

食品中抗氧化劑之檢驗方法－多重分析方法(MOHWA0021.01)修正總說明

為加強食品添加物之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中抗氧化劑之檢驗方法－多重分析方法(MOHWA0021.00)」修正案，其修正要點如下：

- 一、增列檢驗方法編碼。
- 二、「試藥」增列「維生素 C」。
- 三、「器具及材料」增列「陶瓷均質石」，並增列註。
- 四、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」。
- 五、修正「標準溶液之配製」及「檢液之調製」。
- 六、「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。
- 七、增修訂部分文字。

食品中抗氧化劑之檢驗方法－多重分析方法 (MOHWA0021.01)修正對照表

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 MΩ·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 MΩ·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. <u>萃取用粉劑</u> ^(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<u>水及乙腈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，<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)： 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： 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 × <u>15 cm</u>。 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 <table><tr><th>時間(min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr><tr><td>0→7</td><td>85→85</td><td>15→15</td></tr><tr><td>7→15</td><td>85→55</td><td>15→45</td></tr><tr><td>15→22</td><td>55→55</td><td>45→45</td></tr><tr><td>22→23</td><td>55→<u>25</u></td><td>45→<u>75</u></td></tr><tr><td>23→30</td><td><u>25</u>→<u>25</u></td><td><u>75</u>→<u>75</u></td></tr><tr><td><u>30</u>→<u>30.1</u></td><td><u>25</u>→85</td><td><u>75</u>→15</td></tr><tr><td><u>30.1</u>→<u>35</u></td><td>85→85</td><td>15→15</td></tr></table> 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	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→ <u>25</u>	45→ <u>75</u>	23→30	<u>25</u> → <u>25</u>	<u>75</u> → <u>75</u>	<u>30</u> → <u>30.1</u>	<u>25</u> →85	<u>75</u> →15	<u>30.1</u> → <u>35</u>	85→85	15→15	$\frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$ 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： 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 × <u>150 mm</u>。 移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析 <table><tr><th>時間(min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr><tr><td>0→7</td><td>85→85</td><td>15→15</td></tr><tr><td>7→<u>15.5</u></td><td>85→55</td><td>15→45</td></tr><tr><td><u>15.5</u>→22</td><td>55→55</td><td>45→45</td></tr><tr><td>22→23</td><td>55→<u>35</u></td><td>45→<u>65</u></td></tr><tr><td>23→<u>34</u></td><td><u>35</u>→<u>35</u></td><td><u>65</u>→<u>65</u></td></tr><tr><td><u>34</u>→<u>34.1</u></td><td><u>35</u>→85</td><td><u>65</u>→15</td></tr><tr><td><u>34.1</u>→<u>40</u></td><td>85→85</td><td>15→15</td></tr></table> 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： <table><tr><th>相對離子強度(%)</th><th>容許範圍(%)</th></tr><tr><td>> 50</td><td>± 20</td></tr><tr><td>> 20~50</td><td>± 25</td></tr><tr><td>> 10~20</td><td>± 30</td></tr><tr><td>≤ 10</td><td>± 50</td></tr></table> 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	時間(min)	A (%)	B (%)	0→7	85→85	15→15	7→ <u>15.5</u>	85→55	15→45	<u>15.5</u> →22	55→55	45→45	22→23	55→ <u>35</u>	45→ <u>65</u>	23→ <u>34</u>	<u>35</u> → <u>35</u>	<u>65</u> → <u>65</u>	<u>34</u> → <u>34.1</u>	<u>35</u> →85	<u>65</u> →15	<u>34.1</u> → <u>40</u>	85→85	15→15	相對離子強度(%)	容許範圍(%)	> 50	± 20	> 20~50	± 25	> 10~20	± 30	≤ 10	± 50
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→ <u>25</u>	45→ <u>75</u>																																																									
23→30	<u>25</u> → <u>25</u>	<u>75</u> → <u>75</u>																																																									
<u>30</u> → <u>30.1</u>	<u>25</u> →85	<u>75</u> →15																																																									
<u>30.1</u> → <u>35</u>	85→85	15→15																																																									
時間(min)	A (%)	B (%)																																																									
0→7	85→85	15→15																																																									
7→ <u>15.5</u>	85→55	15→45																																																									
<u>15.5</u> →22	55→55	45→45																																																									
22→23	55→ <u>35</u>	45→ <u>65</u>																																																									
23→ <u>34</u>	<u>35</u> → <u>35</u>	<u>65</u> → <u>65</u>																																																									
<u>34</u> → <u>34.1</u>	<u>35</u> →85	<u>65</u> →15																																																									
<u>34.1</u> → <u>40</u>	85→85	15→15																																																									
相對離子強度(%)	容許範圍(%)																																																										
> 50	± 20																																																										
> 20~50	± 25																																																										
> 10~20	± 30																																																										
≤ 10	± 50																																																										

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

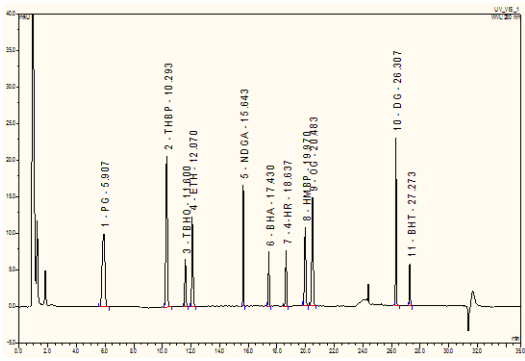
4. 以氣相層析質譜儀(GC/MS)進行確認時，其GC/MS之選擇性離子偵測(selective ion monitoring, SIM)模式之偵測離子如表二，且其相對離子強度(定性離子與定量離子之波峰面積比)應符合下列容許範圍：

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

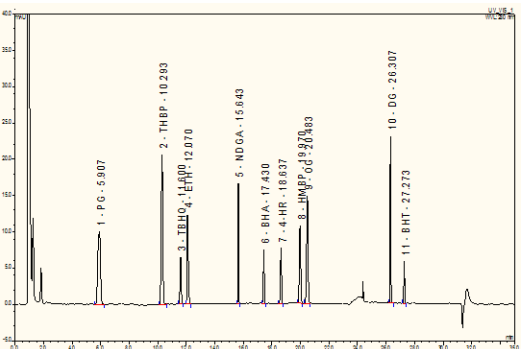
(selective ion monitoring, SIM)模式之偵測離子如表二，且其相對離子強度(定性離子與定量離子之波峰面積比)應符合下列容許範圍：

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	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)	去氬電壓(V)	碰撞能量(eV)
沒食子酸丙酯	propyl gallate (PG)	ESI	211>169*	211>124	-55	-21
三叔基丁酚	2,4,6-trihydroxybutyrophenone (THBP)	ESI	195>124*	195>166	-50	-28
第三丁基羥醌	tert-butyl hydroquinone (TBHQ)	ESI	165>149*	165>108	-53	-30
乙氧基喹	ethoxyquin (ETH)	ESI	218>174*	218>160	44	40
正二氮烯刺楸	nordihydroguaiaric acid (NDGA)	ESI	301>122*	301>273	-60	-37
丁基羥基苯酚	butyl hydroxy anisole (BHA)	ESI	179>164*	179>149	-33	-20
己基間苯二酚	4-hexyl resorcinol (4-HR)	ESI	193>149*	193>122	-48	-20
叔辛基二丁基羥基	4-tert-butyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	ESI	235>217*	235>160	-50	-30
沒食子酸半酯	octyl gallate (OG)	ESI	281>124*	281>169	-80	-42
二丁基羥基苯酚	dibutyl hydroxy toluene (BHT)	ESI	219>203*	219>163	-60	-18
沒食子酸十二酯	dodecyl gallate (DG)	ESI	337>124*	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	離子對 前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	表蒸電壓 (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
三羟基苯丁酮	2,4,5-trihydroxybutyrophene (THBP)	ESI-	195 > 125*, 195 > 166	-50, -50	-28, -28
第三丁基醌	tert-butyl hydroquinone (TBHQ)	ESI-	165 > 149*, 165 > 108	-53, -53	-30, -31
乙氧基喹	ethoxyquin (ETH)	ESI-	218 > 174*, 218 > 160	44, 44	40, 48
正二巯基刺楸	nordihydroguaiaretic acid (NDGA)	ESI-	301 > 122*, 301 > 273	-60, -60	-37, -25
丁基羟基苯基	butyl hydroxy anisole (BHA)	ESI-	179 > 164*, 179 > 149	-33, -33	-20, -35
己基间苯二酚	4-hexyl resorcinol (4-HR)	ESI-	193 > 149*, 193 > 122	-48, -48	-20, -27
羟甲基二丁基苯酚	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	ESI-	235 > 217*, 235 > 160	-50, -50	-30, -36
没食子酸乙酯	octyl gallate (OG)	ESI-	281 > 124*, 281 > 169	-80, -80	-42, -29
没食子酸十二酯	dodecyl gallate (DG)	ESI-	337 > 124*, 337 > 169	-110, -110	-52, -36
二丁基羟基甲苯	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

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
三羟基苯丁酮	2,4,5-trihydroxy butyrophene (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
丁基羟基苯基	butyl hydroxyl anisole (BHA)	EL	137	165, 180
己基间苯二酚	4-hexylresorcinol (4-HR)	EL	123	125, 136
羟甲基二丁基苯酚	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	EL	221	161, 236
二丁基羟基甲苯	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
三羟基苯丁酮	2,4,5-trihydroxy butyrophene (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
丁基羟基苯基	butyl hydroxyl anisole (BHA)	EL	137	165, 180
己基间苯二酚	4-hexylresorcinol (4-HR)	EL	123	125, 136
羟甲基二丁基苯酚	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	EL	221	161, 236
二丁基羟基甲苯	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。