

高解析質譜儀無特定標的分析平台應用於異常豬油之評估

李昱宗^{1*} 王鐘凰¹ 邱群惠²
黃佩綾¹ 蘇鼎元¹ 朱燕華¹

¹財團法人 食品工業發展研究所

²長庚科技大學

（接受刊載日期：中華民國一〇六年一月十五日）

亞洲近年常發生不當來源油品混充正常油品的食品安全事件，因異常油品的情况多元且複雜，以致針對特定檢測標的無法有效判別，故本研究以無特定標的分析 (non-target analysis) 概念建構可評估油品異常情况的高解析質譜儀分析及資訊判讀平台。以6件市售豬油及13件有疑慮之豬油油品為範例，實驗結果顯示異丙醇萃取層之質譜輪廓有顯著差異，針對差異性最大的疑慮豬油樣品探索主要的差異性訊號，其中荷質比 (mass to charge ratio, m/z) 656.5821、684.6137、712.6445與740.6753經資料庫比對判斷為存在於植物中的三酸甘油酯，主要由月桂酸 (12 : 0)、肉豆蔻酸 (14 : 0) 及棕櫚酸 (16 : 0) 脂肪酸所組成，透過標準品驗證確認656.5821為三月桂酸甘油酯 (trilaurin)，顯示這些樣品的異常原因為受到植物油的污染，並由植物固醇的篩檢結果證實此推測；此外亦發現到上述三酸甘油酯的二聚體化合物訊號，推測樣品亦有氧化的狀況。綜合以上結果，無特定標的平台為判斷油品異常情况的有效工具，做為選擇後續確認試驗重點項目的依據，減少不必要的實驗項目，且相較於目前檢測方法多針對單一可能情境，本平台可藉由異常訊號的資訊取得多元的訊息，達到提升評估效率的目的。

關鍵字：無特定標的分析，高解析質譜儀，油品區別。

Application of Non-Target Analysis Platform based on High Resolution Mass Spectrometry in Evaluation of Tainted Lard

Yu-Tsung Lee^{1*}, Chung-Huang Wang¹, Chun-Hui Chiu²,
Pei-Ling Huang¹, Ding-Yuan Su¹ and Yan-Hwa Chu¹

¹Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan, R.O.C.

²Chang Gung University of Science and Technology, Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

(Accepted for publication: January 15, 2017)

In recent years, the adulteration of edible oil with tainted caused increasing food safety issues in Asia. However, current analytical methods cannot effectively distinguish adulterated oils due to its complexity and diversity. In this study, high resolution mass spectrometer with non-target analysis platform was used to evaluate lard samples. Six commercially available lards and thirteen suspected tainted lards were used as experimented samples. Results showed that the mass spectrum profile of isopropanol extracted layer from suspected lard samples were significantly different from the others. The probable chemical compound of the mass to change ratio (m/z) 656.5821, 684.6137, 712.6445 and 740.6753 was triacylglycerol composed of lauric (12 : 0), myristic (14 : 0) and palmitic (16 : 0) acids. Furthermore, the 656.5821 m/z was confirmed to be a trilaurin, which is distributed mainly in vegetable oil. The results obtained were also verified by the phytosterol analysis and confirmed that the suspected lard samples were contaminated with vegetable oils. In addition, triacylglycerol dimers were also found and suggested that the lard samples were oxidized. Based on the above results, this study had developed an effective tool of determining tainted oils. From this method, characteristic signals information were obtained to determine the presence of tainted oil. Besides, this analytical platform may reduce unnecessary experiments and is more efficient compared to the current single target analysis.

Key words: Non-target analysis, High-resolution mass spectrometry, Oil differentiation.

* Corresponding author. E-mail: utsung@firidi.org.tw

前言

2014年台灣發生劣質油品重新精製混充正常油品販售的食安事件，劣質油為來源不明或非正常油品的統稱，包括回收用油、餿水油、化製油與飼料用油等，情況多元且複雜，而精製程序亦可能去除游離脂肪酸、揮發性氧化產物等，使得現有之油品品質檢測項目-酸價、過氧化價、總極性物質等方法無法做為排除有疑慮油品的依據，故急需開發及建構探索潛在標的成分的評估方法。

氧化為油脂主要的劣化反應，包括(1)起始期(initiation)、(2)連鎖期(propagation)及(3)終止期(termination)⁽¹⁻³⁾，影響氧化速率的因子包括脂肪酸的不飽和程度、氧氣、水分、溫度及金屬離子等，而氧化過程會產生極性較高的化合物，如環狀過氧化物(cyclic peroxides)、環氧化物(epoxides)、羥基/羰基衍生物(hydroxy-/oxoderivatives)、醛類(aldehydes)及聚合物等⁽⁴⁾，除了產生油耗味外，亦會使營養成分降低，造成食品品質下降，此外亦有文獻證實油脂氧化產物與癌症、糖尿病等疾病有關⁽⁵⁾。而油脂氧化產物種類繁多且複雜，目前應用於相關檢測的方法包括了滴定法、分光光度計法，以及利用較精密的儀器設備進行產物結構鑑定或組成輪廓建立，包括分子篩層析(high performance size exclusion chromatography, HPSEC)^(6, 7)、氣相層析質譜儀(gas chromatography-mass spectrometry, GC/MS)⁽⁸⁾、液相層析質譜儀(liquid chromatography-mass spectrometry, LC/MS)⁽⁹⁻¹¹⁾、核磁共振光譜(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)⁽¹²⁾等，目前亦有新型態的游離技術-即時分析技術(direct analysis in real time, DART)⁽¹³⁾應用於提高檢測的能力。然而多數研究針對已知的氧化產物進行分析，如氧化三酸甘油酯^(14, 15)與揮發性成分-正己醛⁽¹⁶⁾等，較無法達到全面性評估的目標。

「無特定標的分析(non-target analysis)」概念逐漸運用於食品安全管理中，目前「無特定標的分析」尚未有明確定義，其主要為檢驗前不預先設定所檢測之化合物，利用檢測儀器進行大範圍的成分數據收集，並搭配統計分析使測試樣品依成分相似性來分群，再透過相關參數的設定挑選出具鑑別不同族群的代表性指標。為達到樣品完整成分資訊收集的目的，故需採用輕度的樣品前處理程序，再透過檢測儀器的精密度，提升訊號的識別及判讀

效率，如高解析質譜儀(high-resolution mass spectrometry, HRMS)即為無特定標的分析的有力工具之一。許多研究已將此概念導入原物料的溯源管理，包括用於鑑別咖啡豆的產區與品種⁽¹⁷⁾及不同產區的茶葉^(18, 19)等，已證實該概念的可行性。

無特定標的分析會產生巨量且複雜的數據資訊，多變量統計為解析該類型數據的利器，目前已有商業化的軟體系統，如Waters的Progenesis Q1、ThermoFisher的SIEVE，涵蓋的多變量統計包括主成分分析(principal components analysis, PCA)、因素分析(factor analysis)及相關性分析(correlation analysis)等，PCA是最常被應用於簡化數據的工具之一，為在原始變數中尋找最大的線性組合⁽²⁰⁾，以達到縮減變數與降維(dimensional reducing)的目的，並透過測試樣品於主成份分析散佈圖上座落的位置，取得各測試樣品相似或相異程度的資訊；而偏最小平方(partial least squares, PLS)迴歸主要是將多個應變數與自變數利用線性組合定義出主成分結構後，以迴歸分析解釋變數之間的預測關係⁽²¹⁾，而正交偏最小二乘法(orthogonal partial least squares, OPLS)是一種在進行PLS分析前，利用將原始變數進行正交校正，剔除系統中正交變異，改善PLS對數據的解釋與降低模組的複雜程度，因此更有助於數據的判讀且可提高數據的解釋能力^(22, 23)，以OPLS搭配S-Plot統計圖為選取兩群具差異性樣品族群之關鍵差異訊號(成分)的有效方法，該數據處理模式已成功應用於代謝體研究^(24, 25)、中草藥化學成分^(26, 27)等差異鑑別，其中S-Plot是利用CIJF_{JK} (jack-knifed confidence interval)來表示訊號(成分)的重要性，其計算因子包含訊號(成分)的變異係數(coefficient of variance, CV)、統計誤差值與變異度下的自由度(freedom of CV)，其通常與該訊號(成分)存在於樣品中濃度呈相關性，高濃度的化合物會被判定為具代表性/重要性的訊號(成分)⁽²⁸⁾，因此本研究即利用高解析質譜設備搭配多變量統計建構無特定標的分析平台，以豬油樣品為範例探討平台的運作方式及應用於異常油品評估的可行性。

材料與方法

一、檢體來源

六件由台灣市面購得之豬油，其中三件

為原豬油(統稱為NU, Normal Unrefined)與三件精製豬油(統稱為NR, Normal Refined), 十三件由衛生福利部食品藥物管理署所提供有疑慮的豬油樣品, 包括八件原豬油(代號DU1-DU8, Suspected Tainted Unrefined), 五件精製豬油(代號DR1-DR5, Suspected Tainted Refined)。

二、試藥

甲醇、異丙醇、乙腈、正己烷、氫氧化鈉與氯仿購自Merck (Darmstadt, Germany); 甲酸、醋酸銨與BSTFA + TMCS, 99:1購自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 所使用試劑皆為層析等級; 5 α -cholestane、brassicasterol、campesterol、stigmasterol與 β -sitosterol標準品購自Tama Biochemical (Tokyo, Japan); 而三月桂酸甘油酯標準品購自TCI Chemicals (Tokyo, Japan)。

三、分析方法：

1. 樣品製備

秤取0.5 g已加熱溶解之豬油樣品於離心管中, 加入2 mL甲醇並震盪1 min (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA), 以3,500 rpm離心10 min (Kubota-5920, Kubota Co., Tokyo, Japan), 取上清液於新離心管中, 沉澱物於40℃加熱溶解後重複萃取步驟共三次, 其中第三次萃取溶劑為1 mL, 合併所有上清液, 利用0.22 μ m PTFE進行過濾, 即為甲醇萃取層, 供做檢液; 後續將不溶物以異丙醇取代甲醇進行上述步驟, 即為異丙醇萃取層, 供做檢液。

2. 高解析質譜儀分析

將上述甲醇及異丙醇萃取物以40℃復熱後, 以超高效液相層析系統串聯高解析質譜儀(Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap, ThermoFinnigan, San Jose, CA)進行分析。其中甲醇萃取層之分析管柱為Luna® C18(2) (150 mm \times 4.6 mm, 3 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)進行分離, 管柱溫度為25℃, 移動相為(A) 0.1%醋酸水溶液、(B) 0.1%醋酸乙腈溶液, 流速為0.2 mL/min, 流洗條件為: 0-12 min: 5-100% B; 12-15 min: 100% B; 15-15.1 min: 100-5% B; 15.1-20 min: 5% B。以電噴灑離子化模式(electrospray ionization, ESI)進行游離, 噴霧電壓為3.3 kV; 霧化氣體流速(sheath

gas flow rate)為15 L/hr; 輔助氣體加熱器溫度(aux gas heater temperature)為60℃; 而異丙醇萃取層之分析管柱為Luna® C18(2) (150 mm \times 4.6 mm, 3 μ m)進行分離, 管柱溫度為40℃, 移動相為(A) 0.1%甲酸, 2.5 mM醋酸銨甲醇溶液、(B) 0.1%甲酸, 2.5 mM醋酸銨異丙醇溶液, 流速為0.2 mL/min, 流洗條件為: 0-12 min: 5-100% B; 12-15 min: 100% B; 15-15.1 min: 100-5% B; 15.1-20 min: 5% B。以電噴灑離子化模式進行游離, 噴霧電壓為3.5 kV; 霧化氣體流速為15 L/hr; 輔助氣體加熱器溫度為350℃; 輔助氣體流速為1 L/hr。

3. 植物固醇組成分析

參考文獻方法⁽²⁹⁾並加以修改, 油脂樣品以氫氧化鈉溶液水解, 以正己烷萃取並濃縮至乾後以氯仿回溶, 加入試劑BSTFA + TMCS (99:1)混和乙腈進行衍生化反應, 再添加內標5 α -cholestane, 並以氣相層析儀搭配火焰離子檢測器(GC-17 A, Shimadzu, Kyoto, Japan)分析。分析管柱為HP-5MS (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m) (Agilent, CA, USA), 移動相為氮氣, 流速1.0 mL/min, 注入器溫度為300℃, 檢測器為300℃, 分流比為10:1, 起始溫度為260℃, 升溫速率3℃/min、終溫300℃, 10 min, 以標準品進行樣品中植物固醇定性分析。

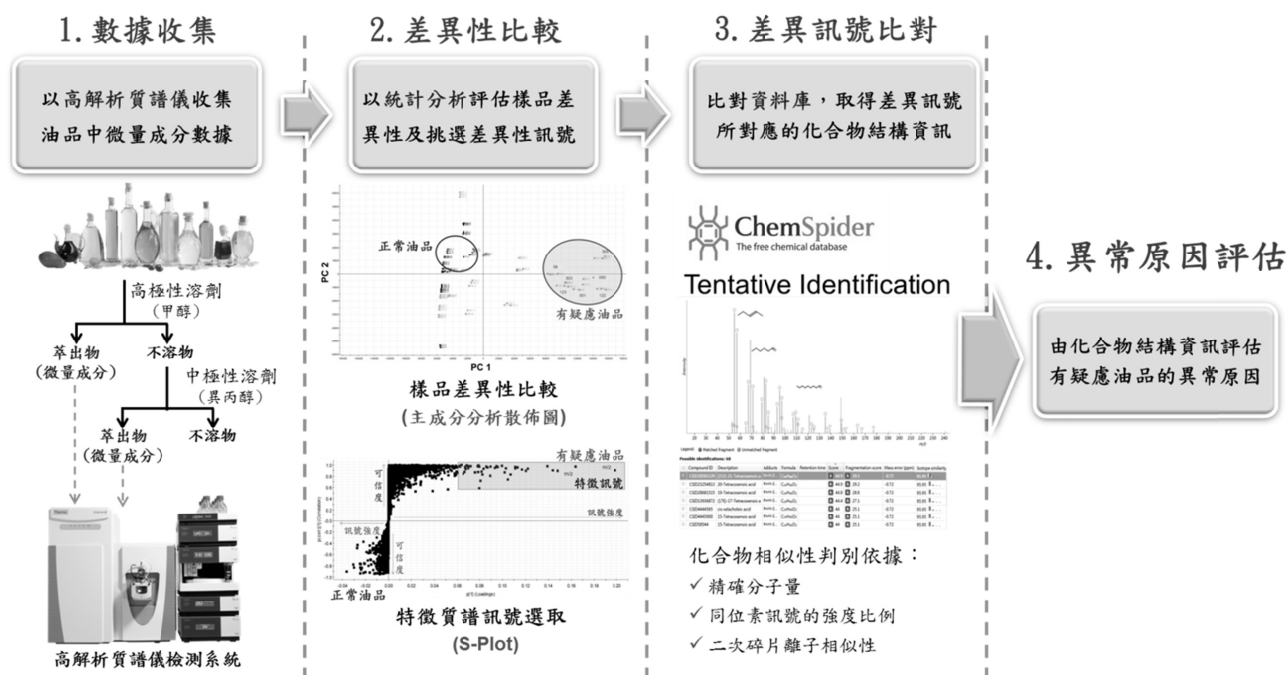
4. 數據分析

Xcalibur v3.1 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)、Progenesis QI v2.0 software (Non-linear Dynamics, Newcastle, UK)與EZinfo v3.0 software (Umetrics, Umea, Sweden)作為質譜數據統計分析軟體。

結果與討論

一、高解析質譜儀無特定標的分析平台運作邏輯

為突破針對特定標的物檢測的局限性, 本研究利用高解析質譜儀收集測試樣品成分資訊, 再透過多變量統計及資料庫比對來解析巨量的數據資料, 研究平台的運作邏輯統整於圖一, 包括(1)數據收集: 油脂主要由低極性化合物的三酸甘油酯組成, 而在劣變或是回收的油品中會產生/夾雜著中、高極性的化合物, 故採用階段式溶劑萃取的方式取得不同極性的萃取物, 並以液相層析-高解析質譜儀進行一



圖一 高解析質譜儀無特定標的分析平台於異常油品評估的運作邏輯。

Fig. 1. The flowchart of the non-target analysis based on high-resolution mass spectrometer for suspected tainted oil samples.

次及二次質譜訊號收集；(2)差異性比較：利用質譜分析軟體進行受測樣品間差異性的比較(主成分分析散佈圖)及差異性訊號的挑選(S-Plot)；(3)差異訊號比對：連結線上資料庫(ChemSpider)取得差異性訊號所對應的化合物結構資訊，訊號比對的判別依據包括精確分子量、同位素訊號的強度比例及二次質譜碎片離子的相似性；(4)異常原因評估。

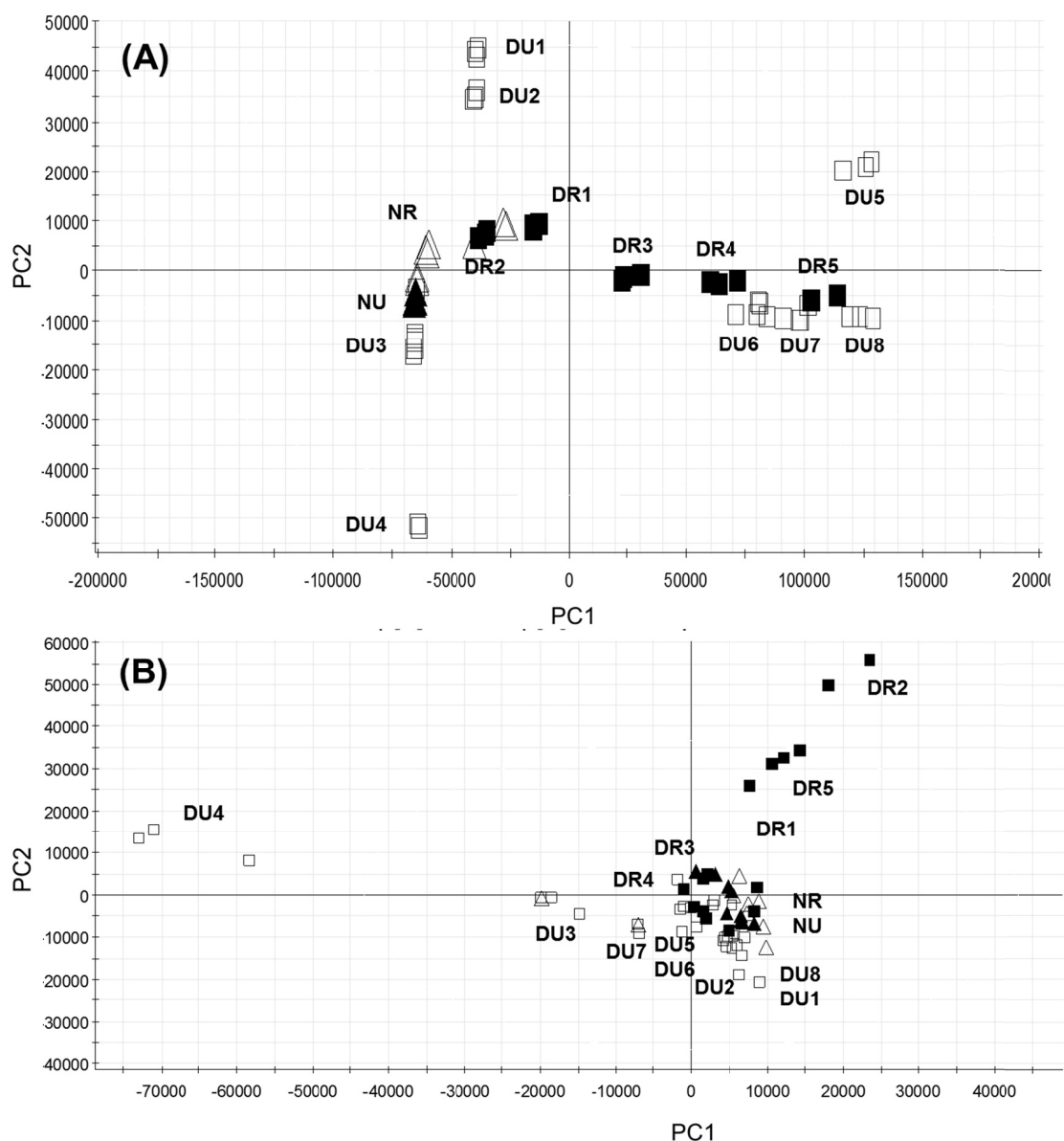
二、具疑慮豬油樣品與市售油品的差異性評估

為減少共同訊號與背景訊號的干擾，選定組間達顯著差異($p < 0.05$)及訊號差異達100倍以上的 m/z ，做為繪製測試樣品主成分分析散佈圖的起始資料，再藉由散佈圖上樣品的分佈情況評估樣品間的相異程度。由高極性(甲醇)萃取層主成分分析散佈圖的結果顯示，多數具疑慮豬油樣品(DU及DR)與市售豬油(NU及NR)呈現交錯且混雜的情況，顯示彼此間無明顯的差異(數據未顯示)，而在中極性(異丙醇)萃取層中(圖二)，市售豬油明顯聚集於相近的位置，其中又以質譜儀正電模式較能獨立區分出市售油品[圖二(A)]，因此選擇該組試驗結果做為探索差異性訊號的模式。

由異丙醇萃取層(正電模式)的主成分分析散佈圖顯示[圖二(A)]，PC1為正值者(座落於第一和第四象限)皆為具疑慮的樣品，包括原豬油DU5-DU8及精製豬油DR3-DR5，而PC1為負值者(座落於第二和第三象限)則包括所有市售油品、疑慮原豬油DU1-DU4及疑慮精製豬油DR1-DR2；主成分分析為將具有相關性的變數(以本研究為例，變數即為各個 m/z 質譜訊號)整併歸納成數個獨立的主成分，利用原變數(X_i)的線性組合產生新的變數(即主成分 PC_i ， $PC_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1n}X_n$)，使原變數的變異大多集中於少數新變數上，達到縮減變數與降維的目的^(30, 31)，並以PC1可以解釋原數據的總變異量最大，由此推估，座落於PC1正值的疑慮樣品與市售豬油具有較大的差異性，因此後續探討此七件疑慮樣品(DU5-DU8、DR3-DR5)與市售豬油的差異性訊號。

三、具差異性豬油樣品之差異訊號及異常原因推測

將前述七件疑慮樣品(DU5-DU8、DR3-DR5)與市售豬油區分為具疑慮組別與市售組別，再利用OPLS進行二維數據鑑別，並透過S-Plot的協助從幾千個質譜訊號中挑選出具代表性的差

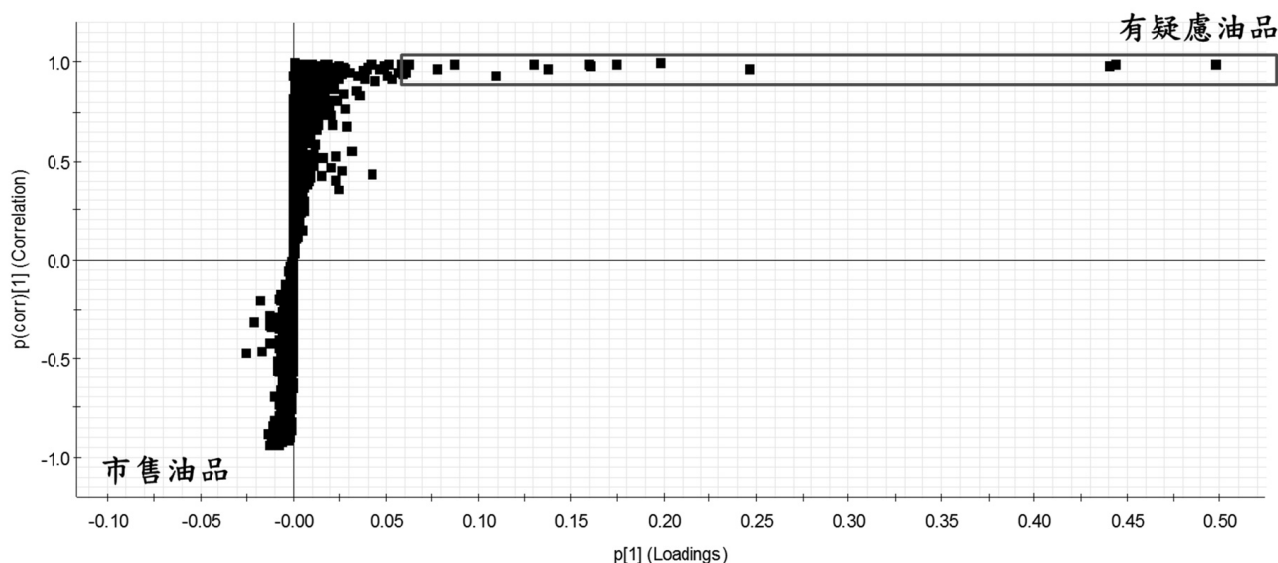


圖二 各豬油樣品異丙醇萃取層質譜訊號的主成份分析散佈圖(A)正電模式(B)負電模式 [▲: 市售原豬油(NU); △: 市售精製豬油(NR); ■: 有疑慮原豬油(DU1-DU8); □: 有疑慮之精製豬油(DR1-DR5)]

Fig. 2. Principal components analysis scatter plot for isopropanol extracts of lards collected from high resolution mass spectrometer analysis using (A) positive and (B) negative ion mode separately. [▲, normal crude lard (NU); △, normal refined lard (NR); ■, suspected tainted crude lard (DU1-DU8); □, suspected tainted refined lard (DR1-DR5)].

異訊號(圖三), 在S-Plot圖中的每個點代表單一的質譜訊號, x軸代表訊號強度, y軸則表示訊號的可信度(再現性), 當質譜訊號座落的位置越集中於y軸($x = 0$)則表示此訊號於兩族群中並無顯著差異, 而當越靠近x軸兩側, 則表示存在於該族群訊號值及差異度越高, 以本實驗為例, x軸右側($x > 0$)的訊號表示存在於疑慮樣品的特徵訊號, 反之, 座落於x軸左側($x < 0$)的訊號表示存在於市售樣品的特徵訊號; 為避免篩選出過多不具代表性或有差異性

但強度低之訊號, 經與原始質譜圖的訊號進行評估比對後, 將訊號強度大於 10^6 者做為挑選特徵訊號的篩選條件, 其對應至本實驗S-Plot為x值的絕對值大於0.06, 在可信度(y值)方面, 則設定在常用的設定值0.9, 篩選結果顯示, 市售油品無具顯著的特徵訊號, 而具疑慮樣品可篩選出17個具差異性的特徵訊號(表一), m/z 範圍介於572-1463, 大多數特徵訊號以 $[M+NH_4]^+$ 為最主要的加成物(adduct), 由線上資料庫比對的結果顯示, 共有八個訊號(編號



圖三 市售豬油樣品與具差異性疑慮豬油樣品(DU5-8及DR3-5)之S-Plot圖(異丙醇萃取層質譜正電模式)。

Fig. 3. S-plot of the Normal Lards (NU and NR) vs. Suspected Tainted Lards (DU5-8 and DR3-5) obtained based on the OPLS-DA statistical analysis of the dataset. (Isopropanol extract at positive ion mode).

1及3-9)有相對應的化合物，皆為碳、氫、氧元素所構成，與其特徵訊號的質量誤差(mass error)在2 ppm以內，同位素比例相似度達97%以上，顯示比對所得之化合物的可信度高。

為了瞭解及比較各訊號的表現情況(表一)，選擇以市售樣品(包括三件原豬油及三件精製豬油)中表現量最強的訊號為基準，計算各試驗樣品的相對訊號表現量，並依照主成分分析散佈圖[圖二(A)]座落的位置做整合，結果顯示，市售油品的背景值訊號強度上限介於 10^6 – 10^8 ，整體市售油品的相對訊號強度在0.2–0.8，其中以編號6–11訊號普遍存在於所有測試市售油品中，其餘訊號僅存在於部份樣品，特別是編號15–16訊號僅存在於精製豬油，在後續研究發現此兩訊號的可能結構為三酸甘油酯的二聚體，應由高溫製程所產生，故於精製豬油中存在少量的背景值。而在有疑慮樣品的相對訊號強度表現上，同樣PC1為負值的第二與第三象限樣品(DU1–DU4及DR1–DR2)，其表現量低於2倍，顯示與市售油品的差異性小；而在PC1為正值的第一與第四象限樣品(DU5–DU8、DR3–DR5)大多數訊號為市售油品的3倍以上，其中又以 m/z 大於1000(編號15–17訊號)的差異倍率最大，可達10–40倍，為顯著高於市售油品的訊號，以上結果亦符合PC1為最主要影響因素的理論。

進一步由化合物結構資訊評估具疑慮豬油的異常原因(表二)，編號4–9訊號的結構為

三酸甘油酯，脂肪酸組成以C12:0、C14:0及C16:0為主，文獻顯示，由3個C12:0脂肪酸所構成的三月桂酸甘油酯(trilaurin)主要存在於植物性油脂中，椰子油、棕櫚油及棕櫚仁油中約有45–50%的trilaurin^(32, 33)，而豬油的脂肪酸組成則以C16:0、C18:0與C18:1為主，僅含少量C12:0與C14:0^(34, 35)，故初步推測具疑慮豬油油品可能受到植物油的汙染。編號1及3訊號的結構則似脂肪酸氧化的聚合物，而編號13(neutral mass 1221.0346)、14(neutral mass 1277.0976)及15(neutral mass 1333.1612)的訊號雖在ChemSpider資料庫未有對應的化合物，但本研究由分子量資訊發現其分別為編號3(neutral mass 610.5176)、4(neutral mass 638.5482)、5(neutral mass 666.5799)訊號的二聚體，而在質譜圖中亦發現此六個訊號具有相同的碎片離子，包括 m/z 439.37717與 m/z 467.41104(數據未呈現)，故可初步證實彼此間具有相似結構的假設；文獻指出在油脂氧化過程中易形成氧化三酸甘油酯(oxidized triglycerides)、三酸甘油酯二聚體(triglyceride dimers)及寡聚體(triglyceride oligopolymer)等較大分子量之化合物，氧化三酸甘油酯 m/z 分布範圍約介於800–1000⁽³⁶⁾，而二聚體及多聚體的 m/z 皆大於1000⁽³⁷⁾，符合編號13–15訊號的範圍，故進一步推測具疑慮豬油油品亦有氧化的情況。

表一 具疑慮與市售豬油油品之差異性訊號資訊及相對訊號表現強度

Table 1. The information and relative signal intensity of characteristic signals

Information of characteristic signals					Relative signal intensity ^e					
Order	m/z ^a	Neutral mass (Da)	Major adduct	Chemical formula ^b	The strongest signal intensity in normal samples		Negative PC1 value region ^d		Positive PC1 value region ^e	
					Normal samples		Quadrant II	Quadrant III	Quadrant I	Quadrant IV
1	572.4889	554.4549	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₃ H ₆₂ O ₆	1.67 × 10 ⁸	0.2 ± 0.4	0.9 ± 0.5	0.2 ± 0.1	5.3 ± 0.5	4.5 ± 1.4
2	600.5200	582.4860	[M+NH ₄] ⁺	-	5.77 × 10 ⁸	0.3 ± 0.4	0.9 ± 0.3	0.2 ± 0.1	4.0 ± 0.2	3.4 ± 0.8
3	628.5514	610.5176	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₇ H ₇₀ O ₆	6.20 × 10 ⁸	0.2 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.1 ± 0.1	4.6 ± 0.3	3.8 ± 0.8
4	656.5821	638.5482	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₉ H ₇₄ O ₆	7.94 × 10 ⁸	0.2 ± 0.4	1.0 ± 0.3	0.1 ± <0.1	4.7 ± 0.1	3.8 ± 0.7
5	684.6137	666.5799	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₁ H ₇₈ O ₆	5.59 × 10 ⁸	0.2 ± 0.4	0.9 ± 0.3	0.0 ± <0.1	5.3 ± 0.3	4.2 ± 0.9
6	712.6445	694.6108	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₃ H ₈₂ O ₆	3.39 × 10 ⁸	0.4 ± 0.3	1.2 ± 0.4	0.1 ± <0.1	7.4 ± 0.3	5.6 ± 1.3
7	740.6753	722.6420	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₅ H ₈₆ O ₆	3.25 × 10 ⁸	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.4	0.3 ± 0.1	7.3 ± 0.5	5.5 ± 1.4
8	768.7071	750.6733	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₇ H ₉₀ O ₆	2.00 × 10 ⁸	0.7 ± 0.3	2.0 ± 1.4	0.8 ± 0.1	3.6 ± 0.3	2.9 ± 0.5
9	796.7387	778.7049	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₉ H ₉₄ O ₆	1.23 × 10 ⁸	0.7 ± 0.2	2.6 ± 1.9	0.9 ± 0.1	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.2
10	928.7605	905.7410	[M+Na] ⁺	-	2.00 × 10 ⁸	0.6 ± 0.3	1.1 ± 0.8	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.7 ± 0.5
11	930.7751	912.7413	[M+NH ₄] ⁺	-	4.26 × 10 ⁸	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.6	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.3
12	1187.9608	1164.9717	[M+Na] ⁺	-	3.16 × 10 ⁷	0.2 ± 0.4	0.8 ± 0.6	0.1 ± 0.1	7.6 ± 0.4	6.4 ± 1.6
13	1239.0684	1221.0346	[M+NH ₄] ⁺	-	4.86 × 10 ⁷	0.2 ± 0.4	1.0 ± 0.6	0.0 ± <0.1	7.7 ± 0.4	6.2 ± 1.4
14	1295.1315	1277.0976	[M+NH ₄] ⁺	-	7.34 × 10 ⁷	0.2 ± 0.4	1.0 ± 0.5	0.0 ± <0.1	7.9 ± 0.1	6.1 ± 1.3
15	1351.1950	1333.1612	[M+NH ₄] ⁺	-	3.22 × 10 ⁷	0.2 ± 0.4	1.0 ± 0.6	0.0 ± <0.1	14.3 ± 0.9	10.4 ± 2.8
16	1407.2552	1389.2213	[M+NH ₄] ⁺	-	9.80 × 10 ⁶	0.2 ± 0.4	2.0 ± 1.5	0.0 ± <0.1	39.6 ± 1.8	28.6 ± 10.0
17	1463.3184	1445.2845	[M+NH ₄] ⁺	-	7.23 × 10 ⁶	0.5 ± 0.3	3.3 ± 1.6	0.1 ± <0.1	41.3 ± 1.5	28.9 ± 10.9

^a Mass to charge ratio (m/z) is a real signal which appears in mass spectrogram.

^b - means no corresponding chemical compound in ChemSpider database.

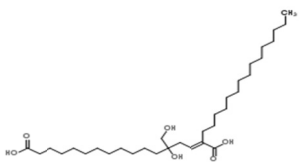

^c The signal intensity of sample divided by the strongest signal intensity in normal samples.

^d According to the PCA scatter plot of isopropanol extract (positive ion mode), "Normal samples" includes three NU and three NR samples. "Quadrant II" includes DU1, DU2, DR1 and DR2 sample. "Quadrant III" includes DU3 and DU4 sample.

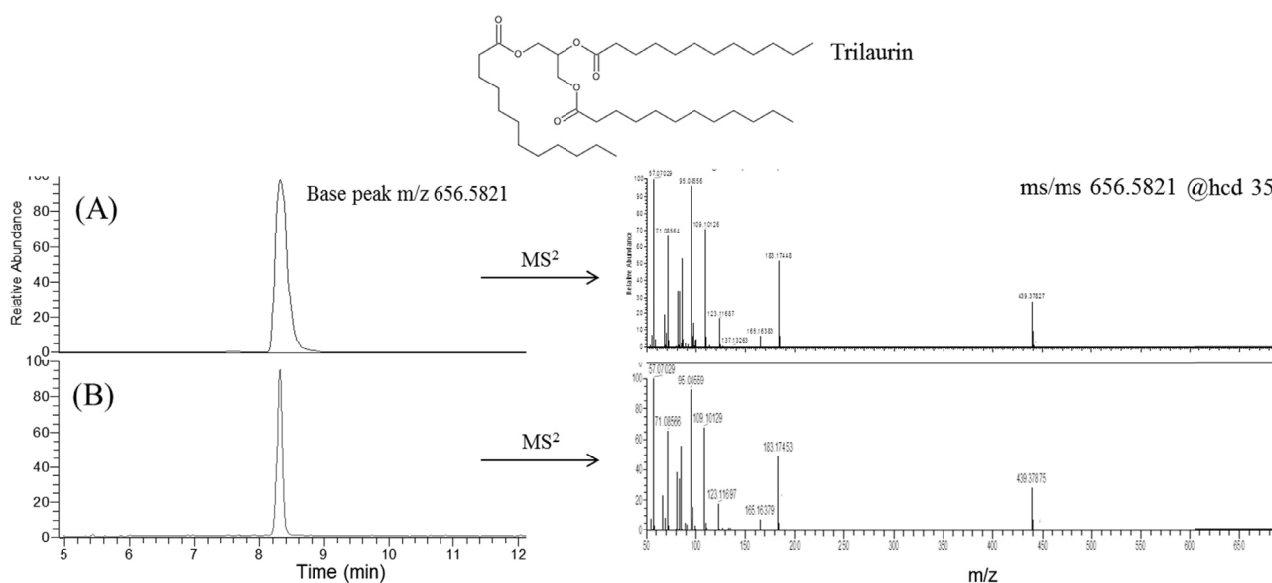
^e According to the PCA scatter plot of isopropanol extract (positive ion mode), "Quadrant I" includes DU5 sample. "Quadrant IV" includes DU6-8 and DR3-5 sample.

表二 具疑慮豬油油品差異性訊號之可能化合物結構資訊

Table 2. The information of the probable chemical compound in suspected tainted lards

Order	Neutral mass (Da)	Chemical formula	Probable chemical compound	
			Name	Structure
1	554.4549	C ₃₃ H ₆₂ O ₆	(2E)-5-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-pentadecyl-2-heptadecenedioic acid	
3	610.5176	C ₃₇ H ₇₀ O ₆	(16Z)-32-[3-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2-methylpropoxy]-32-oxo-16-dotriacontenoic acid	
4	638.5482	C ₃₉ H ₇₄ O ₆	Trilaurin	Triacylglycerol (C12:0/C12:0/C12:0)
5	666.5799	C ₄₁ H ₇₈ O ₆	2,3-Bis(dodecanoyloxy)propyl myristate	Triacylglycerol (C14:0/C12:0/C12:0)
6	694.6108	C ₄₃ H ₈₂ O ₆	1,2-Dimyristoyl-3-lauroyl-rac-glycerol	Triacylglycerol (C14:0/C14:0/C12:0)
7	722.6420	C ₄₅ H ₈₆ O ₆	3-(Dodecanoyloxy)-2-(tetradecanoyloxy)propyl palmitate	Triacylglycerol (C16:0/C14:0/C12:0)
8	750.6733	C ₄₇ H ₉₀ O ₆	2,3-Bis(tetradecanoyloxy)propyl palmitate	Triacylglycerol (C16:0/C14:0/C14:0)
9	778.7049	C ₄₉ H ₉₄ O ₆	2-(Tetradecanoyloxy)-1,3-propanediyl dihexadecanoate	Triacylglycerol (C16:0/C14:0/C16:0)
13	1221.0346	C ₇₄ H ₁₄₀ O ₁₂ ^a	^a Dimer of the 3 rd characteristic signal	
14	1277.0976	C ₇₈ H ₁₄₈ O ₁₂ ^a	Triacylglycerol dimer ^a 2 × (C12:0/C12:0/C12:0)	
15	1333.1612	C ₈₂ H ₁₅₆ O ₁₂ ^a	Triacylglycerol dimer ^a 2 × (C14:0/C12:0/C12:0)	

^aThe probable chemical compound was judged by the information of neutral mass. The others were selected by the result of ChemSpider database screening.



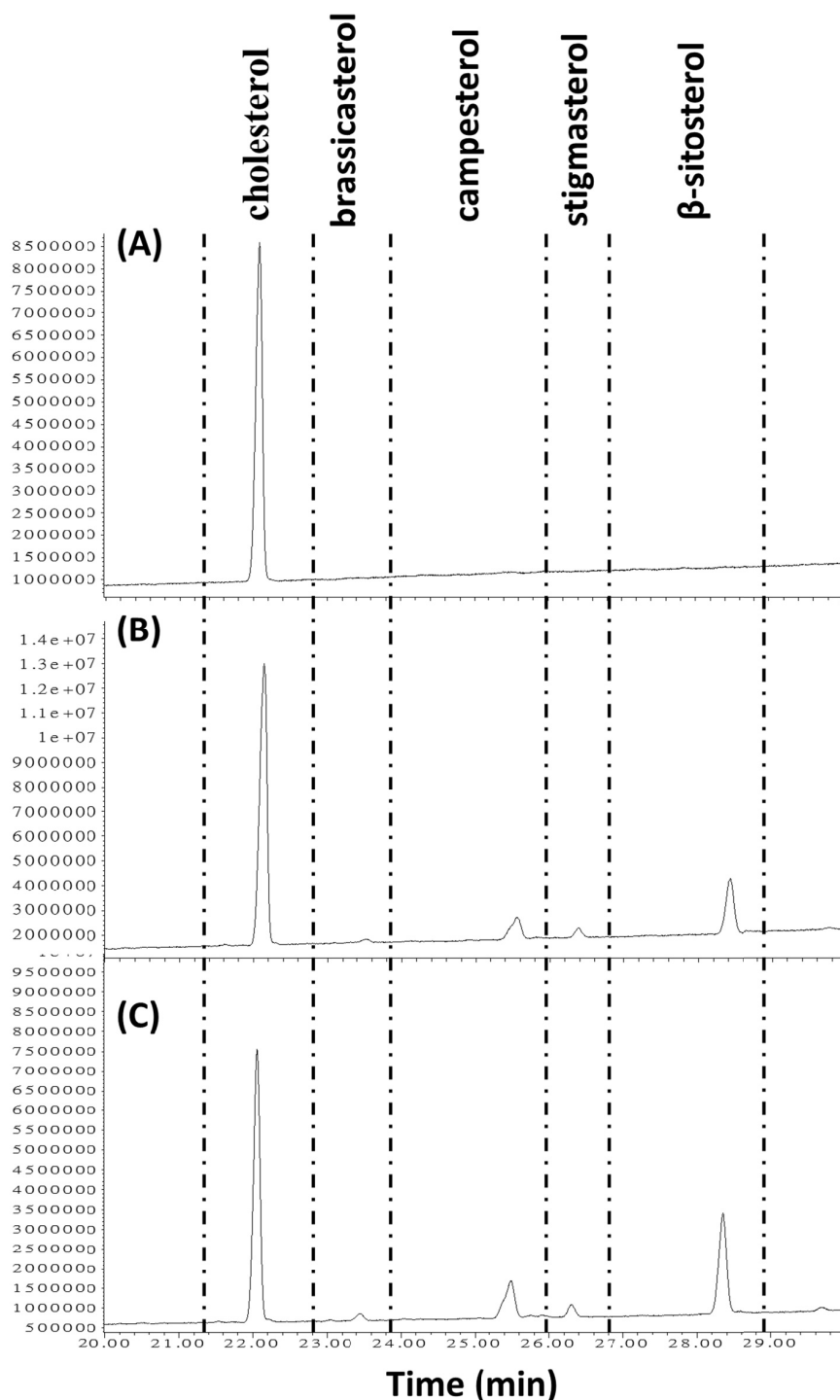
圖四 三月桂酸甘油酯定性分析，(A)具疑慮豬油樣品DU8 (B)標準品。

Fig. 4. Qualitative analysis of trilaurin (A) suspected tainted DU8 (B) standard.

四、推測異常結果的驗證

為確認本無特定分析平台於異常豬油評估的可信度，以標準品進行trilaurin定性分析及額外針對樣品進行植物固醇的篩檢。在trilaurin定性分析的結果顯示(圖四)，標準

品與具疑慮豬油樣品(DU8)具有相同的滯留時間及碎片離子，證實推測的化合物結構及本分析平台可檢測出中碳鏈的三酸甘油酯；而在植物固醇的篩檢結果顯示(圖五)，市售豬油僅存在膽固醇，而在具疑慮豬油樣品DU6與DU8皆偵測出brassicasterol, campesterol, stigmasterol



圖五 市售原豬油 (A) 及具疑慮豬油DU6 (B)、DU8 (C)之固醇分析層析圖。

Fig. 5. Chromatogram of sterols analysis normal crude lard (A) and suspected tainted lard DU6 (B) DU8 (C).

及 β -sitosterol等植物固醇，證實了具疑慮豬油油品的異常原因是受到植物油污染的假設，過去研究是以油脂中三酸甘油酯之當量碳數、植物固醇組成比例等做為判斷油脂摻偽的依據⁽³⁸⁻⁴⁰⁾，實驗程序繁瑣且耗時，而本研究所開發的平台，利用簡單的處理方法，搭配高解析質譜儀之特性，可縮短樣品前製備與分析時間，以豬油為例，亦可作為油脂摻偽之先期評估。

結 論

本研究以無特定標的分析概念開發評估油品差異性的檢測分析及數據資料處理方法，主要包括以高解析質譜儀收集油品異丙醇萃取物的 m/z 資訊，以及利用多變量統計、資料庫比對探索測試油品的差異程度及原因，已成功應用於判別疑慮豬油樣品有植物油污染及氧化現象的異常原因，並藉由植物油中主要三酸甘油酯-trilaurin的定性分析及植物固醇篩檢證實本平台推估的結果，顯示所建構平台具有應用於異常油品初期評估的潛力，做為選擇後續確認試驗重點項目的依據，減少不必要的實驗項目，未來可持續擴大平台的應用，針對特定情境(如高溫氧化)進行代表性指標訊號的建立，以提升結果判別的效率及衍生開發特定檢驗項目的資訊，補足現有判斷標的之不足，提供政府訂立更多元的油脂品質規範的參考。

誌 謝

本研究承財團法人國家衛生研究院經費補助(計畫編號：NHRI-106A1-PDCO-3117181)，謹申謝忱。

參 考 文 獻

- (1) L. Bateman and G. Gee: Determination of absolute rate constants for olefinic oxidations by measurement of photochemical pre-and after-effects. Part I.-At "high" oxygen pressures. *Trans. Faraday Soc.*, **47**: 155-164 (1951).
- (2) L. Bateman, G. Gee, A. Morris and W. Watson: The velocity coefficients of the chain propagation and termination reactions in olefin oxidations in liquid systems. *Discuss. Faraday Soc.*, **10**: 250-259 (1951).
- (3) L. I. Merrill, O. A. Pike, L. V. Ogden and M. L. Dunn: Oxidative stability of conventional and high-oleic vegetable oils with added antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **85**: 771-776 (2008).
- (4) A. Silvagni, L. Franco, A. Bagno and F. Rastrelli: Thermo-induced lipid oxidation of a culinary oil: The effect of materials used in common food processing on the evolution of oxidized species. *Food Chem.*, **133**: 754-759 (2012).
- (5) T. Shibamoto: Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**: 12-25 (2006).
- (6) M. Dobarganes, M. Pérez-Camino and G. Márquez-Ruiz: High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. *Lipid/Fett*, **90**: 308-311 (1988).
- (7) F. Caponio, T. Gomes, A. Pasqualone and C. Summo: Use of the high performance size exclusion chromatography analysis for the measurement of the degree of hydrolytic and oxidative degradation of the lipid fraction of biscuits. *Food Chem.*, **102**: 232-236 (2007).
- (8) A. Beltrán, M. Ramos, N. Grané, M. L. Martín, and M. C. Garrigós: Monitoring of oxidation of almonds by HS-SPME-GC-MS and ART-FTIR: Application of volatile compounds determination to cultivar authenticity. *Food Chem.*, **126**: 603-609 (2011).
- (9) A. Zeb and M. Murkovic: Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**: 844-851 (2010).
- (10) M. Tarvainen, J. P. Suomela, A. Kuksis and H. Kallio: Liquid chromatography-light scattering detector-mass spectrometric analysis of digested oxidized rapeseed oil. *Lipid*, **45**: 1061-1079 (2010).
- (11) M. D. Juaréz, C. C. Osawa, M. E. Acuna, N. Sammán and L. A. Guaraldo Gonçalves: Degradation in soybean oil, sunflower oil and partially hydrogenated fats after food frying, monitored by conventional and unconventional methods. *Food Control*, **22**: 1920-1927 (2011).
- (12) C. Skiera: ¹H NMR spectroscopic determination of deterioration marker compounds in fats and oils. *Universität Würzburg*. Würzburg, Germany (2013).
- (13) L. Vaclavik, B. Belkova, Z. Reblova, K. Riddellova and J. Hajslova: Rapid monitoring of heat-accelerated reactions in vegetable oils using direct analysis in real time ionization coupled with high resolution mass spectrometry. *Food Chem.*, **138**: 2312-2320 (2013).
- (14) F. Giuffrida, F. Destailats, L. H. Skibsted and F. Dionisi: Structural analysis of hydroperoxy- and epoxy-triacylglycerols by liquid chromatography mass spectrometry. *Chem. Phys. Lipids*, **131**: 41-49 (2004).
- (15) A. Zeb: Triacylglycerols composition, oxidation and oxidation compounds in camellia oil using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Phys. Lipids*, **165**: 608-614 (2012).
- (16) 吳惠勤、黃曉蘭、陳江韓、朱志鑫、林曉珊、黃芳、馬葉芬、羅輝泰、鄧欣：SPME/GC-MS鑑別地溝油新方法。分析測試學報，**31**: 1-6 (2012)。
- (17) R. Garrett, E. M. Schmidt, L. F. P. Pereira, C. S. Kitzberger, M. B. S. Scholz, M. N. Eberlin and C. M. Rezende: Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. *LWT-Food Sci. Technol.*, **50**: 496-502 (2013).
- (18) K. Fraser, G. A. Lane, D. E. Otter, Y. Hemar, S. Y. Quek, S. J. Harrison and S. Rasmussen: Analysis of metabolic markers of tea origin by UHPLC and high resolution mass spectrometry. *Food Res. Int.*, **53**: 827-

- 835 (2013).
- (19) J. E. Lee, B. J. Lee, J. O. Chung, H. N. Kim, E. H. Kim, S. Jung, H. Lee, S. J. Lee and Y. S. Hong: Metabolomic unveiling of a diverse range of green tea (*Camellia sinensis*) metabolites dependent on geography. *Food Chem.*, **174**: 452-459 (2005).
 - (20) 徐永衡、林汶鑫、何兆銓、郭寶鏗：利用淨最小平方迴歸、主成分迴歸及類神經網路模式於近紅外光譜資料以預測糙米中粗蛋白質含量之比較。作物、環境與生物資訊，**4**: 41-48 (2007)。
 - (21) M. Bylesjö, M. Rantalainen, O. Cloarec, J. K. Nicholson, E. Holmes and J. Trygg: OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemom.*, **20**: 341-351 (2006).
 - (22) 李俊南、李康、侯豔：校正交偏最小二乘在代謝組學資料分析中的應用。中國衛生統計，**32**: 14-17 (2015)。
 - (23) J. Trygg and S. Wold: Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.*, **16**: 119-128 (2002).
 - (24) J. Chen, W. Wang, S. Lv, P. Yin, X. Zhao, X. Lu, F. Zhang and G. Xu: Metabonomics study of liver cancer based on ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Anal. Chim. Acta*, **650**: 3-9 (2009).
 - (25) H. M. Zhang, S. L. Li, H. Zhang, Y. Wang, Z. L. Zhao, S. L. Chen and H. X. Xu: Holistic quality evaluation of commercial white and red ginseng using a UPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **62**: 258-273 (2012).
 - (26) 胡雲飛、裴月梅、吳虹、徐倩、徐國兵、蔣磊、周建理：基於UPLC-Q-TOF-MS技術研究不同產地牡丹皮藥材化學成分的差異。中草藥，**47**: 2984-2992 (2016)。
 - (27) 周思思、馬增春、梁幹德、王宇光、譚洪玲、尚成榮、張伯禮、高月：基於UPLC/Q-TOF-MS分析附子半夏配伍相反的物質基礎。化學學報，**70**: 284-290 (2011)。
 - (28) Y. Ni, M. Su, J. Lin, X. Wang, Y. Qiu, A. Zhao, T. Chen and W. Jia: Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. *FEBS Lett.*, **582**: 2627-2636 (2008).
 - (29) J. Toivo, V. Piironen, P. Kalo and P. Varo: Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid-phase extraction in sample preparation. *Chromatographia*, **48**: 745-750 (1998).
 - (30) S. Wold, K. Esbensen and P. Geladi: Principal component analysis. *Chemometr. Intell. Lab.*, **2**: 37-52 (1987).
 - (31) S. Rezzi, D. E. Axelson, K. Héberger, F. Reniero, C. Mariani and C. Guillou: Classification of olive oils using high throughput flow 1 H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. *Anal. Chim. Acta*, **552**: 13-24 (2005).
 - (32) D. McIntyre: The analysis of triglycerides in edible oils by APCI LC/MS. *Agilent Application Note* (2000).
 - (33) G. Acosta, R. Smith and K. Arai: High-pressure PVT behavior of natural fats and oils, trilaurin, triolein, and n-tridecane from 303 K to 353 K from atmospheric pressure to 150 MPa. *J. Chem. Eng. Data*, **41**: 961-969 (1996).
 - (34) H. Leskinen, J. P. Suomela and H. Kallio: Quantification of triacylglycerol regioisomers in oils and fat using different mass spectrometric and liquid chromatographic methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**: 2361-2373 (2007).
 - (35) G. Jurriens and A. Kroesen: Determination of glyceride composition of several solid and liquid fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**: 9-14 (1965).
 - (36) A. Zeb and M. Murkovic: Carotenoids and triacylglycerols interactions during thermal oxidation of refined olive oil. *Food Chem.*, **127**: 1584-1593 (2011).
 - (37) W. C. Byrdwell and W. E. Neff: Electrospray ionization MS of high MW TAG oligomers. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81**: 13-26 (2004).
 - (38) R. Aparicio and R. Aparicio-Ruiz: Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A*, **881**: 93-104 (2000).
 - (39) J. M. Bosque-Sendra, L. Cuadros-Rodríguez, C. Ruiz-Samblás and A. P. de la Mata: Combining chromatography and chemometrics for the characterization and authentication of fats and oils from triacylglycerol compositional data - A review. *Anal. Chim. Acta*, **724**: 1-11 (2012).
 - (40) L. Cercaci, M. T. Rodriguez-Estrada and G. Lercker: Solid-phase extraction-thin-layer chromatography-gas chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. *J. Chromatogr. A*, **985**: 211-220 (2003).