

# 油脂食品中維生素 E 檢驗方法之 確效及不確定度之評估

蔡佳芬 陳啟民 潘志寬

## 第四組

### 摘 要

建立以高效液相層析法分析油脂食品中維生素 E (dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate) 含量之檢驗方法，並進行方法之確效。油脂食品以正己烷適量稀釋，經微孔過濾膜過濾後，以高效液相層析分析，其分析條件：液相層析管柱：C18 (4.6×300 mm)，移動相：甲醇，流速：1.0 mL/min，檢出器：紫外光波長 280 nm。方法之確效包括添加回收試驗、空白試驗、最低檢出限量、查核物質之檢驗、重複性試驗等。添加濃度 20~1000 ppm 時之添加回收率於 dl- $\alpha$ -tocopherol 為 94.5~111.4%，變異係數為 0.2~2.4%；dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 為 91.3~118.8%，變異係數為 0.2~1.0%。空白試驗檢出值均為 0。dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 之最低檢出限量均為 10 ppm。以查核物質進行 10 次重複試驗之平均回收率為 99.3%，SD 為 3.003。而在信賴區間 95% 之量測不確定度均為量測值之 4.76%。

關鍵詞：油脂食品，維生素 E，確效，高效液相層析法，不確定度。

### 前 言

油脂食品中含有天然或人工添加之維生素 E 的情形非常普遍，而市售膠囊保健食品之含量多偏高。行政院衛生署公告型態屬膠囊狀、錠狀且標示有每日食用限量之食品，在每日食用量中，其維生素 E 之總含量不得高於 400 I.U. (d- $\alpha$ -tocopherol 268 mg)。其他食品，在每日食用量中，其維生素 E 之總

含量不得高於我國每日營養素建議攝取量之 150%；未標示每日食用量者，每 300 g 食品中維生素 E 之總含量不得高於我國每日營養素建議攝取量之 150%；一般食品以 16 歲男性之建議攝取量為準；嬰兒（輔助）食品以 1 歲之建議攝取量為準<sup>(1)</sup>。

以中國國家標準油脂中維生素 E 之檢驗方法<sup>(2)</sup>為基礎，再參考其他文獻<sup>(3,4)</sup>以建立檢驗方法，並進一步進行方法之確效，包括標

準曲線之製作、添加回收試驗、空白試驗、最低檢出限量、查核物質之檢驗、重複性試驗及不確定度之評估。

## 材料及方法

一、實驗材料：橄欖油及人造奶油。

二、試藥：

(一)標準品：

1. dl- $\alpha$ -tocopherol 標準品 ( catalog number : 66760 , USP reference standard ; 試藥特級 , 液狀 , 日本 Nacalai Tesque 株式會社 )

2. dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 標準品 ( catalog number : 66770 , USP reference standard ; 試藥特級 , 液狀 , 日本 Nacalai Tesque 株式會社 )

(二)試藥：正己烷 (pestiscan 級, 泰國 Lab-Scan 公司) ; 甲醇 (HPLC 級, 德國 Merck 公司) 。

(三)參考物質：Certified reference material 122 Margarine,  $\alpha$ -tocopherol 241 mg/kg, 95% 信賴區間不確定度 12 mg/kg, European Commission-Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Belgium.

三、器材：

(一) 100mL 褐色定量瓶。

移液管：1、5、10 mL。

(二)微孔過濾膜：0.45  $\mu$  m , 25 mm , nylon/PP , 購自美國 SUN 公司。

(四)液相層析管柱 (  $\mu$ -Bondapak 10 C18 , 美國 Phenomenex 公司) 。

(五)高效液相層析儀 ( Shimadzu LC-10AT

pump 及 SPD-10A UV-Vis detector , 日本 Shimadzu 株式會社及 Spark MIDAS auto injector , 荷蘭 Spark 儀器公司) 。

四、標準溶液之配製：

取 dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 標準品各約 0.1 g , 精確稱定 , 分別置於褐色定量瓶 , 以正己烷溶解並定容至 100 mL , 作為標準原液 , 再以正己烷稀釋成為 20~500  $\mu$  g/mL 之混合標準溶液。

五、檢液之調製：

取油液檢體約 1 g , 精確稱定 , 置入 100 mL 褐色定量瓶 , 以正己烷定容至 100 mL , 振搖 5 分鐘 , 使油液與正己烷混勻 , 以濾膜過濾後供作檢液。

六、高效液相層析條件：

層析管柱： $\mu$ -Bondapak 10 C18

移動相：甲醇

流速：1.0 mL/min

檢出器：UV 280 nm

注射量：10  $\mu$  L

七、標準曲線製作：

將配製好之 20~1000  $\mu$  g/mL 之混合標準溶液 , 分別以高效液相層析儀分析 , 每種注射濃度作三重覆 , 由每次各成分之波峰面積對濃度作圖 , 繪製成二條標準曲線。

八、鑑別試驗及含量測定

取檢液及混合標準溶液 , 分別以自動注射儀注入 10  $\mu$  L 於高效液相層析儀 , 就波峰之滯留時間與標準溶液比較鑑別之 , 並依下述公式求出檢體中維生素 E 之含量。

檢體中維生素 E 濃度 (ppm)

$$= C \times \frac{V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中維生素 E 之濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

V：檢體定容之體積 (mL)

M：取樣分析檢體之重量 (g)

#### 九、添加回收試驗：

取橄欖油約 1 g，精確稱定，置入 100 mL 褐色定量瓶，分別加入 1000、500、200、100、50 及 20  $\mu\text{g/mL}$  六種濃度之混合標準品溶液至 100 mL，振搖混合 5 分鐘，以濾膜過濾，作為檢液。以高效液相層析儀作三重複之分析，同時作空白試驗，以檢液所得之 dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 波峰之滯留時間及面積，分別與標準溶液比較鑑別並定量之，求出回收率。

#### 十、空白試驗：

以正己烷作為檢液，於高效液相層析儀作分析，就檢液所得之 dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 波峰之滯留時間及面積，分別與標準溶液比較鑑別並定量之。

#### 十一、最低檢出限量：

取 dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 標準溶液注入高效液相層析儀，就所得波峰計算其雜訊比 (S/N ratio)，以雜訊比大於 3 之最低濃度為儀器最低偵測極限 (IDL)，就此濃度進行樣品之 dl- $\alpha$ -

tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 添加回收試驗，每一添加量進行三重複，同時操作空白試驗，依前述方法進行分析，就所得波峰計算其雜訊比 (S/N ratio)，以雜訊比大於 3 之最低濃度為方法最低檢出極限 (MDL)。

#### 十二、查核物質之檢驗

取參考物質精確稱定，依檢液之調製方法進行查核物質之檢驗。

#### 十三、重複試驗

以參考物質連續測試 10 次，由實測值計算其標準偏差 (SD)。

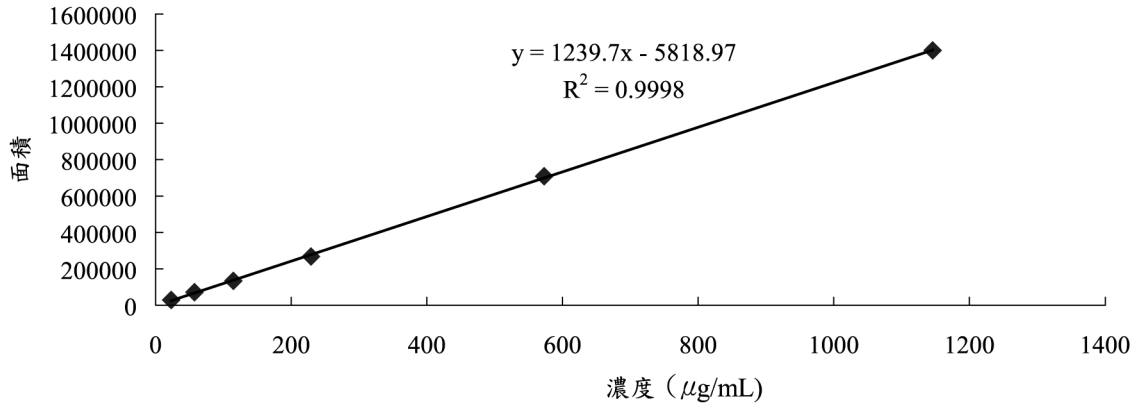
#### 十四、不確定度之評估：

為符合 ISO 17025<sup>(5)</sup>之要求，參考 ISO GUM<sup>(6)</sup>及 EURACHEM/CITAC Guide<sup>(7)</sup>之方法，執行量測不確定度之評估。包括建立數字模式、確定不確定度來源、計算標準不確定度、組合不確定度及擴充不確定度等。

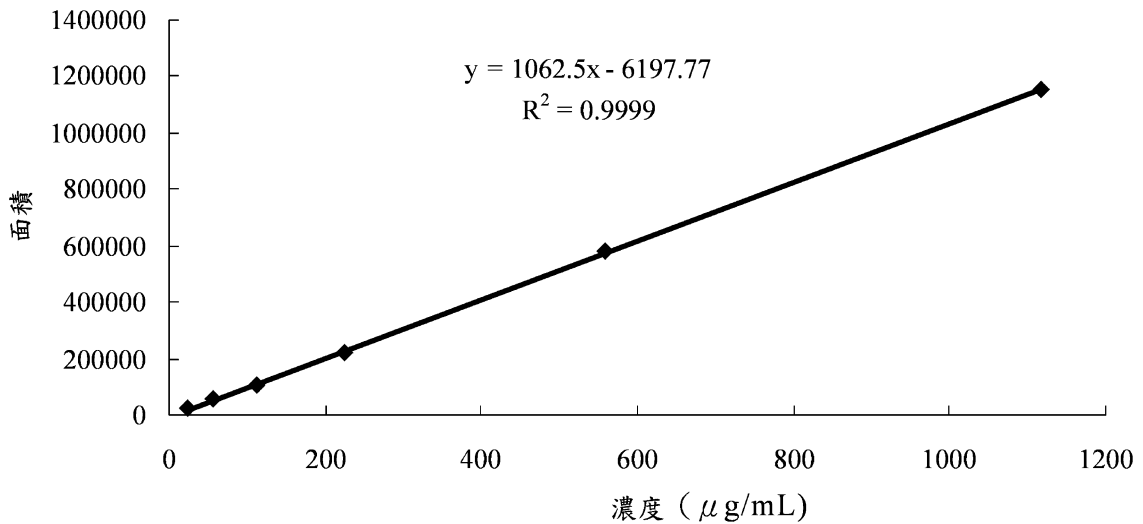
### 結果與討論

#### 一、標準曲線：

標準曲線顯示濃度在 20~1000  $\mu\text{g/mL}$  間 dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 均呈線性關係，其線性迴歸係數  $r^2$  值 dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 為 0.9998 及 0.9999，表示其線性關係非常良好 (圖一、二)。



圖一、dl-α-tocopherol 標準曲線圖



圖二、dl-α-tocopheryl acetate 標準曲線圖

## 二、儀器最低偵測極限：

分別將不同濃度之混合標準品溶液，依次遞減濃度注入高效液相層析儀進行分析，以雜訊比大於 3 作儀器最低偵測極限之探討

，結果儀器最低偵測極限 (IDL) 為  $0.5 \mu\text{g/mL}$ 。

## 三、空白試驗：

連續測試正己烷二次，結果其檢測值均

為 0。

#### 四、添加回收試驗：

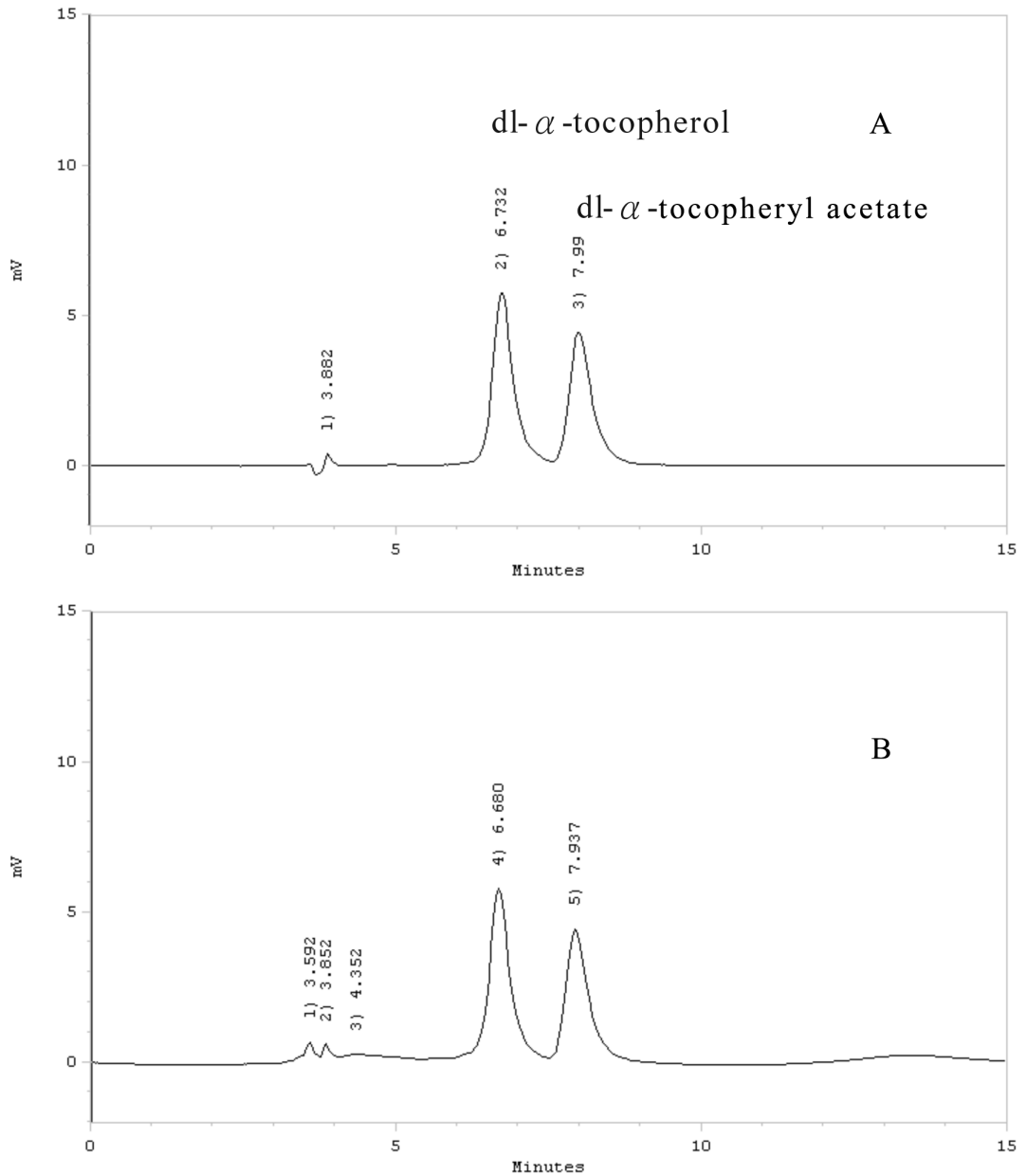
利用上述方法進行回收試驗，取橄欖油約 1 g，精確稱定，置入 100 mL 褐色定量瓶，分別加入 dl- $\alpha$ -tocopherol 1146.0、573.0、229.2、114.6、57.3 及 22.9  $\mu$ g/mL，及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 1117.0、558.5、223.4、

111.7、55.9 及 22.3  $\mu$ g/mL 六組濃度之混合標準品溶液至 100 mL，結果其回收率於 dl- $\alpha$ -tocopherol 為 94.5~111.4%，變異係數為 0.2~2.4%；dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 為 91.3~118.8%，變異係數為 0.2~1.0%，回收狀況良好（表一）。添加 229.2  $\mu$ g/mL 及 223.4  $\mu$ g/mL 濃度之混合標準品高效液相層析圖譜如（圖三）。

表一、添加回收結果

dl- $\alpha$ -tocopherol			dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate		
添加濃度 (ppm)	回收率* (%)	變異係數 (%)	添加濃度 (ppm)	回收率* (%)	變異係數 (%)
22.9	111.4	2.4	22.3	117.0	1.0
57.3	94.9	1.7	55.9	98.5	1.0
114.6	94.5	0.8	111.7	93.9	0.6
229.2	95.1	1.1	223.4	91.3	0.7
573.0	98.5	0.6	558.5	95.1	0.2
1146.0	99.0	0.2	1117	95.1	0.3

\*三重複之平均值。



圖三、維生素 E 之高效液相層析圖譜

A. 標準品 *dl*- $\alpha$ -tocopherol  $229.2 \mu\text{g/mL}$  及 *dl*- $\alpha$ -tocopheryl acetate  $223.4 \mu\text{g/mL}$ .

B. 橄欖油添加維生素 E (*dl*- $\alpha$ -tocopherol  $229.2 \mu\text{g/mL}$  及 *dl*- $\alpha$ -tocopheryl acetate  $223.4 \mu\text{g/mL}$  濃度) 之回收.

## 五、方法最低檢出限量：

取橄欖油約 1 g，精確稱定，置入 100 mL 褐色定量瓶，加入儀器最低偵測極限 5~20 倍濃度之混合標準溶液至 100 mL，進行回收試驗。結果於添加濃度 10  $\mu$ g/mL 之回收率 dl- $\alpha$ -tocopherol 為 99.3%，變異係數為 1.6%；dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 為 99.9% 變異係數為 0.4%，而其雜訊比仍大於 3，顯示在方法上於 10  $\mu$ g/mL 添加濃度下仍有良好之回收情形，可作為本方法之最低檢出限量 (MDL) (圖四)。

## 六、人造奶油試驗：

以市售之人造奶油樣品進行方法之適用性測試，添加 10  $\mu$ g/mL 濃度之回收試驗，結果顯示本檢驗方法亦適用於人造奶油中維生素 E 之檢驗，在 dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 之波峰位置並無干擾現象存在 (圖五)。

## 七、查核物質之檢驗：

以查核物質連續測試 10 次，結果其平均回收率為 99.3%，平均誤差為 6.1 ppm，SD 為 3.003 ppm (表二)。

## 八、重複性試驗：

以查核物質連續測試 10 次，其實測值之標準偏差 (SD) 為 0.0304。

## 九、量測不確定度之評估：

(一)量測不確定度來源分析及辨識：依實驗流程及計量公式得到之量測不確定度來源分析及辨識圖 (圖六)。再依各項目分別進行不確定度之評估。

### (二)標準品量測不確定度之評估：

1.純度 P：由供應商產品標示而得，但無法得知其誤差範圍，故不予列入考慮。

2.稱重誤差：由天平之線性及重複性標準偏差而得。解析度：儀器規格中天平之解析度為 0.1 mg，假設其為矩形分布。校正：天平為依據製造商允差規格  $\pm 0.5$  mg 校正，以確保其準確性在此範圍，假設其為矩形分布。

$$3.u(W) = \left[ (0.1/2/\sqrt{3})^2 + (0.5/\sqrt{3})^2 \right]^{1/2} = 0.291 \text{ mg}$$

### (三)體積不確定度之評估：

1.溫度：實驗室內之溫度變化為  $\pm 10^\circ\text{C}$ ，水之膨脹係數為  $2.1 \times 10^{-4} \cdot \text{C}^{-1}$ ，其為矩形分布，其因溫度變異導致之標準不確定度為： $2.1 \times 10^{-4} \cdot \text{C}^{-1} \times 100 \times 10/\sqrt{3} = 0.120 \text{ mL}$ 。

2.校正：由供應商提供之 100 mL 定容瓶允差為 0.1 mL，假設其為三角形分布，其導致之標準不確定度為： $0.1/\sqrt{6} = 0.04 \text{ mL}$ 。

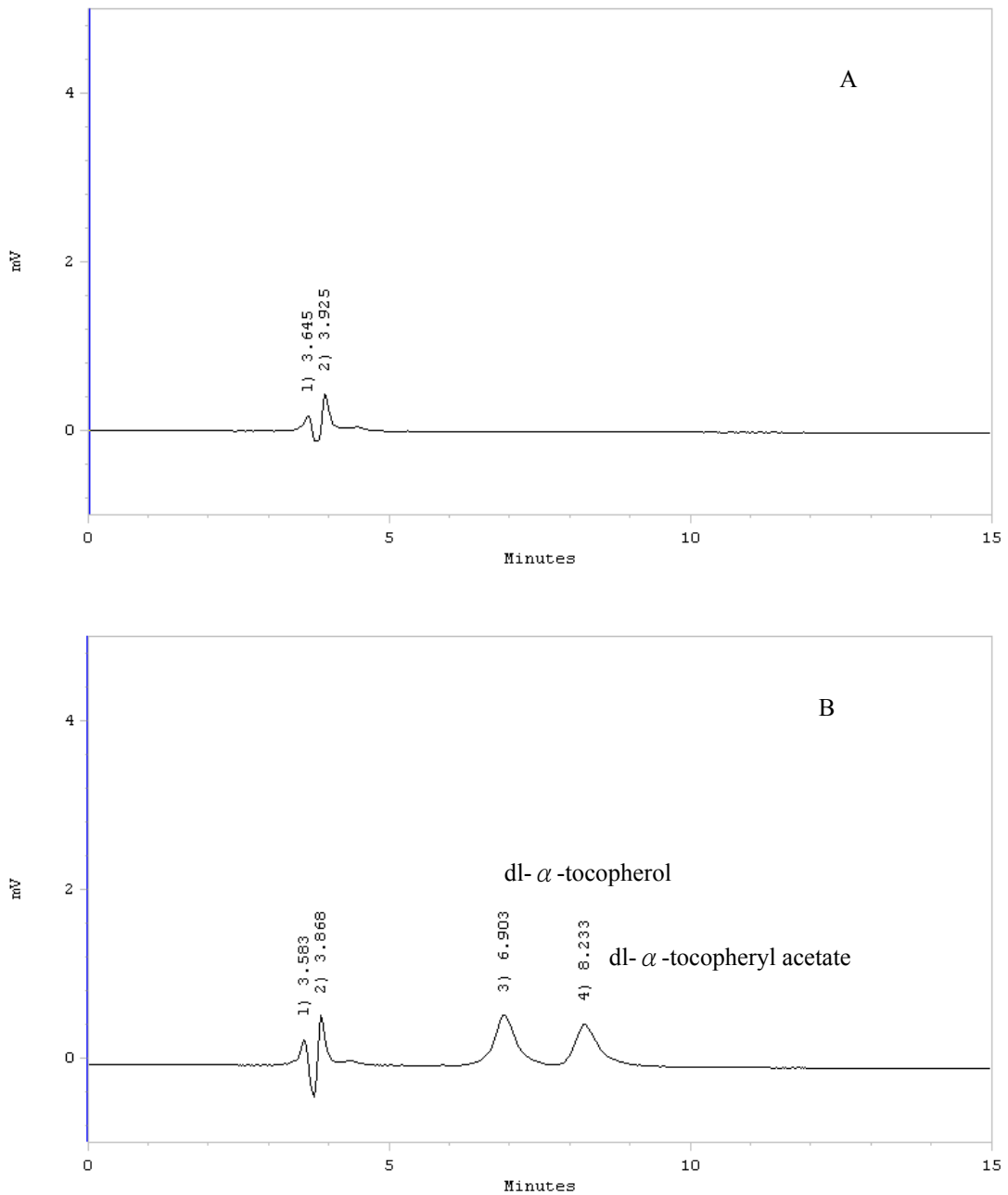
3.重複性：以 100 mL 定容瓶重複試驗中獲得 SD = 0.2197。

$$4.u(V) = (0.120^2 + 0.04^2 + 0.2197^2)^{1/2} = 0.254 \text{ mL}$$

(四)標準品組合量測不確定度： $C_{\text{STD}} = m_{\text{ST}}/V_u(\text{STD}) = C_{\text{STD}} \times [(u(W)/W)^2 + (u(V)/V)^2]^{1/2}$   
 $= 1000 \times [(0.291/100)^2 + (0.254/100)^2]^{1/2}$   
 $= 3.85 \mu\text{g/mL}$

### (五)回收率不確定度之評估：

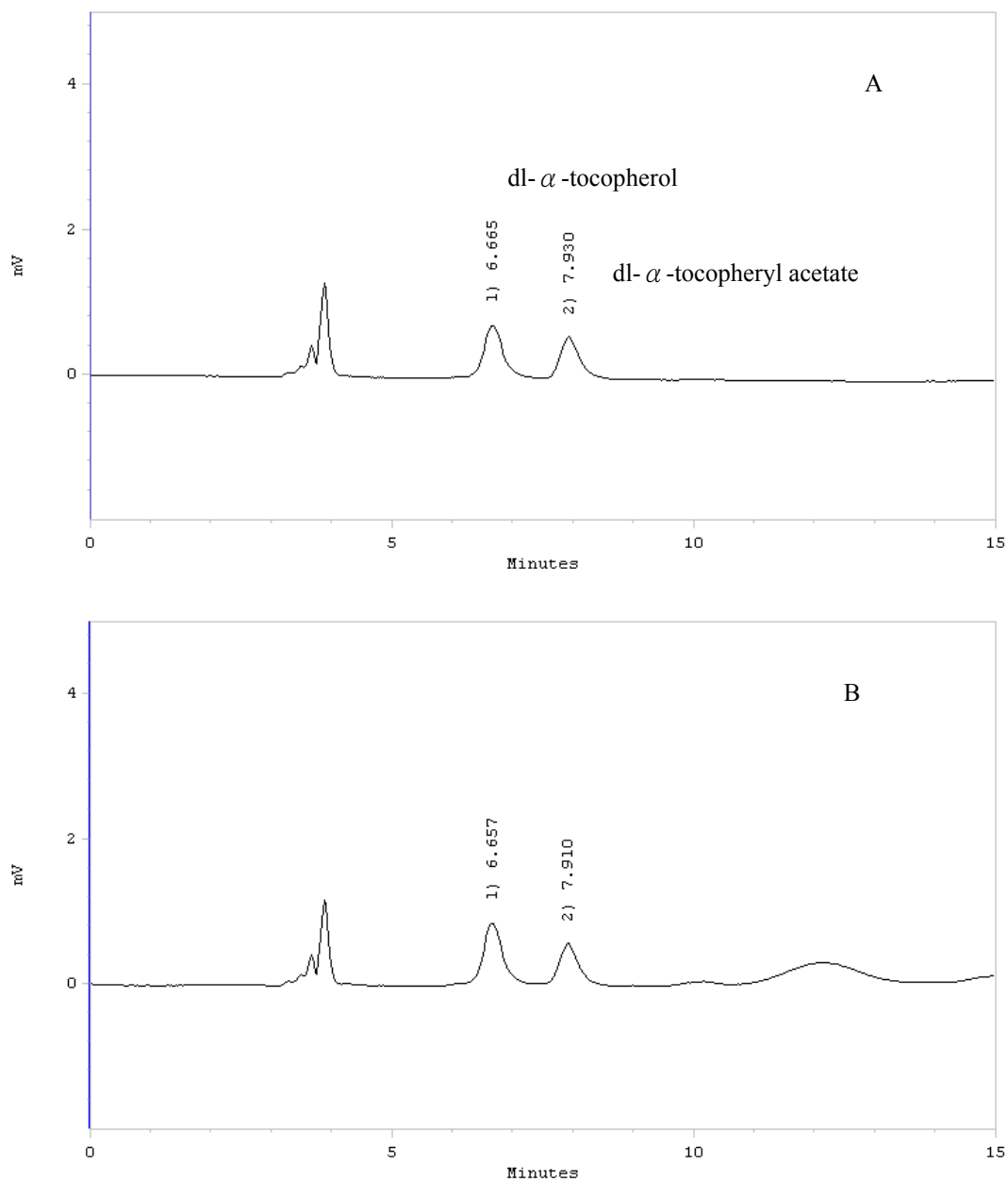
以查核物質 (含 241 ppm dl- $\alpha$ -tocopherol 之奶油) 進行重複試驗數據中獲得。



圖四、維生素 E 之高效液相層析圖譜

A. 空白分析.

B. 最低檢出限量.



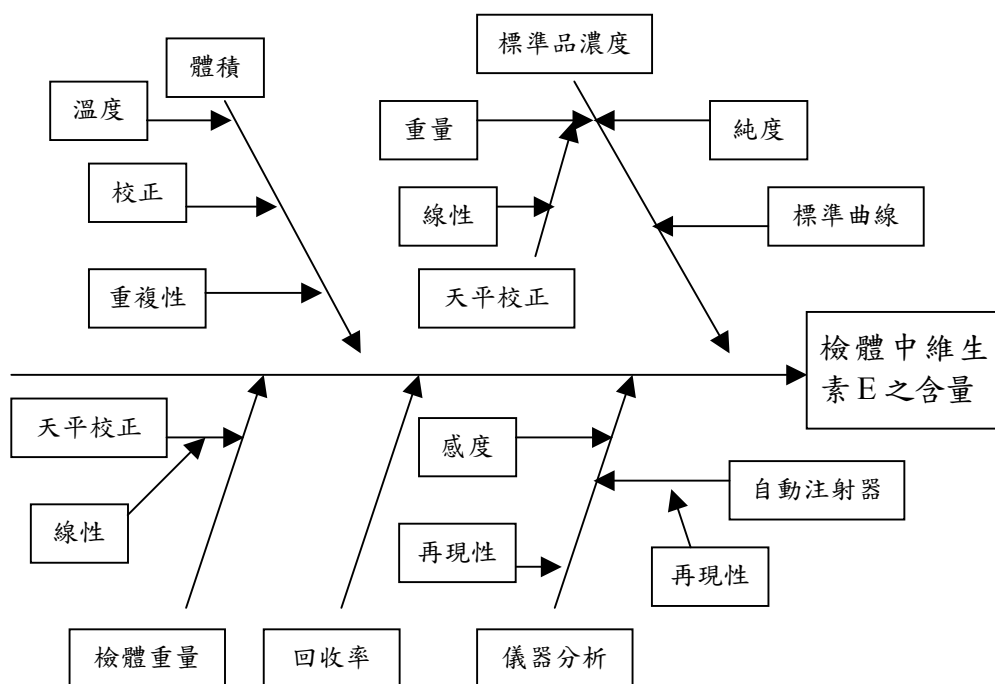
圖五、人造奶油中添加維生素 E 之高效液相層析圖譜

A. 維生素 E 標準品  $10 \mu\text{g/mL}$ .

B. 人造奶油添加維生素 E  $10 \mu\text{g/mL}$  濃度之回收.

表二、查核物質分析值

理論濃度值 (ppm)	實測濃度值 (ppm)	回收率 (%)	誤差值 (ppm)
空白試驗	0	0	0
241	228.8	95.3	12.2
241	243.7	101.5	2.7
241	243.7	101.5	2.7
241	243.1	101.3	2.1
241	247.0	102.9	6.0
241	245.8	102.4	4.8
241	229.2	95.5	11.8
241	233.5	97.3	7.5
241	230.7	96.1	10.3
241	239.9	99.0	1.1
平均		99.3	6.1



圖六、量測不確定度來源分析及辨識圖

1.回收率重複性： $u(\text{fRep})=\text{SD}/\sqrt{2} = 0.0304/\sqrt{2} = 0.0215$

2.回收率：檢測次數 = 10，回收率平均值 = 99.28%，回收率平均值標準偏差 =  $u(\text{Rec}) = 3.003/\sqrt{10} = 0.95$

(六)標準曲線及儀器分析不確定度之評估：  
自動注射器之再現性合併於標準曲線中呈現，不再另計。

1.dl- $\alpha$ -tocopherol：線性迴歸方程式為  $A_j = C_j \times B_1 + B_0 = C_j \times 1239.7 - 5818.97$ ，以實際溶液濃度  $73.67 \mu\text{g/mL}$  之三重複試驗時

$$S^2 = \frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \cdot c_j)]^2}{n-2}$$

$S = 5.225809$ ,  $B_1 = 1239.7$ ,  $p = 3$ ,  $n = 6$ ,  $C_0 = 73.67$ ,  $C = 357.2$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2 = 945710.3$$

$$u(\text{Co}) = S/B_1 \times [1/p + 1/n + (\text{Co}-C)^2/S_{xx}]^{1/2} = 5.2258/1239.7 \times [1/3 + 1/6 + (73.67-357.2)^2/945710.3] = 0.0025 \mu\text{g/mL}$$

2.dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate：線性迴歸方程式為  $A_j = C_j \times B_1 + B_0 = C_j \times 1062.5 - 6197.77$ ，以實際溶液濃度  $58.10 \mu\text{g/mL}$  之三重複試驗時  $S = 6.387249$ ,  $B_1 = 1062.5$ ,  $p = 3$ ,  $n = 6$ ,  $C_0 = 58.10$ ,  $C = 348.1$ ,  $S_{xx} = 898436.9$

$$u(\text{Co}) = 6.387249/1062.5 \times [1/3 + 1/6 + (58.10-348.1)^2/898436.9] = 0.0036 \mu\text{g/mL}$$

(七)組含量測標準不確定度

不確定度項目	量測值	標準不確定度	標準不確定度/量測值
標準品	1000 $\mu\text{g/mL}$	3.85	0.00385
回收率	99.28	0.95	0.00957
回收率重複性	1 (因 $u(\text{fREP})$ 已為相對不確定度)	0.0215	0.0215
標準曲線 vit E	73.67	0.0025	3.39E-05
標準曲線 vit E acetate	58.10	0.0036	6.19E-05

(八)食用液態油脂中維生素 E 含量組合標準量測不確定度

在檢體 dl- $\alpha$ -tocopherol 濃度為  $73.67 \mu\text{g/mL}$ ，dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 為  $58.10 \mu\text{g/mL}$  時

$$U(\text{vit E}) = (\text{vit E}) \times \left[ \frac{u(\text{C})}{\text{C}} \right]^2 + \frac{u(\text{Rec})}{\text{Rec}} \left[ \frac{u(\text{fRep})}{\text{fRep}} \right]^2 + \left[ \frac{u(\text{STD})}{\text{STD}} \right]^2 \Bigg]^{1/2}$$

$$= 73.67 \times 99.88/1.000022 \times \left[ \frac{0.0025}{73.67} \right]^2 + \left[ \frac{0.95}{99.28} \right]^2 + \left[ \frac{0.0215}{1} \right]^2 + \left[ \frac{3.85}{1000} \right]^2 \Bigg]^{1/2} = 175 (\mu\text{g/g})$$

$$\begin{aligned} U(\text{vit E acetate}) &= 58.10 \times 99.88 / 1.000022 \\ &\times \left[ [0.0036/58.10]^2 + [0.95/99.28]^2 \right. \\ &\left. + [0.0215/1]^2 + [3.85/1000]^2 \right]^{1/2} \\ &= 138 (\mu\text{g/g}) \end{aligned}$$

(九)擴充量測不確定度：

於 95%信賴區間,  $K=2$ ，在檢液 dl- $\alpha$ -tocopherol 濃度為  $73.67 \mu\text{g/mL}$ ，dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 為  $58.10 \mu\text{g/mL}$  時，dl- $\alpha$ -tocopherol 之擴充量測不確定度 =  $175 \times 2 = 350 (\mu\text{g/g})$ ；dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate 擴充量測不確定度 =  $138 \times 2 = 276 (\mu\text{g/g})$ 。

### 結 論

以高效液相層析法分析油脂食品中維生素 E (dl- $\alpha$ -tocopherol 及 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate) 含量之檢驗方法經過確效，確實可為液態油脂中維生素 E 之分析依據。而在信賴區間 95%，其量測不確定度均為量測值之 4.76%。

### 參考文獻

1. 行政院衛生署於 90.8.9. 衛署食字第 0900055038 號公告修訂食品添加物「營養添加劑」之使用範圍及用量標準。
2. 中國國家標準總號 CNS 12724，N6229。
3. 財團法人日本食品衛生協會。1991。維生素 E。食品衛生檢查指針理化學篇。62-64 頁。日本。
4. 日本藥學會。2000。衛生試驗法注解。211-213 頁。日本。
5. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025: ISO, 1999.
6. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. ISO, 1995. Geneva.
7. Ellison S.L.R., M Rosslein and A Williams. 2000. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. Second edition.

# The Certification and Analysis Uncertainties of the HPLC Method for Assay of Vitamin E in Edible Fats and Oils

Chia-Fen Tsai\*, Chi-Min Chen and Jyh-Quan Pan

Division of Food Chemistry

## ABSTRACT

This study was aimed at establishing and certifying the HPLC method for assay of vitamin E in edible fats and oils. The sample was diluted with n-hexane and analyzed by HPLC. HPLC conditions were as follows, column: C18 (4.6×300 mm); mobile phase: methanol; flow rate: 1 mL/min; detecting wavelength: UV 280 nm. The tests included recovery, blank study, detection limit, check sample test and repetition study.

The recovery rates were 94.5-111.4% for the spiked concentrations at 20-1000 ppm of dl- $\alpha$ -tocopherol, and 91.3-118.8% for the spiked concentrations at 20-1000 ppm of dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate, the variation coefficients were 0.2-2.4% and 0.2-1.0%. The blank test was 0. The detection limit of the method was 10 ppm for dl- $\alpha$ -tocopherol and dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate in edible fats and oils. The average recovery rate of tenth tests for check sample was 99.3%, SD was 3.003. The expanded uncertainties were 4.76%, which were obtained by multiplying the combined standard uncertainties by a coverage factor of 2.

Key words : edible fats and oils, vitamin E, certification , HPLC, uncertainty.