

國立台東大學生命科學研究所碩士論文

指導教授：張煥宗 博士

以毛細管電泳分析經
氧化鐵奈米粒子萃取之兒茶素

Determination of magnetic nano-particle
concentrated catechins by capillary electrophoresis

研究生：林子鈺 撰

學 號： 9500809

中華民國九十七年七月

國立台東大學

學位論文考試委員審定書

系所別：生命科學研究所

本班 林于鈞 君

所提之論文 以毛細管電泳分析經氧化鐵奈米粒子萃取之
兒茶素

業經本委員會通過合於 ☒ 碩士學位論文 條件
☐ 博士學位論文

論文學位考試委員會：劉春櫻
(學位考試委員會主席)

胡輝璋

張煥宗

(指導教授)

論文學位考試日期：97年7月7日

國立台東大學

附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。

2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為本人在 國立臺東大學 生命科學研究所 系(所)
組 九十六 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：以毛細管電泳分析經氧化鐵奈米粒子萃取之兒茶素

本人具有著作財產權之論文全文資料，授權予下列單位：

同意	不同意	單 位
☒	☐	國家圖書館
☒	☐	本人畢業學校圖書館
☒	☐	與本人畢業學校圖書館簽訂合作協議之資料庫業者

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散布發行或上載網站，藉由網路傳輸，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

☒同意 ☐不同意 本人畢業學校圖書館基於學術傳播之目的，在上述範圍內得再授權第三人進行資料重製。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，請將全文資料延後半年再公開。

公開時程

立即公開	一年後公開	二年後公開	三年後公開
			√

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：張煥宗 (親筆簽名)

研究生簽名：林于鈺 (親筆正楷)

學 號：9500809 (務必填寫)

日 期：中華民國 九十七 年 七 月 三十 日

1.本授權書(得自 <http://www.lib.nttu.edu.tw/theses/> 下載)請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

2.依據 91 學年度第一學期一次教務會議決議:研究生畢業論文「至少需授權學校圖書館數位化，並至遲於三年後上載網路供各界使用及校內瀏覽。」

授權書版本:2008/05/29

謝誌

時光匆匆，自大學畢業至今已有六載，得以重拾書本完成碩士學業，若無家人的支持、恩師的指導與親朋好友、學長、學姊、學弟、學妹的協助，實難達成。

俗話說，隔行如隔山，原本醉心於國小教學的我，轉往研究的道路，實非坦途。有幸在我人生最失意的時刻，恩師胡焯淳教授接納我重回熟悉的實驗室卻又陌生的領域，並推薦我到各地的研究單位學習實驗技巧，除了充實基本能力之外，也了解到未來研究的趨勢與現今。更在胡老師的引薦之下，進入另一生命中的貴人－恩師張煥宗教授門下。在張老師的引領之下，讓我有機會接觸到未知的奈米領域，在經歷了無數的試驗與討論，使我對化學有更深一層的認識，重新拾起對化學的熱情。除了學術見聞的增長之外，兩位老師對於我的生活亦細心關照，並時常與我分享所見所聞，培養我的健全的人生觀與宏偉的國際觀。胡老師對教學的熱情，與張老師對人的真誠，更常常讓我永銘在心，是我最感謝的兩位老師。另外亦感謝自然科學系的林家慶主任、林自奮老師、廖尉岑老師與林文宗老師，常常關心我的狀況，給我鼓勵和支持，還要感謝台灣大學的劉春櫻老師，在百忙之中抽空擔任我的口試委員，給我不少做學問的建議，使我獲益良多。

另外要感謝實驗室裡的郁嫻學姐，管理實驗室帳務有條不紊，使我進行實驗的耗材不虞匱乏，還有姿羽、文璋、益宏、仲維、依婷、晉銘、碧鳳、振宇、孟涵、文虔、淨容、于菁，等學弟學妹，常常幫我跑腿買便當買飲料，與我分享生活中的點點滴滴，甚至在口考時為

我打點各項準備工作，讓我有更充分的時間進行實驗與讀書，更讓我的這兩年的研究生活多采多姿，充滿回憶。還要感謝台大生物奈米分析實驗室的泰嘉學長(現在已經要改稱邱老師囉)、志清學長(也要改稱黃老師了)、泱蔚學長、郁棻學姐、昆鴻學長、己維學長、宗宏學長、政剛學長、國毓學長與皓瑩，提供我尋找資料的方向與建議，減少我在實驗上摸索的時間，尤其感謝泰嘉學長我在碩二下學期時，常找我去吃飯，聽我大吐苦水，並提供我許多實驗室管理與實驗的建議，讓我有得以重拾心情繼續面對論文。另外感謝所上的助理惠嵐，因為您的細心與耐心，總在適當的時間通知我們這些苦於研究的研究生應注意事項，更盡力處理我們請求協助的事情，讓我們免於擔心應配合學校的事項。還有與我多年的好友子安，常常與我分享好聽的音樂與表演，與聖蓮華文宣坊的賴老闆，總是幫我趕製研討會的手冊，再此一並致上我最誠懇的謝意。

最後感謝我的家人對我的支持。祖父、祖母對我的肯定與鼓勵，使我面對未來充滿信心。父親是我經濟上的支柱，母親為我打點各項保險事宜，弟弟協助家務，讓我無後顧之憂的專心讀書，順利畢業。還要感謝與我相知相惜多年的女友慧瑄，有妳的協助與鼓勵，陪我度過人生中大大小小的風暴，讓我得以再接再厲，克服一切挑戰。在獲得學位之際，願將這份喜悅與我生命中的好友與親人一同分享。

林于鈞

戊子年仲夏於台東大學生命科學研究所

中文摘要

本研究開發了運用氧化鐵奈米粒子對兒茶素進行前處理，與以毛細管電泳分析咖啡因和偵測兒茶素的方法。毛細管電泳方面，在使用內徑 75 μm ，外徑 375 μm ，長 65 cm，有效長度為 53 cm 之毛細管，以內含 15% 乙醇之 pH 8、200 mM tris-borate 作為緩衝溶液，UV 偵測器偵測波長設定於 275 nm，電壓+30 kV 進行電泳，20 分鐘內可偵測到四種兒茶素與咖啡因，其偵測極限(LOD)範圍在 0.9 – 75 μM ，定量極限(LOQ)範圍在 2.5 – 90 μM ，線性範圍介於 2.5 μM 至 500 μM 之間，且所有的 R^2 值都在 0.99 以上。樣品前處理方面，以 0.64 pmole 氧化鐵奈米粒子萃取 100 nmole 兒茶素，在常溫避光下靜置 20 分鐘，兒茶素可以被完全吸附。再以含有 10% 乙醇之 pH 5.3、100 mM 酒石酸溶液，常溫避光靜置 10 分鐘脫附兒茶素，在脫附兩次後，總脫附量有最佳回收率，其(-)-EC 之回收率可達 70%。而經過氧化鐵奈米粒子處理之瓶裝茶樣品，(-)-EC 之回收率可達 86%，(-)-EGC 回收率達 9.4%。本方法除了可應用於對真實樣品偵測兒茶素之含量，更開啟了奈米材料應用於產業的新方向。

Abstract

In this study, we developed a method for using magnetic nano-particles (MNPs) to concentrate catechins and detecting these catechins by capillary electrophoresis with UV detector. The optimal separation conditions of electrophoresis were 200mM tris-borate buffer (pH 8.5) containing 15% ethanol. Under 30 kV, four catechins (EGC, EC, ECG and EGCG) could be identified at migration time between 10 to 20 min. The LOD of theses samples were between 0.9 to 7.5 μM and LOQ were between 2.5 to 90 μM with the linear range between 2.5 to 500 μM ($R^2 > 0.99$). For the concentrated process, 100 nmole catechins could be adsorpted by more than 0.64 pmole MNPs within 20 min. And 100 mM tartrate buffer solution (pH 5.3) containing 10% ethanol was selected as the desorption agent. The total recovery ratio of (-)-EC was more than 70% for standard solution, and the total recovery ratio of (-)-EC and (-)-EGC were 86% and 9.4% for the commercial real sample. This method not only used for the enrichment and quantitative of the catechins in the real samples, but also developed a new application for nano-particles.

目錄

謝誌	i
中文摘要	iii
英文摘要	iv
表目錄	vii
圖目錄	ix

第一章 緒論.....	1
一、 茶葉中之兒茶素與咖啡因	1
二、 兒茶素萃取與分析方法之文獻回顧.....	4
三、 毛細管電泳簡介.....	16
四、 研究動機.....	20
第二章 材料與方法	22
一、 藥品	22
二、 儀器	22
三、 標準品與緩衝溶液配製	23
四、 鐵奈米粒子之製備.....	24
五、 真實樣品之處理.....	24
六、 氧化鐵奈米粒子吸附與脫附兒茶素流程.....	25
七、 毛細管電泳實驗流程.....	25
第三章 實驗結果與討論	27
一、 電泳條件之探討.....	27
(一) 決定偵測波長	27
(二) 不同濃度的硼酸緩衝溶液對分離之影響.....	27
(三) 不同濃度的Tris-borate緩衝溶液對分離之影響	28
(四) 不同pH值緩衝溶液對分離之影響	29
(五) 添加有機溶劑對分離之影響	30
(六) 改變電壓對分離之影響	31

(七) 咖啡因與四種兒茶素之定量	31
二、 氧化鐵奈米粒子粒徑大小與濃度	32
三、 氧化鐵奈米粒子吸附兒茶素之條件探討	32
(一) 以紫外可見光吸收儀偵測吸附後的兒茶素	32
(二) 氧化鐵奈米粒子吸附兒茶素之最大吸附量探討	33
(三) 氧化鐵奈米粒子對兒茶素吸附時間之探討	34
四、 氧化鐵奈米粒子脫附兒茶素之條件探討	34
(一) 酒石酸pH值對脫附兒茶素之影響	35
(二) 酒石酸濃度對脫附之影響	36
(三) 脫附時間對脫附量之影響	36
(四) 脫附次數對總脫附量之影響	37
(五) 脫附劑中添加有機溶劑對脫附量之影響	37
五、 樣品濃縮試驗	38
六、 實物樣品檢測	38
(一) 市售茶樣品之電泳檢測	38
(二) 市售茶樣品之吸附實驗	39
(三) 氧化鐵奈米粒子對市售茶樣品前處理之脫附實驗	40
第四章 結論	41
第五章 參考文獻	42

表目錄

Table 1.	Structures, molecular weight, pKa and quantity contained of five catechins in tea	3
Table 2.	The extraction and analysis conditions of catechins	12
Table 3.	Effect of various pH value on migration time and resolution of catechins	45
Table 4.	Effect of various methanol concentration on migration time and resolution of catechins	46
Table 5.	Effect of various ethanol concentration on migration time and resolution of the catechins	47
Table 6.	Effect of various voltage on migration time and resolution of catechins	48
Table 7.	Optimum conditions for capillary electrophoresis experiment	49
Table 8.	Migration time, LOD, LOQ, linear range and R square of the caffeine and catechins	50
Table 9.	Adsorption ratio of the (-)-EC in various adsorption time	51
Table 10.	Formation constants of iron (III) – carboxylate complexes	52
Table 11.	Recovery of (-)-EC desorbed in various pH of tartrate buffer	53
Table 12.	Recovery of (-)-EC desorbed in various Tartrate buffer concentration	54
Table 13.	Recovery of (-)-EC in various desorbed time	55
Table 14.	Recovery of (-)-EC in various desorbed times	56
Table 15.	Recovery of (-)-EC desorbed in tartrate buffer with various organic solvent	57
Table 16.	Concentration of catechins and caffeine in real samples	58
Table 17.	Adsorption ratio of the real sample in various MNPs concentration	59



圖目錄

Fig. 1.	Structure of caffeine.	4
Fig. 2.	Development of the electroosmotic flow.	18
Fig. 3.	Separation mechanism of capillary zone electrophoresis.	20
Fig. 4.	Scheme of Magnetic nano-particles synthesis.	61
Fig. 5.	Scheme of sample preparation process.	62
Fig. 6.	UV absorbance of catechins and caffeine.	63
Fig. 7.	The probable structure of the borate - catechin complex.	64
Fig. 8.	Electropherograms of the catechins and caffeine in various borate buffer concentration.	65
Fig. 9.	Electropherograms of the catechins and caffeine in various tris-borate buffer concentration.	66
Fig. 10.	Electropherograms of the catechins and caffeine in various tris-borate buffer pH value.	67
Fig. 11.	Electropherograms of the catechins and caffeine in various methanol concentration.	68
Fig. 12.	Electropherograms of the catechins and caffeine in various ethanol concentration.	69
Fig. 13.	Electropherograms of the catechins and caffeine in various voltage.	70
Fig. 14.	Electropherograms of the catechins and caffeine under optimum conditions.	71
Fig. 15.	The calibration curves of the catechins and caffeine.	72
Fig. 16.	TEM of the magnetic nano-particles.	73
Fig. 17.	UV absorbance of 5×10^{-5} M (-)-EC.	74
Fig. 18.	Electropherograms of (-)-EC absorbed by various MNPs concentration.	75
Fig. 19.	Electropherograms of caffeine absorbed by various MNPs concentration.	76

Fig. 20.	Adsorption ratio of 10^{-4} M catechins and caffeine adsorbed by various mole of MNPs.	77
Fig. 21.	Electropherograms of (-)-EC after various adsorption time.	78
Fig. 22.	The structure of the (a)oxalate; (b)tartrate and probable structure of the (c) iron - oxalate complex; (d) iron - tartrate complex.	79
Fig. 23.	Electropherograms of (-)-EC desorbed by various tartrate buffer pH value.	80
Fig. 24.	Electropherograms of (-)-EC desorbed by various tartrate buffer concentration.	81
Fig. 25.	Electropherograms of (-)-EC desorbed by tartrate buffer in various time.	82
Fig. 26.	Electropherograms of (-)-EC after various desorbed times.	83
Fig. 27.	Electropherograms of (-)-EC desorbed by tartrate buffer with 10% various organic solvent.	84
Fig. 28.	Electropherograms of 50 mL 2 μ M (-)-EC concentrated by MNPs.	85
Fig. 29.	Electropherograms of 100 mL, 1 μ M (-)-EC concentrated by MNPs.	86
Fig. 30.	Electropherograms of the real sample A diluted 10-fold.	87
Fig. 31.	Electropherograms of the real sample B diluted 10-fold.	88
Fig. 32.	Electropherograms of the real sample C diluted 10-fold.	89
Fig. 33.	Electropherograms of the real sample D diluted 10-fold.	90
Fig. 34.	Electropherograms of the real sample E diluted 10-fold.	91
Fig. 35.	Electropherograms of the real sample F diluted 10-fold.	92
Fig. 36.	Electropherograms of the real sample G diluted 10-fold.	93
Fig. 37.	Electropherograms of the 10-fold diluted real sample (A) without; and (B) after MNPs adsorption .	94
Fig. 38.	Electropherograms of the 10-fold diluted real sample A adsorbed by various MNPs concentration.	95

Fig. 39. Electropherograms of the real sample concentrated by MNPs.

96



第一章 緒論

茶在中國的起源很早，最初僅做藥材之用，至今成為人們最喜歡的飲料之一^[1]。近代藥理研究報告指出，茶中的兒茶素 (catechins) 分子，具抗氧化、抗菌、抗病毒、抗腫瘤、消臭、酵素阻礙、抑制膽固醇上升、抑制血糖上升、預防心血管疾病等各種生理活性^[2]，也因為兒茶素具有多元的效果且其效應顯著，因此含兒茶素的健康食品、營養補充品、配料甚至於除臭等商品隨處可見，具有相當高的經濟價值。

一、茶葉中之兒茶素與咖啡因

許多文獻指出，綠茶中的兒茶素是強抗氧化劑，具抗氧化、抗菌、抗病毒、抗腫瘤、消臭、酵素阻礙、抑制膽固醇上升、抑制血糖上升、預防心血管疾病等各種生理活性。

抗氧化方面，可防止油脂、肉類製品氧化，去除自由基、消除活性氧，螯合金屬離子，降低金屬離子促氧效應，更可降低血脂質氧化，預防心血管疾病^[3,4]。

抗菌抗病毒方面，證實對食品中的毒菌、蛀牙菌、植物病原菌、流行性感冒病毒皆有效果，亦可抑制酵素活性^[5,6]。

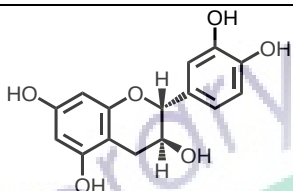
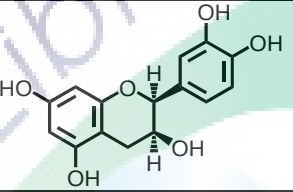
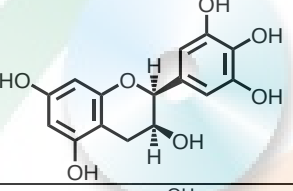
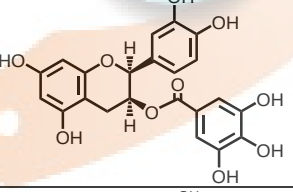
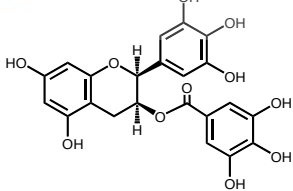
抗腫瘤方面，兒茶素可以抑制基因突變、抑制染色體異常、防止放射線、紫外線的傷害，更可直接抑制腫瘤增生、移轉、降低腫瘤的

數目與大小，甚至經由實驗證實，兒茶素可抑制以癌誘發劑誘導之腫瘤增生。^[7-9]

除了以上活性之外，尚有消臭、整腸、減肥等功效^[2]，也因為兒茶素具有多元的效果且其效果顯著，因此市面上含有兒茶素之相關商品隨處可見。

兒茶素屬於黃烷醇類(flavanols)，是茶葉中含量最高的多元酚，約占可溶性成分的 75%~80%^[9]。茶葉中所含的兒茶素類型有五種，包含游離型的三種與酯化的二種。游離型的分別為兒茶素(Catechin, C)，表兒茶素(Epicatechin, EC)，表沒食子兒茶素(Epigallocatechin, EGC)，酯化型的包括表兒茶素沒食子酸酯(Epicatechin gallate, ECG)，表沒食子兒茶素沒食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)^[1]。其結構式、分子量、pKa 值與含量如表 1。從表 1 中得知(-)-EC、(-)-EGC、(-)-ECG、(-)-EGCG 含量較高，其中含量最高的(-)-EGCG，在苯環上羥基(-OH)的量也最多，而兒茶素生物活性的大小與苯環上羥基的多寡有關，所以(-)-EGCG 是茶葉中最主要也最重要的活性成分。

Table 1. Structures, molecular weight, pKa and quantity contained of five catechins in tea ^[10]

Name	abbreviation	Structures	Molecular weight	pKa	Quantity contained
(±)-Catechin	(±)-C		290.27	9.50	2~3%
(-)-Epicatechin	(-)-EC		290.27	9.50	7~9%
(-)-Epigallocatechin	(-)-EGC		306.27	8.99	13~17%
(-)-Epicatechin gallate	(-)-ECG		442.37	8.38	12~16%
(-)-Epigallocatechin gallate	(-)-EGCG		458.37	8.39	50~60%

茶中另一主要分子為咖啡因 (Caffeine)，其結構如圖 1。在每公升的茶當中，咖啡因的含量約在 65 ~ 470 mg 左右^[11,12]。咖啡因是一種中樞神經系統興奮劑^[13]，

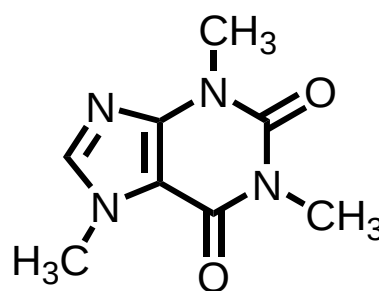


Fig. 1. Structure of caffeine.

常常用於提神或消除疲勞，但短時間內攝取過大的劑量(超過 250 mg)會造成「咖啡因中毒」，其症狀有神經過敏、易怒、焦慮、顫抖、肌肉抽搐(反射亢進)、失眠和心悸^[14,15]。另外，咖啡因能使胃酸增多，過度攝取咖啡因會導致消化性潰瘍、糜爛性食道炎和胃食道逆流^[16]，因此如何去除咖啡因，也是探討兒茶素萃取方法的重點之一。

二、 兒茶素萃取與分析方法之文獻回顧

兒茶素與其衍生的商品深具經濟價值，許多萃取方式也應運而生，傳統是以液相萃取法，所使用的溶劑有熱水、甲醇、乙醇、丙酮、飽和之乙酸乙酯及氯仿等^[17,18]。

1991 年 Ruan's 研究團隊以水溫 90 °C 熱水，使用浸泡式萃取法與逆流式連續萃取法萃取包種茶中之可溶成分、兒茶素類、多元酚類、咖啡因及游離胺基酸等成分，發現逆流式連續萃取法較浸泡式萃取法的效率高 1.5 倍至 2.5 倍，而最終萃取達平衡時的濃度皆為 3.82 g/L^[19]。

Liao's 研究團隊於 2000 年發表之文章中提到的萃取法為：將茶葉以熱水煮沸半個小時，經過濾後之茶湯以等體積之乙酸乙酯震盪平衡，在冰箱過夜後將上層之乙酸乙酯吸出，加入極性樹脂混合。將混合溶液過濾得到的樹脂再以水溶離樹脂上的兒茶素，過濾後將濾液乾燥，可得「粗兒茶素類製品」，其兒茶素純度約在 50 % ~ 60 %，且不含咖啡因^[1]。

2000 年 Lee, B. L. 等研究團隊針對市面上常見之茶葉進行分析，所使用的萃取方法為：各取 0.1 g 茶葉加入 10 mL 沸水，搖晃 30 秒後，在維持水溫為 90°C 的情形下萃取靜置 30 min，再取出液體部分 0.2 mL，加入 0.4 mL 含有 20% 乙腈(Acetonitrile) 的水溶液，以 15000 g 離心 2 min，取出上層液進行分析^[20]。

2003 年，David J. W. 的研究團隊比較日本傳統泡茶方法 — 取 1 g 抹茶以 85 mL、85°C 熱水萃取，與 1 g 抹茶以 25 mL 甲醇萃取，兩者經離心 10 min 後取出上層液，再以 0.2 μ m 尼龍膜過濾，結果發現以甲醇萃取之兒茶素含量較以熱水萃取的量多，其中(-)-EGCG 含量更多達 580 倍以上^[21]。

利用有機溶劑雖然有較好的回收率，但其有高度可燃性與殘留的疑慮，因此另有開發較無毒性之超臨界二氧化碳加入修飾劑萃取兒茶素的方法。

1999 年 Chang's 研究團隊發表利用超臨界二氧化碳萃取與濃縮烏龍茶中的茶葉精油，當使用 4500 psi，60°C 流速 5 mL/min 之超臨界二氧化碳 300 L 有較佳的萃出率(回收率)。在茶葉樣品與 46%乙醇以 3:5 比例混合後，再以最佳化萃取條件進行萃取，發現萃取出來的濃度可再增加 20%^[22]。

同年 Chang's 研究團隊亦發表了利用超臨界二氧化碳萃取烏龍茶粉中的兒茶酚類，當使用 333K、31MPa 超臨界二氧化碳添加 10 mole% 乙醇修飾劑，萃取 90 g 之烏龍茶粉。發現添加乙醇修飾劑可增加 2.8 倍的總茶油量，且可增加兒茶素/咖啡因的比值，總兒茶素萃取量可達 1000 ppm 左右^[23]。

2003 年 Vaheer, M. et al. 發表以利用超臨界二氧化碳萃取種於愛沙尼亞(Estonia)的虎仗(Japanese knotweed，日本蓼科雜草)之黃酮類分子，當使用 60°C，34.5 Mpa 超臨界二氧化碳萃取添加 7.5% (w/w) 乙醇之樣品，結果發現虎仗根部所含的黃酮類總量最高^[24]。

雖然使用超臨界二氧化碳萃取較安全，唯系統建置成本高且萃取效果較差，必須加入大量修飾劑，因此在產業界並不普及。

奈米科學的興起，大大改變了人們的生活方式，奈米材料的大表面積、小尺寸效應，產生了與大尺寸時截然不同的光學、力學、熱學、化學、電學…等性質^[25]，利用這些性質，我們亦可以用作樣品前處理

的材料。

2002 年，T. Rajh 的研究團隊發現，經烯二醇類(enediol)配位基表面修飾的金屬氧化奈米粒子，其可見光吸收峰產生紅移的現象，在膠體二氧化鈦奈米粒子(TiO_2 nanoparticles, TiO_2 NPs)溶液中更可直接見到顏色的變化，其原因是烯二醇結構對奈米粒子表面結構重組，造成金屬氧化物八面體結構(octahedral)與配位基(metal-ligand)偶極距(dipole moment)改變所造成，氧化鐵奈米粒子(Fe_2O_3 nanoparticles, Magnetic nanoparticles, MNPs)與二氧化鋯奈米粒子(ZrO_2 nanoparticles)也有相同的影響^[26]。

兒茶素分子中的烯二醇的結構，提供與 TiO_2 NPs 配位的橋樑，Chang's 研究團隊於 2007 年發表的文獻中利用 TiO_2 NPs 對兒茶素等含烯二醇之樣品進行前處理，再以表面輔助雷射脫附游離質譜法(surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, SALDI – MS)偵測 Catechin、(-)-EGC 與(-)-EGCG，可得偵測極限(limit of detection, LOD)分別為 0.45、1.85 與 0.65 μM ，並可偵測實物樣品中之兒茶素含量，為萃取兒茶素提供了一個新的方向^[27]。

烯二醇類對氧化鐵奈米粒子與二氧化鈦奈米粒子都有 ligand – to – metal oxide crosstalk 的現象，且氧化鐵奈米粒子便宜、毒性極低，萃取過程在水相中進行，減少有機溶劑污染的疑慮，且可直接使用強

力磁鐵分離氧化鐵奈米粒子，降低萃取的成本，大大的提高了使用氧化鐵奈米粒子來萃取茶葉中兒茶素分子的可行性。

在兒茶素的分析與定量上，文獻中測定茶多酚類的方法常見有酒石酸鐵試劑總量檢測法^[28]、高效能液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)^[20,23]。而毛細管電泳 (Capillary Electrophoresis, CE)因為具備了高效率、高解析度、分析時間短、低樣品與試劑消耗而在近幾年來被廣泛的應用。

2003 年 L.Suntornsuk 等研究團隊以 150 mM pH10 硼酸緩衝液進行電泳分離桑葉中的兒茶素 (Catechin)、芸香苷 (Rutin)、沒食子酸 (Gallic acid)、槲皮苷 (Quercitrin)、山柰酚 (Kaempferol) 與槲黃素 (Quercetin)等六種黃烷醇類，在長度 51 cm，有效長度 42.5 cm，內徑 50 μm 的玻璃毛細管，以 15 kV 電壓電泳、紫外光偵測器 (UV Detector) 設定在 207 nm，可得偵測極限 (LOD)在 0.86 ~ 3.16 $\mu\text{g/mL}$ ，實物樣品中可測得每 100 g 桑葉中含有 0.452 g 槲黃素^[29]。

2004 年 Volpi, N.發表了以電泳分離蜂膠中 15 種黃烷醇類，其最佳化條件為使用 30 mM pH 9 四硼酸二鈉 (Sodium tetraborate, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)緩衝液，使用總長 70 cm，有效長度 50 cm，內徑 50 μm 的玻璃毛細管，在 15 kV 電壓，紫外光偵測器設在 254 nm，40 分鐘內可完全分離，其變異係數 (CV%)皆在 8.8%以下，且發現蜂膠中咖啡

酸(caffeic acid)、高良薑素(Galangin)、槲黃素(Quercetin)、白楊素(Chrysin)含量較高^[30]。

2005 年 X. Xu 等研究團隊分析龍牙草(*Agrimonia pilosa* Ledeb.)中的五種黃酮類分子(兒茶素、金絲桃苷(Hyperoside)、槲皮苷、槲黃素與芸香苷)，在使用 pH 8.8，混合了 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 與 120 mM 磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)的緩衝溶液，以長 60 cm，內徑 25 μm 的毛細管，以 19.5 kV 電壓進行電泳，並使用電化學法(+0.95V，vs. Ag/AgCl)進行偵測。所有的化合物其 LOD 在 0.02 ~ 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 之間，並可偵測兒茶素在龍牙草葉之含量為 264.5 $\mu\text{g/g}$ ，根之含量為 193 $\mu\text{g/g}$ ^[31]。

另外，近年來也有文獻提出使用毛細管微胞電動層析(micellar electrokinetic chromatography，MEKC)與毛細管微乳化電動層析(microemulsion electrokinetic chromatography, MEEKC)等方法來分離茶葉中的成分，其最大的優點，就是除了帶電離子之外，還可以將不同的中性物質分離出來。方法就是在緩衝溶液中添加介面活性劑。介面活性劑是一端親水性，另一端為疏水性之長碳鏈。當緩衝溶液中添加之介面活性劑超過其臨界微胞濃度(critical micellar concentration, cmc)時，介面活性劑就會以疏水端互相聚集形成微胞，利用分析物質與微胞之間的作用力不同，達成分離中性物質的目的。另有添加手相選擇劑分離異構物。而 MEEKC 又比 MEKC 多增加了油相，以提高

分離效率^[32]。

2003 年 Pomponio, R. et al. 研究團隊以毛細管微乳化電動層析法分析綠茶中的六種兒茶素與咖啡因，在使用 24 cm (有效長度：19.5 cm)，內徑 50 μm 毛細管，最佳化緩衝溶液條件：1.36%(w/v)庚烷、2.31%(w/v)SDS、9.72%(w/v)正丙醇與 pH 2.5 50 mM 磷酸緩衝液 88.61%下，以 -10 kV 進行電泳，所有樣品可在 12 分鐘內被完全分離出來，其中(+)-C 之線性範圍在 2~6 $\mu\text{g/mL}$ ，LOD 為 0.391 $\mu\text{g/mL}$ ，LOQ 在 1.17 $\mu\text{g/mL}$ ^[33]。

2004 年 Kodama, S. et al. 研究團隊以毛細管微胞電動層析法，並在緩衝溶液中加入 6-O- α -D-Glucosyl- β -cyclodextrin (6G- β -CD)進行分離茶葉中的(±)-C、(±)-EC、(-)-CG、(-)-EGCG、(-)-ECG、(-)-EGC、Caffeine，在使用 pH 6.4，最終濃度 200 mM 硼酸與 20 mM 磷酸緩衝液混合 25 mM 6G- β -CD 與 240 mM SDS (sodium dodecyl sulfate)，在 +25 kV 下以 64.5 cm (有效長度 56 cm)，內徑 50 μm 之毛細管進行電泳，結果發現標準品中線性範圍皆在 2~100 mg/L，偵測極限最低可到 0.2 mg/L。在真實樣品中，發現(-)-EGCG 的含量最高，泡製的茶 (+)-C 的含量較(-)-C 的多，但茶飲料剛好相反^[34]。

2005 年 Huang H.-Y. et al. 研究團隊以毛細管微乳化電動層析法分析十二種多酚類物質，在使用 1.36%(w/v)庚烷、2.89%(w/v)SDS、

7.66%(w/v)環己醇、2% w/v 乙腈與 pH 2.0 25 mM 磷酸緩衝液 86.1% 下，，毛細管長 48.5 cm(有效長度 40 cm)，內徑 50 μm ，在 -27 kV 下進行電泳，所有樣品可在 14 分鐘內被完全分離出來，其中所有待測物之線性範圍在 2~200 $\mu\text{g/mL}$ ， R^2 都在 0.999 以上。應用於真實樣品上，可測得茶葉中(-)-EGCG 含量 21.4 $\mu\text{g/mL}$ ，茶飲料(-)-EGCG 含量為 57.7 $\mu\text{g/mL}$ ^[35]。

2006 年 Gotti, R. et al. 研究團隊利用添加環糊精之毛細管微胞電動層析法(CD-MEKC)偵測可可豆中的兒茶素。在使用緩衝溶液條件為 12 mM HP- β -CD (hydroxypropyl- β -cyclodextrin)、90 mM SDS 與 50 mM pH 2.5 之 Britton-Robinson buffer(硼酸、乙酸與磷酸混合溶於水中，以 1 M 氫氧化鈉調整 pH 值為 pH 2.5，再定量到三種酸之最終濃度都為 16.8 mM 之混合液)，毛細管長 38.5 cm(有效長度 8.5 cm)，內徑 50 μm ，在 15 kV 下進行電泳，所有樣品可在 12 分鐘內被完全分離出來，其中(-)-EC 與(+)-C 線性範圍在 15.0~320.0 $\mu\text{g/m}$ 與 1.0~40.0 $\mu\text{g/mL}$ ， R^2 都在 0.999 以上，LOD 都為 0.03 $\mu\text{g/mL}$ ，LOQ 都為 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。應用於真實樣品上，可將可可豆中(-)-EC 與(+)-C 兩鏡相異構物分離出來^[36]。茶素萃取方法與分析整理如表 2。

Table 2. The extraction and analysis conditions of catechins

Extract	Real Sample	Extraction conditions	Analysis system	Analysis condition	conclusions	Ref.
Catechins	Tea	茶葉以熱水煮沸半小時，經過濾後以等體積醋酸乙酯震盪平衡，在冰箱中過夜後將上層之醋酸乙酯吸出，以極性樹脂吸附兒茶素，分離咖啡因，再以純水溶離，收集濾液過濾，經乾燥後得兒茶素粗製品。	—	—	兒茶素粗製品其兒茶素純度 50%~60%，不含咖啡因。	[1]
Catechins, Polyphenol, Caffeine, amino acid, etc.	Pou-chong (包種茶)	取 20 g 茶樣，加入 90 °C 熱水 200 mL，以逆流式連續萃取法萃取 20 分鐘。	Vanillin 呈色法	—	萃取液中萃取物總濃度為 3.82 g/L，逆流式連續萃取法效率較浸泡式好 1.5 至 2.5 倍。	[19]
(-)-EC, (-)-ECG, (+)-C, (-)-EGCG, (-)-EGC, caffeine, catechin gallate adenine, gallic acid theophylline, caffeic acid,	Long-jing(龍井茶), Pu-erh(普耳茶), Jasmine(茉莉綠茶), Chrysanthemum(菊花茶), Iron Buddha(鐵觀音), Oolong tea(烏龍茶), Japanese(日本綠茶) and Ceylon tea(錫蘭紅茶).	各取 0.1 g 茶葉加入 10 mL 沸水，搖晃 30 秒後，維持 90 °C 萃取 30 min，取出 0.2 mL 溶液加入 0.4 mL 含 20% Acetonitrile 的水溶液，再以 15000 g 離心 2 min，取出上層液進行 HPLC 與 CE 分析。	HPLC – DAD (205 nm) CE – UV (205 nm)	HPLC : Column : PartisSphere 5 C ₁₈ , 5 µm, 110 mm × 4.6 mm I.D. Mobile phase : 5% ACN with 0.035% TFA aqueous and 50% ACN with 0.025% TFA. Flow rate : 1.0 mL/min CE : Capillary : 40 cm×50 µm I.D. Running buffer : 200mM boric acid, 10mM NaH ₂ PO ₄ , 4.5mM β-CD with 27.5% ACN. Voltage : 25 kV	Linear range : (-)-EC, (-)-ECG, (+)-C at 0.05~50 µg/mL. (-)-EGCG, (-)-EGC at 0.05~100 µg/mL.	[20]

(-)-EGC, (-)-EC, (-)ECG,(-)-EGCG, (-)-C, Caffeine	Matcha green tea	1. 85.0 mL、85 °C 熱水加入 1 g 抹茶中，離心 10 分鐘取上層液，再以 0.2 µm 尼龍濾紙過濾。 2. 25 mL 甲醇加入 1 g 抹茶中，離心 10 分鐘取上層液，再以 0.2 µm 尼龍濾紙過濾。	CE – UV (200 nm)	Capillary : 80.5 cm (effective length of 72.0 cm)×50 µm I.D. Running buffer : 25 mM phosphate buffer pH 7.20 mM SDS, with 5% Methanol. Voltage : 27 kV	以甲醇萃取之 EGCG 較以熱水萃取多 137 倍。	[21]
Tea oils	Pou-chong Oolong tea	以 4500 psi , 60 °C 超臨界 CO ₂ 300 L 萃取 46% 乙醇與茶葉以 5:3 混和之樣品	—	—	在樣品中添加 46% 乙醇之總萃取量較未添加高 20%	[22]
Catechins	Tea powder	以 333 K、31 MPa 超臨界 CO ₂ 加入 10 mole%, 99.8% 乙醇共溶劑萃取。	HPLC – UV (231 nm)	—	隨著 99.8% 乙醇共溶劑增加，茶油萃取量增加，添加 10 mole% 有最大萃取量。無共溶劑之茶油萃取量最低，但兒茶素比咖啡因比值可達 10 以上。	[23]
Phenolic	Japanese knotweed	60 °C，34.5 Mpa 超臨界二氧化碳萃取添加 7.5% (w/w) 乙醇之樣品	CE –UV (240 nm)	Capillary: 75 cm (effective length of 5 cm)×50 µm I.D. Running buffer: 25 mM disodium tetraborate buffer at pH 9.4 . Voltage : 18 kV	根部所含的 phenolic 總量最高	[24]
Catechins	Tea	將 1.4 g 茶葉以 400 mL 90 °C 熱水沖泡，靜置 3 分鐘，過濾取濾液後稀釋 10 倍，加入粒徑 5±1 nm TiO ₂ 奈米粒子避光靜置 1 小時進行萃取。	SALDI – TOF	—	LOD : Catechin: 0.45 µM (-)-EGC: 1.85 µM (-)-EGCG: 0.65 µM	[27]

Catechin, Rutin, Gallic acid, Quercitrin, Kaempferol, aglycone quercetin	Mulberry leaves (Morus alba L., 桑葉)	先將桑葉以 60 °C、8 hr 烘乾，磨粉後，取 5 g 以 1.5 N HCl 30 mL 和 甲醇 30 mL 混合液萃取 2 hr，再以 Whatman paper No.1 濾紙過濾。	CE – UV (270 nm)	Capillary : 51 cm (effective length of 42.5 cm)×50 µm I.D. Running buffer : 150mM boric acid. Voltage : +15 kV	aglycone quercetin : LOD: 0.86 µg/mL LOQ: 3.16 µg/mL 0.452 g/ 100 g on dry mulberry leaves weight.	[29]
Flavonoids, phenolic acids	propolis		CE – UV (254 nm)	Capillary : 70 cm (effective length of 50 cm)×50 µm I.D. Running buffer : 30 mM pH9 tetraborate. Voltage : +15 kV	CV% was lower than 8.8. A great percentage of propolis were caffeic acid, galangin, chrysin and quercetin.	[30]
Catechin, hyperoside, quercitrin, quercetin, rutin	Agrimonia pilosa Ledeb. (龍牙草)	取 0.5 g 經乾燥磨碎之樣品加入 50 mL 乙醇，以超音波震盪萃取 30 min 即完成。	CE – ECD	Capillary : 60 cm×25 µm I.D. Running buffer : pH8.8 60 mM tetraborate, 120 mM NaH ₂ PO ₄ . Voltage : +19.5 kV ECD: working electrode:500 µm diameter carbon disk; auxiliary electrode: a platinum; reference electrode: Ag/AgCl.	Linear range and LOD of catechin were 0.09 ~ 53.3 µg/mL and 0.02 µg/mL. Catechin in leaves and stems of Agrimonia pilosa Ledeb. is 264.5 µg/g and 193.6 µg/g	[31]
catechins	Cistus	取 4 g 樣品以 150 mL 熱水萃取，重複三次，將三次萃取液集中，以 Buchner sintered-glass 濾膜過濾。	CE – UV (200 nm)	Capillary: 24 cm(effective length of 19.5 cm)×50 µm I.D. Running buffer : 1.36% (w/v) heptane, 2.31% (w/v) SDS, 9.72% (w/v) butan-1-ol, and 50 mM sodium phosphate buffer (pH2.5) 86.61% (v/w) Voltage : -10 kV	Linear range, LOD, and LOQ of (+)-C were 2~6 µg/mL, 0.391 µg/mL and 1.17 µg/mL. There was 1.26 µg/g of (+)-C in the Cistus.	[33]

(±)-C, (-)-ECG, (±)-EC, (-)-EGCG, (-)-EGC,	Green、oolong and black teas	取 1 g 茶葉以 85°C 60 mL 萃取 1 分鐘，再以 0.22 μm 濾膜過濾。	CE – UV (210nm)	Capillary : 64.5 cm (effective length of 56 cm)×50 μm I.D. Running buffer : 200 mM borate-20mM phosphate buffer (pH 6.4) containing 240 mM SDS and 25 mM 6G-β-CD. Voltage : +25 kV	(-)-EGCG 的含量最高，泡製的茶(+) -C 的含量較(-)-C 的多，但茶飲料剛好相反，而全部的樣品只能偵測到(-)-EC，無法偵測到(+) -EC。	[34]
13 phenolic compounds	Tea	取 1 g 樣品加入 20 mL 100°C 熱水中，萃取 10 分鐘，取出濾液即可。	CE – UV (200 nm)	Capillary : 48.5 cm (effective length of 40 cm)×50 μm I.D. Running buffer : 1.36% (w/v) heptane, 2.89 % (w/v) SDS, 7.66% (w/v) butan-1-ol, 2% ACN and 25 mM sodium phosphate buffer (pH2) 86.1% (v/w) Voltage : -10 kV	所有樣品可在 14 分鐘內被完全分離出來，其中所有待測物之線性範圍在 2~200 μg/mL，R2 都在 0.999 以上。應用於真實樣品上，可測得茶葉中 (-)-EGCG 含量 21.4 μg/mL，茶飲料 (-)-EGCG 含量為 57.7 μg/mL。	[35]
catechins	<i>Theobroma cacao</i> beans	取 50 mg 樣品以體積比 71/29 之水/乙醇混合液 1mL，於溫度 65°C 下萃取 15 分鐘，再以 4000 rpm 離心 5 分鐘，將上層液以 0.2 μm 濾膜過濾。	CE – UV (200 nm)	Capillary : 38.5 cm (effective length of 8.5 cm)×50 μm I.D. Running buffer :12 mM HP-β-CD, 90 mM SDS and pH 2.5 50 mM Britton-Robinson running buffer Voltage : 15 kV	(-)-EC 與(+) -C 線性範圍在 15.0~320.0 μg/m 與 1.0~40.0 μg/mL，R2 都在 0.999 以上，LOD 都為 0.03 μg/mL，LOQ 都為 0.1 μg/mL。應用於真實樣品上，可將可可豆中 (-)-EC 與(+) -C 兩鏡相異構物分離出來	[36]

三、 毛細管電泳簡介

電泳是指帶電物質在電場中因受吸引或排斥而產生的不同速率運動。在毛細管電泳中，電泳在充有緩衝溶液的細毛細管中進行，管內徑一般在 25 μm 至 75 μm 之間，其微小的內徑與毛細管的表面積/體積比很大，使產生的熱量可以很快的擴散。且毛細管中的高電阻能夠在使用很高的電場時(100~500 V/cm)時只產生很少的熱量。毛細管電泳使電泳分離能在高電場下進行，使得分析時間縮短、效率及分離度提高，且因毛細管中使用水相進行電泳實驗，提供了更多樣化的操作模式，用以分離更多種類的樣品。以下簡單介紹毛細管電泳理論。

(一)電泳淌度

電泳的分離是以電場中溶質的速度差異為基礎。一個離子的遷移速度可用下式表示：

$$v = \mu_e E \cdots \cdots (1)$$

v ：離子遷移速度、 μ_e ：電泳淌度、 E ：電場強度

淌度由分子所受的電場力與其通過介質時所受的摩擦力的平衡所決定。即：

$$\mu_e \propto \frac{F_E}{F_F} \cdots \cdots (2)$$

F_E ：電場力、 F_F ：摩擦力

電場力可寫成：

$$F_E = qE \quad \cdots \cdots (3)$$

q ：離子電量

而對球型離子而言，摩擦力為：

$$F_F = -6\pi\eta r v \quad \cdots \cdots (4)$$

η ：溶液黏度、 r ：離子半徑、 v ：離子速度

在電泳過程中，電場力與摩擦力兩個力相等，方向相反。

$$\begin{aligned} qE &= -6\pi\eta r v \\ \text{則 } v &= \frac{qE}{-6\pi\eta r v} \quad \cdots \cdots (5) \end{aligned}$$

將(5)代入(1)，可得

$$\mu_e = \frac{q}{-6\pi\eta r v}$$

由上式可知，帶電量大的離子，電泳淌度較大，帶電量小的，電泳淌度小。

(二)電滲流 (electroosmotic flow, EOF)

除了帶電粒子的移動，毛細管中的緩衝溶液因電場所產生的電滲流，是另一電泳分離的重要因素。如圖 2(a).所示，造成電滲流的原因是存在玻璃毛細管壁/溶液介面的電雙層。當 pH 值大於 3 時，毛細管因內表面壁的矽醇基(Si-OH)離子化而帶負電荷，而緩衝溶液中的陽離子因正負電相吸，聚集在管壁形成緻密層。電荷吸引力與距離平方成反比，所以距離管壁越遠，吸引力越弱，

而形成較為稀疏的正離子組成的擴散層。此兩層合稱為電雙層，如圖 2(b)。因為電雙層與靠近的溶液之間的電荷差異形成一個電位差，稱為 zeta 電位，施加電壓後，組成擴散層的正離子會由正極往負極移動，並帶動所有的溶液向負極移動，形成電滲流，如圖 2(c)。

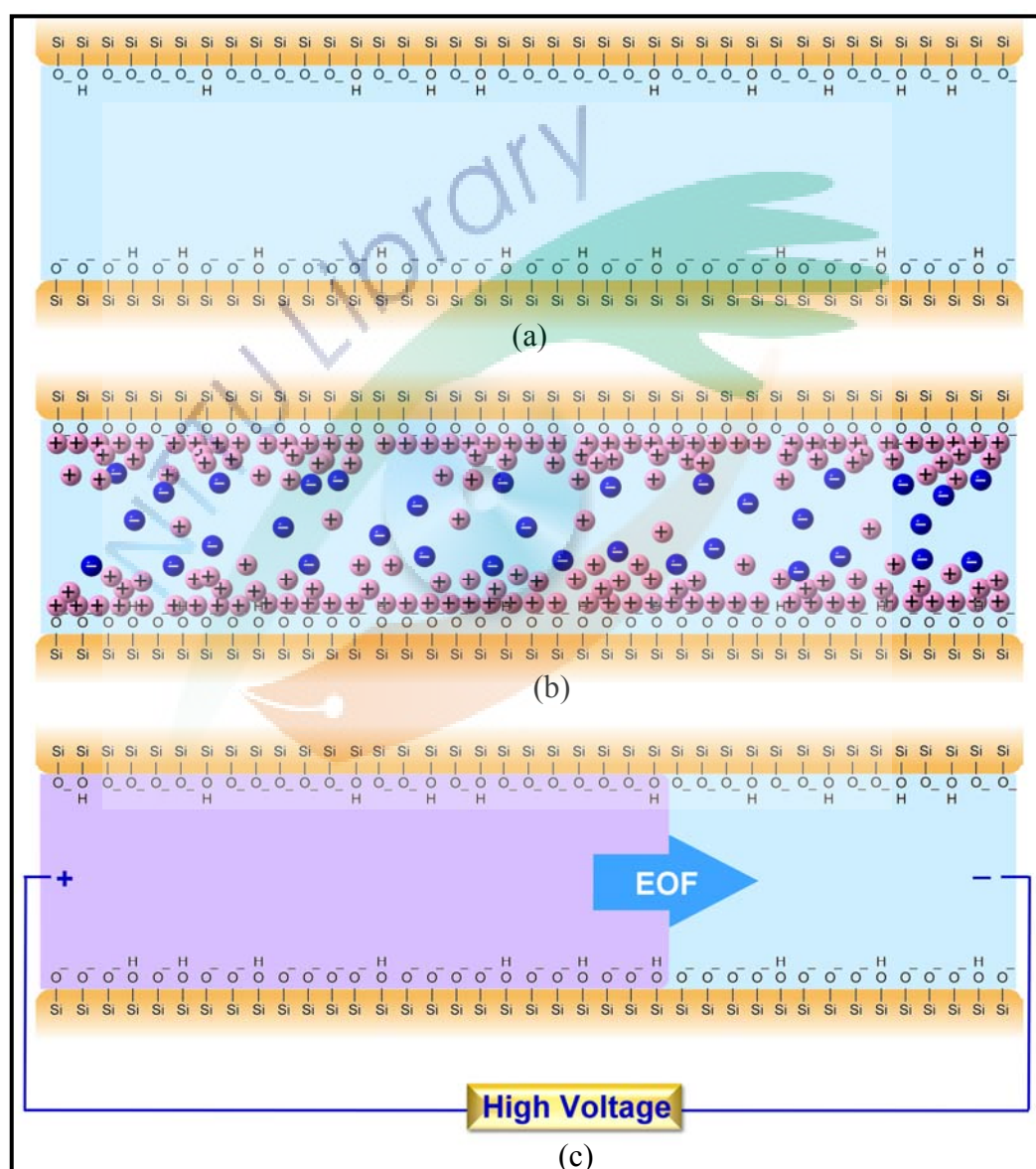


Fig. 2. Development of the electroosmotic flow:
 (a) negatively charge on fused silica surface.
 (b) hydrated cations accumulating near surface.
 (c) bulk flow towards the cathode upon application of electric field.

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \xi}{\eta} E \quad \text{或} \quad v_{EOF} = \frac{\epsilon \xi}{\eta}$$

v_{EOF} ：速度、 μ_{EOF} ：電滲淌度、 ξ ：zeta 電位、 ϵ ：界電常數

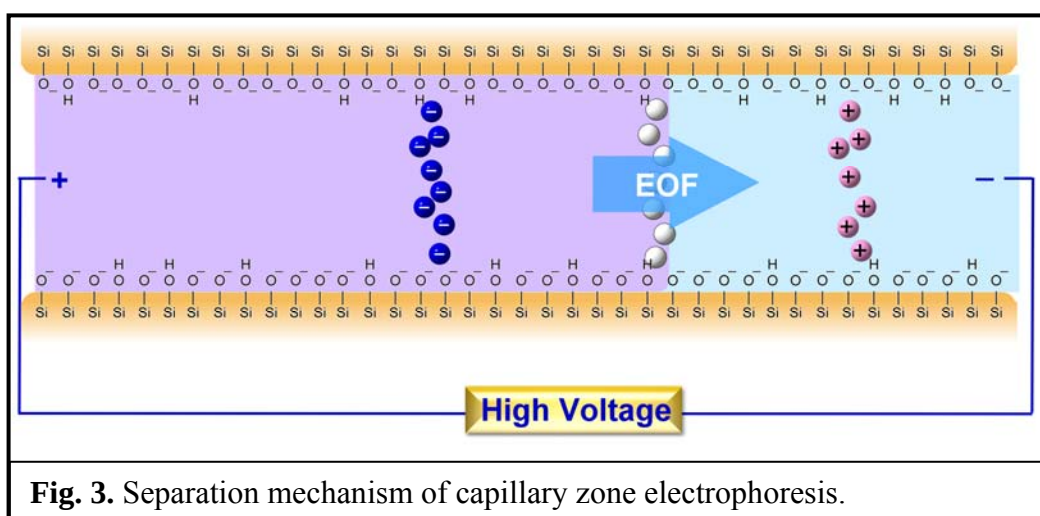
由上式可知電滲流與 zeta 電位大小有關，而 zeta 電位取決於毛細管表面電荷與緩衝溶液的離子強度，表面電荷量又受 pH 控制，所以電滲流會因為溶液的 pH 值而影響大小。

電滲流與一般壓力進行的分析技術的最大差別，是電滲流由靠近管壁的液體帶動流動，不會因液體與管壁摩擦而形成壓力差，造成層流，使得樣品波峰變寬。

電滲流的另一優點是可以使所有離子往同一方向移動，無論所帶電荷為何。在毛細管內壁帶負電的形況下，電滲流是由正極往負極移動，帶正電荷的物質在電場下的移動方向與電滲流相同，其電泳速度是電泳淌度加上電滲流，所以會最快，不帶電的物質會隨著電滲流流出，帶負電的物質在電場下移動方向與電滲流相反，所以最慢被流出。

(三)毛細管區帶電泳 (Capillary zone electrophoresis, CZE)

本研究使用毛細管區帶電泳法進行分析，即只在毛細管中注入緩衝溶液，讓樣品因其帶電量與質量的差異而形成不同的區塊分離，而中性離子就隨著電滲流被分離出來，見圖 3^[32]。



四、研究動機

隨著國人生活水準提升，對養生與保健的觀念愈受重視，開啟了諾大保健食品的商機。兒茶素的高抗氧化特性與價格低廉、易取得，成為保健食品的新寵兒，除了越來越熱賣，種類越來越多的茶飲料之外，許多兒茶素或添加兒茶素的保健商品用品亦紛紛上市，可見兒茶素應用在養生保健商品還有無窮的潛力。

綜合以上文獻整理，氧化鐵奈米粒子 (Magnetic nano – particles, MNPs)可吸附茶葉中含烯二醇(enediol)結構之茶多酚，且反應在水相中即可進行，提供了一種新興、安全萃取兒茶素的方向。故本研究擬利用此特性萃取茶中兒茶素，探討氧化鐵奈米粒子與兒茶素之最佳吸附比例、吸附時間與選擇性吸附兒茶素之成效，再以適當的脫附劑，探討其 pH 值、濃度、脫附時間與可重複脫附次數對回收率的影響，

以尋找最大脫附量，並利用毛細管電泳連接紫外光偵測器 (UV Detector) 發展分離兒茶素的方法，偵測茶葉中含量較高的表兒茶素 (Epicatechin, (-)-EC)、表沒食子兒茶素 (Epigallocatechin, (-)-EGC)、表兒茶素沒食子酸酯 (Epicatechin gallate, (-)-ECG)、表沒食子兒茶素沒食子酸酯 (Epigallocatechin gallate, (-)-EGCG) 與咖啡因 (Caffeine)，探討不同的緩衝溶液、改變 pH 值、濃度與添加有機溶劑對分離分析物的影響，最後使用最佳化的實驗條件對分析物做定量的線性範圍及應用於真實樣品與經氧化鐵奈米粒子萃取液中兒茶素的含量。



第二章 材料與方法

一、藥品

實驗中所使用之(-)-EC、(-)-EGC、(-)-ECG、(-)-EGCG、咖啡因(Caffeine)標準品與二氯化鐵(Fe(II) chloride, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、三氯化鐵(Fe(III) chloride, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，皆購於美國Sigma-Aldrich公司。磷酸(Phosphoric acid, H_3PO_4)、磷酸二氫鈉(Sodium Dihydrogen Phosphate, NaH_2PO_4)、磷酸氫二鈉(Disodium Hydrogen phosphate, Na_2HPO_4)、Tris(Tris(hydroxymethyl)aminomethane, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$)、硼酸(Boric acid, H_3BO_3)、酒石酸(Tartaric acid)、鹽酸(Hydrochloric acid, HCl)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide, NaOH)、氨水(Ammonium Hydroxide Solution, NH_4OH)與乙醇(ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)，購自德國Riedel-de Haën公司。甲醇(methanol, CH_3OH)購自德國Merck公司。二次去離子水由美國Barnstead公司出產之超純水系統所製造。

二、儀器

紫外可見光吸收儀為Perkin Elmer Lambda EZ210。毛細管電泳系統包括Model Prince 250 CE System及與紫外光吸收偵

測器 Bischoff Lambda 1010，儀器透過電腦以 WPrince 32 bit 軟體控制，並以 SISC 32 2.0 中文版軟體系統擷取與計算數據。紫外光吸收設定波長 $\lambda=275$ nm。pH meter 使用 HORIBA pH/ion meter D-23。合成的氧化鐵奈米粒子委請台大農學院以穿透式電子顯微鏡鑑定，其型號為 JEOL JSM-1200EX II TEM (Tokyo, Japan)，電壓為 80.0 kV。

三、標準品與緩衝溶液配製

四種兒茶素等標準品，以甲醇 (Methanol) 配製成濃度 1×10^{-2} M，咖啡因以甲醇配成濃度 5×10^{-3} M，做為母液 (stock solution)，再依實驗所需，以二次去離子水稀釋成所需濃度。母液以 4°C 避光保存，所需濃度於實驗當日配製。所有鹽類與緩衝溶液直接以二次去離子水配製成所需濃度之溶液。Tris-Borate 緩衝液是以硼酸溶液添加 Tris 緩衝液，調整所需之 pH 值，然後以二次去離子水配成硼酸最終濃度為 900 mM 之 Tris-Borate 緩衝液，作為母液，實驗時以二次去離子水稀釋成所需濃度。磷酸緩衝液 (phosphate buffer solution) 以等濃度之磷酸、磷酸二氫鈉與磷酸氫二鈉調整所需之 pH 值，再以二次去離子水稀釋成所需濃度。其餘鹽類或緩衝溶液皆以氫氧化鈉溶液調整至所需之 pH 值，再以二次水稀釋至所需濃度。

四、 鐵奈米粒子之製備

氧化鐵奈米粒子的合成參考 Harrison W. W. 研究團隊於 2004 年發表之方法^[37]。先稱取 2.03 g 之二氯化鐵 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 與 4.88 g 之三氯化鐵 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 置入 15 mL 之離心管中，加入 0.887 mL，37% 鹽酸，再以超音波震盪儀震盪至完全溶解^[38]。另取一 250 mL 塑膠廣口瓶，加入 155 mL 之二次去離子水與 8.3 mL 30% 氨水溶液，在通入氮氣與攪拌的同時，加入 0.887 mL 二氯化鐵與三氯化鐵混合溶液，並在持續通入氮氣的情況下，攪拌 15 分鐘，即可得到氧化鐵奈米粒子 (Magnetic nanoparticles, MNPs)，最後移除氮氣，避光以 4°C 保存。氧化鐵奈米粒子製備過程如圖 4。

五、 真實樣品之處理

本實驗中所有之真實樣品為購自臺東地區超商之瓶裝茶樣品，茶樣品先稀釋 10 倍，再以 0.22 μm nylon 濾膜進行過濾，即可進行電泳。真實樣品進行氧化鐵奈米粒子前處理前，先以毛細管電泳確認其兒茶素之總含量，再計算其氧化鐵奈米粒子之所需量，其餘方法依照氧化鐵奈米粒子吸附與脫附兒茶素之流程，加入適量之氧化鐵奈米粒子進行吸附與脫附，經強力磁鐵分離氧化鐵奈米粒子後，取上層液進行電泳，確認回收率。

六、 氧化鐵奈米粒子吸附與脫附兒茶素流程

在本實驗中探討了氧化鐵奈米粒子對兒茶素之最大吸附比例、吸附時間等因素，與酒石酸溶液之 pH 值、濃度、脫附時間、脫附次數與有機溶劑添加與否對脫附量之影響，並以最佳化條件對真實樣品前處理之結果。其實驗流程如下：

將所需體積之氧化鐵奈米粒子水溶液置入離心管中，以強力磁鐵將氧化鐵奈米粒子與液體分離，移除上層液，再加入兒茶素溶液或真實樣品，搖晃至上下層均勻混合後，避光靜置，等待吸附完成。經吸附所需時間之後，以強力磁鐵將氧化鐵奈米粒子液體分離，取出上層液進行毛細管電泳偵測，可知氧化鐵奈米粒子吸附兒茶素之情形，此過程為吸附。

接下來將吸附過兒茶素之奈米粒子加入脫附劑，搖晃至氧化鐵奈米粒子與脫附劑均勻混合後，避光靜置至脫附時間結束，再強力磁鐵將氧化鐵奈米粒子與液體分離，取出上層液進行毛細管電泳偵測，可知兒茶素之回收率。若需多次脫附，則重複加入脫附劑、搖晃均勻、靜置、分離並取出上層液進行偵測。氧化鐵奈米粒子吸附與脫附兒茶素流程如圖 5。

七、 毛細管電泳實驗流程

本實驗中探討了緩衝溶液的種類、濃度、pH 值、有機溶劑

的種類、含量與電壓對兒茶素分離之影響，尋找最佳化條件後對真實樣品中與經氧化鐵奈米粒子前處理過之樣品偵測兒茶素的含量，其實驗流程如下。

玻璃毛細管長度為 65 cm，有效長度為 53 cm。新的毛細管先充滿 0.1 N 氫氧化鈉，放置隔夜後，再用 0.1 N 氫氧化鈉以 1000 psi 沖洗 30 分鐘，最後以緩衝溶液以 1000 psi 沖洗 3 分鐘，即可開始進行實驗。每天進行實驗之前，先用 0.1 N 氫氧化鈉以 1000 psi 沖洗 30 分鐘，再用緩衝溶液以 1000 psi 沖洗 3 分鐘，即可開始進行實驗。每一次電泳實驗結束，進行下一次電泳實驗之前，先用 0.1 N 氫氧化鈉以 1000 psi 沖洗 1 分鐘，再用緩衝溶液以 1000 psi 沖洗 3 分鐘。每天實驗結束，用 0.1 N 氫氧化鈉以 1000 psi 沖洗 5 分鐘，最後在毛細管充滿二次去離子水的情況下保存，即可關機。每次電泳實驗先以 100 psi 進樣 0.1 min，再以 +30 kV 進行電泳，電泳完畢再用緩衝溶液以 1000 psi 推 2 分鐘，將殘餘的樣品推出來。

第三章 實驗結果與討論

一、電泳條件之探討

(一)決定偵測波長

文獻記載中，大多數的實驗將紫外光偵測器的波長設於 200 nm，但在此波長之下，易受有機溶劑濃度之干擾，有可能影響實驗定量結果，因此我們欲找尋其他不受有機溶劑干擾之吸收波長。我們將五種兒茶素水溶液與咖啡因水溶液，以濃度 5×10^{-5} M 進行紫外可見光吸收之偵測，結果如圖 6。從圖中我們可發現五種兒茶素水溶液與咖啡因水溶液在 250 nm 到 300 nm 之間亦有吸收峰，雖然吸收無 200 nm 至 240 nm 間來的大，但在考慮避免有機溶劑的干擾情況下，本實驗選擇(-)-EGCG 之第二大吸收峰 275 nm 作為我們的偵測波長。

(二)不同濃度的硼酸緩衝溶液對分離之影響

1993 年, Morin, Ph. et al. 研究團隊提出了硼酸分子與苯環上鄰位羥基錯合的結構模型，使得分子的電位改變而在電泳中有較佳的分離效果^[39,40]。兒茶素分子中亦有苯環上鄰位羥基之結構，可能與硼酸分子形成錯合之結構如圖

7，其錯合物也可改善兒茶素電泳分離的效果，因此我們先選用 pH9 之硼酸緩衝液，分別以濃度 60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM，在 15 kV 下進行電泳，其結果如圖 8，其中 100 mM 下因電流過大，造成實驗中斷，故所以無 100 mM 之電泳圖。從圖 8 中發現隨著硼酸緩衝液的濃度提高，分離效果改變雖不明顯，但有越來越佳的趨勢，推測是因為硼酸分子的量增加，與兒茶素形成錯合的機會越高，且因濃度提高，造成離子強度增加，緻密層陽離子量越多，排列越緊密，以至於擴散層陽離子較少，影響 EOF 速度使得分離時間拉長，造成分離效果越佳。

(三)不同濃度的 Tris-borate 緩衝溶液對分離之影響

接下來我們改使用 Tris 調整硼酸緩衝液之 pH 值到 8，在 pH 8 的情形下，Tris 與硼酸的莫耳比為 5:9。我們選用 50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、250 mM 的 Tris-Borate，在+25 kV 下進行電泳，其結果如圖 9，同樣的，250 mM 下因電流過大，造成實驗中斷，所以無 250 mM 之電泳圖。從圖 9 中發現隨著 Tris-borate 緩衝液的濃度提高，分離效果越好，推測原因與使用硼酸緩衝液電泳的實驗雷同，硼酸分子濃度越高，與兒茶素分子錯合的機率越大，

且因濃度提高，造成離子強度增加，緻密層陽離子量越多，排列越緊密，以至於擴散層陽離子較少，影響 EOF 速度使得分離時間拉長，分離效果越好。200 mM Tris-borate 是較佳的分離濃度。

(四)不同 pH 值緩衝溶液對分離之影響

雖然使用 Tris-Borate 緩衝液有較佳的分離度，但是 (-)-EGC 與 (-)-EC，和 (-)-EGCG 與 (-)-EGC 的波峰還是有部份重疊，因此我們改變緩衝溶液的 pH 值，嘗試將 (-)-EGC 與 (-)-EC，和 (-)-EGCG 與 (-)-EGC 完全分離。我們固定硼酸溶液之最終濃度為 360 mM，改變 Tris 溶液的最終濃度，調配出 pH 7、pH 7.5、pH 8、pH 8.5、pH 9 的 Tris-Borate 緩衝溶液，以 20 kV 進行電泳，電泳結果如圖 11，其分離度的結果如表 3。

從圖 11 中可發現隨著 pH 值的增加，電泳時間越長，四種兒茶素的分離效果越好，推測是因為硼酸的 pKa 在 25°C 時為 9.23^[41]，pH 值越高，硼酸解離成硼酸根的量較多，而有較多的硼酸根與兒茶素錯合，且因為 pH 值越高，tris 的濃度越多，離子強度增加，造成 EOF 降低使得分離時間增加，分離效果越佳，從表 3 中亦可得到相同的結果，

但是發現 pH 8.5 以上咖啡因線性範圍變小了，推測是因為咖啡因在鹼性的環境不穩定，對真實樣品的定量上可能有影響，因此選擇 pH 8 的 Tris-Borate 緩衝液做為電泳的緩衝溶液。

(五) 添加有機溶劑對分離之影響

在緩衝溶液中添加有機溶劑可降低電泳時電滲流 (EOF) 的速度^[32]，我們期待在不改變電場的情形下，藉由有機溶劑降低電滲流，增加分離時間，提高分離度，因此我們分別在緩衝溶液中添加了 5%、10%、15%、20% 的甲醇，和 5%、10%、15%、20% 的乙醇，以 +20 kV 進行電泳，實驗結果如圖 12、圖 13，並整理出表 4、表 5，從兩圖中可看出隨著有機溶液比例增加，電泳的時間也慢慢增長，且從表中可發現(-)-EGC 與(-)-EC，和(-)-EGCG 與(-)-EGC 的分離度越來越好，但相較於甲醇，乙醇的毒性遠低於甲醇，因此我們選擇在緩衝溶液中添加乙醇進行電泳，又雖然 20%乙醇雖然有較佳的分離度，但是電泳時間必須耗費 35 分鐘之久，故選擇電泳時間只需 25 分鐘之 15% 乙醇。所以最佳電泳緩衝溶液為含 15% 乙醇之 200 mM, pH 8 Tris-Borate 緩衝溶液。

(六)改變電壓對分離之影響

提高電壓可增加電場強度，提高分離效果與速度，但伴隨著焦耳熱過大造成再現性差的隱憂，因此希望能夠找到最快的分離條件，又能有良好的再現性。我們分別以電壓+15 kV、+20 kV、+25 kV、+30 kV 進行電泳，電泳結果如圖 14，整理結果如表 6，從圖 14 中發現隨著電壓的提高，分離的時間越短，在+30 kV 下，分離全部兒茶素只需 20 分鐘，因此我們選擇以+30 kV 進行真實樣品與之後經氧化鐵奈米粒子吸附、脫附兒茶素實驗之檢測。

(七)咖啡因與四種兒茶素之定量

經過以上檢測，最佳化條件列於表 7，以此條件對咖啡因與四種兒茶素標準品進行電泳，其電泳圖如圖 15，從圖中發現 20 分鐘內可將咖啡因與四種兒茶素完全分離。

我們在以此最佳化電泳條件，對五種標準品製作檢量線，其檢量線如圖 16，將檢量線數據整理後，結果如表 8。從表 8 中可發現咖啡因的線性範圍(linear range) 在 90 μM ~500 μM ，偵測極限 (LOD)為 75 μM (S/N=3)，定量極限 (LOQ)為 90 μM 。(-)-EC 與 (-)-ECG 的線性範圍皆在 5 μM ~500 μM ，其定量極限亦皆在 5 μM ，(-)-EC 之偵測極限為

1.6 μM ，而(-)-ECG 之偵測極限為 1 μM 。(-)-EGC 的線性範圍在 5 μM ~500 μM ，偵測極限為 0.9 μM (S/N=3)，定量極限為 5 μM 。(-)-EGCG 的線性範圍在 2.5 μM ~ 500 μM ，偵測極限為 0.9 μM (S/N=3)，定量極限為 2.5 μM 。

二、 氧化鐵奈米粒子粒徑大小與濃度

我們利用穿透式電子顯微鏡觀察合成之氧化鐵奈米粒子，TEM 圖如圖 17，從圖中可看出所合出來之氧化鐵奈米粒子粒徑大小為 50 nm 左右。因為四氧化三鐵的密度為 5.2 g/cm³ [42]，由此可估算出我們合出來氧化鐵奈米粒子的濃度為 3.22 $\times 10^{-19}$ M。

三、 氧化鐵奈米粒子吸附兒茶素之條件探討

(一)以紫外可見光吸收儀偵測吸附後的兒茶素

因為(-)-EC 的成本較低，且在室溫中(-)-EC 較穩定，所以所有試驗先以(-)-EC 進行，待找到較佳的條件之後，再測試其他兒茶素確認。我們先對 5 $\times 10^{-5}$ M 之(-)-EC 標準品水溶液以大量氧化鐵奈米粒子進行吸附，將吸附後之上層液進行紫外可見光吸收偵測，並與未吸附前之(-)-EC 水溶液之吸收圖比較，結果如圖 18，發現(-)-EC 溶液的吸收

峰消失了，因此推測(-)-EC 分子已吸附在氧化鐵奈米粒子上面，但是利用紫外可見光吸收儀偵測的背景干擾太大，不易判斷兒茶素的含量，因此改用毛細管電泳進行兒茶素之偵測。

(二)氧化鐵奈米粒子吸附兒茶素之最大吸附量探討

為尋找氧化鐵奈米粒子對兒茶素之最大吸附量。我們以 0.032、0.16、0.32、0.64、0.98 pmole 之氧化鐵奈米粒子溶液，個別對 1 mL 之 10^{-4} M (-)-EC 進行吸附，再將吸附後的上層液進行電泳。電泳的結果如圖 19，從圖 19 中發現隨著氧化鐵奈米粒子的量增加，可偵測到兒茶素的量大幅減少，當鐵奈米粒子溶液的量高於 0.64 pmole 時，(-)-EC 可完全被吸附。

以同樣的方法對 1 mL 之 10^{-4} M (-)-EGC、(-)-ECG、(-)-EGCG 與咖啡因，發現除咖啡因外，其他兒茶素有與 (-)-EC 相同的結果。咖啡因的電泳圖如圖 20，從圖 20 中可發現咖啡因幾乎不吸附，推測是因為咖啡因分子結構中無烯二醇結構，無法與氧化鐵奈米粒子作用，因此不會被氧化鐵奈米粒子吸附。

接著我們以氧化鐵奈米粒子莫耳數對 1 mL， 10^{-4} M 的

四種兒茶素分子吸附量之作圖如圖 21，而從圖 21 中可看出所有的兒茶素分子在使用 0.64 pmole 鐵奈米粒子溶液可完全吸附。由此可計算出鐵奈米粒子比兒茶素之吸附的莫耳比值約在 6.4×10^{-6} ($\text{ratio} = \frac{0.64 \times 10^{-12}}{10^{-4} \times 0.001}$)。意即每個的氧化鐵奈米粒子約可吸附 15 萬個的兒茶素分子。

(三) 氧化鐵奈米粒子對兒茶素吸附時間之探討

為了了解吸附所需最短時間，我們以 0.64 pmole 氧化鐵奈米粒子吸附 1 mL (-)-EC，吸附時間各為 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min，找尋最短吸附時間，其結果電泳圖如圖 22，整理如表 9。從圖 22 中發現隨著吸附時間的增加，所測到的 (-)-EC 含量越來越少，而從表 9 中可發現，在第 20 分鐘已經偵測不到 (-)-EC，意即隨著時間的增加，氧化鐵奈米粒子吸附兒茶素的量越來越多，20 分鐘後可完全吸附。

四、 氧化鐵奈米粒子脫附兒茶素之條件探討

羧基 (-COOH) 對鐵離子有強鍵結力，常見的有機酸中，草酸根 (Oxalate) 與酒石酸根 (Tartrate) 與鐵之解離常數 (formation constants) 較大^[43] (常見有機酸與鐵之解離常數如表

10)，且兩者結構中均有兩個羧基 (-COOH)，但酒石酸結構中，接有羧基的碳上面還有羥基，鐵原子與羧基、羥基產生五圓環的結構，較鐵原子與草酸根的羧基形成四圓環結構穩定，草酸根、酒石酸根結構與其和鐵作用結構示意圖如圖 23。我們推測使用酒石酸對氧化鐵奈米粒子有較佳的空間配位，因此選擇使用酒石酸作為我們尋找最佳化的條件，進行以下試驗。

(一)酒石酸 pH 值對脫附兒茶素之影響

過酸的情形可能造成氧化鐵奈米粒子解離，過鹼的環境可能造成兒茶素分子被破壞，故須尋找對兒茶素分子較穩定，且有較大脫附量之條件。我們以最佳吸附條件將 1 mL， 10^{-4} M (-)-EC 吸附後，再個別使用 100 mM pH 3、pH 3.4、pH 4、pH 5.3、pH 11.2 之酒石酸進行脫附，脫附時間 20 分鐘，其脫附後上層液之電泳結果如圖 24，結果整理如表 11，從表 11 中我們發現，隨著 pH 值增加，其脫附量亦增加，在 pH 5.3 時脫附量最大，其回收率可達 51.56%，應是此 pH 值之下為酒石酸之第二當量點，有最多之羧酸根與氧化鐵奈米粒子作用，而有較大的脫附量。另外 pH 11.2 已無法偵測到 (-)-EC，推測是因為 pH 值過高，兒茶素已被水解。

(二)酒石酸濃度對脫附之影響

為尋找最佳的脫附條件，我們以 10 mM、20 mM、40 mM、60 mM、80 mM、100 mM，pH 5.3 酒石酸溶液進行脫附實驗，脫附時間 20 分鐘，實驗電泳圖如圖 25，整理如表 12，從表 12 可發現隨著酒石酸濃度增加，可偵測到 (-)-EC 的濃度也越來越高，100 mM 時，回收率可達 51.62%，因此我們選擇 100 mM pH 5.3 之酒石酸溶液來進行脫附實驗。

(三)脫附時間對脫附量之影響

為了提升脫附量，我們改變脫附時間，希望找到有最大脫附量之脫附時間。脫附時間設定分別為 0、5、10、20、40 與 60 分鐘，其結果如圖 26，整理如表 13，從圖 13 中發現當脫附劑加入後，兒茶素即有明顯的脫附量，隨著時間的增加，脫附量越來越大，直到 10 分鐘後脫附量才無明顯變化，可知 100 mM, pH 5.3 之酒石酸與氧化鐵奈米粒子完全作用須 10 分鐘，從表 13 中可得知脫附量約在 52.08% 左右，因此我們選擇每次脫附時間 10 分鐘。

(四) 脫附次數對總脫附量之影響

雖然找到了較佳的脫附方式，但是回收率只有 52% 左右，因此重複脫附數次，看看是否還能夠有兒茶素被脫附下來。在進行四次脫附之後，個別去偵測其脫附下來之兒茶素濃度，結果如圖 27，整理如表 14。從圖 26 中可發現多次脫附也有 (-)-EC 被脫附下來，隨著次數增加，脫附量越來越少，再從表 14 中可看出第三次與第四次的脫附量低於 5%，因此選擇脫附次數為兩次，而兩次的 (-)-EC 總脫附量約 60%。

(五) 脫附劑中添加有機溶劑對脫附量之影響

為了進一步提升回收率，因此考慮在脫附劑中添加有機溶劑，希望能夠藉由兒茶素在醇類溶劑中有較佳的溶解度來提升脫附量。我們分別在脫附劑中添加 10% 之甲醇 (methanol)、乙醇 (ethanol)、正丙醇 (1-propanol)、異丙醇 (iso-propanol)，其第一次脫附結果電泳圖如圖 28，兩次脫附結果整理如表 15，從表 15 可發現使用 10% 乙醇有較佳的回收率，其脫附效果將近 70%。

五、 樣品濃縮試驗

為了解本方法對樣品濃縮的效果，我們分別選擇在 LOD 以下濃度進行實驗：分別取 2 μM , 50 mL 與 1 μM , 100 mL 之 (-)-EC 溶液，以 0.64 pmole 氧化鐵奈米粒子進行萃取，再以 1 mL pH 5.3, 100 mM 之酒石酸溶液進行脫附兩次，兩溶液濃縮結果電泳圖如圖 29 與圖 30。從圖 29 與 30 中觀察到，濃縮後吸收峰面積明顯的增加，顯示濃縮效率顯著，2 μM (-)-EC 溶液濃縮約 8 倍，濃縮後總濃度為 16.2 μM 左右。而 1 μM (-)-EC 溶液濃縮效果約 16 倍，濃縮後濃度約為 16.0 μM 。

六、 實物樣品檢測

(一)市售茶樣品之電泳檢測

前述利用最佳化電泳條件偵測市售樣品，除了可以了解其兒茶素含量，更可做為尋找吸附兒茶素時，氧化鐵奈米粒子使用量之依據。本試驗購得之市售無糖茶樣品 8 種，分別以樣品 A~G 代表。真實樣品先稀釋 10 倍之後再進行電泳，電泳結果如圖 31 至圖 37，由圖中可知茶樣品中的兒茶素皆有不錯的分離效果，而各樣品之咖啡因與四種兒茶素含量總整理見表 16，其中樣品 D 所含的四種兒茶素最多，咖啡因、(-)-EGC、(-)-EC、(-)-EGCG 與(-)-ECG

的含量分別為 2660、1250、351、992、204 μM ，樣品 B 所含的四種兒茶素較少，但五種待測物含量亦分別有 1840、1520、47、1340、34 μM 。

(二)市售茶樣品之吸附實驗

進行脫附之前，我們必須先估算所需氧化鐵奈米粒子所需量。以樣品 A 進行吸附試驗，首先用毛細管電泳檢測出樣品 A 中四種兒茶素的濃度，以估算出所需氧化鐵奈米粒子之莫耳數，因四種兒茶素所占的含量約在 97%~98% 左右^[10]。所以再將估算出的氧化鐵奈米粒子除以 97%，即是我們實際使用之氧化鐵奈米粒子的莫耳數，經估算，在稀釋 10 倍的真實樣品所需之氧化鐵奈米粒子約 0.96 pmole。

接著將稀釋 10 倍之真實樣品，加入適當莫耳數之氧化鐵奈米粒子中，萃取後將上層液進行電泳偵測，並與吸附前做比較。其吸附前後電泳比較圖如圖 38，從圖 38 中發現使用氧化鐵奈米粒子吸附前之樣品 A 與吸附後之樣品 A，其 (-)-EGC、(-)-EC、(-)-EGCG、(-)-ECG 的 peak 消失了，顯示兒茶素已經被氧化鐵奈米粒子所吸附。而咖啡因

的 peak 可看出改變量很小，並未被吸附，亦表示使用氧化鐵奈米粒子可選擇性的將兒茶素從茶中分離。

另外，為了確認是否估算的量是否可完全吸附氧化鐵奈米粒子，故分別以 0.096、0.192、0.48、0.768、0.96、1.152、1.44 pmole 等不同氧化鐵奈米粒子莫耳數進行脫附實驗，其脫附結果電泳圖如圖 39，數據結果整理如表 17。從圖 39 中發現隨著氧化鐵奈米粒子的莫耳數增加，可被偵測到兒茶素分子的量越來越少，從表 17 確認在我們估算的氧化鐵奈米粒子莫耳數之下，兒茶素已完全吸附。

(三)氧化鐵奈米粒子對市售茶樣品前處理之脫附實驗

以脫附之最佳化條件對吸附樣品 A 中兒茶素之氧化鐵奈米粒子進行脫附，其電泳圖如圖 40，結果整理如表 18，從圖 40 中可明顯看出(-)-EC 與(-)-EGC 的 peak，從表 18 中可發現 (-)-EC 的總脫附量最大，可達 86 %，其次是 (-)-EGC，達 9.4%，(-)-EGCG、(-)-ECG 則無法被偵測到，推測(-)-EGCG、(-)-ECG 結構中含有更多的羥基，因此對氧化鐵奈米粒子的吸附能力更強，導致無法脫附下來。

第四章 結論

1. 本研究建立了運用氧化鐵奈米粒子對茶湯中兒茶素萃取與濃縮的方法，並使用 Tris-borate 作為緩衝溶液之毛細管電泳分離與定量樣品中兒茶素與咖啡因的方法。
2. 在使用含 15% 乙醇的 pH 8, 200 mM Tris-borate 當作緩衝溶液，以 +30 kV 進行電泳，所有兒茶素可在 20 分鐘以內被分離出來，其線性範圍在 5 ~ 500 μM ，LOD 範圍為 0.9 - 75 μM 。
3. 我們以 0.64 pmol 氧化鐵奈米粒子，在常溫常壓下，只需 20 分鐘可完全吸附 100 μmole 兒茶素分子，再以含有 10%乙醇之 100 mM, pH 5.3 酒石酸溶液進行脫附，靜置 10 分鐘後(-)-EC 有最大脫附量，兩次脫附後的總回收率為 70%左右。對真實樣品進行處理，可得 (-)-EC 回收率為 86%，(-)-EGC 回收率為 9.4%，但是(-)-ECG 與 (-)-EGCG 無法被偵測到，推測是酯化的兒茶素分子有較多的羥基而與氧化鐵奈米粒子有更強的吸附能力，以致無法被酒石酸脫附。
4. 隨著氧化鐵奈米粒子的量增加，吸附後咖啡因的濃度幾乎不改變，且從市售的茶樣品中發現，兒茶素的吸收峰明顯的消失，但咖啡因的吸收峰不變。因此從實驗中證實，氧化鐵奈米粒子可選擇性吸附兒茶素，達到兒茶素與咖啡因分離的效果。

第五章 參考文獻

1. 廖慶樑。2000。茶葉中兒茶素的用途與萃取製程。食品資訊，2000，6，22-25。
2. 原征彥。1998。兒茶素(catechin)類的生理活性作用。茶多元酚在食品/保健食品產業之製造及應用研討會。
3. Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H.; Van de Putte, B. *J. Agric. Food. Chem.* **1993**, *41*, 1242.
4. Serafini, M.; Ghiselli, A.; Ferro-Luzzi, A. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1996**, *50*, 28.
5. Gao, G.; Sofic, E.; Prior, R. *J. Agric. Food. Chem.* **1996**, *44*, 3426.
6. Richelle, M.; Tavazzi, I.; Offord, E. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, *49*, 3438.
7. Bravo, L. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317.
8. Cook, N.C.; Samman, S. *Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 66.
9. 陳清泉。民 90。茶葉之兒茶素的機能及應用。食品市場資訊，90，8，16。
10. Huang, H. Y.; Lien, W. C.; Chiu, C. W. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 973.
11. Caffeine Content of Food and Drugs. (1996, December 1), Nutrition Action Health Newsletter. Center For Science in the Public Interest. From the World Wide Web :
http://cspinet.org/nah/caffeine/caffeine_content.htm
12. Erowid. (2006, July 7), Caffeine Content of Beverages, Food, & Medications. The Vaults of Erowid. From the Word Wide Web:
http://www.erowid.org/chemicals/caffeine/caffeine_info1.shtml
13. Bolton, S.; Gary Null, M.S.; *Orthomolecular Psychiatry*. **1981**, *10*, 3, 202.

- 14.Caffeine-related disorders. Encyclopedia of Mental Disorders. From the World Wide Web:
<http://www.minddisorders.com/Br-Del/Caffeine-related-disorders.html>
- 15.Kamijo, Y.; Soma, K.; Asari, Y.; Ohwada, T.; *Vet. Hum. Toxicol.* **1999**, 41, 381.
- 16.Cedars-Sinai. Gastroesophageal Reflux Disease. (GERD) From the World Wide Web: http://www.csmc.edu/pf_5543.html
- 17.Goto, T.; Yoshida, Y.; Kiso, M.; Nagashima, H. *J.Chromatogr. A.* **1996**, 749, 295.
- 18.Price, W. E.; Spitzer, J. C. *Food. Chem.* **1993**, 47, 271.
- 19.阮逸明。1991。茶葉可溶分及主要化學成分萃取之研究。台灣茶葉研究彙報。10，89。
- 20.Lee, B. L.; Ong, C. N. *J.Chromatogr. A.* **2000**, 881, 439.
- 21.Weiss, D. J.; Anderton, C. R. *J.Chromatogr. A.* **2003**, 1101, 173.
- 22.王煌忠；張慶源；邱國隆；陳英玲；張傑明。1999。超臨界二氧化碳萃取茶葉精油及濃縮研究。興大工程學刊。10，3，1。
- 23.吳長煜；邱國隆；張慶源；張傑明。1999。二氧化碳萃取烏龍茶葉之兒茶酚類機能性成分。食品科學，26，614。
- 24.Varike, M.; Koel, M. *J.Chromatogr. A.* **2003**, 990, 225.
- 25.呂宗昕。**2003**。圖解奈米科技與光觸媒。商周。100。
- 26.Rajh, T.; Chen, L.X.; Lukas, K.; Liu, T. Thurnauer, M.C.; Tiede, D.M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 10543.
- 27.Lee, K.H.; Chiang, C.K.; Lin, Z.H.; Chang, H.T. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2007**, 21, 2023.
- 28.陳學森。茶葉茶多酚類物質的測定。From the World Wide Web：
<http://202.194.137.16/yyzwyz/ziyuan/shiyan/12.pdf>
- 29.Suntornsuk, L.; Kasemsook, S.; Wongyai, S. *Electrophoresis.* **2003**, 24, 1236.

30. Volpi, N. *Electrophoresis*. **2004**, 25, 1872.
31. Xu, X.; Qi, X.; Wang, W.; Chen, G. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 647.
32. Heiger, D. N. *High performance capillary electrophoresis-An introduction*, Hewlett-Packard Company, **1992**.
33. Pomponio, R.; Gotti, R.; Santagati, N. A.; Cavrini, V. *J. Chromatogr. A*. **2003**, 990, 215.
34. Kodama, S.; Yamamoto, A.; Matsunaga, A.; Yanai, H. *Electrophoresis*. **2004**, 25, 2892.
35. Huang, H. Y.; Lien, W. C. *Electrophoresis*. **2005**, 26, 3134.
36. Gotti, R.; Furlanetto, S.; Pinzauti, S.; Cavrini, V. *J. Chromatogr. A*. **2006**, 1112, 345.
37. Turney, K.; Drake, T. J.; Smith, J. E.; Tan, W.; Harrison, W. W. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 2367.
38. Massart, R. *Magnetic fluids and process for obtaining them*. US Patent 4'329'241, **1982**.
39. Morin, Ph.; Villard, F.; Dreux, M. *J. Chromatogr.* **1993**, 628, 153.
40. Morin, Ph.; Villard, F.; Dreux, M. *J. Chromatogr.* **1993**, 628, 161.
41. Harris, D. C.; *Quantitative Chemical Analysis 7th Edition*, W. H. Freeman and company, **2007**.
42. Magnetite. Mindat.org. (2001) ◦ From the World Wide Web :
<http://www.mindat.org/min-2538.html>
43. Sillén, L.G.; Martell, A.E. *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, The Chemical Society (London), **1964** and **1971**.

Table 3. Effect of various pH value on migration time and resolution of catechins

pH	Migration time (min)				Resolution	
	Caffeine	(-)-EGC	(-)-EC	(-)-EGCG	EGC / EC	EGCG / ECG
7.0	4.29	5.78	5.78	6.88	—	—
7.5	4.95	6.91	6.98	8.44	0.35	0.50
8.0	5.51	8.13	8.28	10.11	0.51	0.64
8.5	7.74	13.10	13.57	16.71	1.30	1.60
9.0	10.65	20.73	21.59	26.01	1.70	1.73

Table 4. Effect of various methanol concentration on migration time and resolution of catechins

Methanol concentration	Migration time (min)					Resolution	
	Caffeine	(-)-EGC	(-)-EC	(-)-EGCG	(-)-ECG	EGC / EC	EGCG / ECG
5%	6.21	10.03	10.31	13.33	13.84	0.97	1.15
10%	7.46	12.49	12.90	17.24	18.03	1.16	1.33
15%	9.13	15.87	16.51	22.90	24.23	1.34	1.58
20%	10.77	19.71	20.69	30.12	32.43	1.59	1.88

Table 5. Effect of various ethanol concentration on migration time and resolution of the catechins

Ethanol	Migration time (min)					Resolution	
	Caffeine	(-)-EGC	(-)-EC	(-)-EGCG	(-)-ECG	EGC / EC	EGCG / ECG
5%	6.37	10.24	10.53	13.47	13.98	0.99	1.22
10%	7.78	12.82	13.23	17.03	17.72	1.17	1.34
15%	9.84	16.90	17.55	23.06	24.15	1.42	1.58
20%	12.66	22.60	23.65	31.57	33.45	1.67	1.81

Table 6. Effect of various voltage on migration time and resolution of catechins

Voltage (kV)	Migration time (min)					Resolution	
	Caffeine	(-)-EGC	(-)-EC	(-)-EGCG	(-)-ECG	EGC / EC	EGCG / ECG
+15	19.95	33.50	34.72	44.73	46.87	1.58	1.71
+20	13.97	23.24	24.08	30.74	32.16	1.44	1.60
+25	9.84	16.90	17.55	23.06	24.15	1.42	1.57
+30	7.96	13.41	13.84	17.49	18.17	1.26	1.38

Table 7. Optimum conditions for capillary electrophoresis experiment

Experiment conditions	
Buffer	360 mM borate with 200 mM tris (pH8)
Organic modifier	15% ethanol
Applied voltage	+30 kV



Table 8. Migration time, LOD, LOQ, linear range and R square of the caffeine and catechins

	Migration Time (min)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Linear range (μM)	Slope	Intercept	R ²
Caffeine	7.96	75	90	90 – 500	108.2	7061.4	0.9993
(-)-EGC	13.41	0.9	5	5 – 500	998.7	2918.4	0.9994
(-)-EC	13.84	1.6	5	5 – 500	881.3	2776.9	0.9904
(-)-EGCG	17.49	0.9	2.5	2.5 – 500	2830.6	8128.2	0.9992
(-)-ECG	18.17	1	5	5 – 500	2711.7	10857	0.9988

Table 9. Adsorption ratio of the (-)-EC in various adsorption time ^{a)}

Adsorption time (min)	Concentration after absorption (M)	Absorption ratio (%)
5	1.1×10^{-5}	89.01
10	$< 5 \times 10^{-6}$	> 95
15	$< 5 \times 10^{-6}$	> 95
20	0	100
25	0	100
30	0	100

a) Original concentration: 10^{-4} M

Table 10. Formation constants of iron (III) – carboxylate complexes^[43]

carboxylate	Log β_1^a	Log β_2	Log β_3	Log β_4	Temp.	Ionic strength (μ , M)
Formate	1.85	3.61	3.95	5.4	25	1
Acetate	3.38	7.1	9.7		25	0
Oxalate	7.54	14.59	20		—	0.5
Tartrate	6.49	11.87	9.48		20	0.1
Citrate	11.04	21.2			20	0.1

a) The overall (cumulative) formation constant, β_n , is the equilibrium constant for the reaction

$M + nL \rightleftharpoons ML_n$: $\beta_n = [ML_n]/([M][L]^n)$. β_n is related to stepwise formation constants (K_i) by $\beta_n = K_1 K_2 \dots K_n$.

Table 11. Recovery of (-)-EC desorbed in various pH of tartrate buffer^{a)}

Tartrate buffer pH value	Concentration after desorption (M)	Recovery (%)
3	4.36×10^{-5}	43.56
3.4	4.37×10^{-5}	43.74
4	4.77×10^{-5}	47.67
5.3	5.16×10^{-5}	51.62
11.2	0	0

a) Original concentration: 10^{-4} M

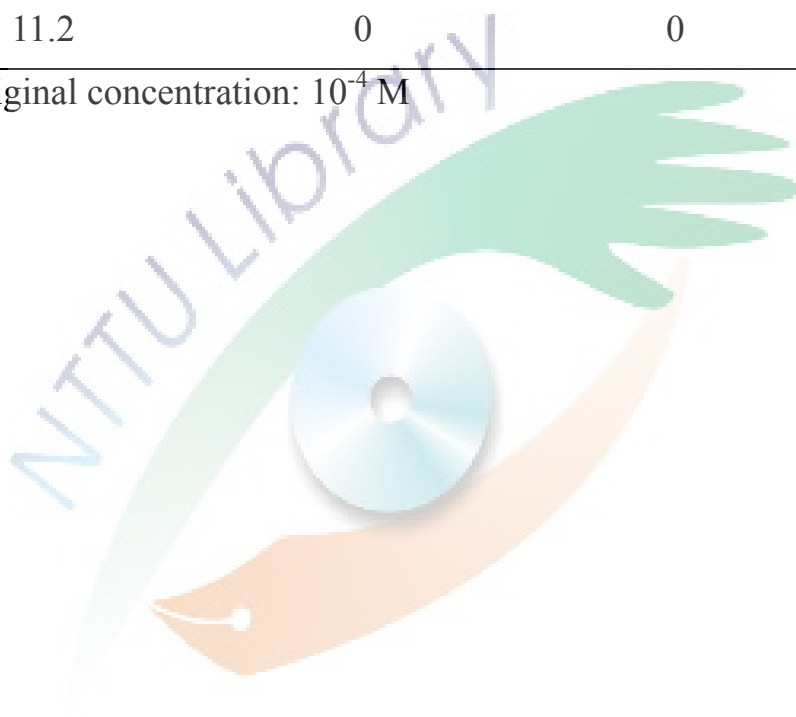


Table 12. Recovery of (-)-EC desorbed in various tartrate buffer concentration ^{a)}

Tartrate buffer concentration (mM)	Concentration after desorption(M)	Recovery (%)
10	4.29×10^{-5}	42.91
20	4.31×10^{-5}	43.10
40	4.41×10^{-5}	44.14
60	4.57×10^{-5}	45.72
80	5.15×10^{-5}	51.58
100	5.16×10^{-5}	51.62

a) Original concentration: 10^{-4} M

Table 13. Recovery of (-)-EC in various desorbed time ^{a)}

Reaction time (min)	(-)-EC concentration (M)	Recovery (%)
5	4.52×10^{-5}	42.55
10	5.21×10^{-5}	52.08
20	5.16×10^{-5}	51.61
40	4.99×10^{-5}	49.93
60	5.19×10^{-5}	51.99

a) Original concentration: 10^{-4} M

Table 14. Recovery of (-)-EC in various desorbed times ^{a)}

Desorption times	Concentration after desorption (M)	Recovery (%)
1 st	5.21×10^{-5}	52.08
2 nd	8.81×10^{-6}	8.81
3 rd	$< 5 \times 10^{-6}$	< 5
4 th	$< 5 \times 10^{-6}$	< 5

a) Original concentration: 10^{-4} M

Table 15. Recovery of (-)-EC desorbed in tartrate buffer with various organic solvent ^{a)}

10% organic solvent	Concentration 1 st desorption (M)	Concentration 2 nd desorption (M)	1 st recovery (%)	2 nd recovery (%)	1 st +2 nd recovery (%)
none	5.21×10^{-5}	8.81×10^{-6}	52.08	8.81	60.89
Methanol	5.96×10^{-5}	7.33×10^{-6}	59.59	7.33	61.92
Ethanol	6.11×10^{-5}	8.15×10^{-6}	61.14	8.15	69.29
1-propanol	5.32×10^{-5}	6.61×10^{-6}	53.24	6.61	59.85
2-propanol	4.99×10^{-5}	5.27×10^{-6}	49.90	5.27	55.17

a) Original concentration 10^{-4} M

Table 16. Concentration of catechins and caffeine in real samples

Real sample	Caffeine (M)	(-)-EGC (M)	(-)-EC (M)	(-)-EGCG (M)	(-)-ECG (M)
A	1.01×10^{-3}	8.17×10^{-4}	1.60×10^{-4}	4.57×10^{-4}	8.17×10^{-5}
B	1.84×10^{-3}	1.52×10^{-4}	4.69×10^{-5}	1.34×10^{-4}	3.42×10^{-5}
C	9.8×10^{-4}	2.92×10^{-4}	5.87×10^{-5}	2.27×10^{-4}	3.87×10^{-5}
D	2.66×10^{-3}	1.25×10^{-3}	3.51×10^{-4}	9.92×10^{-4}	2.04×10^{-4}
E	7.0×10^{-4}	5.91×10^{-4}	1.30×10^{-4}	3.88×10^{-4}	6.45×10^{-5}
F	1.86×10^{-3}	1.34×10^{-3}	3.10×10^{-4}	8.87×10^{-4}	1.70×10^{-4}
G	1.72×10^{-3}	9.84×10^{-4}	2.56×10^{-4}	5.80×10^{-4}	1.29×10^{-5}

Table 17. Adsorption ratio of the real sample in various MNPs concentration

MNPs concentration (pmole)	Catechin concentration (μM)				Adsorption ratio (%)			
	(-)-EGC	(-)-EC	(-)-EGCG	(-)-ECG	(-)-EGC	(-)-EC	(-)-EGCG	(-)-ECG
0.096	30.11	5.84	7.26	<5	62.7	63.5	84.1	>38.8
0.192	27.93	5.35	2.72	N.D.	65.4	66.5	94.0	100
0.480	8.31	5.07	N.D.	N.D.	90.0	68.3	100	100
0.768	2.56	<5	N.D.	N.D.	96.9	>68.8	100	100
0.960	<5	N.D.	N.D.	N.D.	>93.9	100	100	100
1.152	N.D. ^{a)}	N.D.	N.D.	N.D.	100	100	100	100
1.440	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	100	100	100	100

a)Not detected

Table 18. Recovery of real sample A with optimum extract method

Desorption times	Recovery (%)			
	(-)-EGC	(-)-EC	(-)-EGCG	(-)-ECG
1 st	6.8%	79.0%	0%	0%
2 nd	2.6%	7.0%	0%	0%
1 st + 2 nd	9.4%	86.0%	0%	0%



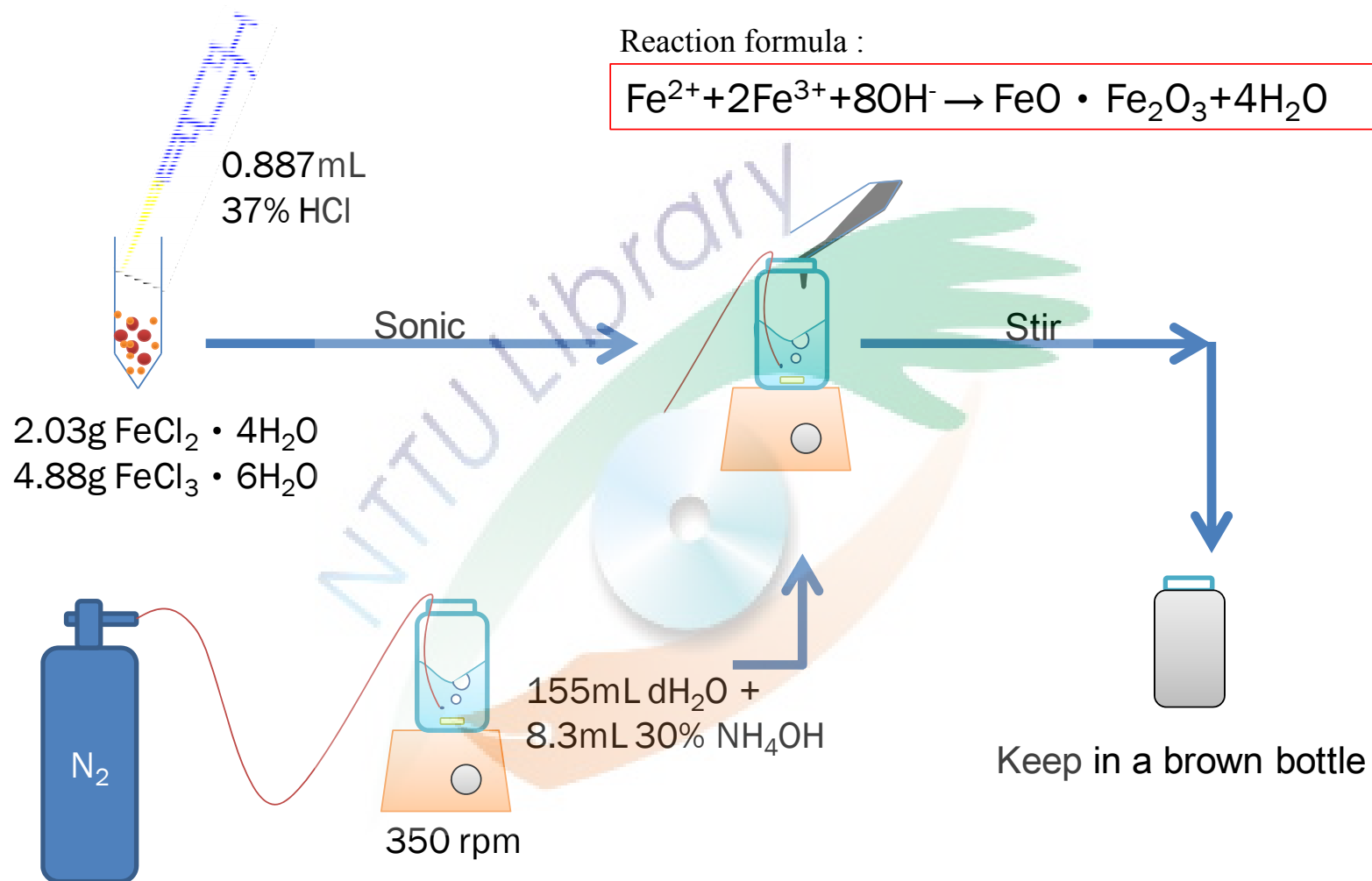


Fig. 4. Scheme of Magnetic nano-particles synthesis.

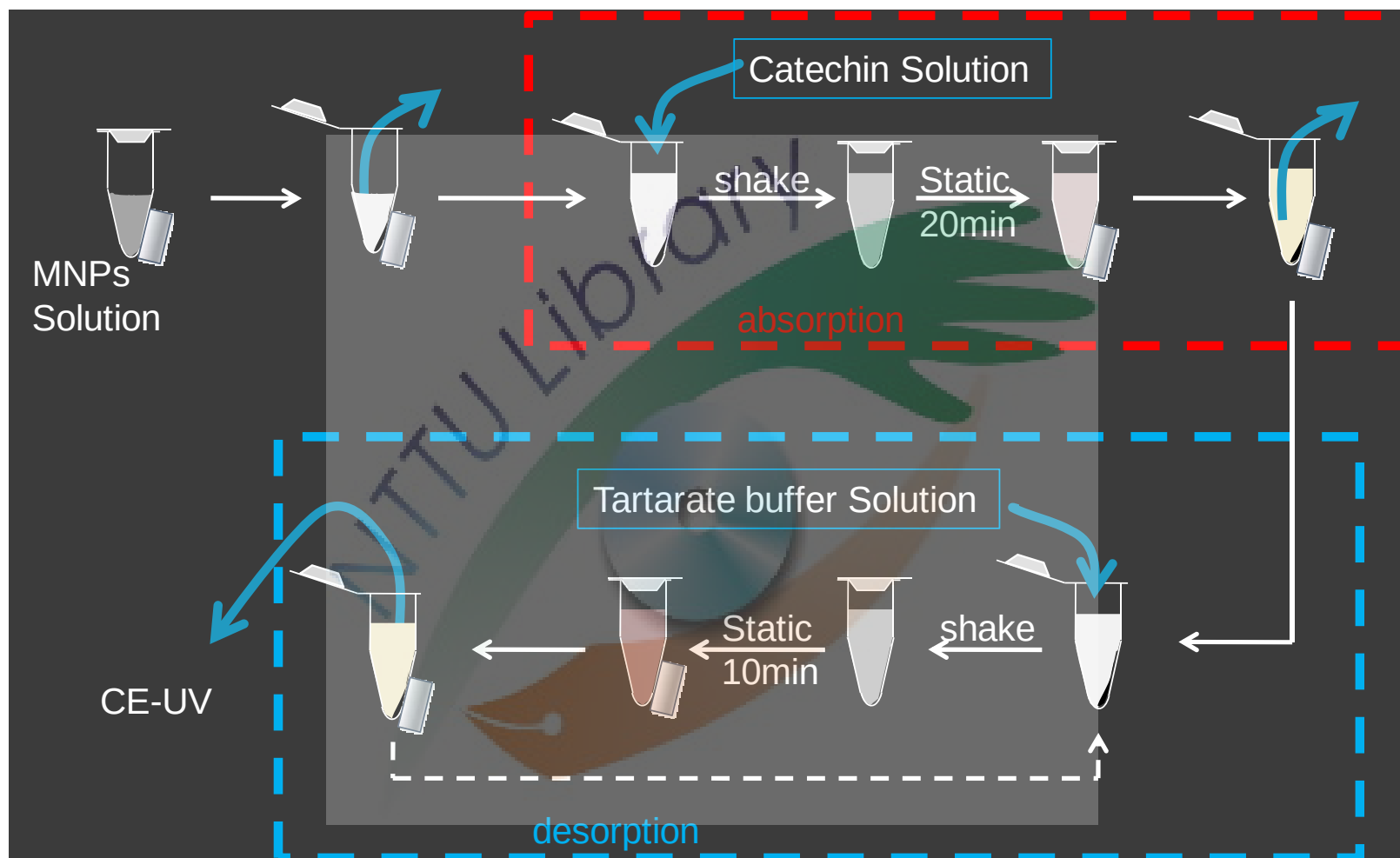


Fig. 5. Scheme of sample preparation process.

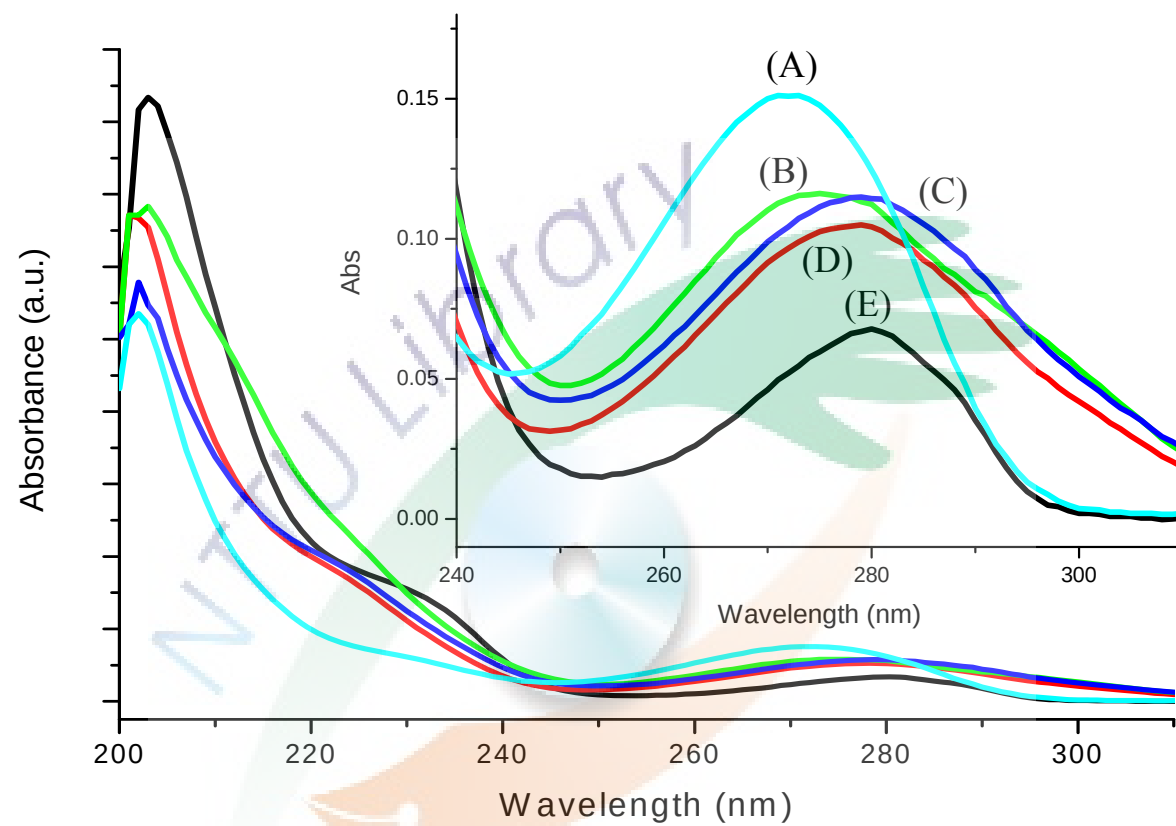
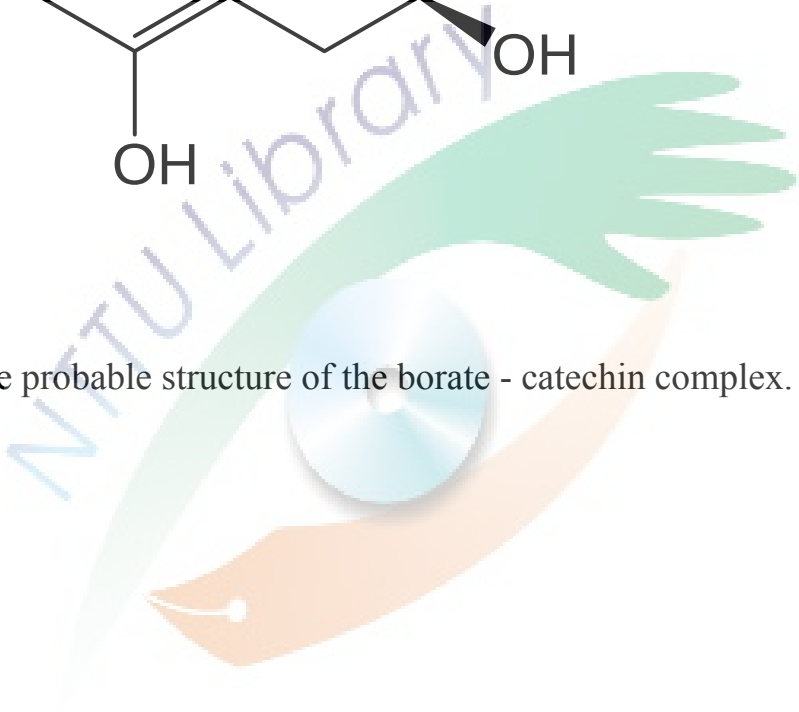


Fig. 6. UV absorbance of catechins and caffeine. Samples: 5×10^{-5} M (A) caffeine; (B) (-)-EGCG; (C) (-)-ECG; (D) (-)-EGC; (E) (-)-EC.



Chemical structure of the probable structure of the borate - catechin complex.

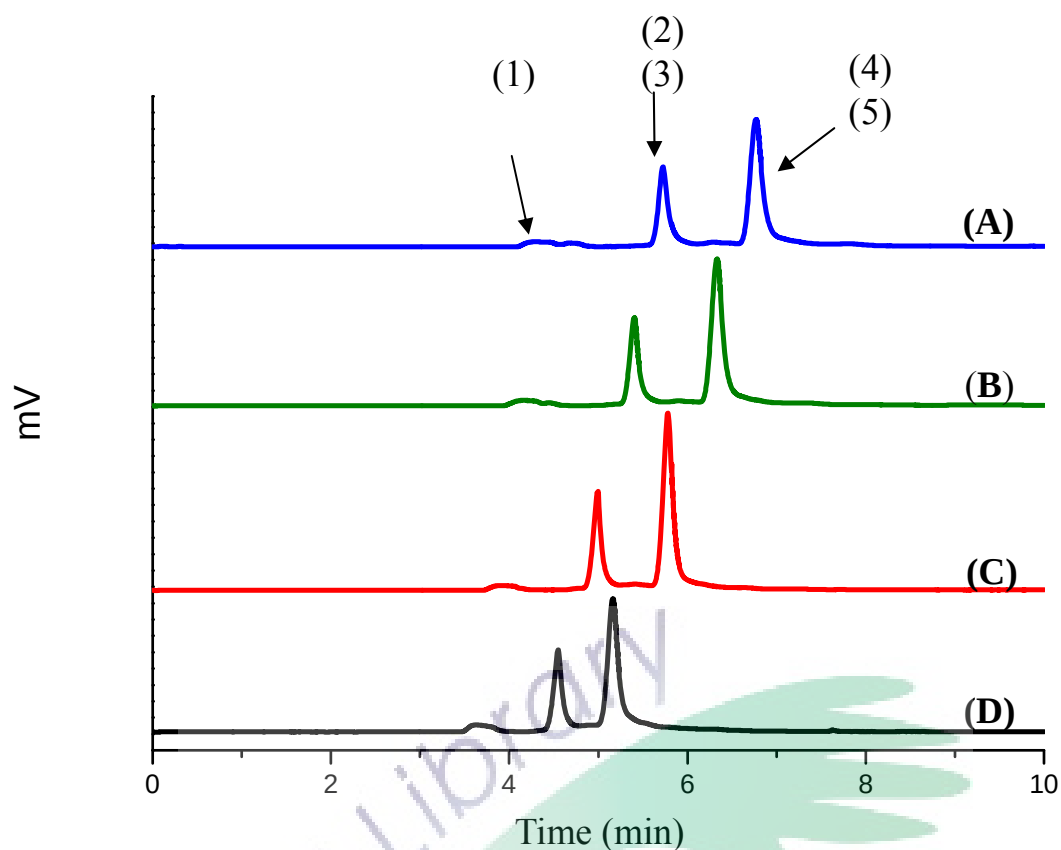


Fig. 8. Electropherograms of the catechins and caffeine in various borate buffer concentration. Samples: 5×10^{-5} M of (1) caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG. Separation electrolyte: (A) 60 mM; (B) 70 mM; (C) 80 mM; and (D) 90 mM, pH 9 borate buffer. Total length of capillary 65 cm (53 cm effective length); Voltage, +15 kV; UV detection at 275 nm.

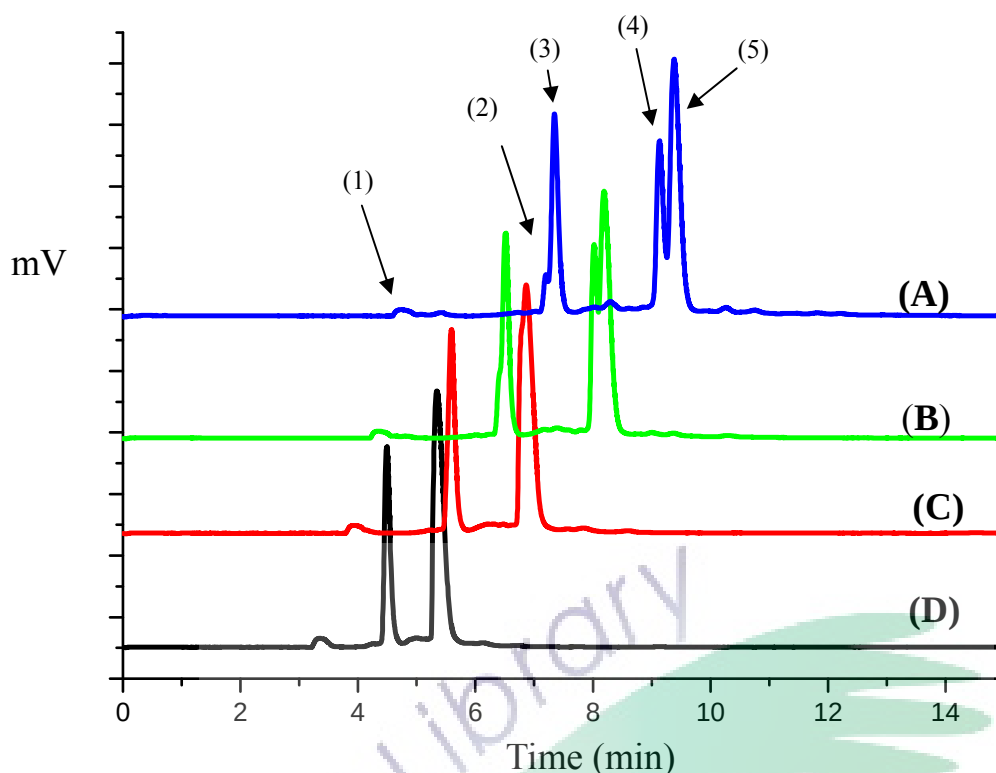


Fig. 9. Electropherograms of the catechins and caffeine in various tris-borate buffer concentration. Samples: 5×10^{-5} M of (1)caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG. Separation electrolyte: (A)200 mM; (B)150 mM; (C)100 mM; and (D)50 mM, pH8 Tris-borate buffer. Total length of capillary 65 cm (53 cm effective length); Voltage, +25 kV; UV detection at 275 nm.

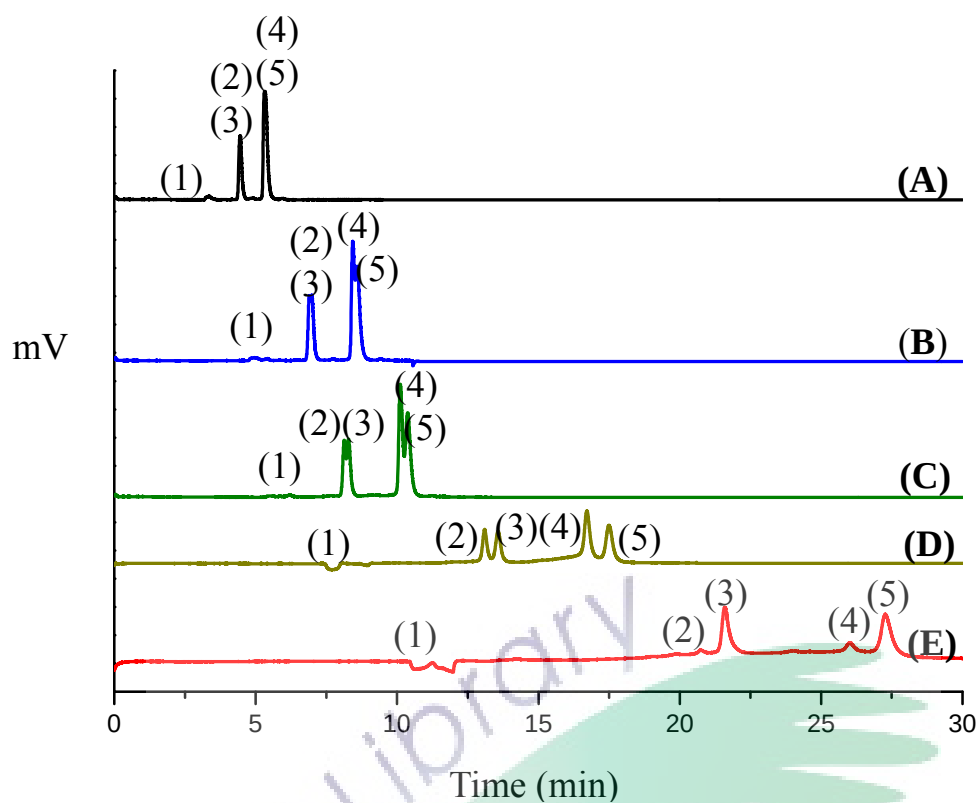


Fig. 10. Electropherograms of the catechins and caffeine in various tris-borate buffer pH value. Separation electrolyte: (A)pH 7; (B)pH 7.5; (C)pH 8; (D)pH 8.5; and (E)pH 9, 200 mM tris-borate buffer. Total length of capillary 65 cm (53 cm effective length); Voltage: +25 kV; UV detection at 275 nm; Samples: 5×10^{-5} M of (1)caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG.

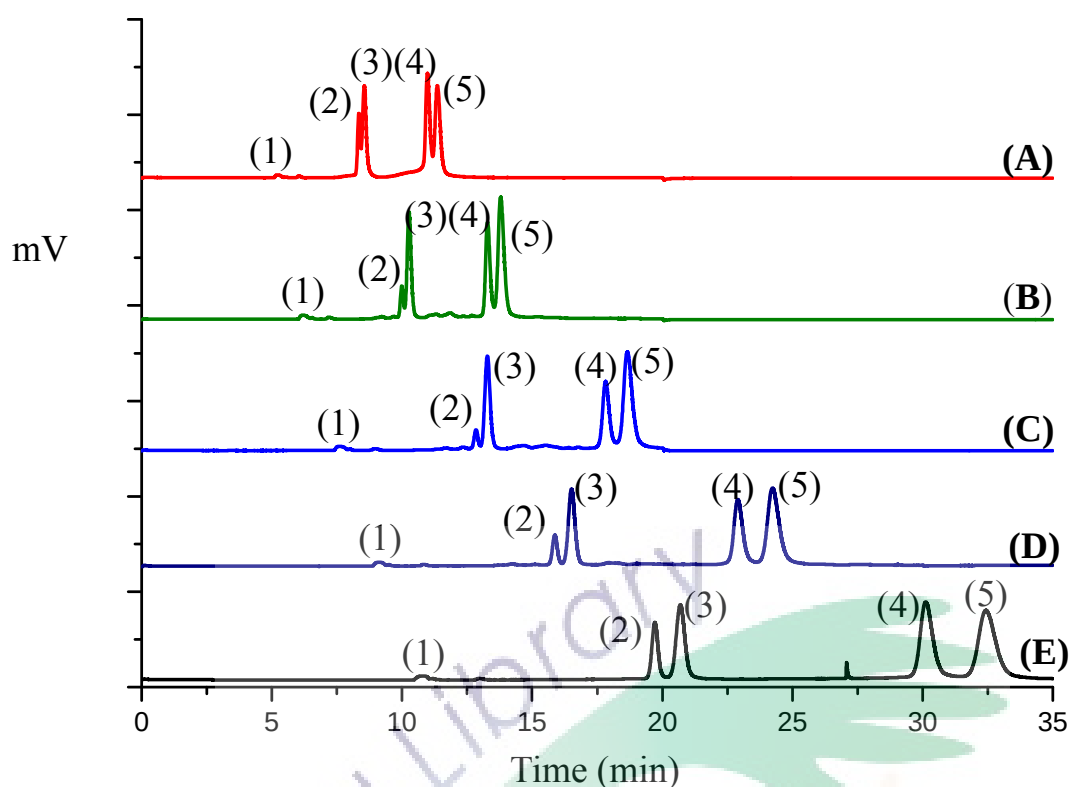


Fig. 11. Electropherograms of the catechins and caffeine in various methanol concentration. Separation electrolyte: pH 8, 200 mM tris-borate buffer with (A)0%; (B)5%; (C)10%; (D)15% and (E)20% methanol. Total length of capillary 65 cm (53 cm effective length); Voltage: +25 kV; UV detection at 275 nm; Samples: 5×10^{-5} M of (1)caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG.

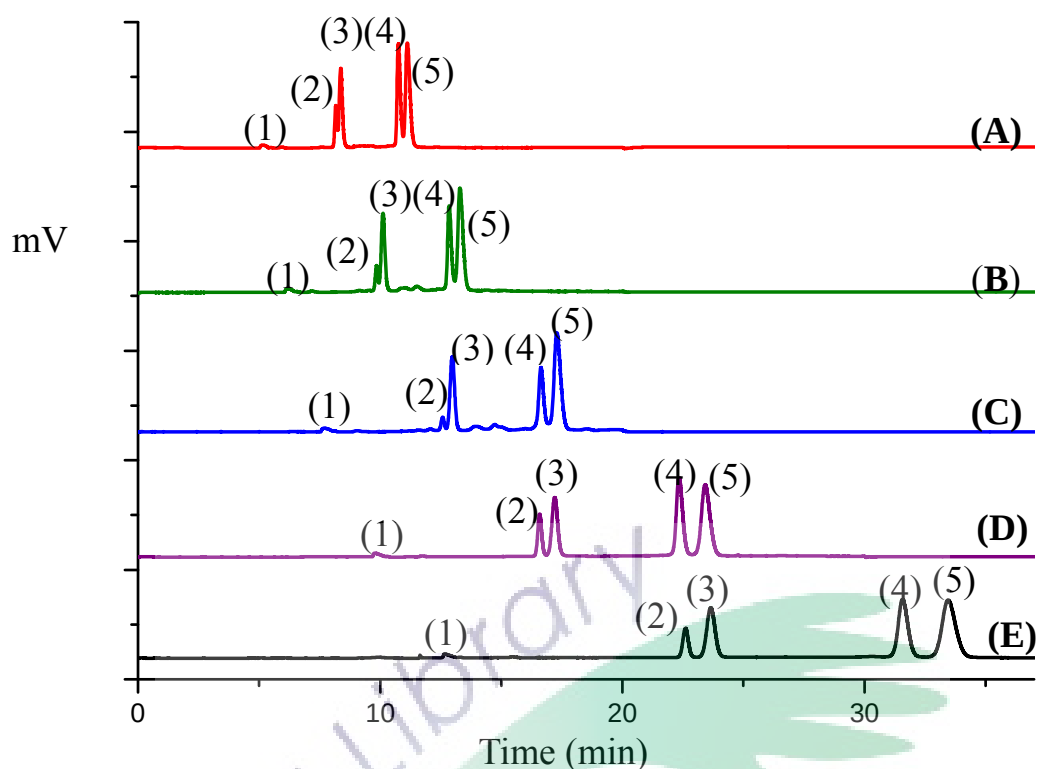


Fig. 12. Electropherograms of the catechins and caffeine in various ethanol concentration. Separation electrolyte: pH 8, 200 mM tris-borate buffer with (A)0%; (B)5%; (C)10%; (D)15% and (E)20% ethanol. Total length of capillary 65 cm (53 cm effective length); Voltage: +25 kV; UV detection at 275 nm; Samples: 5×10^{-5} M of (1)caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG.

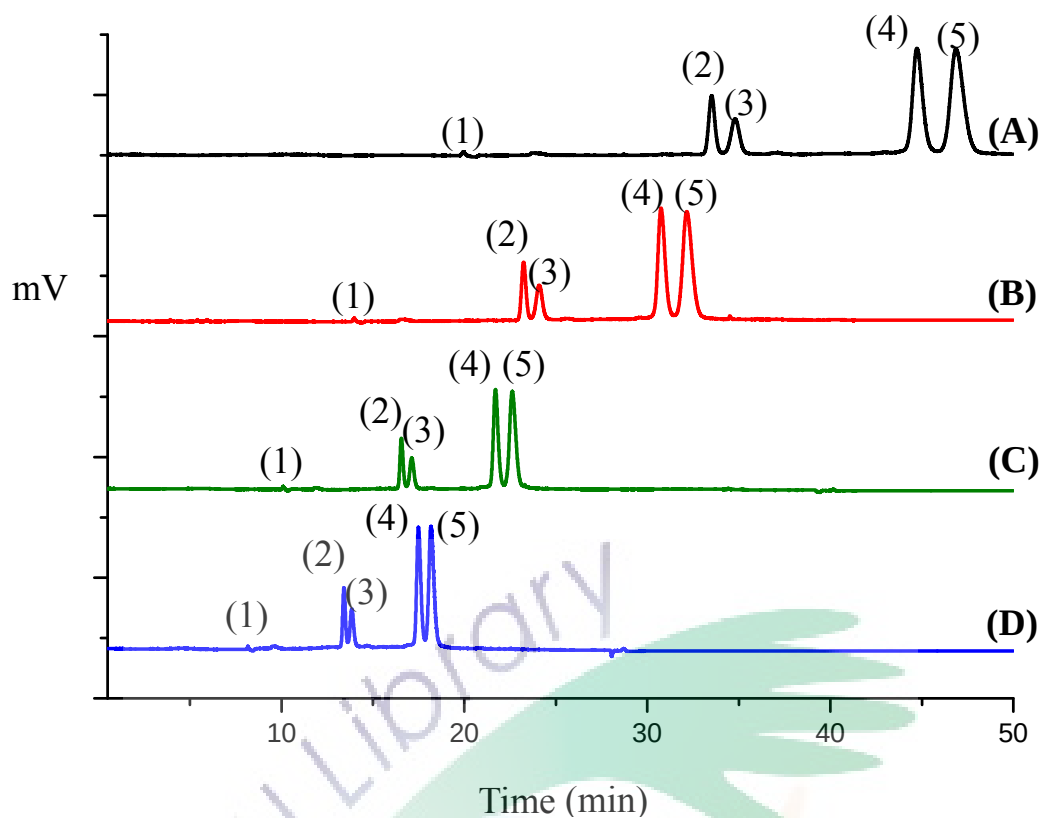


Fig. 13. Electropherograms of the catechins and caffeine in various voltage. Separation electrolyte: pH 8, 200 mM tris-borate buffer with 15% ethanol. Total length of capillary 65 cm (53 cm effective length); Voltage. (A)+15 kV; (B)+20 kV; (C) +25 kV; (D)+30 kV; UV detection at 275 nm; Samples: 5×10^{-5} M of (1)caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG.

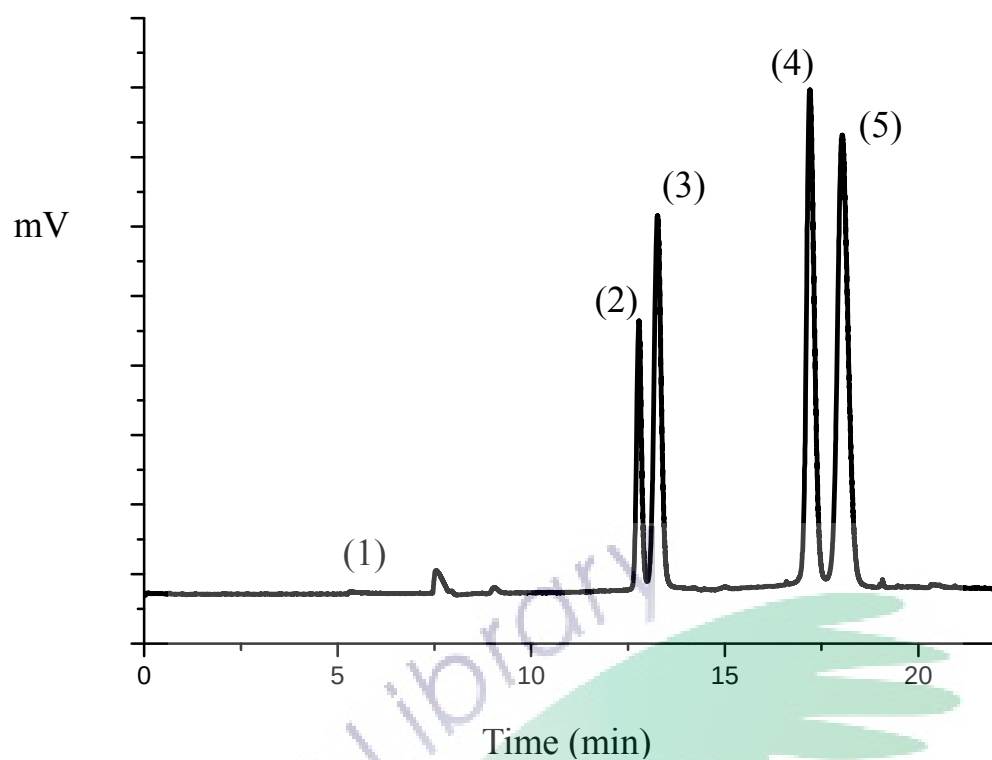


Fig. 14. Electropherograms of the catechins and caffeine under optimum conditions. Sample: 10^{-4} M of (1) caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte: 200 mM Tris-borate buffer containing 15% ethanol. Total length of capillary 65 cm (53 cm effective length); Voltage, +30 kV; UV detection at 275 nm.

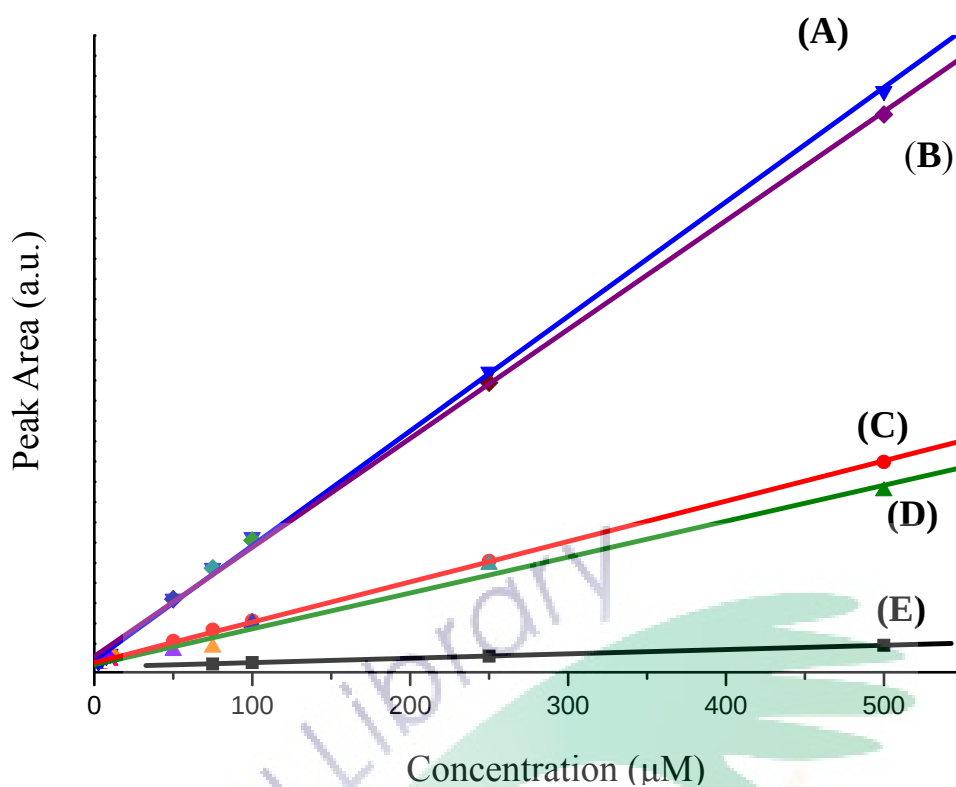


Fig. 15. The calibration curves of the catechins and caffeine. (A) (-)-EGCG; (B) (-)-ECG; (C) (-)-EGC; (D) (-)-EC; and (E) caffeine . Separation electrolyte: 200 mM tris-borate buffer containing 15% ethanol. Total length of capillary 65 cm (53 cm effective length); Voltage, +30 kV; UV detection at 275 nm.

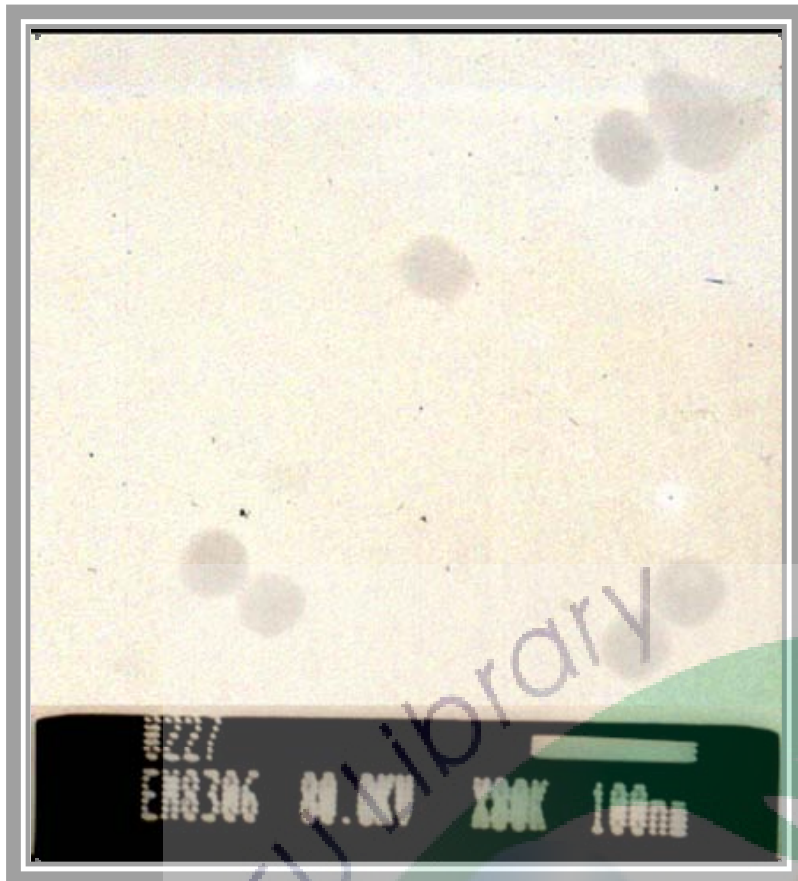


Fig. 16. TEM of the magnetic nano-particles.

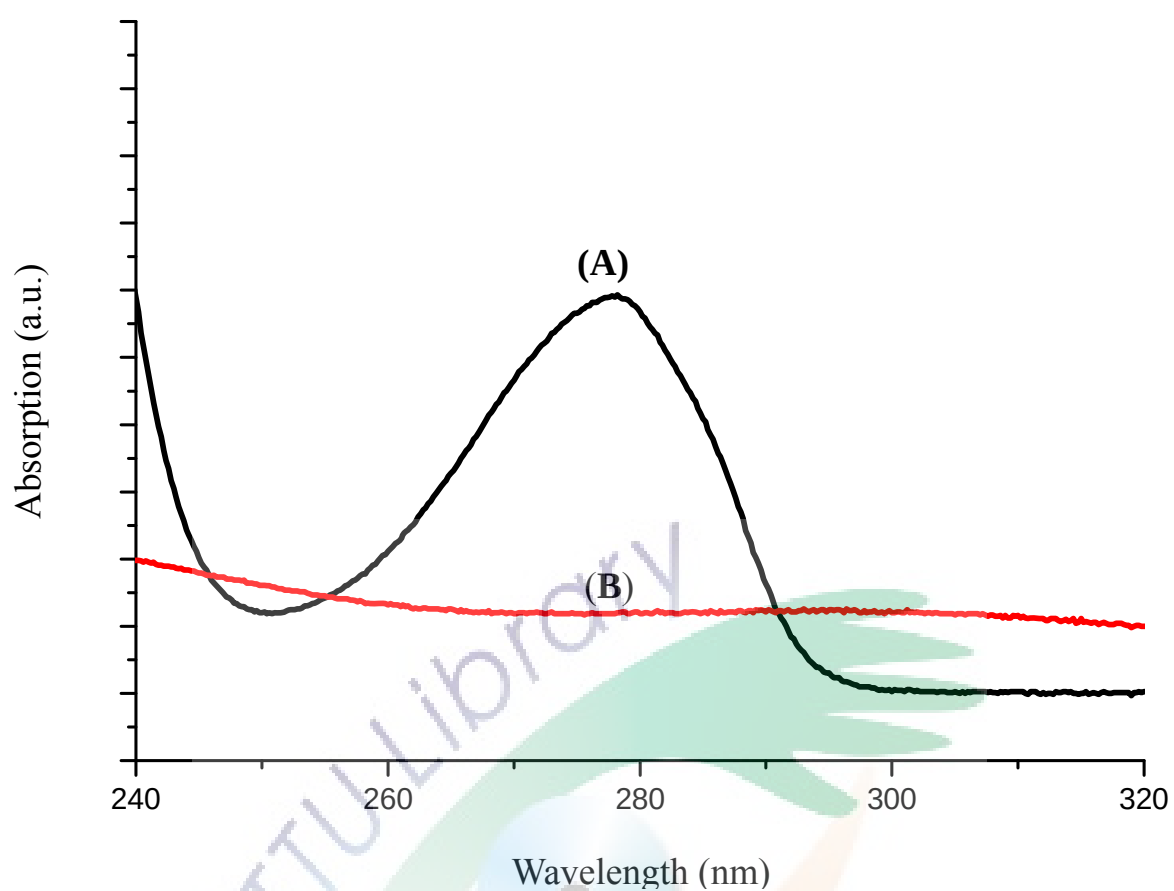


Fig. 17. UV absorbance of 5×10^{-5} M (-)-EC. (A) Without; (B) After MNPs adsorption.

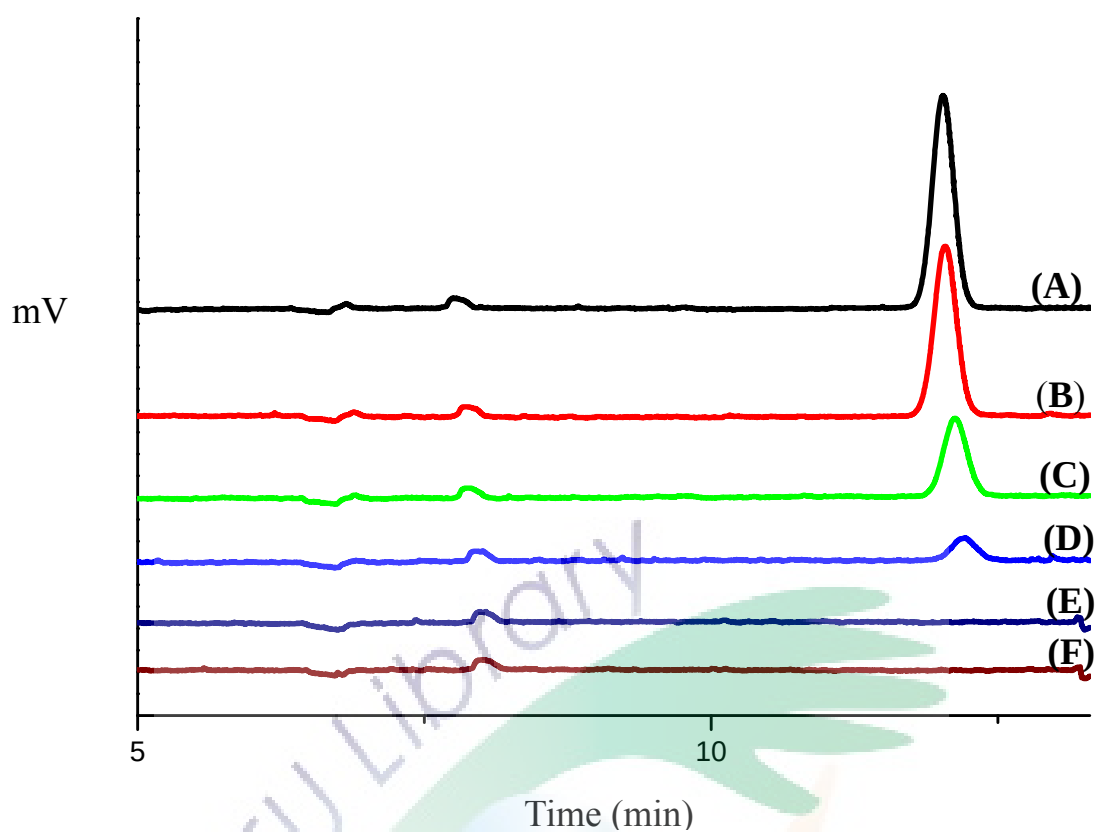


Fig. 18. Electropherograms of (-)-EC absorbed by various MNPs concentration. (A)0; (B)0.032; (C)0.16; (D)0.32; (E)0.64, and (F)0.98 pmole . Separation electrolyte as **Fig. 15**.

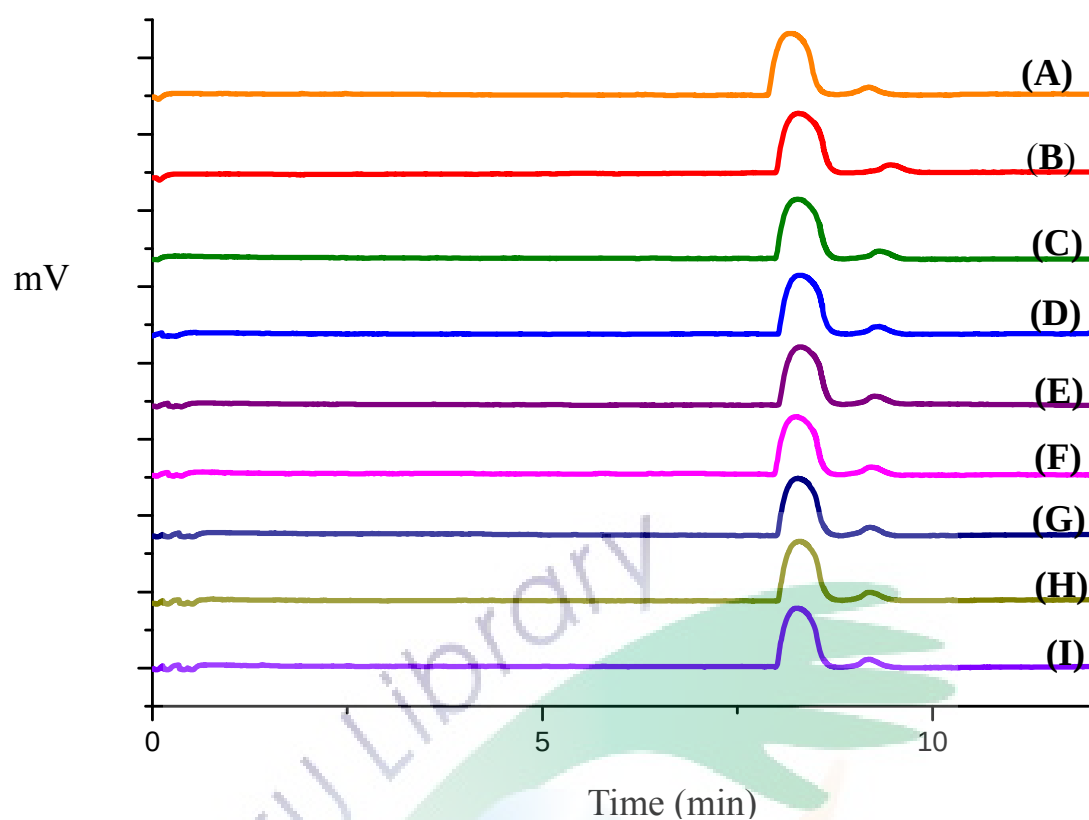


Fig. 19. Electropherograms of caffeine absorbed by various MNPs concentration. (A)0; (B)0.032; (C)0.16; (D)0.32 (E)0.64; and (F)0.98; (G)1.92; (H)2.56; (I)3.2 pmole. Separation electrolyte as **Fig. 15.**

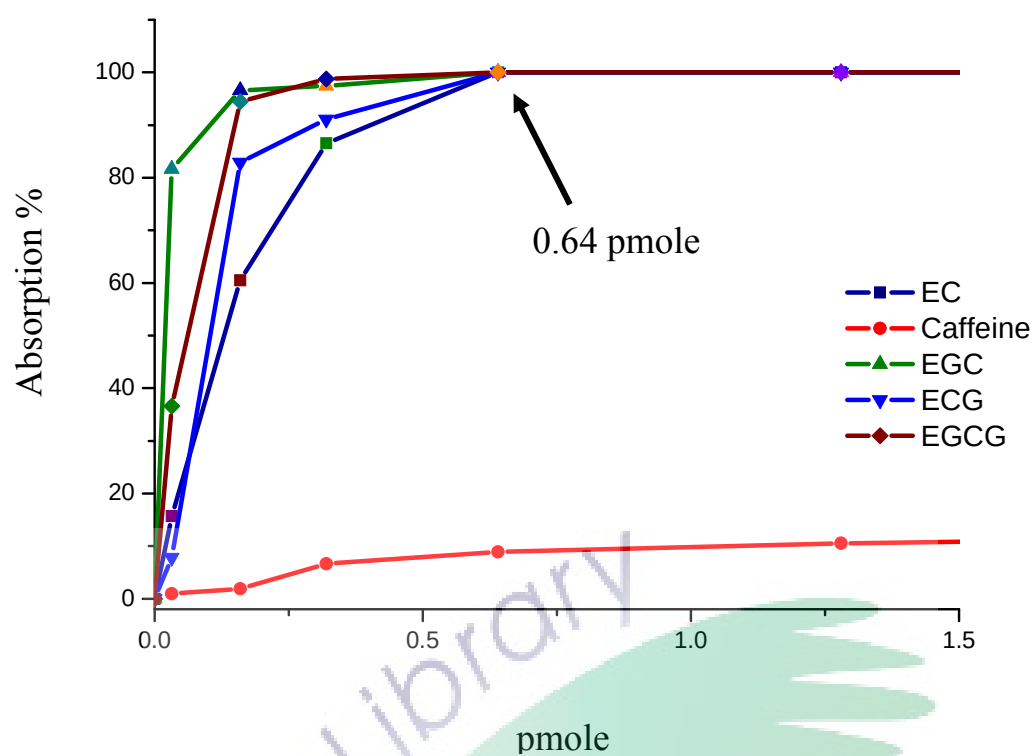


Fig.20. Adsorption ratio of 10^{-4} M catechins and caffeine adsorbed by various mole of MNPs.

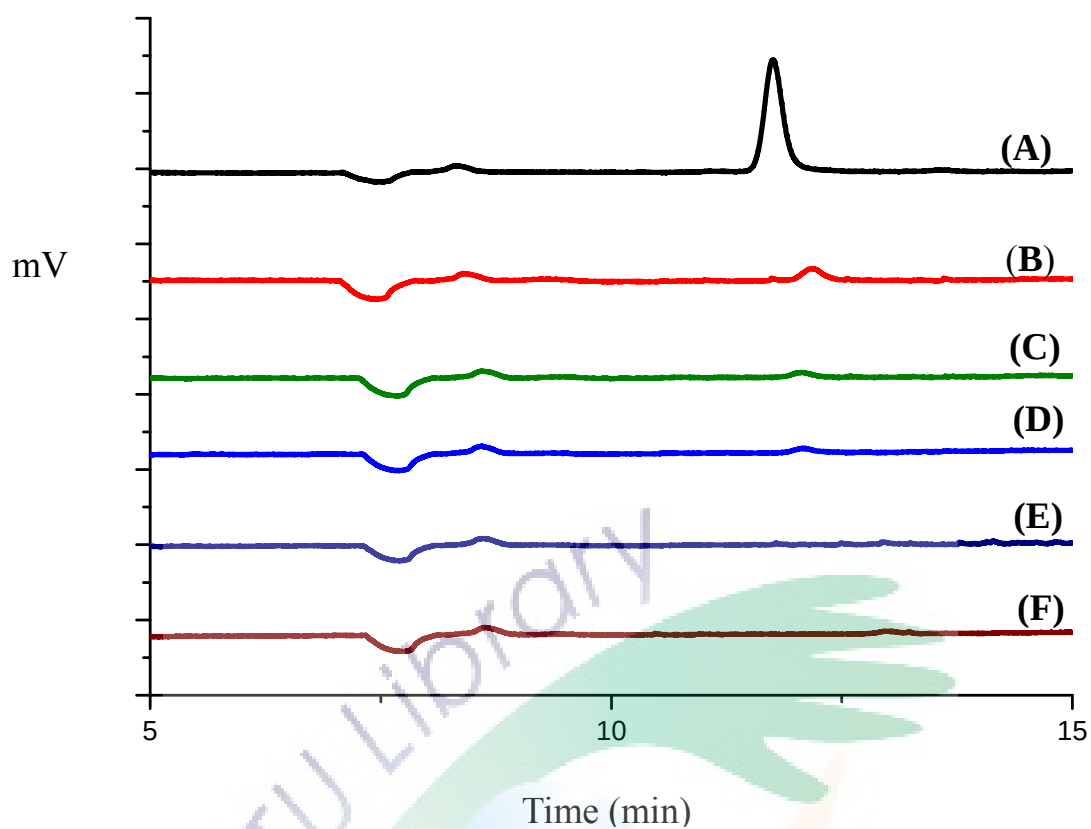


Fig. 21. Electropherograms of (-)-EC after various adsorption time. (A)0; (B)5; (C)10; (D)15; (E)20, and (F)25 min . Sample: 10^{-4} M (-)-EC. Separation electrolyte as **Fig. 15**.

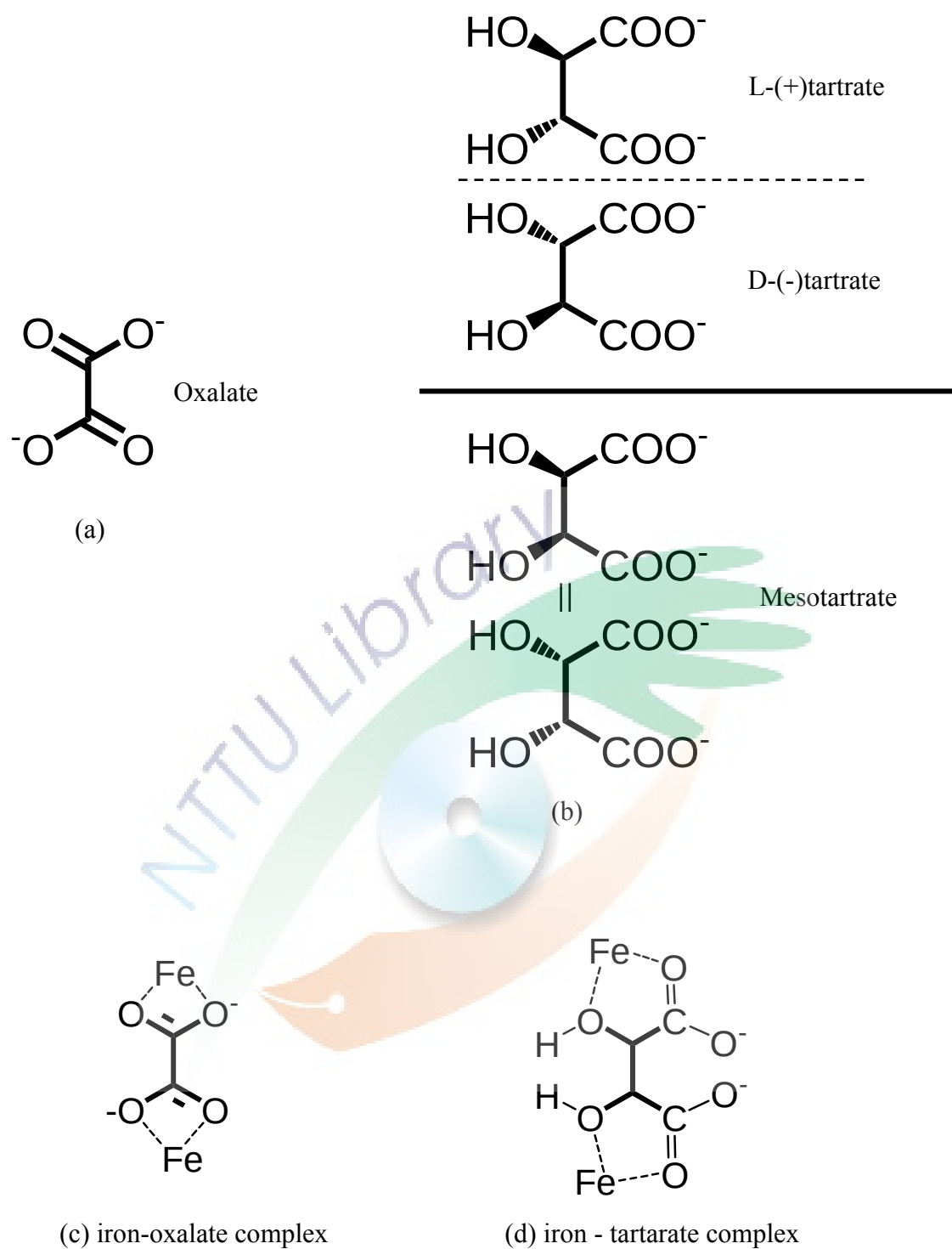


Fig. 22. The structure of the (a)oxalate; (b)tartrate and probable structure of the (c) iron - oxalate complex; (d) iron - tartrate complex.

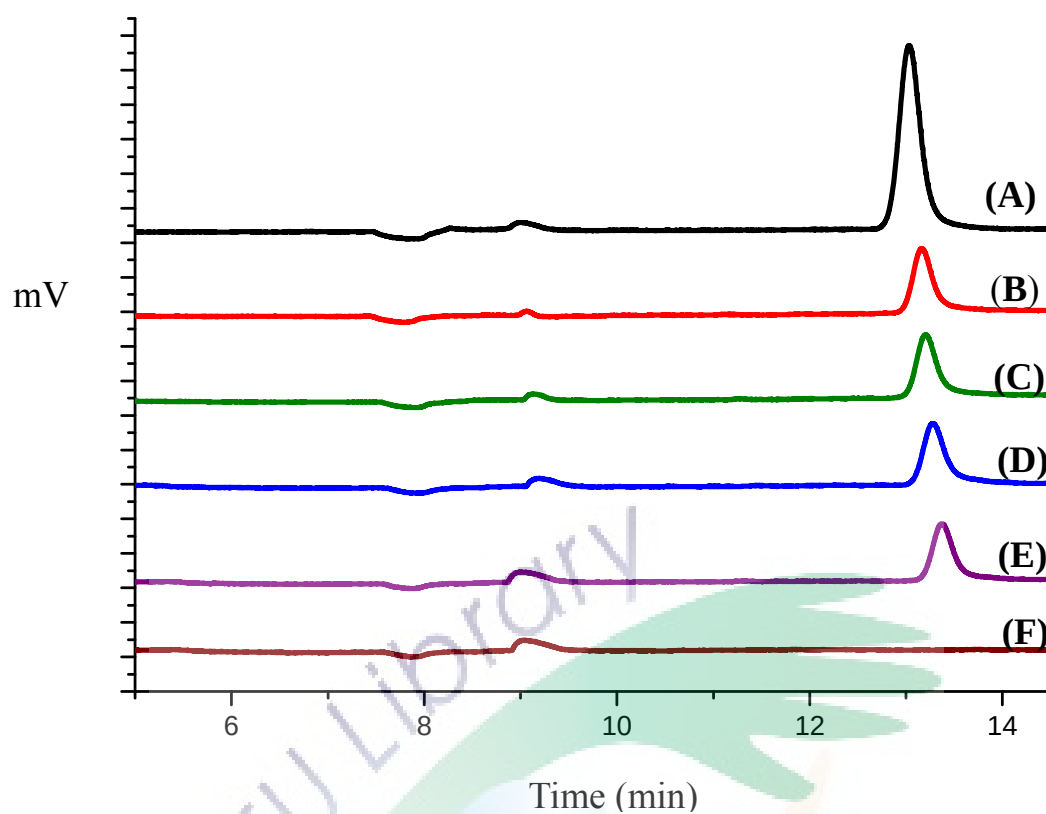


Fig. 23. Electropherograms of (-)-EC desorbed by various tartrate buffer pH value. (A) 1×10^{-4} M (-)-EC; (B) pH 3.0; (C) pH 3.4; (D) pH 4; (E) pH 5.3, and (F) pH 11.2 . Separation electrolyte as **Fig. 15.**

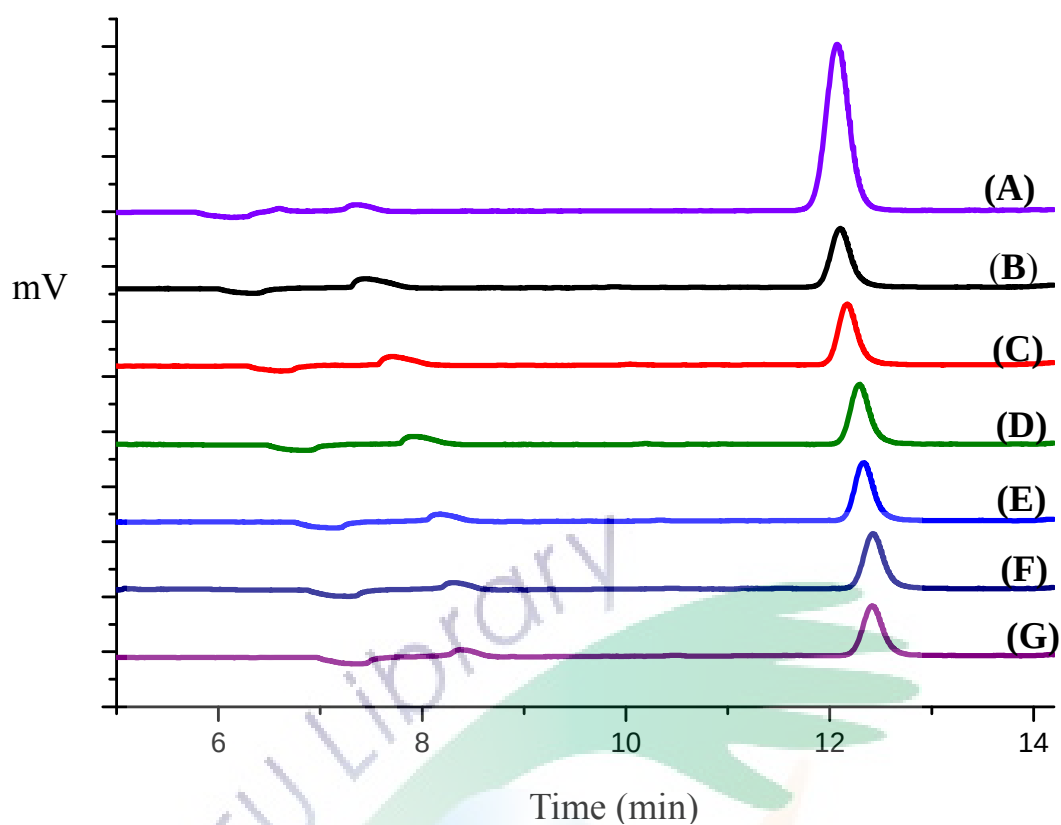


Fig. 24. Electropherograms of (-)-EC desorbed by various tartrate buffer concentration. (A) 1×10^{-4} M (-)-EC; (B) 10; (C) 20; (D) 40; (E) 60, (F) 80; and (G) 100 mM . Separation electrolyte as **Fig. 15**.

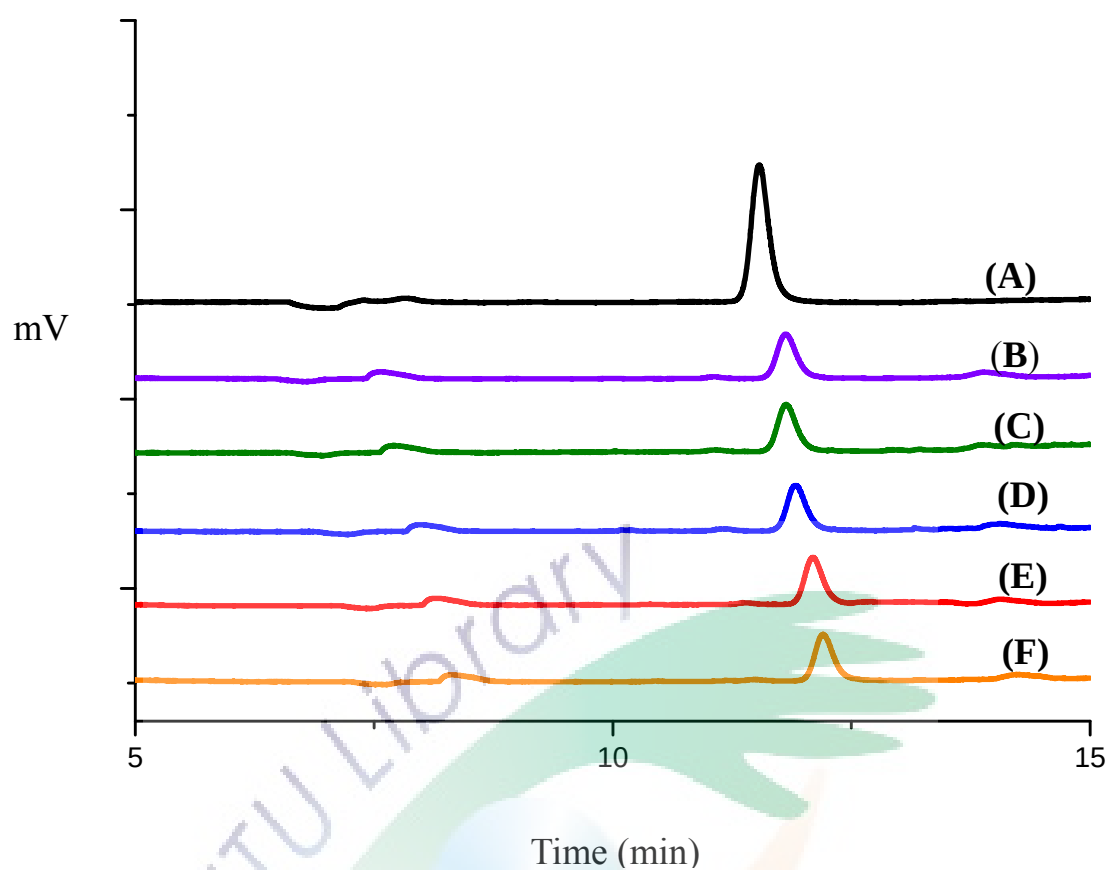


Fig. 25. Electropherograms of (-)-EC desorbed by tartrate buffer in various time. (A) 1×10^{-4} M (-)-EC; (B) 5; (C) 10; (D) 20; (E) 40, and (F) 60 min. Separation electrolyte as **Fig. 15**..

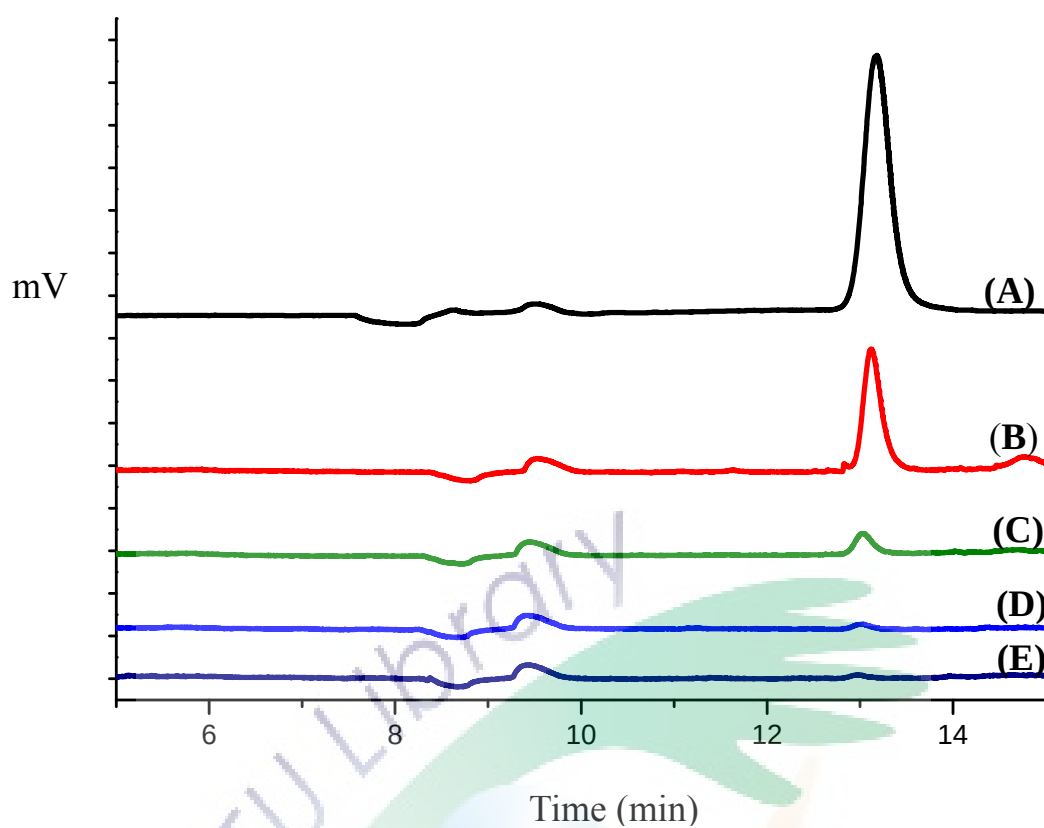


Fig. 26. Electropherograms of (-)-EC after various desorbed times. (A) 1×10^{-4} M (-)-EC; (B) 1st; (C) 2nd; (D) 3rd; and (E) 4th. Separation electrolyte as **Fig. 15**.

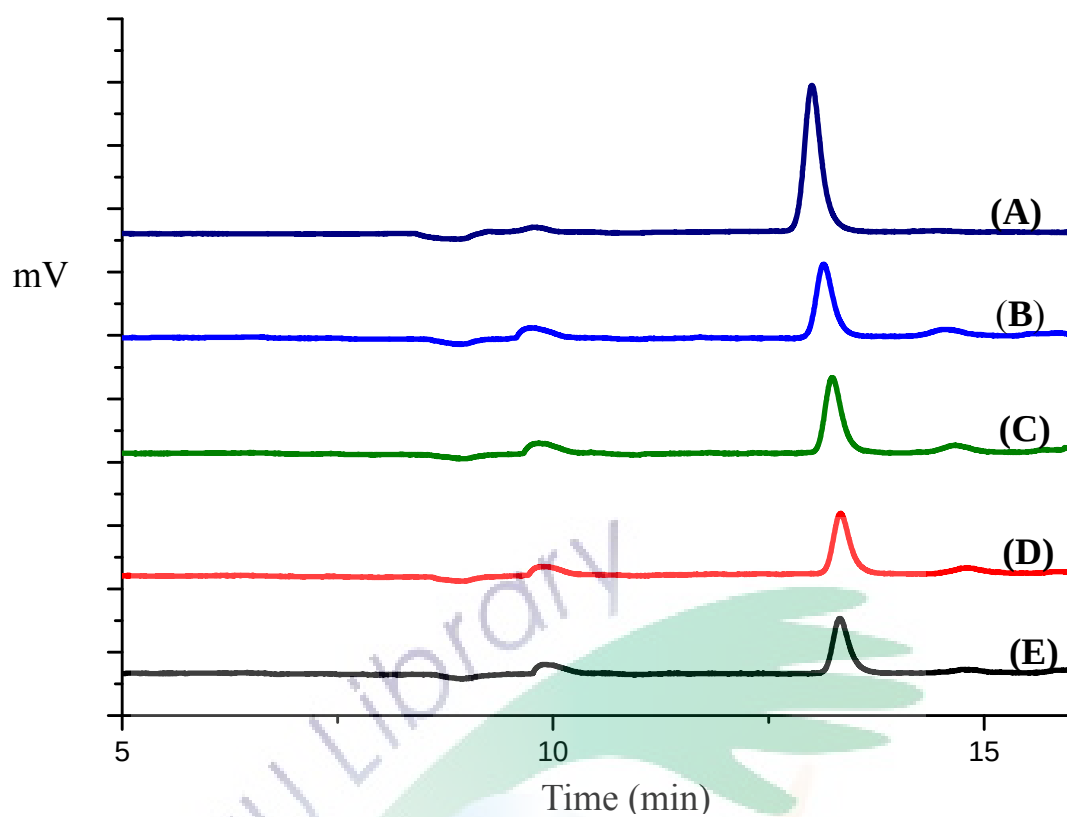


Fig. 27. Electropherograms of (-)-EC desorbed by tartrate buffer with 10% various organic solvent. (A) 1×10^{-4} M (-)-EC; (B) methanol; (C) ethanol; (D) 1-propanol; and (E) iso-propanol. Separation electrolyte as **Fig. 15**.

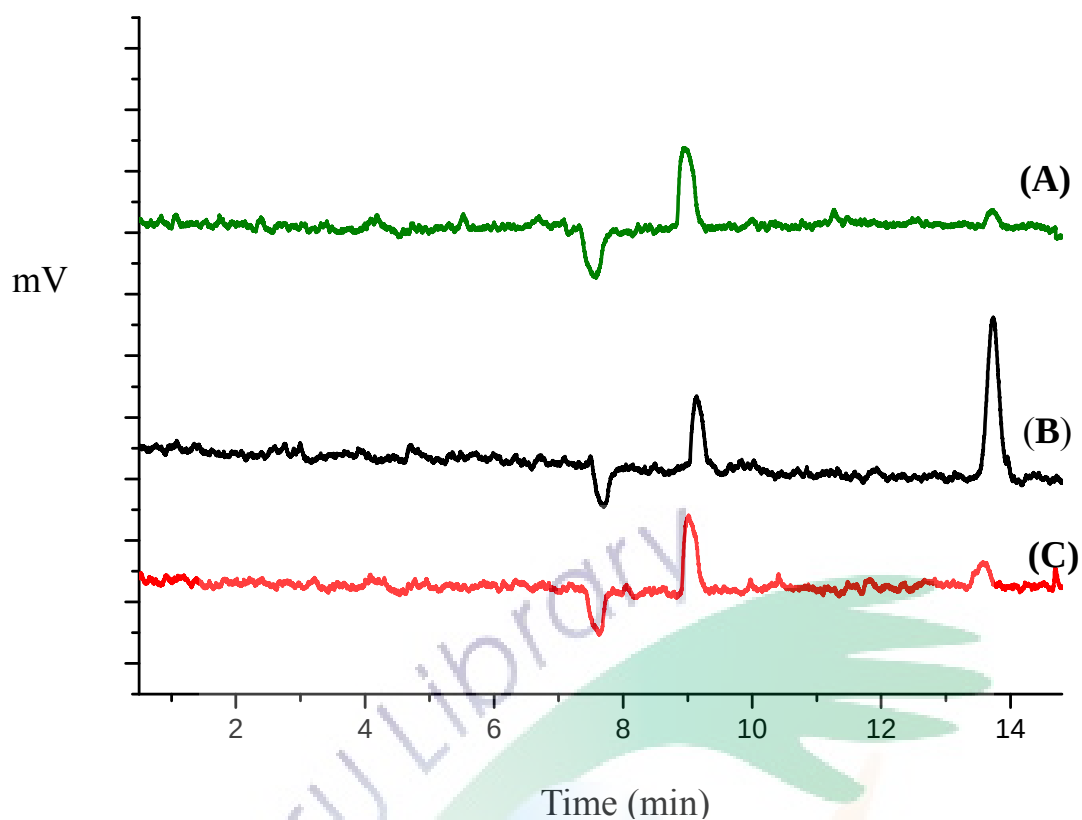


Fig. 28. Electropherograms of 50 mL 2 μ M (-)-EC concentrated by MNPs. (A) 2×10^{-6} M (-)-EC; (B) 1st desorption; and (C) 2nd desorption. Separation electrolyte as **Fig. 15**.

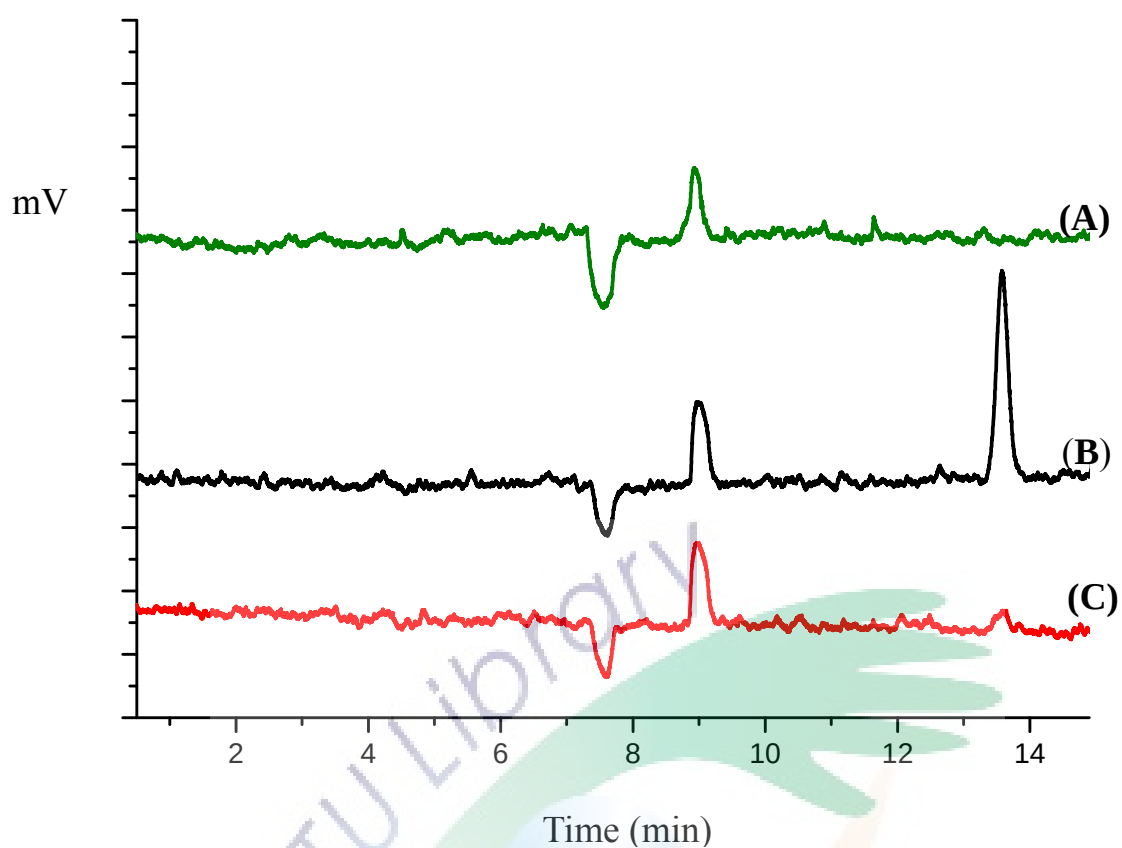


Fig. 29. Electropherograms of 100 mL, 1 μ M (-)-EC concentrated by MNPs. (A) 1×10^{-6} M (-)-EC; (B) 1st desorption; and (C) 2nd desorption. Separation electrolyte as **Fig. 15**.

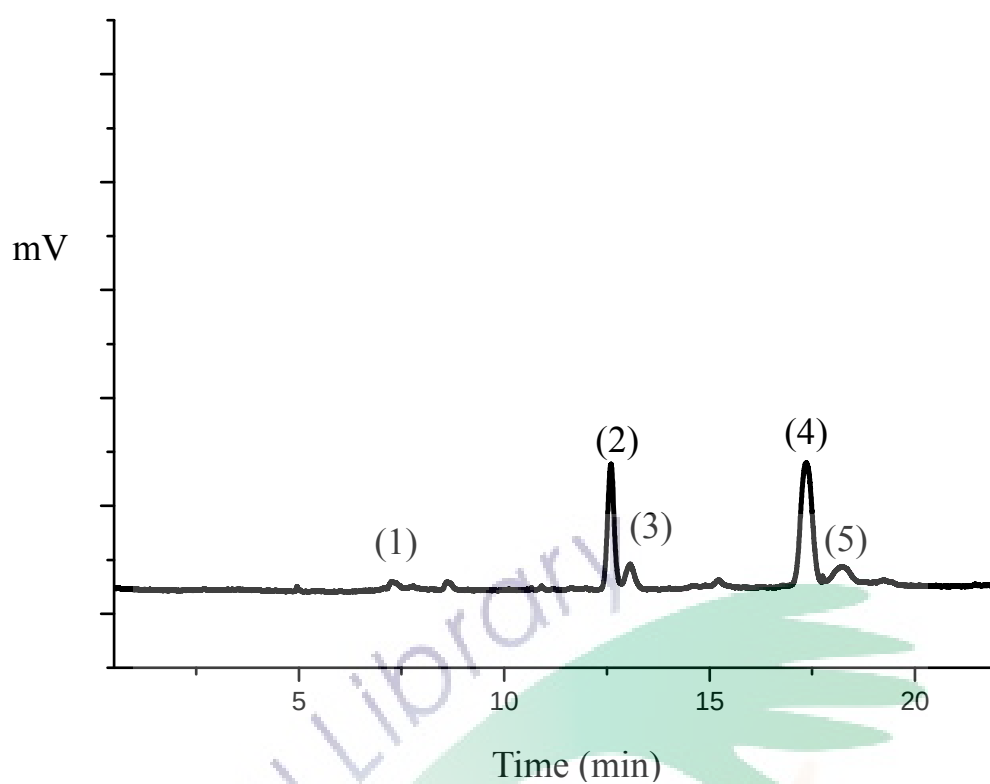


Fig. 30. Electropherograms of the real sample A diluted 10-fold. Sample: (1) Caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte as **Fig. 15**.

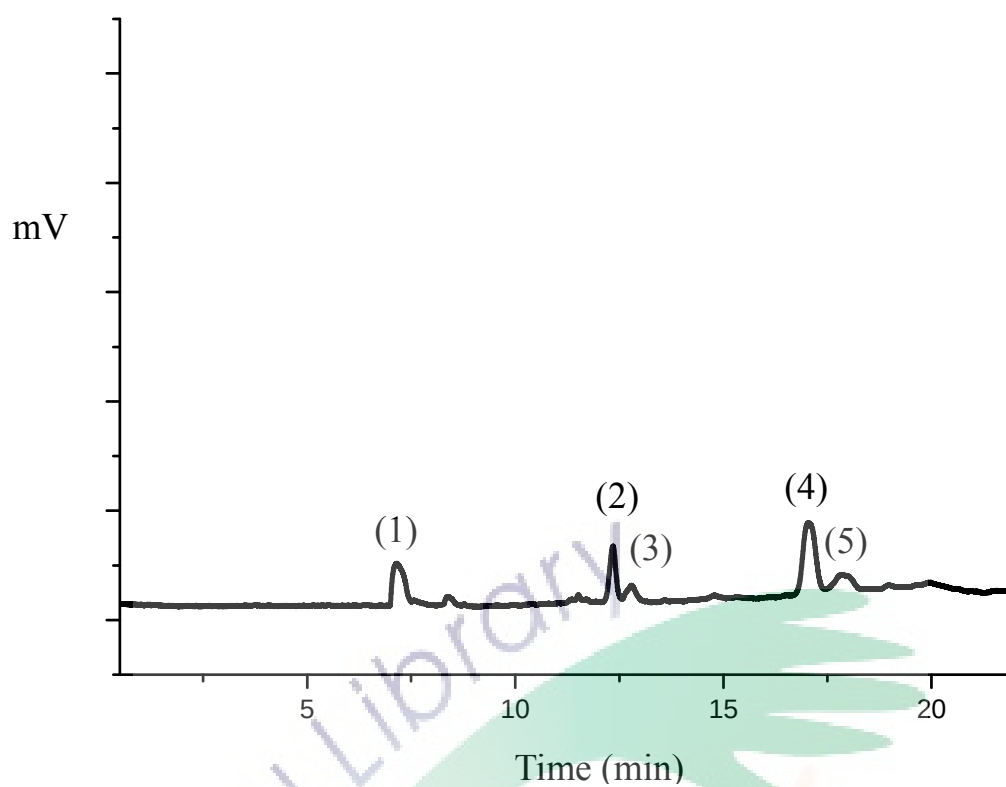


Fig. 31. Electropherograms of the real sample B diluted 10-fold. Sample: (1) Caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte as **Fig. 15**.

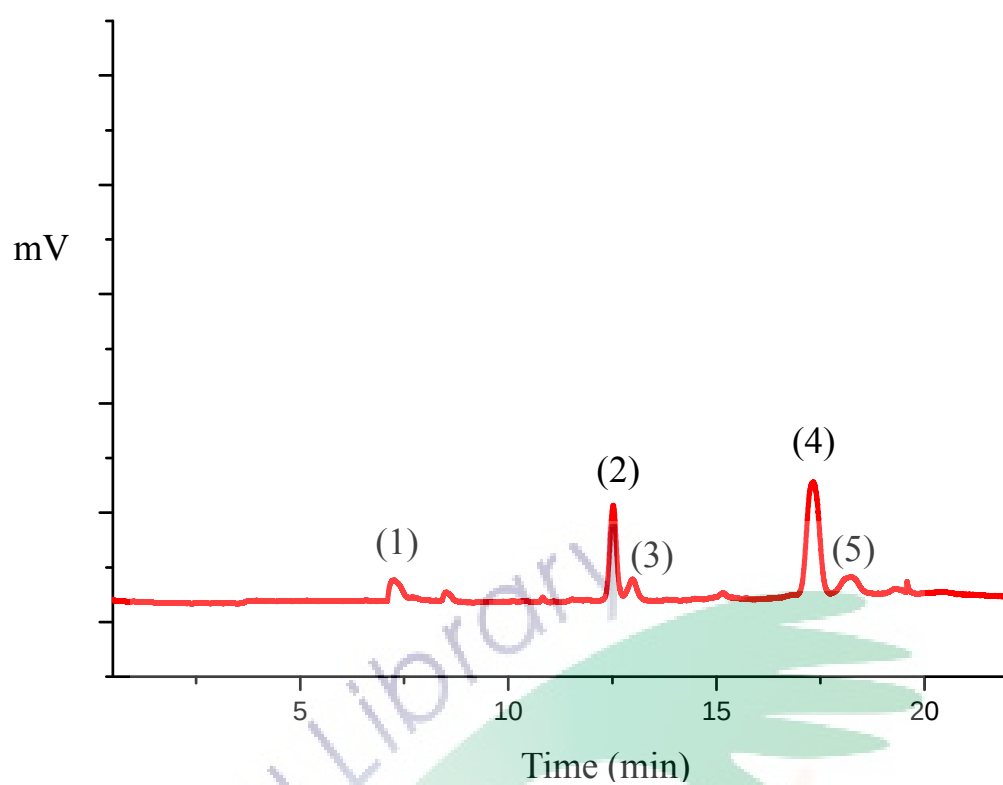


Fig. 32. Electropherograms of the real sample C diluted 10-fold. Sample: (1) Caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte as **Fig. 15**.

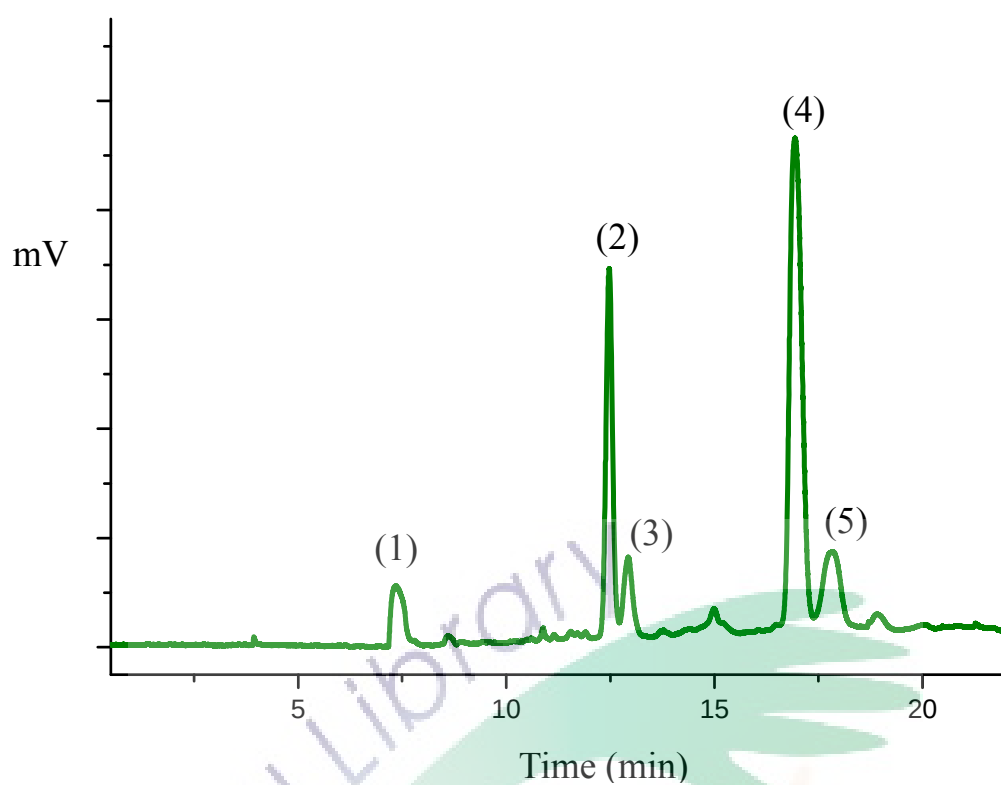


Fig. 33. Electropherograms of the real sample D diluted 10-fold. Sample: (1) Caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte as **Fig. 15**.

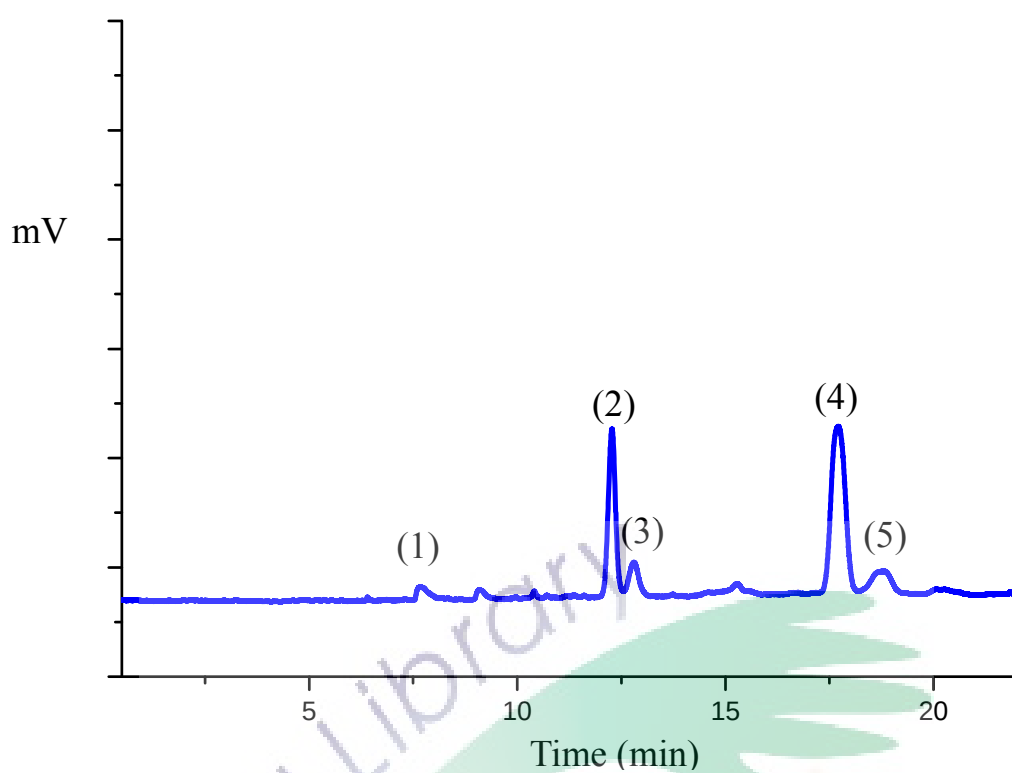


Fig. 34. Electropherograms of the real sample E diluted 10-fold. Sample: (1) Caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte as **Fig. 15**.

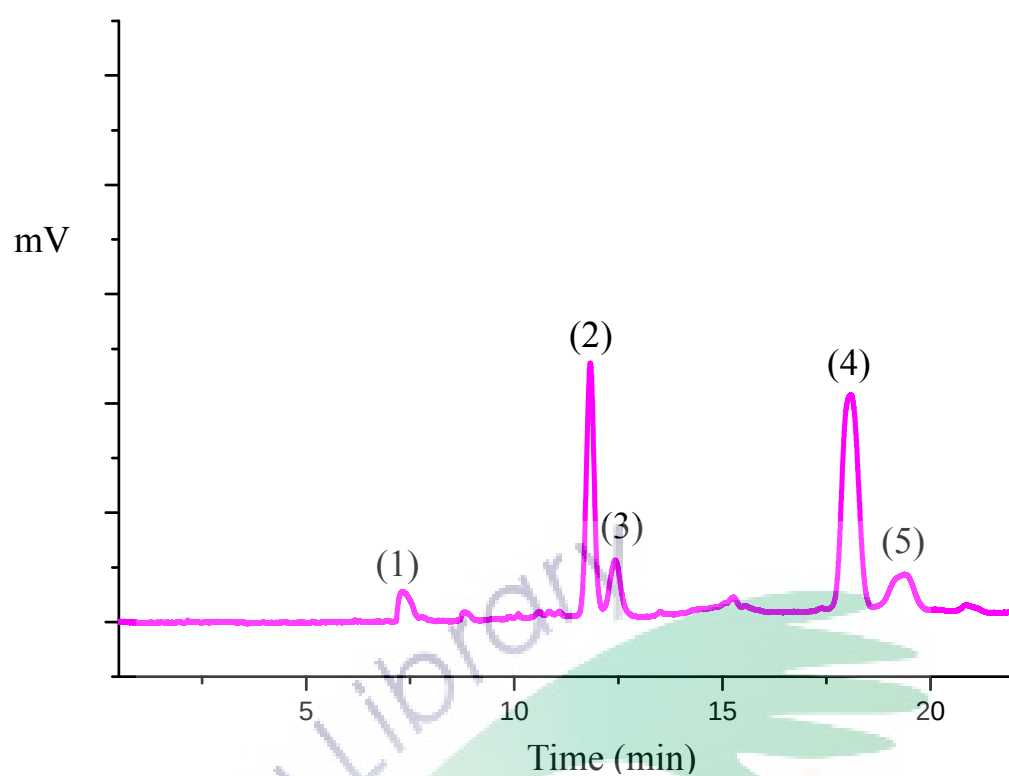


Fig. 35. Electropherograms of the real sample F diluted 10-fold. Sample: (1) Caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte as **Fig. 15**.

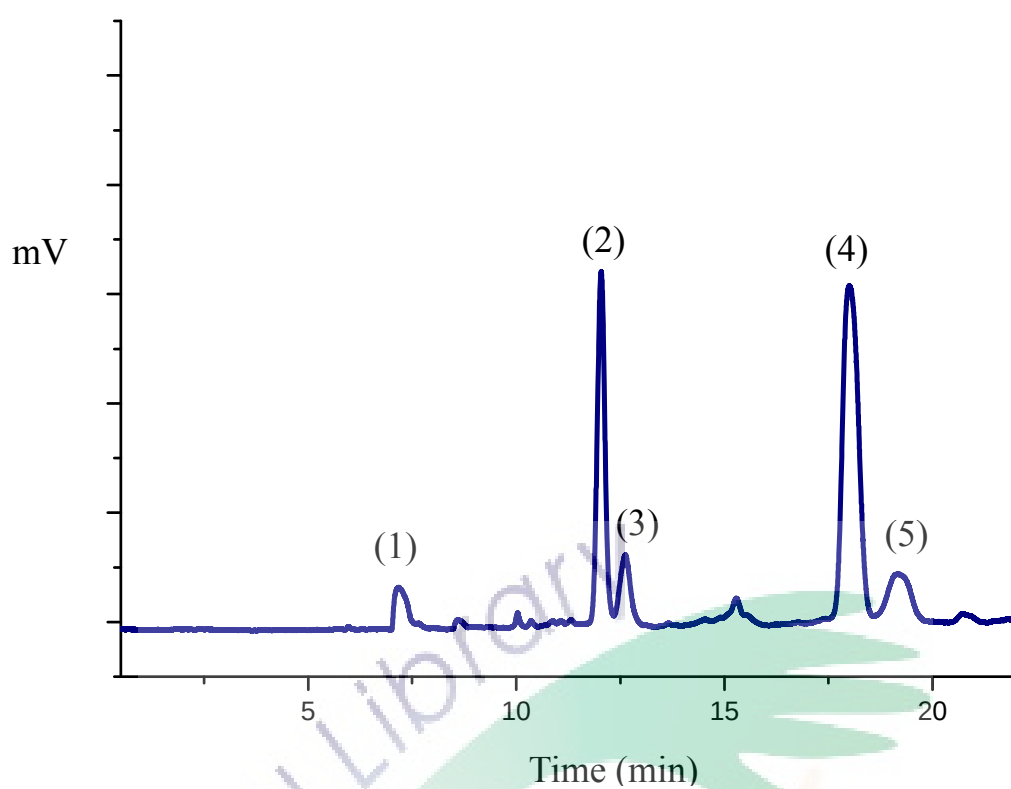


Fig. 36. Electropherograms of the real sample G diluted 10-fold. Sample: (1) Caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte as **Fig. 15**.

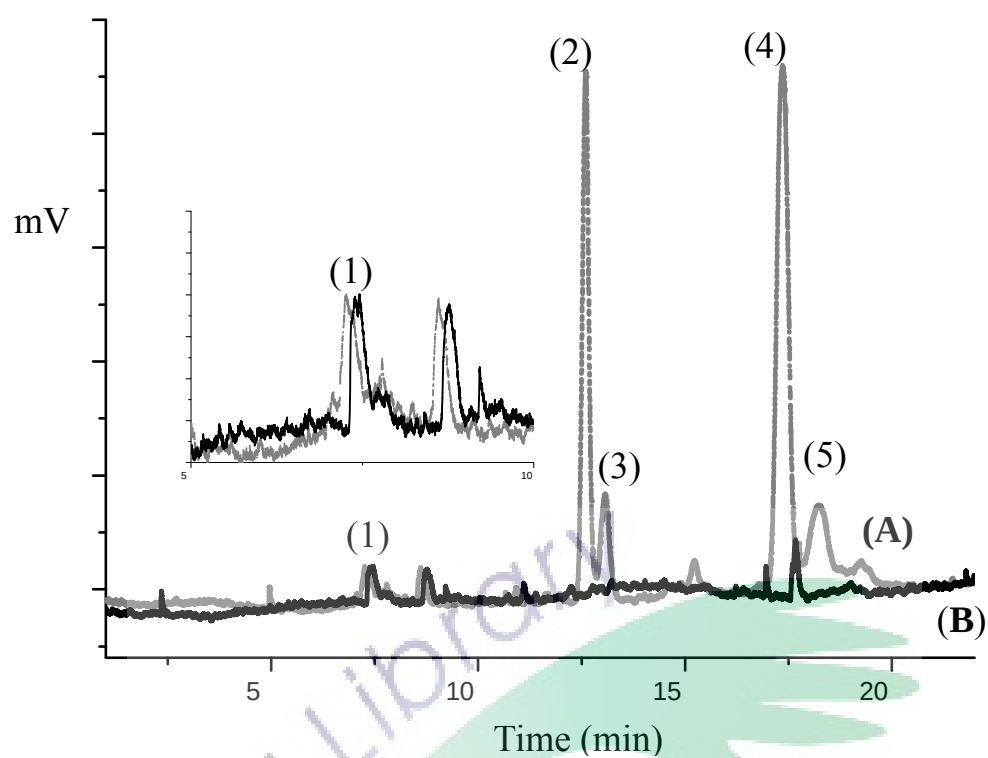


Fig. 37. Electropherograms of the 10-fold diluted real sample (A) without; and (B) after MNPs adsorption . Sample: (1) Caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte as **Fig 15**.

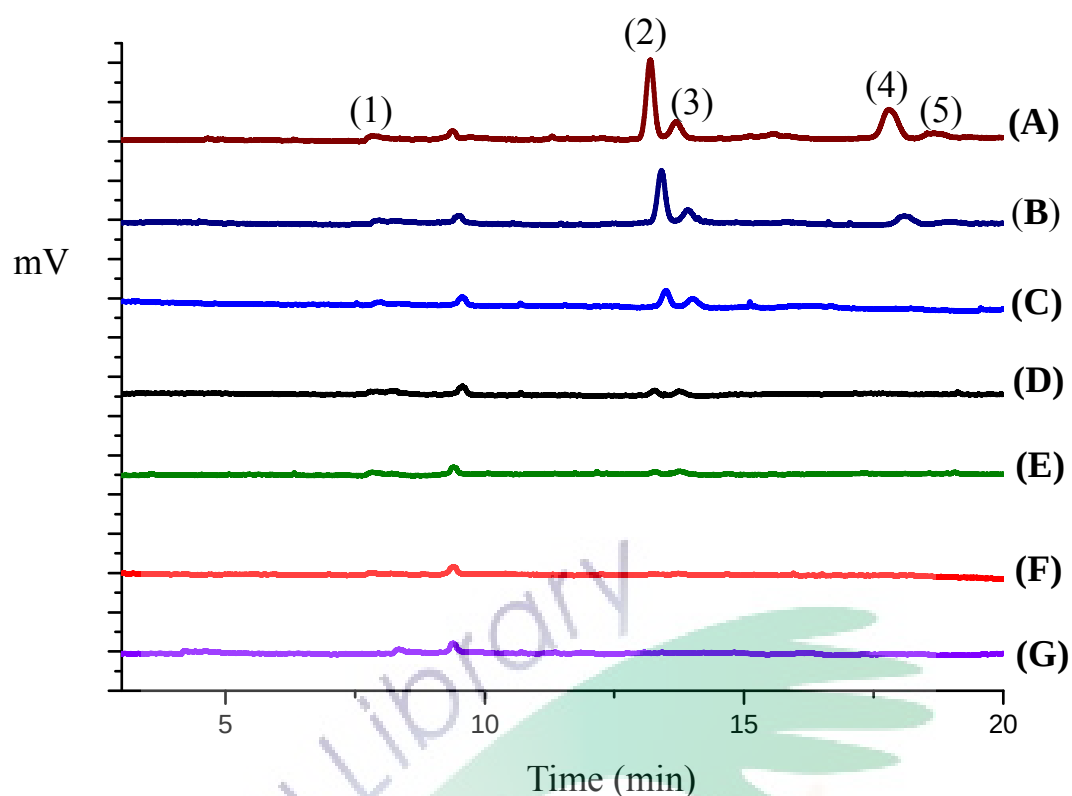


Fig. 38. Electropherograms of the 10-fold diluted real sample A adsorbed by various MNPs concentration. (A)0.096; (B)0.192; (C)0.48; (D)0.768; (E)0.96; (F)1.152 and (G) 1.44 pmole. Sample: (1) Caffeine; (2) (-)-EGC; (3) (-)-EC; (4) (-)-EGCG; and (5) (-)-ECG . Separation electrolyte as **Fig 15**.

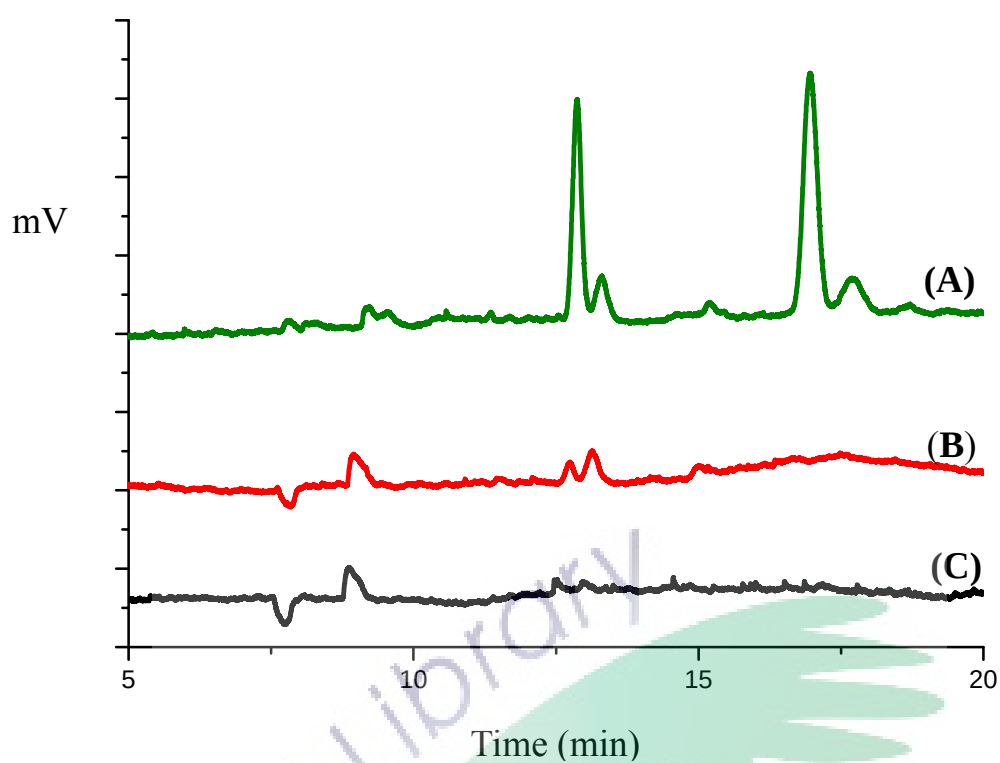


Fig. 39. Electropherograms of the real sample concentrated by MNPs. (A) Original real sample concentration; (B) 1st; and (C) 2nd of 100 mM pH5.3 tartrate buffer with 10% ethanol desorption. Separation electrolyte as **Fig. 15**.