

食用油脂中縮水甘油脂肪酸酯之檢驗方法

Method of Test for Glycidyl Esters in Edible Oils and Fats

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食用油脂中縮水甘油脂肪酸酯(glycidyl esters, GEs)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體先以酸催化將縮水甘油脂肪酸酯轉換成3-單溴丙二醇酯(3-monobromopropanediol esters, 3-MBPDEs)，再經萃取、酸轉酯化及衍生化後，以氣相層析串聯質譜儀(gas chromatograph/tandem mass spectrometer, GC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 氣相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電子游離(electron ionization, EI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：HP-5MS UI毛細管，內膜厚度0.25 μm ，內徑0.25 mm \times 30 m，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達5000 \times g以上者。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 超音波振盪機(Ultrasonicator)。
 - 2.1.5. 水浴(Water bath)：具溫度控制。
 - 2.1.6. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：四氫呋喃(tetrahydrofuran)及甲醇均採用氣相層析級；丙酮及苯基硼酸(phenylboronic acid)均採用液相層析級；甲苯、正庚烷、溴化鈉、碳酸氫鈉、硫酸鈉及硫酸均採用分析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；棕櫚酸縮水甘油脂肪酸酯(glycidyl palmitate, Gly-P)對照用標準品；棕櫚酸縮水甘油脂肪酸酯-d₅(glycidyl palmitate-d₅, Gly-P-d₅)同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：5 mL、10 mL、20 mL及100 mL。
 - 2.4. 內部標準溶液之配製：

取Gly-P-d₅同位素內部標準品約1 mg，精確稱定，以甲苯溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量內部標準原液，以四氫呋喃稀釋至10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，供作內部標準溶液。
 - 2.5. 標準溶液之配製：

取Gly-P對照用標準品約10 mg，精確稱定，以甲苯溶解並定容至100

mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量標準原液及內部標準溶液混合，以四氫呋喃稀釋至5~250 ng/mL (含內部標準品濃度125 ng/mL)，供作標準溶液。

2.6. 試劑之調製：

2.6.1. 5%硫酸溶液：

取硫酸2.5 mL，緩緩加入去離子水40 mL中，再加去離子水使成50 mL。

2.6.2. 含0.3%溴化鈉之硫酸溶液：

稱取溴化鈉150 mg，以5%硫酸溶液溶解使成50 mL。

2.6.3. 0.6%碳酸氫鈉溶液：

稱取碳酸氫鈉3 g，以去離子水溶解使成500 mL。

2.6.4. 含1.8%硫酸之甲醇溶液：

取硫酸9 mL，緩緩加入甲醇400 mL中，再加甲醇使成500 mL。

2.6.5. 20%硫酸鈉溶液：

稱取硫酸鈉50 g，以去離子水溶解使成250 mL。

2.6.6. 飽和碳酸氫鈉溶液：

取碳酸氫鈉約15 g，加去離子水100 mL，攪拌加熱直至碳酸氫鈉不再溶解，冷卻後，取上清液，供作飽和碳酸氫鈉溶液。

2.6.7. 95%丙酮溶液：

取丙酮95 mL，加去離子水使成100 mL。

2.6.8. 含25%苯基硼酸之丙酮溶液：

稱取苯基硼酸5 g，以95%丙酮溶液溶解使成20 mL，臨用時調製。

2.7. 檢液之調製：

將檢體混勻，取約0.1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液25 μ L、四氫呋喃2 mL及含0.3%溴化鈉之硫酸溶液30 μ L，旋渦混勻，於50°C水浴反應15分鐘，加入0.6%碳酸氫鈉溶液3 mL中止反應，再加入正庚烷2 mL，旋渦混勻，以3500 \times g離心1分鐘，取上清液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物以四氫呋喃1 mL溶解，加入含1.8%硫酸之甲醇溶液1.8 mL，於40°C水浴反應16小時。加入飽和碳酸氫鈉溶液0.5 mL中止反應，於40°C以氮氣去除有機溶劑，加入20%硫酸鈉溶液2 mL及正庚烷2 mL，旋渦混勻，以3500 \times g離心1分鐘，棄上層液，下層液再加入正庚烷2 mL，旋渦混勻，以3500 \times g離心1分鐘，棄上層液。下層液加入含25%苯基硼酸之丙酮溶液250 μ L，旋渦混勻，以超音波振盪5分鐘，加入正庚烷1 mL，旋渦混勻，以3500 \times g離心1分鐘，收集

上層液，下層液再加入正庚烷1 mL重複上述步驟萃取1次，合併上層液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物以正庚烷0.4 mL溶解，經5000 ×g離心10分鐘，取上清液，供作檢液。

2.8. 標準曲線之製作：

取標準溶液各2 mL，加入含0.3%溴化鈉之硫酸溶液30 μL，於50°C水浴反應15分鐘，以下步驟同2.7.節檢液之調製，供作衍生化標準溶液，並依下列條件進行分析。就縮水甘油脂肪酸酯與內部標準品之波峰面積比，與對應之縮水甘油脂肪酸酯濃度，分別製作25~1250 ng/mL之標準曲線。

氣相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：HP-5MS UI毛細管，內膜厚度0.25 μm，內徑0.25 mm × 30 m。

層析管溫度：初溫：50°C，1 min；
 升溫速率：10°C/min；
 中溫：210°C；
 升溫速率：30°C/min；
 終溫：300°C，5 min。

注入器溫度：250°C。

注入量：1 μL。

移動相氣體及流速：氮氣，1 mL/min。

介面溫度：280°C。

離子源溫度：230°C。

離子化模式：EI，70 eV。

注入模式：不分流(splitless)。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)，偵測離子對及碰撞能量如下表：

分析物	離子對		碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z)	> 產物離子(m/z)	
縮水甘油脂肪酸酯	240	> 147*	5
	242	> 147	5
縮水甘油脂肪酸酯-d ₅ (I.S.)	245	> 150	10

*定量離子對

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. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及衍生化標準溶液各1 μL，分別注入氣相層析串聯質譜儀中，依2.8.節條件進行分析，就檢液與衍生化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^(註1)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中縮水甘油脂肪酸酯之含量(μg/kg)^(註2)：

$$\text{檢體中縮水甘油脂肪酸酯之含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V}{M} \times 0.2371$$

C：由標準曲線求得檢液中縮水甘油脂肪酸酯之濃度(ng/mL)

V：檢液最後定容之體積(0.4 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

0.2371：棕櫚酸縮水甘油脂肪酸酯轉換為縮水甘油之轉換因子。

註：1. 相對離子強度由定性離子與定量離子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	± 10
> 20~50	± 15
> 10~20	± 20
≤ 10	± 50

2. 檢體中縮水甘油脂肪酸酯之含量，以縮水甘油計。

附註：1. 本檢驗方法之定量極限為25 μg/kg，以縮水甘油計。

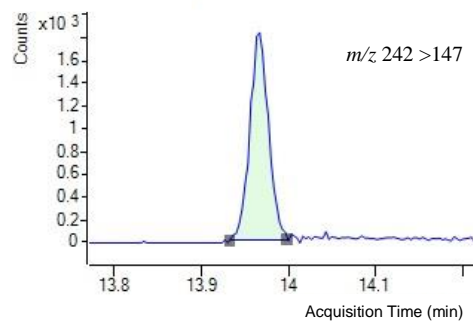
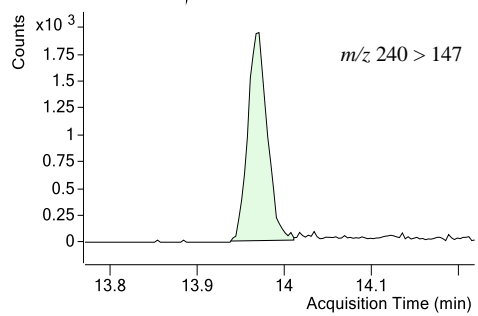
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

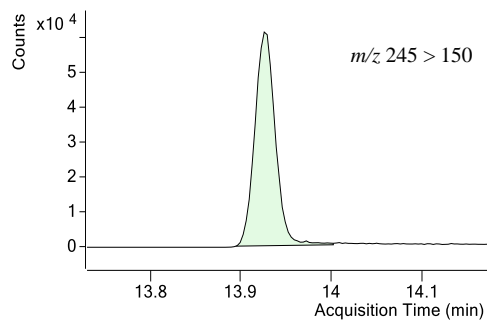
1. Ermacora, A. and Hrncirik, K. 2013. A novel method for simultaneous monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters in oils and fats. J. Am. Oil Chem. Soc. 90: 1-8.
2. Dubois, M., Empl, A. M., Jaudzems, G., Basle, Q. and Konings, E. 2019. Determination of 2- and 3-MCPD as well as 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters (GE) in infant and adult/pediatric nutritional formula by gas chromatography coupled to mass spectrometry method, first action 2018.03. J. AOAC Int. 102: 903-914.

參考層析圖譜

(A)



(B)



圖、以GC-MS/MS分析縮水甘油脂肪酸酯標準品(A)及其同位素內部標準品(B)之MRM圖譜