

對胺基苯甲酸的測定方法之研究

陳伶均 胡森琳

中興大學食品科學研究所

摘 要

對胺基苯甲酸(PABA)是許多細菌製造葉酸的必須成分，因它對紫外光具有良好的吸收能力，被廣泛用於防曬軟乳液的製備。PABA有溫和的抗發炎且在無毛小鼠中能保護皮膚組織免受光照所引起的皮膚癌；然而，迄今少有文獻報導PABA在食品及動、植物組織中含量之測定。本研究發現PABA在中性水溶液中具有螢光性質($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 340 \text{ nm}$)，利用此一性質作為食物(主要是穀類)、動物組織(大鼠肝及血液)及含PABA的綜合維生素中定量之用，並與呈色法及高效液相層析法(HPLC/uv)比較。本實驗的結果是利用計算標準偏差(S.D.)及變異係數(C.V.)以比較各方法之重覆性與再現性，來評估其精密度。此外，亦由回收實驗結果作為比較各方法之準確度的一個準則。

就各分析方法對綜合維他命PABA的定量作比較，呈色法不僅重覆性(0.2% - 0.7%)及再現性(2.6% - 6.1%)皆比其他方法好，而且回收率(78.5%)亦較另二種方法高。對穀類的定量而言，螢光測定法的檢測效果不佳，因干擾而無法測定出穀物類中微量之PABA；另外，呈色法的再現性(2.2% - 12.8%)較HPLC/uv(10.8% - 19.4%)為佳，且回收率(96.1% - 100.8%)亦最高。在血液測定方面，PABA在血液中的含量很低，只有呈色法可測得，其值為 $1.52 \pm 0.22 \mu\text{g} / \text{ml}$ 血液。在大鼠肝臟之PABA含量測定方面，呈色法測得 $5.92 \pm 0.10 \mu\text{g} / \text{g}$ 肝，HPLC/uv則為 $1.23 \pm 0.09 \mu\text{g} / \text{g}$ 肝，但螢光法卻因受到干擾而無法定量。

本研究藉以多種型式樣品之測試說明了這三種分析方法之優劣，以確定其實用性。一般而言，呈色法之實驗程序既簡單又成本便宜，其精密度及準確度皆佳，況且它的偵測限度(detection limit)與另二種分析方法之間差異不大；然而，動物肝臟及血液之檢測則以HPLC/uv較優，因其干擾最少；同時，本法易於改進以適用於其它樣品之檢測。

關鍵詞：對胺基苯甲酸，螢光法，呈色法，高效液相層析法。

前 言

對胺基苯甲酸(以下簡稱PABA)是許多微生物製造葉酸(圖一)的必須成分，曾被認為是維他命群的主要成員之一，為水溶性；它可刺激腸內細菌製造葉酸，而葉酸又能促進泛酸的生成⁽¹⁾。PABA有溫和的抗發炎及抗纖維變性的能力⁽²⁻³⁾，因此被用於抗纖維作用劑，以

治療一些疾病，如硬皮病(scleroderma)、皮肌炎(dermatomyositis)、硬斑病(morphea)及北洛尼氏病(Peyronie's disease)(陰莖海綿體之硬結)⁽⁴⁾。此外，因PABA對紫外光具有良好的吸收能力，被廣泛用於防曬軟膏及化妝品的製備，以保護皮膚免受光照所引起的皮膚癌⁽⁵⁻⁷⁾且也能有效地延緩皮膚老化⁽⁸⁾。近年來在醫學的研究有報導指出，PABA可抑制cisplatin在動

物體內所引起的腎毒性，而且不影響cisplatin的抗癌效果⁽⁹⁾。

縱然PABA在營養及醫學上具有相當之重要性，但在過去的研究中卻無任何文獻報導它在食品和動、植物組織中的含量，僅有Merck Index曾提到它廣存於大自然中⁽¹⁰⁾。在PABA的分析方法方面，迄今曾用的分析方法有溴分析法 (bromometry)⁽⁸⁾、呈色法 (colorimetry)⁽¹¹⁻¹³⁾及高效液相層析法 (HPLC)⁽¹⁴⁻¹⁵⁾，不過這些分析方法大多僅用於防曬軟膏及PABA在生理組織液中(如血液、尿液等)穩定性的測定。直至1964年Merwin⁽¹⁶⁾提出一套適用於飼料中PABA的定量法，主要是選擇 N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED)作為偶合劑；這是因較早的研究提出NED與PABA經偶合產生的紅色複合物較具穩定性及可靠性。由於PABA會在氨基上發生乙醯化而形成結合 (conjugate)，因此在Merwin所修正之方法中以 10 % HCl 沉澱蛋白質，並用水解方式將乙醯化的PABA自飼料中萃取出來，比原先以鹼水解處理再於酸性下進行呈色反應的過程⁽¹⁷⁾來得更為直接。另外，將鹼水解的步驟省略，並不會影響PABA的溶解量，蛋白質沉澱後的過濾快速且濾液清澈；同時，這個修正過的測定方法更簡便亦較省時。

近年來有關食品及生化成份分析的研究，高效液相層析法 (HPLC) 常被應用作為定量及定性分析之工具。以PABA而言，過去曾有人將PABA與肝薄片 (liver slice) 一起培養後，以HPLC 於 acetonitrile / 0.02 M Sodium acetate buffer, pH 4.0 (20:80) 的移動相及流速為 1 ml / min 之條件下，來確認PABA 經代謝後乙醯化結合的情形⁽¹⁴⁾；但該研究並未檢測肝本身所含PABA的量。由於HPLC靈敏度高，所選用的分析條件十分重要，如果有不純物質隱藏在分析譜峰時，將曲解分析結果。

螢光測定法具專一性及高靈敏度，設備上比HPLC簡單又便宜。其在臨床化學的應用方面，Pemberton 等人⁽¹⁵⁾即以螢光測定法取代HPLC 作為胰臟功能之測試 (pancreatic function test, PFT)，來檢測口服 N-benzoyl-L-tyrosyl-PABA (BT-PABA) 之病人的尿液，由於胰糜蛋白酶會將BT-PABA裂解而釋放PABA於尿液中，利用PABA的排出量作為指標來判定胰臟功能是否正常⁽¹⁸⁻²¹⁾。此方法是以鹼水解方式處理測試者的尿液後，測定尿液中的PABA在有機溶

劑dimethyl sulphoxide solution (DMSO) 中的螢光 ($\lambda_{ex}=300\text{ nm}$, $\lambda_{em}=340\text{ nm}$)。另外，本實驗室亦發現 PABA 在中性水溶液中具有一強烈之激發光波峰 ($\lambda_{ex}=280\text{ nm}$ 左右)，及一強烈之螢光波峰 ($\lambda_{em}=340\text{ nm}$)⁽²²⁾；故亦可利用此一螢光性質來作為定量之用。然而螢光法是否能適用於食品及生化之分析，則尚待評估。

PABA 不但有上述之種種功能，同時市面上亦有許多綜合維生素及礦物質之產品含有PABA；因此，一套迅速簡便、精確靈敏的定量法是目前值得研究的課題之一。過去的研究只限於動物飼料⁽¹⁶⁻¹⁷⁾及血液⁽²³⁾添加PABA時的穩定性之探討，而食物及動物組織(血液、肝)本身的PABA含量至今未有報導；故本實驗的主要目的在於利用呈色法、螢光法及高效液相層析法測定食品 (以穀類為主) 及動物組織中PABA 的含量，同時比較這三種方法的再現性及回收率，並觀察螢光法中分別以酸及鹼處理的效果，以確定這些分析方法的實用性。一旦方法確立，日後可應用於更多食品及藥物中PABA 的檢測。

材料與方法

一、樣品

(一) 食品

分析的食品材料有穀物類，包括白米、胚芽米、小麥及大鼠標準飼料 (Standard Laboratory Diet, 簡稱 chow) 皆於1994年3月至1995年1月分別購自台中地區之超級市場，另外選用三種含 PABA 的綜合維他命錠劑或膠囊產品，包括Stress 1 (KAL, Inc, CA, USA, 以下簡稱Stress)、Daily one caps (TWIN Laboratory, Inc, NY, USA, 以下簡稱Daily) 及Radical Fighters (TWIN Laboratory, Inc, NY, USA, 以下簡稱Radical) 等三種廠牌皆購於美國超級市場之藥房。

(二) 動物

本實驗所使用之實驗動物為購自台中榮總醫院動物中心或中國醫藥學院動物中心之成熟、雄性大白鼠 (Sprague-Dawley rats)，體重約在 200 - 250 g。

二、標準品

Potassium *p*-aminobenzoic acid (PABA) 購自Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)，以去離子

水配製成適當之各種濃度的標準液。

三、試藥

Trichloroacetic acid (TCA), sodium nitrite (NaNO_2), ammonium sulfamate, N-naphylethylene diamine(NED), 3 - (N-morpholino) - propanesulphonic acid (MOPS), dimethyl sulphoxide (DMSO)等藥品皆購自美國Sigma 公司，為試藥特級；磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)，氯化氫 (HCl)，醋酸鈉 (CH_3COONa)，氫氧化鈉 (NaOH)購自日本和光純藥工業株式會社，為試藥特級；甲醇(methanol)，氰甲烷(acetonitrile)購自皓峰公司，均為LC 級；本研究所用之水皆為去離子水。

四、儀器

(一) 紫外/可見光分光光度計：HITACHI U-2000 (UV/Vis spectrophotometer)

(二) 高效液相層析儀：Pump：HITACHI L-6200 Chromatointegrator：HITACHI D-2500 Detector：HITACHI L-4200 UV/VIS

(三) 螢光分光光度計：HITACHI (model 650-40)

(四) 冷凍離心機：Hettich (universal 30 RF，Germany)

(五) 超高速離心機：HITACHI SCP-85H2

五、標準溶液之配製及標準檢量線之製作

(一) 呈色法⁽¹⁶⁾

精稱 0.1g potassium PABA 置於100 ml 之定量瓶，加水定容至100 ml，取出 1ml 以水稀釋至 40ml，分別取 0.1, 0.4, 1, 2, 3, 4, 和 5 ml 置入 10 ml 之定量瓶，加入 0.3 ml 之濃 HCl，並以水稀釋至 10ml，濃度分別為 2.5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 μg / 10 ml (即 1.43、5.71、14.27、28.54、42.81、57.08 和 71.35 μM)。

各取 2 ml 不同濃度的 PABA 標準液，分別加入 1 ml 水及 0.4 ml 之 0.1 % NaNO_2 ，混合後放置 3 分鐘，再加 0.4 ml 0.5 % ammonium sulfamate，振盪混合後放置 2 分鐘，最後加入 0.2 ml 之 0.1 % NED，混合後放置 10 分鐘 (產生紅色)，測定 $A_{545\text{nm}}$ 之吸光值，並將此各讀數對 PABA 之濃度作圖，所得到的直線關係式如下：

$$y = 0.014 + 0.014 x \quad (r^2 = 1.000)$$

(二) 螢光法

精稱 0.0175 g 之 potassium PABA 置於100 ml 之定量瓶，加水定容至100 ml，再以水稀釋10 倍，此乃PABA標準液。

1. 酸水解

將PABA標準液以 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.4) 的緩衝液分別配製適當的濃度為0.5、1、2、4、6、8及10 μM ，利用螢光分光光度計於激發光波峰為 280 nm，放射光波峰為 340 nm 的條件下測其螢光強度，並將讀數對 PABA 之濃度作圖，其直線關係式：

$$y = 0.955 + 7.513 x \quad (r^2 = 0.999)$$

2. 鹼水解⁽¹⁵⁾

將PABA標準液以水 配成適當之濃度的 PABA標準液，分為0.5、1、2、4、6、8及10 μM ，取出 0.2 ml 加入2 ml 4M NaOH 一起於 100°C 沸水中加熱30分，待冷卻後取出 0.1 ml 與 0.2 ml 0.5M MOPS /1.6M HCl混合，再加入 1.8ml 14M DMSO以螢光分光光度計於激發光波峰為300 nm，放射光波峰為340 nm 的條件下測其螢光強度，並將讀數對 PABA 之濃度作圖，其直線關係式：

$$y = 8.222 + 67.929 x \quad (r^2 = 0.998)$$

(三) 逆相高效液相層析法 (Reversed phase HPLC)⁽¹⁴⁾

精稱 0.0158 g 之 potassium PABA 置於100 ml 之定量瓶，加水至定量100 ml，以水稀釋10 倍，再以水分別配製適當濃度為0.5、1、5、15、30、45、60 和 75 μM 。

將 PABA 溶於水中，取一定量 (15 μl) 注入 HPLC，其分析條件如下：

管 柱：RP-18; 250 $\times$ 4.6 mm (E. Merck)

沖提液：acetonitrile / 0.02 M Sodium acetate pH 4.0 (20 : 80 , v/v)

流 速：1 ml / min

偵測器：UV 280 nm

配成適當濃度的PABA溶液注入HPLC，其滯留時間為4.6分(圖四)，層析圖上波峰面積與注入樣品的濃度經計算結果呈現如下的直線關係式。

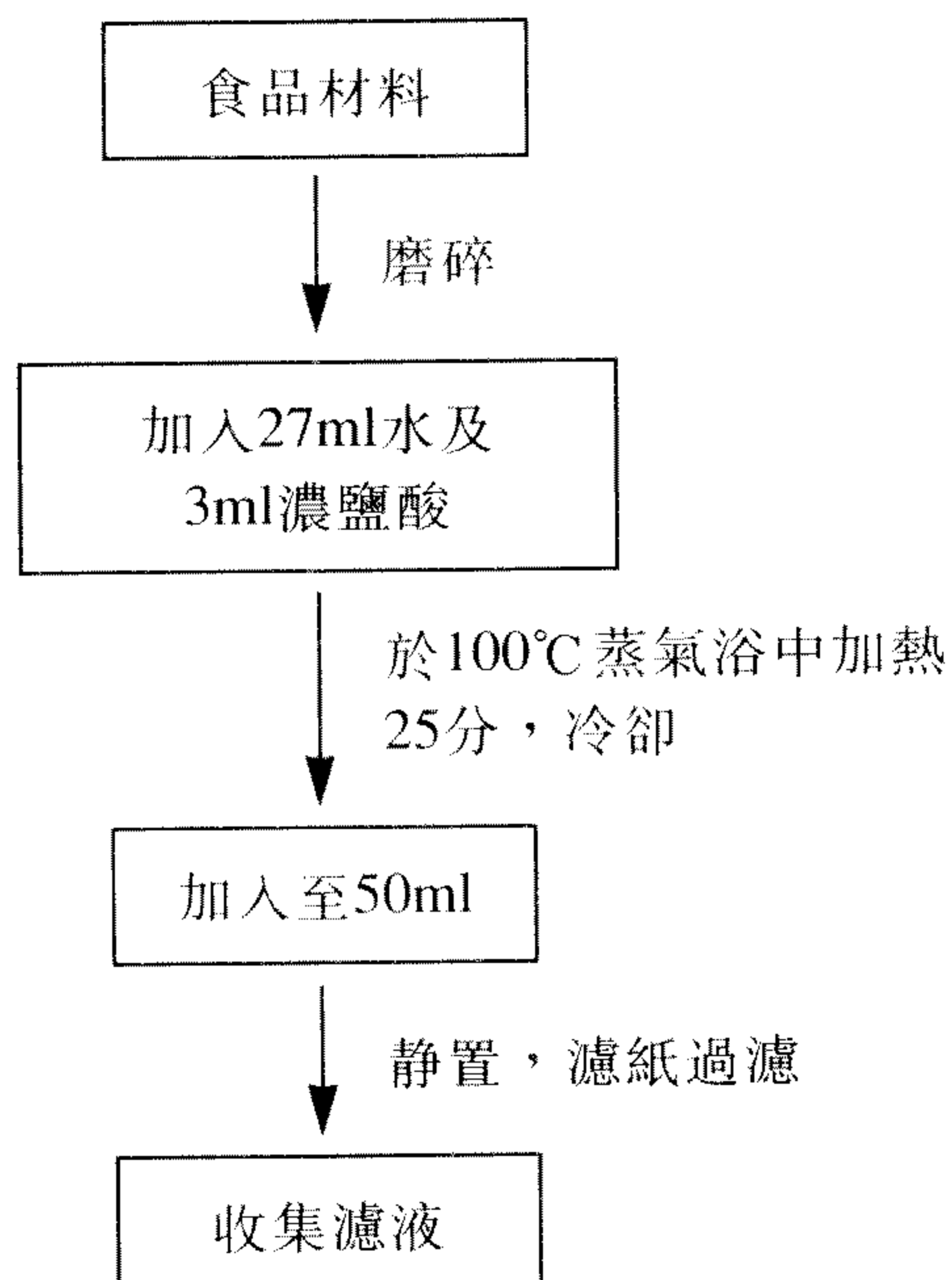
$$y = 184.2 + 6348.42 x \quad (r^2 = 1.0000)$$

六、樣品之處理

(一) 食品材料⁽¹⁶⁾

經磨碎的食品材料 (穀物類1 g、綜合維他命 0.2 g) 與27 ml 水及 3 ml 濃鹽酸 (11N)混合後，在 100 °C 蒸氣浴中加熱 25 分，冷卻後加水

至 50 ml, 並使不溶物沉澱, 取上層液以濾紙過濾, 將濾液收集, 過程如下:



(二) 肝及血液

將重約 200 - 250 g 之大鼠以斷頭方式置死, 立即將血液收集於含有 EDTA (約 1 mg / ml 血液) 的容器內, 同時解剖取出肝臟, 以 1.15 % KCl / 0.01 M KH_2PO_4 緩衝液 (pH 7.4, 4 °C) 稍加沖洗後, 拭乾稱重, 用液態氮急速冷凍與血液皆貯存於 -35°C。

1. 血液⁽²³⁾

取 2 ml 的血液加入 25 ml 水使血球破裂, 以 3 ml 50 % TCA 與其混合振盪使蛋白質沉澱, 再加水至 50 ml, 靜置使不溶物完全沉澱, 取上層液以濾紙過濾, 將濾液收集。

2. 肝⁽²⁴⁾

肝經解凍後於 4°C 下先以剪刀初步剪碎, 再與四倍的水混合置於玻璃均質管中, 以 teflon 棒均質 (上下來回 3 - 4 次), 得肝均質物。將肝均質物於 4°C 下, 9000 × g 離心 10 分鐘, 取上層液 2.7 ml, 加入 0.3 ml 50 % TCA, 混合振盪使蛋白質沉澱, 於 100 °C 加熱 25 分, 再經 5000 × g 離心 5 - 8 分, 取上層液。

七、樣品之分析

(一) 呈色法

取 2 ml 樣品之濾液與 1 ml 水混合, 以 0.4 ml 0.1 % NaNO_2 將樣品溶液進行重氮化 (dia-

zotizing) 2 分鐘, 接著以 0.4 ml 0.5 % ammonium sulfamate 破壞過量的硝酸, 待 3 分鐘後再分別用 0.2 ml 0.1 % N-(naphyl)ethylene diamine (NED) 與重氮過的溶液進行偶合 10 分鐘作為試樣組, 所產生的紅色在可見光波長 545 nm 下測定吸光值; 另外, 以 0.2 ml 水取代 NED 作為控制組。

(二) 螢光法

1. 酸水解

取樣品濾液以 200 mM KH_2PO_4 緩衝液維持於 pH 中性, 以螢光分光光度計於激發光波峰為 280 nm, 放射光波峰為 340 nm 的條件下測其螢光強度, 並將讀數與標準檢量線比較, 計算樣品中 PABA 含量。

2. 鹼水解

樣品之前處理中, 將 1M HCl 改以 4M NaOH 進行水解, 取 0.1 ml 樣品濾液與 0.2 ml 0.5M MOPS / 1.6M HCl 混合, 再加入 1.8 ml DMSO, 以螢光分光光度計於激發光波峰為 300 nm, 放射光波峰為 340 nm 的條件下測其螢光強度, 並將讀數與標準檢量線比較, 計算樣品中 PABA 含量。

(三) 高效液相層析法(HPLC)

將樣品濾液透過 NC 濾紙過濾, 取一定量 (15 μl) 注入 HPLC, 其分析條件與標準檢量線相同。

八、回收試驗

(一) 綜合維他命

將磨碎過的 Daily one caps 與 Radical fighters 各取 0.1 g 混合 w/w, 1 : 1), 添加 0.2 ml PABA 標準液 (mg / ml), 再經前處理後, 分別以呈色、螢光 (包括酸、鹼水解) 及 HPLC 等分析方法一一測定。

(二) 穀物類及生物組織

將磨碎的樣品加入 0.2 ml PABA 標準液 (mg / ml) 再依上述樣品之前處理, 使樣品濾液中多含 200 μg PABA, 以各分析方法分別定量。

結果與討論

本研究藉三種綜合維他命、四種穀物類及二種生物組織 (肝與血液) 中 PABA 的定量, 一一檢討呈色法、螢光法及 HPLC/uv 等分析方法之優劣。各樣品皆以酸水解再用各方法進行分

Table 1. Intercomparison of four methods for determinations of PABA in multiple vitamins*

	Fluorimetry** (I)	Fluorimetry** (II)	Colorimetry	HPLC
Labeled value				
(mg) D : 25				
S : 30				
R : 50				
Measured value***				
(mg) D :	11.57 (4)	10.91 (3)	11.60 (4)	21.51 (3)
S :	23.67 (4)	26.59 (3)	21.99 (4)	36.23 (3)
R :	33.01 (4)	32.83 (3)	44.94 (4)	38.06 (3)
Recovery	67.6%	60.0%	78.5%	76.7%
Precision				
Within-run				
	<u>SD</u>	<u>SD</u>	<u>SD</u>	<u>SD</u>
D :	0.07	0.62	0.08	0.13
S :	0.10	0.67	0.05	0.09
R :	0.22	0.20	0.14	0.31
	<u>CV</u>	<u>CV</u>	<u>CV</u>	<u>CV</u>
D :	0.58%	5.23%	0.70%	0.59%
S :	0.40%	2.51%	0.21%	0.24%
R :	0.70%	0.60%	0.32%	0.82%
Run-to-run				
	<u>SD</u>	<u>SD</u>	<u>SD</u>	<u>SD</u>
D :	0.26	0.79	0.36	1.56
S :	1.20	2.10	1.36	1.71
R :	2.54	2.14	1.17	1.08
	<u>CV</u>	<u>CV</u>	<u>CV</u>	<u>CV</u>
D :	2.26%	7.24%	3.14%	7.05%
S :	5.05%	7.89%	6.17%	4.10%
R :	7.70%	6.52%	2.60%	2.68%

* :D (daily); S (stress); R (radical).

** :Fluorimetric measurement (I) refers to hydrolysis with 1 M HCl and (II) refers to hydrolysis with 4 M NaOH.

***:Means values. Numbers of replication are shown in parentheses.

析；其中，又針對綜合維他命以螢光測定法探討酸水解與鹼水解兩種萃取條件之間的差異。同時亦計算標準偏差(S.D.)及變異係數(C.V.)來

分析各方法的精密度 (precision)，而各方法的標準偏差及變異係數分兩個來源比較：⁽¹⁾ 重覆性 (within - run)；⁽²⁾ 再現性 (run -to - run)。另

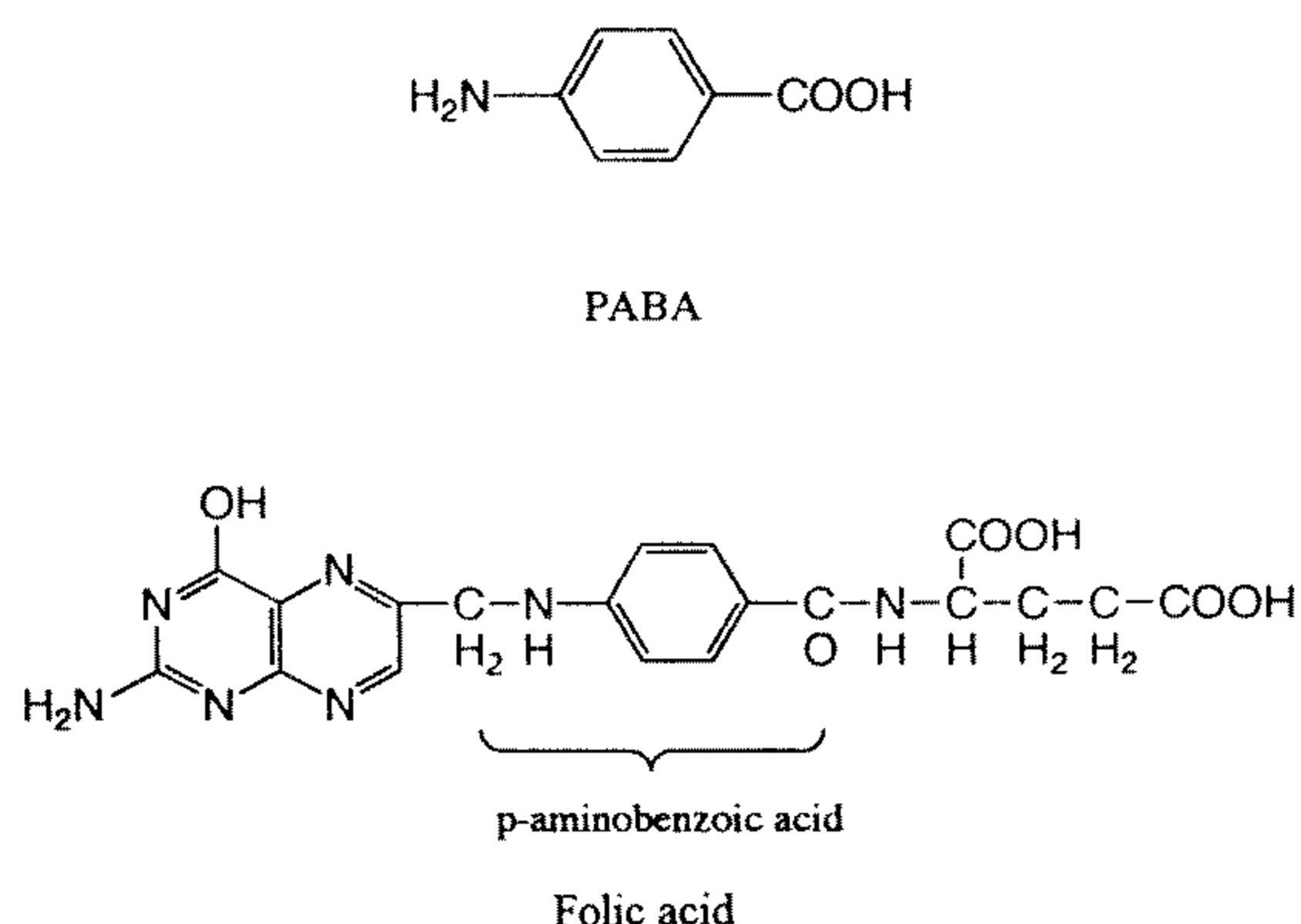


Figure 1. Chemical structures of PABA and Folic acid.

外，亦可由回收實驗結果觀察各方法的回收情形。在研究過程中，實驗數據分別以各分析方法的檢量線換算之；然而，單就靈敏度(sensitivity)而言，此三種方法因各別的應變數(即測定值)不同，故無法比較。但以偵測限度(detection limit)觀之，三種方法並無太大差異；呈色法約為 $0.3\mu\text{M}$ ($A_{545\text{ nm}} \leq 0.009$)，螢光法約為 $0.2\mu\text{M}$ (相對螢光強度 < 2)，而HPLC/uv 則為 $0.2\mu\text{M}$ (波峰面積 < 400)。

一、綜合維他命

本實驗選用美國市售含PABA之綜合維他命，包括 Daily one caps、Stress 1 及 Radical fighters 等三種品牌，每一粒錠劑或膠囊所標示的 PABA 含量分別為25、30 及 50 mg。這三種綜合維他命分別以不同測定方法檢測PABA 含量(圖二)，同時將 Daily one caps及 Radical fighters 混合 (w/w, 1:1) 測定來觀察各方法的回收率，並列出各方法的標準偏差(S.D.)及變異係數(C.V.)以資比較(表一)。

由圖二結果顯示，HPLC/uv 測定Daily one caps 及stress 1 得到的PABA 含量最高，但stress 1 的PABA 測定值卻比標示值高出了20.8 %。在 Stress 1中含有valerian root，為一種中藥成份，其可能含有某些物質與PABA的滯留時間相近，而在HPLC/uv的分析條件下干擾了PABA的分離效果。就螢光測定法而言，酸水解 (1M HCl)與鹼水解 (4M NaOH) 兩種萃取條件的測定值近似，但以酸水解的重覆性

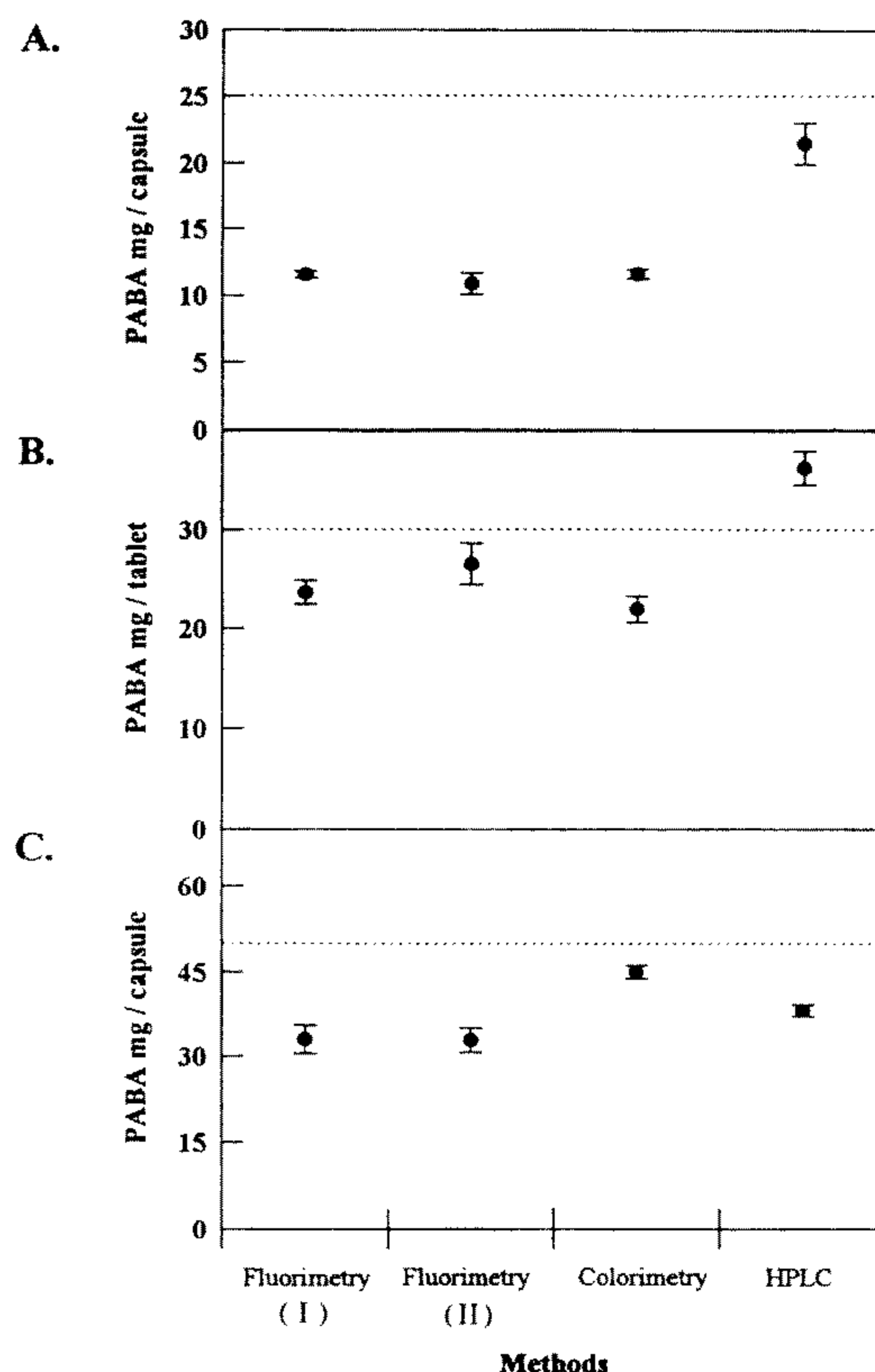


Figure 2. Contents of PABA determined by various methods in multiple vitamins. (mg of PABA per capsule or tablet). Data are means $\pm$ SD ($n \geq 3$). (A) Daily, (B) Stress 1 and (C) Radical.

(C.V.: 0.4- 0.7 %)、再現性 (C.V.: 2.3 % -7.7 %) 及回收率 (67.6 %) 都比鹼水解(重覆性C.V.: 0.6 - 5.2 %; 再現性C.V.: 6.5 - 7.9 %; 回收率: 60 %)為佳，顯示樣品中的PABA以酸水解為較佳之處理方式，故穀物類及生物組織的處理過程皆採用之。

綜合表一及圖二而言，就各分析方法對綜合維他命中PABA的定量作比較，呈色法不僅重覆性 (0.2 % - 0.7 %) 及再現性 (2.6 % - 6.2 %) 皆比其他方法好，而且回收率 (78.5 %) 亦最高。

二、穀物類

將白米、胚芽米、小麥及老鼠飼料 chow 等以酸水解處理後，利用呈色法、螢光法及HPLC/uv等三種分析方法檢測四種穀物類的PABA 含量(表二)；並計算標準偏差及變異係數以比較各方法的精密度(表三)。

在穀類的定量方面，雖然以HPLC/uv所檢測出PABA的含量較高(表二)，但由層析圖的波

Table 2. PABA contents in cereals determined by three methods

Method	PABA ($\mu\text{g} / \text{g}$)			
	milled rice	germ rice	wheat	chow
Colorimetry	1.3 $\pm$ 0.2 (5)*	4.3 $\pm$ 0.3 (5)	5.7 $\pm$ 0.4 (5)	22.1 $\pm$ 0.3 (5)
Fluorimetry (I)	- **(5)	- (5)	- (5)	- (5)
HPLC	10.9 $\pm$ 1.5 (4)	16.7 $\pm$ 2.0 (4)	19.9 $\pm$ 3.9 (4)	42.0 $\pm$ 4.5 (4)

* :Means $\pm$ SD. Numbers of replication are shown in parentheses.

** :Undetectable; interferences exist.

峰可看出分離並不是十分完全(圖三，PABA的滯留時間為4.6分左右)，這可能是由於穀物類中有些成份與PABA的滯留時間很接近，在層析圖中的波峰相近且有重疊現象，因而干擾PABA的分離效果，致使PABA的定量及回收率皆受到影響。

另外，螢光測定法對穀物類的檢測結果不佳，在 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ 的條件下幾乎無法測得；在一些維生素中，具有螢光特性者除了PABA以外，另包括 folic acid、pyridoxine、hydrochloride、calciferol、riboflavin、 α -tocopherol 及 vit. A acetate。其中pyridoxine hydrochloride既是水溶性，且其螢光波峰($\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$)與PABA很接近⁽²⁵⁻²⁷⁾；而且胺基酸中tryptophan亦具有螢光之特性。所以，穀物類因所含的PABA量很低，而可能受到其他成份如 pyridoxine 及 tryptophan的影響，導致PABA的螢光波峰發生偏移現象(shift)，使得其激發光波峰及被放出光的波峰由 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ 移至 $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$ 。

由表三的結果顯示，呈色法的再現性 (2.2 % - 12.8 %) 較 HPLC/uv (10.8 % - 19.4 %) 為佳，且回收率(96.1 % - 100.8 %)亦比 HPLC/uv (53.4 % - 69.9 %) 及螢光法 (16.6 % - 84.8 %) 高。而螢光法在回收試驗中，當PABA濃度提高時，所受的干擾卻相對降低，其螢光波峰並

未有移位的情形。因此，螢光法的測定會受到樣品中PABA含量之限制。

三、生物組織

在血液測定方面，過去的研究僅限於添加PABA後的穩定性之探討⁽²³⁾。本實驗以三種分析方法對血液本身作測定，於表四的測定結果中，PABA在血液中的含量很低，而三種測定方法的回收率都接近100%(表五)，其中呈色法的回收率(101.2 %)略高於螢光法(98.1 %)及HPLC/uv (96.3 %)，但HPLC/uv對血液中PABA的分離效果很好，所呈現的吸收波峰明顯且無干擾(圖四)。雖然，有一些化學物如 phenol，*m*-及 *o*-aminobenzoic acid，cresol，aniline，sulfanilamide 化合物等，有可能在呈色法中的條件下會產生顏色反應，但在生理組織液中並未發現此干擾⁽¹¹⁾。

至於肝本身PABA的含量迄今未有文獻報導，僅有研究將肝薄片額外添加PABA，只探討肝中的乙醯轉移酶(N-acetyltransferase，NAT)對PABA的代謝作用情形⁽¹⁴⁾。NAT在許多組織中具有活性，如腸、脾、腎、膀胱及血液細胞等，而在肝中的活性最大。雖然，PABA的代謝是經由NAT的作用，在胺基上會發生乙醯化的結合；為了避免其干擾定量，故本實驗於前處理時以酸水解將此酵素變性且破壞PABA的乙醯鍵，再以各分析方法對肝作定

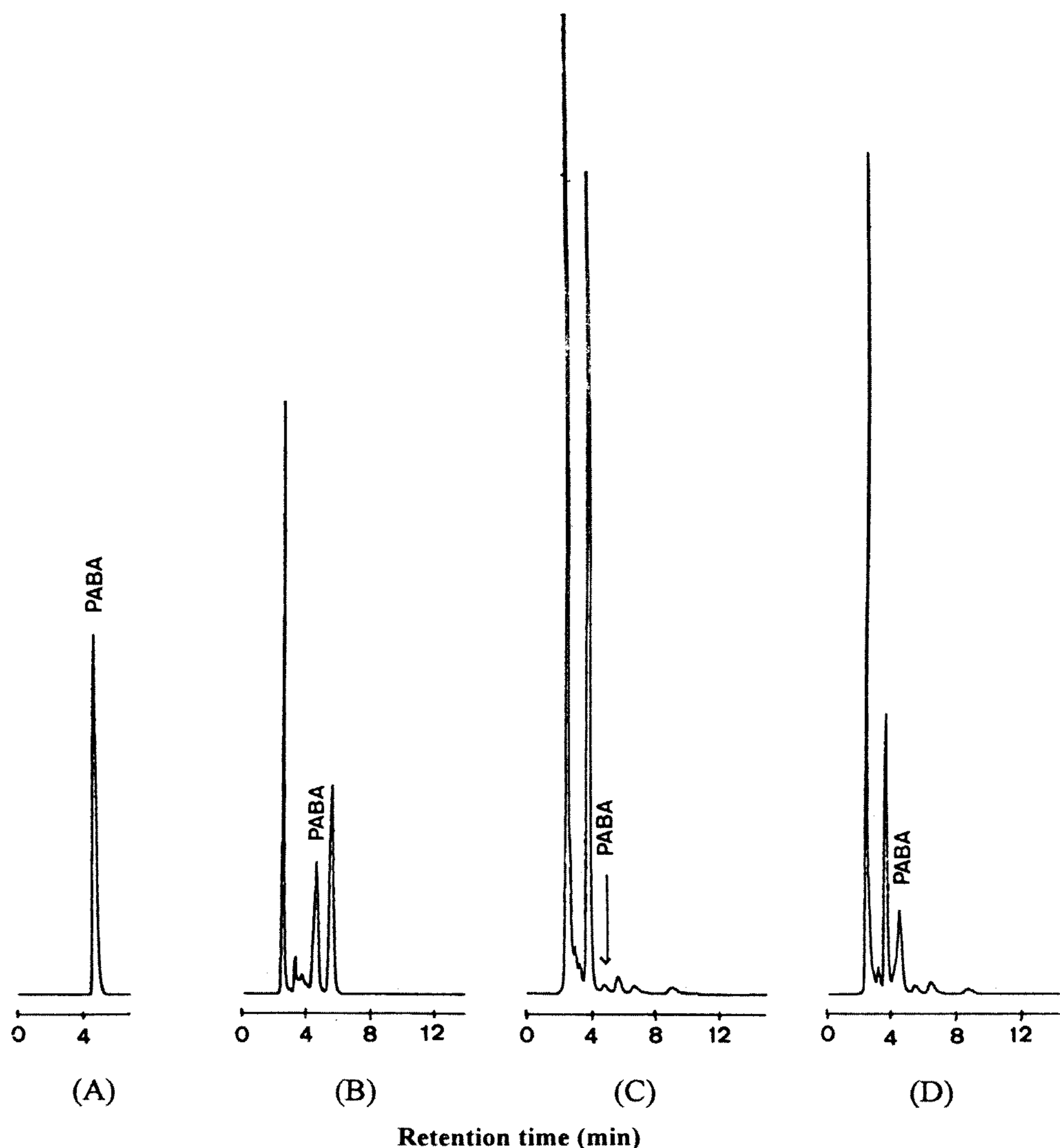


Figure 3. HPLC chromatograms of PABA , vitamins and cereals. (A) PABA standard (B) multiple vitamins(stress) (C) cereals (D) cereals added with PABA, retention time of PABA was 4.6 min.

量。依表四的結果顯示，肝所含的PABA較血液高，因此PABA在大鼠體內可分佈於肝中。此外，呈色法的測定值($5.92 \mu\text{g} / \text{g}$)高於HPLC/uv ($1.23 \mu\text{g} / \text{g}$)；這可能因肝中有某物質干擾HPLC/uv對PABA的分析，或是分析譜峰有雜質隱藏在其中，而使分離效果不佳，影響肝中PABA的定量。

另外，肝中PABA的含量無法以螢光法測定，在光譜圖上會發生波峰移位($\lambda_{\text{ex}} 280 \text{ nm}$ ， $\lambda_{\text{em}} 340 \text{ nm} \rightarrow \lambda_{\text{ex}} 300 \text{ nm}$ ， $\lambda_{\text{em}} 360 \text{ nm}$)，即使在回收試驗中提高PABA的濃度亦是如此。由於肝為動物體內最重要的解毒及代謝組織，所

含的成份十分複雜，其中有些物質如 tryptophan 亦有螢光性質($\lambda_{\text{ex}} 282 \text{ nm}$ ， $\lambda_{\text{em}} 360 \text{ nm}$)，在肝中含量可能比PABA高，而干擾PABA的定量。

結 論

本研究比較了三種測定PABA的分析方法，因過去文獻中並無此一方面之相關資料，同時亦缺乏可作為參考的標準品(已知PABA含量之標準品)；因此只能就各測定方法之回收率、精確度(以C.V.表示)、偵測限度和簡便程

Table 3. Intercomparison of three methods for determinations of PABA in cereals

	Fluorimetry(I)	Colorimetry	HPLC
Recovery *			
milled rice :	84.8% (4)	100.8% (4)	68.5% (5)
germ rice :	65.6% (4)	98.7% (4)	62.1% (5)
wheat :	71.6% (4)	97.3% (4)	53.4% (5)
chow :	16.6% (4)	96.1% (4)	69.9% (5)
Precision			
Within-run	<u>SD</u>	<u>SD</u>	<u>SD</u>
milled rice :	—**	0.16	0.19
germ rice :	—	0.42	0.10
wheat :	—	0.33	0.34
chow :	—	0.28	0.10
	<u>CV</u>	<u>CV</u>	<u>CV</u>
milled rice :	—	10.3%	1.6%
germ rice :	—	6.7%	0.5%
wheat :	—	6.2%	1.5%
chow :	—	1.3%	0.2%
Run-to-run	<u>SD</u>	<u>SD</u>	<u>SD</u>
milled rice :	—	0.16	1.45
germ rice :	—	0.31	1.96
wheat :	—	0.44	3.85
chow :	—	0.49	4.54
	<u>CV</u>	<u>CV</u>	<u>CV</u>
milled rice :	—	12.8%	13.4%
germ rice :	—	7.3%	11.8%
wheat :	—	7.6%	19.4%
chow :	—	2.2%	10.8%

* :Means. Numbers of replication are shown in parentheses.

** :Undetectable; interferences exist.

度作比較。另外，以螢光法針對綜合維他命的測定，探討酸水解與鹼水解二者之間在定量方面的差異。由結果發現，以酸水解處理樣品的精確度較高，而且PABA在中性條件下的螢光強度較具穩定性。

依綜合維他命、穀物類及生物組織的測定結果，來比較呈色法、螢光法及HPLC/uv的優劣。雖然螢光分光光度法比分光光度法靈敏且較具專一性，但螢光測定讀數卻易受到樣品中

PABA濃度含量之限制。一般而言，HPLC/uv可分析極微量的樣品且靈敏度高，可適用於血液的測定；但是其它樣品的吸收光譜則較複雜，可能含許多能在UV中具有吸光能力的物質而造成干擾，致使測定值誤差大。故HPLC/uv法在樣品純化或管柱分離後之偵測方面尚需加以改進，才能適用於食品及生物組織中PABA之測定。至於呈色法，過去的研究僅限於探討飼料之定量及血液添加PABA的穩定

Table 4. PABA contents in rat liver and blood determined by three methods

Method	Blood (PABAµg /ml)	Liver (PABAµg /g)
Colorimetry	1.52 ± 0.22 (3)*	5.92 ± 0.10 (5)
Fluorimetry (I)	- **(4)	- **(5)
HPLC	0****(4)	1.23 ± 0.09 (5)

* :Means ± SD. Numbers of replication are shown in parentheses.

** :Undetectable; interferences exist.

*** :Cannot be determined due to interferences.

****:Undetectable, (peak area<400).

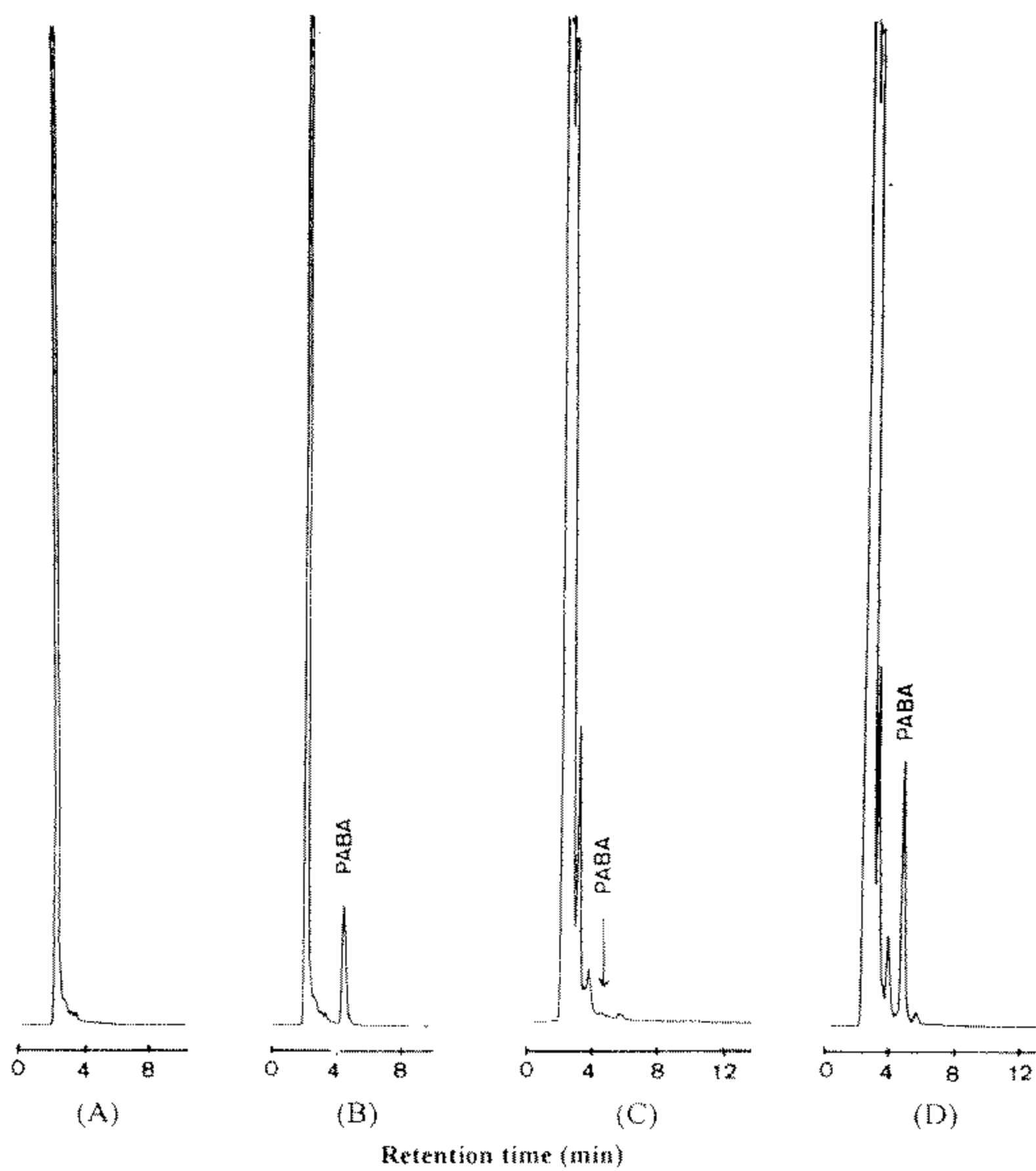


Figure 4. HPLC chromatograms of biological materials (A) blood (B) blood with PABA (C) liver (D) liver added with PABA, retention time of PABA was 4.6 min.

性；由本實驗結果發現，呈色法亦可適用於食品及其它生物組織之檢測，其實驗程序既簡單且成本便宜，而且此法與另二種分析方法之偵測限度的差異並不大。

比較這些方法之優劣後，可確定方法的實用性，便於日後更多的食物與生物組織的分析，不僅可作為自飲食中攝取PABA之參考，也能瞭解PABA在體內之分佈，以利PABA在營養及醫學上之用途。

誌 謝

本計劃承蒙行政院國家科學委員會之經費補助(NSC 84-2321-B005- 051)，謹致謝忱。

參考文獻

1. Combs, J. F. Jr. 1992. The Vitamins : Fundamental Aspects in Nutrition and Health. p. 426. Academic Press, New York.
2. Zarafonetis, C. J. D. 1964. Antifibrotic Therapy with Potaba. Am. J. Med. Sci. 248 : 550-561.
3. Torres, M. A. and Furst, D. E. 1990. Treatment of Generalized Systemic Sclerosis . Rheumatic Dis. Clinics North Am. 16 : 217 - 241.
4. Physicians' desk reference. 1984. p. 991. Medical Economics Co. 38th ed., Oradell, New Jersey.
5. Snyder, D. S. and May, M. 1975. Ability of PABA to Protect Mammalia Skin from Ultraviolet-light Induced Skin Tumors and Actinic Damage. J. Invest. Dermatol. 65: 543-546.
6. Flindt-Hansen, H., Thune, P. and Larsen, T. E. 1990. The Inhibiting Effect of PABA on Photocarcinogenesis. Acta Dermatol. Res. 282: 38-41.

Table 5. Intercomparison of three methods for determinations of PABA in liver and blood

	Fluorimetry (I)	Colorimetry	HPLC
Recovery*			
liver :	— (4)	97.7%(4)	98.5%(5)
blood :	98.1% (4)	101.2%(4)	97.3%(5)
Precision			
Within-run	<u>SD</u>	<u>SD</u>	<u>SD</u>
liver :	— **	0.07	0.02
blood :	—	0.05	—***
	<u>CV</u>	<u>CV</u>	<u>CV</u>
liver :	—	10.3%	1.6%
blood :	—	3.2%	—
Run-to-run	<u>SD</u>	<u>SD</u>	<u>SD</u>
liver :	—	0.10	0.09
blood :	—	0.22	—
	<u>CV</u>	<u>CV</u>	<u>CV</u>
liver :	—	1.7%	7.3%
blood :	—	14.5%	—

* :Means + SD. Numbers of replication are shown in parentheses.

** :Cannot be determined due to interferences.

***:Undetectable

7. Flindt-Hansen, H., Thune, P. and Larsen, T. E. 1990. The Effect of Short-term Application of PABA on Photocarcinogenesis. *Acta Dermato-Venereologica*. 70: 72-75.
8. Kumar, K. and Indrasenan, P. 1989. Titrimetric Determination of *para*-aminobenzoic Acid Using N-bromophthalimide and N-bromosaccharin. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 7 : 627 - 631.
9. Esposito, M., Vannozzi, M. O., Viale, M., Collecchi, R. A. P., Merlo, F. Cian, F. D., Zicca, A., Cadoni, A. and Poirier, M. C. 1993. Para-aminobenzoic Acid Suppression of Cis-diamminedichloroplatinum(II) Nephrotoxicity. *Carcinogenesis*, 14: 2595 - 2599.
10. Strecher, P. G., Windholz, M. and Leahy, D. S. 1989. The Merck Index. p.434. 11th ed. Merck & Co. New Jersey.
11. Eckwet, H. W. 1943. Determination of *p*-Aminobenzoic Acid, Conjugated *p*-Aminobenzoic Acid, and *p*-Nitrobenzoic Acid in Blood. *J. Biol. Chem.* 148: 197- 198.
12. Braganza, J. M., Kay, G. H., Tetlow, V. A. and Herman, K. J. 1983. Observations on the BT PABA/¹⁴C-PABA Tubeless Test of Pancreatic Function. *Clinica Chimica Acta*. 130: 339-347.
13. Gyr, K., Stalder, G. A., Schiffmann, I., Fehr, C., Vonderschmitt, D. and Fahrlaender, H. 1976. Oral Administration of a Chymotrypsin-labile Peptide - a New Test of Exocrine Pancreatic Function (PFT). *Gut*. 17: 27-32.
14. Gunawardhana, L., Barr, J., Weir, A. J. Brendel, K. and Sipes, I. G. 1991. The N-

- acetylation of Sulfamethazine and *p*-Aminobenzoic Acid by Human Liver Slices in Dynamic Organ Culture. Drug Metabolism and Disposition. 19: 648 - 654.
15. Pemberton, P. W., Gagjee, P., Chaloner, C., Braganza, J. M. and Lobley, R. W. 1991. Spectrofluorimetric Determination of Urinary *p*-Aminobenzoic and *p*-Aminosalicylic Acids in the BT-PABA / PAS Test of Pancreatic Function. Clinica. Chimica. Acta. 199:253 - 262.
 16. Merwin, R. T. 1964. Determination of *p*-Aminobenzoic Acid in Feeds. A. O. A. C. J. 47:214 - 218.
 17. Merwin, R. T. 1962. *p*-Aminobenzoic Acid in Feeds. A. O. A. C. J. 45: 289 - 291.
 18. Lankisch, P. G. and Lembecke, B. 1984. Indirect Pancreatic Function Tests: Chemical and Radioisotope Methods. Clin. Gastroenterol. 13: 717-737.
 19. Braganza, J. M. 1984. Prospective Comparison of Three Non-invasive Tests of Pancreatic Disease. Br. Med. J. 289: 562 - 566.
 20. Mitchell, C. J. Humphreys, C. S., Bullen, A. W., Kelleher, J. and Losowsky, M. S. 1979. Improved Diagnostic Accuracy of a Modified Pancreatic Function Test. Scand. J. Gastroenterol. 14: 737-741.
 21. Tetlow, V. A., Lobley, R. W., Herman, K. and Braganza, J. M. 1980. A One-day Oral Pancreatic Function Test Using a Chymotrypsin-labile Peptide and a Radioactive Marker. Clin. Trials. J. 17: 121-130.
 22. Hu, M.-L., Chen, Y.-K., Chen, L.-C. and Sano. M. 1995. *para*-Aminobenzoic Acid Scavenges Reactive Oxygen Species and Protects DNA Against UV and Radical Damage. J. Nutr. Biochem. 6: 504-508.
 23. Eckwet, H. W. 1943. Determination of *p*-Aminobenzoic acid, Conjugated *p*-Aminobenzoic Acid, and *p*-Nitrobenzoic Acid in Blood. J. Biol. Chem. 148: 197 - 198.
 24. Hu, M. L. and Tappel, A. L. 1992. Glutathione and Antioxidants Protect Microsomes Lipid Peroxidation and Enzyme Inactivation. Lipids. 27 : 42-45.
 25. Duggan, D. E., Bowman, R. L., Brodie, B. B. and Udenfriend, S. 1957. A Spectrophotofluorometric Study of Compounds of Biological Interest. Arch. Biochem. Biophys. 68: 1-14.
 26. Ito, S., Maruta, K., Imai, Y., Kato, T., Ito, M., Nakajima, S., Fujita, K. and Kurahashi, T. 1982. Urinary *p*-Aminobenzoic Acid Determined in the Pancreatic Function Test by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. Clin. Chem. 28: 323-326.
 27. Aaron, J. and Winefordner, J. D. 1972. Fluorimetric and Phosphorimetric Characteristics of Several Vitamins. Talanta. 19: 21-29.

Comparison of Methods for Determination of *para*-Aminobenzoic Acid (PABA)

LING-CHUN CHEN AND MAIO-LIN HU

Graduate Institute of Food Science, Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

para-Aminobenzoic acid (PABA) is a precursor of folate in certain bacteria and is commonly used in sun-blocking creams because of its UV-absorbing property. It has mild anti-inflammatory activity and protects against photocarcinogenesis in hairless mice. However, there have been very few reports on the quantitative determination of PABA in foods, plants and animal tissues. In this study we utilized the fluorescent property of PABA in neutral solution (excitation at 280 nm, emission at 340 nm) to quantify PABA in multivitamin preparations, cereals, rat liver and blood, and compared with a colorimetric method and a HPLC/uv method. In addition to the assessment of PABA, we compared the precision (standard deviation, S.D., coefficient variation, C.V.) and recovery (as a criterion of accuracy) between the three methods.

Intercomparison of the methods in multi-vitamin products showed that the colorimetric method was superior in reproducibility (i.e., within-run C.V., 0.2-0.7 %; run-to-run C.V., 2.6-6.1 %) compared to the other methods. The recovery (78.5 %) was also higher for the colorimetric

method compared to the other methods. For cereals, the fluorimetric method was not applicable because of interferences and colorimetric method was found superior to HPLC/uv in both precision (2.2- 12.8 vs. 10.8-19.4 %) and recovery (96.1-100.8 vs. 53.4-69.9 %). In rat blood, PABA was detected exclusively by the colorimetric method (1.52 ± 0.22 μg / ml of blood), although each method produced nearly 100 % recovery. For rat liver, PABA was detected by colorimetric (5.92 ± 0.10 μg / g liver) and HPLC/uv (1.23 ± 0.09 μg / g liver) while the fluorimetric method was not useful due to interferences.

This research demonstrates the comparative applicability, quality and problems of the three methods assessing 3 varieties of samples. In general, the colorimetric method is simple and economical with satisfactory precision and accuracy. In addition, the detection limit (0.3 μM) was comparable to that of fluorimetric method (0.2 μM) and HPLC/uv (0.2 μM). However, in animal tissues, the HPLC/uv method is superior due to avoidance of interferences, and may be readily improved to apply to other types of samples.

Key words: PABA, fluorimetric method, colorimetric method, HPLC/uv.

