

食品中抗氧化劑之檢驗方法—多重分析方法修正 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」，其修正要點如下：

- 一、「高速組織研磨振盪均質機」修正為「高速分散裝置」。
- 二、修正附註四「選擇性離子偵測模式」之中英文，並增列附註「若有干擾需以LC/MS/MS或GC/MS進行定量時，應先進行方法確效」。
- 三、增修訂部分文字。

食品中抗氧化劑之檢驗方法—多重分析方法修正 對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm，內徑3 mm \times 15 cm，或同級品。</p> <p>2.1.1.3. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：<u>SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder®</u>，1000 rpm以上，或同級品。</p> <p>2.1.1.4. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times\text{g}$以上。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 容量瓶：10 mL，褐色。</p> <p>2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF材質。</p> <p>2.3.4. 陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer) ^(註1)：採用 Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。</p> <p>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。</p>	<p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm，內徑3 mm \times 15 cm，或同級品。</p> <p>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。</p> <p>2.1.1.4. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times\text{g}$以上。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 容量瓶：10 mL，褐色。</p> <p>2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF材質。</p> <p>2.3.4. 陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer) ^(註1)：採用 Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。</p> <p>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。</p>	<p>一、「高速組織研磨振盪均質機」修正為「高速分散裝置」。</p> <p>二、修正附註四「選擇性離子偵測模式」之中英文，並增列附註「若有干擾需以LC/MS/MS或GC/MS進行定量時，應先進行方法確效」。</p> <p>三、增修訂部分文字。</p>

<p>註1：陶瓷均質石可視檢體狀況自行評估使用。</p> <p>註2：可依需求自行評估使用市售萃取用組合套組。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 含1%維生素C之50%乙腈溶液：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。</p> <p>2.4.2. 2%維生素C溶液 稱取維生素C 1 g，加去離子水溶解使成50 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>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。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。</p> <p>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°C避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以含1%維生素C之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 1~80 µg/mL，供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製： 取檢體0.5 g，精確稱定，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆、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<u>分散裝</u>置於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2%維生素C溶液使成1 mL (b)，混合均勻，以濾膜過濾後，供作檢液^(註)。</p> <p>註：檢液調製後，應儘快進行儀器分析。</p> <p>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</p>	<p>註1：陶瓷均質石可視檢體狀況自行評估使用。</p> <p>註2：可依需求自行評估使用市售萃取用組合套組。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 含1%維生素C之50%乙腈溶液：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。</p> <p>2.4.2. 2%維生素C溶液 稱取維生素C 1 g，加去離子水溶解使成50 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>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。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。</p> <p>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°C避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以含1%維生素C之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 1~80 µg/mL，供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製： 取檢體0.5 g，精確稱定，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆、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<u>組織研磨振盪均質機</u>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2%維生素C溶液使成1 mL (b)，混合均勻，以濾膜過濾後，供作檢液^(註)。</p> <p>註：檢液調製後，應儘快進行儀器分析。</p> <p>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</p>	
--	---	--

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. 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

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

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

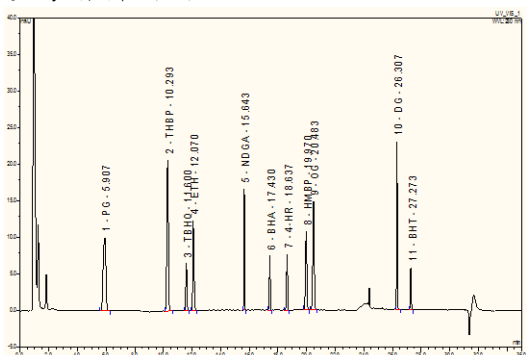
4. 若有干擾需以LC/MS/MS或GC/MS進行定量時，應先進行方法確效。

5. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

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

> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

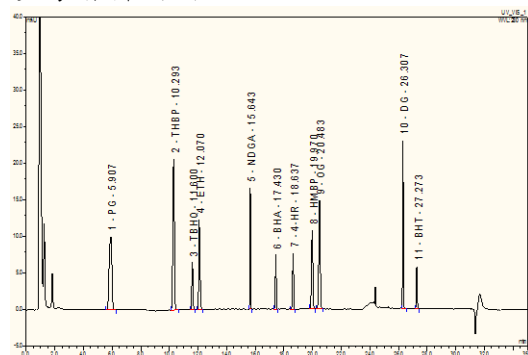
4. 以氣相層析質譜儀(GC/MS)進行確認時，其GC/MS之選擇性離子偵測(selective ion monitoring, SIM)模式之偵測離子如表二，且其相對離子強度(定性離子與定量離子之波峰面積比)應符合下列容許範圍：

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

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		去簇電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
	英文名	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*	-55	-21	
三羥基苯丁醇	2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP)		ESI	195 > 125*	-50	-28	
第三丁基羧醌	tert-butyl hydroquinone (TBHQ)		ESI	165 > 149*	-53	-30	
乙氧基喹啉	ethoxyquin (ETH)		ESI	218 > 174*	44	40	
三二氮烯刺酸	nor-dihydroguaiaretic acid (NDGA)		ESI	301 > 122*	-60	-37	
丁基羥基甲氧基	butyl hydroxy anisole (BHA)		ESI	179 > 149*	-33	-35	
己基羥基二酚	4-hexyl resorcinol (4-HR)		ESI	193 > 149*	-48	-20	
羥甲基二丁基羥基	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)		ESI	235 > 217*	-50	-30	
沒食子酸十二醇	dodecyl gallate (DG)		ESI	337 > 124*	-110	-52	
二丁基羥基甲氧基	dibutyl hydroxy toluene (BHT)		ESI	219 > 203*	-60	-35	

*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	英文名			
沒食子酸丙酯	propyl gallate (PG)		EL	170	153, 212
三羥基苯丁醇	2,4,5-trihydroxy butyrophenone (THBP)		EL	153	181, 196
第三丁基羧醌	tert-butylhydroquinone (TBHQ)		EL	123	151, 166
乙氧基喹啉	ethoxyquin (ETH)		EL	202	174, 217
丁基羥基甲氧基	butyl hydroxyl anisole (BHA)		EL	137	165, 180
己基羥基二酚	4-hexylresorcinol (4-HR)		EL	123	125, 136
羥甲基二丁基羥基	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)		EL	221	161, 236
二丁基羥基甲氧基	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。

模式參數

中文名	分析物		離子化 模式	離子對		去簇電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
	英文名	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*	-55	-21	
三羥基苯丁醇	2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP)		ESI	195 > 125*	-50	-28	
第三丁基羧醌	tert-butyl hydroquinone (TBHQ)		ESI	165 > 149*	-53	-30	
乙氧基喹啉	ethoxyquin (ETH)		ESI	218 > 174*	44	40	
三二氮烯刺酸	nor-dihydroguaiaretic acid (NDGA)		ESI	301 > 122*	-60	-37	
丁基羥基甲氧基	butyl hydroxy anisole (BHA)		ESI	179 > 149*	-33	-35	
己基羥基二酚	4-hexyl resorcinol (4-HR)		ESI	193 > 149*	-48	-20	
羥甲基二丁基羥基	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)		ESI	235 > 217*	-50	-30	
沒食子酸十二醇	dodecyl gallate (DG)		ESI	337 > 124*	-110	-52	
二丁基羥基甲氧基	dibutyl hydroxy toluene (BHT)		ESI	219 > 203*	-60	-35	

*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	英文名			
沒食子酸丙酯	propyl gallate (PG)		EL	170	153, 212
三羥基苯丁醇	2,4,5-trihydroxy butyrophenone (THBP)		EL	153	181, 196
第三丁基羧醌	tert-butylhydroquinone (TBHQ)		EL	123	151, 166
乙氧基喹啉	ethoxyquin (ETH)		EL	202	174, 217
丁基羥基甲氧基	butyl hydroxyl anisole (BHA)		EL	137	165, 180
己基羥基二酚	4-hexylresorcinol (4-HR)		EL	123	125, 136
羥甲基二丁基羥基	4-hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)		EL	221	161, 236
二丁基羥基甲氧基	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。