

食品中溴酸鹽檢驗方法之建立

吳侑倫 許哲綸 林雅姿 黃守潔 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

溴酸鉀曾為我國准用之食品添加物，可使用於麵粉中作為麵粉改良劑，但世界衛生組織於1986年公布其有致癌之潛在危害，並將其從食品添加物列表中移除，我國亦於1994年公告禁用。因應在2007年國外有於洋芋片中檢測出溴酸鉀之相關新聞報導，本研究建立以超高效液相層析串聯式質譜儀(Ultra Performance Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometer, UPLC-MS/MS)檢測食品中溴酸鹽之檢驗方法。檢體以70%乙腈溶液萃取，經固相萃取匣淨化後以UPLC-MS/MS分析，使用BEH Amide之層析管柱(1.7 μm , 2.1 mm \times 10 cm)，搭配50 mM甲酸銨溶液及乙腈進行梯度沖提。確效結果顯示，以麵粉作為基質，添加50及500 ng/g溴酸鹽之同日內平均回收率分別為105.3及108.3%，變異係數為10.3及6.9%，異日間變異係數為8.8%及9.8%；以洋芋片作為基質之同日內平均回收率為114.6及114.7%，變異係數為8.7及5.7%，異日間變異係數為7.3%及4.7%；本方法之定量極限為50 ng/g。以所建立之分析方法應用於市售11件相關食品檢體檢驗，結果皆為未檢出溴酸鹽。

關鍵詞：超高效液相層析串聯式質譜法、溴酸鹽、麵粉、洋芋片

前言

溴酸鹽(Bromate, BrO_3^-)為溴酸形成的鹽類，曾為我國准用於麵粉之食品添加物，其功能為氧化麵糰麵筋的硫氫基，形成雙硫鍵，以促進麵團的網狀結構，增加麵糰發酵時的體積，為麵粉之品質改良劑。但世界衛生組織於1986年公布溴酸鉀具有致癌性，被國際癌症中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)標定為2B級的致癌物，並將其從食品添加物列表中移除⁽¹⁻²⁾。我國亦於1994年公告禁用溴酸鉀為食品添加物，禁止添加於各類食品中。

有關食品中溴酸鹽之檢驗方法，前處理

過程繁複，例如以線上淨化高效離子層析法(Ion Chromatography, IC)分析食品中溴酸鹽之方法，為降低食品基質之訊號干擾，須搭配兩支管柱串聯使用，其操作過程複雜且耗費成本⁽³⁻⁶⁾。隨著質譜分析技術應用的蓬勃發展，近期已有相關文獻以液相層析串聯式質譜法(Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)分析食品中之溴酸鹽含量^(7,8)，另外，由於在2007年國外有於洋芋片中檢測出溴酸鉀之相關新聞報導，本研究以麵粉及洋芋片做為基質，建立以超高效液相層析串聯式質譜儀分析食品中溴酸鹽含量之檢驗方法，並進行市售產品之調查監測，除提升檢驗效能外，亦可遏止不肖業者違法添加，有助於

建立民眾對食品安全的信心。

材料與方法

一、檢體來源

自臺北地區大賣場購入11件檢體，供本研究開發方法進行分析。5件麵粉檢體為1家廠牌所販售；6件洋芋片檢體分屬3家不同廠牌所販售，其中5件原產地為臺灣，1件原產地為韓國。

二、試藥

(一)試藥及溶劑

乙腈(acetonitrile)採用高效液相層析級，購自Merck公司(Darmstadt, Germany)。甲酸銨(ammonium formate)採用試藥特級，購自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)。去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)。

(二)對照用標準品

溴酸鉀(potassium bromate)購自Sigma-Aldrich公司。

三、器具及材料

離心管(50 mL, PP材質)、容量瓶(5 mL、10 mL及1000 mL, 玻璃材質)及濾膜(0.22 μm, PTFE材質)購自Merck公司。固相萃取匣(Sep-Pak® C18, 200 mg, 3 mL)及層析管柱BEH Amide Column (1.7 μm, 內徑2.1 mm × 10 cm)均購自Waters公司(Milford, MA, USA)。

四、儀器設備

(一)超高效液相層析串聯式質譜儀高效液相層析儀：Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, USA)

(二)離心機：Allegra 25R Centrifuge (Beckman Coulter, Brea, California, USA)

五、移動相溶液之調製

(一)移動相溶液A：50 mM甲酸銨溶液

取甲酸銨3.153 g，以去離子水溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，供作移動相溶液A。

(二)移動相溶液B：乙腈

六、標準溶液之配製

取溴酸鉀對照用標準品約13.04 mg，精確稱定，以70%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，使濃度相當於含溴酸鹽1000 μg/mL，作為標準原液，於4°C貯存備用。臨用時取適量標準原液，以70%乙腈溶液稀釋至5-100 ng/mL，供作標準溶液。

七、檢液之調製

將檢體均質混勻後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入70%乙腈溶液9.5 mL，以超音波振盪15分鐘，於5°C以5000 ×g離心30分鐘，取上清液，注入預先以甲醇5 mL及去離子水5 mL潤洗且排淨之固相萃取匣，收集流出液，以70%乙腈溶液定容至10 mL，經濾膜過濾後，供作檢液。

八、超高效液相層析串聯式質譜儀測定條件

層析管：Waters ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 1.7 μm, 內徑2.1 mm × 10 cm

層析管溫度：40°C

移動相組成：A為50 mM甲酸銨溶液。B為乙腈

移動相梯度：如表一

移動相流速：0.3 mL/min

注入量：2 μL

離子源：電灑離子化負離子(negative electrospray ionization, ESI)

溶媒揮散溫度(desolvation temperature)：350°C

表一、超高效液相層析串聯式質譜儀之移動相梯度分析條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 3.0	10 → 10	90 → 90
3.0 → 5.0	10 → 40	90 → 60
5.0 → 8.0	40 → 40	60 → 60
8.0 → 9.0	40 → 10	60 → 90
9.0 → 15.0	10 → 10	90 → 90

進樣錐氣體流速(cone gas flow)：1 L/hr
 溶媒揮散流速(desolvation flow)：650 L/hr
 多重反應偵測模式之參數：如表二。

九、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各2 μL，分別注入液相層析儀中，依第八節之條件進行分析。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，並依下列計算式求出檢體中溴酸鹽之含量(mg/kg)：

$$\frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由標準曲線求得檢液中溴酸鹽之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

十、方法空白樣品分析及基質效應評估

取空白檢體依第七節調製空白檢液，取空白檢液1 mL，於40°C下以氮氣吹至微乾，殘留物加入1 μg/mL標準溶液5-100 μL，再以70%乙醇溶液定容至1 mL，供作基質匹配檢量線溶液，依第八節之條件進行分析。就基質匹配檢量線溶液中溴酸鹽之波峰面積與對應之濃度，製作5-100 ng/mL之基質匹配檢量線，基質效應計算公式如下：

$$\text{基質效應(\%)} = \frac{(\text{MCC之斜率} - \text{SCC之斜率})}{\text{SCC之斜率}} \times 100\%$$

表二、超高效液相層析串聯式質譜儀之多重反應偵測模式參數

分析物	離子對		去集簇電壓(V)	碰撞能量(eV)
	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)		
Bromate	127	> 111 ^a	40	20
	129	> 113	40	20

^a 定量離子對

MCC：基質匹配檢量線

SCC：標準曲線

十一、定量極限之確認

取不同濃度之標準溶液進行超高效液相層析串聯式質譜儀分析，就所得波峰之訊號強度計算其訊號/雜訊比(Signal-to-noise Ratio, S/N ratio)，以訊號/雜訊比大於3之最低濃度為儀器之最低偵測極限，以此濃度以上濃度進行樣品之一系列添加回收試驗，每一添加量進行五重複試驗，同時操作空白試驗，依前述方法進行分析，就所得波峰之訊號強度計算其訊號/雜訊比，若五次分析之訊號/雜訊比均大於10之最低添加量作為定量極限。

十二、添加回收試驗

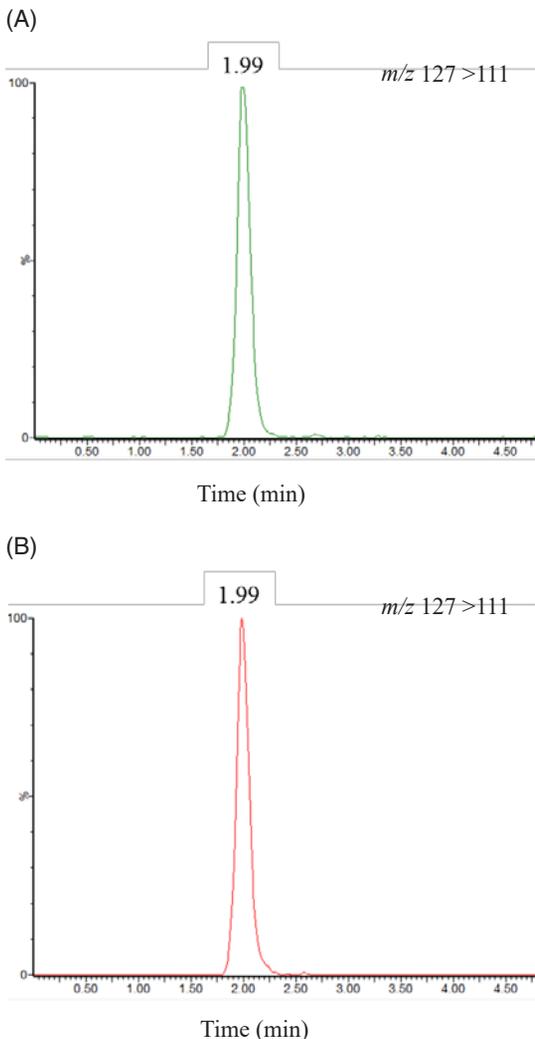
取市售澱粉及洋芋片之空白檢體1.0 g，分別加入1及10 μg/mL標準溶液50 μL，使其檢體配製濃度為50及500 ng/g，分別於同日內及異日間進行五重複添加回收。經檢液調製步驟後，依第九節進行分析，計算其平均回收率及變異係數(Coefficient of Variation, CV)，以評估檢驗方法之準確性及重複性。

結果與討論

一、分析條件之建立

本研究以超高效液相層析串聯式質譜儀分

析食品中溴酸鹽含量，移動相及管柱條件係參考相關文獻⁽⁸⁾，以90%乙腈溶液進行等梯度分析時，於分析洋芋片基質時，發現同一樣品分析之重複性不佳，於連續注射時之第一次注射與其他次相比面積差異過大，推測可能因基質殘留於管柱中影響離子化效果，因此依管柱性質於待測物分析結束後調整移動相比例進行管柱之清洗及平衡，調整後之重複性結果改善，以所建立條件分析溴酸鹽標準品之層析圖如圖一所示。



圖一、以UPLC-MS/MS分析溴酸鹽標準品之定量離子對(A)及定性離子對(B)之MRM圖譜

二、標準曲線之建立

溴酸鹽濃度範圍在5-100 ng/mL間所繪製之標準曲線迴歸方程式為 $y = 322.718x - 58.928$ ，其 r^2 值為0.9999，顯示在5-100 ng/mL之濃度範圍內其線性關係良好，如圖二所示。

三、基質效應的評估

以麵粉及洋芋片為空白基質，其基質效應分別為13.8及9.8%，皆低於15%，故本檢驗方法不需使用基質匹配檢量線。

四、定量極限之評估

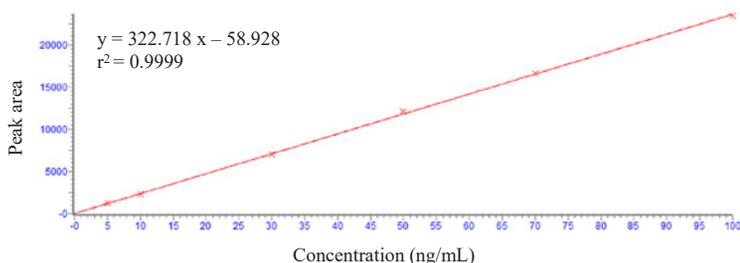
本研究定義之定量極限(Limit of quantitation, LOQ)採評估樣品中添加低濃度之標準溶液，經前處理後層析圖中待測物波峰之訊號/雜訊比大於10之最低濃度，其回收率及重複性皆符合食藥署食品化學檢驗方法確效規範⁽⁹⁾。本方法之溴酸鹽之定量極限為50 ng/g。

五、添加回收及重複試驗

分別以市售之麵粉及洋芋片做為空白檢體，加入溴酸鹽標準溶液，使其檢體配製濃度為50及500 ng/g，依所建立之條件進行5重複試驗，以超高效液相層析串聯式質譜儀進行分析，回收試驗結果如表三所示，麵粉同日內之平均回收率分別為105.3及108.3%，變異係數為10.3及6.9%，異日間之變異係數為8.8及9.8%；洋芋片同日內之平均回收率分別為

表三、空白檢體中添加50及500 ng/g溴酸鹽之分析結果

種類	添加量 (ng/g)	同日內(n = 5)		異日間(n = 10)	
		平均 回收率 (%)	變異 係數 (%)	平均 回收率 (%)	變異 係數 (%)
麵粉	50	105.3	10.3	109.3	8.8
	500	108.3	6.9	105.2	9.8
洋芋片	50	114.7	8.7	111.1	7.3
	500	114.6	5.7	112.3	4.7



圖二、溴酸鹽之標準曲線

114.6及114.7%，變異係數為8.7及5.7%，異日間之變異係數為7.3及4.7%，兩種基質之結果皆符合食藥署食品化學檢驗方法確效規範，顯示方法之準確性良好且重複性及中間精密度佳。

六、市售產品分析結果

將本研究建立之檢驗方法應用於市售麵粉5件及洋芋片6件檢體之檢驗，結果均未檢出溴酸鹽。

結 論

本檢驗方法之確效試驗，2種基質之添加平均回收率介於105.3-114.7%之間，於同日內及異日間之重複性皆符合確效規範。標準曲線迴歸方程式之 r^2 值為0.9999，顯示其線性關係良好，定量極限為50 ng/g，以此方法檢驗市售共11件檢體，結果溴酸鹽皆為未檢出。

目前我國公告之食品檢驗方法中，只有包裝飲用水及盛裝飲用水中溴酸鹽的檢驗方法，使用離子層析法進行分析，但於食品檢體中含有較複雜之基質干擾，因此若要分析食品基質中溴酸鹽之含量，則需使用2組串聯管柱進行線上淨化及分析。本研究以快速之樣品前處理方式及分析儀器操作，優化檢驗流程，可應用於例行性工作中。本檢驗方法已於109年11月19日公開為建議檢驗方法供外界參考使用，爾後將持續測試其他類食品基質，擴增方法適用

範圍，提升檢驗效能。

參考文獻

1. International Agency for Research on Cancer. 1999. Potassium Bromate (Group 2B). Summaries and Evaluations. 73: 481.
2. Kurokawa, Y. and Hayashi, Y. 1990. Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate - a new renal carcinogen. Environ. Health Perspect. 87: 309-335.
3. 衛生福利部。2006。包裝飲用水及盛裝飲用水中溴酸鹽之檢驗方法。95.09.13署授食字第0951800026號公告。
4. Wagner, H.P., Pepich, B.V., Hautman, D.P. and Munch, D.J. 2000. Eliminating the chlorite interference in US Environmental Protection Agency method 317.0 permits analysis of trace bromate levels in all drinking water matrices. J. Chromatogr. A 882: 309-319.
5. Mikako, N., Takayuki, M., Katsuichi, H. and *et al.* 2006. Effects of reducing agents and baking conditions on potassium bromate residues in bread. Cereal Foods World 51: 69-73.
6. 蔡佳芬、方銘志、曾仁鴻、潘志寬等。2010。以線上淨化高效離子層析法分析食品中溴酸鹽。食品藥物研究年報，1: 1-4。
7. Xian, Y., Guo, X., Hou, X. and *et al.* 2017. A modified quick, easy, cheap, effective, rugged,

- and safe cleanup method followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the rapid analysis of perchlorate, bromate and hypophosphite in flour. *J. Chromatogr. A* 1526: 31-38.
8. Sachiki S. 2012. Analysis of free bromate ions in tap water using an ACQUITY UPLC BEH amide column. [<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004197en.pdf>].
9. 食品藥物管理署。2013。食品化學檢驗方法之確效規範。 [<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f636935163435629279>]。

Development of an Analytical Method for Bromate in Foods

YOU-LUN WU, CHE-LUN HSU, YA-TZE LIN, SHOU-CHIEH HUANG,
SU-HSIANG TSENG AND DE-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

An analytical method for determining bromate in foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed. Sample was extracted with 70% acetonitrile solution, further clean-up was achieved with solid-phase extraction, and then the extract was analyzed by UPLC-MS/MS. The separation was conducted on a BEH Amide column with 50 mM aqueous ammonium formate acetonitrile mobile phase by a gradient program. The recovery, repeatability and limit of quantification studies were evaluated by spiking bromate standards into the blank samples at the level of 50 and 500 ng/g. In flour matrix, the average recoveries of bromate were 105.3% and 108.3%, the coefficients of variation were 10.3% and 6.9%, respectively. The intraday and interday coefficients of variation were obtained 8.8% and 9.8%, respectively. In potato chip matrix, the average recoveries of bromate were 114.6% and 114.7%, the coefficients of variation were 8.7% and 5.7%, respectively. The intraday and interday coefficients of variation were obtained 7.3% and 4.7%, respectively. The limit of quantification was 50 ng/g. This analytical method was further applied to 11 related samples, and bromate was not detected in those samples.

Key words: UPLC-MS/MS, bromate, flour, potato chip