

食品中防腐劑之檢驗方法

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。
 - 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 × 25 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：轉速可達3500 rpm者。
 - 2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.4. 蒸餾裝置(Distillation apparatus)。
 - 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，取適量萃取液，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^(註)：

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 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

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

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。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

- 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. 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。
4. 若有干擾需以LC/MS/MS進行定量時，應先進行方法確效。
5. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. 日本藥學會。2015。衛生試驗法・註解。330-334頁。金原出版株式會社。東京，日本。
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.

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	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
對羥苯甲酸丁酯	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。