

免洗筷中殺菌劑鄰苯基苯酚、聯苯、腐絕及依滅列 檢驗方法之探討及建立

蔡雯茹 張美華 鄭嘉珊 曾素香 高雅敏 闕麗卿 施養志

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

有些化合物如鄰苯基苯酚(*o*-phenylphenol, OPP)、聯苯(biphenyl, BP)、腐絕(thiabendazole, TBZ)及依滅列(imazalil, IMZ)具有消毒及防霉的作用，然而，免洗筷若為了防止發霉以延長保存期限而使用此類化合物，將會影響民眾身體健康。本研究以高效液相層析儀配合螢光檢出器(high performance liquid chromatography/fluorescence detector, HPLC/FLD)分析鄰苯基苯酚及聯苯，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)配合多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)模式分析腐絕及依滅列。將免洗筷刨成小片狀後，以乙腈：甲醇(1:1, v/v)溶液經超音波及振盪器振盪萃取，浸漬隔夜，取上清液經濾膜過濾，分別注入HPLC/FLD及LC/MS/MS進行分析，並以標準曲線對鄰苯基苯酚與聯苯及以基質匹配檢量線對腐絕與依滅列進行定量。免洗筷添加回收試驗中，其平均回收率介於81-121%之間，變異係數介於0.17-12.6%之間。本方法之定量極限聯苯及鄰苯基苯酚均為0.05 ppm，腐絕及依滅列均為0.02 ppm。以建立之方法檢測市售10件免洗筷檢體，結果上述4種化合物皆未檢出。本檢驗方法已公開於本署建議檢驗方法網頁，提供相關衛生檢驗、限量標準制定之參考依據。

關鍵詞：免洗筷、鄰苯基苯酚、聯苯、腐絕、依滅列、高效液相層析儀、液相層析串聯質譜儀

前言

鄰苯基苯酚(*o*-phenylphenol, OPP)、聯苯(biphenyl, BP)、腐絕(thiabendazole, TBZ)及依滅列(imazalil, IMZ)為廣泛用於柑橘類的殺菌劑(fungicide)，可以防止水果發霉以延長保存期限⁽¹⁾。在亞洲以米飯為主食之國家，筷子為主要餐具之一，隨著社會發展家庭生活型態改變，上班族及外食族群增加，免洗筷具有成本低、使用後即可丟棄、不必與他人重複使用之優點，因此使用量大增，但若產品水分太高或存放環境潮濕會發現竹筷長霉情形，故竹筷製

造商可能添加此類化合物來防止產品發霉，日本調查曾於竹筷中檢出鄰苯基苯酚殘留⁽²⁾。

為保障民眾食的衛生安全，本署訂定免洗筷衛生標準，規定免洗筷不得有不良變色、異臭、異味、污染、發霉、蟲蛀、含有異物或纖維剝落，二氧化硫殘留量500 ppm以下、過氧化氫及聯苯不得檢出；而日本及中國除了訂立上述化合物的規範外，還制定鄰苯基苯酚、腐絕及依滅列的衛生標準，日本標準針對腐絕等4種化合物均不得檢出，中國則4種化合物殘留量均需10 ppm以下。

檢驗此類殺菌劑的方法大多是建立在檢測

水果中的殘留量，其檢驗方法有以單株抗體檢驗腐絕的酵素免疫分析法⁽³⁾、樣品經固相萃取後以高效液相層析儀分析鄰苯基苯酚及腐絕⁽⁴⁾、以氣相層析質譜儀(gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)檢測鄰苯基苯酚⁽⁵⁾亦或是採用最新的QuEChERS技術處理樣品後以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)分析依滅列及腐絕等⁽⁶⁾。然而，針對免洗筷中檢驗這些品項的相關文獻極少，目前僅有日本及大陸兩國的文獻可參考^(2,7)。日本船山惠市等人⁽²⁾檢驗鄰苯基苯酚、聯苯及腐絕之檢測儀器是採用液相層析/螢光檢出器(high performance liquid chromatography/fluorescence detector, HPLC/FLD)，檢驗依滅列則是採用液相層析/紫外光檢出器(high performance liquid chromatography/ultraviolet detector, HPLC/UV)，該方法標準品之定量極限鄰苯基苯酚、腐絕為0.05 ppm、依滅列為0.2 ppm、聯苯為0.5 ppm。大陸⁽⁷⁾檢測此4品項皆以HPLC/UV進行檢測，此方法之定量極限腐絕、鄰苯基苯酚及聯苯為1 ppm，依滅列為5 ppm。現行台灣僅制定聯苯的衛生標準，故只有聯苯的公告檢驗方法，本篇研究為了因應邊境檢驗腐絕、鄰苯基苯酚及依滅列的需求，參考上述文獻研究，擬依據化合物特性、選擇準確性及靈敏度高之偵測方式，建立竹筷中此4種化合物之最佳檢驗方法，提供免洗筷衛生管理需求之檢驗方法的依據。

材料與方法

一、材料

10件免洗筷檢體係購自台北地區便利商店及大賣場。聯苯、鄰苯基苯酚及腐絕對照用標準品購自德國Riedel-de Haen公司，依滅列對照用標準品購自美國Fluka公司。乙腈及甲醇採用LC級，購自德國Merck公司，醋酸銨純度為試藥級，購自美國Sigma-Aldrich公司。

二、儀器設備

本實驗使用高效液相層析儀Hitachi設備配置DG2410除氣器、L-2130三相溶媒輸送系統、L-2200自動注射器、L-2480螢光檢出器及EZ Chrom Elite資料處理系統(L-2480, Hitachi Ltd., Japan)。液相層析串聯質譜儀Waters Quattro Premier XE搭配Acquity UPLC液相層析系統(Quattro Premier, Waters Corp., USA)。超音波振盪器(DC300H，原拓科技公司，台灣)。振盪器(GENIE-2, Scientific Industries Inc., USA)。離心機(Allegra[®] 25R centrifuge, Beckman Coulter Inc., USA)。

三、實驗方法

(一)高效液相層析儀分析條件

層析管柱為GL Sciences InertSustain C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)；移動相為乙腈：去離子水：甲醇(45:40:15, v/v/v)；移動相流速1 mL/min；管柱溫度30°C；激發波長250 nm，發射波長330 nm；注射體積20 μL。

(二)液相層析串聯質譜儀分析條件

層析管柱為Atlantis[®] T3 (2.1 mm×10 cm, 3 μm)；移動相為(A) 5 mM醋酸銨溶液：甲醇 = 9:1 (v/v)，(B) 5 mM醋酸銨溶液：甲醇 = 1:9 (v/v)進行表一梯度沖提；移動相流速0.25 mL/min；管柱溫度30°C；注射體積10 μL；離子化模式為電灑離子化正離子(ESI⁺)；毛細管電壓為3.4 KV；進樣錐電壓為34 V；游離源溫度為100°C；溶媒揮散溫度為350°C；進樣錐氣體流速為50 L/hr；溶媒揮散流速為850 L/hr；多重反應偵測模式見表二。

表一、梯度分析條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
1.5	0	100
5.0	0	100
5.1	90	10
8.0	90	10

表二、腐絕及依滅列之多重反應偵測模式條件

分析物	電灑離子化模式	離子對		進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
		前驅離子(m/z)	>產物離子(m/z)		
腐絕	ESI ⁺	202	> 175 ^a 202 > 131	28	25 30
依滅列	ESI ⁺	297	> 159 ^a 297 > 410	32	22 25

a. 定量離子對

(三) 檢液之調製

將檢體以刀片刨成小於1 mm薄片，再剪成長度小於0.5 cm的條狀，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入乙腈：甲醇(1:1, v/v)溶液10 mL，以超音波振盪15分鐘，再以振盪器振盪10分鐘，浸漬隔夜後，以1,500 × g離心10分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。聯苯及鄰苯基苯酚取檢液直接以HPLC/FLD分析，腐絕及依滅列則取檢液500 μL，加入乙腈：甲醇(1:1, v/v)溶液500 μL，混合均勻後以LC/MS/MS分析。

(四) 標準原液之配置

取聯苯、鄰苯基苯酚、腐絕及依滅列對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至100 mL，作為標準原液，於-18°C避光貯存。

(五) 標準曲線之配置

聯苯及鄰苯基苯酚分別取適量標準原液混合後，以乙腈：甲醇(1:1, v/v)溶液稀釋至0.005-0.1 μg/mL，供作標準溶液，注入高效液相層析儀中以螢光檢出器進行檢測。

(六) 基質匹配檢量線之配製

取空白檢體，依檢液之調製方式調製空白檢液，分別量取500 μL (a)，加入腐絕及依滅列0.05 μg/mL標準溶液20-200 μL，再加入乙腈：甲醇(1:1, v/v)溶液使成1000 μL (b)，混合均勻，注入液相層析質譜儀進行檢測。就腐絕及依滅列之波峰面積，與對應之濃度，分別製作0.001-0.01 μg/mL之基質匹配檢量線。

(七) 鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液、聯苯及鄰苯基苯酚標準溶液20 μL注入高效液相層析儀，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中聯苯或鄰苯基苯酚之含量(ppm)：

$$\text{檢體中聯苯或鄰苯基苯酚之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中聯苯或鄰苯基苯酚之濃度(μg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

精確量取檢液、腐絕及依滅列標準溶液10 μL分別注入液相層析串聯質譜儀，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鑑別之，並依下列計算式求出檢體中腐絕或依滅列之含量(ppm)：

$$\text{檢體中腐絕或依滅列之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中腐絕或依滅列之濃度(μg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由b/a求得

(八) 添加回收試驗

取空白檢體1 g，加入各標準品使腐絕濃度為0.01、0.2及0.4 ppm，依滅列為0.02、0.2及0.4 ppm，聯苯及鄰苯基苯酚為

0.05、0.2及0.4 ppm，依檢液調製流程操作，供作檢液進行分析，並與添加濃度比較，計算平均回收率及變異係數。

(ii)最低定量濃度(Limit of Quantification, LOQ)

取混合標準溶液分別進行樣品之一系列添加回收試驗，依前述方法進行分析，就所得分析物波峰或定量離子波峰訊號強度之訊噪比(S/N ratio)10：1時之濃度作為檢驗方法之定量極限(LOQ)。

結果與討論

一、萃取溶劑之選擇

參考本署公告「免洗筷中聯苯之檢驗方法」⁽⁸⁾採用乙腈萃取的前處理方式，測試結果，腐絕及依滅列之回收率僅50-70%，推測腐絕及依滅列較聯苯的極性高，導致乙腈萃取此2化合物的效率較差。進而參考日本⁽²⁾採用較具極性的甲醇作為萃取溶劑進行測試，回收率可改善至80%，但由於甲醇會萃取出過多極性物質，導致判讀滯留時間短的腐絕及鄰苯基苯酚之波峰較為困難，最後改採乙腈：甲醇(1:1, v/v)溶液為萃取溶劑，對此4個品項既可得到好的回收率也不致萃出過多極性物質。

二、高效液相層析移動相的選擇

參考Nakazato等人研究⁽⁹⁾其移動相為乙腈：甲醇：去離子水(47:13:40, v/v/v)溶液，調整移動相中乙腈及甲醇比例，經測試後以乙腈：甲醇：去離子水(45:15:40, v/v/v)溶液為移動相為較合適組成，可以避免9分鐘前免洗筷樣品基質的訊號干擾，且於30分鐘內完成分析(表三)。

三、高效液相層析檢測波長的選擇

經由全波長掃描，鄰苯基苯酚最適激發波長為250 nm，放射波長為343 nm，而聯苯最適激發波長為254 nm，放射波長為316 nm，對於只能設定單一激發及放射波長之螢光檢測器，

表三、移動相中有機溶劑組成對鄰苯基苯酚及聯苯滯留時間影響

乙腈：甲醇：水 (v/v/v)	滯留時間(min)	
	鄰苯基苯酚	聯苯
70:30:00	5.1	10.9
50:10:40	8.9	24.2
47:13:40	9.5	26.0
45:15:40	9.5	26.5
50:15:35	7.4	18.4
60:10:30	5.6	17.0
0:70:30	8.9	31.4

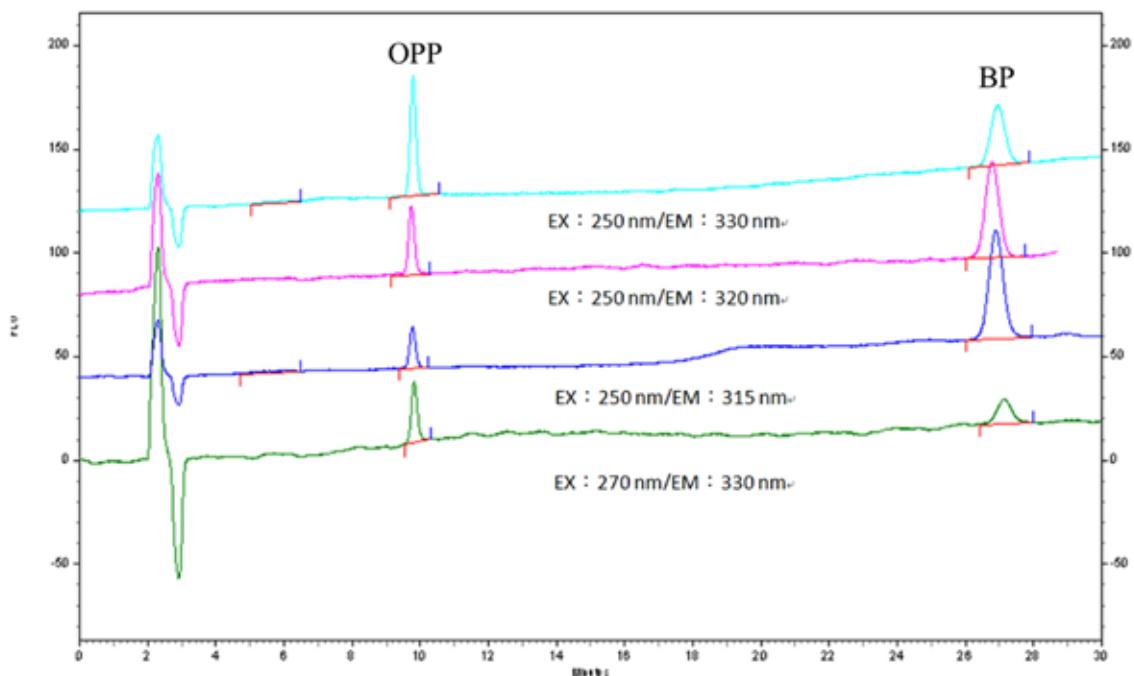
必需探討適當的激發及放射波長以兼顧二者之靈敏度需求，圖一顯示於激發波長250 nm，放射波長330 nm下，聯苯感度受影響不大，但鄰苯基苯酚感度可明顯提高。

四、液相層析串聯質譜法分析條件探討

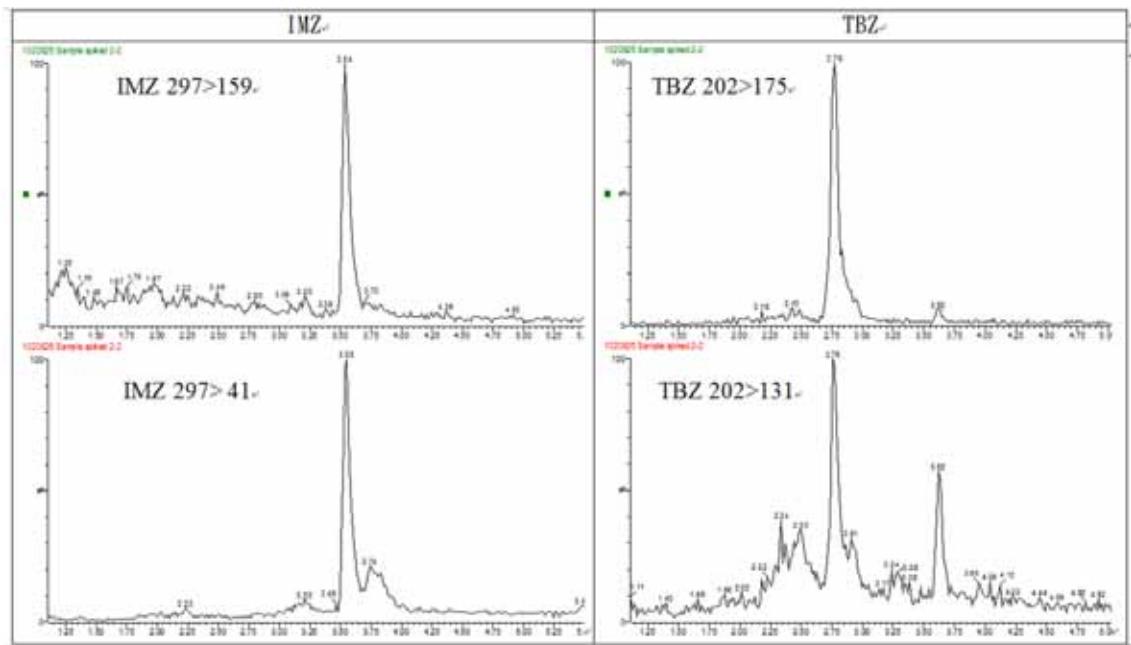
本研究方法參考本署公告方法「食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法(五)」⁽¹⁰⁾中分析項目之一的腐絕，係採用液相層析串聯質譜儀分析法，並以公告方法中Atlantis[®] T3管柱及5 mM醋酸銨水溶液與甲醇為移動相作分析，僅層析梯度稍作調整，腐絕的滯留時間為2.7分鐘，依滅列為3.5分鐘，8分鐘內即可以完成分析(圖二)。

五、基質效應之評估

分別製作標準曲線及基質匹配檢量線，以斜率評估基質效應，標準曲線係由溶於甲醇：乙腈(1:1, v/v)溶液之0.005-0.2 µg/mL標準溶液所製作，另取空白竹筷依檢液調製流程以甲醇：乙腈(1:1, v/v)溶液之萃取液，後添加標準品配製成0.005-0.2 µg/mL之基質匹配檢量線，結果如表四，標準曲線及基質匹配檢量線之線性回歸方程式之 r^2 值皆在0.995以上，顯示於該濃度範圍內之線性關係良好。基質效應評估結果顯示，腐絕以LC/MS/MS分析時有明顯的基質抑制，依滅列、鄰苯基苯酚及聯苯則基質效



圖一、鄰苯基苯酚(OPP)及聯苯(BP)標準品在10 ppb下不同激發及放射波長之層析圖



圖二、以LC/MS/MS分析空白檢體中添加依滅列(IMZ)及腐絕(TBZ)之多重反應偵測層析圖譜

應不明顯，故在LC/MS/MS分析腐絕時應製作基質匹配檢量線。

六、方法確效實驗

以建立之方法進行三重複添加回收試驗及

表四、基質效應之評估

分析物	標準曲線(SCC)		基質匹配檢量線(MCC)		基質效應 ^a (%)
	斜率 (slope)	決定係數 (r^2)	斜率 (slope)	決定係數 (r^2)	
聯苯	124,780	0.999	120,574	0.999	-3.4
鄰苯基苯酚	185,702	0.997	177,454	0.998	-4.4
腐絕	5,831.92	0.998	2,591.73	0.999	-55.6
依滅列	1,871.58	0.998	1,894.96	0.999	1.2

a. 基質效應 = (MCC 之斜率-SCC 之斜率)/SCC 之斜率 × 100%

空白試驗，加入各標準品使腐絕濃度為0.01、0.2及0.4 ppm，依滅列為0.02、0.2及0.4 ppm，聯苯及鄰苯基苯酚均為0.05、0.2及0.4 ppm，各化合物添加回收結果詳(表五)，平均回收率介於81-121%之間，變異係數介於 0.2-12.6%之間，顯示此方法回收率良好且重複性佳。以定量離子或分析物之訊噪比大於10之最低濃度為檢驗方法之定量極限，腐絕及依滅列之LC/MS/MS檢驗方法之定量極限為0.02 ppm，而聯苯及鄰苯基苯酚之HPLC檢驗方法之定量極限為0.05 ppm。

表五、免洗筷中腐絕、依滅列、鄰苯基苯酚及聯苯之添加回收率

分析物	添加濃度 (ppm)	回收率 ^a (%)	變異係數 (%)
聯苯	0.05	117	11.0
	0.20	81	12.6
	0.40	104	7.8
鄰苯基苯酚	0.05	101	9.5
	0.20	82	8.6
	0.40	100	4.3
腐絕	0.01	103	0.8
	0.20	105	2.1
	0.40	117	1.3
依滅列	0.02	121	0.2
	0.20	94	0.7
	0.40	101	0.9

a. n = 3

七、市售免洗筷之檢驗

本署曾於97年調查25件進口免洗筷檢體聯苯含量，產地分別來自中國大陸、越南及印尼，檢測結果聯苯均未檢出。利用已建立之方法進行10件市售免洗筷抽樣檢體之檢驗，調查結果皆未檢出腐絕、依滅列、聯苯及鄰苯基苯酚。本篇免洗筷中腐絕、依滅列、鄰苯基苯酚及聯苯之分析方法，靈敏度均較中國大陸及日本方法高，對照於日本不得檢出腐絕等化合物之衛生要求，更能符合國際法規之需求。本研究已研擬完成「免洗筷中腐絕及依滅列之檢驗方法」及「免洗筷中鄰苯基苯酚及聯苯之檢驗方法」，並公開於本署建議檢驗方法網頁，提供作為邊境進口免洗筷持續監測之檢驗方法依據。

參考文獻

- Ito, Y., Goto, T., Oka, H. and et. al. 2003. Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil, and o-phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 51: 861-6.
- 船山惠市、金子令子、羽石奈穂子等人。2004。割りばし中防かび剤の溶出傾向の検討。東京健安研セ年報，55: 117-22。
- Brandon, D. L., Binder, R. G., Bates, A. H. and et. al. 1995. Competitive ELISA of

- thiabendazole residues in produce using indirectly immobilized monoclonal antibodies. *Food Agric. Immunol.* 7: 99-108.
4. Martinez Galera, M., Picon Zamora, D., Martinez Vidal, J. L. and *et. al.* 2003. Determination of carbendazim, thiabendazole and fuberidazole using a net analyte signal-based method. *Talanta.* 59: 1107-16.
5. Yu, L., Schoen, R., Dunkin, A. and *et. al.* 1997. Rapid identification and quantitation of diphenylamine, *o*-phenylphenol, and propragite pesticide residues on apples by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 45: 748-52.
6. Dasika, R., Tangirala, S. and Naishadham, P. 2012. Pesticide residue analysis of fruits and vegetables. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 4: 19-28.
7. 中華人民共和國國家質量監督檢驗檢疫總局，中國國家標準化管理委員會。2005。一次性筷子。中華人民共和國國家標準 GB19790.2。
8. 衛生福利部。2012。免洗筷中聯苯之檢驗方法。102.09.06部授食字第1021950329號公告。
9. Nakazato, M., Tadano, K., Ogaw, H. and *et. al.* 1995. Determination of imazalil, diphenyl, thiabendazole and *o*-phenylphenol in citrus fruits, and of imazalil and thiabendazole in banana, by high performance liquid chromatography. *Japanese J. Toxicol. Environ.* 41: 392-7.
10. 衛生福利部。2012。食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析方法(五)。102.09.06部授食字第1021950329號公告。

Investigation and Establishment on the Test Method for *O*-phenylphenol, Biphenyl, Thiabendazole and Imazalil in Disposable Chopsticks

WEN-JU TSAI, MEI-HUA CHANG, CHIA-SHAN TSOU,
SU-HSIANG TSENG, YA-MIN KAO, LIH-CHING CHIUEH
AND DANIEL YANG-CHIH SHIH

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

Compounds such as *o*-phenylphenol, biphenyl, thiabendazole and imazalil have disinfection and anti-mildew functions. However, there are health concerns with the above compounds being used in disposable chopsticks to prevent mold and thus extend shelf-life. In this study the analytical method used for biphenyl and *o*-phenylphenol was the high performance liquid chromatography/fluorescence detector (HPLC/FLD), while for thiabendazole and imazalil, the liquid chromatography/tandem mass spectrometer (LC/MS/MS) with multiple reaction monitoring was applied. Chopsticks were sliced into pieces, added with acetonitrile: methanol (1:1, v/v) solution and then extracted with a sonicator and a vortex mixer and soaked overnight. The supernatant was filtered with a membrane filter and analyzed by HPLC/FLD and LC/MS/MS individually. The levels of compounds were quantitated by standard curves for *o*-phenylphenol, biphenyl and matrix-matched calibration curves for thiabendazole and imazalil. Recovery studies were done with fortification at difference concentration of standards. The average recoveries ranged from 81 to 121%, with the coefficients of variation (CVs) ranging from 0.17 to 12.6%. The limits of quantification have been estimated as 0.05 ppm for biphenyl and *o*-phenylphenol and 0.02 ppm for thiabendazole and imazalil. Based on our established method, none of the above 4 compounds was detected in the 10 disposable chopstick samples collected from the market. This method has been published on TFDA website, which provides reference for sanitary inspection and establishing the limit standard.

Key words: isposable chopsticks, *o*-phenylphenol, biphenyl, thiabendazole, imazalil, high performance liquid chromatography, liquid chromatography/tandem mass spectrometry