

食用油脂中維生素E之檢驗方法(二)

Method of Test for Vitamin E in Edible Oils (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食用油脂中維生素E，包括醇類維生素E (α -tocopherol、 β -tocopherol、 γ -tocopherol、 δ -tocopherol、 α -tocotrienol、 β -tocotrienol、 γ -tocotrienol及 δ -tocotrienol)及乙酸 α -生育醇酯(α -tocopheryl acetate)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)搭配螢光檢出器(fluorescence detector, FLD)分析醇類維生素E，及串聯質譜儀(tandem mass spectrometer, MS/MS)分析乙酸 α -生育醇酯之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 高效液相層析儀搭配螢光檢出器及串聯質譜儀(HPLC-FLD-MS/MS)：
 - 2.1.1.1. 螢光檢出器：激發波長298 nm；放射波長345 nm。
 - 2.1.1.2. 串聯質譜儀：
 - 2.1.1.2.1 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.3. 層析管：InfinityLab Poroshell 120 PFP，1.9 μ m，內徑3 mm \times 10 cm，或同級品。
 - 2.1.1.4. 保護管柱：InfinityLab Poroshell 120 PFP，1.9 μ m，內徑3 mm \times 5 mm，或同級品。
 - 2.1.2. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 固相萃取真空裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.2. 試藥：甲酸及二丁基羥基甲苯(dibutyl hydroxyl toluene, BHT)均採用試藥級；甲醇、二氯甲烷及正己烷均為液相層析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 M Ω ·cm以上)；dl- α -tocopherol、dl- β -tocopherol、dl- γ -tocopherol、dl- δ -tocopherol、d- α -tocotrienol、d- β -tocotrienol、d- γ -tocotrienol、d- δ -tocotrienol及dl- α -tocopheryl acetate對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：5 mL。
 - 2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Strata® SI-1 Silica (55

μm , 70 Å), 1 g, 6 mL, 或同級品。

2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm , PVDF材質。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 含12.5 mg/L BHT之正己烷溶液：

取BHT 12.5 mg, 以正己烷溶解使成1000 mL。

2.4.2. 含12.5 mg/L BHT之3%二氯甲烷正己烷溶液：

取二氯甲烷15 mL, 加入含12.5 mg/L BHT之正己烷溶液使成500 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸1 mL, 加入去離子水使成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：

取甲酸1 mL, 加入甲醇使成1000 mL, 以濾膜過濾, 取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

2.6.1. 醇類維生素E標準溶液：

取dl- α -tocopherol、dl- β -tocopherol、dl- γ -tocopherol、dl- δ -tocopherol、d- α -tocotrienol、d- β -tocotrienol、d- γ -tocotrienol及d- δ -tocotrienol對照用標準品各約50 mg, 精確稱定, 分別以正己烷溶解並定容至5 mL, 作為標準原液, 冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液溶液混合, 經氮氣吹乾, 以甲醇溶解並稀釋至0.04~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 供作標準溶液。

2.6.2. 乙酸 α -生育醇酯標準溶液

取dl- α -tocopheryl acetate對照用標準品約50 mg, 精確稱定, 以正己烷溶解並定容至5 mL, 作為標準原液, 冷凍避光貯存。臨用時取適量標準原液, 經氮氣吹乾, 以甲醇溶解並稀釋至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

取檢體約0.1 g, 精確稱定, 以含12.5 mg/L BHT之正己烷溶液5 mL溶解, 注入預先以正己烷6 mL潤洗之固相萃取匣, 棄流出液, 以含12.5 mg/L BHT之3%二氯甲烷正己烷溶液6 mL流洗, 棄流出液, 以二氯甲烷9 mL沖提, 收集沖提液, 經氮氣吹乾, 以甲醇溶解並定容至5 mL, 經濾膜過濾後, 再以甲醇稀釋5倍, 供作檢液。

2.8. 醇類維生素E標準曲線之製作：

精確量取醇類維生素E標準溶液各5 μL ，注入HPLC-FLD-MS/MS中，依下列條件進行高效液相層析，就各醇類維生素E之波峰面積比，與對應之各醇類維生素E之濃度，製作標準曲線。

高效液相層析測定條件^(註)：

螢光檢出器：激發波長298 nm；放射波長345 nm。

層析管：InfinityLab Poroshell 120 PFP，1.9 μm ，內徑3 mm \times 10 cm。

保護管柱：InfinityLab Poroshell 120 PFP，1.9 μm ，內徑3 mm \times 5 mm。

層析管溫度：40°C。

樣品槽溫度：10°C。

注入量：5 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 (%)
0.0 \rightarrow 15.5	19 \rightarrow 19	81 \rightarrow 81
15.5 \rightarrow 16.5	19 \rightarrow 15	81 \rightarrow 85
16.5 \rightarrow 21.0	15 \rightarrow 10	85 \rightarrow 90
21.0 \rightarrow 22.0	10 \rightarrow 5	90 \rightarrow 95
22.0 \rightarrow 25.0	5 \rightarrow 5	95 \rightarrow 95
25.0 \rightarrow 25.1	5 \rightarrow 0	95 \rightarrow 100
25.1 \rightarrow 29.0	0 \rightarrow 0	100 \rightarrow 100
29.0 \rightarrow 29.1	0 \rightarrow 19	100 \rightarrow 81
29.1 \rightarrow 30.0	19 \rightarrow 19	81 \rightarrow 81

移動相流速：0.27 mL/min。

2.9. 乙酸 α -生育醇酯基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7節調製之固相萃取匣沖提液，以氮氣吹乾後，以甲醇溶解並定容至5 mL，經濾膜過濾後，分別取0.2 mL，添加乙酸 α -生育醇酯標準溶液40~500 μL 及適量甲醇，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，注入HPLC-FLD-MS/MS中，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就乙酸 α -生育醇酯之波峰面積，與對應之乙酸 α -生育醇酯濃度，分別製作0.04~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管、保護管柱、層析管溫度、樣品槽溫度、注入量、移動相溶液及移動相流速：同2.8節。

離子化模式：正離子電灑離子化(ESI⁺)。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.0 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

加熱溫度(Temperature)：400°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow)：50 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：900 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
乙酸 α -生育醇酯	473 > 207*	32	28
	473 > 165	32	20

*定量離子對

- 註：1. 上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。
2. 高效液相層析儀與液相層析串聯質譜儀連接須注意背景壓力之變化以避免螢光檢出器損壞。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液、醇類維生素E標準溶液及乙酸 α -生育醇酯基質匹配檢量線溶液各5 μ L，分別注入HPLC-FLD-MS/MS中，依2.8.及2.9.節條件進行分析。就檢液與醇類維生素E標準溶液或乙酸 α -生育醇酯基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各醇類維生素E或乙酸 α -生育醇酯含量：

檢體中各醇類維生素E或乙酸 α -生育醇酯之含量(mg/100 g)

$$= \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：由標準曲線求得檢液中各醇類維生素E之濃度或由基質匹配檢量線求得檢液中乙酸 α -生育醇酯之濃度(μ g/mL)

V：檢體最後定容之體積(5 mL)

W：取樣分析檢體之重量(g)

D：稀釋倍數(5)

註：相對離子強度由定性離子與定量離子之波峰面積相除而得($\leq 100\%$)，

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

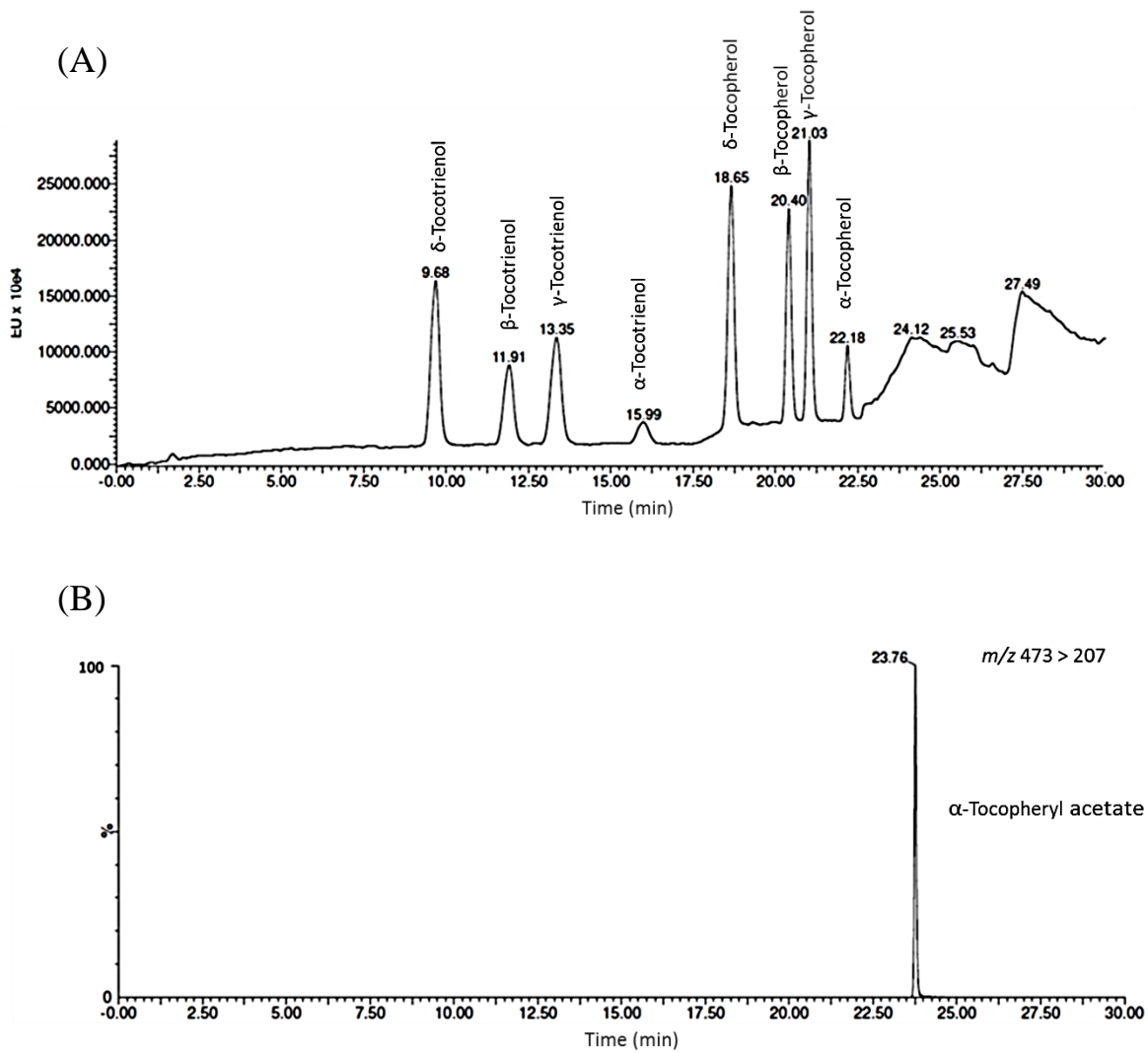
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，各醇類維生素E及乙酸 α -生育醇酯均為 1 mg/100 g。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Wong, Y. F., Makahleh, A., Saad, B., Ibrahim, M. N. M., Rahim, A. A. and Brosse N. 2014. UPLC method for the determination of vitamin E homologues and derivatives in vegetable oils, margarines and supplement capsules using pentafluorophenyl column. *Talanta* 130: 299-306.
2. Grigoriadou, D., Androulaki, A., Psomiadou, E. and Tsimidou, M. Z. 2007. Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil. *Food Chem.* 105: 675-680.
3. 覃丞弘、吳白玟、侯嘉華、林汝青、高雅敏、曾素香、王德原。2019。食用油脂中多種型態維生素E檢驗方法之建立。食品藥物研究年報，10: 22-34。

參考層析圖譜



圖、以HPLC-FLD-MS/MS分析各醇類維生素E標準品之HPLC圖譜(A)及乙酸α-生育醇酯標準品之MRM圖譜(B)