

食用油中銅葉綠素之鑑別方法

Method of Test for Copper Chlorophyll in Edible Oils

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食用油中銅葉綠素之鑑別。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)篩檢，疑似陽性檢體再以液相層析高解析度串聯質譜儀(liquid chromatograph/high resolution tandem mass spectrometer, LC/HRMS²)或液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)確認之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 高效液相層析儀：
 - 2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。
 - 2.1.1.2. 層析管：GL Sciences InertSustain C18，2 μm，內徑 2.1 mm × 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 液相層析高解析度串聯質譜儀：
 - 2.1.2.1. 離子源：大氣壓化學游離負離子(atmospheric pressure chemical ionization negative, APCI)。
 - 2.1.2.2. 層析管：HALO C18，2.7 μm，內徑 4.6 mm × 10 cm，或同級品。
 - 2.1.3. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.3.1. 離子源：大氣壓化學游離負離子(atmospheric pressure chemical ionization negative, APCI)。
 - 2.1.3.2. 層析管：HALO C18，2.7 μm，內徑 4.6 mm × 7.5 cm，或同級品。
 - 2.1.4. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.6. 展開槽。
 - 2.2. 試藥：石油醚、乙醚、丙酮、甲醇及無水乙醇均採用液相層析級；正己烷、三氯甲烷及乙醇均採用試藥級；醋酸銨採用試藥特級；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18 MΩ·cm 以上)；銅葉綠素添加物。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL，PP 材質。

- 2.3.2. 濾膜：孔徑0.22 μm ，Nylon材質。
- 2.3.3. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Sep-Pak[®] silica，1 g，6 mL，或同級品。
- 2.3.4. 微量吸管：5 μL ，具刻度。
- 2.3.5. 薄層層析板：矽膠，厚度0.2 mm，10 cm \times 10 cm。
- 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 1 M醋酸銨溶液：

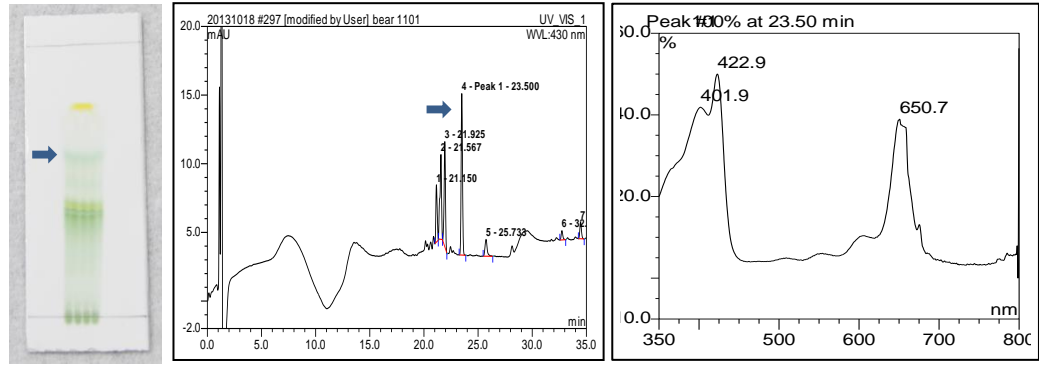
稱取醋酸銨77 g，以去離子水溶解使成1000 mL。
 - 2.4.2. 石油醚：乙醚(9: 1, v/v)溶液：

取石油醚與乙醚以9：1 (v/v)之比例混勻。
 - 2.4.3. 展開溶媒：

取正己烷、三氯甲烷與乙醇以10：9：1 (v/v/v)之比例混勻。
- 2.5. 移動相溶液之調製：
 - 2.5.1. HPLC
 - 2.5.1.1. 移動相溶液A：

取甲醇與1M醋酸銨溶液以8：2 (v/v)之比例混勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
 - 2.5.1.2. 移動相溶液B：丙酮。
 - 2.5.1.3. 移動相溶液C：甲醇。
 - 2.5.1.4. 移動相溶液D：去離子水。
 - 2.5.2. LC/HRMS
 - 2.5.2.1. 移動相溶液A：丙酮。
 - 2.5.2.2. 移動相溶液B：甲醇。
 - 2.5.3. LC/MS/MS
 - 2.5.3.1. 移動相溶液A：甲醇。
 - 2.5.3.2. 移動相溶液B：無水乙醇。
- 2.6. 銅葉綠素添加物之純化：

取銅葉綠素添加物0.1 g，以丙酮2 mL溶解後，供作銅葉綠素溶液。沿矽膠薄層板下端1 cm之橫向，點上直徑約0.5 cm之銅葉綠素溶液，並風乾之。置入盛有展開溶媒之展開槽內，使展開溶媒浸沒薄層板下端約0.5 cm，展開高度達8 cm後取出風乾，依檢液上昇之斑點的位置(R_F 值)及顏色鑑別之，將矽膠薄層板上 R_F 值約0.6綠色斑點刮下，以丙酮2 mL萃取，以濾膜過濾後，供作銅葉綠素純化溶液。精確量取銅葉綠素純化溶液20 μL ，注入高效液相層析儀中，依2.8節條件進行液相層析，銅葉綠素之滯留時間約23.5分鐘，其UV吸收圖譜如下：



TLC圖譜

HPLC圖譜

UV吸收圖譜

2.7. 檢液之調製：

稱取檢體 1 g，置於離心管中，以塑膠滴管吸取油脂，注入固相萃取匣中，以石油醚 3 mL 潤洗離心管，將洗液注入固相萃取匣中，重複此潤洗步驟 2 次，棄流出液，以石油醚:乙醚(9: 1, v/v)溶液 9 mL 沖洗，棄流出液，以丙酮 6 mL 沖提，收集沖提液，於 25°C 下以氮氣濃縮至乾，殘留物以丙酮 1 mL 溶解，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 篩檢試驗：

精確量取檢液及銅葉綠素純化溶液各 20 μL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行液相層析，就檢液與銅葉綠素純化溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之。

高效液相層析測定條件：

光二極體陣列檢出器：波長掃描範圍 350 ~ 800 nm。

層析管：GL Sciences InertSustain C18，2 μm，內徑 2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：30°C。

移動相溶液：A液、B液、C液與D液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
0.0 → 3.0	30 → 30	0 → 0	0 → 0	70 → 70
3.0 → 7.0	30 → 100	0 → 0	0 → 0	70 → 0
7.0 → 9.0	100 → 100	0 → 0	0 → 0	0 → 0
9.0 → 11.0	100 → 50	0 → 25	0 → 25	0 → 0
11.0 → 13.0	50 → 50	25 → 25	25 → 25	0 → 0
13.0 → 15.0	50 → 0	25 → 50	25 → 50	0 → 0
15.0 → 25.0	0 → 0	50 → 50	50 → 50	0 → 0
25.0 → 26.0	0 → 0	50 → 70	50 → 30	0 → 0

26.0 → 35.0	0 → 0	70 → 90	30 → 10	0 → 0
35.0 → 35.1	0 → 30	90 → 0	10 → 0	0 → 70
35.1 → 40.0	30 → 30	0 → 0	0 → 0	70 → 70

移動相流速：0.25 mL/min。

註：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。

2.9. 確認試驗

2.9.1. LC/HRMS

精確量取 HPLC 篩檢陽性檢液及銅葉綠素純化溶液各 40 μ L，分別注入液相層析高解析度串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就檢液與銅葉綠素純化溶液所得波峰之滯留時間、精確質量(< 5 ppm)及相對離子強度鑑別之。

液相層析高解析度串聯質譜測定條件：

層析管：HALO C18，2.7 μ m，內徑4.6 mm \times 10 cm。

層析管溫度：30 $^{\circ}$ C。

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 → 10.0	5 → 80	95 → 20
10.0 → 11.0	80 → 100	20 → 0
11.0 → 14.0	100 → 100	0 → 0
14.0 → 14.1	100 → 5	0 → 95

移動相流速：1 mL/min。

離子源：大氣壓化學游離負離子(atmospheric pressure chemical ionization negative, APCI)。

碰撞能量：20 eV。

偵測模式：產物離子掃描(product ion scan)。

解析度：70000。

分析物	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)
Cu-pyropheophytin a	873.4749	522.1486
		550.1799
		594.1697

2.9.2. LC/MS/MS

精確量取 HPLC 篩檢陽性檢液及銅葉綠素純化溶液各 40 μ 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

銅葉綠素純化溶液所得波峰之滯留時間及相對離子強度鑑別之。

液相層析串聯質譜測定條件：

層析管：HALO C18，2.7 μm ，內徑4.6 mm \times 7.5 cm。

層析管溫度：30 $^{\circ}\text{C}$ 。

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 1.0	100 \rightarrow 70	0 \rightarrow 30
1.0 \rightarrow 6.0	70 \rightarrow 40	30 \rightarrow 60
6.0 \rightarrow 14.0	40 \rightarrow 0	60 \rightarrow 100
14.0 \rightarrow 15.5	0 \rightarrow 0	100 \rightarrow 100
15.5 \rightarrow 16.0	0 \rightarrow 100	100 \rightarrow 0
16.0 \rightarrow 20.0	100 \rightarrow 100	0 \rightarrow 0

移動相流速：0.8 mL/min。

離子源：大氣壓化學游離負離子(atmospheric pressure chemical ionization negative, APCI)。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：-4.5 kV。

氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。

碰撞氣體(Collision gas, CAD)：high。

霧化氣體(Gas 1)：55 psi。

加熱氣體(Gas 2)：0 psi。

加熱溫度(Temperature)：400 $^{\circ}\text{C}$ 。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。

偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)與碰撞能量(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)		
	873.5 > 522	-68	-50
Cu-pyropheophytin a	873.5 > 535	-68	-57
	873.5 > 550	-68	-50

873.5 > 594 -68 -38

註：1. 相對離子強度由2對產物離子之波峰面積比而得($\leq 100\%$)，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

2. 上述條件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：檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。