

食品中抗氧化劑之檢驗方法－多重分析方法

Method of Test for Antioxidants in Foods- Multiple Analysis

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食用油脂、乳酪及人造奶油中沒食子酸丙酯(propyl gallate, PG)等11品項抗氧化劑(品項見表一)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 高效液相層析儀：
 - 2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Poroshell 120 EC-C18，2.7 μm ，內徑3 mm $\times$ 15 cm，或同級品。
 - 2.1.1.3. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.1.4. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times$ g以上。
 - 2.2. 試藥：異丙醇及乙腈均採用液相層析級；醋酸及維生素C(ascorbic acid)採用試藥特級；檸檬酸鈉、檸檬酸氫二鈉、無水硫酸鎂及氯化鈉均採用分析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；沒食子酸丙酯等對照用標準品共11品項。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL，褐色。
 - 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.3.4. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)^(註1)：採用Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
 - 2.3.5. 萃取用粉劑^(註2)：含檸檬酸鈉1 g、檸檬酸氫二鈉0.5 g、無水硫酸鎂4 g及氯化鈉1 g。
 - 註1：陶瓷均質石可視檢體狀況自行評估使用。
 - 註2：可依需求自行評估使用市售萃取用組合套組。
 - 2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 含1%維生素C之50%乙腈溶液：

稱取維生素C 1 g，以去離子水50 mL溶解，再加乙腈使成100 mL。

2.4.2. 2%維生素C溶液

稱取維生素C 1 g，加去離子水溶解使成50 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取醋酸50 mL，加去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。

2.6. 標準溶液之配製：

取抗氧化劑對照用標準品各約100 mg，精確稱定，分別以異丙醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，於-18℃避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以含1%維生素C之50%乙腈溶液稀釋至PG、THBP、TBHQ、NDGA、BHA、4-HR、OG、DG及BHT 0.25~20 µg/mL，ETH及HMBP 1~80 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

取檢體0.5 g，精確稱定，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆、去離子水8 mL及乙腈10 mL，再加入萃取用粉劑，蓋上離心管蓋，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以5000 ×g離心5分鐘。取上清液0.5 mL (a)，加入2%維生素C溶液使成1 mL (b)，混合均勻，以濾膜過濾後，供作檢液^(註)。

註：檢液調製後，應儘快進行儀器分析。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各10 µL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各抗氧化劑之含量(g/kg)：

$$\text{檢體中各抗氧化劑之含量(g/kg)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由標準曲線求得檢液中各抗氧化劑之濃度(µg/mL)

V：萃取檢體之乙腈體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由b/a求得

高效液相層析測定條件^(註3)：

光二極體陣列檢出器：定量波長280 nm。

層析管：Poroshell 120 EC-C18，2.7 μm，內徑3 mm × 15 cm。

層析管溫度：45°C。

注入量：10 μL。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0 → 7	85 → 85	15 → 15
7 → 15	85 → 55	15 → 45
15 → 22	55 → 55	45 → 45
22 → 23	55 → 25	45 → 75
23 → 30	25 → 25	75 → 75
30 → 30.1	25 → 85	75 → 15
30.1 → 35	85 → 85	15 → 15

移動相流速：0.7 mL/min。

註3：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，PG、THBP、TBHQ、NDGA、BHA、4-HR、OG、DG及BHT均為0.01 g/kg，ETH及HMBP均為0.04 g/kg。

2. 以液相層析串聯質譜儀(LC/MS/MS)進行確認時，其LC/MS/MS之多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)模式參考參數如表一，且其相對離子強度(定性離子與定量離子之波峰面積比)應符合下列容許範圍：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

3. 以氣相層析質譜儀(GC/MS)進行確認時，其GC/MS之選擇離子偵測(selected ion monitoring, SIM)模式之偵測離子如表二，且其相對離子強度(定性離子與定量離子之波峰面積比)

105 年 2 月 26 日部授食字第 1051900163 號公告訂定
 107 年 3 月 9 日衛授食字第 1071900313 號公告修正
 108 年 1 月 29 日衛授食字第 1081900166 號公告修正
 MOHWA0021.02

應符合下列容許範圍：

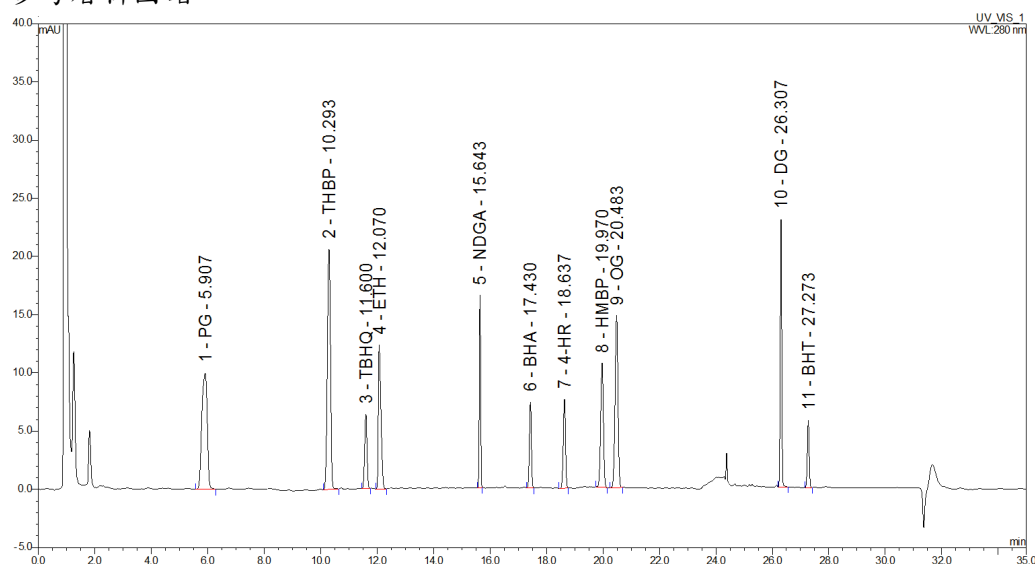
相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 10
> 20~50	± 15
> 10~20	± 20
≤ 10	± 50

4. 若有干擾需以LC/MS/MS或GC/MS進行定量時，應先進行方法確效。
5. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Page, B. D. 1993. Liquid chromatographic method for the determination of nine phenolic antioxidants in butter oil: collaborative study. J. AOAC Int. 76: 765-779.
2. Jia, W., Ling, Y., Lin, Y., Chang, J. and Chu, X. 2014. Analysis of additives in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1336: 67-75.

參考層析圖譜



圖、沒食子酸丙酯等11項抗氧化劑標準品之HPLC圖譜

表一、沒食子酸丙酯等11項抗氧化劑之液相層析串聯質譜儀多重反應偵測模式參數

分析物		離子化 模式	離子對	去簇電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
中文名	英文名		前驅離子(<i>m/z</i>)> 產物離子(<i>m/z</i>)		
沒食子酸丙酯	propyl gallate (PG)	ESI ⁻	211 > 169* 211 > 124	-55 -55	-21 -34
三羥基苯丁酮	2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP)	ESI ⁻	195 > 125* 195 > 166	-50 -50	-28 -28
第三丁基氫醌	<i>tert</i> -butyl hydroquinone (TBHQ)	ESI ⁻	165 > 149* 165 > 108	-53 -53	-30 -31
乙氧基喹啉	ethoxyquin (ETH)	ESI ⁺	218 > 174* 218 > 160	44 44	40 48
正二氫癬創酸	nordihydroguaiaietic acid (NDGA)	ESI ⁻	301 > 122* 301 > 273	-60 -60	-37 -25
丁基羥基甲氧苯	butyl hydroxy anisole (BHA)	ESI ⁻	179 > 164* 179 > 149	-33 -33	-20 -35
己基間苯二酚	4-hexyl resorcinol (4-HR)	ESI ⁻	193 > 149* 193 > 122	-48 -48	-20 -27
羥甲基二丁基苯酚	4-hydroxymethyl-2,6-di- <i>tert</i> -butylphenol (HMBP)	ESI ⁻	235 > 217* 235 > 160	-50 -50	-30 -36
沒食子酸辛酯	octyl gallate (OG)	ESI ⁻	281 > 124* 281 > 169	-80 -80	-42 -29
沒食子酸十二酯	dodecyl gallate (DG)	ESI ⁻	337 > 124* 337 > 169	-110 -110	-52 -36
二丁基羥基甲苯	dibutyl hydroxy toluene (BHT)	ESI ⁻	219 > 203* 219 > 163	-60 -60	-35 -20

*定量離子對

註：上述參數不適時，可依所使用之儀器，設定適合之參數。

表二、沒食子酸丙酯等8項抗氧化劑之氣相層析質譜儀選擇性離子偵測模式之偵測離子

分析物		離子化 模式	定量離子 (m/z)	定性離子 (m/z)
中文名	英文名			
沒食子酸丙酯	propyl gallate (PG)	EI	170	153, 212
三羥基苯丁酮	2,4,5-trihydroxy butyrophenone (THBP)	EI	153	181, 196
第三丁基氫醌	tert-butylhydroquinone (TBHQ)	EI	123	151, 166
乙氧基喹啉	ethoxyquin (ETH)	EI	202	174, 217
丁基羥基甲氧苯	butyl hydroxyl anisole (BHA)	EI	137	165, 180
己基間苯二酚	4-hexylresorcinol (4-HR)	EI	123	125, 136
羥甲基二丁基苯酚	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	EI	221	161, 236
二丁基羥基甲苯	dibutyl hydroxyl toluene (BHT)	EI	205	145, 220

註：上述參數不適時，可依所使用之儀器，設定適合之參數。