食品藥物研究年報. 13：50-57 2022
Ann. Rept. Food Drug Res. 13：50-57 2022

# 食品中硼酸之檢驗方法探討

尤心正　方俊仁　許哲綸　林雅姿　黃守潔　曾素香　王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

## 摘　要

現行衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)公開之「食品中硼酸之檢驗方法(TFDAA0086.00)」，係利用樣品經萃取後，與衍生試劑反應呈色，以分光光度計檢測，考量其使用毒性較高之氯仿作為衍生化之萃取溶劑，因此本研究評估使用其他溶劑系統之可行性，並以紅麴酒糟、紫米及湯圓三種基質進行專一性、精密度及定量極限之評估測試。本研究結果顯示以正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液作為萃取溶劑，其平均回收率介於92.5-104.8%，顯示可作為替代之萃取溶劑；以紅色色素、紅麴酒糟、紫米及湯圓進行專一性評估，結果顯示均無顏色干擾之情形。另準確度及精密度試驗，結果顯示，於基質中添加硼酸300及600 mg/kg，其同日內之平均回收率分別為94.9-102.7%及97.0-101.9%，變異係數分別為2.8-6.7%及0.7-3.1%；於異日間之變異係數則分別為3.3-5.6%及1.2-4.8%，皆符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範，本檢驗方法之定量極限為300 mg/kg。

**關鍵詞：分光光度計法、硼酸、紅麴酒糟、紫米、湯圓**

## 前　言

硼砂又稱四硼酸鈉，化學式為$Na_2B_4O_7$，是一種常見的含硼鹽類，外觀為無色晶體或白色粉末。它可以抑制酵母菌與黴菌的生長，曾作為防腐劑，也能抑制酪胺酸酵素(tyrosinase)作用，防止酪胺酸(tyrosine)氧化成黑色素，偶有不肖業者用於防止食品發生褐變反映以保持其色澤美觀，亦可能用於鹼粽等食品，使其口感更為Q彈[1]。硼酸雖然本身毒性不強，但在連續攝取後產生累積作用，仍可能破壞中樞與消化系統，妨礙消化酵素作用，引起食慾減退，抑制營養吸收，導致體重減輕等症狀，硼砂對人體健康具有潛在危害，世界衛生組織(World Health Organization, WHO)建議每日攝取量為0.16 mg/kg bw/day，故不應做為食品添加物，目前世界各國，大多禁止將硼砂作為食品添加劑；僅歐盟允許硼砂或硼酸做為魚子醬的防腐劑[2]，臺灣也已經明令禁止其作為食品添加物使用。現常以品質改良劑「三偏磷酸鈉」替代硼砂，以增加食品的彈性與口感，且安全性高。我國食品添加物管理採正面表列，硼砂並不在許可清單之中。

針對食品中硼酸及其鹽類之檢驗，目前訂有公告檢驗方法「食品中硼酸及其鹽類之檢驗方法(MOHWA0014.01)」[3]，惟該公告檢驗方法係屬定性鑑別方法，樣品先經灰化處理較耗時，後續以薑黃試紙測試，其試紙呈色結果易受人為主觀判定影響。隨著分析技術的蓬勃發展及應用，已有相關文獻以分光光度計

(spectrophotometer)分析食品中硼酸含量[4]，此也應用於分析血液中硼酸含量[5,6]，另外，也有以ICP-MS分析水中硼酸含量[7]。

食藥署亦於110年5月24日公開建議檢驗方法「食品中硼酸之檢驗方法(TFDAA0086.00)」[8]，樣品經萃取及呈色後，以分光光度計分析其中之硼酸，惟該檢驗方法中使用氯仿作為衍生化之萃取溶劑，考量其毒性較高，擬進行該方法之優化。另有文獻指出，在酸性條件下，使用含5% 2-乙基-1,3-己二醇(2-ethyl-1,3-hexanediol, EHD)之己烷/乙酸丁酯(4:1, v/v)混合溶液萃取硼酸，並與薑黃素呈色，在550 nm處測定吸光值，其硼酸回收率可達97.0%以上[9]。爰此，本研究規劃以不同萃取溶劑系統進行測試，期能使用其他毒性較低之溶劑系統取代氯仿以精進該檢驗方法。

## 材料與方法

### 一、材料與方法

㈠檢體來源

市售鹼粽4件及湯圓3件，共計7件檢體，由台北地區大賣場購入。

㈡試藥及對照用標準品

硫酸、冰醋酸、無水乙醇、正己烷(hexane, HE)、乙酸乙酯(ethyl acetate, EA)、二氯甲烷(dichloromethane, DCM)及氯仿(chloroform, CHL)採用HPLC級，均購自Merck公司(Darmstadt, Germany)；亞鐵氰化鉀[$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$]、醋酸鋅[$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$]、薑黃素(curcumin)及2-乙基-1,3-己二醇(2-ethyl-1,3-hexanediol, EHD)採用試藥級，均購自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)；硼酸對照用標準品，購自J. T. Baker公司(Phillipsburg, NJ, USA)；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ · cm以上)。

㈢器具及材料

50 mL離心管(PP材質)；10 mL及100 mL容量瓶(玻璃材質)。

㈣儀器及裝置

1. 分光光度計：Varian CARY 300 Bio，Agilent公司(Santa Clara, CA, USA)。
2. 漩渦混合器(Vortex mixer)：VORTEX-GENIE 2，Scientific Industries， (New York, NY, USA)。
3. 離心機：Allegra 25R Centrifuge，Beckman Coulter公司(Brea, CA, USA)。
4. 精密天平：Mettler XS 105，瑞士商梅特勒-托利多股份有限公司台灣分公司(Taipei, Taiwan)。

### 二、檢驗方法

㈠試劑之調製

1. 50%硫酸溶液：取硫酸50 mL，緩緩加入去離子水40 mL中，同時不斷攪拌，使熱量及時散失，冷卻後再加去離子水使成100 mL。
2. 亞鐵氰化鉀溶液：稱取亞鐵氰化鉀10.6 g，以去離子水溶解使成100 mL。
3. 醋酸鋅溶液：稱取醋酸鋅22 g，以冰醋酸3 mL溶解，再加去離子水使成100 mL。
4. 薑黃試劑：稱取薑黃素0.1 g，以冰醋酸溶解使成100 mL。
5. 正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液：取正己烷與乙酸乙酯以1:1 (v/v)比例混合均勻。
6. 正己烷/乙酸乙酯(3:1, v/v)混合溶液：取正己烷與乙酸乙酯以3:1 (v/v)比例混合均勻。
7. 含10% EHD之氯仿溶液：取EHD 10 mL，加氯仿使成100 mL。
8. 含10% EHD之二氯甲烷溶液：取EHD 10 mL，加二氯甲烷使成100 mL。
9. 含10% EHD之正己烷溶液：取EHD 10

mL，加正己烷使成100 mL。

10. 含10% EHD之正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液：取EHD 10 mL，加正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液使成100 mL。
11. 含10% EHD之正己烷/乙酸乙酯(3:1, v/v)混合溶液：取EHD 10 mL，加正己烷/乙酸乙酯(3:1, v/v)混合溶液使成100 mL。

㈡標準溶液之配製

取硼酸對照用標準品約600 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至100 mL，作為標準原液。臨用時取適量標準原液，以去離子水稀釋至3-10 μg/mL，供作標準溶液。

㈢衍生化標準溶液之配製

精確量取標準溶液各5 mL，置於50 mL離心管中，分別加入50%硫酸溶液1 mL，旋渦混勻，再加入含10% EHD之正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液5 mL，旋渦混合2分鐘後，以3500 ×g離心2分鐘，取上層液體1 mL，置於另一50 mL離心管中，依序加入薑黃試劑1 mL及硫酸0.5 mL，混合均勻，靜置30分鐘，加入無水乙醇25 mL，靜置10分鐘，供作衍生化標準溶液。另取去離子水5 mL，同樣操作，供作空白衍生化溶液。

㈣檢液之調製

將檢體細切並均質混勻後，取約1 g，精確稱定，置於100 mL燒杯中，加入去離子水約50 mL，旋渦混合，緩慢滴加硫酸2 mL，經超音波振盪10分鐘後，加入醋酸鋅溶液及亞鐵氰化鉀溶液各5 mL，混合均勻，以去離子水定容至100 mL，取適量萃取液於50 mL離心管中，以3500 ×g離心2分鐘，取上清液5 mL，置於另一50 mL離心管中，加入50%硫酸溶液1 mL，以下步驟同二、㈢，供作檢液。

㈤標準曲線之製作

取衍生化標準溶液，以分光光度計於波長550 nm測定其吸光值，就所得之吸光值與對應之標準溶液濃度製作標準曲線。另取空白衍生化溶液，同樣操作，供作空白試驗。

㈥含量測定

取檢液，依二、㈤操作，就所得之吸光值依下列計算式求出檢體中硼酸之含量(mg/kg)：

$$\text{檢體中硼酸之含量(mg/kg)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中硼酸之濃度(μg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)。

## 三、衍生化之萃取溶劑評估

精確量取標準溶液5 mL，置於50 mL離心管中，加入50%硫酸溶液1 mL，旋渦混勻，再分別以含10% EHD之不同萃取溶劑【氯仿、正己烷、正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液及正己烷/乙酸乙酯(3:1, v/v)混合溶液】5 mL進行試驗，其步驟同二、㈢，所得衍生化標準溶液再依二、㈤製作標準曲線。另取空白檢體1 g，添加600 μg/mL標準溶液0.5 mL，使其中硼酸含量為300 mg/kg，依二、㈣步驟執行檢液之調製，加入50%硫酸溶液1 mL，旋渦混勻，再分別加入含10% EHD之不同萃取溶劑【氯仿、正己烷、正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液及正己烷/乙酸乙酯(3:1, v/v)混合溶液】5 mL，以下步驟同二、㈢，所得檢液再依二、㈥求出檢體中硼酸之含量(mg/kg)。於同日內進行5重複分析並計算回收率，以評估不同衍生化之萃取溶劑對於硼酸含量測定之影響。

## 四、檢驗方法確效

㈠專一性之評估

1. 市售紅色食品之評估：
分別取紅麴酒糟、紫米及湯圓各1 g，依二、㈣及㈥操作，於波長550 nm測定其吸光值，以評估市售紅色食品是否有干擾待測物之現象。
2. 紅色色素之評估：
取空白檢體(湯圓) 1 g，分別添加1000 μg/mL色素標準溶液(食用紅色6號、食用紅色7號、食用紅色40號、蘇丹紅B及蘇丹Ⅳ) 1 mL，使其中色素含量為1000 mg/kg，依二、㈣及㈥操作，以評估紅色色素是否有干擾待測物之情形。

㈡定量極限之評估
取空白檢體1 g，添加600 μg/mL標準溶液0.5 mL，使其中硼酸含量為300 mg/kg，依二、㈣及㈥操作，於同日內進行5重複分析，測定檢體中硼酸之含量並計算平均回收率及變異係數，以評估定量極限。

㈢準確度之評估
取空白檢體1 g，分別添加600 μg/mL標準溶液0.5 mL與1 mL，使其中硼酸含量分別為300 mg/kg及600 mg/kg，依二、㈣及㈥操作，於同日內及異日間進行6重複分析，測定檢體中硼酸之含量並計算平均回收率。

㈣精密度之評估
1. 重複性
取空白檢體1 g，分別添加600 μg/mL標準溶液0.5 mL與1 mL，使其中硼酸含量分別為300 mg/kg及600 mg/kg，依二、㈣及㈥操作，於同一分析日內進行6重複試驗，測定檢體中硼酸之含量並計算同日內(intraday)之變異係數。
2. 中間精密度
取空白檢體1 g，分別添加600 μg/mL標準溶液0.5 mL與1 mL，使其中硼酸含量分別為300 mg/kg及600 mg/kg，依二、㈣及㈥操作，於不同分析日分別進行6重複試驗，測定檢體中硼酸之含量並計算異日間(interday)之變異係數。

## 五、市售產品之方法適用性評估

自行價購市售檢體，並依二、㈣及㈥操作，測定檢體中硼酸之含量，以評估檢驗方法之適用性。

# 結果與討論

## 一、衍生化之萃取溶劑評估

取3種基質之空白檢體添加硼酸300 mg/kg，並分別使用含10% EHD之不同溶劑【氯仿、正己烷、正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液及正己烷/乙酸乙酯(3:1, v/v)混合溶液】進行硼酸之萃取，以評估不同衍生化萃取溶劑對於各基質中硼酸含量測定之影響(表一)，結果顯示，使用氯仿及二氯甲烷之平均回收率分別為93.1-103.7%及98.5-105.2%，雖有較佳回收率，惟因所使用的溶劑毒性較強，故改以正己烷進行萃取，結果顯示，平均回收率為69.8-75.4%；另，比較正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)及(3:1, v/v)混合溶液，結果顯示，正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液之平均回收率介於92.5-104.8%之間，回收率較佳，故本研究後續選用正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)混合溶液作為衍生化之萃取溶劑。

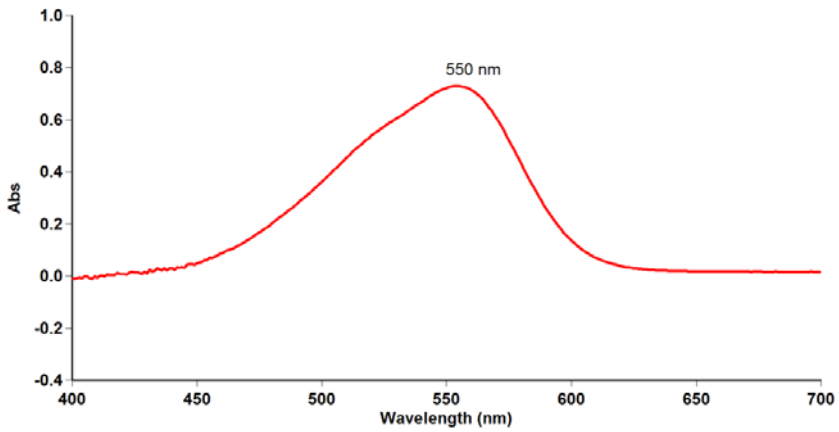
## 二、專一性之評估

本研究係利用硼酸與薑黃反應產生之紅色化合物，於波長550 nm測定吸光值並藉以定量(圖一)，為評估可能之干擾物質，分別以常見之紅色食品(紅麴酒糟、紫米及湯圓)進行測試，另於空白湯圓基質分別添加1000 mg/kg之水溶性紅色色素(食用紅色6號、7號及40號)及脂溶性紅色色素(蘇丹紅B及蘇丹Ⅳ)進行測試，所得之檢液於波長550 nm測得之吸光值介於0.0078-0.0339 (表二)，又空白湯圓基質中添

表一、衍生化之萃取溶劑評估結果

| 萃取溶劑 | 紅麴酒糟 | | 紫米 | | 湯圓 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 平均回收率[a] (%) | 變異係數 (%) | 平均回收率[a] (%) | 變異係數 (%) | 平均回收率[a] (%) | 變異係數 (%) |
| 氯仿 | 94.4 | 5.2 | 93.1 | 4.2 | 103.7 | 2.1 |
| 二氯甲烷 | 98.5 | 1.7 | 101.1 | 3.6 | 105.2 | 4.7 |
| 正己烷 | 74.6 | 4.0 | 75.4 | 4.5 | 69.8 | 4.9 |
| 正己烷：乙酸乙酯(1:1) | 101.9 | 5.4 | 104.8 | 1.2 | 92.5 | 1.0 |
| 正己烷：乙酸乙酯(3:1) | 86.0 | 1.1 | 80.6 | 4.2 | 79.2 | 2.3 |

[a]n=5




圖一、硼酸標準品與薑黃試劑反應衍生產物之可見光光譜圖

表二、專一性之評估結果

| 測試基質 | 吸光值($Abs_{550\ nm}$)[a] |
|---|---|
| 紅麴酒糟 | 0.0306 ± 0.0002 |
| 紫米 | 0.0155 ± 0.0005 |
| 湯圓 | 0.0101 ± 0.0001 |
| 湯圓添加食用紅色6號[b] | 0.0229 ± 0.0002 |
| 湯圓添加食用紅色7號[b] | 0.0166 ± 0.0002 |
| 湯圓添加食用紅色40號[b] | 0.0339 ± 0.0003 |
| 湯圓添加蘇丹紅B[b] | 0.0078 ± 0.0002 |
| 湯圓添加蘇丹Ⅳ[b] | 0.0138 ± 0.0002 |
| 湯圓添加硼酸[c] | 0.2693 ± 0.0022 |

[a]n=3，數值以平均值±標準差表示
[b]於空白湯圓基質中添加色素1000 mg/kg
[c]於空白湯圓基質中添加硼酸300 mg/kg

加硼酸300 mg/kg，所得之檢液於波長550 nm測得之吸光值為0.2693 (表二)，顯示前揭測試之紅色食品及紅色色素並無干擾待測物之情形。

## 三、線性之評估

取二、㈡所配製之硼酸標準溶液，依二、㈢進行衍生化後再依二、㈤製作標準曲線(3-10 μg/mL)，所得線性回歸方程式為y = 0.09500x－0.00063 (y為吸光值，x為濃度)，其相關係數(r)為0.99995，顯示於此濃度範圍內之線性良好。

## 四、定量極限之評估

以紅麴酒糟、紫米及湯圓作為空白檢體，分別添加硼酸300 mg/kg，並依二、㈣及㈤操作，於同日內進行5重複分析，測定檢體中硼酸之含量並計算其平均回收率及變異係數分別為98.7-104.8%及1.2-5.4% (表三)，顯示於空白基質中添加硼酸300 mg/kg時，其回收率及重複性皆符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範，爰本檢驗方法之定量極限定為300 mg/kg。

## 五、準確度及精密度之評估

以紅麴酒糟、紫米及湯圓作為空白檢體，分別添加硼酸300及600 mg/kg，並依二、㈣及㈤操作，於不同分析日內分別進行6重複分析，測定檢體中硼酸之含量並計算其平均回收率及變異係數(表四)，當添加硼酸300及600 mg/kg時，於同日內之平均回收率分別為94.9-102.7%及97.0-101.9%；於異日間之變異係數為2.8-6.7%及0.7-3.1%；於異日間之變異係數則分別為3.3-5.6%及1.2-4.8%，皆符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範，顯示本檢驗方法具有良好之準確度及精密度。

## 六、市售產品之方法適用性評估

為評估本檢驗方法之適用性，於110年7月間自行價購鹼粽4件及湯圓3件，並依本研究所建立之檢驗方法進行檢體中硼酸含量之測定，檢驗結果皆為未檢出(表五)。

## 結　論

本研究成功以已烷/乙酸乙酯混合溶液(1:1)取代氯仿作為衍生化之萃取溶劑，3種基質之添加平均回收率介於94.9-102.7%，於同日內及異日間之重複性皆符合確效規範，標準曲線相關係數(r)為0.99995，顯示其線性關係

表三、定量極限之評估結果

| 測試基質 | 添加濃度 (mg/kg) | 平均回收率[a] (%) | 變異係數 (%) |
|---|---|---|---|
| 紅麴酒糟 | 300 | 101.9 | 5.4 |
| 紫米 | 300 | 104.8 | 1.2 |
| 湯圓 | 300 | 98.7 | 4.0 |

[a]n=5

表五、市售產品中硼酸之分析結果

| 檢體序號 | 檢體名稱 | 含量(mg/kg)[a] |
|---|---|---|
| 1 | 粽子A | 未檢出 |
| 2 | 粽子B | 未檢出 |
| 3 | 粽子C | 未檢出 |
| 4 | 粽子D | 未檢出 |
| 1 | 湯圓A | 未檢出 |
| 2 | 湯圓B | 未檢出 |
| 3 | 湯圓C | 未檢出 |

[a]n=3

表四、準確度及精密度之評估結果

| 分析物 | 添加濃度 (mg/kg) | 同日內(n=6) | | 異日間(n=12) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 平均回收率(%) | 變異係數(%) | 平均回收率(%) | 變異係數(%) |
| 紅麴酒糟 | 300 | 102.7 | 2.8 | 100.3 | 3.3 |
| | 600 | 101.9 | 0.7 | 102.0 | 1.2 |
| 紫米 | 300 | 99.9 | 6.7 | 101.8 | 5.6 |
| | 600 | 97.0 | 3.1 | 100.7 | 4.8 |
| 湯圓 | 300 | 94.9 | 3.5 | 97.9 | 5.4 |
| | 600 | 101.2 | 2.9 | 98.9 | 3.3 |

良好，定量極限為300 mg/kg，另測試市售紅色食品及紅色色素，均無干擾現象，顯示方法專一性、精密度與準確度均良好，可作為後續檢驗方法精進修正之依據，以提供外界執行相關檢驗之參考。

## 參考文獻

1. 行政院環境保護署毒物及化學物質局。2017。是好幫手還是壞朋友？令人又愛又恨的「硼酸」。[https://www.tcsb.gov.tw/cp-263-2724-1c94a-1.html] 。
2. European Food Safety Authority. 2013. Scientific opinion on the re-evaluation of boric acid (E 284) and sodium tetraborate (borax) (E 285) as food additives. EFSA J. 11(10): 3407
3. 衛生福利部。2013。食品中硼酸及其鹽類之檢驗方法。102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正。[http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f636694231505025751&type=2&cid=6640]。
4. 國家食品藥品監督管理總局。2017。食品中硼酸的測定。中華人民共和國國家標準(GB) 5009.275-2016。
5. Takakura1, A., Tanaka1, N., Omyia, T., Omori, H. and *et al*. 2017. Spectrophotometric measurement of boric acid in a case of accidental ingestion. Albanian J. Med. Health Sci. 48: 49-53.
6. Mohan, T.C. and Jones, A.M.E. 2018. Determination of boron content using a simple and rapid miniaturized curcumin assay. Bio Protoc. 8: e2703.
7. 行政院環境保護署環境檢驗所。2008。水中硼檢測方法-薑黃素比色法。97年5月28日環署檢字第0970039223E號公告。
8. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品中硼酸之檢驗方法。110年5月24日公布。[http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f637572062066965017&type=2&cid=36933]。
9. Nair, P., Vora, N., Purandhar, K., Kamle, V. and Seshadri, S. 2012. Evaluating the reversal potentials of hydroalcoholic extracts of *Eclipta alba* in boric acid induced male reproductive toxicity. Eur. J. Exp. Biol. 1: 77-93.

# Evaluation of the Test Method for Boric Acid in Food

HSIIN-CHENG YOU, CHUN-JEN FANG, CHE-LUN HSU, YA-TZA LIN, SHOU-CHIEH HUANG, SU-HSANG TSENG AND DE-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

## ABSTRACT

This study evaluated the feasibility of using less hazardous solvent system as a substitute for chloroform during the derivatization process in the "Method of Test for Boric Acid in Foods (TFDAA0086.00)" published on May 24, 2020. The red-colored food matrices (red yeast rice, purple rice and glutinous rice ball) were selected as sample to evaluate the specificity, precision and limit of quantitation of the method in different solvent systems. The recoveries of boric acid were 92.5-104.8% when using the mixture solution of *n*-hexane/ethyl acetate mixture (1:1, v/v) as the extraction solvent system. The results showed this solvent system could be a suitable replacement of chloroform. The modified method for boric acid in foods was validated in red colorants and the red-colored foods. The results showed there was no interference from the red substances. The accuracy and precision tests were conducted by spiking 300 mg/kg and 600 mg/kg boric acid into matrices described above, and the results showed that the intra-day average recoveries were 94.9-102.7% and 97.0-101.9% for 300 mg/kg and 600 mg/kg spiked sample, respectively. Their coefficients of variation were 2.8-6.7% and 0.7-3.1%, respectively. The inter-day coefficients of variation were 3.3-5.6% and 1.2-4.8%, respectively. The limit of quantification was 300 mg/kg.

Key word: spectrophotometry, boric acid, red yeast rice, purple rice, glutinous rice ball