

咖啡中16-*O*-甲基咖啡醇之檢驗方法(二)
Method of Test for 16-*O*-Methylcafestol in Coffee (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於咖啡豆中16-*O*-甲基咖啡醇(16-*O*-methylcafestol, 16-OMC)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經皂化及萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μm ，內徑2.1 mm \times 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 加熱器(Heater)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達3000 \times g以上者。
 - 2.2. 試藥：乙醇、乙醚及乙腈均採用液相層析級；氫氧化鉀及甲酸採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；16-*O*-甲基咖啡醇對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：10 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 2.5 M氫氧化鉀之乙醇溶液：
取氫氧化鉀14 g，以乙醇溶解使成100 mL。
 - 2.4.2. 20%乙腈溶液：
取乙腈20 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：
取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾，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，加乙腈使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。
 - 2.6. 標準溶液之配製：

取16-*O*-甲基咖啡醇對照用標準品約1 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷藏貯存。臨用時取適量標準原液，以20%乙腈溶液稀釋至0.1~5 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體均質混勻後，取約0.2 g，精確稱定，置於離心管中，加入2.5 M氫氧化鉀之乙醇溶液2 mL，蓋上並拴緊離心管蓋，於80°C加熱皂化1小時，取出冷卻，加入去離子水2 mL，混合均勻。再加入乙醚2 mL，旋渦混合30秒，以3000 ×g離心3分鐘，收集乙醚層至另一離心管中，殘留物重複上述步驟2次，合併乙醚層。加入去離子水2 mL，旋渦混合30秒，以3000 ×g離心3分鐘，取乙醚層並以乙醚定容至10 mL。取1 mL於40°C加熱至乾，殘留物以20%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，經濾膜過濾後，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2 µL，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多重反應偵測相對離子強度^(註1)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中16-*O*-甲基咖啡醇之含量(mg/g)：

$$\text{檢體中16-}O\text{-甲基咖啡醇之含量(mg/g)} = \frac{C \times V \times 10}{M \times 10^3}$$

C：由標準曲線求得檢液中16-*O*-甲基咖啡醇之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

10：稀釋倍數

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註2)：

層析管：ACQUITY UPLC HSS T3 Column，1.8 µm，內徑2.1 mm × 15 cm。

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 → 1.0	80 → 80	20 → 20
1.0 → 4.0	80 → 40	20 → 60
4.0 → 4.5	40 → 40	60 → 60
4.5 → 9.5	40 → 10	60 → 90
9.5 → 12.5	10 → 10	90 → 90
12.5 → 12.6	10 → 80	90 → 20

12.6 → 18.0 80 → 80 20 → 20

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：2 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：150 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：950 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子、去集簇電壓(declustering potential)及碰撞能量(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)		
16- <i>O</i> -甲基咖啡醇	331 > 281*	40	15
	331 > 263	40	20

*定量離子對

註：1. 相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得(≤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。

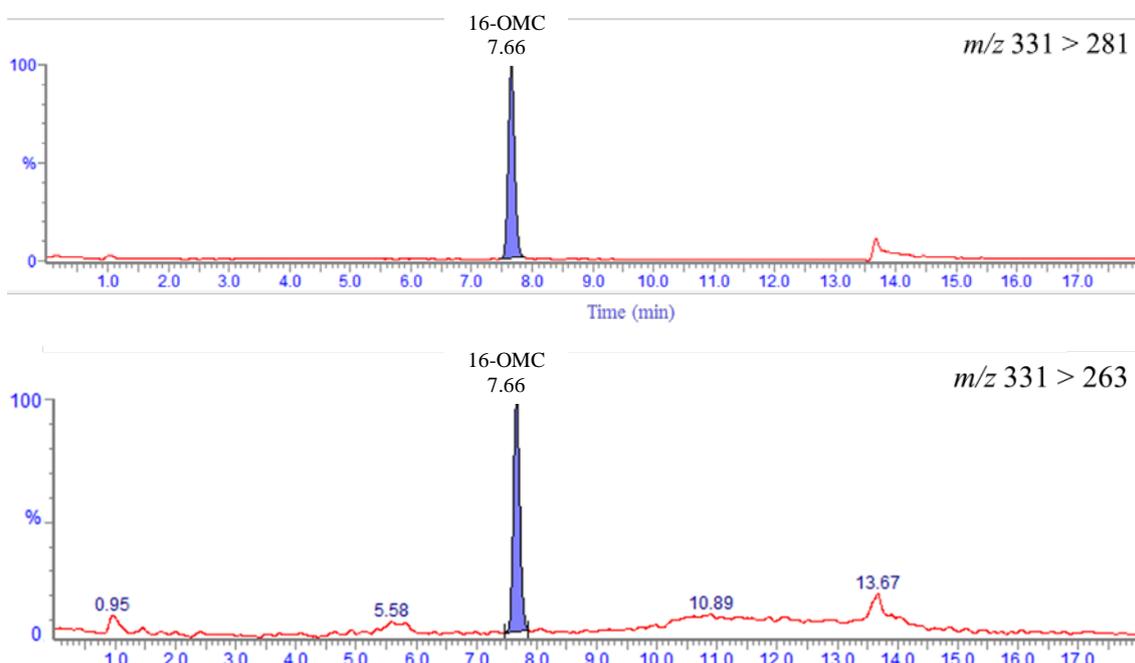
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.05 mg/g。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

Gunning, Y., Defernez, M., Watson, A. D., Beadman, N., Colquhoun, I. J., Le Gall, G., Philo, M., Garwood, H., Williamson, D., Davis, A. P. and Kemsley, E. K. 2018. 16-*O*-methylcafestol is present in ground roast Arabica coffees: Implications for authenticity testing. Food Chem. 248: 52-60.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析16-*O*-甲基咖啡醇標準品之MRM圖譜