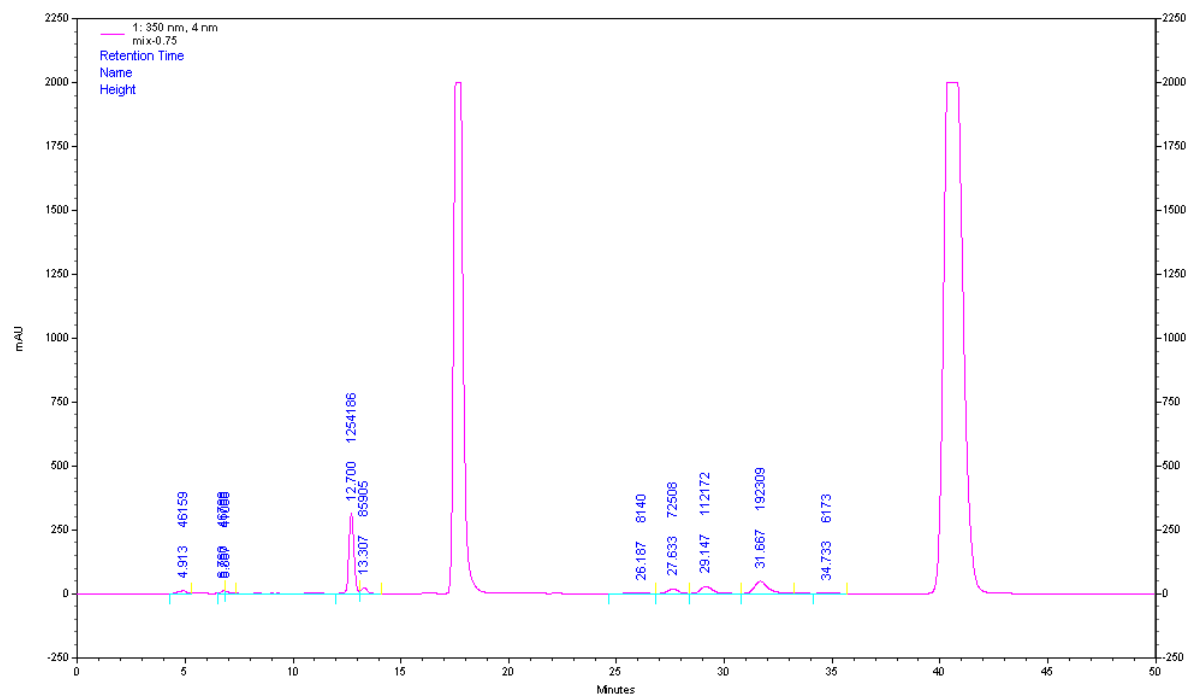
混合標準品 0.3mg：



1: 350 nm, 4 nm Results

Pk #	Retention Time	Area	Area Percent	Height	Width
1	6.967	767952	0.193	33251	1.27
2	12.600	8558047	2.149	536649	1.11
3	13.173	764494	0.192	37291	0.96
4	17.513	126897013	31.858	5546858	2.80
5	27.620	1090806	0.274	30972	1.59
6	29.173	1939006	0.487	45537	2.35
7	31.587	3653474	0.917	76809	2.47
8	40.260	254652164	63.931	5417959	4.31
Totals		398322956	100.000	11725326	

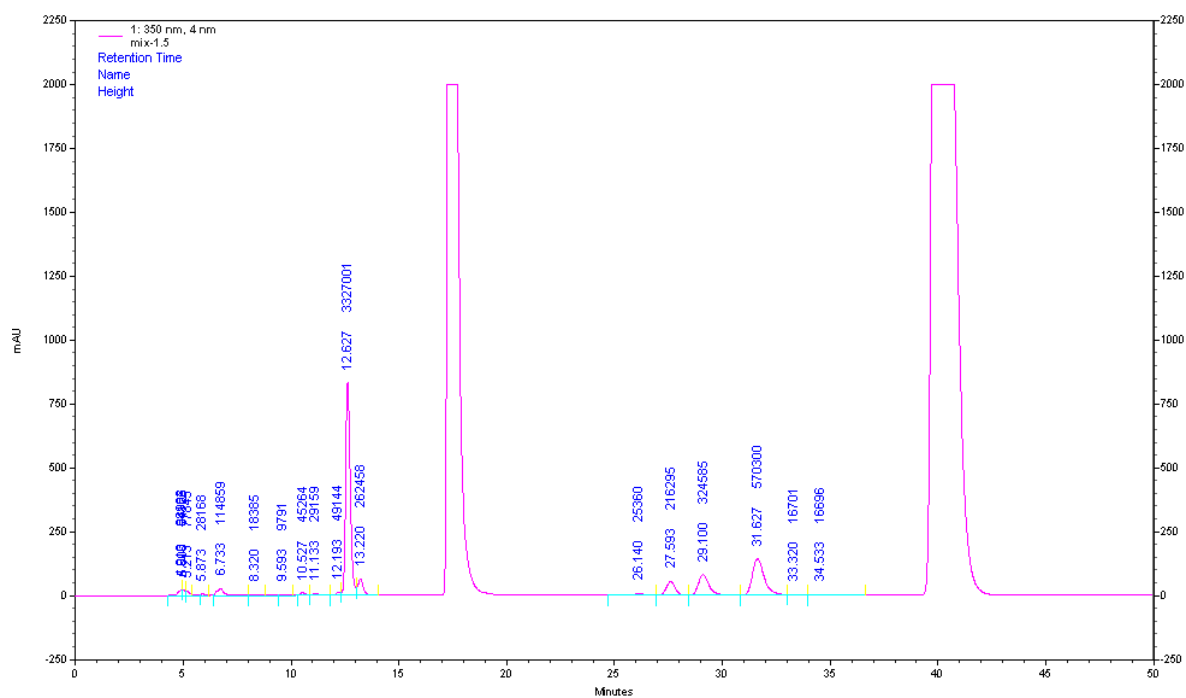
混合標準品 0.75mg :



1: 350 nm, 4 nm Results

Pk #	Retention Time	Area	Area Percent	Height	Width
1	4.913	1345478	3.335	46159	0.99
2	6.760	599325	1.486	46788	0.34
3	6.887	475214	1.178	41068	0.48
4	12.700	20021276	49.628	1254186	1.07
5	13.307	1699853	4.214	85905	1.00
6	26.187	420158	1.041	8140	2.17
7	27.633	2437847	6.043	72508	1.54
8	29.147	4407882	10.926	112172	2.40
9	31.667	8608391	21.338	192309	2.44
10	34.733	327099	0.811	6173	1.57
Totals		40342523	100.000	1865408	

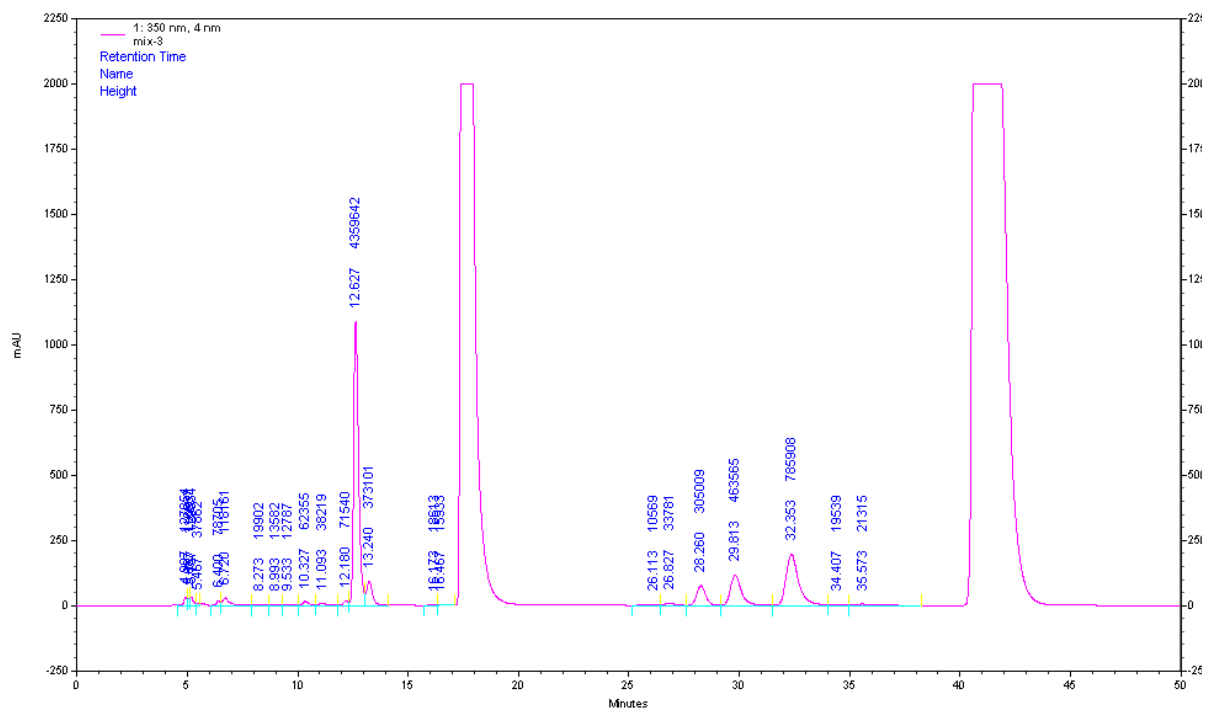
混合標準品 1.5mg：



1: 350 nm, 4 nm Results

Pk #	Retention Time	Area	Area Percent	Height	Width
1	4.913	1115946	1.055	88963	0.67
2	5.000	900131	0.851	94125	0.19
3	5.213	801930	0.758	77845	0.29
4	5.873	364729	0.345	28168	0.41
5	6.733	2919383	2.761	114859	1.61
6	8.320	492447	0.466	18385	0.77
7	9.593	303457	0.287	9791	0.70
8	10.527	777663	0.735	45264	0.58
9	11.133	700739	0.663	29159	0.95
10	12.193	710278	0.672	49144	0.48
11	12.627	49173628	46.503	3327001	0.71
12	13.220	4764967	4.506	262458	1.00
13	26.140	1118006	1.057	25360	2.22
14	27.593	6295175	5.953	216295	1.50
15	29.100	11452328	10.830	324585	2.39
16	31.627	22316854	21.105	570300	2.19
17	33.320	603203	0.570	16701	0.95
18	34.533	932261	0.882	16696	2.67
Totals		105743125	100.000	5315099	

混合標準品 3.0mg：

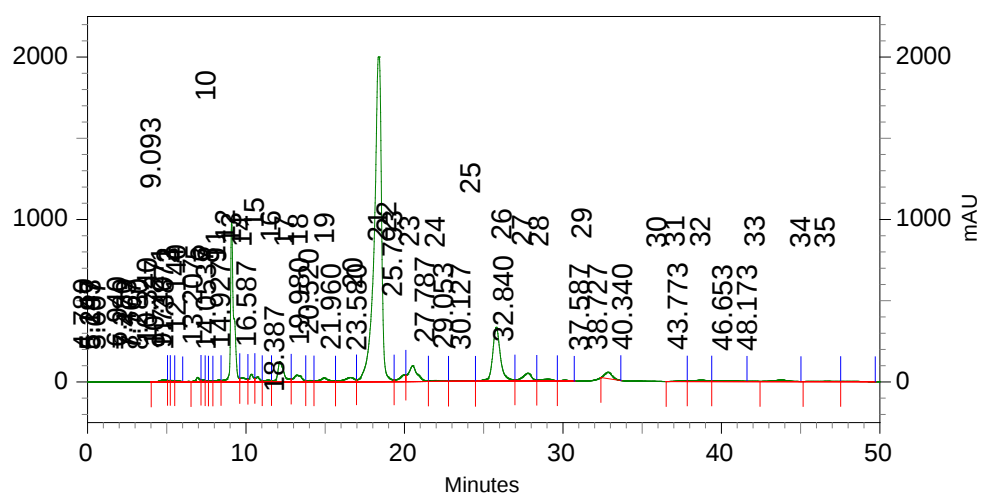


1: 350 nm, 4 nm Results

Pk #	Retention Time	Area	Area Percent	Height	Width
1	4.907	1164528	0.799	127854	0.42
2	5.087	976051	0.670	116667	0.15
3	5.187	1246837	0.856	129834	0.27
4	5.467	300186	0.206	37862	0.16
5	6.400	849300	0.583	78705	0.43
6	6.720	2793580	1.917	118161	1.40
7	8.273	583636	0.401	19902	0.77
8	8.993	374094	0.257	13582	0.63
9	9.533	368129	0.253	12787	0.73
10	10.327	1223400	0.840	62355	0.75
11	11.093	897430	0.616	38219	1.03
12	12.180	1066410	0.732	71540	0.49
13	12.627	67028569	46.001	4359642	0.74
14	13.240	6922140	4.751	373101	1.05

15	16.173	322468	0.221	18613	0.61
16	16.467	331295	0.227	15933	0.79
17	26.113	456486	0.313	10569	1.24
18	26.827	1070971	0.735	33781	1.20
19	28.260	8741893	6.000	305009	1.56
20	29.813	15933210	10.935	463565	2.37
21	32.353	31065288	21.320	785908	2.47
22	34.407	734114	0.504	19539	0.98
23	35.573	1259972	0.865	21315	3.26
Totals		145709987	100.000	7234443	

3. 樣品中多項類黃酮類物質之分析圖譜



三、植物固醇類化合物混合樣品分析條件開發：

1. 分析條件：

Luna C8 (2) column (250×4.6 mm i.d.; Phenomenex, Cheshire, UK)

Column temperature: 50 °C

Chromatograms were extracted at 205 nm

Mobile phase: 80 % acetonitrile and 20 % water

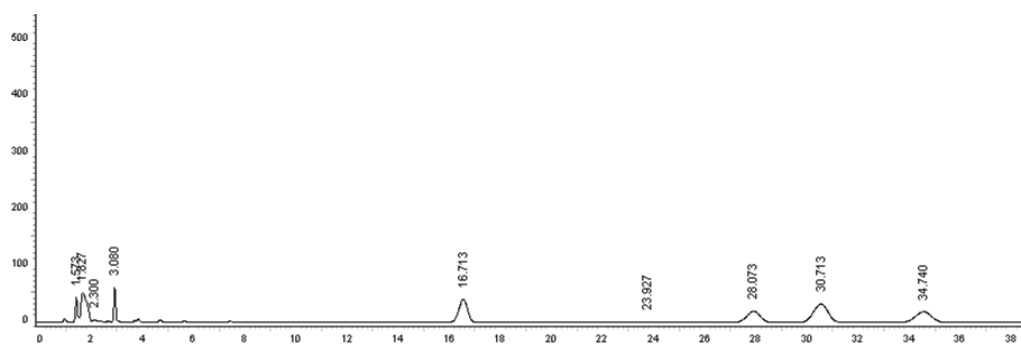
Flow rate: 1.6 mL/min

2. 標準曲線：

精確量取 campesterol、stigmasterol、 β -sitosterol 等各對照標準品，並分別添加適量之 ethanol 稀釋調配成各一系列不同濃度之標準品溶液，再經 0.45 μ m 濾膜過濾後，便可供為製作標準曲線之試液。

製作標準曲線時，則將一系列不同濃度之欲分析的標準品試液，每次以 20 μ L 注入 HPLC 進行分析，以標準品波峰面積為 Y 軸及標準品之濃度為 X 軸，繪圖製作檢量線，並求得標準曲線之線性迴歸方程式 ($Y=aX+b$) 及相關係數 (γ)。

3. 混合標準品之高效液相層析圖譜：



Phytosterol compound standards (25 $\mu\text{g/mL}$)		Retention time (min)
1	Campesterol	28.07
2	Stigmasterol	30.71
3	β -Sitosterol	34.74

肆、總結

本計畫針對酚酸類、類黃酮類及固醇類化合物開發快速的分析方法，以可同時分析多項常見的標準品為出發，期廠商於演練或測試時可快速提供明確的產品優勢，且於反覆的分析方法嘗試中，增加研發、品管人員之職能，以達永續經營之理念。雲集貿易有限公司長年進行儀器分析貿易，進口並販售諸多管柱、偵測器、自動進樣裝置或其他 HPLC 相關耗材，不時遭遇顧客詢問特定成分分析合適之條件及資訊，本計畫建立之可同時分析多項標準品之方法，將可提供廠商快速的品管及演練平台，且可符合食品樣品之分析所用，對廠商具有相助益。

伍、參考文獻

1. 食品藥物消費者知識服務網衛生福利部審核通過之健康食品
資 料 查 詢
(<https://consumer.fda.gov.tw/Food/InfoHealthFood.aspx?nodeID=162>) 。
2. Chung C. P., Hsu H. Y., Huang D. W., Hsu H. H., Lin J. T., Shih C. K., Chiang W. Ethyl acetate fraction of adlay bran ethanolic extract inhibits oncogene expression and suppresses DMH-induced preneoplastic lesions of the colon in F344 rats through an anti-inflammatory pathway. J Agric Food Chem. 2010. 58(13): 7616-7623.
3. Chung C. P., Hsia S. M., Lee M. Y., Chen H. J., Cheng F., Chan L. C., Kuo Y. H., Lin Y. L., Chiang W. Gastroprotective Activities of Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) on the Growth of the Stomach Cancer AGS Cell Line and Indomethacin-Induced Gastric Ulcers. J Agric Food Chem. 2011. 59(11): 6025-6033.
4. Kaur K. D., Jha A., Sabikhi L., Singh A. K. Significance of coarse cereals in health and nutrition: a review. J. Food. Sci. Technol. 2014. 51(8): 1429-1441.
5. Maguire, L. S., O'Sullivan, S. M., Galvin, K., O'Connor, T. P., and O'Brien, N. M. 2004. Fatty acid profile, tocopherol, squalene

and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J. Food Sci Nutr* 55:171– 178.

6. 賴茲漢、金安兒。基礎食品分析。