

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 \times 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($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、檸檬酸三鈉($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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 $^{\circ}\text{C}$ 可達 18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 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 ，Nylon 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. 0.1N 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 0.1N 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，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，取試量萃取液，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 μ L，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(μ g/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：

層析管：ACE C18-AR，5 μm ，內徑 4.6 mm \times 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 \rightarrow 5	78 \rightarrow 73	22 \rightarrow 27
5 \rightarrow 20	73 \rightarrow 63	27 \rightarrow 37
20 \rightarrow 50	63 \rightarrow 33	37 \rightarrow 67
50 \rightarrow 65	33 \rightarrow 78	67 \rightarrow 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。

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，惟該法僅適用於酸類防腐劑之分析。
3. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。
4. 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。

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	電灑離子化模式	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
羥羥苯甲酸丁酯	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。