

102 年公務人員高考三等 食品衛生檢驗試題

等別：三等考試

類科：食品衛生檢驗

科目：食品分析與檢驗

一、請說明測試結果之品質管制規範中，所要求的品管樣品分析有那些？（20 分）

【擬答】 **命中特區：102(春) 食品分析檢驗 1A, page 26-29, page 35-37**

(一)分析方法是指出在進行分析的方法過程中，詳細敘述執行每一種分析試驗所需要的步驟。分析方法至少可包含下列項目：試樣採樣、對照標準品與試劑製備液、器具設備的使用、檢量線的製作、計算公式的使用等。

(二)所要求的品管樣品分析方法包括下列：

1. 精密度(precision)：在統計上指某測定值與測定平均值的差異程度。精密度可從三個層次來表現，包括重複性、中間精密度及再現性。
2. 準確度(accuracy)：在統計上指某測定值與真實值的差異程度，用於表現所檢測出來的值與公認真值或公認之對照值間之接近程度。也被稱為真實度。結果正確性，表示分析結果之平均值趨近於實際值。
3. 特異性或專一性(specificity)：指所選擇方法不受其他物質干擾程度，也就是說當可能存在之成分(如雜質、分解物、基質)存在時，能明確的評估標的待測分析物的能力。食品分析結果的確認和樣品本身之特性有關，可信度可視分析之專一性表示分析方法可被相當程度之認同。※專一性(specificity)：專一性也稱專屬性，在食品分析化學中，當一個試劑只與一種離子或物質發生反應，而不與其他離子或物質起相同反應時，則該試劑可稱專一性試劑，該反應稱專屬性反應。
4. 偵測極限或最低檢測濃度(detection limit)：指在使用該方法時，檢品中的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)。偵測極限可藉由儀器訊號雜訊比(Signal to noise ratio, S/N)決定。
5. 線性範圍(Linear range)：分析方法的線性範圍是指在標的分析物的特定濃度(或含量)範圍內，由該方法分析檢品所得之試驗結果與標的分析物的濃度(或量)成正比的能力，其分析結果具有適當的準確度、精密度及線性關係。
6. 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。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)。有學者以偵測信號(signal, S)與空白實驗所得之雜訊訊號(noise, N)來表示，即 $S/N = 3$ 。
7. 操作簡便性：複雜方法影響操作困難度與成本，也降低再現性。
8. 速度(Speed)：儀器分析通常具有此優點。
9. 安全性(Safety)：使用許多有毒或可燃性的化學物質應儘量避免。
10. 公訂方法：若有國家標準(CNS)方法應儘量採用，如；或是世界公認方法，如 ISO、AOAC、BSI。

二、請說明如何以高效液相層析法測試澱粉及其製品中順丁烯二酸及順丁烯二酸酐總量 (20 分)

【擬答】**命中特區：102(春) 食品分析檢驗 2A, page 43-48, (秋)補充資料 1A**

順丁烯二酸，化學式為 $\text{HO}_2\text{CCHCHCO}_2\text{H}$ ，是一種二羧酸，即一個含有兩個羧酸官能基的有機化合物。順丁烯二酸和富馬酸 (fumaric acid 反丁烯二酸) 互為順反異構物。順丁烯二酸常用來製備富馬酸，馬來酸的酸酐為順丁烯二酸酐，和其酸酐比較起來，馬來酸的應用範圍較少。

順丁烯二酸和其酸酐都不是核准的食品添加物，但美國及歐盟有限度的允許使用順丁烯二酸酐在食品直接或間接接觸的包材中，美國也允許將順丁烯二酸用為化妝品中的酸鹼調和劑。

衛生署食品藥物管理局(TFDA)公布「食品中順丁烯二酸與順丁烯二酸酐總量之檢驗方法」如下：
(適用範圍：本檢驗方法適用於順丁烯二酸酐化製澱粉及其製品中順丁烯二酸與順丁烯二酸酐總量之檢驗)

2. 檢驗方法： 檢體經萃取、鹼水解後，以高效液相層析儀(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：GL Sciences InertSustain C18，內徑 4.6 mm × 25 cm 或同級品。
 - 2.1.2. 振盪器。
 - 2.1.3. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2. 試藥：甲醇採用液相層析級；磷酸(85%)、鹽酸及氫氧化鉀均採用試藥特級；去離子水 (比電阻於 25°C 可達 18 MΩ · cm 以上)；順丁烯二酸對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶。
 - 2.3.2. 離心管：50 mL，PP 材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑 0.22 μm，PVDF 材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 50%甲醇溶液：取甲醇 250 mL，加去離子水使成 500 mL。
 - 2.4.2. 5N 鹽酸溶液：取去離子水 50 mL，徐徐加入鹽酸 42 mL，混勻冷卻後，再加去離子水使成 100 mL。
 - 2.4.3. 0.5N 氫氧化鉀溶液：稱取氫氧化鉀 14 g，以去離子水溶解使成 500 mL。
 - 2.4.4. 0.1%磷酸溶液：取磷酸 1.2 mL，加去離子水使成 1000 mL。
 - 2.5. 移動相溶液之調製：取 0.1%磷酸溶液與甲醇以 98：2 (v/v)之比例混勻，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。
 - 2.6. 標準溶液之配製：取順丁烯二酸對照用標準品約 100 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至 100 mL，作為標準原液，冷藏儲存。臨用時精確量取適量標準原液，以去離子水稀釋至 0.02 ~ 1.0 μg/mL，供作標準溶液。
 - 2.7. 檢液之調製：將檢體均質或混勻後，取約 1 g，精確稱定，置於離心管中，加 50%甲醇溶液 25 mL，振盪 30 分鐘後，加 0.5N 氫氧化鉀溶液 20 mL，混勻，靜置 2 小時。加 5N 鹽酸溶液約 3 mL，使呈酸性，以去離子水定容至 50 mL。靜置後，取上清液 100 μL (a)，加去離子水使成 1000 μL (b)，混勻後，經濾膜過濾供作檢液。

- 2.8. 鑑別試驗及含量測定：精確量取檢液及標準溶液各 20 μL，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順丁烯二酸與順丁烯二酸酐之總量(ppm) (註)：

$$\text{檢體中順丁烯二酸與順丁烯二酸酐之總量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M}$$

C：由標準曲線求得順丁烯二酸之濃度(μg/mL)

V：檢體定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由 b/a 求得

註：順丁烯二酸與順丁烯二酸酐之總量，以順丁烯二酸計。

高效液相層析測定條件(註)：

光二極體陣列檢出器：波長 214 nm。

層析管：GL Sciences InertSustain C18，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm。

移動相溶液：依 2.5 節調製之溶液。

移動相流速：1 mL/min。

註：

1. 所採用之層析管應有效將順丁烯二酸與反丁烯二酸、醋酸、蘋果酸(malic acid)及琥珀酸等分離。
2. 上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。
附註：1. 本檢驗方法之定量極限(LOQ)為 10 ppm。
3. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。
4. 食品中可能存在微量順丁烯二酸，當檢驗出微量順丁烯二酸時，尚需就其原料綜合研判，以釐清是否違法添加順丁烯二酸酐化製澱粉。

三、請說明如何執行水分測定方法中所要求「乾燥樣品直至恆重(恆量)為止」。(20 分)

【擬答】**命中特區：102(春) 食品分析檢驗 3A, page 5-6**

水分測定法中要求「乾燥樣品直至恆重(恆量)為止」，以常壓乾燥法為例：

常壓乾燥法為在一般大氣壓下進行的乾燥方式，其乾燥時間長，可適用於大部分的樣品，且同時可處理多量樣品。

操作執行之說明：

- (1) 將秤量瓶洗淨、加熱乾燥 (105°C) 至恆量，冷卻後稱重。
- (2) 加入已經過前處理的樣品後並精稱，接著放入烘箱中。
- (3) 依照樣品的種類，選擇乾燥溫度及時間(一般為 100~110°C，乾燥 1~6 小時)。
- (4) 待乾燥完成後將樣品取出，再放入玻璃乾燥器冷卻至室溫。
- (5) 精稱樣品，再將樣品繼續乾燥 1 小時，冷卻、精稱，重複上述步驟直至樣品重量達到恆重。
- (6) 計算方法

$$\text{水分(\%)} = \frac{\text{樣品重量} - \text{乾燥後恆重之樣品重量(g)}}{\text{樣品重量(g)}} \times 100$$

四、請說明比較食品中組織胺的重氮、螢光及苯甲醯胺檢驗方法。(20分)

【擬答】**命中特區：102(春) 食品分析檢驗 5A, page 15-19**

組織胺(Histamine, Him) 測定: 重氮、螢光、苯甲醯胺法

生物胺(biogenic amines)在動植物及微生物中可經由合成及分解途徑而生成，因不易揮發及具熱穩定之特性而可作為食品腐敗及安全性評估之指標。

食品中常見的組織胺(histamine; Him)來自生物體內之脫羧過程包括二種途徑：

一為內生性脫羧酵素作用，另一為來自污染微生物酵素之外生性分解作用。

在生物胺所引起之食物中毒中，Him 中毒最常發生，魚類、禽肉、乳酪、酒及香腸等食品皆有因 Him 中毒而被報導過之案例。

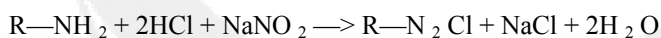
Him 中毒最常發生在組胺酸含量高之鯖魚、鮪魚、沙丁魚等鯖科魚 (scombridae)，故 Him 中毒又稱為鯖科魚類中毒(scombroid poisoning)。

目前許多國家以 100 ppm 為 Him 中毒之危害標準(hazard level)；美國食品藥物管理局(FDA)則是以 50 ppm 作為標準。

組織胺之檢測分析有多種方法：

(一)重氮法

重氮化 是芳香胺或組織胺與亞硝酸生成重氮鹽的反應。反應中一般使用亞硝酸鈉與過量無機酸作為亞硝酸供源。通式如下：



反應由 Peter Griess 在 1858 年發現。

反應中使用大大過量的 HCl，其中 1 莫耳於產生 ON-OH₂⁺ 離子，1 莫耳用於生成 NOCl，另 1 莫耳則用於產生重氮鹽酸鹽 R-N=NCl。

(二)螢光法(spectrofluorometry)分析鯖魚普通肉（白色肉）及紅色肉儲藏中生成之非揮發性胺類 (non-volatile amines)；由於大部分生物胺在可見光及紫外光波長範圍並無明顯的吸收，因此在偵測時，通常會先進行衍生化反應以接上發色基團，提高偵測靈敏度，而最常使用苯甲醯氯 (benzoyl chloride)及單斯氯(dansyl chloride)兩種衍生化方法。

(三)苯甲醯胺法

組織胺之苯甲醯化(benzoylation): 取組織胺標準溶液（或 TCA 抽出液）2 ml，加入 2 ml 的 2 N NaOH 與 10 μl 的苯甲醯氯，經旋渦混合器振盪混合後，於 30°C 反應 40 分鐘後取出，加入 2 ml 飽和食鹽水使苯甲醯化反應終止，以 4 ml 乙醚萃取二次以去除 TCA，收集乙醚層經氮氣吹乾

後，以 3 ml 甲醇將殘留物溶出，注入高效液相層析儀進行分析。

Histamine 衍生化: 苯甲醯氯(benzoyl chloride) + histamine → 苯甲醯胺



組織胺之分析:

取前述之 TCA 萃取物 2 ml 依組織胺標準溶液之苯甲醯化條件經苯甲醯化後，注入高效能液相層析儀進行分析，其分析條件如下：

- (1)使用機型：Shimadzu LC-10A system (包括 SIL-10A auto injector)。
- (2)記錄器：Hitachi D-2500 chromato-integrator。
- (3)分析管柱：LiChrospher 100 RP-18 reverse-phase column
(5 μ m, 125X4 mm i.d., E. Merck)。
- (4)管柱溫度：27 $^{\circ}$ C (CTO-6A column oven)。
- (5)移動相：水與甲醇。
- (6)分析條件：開始為 50%甲醇與 50%水；至 7 分鐘後將甲醇以梯度提高至 70%，水為 30%，維持至 16 分鐘；至 23 分鐘後將甲醇以梯度提高至 85%，水為 15%，維持至 26 分鐘；28 分鐘後回復為 50%甲醇與 50%水。
- (7)流速：0.8 ml/min。
- (8)偵測器：UV 偵測器，波長為 254 nm。

計算含量

樣品中之組織胺含量，可由以下公式計算：

$$\text{組織胺含量(mg/100 g)} = mM(A/B)(100/W)100$$

m：組織胺標準溶液最終濃度(mg/ml)

M：樣品中組織胺濃度(mg/ml)

A：苯甲醯化所取樣品濾液體積(ml)

B：苯甲醯化後以甲醇所定量體積(ml)

100/W：TCA 定容至 100 ml

W：樣品重(g)

注意事項: 本檢驗方法之最低檢出限量為 0.1 mg/100 g。

五、請說明液相層析儀的組成元件，再區分逆相 (Reversed phase)、正相 (Normal phase) 及離子交換 (Ion-exchange) 三種管柱的差異。(20 分)

【擬答】**命中特區：102(春) 食品分析檢驗 2A, page 27-29**

層析是將欲分析的樣品置於移動相(mobile phase)和固定相(stationary phase)中，因流動相為液體或氣體，固定相為固體或液體，欲分析樣品中的不同成分在流動相和固定相間有不同的分配係數(K)或平衡常數(D)，故成分在兩相之間達到平衡時即可達到分離的目的。

樣品的各成分在兩相的相互作用中(氣/液、液/固、液/液等)牽涉到不同的吸附力、分配率、離子交換性等，且在相同或不同性質移動相的帶動下，產生各成分的移動速率、分配交換、親和及排斥不同，使彼此產生分離作用。層析法所應用的移動相如為液體稱為液體層析法(LC, liquid chromatography)。

(一)LC 組成元件

在整套 LC 的裝置中，包括有配置好的移動相溶液儲槽，並將移動相溶液經細的不鏽鋼管通入機械帶動的泵裝置，使流速固定或定體積進入分析管柱，在分析管柱前有保衛性管柱及樣品注入裝置，在分析管柱後有檢測裝置、記錄和數據處理之微電腦設備，最終則有劃分收集器或廢液的收集裝置。



(1) 泵 Pump

LC 的泵裝置需要精密度與準確度皆高的機械式泵 (幫浦)。

(2) 樣品注入裝置

一般樣品溶液均需以薄膜 (0.20~0.45 μm) 過濾，以確保分離之效果及延長管柱之使用壽命。

(3) 管柱

管柱是注入樣品液後最直接接觸且能達到分離成分的主要裝置，樣品注入後會先經過保衛性管柱，而此管柱是樣品進入分析管柱前的管柱配件。有正相、逆相、離子交換管柱等。

(4) 填充料

(a) 多孔矽膠：一般以 3、5 和 10 μm 直徑球狀顆粒最常使用。

(b) 高分子材料：填充料亦可以高分子的材料樹脂為主。

(c) 樹脂凝膠聚合：是由小顆粒的小孔徑凝膠顆粒聚合形成大顆粒，且形成永久性的較大孔徑，孔徑在 12~600 nm 均有。

(5) 檢測器

① 紫外可見光(UV-VIS)檢測器

② 螢光檢測器

③ 示差折光檢測器

④ 電化學檢測器

(6) 記錄、積分及數據處理

由檢測器發出的電訊號的強弱代表移動相中樣品的成分的濃度變化。

是由此電訊號在移動帶式記錄器中產生訊號後畫出如山峰般的圖譜，此峰圖譜所滯留的時間代表沖提出來的分析物質，其面積代表此成分的濃度（量）。

(二) 正相層析與逆相層析

分配層析的移動相為液體，而固定（吸附）相亦為被載體所吸附的液體，當欲分析的樣品成分被移動相帶動時，因移動相和固定相之兩液相間相互的接觸，欲分析樣品的各種成分（溶質）會因分配係數的大小不同，在兩液相間重新分配，因而達到分離的目的。

兩相中之液體，通常極性較大的液體會固定吸附在固定相的惰性載體上，而極性較小的液體（溶劑）則會當作移動相，此又稱為正相層析；而固定相之液體性質如為極性較小（非極性）而移動相為極性液體，則稱為逆相層析。

層析方法	移動相	固定相	欲分析樣品特性
正相 Forward phase	極性小的溶劑 (偏非極性)	固定在惰性載體上極性 大之溶液	分離極性的親水物質如胺基 酸、有機酸、水溶性色素。
逆相 Reverse phase	極性大的溶劑	固定在惰性載體上極性 小之溶液(偏非極性)	分離極性小之物質如親油性化 合物(脂肪、脂溶性色素)等。

在管柱層析法中，利用化學鍵結固定相之方法已普遍被使用並商品化，其原理係藉由矽膠表面的醇基去活性化後，與其他官能基進行衍生化，此官能基可利用烷基、酚基、烷基胺等，而非極性鍵結則可利用矽膠表面鍵結 C8 或 C18 烷基，前者利用極性低的移動相溶液流過時，可分離極性較大的物質稱為正相層析；後者用極性的溶劑溶出時可分離非極性的樣品成分稱為逆相層析。

(三) 離子交換

可視為吸附層析的一種，固定相的載體為樹脂，鍵結有固定化的官能基，此官能基具有正電荷或負電荷，而正負電荷則決定欲交換的離子，如官能基為正電荷，則交換陰離子，稱為陰離子交換樹脂；如官能基為負電荷，則交換陽離子，稱為陽離子交換樹脂。

陽離子交換樹脂的官能基如為強酸型（如磺酸化團基；RSO₃⁻，則在 pH2 以上，其官能基團則為離子化狀態。而樹脂上鍵結強鹼的三級胺團基(R-NR₄⁺屬強陰離子交換樹脂，在 pH 10 以下其官能基均為離子化。