

膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素之檢驗方法

Method of Test for Lutein and Zeaxanthin in Foods in Capsule or Tablet Form

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經皂化及萃取後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 高效液相層析儀：
 - 2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Ascentis RP-Amide，5 μm ，內徑4.6 mm $\times$ 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)
 - 2.1.3. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.4. 水浴(Water bath)：具溫度控制，可振搖。
 - 2.2. 試藥：甲醇、乙腈、乙酸乙酯、四氫呋喃及丙酮均採用液相層析級；二丁基羥基甲苯(butylated hydroxy toluene, BHT)、氫氧化鉀、乙醇及乙醚均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；葉黃素及玉米黃素對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：1 mL、5 mL、10 mL及25 mL，褐色。
 - 2.3.2. 濾膜：孔徑0.45 μm ，Nylon 材質。
 - 2.3.3. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 乙醇：乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液：
取乙醇與乙酸乙酯以1：1 (v/v)比例混勻。
 - 2.4.2. 乙酸乙酯：乙醚(1:1, v/v)溶液：
取乙酸乙酯與乙醚以1：1 (v/v)比例混勻。
 - 2.4.3. 含2% BHT之乙醇：乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液：
稱取BHT 4 g，以乙醇：乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液溶解使成200 mL。
 - 2.4.4. 含0.2% BHT之乙酸乙酯：乙醚(1:1, v/v)溶液：
稱取BHT 1 g，以乙酸乙酯：乙醚(1:1, v/v)溶液溶解使成500 mL。
 - 2.4.5. 40%氫氧化鉀之甲醇溶液：

稱取氫氧化鉀40 g，以甲醇溶解使成100 mL。

2.5. 標準溶液之配製：

取葉黃素及玉米黃素對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別加入含2% BHT之乙醇：乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液0.5 mL，以四氫呋喃溶解並定容至5 mL，作為標準原液，冷凍避光儲存。臨用時取適量各標準原液，分別以含2% BHT之乙醇：乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液稀釋至葉黃素1~100 µg/mL，玉米黃素1~20 µg/mL，供作標準溶液。

2.6. 檢液之調製^(註)：

將檢體磨碎混勻後，取油狀檢體約100 mg，粉狀檢體約200 mg，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入含2% BHT之乙醇：乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液2 mL及丙酮8 mL，旋渦混合1分鐘，再加入去離子水4 mL，旋渦混勻後，振盪30分鐘，加入40%氫氧化鉀之甲醇溶液8 mL，旋渦混勻，於70°C水浴中皂化30分鐘，旋渦混勻，再皂化30分鐘。迅速冷卻至室溫，以丙酮定容至25 mL。取2 mL置於15 mL離心管中，加入含0.2% BHT之乙酸乙酯：乙醚(1:1, v/v)溶液3 mL，旋渦混合20秒，靜置分層，收集上層液，下層液再加入含0.2% BHT之乙酸乙酯：乙醚(1:1, v/v)溶液3 mL，重複上述萃取步驟2次，合併上層液，以含0.2% BHT之乙酸乙酯：乙醚(1:1, v/v)溶液定容至10 mL。取5 mL以氮氣吹乾，殘留物以含2% BHT之乙醇：乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾後，供作檢液。

註：本實驗全程需避光。

2.7. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各5 µL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中葉黃素或玉米黃素之含量(mg/g)：

$$\text{檢體中葉黃素或玉米黃素之含量(mg/g)} = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由反式及順式葉黃素或反式及順式玉米黃素之波峰總面積依標準曲線求得檢液中葉黃素或玉米黃素之濃度(µg/mL)

V：檢體定容之體積(25 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：葉黃素或玉米黃素之含量，以游離型葉黃素或玉米黃素計。

高效液相層析測定條件^(註)：

光二極體陣列檢出器：定量波長450 nm。

層析管：Ascentis RP-Amide，5 μm，內徑4.6 mm × 15 cm。

層析管溫度：30°C。

移動相溶液：A液(乙腈)、B液(甲醇)與C液(乙酸乙酯)以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)	C (%)
0 → 21.0	99 → 99	1 → 1	0 → 0
21.0 → 24.0	99 → 0	1 → 0	0 → 100
24.0 → 28.0	0 → 0	0 → 0	100 → 100
28.0 → 28.1	0 → 99	0 → 1	100 → 0
28.1 → 40.0	99 → 99	1 → 1	0 → 0

移動相流速：0.6 mL/min。

注入量：5 μL。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

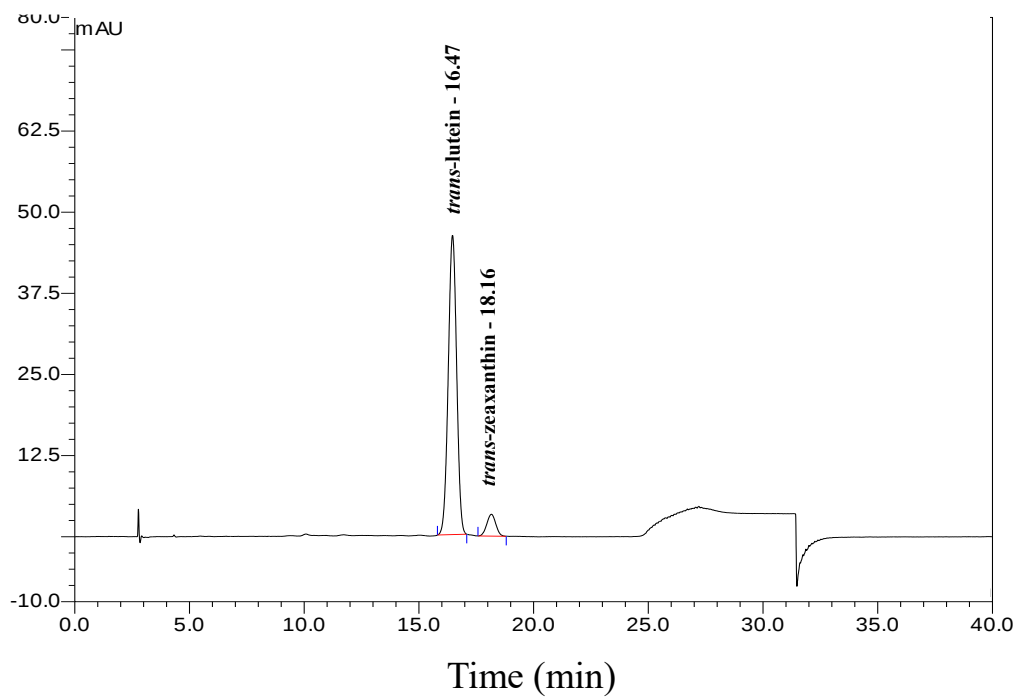
附註：1. 本檢驗方法定量極限，葉黃素及玉米黃素於油狀檢體均為0.25 mg/g，粉狀檢體均為0.125 mg/g。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

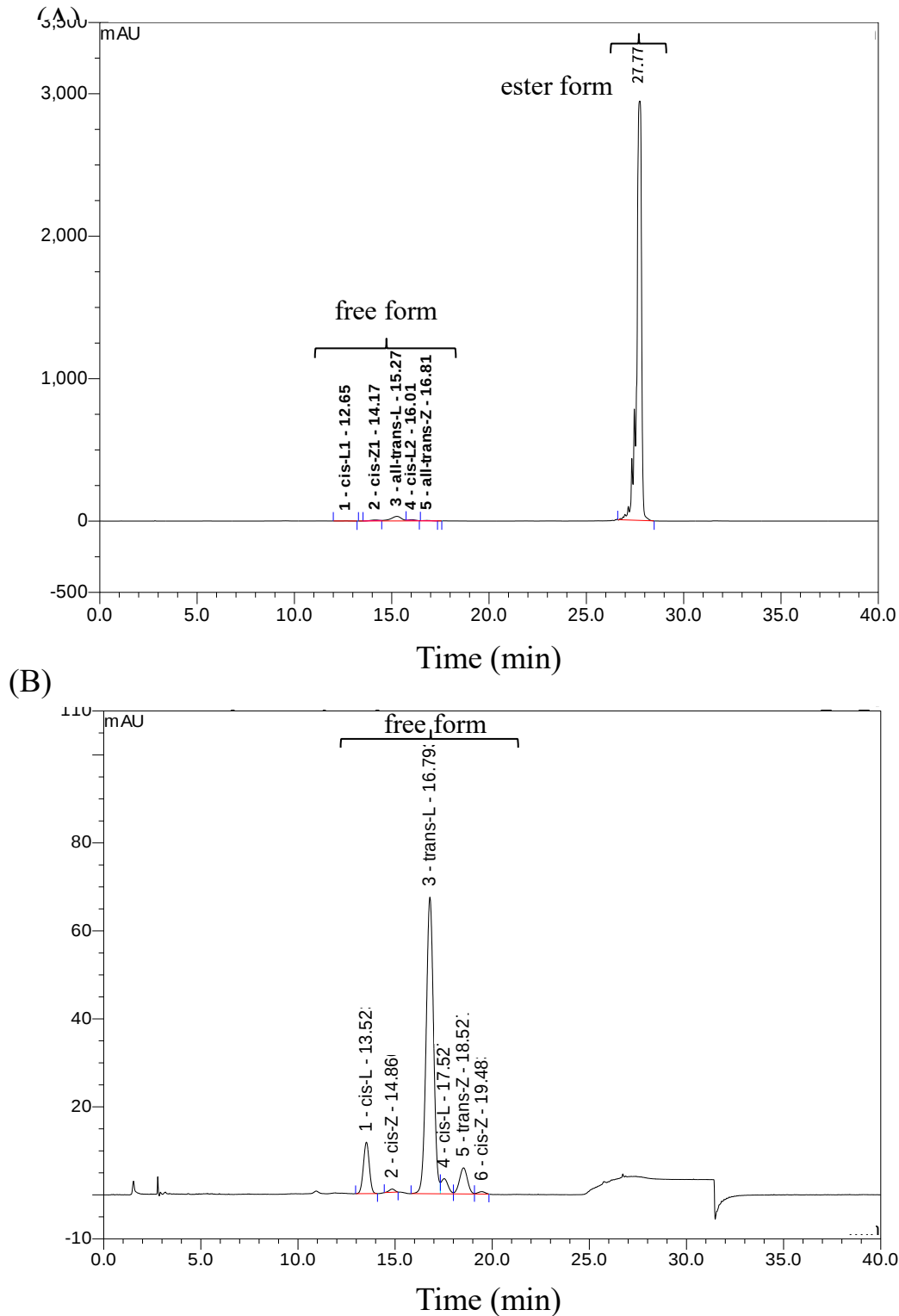
參考文獻：

1. 陳瑋芸、蔡沁玗、江峻蔚、吳白玫、曾素香、高雅敏、闕麗卿、施養志。2014。利用高效液相層析法檢測膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素之含量。食品藥物研究年報，5: 17-25。
2. Vechpanich, J. and Shotipruk, A. 2011. Recovery of free lutein from *Tagetes erect*. determination of suitable saponification and crystallization conditions. Sep. Sci. Technol. 46: 265-271.

參考層析圖譜



圖一、游離型葉黃素及玉米黃素標準品之HPLC圖譜



圖二、膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素未經皂化反應(A)及經皂化反應(B)之HPLC圖譜

波峰：1, *cis*-lutein like structure；2, *cis*-zeaxanthin like structure；3, *all-trans*-lutein；4, *cis*-lutein like structure；5, *all-trans*-zeaxanthin；6, *cis*-zeaxanthin like structure