

國立臺灣海洋大學食品科學系碩士班  
專題討論書面報告

12種十字花科蔬菜中類胡蘿蔔素、生育酚  
和葉綠醜的測定

授課老師：黃崇雄 老師  
                  方銘志 老師  
指導老師：張祐維 老師  
學    號：41042006  
學    生：梁立宸  
報告日期：2021/03/26

內容 40%	時間掌控 10%	表達能力 30%	投影片 10%	書面資料 10%

指導教授：

# 大綱

## 一、前言

## 二、材料與方法

## 三、結果與討論

## 四、總結

## 五、參考文獻

### 摘要

許多研究已經觀察到十字花科蔬菜攝入量與心血管疾病和癌症風險降低之間呈負相關，這可能是由於十字花科蔬菜富含類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌等親脂性植物化學物質。目前，蔬菜中類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌的分析是獨立進行的，這表明需要一種有效的分析方法來同時準確地測定這些親脂性微量營養素。開發並驗證了一種 LC-APCI-MS/MS 分析方法，可同時測定 12 種十字花科蔬菜中的 7 種類胡蘿蔔素、2 種生育酚和葉綠醌。分析運行時間為 35 分鐘，使用包含甲醇和異丙醇混合物的 LCMS 友好型流動相完全分離葉黃素和玉米黃質。檢測限和定量限分別為 0.10-21.5  $\mu\text{g/g}$  乾重 (DW) 和 1.10-47.6  $\mu\text{g/g}$  DW。日內和日間重複性小於 20% 的相對標準偏差 (RSD)，回收率為 89-128%。數據表明，葉黃素和  $\alpha$ -生育酚是綠葉蔬菜中主要的類胡蘿蔔素和生育酚。分別在芝麻葉 ( $1061 \pm 11$   $\mu\text{g/g}$  DW)、青花菜 ( $286 \pm 85$   $\mu\text{g/g}$  DW) 和豆瓣菜 ( $55 \pm 4$   $\mu\text{g/g}$  DW) 中發現最高含量的類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌。我們的研究結果表明，這些蔬菜是親脂性微量營養素的極好來源。總體而言，該分析方法非常適合準確快速地測定蔬菜中的類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌。

### 一、前言

增加蔬菜的食用已被廣泛認知為健康飲食的重要一環，並且可以降低重大慢性病的風險。許多研究已經觀察到十字花科蔬菜攝入量與心血管疾病和癌症風險降低之間呈負相關，這可能是由於十字花科蔬菜富含類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌等親脂性植物化學物質。十字花科的蔬菜，是獲取胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌的主要膳食來源。類胡蘿蔔素是 C40 類萜烯化合物，是重要的生物抗氧化劑和維生素 A 來源，可預防癌症、心血管疾病和黃斑變性。生育酚是維生素 E 家族的一部分，具有與色原醇環相連的飽和 C16 基側鏈。由於其抗高血壓、神經保護和抗動脈粥樣硬化作用，生育酚已顯示出對炎症性疾病和癌症的保護作用。葉綠醌（維生素 K1）由萘醌組成連接到一個異戊烯基

的部分不飽和側鏈的環其次是三個異戊基單元。它作為  $\Gamma$ -谷氨酰羧化酶的輔助因子，一種負責翻譯後的酶修飾一些蛋白質以允許結合所需的鈣離子因為它們的生物活性，例如在產生凝血中適當凝血的因子，以及調節骨代謝和生長的因素。因此，食用類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌對健康至關重要。此外，由於人類無法從頭合成它們，這些微量營養素必須從飲食中獲得。由於其親脂性，類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌的分析通常使用 C18、C30 或 C34 固定相柱進行液相色譜 (LC) 分離，然後進行紫外/可見 (UV/VIS) 和質譜 (MS) 分離檢測。使用 C30 層析管柱所分離出的類胡蘿蔔素之幾何異構物較其他兩者佳，且極性類胡蘿蔔素包括葉黃素類及  $\beta$ -胡蘿蔔素順反異構物均可清楚地區分出來，但 C30 管柱的缺點為滯留時間較長。之後又發展出結合 HPLC-MS 及 HPLC-NMR 快速分離與鑑定方法 (DACHTLER ET AL., 2001)。此外，螢光檢測還可用於生育酚和葉綠醌分析。質譜越來越多地用於通過在串聯質譜下克服光譜干擾並從碎片模式中獲取有用信息來提高複雜混合物的分析選擇性和靈敏度。在電離技術中，大氣壓化學電離 (APCI) 已廣泛用於這些微量營養素的研究，因為它具有更強的電離非極性化合物的能力。以下為傳統 LC-MS/MS 和 LC-APCI-MS/MS 比較 (郭瀚文、丁望賢，液相層析質譜儀中大氣壓力光游離法之原理與應用)：

表 2. 應用於 LC/MS 三種游離源介面之特性比較。

游離源	離子化過程	特點	分析物性質
電灑游離法 (ESI)	液體流經高電壓之毛細管後受到電場影響，形成帶電荷之液滴後噴灑而出。液滴達到雷利安極限 (Rayleigh limit) 庫侖爆炸 (Coulomb explosion) 後，進而氣化逐步形成待測離子。	1. 可形成單一電荷或多重電荷之離子。 2. 正離子模式形成之離子除 $[M+H]^+$ 外，亦會與陽離子生成加成離子，如 $[M+Na]^+$ 或 $[M+K]^+$ 等。 3. 容易受基質干擾而產生離子抑制現象。	1. 中、高極性或離子性分子。 2. 熱不穩定之分析物。 3. 大分子，如蛋白質等。
大氣壓力化學游離法 (APCI)	液體經由霧化並加熱氣化後，電量放電使大量之溶劑分子游離，再利用溶劑離子經由質子傳遞或電荷轉移使分析物形成待測離子	1. 基質抑制影響不如 ESI 嚴重。 2. 正離子模式形成之離子主要為 $[M+H]^+$ 。	1. 中、低極性之分子。 2. 熱穩定性之化合物。 3. 較易揮發之分析物。
大氣壓力光游離法 (APPI)	1. 光子直接游離方式—分析物可直接被光子游離，產生 $M^+$ 之離子。 2. 摻雜物輔助之光子游離方式—此方式類似於 APCI，以光子取代電量放電。	1. 不易受基質抑制離子訊號影響。 2. 靈敏度與流速成反比。 3. 適用於低流速 $< 200 \mu\text{L}/\text{min}$ 。	1. APCI 所不易離子化之物質 2. 非極性化合物。 3. 疏水性胜肽。

目前，蔬菜中類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌的測定大多採用不同的萃取溶劑、色譜條件和檢測方法獨立進行。這代表需要一種時間和成本有效的分析方法，可以在單一的提取方法和使用質譜的色譜分析中同時準確地確定這些親脂性微量營養素。因此，本研究的目的是開發和驗證一種同時測定一些常見的親脂性微量營養素的分析方法，包括七種類胡蘿蔔素、兩種生育酚和葉綠醌。經驗證的方法被進一步用於研究亞洲普遍食用的 12 種十字花科蔬菜中這些親脂性微量營養素的分布，以下為這次實驗的十二種青菜：青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*)、孢子甘藍 (*B. oleracea* var. *gemmifera*)、高麗菜 (*B. oleracea* var. *capitata*)、白花菜 (*B. oleracea* var. *botrytis*)、芥藍 (*B. oleracea* var.

*alboglabra*)、大白菜 (*B. rapa var. pekinensis*)、小白菜 (*B. rapa var. chinensis*)、菜心 (*B. rapa var. parachinensis*)、蘿蔔 (*Raphanus sativus*)、紅蘿蔔 (*Raphanus sativus*)、芝麻葉 (*Eruca sativa*)、豆瓣菜 (*Nasturtium officinale*)。

## 二、材料與方法

### 2.1 化學品和試劑

紫黃質、新黃質、B-隱黃質和花藥黃質購自 CaroteNature GmbH (Münsingen, Switzerland)。葉黃素、B-胡蘿蔔素、玉米黃質和 B-衍-8'-胡蘿蔔醛購自 ChromaDex Inc (Irvine, CA, USA)。葉綠醜、甲基茶醜、A-生育酚、 $\Gamma$ -生育酚、A-生育酚乙酸酯和丁基羥基甲苯 (BHT) 購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。LiChrosolv® 級的乙醇和氯仿、HPLC 級的甲基第三丁基醚 (MTBE) 和分析級的乙酸乙酯購自 Merck Millipore (Burlington, MA, USA)。LC-MS 級的乙腈、甲醇和異丙醇 (IPA) 以及 HPLC 級的丙酮和己烷購自 Fisher Chemical (Waltham, MA, USA)。超純水 (18.2 M $\Omega$ /cm) 由 Siemens Ultra Clear TWF 水淨化系統 (Munich, Germany) 生產。

### 2.2 植物原料

從新加坡的超市購買了第三批獨立的蔬菜 (青花菜、孢子甘藍、高麗菜、白花菜、芥蘭、大白菜、小白菜、菜心、蘿蔔、紅蘿蔔、芝麻葉和豆瓣菜)。用自來水清洗蔬菜並使用 Labconco FreeZone 冷凍乾燥機 (Kansas City, MO, USA) 進行冷凍乾燥。將冷凍乾燥的蔬菜在昏暗的光線下混合併儲存在 -80 °C 直至分析。

### 2.3. 標準液製備

在乙醇中製備新黃質、紫羅蘭黃質、花藥黃質、葉綠醜、甲基茶醜、葉黃素和 B-衍-8'-胡蘿蔔醛的單獨儲備溶液；在乙腈中用於 A-生育酚、 $\Gamma$ -生育酚和 A-生育酚乙酸酯；在己烷中用於 B-隱黃質和 B-胡蘿蔔素；在乙醇：MTBE：IPA：氯仿 (20：5：25：33.3, mL：mL：mL：mL) 中 玉米黃質。所有儲備溶液均含有 BHT (1 mg/mL)，並且儲存於 -80 °C。使用含有 BHT 的甲醇 (1 mg/mL) 以獲得 9 點校準曲線，範圍為 20 至 2000 ng/mL。所有標準液都含有 50 ng/mL 的內標準液 (IS)：B-衍-8'-胡蘿蔔醛、甲基茶醜和 A-生育酚乙酸酯，並儲存在 -30 °C 直至使用。

### 2.4. 儀器儀表

在 Agilent Technologies 1290 Infinity II 液相色譜 (LC) 系統 (Santa Clara, CA, USA) 上進行分析，該系統與配備大氣壓化學電離 (APCI) 源的 Agilent 6490 三重四極桿質譜儀 (MS/MS) 以正模式耦合。LC 系統由膜脫氣器、二元泵、恆溫自動進樣器和柱溫

箱組成，分別保持在4 °C和35 °C。

## 2.5. 樣品提取

乙醇和己烷的萃取效率：乙酸乙酯（1：1，mL:mL）首次在芥蘭和白蘿蔔上進行評估，評估後，蔬菜的後續提取使用乙醇進行。使用含有BHT（1 mg/mL）的1 mL 乙醇連續三次提取冷凍乾燥的蔬菜粉（100 mg）。在第一次提取中加入 IS，並在冰浴中超聲處理15 分鐘進行提取。在分析之前，將合併的上清液用含有 BHT（1 mg/mL）的甲醇稀釋50 倍。三批蔬菜各提取一次，注射一次。結果表示為蔬菜（n = 3）的  $\mu\text{g/g}$  乾重（DW）的平均值 $\pm$ 標準誤差（SE）。

## 2.6. 色譜和質譜條件

分析物的分離是在 YMC Co., LTD (KYOTO, JAPAN) 的 YMC 類胡蘿蔔素 C30 色譜柱（150 mm  $\times$  2.1 mm，3  $\mu\text{m}$  粒徑）上實現的，進樣量為 10  $\mu\text{L}$ 。使用的流動相為甲醇：水（9:1，mL:mL；溶劑 A）和 IPA：甲醇（7:3，mL:mL；溶劑 B），流速為 0.3 mL/min，梯度如下洗脫程序：15 - 30% B（0 - 5 min）、30 - 45% B（5 - 15 min）、45 - 95% B（15 - 17 min）、95% B（17 - 30 min）、95 - 15% B（30 - 30.1 min）和 15% B（30.1 - 35 min）。

在優化 APCI 源（SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS, SI）後，使用的參數為：氣體溫度 200 °C，蒸發器溫度 350 °C，乾燥氣體流速  $2.33 \times 10^{-4}$   $\text{m}^3/\text{s}$ ，噴霧器壓力  $1.38 \times 10^5$  Pa，電暈電流 5  $\mu\text{A}$ ，毛細管電壓 4500 V。

使用單獨的標準品，進行全掃描和子離子掃描，以驗證前體離子和子離子與文獻中報導的離子是否相符。識別出最敏感和第二敏感的離子對，分別為分析物生成一個定量離子和一個定性離子，隨後優化每個離子對的碰撞能量。最後，多反應監測（MRM）模式用於使用優化的離子對確定目標分析物。分析物通過基於不同濃度標準的量化離子的內標準液歸一化峰面積通過內標校準來量化。

## 2.7. 方法驗證

該分析方法的基質效應、校準線性、檢測限（LOD）和定量限（LOQ）已得到驗證（補充材料和方法，SI）。重複性是通過連續三天（日間，N = 15）在一天內（一天內，N = 5）五次注射混合樣品提取物獲得的相對標準差（RSD）。對於回收率研究，在提取前，將六份混合蔬菜粉末（N = 6）中加入已知量的目標分析物。

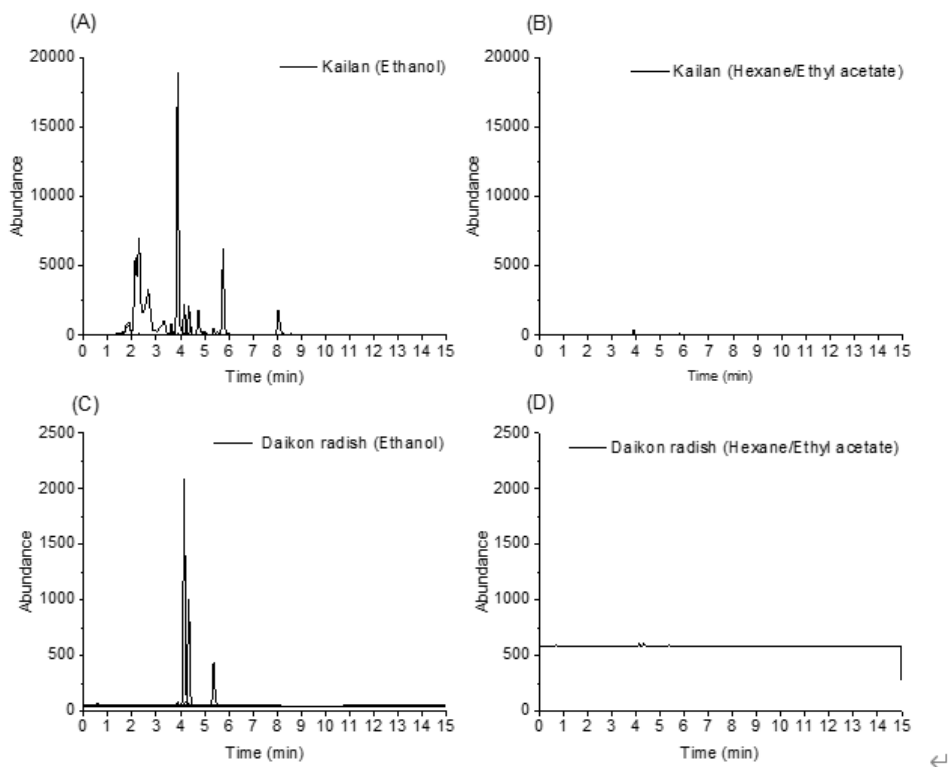
## 2.8. 數據處理

Agilent MassHunter 定量軟件（Santa Clara, CA, USA）用於峰可視化和整合。Microsoft Excel（Redmond, WA, USA）用於數據處理和校準曲線構造。RStudio（Boston, MA, USA）用於繪圖熱圖和 OriginPro（Version 2017）（OriginLab Corporation; Northampton, MA, USA）用於構建色譜圖。

### 三、結果與討論

#### 3.1. 樣品提取

蔬菜中的親脂性微量營養素經常被提取有機溶劑，包括乙醇和己烷-乙酸乙酯混合物。芥蘭和白蘿蔔，用乙醇進行萃取，然後將己烷:乙酸乙酯 (1:1, mL:mL)連續添加到殘留的顆粒中，以萃取剩餘的未被乙醇萃取的目標分析物。根據 MRM兩種溶劑的合併提取物的色譜圖 (圖 S1 和 SI)，因此做三個循環的乙醇提取足以從蔬菜中提取目標分析物。



**Fig. S1.** Representative MRM chromatograms obtained from the extraction of kailan and daikon radish using ethanol (A and C) and hexane/ethyl acetate (B and D).

#### 3.2. LC-APCI-MS/MS 分析

由於十字花科蔬菜中的番茄紅素、 $\alpha$ -胡蘿蔔素、 $\delta$ -生育酚和生育三烯酚含量微不足道，因此這些本分析中排除了化合物。七種類胡蘿蔔素，兩種生育酚和葉綠醌在C30 柱上分離，保持在35 °C，使用甲醇:水 (9:1, mL:mL) 和 IPA:-甲醇 (7:3, mL:mL)，流速為 0.3 mL/min。分析物是用三重四極桿質譜儀和正APCI源在 200 °C 的氣體溫度下運行，乾燥氣體流速 $2.33 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$  和  $1.38 \times 10^5 \text{ Pa}$  的霧化器壓力導致最高的平均分析物峰面積 (表 S1 和 SI) 使用純標準並參考其他研究，保留目標分析物的母離子和MRM 離子 (表 1)。標準品和混合品的色譜圖植物提取物如圖 1 所示。分析方法運行時間為 35 min，目標分析物在更短的時間內完全分離超過24 min，包括葉黃素和玉米黃質的異構物 (圖 1A和B)。由於蔬菜基質的複雜性，混合分析植

物提取物 (圖1C ) 產生了具有相同的附加峰MRM轉變為 $\alpha$ -生育酚 (峰14 )、紫黃質 (峰15 ) 和 $\beta$ -胡蘿蔔素 (峰16 和17 ) 標準品。雖然無法識別第14 峰, 但它不會干擾 $\alpha$ -生育酚的定量。基於MRM 離子對, 峰15 的可能身份包括 (9'Z)-新黃質和黃體黃素, 而峰16 和17 可能是 (13Z)- $\beta$ -胡蘿蔔素、 $\alpha$ -胡蘿蔔素、(9Z)- $\beta$ -胡蘿蔔素和番茄紅素。總之, 使用簡單的LCMS 友好型溶劑即可實現目標分析物的分離, 即甲醇和異丙醇混合物, 它們是己烷、氯仿和 MTBE 等溶劑的合適替代品, 因為這些溶劑對環境不太友好。

**Table 1**  
Optimised ion transitions and collision energies for positive APCI-MS/MS detection.

Peak <sup>a</sup>	Analyte	RT (min)	Precursor ion (m/z)	MRM transition (m/z)	
				Quantifier ion (CE, V)	Qualifier ion (CE, V)
1	$\gamma$ -Tocopherol	6.40	416.5	151.0 (34)	191.0 (26)
2	Menaquinone (IS)	6.66	445.4	187.1 (26)	81.3 (32)
3	Violaxanthin	6.88	601.4	221.2 (20)	583.4 (10)
4	Neoxanthin	7.23	601.4	167.0 (18)	583.0 (8)
5	$\alpha$ -Tocopherol	7.46	430.5	165.0 (38)	137.0 (44)
6	Tocopherol acetate (IS)	9.77	473.4	207.0 (16)	165.2 (30)
7	Phylloquinone	9.95	451.4	187.0 (26)	199.0 (30)
8	Antheraxanthin	10.39	585.5	119.0 (42)	567.4 (12)
9	Lutein	13.58	569.4	119.0 (42)	551.4 (12)
10	Trans- $\beta$ -apo-8'-carotenal (IS)	15.21	417.4	95.0 (30)	119.0 (34)
11	Zeaxanthin	15.73	569.4	119.0 (42)	175.2 (20)
12	$\beta$ -Cryptoxanthin	19.19	553.5	119.1 (32)	177.2 (20)
13	$\beta$ -Carotene	21.44	537.4	177.2 (20)	137.1 (32)

<sup>a</sup> Peak numbers are according to Fig. 1. IS: internal standard; RT: retention time; CE: collision energy.

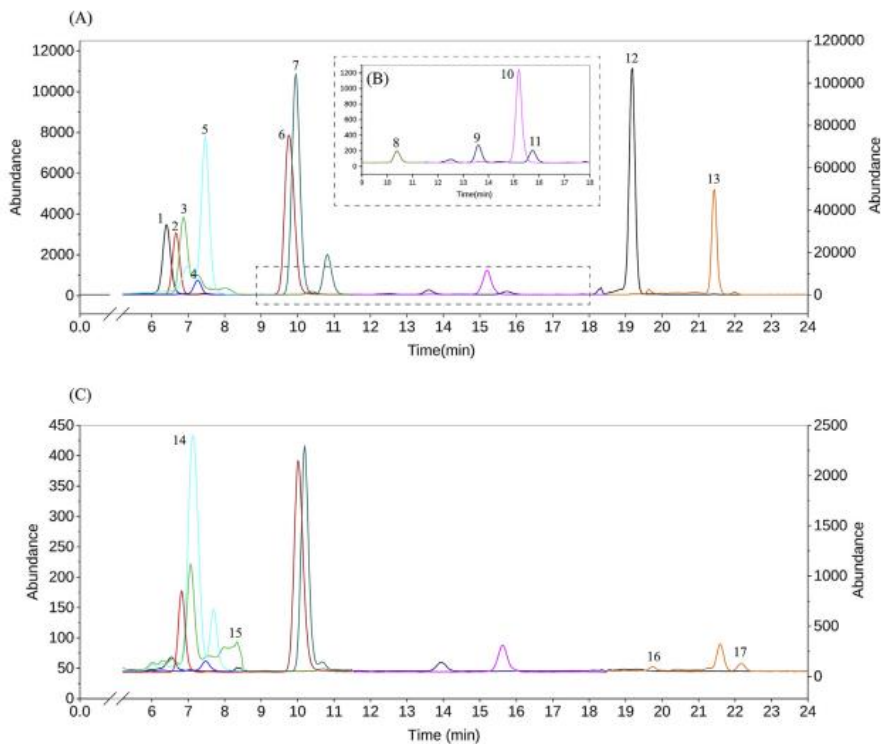


Fig. 1. (A) Representative chromatogram of the calibration standards, containing seven carotenoids, two tocopherols and phylloquinone, separated using C30 column and analysed by positive APCI-MS/MS. Peak assignment is shown in Table 1. Phylloquinone (peak 7) is plotted on the right secondary y-axis. A magnified portion of the chromatogram from 9 to 18 min is shown in (B). (C) Chromatogram of a mixed vegetable extract containing all vegetables studied. The three IS (peaks 2, 6 and 10) are plotted on the right secondary y-axis. Peak 14: unidentified; peak 15: (9Z)-neoxanthin and luteoxanthin; peaks 16 and 17: (13Z)- $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene, (9Z)- $\beta$ -carotene and lycopene.

### 3.3. 方法驗證

分析方法在其線性、檢測限、定量限、基質效應、重複性和回收率（表 2）。是為了根據保留時間的接近程度選擇目標分析物。目標分析物在  $\gamma$ -生育酚、新黃質和  $\alpha$ -生育酚的範圍為 20 - 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；紫黃質為 20 - 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；葉綠醜 50 - 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；花藥黃質 50 - 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；葉黃素 50 - 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；20 - 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  玉米黃質；50 - 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  用於  $\beta$ -隱黃質和  $\beta$ -胡蘿蔔素。蔬菜中目標分析物的 LOD 和 LOQ 分別從 3 和 10 的峰高信噪比確定，範圍分別為 0.1 至 21.5  $\mu\text{g}/\text{g DW}$  和 1.10-47.6  $\mu\text{g}/\text{g DW}$ 。所有目標分析物的基質效應都在可接受的範圍內 ( $100 \pm 15\%$ )，這意味著內部校準方法足以通過共流出基質中的干擾來補償 MS 系統中目標分析物的任何信號變化。

分析的日內和日間重複性分別為 2-16% 和 6-21%，表明植物提取物在連續三天儲存期間可能不穩定，特別是對於 RSD 高於 15% 的新黃質和玉米黃質。因此，植物提取物的分析應在提取後 48 小時內完成，如之前的研究報告中表明，該研究表明類胡蘿蔔素標準品和提取物在  $8^\circ\text{C}$  下至少穩定 48 小時。或者，可以將提取物中的 BHT 增加到 1  $\text{mg}/\text{mL}$  以上，以增強對分析物在分析前降解的保護。從加標提取物中也獲得了令人滿意的標準品回收率，從 89%-128% 不等。

先前的研究已經表明超音波輔助萃取的潛在缺點，例如由於熱量和與反應性羥基自由基的相互作用導致類胡蘿蔔素的降解和異構化。 $\beta$ -胡蘿蔔素和葉黃素標準品的穩定性研究表明，超音波輔助萃取的效果取決於溶劑、超聲參數、溫度和超聲處理持續時間等因素。不推薦使用二氯甲烷作為超聲輔助萃取的溶劑，因頻率較低 ( $< 45 \text{ kHz}$ ) 和功率 ( $< 120 \text{ W}$ ) 有利於穩定性，因



為它們減少異構化事件的數量和系統中產生的氧化自由基的數量。本研究中採用的超聲處理程序，BHT 溫度低、持續時間短、頻率低，作為抗氧化劑添加，並獲得了良好的回收率，表明該分析方法對蔬菜中目標分析物的定量分析。

### 3.4. 12 種十字花科青菜中的類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌

實驗後分析 12 種十字花科蔬菜，蔬菜中分析物的概況如表 3 所示。芝麻葉的總類胡蘿蔔素含量最高 ( $1061 \pm 11 \mu\text{g/g DW}$ )，其次是豆瓣菜 ( $916 \pm 22 \mu\text{g/g DW}$ )，菜心 ( $625 \pm 63 \mu\text{g/g DW}$ ) 和芥藍 ( $620 \pm 10 \mu\text{g/g DW}$ )。葉黃素，其次是  $\beta$ -胡蘿蔔素，紫黃質和新黃質，構成了大多數蔬菜的主要類胡蘿蔔素。在白花菜、高麗菜、蘿蔔和紅蘿蔔中，花藥黃質是主要的類胡蘿蔔素。白花菜、白蘿蔔和紅蘿蔔含有最少的類胡蘿蔔素，這在早期研究中也觀察到 (Guzman et al., 2012; Isabelle et al., 2010)。先前的研究報導，青花菜中的葉黃素、 $\beta$ -胡蘿蔔素含量高於豆瓣菜、高麗菜、芥藍和菜心 (Kao, Chiu, Tsou, & Chiang, 2012)。然而，在其他研究中， $\beta$ -胡蘿蔔素是在青花菜、芥蘭、高麗菜、白花菜、大白菜和芝麻菜中發現的主要類胡蘿蔔素 (Guzman 等, 2012; Isabelle 等, 2010; Kao 等, 2012; Žnidarčič、Ban 和 Šircelj, 2011 年)。蔬菜的文獻報導值不一致，可能是由於生物學差異 (例如品種或栽培品種、階段成熟度) 和環境 (例如氣候或季節) 因素、農業技術，以及收穫前後的條件。導致同一類型蔬菜中類胡蘿蔔素的總含量差異很大。此外，Santos et al. (2012) 描述了冷藏 10 天後豆瓣菜的  $\beta$ -胡蘿蔔素含量顯著增加，而 Hwang, Jang, and Kim (2012) 的研究中冷藏會導致莖苔屬的葉黃素和  $\beta$ -胡蘿蔔素含量減少。這意味著儲存效果可能因蔬菜類型和分析物而異。蔬菜生長期對類胡蘿蔔素含量的影響在青花菜、紅蘿蔔和莖苔屬 (*var. raapstelen, Groene Gewone*) (Jahangir et al., 2014) 中觀察到隨著生長，類胡蘿蔔素含量不斷減少。分析程序和方法 (例如提取溶劑、提取方法、檢測方法) 的差異也可能導致報告結果的差異。然而，這些研究一致發現，綠葉蔬菜的葉黃素和  $\beta$ -胡蘿蔔素含量相對較高。

儘管蔬菜是主要的膳食來源 葉綠醌，關於其在蔬菜中的分析報告有限。在豆瓣菜中發現最高量的葉綠醌 ( $55 \pm 4 \mu\text{g/g DW}$ ) 和芝麻葉 ( $47 \pm 2 \mu\text{g/g DW}$ )，而最低量是在蘿蔔中發現 ( $3.9 \pm 0.2 \mu\text{g/g DW}$ )。與美國農業部 (2019) 的數據庫中的濃度相比，除了數據庫中沒有的菜心和紅蘿蔔外，本研究得到的結果更高，較數據庫中葉綠醌濃度還要高。如前所述，結果的差異可能是由於生物學變異以及分析程序和方法造成的。

使用熱圖顯示了 12 種蔬菜中類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌的相對濃度 (圖 2)。蔬菜中分析物的最高和最低濃度服用後分別歸一化為 +1 (紅色) 和 -1 (藍色) 濃度的以十為底的對數 ( $\log_{10}$ )。總體而言，觀察到類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌通常綠葉蔬菜含量較高，如豆瓣菜、芝麻葉、芥蘭、小白菜和菜心。根菜類、白蘿蔔和紅蘿蔔，濃度最低，其次是高麗菜、花椰菜、大白菜和孢子甘藍。

**Table 2**  
Linearity, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), repeatability and recovery of analytes.

Analyte	IS	Linearity			LOD (µg/g DW)	LOQ (µg/g DW)	Matrix effect (%)	Repeatability (RSD, %)		Recovery (n = 6)	
		Range (ng/mL)	Regression equation <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>				Intra-day (n = 5)	Inter-day (n = 15)	Spiked (ng/mg DW)	Mean ± SD (%)
γ-Tocopherol	Menaquinone	20-2000	y = 0.1103x + 0.0035	0.9999	0.10	1.10	100	7	6	300	89 ± 8
Violaxanthin	Menaquinone	20-1000	y = 0.3240x - 0.0689	0.9973	6.64	8.73	95	9	11	300	128 ± 15
Neoxanthin	Menaquinone	20-2000	y = 0.1051x - 0.0399	0.9957	7.69	16.91	81	5	21	301	120 ± 13
α-Tocopherol	Tocopherol acetate	20-2000	y = 0.0660x - 0.0015	1.0000	3.58	4.79	102	8	14	299	109 ± 3
Phylloquinone	Tocopherol acetate	50-2000	y = 0.4432x - 0.0216	0.9999	8.46	8.57	105	2	7	300	110 ± 6
Antheraxanthin	Tocopherol acetate	50-500	y = 0.0020x - 0.0002	0.9973	21.46	47.55	95	9	15	400	105 ± 4
Lutein	Trans-β-apo-8'-carotenal	100-2000	y = 0.0566x - 0.0409	0.9934	12.72	34.51	85	5	8	1563	124 ± 15
Zeaxanthin	Trans-β-apo-8'-carotenal	20-200	y = 0.0892x - 0.0017	0.9999	2.84	6.57	95	16	20	90	110 ± 12
β-Cryptoxanthin	Trans-β-apo-8'-carotenal	50-1000	y = 0.3347x - 0.0353	0.9970	7.41	7.71	97	10	10	58	89 ± 5
β-Carotene	Trans-β-apo-8'-carotenal	50-1000	y = 0.1640x - 0.0165	0.9989	4.31	4.94	94	2	11	1416	100 ± 8

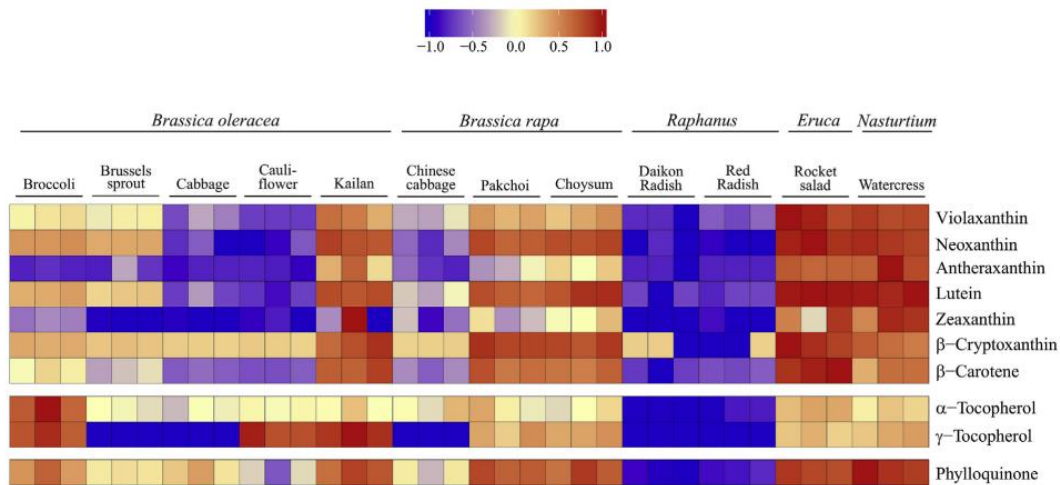
IS: internal standard; R<sup>2</sup>: coefficient of determination; DW: dry weight; RSD: relative standard deviation; SD: standard deviation.

<sup>a</sup> Regression equation is given in the form of y = mx + c where y and x represent the IS-normalised peak area and standard concentration respectively, while m and c represent the slope and y-intercept of the regression line respectively.

**Table 3**  
Concentrations (mean ± SE) of carotenoids, tocopherols and phyloquinone in 12 Brassicaceae vegetables (µg/g DW; n = 3).

Vegetable	Carotenoids							Tocopherols			Phylloquinone	
	VIO	NEO	ANT	LUT	ZEA	β-CRYV	β-CAR	Total	α	γ		Total
Broccoli	30 ± 2	34.7 ± 0.6	11.1 ± 0.3	102 ± 6	3.1 ± 0.1	8.76 ± 0.04	26 ± 4	215 ± 10	221 ± 66	65 ± 19	286 ± 85	31 ± 4
Brussels sprout	25 ± 2	30.1 ± 0.3	15 ± 4	69 ± 4	8.25 ± 0.01	8.25 ± 0.05	13 ± 2	162 ± 11	22 ± 2	0.05 <sup>a</sup>	22 ± 2	17.7 ± 0.3
Cabbage	10 ± 2	6 ± 1	10.3 ± 0.4	9 ± 3	1.44 ± 0.02	7.98 ± 0.03	6.0 ± 0.3	50 ± 6	20 ± 3	0.05 <sup>a</sup>	20 ± 3	22 ± 3
Cauliflower	5.92 ± 0.04	5 ± 1	10.1 ± 0.6	5.0 ± 0.7	1.6 ± 0.1	7.99 ± 0.06	5.3 ± 0.2	41 ± 1	27 ± 2	78 ± 22	104 ± 23	10 ± 2
Kailan	65 ± 10	56 ± 2	72 ± 18	288 ± 10	10 ± 8	11.4 ± 0.5	117 ± 14	620 ± 10	34 ± 8	107 ± 17	141 ± 25	42 ± 4
Chinese cabbage	15 ± 2	8 ± 1	13 ± 2	24 ± 5	3.0 ± 0.8	7.94 ± 0.03	7.6 ± 0.9	79 ± 9	34 ± 11	0.05 <sup>a</sup>	34 ± 11	15 ± 2
Pakchoi	50 ± 4	52 ± 3	27 ± 4	248.50 ± 22	5 ± 1	11.9 ± 0.2	97 ± 12	491 ± 38	39 ± 14	12 ± 4	52 ± 14	42 ± 2
Choysum	50 ± 7	57 ± 1	47 ± 5	367 ± 50	7 ± 1	11.7 ± 0.3	87 ± 7	625 ± 63	28 ± 6	14 ± 2	41 ± 8	42 ± 5
Daikon radish	4.6 ± 0.6	4.4 ± 0.5	9.8 ± 0.9	5 ± 1	1.42 <sup>a</sup>	7 ± 1	3.5 ± 0.7	35 ± 2	1.78 ± 0.01	0.05 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.01	3.9 ± 0.2
Red radish	7.5 ± 0.5	4.0 ± 0.1	10.73 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.6	1.5 ± 0.1	5 ± 1	5.2 ± 0.3	40 ± 2	2.4 ± 0.3	0.05 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.3	4.6 ± 0.2
Rocket salad	144 ± 17	73 ± 3	108 ± 3	522 ± 6	13 ± 4	12.5 ± 0.4	189 ± 14	1061 ± 11	63 ± 6	8 ± 1	70 ± 6	47 ± 2
Watercress	117 ± 5	65 ± 3	136 ± 21	495 ± 23	19 ± 3	10.5 ± 0.3	74 ± 14	916 ± 22	40 ± 5	11 ± 2	50 ± 7	55 ± 4

<sup>a</sup> LOD/2 was reported as the analyte was not detected in the sample. VIO: Violaxanthin; NEO: Neoxanthin; ANT: Antheraxanthin; ZEA: Zeaxanthin; β-CRY: β-Cryptoxanthin; β-CAR: β-Carotene; SE: Standard error.



**Fig. 2.** Relative concentrations of carotenoids, tocopherols and phyloquinone in 12 Brassicaceae vegetables. Red (+1) and blue (-1) represent the highest and lowest normalised concentration of an analyte in the vegetables respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

#### 四、總結

本研究提出了一種經過驗證的分析方法，使用 LC-APCI-MS/MS 和 LCMS 友好且環保的流動相（即甲醇和異丙醇）同時測定七種類胡蘿蔔素、兩種生育酚和葉綠醌混合物。該分析方法的運行時間為 35 分鐘，進一步用於分析 12 種常用的亞洲十字花科植物蔬菜。葉黃素和 β-胡蘿蔔素是主要的類胡蘿蔔素，而 α-生育酚是蔬菜中主要的生育酚研究過。綠葉蔬菜如青花菜和芝麻葉是類胡蘿蔔素、生育酚和葉綠醌的極好來源，而根莖類蔬菜如白蘿蔔和紅蘿蔔則相反。總之，這種快速有效的分析方法

法有助於同時分析蔬菜中的親脂性微量營養素，以便在飲食或營養研究中準確測定它們。

## 五、參考文獻

- Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49–73. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>.
- Flakelar, C. L., Prenzler, P. D., Luckett, D. J., Howitt, J. A., & Doran, G. (2017). A rapid method for the simultaneous quantification of the major tocopherols, carotenoids, free and esterified sterols in canola (*Brassica napus*) oil using normal phase liquid chromatography. *Food Chemistry*, 214, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.059>.
- Guzman, I., Yousef, G. G., & Brown, A. F. (2012). Simultaneous extraction and quantitation of carotenoids, Chlorophylls, and tocopherols in Brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7238–7244. <https://doi.org/10.1021/jf302475d>.
- Hwang, E.-S., Jang, M.-R., & Kim, G.-H. (2012). Effects of storage condition on the bioactive compound contents of Korean cabbage. *Food Science and Biotechnology*, 21(6), 1655–1661. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0220-0>.
- Isabelle, M., Lee, B. L., Lim, M. T., Koh, W.-P., Huang, D., & Ong, C. N. (2010). Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chemistry*, 120(4), 993–1003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.038>.
- Jahangir, M., Abdel-Farid, I. B., Vos, C. H. R.d., Jonker, H. H., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2014). Metabolomic variation of *Brassica rapa* var. *rapa* (var. *raapstelen*) and *Raphanus sativus* L. at different developmental stages. *Pakistan Journal of Botany*, 46(4), 1445–1452.
- Kao, F. J., Chiu, Y. S., Tsou, M. J., & Chiang, W. D. (2012). Effects of Chinese domestic cooking methods on the carotenoid composition of vegetables in Taiwan. *LWT—Food Science and Technology*, 46(2), 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.019>.
- Kim, M. J., Chiu, Y.-C., & Ku, K.-M. (2017). Glucosinolates, carotenoids, and vitamins E and K variation from selected kale and collard cultivars. *Journal of Food Quality*, 2017, 8. <https://doi.org/10.1155/2017/5123572>.
- Kulczyński, B., Gramza-Michałowska, A., Kobus-Cisowska, J., & Kmiecik, D. (2017). The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – current state of knowledge. *Journal of Functional Foods*, 38, 45–65.
- Mageney, V., Baldermann, S., & Albach, D. C. (2016). Intraspecific variation in carotenoids of *Brassica oleracea* var. *sabellica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

64(16), 3251–3257. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00268>.

Manchali, S., Murthy, K. N. C., & Patil, B. S. (2012). Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.08.004>.

Maurer, M. M., Mein, J. R., Chaudhuri, S. K., & Constant, H. L. (2014). An improved UHPLC-UV method for separation and quantification of carotenoids in vegetable crops. *Food Chemistry*, 165, 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.038>.

Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., & Pogson, B. J. (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68–82. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>.

Nowicka, B., & Kruk, J. (2010). Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(9), 1587–1605. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2010.06.007>.

Oberson, J., Campos-Gimenez, E., Riviere, J., & Martin, F. (2018). Application of supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry to the determination of fat-soluble vitamins in selected food products. *Journal of Chromatography B*, 1086, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.017>.

Park, S.-Y., Choi, S. R., Lim, S.-H., Yeo, Y., Kweon, S. J., Bae, Y.-S., et al. (2014). Identification and quantification of carotenoids in paprika fruits and cabbage, kale, and lettuce leaves. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(3), 355–358. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4081-5>.

Petrier, C., Jeunet, A., Luche, J. L., & Reverdy, G. (1992). Unexpected frequency effects on the rate of oxidative processes induced by ultrasound. *Journal of the American Chemical Society*, 114(8), 3148–3150. <https://doi.org/10.1021/ja00034a077>.

Pinela, J., Barreira, J. C. M., Barros, L., Verde, S. C., Antonio, A. L., Carvalho, A. M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2016). Suitability of gamma irradiation for preserving fresh-cut watercress quality during cold storage. *Food Chemistry*, 206, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.050>.

Réboufa, C., & Artaud, J. (2018). Analytical determination of phylloquinone (vitamin K1) in olive oils. Comparison with Other Vegetable Oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(6), 1700527. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700527>.

dos Reis, L. C. R., de Oliveira, V. R., Hagen, M. E. K., Jablonski, A., Flôres, S. H., & de Oliveira Rios, A. (2015). Carotenoids, flavonoids, chlorophylls, phenolic compounds and antioxidant activity in fresh and cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina F1). *LWT—Food Science and Technology*, 63(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.089>.

Renaud, E. N. C., Lammerts van Bueren, E. T., Myers, J. R., Paulo, M. J., van Eeuwijk, F. A., Zhu, N., et al. (2014). Variation in broccoli cultivar phytochemical content under

- organic and conventional management systems: Implications in breeding for nutrition. *PloS One*, 9(7), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095683> e95683-e95683.
- Rivera, S. M., Christou, P., & Canela-Garayoa, R. (2014). Identification of carotenoids using mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(5), 353–372. <https://doi.org/10.1002/mas.21390>.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2), 97–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.004>.
- Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2016). Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International*, 82, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.025>.
- Saini, R. K., Shang, X. M., Ko, E. Y., Choi, J. H., Kim, D., & Keum, Y.-S. (2016). Characterization of nutritionally important phytoconstituents in minimally processed ready-to-eat baby-leaf vegetables using HPLC–DAD and GC–MS. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(2), 341–349. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9312-5>.
- Santos, J., Herrero, M., Mendiola, J. A., Oliva-Teles, M. T., Ibáñez, E., Delerue-Matos, C., et al. (2014). Assessment of nutritional and metabolic profiles of pea shoots: The new ready-to-eat baby-leaf vegetable. *Food Research International*, 58, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.062>.
- Santos, J., Mendiola, J. A., Oliveira, M. B. P. P., Ibanez, E., & Herrero, M. (2012). Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage. *Journal of Chromatography A*, 1261, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.067>.
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Prasad, K., Bahadur, A., & Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.002>.
- Song, J.-F., Li, D.-J., Pang, H.-L., & Liu, C.-Q. (2015). Effect of ultrasonic waves on the stability of all-trans lutein and its degradation kinetics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 602–608. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.020>.
- Song, J., Yang, Q., Huang, W., Xiao, Y., Li, D., & Liu, C. (2018). Optimization of trans lutein from pumpkin (*Cucurbita moschata*) peel by ultrasound-assisted extraction. *Food and Bioprocess Technology*, 107, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.10.008>.
- Sun, Y., Ma, G., Ye, X., Kakuda, Y., & Meng, R. (2010). Stability of all-trans- $\beta$ -carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(4), 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.04.002>.

doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.12.005.

- Tan, J., Neo, J. G. L., Setiawati, T., & Zhang, C. (2017). Determination of carotenoids in human serum and breast milk using high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD). *Separations*, 4(2), 19. <https://doi.org/10.3390/separations4020019>.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2019). USDA food composition databases. Retrieved from <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.
- Vasanthi, H. R., Mukherjee, S., & Das, D. K. (2009). Potential health benefits of broccoli- A chemico-biological overview. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(6), 749–759. <https://doi.org/10.2174/138955709788452685>.
- Walsh, R. P., Bartlett, H., & Eperjesi, F. (2015). Variation in carotenoid content of kale and other vegetables: A review of pre- and post-harvest effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(44), 9677–9682. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03691>.
- Xiao, Z., Lester, G. E., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: Edible microgreens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7644–7651. <https://doi.org/10.1021/jf300459b>.
- Xiao, Z., Rausch, S. R., Luo, Y., Sun, J., Yu, L., Wang, Q., et al. (2019). Microgreens of Brassicaceae: Genetic diversity of phytochemical concentrations and antioxidant capacity. *LWT–Food Science and Technology*, 101, 731–737. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.076>.
- Ye, J., Feng, L., Xiong, J., & Xiong, Y. (2011). Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(10), 2131–2136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02727.x>.
- Žnidarčič, D., Ban, D., & Šircelj, H. (2011). Carotenoid and chlorophyll composition of commonly consumed leafy vegetables in Mediterranean countries. *Food Chemistry*, 129(3), 1164–1168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.097>.