

膠囊與錠狀食品中羥基酪醇之檢驗方法建立

林辰 吳白玟 林汝青 高雅敏 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

羥基酪醇(hydroxytyrosol)為存在於油橄欖的枝葉及果實中之多酚類化合物，具有強抗氧化活性，近年來歐美已認可羥基酪醇作為食品原料使用。衛生福利部108年3月公告之「食用原料油橄欖果實渣萃取物(含羥基酪醇)之使用限制及其標示」，對羥基酪醇訂有每日食用限量(20 mg以下)。本研究配合行政管理之施行，以高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器建立膠囊與錠狀食品中羥基酪醇之檢驗方法。檢體以0.05 M醋酸鈉溶液(pH 5)均勻分散，以超音波振盪萃取20分鐘，經離心過濾後，以ZORBAX Eclipse Plus C18管柱(5 μ m, 4.6 mm \times 25 cm)，配合光二極體陣列檢出器於波長280 nm進行檢測。以不含橄欖萃取物之市售錠狀產品基質添加羥基酪醇0.05及2.5 mg/g，同日間平均回收率分別為104.7及102.6%，變異係數為1.6及1.2%，異日間平均回收率分別為104.6及103.4%，變異係數為1.7及1.2%，顯示方法之準確度及精密度均符合確效規範。以本方法進行7件膠囊錠狀食品之羥基酪醇含量調查，有1件未檢出，其餘6件含量為0.07-2.88 mg/g，依產品包裝標示計算羥基酪醇之每日食用量為0.1-2.9 mg，均未超出每日食用限量。本方法已研提為建議檢驗方法供各界參考使用，以利後市場保健食品品質監測及維護消費者之健康與權益。

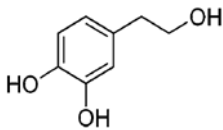
關鍵詞：羥基酪醇、膠囊錠狀食品、油橄欖果渣萃取物、高效液相層析儀

前言

羥基酪醇(hydroxytyrosol)為一自然存在於橄欖樹(*Olea europaea* L.)、橄欖果實、橄欖油及橄欖油渣(alperujo, olive pomace)中的酚類化合物⁽¹⁾，結構及詳細資料如表一。由於具有鄰苯二酚結構，可提供電子並隨後與自由基形成穩定的分子內氫鍵苯氧基⁽²⁾，使其有良好自由基清除能力，有研究指出，羥基酪醇之抗氧化能力高，具有作為功能性食品或營養保健品之潛力^(3、4)。衛生福利部於108年3月公告「食用原料油橄欖果實渣萃取物(含羥基酪醇)之使用限制及其標示」，對羥基酪醇訂有每日食用限

量(20 mg以下)⁽⁵⁾。故本研究配合行政管理所需，進行膠囊與錠狀食品中羥基酪醇之檢驗研究，建立檢驗方法供外界參考並保障消費者之

表一、羥基酪醇之相關資料及結構

英文名	Hydroxytyrosol
中文名	羥基酪醇
CAS NO.	10597-60-1
分子式	C ₈ H ₁₀ O ₃
分子量	154.17
化學結構	

健康與權益。

有關羥基酪醇之相關分析方法，大多使用逆相層析管柱分離、儀器選擇HPLC-UV、檢測波長為280 nm，檢測的基質包含化粧品、橄欖萃取物原料、橄欖果渣萃取物等，尚未搜尋到可檢測營養補充品或膠囊錠狀食品中羥基酪醇之相關檢驗方法，在前處理的部分，一般使用移動相、不同比例之甲醇溶液或乙醇溶液搭配超音波振盪或水浴加熱之方式進行萃取；因考量市售膠囊錠狀產品多為粉狀型態，故參考2015年Miralles等人研究，以水相移動相1%醋酸溶液(pH 5)作為萃取溶劑並搭配超音波振盪進行萃取作為前處理步驟，而層析條件的部分，因2013年Alzweiri等人研究指出，以逆相層析系統並使用梯度沖提條件分析羥基酪醇，可得到較佳的分離效果⁽⁶⁾，故於層析條件的部分則參考2017年Čepo等人⁽⁷⁾之研究並進行修飾，作為後續方法開發之基礎。

材料與方法

一、材料與試藥

(一)檢體來源

膠囊產品4件及粉狀產品3件均於108年5-6月購自網路商城，並儲放於室溫備用。確效試驗之空白樣品(不含橄欖萃取物之錠狀產品)1件，購自藥粧店。

(二)試藥、標準品及溶劑

乙腈(acetonitrile, ACN)及甲醇(methanol, MeOH)採用HPLC級，購自德國Merck公司(Darmstadt, Germany)。冰醋酸及無水醋酸鈉均採用試藥級，購自美國Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)。羥基酪醇(Hydroxytyrosol)對照用標準品，購自美國ChromaDex公司(Los Angeles, CA, USA)，純度達80%以上。

(三)器材及材料

離心管(15 mL, PP材質)、容量瓶(5 mL

及10 mL)、濾膜(孔徑0.45 μm, PVDF材質)、針筒(1 mL, PP材質, 無針)、血清瓶(500 mL, 無色)。

二、儀器與設備

- (一)高效液相層析儀(Diones Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, USA)
- (二)光二極體陣列檢出器(3000RS, Thermo Fisher Scientific, USA)
- (三)液相層析管柱(ZORBAX Eclipse Plus C18, Agilent, USA)
- (四)離心機(Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, USA)
- (五)超音波振盪器(Delta Sonicator DC300H, 力明儀器有限公司, 台灣)
- (六)漩渦混合器(Vortex genie-2, Scientific Industries, USA)
- (七)去離子水製造機(Millipore milli-Q, Millipore, USA)

三、0.05 M醋酸鈉溶液(pH 5)之調製

取無水醋酸鈉2.1 g，加入去離子水約450 mL溶解，以冰醋酸調整pH值至5，再加去離子水使成500 mL，經濾膜過濾。

四、移動相之配製

- (一)移動相A：0.05 M醋酸鈉溶液。
- (二)移動相B：乙腈。

五、標準溶液之配製

取羥基酪醇對照用標準品約10 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，避光冷凍儲存。臨用時取適量標準原液，以0.05 M醋酸鈉溶液稀釋至1-100 mg/mL，供作標準溶液。

六、檢液之調製

將檢體研磨混勻後，取約0.2 g，精確稱

定，加入0.05 M醋酸鈉溶液8 mL，旋渦混合，超音波振盪20分鐘，再以0.05 M醋酸鈉溶液定容至10 mL，於5000 × g離心10分鐘，取上清液經濾膜過濾後，供作檢液。

七、高效液相層析儀分析條件

- (一)光二極體陣列檢出器：定量波長280 nm
- (二)液相層析管：ZORBAX Eclipse Plus C18, 5 μm，內徑4.6 mm × 15 cm
- (三)層析管溫度：40°C
- (四)注入量：10 μL
- (五)移動相溶液梯度分析：如表二
- (六)流速：1.0 mL/min

表二、移動相A液與B液之梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 8.0	90 → 80	10 → 20
8.0 → 8.1	80 → 0	20 → 100
8.1 → 11.0	0 → 0	100 → 100
11.0 → 11.1	0 → 90	100 → 10
11.1 → 15.0	90 → 90	10 → 10

八、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，依上述條件進行分析。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羥基酪醇之含量(mg/g)：

$$\text{檢體中羥基酪醇之含量(mg/g)} = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由標準曲線求得檢液中羥基酪醇之濃度(μg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

九、標準溶液穩定性之探討

羥基酪醇標準品配製於甲醇中得標準原液，再以去離子水及0.05 M醋酸鈉溶液(pH 5)

分別稀釋至20 μg/mL，於不同時間點(0、45、90、135分鐘)以HPLC進行分析，並記錄其波峰面積及變異係數，探討不同羥基酪醇於不同溶液中穩定性情形。

十、專一性試驗及標準曲線配製

專一性部分係以含類似樣品基質之空白樣品進行試驗；標準曲線部分，至少包含5種不同濃度，線性回歸方程式之相關係數不應低於0.99。

十一、準確度及精密度試驗

於同日及不同日進行添加回收試驗，將適當濃度之羥基酪醇標準溶液添加至空白樣品中，添加之高濃度為2.5 mg/g，低濃度為0.05 mg/g，各濃度皆進行5重複試驗，依前述流程製成檢液，並計算其平均回收率及變異係數，以評估是否符合食品藥物管理署食品化學檢驗方法確效規範⁽⁸⁾之要求。

十二、定量極限評估

將適當濃度之羥基酪醇標準溶液添加至空白樣品中，依檢液之調製流程操作製成檢液，並計算其回收率、重複性及波峰之訊號/雜訊比，以回收率、重複性符合規範及訊噪比≥10之最低添加濃度為本方法之定量極限。

十三、市售產品含量調查

選購市售產品原料成分標示中含橄欖萃取物之膠囊與錠狀產品為主，以本研究所建立之方法進行含量調查。

結果與討論

一、標準溶液穩定性之探討

比較2015年Miralles等人與2017年Čepo等人研究發現，兩篇配製標準曲線之溶液分別為水相移動相1%醋酸溶液(pH 5)及去離子水。為

表三、羥基酪醇於不同稀釋溶液中之穩定性結果

稀釋溶液	時間(min)	平均波峰面積(n=3)	CV (%)
去離子水	0	5.45	0.4
	45	4.76	4.1
	90	4.34	9.0
	135	4.04	10.6
0.05M醋酸鈉溶液 (pH5)	0	5.48	0.6
	45	5.46	0.4
	90	5.48	0.5
	135	5.46	0.5

選擇合適之標準曲線配製溶液，本研究先將羥基酪醇標準品配製於甲醇中得標準原液，再前去離子水及0.05 M醋酸鈉溶液(pH 5)分別稀釋至20 mg/mL，於不同時間點(0、45、90、135分鐘)以HPLC進行分析，並記錄其波峰面積及變異係數如表三，結果顯示以去離子水作為稀釋溶液之波峰面積隨著時間增長而降低，變異係數隨之增加，有研究指出羥基酪醇於水溶液中消失與氧氣消耗有關，並認為羥基酪醇可自動氧化成鄰醌或互變異構的對醌甲基化物，並在添加水後與第二個鄰醌偶聯形成二聚體⁽⁹⁾，而以0.05 M醋酸鈉溶液(pH 5)作為稀釋溶液之波峰面積經過135分鐘後仍相當穩定，變異係數均小於1%，故本實驗最後係以0.05 M醋酸鈉溶液(pH 5)作為稀釋溶液，進行標準曲線配製。

二、專一性及標準曲線

方法專一性部分，因市售產品基質複雜，多數產品除了含膠囊錠狀食品常用之賦型劑如硬脂酸鎂、二氧化矽及纖維素等原料外，亦含各式各樣之萃取物如橄欖萃取物、苦瓜萃取物、綠茶萃取物等多種原料，考量羥基酪醇大多存在於橄欖萃取物中，因此挑選不含橄欖萃取物且含多種原料成分之錠狀產品做為本研究之類似樣品基質之空白檢體進行後續確效試

表四、類似基質之空白檢體原料成分

產品名稱	原料成分
OOO加強版 (錠狀食品)	植物性葡萄糖胺、甲基硫基甲烷(MSM)、貓爪藤萃取物、薑黃萃取物、葡萄籽萃取物、維生素C、葡萄糖酸鈣、葡萄糖酸鋅、葡萄糖酸鎂、硬脂酸鎂、維生素D ₃

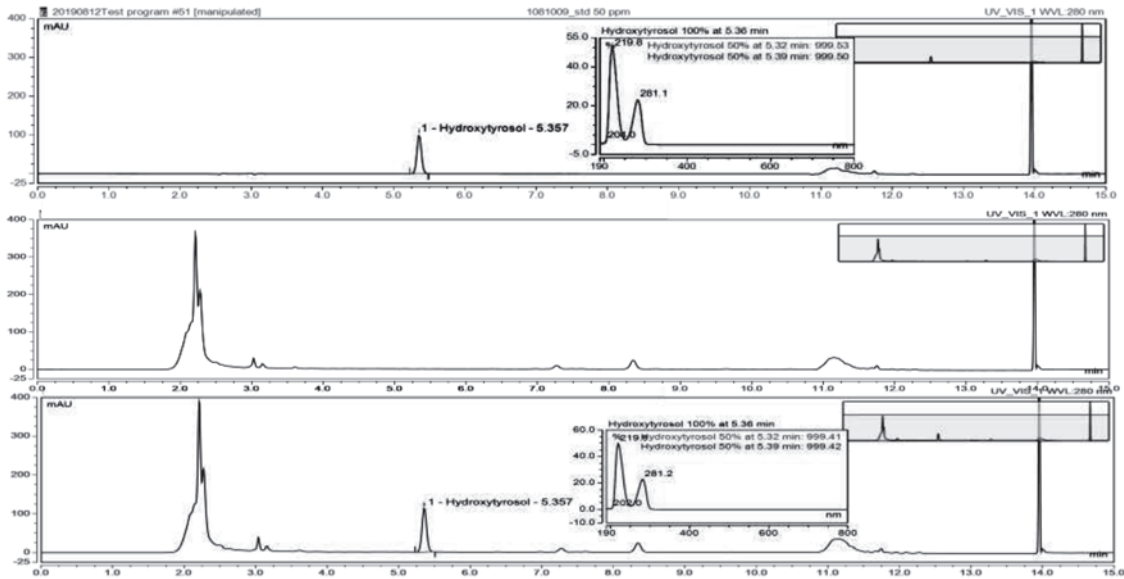
驗，其原料成分如表四。依檢驗方法步驟進行空白試驗，與標準品圖譜進行比對，可發現空白檢體之層析圖譜中並無明顯干擾波峰出現，續添加羥基酪醇標準溶液於空白檢體中，可發現於5.3分鐘處有一明顯波峰，經與標準品圖譜之滯留時間及光譜圖比對後確認為羥基酪醇，表示該方法專一性良好(圖一)；標準曲線部分，羥基酪醇之線性範圍約為1-100 µg/mL，R²均可達0.995以上，顯示線性良好(圖二)。

三、準確度及精密度試驗

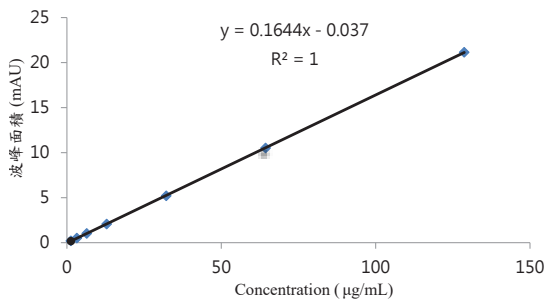
於同日及不同日間添加羥基酪醇之標準溶液於空白檢體中，各進行五重複，依前述實驗步驟分析並計算回收率及變異係數以評估方法之準確度及精密度。結果如表五，同日羥基酪醇之低濃度(0.05 mg/g)平均回收率及變異係數為104.7%及1.6%，高濃度(2.5 mg/g)平均回收率為102.6%及1.2%；異日間羥基酪醇之低濃度(0.05 mg/g)平均回收率及變異係數為104.6%及1.7%，高濃度(2.5 mg/g)平均回收率及變異係數為103.4%及1.2%，顯示方法之準確度及精密度均符合食品藥物管理署食品化學檢驗方

表五、羥基酪醇添加於空白檢體中之準確度及精密度結果

分析物	添加濃度(mg/g)	同日間(n=5)		異日間(n=10)	
		平均回收率(%)	變異係數(%)	平均回收率(%)	變異係數(%)
羥基酪醇	0.05	104.7	1.6	104.6	1.7
	2.5	102.6	1.2	103.4	1.2



圖一、羥基酪醇標準品(A)、空白檢體(B)及空白檢體添加羥基酪醇標準溶液(C)之層析圖譜及其光譜圖



圖二、羥基酪醇之標準曲線

法確效規範之要求。

四、定量極限之評估

添加羥基酪醇0.05 mg/g於空白檢體中，依前述實驗步驟進行分析並計算回收率與變異係數，以評估方法之定量極限。結果如表六，不管是同日間或異日間羥基酪醇之平均回收率及變異係數皆符合確效規範之要求，另，表五結果顯示，待測物波峰之訊噪比 ≥ 10 ，變異係數為4.9%，故訂定本方法之定量極限為0.05 mg/g。

表六、定量極限檢測結果

基質	添加濃度 (mg/g)	訊噪比 (n=5)	變異係數 (%)
膠囊錠狀食品	0.05	32.5	4.9

五、市售產品含量調查

本研究市售產品之選擇，主要係以原料成分標示中含橄欖萃取物之膠囊或錠狀產品為主，並以本研究建立之方法進行含量調查。結果如表七，7件檢體之羥基酪醇含量，有1件未檢出，其餘6件含量為0.07-2.88 mg/g，依產品包裝標示計算羥基酪醇之每日食用量為0.1-2.9 mg，均未超出每日食用限量20 mg。

結 論

本研究建立之檢驗方法符合食藥署「食品化學檢驗方法之確效規範」，適用於膠囊與錠狀食品中羥基酪醇之檢驗，可作為監測保健食品品質之參考。依據本研究檢驗成果所

表七、市售產品中羥基酪醇之含量檢測結果

檢體編號	有效日期 (批號)	包裝	食用方式	檢測結果		
				平均內容物重	含量(mg/g)	每日食用量 ^a (mg)
S-1	2019.11.08 (-)	30粒/盒 0.5 g/粒	每日2次，每次1粒	499 mg/粒	2.88	2.9
S-2	2022.02 (169)	60粒/盒 -	1日勿超過2粒	374 mg/粒	0.34	0.3
S-3	2020.04 (86141)	90粒/瓶 0.4 g/粒	1日3粒	356 mg/粒	0.07	0.1
S-4	2021.01 (-)	60粒/瓶 -	每日3次 每次1粒	331 mg/粒	0.69	0.7
S-5	2023.02.21 (20190125006)	60粒/瓶 632 mg/粒	1日勿超過4粒	516 mg/粒	0.09	0.2
S-6	2020.09.10 (8554554)	20包/盒 2.5 g/包	每日1-2包	2.51 g/包	N.D.	N.D.
S-7	2020.03.04 (18G00502)	80 g/瓶	每日0.6 g	-	0.09	0.1

^a 食品原料油橄欖果實渣萃取物(含羥基酪醇)之使用限制及標示，本品之每日使用量以羥基酪醇計為二十毫克

研擬「膠囊錠狀食品中羥基酪醇之檢驗方法(TFDAA0077.00)」⁽¹⁰⁾，經檢驗方法審查小組審查通過，已於108年12月27日公開於食藥署建議檢驗方法專區供各界參考引用。

參考文獻

- Miralles, P., Chisvert, A. and Salvador, A. 2015. Determination of hydroxytyrosol and tyrosol by liquid chromatography for the quality control on cosmetic products based on olive extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102: 157-161.
- Zagmutt, S., Guzmán, L., Orrego, R., Wehinger, S. and *et al.* 2016. Phenolic compound identification and antioxidant capacity of alperujo extracts from region del maule, chile. *Int. J. Food Prop.* 19: 2016-2025.
- Martínez, L., Ros, G. and Nieto, G. 2018. Hydroxytyrosol: health benefits and use as functional ingredient in meat. *Medicines.* 5: 1-12.
- Achmon, Y. and Fishman, A. 2015. The antioxidant hydroxytyrosol: biotechnological production challenges and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 1119-1130.
- 衛生福利部。2019。食品原料油橄欖果實渣萃取物(含羥基酪醇)之使用限制及其標示。108.03.27衛授食字第1081300278號公告。[<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?cid=3&id=25022>]。
- Alzweiri, M. and Al-Hiari, Y. M. 2013. Analysis and evaluation of hydroxytyrosol in olive leaf extract. *Jordan J. Pharm. Sci.* 6: 314-322.
- Čepo, D. V., Albahari, P., Končić, M. Z., Radićnd, K. and *et al.* 2017. Solvent extraction and chromatographic determination of polyphenols in olive pomace. *Food in Health and Disease: Scientific-professional Journal of Nutrition and Dietetics.* 6: 7-14.

8. 食品藥物管理署。2013。食品化學檢驗方法之確效規範(第二次修正)。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=4115>]。
9. Zafra-Gómez, A., Luzón-Toro, B., Capel-Cuevas, S. and Morales, J. C. 2011. Stability of hydroxytyrosol in aqueous solutions at different concentration, temperature and with different ionic content: a study using UPLC-MS. *Food Nutr. Sci.* 2: 1114-1120.
10. 食品藥物管理署。2019。膠囊錠狀食品中羥基酪醇之檢驗方法。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=1574&key=%e7%be%a5%e5%9f%ba>]。

Method of Test for Hydroxytyrosol for Foods in Capsule and Tablet Form

CHEN LIN, PAI-WEN WU, NU-CHING LIN, YA-MIN KAO,
SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Hydroxytyrosol is a phenolic compound presenting in the leaves and fruits of olive trees (*Olea europaea* L.) and it has strong antioxidant activity. In recent years, Europe and the United States have recognized the use of hydroxytyrosol as a food ingredient. Furthermore, hydroxytyrosol extracted from olive pomace has a daily consumption limit (below 20 mg) in the available food list of the Food and Drug Administration. In this study, we coordinate the implementation of administrative management to establish the analytical method for hydroxytyrosol in capsule and tablet functional foods by high performance liquid chromatography. The sample was uniformly dispersed with 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5) by ultrasonication for 20 min. After centrifuged and filtrated, the filtrate was separated by a ZORBAX Eclipse Plus C18 column (5 μ m, 4.6 \times 25 cm) and detected at the wavelength of 280 nm. The average recoveries of hydroxytyrosol at 0.05 and 2.5 mg/g in intra-day were 104.7 and 102.6%, and the coefficients of variation were 1.6 and 1.2%, respectively. The average recoveries of hydroxytyrosol at 0.05 and 2.5 mg/g in inter-day were 104.6 and 103.4%, and the coefficients of variation were 1.7 and 1.2%, respectively. The results showed that the method had high precision and accuracy. The contents of hydroxytyrosol in the six of seven online shopping samples were 0.07-2.88 mg/g, except one not detectable. And none of them violet the regulation for hydroxytyrosol daily recommended consumption limit (not exceed 20 mg per day).

Key words: hydroxytyrosol, olive pomace extract, high performance liquid chromatography