

東海大學食品科學研究所

Graduate Institute of Food Science

TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組

Food Technology Section

碩士論文

Master thesis

指導教授：盧錫祺博士

Advisor : Lu, Hsi-Chi, Ph. D.

愛玉子功能性成分初探及抗氧化力之評估

Preliminary Studies of Components of *Ficus awkeotsang*

Makino with Antioxidative Activity

研究生：張志丞 撰

Graduate Student : Chang, Chih-Cheng

中華民國九十七年十二月

December, 2008

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
一、前言.....	3
1-1 愛玉子.....	3
1-1-1 愛玉子的命名.....	3
1-1-2 愛玉子植物型態性狀.....	3
1-1-3 愛玉子隱花果的發育.....	4
1-2 愛玉子研究簡史.....	5
1-3 植物種子中的功能性成分.....	6
1-3-1 不飽和脂肪酸.....	6
1-3-2 抗氧化物質.....	9
1-4 自由基與活性氧.....	10
1-4-1 自由基與活性氧族群.....	10
1-4-2 自由基與疾病.....	10
1-5 花青素.....	13
1-6 研究目的.....	15
二、材料與方法.....	16
2-1 實驗材料.....	16
2-2 基本成分分析.....	16
2-3 瘦果中脂肪酸種類分析.....	17
2-4 愛玉子瘦果溶劑萃取物之製備.....	17
2-5 愛玉子抗氧化能力之評估.....	19
2-6 總酚類化合物測定.....	20
2-7 愛玉子瘦果甲醇萃取物之高效率液相層析.....	21
2-8 愛玉子果托花青素萃取與初步純化.....	21
2-9 愛玉子果托花青素之薄層層析與光譜分析.....	21
2-10 花青素部分水解與糖基之鑑定.....	24
2-11 愛玉子果托花青素之鑑定.....	24
三、結果.....	27
四、討論.....	50
五、結論.....	53
參考文獻.....	54

摘要

愛玉子(*Ficus awkeotsang* Makino)先前的研究主要與凝膠性質有關，最近則有油體的分析與其蛋白質萃取物之抗腫瘤及免疫調節作用之探究。本研究對愛玉瘦果的抗氧化能力做初步的探討，並自愛玉果托及瘦果找尋具功能性之成分。結果發現，每毫克瘦果甲醇萃取物對 DPPH 自由基的清除率可達到 96%，相當於 9 毫克之 BHA 對 DPPH 自由基的清除率，總抗氧化力以 TEAC 法評估，顯示每毫克萃取物相當於 1.22 毫克 Trolox 之抗氧化能力，總多酚含量則達到 320 mg/g 沒食子酸當量。此外，瘦果含有多元不飽和脂肪酸：次亞麻油酸佔 65.64%，亞麻油酸則佔 20.29%；果托含有之花青素，由光譜學上的資料及酸水解之分析，可知其花色苷結構為 Cyanidin，並在 C-3 的位置接有一分子葡萄糖，輔以花青素標準品與高效率液相層析，以及液相層析質譜儀與核磁共振光譜儀，判定其結構為 Cyanidin-3-glucoside。由以上結果可知，往昔被視為廢棄物之愛玉子瘦果與果托具有豐富的多元不飽和脂肪酸、可萃取之抗氧化成份、以及花青素，這些潛在的機能性成份之生理功效與可利用性值得進一步探究。

Absract

Former studies of jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) were mainly focused on the gelation properties. Recently, researchers in the frontier of proteomics and immunology were interested in the proteins and other extracted compounds of jelly fig, focusing on the structure of oil body proteins and the accompanying antitumor or immunomodulatory activities. Few attempts have ever been made to characterize active functional components. In this research, the antioxidant properties of jelly fig extracts were evaluated. We also tried to search functional components in jelly fig.

Possible active compound in jelly fig achene and receptacles were also purified and structure identified. DPPH radical scavenging activity of each miligram methanolic extracts of jelly fig achenes was found to be equivalent to 9 miligram BHA, and approaching 96% clearance rate. Total antioxidant activity of the extracts was evaluated by trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay revealed that equivalent to 1.22 miligram of trolox. The estimated total polyphenol of each gram of jelly fig extracts was 320 miligram gallic acid equivalent. Among the unsaturated fatty acids present, linolenic acid (65.64%) was the most abundant with linoleic acid (20.29%) next to it. Inferred from the spectral data and the structural analysis of acid hydrolysates, the aglycone of the anthocyanins in the receptacle of jelly fig was thought to be with cyaniding, a glucose attached on the C-3 position. With the standards of anthocyanins, HPLC, LC-MS and NMR analysis further proved that the anthocyanin from the receptacle of the jelly fig was cyaniding-3-glucoside.

We concluded that the achenes and receptacle of jelly fig, long been regarded as waste materials, are abundant in polyunsaturated fatty acid, extractable antioxidant compounds and anthocyanins. Subsequent studies are demanded to explore the biological effects, potential applications of these valuable components.

一、前言

1-1 愛玉子

1-1-1 愛玉子的命名

愛玉子學名為 *Ficus awkeotsang* Makino，是由日本人牧野富太郎 (T.Makino) 於 1904 年訂定，而我國記載愛玉子的最早的文獻為連雅堂於西元 1921 年的著作：台灣通史中的農業志，其中記載了愛玉子被發現的經過與名稱的由來，摘錄如下：「愛玉子：產於嘉義山中。舊誌未載其名。道光初，有同安人某居於郡治之媽祖樓街，每往來嘉義，採辦土宜。一日，過後大埔，天熱渴甚，赴溪飲，見水面成凍，掬而飲之，良沁心脾，自念此間暑，何得有冰？細視水上，樹子錯落，揉之有漿，以為此物化之也。拾而歸家，以水洗之，傾刻成凍，和以糖，風味殊佳，或合以兒茶少許，則色如瑪瑙。某有女曰愛玉，年十五，楚楚可人，長日無事，出凍以賣，飲者甘之，遂呼為愛玉凍。」而稱呼愛玉子的俗名則有枳仔、玉枳、草枳仔、天拋藤與天拋子等。(邱,1988; 林,1991)

1-1-2 愛玉子植物型態性狀

愛玉子屬桑科 (*Moraceae*) 無花果屬 (*Ficus*) 木質藤本植物，分佈於海拔 800 至 1800 公尺之山區。愛玉子的植株特徵為氣根多，攀附於岩石或樹幹上，葉互生，有兩種型態，分別為幼年葉與成長葉。幼年葉呈心臟形，成長葉則是長橢圓狀披針形，全緣，革質，表面濃綠色無毛，葉背灰綠色，密生淡褐色細毛。雌雄異株，花著生於隱頭花序的花托內，雌株隱頭花序的花托聚生有約 1~2 萬朵的雌花，及少量發育不全退化之雌花，雌花授粉後發育成瘦果，花托則生長成果托。(邱,1986; 林,1991)

1-1-3 愛玉子隱花果的發育

愛玉子果實源自枝條之花芽，隱花果的發育可分為五個發育期：

第一期為果托鮮重急增期：自雌花盛開日起至瘦果發育第 16 日，果托持續

生長，其鮮重及瘦果含水率均快速增加，並且可自瘦果中測得果膠酯酶活性以及果膠與甲氧基存在，惟含量極微。

第二期為瘦果鮮重急增期：自瘦果發育第 17 日起至第 62 日止，此時果托未再增大，只有瘦果發育快速，瘦果鮮重增至 38 公克，為隱花果成熟前瘦果鮮重最重時期。此時期瘦果的含水率隨發育時間增加而逐漸降低，但果膠酯酶活性、果膠與甲氧基含量均隨著發育時間而大量增加。

第三期為瘦果乾物堆積成熟期：自瘦果發育第 63 日起至第 96 日止，瘦果的鮮重未再增加，因瘦果乾物堆積所增加之重量被減少的水分所抵銷之故，其含水量降至最低之百分之 66。瘦果發育至第 96 日為最佳採收時機，因此時果膠酯酶的活性達到最高之每公克瘦果 1548 單位(圖 1-1a)。

第四期為果托鮮重再增期：自瘦果發育第 97 日起至 108 日止，瘦果的乾重未再增加，但果托鮮重再一次增加，隱花果內瘦果果膠酯酶的活性則開始降低。

第五期為隱花果成熟期：自瘦果發育第 109 日起至 120 日止，瘦果含水率再次增加，隱花果鮮重亦增加，瘦果外果皮所含之果膠成黏稠狀，不易乾燥，故儲藏時容易發霉。果托顏色在此時期逐漸轉變為紅紫色，並裂開成 2~4 片(圖 1-1b,c)，果膠酯酶活性以及果膠與甲氧基含量均降低。(林,1991)



(a)

(b)

(c)

圖 1-1 發育至(a)第三期與(b) (c)第五期之愛玉子隱花果

1-2 愛玉子研究簡史

愛玉子為台灣的特產，但並非糧食等生活必需品，故相關研究罕見。高尾(1917)首先分析出愛玉子之成分：水分 10~14%、碳水化合物 29~35%。三宅及大野於 1930~1933 年確認愛玉子之凝膠粘性物質是一種果膠，甲氧基含量為 8.47%。大野及上吹越(1934)以酒精沉澱法純化愛玉子果膠，得到純白色粉狀物，並分析其成分得水分 9.26%、灰分 0.65%、半乳糖醛酸 90.33%、甲氧基含量 11.80%。井上(1936)分析愛玉子果膠中甲氧基的含量，使用 Zeisel 法測得甲氧基的含量為 7.99%，使用皂化法測定則為 9.7%。綜觀早期愛玉子的研究大多著重於愛玉子中的果膠，由發現到證實愛玉子的凝膠物質為果膠。

黃(1967)以配位滴定法分析愛玉子隱花果中各部位之總果膠含量，分別為：新鮮果托 1.5~1.8%，新鮮瘦果約 2.5%，市售之乾燥愛玉子果托約 5.1%而瘦果中約 5.7%。黃等(1980)發表愛玉凍凝膠原理，認為愛玉凍是由愛玉子瘦果中溶出果膠經果膠酯酶作用後再與水中之二價陽離子交聯形成之大分子。Lin *et al*(1989,1990)對愛玉子中的果膠酯酶做了系列研究，並提出愛玉子果膠酯酶須藉由空氣之誘發而產生活性，且認為愛玉子中可能有果膠酯酶抑制劑的存在。賴(1998)證實愛玉子中含有能抑制果膠酯酶活性之物質。李(2000)發表愛玉子凝膠性質與愛玉凍品質之關聯性，認為果膠酯酶為影響愛玉凍品質最重要的因素。

Ding *et al* (2000,2002), Peng *et al*(2005),及 Chua *et al*(2007,2008)對愛玉子的蛋白質體做了全面性的研究，包括自愛玉子瘦果中純化果膠酯酶、幾丁質酶、似索馬甜蛋白(thaumatin-like protein)、儲存蛋白、油體蛋白以及愛玉子乳膠中橡膠粒子之蛋白質，將以上蛋白質之基因序列解碼、建立 cDNA 資料庫並在體外表現，揭櫫愛玉子的蛋白質體結構及特性。

張(2005) 證實愛玉子多肽分離物可抑制 U937 白血病細胞生長並促使其分化及誘導細胞凋亡之能力，以及於生物體內經由免疫調節方式達到抗 CT26 腫瘤的效果。賴(2008)探討愛玉子瘦果殘渣水草物之功能性，發現水草物有良好之抗氧化活性與抑制食品中毒菌之能力。

1-3 植物種子中之功能性成分

1-3-1 不飽和脂肪酸

根據衛生署統計，九十六年國人主要十大死因之前五名依序為：惡性腫瘤、心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病以及事故傷害，其中的心血管慢性疾病與高脂飲食及缺乏運動等因素有所關聯；高脂飲食中的脂是指脂質，通常稱為脂肪或油脂。

油脂是人體所必需的营养素之一，用以提供人體活動的能量、形成保護內臟的保護層，亦堆積成皮下脂肪之絕緣構造，以維持體溫。此外，人體的所有細胞與組織，幾乎都須要脂肪之參與才能維持正常的結構和功能，因此人體從裡到外都需要脂肪。

而人類在日常生活中攝食之脂肪主要成分為三酸甘油酯。三酸甘油酯是由脂肪酸所組成，依據碳鏈上雙鍵的有無，可將脂肪酸分為飽和脂肪酸以及不飽和脂肪酸。在不飽和脂肪酸中，以雙鍵的多寡，可再細分為只含有一個雙鍵之單元不飽和脂肪酸（MUFA）與一個以上雙鍵之多元不飽和脂肪酸（PUFA）。含有多個雙鍵之不飽和脂肪酸則稱之為高度不飽和脂肪酸（HUFA）(Whitney *et al*, 2008)。若依雙鍵同邊鍵結構型的不同而分為順式脂肪酸與反式脂肪酸。各類脂肪酸的生理活性及常見之食物來源如表 1-1(Harris *et al*, 2007, 2008; Mehmood *et al*, 2008) 所示。與飽和脂肪酸相較，不飽和脂肪酸具有多樣化的保健功效。

植物種子儲存有脂肪酸，高含油量之種子，如大豆等常用於提取植物油。大多數之植物油均富含不飽和脂肪酸(表 1-2)。

表 1-1 存在於日常食物中之脂肪酸

脂肪酸之分類		結構	生理活性	常見食物來源
飽和脂肪酸				
月桂酸 Lauric acid		C12:0	增加總膽固醇含量（包括高密度脂蛋白與低密度脂蛋白）	椰子油
肉豆蔻酸 Myristic acid		C14:0		奶油、椰子油
棕櫚酸 Palmitic acid		C16:0		大部分脂肪與油脂
硬脂酸 Stearic acid		C18:0		大部分脂肪與油脂、可可油、完全氫化植物油
單元不飽和脂肪酸				
順式	棕櫚烯酸 Palmitoleic acid	C16:1	降低總膽固醇及低密度脂蛋白膽固醇含量	魚油、牛油
	油酸 Oleic acid	C18:1		大部分脂肪與油脂、堅果、種子
反式	反油酸 Elaidic acid	C18:1	增加總膽固醇含量	部分氫化植物油
	十八碳烯酸 Vaccenic acid	C18:1	未知	反芻動物之肉及其乳脂肪
多元不飽和脂肪酸				
n-6 脂肪酸	亞麻油酸 Linoleic acid	C18:2	降低總膽固醇及低密度脂蛋白膽固醇含量	植物油、堅果類種子
	花生四烯酸 Arachidonic acid	C20:4	合成 prostaglandins、thromboxanes 及 leukotrienes 之前驅物	肝臟、肉類、蛋
	共軛亞麻油酸 Conjugated linoleic acid	C18:2	抗癌、減少體脂肪	肉類、乳脂肪
n-3 脂肪酸	次亞麻油酸 Linolenic acid	C18:3	降低心血管疾病之發生	植物油、堅果類種子
	二十碳五烯酸 Eicosapentaenoic acid	C20:5	降低心血管疾病之發生、促進神經系統之發展	深海魚類、海藻類
	二十二碳五烯酸 Docosapentaenoic acid	C22:5		
	二十二碳六烯酸 Docosahexaenoic acid	C22:6		

表 1-2 常見植物油中主要脂肪酸種類與含量百分比

Fat ⁺	Total ⁺ SFA		Lauric ⁺ C12:0		Myristic ⁺ C14:0		Palmitic ⁺ C16:0		Stearic ⁺ C18:0		Total ⁺ MUFA		Oleic ⁺ C18:1		Total ⁺ PUFA		Linoleic ⁺ C18:2		Linolenic ⁺ C18:3 (n-3)		Reference
Almond ⁺	7.55 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	6.37 ⁺	1.18 ⁺	70.3 ⁺	69.9 ⁺	22.5 ⁺	22.5 ⁺	0 ⁺	Askin et al (2007) ⁺										
Apricot ⁺	6.22 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	5.22 ⁺	1 ⁺	69 ⁺	68.1 ⁺	25.1 ⁺	25.1 ⁺	0 ⁺	Ozkal et al (2005) ⁺										
Avocado ⁺	17 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	16.3 ⁺	0.6 ⁺	62.9 ⁺	62.7 ⁺	12.2 ⁺	11.4 ⁺	0.8 ⁺	Haiyan et al (2005) ⁺										
Candla ⁺	11.5 ⁺	0 ⁺	0.1 ⁺	8.9 ⁺	2.2 ⁺	57.6 ⁺	57.4 ⁺	30.6 ⁺	22.8 ⁺	6.8 ⁺	Abdulkarim et al (2007) ⁺										
Cocoa ⁺	62.5 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	26.2 ⁺	36.3 ⁺	35 ⁺	35 ⁺	2.5 ⁺	2.5 ⁺	0 ⁺	Lindo et al (1998) ⁺										
Coconut ⁺	85.7 ⁺	42.6 ⁺	22.8 ⁺	14 ⁺	6.11 ⁺	11.71 ⁺	11.71 ⁺	2.63 ⁺	2.63 ⁺	0 ⁺	Samman et al (2008) ⁺										
Flaxseed ⁺	11.45 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	6.86 ⁺	4.59 ⁺	15.94 ⁺	15.94 ⁺	72.27 ⁺	13.96 ⁺	58.31 ⁺	Bozan et al (2008) ⁺										
Grapeseed ⁺	6 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	3.8 ⁺	2.2 ⁺	12.3 ⁺	12.3 ⁺	57.3 ⁺	57.2 ⁺	0.1 ⁺	Cao et al (2003) ⁺										
Olive ⁺	13.42 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	10.42 ⁺	2.56 ⁺	76 ⁺	75.2 ⁺	10.59 ⁺	9.71 ⁺	0.85 ⁺	Samman et al (2008) ⁺										
Palm ⁺	42.3 ⁺	0.2 ⁺	07 ⁺	37.7 ⁺	3.7 ⁺	46.2 ⁺	45.6 ⁺	11 ⁺	10.8 ⁺	0.2 ⁺	Abdulkarim et al (2007) ⁺										
Peanut ⁺	20.8 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	12.6 ⁺	1.8 ⁺	49 ⁺	47.8 ⁺	30.2 ⁺	30.2 ⁺	0 ⁺	Alayi et al (2007) ⁺										
Poppyseed ⁺	11.72 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	9.79 ⁺	1.93 ⁺	13.03 ⁺	11.94 ⁺	75.07 ⁺	74.47 ⁺	0.6 ⁺	Bozan et al (2008) ⁺										
Rice bran ⁺	15.6 ⁺	0 ⁺	0.5 ⁺	13.4 ⁺	1.24 ⁺	41.4 ⁺	41.1 ⁺	39 ⁺	35.2 ⁺	3.8 ⁺	Zhou et al (2007) ⁺										
Sesame ⁺	15.6 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	9.4 ⁺	5.6 ⁺	42.1 ⁺	41.8 ⁺	42 ⁺	41.3 ⁺	0.7 ⁺	Haiyan et al (2005) ⁺										
Soybean ⁺	15.5 ⁺	0 ⁺	0.1 ⁺	11.3 ⁺	3.9 ⁺	25.1 ⁺	24.8 ⁺	59 ⁺	53.5 ⁺	5.5 ⁺	Abdulkarim et al (2007) ⁺										
Sunflower ⁺	10.44 ⁺	0 ⁺	0.16 ⁺	7.59 ⁺	2.42 ⁺	11.9 ⁺	11.04 ⁺	70.73 ⁺	70.46 ⁺	0 ⁺	Bozan et al (2008) ⁺										
Tomatoseed ⁺	17.5 ⁺	0 ⁺	0.1 ⁺	12.26 ⁺	5.15 ⁺	22.68 ⁺	22.17 ⁺	59.27 ⁺	56.12 ⁺	2.77 ⁺	Giannelos et al (2005) ⁺										
Teaseeds ⁺	19 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	16.9 ⁺	1.9 ⁺	52.1 ⁺	51.2 ⁺	24 ⁺	22.9 ⁺	0.9 ⁺	Peiretti et al (2009) ⁺										
Walnut ⁺	8.9 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	6.59 ⁺	2.16 ⁺	21.4 ⁺	21.1 ⁺	62.7 ⁺	50.2 ⁺	12.5 ⁺	Martinez et al (2006) ⁺										

*SFA : saturated fatty acid MUFA : monounsaturated fatty acids PUFA : polyunsaturated fatty acids

1-3-2 抗氧化物質

為了避免油脂氧化的緣故，抗氧化物質亦伴隨著脂肪酸存在於種子之中 (Pratt & Miller, 1984)。而這些抗氧化物質大致可分為維生素 C 與維生素 E、類黃酮類與多酚類化合物。相關研究如表 1-3 所示。

表 1-3 植物種子中所含有之抗氧化物質

種子	抗氧化物質
花生	quercetin (Pratt & Miller, 1984)
芝麻	sesamol、sesamolol、pinosresinol、seasmol dimers、syrigic acid、frulic acid (Fukuda,1986)
蕎麥	hyperin、rutin、quercetin、vitexin、isovetixin、protocatechuic acid、dihydroxy benzaidehyde (Mitsuru, Yasuo & Tojiro, 1997)
葡萄子	gallic acid、catechin、epicatechin、procyanidin dimers(Yilmaz & Toledo, 2004)
蓮子	gallic acid、p-hydroxybenzoic acid、chlorogenic acid、caffeic acid(Yen, <i>et al</i> , 2004)
薏仁	Ascorbic acid、Tocopherol(Tseng <i>et al</i> , 2006)
紫麥	Anthocyanins(Hosseinian <i>et al</i> , 2008)

1-4 自由基與活性氧

1-4-1 自由基與活性氧族群

自由基是指含有一個或多個不成對電子之獨立存在的原子、分子或分子片段 (Cheeseman & Slater, 1993)。自由基本身具有高能量，易與相鄰之分子反應以獲得電子，使自身形成穩定之狀態，但失去電子之分子則形成另一個不穩定之自由基 (Valko *et al*, 2006)。活性氧族群(reactive oxygen species)泛指含氧之高反應分子 (Niki, 1992)，包含自由基與非自由基(表 1-4) (Abuja & Albertini, 2001)。自由基與活性氧的來源可分為內生性與外源性。前者主要是由細胞進行氧化作用所產生，後者則是由外來因素誘發體內而產生，如表 1-5 所示(Ames *et al* 1993; Morrissey & O' Brien, 1998)：

1-4-2 自由基與疾病

現今之研究指出自由基與活性氧會導致脂質的過氧化，蛋白質與去氧核糖核酸(DNA)傷害，使得細胞老化、損傷甚至死亡。(Marnett, 1999; Osawa, 1999)

當體內自由基與活性氧增加，或抗氧化防禦力降低，自細胞至器官將會遭受傷害，引發人體各部位的疾病，有時甚者會由病變進展成癌症。自由基及活性氧參與的疾病如表 1-6 所示(Aruoma 1998)。

表 1-4 活性氧族群

Radicals		Non-radicals	
Hydroxyl	$\cdot \text{OH}$	Peroxynitrite	ONOO^-
Alkoxyl	$\text{L(R)O} \cdot$	Hypochlorite	$^- \text{OCl}$
Hydroperoxyl	$\text{HOO} \cdot$	Hydroperoxide	L(R)OOH
Peroxyl	$\text{L(R)OO} \cdot$	Singlet oxygen	$^1\Delta\text{O}_2$
Nitric oxide	$\cdot \text{NO}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Superoxided	$\text{O}_2^- \cdot$		

表 1-5 自由基與活性氧的來源

內生性	外源性
Electron transport chain of mitochondria	Re-dox substrate
Electron transport chain of microsomal Oxidase	Paraquat
Xanthine oxidase	Medication oxidation
Indoleamine dioxygenase	Smoking
Tryptophane dioxygenase	Ion irradiation
Galactose oxidase	Sun light
Lipoxygenase	Food processing
Monoamine oxidase	
Phagocytic cells	
Neutrophils	
Monocytes	
Eosinophils	
Endothelial cell	
Auto oxidation-reduction	
Transition metal ions (e.g. Mn^+ , Fe^{2+} , Cu^+)	

1-5 花青素

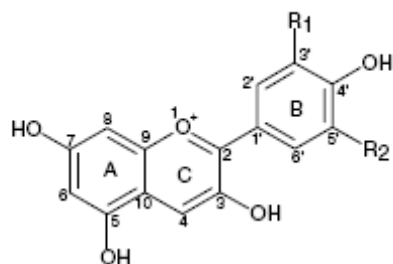
花青素屬於類黃酮家族之天然色素，普遍存在於花卉、蔬菜、水果以及種子外皮等部位之中，種類將近有 400 種(Kong *et al*, 2003)。常見之花青素有六種，其基本結構如表 1-7 所示(Cooke *et al*, 2005; Hosseinian *et al*, 2008)：

花青素的顏色易受 pH 值之影響，在酸性環境下，由於可以形成 flavylium 陽離子構造，顏色較為穩定，但在弱酸及中性環境下則不穩定，其顏色會快速褪色而消失(Hong & Wrolstad, 1990)。

早期，花青素的分離純化與鑑定包含了以層析之方式將花青素分離，配合適當的溶劑系統做為展開劑，測量花青素之 R_f 值、以紫外光-可見光分光光度計偵測溶於含酸甲醇中之花青素之吸光值、加入氯化鋁溶液來判斷花青素的 B 環上是否有相鄰之氫氧基，以及部分水解來推測花青素之結構(Harborne, 1958; 1967)。現今則有高效率液相層析儀(HPLC)用以純化與分析花青素，再搭配花青素標準品，可更精確測定樣品中花青素之種類(Hong & Wrolstad, 1990)；質譜儀(LC-MS)可用於測定花青素之分子量(Revilla *et al*, 1999)，以及核磁共振光譜儀用於測定花青素之氫譜與碳譜(Giusti *et al*, 1998)。

花青素鮮艷之色澤對植物本身而言，除了吸引昆蟲以授粉與散佈種子外，另有抗氧化與抗蟲害之功能(Kong *et al*, 2003)。而花青素之生理活性則有：抑制脂蛋白氧化 (Ghiselli *et al*, 1998)、保肝作用(Obi *et al*, 1998)、抗致突變性(Yoshimoto *et al*, 1999)以及抑制 Caco-2、HeLa S3、HL60、HT29、RAW264、U937 等腫瘤細胞生長(Cooke *et al*, 2005)

表 1-7 常見花青素之結構



<u>Aglycone</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>Color</u>	<u>λ_{max} (nm)</u>	<u>MW</u>
Cyanidin (Cy)	OH	H	Red	535	287
Peonidin (Pn)	OCH ₃	H	Bluish-purple	532	301
Pelargonid(Pg)	H	H	Orange-red	520	271
Malvidin (Mv)	OCH ₃	OCH ₃	Purple	542	331
Delphinidin(Dp)	OH	OH	Purple	546	303
<u>Petunidin (Pt)</u>	<u>OCH₃</u>	<u>OH</u>	<u>Purple</u>	<u>543</u>	<u>317</u>

1-6 研究目的

自愛玉子果托分離出之花青素做一鑑定，並分析瘦果中所含有之脂肪酸含量與種類。此外，本研究以 DPPH 法、TEAC 法與硫氰酸鐵法評估瘦果之甲醇萃取物之抗氧化力，以期對愛玉子具實用價值之天然成分有更多瞭解。

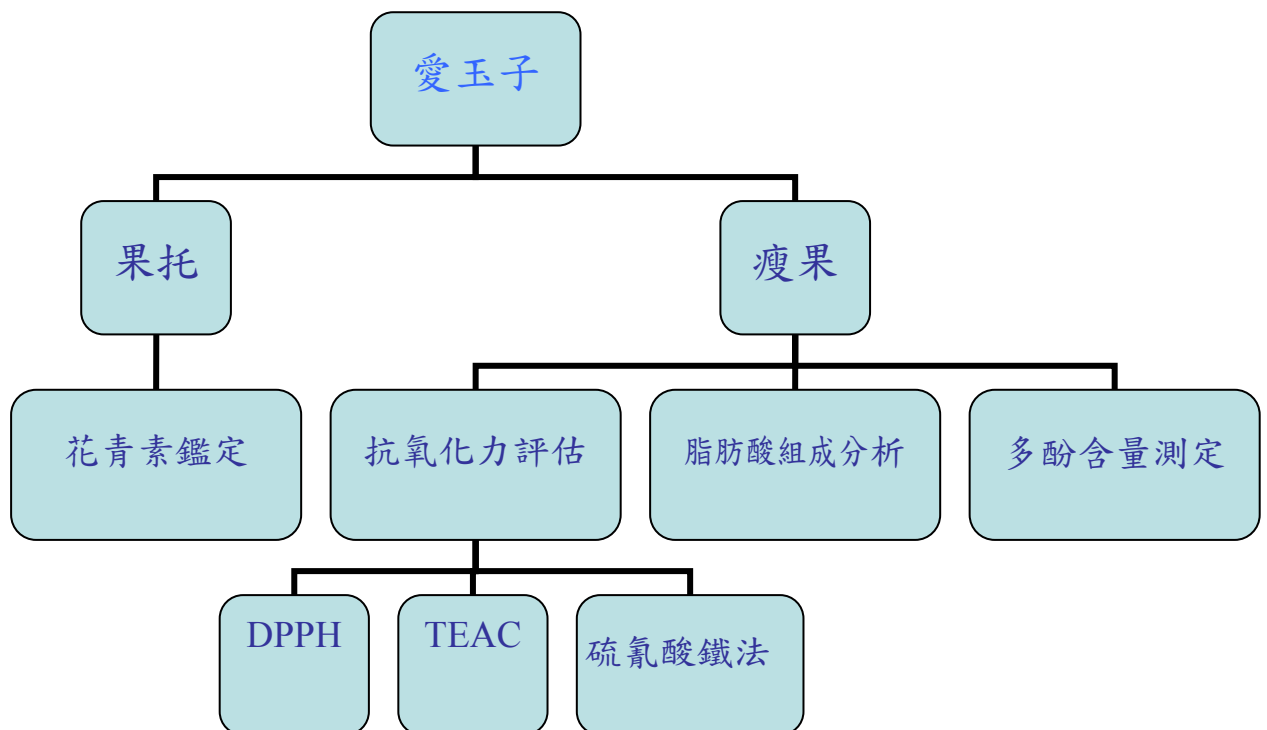


圖 1-2 實驗設計

二、材料與方法

2-1 實驗材料：

愛玉子 (*Ficus awkeotsang* Makino) 果托與瘦果購自南投縣農會愛玉子第二產銷班，儲存於超低溫 (-80°C) 凍箱中。本研究所使用的為紫紅色，發育達 120 日之成熟果托。



圖 2-1 愛玉子成熟果托

2-2 愛玉子的基本成分分析

參考中國國家標準(CNS)，對愛玉子果托與瘦果的水分含量、粗蛋白含量、粗脂肪含量及灰份做初步的探討。水分含量以常壓加熱乾燥法測定。將愛玉子的果托以均質機 (Osterizer, Sunbeam Products, Inc., USA) 打碎，瘦果則以磨粉機(榮聰鐵工廠, Taiwan)磨碎，分別秤取 10 克，置於已烘乾至恆重之秤量瓶中，置入烘箱 (Mettler, Germany)，以 100~110°C 乾燥至恆重。將烘乾前之重量扣除烘乾後之重量得到水分重量，再將水分重量除以樣品重量而得水分含量百分比。粗蛋白含量以凱氏氮分析法(Kjeldah method)測定：秤取 0.2 公克樣品，連同消化錠放入分解管，再加入 10 毫升濃硫酸(聯工, Taiwan)，最後將分解管置於分解爐(Foss 2006 digester, Foss, Sweden)上，以 420°C 煮至分解管內液體呈現澄清透明；待冷卻後，加入 100 毫升蒸餾水稀釋，再以凱氏氮蒸餾裝置(Kjeltec 2100 distillation unit,

Foss, Sweden)將氮蒸餾而出並以定量硼酸(Sigma-Adrich Laborchemikalien GmbH, Germany)接收，最後以 0.1N 鹽酸(聯工,Taiwan)滴定，自滴定結果求出氮含量，再乘以 6.25 而得到粗蛋白含量。粗脂肪含量則是將乾燥之愛玉子花托及瘦果磨碎成粉狀，各秤取 10 公克粉末置入圓筒濾紙，再放入索氏萃取器中以正己烷(Tedia Company Inc.,USA)迴流八小時後，取下圓底瓶，以減壓濃縮機(Eyela N-4N, Tokyo Rikkakikia Inc., Japan)去除正己烷。比較萃取前後圓底瓶總重量之差除以樣品重量而得粗脂肪含量百分比。灰份含量則是各秤取 2 克樣品置入坩鍋中，放入灰化爐(Carbolite, England)以 550°C 灰化達到恆重，由灰化前後坩鍋總重之差而得灰分含量。

2-3 愛玉子瘦果中脂肪酸之分析

將愛玉子瘦果以磨粉機磨碎後，以氯仿及甲醇萃取其中之脂肪酸。由於油脂或脂肪酸的揮發性較低，不適於直接以氣相層析儀分析，須經由衍生化反應將其轉成沸點較低之甲基酯衍生物，故以 TMAH (tetramethyl ammonium hydroxide, Sigma Chemical Co., USA) 將脂肪酸甲基化。首先取 0.1mL 愛玉子油，加入 1mLTMAH 後，靜置 10 分鐘後，加入 1mL 二次水終止反應，取出有機層並加入 1g 無水硫酸鈉去除殘餘之水分後，取上層液以氣相層析儀分析，所使用之條件如表 2-1 及表 2-2 所示。

2-4 愛玉子瘦果溶劑萃取物之製備

將完全粉碎之愛玉子瘦果依序以正己烷、乙酸乙酯(Echo Chemical co., Taiwan)及甲醇三種不同極性之溶劑萃取，瘦果粉末與溶劑體積比例為 1：3，每種溶劑均萃取三次，再將萃取液以濾紙(Advantec, Japan)過濾並在常溫下以減壓濃縮機濃縮至溶劑完全揮發，而得到正己烷、乙酸乙酯及甲醇萃取物。

表 2-1 分析愛玉子瘦果中脂肪酸所使用之氣相層析條件

Instrument	Shimadzu GC-14A
Detector	FID
Integrator	Chromatocorder 21
Column	Supelco SP-2330 column
Carrier gas	N ₂ (1kg/cm ²)
FID temperature	280°C
Injector temperature	250°C
<u>Column temperature</u>	<u>Gradient (表 2-2)</u>

表 2-2 分析愛玉子瘦果中脂肪酸所使用之GC溫度梯度條件

<u>Time(min)</u>	<u>Temperature</u>
0	150°C
2	150°C
22	170°C
<u>27</u>	<u>170°C</u>

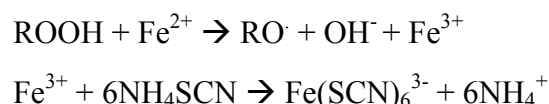
2-5 愛玉子抗氧化能力之評估

本研究以硫氰酸鐵法、DPPH 自由基清除能力、總抗氧化力測定(TEAC 法)及總酚類化合物含量四項檢測方法評估愛玉子瘦果溶劑萃取物之抗氧化力。

2-5-1 以硫氰酸鐵法評估抗氧化力

本研究參考 Mitsuda(1966)及蘇(1991)等之方法，將愛玉子瘦果溶劑萃取物、 α -生育醇(Sigma Chemical Co., USA)及 BHA(butyl hydroxyl anisole)(Sigma Chemical Co., USA)分別配製成濃度為 1mg/mL 之甲醇溶液，取 0.2mL 加入附有磨砂瓶蓋之 50mL 錐形瓶中，再分別加入 10mL 1.3% 亞麻油酸(林純試藥, Japan) 甲醇溶液及 10mL 0.2M pH=7.0 之磷酸緩衝液(Merck KGaA, Germany)，以二次水定量至 25mL。最後，將錐形瓶密封，置入 40°C 恆溫烘箱中，每隔 24 小時定時取樣 0.2mL，加入 9.4mL 75% 甲醇溶液，再依序加入 0.2mL 0.02M 氯化亞鐵鹽酸溶液與 0.2mL 30% 硫氰酸鉍溶液。之後震盪使之混合均勻，反應三分鐘後，檢測在波長 500nm 下之吸光值。

當油脂氧化所產生的氫過氧化物與二價鐵離子(Fe^{2+})反應，會將其氧化成三價鐵離子(Fe^{3+})，再將三價鐵離子(Fe^{3+})與硫氰酸根(SCN^-)反應，生成紅色之硫氰酸鐵錯化合物 $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$ ，此錯化合物在波長 500nm 下有最大吸光值。當油脂氧化程度越高，氫過氧化物生成越多，則紅色之硫氰酸鐵錯化合物也就越愈，高，顏色相對愈深，因此由吸光值的大小可推知油脂氧化程度，並獲知樣品抗氧化力的強弱。其反應式為：



2-5-2 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 自由基清除能力之測定：

參照 Shimada(1992)之方法，測定愛玉子瘦果萃取物對 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)(Sigma Chemical Co., USA)自由基之清除能力。首先取 1mL 萃取物

加入 0.008%DPPH 甲醇溶液，混合均勻後靜置 5 分鐘，測 520nm 下之吸光值。另外以 BHA 當對照組。當 DPPH 自由基清除愈多時，其吸光值會下降的愈多，利用相對於對照組的吸光值下降百分比，以評估萃取物清除 DPPH 自由基能力的強弱，其計算公式為：

$$\text{Scavenging effect (\%)} = [A1 - (A - A2)] / A1 * 100\%$$

A1：未加入樣品之吸光值

A：加入樣品之吸光值

A2：樣品本身之吸光值

2-5-3 總抗氧化力測定(TEAC 法)

本法參考 Miller(1993)及 Arnao(1996)等方法，將 peroxidase(Sigma Chemical Co., USA)、2,2-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid](ABTS)(Sigma Chemical Co., USA)與過氧化氫(Merck, Germany)混合均勻，使最終系統濃度分別為 peroxidase 4.4U/mL、ABTS 100 μ M 以及過氧化氫 70 μ M，置於室溫下反應 1 小時生成穩定之藍綠色陽離子自由基，再加入溶於甲醇溶液之愛玉子瘦果溶劑萃取物，測波長 734nm 下之吸光值，觀察其藍綠色脫色程度。另外，以不同濃度的 Trolox 清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力作一清除力標準曲線，以計算愛玉子萃取物清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力。

2-6 總酚類化合物測定

參考 Singleton *et al* (1999)之方法，取愛玉子萃取物置於 10mL 試管中，加入 2mL 蒸餾水及 1mL 之 100% Folin-Ciocalteu's phenol 試劑(Sigma-Adrich Laborchemikalien GmbH, Germany)混和均勻後，加入 5mL 之 20%碳酸鈉(Merck KGaA, Germany)後，再次混和均勻，室溫下靜置 20 分鐘後，於波長 735nm 下測其吸光值。本實驗以沒食子酸(gallic acid)(Sigma Chemical Co., USA)做標準曲線，總酚類化合物含量以沒食子酸當量表示。

2-7 愛玉子瘦果甲醇萃取物之高效率液相層析

將甲醇萃取物復溶於甲醇中，以孔徑為 0.45 μm 之過濾膜過濾後，以高效率液相層析(HPLC)初步分析其中可能含有之成分。層析條件如表 2-3 及表 2-4 所示，偵測器設定之波長以 280 nm 偵測多酚類，以 350 nm 偵測類黃酮。

2-8 愛玉子果托花青素萃取與初步純化

將愛玉果托加入含有 0.1% 鹽酸(聯工, Taiwan)的甲醇(Mallinckrodt Chemical Co., USA)後，以均質機打碎，置於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置隔夜，取出萃取液，再加入含有 0.1% 鹽酸的甲醇，再萃取一次。之後，收集所有萃取液，以減壓濃縮機(Eyela A-3S, Tokyo Rikakikia Inc., Japan)將萃取液濃縮，此時所得之濃縮液為愛玉子果托花青素粗萃取液。

再將粗萃取液吸附於以 Amberlite XAD-7 (Sigma Chemical Co., USA) 樹脂填充之玻璃管柱，先以含 0.1% 鹽酸之二次水洗去殘留於萃取液之醣類、果膠與其他種類的雜色素，再以含 0.1% 鹽酸之甲醇將紅色素洗下，最後進行減壓濃縮。

2-9 愛玉子果托花青素之薄層層析與光譜分析

將粗萃取液以纖維素薄層層析板(Merck KGaA, Germany)配合 MAW、AWH 及 1% 鹽酸三種展開液，配方如表 2-5 進行層析，以尋求可將愛玉果托花青素自粗萃取液中分離之最適條件。之後，將粗萃取液劃於 3mm 濾紙(Whatman International Ltd., England)，以展開液向上展開，再將色素帶自濾紙上剪下，以含有 0.01% 鹽酸的甲醇將花青素自濾紙上洗下回收，並減壓濃縮去除大部分之甲醇。

之後，將花青素溶於含 0.01% 鹽酸之甲醇中，以紫外光-可見光分光光度計(Shimadzu UV-2100, Japan)進行全光譜掃描，接著將花青素加入不同 pH 值之緩衝溶液中進行全光譜掃描，使用兩種不同系統之緩衝液，配方如表 2-6(a)、(b)所示。最後，將含有 14% 硝酸鋁($\text{AlNO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Sigma Chemical Co., USA)之百分之九十

五酒精(台糖, Taiwan)溶液加入含有花青素之 0.01% 鹽酸之甲醇溶液中, 做可見光光譜掃描。本反應主要測定花青素的 B 環是否存在兩個相鄰的氫氧基, 以判定愛玉子果托花青素呈色團 (花色素) 之種類。

表 2-3 分析甲醇萃取物所使用之高效率液相層析條件

Instrument	Hitachi 6200
Detector	Soma S-3702 UV/Vis detector
Integrator	LiChrospher 100 RP-18 column (250 X 4 mm)
Flow rate	0.8mL/min
Mobile phase	2% acetic acid in CH ₃ CN 2% acetic acid in H ₂ O (gradient)(表 2-4)

表 2-4 分析甲醇萃取物所使用之梯度移動相條件

Time(min)	2% acetic acid in H ₂ O	2% acetic acid in CH ₃ CN
0	96%	4%
20	88%	12%
30	80%	20%
45	50%	50%

表 2-5 分析愛玉子果托中花青素所使用之展開液

縮寫	溶劑組成	比例(體積比)
MAW	methanol – acetic acid – water	90 : 5 : 5
AWH	acetic acid – water – conc. Hydrochloric acid	15 : 82 : 3
1%HCl	conc. Hydrochloric acid – water	3 : 97

表 2-6(a) 檸檬酸-磷酸緩衝溶液配方

pH值	A (mL)	B(mL)
3	39.8	10.2
4	30.7	19.3
5	24.3	25.7
6	17.9	32.1
7	6.5	43.6

A : 0.1M citric acid

B : 0.2M dibasic sodium phosphate solution

表 2-6(b) 磷酸緩衝溶液配方

pH值	A (mL)	B(mL)
8	5.3	94.7

A : 0.2M monobasic sodium phosphate solution

B : 0.2M dibasic sodium phosphate solution

2-10 花青素部分水解與糖基之鑑定

將純化的花青素以 Francis(1966)之方法，加入 2N 鹽酸，於 95°C 下水解，逐次於水解 0、2、5、10、15 及 20 分鐘取樣，點於濾紙上，以 AWH 溶劑系統展開。糖基之鑑定是將完全水解之花青素，先以戊醇萃取未水解之花青素與呈色團，殘餘之酸水解物，再以 10%三辛胺(Sigma Chemical Co., USA)氯仿(Panreac Química S.A., Spain)溶液重複洗滌數次，以去除水解液中的酸。再以氯仿重複洗滌數次以去除殘餘之胺，最後減壓濃縮至乾再復溶於蒸餾水中，以 HPLC 搭配糖標準品(Sigma Chemical Co., USA)，判斷糖的種類。糖標準品共五種，分別為 glucose、galactose、arabinose、xylose 及 rhamnose。HPLC 條件如表 2-7 所示。

2-11 愛玉子果托花青素之鑑定

2-11-1 與標準品共注射

花青素之鑑定則是將純化的花青素，以 HPLC 搭配花青素標準品(Polyphenols Laboratories, Norway)，判斷愛玉花托中的花青素是屬於 cyanidin-3-glucoside、delphinidin-3-glucoside 或 pelargonidin-3-glucoside，分析條件如表四，梯度移動相之條件則參考 Wu(2004)並略做修改，本條件亦用於判斷花青素萃取物之純度以及分離純化花青素以供做核磁共振光譜之用。使用半製備管柱(10×250mm, Sunfire C-18, Waters, USA)純化花青素時，流速則為 2mL/min，其餘條件等同表 2-8 與表 2-9 所示。

2-11-2 以 LC-MS 測定分子量

分子量測定是使用 HPLC 搭配 SSI-MS(sonic spray ionization mass spectrometer)(Hitachi M-8000)測定。HPLC 條件如表 2-9 及表 2-10

2-11-3 核磁共振光譜

將純化後之愛玉子花托花青素溶於含有 0.01%氯化氘(DCl)之全氘代甲醇

(CD₃OD)中，使用核磁共振光譜儀(VXR-300/51) 以 300MHz 檢測 ¹H-NMR。

表 2-7 分析糖基種類所使用之高效率液相層析條件

Instrument	Alcott 765
Detector	ERC-7515A RI detector
Integrator	Chromatocorder 21
Column	Transgenmic CHO-682
Mobile phase	H ₂ O
Flow rate	0.35mL/mim
Column oven	Super CO-150
<u>Column temperature</u>	<u>80°C</u>

表 2-8 分析花青素種類所使用之高效率液相層析條件

Instrument	Shimadzu LC-10AT
Detector	Soma S-3702 UV/Vis detector
Integrator	Chromatocorder 21
Column	Aglient Zorbax SB-C18 4.6×250mm
Flow rate	1mL/mim
<u>Mobile phase</u>	<u>Methanol & 5% formic acid (gradient) (表 2-9)</u>

表 2-9 分析花青素種類所使用之高效率液相層析梯度移動相條件

Time(min)	Methanol (%)	5% Formic acid (%)
0-2	5%	95%
2-10	20%	80%
10-15	20%	80%
15-30	30%	70%
30-35	30%	70%
35-50	45%	55%
50-60	5%	95%
60-75	5%	95%

表 2-10 鑑定花青素分子量所使用之高效率液相層析條件

Instrument	Hitachi L-7100
Detector	Hitachi L-7450A
Interface	Hitachi D-7000
Column	Aglient Zorbax SB-C18 4.6×250mm
Flow rate	1mL/mim
Mobile phase	Methanol & 5% formic acid (gradient) (表 2-8)

三、結果

將愛玉子果托與瘦果磨碎後，進行水分、粗脂肪、粗蛋白及灰分的分析，結果如表 3-1。其中，果托含有八成左右之水分，且灰分含量達 11%。而愛玉子瘦果脂肪酸以 TMAH 將脂肪酸甲基化，再以氣相層析儀分析，所得之氣相層析圖如圖 3-1 所示：愛玉油脂中共分析出五種脂肪酸，飽和脂肪酸兩種及不飽和脂肪酸三種，其中以次亞麻油酸含量最豐富，占 65.64%，其次為亞麻油酸，占 20.29%，油酸則占 6.85%；不飽和脂肪酸的部分，棕櫚酸占 5.95%，硬脂酸則占 1.26%。

以三種極性不同之溶劑萃取愛玉子瘦果粉末而得之溶劑萃取物其萃取率如表 3-4 所示。之後以硫氰酸鐵法、DPPH 自由基清除能力及 TEAC 法評估以上萃取物之抗氧化力，可知甲醇萃取物具有較佳之抗氧化效果，且其 DPPH 自由基清除能力可達 96%，TEAC 當量則達到 1.22mg/g；而總酚類含量亦以甲醇萃取物的總酚類含量最高，達 320 mg/g 沒食子酸當量。將甲醇萃取物以 HPLC 分析，發現其中含有多酚類與類黃酮類化合物。

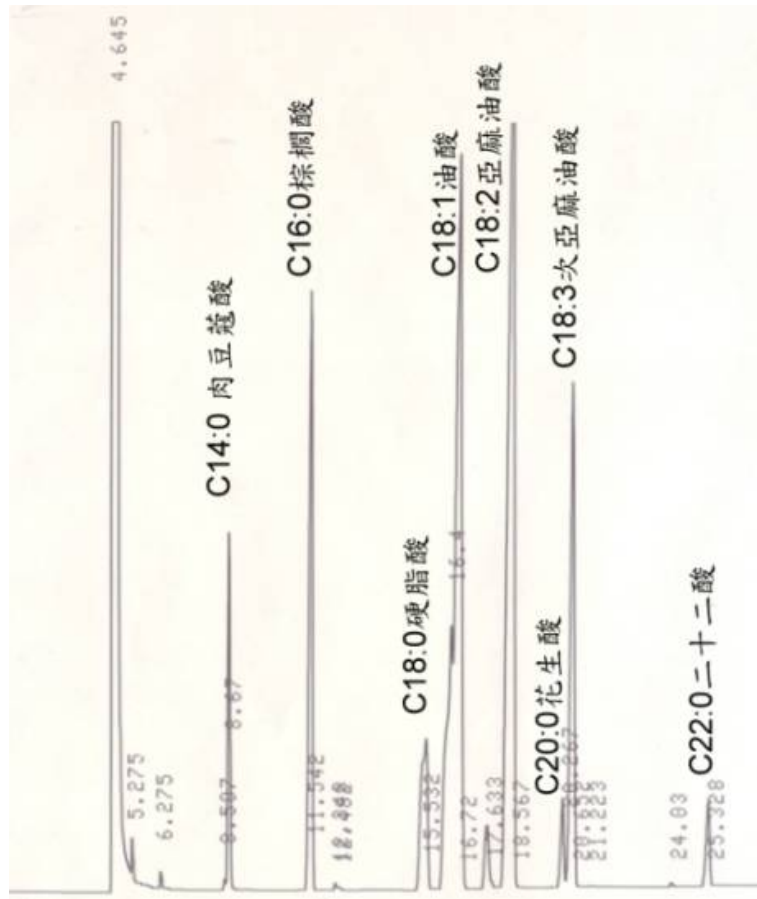
愛玉果托花青素粗萃取液初步判定具有典型之花青素之特性，即在不同 pH 值之環境下，最大吸收波長會隨之改變。接著將愛玉子果托花青素粗萃取液點於纖維素薄層層析板上，以 MAW、AWH 與 1%HCl 三種不同溶劑展開，其 R_f 值 $\times 100$ 分別為 29.8、11 及 5.7。經 XAD-7 管柱純化之萃取液做全光譜掃描，發現有三個主要吸收峰，分別為 530nm、328nm 及 283nm。但若以經濾紙純化後之花青素做光譜掃描，則最大吸收波長只剩 530nm 與 283nm。將含有 14% 硝酸鋁之百分之九十五酒精溶液加入含有花青素之 0.01% 鹽酸之甲醇溶液中，做可見光光譜掃描，發現加入前後，花青素的可見光區最大吸收波長有所改變， λ_{max} 自 529nm 右移至 549nm。將只經 XAD-7 管柱純化、再經 3mm 濾紙純化以及再經半製備管柱純化之花青素以分析型管柱，檢測純度，可知濾紙可有效將花青素與其他雜質分離。

將花青素以酸水解並定時取樣，點於於 3mm 濾紙上，以 AWH 展開，發現花青素只可被水解成兩點，故可以確定愛玉果托花青素的結構應上有一糖分子鍵

結於呈色團上。將酸水解後之水解液脫酸、減壓濃縮至乾再復溶於蒸餾水中，以 HPLC 搭配糖標準品，確認花青素上所鍵結之糖類為葡萄糖。

將愛玉子果托花青素與 cyanidin-3-glucoside、delphinidin-3-glucoside 或 pelargonidin-3-glucoside 共注射，並比對滯留時間(Rt)，確定花青素之種類為 cyanidin-3-glucoside。由質譜可知愛玉果托花青素之分子斷裂峰[M-glucose residue]⁺ 為 287，愛玉子花青素之吸收訊號出現在 8.99、8.23、8.04、7.06、6.93 以及 6.67ppm 之位置，分別為 H4、H6'、H2'、H5'、H8 與 H6 之 H proton 吸收峰，故判斷其呈色團為 cyanidin。

(a)



(b)

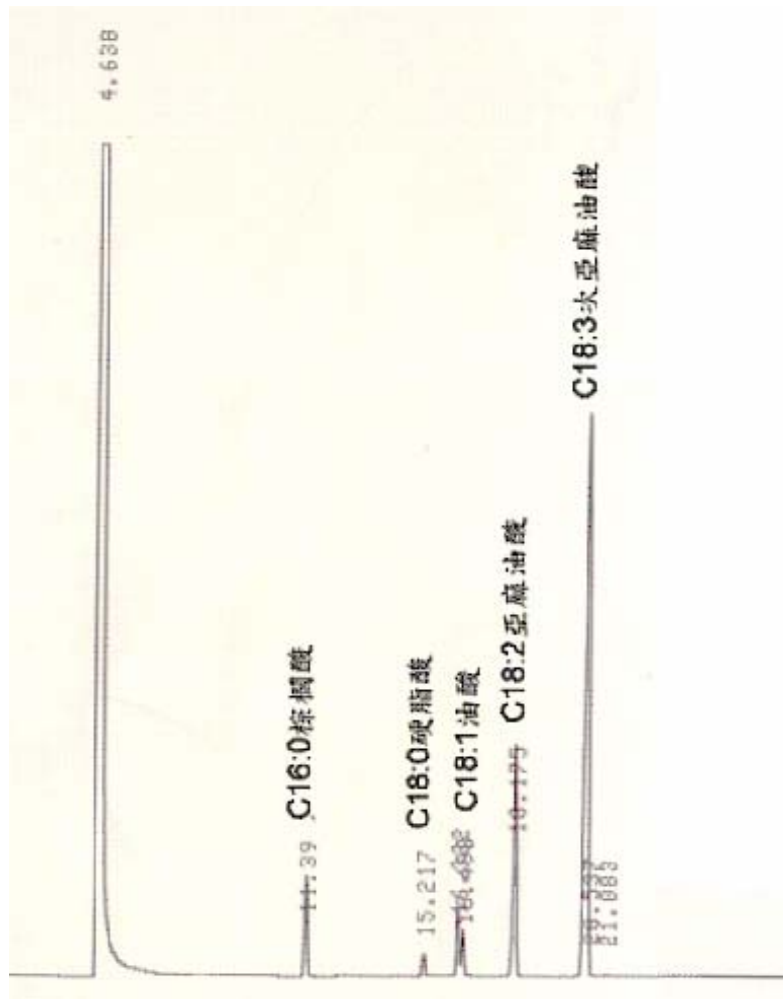


圖 3-1(a)脂肪酸標準品 (b)愛玉子瘦果中脂肪酸氣相層析圖譜

表 3-1 愛玉子果托及瘦果之基本成分分析

部位	水分 (%)	粗脂肪 (%)	粗蛋白 (%)	灰分 (%)
瘦果	6.38±0.02	10.46±0.07	12.74±0.69	2.15±0.03
果托	80.74±2.40	4.34±0.08	4.58±0.46	11.73±0.06

表 3-2 溶劑萃取物產率表

萃取溶劑	萃取物重量(g)	產率(%)
正己烷	3.56±0.07	11.87±0.4%
乙酸乙酯	0.48±0.04	1.6%±0.13%
甲醇	2.12±0.04	7.7%±0.13%

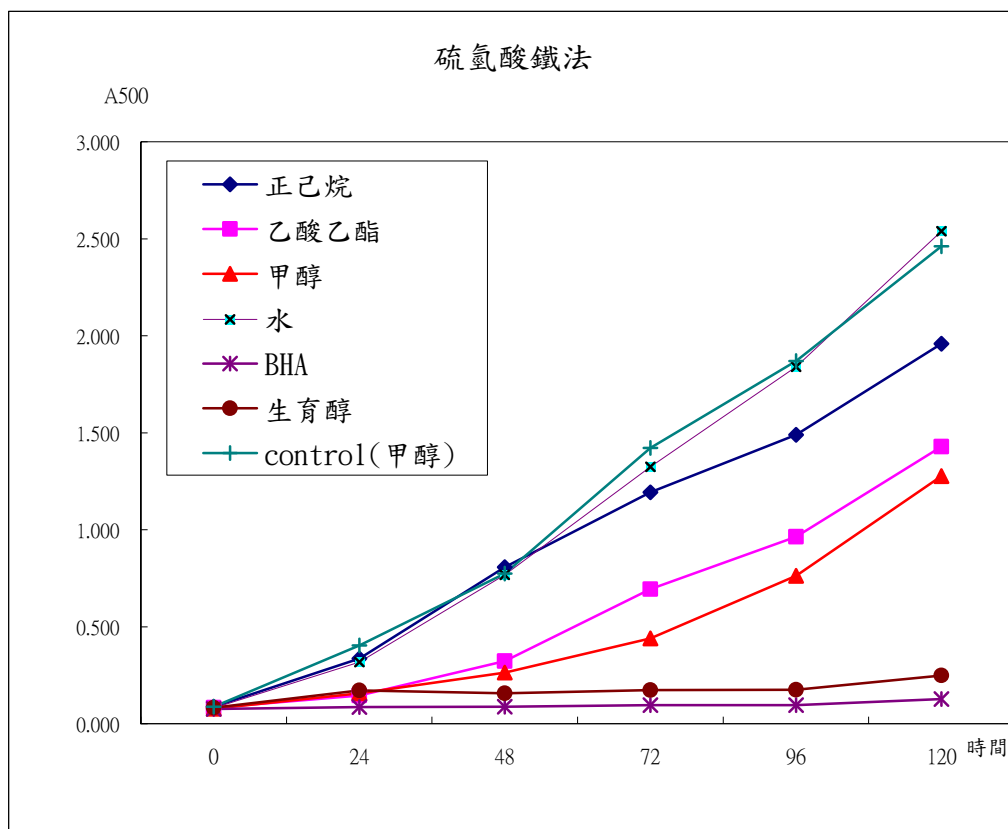


圖 3-2 愛玉子瘦果不同溶劑萃取物之抗氧化性

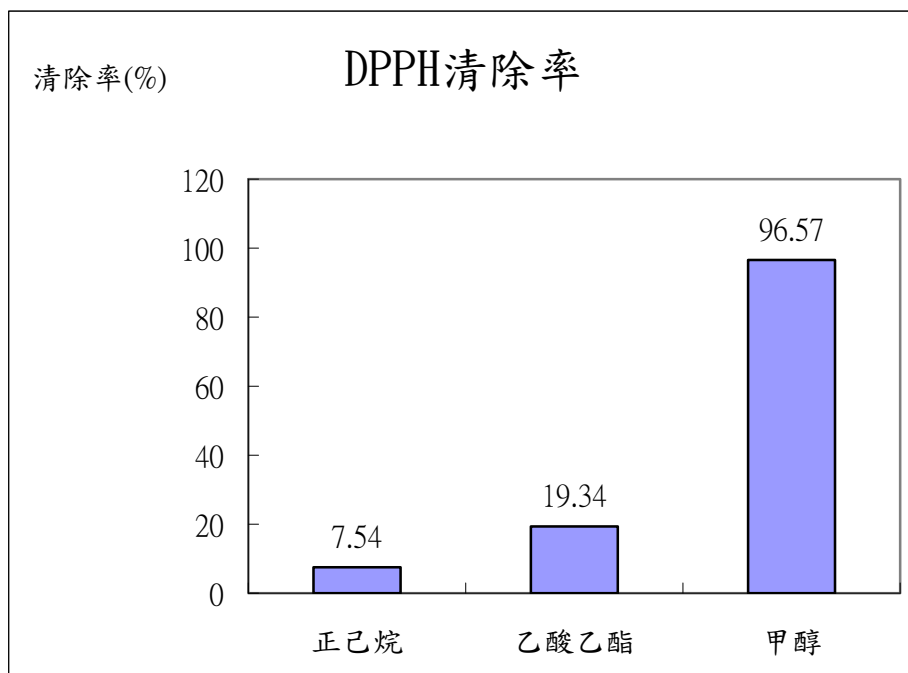


圖 3-3 愛玉子瘦果不同溶劑萃取物對 DPPH 自由基清除能力

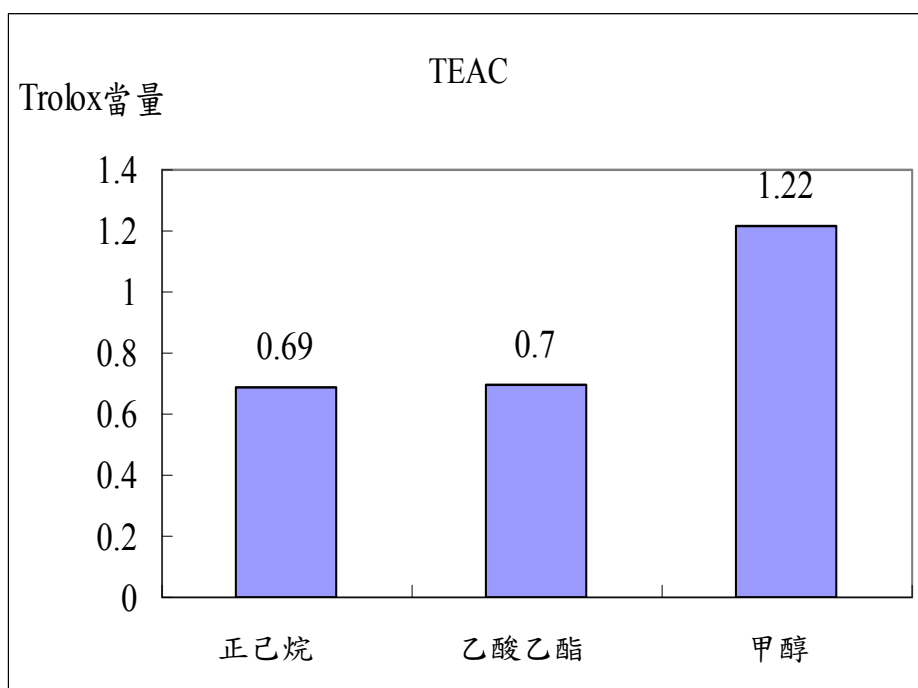


圖 3-4 愛玉子瘦果不同溶劑萃取物中 TEAC 當量

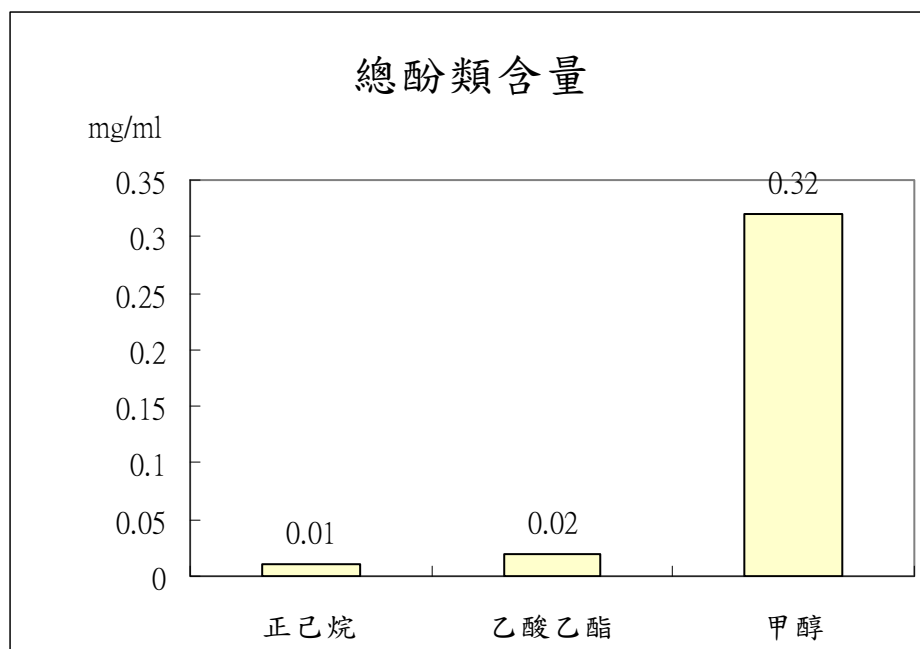


圖 3-5 愛玉子瘦果不同溶劑萃取出物中總酚類之含量

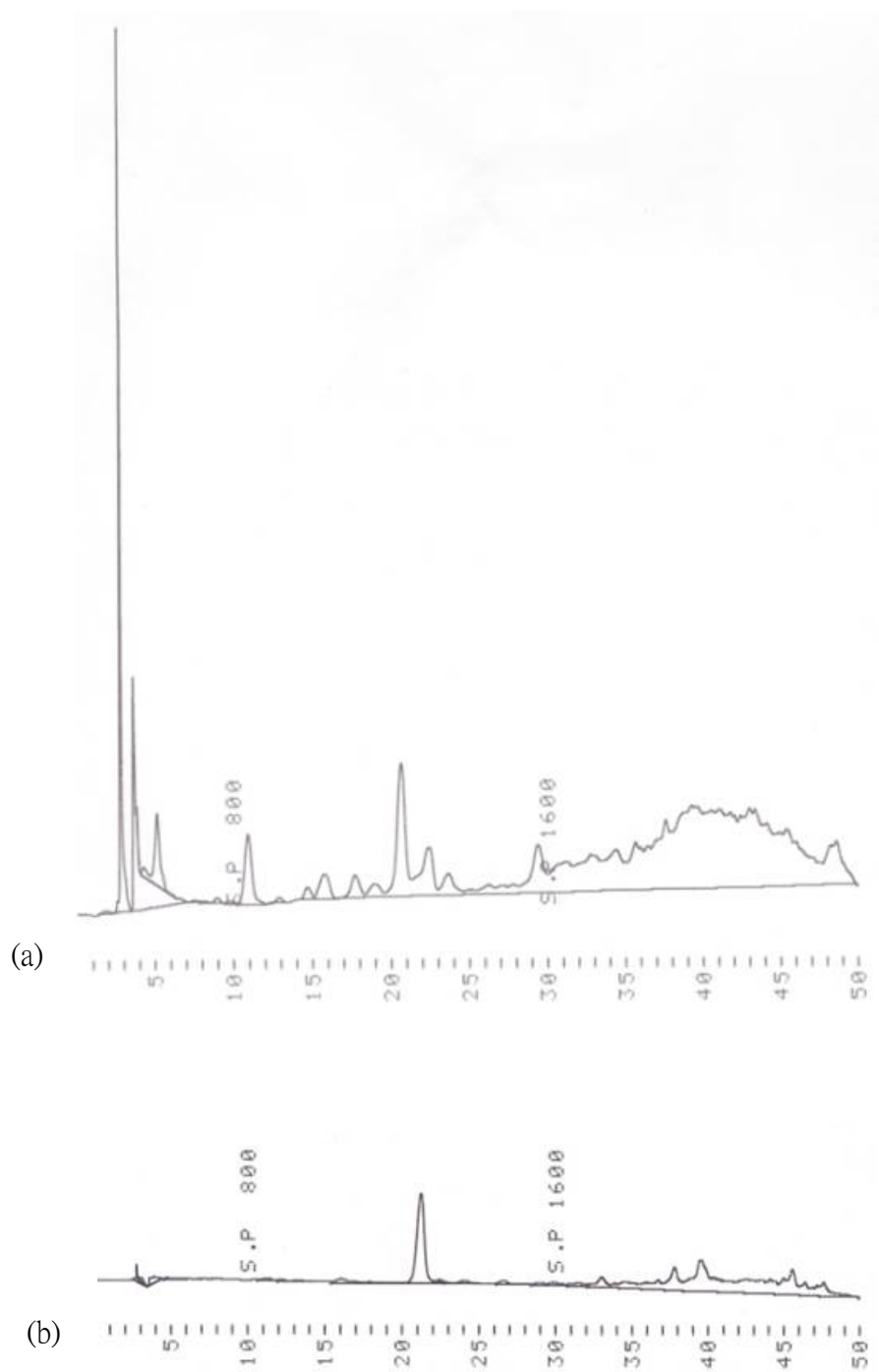


圖 3-6 不同偵測波長下愛玉子瘦果甲醇萃取物之高效率液相層析圖
 (a)280nm (b)350nm

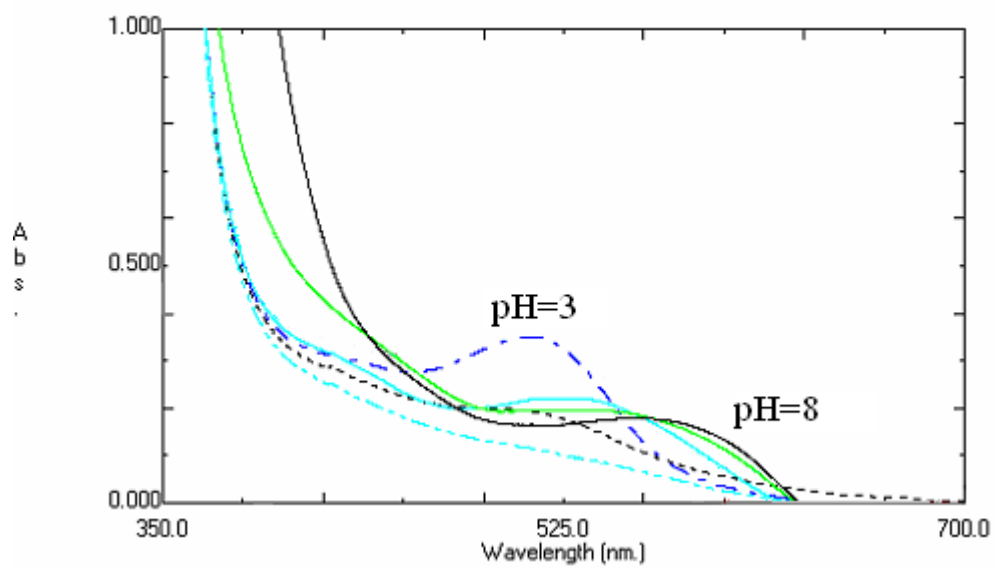


圖 3-7 在不同 pH 值下粗萃取花青素吸光光譜圖
(由左至右分別為在 pH=3、4、5、6、7、8 下之吸光光譜)

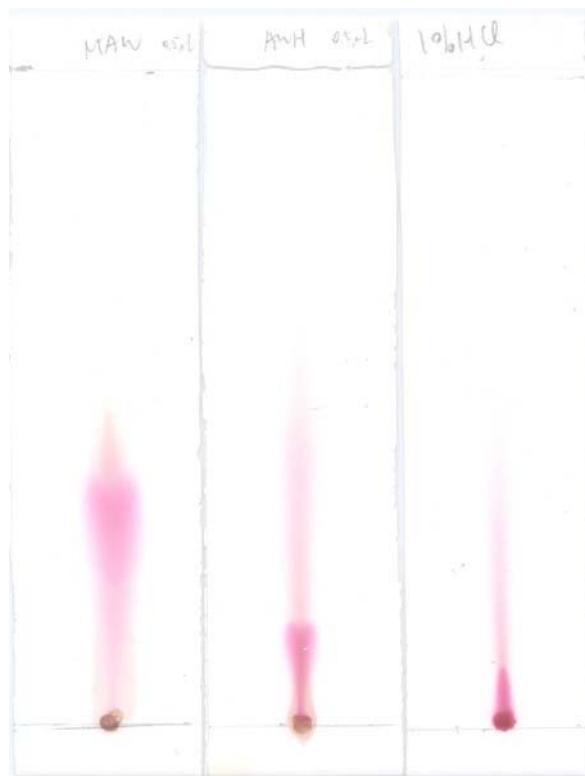


圖 3-8 愛玉子果托花青素纖維素薄層層析圖(展開系統由左自右分別為 MAW、AWH 與 1%HCl)



圖 3-9 愛玉子果托花青素纖維素薄層層析圖(展開系統為 MAW, 左側為經 XAD-7 管柱及濾紙純化, 右側只經過 XAD-7 管柱)

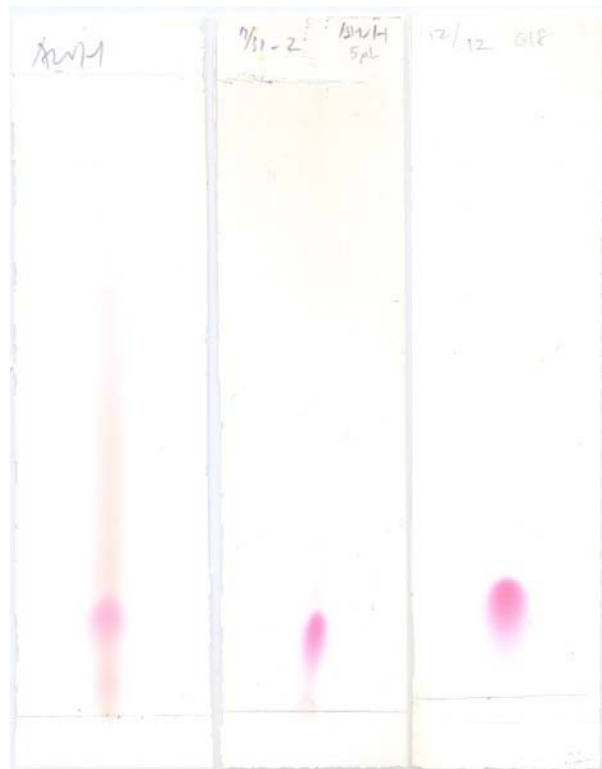


圖 3-10 愛玉子果托花青素纖維素薄層層析圖(展開系統為 MAW，由左至右依序為：只經 XAD-7 管柱純化、再經濾紙純化以及再經半製備管柱純化)

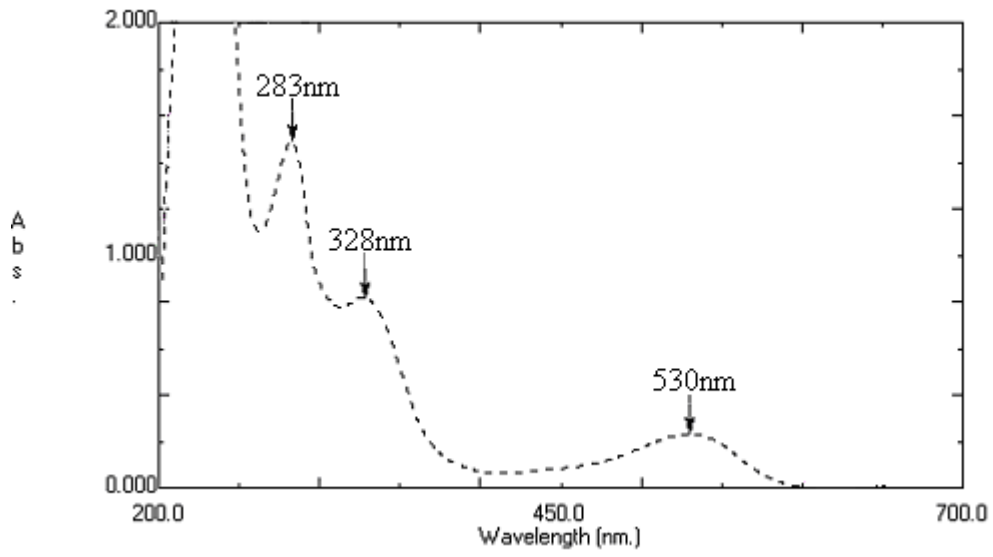


圖 3-11 粗萃取花青素吸光光譜圖

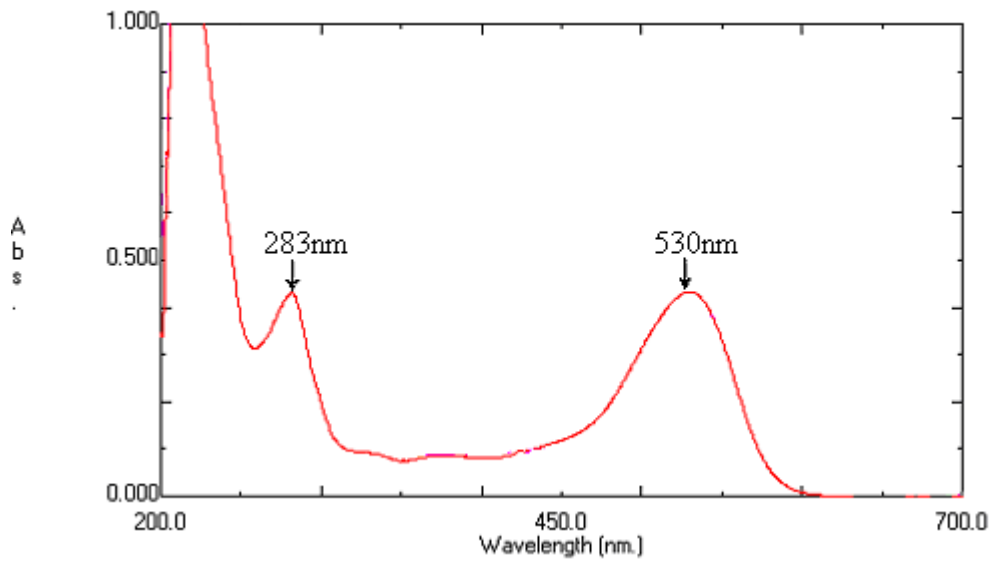


圖 3-12 濾紙純化後之花青素吸光光譜圖

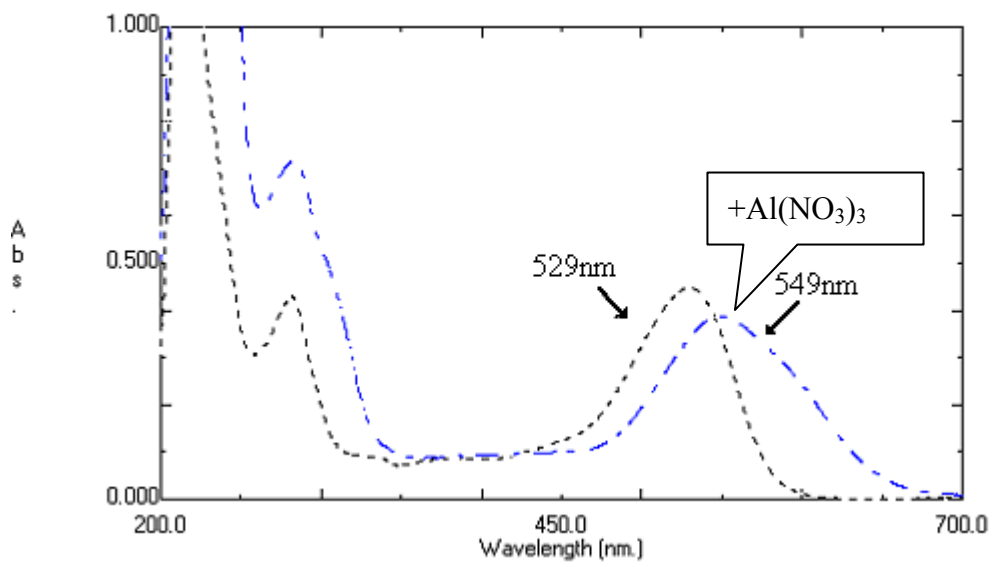


圖 3-13 與氯化鋁反應前後花青素吸光光譜圖

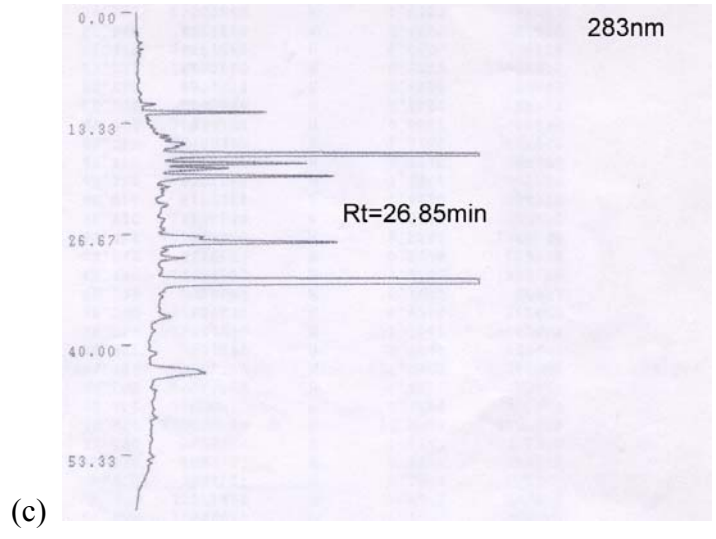
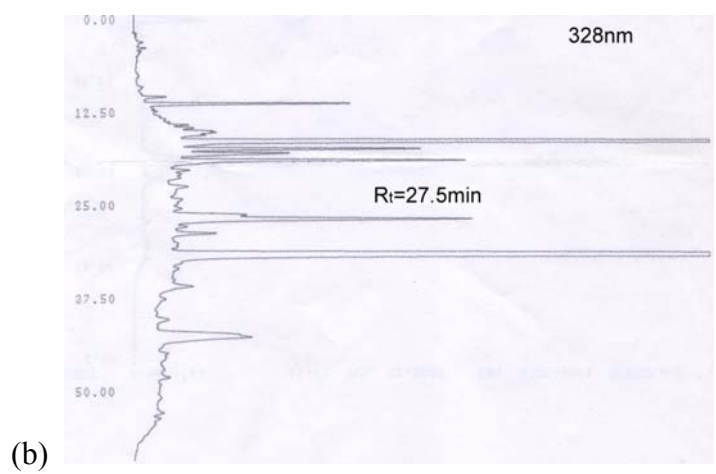
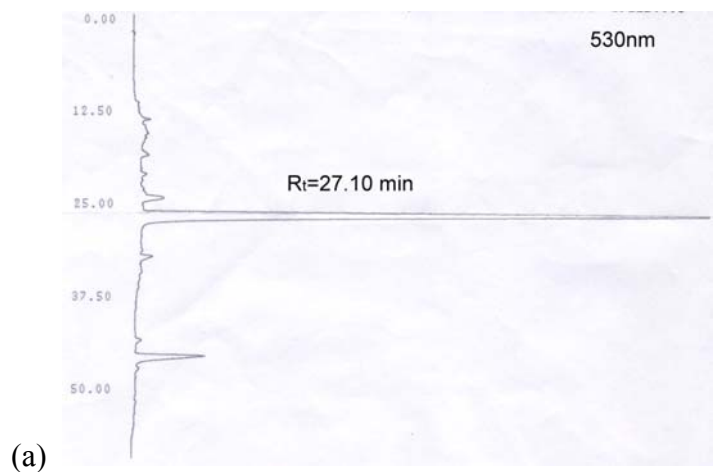


圖 3-14 在不同偵測波長下只經 XAD-7 管柱純化花青素之 HPLC 圖譜
(a)530nm (b) 328nm (c) 283nm

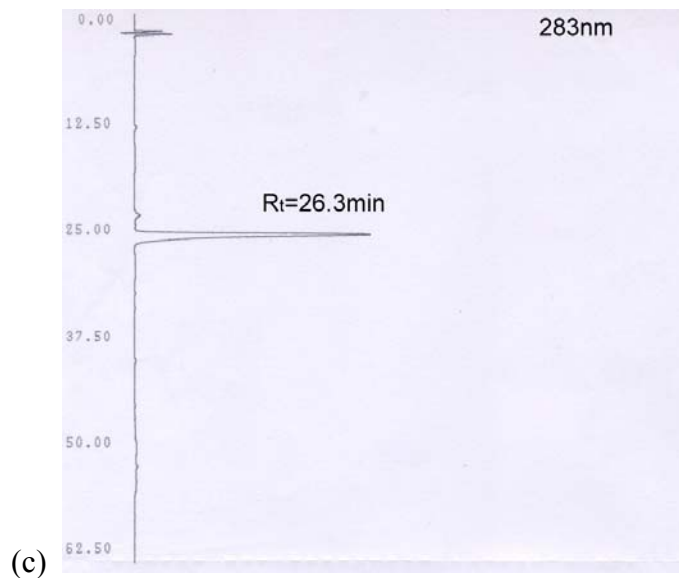
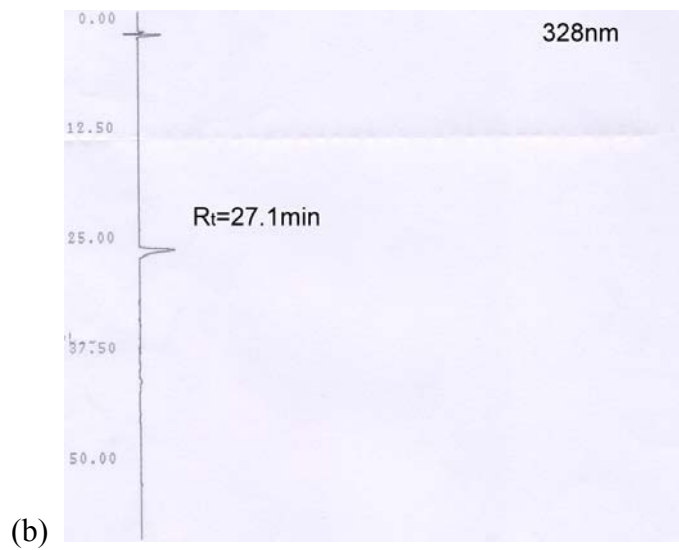
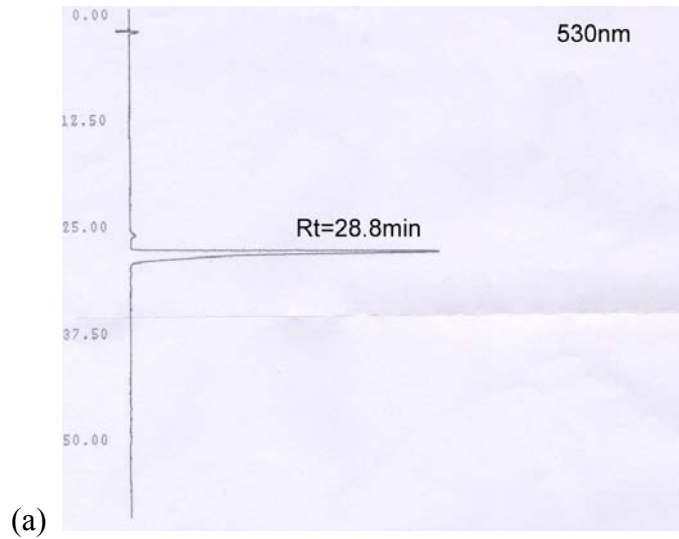


圖 3-15 在不同偵測波長下經濾紙純化花青素之 HPLC 圖譜
(a)530nm (b) 328nm (c) 283nm

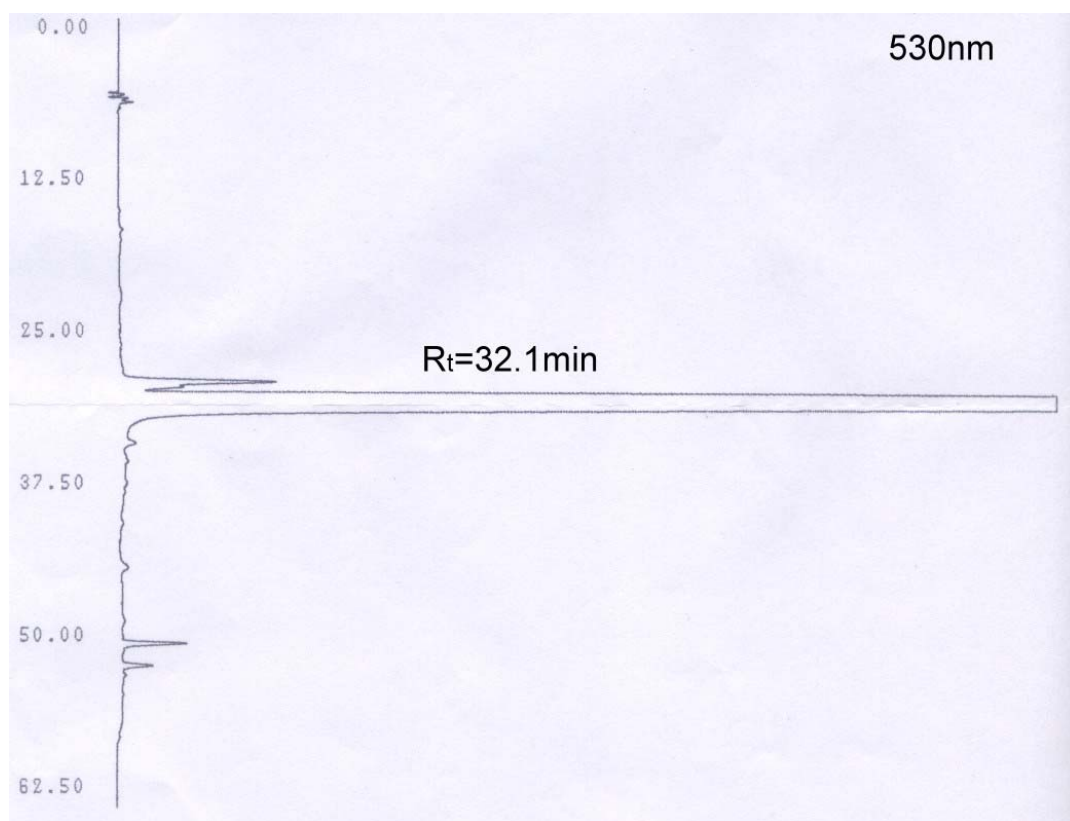


圖 3-16 在波長 530nm 下經濾紙純化花青素之半製備 HPLC 圖譜

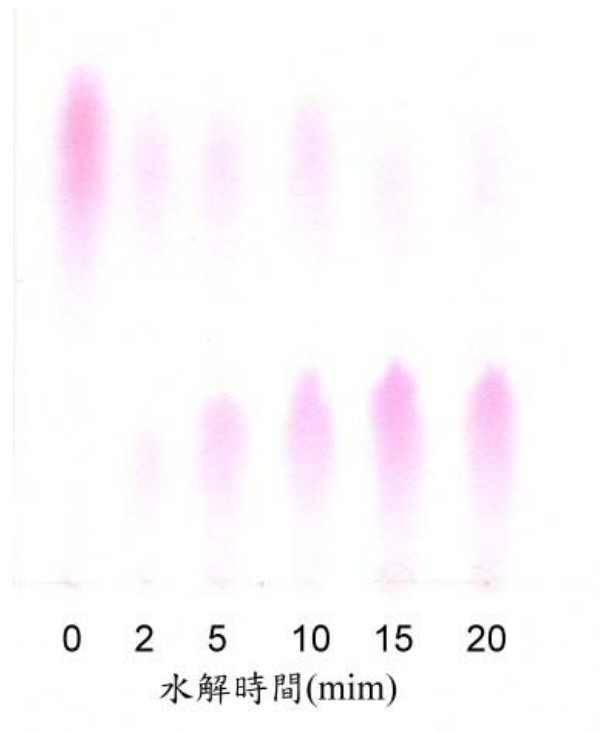


圖 3-17 花青素部分水解圖

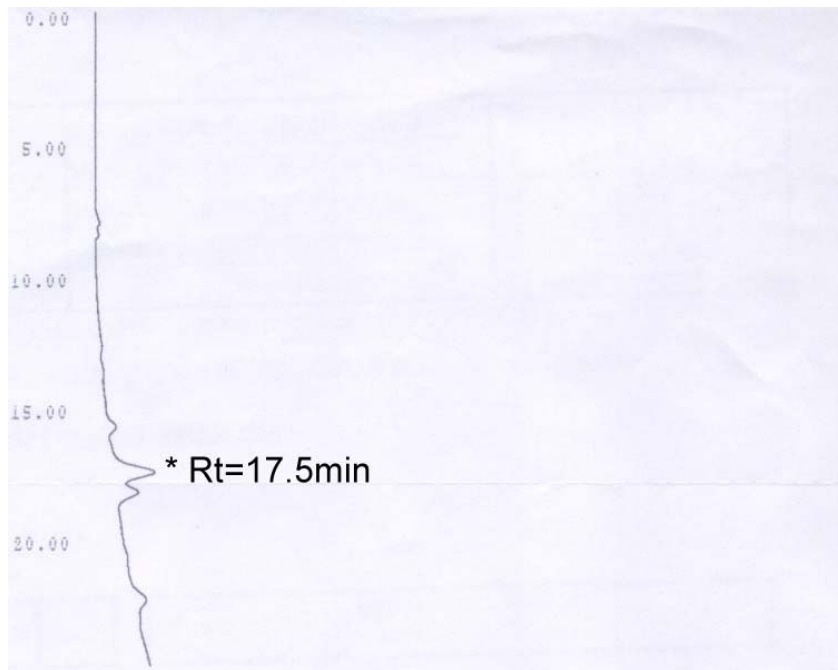


圖 3-18 酸水解物之糖類 HPLC 圖譜

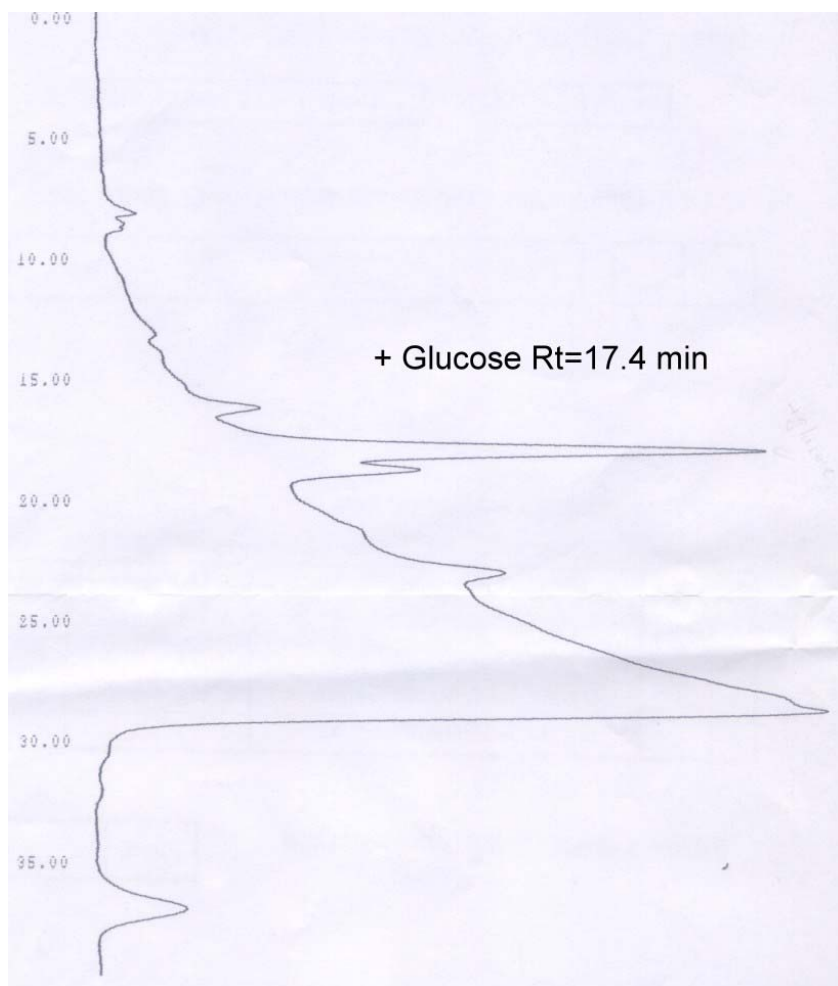


圖 3-19 酸水解物與葡萄糖共注射之糖類 HPLC 圖譜

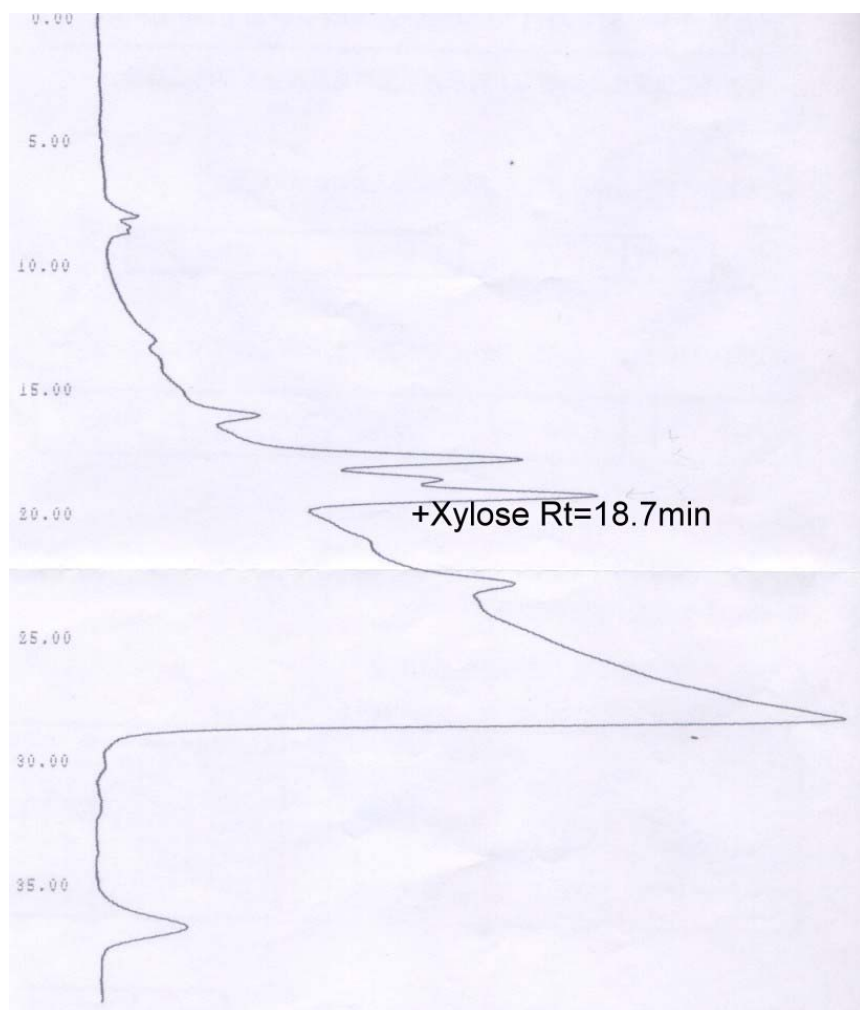


圖 3-20 酸水解物與木糖共注射之糖類 HPLC 圖譜

表 3-3 愛玉子果托花青素之糖類HPLC滯留時間分析表

	滯留時間(分)				
	Glu	Xyl	Gal	Ara	Man
標準品	16.7	18.1	19.7	21.9	23.7
酸水解物	17.5	-	-	-	-
酸水解物+Glu	17.4	-	-	-	-
酸水解物+Xyl	17.5	18.7	-	-	-

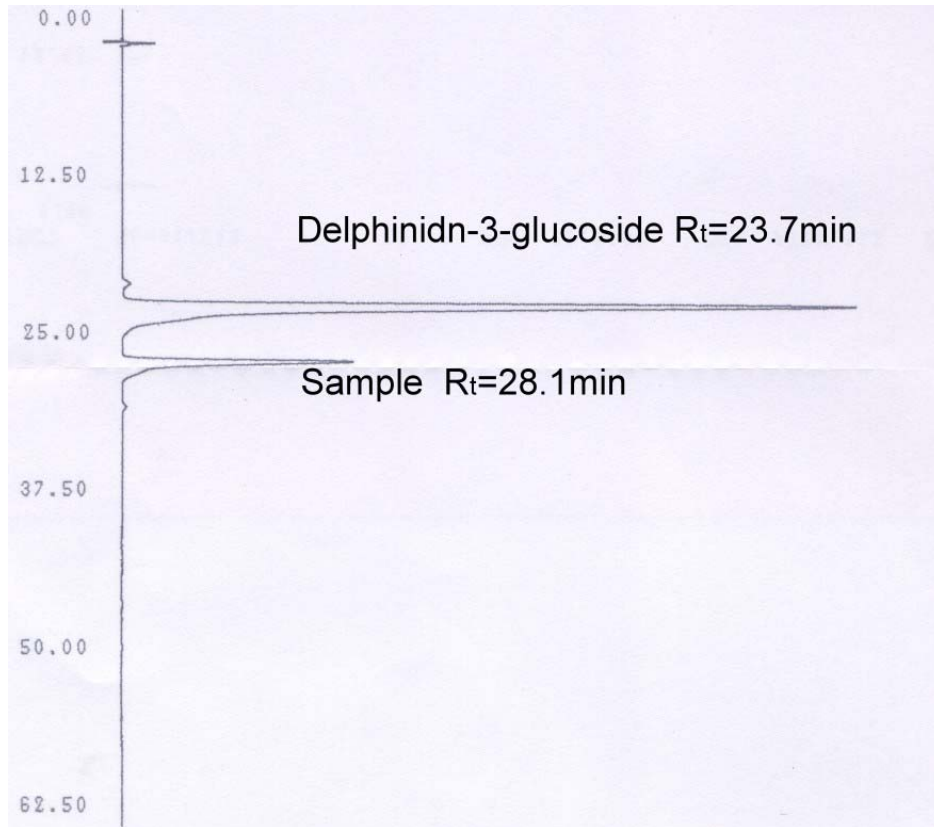


圖 3-21 愛玉子果托花青素與 Delphinidin-3-glucoside 共注射之 HPLC 圖譜

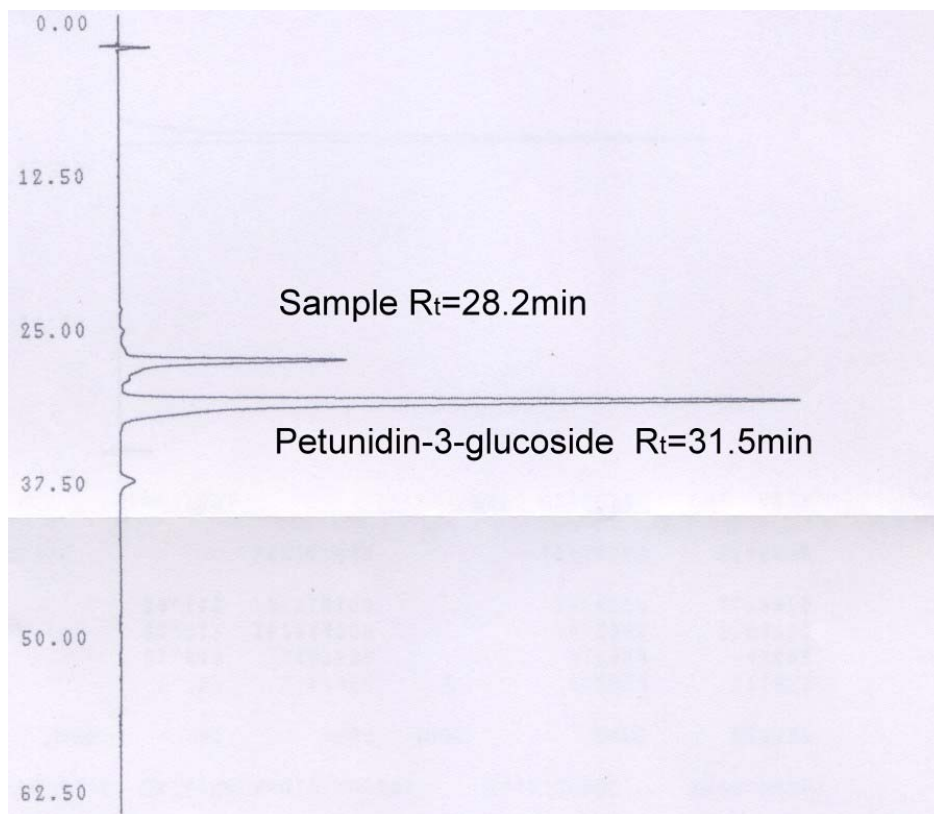


圖 3-22 愛玉子果托花青素與 Petunidin-3-glucoside 共注射之 HPLC 圖譜

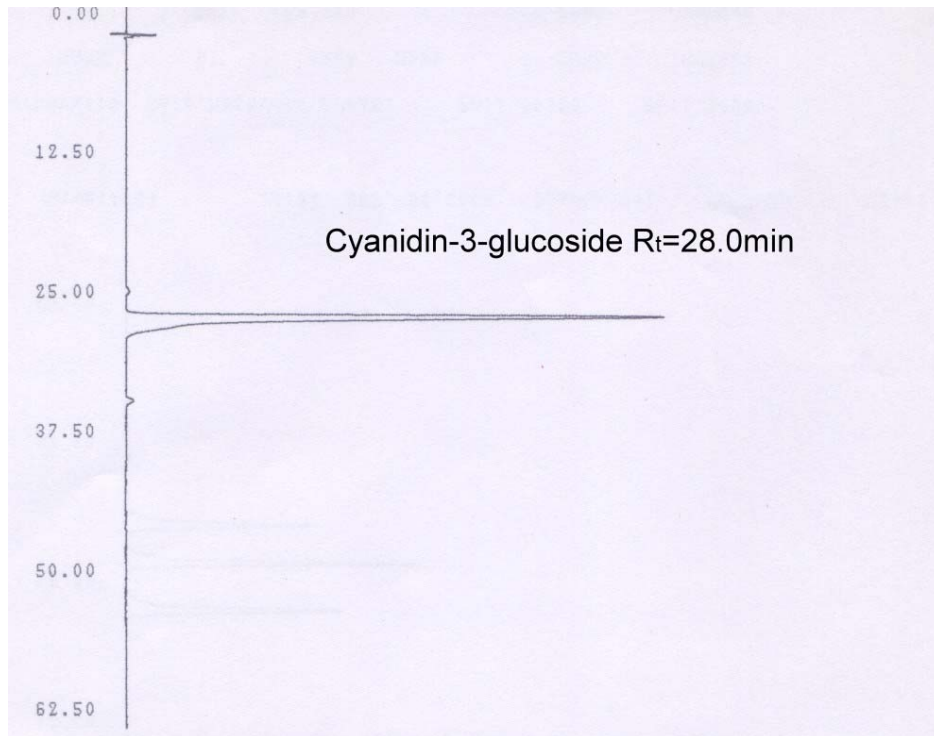


圖 3-23 愛玉子果托花青素與 Cyanidin-3-glucoside 共注射之 HPLC 圖譜

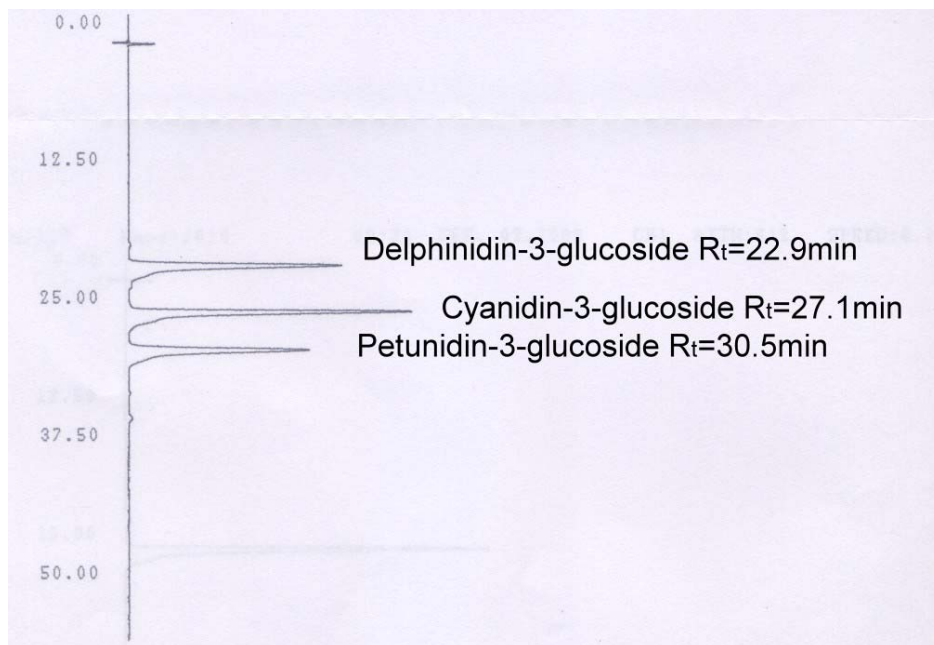


圖 3-24 愛玉子果托花青素與 Cyanidin-3-glucoside、Delphinidin-3-glucoside 與 Pelargonidin-3-glucoside 共注射之 HPLC 圖譜

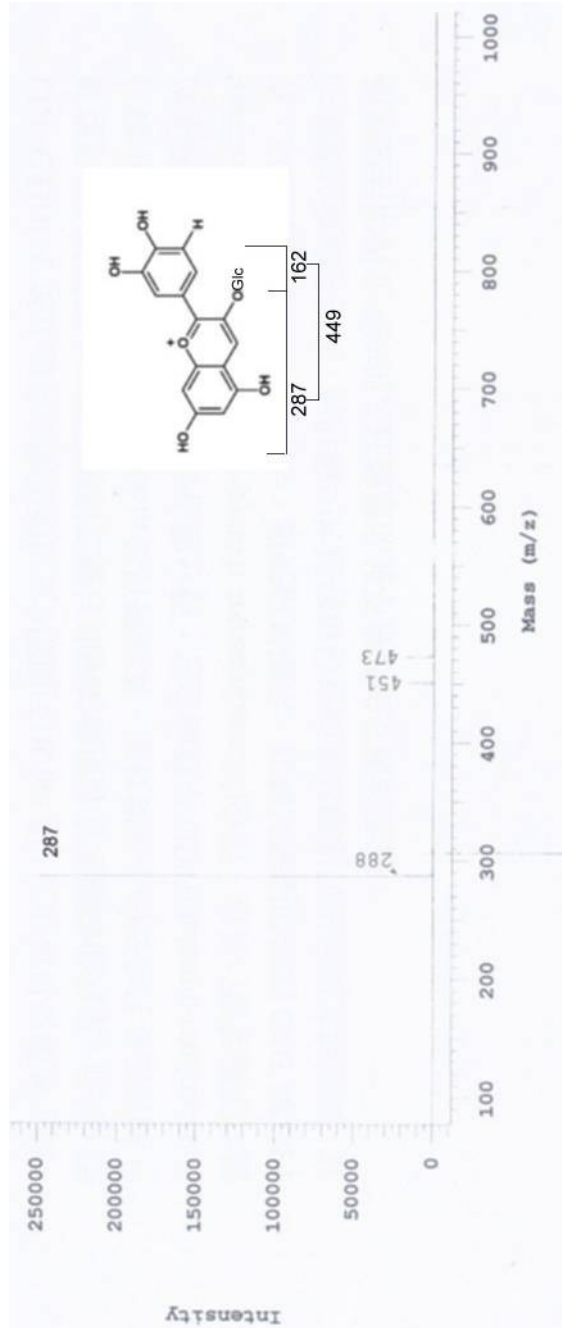


圖 3-25 愛玉子果托花青素之圖 LC-MS 圖譜

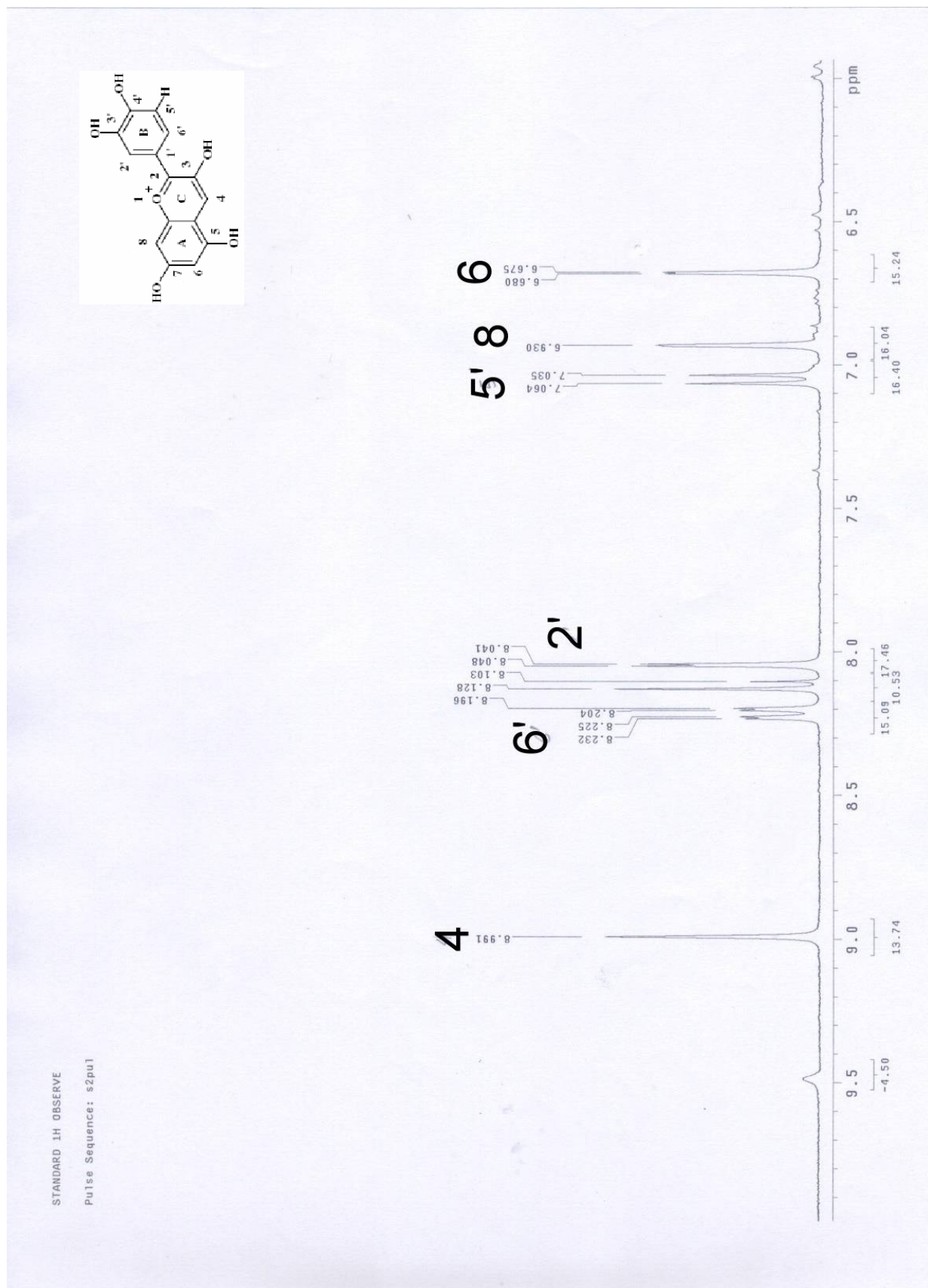


圖 3-26 愛玉子果托花青素之 ¹H-NMR 圖譜

四、討論

與先前之文獻(李, 2000)相較，瘦果的水分、灰分及粗脂肪含量較低，惟粗蛋白含量較高。造成差異之原因應為材料來源不同所致：李(2000)所使用之愛玉子產自嘉義，本研究所使用之愛玉子產自南投。果托之水分含量有極大之差異是由於文獻使用已經乾燥處理之果托，與本研究所使用之新鮮果托有所不同(表 4-1)。

與已知文獻(Chua et al, 2008)相比，愛玉子瘦果中主要脂肪酸種類相同，均為次亞麻油酸、亞麻油酸、油酸、棕櫚酸以及硬脂酸，惟各種脂肪酸之含量百分比略有差異(表 4-2)。若與他種植物油(表 1-2)相比，愛玉子瘦果脂肪酸含有豐富之次亞麻油酸(占 65.64%)，因此在安全無虞之狀況下，愛玉子瘦果可開發用以榨取次亞麻油酸。

以硫氰酸鐵法評估瘦果之溶劑萃取物之抗氧化力，以甲醇萃取物有最佳之抗氧化效果，且 DPPH 自由基清除率可達到 96%。而 TEAC 當量與總酚類含量亦是三者之中最高者，故更進一步以 HPLC 分析。由 HPLC 圖譜可知甲醇萃取物含有多種多酚類與類黃酮化合物，尚需搭配適合之標準品方可定性與定量。甲醇萃取物有開發作為天然抗氧化劑之潛力，惟產率不高，僅有 7.7%。

在不同 pH 值下，自愛玉子果托中萃取出之紅色物物質會隨之改變，證明此紅色物質為花青素而非其他種類(如胡蘿蔔素、甜菜苷等)之色素。花青素之結構特性可由光譜學上之資料獲得，包括呈色團之特性、醣分子鍵結之位置以及是否被芳香族有機酸醞化(Harborne, 1958)。花青素粗萃取液經全光譜掃描，得到三個具較高吸光值之波峰，分別為可見光區之 520nm 以及紫外光區之 283nm 及 328nm，接下來之花青素 HPLC 分析以此三種波長來偵測，並判斷萃取物之純度，發現雖然粗萃取物雖已經 XAD-7 管柱純化，其中花青素含量不低，但是在主要波峰前後伴隨不少不明物質所造成之波峰，因此粗萃取液仍須經由濾紙層析，以進一步去除花青素以外之雜質。

表 4-1 愛玉子基本成分分析比較表

部位	水分 (%)	粗脂肪 (%)	粗蛋白 (%)	灰分 (%)	參考文獻
瘦果	6.38±0.02	10.46±0.07	12.74±0.69	2.15±0.03	本研究
果托	80.74±2.40	4.34±0.08	4.58±0.46	11.73±0.06	本研究
瘦果	7.52	12.34	6.95	3.28	李(2000)
果托	11.98	1.84	3.30	10.50	李(2000)

表 4-2 愛玉子瘦果脂肪酸成分分析比較表

脂肪酸種類	含量(%)	含量(%)
參考文獻	本研究	(Chua <i>et al</i> , 2008)
次亞麻油酸	65.64	62.65
亞麻油酸	20.29	18.24
油酸	6.85	10.62
棕櫚酸	5.95	5.33
硬脂酸	1.26	2.05

取經由濾紙層析之花青素再次進行全光譜掃描，波長 328nm 處不再有吸收峰出現，再以 HPLC 分析，濾紙層析確實將花青素以外之雜質去除，達到純化花青素之效果。而純化之愛玉子果托花青素在波長 328nm 處不再有吸收峰，表示此花青素結構上並未被芳香族有機酸醯化，而 $E_{440}/E_{vis\ max}$ 之比值為 25。Harbone(1958)之數據指出，當 $E_{440}/E_{vis\ max}$ 之比值為 24 時，表示 cyanidin 在 C-3 位置上有糖基取代。

將硫酸鋁加入經層析純化之花青素，花青素甲醇溶液之顏色由紅色轉變為紫色(λ_{max} 由 520nm 偏移至 549nm)，顯示花青素之 B 環上含有兩相鄰之氫氧基，故呈色團(aglycone)應為 cyanidin, delphinidin 或 petunidin 三者其中之一。將花青素粗萃取液點於纖維素層析板上，分別以 AWH、MAW 及 1%HCl 為展開液進行層析。發現 AWH 之展開效果較佳，故選擇此溶劑系統進行濾紙層析。將花青素粗萃取液劃於 3mm 濾紙上，以 AWH 為展開液進行濾紙層析。再將含有花青素之色帶自濾紙上剪下，以含有 0.01% HCl 之甲醇將花青素回收，再以 HPLC 檢測樣品的純度，濾紙層析確實將花青素以外之雜質去除。

花青素經由部分水解，只能被水解成兩點，確認花青素結構上只接有一糖分子，結果與楊(1995)符合。糖基鑑定方面，由標準品共注射以及與標準品比對其滯留時間，判定該糖類為葡萄糖。

將愛玉果托花青素與花青素標準品(cyanidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside 與 petunidin-3-glucoside)分別注射入 HPLC，比對其滯留時間，判定花青素應為 cyaniding-3-glucoside。

由 LC-MS 質譜之斷裂峰[M-glucose residue]⁺ 為 287。由斷裂峰可以確認此花青素之呈色團為 cyanidin(分子量為 287)，與文獻值([M-glucose residue]⁺=287)(楊,1995; Duenas *et al*,2008)相符。由 ¹H-NMR 圖譜可以確認愛玉果托花青素之呈色團為 cyanidin。

五、結論

- 1、愛玉子瘦果中之脂肪酸含量占瘦果總重之 10%左右，其中單元不飽和脂肪酸佔 6.85%，多元不飽和脂肪酸佔 85.93%，各類脂肪酸之含量以次亞麻油酸佔 65.64%為最高，其次為亞麻油酸，含量佔 20.29%，佔第三多者為油酸，含量僅 6.85%。
- 2、愛玉子果托中所含有之花青素，經過萃取、層析與 HPLC 純化，得到一主要花青素色帶，將此色帶以光譜分析、酸水解、與花青素標準品比對、液相層析-質譜與核磁共振圖譜分析，確認此花青素為 cyanidin-3-glucoside。
- 3、將愛玉子瘦果以正己烷、乙酸乙酯與甲醇萃取，三種萃取物均具有抗氧化能力，惟甲醇萃取物不論在抗氧化力、DPPH 自由基清除率、TEAC assay 及總多酚含量均較其他兩種萃取物為高。
- 4、本研究發掘了在愛玉子加工過程中，往昔被視為廢棄物之瘦果與果托之功能性成分，期望這些成果可供作為開發愛玉子新用途之參考。

參考文獻

李柏宏 (2000). 愛玉子凝膠性質及愛玉凍品質之研究. 國立台灣大學農業化學研究所博士論文.

邱年永 (1988). 愛玉子. 原色臺灣藥用植物圖誌. 南天圖書出版社.

林讚標 (1991). 愛玉子專論. 林業叢刊 36. 臺灣省林業實驗所.

張佳惠 (2005). 愛玉瘦果中多胜肽區分之抗腫瘤及免疫調節作用. 國立臺灣大學食品科技研究所博士論文.

楊正憲 (1995). 桑葚, 紅皮甘藷花色苷之研究與花色苷之氧化與抗氧化之探討. 東海大學食品科學研究所碩士論文

賴盈璋 (1997). 愛玉子果膠酯酶所催化轉醯基反應與愛玉子瘦果中所存在抑制劑之探討. 國立台灣大學農業化學研究所碩士論文.

賴盈璋 (2008). 愛玉子瘦果殘渣水草物功能性質之研究. 國立臺灣大學食品科技研究所博士論文

蘇正德, & 陳雅瑛 (1991). 省產稻米外殼抗氧化性之研究調查. 東海學報, 32, 719-730.

Abdulkarim, S. M., Long, K., Lai, O. M., Muhammad, S. K. S., & Ghazali, H. M. (2007). Frying quality and stability of high-oleic *Moringa oleifera* seed oil in comparison with other vegetable oils. *Food Chem.*, 105, 1382-1389.

Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica. Chimica. Acta.*, 306, 1-17.

Ajayi, I. A., Oderinde, R. A., Ogunkoya, B. O., Egunyomi, A., & Taiwo V.O. (2007). Chemical analysis and preliminary toxicological evaluation of *Garcinia mangostana* seeds and seed oil. *Food Chem*, 101, 999-1004.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915-7922.

- Arnao, M. B., Cano, A., Hernadez-Ruiz, J., Carcia-Canovas, F., & Acosta, M. (1996). Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of 2,2'-azino-bis (3-ethylbiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase : a new approach for determining total antioxidant statues of food. *Analy. Biochem.*, *236*, 255-261.
- Aruoma, O. I. (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, *75*, 199–212.
- Askin, M. A., Balta, M. F., Tekintas, F. E., Kazankaya, A., & Balta, F. (2007). Fatty acid composition affected by kernel weight in almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.] genetic resources. *J. Food Compost. Anal.*, *20*, 7-12.
- Bozan, B., & Temelli, F. (2008). Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresour. Technol.*, *99*, 6354-6359.
- Bruce N. Ames, Mark K. Shigenaga, & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*, 7915-7922.
- Cao, X., & Ito, Y. (2003). Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.*, *1021*, 117-124.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, *49*, 481-493.
- Chua, A. C., Chou, W. M., Chyan, C. L., & Tzen, J. T. (2007). Purification, cloning, and identification of two thaumatin-like protein isoforms in jelly fig (*Ficus awkeotsang*) Achenes. *J. Agric. Food Chem.*, *55*(18), 7602-7608.
- Chua, A. C., Hsiao, E. S., Yang, Y. C., Lin, L. J., Chou, W. M., & Tzen, J. T. (2008). Gene families encoding 11S globulin and 2S albumin isoforms of jelly fig (*Ficus awkeotsang*) Achenes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *72*(2), 506-513.
- Chua, A. C., Jiang, P. L., Shi, L. S., Chou, W. M., & Tzen, J. T. (2008). Characterization of oil bodies in jelly fig achenes. *Plant Physiol. Biochem.*, *46*(5-6), 525-532.

- Cooke, D., Steward, W. P., Gescher, A. J., & Marczyklo, T. (2005). Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Eur. J. Cancer.*, *41*, 1931-1940.
- Ding, J. L., Hsu, J. S., Wang, M. M., & Tzen, J. T. (2002). Purification and glycosylation analysis of an acidic pectin methylesterase in jelly fig (*Ficus awkeotsang*) achenes. *J. Agric. Food Chem.*, *50*(10), 2920-2925.
- Ding, J. L., Lee, T. T., Wang, M. M., Tai, S. S., & Tzen, J. T. (2000). Cloning and expression of an acidic pectin methylesterase from jelly fig (*Ficus awkeotsang*). *J. Agric. Food Chem.*, *48*(7), 3052-3057.
- Duenas, M., Perez-Alonso, J. J., Santos-Buelga, C., & Escribano-BailonTeresa (2008). Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.). *J. Food Compost. Anal.*, *21*, 107-115.
- Francis, F. J., & Harborne, J. B. (1966). Anthocyanins of the Garden Huckleberry, *Solanum guineense*. *J. Food Sci.*, *31*(4), 524-528.
- Fukuda, Y., Nagata, M., Osawa, T., & Namiki, M. (1986). Contribution of lignan analogs to antioxidative activity of refined unroasted sesame seed oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, *63*(8), 1027-1031.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., & Scaccini, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.*, *46*(2), 361-367.
- Giannelos, P. N., Sxizas, S., Lois, E., Zannikos, F., & AnastopoulosG. (2005). Physical, chemical and fuel related properties of tomato seed oil for evaluating its direct use in diesel engines. *Ind. Crop Prod.*, *22*, 193-199.
- Giusti, M. M., Ghanadan, H., Wrolstad, R.E., (1998). Elucidation of the structure and conformation of red radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *J. Agric. Food Chem.*, *46*, 4858-4863.

- Haiyan, Z., Bedgood Jr., D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils. *Food Chem*, *100*, 1544-1551.
- Harborne, J. B. (1958). The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *J Chrom*, *1*, 473-488.
- Harris, W. S. (2008). Linoleic acid and coronary heart disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, *79*, 169-171.
- Harris, W. S., Poston, W. C., & Haddock, C. K. (2007). Tissue n-3 and n-6 fatty acids and risk for coronary heart disease events. *Atherosclerosis*, *193*, 1-10.
- Hong, V., & Wrolstad, R. E. (1990). Use of HPLC Separation/Photodiode Array Detection for Characterization of Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, *38*, 708-715.
- Hosseinian, F. S., Li, W., & Beta, T. (2008). Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chem*, *109*, 916-924.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, *64*, 923-933.
- Liendo, R., Padilla, F. C., & Quintana, A. (1998). Characterization of cocoa butter extracted from Criollo cultivars of *Theobroma cacao* L. *Food Res. Intern.*, *30*(9), 727-731.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, *424*, 83-95.
- Martínez, M. L., Mattea, M. A., & Maestri, D. M. (2006). Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, *83*, 791-796.
- Mehmood, S., Orhan, I., Ahsan, Z., Aslan, S., & Gulfraz, M. (2008). Fatty acid composition of seed oil of different *Sorghum bicolor* varieties. *Food Chem.*, *109*, 855-859.

- Miller, L. N., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci*, *84*, 407-412.
- Mitsuda, H., Yuasumoto, K., & Iwami, K. (1966). Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*, *19*, 210-214.
- Mitsuru, W., Yasuo, O., & Tojiro, T. (1997). Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) hulls. *J. Agric. Food Chem.*, *45*(4), 1039-1044.
- Morrissey, P. A., & O'Brien, N. M. (1998). Dietary antioxidants in health and disease. *Int. Dairy Journal*, *8*, 463-472.
- Niki, E. (1992). Active oxygens and free radicals in biology. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, *41*, 379-390.
- O'zkal, S. G., Yener, M. E., & Bayındırlı, L. (2005). Response surfaces of apricot kernel oil yield in supercritical carbon dioxide. *LWT*, *38*, 611-616.
- Obi, F., Usenu, I., & Osayande, J. (1998). Prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat by *H. rosasinensis* anthocyanin extract administered in ethanol. *Toxicol.*, *131*, 93-98.
- Osawa, T. (1999). Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Mech. Ageing Dev.* *III*, 133-139.
- Peiretti, P. G., & Gai, I. F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Ani. Feed Sci. and Tech.*, *148*, 267-275.
- Peng, C. C., Hsiao, E. S., Ding, J. L., & Tzen, J. T. (2005). Functional expression in pichia pastoris of an acidic pectin methylesterase from jelly fig (*Ficus awkeotsang*). *J. Agric. Food Chem.*, *53*(14), 5612-5616.
- Pratt, D. E., & Miller, E. E. (1984). A Flavonid Antioxidant in Spanish Peanuts. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, *61*(6), 1064-1068.

- Revilla, I., Pe´rez-Magarin˜ o, S., Gonza´lez-SanJose´, M.L., Beltra´n, S., (1999). Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 847(83-90).
- Samman, S., Chow, J. W. Y., Foster, M. J., Ahmad, Z. I., Phuyal, J. L., & Petocz, P. (2008). Fatty acid composition of edible oils derived from certified organic and conventional agricultural methods. *Food Chem.*, 109, 670-674.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 945-948.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 199, 152-178.
- Tseng, Y. H., Yang, J. H., Chang, H. L., Lee, Y. L., & Mau, J. L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Monascal adlay*. *Food Chem.*, 97, 375-381.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1–40.
- Whitney S, Monica G, Julia, B. M., Black Paul N. , & C., D. C. (2008). Dietary polyunsaturated fatty acids (C18:2 ω6 and C18:3 ω3) do not suppress hepatic lipogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1781, 406–414.
- Wu, X., & Prior, R. L. (2005). Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States:fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2589-2599.
- Yen, G. C., Duh, P. D., & Su, H. J. (2005). Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. *Food Chem*, 89, 379-385.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 422-433.

Yoshimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, M., & Yamada, J. (1999). Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 63(3).

Zhou, Z., Blanchard, C., Helliwell, S., & Robards, K. (2003). Fatty acid composition of three rice varieties following storage
J. Cereal Sci, 37, 327-335.