

食用油中 Cu-pyropheophytin A 之檢驗方法  
Method of Test for Cu-pyropheophytin A in Edible Oils

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食用油中銅葉綠素主要成分 Cu-pyropheophytin a 之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)分析，再以液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS) 或液相層析高解析度串聯質譜儀 (liquid chromatograph/high resolution tandem mass spectrometer, LC/HRMS<sup>2</sup>) 確認之方法。
  - 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：GL Sciences InertSustain C18，2 μm，內徑 2.1 mm × 10 cm，或同級品。
    - 2.1.2. 液相層析串聯質譜儀：
      - 2.1.2.1. 離子源：大氣壓化學游離負離子(atmospheric pressure chemical ionization negative, APCI)。
      - 2.1.2.2. 層析管：HALO C18，2.7 μm，內徑 4.6 mm × 7.5 cm，或同級品。
    - 2.1.3. 液相層析高解析度串聯質譜儀：
      - 2.1.3.1. 離子源：大氣壓化學游離負離子(atmospheric pressure chemical ionization negative, APCI)。
      - 2.1.3.2. 層析管：HALO C18，2.7 μm，內徑 4.6 mm × 10 cm，或同級品。
    - 2.1.4. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
    - 2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
  - 2.2. 試藥：石油醚、乙醚、丙酮、甲醇及無水乙醇均採用液相層析級；醋酸銨採用試藥特級；去離子水(比電阻於 25℃ 可達 18 MΩ·cm 以上)；Cu-pyropheophytin a 對照用標準品。
  - 2.3. 器具及材料：
    - 2.3.1. 離心管：15 mL，PP 材質。

2.3.2. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。

2.3.3. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge): Sep-Pak<sup>®</sup> silica, 1 g, 6 mL, 或同級品。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 1 M醋酸銨溶液：

稱取醋酸銨77 g，以去離子水溶解使成1000 mL。

2.4.2. 石油醚：乙醚(9: 1, v/v)溶液：

取石油醚與乙醚以9：1 (v/v)之比例混勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. HPLC

2.5.1.1. 移動相溶液A：

取甲醇與1M醋酸銨溶液以8：2 (v/v)之比例混勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.1.2. 移動相溶液B：丙酮。

2.5.1.3. 移動相溶液C：甲醇。

2.5.1.4. 移動相溶液D：去離子水。

2.5.2. LC/MS/MS

2.5.2.1. 移動相溶液A：甲醇。

2.5.2.2. 移動相溶液B：無水乙醇。

2.5.3. LC/HRMS<sup>2</sup>

2.5.3.1. 移動相溶液A：丙酮。

2.5.3.2. 移動相溶液B：甲醇。

2.6. 標準溶液之配製：

取 Cu-pyropheophytin a 對照用標準品約 10 mg，精確稱定，以丙酮溶解並定容至 10 mL，作為標準原液，冷藏儲存。臨用時取適量標準原液，以丙酮稀釋至 0.05~0.5 μg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

取檢體約 1 g，精確稱定，置於離心管中，以塑膠滴管吸取油脂，注入固相萃取匣中，以石油醚 3 mL 潤洗離心管，將洗液注入固相萃取匣中，重複此潤洗步驟 2 次，棄流出液，以石油醚：乙醚(9: 1, v/v)溶液 9 mL 沖洗，棄流出液，以丙酮 6 mL 沖提，收集沖提液，於 25°C 下以氮氣濃縮至乾，殘留物以丙酮 1 mL 溶解，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各20 μL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行液相層析，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 Cu-pyropheophytin a之含量(ppm)：

$$\text{檢體中 Cu-pyropheophytin a 之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中 Cu-pyropheophytin a 之濃度(μg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

高效液相層析測定條件：

光二極體陣列檢出器：430 nm。

層析管：GL Sciences InertSustain C18，2 μm，內徑2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：30°C。

移動相溶液：A液、B液、C液與D液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
0.0 → 3.0	30 → 30	0 → 0	0 → 0	70 → 70
3.0 → 7.0	30 → 100	0 → 0	0 → 0	70 → 0
7.0 → 9.0	100 → 100	0 → 0	0 → 0	0 → 0
9.0 → 11.0	100 → 50	0 → 25	0 → 25	0 → 0
11.0 → 13.0	50 → 50	25 → 25	25 → 25	0 → 0
13.0 → 15.0	50 → 0	25 → 50	25 → 50	0 → 0
15.0 → 25.0	0 → 0	50 → 50	50 → 50	0 → 0
25.0 → 26.0	0 → 0	50 → 70	50 → 30	0 → 0
26.0 → 35.0	0 → 0	70 → 90	30 → 10	0 → 0
35.0 → 35.1	0 → 30	90 → 0	10 → 0	0 → 70
35.1 → 40.0	30 → 30	0 → 0	0 → 0	70 → 70

移動相流速：0.25 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。

## 2.9. 確認試驗

## 2.9.1. LC/MS/MS

精確量取檢液及標準溶液各 40  $\mu\text{L}$ ，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及相對離子強度鑑別之。

液相層析串聯質譜測定條件：

層析管：HALO C18，2.7  $\mu\text{m}$ ，內徑4.6 mm  $\times$  7.5 cm。

層析管溫度：30 $^{\circ}\text{C}$ 。

移動相溶液：A液(甲醇)與B液(無水乙醇)以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 $\rightarrow$ 1.0	100 $\rightarrow$ 70	0 $\rightarrow$ 30
1.0 $\rightarrow$ 6.0	70 $\rightarrow$ 40	30 $\rightarrow$ 60
6.0 $\rightarrow$ 14.0	40 $\rightarrow$ 0	60 $\rightarrow$ 100
14.0 $\rightarrow$ 15.5	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
15.5 $\rightarrow$ 16.0	0 $\rightarrow$ 100	100 $\rightarrow$ 0
16.0 $\rightarrow$ 20.0	100 $\rightarrow$ 100	0 $\rightarrow$ 0

移動相流速：0.8 mL/min。

離子源：大氣壓化學游離負離子(atmospheric pressure chemical ionization negative, APCI)。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：-4.5 kV。

氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。

碰撞氣體(Collision gas, CAD)：high。

霧化氣體(Gas 1)：55 psi。

加熱氣體(Gas 2)：0 psi。

加熱溫度(Temperature)：400 $^{\circ}\text{C}$ 。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。

偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)與碰撞能量(collision energy)如下表。

分析物	離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子( $m/z$ ) > 產物離子( $m/z$ )		
Cu-pyropheophytin a	873.5 > 522	-68	-50
	873.5 > 535	-68	-57

873.5 > 550	-68	-50
873.5 > 594	-68	-38

### 2.9.2. LC/HRMS<sup>2</sup>

精確量取檢液及標準溶液各 40 μL，分別注入液相層析高解析度串聯質譜儀中，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、精確質量(< 5 ppm)及相對離子強度鑑別之。

液相層析高解析度串聯質譜測定條件：

層析管：HALO C18，2.7 μm，內徑4.6 mm × 10 cm。

層析管溫度：30°C。

移動相溶液：A液(丙酮)與B液(甲醇)以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 10.0	5 → 80	95 → 20
10.0 → 11.0	80 → 100	20 → 0
11.0 → 14.0	100 → 100	0 → 0
14.0 → 14.1	100 → 5	0 → 95

移動相流速：1 mL/min。

離子源：大氣壓化學游離負離子(atmospheric pressure chemical ionization negative, APCI)。

碰撞能量：20 eV。

偵測模式：產物離子掃描(product ion scan)。

解析度：70000。

分析物	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)
Cu-pyropheophytin a	873.4749	522.1486
		550.1799
		594.1697

註：1. 相對離子強度由2對產物離子之波峰面積比而得(≤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. 上述條件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：檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。