

等國仍准許使用BP及ADA(日本只准用BP)，為配合政府即將加入GATT，屆時市場開放，該等國之麵粉可能輸入。日前衛生署建議將BP及ADA列為進口麵粉之優先檢驗項目，至今中央標準局及衛生署均未公告該等檢驗方法。為了解國產及進口麵粉之含量情形，檢驗方法之建立實為刻不容緩之課題。鑑此研擬本研究進行檢驗方法之探討。BP之檢驗方法有比色法⁽⁸⁾，氣相層析法(GC)^(9,10)及高效液相層析法(HPLC)^(11,12)，ADA之參考文獻有比色法⁽³⁾及HPLC^(2,4)，本研究之目的在於建立快速精確之麵粉中BP及ADA之檢測法。

材料與方法

一、檢體來源

本研究所使用之進口檢體函請經濟部商品檢驗局協助抽樣，自83年11月至84年3月由高雄分局及基隆分局送樣來自日本及澳洲之檢體33件(編號1~33)，國產麵粉檢體係84年1月間於台北市區依不同廠牌價購12件(編號34~45)，共計45件。

二、試藥

BP對照標準品購自Nippon Oil Fat Corporation, Japan, 依據FCC⁽¹⁾予以測定，含量99.3%，ADA對照標準品購自Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan，依據FCC⁽¹⁾予以測定，含量99.1%。PIC B6(0.005M hexane sulfonic acid)購自Milipore Corporation, Ma, USA。乙腈採用液相層析級(Labscan Limited Co., Dublin, Ireland)。丙酮、甲醇、氯仿、正己烷、磷酸氫二鉀、氫氧化鈉、鹽酸、過氯酸鈉及二甲基代甲醯胺(N,N-dimethylformamide (DMF))均採試藥特級。

三、儀器與設備

(一) 高效液相層析儀: Shimadzu LC-6AD Liquid Chromatography, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan。

(二) 檢出器: Shimadzu SPD-6AV UV-VIS Spectrophotometric Detector, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan。

(三) 檢出器: Shimadzu SPD-M6A Photodiode Array UV-VIS Detector, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan。

(四) 層析管: Cosmosil packed column, 5 μ m, C18, 250 X 4.6 mm i.d., Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan。

四、標準溶液之調製

(一) BP

精確稱取BP對照標準品10 mg加乙腈溶解並定容至100 ml，供作標準原液，臨用時再以乙腈稀釋成一系列各種不同濃度之標準溶液。

(二) ADA

1. 參考De Stefanis method⁽⁴⁾精確稱取ADA 100 mg溶於0.1N NaOH 300~350 ml三分鐘(23~25°C)，以0.1N HCl中和至pH 6.00~6.50，再加水定容至1000 ml，供作標準原液，臨用時再以水稀釋成一系列各種不同濃度之標準溶液。

2. 精確稱取ADA對照標準品10 mg加DMF溶解並定容至100 ml，供作標準原液，臨用時再以水稀釋成一系列各種不同濃度之標準溶液。

五、檢液之調製

(一) BP

本研究主要是參考Gaddipati *et al.*⁽¹¹⁾之方法加以修飾，精確稱取檢體5 g於100 ml之容量瓶中，分別加乙腈、甲醇、乙醚及丙酮約70 ml，充分振搖混合均勻，置於超音波振盪器(Branson Ultrasonics Corporation, USA)振盪5分鐘，加溶劑定容至100 ml，以0.45 μ m nylon濾膜(Sun Brokers, Inc., USA)過濾。乙醚萃取時，則以Whatman No.41濾紙抽氣過濾，取濾液10 ml，於40~45°C減壓濃縮(Buchi Rotavapor, Switzerland)後，殘留物加乙腈溶解並定容至10 ml，以0.45 μ m nylon濾膜過濾，濾液供作定量用檢液。

(二) ADA

本研究主要是參考De Stefanis⁽⁴⁾之方法加以修飾，精確稱取檢體10 g於100 ml之容量瓶中，分別加丙酮、甲醇、乙腈、DMF、氯仿、正己烷及水，充分振搖混合均勻，置於振盪器(祥泰精機有限公司，台北縣)振盪5、10及15分鐘，加溶劑定容至100 ml，以Whatman No.41濾紙抽氣過濾，取濾液25 ml於40~45°C及23~25°C減壓濃縮(Buchi Rotavapor, Switzerland)至約1 ml，加0.5% K₂HPO₄溶液超

音波振盪溶解並定容至10 ml，以0.2 μm 濾膜 (Acrodisc LC PVDF, Gelman Sciences Inc., MI, USA)濾膜過濾，濾液供作定量用檢液。

六、定性及定量分析

(一) 高效液相層析條件

1. BP

分離管: Cosmosil Packed Column, 5 μm , C18。

檢出器: UV 238 nm。

移動相溶液: (I) CH_3CN : 0.01M NaClO_4 (63:37), (II) CH_3CN : H_2O (63:37)，以0.45 μm 濾膜過濾並抽氣。

流速: 1 ml/min。

感度(attenuation): 3。

注入量: 20 μl 。

2. ADA

分離管: Cosmosil Packed Column, 5 μm , C18。

檢出器: UV 247 nm。

移動相溶液: (I) 0.005M PIC B-6, (II) 0.02% K_2HPO_4 , pH 2.5, 以0.45 μm 濾膜過濾並抽氣。

流速: 0.5 ml/min。

感度(attenuation): 3。

注入量: 20 μl 。

(二) 取BP及ADA標準原液分別配製成0.05、0.1、0.2、0.4及0.25、0.5、1、2 $\mu\text{g/ml}$ 四種標準溶液，每一濃度作三重複，以平均波峰面積及標準溶液之濃度繪製兩種標準曲線。就定量用檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及光電二極體陣列檢測結果比較鑑別之，並由檢液之波峰面積與標準曲線比較，求出BP及ADA之含量。

七、回收試驗

(一) BP

取檢體5 g，同時各添加BP標準原液(100 $\mu\text{g/ml}$) 50、100、200及400 μl ，每一添加量作三重複，同時作空白試驗，其步驟依上述五、(一)節處理之。

(二) ADA

取檢體10 g，同時各添加ADA標準原液(100 $\mu\text{g/ml}$ in DMF) 100、200、400及800 μl ，每一添加量作三重複，同時作空白試驗，其步驟依上述五、(二)節處理之。

八、統計分析

實驗結果所有數據均以三重複平均值及變異係數表示。

結果與討論

本研究之目的在於建立簡易快速且精確之BP及ADA之檢驗方法，以下就兩種方法分別進行探討。

一、BP

BP之檢驗方法計有比色法⁽⁸⁾，GC法^(9,10)及HPLC法^(11,12)，AOAC採用耗時繁重之比色法，將麵粉中之BP以含鐵粉之酸性乙醚萃取，將BP生成 benzoic acid (BA)，淨化後與 $\text{H}_2\text{NOH} \cdot \text{HCl}$ 溶液反應，於510 nm測定含量。日本食品衛生檢查指針⁽⁹⁾所收載之GC法係將食品中之BP以乙醚萃取，經silica gel分離管柱將食品中之BA吸附，溶出液加碘化鉀溶液，使BP生成BA，再以乙醚萃取後，利用GC分析。Gaddipati *et al.*⁽¹¹⁾及Chou *et al.*⁽¹²⁾以HPLC法檢測乳霜及乳液等含藥化妝品中BP之含量，將檢體以乙腈⁽¹¹⁾及甲醇⁽¹²⁾萃取後，直接偵測BP。AOAC比色法之感度低，特異性較差，同時因鐵粉較無法有效的將BP生成BA，導致回收率差異性較大⁽¹⁰⁾。Nozaki *et al.*⁽¹³⁾提到BP於79.8 $^{\circ}\text{C}$ 時，在很多溶劑(如chloroform, benzene, toluene, carbon disulfide, acetone, ethyl acetate, acetic acid, diethyl ether, ethyl alcohol等)中會分解成biphenyl, phenylbenzoate, benzoic acid及benzene等成分。日本食品衛生檢查指針⁽⁹⁾先將小麥粉中之BA去除，再將BP反應生成BA，如果BP在麵粉中會分解生成BA，則該法所檢測者係殘留之BP，與AOAC法稍有異。本研究擬參考日本食品衛生檢查指針所載之方法及HPLC法針對麵粉中BP之檢測法加以探討。

(一) 高效液相層析條件之探討

參考Gaddipati *et al.*之方法，以乙腈調製標準溶液，利用C18層析管，比較(A) MeOH : H_2O (75:25, v/v)⁽¹¹⁾及(B) CH_3CN : 0.01M NaClO_4 (63:37, v/v)⁽¹²⁾兩種移動相時，(A)之層析圖譜受雜質嚴重干擾，(B)則得到相當滿意之層析圖譜(圖略)。BP之化學構造及性質顯示屬非極性，移動相並不需要緩衝液來削弱其極性，因此改以 CH_3CN : H_2O (63:37)測試，結果BP之滯留時間沒有影響，有些干擾物質之滯留時間反

Table 1. Comparison of extraction efficiencies with various solvents of 8 ppm BP spiked in flour

Extraction solvent	Recovery (%) ^a
Ether	101.84 (4.12) ^b
Acetonitrile	101.43 (0.55)
Methanol	99.03 (2.57)

^a Average of three determinations.

^b Number in parenthesis is the coefficient of variation (CV, %).

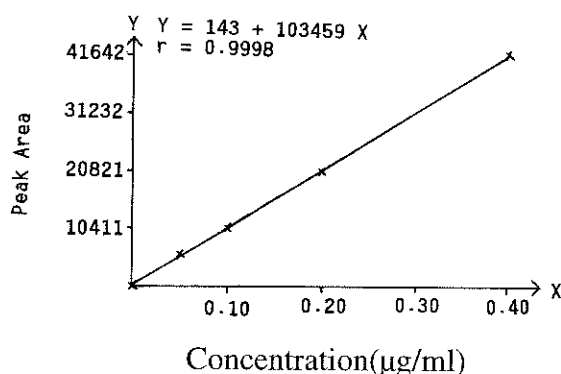


Figure 1. Standard curve of BP.

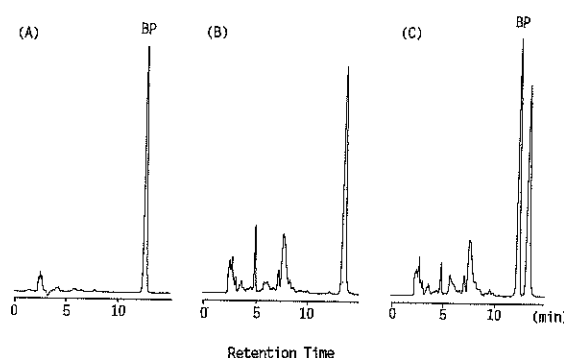


Figure 2. HPLC chromatograms of (A) standard solution of 0.4 µg/ml BP, (B) flour, (C) flour spiked with 8 ppm BP.

而縮短而達到更良好之分離效果(圖略),同時又可免除緩衝液對層析管之不良影響,因此改

Table 2. Recoveries of BP in flour

Spiked level (ppm)	Recovery ^a (%)
1	101.37 (3.04) ^b
2	100.40 (4.33)
4	99.85 (2.54)
8	101.43 (0.55)

^a Average of three determinations.

^b Number in parenthesis is the coefficient of variation (CV, %).

採CH₃CN: H₂O (63:37)為移動相。

(二)萃取溶媒之選擇

為了解溶媒之萃取效果,取10 g麵粉檢體中添加8 ppm BP,分別加乙腈、甲醇、乙醚及丙酮各70 ml,以超音波振盪萃取5分鐘,再加溶媒定容至100 ml,經0.45 µm nylon濾膜過濾後,利用上述層析條件分析。結果(見表一)前三種溶媒之萃取效果均相當良好,而丙酮本身干擾BP波峰。當以乙醚萃取時,無法直接進行HPLC分析,必須經減壓濃縮及轉溶之步驟。乙腈萃取所得層析圖譜之雜質較甲醇少,因此選用乙腈為萃取溶媒。

(三)添加回收試驗

添加回收試驗之檢體含水分12.74%及粗蛋白質12.51%,圖一所示為BP之標準曲線,其線性迴歸係數 $r = 0.9998$ 。取檢體5 g,添加1、2、4及8 ppm進行回收試驗,每一添加量作三重複,所得回收率(如表二)為101.37、100.40、99.85及101.43%,其變異係數皆小於5%。圖二為麵粉檢體中添加8 ppm之液相層析回收圖譜。

二、ADA

ADA之參考文獻有比色法⁽³⁾及高效液相層析法^(2,4),比色法將麵粉以DMF萃取,經DMSO轉溶,以強鹼及還原劑處理後,再反應生成hydrazine,最後於460 nm測定含量,該法之可信度(約±20%)及精確度皆較差^(2,4)。Osborne⁽²⁾將檢體以DMF萃取後,利用HPLC分離定量,其條件為silica層析管,以甲醇:乙醚

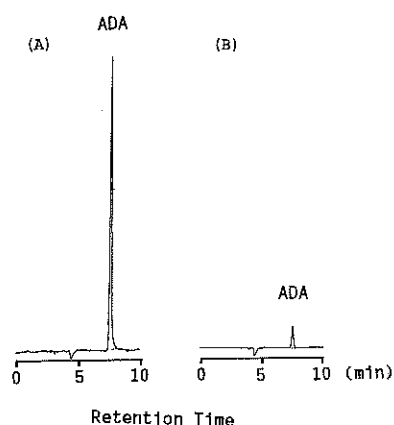


Figure 3. HPLC chromatograms of ADA standard solution (1 µg/ml), (A) authorial method, (B) De Stefanis method.

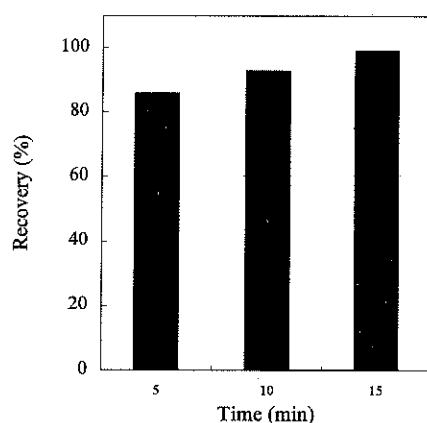


Figure 4. Relationship between extraction times and recoveries of 4 ppm ADA spiked in flour.

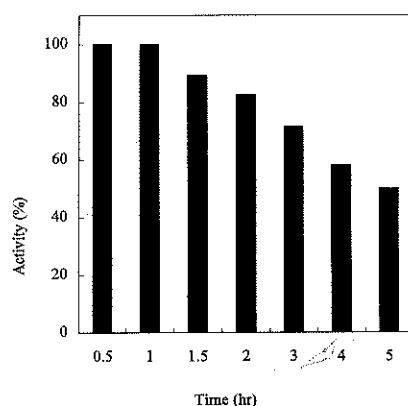


Figure 5. Stability of ADA in 0.5% K₂HPO₄.

Table 3. Effect of different evaporated temperatures on the recoveries of 4 ppm ADA spiked in flour

Temperature (°C)	Recovery ^a (%)
23~25	99.26(3.18) ^b
40~45	99.11(5.24)

a Average of three determinations.

b Number in parenthesis is the coefficient of variation (CV, %).

(20:1000)為移動相，於275 nm偵測，ADA之最大吸收在UV 247 nm，當ADA溶於DMF時，於260 nm有很強之吸光，為了消除此干擾，選用275 nm偵測，導致感度降低(偵測極限為1 mg/l)。De Stefanis⁽⁴⁾將檢體以丙酮萃取，經減壓濃縮(23~25°C)後，以0.5% K₂HPO₄(pH 8.40)溶解，再利用HPLC分析，本研究主要是參考De Stefanis method進行一系列之探討。

(一)液相層析條件之探討

De Stefanis⁽⁴⁾利用C18層析管及0.02% K₂HPO₄ (pH 8.40)移動相，於260 nm偵測。ADA之化學構造有兩個amide groups，在溶液中呈解離態，為了降低其極性，移動相改以與ADA相反電荷之0.005M PIC B-6 (hexane sulfonic acid)，檢出器選用ADA之最大吸收UV 247 nm，測試結果，分離效果及感度皆明顯提高，麵粉經萃取後之層析圖譜亦無雜質干擾(圖略)。

(二)標準溶液之調製

De Stefanis⁽⁴⁾精確稱取ADA 0.100 g加0.1N NaOH 300~350ml，於23~25°C溶解三分鐘後，以0.1N HCl中和至pH 6.00~6.50，再加水定容至1000 ml。ADA是橘紅色粉末，溶於0.1N NaOH時呈黃色透明液，中和時黃色漸漸消退，隨著加鹼溶解時間越長，中和時顏色褪得越淡，所得層析圖譜之波峰亦越低，原因是在強鹼下ADA之amide groups水解所致⁽³⁾。Osborne⁽²⁾提到ADA之溶解度在DMF中為6 g/l，水中為0.035 g/l，因此本研究取ADA 10 mg加DMF溶解定容至100 ml，再以水稀釋成不

同濃度之標準溶液，結果(見圖三)層析圖譜之再現性良好，同時感度(波峰面積)較De Stefanis method提高約十倍。

(三)萃取溶媒之選擇

比較丙酮、甲醇、乙腈、DMF、氯仿、正己烷及水等溶媒之萃取效果。Weak *et al.*⁽³⁾及Osborne⁽²⁾皆以DMF萃取，但DMF與ADA有相同之滯留時間而無法直接進行高效液相層析，減壓濃縮之溫度至少60~65°C，而殘留之DMF又干擾分析。以氯仿及正己烷萃取時，僅能萃取少量之ADA，甲醇、乙腈及水則萃取出多量干擾物，同時回收率偏低。丙酮抽出物不含蛋白質或其他干擾成份，因此進行液相層析前不需要去除雜質，故萃取溶媒採用丙酮。但丙酮與DMF一樣，與ADA有相同之滯留時間，於247 nm不能直接進行高效液相層析，因此必須經減壓濃縮再轉溶，另外一些滯留時間較長之雜質使分析時間長達30分鐘為其缺點。

(四)萃取時間

為了解丙酮之萃取效果，乃進行不同萃取時間之測試，圖四為10 g麵粉中添加4 ppm ADA，不同振盪器萃取時間與回收率之關係，萃取5、10及15分鐘之回收率分別為85.82%、92.84%及99.11%，因此萃取時間為15分鐘。

(五)減壓濃縮溫度

De Stefanis Method之減壓濃縮溫度為23~25°C，需時較長(約30分鐘)，FCC⁽¹⁾記載ADA於180°C融溶而分解，因此比較23~25°C及40~45°C兩種濃縮溫度，經添加4 ppm之結果(見表三)回收率分別為99.26及99.11%，並無差異，但40~45°C之濃縮時間縮短很多，故本實驗之減壓濃縮溫度為40~45°C。

(六)ADA之安定性

調製標準溶液時發現ADA易溶於鹼，但在鹼性下亦容易分解，為了解ADA在0.5% K₂HPO₄ (pH 8.40)中之安定性，取麵粉檢體10 g加4 ppm ADA以丙酮萃取，經上述方法萃取、濃縮，以0.5% K₂HPO₄ (pH 8.40)溶解，經0.2 µm濾膜(以0.45 µm濾膜過濾無法得到澄清濾液)過濾後，進行高效液相層析，圖五為檢液經過0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4及5小時之變化情形，顯示ADA於1.5小時後逐漸分解，因此建議檢液必須於1小時內進行液相層析分析。

(七)添加回收試驗

Table 4. Recoveries of ADA in flour

Spiked level (ppm)	Recovery ^a (%)
1	94.35 (4.21) ^b
2	95.58 (6.25)
4	99.11 (5.24)
8	97.53 (6.57)

a Average of three determinations.

b Number in parenthesis is the coefficient of variation (CV, %).

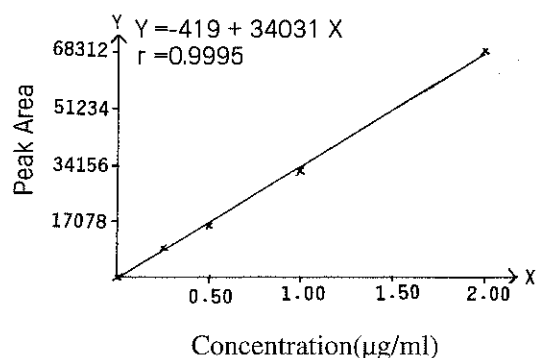


Figure 6. Standard curve of ADA.

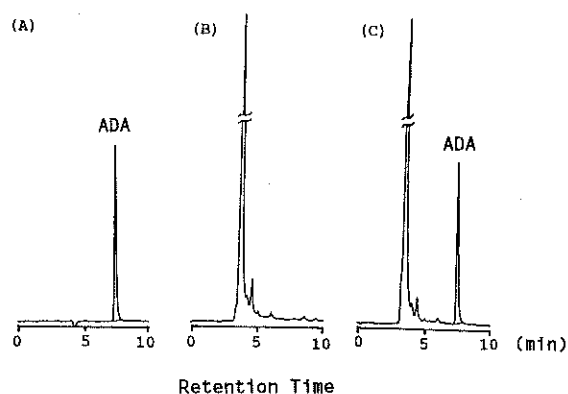


Figure 7. HPLC chromatograms of (A) standard solution of 0.5 µg/ml ADA, (B) flour, (C) flour spiked with 2 ppm ADA.

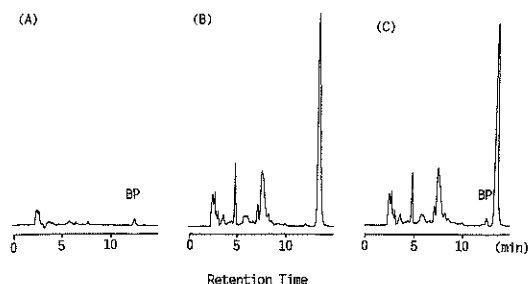


Figure 8. HPLC chromatograms of (A) standard solution of 0.01 µg/ml BP, (B) flour, (C) flour spiked with 0.2 ppm BP.

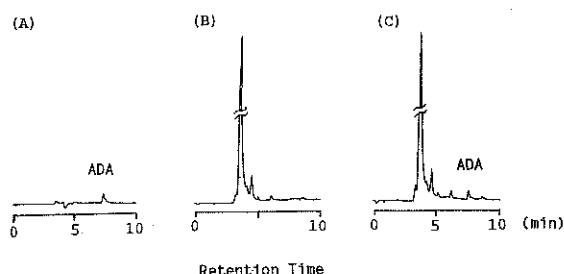


Figure 9. HPLC chromatograms of (A) standard solution of 0.05 µg/ml ADA, (B) flour, (C) flour spiked with 0.2 ppm ADA.

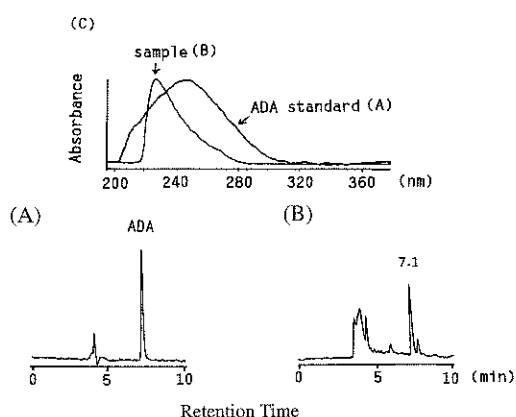


Figure 10. HPLC chromatograms of (A) standard solution of 0.25 µg/ml ADA, (B) No. 27 sample of imported flour. (C) Photodiode array spectra of (A) and (B), chromatographic peaks at Rt 7.1 min.

圖六所示為ADA之標準曲線，其線性迴歸係數 $r = 0.9995$ 。取檢體10 g，添加1、2、4及8

ppm進行添加回收試驗，所得回收率(見表四)為94.35、95.58、99.11及97.53%，其變異係數皆小於10%，圖七為麵粉檢體中添加2 ppm之液相層析回收圖譜。

三、檢出限量及偵測極限

將麵粉檢體添加各種濃度之標準溶液，以本實驗建立之方法分別分析BP及ADA，經測試結果(如圖八及圖九)，BP及ADA之檢出限量均為0.2 ppm，儀器偵測極限(注入量20 µl)BP為0.2 ng，ADA為1 ng。

四、國產及進口麵粉檢體中BP及ADA之含量調查

本研究之麵粉檢體包括國產12件及進口33件，國產檢體於台北市區價購，進口檢體因取得不易，故函請經濟部商品檢驗局協助，所送檢體來自日本及澳洲，而其他國家之麵粉因無廠商申請進口而無法取得。檢測結果發現No.27進口麵粉檢體之層析圖譜有一波峰與ADA之滯留時間相近，經以光電二極體陣列(photodiode array)偵測結果(如圖十)，該波峰之吸收光譜(max 227 nm)與ADA (max 247 nm)有異，因此45件檢體均未檢出BP及ADA。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會經費支助(84AST-2.8-FAD-47(2))及經濟部商品檢驗局提供進口麵粉檢體，謹致謝忱。

參考文獻

1. National Research Council (U.S.). Food and Nutrition Board. Committee on Codex Specifications. 1981. Food Chemical Codex III. National Academy Press. p.31, p.35.
2. Osborne, B.G. 1986. High-Performance Liquid Chromatography of Azodicarbonamide. J. Chromatogr. 368: 401-404.
3. Weak, E.D., Hosney, R.C. and Seib, P.A. 1976. Determination of Azodicarbonamide in Wheat Flour. Cereal Chem. 53(6): 881-889.
4. De Stefanis, V.A. 1988. Analysis of Azodicarbonamide in Wheat Flour by Liquid Chromatography. Cereal Chem. 65(1): 52-55.

5. Tsen, C.C. 1964. Comparative Study on Reactions of Iodate, Azodicarbonamide and Acetone Peroxides in Simple Chemical Systems and in Dough. *Cereal Chem.* 41: 22.
6. The Bread and Flour Regulations 1984, S.I. 1984, No.1304, HMSO, London.
7. 行政院衛生署。1980。69.4.15衛署藥字第264770號公告。台北市。
8. AOAC. 1990. Chapt. 32 Cereal Foods. In "AOAC Official Methods of Analysis". p.784. Helrich, K. (ed). Assoc. Off. Anal. Chem. Inc., Virginia, USA.
9. 厚生省生活衛生局。1989。第15章小麥粉處理劑等，78.過酸化ベンゾイル。食品衛生検査指針。312-315頁。日本食品衛生協會。東京。日本。
10. Karasz, A.B., DeCocco F. and Maxstadt, J.J. 1974. Gas Chromatographic Measurement of Benzoyl Peroxide (as Benzoic acid) in Cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57(3): 706-709.
11. Gaddipati, N., Volpe, F., and Anthony, G. 1983. Quantitative Determination of Benzoyl Peroxide by High-Performance Liquid Chromatography and Comparison to the Idometric Method. *J. Pharm. Sci.* 72(12): 1398-1400.
12. Chou, C.K. and Locke, D.C. 1984. Liquid Chromatographic Determination of Benzoyl Peroxide in Acne Preparations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67(5): 913-915.
13. Nozaki, K. and Bartlett, P.D. 1946. The Kinetics of Decomposition of Benzoyl Peroxide in Solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 68: 1686-1692.

Determination of Benzoyl Peroxide and Azodicarbonamide in Flour

SHU-CHU SU*, HWA CHU, CHING-MEI CHEN,
SHU-CHU LEE AND SHIN-SHOU CHOU

*National Laboratories of Foods and drugs,
Department of Health, Executive Yuan, R.O.C.*

ABSTRACT

High performance liquid chromatographic (HPLC) methods for the determination of benzoyl peroxide (BP) and azodicarbonamide (ADA) in flour were developed. To determine BP, the sample was extracted with acetonitrile, and after being sonicated and filtered, the solution was determined by HPLC. ADA was extracted with acetone, and an aliquot of the extract was evaporated (40-45°C). The residue was dissolved with

0.5% K_2HPO_4 , then determined by HPLC. Recovery studies of BP and ADA were performed at 1, 2, 4 and 8 ppm fortification levels in flour samples. Average recoveries were 99.85-101.43% for BP and 94.35-99.11% for ADA. Coefficients of variation were less than 10%. Thirty three imported flours and twelve domestic flours were analyzed. No BP and ADA were found in any of the samples.

Key words: Benzoyl peroxide, azodicarbonamide, flour, high performance liquid chromatography.

