



經濟部標準檢驗局臺中分局 99 年度
自行研究計畫

食品中抗氧化劑檢驗方法之探討

經濟部標準檢驗局臺中分局 編印

中華民國 99 年 12 月 31 日

本報告書僅供政府機關參考，
請勿轉載

標準檢驗局臺中分局 99 年度自行研究報告提要表			填表人：周曉蕙 填表日期：99.12.31	
研究報告名稱		食品中抗氧化劑檢驗方法之探討		
研究單位 及研究人員		第三課 陳素燕 周曉蕙	研究 期程	自 99 年 01 月 01 日 至 99 年 12 月 31 日
報 告 內 容 提 要				
抗氧化劑為食品中常見添加物，主要用於抑制食品中之氧化反應，以達到延遲食品的劣化的目的，合成抗氧化劑目前以丁基羥基甲氧苯(butylated hydroxyl anisole, BHA)、二丁基羥基甲苯(butylated hydroxyl toluene, BHT)及第三丁基氫醌 (tertiary-butyl hydroquinone, TBHQ)最常使用。本研究第一部分為比較兩種衛生署公告抗氧化劑檢驗法之回收率及最低偵測極限，氣相層析法回收率除 TBHQ 偏低為 26.9%外，BHA 與 BHT 之回收率分別為 87.0%及 90.9%；液相層析法回收率介於 91.7~95.6%，而兩種方法最低偵測極限均低於公告方法及使用限量，線性迴歸相關係數則均可達 0.999 以上。第二部分之定性試驗，確立氣相層析質譜儀最佳化之分析條件，依所得滯留時間及特徵離子進行標準品與樣品間比較鑑別，BHA、BHT 及 TBHQ 特徵離子分別為 137 與 165m/z、205 與 177 m/z 及 123 與 151 m/z，最低偵測極限分別為 2ppm、2ppm 及 5ppm。本研究結果顯示，液相層析法對於 3 種抗氧化劑之回收率優於氣相層析法，同時輔以氣相層析質譜儀之定性檢驗，可減少雜訊干擾，造成誤判情形，以達到縮短檢驗時間，增加時效性，以及節省人力、試藥之目的。				

目錄

目次.....	1
表次.....	2
圖次.....	3
摘要.....	4
壹、前言.....	5
貳、文獻回顧	
一、BHA、BHT 及 TBHQ 等抗氧化劑介紹.....	7
二、各國使用範圍及限量規定.....	9
三、BHA、BHT 及 TBHQ 相關檢驗方法.....	10
參、材料與方法	
一、化學試藥.....	13
二、器具及裝置.....	13
三、方法	
(一) 萃取、淨化及濃縮.....	14
(二) 最低檢出限量試驗.....	15
(三) 回收試驗.....	16
(四) 氣相層析質譜儀定性試驗.....	16
肆、結果與討論	
一、標準曲線之線性關係.....	17
二、最低檢出限量.....	18
三、添加回收試驗.....	18
四、氣相層析質譜儀定性試驗.....	20
伍、結論.....	22
陸、參考文獻.....	23

表目錄

表一、 台灣之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範.....	25
表二、 歐盟之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範.....	26
表三、 美國之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範.....	27
表四、 澳洲之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用抗氧化劑規範.....	28
表五、 日本之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範.....	29
表六、 BHA、BHT 及 TBHQ 於氣相層析儀中標準曲線之線性迴歸方程式和相關係數及滯留時間.....	30
表七、 BHA、BHT 及 TBHQ 於液相層析儀中標準曲線之線性迴歸方程式和相關係數及滯留時間.....	31
表八、 食用油脂中添加 BHA、BHT 及 TBHQ 於氣相層析法之回收率.....	32
表九、 食用油脂中 BHA、BHT 及 TBHQ 於液相層析儀方之回收率.....	33
表十、 BHA、BHT 及 TBHQ 於氣相層析質譜儀中之滯留時間及特徵離子.....	34

圖目錄

圖一、	BHA、BHT 及 TBHQ 化學結構.....	35
圖二、	BHA、BHT 及 TBHQ 之氣相層析圖.....	36
圖三、	BHA、BHT 及 TBHQ 之液相層析圖及光譜圖.....	37
圖四、	BHA、BHT 及 TBHQ 最低檢出限量之氣相層析圖...	38
圖五、	BHA、BHT 及 TBHQ 最低檢出限量之液相層析圖...	39
圖六、	BHA、BHT 及 TBHQ(a)添加於食用油脂(b)空白基 質之氣相層析圖.....	40
圖七、	BHA、BHT 及 TBHQ(a)添加於食用油脂(b)空白基 質之液相層析圖.....	41
圖八、	BHA 之氣相層析質譜圖.....	42
圖九、	BHT 之氣相層析質譜圖.....	43
圖十、	TBHQ 之氣相層析質譜圖.....	44
圖十一、	BHA 最低偵測極限之氣相層析質譜圖.....	45
圖十二、	BHT 最低偵測極限之氣相層析質譜圖.....	46
圖十三、	TBHQ 最低偵測極限之氣相層析質譜圖.....	47

摘要

抗氧化劑為食品中常見添加物，主要用於抑制食品中之氧化反應，以達到延遲食品的劣化的目的，合成抗氧化劑目前以丁基羥基甲氧苯(butylated hydroxyl anisole, BHA)、二丁基羥基甲苯(butylated hydroxyl toluene, BHT)及第三丁基氫醌 (tertiary-butyl hydroquinone, TBHQ)最常使用。本研究第一部分為比較兩種衛生署公告抗氧化劑檢驗法之回收率及最低偵測極限，氣相層析法回收率除 TBHQ 偏低為 26.9%外，BHA 與 BHT 之回收率分別為 87.0%及 90.9%；液相層析法回收率介於 91.7~95.6%，而兩種方法最低偵測極限均低於公告方法及使用限量，線性迴歸相關係數則均可達 0.999 以上。第二部分之定性試驗，確立氣相層析質譜儀最佳化之分析條件，依所得滯留時間及特徵離子進行標準品與樣品間比較鑑別，BHA、BHT 及 TBHQ 特徵離子分別為 137 與 165m/z、205 與 177 m/z 及 123 與 151 m/z，最低偵測極限分別為 2ppm、2ppm 及 5ppm。本研究結果顯示，液相層析法對於 3 種抗氧化劑之回收率優於氣相層析法，同時輔以氣相層析質譜儀之定性檢驗，可減少雜訊干擾，造成誤判情形，以達到縮短檢驗時間，增加時效性，以及節省人力、試藥之目的。

關鍵詞：抗氧化劑、BHA、BHT、TBHQ、氣相層析法、液相層析法、氣相層析質譜儀

壹、前言

食品中含油成分、食用油脂及脂肪除提供人體所需營養素外，亦可成為食品香氣及風味來源之一，卻可能因脂質氧化或酸敗，影響食品風味，亦產生對人體有害物質，例如自由基，成為健康的潛在危害因子⁽¹⁾，因此需要抑制或阻斷脂質氧化生成，減少食品劣化，避免對人類健康產生危害，而添加抗氧化劑為抑制脂質氧化的方式之一。抗氧化劑種類繁多，大致可分天然及人工合成，由於人工合成抗氧化劑較天然者穩定性高、便宜且易利用，因此普遍使用於食品工業⁽²⁾。目前以丁基羥基甲氧苯(butylated hydroxyl anisole, BHA)、二丁基羥基甲苯(butylated hydroxyl toluene, BHT)及第三丁基氫醌 (tertiary-butyl hydroquinone, TBHQ)等酚類化合物與沒食子酸丙酯(propyl gallate, PG)等最常使用⁽³⁾，我國對於准用抗氧化劑其使用範圍及用量標準均有明文規定⁽⁴⁾。

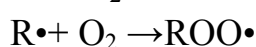
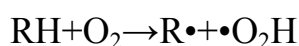
為配合食品安全衛生管理，及提供食品製造業者改善品質，並達到衛生標準，衛生署已公告相關檢驗方法，包括以氣相層析法、薄層層析法及高效能液相層析法等進行檢驗^(5,6)。除上述方法外，文獻中以質譜儀分析輔助確認之相關檢驗方法或研究並不多見。本研究藉由比較兩種衛生署公告的檢驗方法，探討 BHA、BHT 及 TBHQ 等 3 種抗氧化劑於氣相層析儀 (GC) 和高效液相層析儀 (HPLC) 中之回

收率、線性關係及最低偵測極限。另外，鑒於試驗中可能因雜訊造成誤判，本研究第二部分利用氣相層析質譜儀(GC/MS)進行定性試驗，找出最佳化之分析條件，建立快篩方法，以達到縮短檢驗時間，增加時效性、節省人力及試藥之目的。

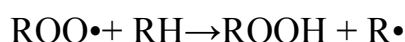
貳、文獻回顧

一、BHA、BHT 及 TBHQ 等抗氧化劑介紹

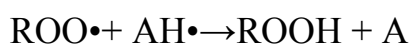
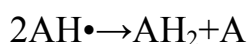
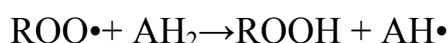
抗氧化劑主要功用為延緩油脂的氧化劣變的現象。在油脂氧化的連鎖反應中，抗氧化劑本身受氧化，當氧對油脂或食品作用時，其油脂分子經活化而產生自由基（R•）：



這些自由基繼續與油脂分子反應產生連鎖反應的結果：



若有抗氧化劑（AH₂）存在，則：



在酸敗氧化過程中產生的自由基則被消耗排除掉，使氧化反應中斷而抑制氧化現象。抗氧化的機轉，是因提供結構上的氫給自由基形成穩定的氫過氧化物或將油脂還原；而抗氧化劑自身抗氧化自由基分子，因穩定性高不會參與其他反應而終止連鎖反應，達到抗氧化效果。

抗氧化劑依功能可分為自由基終止型（ free radical terminator ）、還原劑或清除者（ reducing agent or oxygen scavenging ）、鉗合劑型（ chelating agent ）三類⁽⁷⁾。 BHA 、BHT 及TBHQ即屬於自由基終止型，其抗氧化作用為將羧基上的氧原

子轉移到氫過氧化物的自由基 $\text{ROO}\cdot$ ，成為自由基清除者，終止自由基氧化連鎖反應⁽⁸⁾。

抗氧化劑在 1940 年代，因 PG 抗氧化效果之研究開始受到重視，1947 年起 BHA 為第一個被使用於商業化食品的合成抗氧化劑，其後美國分別於 1954 年及 1972 年准許 BHT 及 TBHQ 使用於食品中⁽⁹⁾。使用範圍包括食用油脂、冷凍魚肉貝類、穀物類、馬鈴薯產品、口香糖和汽水中，目前延伸使用於化妝品唇膏及眼影。BHA、BHT 及 TBHQ 基本特性如下⁽¹⁰⁾(化學結構如圖一)：

(1) BHA (butylated hydroxyanisole)

由二個化合物 3-tertiary-butyl-4-hydroxyanisole、2-tertiary-butyl-4-hydroxyanisole 混合而得，不溶於水但溶解於油脂、石油、石蠟及乙醇。耐高溫，不論油煎、高溫烘焙皆不會引起色、香、味之改變。可和 BHT、TBHQ 與 PG 一起使用，而產生所謂相乘作用，提供更佳的抗氧化效果，添加量不得高於總油脂含量之 0.02%⁽¹¹⁾。

(2) BHT (butylated hydroxytoluene)

白色結晶或白色粉末，可溶解於油脂、乙醇，但不溶解於水。耐高溫，適用於油煎與高溫烘烤。可與 BHA、TBHQ 與 PG 一起使用，添加量不得高於總油脂含量之 0.02%⁽¹¹⁾。

(3) TBHQ (tertiary butylhydroquinone)

白或黃褐色之結晶，溶解於甘油、乙醇，微溶於脂肪但不溶於水，可用於油炸，但無法高溫烘焙，與檸檬酸共同使用時，效果更佳⁽²⁾。可與BHA、BHT合用，但不可與PG一起使用，添加量仍是不得高於總油脂含量之0.02%⁽¹¹⁾。TBHQ被視為防止油炸油氧化的最佳抗氧化劑，主要適用於酥油及其他熔點較高油脂，在液態油脂轉換成半固態油脂之氫化作用，增加氧化穩定度及改善顏色，但價格昂貴⁽⁷⁾。

二、各國使用範圍及限量規定

我國使用BHA、BHT及TBHQ用量，須依據衛生署「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」第三類抗氧化劑之標準使用（表一），BHA及BHT准用範圍較廣，包括冷凍魚肉貝類、冷凍鯨魚肉之浸漬液、口香糖、食用油脂、乳酪、奶油、魚貝類乾製品及鹽藏品、穀物類早餐、脫水馬鈴薯產品和馬鈴薯顆粒中，使用限量介於0.010~1.0g/kg，但TBHQ只允許使用於油脂、乳酪及奶油中⁽⁴⁾，使用限量為0.20g/kg。

其他國家部份，Codex Alimentarius（國際食品法典委員會）由於各會員國的消費習慣、經濟因素、食品製作方式及技術等考量不同，並未有統一規定，只提供ADI（Acceptable Daily Intake,

每日容許攝取量)及相關毒性試驗資訊供會員國參考。歐盟(Europen Union, EU)准用部分如表二所示，TBHQ 在歐盟規定上不得使用。美國對於抗氧化劑使用上規定則依食品類別不同使用量而有所差異(表三)，BHA、BHT 及 TBHQ 等合成抗氧化劑使用總和含量不得超過 200 mg/kg 油脂或脂肪。在澳洲，雖然 BHA、BHT 及 TBHQ 為允用抗氧化劑(表四)，但僅限於油脂或含油食物，對於魚類或魚製品(包括蝦類、龍蝦類)、肉類或肉製品(包括鹽漬、醃漬或烹煮過)及蔬果或蔬菜製品(包括生已去皮馬鈴薯類)等只准使用天然抗氧化劑。日本的相關規範如表五，其規定與我國相同亦屬於正面表列管理⁽¹²⁾。

三、BHA、BHT 及 TBHQ 相關檢驗方法

文獻上食品中抗氧化劑檢驗方法，萃取方面計有蒸餾抽出法(Steam Extraction)、液-液抽出法(Liquid-Liquid Extraction)、熱溶媒抽出法(Hot Solvent Extraction)、冷溶媒抽出法(Cold Solvent Extraction)、柱層色層分離法(Column Chromatography)等。測定方法則有比色法(Colorimetric Method)、紫外線分光光度法(UV Spectrophotometric Method)、濾紙及薄層層析法(Paper and Thin-Layer Chromatographic Method)、氣相層析法(Gas Chromatographic Method)、液相層析法(High-Performance Liquid

Chromatographic Method) 及氣相層析質譜儀法 (Gas Chromatograph/Tandem Mass Spectrometer Method) 等⁽³⁾。

氣相層析檢驗法，Min 及 Schweizer 以不需衍生化方式，將 BHA 200ppm、BHT 200ppm 及 TBHQ 100ppm，添加於油中，以氣相層析儀分析後分別測得 BHA、BHT 及 TBHQ 為 193~203ppm、195~207ppm 及 98~106ppm，方法偵測極限為 10ppm⁽¹³⁾。Icenhour 及 Van Dalah 以乙酸乙酯萃取魚油中 TBHQ 並添加衍生化試劑 (BSTFA) 後，再以氣相層析儀分析，其回收率介於 95~113%⁽¹⁴⁾。Ohta 等人分別添加 BHA、BHT 及 TBHQ 各 100ppm 於口香糖中，利用乙腈萃取後，再以氣相層析儀及氣相層析質譜儀分析，其回收率分別為 81.4~98.9%、80.7%~106% 及 70.8~116%，其氣相層析儀偵測極限為 1ppm，氣相層析質譜儀偵測極限為 0.1ppm⁽¹⁵⁾。Choong 和 Lin 利用添加衍生化試劑 (TMAH) 將食用油質中抗氧化劑 BHA、BHT 及 TBHQ 進行甲基化，並添加 14C-OH 為內標，以氣相層析儀分析，回收率介於 94~106%之間⁽²⁾。Lin 等人以氣相層析儀分析由乙酸乙酯萃取口香糖中 BHT 及 BHA，回收率分別介於 99~101%及 94~99%⁽¹⁶⁾。

液相層析檢驗法上，Indyk 及 Woollard 利用正相管柱之液相層析系統，搭配以正己烷、二氯甲烷及乙腈不同比例之移動相，

可分析出包括 BHA、BHT 及 TBHQ 等在內共 6 種抗氧化劑⁽¹⁷⁾。Andrikopoulos 等人則以逆相 C₁₈ 管柱進行液相層析分析，並以水、磷酸 (pH 3)、乙腈、甲醇及異丙醇等溶劑，以不同比例混合，分析 BHA、BHT 及 TBHQ 等在內共 9 種抗氧化劑⁽¹⁸⁾。Yang 等人則以正戊烷溶解檢體，利用固相萃取以異丙醇及乙腈混和液溶離，再以逆相液相層析法分析 BHA、BHT、TBHQ、PG 及 NDGA 等 5 種抗氧化劑，回收率範圍介於 90.5~100.7%⁽³⁾。

我國目前已公告方法包括氣相層析法：主要以液-液抽出法萃取，將樣品以經飽和正戊烷乙腈溶液萃取，再以氣相層析儀分析；液相層析法：樣品利用正戊烷溶解後，以固相匣萃取，搭配高效能液相層析儀進行分析；及以濾紙及薄層層析法測定。在相關文獻資料收集上，發現以氣相層析質譜儀進行研究或文獻並不多見，因此本研究除比較氣相層析法及液相層析法兩種公告方法之回收率及最低偵測極限，亦利用氣相層析質譜儀進行定性試驗，找出最佳化之分析條件，增加時效，並避免檢驗結果因雜訊干擾造成誤判。

參、材料與方法

一、化學試藥

乙腈採用液相層析級；丙酮、正戊烷、異丙醇及醋酸均採用試藥特級；第三丁基氫醌、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯採對照用標準品。

二、器具及裝置

(一)分液漏斗：250mL

(二)定量瓶：10mL

(三)固相萃取匣：C₁₈，1g，6mL, Harbor City, CA, USA。

(四)減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)：BUCHI Rotavapor R-2000

(五)固相萃取減壓裝置：Supelco visiprep 24TM DL

(六)高效液相層析儀(High performance liquid chromatograph,

HPLC)：

檢出器：Waters 2996 photodiode Array Detector

溶媒輸送系統：Separations Module 2695

(七)氣相層析儀(Gas chromatograph, GC)：Varian 3800 with FID

(Flame Ionization detector)，USA.

(八)氣相層析離子阱質譜分析儀(Gas chromatograph/tandem mass

spectrometer, GC/MS/MS)：Varian CP 3800 Gas chromatograph,

Varian 4000 GC/MS/MS，Varian Inc., CA,USA。

三、方法

(一) 萃取、淨化及濃縮

(1) 氣相層析法:

參考行政院衛生署公告之「食品中抗氧化劑之檢驗方法(一)」⁽⁵⁾，精確秤取油脂檢體 5g，加入正戊烷 20 mL 溶解後，移入分液漏斗中，以每次 100 mL 之飽和正戊烷乙腈溶液萃取三次，合併乙腈萃取液，於 40℃ 減壓濃縮，去除溶媒，供作檢液。

氣相層析儀測定條件:

檢出器：火焰離子檢出器(Flame Ionization detector)

層析管柱：DB-1，內徑 0.53mm X 30m

管柱溫度：初溫 140 °C，維持 10 min，溫度上升速率 10 °C/min，

終溫 145°C，維持 3.5 min，第二段溫度上升速率 10

°C/min，終溫 150°C，維持 2 min，第三段溫度上升

速率 10 °C/min，終溫 170°C，維持 5 min。

注入器溫度：200°C

偵測器溫度：220°C

移動相氣體及壓力流速：氮氣，10psi

(2)液相層析法

參考行政院衛生署公告之「食品中抗氧化劑之檢驗方法—油脂中沒食子酸正丙酯、第三丁基氫醌、正二氫愈創酸、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯之檢驗」⁽⁶⁾，精確稱取油脂檢體 2g，加入少量正戊烷溶解後，定容至 10mL。取其中 1mL 注入固相真空萃取槽上之層析管中，抽氣過濾，收集流出液於 5mL 刻度試管中。然後用異丙醇：乙腈(1:1，V/V)溶液每次 1mL 分別沖提三次，再以含 5%醋酸之乙醇溶液 1mL 沖提，合併收集沖提液於 5 mL 刻度試管中，最後以異丙醇：乙腈(1:1，V/V)溶液定容至 5 mL，充份混合，供作檢液。

液相層析儀測定條件：

紫外光檢出器：波長 280nm

層析管柱：Lichrospher 100 RP-18,5 μ m，內徑 4mm x 25cm

移動相溶液：A 液為 5%醋酸溶液，B 液為乙腈與醋酸以 95:5(V/V)

之比例混合。在 10 分鐘內，A 液依線性遞減方式

由 70%遞減至 0%；於此同時 B 液依線性遞增方式

由 30%遞增至 100%，並持續保持 4 分鐘。

(二) 最低檢出限量試驗

以確定無添加抗氧化劑之食用油脂為基質，加入適量抗氧

化劑標準品，依前述兩種公告方法製成檢液，以雜訊比(S/N ratio)

大於 3 作為判定基準，估算其最低檢出限量。

(三) 回收試驗

以確定無添加抗氧化劑之食用油脂為基質，加入抗氧化劑標準品溶液(氣相層析法為 20 μ g/mL、液相層析法為 10 μ g/mL 之檢體濃度)，靜置 5 分鐘，再依前述公告方法進行三重複試驗，同時進行空白試驗分析，求其回收率。

(四) 氣相層析質譜儀定性試驗

取檢液及標準溶液，注入氣相層析質譜儀中，以檢液與標準品所得之滯留時間及特徵離子比較鑑別。

氣相層析質譜儀測定條件:

質譜儀種類:離子阱(Ion Trap)

層析管柱：DB-5，內徑 0.53mm X 30m

管柱溫度：初溫 100 °C，維持 3 min，溫度上升速率 15 °C/min，

終溫 280°C，維持 10min

注入器溫度：290°C

注入量：1 μ L

移動相氣體：氮氣，流速 1 mL/min

離子化模式：電子撞擊游離

肆、結果與討論

一、標準曲線之線性關係

(一)氣相層析法

取 BHA、BHT 及 TBHQ 標準品粉末，以丙酮稀釋配成 1~100 μ g/mL 等一系列濃度，供作標準液。精確量取標準溶液 1 μ L 注入氣相層析儀，其層析圖譜如圖二。以濃度為橫軸，面積為縱軸，繪製標準曲線，再以迴歸分析計算直線方程式相關係數，及各抗氧化劑滯留時間如表六。所得三種抗氧化劑之相關係數(R square, R^2)皆於 0.999 以上，顯示線性關係良好。

(二)液相層析法

取 BHA、BHT 及 TBHQ 標準品粉末，以異丙醇：乙腈(1:1, V/V)溶液配成 2~100 μ g/mL 等一系列濃度，供作標準液。精確量取標準溶液 20 μ L 注入液相層析儀，其層析圖及光譜圖如圖三。以濃度為橫軸，面積為縱軸，繪製標準曲線，再以迴歸分析計算直線方程式及相關係數，及各抗氧化劑滯留時間如表七。所得三種抗氧化劑之相關係數皆於 0.999 以上，顯示線性關係良好。

二、最低檢出限量

依前述公告方法之檢驗流程進行最低檢出限量試驗，分別添加抗氧化劑標準品於食用油脂檢體中，以S/N值大於3作為最低檢出限量，於氣相層析法中，BHA及BHT之最低檢出限量皆為2ppm、TBHQ之最低檢出限量為5ppm，其氣相層析圖如圖四，而公告方法中未註明該方法最低檢出限量⁽⁵⁾；液相層析法中，BHA、BHT及TBHQ之檢出限量皆為0.25ppm，其液相層析圖如圖五，低於公告方法所註明之最低檢出限量為10ppm⁽⁶⁾。本研究之兩種檢驗方法其最低檢出限量均低於國內BHA、BHT及TBHQ使用量標準（10ppm以下）⁽⁴⁾。

三、添加回收試驗

(一)氣相層析法

本研究添加回收試驗採用食用油脂為基質進行三重複添加回收試驗，3種抗氧化劑標準品外添加於食用油脂空白基質之氣相層析圖，如圖六，比較(a)、(b)兩圖，可看出此檢驗法淨化效果良好，可有效去除與標準品相同滯留時間之干擾物質。氣相層析法中，BHA、BHT及TBHQ之外添加濃度皆為20ppm，其回收率分別為87.0、90.9、及26.9%，變異係數為1.0~4.3%，如

表八。TBHQ 回收率低於 BHA 及 BHT，這可能是因為從樣品基質中分離出 TBHQ 需要多種方法或程序，且在蒸發濃縮步驟可能造成 TBHQ 損失，導致回收率下降⁽¹⁴⁾，另外，文獻亦指出，利用衍生化，可有助於 TBHQ 與管柱結合能力以利分析，提高回收率，而公告方法並未進行衍生化。Denis Page 之文獻中亦指出，在一項多個實驗室參與的研究中，同樣發生 TBHQ 回收率偏低之情形，推測可能原因為樣品在經乙腈萃取，及 40°C 水浴下蒸發濃縮過程發生氧化作用，TBHQ 參與此時之抗氧化作用，而造成低回收率⁽¹⁹⁾。

(二)液相層析法

本研究添加回收試驗採用食用油脂為基質進行三重複添加回收試驗，3 種抗氧化劑標準品外添加於食用油脂空白基質之液相層析圖，如圖七。液相層析法中回收率，BHA、BHT 及 TBHQ 之添加濃度為 10ppm，其回收率分別為 95.6、95.2 及 91.7%，變異係數為 2.9~5.3%，如表九，顯示 3 種抗氧化劑回收率均可達九成以上。Yang 等人之研究，將 A.O.A.C.1984 年版公佈之液—液抽出法抗氧化劑檢驗法，與以固相萃取淨化後液相層析法進行比較，結果顯示固相萃取的結果優於液—液抽出法⁽³⁾，固相萃取之

回收率介於 90.5~100.7%。進一步比較本研究之兩種公告方法，可發現使用固相萃取之液相層析法回收率，同樣高於使用液-液抽出法之氣相層析法。該文獻並指出，使用固相萃取並以液相層析儀檢驗，可使用較少溶媒，且操作簡便迅速。

本研究兩種公告方法對於 BHA 及 BHT 皆有不錯回收率，但 TBHQ 回收率差異較大，推測可能因為氣相層析法使用液-液萃取，長時間蒸發濃縮，造成 TBHQ 因抗氧化作用損失，回收率偏低。而液相層析法因固相萃取中的淨化處理，使樣品基質不再複雜，降低雜訊干擾，增加 TBHQ 於液相層析系統感度，而有較高回收率。

四、氣相層析質譜儀定性試驗

將標準品溶液 1 μ L，注入氣相層析質譜儀中，參照前述測定條件，進行分析，所得 BHA、BHT 及 TBHQ 之滯留時間及特徵離子，如表十，其氣相層析質譜圖如圖八、九、十。另將添加回收試驗所得之檢液，取 1 μ L 注入氣相層析質譜儀中，所得 BHA、BHT 及 TBHQ 之最低檢出限量分別為 2ppm、2ppm 及 5ppm，其氣相層析質譜圖如圖十一、十二、十三。Ohta 等人以氣相層析質譜儀分析口香糖中 BHT、BHA 及 TBHQ，其選擇之特徵離子分

別為 180 與 165m/z、220 與 205m/z、166 與 151m/z⁽¹⁵⁾，偵測極限為 1ppm。該文獻顯示，當 BHT、BHA 及 TBHQ 在高濃度添加試驗中，可使用氣相層析儀進行定量，但在低濃度（5ppm）添加試驗，氣相層析儀及氣相層析質譜儀結果差異甚大，可能因雜訊干擾、積分基線處理不當等影響積分結果，反而造成回收率達 200%以上，建議在低濃度時使用氣相層析質譜儀定量較佳⁽¹⁵⁾。

伍、結論

本研究藉由比較兩種公告方法之標準曲線線性關係、最低檢出限量及添加回收試驗，發現以氣相層析法及液相層析法對於 BHA 及 BHT 均有不錯的回收率，氣相層析法中 BHA 及 BHT 之回收率分別為 87.0%及 90.9%，液相層析法中回收率分別為 95.6%及 95.2%，但對於 TBHQ 之回收率差異較大，於氣相層析法與液相層析法中回收率分別為 26.9%與 91.7%，使用液相層析法除了有較佳分析效果外，亦可節省大量溶媒的使用，符合現今環保趨勢。在定性試驗中，利用氣相層析質譜儀找出 BHA、BHT 及 TBHQ 分析之最佳化條件，有助於結果核判，避免雜訊干擾，造成誤判，增加檢驗準確度。

陸、參考文獻

1. Kubow, S. 1990. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Tren. Food Sci.* 1:677-770.
2. Choong, Y. M. and Lin, H. J. 2001. Gas chromatographic determination of synthetic antioxidants in edible fat and oil-a simple methylation method. *J. Food Drug Anal.* 9:20-26.
3. Yang, S. S., Lee, M. J., Lee, S. C., Su, S. J. and Chou, S. S. 1993. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in fats and oils. *J. Food Drug Anal.* 1:287-296.
4. <http://www.fda.gov.tw/> (最後檢視日期:99 年 12 月 28 日)
5. 行政院衛生署。1988。衛署食字第 707604 號公告。
6. 行政院衛生署。2001。衛署食字第 0900018531 號公告。
7. Dziezak, J. D. 1986. Preservatives: Antioxidants. *Food Tech.* 40:94-102.
8. 江文霞。2007。抗氧化劑 BHA 及 BHT 之簡介。食品工業 39:35-37。
9. Robards, K. and Dill, S. 1987. Analytical chemistry of synthetic food antioxidants-a review. *Analyst.* 112:933-943.
10. 姜淑鏞。2001。省產蘿蔔之抗氧化性研究。大葉大學食品工程學系碩士班碩士論文。
11. 高馥君及李敏雄。1998。食品保存與抗氧化劑。食品工業 30:17-24。
12. Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. 2001. The regulation of antioxidants in food. In "Antioxidants in food".1st ed. pp267-284. Woodhead Publishing Ltd. Philadelphia, U. S. A.
13. Min, D. B. and Schweizer, D. 1983. Gas chromatographic determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and tertiarybutyl hydroquinone in soybean oil. *J. Food Sci.* 48:73-74.
14. Icenhour, T. P. and Van Dolah, F. M. 1991. A rapid method for analysis of tert-butyl hydroquinone(TBHQ) in ethyl esters of fish oil. *JAACS* 68:659-661.
15. Ohta, M., Narita, M., Miyoshi, T., Itoyama, T., Kimura, M., Kobayashi, M., Ochi, R., Sekiguchi, Y., Koiguchi, S., Hirahara, Y., Hasegawa, M., Miyata, M., Kamakura, K., Maeda, K., Otomasu, M.

- and Ishiwata, H.1997. Aanalysis of BHA, BHT and TBHQ in chewing gum by GC and GC/MS. J. Food Hygi. Soc. Japan 38:78-84.
16. Lin, H. J., Wang, M. L., Choong, Y. M., Chen, C. W., Hwang, B. S., Tsai, S. L., Chung L. C. and Yang, M. H. 2003. Effects of extraction solvent on gas chromatographic quantitation of BHT and BHA in chewing gum. J. Food Drug Anal. 11:141-147. J. Food Drug Anal.
 17. Indyk, H. and Woollard, D.C. 1986. Antioxidant analysis un edible oils and fats by normal phase high-performance liquid chromatography. J Chrom. 356:401-408.
 18. Andrlkopoulos, N.K., Brueschweiler H., Felber, H. and Taeschler, Ch. 1991. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. JAOCS 68:359-364.
 19. Denis Page, B. 1983. High performance liquid chromatographic determination of seven antioxidants in oil and lard: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66:727-745.

表一、台灣之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範

Table 1. The regulation of BHA, BHT and TBHQ in Taiwan

編號	品名	使用食品範圍及限量
001	二丁基羥基甲苯 Dibutyl Hydroxy Toluene (BHT)	1.本品可使用於冷凍魚貝類及冷凍鯨魚肉之浸漬液；用量為1.0g/kg以下。 2.本品可使用於口香糖及泡泡糖；用量為0.75g/kg以下。 3.本品可使用於油脂、乳酪（butter）、奶油（cream）、魚貝類乾製品及鹽藏品；用量為0.20g/kg以下。 4.本品可使用於脫水馬鈴薯片（ flakes ） 或粉、脫水甘薯片（ flakes ），及其他乾燥穀類早餐；用量為0.05g/kg 以下。 5.本品可使用於馬鈴薯顆粒（ granules ）；用量為0.010g/kg 以下。 6.本品可使用於膠囊狀、錠狀食品；用量為0.40 g/kg 以下。
002	丁基羥基甲氧苯 Butyl Hydroxy Anisole (BHA)	1.本品可使用於冷凍魚貝類及冷凍鯨魚肉之浸漬液；用量為1.0g/kg以下。 2.本品可使用於口香糖及泡泡糖；用量為0.75g/kg以下。 3.本品可使用於油脂、乳酪（butter）、奶油（cream）、魚貝類乾製品及鹽藏品；用量為0.20g/kg以下。 4.本品可使用於脫水馬鈴薯片（ flakes ） 或粉、脫水甘薯片（ flakes ），及其他乾燥穀類早餐；用量為0.05g/kg 以下。 5.本品可使用於馬鈴薯顆粒（ granules ）；用量為0.010g/kg 以下。 6.本品可使用於膠囊狀、錠狀食品；用量為0.40 g/kg 以下。
013	第三丁基氫醌 Tertiary Butyl Hydroquinone	本品可使用於油脂、乳酪及奶油；用量為0.20g/kg以下。

表二、歐盟之 BHA、 BHT 及 TBHQ 使用規範

Table 2. The regulation of BHA, BHT and TBHQ in the European Union

Name	Food	Maximum level (mg/kg)
BHA	frying oil and frying fat	100* (BHT)
BHT	(excluding olive pomace oil) lard; fish oil; beef, poultry and sheep fat	both expressed o fat
	cake mixes	200 (gallates and BHA,
	cereal-based snack foods	individually or in
	milk powder	combination)
	dehydrated soups and broths	
	saucers	
	dehydrated meat	expressed on fat
	processed nuts	
	seasoning and condiments	
	pre-cooked cereals	
	dehydrated potatoes	25 (gallates and BHA,
		individually or in
		combination)
	chewing gum	400 (gallates, BHA and
	dietary supplements	BHT individually or in
		combination)

*When a combination of gallates, BHA and BHT are used, the individual levels must be reduced proportionally

表三、美國之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範

Table 3. The regulation of BHA, BHT and TBHQ in the United States

Foodstuff	Antioxidant	Maximum level (mg/kg)
non-alcoholic beverages	BHA	2
(from dry mixes)	BHT	prohibited
dry mixes for beverages	BHA	90
	BHT	prohibited
chewing gum	BHA	1000
	BHT	
animal fat, rendered	BHA	100 singly or 200 combined
animal fat plus vegetable fat, rendered	BHT	TBHQ should not be used in combination with glycine, propyl gallate or guaiac resin
	TBHQ	200
margarine	BHA	
	BHT	TBHQ should not be used in combination with glycine, ascorbyl palmitate or stearate
	TBHQ	200(total content)
shrimp, frozen raw breaded	BHA	
	BHT	
fruit, glazed, diced, dry	BHA	32
potato granules	BHA	10
potato flakes	BHT	50
meat, dried	BHA	100 singly or combined
	BHT	TBHQ and propyl gallate should not be used in combination
	TBHQ	
sausage, dry	BHA	30 singly or 60 combined
	BHT	TBHQ and propyl gallate should not be used in combination
	TBHQ	
sausage, fresh Italian sausage	BHT	100 singly or 200 combined
products, fresh beef patties	TBHQ	TBHQ and propyl gallate should not be used in combination
pizza topping, raw and cooked		
meatballs, raw and cooked		
poultry and poultry products		
breakfast cereal, dry	BHA	50
	BHT	
desserts(from dry mix)	BHA	2
emulsion stabilisers	BHA	200
	BHT	
flavouring substances	BHA	500 based on oil content
mixes for desserts	BHA	90
yeast(active, dry)	BHA	1000

表四、澳洲之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用抗氧化劑規範

Table 4. The regulation of BHA, BHT and TBHQ in Australia

Group	Name	Maximum level (%)
essential oils	BHA	0.1
	TBHQ	0.1
fats and oils, other table spreads	BHA	0.02
	TBHQ	0.02

表五、日本之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範

Table 5. The regulation of BHA, BHT and TBHQ in Japanese

Antioxidant	Limitation or restriction	Maximum permitted level (mg/kg)
BHA ^a	butter	200
	fats and oils	200
	frozen fish, shellfish, and whale meat(for dipping solution)	1000
	mashed potato(dried)	200
	salted fish and shellfish	200
	dried fish and shellfish	200
BHT ^b	butter	200
	chewing gum	750
	fats and oils	200
	frozen fish, shellfish, and whale meat(for dipping solution)	1000
	mashed potato(dried)	200
	salted fish and shellfish	200
	dried fish and shellfish	200

^a if used in combination with BHT, total amount of both antioxidants must not exceed permitted level

^b if used in combination with BHA, total amount of both antioxidants must not exceed permitted level

表六、BHA、BHT 及 TBHQ 於氣相層析儀中標準曲線之線性迴歸方程式和相關係數及滯留時間

Table 6. Linear regression equations, coefficients of standard curve, and retention time for BHA, BHT and TBHQ by GC

Antioxidants	R square	Linear equation	Retention time (min)
BHA	0.9998	$Y=4113.1X+6933.1$	6.191
BHT	0.9998	$Y=5131.8X+920.47$	7.337
TBHQ	0.9998	$Y=4101.9X+2653.8$	7.897

表七、BHA、BHT 及 TBHQ 於液相層析儀中標準曲線之線性迴歸方程式和相關係數及滯留時間

Table 7. Linear regression equations, coefficients of standard curve, and retention time for BHA, BHT and TBHQ by HPLC

Antioxidants	R square	Linear equation	Retention time (min)
BHA	0.9997	$Y=19200X-11700$	8.904
BHT	0.9997	$Y=12600X+5510$	13.534
TBHQ	0.9998	$Y=17300X-14300$	5.979

表八、食用油脂中添加 BHA、BHT 及 TBHQ 於氣相層析儀方法之回收率

Table 8. Recoveries of BHA, BHT and TBHQ spiked into edible oil by GC

Antioxidants	Spike level (ppm)	Recovery ^a (%)
BHA	20	87.0±1.9(2.2) ^b
BHT	20	90.9±0.9(1.0)
TBHQ	20	26.9±1.2(4.3)

^a Average of triplicate.

^b Means $\pm$ standard deviation, value in parenthesis is coefficient of variation (CV,%)

表九、食用油脂中 BHA、BHT 及 TBHQ 於液相層析儀方法之回收率

Table 9. Recoveries of BHA, BHT and TBHQ spiked into edible oil by HPLC

Antioxidants	Spike level (ppm)	Recovery ^a (%)
BHA	10	95.6±2.8(2.9) ^b
BHT	10	95.2±5.0(5.3)
TBHQ	10	91.7±2.9(3.2)

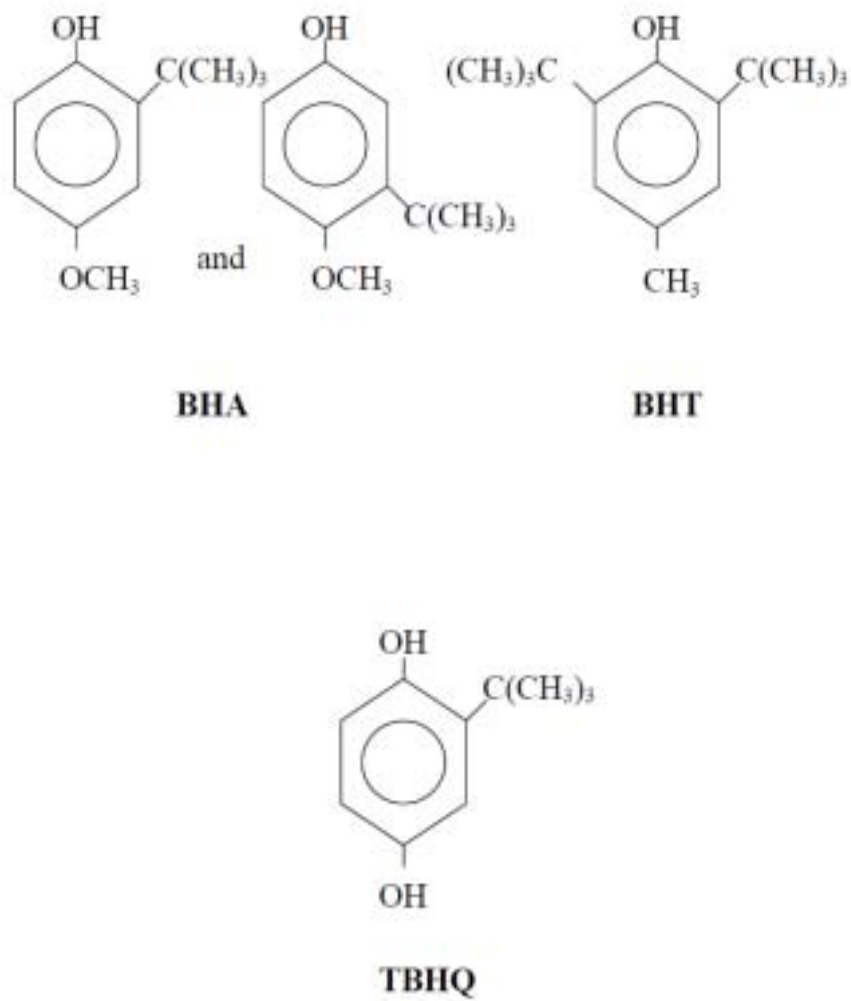
^a Average of triplicate.

^b Means $\pm$ standard deviation, value in parenthesis is coefficient of variation (CV,%)

表十、BHA、BHT 及 TBHQ 於氣相層析質譜儀中之滯留時間及特徵離子

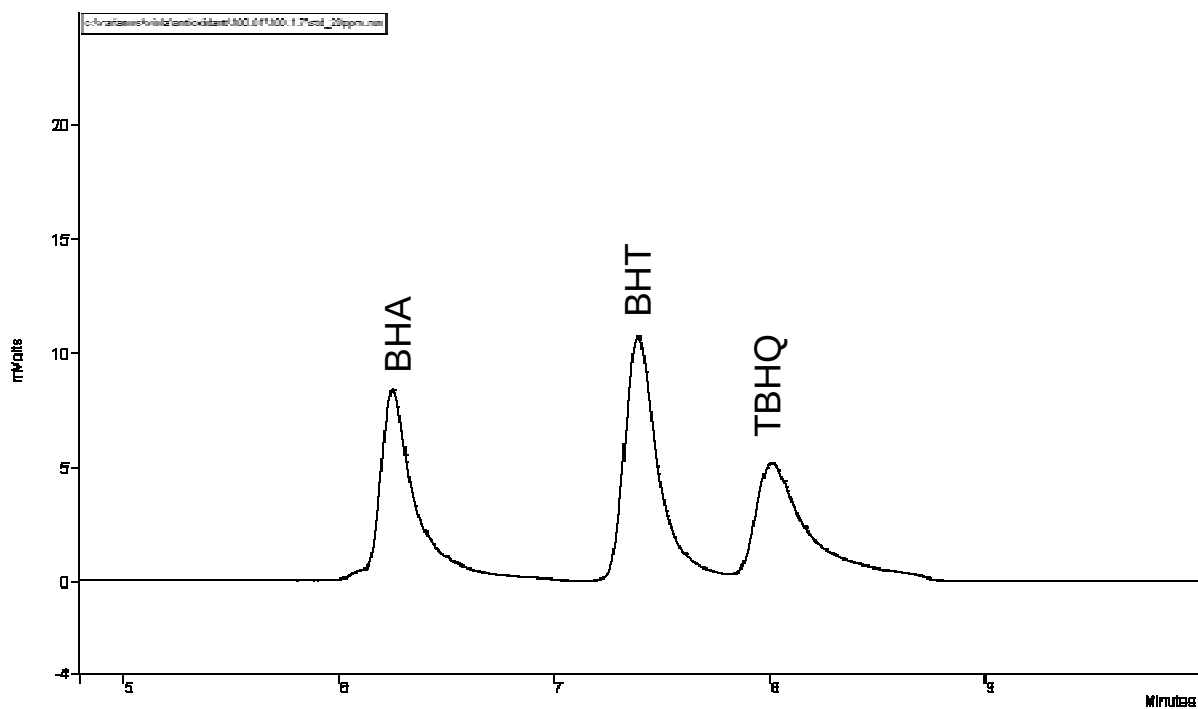
Table 10. Retention time and characteristic ions of BHA, BHT and TBHQ determined by GC/MS

Antioxidants	Retention time(min)	Characteristic ions(m/z)
BHA	8.509	137、165
BHT	8.784	205、177
TBHQ	9.041	123、151



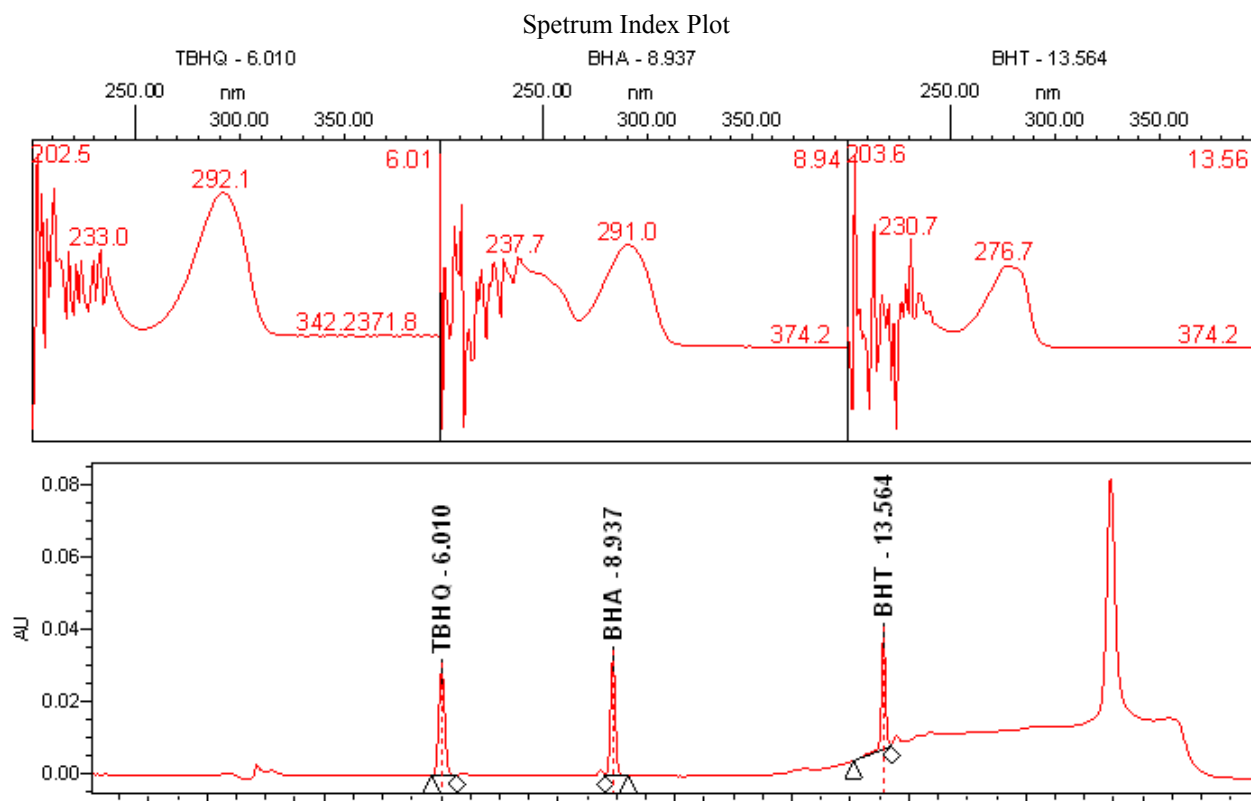
圖一、BHA、BHT 及 TBHQ 化學結構

Figure 1. Chemical structures of BHA, BHT and TBHQ.



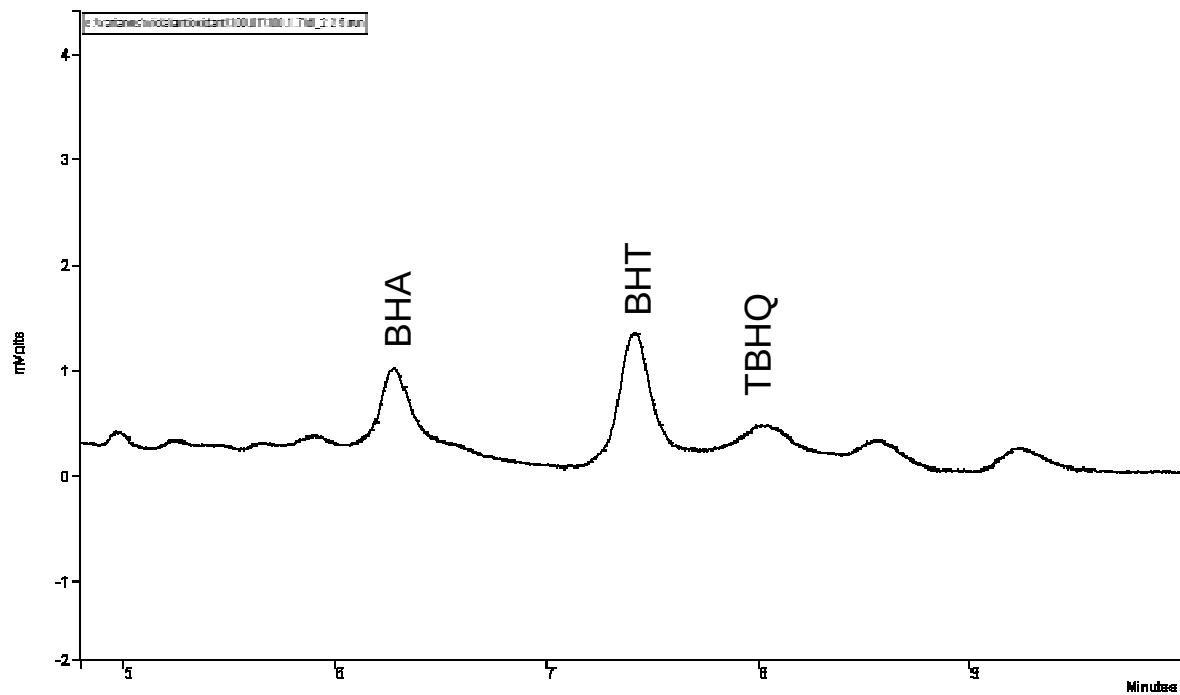
圖二、BHA、BHT 及 TBHQ 之氣相層析圖

Figure 2. GC chromatogram of BHA, BHT and TBHQ.



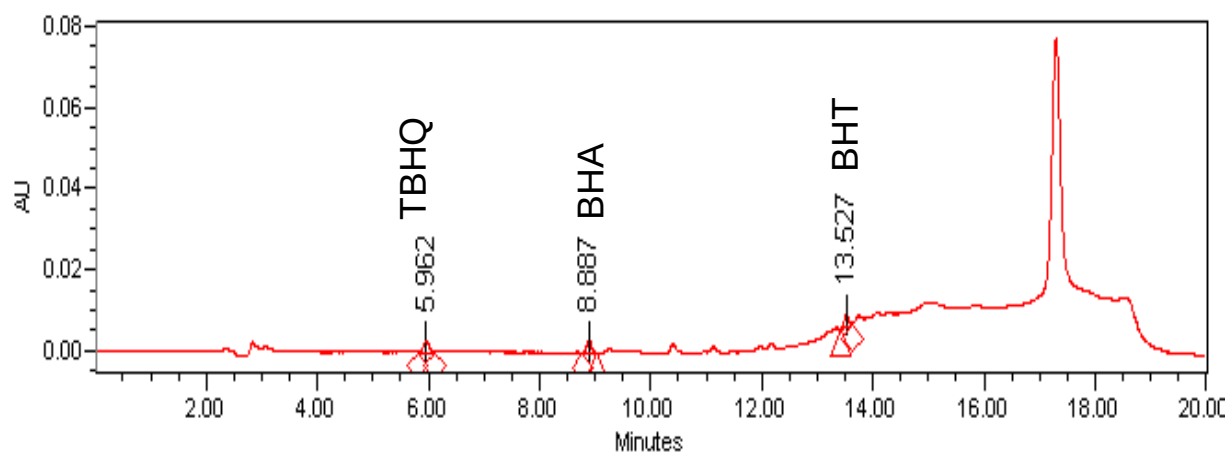
圖三、BHA、BHT 及 TBHQ 之液相層析圖及光譜圖

Figure 3. HPLC chromatogram and spectra of BHA, BHT and TBHQ.



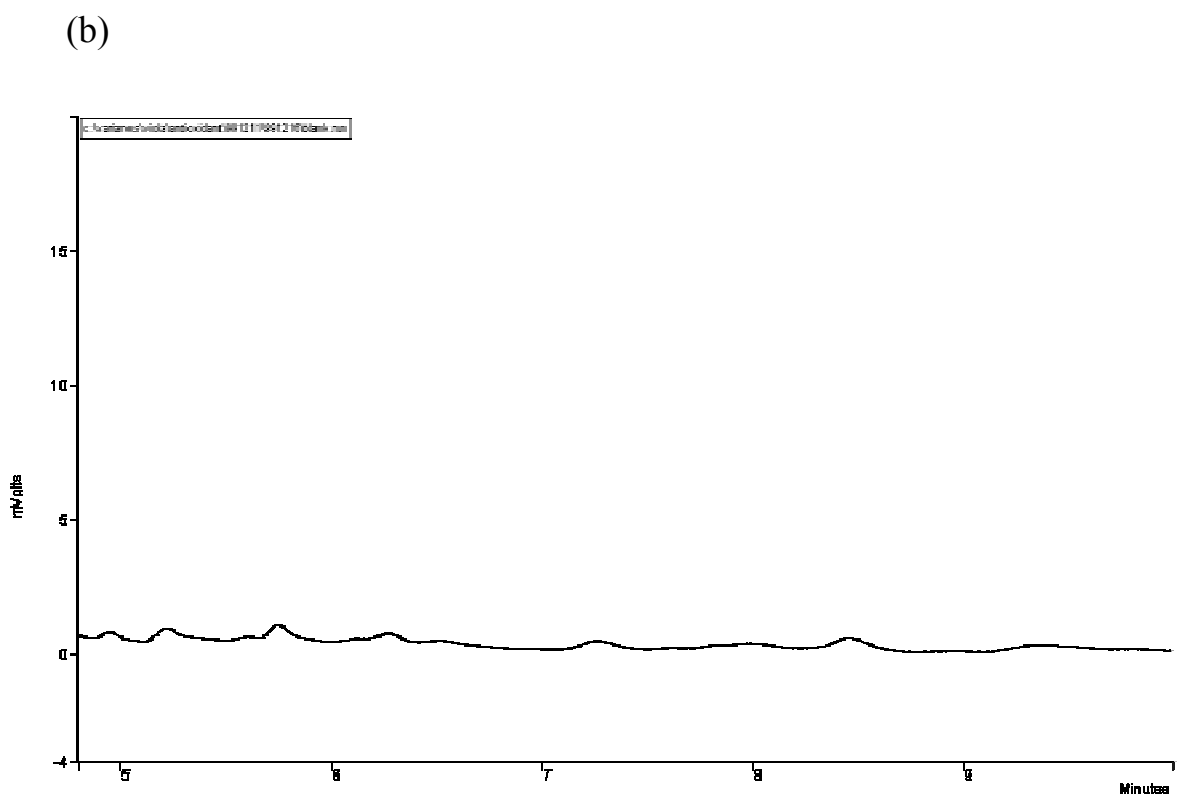
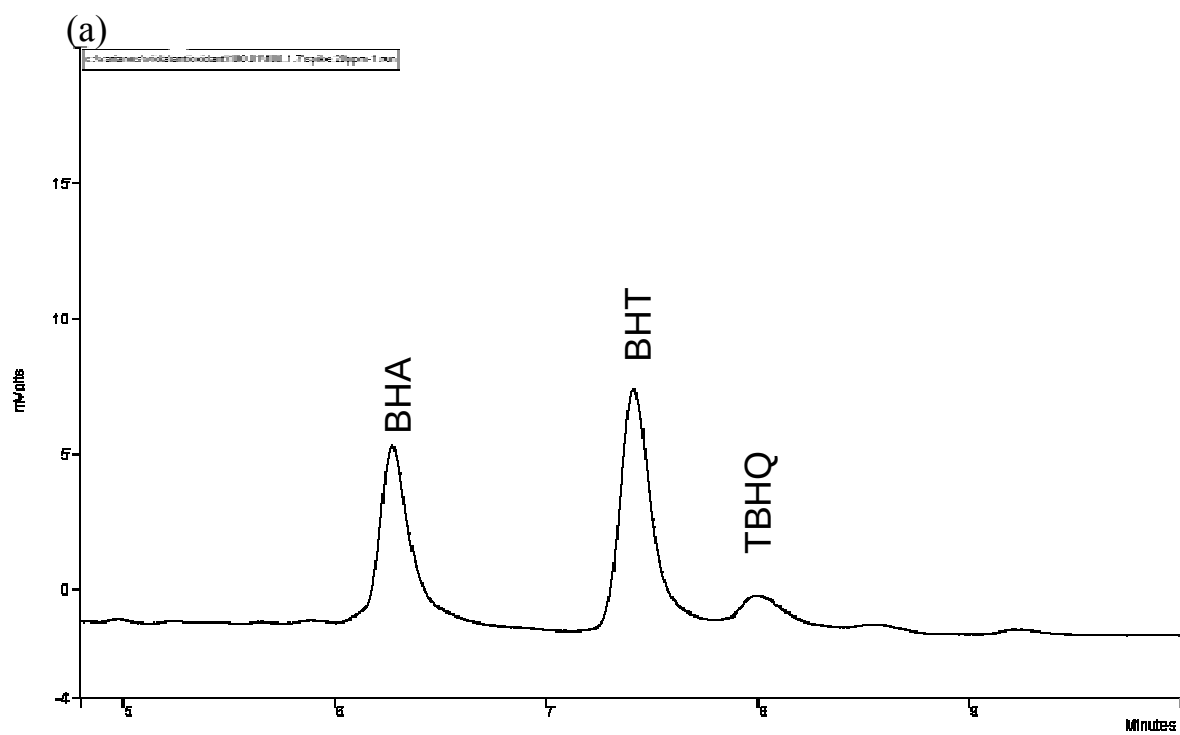
圖四、BHA、BHT 及 TBHQ 最低檢出限量之氣相層析圖

Figure 4. GC chromatogram of detection limit of BHA, BHT and TBHQ spiked into edible oil.



圖五、BHA、BHT 及 TBHQ 最低檢出限量之液相層析圖

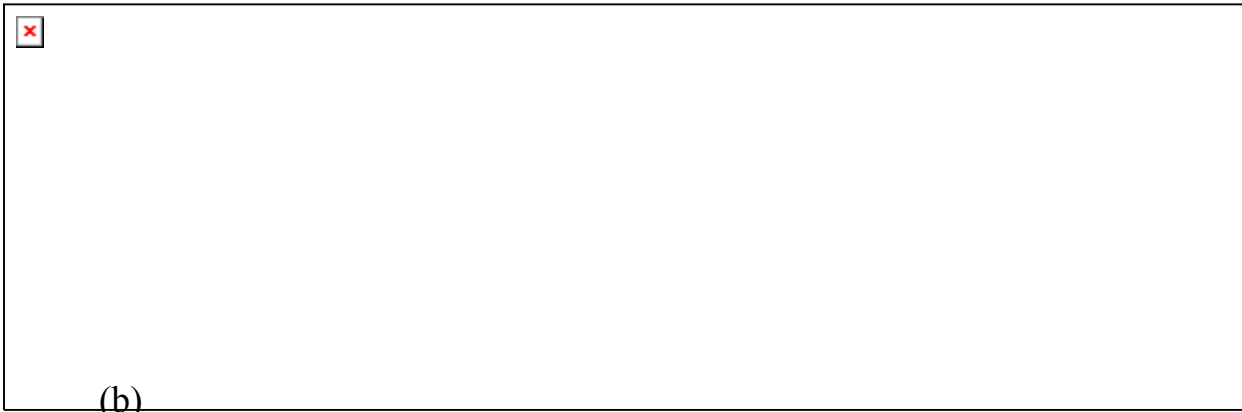
Figure 5. HPLC chromatogram of detection limit of BHA, BHT and TBHQ spiked into edible oil.



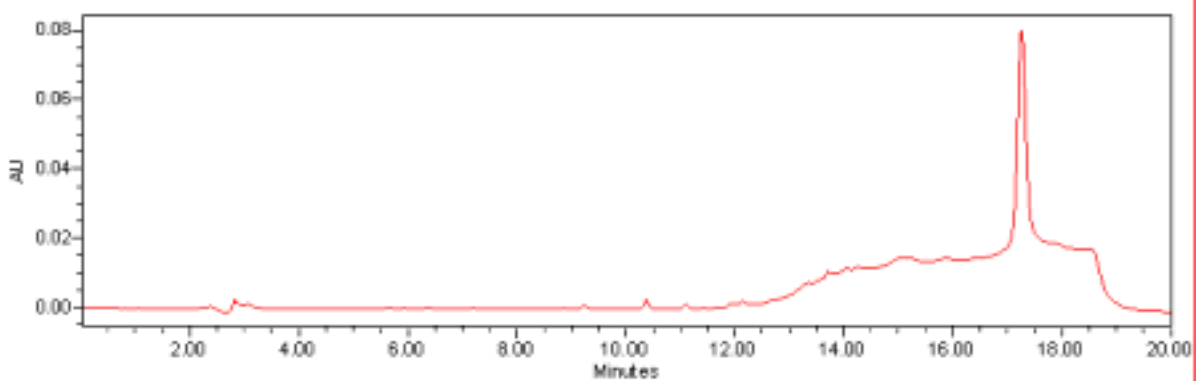
圖六、BHA、BHT 及 TBHQ(a)添加於食用油脂(b)空白基質之氣相層析圖

Figure 6. GC chromatogram of BHA, BHT and TBHQ (a) spiked 20ppm into edible oil,(b) blank.

(a)



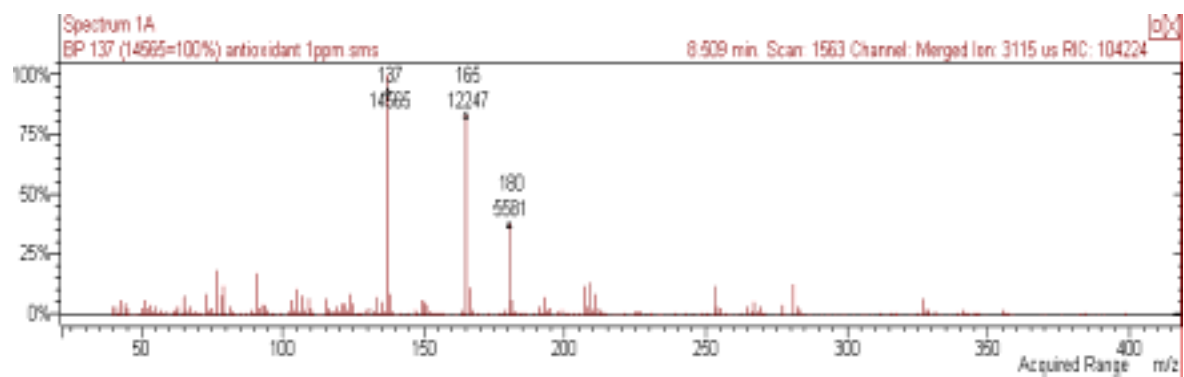
(b)



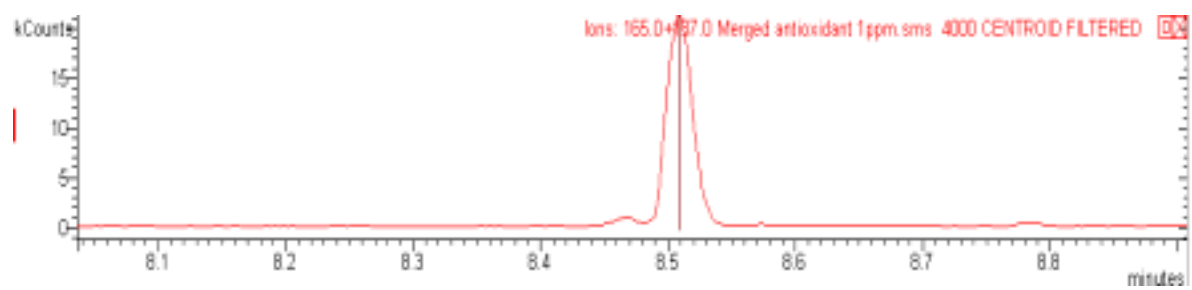
圖七、BHA、BHT 及 TBHQ(a)添加於食用油脂(b)空白基質之液相層析圖

Figure 7. HPLC chromatogram of BHA, BHT and TBHQ (a) spiked 10ppm into edible oil,(b) blank.

(a)



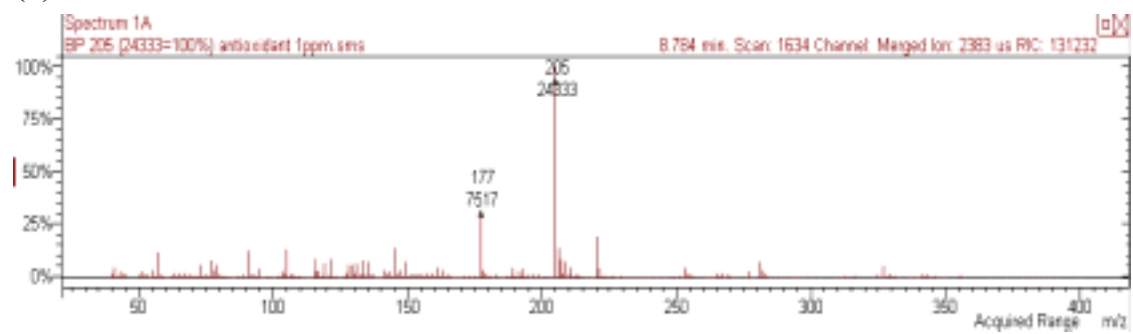
(b)



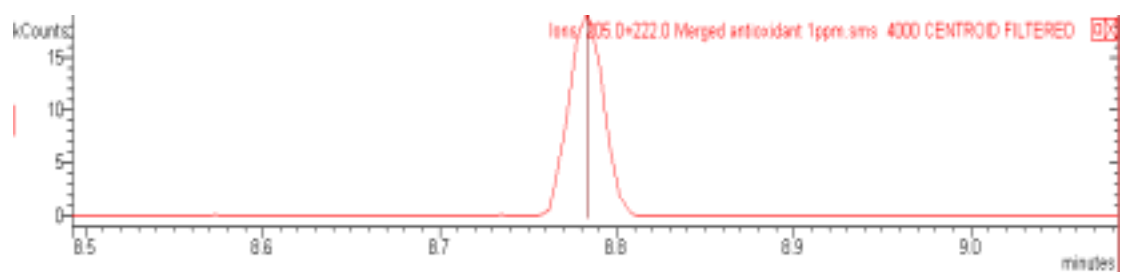
圖八、BHA 之氣相層析質譜圖

Figure 8. GC/MS chromatogram of BHA (a) mass spectra (b) total ion chromatogram(TIC).

(a)



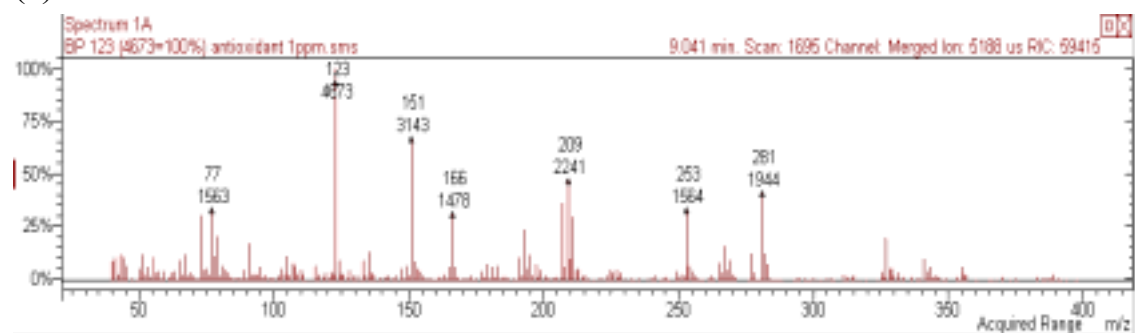
(b)



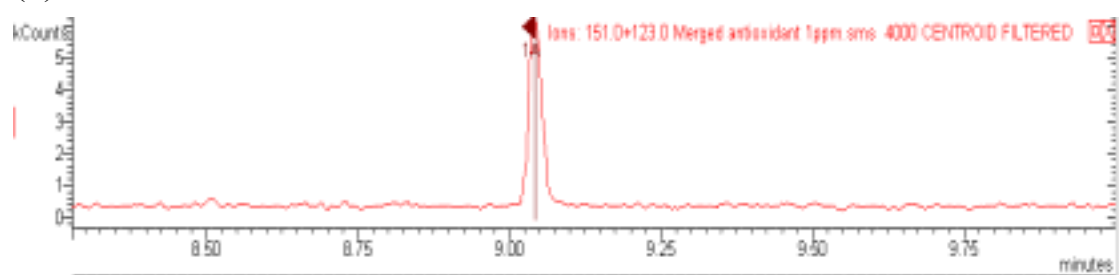
圖九、BHT 之氣相層析質譜圖

Figure 9. GC/MS chromatogram of BHT (a) mass spectra (b) total ion chromatogram(TIC).

(a)



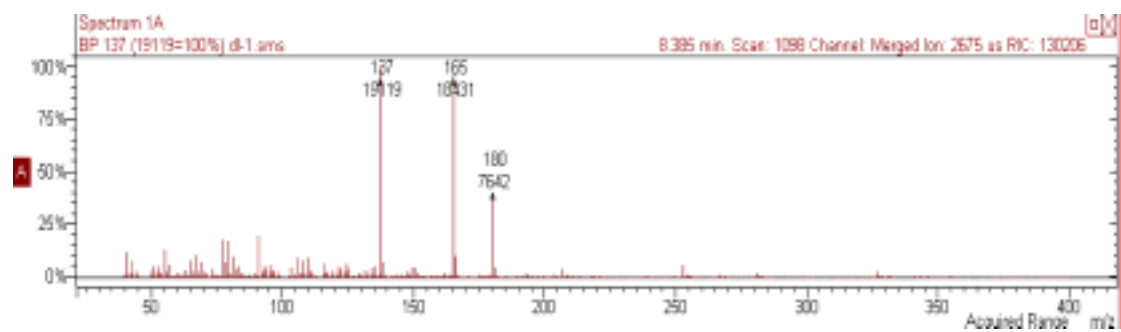
(b)



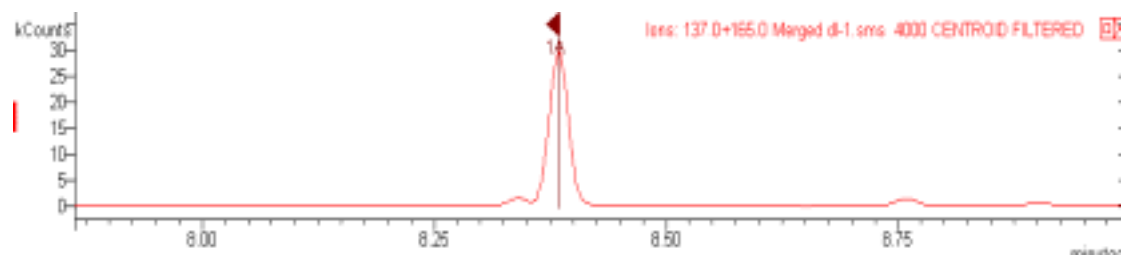
圖十、TBHQ 之氣相層析質譜圖

Figure 10. GC/MS chromatogram of TBHQ (a) mass spectra (b) total ion chromatogram(TIC).

(a)



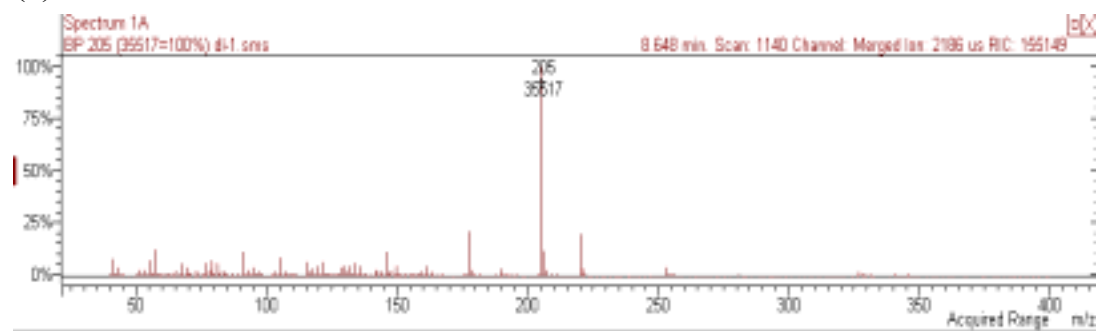
(b)



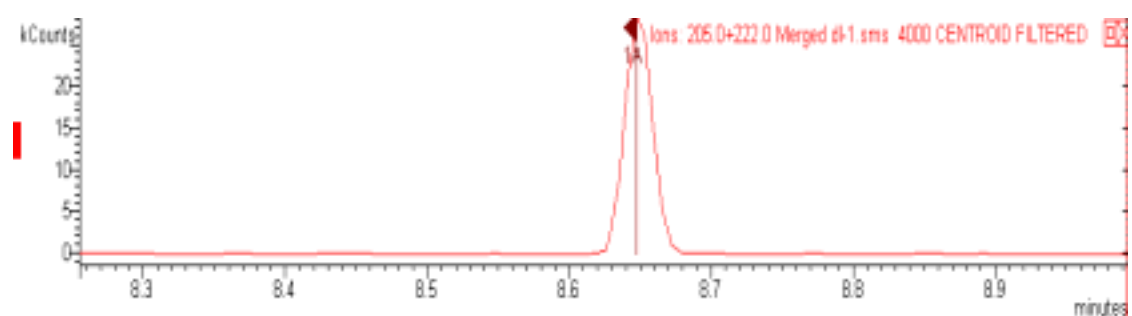
圖十一、BHA 最低偵測極限之氣相層析質譜圖

Figure 11. GC/MS chromatogram of detection limit of BHA spiked into edible oil (a) mass spectra (b) total ion chromatogram(TIC).

(a)



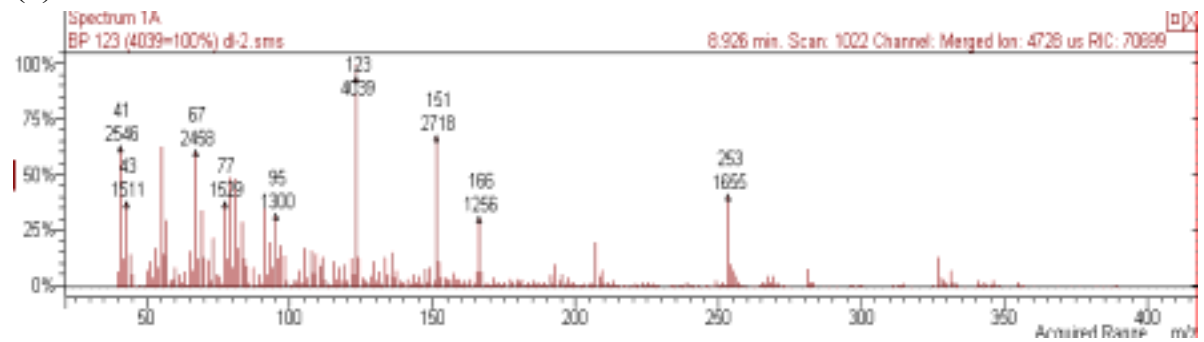
(b)



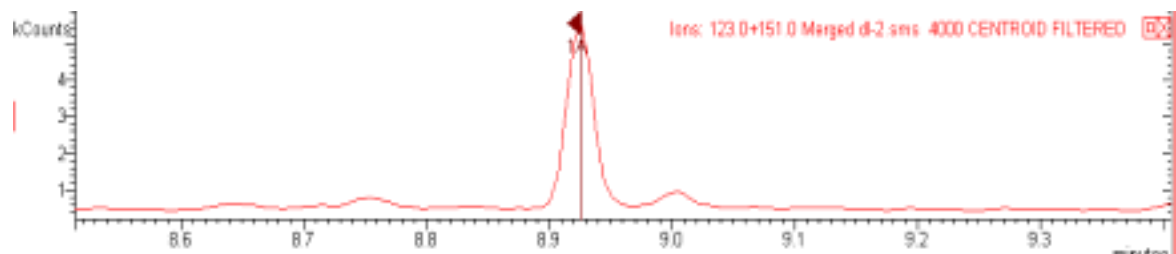
圖十二、BHT 最低偵測極限之氣相層析質譜圖

Figure 12. GC/MS chromatogram of detection limit of BHT spiked into edible oil (a) mass spectra (b) total ion chromatogram(TIC).

(a)



(b)



圖十三、TBHQ 最低偵測極限之氣相層析質譜圖

Figure 13. GC/MS chromatogram of detection limit of TBHQ spiked into edible oil (a)mass spectra (b) total ion chromatogram (TIC).