

醬油及飲料中 4-甲基咪唑及 2-甲基咪唑檢驗方法

Method of Test for 4-Methylimidazole and 2-Methylimidazole in Soy Sauce and Beverages

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於醬油及飲料中 4-甲基咪唑(4-methylimidazole)及 2-甲基咪唑(2-methylimidazole)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經稀釋後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive electrospray ionization, ESI⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Agilent Pursuit 5 PFP, 5 μm ，內徑 4.6 mm \times 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.2. 試藥：甲醇採用液相層析級；甲酸採用試藥特級；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18 M Ω ·cm 以上)；4-甲基咪唑及 2-甲基咪唑對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL、50 mL 及 1000 mL。
 - 2.3.2. 濾膜：孔徑 0.22 μm ，PVDF 材質。
 - 2.4. 移動相溶液之調製：
 - 2.4.1. 移動相溶液 A：

取甲酸 1 mL，加去離子水使成 1000 mL，混勻後，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 A。
 - 2.4.2. 移動相溶液 B：

取甲酸 1 mL，加甲醇使成 1000 mL，混勻後，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 B。
 - 2.5. 標準溶液之配製：

取 4-甲基咪唑及 2-甲基咪唑對照用標準品各約 50 mg，精確稱定，分別以去離子水溶解並定容至 50 mL，作為標準原液，冷藏儲存。臨用時精確量取適量 4-甲基咪唑與 2-甲基咪唑標準原液混合後，以去離子水稀釋至 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，供作標準溶液。

2.6. 檢液之調製：

含二氧化碳之檢體應先以超音波振盪 5 分鐘去除氣泡，取檢體約 1 g，精確稱定，加去離子水混勻並定容至 10 mL，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.7. 基質匹配檢量線製作：

稱取空白檢體各 1 g，分別加入標準溶液 5~500 μL ，以去離子水定容至 10 mL，經濾膜過濾後，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就 4-甲基咪唑及 2-甲基咪唑定量離子之波峰面積與對應之 4-甲基咪唑及 2-甲基咪唑添加濃度，分別製作 0.01~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註1)：

移動相溶液：A 液與 B 液以下列條件進行梯度分析。

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 1.0	98 → 98	2 → 2
1.0 → 2.0	98 → 0	2 → 100
2.0 → 5.0	0 → 0	100 → 100
5.0 → 6.0	0 → 98	100 → 2
6.0 → 10.0	98 → 98	2 → 2

移動相流速：1 mL/min。

注入量：10 μL 。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：4.5 kV。

氣簾氣體(Curtain gas)：10 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：5 psi。

霧化氣體(Gas 1)：50 psi。

加熱氣體(Gas 2)：50 psi。

加熱溫度(Temperature)：500°C。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子、去集簇電壓(declustering potential)及碰撞能量(collision energy)如附表。

註 1：上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 10 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依 2.7 節條件進行分析，就檢液與標準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 2)鑑別之，並依下列計算式求得檢體中 4-甲基咪唑或 2-甲基咪唑之含量(ppm)：

$$\text{檢體中 4-甲基咪唑或 2-甲基咪唑之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得 4-甲基咪唑或 2-甲基咪唑之濃度 (μg/mL)

V：檢體定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註 2：相對離子強度由定性離子與定量離子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均為 0.1 ppm。

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

附表、2-甲基咪唑及4-甲基咪唑之液相層析串聯質譜儀多重反應偵測模式參數

分析物		定量離子對			定性離子對		
英文名	中文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	去集簇電 壓(V)	碰撞能 量(V)	前驅離子(m/z) >產物離子(m/z)	去集簇 電壓(V)	碰撞能 量(V)
2-Methylimidazole	2-甲基咪唑	83 > 42	13	30	83 > 56	13	30
4-Methylimidazole	4-甲基咪唑	83 > 56	13	30	83 > 42	13	44