更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

食品藥物研究年報. 5 : 17-25 2014
Ann. Rept. Food Drug Res. 5 : 17-25 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

陳瑋芸　蔡沁玹　江峻蔚　吳白玟　曾素香　高雅敏　闕麗卿　施養志

食品藥物管理署研究檢驗組

摘　要

葉黃素及玉米黃素可避免老年性黃斑病變(age-related macular degeneration, AMD)。在調查市售膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素之含量時，為能提高檢驗效率並同時分析二種待測物，本研究擬建立以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)搭配光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)同步分析膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素含量之檢驗方法。檢體以丙酮：去離子水溶液超音波振盪萃取，加入20%氫氧化鉀酒精溶液進行皂化，經0.2% BHT之乙醚-乙酸乙酯溶液進行液/液萃取，合併上層液經減壓濃縮後，殘留物以乙醇-乙酸乙酯溶液溶解並定容，再以HPLC進行分析。使用之層析管柱為Ascentis® RP-Amide，移動相溶液為乙腈與去離子水以95:5 (v/v)之比例混合，流速為1 mL/min，檢測波長為450 nm。經實驗分析後，葉黃素及玉米黃素標準曲線之線性範圍均為0.1-100 μg/mL，線性回歸方程式之判定係數(R^2)分別為0.9993及0.9959。接著進行添加回收試驗，將已知濃度的標準品添加至粉狀基質及沙拉油基質後，求得葉黃素及玉米黃素於粉狀基質之回收率介於77.4-95.4%之間，添加回收率之相對標準偏差則介於3.2-6.0%之間；葉黃素及玉米黃素於沙拉油基質之回收率介於86.1-124.6%之間，添加回收率之相對標準偏差則介於8.5-11.1%之間。進一步分析葉黃素及玉米黃素之定量極限濃度，由實驗結果得知葉黃素及玉米黃素於粉狀基質之定量極限為125 mg/kg，於沙拉油基質之定量極限為625 mg/kg。

關鍵詞：膠囊錠狀食品、酯化型葉黃素、酯化型玉米黃素、皂化、高效液相層析法

前　言

目前已知自然界中有700多種類胡蘿蔔素，僅有40種類胡蘿蔔素可以被人體吸收、代謝或使用[1]。類胡蘿蔔素以番茄紅素(lycopene)、α-胡蘿蔔素(α-carotene)、β-胡蘿蔔素(β-carotene)、葉黃素(lutein)及玉米黃素(zeaxanthin)最被大眾熟知[2]，其主要攝取來源為深色葉菜、水果及蛋黃[3-5]。

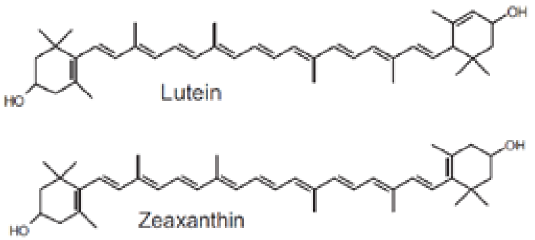
葉黃素及玉米黃素屬於類葉黃素(xanthophylls)，此類化合物以40個碳原子為主要架構，並連接含氧官能基[6]。葉黃素及玉米黃素高度集中於眼睛的黃斑區，可以過濾光線中的藍光，避免老年性黃斑病變[7]；且具強抗氧化能力，能清除單態氧及自由基，能減少自由基攻擊水晶體之蛋白質，避免水晶體之蛋白質沈澱，減少白內障產生機會。此外，葉黃素及玉米黃素也能減少動脈硬化危機，預防心臟病、中風[8-10]、抑制發炎反應[11]。

由於天然類葉黃素含有羥基(hydroxyl

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

group)，可以與脂肪酸鍵結形成酯鍵。因此，市售營養補充劑所含之葉黃素及玉米黃素型態可分成二種：「游離型」(free form)」及「酯化型(ester form)」。而市售葉黃素產品所添加之葉黃素型態常標示不明確[12]，且目前並無酯化型葉黃素或酯化型玉米黃素之標準品可以直接檢測酯類型態之葉黃素或玉米黃素，因此檢測時，須進行皂化，以去除脂質、葉綠素和含氧的類胡蘿蔔素酯化物[13]，以免低估其含量。此外，葉黃素及玉米黃素因具有長鏈的不飽和共軛雙鍵，易受高溫、光線、氧氣、pH值及助氧化劑(鐵和銅)影響，而發生自氧化、裂解或異構化之情況[14-15]。實驗時，為了提高實驗中葉黃素與玉米黃素的回收率，可添加抗氧化劑，並於萃取步驟充份的混勻及使用溶劑重複萃取[16-17]。

目前我國准用之類葉黃素包含葉黃素與玉米黃素2種，其化學結構如圖一[18]。依食品添加物使用範圍及限量暨規格標準之規定，其型態屬膠囊狀、錠狀且標示有每日食用限量之食品，其玉米黃素之總含量不得高於10 mg，葉黃素之總含量不得高於30 mg。而其他一般食品，在每日食用量或每300 g食品(未標示每日食用量者)中，葉黃素之總含量不得高於9 mg(表一)。因近年3C產品盛行及國人保健意識抬頭，葉黃素及玉米黃素頗受重視，本署目前僅就葉黃素公開建議檢驗方法，由於葉黃素於甲醇之溶解度僅有200 mg/L，必須使用大量甲醇才能完全回溶萃取而得之葉黃素，因此本研究除解決前述問題外，並參考Sarkar 2012年發表文獻[19]之皂化條件，擬建立以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)搭配光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)同步分析膠囊錠狀食品中總葉黃素及總玉米黃素含量之檢驗方法。



圖一、類胡蘿蔔素之化學結構

材料與方法

一、檢體來源

於102年間，至臺北地區各大賣場購買標示葉黃素及玉米黃素之膠囊食品16件，錠狀食品2件，及未標示葉黃素及玉米黃素之膠囊產品1件，共計19件檢體。

二、試驗藥品

㈠試藥溶劑

乙酸乙酯、四氫呋喃及乙腈採用液相層析級，二丁基羥基甲苯(dibutyl hydroxy-toluene，BHT)、氫氧化鉀及酚酞指示劑採用化學試藥特級，皆購自德國Merck公

表一、食品添加物第(八)類營養添加劑使用範圍及限量暨規格標準

項次	中文品名	英文品名	使用食品範圍及限量	使用限制
1	合成玉米黃素	Synthetic zeaxanthin	型態屬膠囊狀、錠狀且標示有每日食用限量之食品，在每日食用量中，其zeaxanthin之總含量不得高於10 mg	限於補充食品中不足之營養素時使用。
2	葉黃素	Lutein	1. 型態屬膠囊狀、錠狀且標示有每日食用限量之食品，在每日食用量中，其lutein之總含量不得高於30 mg 2. 其他一般食品，在每日食用量或每300 g食品(未標示每日食用量者)中，其lutein之總含量不得高於9 mg	限於補充食品中不足之營養素時使用。

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

司(Darmstadt, Germany)。無水乙醇購自景明化工公司。乙醚採用化學試藥特級，購自長雅科技有限公司。丙酮採用液相層析級，購自友和貿易股份有限公司。

㈡對照用標準品

葉黃素(lutein)純度為99%以上，玉米黃素(zeaxanthin)純度為74.5%，均購自美國ChromaDex公司(Irvine, CA, USA)。

三、器具

㈠容量瓶：1 mL、5 mL及25 mL，褐色
㈡褐色樣品瓶：50 mL，附瓶蓋
㈢分液漏斗：125 mL，褐色
㈣離心管：50 mL，PP材質
㈤針筒：1 mL，PP材質，無針
㈥針筒式濾頭(syringe filter)：孔徑0.22 μm，聚氟化二乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)材質

四、儀器設備

㈠旋渦混合器(VORTEX GENIE-2, Scientific Industries, USA)
㈡超音波震盪器(Delta Sonicator DC300H，力明儀器有限公司，台灣)
㈢往復式振盪恒溫水槽(RECIPROCAL SHAKING BATHS SB301，雙鷹企業有限公司，台灣)
㈣高速組織研磨振盪均質機(Geno/Grinder®, SPEX SamplePrep, USA)
㈤去離子水製造機(Millipole milli-Q, Millipore, USA)
㈥多管蒸餾儀(Multivapor P-12, Buchi, Switzerland)

五、標準溶液之配製

稱取葉黃素及玉米黃素標準品各約10 mg，精確稱定，加入含2% BHT之乙醇-乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液0.5 mL，再以四氫呋喃定容至5 mL，供作標準原液，分裝後貯存於-20℃。臨用時精確量取適量葉黃素及玉米黃素標準原液混合後，以含0.2% BHT之乙醇-乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液稀釋配製成0.1-100 μg/mL之混合標準溶液。

六、檢液之調製

將檢體均質混勻，取油狀檢體約20 mg，粉狀檢體約100 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2.5 mL及丙酮：去離子水(1:1, v/v)溶液10 mL，拴緊瓶蓋，旋渦混合30秒，置於超音波振盪器振盪15分鐘。加入20%氫氧化鉀甲醇溶液2 mL，拴緊瓶蓋，旋渦混合30秒，置於往復式振盪恒溫水槽，以50℃皂化30分鐘，取出冷卻。加入含0.2% BHT之乙醚-乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液20 mL，置於高速組織研磨振盪均質機，以3000 rpm垂直振盪3分鐘後，移入分液漏斗中，靜置至分層，取上層液，下層液重複萃取步驟3次。合併上層液，再以含酚酞指示劑之去離子水，每次30 mL洗至中性。經減壓濃縮後，殘留物以乙醇-乙酸乙酯(1:1, v/v)溶液溶解並定容至25 mL，混勻後經濾膜過濾後，供作檢液。

七、高效液相層析儀分析條件

㈠層析管柱：Ascentis® RP-Amide，4.6 × 150 mm, 5 μm
㈡移動相溶液：(A)乙腈，(B)去離子水，(A)液及(B)液以95:5 (v/v)進行等梯度流洗
㈢流速：1 mL/min
㈣管柱溫度：30℃
㈤樣品注入量：10 μL
㈥檢測波長：450 nm

八、標準曲線之製作

精確量取0.1、1、5、10、50及100 μg/mL混合標準溶液各10 μL，分別注入高效液相層析儀進行檢測，就葉黃素及玉米黃素層析圖譜之波峰面積與對應之濃度作圖，分別製作標準曲線，得到線性回歸方程式。

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

九、鑑別試驗與含量測定

精確量取檢液及混合標準溶液各10 μL，分別注入高效液相層析儀中，參照高效液相層析儀分析條件進行液相層析，就檢液與混合標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中葉黃素或玉米黃素之含量(μg/g)。

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

C ：由標準曲線求得之葉黃素或玉米黃素之含量(μg/mL)
V ：檢體定容之體積(mL)
M ：取樣分析檢體之重量(g)

十、添加回收試驗及重複試驗

以統一大豆沙拉油做為沙拉油基質；另取玉米澱粉24 g、乳糖24 g、結晶纖維素24 g、澱粉24 g、硬脂酸鎂2 g及二氧化矽2 g，共計100 g，混合均勻後，做為粉狀基質。取沙拉油基質20 mg，粉狀基質100 mg，分別加入葉黃素及玉米黃素標準原液3種濃度，使其粉狀基質所含葉黃素及玉米黃素濃度為125，625與1250 mg/kg；沙拉油基質所含葉黃素及玉米黃素濃度為625，3125與6250 mg/kg，進行5重複，依檢液之調製流程操作，供作檢液，同時進行空白試驗，以檢液所得波峰之滯留時間及面積，分別與標準溶液比較鑑別並定量之，計算其回收率及變異係數。

十一、定量極限之評估

取沙拉油基質20 mg，粉狀基質100 mg，分別加入葉黃素及玉米黃素標準原液，依檢液之調製流程操作後，分別注入高效液相層析儀，就所得波峰之訊號強度計算其訊噪比(S/N ratio)，以雜訊比大於10之最低濃度為檢驗方法之定量極限(limit of quantification, LOQ)。

十二、市售產品檢驗之分析

以本研究所建立之方法檢測市售標示含葉黃素及玉米黃素之膠囊食品16件及錠狀食品2件，共計18件檢體。另檢驗1件未標示葉黃素及玉米黃素之膠囊產品，以了解本方法之適用性及市售產品標示之符合性。

結果與討論

一、液相層析之最適分析條件

本研究使用Ascentis® RP-Amide，4.6 × 150 mm, 5 μm管柱，較一般用C30管柱之分析時間短。在移動相組成方面，文獻常以去離子水、乙腈、甲基第三丁基醚(methyl tert-butyl ether, MTBE)及甲醇等互相搭配，作為移動相。本研究選用乙腈與去離子水，以95:5 (v/v)之比例進行等梯度流洗，流速為1 mL/min，注入量為10 μL，於30分鐘內可完成葉黃素及玉米黃素之分析，葉黃素及玉米黃素之層析圖譜(圖二)。

二、標準品的線性關係

以高效液相層析儀偵測葉黃素及玉米黃素之混合標準溶液，所得高效液相層析圖譜如圖二。葉黃素及玉米黃素標準曲線之線性回歸判定係數(R^2)分別為0.9993及0.9995 (表二)，顯示濃度在0.1-100 μg/mL之量測範圍內，其線性關係良好。

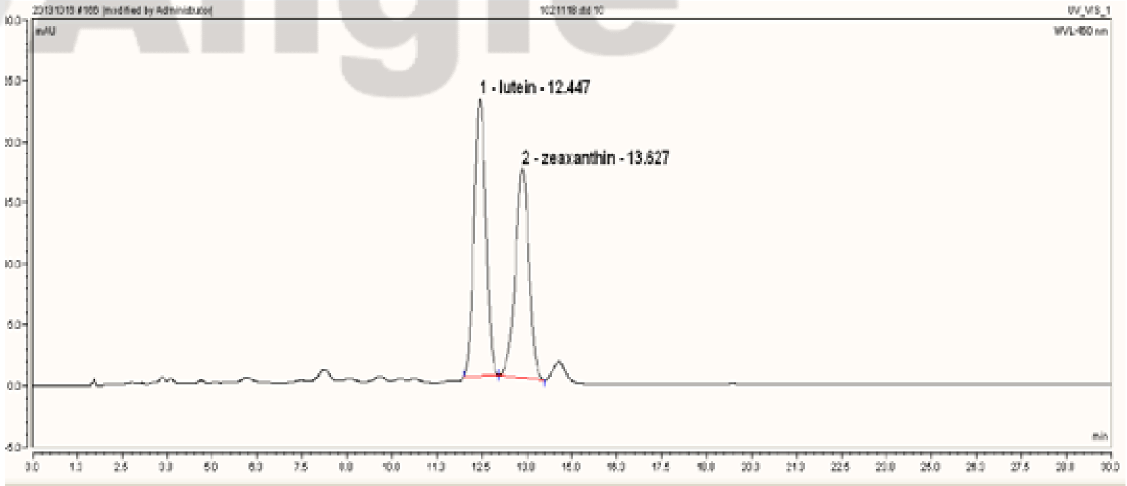
三、添加回收試驗及重複試驗

(1)沙拉油基質

取沙拉油基質20 mg，分別添加葉黃素及玉米黃素標準原液3種濃度，使其所含葉黃素及玉米黃素濃度為625、3125及6250 mg/kg，進行5重複，再依檢液之調製流程操作，進行回收試驗及重複試驗，其葉黃素於沙拉油基質之回收率為91.3-102.7%，變異係數為9.4-10.4%(表二)；玉米黃素於沙拉油基質之回收率為86.1-124.6%，變異係數為8.5-11.1%(表二)。

(2)粉狀基質

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw



圖二、葉黃素及玉米黃素標準品(10 μg/mL)之HPLC層析圖譜

表二、葉黃素及玉米黃素於不同基質之方法確效結果

	Matrix	線性範圍 (μg/mL)	線性回歸方程式判定係數(R^2)	定量極限 (μg/g)	添加濃度 (μg/g)	回收率(%)[a]	變異係數 (%)
葉黃素	粉狀基質[b]	0.1-100	0.9993	125	125	88.5	5.1
					625	87.6	4.1
					1250	95.4	4.6
	沙拉油基質	0.1-100	0.9993	625	625	102.7	10.4
					3125	91.3	9.4
					6250	95.8	9.6
玉米黃素	粉狀基質[b]	0.1-100	0.9995	125	125	82.7	6.0
					625	77.4	3.2
					1250	85.4	3.9
	沙拉油基質	0.1-100	0.9995	625	625	98.2	8.5
					3125	86.1	11.1
					6250	124.6	9.6

a. n = 5
b. 每100 g粉狀基質含玉米澱粉24 g、乳糖24 g、結晶纖維素24 g、澱粉24 g、硬脂酸鎂2 g及二氧化矽2 g

取粉狀基質100 mg，分別添加葉黃素及玉米黃素標準原液3種濃度，使其所含葉黃素及玉米黃素濃度為125、625及1250 mg/kg，進行5重複，再依檢液之調製流程操作，進行回收試驗及重複試驗，其葉黃素於粉狀基質之回收率為87.6-95.4%，變異係數為4.1-5.1%(表二)；玉米黃素於粉狀基質之回收率為77.4-85.4%，變異係數為3.2-6.0% (表二)。

由上述空白添加回收及重複試驗結果顯示，本方法對葉黃素及玉米黃素之回收狀況及重複性良好，可據以進行葉黃素及玉米黃素之檢驗。

四、葉黃素及玉米黃素之定量極限

㈠沙拉油基質

以沙拉油基質添加葉黃素及玉米黃素標準

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

原液3種濃度，使其檢體濃度為125、625及1250 mg/kg之添加回收結果中，葉黃素及玉米黃素於625 mg/kg之添加回收下，其波峰之S/N 皆大於10，故葉黃素及玉米黃素於沙拉油狀基質之定量極限為625 mg/kg (表二)。

㈡粉狀基質

以粉基質添加葉黃素及玉米黃素標準原液3種濃度，使其檢體濃度為25、125及250 mg/kg之添加回收結果中，葉黃素及玉米黃素於125 mg/kg之添加回收下，其波峰之S/N皆大於10，故葉黃素及玉米黃素於粉狀基質之定量極限為125 mg/kg (表二)。

五、皂化條件

由於類葉黃素含有羥基，可與脂肪酸鍵結形成酯鍵，而酯化型種類繁多，難以逐一鑑別、計量，故檢驗時進行皂化切斷酯鍵後，再予以偵測。因此本研究參考Sarkar 2012年文獻報告[19]，以0.5 M KOH做為皂化液，於50℃下皂化30分鐘，以切斷酯鍵。該文獻指出以0.5 M KOH進行皂化，可以避免葉黃素及玉米黃素於皂化流程中受到破壞。Sarkar[19]與本署建議方法，均係使用KOH做為皂化液，並在50℃下皂化30分鐘。試驗結果顯示：檢出率偏低，推測膠囊錠狀食品中所添加葉黃素及玉米黃素之劑量高於一般植物之含量，因此皂化條件應更嚴竣，如：提高氫氧化鉀-乙醇溶液濃度、提高皂化溫度或延長皂化時間等，以切斷葉黃素及玉米黃素之酯鍵，使葉黃素及玉米黃素之回收率提高。後續擬就提升可切斷酯鍵且不破壞葉黃素及玉米黃素之氫氧化鉀-乙醇溶液濃度進行探討。

六、市售膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素之檢驗結果

本研究共抽驗市售標示含葉黃素及玉米黃素之錠狀食品2件及膠囊食品16件(粉狀劑型計4件，油狀劑型計12件)，另檢驗1件未標示葉黃素及玉米黃素之膠囊產品，共19件檢體(表三)，檢驗結果如表四。其中未檢出葉黃素者計9件，玉米黃素7件；檢測值高於標示值者(> 120%)，葉黃素有5件，玉米黃素有4件；檢測值低於標示值者(< 80%)，葉黃素有4件，玉米黃素有3件；檢測值與標示值相符者(80-120%)，玉米黃素有1件；另外，有檢出但未標示玉米黃素者，計3件；此外，本研究發現有標示但未檢出者，葉黃素有8件，玉米黃素有4件，惟因葉黃素及玉米黃素分為酯化型及游離型式二種，檢測結果受產品配方、存在型式(酯化型或游離型式)、添加量及是否經皂化等檢驗條件之不同影響，須進行個案探討。另檢驗1件未標示葉黃素及玉米黃素之膠囊產品，其檢驗結果均未檢出，顯示本檢驗方法定性結果良好(表五)。

表三、市售膠囊錠狀檢體抽驗件數

類別	件數
錠狀	2
膠囊(粉末)	4
膠囊(油狀)	12
其他[a]	1
合計	19

a. 品名與成分未標示葉黃素及玉米黃素之膠囊產品

結　論

本研究建立以高效液相層析儀檢測膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素含量之檢驗方法。葉黃素及玉米黃素於沙拉油基質及粉狀基質之定量極限分別為625及125 mg/kg。其葉黃素於沙拉油基質之回收率為91.3-102.7%，變異係數為9.4-10.4%；玉米黃素於沙拉油基質之回收率為86.1-124.6%，變異係數為8.5-11.1%；葉黃素於粉狀基質之回收率為87.6-95.4%，變異係數為4.1-5.1%；玉米黃素於粉狀基質之回收率為77.4-85.4%，變異係數為3.2-6.0%。

本研究建立之HPLC-DAD檢驗方法經方法確效及市售產品檢測後結果，其定性結果良好，惟因葉黃素及玉米黃素分為酯化型及游離

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

表四、市售膠囊錠狀產品中葉黃素及玉米黃素之檢測結果

檢體編號	葉黃素			玉米黃素		
	標示值 (mg/cap)	檢測值 (mg/cap)	標示符合性[a] (%)	標示值 (mg/cap)	檢測值 (mg/cap)	標示符合性[a] (%)
1	30	N.D.[b]	N.A.[b]	1.0	0.8	80
2	15	27.38	182.53	1.0	3.17	317
3	30	44.32	147.73	-	5.23	N.A.
4	15	33.46	223.07	-	1.68	N.A.
5	30	0.85	2.83	1.2	0.78	65
6	15	N.D.	N.A.	-	N.D.	N.A.
7	30	1.76	5.87	1.5	0.89	59.33
8	30	0.17	0.57	-	0.22	N.A.
9	15	N.D.	N.A.	0.7	N.D.	N.A.
10	30	N.D.	N.A.	2.0	N.D.	N.A.
11	標示不清	N.D.	N.A.	-	N.D.	N.A.
12	30	3.36	11.2	0.05	0.76	1520
13	30	N.D.	N.A.	0.1	0.52	520
14	30	N.D.	N.A.	1.0	N.D.	N.A.
15	20	40.09	200.45	0.8	1.87	233.75
16	20	N.D.	N.A.	1.23	N.D.	N.A.
17	12	26.71	222.58	2.4	1.61	67.08
18	30	N.D.	N.A.	1.0	N.D.	N.A.
19	—	N.D.	N.A.	-	N.D.	N.A.

a. 標示符合性(%) = $\frac{\text{檢測值}}{\text{標示值}}$

b. N.D. : not detected; N.A.: not available; -: not labeling.

表五、市售膠囊錠狀檢體之標示符合性

品項	標示符合性(件數)				
	N.D.	> 120%	80-120%	< 80%	有檢出，但未標示
葉黃素	9	5	0	4	0
玉米黃素	7	4	1	3	3
其他[a]	1	0	0	0	0

a. 其他：未標示葉黃素及玉米黃素之膠囊產品，其檢驗結果均未檢出，顯示本檢驗方法定性結果良好

型式二種，檢測結果受產品配方、存在型式、添加量及是否經皂化等檢驗條件之不同影響，須進行個案探討。

參考文獻

1. Fernandez-Garcia, E., Carvajal-Lerida, I., Jaren-Galan, M. and *et. al*. 2012. Review: Carotenoids bioavailability from foods: from plant pigments to efficient biological activities. Food Res. Int. 46: 438-450.
2. Rodić, Z., Simonovska, B., Albreht, A. and *et. al*. 2012. Determination of lutein by

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. J. Chromatogr. A 1231: 59-65.

3. Sommerburg, O., Keunen, J.E.E. and Bird, A.C. and *et. al*. 1998. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. Br. J. Ophthalmol. 82: 907-910.
4. Murillo, E., Melendez-Martinez, A.J. and Portugal, F. 2010. Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. Food Chem. 122: 167-172.
5. Perry, A., Rasmussen, H. and Johnson, E.J. 2009. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. J. Food Compos. Anal. 22: 9-15.
6. Liu, R.H. 2007. Whole grain phytochemicals and health. J. Cereal Sci. 46: 207-219.
7. Roberts, R.L., Green, J. and Lewis, B. 2009. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. Clin. Dermatol. 27: 195-201.
8. Dwyer, J.H., Navab, M., Dwyer, K.M. and *et. al*. 2001. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: The Los Angeles atherosclerosis study. Cirulation 103: 2922-2927
9. Kritchevsky, S.B., Bush, A.J., Pahor, M. and *et. al*. 2000. Serum carotenoids and markers of inflammation in nonsmokers. Am. J. Epidemiol. 152: 1065-1071.
10. Mares-Perlman, J.A., Millen, A.E., Ficek, T. L. and *et. al*. 2002. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. J. Nutr. 132: 518S-524S.
11. Horie, S., Okuda, C., Yamashita, T. and *et. al*. 2010. Purified canola lutein selectively inhibits specific isoforms of mammalian DNA polymerases and reduces inflammatory response. Lipids 45: 713-721.
12. Sechrist, J., Pachuski, J. and Sherma, J. 2002. Quantification of lutein in dietary supplements by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography with visible- mode densitometry. Acta Chromatogr. 12: 151-158.
13. Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura, M., Godoy, H.T. and *et. al*. 2008. Updated Brazilian database on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition. J. Food Compos. Anal. 21: 445-463.
14. Cortes, C., Torregrosa, F., Esteve, M.J. and *et. al*. 2006. Carotenoid profile modification during refrigerated storage in untreated and pasteurized orange juice and orange juice treated with high-intensity pulsed electric fields. J. Agric. Food Chem. 54: 6247-6254.
15. Berg, H., Faulks, H., Granado, H.F. and *et. al*. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. J. Sci. Food Agric. 80: 880-912.
16. Granelli, K. and Helmersson, S. 1996. Rapid high-performance liquid chromatographic method for determination of beta-carotene in milk. J. Chromatogr. A 721: 355-358.
17. Sharpless, K.E., Arce-Osuna, M., Thomas, J.B. and *et. al*.1999. Value assignment of retinal, retinyl palmitate, tocopherol and carotenoid concentrations in standard reference material 2383 (Baby Food Composite). J. AOAC Int. 82: 288-296.
18. Van Breemen, R.B., Dong, L. and Pajkovic, N.D. 2012. Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids. Int. J. Mass Spectrom. 312: 163-172.
19. Sarkar, C.R., Bhagawati, B., Das, L. and *et. al*. 2012. An efficient condition of saponification of lutein ester from marigold flower. Ann. Biol. Res. 3: 1461-1466.

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

Determination of Lutein and Zeaxanthin Contents in Capsules or Tablets by a HPLC Method

WEI-YUN CHEN, CHING-HSUAN TSAI, CHUN-WEI CHIANG, PAI-WEN WU, SU-HSIANG TSENG, YA-MIN KAO, LI-CHING CHIUE AND YANG-CHIH SHIH

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

Lutein and zeaxanthin can reduce the risk of Age-related Macular Degeneration (AMD). This study was aimed to develop a analytical method for lutein and zeaxanthin contents in capsules or tablets by HPLC-DAD at the same time. The homogenized samples were sonicated in acetone solution, and then 20% ethanolic KOH saponification agent was added. After saponification, samples were extracted three times using ether/ethyl acetate (1:1, v/v) solution containing 0.2% BHT. The supernatants were collected and combined, then evaporated to dryness. After evaporation, the oily residue was completely dissolved with ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) solution contain 2% BHT then transferred to a 25 mL volumetric flask and made up to the volume. The aliquot was filtered and injected to a HPLC. The HPLC was equipped with a Ascentis® RP-Amide column using ACN and water (95:5, v/v) as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. The chromatography was monitored by absorbance at 450 nm. The linear coefficients of regression equation of lutein and zeaxanthin were 0.9993 and 0.9995, respectively. Recovery analysis was performed by spiking standard compounds into blank powder and oil materials. The recoveries of lutein and zeaxanthin were from 77.4 to 95.4% and the coefficients of variation were from 3.2 to 6.0% for powder material. The recoveries of lutein and zeaxanthin were from 86.1 to 124.6% and the coefficients of variation were from 8.5 to 11.1% for oil material. The quantitation limits of lutein and zeaxanthin were 125 mg/kg for powder material and 625 mg/kg for oil material.

Key words: capsule, tablets, lutein ester, zeaxanthin easter, saponification, HPLC.