

食品中乙烯二胺四醋酸二鈉鈣檢驗方法之探討

蕭鴻偉 郭景豪 吳冠彥 林勇偉 蔡佳芬 曾素香 闕麗卿 施養志

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

本研究建立以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)利用負離子電灑法以多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)分析食品中乙烯二胺四醋酸二鈉鈣(calcium disodium ethylenediaminetetraacetic acid)。取均質後之食品以去離子水20 mL於超音波振盪萃取，離心後上清液經濾膜過濾，取濾液0.5 mL與0.01M氯化鐵溶液0.5 mL混勻後靜置5分鐘，使用Acquity UPLC BEH Phenyl管柱，以含5 mM三正丁胺之甲醇及水溶液為移動相溶液進行梯度沖提，再以串聯質譜儀分析。添加乙烯二胺四醋酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt)於空白布丁及沙拉醬中，濃度為20及40 ppm進行回收試驗，其回收率為94-105%，變異係數小於2%。應用本方法進行市售食品之檢驗，共計31件之檢驗，檢體之乙烯二胺四醋酸二鈉鈣檢出範圍則為未檢出-2218.4 ppm，本方法將可提供檢測之參考。

關鍵詞：乙烯二胺四醋酸、液相層析串聯質譜儀

前 言

乙烯二胺四醋酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)為結構對稱且穩定的含氮化合物，分子式為(C₁₀H₁₆N₂O₈)，化學式為(CH₂COOH)₂N-(CH₂)₂-N(CH₂COOH)₂，難溶於水，但其鹽類則易溶於水，是一種常用的螯合劑(chelating agent)，可解離出四個H⁺，螯合能力很強，故在食品、藥品都可以看到乙烯二胺四醋酸的相關應用。

根據我國食品添加物使用範圍及限量暨規格標準，依其使用目的，乙烯二胺四醋酸分別列屬第三、七及八類。作為抗氧化劑，使用於為防止油脂氧化而引起變味之食品，其用量為0.10 g/kg以下(以食品重量計)；作為品質改良用、釀造用及食品製造用劑，用量以乙烯二胺

四醋酸二鈉鈣計，在非酒精性飲料為25 ppm以下，熱殺菌包裝食品為250 ppm以下，乳化食品及複合維生素調製品為150 ppm以下，於防止褐變之食品為350 ppm以下(以乾重計)；作為營養添加劑，可使用於一般食品中以補充不足之營養素，乙烯二胺四醋酸鐵鈉在每日食用量中或每300 g食品(未標示每日食用量者)中，其鐵之總含量不得高於22.5 mg，其EDTA之總含量不得高於75 mg，但限於補充食品中不足之營養素時使用，且尚未准予用於嬰兒(輔助)食品⁽¹⁾。故本方法將以乙烯二胺四醋酸二鈉鈣為計量目標。

Cagnasso等人(2007)⁽²⁾以高效液相層析儀搭配UV檢出器檢測非酒精性飲料中乙烯二胺四醋酸的含量，樣品前處理方式主要以乙腈萃取，離心後取上清液，再與相同體積的FeCl₃

溶液進行螯合，經濾膜過濾後以HPLC分析，線性範圍為1-20 mg/L，萃取方式簡單，分析時間10分鐘。

Krokidis等人(2005)⁽³⁾以離子層析儀搭配抑制型電導度檢出器(suppressed conductivity detector)以及陰離子交換管柱，檢測罐頭食品及美乃滋中乙烯二胺四醋酸之含量。以美乃滋為例，先以水混和並加熱，過濾後再以苯萃取，以去除美乃滋之脂質，其回收率介於74-108%。

Quintana及Reemtsma (2007)⁽⁴⁾與楊及魏(2012)⁽⁵⁾均以液相層析串聯式質譜儀分析食品中乙烯二胺四醋酸。Quintana及Reemtsma採用之樣品前處理方式僅需將樣品與氯化鐵溶液、醋酸混和，即可上機分析。楊及魏則選擇氯化鐵溶液作為螯合試劑，再經固相萃取去除非目標物。

在Cagnasso的方法中，分析圖譜會有一明顯干擾波峰，研判是螯合後的副產物；離子層析儀搭配抑制型電導度檢出器尚無法針對檢測標的物而確認之功能，且為考量檢驗方法之與時俱進，本研究擬以液相層析串聯質譜儀進行食品中乙烯二胺四醋酸二鈉鈣之檢驗方法探討，並將方法進一步提供各界參考引用。

材料與方法

一、檢體來源

於102年3至7月及103年5月間，本署於臺北地區各大賣場價購原料布丁粉2件、果凍布丁類5件、罐頭2件、沙拉醬18件及塗抹醬類4件，共計31件。

二、試藥

甲醇及乙腈均採用液相層析級；三正丁胺(tributylamine)及氯化鐵(ferric chloride)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；乙烯二胺四醋酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate, EDTANa₂·2H₂O)對照用標準品。

三、器具

微孔濾頭(syringe filter)採用耐龍材質，13 mm，孔徑為0.22 mm。50 mL塑膠離心管採用PP材質。

四、儀器設備

液相層析串聯質譜儀(Acquity™ with Waters Micromass Quattro Premier XE, Waters Co., Milford, MA, USA)。純水製造機(Milli-Q SP Advantage A10 System, Millipore Ltd., Bedford, MA, USA)。旋渦混合器(Type 37600 mixer, Thermolyne Co., Dubuque, IA, USA)。超音波振盪器(DC300H, DELTA, Taiwan)。離心機(Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)。

五、乙烯二胺四醋酸二鈉標準溶液之配製

取乙烯二胺四醋酸二鈉對照用標準品約100 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至100 mL，作為標準原液，冷藏貯存。臨用時取適量標準原液，以去離子水稀釋至0.1-2 mg/mL。各取0.5 mL，加0.01 M氯化鐵溶液0.5 mL，混勻後，於室溫反應5分鐘，以濾膜過濾，供作標準溶液。

六、檢液之調製

精確稱取檢體0.2 g，加去離子水20 mL，旋渦振盪30秒^(註1)，再以超音波振盪30分鐘，以5000×g離心5分鐘後，經濾膜過濾，取上清液0.5 mL，加0.01 M氯化鐵溶液使成1 mL，混勻後靜置5分鐘，供作檢液。

註：1.針對高糖的樣品可使用50%乙腈溶液20 mL進行萃取。

七、液相層析串聯質譜分析測定條件

(一)液相層析儀

層析管：Acquity UPLC BEH Phenyl，1.7 mm，內徑2.1 mm×100 mm

表一、液相層析移動相梯度

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0.0	95	5
1.0	95	5
5.0	80	20
5.1	70	30
7.1	70	30
7.2	95	5
10.2	95	5

A: methanol / 5 mM tri-*n*-butylamine (1.0 : 9.0, v/v)B: methanol / 5 mM tri-*n*-butylamine (9.5 : 0.5, v/v)

移動相溶液：移動相梯度如表一

A液：甲醇/5 mM三正丁胺(1.0 : 9.0, v/v)

B液：甲醇/5 mM三正丁胺(9.5 : 0.5, v/v)

移動相流速：0.2 mL/min

注入量：5 mL

(二)串聯質譜儀

離子源：電灑法負離子模式(negative ion electrospray ionization, ESI)

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.4 kV

離子源溫度(Ion source temperature)：110°C

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：400°C

溶媒揮散氣體流速(Desolvation gas flow)：500 L/hr

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)，其分析參數詳表二

八、標準曲線之製作

取乙烯二胺四醋酸二鈉標準溶液進行LC/MS/MS分析，以波峰面積對濃度作圖，繪製成標準曲線。

九、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各5 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，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鑑別之^(註1)，並依下列計算式求出檢體中乙烯二胺四醋酸二鈉鈣之含量(ppm)：

檢體中乙烯二胺四醋酸二鈉鈣之含量

$$(\text{ppm}) = \frac{C \times V \times 1.10}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中乙烯二胺四醋酸二鈉之濃度(mg/mL)

V：萃取檢體之溶液體積(20mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

1.10：乙烯二胺四醋酸二鈉換算成乙烯二胺四醋酸二鈉鈣之轉換因子

註1：相對離子強度由2組離子對之波峰面積比而得($\leq 100\%$)。

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

十、添加回收試驗

於空白布丁及沙拉醬檢體中添加乙烯二胺四醋酸二鈉標準溶液，使其檢體濃度為20及40 ppm，依檢液之調製流程操作，供作檢液，以LC/MS/MS進行分析，同時進行空白試驗，以檢液所得滯留時間及面積，分別與標準溶液比較鑑別並定量之，依下列計算式求出回收率。

檢體中各添加濃度之回收率(%) =

$$\frac{C_f \times C_u}{C_a} \times 100\%$$

表二、質譜儀之分析參數

分析物	定量			定性		
	偵測離子(m/z)	進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)	偵測離子(m/z)	進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
NaFe EDTA	344 > 300	23	14	344 > 256	23	18

C_f ：由標準曲線求得添加試驗之檢體中乙二胺四醋酸二鈉濃度(ppm)

C_u ：由標準曲線求得空白檢體中乙二胺四醋酸二鈉濃度(ppm)

C_a ：添加之乙二胺四醋酸二鈉濃度(ppm)

十一、基質效應(matrix effect)評估

基質效應評估係以下列方式建立檢量線，並依基質效應計算公式評估之：

(一)標準曲線(standard calibration curve, SCC)：取0.1、0.2、0.4、1.0及2.0 mg/mL標準溶液，隨後等比例加0.01 M氯化鐵溶液稀釋至0.05-1.0 mg/mL。

(二)基質匹配檢量線(matrix-matched calibration curve, MCC)：分別量取空白檢液500 mL，分別加入4 mg/mL標準溶液25-500 mL，再加入去離子水至1000 mL混合均勻，使其濃度為0.1、0.2、0.4、1.0及2.0 mg/mL。

(三)基質效應計算公式如下：

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

十二、定量極限之評估

取經均質之空白檢體，精確稱定，加入適當標準溶液，依所建立之方法製備檢液並以LC/MS/MS分析，就所得波峰之訊號強度

計算其訊噪比(S/N ratio)，LC/MS/MS以定性離子訊噪比大於3且定量離子訊噪比大於10之最低濃度為檢驗方法之定量極限(limit of quantification, LOQ)。

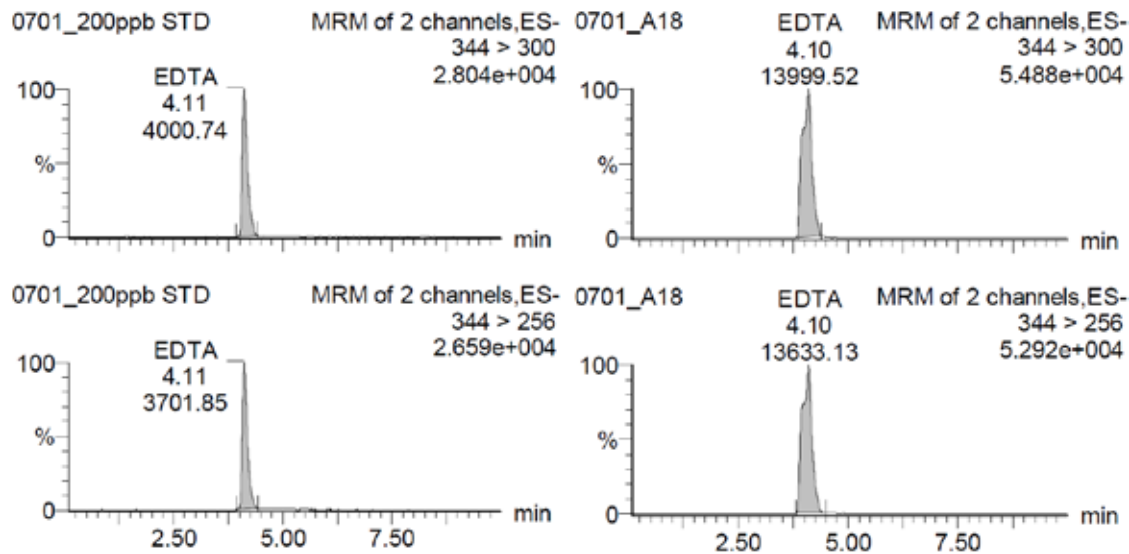
結果與討論

一、液相層析串聯質譜分析參數

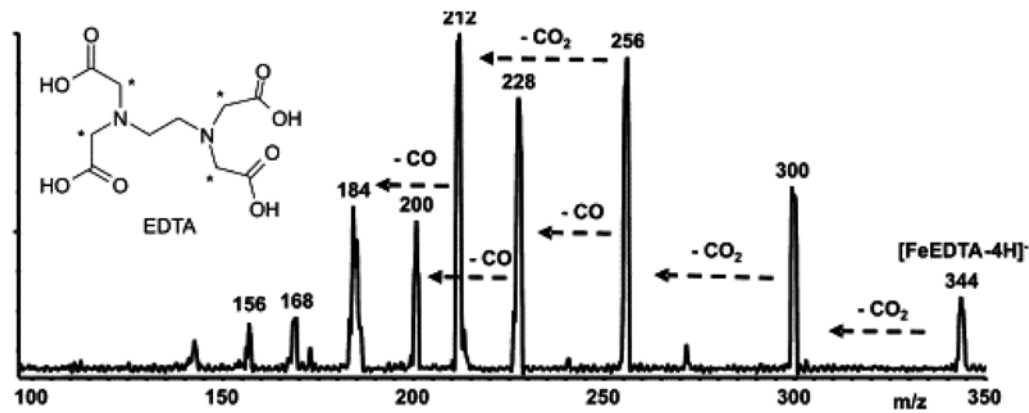
本研究以電噴灑離子化(electron spray ionization, ESI)，負離子模式進行偵測，藉由改變毛細管電壓(capillary voltage)、去溶劑(desolvation)溫度及氣體流速、樣品錐(sample cone)電壓及碰撞能量(collision energy)等，使分析物的前驅離子(precursor ion)及產生之產物離子(product ion)具最大之偵測感度，表三為本研究所設定的質譜儀參數。由前驅離子形成的碎片中，挑選具分子特異性且訊號較強之產物離子作為MRM偵測離子，以訊號較強的產物離子進行定量，並以訊號次高之產物離子做為定性確認。乙二胺四醋酸鈉鐵前驅離子為 m/z 344，產物離子選定 m/z 300與 m/z 256，其mass transition即為 m/z 344 > 300及 m/z 344 > 256，分別為定量離子對與定性離子對(圖一)。前驅離子依Quintana及Reemtsma⁽⁴⁾之評估結果應為[Fe EDTA-4H]⁻，其 m/z 為344，依序丟失[-CO₂]⁻後得到 m/z 300與 m/z 256之產物離子(圖二)。依據歐盟之鑑別規定，LC-MS/MS鑑別系統必須包含1個母離子(1 IP)及2個子離子(1.5×2=3 IPs)，獲得4 IPs才屬有效鑑別。本

表三、乙二胺四醋酸鈉鐵之質譜儀參數

Source (ESI+)	Settings	Analyzer	Settings
Capillary (kV)	3.0	LM1 resolution	13.0
Extractor (V)	3.0	HM1 resolution	13.0
RF lens (V)	0.0	Ion energy 1	1.0
Source temp. (°C)	120.0	Entrance	1.0
Desolvation temp. (°C)	500.0	Exit	1.0
Cone gas flow (L/hr)	50.0	LM2 resolution	13.0
Desolvation gas flow (L/hr)	700.0	HM2 resolution	13.0
		Ion energy 2	1.0



圖一、溶劑中(A)及基質中(B) 乙烯二胺四醋酸鈉鐵之MRM圖譜



圖二、乙烯二胺四醋酸鈉鐵之MRM圖譜⁽⁴⁾

研究符合該規定，且於10.2分鐘內即可完成分析。

二、標準曲線之測定

乙烯二胺四醋酸二鈉標準品濃度在LC/MS/MS偵測所繪製之標準曲線回歸方程式如表四，以加權方式(calibration weighting

function 1/X)進行線性迴歸，標準曲線範圍0.05-1 µg/mL，其相關係數(R)可達0.9993以上，顯示其濃度與積分面積具有良好線性關係。

三、回收試驗及重複性試驗

以空白布丁及沙拉醬進行乙烯二胺四醋

表四、乙烯二胺四醋酸鈉鐵於 LC/MS/MS 之線性範圍測定

Compound	Linear range (mg/mL)	y = ax + b	R
乙烯二胺四醋酸鈉鐵	0.05-1	y = 776.51x + 48.71	0.9993

表五、添加乙烯二胺四醋酸二鈉於布丁及沙拉醬之回收率

Matrix	Spiked level (ppm)	Recovery* (CV, %)
布丁	20	94.0 - 96.6 (1.7)
	40	101.0 - 103.4 (1.4)
沙拉醬	20	99.0 - 100.0 (0.1)
	40	95.5 - 105.0 (1.9)

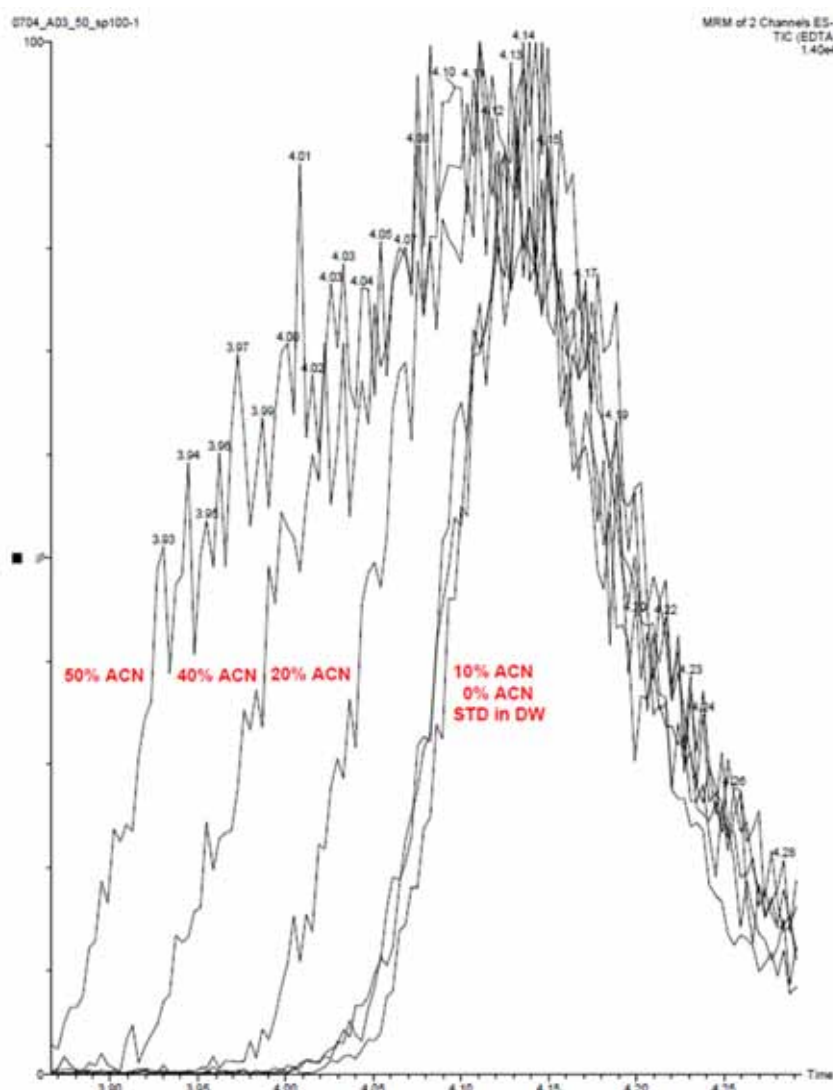
*n=3

酸二鈉之添加回收試驗，添加濃度為20及40 ppm，其回收率分別為94.0-96.6%及101.0-

103.4%，變異係數分別為1.7及1.4% (表五)，顯示方法之準確性及重複性良好。

四、萃取及螯合條件

參考Cagnasso等人(2007)⁽²⁾之前處理流程，並針對其萃取溶劑乙腈之濃度進行探討，以添加固定濃度NaFe EDTA之布丁分別以0、10、20、40及50%乙腈溶液進行萃取後，以LC/MS/MS分析之。結果顯示，隨乙腈的濃度增加，NaFe EDTA的波峰亦隨之變化(圖三)，顯示乙腈濃度影響層析管柱之層析效果，而其



圖三、以不同濃度乙腈萃取乙烯二胺四醋酸鈉鐵之MRM層析圖

中0%、10%及標準品的波峰無明顯差異。然應用於高糖分樣品之萃取時，其水萃液於濾膜過濾時略有困難。因此針對高糖分的樣品，則使用50%乙醇溶液萃取，以利後續過濾流程。參考Cagnasso等人(2007)⁽²⁾及楊及魏(2012)⁽⁵⁾之螯合條件，取經萃取之濾液，加0.01 M 氯化鐵溶液進行螯合，再經混勻、靜置及過濾後，進行乙二胺四醋酸鈉鐵分析，其添加回收試驗有良好之準確性及重複性，顯示萃取液經添加0.01 M 氯化鐵及混勻後靜置5分鐘之螯合條件應為可行。故無論檢體中內含為乙二胺四醋酸二鈉、乙二胺四醋酸二鈉鈣或乙二胺四醋酸鐵鈉，本方法均能夠透過一連串萃取及螯合的過程，並以適當的換算，最後正確計算出乙二胺四醋酸二鈉鈣之含量。

五、基質效應評估結果

以 LC/MS/MS進行定量，與分析物共同沖提出之基質干擾物(co-eluting matrix compound)會影響分析物於質譜儀之離子化情形，可能造成抑制或增強訊號，稱為基質效應(matrix effect)。為評估基質效應，分別製作標準曲線及基質匹配檢量線，並比較其斜率。標準曲線為溶於去離子水之標準溶液，濃度範圍為0.05-1.0 mg/mL。基質匹配檢量線為布丁及沙拉醬檢體依建立方法調製檢液，再添加標準溶液，使其濃度範圍為0.05-1.0 mg/mL，經評估其基質效應分別為12.1 %及9.25 % (表六)，並無明顯基質效應。

六、定量極限之評估

本研究定義之定量極限(limit of quantitation, LOQ)須符合MRM偵測模式下之定量離子層析圖之S/N > 10 且定性離子層析圖之S/N > 3。本LC-MS/MS方法於布丁及沙拉醬之乙二胺四醋酸二鈉定量極限為10 ppm。

七、市售食品中乙二胺四醋酸二鈉鈣含量檢驗結果

於102年3至7月及103年5月間，分別價購20件檢體及11件檢體，第一批檢體包含原料布丁粉2件、果凍布丁類2件、罐頭2件、沙拉醬8件及塗抹醬類4件，第二批檢體包含果凍布丁類3件及沙拉醬10件。其中第一批檢體原料布丁粉、果凍布丁類、罐頭及一件塗抹醬類均未檢出乙二胺四醋酸二鈉鈣，其餘檢體之乙二胺四醋酸二鈉鈣檢出範圍則為87.8-1984.9 ppm，其中塗抹醬類(三件)檢出平均為188.1 ± 51.8 ppm，沙拉醬類(十件)檢出平均為331.2 ± 582.5 ppm，其中，檢體中標榜「light」的沙拉醬檢體之乙二胺四醋酸二鈉鈣含量為1984.9 ppm，為本調查第一批檢體中乙二胺四醋酸二鈉鈣含量最高之產品，已超過我國食品添加物使用範圍及限量暨規格標準中，使用於為防止油脂氧化而引起變味之食品，其用量為0.10 g/kg以下(以食品重量計)；以及作為品質改良用、釀造用及食品製造用劑，用量以乙二胺四醋酸二鈉鈣計，在乳化食品為150

表六、基質效應評估

Matrix	Standard calibration curve matrix-matched calibration curve	R	Matrix effect(%)
布丁	y = 165.39 x + 0.91	0.9994	12.10
	y = 185.45 x + 1.69	0.9978	
沙拉醬	y = 1022.75 x - 7.29	0.9997	9.25
	y = 1117.4x + 291.18	0.9999	

註：評估濃度範圍為0.05-1.0 mg/mL

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

SCC：標準曲線(standard calibration curve)

MCC：基質匹配檢量線(matrix-matched calibration curve)

ppm以下之規定。如扣除此件檢體，乙烯二胺四醋酸二鈉鈣檢出平均為 147.4 ± 43.3 ppm。第二批檢體三件果凍布丁類均未檢出乙烯二胺四醋酸二鈉鈣，沙拉醬檢體之乙烯二胺四醋酸二鈉鈣檢出範圍則為49.4-2218.4 ppm，檢體中標榜「light」的沙拉醬檢體依然為此批檢體中乙烯二胺四醋酸二鈉鈣含量最高之產品，如扣除此件檢體，乙烯二胺四醋酸二鈉鈣檢出平均為 77.0 ± 24.9 ppm。

針對標示部分，檢體標示添加乙烯二胺四醋酸且檢出者有13件，其中3件為塗抹醬類，10件為沙拉醬檢體；產品未標示而有檢出者有8件，均為沙拉醬檢體。

結 論

本研究建立以LC/MS/MS分析食品中乙烯二胺四醋酸二鈉鈣之檢驗方法，此方法之前處理流程，操作簡便、省時、成本低，其回收率、重複性及靈敏度皆相當良好，適於作為市售果凍、布丁食品及沙拉醬之乙烯二胺四醋酸二鈉鈣例行分析之用。本次檢驗2批次共31件樣品，2批次中有2件標榜「light」之沙拉醬檢體其乙烯二胺四醋酸二鈉鈣含量分別為1984.9 ppm及2218.4 ppm，均已超過我國食品添加物使用範圍及限量暨規格標準，將移請相關單位辦理稽查事宜。

參考文獻

1. 衛生福利部。2013。食品添加物使用範圍及限量暨規格標準。[<http://consumer.fda.gov.tw/Law/FoodAdditivesList.aspx?nodeID=521>]。
2. Cagnasso, C. E., Lopez, L. B., Rodriguez, V. G. and Valencia, M. E. 2007. Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC. *J Food Compos Anal.* 20: 248-51.
3. Krokidis, A. A., Megoulas, N. C. and Koup-paris, M. A. 2005. EDTA determination in pharmaceutical formulations and canned foods based on ion chromatography with suppressed conductimetric detection. *Anal Chim Acta.* 535: 57-63.
4. Quintana, J. B. and Reemtsma, T. 2007. Rapid and sensitive determination of ethylenediaminetetraacetic acid and diethylenetriaminepentaacetic acid in water sample by ion-pair reversed-phase liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1145: 110-7.
5. 楊長志、魏冬旭。2012。液相色譜-質譜/質譜法測定食品中乙二胺四乙酸的殘留量。食品科學，33: 180-185。

Determination of EDTA in Foods by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

HUNG-WEI HSIAO, CHING-HAO KUO, GUAN-YAN WU, YUNG-WEI LIN,
CHIA-FEN TSAI, SU-HSIANG TSENG, LIH-CHING CHIUEH
AND DANIEL YANG-CHIH SHIH

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

A method for the analysis of EDTA in foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) with electrospray ionization was developed. Data acquisition under MS/MS for EDTA was achieved by applying multiple reaction monitoring (MRM). EDTA was extracted from foods with deionized water, and reacted with FeCl_3 to form NaFe EDTA , then analyzed by LC/MS/MS with electrospray ionization. The LC separation was conducted on an Acquity UPLC BEH Phenyl ($1.7\ \mu\text{m}$, $2.1 \times 100\ \text{mm}$) column with methanol/5mM tri-*n*-butylamine as the mobile phase by gradient elution. The recoveries of EDTA (20 and 40 ppm) spiked in pudding and mayonnaise ranged from 94 % to 105 % and the coefficients of variation were below 2%. Application of this method to test a total of 31 commercially available food samples, the concentration of calcium disodium ethylenediaminetetraacetic acid ($\text{CaNa}_2\text{ EDTA}$) ranged from ND-2218.4 ppm. This method will provide a reference detection of EDTA.

Key words: ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS