

食品中防腐劑之檢驗方法修正總說明

為加強食品添加物之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中防腐劑之檢驗方法」，主要修正第 2.3.4.節濾膜之材質及附註 3 之部分文字，另增列參考文獻。

食品中防腐劑之檢驗方法修正對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中酸類防腐劑[苯甲酸(benzoic acid)、己二烯酸(sorbic acid)、去水醋酸(dehydroacetic acid)、對羥苯甲酸(<i>p</i>-hydroxybenzoic acid)、水楊酸(salicylic acid)]及酯類防腐劑[對羥苯甲酸甲酯(methyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸乙酯(ethyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸異丙酯(isopropyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸丙酯(propyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸第二丁酯(secbutyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸異丁酯(isobutyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)及對羥苯甲酸丁酯(butyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)]之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經直接稀釋或振盪萃取或水蒸氣蒸餾後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)分析之方法。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器 (photodiode array detector)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：ACE C18-AR，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：轉速可達 3500 rpm 者。</p> <p>2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.1.4. 蒸餾裝置 (Distillation apparatus)。</p> <p>2.2. 試藥：氫氧化鈉、檸檬酸(C₆H₈O₇ · H₂O)、檸檬酸三鈉(Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O) 及酒石酸均</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中酸類防腐劑[苯甲酸(benzoic acid)、己二烯酸(sorbic acid)、去水醋酸(dehydroacetic acid)、對羥苯甲酸(<i>p</i>-hydroxybenzoic acid)、水楊酸(salicylic acid)]及酯類防腐劑[對羥苯甲酸甲酯(methyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸乙酯(ethyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸異丙酯(isopropyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸丙酯(propyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸第二丁酯(secbutyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸異丁酯(isobutyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)及對羥苯甲酸丁酯(butyl <i>p</i>-hydroxybenzoate)]之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經直接稀釋或振盪萃取或水蒸氣蒸餾後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)分析之方法。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器 (photodiode array detector)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：ACE C18-AR，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：轉速可達 3500 rpm 者。</p> <p>2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.1.4. 蒸餾裝置 (Distillation apparatus)。</p> <p>2.2. 試藥：氫氧化鈉、檸檬酸(C₆H₈O₇ · H₂O)、檸檬酸三鈉(Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O) 及酒石酸均</p>	<p>一、修正 2.3.4. 節濾膜之材質。</p> <p>二、增列參考文獻。</p>

採用試藥特級；氯化鈉採試藥級；甲醇及乙腈均採用液相層析級；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18 MΩ·cm 以上)；苯甲酸、己二烯酸、去水醋酸、對羥苯甲酸、水楊酸、對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸乙酯、對羥苯甲酸異丙酯、對羥苯甲酸丙酯、對羥苯甲酸第二丁酯、對羥苯甲酸異丁酯及對羥苯甲酸丁酯對照用標準品。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 蒸餾瓶：500 mL。

2.3.2. 離心管：50 mL，PP 材質。

2.3.3. 容量瓶：50 mL、100 mL、200 mL、500 mL 及 1000 mL。

2.3.4. 濾膜：孔徑 0.45 μm，PVDF 材質。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 50% 甲醇溶液：

取甲醇及去離子水，以 1:1 (v/v) 之比例混勻。

2.4.2. 0.1 N 氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉 0.4 g，以去離子水溶解使成 100 mL。

2.4.3. 5 mM 檸檬酸緩衝溶液：

稱取檸檬酸 7.0 g 及檸檬酸三鈉 6.0 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。臨用時再以去離子水稀釋 10 倍，以濾膜過濾。

2.4.4. 15% 酒石酸溶液：

稱取酒石酸 15 g，以去離子水溶解使成 100 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液 A：5 mM 檸檬酸緩衝溶液。

2.5.2. 移動相溶液 B：

取甲醇與乙腈以 1:2 (v/v) 之比例混勻後，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 B。

2.5.3. 移動相溶液 C：

取甲醇、乙腈及 5 mM 檸檬酸緩衝溶液以 1:2:7 (v/v/v) 之比例混勻後，以濾膜過濾，取濾液供

採用試藥特級；氯化鈉採試藥級；甲醇及乙腈均採用液相層析級；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18 MΩ·cm 以上)；苯甲酸、己二烯酸、去水醋酸、對羥苯甲酸、水楊酸、對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸乙酯、對羥苯甲酸異丙酯、對羥苯甲酸丙酯、對羥苯甲酸第二丁酯、對羥苯甲酸異丁酯及對羥苯甲酸丁酯對照用標準品。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 蒸餾瓶：500 mL。

2.3.2. 離心管：50 mL，PP 材質。

2.3.3. 容量瓶：50 mL、100 mL、200 mL、500 mL 及 1000 mL。

2.3.4. 濾膜：孔徑 0.45 μm，Nylon 材質。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 50% 甲醇溶液：

取甲醇及去離子水，以 1:1 (v/v) 之比例混勻。

2.4.2. 0.1 N 氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉 0.4 g，以去離子水溶解使成 100 mL。

2.4.3. 5 mM 檸檬酸緩衝溶液：

稱取檸檬酸 7.0 g 及檸檬酸三鈉 6.0 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。臨用時再以去離子水稀釋 10 倍，以濾膜過濾。

2.4.4. 15% 酒石酸溶液：

稱取酒石酸 15 g，以去離子水溶解使成 100 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液 A：5 mM 檸檬酸緩衝溶液。

2.5.2. 移動相溶液 B：

取甲醇與乙腈以 1:2 (v/v) 之比例混勻後，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 B。

2.5.3. 移動相溶液 C：

取甲醇、乙腈及 5 mM 檸檬酸緩衝溶液以 1:2:7 (v/v/v) 之比例混勻後，以濾膜過濾，取濾液供

作移動相溶液 C。

2.5.4. 移動相溶液 D：

取甲醇及 5 mM 檸檬酸緩衝溶液以 6：4 (v/v) 之比例混勻後，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 D。

2.6. 標準溶液之配製：

取苯甲酸、己二烯酸、去水醋酸、對羥苯甲酸及水楊酸對照用標準品各約 50 mg，精確稱定，分別置於 100 mL 容量瓶中，以 0.1 N 氫氧化鈉溶液 5 mL 溶解後，加去離子水定容，作為酸類防腐劑標準原液；取對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸乙酯、對羥苯甲酸異丙酯、對羥苯甲酸丙酯、對羥苯甲酸第二丁酯、對羥苯甲酸異丁酯及對羥苯甲酸丁酯對照用標準品各約 50 mg，精確稱定，分別置於 100 mL 容量瓶中，以 50% 甲醇溶液溶解並定容，作為酯類防腐劑標準原液。臨用時各取適量標準原液混合，以 50% 甲醇溶液稀釋至 0.25 ~ 100 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 稀釋法(適用液體檢體)：

含二氧化碳之檢體應先去除二氧化碳，取檢體約 5 g，精確稱定，以 50% 甲醇溶液定容至 100 mL，混勻後，靜置 10 分鐘，經濾膜過濾，取濾液供作檢液。

2.7.2. 萃取法：

將檢體均質混勻後，取約 5 g，精確稱定，加入 50% 甲醇溶液 50 mL，經超音波振盪 30 分鐘後，以 50% 甲醇溶液定容至 100 mL，取試量萃取液，於 3500 rpm 離心 10 分鐘，取上清液經濾膜過濾後，取濾液供作檢液。

2.7.3. 水蒸氣蒸餾法：

將檢體均質混勻後，取約 25 g，精確稱定，置於蒸餾瓶中，加入 15% 酒石酸溶液 15 mL、氯化鈉

作移動相溶液 C。

2.5.4. 移動相溶液 D：

取甲醇及 5 mM 檸檬酸緩衝溶液以 6：4 (v/v) 之比例混勻後，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 D。

2.6. 標準溶液之配製：

取苯甲酸、己二烯酸、去水醋酸、對羥苯甲酸及水楊酸對照用標準品各約 50 mg，精確稱定，分別置於 100 mL 容量瓶中，以 0.1 N 氫氧化鈉溶液 5 mL 溶解後，加去離子水定容，作為酸類防腐劑標準原液；取對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸乙酯、對羥苯甲酸異丙酯、對羥苯甲酸丙酯、對羥苯甲酸第二丁酯、對羥苯甲酸異丁酯及對羥苯甲酸丁酯對照用標準品各約 50 mg，精確稱定，分別置於 100 mL 容量瓶中，以 50% 甲醇溶液溶解並定容，作為酯類防腐劑標準原液。臨用時各取適量標準原液混合，以 50% 甲醇溶液稀釋至 0.25 ~ 100 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 稀釋法(適用液體檢體)：

含二氧化碳之檢體應先去除二氧化碳，取檢體約 5 g，精確稱定，以 50% 甲醇溶液定容至 100 mL，混勻後，靜置 10 分鐘，經濾膜過濾，取濾液供作檢液。

2.7.2. 萃取法：

將檢體均質混勻後，取約 5 g，精確稱定，加入 50% 甲醇溶液 50 mL，經超音波振盪 30 分鐘後，以 50% 甲醇溶液定容至 100 mL，取試量萃取液，於 3500 rpm 離心 10 分鐘，取上清液經濾膜過濾後，取濾液供作檢液。

2.7.3. 水蒸氣蒸餾法：

將檢體均質混勻後，取約 25 g，精確稱定，置於蒸餾瓶中，加入 15% 酒石酸溶液 15 mL、氯化鈉

60 g 及去離子水 150 mL，以水蒸氣蒸餾之，以每分鐘約 10 mL 之速度收集餾出液約 490 mL，以去離子水定容至 500 mL，經濾膜過濾後，取濾液供作檢液。

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，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各防腐劑之含量(g/kg)：

$$\text{檢體中各防腐劑之含量(g/kg)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由標準曲線求得檢液中各防腐劑之濃度(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：換算值^(註)

註：檢體檢出酯類防腐劑時，以對羥苯甲酸含量計，其換算值如下表：

酯類防腐劑	分子量	對羥苯甲酸之換算值
對羥苯甲酸甲酯	152.15	0.9077
對羥苯甲酸乙酯	166.17	0.8311
對羥苯甲酸異丙酯	180.20	0.7664
對羥苯甲酸丙酯	180.20	0.7664
對羥苯甲酸第二丁酯	194.23	0.7111
對羥苯甲酸異丁酯	194.23	0.7111
對羥苯甲酸丁酯	194.23	0.7111
對羥苯甲酸	138.12	1

高效液相層析測定條件：

層析管：ACE C18-AR，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm。

移動相流速：1 mL/min。

層析測定條件 1：

光二極體陣列檢出器：波長 230

60 g 及去離子水 150 mL，以水蒸氣蒸餾之，以每分鐘約 10 mL 之速度收集餾出液約 490 mL，以去離子水定容至 500 mL，經濾膜過濾後，取濾液供作檢液。

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，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各防腐劑之含量(g/kg)：

$$\text{檢體中各防腐劑之含量(g/kg)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由標準曲線求得檢液中各防腐劑之濃度(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：換算值^(註)

註：檢體檢出酯類防腐劑時，以對羥苯甲酸含量計，其換算值如下表：

酯類防腐劑	分子量	對羥苯甲酸之換算值
對羥苯甲酸甲酯	152.15	0.9077
對羥苯甲酸乙酯	166.17	0.8311
對羥苯甲酸異丙酯	180.20	0.7664
對羥苯甲酸丙酯	180.20	0.7664
對羥苯甲酸第二丁酯	194.23	0.7111
對羥苯甲酸異丁酯	194.23	0.7111
對羥苯甲酸丁酯	194.23	0.7111
對羥苯甲酸	138.12	1

高效液相層析測定條件：

層析管：ACE C18-AR，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm。

移動相流速：1 mL/min。

層析測定條件 1：

光二極體陣列檢出器：波長 230

<p>nm (水楊酸、苯甲酸及去水醋酸)、256 nm (對羥苯甲酸及其酯類)及 260 nm (己二烯酸)。 移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 → 5</td> <td>78 → 73</td> <td>22 → 27</td> </tr> <tr> <td>5 → 20</td> <td>73 → 63</td> <td>27 → 37</td> </tr> <tr> <td>20 → 50</td> <td>63 → 33</td> <td>37 → 67</td> </tr> <tr> <td>50 → 65</td> <td>33 → 78</td> <td>67 → 22</td> </tr> </tbody> </table> <p>層析測定條件 2： 光二極體陣列檢出器：波長 230 nm (水楊酸、苯甲酸及去水醋酸)、256 nm (對羥苯甲酸)及 260 nm (己二烯酸)。 移動相溶液：C 液。 層析測定條件 3： 光二極體陣列檢出器：波長 256 nm (對羥苯甲酸酯類)。 移動相溶液：D 液。 附註：1. 本檢驗方法酸類防腐劑之定量極限均為 0.02 g/kg；酯類防腐劑之定量極限均為 0.005 g/kg。 2. 採稀釋法或萃取法均不可行時，可採水蒸氣蒸餾法，惟該法僅適用於苯甲酸、己二烯酸及去水醋酸之分析。 3. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。 4. 以液相層析串聯質譜儀 (LC/MS/MS) 進行確認時，其 LC/MS/MS 之多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式參考參數如附表。</p> <p><u>參考文獻：</u> 1. 日本藥學會。2005。衛生試驗法·註解。302-304 頁。 2. Kishi, H. and Yamada, T. 2007. Simultaneous determination of nine kinds of preservatives in foods by HPLC. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 48: 58-63.</p>	時間(min)	A (%)	B (%)	0 → 5	78 → 73	22 → 27	5 → 20	73 → 63	27 → 37	20 → 50	63 → 33	37 → 67	50 → 65	33 → 78	67 → 22	<p>nm (水楊酸、苯甲酸及去水醋酸)、256 nm (對羥苯甲酸及其酯類)及 260 nm (己二烯酸)。 移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 → 5</td> <td>78 → 73</td> <td>22 → 27</td> </tr> <tr> <td>5 → 20</td> <td>73 → 63</td> <td>27 → 37</td> </tr> <tr> <td>20 → 50</td> <td>63 → 33</td> <td>37 → 67</td> </tr> <tr> <td>50 → 65</td> <td>33 → 78</td> <td>67 → 22</td> </tr> </tbody> </table> <p>層析測定條件 2： 光二極體陣列檢出器：波長 230 nm (水楊酸、苯甲酸及去水醋酸)、256 nm (對羥苯甲酸)及 260 nm (己二烯酸)。 移動相溶液：C 液。 層析測定條件 3： 光二極體陣列檢出器：波長 256 nm (對羥苯甲酸酯類)。 移動相溶液：D 液。 附註：1. 本檢驗方法酸類防腐劑之定量極限均為 0.02 g/kg；酯類防腐劑之定量極限均為 0.005 g/kg。 2. 採稀釋法或萃取法均不可行時，可採水蒸氣蒸餾法，惟該法僅適用於苯甲酸、己二烯酸及去水醋酸之分析。 3. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。 4. 以液相層析串聯質譜儀 (LC/MS/MS) 進行確認時，其 LC/MS/MS 之多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式參考參數如附表。</p>	時間(min)	A (%)	B (%)	0 → 5	78 → 73	22 → 27	5 → 20	73 → 63	27 → 37	20 → 50	63 → 33	37 → 67	50 → 65	33 → 78	67 → 22	
時間(min)	A (%)	B (%)																														
0 → 5	78 → 73	22 → 27																														
5 → 20	73 → 63	27 → 37																														
20 → 50	63 → 33	37 → 67																														
50 → 65	33 → 78	67 → 22																														
時間(min)	A (%)	B (%)																														
0 → 5	78 → 73	22 → 27																														
5 → 20	73 → 63	27 → 37																														
20 → 50	63 → 33	37 → 67																														
50 → 65	33 → 78	67 → 22																														

附表、苯甲酸等 12 項防腐劑之液相層析串聯質譜儀多重反應偵測模式參數

分析物	電灑離子化模式	定量離子對			定性離子對		
		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	去簇電壓(V)	碰撞能量(eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	去簇電壓(V)	碰撞能量(eV)
苯甲酸	ESI	121 > 77	-40	-15	—	—	—
己二烯酸	ESI ⁺	113 > 95	21	15	113 > 67	21	21
去水醋酸	ESI ⁺	169 > 85	42	27	169 > 127	42	18
對羥苯甲酸	ESI	137 > 93	-27	-16	137 > 65	-27	-40
水楊酸	ESI	137 > 93	-27	-26	137 > 65	-27	-41
對羥苯甲酸甲酯	ESI	151 > 92	-37	-29	151 > 136	-37	-20
對羥苯甲酸乙酯	ESI	165 > 92	-30	-31	165 > 137	-30	-18
對羥苯甲酸異丙酯	ESI	179 > 92	-38	-32	179 > 137	-38	-19
對羥苯甲酸丙酯	ESI	179 > 92	-38	-32	179 > 137	-38	-20
對羥苯甲酸第二丁酯	ESI	193 > 92	-39	-32	193 > 136	-39	-22
對羥苯甲酸異丁酯	ESI	193 > 92	-39	-32	193 > 136	-39	-21
羥羥苯甲酸丁酯	ESI	193 > 92	-39	-32	193 > 136	-39	-21

註：上述參數不適時，依所使用之儀器，設定適合之參數。