

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 $\times$ 150 mm，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 $^{\circ}\text{C}$ 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：100 mL 及 1000 mL。

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)：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：可依需求自行評估使用市售萃取用組合套組。

2.4. 50%乙腈溶液之調製：

取乙腈 50 mL，加去離子水使成 100 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 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. 檢液之調製：

取檢體 0.5 g，精確稱定，置於離心管中，加入去離子水 8 mL 水及乙腈 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，振盪萃取 10 分鐘，以 5000 ×g 離心 5 分鐘。取上清液 0.5 mL (a)，加入去離子水使成 1 mL (b)，混合均勻，以濾膜過濾後，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 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：

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。

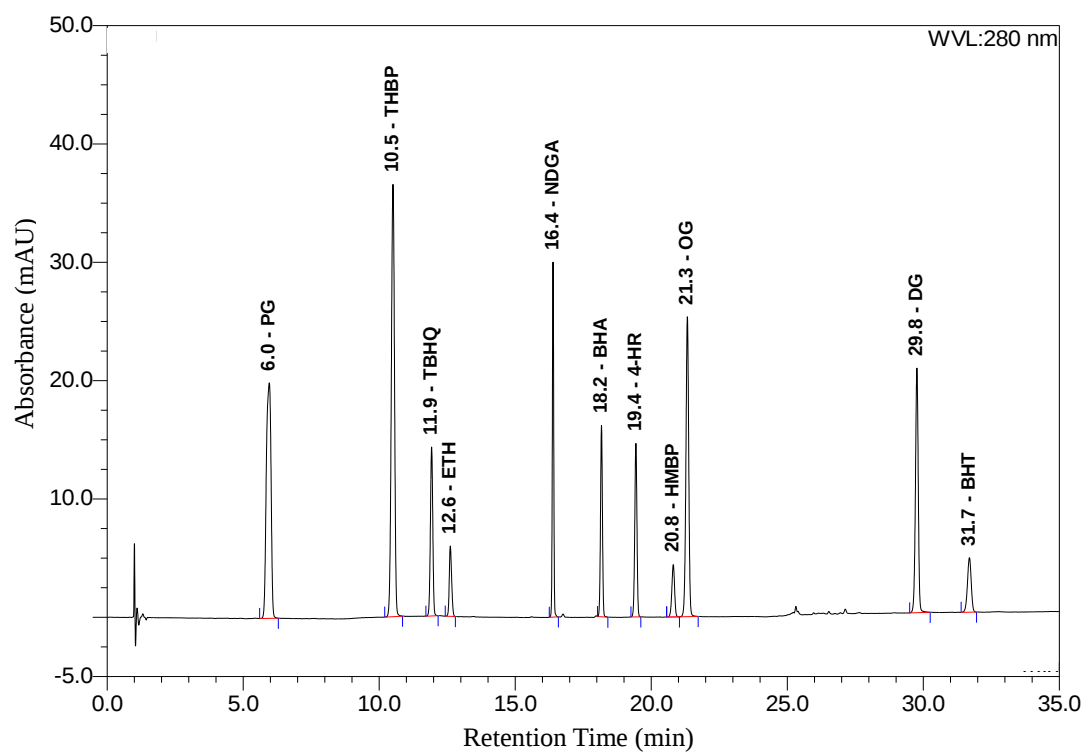
註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

- 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。
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。

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(m/z)> 產物離子(m/z)		
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	tert-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
正二氫癸創酸	nordihydroguaiaretic 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-tert-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
二丁基羥基甲苯	dibutyl hydroxy toluene (BHT)	ESI ⁻	219>203* 219>163	-60 -60	-35 -20
沒食子酸十二酯	dodecyl gallate (DG)	ESI ⁻	337>124* 337>169	-110 -110	-52 -36

*定量離子對

註：上述參數不適時，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 (<i>m/z</i>)	定性離子 (<i>m/z</i>)
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	<i>tert</i> -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- <i>tert</i> -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，依所使用之儀器，設定適合之參數。