

膠囊及錠狀食品中反式白藜蘆醇之檢驗方法探討

馬詠舜 吳白玟 蔡麗瑤 高雅敏 林美智 曾素香

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

反式白藜蘆醇(*trans*-Resveratrol)主要存在於特定天然植物中，如葡萄以及藍莓等莓果類，亦可由微生物合成取得，可作為強抗氧化劑，具抗癌與抗發炎之潛在能力。衛生福利部公告之「以基因改造啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) EFSC4687菌株發酵生產之食品原料反式白藜蘆醇之使用限制及標示規定」中，每日食用限量以反式白藜蘆醇計為150 mg。本研究探討以高效液相層析儀搭配光電二極體陣列檢出器(HPLC-DAD)，建立膠囊及錠狀食品中反式白藜蘆醇之檢驗方法。檢體經50%甲醇溶液萃取後，以Waters Spherisorb ODS-2 C18 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm)管柱，搭配甲醇和去離子水(40：60, v/v)作為移動相，經光電二極體陣列偵測器於波長306 nm檢測。確效試驗結果顯示，於空白基質添加2.0及5.0 mg/g反式白藜蘆醇，同日內平均回收率分別為95.2及95.0%，變異係數為4.3及1.5%，異日間之平均回收率分別為100.7及97.7%，變異係數為6.1及3.2%，均符合衛生福利部食品藥物管理署食品化學檢驗方法之確效規範，顯示本研究開發之檢驗方法精密度與準確度均良好。本方法之定量極限為2.0 mg/g。以本研究建立之檢驗方法進行9件標示含白藜蘆醇市售產品之標示符合性評估，其反式白藜蘆醇之檢測含量為2.2-102.1 mg/g，換算為每日食用量後，介於0.9-82.3 mg之間。

關鍵詞：反式白藜蘆醇、高效液相層析儀、光電二極體陣列檢出器、每日食用限量

前言

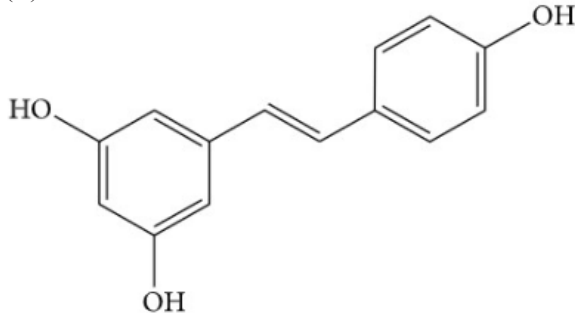
一、白藜蘆醇與反式白藜蘆醇之介紹與來源

白藜蘆醇(Resveratrol)屬於一種酚類化合物，是植物體為了因應真菌的感染而產生之植物抗毒素(Phytoalexin)，有抗真菌感染的作用，且會因各種壓力條件而誘發生成，例如氣候變化、暴露於臭氧和重金屬亦或是受到環境外力、紫外光過度照射，或是受到昆蟲及微生物入侵感染等。最早白藜蘆醇於1940年從白藜

蘆(*Veratrum grandiflorum* O. Loes)的根部被分離鑑定出來，隨後於1963年在中國傳統藥材-虎杖(*Polygonum cuspidatum*)之根莖部亦被分離鑑定出^(1,2)。

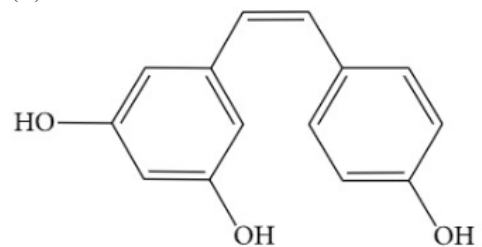
白藜蘆醇亦存在於一些特定的天然植物中，如葡萄、藍莓等莓果類或花生等，且較多以反式的型態存在。相關文獻曾記載，不同品種葡萄，平均含有反式白藜蘆醇288-7,146 μ g/g。此外，藍莓、草莓及花生中也分別存在反式白藜蘆醇0.76-1.6 μ g/g、0.2 μ g/g及0.034-0.075 μ g/g⁽³⁻⁶⁾。

(A)反式白藜蘆醇



圖一、白藜蘆醇之化學結構式

(B)順式白藜蘆醇

(Rigon *et al.*, 2019)

二、反式白藜蘆醇的化學結構與特性

白藜蘆醇是一種二苯乙烯類的酚類化合物，化學式為 $C_{14}H_{12}O_3$ ，結構中兩端帶有苯環，2個苯環共帶有3個-OH基^(7,8)。白藜蘆醇存在順式(*cis-form*)及反式(*trans-form*)兩種異構物型態(結構如圖一)，而有文獻指出，白藜蘆醇之反式型態較具有生物活性⁽⁹⁾，且在植物體中主要以反式白藜蘆醇居多，但在經過加工的植物萃取物中，順式白藜蘆醇則有增加的趨勢。反式白藜蘆醇容易受到光學誘導，在碰到陽光或紫外線時，會轉變成順式白藜蘆醇，Brizzi等人於2008年的研究指出，反式白藜蘆醇在波長365 nm照射60分鐘後會轉變成順式，而順式白藜蘆醇在波長285 nm有最大吸收波⁽¹⁰⁻¹⁴⁾。在Sun等人的研究中則發現葡萄皮中很少檢測到順式白藜蘆醇，但兩種異構體通常在紅酒中都會存在，其中順式白藜蘆醇可歸因於釀酒過程中反式白藜蘆醇的光化學異構化，導致兩種異構物均會在紅酒中被發現⁽¹⁵⁾。由於反式白藜蘆醇之穩定性及生物活性均較高，故以此型態之販售及研究均較為常見。

三、反式白藜蘆醇的生化特性與生理功效

反式白藜蘆醇是較具有生物活性的形態，在許多化學或臨床的研究中發現反式白藜蘆醇

具有抗氧化的效果，有預防冠心病、抗細胞突變、抗發炎或是抗癌症腫瘤等效用⁽¹⁶⁻¹⁸⁾。

四、反式白藜蘆醇的相關規範

歐盟委員會實施條例(Commission Implementing Regulation, EU 2021/51)公布，以作為膠囊或片劑形式的食品補充劑成分進行銷售之新興食品中反式白藜蘆醇(生物來源)，每日攝取量為150 mg⁽¹⁹⁾。衛生福利部於112年6月29日衛授食字第1121301256號公告，訂定「以基因改造啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) EFSC4687菌株發酵生產之食品原料反式白藜蘆醇之使用限制及標示規定」，限用於供成人使用之膳食補充品，每日食用限量為150毫克⁽²⁰⁾。

五、相關分析方法

有關食品中反式白藜蘆醇之相關分析方法，多數文獻使用乙腈或甲醇進行超音波振盪萃取，經逆相C18管柱搭配不同種類之溶劑為移動相進行等梯度沖提，以HPLC-PDA於波長303-306 nm進行檢測。本研究為因應行政管理所需，參考上述分析條件進行檢驗方法開發，建立食品中反式白藜蘆醇之檢驗方法供外界參考。

材料與方法

一、試驗樣品

- (一)市售產品：膠囊產品7件及錠狀產品2件，共9件樣品，均於113年3月購自網路商城，並儲放於室溫備用。
- (二)樣品空白基質：32%玉米澱粉、32%乳糖、32%澱粉、2%硬脂酸鎂與2%二氧化矽，依上述比例配製成空白基質。

二、試藥、溶劑及標準品

- (一)試藥及溶劑
甲醇(Methanol)採用HPLC級，購自德國Merck公司(Darmstadt, Germany)。乙腈(Acetonitrile)採用HPLC級，購自J.T.Baker Chemical公司(Phillipsburg, NJ, USA)。玉米澱粉(Corn starch)、乳糖(Lactose)、澱粉(Starch)、硬脂酸鎂(Magnesium stearate)及二氧化矽(Silicon dioxide)，均購自美國Sigma-Aldrich公司(Saint Louis, MO, USA)。去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)。
- (二)對照用標準品
反式白藜蘆醇(*trans*-Resveratrol，純度99.98%)對照用標準品，購自美國Sigma-Aldrich公司。順式白藜蘆醇(*cis*-Resveratrol，純度97%)對照用標準品，購自Toronto Research Chemicals公司(Ontario, Canada)。

三、器具與材料

- (一)容量瓶：10 mL及20 mL，褐色。
- (二)樣品瓶：10 mL及20 mL，褐色。
- (三)離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
- (四)針筒：1 mL，PP材質，無針。
- (五)針筒式濾頭(Syringe filter)：孔徑0.22 μm，PVDF材質。
- (六)層析管：Waters Spherisorb ODS-2 C18，5

μm，內徑4.6 × 250 mm，為美國Waters公司(Milford, MA, USA)產品。

四、儀器及設備

- (一)漩渦混合器：VORTEX GENIE-2，為美國Scientific Industries公司(Ocala, FL, USA)產品。
- (二)超音波振盪器：Transonic Digital S，為德國Elma Schmidbauer GmbH公司(Singen, BW, Germany)產品。
- (三)去離子水製造機：Millipore milli-Q，為美國Millipore公司(Bedford, MA, USA)產品。
- (四)離心機：Allegra 25R Centrifuge，為美商貝克曼庫爾特(Beckman Coulter)有限公司臺灣分公司(Taipei, Taiwan)產品。
- (五)電子天平(Analytical balance)：ES 225SMDR，為瑞士Precisa公司(Dietikon, Switzerland)產品。
- (六)高效液相層析儀(High-Performance Liquid Chromatograph, HPLC)：為美國Thermo fisher scientific公司(Waltham, MA, USA)產品。
 - 1. 液相層析儀：Thermo Fisher UltiMate 3000。
 - 2. 光電二極體陣列檢出器：Dionex UltiMate 3000 diode array detector。
 - 3. 數據分析系統：使用Chromeleon 7數據分析軟體之電腦系統。

五、移動相溶液之調製：

- (一)移動相溶液A：甲醇。
- (二)移動相溶液B：去離子水。

六、標準溶液之配製

取反式白藜蘆醇標準品約20 mg，精確稱定，以50%甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍儲存。臨用時取適量標準原液，

以50%甲醇稀釋至0.5-150 µg/mL，供作標準溶液。

七、空白檢液之調製

將空白樣品混勻後，取約0.05 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入50%甲醇溶液40 mL，旋渦混合，於避光環境25°C下以超音波振盪30分鐘，靜置冷卻，以50%甲醇溶液定容至50 mL，旋渦混合，再以3,500 ×g離心15分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作空白檢液。

八、檢液之調製

將樣品混勻後，取約0.05 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入50%甲醇溶液40 mL，旋渦混合，於避光室溫中以超音波振盪30分鐘，以50%甲醇溶液定容至50 mL，再以3,500 ×g離心15分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。

九、高效液相層析儀分析條件

- (一)光電二極體陣列檢出器：定量波長306 nm。
- (二)層析管：Waters Spherisorb ODS-2 C18，5 µm，內徑4.6 × 250 mm。
- (三)層析管溫度：25°C。
- (四)樣品槽溫度：10°C。
- (五)注入量：10 µL。
- (六)移動相溶液：A液與B液以40：60 (v/v)進行等梯度分析。
- (七)移動相流速：1.5 mL/min。

十、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各10 µL，分別注入超高效液相層析儀中，依第九節條件進行分析。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反式白藜蘆醇之含量(mg/g)：

檢體中反式白藜蘆醇之含量(mg/g) =

$$\frac{C \times V}{M \times 1,000}$$

C：由標準曲線求得檢液中反式白藜蘆醇之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

十一、方法確效

依據衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)公布之「食品化學檢驗方法之確效規範」⁽²²⁾進行確效試驗，評估本研究檢驗方法之準確度(Accuracy)、精密度(Precision)及定量極限(Limit of Quantification, LOQ)。

(一)專一性試驗

分別取空白樣品及添加反式白藜蘆醇之空白樣品進行分析，評估本研究檢驗方法是否存在干擾待測物之物質，以確認具有明確評估待測物之能力。

(二)標準曲線

配製反式白藜蘆醇標準溶液至少包括5種不同濃度，就波峰面積與對應之標準溶液濃度，製作標準曲線，其線性回歸方程式之相關係數不應低於0.99，檢液中反式白藜蘆醇濃度應在標準曲線之線性範圍內。

(三)準確度-添加回收試驗

1. 執行方式

分別稱取粉狀空白樣品0.05 g，各加入2,000 µg/mL反式白藜蘆醇標準原液50及125 µL，使其分別含反式白藜蘆醇為2.0及5.0 mg/g，依第七節流程製成檢液，於同日內進行5重複試驗，測定樣品中反式白藜蘆醇含量並計算平均回收率，以評估本研究檢驗方法之準確度是否符合規範要求。

2. 準確度之回收率規範如下：

濃度範圍(mg/kg)	回收率(%)
≥ 100	85-110

3. 回收率計算方式：

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{檢測值}}{\text{添加值}} \times 100$$

(四)精密度-重複性及中間精密度試驗

1. 執行方式

於不同日期分別稱取空白樣品0.05 g，各加入2,000 µg/mL反式白藜蘆醇標準原液50及125 µL，使其分別含反式白藜蘆醇為2.0及5.0 mg/g，依第七節流程製成檢液，於異日間進行5重複試驗，測定樣品中反式白藜蘆醇含量並計算其變異係數，以評估本研究檢驗方法之精密度是否符合規範要求。

2. 重複性及中間精密度之變異係數(CV, %)規範如下：

濃度範圍(ppm)	變異係數(CV, %)	
	重複性	中間精密度
≥ 1	10	14

3. 變異係數計算方式如下：

$$\text{變異係數}(\%) = \frac{\text{標準差}}{\text{平均值}} \times 100$$

(五)定量極限之評估

分別將適當濃度之反式白藜蘆醇標準溶液添加至空白樣品中，測定樣品中反式白藜蘆醇含量並計算平均回收率及變異係數，另計算層析圖譜中反式白藜蘆醇波峰之訊號/雜訊比(S/N)，當S/N ≥ 10且符合食藥署確效規範之最低濃度視為定量極限。

十二、統計分析

平均值、標準差及變異係數等數值係以Microsoft Excel 2019軟體進行計算。

結果與討論

一、層析條件之探討

本研究參考前人文獻^(3,10,21)，及考量實驗室設備及器材，選用Waters Spherisorb ODS-2 C18，5 µm，內徑4.6 × 25 cm之管柱，以HPLC搭配PDA於波長306 nm下檢測，移動相流速為1.5 mL/min，管柱溫度為25℃，將含反式及順式白藜蘆醇各50 µg/mL之50%甲醇混合標準溶液進行移動相測試。首先嘗試El Azab等人研究⁽³⁾中所使用之移動相乙腈：0.1%磷酸溶液(50：50, v/v)，所得層析圖譜顯示反式以及順式白藜蘆醇之滯留時間落在3.55至3.94分鐘左右，其滯留時間過於前面，若未來分析市售檢體，可能會有檢體基質干擾問題。再以Brizzi等人研究⁽¹⁰⁾中所使用之移動相乙腈：去離子水(30：70, v/v)進行測試，結果顯示反式及順式白藜蘆醇之波峰均有拖尾之情形。另以Craciun等人研究⁽²¹⁾中所使用之移動相甲醇：去離子水(40：60, v/v)進行測試，其反式以及順式白藜蘆醇滯留時間落在12.65與15.49分鐘，且波峰較無拖尾之情形，因此最後選擇甲醇：去離子水(40：60, v/v)為移動相進行等梯度分析，搭配25℃之管柱溫度作為層析條件，進行後續前處理條件之評估(圖二)。

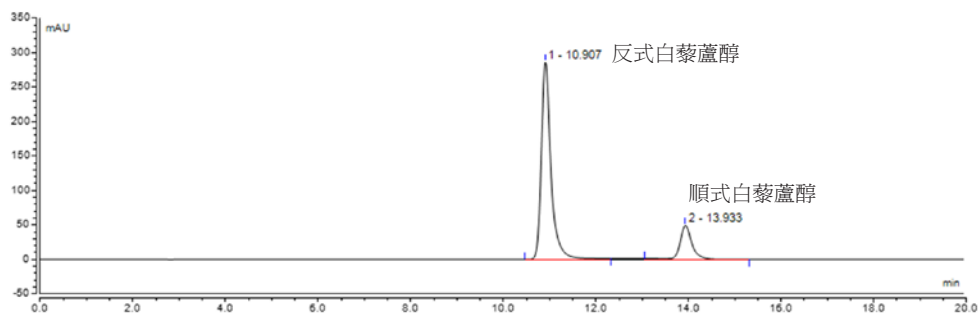
二、前處理條件之評估

參考文獻所使用溶劑評估該等溶劑之萃取效果^(3,10,21)。取一市售檢體(編號S09) 0.5 g，分別以10、50及100%甲醇與10、50及100%乙腈萃取，超音波振盪15分鐘，再以萃取溶劑定容至50 mL，測試結果顯示以10、50及100%甲醇萃取所得反式白藜蘆醇之波峰訊號積分面積分別為2.5、6.5及6.1 mA.U.；以10、50及100%乙腈萃取所得反式白藜蘆醇之波峰訊號積分面積分別為1.1、6.0及5.8 mA.U.，其中以100%甲醇及乙腈進行萃取之檢液，其反式白藜蘆醇波峰均有明顯前置(fronting)之情形，故不採納；以

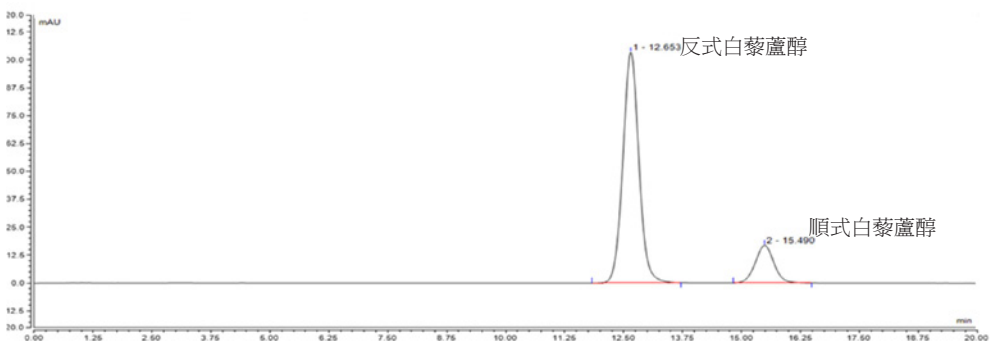
(A) 乙腈：0.1%磷酸溶液= 50：50 (v/v)



(B) 乙腈：去離子水 = 30：70 (v/v)



(C) 甲醇：去離子水= 40：60 (v/v)



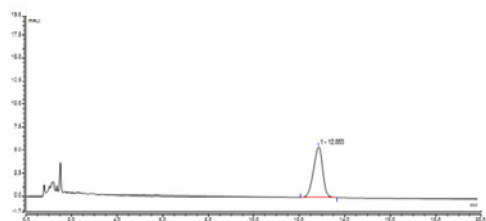
圖二、50 µg/mL順式及反式白藜蘆醇標準溶液於不同移動相條件下之液相層析圖

10%甲醇溶液及10%乙腈溶液進行萃取而得之波峰面積相較於以50%甲醇溶液及50%乙腈溶液萃取之結果來得低，因此也不採納；而50%甲醇溶液及50%乙腈溶液之結果所得波峰面積

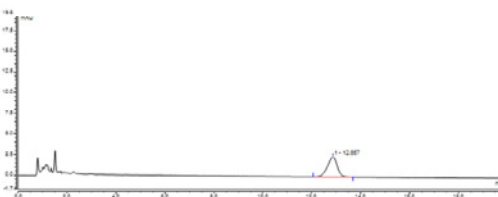
相近，考量甲醇相較於乙腈對環境較友善，較符合綠色化學，故本研究檢驗方法選擇以50%甲醇溶液作為萃取溶劑。

續探討檢體取樣量以及超音波振盪時間

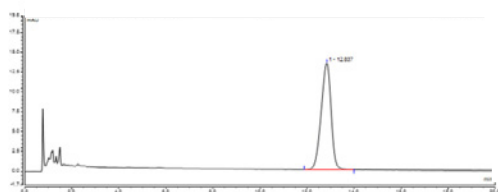
(A) 10% 甲醇溶液



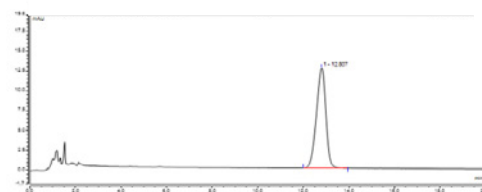
(D) 10% 乙腈溶液



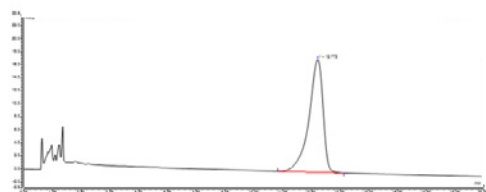
(B) 50% 甲醇溶液



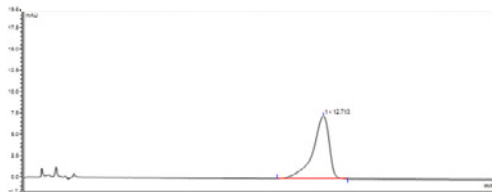
(E) 50% 乙腈溶液



(C) 甲醇



(F) 乙腈



圖三、檢體中反式白藜蘆醇以不同溶劑萃取之液相層析圖

對反式白藜蘆醇含量分析之影響。分別取市售檢體(編號S09) 0.05、0.1及0.5 g，以50%甲醇溶液萃取，超音波振盪15分鐘，再以50%甲醇溶液定容至50 mL，最後換算成檢體含量(mg/g)，結果顯示以取樣量0.05 g之結果，其所得反式白藜蘆醇的含量最高(表一)。再分別取檢體0.05 g，以50%甲醇溶液萃取，於超音波振盪10、15、20及25分鐘，再以50%甲醇溶液定容至50 mL，結果顯示以超音波振盪時間15分鐘之結果，其所得反式白藜蘆醇的含量最高(表二)。推測檢體於超音波振盪萃取時，溫度會提升，因此在以長時間進行萃取時，反式白藜蘆醇可能會因熱而造成降解，導致萃取結

果變差。

綜整上述結果，前處理步驟為稱取樣品約0.05 g，以50%甲醇溶液作為萃取溶劑，超音波振盪15分鐘，再以50%甲醇溶液定容至50

表一、不同取樣量對檢體中反式白藜蘆醇之萃取效果

取樣量 (g)	平均檢測值* (mg/g)	變異係數* (%)
0.05	7.23	0.02
0.1	6.94	0.24
0.5	6.97	0.17

* n=3.

表二、不同超音波振盪萃取時間對檢體中反式白藜蘆醇之萃取效果

萃取時間 (min)	平均檢測值 (mg/g)	變異係數 (%)
10	7.10	0.08
15	7.61	0.05
20	6.95	0.07
25	7.14	0.07

* n=3.

mL，離心後取上清液，經0.22 μ m之PVDF濾膜過濾，以HPLC-DAD進行分析。後續以此流程執行確效試驗。

三、確效試驗結果

(一)專一性試驗

以空白樣品、反式及順式白藜蘆醇標準溶液各50 μ g/mL，參考Brizzi⁽¹⁰⁾等人之研究，分別在306 nm (反式白藜蘆醇最大吸收波峰)及285 nm (順式白藜蘆醇最大吸收波峰)兩個波長下進行分析比對(圖四)，結果顯示，兩個波長下均能觀察到反式及順式白藜蘆醇，其滯留時間分別為12.65分鐘及15.49分鐘，而空白樣品之層析圖譜中並無干擾波峰出現，且反式及順式白藜蘆醇兩者間也無明顯干擾情形。基於法規針對反式白藜蘆醇訂定規範，本研究針對該成分進行檢驗方法探討。

(二)標準曲線

製作反式白藜蘆醇之標準曲線，濃度配製範圍為0.5-150 μ g/mL，相關係數(correlation coefficient, r)為0.9998，顯示在此濃度範圍內均能呈現良好線性關係(圖五)。

(三)添加回收試驗

空白樣品之2.0及5.0 mg/g添加回收試驗中，同日內平均回收率分別為95.2及95.0%，變異係數為4.3及1.5%，異日間之

表三、於空白基質中添加反式白藜蘆醇標準品之確效試驗結果

添加 濃度 (mg/g)	同日間(n=5)		異日間(n=10)		S/N
	平均回收 率(%)	變異係數 (%)	平均回收 率(%)	變異係數 (%)	
2.0	95.2	4.3	100.7	6.1	69
5.0	95.0	1.5	97.7	3.2	348

平均回收率為100.7及97.7%，變異係數為6.1及3.2% (表三)，均符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範。

(四)定量極限之評估

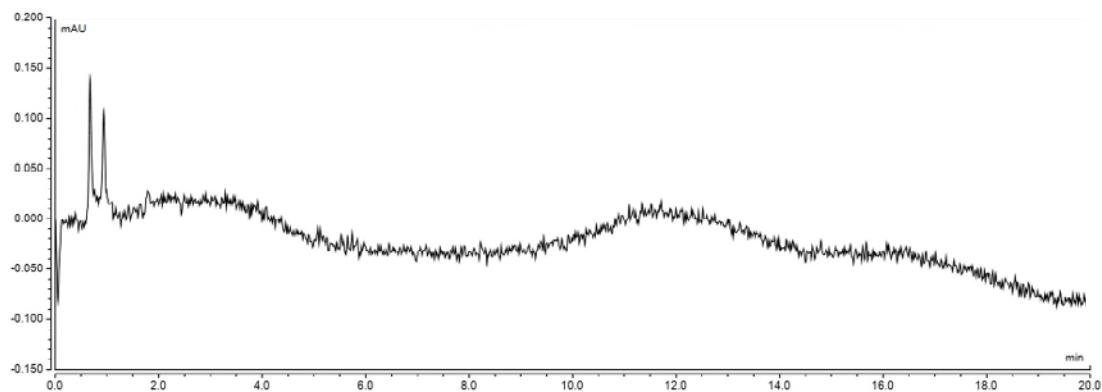
於空白樣品添加2.0 mg/g反式白藜蘆醇，其訊號/雜訊比為69，大於10，且回收率與變異係數(表三)皆符合確效規範之要求，故將粉狀樣品之定量極限訂為2.0 mg/g。

四、市售產品之方法適用性評估

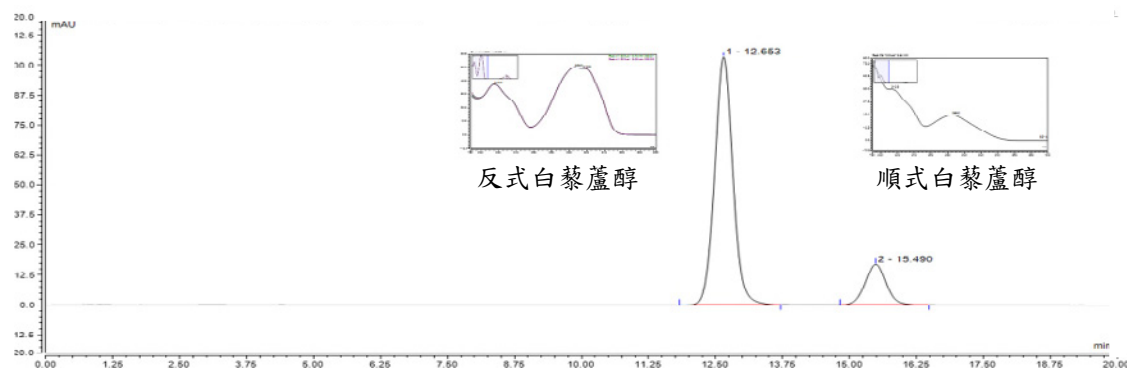
價購產品名稱含白藜蘆醇或其原料成分標示中含葡萄萃取物、白藜蘆醇或反式白藜蘆醇之市售產品，計有7件膠囊狀食品及2件錠狀食品，以本研究建立之檢驗方法進行三重複測試，以評估方法之適用性，結果如表四，9件產品皆檢出反式白藜蘆醇，其含量介於2.2-102.1 mg/g之間，另依檢測值換算反式白藜蘆醇之每日食用量則介於0.9-82.3 mg。

由9件檢體之檢驗結果得知，皆僅含反式白藜蘆醇不含順式白藜蘆醇，與文獻中提到在天然植物萃取物中，含量以反式白藜蘆醇較多相符。而順式白藜蘆醇的生成主要是在加工過程中受到溫度或是光線的影響，而造成反式白藜蘆醇轉變成順式白藜蘆醇，如葡萄酒中有大量的反式白藜蘆醇，也有微量的順式白藜蘆醇⁽⁹⁾。

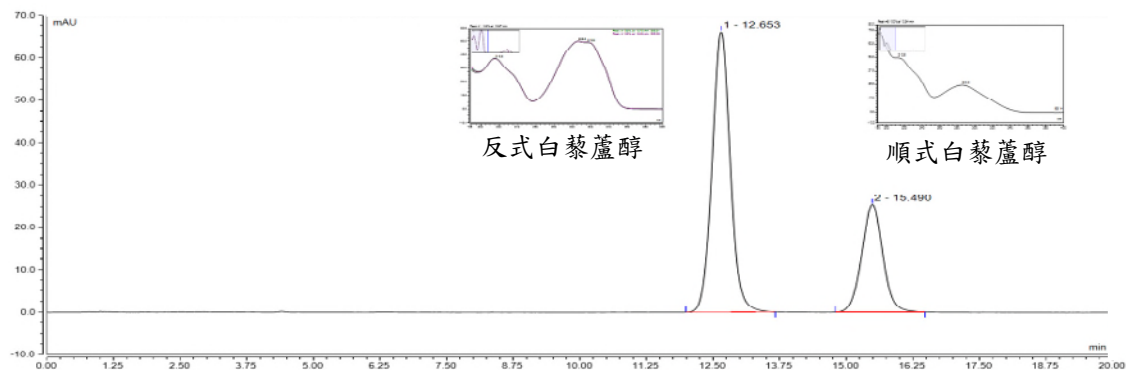
(A) 未添加標準品之空白樣品(306 nm)



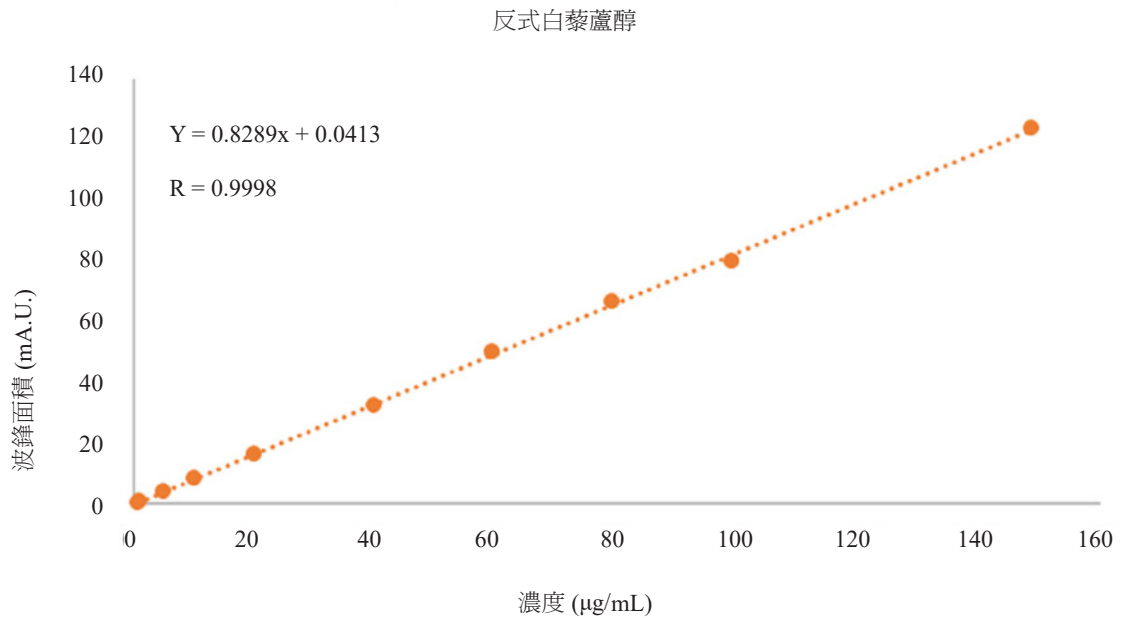
(B) 白藜蘆醇標準溶液(306 nm)



(C) 白藜蘆醇標準溶液(285 nm)



圖四、空白樣品及白藜蘆醇標準溶液於波長306 nm及285 nm之液相層析圖及全波長吸收光譜圖



圖五、反式白藜蘆醇標準曲線

表四、市售產品中反式白藜蘆醇之含量及每日食用量

編號	型態	標示食用方式	內容物重 (mg/顆)	檢測值* (mg/g)	變異係數 (%)	每日食用量 (mg)	標示內容
S01	膠囊	每日1次，每次2顆	403	102.1	1.6	82.3	紅葡萄萃取物 (含白藜蘆醇)
S02	膠囊	每日1次，每次1至2顆	493	31.6	6.1	15.6-31.2	紅葡萄萃取物 (含白藜蘆醇)
S03	膠囊	每日1次，每次1至2顆	450	20.3	1.0	9.1-18.3	紅葡萄萃取物 (含白藜蘆醇)
S04	錠劑	每日1-2次，每次1顆	418	2.2	3.0	0.9-1.8	葡萄皮萃取物 (含白藜蘆醇)
S05	膠囊	每次1至2顆，至多3顆	445	17.8	2.5	7.9-23.8	紅葡萄萃取物 300 mg (含白藜蘆醇)
S06	膠囊	每日1次，每次2顆	656	15.7	8.5	20.6	葡萄萃取物 (白藜蘆醇) 20.4 mg/2顆
S07	錠劑	每日1次，每次1顆	518	97.1	3.1	50.3	葡萄皮萃取 (含白藜蘆醇)
S08	膠囊	每日2粒	485	7.0	2.7	6.8	紅葡萄萃取物 (含白藜蘆醇)
S09	膠囊	每日1次，每次1至2顆	458	7.8	3.1	3.6-7.1	葡萄皮萃取物

*n=3

結論與建議

本研究配合行政管理所需，建立食品中反式白藜蘆醇之檢驗方法，係檢體加入50%甲醇溶液經超音波振盪萃取後，經C18管柱搭配甲醇和去離子水(40：60, v/v)沖提層析，再以光電二極體陣列偵測器於波長306 nm進行檢測。確效結果符合食藥署「食品化學檢驗方法之確效規範」，顯示該簡單快速方法適用於膠囊錠狀食品中反式白藜蘆醇之檢驗，可供作為監測此類產品之標示符合性之參考。

參考文獻

1. 黃學聰、郭曉萍、賴進此。2015。以微生物轉化生產白藜蘆醇(Resveratrol)的方法。中華民國智慧財產局發明說明書公告，TW 1486452 B。
2. Sebastia, N., Montoro, A., Leo'n, Z. and Soriano, J.M. 2017. Searching *trans*-Resveratrol in fruits and vegetables : a preliminary screening. J. Food Sci. Technol. 54 : 842-845.
3. El Azab, N.F., Abdelaal, S.H., Hassan, S.A. and El-Kosasy, A.M. 2022. Dietary supplement mislabelling : case study on selected slimming products by developing a green isocratic HPLC method for their quality control. Sci. Rep. 12 : 22305.
4. Kim, D.J., Kim, S.K., Kim, M., Lee, H.B. *et al.* 2003. Analysis of *trans*-Resveratrol contents of grape and grape products consumed in Korea. Korean J. Food Sci. Technol. 35 : 764-768.
5. Rimando, A.M., Kalt, W., Magee, J.B., Dewey, J. *et al.* 2004. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. J. Agric. Food Chem. 52 : 4713-4719.
6. Sobolev, V. and Cole, R.J. 1999. *trans*- Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. J. Agric. Food Chem. 47 : 1435-1439.
7. Souto, A.A., Carneiro, M.C., Seferin, M., Senna, M.J. *et al.* 2001. Determination of *trans*-Resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. J. Food Compos. Anal. 14 : 441-445.
8. Vian, M.A., Tomao, V., Gallet, S., Coulomb, P.O. *et al.* 2005. Simple and rapid method for *cis*- and *trans*-Resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using chromolith columns. J. Chromatogr. A. 1085 : 224-229.
9. Jagwani, S., Jalalpure, S., Dhamecha, D., Hua, G.S. *et al.* 2020. Development and validation of reverse-phase high-performance liquid chromatographic method for determination of Resveratrol in human and rat plasma for preclinical and clinical studies. Indian J. Pharm. Sci. 54 : 187-193.
10. Brizzi, A., Brizzi, V. and Corradini, D. 2008. Identification and quantification of *trans*-Resveratrol in dietary supplements by a rapid and straightforward RP-HPLC method. J. Liq. Chromatogr. R. T. 31 : 2089-2100.
11. Bancuta, O.R., Chilian, A., Bancuta, I., Setnescu, R. *et al.* 2018. Thermal characterization of Resveratrol. Rev. Chim. 69 : 1346-1351.
12. Li, X., Wu, B., Wang, L. and Li, S. 2006. Extractable amounts of *trans*-Resveratrol in seed and berry skin in Vitis evaluated at the germplasm level. J. Agric. Food Chem. 54 : 8804-8811.
13. Zhao, Y., Shi, M., Ye, J.H., Zheng, X.Q. *et al.* 2015. Photo-induced chemical reaction of *trans*-Resveratrol. Food Chem. 171 :

- 137-143.
14. Trela, B.C. and Waterhouse, A.L. 1996. Resveratrol : isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food Chem.* 44 : 1253-1257.
15. Sun, B., Ribes, A.M., Leandro, M.C., Belchior, A.P. *et al.* 2006. Stilbenes : Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta* 563 : 382-390.
16. Frankel, E.N., German, J.B., Kinsella, J.E., Parks, E. *et al.* 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341 : 454-457.
17. Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A. *et al.* 2001. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat. Res-Gen. Tox. En.* 496 : 171-180.
18. Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V. *et al.* 1997. Cancer chemopreventive activity of Resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275 : 218-220.
19. European Commission. 2016. Commission Implementing Decision (EU) 2016/1190 of 19 July 2016 authorising the placing on the market of *trans*-Resveratrol as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. OJL196, 53, 21.7.2016.
20. 衛生福利部。2023。以基因改造啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) EFSC4687菌株發酵生產食品原料反式白藜蘆醇(*trans*-Resveratrol)之使用限制及標示規定。112年6月29日衛授食字第1121301256號公告。[[https : //www.foodlabel.org.tw/FdaFrontEndApp/Law/Edit?SystemId=eb16a04a-be05-4f29-ba84-244c4c0d0be6&clPublishStatus=1](https://www.foodlabel.org.tw/FdaFrontEndApp/Law/Edit?SystemId=eb16a04a-be05-4f29-ba84-244c4c0d0be6&clPublishStatus=1)]
21. Craciun, V.I., Gligor, F.G., Juncan, A.M., Chis, A.A. *et al.* 2019. A new, rapid and efficient HPLC method to assay Resveratrol in food supplements. *Rev. Chim.* 70 : 3202-3205.
22. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。110年11月1日修正公布。

Method Development for *trans*-Resveratrol in Foods in Capsule and Tablet Form

YUNG-SHUN MA, PAI-WEN WU, LI-YAO TSAI, YA-MIN KAO,
MEI-CHIH LIN AND SU-HSIANG TSENG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

The *trans*-resveratrol is primarily found in certain natural plants, such as grapes and berries like blueberries, and can also be produced by microorganisms. It acts as a strong antioxidant and has potential anti-cancer and anti-inflammatory properties. According to the “Restrictions and Labeling Requirements for the Use of *trans*-Resveratrol Produced by Genetically Modified Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) EFSC4687 as a Food Ingredient” announced by the Ministry of Health and Welfare in Taiwan, the daily intake limit of *trans*-resveratrol is set at 150 mg. This study aimed to establish a testing method for *trans*-resveratrol in food in capsule or tablet form by high-performance liquid chromatography combined with a diode array detector (HPLC-DAD). After being extracted with 50% methanol, the specimen was analyzed using a Waters Spherisorb ODS-2 C18 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm) column with methanol and deionized water (40:60, v/v) as the mobile phase, and detected using a photodiode array detector at a wavelength of 306 nm. The validation results showed that the blank sample spiked with *trans*-resveratrol at the levels of 2.0 and 5.0 mg/g had the average recoveries of 95.2 and 95.0% with the coefficients of variation (CVs) of 4.3 and 1.5% on the intra-day, and the average recoveries were 100.7 and 97.7% with the CVs of 6.1 and 3.2% on the inter-day, respectively. All results met the validation criteria of chemical testing methods for foods set by TFDA, indicating that the developed testing method had good precision and accuracy. Additionally, the limit of quantification was 2.0 mg/g. Nine commercially available products labeled as containing resveratrol were tested by the established method to evaluate the applicability. The results showed that the contents of *trans*-resveratrol in 9 products ranged from 2.2 to 102.1 mg/g, which corresponded to daily intake amounts of 0.9 to 82.3 mg/day.

Key words: *trans*-Resveratrol, HPLC, DAD, daily intake limit