

食品中防腐劑多重分析方法之開發

郭景豪 方俊仁 許哲綸 蔡麗瑤 高雅敏 林美智 曾素香

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

現行公告之「食品中防腐劑之檢驗方法(MOHWA0020.03)」係以高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器(High Performance Liquid Chromatograph/ Photodiode Array Detector, HPLC-DAD)進行12項防腐劑之分析，本研究規劃以超高效液相層析串聯質譜儀(Ultra-high Performance Liquid Chromatograph/tandem Mass Spectrometer, UPLC-MS/MS)開發多重分析方法。本方法之分析物於原檢測之12品項外，新增規定外6項酯類及2項其它類防腐劑，共計20項防腐劑。本研究以含1%甲酸之乙腈溶液及QuEChERS萃取粉劑進行萃取，離心後取上清液以去離子水定容，經濾膜過濾後上機分析，使用ACQUITY UPLC BEH C18層析管柱，移動相採用0.1%甲酸溶液及含0.1%甲酸之甲醇溶液進行梯度沖提，20項防腐劑之質譜參數均進行最佳化設定，檢量線之線性範圍，除苯甲酸、二苯氧乙醇及鄰苯基苯酚等3項防腐劑為100-1,000 ng/mL外，其餘17項防腐劑均為10-100 ng/mL，其相關係數(r)均大於0.990。確效試驗與定量極限評估：於空白基質中添加2種濃度之20項防腐劑，結果顯示，平均回收率介於87.0-104.8%之間，同日內變異係數介於1.8-9.3%之間，異日間變異係數介於1.6-13.8%之間，定量極限介於2-20 mg/kg，均符合衛生福利部食品藥物管理署公布之食品化學檢驗方法之確效規範。另以市售烘焙類食品10件驗證所建立之檢驗方法適用性，結果均與產品標示相符且無基質干擾之情形。

關鍵詞：超高效液相層析串聯質譜儀、防腐劑、烘焙食品

前 言

防腐劑具有抑制或延緩細菌或真菌生長之功能，從而延長食品、藥品及化粧品等之保存期限，但近年來陸續有研究或文獻指出特定防腐劑之潛在風險，如苯甲酸钠會與抗壞血酸產生化學反應，而生成易使人類罹癌之苯⁽¹⁾；對羥苯甲酸酯類則可能引起粒線體障礙、破壞細胞功能⁽²⁾，其類似雌激素(estrogen)功能可能增加乳腺癌風險⁽³⁾等議題，至今依然有許多文獻持續討論。

食品之腐敗與變質大多是由微生物作用所導致，因此，利用防腐劑於食品中可抑制微生物之生長與繁殖功能，進而延長食品之保存期限。國際間均允許食品添加防腐劑，惟防腐劑的使用均有一定規範，若使用過量則可能引發健康之疑慮，我國則訂有「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」⁽⁴⁾，正面表列可作為食品添加防腐劑之品項，並規範其可使用之食品範圍及使用限量，若非表列品項則不能使用於食品中，惟於食品中合法添加防腐劑，卻未正確標示，仍可能違反相關標示規定。

有關食品中防腐劑之檢驗方法，現行公告檢驗方法「食品中防腐劑之檢驗方法(MOHWA0020.03)」係以高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器(HPLC-DAD)，分析食品中苯甲酸等12項防腐劑(5項酸類及7項酯類)，另列有其質譜確認條件。蔡等人⁽⁵⁾於109年度開發之飲料中防腐劑多重分析方法，以超高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器(UPLC-DAD)分析黑麥汁及果汁中對羥苯甲酸甲酯等14項准用及非准用防腐劑，其前處理方法應用QuEChERS之鹽析步驟進行萃取，方法簡便且快速，惟該研究之防腐劑分析品項並未涵蓋酸性防腐劑，因此仍無法完全取代公告檢驗方法。

本研究擬參考前人研究，並納入苯甲酸等5項酸類防腐劑及二苯氧乙醇(2-phenoxyethanol)，規劃建立可同步分析20項防腐劑之多重分析方法。惟考量酸類及酯類防腐劑之極性差異甚大，且部分品項為同分異構物，若延續過去研究，採用UPLC-DAD進行方法開發，將大幅增加分析時間，爰規劃採用超高效液相層析串聯質譜儀(UPLC-MS/MS)進行分析，除可縮短分析時間，亦可有效降低食品中複雜基質可能造成之層析干擾。

材料與方法

一、檢體來源

自臺北市大賣場購入市售糕餅類檢體10件，供檢驗方法開發測試之用。

二、試藥

(一) 甲醇採用液相層析級，甲酸及乙腈採用試藥特級，均購自Merck公司(Kenilworth, NJ, USA)；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)。

(二) 對照用標準品：對羥苯甲酸

(*p*-Hydroxybenzoic acid, 99.0%)、苯甲酸(Benzoic acid, 99.5%)、鄰苯基苯酚(*o*-Phenylphenol, 99.6%)、二苯氧乙醇(2-Penoxyethanol, 99.5%)、對羥苯甲酸甲酯(Methyl *p*-hydroxybenzoate, 99.0%)、對羥苯甲酸丙酯(Propyl *p*-hydroxybenzoate, 99.0%)、對羥苯甲酸戊酯(Pentyl *p*-hydroxybenzoate, 99.6%)及對羥苯甲酸苯酯(Phenyl *p*-hydroxybenzoate, 98.0%)，均購自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)；對羥苯甲酸第二丁酯(sec-Butyl *p*-hydroxybenzoate, 98.0%)、對羥苯甲酸異丁酯(Isobutyl *p*-hydroxybenzoate, 99.0%)、對羥苯甲酸異戊酯(Isopentyl *p*-hydroxybenzoate, 99.9%)及對羥苯甲酸己酯(Hexyl *p*-hydroxybenzoate, 98.0%)，均購自Tokyo Chemical Industry公司(Tokyo, Japan)；對羥苯甲酸庚酯(Heptyl 4-hydroxybenzoate, 99.9%)及對羥苯甲酸苄酯(Benzyl 4-hydroxybenzoate, 100.0%)，均購自AccuStandard公司(New Haven, CT, USA)；己二烯酸(Sorbic acid, 98.5%)、水楊酸(Salicylic acid, 99.5%)、對羥苯甲酸乙酯(Ethyl *p*-hydroxybenzoate, 99.0%)及對羥苯甲酸丁酯(Butyl *p*-hydroxybenzoate, 99.9%)，均購自Nacalai tesque公司(Kyoto, Japan)；去水醋酸(Dehydroacetic acid, 98.0%)及對羥苯甲酸異丙酯(Isopropyl *p*-hydroxybenzoate, 98.0%)，均購自Alfa Aesar公司(Haverhill, MA, USA)。

三、器具及材料

50 mL離心管(PP材質)，5及1,000 mL容量瓶(玻璃材質)及濾膜(0.22 μm，PTFE材質)，均購自Merck公司；層析管(ACQUITY UPLC BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 × 100 mm)，購自Waters公司(Milford, MA, USA)；萃取用粉劑：EN method (含檸檬酸鈉1 g、檸檬酸氫二

鈉0.5 g、無水硫酸鎂4 g及氯化鈉1 g，產品編號：5982-6650)、Original method (含無水硫酸鎂6 g及氯化鈉1.5 g，產品編號：5982-5555)、AOAC 2007.01 method (含醋酸鈉1.5 g及無水硫酸鎂6 g，產品編號：5982-6755) 均購自Agilent 公司(Santa Clara, CA, USA)。

四、儀器設備

- (一)超高效液相層析串聯質譜儀(Acquity UPLC及Xevo TQ-XS, Waters, USA)。
- (二)旋渦混合器(VORTEX-GENIE 2, Scientific Industries, USA)。
- (三)高速分散裝置(2010 GenoGrinder, Cole-Parmer, USA)。
- (四)離心機(Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, USA)。

五、檢驗方法

(一)試劑之調製

1. 含1%甲酸之乙腈溶液：取甲酸10 mL，加乙腈使成1,000 mL。
2. 50%甲醇溶液：取甲醇50 mL，加去離子水使成100 mL。

(二)移動相溶液之調製

1. 移動相溶液A：取甲酸1 mL，加去離子水使成1,000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
2. 移動相溶液B：取甲酸1 mL，加甲醇使成1,000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作

移動相溶液B。

(三)標準溶液之配製

取對羥苯甲酸庚酯對照用標準品約10 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至5 mL，使濃度相當於2,000 µg/mL，另取其餘19項防腐劑對照用標準品各約10 mg，精確稱定，以50%甲醇溶液溶解並定容至5 mL，使濃度相當於2,000 µg/mL，作為標準原液，於4℃貯存備用。臨用時，取適量各標準原液混合，以50%甲醇溶液稀釋至含苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇500 µg/mL，其餘17項防腐劑為50 µg/mL，供作添加回收試驗用標準溶液，再以50%甲醇溶液稀釋至含苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇10 µg/mL，其餘17項防腐劑為1 µg/mL，供作基質匹配檢量線用標準溶液，另以50%甲醇溶液進行稀釋，使其分別含苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇100-1,000 ng/mL，其餘17項防腐劑為10-100 ng/mL (表一)，供作標準溶液。

(四)檢液之調製

將檢體均質後，取約1 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入去離子水10 mL及含1%甲酸之乙腈溶液10 mL，再加入QuEChERS萃取粉劑(EN method)，蓋上離心管蓋，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1,000 rpm振盪1分鐘後，以5,000 ×g離心5分鐘，取上清液100 µL (a)，加入50%甲醇溶液使成1,000

表一、20項防腐劑之標準溶液配製濃度

防腐劑品項	配製濃度(ng/mL)				
	L1	L2	L3	L4	L5
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、對羥苯甲酸丙酯、對羥苯甲酸異丙酯、對羥苯甲酸丁酯、對羥苯甲酸異丁酯、對羥苯甲酸第二丁酯、對羥苯甲酸戊酯、對羥苯甲酸異戊酯、對羥苯甲酸苯酯、對羥苯甲酸己酯、對羥苯甲酸苄酯、對羥苯甲酸庚酯	10	20	50	75	100
苯甲酸、鄰苯基苯酚、二苯氧乙醇	100	200	500	750	1,000

μL (b)，經濾膜過濾後，供作檢液。

(五)標準曲線之製作

精確量取標準溶液各5 μL，分別注入超高效液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就各防腐劑之波峰面積，與對應之各防腐劑濃度，製作標準曲線。

超高效液相層析串聯質譜儀分析條件：

層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，
1.7 μm，內徑2.1 × 100 mm。

層析管溫度：35°C。

移動相組成：A為0.1%甲酸溶液，B為含0.1%甲酸之甲醇溶液。

移動相梯度：如表二。

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：2 μL。

離子源：電灑式游離源(Electrospray ion source)。

離子化模式：正離子(ESI⁺)及負離子模式(ESI⁻)。

毛細管電壓(Capillary voltage)：

電灑離子化正離子(ESI⁺)採用4 kV，

電灑離子化負離子(ESI⁻)採用1 kV。

表二、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 → 2.0	95 → 95	5 → 5
2.0 → 2.1	95 → 60	5 → 40
2.1 → 5.0	60 → 60	40 → 40
5.0 → 5.1	60 → 40	40 → 60
5.1 → 15.0	40 → 40	60 → 60
15.0 → 15.1	40 → 20	60 → 80
15.1 → 20.0	20 → 20	80 → 80
20.0 → 21.0	20 → 0	80 → 100
21.0 → 25.0	0 → 0	100 → 100
25.0 → 26.0	0 → 95	100 → 5
26.0 → 30.0	95 → 95	5 → 5

離子源溫度(Ion source temperature)：

150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：550°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow)：150 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：1,000 L/hr。

碰撞氣體流速(Collision gas flow)：0.15 mL/min (氬氣)。

多重反應偵測(Multiple reaction monitoring, MRM)模式：如表三。

(六)鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各5 μL，分別注入超高效液相層析串聯質譜儀中，依五、(五)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各防腐劑之含量(mg/kg)：

檢體中各防腐劑之含量(mg/kg) =

$$\frac{C \times V \times F}{M \times 1,000}$$

C：由標準曲線求得檢液中各防腐劑之濃度(ng/mL)

V：萃取檢體之含1%甲酸之乙腈溶液體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由b/a求得

六、檢驗方法確效

(一)專一性之評估

分別取溶劑(50%甲醇溶液)、市售餅乾檢體及添加各防腐劑之檢體1 g，依五、(四)及(六)操作，評估本方法於糕餅類基質中是否存在干擾分析物之現象，以確認具有明確評估分析物之能力。

(二)線性與基質效應之評估

依五、(三)及表一配製標準溶液，並依五、

表三、20項防腐劑之質譜參數

分析物	離子化模式	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
己二烯酸	ESI ⁺	113 > 67 ^a	15	20
		113 > 95	15	15
去水醋酸	ESI ⁺	169 > 85 ^a	30	20
		169 > 127	30	15
苯甲酸	ESI ⁻	121 > 77 ^a	16	10
對羥苯甲酸	ESI ⁻	137 > 65 ^a	24	24
		137 > 93	24	12
水楊酸	ESI ⁻	137 > 65 ^a	24	24
		137 > 93	24	14
鄰苯基苯酚	ESI ⁻	169 > 115 ^a	40	27
		169 > 141	40	23
對羥苯甲酸甲酯	ESI ⁻	151 > 92 ^a	16	28
		151 > 136	16	18
對羥苯甲酸乙酯	ESI ⁻	165 > 92 ^a	16	28
		165 > 137	16	18
對羥苯甲酸丙酯	ESI ⁻	179 > 92 ^a	16	28
		179 > 137	16	18
對羥苯甲酸異丙酯	ESI ⁻	179 > 92 ^a	16	28
		179 > 137	16	18
對羥苯甲酸丁酯	ESI ⁻	193 > 92 ^a	16	28
		193 > 136	16	18
對羥苯甲酸異丁酯	ESI ⁻	193 > 92 ^a	16	28
		193 > 136	16	18
對羥苯甲酸第二丁酯	ESI ⁻	193 > 92 ^a	16	28
		193 > 136	16	18
對羥苯甲酸戊酯	ESI ⁻	207 > 92 ^a	12	19
		207 > 136	12	19
對羥苯甲酸異戊酯	ESI ⁻	207 > 92 ^a	12	29
		207 > 136	12	15
對羥苯甲酸苯酯	ESI ⁻	213 > 93 ^a	12	13
對羥苯甲酸己酯	ESI ⁻	221 > 92 ^a	12	23
		221 > 136	12	21
對羥苯甲酸苄酯	ESI ⁻	227 > 92 ^a	12	27
		227 > 136	12	19
對羥苯甲酸庚酯	ESI ⁻	235 > 92 ^a	12	23
		235 > 136	12	17
二苯氧乙醇	ESI ⁺	139 > 77 ^a	16	28

^a定量離子對

(戊)條件進行分析。就各防腐劑之波峰面積，與對應之各防腐劑濃度，分別製作標準曲線。

另取空白餅乾檢體，依五、(四)調製檢液，供作空白檢液，分別量取100 μ L，加入基質匹配檢量線用標準溶液10-100 μ L，以50%甲醇溶液定容至1,000 μ L，供作基質匹配檢量線溶液，並依五、(戊)條件進行分析，就各防腐劑之波峰面積，與對應之各防腐劑濃度，分別製作基質匹配檢量線。就前述所得基質匹配檢量線及標準曲線之斜率，依下列計算式求得基質效應。

基質效應(%) =

$$\text{基質效應驗}(\%) = \left[\left(\frac{\text{基質匹配檢量線之斜率}}{\text{標準曲線之斜率}} \right) - 1 \right] \times 100$$

(三)定量極限之評估

取均質後之空白餅乾檢體，加入適量20項防腐劑標準品溶液，依五、(四)至(六)操作，於同日內進行5重複分析，測定檢體中各防腐劑之含量並計算平均回收率及變異係數，另計算層析圖譜中分析物波峰之訊號/雜訊比(signal-to-noise ratio, S/N ratio)，以評估本檢驗方法之定量極限。

(四)準確度之評估

取均質後之空白餅乾檢體，分別加入添加回收試驗用標準溶液，使其分別含苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇20及50 mg/kg，其餘17項防腐劑為2及5 mg/kg，依五、(四)至(六)操作，於同日內進行5重複分析，測定檢體中各防腐劑之含量並計算平均回收率，以評估本檢驗方法之準確度。

(五)精密度之評估

1. 重複性

取均質後之空白餅乾檢體，分別加入添加回收試驗用標準溶液，使其分別含苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇20及50 mg/kg，其餘17項防腐劑為2及5 mg/kg，依五、(四)至(六)操作，於同日內進行

5重複分析，測定檢體中各防腐劑之含量並計算同日內之變異係數，以評估本檢驗方法之重複性。

2. 中間精密度

取均質後之空白餅乾檢體，分別加入添加回收試驗用標準溶液，使其分別含苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇20及50 mg/kg，其餘17項防腐劑為2及5 mg/kg，依五、(四)至(六)操作，於不同分析日分別進行5重複分析，測定檢體中各防腐劑之含量並計算異日間之變異係數，以評估本檢驗方法之中間精密度。

七、市售產品適用性之評估

自行價購市售檢體，並依五、(四)至(六)操作，測定檢體中各防腐劑之含量，以評估檢驗方法之適用性。

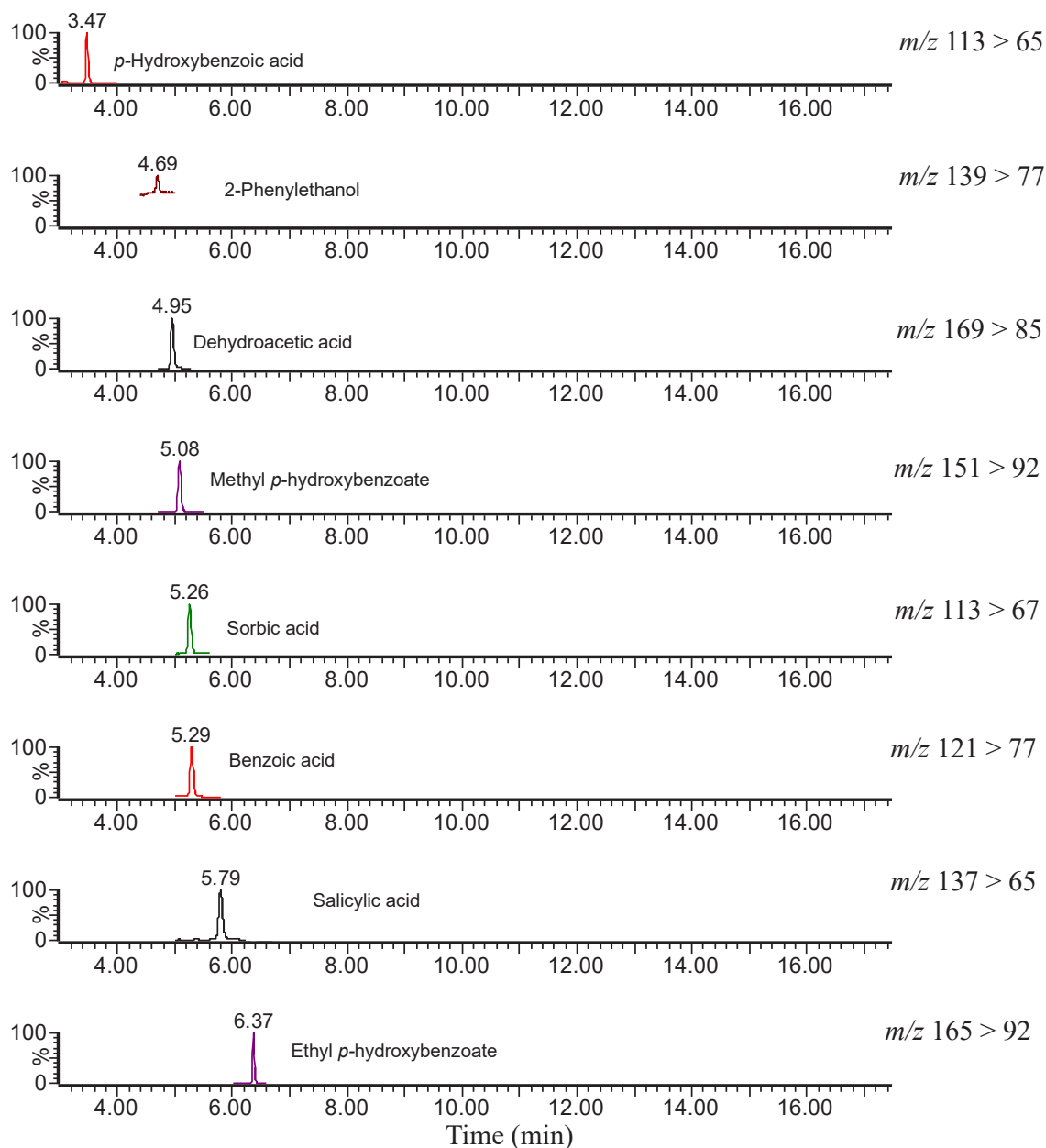
結果與討論

一、分析條件之建立

本研究質譜儀分析條件之評估係參考食藥署公告檢驗方法及相關文獻⁽⁶⁻⁸⁾並進行修改，離子源使用電噴灑離子化之正負離子切換模式，質量分析器收集模式採用多重反應監測模式，各防腐劑以標準溶液測試後挑選出2對離子對，惟苯甲酸、對羥苯甲酸苯酯及二苯氧乙醇僅產生1對定量離子對，質譜分析條件如表三所示，後續依材料與方法五、(五)之層析及離子源條件進行分析，所得MRM層析圖如圖一所示。

二、前處理條件之比較

過去研究中所開發之新興多重防腐劑之檢驗方法，主要是利用去離子水及含1%甲酸之乙腈溶液，配合使用Original method萃取粉劑，可得到最佳之萃取效果，後續以UPLC-DAD分析烘焙食品中對羥苯甲酸甲酯等14項

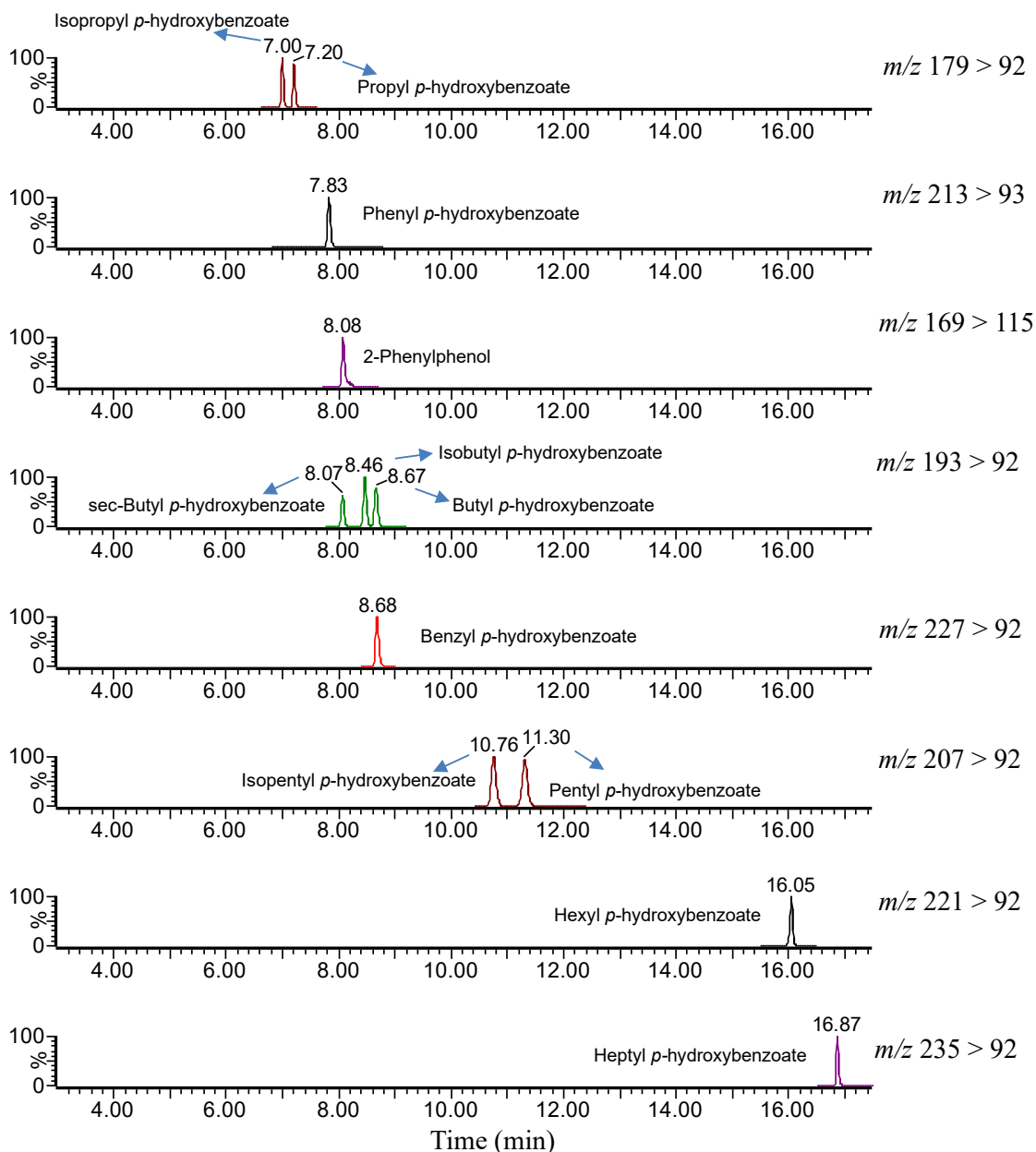


圖一、以UPLC-MS/MS分析20項防腐劑標準品之MRM層析圖

防腐劑之檢驗方法，結果顯示，14項防腐劑之平均回收率及變異係數，皆符合食藥署公布之「食品化學檢驗方法之確效規範」⁽⁹⁾(下稱確效規範)，惟前揭研究，尚缺酸性防腐劑之探

討，因此本研究針對烘焙食品基質，進行分析品項擴充並精進檢驗方法。

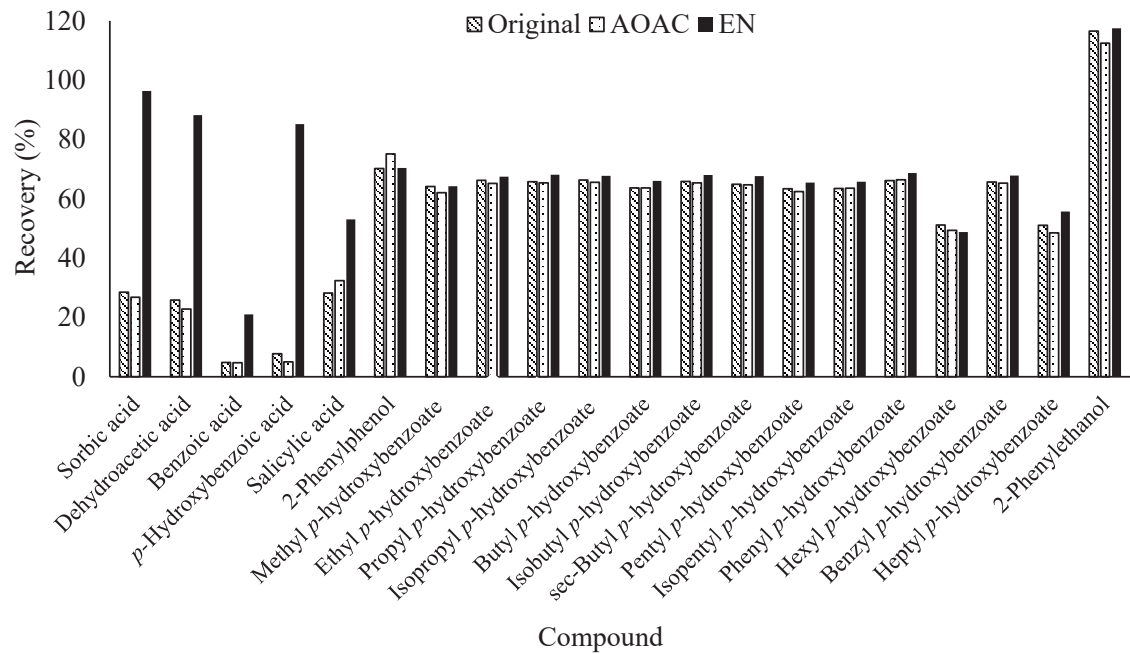
首先評估3種市售萃取用粉劑(Original method、AOAC method及EN method)之萃取



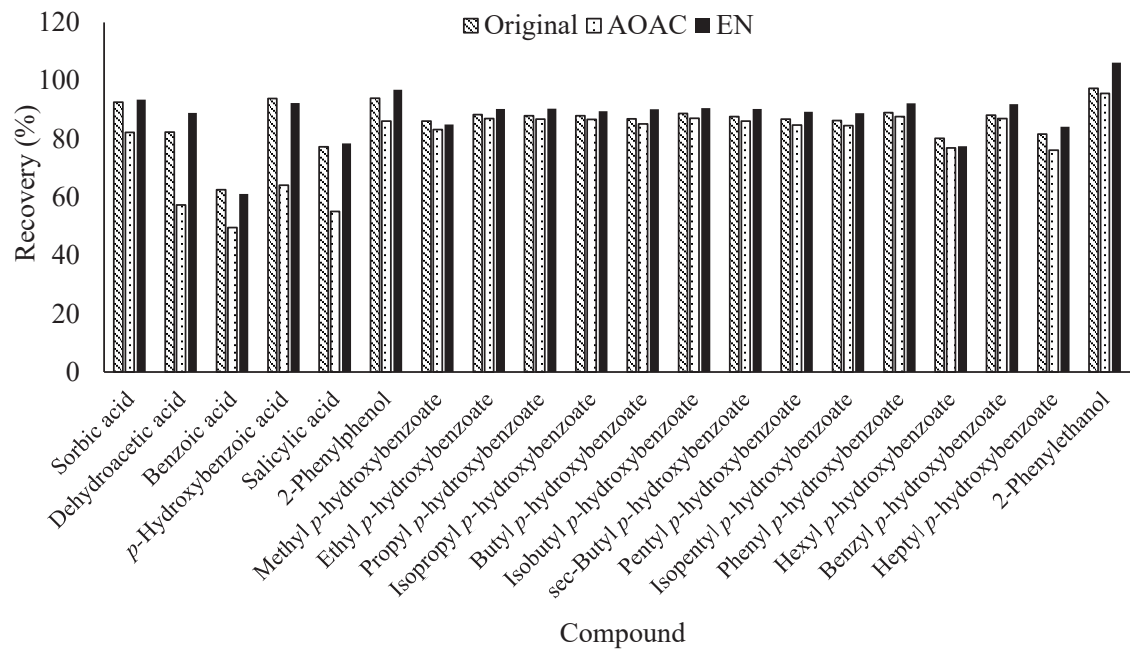
圖一、以UPLC-MS/MS分析20項防腐劑標準品之MRM層析圖(續)

效果，評估方式為於空白餅乾檢體(營養口糧)添加20項防腐劑(苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇為50 mg/kg，其餘17項防腐劑為5 mg/kg)，以乙腈為萃取溶劑，並分別使用3種萃取

粉劑進行檢液之調製，上機分析後比較各防腐劑之回收率，結果如圖二所示，其中使用EN method萃取粉劑之回收率最佳，惟酸性防腐劑之回收率普遍不佳。後續則改以含1%甲酸之



圖二、餅乾基質添加20項防腐劑以乙腈搭配不同QuEChERS萃取粉劑之萃取效果



圖三、餅乾基質添加20項防腐劑以含1%甲酸之乙腈溶液搭配不同QuEChERS萃取粉劑之萃取效果

乙腈溶液為萃取溶劑，並分別使用3種萃取粉劑之萃取方式進一步評估，結果如圖三所示，酸性防腐劑之回收率均有明顯提高，爰本研究之前處理條件最終採用含1%甲酸之乙腈溶液及EN method萃取粉劑進行萃取。

三、專一性之評估

評估本方法於餅乾基質中是否具有明確評估分析物之能力。分別取市售空白檢體及添加20項防腐劑標準品之空白檢體1 g，依材料與方法五、(四)調製檢液後依其五、(五)條件進行分析，就所得之定量及定性離子對MRM圖譜進行對照。結果於空白檢體中均無明顯之訊號，

另添加標準品之空白檢體顯示無干擾分析物之現象且峰形良好，顯示本方法之專一性良好。

四、線性及基質效應之評估

基質存在下可能會影響分析物在質譜儀游離源之離子化情形，造成抑制或增強訊號等情況，稱為基質效應(matrix effect)。本研究利用標準曲線與基質匹配檢量線之斜率來衡量基質效應之程度(表四)，結果顯示，各防腐劑之基質效應介於-11.8至5.2%，皆未超過-20至20%之範圍，顯示基質效應不顯著⁽¹⁰⁻¹²⁾，爰後續即以標準曲線進行定量。

表四、20項防腐劑之基質效應評估

分析物	標準曲線		基質匹配檢量線		基質效應 (%)
	迴歸方程式	相關係數	迴歸方程式	相關係數	
己二烯酸	$y = 2,189,868x + 5,071$	0.9989	$y = 2,304,256x + 2,954$	0.9998	5.2
去水醋酸	$y = 31,032,600x - 7,112$	0.9999	$y = 31,489,226x - 9,095$	0.9999	1.5
苯甲酸	$y = 826,080x - 21,195$	0.9991	$y = 728,309x + 15,783$	0.9993	-11.8
對羥苯甲酸	$y = 7,462,309x - 18,372$	0.9993	$y = 7,286,106x - 13,808$	0.9990	-2.4
水楊酸	$y = 27,911,047x - 20,070$	0.9999	$y = 26,231,382x - 2,727$	0.9999	-6.0
鄰苯基苯酚	$y = 1,790x - 22$	0.9990	$y = 1,584x - 82$	0.9965	-11.5
對羥苯甲酸甲酯	$y = 4,039,622x - 6,848$	0.9996	$y = 3,791,097x - 3,276$	0.9998	-6.2
對羥苯甲酸乙酯	$y = 4,671,542x - 6,091$	0.9998	$y = 4,521,812x - 9,490$	0.9995	-3.2
對羥苯甲酸丙酯	$y = 7,547,199x - 7,371$	0.9999	$y = 7,217,446x - 12,244$	0.9996	-4.4
對羥苯甲酸異丙酯	$y = 6,286,355x - 10,368$	0.9992	$y = 5,911,491x - 10,043$	0.9997	-6.0
對羥苯甲酸丁酯	$y = 9,737,487x - 9,309$	0.9999	$y = 9,165,435x - 13,644$	0.9996	-5.9
對羥苯甲酸異丁酯	$y = 11,074,833x - 13,239$	0.9998	$y = 10,344,151x - 16,408$	0.9997	-6.6
對羥苯甲酸第二丁酯	$y = 6,461,640x - 10,333$	0.9995	$y = 6,038,814x - 12,035$	0.9994	-6.5
對羥苯甲酸戊酯	$y = 15,070,152x - 21,287$	0.9998	$y = 14,094,565x - 22,165$	0.9997	-6.5
對羥苯甲酸異戊酯	$y = 12,834,829x - 14,437$	0.9999	$y = 12,267,808x - 26,248$	0.9996	-4.4
對羥苯甲酸苯酯	$y = 32,649,620x - 45,735$	0.9995	$y = 30,385,297x - 45,563$	0.9997	-6.9
對羥苯甲酸己酯	$y = 14,924,378x - 10,790$	0.9998	$y = 14,839,003x - 24,018$	0.9997	-0.6
對羥苯甲酸苄酯	$y = 16,553,223x - 20,829$	0.9997	$y = 15,491,646x - 17,611$	0.9999	-6.4
對羥苯甲酸庚酯	$y = 4,904,955x - 7,102$	0.9996	$y = 4,722,320x - 5,525$	0.9999	-3.7
二苯氧乙醇	$y = 574,168x + 5,207$	0.9986	$y = 572,458x + 4,015$	0.9997	-0.3

五、定量極限之評估

本研究選定餅乾檢體(營養口糧)作為烘培食品之代表性基質，以進行測試。取測試檢體添加標準溶液，使其相當於含苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇20 mg/kg，其餘17項防腐劑為2 mg/kg，並依材料與方法五、(四)至(六)操作，於同日內進行5重複分析，測定檢體中20種防腐劑之含量並計算平均回收率及變異係數。20項防腐劑之平均回收率及變異係數分別為89.2-102.4%及1.9-9.3% (表五)，顯示於前揭基質中添加20種防腐劑，其準確度及重複性皆

符合確效規範⁽⁹⁾，且其MRM層析圖譜中定性與定量波峰之訊號/雜訊比皆大於10，爰本檢驗方法苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇之定量極限訂為20 mg/kg，其餘17項防腐劑之定量極限則訂為2 mg/kg。

六、準確度及精密度之評估

取營養口糧檢體添加適量20項防腐劑標準溶液，製備低、高濃度之基質添加樣品，低濃度基質添加樣品為含苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇20 mg/kg，其餘17項防腐劑為2 mg/kg；高濃度基質添加樣品為含苯甲酸、鄰苯

表五、20項防腐劑之準確度、精密度及定量極限評估結果

分析物	添加濃度 (mg/kg)	回收率(變異係數) (%)		分析物	添加濃度 (mg/kg)	回收率(變異係數) (%)	
		同日內 (n=5)	異日間 (n=10)			同日內 (n=5)	異日間 (n=10)
己二烯酸	2 ^a	95.7(3.9)	93.3(5.1)	對羥苯甲酸丁酯	2 ^a	100.6 (3.3)	98.8 (4.2)
	5	99.2(2.4)	97.7(2.2)		5	103.4 (2.7)	102.5 (2.3)
去水醋酸	2 ^a	95.6(2.3)	92.7(4.9)	對羥苯甲酸異丁酯	2 ^a	98.8 (2.9)	97.6 (3.8)
	5	98.1(2.2)	95.4(3.4)		5	102.2 (2.2)	102.4 (1.7)
苯甲酸	20 ^a	93.5(2.3)	93.4(4.0)	對羥苯甲酸第二丁酯	2 ^a	99.4 (3.1)	97.9 (3.9)
	50	99.1(1.8)	103.3(5.8)		5	102.3 (2.3)	102.4 (1.9)
對羥苯甲酸	2 ^a	90.6(2.6)	90.8(3.4)	對羥苯甲酸戊酯	2 ^a	97.5 (2.9)	98.2 (3.8)
	5	95.8(2.1)	95.4(1.8)		5	99.6 (2.7)	102.2 (3.3)
水楊酸	2 ^a	94.7(1.9)	92.7(4.1)	對羥苯甲酸異戊酯	2 ^a	98.5 (2.9)	97.7 (3.7)
	5	99.2(3.7)	99.8(2.9)		5	101.3 (2.3)	101.9 (1.9)
鄰苯基苯酚	20 ^a	89.4(9.3)	93.0(9.3)	對羥苯甲酸苯酯	2 ^a	102.4 (3.3)	101.2 (4.2)
	50	95.4(4.1)	99.9(6.2)		5	104.8 (2.2)	105.0 (1.9)
對羥苯甲酸甲酯	2 ^a	96.8(2.1)	95.5(3.9)	對羥苯甲酸己酯	2 ^a	96.2 (4.5)	98.0 (6.6)
	5	101.2(2.7)	101.3(2.1)		5	87.3 (3.5)	100.1 (13.8)
對羥苯甲酸乙酯	2 ^a	100.1(2.3)	98.8(3.9)	對羥苯甲酸苄酯	2 ^a	101.1 (3.1)	100.0 (4.0)
	5	103.6(2.2)	103.7(1.9)		5	103.8 (2.3)	103.9 (1.9)
對羥苯甲酸丙酯	2 ^a	99.9(2.8)	98.6(3.8)	對羥苯甲酸庚酯	2 ^a	89.2 (2.0)	90.2 (4.1)
	5	102.9(2.3)	103.0(1.7)		5	87.0 (4.1)	91.5 (6.0)
對羥苯甲酸異丙酯	2 ^a	99.0(2.3)	97.5(3.9)	二苯氧乙醇	20 ^a	96.7 (5.9)	95.2 (4.7)
	5	101.5(2.1)	101.1(1.6)		50	103.8 (3.8)	100.7 (4.9)

^a本檢驗方法之定量極限

表六、2件檢體以公告檢驗方法及本研究分析方法
己二烯酸之結果比較

檢體序號	己二烯酸含量(g/kg) ^a	
	公告檢驗方法 ^b	本研究方法
112-RP004	0.63 (2.7)	0.65 (1.8)
112-RP005	0.51 (8.3)	0.54 (2.8)

^a 數值以2重複分析之平均值表示，括號內為相對差異百分比(%)

^b 衛生福利部108年1月30日衛授食字第1081900155號公告修正「食品中防腐劑之檢驗方法(MOHWA0020.03)」

基苯酚及二苯氧乙醇50 mg/kg，其餘17項防腐劑為5 mg/kg，並依材料與方法五、(四)至(六)操作，於不同分析日內分別進行5重複分析，測定20項防腐劑之含量並計算平均回收率及變異係數。

結果顯示，於同日內之平均回收率介於87.0-104.8%之間，同日內之變異係數介於1.8-9.3%之間；於兩不同分析日間之變異係數介於1.6-13.8%之間(表五)，皆符合確效規範⁽⁹⁾，顯示本檢驗方法具有良好之準確度及精密度(重複性及中間精密度)。

七、市售產品適用性之評估

為了解本檢驗方法應用於檢驗市售糕餅類食品之可行性，自行價購市售檢體10件，並依本研究所建立之檢驗方法進行防腐劑含量之測定，結果顯示，除2件檢體檢出己二烯酸外，其餘檢體均未檢出。由於該2件檢體中己二烯酸含量較高，爰需修正前處理步驟，將取樣量由1 g減少至0.1 g，並將稀釋倍數由10倍提高至100倍，以符合標準曲線範圍，另依據公告檢驗方法測定己二烯酸含量分別為0.63及0.51 g/kg，並與本研究方法之分析結果進行比較(表六)，顯示兩者結果接近。

結 論

本研究建立快速且有效分析食品中多重防

腐劑之檢驗方法，前處理使用溶劑萃取並配合萃取粉劑，相較於現行公告檢驗方法，大幅減少有機溶劑使用量及前處理時間，有效提高檢驗效率。本研究方法可同步分析20項防腐劑，其中包含非准用之防腐劑共計11項，可供市售產品品質監測之參考。本研究方法之準確度及精密度(重複性及中間精密度)皆符合確效規範⁽⁹⁾，且苯甲酸、鄰苯基苯酚及二苯氧乙醇之定量極限均為20 mg/kg，其餘17項防腐劑之定量極限均為2 mg/kg，日後可供外界參考並應用於例行性檢驗工作，以提升檢驗效能，健全食品安全之管理機制。

參考文獻

1. Gardner, L.K. and Lawrence, G.D. 1993. Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition-metal catalyst. *J. Agric. Food Chem.* 41(5): 693-695.
2. Nakagawa, Y. and Moldéus, P. 1998. Mechanism of *p*-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 55(11): 1907-1914.
3. Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G. and *et al.* 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* 24(1): 5-13.
4. 衛生福利部食品藥物管理署。2023。食品添加物使用範圍及限量暨規格標準。112年8月10日衛授食字第1121301321號令修正。[<http://consumer.fda.gov.tw/Law/FoodAdditivesList.aspx?nodeID=521&rand=891313055>]
5. 蔡祈民、郭景豪、陳欣郁、林雅姿等。2020。飲料中防腐劑多重檢驗方法之建立。食品藥物研究年報，11: 47-54。

6. 蔡佳芬、郭景豪、黃立宇、曾素香等。2011。高效液相層析串聯質譜法分析食品中之防腐劑。食品藥物研究年報，2: 97-106。
7. Song, S., Zhang, Z., Zou, N., Chen, R. and *et al.* 2017. Determination of six paraben residues in fresh-cut vegetables using QuEChERS with multi-walled carbon nanotubes and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Anal. Methods 10(12): 3972-3979.
8. Pritchett, T.H., Myers, E.A. and Brettell, T.A. 2015. Determination of preservatives in cosmetics and personal care products by LC-MS-MS. LCGC Supplements. 33:6. [<https://www.chromatographyonline.com/view/determination-preservatives-cosmetics-and-personal-care-products-lc-ms-ms-0>]
9. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。110年11月1日公開修正。
[<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f637713826789525112&type=2&cid=38868>]
10. Kim, T.H., Kim, M.G., Kim, M.G., Shin, B.S. and *et al.* 2015. Simultaneous determination of phenoxyethanol and its major meta-bolite, phenoxyacetic acid, in rat biological matrices by LC-MS/MS with polarity switching: Application to ADME studies. Talanta 144: 29-38.
11. Ham, H.J., Sardar, S.W., Ishag, A.E.S.A., and Hur, J.H. 2022. Optimization of an analytical method for indoxacarb residues in fourteen medicinal herbs using GC- μ ECD, GC-MS/MS and LC-MS/MS. Separations 9(9): 232-243.
12. Łozowicka, B., Rutkowska, E. and Jankowska, M. 2017. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. Environ. Sci. Pollut. Res. 24(8): 7124-7138.

Development of a Multiple Analytical Method for Preservatives in Foods

CHING-HAO KUO, CHUN-JEN FANG, CHE-LUN HSU, LI-YAO TSAI,
YA-MIN KAO, MEI-CHIH LIN, AND SU-HSIANG TSENG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

The “Method of Test for Preservatives in Foods (MOHWA0020.03)” announced by the Ministry of Health and Welfare in Taiwan is based on high performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector (HPLC-DAD) to analyze 12 preservatives. The aim of this study was to develop a multiple analytical method using ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to analyze 20 preservatives. An ACQUITY UPLC BEH C18 column was used, and 0.1% formic acid and methanol containing 0.1% formic acid used as the mobile phase for gradient elution. The mass spectrometric parameters of 20 preservatives were optimized. The linear ranges of the 20 preservatives in this method, except for benzoic acid, 2-phenoxyethanol and o-phenylphenol, which were from 100 to 1,000 ng/mL, were from 10 to 100 ng/mL for the rest of the 17 preservatives. Their linear correlation coefficients (r) were all greater than 0.990. The sample was extracted with acetonitrile containing 1% formic acid and QuEChERS extraction powder, after centrifugation, the supernatant was diluted to a constant volume with deionized water. Twenty preservatives at 2 concentrations were added to the blank samples, and the accuracy, precision and limit of quantification were evaluated. The results showed that the average recoveries ranged from 87.0 to 104.8%. The intraday and interday coefficients of variation ranged from 1.8 to 9.3% and from 1.6 and 13.8%, respectively, and the limits of quantification were between 2 and 20 mg/kg. The above results all complied with the validation guideline of the food chemical testing methods published by TFDA. In addition, ten commercial bakery products were used to verify the applicability of this method. The results were consistent with the product labeling and there were no matrix interference.

Key words: UPLC-MS/MS, preservatives, bakery products