

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

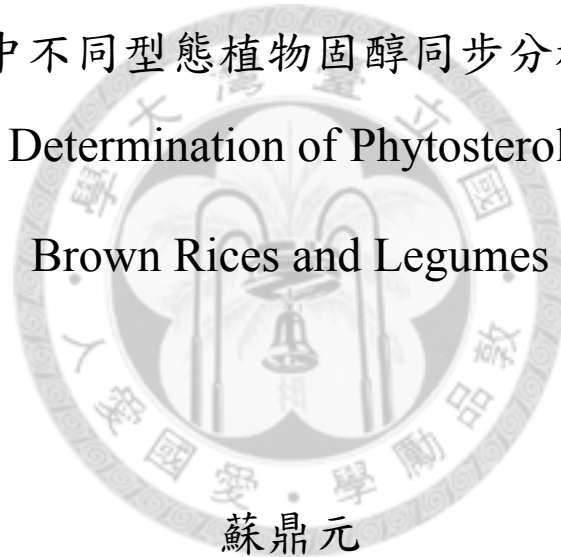
College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

糙米及豆類中不同型態植物固醇同步分析方法之建立  
Simultaneous Determination of Phytosterol Conjugates in

Brown Rices and Legumes



蘇鼎元

Ding-Yuan Su

指導教授：呂廷璋 博士

Advisor: Ting-Jang Lu, Ph. D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

## 謝誌

非常感激恩師呂廷璋博士對於學生的指導，在想法上有許多啟發，培養了我發現問題，解決問題的能力，獲益良多。論文初成，感謝盧訓所長、張永和老師、王惠珠老師與曾素香博士詳細審閱，對於內文及實驗不足之處提供許多寶貴意見，使論文更趨完善。

感謝周宏農老師慷慨出借儀器，使實驗能順利進行；感謝聯米企業莊董事長及蔡先生提供糙米樣品；感謝日本築野食品工業株式會社三浦隆志先生的協助提供固醇標準品。感謝共儀中心祐維學長、佩吟學姐與宜如學姐協助儀器使用。

很高興能有 R301 夥伴的陪伴，順利度過忙碌的碩士生活。感謝群惠學姊一開始指導我做實驗，打下深厚的基礎，雪婷學姐、鐘鳳學姐與麗嬋學姊對實驗的幫忙與其他事務的協助。與同學凱琪與帆益一起努力做實驗、互相打氣，是段難忘的日子，雖然實驗上都經歷了許多困難，最後都順利畢業了！謝謝學弟妹們：琬庭、詩婷、令杰、芸華、韻慈、昱宗和振宇，平日的幫忙，R301 有你們在增添了許多歡樂，接下來好好努力加油吧！

感謝我最愛的家人的支持，尤其是辛苦的媽媽，疲累的身軀回家後能吃到熱好的晚餐，總讓疲倦減輕不少。一路走來受到許多幫助，心中的感激實難以三言兩語表達，最後，謝謝大家！

## 中文摘要

植物固醇可分為自由態、steryl ferulate、酯化態、醣苷態及酯化醣苷態 5 種。本實驗目的即為建立以液相層析/大氣壓力化學游離法串聯質譜 (liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry, LC/APCI-MS) 及液相層析-蒸發光散射偵測器 (liquid chromatography-evaporative light scattering detector, LC-ELSD) 同步分析不同型態植物固醇的方法，來克服傳統分析植物固醇的方法因需要酸水解與鹼皂化而造成固醇降解或異構化的缺陷。所建議方法以固相萃取管 (NH<sub>2</sub>) 淨化樣品可去除三酸甘油酯，但同時去除酯化態固醇，再以 LC/APCI-MS 分析；若以自由態植物固醇進行添加回收率評估，回收率介於 83.69-106.89 %；此固相萃取法可取代傳統水解法並避免固醇分子產生異構化並保持完整的植物固醇型態。使用逆相液相層析串聯質譜可同步分析自由態、steryl ferulate、醣苷態及酯化醣苷態固醇的個別分子，植物固醇的最強特徵離子皆為其固醇基團脫去一分子水的訊號，自由態固醇偵測極限介於 5-50 ng/mL。另以正相液相層析-蒸發光散射偵測器分析，樣品可不經前處理直接分析，正相層析管柱可將植物固醇依結構上不同結合態分離，並定量該型態固醇的總量。但由於酯化態固醇與蠟酯無法分離，仍無法對其定量；不同植物固醇偵測極限介於 0.5-5 µg/mL。分析糙米及豆類樣品結果顯示 LC-MS 及 LC-ELSD 的結果具有差異，由於結合態固醇缺乏單一標準品而無法以 LC-MS 準確定量，而 ELSD 對於結構相似的固醇分子感應值較相同，因此定量的數值應較 MS 的結果準確。樣品中的固醇組成以 avenasterol、campesterol、stigmasterol 及  $\beta$ -sitosterol 為主，糙米中主要含有自由態固醇及 steryl ferulate ( $\gamma$ -oryzanol)，醣苷態及酯化醣苷態的含量較低；豆類樣品中含有自由態固醇及高量的酯化醣苷態固醇，但皆不含有 steryl ferulate。樣品中黃豆及黑豆的醣苷態固醇含量較高。

關鍵字：結合態植物固醇、糙米、豆類、液相層析串聯質譜、大氣壓力化學游離法、蒸發光散射偵測器。

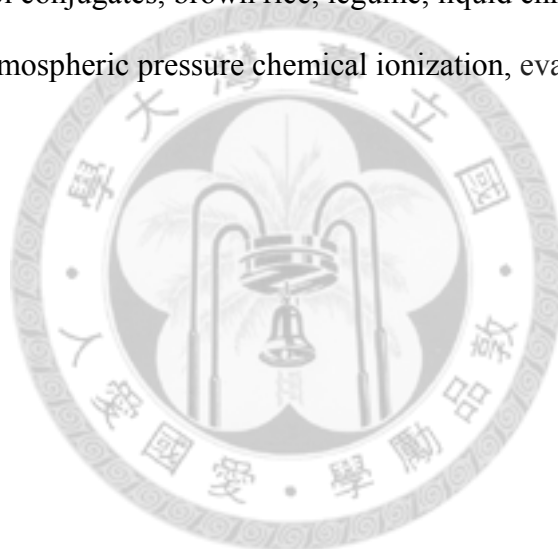
## 英文摘要

### Abstract

There are five common forms of phytosterols: free sterols (FS), steryl ferulates (SF), steryl glycosides (SG), acylated steryl glycosides (ASG) and steryl esters (SE). The aim of this study was to develop simultaneous methods to determine free and conjugated phytosterols by LC/APCI-MS (liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry) and LC-ELSD (liquid chromatography-evaporative light scattering detector), respectively, to overcome the degradation and isomerization drawbacks caused by acid hydrolysis and alkaline saponification in the traditional method. The suggested method was using NH<sub>2</sub> solid-phase extraction (SPE) cartridge as clean-up tool before LC/APCI-MS analysis. The triglycerides but also steryl esters were removed from sample extracts. The recoveries of this method were 83.69 to 106.89 %, evaluated by using free phytosterols as standard. Replacing hydrolysis methods by SPE could avoid sterol isomerization and retain intact sterol conjugates. Individual compound of FS, SF, SG and ASG was separated by reverse phase C18 column and detected by APCI-MS. All phytosterols give an intense characteristic ion corresponding to the loss of a water molecule from the sterol moiety. The limit of detection (LOD) for free sterols was 5-50 ng/mL. NPLC-ELSD could separate and detect lipid (phytosterol) classes synchronously without further sample pretreatment. Sterol esters still could not be quantified by NPLC-ELSD because of the coelution of wax esters and steryl esters. The limit of detection (LOD) for phytosterols was 0.5-5 µg/mL. Results showed significant difference in the phytosterol contents of samples between measurement by LC-MS and LC-ELSD. Since the lack of single pure standard

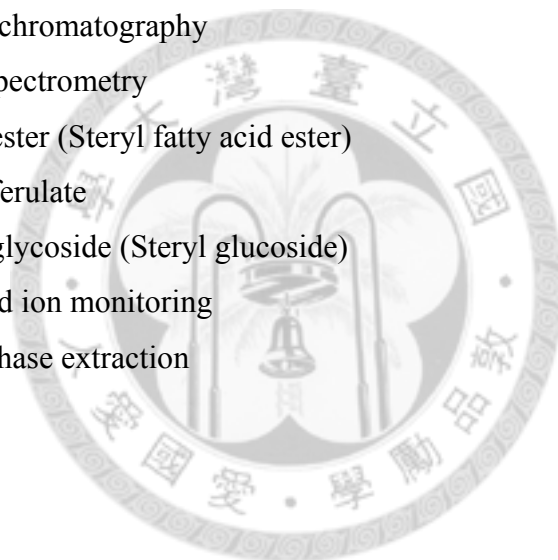
of phytosterol conjugates, it is hard to accurately quantify by LC-MS. ELSD provides a more uniform response to structurally similar analytes, so here we speculated that the results measured by LC-ELSD were much accurate than LC-MS. Avenasterol, campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol are predominate among sample phytosterols. The major phytosterols in brown rices are FS and SF ( $\gamma$ -oryzanol) and there is less SG and ASG in brown rices. Legumes all have high content of FS and ASG but no SF. Soybean and black soybean contain much higher amounts of SG than other samples.

Keywords: phytosterol conjugates, brown rice, legume, liquid chromatograph/tandem mass spectrometry, atmospheric pressure chemical ionization, evaporative light scattering detector



## 縮寫表

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
ASG	Acylated steryl glycoside
ELSD	Evaporative light scattering detector
ESG	Esterified steryl glucoside
ESI	Electrospray ionization
EIC	Extracted ion chromatogram
FS	Free sterol
GC	Gas chromatography
HSE	Hydroxycinnamic acid steryl ester
LC	Liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
SE	Steryl ester (Steryl fatty acid ester)
SF	Steryl ferulate
SG	Steryl glycoside (Steryl glucoside)
SIM	Selected ion monitoring
SPE	Solid phase extraction



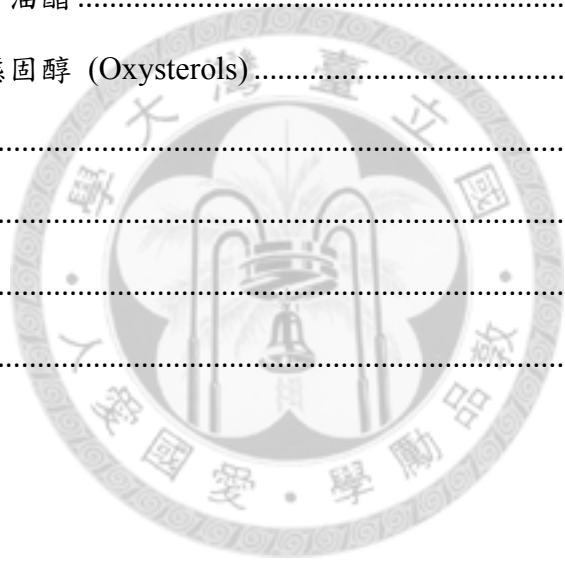
## 總目錄

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	II
縮寫表 .....	IV
總目錄 .....	V
圖目錄 .....	VIII
表目錄 .....	X
壹、前言 .....	1
貳、文獻整理 .....	2
第一節、植物中的固醇 .....	2
一、結構 .....	2
二、結合態固醇 .....	4
第二節、植物固醇生理活性 .....	5
一、植物固醇的人體吸收及代謝 .....	5
二、植物固醇的活性 .....	6
第三節、植物固醇受加工的影響 .....	8
一、油脂精煉 .....	8
二、固醇氧化 .....	8
第四節、植物固醇的分析 .....	10
一、溶劑萃取 .....	10
二、化學及酵素水解 .....	11
三、固醇分離 .....	14
四、固醇分析與檢測 .....	16
五、自由態及結合態固醇分析 .....	21

參、研究目的與實驗架構 .....	22
肆、材料與方法 .....	24
第一節、實驗材料 .....	24
一、稻米 ( <i>Oryza sativa</i> ) .....	24
二、豆類 .....	24
第二節、藥品 .....	24
一、植物固醇標準品 .....	24
二、溶劑 .....	25
三、藥品 .....	25
第三節、儀器設備 .....	26
一、樣品製備及萃取 .....	26
二、固相萃取 .....	26
三、溶劑及樣品過濾 .....	26
四、逆相液相層析與串聯質譜系統 .....	27
五、正相液相層析-蒸發光散射偵測器系統 .....	27
第四節、實驗方法 .....	28
一、植物固醇萃取 .....	28
二、固相萃取法 .....	28
三、以逆相液相層析串聯質譜儀分析植物固醇 .....	28
四、以正相液相層析搭配蒸發光散射檢測器分析植物固醇 .....	31
陸、結果與討論 .....	33
第一節、溶劑選擇 .....	33
第二節、逆相液相層析串聯質譜儀分析樣品中的植物固醇 .....	34
一、植物固醇逆相液相層析法的建立 .....	34
二、固相萃取法分離植物固醇 .....	36



三、植物固醇的定性 .....	38
四、檢量線線性、偵測極限及定量極限 .....	53
五、植物固醇的添加回收率 .....	54
六、樣品中植物固醇的含量 .....	57
第三節、正相液相層析搭配蒸發光散射檢測器分析樣品中的植物固醇 .....	68
一、植物固醇正相液相層析法的建立 .....	68
二、檢量線線性及偵測、定量極限 .....	69
第四節、樣品中的非固醇物質及雜質 .....	78
一、三酸甘油酯 .....	78
二、氧化態固醇 (Oxysterols) .....	79
三、雜質 .....	81
柒、結論 .....	85
捌、參考文獻 .....	86
玖、附錄 .....	96



## 圖目錄

圖 1. 4-甲基及 4,4-二甲基植物固醇 .....	2
圖 2. 於 4 號碳上無甲基取代的 C28 植物固醇 .....	3
圖 3. 於 4 號碳上無甲基取代的 C29 植物固醇 .....	3
圖 4. 結合態植物固醇的結構 .....	5
圖 5. 固醇脫水的假設機制 .....	9
圖 6. 固醇主要的氧化產物 .....	10
圖 7. Fucosterol 及 $\Delta^5$ -avenasterol 經由酸催化產生異構化的可能機制 .....	14
圖 8. 糙米植物固醇萃取物的液相層析串聯質譜圖 .....	34
圖 9. 移動相甲醇及乙腈比例為 1:1 時的植物固醇標準品液相層析串聯質譜圖 .....	35
圖 10. 三酸甘油酯及固醇標準品於 $\text{NH}_2$ 管柱的層析圖 .....	37
圖 11. $\beta$ -Sitosterol 標準品的質譜圖 .....	42
圖 12. $\beta$ -Sitosteryl glucoside 標準品的質譜圖 .....	42
圖 13. 24-methylencycloartanyl ferulate 標準品的質譜圖 .....	43
圖 14. 24-methylencycloartanyl ferulate 標準品的質譜圖 ( $m/z$ 600-630) .....	43
圖 15. $\beta$ -Sitosteryl (6'-O-linoleoyl)- $\beta$ -D-glucoside 的質譜圖 .....	44
圖 16. 自由態固醇的二次質譜圖 .....	45
圖 17. Seryl ferulate 特徵離子的二次質譜圖 .....	46
圖 18. 植物固醇混合標準品的層析質譜圖 .....	47
圖 19. 糙米樣品的萃取離子層析圖 .....	49
圖 20. $\beta$ -sitosterol 標準品 (Calbiochem) 的層析圖 .....	49
圖 21. 糙米樣品萃取液經日光照射前後的萃取離子圖譜 .....	51
圖 22. 植物固醇混合物標準品 $\gamma$ -oryzanol 處的層析圖 .....	52
圖 23. 台南 11 號糙米植物固醇萃取物的層析質譜圖 .....	55

圖 24. 黃豆植物固醇萃取物的層析質譜圖 .....	56
圖 25. 植物固醇及三酸甘油酯標準品的層析圖 .....	69
圖 26. Cholesteryl palmitate 標準品的檢量線 .....	70
圖 27. 台南 11 號糙米萃取液層析圖 .....	71
圖 28. 台南 11 號糙米萃取液的 18-40 分鐘處層析圖 .....	72
圖 29. 綠豆萃取液的 18-40 分鐘處層析圖 .....	72
圖 30. 糙米中不同種類植物固醇的含量 .....	76
圖 31. 豆類中不同種類植物固醇的含量 .....	76
圖 32. 糙米樣品中 LLL (trilinolein) 的質譜圖 .....	78
圖 33. 糙米樣品中 campesterol 氧化態的二次質譜圖 .....	79
圖 34. 糙米樣品中 stigmasterol 氧化態的二次質譜圖 .....	80
圖 35. 糙米樣品中 $\beta$ -sitosterol 氧化態的二次質譜圖 .....	80
圖 36. 糙米樣品中塑膠添加物的萃取離子層析圖 .....	81
圖 37. 糙米樣品中 erucamide 的二次質譜圖 .....	82
圖 38. 糙米樣品中 DINP 的二次質譜圖 .....	82
圖 39. 糙米樣品中 Irgafos 168 phosphate 的二次質譜圖 .....	83
圖 40. 氯仿經塑膠及玻璃針筒過濾後的層析圖 .....	84
圖 41. 植物固醇結構命名 .....	96

## 表目錄

表 1. 使用正相固相萃取管分離不同型態植物固醇.....	15
表 2. 正相液相層析法分析植物固醇.....	19
表 3. 逆相液相層析法分析植物固醇.....	20
表 4. 經 LC-APCI-MS 分析所得植物固醇的特徵離子及滯留時間.....	40
表 5. 自由態固醇的檢量線.....	53
表 6. 自由態固醇的添加回收率.....	54
表 7. 98 年期作糙米樣品自由態固醇的含量.....	60
表 8. 99 年期作糙米樣品自由態固醇的含量.....	60
表 9. 98 年期作糙米樣品糖苷態固醇的含量.....	61
表 10. 99 年期作糙米樣品糖苷態固醇的含量.....	61
表 11. 98 年期作糙米樣品酯化糖苷態固醇的含量.....	62
表 12. 99 年期作糙米樣品酯化糖苷態固醇的含量.....	62
表 13. 98 年期作糙米樣品 steryl ferulates 的含量.....	63
表 14. 99 年期作糙米樣品 steryl ferulates 的含量.....	64
表 15. 不同年份期作糙米植物固醇含量的比較.....	65
表 16. 豆類自由態固醇的含量.....	66
表 17. 豆類糖苷態固醇的含量.....	66
表 18. 豆類酯化糖苷態固醇的含量.....	67
表 19. 固醇及三酸甘油酯標準品的標準曲線.....	70
表 20. HPLC-ELSD 分析糙米植物固醇的含量.....	74
表 21. 不同偵測方法分析糙米植物固醇含量的比較.....	74
表 22. HPLC-ELSD 分析豆類植物固醇的含量.....	75
表 23. 不同偵測方法分析豆類植物固醇含量的比較.....	75

表 24. 豆類酯化糖苷態及糖苷態固醇實驗數據與文獻數據的比較..... 77



## 壹、前言

植物固醇具有降膽固醇、抗腫瘤及抗發炎等生理活性，其結構具有 5 種不同型態，傳統分析植物固醇使用的水解法多僅針對水解後產生的自由態固醇分析，步驟繁瑣具有許多缺點，如測得的固醇種類較少，糖苷態固醇被認為含量少而常被忽略，但實際上糖苷態固醇於植物中的含量並不低，且具特殊生理活性。鑒於現有植物固醇分析方法的諸多缺陷，本研究欲建立同步分析不同種類植物固醇的方法，由於植物固醇大多無法以紫外光-可見光偵測器偵測，實驗以兩種系統來分析植物固醇：(1) 正相液相層析搭配蒸發光散射偵測器及 (2) 逆相液相層析串聯質譜儀，針對層析及質譜資訊作詳盡的討論。



## 貳、文獻整理

### 第一節、植物中的固醇

植物固醇 (phytosterols) 屬於三萜類 (triterpene) 的物質, 存在於所有植物中, 其在植物細胞膜上具有穩定脂雙層結構的效果, 與膽固醇在動物體內的功能類似。而植物並非不含有膽固醇, 它約占植物總固醇量 1-2%, 在某些植物科別或是植物局部的組織器官部分, 膽固醇可占總固醇量的 5% 或更多 (Moreau *et al.*, 2002)。許多茄科 (Solanaceae) 植物含有高量的膽固醇 (Moreau *et al.*, 2002), 如番茄 (*Solanum lycopersicum*) 其綠熟期果實的果皮中自由態固醇約含有 8% 的膽固醇 (Whitaker, 1988)。另真菌中的主要固醇為 ergosterol, 由於真菌不屬於植物界, 一般將 ergosterol 稱為 fungal sterol (Weete *et al.*, 2010) 而不歸類於植物固醇, 但也有部分文獻將其併入植物固醇的分類 (Piironen *et al.*, 2000; Moreau *et al.*, 2002)。

#### 一、結構

根據在 4 號碳上甲基的數目, 植物固醇可分為 4-desmethylsterols、4-dimethylsterols 及 4-monomethylsterols 三種。4-desmethylsterols 在 4 號碳上不具有甲基, 植物固醇中含量較多的  $\beta$ -sitosterol、stigmasterol 及 campesterol 皆屬此類; 4-monomethylsterols (如 gramisterol) 和 4-dimethylsterols (如 cycloartanol) 分別於 4 號碳上接上一及二個甲基 (圖 1), 這二種固醇為植物固醇生合成過程的中間產物, 故在大部分植物中的含量皆較 4-desmethylsterols 低 (Moreau *et al.*, 2002)。

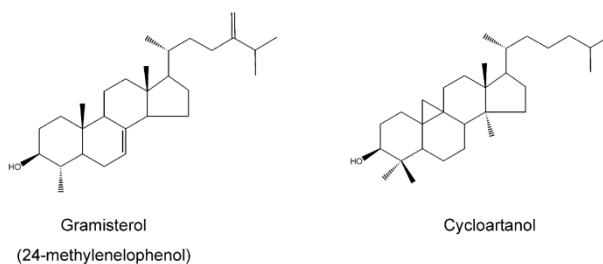


圖 1. 4-甲基及 4,4-二甲基植物固醇

Fig 1. 4-Monomethyl and 4,4-dimethylphytosterols (Moreau *et al.*, 2002)

4-desmethylsterols 以結構中總碳原子數目再分類，主要分為 27、28 及 29 個碳三種 (圖 2 及圖 3)。大部分的固醇在 5 號及 6 號碳 (見附錄圖 41) 上有一雙鍵，故稱為  $\Delta^5$  固醇；另有部分的固醇的雙鍵位在 7 號及 8 號碳上而非  $\Delta^5$  的結構，稱為  $\Delta^7$  固醇。 $\Delta^5$  及  $\Delta^7$  固醇都可能在其烴基 (alkyl) 支鏈上含有額外的雙鍵，多位於 22 及 23 號碳及 24 及 28 (24'') 號碳之間。含有 28 及 29 個碳醇在其 24 號碳上接有甲基或乙基，如該處產生雙鍵則為亞甲基 (methylene) 或乙烯基 (ethylene)。如固醇結構中的雙鍵全部被還原，則稱為該種固醇的烷醇 (stanol)，如 sitostanol。

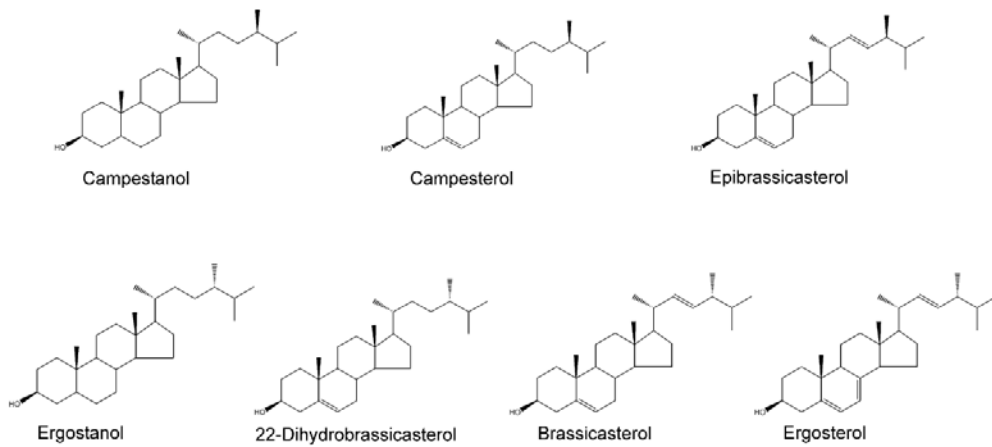


圖 2. 於 4 號碳上無甲基取代的 C28 植物固醇

Fig 2. C28 4-desmethyl phytosterols (Moreau *et al.*, 2002)

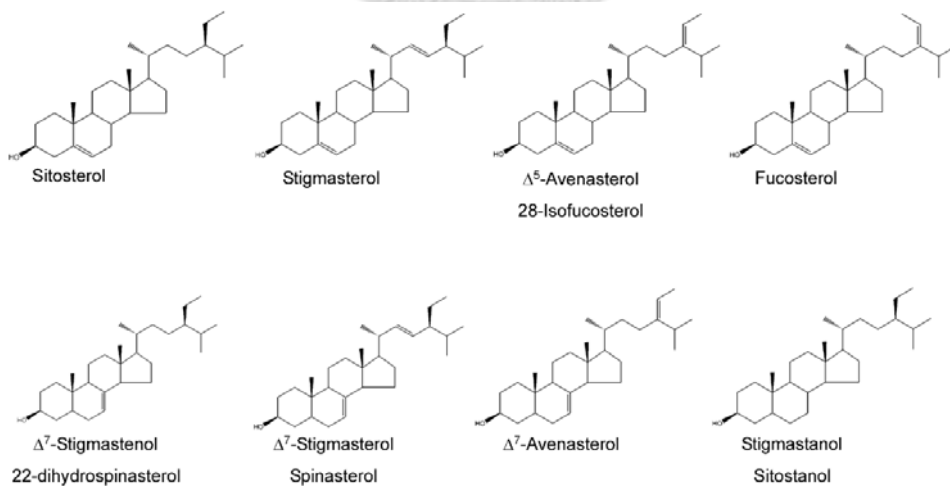


圖 3. 於 4 號碳上無甲基取代的 C29 植物固醇

Fig. 3. C29 4-desmethyl phytosterols (Moreau *et al.*, 2002)



## 二、結合態固醇

除了自由態的固醇，植物中尚有 4 種結合態固醇 (steryl conjugates) (圖 4)，皆為固醇 3 號碳上的羥基與不同的基團鍵結。

酯化態固醇 (steryl ester, SE) 為固醇與脂肪酸以酯鍵結合；常見與含 16 或 18 個碳的飽和或不飽和脂肪酸鍵結 (Zdzislaw, 1992)。

糖苷態固醇 (steryl glycoside, SG) 為固醇接上糖基，主要為 D 型葡萄糖以  $\beta$  型式鍵結，多為一個糖分子，如  $\beta$ -sitosteryl glucoside，也有接上 2 到 4 個糖分子的結構，如從紅豆中分離出的  $\beta$ -sitosteryl 3-O-gentiotetraoside 即接有 4 個葡萄糖 (Kojima *et al.*, 1989)；除了六碳糖外也有和五碳糖、糖醛酸及 6-去氧六碳糖鍵結的固醇從植物中分離出來 (Kovganko and Kashkan, 1999)。

酯化糖苷態固醇 (acylated steryl glycoside, ASG) 為糖苷態固醇的糖分子上的 6 號碳上的羥基與一脂肪酸酯化鍵結，常見脂肪酸組成與酯化態類似 (Zdzislaw, 1992)，也有脂肪酸與糖分子上其他位置羥基鍵結的結構 (Kovganko and Kashkan, 1999)。

Hydroxycinnamic acid steryl ester (HSE) 或 steryl ferulate (SF)，為固醇或三萜醇 (triterpene alcohol) 和阿魏酸 (ferulic acid)、對-香豆酸 (*p*-coumaric acid) 或咖啡酸 (caffeic acid) (Fang *et al.*, 2003) 以酯化鍵結，此種固醇大多存在於玉米及稻米等穀類中，如米糠中可分離出的  $\gamma$ -oryzanol 即屬 HSE， $\gamma$ -oryzanol 中主要成分為 24-methylencycloartanyl ferulate、cycloartenyl ferulate、campesteryl ferulate 及  $\beta$ -sitosterol ferulate (Xu and Godber, 1999)。

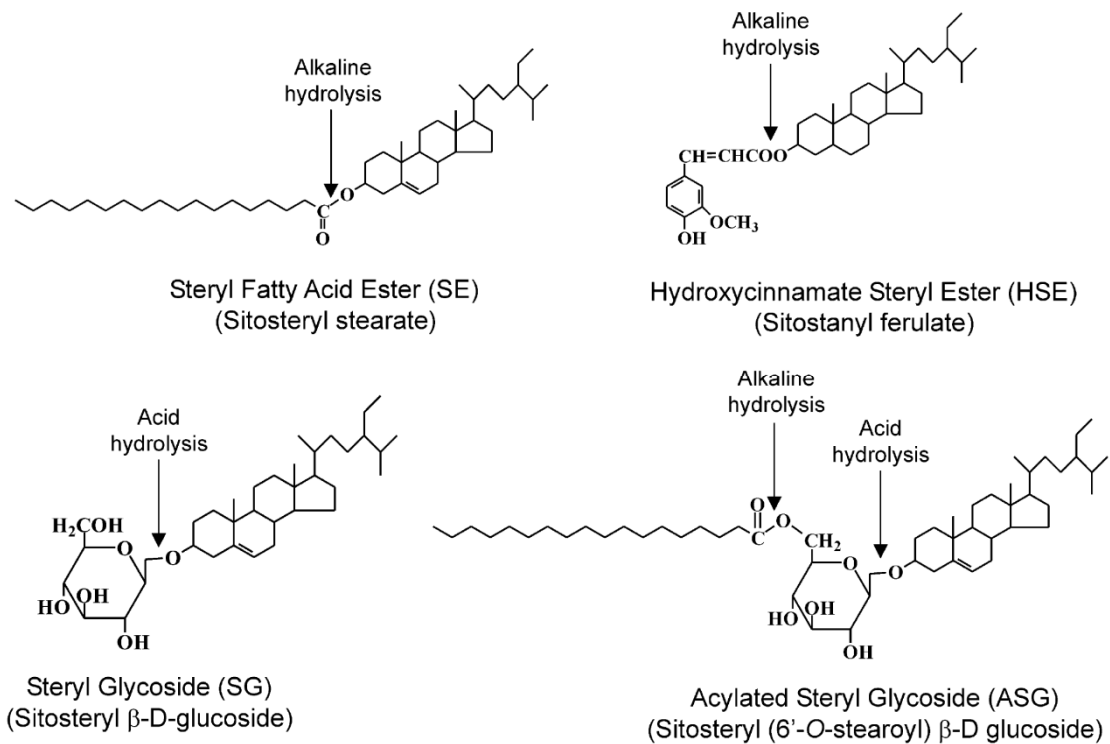


圖 4. 結合態植物固醇的結構

Fig 4. Structures of phytosterol conjugates. The sites of cleavage via alkaline hydrolysis (saponification) and acid hydrolysis are indicated with arrows (Moreau *et al.*, 2002)

## 第二節、植物固醇生理活性

### 一、植物固醇的人體吸收及代謝

根據 Berger 等人的文獻回顧，不同族群中的日常植物固醇的攝取量約為 160-400 mg (Berger *et al.*, 2004)；食物中植物固醇的主要來源為植物油，或是穀類及其相關製品及堅果類。食物來源主要為植物的族群其植物固醇攝取量可能更高，如墨西哥的 Tarahumara 印第安人較少攝食肉類，每日的植物固醇攝取量可達約 500 mg，而膽固醇攝取量僅 71 mg (Cerqueira *et al.*, 1979)。

雖然植物固醇與膽固醇的結構相似，前者的吸收率遠較後者低。在人體對植物固醇的吸收率實驗中，sitosterol 的吸收率約 0.5%，campesterol 約為 1.9%；sitostanol 的吸收率約為 0.04%，campestanol 的吸收率約為 0.16%，固醇  $\Delta^5$  處雙鍵被還原後的吸收率減少了 90%；而膽固醇吸收率約為 56% (Ostlund Jr *et al.*, 2002)。

固醇支鏈的取代基增加及  $\Delta 5$  處雙鍵被還原皆減少了植物固醇的吸收率 (Gylling and Miettinen, 2005)。

與脂肪酸酯化的酯化態固醇大部分在腸道內被水解成自由態固醇 (Miettinen *et al.*, 2000)，故 Moreau 等人認為植物固醇的生理活性型態主要為自由態 (Moreau *et al.*, 2002)。Lin 等人的動物實驗結果顯示，將酯化糖苷態及脂肪酸酯化態固醇分別給予小鼠後，二者皆顯著降低膽固醇吸收。而大部分的酯化糖苷態被水解產生糖苷態固醇，但糖苷態固醇並未進一步再水解成自由態固醇，作者認為糖苷態固醇並不需要被水解成自由態即能展現降低膽固醇吸收的活性；而小鼠攝食酯化糖苷態固醇後其肝及血液內植物固醇的含量並無顯著變化，顯示酯化糖苷態固醇並未被動物體吸收 (Lin *et al.*, 2011)。

## 二、植物固醇的活性

諸多研究證實所有種類的植物固醇已知皆具有降低血膽固醇的活性 (Tabata *et al.*, 1980; Miettinen *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011)，另有文獻顯示植物固醇亦具有抗腫瘤 (anti-cancer) (Awad and Fink, 2000)、輔助抗癌藥物治療 (Awad *et al.*, 2008)、免疫調節 (immune modulation) (Bouic, 2001)、抗發炎 (anti-inflammatory) (Islam *et al.*, 2008) 及 抑制潰瘍 (anti-ulcer) (Goel and Sairam, 2002) 等活性。由於已有諸多文獻對植物固醇活性進行整理，因此本處僅簡述而不多做回顧，但近年來糖苷態固醇被發現具有特殊的生理活性，故針對該處詳細整理。

曾在關島地區發生的特殊神經系統退化疾病，統稱為 amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex (ALS-PDC)，其致病原因多年來仍不明瞭，但可能和關島人的日常飲食有關聯。有研究推測這與關島人曾食用的蘇鐵 (*Cycas micronesica*, cycad) 種子中含有的毒性胺基酸有關，如  $\beta$ -N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) 及  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) (Ly *et al.*, 2007)。但由於傳統上處理蘇鐵種子時會先取出其含澱粉胚乳部分，切片後再水洗；這些水溶性的毒性胺

基酸大部分會在此水洗過程中被除去 (Duncan *et al.*, 1990)，顯示這些胺基酸可能並非引起 ALS-PDC 的主要原因 (Shaw and Wilson, 2003)。

由於推測致病因子並非水溶性物質，Khabazian 等人從蘇鐵種子中分離出低極性的： $\beta$ -sitosteryl  $\beta$ -D-glucoside (BSSG)、campesteryl  $\beta$ -D-glucoside 及 stigmasteryl  $\beta$ -D-glucoside 三種糖苷態固醇，這些糖苷態固醇具有去極化 field potentials、活化不同的蛋白質激酶使大鼠腦皮質細胞釋出乳酸脫氫酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) 等活性；而 BSSG 的配糖基，即  $\beta$ -sitosterol 在此實驗中並未展現毒性 (Khabazian *et al.*, 2002)。以 BSSG 處理小鼠運動神經元細胞株 NSC-34，結果顯示細胞死亡率與 BSSG 濃度具有劑量關係 (Tabata *et al.*, 2008)。將 BSSG (劑量：10, 100 及 1000  $\mu$ g/天) 餵食 C57/BL6 小鼠 10 週後，與控制組比較，最高劑量組別其 lumbar spinal cord 處的運動神經元數目減少了 34%；而在最後給予 BSSG 後間隔 22 週，3 個不同 BSSG 劑量的實驗組其運動神經元數目都顯著減少 (10  $\mu$ g: -33%; 100  $\mu$ g: -31%; 1,000  $\mu$ g: -44%)，顯示即使停止餵食 BSSG 後，lumbar spinal cord 處的運動神經元仍持續減少 (Tabata *et al.*, 2008)。分析蘇鐵組織中的糖苷態固醇，顯示皆含有高量的 stigmasteryl glucoside 及  $\beta$ -sitosteryl glucoside，如生長 8 個月的蘇鐵種子中含有 0.790 mg/g stigmasteryl glucoside 及 0.722 mg/g  $\beta$ -sitosteryl glucoside (Marler and Shaw, 2010)。

以上細胞及動物實驗研究顯示糖苷態固醇會造成神經系統退化，並可能與攝食蘇鐵種子引起的 ALS-PDC 有關連性，但仍有待進一步研究。

### 第三節、植物固醇受加工的影響

食物經過加工後其中的植物固醇含量可能降低或是固醇結構產生變化，植物固醇可能在加工過程中產生許多反應，如氧化、水解、異構化及脫水等 (Piironen *et al.*, 2000)。

#### 一、油脂精煉

由於在植物油中含有高量的植物固醇，許多文獻探討油脂精煉對植物固醇的影響。植物油在脫膠 (degumming) 時會將糖苷態固醇幾乎全部除去，鹼精製/脫酸的步驟則會移除部份植物固醇，脫色 (bleaching) 會使固醇產生結構變異，如酯化態固醇可能會脫去烴基、固醇氧化、脫水產生非極性的 steroidal hydrocarbons 及異構化等 (Kochhar, 1983)。

研究顯示未精煉葵花油經過白土 (earth) 脫色後， $\Delta 7$  固醇會異構化產生  $\Delta 8$  及  $\Delta 8(14)$  固醇， $\Delta 5$  固醇的含量同時也降低 (Biedermann *et al.*, 1996)。初榨橄欖油中的 24-methylenecycloartanol 在精煉後則會異構化產生 cyclobranol 及另一含有  $\Delta 7$  雙鍵的固醇異構物 (Lanzón *et al.*, 1999)。

Steroidal hydrocarbons (sterenes) 是植物油中的固醇在脫色時與酸性白土反應或是脫臭 (deodorization) 時於高溫環境下產生的脫水產物，如 steradienes 及 steratrienes；這類物質會傾向異構化形成含有共軛雙鍵因而更穩定的  $\Delta 3,5$  結構 (見圖 5) (Kasim *et al.*, 2009)。由於 steroidal hydrocarbons 在未精煉油脂中的含量甚低，因此檢測其含量可以判定油脂是否經過精煉或作為摻假與否 (初榨橄欖油) 的依據 (Verleyen *et al.*, 2002)。

#### 二、固醇氧化

植物固醇與膽固醇的氧化機制相同，在有氧氣存在時，經加熱、光照或長時間儲存會產生氧化反應 (Savage and Dutta, 2002; Otaegui-Arrazola *et al.*, 2010)。

固醇氧化產物稱為氧化態固醇 (oxysterols)， $7\alpha/\beta$ -hydroxysterols、7-ketosterols、 $5,6\alpha/\beta$ -epoxysterols 及 triols 是最常被偵測到的固醇氧化產物 (圖 6)；固醇的側鏈也可能產生氧化反應，如三級碳處氧化的 20-及 25-hydroxysterols，但這類氧化固醇的含量較低 (Piironen *et al.*, 2000)。

研究顯示 stigmasterol 於  $180^{\circ}\text{C}$  加熱後，除了產生上述極性較高的氧化態固醇，也偵測到含有中、低極性的氧化產物，如 stigmasteran-4,22-dien-3,6-dione、stigmasteran-3,5,22-trien-7-one 及 stigmasteran-2,4,6,22-tetraene 等，顯示固醇氧化後又進一步產生了脫水、氧化反應 (Menéndez-Carreño *et al.*, 2010)。

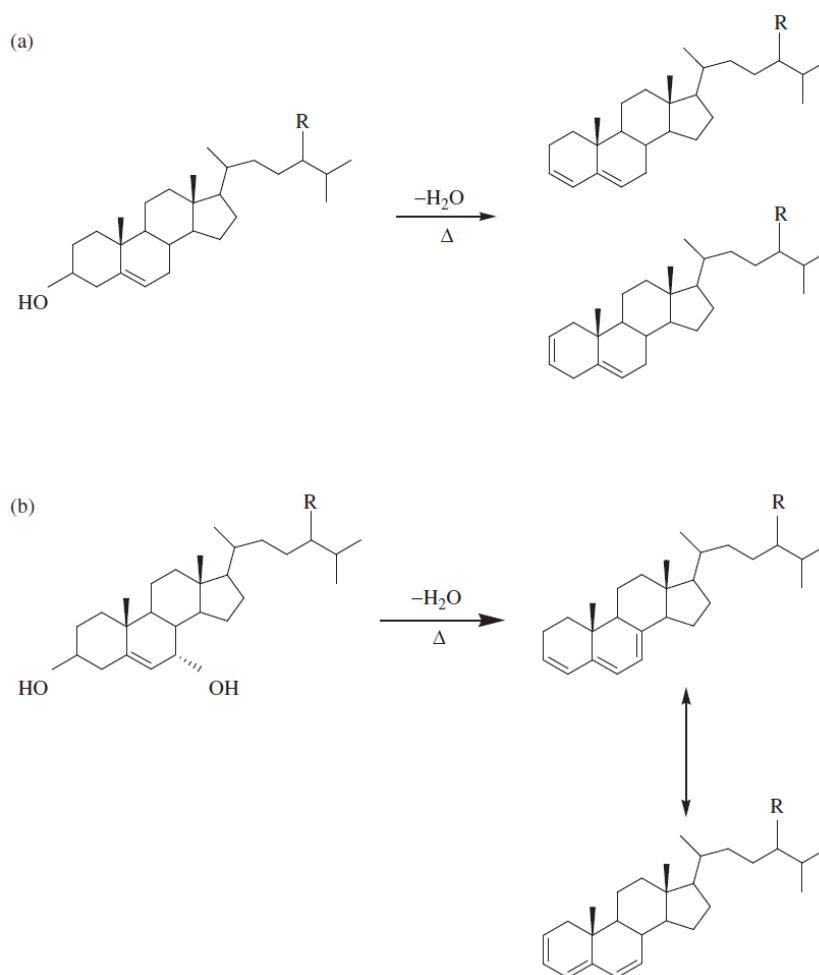


圖 5. 固醇脫水的假設機制

Figure 5. Postulated mechanism of sterol dehydration to form (a) steradienes and (b) steratrienes. R is designated as alkyl chain (Kasim *et al.*, 2012)

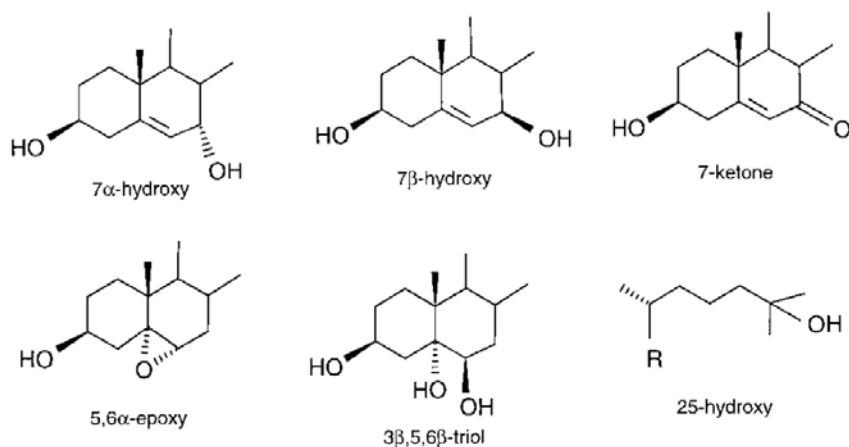


圖 6. 固醇主要的氧化產物

Figure 6. Functional groups of major oxidation products of sterols (R, sterol nucleus)

(Piironen *et al.*, 2000)

#### 第四節、植物固醇的分析

##### 一、溶劑萃取

由於使用的萃取溶劑對固醇的溶解度會影響到萃取率，而不同的結合態固醇其溶解度也不相同，挑選適合的萃取溶劑對於固醇分析為首要關鍵。因此 Heupel 認為在進行固醇的定量分析時，最主要的誤差可能來自於萃取步驟 (Heupel, 1989)。固醇為低極性物質，一般被歸類於脂類化合物，文獻中可見使用正己烷 (Gunawan *et al.*, 2006)、乙醚 (Rozenberg *et al.*, 2003)、二氯甲烷 (Oliveira *et al.*, 2008)、氯仿/甲醇 (Miller and Engel, 2006)、丙酮 (Rudell *et al.*, 2011)、甲醇 (Fang *et al.*, 2003) 等有機溶劑或使用超臨界二氧化碳萃取 (supercritical carbon dioxide extraction) (Moreau *et al.*, 1996) 進行固醇成分萃取。

研究顯示膽固醇於醇類中的溶解度從甲醇至正庚醇為止溶解度與醇類碳數成正比 (Flynn *et al.*, 1979)。Bar 等人測量  $\beta$ -sitosterol 及膽固醇於高極性有機溶劑中的溶解度依序為乙腈 < 甲醇 < 乙醇 < 丙酮 (Bar *et al.*, 1984)；Wei 等人測量  $\beta$ -sitosterol 於常用有機溶劑中的溶解度為甲醇 < 正己烷 < 乙醇 < 丙酮 < 乙酸乙酯 (Wei *et al.*, 2010)。

$\gamma$ -Oryzanol 在丙酮、丁酮、乙酸乙酯及二氯甲烷中的溶解度高，異丙醇較低，而正己烷的溶解度最低 (Kumar *et al.*, 2009)。酯化態固醇如 cholesteryl acetate 的溶解度為甲醇 < 乙醇 < 異丙醇 < 丙酮 (Bar *et al.*, 1984)； $\beta$ -sitosteryl maleate 及 stigmasteryl maleate 在乙酸乙酯中的溶解度高於丙酮 (Wang *et al.*, 2007)。糖苷態固醇於有機溶劑的溶解度並未搜尋到文獻可供參考。

使用 Folch 法 (Folch *et al.*, 1957)，以氯仿/甲醇 (2:1, v/v) 混和溶劑萃取包含固醇的脂質為最常使用的萃取方式。文獻中提出在氯仿/甲醇萃取系統中如果樣品/溶劑的比例 (solvent-to-tissue ratio) 太低時，可能會產生溶液分層，需要加入額外的溶劑使溶液不分層，而樣品/溶劑的比例太高時，相對使水分的比例過低，會使一些較高極性的固醇無法被完全萃取出來，如 di- 及 triglycosylsterols (Grunwald and Huang, 1989)。

## 二、化學及酵素水解

糖苷態固醇及酯化糖苷態固醇的糖苷鍵可藉由酸水解斷裂，SE、ASG 及 HSE 的酯鍵可由鹼水解 (皂化, saponification) 分離。由於常見檢測總固醇方式為將各種結合態的固醇水解後再測量其自由態固醇 (包含原自由態固醇及結合態固醇水解後釋出的自由態固醇) 的含量，這種分析方法須在萃取前或萃取後進行酸水解、鹼皂化或是二者皆有 (Toivo *et al.*, 2001) 以將結合態固醇水解。可根據樣品中結合態固醇的含量決定採用何種水解方式，文獻中顯示精煉後的植物油中僅含有自由態及酯化態 (脂肪酸) 固醇 (Kochhar, 1983)，即使植物油中原來含有糖苷態固醇 (SG 及 ASG)，在油脂精煉過程中也會被移除 (Toivo *et al.*, 2001)，故僅使用鹼皂化就足夠將所有的結合態固醇分解。

使用酸、鹼水解除除了能水解結合態固醇，文獻提出部分固醇可能會卡在植物的組織中而難以完全萃取出來，藉由酸、鹼水解後再進行萃取可將埋藏在植物組織中的固醇萃出 (Kamal-Eldin *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 2002)。Toivo 等人的研究



在溶劑萃取前將樣品以鹽酸水解，比照直接鹼皂化的組別其自由態固醇含量多出 9~42%，顯示酸水解已將糖苷態固醇水解產生自由態固醇 (Toivo *et al.*, 2001)。而使用鹼水解可將與固醇一併萃取出的脂質 (如三酸甘油酯及磷脂質等) 分解，避免後續分析時受到干擾。

但酸、鹼水解亦有缺點，Biedermann 等人的研究顯示，將 latosterol ( $\Delta 7$ -cholesterol) 於 80°C 鹽酸/甲醇溶液中反應，結果顯示  $\Delta 7$ -固醇比例隨著反應時間增加逐漸降低， $\Delta 8(14)$ - 及  $\Delta 7$ -固醇的比例逐漸增加，表示在酸水解條件下 latosterol 產生異構化 (Biedermann *et al.*, 1996)。Kesselmeier 等人的實驗指出  $\Delta 5$ -及  $\Delta 7$ -avenasterols 會在酸水解的過程中降解 (Kesselmeier *et al.*, 1985)；Kamal-Eldin 等人 (Kamal-Eldin *et al.*, 1998) 將 fucosterol 鹽酸水解後以 GC-MS 分析產物，圖譜上出現 fucosterol、 $\Delta 5$ -avenasterol 及其他 3 根波峰，作者推論產生異構化的機制為在酸水解條件下固醇支鏈上具有 ethylene 基團的固醇該處的雙鍵會因可能產生碳陽離子 (carbonium ion) 而不穩定，產生碳陽離子後會再脫去一氫質子轉變成另一高度穩定的烯類，同時產生異構化 (圖 7)，由於三級碳陽離子較二級碳陽離子穩定，因此在 GC-MS 圖譜上顯示異構物 a、b 及 c 的波峰面積均較  $\Delta 5$ -avenasterol 高。

以上文獻顯示，結構為  $\Delta 7$  及支鏈上具有 ethylene 基團的固醇在酸水解的環境下不穩定，短時間反應即產生異構化；另外 ergosterol 則會在酸水解下降解 (戴, 2012)。因此在分析含有這些固醇結構的植物或產品時使用酸水解可能會低估這類結構固醇的含量。

目前並無文獻指出固醇在鹼皂化環境下會產生異構化，但 Oliveira 等人的研究指出，將富含酯化態固醇的香蕉皮萃取物以氫氧化鉀水解後，4-dimethyl 及 4-monomethylsterol esters 其對應的自由態固醇及脂肪酸並未如預期增加，顯示這種結構的酯化態固醇具有抗鹼水解的特性，如 cycloeucalenol、cycloartenol 及 24-methylenecycloartanol (Oliveira *et al.*, 2008)。另有文獻指出，在製作紙漿的 kraft

pulping (kraft process) 步驟, 4-dimethyl 及 4-monomethylsterol esters 與其他結構的酯化態固醇相比能抵抗過程中的鹼水解, 在水解後仍能存在。(Tenkanen *et al.*, 2003)。

由於部分糖苷態固醇的酸不穩定性, Kesselmeier 等人使用  $\beta$ -glucosidase 來水解糖苷態固醇 (Kesselmeier *et al.*, 1985)。並有研究使用酵素取代化學水解結合態固醇, 如使用不同種類的脂酶 (lipase) 水解酯化態固醇並可能同時水解三酸甘油酯 (Fischer and Holl, 1990; Tenkanen *et al.*, 2003); Nyström 等人以不同來源的  $\beta$ -glucosidase 及 steryl esterase 分別水解糖苷態 (SG, ASG) 及 steryl ferulates (Nyström *et al.*, 2008)。但使用酵素水解也有缺點, 如結合態固醇於酵素溶液中的溶解度 (Kesselmeier *et al.*, 1985)、酵素專一性 (Kesselmeier *et al.*, 1985)、酵素水解速率較慢及反應時間過長等問題, 可能因上述缺陷使得使用酵素水解結合態固醇的研究並不多。





表 1. 使用正相固相萃取管分離不同型態植物固醇

Table 1. Separation of sterol conjugates by normal phase SPE cartridges

Cartridge type	Condition solvent	Sample solvent	Elution solvent (ratio, v:v)					Saponification <sup>1</sup>	References
			SE	FS	HSE	ASG	SG		
Silica	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> / Me <sub>2</sub> CO 90:10	-	-	Me <sub>2</sub> CO	Y	(Picchioni <i>et al.</i> , 1994)
Alumina (neutral)	Hex	Hex/DEE 20:80	Hex/DEE 20:80	Hex/DEE/EtOH 25:25:50	-	-	-	Y	(Phillips <i>et al.</i> , 2002)
Silica	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	-	CHCl <sub>3</sub>	-	-	MeOH	Y	(Phillips <i>et al.</i> , 2005)
Silica	Hex	Hex/EA 90:10	Hex/EA 90:10	Hex/EA 90:10 and Hex/EA/EtOH 25:25:50	-	-	-	Y	(Cunha <i>et al.</i> , 2006)
Silica,	Hep	Hep/DEE 90:10	-	-	Hep/DEE 90:10 and 50:50	-	Me <sub>2</sub> CO	N <sup>2</sup>	(Nyström <i>et al.</i> , 2007)
Silica	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	Hex/DEE 99:1	CHCl <sub>3</sub> Hex/DEE 85:15	-	-	CHCl <sub>3</sub> /Me <sub>2</sub> CO 50:50	N <sup>3</sup>	(Wewer <i>et al.</i> , 2011)

-: Not mentioned in the paper.

SE: steryl ester, FS: free sterol, HSE: Hydroxycinnamic acid steryl ester, ASG: acylated steryl glycoside, SG: steryl glycoside.

CHCl<sub>3</sub>: chloroform, DEE: diethyl ether, EA: ethyl acetate, EtOH: ethanol, Hep: 1-heptane, Hex: hexane, Me<sub>2</sub>CO: acetone, MeOH: methanol.

<sup>1</sup>: SE and FS fractions were saponified after SPE. <sup>2</sup>: HSE fraction was further purified using an acid–base wash. <sup>3</sup>: Sterols were directly infused into the Q-TOF mass spectrometer via nanospray ionization.

由於固醇的低極性，文獻中幾乎都以正相固相萃尿管 (如 silica 及 alumina) 分離不同型態的植物固醇。藉由不同結合態固醇極性的差異，酯化態、自由態及糖苷態固醇可在正相固相萃尿管上分離。Cunha 等人比較 silica 及 alumina 正相固相萃尿管分離酯化態及自由態植物固醇能力，結果顯示回收率部分二者並無差異，但 alumina 固相萃尿管再現性較差，可能因該種材質較易受到濕氣影響，故最後作者採用 silica 固相萃尿管進行實驗 (Cunha *et al.*, 2006)。

Lechner 等人在固相萃取前先將樣品衍生化，固醇結構上未鍵結的羥基處成為三甲基矽醚而大幅降低其極性，再使用 silica 固相萃尿管將衍生化後的自由態及酯化態固醇與相較極性稍高的三酸甘油酯分離，隨即以氣相層析分析 (Lechner *et al.*, 1999)。

#### 四、固醇分析與檢測

##### (一) 氣相層析法 (Gas chromatography, GC)

氣相層析法是最常用來分析固醇的方式 (Abidi, 2001)，在分析前樣品通常需經過衍生化 (derivatization) 使分析物質能夠揮發，並提高解析度，目前常見以 TMS (trimethylsilyl) 進行衍生化，雖然文獻中也可見不衍生化直接分析的方式。氣相層析法偵測方式主要為火焰離子偵測器 (Flame ionization detector, FID) 及質譜，火焰離子偵測器僅能以波峰的滯留時間為定性的依據，而使用質譜可知該波峰的離子片段而得到更多的結構資訊。

氣相層析法對個別固醇分子的分離效果佳，且固醇質譜離子片段具有較多的文獻可供比對。但氣相層析法的缺點在於衍生化過程耗時，且可能產生副產物 (Rozenberg *et al.*, 2003)，如在固醇糖基上衍生化不完全產生波峰變寬或重疊現象 (Pieber *et al.*, 2010)；而酯化態、衍生化後的糖苷態 (SG 及 ASG) 固醇的沸點太高，使用氣相層析法分析需要較高溫的分析條件而造成限制 (Caboni *et al.*, 2005; Pieber *et al.*, 2010)。

## (二) 高效液相層析法 (High performance liquid chromatography, HPLC)

相較於氣相層析法，液相層析法所用的分析條件較溫和，且為非破壞性的偵測方式，故適用於分析熱敏感的固醇 (Abidi, 2001)。

### 1. 正相液相層析法 (normal phase liquid chromatography, NPLC)

正相液相層析可用於分離不同種類的結合態固醇，萃取物通常不經鹼皂化及其他前處理，過濾後直接進行分析 (Moreau *et al.*, 1990; Conforti *et al.*, 1993; Christie and Urwin, 1995)；正相層析法的優點為利用梯度層析可同步分析不同種類脂質 (lipid class, 包含植物固醇)，但由於移動相通常由低極性轉換到高極性，要找到適合的分析條件較為困難。正相層析較無法分離極性相近的個別固醇分子，並有管柱平衡時間長及移動相揮發性高等缺點 (Abidi, 2001)。表 2 為對使用正相液相層析法分析植物固醇的方法整理。

### 2. 逆相液相層析法 (reverse-phase LC, RPLC)

由於多數固醇物質的極性較低，使用逆相液相層析分析需要使用高比例有機溶劑或不含水 (non-aqueous) 的移動相以避免分析物殘留於管柱中 (Abidi, 2001; Lagarda *et al.*, 2006)。移動相常使用甲醇、乙腈、異丙醇及四氫呋喃 (tetrahydrofuran) 等溶劑；文獻中多使用 C18 管柱，此外也可見 C8 (Yu *et al.*, 2007)、C30 (Stöggli *et al.*, 2005) 及 Phenyl-hexyl (Mezine *et al.*, 2003) 等管柱材質。表 3 為使用逆相液相層析法分析植物固醇的方法整理。

### 3. 偵測器

由於除了具有共軛雙鍵的固醇 (如 7-dehydrocholesterol 和 ergosterol) 及 HSE 態的固醇分別在約 280 及 325 nm 有 UV 吸收外，其餘大多數自由態及結合態固醇並無特殊吸收波長，故使用紫外光檢測器 (UV detector) 時必須在 200-210 nm 低波長下進行偵測，但會面臨使用梯度沖提時移動相 (如甲醇及異丙醇) 的 UV 界限波長 (cut-off) 干擾。

蒸發光散射檢測器 (evaporative light scattering detector, ELSD) 的原理為從管柱流出的移動相溶劑進入霧化器 (nebulizer) 後與霧化氣體 (氮氣或空氣) 混合產生氣膠 (aerosol)；氣膠為混合均勻的液滴，進入漂移管 (drift tube) 後其中的揮發性成分如移動相經加熱蒸發，無法揮發的待測物質形成顆粒；懸浮於蒸氣中的顆粒通過光檢測區時經雷射光照射產生散射，被散射的光子根據一固定的入射角度由光二極體 (photodiode) 或光電倍增管 (photomultiplier tube) 偵測 (Young and Dolan, 2003)。

蒸發光散射檢測器的優點為除了高揮發性物質，其能偵測到大部分的化合物；其偵測靈敏度與待測分子的光學性質無關而是根據該物質的絕對含量，對不同的物質的偵測靈敏度較相近；由於移動相會被蒸發而不被偵測，有別於折射率偵測器 (Refractive index detector, RI) 和紫外光檢測器的限制，蒸發光散射檢測器可使用梯度沖提，並能同時維持圖譜基線平穩 (Young and Dolan, 2003)。另因蒸發光散射檢測器對結構相近的化合物可產生均一的感應值 (response)，故在分析同類的物質如脂質時，可用單一標準品所做的檢量線定量與該標準品相同類的物質 (Young and Dolan, 2004)。

質譜 (mass spectrometry) 的偵測靈敏度高，從分子離子 (molecular ion) 及離子片段可提供較多的分析物結構資訊，而利用選擇離子偵測模式 (selected ion monitoring, SIM) 或萃取離子層析圖 (extracted ion chromatogram, EIC) 的方式可對在層析上無法完全分離的波峰進行個別定量，故質譜為近年來最常使用的偵測方式 (表 3)。由於多數固醇化合物的極性低，結構上缺乏可供電噴灑式 (electrospray ionization, ESI) 游離法離子化的基團 (Trösken *et al.*, 2004)，故在文獻中使用質譜進行固醇分析時會選擇大氣壓力化學游離法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 作為游離方式 (Lagarda *et al.*, 2006)。但也有部分文獻採用電噴灑式游離法仍能順利分析不同結合態的固醇 (Caboni *et al.*, 2005; Schrick *et al.*, 2011)。大氣壓力化學游離法的原理為移動相溶劑被氮氣霧化成細小液滴，經 APCI 噴嘴 (APCI nozzle) 加熱後氣化進入游離區，施加高電壓於一接近噴嘴口的尖針，產生電暈放電 (corona discharge)，溶劑分子形成離子，溶劑離子與待測物分子作用後形成待測物離子，待測物離子進入質譜儀進行分析。

表 2. 正相液相層析法分析植物固醇

Table 2. Normal phase liquid chromatography analysis of phytosterols

Detector	Stationary and mobile phase (v:v)	Sample solution	Sterol investigated	Matrix	References
UV, FID	Lichrosorb Si-60 (100 × 3.0 mm, 7 μm) A = isooctane-THF (99:1), B = IPA, C = H <sub>2</sub> O	CHCl <sub>3</sub>	SE, FS, ASG, SG	Plant tissues	(Moreau <i>et al.</i> , 1990)
ELSD	Lichrosorb Si-60 (100 × 3.0 mm, 7 μm) A = Hex-THF (99:1), B = IPA, C = H <sub>2</sub> O	CHCl <sub>3</sub> :MeOH = 2:1	SE, FS, ASG, SG	Wheat flour	(Conforti <i>et al.</i> , 1993)
ELSD	Spherisorb S3CN (100× 3.2 mm, 3 μm) A = isoHex-MTBE (98:2), B = IPA- CHCl <sub>3</sub> - AA (82:20:0.01), C = IPA-H <sub>2</sub> O- TEA (47:47:6)	CHCl <sub>3</sub>	SE, FS, ASG, SG	Potato	(Christie and Urwin, 1995)
ELSD	LiChrosorb DIOL (100× 3 mm, 5 μm) A = Hex/AA (1000:1), B = IPA	Hex	SE, FS, SF	Corn fiber	(Moreau <i>et al.</i> , 1996)
ELSD	LiChrospher Si-60 (125 × 4 mm, 5 μm) A = CHCl <sub>3</sub> , B = MeOH-H <sub>2</sub> O (95:5)	CHCl <sub>3</sub>	ASG, SG	Edible plants	(Sugawara and Miyazawa, 1999)
ELSD, UV, MS	LiChrosorb DIOL (100× 3 mm, 5 μm) A = Hex/AA (1000:1), B = IPA, C = H <sub>2</sub> O	CHCl <sub>3</sub> :MeOH = 85/15	ASG, SG	Lecithin, Biodiesel	(Moreau <i>et al.</i> , 2008)

SE: steryl ester, FS: free sterol, HSE: Hydroxycinnamic acid steryl ester, ASG: acylated steryl glycoside, SG: steryl glycoside.

AA: acetic acid, CHCl<sub>3</sub>: chloroform, Hex: hexane, iso-Hex: isohexane, IPA: isopropanol, MTBE: methyl tert-butyl ether, MeOH: methanol,

TEA: triethylamine, THF: tetrahydrofuran.



表 3. 逆相液相層析法分析植物固醇

Table 3. Reverse phase liquid chromatography analysis of phytosterols

Method detection	Stationary and mobile phase	Separation/clean up method	Sterol investigated	Matrix	References
UV, APCI-MS	Luna C18 (150 × 2.0 mm, 3 μm) MeOH-EtOH	TLC, Silica gel column	SG, ASG	Red bell pepper	(Yamauchi <i>et al.</i> , 2001)
APCI-MS	Prevail C18 (150 × 2.1 mm, 2 μm) H <sub>2</sub> O/ACN-MeOH	SPE	SG, FS	Spelt and wheat	(Rozenberg <i>et al.</i> , 2003)
ELSD, ESI-MS	Luna C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm) ACN-IPA	TLC	SE	Wheats	(Caboni <i>et al.</i> , 2005)
DAD, APCI-MS	Prontosil 200-3-C30 (250 × 2.0 mm, 3 μm) MeOH-tBME (75:25)	centrifugation	HSE	Rice bran oil	(Stöggel <i>et al.</i> , 2005)
UV, API-ES-MS	Eclipse XDB-C8 (150 × 4.6 mm, 5 μm) ACN-H <sub>2</sub> O	-	HSE	Rice germ and bran	(Yu <i>et al.</i> , 2007)
DAD, APCI-MS	Chromolith Performance RP-18e (100 × 4.6 mm) H <sub>2</sub> O/MeOH (20:80, v/v)-EtOH	SPE (for initial identification)	SG, FS, ASG, SE	Apple peel	(Rudell <i>et al.</i> , 2011)

SE: steryl ester, FS: free sterol, HSE: Hydroxycinnamic acid steryl ester, ASG: acylated steryl glycoside, SG: steryl glycoside.

ACN: acetonitrile, EtOH: ethanol, MeOH: methanol, IPA: isopropanol, tBME: *tert*-butyl methyl ether

API-ES: atmospheric pressure interface-electrospray, DAD: diode array detection.

## 五、自由態及結合態固醇分析

最常見的固醇分析方式為使用溶劑萃取，將萃取液鹼皂化，使用溶劑萃出不皂化 (unsaponifiable) 物，利用固相萃取淨化樣品 (可能省去此步驟)，衍生化後以氣相層析法分析 (Piironen *et al.*, 2000)；如使用液相層析法分析則不經衍生化。此方法缺點為僅測得自由態及酯化態固醇而忽略了糖苷態固醇的存在，因糖苷鍵無法被鹼水解並可能在皂化後的液/液分配萃取中被分離到水相層 (Heupel, 1989)。

為了測得總固醇的含量，Toivo 等人 (Toivo *et al.*, 2001) 先以鹽酸進行酸水解，再於氫氧化鉀-乙醇溶液中鹼皂化，萃取不皂化物後衍生化並以氣相層析法分析。其結果顯示使用酸及鹼水解併用測得的玉米粉及洋蔥的總固醇量高於只使用鹼皂化的方法，顯示這二種樣品中含有相當量的糖苷態固醇；使用這二種方法檢測葡萄籽油的總固醇量並無明顯差異，顯示葡萄籽油中不含有糖苷態固醇。雖然這方法成功檢測了樣品中總固醇的含量，但經酸水解後  $\Delta^5$ -avenasterol 的含量些微下降，顯示這種酸敏感的固醇在酸水解環境下產生結構變化。

Breinhölder 等人 (Breinhölder *et al.*, 2002) 以固相萃取分離非極性脂質 (自由態及酯化態固醇) 及糖脂質 (糖苷態固醇)。非極性脂質鹼皂化後以氣相層析分析可得自由態及酯化態固醇的合併含量；糖脂質再經固相萃取分離並以液相層析-蒸發光散射檢測器檢測糖苷態固醇，此方法分開檢測非極性及較高極性的固醇，可測得不同型態植物固醇的含量，不使用酸水解避免了酸敏感固醇產生異構化。

目前的研究多利用薄層層析法或是固相萃取的方式分離不同型態的植物固醇，並個別分析分離出的該種固醇 (表 1 及表 3)，對於結合態固醇可能會使用酸/鹼水解並以釋出的自由態固醇定量 (Cunha *et al.*, 2006; Nyström *et al.*, 2007)。

## 參、研究目的與實驗架構

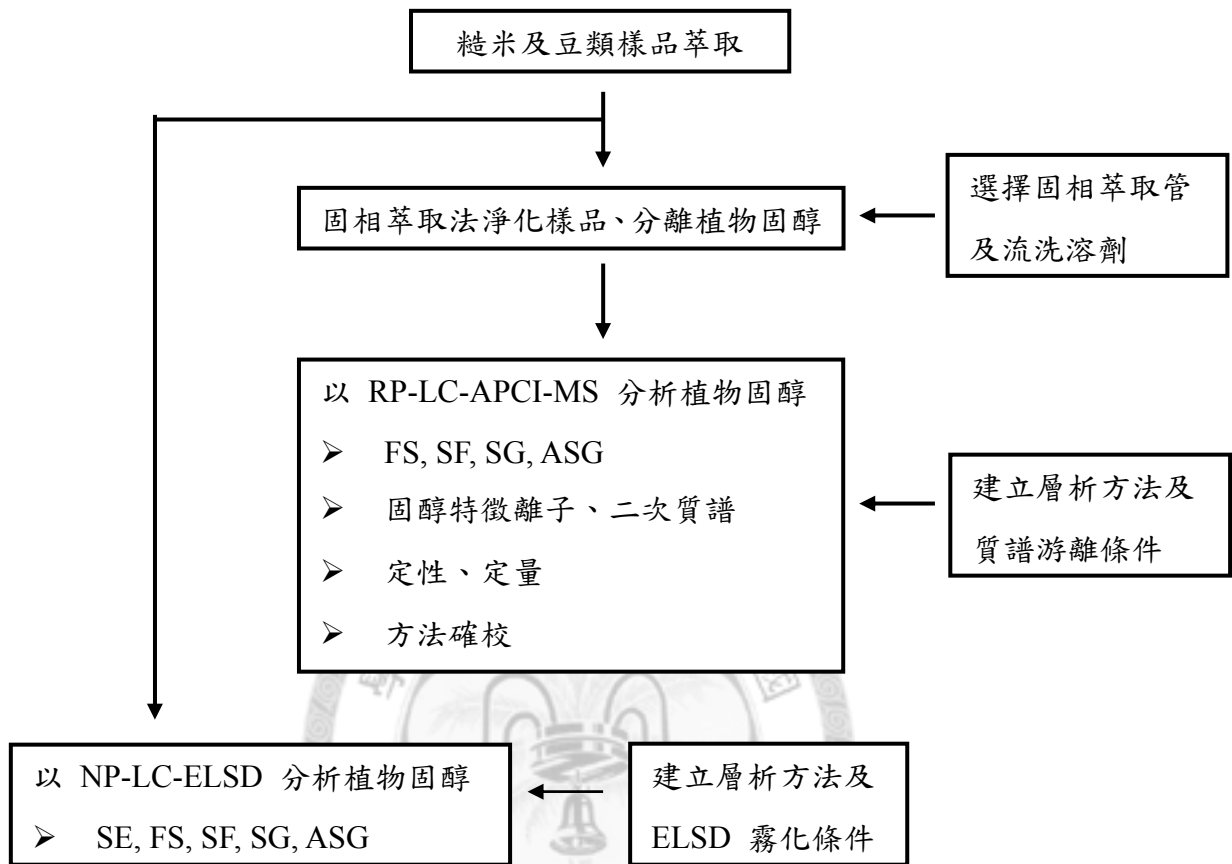
### 第一節、研究目的

鑒於目前缺乏同步分析不同型態植物固醇的分析方法，本實驗的研究目的為：以固相萃取法取代傳統水解法來分離植物固醇，可保存完整的植物固醇結構；再以逆相液相層析串聯質譜法進行同步分析，利用化合物的特徵離子來推測其分子結構。

另使用正相液相層析-蒸發光散射檢測器分析植物固醇，此方法樣品只須以溶劑萃取後再將萃取液過濾即可進行分析，不須經其他前處理，可將不同脂質（固醇）分為大類進行分析，得知該類固醇化合物的總量；並比較二種分析方法測定樣品植物固醇含量的差異。



## 第二節、實驗架構



## 肆、材料與方法

### 第一節、實驗材料

#### 一、稻米 (*Oryza sativa*)

稻穀樣品由聯米企業提供，期作年份及米種如下：

98 年期作：高雄 139 號、高雄 145 號、台南 11 號、台農 71 號、台中秈 10 號、台稉 9 號。99 年期作：高雄 145 號、台南 11 號、台農 71 號、台中秈 10 號、台稉 9 號、越光米。稻穀經去殼機脫殼後，糙米部分再以刀片式磨粉機 (固定 20000 rpm) 磨粉，磨粉條件參考儀器對稻穀類建議操作方式，秤取 50 g 糙米，磨粉 5 秒鐘 × 2 次。

#### 二、豆類

豆類樣品購自賣場，種類及商品標示產地如下：

黃豆 (*Glycine max*, 產自加拿大)、黑豆 (*Glycine max* (L.) Merr., 產自中國)、紅豆 (*Vigna angularis*, 產自台灣)、綠豆 (*Vigna radiate*, 產自台灣)、花豆 (*Phaseolus coccineus* L. var. *albonanus* Bailey, 產自台灣)。以刀片式磨粉機 (固定 20000 rpm) 磨粉，磨粉條件參考儀器對豆類建議操作方式，秤取 50 g 豆類，磨粉 5 秒鐘 × 2 次。

### 第二節、藥品

#### 一、植物固醇標準品

1. Campesterol，純度 $\geq 97\%$ ，タマ生化學株式會社，(Tokyo, Japan)。
2. Cholesterol，純度 $\geq 99\%$ ，Sigma (St. Louis, Mo, USA)。
3. Cholesteryl palmitate，純度 $\geq 97\%$ ，MP Biomedicals (Boston, MA, USA)。
4. Ergosterol，純度 $\geq 95\%$ ，東京化成工業株式會社，(Tokyo, Japan)。
5. Esterified steryl glucosides，純度 $\geq 98\%$ ，Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, USA)。
6. Sitostanol，純度 $\geq 95\%$ ，Sigma (St. Louis, Mo, USA)。
7. Steryl glucosides，純度 $\geq 98\%$ ，Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, USA)。
8. Stigmasterol，純度 $\geq 95\%$ ，Sigma (St. Louis, Mo, USA)。

9. Tristearin，純度 $\geq 97\%$ ，MP Biomedicals (Boston, MA, USA)。
10.  $\beta$ -Sitosterol，純度 $\geq 97\%$ ，タマ生化学株式會社 (Tokyo, Japan)。
11.  $\beta$ -Sitosterol，總固醇 $\geq 95\%$ ，Calbiochem (Darmstadt, Germany)。  
\* 內含  $\beta$ -Sitosterol 75.5%, Sitostanol 13.0%, Campesterol 8.4%, Campestanol 1.3 %
12.  $\gamma$ -Oryzanol，純度 98.7%，築野食品工業株式會社 (Wakayama, Japan)。  
\* 參考值內含 campesteryl ferulate 13.2%,  $\beta$ -sitosteryl ferulate 7.4%  
cycloartenyl ferulate 36.3%, 24-methylencycloartanyl ferulate 40.7%

## 二、溶劑

1. Acetone：層析級，純度 99.9%，景明公司 (Miaoli, Taiwan)。
2. Acetonitrile：質譜級，純度 100%，J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)。
3. Chloroform：層析級，純度 100%，J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)。
4. Ether：層析級，純度 99.9%，J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)。
5. Ethyl acetate：試藥級，純度 99.9%，J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)。
6. Methanol：層析級，純度 99.9%，Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, NJ, USA)。
7. Methanol：質譜級，純度 100%，J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)。
8. n-Hexane：層析級，純度 99%，J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)。
9. 2-Propanol：層析級，純度 99.7%，J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)。

## 三、藥品

1. Formic acid：試藥級，純度 99.7%，Riedel-de Haën (Germany)
2. Butylated hydroxytoluene (BHT)：試藥級，純度 $\geq 99\%$ ，Sigma (St. Louis, Mo, USA)

### 第三節、儀器設備

#### 一、樣品製備及萃取

1. 刀片式磨粉機:1095 Knifetec Sample Mill, Foss Tecator 製造 (Höganäs, Sweden)
2. 水浴槽 (Shaker bath) : Hotech 製造 (Taipei, Taiwan)
3. 減壓濃縮機 (Rotary evaporator) : RE111, Buchi 製造 (Flawil, Switzerland)
4. 減壓濃縮機用水浴槽 (water bath) : 461, Buchi 製造 (Flawil, Switzerland)
5. 超音波洗淨器 (Ultrasonic cleaner) : power sonic 420, Hwashin 公司製造 (Korea)

#### 二、固相萃取

1. 固相萃取管 :  
Strata® NH<sub>2</sub>, 500 mg / 3 mL Tubes, 購自 Phenomenex (Torrance, CA, USA)  
Strata® SI-1 Silica, 500 mg / 3 mL Tubes, 購自 Phenomenex (Torrance, CA, USA)  
Sep-Pak® Plus tC18 cartridge, 400 mg, 購自 Waters (Milford, MA, USA)
2. 固相萃取真空抽氣裝置 : Sample preparation unit, Merck 製造 (Darmstadt, Germany)
3. 抽氣幫浦 : Bio-Vac 240 Suction System, 今日儀器製造 (Taipei, Taiwan)

#### 三、溶劑及樣品過濾

1. HPLC 流洗液過濾裝置 : 抽氣瓶 : Millipore 製造 (Billerica, MA, USA)
2. 固定濾膜裝置 : 購自慶發玻璃公司 (Hsinchu, Taiwan)
3. 尼龍過濾膜 (Nylon membrane) : 47 mm × 0.22 μm, 購自 Chrom Tech (Apple Valley, MN, USA)
4. 濾紙 (filter paper) : No. 1, 9.0 cm I.D., 購自 Whatman (Springfield Mill, UK)
5. 針筒過濾器 (Syringe filter) : Nylon, 13 mm × 0.22 μm, 購自 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

#### 四、逆相液相層析與串聯質譜系統

1. 由 Thermo Scientific 製造 (Waltham, MA, USA) :

離子阱式質譜儀：Finnigan LXQ Linear Ion Trap Mass Spectrometer，含大氣壓力化學游離離子源 (APCI) 及電噴灑游離離子源 (ESI) 探針 (Probe)

自動進樣器 (Autosampler)：Finnigan Surveyor autosampler plus

層析幫浦 (Pump)：Finnigan Surveyor LC pump plus, sample loop volume: 25  $\mu$ L

光二極體陣列式檢測器 (Photo Diode Array detector)：Finnigan Surveyor PDA plus detector

數據擷取與處理軟體 (data acquisition and processing software)：LXQ tune and Xcalibur 2.0.7

2. 液相層析管柱 (HPLC column)：

Kinetex C18, 150  $\times$  2.1mm I.D. 2.6  $\mu$ m, 10 nm, Phenomenex (Torrance, CA, USA)

KrudKatcher Ultra HPLC In-Line Filter 0.5  $\mu$ m Depth Filter x 0.004in ID，

Phenomenex (Torrance, CA, USA)

#### 五、正相液相層析-蒸發光散射偵測器系統

1. 由 Hitachi 公司製造 (Tokyo, Japan)：

層析幫浦 (Pump)：Model L-7100

紫外光-可見光偵測器 (UV-VIS Detector)：Model L-7420

自動進樣器 (Autosampler)：Model L-7200，進樣體積：20  $\mu$ L

2. 管柱恆溫器 (column oven)：Model EOC-1，立行公司製造 (Taipei, Taiwan)

3. 蒸發光散射偵測器 (evaporative light scattering detector)：Varex MKIII ELSD，Alltech 公司製造 (Deerfield, IL, USA)

4. 無油式空氣壓縮機 (Oilless Piston Air Compressor)：Model M450GX，Gast Manufacturing 公司製造 (Benton Harbor, MI, USA)

5. 數據擷取與處理軟體 (data acquisition and processing software)：SISC chromatography data system，購自訊華公司 (Taipei, Taiwan)

6. 液相層析管柱 (HPLC column)：Chromatorex Diol SPS 100-5 (250 $\times$ 4.6 mm I.D. 5  $\mu$ m, 10 nm) 購自 Fuji Silysia Chemical (Aichi, Japan)



## 第四節、實驗方法

### 一、植物固醇萃取

精秤 2 g 的樣品粉末 (磨粉條件詳見實驗材料處) 後倒入 125 mL 磨砂口錐形瓶, 加入 0.1 mL (10 mg/mL, 溶於甲醇) 的 BHT (butylated hydroxytoluene) 作為抗氧化劑, 加入 10 mL 甲醇, 使用超音波震盪 1 分鐘後再加入 20 mL 氯仿, 置於 30°C 水浴槽中振盪萃取 20 分鐘。萃取液以 Whatman No. 1 濾紙 (直徑 9 cm) 及玻璃漏斗過濾至濃縮瓶, 濾紙上的濾渣以甲醇沖入錐形瓶中, 再進行上述萃取步驟二次。重複萃取三次的萃取液於 40°C 水浴鍋中減壓濃縮, 再以 6 mL 氯仿回溶, 即為樣品液 (最終 BHT 濃度約 0.05%), 所有樣品皆為三重複 (n = 3)。

### 二、固相萃取法

參考 Pinkart 等人利用 NH<sub>2</sub> 固相萃取管分離微生物脂質的方式 (Pinkart *et al.*, 1998) 及 Russo 等人利用 NH<sub>2</sub> 固相萃取管分離出動物油中膽固醇的方法 (Russo *et al.*, 2005) 加以修改, 將固相萃取管插入固相萃取真空抽氣裝置上, 使用玻璃吸量管吸取有機溶劑。以 3 mL 的正己烷活化 NH<sub>2</sub> 固相萃取管 (500 mg / 3 mL), 加入樣品液 200 µL, 以正己烷/乙酸乙酯 (95:5, v:v) 6 mL 洗去三酸甘油酯及酯化態固醇, 再依序加入各 5 mL 的氯仿、丙酮及甲醇, 自由態固醇及 steryl ferulate 主要於氯仿層中, 酯化糖苷態在丙酮層, 糖苷態固醇於甲醇層。合併收集流洗下來的氯仿、丙酮及甲醇流洗液, 收集液減壓濃縮至乾後以 2 mL 甲醇回溶, 以玻璃針筒及 0.22 µm Nylon 針筒過濾器過濾置入 2 mL 褐色樣品瓶, 保存於 -20°C 待 LC-MS 分析。

### 三、以逆相液相層析串聯質譜儀分析植物固醇

#### (一) 分析條件

經過固相萃取分離淨化後的樣品, 以自動進樣器注入管柱, 進樣體積為 25 µL。使用管柱為 Kinetex C18 (150 × 2.1 mm, 2.6 µm), 管柱溫度 30°C; 移動相為 A: 超純水、B: 乙腈及 C: 甲醇組成的三相系統, 移動相皆含有 0.1% 甲酸, 流速為 0.3 mL/min。層析梯度為線性, 條件如下:

Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	15.0	42.5	42.5
10	0.0	50.0	50.0
30	0.0	50.0	50.0
32	0.0	20.0	80.0
80	0.0	20.0	80.0
82	15.0	42.5	42.5
100	15.0	42.5	42.5

## (二) 標準品

將 cholesterol、campesterol、stigmasterol、 $\beta$ -sitosterol 及 sitostanol 溶於丙酮中，再以甲醇稀釋成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的儲備液，分析時以甲醇序列稀釋作為檢量線樣品。非單一物質的標準品  $\gamma$ -oryzanol 及 esterified sterol glycosides 溶於丙酮，sterol glycosides 溶於氯仿，分別作為 sterol ferulate、酯化甾萜及甾萜固醇的標準品，同樣以甲醇稀釋並與自由態固醇混合作為對照用的混合標準品。

## (三) 自由態固醇的添加回收率

將 cholesterol、campesterol、stigmasterol、 $\beta$ -sitosterol 及 sitostanol 添加到糙米樣品 (2 g) 中各 30、90 及 180  $\mu\text{g}$  (相當於最後樣品液中濃度 0.5, 1.5 及 3.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，依前述樣品萃取方式萃取及以固相萃取淨化樣品，經 LC-MS 分析後計算結果，將添加自由態固醇後測定的固醇量扣除未添加的數值，計算各個自由態固醇的添加回收率百分比。

## (四) 植物固醇的質譜分析

### 1. 游離化條件設定

由於本實驗方法植物固醇大多於移動相提升到完全為有機相時才被流洗出管柱，模擬實際分析時的移動相條件，使用 T 型接頭連接針筒幫浦 (混和自由態固醇標準品，1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，流速 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) 及流洗液 (乙腈:甲醇=1:1，流速 300  $\mu\text{l}/\text{min}$ )，將混和溶液直接注入質譜儀中。於正電模式下以自動調機 (auto tune) 調整儀器參數，並以半自動模式調整 sheath gas、aux gas、電壓等參數， $\beta$ -sitosterol 的離子訊號 ( $m/z$  397) 強度最佳化，並以此 tune file 作為分析時所用的質譜條件：

Capillary temperature: 150°C, APCI vaporizer temperature: 350°C, Sheath gas flow: 20 arb (arbitrary unit), Aux gas flow: 5 arb, Source voltage: 6 kV, Source current: 5 μA, Capillary voltage: 5 V。

## 2. 以二次質譜對植物固醇進行斷裂片段分析

選定一次質譜所得植物固醇的離子訊號，額外施加能量撞擊此母離子使其解離 (collision-induced dissociation, CID)，可得該離子的二次質譜，為該化合物特有的離子片段，可做為定性參考。實驗中皆設定 CID 能量值為 25%。

## 3. 檢量線配製及質譜分析的偵測與定量極限

配製不同濃度的自由態固醇標準品溶液：10000, 5000, 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 ng/mL，以液相層析串聯質譜儀分析，數據處理時將 peak smoothing (波峰平滑) 的設定至最大，以濃度及積分面積的關係製作檢量線並計算其 R square 值。另以該波峰的訊噪比 (Signal-to-noise ratio, S/N)  $\geq 3$  時的濃度定為儀器偵測極限 (limit of detection, LOD)；波峰的訊噪比 (Signal-to-noise ratio, S/N)  $\geq 10$  時的濃度定為儀器定量極限 (limit of quantitation, LOQ)。

## 4. 定量計算

以數據處理軟體 Xcalibur 選擇固醇基團脫去一分子水的最強特徵離子訊號，以 extracted ion chromatogram (EIC) 選擇該離子觀察，得出各波峰的面積。自由態固醇各以其標準品定量，無標準品的 avenasterol 則以 stigmasterol 定量，由於缺乏各類結合態固醇的單一物質標準品，仍以自由態固醇為定量基準，如結合態固醇其結構中固醇基團為  $\beta$ -sitosterol 者，皆以  $\beta$ -sitosterol 定量，以此類推，固醇基團為 avenasterol 者則以 stigmasterol 定量。Steryl ferulate 中的 cycloartenyl ferulate, cycloartanyl ferulate 及 24-methylcycloartanyl ferulate，包含其 *cis*-ferulate 型皆以  $\beta$ -sitosterol 定量。

#### 四、以正相液相層析搭配蒸發光散射檢測器分析植物固醇

##### (一) 分析條件

將萃取後的樣品液以氯仿適當稀釋後以玻璃針筒及 0.22  $\mu\text{m}$  Nylon 過濾器過濾置入 2 mL 褐色樣品瓶，以自動進樣器注入分析，進樣體積為 20  $\mu\text{L}$ ，使用管柱為 Diol (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )，管柱溫度 30 $^{\circ}\text{C}$ ；移動相為 A：正己烷 (含有 0.1% 甲酸) 及 B：異丙醇，流速為 1.0 mL/min。層析梯度為線性，條件如下：

Time (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
5	100	0
7	99	1
20	99	1
25	80	20
35	75	25
40	15	85
50	15	85
52	100	0
75	100	0

蒸發光散射檢測器參數設定：漂移管溫度 (Drift tube temperature)：75 $^{\circ}\text{C}$ ，霧化器氣體流速 (Nebulizer gas flowrate)：2.2 SLPM (Standard Liters Per Minute)，氣體為空氣。

##### (二) 標準品

以 cholesteryl palmitate (酯化態固醇)、tristearin (三酸甘油酯)、 $\beta$ -sitosterol (自由態固醇)、 $\gamma$ -oryzanol (steryl ferulate)、esterified steryl glycoside (酯化糖苷態固醇) 及 steryl glycoside (糖苷態固醇) 作為定量用標準品，除 steryl glycosides 溶於氯仿：甲醇 = 2:1 (v:v) 的 Folch 溶劑中，其餘標準品皆溶於氯仿。將標準品混合配製為 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (steryl glycosides 及 esterified steryl glycoside 為 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 儲備液保存，分析時以氯仿序列稀釋成不同濃度的溶液作為檢量線樣品。

(三) 檢量線配製及蒸發光散射檢測器的偵測與定量極限

Cholesteryl palmitate、 $\beta$ -sitosterol 及  $\gamma$ -oryzanol 的配製濃度為：1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；tristearin、esterified steryl glucoside 及 steryl glucoside 的配製濃度為：0.5, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以濃度及積分面積的關係製作檢量線並計算其 R square 值。另以該波峰的訊噪比 (Signal-to-noise ratio, S/N) = 3 時的濃度定為儀器偵測極限 (limit of detection, LOD)；波峰的訊噪比 (Signal-to-noise ratio, S/N) = 10 時的濃度定為儀器定量極限 (limit of quantitation, LOQ)。



## 陸、結果與討論

### 第一節、溶劑選擇

雖然植物固醇均屬低極性物質，但其接上不同的取代基後仍造成其極性及對溶劑溶解度的改變，而本實驗目的在於同步分析不同型態的植物固醇，因此尋找對各種植物固醇皆有良好溶解度並能與流洗液互溶的溶劑為首要關鍵。

在溶解自由態植物固醇標準品試驗中發現甲醇、異丙醇及正己烷的溶解度皆不佳，而丙酮的溶解效果良好，故自由態、 $\gamma$ -oryzanol 及酯化糖苷態植物固醇標準品皆溶於丙酮；但發現糖苷態固醇於丙酮的溶解度較差，因此改溶於氯仿，後續再以甲醇稀釋，作為逆相層析時所用的標準品溶劑。正相層析實驗由於流洗液構成含低極性正己烷，參考分析脂類物質文獻所使用的溶劑 (Moreau *et al.*, 1990; Christie and Urwin, 1995)，將標準品溶於氯仿中，但因糖苷態配製的濃度較高，發現氯仿已不能有效溶解，改以氯仿/甲醇 2:1 (v:v) 的 Folch 溶劑即能順利溶解。

樣品溶劑的選擇除了溶解度與其和移動相的互溶性外，另一需考慮的為該溶劑與移動相強度的差異。如將樣品溶解於比移動相溶劑強度更高的溶劑中，可能造成波峰變寬 (broadening) 或變形 (distortion) (Snyder *et al.*, 2010)。在逆相層析分析植物固醇的預實驗時，由於初始選擇丙酮作為固相萃取後收集液濃縮回溶的溶劑，經分析後發現產生嚴重的波峰變形 (圖 8-A)，為解決此問題將該丙酮樣品液以流洗強度較弱的甲醇稀釋 10 倍後即改善 (圖 8-B)；而由於僅取少量樣品進行固相萃取，植物固醇的濃度已大幅降低，之後則全以甲醇回溶、稀釋樣品。正相層析實驗則因氯仿對各種植物固醇都有良好的溶解度，因此選擇氯仿作為樣品的溶液，實驗時並未發現產生波峰變形的問題。

綜合上述結果，單一組成溶劑中可與水互溶的溶劑以丙酮對於不同型態的植物固醇的溶解度最好，不與水互溶的溶劑則為氯仿；而氯仿的溶解度又較丙酮更佳，因其能溶解一定比例 (根據實驗推測至少 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的糖苷態固醇。植物固醇中的糖苷態固醇由於含有糖基，極性為固醇中最高者，氯仿對其溶解度不高，高極性的丙酮亦難溶，使用 Folch 溶劑方能溶解高濃度的糖苷態固醇標準品，根據此現象推論使用 Folch 法萃取不同型態植物固醇仍是目前最有效率的方法。但由於氯仿毒性較高，以其他的溶劑取代氯仿萃取可為未來研究方向。

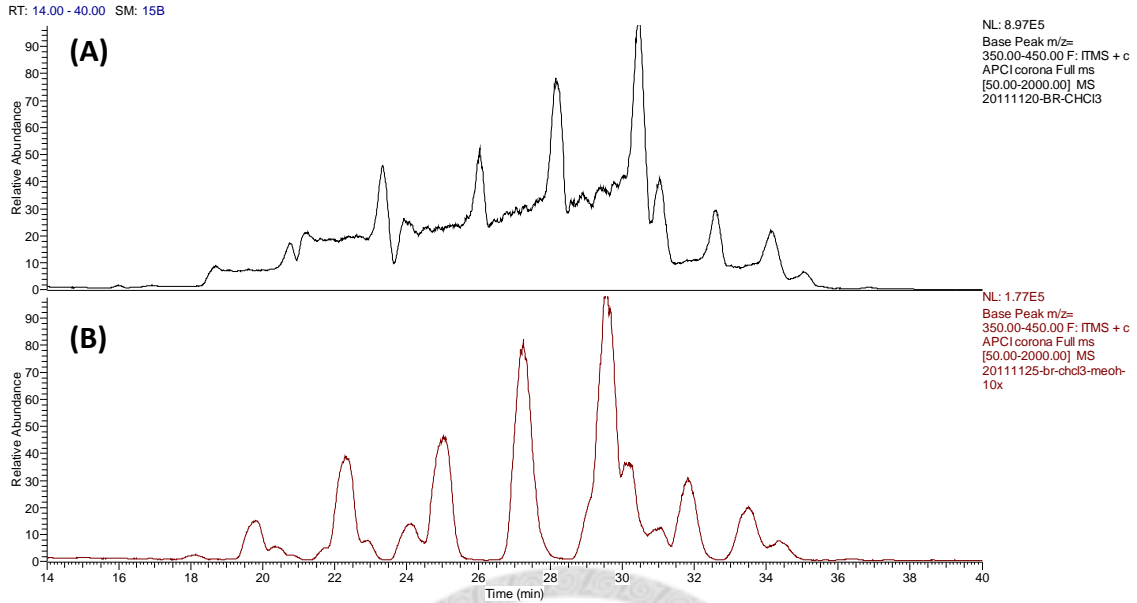


圖 8. 糙米植物固醇萃取物的液相層析串聯質譜圖譜

Figure 8. LC-MS chromatograms of brown rice phytosterols extract (A) dissolved in acetone (B) diluted the acetone solution 10 times with methanol

## 第二節、逆相液相層析串聯質譜儀分析樣品中的植物固醇

### 一、植物固醇逆相液相層析法的建立

#### (一) 管柱選擇

在建立層析方法時選用了 Kinetex C18 (150 × 2.1mm, 2.6 μm) 管柱，在預實驗時比較了 Kinetex C18 與其他 2 種管柱 Kinetex PFP (150 × 2.1mm, 2.6 μm) 及 YMC hydrosphere C18 (150 × 2.0 mm, 5 μm) 對於 6 種自由態固醇的分離效果，結果顯示 Kinetex C18 管柱分離效果遠高於 YMC hydrosphere C18 管柱，如 YMC 管柱對 campesterol 及 stigmasterol 分離不佳，而 Kinetex PFP 管柱則幾乎無法將個別的自由態固醇分離開。因此本實驗以 Kinetex C18 管柱進行後續分析。

#### (二) 移動相選擇

大部分的植物固醇都於移動相提升至 100% 的有機相時才被流洗出管柱，但實驗結果顯示移動相由 85% 的有機相開始梯度層析會比一開始就使用 100% 有機相的分離效果好。根據文獻對層析方法的整理，使用逆相層析移動相中有機相為乙腈

時流洗順序為 campesterol → stigmasterol，甲醇的結果則相反 (Abidi, 2001)；但本實驗結果顯示使用 Kinetex C18 管柱於水-甲醇或是水-甲醇/乙腈的系統下流洗順序皆為 campesterol → stigmasterol。此管柱在水-甲醇系統下無法將 campesterol 及 stigmasterol 分離，故再使用乙腈部分或完全取代甲醇下條件的測試這 2 種固醇分離效果，結果顯示當甲醇與乙腈的比例為 1:1 時分離效果最佳，但仍無法達到基線分離 (圖 9)，而乙腈的比例再增加時並無更好的分離效果，且由於乙腈流洗強度較甲醇弱，增加乙腈比例會使波峰的滯留時間增加。因此有機相以甲醇及乙腈的比例為 1:1 時作為移動相

酯化醣苷態固醇滯留於 C18 管柱中時間較長，因此嘗試於層析時間 30 分鐘時提高甲醇的比例使其加快流洗出來，測試甲醇比例 60、70、80、90 及 100% 的層析條件，結果顯示甲醇比例為 80% 時仍對酯化醣苷態固醇的分離效果良好，而提升甲醇比例亦有助於將未以固相萃取去除完全的三酸甘油酯洗出管柱，避免殘留干擾下一次分析。而接上脂肪酸的酯化態固醇由於其極端的低極性會比三酸甘油酯更加滯留於 C18 管柱中，因此實驗初期即擬以固相萃取方式去除而不分析。

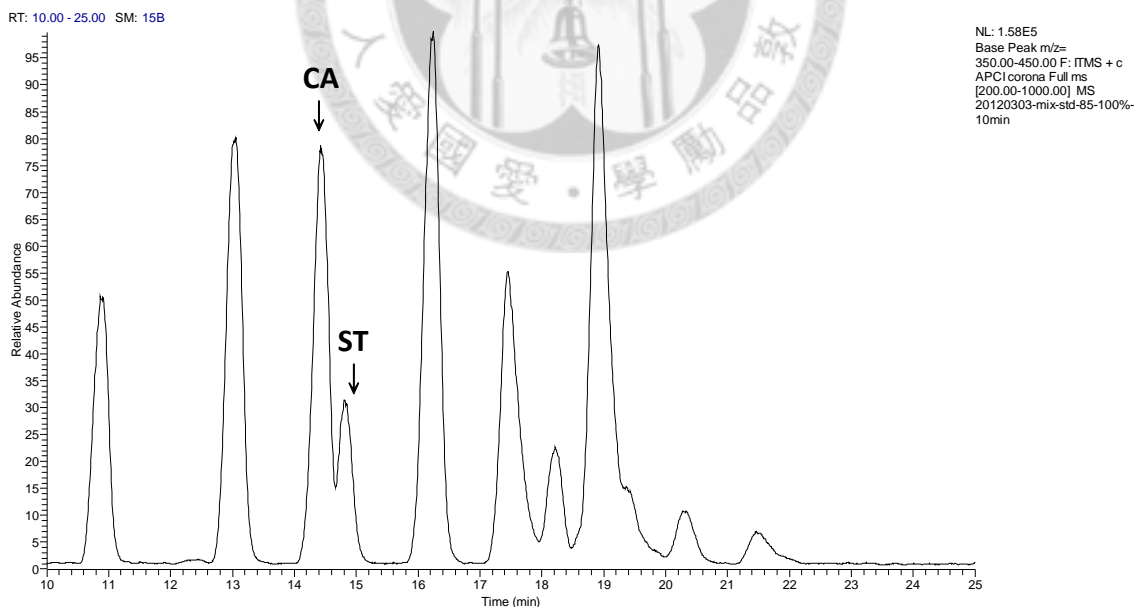


圖 9. 移動相甲醇及乙腈比例為 1:1 時的植物固醇標準品液相層析串聯質譜圖譜

Figure 9. LC-MS chromatogram of phytosterol standards, mobile phase consisting of methanol:acetonitrile 1:1. Extracted ion chromatogram in the 350 to 450  $m/z$  range. CA: campesterol, ST: stigmasterol



## 二、固相萃取法分離植物固醇

由於三酸甘油酯及酯化態固醇會滯留於 C18 管柱中，於本實驗的層析系統下需要長時間方能流洗出來。因此尋找將其二者去除並可同時分離出其他型態植物固醇的固相萃取法極為重要。

### (一) Silica SPE

一開始使用最多文獻 (見表 1) 採用的 silica 材質固相萃取管 (SI-1 Silica, 500 mg, Phenomenex) 試驗，以表 1 中所列的流洗方法進行糙米樣品的淨化，使用正己烷活化固相萃取管後加入溶於氯仿的樣品萃取液，依序以正己烷、正己烷:乙醚 (v:v, 90:10、85:15、80:20、70:30、50:50、0:100) 流洗，結果顯示正己烷:乙醚 = 85:15 含有大部分的自由態及  $\gamma$ -oryzanol，但仍含有大量的三酸甘油酯，而表 1 中所列的方法幾乎都針對酯化態及自由態固醇的區分層再進行皂化，顯示這些方法可能無法對三酸甘油酯及固醇分離，因無法再改善故不再使用正己烷/乙醚的系統。

### (二) C18 SPE

另參考 Toivo 等人方法加以修改 (Toivo *et al.*, 1998)，使用 C18 材質的固相萃取管 (tC18, 400mg, Waters)，測試最佳的系統為以甲醇活化固相萃取管，再以超純水洗去甲醇，加入溶於丙酮的樣品液，依序以超純水、50% 甲醇、80% 甲醇及 10% 氯仿/甲醇溶液流洗，結果顯示 10% 氯仿/甲醇層含有糖苷態、自由態、 $\gamma$ -oryzanol，而酯化糖苷態並未完全洗出來。如再進一步流洗則會一同洗出大量的三酸甘油酯造成分析上的干擾，因此放棄使用 C18 材質的固相萃取管。

### (三) NH<sub>2</sub> SPE

由於最常使用的 silica 及 C18 固相萃取管淨化樣品的效果皆不佳，查詢文獻後發現 NH<sub>2</sub> 固相萃取管被廣泛用於生物體脂質成分的分離，但並未搜尋到其使用於分離植物固醇的文獻，故參考 Pinkart 等人分離微生物脂質的方式 (Pinkart *et al.*, 1998) 及 Russo 等人分離動物油中膽固醇的方法 (Russo *et al.*, 2005) 加以修改，以正己烷活化 NH<sub>2</sub> 管柱，加入溶於氯仿的糙米樣品液，以正己烷:乙酸乙酯 (95:5, v:v) 流洗洗去三酸甘油酯及酯化態固醇，再以氯仿流洗出自由態固醇及  $\gamma$ -oryzanol，丙

酮流洗出酯化糖苷態固醇，甲醇流洗出糖苷態固醇。雖然氣仿層仍有少量三酸甘油酯的存在，但在分析時間內仍可流洗出管柱，故不對分析造成干擾；而 NH<sub>2</sub> 固相萃取管另可以將脂肪酸酯化態固醇及三酸甘油酯分離開 (Pinkart *et al.*, 1998)，但在逆相層析實驗中並不分析酯化態固醇，故以正己烷:乙酸乙酯 (95:5, v:v) 將其一併洗去。而在測試正相層析的層析條件時曾使用 NH<sub>2</sub> 管柱分析固醇標準品，層析圖如圖 10 所示，cholesteryl palmitate (代表酯化態固醇) 於移動相為正己烷時洗出管柱，tristearin (代表三酸甘油酯) 於梯度提升至約 25% 異丙醇時才流洗出來，由於將二者於從層析管柱上流洗出所需的移動相強度差異較大，推測即便使用分離效果較差的固相萃取管柱也能達到分離，此一結果除了與文獻結果對照外，並可作為將來分離酯化態固醇的參考。

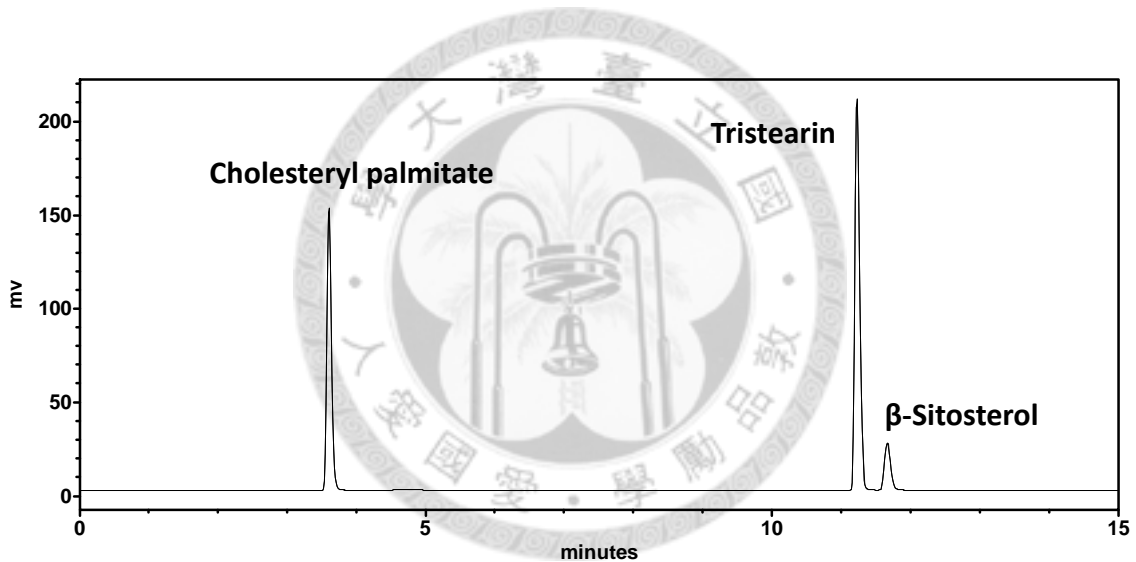


圖 10. 三酸甘油酯及固醇標準品於 NH<sub>2</sub> 管柱的層析圖

Figure 10. HPLC-ELSD chromatogram of lipid standards using NH<sub>2</sub> column (Spherecolon NH<sub>2</sub>, 250 × 4.6 mm, 5 μm, Phenomenex) as stationary phase. The gradient starts at 100% hexane at 0-5 minutes, and increases to 15/85, hexane/isopropanol at 25 minutes, flow rate is 1 mL/min

### 三、植物固醇的定性

由於植物固醇種類繁多，商業上大多缺乏固醇的單一標準品可供使用，如本實驗中所用的結合態植物固醇標準品皆為混合物。要針對樣品中含有的植物固醇定性，除了在層析上將不同化合物分離開，更需依賴質譜所提供的離子訊號來得到結構資訊。

#### (一) 不同型態植物固醇於 APCI 正電模式下的特徵離子訊號

預實驗時將自由態固醇標準品溶液直接注入質譜儀中，在電噴灑游離法正電及負電模式下皆未觀察到有特徵離子產生，顯示自由態固醇無法以電噴灑游離方式游離化。故本實驗選擇大氣壓力化學游離法作為游離源，於正電模式下可觀察到固醇的訊號，負電模式下則連背景訊號都不穩定，故後續實驗皆以正電模式下分析，表 4 為以 LC-MS 分析固醇標準品及樣品後所得植物固醇的特徵離子訊號及層析滯留時間。

將植物固醇標準品及樣品以 LC-MS 分析後發現，自由態、steryl ferulate、醣苷態及酯化醣苷態固醇於 APCI 正電模式下的特徵離子皆以其固醇基團（不含取代基）脫水後的離子  $[M+H-H_2O]^+$  最高（見表 4 及圖 11），此結果與文獻的結果一致 (Yamauchi *et al.*, 2001; Rozenberg *et al.*, 2003; Stöggel *et al.*, 2005; Rudell *et al.*, 2011)。而大多數固醇此特徵離子訊號落於  $m/z$  350-450 之間，故呈現層析質譜圖時也選擇此  $m/z$  範圍產生萃取離子層析圖，較易觀察到固醇的波峰。自由態固醇另有較弱的  $[M+H-2H]^+$  及  $[M+H-4H]^+$  的訊號，這二者分別代表固醇分子產生脫氫 (dehydrogenation) 及環化 (cyclization) (Rozenberg *et al.*, 2003)；本實驗中僅 ergosterol 產生較強的分子離子 (molecular ion) 訊號 ( $m/z$  397,  $[M+H]^+$ )，推測此差異是因其結構上帶有共軛雙鍵而與其他固醇分子不同所產生。而在所用游離系統下皆未觀察到固醇分子接上甲酸、鈉或鉀離子的加成訊號。

如圖 12 所示，醣苷態固醇的次要離子訊號與自由態固醇相同，為其配醣基（固醇基團）減去 2 及 4 個氫離子 ( $[Aglycone+H-2H]^+$  及  $[Aglycone+H-4H]^+$ )，推測亦為固醇分子產生脫氫及環化。分子離子訊號與 Yamauchi 等人的  $[M+Na]^+$  (Yamauchi *et al.*, 2001) 及 Rozenberg 等人的  $[M+H_2O]^+$  (Rozenberg *et al.*, 2003) 結果不同，本實驗中醣苷態固醇  $[M+H]^+$  的分子離子訊號強度極低，對溫度 (APCI

vaporizer temperature) 及電壓 (Source voltage) 進行調整未使訊號強度增加，使用自動調機也無法使醣苷態分子離子訊號增強。由於醣苷態與自由態產生的離子訊號種類相同，對醣苷態固醇定性除了比較其次要離子訊號的強度外亦須仰賴其與自由態固醇的滯留時間差異來判斷。

Steryl ferulate 的質譜圖如圖 13 所示，其次要離子訊號為與其分子量相近的一連串訊號 (圖 14)，文獻中以 APCI 正電模式下分析 steryl ferulate 除了其固醇基團脫水的訊號外並未產生分子離子訊號 (Fang *et al.*, 2003; Stöggel *et al.*, 2005)，目前並無文獻可供比對，故暫時推測為  $[M\cdot]^+$  的訊號。表 4 中列出的 isomer-409 及 isomer-423 為其最強特徵離子訊號為 409 及 423，Stöggel 等人分析粗米糠油亦發現  $\gamma$ -oryzanol 中的未知化合物也有 409 及 423 的訊號 (Stöggel *et al.*, 2005)，由於二者訊號分別與 cycloartenyl ferulate 及 24-methylcycloartenyl ferulate 相同，以一次質譜訊號僅能推測可能為已知化合物的類似物。

文獻中酯化醣苷態固醇的分子離子訊號有  $[M + H_2O]^+$  (Rozenberg *et al.*, 2003) 及  $[M + Na]^+$  (Yamauchi *et al.*, 2001)，在本實驗中產生的分子離子訊號有三種： $[M+H]^+$ 、 $[M+H-H_2O]^+$  及  $[M + H_2O]^+$  (見表 4 及圖 15)。經比較訊號強度後發現，與飽和脂肪酸 ( $C_{16:0}$  及  $C_{18:0}$ ) 酯化鍵結的酯化醣苷態固醇其分子離子訊號  $[M+H-H_2O]^+$  強度最強，但產生的訊號多未及特徵離子訊號的 10%，而不飽和脂肪酸 ( $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$  及  $C_{18:3}$ ) 鍵結的酯化醣苷態固醇則並不固定，但隨著結構中雙鍵的增加分子離子訊號的訊號強度比例大部分皆有上升。推測結構中雙鍵增加可使分子離子訊號增強，自由態固醇中具有三個雙鍵的 ergosterol 亦產生明顯的分子離子訊號。

表 4. 經 LC-APCI-MS 分析所得植物固醇的特徵離子及滯留時間

Table 4. Molecular mass, MS data and retention time (RT) for standard sterols and phytosterols found in samples, analysed by LC/APCI-MS

Compound	Molecular mass	Characteristic ions (intensity, %)				RT (min)
		[M+H] <sup>+</sup>	[Aglycone +H-2H] <sup>+</sup>	[Aglycone +H-4H] <sup>+</sup>	[Aglycone + H -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	
<i>Steryl glucoisdes</i>						
Avenasterol glucoside	574	575 (1.3)	411 (9.2)	409 (33.8)	395 (100)	8.05
Campesteryl glucoside	562	563 (0.2)	399 (4.6)	397 (7.1)	383 (100)	8.88
Stigmasteryl glucoside	574	575 (0.7)	411 (7.9)	409 (10.5)	395 (100)	9.11
β-Sitosterol glucoside	576	577 (0.4)	413 (4.0)	411 (5.9)	397 (100)	9.83
<i>Free sterols</i>						
		[M+H] <sup>+</sup>	[M +H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[M +H-2H] <sup>+</sup>	[M +H-4H] <sup>+</sup>	
Ergosterol	396	397 (7.4)	379 (100)	395 (4.7)	393 (22.2)	11.52
Cholesterol	386		369 (100)	385 (23.0)	383 (23.0)	13.79
Avenasterol (Δ <sup>5</sup> +Δ <sup>7</sup> )	412		395 (100)	411 (15.0)	409 (16.5)	14.00
Campesterol	400		383 (100)	399 (22.0)	397 (22.2)	15.28
Stigmasterol	412		395 (100)	411 (22.0)	409 (21.5)	15.66
β-Sitosterol	414		397 (100)	413 (23.0)	411 (23.1)	17.15
Stigmastanol (sitostanol)	416		399 (100)	415 (0.8)	413 (9.1)	19.22
<i>Steryl ferulates</i>						
				[M] <sup>+</sup>	[M-Ferulate+ H -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	
Cycloartenyl ferulate	602.9			603 (4.9)	409 (100)	18.67
Cycloartenyl <i>cis</i> -ferulate (Isomer-409)	602.9			603 (1.9)	409 (100)	19.87
24-methylcycloartanyl ferulate	616.9			616 (2.8)	423 (100)	20.20

Campesteryl ferulate	576.9	576 (4.0)	383 (100)	20.63
Stigmasteryl ferulate	588.9	588 (7.6)	395 (100)	21.01
24-methylcycloartanyl <i>cis</i> -ferulate (Isomer-423)	616.9	616 (0.5)	423 (100)	21.66
$\beta$ -Sitosteryl ferulate	590.9	590 (4.4)	397 (100)	22.94
Cycloartanyl ferulate	604.9	604 (3.3)	411 (100)	23.18

<i>Acylated steryl glucosides</i>		[M+H] <sup>+</sup>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[M+H <sub>2</sub> O] <sup>++</sup>		[M-Fatty acid-Glc+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	
Campesteryl (6'-O-linolenyl)- $\beta$ -D-glucoside	834	835 (34.1)	817 (26.8)	852 (1.9)		395 (100)	34.18
Stigmasteryl (6'-O-linolenyl)- $\beta$ -D-glucoside	822	823 (11.6)	806 (21.3)	840 (8.9)		383 (100)	34.56
Avenasteryl (6'-O-linoleoyl)- $\beta$ -D-glucoside	836	837	819	854		395 (100)	36.51
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-linolenyl)- $\beta$ -D-glucoside	836	837 (20.2)	819 (11.9)	854 (19.6)		397 (100)	36.62
Campesteryl (6'-O-linoleoyl)- $\beta$ -D-glucoside	824	825 (15.6)	807 (16.1)	842 (10.3)		383 (100)	39.29
Stigmasteryl (6'-O-linoleoyl)- $\beta$ -D-glucoside	836	837 (31.7)	819 (22.2)	854 (23.0)		395 (100)	39.72
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-linoleoyl)- $\beta$ -D-glucoside	838	839 (16.3)	821 (12.0)	856 (13.0)		397 (100)	42.38
Avenasteryl (6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucoside	812	813 (5.4)	795 (8.1)	830 (6.2)		395 (100)	43.59
Avenasteryl (6'-O-oleyl)- $\beta$ -D-glucoside	838	839 (2.1)	821 (1.4)	856 (1.9)		395 (100)	43.62
Campesteryl (6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucoside	800	801 (1.5)	783 (5.8)	818 (4.5)		383 (100)	46.15
Campesteryl (6'-O-oleyl)- $\beta$ -D-glucoside	826	827 (6.7)	809 (8.7)	844 (4.8)		383 (100)	46.50
Stigmasteryl (6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucoside	812	813 (0.2)	795 (7.6)	830 (7.4)		395 (100)	46.53
Stigmasteryl (6'-O-oleyl)- $\beta$ -D-glucoside	838	839 (8.4)	821 (10.9)	856 (10.8)		395 (100)	46.60
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucoside	814	815 (1.3)	797 (4.1)	832 (5.0)		397 (100)	50.12
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-oleyl)- $\beta$ -D-glucoside	840	841 (5.6)	823 (6.6)	858 (4.3)		397 (100)	50.39
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-stearyl)- $\beta$ -D-glucoside	842	843 (1.3)	825 (10.7)	860 (3.8)		397 (100)	62.40

20120330-mix-STD-all #4351 RT: 17.15 AV: 1 NL: 1.22E5  
F: ITMS + c APCI corona Full ms [200.00-1000.00]

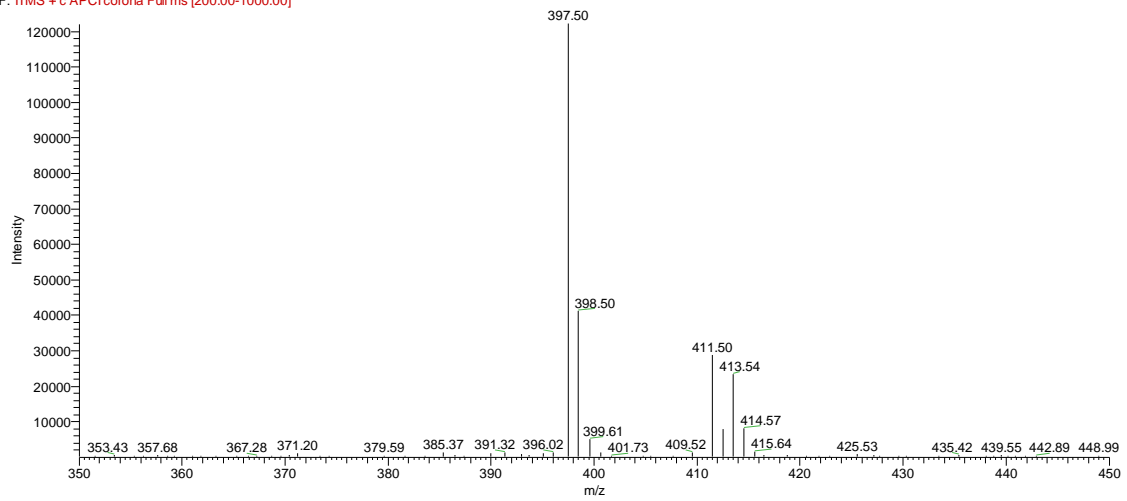


圖 11.  $\beta$ -Sitosterol 標準品的質譜圖

Figure 11. Mass spectrum of  $\beta$ -sitosterol standard

20120330-mix-STD-all #2470-2491 RT: 9.74-9.82 AV: 11 NL: 9.19E4  
F: ITMS + c APCI corona Full ms [200.00-1000.00]



圖 12.  $\beta$ -Sitosteryl glucoside 標準品的質譜圖

Figure 12. Mass spectrum of  $\beta$ -sitosteryl glucoside standard

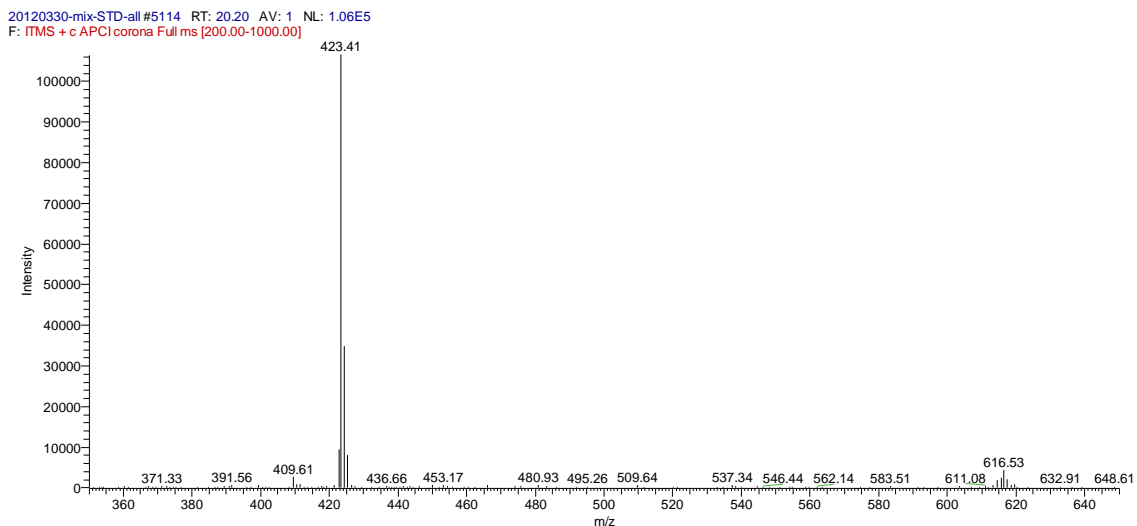


圖 13. 24-methylcycloartanyl ferulate 標準品的質譜圖

Figure 13. Mass spectrum of 24-methylcycloartanyl ferulate standard

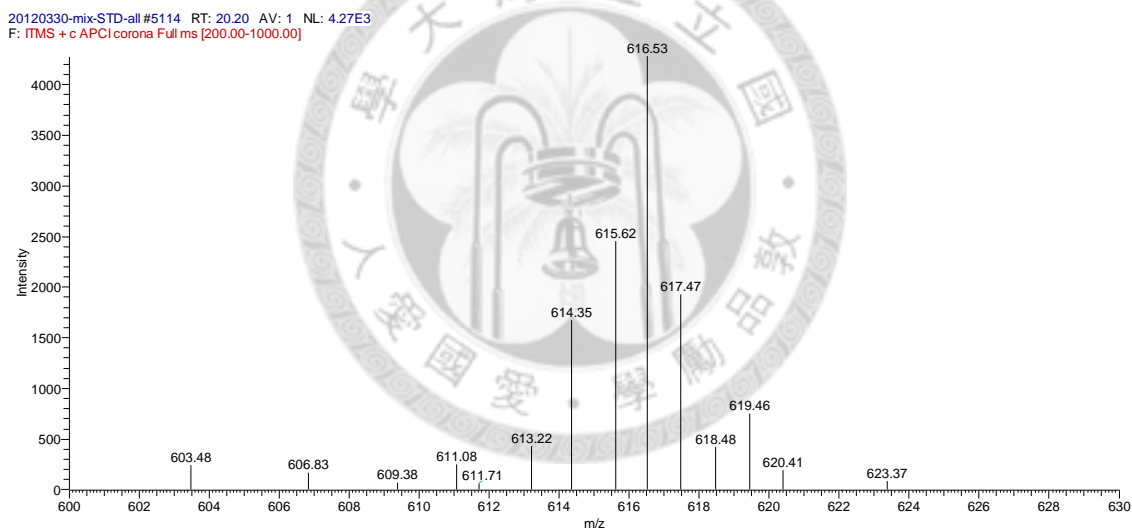


圖 14. 24-methylcycloartanyl ferulate 標準品的質譜圖 ( $m/z$  600-630)

Figure 14. Mass spectrum ( $m/z$  600-630) of 24-methylcycloartanyl ferulate standard



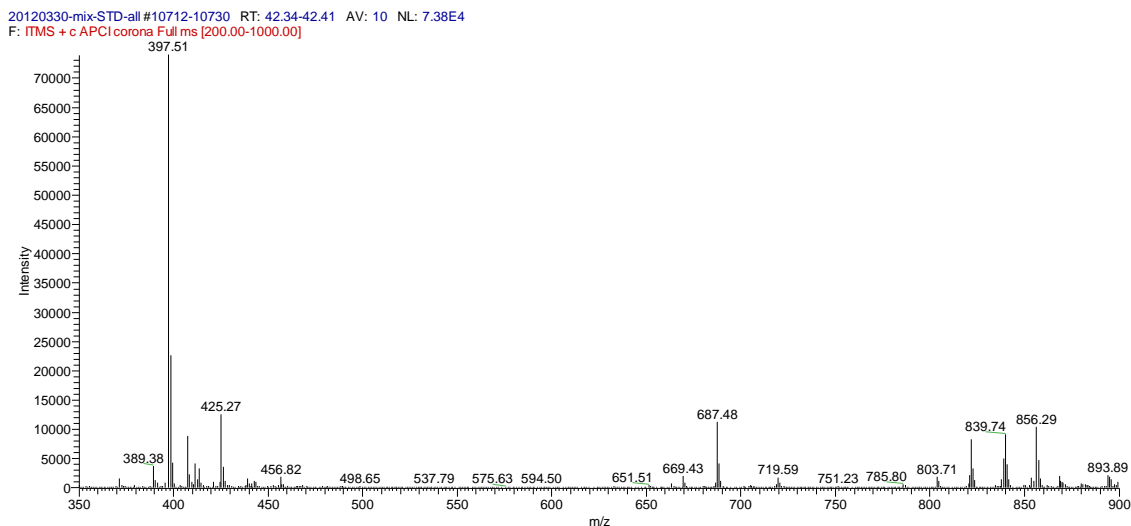


圖 15.  $\beta$ -Sitosteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside 的質譜圖

Figure 15. Mass spectrum of  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside (mixed standard)

## (二) 植物固醇的二次質譜

針對植物固醇特徵離子施加能量撞擊分析可得到其二次質譜，有助於對化合物的固醇基團進一步確認。圖 16 為自由態固醇特徵離子  $[M+H-H_2O]^+$  的二次質譜圖，與文獻中的二次質譜比對極為相似 (Rozenberg *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2011)，分析樣品中含有的固醇 avenasterol 及 stigmasterol 的特徵離子皆為  $m/z$  395，雖然其流洗順序不同，但在分析其結合態時仍造成定性上的困擾；而二者的二次質譜具有差異，stigmasterol 的二次質譜中  $m/z$  297 的訊號較 avenasterol 強，以此判定這 2 種化合物。但在分析樣品中 avenasterol 並非為單一化合物，圖 19 顯示 avenasterol 波峰由 2 波峰組成，比對文獻 (Rozenberg *et al.*, 2003) 後推測為  $\Delta$ 5- 及  $\Delta$ 7-avenasterol，其特徵離子訊號皆為  $m/z$  395，且二次質譜無明顯差異 (Rozenberg *et al.*, 2003)，故難以質譜訊號分辨二者。結合態植物固醇特徵離子的二次質譜與其固醇基團 (即自由態固醇) 相同，故不逐一列出。

圖 17 為 steryl ferulates 中缺少其固醇基團標準品的化合物其特徵離子的二次質譜，其中 cycloartenyl ferulate 與其質譜訊號相同的 isomer-409 的二次質譜相似；24-methylencycloartanyl ferulate 及 isomer-423 亦同，推測其結構上的固醇基團相似度極高；其餘 steryl ferulates 特徵離子的二次質譜與其自由態固醇相同。

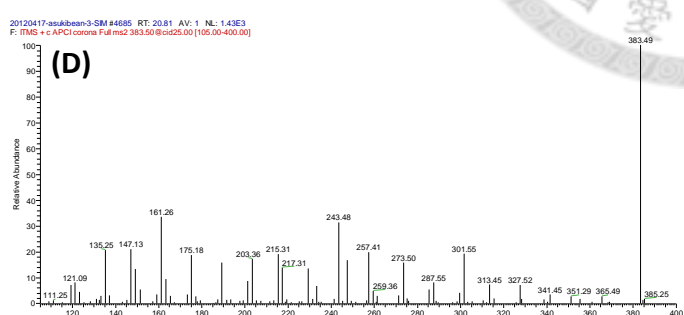
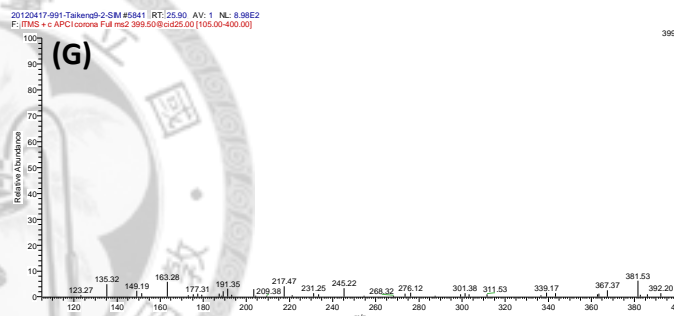
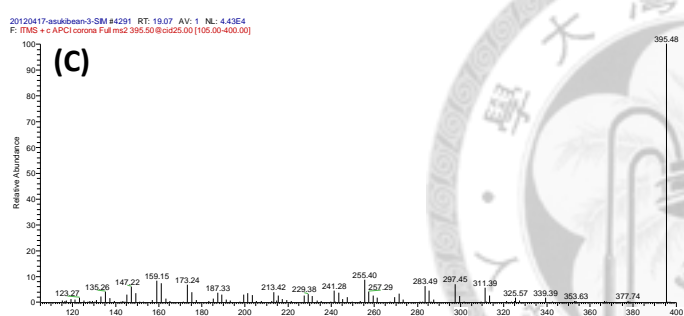
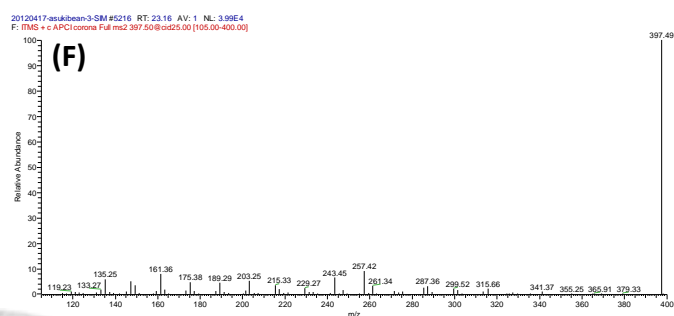
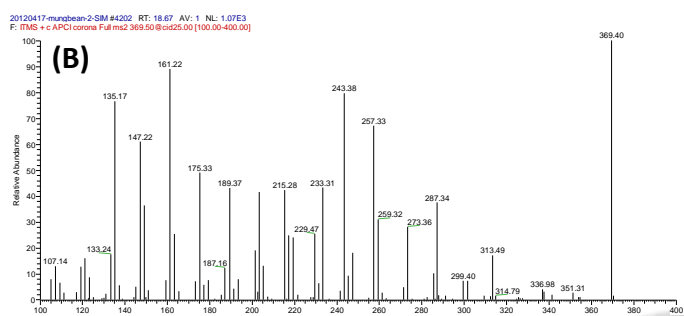
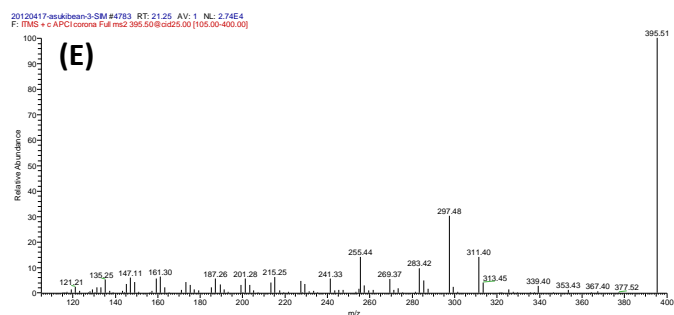
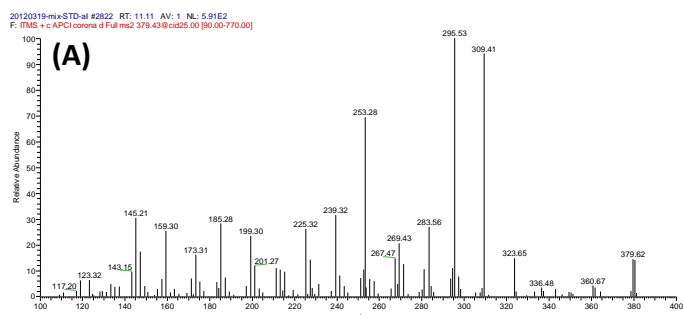


圖 16. 自由態固醇的二次質譜圖  
Figure 16. APCI-MS/MS spectra of (A) ergosterol, (B) cholesterol, (C) avenasterol, (D) campesterol, (E) stigmasterol, (F)  $\beta$ -sitosterol, and (G) sitostanol

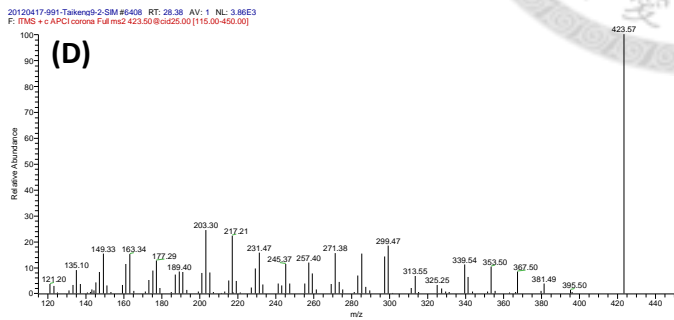
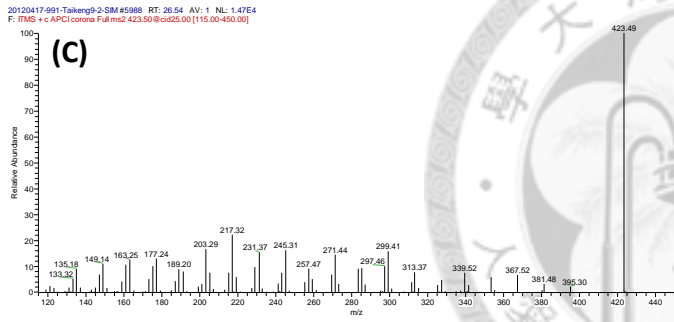
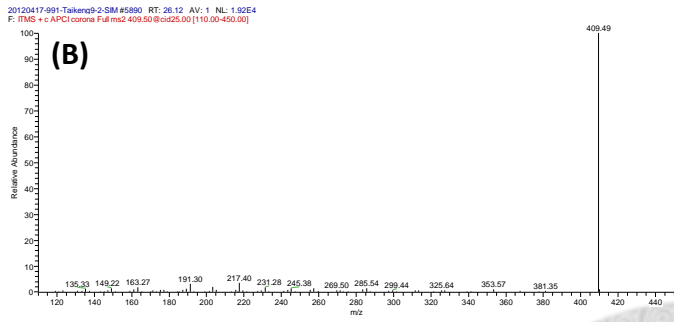
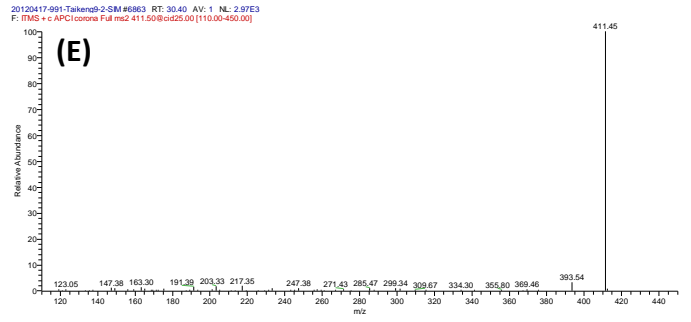
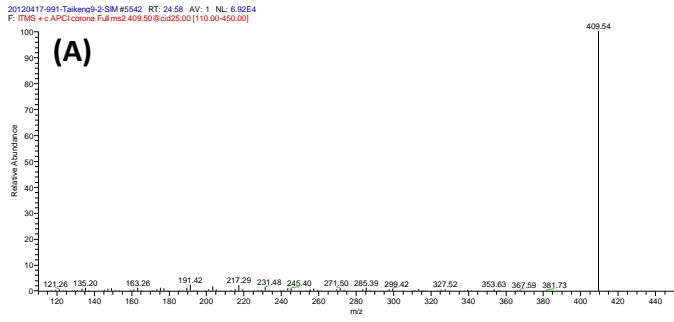


圖 17. Seryl ferulate 特徵離子的二次質譜圖

Figure 17. APCI-MS/MS spectra of (A) cycloartenyl ferulate, (B) isomer-409, (C) 24-methylcycloartanyl ferulate, (D) isomer-423, and (E) cycloartanyl ferulate



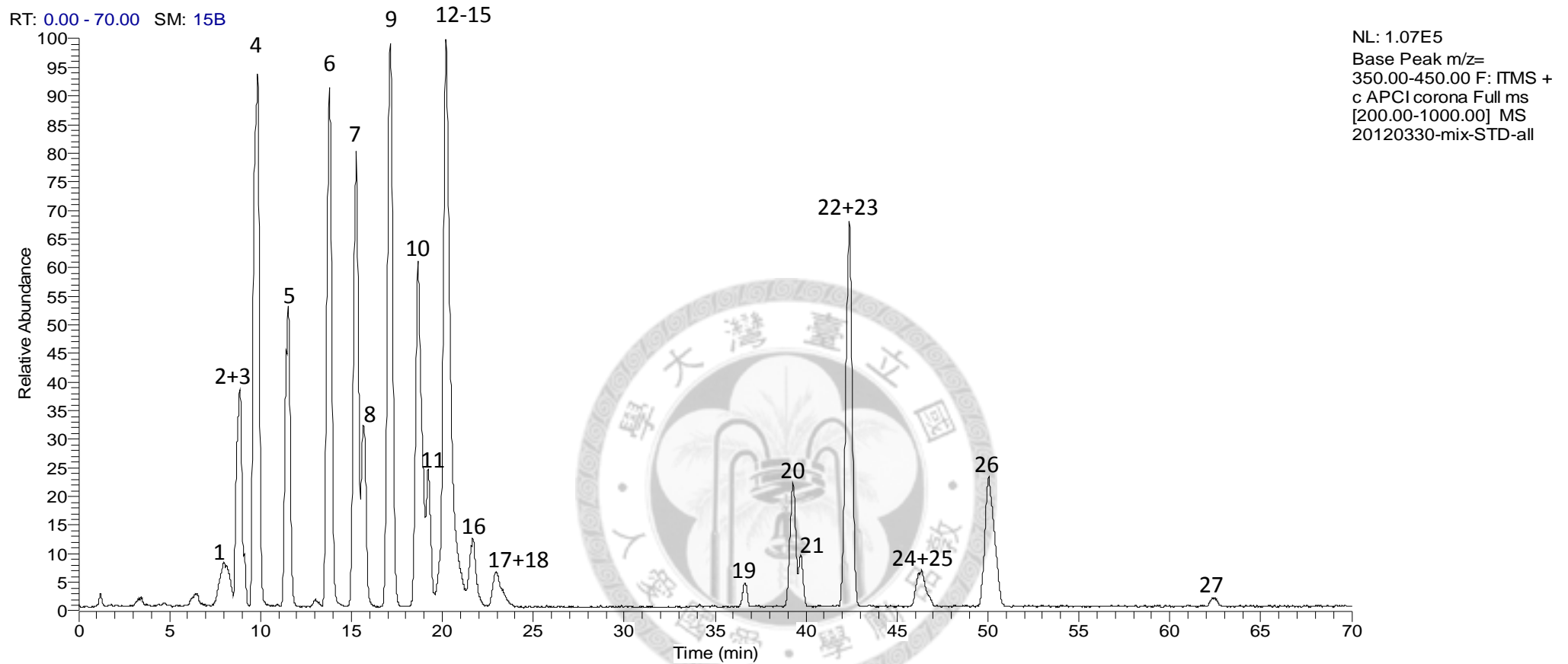


圖 18. 植物固醇混合標準品的層析質譜圖

Figure 18. LC-MS chromatogram of mixed phytosterol standards, base peak mode,  $m/z$  350-450. 1: avenasteryl glucoside, 2: campesteryl glucoside, 3: stigmasteryl glucoside, 4:  $\beta$ -sitosteryl glucoside, 5: ergosterol, 6: cholesterol, 7: campesterol, 8: stigmasterol, 9:  $\beta$ -sitosterol, 10: cycloartenyl ferulate, 11: sitostanol, 12: isomer-409, 13: 24-methylcycloartanyl ferulate, 14: campesteryl ferulate, 15: stigmasteryl ferulate, 16: isomer-423, 17:  $\beta$ -sitosterol ferulate, 18: cycloartanyl ferulate, 19:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-linolenyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 20: campesteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 21: stigmasteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 22:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 23: avenasteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 24: campesteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 25: stigmasteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 26:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 27:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-stearyl)-  $\beta$ -D-glucoside

### (三) 植物固醇的層析流洗順序及綜合分析

針對樣品中的植物固醇進行定性除了質譜特徵離子訊號及二次質譜資訊外，化合物的層析流洗順序（滯留時間）也為重要的依據。根據 Abidi 的整理，於逆相層析系統中如固醇結構碳數 ( $C_{27-29}$ ) 及不飽和度（雙鍵數目）具有差異，這些固醇分子可於層析系統中分離開，但對於結構中僅雙鍵位置改變的固醇分離能力較差 (Abidi, 2001)。

#### 1. 自由態固醇

見圖 18，本實驗中自由態固醇的流洗順序為：ergosterol  $\rightarrow$  cholesterol  $\rightarrow$  campesterol  $\rightarrow$  stigmasterol  $\rightarrow$   $\beta$ -sitosterol  $\rightarrow$  sitostanol。此結果與文獻 (Abidi, 2001) 的說明相同，結構（固醇結構見圖 2 及圖 3）帶有 3 個雙鍵而極性最高的 ergosterol 最先流洗出，接著為缺乏 24-ethyl 基團並有一雙鍵的 cholesterol，雖然 stigmasterol 帶有 2 個雙鍵但因其具 24-ethyl 基團，故極性仍低於 cholesterol。stigmasterol 及 campesterol 的結構差異為 24-methyl (-ethyl) 及 22 號碳處雙鍵的差異，其流洗順序受到層析系統的影響而有所不同 (Abidi, 2001)，已於逆相液相層析法的建立處說明。 $\beta$ -sitosterol 較 stigmasterol 少一雙鍵而較滯留，完全飽和無雙鍵的 sitostanol 則最慢流洗出管柱。Avenasterol 的結構較特殊，側鏈接有 24-ethylidene 基團，滯留時間顯示其極性較與其結構相似的 stigmasterol 高。如圖 19 所示 avenasterol 波峰由 2 個未分離波峰組成，其特徵離子訊號皆為  $m/z$  395，推測其為  $\Delta$ 5-及  $\Delta$ 7-avenasterol，二者結構上只有雙鍵的位置不同而難以逆相層析完全分離。由於缺少 campestanol 的標準品，以含 campestanol 1.3% 的  $\beta$ -sitosterol 混合物標準品分析，圖 20 (A) 顯示標準品中含有 campesterol、 $\beta$ -sitosterol 及 sitostanol 三根明顯波峰，未發現 campestanol；圖 20 (C) 則以理論上 campestanol 於 APCI 正電模式下的特徵離子  $m/z$  385 進行萃取離子觀察，發現一波峰鄰近於  $\beta$ -sitosterol，因其較不飽和的 campesterol 滯留，符合飽和態較不飽和態固醇滯留的理論流洗順序，推測該波峰即為的 campestanol，而在本實驗的層析系統中 campestanol 無法與  $\beta$ -sitosterol 分離開。

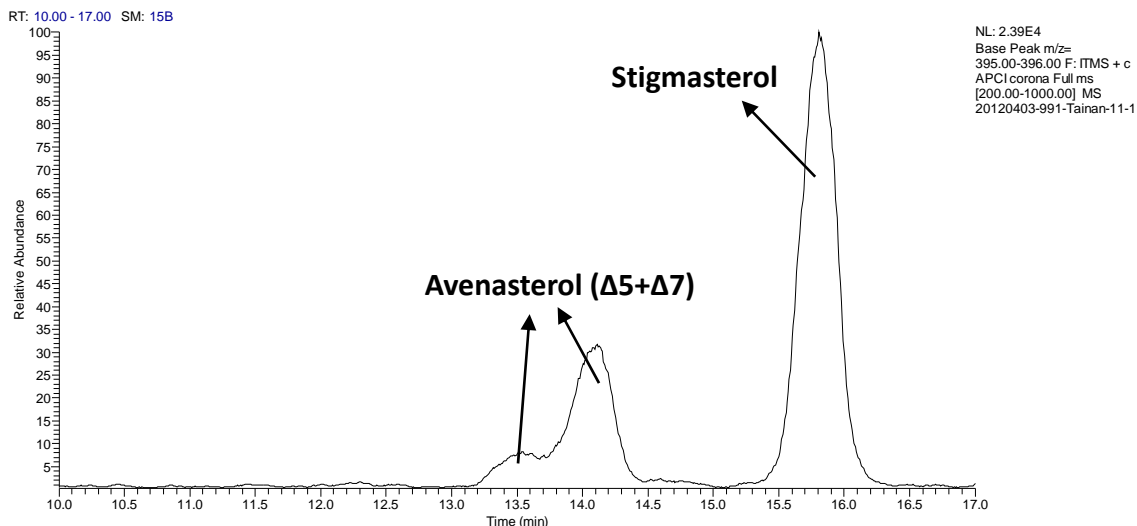


圖 19. 糙米樣品的萃取離子層析圖

Figure 19. Extracted ion chromatogram (EIC) for  $m/z$  395 of brown rice sample

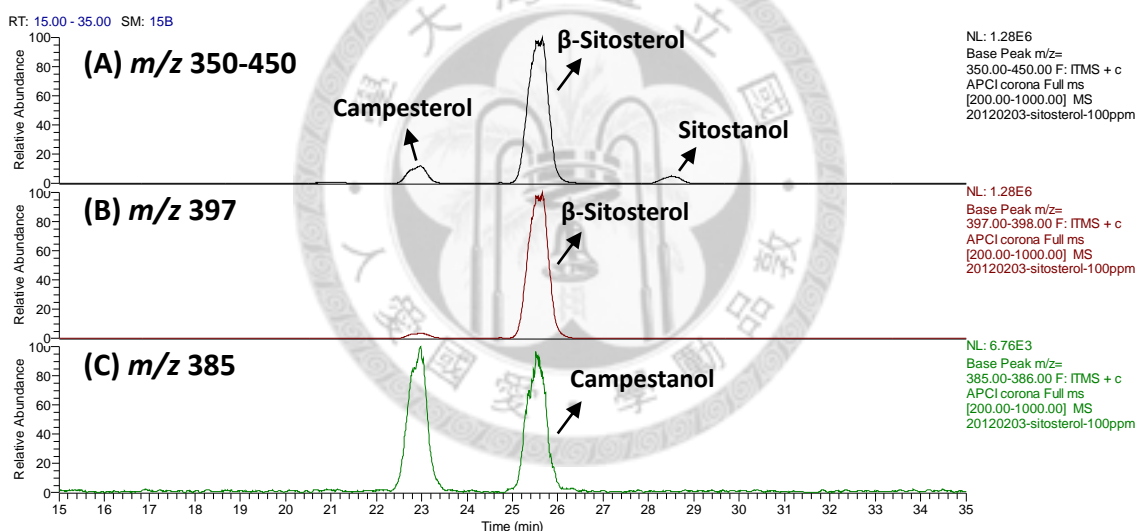


圖 20.  $\beta$ -sitosterol 標準品 (Calbiochem) 的層析圖

Figure 20. LC-MS chromatograms, base peak mode (A)  $m/z$  350-450 (B)  $m/z$  397 (C)  $m/z$  385 of  $\beta$ -sitosterol standard

結合態固醇中醣苷態固醇接有醣基極性最高故滯留時間最短，自由態固醇次之，而接有酚酸的 steryl ferulate ( $\gamma$ -oryzanol) 較大多數自由態固醇滯留 (除了 sitostanol)，最滯留為酯化醣苷態固醇 (見圖 18)。而本實驗中結合態固醇的流洗順序與其固醇基團 (自由態固醇) 完全相同，與文獻的結果相符 (Breinhölder *et al.*, 2002; Rozenberg *et al.*, 2003)。

## 2. 醣苷態固醇

在標準品及樣品中僅發現 avenasterol、campesterol、stigmasterol 及  $\beta$ -sitosterol 的醣苷態固醇，avenasterol 的醣苷態如自由態固醇亦為 2 波峰所組成無法分離，由於植物中的醣苷態固醇 (含酯化) 的醣基多為葡萄糖，且層析條件及質譜訊號無法分辨醣基的不同，故在本文中將醣苷態固醇 (含酯化) 上的醣基皆視為葡萄糖。

## 3. Steryl ferulate ( $\gamma$ -oryzanol)

以標準品  $\gamma$ -oryzanol 進行 LC-MS 分析，發現其中除了藥品標示的 campesteryl ferulate、cycloartenyl ferulate、24-methylcycloartanyl ferulate 及  $\beta$ -sitosteryl ferulate 以外，另含有微量的 cycloartanyl ferulate 及 stigmasteryl ferulate，其流洗順序為：cycloartenyl ferulate  $\rightarrow$  24-methylcycloartanyl ferulate  $\rightarrow$  campesteryl ferulate  $\rightarrow$  stigmasteryl ferulate  $\rightarrow$   $\beta$ -sitosteryl ferulate  $\rightarrow$  cycloartanyl ferulate。

前述的與已知化合物相同質譜訊號的 isomer-409 及 isomer-423 除在糙米樣品發現外，標準品溶液保存過久時亦會產生。在糙米樣品萃取時一批萃取液曾不慎暴露到陽光，未被照射到的相同樣品萃取液其 24-methylcycloartanyl ferulate 與 isomer-423 的波峰面積比為 3.42:1，被陽光照射的樣品液二者波峰面積比為 1.66:1 (圖 21)，此結果顯示 24-methylcycloartanyl ferulate 會因光照而減少並使 isomer-423 的含量增加；而 cycloartenyl ferulate 也會因光照減少同時使 isomer-409 的含量增加，其餘的 steryl ferulates 也由原本的單一波峰產生分岔的雙峰。查詢文獻後顯示 feruloyl esters 或是不同的 *trans*-cinnamic acids 受到日光或是長波長 UV 照射時會產生 *trans*-to-*cis* 的異構化反應 (Hartley and Jones, 1975; Arin *et al.*, 1995; Van Boven *et al.*, 1996)，由於在萃取樣品時無法避光，異構化反應迅速產生，推測 steryl *trans*-ferulate 會因照光而部分轉變為 steryl *cis*-ferulate；而在 C18 管柱中

*cis*-型會比 *trans*-型滯留時間更長 (Akihisa *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2003), isomer-409 及 isomer-423 也符合此結果。由以上實驗結果及文獻內容判斷 isomer-423 即為 24-methylencycloartanyl *cis*-ferulate, 而 isomer-409 為 cycloartenyl *cis*-ferulate, 其餘的 steryl ferulates 的 *cis* 型態也存在於樣品中, 但在本實驗層析條件下分離效果較差, 又 *trans* 型含量正常情況下遠較 *cis* 型高, 濃度差異使其更無法分離。而糙米樣品中是否天然就含有 steryl *cis*-ferulate 並無法得知。

除質譜訊號外, 另一針對 steryl ferulates 定性的方式為以 UV 偵測, 由於結構上的酚酸使其約於 UV 325 nm 處有最大吸收波長, 在以 LC-MS 分析樣品時即同時設定 PDA 偵測器於 325 nm 偵測。如圖 22 所示滯留時間 18-24 分鐘處的波峰大多為 steryl ferulates, 在該區段的 UV 層析圖譜確實有明顯的吸收波峰並對應到萃取離子圖譜中 steryl ferulates 的波峰。

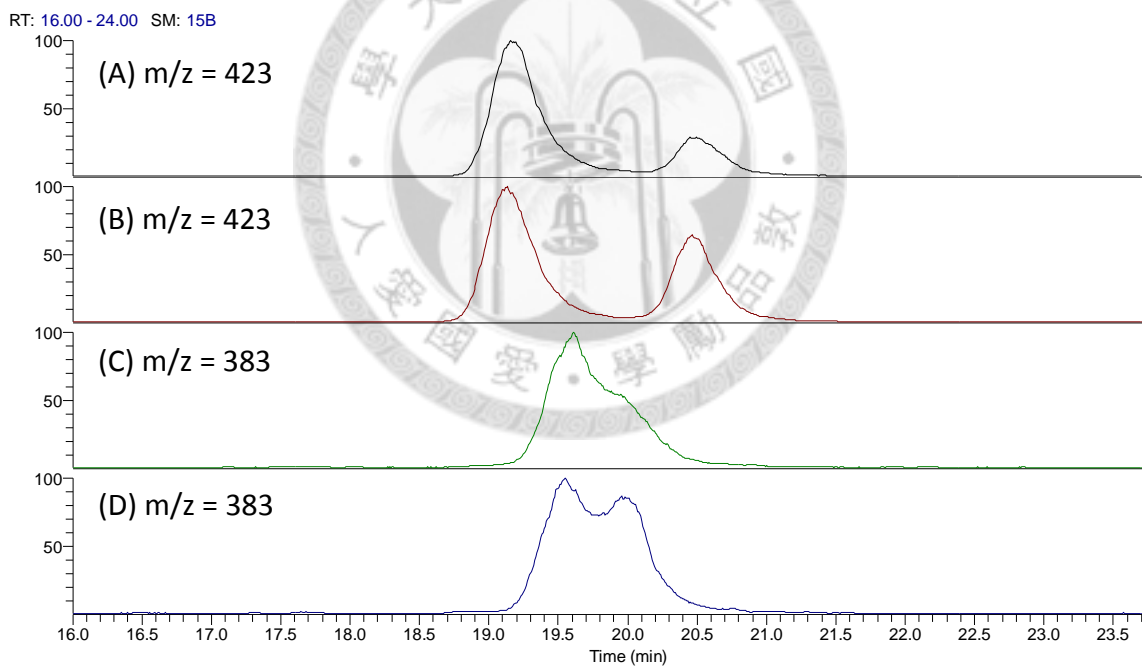


圖 21. 糙米樣品萃取液經日光照射前後的萃取離子圖譜

Figure 21. Extracted ion chromatograms of brown rice extract solutions (A+C) devoid of daylight and (B+D) exposed to daylight



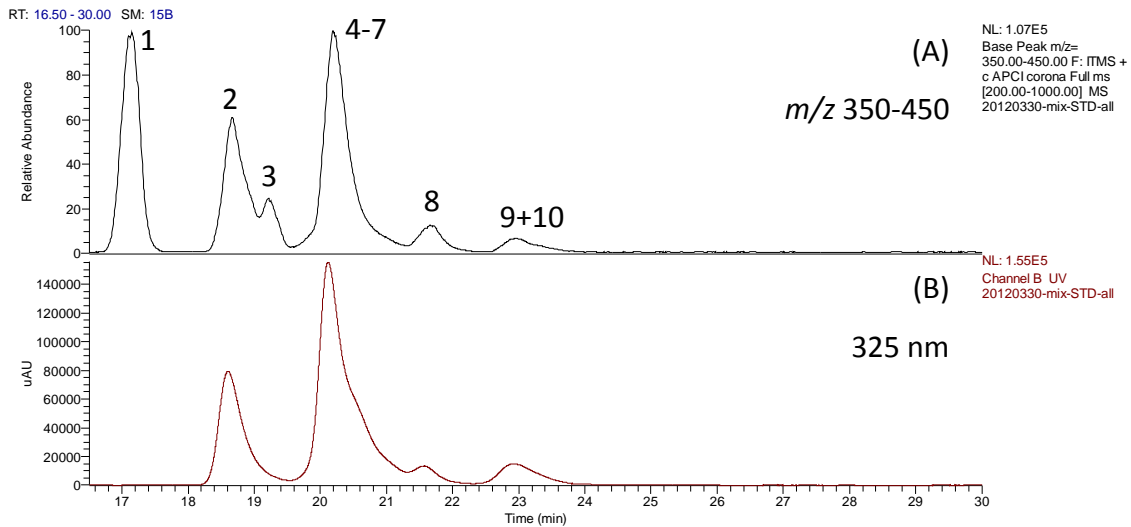


圖 22. 植物固醇混合物標準品  $\gamma$ -oryzanol 處的層析圖

Figure 22. LC-MS chromatogram, base peak mode, (A)  $m/z$  350-450 and (B) UV (325 nm) chromatogram of  $\gamma$ -oryzanol standard. 1:  $\beta$ -sitosterol, 2: cycloartenyl ferulate, 3: sitostanol, 4: isomer-409, 5: 24-methylcycloartenyl ferulate, 6: campesteryl ferulate, 7: stigmasteryl ferulate, 8: isomer-423, 9:  $\beta$ -sitosteryl ferulate, 10: cycloartenyl ferulate

#### 4. 酯化糖苷態固醇

針對酯化糖苷態固醇的層析分析的文獻較少，故以文獻中整理的脂肪酸酯化態固醇的流洗順序做為參考，根據脂肪酸的不同流洗順序為  $C_{18:2} \rightarrow C_{18:1} \rightarrow C_{16:0} \rightarrow C_{18:0}$  (Abidi, 2001)。查詢文獻中分析酯化糖苷態固醇的種類並不多，但皆符合上述流洗順序 (Yamauchi *et al.*, 2001; Rozenberg *et al.*, 2003; Rudell *et al.*, 2011)。在本實驗中發現的順序不同者為  $C_{16:0} \rightarrow C_{18:1}$ ，但二者的幾乎無法分離，僅能以質譜萃取離子的方式發現些微的滯留時間差異。由於酯化糖苷態固醇的化合物種類較多，在層析時接有不同脂肪酸的不同固醇有部分無法分離良好，需仰賴質譜產生的分子離子訊號方能判斷其可能的結構。由於植物中的酯化糖苷態固醇的脂肪酸多與糖基上的 6 號碳羥基酯化鍵結，且實驗中無法分辨脂肪酸鍵結處與糖基的不同；故在本文中將酯化糖苷態固醇皆視為與葡萄糖鍵結，脂肪酸與葡萄糖鍵結處為其 6 號碳的羥基。

#### 四、檢量線線性、偵測極限及定量極限

本分析方法自由態固醇的檢量線具有良好線性，其  $r^2$  值均大於 0.999。Ruibal-Mendieta 等人的研究顯示 stanols 的於儀器中的偵測極限 (160-200 ng/mL) 均較不飽和自由態固醇的值 (40-60 ng/mL) 高 (Ruibal-Mendieta *et al.*, 2004)；本研究結果與其相符 (見表 5)，不飽和的自由態固醇的儀器偵測極限為 5-20 ng/mL 之間，儀器定量極限為 50 ng/mL；但飽和態的 sitostanol 儀器偵測極限為 50 ng/mL，儀器定量極限為 200 ng/mL。但 Zarrouk 等人的研究結果相反，其 sitostanol 的儀器偵測極限均較其他不飽和自由態固醇低 (Zarrouk *et al.*, 2010)。由於本實驗所使用的 LXQ 質譜儀與 Ruibal-Mendieta 等人的研究所使用的 LCQ 質譜儀機型類似，Zarrouk 等人所使用的質譜儀為不同廠牌，推測這樣截然不同的結果可能因所使用的質譜儀機型不同所導致。

表 5. 自由態固醇的檢量線

Table 5. Calibration curve of free sterols

Sterol	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Calibration range (ng/mL)	Calibration equations <sup>a</sup>	$r^2$
Cholesterol	5	50	50-1000	$Y = 553.53X + 8254$	0.9998
Campesterol	20	50	500-10000	$Y = 422.09X + 86713$	0.9997
Stigmasterol	20	50	500-10000	$Y = 169.41X + 27649$	0.9997
$\beta$ -Sitosterol	10	50	500-10000	$Y = 427.99X + 70538$	0.9999
Sitostanol	50	200	200-5000	$Y = 128.08X + 12404$	0.9991

a: X represented concentration of sterol. Y represented peak area of sterol.

LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantitation.

## 五、植物固醇的添加回收率

回收率實驗添加不同自由態固醇各 30、90 及 180  $\mu\text{g}$  至樣品粉末中，即低中高三個濃度，依實驗流程進行後以 LC-MS 分析。其結果如表 6 所示，各個自由態固醇於不同濃度的回收率介於 83.69-106.89%之間，均高於 80%。

由於樣品經過固相萃取淨化，依所參考的方法 (Pinkart *et al.*, 1998) 顯示，在其測定標準品回收率時，脂肪酸酯化態固醇及三酸甘油酯 2 類物質的分層皆含有少量的固醇 (膽固醇)，其固醇的回收率為 82.67%及 84.67%，文獻的結果顯示以  $\text{NH}_2$  固相萃取管柱分離酯化態固醇及三酸甘油酯 (本實驗的目的為排除這 2 類物質以淨化樣品) 時會一併將小部分自由態固醇洗出管柱。本實驗的結果也與文獻類似，大多數自由態固醇回收率約落在 90%。

由於缺乏結合態植物固醇的單一標準品，本實驗並未做這些固醇的回收率，但依 steryl ferulate、糖苷態固醇及酯化糖苷態其於正相管柱中均較自由態固醇滯留時間長的性質，且預實驗時進行固相萃取，流洗甲醇層分別收集前 3 mL 及後 3 mL 區段，分析結果顯示僅前 3 mL 含有糖苷態固醇，後 3 mL 甲醇收集液完全偵測不到糖苷態固醇，推測本實驗所使用的分析方法並不會使其他的結合態植物固醇的回收率低於自由態固醇。

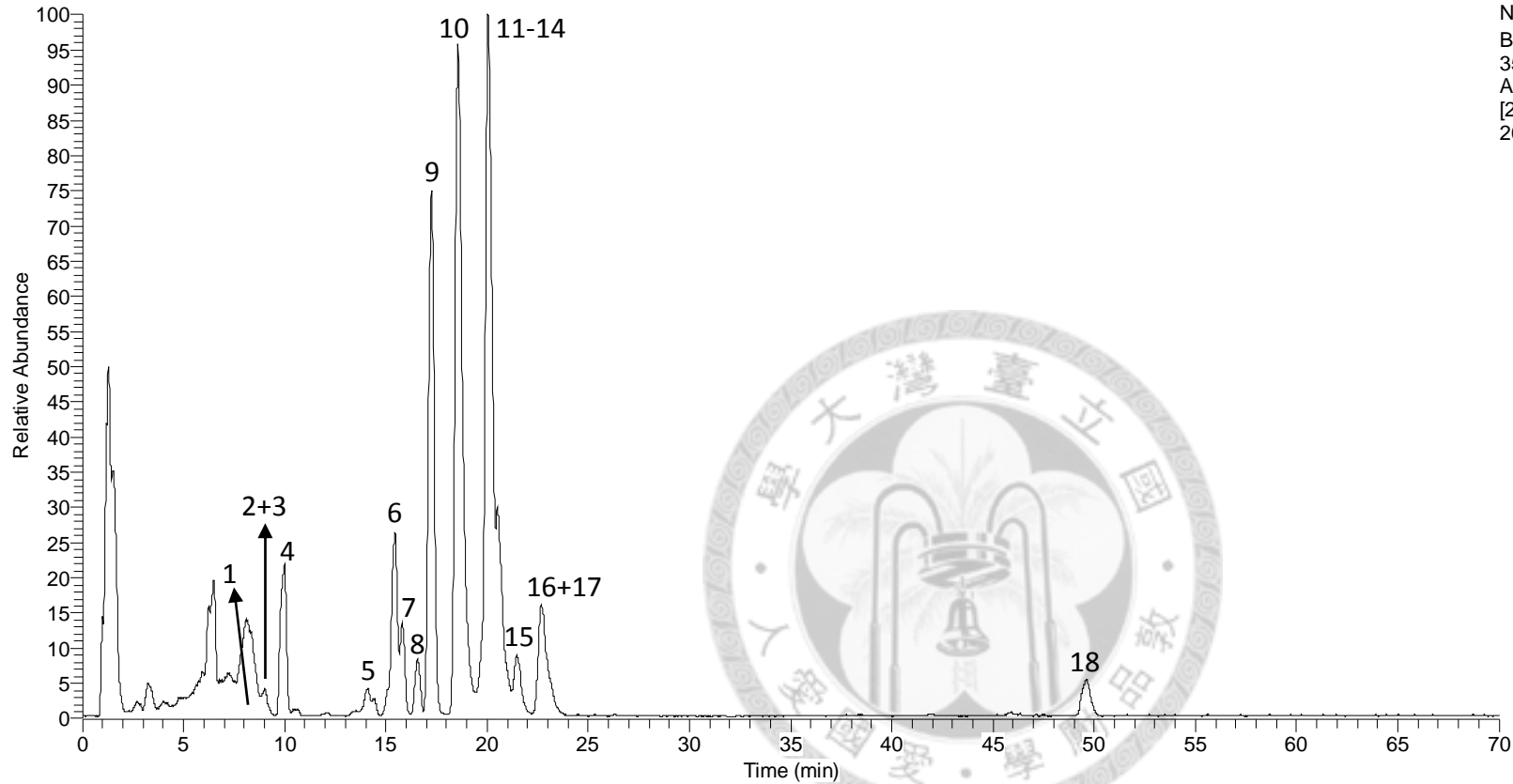
表 6. 自由態固醇的添加回收率

Table 6. Recoveries of added free sterols

Compound	Recovery (%)					
	Amount of sterol added ( $\mu\text{g}$ )					
	30		90		180	
Cholesterol	84.76	$\pm$ 1.25	92.59	$\pm$ 3.90	89.81	$\pm$ 1.16
Campesterol	88.85	$\pm$ 2.78	87.04	$\pm$ 2.57	91.30	$\pm$ 3.39
Stigmasterol	89.98	$\pm$ 7.72	88.89	$\pm$ 6.19	91.11	$\pm$ 4.75
$\beta$ -Sitosterol	106.89	$\pm$ 9.87	95.56	$\pm$ 7.70	86.48	$\pm$ 5.77
Sitostanol	83.69	$\pm$ 1.58	84.81	$\pm$ 4.49	88.52	$\pm$ 2.10

Data were shown as mean  $\pm$  SD (n=3).

RT: 0.00 - 70.00 SM: 15B



NL: 1.76E5  
Base Peak m/z=  
350.00-450.00 F: ITMS + c  
APCI corona Full ms  
[200.00-1000.00] MS  
20120403-991-Tainan-11-1

圖 23. 台南 11 號糙米植物固醇萃取物的層析質譜圖

Figure 23. LC-MS chromatogram of phytosterol extract of Tainan No. 11 brown rice, base peak mode,  $m/z$  350-450. 1: avenasteryl glucoside, 2: campesteryl glucoside, 3: stigmasteryl glucoside, 4:  $\beta$ -sitosteryl glucoside, 5: avenasterol, 6: campesterol, 7: stigmasterol, 8: unknown, 9:  $\beta$ -sitosterol, 10: cycloartenyl ferulate, 11: isomer-409, 12: 24-methylcycloartanyl ferulate, 13: campesteryl ferulate, 14: stigmasteryl ferulate, 15: isomer-423, 16:  $\beta$ -sitosterol ferulate, 17: cycloartanyl ferulate, 18:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O- palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside

RT: 0.00 - 70.00 SM: 15B

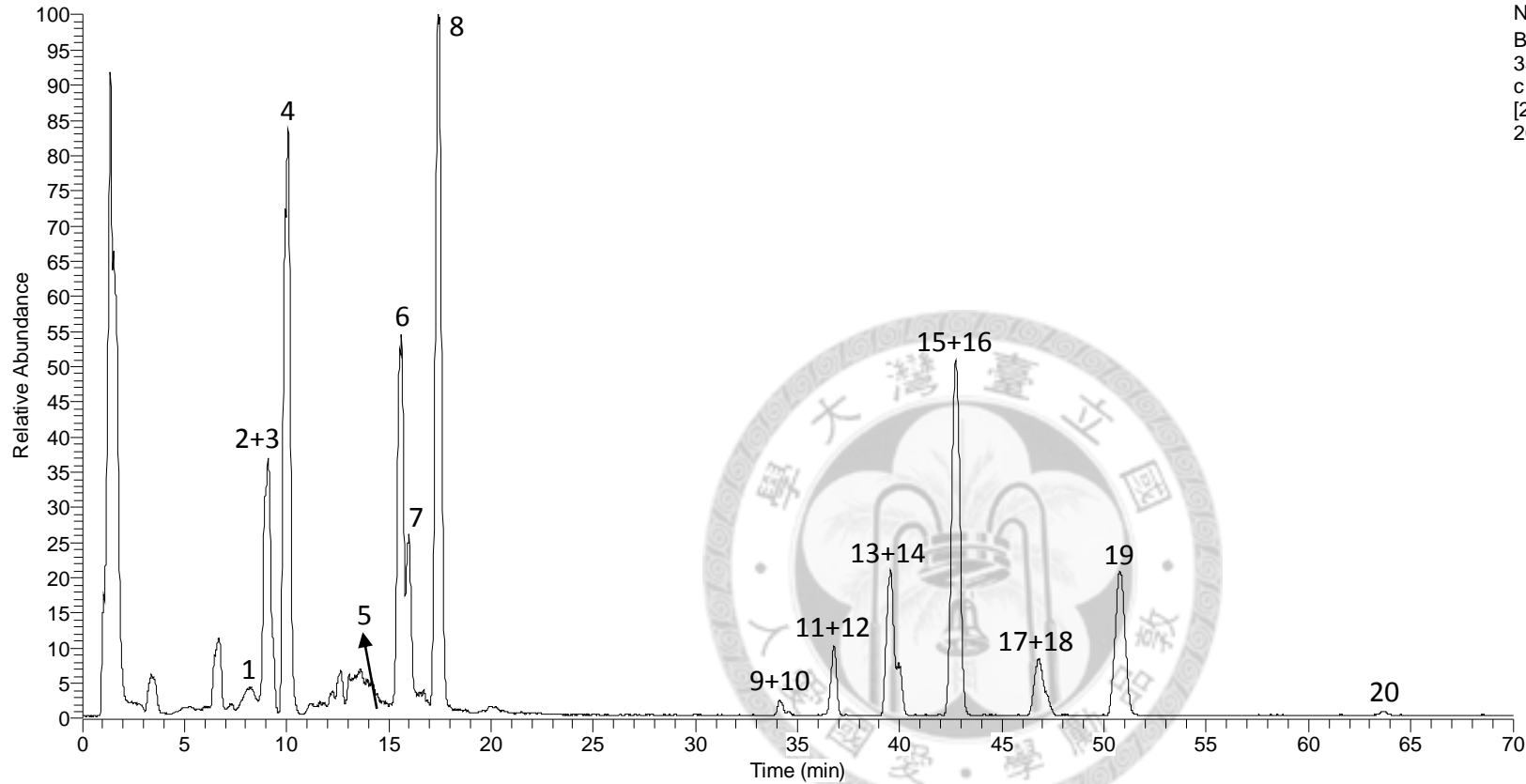


圖 24. 黃豆植物固醇萃取物的層析質譜圖

Figure 24. LC-MS chromatogram of phytosterol extract of soybean, base peak mode,  $m/z$  350-450. 1: avenasteryl glucoside, 2: campesteryl glucoside, 3: stigmasteryl glucoside, 4:  $\beta$ -sitosteryl glucoside, 5: avenasterol, 6: campesterol, 7: stigmasterol, 8:  $\beta$ -sitosterol, 9: campesteryl (6'-O-linolenyl)-  $\beta$ -D-glucoside 10: stigmasteryl (6'-O-linolenyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 11: avenasteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 12:  $\beta$ -sitosterol (6'-O-linolenyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 13: campesteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 14: stigmasteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 15:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 16: avenasteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 17: Campesteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 18: stigmasteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 19:  $\beta$ -Sitosteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 20:  $\beta$ -Sitosteryl (6'-O-stearyl)-  $\beta$ -D-glucoside

## 六、樣品中植物固醇的含量

因缺乏結合態植物固醇的單一標準品，故皆以自由態固醇的檢量線進行定量，如結合態植物固醇的固醇基團為  $\beta$ -sitosterol 時則都以其定量，campesterol 及 stigmasterol 以此類推。而未有自由態固醇標準品的 avenasterol 及其結合態以與其分子量及結構較相似的 stigmasterol 定量，steryl ferulate 無自由態固醇標準品的化合物皆以  $\beta$ -sitosterol 為定量依據。

糙米中含有獨特的 steryl ferulate ( $\gamma$ -oryzanol)，而豆類含有高量的糖苷態及酯化糖苷態固醇 (Sugawara and Miyazawa, 1999)。由於糙米及豆類中的植物固醇組成較特殊，而對於米及豆類的植物固醇組成目前也缺乏完整的研究，因此本實驗選擇國人常食用米種糙米的不同年分期作及豆類進行植物固醇分析。另 98 年期作的高雄 139 號及 99 年期作的越光米僅有該年分的樣品，故無 2 年期作的分析比較。糙米 (台南 11 號) 及豆類 (黃豆) 的層析質譜圖見圖 23 及圖 24。

### (一) 糙米

#### 1. 分析結果說明

糙米樣品中的自由態固醇種類主要有 4 種 (表 7 及表 8)， $\beta$ -sitosterol 的含量最高，campesterol 及 stigmasterol 次之，avenasterol 大多為含量最低，此結果符合文獻中米糠自由態固醇的組成 (Kuroda *et al.*, 1977)。另樣品中皆以質譜偵測到含有 cholesterol 及 sitostanol，但這二種含量皆低於定量極限。98 年期作糙米自由態固醇總量為 14.98-29.86 mg/100 g，含量最高的米種為高雄 139 號，最低為台中私 10 號。99 年期作糙米自由態固醇總量為 28.40-37.82 mg/100 g，含量最高為台中私 10 號，最低為台農 71 號。

糖苷態固醇 (表 9 及表 10) 主要含  $\beta$ -sitosteryl glucoside、campesteryl glucoside、stigmasteryl glucoside 及 avenasteryl glucoside，98 年期作糙米中 avenasteryl glucoside 的含量低於定量極限。除高雄 139 號糖苷態固醇的含量最高，其餘米種固醇含量並無顯著差異，介於 1.64-2.49 mg/100 g。99 年期作米種糖苷態固醇含量變化較大，介於 6.37-10.44 mg/100 g。

糙米中的酯化糖苷態固醇 (表 11 及表 12) 組成為  $\beta$ -sitosterol 為主，campesterol 和 stigmasterol 較低或是微量，以接上棕櫚酸 (palmitic acid,  $C_{16:0}$ ) 及油酸

(oleic acid, C<sub>18:1</sub>) 的含量較高 (二者無法由層析分離故合併定量), 與亞麻油酸 (linoleic acid, C<sub>18:2</sub>) 鍵結的固醇僅測得  $\beta$ -sitosterol, 本實驗糙米酯化糖苷態固醇結構中脂肪酸的種類與文獻中米糠中酯化糖苷態固醇所接的主要種類相同 (文獻中比例為 C<sub>16:0</sub>: 29.9%, C<sub>18:1</sub>: 22.7%, C<sub>18:2</sub>: 42.5%) (Kuroda *et al.*, 1977)。

$\gamma$ -oryzanol 主要存在於米糠中, 含量為稻米胚芽的 5 倍以上 (Yu *et al.*, 2007), 而糙米脫去外殼仍保留了米糠層, 故含有大量的  $\gamma$ -oryzanol。本實驗測得糙米中的 steryl ferulate 主要含 24-methylcycloartanyl ferulate、cycloartenyl ferulate、campesterol ferulate 及  $\beta$ -sitosterol ferulate, 另有含量較少的 stigmasteryl ferulate 及 cycloartanyl ferulate; 此結果與文獻相符 (Xu and Godber, 1999; Fang *et al.*, 2003)。並發現  $\gamma$ -oryzanol 的結構除了主要的 *trans*-ferulate 與植物固醇酯化鍵結外 (Lerma-García *et al.*, 2009), 還包含與 *cis*-ferulate 酯化鍵結者 (Akihisa *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2003); 本實驗中測得的 isomer-423 及 isomer-409, 前文推論二者分別為 24-methylcycloartanyl *cis*-ferulate 及 cycloartenyl *cis*-ferulate, 其餘 steryl ferulate 接上 *cis*-ferulate 的化合物在本實驗層析條件下與 *trans*-ferulate 型式無法以分離良好, 而亦無法以質譜訊號分辨差異 (Fang *et al.*, 2003), 故將二者合併定量。

## 2. 二年期作糙米植物固醇含量比較

為比較二年期作糙米的固醇含量是否有差異, 將各類固醇總量進行統計分析。表 15 顯示不同年分期作自由態固醇含量具有顯著差異, 98 年期作均低於 99 年期作, 除年份差異外, 另一可能因素為 98 年期作樣品保存較久產生氧化而使含量減少, 因在 98 年糙米樣品分析時測得許多與固醇相似的訊號, 經比對二次質譜後推論為氧化態植物固醇, 但 99 年樣品氧化態植物固醇的訊號則較弱, 氧化態固醇於後面章節詳細討論。固醇組成較不同者為 99 年台中私 10 號含有較高量的 avenasterol。

99 年期作糙米糖苷態及酯化糖苷態固醇皆高於 98 年期作, 但含量並不高。由於糙米樣品於低溫保存時可能仍具有部分酵素活性, 長期貯存造成糖苷鍵被酵素水解及固醇的氧化都可能是 98 年期作糖苷態及酯化糖苷態固醇較低的原因。

Steryl ferulate 在 98 年期作含量較高的米種為高雄 139 號及台南 11 號，99 年期作為台南 11 號，此一結果與文獻結果一致 (Lu *et al.*, 2011)。統計結果不同年分期作僅台稉 9 號含量具有顯著差異，台南 11 號及台農 71 號則因部分數值標準差較大而導致無差異。

## (二) 豆類

豆類的自由態 (表 16) 及結合態固醇 (表 17 及表 18) 的固醇組成主要為  $\beta$ -sitosterol、campesterol、stigmasterol 及 avenasterol。此結果與文獻相符 (Geuns, 1973; Kojima *et al.*, 1998; Ikuo, 2005)。

紅豆、綠豆及花豆中 stigmasterol 及 avenasterol 的含量較 campesterol 高，在紅豆中甚至較  $\beta$ -sitosterol 高，另外綠豆含有較高量的膽固醇。5 種豆類樣品自由態固醇含量為 46.45-79.24 mg/100 g，花豆的含量最高，黃豆最低。

根據文獻結果 (Sugawara and Miyazawa, 1999)，黃豆及黑豆中含有較高量的糖苷態固醇。本實驗結果黃豆及黑豆中糖苷態固醇的含量分別為 31.18 及 29.87 mg/100 g，紅豆含量最低為 7.10 mg/100 g。5 種豆類與糙米相比皆含有高量的酯化糖苷態固醇，可偵測到的脂肪酸為  $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$  及  $C_{18:3}$ ，但  $C_{18:0}$  及  $C_{18:3}$  的含量較低，部分豆類僅含有微量。酯化糖苷態固醇含量最高為紅豆，文獻所測的豆類樣品中也顯示紅豆含有特別高量的酯化糖苷態固醇 (Sugawara and Miyazawa, 1999)。另外豆類樣品中並無偵測到有 steryl ferulate 的存在。



表 7. 98 年期作糙米樣品自由態固醇的含量

Table 7. The contents of free strols of brown rices harvested in the first crop of 2009 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稔 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 139 號	高雄 145 號	台中秈 10 號
Avenasterol	2.13 ± 0.25	1.91 ± 0.10	1.75 ± 0.25	3.16 ± 0.29	1.83 ± 0.46	2.19 ± 0.82
Campesterol	3.40 ± 0.37	4.09 ± 0.30	3.79 ± 0.52	4.76 ± 0.18	2.73 ± 0.30	2.62 ± 0.17
Stigmasterol	4.48 ± 0.48	5.85 ± 0.65	5.39 ± 0.96	6.35 ± 6.35	3.53 ± 0.57	2.97 ± 0.08
β-Sitosterol	11.58 ± 1.41	12.57 ± 1.07	11.68 ± 2.01	15.60 ± 0.80	8.31 ± 1.28	7.19 ± 0.32
Total	21.59 ± 2.51 <sup>b</sup>	24.43 ± 2.12 <sup>b</sup>	22.61 ± 3.74 <sup>b</sup>	29.86 ± 1.89 <sup>a</sup>	16.39 ± 2.61 <sup>c</sup>	14.98 ± 1.39 <sup>c</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p<0.05$ ).

表 8. 99 年期作糙米樣品自由態固醇的含量

Table 8. The contents of free strols of brown rices harvested in the first crop of 2010 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稔 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	越光米	台中秈 10 號
Avenasterol	3.46 ± 0.20	3.14 ± 0.14	2.60 ± 0.10	3.80 ± 0.13	3.28 ± 0.20	6.46 ± 0.39
Campesterol	5.52 ± 0.09	6.39 ± 0.18	4.98 ± 0.08	5.78 ± 0.26	5.71 ± 0.35	6.14 ± 0.33
Stigmasterol	7.17 ± 0.39	7.87 ± 0.07	6.47 ± 0.34	6.77 ± 0.41	6.98 ± 0.47	6.65 ± 0.29
β-Sitosterol	18.65 ± 0.44	17.70 ± 0.28	14.36 ± 0.15	17.38 ± 0.70	15.92 ± 0.95	18.57 ± 0.29
Total	34.80 ± 1.12 <sup>b</sup>	35.10 ± 0.66 <sup>b</sup>	28.40 ± 0.67 <sup>d</sup>	33.73 ± 1.50 <sup>bc</sup>	31.89 ± 1.97 <sup>c</sup>	37.82 ± 1.31 <sup>a</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p<0.05$ ).

表 9. 98 年期作糙米樣品醣苷態固醇的含量

Table 9. The contents of steryl glucosides of brown rices harvested in the first crop of 2009 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稉 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 139 號	高雄 145 號	台中私 10 號
Avenasteryl glucoside	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Campesteryl glucoside	0.15 ± 0.03	0.31 ± 0.09	0.35 ± 0.04	0.75 ± 0.05	0.25 ± 0.11	0.22 ± 0.12
Stigmasteryl glucoside	trace	0.29 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.61 ± 0.05	trace	trace
β-Sitosteryl glucoside	1.49 ± 0.02	1.85 ± 0.27	1.89 ± 0.16	3.63 ± 0.22	1.72 ± 0.55	1.48 ± 0.55
Total	1.64 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.45 ± 0.41 <sup>b</sup>	2.49 ± 0.25 <sup>b</sup>	4.99 ± 0.32 <sup>a</sup>	1.97 ± 0.65 <sup>b</sup>	1.70 ± 0.67 <sup>b</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ). trace: less than LOQ.

表 10. 99 年期作糙米樣品醣苷態固醇的含量

Table 10. The contents of steryl glucosides of brown rices harvested in the first crop of 2010 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稉 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	越光米	台中私 10 號
Avenasteryl glucoside	0.61 ± 0.08	0.40 ± 0.04	0.52 ± 0.07	0.53 ± 0.11	0.78 ± 0.05	0.46 ± 0.06
Campesteryl glucoside	1.03 ± 0.02	0.82 ± 0.03	0.86 ± 0.01	1.08 ± 0.04	1.21 ± 0.08	0.64 ± 0.01
Stigmasteryl glucoside	0.96 ± 0.02	0.88 ± 0.10	0.79 ± 0.03	1.01 ± 0.06	1.08 ± 0.05	0.61 ± 0.06
β-Sitosteryl glucoside	6.13 ± 0.33	5.41 ± 0.13	5.27 ± 0.11	6.82 ± 0.35	7.37 ± 0.32	4.64 ± 0.37
Total	8.73 ± 0.45 <sup>c</sup>	7.50 ± 0.30 <sup>d</sup>	7.44 ± 0.22 <sup>d</sup>	9.43 ± 0.56 <sup>b</sup>	10.44 ± 0.50 <sup>a</sup>	6.37 ± 0.49 <sup>e</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ).

表 11. 98 年期作糙米樣品酯化糖苷態固醇的含量

Table 11. The contents of acylated steryl glucosides of brown rices harvested in the first crop of 2009 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稈 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 139 號	高雄 145 號	台中秈 10 號
$\beta$ -Sitosteryl-18:2-Glc	trace	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.02	trace	trace
Campesterol-16:0-Glc	trace	0.14 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.01	trace	trace
Stigmasteryl-16:0-Glc	trace	trace	trace	trace	trace	trace
$\beta$ -Sitosteryl-16:0-Glc	1.31 $\pm$ 0.04	1.36 $\pm$ 0.07	1.32 $\pm$ 0.13	1.93 $\pm$ 0.07	0.70 $\pm$ 0.10	0.66 $\pm$ 0.17
Total	1.31 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	1.64 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.61 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	2.43 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>	0.66 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>

Data were shown as mean  $\pm$  SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ). Steryl-18:1-Glc were quantified with steryl-16:0-Glc. trace: less than LOQ

表 12. 99 年期作糙米樣品酯化糖苷態固醇的含量

Table 12. The contents of acylated steryl glucosides of brown rices harvested in the first crop of 2010 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稈 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	越光米	台中秈 10 號
$\beta$ -Sitosteryl-18:2-Glc	0.14 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	trace	0.13 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02	trace
Campesterol-16:0-Glc	trace	trace	0.14 $\pm$ 0.02	trace	trace	0.14 $\pm$ 0.01
Stigmasteryl-16:0-Glc	trace	trace	trace	trace	trace	trace
$\beta$ -Sitosteryl-16:0-Glc	1.93 $\pm$ 0.10	1.79 $\pm$ 0.07	1.15 $\pm$ 0.02	1.44 $\pm$ 0.04	1.37 $\pm$ 0.07	1.37 $\pm$ 0.07
Total	2.08 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.89 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.29 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	1.47 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	1.50 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	1.58 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>

Data were shown as mean  $\pm$  SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ). Steryl-18:1-Glc were quantified with steryl-16:0-Glc. trace: less than LOQ

表 13. 98 年期作糙米樣品 steryl ferulates 的含量

Table 13. The contents of steryl ferulates of brown rices harvested in the first crop of 2009 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稈 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 139 號	高雄 145 號	台中私 10 號
Cycloartenyl ferulate	16.09 ± 0.25	19.61 ± 6.48	13.59 ± 7.02	20.38 ± 1.60	11.18 ± 1.49	10.92 ± 1.10
Isomer-409	4.68 ± 0.43	6.07 ± 2.05	5.83 ± 1.42	5.57 ± 0.20	3.27 ± 0.79	3.04 ± 1.02
24-methylencycloartanyl ferulate	23.32 ± 0.47	21.78 ± 4.24	16.88 ± 5.38	20.96 ± 2.00	16.09 ± 1.64	18.22 ± 2.39
Isomer-423	6.54 ± 0.59	6.57 ± 1.30	6.64 ± 0.53	5.20 ± 0.07	4.20 ± 0.18	4.53 ± 0.20
Campesteryl ferulate	8.11 ± 0.12	9.45 ± 0.49	8.20 ± 0.52	10.76 ± 1.06	6.03 ± 1.11	5.50 ± 1.06
Stigmasteryl ferulate	0.90 ± 0.08	0.89 ± 0.28	0.73 ± 0.19	1.11 ± 0.08	0.44 ± 0.09	0.49 ± 0.11
β-sitosteryl ferulate	4.88 ± 0.08	4.70 ± 0.76	4.00 ± 0.67	5.50 ± 0.38	2.96 ± 0.46	2.92 ± 0.30
Cycloartanyl ferulate	0.59 ± 0.03	0.70 ± 0.15	0.45 ± 0.20	0.56 ± 0.08	0.35 ± 0.07	0.33 ± 0.03
Total	65.12 ± 2.05 <sup>a</sup>	69.77 ± 15.74 <sup>a</sup>	42.71 ± 8.90 <sup>b</sup>	70.04 ± 5.47 <sup>a</sup>	44.52 ± 5.83 <sup>b</sup>	45.94 ± 6.22 <sup>b</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ).

表 14. 99 年期作糙米樣品 steryl ferulates 的含量

Table 14. The contents of steryl ferulates of brown rices harvested in the first crop of 2009 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稈 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	越光米	台中私 10 號
Cycloartenyl ferulate	19.39 ± 2.18	31.42 ± 0.92	7.02 ± 0.67	11.86 ± 0.76	13.50 ± 1.40	8.01 ± 0.17
Isomer-409	6.25 ± 1.13	2.91 ± 0.34	3.30 ± 0.28	1.69 ± 0.10	4.49 ± 0.52	2.46 ± 0.21
24-methylencycloartanyl ferulate	24.61 ± 2.25	31.67 ± 0.67	10.03 ± 0.85	17.25 ± 1.40	17.27 ± 1.37	19.16 ± 0.41
Isomer-423	7.42 ± 1.25	2.40 ± 0.16	4.12 ± 0.34	2.09 ± 0.11	5.30 ± 0.61	5.33 ± 0.49
Campesteryl ferulate	8.53 ± 0.51	11.23 ± 0.07	6.52 ± 0.11	8.11 ± 0.82	9.08 ± 0.62	6.87 ± 0.10
Stigmasteryl ferulate	1.03 ± 0.02	1.12 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.71 ± 0.02	0.70 ± 0.03	0.63 ± 0.05
β-sitosterol ferulate	5.53 ± 0.26	6.01 ± 0.09	2.65 ± 0.14	3.30 ± 0.33	4.02 ± 0.38	3.18 ± 0.08
Cycloartanyl ferulate	0.65 ± 0.03	1.17 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.21 ± 0.03
Total	73.42 ± 7.63 <sup>b</sup>	87.93 ± 2.30 <sup>a</sup>	34.38 ± 2.47 <sup>e</sup>	45.42 ± 3.59 <sup>d</sup>	54.73 ± 4.98 <sup>c</sup>	45.86 ± 1.54 <sup>d</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ).

表 15. 不同年份期作糙米植物固醇含量的比較

Table 15. The comparison of phytosterol contents of brown rices between two crop years (mg/100 g)

Crop year	Rice cultivars				
	台稜 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	台中秣 10 號
<i>Free sterol</i>					
98 年	21.59 ± 2.51	24.43 ± 2.12	22.61 ± 3.74	16.39 ± 2.61	14.98 ± 1.39
99 年	34.80 ± 1.12*	35.10 ± 0.66*	28.40 ± 0.67	33.73 ± 1.50*	37.87 ± 1.37*
<i>Steryl glucoside</i>					
98 年	1.64 ± 0.05	2.45 ± 0.41	2.49 ± 0.25	1.97 ± 0.65	1.70 ± 0.67
99 年	8.73 ± 0.45*	7.50 ± 0.30*	7.44 ± 0.22*	9.43 ± 0.56*	6.37 ± 0.49*
<i>Acylated steryl glucoside</i>					
98 年	1.31 ± 0.04	1.64 ± 0.10	1.61 ± 0.19	0.70 ± 0.10	0.66 ± 0.17
99 年	2.08 ± 0.12*	1.89 ± 0.08	1.29 ± 0.04*	1.47 ± 0.07*	1.58 ± 0.05*
<i>Steryl ferulate</i>					
98 年	65.12 ± 2.05	69.77 ± 15.74	42.71 ± 8.90	44.52 ± 5.83	45.94 ± 6.22
99 年	73.42 ± 7.63*	87.93 ± 2.30	34.38 ± 2.47	45.42 ± 3.59	45.86 ± 1.54

Data were shown as mean ± SD (n=3).

\* indicates significant differences between two crop years ( $p < 0.05$ ).

表 16. 豆類自由態固醇的含量

Table 16. The contents of free sterols of legumes (mg/100 g)

Legumes	Sample				
	黃豆	黑豆	紅豆	綠豆	花豆
Cholesterol	trace	trace	trace	0.95 ± 0.01	trace
Avenasterol	2.83 ± 0.07	7.06 ± 0.42	29.74 ± 0.92	13.91 ± 0.28	15.09 ± 0.10
Campesterol	11.32 ± 0.52	12.06 ± 0.36	0.62 ± 0.02	2.49 ± 0.04	2.87 ± 0.05
Stigmasterol	11.93 ± 0.11	13.37 ± 0.65	17.49 ± 0.33	13.03 ± 0.80	21.62 ± 0.73
β-Sitosterol	20.38 ± 0.92	24.02 ± 1.10	6.52 ± 0.22	30.06 ± 0.99	39.66 ± 1.10
Total	46.45 ± 1.62 <sup>d</sup>	56.51 ± 2.53 <sup>c</sup>	54.37 ± 1.50 <sup>c</sup>	60.45 ± 2.12 <sup>b</sup>	79.24 ± 1.98 <sup>a</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ).

trace: less than LOQ

表 17. 豆類糖苷態固醇的含量

Table 17. The contents of steryl glucosides of legumes (mg/100 g)

Legumes	Sample				
	黃豆	黑豆	紅豆	綠豆	花豆
Avenasteryl glucoside	1.42 ± 0.01	2.99 ± 0.12	2.76 ± 0.09	2.04 ± 0.10	1.01 ± 0.06
Campesteryl glucoside	7.55 ± 0.40	6.24 ± 0.25	trace	0.37 ± 0.03	0.18 ± 0.03
Stigmasteryl glucoside	4.96 ± 0.31	4.72 ± 0.28	2.33 ± 0.04	2.94 ± 0.28	4.42 ± 0.47
β-Sitosteryl glucoside	17.26 ± 0.89	15.91 ± 0.89	2.01 ± 0.06	7.63 ± 0.30	5.75 ± 0.13
Total	31.18 ± 1.61 <sup>a</sup>	29.87 ± 1.54 <sup>a</sup>	7.10 ± 0.18 <sup>c</sup>	12.98 ± 0.71 <sup>b</sup>	11.36 ± 0.71 <sup>b</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ).

trace: less than LOQ

表 18. 豆類酯化糖苷態固醇的含量

Table 18. The contents of acylated steryl glucosides of legumes (mg/100 g)

Legumes	Sample				
	黃豆	黑豆	紅豆	綠豆	花豆
Avenasteryl-18:3-Glc	nd	nd	1.88 ± 0.05	trace	trace
Campesteryl-18:3-Glc	0.41 ± 0.04	trace	nd	trace	trace
Stigmasteryl-18:3-Glc	0.35 ± 0.05	trace	2.15 ± 0.10	0.45 ± 0.03	3.00 ± 0.06
β-Sitosteryl-18:3-Glc	1.72 ± 0.02	0.81 ± 0.09	1.14 ± 0.04	0.65 ± 0.02	2.73 ± 0.03
Avenasteryl-18:2-Glc	0.51 ± 0.05	0.91 ± 0.08	8.83 ± 0.25	0.50 ± 0.01	0.66 ± 0.04
Campesteryl-18:2-Glc	4.82 ± 0.17	2.91 ± 0.16	trace	trace	trace
Stigmasteryl-18:2-Glc	4.15 ± 0.09	2.61 ± 0.15	5.94 ± 0.20	1.39 ± 0.11	2.38 ± 0.15
β-Sitosteryl-18:2-Glc	13.61 ± 0.29	9.34 ± 0.38	2.68 ± 0.16	2.75 ± 0.08	2.09 ± 0.12
Avenasteryl-16:0-Glc	0.48 ± 0.05	0.89 ± 0.08	14.00 ± 0.09	0.71 ± 0.06	0.91 ± 0.08
Campesteryl-16:0-Glc	2.40 ± 0.16	2.23 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.00	0.22 ± 0.00
Stigmasteryl-16:0-Glc	2.03 ± 0.13	1.86 ± 0.03	11.04 ± 0.09	3.43 ± 0.10	6.56 ± 0.22
β-Sitosteryl-16:0-Glc	6.68 ± 0.20	6.17 ± 0.39	3.57 ± 0.43	5.85 ± 0.11	5.97 ± 0.03
β-Sitosteryl-18:0-Glc	0.28 ± 0.01	trace	trace	0.19 ± 0.03	trace
Total	37.45 ± 1.26 <sup>b</sup>	27.72 ± 1.36 <sup>c</sup>	51.44 ± 1.44 <sup>a</sup>	16.12 ± 0.55 <sup>e</sup>	24.52 ± 0.72 <sup>d</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ).

nd: not detected

trace: less than LOQ



### 第三節、正相液相層析搭配蒸發光散射檢測器分析樣品中的植物固醇

由於 C18 逆相層析管柱會過度滯留酯化態固醇及三酸甘油酯，並無法達到同步分析所有種類植物固醇，故接著使用正相層析法，希望能將植物固醇進行大類分離，藉此可知各類植物固醇的總量。

#### 一、植物固醇正相液相層析法的建立

參考 Moreau 等人 (Moreau *et al.*, 1996; Moreau *et al.*, 2008) 分析樣品中植物固醇的層析條件，選擇 Diol 管柱分析，移動相使用正己烷 (含 0.1% 甲酸) 及異丙醇。使用標準品進行實驗，初始 5 分鐘維持正己烷流洗，可流洗出酯化態固醇；如在之後將異丙醇比例提高梯度層析，三酸甘油酯及自由態固醇波峰無法分離，因此最後選擇僅將異丙醇提升至 1% 維持至 20 分鐘，2 根波峰能達到基線分離，但比較文獻中使用 Diol 管柱分離三酸甘油酯及自由態固醇的效果，二者皆能輕易分離，文獻中使用管柱為 LiChrosorb Diol (100 × 3 mm, 5 μm, Chrompack) (Moreau *et al.*, 1996) 及 Lichrosphere Diol (250 × 4.6 mm, 5 μm, Merck) (Perona and Ruiz-Gutierrez, 2004)，推測本實驗所使用的 Chromatorex Diol SPS 100-5 管柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm, Fuji Silisia Chemical) 性質與文獻所使用的有較大差異。之後逐步提升異丙醇比例以流洗出 steryl ferulate、酯化糖苷態固醇及糖苷態固醇。

選擇管柱時曾使用 silica 及 NH<sub>2</sub> 管柱，但 silica 管柱分離植物固醇效果較差，NH<sub>2</sub> 則對高極性的脂類較為滯留，需要使用比異丙醇更高極性的溶劑提高移動相強度，且考量其具有的陰離子交換性質，可能會使部分帶電荷化合物滯留於管柱中，故不採用。

蒸發光散射檢測器參數設定參考儀器操作手冊上的建議數值，以能將層析移動相最難揮發時的 75% 異丙醇揮發的數值計算，設定漂移管溫度及霧化氣體流速，分析時觀察基線平穩，訊號波動不超過 ± 0.1 mV。

ELSD 層析圖譜需依靠波峰滯留時間來判別化合物，由於觀察到 steryl ferulate 波峰處有較多其他物質波峰產生，以在 ELSD 之前的紫外光偵測器於 325 nm 偵測，根據滯留時間的些微差異可更加確認 steryl ferulate 的波峰位置。

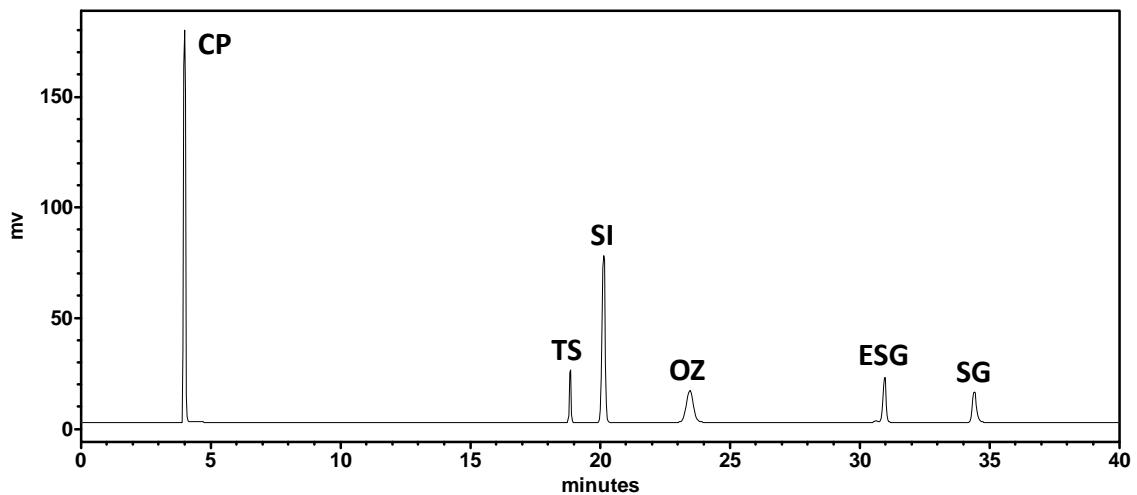


圖 25. 植物固醇及三酸甘油酯標準品的層析圖

Figure 25. HPLC-ELSD chromatogram of phytosterol and triglyceride standards. CP: cholesteryl palmitate, TS: tristearin, SI:  $\beta$ -Sitosterol, OZ:  $\gamma$ -Oryzanol, ESG: esterified steryl glucosides, SG: steryl glucosides

## 二、檢量線線性及偵測、定量極限

將固醇及三酸甘油酯標準品序列稀釋後分析，計算其檢量線線性及偵測、定量極限，結果如表 19，固醇化合物儀器偵測極限介於 0.5-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，儀器定量極限為 2.5-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。檢量線皆呈現為多項式而非線性 (圖 26)，這與文獻實驗結果相符 (Perona and Ruiz-Gutierrez, 2004)，本實驗數據以線性計算檢量線公式時， $r^2$  大多低於 0.98，多項式計算則皆高於 0.99。但亦有文獻使用 ELSD 偵測脂質的檢量線為線性且  $r > 0.99$  (Conforti *et al.*, 1993)，ELSD 檢測值是否為線性可能根據檢量線的範圍 (Perona and Ruiz-Gutierrez, 2004) 或所使用的管柱 (Nordbäck and Lundberg, 1999) 而不同。

表 19. 固醇及三酸甘油酯標準品的標準曲線

Table 19. Calibration curve of sterols and triglyceride

Compound	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Calibration range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Calibration equations <sup>a</sup>	$r^2$
Cholesteryl palmitate	0.5	2.5	20-160	$Y = 13.696X^2 + 1713.7X - 16006$	0.9996
$\beta$ -Sitosterol	2.5	5	20-160	$Y = 11.998X^2 + 705X - 8246.7$	0.9999
$\gamma$ -Oryzanol	5	10	20-160	$Y = 6.5143X^2 + 130.58X + 1074.5$	0.9995
Esterified sterol glucosides	0.5	5	20-100	$Y = 9.4011X^2 + 753.99X - 8197.6$	0.9990
Steryl glucosides	2.5	5	20-100	$Y = 10.926X^2 + 426.8X - 4845$	0.9997

a: X represented concentration of sterol. Y represented peak area of sterol.

LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantitation.

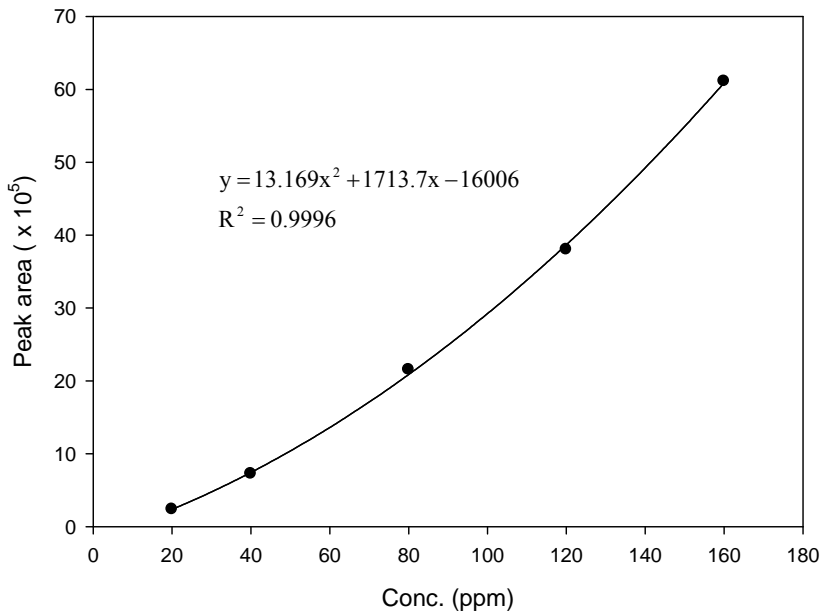


圖 26. Cholesteryl palmitate 標準品的檢量線

Figure 26. Calibration curve of cholesteryl palmitate standard

### 三、樣品中植物固醇的定量分析

分析樣品時發現米類及豆類樣品於酯化態固醇波峰處的波峰其訊號大多超過儀器訊號值上限 (圖 27)，顯示該處流洗出物質含量極高，但酯化態固醇在植物中較不可能有這麼高的含量，推測該處有其他含量較高的低極性物質與酯化態固醇一同流洗出來。查詢文獻後顯示該物質可能為蠟酯 (wax ester) 及類胡蘿蔔素 (carotenoid) (Gonzalez-Castro *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 2002)，而由於以 silica 為基質的管柱無法分離皆為非極性的蠟酯及酯化態固醇 (Nordbäck and Lundberg, 1999)，推測實驗樣品中同樣也面臨到此問題，由於 Diol 管柱並無法將蠟酯及酯化態固醇分離，故無法對酯化態固醇定量。

而在分析樣品時的另一問題為樣品中的三酸甘油酯含量遠超過自由態固醇，而二者雖然能達成基線分離，但由於三酸甘油酯含量極高，二波峰如面積差異太大時仍可能無法分離，需要將樣品適當稀釋；另一方面由於部分植物固醇如糙米的酯化糖苷態固醇含量較低，稀釋倍數過高可能會使其樣品液濃度低於定量極限，故參考 LC-MS 的固醇含量數據及樣品性質，最後選擇將糙米樣品萃取液稀釋 2 倍，豆類樣品則依三酸甘油酯多寡稀釋 0.7-10 倍不等。圖 28 及圖 29 為台南 11 號糙米及綠豆萃取液層析圖中固醇滯留區段，三酸甘油酯與自由態固醇間的波峰參考文獻結果應為游離脂肪酸 (Moreau *et al.*, 1996)，其餘非固醇 (脂類) 波峰則不討論。

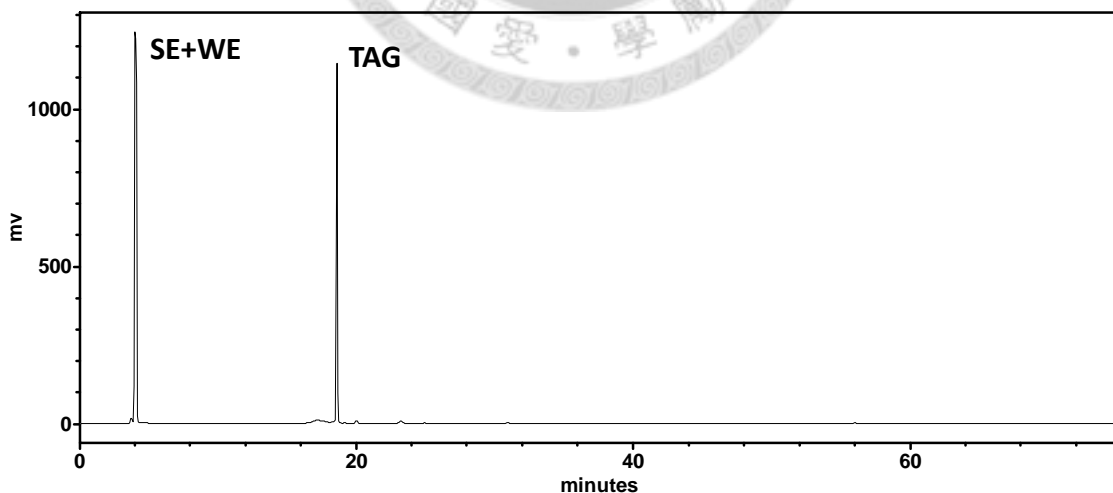


圖 27. 台南 11 號糙米萃取液層析圖

Figure 27. HPLC-ELSD chromatogram of Tainan No.11 brown rice extract. SE: steryl esters, WE: wax esters, TAG: triglycerides

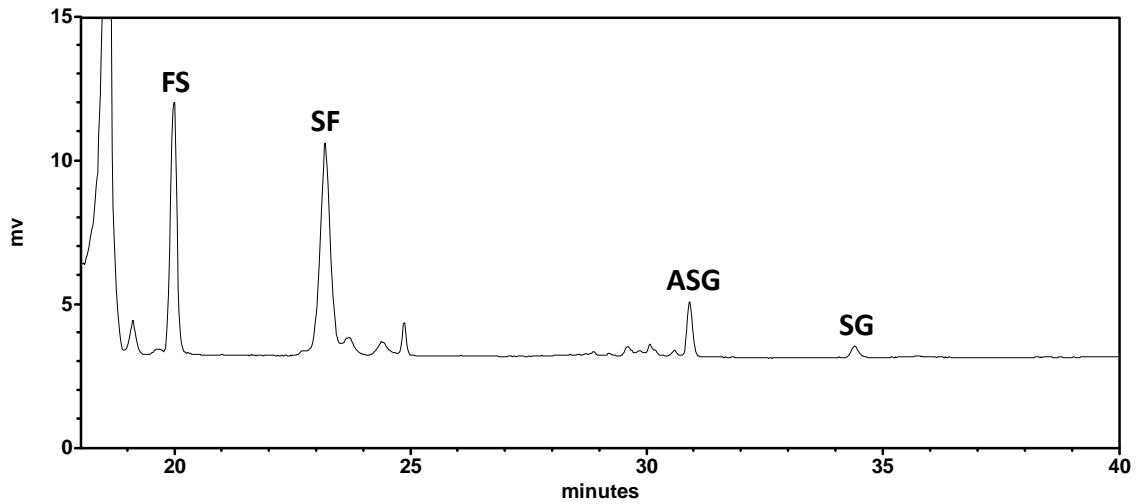


圖 28. 台南 11 號糙米萃取液的 18-40 分鐘處層析圖

Figure 28. HPLC–ELSD chromatogram (18-40 minutes) of Tainan No.11 brown rice extract. FS: free sterols, SF: steryl ferulates, ASG: acylated steryl glycosides, SG: steryl glycosides

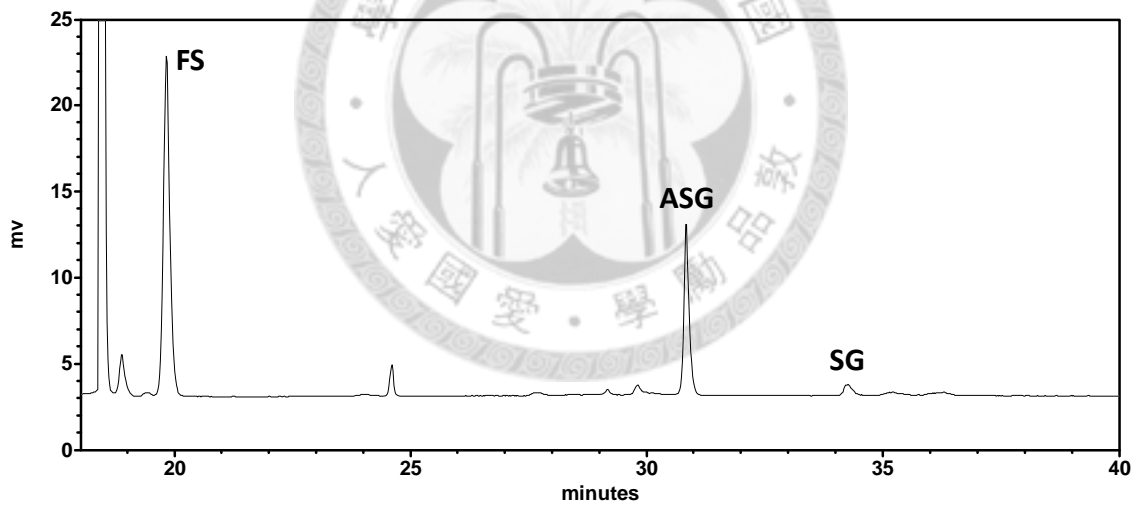


圖 29. 綠豆萃取液的 18-40 分鐘處層析圖

Figure 29. HPLC–ELSD chromatogram (18-40 minutes) of mung bean extract. FS: free sterols, ASG: acylated steryl glycosides, SG: steryl glycosides

### (一) 糙米樣品

99 年糙米樣品所測植物固醇含量如表 20 及圖 30 所示，並以 t-test 比較 MS 與 ELSD 不同偵測器分析結果有無顯著差異 (表 21)，由於 ELSD 理論上對於相同類物質所產生的感應值較接近，且皆有固醇標準品製作檢量線定量，所得結果應較符合實際含量。

ELSD 測量糙米自由態固醇含量為 27.34-35.24 mg/100 g，自由態固醇由於主要組成固醇皆有標準品可供 LC-MS 製作檢量線定量，大部分米種差異不大，且數值的高低 2 種偵測器結果皆符合。僅高雄 145 號及台中私 10 號的 ELSD 值較低並有顯著差異，比較米種間固醇組成差異，這 2 種米種皆含有較高量的 avensterol，由於 avensterol 是以 stigmasterol 為定量基準，推測 avensterol 的游離化效果較 stigmasterol 佳，同樣濃度的波峰面積較高，因此 MS 測量的數值應較實際高。

所有米種 MS 及 ELSD 所測的 steryl ferulate 量皆有顯著差異，ELSD 的測量值 (24.83-69.45 mg/100 g) 較低且差異甚大，由於缺乏單一成分標準品，以結構不同的自由態固醇來定量 steryl ferulate 較實際值差異較大並不意外，但 ELSD 測定含量的高低仍與 MS 結果相符。

酯化糖苷態固醇 ELSD 的測量值 (5.69-12.52 mg/100 g) 皆遠高於 MS，此結果顯示酯化糖苷態於本實驗的質譜游離化條件不佳，感應值較自由態固醇低，而有些化合物也因訊號低於定量極限而未能計算，因此所測結果較低。而糖苷態固醇 MS 及 ELSD (6.99-9.94 mg/100 g) 的結果較相近。

### (二) 豆類樣品

豆類樣品所測植物固醇含量如

表 22 及圖 31 所示，表 23 為 MS 及 ELSD 的結果比較。由於豆類含有較高量的 avensterol，與上述推論相符，大部分豆類 ELSD 的自由態固醇測量值 (32.80-61.80 mg/100 g) 較 MS 低，但黑豆則無差異。黑豆亦含有 avensterol，如以上述推論其 ELSD 值應較低，由於僅有黑豆不符推論，有可能為黑豆含有未被質譜分析到的其他種固醇，這部分需再觀察黑豆自由態固醇區段質譜訊號是否有其他訊號加以確認。

表 20. HPLC-ELSD 分析糙米植物固醇的含量

Table 20. Phytosterol contents of brown rices determined by HPLC-ELSD

Sterol classes	Rice cultivars					
	台稉 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	越光米	台中私 10 號
Free sterol	33.16 ± 4.35 <sup>ab</sup>	35.24 ± 1.48 <sup>a</sup>	27.34 ± 0.52 <sup>c</sup>	30.31 ± 0.97 <sup>bc</sup>	28.03 ± 2.57 <sup>c</sup>	29.64 ± 1.77 <sup>bc</sup>
Steryl ferulate	47.76 ± 6.00 <sup>b</sup>	69.45 ± 3.00 <sup>a</sup>	24.83 ± 0.20 <sup>d</sup>	28.05 ± 1.48 <sup>cd</sup>	33.28 ± 1.97 <sup>c</sup>	30.56 ± 0.27 <sup>c</sup>
Acylated steryl glucoside	12.52 ± 0.70 <sup>a</sup>	12.61 ± 1.32 <sup>a</sup>	9.72 ± 0.34 <sup>b</sup>	5.69 ± 0.79 <sup>c</sup>	5.72 ± 0.48 <sup>c</sup>	10.85 ± 0.42 <sup>b</sup>
Steryl glucoside	9.94 ± 0.75 <sup>a</sup>	9.10 ± 0.26 <sup>ab</sup>	8.52 ± 0.16 <sup>bc</sup>	6.99 ± 0.36 <sup>d</sup>	7.40 ± 1.07 <sup>d</sup>	8.00 ± 0.32 <sup>cd</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ).

表 21. 不同偵測方法分析糙米植物固醇含量的比較

Table 21. The comparison of phytosterol contents of brown rices analyzed by LC-MS and LC-ELSD

Rice Variety	Free sterol		Steryl ferulate		Acylated steryl glucoside		Steryl glucoside	
	MS	ELSD	MS	ELSD	MS	ELSD	MS	ELSD
台稉 9 號	35.84 ± 0.92	33.16 ± 4.35	73.42 ± 2.83	47.76 ± 6.00*	2.08 ± 0.11	12.52 ± 0.70*	8.73 ± 0.40	9.94 ± 0.75
台南 11 號	35.10 ± 0.57	35.24 ± 1.48	87.93 ± 1.38	69.45 ± 3.00*	1.89 ± 0.07	12.61 ± 1.32*	7.50 ± 0.22	9.10 ± 0.26*
台農 71 號	28.40 ± 0.52	27.34 ± 0.52	34.38 ± 1.27	24.83 ± 0.20*	1.29 ± 0.02	9.72 ± 0.34*	7.44 ± 0.14	8.52 ± 0.16*
高雄 145 號	33.73 ± 1.14	30.31 ± 0.97*	45.42 ± 3.56	28.05 ± 1.48*	1.47 ± 0.07	5.69 ± 0.79*	9.43 ± 0.55	6.99 ± 0.36*
越光	31.89 ± 1.88	28.03 ± 2.57	54.73 ± 3.30	33.28 ± 1.97*	1.50 ± 0.09	5.72 ± 0.48*	10.44 ± 0.40	7.40 ± 1.07*
台中私 10 號	37.82 ± 1.24	29.64 ± 1.77*	45.86 ± 0.94	30.56 ± 0.27*	1.58 ± 0.05	10.85 ± 0.42*	6.37 ± 0.49	8.00 ± 0.32*

Data were shown as mean ± SD (n=3).

\* indicates significant differences between different detection methods ( $p < 0.05$ ).

表 22. HPLC-ELSD 分析豆類植物固醇的含量

Table 22. Phytosterol contents of legumes determined by HPLC-ELSD

Sterol classes	Legumes				
	黃豆	黑豆	紅豆	綠豆	花豆
Free sterol	38.21 ± 0.87 <sup>d</sup>	56.16 ± 0.49 <sup>b</sup>	32.80 ± 1.43 <sup>e</sup>	47.98 ± 1.26 <sup>c</sup>	61.80 ± 3.64 <sup>a</sup>
Acylated sterol glucoside	36.13 ± 0.51 <sup>b</sup>	52.08 ± 0.63 <sup>a</sup>	50.57 ± 2.23 <sup>a</sup>	30.32 ± 1.11 <sup>c</sup>	39.75 ± 4.03 <sup>b</sup>
Sterol glucoside	17.77 ± 1.46 <sup>a</sup>	19.09 ± 1.46 <sup>a</sup>	4.86 ± 0.34 <sup>c</sup>	9.19 ± 0.30 <sup>b</sup>	8.18 ± 1.06 <sup>b</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ).

表 23. 不同偵測方法分析豆類植物固醇含量的比較

Table 23. The comparison of phytosterol contents of legumes analyzed by LC-MS and LC-ELSD

Legumes	Free sterol		Acylated sterol glucoside		Sterol glucoside	
	MS	ELSD	MS	ELSD	MS	ELSD
黃豆	46.45 ± 1.50	38.21 ± 0.87*	37.45 ± 1.18	36.13 ± 0.51	31.18 ± 1.58	17.77 ± 1.46*
黑豆	56.51 ± 0.49	56.16 ± 0.49	27.72 ± 1.17	52.08 ± 0.63 *	29.87 ± 1.45	19.09 ± 1.46*
紅豆	54.37 ± 0.61	32.80 ± 1.43*	51.44 ± 0.43	50.57 ± 2.23	7.10 ± 0.11	4.86 ± 0.34*
綠豆	60.45 ± 1.87	47.98 ± 1.26*	16.12 ± 0.39	30.32 ± 1.11 *	12.98 ± 0.63	9.19 ± 0.30*
花豆	79.24 ± 0.82	61.80 ± 3.64*	24.52 ± 0.58	39.75 ± 4.03 *	11.36 ± 0.71	8.18 ± 1.06*

Data were shown as mean ± SD (n=3)

\* indicates significant differences between different detection methods ( $p < 0.05$ ).



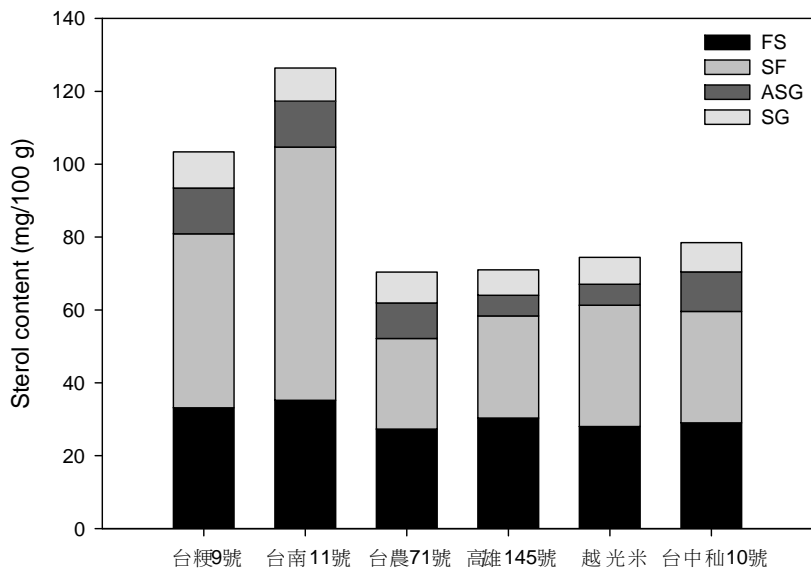


圖 30. 糙米中不同種類植物固醇的含量

Figure 30. Content of phytosterol conjugates in brown rices. FS: free sterol, SF: steryl ferulate, ASG: acylated steryl glycoside, SG: steryl glycoside

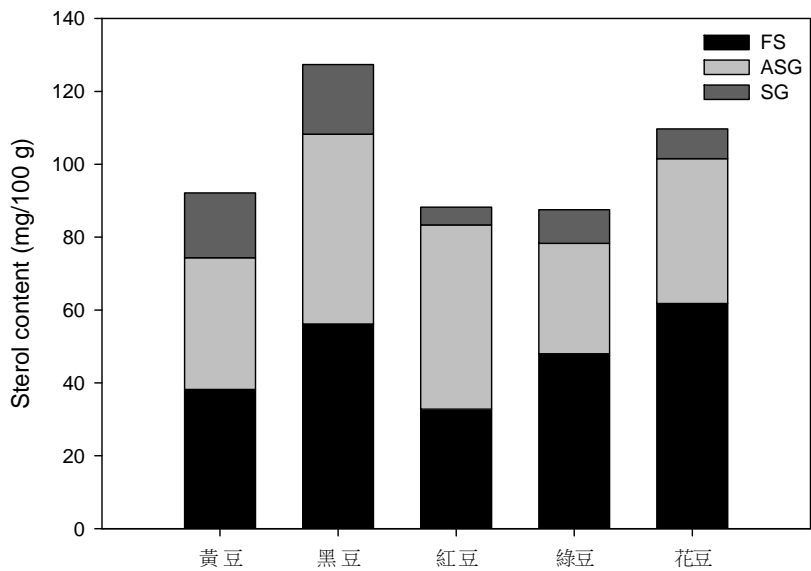


圖 31. 豆類中不同種類植物固醇的含量

Figure 31. Content of phytosterol conjugates in legumes. FS: free sterol, ASG: acylated steryl glycoside, SG: steryl glycoside

豆類樣品並未偵測到含有 steryl ferulate，酯化醣苷態固醇 MS 及 ELSD 的結果有較大不同，其中黃豆及紅豆的結果無差異，黑豆、綠豆及花豆則為 ELSD 的測量值較高。推測酯化醣苷態也與自由態相同，游離化程度依不同的固醇基團而有差異，故雖然依米類結果的討論豆類的酯化醣苷態 ELSD 測量值應較高，但紅豆 MS 結果顯示紅豆的酯化醣苷態固醇其固醇基團為 avenasterol 者約佔一半，avenasterol 的游離化較佳，故這部分的含量亦被高估，可能為紅豆含量仍不變的原因。黃豆其固醇組成較不同處為其接上亞麻油酸 (C<sub>18:2</sub>) 的酯化醣苷態固醇含量較高，但組成同樣有較高亞麻油酸的黑豆其 ELSD 結果較 MS 高，酯化醣苷態固醇上的脂肪酸不同影響分子游離化的程度在本實驗中難以評估，黃豆 2 種偵測器測量值結果相同原因較難解釋。

醣苷態固醇的結果顯示 ELSD 測量值 (8.18-19.09 mg/100 g) 均較 MS 低，由於 LC-MS 分析醣苷態時也以自由態固醇定量，米類數據單以數值比較雖然與 ELSD 結果接近，但含量高的米種二者的差異變大，豆類醣苷態固醇的含量較多，推測以自由態固醇定量時已與實際值大幅偏差；而紅豆醣苷態固醇量雖與米類接近，但 ELSD 數值仍較低，顯示仍需考量 avenasterol (avenasteryl glucoside) 游離化的問題。本實驗中豆類酯化醣苷態及醣苷態固醇以 MS 及 ELSD 定量結果差異較大，但表 24 以本實驗數據與文獻中同樣以 NP-LC-ELSD 分析豆類中醣苷態及醣苷態固醇的結果對照，顯示相對數值大多符合，唯本實驗紅豆的結果略較黑豆低，與文獻結果不同。

表 24. 豆類酯化醣苷態及醣苷態固醇實驗數據與文獻數據的比較

Table 24. The comparison of values of acylated steryl glucoside and steryl glucoside of legumes between reference value and experimental value

Legumes	Acylated steryl glycosides		Steryl glycosides	
	Reference value <sup>a</sup>	Experimental value	Reference value <sup>a</sup>	Experimental value
黃豆	38.0	36.13	11.6	17.77
黑豆	99.1	52.08	27.0	19.09
紅豆	125.1	50.57	9.1	4.86

<sup>a</sup> (Sugawara and Miyazawa, 1999)

#### 第四節、樣品中的非固醇物質及雜質

在進行 LC-MS 及 LC-ELSD 分析時於樣品中可發現其他的含量較多的非固醇物質及從實驗過程產生的雜質，部分物質鄰近固醇分子波峰，可能會干擾固醇的分析。由於可供未來實驗的參考，在此列出其質譜及層析的詳細資訊，並推測其可能來源。

##### 一、三酸甘油酯

逆相層析時如樣品前處理不當，可於層析圖觀察到大量三酸甘油酯波峰存在，觀察其質譜訊號可輕易鑑別這些波峰即為三酸甘油酯。根據參考資料中的整理，三酸甘油酯以 LC-APCI 正電模式分析時產生的訊號為  $[M+H]^+$  及  $[M-RCO_2]^+$ ， $[M+H]^+$  為分子離子， $[M-RCO_2]^+$  代表三酸甘油酯分子脫去一脂肪酸的訊號（二酸甘油酯），可藉二者訊號判斷分子中脂肪酸的組成 (Hazel, 2005)。如圖 32 為糙米樣品中發現的 trilinolein 的質譜圖，圖中可看到其分子離子  $[M+H]^+$  ( $m/z$  879) 及脫去一亞麻油酸的  $[LL]^+$  ( $m/z$  599)；如三酸甘油酯的組成有不同脂肪酸時，則可能會有多個  $[M-RCO_2]^+$  的訊號。由於本實驗中三酸甘油酯以  $[M+H]^+$  的訊號最強，依據文獻不同的三酸甘油酯分子離子訊號範圍約介於  $m/z$  800-1000，其因此分析層析質譜圖時可選擇此範圍質量來觀察三酸甘油酯。

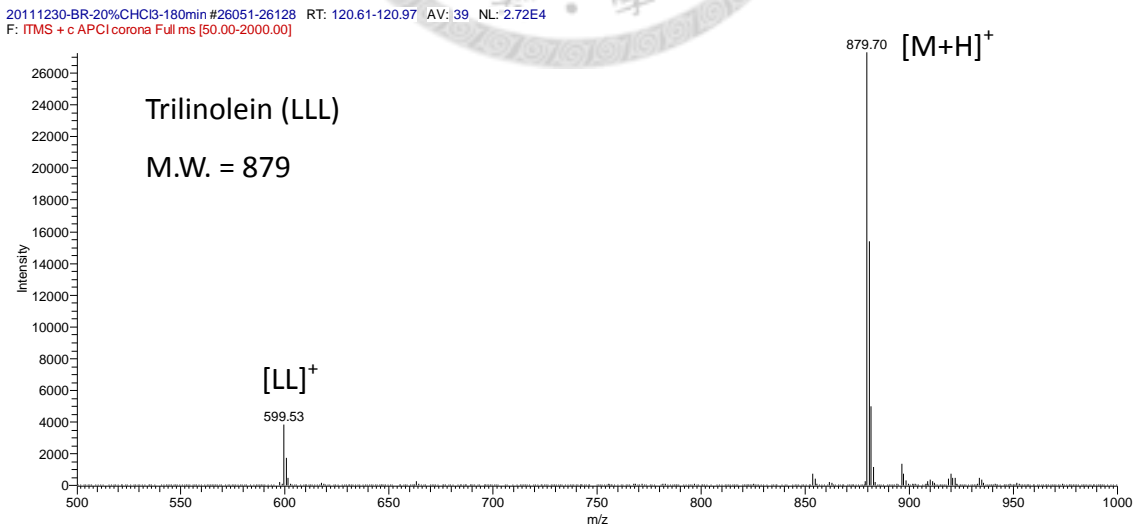


圖 32. 糙米樣品中 LLL (trilinolein) 的質譜圖

Figure 32. The APCI-MS spectrum of trilinolein (LLL) from brown rice

## 二、氧化態固醇 (Oxysterols)

98 年的糙米樣品中發現有些波峰其質譜訊號和欲分析的固醇訊號相同，由於這些波峰的滯留時間接近自由態固醇，一開始推測為未知的自由態固醇。但分析其二次質譜訊號後發現與自由態固醇不同，自由態固醇的二次質譜幾乎皆為眾多的斷裂片段所組成，少有某一斷裂訊號特別強，但針對氧化態固醇的特徵離子給予相同能量撞擊進行二次質譜分析後發現會產生一強度特別強的訊號，為其脫去一分子水的訊號，這與文獻以質譜分析植物固醇不同氧化物的結果相同 (Kemmo *et al.*, 2008)。如圖 33 至圖 35，分別為離子訊號  $m/z$  399、427 及 413 的訊號進行 MS/MS 分析後得到的二次質譜圖，圖中可看到最強的片段為該離子訊號脫去一分子水的訊號 ( $m/z$  381, 409 及 395)，比對文獻後發現此 3 個離子訊號分別代表 campesterol、stigmasterol 及  $\beta$ -sitosterol 的氧化態，但無法知道為何種結構。固醇分子大多為不飽和的結構，遇到空氣及熱時仍會氧化，而本實驗中 98 年期作糙米樣品可能因存放太久而氧化形成氧化態固醇，這顯示於分析固醇時應注意樣品的保存，否則固醇氧化後會使所測定的含量減少而使結果失真，並會干擾質譜分析。

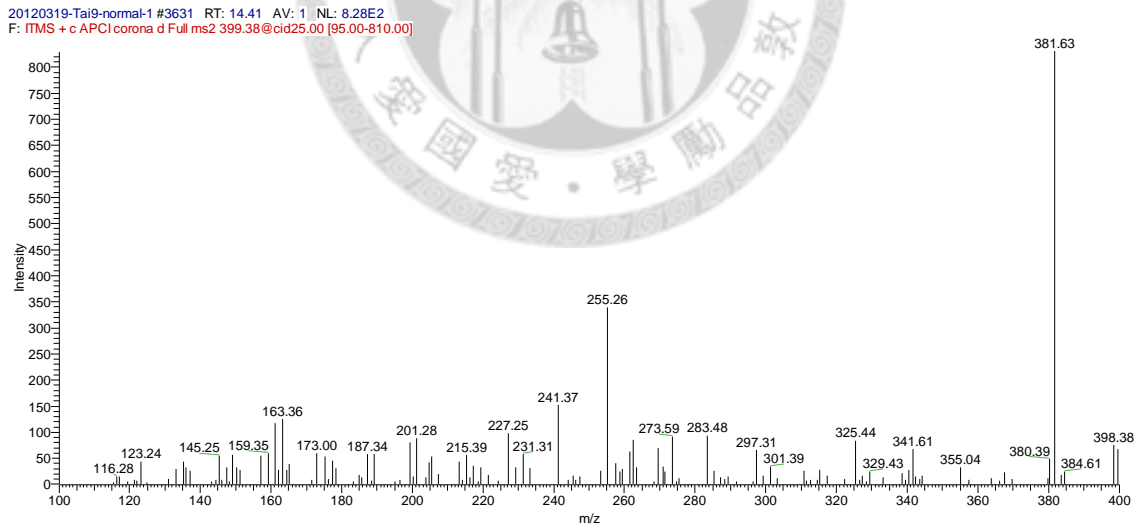


圖 33. 糙米樣品中 campesterol 氧化態的二次質譜圖

Figure 33. The APCI-MS/MS spectrum of campesterol oxide ( $m/z$  399) from brown rice sample

20120319-Tai9-normal-1 #3377 RT: 13.40 AV: 1 NL: 2.12E2  
F: ITMS + c.APCI.corona d Full ms2 427.39@cid25.00 [105.00-865.00]

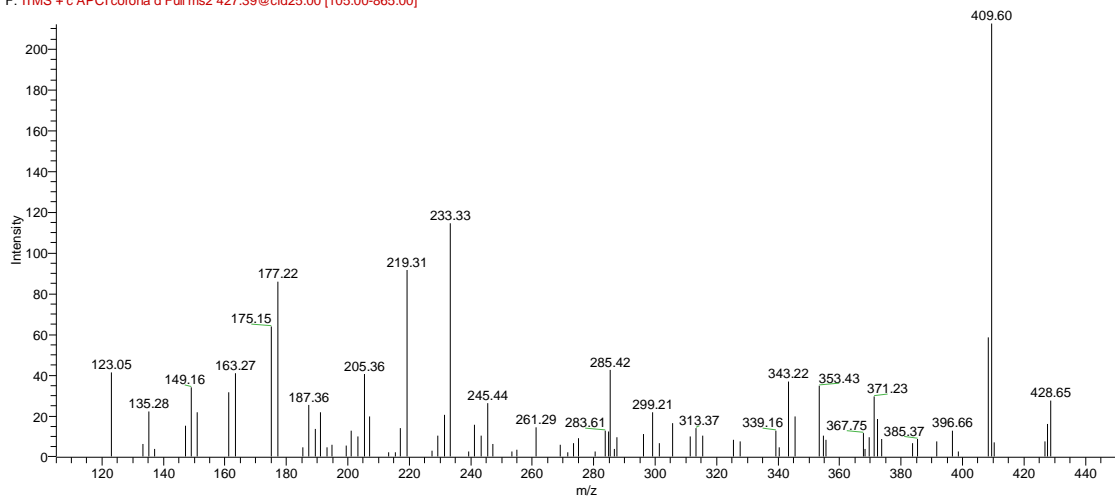


圖 34. 糙米樣品中 stigmasterol 氧化態的二次質譜圖

Figure 34. The APCI-MS/MS spectrum of stigmasterol oxide ( $m/z$  427) from brown rice sample

20120319-Tai9-normal-1 #3611 RT: 14.34 AV: 1 NL: 7.28E2  
F: ITMS + c.APCI.corona d Full ms2 413.28@cid25.00 [100.00-840.00]



圖 35. 糙米樣品中  $\beta$ -sitosterol 氧化態的二次質譜圖

Figure 35. The APCI-MS/MS spectrum of  $\beta$ -sitosterol oxide ( $m/z$  413) from brown rice sample

### 三、雜質

#### (一) 塑膠添加劑

以 LC-MS 分析樣品時額外觀察到一些明顯波峰，由於其並非固醇類物質，因此分析其質譜訊號並搜尋文獻來推測其為何種化合物。圖 36 為觀察到的主要 3 個雜質波峰，其質譜訊號為  $m/z$  338、419 及 663，圖 37 至圖 39 分別為這 3 個訊號的二次質譜圖。比對文獻 (Carrott, 1998; Kawamura *et al.*, 2000) 後推測  $m/z$  338 可能為 erucamide (13-Docosamide, M.W. = 337) 的分子離子訊號，erucamide 為塑膠中的潤滑劑，而其二次質譜顯示連續 -14 (脫去  $\text{CH}_2$  基團) 的訊號 (圖 37)，顯示其結構具有長鏈烷類，與 erucamide 的結構符合。

塑膠中的塑化劑，鄰苯二甲酸酯類 (phthalates) 亦可在樣品中偵測到，實驗中最常發現者為鄰苯二甲酸二異壬酯 (diisononyl phthalate, DINP)，其特徵離子為  $m/z$  419，而二次質譜的訊號 (圖 38) 與文獻相符，其中  $m/z$  149 為所有鄰苯二甲酸酯類皆有的特徵離子，代表 phthalic anhydride 片段 (Sørensen, 2006)。

另一  $m/z$  663 訊號查詢文獻後推測為塑膠中的抗氧化劑 Irgafos 168 (Tris (2,4-di-*tert*-butylphenyl) phosphite, M.W. = 646) 的氧化物 Irgafos 168 phosphate (Tris (2,4-di-*tert*-butylphenyl) phosphate, M.W. = 662) (Chen and Her, 1993; Carrott, 1998)，其分子離子為  $m/z$  633，文獻中的二次質譜含有  $m/z$  607、551、495、439、383；本實驗的二次質譜則含有前述 4 個離子片段 (圖 39)，與文獻高度符合。

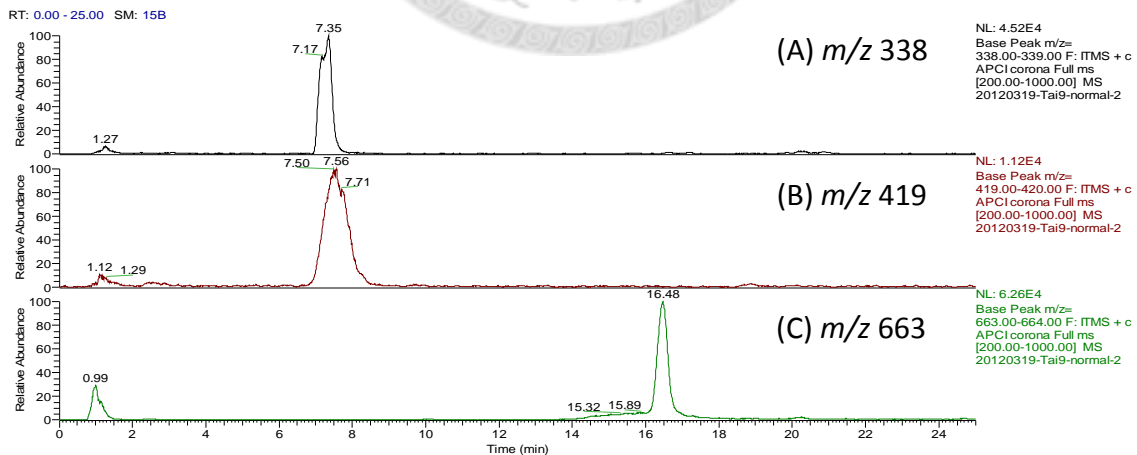


圖 36. 糙米樣品中塑膠添加物的萃取離子層析圖

Figure 36. Extracted ion chromatograms of plastic additives:  $m/z$  (A) 338, (B) 419, and (C) 663 from brown rice sample

20120319-Tai9-normal-2 #1772 RT: 6.99 AV: 1 NL: 8.34E2  
F: ITMS + c APCI corona d Full ms2 338.31 @cid25.00 [80.00-690.00]

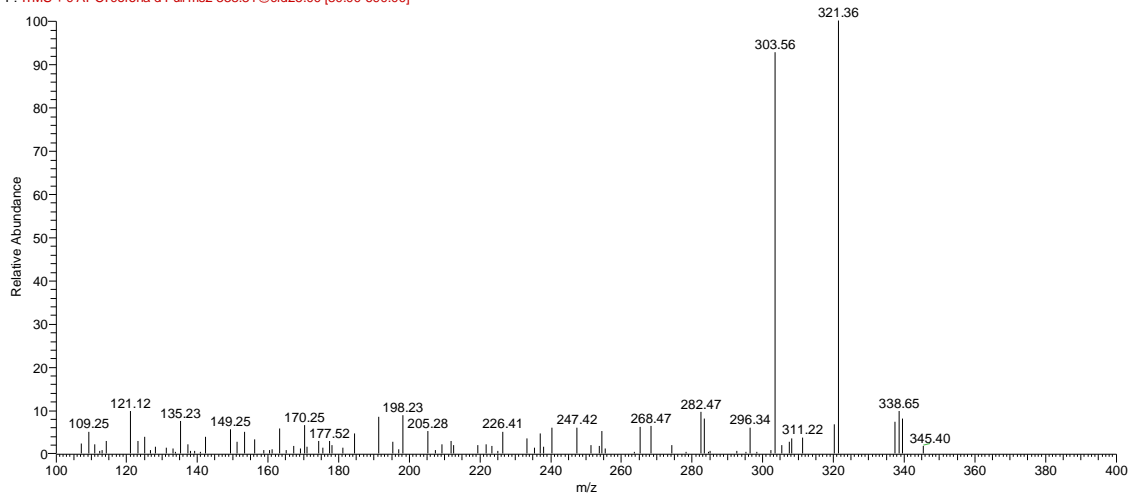


圖 37. 糙米樣品中 erucamide 的二次質譜圖

Figure 37. The APCI-MS/MS spectrum of erucamide ( $m/z$  338) from brown rice sample

20120319-Tai9-normal-2 #1766 RT: 6.96 AV: 1 NL: 2.45E2  
F: ITMS + c APCI corona d Full ms2 419.00 @cid25.00 [105.00-850.00]

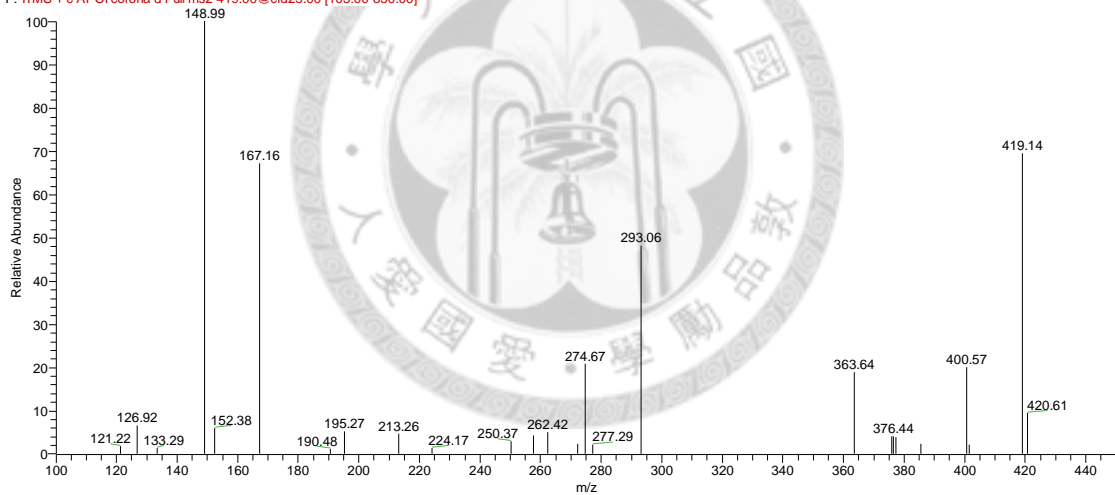


圖 38. 糙米樣品中 DINP 的二次質譜圖

Figure 38. The APCI-MS/MS spectrum of DINP ( $m/z$  419) from brown rice sample

20120319-Tai9-normal-2 #3988 RT: 15.81 AV: 1 NL: 3.33E3  
F: ITMS + c APCI corona d Full ms2 663.48@cid25.00 [170.00-1340.00]

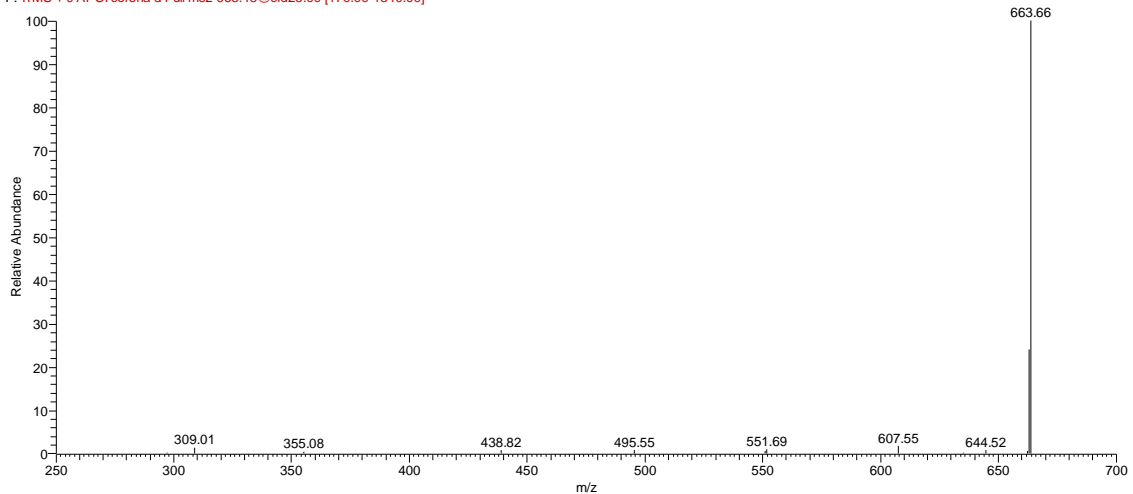


圖 39. 糙米樣品中 Irgafos 168 phosphate 的二次質譜圖

Figure 39. The APCI-MS/MS spectrum of Irgafos 168 phosphate ( $m/z$  663) from brown rice

雖然於實驗時多採用玻璃器具 (含針筒) 已大幅降低上述塑膠添加物的含量，但樣品經固相萃取時仍會接觸到塑膠材質的固相萃取管，使用有機溶劑流洗仍無法避掉上述物質一併洗出，故仍能於分析樣品時偵測到。而這些塑膠添加物多為低極性，使用 APCI 為游離法時會比 ESI 更容易偵測到這些物質的存在。另外實驗時發現如使用塑膠 tip 吸取甲醇後，該瓶甲醇較未接觸塑膠 tip 的甲醇相比含有更高量的塑膠抗氧化劑 (Irgafos 168)，這顯示實驗時吸取溶劑需使用氣密針或玻璃吸量管以避免分析時的干擾及汙染溶劑。

## (二) 針筒潤滑劑

正相層析分析樣品前須事先將樣品以針筒過濾器過濾，預實驗時發現以塑膠針筒過濾器過濾樣品時於層析時間 2-4 分鐘處有數個波峰產生，但以玻璃針筒過濾時則消失，再測試以塑膠及玻璃針筒過濾空白溶劑氣仿後分析，也有相同結果，圖 40 顯示氣仿經塑膠針筒過濾後較玻璃針筒過濾者多出至少 3 個波峰，依其滯留時間推測極性較蠟酯及酯化態固醇低。對照文獻中以正相管柱分析低極性物質的結果 (Moreau *et al.*, 1990; Nordbäck and Lundberg, 1999)，這些波峰可能為碳氫化合物 (hydrocarbon)，推測為塑膠針筒中的潤滑劑成分，因此正相層析後續實驗皆使用玻璃針筒進行過濾以避免雜質干擾分析。



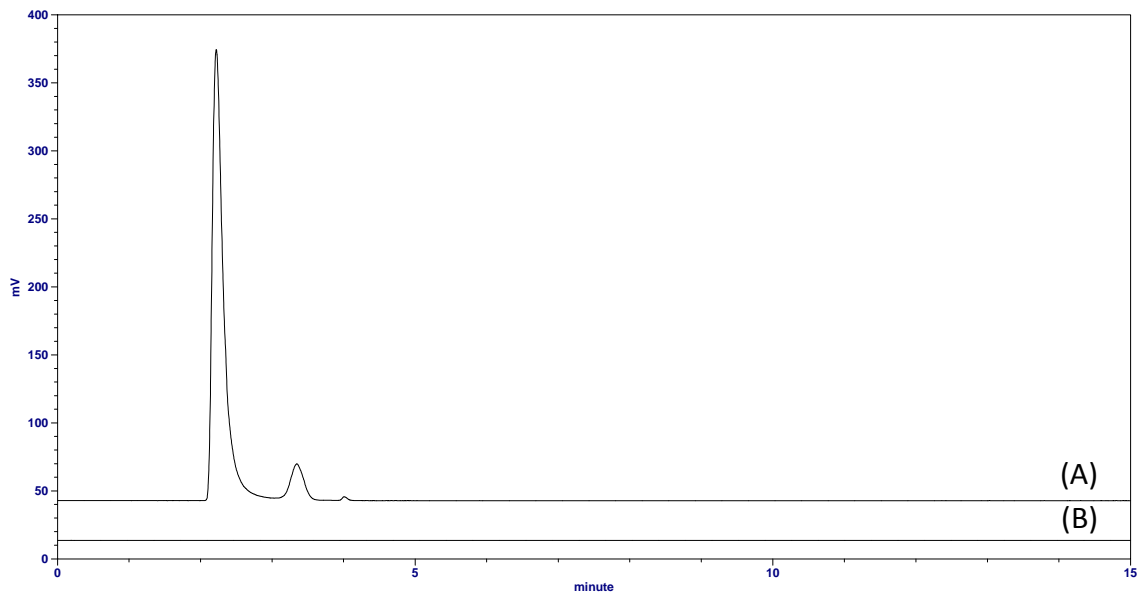
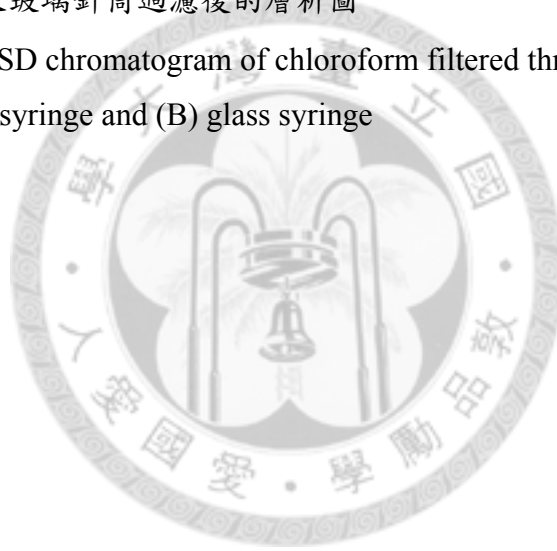


圖 40. 氯仿經塑膠及玻璃針筒過濾後的層析圖

Figure 40. HPLC-ELSD chromatogram of chloroform filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  nylon filter with (A) plastic syringe and (B) glass syringe



## 柒、結論

本實驗建立了以逆相液相層析串聯質譜儀同步分析自由態、steryl ferulate、醣苷態及酯化醣苷態 4 種植物固醇的方法。淨化樣品使用  $\text{NH}_2$  固相萃取管取代傳統化學水解法，較為快速且便利。固相萃取可將三酸甘油酯及酯化態固醇去除並分離植物固醇成分，保持固醇分子完整型態，避免水解法產生的問題。以大氣壓力化學游離法可順利將低極性的植物固醇分子游離，植物固醇於逆相液相層析分離後利用串聯質譜儀可推測分子的結構資訊，了解樣品中的固醇組成。

另以建立以正相液相層析搭配蒸發光散射偵測器分析植物固醇的方法，樣品可不經其他前處理直接分析，結果顯示以正相層析管柱可將不同種類植物固醇分離成單一波峰，由於蒸發光散射偵測器對於結構相似的固醇分子有接近的感應值，對於植物固醇的定量較為精確。相較於質譜儀分析，不同植物固醇分子的游離化程度差異較大，亦缺乏標準品進行定量分析，故僅以自由態固醇作為定量基準會產生極大偏差。

但是以正相或逆相液相層析皆無法達成同步分析脂肪酸酯化態固醇的目的，為本分析方法的缺點。由於酯化態固醇會於 C18 管柱中嚴重滯留，已使用固相萃取方式去除；而酯化態固醇於 Diol 管柱中無法和蠟酯類化合物分離開，亦無法定量。此結果顯示以常使用的正相及逆相層析管柱並無法同步分離植物固醇，後續研究可能需使用較少使用的材質（如 alumina 正相管柱）或是不同裝填顆粒（如 monolithic）的管柱進行分析，才能克服現有管柱的限制，達成同步分析植物固醇的需求。

近年來發現醣苷態固醇與自由態及酯化態固醇不同，具有特殊的生理活性，但傳統分析方法常忽略醣苷態固醇而未分析，現有文獻亦缺乏對其分析的內容。本實驗建立的方法可對 4 種植物固醇同步分析，並得到較完整的層析及質譜資訊，可供後續研究參考。

## 捌、參考文獻

- 戴慧玲。2012。以靈芝菌絲進行西洋參生物轉化過程固醇類化合物之組成變化。  
國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
- Abidi, S. L., Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J. Chromatogr. A* **2001**, 935, 173-201.
- Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Yamaura, M.; Ukiya, M.; Kimura, Y.; Shimizu, N.; Arai, K., Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, 48, 2313-2319.
- Arin, M. J.; Diez, M. T.; Resines, J. A., High-performance liquid chromatographic determination of phenolic acids isolated from plants. *J. Liq. Chromatogr.* **1995**, 18, 4183-4192.
- Awad, A. B.; Fink, C. S., Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2127-2130.
- Awad, A. B.; Barta, S. L.; Fink, C. S.; Bradford, P. G.,  $\beta$ -Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, 52, 419-426.
- Bar, L. K.; Garti, N.; Sarig, S.; Bar, R., Solubilities of cholesterol, sitosterol, and cholesteryl acetate in polar organic solvents. *J. Chem. Eng. Data* **1984**, 29, 440-443.
- Berger, A.; Jones, P.; Abumweis, S., Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.* **2004**, 3.
- Biedermann, M.; Grob, K.; Mariani, C.; Schmidt, J. P., Detection of desterolized sunflower oil in olive oil through isomerized  $\Delta^7$ -sterols. *Eur. Food Res. Technol.* **1996**, 202, 199-204.
- Bouic, P. J. D., The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2001**, 4, 471-475.
- Breinhölder, P.; Mosca, L.; Lindner, W., Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices. *J. Chromatogr. B* **2002**, 777, 67-82.
- Caboni, M. F.; Iafelice, G.; Pelillo, M.; Marconi, E., Analysis of fatty acid sterol esters

- in tetraploid and hexaploid wheats: identification and comparison between chromatographic methods. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7465-7472.
- Carrott, M. J., Identification and analysis of polymer additives using packed-column supercritical fluid chromatography with APCI mass spectrometric detection. *Analyst* **1998**, *123*, 1827-1833.
- Cerqueira, M. T.; Fry, M. M.; Connor, W. E., The food and nutrient intakes of the Tarahumara Indians of Mexico. *Am. J. Clin. Nutr.* **1979**, *32*, 905-915.
- Chen, S. W.; Her, G. R., Analysis of additives in polyethylene with desorption chemical ionization/tandem mass spectrometry. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 844-851.
- Christie, W. W.; Urwin, R. A., Separation of lipid classes from plant tissues by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1995**, *18*, 97-100.
- Conforti, F. D.; Harris, C. H.; Rinehart, J. T., High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector. *J. Chromatogr. A* **1993**, *645*, 83-88.
- Cunha, S. S.; Fernandes, J. O.; Oliveira, M. B. P. P., Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1128*, 220-227.
- Duncan, M. W.; Steele, J. C.; Kopin, I. J.; Markey, S. P., 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: An unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology* **1990**, *40*, 767-772.
- Fang, N.; Yu, S.; Badger, T. M., Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3260-3267.
- Fischer, C.; Holl, W., Lipoprotein lipase as a new tool in sterol ester analysis. *Lipids* **1990**, *25*, 292-295.
- Flynn, G. L.; Shah, Y.; Prakongpan, S., Cholesterol solubility in organic solvents. *J. Pharm. Sci.* **1979**, *68*, 1090-1097.
- Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497-509.

- Geuns, J. M. C., Variations in sterol composition in etiolated mung bean seedlings. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 103-106.
- Goel, R. K.; Sairam, K., Anti-ulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasma*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. *Indian J. Pharmacol.* **2002**, *34*, 100-110.
- Gonzalez-Castro, M. J.; Lopez-Hernandez, J.; Simal-Lozano, J.; Oruña-Concha, M. J.; Vazquez-Blanco, M. E., Separation of neutral lipid classes in green beans by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **1996**, *34*, 199-201.
- Grunwald, C.; Huang, L.-S., Analysis of steryl glycosides. In *Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids*, Nes, W. D.; Parish, E. J., Eds. Academic Press: San Diego, **1989**; pp 49-60.
- Gunawan, S.; Vali, S.; Ju, Y.-H., Purification and identification of rice bran oil fatty acid steryl and wax esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 449-456.
- Gylling, H.; Miettinen, T. A., The effect of plant stanol- and sterol-enriched foods on lipid metabolism, serum lipids and coronary heart disease. *Ann. Clin. Biochem.* **2005**, *42*, 254-263.
- Hartley, R. D.; Jones, E. C., Effect of ultraviolet light on substituted cinnamic acids and the estimation of their cis and trans isomers by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1975**, *107*, 213-218.
- Hazel, M., Regiospecific Analysis of Triacylglycerols Using High Performance Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. In *Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography*, AOCS Publishing: **2005**.
- Heupel, R. C., Isolation and Primary Characterization of Sterols. In *Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids*, Nes, W. D.; Parish, E. J., Eds. Academic Press: San Diego, **1989**; pp 1-31.
- Hwang, K. T.; Cuppett, S. L.; Weller, C. L.; Hanna, M. A., HPLC of grain sorghum wax classes highlighting separation of aldehydes from wax esters and steryl esters. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 619-623.
- Igarashi, F.; Hikiba, J.; Ogihara, M. H.; Nakaoka, T.; Suzuki, M.; Kataoka, H., A highly specific and sensitive quantification analysis of the sterols in silkworm larvae by

- high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2011**, *419*, 123-132.
- Ikuo, I., Soy Sterols. In *Soy in Health and Disease Prevention*, CRC Press: **2005**; pp 199-205.
- Islam, M. S.; Murata, T.; Fujisawa, M.; Nagasaka, R.; Ushio, H.; Bari, A. M.; Hori, M.; Ozaki, H., Anti-inflammatory effects of phytosterol ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154*, 812-824.
- Kamal-Eldin, A.; Määttä, K.; Toivo, J.; Lampi, A.-M.; Piironen, V., Acid-catalyzed isomerization of fucosterol and  $\Delta^5$ -avenasterol. *Lipids* **1998**, *33*, 1073-1077.
- Kasim, N. S.; Gunawan, S.; Ju, Y.-H., Isolation and identification of steroidal hydrocarbons in soybean oil deodorizer distillate. *Food Chem.* **2009**, *117*, 15-19.
- Kasim, N. S.; Huynh, L. H.; Ju, Y. H., Purification and identification of endogenous and exogenous minor constituents from vegetable oils. *Sep. Purif. Rev.* **2012**, *41*, 62-96.
- Kawamura, Y.; Yonezawa, R.; Maehara, T.; Yamada, T., Determination of additives in food contact polypropylene. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **2000**, *41*, 154-161.
- Kemmo, S.; Ollilainen, V.; Lampi, A. M.; Piironen, V., Liquid chromatography mass spectrometry for plant sterol oxide determination in complex mixtures. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 1325-1334.
- Kesselmeier, J.; Eichenberger, W.; Urban, B., High performance liquid chromatography of molecular species from free sterols and sterol glycosides isolated from oat leaves and seeds. *Plant Cell Physiol.* **1985**, *26*, 463-471.
- Khabazian, I.; Bains, J. S.; Williams, D. E.; Cheung, J.; Wilson, J. M. B.; Pasqualotto, B. A.; Pelech, S. L.; Andersen, R. J.; Wang, Y. T.; Liu, L.; Nagai, A.; Kim, S. U.; Craig, U. K.; Shaw, C. A., Isolation of various forms of sterol  $\beta$ -d-glucoside from the seed of *Cycas circinalis*: neurotoxicity and implications for ALS-parkinsonism dementia complex. *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 516-528.
- Kochhar, S. P., Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. *Prog. Lipid Res.* **1983**, *22*, 161-188.
- Kojima, M.; Ohnishi, M.; Ito, S.; Fujino, Y., Characterization of acylmono-, mono-, di-, tri- and tetraglycosylsterol and saponin in Adzuki bean (*Vigna angularis*) seeds. *Lipids* **1989**, *24*, 849-853.

- Kojima, M.; Suzuki, H.; Ohnishi, M.; Ito, S., Effects of growth temperature on lipids of Adzuki bean cells. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1483-1487.
- Kovganko, N. V.; Kashkan, Z. N., Sterol glycosides and acylglycosides. *Chem. Nat. Compd.* **1999**, *35*, 479-497.
- Kumar, R. R.; Tikku, P. K.; Prakash, V., Preferential extractability of  $\gamma$ -oryzanol from dried soapstock using different solvents. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 195-200.
- Kuroda, N.; Ohnishi, M.; Fujino, Y., Sterol lipids in rice bran. *Cereal Chem.* **1977**, *54*, 997-1006.
- Lagarda, M.; Garciallatas, G.; Farre, R., Analysis of phytosterols in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1486-1496.
- Lanzón, A.; Albi, T.; Guinda, A., Formation of a  $\Delta^7$  triterpene alcohol in refined olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 1421-1423.
- Lechner, M.; Reiter, B.; Lorbeer, E., Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* **1999**, *857*, 231-238.
- Lerma-García, M. J.; Herrero-Martínez, J. M.; Simó-Alfonso, E. F.; Mendonça, C. R. B.; Ramis-Ramos, G., Composition, industrial processing and applications of rice bran  $\gamma$ -oryzanol. *Food Chem.* **2009**, *115*, 389-404.
- Lin, X.; Ma, L.; Racette, S. B.; Spearie, C. L. A.; Ostlund Jr, R. E., Phytosterol glycosides reduce cholesterol absorption in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2009**, *296*, G931-G935.
- Lin, X.; Ma, L.; Moreau, R. A.; Ostlund Jr, R. E., Glycosidic bond cleavage is not required for phytosteryl glycoside-induced reduction of cholesterol absorption in mice. *Lipids* **2011**, *46*, 701-708.
- Lu, T.-J.; Chen, H.-N.; Wang, H.-J., Chemical constituents, dietary fiber, and  $\gamma$ -oryzanol in six commercial varieties of brown rice from Taiwan. *Cereal Chem.* **2011**, *88*, 463-466.
- Ly, P. T. T.; Singh, S.; Shaw, C. A., Novel environmental toxins: Steryl glycosides as a potential etiological factor for age-related neurodegenerative diseases. *J. Neurosci. Res.* **2007**, *85*, 231-237.
- Marler, T. E.; Shaw, C. A., Distribution of free and glycosylated sterols within *Cycas micronesica* plants. *Sci. Hortic.* **2010**, *123*, 537-542.

- Menéndez-Carreño, M.; Ansorena, D.; Astiasarán, I.; Piironen, V.; Lampi, A.-M., Determination of non-polar and mid-polar monomeric oxidation products of stigmasterol during thermo-oxidation. *Food Chem.* **2010**, *122*, 277-284.
- Mezine, I.; Zhang, H.; Macku, C.; Lijana, R., Analysis of plant sterol and stanol esters in cholesterol-lowering spreads and beverages using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5639-5646.
- Miettinen, T. A.; Vuoristo, M.; Nissinen, M.; Järvinen, H. J.; Gylling, H., Serum, biliary, and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized patients before and during consumption of stanol ester margarine. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1095-1102.
- Miller, A.; Engel, K. H., Content of  $\gamma$ -oryzanol and composition of steryl ferulates in brown rice (*Oryza sativa* L.) of European origin. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8127-8133.
- Moreau, R. A.; Asmann, P. T.; Norman, H. A., Analysis of major classes of plant lipids by high-performance liquid chromatography with flame ionization detection. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2461-2466.
- Moreau, R. A.; Powell, M. J.; Hicks, K. B., Extraction and quantitative analysis of oil from commercial corn fiber. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2149-2154.
- Moreau, R. A.; Whitaker, B. D.; Hicks, K. B., Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.* **2002**, *41*, 457-500.
- Moreau, R. A.; Scott, K. M.; Haas, M. J., The identification and quantification of steryl glucosides in precipitates from commercial biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 761-770.
- Nordbäck, J.; Lundberg, E., High resolution separation of non-polar lipid classes by HPLC-ELSD using alumina as stationary phase. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1999**, *22*, 483-486.
- Nyström, L.; Paasonen, A.; Lampi, A. M.; Piironen, V., Total plant sterols, steryl ferulates and steryl glycosides in milling fractions of wheat and rye. *J. Cereal Sci.* **2007**, *45*, 106-115.
- Nyström, L.; Moreau, R.; Lampi, A.-M.; Hicks, K.; Piironen, V., Enzymatic hydrolysis of steryl ferulates and steryl glycosides. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*,



727-733.

- Oliveira, L.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Cordeiro, N., Lipophilic extracts from banana fruit residues: A source of valuable phytosterols. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9520-9524.
- Ostlund Jr, R. E.; McGill, J. B.; Zeng, C. M.; Covey, D. F.; Stearns, J.; Stenson, W. F.; Spilburg, C. A., Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy  $\Delta^5$ -phytosterols and phytostanols in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2002**, *282*, E911-E916.
- Otaegui-Arrazola, A.; Menéndez-Carreño, M.; Ansorena, D.; Astiasarán, I., Oxysterols: A world to explore. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3289-3303.
- Perona, J. S.; Ruiz-Gutierrez, V., Quantification of major lipid classes in human triacylglycerol-rich lipoproteins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 653-659.
- Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Toivo, J. I.; Swank, M. A.; Simpkins, A. H., Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J. Food Compos. Anal.* **2002**, *15*, 123-142.
- Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Ashraf-Khorassani, M., Analysis of steryl glucosides in foods and dietary supplements by solid-phase extraction and gas chromatography. *J. Food Lipids* **2005**, *12*, 124-140.
- Picchioni, G. A.; Watada, A. E.; Roy, S.; Whitaker, B. D.; Wergin, W. P., Membrane Lipid Metabolism, Cell Permeability, and Ultrastructural Changes in Lightly Processed Carrots. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 597-601.
- Pieber, B.; Schober, S.; Goebel, C.; Mittelbach, M., Novel sensitive determination of steryl glycosides in biodiesel by gas chromatography–mass spectroscopy. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 6555-6561.
- Piironen, V.; Lindsay, D. G.; Miettinen, T. A.; Toivo, J.; Lampi, A.-M., Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 939-966.
- Pinkart, H. C.; Devereux, R.; Chapman, P. J., Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns. *J. Microbiol. Methods* **1998**, *34*, 9-15.
- Rozenberg, R.; Ruibal-Mendieta, N. L.; Petitjean, G.; Cani, P.; Delacroix, D. L.; Delzenne, N. M.; Meurens, M.; Quetin-Leclercq, J.; Habib-Jiwan, J.-L.,

- Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS. *J. Cereal Sci.* **2003**, *38*, 189-197.
- Rudell, D. R.; Buchanan, D. A.; Leisso, R. S.; Whitaker, B. D.; Mattheis, J. P.; Zhu, Y.; Varanasi, V., Ripening, storage temperature, ethylene action, and oxidative stress alter apple peel phytosterol metabolism. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1328-1340.
- Ruibal-Mendieta, N. L.; Rozenberg, R.; Delacroix, D. L.; Petitjean, G.; Dekeyser, A.; Baccelli, C.; Marques, C.; Delzenne, N. M.; Meurens, M.; Habib-Jiwan, J.-L.; Quetin-Leclercq, J., Spelt (*Triticum spelta* L.) and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) wholemeals have similar sterol profiles, as determined by quantitative liquid chromatography and mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4802-4807.
- Russo, M. V.; De Leonardis, A.; Macciola, V., Solid phase extraction—gas-chromatographic method to determine free cholesterol in animal fats. *J. Food Compos. Anal.* **2005**, *18*, 617-624.
- Sørensen, L. K., Determination of phthalates in milk and milk products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1135-1143.
- Savage, G.; Dutta, P., Formation and Content of Phytosterol Oxidation Products in Foods. In *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products*, AOCS Publishing: **2002**.
- Schrack, K.; Shiva, S.; Arpin, J. C.; Delimont, N.; Isaac, G.; Tamura, P.; Welti, R., Steryl glucoside and acyl steryl glucoside analysis of arabidopsis seeds by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Lipids* **2011**, 1-9.
- Shaw, C. A.; Wilson, J. M. B., Analysis of neurological disease in four dimensions: insight from ALS-PDC epidemiology and animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2003**, *27*, 493-505.
- Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W., Basic Concepts and the Control of Separation. In *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc.: **2010**; pp 19-86.
- Stöggel, W.; Huck, C.; Wongyai, S.; Scherz, H.; Bonn, G., Simultaneous determination of carotenoids, tocopherols, and  $\gamma$ -oryzanol in crude rice bran oil by liquid

- chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detection employing silica C30 stationary phases. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1712-1718.
- Sugawara, T.; Miyazawa, T., Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Lipids* **1999**, *34*, 1231-1237.
- Tabata, R. C.; Wilson, J. M. B.; Ly, P.; Zwiegers, P.; Kwok, D.; Van Kampen, J. M.; Cashman, N.; Shaw, C. A., Chronic exposure to dietary sterol glucosides is neurotoxic to motor neurons and induces an ALS-PDC phenotype. *Neuromolecular Med.* **2008**, *10*, 24-39.
- Tabata, T.; Tanaka, M.; Iio, T., Hypocholesterolemic activity of phytosterol. II. *Yakugaku Zasshi.* **1980**, *100*, 546-552.
- Tenkanen, M.; Kontkanen, H.; Isoniemi, R.; Spetz, P.; Holmbom, B., Hydrolysis of sterol esters by a lipase (Lip 3) from *Candida rugosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 120-127.
- Toivo, J.; Piironen, V.; Kalo, P.; Varo, P., Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid-phase extraction in sample preparation. *Chromatographia* **1998**, *48*, 745-750.
- Toivo, J.; Phillips, K.; Lampi, A.-M.; Piironen, V., Determination of sterols in foods: recovery of free, esterified, and glycosidic sterols. *J. Food Compos. Anal.* **2001**, *14*, 631-643.
- Trösken, E. R.; Straube, E.; Lutz, W. K.; Völkel, W.; Patten, C., Quantitation of lanosterol and its major metabolite FF-MAS in an inhibition assay of CYP51 by azoles with atmospheric pressure photoionization based LC-MS/MS. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2004**, *15*, 1216-1221.
- Van Boven, M.; Daenens, P.; Tytgat, J.; Cokelaere, M., Determination of simmondsins and simmondsin ferulates in jojoba meal and feed by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* **1996**, *44*, 2239-2243.
- Verleyen, T.; Szulczewska, A.; Verhe, R.; Dewettinck, K.; Huyghebaert, A.; De Greyt, W., Comparison of steradiene analysis between GC and HPLC. *Food Chem.* **2002**, *78*, 267-272.
- Wang, Y. Q.; Ji, M. J.; Cao, Y.; Xu, W. L., Solubility of  $\beta$ -sitosterol maleate and stigmasterol maleate in acetone and ethyl acetate. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52*,

- 2110-2111.
- Weete, J. D.; Abril, M.; Blackwell, M., Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS ONE* **2010**, *5*.
- Wei, D.; Wang, L.; Liu, C.; Wang, B.,  $\beta$ -Sitosterol solubility in selected organic solvents. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, *55*, 2917-2919.
- Wewer, V.; Dombrink, I.; Vom Dorp, K.; Dörmann, P., Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 1039-1054.
- Whitaker, B. D., Changes in the steryl lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3411-3416.
- Xu, Z.; Godber, J. S., Purification and identification of components of  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oil. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2724-2728.
- Yamauchi, R.; Aizawa, K.; Inakuma, T.; Kato, K., Analysis of molecular species of glycolipids in fruit pastes of red bell pepper (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 622-627.
- Young, C. S.; Dolan, J. W., Success with evaporative light-scattering detection. *LC-GC Europe* **2003**, *16*, 132-137.
- Young, C. S.; Dolan, J. W., Success with evaporative light-scattering detection, part II: Tips and techniques. *LC-GC Europe* **2004**, *17*, 192-199.
- Yu, S.; Nehus, Z. T.; Badger, T. M.; Fang, N., Quantification of vitamin E and  $\gamma$ -oryzanol components in rice germ and bran. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7308-7313.
- Zarrouk, W.; Carrasco-Pancorbo, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Zarrouk, M., Exploratory characterization of the unsaponifiable fraction of Tunisian virgin olive oils by a global approach with HPLC-APCI-IT MS/MS analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6418-6426.
- Zdzislaw, W., Biochemistry of Phytosterol Conjugates. In *Physiology and Biochemistry of Sterols*, AOCS Publishing: **1992**; pp 361-395.

玖、附錄

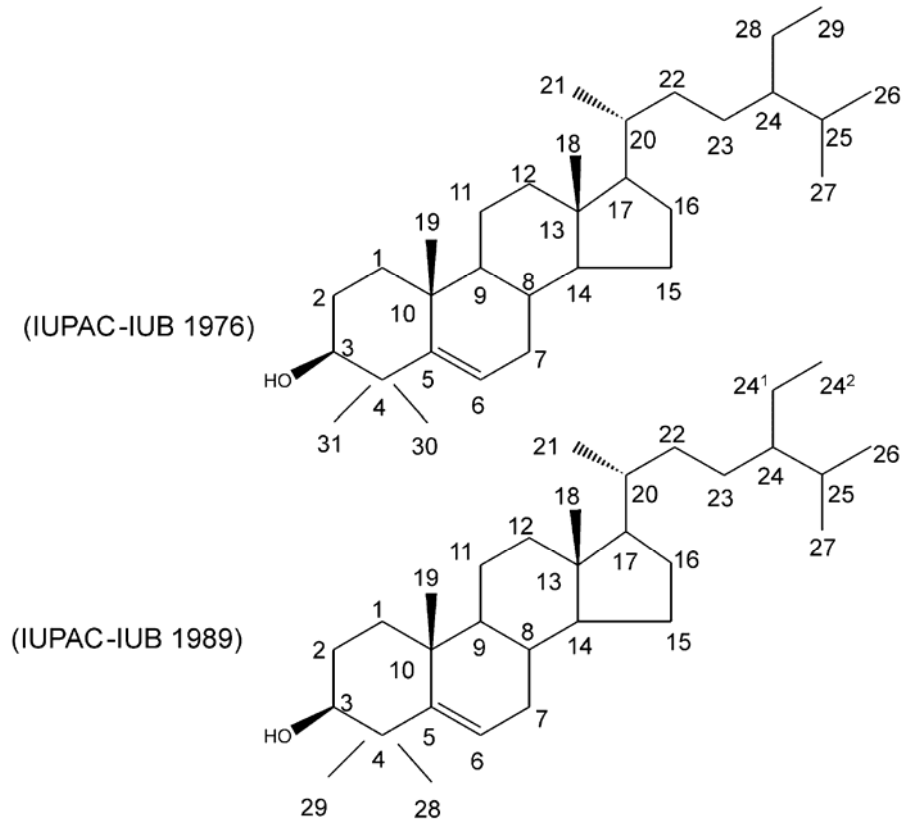


圖 41. 植物固醇結構命名

Figure 41. Nomenclature of phytosterols (IUPAC-IUB recommendations of 1976 and 1989) (Moreau *et al.*, 2002)

## 口試問答

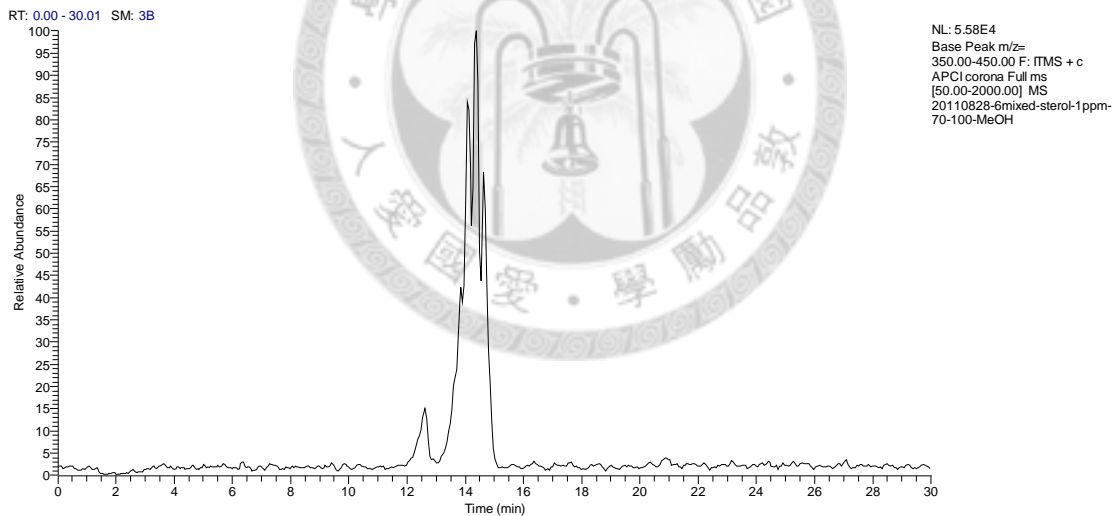
張永和老師：

**Q:** 目的為同步分析，所用的兩個分析方法哪個較佳？

**A:** 使用逆相層析管柱可分離出固醇單一分子，配合質譜可定性，但缺乏標準品故定量較不準確；正相層析管柱將固醇以大類分離，由於 ELSD 對結構相似分子感應值較均一，故可以單一或者混和標準品定固醇總量，其定量應較 MS 準確。但無法對單一分子定性。

**Q:** 逆相層析曾用了其他管柱，可再詳細討論

**A:** YMC C18 管柱對 campesterol 及 stigmasterol 的分離效果不佳，而 Kintex PFP 管柱無論如何變換流洗液組成，對於自由態固醇幾乎無法分離，如下圖所示，為 ergosterol、cholesterol、campesterol、stigmasterol、 $\beta$ -sitosterol 及 sitostanol 標準品的 LC/APCI-MS 層析圖，滯留時間 14 分鐘處的波峰即為 6 種自由態固醇的波峰。



**Q:** 台「梗」應為台「稊」或「稊」。

**A:** 已修正。

曾素香博士

**Q: LOD, LOQ 如何測定?**

A: 標準品經連續稀釋後, 將波峰  $S/N \geq 3$  者濃度訂為 LOD,  $S/N \geq 10$  者為 LOQ。

(曾博士補充: 這樣應為儀器的 LOD, LOQ 而非分析方法的)

**Q: 結合態固醇用甚麼離子定量? 要寫清楚。**

A: 皆使用其固醇基團脫去一分子水的最強特徵離子定量, 會補充在內容。

**Q: 固醇回收率固醇是何時添加?**

A: 一開始就添加在樣品粉末中, 進行實驗 (曾博士: 那就不需要寫 SPE 後的回收率而為整體回收率)。

**Q: 可以考慮改善萃取溶劑, 如把氯仿改成二氯甲烷。**

A: 未來實驗可以試驗這一點, 可能可以使用正己烷及異丙醇混和萃取。

盧訓所長

**Q: 方法中溶劑的選擇, 於你的實驗有何改進?**

A: 其他文獻中雖然有使用不同溶劑萃取, 但可能分析目標只針對少數固醇, 且只做定性而非定量, 因此多數文獻不需考慮萃取率。本實驗目的為同步分析不同型態植物固醇並定量, 用 Folch 法可同時萃取到多種植物固醇, 理論上在現有萃取法中萃取率為最佳, 是否有較 Folch 法萃取率相同或更加的萃取方式則待研究。

**Q: 改進後數據準確度和別人所測有何不同? 要可說服人的數據。**

A: 這需要做不同溶劑萃取後植物固醇含量的比較, 並沒有做這個實驗。但依照文獻比較不同溶劑萃取的結果, 氯仿或 Folch 溶劑萃取效果仍優於其他溶劑。

**Q: 糙米豆類如何磨粉, 沒有寫清楚。**

A: 磨粉條件會在方法中補上。

**Q: Oryzanol 照光後性質就改變, 可再做一些實驗確認。**

A: 可補做用 oryzanol 標準品照光的實驗。

**Q: 考慮不用糙米, 使用麩皮為樣品?**

A: 米糠中脂氧合酶會迅速使內含物氧化, 在儲存上有困難, 精白糙米會有精白度的問題, 難以控制。

王惠珠老師

**Q: 層析方法處 25-35 mins 沒有波峰，從這裡就可以改梯度**

A: 確實可以從此處就增加甲醇比例以縮短分析時間。

**Q: 含量多少可用柱狀圖(%)顯示，比較好懂**

A: 已補上在論文中。

**Q: 豆類醣苷態比較多，文獻寫到醣苷態可能會使神經退化，是否需要擔心？**

A: 這可能關係到劑量問題 (依照文獻蘇鐵種子的醣苷態含量特別高: 至少含 140 mg/100 g 以上，遠超過一般食物的含量)，且目前這方面仍需要更多研究，還不需要過於擔心醣苷態毒性。

**Q: 文獻中稷米的 oryzanol 均較私米多，但你的結果並非如此。**

A: 張老師補充：台中私 10 號與其他私米相比直鏈澱粉含量較低，較接近稷米，屬於食用米而非加工用，這部分的不同可能為其 oryzanol 較高的原因 (和其他私米品種有較大差異)。





# 糙米及豆類中不同型態植物固醇同步分析方法之建立

蘇鼎元<sup>1</sup>、呂廷璋<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 國立臺灣大學食品科技研究所

摘要：植物固醇可分為自由態、steryl ferulate、酯化態、醣苷態及酯化醣苷態 5 種。傳統分析植物固醇的方法具有許多缺陷，如酸水解造成的固醇降解或異構化。本實驗目的即為建立以液相層析/大氣壓力化學游離法串聯質譜儀 (liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry, LC/APCI-MS) 及液相層析-蒸發光散射偵測器 (liquid chromatography- evaporative light scattering detector, LC-ELSD) 同步分析不同型態植物固醇的方法。以 NH<sub>2</sub> 固相萃取管淨化樣品可去除三酸甘油酯及酯化態固醇，並分離出植物固醇，以 LC/APCI-MS 分析自由態植物固醇的添加回收率，介於 83.69- 106.89 %；以固相萃取法取代傳統水解法可避免固醇分子產生異構化並保持完整的植物固醇型態。使用逆相液相層析串聯質譜可同步分析自由態、steryl ferulate、醣苷態及酯化醣苷態固醇的個別分子，植物固醇的最強特徵離子皆為其固醇基團脫去一分子水的訊號，自由態固醇偵測極限介於 5-50 ng/mL。另以正相液相層析-蒸發光散射偵測器分析，樣品可不經前處理直接分析，正相層析管柱可將植物固醇依結構上不同結合態分離，並定量該型態固醇的總量。但由於酯化態固醇與蠟酯無法分離，仍無法對其定量；不同植物固醇偵測極限介於 0.5-5 µg/mL。分析糙米及豆類樣品結果顯示 LC-MS 及 LC-ELSD 的結果具有差異，由於結合態固醇缺乏單一標準品而無法以 LC-MS 準確定量，而 ELSD 對於結構相似的固醇分子感應值較相同，因此定量的數值應較 MS 的結果準確。樣品中的固醇組成以 avenasterol、campesterol、stigmasterol 及 β-sitosterol 為主，糙米中主要含有自由態固醇及 steryl ferulate (γ-oryzanol)，醣苷態及酯化醣苷態的含量較低；豆類樣品中含有自由態固醇及高量的酯化醣苷態固醇，但皆不含有 steryl ferulate。樣品中黃豆及黑豆的醣苷態固醇含量較高。

關鍵字：結合態植物固醇、糙米、豆類、液相層析串聯質譜儀、大氣壓力化學游離法、蒸發光散射偵測器。

## 前 言

植物固醇具有降膽固醇、抗腫瘤及抗發炎等生理活性，其結構具有 5 種不同型態，傳統分析植物固醇使用的水解法多僅針對水解後產生的自由態固醇分析，步驟繁瑣具有許多缺點，如測得的固醇種類較少，醣苷態固醇被認為含量少而常被忽略，但實際上醣苷態固醇於植物中的含量並不低，且具特殊生理活性。鑒於現有植物固醇分析方法的諸多缺陷，本研究欲建

立同步分析不同種類植物固醇的方法，由於植物固醇大多無法以紫外光-可見光偵測器偵測，實驗以兩種系統來分析植物固醇：(1) 正相液相層析搭配蒸發光散射偵測器及 (2) 逆相液相層析串聯質譜儀，針對層析及質譜資訊作詳盡的討論。

## 材料與方法

### 一、材料

稻穀樣品如下：99 年期作：高雄 145 號、台南 11 號、台農 71 號、台中私 10 號、台稔 9 號、越光米。稻穀經去殼機脫殼後，糙米部分再以刀片式磨粉機 (固定 20000 rpm) 磨粉，磨粉條件參考儀器對稻穀類建議操作方式，秤取 50 g 糙米，磨粉 5 秒鐘 × 2 次。

豆類樣品種類及商品標示產地如下：

黃豆 (*Glycine max*, 產自加拿大)、黑豆 (*Glycine max* (L.) Merr., 產自中國)、紅豆 (*Vigna angularis*, 產自台灣)、綠豆 (*Vigna radiate*, 產自台灣)、花豆 (*Phaseolus coccineus* L. var. *albonanus* Bailey, 產自台灣)。以刀片式磨粉機 (固定 20000 rpm) 磨粉，磨粉條件參考儀器對豆類建議操作方式，秤取 50 g 豆類，磨粉 5 秒鐘 × 2 次。

### 二、樣品萃取

精秤 2 g 的樣品粉末後倒入 125 mL 磨砂口錐形瓶，加入 0.1 mL (10 mg/mL, 溶於甲醇) 的 BHT (butylated hydroxytoluene) 作為抗氧化劑，加入 10 mL 甲醇，使用超音波震盪 1 分鐘後再加入 20 mL 氯仿，置於 30°C 水浴槽中振盪萃取 20 分鐘。萃取液以 Whatman No. 1 濾紙 (直徑 9 cm) 及玻璃漏斗過濾至濃縮瓶，濾紙上的濾渣以甲醇沖入錐形瓶中，再進行上述萃取步驟二次。重複萃取三次的萃取液於 40°C 水浴鍋中減壓濃縮，再以 6 mL 氯仿回溶，即為樣品液 (最終 BHT 濃度約 0.05%)，所有樣品皆為三重複。

### 三、以逆相液相層析串聯質譜儀分析植物固醇

#### (一) 固相萃取

將 NH<sub>2</sub> 固相萃取管 (500 mg / 3 mL, Phenomenex, USA) 插入固相萃取真空抽氣裝置上，使用玻璃吸量管吸取有機溶劑。以 3 mL 的正己烷活化 NH<sub>2</sub> 固相萃取管，加入樣品液 200 μL，以正己烷/乙酸乙酯 (95:5, v:v) 6 mL 洗去三酸甘油酯及酯化態固醇，再依序加入各 5 mL 的氯仿、丙酮及甲醇，自由態固醇及 steryl ferulate 主要於氯仿層中，酯化醣苷態在丙酮層，醣苷態固醇於甲醇層。合併收集流洗下來的氯仿、丙酮及甲醇流洗液，收集液減壓濃縮至乾後以 2 mL 甲醇回溶，以玻璃針筒及 0.22 μm Nylon 針筒過濾器過濾置入 2 mL 褐色樣品瓶，保存於 -20°C 待 LC-MS 分析。

#### (二) 自由態固醇的添加回收率

將 cholesterol、campesterol、stigmasterol、β-sitosterol 及 sitostanol 添加到糙米樣品 (2 g) 中各 30、90 及 180 μg (相當於最後樣品液中濃度 0.5、1.5 及 3.0 μg/mL)，依前述樣品萃取方式萃取及以固相萃取淨化樣品，經 LC-MS 分析後計算結果，將添加自由態固醇後測定的固醇量扣除未添加的數值，計算各個自由態固醇的添加回收率百分比。

#### (三) 液相層析條件

經過固相萃取分離淨化後的樣品，以自動進樣器注入管柱，進樣體積為 25 μL。使用管柱為 Kinetex C18 (150 × 2.1 mm, 2.6 μm, Phenomenex, USA)，管柱溫度 30°C；移動相為 A：超純水、B：乙腈及 C：甲醇組成的三相系統，移動相皆含有 0.1% 甲酸，流速為 0.3 mL/min。層析梯度為線性，條件如下：

Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	15.0	42.5	42.5
10	0.0	50.0	50.0
30	0.0	50.0	50.0
32	0.0	20.0	80.0
80	0.0	20.0	80.0
82	15.0	42.5	42.5
100	15.0	42.5	42.5

#### (四) 質譜分析

使用質譜儀為 Finnigan LXQ MS (Thermo Scientific, USA) 於正電模式下以自動調機 (auto tune) 調整儀器參數，並以半自動模式調整 sheath gas、aux gas、電壓等參數， $\beta$ -sitosterol 的離子訊號 ( $m/z$  397) 強度最佳化，並以此 tune file 作為分析時所用的質譜條件：  
Capillary temperature: 150°C, APCI vaporizer temperature: 350°C, Sheath gas flow: 20 arb (arbitrary unit), Aux gas flow: 5 arb, Source voltage: 6 kV, Source current: 5  $\mu$ A, Capillary voltage: 5 V。

選定一次質譜所得植物固醇的離子訊號，額外施加能量撞擊此母離子使其解離 (collision induced dissociation, CID)，可得該離子的二次質譜，為該化合物特有的離子片段，可做為定性參考。實驗中皆設定 CID 能量值為 25%。

#### (五) 定量計算

以數據處理軟體 Xcalibur 選擇固醇基團脫去一分子水的最強特徵離子訊號，以 extracted ion chromatogram (EIC) 選擇該離子觀察，得出各波峰的面積。自由態固醇各以其標準品定量，無標準品的 avenasterol 則以 stigmasterol 定量，由於缺乏各類結合態固醇的單一物質標準品，仍以自由態固醇為定量基準，如結合態固醇其結構中固醇基團為  $\beta$ -sitosterol

者，皆以  $\beta$ -sitosterol 定量，以此類推，固醇基團為 avenasterol 者則以 stigmasterol 定量。

Steryl ferulate 中的 cycloartenyl ferulate, cycloartenyl ferulate 及 24-methylcycloartenyl ferulate，包含其 *cis*-ferulate 型皆以  $\beta$ -sitosterol 定量。

#### 四、以正相液相層析搭配蒸發光散射檢測器分析植物固醇

##### (一) 分析條件

將萃取後的樣品液以氯仿適當稀釋後以玻璃針筒及 0.22  $\mu$ m Nylon 過濾器過濾置入 2 mL 褐色樣品瓶，以自動進樣器注入分析，進樣體積為 20  $\mu$ L，使用管柱為 Diol (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)，管柱溫度 30°C；移動相為 A：正己烷 (含有 0.1% 甲酸) 及 B：異丙醇，流速為 1.0 mL/min。層析梯度為線性，條件如下：

Time (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
5	100	0
7	99	1
20	99	1
25	80	20
35	75	25
40	15	85
50	15	85
52	100	0
75	100	0

蒸發光散射檢測器 (Varex MKIII ELSD, Alltech, USA) 參數設定：漂移管溫度 (Drift tube temperature)：75°C，霧化器氣體流速 (Nebulizer gas flowrate)：2.2 SLPM (Standard Liters Per Minute)，氣體為空氣。

(二) 檢量線配製及蒸發光散射檢測器的偵測與  
定量極限

Cholesteryl palmitate、 $\beta$ -sitosterol 及  $\gamma$ -oryzanol 的配製濃度為：1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200  $\mu\text{g/mL}$ ；tristearin、esterified steryl glucoside 及 steryl glucoside 的配製濃度為：0.5, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/mL}$ 。以濃度及積分面積的關係製作檢量線並計算其 R square 值。另以該波峰的訊噪比 (Signal-to-noise ratio, S/N) = 3 時的濃度定為儀器偵測極限 (limit of detection, LOD)；波峰的訊噪比 (Signal-to-noise ratio, S/N) = 10 時的濃度定為儀器定量極限 (limit of quantitation, LOQ)。

結果與討論

一、以 LC/APCI-MS 分析植物固醇

將植物固醇標準品及樣品以 LC-MS 分析後發現，自由態、steryl ferulate、糖苷態及酯化糖苷態固醇於 APCI 正電模式下的特徵離子皆以其固醇基團 (不含取代基) 脫水後的離子  $[M+H-H_2O]^+$  最高，此結果與文獻的結果一致 (Yamauchi et al., 2001; Rozenberg et al., 2003; Stöggel et al., 2005; Rudell et al., 2011)。詳細質譜及滯留時間資訊見表 1。

結合態固醇中糖苷態固醇接有糖基極性最高故滯留時間最短，自由態固醇次之，而接有酚酸的 steryl ferulate ( $\gamma$ -oryzanol) 較大多數自由態固醇滯留 (除了 sitostanol)，最滯留為酯化糖苷態固醇 (圖 1)。

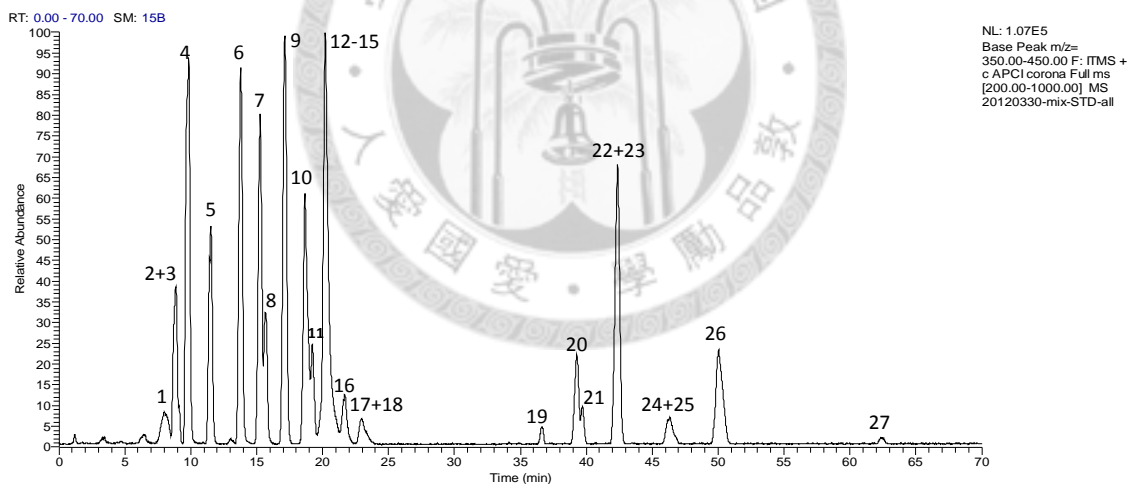


圖 1. 植物固醇混合標準品的層析質譜圖 1: avenasteryl glucoside, 2: campesteryl glucoside, 3: stigmasteryl glucoside, 4:  $\beta$ -sitosteryl glucoside, 5: ergosterol, 6: cholesterol, 7: campesterol, 8: stigmasterol, 9:  $\beta$ -sitosterol, 10: cycloartenyl ferulate, 11: sitostanol, 12: isomer-409, 13: 24-methylcycloartanyl ferulate, 14: campesteryl ferulate, 15: stigmasteryl ferulate, 16: isomer-423, 17:  $\beta$ -sitosterol ferulate, 18: cycloartanyl ferulate, 19:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-linolenyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 20: campesteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 21: stigmasteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 22:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-linoleoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 23: avenasteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 24: campesteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 25: stigmasteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 26:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-palmitoyl)-  $\beta$ -D-glucoside, 27:  $\beta$ -sitosteryl (6'-O-stearyl)-  $\beta$ -D-glucoside

表 1. 經 LC-APCI-MS 分析所得植物固醇的特徵離子及滯留時間

Table 1. Molecular mass, MS data and retention time (RT) for standard sterols and phytosterols found in samples, analysed by LC/APCI-MS

Compound	Molecular mass	Characteristic ions (intensity, %)				RT (min)
		[M+H] <sup>+</sup>	[Aglycone +H-2H] <sup>+</sup>	[Aglycone +H-4H] <sup>+</sup>	[Aglycone + H -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	
<i>Steryl glucoisdes</i>						
Avenasterol glucoside	574	575 (1.3)	411 (9.2)	409 (33.8)	395 (100)	8.05
Campesteryl glucoside	562	563 (0.2)	399 (4.6)	397 (7.1)	383 (100)	8.88
Stigmasteryl glucoside	574	575 (0.7)	411 (7.9)	409 (10.5)	395 (100)	9.11
β-Sitosterol glucoside	576	577 (0.4)	413 (4.0)	411 (5.9)	397 (100)	9.83
<i>Free sterols</i>						
Ergosterol	396	[M+H] <sup>+</sup> 397 (7.4)	[M +H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 379 (100)	[M +H-2H] <sup>+</sup> 395 (4.7)	[M +H-4H] <sup>+</sup> 393 (22.2)	11.52
Cholesterol	386		369 (100)	385 (23.0)	383 (23.0)	13.79
Avenasterol (Δ <sup>5</sup> +Δ <sup>7</sup> )	412		395 (100)	411 (15.0)	409 (16.5)	14.00
Campesterol	400		383 (100)	399 (22.0)	397 (22.2)	15.28
Stigmasterol	412		395 (100)	411 (22.0)	409 (21.5)	15.66
β-Sitosterol	414		397 (100)	413 (23.0)	411 (23.1)	17.15
Stigmastanol (sitostanol)	416		399 (100)	415 (0.8)	413 (9.1)	19.22
<i>Steryl ferulates</i>						
Cycloartenyl ferulate	602.9			[M] <sup>•+</sup> 603 (4.9)	[M-Ferulate+ H -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 409 (100)	18.67
Cycloartenyl <i>cis</i> -ferulate (Isomer-409)	602.9			603 (1.9)	409 (100)	19.87
24-methylcycloartanyl ferulate	616.9			616 (2.8)	423 (100)	20.20
Campesteryl ferulate	576.9			576 (4.0)	383 (100)	20.63

Stigmasteryl ferulate	588.9	588 (7.6)	395 (100)	21.01
24-methylencycloartanyl <i>cis</i> -ferulate (Isomer-423)	616.9	616 (0.5)	423 (100)	21.66
$\beta$ -Sitosteryl ferulate	590.9	590 (4.4)	397 (100)	22.94
Cycloartanyl ferulate	604.9	604 (3.3)	411 (100)	23.18

<i>Acylated steryl glucosides</i>		[M+H] <sup>+</sup>	[M +H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[M + H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[M-Fatty acid-Glc+H -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	
Campesteryl (6'-O-linolenyl)- $\beta$ -D-glucoside	834	835 (34.1)	817 (26.8)	852 (1.9)	395 (100)	34.18
Stigmasteryl (6'-O-linolenyl)- $\beta$ -D-glucoside	822	823 (11.6)	806 (21.3)	840 (8.9)	383 (100)	34.56
Avenasteryl (6'-O-linoleoyl)- $\beta$ -D-glucoside	836	837	819	854	395 (100)	36.51
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-linolenyl)- $\beta$ -D-glucoside	836	837 (20.2)	819 (11.9)	854 (19.6)	397 (100)	36.62
Campesteryl (6'-O-linoleoyl)- $\beta$ -D-glucoside	824	825 (15.6)	807 (16.1)	842 (10.3)	383 (100)	39.29
Stigmasteryl (6'-O-linoleoyl)- $\beta$ -D-glucoside	836	837 (31.7)	819 (22.2)	854 (23.0)	395 (100)	39.72
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-linoleoyl)- $\beta$ -D-glucoside	838	839 (16.3)	821 (12.0)	856 (13.0)	397 (100)	42.38
Avenasteryl (6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucoside	812	813 (5.4)	795 (8.1)	830 (6.2)	395 (100)	43.59
Avenasteryl (6'-O- oleyl)- $\beta$ -D-glucoside	838	839 (2.1)	821 (1.4)	856 (1.9)	395 (100)	43.62
Campesteryl (6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucoside	800	801 (1.5)	783 (5.8)	818 (4.5)	383 (100)	46.15
Campesteryl (6'-O-oleyl)- $\beta$ -D-glucoside	826	827 (6.7)	809 (8.7)	844 (4.8)	383 (100)	46.50
Stigmasteryl (6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucoside	812	813 (0.2)	795 (7.6)	830 (7.4)	395 (100)	46.53
Stigmasteryl (6'-O-oleyl)- $\beta$ -D-glucoside	838	839 (8.4)	821 (10.9)	856 (10.8)	395 (100)	46.60
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucoside	814	815 (1.3)	797 (4.1)	832 (5.0)	397 (100)	50.12
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-oleyl)- $\beta$ -D-glucoside	840	841 (5.6)	823 (6.6)	858 (4.3)	397 (100)	50.39
$\beta$ -Sitosteryl (6'-O-stearyl)- $\beta$ -D-glucoside	842	843 (1.3)	825 (10.7)	860 (3.8)	397 (100)	62.40

### (一) 固相萃取

由於三酸甘油酯及酯化態固醇會滯留於 C18 管柱中，於本實驗的層析系統下需要長時間方能流洗出來。因此尋找將其二者去除並可同時分離出其他型態植物固醇的固相萃取法極為重要。參考 Pinkart 等人分離微生物脂質的方式 (Pinkart et al., 1998) 及 Russo 等人分離動物油中膽固醇的方法 (Russo et al., 2005) 加以修改，以正己烷活化 NH2 管柱，加入溶於氯仿的糙米樣品液，以正己烷:乙酸乙酯 (95:5, v:v) 流洗洗去三酸甘油酯及酯化態固醇，再以氯仿流洗出自由態固醇及  $\gamma$ -oryzanol，丙酮流洗出酯化糖苷態固醇，甲醇流洗出糖苷態固醇。雖然氯仿層仍有少量三酸甘油酯的存在，但在分析時間內仍可流洗出管柱，故不對分析造成干擾。

### (二) 方法確校

本分析方法自由態固醇的檢量線具有良好線性，其  $r^2$  值均大於 0.999。不飽和的自由態固醇的儀器偵測極限為 5-20 ng/mL 之間，儀器定量極限為 50 ng/mL；但飽和態的 sitostanol 儀器偵測極限為 50 ng/mL，儀器定量極限為 200 ng/mL (表 2)。

回收率實驗添加不同自由態固醇各 30、90 及 180  $\mu\text{g}$  至樣品粉末中，即低中高三個濃度，依實驗流程進行後以 LC-MS 分析。其結果如表 3 所示，各個自由態固醇於不同濃度的回收率介於 83.69-106.89% 之間，均高於 80%。

表 2. 自由態固醇的檢量線

Sterol	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Calibration range (ng/mL)	Calibration equations <sup>a</sup>	$r^2$
Cholesterol	5	50	50-1000	$Y = 553.53X + 8254$	0.9998
Campesterol	20	50	500-10000	$Y = 422.09X + 86713$	0.9997
Stigmasterol	20	50	500-10000	$Y = 169.41X + 27649$	0.9997
$\beta$ -Sitosterol	10	50	500-10000	$Y = 427.99X + 70538$	0.9999
Sitostanol	50	200	200-5000	$Y = 128.08X + 12404$	0.9991

a: X represented concentration of sterol. Y represented peak area of sterol. LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantitation.

表 3. 自由態固醇的添加回收率

Compound	Recovery (%)					
	Amount of sterol added ( $\mu\text{g}$ )					
	30		90		180	
Cholesterol	84.76	$\pm 1.25$	92.59	$\pm 3.90$	89.81	$\pm 1.16$
Campesterol	88.85	$\pm 2.78$	87.04	$\pm 2.57$	91.30	$\pm 3.39$
Stigmasterol	89.98	$\pm 7.72$	88.89	$\pm 6.19$	91.11	$\pm 4.75$
$\beta$ -Sitosterol	106.89	$\pm 9.87$	95.56	$\pm 7.70$	86.48	$\pm 5.77$
Sitostanol	83.69	$\pm 1.58$	84.81	$\pm 4.49$	88.52	$\pm 2.10$

Data were shown as mean  $\pm$  SD (n=3).

### 二、以 LC-ELSD 分析植物固醇

參考 Moreau 等人 (Moreau et al., 1996; Moreau et al., 2008) 分析樣品中植物固醇的層析條件，選擇 Diol 管柱分析，移動相使用正己烷 (含 0.1% 甲酸) 及異丙醇。使用標準品進行實驗，初始 5 分鐘維持正己烷流洗，可流洗出酯化態固醇；如在之後將異丙醇比例提高梯度層析，三酸甘油酯及自由態固醇波峰無法分離，因此最後選擇僅將異丙醇提升至 1% 維持至 20 分鐘，2 根波峰能達到基線分離，之後逐步提升異丙醇比例以流洗出 steryl ferulate、酯化糖苷態固醇及糖苷態固醇 (圖 2)。

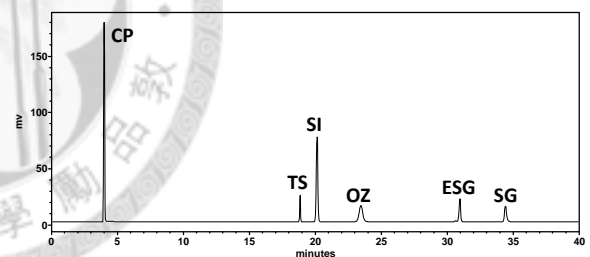


圖 3. 植物固醇及三酸甘油酯標準品的層析圖。CP: cholesteryl palmitate, TS: tristearin, SI:  $\beta$ -Sitosterol, OZ:  $\gamma$ -Oryzanol, ESG: esterified steryl glucosides, SG: steryl glucosides

將固醇及三酸甘油酯標準品序列稀釋後分析，計算其檢量線線性及偵測、定量極限，結果如表 4，固醇化合物儀器偵測極限介於 0.5-5  $\mu\text{g/mL}$ ，儀器定量極限為 2.5-10  $\mu\text{g/mL}$ 。檢量線皆呈現為多項式而非線性 (圖 4)

表 4. 固醇及三酸甘油酯標準品的標準曲線

Compound	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Calibration range (µg/mL)	Calibration equations <sup>a</sup>	r <sup>2</sup>
Cholesteryl palmitate	0.5	2.5	20-160	Y = 13.696X <sup>2</sup> + 1713.7X - 16006	0.9996
β-Sitosterol	2.5	5	20-160	Y = 11.998X <sup>2</sup> + 705X - 8246.7	0.9999
γ-Oryzanol	5	10	20-160	Y = 6.5143X <sup>2</sup> + 130.58X + 1074.5	0.9995
Esterified steryl glucosides	0.5	5	20-100	Y = 9.4011X <sup>2</sup> + 753.99X - 8197.6	0.9990
Steryl glucosides	2.5	5	20-100	Y = 10.926X <sup>2</sup> + 426.8X - 4845	0.9997

a: X represented concentration of sterol. Y represented peak area of sterol. LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantitation.

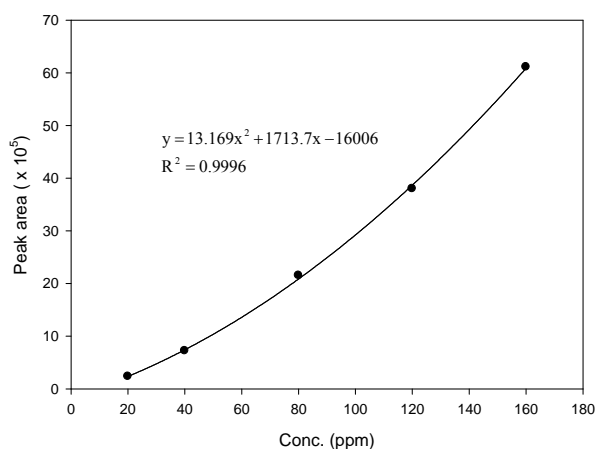


圖 4. Cholesteryl palmitate 標準品的檢量線

分析樣品時發現米類及豆類樣品於酯化態固醇波峰處的波峰其訊號大多超過儀器訊號值上限(圖 5)，顯示該處流洗出物質含量極高，但酯化態固醇在植物中較不可能有這麼高的含量，推測該處有其他含量較高的低極性物質與酯化態固醇一同流洗出來。查詢文獻後顯示該物質可能為蠟酯 (wax ester) 及類胡蘿蔔素 (carotenoid) (Gonzalez-Castro et al., 1996; Hwang et al., 2002)，而由於以 silica 為基質的管柱無法分離皆為非極性的蠟酯及酯化態固醇 (Nordbäck and Lundberg, 1999)，推測實驗樣品中同樣也面臨到此問題，由於 Diol 管柱並無法將蠟酯及酯化態固醇分離，故無法對酯化態固醇定量。

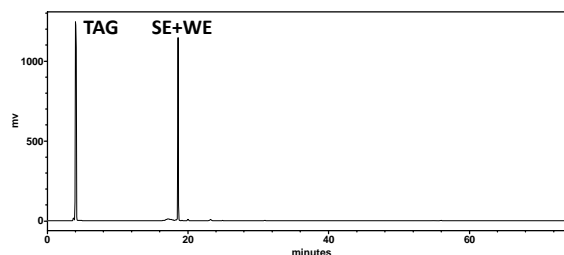


圖 5. 台南 11 號糙米萃取液層析圖。SE: steryl esters, WE: wax esters, TAG: triglycerides

### 三、以 LC-MS 分析糙米樣品

以 LC-MS 分析糙米樣品的不同型態固醇組成詳見表 5-表 8，糙米樣品中的自由態固醇種類主要有 4 種，β-sitosterol 的含量最高，campesterol 及 stigmasterol 次之，avenasterol 大多為含量最低。

另樣品中皆以質譜偵測到含有 cholesterol 及 sitostanol，但這二種含量皆低於定量極限。糖苷態固主要含 β-sitosteryl glucoside、campesteryl glucoside、stigmasteryl glucoside 及 avenasteryl glucoside。

糙米中的酯化糖苷態固醇組成成為 β-sitosterol 為主，campesterol 和 stigmasterol 較低或是微量，以接上棕櫚酸 (palmitic acid, C<sub>16:0</sub>) 及油酸 (oleic acid, C<sub>18:1</sub>) 的含量較高 (二者無法由層析分離故合併定量)，與亞麻油酸 (linoleic acid, C<sub>18:2</sub>) 鍵結的固醇僅測得 β-sitosterol。

本實驗測得糙米中的 steryl ferulate 主要含 24-methylcycloartanyl ferulate、cycloartenyl ferulate、campesteryl ferulate 及 β-sitosterol ferulate，另有含量較少的 stigmasteryl ferulate 及 cycloartenyl ferulate；本實驗中測得的 isomer-423 及 isomer-409，推論二者分別為 24-methylcycloartanyl cis-ferulate 及 cycloartenyl cis-ferulate，其餘 steryl ferulate 接上 cis-ferulate 的化合物在本實驗層析條件下與 trans-ferulate 型式無法以分離良好，而亦無法以質譜訊號分辨差異 (Fang et al., 2003)，故將二者合併定量。



表 5. 99 年期作糙米樣品自由態固醇的含量 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稈 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	越光米	台中私 10 號
Avenasterol	3.46 ± 0.20	3.14 ± 0.14	2.60 ± 0.10	3.80 ± 0.13	3.28 ± 0.20	6.46 ± 0.39
Campesterol	5.52 ± 0.09	6.39 ± 0.18	4.98 ± 0.08	5.78 ± 0.26	5.71 ± 0.35	6.14 ± 0.33
Stigmasterol	7.17 ± 0.39	7.87 ± 0.07	6.47 ± 0.34	6.77 ± 0.41	6.98 ± 0.47	6.65 ± 0.29
β-Sitosterol	18.65 ± 0.44	17.70 ± 0.28	14.36 ± 0.15	17.38 ± 0.70	15.92 ± 0.95	18.57 ± 0.29
Total	34.80 ± 1.12 <sup>b</sup>	35.10 ± 0.66 <sup>b</sup>	28.40 ± 0.67 <sup>d</sup>	33.73 ± 1.50 <sup>bc</sup>	31.89 ± 1.97 <sup>c</sup>	37.82 ± 1.31 <sup>a</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different (p<0.05).

表 6. 99 年期作糙米樣品醣苷態固醇的含量(mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稈 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	越光米	台中私 10 號
Avenasteryl glucoside	0.61 ± 0.08	0.40 ± 0.04	0.52 ± 0.07	0.53 ± 0.11	0.78 ± 0.05	0.46 ± 0.06
Campesteryl glucoside	1.03 ± 0.02	0.82 ± 0.03	0.86 ± 0.01	1.08 ± 0.04	1.21 ± 0.08	0.64 ± 0.01
Stigmasteryl glucoside	0.96 ± 0.02	0.88 ± 0.10	0.79 ± 0.03	1.01 ± 0.06	1.08 ± 0.05	0.61 ± 0.06
β-Sitosteryl glucoside	6.13 ± 0.33	5.41 ± 0.13	5.27 ± 0.11	6.82 ± 0.35	7.37 ± 0.32	4.64 ± 0.37
Total	8.73 ± 0.45 <sup>c</sup>	7.50 ± 0.30 <sup>d</sup>	7.44 ± 0.22 <sup>d</sup>	9.43 ± 0.56 <sup>b</sup>	10.44 ± 0.50 <sup>a</sup>	6.37 ± 0.49 <sup>c</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different (p<0.05).

表 7. 99 年期作糙米樣品 steryl ferulates 的含量(mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稈 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	越光米	台中私 10 號
Cycloartenyl ferulate	19.39 ± 2.18	31.42 ± 0.92	7.02 ± 0.67	11.86 ± 0.76	13.50 ± 1.40	8.01 ± 0.17
Isomer-409	6.25 ± 1.13	2.91 ± 0.34	3.30 ± 0.28	1.69 ± 0.10	4.49 ± 0.52	2.46 ± 0.21
24-methylencycloartanyl ferulate	24.61 ± 2.25	31.67 ± 0.67	10.03 ± 0.85	17.25 ± 1.40	17.27 ± 1.37	19.16 ± 0.41
Isomer-423	7.42 ± 1.25	2.40 ± 0.16	4.12 ± 0.34	2.09 ± 0.11	5.30 ± 0.61	5.33 ± 0.49
Campesteryl ferulate	8.53 ± 0.51	11.23 ± 0.07	6.52 ± 0.11	8.11 ± 0.82	9.08 ± 0.62	6.87 ± 0.10
Stigmasteryl ferulate	1.03 ± 0.02	1.12 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.71 ± 0.02	0.70 ± 0.03	0.63 ± 0.05
β-sitosterol ferulate	5.53 ± 0.26	6.01 ± 0.09	2.65 ± 0.14	3.30 ± 0.33	4.02 ± 0.38	3.18 ± 0.08
Cycloartanyl ferulate	0.65 ± 0.03	1.17 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.21 ± 0.03
Total	73.42 ± 7.63 <sup>b</sup>	87.93 ± 2.30 <sup>a</sup>	34.38 ± 2.47 <sup>c</sup>	45.42 ± 3.59 <sup>d</sup>	54.73 ± 4.98 <sup>c</sup>	45.86 ± 1.54 <sup>d</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different (p<0.05).

表 8. 99 年期作糙米樣品酯化醣苷態固醇的含量 (mg/100 g)

Analytes	Rice cultivars					
	台稈 9 號	台南 11 號	台農 71 號	高雄 145 號	越光米	台中私 10 號
β-Sitosteryl-18:2-Glc	0.14 ± 0.02	0.10 ± 0.01	trace	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.02	trace
Campesteryl-16:0-Glc	trace	trace	0.14 ± 0.02	trace	trace	0.14 ± 0.01
Stigmasteryl-16:0-Glc	trace	trace	trace	trace	trace	trace
β-Sitosteryl-16:0-Glc	1.93 ± 0.10	1.79 ± 0.07	1.15 ± 0.02	1.44 ± 0.04	1.37 ± 0.07	1.37 ± 0.07
Total	2.08 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.04 <sup>d</sup>	1.47 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.50 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.58 ± 0.08 <sup>c</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different (p<0.05). Steryl-18:1-Glc were quantified with steryl-16:0-Glc. trace: less than LOQ

表 9. 豆類自由態固醇的含量 (mg/100 g)

Legumes	Sample				
	黃豆	黑豆	紅豆	綠豆	花豆
Cholesterol	trace	trace	trace	0.95 ± 0.01	trace
Avenasterol	2.83 ± 0.07	7.06 ± 0.42	29.74 ± 0.92	13.91 ± 0.28	15.09 ± 0.10
Campesterol	11.32 ± 0.52	12.06 ± 0.36	0.62 ± 0.02	2.49 ± 0.04	2.87 ± 0.05
Stigmasterol	11.93 ± 0.11	13.37 ± 0.65	17.49 ± 0.33	13.03 ± 0.80	21.62 ± 0.73
β-Sitosterol	20.38 ± 0.92	24.02 ± 1.10	6.52 ± 0.22	30.06 ± 0.99	39.66 ± 1.10
Total	46.45 ± 1.62 <sup>d</sup>	56.51 ± 2.53 <sup>c</sup>	54.37 ± 1.50 <sup>c</sup>	60.45 ± 2.12 <sup>b</sup>	79.24 ± 1.98 <sup>a</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different (p<0.05). trace: less than LOQ

表 10. 豆類糖苷態固醇的含量 (mg/100 g)

Legumes	Sample									
	黃豆		黑豆		紅豆		綠豆		花豆	
Avenasteryl glucoside	1.42	± 0.01	2.99	± 0.12	2.76	± 0.09	2.04	± 0.10	1.01	± 0.06
Campesteryl glucoside	7.55	± 0.40	6.24	± 0.25	trace		0.37	± 0.03	0.18	± 0.03
Stigmasteryl glucoside	4.96	± 0.31	4.72	± 0.28	2.33	± 0.04	2.94	± 0.28	4.42	± 0.47
β-Sitosteryl glucoside	17.26	± 0.89	15.91	± 0.89	2.01	± 0.06	7.63	± 0.30	5.75	± 0.13
Total	31.18	± 1.61 <sup>a</sup>	29.87	± 1.54 <sup>a</sup>	7.10	± 0.18 <sup>c</sup>	12.98	± 0.71 <sup>b</sup>	11.36	± 0.71 <sup>b</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ). trace: less than LOQ

表 11. 豆類酯化糖苷態固醇的含量 (mg/100 g)

Legumes	Sample									
	黃豆		黑豆		紅豆		綠豆		花豆	
Avenasteryl-18:3-Glc	nd		nd		1.88	± 0.05	trace		trace	
Campesteryl-18:3-Glc	0.41	± 0.04	trace		nd		trace		trace	
Stigmasteryl-18:3-Glc	0.35	± 0.05	trace		2.15	± 0.10	0.45	± 0.03	3.00	± 0.06
β-Sitosteryl-18:3-Glc	1.72	± 0.02	0.81	± 0.09	1.14	± 0.04	0.65	± 0.02	2.73	± 0.03
Avenasteryl-18:2-Glc	0.51	± 0.05	0.91	± 0.08	8.83	± 0.25	0.50	± 0.01	0.66	± 0.04
Campesteryl-18:2-Glc	4.82	± 0.17	2.91	± 0.16	trace		trace		trace	
Stigmasteryl-18:2-Glc	4.15	± 0.09	2.61	± 0.15	5.94	± 0.20	1.39	± 0.11	2.38	± 0.15
β-Sitosteryl-18:2-Glc	13.61	± 0.29	9.34	± 0.38	2.68	± 0.16	2.75	± 0.08	2.09	± 0.12
Avenasteryl-16:0-Glc	0.48	± 0.05	0.89	± 0.08	14.00	± 0.09	0.71	± 0.06	0.91	± 0.08
Campesteryl-16:0-Glc	2.40	± 0.16	2.23	± 0.04	0.22	± 0.02	0.18	± 0.00	0.22	± 0.00
Stigmasteryl-16:0-Glc	2.03	± 0.13	1.86	± 0.03	11.04	± 0.09	3.43	± 0.10	6.56	± 0.22
β-Sitosteryl-16:0-Glc	6.68	± 0.20	6.17	± 0.39	3.57	± 0.43	5.85	± 0.11	5.97	± 0.03
β-Sitosteryl-18:0-Glc	0.28	± 0.01	trace		trace		0.19	± 0.03	trace	
Total	37.45	± 1.26 <sup>b</sup>	27.72	± 1.36 <sup>c</sup>	51.44	± 1.44 <sup>a</sup>	16.12	± 0.55 <sup>c</sup>	24.52	± 0.72 <sup>d</sup>

Data were shown as mean ± SD (n=3) and were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Different alphabet means significantly different ( $p < 0.05$ ). nd: not detected. trace: less than LOQ.

表 12. 不同偵測方法分析糙米植物固醇含量的比較

Rice Variety	Free sterol		Steryl ferulate		Acylated steryl glucoside		Steryl glucoside	
	MS	ELSD	MS	ELSD	MS	ELSD	MS	ELSD
台稉 9 號	35.84 ± 0.92	33.16 ± 4.35	73.42 ± 2.83	47.76 ± 6.00*	2.08 ± 0.11	12.52 ± 0.70*	8.73 ± 0.40	9.94 ± 0.75
台南 11 號	35.10 ± 0.57	35.24 ± 1.48	87.93 ± 1.38	69.45 ± 3.00*	1.89 ± 0.07	12.61 ± 1.32*	7.50 ± 0.22	9.10 ± 0.26*
台農 71 號	28.40 ± 0.52	27.34 ± 0.52	34.38 ± 1.27	24.83 ± 0.20*	1.29 ± 0.02	9.72 ± 0.34*	7.44 ± 0.14	8.52 ± 0.16*
高雄 145 號	33.73 ± 1.14	30.31 ± 0.97*	45.42 ± 3.56	28.05 ± 1.48*	1.47 ± 0.07	5.69 ± 0.79*	9.43 ± 0.55	6.99 ± 0.36*
越光	31.89 ± 1.88	28.03 ± 2.57	54.73 ± 3.30	33.28 ± 1.97*	1.50 ± 0.09	5.72 ± 0.48*	10.44 ± 0.40	7.40 ± 1.07*
台中秈 10 號	37.82 ± 1.24	29.64 ± 1.77*	45.86 ± 0.94	30.56 ± 0.27*	1.58 ± 0.05	10.85 ± 0.42*	6.37 ± 0.49	8.00 ± 0.32*

Data were shown as mean ± SD (n=3).

\* indicates significant differences between different detection methods ( $p < 0.05$ ).

表 13. 不同偵測方法分析豆類植物固醇含量的比較

Legumes	Free sterol		Acylated steryl glucoside		Steryl glucoside	
	MS	ELSD	MS	ELSD	MS	ELSD
黃豆	46.45 ± 1.50	38.21 ± 0.87*	37.45 ± 1.18	36.13 ± 0.51	31.18 ± 1.58	17.77 ± 1.46*
黑豆	56.51 ± 0.49	56.16 ± 0.49	27.72 ± 1.17	52.08 ± 0.63 *	29.87 ± 1.45	19.09 ± 1.46*
紅豆	54.37 ± 0.61	32.80 ± 1.43*	51.44 ± 0.43	50.57 ± 2.23	7.10 ± 0.11	4.86 ± 0.34*
綠豆	60.45 ± 1.87	47.98 ± 1.26*	16.12 ± 0.39	30.32 ± 1.11 *	12.98 ± 0.63	9.19 ± 0.30*
花豆	79.24 ± 0.82	61.80 ± 3.64*	24.52 ± 0.58	39.75 ± 4.03 *	11.36 ± 0.71	8.18 ± 1.06*

Data were shown as mean ± SD (n=3)

\* indicates significant differences between different detection methods ( $p < 0.05$ )

#### 四、以 LC-MS 分析豆類樣品

以 LC-MS 分析糙米樣品的不同型態固醇組成詳見表 9-表 11，豆類的自由態及結合態固醇的固醇組成主要為  $\beta$ -sitosterol、campesterol、stigmasterol 及 avenasterol。紅豆、綠豆及花豆中 stigmasterol 及 avenasterol 的含量較 campesterol 高，在紅豆中甚至較  $\beta$ -sitosterol 高，另外綠豆含有較高量的膽固醇。5 種豆類樣品自由態固醇含量為 46.45-79.24 mg/100 g，花豆的含量最高，黃豆最低。本實驗結果黃豆及黑豆中醣苷態固醇的含量分別為 31.18 及 29.87 mg/100 g，紅豆含量最低為 7.10 mg/100 g。5 種豆類與糙米相比皆含有高量的酯化醣苷態固醇，可偵測到的脂肪酸為  $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$  及  $C_{18:3}$ ，但  $C_{18:0}$  及  $C_{18:3}$  的含量較低，部分豆類僅含有微量。酯化醣苷態固醇含量最高為紅豆，另外豆類樣品中並無偵測到有 steryl ferulate 的存在。

#### 五、以 LC-ELSD 分析糙米樣品

MS 與 ELSD 植物固醇定量結果的比較見表 12，由於 ELSD 理論上對於相同類物質所產生的感應值較接近，且皆有固醇標準品製作檢量線定量，所得結果應較符合實際含量。

ELSD 測量糙米自由態固醇含量為 27.34-35.24 mg/100 g，自由態固醇由於主要組成固醇皆有標準品可供 LC-MS 製作檢量線定量，大部分米種差異不大，且數值的高低 2 種偵測器結果皆符合。僅高雄 145 號及台中私 10 號的 ELSD 值較低並有顯著差異，比較米種間固醇組成差異，這 2 種米種皆含有較高量的 avenasterol，由於 avenasterol 是以 stigmasterol 為定量基準，推測 avenasterol 的游離化效果較 stigmasterol 佳，同樣濃度的波峰面積較高，因

此 MS 測量的數值應較實際高。

所有米種 MS 及 ELSD 所測的 steryl ferulate 量皆有顯著差異，ELSD 的測量值 (24.83-69.45 mg/100 g) 較低且差異甚大，由於缺乏單一成分標準品，以結構不同的自由態固醇來定量 steryl ferulate 較實際值差異較大並不意外，但 ELSD 測定含量的高低仍與 MS 結果相符。

酯化醣苷態固醇 ELSD 的測量值 (5.69-12.52 mg/100 g) 皆遠高於 MS，此結果顯示酯化醣苷態於本實驗的質譜游離化條件不佳，感應值較自由態固醇低，而有些化合物也因訊號低於定量極限而未能計算，因此所測結果較低。而醣苷態固醇 MS 及 ELSD (6.99-9.94 mg/100 g) 的結果較相近。

#### 六、以 LC-ELSD 分析豆類樣品

表 13 為 MS 及 ELSD 的結果比較。由於豆類含有較高量的 avenasterol，與上述推論相符，大部分豆類 ELSD 的自由態固醇測量值 (32.80-61.80 mg/100 g) 較 MS 低，但黑豆則無差異。黑豆亦含有 avenasterol，如以上推論其 ELSD 值應較低，由於僅有黑豆不符推論，有可能為黑豆含有未被質譜分析到的其他種固醇，這部分需再觀察黑豆自由態固醇區段質譜訊號是否有其他訊號加以確認。

豆類樣品並未偵測到含有 steryl ferulate，酯化醣苷態固醇 MS 及 ELSD 的結果有較大不同，其中黃豆及紅豆的結果無差異，黑豆、綠豆及花豆則為 ELSD 的測量值較高。推測酯化醣苷態也與自由態相同，游離化程度依不同的固醇基團而有差異，故雖然依米類結果的討論豆類的酯化醣苷態 ELSD 測量值應較高，但紅豆 MS 結果顯示紅豆的酯化醣苷態固醇其

固醇基團為 avenasterol 者約佔一半，avenasterol 的游離化較佳，故這部分的含量亦被高估，可能為紅豆含量仍不變的原因。黃豆其固醇組成較不同處為其接上亞麻油酸 (C18:2) 的酯化糖苷態固醇含量較高，但組成同樣有較高亞麻油酸的黑豆其 ELSD 結果較 MS 高，酯化糖苷態固醇上的脂肪酸不同影響分子游離化的程度在本實驗中難以評估，黃豆 2 種偵測器測量值結果相同原因較難解釋。

糖苷態固醇的結果顯示 ELSD 測量值 (8.18-19.09 mg/100 g) 均較 MS 低，由於 LC-MS 分析糖苷態時也以自由態固醇定量，米類數據單以數值比較雖然與 ELSD 結果接近，但含量高的米種二者的差異變大，豆類糖苷態固醇的含量較多，推測以自由態固醇定量時已與實際值大幅偏差；而紅豆糖苷態固醇量雖與米類接近，但 ELSD 數值仍較低，顯示仍需考量 avenasterol (avenasteryl glucoside) 游離化的問題。本實驗中豆類酯化糖苷態及糖苷態固醇以 MS 及 ELSD 定量結果差異較大。

## 結 論

本實驗建立了以逆相液相層析串聯質譜儀同步分析自由態、steryl ferulate、糖苷態及酯化糖苷態 4 種植物固醇的方法。淨化樣品使用  $\text{NH}_2$  固相萃取管取代傳統化學水解法，較為快速且便利。固相萃取可將三酸甘油酯及酯化態固醇去除並分離植物固醇成分，保持固醇分子完整型態，避免水解法產生的問題。以大氣壓力化學游離法可順利將低極性的植物固醇分子游離，植物固醇於逆相液相層析分離後利用串聯質譜儀可推測分子的結構資訊，了解樣品中的固醇組成。

另以建立以正相液相層析搭配蒸發光散射偵測器分析植物固醇的方法，樣品可不經其他前處理直接分析，結果顯示以正相層析管柱可將不同種類植物固醇分離成單一波峰，由於蒸發光散射偵測器對於結構相似的固醇分子有接近的感應值，對於植物固醇的定量較為精確。相較於質譜儀分析，不同植物固醇分子的游離化程度差異較大，亦缺乏標準品進行定量分析，故僅以自由態固醇作為定量基準會產生極大偏差。

但是以正相或逆相液相層析皆無法達成同步分析脂肪酸酯化態固醇的目的，為本分析方法的缺點。由於酯化態固醇會於 C18 管柱中嚴重滯留，已使用固相萃取方式去除；而酯化態固醇於 Diol 管柱中無法和蠟酯類化合物分離開，亦無法定量。此結果顯示以常使用的正相及逆相層析管柱並無法同步分離植物固醇，後續研究可能需使用較少使用的材質（如 alumina 正相管柱）或是不同裝填顆粒（如 monolithic）的管柱進行分析，才能克服現有管柱的限制，達成同步分析植物固醇的需求。

近年來發現糖苷態固醇與自由態及酯化態固醇不同，具有特殊的生理活性，但傳統分析方法常忽略糖苷態固醇而未分析，現有文獻亦缺乏對其分析的內容。本實驗建立的方法可對 4 種植物固醇同步分析，並得到較完整的層析及質譜資訊，可供後續研究參考。

## 參考文獻

- Fang, N.; Yu, S.; Badger, T. M., Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3260-3267.
- Gonzalez-Castro, M. J.; Lopez-Hernandez, J.; Simal-Lozano, J.; Oruña-Concha, M. J.;

- Vazquez-Blanco, M. E., Separation of neutral lipid classes in green beans by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **1996**, *34*, 199-201.
- Hwang, K. T.; Cuppett, S. L.; Weller, C. L.; Hanna, M. A., HPLC of grain sorghum wax classes highlighting separation of aldehydes from wax esters and steryl esters. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 619-623.
- Moreau, R. A.; Powell, M. J.; Hicks, K. B., Extraction and quantitative analysis of oil from commercial corn fiber. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2149-2154.
- Moreau, R. A.; Scott, K. M.; Haas, M. J., The identification and quantification of steryl glucosides in precipitates from commercial biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 761-770.
- Nordbäck, J.; Lundberg, E., High resolution separation of non-polar lipid classes by HPLC-ELSD using alumina as stationary phase. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1999**, *22*, 483-486.
- Pinkart, H. C.; Devereux, R.; Chapman, P. J., Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns. *J. Microbiol. Methods* **1998**, *34*, 9-15.
- Rozenberg, R.; Ruibal-Mendieta, N. L.; Petitjean, G.; Cani, P.; Delacroix, D. L.; Delzenne, N. M.; Meurens, M.; Quetin-Leclercq, J.; Habib-Jiwan, J.-L., Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS. *J. Cereal Sci.* **2003**, *38*, 189-197.
- Russo, M. V.; De Leonadis, A.; Macciola, V., Solid phase extraction-gas-chromatographic method to determine free cholesterol in animal fats. *J. Food Compos. Anal.* **2005**, *18*, 617-624.
- Rudell, D. R.; Buchanan, D. A.; Leisso, R. S.; Whitaker, B. D.; Mattheis, J. P.; Zhu, Y.; Varanasi, V., Ripening, storage temperature, ethylene action, and oxidative stress alter apple peel phytosterol metabolism. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1328-1340.
- Stöggel, W.; Huck, C.; Wongyai, S.; Scherz, H.; Bonn, G., Simultaneous determination of carotenoids, tocopherols, and  $\gamma$ -oryzanol in crude rice bran oil by liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detection employing silica C30 stationary phases. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1712-1718.
- Yamauchi, R.; Aizawa, K.; Inakuma, T.; Kato, K., Analysis of molecular species of glycolipids in fruit pastes of red bell pepper (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography– mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 622-627.