

## 108 年度第一次食品技師考試

科目：食品分析與檢驗

一、擬分析市售寡糖飲料和奶粉的水分含量，請由下列二者選擇合適的分析方法：卡爾費休 (Karl-Fischer) 滴定法和折射計法，並且說明選擇此方法的理由及其檢測原理。(20 分)

【擬答】

100% 北志聖阮籍食品分析與檢驗 B01, p.89, p.124-125

(一)寡糖飲料選擇折射法

基於自動密度計和/或折光率儀與自動進樣器的解決方案，是糖蜜和糖漿中蔗糖測定的理想選擇。

利用示差折光檢測器進行分析的物質需可溶於移動相的溶液中，且會引起折光係數的變化，以便鑑定分析物質成分的濃度。

由於其折光的特性限制了某些測定條件，除移動相的溶液需能溶解分析物質外，更要具有透光特性(如碳水化合物、脂質等)，而周圍環境溫度改變和移動相的配置條件(需為固定濃度或配置組合)等因素亦均會影響分析結果，因此其檢測的靈敏度較低，但能偵測的化合物種類較為廣泛。

RI detector 分析條件:(a)需固定流動相比率 (b)固定流速 (c)固定溫度 (d)固定壓力 (e)低脈衝 (f)不能使用梯度 gradient eluent 沖提。優點:(a)每種物質都有各自的折光率，因此使用廣泛 (b)對糖類靈敏度高  $10^{-8}$ g/ml (c)穩定性好 (d)操作方便。

(二)奶粉含水量分析選擇卡爾費雪滴定法

卡爾費雪法適用於測定水分含量少、含糖量高的食品及一般藥品。

利用碘氧化二氧化硫時，需要一定量的水參加反應。1mole 水參與 1mole 碘、1mole 二氧化硫、1mole 甲醇、3mole 吡啶產生 2 mole 氫碘酸吡啶、1 mole 甲基硫酸吡啶的氧化還原反應。

以 KF reagent(吡啶 + 甲醇 + 碘分子 + 二氧化硫)滴定寡糖飲料至退色為黃色，加入指示劑 methylene blue，至綠色為滴定終點。

卡爾·費雪試劑因含有  $I_2$  而呈棕色，當  $I_2$  與  $SO_2$  與  $H_2O$  反應後， $I_2$  棕色褪去而呈黃色，加入甲烯藍(methylene blue)成綠色為滴定終點。

水分 (%) =  $\frac{\text{樣品滴定體積}(V) \times \text{水當量}(F)}{\text{樣品重量}} \times 100\%$

二、在市面上查扣疑似遭受黴菌毒素污染的 10 袋 50 公斤重咖啡豆，擬利用高效液相層析串聯質譜儀進行黴菌毒素之分析，請說明在樣品上機前，應如何進行樣品的製備及管控其品質之穩定？(20 分)

【擬答】

100%北志聖阮籍食品分析與檢驗 B01, p. 92-96, p341-348

咖啡豆製備用於 HPLC/MS 檢測:

分析真菌毒素的方法包括定性或半定量法(如微管柱法和薄層色層分析)和精確的定量分析法(高效能液相層析、氣相層析、液相層析質譜分析、毛細管電泳等)。

高效液相層析串聯質譜分析法 (HPLC/MS) 為定量真菌毒素時最常使用之方法，可對毒素同時進行確認、定性及定量，應用最廣的為逆相液相層析(reversed phase, RP)。常用的管柱包括 AFLAXTM C<sub>18</sub>、LKB lichrosorb RP18、 $\mu$ -Bondapak C<sub>8</sub>、Shim-Park CLC-CN、Lichrospher 100 C<sub>18</sub>、Hypersil ODS、Radialpak C<sub>18</sub>、 $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>、Lichrosorb 5RP18、Raclial-Pak C<sub>18</sub>、TSKGEL ODS 80TS、Shim-Park CLC-ODS 等。

由於真菌毒素性質不同，加上分析條件之間的相互影響，欲達到理想的分離效果，需要綜觀考慮，包括流動相、層吸管柱的選用、管柱溫度及檢測器等，找出最佳之分析條件。其中某些自身會產生螢光的真菌毒素(如赭麴毒素和麥角毒素)，可以直接使用搭配有螢光檢測器的 HPLC 分析，分子中不含發色基團或是本身可產生螢光但強度較弱的毒素(如 AFB<sub>1</sub> 和 AFG<sub>1</sub>)，進行 HPLC 分析時須經由衍生化定量檢測。

HPLC 後再經介面進入 MS，完成精密定量。

(一) 樣品製備與品質管控

黴菌毒素的萃取與純化技術

1. 萃取 Extraction

影響真菌毒素萃取的因素很多，主要包括萃取溶液、溫度、食品基質及毒性性質等

(1) 萃取溶劑

從食品和飼料中萃取真菌毒素溶劑的選擇，通常取決於待測毒素的種類、性質、在萃取溶劑中的溶解度、毒性、價格與非測定成分在萃取溶劑中的分配係數等，一般大多會選用毒性小、極性大、價格低廉的溶劑系統。

常用的萃取溶劑包括甲醇、氯仿、丙酮、己烷、乙酸乙酯、乙和水，選其中一種或多種不同比例的混合物。

(2) 溫度

溫度對毒素的萃取也有影響，適當升高萃取溫度可增加玉米及其製品中鐮孢毒素的回收率。

(3) 食品原料組成

一般固體食品多選用浸漬、分離、索氏回流等；液體食品則多選用液相分離的方法。當從動物組織中萃取毒素時，為了降低組織中蛋白質與某些毒素（如赭麴毒素 A, OTA）結合的干擾，在萃取溶劑系統中可適當加入一些蛋白質水解酶以提高回收率。

(4) 毒素性質

萃取酸性毒素時，萃取溶劑應為酸性，以促進待測毒素的溶出；萃取含氮之毒素，可用氫氧化胺轉化為水不溶性有機物，接著再用液相分離法萃取。

近來，利用高溫高壓條件下以二氧化碳超臨界流體萃取真菌毒素，結果顯示與傳統萃取法相比，利用此法可提高回收率。

2. 純化 Purification

食品原料組成中，除了待測毒素外，尚包含有蛋白質、脂肪、色素等干擾物質，這些物質的存在會干擾待測毒素的測定，因此必須確保在不損失待測毒素的前提下除去干擾物質，此過程稱為純化。

常用純化方法包括液-固相萃取、液-液分配、化學吸附、層析法、透析等。

(二) 液相層析質譜分析儀 (HPLC/MS)

咖啡豆樣品經萃取與純化前處理後，再注入液相層析質譜分析儀，經由高效液相層析之高分離效果與質譜之高辨識性結合之儀器，將液相層析分離之成分進入質譜儀分析獲得分子量及分子結構之資訊，是一種快速檢測真菌毒素的方法，可應用於數種食品產品上，例如無花果和花生。

三、市售營養保健食品膠囊宣稱其葉黃素的含量為 10mg/顆，請說明葉黃素的分析步驟（包括萃取、皂化、分離、乾燥及高效液相層析），並且說明如何確認其葉黃素的含量符合宣稱？（20 分）

【擬答】

100%北志聖阮籍食品分析與檢驗 B01, p. 86-90 (儀器與方法)

葉黃素及玉米黃素可避免老年性黃斑病變(AMD)。市售膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素之含量時，為能提高檢驗效率並同時分析二種待測物，以高效液相層析儀(HPLC)搭配光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)同步分析膠囊錠狀食品中葉黃素及玉米黃素含量之檢驗方法。

1. 萃取、皂化、分離、乾燥

檢體以丙酮：去離子水溶液超音波振盪萃取，加入 20% 氫氧化鉀酒精溶液進行皂化，經 0.2% BHT 之乙醚-乙酸乙酯溶液進行液/液萃取，合併上層液經減壓濃縮後，殘留物以乙醇-乙酸乙酯溶液溶解並定容，再以 HPLC 進行分析。

2. HPLC 分析

使用 HPLC 層析管柱為 Ascentis® RP-Amide，移動相溶液為乙腈與去離子水以 95:5 (v/v) 之比例混合，流速為 1 mL/min，檢測波長為 450 nm。

### 3. 標準檢量線

經實驗分析後，葉黃素及玉米黃素標準曲線之線性範圍均為 0.1-100 µg/mL，線性回歸方程式之判定係數(R<sup>2</sup>)分別為 0.9993 及 0.9959。接著進行添加回收試驗，將已知濃度的標準品添加至粉狀基質及沙拉油基質後，求得葉黃素及玉米黃素於粉狀基質之回收率介於 77.4-95.4%之間，添加回收率之相對標準偏差則介於 3.2-6.0%之間；葉黃素及玉米黃素於沙拉油基質之回收率介於 86.1-124.6%之間，添加回收率之相對標準偏差則介於 8.5-11.1%之間。進一步分析葉黃素及玉米黃素之定量極限濃度，由實驗結果得知葉黃素及玉米黃素於粉狀基質之定量極限為 125 mg/kg，於沙拉油基質之定量極限為 625 mg/kg。利用基質匹配標準檢量線測定，可以確認葉黃素含量是否符合宣稱的每顆 10 mg。

四、擬利用氣相層析法分析市售雞蛋戴奧辛含量、魚油脂肪酸組成及大蒜精含硫化合物含量，請配對選擇下列合適的偵測器：火焰離子化偵測器 (FID)、火焰光度偵測器 (FPD) 及電子捕獲偵測器 (ECD)，並說明此三種偵測器之偵測原理。(20 分)

### 【擬答】

100%北志聖阮籍食品分析與檢驗 B01, p.95-97

#### (一)戴奧辛

利用 GC-ECD(電子捕獲偵測器)

戴奧辛是 75 種多氯戴奧辛 (PCDD) 及 135 種多氯呋喃 (PCDF) 的群集稱呼，戴奧辛並無商業用途，是當含氯物質燃燒時或製造含氯物質時所產生有毒產物。

樣品經由萃取、濃縮、淨化等程序，利用 <sup>13</sup>C12- 同位素標幟稀釋法(Isotope dilution method)，經氣相層析儀/高解析質譜儀(HRGC/HRMS)分析，測定 12 種戴奧辛類多氯聯苯之濃度並計算其總毒性當量濃度。

一般的掃描方式會使用電子捕捉偵測器(Electron Capture Detector, ECD)，但需要清潔樣品萃取物以降低油脂基質干擾。

電子捕獲偵測器(ECD)來自管柱末端的載流氣體（通常為 N<sub>2</sub> 或 H<sub>2</sub>，而不宜使用其他惰性氣體）通過 β 放射源時，載流氣體被常見之 β 放射源為 Ni<sup>63</sup> 或氬。離子化並產生電子(β + N<sub>2</sub> → N<sub>2</sub><sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup>)。產生之電子為正電極所接收而得一穩定電流，經放大記錄得一基線。若載流氣體中含有易接收電子的試料（如戴奧辛）

，則電子被試料捕獲而使電流減少 e<sup>-</sup> + x → x<sup>-</sup>故 ECD 所量係電流之損失，而得一負訊號，此負訊號與試料濃度成正比，利用製作檢量線即由此可得試料之濃度。

電子捕獲偵測器是應用被分析物質流過可供電子之鍍鎳陽極，其電子(電流量)為固定基準，當有一此可捕捉電子的化合物（如戴奧辛或共軛雙鍵之化合物）經過時，則電子會被分離化合物攜走，因而產生電流量降低，此檢測法已廣泛被利用在某些食品添加物或農藥殘留之測定，其有較佳之靈敏度，可測至 0.05~1 pg 範圍，由於靈敏度高，且電子的供應有一極限，所以在分析樣品時的稀釋條件須特別注意。

#### (二)魚油脂肪酸組成分析

利用 GC-FID(火焰離子化偵測器)

深海魚油甘三酯作用，將 sn -1,3 位上酯化的脂肪酸水解成游離脂肪酸(FFA)，通過薄層層析(TLC)分離得到 sn -2-單甘酯，甲酯化後利用氣相色譜(GC)對脂肪酸進行測定，從而得到脂肪酸在甘三酯中的位置分佈情況。

魚油中各種脂肪酸包括 DHA、EPA，先作 methyl ester 脂化衍生物，再以 GC/FID 其分離效應及檢測感度優。

火焰離子化偵測器 (FID, flame ionization detector) 簡稱氫焰偵測器。是於檢驗氫火焰離子化的機器。火焰離子化偵測器是一般氣相層析儀常配合使用的檢測器，其利用被分離的樣品化合物，經火焰燃燒後產生的有機離子量使電流的通過被放大而被記錄。氣相層析-火焰

## 公職王歷屆試題 (108 專技高考)

離子化偵測器是一種極為常見的分析技術，廣泛用於石油化學產品、製藥與魚油脂肪酸組成分析。火焰的氣體供應來自氫氣(燃料)和空氣(氧化劑)，因此，標準 GC 須有氫氣鋼筒的準備，由於是利用燃燒樣品產生電離化的作用，對非碳氫化合物（如一些氣體小分子或水）無檢驗效果，但對食品中的有機化合物如碳水化合物、脂肪、固醇類、香精、添加物及抗氧化劑等均有極佳的檢測效果，樣品會通入此火焰中以將有機分子氧化並生產具電價的粒子（離子）。這些離子會被收集並且產生電信號然後進行量測。其靈敏度約在 10~100 pg，且在分析濃度在檢測範圍內有極佳的線性關係。

### (三)大蒜精含硫化合物含量

利用 GC-FPD(火焰光度偵測器)

大蒜是蔬果中含硫比例最高的。大蒜的氣味與一些特殊功用，也和這些含硫的分子有關。大蒜烹煮時的香味來自於大蒜素的分解產物，主要是揮發性的誘烯醚（diallyl disulfide, DADS），大蒜的辛辣味則來自大蒜素，大蒜素會刺激身體中熱和痛的受體分子，讓我們感到灼熱及刺痛。因為大蒜有這種特殊的辛辣味，許多人都認為造成這個辛辣味的化學物質就是大蒜神奇功效的來源。

GC-FPD 技術是用來分析含硫或磷化合物、或錫、硼、砷與鉻等金屬。FPD 使用氫氣/空氣火焰，樣品會通入此火焰中。含磷與硫的碳氫化合物會產生特定波長的化學發光，此光在通入光電倍增器時會產生電信號(之後可量測出此電信號)。

GC-FPD 其分析的訊號強度（發光強度）可達其他化合物的千倍以上，因此此法非常適合作為特殊微量化合物（如有機磷農藥和含硫之香氣）之成分分析，而這兩種分析物質的分析靈敏度可達 1~2 pg。

## 五、請試述下列名詞之意涵：（每小題 5 分，共 20 分）

- (一)標準偏差
- (二)變異係數
- (三)靈敏度
- (四)偵測極限

### 【擬答】

#### (一)標準偏差

標準偏差(standard deviation, SD)是在分析數據精密度時，是最常使用的統計評估方法，標準偏差能評估實驗測定值的分散程度，也代表各測定值的接近程度。標準偏差可用  $\sigma$  表示，為變異的平方根，計算如式。 $S = \sigma = SD$ ,

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{sample } (n) < 30$$

其中  $X_i$  為第  $i$  個測定值， $\bar{X}$  為測定平均值， $n$  為樣品數，若樣品數大於 30 則公式可將  $n-1$  改為  $n$ 。

#### (二)變異係數

變異係數(Coefficient of variance, CV)為標準偏差除以測定之平均值，如下式，利用 CV 大小可以瞭解標準偏差，CV 越小表示重複結果的精密度越高。

一般而言，CV 應小於 5% 才可接受。

分析的精密度可由分析的變異係數(coefficient of variation, CV)來表示。

若多次分析的結果，平均值為  $\bar{X}$ ，標準偏差為  $\sigma = SD$ ，則 CV 值即為  $\sigma / \bar{X}$ 。

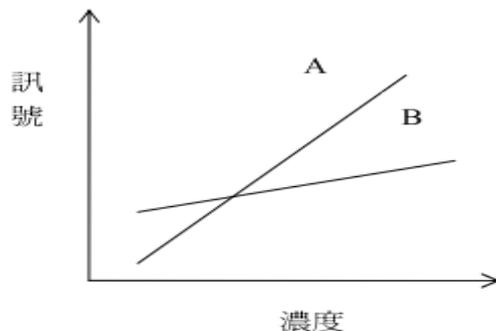
如果  $CV < 5\%$ ，我們就說這個分析實驗很精密，可以被接受。

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100\%$$

#### (三)靈敏度

靈敏度(Sensitivity)表示區別微小差異的能力，通常與使用的儀器設備有關。即相同濃度（或含量）區間變化所產生的試驗結果。以分析儀器為例，相同濃度（或含量）區間所產

生的訊號變化越大表示越靈敏。如圖。



測定方法之靈敏度(sensitivity)，也是對實驗結果可信度之確認方式之一。靈敏度是指一分析方法或反應能測定之物質的最低檢測濃度或最低極限量，又稱為偵測極限(limit of detection, LOD)。

一般學者以偵測信號(signal, S)與空白實驗所得之雜訊訊號(noise, N)來表示，即  $S/N=3$ 。

另有學者指出，偵測極限(LOD) =  $3.3 \times \sigma/S$  ( $\sigma$ ：測定數次低樣品濃度所得之回歸線的殘餘標準偏差(residual standard deviation, R.S.D.)，而 S：所得之回歸線的斜率)。

#### (四) 偵測極限

偵測極限或最低檢測濃度(detection limit)指在使用該偵測方法時，檢品中標的分析物可被檢測的最低量或濃度，但是未必能定量出標的分析物之正確值。檢品中的標的分析物可被定量測出具有準確度與精密度的最低量，稱為最低定量濃度(Quantitation limit)。最低定量濃度是對存在於試樣基質中的低含量化合物之含量測定的一個參數。偵測極限可藉由儀器訊號雜訊比(Signal to noise ratio, S/N)決定，分別測定空白試樣與若干含有低濃度已知量標的分析物之標準品，再以標準品能被可靠的檢測出來的濃度作為最低檢測濃度。通常以訊號雜訊比為 3:1 或 2:1 時之濃度，作為最低檢測濃度值之估計值。  $S/N > 1:1$ ，表示訊號大於雜訊。