

食品中反丁烯二酸二甲酯殘留之檢驗方法探討

郭景豪 方銘志 許哲綸 蔡佳芬 高雅敏 周秀冠 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

本研究建立以頂空固相微萃取技術(head space solid phase microextraction, HS-SPME)搭配氣相層析質譜法(gas chromatography / mass spectrometry, GC/MS)檢測食品中反丁烯二酸二甲酯(dimethyl fumarate, DMF)之殘留檢驗方法。檢體以頂空固相微萃取後進樣，改進了以往須以大量有機溶劑萃取之缺點，此外由於使用頂空分析，樣品不須經繁瑣的前處理步驟，節省了大量操作時間與溶劑。於食品檢體中添加適當標準溶液進行回收率及重複性等試驗。試驗結果，反丁烯二酸二甲酯之回收率為88.3 - 117.5% (添加濃度0.2及1 ppm)，變異係數均小於7%，定量極限為0.2 ppm。利用本方法進行市售10件糕點及10件麵包檢體之反丁烯二酸二甲酯殘留分析，檢驗結果，上述食品檢體均未檢出反丁烯二酸二甲酯。

關鍵詞：氣相層析質譜儀、反丁烯二酸二甲酯、頂空固相微萃取

前言

反丁烯二酸二甲酯(dimethyl fumarate, DMF)是一種化學防腐劑，能抑制30多種黴菌和酵母菌，白色結晶、略有酯香味，熔點103 - 104°C，沸點193°C，溶於乙醇、乙酸乙酯及氯仿中，微溶於水，常溫下可以昇華，對光和熱穩定，毒性低，因此使用安全，常被用於丙烯酸纖維及塑料的製造上，也應用於製造殺蟲劑、接著劑、人造皮革、纖維及表面塗裝等，具有防腐功效，常使用在傢俱或皮鞋，還可用於食品、糧食、果蔬及飼料等⁽¹⁾。

文獻報導指出工業級的反丁烯二酸二甲酯接觸人體皮膚上會產生刺激、紅腫、燒傷及出現急性呼吸困難的情況⁽²⁾，歐盟已於2009年3月公佈2009/251/EC指令，要求會員國不得於市場流通使用含有反丁烯二酸二甲酯之防腐劑，並於2009年5月起開始施行⁽³⁾。我國相關

法規中，反丁烯二酸二甲酯並未表列於食品添加物使用範圍及限量暨規格標準中，因此反丁烯二酸二甲酯在各類食品中皆禁止使用。

目前我國公告之食品檢驗方法中，並無此化學防腐劑之檢驗方法，有關食品中反丁烯二酸二甲酯檢驗方法之相關文獻，在進行分析時，樣品前處理需經萃取步驟⁽⁴⁾，檢驗過程複雜繁瑣增添定量的不確定度。針對食品分析，現代主流檢驗方法常利用頂空固相微萃取技術分析(head space solid phase microextraction, HS-SPME)，可實現自動化之檢驗技術⁽⁵⁾，為使檢驗方法與時俱進，本研究建立以頂空固相微萃取技術搭配氣相層析質譜法(gas chromatography/ mass spectrometry, GC/MS)檢測食品中反丁烯二酸二甲酯之殘留檢驗方法，以達提升檢驗效能之目的，並將方法進一步公開供各界參考引用。

材料與方法

一、檢體來源

104年間於台北地區大賣場購買市售糕點10件及麵包10件。

二、試藥

丙酮採用液相層析級；反丁烯二酸二甲酯(純度99%)對照用標準品；1,2-二氯苯-d₄(1,2-dichlorobenzene-d₄)同位素內部標準品，皆購自Sigma-Aldrich公司。

三、儀器設備

- (一)氣相層析系統為Agilent 7890A、頂空自動注射器為Agilent GC Sampler 120、質譜儀為Agilent 5975C配置MassHunter軟體(Aglient Technologies Inc., USA)
- (二)氣相層析管柱為DB-624毛細管，內膜厚度1.4 μm，內徑0.25 mm× 60 m (Agilent Technologies Inc., USA)
- (三)固相微萃取針(CTC Analytics AG, Switzerland)，固相微萃取針上之吸附纖維材質為100 μm聚二甲基矽氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)

四、標準溶液之配製及標準曲線製作

- (一)內部標準溶液之配製：精確稱取1,2-二氯苯-d₄同位素內部標準品約10 mg，再以丙酮溶解並定容至10 mL，混合均勻，作為內部標準原液，冷藏貯存。臨用時取適量內部標準原液，以丙酮稀釋至4 μg/mL，供作內部標準溶液。
- (二)標準溶液之配製：精確稱取反丁烯二酸二甲酯對照用標準品約20 mg，再以丙酮溶解並定容至10 mL，混合均勻，作為標準原液，冷藏貯存。臨用時取適量標準原液，以丙酮稀釋至20 μg/mL，供作標準溶

液。

- (三)標準曲線之製作：精確量取標準溶液10 - 250 μL置於頂空分析瓶中，再加入內部標準溶液50 μL，迅速以瓶蓋封瓶後，混合均勻，供作標準曲線溶液，以配置頂空固相微萃取進樣器之氣相層析質譜儀進行分析，就反丁烯二酸二甲酯與內部標準品之波峰面積比，與對應之反丁烯二酸二甲酯含量，製作0.2 - 5 μg檢量線。本研究建立之頂空進樣測定參數如表一，氣相層析質譜儀器參數如表二。

表一、自動注射器參數

參數	條件
樣品加熱溫度	80°C
樣品預熱時間	5 min
樣品萃取時間	10 min
攪拌速度	500 rpm
樣品脫附時間	5 min
注射針清洗溫度	280°C
注射針清洗時間	10 min

五、檢液之調製

取均質之檢體約1 g，精確稱定，置於頂空分析瓶中，加入內部標準溶液50 μL，迅速以瓶蓋封瓶後，混合均勻。

六、鑑別試驗及含量測定

將檢體及檢量線溶液之頂空分析瓶置於頂空固相微萃取進樣器上，於80°C加熱萃取10分鐘，依氣相層析質譜儀參數進行分析，就檢體與檢量線溶液所得波峰之滯留時間及選擇性離子偵測相對離子強度鑑別之，並依下列計算式求出檢體中反丁烯二酸二甲酯之含量(ppm)：

檢體中反丁烯二酸二甲酯之含量(ppm)

$$= \frac{C}{M}$$

C：由檢量線求得檢體中反丁烯二酸二甲

表二、氣相層析質譜儀參數

參數	條件
層析管柱	DB-624毛細管，內膜厚度1.4 μm ，內徑0.25 mm \times 60 m
層析管溫度	初溫：50 $^{\circ}\text{C}$ ； 升溫速度：15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ； 終溫：225 $^{\circ}\text{C}$ ，8 min
注入器溫度	270 $^{\circ}\text{C}$
移動相氮氣流速	1.3 mL/min
注入模式	不分流(splitless)
離子源溫度	230 $^{\circ}\text{C}$
介面溫度	250 $^{\circ}\text{C}$
離子化模式	電子撞擊(electron impact)，70 eV
偵測模式	選擇性離子偵測(selective ion monitoring, SIM)
定量離子(m/z)	反丁烯二酸二甲酯，113；1,2-二氯苯- d_4 ，150
定性離子(m/z)	反丁烯二酸二甲酯，85、59

酯之含量(μg)

M：取樣分析檢體之重量(g)

七、回收率及重複性試驗

於空白均質麵包中加入反丁烯二酸二甲酯標準溶液，使其濃度為0.2與1 ppm，依上述方法進行5重複試驗，並同時作空白試驗，以氣相層析儀頂空進樣進行分析，求得5重複間之平均回收率及變異係數（coefficient of variation, CV），以評估本研究建立之分析方法之回收率及重複性。

八、定量極限之評估

於空白均質麵包中加入適量反丁烯二酸二甲酯標準溶液，每一添加量進行5重複試驗，同時操作空白試驗，依前述方法進行分析，所得波峰之訊號強度計算其訊噪比(S/N ratio)，以訊噪比大於10以上之最低濃度為檢驗方法之定量極限(limit of quantification, LOQ)。

結果與討論

一、儀器分析條件的選擇

參考Narizzano等人⁽⁶⁾之研究，反丁烯二酸二甲酯採GC/MS全離子偵測(full scan)所得質譜圖中，碎片離子 m/z 分別為113、85、59、53及43。本研究採SIM模式之定量離子為訊號強度最強之碎片離子[M-OCH₃]⁺，其 m/z 為113，而定性之碎片離子分別為[C₄H₅O₂]⁺及[C₂H₃O₂]⁺， m/z 分別為85及59。因此本研究選定之SIM模式以 m/z 113、85及59，鑑別反丁烯二酸二甲酯，如圖一所示。

在定量上本研究亦參考Narizzano等人之研究以1,2-二氯苯- d_4 作為定量上使用之內部標準品，實際以SIM模式偵測空白麵包樣品分別添加反丁烯二酸二甲酯標準品及1,2-二氯苯- d_4 內部標準品各0.2 ppm，其層析圖譜具有良好之分離度及專一性，如圖二所示。

二、標準曲線建立

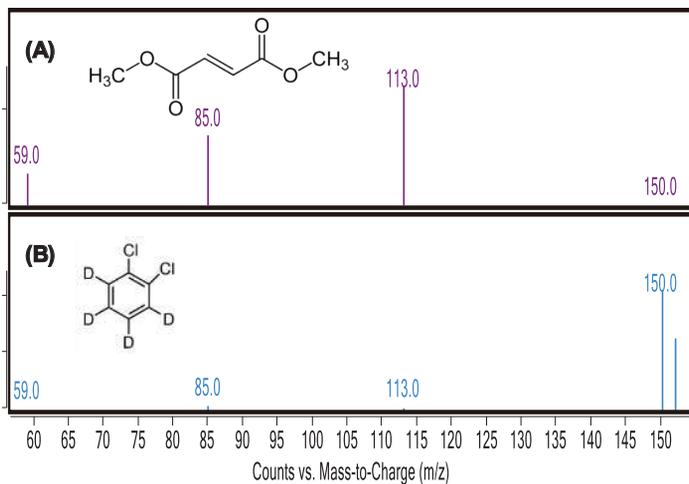
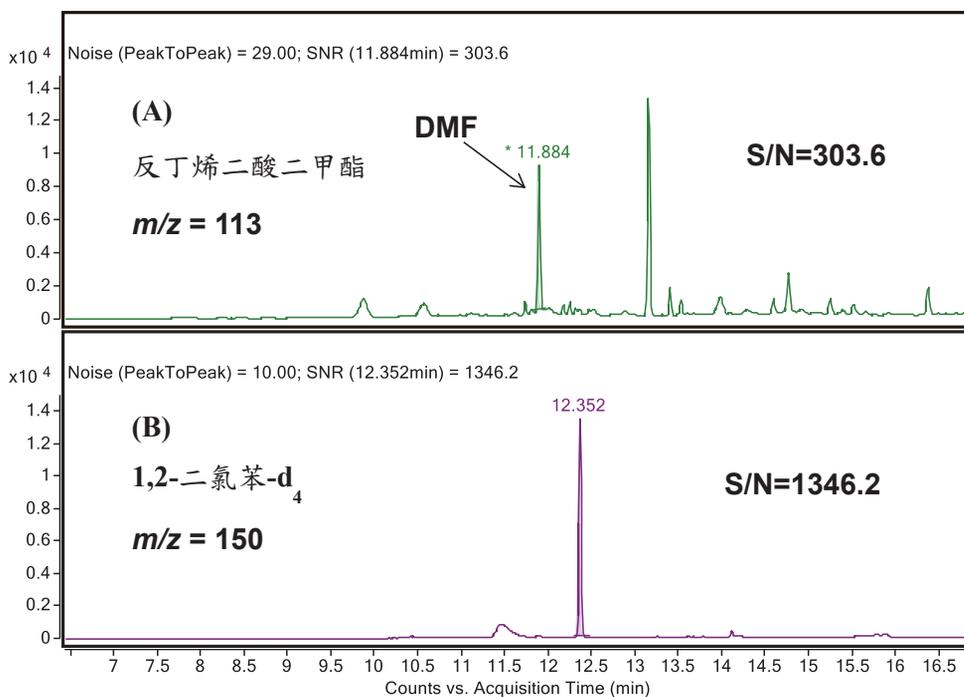
濃度範圍在0.1 - 5 μg 間所繪製之標準曲線迴歸方程式為 $Y = 0.002406x + 0.231686$ ，其 r^2 值為0.9997，顯示在0.2 - 5 μg 之濃度範圍內其線性關係良好，如圖三。

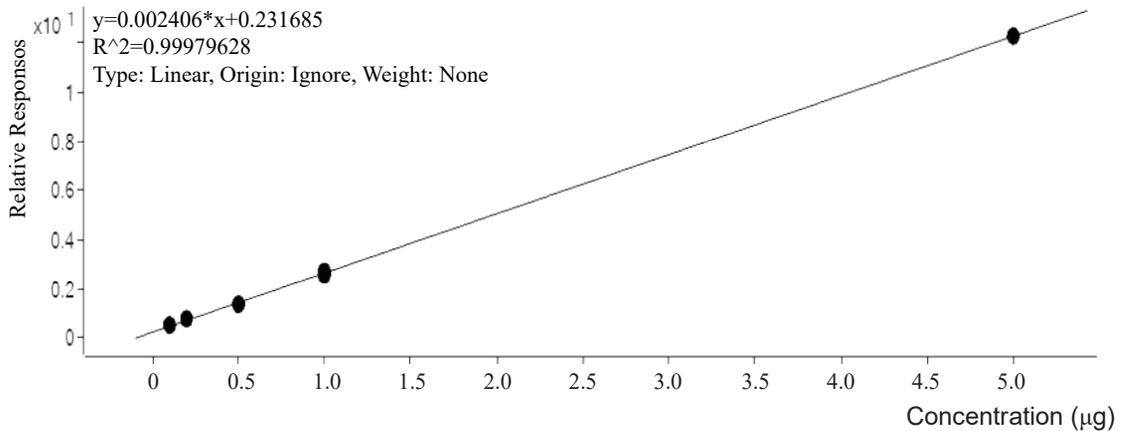
三、添加回收及重複試驗

於空白均質麵包中加入反丁烯二酸二甲酯標準溶液，使其濃度為0.2與1 ppm，依上述方法進行5重複試驗，以氣相層析儀頂空進樣進行分析，添加回收試驗結果如表三所示，其回收率介於88.3 - 117.5%間，變異係數均小於7%，符合食品化學檢驗方法確效規範⁽⁷⁾，顯示方法回收率良好且重複性佳。

四、定量極限之評估

本研究定義之定量極限採評估含有已知量待測物之低濃度樣品，經前處理後層析圖中待

圖一、反丁烯二酸二甲酯標準品(A)與1,2-二氯苯-d₄ (B)之質譜圖圖二、空白麵包中添加反丁烯二酸二甲酯標準品0.2 ppm (A)及1,2-二氯苯-d₄內部標準品之GC/MS圖譜



圖三、反丁烯二酸二甲酯之標準曲線

表三、於空白麵包中加入反丁烯二酸二甲酯標準溶液之添加回收情形

Spiked level ^a (ppm)	Recovery (%)		CV (%)
	Range	Mean	
0.2	88.3 - 104.0	94.2	6.66
1.0	106.0 - 117.5	110.3	3.88

a. n = 5

測物波峰之訊噪比大於10之最低濃度其回收率及重複性符合表三要求。本GC/MS方法就反丁烯二酸二甲酯之定量極限訂為0.2 ppm。

五、市售糕點及麵包之檢驗結果

利用本方法進行市售糕點10件及麵包10件檢體之反丁烯二酸二甲酯分析，檢驗結果，糕點及麵包檢體均未檢出。

結 論

本方法之檢驗流程簡單容易，分析時間短，經應用進行市售糕點及麵包檢體之測試，可作為例行性之檢驗工作，並已研提為食品藥物管理署之建議檢驗方法供各界參考引用，以補足現行無公告方法之窘境，提升檢驗效率。

參考文獻

1. Islam, M.N. 1982. Inhibition of mold in bread by dimethyl fumarate. *J. Food Sci.* 47(5): 1710-1712.
2. Rantanen, T. 2008. The cause of the Chinese sofa/chair dermatitis epidemic is likely to be contact allergy to dimethylfumarate, a novel potent contact sensitizer. *Br. J. Derm.* 159(1): 218-221.
3. The Commission of the European Communities. 2009. Requiring member states to ensure that products containing the biocide dimethyl fumarate are not placed or made available on the market. 2009/251/EC. *Off. J. Eu. Union.* L74/32-34.
4. Yang, J., Luo, M., Feng, D., Miao, H. and *et al.* 2015. Determination of dimethyl fumarate in bakery food by d-SPE-HPLC-PDA. *J. Hyg. Res.* 44 (3): 431-439.
5. Ravid, U., Elkabetz, M., Zamir, C., Cohen, K., and *et al.* 2010. Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto-HS-SPME stereoselective

- GC-MS. *Flav. Frag. J.* 25(1): 20-27.
6. Narizzano, R., Risso, F., Venturelli, G., Devia, C. and *et al.* 2009. Gas-chromatography–mass spectrometry analysis of dimethyl fumarate in consumer products. *J. Chromatogr. A.* 1216(39): 6762-6766.
7. 食品藥物管理署。2012。食品化學檢驗方法之確效規範。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=4199>]。

Determination of Dimethyl Fumarate in Food by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

CHING-HAO KUO, MING-CHIH FANG, CHE-LUN HSU, CHIA-FEN TSAIA,
YA-MIN KAO, HSIU-KUAN CHOU AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

An analytical method for the determination of dimethyl fumarate (DMF) in food by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS) was developed. HS-SPME is fast, simple and solvent-free, compared to conventional methods. A recovery study was performed by spiking standards into blank samples. The results showed great linearity of calibration. The recoveries of DMF were between 88.3 and 117.5% with coefficients of variation (CV) of less than 7% at 0.2 ppm and 1 ppm. The quantification limit of DMF was 0.2 ppm. A survey on the content of DMF in 10 cakes and 10 breads was done and all the samples were found negative for DMF.

Key words: GC/MS, dimethyl fumarate, headspace solid phase microextraction