

食品中多環芳香族碳氫化合物之檢驗方法

Method of Test for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用食用油脂、可可脂、肉及肉製品、水產動物製品、嬰幼兒食品及膳食補充品等食品中苯駢芘(benzo[a]pyrene, BaP)、benz[a]anthracene (BaA)、benzo[b]fluoranthene (BbF)及chrysene (CHR)等4項多環芳香族碳氫化合物之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，以氣相層析串聯質譜儀(gas chromatograph/tandem mass spectrometer, GC/MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 氣相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電子游離(electron ionization, EI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Select PAH毛細管，內膜厚度0.15 μm ，內徑0.25 mm $\times$ 30 m，或同級品。
 - 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times g$ 以上，控制溫度可達15 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.6. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.7. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.8. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：正己烷採用殘留量級；四氫呋喃(tetrahydrofuran)、甲基第三丁基醚(methyl *tert*-butyl ether)及環己烷(cyclohexane)均採用氣相層析級；乙腈採用液相層析級；無水硫酸鎂、醋酸鈉、primary secondary amine (PSA)及octadecylsilane, end-capped (C18 EC)均採用分析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；BaP、BaA、BbF及CHR對照用標準品；benzo[a]pyrene- d_{12} (BaP- d_{12})、benz[a]anthracene- d_{12} (BaA- d_{12})、benzo[b]fluoranthene- d_{12} (BbF- d_{12})及chrysene- d_{12} (CHR- d_{12})同位素內部標準品。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。

2.3.2. 容量瓶：10 mL、50 mL及100 mL。

2.3.3. 固相萃取匣(Solid extraction cartridge)：HR-P，6 mL，500 mg，或同級品；Sep-pak Silica，6 mL，1 g，或同級品。

2.3.4. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：採用Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。

2.3.5. 萃取用粉劑^(註)：含無水硫酸鎂6 g及醋酸鈉1.5 g。

2.3.6. 淨化用離心管^(註)：含PSA 400 mg、C18 EC 400 mg及無水硫酸鎂1200 mg。

2.3.7. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。

註：可依需求自行評估使用市售各種萃取及淨化用組合套組。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 正己烷：甲基第三丁基醚(95:5, v/v)溶液

取正己烷與甲基第三丁基醚以95:5 (v/v)之比例混勻。

2.4.2. 正己烷：甲基第三丁基醚(80:20, v/v)溶液

取正己烷與甲基第三丁基醚以80:20 (v/v)之比例混勻。

2.4.3. 正己烷：甲基第三丁基醚(50:50, v/v)溶液

取正己烷與甲基第三丁基醚以50:50 (v/v)之比例混勻。

2.5. 內部標準溶液之配製：

取BaP-d₁₂、BaA-d₁₂、BbF-d₁₂及CHR-d₁₂同位素內部標準品各約10 mg，精確稱定，分別以正己烷溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，於-18°C避光貯存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以正己烷稀釋至5 $\mu\text{g/mL}$ ，供作內部標準溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

取BaP、BaA、BbF及CHR對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以正己烷溶解並定容至100 mL，作為標準原液，於-18°C避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以正己烷稀釋至0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 食用油脂

取液態檢體約2 g，固態檢體則先以40°C水浴加熱融化後取約2 g，精確稱定，置於15 mL離心管中，加入內部標準溶液5 µL及正己烷：甲基第三丁基醚(95:5, v/v)溶液5 mL，旋渦混合15秒，注入預先以正己烷：甲基第三丁基醚(95:5, v/v)溶液10 mL潤洗之HR-P固相萃取匣中，依序以正己烷：甲基第三丁基醚(95:5, v/v)溶液10 mL、正己烷：甲基第三丁基醚(80:20, v/v)溶液10 mL及正己烷：甲基第三丁基醚(50:50, v/v)溶液10 mL清洗固相萃取匣，棄流出液，以四氫呋喃15 mL分3次進行沖提，收集沖提液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物以正己烷1 mL溶解，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.2. 可可脂

檢體先以40°C水浴加熱融化後取約2 g，精確稱定，置於15 mL離心管中，依2.7.1.節調製檢液。

2.7.3. 肉及肉製品、水產動物製品及嬰幼兒蔬果泥與肉泥副食品

將檢體均質，取約5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入冷藏預冷之去離子水5 mL，混合後靜置20分鐘，加入內部標準溶液12.5 µL及乙腈10 mL，再依序加入陶瓷均質石1顆及萃取用粉劑，蓋上離心管蓋，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於15°C，4000 ×g離心5分鐘。取上清液8 mL至淨化粉劑管中，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於15°C，4000 ×g離心5分鐘。取上清液4 mL (a)於40°C以氮氣吹乾，殘留物以正己烷1 mL (b)溶解，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.4. 嬰幼兒奶粉及穀物類輔助食品

將檢體均質，取約5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入內部標準溶液5 µL及正己烷10 mL，旋渦混合，以超音波振盪萃取10分鐘後，以5000 ×g離心5分鐘，收集上清液，殘留物再加入正己烷10 mL，重複萃取2次，合併上清液。於40°C以氮氣吹至約5 mL，注入Sep-pak Silica固相萃取匣中，收集流出液，以正己烷10 mL沖提固相萃取匣，合併流出液。於40°C以氮氣吹乾，殘留物以正己烷1 mL溶解，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.5. 蜂王乳及含螺旋藻之膳食補充品食品

將檢體均質，取約0.5 g，精確稱定，置於15 mL離心管中，加入內部標準溶液5 µL及環己烷4 mL，旋渦混合，以超音波振盪萃取10分鐘後，以5000 ×g離心5分鐘，收集上清液，殘留物再加入環己烷4 mL，重複萃取2次，合併上清液。於40°C以氮氣吹至約5 mL，注入Sep-pak Silica固相萃取匣中，收集流出液，以環己烷10 mL沖提固相萃取匣，合併流出液。於40°C以氮氣吹乾，殘留物以正己烷1 mL溶解，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

2.8.1. 食用油脂

取空白檢體，依2.7.1.節調製未添加內部標準品之固相萃取匣沖提液，以氮氣吹乾後，分別加入適量正己烷、標準溶液2~100 µL及內部標準溶液5 µL，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液。依下列條件進行分析，就各多環芳香族碳氫化合物與其內部標準品之波峰面積比，與對應之各多環芳香族碳氫化合物濃度，分別製作1~50 ng/mL之基質匹配檢量線。

氣相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：Select PAH毛細管，內膜厚度0.15 µm，內徑0.25 mm × 30 m。

層析管溫度：初溫：50°C；

升溫速率：10°C/min；

中溫1：200°C，2 min；

升溫速率：10°C/min；

中溫2：250°C，10 min；

升溫速率：10°C/min；

中溫3：270°C，9 min；

升溫速率：30°C/min；

終溫：320°C，15 min。

移動相流速：氮氣，1 mL/min。

注入器溫度：320°C。

注入模式：不分流(splitless)。

注入量：2 μ L。

介面溫度：280°C。

離子源溫度：340°C。

離子化模式：電子游離(EI)，70 eV。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)，偵測離子對及碰撞能量如下：

分析物	離子對	碰撞能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	
Benz[a]anthracene	228 > 226 [*]	35
	113 > 112	15
	228 > 227	20
Benzo[b]fluoranthene	252 > 250 [*]	40
	125 > 124	15
	126 > 113	15
Benzo[a]pyrene	252 > 250 [*]	40
	125 > 124	15
	126 > 113	15
Chrysene	228 > 226 [*]	35
	228 > 227	20
	113 > 112	15
Benz[a]anthracene-d ₁₂ (I.S.)	240 > 236	35
Benzo[b]fluoranthene-d ₁₂ (I.S.)	264 > 260	35
Benzo[a]pyrene-d ₁₂ (I.S.)	264 > 260	40
Chrysene-d ₁₂ (I.S.)	240 > 236	35

*定量離子對，定性離子對可視基質情況選擇適合之離子對。

註：1. 所採用之層析管應有效將chrysene及triphenylene分離。

2. 上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.8.2. 可可脂

取空白檢體，依2.7.2.節調製未添加內部標準品之固相萃取匣沖提液，以氮氣吹乾後，分別加入適量正己烷、標準溶液10~100 μ L及內部標準溶液5 μ L，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量

線溶液。依2.8.1.節條件進行分析，就各多環芳香族碳氫化合物與其內部標準品之波峰面積比，與對應之各多環芳香族碳氫化合物濃度，分別製作5~50 ng/mL之基質匹配檢量線。

2.8.3. 肉、肉製品、水產動物製品及嬰幼兒蔬果泥與肉泥副食品

取空白檢體，依2.7.3.節調製未添加內部標準品之淨化後上清液，分別量取4 mL，以氮氣吹乾後，分別加入適量正己烷、標準溶液2~100 μ L及內部標準溶液5 μ L，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液。依2.8.1.節條件進行分析，就各多環芳香族碳氫化合物與其內部標準品之波峰面積比，與對應之各多環芳香族碳氫化合物濃度，製作1~50 ng/mL之基質匹配檢量線。

2.8.4. 嬰幼兒奶粉及穀物類輔助食品

取空白檢體，依2.7.4.節調製未添加內部標準品之固相萃取匣流出液，以氮氣吹乾後，分別加入適量正己烷、標準溶液2~100 μ L及內部標準溶液5 μ L，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液。依2.8.1.節條件進行分析，就各多環芳香族碳氫化合物與其內部標準品之波峰面積比，與對應之各多環芳香族碳氫化合物濃度，分別製作1~50 ng/mL之基質匹配檢量線。

2.8.5. 蜂王乳及含螺旋藻之膳食補充品食品

取空白檢體，依2.7.5.節調製未添加內部標準品之固相萃取匣流出液，以氮氣吹乾後，分別加入適量正己烷、標準溶液5~100 μ L及內部標準溶液5 μ L，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液。依2.8.1.節條件進行分析，就各多環芳香族碳氫化合物與其內部標準品之波峰面積比，與對應之各多環芳香族碳氫化合物濃度，分別製作2.5~50 ng/mL之基質匹配檢量線。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各2 μ L，分別注入氣相層析串聯質譜儀中，依2.8.節條件進行分析，就檢液及基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各多環芳香族碳氫化合物之含量(μ g/kg)：

2.9.1. 食用油脂、可可脂、嬰幼兒奶粉、穀物類輔助食品、蜂王乳及含螺

螺旋藻之膳食補充品食品

$$\text{檢體中各多環芳香族碳氫化合物之含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中各多環芳香族碳氫化合物之濃度(ng/mL)

V：檢液最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

2.9.2. 肉、肉製品、水產動物製品及嬰幼兒蔬果泥與肉泥副食品

$$\text{檢體中各多環芳香族碳氫化合物之含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V}{M} \times F$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中各多環芳香族碳氫化合物之濃度(ng/mL)

V：萃取溶劑之體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：濃縮倍數，由b/a求得(1/4)

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得(≤100%)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

附註：1. 本檢驗方法之定量極限如下：

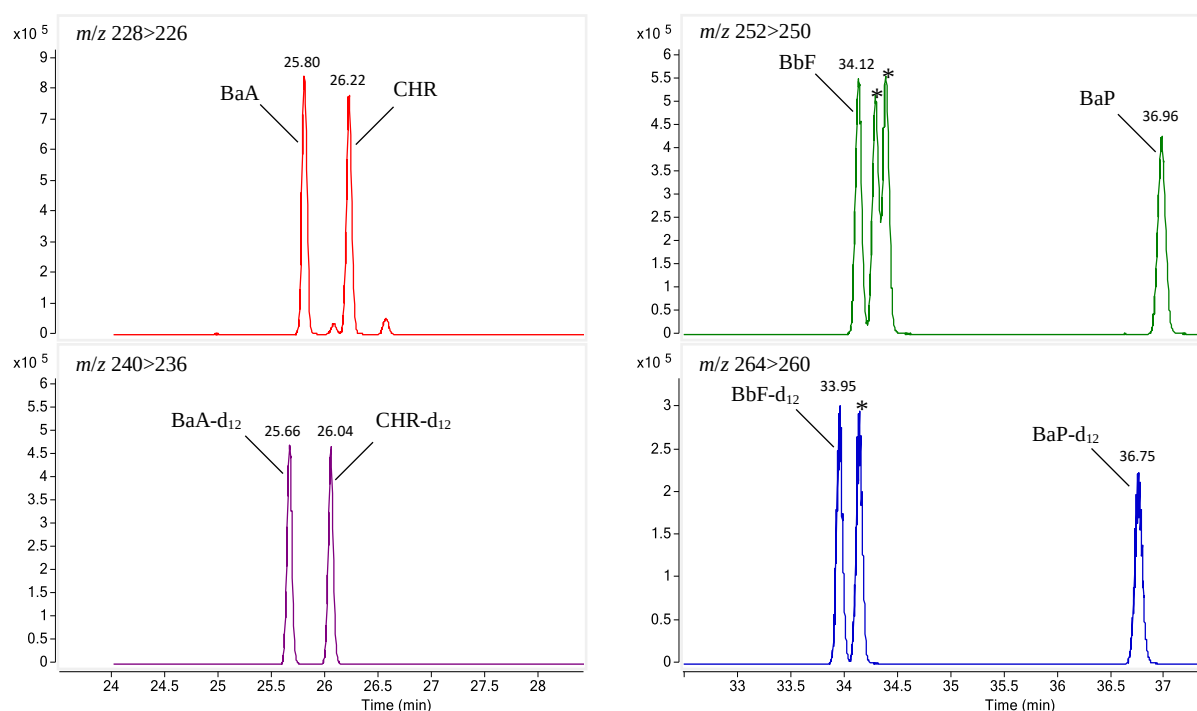
檢體	定量極限(μg/kg)
食用油脂、肉、肉製品、水產動物製品及嬰幼兒蔬果泥與肉泥副食品	0.5
可可脂	2.5
嬰幼兒奶粉及穀物類輔助食品	0.2
蜂王乳及含螺旋藻之膳食補充食品	5

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Forsberg, N. D., Wilson, G. R. and Anderson, K. A. 2011. Determination of parent and substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in high-fat salmon using a modified QuEChERS extraction, dispersive SPE and GC-MS. J. Agric. Food Chem. 59: 8108-8116.
2. Rey-Salgueiro, L., Martínez-Carballo, E., García-Falcón, M. S., González-Barreiro, C. and Simal-Gándara, J. 2009. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. Food Chem. 115: 814-819.
3. Albero, B., Sánchez-Brunete, C. and Tadeo, J. L. 2003. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry. J. AOAC Int. 86: 576-582.

參考層析圖譜



圖、以GC/MS/MS分析benz[a]anthracene、benzo[b]fluoranthene、benzo[a]pyrene及chrysene標準品及其同位素內部標準品之MRM圖譜
*其他多環芳香族碳氫化合物及其內部標準品之層析峰