

飲料中香豆素之檢驗方法  
Method of Test for Coumarin in Beverages

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於飲料中香豆素(coumarin)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經稀釋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 BEH C18, 1.7  $\mu\text{m}$ , 內徑2.1 mm  $\times$  10 cm, 或同級品。
    - 2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
  - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；甲酸採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 M $\Omega$ ·cm以上)；香豆素對照用標準品。
  - 2.3. 器具及材料：
    - 2.3.1. 容量瓶：10 mL。
    - 2.3.2. 濾膜：孔徑0.22  $\mu\text{m}$ , PVDF材質。
  - 2.4. 移動相溶液之調製：
    - 2.4.1. 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。
    - 2.4.2. 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。
  - 2.5. 標準溶液之配製：

取香豆素對照用標準品約10 mg, 精確稱定, 以甲醇溶解並定容至10 mL, 作為標準原液, 冷藏貯存。臨用時取適量標準原液, 以甲醇稀釋至5~500 ng/mL, 供作標準溶液。
  - 2.6. 檢液之調製：

將檢體混勻後, 取約1.0 g, 精確稱定, 以甲醇定容至10 mL, 經濾膜過濾後, 供作檢液。
  - 2.7. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各2  $\mu\text{L}$ , 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<sup>(註1)</sup>鑑別之，並依下列計算式求出檢體中香豆素之含量(mg/kg)：

$$\text{檢體中香豆素之含量(mg/kg)} = \frac{C \times V}{M \times 10^3}$$

C：由標準曲線求得檢液中香豆素之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

液相層析串聯質譜分析測定條件<sup>(註2)</sup>：

層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 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 → 3.0	60 → 60	40 → 40

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)：250°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：150 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：600 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)		
香豆素	147 > 103*	35	15
	147 > 77	35	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。

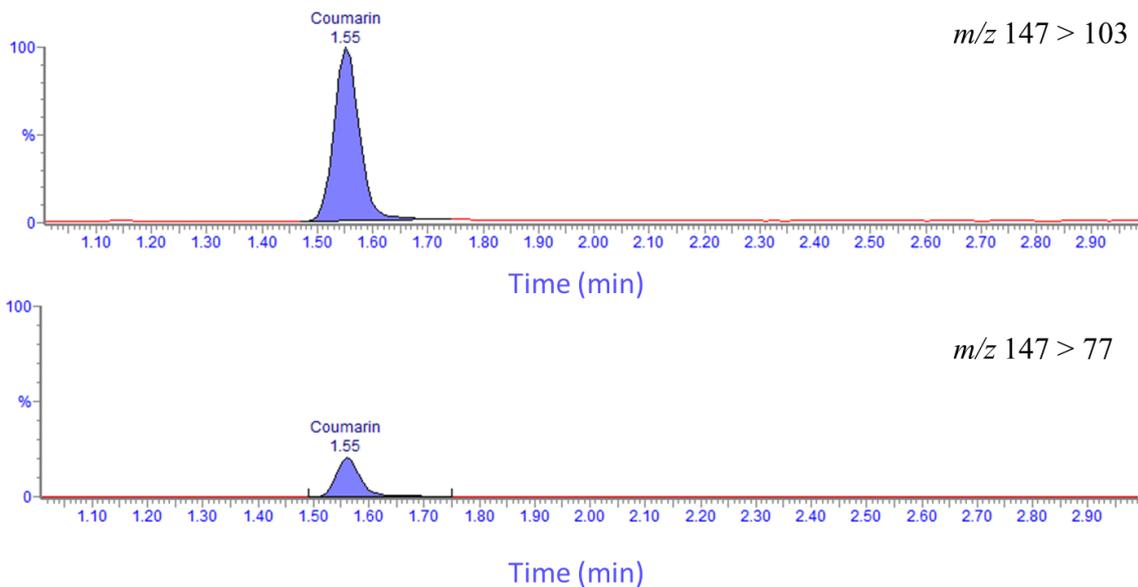
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.05 mg/kg。

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. Raters, M. and Matissek, R. 2008. Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Eur. Food Res. Technol.* 227: 637-642.
2. Sproll, C., Ruge, W., Andlauer, C., Godelmann, R. and Lachenmeier, D. W. 2008. HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. *Food Chem.* 109: 462-469.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析香豆素標準品之MRM圖譜