

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 化學科

030205

晶彩人生---探究市售葉黃素飲與自由基之抗氧化反應

學校名稱：臺中市立大業國民中學

作者： 國二 許瑋庭 國二 陳佩羽	指導老師： 高靜儀 張顥瀚
---------------------------------	-----------------------------

關鍵詞：葉黃素、芬頓試劑、反應速率

作品名稱：

晶彩人生---探究市售葉黃素飲與自由基之抗氧化反應

摘要

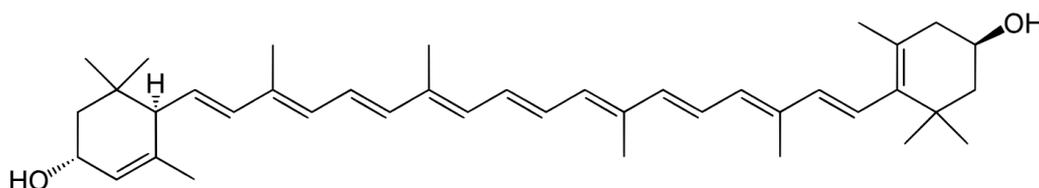
市售葉黃素飲外觀呈現橘紅色黏稠狀，去離子水稀釋以光譜儀測量波長在 447nm 有吸收峰。另以丙酮與正己烷萃取得黃色液體，光譜儀測量最大吸收率於波長 450nm。濾紙色層分析法得知含有兩種葉黃素，分別為葉黃素與玉米黃素，同時也比較菠菜汁與市售葉黃素膠囊，皆含有葉黃素與玉米黃素。利用芬頓試劑產生氫氧自由基·OH，模擬自由基攻擊視神經時，存在於眼球的葉黃素作為抗氧化劑，與自由基反應，長鏈共軛雙鍵分解成短鏈，黃色消失。並利用光譜儀測量市售葉黃素飲與芬頓試劑反應，為二級反應。最佳反應條件為市售葉黃素飲加水稀釋成原濃度 25%， $[Fe^{2+}] = 0.005M$ ， $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH = 2.92$ ，反應速率定律式： $R = k [葉黃素]^2$ ， $k = (3.58 \pm 1.5) \times 10^{-5} 1/Ms$ 。

壹、前言

一、研究動機

眼睛是靈魂之窗，而現代人使用 3C 電子產品不離手情況下，3C 產品發出的藍光，進入人體的眼睛，透至眼底直至視網膜和黃斑部，視網膜上的敏感細胞，會產生大量的自由基，可使人的眼睛出現視覺疲勞、白內障或黃斑區退化變性。

存在視網膜中央黃斑區的「葉黃素」，英文命名為 Lutein，分子式 $C_{40}H_{36}O_2$ ，屬於脂溶性，不溶於水，結構式如圖一：



圖一 葉黃素的分子結構

有十個共軛雙鍵的結構，為其呈黃色外觀的發色團，在紫外光可見光照射下，波長 425nm、450nm、476nm 特定的吸收，即是吸收藍光部分。與自由基反應時，自由基會將其長鏈共軛雙鍵結構分解成小分子，黃色消失，故葉黃素具有吸收藍光與對自由基抗氧化能力，阻隔自由基對視神經的傷害，進而保護視網膜，對人的眼睛保護特別重要¹。

葉黃素是一種類胡蘿蔔素，自然界天然存在的類胡蘿蔔素超過 600 種，但是只有兩種能存在於眼球的視網膜與黃斑部，也就是葉黃素(Lutein)與玉米黃素(Zeaxanthin)，無法於人體自行生成，必須透過攝取綠黃色蔬菜如胡蘿蔔、菠菜、玉米、南瓜和蛋黃等或直接服用高劑量葉黃素保健食品，已成為在眾多的保健食品中，目前最夯的保健食品。

由於葉黃素保健食品的種類眾多，有多種不同的形式，如液態膠囊式、果凍形式、飲料

型式，皆標榜抗氧化效果很好，其中，令我們感到好奇的，是其中飲料型的葉黃素飲，因為葉黃素本身是脂溶性的，不易溶於水，但打開發現內容物，是呈橘紅色黏稠狀混濁液體，與文獻報導的黃色不太一樣，如圖二的外觀。



圖二 富含葉黃素之市售葉黃素飲、膠囊與菠菜

因此，想研究市售葉黃素飲成分，是否真含有葉黃素，並且與芬頓試劑反應，模擬葉黃素與自由基的反應。芬頓試劑為亞鐵離子 Fe^{2+} 加入過氧化氫 H_2O_2 ，反應為亞鐵離子催化過氧化氫分解成氧氣與水^{2,3,4}。由推測的反應機構，中間的產物裡，會有氫氧自由基 $\cdot OH$ （式一），此氫氧自由基 $\cdot OH$ 可再與過氧化氫 H_2O_2 反應生成過氧化氫自由基 $\cdot OOH$ （式三），或鐵離子 Fe^{3+} 再與 H_2O_2 也生成 $\cdot OOH$ （式二），過氧化氫自由基 $\cdot OOH$ 與 Fe^{3+} 鐵離子反應生成 O_2 氧氣與亞鐵離子，故亞鐵離子在反應中不斷循環著（式四）。



而反應的中間體氫氧自由基 $\cdot OH$ 、過氧自由基 $\cdot OOH$ 具有未配對電子，具超強的氧化能力，此時加入葉黃素如圖一的結構，推測自由基與葉黃素反應機構可能為式五或式六



當葉黃素與自由基反應成短鏈的分子時，呈現黃色的長鏈共軛雙鍵系統被斷鏈，生成較短的有機分子、水及二氧化碳，黃色消失。模擬自由基攻擊視神經時，葉黃素就是與高活性自由基反應，作為一抗氧化劑的角色，也證明葉黃素確實能與自由基反應，具有抗氧化能力，保護我們的眼睛，免於自由基的傷害。

二、研究目的

1.分析市售葉黃素飲的成分

2.探究市售葉黃素飲與芬頓試劑反應，證明市售葉黃素具有抗氧化的能力，具有保護眼睛重要功能，及其反應速率之動力學研究

貳、研究設備及器材

一、研究設備

1.光譜儀 PASCO SPECTROMETER PS-2600 ；2.分液漏斗 250mL 一只；3.滴定管 50mL 一支；
4.量瓶 100 mL 3 個；5.量筒 10mL、20mL、50mL、100mL；6.燒杯 50mL、250mL、500mL 各 5
個；7.錐形瓶 250mL 數個；8.玻璃片 5 片；9.鐵環 1 個；10.鐵架 1 個；11.樣本瓶 5 個；12.毛
細管數支；13.刮勺 5 支；14.滴管 5 支；15.漏斗 1 個；16.濾紙 11 mm 1 盒；17.展開槽 1 個；
18.鑷子 2 支；19.果汁機；20.直尺 1 支；21.剪刀 1 把；22.電子天平；23.微量吸管(micropipette)
100 μ L 1 支；24.微量吸管吸頭 100 μ L 10 個；25. pH 計

二、研究藥品與材料

(一)藥品：

1.六水合硫酸銨亞鐵 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}=392.16$ 500 公克 1 瓶；2.雙氧水 $\text{H}_2\text{O}_2(35\%)$ 2 瓶；
3.過錳酸鉀 $\text{KMnO}_4=158.04$ ；4.去離子水；5.丙酮；6.正己烷；7.乙酸乙酯；8.硫酸；9.硫酸鐵

(二)材料：

1.市售葉黃素飲 10 瓶；2.市售葉黃素膠囊 10 顆；3.菠菜 1 把

參、研究過程或方法

一、分析市售葉黃素飲的成分

(一) 萃取市售葉黃素飲中的葉黃素

- 1.量筒取 40 mL 市售葉黃素飲，以漏斗倒入分液漏斗中。
- 2.量筒取 10mL 丙酮，以漏斗倒入分液漏斗中。
- 3.量筒取 30mL 正己烷，以漏斗倒入分液漏斗中。
- 4.將分液漏斗拿起，倒置，上下搖盪數次，並將開關洩氣。
- 5.再將分液漏斗放回鐵架，等待水層與有機層分層。
- 6.約 1 分鐘，就如圖三的分層，取上層的有機層於樣本瓶中如圖四。



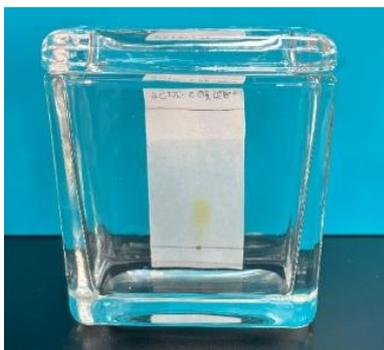
圖三 分液漏斗中的分層



圖四 有機層的液體

(二) 濾紙色層分析法分析市售葉黃素飲的葉黃素

- 1.取一直徑 10 公分的濾紙，對折一半，再對折成四分之一圓。
- 2.濾紙張開，以鉛筆與尺連界摺痕點，即可得到一正方形，剪刀剪出正方形的濾紙。
- 3.再取數張圓型濾紙，與步驟 2.中的濾紙疊在一起，剪刀將外圍剪開，得數張正方形濾紙。
- 4.取一張正方形濾紙，於邊長在上下各留 1 公分畫直線，畫其基礎線與溶劑前方位置線。
- 5.將 4.中的濾紙分成剪成一半，於基礎線中央以鉛筆畫一記號，為毛細管點樣品所在位置。
- 6.將於（一）所得的有機層，以毛細管沾取，點於濾紙上，直至有明顯的黃色。
- 7.(1)量筒取 10 mL 正己烷為展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 6.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖八。



圖五 展開液移動葉黃素在濾紙

- (2)量筒取 10 mL 乙酸乙酯為展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 6.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖八。
- (3)量筒量取 5 mL 正己烷與 5 mL 乙酸乙酯，即為正己烷：乙酸乙酯=1：1 展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 6.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖八。
- (4)量筒量取 6 mL 正己烷與 3 mL 乙酸乙酯，即為正己烷：乙酸乙酯=2：1 展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 6.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖八。
- (5)量筒量取 10 mL 正己烷與 2 mL 乙酸乙酯，即為正己烷：乙酸乙酯=5：1 展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 6.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖八。
- (6)量筒量取 10 mL 正己烷與 1mL 乙酸乙酯，即為正己烷：乙酸乙酯=10：1 展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 6.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖八。
- (7)量筒量取 10 mL 正己烷與 0.5mL 乙酸乙酯，即為正己烷：乙酸乙酯=20：1 展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 6.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動（圖五）至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖八。

(三) 濾紙色層分析法比較菠菜汁、市售葉黃素飲與市售葉黃素膠囊

1. 菠菜汁取得：

(1) 將 1 把市售菠菜折成小段，稱取 200 公克後，放入果汁機。

(2) 加入 200 公克去離子水於果汁機，打開開關，攪動 30 秒，得綠色液體。

(3) 以紗布過濾(2)中的綠色液體，而後以量筒取 100mL 過濾的綠色液體，倒入分液漏斗。

(4) 量筒量取 50mL 丙酮，倒入分液漏斗，接著在量取 50mL 正己烷，倒入分液漏斗中。

(5) 搖盪分液漏斗，同時將開關放氣，帶液體分層後，樣本瓶收集上層的綠色液體。

2. 將市售葉黃素膠囊以剪刀剪開，將咖啡色液體擠入樣本瓶，並加入 20mL 丙酮溶解。

3. 取(二)中的正方形濾紙，於邊長在上下各量取 1 公分畫直線，各留 1 公分，畫其基礎線與溶劑前方位置線。

4. 於基礎線以鉛筆畫記號，依序標示菠菜、葉黃素(市售葉黃素飲)、膠囊所在位置，以毛細管點樣品

5. 量筒量取 10 mL 正己烷與 2 mL 乙酸乙酯，即為正己烷：乙酸乙酯=5：1 展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 4.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖九

(6) 量筒量取 10 mL 正己烷與 1mL 乙酸乙酯，即為正己烷：乙酸乙酯=10：1 展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 4.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖九

(7) 量筒量取 10 mL 正己烷與 0.5mL 乙酸乙酯，即為正己烷：乙酸乙酯=20：1 展開液，倒入展開槽中，再以鑷子夾入 4.中的濾紙，蓋上展開槽蓋子，待展開液移動至溶劑前方位置線，打開蓋子，鑷子夾出濾紙，如圖九

(四) 光譜儀測量市售葉黃素飲的吸收光譜

1. 關於實驗所需樣品的吸收光譜，皆以圖六光譜儀 PASCO SPECTROMETER PS-2600 測量，當樣品為水溶液時，以去離子水校正光譜儀；而脂溶性的葉黃素則以丙酮+正己烷校正光譜儀。



圖六 光譜儀 PASCO SPECTROMETER PS-2600

2. 測量實驗(一) 有機層的吸收光譜

(五) 市售葉黃素飲稀釋不同濃度吸收光譜

1.市售葉黃素飲外觀呈橘色濃稠狀，無法直接以光譜儀測量，分別取不同體積倒入於量筒，同時加入不同體積的去離子水，其濃度以稀釋倍率來表示。

2.光譜儀測量稀釋倍率 6.25%、10%、12.5%、15%、25%葉黃素飲吸收光譜，得圖十一。

3.圖十一吸收光譜，波長 447nm 處，都有一吸收峰，故以波長 447 nm 判斷葉黃素的依據。

二、探究市售葉黃素飲與芬頓試劑反應，證明市售葉黃素具有抗氧化的能力，具有保護眼睛重要功能，及其反應速率之動力學研究

(一) 過錳酸鉀滴定雙氧水

市售的雙氧水標示 $w\% = 35\%$ ， $d = 1.13g/cm^3$ ，為確定雙氧水中過氧化氫 H_2O_2 的濃度，以過錳酸鉀滴定：

1.電子天平稱取過錳酸鉀 3.685 公克， $[H_2SO_4] = 1M$ 水溶液溶解，以量瓶配置成 $[KMnO_4] = 0.233M$ ，100mL 過錳酸鉀溶液，再裝入 50mL 規格滴定管中。



圖七 過錳酸鉀滴定雙氧水

2.量筒取市售雙氧水 5mL，倒入錐形瓶，同時加入 45mL $[H_2SO_4] = 1M$ 水溶液於錐形瓶中，成雙氧水溶液 50mL，置於滴定管下方。

3.開啟滴定管開關，逐滴滴入過錳酸鉀於雙氧水中，如圖七。

4.紫紅色的過錳酸鉀加入雙氧水溶液 50mL 後，錐形瓶內水溶液的顏色仍為無色，再加入 50mL 過錳酸鉀溶液於滴定管，直到加入共 95mL 過錳酸鉀溶液，錐形瓶內的溶液呈粉紅色，表示已達滴定終點，可得該雙氧水的 $[H_2O_2] = 1M$ ，故此瓶雙氧水溶液的過氧化氫濃度為 11M。

(二) 不同濃度 $FeSO_4$ 吸收光譜

1.天秤稱取六水合硫酸銨亞鐵 3.92 公克，去離子水溶解，量瓶配置成 100 mL $FeSO_4$ 溶液， $[Fe^{2+}] = 0.1M$ ，光譜儀測量吸收光譜，如圖十二。

2.量筒取不同體積的 $[Fe^{2+}] = 0.1M$ ，與不同體積的去離子水，配置成 $[Fe^{2+}] = 0.05M$ 、 $0.025M$ 、 $0.01M$ ，光譜儀測量吸收光譜，如圖十二。

3.從 $FeSO_4$ 的吸收光譜中，我們發現， $FeSO_4$ 於 450nm 處，為最大吸收波長，以光譜儀測不同濃度 $FeSO_4$ 在 450nm 的吸收率 A， $FeSO_4$ 莫耳濃度為橫坐標，吸收率 A 為縱坐標，做檢量線，如圖十三。

(三) 證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應

1. 取 50mL、50%葉黃素於 100mL 的燒杯，再倒入 0.01M 硫酸亞鐵 50mL 於該杯中，兩者充分混合後，其濃度為 25%葉黃素、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ ，100mL 混合液。

2. 量筒取混合液 40mL，倒入分液漏斗中，稱為反應液①。

3. 萃取反應液①：量筒取 10mL 丙酮，以漏斗倒入分液漏斗中；再量筒取 30mL 正己烷，以漏斗倒入分液漏斗中，將分液漏斗拿起，倒置，上下搖盪數次，並將開關洩氣。再將分液漏斗放回鐵架，等待水層與有機層分層，取上層有機層，以光譜儀測其吸收光譜，如圖十四（反應前）。

4. 量筒取混合液 40mL，倒入 250mL 規格的錐形瓶中，稱為反應液②。

5. 量筒取 3mL， $[\text{H}_2\text{O}_2] = 11\text{M}$ 雙氧水，倒入裝有反應液②的錐形瓶中，此時錐形瓶內市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ 反應溶液，並開始計時。

6. 取 4mL 混合液於比色管中，以光譜儀測與芬頓試劑反應前的吸收光譜如圖十五，稱為反應液③。

7. 葉黃素與芬頓試劑反應動力學研究步驟：

(1) 由步驟 6. 中的吸收光譜中，選擇波長 λ 在 447nm，偵測其吸收率 A。

(2) 選擇光譜儀中時間與吸收率 A 的功能。

(3) 時間的設定為 10 秒偵測 1 次吸收率 A。

(4) 以微量滴管加入 300 μL ， $[\text{H}_2\text{O}_2] = 11\text{M}$ ，於反應液③比色管後，開始測量，而比色管中為 25%葉黃素、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ ， $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ 反應溶液。

(5) 反應 3100 秒後，停止反應，並且測葉黃素與芬頓試劑反應後的吸收光譜如圖十五，同時將光譜儀中的吸收率 A 與時間 t 數據，轉成 excel 檔案。

(6) 將 excel 檔案，先繪製成橫坐標為時間 t，縱坐標為吸收率 A 的曲線圖，如圖十六。

(7) 將吸收率 A 倒數 $1/A$ 為縱坐標，橫坐標為時間 t 作圖，時間 t 選擇 500 秒之後呈現線性如圖十七。

(8) 圖十七中，其直線方程式的斜率，就為葉黃素與芬頓試劑反應速率 k 值。

8. 反應經過 3100 秒後，同時停止步驟 5 反應。

9. 將步驟 5 的反應液②倒入分液漏斗中，萃取反應液②：量筒取 10mL 丙酮，以漏斗倒入分液漏斗中；再量筒取 30mL 正己烷，以漏斗倒入分液漏斗中，將分液漏斗拿起，倒置，上下搖盪數次，並將開關洩氣。再將分液漏斗放回鐵架，等待水層與有機層分層，取上層有機層，以光譜儀測其吸收光譜，如圖十四（反應後）。

(四) 市售葉黃素飲與不同條件芬頓試劑反應

藉由加入不同體積的雙氧水而改變 H_2O_2 濃度，與配製不同濃度的 Fe^{2+} ，組成不同條件的芬頓試劑：

1. 市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ ，步驟同（三）證明市售葉黃素飲

與芬頓試劑反應裡 7.的(1)~(8)，重複三次實驗。

2.市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1\text{M}$ ，步驟同(三)證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應裡 7.的(1)~(8)，重複三次實驗。

3.市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.523\text{M}$ ，步驟同(三)證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應裡 7.的(1)~(8)，重複三次實驗。

4.市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.243\text{M}$ ，步驟同(三)證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應裡 7.的(1)~(8)，重複三次實驗。

5.市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ ， $\text{pH} = 0.33$ ，步驟同(三)證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應裡 7.的(1)~(8)。

6.市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ ， $\text{pH} = 1.09$ ，步驟同(三)證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應裡 7.的(1)~(8)。

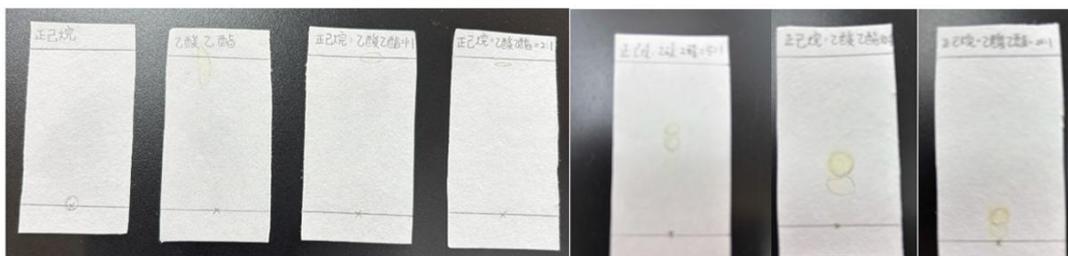
7.市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.01\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ ，步驟同(三)證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應裡 7.的(1)~(8)。

8.市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.02\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ ，步驟同(三)證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應裡 7.的(1)~(8)。

肆、研究結果

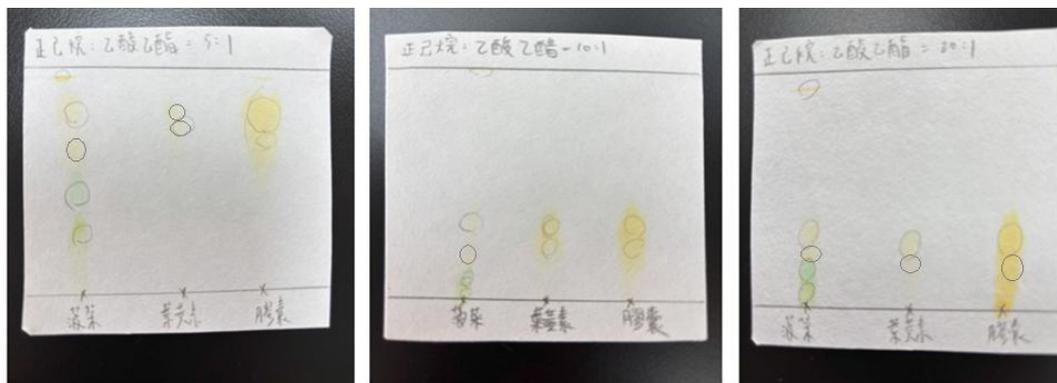
一、分析市售葉黃素飲的成分

(一) 濾紙色層分析法分析市售葉黃素飲的葉黃素，不同比例展開液



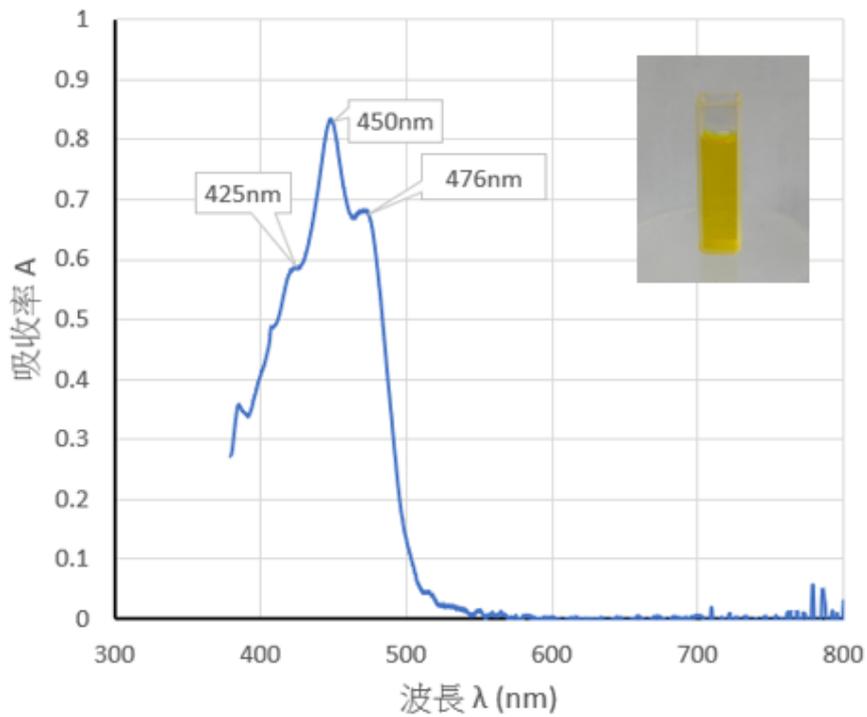
圖八 市售葉黃素飲的葉黃素在不同正己烷與乙酸乙酯比例展開液的濾紙色層分析

(二) 濾紙色層分析法比較菠菜汁、市售葉黃素飲與市售葉黃素膠囊，不同比例展開液



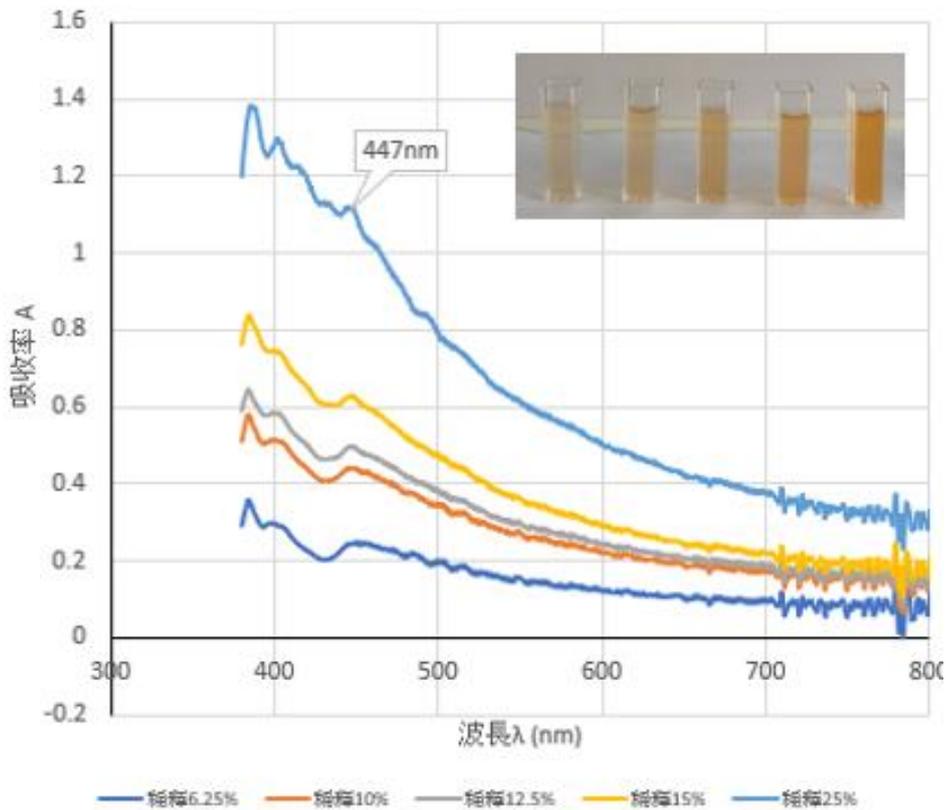
圖九 菠菜汁、市售葉黃素飲與市售葉黃素膠囊，不同比例展層液

(三) 光譜儀測量萃取市售葉黃素飲有機層的吸收光譜



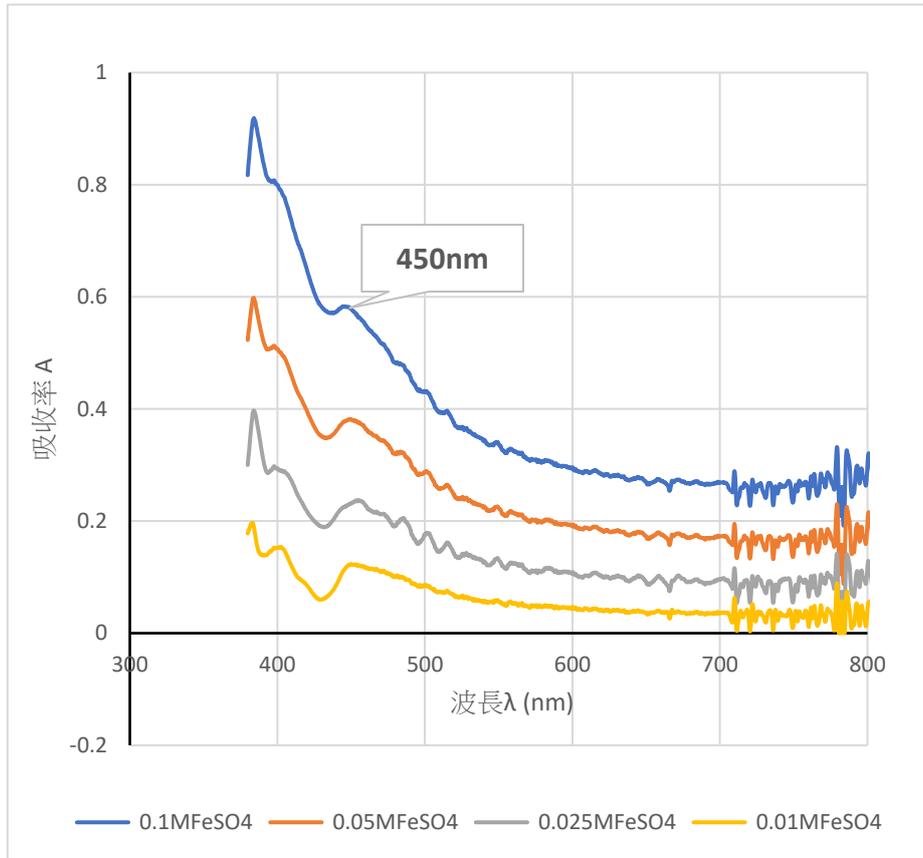
圖十 市售葉黃素飲有機層的吸收光譜

(四) 市售葉黃素飲以去離子稀釋成不同濃度倍率吸收光譜

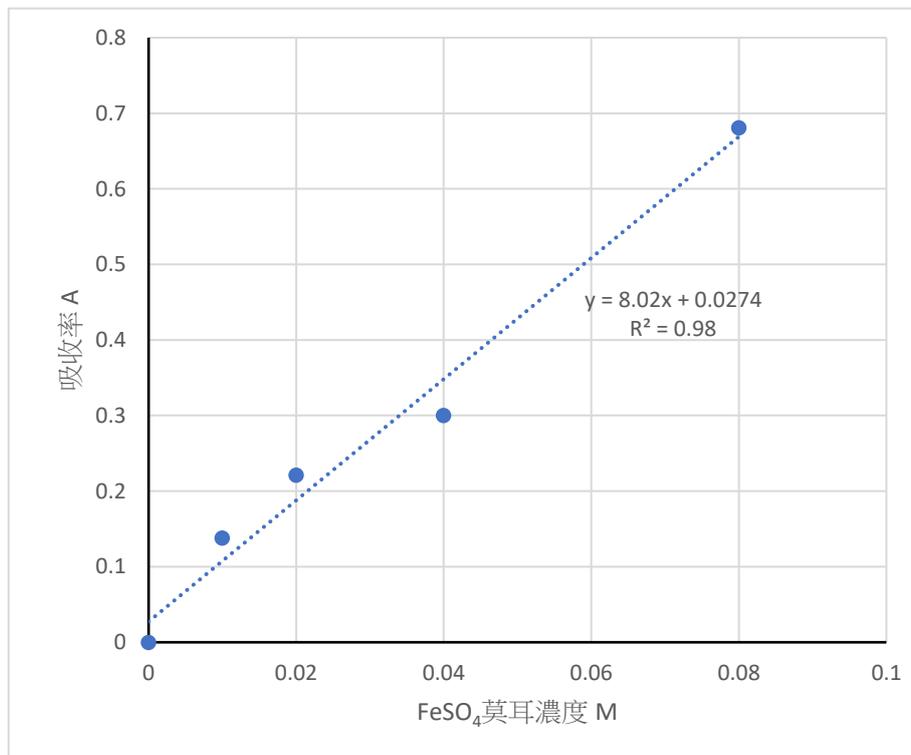


圖十一 市售葉黃素飲稀釋成不同濃度倍率

二、探究市售葉黃素飲與芬頓試劑反應
(一) 不同濃度硫酸銨亞鐵吸收光譜



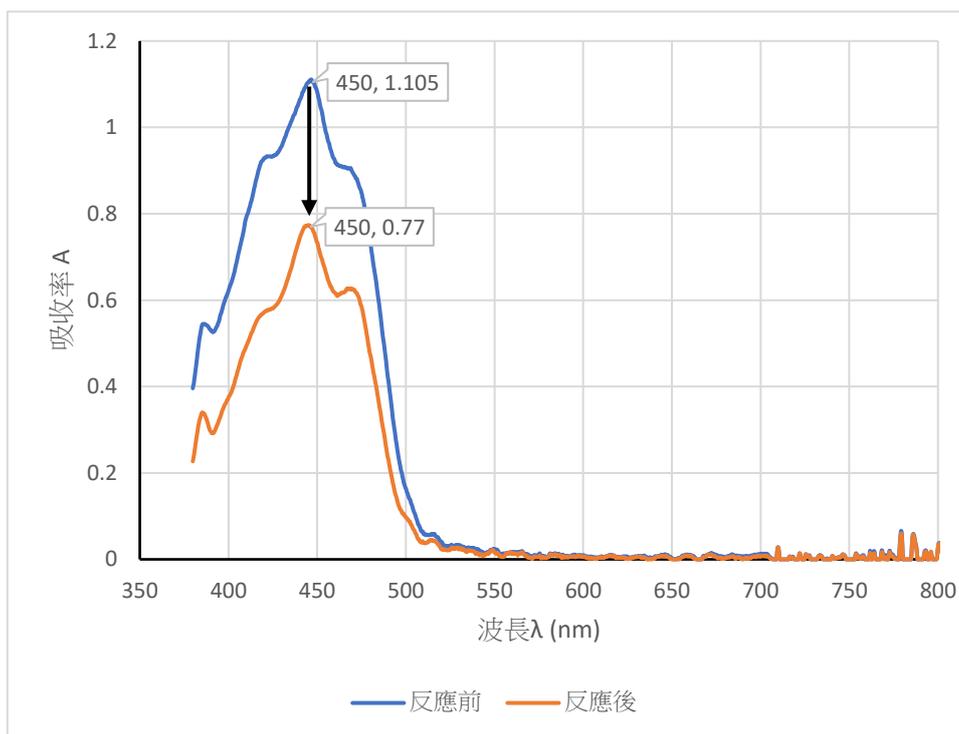
圖十二 不同濃度硫酸銨亞鐵吸收光譜圖



圖十三 硫酸銨亞鐵於 450nm 檢量線

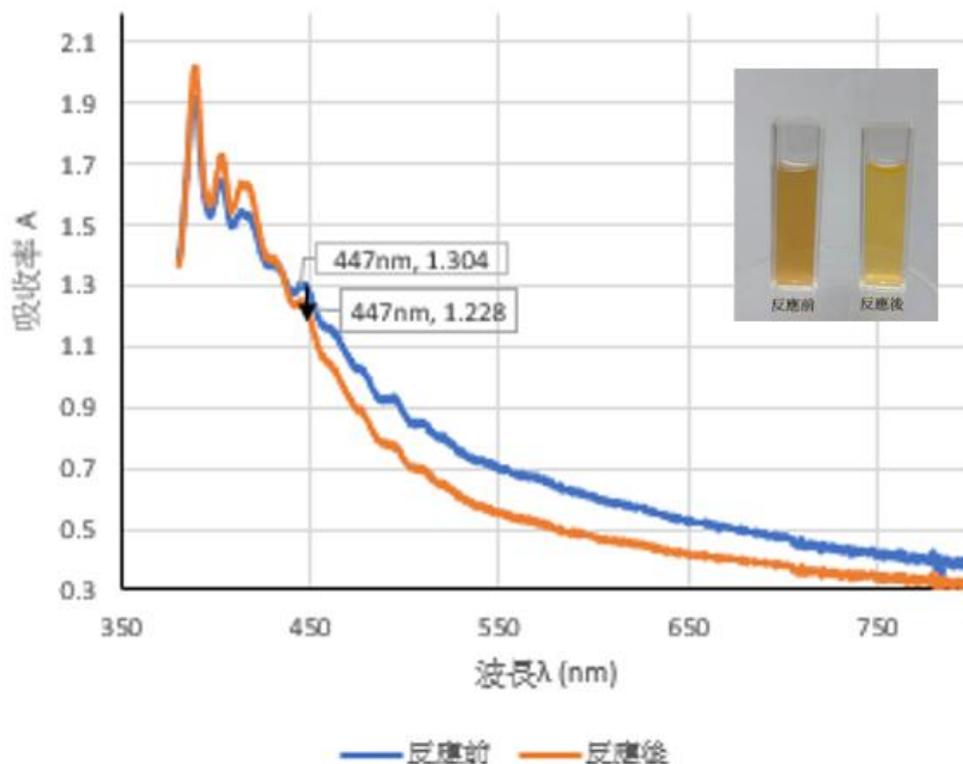
(二) 證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應

1. 市售葉黃素飲在芬頓試劑反應前後萃取有機層之吸收光譜圖



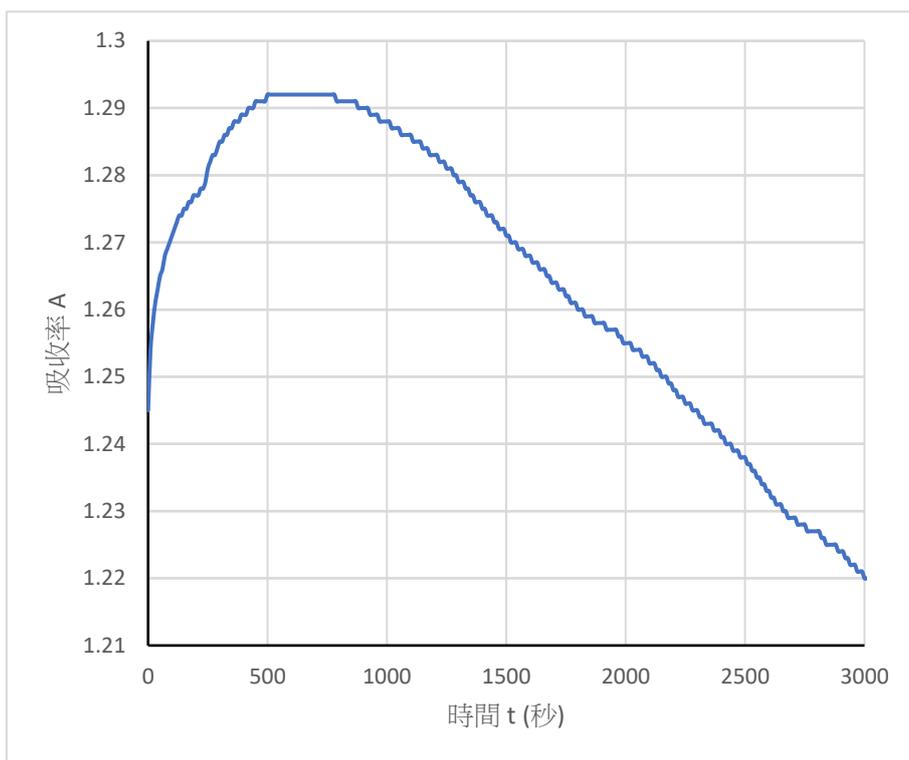
圖十四 市售葉黃素飲在芬頓試劑反應前後萃取有機層吸收光譜

2. 光譜儀測量市售葉黃素飲在芬頓試劑反應前後之吸收光譜圖



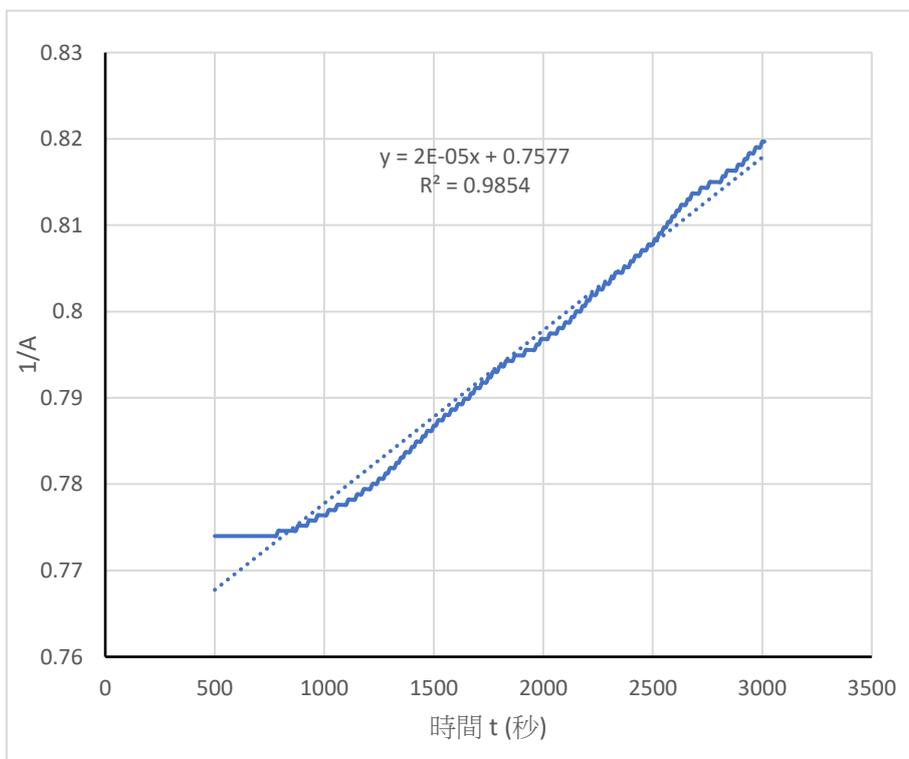
圖十五 市售葉黃素飲在芬頓試劑反應前後吸收光譜圖與溶液顏色

3.(1)葉黃素飲稀釋 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ ，在波長 447nm，每 10 秒偵測 1 次吸收率



圖十六 葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$

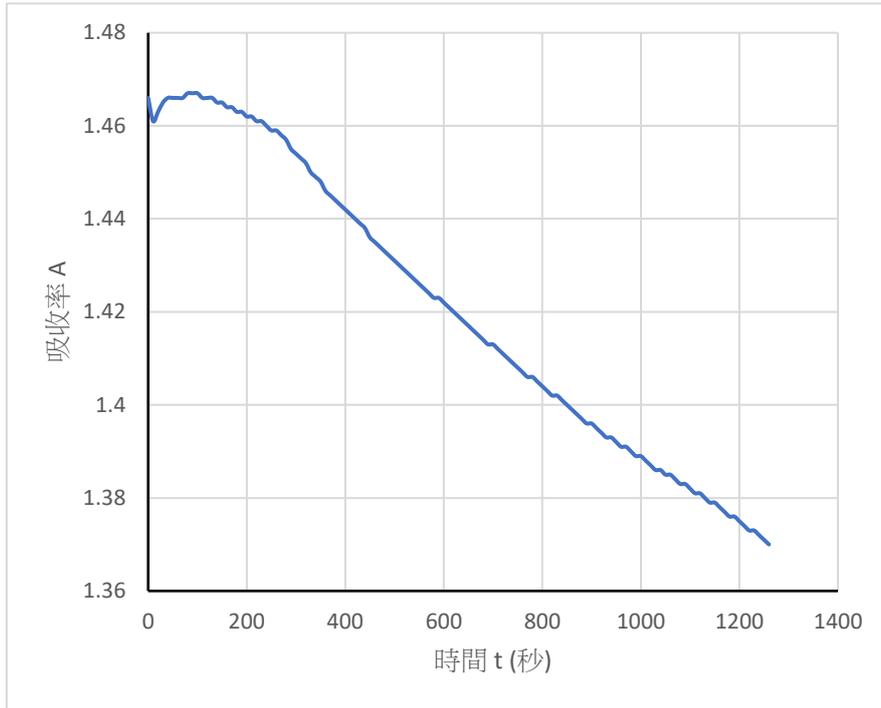
(2)將吸收率 A 值倒數為 $1/A$ 為縱坐標，時間 t 為橫坐標



圖十七 葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ 得直線方程式，其斜率 = 2×10^{-5} ，速率常數值 $k = 2 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$

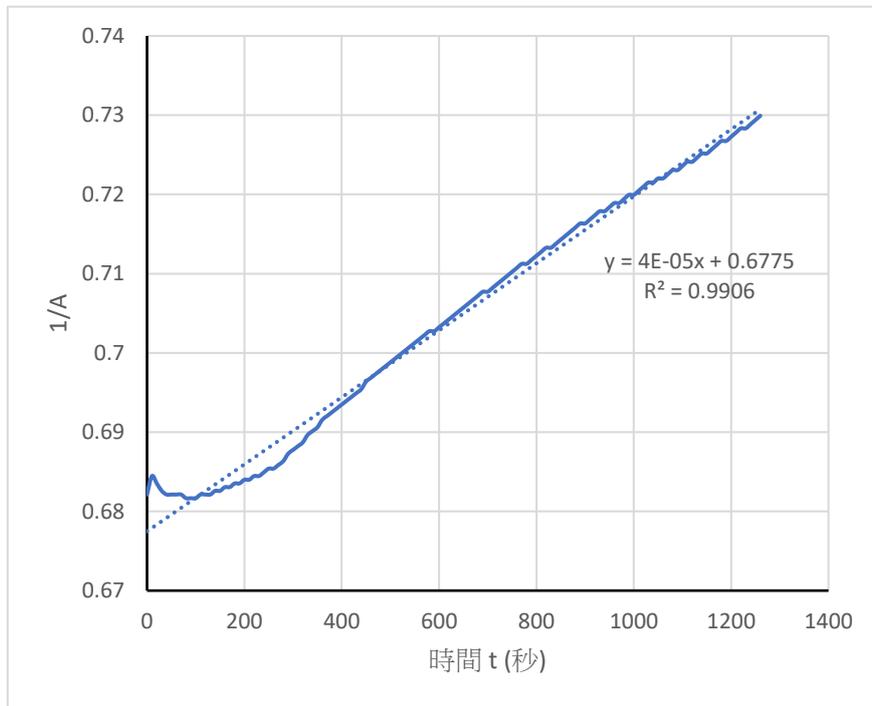
(四) 市售葉黃素飲與不同條件芬頓試劑反應

1.(1)葉黃素飲稀釋 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$ ，在波長 447nm，每 10 秒偵測 1 次吸收率



圖十八 葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$

(2)將吸收率 A 值倒數為 $1/A$ 為縱坐標，時間 t 為橫坐標

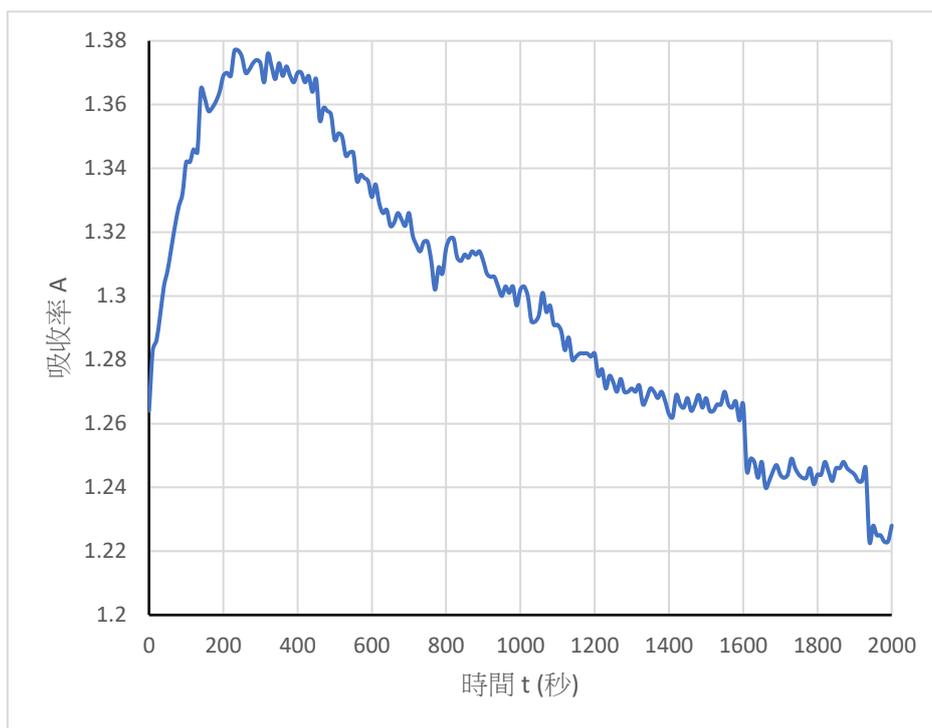


圖十九 葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 1M$

得直線方程式，其斜率 = 4×10^{-5} ，速率常數值 $k = 4 \times 10^{-5}$

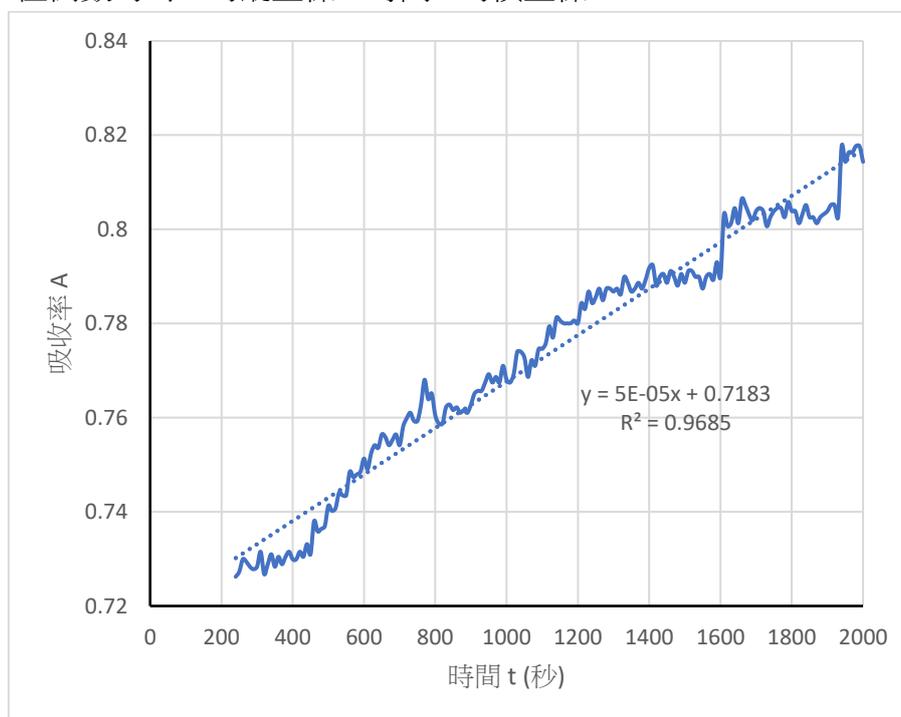
(3)三次實驗的速率常數值分別為 $2 \times 10^{-5} 1/Ms$ 、 $4 \times 10^{-5} 1/Ms$ 、 $3 \times 10^{-5} 1/Ms$ ，故其平均速率常數值 = $3 \times 10^{-5} 1/Ms$

2.(1)葉黃素飲稀釋 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 1M$ ，在波長 447nm，每 10 秒偵測 1 次吸收率



圖二十 葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 1M$

(2)將吸收率 A 值倒數為 $1/A$ 為縱坐標，時間 t 為橫坐標

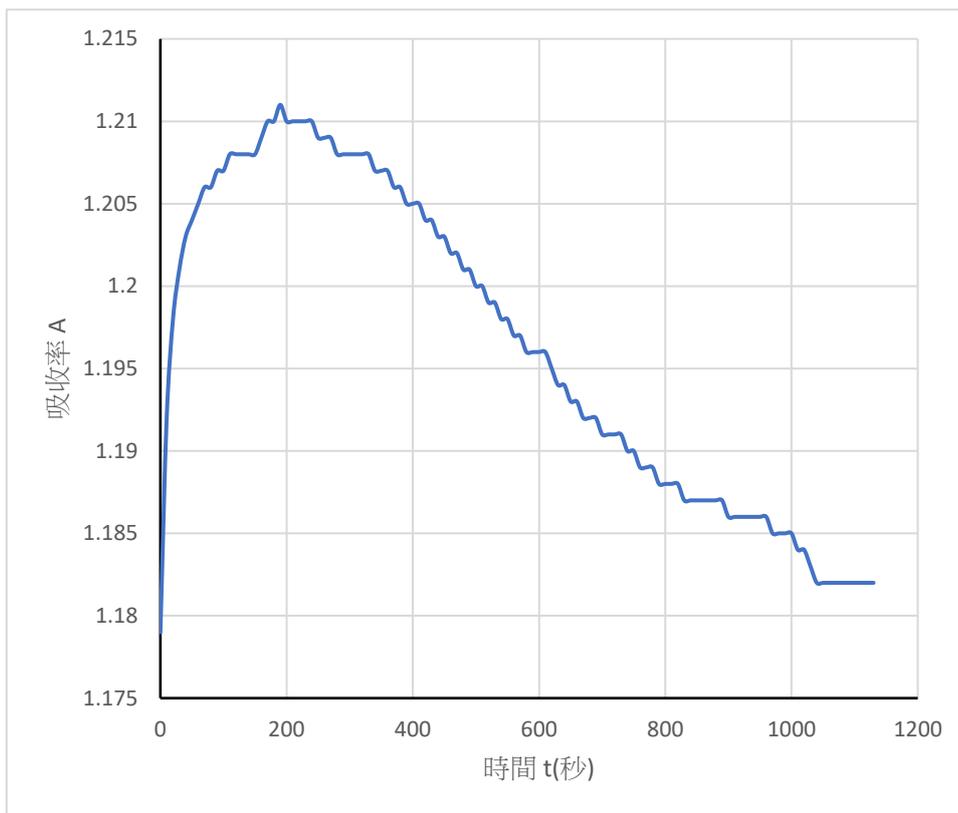


圖二十一 葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 1M$

得直線方程式，其斜率 = 5×10^{-5} ，速率常數值 $k = 5 \times 10^{-5} 1/Ms$

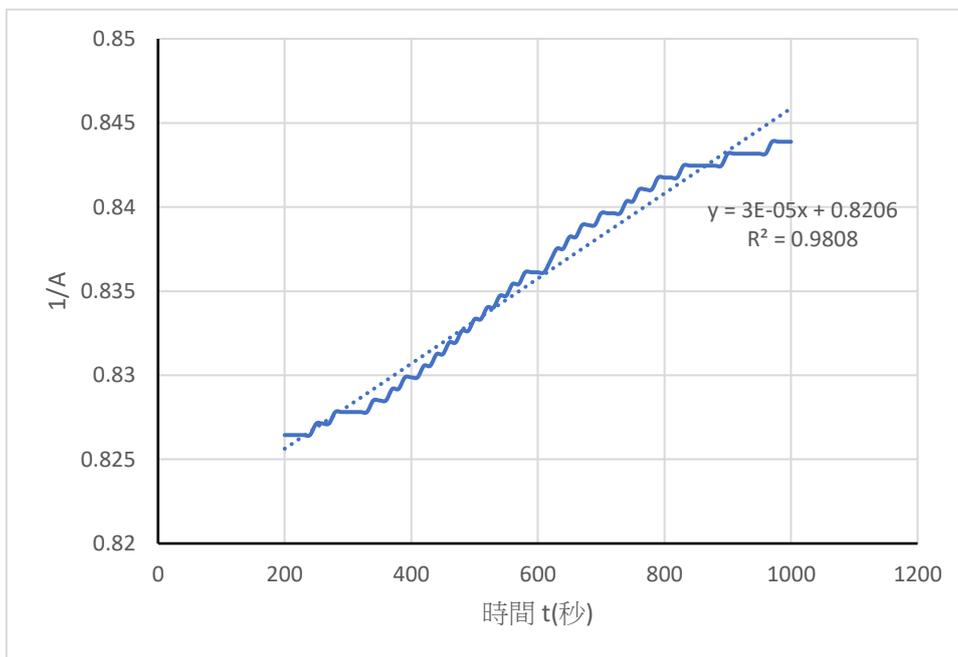
(3)三次實驗的速率常數值分別為 $5 \times 10^{-5} 1/Ms$ 、 $4 \times 10^{-5} 1/Ms$ 、 $5 \times 10^{-5} 1/Ms$ ，故其平均速率常數值 = $4.6 \times 10^{-5} 1/M$

3.(1)市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.523\text{M}$ ，在波長 447nm，每 10 秒偵測 1 次吸收率



圖二十二 葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.523\text{M}$

(2)將吸收率 A 值倒數為 $1/A$ 為縱坐標，時間 t 為橫坐標

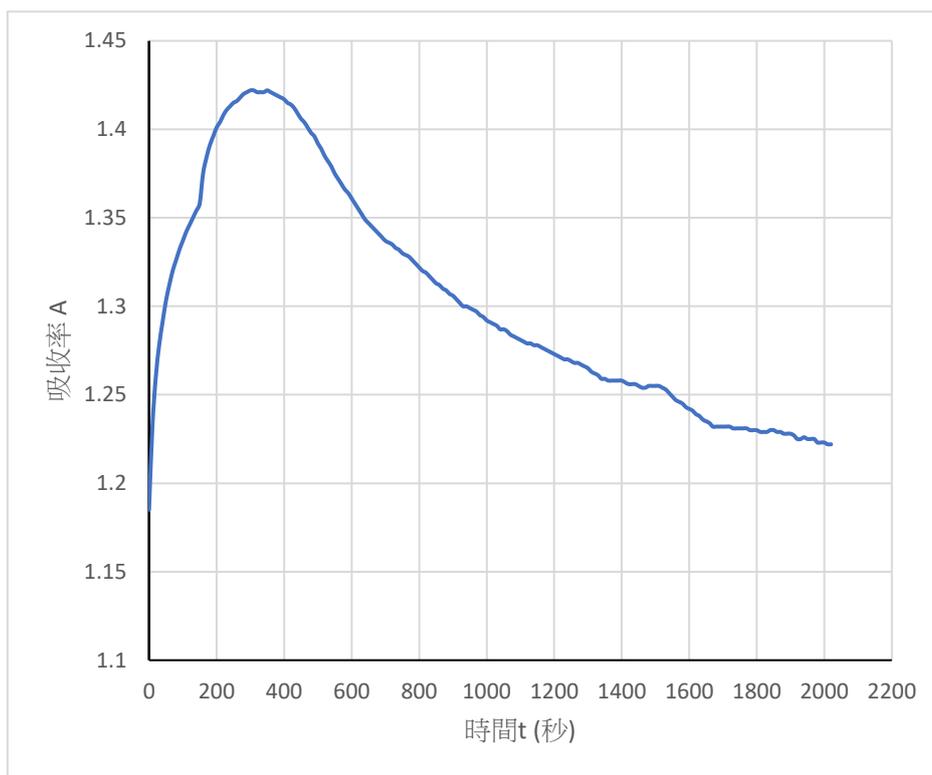


圖二十三 葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.523\text{M}$

得直線方程式，其斜率 = 3×10^{-5} ，速率常數值 $k = 3 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$

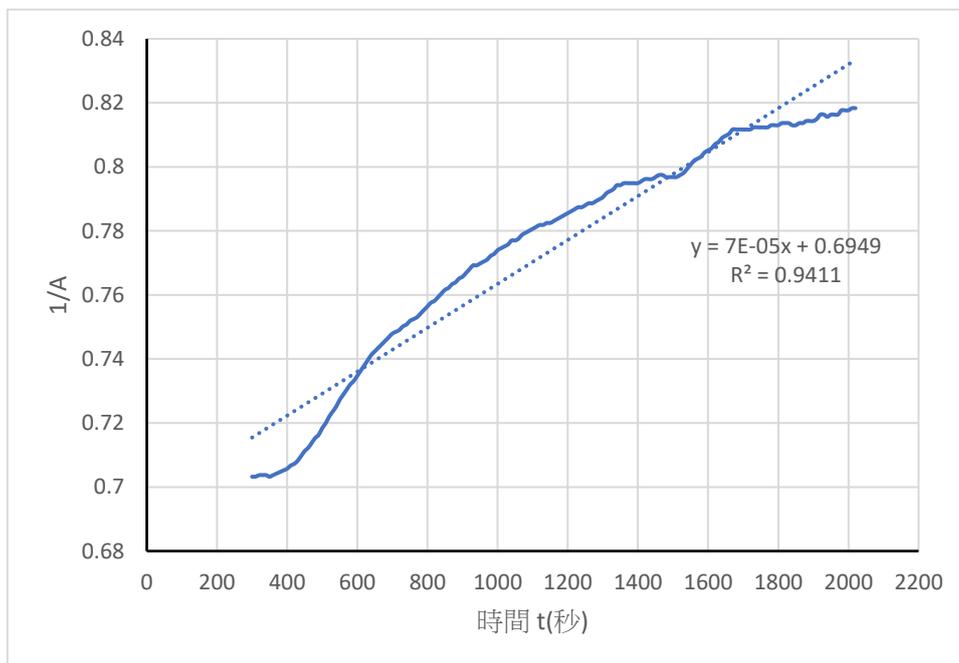
(3)三次實驗的速率常數值分別為 $3 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$ 、 $2 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$ 、 $3 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$ ，故其平均速率常數值 = $2.67 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$

4.(1)市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.243\text{M}$ ，在波長 447nm，每 10 秒偵測 1 次吸收率



圖二十四 市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.243\text{M}$

(2)將吸收率 A 值倒數為 $1/A$ 為縱坐標，時間 t 為橫坐標

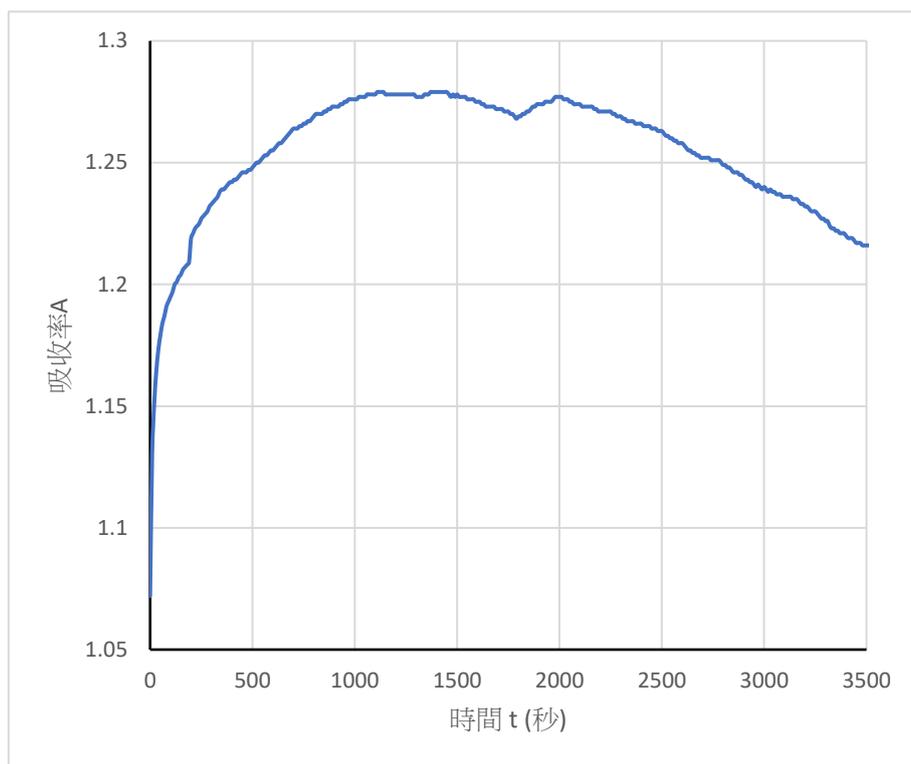


圖二十五 市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.243\text{M}$

得直線方程式，其斜率 = 7×10^{-5} ，速率常數值 $k = 7 \times 10^{-5}$

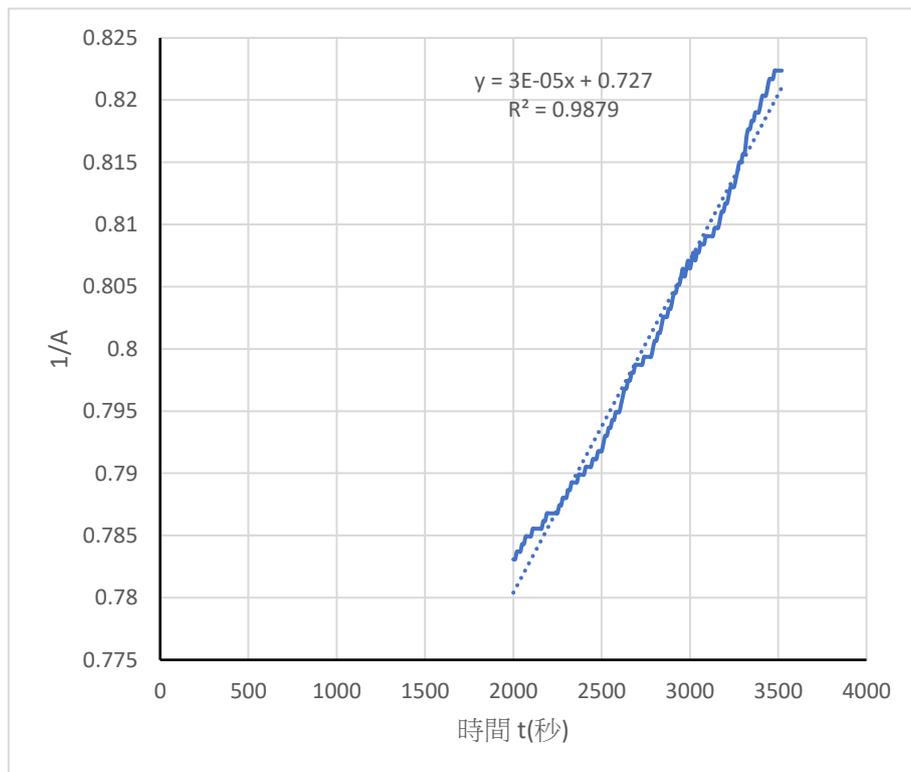
(3)三次實驗的速率常數值分別為 $7 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$ 、 $2 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$ 、 $3 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$ ，故其平均速率常數值 = $2.67 \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$

5.(1)市售葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH=0.33$ 在波長 447nm，每 10 秒偵測 1 次吸收率



圖二十六 葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH=0.33$

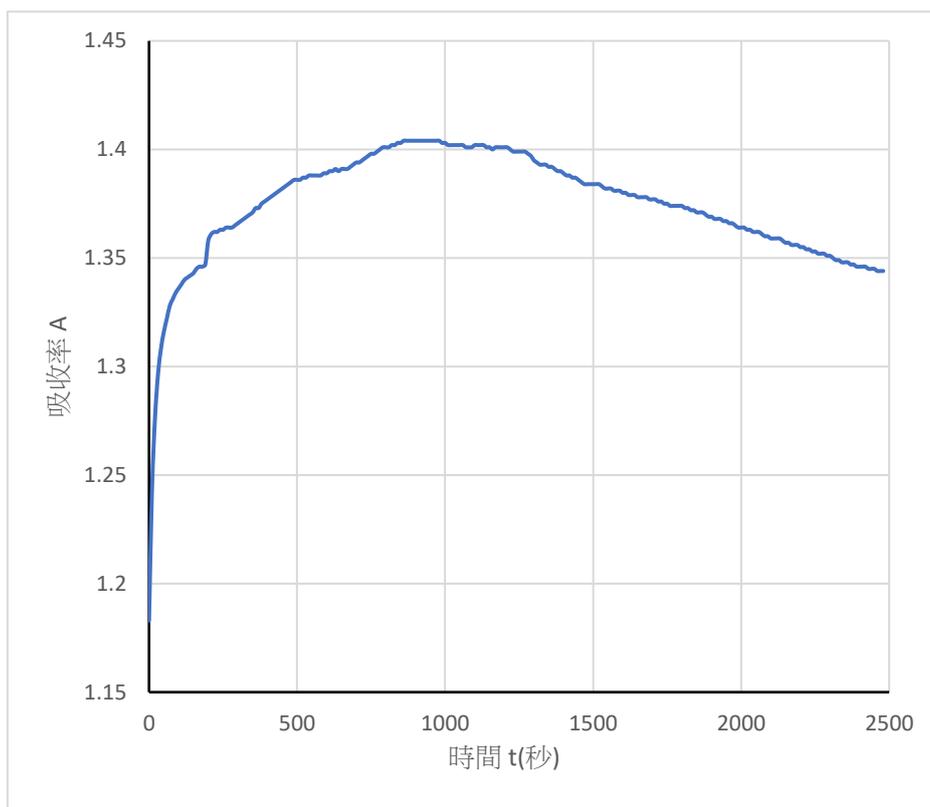
(2)將吸收率 A 值倒數為 $1/A$ 為縱坐標，時間 t 為橫坐標



圖二十七 葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH=0.33$

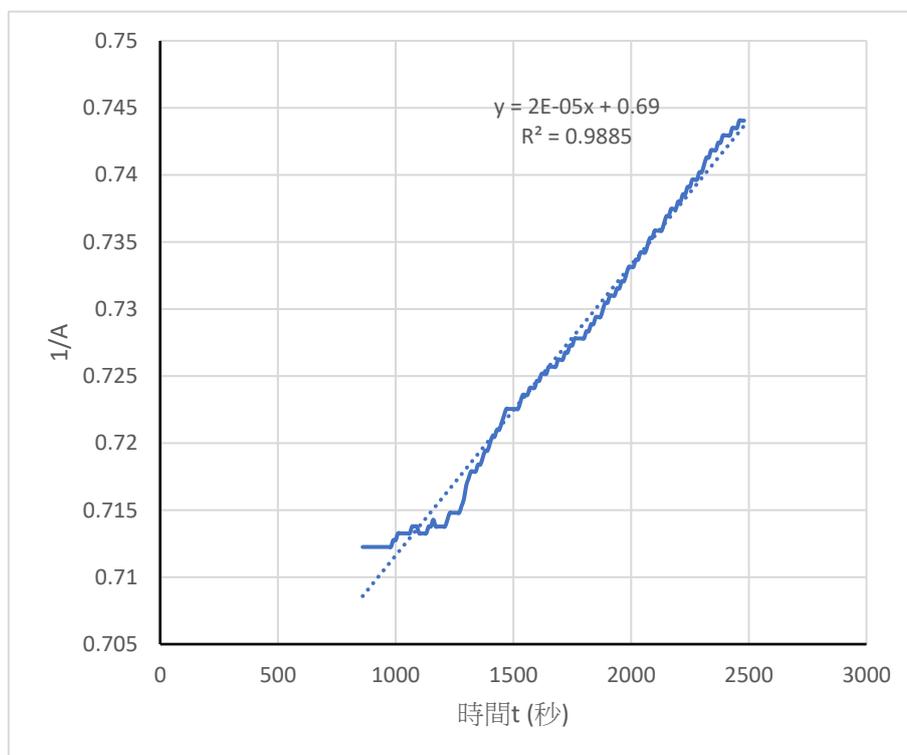
得直線方程式，其斜率 $= 3 \times 10^{-5}$ ，速率常數值 $k = 3 \times 10^{-5} 1/Ms$

6.(1)葉黃素飲稀釋 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH=1.09$ 在波長 447nm，每 10 秒偵測 1 次吸收率



圖二十八 葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH=1.09$

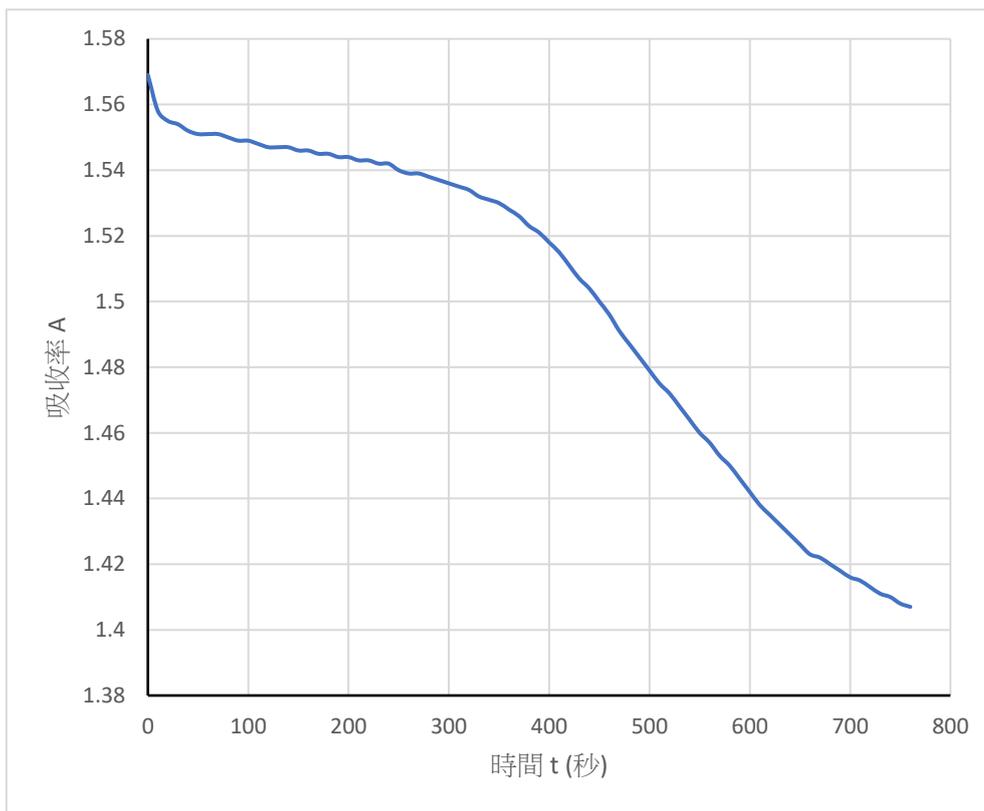
(2)將吸收率 A 值倒數為 $1/A$ 為縱坐標，時間 t 為橫坐標



圖二十九 葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH=1.09$

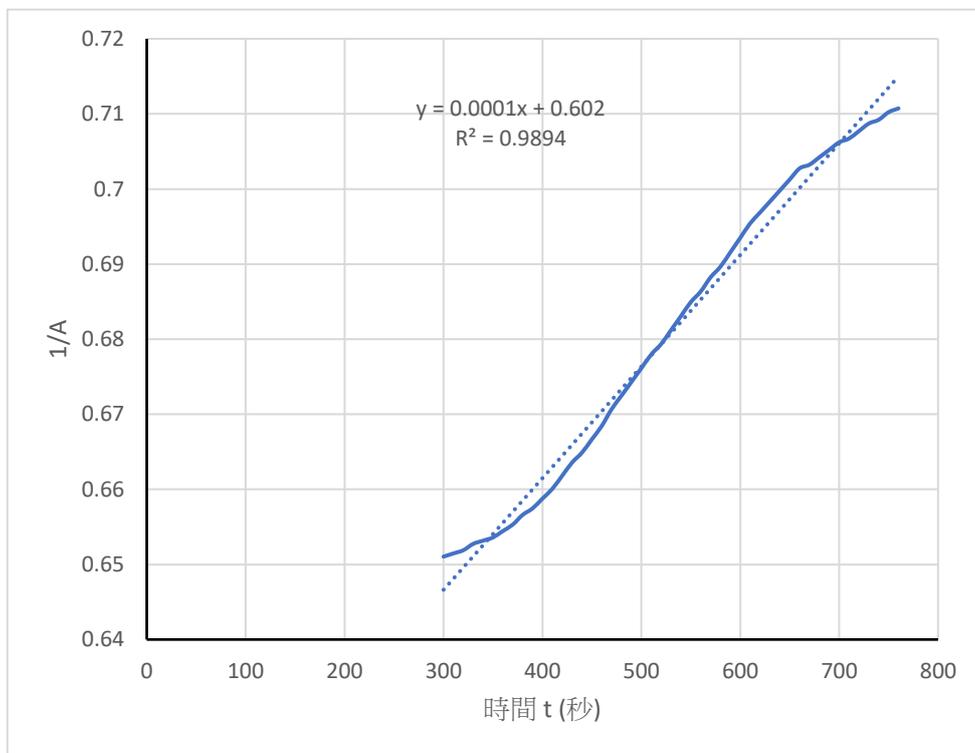
得直線方程式，其斜率 $= 2 \times 10^{-5}$ ，速率常數值 $k = 2 \times 10^{-5} 1/Ms$

7.(1)市售葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.01\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ ，在波長 447nm，每 10 秒偵測 1 次吸收率



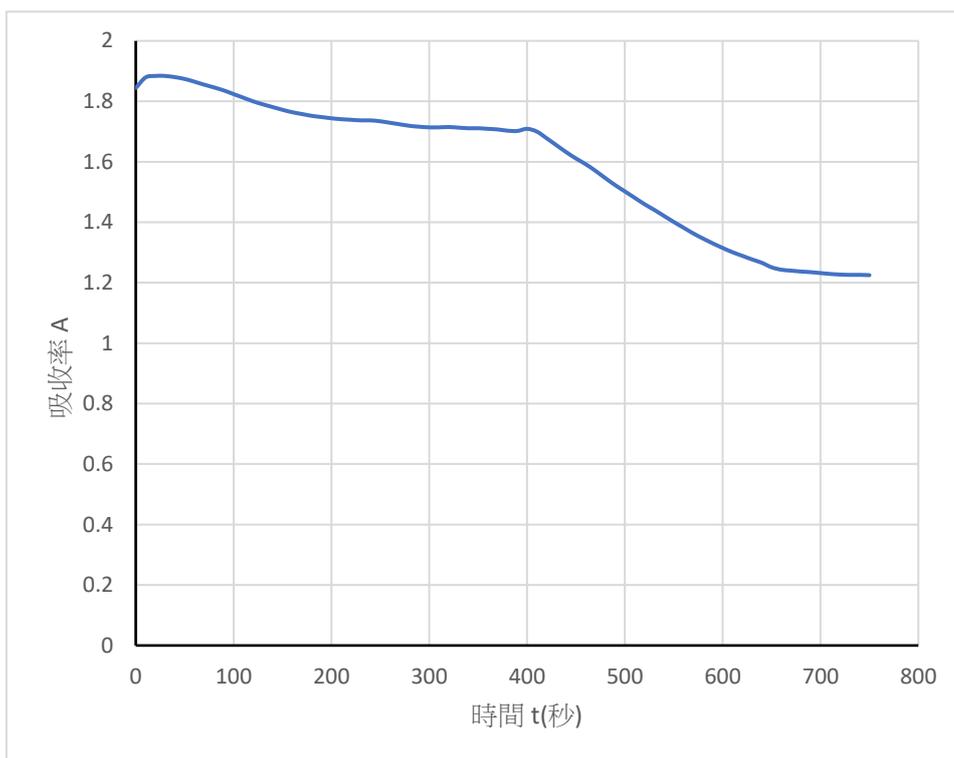
圖三十 葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.01\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$

(2)將吸收率 A 值倒數為 $1/A$ 為縱坐標，時間 t 為橫坐標



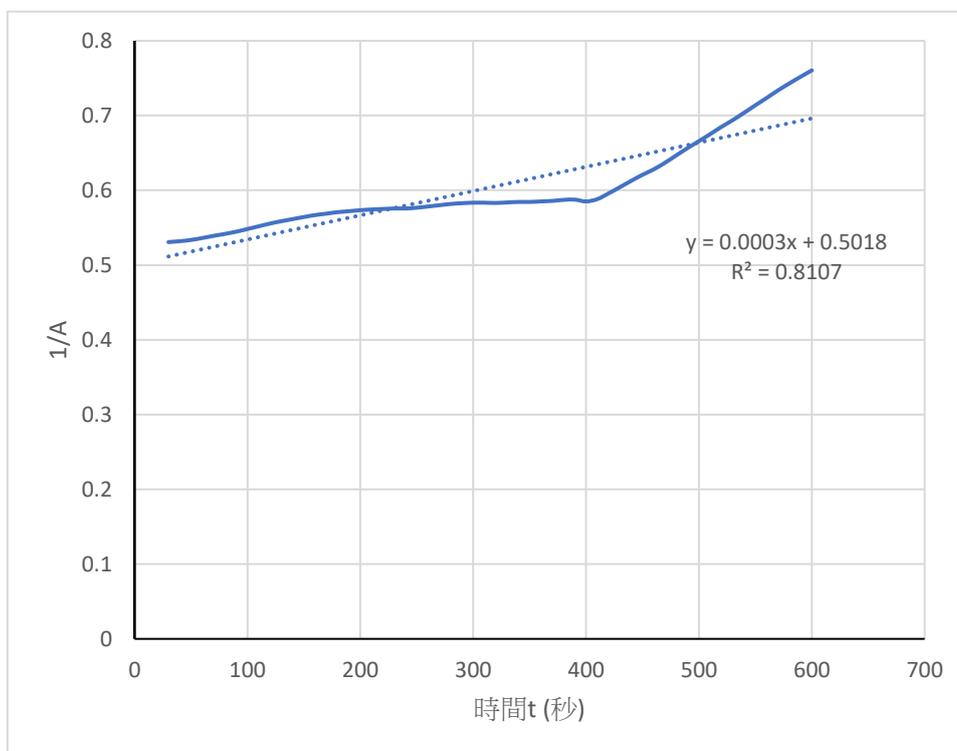
圖三十一 葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.01\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ 得直線方程式，其斜率 $= 1 \times 10^{-4}$ ，速率常數值 $k = 1 \times 10^{-4} \text{ 1/Ms}$

8.(1)葉黃素飲稀釋 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.02\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ ，在波長 447nm，每 10 秒偵測 1 次吸收率



圖三十二 葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.02\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$

(2)將吸收率 A 值倒數為 $1/A$ 為縱坐標，時間 t 為橫坐標



圖三十三 葉黃素飲 25%、 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.02\text{M}$ 、 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ 得直線方程式，其斜率 = 3×10^{-4} ，速率常數值 $k = 3 \times 10^{-4} \text{ 1/Ms}$

伍、討論

一、分析市售葉黃素飲的成分

(一) 市售葉黃素飲中是否含有葉黃素

市售的葉黃素飲倒入燒杯中，外觀呈現橘紅色的黏稠狀，如圖三十四中的右邊，其產品成分標示為自由型液態葉黃素，其實就是 lutein，但是，葉黃素 (lutein) 是脂溶性，不會溶解在水中，才會以糊精包裹脂溶性的葉黃素，混合黑醋栗濃縮果汁使其均勻懸浮分散於水中，容易被人體所吸收，藉由血液，運送到眼球。為確定市售葉黃素飲確實含有葉黃素，取 40mL 市售葉黃素飲於分液漏斗中，先以 10mL 有機溶劑丙酮萃取，雖然葉黃素可溶於丙酮，但因市售葉黃素飲中有糊精，丙酮與糊精兩者混合成均勻的懸浮液，不易分層，於是再加入 30mL 正己烷，正己烷為非極性有機溶劑，丙酮更易溶於正己烷中，馬上分成上下兩層，並且上層是有機層呈現黃色，推測應該是丙酮與正己烷將葉黃素溶出，以樣本瓶收集上層的有機層，外觀如圖三十四左邊，再以光譜儀測量吸收光譜，得圖十。



圖三十四 萃取市售葉黃素飲前後（左邊：萃取後、右邊：市售葉黃素飲）

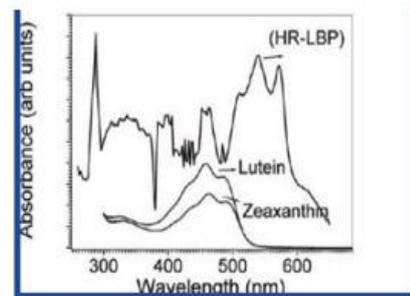
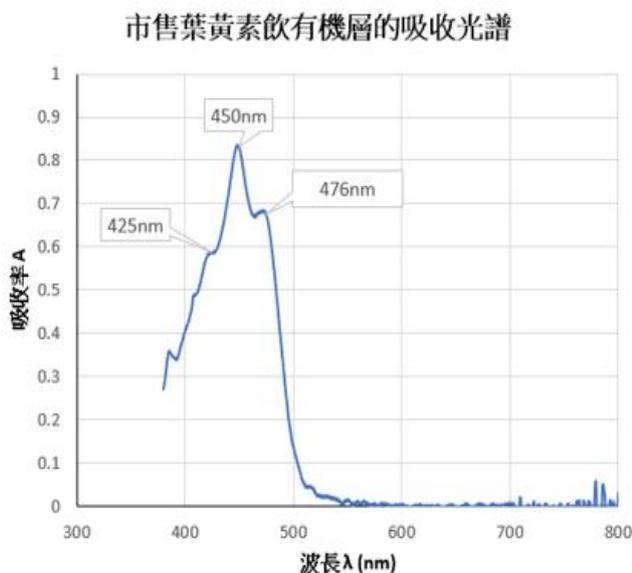


FIGURE 1: Elution pattern of HR-LBP on a silica gel size-exclusion chromatographic column. Contour view of the online photodiode array scans performed at 0.5 s intervals during the chromatographic purification of HR-LBP (upper panel). Absorbance spectrum of purified HR-LBP eluting from the silica gel column at 11 min compared with that of (3R,3'R)-zeaxanthin and (3R,3'R,6'R)-lutein standards dissolved in THF (lower panel). There is a bathochromic shift of the absorbance peaks of HR-LBP (507, 537, 589 nm) relative to zeaxanthin (425, 456, 478 nm) and lutein (425, 450, 476 nm).

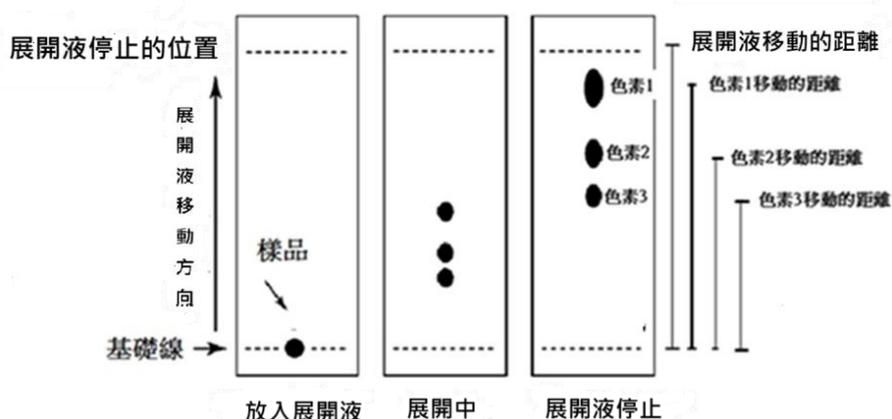
圖三十五 比較萃取後的葉黃素飲（左圖）與文獻葉黃素 lutein⁵（右圖）吸收光譜於圖十的吸收光譜標示出在波長 476nm、450nm、425nm 皆有吸收峰，與文獻報導 lutein⁵

吸收光譜放在一起比較，如圖三十五所示，文獻⁵的 lutein 於 425nm、450nm、476nm 應是長鏈共軛雙鍵特有的吸收峰，證明市售葉黃素飲確實含有葉黃素 lutein，萃取後外觀呈現黃色，而在未萃取前的橘紅色外觀，應該是黑醋栗果汁的顏色將黃色的葉黃素遮蔽。

(二) 濾紙色層分析法分析市售葉黃素飲中的葉黃素

利用色素在濾紙上吸附力的差異，會隨著展開液（移動相）在濾紙（固定相）上的向上移動而有分離的效果，以色素點與基礎線的距離為分子而展開液移動距離為分母，求出 Retention factor(Rf)值，如式七，藉由色素 Rf 值，簡易判別是否為同一種物質的方法，稱為濾紙色層分析法⁶，如圖三十六的說明，本次實驗選取正己烷（非極性）與乙酸乙酯（極性）

$$Rf = \frac{\text{色素點與基礎線的距離}}{\text{展開液移動距離}} \quad (\text{式七})$$



圖三十六 濾紙色層分析法說明

此兩種有機溶劑，以量筒量取不同體積，做為不同極性比例的展開液，濾紙色層分析市售葉黃素飲的葉黃素在這些展開液的位置，結果如圖八，可以發現：

表一 市售葉黃素飲的葉黃素在不同展層液的 Rf 值

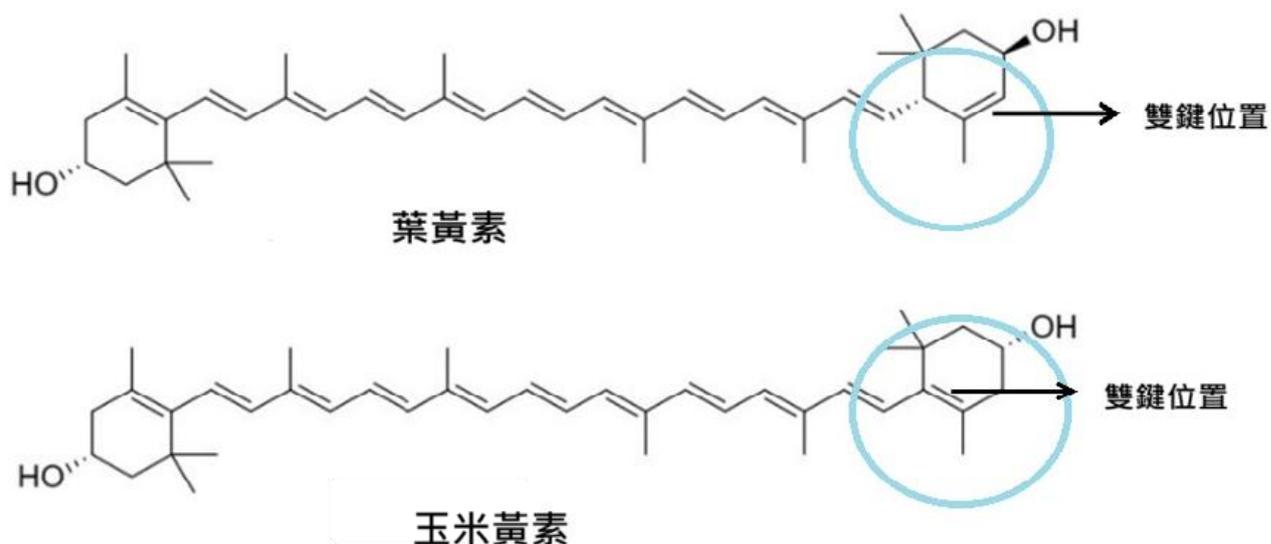
展層液比例	正己烷 (100%)	乙酸乙酯 (100%)	正己烷：乙酸乙酯 =1：1	正己烷：乙酸乙酯 =2：1	正己烷：乙酸乙酯 =5：1	正己烷：乙酸乙酯 =10：1	正己烷：乙酸乙酯 =20：1
Rf 值	0	1	1	0.96	0.62 0.52	0.37 0.23	0.14 0.05

1. 展開液只有正己烷，葉黃素的色素點幾乎消失，濾紙從展開槽拿起時，還可以看到微弱的黃色點，在基礎線上，當展開液揮發完全時，濾紙已經乾了，在濾紙上已經完全看不到黃色點，推測可能以毛細管點在濾紙上的葉黃素量太少，同時葉黃素溶於正己烷的展開液中，黃色的點消失，不過，可以得知，葉黃素在非極性的正己烷，幾乎不會移動。

2. 展開液只有乙酸乙酯時，葉黃素的點，會隨著極性大乙酸乙酯展開液一起向上移動，葉黃素

的點，變成長條點，黃色點應該有兩種葉黃素。

3.從 1.與 2.可以發現，葉黃素在非極性的正己烷不移動，隨極性大的乙酸乙酯一起移動，調整展開液正己烷與乙酸乙酯的比例，分別為 1：1、2：1、5：1、10：1、20：1，當正己烷與乙酸乙酯的比例 1：1 時，葉黃素都與展開液一起移動，其 Rf 值為 1（如表一），而當正己烷與乙酸乙酯的比例 2：1 時，其 Rf 值為 0.96。表示展開液的極性要降低，於是調整增加非極性正己烷比例，展開液正己烷與乙酸乙酯的比例為 5：1、10：1、20：1，在圖八中就有兩點分離黃色的點，上方黃色的點，顏色明顯，在黃色點的下方，另有一微弱的顏色，為與葉黃素有相同分子式的異構物，稱為玉米黃素(Zeaxanthin)，如圖三十七的葉黃素與玉米黃素分子結構，與葉黃素的唯一差異在於右端環內雙鍵的不同位置如箭號所示。市售葉黃素飲的標示上，有標示葉黃素與玉米黃素比為 5：1。所以濾紙上顏色比較淡，故在展開液正己烷與乙酸乙酯的比例為 5：1、10：1、20：1，就有兩個 Rf 值，如表一，Rf 值大為葉黃素，Rf 值小為玉米黃素。由表一中，展開液正己烷與乙酸乙酯的比例為 5：1 分離葉黃素與玉米黃素較佳。在圖十光譜圖不易發現兩者差異，葉黃素的特定吸收峰波長（425nm、450nm、476nm）與玉米黃素的特定吸收波長（425nm、456nm、476nm），幾乎一致，重疊在一起，不易分辨。



圖三十七 比較葉黃素與玉米黃素的分子結構¹⁰

（三）濾紙色層分析法比較菠菜汁、市售葉黃素飲與市售葉黃素膠囊，不同比例展開液

藉由濾紙色層分析法，分析富含葉黃素的菠菜與市售葉黃素膠囊，比較與市售葉黃素飲，是否含有相同種類的葉黃素，先以有機溶劑丙酮將菠菜的色素溶解出，而市售葉黃素膠囊也是將膠囊剪開，以丙酮溶解。毛細管點在濾紙上的樣品分別是溶於丙酮的菠菜、萃取的市售葉黃素飲與溶於丙酮的葉黃素膠囊，其展開液分別為正己烷與乙酸乙酯的比例，分別為 5：1、10：1、20：1，其結果如圖九，計算其葉黃素 Rf 值，整理如表二，由圖九與表二我們得知，菠菜汁、葉黃素的膠囊，都與市售葉黃素飲一樣，展開液正己烷與乙酸乙酯不同比例，濾紙色層分析圖都可發現兩個黃色的點，其 Rf 值比較大，顏色深，為葉黃素；Rf 值小，顏色淺，

為玉米黃素。同比例展開液，Rf 值很接近，說明菠菜、葉黃素膠囊中，皆含有與市售葉黃素飲相同的葉黃素及玉米黃素。

表二 菠菜、市售葉黃素飲、葉黃素膠囊中的葉黃素於不同展開液 Rf 值

展層液比例 各物質 葉黃素 Rf 質	正己烷：乙酸乙酯 = 5：1	正己烷：乙酸乙酯 = 10：1	正己烷：乙酸乙酯 = 20：1
菠菜汁	0.82	0.32	0.32
	0.64	0.2	0.23
市售葉黃素飲	0.8	0.35	0.29
	0.72	0.22	0.19
葉黃素膠囊	0.79	0.34	0.3
	0.66	0.21	0.17

美國哈佛大學在 1994 年研究發現每天攝取 6 毫克葉黃素可減低老年性黃斑部退化，其根據研究結果建議，一般人日常應該攝取 6~10 毫克的葉黃素¹¹。菠菜是綠色蔬菜中含有葉黃素最高，文獻報導⁸，食用 100 克的菠菜，可獲得 5.6 毫克的葉黃素，不過冬季才有產菠菜，直接引用葉黃素飲，是最快獲取葉黃素的方式，較不受時間季節限制，如圖三十八所示，一瓶葉黃素飲容量 60 毫升，含有葉黃素 8 毫克及玉米黃素 1.6 毫克就可達一日所需的量。而市售葉黃素膠囊則以膠囊包覆脂溶性葉黃素，剪刀將膠囊剪開再擠出液態葉黃素，須以大量的有機溶劑丙酮溶解，濃度很高，進行濾紙色層分析實驗時，毛細管只點一次，黃色色素點顏色很深，展開液往上移動時，黃色色素點會拖，表示濃度很高，所以藉由直接吞食來獲得葉黃素，但是脂溶性的葉黃素，水溶性差，需藉由其溶於其他的油脂，才能被人體吸收，所以會標示於飯後服用。從市售葉黃素飲在萃取葉黃素時，葉黃素含量就沒有膠囊的葉黃素高，但是與糊精混合，可均勻分散懸浮在水溶液，藉由人體的消化之後，應該比較容易被人體直接吸收。推測要有油脂，葉黃素才能被人體消化吸收，應該與葉黃素混著糊精的效果相同。



圖三十八 市售葉黃素飲成分標示

(四) 市售葉黃素飲稀釋不同濃度吸收光譜

市售的葉黃素飲，外觀呈現橘紅色的黏稠狀，這是因為葉黃素混著糊精與黑醋栗汁，才能懸浮於水溶液之中，原汁太黏稠，無法直接測量，加水稀釋至可測量的濃度。我們發現，將原汁加水稀釋至原濃度倍率 25%，如圖十一中，在波長 447nm 有一個明顯吸收峰。隨著稀釋成更低濃度，在 447nm 吸收峰更為明顯，黑醋栗汁的干擾減小。與圖十的葉黃素溶於正己烷與丙酮比較，我們認為在水溶液的 447nm 吸收峰，應該是圖十葉黃素於有機溶劑中最大吸收率 450nm 吸收峰，這是因為溶劑不同，吸收峰波長會偏移數個奈米。

二、探究市售葉黃素飲與芬頓試劑反應，證明市售葉黃素具有抗氧化的能力，具有保護眼睛重要功能，及其反應速率之動力學研究

(一) 過錳酸鉀滴定雙氧水

芬頓試劑為亞鐵離子 Fe^{2+} 加入過氧化氫 H_2O_2 ，反應為亞鐵離子催化過氧化氫分解成氧氣與水，為確定加入雙氧水中過氧化氫的濃度，我們利用已知濃度過錳酸鉀滴定雙氧水，其反應方程式為式八



以 1M 的硫酸水溶液將雙氧水 5mL 稀釋成 50mL，置於錐形瓶。同時以去離子水與 1M 硫酸水溶液配置成 $[KMnO_4] = 0.233M$ ，放在滴定管中。紫紅色的過錳酸鉀滴入含有過氧化氫錐形瓶中，如圖七所示，過錳酸鉀在酸性環境將過氧化氫氧化成氧氣，瞬間變成無色。當滴入 95mL 過錳酸鉀溶液時，溶液呈粉紅色，表示已達滴定終點，計算雙氧水在稀釋前的 $[H_2O_2] = 11M$ ，日後芬頓試劑過氧化氫的濃度就為 11M。

(二) 不同濃度硫酸銨亞鐵吸收光譜

硫酸銨亞鐵配置成水溶液時，外觀呈淡黃色，光譜儀測其吸收光譜，在波長 450nm 處有吸收峰，將溶液稀釋配製成不同濃度，測其吸收光譜，如圖十二所示。以 450nm 的吸收率為縱座標，硫酸銨亞鐵為橫坐標做檢量線，如圖十三，其直線的線性相關係數 R^2 可達 0.98，表示此波長確實為亞鐵離子的特定吸收，但是與葉黃素在水溶液的吸收波長 447nm 太靠近，不過，芬頓試劑中的亞鐵離子是催化劑，濃度不用太高，故使用芬頓試劑時，最佳的亞鐵濃度為 0.005M，並且將此濃度代入圖十三的檢量線，其吸收率 A 為 0.067，對葉黃素的吸收率影響不大。

(三) 證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應

市售葉黃素飲稀釋倍率成 25%， $[Fe^{2+}] = 0.005M$ ，混合液 40mL，以 10mL 丙酮與 30mL 正己烷萃取葉黃素，光譜儀測其吸收光譜如圖十四藍色線為反應前。同時取稀釋倍率 25% 市售葉黃素飲， $[Fe^{2+}] = 0.005M$ ，混合液 40mL，再加入 3mL， $[H_2O_2] = 11M$ 的雙氧水，於反應 3100 秒後，再以 10mL 丙酮與 30mL 正己烷萃取葉黃素，光譜儀其吸收光譜如圖十四橘色線為反應後。比較市售葉黃素飲與芬頓試劑反應前後，葉黃素特定吸收波長 450nm 吸收率 A 由 1.105 降至 0.77。同時也利用光譜儀偵測葉黃素飲與芬頓試劑的反應，取相同稀釋倍率 25%

市售葉黃素飲， $[Fe^{2+}] = 0.005M$ ，混合液 4mL 置於比色管中，測量與芬頓試劑反應前的光譜圖如圖十五藍色線，加入 $300 \mu L$ ， $[H_2O_2] = 11M$ 的雙氧水，於反應 3100 秒後，停止偵測，並再測量與反應後的光譜圖，如圖十五橘色線，反應 3100 秒後，於波長 447nm，吸收率 A 也是由 1.304 降至 1.228，溶液的顏色由淺橘變成淡黃色，還有氣泡產生。這兩種方式都表示市售葉黃素飲中的葉黃素濃度降低，葉黃素確實能與芬頓試劑的自由基反應，分解斷鏈成小分子，證明葉黃素確實能作為抵抗自由基的抗氧化劑，保護我們的眼睛不受自由基的氧化而老化。

也配製 $[Fe^{3+}] = 0.005M$ 、稀釋倍率 25%市售葉黃素飲，加入過氧化氫 H_2O_2 水溶液，但經 3100 秒後，沒有反應，所以生成芬頓試劑，仍需以亞鐵離子 Fe^{2+} ，才能產生自由基如式一，鐵離子 Fe^{3+} 只能在產生自由基後，才能有作用。

(四) 探究市售葉黃素飲與不同條件芬頓試劑反應之動力學研究

由於市售葉黃素飲很黏稠，原汁無法直接與芬頓試劑反應，需倒出加水稀釋，多次實驗，如稀釋至濃度倍率 40%或 50%，無法與芬頓試劑反應。多次將市售葉黃素飲加水稀釋至原濃度不同倍率，以稀釋 25%為與芬頓試劑最佳反應濃度。故取已稀釋倍率 25%市售葉黃素飲， $[Fe^{2+}] = 0.005M$ ，混合液 4mL 置於比色管中，光譜儀設定在波長 447nm，加入 $300 \mu L$ ， $[H_2O_2] = 11M$ 的雙氧水，每隔 10 秒偵測波長 447nm 的吸收率 A，於反應 3100 秒後，停止偵測如圖十六為葉黃素隨時間與吸收率 A 的圖形，一開始的吸收率 A 是在增加中，推測可能是中間產物，於波長 447nm 有吸收，吸收率 A 先增高，在反應 500 秒之後，吸收率 A 才開始降低，葉黃素減少，此時才是葉黃素被分解反應⁹。我們嘗試將圖十六的吸收率 A 值，以 Excel 處理成倒數，為 $1/A$ ，並以 $1/A$ 為縱座標，以時間 t 為橫坐標，且選取時間 t 為 500 秒以後，得直線方程式如圖十七，其直線的線性相關係數 R^2 可達 0.98，在化學動力學中，化學反應是二級反應才有的線性關係。因為在二級反應裡，反應物濃度與時間關係式如式九⁷

$$\frac{1}{[C]} = \frac{1}{[C]_0} + kt \quad (\text{式九})$$

另外，根據比爾定律，如式十

$$A = \epsilon \cdot b \cdot [C] \quad (\text{式十})$$

吸收率是 A，

ϵ 與樣品在特定的波長下的吸光能力有關，稱為莫耳消光係數單位為 $1/M \cdot cm$ ，

b 是光穿過比色管的路徑長度，單位使用 cm，

$[C]$ 是樣品中吸光物質的濃度，單位使用 $mol/L = M$ ，

所以 $[C] = \frac{A}{\epsilon \cdot b}$ (式十一) 表示

$$\text{可寫成} \quad \frac{1}{A/\epsilon b} = \frac{1}{A_0/\epsilon b} + kt \quad (\text{式十二})$$

所以 $1/A$ 與時間 t 有線性關係時，其中直線的斜率 k，如式十二中就為反應速率式中的速率常

數 k (單位為 $1/M \cdot s$)。並且 Basu⁴ 等人中, 利用 Electrospray ionization mass spectrometry (ESMS), 中文稱為電噴灑游離質譜法, 確認三氯酚與芬頓試劑反應, 為二級反應; 並且, J.A.Zazo² 等人研究酚與芬頓試劑為二級反應; 另外, Fan³ 等人, 也表示結晶紫染料, 在芬頓試劑的降解反應, 亦是二級反應, 故推論葉黃素與芬頓試劑反應為二級反應。本次研究是以光譜儀偵測葉黃素在水溶液中的最大吸收波長 447nm 吸收率 A , 每隔 10 秒偵測其吸收率 A , 吸收率 A 降低, 表示葉黃素減少, 即葉黃素在單位時間內減少的濃度為反應速率 R , 反應速率定律式表示成式十三:

$$R = -\frac{d[\text{葉黃素}]}{dt} = k [\text{葉黃素}]^2 \quad (\text{式十三})$$

藉由改變芬頓試劑中 H_2O_2 濃度、pH 值及提高濃度 Fe^{2+} , 得反應的速率常數 k 值, 探討葉黃素與芬頓試劑之研究, 整理如表三,

表三 市售葉黃素飲與不同條件芬頓試劑的反應速率常數 k

實驗次別	葉黃素稀釋倍率%	$[Fe^{2+}]$, M	$[H_2O_2]$, M	pH 值	速率常數 k ($1/M \cdot s$)
一	25	0.005	0.767	2.92	$(3 \pm 1) \times 10^{-5}$
二	25	0.005	1	2.92	$(4.67 \pm 0.58) \times 10^{-5}$
三	25	0.005	0.523	2.92	$(2.67 \pm 0.58) \times 10^{-5}$
四	25	0.005	0.243	2.92	$(4 \pm 2.65) \times 10^{-5}$
五	25	0.005	0.767	0.33	3×10^{-5}
六	25	0.005	0.767	1.09	2×10^{-5}
七	25	0.01	0.767	2.92	1×10^{-4}
八	25	0.02	0.767	2.92	3×10^{-4}

1. 比較實驗一、二、三、四, 改變芬頓試劑中 H_2O_2 的濃度, 可以發現, 速率常數 k 不會因為 H_2O_2 濃度增加或減少而改變, 推測 H_2O_2 濃度遠大於葉黃素, 產生高活性的氫氧自由基 $\cdot OH$, 也幾乎是氫氧自由基 $\cdot OH$ 在反應, 因此, H_2O_2 濃度可視為一定值, 也不影響反應級數, 故速率常數 k 不影響。

2. 比較實驗一、五、六, 利用 HCl 改變反應的 pH 值, 在酸性的環境下, pH 值 = 0.33 ~ 2.92, 速率常數 k 沒有太大差異, 文獻^{2,4} 表示, 像酚、三氯酚等有機物, 最終的產物為短鏈的有機酸甚至為甲酸, 所以葉黃素在與芬頓試劑反應後的產物其溶液, 以 pH 計測量, 大多落在 pH = 0 ~ 1, 正如我們前言的式一與式二的預測, 產物最後為 CO_2 , 故 pH 值對速率常數 k 不影響, 但是起始的反應條件, 不能是鹼性環境的實驗, 因為 Fe^{2+} 會與 OH^- 發生沉澱。

3. 在實驗一、二、三、四、五、六, 其吸收率 A 與時間 t 的圖形, 如圖十六、十八、二十、二十二、二十四、二十六、二十八, 剛開始反應時, 吸收率會增加, 一段時間後, 吸收率 A 才

開始下降，不會因為 H_2O_2 濃度或 pH 值的改變，皆有一致性，雖然吸收率 A 開始下降的時間不是每次相同，但是 $1/A$ 與時間 t 線性趨勢是一致的，所以速率常數 k 值可視為是相同，故 $k = (3.58 \pm 1.5) \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}$ ，所以市售葉黃素飲與芬頓試劑反應之速率定律式可表示為：

$$R = k [\text{葉黃素}]^2, k = (3.58 \pm 1.5) \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}。$$

4. 芬頓試劑裡，亞鐵離子是一個催化劑，實驗一、七、八，增加亞鐵濃度，圖三十、圖三十二的吸收率 A 與時間 t 的圖，反應開始，有先上升，就下降，但是可以看到兩個不同的下降趨勢，前段下降慢，後段下降快，將吸收率 A 倒數， $1/A$ 與時間 t 做直線，線性相關 R^2 會變差，速率常數 k 會隨亞鐵離子濃度增加變大，增加 10 倍，反應後觀察比色管溶液，會有黑色沉澱物逐漸下沉，推測增加亞鐵離子的濃度，產生更多的氫氧自由基·OH，氫氧自由基·OH 的活性大，同時更有機會產生活性較小的過氧化氫自由基·OOH，這兩種自由基，皆可隨機與溶液中的葉黃素、 Fe^{3+} 及過氧化氫 H_2O_2 反應，致使葉黃素分解加快，但反應機制可能更為複雜，故在探討亞鐵離子的濃度，仍以 $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ 為較佳的濃度。

從表三的結果，將市售葉黃素飲以去離子水稀釋至原濃度 25%， $[\text{Fe}^{2+}] = 0.005\text{M}$ ， $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.767\text{M}$ ， $\text{pH} = 2.92$ ，為研究市售葉黃素飲與芬頓試劑的自由基抗氧化之反應速率研究最佳條件濃度，與參考文獻³中最佳芬頓試劑比例 $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2 = 0.5\text{mM} : 50\text{mM}$ 雖有差異，但本實驗則是在水溶液反應，與在 GC-MS 反應狀態不同。

陸、結論

探究市售葉黃素飲與自由基抗氧化反應，可得以下結論：

1. 市售葉黃素飲外觀呈橘紅色黏稠狀，橘紅色應是黑醋栗汁的顏色，黏稠狀是因為難溶於水的葉黃素混著糊精，才能使均勻分散懸浮於水中，有助於人體吸收。
2. 以丙酮與正己烷從市售葉黃素飲萃取出葉黃素，葉黃素呈黃色，藉光譜儀偵測在波長 476nm、450nm、425nm 皆有吸收峰，450nm 是最大吸收峰，與文獻報導一致，確實為葉黃素 Lutein。
3. 以濾紙色層分析法，展開液是正己烷與乙酸乙酯的體積比例為 5 : 1、10 : 1、20 : 1，濾紙上有兩個黃色色素點，為葉黃素與玉米黃素， R_f 值大顏色深的是葉黃素， R_f 值小顏色淺是玉米黃素 (Zeaxanthin)，以正己烷與乙酸乙酯的體積比例為 5 : 1 分離葉黃素與玉米黃素較佳。兩者都具有長鏈共軛雙鍵系統，差別在有一個雙鍵位置不同，結構就不同，濾紙色層分析法就能分出兩者差異，但是兩者在光譜儀的吸收峰很靠近，重疊在一起，無法分辨葉黃素與玉米黃素。
4. 濾紙色層分析法比較市售葉黃素飲、菠菜與市售葉黃素膠囊，展開液為正己烷與乙酸乙酯的比例為 5 : 1、10 : 1、20 : 1，三者都在濾紙上都有兩個 R_f 值相同的黃色色素點，表示皆含有葉黃素與玉米黃素。菠菜、市售葉黃素膠囊，也都含有與市售葉黃素飲相同種類的葉黃素，只是直接飲用市售葉黃素飲為取得葉黃素較為方便。
5. 芬頓試劑在未稀釋液黃素飲或濃度倍率大於 40% 反應速率變慢許多而無法探討，故市售葉

黃素飲與芬頓試劑反應的最佳濃度是將市售葉黃素飲加水稀釋至原濃度倍率 25%，與 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ ， $[H_2O_2] = 0.767M$ ，在反應 3100 秒後，再以正己烷與丙酮萃取出葉黃素，光譜儀偵測葉黃素在 450nm 吸收峰下降。同時也利用光譜儀偵測葉黃素飲與芬頓試劑的反應，於反應 3100 秒後，停止偵測，反應 3100 秒後，於波長 447nm，吸收率 A 也是由 1.304 降至 1.228，溶液的顏色由淺橘變成淡黃色，還有氣泡產生。這兩種方式都表示市售葉黃素飲中的葉黃素濃度降低，葉黃素確實能與芬頓試劑的自由基反應，是一抗氧化劑，當自由基攻擊視神經時，葉黃素的共軛雙鍵長鏈結構與高活性自由基反應成小分子，黃色消失具有抗氧化能力，保護我們的眼睛，免於自由基的傷害。

6.無法直接以光譜儀偵測未稀釋的市售葉黃素飲，需將市售葉黃素飲加水稀釋成原濃度倍率 25%時，葉黃素是被糊精圍成均勻分散在水溶液，吸收光譜與溶於有機溶劑差別很大，稀釋後的葉黃素飲，仍含有橘紅色黑醋栗汁，在波長 400nm~500nm 有一大片吸收，影響葉黃素吸收峰，相較於葉黃素在有機溶劑中有三個吸收峰其中在 450nm 吸收率最大，而葉黃素在水溶液時，應該在波長 447nm 有最大吸收峰，作為觀察葉黃素在水溶液的依據。

7.探究葉黃素飲與芬頓試劑產生自由基反應之反應速率，市售葉黃素飲稀釋原濃度倍率 25%，加入亞鐵離子 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ ，光譜儀記錄波長 447nm 每 10 秒，其吸收率 A 隨著時間變化趨勢，將吸收率 A 倒數對應時間 t 做斜直線，所得的直線相關 R^2 可達 0.98，斜直線的斜率就是反應速率 k 值，說明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應為二級反應，反應速率式以表示

$$R = k [葉黃素]^2, k = (3.58 \pm 1.5) \times 10^{-5} 1/Ms。$$

8.當增加芬頓試劑中 H_2O_2 濃度，因為 H_2O_2 濃度遠大於葉黃素，主要產生的活性大的氫氧自由基 $\cdot OH$ 可視為一定值。當反應在酸性環境，pH 值 = 0.33~2.92，速率常數 k 也不影響，因葉黃素與芬頓試劑在反應後的產物可能為短鏈的有機酸，反應後溶液 pH = 0~1。但是當芬頓試劑中 Fe^{2+} 濃度由 0.005M 增加至 0.01M 或 0.02M，1/A 與時間 t 直線相關性變差，推測亞鐵離子可產生更多活性大的氫氧自由基 $\cdot OH$ ，促進活性較小的過氧化氫自由基 $\cdot OOH$ 產生，兩種自由基皆隨機與葉黃素、鐵離子 Fe^{3+} 及 H_2O_2 反應，反應變快且複雜。因此調整市售葉黃素飲以去離子水稀釋至原濃度 25%， $[Fe^{2+}] = 0.005M$ ， $[H_2O_2] = 0.767M$ ，pH = 2.92，為市售葉黃素飲與芬頓試劑的自由基抗氧化之反應動力學研究最佳條件濃度。

柒、參考文獻資料

1. Buscemi S, Corleo D, Di Pace F, Petroni ML, Satriano A, Marchesini G. The Effect of Lutein on Eye and Extra-Eye Health. *Nutrients*. 2018, Sep 18;10(9):1321
2. J.A.Zazo, J.A.Casas, A. F.Mohedano, M.A.Gilarranz, J.J.RODRIÄGUEZ*. Chemical Pathway and Kinetics of Phenol Oxidation by Fenton's Reagent. *Environmental Science & Technology*. 2005, 39, 9295-9302
3. Huan-Jung Fan, Shiu-Tsuen Huang, Wen-Hsin Chung, Jeng-Lyan Jan, Wan-Yu Lin, Chiing-Chang

Chen*, Degradation pathways of crystal violet by Fenton and Fenton-like systems. *Journal of Hazardous Materials* . **2009**, 171, 1032–1044

4. Basu, S.; Wei, I. W. Mechanism and kinetics of oxidation of 2,4,6-trichlorophenol by Fenton's Reagent. *Environ. Eng. Sci.* **2000**, 17 (5), 279-290.

5. Prakash Bhosale, Binxing Li. Purification and Partial Characterization of a Lutein-Binding Protein from Human Retina. *Biochemistry.*, **2009**, 48, 4798-4807

6. 中華民國第四十七屆中小學科學展覽會高中組生物科：眼見不為憑：光合色素的濾紙層析分離

7. 二級反應維基百科：

<https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E4%BA%8C%E7%B4%9A%E5%8F%8D%E6%87%89>

8. 每日所需葉黃素

<https://www.dietician.com.tw/knowledge/item/1088.html?srsltid=AfmBOoqzAVDfPOi-hmssITAbRs0IWizK7dwjqJ6BTTxp-WeRy0iWSb1o>

9. 陳榮輝、謝定翊等人., 利用費頓試劑來氧化甲基橙染料之可行性及動力學的研究., 高雄師大學報 **2014**, 36, 1-14

10. Petra Pavelková, Aleš Krmela, Věra Schulzová. Determination of carotenoids in flowers and food supplements by HPLC-DAD ., *Acta Chimica Slovaca*, **2020**, Vol. 13, No. 1, , pp. 6—12,

11. 成人每日所需葉黃素：https://epaper.ntuh.gov.tw/health/201102/project_3.html

註：圖片來源

1. 圖一：維基百科 <https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E8%91%89%E9%BB%83%E7%B4%A0>

2. 圖三十五右圖取自參考文獻資料 5.

3. 圖三十七：參考文獻資料 10. 再以小畫家繪製

4. 其他圖片二~三十四、圖三十六及圖三十八，皆為作者自行拍攝，或以光譜儀數據轉檔成 Excel 自行製作

【評語】 030205

本研究分析市售葉黃素飲的成分與抗氧化能力。光譜分析顯示其在約 450 nm 處有吸收峰，並含葉黃素與玉米黃素。與菠菜汁及葉黃素膠囊比較，皆含類似成分。以芬頓試劑產生 $\cdot\text{OH}$ 模擬自由基攻擊葉黃素，因共軛雙鍵斷裂而顏色消失。實驗得出最佳反應條件並建立速率定律，說明市售葉黃素飲具良好抗氧化潛力。

1. 葉黃素對人體的健康有重要的影響，本研究的主題非常契合化學與生活的結合，本研究在反應速率的實驗設計以及後面的分離實驗的研究都有相當紮實的化學討論，相關的文獻與原理也有一定程度的了解，值得鼓勵。
2. 實驗同時考慮了多種不同市售的葉黃素來源，提供了相當清楚的討論，對於真實樣品的光譜測試，若能考慮不同背景雜質對光譜的干擾，實際會比較了解複雜的真實狀況。

作品海報

晶彩人生

探究市售葉黃素飲與自由基之抗氧化反應

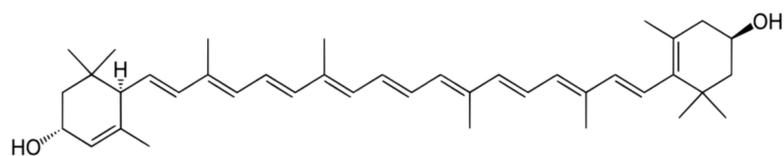
摘要

市售葉黃素飲外觀呈現橘紅色黏稠狀，去離子水稀釋以光譜儀測量波長在 447nm 有吸收峰。另以丙酮與正己烷萃取得黃色液體，光譜儀測量最大吸收率於波長 450 nm。濾紙色層分析法得知含有兩種葉黃素，分別為葉黃素與玉米黃素，同時也比較菠菜汁與市售葉黃素膠囊，皆含有葉黃素與玉米黃素。利用芬頓試劑產生氫氧自由基·OH，模擬自由基攻擊視神經時，存在於眼球的葉黃素作為抗氧化劑，與自由基反應，長鏈共軛雙鍵分解成短鏈，黃色消失。並利用光譜儀測量市售葉黃素飲與芬頓試劑反應，為二級反應。最佳反應條件為市售葉黃素飲加水稀釋成原濃度 25%， $[Fe^{2+}] = 0.005M$ ， $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH = 2.92$ ，反應速率定律式： $R = k [葉黃素]^2$ ， $k = (3.58 \pm 1.5) \times 10^{-5} 1/Ms$ 。

壹、前言

一、研究動機

眼睛是靈魂之窗，而現代人使用 3C 電子產品不離手情況下，3C 產品發出的藍光，進入人體的眼睛，透至眼底直至視網膜和黃斑部，視網膜上的敏感細胞，會產生大量的自由基，可使人的眼睛出現視覺疲勞、白內障或黃斑區退化變性。存在視網膜中央黃斑區的「葉黃素」，英文命名為 Lutein，分子式 $C_{40}H_{36}O_2$ ，屬於脂溶性，不溶於水，結構式如圖一：



圖一 葉黃素的分子結構

有十個共軛雙鍵的結構，為其呈黃色外觀的發色團，在紫外光可見光照射下，波長 425nm、450nm、476nm 特定的吸收，即是吸收藍光部分。與自由基反應時，自由基會將其長鏈共軛雙鍵結構分解成小分子，黃色消失，故葉黃素具有吸收藍光與對自由基抗氧化能力，阻隔自由基對視神經的傷害，進而保護視網膜，對人的眼睛保護特別重要。

葉黃素是一種類胡蘿蔔素，但是只有兩種能存在於眼球的視網膜與黃斑部，也就是葉黃素(Lutein)與玉米黃素(Zeaxanthin)，無法於人體自行生成，必須透過攝取綠色蔬菜如胡蘿蔔、菠菜、玉米、南瓜和蛋黃等或直接服用高劑量葉黃素保健食品，已成為在眾多的保健食品中，目前最夯的保健食品。葉黃素保健食品的種類眾多，有多種不同的形式，如液態膠囊式、果凍形式、飲料型式，皆標榜抗氧化效果很好，其中，令我們感到好奇的，是其中飲料型的葉黃素飲，因為葉黃素本身是脂溶性的，不易溶於水，但打開發現內容物，是呈橘紅色黏稠狀混濁液體，與文獻報導¹的黃色不太一樣，如圖二的外觀。



圖二 富含葉黃素之市售葉黃素飲、膠囊與菠菜

想研究市售葉黃素飲成分，是否真含有葉黃素，並且與芬頓試劑反應，模擬葉黃素與自由基的反應。芬頓試劑為亞鐵離子 Fe^{2+} 加入過氧化氫 H_2O_2 ，反應為亞鐵離子催化過氧化氫分解成氧氣與水。由推測的反應機構，中間的產物裡，會有氫氧自由基·OH (式一)，此氫氧自由基·OH 可再與過氧化氫 H_2O_2 反應生成過氧化氫自由基·OOH (式三)，或鐵離子 Fe^{3+} 再與 H_2O_2 也生成·OOH (式二)，過氧化氫自由基·OOH 與 Fe^{3+} 鐵離子反應生成 O_2 氧氣與亞鐵離子，故亞鐵離子在反應中不斷循環著 (式四)。



反應的中間體氫氧自由基·OH、過氧自由基·OOH 具有未配對電子，具超強的氧化能力，此時加入葉黃素如圖一的結構，推測自由基與葉黃素反應機構可能為式五或式六



當葉黃素與自由基反應成短鏈的分子時，呈現黃色的長鏈共軛雙鍵系統被斷鏈，生成較短的有機分子、水及二氧化碳，黃色消失。模擬自由基攻擊視神經時，葉黃素就是與高活性自由基反應，作為一抗氧化劑的角色，也證明葉黃素確實能與自由基反應，具有抗氧化能力，保護我們的眼睛，免於自由基的傷害。

二、研究目的

1. 分析市售葉黃素飲的成分

2. 探究市售葉黃素飲與芬頓試劑反應，證明市售葉黃素具有抗氧化的能力，具有保護眼睛重要功能，及其反應速率之動力學研究

貳、研究過程或方法



圖三



圖四



圖五



圖六



圖七

參、研究結果

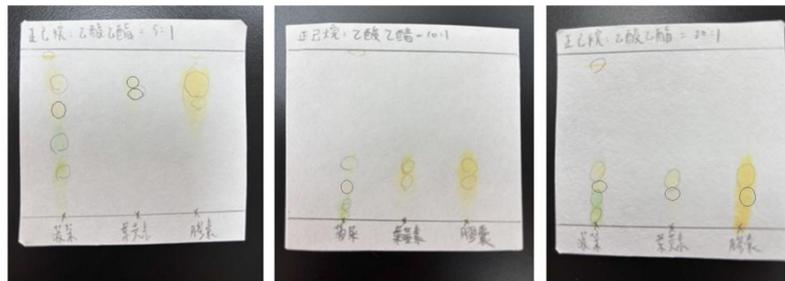
一、分析市售葉黃素飲的成分

(一) 濾紙色層分析法分析市售葉黃素飲的葉黃素



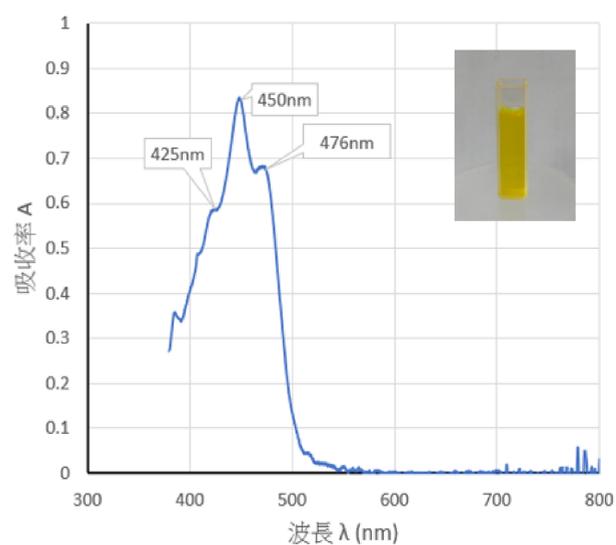
圖八 正己烷與乙酸乙酯不同比例展開液

(二) 濾紙色層分析法比較



圖九 菠菜汁、市售葉黃素飲與市售葉黃素膠囊不同比例展開液

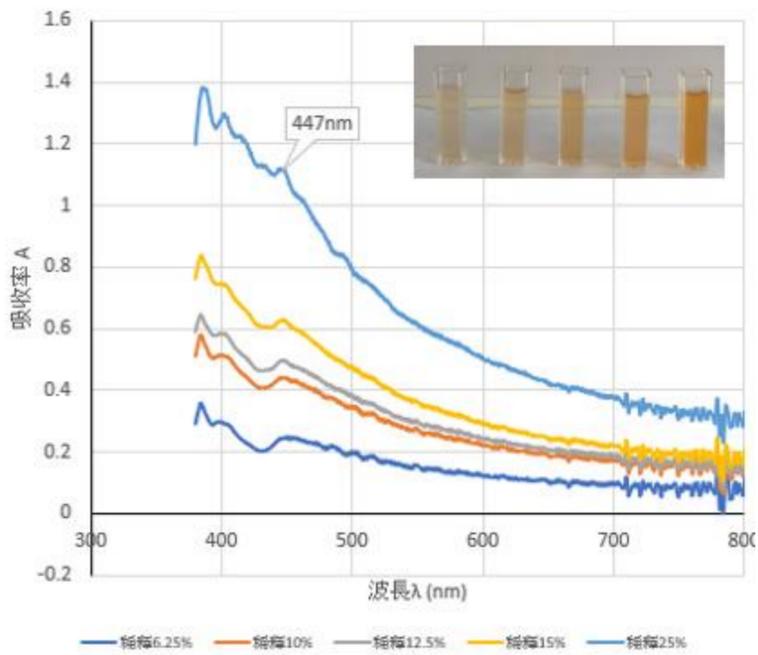
(三) 光譜儀測量萃取市售葉黃素飲有機層的吸收光譜



圖十 市售葉黃素飲有機層的吸收光譜

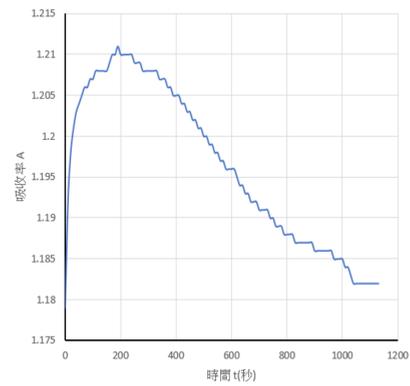
(註：圖一來源，取自於作品說明書的參考資料 1；圖二～圖三十一作者自行拍攝與製作；圖三十二為參考資料 4.)

(四) 市售葉黃素飲以去離子稀釋成不同濃度倍率吸收光譜

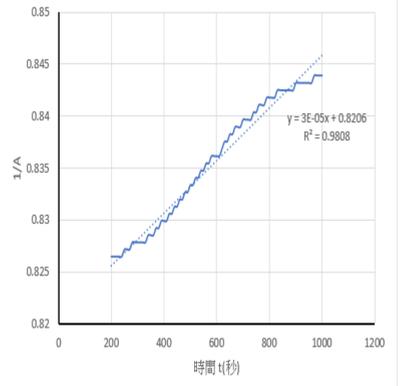


圖十一

2. 市售葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.523M$

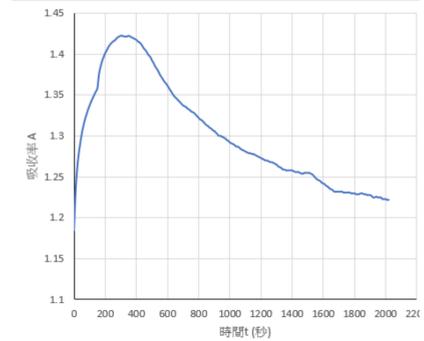


圖二十

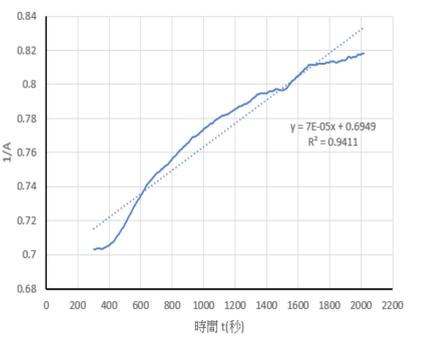


圖二十一

3. 市售葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.243M$

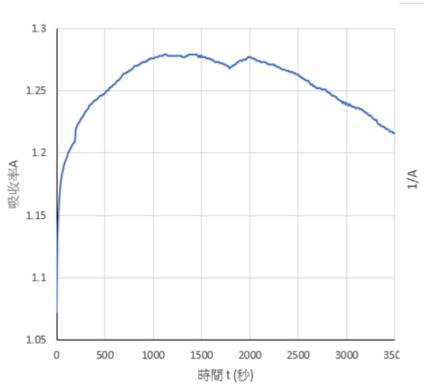


圖二十二

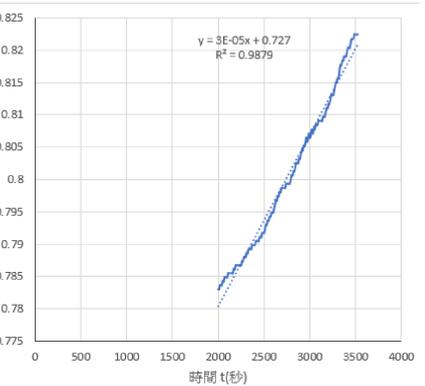


圖二十三

4. 市售葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH = 0.33$

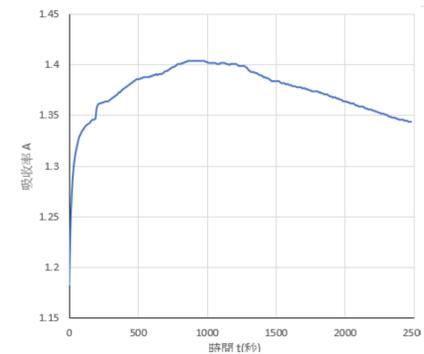


圖二十四

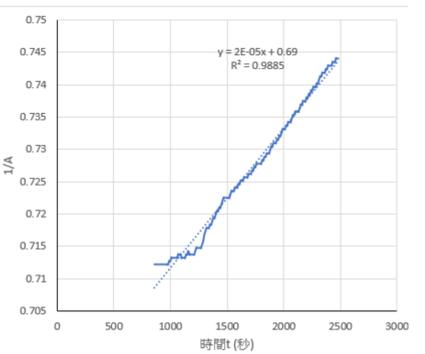


圖二十五

5. 葉黃素飲稀釋 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$ ， $pH = 1.09$

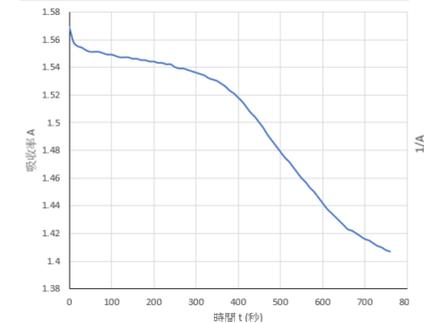


圖二十六

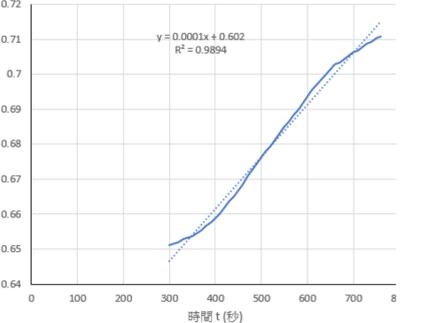


圖二十七

6. 市售葉黃素飲 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.01M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$

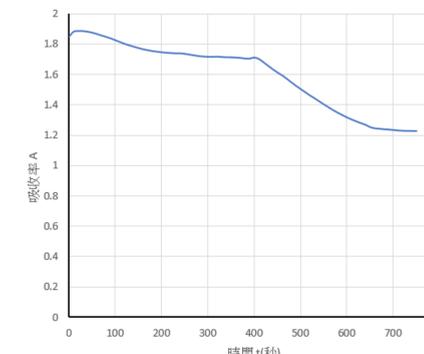


圖二十八

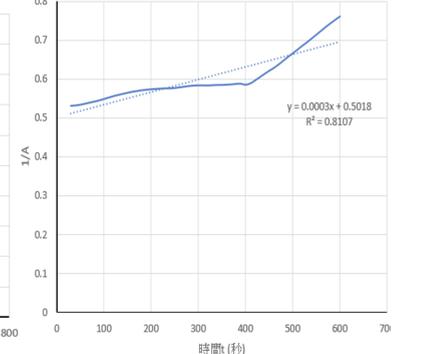


圖二十九

7. 葉黃素飲稀釋 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.02M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$



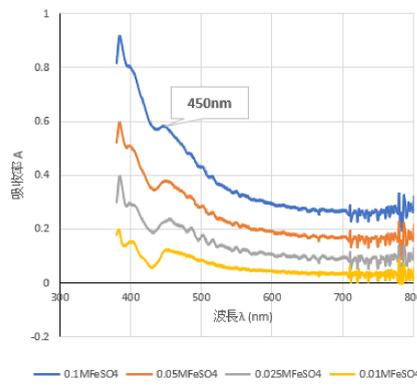
圖三十



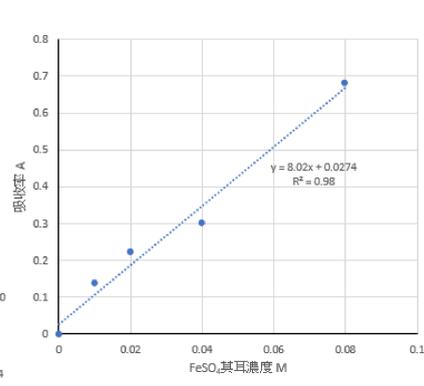
圖三十一

二、探究市售葉黃素飲與芬頓試劑反應

(一) 不同濃度硫酸銨亞鐵吸收光譜



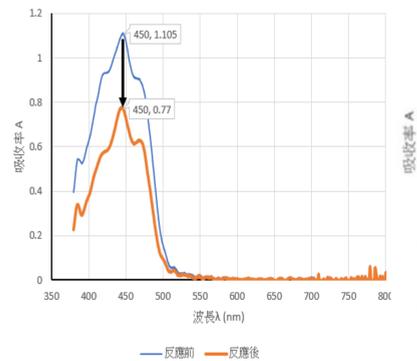
圖十二



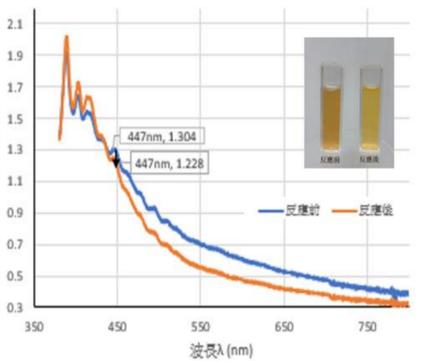
圖十三 450nm 檢量線

(二) 證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應

1. 市售葉黃素飲在芬頓試劑反應前後吸收光譜圖

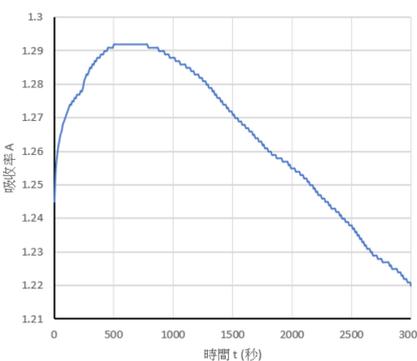


圖十四 萃取有機層吸收光譜

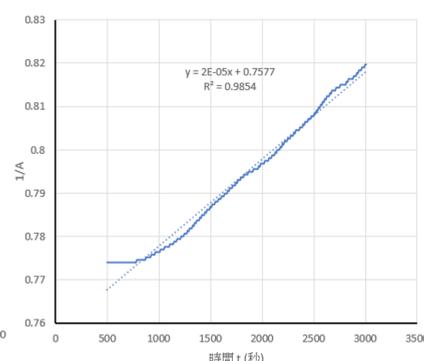


圖十五 光譜儀測量吸收光譜圖

2. 葉黃素飲稀釋 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 0.767M$



圖十六

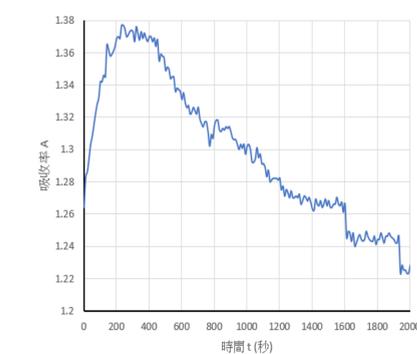


圖十七

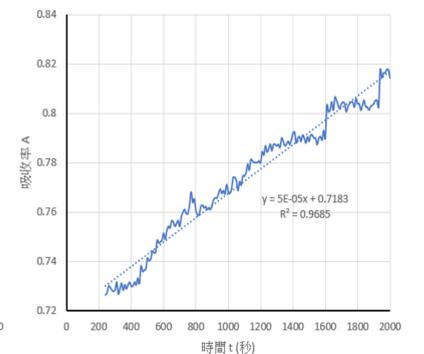
得直線方程式，其斜率 = 2×10^{-5} ，速率常數值 $k = 2 \times 10^{-5} 1/Ms$

(三) 市售葉黃素飲與不同條件芬頓試劑反應

1. 葉黃素飲稀釋 25%、 $[Fe^{2+}] = 0.005M$ 、 $[H_2O_2] = 1M$



圖十八

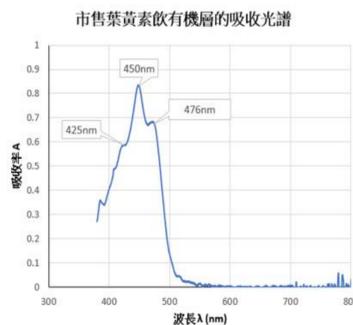


圖十九

肆、討論

一、分析市售葉黃素飲的成分

(一) 市售葉黃素飲中是否含有葉黃素



圖三十二⁴

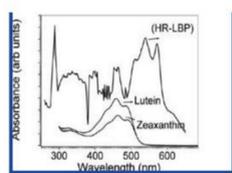


Figure 1: Elution pattern of HR-LBP on a silica gel size-exclusion chromatographic column. Contour view of the online photodiode array scans performed at 0.5 s intervals during the chromatographic purification of HR-LBP (upper panel). Absorbance spectrum of purified HR-LBP eluting from the silica gel column at 11 min compared with that of (3R,3'R)-zeaxanthin and (3R,3'R,6'R)-lutein standards dissolved in THF (lower panel). There is a bathochromic shift of the absorbance peaks of HR-LBP (507, 537, 589 nm) relative to zeaxanthin (425, 456, 478 nm) and lutein (425, 450, 476 nm).

(二) 濾紙色層分析法分析市售葉黃素飲中的葉黃素

$$R_f = \frac{\text{色素點與基礎線的距離}}{\text{展開液移動距離}} \quad (\text{式七})$$

表一 市售葉黃素飲不同展層液的 Rf 值

展層液比例	正己烷 (100%)	乙酸乙酯 (100%)	正己烷: 乙酸乙酯 = 1:1	正己烷: 乙酸乙酯 = 2:1	正己烷: 乙酸乙酯 = 5:1	正己烷: 乙酸乙酯 = 10:1	正己烷: 乙酸乙酯 = 20:1
Rf 值	0	1	1	0.96	0.62 0.52	0.37 0.23	0.14 0.05

表二 菠菜、市售葉黃素飲、葉黃素膠囊中於不同展開液 Rf 值

展層液比例	各物質葉黃素 Rf 質		
	正己烷: 乙酸乙酯 = 5:1	正己烷: 乙酸乙酯 = 10:1	正己烷: 乙酸乙酯 = 20:1
菠菜汁	0.82 0.64	0.32 0.2	0.32 0.23
市售葉黃素飲	0.8 0.72	0.35 0.22	0.29 0.19
葉黃素膠囊	0.79 0.66	0.34 0.21	0.3 0.17

二、探究市售葉黃素飲與芬頓試劑反應，證明市售葉黃素具有抗氧化的能力，具有保護眼睛重要功能，及其反應速率之動力學研究

(一) 過錳酸鉀滴定雙氧水

(二) 不同濃度硫酸銨亞鐵吸收光譜

(三) 證明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應

(四) 探究市售葉黃素飲與不同條件芬頓試劑反應之動力學研究

$$\frac{1}{[C]} = \frac{1}{[C]_0} + kt \quad (\text{式八})$$

$$A = \epsilon \cdot b \cdot [C], \quad [C] = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \quad \text{表示} \quad (\text{式九})$$

$$\text{結合式八與式九可寫成} \quad \frac{1}{A/\epsilon b} = \frac{1}{A_0/\epsilon b} + kt \quad (\text{式十})$$

另外葉黃素在單位時間內減少的濃度為反應速率 R，反應速率定律式表示成式十一：

$$R = -\frac{d[\text{葉黃素}]}{dt} = k[\text{葉黃素}]^2 \quad (\text{式十一})$$

表三 市售葉黃素飲與不同條件芬頓試劑的反應速率常數 k

實驗次別	葉黃素稀釋倍率%	[Fe ²⁺], M	[H ₂ O ₂], M	pH 值	速率常數 k (1/M·s)
一	25	0.005	0.767	2.92	(3±1)×10 ⁻⁵
二	25	0.005	1	2.92	(4.67±0.58)×10 ⁻⁵
三	25	0.005	0.523	2.92	(2.67±0.58)×10 ⁻⁵
四	25	0.005	0.243	2.92	(4±2.65)×10 ⁻⁵
五	25	0.005	0.767	0.33	3×10 ⁻⁵
六	25	0.005	0.767	1.09	2×10 ⁻⁵
七	25	0.01	0.767	2.92	1×10 ⁻⁴
八	25	0.02	0.767	2.92	3×10 ⁻⁴

伍、結論

探究市售葉黃素飲與自由基抗氧化反應，可得以下結論：

1.市售葉黃素飲外觀呈橘紅色黏稠狀，橘紅色應是黑醋栗汁的顏色，黏稠狀是因為難溶於水的葉黃素混著糊精，才能使均勻分散懸浮於水中，有助於人體吸收。

2.以丙酮與正己烷從市售葉黃素飲萃取出葉黃素，葉黃素呈黃色，藉光譜儀偵測在波長 476nm、450nm、425nm 皆有吸收峰，450nm 是最大吸收峰，與文獻報導一致，確實為葉黃素 Lutein。

3.以濾紙色層分析法，展開液是正己烷與乙酸乙酯的體積比例為 5:1、10:1、20:1，濾紙上有兩個黃色色素點，為葉黃素與玉米黃素 (Zeaxanthin)，以正己烷與乙酸乙酯的體積比例為 5:1 分離葉黃素與玉米黃素較佳。兩者都具有長鏈共軛雙鍵系統，差別在有一個雙鍵位置不同，結構就不同，濾紙色層分析法就能分出兩者差異，但是兩者在光譜儀的吸收峰很靠近，重疊在一起，無法分辨葉黃素與玉米黃素。

4.濾紙色層分析法比較市售葉黃素飲、菠菜與市售葉黃素膠囊，展開液為正己烷與乙酸乙酯的比例為 5:1、10:1、20:1，三者在濾紙上都有兩個 Rf 值相同的黃色色素點，表示皆含有葉黃素與玉米黃素。菠菜、市售葉黃素膠囊，也都含有與市售葉黃素飲相同種類的葉黃素，只是直接飲用市售葉黃素飲為取得葉黃素較為方便。

5.芬頓試劑在未稀釋液黃素飲或濃度倍率大於 40% 反應速率變慢許多而無法探討，故市售葉黃素飲與芬頓試劑反應的最佳濃度是將市售葉黃素飲加水稀釋至原濃度倍率 25%，與 [Fe²⁺] = 0.005M，[H₂O₂] = 0.767M，在反應後，以正己烷與丙酮萃取出葉黃素，光譜儀偵測葉黃素在 450nm 吸收峰下降。同時也利用光譜儀偵測葉黃素飲與芬頓試劑的反應，於波長 447nm，吸收率 A 也是由 1.304 降至 1.228，溶液的顏色由淺橘變成淡黃色，還有氣泡產生。這兩種方式都表示市售葉黃素飲中的葉黃素濃度降低，葉黃素確實能與芬頓試劑的自由基反應，是一抗氧化劑，當自由基攻擊視神經時，葉黃素的共軛雙鍵長鏈結構與高活性自由基反應成小分子，黃色消失具有抗氧化能力，保護我們的眼睛，免於自由基的傷害。

6.探究葉黃素飲與芬頓試劑產生自由基反應之反應速率，市售葉黃素飲稀釋原濃度倍率 25%，加入亞鐵離子 [Fe²⁺] = 0.005M，光譜儀記錄波長 447nm 每 10 秒，其吸收率 A 隨著時間變化趨勢，將吸收率 A 倒數對應時間 t 做斜直線，所得的直線相關 R² 可達 0.98，斜直線的斜率就是反應速率 k 值，說明市售葉黃素飲與芬頓試劑反應為二級反應，反應速率式以表示：

$$R = k[\text{葉黃素}]^2, \quad k = (3.58 \pm 1.5) \times 10^{-5} \text{ 1/Ms}.$$

7 當增加芬頓試劑中 H₂O₂ 濃度，因為 H₂O₂ 濃度遠大於葉黃素，主要產生的活性大的氫氧自由基 ·OH 可視為一定值。當反應在酸性環境，pH 值 = 0.33~2.92，速率常數 k 也不影響，因葉黃素與芬頓試劑在反應後的產物可能為短鏈的有機酸，反應後溶液 pH 值介於 0~1。但是當芬頓試劑中 Fe²⁺ 濃度由 0.005M 增加至 0.01M 或 0.02M，1/A 與時間 t 直線相關性變差，推測亞鐵離子可產生更多活性大的氫氧自由基 ·OH，促進活性較小的過氧化氫自由基 ·OOH 產生，兩種自由基皆隨機與葉黃素、鐵離子 Fe³⁺ 及 H₂O₂ 反應，反應變快且複雜。因此調整市售葉黃素飲以去離子水稀釋至原濃度 25%，[Fe²⁺] = 0.005M，[H₂O₂] = 0.767M，pH = 2.92，為市售葉黃素飲與芬頓試劑的自由基抗氧化之反應動力學研究最佳條件濃度。

陸、參考文獻資料

- Buscemi S, Corleo D, Di Pace F, Petroni ML, Satriano A, Marchesini G. The Effect of Lutein on Eye and Extra-Eye Health. *Nutrients*. 2018, Sep 18;10(9):1321
- Huan-Jung Fan, Shih-Tsuen Huang, Wen-Hsin Chung, Jeng-Lyan Jan, Wan-Yu Lin, Chiing-Chang Chen*, Degradation pathways of crystal violet by Fenton and Fenton-like systems. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, 171, 1032–1044
- Basu, S.; Wei, I. W. Mechanism and kinetics of oxidation of 2,4,6-trichlorophenol by Fenton's Reagent. *Environ. Eng. Sci.* 2000, 17 (5), 279-290.
- Prakash Bhosale, Binxing Li. Purification and Partial Characterization of a Lutein-Binding Protein from Human Retina. *Biochemistry*, 2009, 48, 4798-4807