

食品添加物規格檢驗方法—β-胡蘿蔔素修正總說明

為加強食品添加物規格之管理，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」，並配合衛生福利部一百零九年九月二十九日衛授食字第一〇九一三〇二〇〇六號令修正「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」第四條及第二條附表一、第三條附表二中β-胡蘿蔔素之規格標準修正，爰修正「食品添加物規格檢驗方法—β-胡蘿蔔素」，其修正要點如下：

- 一、修正「分子量」、「含量」、「外觀」、「鑑別」及「含量測定」。
- 二、刪除「分解溫度」、「溶狀」、「砷」、「重金屬」、「吸光度」、「乾燥減重」及「熾灼殘渣」。
- 三、增列「硫酸化灰分」、「輔助著色物」、「溶劑殘留」、「鉛」及「參考文獻」。
- 四、增修訂部分文字。

食品添加物規格檢驗方法—β-胡蘿蔔素修正對照表

| 修正規定 | 現行規定 | 說明 |
|--|--|---|
| <p>§ 09014</p>  <p>分子式：C₄₀H₅₆ 分子量：536.88</p> <p>1.含量：本品所含總著色物應在96.0%以上(以β-胡蘿蔔素計)。</p> <p>2.外觀：本品為紅~棕紅色結晶或結晶狀粉末，對氧氣和光敏感，故應保存於惰性氣體下之避光容器中。</p> <p>3.鑑別：</p> <p>(1)溶解度：本品不溶於水；幾乎不溶於乙醇；微溶於植物油。</p> <p>(2)類胡蘿蔔素：本品之丙酮溶液，連續加入5%亞硝酸鈉溶液及0.5 M硫酸溶液後，其顏色會消失。</p> <p>(3)吸光度：取8.含量測定之檢品溶液(V₃)，按照吸光度測定法(附錄A-13)測定其波長340 nm、455 nm及483 nm之吸光度A₃₄₀、A₄₅₅及A₄₈₃。</p> <p><i>Blakeslea trispora</i>來源：所得之吸光度比A₄₅₅/A₄₈₃應為1.14~1.19；A₄₅₅/A₃₄₀應在0.75以上。其他來源：所得之吸光度比A₄₅₅/A₄₈₃應為1.14~1.19；A₄₅₅/A₃₄₀應在15以上。</p> <p>4.硫酸化灰分：取本品2 g，精確稱定，按照熾灼殘渣檢查法(附錄A-4)檢查之，於800±25°C熾灼15分鐘，必要時延長熾灼時間，使完全灰化，其遺留殘渣，<i>Blakeslea trispora</i>來源應在0.2%以下；其他來源應在0.1%以下。</p> <p>5.輔助著色物：利用高效液相層析法測定檢品中除β-胡蘿蔔素以外之類胡蘿蔔素，其含量應佔總著色物之3.0%以下。</p> | <p>§ 09014</p>  <p>分子式：C₄₀H₅₆ 分子量：536.89</p> <p>1.含量：本品所含C₄₀H₅₆按乾品計算，應在98%以上。</p> <p>2.外觀：本品紅紫~暗紅色之結晶性粉末，略具特異臭及味。</p> <p>3.鑑別：</p> <p>(1)本品之氣仿溶液(1：1000)呈橙色，取10 mL加三氯化銻試液1 mL，則顏色應變藍綠色。</p> <p>(2)本品之氣仿溶液(1：250) 0.5 mL加環己烷1000 mL，於波長454~456nm及482~484nm應有最大吸收峰。</p> <p>4.分解溫度：本品之分解溫度於減壓密封管中測定為178~183°C(附錄A-12)。</p> <p>5.溶狀：本品0.1 g溶於氣仿10 mL，其溶液應『澄明』。</p> <p>6.砷：取本品0.5 g，按照砷檢查第I-2法(附錄A-8)檢查之，其所含砷(以As₂O₃計)應在2 ppm以下。</p> <p>7.重金屬：取本品1.0 g，按照重金屬檢查第II法(附錄A-7)檢查之，其所含重金屬(以Pb計)應在20 ppm以下。</p> <p>8.吸光度：本品之環己烷溶液(1→30000)在波長340 nm與362 nm之吸光度比應在1以上。本品之環己烷溶液(1→30000)在波長340 nm之吸光度與本品之環己烷溶液(1→300000)在波長455 nm之吸光度比應在1.45以上。本品之環己烷溶液(1→300000)在波長434 nm與455 nm之吸光度比應在1.40±0.15、波長483 nm與455 nm之吸光度比應為1.15±0.10。</p> | <p>一、修正「分子量」、「含量」、「外觀」、「鑑別」及「含量測定」。</p> <p>二、刪除「分解溫度」、「溶狀」、「砷」、「重金屬」、「吸光度」、「乾燥減重」及「熾灼殘渣」。</p> <p>三、增列「硫酸化灰分」、「輔助著色物」、「溶劑殘留」、「鉛」及「參考文獻」。</p> <p>四、增修訂部分文字。</p> |

取本品約0.010 g，精確稱定，以含0.025% BHT之四氫呋喃(tetrahydrofuran)溶解並定量至100 mL。取此液與乙醇以1：10 (v/v) 比例混勻，供作檢品溶液，依下列條件進行液相層析。全反式β-胡蘿蔔素及其順式異構物之滯留時間介於20-25分鐘，最大波峰為全反式β-胡蘿蔔素(all-trans-β-carotene)，其餘類胡蘿蔔素及β-胡蘿蔔素之順式異構物相對於β-胡蘿蔔素之滯留時間分別：為全反式-視網醛(all-trans-retinal) 0.26、全反式β-衍-12'-胡蘿蔔醛(all-trans-β-apo-12'-carotenal) 0.33、全反式β-衍-10'-胡蘿蔔素(all-trans-β-apo-10' carotenal) 0.34、全反式γ-胡蘿蔔素(all-trans-γ-carotene) 0.85、全反式α-胡蘿蔔素(all-trans-α-carotene) 0.95、9-順式-β-胡蘿蔔素(9-cis-β-carotene) 1.05、13-順式-β-胡蘿蔔素(13-cis-β-carotene) 1.15及15-順式-β-胡蘿蔔素(15-cis-β-carotene) 1.18。就檢品溶液所得波峰之滯留時間與上述各成分之相對滯留時間鑑別之，並依下列計算式求得檢品中除β-胡蘿蔔素以外之類胡蘿蔔素佔總著色物之含量。

檢品中除β-胡蘿蔔素以外之類胡蘿蔔素佔總著色物之含量(%)

$$= \left[\frac{A_{\text{total}} - A_{\beta\text{-carotenes}}}{A_{\text{total}}} \right] \times 100$$

A_{total} ：扣除溶劑之各波峰面積總和

$A_{\beta\text{-carotenes}}$ ：β-胡蘿蔔素(包括全反式β-胡蘿蔔素、9-順式-β-胡蘿蔔素、13-順式-β-胡蘿蔔素及15-順式-β-胡蘿蔔素)波峰面積總和

高效液相層析測定條件^(註)：

紫外光或光二極體陣列檢出器：波長453 nm。

層析管：Reverse phase C18，

9.乾燥減重：本品於硫酸減壓乾燥器乾燥4小時，其減失重量不得超過1%(附錄A-3)。

10.熾灼殘渣：取本品2.0 g，按照熾灼殘渣檢查法(附錄A-4)檢查之，其遺留殘渣不得超過0.1%。

11.含量測定：取預經硫酸減壓乾燥器乾燥4小時之本品約40 mg，精確稱定，加氯仿10 mL溶解，加環己烷使成100 mL，精確量取此液5 mL加環己烷使成100 mL，再取此液10 mL加環己烷使成100 mL，作為檢品溶液。於最大吸收峰之波長454~456 nm測其吸光度A，並依下式計算其含量。

$$\beta\text{-胡蘿蔔素}(C_{40}H_{56})\text{之含量} = \frac{A}{2450} \times \frac{200000}{\text{檢品之採取量}(mg)} \times 100\%$$

Suplex pkb-100, 5 μm, 內徑4.6 mm × 250 mm, 或同級品。

層析管溫度：30°C。

移動相溶液：取BHT 50 mg, 置於1000 mL容量瓶中, 以異丙醇20 mL溶解, 加入N-乙基二異丙基胺

(N-ethyl-diisopropylamine) 0.2 mL、0.2%醋酸銨溶液25 mL、乙腈455 mL及甲醇約450

mL, 充分混合, 冷卻至室溫, 以甲醇定容至1000 mL, 經濾膜過濾, 供作移動相溶液, 配製2天後應丟棄。

移動相流速：0.6 mL/min。

自動進樣器溫度：15°C。

注入量：10 μL。

層析時間：35 min。

註：上述條件分析不適時, 可依所使用之儀器, 設定適合之測定條件。

6.溶劑殘留：利用頂空氣相層析法測定檢品中乙醇(ethanol)、乙酸乙酯(ethyl acetate)、異丙醇(isopropanol)及乙酸異丁酯(isobutyl acetate)之含量, *Blakeslea trispora*來源之檢品所含乙醇及乙酸乙酯應在0.8%以下(總計或單一計), 異丙醇應在0.1%以下, 乙酸異丁酯應在1.0%以下。

(1)內部標準溶液之配製：

取甲醇50 mL, 置於50 mL頂空分析瓶中密封, 精確量取3-甲基-2-戊酮(3-methyl-2-pentanone) 15 μL, 通過隔墊注入, 混合均勻, 供作內部標準溶液。

(2)空白檢液之調製：

取空白檢品約0.2 g, 精確稱定, 置於頂空分析瓶中, 加入甲醇5 mL及內部標準溶液1 mL, 於60°C加熱10分鐘, 並劇烈振盪10秒, 供作空白檢液。

(3)檢品溶液之調製：

取檢品約0.2 g, 精確稱定, 置於

頂空分析瓶中，加入甲醇5 mL及內部標準溶液1 mL，於60°C加熱10分鐘，並劇烈振盪10秒，供作檢品溶液。

(4)校準溶液之調製：

取甲醇50 mL，置於50 mL頂空分析瓶中密封並稱重。精確量取標準品50 µL，通過隔墊注入，並精確稱定至0.01 mg以內(前後重量相減求得標準品之稱重量)，混合均勻，供作校準溶液。

取空白檢品約0.2 g，置於頂空分析瓶中，加入甲醇4.9 mL、內部標準溶液1 mL及標準溶液0.1 mL，混合均勻，於60°C加熱10分鐘，並劇烈振盪10秒，供作校準溶液。

(5)測定法：

將檢品溶液、空白檢液及校準溶液之頂空分析瓶置於頂空進樣器上，依下列條件進行分析，就檢品溶液與校準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式分別求得檢品中乙醇、乙酸乙酯、異丙醇或乙酸異丁酯之含量。

檢品中乙醇、乙酸乙酯、異丙醇或乙酸異丁酯之含量(%)

$$= \frac{R_s \times W_{st} \times 0.1}{(R_{st} - R_b) \times W_s \times 50} \times 0.1$$

R_s：檢品溶液中乙醇、乙酸乙酯、異丙醇或乙酸異丁酯與內部標準品之相對波峰面積

R_{st}：校準溶液中乙醇、乙酸乙酯、異丙醇或乙酸異丁酯與內部標準品之相對波峰面積

R_b：空白檢液中乙醇、乙酸乙酯、異丙醇或乙酸異丁酯與內部標準品之相對波峰面積

W_{st}：乙醇、乙酸乙酯、異丙醇或乙酸異丁酯標準品之稱重量(mg)

W_s：檢品之採取量(g)

頂空進樣條件^(註)：

樣品加熱溫度：60°C。

樣品加熱時間：10 min。

頂空進樣針溫度：70°C。

轉移溫度：80°C。

注入量：1.0 mL。

注入模式：分流。

氣相層析條件^(註)：

檢出器：火焰離子檢出器。

層析管：DB-wax毛細管(膜厚1 μm，內徑0.53 mm × 0.8 m)串聯

DB-1毛細管(膜厚5 μm，內徑0.53 mm × 30 m)，或同級品。

層析管溫度：初溫：35°C，5 min；

升溫速率：5°C/min

終溫：90°C，6 min。

注入器溫度：140°C。

檢出器溫度：300°C。

移動相氣體流速：氮氣，5 mL/min。

註：上述條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

7.鉛：取本品0.5 g，按照衛生福利部公告「重金屬檢驗方法總則」進行分析，其所含鉛(Pb)應在2 mg/kg以下。

8. 含量測定：取本品約0.08 g，精確稱定，加氯仿20 mL使之完全溶解，以環己烷(cyclohexane)定容至100 mL (V₁)，精確量取5 mL (v₁)，以環己烷定容至100 mL (V₂)，再精確量取5 mL (v₂)，以環己烷定容至100 mL (V₃)，供作檢品溶液。另取環己烷作空白試液，按照吸光度測定法(附錄A-13)於最大吸收峰之波長455 nm，光徑長度1 cm，測定其吸光度，並依下式計算求得檢品中總著色物之含量(以β-胡蘿蔔素計)。

檢品中總著色物之含量(%) =

$$A \times V_1 \times D$$

$$W \times A_{1\text{ cm}}^{1\%}$$

A：檢品溶液之吸光度

A_{1 cm}^{1%}：標準品之比吸光度(2500)

W：檢品之採取量(g)

D: 稀釋倍數($\frac{V_2 \times V_3}{V_1 \times V_2}$)

參考文獻:

1. FAO. 2011. β -CAROTENES, synthetic monograph 1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

[http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph11/additive-113-m11.pdf]

2. FAO. 2003. β -CAROTENE from BLAKESLEA TRISPORA monograph 1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

[http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph4/additive-112-m4.pdf]