

食品中迷迭香萃取物之檢驗方法

Method of Test for Extracts of Rosemary in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食用油脂、膠囊及錠狀食品、口香糖及泡泡糖中迷迭香萃取物，包括鼠尾草酚(carnosol)及鼠尾草酸(carnosic acid)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Accucore aQ C18，2.6 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times g$ 以上者。
 - 2.1.4. 攪拌均質機(Blender)。
 - 2.2. 試藥：正己烷及乙腈均採用液相層析級；抗壞血酸(ascorbic acid)採用試藥級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 M $\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；鼠尾草酚及鼠尾草酸對照用標準品；對羥苯甲酸丁酯(butyl *p*-hydroxybenzoate)內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：5 mL、10 mL及20 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 含1%抗壞血酸之50%乙腈溶液：
稱取抗壞血酸5 g，以去離子水250 mL溶解，再加乙腈使成500 mL。
 - 2.4.2. 正己烷飽和之乙腈溶液：
取乙腈400 mL，加正己烷80 mL，振盪混勻，靜置至完全分層後，取下層(乙腈層)。
 - 2.5. 移動相溶液之調製：
 - 2.5.1. 移動相溶液A：
取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾後，取濾液供作移動相溶液A。
 - 2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取對羥苯甲酸丁酯約20 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量內部標準原液，以含1%抗壞血酸之50%乙腈溶液稀釋至40 µg/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取鼠尾草酚及鼠尾草酸對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至5 mL，供作標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，加入內部標準溶液，以含1%抗壞血酸之50%乙腈溶液稀釋至5~100 ng/mL (含內部標準品濃度10 ng/mL)，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 食用油脂：

將液態檢體或已加熱融化之固態檢體混勻後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液50 µL及正己烷3 mL，溶解後，加入正己烷飽和之乙腈溶液3 mL，混合均勻，以1000 rpm振盪1分鐘後，以3000 ×g離心3分鐘，收集乙腈層(下層)，上層再加入正己烷飽和之乙腈溶液3 mL，重複上述步驟萃取2次，合併乙腈層，以乙腈定容至20 mL，作為檢液原液。取適量檢液原液，以含1%抗壞血酸之50%乙腈溶液稀釋10倍，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8.2. 錠狀食品：

將檢體磨碎混勻後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液50 µL及乙腈3 mL，混合均勻，以1000 rpm振盪1分鐘後，以5000 ×g離心5分鐘，收集上清液，殘渣再加入乙腈3 mL，重複上述步驟萃取2次，合併上清液，以乙腈定容至20 mL，作為檢液原液。取適量檢液原液，以含1%抗壞血酸之50%乙腈溶液稀釋10倍，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8.3. 軟膠囊食品：

將檢體之內容物取出磨碎混勻後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液50 µL及正己烷3 mL，溶解後，加入正己烷飽和之乙腈溶液3 mL，混合均勻，以1000 rpm振盪1分鐘後，以3000 ×g離心3分鐘，收集乙腈層(下層)，上層再加入正己烷飽和之乙腈溶液3 mL，重複上述步驟萃取2次，合併乙腈層，以乙腈定容至20 mL，作為檢液原液。取適量檢液原液，以含1%抗壞血酸之50%乙腈溶液稀釋10倍，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8.4. 口香糖及泡泡糖：

將檢體冷凍、磨碎混勻後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液50 μ L及乙腈3 mL，混合均勻，以1000 rpm振盪1分鐘後，以5000 $\times$ g離心5分鐘，收集上清液，殘渣再加入乙腈3 mL，重複上述步驟萃取2次，合併上清液，以乙腈定容至20 mL，作為檢液原液。取適量檢液原液，以含1%抗壞血酸之50%乙腈溶液稀釋10倍，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各2 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就鼠尾草酚及鼠尾草酸與內部標準品之波峰面積比，與對應之鼠尾草酚及鼠尾草酸之濃度，分別製作5~100 ng/mL標準曲線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：Accucore aQ C18，2.6 μ m，內徑2.1 mm $\times$ 15 cm。

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 (%)
0.0 $\rightarrow$ 12.0	50 $\rightarrow$ 40	50 $\rightarrow$ 60
12.0 $\rightarrow$ 13.0	40 $\rightarrow$ 0	60 $\rightarrow$ 100
13.0 $\rightarrow$ 16.0	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
16.0 $\rightarrow$ 16.1	0 $\rightarrow$ 50	100 $\rightarrow$ 50
16.1 $\rightarrow$ 20.0	50 $\rightarrow$ 50	50 $\rightarrow$ 50

移動相流速：0.25 mL/min。

注入量：2 μ L。

管柱溫度：40°C。

樣品盤溫度：10°C。

毛細管電壓(Capillary voltage)：1.6 kV。

離子化模式：ESI負離子。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：150 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：950 L/hr。

碰撞氣體流速(Collision gas flow)：0.15 mL/min。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如下表。

分析物	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
鼠尾草酚	329 > 285*	-25	-15
	329 > 201	-25	-45
鼠尾草酸	331 > 287*	-10	-25
	331 > 244	-10	-25
對羥苯甲酸丁酯	193 > 92	-18	-22

*定量離子對

註：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。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各2 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.節條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測之相對離子強度^(註1)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中迷迭香萃取物之含量(mg/kg)^(註2)：

$$\text{檢體中迷迭香萃取物之含量(mg/kg)} = \frac{\Sigma C \times V \times 10}{M \times 10^3}$$

C：由標準曲線求得檢液中鼠尾草酚或鼠尾草酸之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(20 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

10：稀釋倍數

註：1. 相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積比而得(≤100%)，容許範圍如下：

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

2. 檢體中迷迭香萃取物之含量以鼠尾草酚及鼠尾草酸之總量計。

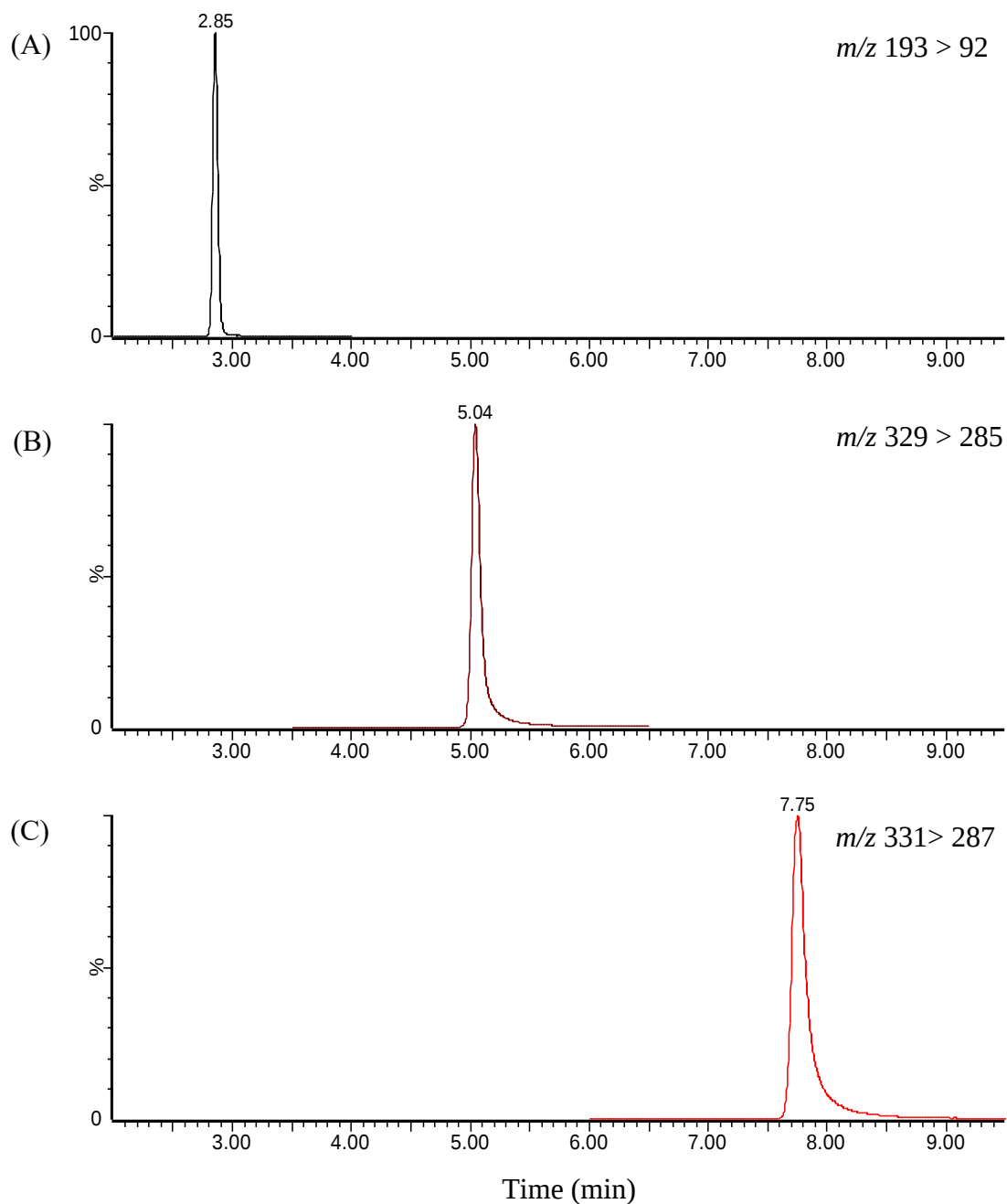
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，鼠尾草酚及鼠尾草酸均為1 mg/kg。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

Wang, L., Gan, C., Wang, Z., Liu, L., Gao, M., Li, Q. and Yang, C. 2017. Determination and pharmacokinetic study of three diterpenes in rat plasma by UHPLC-ESI-MS/MS after oral administration of *Rosmarinus officinalis* L. extract. Molecules 22: 9341.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析對羥苯甲酸丁酯內部標準品(A)、鼠尾草酚標準品(B)及鼠尾草酸標準品(C)之MRM圖譜