

食品中抗氧化劑之檢驗方法－多重分析方法修正 草案對照表

修正名稱	現行名稱	說明
食品中抗氧化劑之檢驗方法－多重分析方法(MOHWA0021.01) Method of Test for Antioxidants in Foods- Multiple Analysis (MOHWA0021.01)	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	增加檢驗方法編碼。
修正規定	現行規定	說明
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 $\times$ <u>15 cm</u>，或同級品。 2.1.1.3. 高速組織研磨振盪均質機(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°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。	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 $\times$ <u>150 mm</u>，或同級品。 2.1.1.3. 高速組織研磨振盪均質機(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°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. 萃取用粉劑^(註2)：含檸檬酸鈉1	一、「試藥」增列「維生素C」。 二、「器具及材料」增列「陶瓷均質石」，並增列註。 三、增列「試劑之調製」、「維生素C溶液」及「含維生素C之乙腈溶液」，並刪除「乙腈溶液」。 四、修正「標準溶液之配製」及「檢液之調製」。 五、「高效液相層析測定條件」增列「層析管溫度」及「注入量」，並修正移動相溶液之梯度條件。 六、增修訂部分文字。

2.3.4. <u>陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer)</u> ^(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：<u>陶瓷均質石可視檢體狀況自行評估使用。</u> 註2：<u>可依需求自行評估使用市售萃取用組合套組。</u> 2.4. <u>試劑之調製：</u> 2.4.1. <u>含1%維生素C之50%乙腈溶液：</u>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. <u>2%維生素C溶液</u>：稱取維生素C 1 g，加去離子水溶解使成50 mL。 2.5. <u>移動相溶液之調製：</u> 2.5.1. <u>移動相溶液A：</u>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. <u>移動相溶液B：乙腈。</u> 2.6. <u>標準溶液之配製：</u>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<u>含1%維生素C之50%乙腈溶液</u>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. <u>檢液之調製：</u>取檢體0.5 g，精確稱定，置於離心管中，加入<u>陶瓷均質石1顆、去離子水8 mL及乙腈10 mL</u>，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，再以高速組織研磨振盪均質機於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<u>2%維生素C溶液</u>使成1 mL (b)，混合均勻，以濾膜過濾後，供作檢液^(註)。	g、檸檬酸氫二鈉0.5 g、無水硫酸鎂4 g及氯化鈉1 g。 註：<u>可依需求自行評估使用市售萃取用組合套組。</u> 2.4. <u>50%乙腈溶液之調製：</u>取乙腈50 mL，加去離子水使成100 mL。 2.5. <u>移動相溶液之調製：</u> 2.5.1. <u>移動相溶液A：</u>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. <u>移動相溶液B：乙腈。</u> 2.6. <u>標準溶液之配製：</u>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 1～20 µg/mL，供作標準溶液。 2.7. <u>檢液之調製：</u>取檢體0.5 g，精確稱定，置於離心管中，加入去離子水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，再以高速組織研磨振盪均質機於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，<u>振盪萃取10分鐘</u>，以5000 ×g離心5分鐘。取上清液0.5 mL (a)，加入<u>去離子水</u>使成1 mL (b)，混合均勻，以濾膜過濾後，供作檢液^(註)。 註：<u>檢液調製後，應儘快進行儀器分析。</u> 2.8. <u>鑑別試驗及含量測定：</u>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)： 檢體中各抗氧化劑之含量(g/kg)＝
--	--

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. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

3. 以液相層析串聯質譜儀(LC/MS/MS)進行確認時，其

$$\frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

$$M \times 1000$$

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：

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 × 150 mm。

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→15.5	85→55	15→45
15.5→22	55→55	45→45
22→23	55→35	45→65
23→34	35→35	65→65
34→34.1	35→85	65→15
34.1→40	85→85	15→15

移動相流速：0.7 mL/min。

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。

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. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

3. 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

4. 以氣相層析質譜儀(GC/MS)進行確認時，其GC/MS之選擇性離子偵測

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

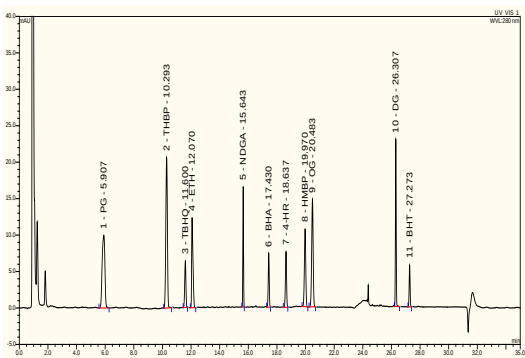
4. 以氣相層析質譜儀(GC/MS)進行確認時，其GC/MS之選擇性離子偵測(selective ion monitoring, SIM)模式之偵測離子如表二，且其相對離子強度(定性離子與定量離子之波峰面積比)應符合下列容許範圍：

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

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

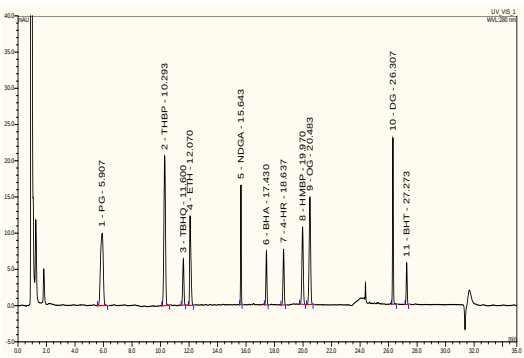
(selective ion monitoring, SIM)模式之偵測離子如表二，且其相對離子強度(定性離子與定量離子之波峰面積比)應符合下列容許範圍：

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

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

中文名	英文名	離子化模式	離子對 (m/z) ^a	碰撞能量 (eV)	碰撞電壓 (V)
沒食子酸丙酯	propyl gallate (PG)	ESI ⁺	211→169 ^b 211→124	-55	-21
三叔基苯丁酮	2,4,6-trihydroxybutyrophenone (THBP)	ESI ⁺	195→125 ^b 195→166	-50	-28
第三丁基醌	tert-butyl hydroquinone (TBHQ)	ESI ⁺	165→149 ^b 165→108	-53	-30
乙氧基吡嗪	ethoxycinn (ETH)	ESI ⁺	218→174 ^b 218→160	44	40
二氫愈創木酸	ordihydroguaric acid (NDGA)	ESI ⁺	301→122 ^b 301→273	-60	-37
丁基羥基苯基	butyl hydroxy anisole (BHA)	ESI ⁺	179→164 ^b 179→149	-33	-20
乙基羥基二羧	4-hexyl resorcinol (4-HR)	ESI ⁺	193→149 ^b 193→122	-48	-20
叔基二羧基	4-tert-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	ESI ⁺	235→217 ^b 235→160	-50	-36
沒食子酸半酯	octyl gallate (OG)	ESI ⁺	281→124 ^b 281→169	-80	-42
二丁基羥基苯基	dibutyl hydroxy toluene (BHT)	ESI ⁺	219→203 ^b 219→163	-60	-38
沒食子酸十二酯	dodecyl gallate (DG)	ESI ⁺	337→124 ^b 337→169	-110	-52

*定量離子對

註：上述參數不適時，依所使用之儀

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

中文名	分析物	離子化模式	離子化 前驅離子(m/z) 產物離子(m/z)	碰撞能量 (V)	碰撞能量 (eV)
	英文名				
沒食子酸丙酯	propyl gallate (PG)	ESI	211 > 169*, 211 > 124	-55, -55	-21, -34
三羧基苯丁酮	2,4,5-trihydroxybutyophenone (THBP)	ESI	195 > 125*, 195 > 166	-50, -50	-28, -28
第三丁基醌	tert-butyl hydroquinone (TBHQ)	ESI	165 > 149*, 165 > 168	-53, -53	-30, -31
乙氧基喹	ethoxyquin (ETH)	ESI*	218 > 174*, 218 > 160	44, 44	40, 48
異二氮癰利酸	nordihydroguaiaric acid (NDGA)	ESI	301 > 122*, 301 > 273	-60, -60	-37, -25
丁基羥基苯基	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
癸基二丁基苯酚	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	ESI	235 > 217*, 235 > 160	-50, -50	-30, -36
沒食子酸乙酯	ethyl gallate (EG)	ESI	281 > 124*, 281 > 169	-80, -80	-42, -29
沒食子酸十二醇	dodecyl gallate (DG)	ESI	337 > 124*, 337 > 169	-110, -110	-52, -36
二丁基羥基苯基	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

中文名	分析物	離子化 模式	定量離子 (m/z)	定性離子 (m/z)
	英文名			
沒食子酸丙酯	propyl gallate (PG)	EL	170	153, 212
三羧基苯丁酮	2,4,5-trihydroxy butyophenone (THBP)	EL	153	181, 196
第三丁基醌	tert-butylhydroquinone (TBHQ)	EL	123	151, 166
乙氧基喹	ethoxyquin (ETH)	EL	202	174, 217
丁基羥基苯基	butyl hydroxyl anisole (BHA)	EL	137	165, 180
己基間苯二酚	4-hexylresorcinol (4-HR)	EL	123	125, 136
癸基二丁基苯酚	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	EL	221	161, 236
二丁基羥基苯基	dibutyl hydroxyl toluene (BHT)	EL	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。

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

中文名	分析物	離子化 模式	定量離子 (m/z)	定性離子 (m/z)
	英文名			
沒食子酸丙酯	propyl gallate (PG)	EL	170	153, 212
三羧基苯丁酮	2,4,5-trihydroxy butyophenone (THBP)	EL	153	181, 196
第三丁基醌	tert-butylhydroquinone (TBHQ)	EL	123	151, 166
乙氧基喹	ethoxyquin (ETH)	EL	202	174, 217
丁基羥基苯基	butyl hydroxyl anisole (BHA)	EL	137	165, 180
己基間苯二酚	4-hexylresorcinol (4-HR)	EL	123	125, 136
癸基二丁基苯酚	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	EL	221	161, 236
二丁基羥基苯基	dibutyl hydroxyl toluene (BHT)	EL	205	145, 220

註：上述參數不適時，依所使用之儀器，設定適合之參數。