

寵物食品中抗氧化劑之檢驗方法
Method of Test for Antioxidants in Pet Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於寵物食品中衣索金 (Ethoxyquin)、丁羥甲苯 (Butylated hydroxytoluene, BHT) 及丁羥甲醚 (Butylated hydroxyanisole, BHA)等3品項抗氧化劑之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，以高效液相層析儀 (high erformance liquid chromatograph, HPLC) 分析之方法。
 - 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：Poroshell 120 EC-C18，2.7 μm ，內徑3 mm $\times$ 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 高速分散裝置 (High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.3. 離心機 (Centrifuge)：可達5000 $\times g$ 以上。
 - 2.2. 試藥：乙腈均採用液相層析級；醋酸採用試藥特級；檸檬酸鈉、檸檬酸氫二鈉、無水硫酸鎂及氯化鈉均採用分析級；去離子水 (比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；衣索金 (Ethoxyquin)、丁羥甲苯 (Butylated hydroxytoluene, BHT) 及丁羥甲醚 (Butylated hydroxyanisole, BHA)對照用標準品共3品項。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：10 mL，褐色。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.3.4. 陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer)^(註1)：採用Bond ElutQuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
 - 2.3.5. 萃取用粉劑^(註)：含檸檬酸鈉1 g、檸檬酸氫二鈉0.5 g、無水硫酸鎂4g及氯化鈉1 g。
 - 註1：陶瓷均質石可視檢體狀況自行評估使用。
 - 註2：可依需求自行評估使用市售萃取用組合套組。
 - 2.4. 移動相溶液之調製：

2.4.1. 移動相溶液A(5%醋酸溶液)：

取醋酸50 mL，加去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.4.2. 移動相溶液B：乙腈。

2.5. 標準溶液之配製：

精確量取衣索金 (Ethoxyquin)、丁羥甲苯(Butylated hydroxytoluene, BHT) 及丁羥甲醚(Butylated hydroxyanisole, BHA)對照用標準品各10 mg，以乙腈溶液稀釋並定容至10 mL，作為標準原液，於-18°C避光貯存。臨用時取適量標準原液，以乙腈溶液稀釋至100 ug/mL，供作標準溶液。

2.6. 檢液之調製：

取檢體1.00 g，精確稱定，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆、去離子水8 mL及乙腈10 mL，再加入萃取用粉劑，蓋上離心管蓋，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm 振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以5000 × g 離心5分鐘。取上清液以濾膜過濾後，供作檢液^(註)。

註：檢液調製後，應儘快進行儀器分析。

2.7. 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，依下列條件進行液相層析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各抗氧化劑之含量(mg/kg)：

$$\text{檢體中各抗氧化劑之含量(mg/Kg)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中各抗氧化劑之濃度(ug/mL)

V：萃取檢體之乙腈體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

高效液相層析測定條件^(註)：

光二極體陣列檢出器：定量波長280 nm。

層析管：Poroshell 120 EC-C18，2.7 µm，內徑3 mm × 15 cm。

層析管溫度：45°C。

注入量：10 µL。

移動相溶液：A液(5%醋酸溶液)與B液(乙腈)以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A(%)	B(%)
0 → 4	70	30
4 → 15	30	70
15 → 20	30	70
20.1 → 30	70	30

移動相流速：0.7 mL/min。

附註：

1. 本檢驗方法之定量極限各抗氧化劑均為10 mg/kg。
2. 上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。
3. 以液相層析串聯質譜儀(LC/MS/MS)進行確認時，其LC/MS/MS之多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)模式參考參數如表一，且其相對離子強度(定性離子與定量離子之波峰面積比)應符合下列容許範圍：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20 ~ 50	± 25
> 10 ~ 20	± 30
≤ 10	± 50

4. 以氣相層析質譜儀(GC/MS)進行確認時，其GC/MS之選擇離子偵測(selected ion monitoring, SIM)模式之偵測離子如表二，且其相對離子強度(定性離子與定量離子之波峰面積比)應符合下列容許範圍：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 10
> 20 ~ 50	± 15
> 10 ~ 20	± 20
≤ 10	± 50

5. 若有干擾需以LC/MS/MS或GC/MS進行定量時，應先進行方法確效。
6. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. 食品中抗氧化劑之檢驗方法－多重分析方法(MOHWA0021.02)。衛授食字第1081900166號公告(修正日期：108 年 1 月 29 日)。
2. ISO 5132. Animal and vegetable fats and oils_HPLC analysis of phenolic antioxidants.
3. Schreier, C.J. 1997. Determination of ethoxyquin in feeds by liquid chromatography: collaborative study. J. AOAC Int. 80(4) : 725-731.

表一、抗氧化劑之液相層析串聯質譜儀多重反應偵測模式參數分析物

分析物		離子化 模式	離子對	去簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
中文名	英文名		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)		
衣索金	Ethoxyquin (ETH)	ESI ⁺	218>174*	44	40
			218>160	44	48
丁羥甲醚	Butylated hydroxyanisole (BHA)	ESI ⁻	179>164*	-33	-20
			179>149	-33	-35
丁羥甲苯	Butylated hydroxytoluene (BHT)	ESI ⁻	219>203*	-60	-35
			219>163	-60	-20

*定量離子對

註：上述參數不適時，可依所使用之儀器，設定適合之參數。

表二、抗氧化劑之氣相層析質譜儀選擇離子偵測模式之偵測離子

分析物		離子化 模式	前驅離子 (m/z)	產物離子 (m/z)
中文名	英文名			
衣索金	Ethoxyquin (ETH)	EI	202	174,217
丁羥甲醚	Butylated hydroxyanisole (BHA)	EI	137	165,180
丁羥甲苯	Butylated hydroxytoluene (BHT)	EI	205	145,220

註：上述參數不適時，可依所使用之儀器，設定適合之參數。