

食品中防腐劑之檢驗方法(草案)

Method of Test for Preservatives in Foods

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(*p*-hydroxybenzoic acid)、水楊酸(salicylic acid)]及酯類防腐劑[對羥苯甲酸甲酯(methyl *p*-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸乙酯(ethyl *p*-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸異丙酯(isopropyl *p*-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸丙酯(propyl *p*-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸第二丁酯(secbutyl *p*-hydroxybenzoate)、對羥苯甲酸異丁酯(isobutyl *p*-hydroxybenzoate)及對羥苯甲酸丁酯(butyl *p*-hydroxybenzoate)]之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經稀釋或萃取後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 高效液相層析儀：
 - 2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。
 - 2.1.1.2. 層析管：ACE C18-AR，5 μm ，內徑 4.6 mm \times 25 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：轉速可達 3500 rpm 者。
 - 2.1.3. 超音波震盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.2. 試藥：氫氧化鈉、檸檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)及檸檬酸三鈉($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)均採用試藥特級；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 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 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. 離心管：50 mL，PP 材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：50 mL、100 mL、500 mL 及 1000 mL。
 - 2.3.3. 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. 0.1N 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。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液 A：

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，濾液供作移動相溶液 A。

2.5.2. 移動相溶液 B：

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

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，分置於 100 mL 容量瓶中，以 0.1N 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，分置於 100 mL 容量瓶中，以甲醇 10 mL 溶解於後，加去離子水定容，作為酯類防腐劑標準原液。臨用時各取適量標準原液混合，以去離子水稀釋至 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(適用其他檢體)：

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，經超音波震盪 30 分鐘後，以 50% 甲醇溶液定容至 100 mL，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。

2.8. 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($\mu\text{g/mL}$)

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：

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 (對羥苯甲酸及其酯類)及 260 nm (己二烯酸)。

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

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 \rightarrow 5	78 \rightarrow 73	22 \rightarrow 27
5 \rightarrow 20	73 \rightarrow 63	27 \rightarrow 37
20 \rightarrow 50	63 \rightarrow 33	37 \rightarrow 67
50 \rightarrow 65	33 \rightarrow 78	67 \rightarrow 22

移動相流速：1 mL/min。

附註：

1. 本檢驗方法酸類防腐劑之檢出限量均為 0.02 g/kg；酯類防腐劑之檢出限量均為 0.005 g/kg。
2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。
3. 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。

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。