

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

奈米貴金屬修飾玻璃碳電極應用於食品中
人工抗氧化劑之定量檢測

Quantitative determination of artificial antioxidants in foods
using nanoparticles modified glassy carbon electrodes

陳昱華

Yu-Hua Chen

指導教授：徐詮亮 博士

Advisor: Chuan-Liang Hsu, Ph.D.

中華民國一百零四年一月

Jan., 2015

碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 陳昱華 君所提之論文

奈米貴金屬修飾玻璃碳電極

應用於食品中人工抗氧化劑之定量檢測

Quantitative determination of artificial antioxidants
in foods using nanoparticles modified
glassy carbon electrodes

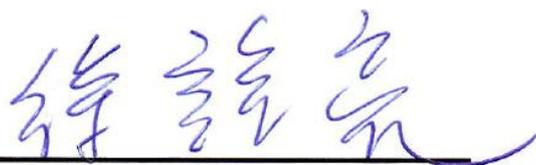
係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任



指導教授



中華民國一零四年一月二十日

碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 陳昱華 君所提之論文

奈米貴金屬修飾玻璃碳電極

應用於食品中人工抗氧化劑之定量檢測

Quantitative determination of artificial antioxidants in foods
using nanoparticles modified glassy carbon electrodes

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

張公島

元培醫事科技大學食品科學系教授

李勝文

國立勤益科技大學化工與材料工程系助理教授

葉貝傑

東海大學化學系助理教授

指導教授：

符發宏

中華民國一零四年一月二十日

謝誌

兩年半的研究生生活即將畫下句點，非常感謝一路以來幫助我的人，在研究所與大家相處的這幾兩年半是我收穫良多的一段旅程。

首先誠摯感謝恩師 徐詮亮教授，求學期間給予關心及悉心指導，並在論文撰寫期間，不厭其煩的審閱並給予許多寶貴意見，使論文趨於完善，順利通過學位口試，在此致上最高的謝意。

論文口試期間，承蒙三位口試委員元培醫事科技大學食品科學系 張谷昇博士、國立勤益科技大學化工與材料工程系 黃怡銘博士及東海大學化學系 莊旻傑博士撥冗審閱論文及參與口試，並對論文給予斧正和指導，使論文更為嚴謹。

在學期間，感謝系上所有成就這本論文的人；感謝王姐的教導及照顧，還有怡君助教、叔瑜助教、佩玲助教及貞誼助教的鼓勵與關心都讓我倍感溫暖。謝謝實驗室裡曜寬、瑋翔、昭緯、宏仔、中愷學長及昭蓁學姐的照顧與教導，讓我不斷成長；也要謝謝鵬年、松佑、性樺學弟和倩好學妹的鼓勵與幫忙，做我堅強的

後盾。也感謝專題生一民學弟及芸禎、宜均學妹為實驗室帶來年輕的活力。感謝同窗容蓉、毓琪、盈吟、貫中、文華、孟蓉、儒碩、健峰、昱翔、皓儀、瀚文、明興、曄婷、琮為、瑞庭的扶持與鼓勵，有你們讓我的研究生生活多采多姿。還要感謝彥甫學長、予捷學妹對於實驗上的幫助及包容，使我得以順利完成實驗。

除此以外，還要感謝許多舊友，謝謝你們總是知道我最無助的時候，陪伴我、幫我打氣，給予我足夠的信心面對挑戰。

最後，我要感謝最親愛的家人，不斷關心研究進度和身體健康狀況，並包容我、支持我，讓我在求學過程無後顧之憂，謹將此論文獻給你們。

陳昱華 謹致於

東海大學食品科學系碩士班

中華民國一〇四年一月

摘要

人工抗氧化劑的致癌性在全世界備受爭議，是一大隱憂；其中，丁基羥基甲氧苯（Butylated hydroxyl anisole, BHA）、二丁基羥基甲氧苯（Dibutyl hydroxy toluene, BHT）及第三丁基氫醌（Tertiary butylhydroquinone, TBHQ）為常見添加於食品中的人工抗氧化劑；衛生福利部食品藥物管理署依食品種類有不同添加規範。傳統檢測人工抗氧化劑的方法高效液相層析法(High-performance liquid chromatography, HPLC)檢測時間長、操作步驟繁複，且成本高。本研究開發簡單、快速的電化學方法檢測食品中 BHA、BHT 及 TBHQ 之含量，利用奈米材料修飾玻璃碳電極，並探討最適檢測條件，包括奈米材料選擇、電極修飾條件、修飾成效、pH 值、溫度、掃描速率等影響因子，再以最適檢測條件製作人工抗氧化劑濃度對電流訊號之檢量線，應用於食品中人工抗氧化劑含量之檢測；結果顯示：玻璃碳電極經奈米金修飾，其檢測人工抗氧化劑之靈敏度較奈米白金佳；玻璃碳電極修飾奈米金之最適條件為-0.6 至 1.5 V 循環伏安法掃描 6 圈，修飾後具有放大訊號的效果；最適檢測條件探討中，0.04 M B-R 緩衝溶液的最適 pH 值為 2，最適檢測溫度為 30°C，掃描速率 0.1 V/s；在 0 mg/L 至 330 mg/L 的濃度範圍中具有線性關係，TBHQ、BHA 及 BHT 之 R^2 值分別為 0.9962、0.9974 及 0.9968。應用經奈米金修飾之玻璃碳電極，檢測市售食用油品中人工抗氧化劑之含量，並外加標準溶液，其回收率介於 95.56% ~ 104.98%；結果顯示本研究開發之電化學方法具實務應用之潛力。

【關鍵詞】 電化學快速檢測、抗氧化劑、丁基羥基甲氧苯、二丁基羥基甲氧苯、第三丁基氫醌、奈米金修飾電極

Abstract

The risk of food additives has attracted a lot of discussion and their safety has become the main concern of consumers' daily life. Among those food additives, artificial antioxidants have been disputed due to its carcinogenicity that is one of the issues people worry about. Butylated hydroxyl anisole (BHA), Dibutyl hydroxy toluene (BHT) and Tertiary butylhydroquinone (TBHQ) are artificial antioxidants commonly used in foods. The antioxidants are classified as the third category of food additives and have standards for specification, scope, application and limitation for various foods according to the regulation of Food and Drug Administration in Taiwan. The official methodology for detecting artificial antioxidants is high-performance liquid chromatography (HPLC). However, the detection procedures are time-consuming and with high-cost. The study developed a simple electrochemical method which can be applied for simultaneously quantitative determination of BHA, BHT and TBHQ in food. The glassy carbon electrode modified with nanomaterials was fabricated and the optimum detecting conditions which included pH, temperature, and scan rate by cyclic voltammogram (CV) were evaluated. After the calibration curve of peak current versus concentration for each of the three artificial antioxidants were established, the method was applied to detect those three artificial antioxidants in commercial edible oil samples. The results indicated that the optimum detecting conditions about modifying electrode with gold nanoparticles to amplify the signal were at cyclic voltammogram -0.6 to 1.5 V by 12 segments. The optimum detecting conditions were pH 2 at 30°C and scan rate is 0.1 V/s, response time was 30 seconds. The sensor responded linearly to

TBHQ, BHA and BHT in a concentration range from 0 mg/L to 330 mg/L with correlation coefficient of 0.9962, 0.9974 and 0.9968. Compare the concentrations of those three artificial antioxidants in the commercial edible oil samples detected by the established method and HPLC, the recovery which between 95.56% and 104.98% is acceptable. Obviously, the established methodology in the study has potential for application in quantitative determination of artificial antioxidants in foods.

【Keywords】 electrochemical rapid detection, antioxidants, BHA, BHT, TBHQ, gold nanoparticles modified electrode

目錄

摘要	I
Abstrast.....	II
目錄	IV
表目錄	VIII
圖目錄	IX
第一章、緒言	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究動機及目的	3
第二章、文獻回顧	4
2.1 抗氧化劑	4
2.1.1 種類與特性	4
2.1.2 人工抗氧化劑特性及其法規限量標準	7
2.1.3 傳統檢測方法	17
2.2 電化學感測器	20
2.2.1 感測器原理及特性	20
2.2.2 電化學分析法	25
2.2.2.1 循環伏安法	28

2.2.2.2 安培法.....	34
2.2.3 電化學檢測之電極.....	38
2.3 貴金屬奈米粒子.....	44
2.3.1 奈米材料.....	44
2.3.2 貴金屬奈米粒子於修飾電極之效用.....	49
2.3.2.1 奈米金粒子於修飾電極之效用.....	50
2.3.2.2 奈米白金粒子於修飾電極之效用.....	57
2.4 電化學分析法於檢測人工抗氧化劑之應用.....	58
第三章、材料與方法.....	71
3.1 實驗樣品.....	71
3.2 實驗試藥.....	71
3.3 儀器設備.....	73
3.4 電化學檢測系統建立.....	75
3.5 實驗架構.....	77
3.6 以奈米金修飾電極之方法.....	79
3.7 以奈米白金修飾電極之方法.....	80
3.8 最適檢測條件探討.....	81
3.8.1 奈米金粒子修飾玻璃碳電極之最適條件探討.....	81

3.8.2 奈米金修飾玻璃碳電極效應探討.....	81
3.8.3 奈米金修飾玻璃碳電極檢測抗氧化劑之反應槽溶液最適 pH 值 探討.....	82
3.8.4 奈米金修飾玻璃碳電極檢測抗氧化劑之反應槽溶液最適溫度 探討.....	84
3.8.5 奈米金修飾玻璃碳電極檢測抗氧化劑之最適掃描速率探討.	84
3.9 實際樣品檢測.....	85
第四章、結果與討論.....	87
4.1 奈米金粒子修飾玻璃碳電極之最適條件探討.....	87
4.2 奈米白金粒子修飾玻璃碳電極之探討.....	89
4.3 奈米金修飾玻璃碳電極效應探討.....	92
4.4 電化學系統檢測抗氧化劑之最適 pH 值探討.....	98
4.5 電化學系統檢測抗氧化劑之反應槽溶液最適溫度探討.....	103
4.6 電化學系統檢測抗氧化劑之最適掃描速率探討.....	105
4.7 修飾電極穩定度探討.....	107
4.8 電化學系統檢測抗氧化劑之檢量線.....	109
4.9 電化學及 HPLC 檢測實際樣品之結果比較.....	113
第五章、結論與檢討.....	120
第六章、參考文獻.....	122

6.1 中文部分	122
6.2 英文部分	125
附錄一、丁基羥基甲氧苯特性.....	140
附錄二、二丁基羥基甲氧苯特性.....	143
附錄三、第三丁基氫醌特性.....	145
附錄四、台灣之食品添加物使用範圍及限量暨規格標準.....	152
附錄五、歐盟之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範.....	160
附錄六、美國之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範.....	161
附錄七、澳洲之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範.....	162
附錄八、日本之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範.....	163
附錄九、食品中抗氧化劑之檢驗方法—油脂中沒食子酸正丙脂、第三 基丁氫醌、正二氫癒創酸、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲氧苯之檢驗	164

表目錄

表 3-1、Britton-Robinson 緩衝溶液配方	83
表 4-1、以電化學法與高效液相層析法檢測食用油樣品中 TBHQ 含量之比較.....	117
表 4-2、以電化學法與高效液相層析法檢測食用油樣品中 BHA 含量之比較.....	118
表 4-3、以電化學法與高效液相層析法檢測食用油樣品中 BHT 含量之比較.....	119



圖目錄

圖 2-1、第三丁基氫醌結構式	9
圖 2-2、丁基羥基甲氧苯結構式	12
圖 2-3、二丁基羥基甲苯結構式	15
圖 2-4、感測器原理示意圖	21
圖 2-5、電化學分析法大綱	27
圖 2-6、檢測 A 溶液之電極表面之能階圖	30
圖 2-7、循環伏安法之電位—時間關係圖	31
圖 2-8、循環伏安法之電流—電位關係圖	32
圖 2-9、電位變化對應電流變化關係	33
圖 2-10、安培法之待測物與電位及電流關係圖	35
圖 2-11、計時安培法關係圖	37
圖 2-12、電化學應用於抗氧化劑檢測之電極分類	40
圖 2-13、奈米材料製備技術	48
圖 2-14、高分子穩定奈米金粒子表面	51
圖 2-15、硫醇分子穩定奈米金粒子機制	53
圖 2-16、無機陰離子對奈米金粒子穩定作用	56
圖 2-17、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 系統檢測 BHA 之反應機制	59

圖 2-18、MnHCF 修飾石墨蠟電極檢測 BHA 之反應機制	61
圖 2-19、NAPCF 修飾石墨蠟電極檢測 BHA 之反應機制.....	63
圖 2-20、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 系統檢測 BHA 之反應機制.....	65
圖 2-21、金剛石薄膜(BDD)電極檢測 BHA 及 BHT 之反應機制	67
圖 2-22、奈米金修飾玻璃碳電極檢測 BHA、BHT 及 TBHQ 之反應 應機制.....	70
圖 3-1、電化學檢測系統示意圖	76
圖 3-2、本研究之實驗架構	78
圖 4-1、玻璃碳電極以循環伏安法修飾奈米金之電位—電流反應圖	88
圖 4-2、以安培法修飾奈米白金於玻璃碳電極，分別檢測空白試驗 (B-R 緩衝溶液)、BHA、BHT 及 THBQ 之電位—電流反應圖....	90
圖 4-3、以循環伏安法修飾奈米白金玻璃碳電極，分別檢測空白試 驗(B-R 緩衝溶液)、BHA、BHT 及 THBQ 之電位—電流反應圖	91
圖 4-4、奈米金修飾玻璃碳電極檢測 TBHQ 之電位—電流反應圖	94
圖 4-5、奈米金修飾玻璃碳電極檢測 BHA 之電位—電流反應圖	95
圖 4-6、奈米金修飾玻璃碳電極檢測 BHT 之電位—電流反應圖	96
圖 4-7、奈米金修飾玻璃碳電極檢測混合溶液之電位—電流反應圖	97

圖 4-8、pH 值對抗氧化劑檢測之影響	102
圖 4-9、溫度對抗氧化劑檢測之影響	104
圖 4-10、掃描速率對抗氧化劑檢測之影響	106
圖 4-11、電極穩定度之掃描次數-電流圖	108
圖 4-12、電化學系統檢測 TBHQ 之檢量線	110
圖 4-13、電化學系統檢測 BHA 之檢量線	111
圖 4-14、電化學系統檢測 BHT 之檢量線	112



第一章、緒言

1.1 研究背景

加工食品的定義為：「以農產品、畜產品、水產品和林產品等為主要的食品原料，利用物理的、化學的、微生物的或併用的方法，使其改變原來的性質或型態、質地，進而增加食品的保藏性、提高營養價值及便利性、實用性。」(林等，2012)。隨著早期台灣的農業時代演化到工業、服務業等，繁忙的社會、消費者的諸多需求、農業的物流保存問題等，使加工食品不斷演進；現代人類生活中，加工食品逐漸變成生活中不可或缺的必需品，在人類生活中佔有重要地位。即便現代人消費意識抬頭，鼓吹養生，提倡吃「天然的食物」，少吃加工食品，但每天攝食的加工產品仍不計其數，食品添加物總含量難以估計。

食品添加物為食品在加工過程中經常被使用到的加工方法，係加入天然提煉或化學合成的製品，主要目的為改善食品之外觀、氣味、風味、調整或改善食品之質地及延長食品之保存期限等。適當使用可改善食品品質、延長保存時間及增加營養素，對食品腐敗亦有良好的抑制作用(張，2012)。但人體對食品添加物之每日代謝量及其累積對人體之傷害經常引發爭議，因此各國對於添加物都有明確的規範，而台灣的衛生福利部食品藥物管理署對於食品添加物在食品中之用量規範出一套明確的標準，使用時最低限度必需遵照法規之使用範圍及其限量標準。

抗氧化劑為油類產品常見的食品添加物，根據美國食品藥物管理局(Food and Drug Administration, FDA)規定，二丁基羥基甲苯(Dibutyl hydroxy toluene, BHT)、丁基羥基甲氧苯(Butyl hydroxy anisole, BHA)及第三丁基氫醌(Tertiary butylhydroquinone, TBHQ)

在食品中的限量標準分別為：BHA 及 BHT 依據不同食品種類，從馬鈴薯顆粒限量 10 ppm 至起酥油(乳化穩定劑)限量 200 ppm 皆有，而 TBHQ 則規定添加限量標準比例為油或油脂中的 0.02%。

台灣的添加物限量法規則根據食品衛生福利部食品藥物管理署(TFDA)所頒行之「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」第十八條第一項，將食品添加物分為十八類；其中抗氧化劑屬於食品添加物使用範圍及限量標準中的第三類，包含了數十種抗氧化劑；BHA、BHT 及 TBHQ 限量標準分別為：BHA 及 BHT 依據食品種類，標準落在 10 至 1000 ppm，TBHQ 限用於油脂、乳酪及奶油，限量標準為 200 ppm 以下。

抗氧化劑傳統檢測方法以油脂為例，係依據行政院衛生署(現已改為衛生福利部)於 90.03.27 衛署食字第 0900018531 號公告訂定、102.09.06 部授食字第 1021950329 號公告修正的「食品中抗氧化劑之檢驗方法—油脂中沒食子酸正丙脂(PG)、第三基丁氫醌(TBHQ)、正二氫癒創酸(NDGA)、丁基羥基甲氧苯(BHA)及二丁基羥基甲氧苯(BHT)之檢驗」(TFDA, 2013)，採用高效能液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)檢測(行政院衛生福利部, 2001)，亦有單位採用氣相層析儀(Gas chromatography, GC)檢測三種人工抗氧化劑(Yang, 2002)。

1.2 研究動機及目的

動物實驗中發現人工抗氧化劑對動物具有致癌性(Keum *et al.*, 2006; Masui *et al.*, 1986; Mona *et al.*, 2012)，醫學研究統計亦推測人工抗氧化劑為人類致癌的因素之一(Botterweck *et al.*, 2000; Keum *et al.*, 2006)。對人體雖有理論上的致癌性，而實驗性的證據有限，無法完全證實其關聯；在養生當道的時代，消費者對於未知的致癌物更為恐懼。以傳統方法 HPLC 檢測人工抗氧化劑含量雖然非常靈敏，但十分耗時，且成本高又專業，一般消費者不得其門而入，只能被動的等待食品公司或公家機關把關。而一家公司的產品眾多，公家機關需要審核的產品更多，等到發現產品人工抗氧化劑超標時，不知情的消費者已經不知吃進多少可能的致癌物，容易造成民眾恐慌。

本研究主要目的為開發簡單、快速、低成本的電化學方法檢測食品中人工抗氧化劑含量，做為樣品的初步篩選門檻。建立電化學檢測系統，並確立檢測系統之操作參數及方法。透過檢量線的建立，應用於實際樣品之檢測，確認本檢測方法檢測人工抗氧化劑之可行性。

第二章、文獻回顧

2.1 抗氧化劑

2.1.1 種類與特性

暴露在「空氣」和「陽光」是食物氧化或腐敗的兩大因素，所以市面上大多將食物避光保存和存放在密封容器中，或者塗蠟包裹儲藏；而抗氧化劑為一種食品添加劑，可以幫助食品對抗氧化或變質，提高食品穩定性。

然而，氧氣對於植物的呼吸作用也是十分重要的，將蔬果類存放於厭氧環境下會產生難聞的氣味和難看的顏色(Kader *et al.*, 1989)；不同於由細菌和真菌造成食品變質，冰凍或冷藏食物仍然能被相對較快氧化，故新鮮的水果與蔬菜一般儲放在含 8% 氧氣的環境下。除了儲存條件外，有些產品亦會添加有抗氧化作用的抗氧化劑，包括天然的維生素 C 和維生素 E，及人工合成的沒食子酸丙酯(Propyl gallate, PG)、二丁基羥基甲苯(Dibutyl hydroxy toluene, BHT)、丁基羥基甲氧苯(Butyl hydroxy anisole, BHA)、第三丁基氫醌(Tertiary butylhydroquinone, TBHQ)和丁基羥基茴香醚等。

不飽和脂肪酸是常見易被氧化的分子，脂肪酸氧化會引起酸敗(Robards *et al.*, 1988)。由於氧化後的脂類會變色並產生類似金屬或硫磺的味道，故防止富含脂肪食品的氧化是非常重要的，含脂食物很少經由風乾存放，而是以煙燻、鹽漬或發酵的方法來儲藏；脂類產品，例如：橄欖油，由於原料含有天然抗氧化劑，所以大多能避免氧化，但部分廠商仍會另外添加抗氧化劑；此外，油脂

對光氧化敏感(Carlo *et al.*, 2004)，故市售油脂為了維持產品品質，除添加抗氧化劑外，大多會輔以使用棕色或深色容器包裝。

不同的抗氧化劑對各種活性氧物種的反應活性不同，所以衡量抗氧化劑的抗氧化性並非易事。在食品科學中，抗氧化能力指數(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)已經成為衡量食品和添加劑抗氧化能力的主要標準(Cao *et al.*, 1993; Ou *et al.*, 2001)。其他的測定方法包括 Folin-Ciocalteu 試劑法和等效抗氧化容量分析法(Trolox equivalent antioxidant capacity assay) (Katsube *et al.*, 2004)。

抗氧化劑的種類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)、銼合劑型(chelating agent)三類(Dziedzic, 1986)，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，成為自由基清除者，終止自由基氧化連鎖反應(江, 2007)；依來源可分成「天然抗氧化劑」及「人工抗氧化劑」；若依溶解性，則可分為「水溶性抗氧化劑」及「脂溶性抗氧化劑」(萬等, 1998)，「水溶性抗氧化劑」包括：抗壞血酸及其鈉鹽、異抗壞血酸及其鈉鹽、L-半胱氨酸(L-Cysteine)、硒(Selenium)等，「脂溶性抗氧化劑」包括：二丁基羥基甲苯(Dibutyl hydroxy toluene, BHT)、丁基羥基甲氧苯(Butyl hydroxy anisole, BHA)、沒食子酸丙酯(Propyl gallate, PG)、第三丁基氫醌(Tertiary butylhydroquinone, TBHQ)、維他命 A、生育醇(維他命 E)、Gamma-亞麻油酸(γ -Linoleic acid, GLA)、L-麩胱甘肽(L-Glutathione)等。其中，油脂或含油脂之產品中，最常見的抗氧化劑包含：生育醇(維生素 E)、二丁基羥基甲苯(BHT)、丁基羥基甲氧苯(BHA)、第三丁基氫醌(TBHQ)；一般消費者對於維生素 E

的觀感較為正面，對未知的添加物都較為恐懼，雖然目前為止抗氧化劑違法添加或添加超標的案例很少，但民眾對於含油脂之產品中含有二丁基羥基甲苯(BHT)、丁基羥基甲氧苯(BHA)、第三丁基氫醌(TBHQ)等酚類抗氧化劑仍會感到十分恐慌，其中最近一次的事件當屬 2012 年在廣州發生的「徐福記」事件。

徐福記在該公司之產品「芒果酥」、「芝麻香酥沙琪瑪」及「落花生酥心糖」包裝上標明含有食品添加劑 TBHQ、BHT。而根據中國大陸的國家標準 GB2760-2011《食品添加劑使用衛生標準》規定，第三丁基氫醌(陸譯：特丁基對苯二酚，TBHQ)和二丁基羥基甲苯(BHT)兩種食品添加劑不能添加到糕點或糖果類食品中，故遭到消費者檢舉，雖然徐福記解釋是由原料帶入的抗氧化劑，但依照大陸的中華人民共和國衛生部所頒布之國家標準 GB7718-2011《食品安全國家標準預包裝食品標籤通則》規定，直接使用的食品添加劑應在食品添加劑中標註，非直接使用的食品添加劑不在食品添加劑中標註，而 TBHQ 及 BHT 有標註在包裝上，表示該公司是直接使用該兩種食品添加劑，若原料真無使用此兩種抗氧化劑，仍觸犯《食品安全法》的標示不實，故法院仍宣判該公司違法。而此事件也引發討論，引起消費者議論紛紛，不少專家出面說明抗氧化劑的作用，及用法規解釋 TBHQ、BHT 對人體的影響等，希望可以平息消費者恐慌。

2.1.2 人工抗氧化劑特性及其法規限量標準

(1) 第三丁基氫醌(Tertiary butylhydroquinone, TBHQ)

第三丁基氫醌，又名特丁基對苯二酚叔丁基對苯二酚、叔丁基氫醌，英文 Tertiary butylhydroquinone，縮寫 TBHQ，分子式為 $C_{10}H_{14}O_2$ ，結構式如圖 2-1。特性(附錄三)為白色或灰白色結晶性粉末，有些微特殊氣味，抗氧化性能優越，比 BHT、BHA、PG (沒食子酸丙脂) 和維生素 E 具有更強的抗氧化能力，抗氧化能力約比 BHA、BHT、PG 強 5~7 倍(劉等, 2013)；添加過程可與其他抗氧化劑混用，若添加適當食品級植酸，抗氧化效果更優(Reda, 2011)。除此之外，TBHQ 亦可有效抑制枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)等細菌以及黑麴菌、雜色麴黴等微生物生長(Ooi *et al.*, 2013)。

台灣對於 TBHQ 之限量標準係依據衛生福利部食品藥物管理署法規屬於第(三)類抗氧化劑食品，抗氧化劑之使用範圍及限量如附錄四所示，TBHQ 的添加限量規範如下：

1、油脂、乳酪 (butter)及奶油 (cream)；用量為 0.20 g/kg 以下。

在台灣法規中僅能添加於此三類食品中，而 World Health Organization(WHO)和 FDA 建議 TBHQ 之每日容許攝取量 (Acceptable daily intake, ADI)為 0~0.2 mg/kg，澳洲對於 TBHQ 添加之限量範圍為 0.02~0.1%，日本(附錄八)及歐盟(附錄五)則規定不得添加。

有研究顯示：在動物試驗中，最高劑量組小鼠卵細胞腺瘤的發生率上升，但未觀察到卵巢卵泡細胞癌；氫醌可引起小鼠的甲狀腺毒性，但並不引起大鼠的甲狀腺毒性。在對狗的 117 週飼養試驗中，經特定組織病理學檢查也未顯示異常，但最高劑量組和最低劑量組相比，紅細胞計數和血紅蛋白值均下降，顯示隨著劑量的升高，TBHQ 對實驗動物的健康的影響愈顯著，例如產生胃癌和對 DNA 的損傷(Gharavi & Ayman, 2005)，但由於該實驗週期短，尚無法證實其致癌性，亦無法確認對人體之傷害，需再進一步驗證，故目前國際癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)尚未確定 TBHQ 之分類。TBHQ 與其他抗氧劑相比的缺點是可以添加的種類少，大多用於食品方面，醫藥和化妝品行業多採用其他抗氧劑，例如：BHT，茶多酚等；製備成本較 BHA 及 BHT 高，且易產生酚汙染(黃等，2003)。



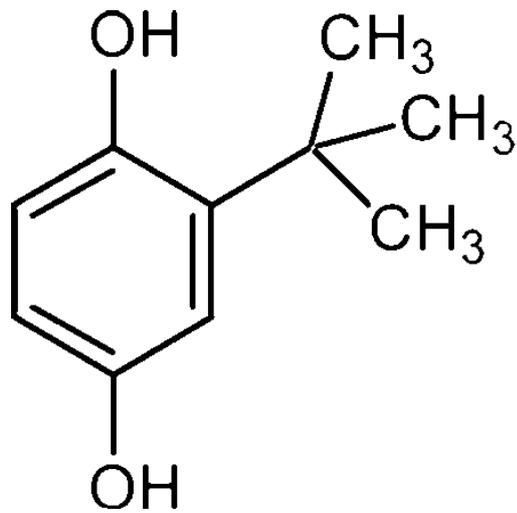


圖 2-1、第三丁基氫醌結構式。

Fig. 2-1 The molecular structure of tertiary butylhydroquinone (TBHQ).



(2) 丁基羥基甲氧苯(Butyl hydroxy anisole, BHA)

丁基羥基甲氧苯，英文 Butyl hydroxy anisole，縮寫 BHA，分子式為 $C_{11}H_{16}O_2$ ，結構式如圖 2-2。特性(附錄一)為無色，或略帶黃褐色結晶或塊或白色結晶性粉末，略具特異臭味，不溶於水，可溶於乙醇及丙二醇。BHA 是食物添加劑的一種，常用在油脂食品當作抗氧化劑使用，作用是防止不飽和脂肪及油經氧化而酸敗。可以減緩維生素 A、E、胡蘿蔔素、油脂、植物油的氧化速度，穩定食物中的油脂，延長食品保存期限。BHA 是人工合成的抗氧化劑，非天然存在於食品中，通常是在食品加工時添加於其中，使油脂不易被氧化而產生油耗味。BHA 抗氧化劑可添加於各種食品中，包括食用油脂、肉製品、穀物類、馬鈴薯產品、烘焙食品、堅果、點心類、口香糖和汽水更可延伸到化妝品，特別是唇膏和眼影。

除抗氧化作用外，BHA 還有高抗菌力，可避免食品中黴菌毒素中毒。0.25 g/kg BHA 可完全抑制黃麴黴菌生長及黃麴黴菌毒素的產生，0.2 g/kg BHA 即可完全抑制食品及飼料中的其他黴菌，如青黴菌、黑麴黴菌的孢子生長。BHA 在人體中作用減少一半所需時間為 2 至 5 天，大部份可由尿液排出。

台灣對於 BHA 之限量標準係依據衛生福利部食品藥物管理署法規屬於第(三)類抗氧化劑食品，抗氧化劑之使用範圍及限量如附錄四所示，BHA 的添加限量規範如下：

- 1、冷凍魚貝類及冷凍鯨魚肉之浸漬液；用量為 1.0 g/kg 以下。
- 2、口香糖及泡泡糖；用量為 0.75 g/kg 以下。

- 3、油脂、乳酪 (butter)、奶油 (cream)、魚貝類乾製品及鹽藏品；用量為 0.20 g/kg 以下。
- 4、脫水馬鈴薯片(flakes)或粉、脫水甘薯片(flakes)，及其他乾燥穀類早餐食品；用量為 0.05 g/kg 以下。
- 5、馬鈴薯顆粒 (granules)；用量為 0.010 g/kg 以下。
- 6、膠囊狀、錠狀食品；用量為 0.40 g/kg 以下。

美國食品藥物管理局(U.S. FDA)認為 BHA 為公認安全的添加物 (Generally Recognized As Safe, GRAS)。BHA 在高濃度下對眼睛和皮膚有溫和的刺激性，毒性作用的器官為肝臟、腎臟和腸胃道。WHO 建議之每日容許量攝取(ADI)為 0~0.5 mg/kg。國際癌症研究中心(IARC)將 BHA 分類為 2B，為『對人體可能有致癌性』之物質(Pokorny *et al.*, 2001)。

美國國家衛生研究院(National Institutes of Health)提及：有研究指出 BHA 可能具有致癌性；該研究以餵食 F344 大鼠、黃金鼠及 B6C3F1 小鼠三種不同品種的鼠兩種高劑量(0.5~2%)的 BHA，並在 104 週內間隔 8 週陸續犧牲，觀察其細胞內乳頭狀瘤(papillomas)及惡性腫瘤(carcinomas)，結果顯示三品種皆有一定比例以上罹患乳頭狀瘤及惡性腫瘤(Masui *et al.*, 1986)。雖然實驗結果並非百分之百確定 BHA 與惡性腫瘤完全相關，但仍有罹患乳頭狀瘤及惡性腫瘤的高度風險，故 BHA 必須嚴格限定添加量，政府有關單位也必需嚴格審查檢驗其含量是否超出規定。

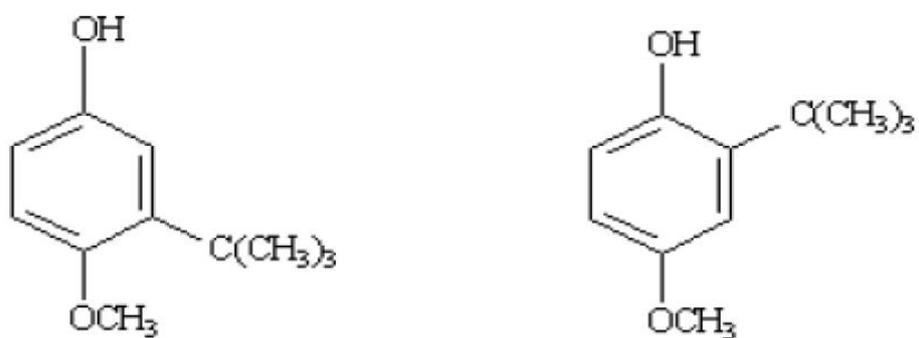


圖 2-2、丁基羥基甲氧苯結構式。

Fig. 2-2 The molecular structure of butyl hydroxy anisole (BHA).



(3) 二丁基羥基甲苯(Dibutyl hydroxy toluene, BHT)

二丁基羥基甲苯，又稱 2,6-二第三丁基對甲酚，英文 Dibutyl hydroxy-toluene(亦可寫做 Butylated hydroxytoluene 或 Butylhydroxytoluene)，縮寫 BHT，分子式為 $C_{15}H_{24}O$ ，結構式如圖 2-3。特性(附錄二)為白色粉末狀，可以減緩維生素 A、E、胡蘿蔔素、油脂、植物油的氧化速度，穩定食物中的油脂，延長食品保存期限，常用在油脂食品當作抗氧化劑使用，防止不飽和脂肪及油脂氧化酸敗。BHT 是人工合成的抗氧化劑，並非天然存在於食品中，通常在食品加工時添加於食品中，使油脂不易被氧化而產生油耗味。BHT 是目前國際上廣泛應用的廉價抗氧化劑，一般與丁基羥基甲氧苯(Butylated hydroxyl anisole, BHA)併用，並輔以檸檬酸或其他有機酸為增效劑。BHT 對熱穩定，與金屬離子作用不會著色，相對 BHA 來說，毒性稍高一些。

台灣對於 BHT 之限量標準係依據衛生福利部食品藥物管理署法規屬於第(三)類抗氧化劑食品，抗氧化劑之使用範圍及限量如附錄四所示，BHT 的添加限量規範如下：

- 1、冷凍魚貝類及冷凍鯨魚肉之浸漬液；用量為 1.0 g/kg 以下。
- 2、口香糖及泡泡糖；用量為 0.75 g/kg 以下。
- 3、油脂、乳酪 (butter)、奶油 (cream)、魚貝類乾製品及鹽藏品；用量為 0.20 g/kg 以下。
- 4、脫水馬鈴薯片(flakes)或粉、脫水甘薯片(flakes)，及其他乾燥穀類早餐食品；用量為 0.05 g/kg 以下。
- 5、馬鈴薯顆粒 (granules)；用量為 0.010 g/kg 以下。
- 6、膠囊狀、錠狀食品；用量為 0.40 g/kg 以下。

研究顯示 BHT 本身並無遺傳毒性，但可能會改變其他藥物之遺傳毒性，而 100 % BHT 對皮膚是溫和的刺激物與溫和的致過敏物質，皮膚脫色臨床測試顯示皮膚接觸 1~2 % 之 BHT 並不會造成皮膚脫色，只有極少數人皮膚會有脫色現象(Lanigan & Yamarik, 2002)。BHT 在脂肪內半衰期(Half-life)為 7~10 天(Daniel & Gage, 1965)。歐洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)對 BHT 之建議每日容許攝取量(ADI)為 0.25 mg/Kg，世界衛生組織(WHO)和美國食品藥物管理局(Food and Drug Administration, FDA)建議每日容許攝取量(ADI)為 0~0.125 mg/Kg，並且 FDA 將 BHT 分類為安全物質(GRAS)；國際癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)將 BHT 分類為第 3 類，為『對動物有致癌性，對人體則資料不足』(Pokorny *et al.*, 2001)。美國有機資材審核協會 (Organic Materials Review Institute, OMRI) 研究資料顯示：人體攝入 40 mg/Kg/bw 劑量之 BHT，約 50% 會在 24 小時內由尿液排出；其餘 BHT 會由體內組織代謝超過 10 天(OMRI, 2002)。

由於目前研究顯示 BHT 對人體具有潛在致癌風險，若攝食過多可能會導致 BHT 長時間殘留在體內無法排出，增加致癌機率；為了把關消費者健康、確保消費者不會誤食超過標準而增加罹癌風險，必需嚴格審查檢驗其含量是否超出法規限量標準。

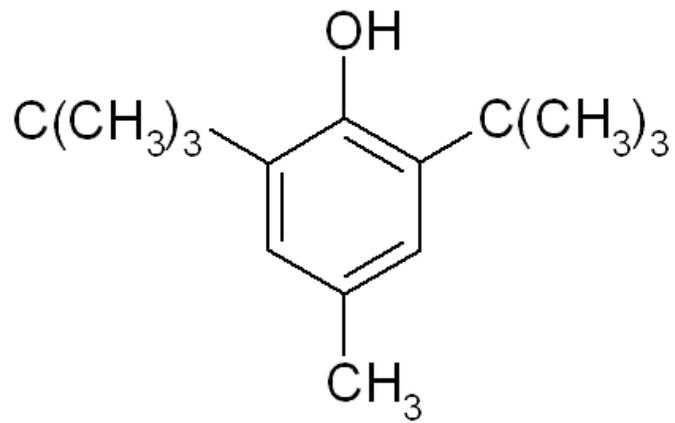


圖 2-3、二丁基羥基甲苯結構式。

Fig. 2-3 The molecular structure of dibutyl hydroxy toluene (BHT).



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，Codex Alimentarius（國際食品法典委員會）對於人工抗氧化劑並未有統一規定，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（European Union, EU）對於人工抗氧化劑的法規(附錄五)中，TBHQ 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（附錄六），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（附錄七），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（包括去皮馬鈴薯類）等只准使用天然抗氧化劑。日本的相關規範(附錄八)與我國相同亦屬於正面表列管理(陳與周，2010)。

總結以上，TBHQ 之抗氧化能力上較 BHA 及 BHT 好，毒性試驗結果三種抗氧化劑相當(BHA 毒性略小)，但在致癌潛在風險上，TBHQ 尚未確定，故使用於食品添加仍有不確定之風險，也因此對於 TBHQ 之限制添加的食品種類較其他兩者少；此三種人工抗氧化劑對人類有潛在致癌風險，仍需嚴格把關。

2.1.3 傳統檢測方法

食品中抗氧化劑檢驗方法，萃取方面有蒸餾抽出法 (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(Yang *et al.*, 1993)；目前台灣採用的萃取法為液-液抽出法，使用正己烷、乙腈及異丙醇萃取。

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)、高效液相層析法 (High-performance liquid chromatographic method) 及氣相層析質譜儀法 (Gas chromatograph/tandem mass spectrometer method) 等(Yang *et al.*, 1993)；目前較常見的檢測方法為氣相層析及液相層析，但由於衛生署公告檢驗方法為液相層析，故液相層析又較氣相層析更為普遍。

使用氣相層析檢驗法之文獻中，Min 及 Schweizer 以不需衍生化方式，將 200 ppm BHA、200 ppm BHT 及 100 ppm TBHQ 添加於油中，以氣相層析儀分析後分別測得 BHA、BHT 及 TBHQ 為 193~203 ppm、195~207 ppm 及 98~106 ppm，偵測極限為 10 ppm(Min & Schweizer, 1983)。Icenhour 及 Van Dalah 以乙酸乙酯萃取魚油中 TBHQ 並添加衍生化試劑 (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, BSTFA) 後，再以氣相層析儀分析，其回收率介於 95~113%(Icenhour & Van Dalah, 1991)。Ohta 等人分別添加 BHA、BHT 及 TBHQ 各 100 ppm 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%、0.7%~106%及 70.8~116%，其氣相層析儀偵測極限為 1 ppm，氣相層析質譜儀偵測極限為 0.1 ppm(Ohta *et al.*, 1997)。Choong 和 Lin 利用添加衍生化試劑 (Tetramethylazanium hydroxide, 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(Choong & Lin, 2001)。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%(Lin *et al.*, 2003)。

使用液相層析檢驗法之文獻中，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(Indyk & Woollard, 1986)。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(Andrikopoulos *et al.*, 1991)。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(Nordihydroguaiaretic acid)等 5 種抗氧化劑，回收率範圍介於 90.5~100.7%(Yang *et al.*, 1993)。

台灣現行使用的檢測方法為 90.03.27 衛署食字第 0900018531 號訂定、102.09.06 部授食字第 1021950329 號修正之「食品中抗氧化劑之檢驗方法—油脂中沒食子酸正丙脂、第三基丁氫醌、正二氫癒創酸、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯之檢驗」法進行檢測(附錄九)，採用液—液抽出法萃取樣品，並使用高效液相層析法

檢測其含量。此檢測方法可測得精確的含量數據，但是過程十分繁複，需要配置許多藥品，而且需要對機器操作十分了解；檢測所耗的時間長，一次檢測需耗時 20 分鐘以上，當檢測樣品眾多時，此方法無法在短時間內得到分析結果，故本研究欲開發可以快速檢測的方法，做為樣品初步篩選的門檻。



2.2 電化學感測器

2.2.1 感測器原理及特性

感測器(sensor)基本原理為透過轉換器將待測物濃度經過轉換變成所需訊號再輸出分析，因此感測器通常由感應元件及轉換元件組成；當感應元件接收外界環境的物理或化學變化(例如：壓力、溫度、長度、濕度、pH 值及化學成分等)，透過轉換元件轉譯成可量測的電子訊號(黃興莊，1999)，之後再以此做分析。如此一來，除了可替代人類主觀的感官記錄(視覺、聽覺、嗅覺、味覺等)、方便快捷的記錄量測外，更能避免特殊危害對量測人員的影響及主觀意識的誤差(Walker & Rapley, 2014)，感測器之原理(Zorbas *et al.*, 2004)如圖 2-4 所示。近年來感測器在許多領域中皆被廣泛運用，從一般市面上的電子產品、機器，到醫療用的血糖感測器，皆屬於感測器之範疇；感測器的作用為「經由外界輸入訊號，再將訊號轉換為電流訊號的元件」(Xudong *et al.*, 2008)。

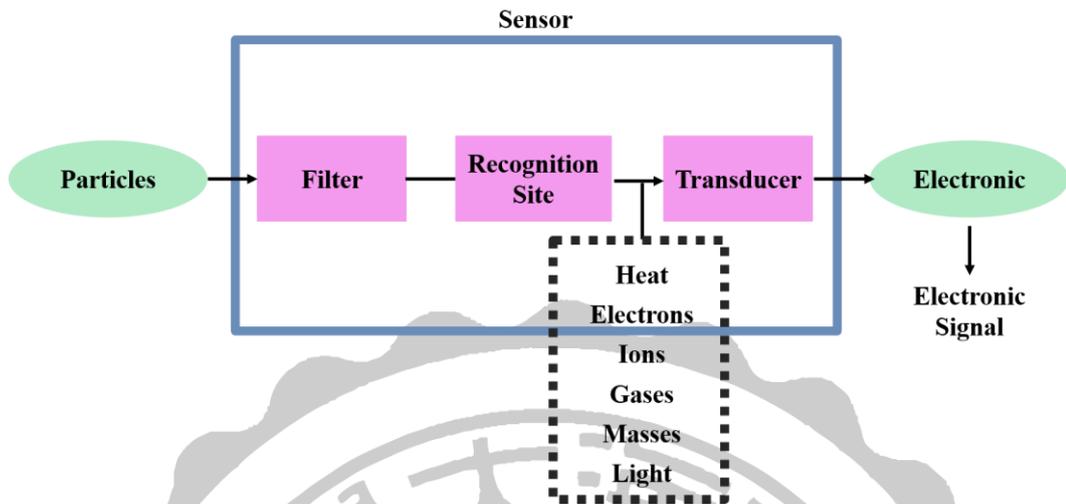


圖 2-4、感測器原理示意圖(Zorbas *et al.*, 2004)。

Fig. 2-4 Schematic representation of the principle of sensor (Zorbas *et al.*, 2004).

感測器組成大致可分為兩部分；分子辨識單元(Molecular recognition unit)及物理化學換能器(Physicochemical transducer)。

分子辨識單元：用以偵測分析物；依生產方式可分為：(1) 化學感測器(Chemical sensor)：以化學方法合成對分析物有辨識功能的物質；(2) 生物感測器(Biosensor)：以抗體、抗原或酵素等生物體所產生的物質作為辨識依據 (Chambers *et al.*, 2008)。

物理化學換能器：將物質辨識之行為轉變為可被儀器偵測的訊號，被偵測的訊號常見以三種形式：(1) 電化學電極(Electrochemical electrode)之電流訊號；(2) 光學訊號(Optical signal)；(3) 光電聲波訊號(Optical-electronic acoustic signal) (Farre´ *et al.*, 2005)。

若依轉換機制分類，感測器大致可分為物理感測器(Physical sensor)、生物感測器(Biosensor)及化學感測器(Chemical sensor) (Zheng *et al.*, 2003)。

物理感測器係檢測物理量的感測器。利用物理效應，將被測量的物理量轉化為便於處理的能量形式信號裝置。其輸出的信號和輸入的信號有可以以公式表示的確定關係。目前市面上常見的物理感測器有光電式感測器、壓電感測器、壓阻式感測器、電磁式感測器、熱電式感測器、光導纖維感測器等。

化學感測器通常是指體積小、靈敏度高且對特種有機、無機或生化醫學物質具有相當高選擇性之偵測器。IUPAC 組織於 1991 年對化學感測器之定義為：「化學感測器為一種能將量測物的化學

訊號，如濃度、成分組成等，轉換成物理訊號的裝置」。而上述的化學訊號可由分析物進行之化學反應產生，或由量測系統之物理性質得到。化學感測器皆由特殊化學感應材料辨識元(Recognition elements)感應元件及化學/電能信號換能器(Transducer)所組成；一般常用化學感測器依化學感測元件之不同分類，可分為電化學感測器(Electrochemical sensors)、壓電晶體化學感測器(Piezoelectric crystal chemical sensors)、光化學感測器(Optical sensors)、生物化學感測器(Bio-sensors)、表面聲波(Surface acoustic wave, SAW)化學感測器，及微晶片(Microchip)微化學感測器(Micro-sensors)。電化學感測器是利用待測物電化學氧化還原或所引起的感應元件阻抗之改變而發展出來之感測器；壓電晶體化學感測器是利用壓電晶體之共振頻率會因表面吸附待測物而改變開發出來之感測器；光化學感測器是利用待測物吸收特殊波長之光波或發出螢光而設計之感測器；生物化學感測器為利用生化物質(如酵素及抗體)或其他化學感應材料以感應偵測生化醫學樣品(如葡萄糖，尿酸等)；表面聲波化學感測器是利用高週波(100-300 MHz)聲波通過含待測物之壓電薄膜表面產生高週波頻率或波速變化而設計之感測器；而微晶片/微小化化學感測器則將整個感測器(含感應元件及換能器)全部嵌入一小晶片中而製成微感測器，用在一般化學及生化微晶片分別通稱為化學晶片及生物晶片，微晶片化為各種化學感測器發展之最後目標(施，2001)。目前常見應用的化學感測器包含 pH 計、酒精感測器及污染物檢測等。

生物感測器是一種將生物分子固定化(Immobilized biomolecules)來偵測與其具有特異性結合的分析物，屬於化學感測器的一種，1996 年 IUPAC 組織對生物感測器之定義：「生物感測器為一個使用生物性的識別元件，與訊號轉換元件結合，可提供特定的

定量或半定量之分析訊號。一般生物感測器主要由生物辨識元件 (Biological recognition element)、信號換能器 (Signal transducer) 及訊號處理器 (Signal processor) 所組成，而生物辨識元件是生物感測器最重要的部分；生物辨識元件在被修飾上感測器表面後，對分析物具有良好特異性，與待測物質結合或反應產生物理或化學變化，經過信號換能器及訊號處理器將結果紀錄、分析；生物辨識元件主要以酵素、抗體、抗原等生物體所產生的物質來做辨識 (Bănică, 2012)。目前生物感測器的應用包括醫學診斷、植物之疾病診斷、生物化學之鑑定與分析等。

感測器可分成許多類型，而其共通點為需具備以下特性 (Thévenot *et al.*, 2001)：

- (1) 靈敏度 (Sensitivity)：感測系統對每單位待測物所產生訊號大小的程度，當線性關係良好時，可做為檢量線。
- (2) 穩定度 (Stability)：感測器在使用或儲存一段時間後，對於待測物的訊號是否改變；其影響因素相當多，包含溫度、濕度、或是感測元件老化，都有可能造成穩定度下降。
- (3) 選擇性 (Selectivity)：此乃感測器最重要的特性。在複雜的感測環境中，除了待測物質有感測訊號外，其他物質的存在對待測物質的干擾，及其占總訊號的比例是否影響結果判讀。
- (4) 應答時間 (Response time)：待測物進入感測系統後至訊號傳出並達穩定狀態所需的時間。
- (5) 再現性 (Reproducibility)：在相同感測條件下，對待測物進行重複試驗，若一致性良好表示轉換元件的可靠度越高。

2.2.2 電化學分析法

電化學分析法是一種伴隨著電荷轉移的化學反應，也就是利用電位調整電極表面電子的能量，使具有電活性的物種(Electroactive species)能夠與電極發生電荷轉移的反應(Crow, 1979; Bard & Faulkner, 2001)。電化學源自於電池構想，組成包含工作電極(Working electrode, WE)、輔助電極(Counter electrode, CE)和參考電極(Reference electrode, RE)；其分別功用(Zoski, 2007)為：

工作電極為欲研究、測試的電極，此電極不固定為陽極或陰極，視反應的不同而異。若在電極發生氧化反應，工作電極為陽極；反之則為陰極。

輔助電極為相對應工作電極，隨著工作電極改變而改變，故可為陰極或陽極；此電極上發生的電化學反應以不影響工作電極為原則。一般常使用白金絲做為輔助電極。

參考電極主要是準確設定工作電極上之電位，故此電極在測定的電流範圍內，本身電位必須盡量維持在一固定值；因此，理想的參考電極之電化學性能必需是可逆且穩定的，且需擁有近似於理想非極化電極(Ideally non-polarized electrode)的特性，具有高交換電流和快速的電位應答之特性。一般常使用銀—氯化銀(Ag/AgCl)或甘汞電極(Calomel electrode)做為參考電極。

電化學分析方法中已有相當多的種類，圖 2-5 為電化學分析方法大綱，分為介面方法及總體方法。介面方法具有較多用途，是根據電極表面和鄰近電極表面的溶液薄層間介面所發生的現象

做檢測分析；而總體方法是根據發生在整個溶液中的現象，並盡力避免界面效應。介面方法可分為動態和靜態，依電化學電池操作時是否有電流而定；靜態方法採用電位測量，具有速度及選擇性的關係；動態介面法有數種形式，一般而言，這些方法靈敏且有相當寬的動態範圍(約 10^{-3} M 至 10^{-8} M)，具有低偵測極限(Skoog & Leary, 1992)。

依據電化學性質常被運用於生物感測器的方法可分為循環伏安法(Cyclic voltammetry, CV)、計時安培法(Chronoamperometry)、及電化學阻抗分析法(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)等。本研究使用循環伏安法及安培法(Amperometry)，故以下介紹此兩種分析方法。

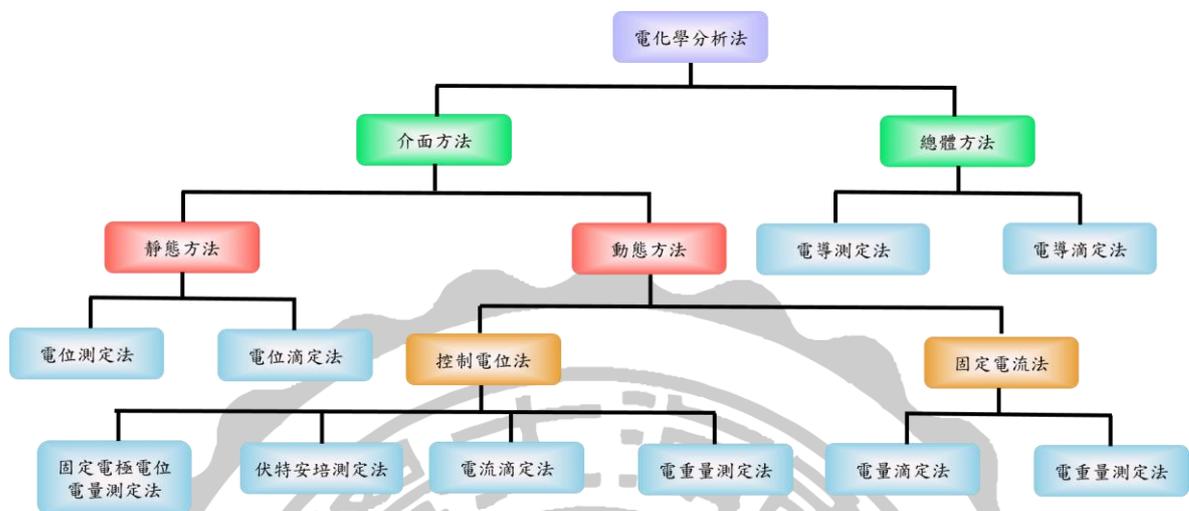


圖 2-5、電化學分析法大綱(Skoog & Leary, 1992)。

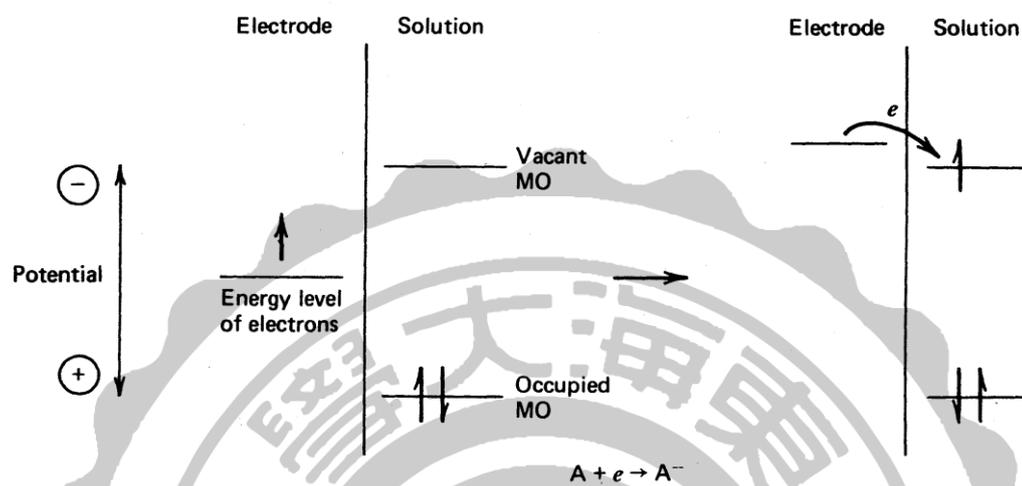
Fig. 2-5 The outline of electrochemical analysis (Skoog & Leary, 1992).

2.2.2.1 循環伏安法

伏安法(Voltammetry)是指電極在濃度極化條件下，施以不同電位時能階的變化，而電流的變化係因電子轉移所造成，因此能得到電流—電位之曲線。然而物質本身的能階高低也不同，圖 2-6 表示電極與物質之間的能階圖；當電位掃描至特定電位時，溶液中的物質經擴散至電極表面進行氧化或還原反應(Bard & Faulkner, 2001)。

循環伏安法(Cyclic voltammetry, CV)主要用於探討物質在溶液中之電化學行為，藉由電位掃描所表現出波峰電位、波峰電流大小及形狀等，判斷物質的電化學特性，且實驗通常可在短時間完成，是發展電化學系統中最重要的分析工具。循環伏安法基本原理為：所施電位隨著時間以對稱鋸齒波型(Symmetrical saw-tooth waveform)正向與負向電位來回掃描(圖 2-7)，使電流改變；施以不同電位，使分析物產生氧化(oxidation)或還原(reduction)反應，記錄其電流改變，成為循環伏安法電流與電位的關係圖(圖 2-8)；由圖中可得到實驗分析所需要之資訊包含：氧化波峰電流(Anodic peak current)、還原波峰電流(Cathodic peak current)、氧化波峰電位(Anodic peak potential)及還原波峰電位(Cathodic peak potential)。將電位改變及循環伏安法結果紀錄上下對照(圖 2-9)，可以清楚了解循環伏安法結果圖在不同電位下之變化。

(A)



(B)

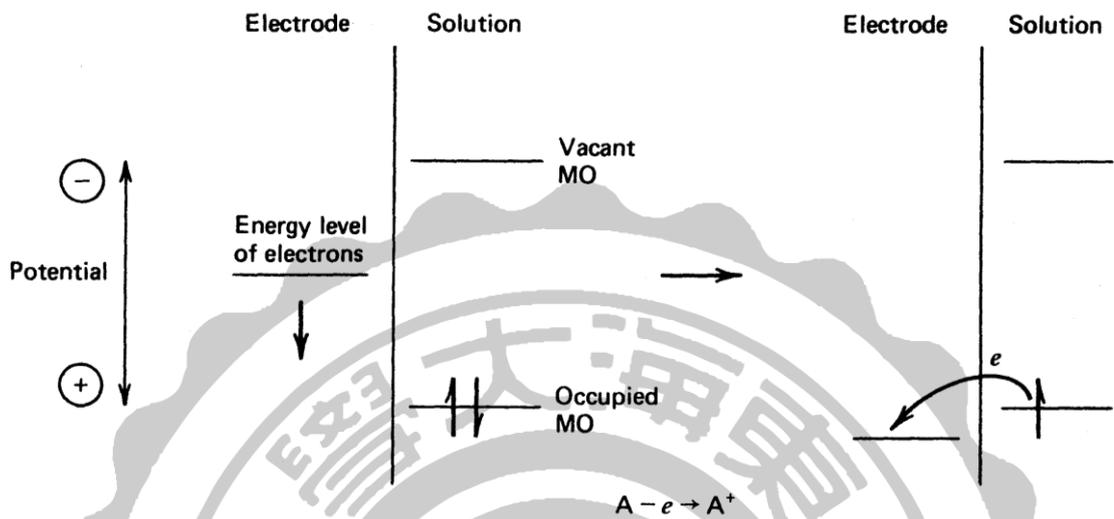


圖 2-6、檢測 A 溶液之電極表面之能階圖(Bard & Faulkner, 2001)。(A)還原反應。(B)氧化反應(Bard & Faulkner, 2001)。

Fig. 2-6 Representation of (A) reduction and (B) oxidation process of energy levels in A solution (Bard & Faulkner, 2001).

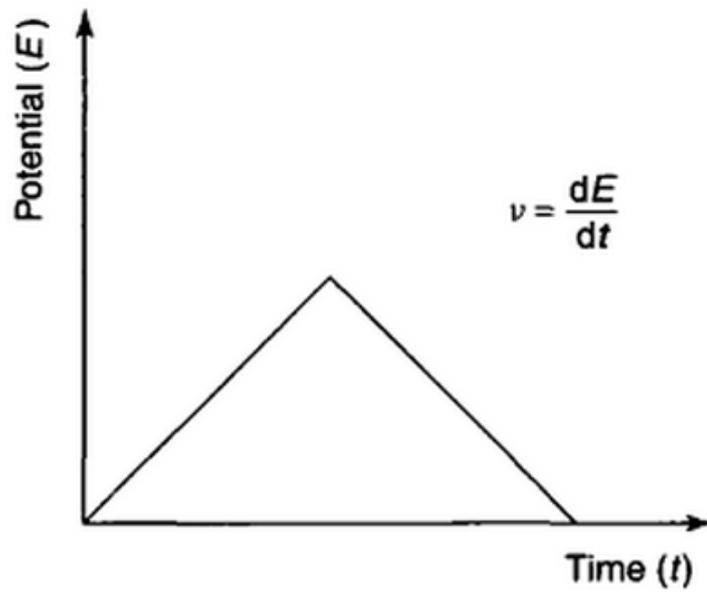


圖 2-7、循環伏安法之電位—時間關係圖(Eggins, 2002)。

Fig. 2-7 Cyclic voltammetry potential waveform (Eggins, 2002).

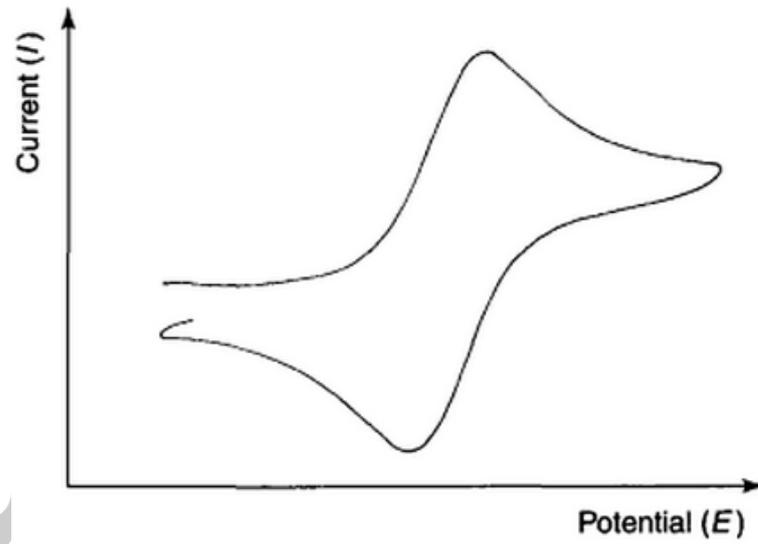


圖 2-8、循環伏安法之電流—電位關係圖(Eggins, 2002)。

Fig. 2-8 Current versus potential curve for cyclic voltammetry (Eggins, 2002).

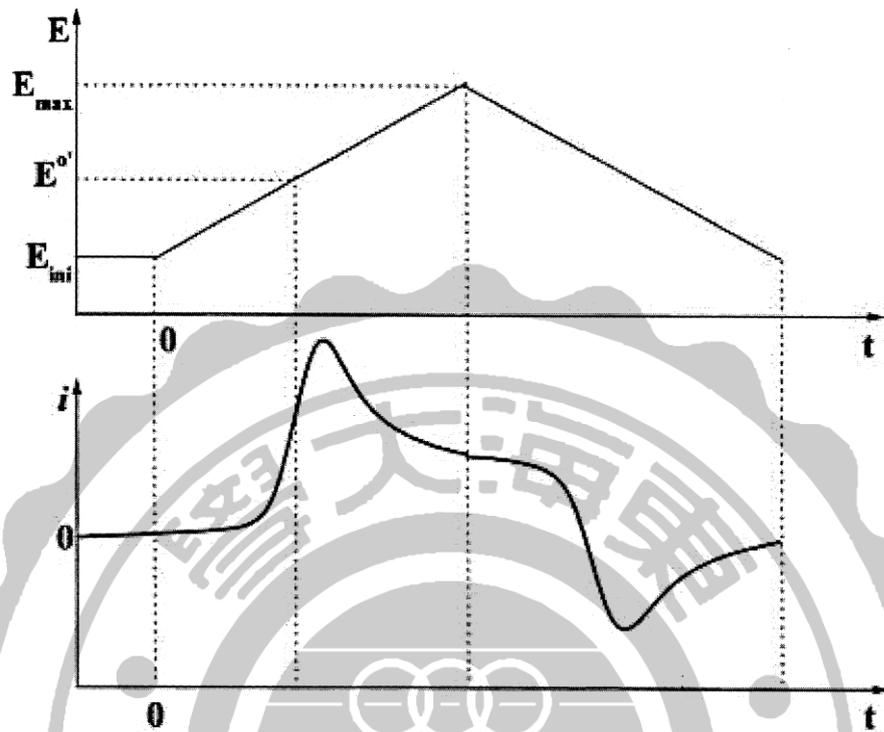


圖 2-9、電位變化對應電流變化關係(Skoog et al., 2007)。
Fig. 2-9 The relationship between potential variation and current variation (Skoog et al., 2007).

2.2.2.2 安培法

安培法(Amperometry)為工作電極在極化狀態下，藉由控制施加電位，使電位維持在可使待測物進行氧化或還原反應之常數值；當待測物加入時，電極上之電子轉移會表現在電流變化上，由此可得電流對時間(I-t)圖。在此方法中，電流變化量會隨加入的待測物濃度而成比例關係(廖，2011)。

在電化學分析上，安培法(Amperometry)與計時安培法(Chronoamperometry)皆為施加電位測量電流的方法。兩種方法之不同點在於前者用於動態系統，當待測物經過電極表面時，可獲得電流改變量，持續時間記錄電流值，如圖 2-10 所示；後者屬於靜態系統下，記錄短時間內產生的瞬間最大電流值(呂，2003)，如圖 2-11 所示，其原理為：由儀器對其工作電極提供一階躍電位，並觀察電流對時間之變化，通常用於量測電極表面氧化還原物質濃度(電流)隨時間之變化關係。如圖 2-11(A)所示，當系統有氧化還原物質存在且電極電位在 E_1 時，不發生氧化還原反應，當提供一階電位使其電位達 E_2 時，則產生迅速的還原反應，因此使得擴散至電極表面之還原物質濃度為零，其應達電流與時間關係如圖 2-11(B)所示(Eggins, 2002)。

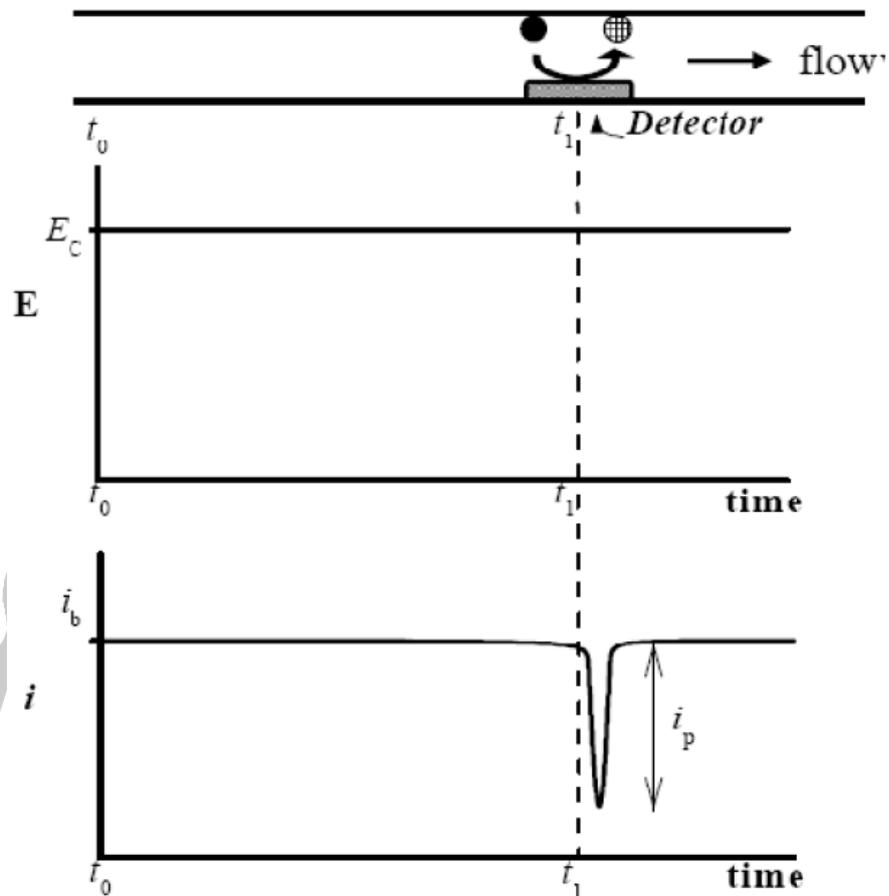
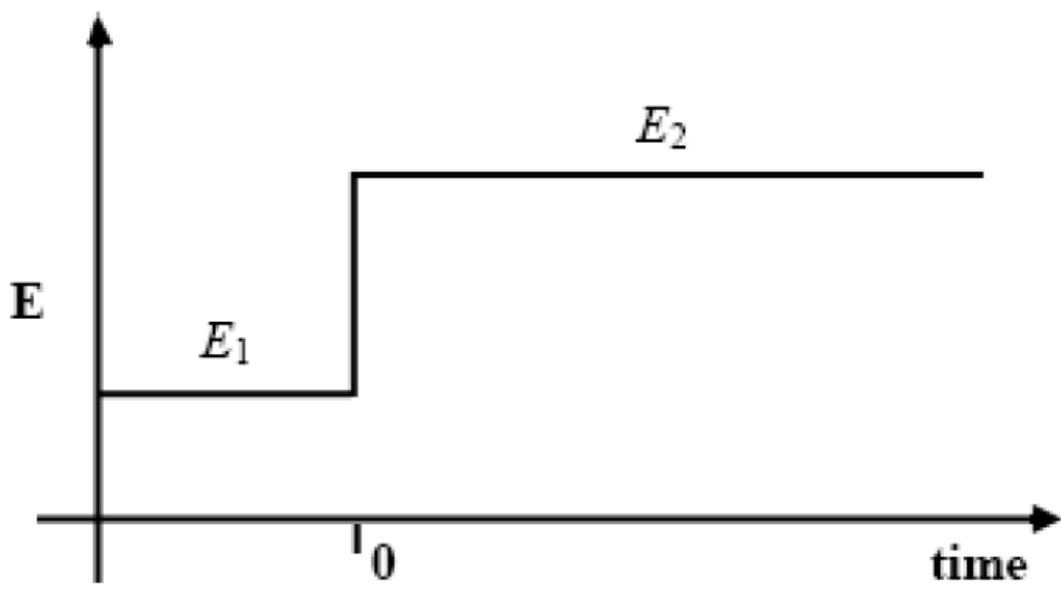


圖 2-10、安培法之待測物與電位及電流關係圖(Bard & Faulkner, 2001)。

Fig. 2-10 Applied potential and current response for detector in amperometric experiment (Bard & Faulkner, 2001).

(A)



(B)

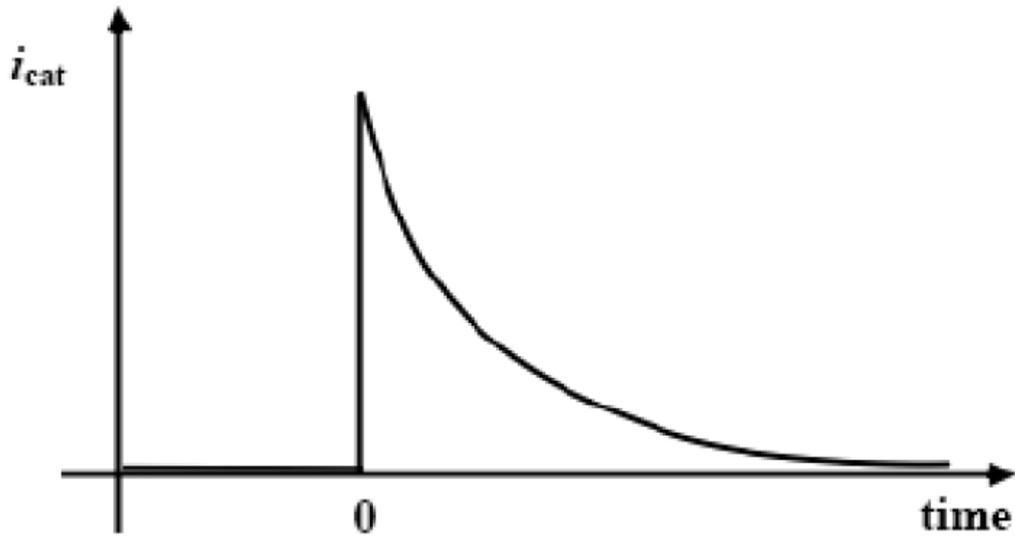


圖 2-11、計時安培法關係圖：(A)電位—時間關係圖 (B)電流—時間關係圖(Bard & Faulkner, 2001)。

Fig. 2-11 The graph of chronoamperometry: (A) potential-time response, (B) current-time response (Bard & Faulkner, 2001).

2.2.3 電化學檢測之電極

過去電化學研究常使用網版印刷電極(Screen-printed electrode, SPE)、玻璃碳電極(Glassy carbon electrode, GCE)、白金電極(Platinum electrode, PTE)等，其中，玻璃碳電極因為具有低電阻、殘留電流小、再現性良好等優點，是相當良好的電極材質，常被廣泛應用在各項電化學領域中。但由於範圍大多限制於裸電極(Bare electrode)，但在其應用上可能會碰到三個問題(Wang & Hutchins-Kumar, 1986)：

1. 電極表面因吸附有機物質而產生鈍化，進而影響偵測靈敏度及再現性。
2. 某些物質在電極表面的反應速度較慢，需要施加至過電壓才能偵測到欲分析的物質。
3. 僅限於偵測電化學活性物種(Electroactive species)，因此應用範圍有限。

為了改善上述缺點，並且擴展電化學分析領域及應用範圍，電化學分析領域之科學家研究發展出修飾電極，期望可以改善或突破在檢測分析中受到的限制。

修飾電極分類

在電化學應用於抗氧化劑的領域中，電極檢測大致上可分為兩類，分別為裸電極及修飾電極；裸電極即為一般電極。而修飾電極又可分為三類，分別為：化學修飾電極(Chemically modified electrode, CME)、酵素修飾電極及 DNA 修飾電極(圖 2-12) (Barroso *et al.*, 2011)。最常見的修飾仍為化學修飾電極，本研究所使用的修飾方法亦屬於化學修飾電極之範疇。

化學修飾電極特性與製備分類

電化學分析領域之科學家發展化學修飾電極(Baldwin & Thomsen, 1991; Murray *et al.*, 1987); 1975 年 Watkins 等人進行化學修飾電極之研究，對電極表面進行化學分子修飾可賦予電極表面特殊機能，使電極對待測物更具選擇性，進而達到期望之反應 (Watkins *et al.*, 1975)。修飾電極方法為：在裸電極表面透過物理或化學方法處理，使電極具備更多特性，尤其是將化學修飾物 (Modifier) 塗覆於裸電極表面，除了讓電極保持原有的偵測能力外，還擁有化學修飾物質的特性，例如：電荷極性、離子交換能力、氧化還原特性等，可改進傳統電極特性或突破限制。

理想的化學修飾電極需具備以下特性(銀，2011)：

- (1) 製備方法簡單
- (2) 具有良好的機械與化學性質
- (3) 具有良好的再現性與穩定性

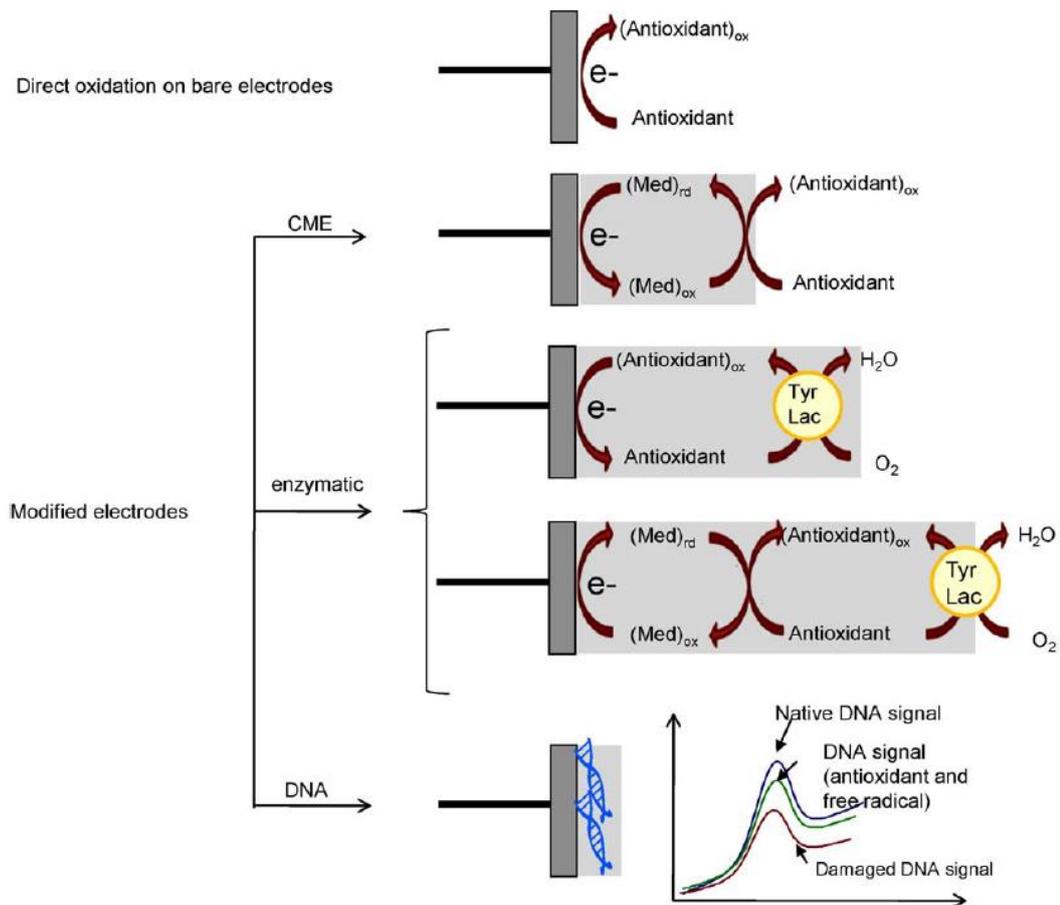


圖 2-12、電化學應用於抗氧化劑檢測之電極分類(Barroso *et al.*, 2011)。

Fig. 2-12 Principle of operation for the four electrochemical sensing approaches described for antioxidant quantification (Barroso *et al.*, 2011).

- (4) 背景電流必須低且穩定
- (5) 可適用於不同溶劑組成之溶液中。

修飾電極的製備方式大致分為四種(Damien, 1994)：

1. 單層吸附法(Monolayer adsorption)

單層吸附法為 Lane 與 Hubbard 發展出最早的修飾方法(Lane & Hubbard, 1973)；此法係利用電極表面和修飾物本身的凡得瓦力、原子力、親疏水性作用力作用而使修飾物吸附於電極表面。單層吸附法的優點為製作過程簡單，可運用的範圍廣泛；但缺點是由於吸附於電極表面之作用力較弱，容易使電極上之修飾物剝落，使偵測訊號降低。

2. 共價鍵修飾法(Covalent modification)

共價鍵修飾法為當電極表面具有官能基時，以共價鍵結方式將修飾物鍵結於電極上；由於共價鍵的鍵結力較強，故此修飾法可得到穩定性較好且不易剝落的修飾電極，但易受酸鹼度、離子強度而影響檢測。

3. 電化學沉積法(Electrochemical deposition)

電化學沉積法是將電極置於含有修飾物之溶液中，以施加電位的方式將修飾物沉積於電極表面上，可以調整電位、施加電位時間或調整待析鍍溶液成份來改變電極特性，其原理類似於電鍍法。

4. 高分子修飾法(Polymer modification)

高分子修飾法主要分為兩類；一類是具有離子交換能力的高分子修飾電極，如：全氟硫酸聚合物(Nafion) (Cha *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1982)、聚乙烯吡啶(PVP)、Tosflex 等離子交換之聚合物，可分別對陽離子或陰離子行離子交換作用，而達到預濃縮之效果。另一類型如醋酸纖維素修飾電極，其選擇性只與分析物之形狀、大小有關。

通常化學修飾電極的製成方法並不僅限於某一種方式，亦有可能是結合兩種以上的方法；另一方面，根據修飾物之特性，化學修飾電極效能提升的原理大約分為以下四點(Naraghi, 2011)：

1. 選擇性的預濃縮(Selective preconcentration)：利用修飾物本身對分析物之選擇性，經由螯合、離子交換或吸附過程，將分析物沉積於電極表面，達到預濃縮之效果。
2. 滲透選擇性(Permselectivity)：在電極表面塗覆一層具半滲透特性的高分子薄膜，阻隔可能干擾訊號的其他電活性物質，以增加電極選擇性，可預防大分子附著於電極表面造成電極損壞而影響電極之檢測穩定度，造成檢測結果誤差。
3. 選擇性識別(Selective recognition)：選擇性識別是生物感測器中相當重要的一環；生物檢體如血液、尿液等所包含的基質十分複雜，因此在檢測這類物質時，電極需具有極高的選擇性才能有效量測。此類修飾電極最廣泛使用之修飾物為酵素(Enzyme)；酵素具有高度專一性，非常適合應用於生物檢體分析。其檢測原理可分為兩類：一類為藉由偵

測酵素與受質(Substrate)作用後所產生之過氧化氫訊號，間接推得分析物質濃度；另一類則是直接偵測酵素受質之訊號。

4. 電催化的應用(Electrocatalysis)：電催化反應主要在降低電極表面電荷轉移時的活化能，進而降低過電壓。為了解決分析物的過電壓問題，在電極表面塗覆一層電子轉移物質，藉由其催化功能可使反應活化能降低，加速分析物在電極表面的反應，進而達到提升靈敏度之目標。

本研究所使用的修飾電極製備方式為「電化學沉積法」，其原理為「電催化的應用」；希望可以藉由修飾物沉積於電極，降低過電壓、反應活化能，並加速分析物反應，提升對分析物之靈敏度。

2.3 貴金屬奈米粒子

2.3.1 奈米材料

奈米科技的範疇相當廣泛，涵蓋物理學、化學、材料學、生物學、醫學、電子學、力學及加工學等領域(陳等，2011)，可以預期未來將有更廣泛的應用。由於奈米科技突飛猛進，其中不乏對人類生活有極為重要影響的研究，故有人形容奈米科技為第四次的工業革命。

奈米(nanometer)為長度單位，數學符號為 nm，一奈米為十億分之一公尺($1\text{ nm} = 1 \times 10^{-9}\text{ m}$)。奈米材料目前尚未有確切的定義，但目前大多數採用的定義為：材料的三個維度中，至少一個維度的長度是奈米級(介於 1~100 nm 之間)，即稱為奈米材料(馬，2002)。

自 1959 年費曼在美國加州理工學院的演講中提出奈米概念以來，奈米領域研究不過五十餘年，而奈米材料更是近十年來才逐漸興起的產業，但奈米在自然界的應用卻已存在許久，例如：彩蝶效應、蓮葉效應(Lotus Effect)、禽類羽毛防水層及生物體中的去氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid, DNA)等。奈米材料的發展最早為 1962 年，日本久保等人研究金屬超微粒子，提出久保理論，即超微粒子的量子限域理論；1963 年，Vyeda 等人利用氣體冷凝法製備清洗表面的超微粒子；1984 年，德國的 Gleiter 等人以惰性氣體蒸發凝聚法製備具有清潔表面能力的奈米材料(李等，2002)。此後各國產業及研究單位投入奈米領域，並列為技術發展重點。

奈米材料有別於傳統材料特性，其製作主要集中於顆粒奈米

化，形成奈米晶體或奈米非晶體等。由於奈米材料體積小，表面積相對增加，許多材料特性透過表面發生作用，材料之活性因而提升；許多基本性質，如：熔點、磁性、電學性能、光學性能、力學性能和化學活性等都與傳統材料有很大的差異。

奈米材料的形貌主要包括以下幾個方面(馬，2006)：

- (1) 奈米材料的尺寸大小：如奈米材料的粒徑、長度、寬度及薄膜厚度、層狀結構的層間距等參數。
- (2) 奈米材料的團聚程度：具有良好單分散性的奈米材料通常是研究所追求的目標。
- (3) 奈米材料的尺寸均勻性：為奈米材料粒徑的分布，儘管目前已有多種測試奈米材料粒徑分布的方法，但可信度最高的應屬穿透式電子顯微鏡 (Transmission electron microscope, TEM)。
- (4) 奈米材料的形狀：包括控制奈米粒子幾何形狀，及更為複雜的形貌，如層狀、管狀、介孔結構等。

奈米材料依類型可大致分為奈米顆粒、奈米纖維、奈米薄膜和奈米塊體四種；其中奈米薄膜和奈米塊體皆來自於奈米顆粒，因此奈米顆粒的製備就更顯重要。依屬性則可分為奈米金屬、奈米金屬氧化物、奈米非金屬氧化物、奈米硫化物、奈米碳化物、奈米氮化物、奈米磷化物、奈米鹵化物、奈米金屬鹽，以及複合型奈米材料。

奈米化技術分成由上而下(Top down)的極小型化法及由下而上(Bottom up)的次微米組合法兩大類。若依奈米材料製備技術(圖

2-13)則分為物理製備法及化學製備法。物理製備法分別有固相法、液相法及氣相法。固相法即為珠磨法(Bean milling process)，液相法為噴霧法(Spray method)，氣相法有物理氣相沉積法(Physical vapor deposition, PVD)、金屬絲爆炸法(Wire explosion process)、電弧氣化法(Arc-evaporation method)、雷射剝削法(Laser ablation process)、濺鍍法(Sputtering method)及電漿法(Plasma method)。化學法則分為液相法及氣相法。液相法有水熱法(Hydrothermal method)、沉澱法(Precipitation method)、微乳化法(Microemulsion method)、化學還原法(Chemical reduction method)、溶膠凝膠法(Sol-gel method)及超臨界流體法(Supercritical fluid method)；氣相法有化學氣相沉積法(Chemical vapor deposition, CVD)及化學氣相凝聚法(Chemical vapor condensation, CVC) (陳等，2011)。

在眾多奈米材料中，奈米碳管是最為知名的奈米材料，常見應用於電池、電視、電腦顯示器與記憶晶片等(馬，2003)；奈米金粒子亦是應用最為廣泛的材料之一，生化感測、光學偵測、藥物投遞、催化反應、疾病治療、電子工程及模板結晶等都可見其應用。而後，奈米銀、奈米白金、奈米氧化鐵等研究亦逐漸興起，並且開發出奈米複合材料，應用於各種領域。

本研究使用化學還原法結合電化學製備奈米金屬粒子。化學還原法具有操作簡便、可在溫和條件下反應及放大製程等優點；電化學可藉由調整電流密度控制粒徑，通常電流密度愈高，所得粒徑愈小，通常所得金屬顆粒為球狀(Reetz & Helbig, 1994)。化學還原法原理即利用氧化還原反應將金屬離子還原為奈米金屬粒子；反應前驅物為金屬鹽溶液，依反應特性不同加入適宜的還原

劑(陳等, 2011)。由於金屬粒子間可再聚集增加粒徑, 故有時會加入保護劑來防止金屬聚集。有機酸為本法常採用的還原劑之一; 1857 年 Faraday 利用檸檬酸鈉將 $[\text{AuCl}_4]^-$ 還原形成奈米金粒子 (Faraday, 1857)。有機酸屬於弱還原劑, 金屬離子還原速率較低, 相對較易控制粒徑及型態。其餘常見的還原劑包括: NaBH_4 、 NaBEt_3H 、 LiBEt_3H 、 N_2H_4 、ethylene glycol、formamide、醇類及鹼類等。部分還原力較弱的尚須配合其他條件幫助反應, 例如高溫。Fievet 在 150°C 以上的環境, 利用乙二醇將銅的前驅物溶液還原為粒徑分布集中且純度高的奈米銅產物(馬, 2003)。考量金屬前驅物、還原劑或保護劑的溶解度, 許多還原反應在有機溶劑環境進行; Yee 等利用 tetrahydrofuran(THF)作為 K_2PtCl_4 之溶劑, 合成奈米鉑金屬(馬, 2003), Esumi 等以 formamide 及 N' , N -dimethylformamide 作為系統溶劑, 以利保護劑 polyamideamine 之應用(馬, 2003)。保護劑常見的種類包括界面活性劑、螯合劑、配位基及高分子等; 由於部分保護劑能在金屬粒子表面形成鍵結或包覆, 若考量後續之催化應用, 需注意保護劑的包覆厚度, 避免影響其催化活性。

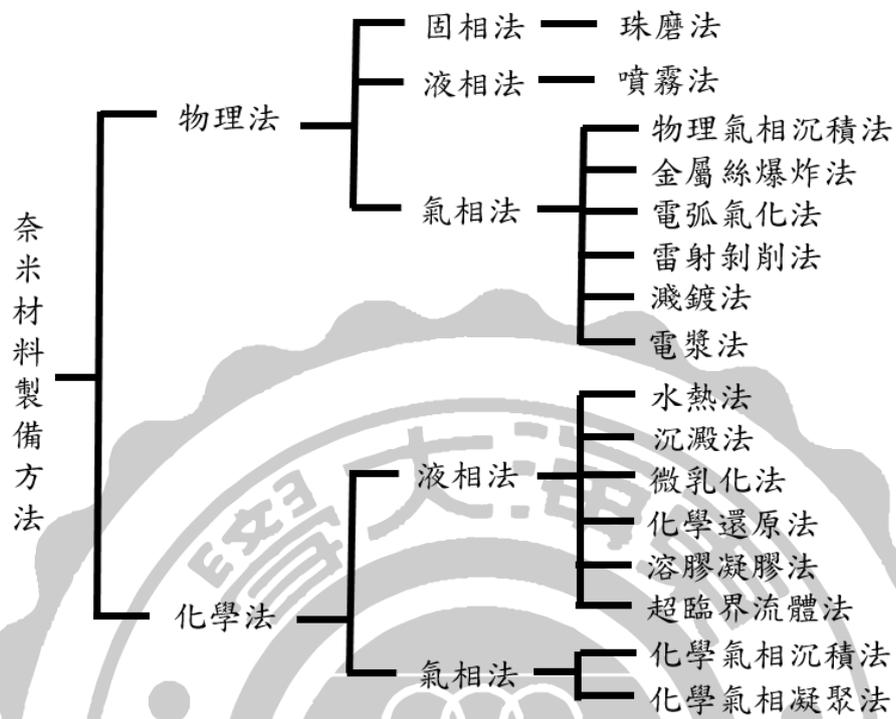


圖 2-13、奈米材料製備技術(陳等，2011)。

Fig. 2-13 The fabrication methods of nanophase materials (陳等，2011).

2.3.2 貴金屬奈米粒子於修飾電極之效用

以往使用金、銀、鉑等材料製成的一般電極，在應用上受到諸多限制，故科學家發展各種修飾方法。近年來，發展偵測金屬離子和有機物的修飾電極有許多，而奈米金粒子修飾於電極近年來被廣泛使用。由於金、白金和鎳等金屬為孔洞結構，孔洞金屬結構具有大表面積和催化性(Zhang *et al.*, 2007)，故貴金屬奈米粒子普遍具有尺寸小和良好的催化活性，在電極表面與電活性物質間具有較好的電子傳導能力，故常被應用在生物感測器。

製備貴金屬奈米粒子修飾電極常見的方式為電沉積方式，電沉積即為化學還原法；製備原理為將含有金屬離子的溶液透過循環伏安法或安培法將金屬離子還原，金屬奈米粒子沉積於電極表面，可根據電沉積方式和調整參數設定製備不同尺寸及分布密度的金屬奈米粒子。除了修飾單一種金屬外，亦可修飾合金、導電聚合物或者金屬和導電聚合物複合材料(Bartlet *et al.*, 2002; Braun & Wiltzius, 1999)。

電沉積的影響因素包括：電沉積溶液組成、電沉積溶液濃度、沉積電位、電沉積溫度及電沉積時間(Magg *et al.*, 2002; Nielsch *et al.*, 2000; Nielsch *et al.*, 2001)。本研究旨在放大訊號及提高專一性，評估各個影響因素探討之必要性，將電沉積溶液組成、電沉積溶液濃度及電沉積溫度影響因素固定，探討「沉積電位」及「電沉積時間」兩個參數。

電沉積方式製備金屬奈米粒子修飾電極之優點為：製備過程容易、步驟短、高經濟效益，且電子傳導能力佳。

2.3.2.1 奈米金粒子於修飾電極之效用

黃金是一種貴金屬，自古以來主要作為貨幣、裝飾品用。近年來，因應奈米科學及技術普及化，奈米金已在奈米材料領域嶄露頭角、被廣泛應用(Daniel & Astruc, 2004; Schmid & Chi, 1998)。

奈米金體積小、具有獨特的光學、電子及催化性能，且導電性良好，有助於檢測時微小電流之傳遞(Lin *et al.*, 2013)，而目前奈米材料修飾領域中，奈米金是最常見的奈米材料。實際上，奈米金粒子的研究已有悠久歷史；1857年英國科學家 Faraday 發現金溶膠的變色現象(Faraday, 1857; Matijevic, 1994)，之後科學家對奈米金粒子的研究文獻逐漸增加。奈米金粒子在合適的穩定體系中易形成高分散、大小均勻的球體；此現象在電子學、磁學、光學、催化，甚至是生物學中都可應用。

Mangeney 等提出高分子穩定奈米金粒子的機制；高分子中的 S、N 及 O 等原子可與 Au(III) 或 Au⁰ 發生超量分子(Supramolecular)作用，使附著在金表面、體積龐大的分子鏈對金粒子的團聚有明顯的阻隔作用(圖 2-14) (Mangeney *et al.*, 2002)。

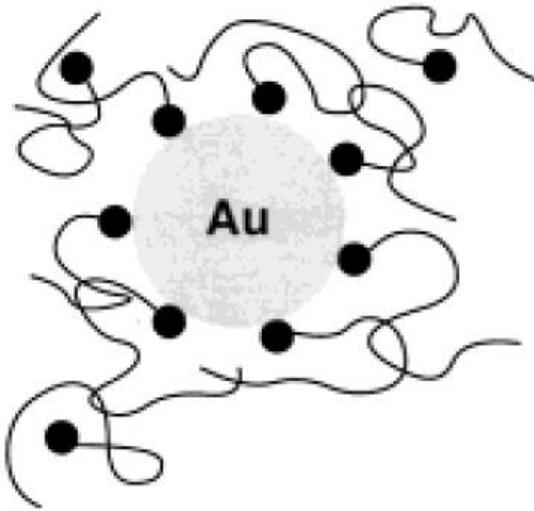
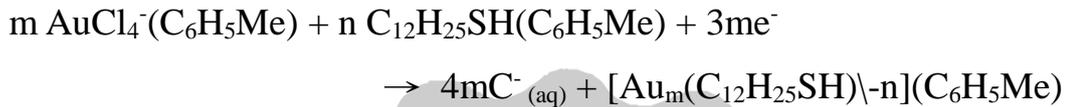
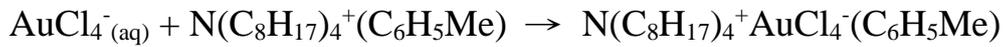


圖 2-14、高分子穩定奈米金粒子表面(Mangenev *et al.*, 2002)。

Fig. 2-14 Derivatize of gold nanoparticle surfaces by fixing the polymer (Mangenev *et al.*, 2002).

Sun 等描述有機硫醇分子穩定奈米金粒子的機制：



奈米金的前驅物 HAuCl_4 可被 NaBH_4 還原成單質金，穩定劑硫醇中的硫原子吸附於金粒子表面(圖 2-15)，在這種條件下得到的金粒子具有高分散性(Sun *et al.*, 2001)；硫原子與金原子有良好的親和性，兩原子間利用自組裝單分子層(Self-assembled monolayers, SAMs)技術在金表面以含硫的生化分子進行修飾，靠超量分子作用力相互結合，使其具有感測的功能。文獻中將硫原子與金原子描述為「軟性」物質(Daniel & Astruc, 2004)。

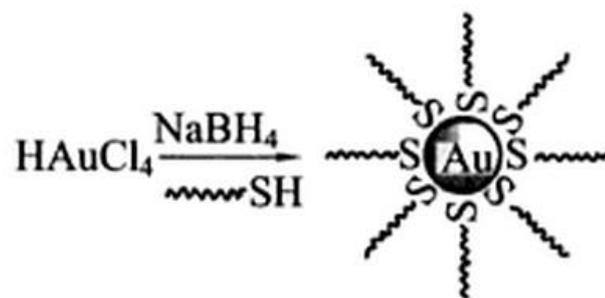


圖 2-15、硫醇分子穩定奈米金粒子機制(Sun *et al.*, 2001)。

Fig. 2-15 The mechanism of organic thiol groups stable gold nanoparticles.

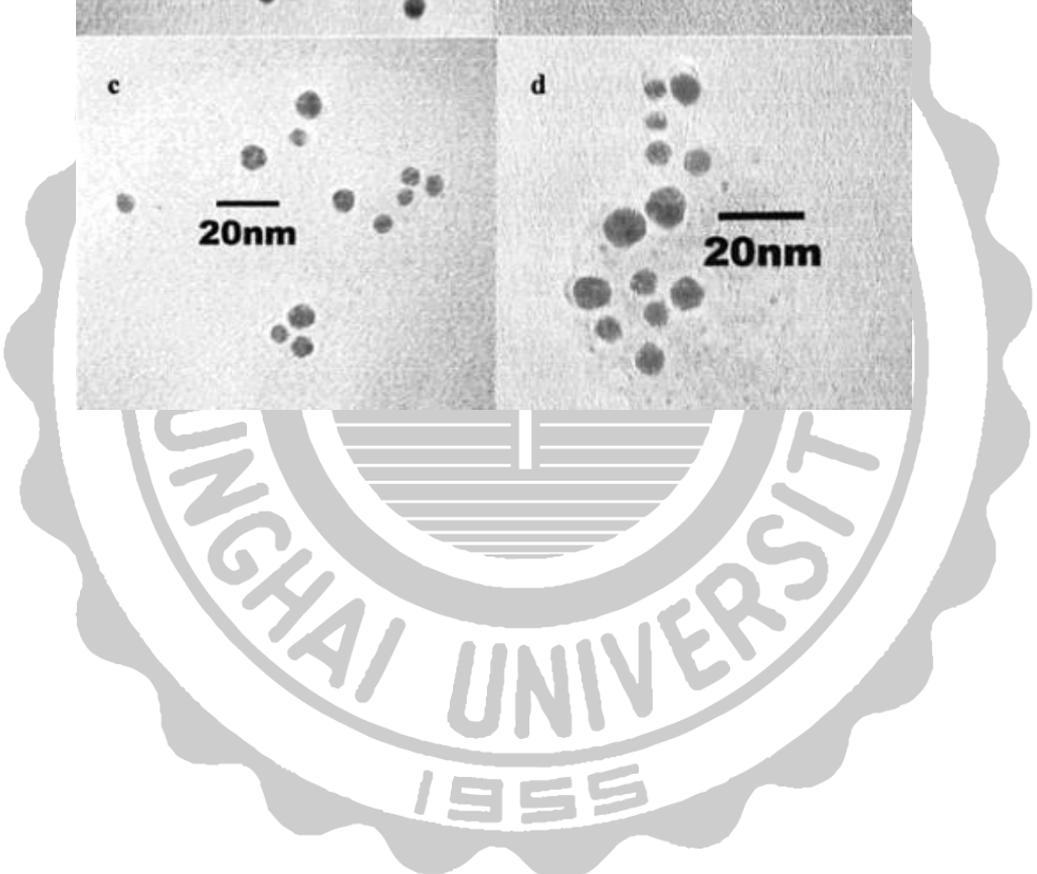
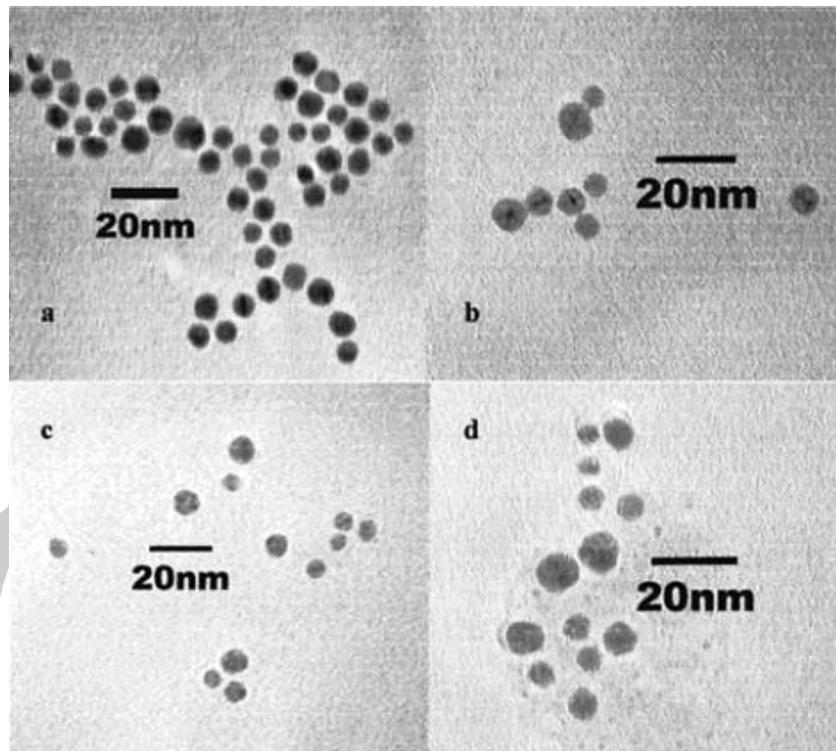


奈米金粒子較容易被穩定，簡單的無機陰離子即可穩定奈米金粒子。Cumberland 等將製備出的奈米金粒子加入檸檬酸鈉—單寧酸緩衝體系，再分別加入 NaCl、Na₂CO₃、Na₂SO₄ 和 NaH₂PO₄，觀察無機陰離子對奈米金粒子的穩定作用；結果顯示 Cl⁻對奈米金粒子的微結構影響不大，而含氧根離子對奈米金粒子有良好的穩定功能(圖 2-16A)，其中又因 SO₄²⁻中氧離子與奈米金粒子表面接觸之作用力較 CO₃²⁻及 PO₄³⁻大且穩定(圖 2-16B)，故 SO₄²⁻穩定作用更強(Cumberland & Strouse, 2002)。

就觸媒特性而言，奈米金粒子穩定性優良、易於操控與觀察，且具有良好的生物相容性；早期常使用於催化一氧化碳的氧化反應與有機化合物的合成等高價值製程，近年更常見將奈米金粒子吸附於載體上，以增加效率及可回收性。許多文獻也提出修飾奈米金粒子對於葡萄糖、過氧化氫等生物分子的氧化還原反應有良好的催化效果，可提高電流訊號(Tominaga *et al.*, 2005)。

本研究在奈米金粒子修飾部份，使用 H₂SO₄ 作為穩定劑，並以 Na₂SO₄ 作為奈米金前驅物 HAuCl₄ 之還原劑，使奈米金可以穩定沉積於玻璃碳電極，並提高檢測之電流訊號。

(A)



(B)

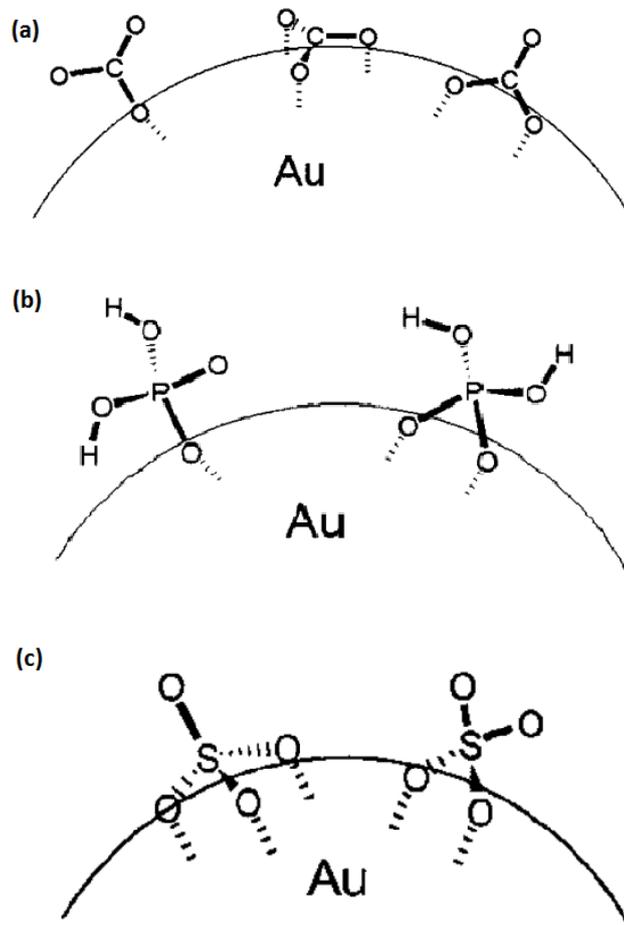


圖 2-16、無機陰離子對奈米金粒子穩定作用 (A)奈米金粒子於穩定劑 (a) Cl^- (b) CO_3^{2-} (c) SO_4^{2-} (d) H_2PO_4^- 之 TEM 圖像；(B) 無機陰離子(a) CO_3^{2-} (b) H_2PO_4^- (c) SO_4^{2-} 穩定奈米金粒子示意圖 (Cumberland & Strouse, 2002)。

Fig. 2-16 The anion stabilize gold nanoparticles: (A) TEM images of (a) Au-Cl, (b) Au- CO_3 , (c) Au- SO_4 , and (d) Au- PO_4 ; (B) Illustration of (a) CO_3^{2-} (b) H_2PO_4^- (c) SO_4^{2-} binding on a gold nanoparticle surface to be stable (Cumberland & Strouse, 2002).

2.3.2.2 奈米白金粒子於修飾電極之效用

白金(Pt)為銀白色、柔軟且具延展性的貴重金屬；由於常溫下為十分安定的金屬，且不易被強酸、強鹼侵蝕，也不易形成氧化層或與物質形成化合物；故白金常被使用作為傳導電子的材料。

以奈米白金修飾電極雖然沒有奈米金普遍，但仍有不少文獻採用奈米白金修飾，以檢測不同標的物。奈米白金具有高電催化效率及選擇性，在工作電位、檢測極限、穩定性及再現性都有良好表現，且白金具有良好的抗氧化性，可防止檢測過程中浸於緩衝溶液內，因氧化過程而影響檢測結果(Liu *et al.*, 2011)；加上奈米材料普遍特性為表面積體積比大，可增加電子轉移動力，辨識分子穩定性高，且具催化性能，可提升靈敏度(陳等，2011)；故本研究嘗試以奈米白金修飾，對人工抗氧化劑檢測，期望可以與奈米金比較檢測之結果。

2.4 電化學分析法於檢測人工抗氧化劑之應用

電化學應用於檢測人工抗氧化劑最早的文獻為 1982 年，Tonmanee 和 Archer 使用微分脈衝伏安法(Differential-pulse polarography)檢測食用油中之 TBHQ(Tonmanee & Archer, 1982)；而後，電化學應用於檢測人工抗氧化劑之領域雖然仍持續有研究，但文獻並不多，且多使用裸電極，檢測效果不彰，直到近幾年才逐漸有學者將電極修飾後再檢測人工抗氧化劑。

2006 年，Jayasri 及 Narayanan 將鐵氰化銀(AgHCF)固定於工作電極，反應槽置入緩衝液及電極，待電流訊號穩定後加入 BHA，使 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 系統產生氧化還原反應，BHA 氧化成 TBQ，由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中 BHA 濃度。其方法之機制如圖 2-17 反應式所示。電極修飾之方法為：0.65 g 石墨粉和 0.05 g AgHCF 顆粒混合均勻，加入 0.30 g 融化的石蠟混合，再填充到內徑 4 mm 長 4 cm 的玻璃管中等待固化，固化後從玻璃管中取出，除去兩端絕緣的蠟，一端接上金屬感測器，即為工作電極；使用前研磨表面，並用二次蒸餾水清洗。輔助電極為白金絲，參考電極為飽和甘汞。結果顯示實驗溫度為室溫(25°C)時，以 0.1 M KNO_3 做為緩衝液，最適 pH 值為 6，檢測極限為 3.7×10^{-6} M，流體注入分析法(Flow injection)最適電壓為 0.7 V，實際樣品檢測為馬鈴薯片(Jayasri & Narayanan, 2006)。

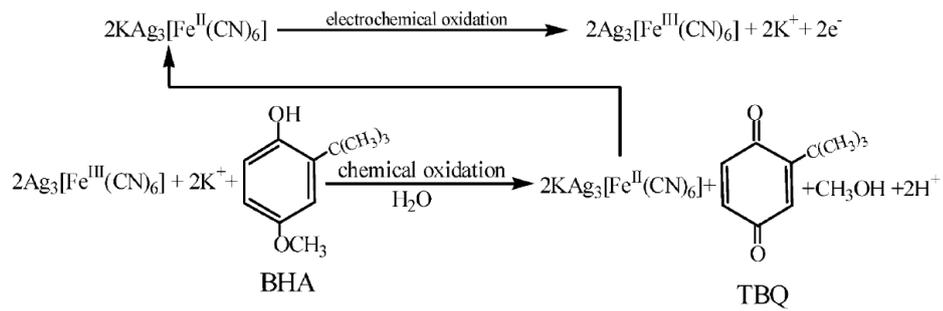


圖 2-17、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 系統檢測 BHA 之反應機制(Jayasri & Narayanan, 2006)。

Fig. 2-17 The mechanism of the electrocatalytic oxidation of BHA to TBQ at the system of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (Jayasri & Narayanan, 2006).

同年，Guan 等學者使用碳圓盤電極檢測四種人工抗氧化劑；將反應槽先置入緩衝液及電極，待電流訊號穩定後加入 BHA、BHT、PG 或 TBHQ，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中 BHA、BHT、PG 或 TBHQ 濃度。此篇文獻僅以碳圓盤作為工作電極；使用前碳圓盤電極表面以砂紙和氧化鋁拋光，再使用二次蒸餾水超音波震盪。輔助電極為白金絲，參考電極為飽和甘汞。結果顯示實驗溫度為室溫(25°C)，以 0.025 M sodium dodecyl sulfate 做為緩衝液，最適 pH 值為 7.4，檢測極限 BHA 為 1×10^{-6} M，BHT 為 2.7×10^{-6} M，PG 為 2.9×10^{-7} M，TBHQ 為 8×10^{-7} M，實際樣品檢測為蔬菜油、奶油蘑菇及魚湯(Guan *et al.*, 2006)。

2007 年，Jayasri 及 Narayanan 將 MnHCF 固定於工作電極上，反應槽置入緩衝液及電極，待電流訊號穩定後加入 BHA，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中 BHA 濃度。其方法之機制如圖 2-18 反應式所示。其電極修飾之方法為：0.65 g 石墨粉和 0.05 g MnHCF 顆粒混合均勻，加入 0.30 g 融化的石蠟中混合，再填充到內徑 4 mm 長 4 cm 的玻璃管中等待固化，固化後從玻璃管中取出，除去兩端絕緣的蠟，一端接上金屬感測器，即為工作電極。輔助電極為白金絲，參考電極為飽和甘汞。結果顯示，實驗溫度為室溫(25°C)，以 0.1M NaCl 做為緩衝液，最適 pH 值為 6，BHA 檢測極限為 5×10^{-8} M，實際樣品檢測為馬鈴薯片(Jayasri & Narayanan, 2007)。

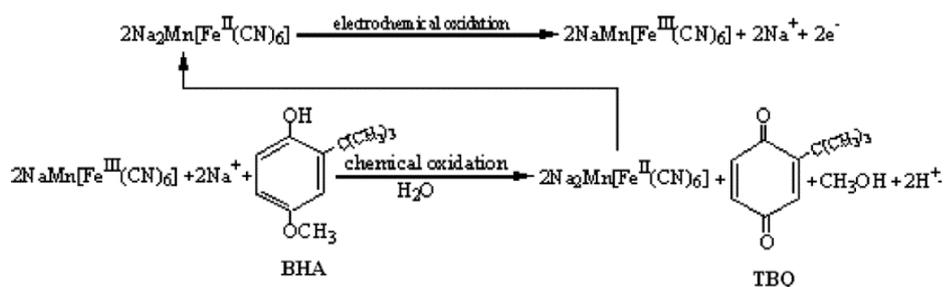


圖 2-18、MnHCF 修飾石墨蠟電極檢測 BHA 之反應機制(Jayasri & Narayanan, 2007)。

Fig. 2-18 The mechanism of the electrocatalytic oxidation of BHA to TBQ at the MnHCF modified graphit-wax composite electrode (Jayasri & Narayanan, 2007).

2008 年，Kumar 及 Narayanan 將 nickel aquapentacyanoferrate (NAPCF) 固定於工作電極上進行檢測。反應槽先置入緩衝液及電極，待電流訊號穩定後加入 BHA，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中 BHA 濃度，其方法之機制如圖 2-19 反應式所示。電極修飾之方法為：將 50 mM 的 NiSO_4 和 $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]$ 溶液各取 20 mL 混合，利用機械固定方式均勻固定於直徑 6 mm 已拋光並用甲醇和二次蒸餾水先後漂洗過的石墨蠟電極上，輔助電極為白金絲，參考電極為飽和甘汞。實驗溫度為室溫(25°C)，以 0.1 M NaNO_3 做為緩衝液，最適 pH 值為 7，BHA 的檢測極限為 2.49×10^{-7} M，實際樣品檢測為穀片 (Kumar & Narayanan, 2008)。

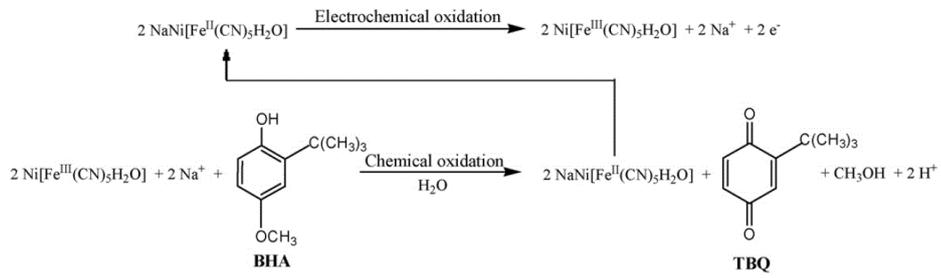


圖 2-19、NAPCF 修飾石墨蠟電極檢測 BHA 之反應機制(Kumar & Narayanan, 2008)。

Fig. 2-19 The mechanism of the electrocatalytic oxidation of BHA to TBQ at the NAPCF modified graphit-wax composite electrode (Kumar & Narayanan, 2008).

2010年,Prabakar 及 Sriman 將鐵氰化鎳(NiHCF)修飾於工作電極上,反應槽置入緩衝液及電極,待電流訊號穩定後加入 BHA,使 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 系統產生氧化還原反應, BHA 氧化成 TBQ(圖 2-20),由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中 BHA 濃度。電極修飾之方法為:石墨蠟電極以配置好之 p-phenylenediamine 吸附石墨粉,電極拋光後浸入 $\text{NiCl}_2/\text{EtOH}$ 混合溶液中,讓電極上與溶液中的鎳離子吸附胺,穩定後再將電極浸入亞鐵氰化鉀溶液,不斷循環掃描,直到金屬陽離子與不溶於水的鐵氰離子穩定結合成鐵氰化鎳薄膜,即為工作電極。輔助電極為白金,參考電極為飽和甘汞。結果顯示,實驗溫度為室溫(25°C),以 0.1 M NaNO_3 做為緩衝液,最適 pH 值為 7, BHA 檢測極限為 $6 \times 10^{-7}\text{ M}$,線性檢測範圍 $1.2 \times 10^{-6} \sim 1.07 \times 10^{-3}\text{ M}$,流體注入分析法(Flow injection)最適電壓為 0.4 V ,實際檢測馬鈴薯片樣品中 BHA 濃度(Prabakar & Sriman, 2010)。

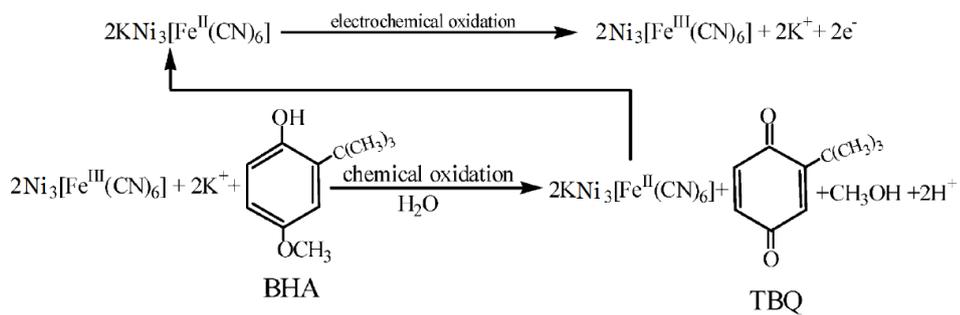


圖 2-20、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 系統檢測 BHA 之反應機制 (Prabakar & Sriman, 2010)。

Fig. 2-20 The mechanism of the electrocatalytic oxidation of BHA to TBQ at the system of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (Prabakar & Sriman, 2010).

同年，Medeiros 等學者將金剛石薄膜(Boron-doped diamond, BDD)固定於工作電極上，反應槽置入緩衝液及電極，待電流訊號穩定後加入 BHA 或 BHT，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中 BHA 及 BHT 濃度。其方法之機制如圖 2-21 反應式所示。電極修飾之方法為：金剛石薄膜(BDD)固定於矽晶片上作為工作電極，使用前需先將 BDD 浸入 0.5 M 硫酸溶液，並通以電流密度 -1.0 A cm^{-2} 或 1.0 A cm^{-2} ，再使用 1 及 $0.05 \text{ }\mu\text{m}$ 氧化鋁/水泥漿拋光後以超純水漂洗；輔助電極為白金絲，參考電極為飽和甘汞。以蛋黃醬作為應用之實際樣品檢測；結果顯示，實驗溫度為室溫(25°C)，以 0.1 M NaNO_3 做為緩衝液，最適 pH 值為 7，BHA 檢測極限為 $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ ，流體注入分析法(Flow injection)最適電壓為 0.4 V ，BHA 及 BHT 檢測範圍分別為 $2.8 \sim 83 \text{ }\mu\text{M}$ 及 $2.8 \sim 36 \text{ }\mu\text{M}$ (Medeiros *et al.*, 2010)。

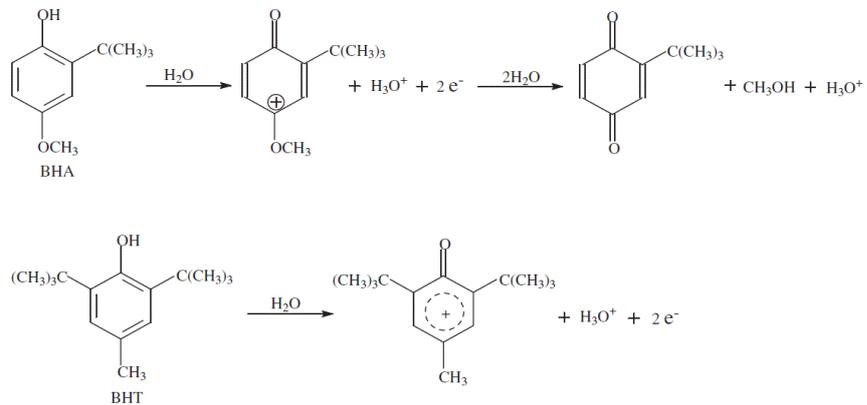


圖 2-21、金剛石薄膜(BDD)電極檢測 BHA 及 BHT 之反應機制 (Medeiros et al., 2010)。

Fig. 2-21 BHA and BHT oxidation mechanisms at the BDD electrode surface (Medeiros et al., 2010).

2010年, Freitas 等學者將聚磷酸銅($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Poly}$)固定於工作電極上, 反應槽置入緩衝液及電極, 待電流訊號穩定後加入 BHA 或 BHT, 使其發生氧化還原反應, 由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中 BHA 及 BHT 濃度。電極修飾之方法為: 0.4 g 40% 聚磷酸銅($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Poly}$)、0.4 g 40% 石墨粉和 0.2 g 20% 於 60°C 融化的石蠟混合, 再填充進塑料注射器並加入銅線作為工作電極, 輔助電極為白金絲, 參考電極為 Ag/AgCl (3 M KCl)。結果顯示, 實驗溫度為室溫(25°C), 以 0.1M KNO_3 / 10% 乙醇做為緩衝液, 最適 pH 值為 6.7, BHA 檢測極限為 6×10^{-7} M, 流體注入分析法(Flow injection)最適電壓為 0.4 V, BHA 及 BHT 檢測極限分別為 7.2×10^{-8} M 及 9.3×10^{-8} M, 實際樣品檢測為蛋黃醬(Freitas *et al.*, 2010)。

2013年, Lin 等使用奈米金修飾於玻璃碳電極上, 反應槽置入緩衝液及電極, 待電流訊號穩定後加入 BHA、BHT 及 TBHQ 混合溶液, 使其發生氧化還原反應(圖 2-22); 由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中 BHA、BHT 及 TBHQ 之濃度。其電極修飾之方法為: 使用直徑 3 mm 之玻璃碳電極, 以氧化鋁拋光後, 分別浸於稀硝酸、乙醇及蒸餾水中超音波震盪, 再將三電極系統置於 0.25 M 硫酸, 以循環伏安法在 -1.0 到 1.0 V 間來回掃描, 直到訊號穩定, 即電極清洗完畢。再將 1.0×10^{-3} M 的四氯金酸和 0.01 M 的 Na_2SO_4 、0.01 M 的 H_2SO_4 混合, 三電極置於其中, 以 -0.2 V 定電壓掃描 30 秒, 使奈米金可以沉積於電極表面; 修飾完成後再將電極浸於二次蒸餾水。輔助電極為白金絲, 參考電極為飽和甘汞。結果顯示: 實驗溫度為室溫(25°C), 以 Britton-Robinson(B-R)緩衝溶液做為緩衝液, 最適 pH 值為 2.0, BHA 檢測極限為 0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BHT 檢測極限為 0.080 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TBHQ 檢測極限為 0.079

$\mu\text{g/mL}$ ，實際樣品檢測為食用油，回收率範圍在 91.6% 至 105.0% (Lin *et al.*, 2013)。

本研究中關於奈米金修飾部份，主要參考 2013 年之文獻，針對文獻中對條件的探討更進一步研究，期望能提升檢測之準確度，使樣品回收率可縮小範圍。



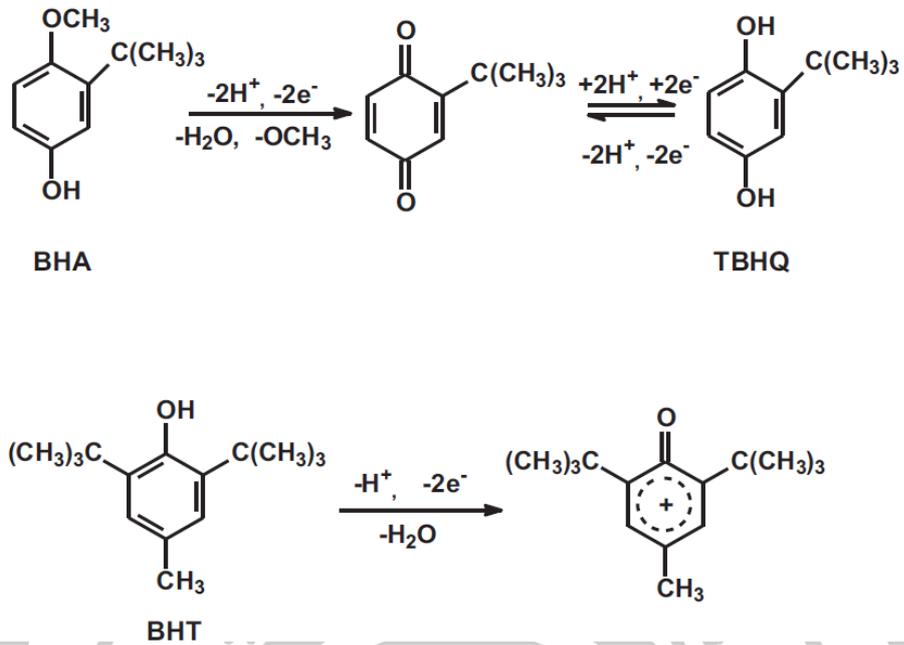


圖 2-22、奈米金修飾玻璃碳電極檢測 BHA、BHT 及 TBHQ 之反應機制(Lin *et al.*, 2013)。

Fig. 2-22 Electrochemical reaction mechanisms of BHA, BHT, and TBHQ at the gold nanoparticles modified glassy carbon electrode (Lin *et al.*, 2013).

第三章、材料與方法

3.1 實驗樣品

本實驗所採用之樣品為市售油品，皆購自台糖量販店，油品包含台糖烤酥油、台糖芥花油、正統調合油、得意的一天橄欖油及寶素齋葵花油，容量分別為 2 公升、2 公升、2 公升、1 公升、0.5 公升；購買日期為 2014 年 8 月 6 日。實驗樣品皆儲藏於室溫陰涼處。

3.2 實驗試藥

1. 醋酸(acetic acid, CH_3COOH) 純度 99-100%，島久藥品株式會社，日本。
2. 磷酸(phosphoric acid, H_3PO_4) 純度 85%，島久藥品株式會社，日本。
3. 硼酸(boric acid, H_3BO_3) 純度 99.5%，片山試藥株式會社，日本。
4. 乙醇(ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 純度 95%，景明化工股份有限公司，台中，台灣。
5. 二丁基羥基甲苯(butylated hydroxyl toluene, BHT, $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$) 純度 99%，Alfa Aesar，美國。
6. 丁基羥基甲氧苯(butylated hydroxyl anisole, BHA, $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$) 純度 98.5%，ALDRICH，美國。
7. 第三丁基氫醌(tert-butyl hydro quinone, TBHQ, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$) 純度

- 97% , ALDRICH , 美國。
8. 四氯金酸(hydrogen tetrachloroaurate(III), HAuCl_4) Au 純度 41.80% , Alfa Aesar , 美國。
 9. 氯鉑酸(dihydrogen hexachloroplatinate(IV), $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$) Pt 純度 20% , Alfa Aesar , 美國。
 10. SDS(Sodium dodecyl sulfate, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) 純度 99% , Sigma , 美國。
 11. 正戊烷(*n*-pentane, C_5H_{12}) , Riedel-de Haën , 德國。
 12. 異丙醇(2-propanol, $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) , 光泰化工企業行 , 台中 , 台灣。
 13. 乙腈(acetonitrile, CH_3CN) , J. T. Baker , 美國。

3.3 儀器設備

1. 電化學分析儀(CHI800C, CH Instruments Electrochemical Analyzer, Austin, Texas, USA)。

2. 三電極系統

5 mm 玻璃碳電極(CHI 104, ALS, Tokyo, Japan)。

Ag/AgCl 電極(RE-1B, ALS, Tokyo, Japan)。

0.5 mm 白金絲電極(佳佑企業有限公司, 台北, 台灣)。

3. 微量吸管(Model P100、P200、P1000、P5000, Gilson Pipetman, Connecticut, USA)。

4. 完全不斷電系統(C-1000F, 伊頓飛瑞慕品股份有限公司, 台中, 台灣)。

5. 恆溫循環水槽(CY-130, 程揚儀器有限公司, 台中, 台灣)。

6. 超純水製造裝置(Barnstead EASYpure II, USA)。

7. 高效能液相層析儀(HPLC)

管柱(Luna C18, 5 μ m, 250 \times 4.6 mm, Phenomenex, USA)。

幫浦(LC-10AT VP Quaternary pump, SHIMADZU, Japan)。

除氣裝置(4 channel degasser, GASTORR AG-14, Fischer analytics, Germany)。

偵測器(UV-VIS DETECTOR S-3702, Soma, Japan)。

資料處理(Chromatocorder 21, SYSTEM INSTRUMENTS CO., LTD, Japan)。

8. 電子分析天平(BL 120S, Sartorius, 台灣哈那精密股份有限公司, 台北, 台灣)。

9. 標準型電子天平(XS 6250C, Precisa, Switzerland)。

10. 酸鹼度計(inoLab pH Level 1, 上泰儀器股份有限公司, 台中, 台灣)。

11. 電磁攪拌器(MH-1, 新光精機工業股份有限公司, 台北, 台灣)。

12. 數字型電磁攪拌器(COLOR SQUID, IKA, 詠欣有限公司, 台中, 台灣)。

13. 超音波洗淨器(5510R-DTH, 程揚儀器有限公司, 台中, 台灣)。

3.4 電化學檢測系統建立

本研究主要應用循環伏安法於人工抗氧化劑之檢測；在固定掃描速率下，於設定之電位範圍中循環掃描，當掃描至特定電位時，抗氧化劑於電極表面失去電子發生氧化反應，並在相對應之電位顯示氧化電流訊號，再利用電流訊號與抗氧化劑濃度之關係進行定量分析。

檢測系統由電化學分析儀設定掃描條件，反應槽中加入 10 mL 之反應槽溶液，連結恆溫循環水槽，以維持溶液溫度。於特定之 pH 值和溫度下加入 0.1 mL 待測物，將待測物與反應槽溶液均勻混合後，連接三電極系統，其中，工作電極為玻璃碳電極或修飾奈米材料之玻璃碳電極，輔助電極為白金絲，參考電極為銀／氯化銀(Ag/AgCl)電極。

待測物於特定電位所產生之訊號連接於電腦，以軟體(CHI 800C Electrochemical Detector)呈現電流訊號曲線及數據。檢測系統示意圖如圖 3-1 所示。

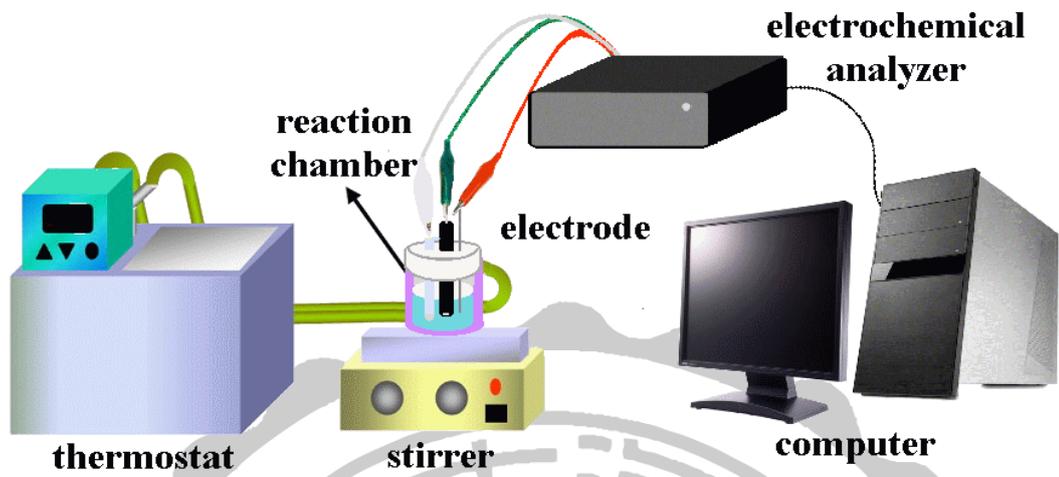


圖 3-1、電化學檢測系統示意圖。

Fig. 3-1 Schematic diagram of the electrochemical detection system.

3.5 實驗架構

本研究主要以電化學方法探討檢測三種人工抗氧化劑丁基羥基甲氧苯 (Butylated hydroxyl anisole, BHA)、二丁基羥基甲苯 (Dibutyl hydroxy toluene, BHT) 及第三丁基氫醌 (Tertiary-butyl hydro-quinone, TBHQ) 之最適檢測條件，並以標準品依最適條件製作檢量線。而實際樣品之測定依衛生福利部食品藥物管理署於 2013 年公告修正之的「食品中抗氧化劑之檢驗方法—油脂中沒食子酸正丙脂(PG)、第三基丁氫醌(TBHQ)、正二氫癒創酸(NDGA)、丁基羥基甲氧苯(BHA)及二丁基羥基甲苯(BHT)之檢驗」(附錄九)所檢測之結果共同分析比較，詳細實驗架構如圖 3-2 所示。



圖 3-2、本研究之實驗架構。

Fig. 3-2 Procedures for determination of antioxidants in the study.

3.6 以奈米金修飾電極之方法

本研究參考 Lin 等(Lin *et al.*, 2013)使用之修飾方法；使用直徑 3 mm 之玻璃碳電極，以氧化鋁於拋光絨布上拋光後，分別浸於稀硝酸、乙醇及蒸餾水中超音波震盪，再將三電極系統置於 0.25 M 硫酸，以循環伏安法在 -1.0 到 1.0 V 間來回掃描，直到訊號穩定，即電極清洗完畢。再將 1.0×10^{-3} M 的四氯金酸和 0.01 M 的 Na_2SO_4 、0.01 M 的 H_2SO_4 混合，三電極置於其中，探討以安培法及循環伏安法掃描使奈米金可以沉積於電極表面之最適條件；修飾完成後再將電極浸於二次蒸餾水。輔助電極為白金絲，參考電極為 Ag/AgCl。

3.7 以奈米白金修飾電極之方法

本實驗採用的修飾方法參考兩篇文獻；

1. 界面活性劑 Sodium dodecyl sulfate (SDS) 與氯鉑酸混合，以安培法掃描 (Hasnat *et al.*, 2010)。

2. 硫酸與氯鉑酸混合，以循環伏安法以 -1.5 V 到 -0.3 V 掃描 (Awad *et al.*, 2011)。

使用以上兩種方法修飾前，皆需參考奈米金修飾前之清洗步驟：氧化鋁於拋光絨布上拋光後，分別浸於稀硝酸、乙醇及蒸餾水中超音波震盪，再將電極置於 0.25 M 硫酸，以循環伏安法在 -1.0 到 1.0 V 間來回掃描，直到訊號穩定，即電極清洗完畢。輔助電極為白金絲，參考電極為 Ag/AgCl。

3.8 最適檢測條件探討

以電化學系統檢測時，許多因子會影響檢測結果；修飾方面，修飾物種類及修飾條件皆會影響對待測物的反應電流大小，檢測所設定的掃描速率亦會影響反應之電流大小及電位，而反應槽溶液之 pH 值及反應溫度則是電化學檢測中最大之影響因子。本研究將針對上述因子進行探討，並整合出以此系統檢測三種人工抗氧化劑之最適化檢測條件。

3.8.1 奈米金粒子修飾玻璃碳電極之最適條件探討

於室溫(25°C)下，使用含有四氯金酸、硫酸及硫酸鈉之混合溶液，分別探討使用安培法及循環伏安法修飾之條件，再以緩衝溶液探討其最適之修飾效果。更換檢測條件時，皆將修飾物清洗、拋光後，重新修飾再置於反應槽中檢測下一條件。

3.8.2 奈米金修飾玻璃碳電極效應探討

探討出最適修飾條件後，將已修飾之玻璃碳電極於室溫(25°C)下，分別檢測 BHA、BHT、TBHQ 及三種抗氧化劑混合物，並將結果圖與裸電極掃描抗氧化劑之結果圖利用軟體進行疊圖比較，確認修飾後之電極是否具有放大電流訊號、降低電位等優勢。

3.8.3 奈米金修飾玻璃碳電極檢測抗氧化劑之反應槽溶液最適 pH 值探討

於室溫(25°C)下，設定掃描電位範圍為-0.5 V ~ 1.5 V，掃描速率 0.1 V/s，分別以 pH 值 2 ~ 7 之 Britton-Robinson 緩衝溶液作為反應槽溶液，緩衝溶液之配方如表 3-1 所示。

上述緩衝溶液加入抗氧化劑混合溶液，均勻混合後進行檢測，探討反應槽溶液之最適 pH 值。更換檢測條件時，皆將修飾物清洗、拋光後，重新修飾再置於反應槽中檢測下一條件。



表 3-1、Britton-Robinson 緩衝溶液配方

Table 3-1 The formula for Britton-Robinson buffer.

Stocks solutions: Titration of 100 mL of a solution of 0.04 M H_3BO_3 , 0.04 H_3PO_4 and 0.04 M CH_3COOH with 0.2 N NaOH.

NaOH (mL)	pH	NaOH (mL)	pH	NaOH (mL)	pH
0.0	1.81	35.0	5.02	70.0	9.15
2.5	1.89	37.5	5.33	72.5	9.37
5.0	1.98	40.0	5.72	75.0	9.62
7.5	2.09	42.5	6.09	77.5	9.91
10.0	2.21	45.0	6.37	80.0	10.38
12.5	2.36	47.5	6.59	82.5	10.88
15.0	2.56	50.0	6.80	85.0	11.20
17.5	2.87	52.5	7.00	87.5	11.40
20.0	3.29	55.0	7.24	90.0	11.58
22.5	3.78	57.5	7.54	92.5	11.70
25.0	4.10	60.0	7.96	95.0	11.82
27.5	4.35	62.5	8.36	97.5	11.92
30.0	4.56	65.0	8.69	100.0	11.98
32.5	4.78	67.5	8.95		

(Britton & Robinson, 1931)

3.8.4 奈米金修飾玻璃碳電極檢測抗氧化劑之反應槽溶液最適溫度探討

文獻指出溫度為電化學系統中影響分析結果之其中一項重要變因(Shan *et al.*, 2007)。本研究探討之最適溫度，以 10 mL 0.04 M 之 Britton-Robinson 緩衝溶液(pH = 2.0)為反應槽溶液，掃描電位範圍為-0.5 V ~ 1.5 V，掃描速率為 0.1 V/s，分別於 25°C、30°C、35°C、40°C、45°C 之反應槽溶液中，加入 0.1 mL 之抗氧化劑混合溶液，均勻混合後檢測，探討最適溫度。更換檢測條件時，皆將修飾物清洗、拋光後，重新修飾再置於反應槽中檢測下一條件。

3.8.5 奈米金修飾玻璃碳電極檢測抗氧化劑之最適掃描速率探討

以 10 mL 0.04 M 之 Britton-Robinson 緩衝溶液(pH = 2.0)作為反應槽溶液，於室溫(25°C)下，設定掃描電位範圍為-0.5 V ~ 1.5 V，加入 0.1 mL 之抗氧化劑混合溶液，均勻混合後，分別以 0.01 V/s、0.05 V/s、0.1 V/s、0.2 V/s、0.5 V/s、1 V/s 之掃描速率檢測。更換檢測條件時，皆將修飾物清洗、拋光後，重新修飾再置於反應槽中檢測下一條件。

3.9 實際樣品檢測

1. 電化學系統檢測抗氧化劑之檢量線製作

配製各種濃度之抗氧化劑標準溶液，利用本研究中所探討出之最適檢測條件，將 0.1 mL 標準溶液加入 Britton-Robinson 緩衝溶液(pH = 2.0)，均勻混合後，以經修飾之玻璃碳電極、白金絲及銀／氯化銀電極所組成之三電極系統檢測，探討電化學系統對 BHA、BHT 及 THBQ 之檢測範圍並製作檢量線。更換檢測條件時，皆將修飾物清洗、拋光後，重新修飾再置於反應槽中檢測下一條件。

2. 樣品前處理

本研究待測之樣品皆以衛生福利部食品藥物管理署於 2013 年所公告修訂之「食品中抗氧化劑之檢驗方法—油脂中沒食子酸正丙脂、第三基丁氫醌、正二氫癒創酸、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲氧苯之檢驗」(附錄九)進行前處理。五種食用油樣品購自台糖量販店，使用 C18 固相萃取分離管，以異丙醇、乙腈混合溶液萃取，並以濾膜過濾，將萃取液過濾使成檢液。

3. 樣品檢測

實際樣品之電化學檢測條件同檢量線製作之系統條件，將已經過前處理後之樣品濾液取 0.1 mL 加入反應槽中，均勻混合後檢測，將測得之電流變化量代入檢量線，求得樣品中三種抗氧化劑分別之含量。更換檢測條件時，皆將修飾物清洗、拋光後，重新修飾再置於反應槽中檢測下一條件。

相同樣品亦參考公告「食品中抗氧化劑之檢驗方法－油脂中沒食子酸正丙脂、第三基丁氫醌、正二氫癒創酸、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯之檢驗」(附錄九)以高效液相層析儀(High performance liquid chromatograph, HPLC)之分析方法檢測，並與電化學方法之分析結果進行比較。

第四章、結果與討論

4.1 奈米金粒子修飾玻璃碳電極之最適條件探討

在國內外文獻中，使用電化學法修飾奈米金粒子於電極表面的方法大致分為兩種，分別是「安培法」(Lin *et al.*, 2013)及「循環伏安法」(Gholivand *et al.*, 2011)，普遍使用其中一種方法；而在預實驗過程中，發現使用安培法修飾，檢測抗氧化劑之效果並不顯著，尤其無法明確辨識 BHT 之波峰；故使用循環伏安法修飾，再探討其電流訊號最強之最適條件(圖 4-1)。

圖 4-1 為經循環伏安法以 $-0.6\text{ V}\sim 1.5\text{ V}$ 修飾後，再檢測緩衝溶液之電流反應圖；分別以 1 圈(2 segments)、2 圈(4 segments)、3 圈(6 segments)、4 圈(8 segments)、5 圈(10 segments)、6 圈(12 segments)及 7 圈(14 segments)修飾後，掃描緩衝溶液，得到圖 4-2 之電流反應圖。由圖中可觀察出循環伏安法修飾 6 圈(12 segments)後可得到最高的電流反應，修飾 7 圈(14 segments)之電流訊號開始下降，故在循環伏安法的修飾中，以修飾 6 圈(12 segments)為最適條件。

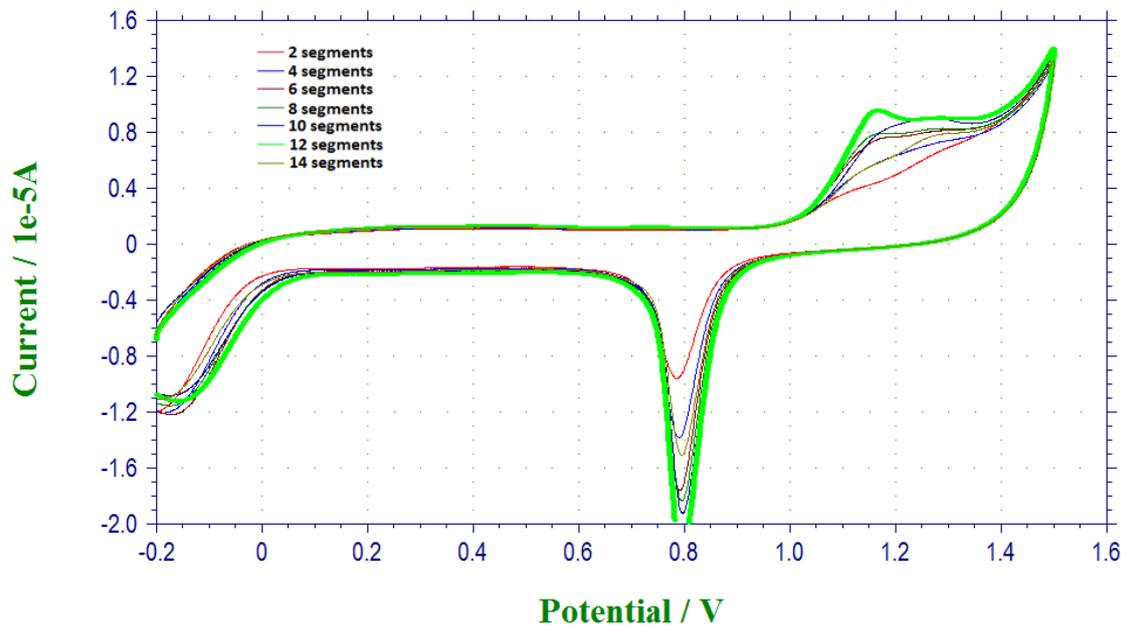


圖 4-1、玻璃碳電極以循環伏安法修飾奈米金之電位—電流反應圖。分別掃描 1 圈(2 segments)、2 圈(4 segments)、3 圈(6 segments)、4 圈(8 segments)、5 圈(10 segments)、6 圈(12 segments)及 7 圈(14 segments)，再以循環伏安法檢測緩衝溶液之反應圖。

Fig. 4-1 Glassy carbon electrode (GCE) modified with gold nanoparticles (AuNPs) by cyclic voltammetry scanning with 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 segments respectively, then detected 0.04 M B-R (pH 2.0) buffer at 25°C. Scan rate = 0.1 V/s.

4.2 奈米白金粒子修飾玻璃碳電極之探討

在國內外文獻中，常見使用奈米白金的修飾方法為使用界面活性劑 Sodium dodecyl sulfate (SDS)與氯鉑酸混合，以安培法掃描 (Hasnat *et al.*, 2010)；或使用硫酸與氯鉑酸混合，以循環伏安法以 -1.5 V 到 -0.3 V 掃描 (Awad *et al.*, 2011)；亦有將電極浸於氯鉑酸 18 小時，再加入甲酸後，等待 3 小時 (Liu *et al.*, 2011)。考量 Liu 等所使用之修飾方法較前兩種耗時，該篇採用的電極為奈米碳纖維電極，與本研究使用之電極不同，且修飾成效不如前兩篇佳，故本研究使用前兩種修飾方法。

使用 Hasnat 等人之修飾方法檢測結果(圖 4-2)顯示：除了 BHA 有氧化峰之外，其餘兩種人工抗氧化劑並無明顯氧化及還原波峰。推測原因可能為：SDS 為界面活性劑，一端為親水端，與奈米白金結合；一端為疏水端，BHA 之疏水性較 TBHQ 及 BHT 好 (Diego *et al.*, 1998)，故檢測結果僅有 BHA 可測得訊號。

使用 Awad 等人之修飾方法檢測結果(圖 4-3)顯示，由圖中可知：BHA 及 BHT 之氧化電位皆大約在 -0.2 V，曾有文獻顯示兩種抗氧化劑之反應電位相近 (Lin *et al.*, 2013)，需探討更適合分離兩種抗氧化劑之檢測條件。但 TBHQ 並無明顯之氧化及還原電位，推測可能原因為 TBHQ 末端與感測器上之分子辨識單元不合，故難以檢測出其含量；而 BHA 及 BHT 一端可與分子辨識單元可結合，故兩抗氧化劑仍可被偵測。

評估奈米材料修飾玻璃碳電極檢測人工抗氧化劑之成效，雖然經奈米白金修飾玻璃碳電極可較經奈米金修飾玻璃碳電極更易測得 BHT 之含量，但奈米白金修飾玻璃碳電極無法檢測 TBHQ，故後續以奈米金修飾玻璃碳電極檢測人工抗氧化劑之含量。

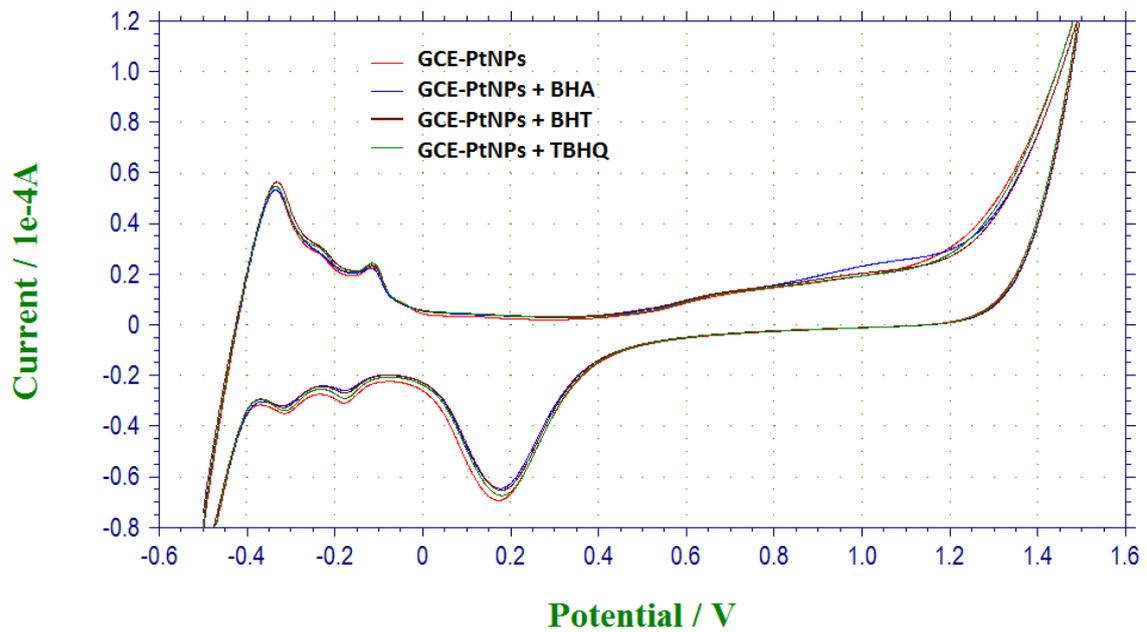


圖 4-2、以安培法修飾奈米白金於玻璃碳電極，分別檢測空白試驗(B-R 緩衝溶液)、BHA、BHT 及 TBHQ 之電位—電流反應圖。

Fig. 4-2 Cyclic voltammograms obtain with the platinum nanoparticles modified glassy carbon electrode by amperometry in a 0.04 M B-R (pH 2.0) buffer at 25°C containing BHA, BHT, and TBHQ respectively. Scan rate = 0.1 V/s.

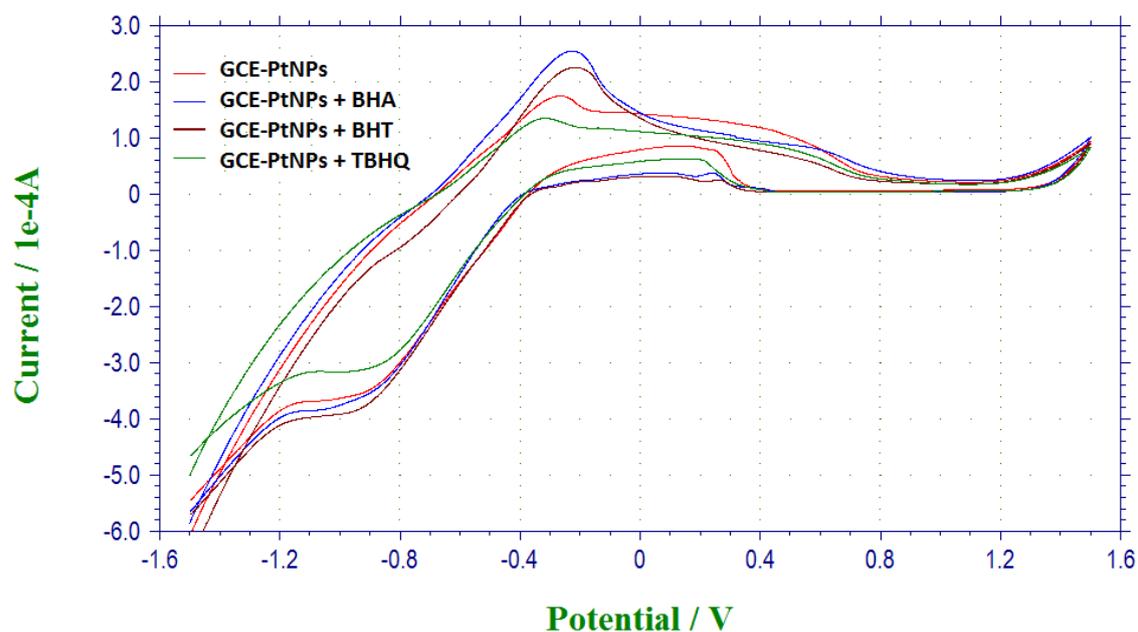


圖 4-3、以循環伏安法修飾奈米白金玻璃碳電極，分別檢測空白試驗 (B-R 緩衝溶液)、BHA、BHT 及 TBHQ 之電位—電流反應圖。

Fig. 4-3 Cyclic voltammograms obtain with the platinum nanoparticles modified glassy carbon electrode by cyclic voltammetry in a 0.04 M B-R (pH 2.0) buffer at 25°C containing BHA, BHT, and TBHQ respectively. Scan rate = 0.1 V/s.

4.3 奈米金修飾玻璃碳電極效應探討

玻璃碳電極經過奈米金粒子修飾後，在反應槽中加入 pH 2 之 Britton-Robinson buffer(B-R buffer) 10 mL 設定掃描速率為 0.1 V/s，在室溫 (25°C) 下分別檢驗三種抗氧化劑及三種抗氧化劑之混合溶液在修飾前後電流訊號的差異，確認修飾後的電極是否可以放大待測物之電流訊號，或是對檢測分析過程有所助益或影響。

TBHQ 在修飾電極前後之結果圖(圖 4-4)中，a 為經過奈米金粒子修飾玻璃碳電極後檢測 TBHQ 之結果，c 為玻璃碳電極檢測 TBHQ 之結果，b 與 d 則分別為修飾與未修飾時掃描緩衝溶液之結果圖。由圖中可知，經過修飾後可以提高電流訊號，並且在較低的電位中得到訊號；奈米金粒子修飾玻璃碳電極與玻璃碳電極比較，前者可在較低電位得到較高的電流訊號，故就檢測 TBHQ 而言，經奈米金修飾之玻璃碳電極可以提高檢測的效益。

BHA 在修飾電極前後之結果圖(圖 4-5)中，a 為經奈米金粒子修飾玻璃碳電極後檢測 BHA 之結果，c 為玻璃碳電極檢測 BHA 之結果，b 與 d 則分別為修飾與未修飾時掃描緩衝溶液之結果圖。由圖中可知，在經過修飾後可以提高電流訊號，並且在較低的電位中得到訊號，電位低所得到的電流訊號較為穩定；奈米金粒子修飾玻璃碳電極與玻璃碳電極比較，前者可在較低電位得到較高的電流訊號，故就檢測 BHA 而言，經奈米金修飾之玻璃碳電極可以提高檢測的效益。

BHT 在修飾電極前後之結果圖(圖 4-6)中，a 為經過奈米金粒子修飾玻璃碳電極後檢測 BHT 之結果，c 為玻璃碳電極檢測 BHT

之結果，b 與 d 則分別為修飾與未修飾時掃描緩衝溶液之結果圖。由圖中可知，玻璃碳電極無法檢測緩衝溶液中的 BHT，而經過奈米金粒子修飾的玻璃碳電極可偵測出 BHT 之電流訊號。推測玻璃碳電極無法偵測到氧化反應可能原因是 BHT 相較於 BHA 及 TBHQ 之抗氧化能力(還原力)低，相較於 BHA 及 TBHQ 來說，BHT 氧化反應的電子轉移較少，無法達到玻璃碳電極偵測所需的電子轉移量，而經過奈米金粒子修飾後，電極表面積增加，可偵測較多電子轉移量，放大其電流訊號。故經奈米金修飾之玻璃碳電極有助於放大電流訊號、檢測原本無法檢測之 BHT。

三種抗氧化劑之混合溶液在修飾電極前後之結果圖(圖 4-7)旨在檢視三種抗氧化劑混合後是否會互相干擾進而影響檢測結果；由圖 4-8 中可知三種抗氧化劑在混合後並不影響其檢測結果。

綜觀以上結果可以得知：玻璃碳電極經修飾奈米金粒子修飾後可以有效放大電流訊號，並且提高檢測人工抗氧化劑的效益。

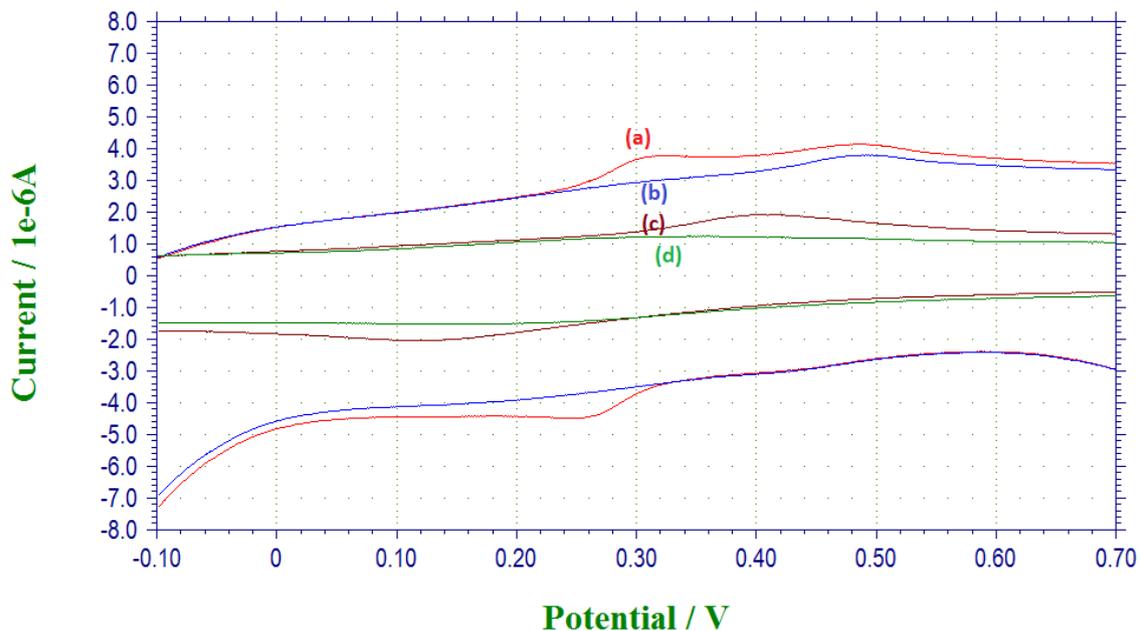


圖 4-4、奈米金修飾玻璃碳電極檢測 TBHQ 之電位—電流反應圖，(a) 以奈米金粒子修飾玻璃碳電極掃描添加 TBHQ 之緩衝溶液；(b) 以奈米金粒子修飾玻璃碳電極掃描緩衝溶液；(c) 玻璃碳電極掃描添加 TBHQ 之緩衝溶液；(d) 玻璃碳電極掃描緩衝溶液。

Fig. 4-4 Cyclic voltammograms obtain with the GCE and AuNPs/GCE in a 0.04 M B-R (pH 2.0) buffer at 25°C containing: (a) AuNPs/GCE + 50 mg/L TBHQ, (b) AuNPs/GCE, (c) GCE + 50 mg/L TBHQ, (d) GCE. Scan rate = 0.1 V/s.

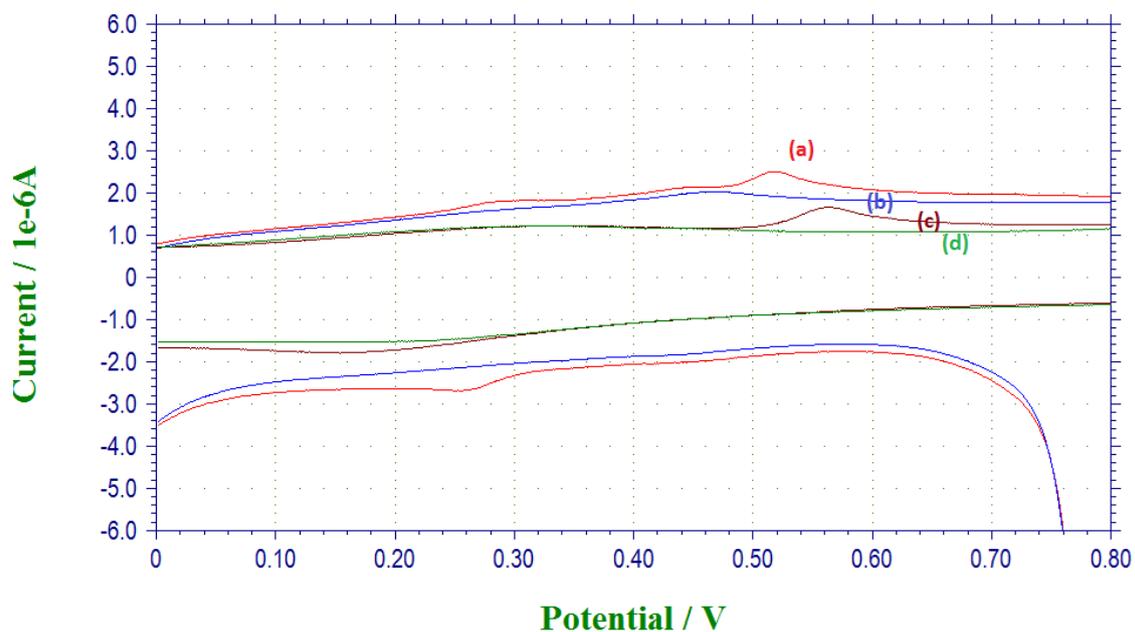


圖 4-5、奈米金修飾玻璃碳電極檢測 BHA 之電位—電流反應圖，(a) 以奈米金粒子修飾玻璃碳電極掃描添加 BHA 之緩衝溶液；(b) 以奈米金粒子修飾玻璃碳電極掃描緩衝溶液；(c) 玻璃碳電極掃描添加 BHA 之緩衝溶液；(d) 玻璃碳電極掃描緩衝溶液。

Fig. 4-5 Cyclic voltammograms obtain with the GCE and AuNPs/GCE in a 0.04 M B-R (pH 2.0) buffer at 25°C containing: (a) AuNPs/GCE + 50 mg/L BHA, (b) AuNPs/GCE, (c) GCE + 50 mg/L BHA, (d) GCE. Scan rate = 0.1 V/s.

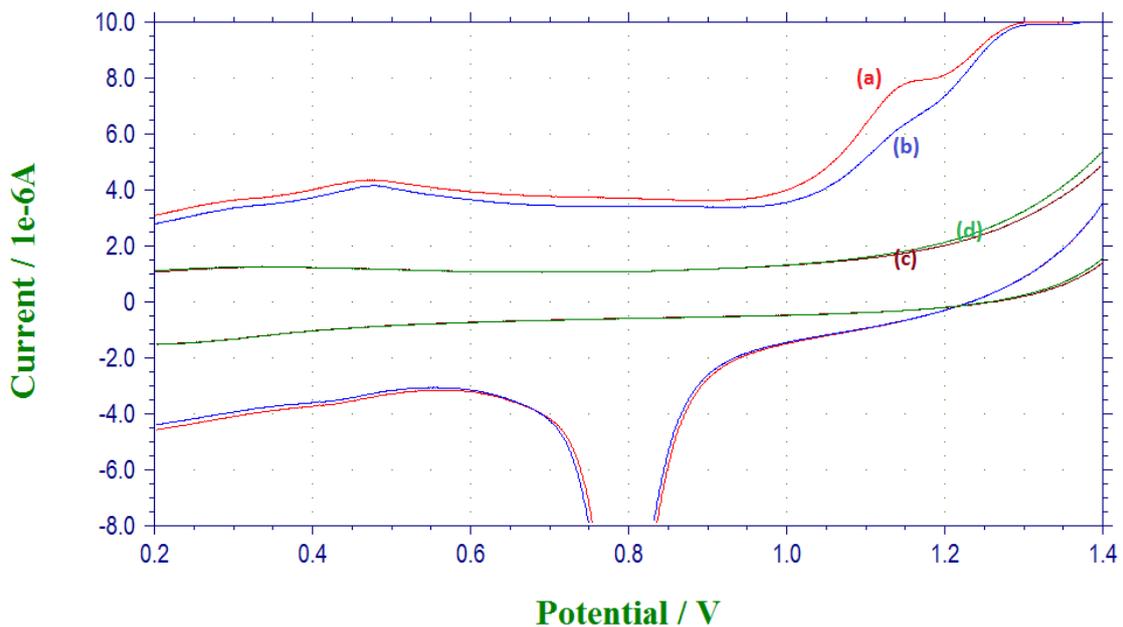


圖 4-6、奈米金修飾玻璃碳電極檢測 BHT 之電位—電流反應圖，(a) 以奈米金粒子修飾玻璃碳電極掃描添加 BHT 之緩衝溶液；(b) 以奈米金粒子修飾玻璃碳電極掃描緩衝溶液；(c) 玻璃碳電極掃描添加 BHT 之緩衝溶液；(d) 玻璃碳電極掃描緩衝溶液。

Fig. 4-6 Cyclic voltammograms obtain with the GCE and AuNPs/GCE in a 0.04 M B-R (pH 2.0) buffer at 25°C containing: (a) AuNPs/GCE + 50 mg/L BHT, (b) AuNPs/GCE, (c) GCE + 50 mg/L BHT, (d) GCE. Scan rate = 0.1 V/s.

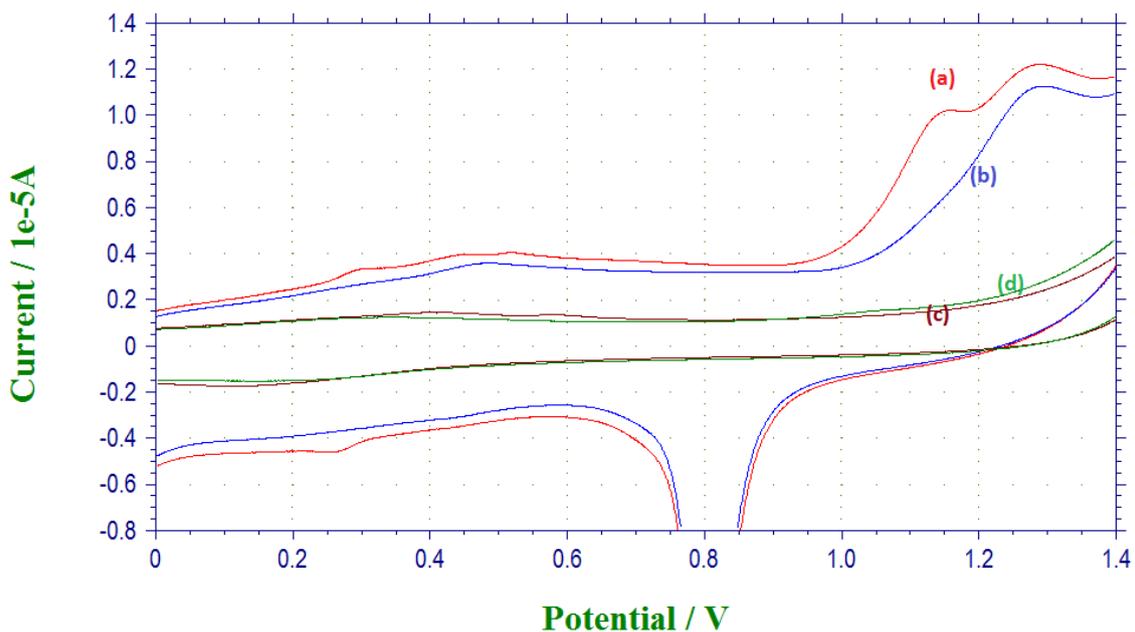


圖 4-7、奈米金修飾玻璃碳電極檢測混合溶液之電位—電流反應圖，(a) 以奈米金粒子修飾玻璃碳電極掃描添加混合溶液之緩衝溶液；(b) 以奈米金粒子修飾玻璃碳電極掃描緩衝溶液；(c) 玻璃碳電極掃描添加混合溶液之緩衝溶液；(d) 玻璃碳電極掃描緩衝溶液。

Fig. 4-7 Cyclic voltammograms obtain with the GCE and AuNPs/GCE in a 0.04 M B-R (pH 2.0) buffer at 25°C containing: (a) AuNPs/GCE + mixture of BHA, BHT, and TBHQ, (b) AuNPs/GCE, (c) GCE + mixture of BHA, BHT, and TBHQ, (d) GCE. Scan rate = 0.1 V/s.

4.4 電化學系統檢測抗氧化劑之最適 pH 值探討

室溫 (25°C) 下，分別檢測 pH 2 至 7 之 B-R 緩衝溶液，取緩衝溶液 10 mL 加入反應槽，於緩衝溶液中加入三種抗氧化劑之混合溶液 100 μ L，以磁石攪拌均勻後，設定掃描速率為 0.1 V/s，由奈米金粒子修飾之玻璃碳電極感測，得到電流反應圖 (圖 4-8)。由於圖 4-8(A) 為混合溶液之檢測，為能準確分析 BHA、TBHQ 及 BHT 之訊號，分別將局部放大，得圖 4-8(B) 及圖 4-8(C)。

圖 4-8(B) 為比較 BHA 及 TBHQ 之電流訊號；在 pH 2 的緩衝溶液下，BHA 及 TBHQ 分別在 0.52 V 及 0.30 V 有最大氧化電流，隨著 pH 值增加至 6，氧化電位降低，但電流訊號也逐漸減小。於 pH 7 時並無觀察到明顯的電流變化，推測原因為：在中性環境下，抗氧化劑於氧化反應中所釋出的氫離子及電子被緩衝溶液平衡為迅速中和至中性環境，電流訊號會較低 pH 值環境微弱；而還原峰的部分，TBHQ 的還原峰在 0.26 V 有最大還原電流，pH 越高，還原電位越高。

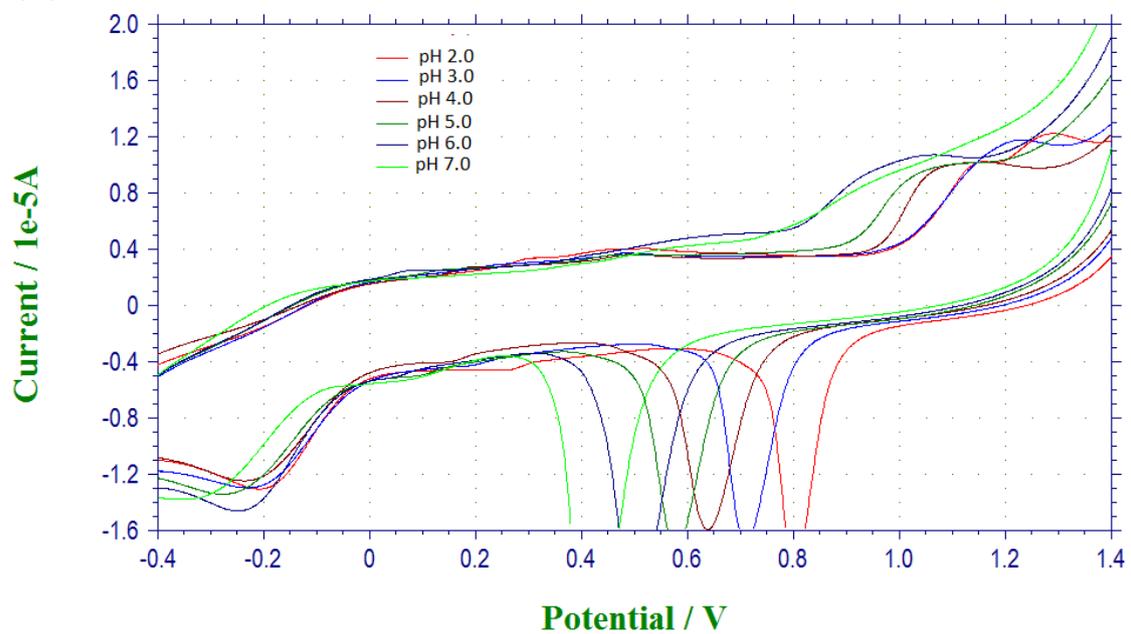
由圖 4-8(C) 可比較 BHT 之電流訊號，BHT 在 pH 2 之緩衝溶液中，於 1.15 V 有最大反應電流，而其他 pH 值並無觀察到 BHT 的氧化波峰，顯示 BHT 僅能於 pH 2 之緩衝溶液中檢測出其含量，推測原因為：BHT 氧化能力較弱，在 pH 值較高的環境下不容易偵測到其反應之電子轉移，低 pH 值下才有較顯著之反應。

由於除了 pH 2 以外，其他 pH 值之 B-R 緩衝溶液在檢測 BHT 時無法被檢出，雖然在 pH 2 環境下檢測 BHA 及 TBHQ 的電位並非最低，但是檢測的反應電流最高，考量三種抗氧化劑要同時檢

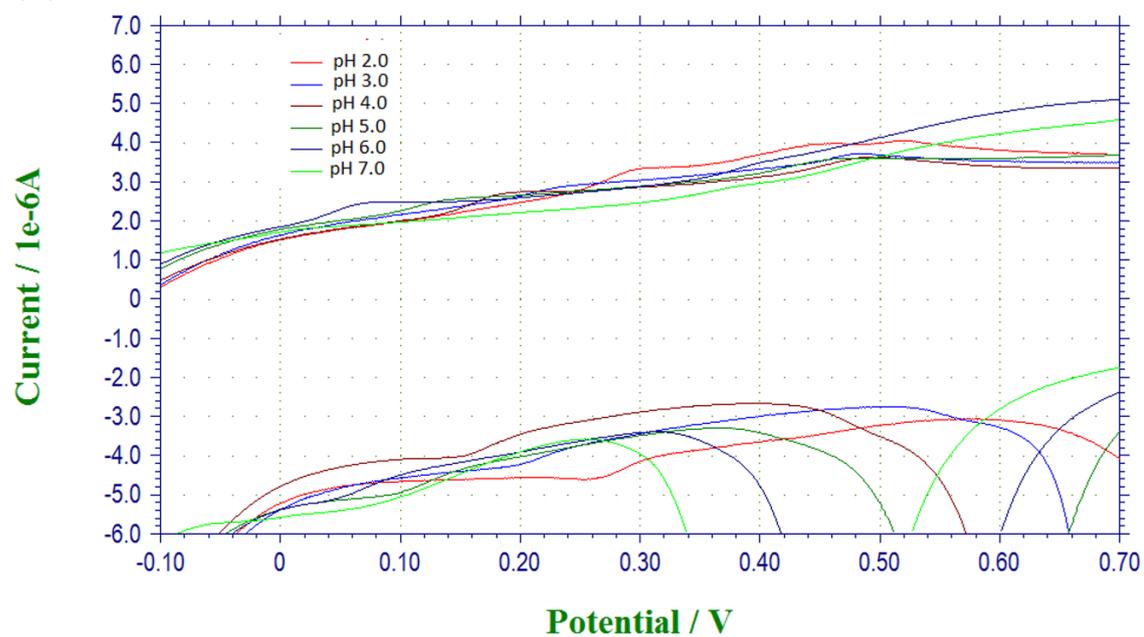
測出結果，故以 pH 2 之 B-R 緩衝溶液做為後續實驗之最適 pH 值條件。



(A)



(B)



(C)

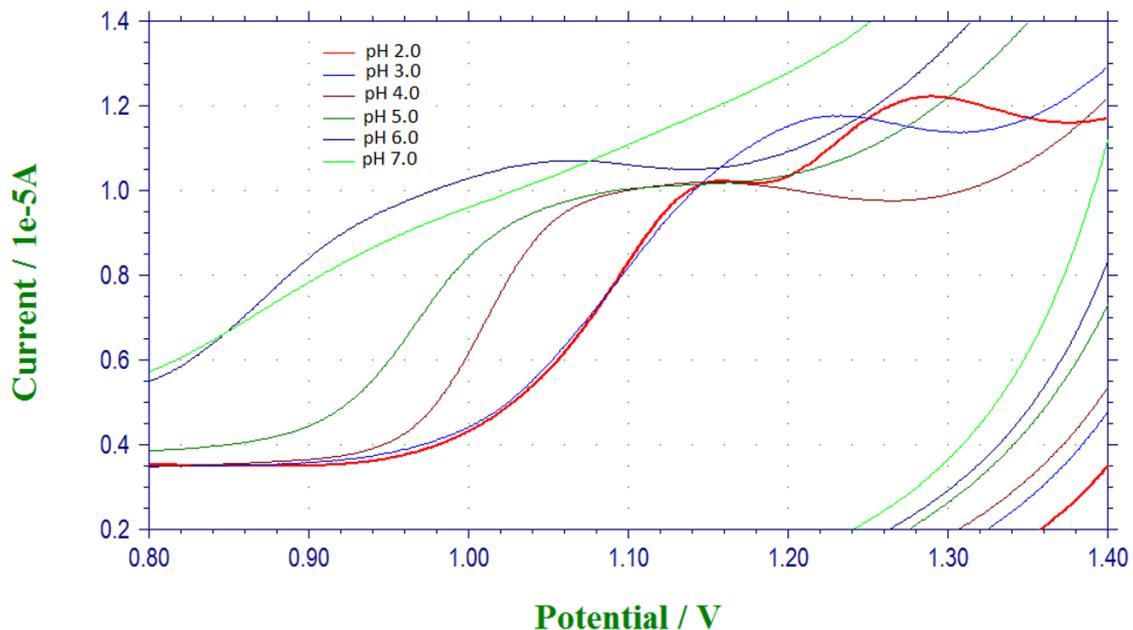


圖 4-8、pH 值對抗氧化劑檢測之影響。(A)以奈米金修飾玻璃碳電極，於室溫下以 0.04 M B-R 緩衝溶液檢測抗氧化劑混合溶液。(B)電位 -0.10~0.70 V 放大檢視。(C)電位 0.80~1.40 V 放大檢視。

Fig. 4-8 Influence of pH value on the peak current of GCE to antioxidants. (A) Cyclic voltammograms of BHA, BHT, and TBHQ solution mixture in 0.04 M B-R buffer at 25°C: influence of pH on the peak potential profiles. (B) Magnify the figure 4-9 between potential -0.10 to 0.70 V to see BHA and TBHQ peak. (C) Magnify the figure 4-9 between potential 0.80 to 1.40 V to see BHT peak. Scan rate = 0.1 V/s. (numbers 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, and 7.0 represent the pH values).

4.5 電化學系統檢測抗氧化劑之反應槽溶液最適溫度探討

在反應槽中加入 pH 2 之 B-R 緩衝溶液 10 mL，於緩衝溶液中加入三種抗氧化劑之混合溶液 100 μ L，以磁石攪拌均勻後，設定掃描速率為 0.1 V/s，分別檢測溫度 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C 及 45 $^{\circ}$ C，分別得到電流反應圖，再將電流訊號經過計算後做圖。

BHA 氧化峰、BHT 氧化峰及 TBHQ 氧化峰(anodic)探討最適溫度所得到的溫度-電流圖 (圖 4-9) 中，皆是 30 $^{\circ}$ C 之電流訊號為最大，故對三種抗氧化劑之氧化峰而言，為 30 $^{\circ}$ C 最適溫度條件。

而在 TBHQ 還原峰(cathodic)探討最適溫度所得到的結果中，25 $^{\circ}$ C 所得到的電流訊號最大，但 30 $^{\circ}$ C 之電流訊號與 25 $^{\circ}$ C 之電流訊號並無顯著差異，故 25 $^{\circ}$ C 及 30 $^{\circ}$ C 兩者皆可作為 TBHQ 還原峰之最適條件。

歸納上述對於最適溫度之探討，若要同時檢測三種抗氧化劑，最適溫度條件為 30 $^{\circ}$ C。

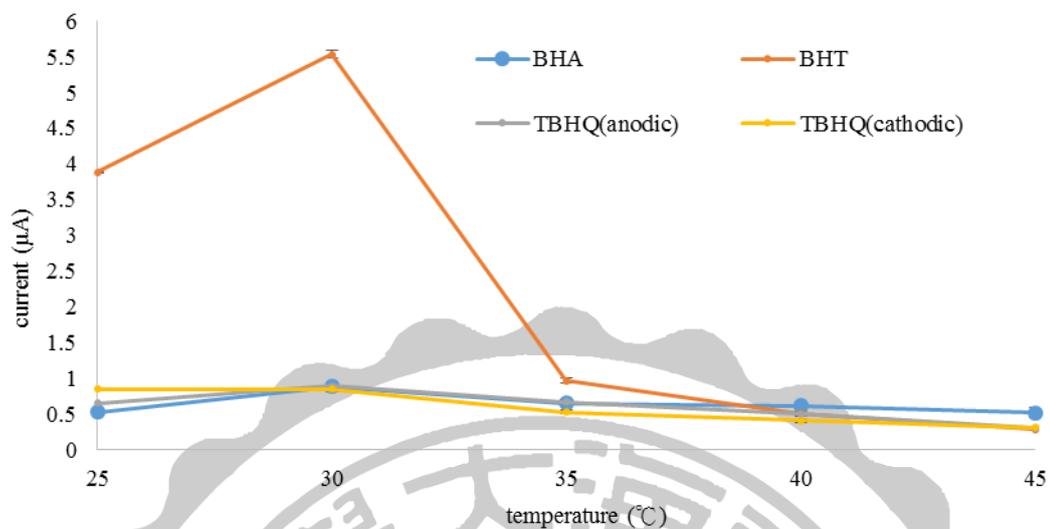


圖 4-9、溫度對抗氧化劑檢測之影響。

Fig. 4-9 Influence of temperature on the peak current of GCE to BHA, BHT, and TBHQ solution mixture in 0.04 M B-R (pH 2.0) buffer. Scan rate = 0.1 V/s.

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

4.6 電化學系統檢測抗氧化劑之最適掃描速率探討

在反應槽中加入 pH 2 之 B-R 緩衝溶液 10 mL，於緩衝溶液中加入三種抗氧化劑之混合溶液 100 μL ，以磁石攪拌均勻後，設定檢測溫度 30 $^{\circ}\text{C}$ ，掃描速率分別為 1.0 V/s、0.5 V/s、0.2 V/s、0.1 V/s、0.05 V/s 及 0.01 V/s，得到電流反應圖進行比較。

掃描速率決定電化學反應之反應時間，在特定之電位範圍中，掃描速率越快，會相對降低反應時間，若反應速率較慢之化學反應，在快速掃描的過程中可能無法被察覺(胡，2011)。

由圖 4-10 中可觀察到掃描速率越大時，所得到的電流訊號越大，但相對的電位也變得較高，訊號會較不穩定；且文獻指出，當掃描速率過快時，會使背景值電流大幅提高，得到的電流訊號容易被忽略或難以辨識，較難檢測濃度低的待測物(胡，2011)，因此本研究選用掃描速率 0.1 V/s 作為最適掃描速率條件，此掃描速率亦為多數電化學文獻中所決定之實驗操作條件；以此條件掃描一圈(2 segments)之反應時間為 40 秒，可快速得到電流訊號並進行數據分析。

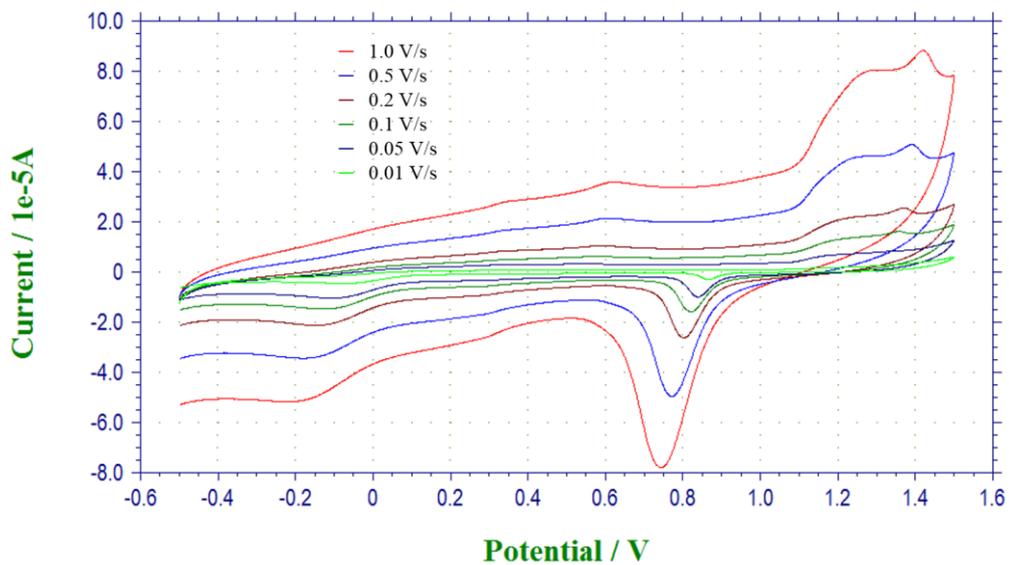


圖 4-10、掃描速率對抗氧化劑檢測之影響。

Fig. 4-11 Cyclic voltammograms of BHA, BHT, and TBHQ solution mixture in 0.04 M B-R (pH 2.0) buffer at 30°C: influence of scan rate on the peak potential profiles.

(numbers 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, and 1.0 represent the scan rate).

4.7 修飾電極穩定度探討

將玻璃碳電極修飾奈米金後，以循環伏安法反覆檢測反應槽內之混合溶液，檢視經過奈米金修飾之電極可維持之檢測次數，用意為確認實驗中使用同一次修飾之電極所得的實驗數據是穩定、可採用的。

電極穩定度之掃描圈數-電流圖(圖 4-11)中為 TBHQ、BHA 及 BHT 檢測所得之電流結果，將第 1 次至第 30 次平均得到值分別為 $0.00000488 \pm 0.00000002$ 、 $0.00000494 \pm 0.00000003$ 、 $0.00001863 \pm 0.000000035$ ，計算變異係數(Coefficient of variation)分別得到 0.41%、0.61% 及 1.88%。比較三種抗氧化劑的實驗結果及變異係數，TBHQ、BHA 及 BHT 在掃描檢測 30 次以內之電流訊號並無顯著差異，代表實驗檢測 30 次以內所得之電流訊號穩定，數據足以採信。

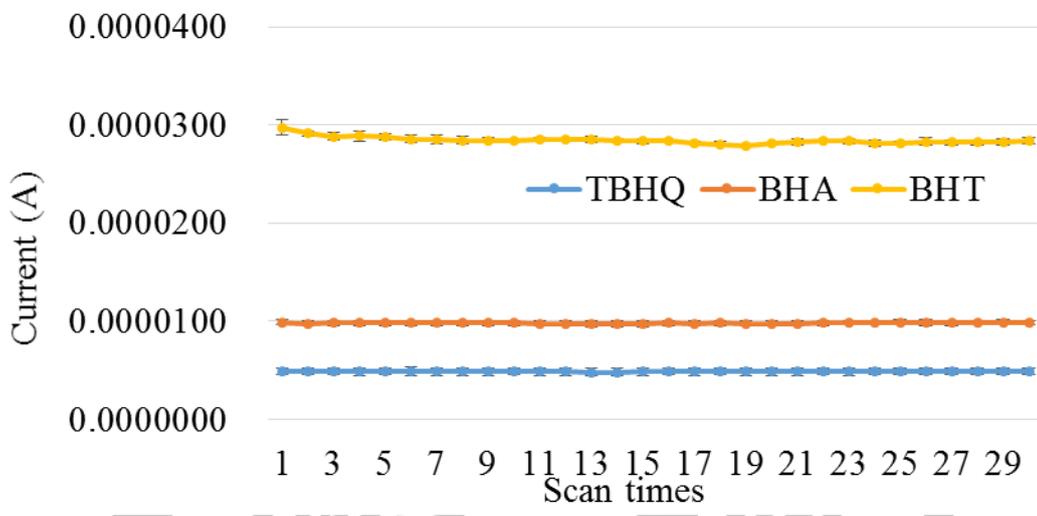


圖 4-11、電極穩定度之掃描次數-電流圖。

Fig. 4-12 Scan times-current chart of the stability of AuNPs/GCE detecting BHA, BHT, and TBHQ solution mixture.

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

4.8 電化學系統檢測抗氧化劑之檢量線

依照食品藥物管理署所頒布之檢測方法配置抗氧化劑標準溶液，並將三種抗氧化劑均勻混合，以電化學法檢測，得到各濃度之電流訊號，再以濃度及電流訊號做圖得到檢量線。濃度範圍係參考食品藥物管理署對於添加物之限量標準，本研究所探討的抗氧化劑其限量標準為 200 mg/L，故濃度選在 200 mg/L 以上的 330 mg/L。

線性範圍皆為 0 mg/L 至 330 mg/L，TBHQ、BHA 和 BHT 之線性迴歸方程式為：

$$\text{TBHQ: } y=9 \times 10^{-9} x + 2 \times 10^{-7}, R^2 = 0.9962$$

$$\text{BHA: } y=9 \times 10^{-9} x + 1 \times 10^{-7}, R^2 = 0.9974$$

$$\text{BHT: } y=3 \times 10^{-8} x + 3 \times 10^{-7}, R^2 = 0.9968$$

TBHQ(圖 4-12)、BHA(圖 4-13)和 BHT(圖 4-14)之檢量線 R^2 值分別為 0.9962、0.9974 及 0.9968，雖然比起 HPLC 迴歸線之 R^2 值小，但皆大於 0.995，顯示濃度的範圍在 0 至 330 mg/L 的迴歸線相關性仍然高，可用以檢測未知物並推算其濃度。

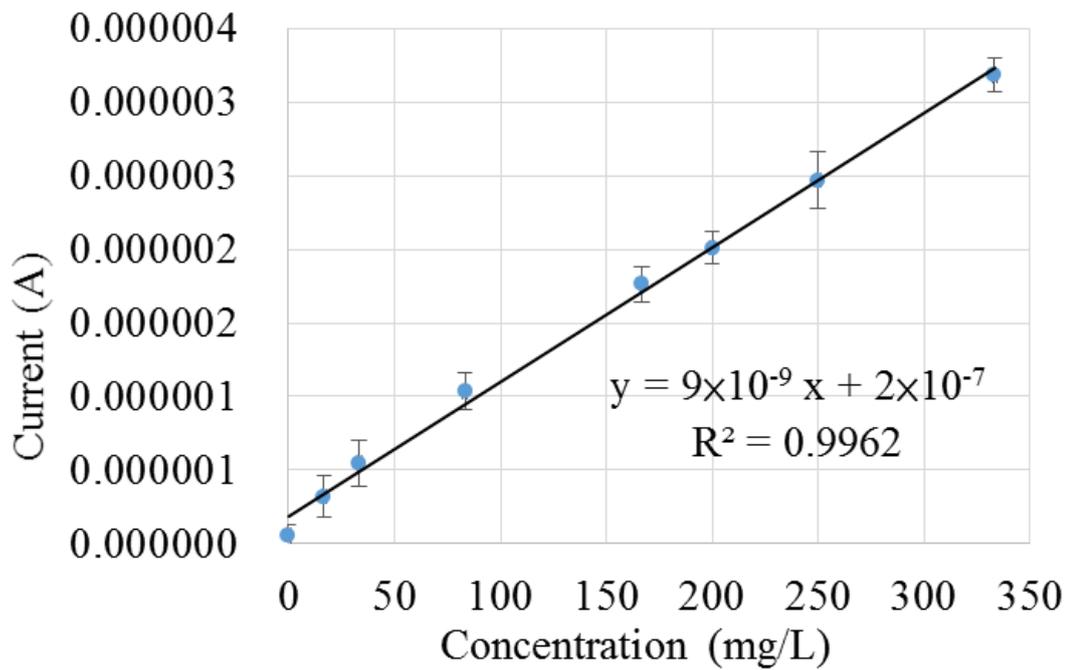


圖 4-12、電化學系統檢測 TBHQ 之檢量線。

Fig. 4-13 The calibration curve of detecting TBHQ by electrochemical system.

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

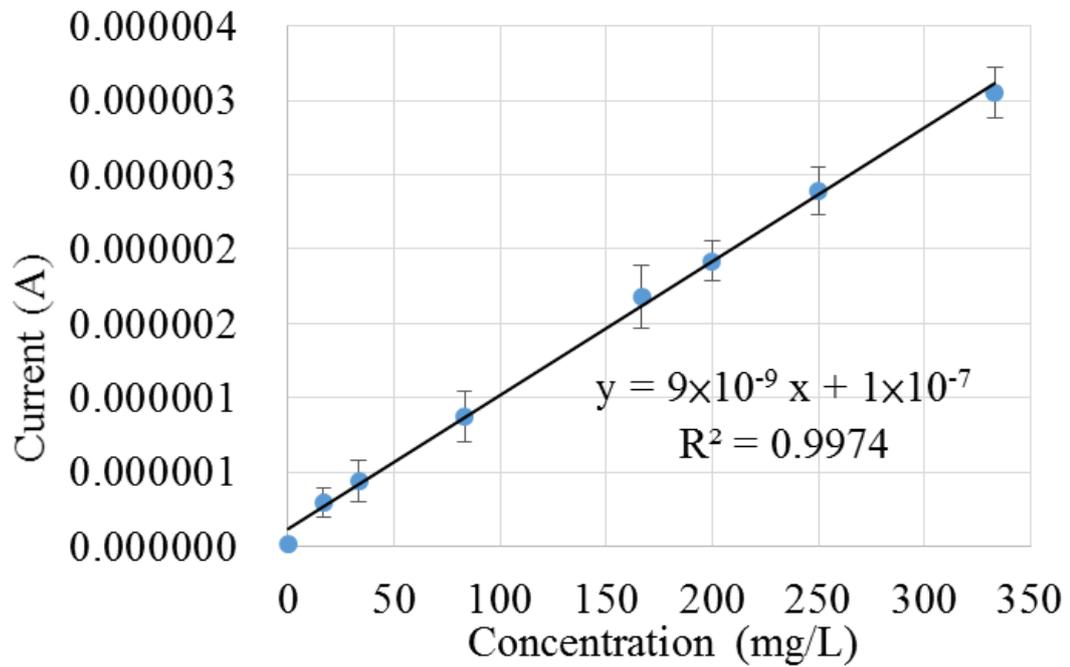


圖 4-13、電化學系統檢測 BHA 之檢量線。

Fig. 4-14 The calibration curve of detecting BHA by electrochemical system.

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

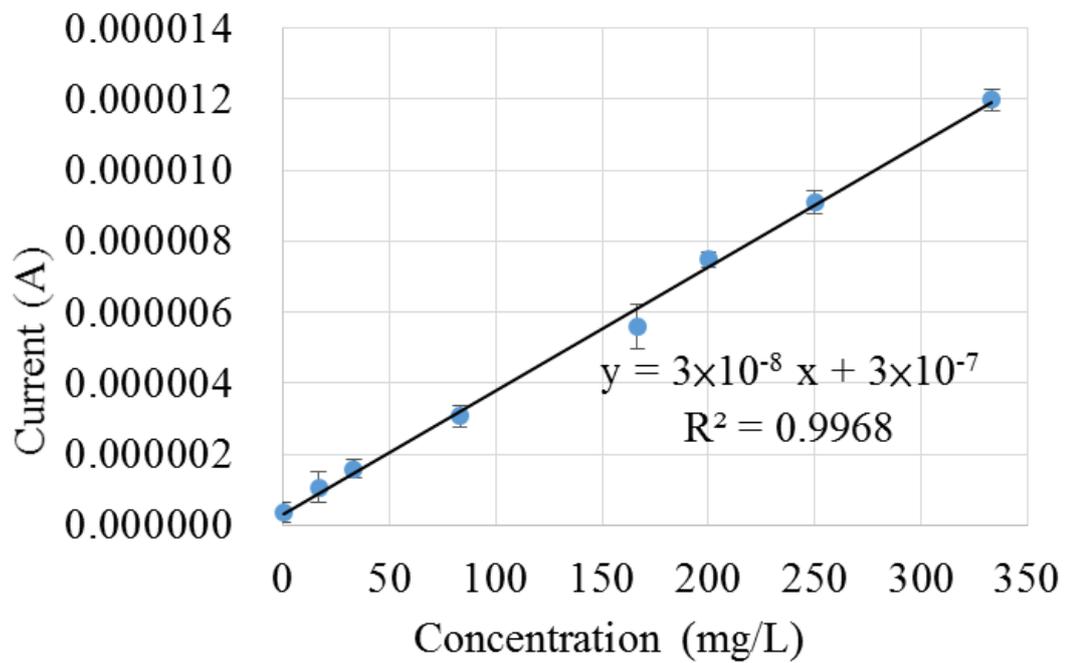


圖 4-14、電化學系統檢測 BHT 之檢量線。

Fig. 4-15 The calibration curve of detecting BHT by electrochemical system.

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

4.9 電化學及 HPLC 檢測實際樣品之結果比較

選用五種市售之食用油品，依照食品藥物管理署公布 HPLC 檢測方法將樣品前處理後，分別以 HPLC 及電化學法檢測樣品中 TBHQ、BHA 及 BHT 之含量。並將配製好之 100 ppm TBHQ 標準溶液、100 ppm BHA 標準溶液和 100 ppm BHT 標準溶液與樣品等量混合，可得到各含有外加 25 ppm 抗氧化劑(25 ppm TBHQ、25 ppm BHA 和 25 ppm BHT)標準溶液之樣品；依此方法分別再配置各含有外加 125 ppm 及 200 ppm 抗氧化劑標準溶液之樣品，並檢測其含量，由以上兩種結果可以計算抗氧化劑檢測之回收率。選用此三種濃度，分別代表抗氧化劑含量從低濃度到高濃度，包含法規所規定之限量添加標準，用來檢視此套系統檢測不同濃度之抗氧化劑的精確度。

市售油品可能包含之干擾物為抗壞血酸(Ascorbic acid)、維生素 E(Vitamin E)、鄰苯二甲酸酯(Phthalate)、檸檬酸(Citric acid)、金屬和酸離子自由基等；文獻顯示，濃度高於人工抗氧化劑最大容許量 2 倍之抗壞血酸、10 倍之維生素 E、10 倍之鄰苯二甲酸酯、10 倍之檸檬酸皆無明顯電流訊號，而金屬和酸離子自由基濃度則要高達 100 倍才有明顯干擾(Lin et al., 2013)，故干擾物對於本研究檢測之三種抗氧化劑並無顯著影響。

檢測樣品使用外加標準溶液原因是：樣品包裝並無標示添加含量，故無法確定 HPLC 與電化學法檢測到的結果是否與含量相近，若外加已知濃度，則可檢視方法之可信度。一般來說，外加已知濃度係透過計算回收率(Recovery, %)評估檢測結果，回收率在 $100\% \pm 5\%$ 都是可接受的範圍。其公式如下：

$$\text{回收率(\%)} = \frac{(\text{添加樣品中待測物測定量} - \text{原樣品中待測物測定量})}{\text{標準品添加量}} \times 100\%$$

1. 樣品中 TBHQ 含量之結果探討

由表 4-1 比較 HPLC 及電化學法檢測到的 TBHQ 含量；在樣品檢測中，由於電化學之靈敏度不如 HPLC 好，故電化學所檢測換算出之濃度普遍較 HPLC 結果還高，但由於五種樣品皆無違反食品藥物管理署所頒布之限量添加規定，且兩種方法所得之數值無明顯差距，並不影響判別添加物之過量與否。

在外加 25 ppm、125 ppm 及 200 ppm 抗氧化劑的檢測結果中，計算得到的回收率分別介於 97.74%~104.15%、97.68%~102.19% 及 98.75%~101.53%。三種濃度得到之回收率皆在±5%以內，應屬可接受之範圍，且隨著濃度的增加，回收率範圍越小，表示電化學系統在相對高濃度下，得到的檢測結果更為準確。在外加 200 ppm 之檢測結果中，五種樣品裡測出四種所含之 TBHQ 濃度超標，而檢測結果顯示未超標之樣品，其測出之濃度也與 200 ppm 接近；故在檢測 TBHQ 中，此系統雖無法達到百分之百準確檢測出樣品是否超標，但依本研究所檢測之比例來看，仍有 80%之樣品可被檢測出來，而結果中接近超標之樣品可利用 HPLC 法做進一步之分析，檢測其確切含量。

2.樣品中 BHA 含量之結果探討

表 4-2 為比較 HPLC 及電化學法檢測到的 BHA 含量；電化學所檢測換算出之濃度與 HPLC 結果十分接近，而五種樣品皆無違反食品藥物管理署所頒布之限量添加規定，且兩種方法所得之數值無明顯差距，並不影響判別添加物之過量與否。

在外加 25 ppm、125 ppm 及 200 ppm 抗氧化劑的檢測結果中，計算得到的回收率分別介於 95.56%~104.98%、99.49%~102.43% 及 98.58%~101.66%。三種濃度得到之回收率皆在±5%以內，應屬可接受之範圍，且濃度增加時，回收率範圍較低濃度小，表示電化學系統在相對高濃度下，得到的檢測結果更為準確。在外加 200 ppm 之檢測結果中，五種樣品裡測出三種所含之 BHA 濃度超標，而檢測結果顯示未超標之樣品，其測出之濃度也與 200 ppm 接近（分別為 199.63 ppm 及 198.06 ppm），結果中接近超標之樣品可利用 HPLC 法做進一步之分析，檢測其確切含量。

3.樣品中 BHT 含量之結果探討

表 4-3 為比較 HPLC 及電化學法檢測到的 BHT 含量；電化學所檢測換算出之濃度與 HPLC 結果十分接近，而五種樣品皆無違反食品藥物管理署所頒布之限量添加規定，且兩種方法所得之數值無明顯差距，並不影響判別添加物之過量與否。

在外加 25 ppm、125 ppm 及 200 ppm 抗氧化劑的檢測結果中，計算得到的回收率分別介於 97.04%~103.27%、100.65%~102.63% 及 98.72%~101.17%。三種濃度得到之回收率皆在±5%以內，應屬可接受之範圍，且濃度增加時，回收率範圍較低濃度小，表示電化學系統在相對高濃度下，得到的檢測結果更為準確。在外加 200 ppm 之檢測結果中，五種樣品皆可測出其所含之 BHT 濃度超標；故檢測 BHT 超標與否中，此系統可辨別樣品超標之成效好，幾乎可以將超標之樣品辨識出來；本研究所選之樣品來看並無接近而未達超標標準之檢測結果，但未來若有接近超標標準之樣品，仍可利用 HPLC 法做進一步之分析，檢測其確切含量。

在樣品檢測中，三種抗氧化劑的含量都很低；有文獻提出：BHA 在添加 0.02% 抗氧化效果較 0.01% 佳，但添加超過 0.02% 時，抗氧化效果反而會下降，該文獻亦指出抗氧化劑在混合使用時，其抗氧化效果較添加單一種抗氧化劑佳(萬等，1998)，但本實驗檢測出之含量明顯低於 0.02% 許多，推測可能是因為油品中除了添加此三種抗氧化劑外，亦可能加了常見添加於油製品中的生育醇(維生素 E)，利用混合不同抗氧化劑的方法，不僅提高抗氧化效果，且能避免添加過量而違法之問題。

表 4-1、以電化學法與高效液相層析法檢測食用油樣品中 TBHQ 含量之比較。(n=3)

Table 4-1 Detection of TBHQ in edible oil by electrochemical sensor and HPLC (n=3).

Edible oil	Electrochemical sensor ^a (mg/L)	HPLC method ^a (mg/L)	Spiked (mg/L)	Found ^a (mg/L)	Recovery ^b (%)
台糖烤酥油	2.87±0.41	2.35±0.20	25	28.28±0.52	101.60
			125	128.57±4.48	100.55
			200	205.93±12.26	101.53
台糖芥花油	2.10±0.46	1.89±0.21	25	27.73±0.10	102.54
			125	128.86±3.83	101.41
			200	200.55±8.24	99.22
正統調合油	3.04±0.37	1.98±0.34	25	27.47±0.60	97.74
			125	129.59±4.76	101.24
			200	200.55±5.67	99.75
得意的一天橄欖油	0.39±0.27	0.58±0.08	25	26.43±0.47	104.15
			125	128.13±3.83	102.19
			200	198.44±7.90	99.02
寶素齋葵花油	0.57±0.48	0.29±0.05	25	26.28±0.53	102.82
			125	122.67±6.21	97.68
			200	203.46±6.67	101.44

^a Mean ± standard deviation (n=3)

^b Recovery = [(present-detected)/spiked]×100

表 4-2、以電化學法與高效液相層析法檢測食用油樣品中 BHA 含量之比較。(n=3)

Table 4-2 Detection of BHA in edible oil by electrochemical sensor and HPLC (n=3).

Edible oil	Electrochemical sensor ^a (mg/L)	HPLC method ^a (mg/L)	Spiked (mg/L)	Found ^a (mg/L)	Recovery ^b (%)
台糖烤酥油	2.46±0.22	2.49±0.29	25	28.70±0.39	101.99
			125	130.50±3.93	102.43
			200	199.63±4.01	98.58
台糖芥花油	2.13±0.30	2.14±0.30	25	26.82±0.25	98.75
			125	129.19±1.97	101.65
			200	205.45±4.32	101.66
正統調合油	2.50±0.27	2.56±0.33	25	26.39±0.53	95.26
			125	127.06±3.95	99.65
			200	201.46±3.26	99.48
得意的一天橄欖油	0.78±0.61	0.22±0.02	25	25.72±0.45	101.86
			125	128.37±3.57	102.07
			200	198.06±8.40	98.64
寶素齋葵花油	1.17±0.40	0.34±0.07	25	25.57±0.28	100.59
			125	125.53±5.10	99.49
			200	203.02±5.01	100.93

^a Mean ± standard deviation (n=3)

^b Recovery = [(present-detected)/spiked]×100

表 4-3、以電化學法與高效液相層析法檢測食用油樣品中 BHT 含量之比較。(n=3)

Table 4-3 Detection of BHT in edible oil by electrochemical sensor and HPLC (n=3).

Edible oil	Electrochemical sensor ^a (mg/L)	HPLC method ^a (mg/L)	Spiked (mg/L)	Found ^a (mg/L)	Recovery ^b (%)
台糖烤酥油	6.00±0.18	5.96±0.47	25	31.82±0.89	103.27
			125	133.95±1.17	102.35
			200	203.44±2.23	98.72
台糖芥花油	7.08±0.16	6.93±0.50	25	32.27±1.27	101.13
			125	132.89±1.21	100.65
			200	204.69±4.26	98.81
正統調合油	7.50±0.27	7.59±0.41	25	33.75±0.61	104.99
			125	134.48±0.88	101.58
			200	209.09±6.08	100.79
得意的一天橄欖油	7.08±0.16	6.87±0.47	25	32.47±0.32	102.07
			125	135.01±1.69	102.34
			200	206.51±8.55	99.71
寶素齋葵花油	4.36±0.56	4.04±0.46	25	28.62±0.96	99.38
			125	132.64±1.19	102.63
			200	206.70±8.14	101.17

^a Mean ± standard deviation (n=3)

^b Recovery = [(present-detected)/spiked]×100

第五章、結論與檢討

本研究利用電化學領域中之循環伏安法，探討奈米材料修飾於玻璃碳電極，檢測人工抗氧化劑 BHA、BHT 及 TBHQ。修飾最適條件為：以奈米金修飾玻璃碳電極，使用安培法掃描 120 秒後，再以循環伏安法掃描 6 圈(12 segments)，完成電極修飾。檢測最適條件為：反應槽溶液使用 pH 值為 2.0 之 0.04 M Britton-Robinson 緩衝溶液，最適溫度為 30°C，最適掃描速率 0.1 V/s。以此條件製作檢測三種抗氧化劑之檢量線，線性範圍皆為 0 mg/L 至 330 mg/L，TBHQ、BHA 和 BHT 之線性迴歸方程式為：

$$\text{TBHQ: } y=9 \times 10^{-9} x + 2 \times 10^{-7}, R^2 = 0.9962$$

$$\text{BHA: } y=9 \times 10^{-9} x + 1 \times 10^{-7}, R^2 = 0.9974$$

$$\text{BHT: } y=3 \times 10^{-8} x + 3 \times 10^{-7}, R^2 = 0.9968$$

應用電化學方法與高效液相層析法於實際樣品檢測上，樣品使用 5 種市售食用油，5 種樣品所含之三種人工抗氧化劑皆在法規限量範圍之內。在外加 25 ppm、125 ppm 及 200 ppm 三種濃度之抗氧化劑標準溶液的檢測結果中，TBHQ 得到的回收率分別介於 97.74% ~ 104.15%、97.68% ~ 102.19% 及 98.75% ~ 101.53%，BHA 得到的回收率分別介於 95.56% ~ 104.98%、99.49% ~ 102.43% 及 98.58% ~ 101.66%，BHT 得到的回收率分別介於 97.04% ~ 103.27%、100.65% ~ 102.63% 及 98.72% ~ 101.17%。而在樣品中抗氧化劑含量超標的檢測部份，接近而未超標之樣品中，可利用 HPLC 法做進一步之分析，檢測其確切含量。

本研究開發以電化學系統檢測食品中人工抗氧化劑含量，具

有反應時間快、操作簡單、儀器及耗材成本較低等優點，另外，此方法不同於高效液相層析法需要使用許多藥品及列管之毒化物，是具有環保意識之檢測系統。

後續研究之方向可針對在法規限量標準 200 mg/L 作為分界點，利用更複雜的修飾電極表面方法，提高檢測樣品中人工抗氧化劑含量之靈敏度及專一性，並使用方波伏安法(Square wave voltammetry)製作檢量線；方波伏安法的優點為可以降低背景電流訊號及干擾，靈敏度較循環伏安法高，可提高辨識超標樣品之成功率，應用於不同食品中人工抗氧化劑含量檢測，檢測更多種類的市售食品。



第六章、參考文獻

6.1 中文部分

江文霞。2007。抗氧化劑 BHA 及 BHT 之簡介。食品工業 39: 35-37。

李世光、張所鎡、林世明、張培仁、林啟萬、黃榮山、胡毓忠、劉安順、孫美芳、韓謝忱、陳吉良、劉盈村、王裕銘。2002。競逐原子世界奈米技術與產業發展系列 No.1—奈米科學與技術導論。經濟部工業局，台北市。

呂慧菁。2003。電化學葡萄糖感測試片之研發。中興大學化學研究所碩士論文。

林淑瑗、饒家麟、顏裕鴻、王聯輝、蔡碧仁、鄔文盛、蕭泉源、林麗雲、陳時欣。2012。實用食品加工學。華格那出版有限公司，台中市。

施正雄。2001。化學感測器專題報導簡介。化學季刊 59(2): 199-200。

胡啟章。2011。電化學原理與方法(二版)。五南圖書出版股份有限公司，台北市。

食品安全國家標準預包裝食品標籤通則(GB7718-2011)。2011。中華人民共和國衛生部。

食品添加物使用範圍及限量暨規格標準。2013。行政院衛生福利部食品藥物管理署 (TFDA)。

食品添加劑使用衛生標準(GB2760-2011)。2011。中華人民共和國衛生部。

馬振基。2003。奈米材料科技—原理與應用。全華科技圖書股份有限公司，台北市。

馬振基、汪信、劉孝恒。2006。奈米材料化學。五南圖書出版股份有限公司，台北市。

馬遠榮。2002。奈米科技。商周出版社，台北市。

陳素燕、周曉蕙。2010。食品中抗氧化劑檢驗方法之探討。經濟部標準檢驗局台中分局自行研究計畫報告書。

陳輝煌、朱聖哲、劉冠汝、楊屹沛、葉安義、張正昇、陳榮輝、蔡敏郎、溫曉薇、張克亮、謝昌衛、馮臨惠、陳時欣、謝明發、潘子明。2011。食品奈米科技—基礎與應用。新文京開發出版股份有限公司，新北市。

張瑋翔、詹鴻得、張宜煌、張谷昇、徐詮亮。2012。開發電化學方法檢測金針花乾製品中亞硫酸鹽之殘留量。台灣農業化學與食品科學 50(4): 210-216。

黃炳照、莊睦賢。1999。電化學感測器。化工技術 7(2): 150-161。

黃濤、陳喜斌、王全利。2003。飼料抗氧化劑 TBHQ 的安全性研究。飼料研究 7: 10-12。

萬素英、趙亞軍、李琳、王慧君。1998。食品抗氧化劑。中國輕工業出版社，北京。

廖修賢。2011。金奈米粒子綴飾之奈米碳管修飾的電極進行葡萄糖與過氧化氫之非酵素電化學感測。成功大學化學工程研究所碩士論文。

銀解語。2011。聚亞甲基藍/FAD 與聚發光胺/MWCNT 修飾電極應用於測定 H_2O_2 和 NADH 生物感測器的電化學研究。台北科技大學化學工程研究所碩士論文。

劉嘉喜、王越鵬、鄭志強。2013。耐貯烤餅及其製備方法。中華人民共和國國家知識產權局(專利公開號：CN102972470 A)。

6.2 英文部分

Andrlikopoulos, N.K., H. Brueschweiler, H. Felber, and C. Taeschler. 1991. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68(6): 359-364.

Awad, M. I., M. M. Saleh, and T. Ohsaka. 2011. Impact of SO₂ poisoning of platinum nanoparticles modified glassy carbon electrode on oxygen reduction. *Journal of Power Sources* 196(8): 3722-3728.

Baldwin, R. P. and K. N. Thomsen. 1991. Chemically modified electrodes in liquid chromatography detection: A review. *Talanta* 38(1): 1-16.

Bănică, F. G. 2012. *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. p.576. John Wiley & Sons. Chichester, United Kingdom.

Bard, A. J. and L. R. Faulkner, 2001. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd edition. John Wiley & Sons. New York, U.S.A..

Barroso, M. F., N. de-los-Santos-Álvarez, C. Delerue-Matos, and M. B. Oliveira. 2011. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: electrochemical (bio)sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 30(1): 1-12.

Bartlet, P. N., J. J. Baumberg, P. R. Birkin, M. A. Ghanem, and M. C. Neti. 2002. Highly ordered macroporous gold and platinum films formed by electrochemical deposition through templates assembled from submicron diameter monodisperse polystyrene spheres. *Chemistry of Materials* 14(5): 2199-2208.

Botterweck, A. A. M., H. Verhagen, R. A. Goldbohm, J. Kleinjans and P. A. van den Brandt. 2000. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology* 38: 599-605.

Braun, P. V. and P. Wiltzius. 1999. Microporous materials: Electrochemically grown photonic crystals. *Nature* 402: 603-604.

Britton H. T. S. and R. A. Robinson. 1931. CXCVIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society* 1456-1462.

Cao, G, H. M. Alessio, and R.G. Cutler. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14(3): 303–311.

Carlo, M. D., G. Sacchetti, C. D. Mattia, D. Compagnone, D. Mastrocola, L. Liberatore, and A. Cichelli. 2004. Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *J Agricultural and Food Chemistry* 52(13): 4072–4079.

Cha, C. S., J. Chen, and P. F. Liu. 1993. Improvement of the adhesion of a Nafion® modifying layer on electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 345(1–2): 463–467.

Chambers, J. P., B. P. Arulanandam, L. L. Matta, A. Weis, and J. J. Valdes. 2008. Biosensor recognition elements. *Current Issues in Molecular Biology* 10(1-2): 1-12.

Choong, Y. M. and H. J. Lin. 2001. Gas chromatographic determination of synthetic antioxidants in edible fat and oil—a simple methylation method. *Journal of Food and Drug Analysis* 9(1): 20-26.

Crow, D. R.. 1979. *Principles and Applications of Electrochemistry*. 2nd edition. Chapman and Hall Limited, London, United Kingdom.

Cumberland, S. L. and G. F. Strouse. 2002. Analysis of the nature of oxyanion adsorption on gold nanomaterial surfaces. *Langmuir* 18(1): 269–276.

- Damien, W. M.. 1994. Tutorial review. Voltammetric determination of trace metals and organics after accumulation at modified electrodes. *Analyst* 119(9): 1953-1966.
- Daniel, J. and J. Gage. 1965. The absorption and excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) in the rat. *Food and Cosmetics Toxicology* 3: 405-415.
- Daniel M.C. and D. Astruc. 2004. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews* 104(1):293-346.
- Diego E., L. Agüí, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, and J. M. Kauffmann. 1998. Critical Comparison of Paraffin Carbon Paste and Graphite-Poly(tetrafluorethylene) Composite Electrodes Concerning the Electroanalytical Behavior of Various Antioxidants of Different Hydrophobicity. *Electroanalysis* 10(1): 33-38.
- Dziezak, J. D.. 1986. Preservatives: Antioxidants. *Food Technology* 40(9): 94-102.
- Eggins, B.R.. 2002. *Chemical Sensors and Biosensors*. 1st edition. John Wiley & Sons Ltd., England, United Kingdom.

- Elshafie M. M., I. A. Nawar, M. A. Algamal, and S. M. Ahmad. 2012. Evaluation of the biological effects for adding cinnamon volatile oil and TBHQ as antioxidant on rats' lipid profiles. *Asian Journal of Plant Sciences* 11(3): 100-108.
- Faraday, M.. 1857. The bakerian lecture: experimental relations of gold(and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 147: 145-181.
- Farre ´, M., R. Brix, and D. Barcelo. 2005. Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24(6): 532–545.
- Freitas, K. H. G. and O. Fatibello-Filho. 2010. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ immobilized in polyester resin. *Talanta* 81(3): 1102–1108.
- Gharavi, N. and O. S. E. K. Ayman. 2005. Tert-butylhydroquinone is a novel aryl hydrocarbon receptor ligand. *Drug Metabolism and Disposition* 33(3): 365-372.

- Gholivand, M. B., A. Pashabadi, A. Azadbakht, and S. Menati. 2011. A nano-structured Ni(II)–ACDA modified gold nanoparticle self-assembled electrode for electrocatalytic oxidation and determination of tryptophan. *Electrochimica Acta* 56(11): 4022-4030.
- Guan, Y., Q. Chu, L. Fu, T. Wu, and J. Ye. 2006. Determination of phenolic antioxidants by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection. *Food Chemistry* 94(1): 157–162.
- Hasnat, M. A., M. A. Rashed, M. S. Alam, M. M. Rahman, M. A. Islam, M. A. Islam, S. Hossain, and N. Ahmed. 2010. Electrocatalytic reduction of NO_2^- : Platinum modified glassy carbon electrode. *Catalysis Communications* 11(13): 1085-1089.
- Icenhour, T. P. and F. M. Van Dolah. 1991. A rapid method for analysis of tert-butyl hydroquinone(TBHQ) in ethyl esters of fish oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68(9): 659-661.
- Indyk, H. and D.C. Woollard. 1986. Antioxidant analysis in edible oils and fats by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 356: 401-408.

Jayasri, D. and S. S. Narayanan. 2006. Electrocatalytic oxidation and amperometric determination of BHA at graphite-wax composite electrode with silver hexacyanoferrate as electrocatalyst. *Sensors and Actuators B* 119(1): 135–142.

Jayasri, D. and S. S. Narayanan. 2007. Manganese(II) hexacyanoferrate based renewable amperometric sensor for the determination of butylated hydroxyanisole in food products. *Food Chemistry* 101(2): 607–614.

Kader, A. A., D. Zagory, and E. Kerbel. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28(1): 1–30.

Katsube, T., H. Tabata, Y. Ohta, Y. Yamasaki, E. Anuurad, K. Shiwaku, and Y. Yamane. 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu Assay. *Food and Feed Chemistry* 52(8): 2391-2396.

Keum Y, S., Y. H. Han, C. Liew, J. H. Kim, C. Xu, X. Yuan, M. P. Shakarjian, S. Chong, and A. N. Kong. 2006. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD[P]H: quinone oxidoreductase 1 (nqo1) by a phenolic antioxidant, butylated hydroxyanisole (BHA) and its metabolite, tert-butylhydroquinone (TBHQ) in primary-cultured human and rat hepatocytes. *Pharmaceutical Research* 23(11): 2586-2594.

- Kumar, S. S. and S. S. Narayanan. 2008. Mechanically immobilized nickel aquapentacyanoferrate modified electrode as an amperometric sensor for the determination of BHA. *Talanta* 76(1): 54–59.
- Lane, R. F. and A. T. Hubbard. 1973. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. *Journal of Physical Chemistry* 77(11): 1401–1410.
- Lanigan, R.S. and T.A. Yamarik. 2002. Final report on the safety assessment of BHT. *International Journal of Toxicology* 21(2): 19-94.
- Lin, H. J., M. L. Wang, Y. M. Choong, C. W. Chen, B. S. Hwang, S. L. Tsai, L. C. Chung, and M. H. Yang. 2003. Effects of extraction solvent on gas chromatographic quantitation of BHT and BHA in chewing gum. *Journal of Food and Drug Analysis* 11(2): 141-147.
- Lin, X., Y. Ni, and S. Kokot. 2013. Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants. *Analytica Chimica Acta* 765(26): 54-62.
- Liu, Y., D. Wang, L. Xu, H. Hou, and T. You. 2011. A novel and simple route to prepare a Pt nanoparticle-loaded carbon nanofiber electrode for hydrogen peroxide sensing. *Biosensors and Bioelectronics* 26(11): 4585-4590.

- Magg, N., J. B. Giorgi, T. Schroeder, M. Baumer, and H. J. Freund. 2002. Model catalyst studies on vanadia particles deposited onto a thin-film alumina support. 1. Structural characterization. *The Journal of Physical Chemistry B* 106 (34): 8756-8761.
- Mangenev, C., F. Ferrage, I. Aujard, V. Marchi-Artzner, L. Jullien, O. Ouari, D. Rékaï el, A. Laschewsky, I. Vikholm, and J. W. Sadowski. 2002. Synthesis and properties of water-soluble gold colloids covalently derivatized with neutral polymer monolayers. *Journal of the American Chemical Society* 124(20) 5811-5821.
- Martin, C. R., T. A. Rhoades, and J. A. Ferguson. 1982. Dissolution of perfluorinated ion-containing polymers. *Analytical Chemistry* 54 (9): 1639–1641.
- Masui, T., M. Hirose, K. Imaida, S. Fukushima, S. Tamano, and N. Ito. 1986. Sequential changes of the forestomach of F344 rats, Syrian golden hamsters, and B6C3F1 mice treated with butylated hydroxyanisole. *Japanese Journal of Cancer Research* 77: 1083-1090.
- Matijevic, E.. 1994. Uniform inorganic colloid dispersions. Achievements and challenges. *Langmuir* 10(1): 8–16.

- Medeiros, R. A., R. C. Rocha-Filho, and O. Fatibello-Filho. 2010. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. *Food Chemistry* 123(3): 886–891.
- Min, D. B. and D. Schweizer. 1983. Gas chromatographic determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and tertiarybutyl hydroquinone in soybean oil. *Journal of Food Science* 48(1): 73-74.
- Murray, R.W., A. G. Ewing, and R. A. Durst. 1987. Chemically modified electrodes-Molecular design for electroanalysis. *Analytical Chemistry* 59(5): 379-390.
- Naraghi M.. 2011. *Carbon Nanotubes-Growth and Applications*. 1st edition. InTech, Croatia.
- Niensch, K., F. Müller, A. P. Li, and U. Gösele. 2000. Uniform nickel deposition into ordered alumina pores by pulsed electrodeposition. *Advanced Materials* 12(8): 582-586.
- Niensch, K., R. B. Wehrspohn, J. Barthel, J. Kirschner, U. Gösele, S. F. Fisher, and H. Kronmüller. 2001. Hexagonally ordered 100 nm period nickel nanowire arrays. *Applied Physics Letters* 79(9): 1360-1362.

Ohta, M., M. Narita, T. Miyoshi, T. Itoyama, M. Kimura, M. Kobayashi, R. Ochi, Y. Sekiguchi, S. Koiguchi, Y. Hirahara, M. Hasegawa, M. Miyata, K. Kamakura, K. Maeda, M. Otomasu, and H. Ishiwata. 1997. Analysis of BHA, BHT and TBHQ in chewing gum by GC and GC/MS. *Food Hygiene and Safety Science* 38(2): 78-84.

OMRI(Organic Materials Review Institute). 2002. Butylated Hydroxytoluene (BHT) Crops. National Organic Standards Board Technical Advisory Panel Review for the USDA National Organic Program 1-12.

Ooi, N., I. Chopra, A. Eady, J. Cove, R. Bojar, and A. J. O'Neill. 2013. Antibacterial activity and mode of action of tert-butylhydroquinone (TBHQ) and its oxidation product, tert-butylbenzoquinone (TBBQ). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68(6): 1297-1304.

Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R. L. Prior. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4619-4626.

Pokorny, J., N. Yanishlieva, and M. Gordon. 2001. Antioxidants in food : Practical Applications. 1st edition, p. 267-284. Woodhead Publishing Limited, Philadelphia, U. S. A..

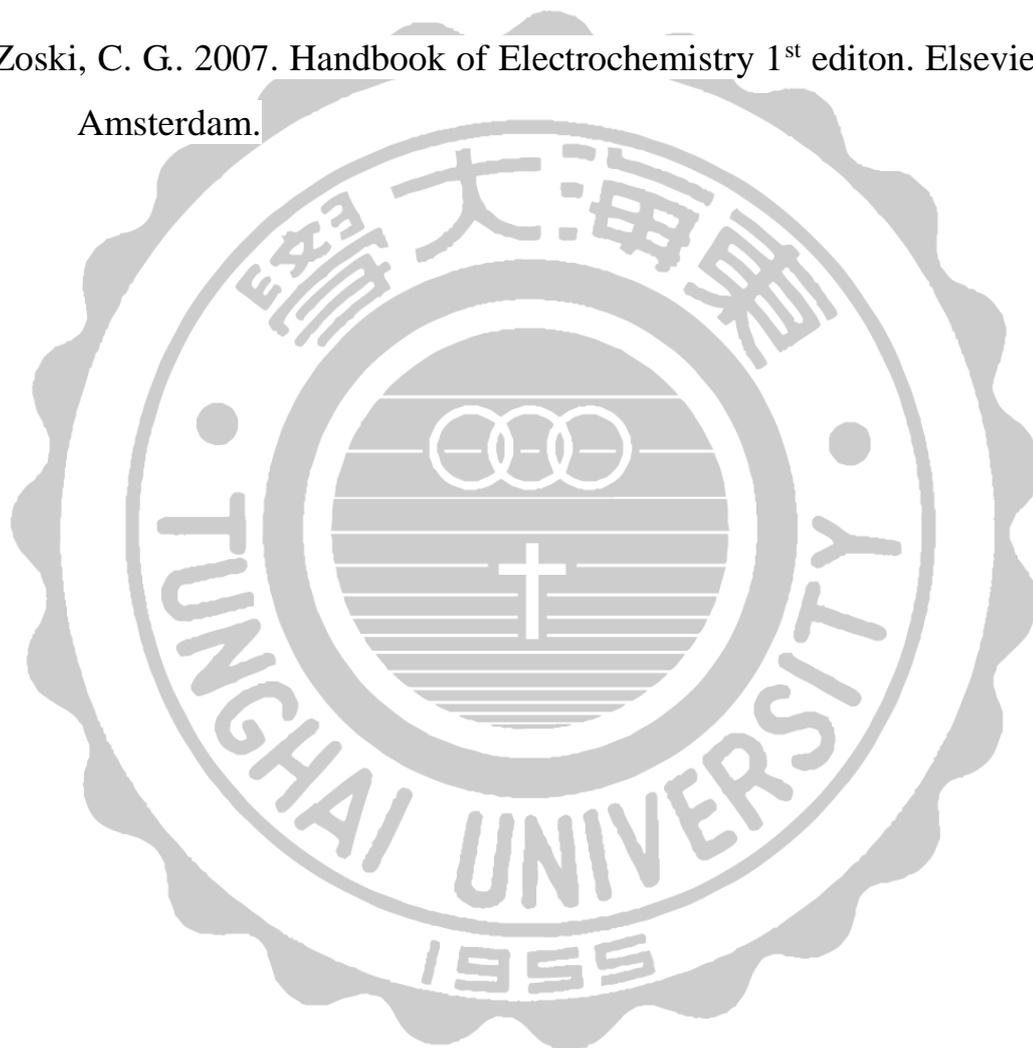
- Prabakar, S. J. R. and S. S. Narayanan. 2010. Flow injection analysis of BHA by NiHCF modified electrode. *Food Chemistry* 118(2): 449–455.
- Reda, S. Y.. 2011. Evaluation of antioxidants stability by thermal analysis and its protective effect in heated edible vegetable oil. *Food Science and Technology* 31(2): 475-480.
- Reetz, M. T. and W. Helbig. 1994. Size-selective synthesis of nanostructured transition metal clusters. *Journal of the American Chemical Society* 116(16): 7401-7402.
- Robards, K., A. F. Kerr, and E. Patsalides. 1988. Rancidity and its measurement in edible oils and snack foods. A review. *Analyst* 113(2): 213–224.
- Schmid, G. and L. F. Chi. 1998. Metal clusters and colloids. *Advanced Materials* 10(7): 515-526.
- Shan D., Q. Shi, D. Zhu, and H. Xue. 2007. Inhibitive detection of benzoic acid using a novel phenols biosensor based on polyaniline-polyacrylonitrile composite matrix. *Talanta* 72(5): 1767-1772.
- Skoog, A. and J. J. Leary. 1992. *Principles of Instrumental Analysis*, 4th edition. Saunders College, Philadelphia, Pennsylvania.

- Skoog, D. A., F. J. Holler, and S. R. Crouch. 2007. Principles of instrumental analysis, 6th ed. Belmont, CA.
- Sun, L., R. M. Crooks, and V. Chechik. 2001. Preparation of polyclodextrin hollow spheres by templating gold nanoparticles. *Chemical Communications* 4: 359-360.
- Thévenot, D. R., K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* 16(1-2): 121-131.
- Tonmanee, N. T. and V. S. Archer. 1982. Determination of tert-butylhydroquinone in edible oils by differential-pulse polarography. *Talanta* 29(11): 905-909.
- Tominaga, M., T. Shimazoe, M. Nagashima, and I. Taniguchi. 2005. Electrocatalytic oxidation of glucose at gold nanoparticle-modified carbon electrodes in alkaline and neutral solutions. *Electrochemistry Communications* 7(2): 189-193.
- Walker, J. M. and R. Rapley. 2014. *Molecular Biology and Biotechnology*. 6th edition. Royal Society of Chemistry, London, U.S.A..
- Wang, J. and D. L. Hutchins-Kumar. 1986. Cellulose acetate coated mercury film electrodes for anodic stripping voltammetry. *Analytical Chemistry* 58(2): 402-407.

- Watkins, B. F., J. R. Behling, E. Kariv, and L. L. Miller. 1975. Chiral electrode. *Journal of the American Chemical Society* 97(12): 3549-3550.
- Xudong, F., I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun. 2008. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta* 620(1): 8-26.
- Yang, M. H., H. J. Lin, and Y. M. Choong. 2002. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. *Food Research International* 35(7): 627-633.
- Yang, S. S., M. J. Lee, S. C. Lee, S. J. Su, and S. S. Chou. 1993. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in fats and oils. *Journal of Food and Drug Analysis* 1(3): 287-296.
- Zhang, J., P. Liu, H. Ma, and Y. Ding. 2007. Nanostructured porous gold for methanol electro-oxidation. *The Journal of Physical Chemistry* 111(28): 10382-10388.
- Zheng, M., A. Jagota, E. D. Semke, B. A. Diner, R. S. Mclean, S. R. Lustig, R. E. Richardson, and N. G. Tassi. 2003. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nature Materials* 2: 338-342.

Zorbas, V., A. Ortiz-Acevedo, A. B. Dalton, M. M. Yoshida, G. R. Dieckmann, R. K. Draper, R. H. Baughman, M. Jose-Yacaman, and I. H. Musselman. 2004. Preparation and characterization of individual peptide-wrapped single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* 126(23): 7222-7227.

Zoski, C. G. 2007. *Handbook of Electrochemistry* 1st edition. Elsevier, Amsterdam.

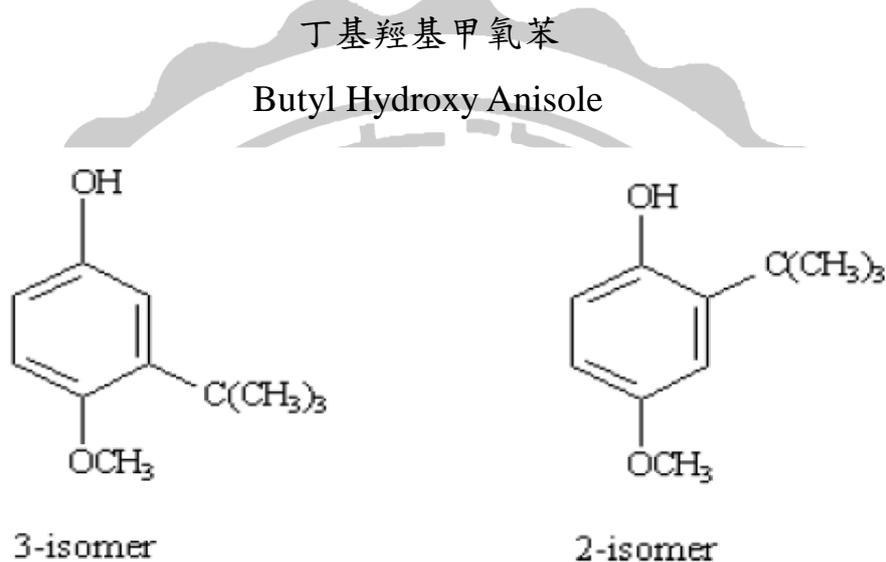


附錄一、丁基羥基甲氧苯特性

Appendix 1. The characteristics of Butyl Hydroxy Anisole (BHA)

§03002

85年8月14日衛署食字第85052151號公告訂定
102年9月2日部授食字第1021950267號公告修正



分子式： $C_{11}H_{16}O_2$ ，分子量：180.25

1. 含量：本品所含 $C_{11}H_{16}O_2$ 應在98.5%以上。
2. 外觀及性狀：本品係以 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (3-BHA) 為主，以 2-tert-butyl-4-hydroxyanisole (2-BHA) 為副之混合物。為無色，或略帶黃褐色結晶或塊或白色結晶性粉末。略具特異臭，不溶於水，可溶於乙醇及丙二醇。
3. 鑑別：本品之乙醇溶液（本品1 g 溶於72 %乙醇10,000 mL）5 mL，加入硼酸鈉試液 2 mL 及 2,6-dichloroquinonechlorimide之乙醇溶液（該品1 g溶於乙醇10,000 mL），混合後溶液呈藍色。

4. 熔融溫度：按照熔融溫度測定法（附錄A-12）測定之，其熔融溫度應為 57~65°C。
5. 濁度：本品0.5 g溶於乙醇10 mL，其溶液應為無色且『澄明』。
6. 硫酸鹽：取本品1.0 g，按照硫酸鹽檢查法（附錄A-20）檢查之，如起混濁不得較0.01 N硫酸液0.4 mL之對照試驗所起者為濃（以SO₄計，0.02%以下）。
7. 砷：取本品1.0 g按照砷檢查第Ⅱ-2法（附錄A-8）檢查之，其所含砷（以As計）應在3 ppm以下。
8. 重金屬：取本品2 g，按照重金屬檢查第Ⅱ法（附錄A-7）檢查之，其所含重金屬（以Pb計）應在10 ppm以下。
9. 熾灼殘渣：取本品約10 g，精確稱定，按照熾灼殘渣檢查法（附錄A-4）檢查之，其殘留殘渣不得超過0.05 %。
10. 含量測定：
- (1) 內部標準品溶液製備：
取 4-tert-butylphenol 約 500 mg 精確稱定，溶於丙酮並以丙酮定容至 100 mL。
- (2) 標準溶液製備：
分別稱取 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole 及 2-tert-4-hydroxyanisole標準品，混合溶於內部標準品溶液中，使其最終濃度分別為9 mg/mL及1 mg/mL。
- (3) 檢品溶液製備：
取本品約100 mg，精確稱定，溶於內部標準品溶液，再以內部標準溶液定容至10 mL，作為檢品溶液。
- (4) 定量：
注入標準溶液及檢品溶液各約5 μL於氣相層析儀中，依下式計算丁基羥基甲氧苯 (C₁₁H₁₆O₂) 之含量 (3-BHA及2-BHA之總含量)：

2-BHA或3-BHA在檢品溶液下之濃度 (mg/mL) = 10

$$C_s (R_U / R_s)$$

C_s ：標準溶液中3- BHA或2-BHA之濃度 (mg / mg)。

R_s ：溶液中3- BHA或2-BHA對4-tert-butylphenol 之波峰面積比。

R_U ：溶液中3- BHA或2-BHA對 4-tert-butylphenol 之波峰面積比。

丁基羥基甲氧苯之含量 =

2-BHA 及 3- BHA 在檢液中之總濃度

$$\frac{\text{2-BHA 及 3- BHA 在檢液中之總濃度}}{\text{檢品濃度 (10 mg/mL)}} \times 100(\%)$$

氣相層析條件：

檢出器：氬氦離子化檢出器。

層析管：內徑2 mm，長度1.8 m之不鏽鋼管柱。

層析管用填充劑：10 % silicone GEXE-60。

層析管：溫度175~185°C

移動相氣體He流量：30 mL/min。

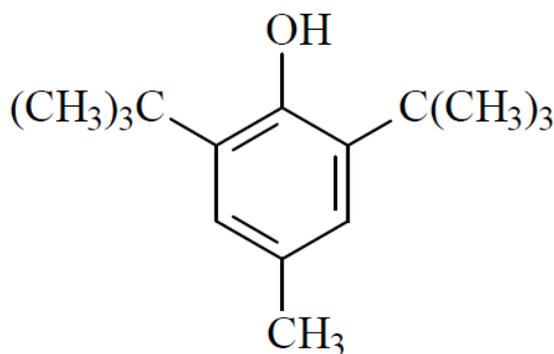
附錄二、二丁基羥基甲苯特性

Appendix 2. The characteristics of Dibutyl Hydroxy Toluene (BHT)

§03001

85年8月14日衛署食字第85052151號公告訂定
102年9月2日部授食字第1021950267號公告修正

二丁基羥基甲苯
Dibutyl Hydroxy Toluene



分子式： $C_{15}H_{24}O$ ，分子量：220.35

1. 含量：本品所含 $C_{15}H_{24}O$ 應在99.0%以上。
2. 外觀：本品為無色結晶或白色結晶性粉末或塊，無臭或略具特異臭。
3. 鑑別：本品之甲醇溶液（本品1 g溶於甲醇100,000 mL）10 mL加入水 10 mL，亞硝酸鈉溶液（亞硝酸鈉3 g溶於水1,000 mL）2 mL，及dianisidine溶液（3,3'-dimethoxybenzidine dihydrochloride 200 mg溶於甲醇40 mL及1 N鹽酸60 mL混合液）5 mL，則在3分鐘內溶液呈橙紅色；加入氯仿5 mL振盪後，氯仿層所呈現之紫或紫紅色在光照下消失。
4. 熔融溫度：本品之熔融溫度為69~72°C(附錄A-12)。
5. 濁度：本品1.0 g溶於乙醇10 mL，其溶液應無色『澄明』。

6. 對位甲酚：取本品1.0 g，加水10 mL及氨水1 mL，時時振混下，於水浴中加熱3分鐘，冷後過濾，濾紙上之殘留物，以少量之水洗滌，洗液合併濾液，加水使成100 mL，作為檢品溶液，量取檢品溶液3.0 mL置鈉氏管中，加磷鉬酸乙醇溶液 (1→20) 1 mL及氨試液0.2 mL搖勻，再加水至50 mL，放置10分鐘時，其液色不得較對位甲酚溶液 (1→100000) 3.0 mL依同法操作所得之液色為濃 (以對位甲酚計，0.1 %以下)。
7. 硫酸鹽：取本品0.5 g，加水30 mL，時時振混下於水浴中加熱5分鐘，冷後過濾，作為檢品溶液，按照硫酸鹽檢查法 (附錄A-2) 檢查之，如起混濁，不得較0.01 N硫酸液0.2 mL之對照試驗所起者為濃 (以 SO_4 計，0.02%以下)。
8. 砷：取本品1.0 g，按照砷檢查第Ⅱ-2法 (附錄A-8) 檢查之，其所含砷 (以As計) 應在3 ppm以下。
9. 重金屬：取本品2.0 g，按照重金屬檢查第Ⅱ法 (附錄A-7) 檢查之，其所含重金屬 (以Pb計) 應在10 ppm以下。
10. 熾灼殘渣：取本品 2.0 g，按照熾灼殘渣檢查法 (附錄 A-4) 檢查之，其遺留殘渣不得超過 0.05 %。
11. 含量測定：本品按照凝固溫度測定法 (附錄 A-26) 測定之，其凝固溫度應不得低於 69.2 °C，則表示其所含在 99.0 % 以上。

附錄三、第三丁基氫醌特性

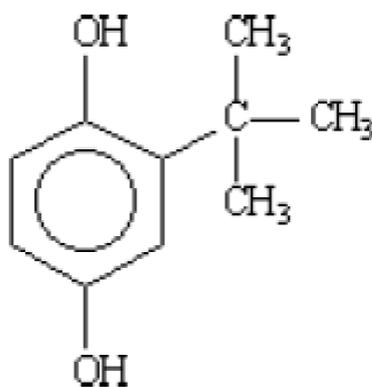
Appendix 3. The characteristics of Tertiary-butyl Hydroquinone (TBHQ)

§03013

83年10月12日衛署食字第83059688號公告訂定
102年9月2日部授食字第1021950267號公告修正

第三丁基氫醌

Tertiary-Butyl Hydroquinone



分子式： $C_{10}H_{14}O_2$ ，分子量：166.22

1. 含量：本品所含 $C_{10}H_{14}O_2$ 應在99.0%以上。
2. 外觀及性狀：本品為白色結晶，具特異氣味，可溶於酒精及乙醚，不溶於水。
3. 鑑別：取本品數毫克溶於甲醇1 mL，再加入數滴25%二甲胺水溶液，有粉紅～紅色產生。
4. 熔融溫度：按照熔融溫度測定法（附錄A-12）測定之，其熔融溫度應為126.5～128.5℃。
5. 甲苯：取本品約2 g，精確稱定，置於10 mL定量瓶中，以辛醇溶解，並以辛醇定容至10 mL，混合均勻，供作檢品溶液。另量取甲苯於辛醇中，配製成濃度約為50 μg/mL之準備品

溶液。

取檢品溶液及標準溶液各5 μL ，分別注入氣相層析儀中，參照下列條件進行分析，就檢品溶液所得之波峰之滯留時間與標準溶液比較鑑定之，依下式計算甲苯之含量。

$$\text{甲苯之含量} = \frac{H_s \times C_R}{H_R \times C_S} \times 100 (\%)$$

H_S = 檢品溶液中甲苯之波峰高度

H_R = 標準品溶液中甲苯之波峰高度

C_R = 標準品溶液之濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_S = 品溶液之濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

氣相層析條件：

檢出器：氫焰離子化檢出器

層析管：內徑3.18 mm，長度3.66 m之不鏽鋼管柱

層析管用填充劑：Diatoport S (60/80 mesh)上覆被 10 % silicon SE-30

層析管溫度：起始溫度 70 $^{\circ}\text{C}$ ，升溫速度每分鐘 15 $^{\circ}\text{C}$ ，最終溫度 280 $^{\circ}\text{C}$

注入器溫度：275 $^{\circ}\text{C}$

檢出器溫度：300 $^{\circ}\text{C}$

空氣壓力：20 psi

氫氣壓力：20 psi

移動相氣體He流量：50 mL/min

6.2,5-二-第三丁基氫醌及氫醌：

(1)標準原液製備：

分別取約50 mg之氫醌(hydroquinone)、2,5-二-第三丁

基氫醌(2,5-di-*t*-butylhydroquinone) 及甲基苯 (內部標準品)，精確測定，分別置於50 mL定量瓶中，以吡啶定容至50 mL，混合均勻，為氫醌標準原液、2,5-二-第三丁基氫醌標準原液及內部標準溶液。

(2)檢量線：

量取氫醌標準原液各0.5、1.0、2.0及3.0 mL，分別置於10 mL定量瓶中，加內部標準溶液2.0 mL，以吡啶定容至10 mL，混合均勻，作為氫醌標準溶液。依上述同樣方法配製四種濃度 2,5-二-第三丁基氫醌標準溶液。取各標準品溶液作三甲矽烷衍生化：加9滴標準溶液於2 mL之血清瓶中，蓋上瓶蓋，用50 mL氣針排氣後加N,O -二-三甲矽烷基乙醯胺250 μ L於80 $^{\circ}$ C加熱10分鐘。注入10 μ L於氣相層析儀，以氫醌內部標準溶液各種濃度比值作X軸，以氫醌標準溶液與內部標準溶液所得波峰面積比值作Y軸，繪製檢量線。2,5-二-第三丁基氫醌之檢量線同為上述方法製作。

(3)檢品溶液製備：

取本品約1 g，精確稱定，置於10 mL定量瓶中，加內部標準溶液2 mL，以吡啶定容至10 mL，混合均勻，供作檢品溶液。

(4)定量：

取檢品溶液按標準品溶液同樣操作方法進行三甲矽烷衍生化，並注入10 μ L於氣相層析儀，由檢品溶液出現之波峰，依檢量線及下式計算氫醌及2,5-二-第三丁基氫醌之含量百分比。

$$A = Y \times I \times 10 / S$$

A：氫醯或2,5-二-第三丁基氫醯之含量百分比(%)

Y：檢品溶液中氫醯或2,5-二-第三丁基氫醯與甲基苯之濃度比值

I：甲基苯於檢品中重量百分比(w/v)

S：檢品之採取量(g)

氣相層析條件：

檢出器：氫焰離子化檢出器 (Flame Ionization Detector)

層析管：內徑3-4 mm，長度2-3 m (2 ft) 之玻璃管或是不鏽鋼管柱

層析管用填充劑：Chromsorb W，AW，DMCS (60 / 80 mesh) 上覆被3% Dexsil 300

層析管溫度：起始溫度90°C，升溫速度每分鐘15°C，最終溫度290°C。

注入器溫度：300°C

移動相氣體N₂流量：50 mL/min

註：甲基苯、氫醯、第三丁基氫醯及2,5-二-第三丁基氫醯之三甲矽烷衍生物滯留時間分別為2.5、5.5、7.3及8.4分鐘。

7. 第三丁基對苯苷：取預經磨成微細粉末之本品約1 g，精確稱定，置於10 mL定量瓶中，以四氯化碳溶解並定容至10 mL，振搖5分鐘萃取第三丁基對苯苷，並以濾膜 (UHWPO 1300) 過濾，供作檢品溶液。另取第三丁基對苯苷標準品約10 mg，精確稱定，置於10 mL定量瓶中，以四氯化碳溶解並定容至10 mL，作為標準溶液。

以四氯化碳作為空白對照液，將四氯化碳及標準溶液分別置於儲液管中，按照紅外線光譜測定法(附錄A-29)測定之(光窗使用氟化鈣，光窗間距離為0.4 mm)。標準溶液以波長 $1600\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ 測定並繪製圖譜，對照液以波長 $1612\sim 1775\text{ cm}^{-1}$ 測定並繪製圖譜，再將標準溶液及檢品溶液於波長 1659 cm^{-1} 測定吸光淨值後，依下列公式計算檢品中第三丁基對苯苄含量百分比，第三丁基對苯苄之含量不得超過0.2%。

$$\text{第三丁基對苯苄含量} = (A_U/A_S) \times (W_S/W_U) \times 100 (\%)$$

A_U ：檢品溶液於 1659 cm^{-1} 之吸光值

A_S ：標準溶液於 1659 cm^{-1} 之吸光值

W_S ：對照標準品之重量(mg)

W_U ：檢品之採取量(mg)

8. 砷：取本品1 g，按照砷檢查第Ⅱ-1法(附錄A-8)檢查之，其所含砷(以As計)應在3 ppm以下。
9. 重金屬：取本品2 g，按照重金屬檢查第Ⅱ法(附錄A-7)檢查之，其所含重金屬(以Pb計)應在10 ppm以下。
10. 多環芳香烴：取抗壞血酸1 g溶於乙醇100 mL及水100 mL，置於500 mL之分液漏斗中(S-1)，取本品約50 g，精確稱定，置前述之分液漏斗中，振盪至溶解後，以異辛烷50 mL萃取三分鐘，使分層，將下層液流至另一支500 mL分液漏斗中(S-2)，再放置1分鐘，將下層液併入分液漏斗中(S-2)。於分液漏斗中(S-2)加異辛烷50 mL萃取三分鐘，萃取

方法同前述，將下層液合併於分液漏斗中 (S-3)。於分液漏斗中 (S-3) 中加異辛烷50 mL萃取3分鐘，萃取方法同前述，將下層液棄之。各異辛烷溶液 (S-1、S-2及S-3) 先以0.5 %之抗壞血酸乙醇·水溶液 (25:75) 每次100 mL萃取2次，振搖混合，分層後棄下層液，再以0.5 %乙醇溶液每次100 mL萃取2次，振搖混合，分層後棄下層液，再以0.5 %乙醇溶液每次100 mL萃取2次，分層後棄下層液，最後以水每次 100 mL清洗2次，洗液棄之。取無水硫酸鈉100 g填充層析管，用異辛烷75 mL洗層析管，洗液棄之，以S-1之異辛烷沖提層析管，並收集沖提液於500 mL濃縮瓶中，再用S-2之異辛烷洗 S-1後沖提層析管，收集沖提液於濃縮瓶中，再用S-3之異辛烷液洗S-2、S-1後沖提層析管，收集沖提液於濃縮瓶中，另取異辛烷25 mL連續依序洗S-3、S-2、S-12次後沖提層析管，收集沖提液於濃縮瓶中。加入十六烷2 mL及沸石，並將濃縮瓶置於水浴中，連接至真空蒸餾裝置，於1/3大氣壓之抽真空下進行蒸餾，當異辛烷停止滴落入接受器時則關掉真空，以異辛烷5 mL洗濃縮瓶及蒸餾器接頭，約1分鐘內可減壓濃縮至乾。另取異辛烷5 mL洗濃縮瓶及蒸瓶接頭，再減壓濃縮至乾。用異辛烷洗濃縮瓶之殘留物於10 mL定量瓶，以異辛烷定容至10 mL，供作檢品溶液。另取異辛烷按檢品溶液同樣操作做一空白試驗，分別於波長280~289，290~299，300~359及360~400 nm處測定吸光度，

檢品溶液所測之吸收度分別不得超過0.15，
0.12，0.08及0.02。

12. 含量測定：取預經磨成微細粉末之本品約170 mg，精確稱定，置於250 mL廣口有栓三角瓶中，以甲醇10 mL溶解，加水150 mL及1 N硫酸1 mL。以二苯胺溶液（二苯胺磺酸鈉3 mg溶於0.1 N硫酸液1 mL）4滴為指示劑，用0.1N硫酸鈾液滴定至液色由黃色變紫紅色為止，依下式計算第三丁基氫醌含量。

$$\text{第三丁基氫醌含量} = 8.311N(V - 0.1 \text{ mL}) / W \times 100 (\%)$$

0.1 mL：檢品中第三丁基氫醌在最初產生氧化所消耗
0.1 N硫酸鈾液之量

V：檢品所消耗0.1 N硫酸鈾液之mL數

N：硫酸鈾液之當量濃度

W：檢品之採取量(g)

若檢品中含有氫醌及2,5-二-第三丁基氫醌時，依下式
計算第三丁基氫醌之含量百分比。

$$\text{第三丁基氫醌含量} = A - (\text{氫醌}\% \times 1.51) - (2,5\text{-二-第三丁基氫醌}\% \times 0.75)$$

附錄四、台灣之食品添加物使用範圍及限量暨規格標準

Appendix 4. Scope and application standards of food additives in Taiwan

97 年 11 月 20 日衛署食字第 0970405591 號令發布

102 年 1 月 22 日署授食字第 1011304051 號令修正

第 (三) 類 抗氧化劑

第 (三) 類 抗氧化劑 食品添加物使用範圍及限量暨規格標準			
編號	品名	使用食品範圍及限量	使用限制
001	二丁基羥基甲苯 Dibutyl Hydroxy Toluene (BHT)	<ol style="list-style-type: none"> 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 1.0 g/kg 以下。 2. 本品可使用於口香糖及泡泡糖；用量為 0.75 g/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 0.20 g/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 0.05 g/kg 以下。 5. 本品可使用於馬鈴薯顆粒 (granules)；用量為 0.010 g/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)	<ol style="list-style-type: none"> 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 1.0 g/kg 以下。 2. 本品可使用於口香糖及泡泡糖；用量為 0.75 g/kg 以 	

		<p>下。</p> <p>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 0.20 g/kg 以下。</p> <p>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 0.05 g/kg 以下。</p> <p>5. 本品可使用於馬鈴薯顆粒 (granules)；用量為 0.010 g/kg 以下。</p> <p>6. 本品可使用於膠囊狀、錠狀食品；用量為 0.40 g/kg 以下。</p>	
003	L-抗壞血酸 (維生素 C) L-Ascorbic Acid (Vitamin C)	本品可使用於各類食品；用量以 Ascorbic Acid 計為 1.3g/kg 以下。	限用為抗氧化劑。
004	L-抗壞血酸鈉 Sodium L-Ascorbate	本品可使用於各類食品；用量以 Ascorbic Acid 計為 1.3g/kg 以下。	限用為抗氧化劑。
005	L-抗壞血酸硬脂酸酯 L-Ascorbyl Stearate	本品可使用於各類食品；用量以 Ascorbic Acid 計為 1.3g/kg 以下。	限用為抗氧化劑。
006	L-抗壞血酸棕櫚酸酯 L-Ascorbyl Palmitate	本品可使用於各類食品；用量以 Ascorbic Acid 計為 1.3g/kg 以下。	限用為抗氧化劑。
007	異抗壞血酸 Erythorbic Acid	本品可使用於各類食品；用量以 Ascorbic Acid 計為 1.3g/kg 以下。	限用為抗氧化劑。
008	異抗壞血酸鈉	本品可使用於各類食品；用量	限用為抗氧化劑

	Sodium Erythorbate	以 Ascorbic Acid 計為 1.3g/kg 以下。	化劑。
009	生育醇(維生素 E) dl- α -Tocopherol (Vitamin E)	本品可使用於各類食品；用量同營養添加劑生育醇(維生素 E)之標準。	
010	沒食子酸丙酯 Propyl Gallate	本品可使用於油脂、乳酪及奶油；用量為 0.10g/kg 以下。	
011	癒創樹脂 Guaiac Resin	本品可使用於油脂、乳酪及奶油；用量為 1.0g/kg 以下。	
012	L-半胱氨酸鹽酸鹽 L-Cysteine Mono- hydro-chloride	本品可於麵包及果汁中視實際需要適量使用。	
013	第三丁基氫 Tertiary-Butyl Hydro-quinone (TBHQ)	本品可使用於油脂、乳酪及奶油；用量為 0.20g/kg 以下。	
014	L-抗壞血酸鈣 Calcium L-Ascorbate	本品可使用於各類食品；用量以 Ascorbic Acid 計為 1.3g/kg 以下。	限用為抗氧化劑。
015	混合濃縮生育醇 Tocopherols Con- centrate, Mixed	本品可使用於各類食品；用量同營養添加劑生育醇(維生素 E)之標準。	
016	濃縮 d- α -生育醇 d- α -Tocopherol Concentrate	本品可使用於各類食品；用量同營養添加劑生育醇(維生素 E)之標準。	
017	乙烯二胺四醋酸二	本品可使用於為防止油脂氧	EDTA Na ₂

	<p>鈉或乙烯二胺四醋酸二鈉鈣 EDTA Na₂ or EDTA CaNa₂</p>	<p>化而引起變味之食品；用量為 0.10 g/kg 以下（以食品重量計）。</p>	<p>於最終食品完成前必須與鈣離子結合成 EDTA CaNa₂。</p>
018	<p>亞硫酸鉀 Potassium Sulfite</p>	<p>1.本品可使用於麥芽飲料(不含酒精)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.03 g/kg 以下。 2.本品可使用於果醬、果凍、果皮凍及水果派餡；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.1 g/kg 以下。 3.本品可使用於表面裝飾用途（薄煎餅之糖漿、奶昔及冰淇淋等產品之調味糖漿）；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.04 g/kg 以下。 4.本品可使用於含葡萄糖糖漿之糕餅；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.05 g/kg 以下。</p>	<p>限於食品製造或加工必須時使用。</p>
019	<p>亞硫酸鈉 Sodium Sulfite</p>	<p>1.本品可使用於麥芽飲料(不含酒精)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.03 g/kg 以下。 2.本品可使用於果醬、果凍、果皮凍及水果派餡；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.1 g/kg 以下。 3.本品可使用於表面裝飾用途（薄煎餅之糖漿、奶昔及冰</p>	<p>限於食品製造或加工必須時使用。</p>

		<p>淇淋等產品之調味糖漿)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.04 g/kg 以下。</p> <p>4.本品可使用於含葡萄糖糖漿之糕餅；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.05 g/kg 以下。</p>	
020	<p>亞硫酸鈉 (無水) Sodium Sulfite (Anhydrous)</p>	<p>1.本品可使用於麥芽飲料(不含酒精)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.03 g/kg 以下。</p> <p>2.本品可使用於果醬、果凍、果皮凍及水果派餡；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.1 g/kg 以下。</p> <p>3.本品可使用於表面裝飾用途 (薄煎餅之糖漿、奶昔及冰淇淋等產品之調味糖漿)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.04 g/kg 以下。</p> <p>4.本品可使用於含葡萄糖糖漿之糕餅；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.05 g/kg 以下。</p>	<p>限於食品製造或加工必須時使用。</p>
021	<p>亞硫酸氫鈉 Sodium Bisulfite</p>	<p>1.本品可使用於麥芽飲料(不含酒精)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.03 g/kg 以下。</p> <p>2.本品可使用於果醬、果凍、果皮凍及水果派餡；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.1 g/kg 以下。</p> <p>3.本品可使用於表面裝飾用</p>	<p>限於食品製造或加工必須時使用。</p>

		<p>途 (薄煎餅之糖漿、奶昔及冰淇淋等產品之調味糖漿)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.04 g/kg 以下。</p> <p>4.本品可使用於含葡萄糖糖漿之糕餅；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.05 g/kg 以下。</p>	
022	<p>低亞硫酸鈉 Sodium Hydrosulfite</p>	<p>1.本品可使用於麥芽飲料(不含酒精)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.03 g/kg 以下。</p> <p>2.本品可使用於果醬、果凍、果皮凍及水果派餡；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.1 g/kg 以下。</p> <p>3.本品可使用於表面裝飾用途 (薄煎餅之糖漿、奶昔及冰淇淋等產品之調味糖漿)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.04 g/kg 以下。</p> <p>4.本品可使用於含葡萄糖糖漿之糕餅；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.05 g/kg 以下。</p>	<p>限於食品製造或加工必須時使用。</p>
023	<p>偏亞硫酸氫鉀 Potassium Metabisulfite</p>	<p>1.本品可使用於麥芽飲料(不含酒精)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.03 g/kg 以下。</p> <p>2.本品可使用於果醬、果凍、果皮凍及水果派餡；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.1 g/kg 以下。</p>	<p>限於食品製造或加工必須時使用。</p>

		<p>3.本品可使用於表面裝飾用途 (薄煎餅之糖漿、奶昔及冰淇淋等產品之調味糖漿)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.04 g/kg 以下。</p> <p>4.本品可使用於含葡萄糖糖漿之糕餅；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.05 g/kg 以下。</p>	
024	<p>亞 硫 酸 氫 鉀 Potassium Bisulfite</p>	<p>1.本品可使用於麥芽飲料(不含酒精)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.03 g/kg 以下。</p> <p>2.本品可使用於果醬、果凍、果皮凍及水果派餡；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.1 g/kg 以下。</p> <p>3.本品可使用於表面裝飾用途 (薄煎餅之糖漿、奶昔及冰淇淋等產品之調味糖漿)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.04 g/kg 以下。</p> <p>4.本品可使用於含葡萄糖糖漿之糕餅；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.05 g/kg 以下。</p>	<p>限於食品製造或加工必須時使用。</p>
025	<p>偏 亞 硫 酸 氫 鈉 Sodium Metabisulfite</p>	<p>本品可使用於麥芽飲料(不含酒精)；用量以 SO₂ 殘留量計為 0.03 g/kg 以下。</p> <p>2.本品可使用於果醬、果凍、果皮凍及水果派餡；用量以</p>	<p>限於食品製造或加工必須時使用。</p>

		<p>SO₂殘留量計為0.1 g/kg以下。</p> <p>3.本品可使用於表面裝飾用途（薄煎餅之糖漿、奶昔及冰淇淋等產品之調味糖漿）；用量以SO₂殘留量計為0.04 g/kg以下。</p> <p>4.本品可使用於含葡萄糖糖漿之糕餅；用量以SO₂殘留量計為0.05 g/kg以下。</p>
026	<p>α- 醣基異槲皮苷 (α- Glycosyl- isoquercitrin)</p>	<p>1. 本品可用於飲料、蔬果汁、冷凍乳製品、動物膠、布丁、果醬、果凍、糖果、糕餅、湯粉及罐裝湯品，用量為150 mg/kg以下。</p> <p>2. 本品可用於口香糖，用量為1500 mg/kg以下。</p>

- 備註：1. 抗氧化劑混合使用時，每一種抗氧化劑之使用量除以其用量標準所得之數值（即使用量／用量標準）總和應不得大於1。
2. 本表為正面表列，非表列之食品品項，不得使用該食品添加物。

附錄五、歐盟之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範

(Pokorny *et al.*, 2001)

Appendix 5. 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	
	saucés	
	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

附錄六、美國之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範

(Pokorny *et al.*, 2001)

Appendix 6. The regulation of BHA, BHT and TBHQ in the United States

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

附錄七、澳洲之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範

(Pokorny *et al.*, 2001)

Appendix 7. 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



附錄八、日本之 BHA、BHT 及 TBHQ 使用規範

(Pokorny *et al.*, 2001)

Appendix 8. 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
	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



附錄九、食品中抗氧化劑之檢驗方法—油脂中沒食子酸正丙脂、第三基丁氫醌、正二氫癒創酸、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲氧苯之檢驗

Appendix 9. Method of Test for Antioxidants in Foods-Test of Gallic acid n-Propyl Ester (PG), tertiary-Butylhydroquinone (TBHQ), Nordihydroguaiaretic Acid (NDGA), 3-tert-Butyl-4-hydroxyanisole (BHA), and Dibutylhydroxytoluene (BHT) in Fats and Oils

90 年 3 月 27 日衛署食字第 0900018531 號公告訂定

102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正

1. 適用範圍：本檢驗方法通用於食品中沒食子酸正丙脂、第三基丁氫醌、正二氫癒創酸、丁基羥基甲氧苯、二丁基羥基甲氧苯之檢驗。
2. 檢驗方法：高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 高效液相層析儀：
 - 2.1.1.1. 溶媒梯度控制器。
 - 2.1.1.2. 溶媒輸送系統。
 - 2.1.1.3. 檢出器：具有 280 nm 波長之紫外光檢出器。
 - 2.1.1.4. 層析管：Lichrospher 100 RP-18, 5 μ m, 內徑 4 mm \times 25 cm。
 - 2.1.2. 固相真空萃取槽(Solid phase extraction vaxuum manifols)
 - 2.2. 試藥：

乙腈採用液相層析級；正戊烷、異丙醇及醋酸均採用試藥特級；

沒食子酸正丙脂、第三基丁氫醌、正二氫癒創酸、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯對照用標準品。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. C18 固相萃取分離管(Solid phase extraction column, C18, 500 mg)：使用前以異丙醇：乙腈(1:1, v/v)溶液每次 2 mL 洗三次。

2.3.2. 濾膜：孔徑 0.45 μm , nylon 材質。

2.4. 移動相溶液之調製：

A 液：5%醋酸溶液，B 液：乙腈與醋酸以 95：5 (v/v)之比例混合。分別以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.5. 標準溶液之調製：

稱取沒食子酸正丙脂、第三基丁氫醌、正二氫癒創酸、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯對照用標準品各約 100 mg，精確稱定，合併置於 100 mL 褐色容量瓶中，以異丙醇：乙腈(1:1, v/v)溶液溶解並定容，供作標準原液，儲存於冰箱。使用時再以異丙醇：乙腈(1:1, v/v)溶液稀釋成 10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，供作標準溶液。

2.6. 檢液之調製：

精確稱取油脂檢體約 2 g (含抗氧化劑 50~400 $\mu\text{g}/\text{g}$)加入少量正戊烷溶解(固體油脂須先微溫加熱融化)後定容至 10 mL。取其 1 mL 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 5 mL 刻度試管中。然後用異丙醇：乙腈(1:1, v/v)溶液每次 1 mL 分別沖提三次，再以含 5%醋酸之乙醇溶液 1 mL 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，充分混合，供作檢液。

2.7. 鑑別及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 25 μL ，分別注入高效液相層析儀中，參照下列層析條件進行分析，就檢液及標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依另取之標準溶液按上述方法作出檢量線，求出檢體中抗氧化劑之含量(ppm)：

$$\text{檢體中抗氧化劑含量(ppm)} = \frac{C \times V \times 10}{M}$$

C：由檢量線或波峰面積求得檢液中抗氧化劑之含量($\mu\text{g/mL}$)

V：定量用檢液之體積(mL)

M：油脂之重量(g)

高效液相層析測定條件：

層析管：Lichrospher 100 RP-18, 5 μm ，內徑 4 mm \times 25 cm。

移動相溶液：依 2.4 節所調製之溶液，採線性梯度遞變。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。

紫外光檢出器：波長 280 nm。

備註：1. 本分析方法必須作梯度空白 (gradient blank) 及溶媒空白 (reagent blank) 試驗，其層析圖譜不得出現干擾之波峰。其中 BHT 常有無法去除之干擾波峰出現，則該抗氧化劑改採行政院衛生署 77.10.13 衛署食字第 707604 號公告予以檢驗。

2. TBHQ 較不穩定，檢液調製後應儘快進行儀器分析。

3. 本檢驗方法之最低檢出限量皆為 10 ppm。