食品藥物研究年報. 12:8-22 2021 Ann. Rept. Food Drug Res. 12:8-22 2021

以SweEt流程開發食品中農藥殘留檢驗方法

游蕎瑪 林書緯 洪于淨 楊舒涵 賴怡甄 彭冠智 林汝青 高雅敏 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

SweEt殘留農藥分析方法(Swedish ethyl acetate method)為1989年由瑞典國家食品管理局(Swedish National Food Agency)所建立,其分析流程不須淨化步驟,具分析時間短、流程簡單等優點。目前,SweEt、QuEChERS與Dutch mini-Luke萃取法為歐盟主要農藥分析方法。本研究參考歐盟參考實驗室及瑞典國家食品管理局之分析流程,針對尚無檢驗方法之14項農藥進行試驗。測試基質為蔬果類、穀類及茶類,分別以蘋果、白米及綠茶作為代表性基質;由於茶類基質較為複雜,為保護層析管柱及儀器,另參考國際文獻及食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析方法(六)之淨化粉劑進行淨化流程之評估。本研究以SweEt之流程進行調整,並進行蘋果、白米及綠茶基質之添加回收及重複性試驗,綠茶基質額外再以PSA、GCB及CaCl2之淨化粉劑進行淨化,以建立「SweEt殘留農藥分析方法」。結果顯示,14項農藥中符合衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)「食品化學檢驗方法之確效規範」,且定量極限利部食品藥物管理署(下稱食藥署)「食品化學檢驗方法之確效規範」,且定量極限可滿足衛生福利部公告之「農藥殘留容許量標準」,於蘋果基質中有10項,定量極限為0.01 - 0.05 ppm;於白米基質中有10項,定量極限為0.02 - 0.1 ppm;於綠茶中有7項,定量極限均為0.05 ppm。

關鍵詞:SweEt、乙酸乙酯、液相層析串聯質譜儀

前言

開發簡單、快速及具有成本效益和可靠之 殘留農藥檢驗方法為目前農藥檢驗之主流,常 見之農藥分析方法,包含以丙酮為萃取溶劑之 Dutch mini-Luke萃取法⁽¹⁾、乙腈為萃取溶劑之 QuEChERS萃取法⁽²⁾以及乙酸乙酯為萃取溶劑 之Ethyl acetate萃取法^(3,4)。

以丙酮為萃取溶劑之萃取法,最早於1970年代由Luke等學者所提出,後經許多學者進行樣品取樣量及萃取溶劑之減量評估及優化後,建立Dutch mini-Luke萃取法,該萃取法以丙酮

為萃取溶劑,並加入無水硫酸鈉,藉由鹽析效應將分析物由水層分配至有機層,再加入石油醚及二氯甲烷進行二次液液萃取,因液液萃取之共萃物(Co-extractives)較少,故此分析流程無須淨化步驟,Dutch mini Luke萃取法之分析時間為前述三種萃取法中最短,且具流程簡單等優點(1)。

QuEChERS萃取法之名稱係由快速 (Quick)、簡單(Easy)、便宜(Cheap)、效率 (Effective)、耐用(Rugged)與安全(Safe)六 個英文字所組成,為2003年美國農業部 Anastassiades等學者所開發⁽²⁾,該萃取法主要 分為萃取及淨化兩大步驟,以乙腈為萃取溶 劑,再加入鹽類與無水硫酸鎂,藉由鹽析效應 使乙腈與水分離,無水硫酸鎂則可去除乙腈萃 取液中之水分; 在淨化步驟, 於萃取液中加入 無水硫酸鎂與固相吸附劑進行淨化,以減少萃 取液中所含之干擾物,常見之固相吸附劑包含 用於去除醣類、脂肪酸、極性有機酸及部分 色素之一級二級胺(Primary secondary amine, PSA)、用於去除脂肪酸與脂質等非極性干擾 物之C18以及用於去除葉綠素和色素之石墨 化碳黑(Graphitized carbon black, GCB)等。 QuEChERS方法具有操作簡單、快速、便宜、 並可同時分析多種分析物等優點,目前食藥署 亦以該萃取法建立「食品中殘留農藥檢驗方 法-多重殘留分析方法(五)」(5)(下稱方法(五)) 及其擴增方法(6),可分析品項數共397項,以 及「食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析 方法(六)」(7)(下稱方法(六)),可分析品項數為 23項。

以乙酸乙酯(Ethyl acetate)為萃取溶劑之萃 取法,最早於1980年代被提出,後經瑞典國 家食品管理局(Swedish National Food Agency) (下稱NFA)針對樣品取樣量及萃取溶劑做減 少及優化後,建立SweEt萃取法(Swedish ethyl acetate method) (3,4), 現今已成為常見之殘留農 藥檢驗方法之一,該萃取法以乙酸乙酯為萃取 溶劑,並視基質特性以碳酸氫鈉調整pH值, 再使用無水硫酸鈉去除水分,文獻指出,於蔬 果類基質中,相較於乙腈萃取液,乙酸乙酯 萃取液之共萃物較少(8),故分析流程無須淨化 步驟,但針對成分較複雜之基質如茶葉等,基 於保護管柱及延長儀器使用壽命之前提下, 會於萃取後增加淨化步驟或是以稀釋之方式 來減低基質干擾。SweEt萃取法之分析時間較 OuEChERS萃取法短,且分析過程不產生熱, 適合用於分析對熱敏感之農藥,另外,乙酸乙 酯毒性較乙腈低,對於檢驗操作人員較為安全 且具環境友善及便官等優點。

不同農藥及基質所適用之萃取法不盡相同,惟各萃取法適合之農藥特性或基質種類,目前尚無定論^(9,10),也因三種萃取法於不同農藥與基質中表現相異,故本研究擬建立Ethylacetate萃取法,期能與現行使用QuEChERS萃取法之方法(五)及方法(六)互補。本研究參考並比較歐盟參考實驗室⁽¹⁾及瑞典國家食品管理局之分析流程,針對尚無檢驗方法之得拉松等14項農藥(表一),於蔬果、穀類及茶類基質建立以Ethylacetate萃取之殘留農藥分析方法,因茶葉基質較為複雜,為保護分析管柱及延長儀器使用壽命,另參考方法(六)及國際文獻,評估茶葉之淨化流程,使檢驗方法更加完善。

表一、液相層析分析條件

Parameter	Condition							
LC column Guard column Mobile phase	Waters HSS T3, 100 × 2.1mm, 1.7 μm Waters Pre-Column HSS T3, 5 × 2.1 mm, 1.7 μm A: 10 mM Ammonium formate, pH 4 B: Methanol							
Gradient program	Time (min)	A (%)						
	0.0	5	95					
	0.2	5	95					
	0.5	50	50					
	2.5	55	45					
	5.5	75	25					
	8.0	85	15					
	11.0	100	0					
	13.0	100	0					
	13.1	5	95					
	16.0	5	95					
Flow rate	0.45 mL/min							
Injection volume	$2~\mu L$							
Column temperature	45°C							
Analytical time	16 min							

材料與方法

一、檢體來源

本檢驗方法建立及測試所需檢體購自臺北 市超級市場及有機商店,蘋果檢體均質後置於 冷凍儲存備用,白米及茶檢體均經磨粉後置於 室溫儲存備用。

二、試藥

(一)試劑

甲酸(試藥級)、醋酸(試藥級)、甲酸銨(試藥級)、甲醇(液相層析級)、丙酮(液相層析級)及乙酸 相層析級)、乙腈(液相層析級)及乙酸 乙酯(液相層析級)購自臺灣默克(Merck) 股份有限公司(Darmstadt, Germany), 碳酸氫鈉(試藥級)及氯化鈣(CaCl₂, 試 藥級)購自J.T. Baker Chemical Company (Radnor, PA, USA),無水硫酸鈉(試藥級) 購自Macron Fine Chemical (Radnor, PA, USA),Primary secondary amine (PSA)及 graphitized carbon black (GCB)購自Agilent Technologies公司(San Diego, CA, USA)。

仁)對照用標準品

農藥對照用標準品三亞蟎(Amitraz) (純度 98.6%)及DMPF (N-(2,4-dimethylphenyl)-N'-methylformamidine) (純度 99.5%) 購自Chem Service Inc (West Chester, PA, USA) , 益發靈(Dichlofluanid) (純度 100.0%)、得拉松(Dialifos) (純度 100.0%)、Milbemectin A3 (純度 98.7%)及Milbemectin A4 (純度 98.2%) 購自AccStandard (New Haven, CT, USA) , Diafenthiuron-methanimidamide (純度 99.1%) 購自林純藥工業株式會社 (Osaka, Japan) , 汰芬隆(Diafenthiuron) (純度 99.1%)、Dicamba (純度 98.9%)、Ethoxyquin (純度 95.1%)、Flumioxazin

(純度96.4%)及三得芬(Tridemorph) (純度58.3%)購自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Diafenthiuron-urea (純度99.7%)及Pyflubumide (純度99.1%)購自FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan)。

三、器具及材料

- (一)針筒式濾膜:直徑為13 mm,孔徑為0.22 μm,聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)材質及聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)材質,購自Merck公司。
- (二層析管柱: Waters HSS T3, 100 × 2.1 mm, 1.7 μm, 為Waters產品(Milford, MA, USA)。
- (三)保護管柱: Waters Pre-Column HSS T3, 5× 2.1 mm, 1.7 μm, 為Waters產品(Milford, MA, USA)。

四、儀器設備與裝置

- (一)離心機(Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, USA)
- 二旋渦混合器(Vortex-Genie 2 mixer, Scientific Industries, USA)
- (三高速分散裝置(GenoGrinder®, SPEX SamplePrep, USA)
- 四pH測定儀(pH meter 3200P, Agilent Technologies, USA)
- (五高效能液相層析串聯質譜儀(Shimadzu Nexera X2及LCMS-8060, Kyoto, Japan)

五、試劑之調製

- (→)含1%甲酸之乙酸乙酯溶液 取甲酸10 mL,加乙酸乙酯使成1000 mL。
- (二)含1%醋酸之乙酸乙酯溶液 取醋酸 $10 \ mL$,加乙酸乙酯使成 $1000 \ mL$ 。

六、移動相溶液之調製

(一)移動相溶液A:取甲酸銨0.65 g,以去離子水溶解使成1000 mL,以甲酸調整pH值至4.0後,以濾膜過濾,取濾液供作移動相溶液A。

仁)移動相溶液B:甲醇。

七、標準溶液之配製

取三亞蟎、DMPF及Tridemorph對照用標準品各約10 mg,精確稱定,分別以丙酮溶解並定容至10 mL,作為標準原液,冷藏避光貯存;取Dicamba、Dichlofluanid及Dialifos對照用標準品各約10 mg,精確稱定,分別以甲醇溶解並定容至10 mL,作為標準原液,冷藏避光貯存;取Diafenthiuron、Diafenthiuronmethanimidamide、Diafenthiuron-urea、Flumioxazin、Ethoxyquin、Milbemectin A3、Milbemectin A4及Pyflubumide對照用標準品各約10 mg,精確稱定,分別以乙腈溶解並定容至10 mL,冷藏避光貯存;臨用時取適量各標準原液混合,以甲醇稀釋至1 µg/mL,供作標準溶液。

八、前處理探討之檢液調製

(一)蘋果基質

將檢體粉碎均質,取約10 g,精確稱定, 置於50 mL離心管中,加入農藥標準溶 液,靜置30分鐘後,再加入乙酸乙酯溶 液20 mL及碳酸氫鈉3 g漩渦混合,隨即以 高速分散裝置於1500 rpm振盪5分鐘後, 再加入無水硫酸鈉10 g漩渦混合,隨即以 高速分散裝置於1000 rpm振盪1分鐘後, 於15℃,4000×g離心3分鐘。取上清液1 mL,以0.22 μm濾膜過濾後,供作檢液。

(二)白米基質

將檢體粉碎均質,取約5g,精確稱定, 置於50 mL離心管中,加入農藥標準溶 液,靜置30分鐘後,加入預冷去離子水10 mL漩渦混合,靜置30分鐘後,再加入含1%甲酸之乙酸乙酯溶液10 mL漩渦混合,隨即以高速分散裝置於1500 rpm振盪5分鐘後,再加入無水硫酸鈉10 g漩渦混合,隨即以高速分散裝置於1000 rpm振盪1分鐘後,於15℃,4000 ×g離心3分鐘。取上清液1 mL,以0.22 μm濾膜過濾後,供作檢液。

(三)綠茶基質

將檢體粉碎均質,取約2 g,精確稱定,置於50 mL離心管中,加入農藥標準溶液,靜置30分鐘後,加入預冷去離子水10 mL漩渦混合,靜置30分鐘後,加入含1%醋酸之乙酸乙酯溶液10 mL漩渦混合,隨即以高速分散裝置於1500 rpm振盪5分鐘後,再加入無水硫酸鈉10 g漩渦混合,隨即以高速分散裝置於1000 rpm振盪1分鐘後,於15°C,4000×g離心3分鐘。取上清液6 mL,置於含150 mg CaCl2、150 mg PSA及45 mg GCB之淨化用離心管,置入高速分散裝置中,以1000 rpm振盪1分鐘後,於15°C,4000×g離心3分鐘。取上清液1 mL,以0.22 μ m濾膜過濾後,供作檢液。

九、液相層析串聯質譜儀測定條件

(一)液相層析儀

層析管柱為Waters HSS T3,1.7 μ m,內 徑100 × 2.1 mm,管柱溫度45°C,注入量 為2 μ L,移動相A為含10 mM甲酸銨之水 溶液,移動相B為甲醇,流速為0.45 mL/ min,時間梯度如表一。

二)串聯質譜儀

離子源採電灑式游離源(Electrospray ion source),以正負離子模式搭配多重反應偵測模式(Multiple reaction monitoring, MRM)進行偵測。質譜儀分析參數及MRM偵測

離子對如表二。

十、基質匹配檢量線製作

取空白檢體依八、調製未添加農藥標準 溶液之檢液,分別加入農藥標準溶液2 - 100 mL,使體積為1000 mL,混合均匀,供作基質 匹配檢量線溶液,續依九、條件進行液相層析 串聯質譜分析。就農藥標準品之波峰面積與對應之濃度,分別製作0.002 - 0.1 μg/mL之基質 匹配檢量線。

十一、添加回收及重複性試驗

取均質後蘋果空白檢體約10g、均質後白 米空白檢體約5g及均質後綠茶空白檢體約2

表二、14項農藥以液相層析串聯式質譜儀分析之MRM參數

分析物 英文名稱 中文 名稱		郊生 フガス	離子對	Q1/Q3	碰撞電壓 (V)	
		離子化 一模式	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	聚焦電壓 (V)		
Dialifos	得拉松	$\mathrm{ESI}^{^{+}}$	394 > 208* 394 > 187	-15 -15	-17 -9	
Dichlofluanid	益發靈	ESI ⁺	350 > 123* 350 > 224	-10 -13	-30 -16	
Dicamba	-	ESI	219 > 175* 221 > 177	23 15	7 8	
Milbemectin A3	密滅汀	$ESI^{^+}$	511.5 > 493* 511.5 > 147 511.5 > 95	-24 -26 -24	-12 -24 -32	
Milbemectin A4		ESI ⁺	525.5 > 127* 525.5 > 161	-24 -20	-16 -26	
Amitraz	三亞蟎	$\mathrm{ESI}^{^{+}}$	294 > 163* 294 > 122	-10 -10	-15 -28	
DMPF	-	$\mathrm{ESI}^{^{+}}$	163 > 122* 163 > 132	-11 -11	-17 -20	
Flumioxazin	-	$\mathrm{ESI}^{^{+}}$	372 > 327* 372 > 77	-10 -26	-22 -54	
Diafenthiuron	汰芬隆	$\mathrm{ESI}^{^{+}}$	385 > 329* 385 > 270	-20 -14	-20 -25	
Diafenthiuron- methanimidamide	-	ESI ⁺	369 > 229* 369 > 271	-17 -18	-27 -19	
Diafenthiuron-urea	-	ESI ⁺	353 > 297* 353 > 280	-13 -10	-22 -19	
Ethoxyquin	-	$\mathrm{ESI}^{^{+}}$	218 > 160* 218 > 148	-15 -15	-31 -21	
Tridemorph	三得芬	$\mathrm{ESI}^{^{+}}$	298 > 130* 298 > 116	-20 -20	-25 -25	
Pyflubumide	-	$\mathrm{ESI}^{^{+}}$	536.2 > 155* 537.2 > 155	-30 -20	-30 -25	

⁻無中文名稱

^{*}定量離子對

g,精確稱定,分別加入適量農藥標準溶液, 使蘋果檢體內農藥標準品含量為0.01 μg/g及 0.05 μg/g;白米檢體內農藥標準品含量為0.02 μg/g與0.1 μg/g;綠茶檢體內農藥標準品含量為 0.05 μg/g與0.2 μg/g。靜置30分鐘後,依所建 立之方法進行5重複回收試驗,同時作空白試 驗,計算5重複試驗間之平均回收率及變異係 數(Coefficient of variation, CV)。添加濃度之回 收率及變異係數為參考食藥署食品化學檢驗方 法之確效規範⁽¹²⁾進行評估。

十二、定量極限之評估

取蘋果、白米及綠茶檢體各約10 g、5 g 及2 g,精確稱定,加入適量標準溶液,依所 建立之方法製備檢液並以LC-MS/MS分析。 以所設定之定量離子訊號與雜訊之比值(S/N ratio)≥10,定性離子之訊號與雜訊之比值(S/N ratio)≥3之最低添加量,同時其回收率與變異 係數符合食品化學檢驗方法之確效規範作為定 量極限(Limit of quantification, LOQ)。

結果與討論

一、測試樣品之選擇

本研究將測試基質分為蔬果類、穀類及茶類,分別選擇蘋果、白米及綠茶作為代表性基質。

二、質譜儀之最適分析條件

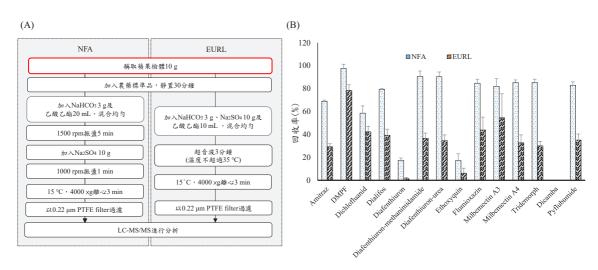
本研究利用電灑游離法配合MRM模式偵測。由直接進樣方式將待測物注入質譜儀中以氫氣進行碰撞,使待測分子碎裂,從前驅離子所形成的碎片中,挑選2個訊號較強之產物離子作為MRM偵測離子,相關MRM參數整理於表二。

三、前處理之選擇

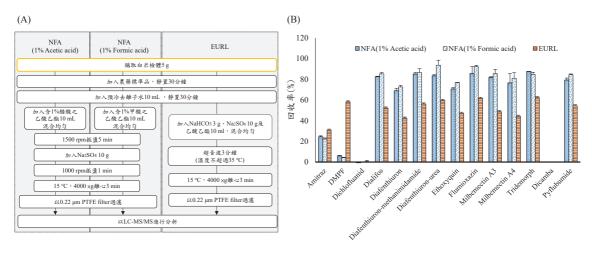
(一)蔬果類

本研究以蘋果作為蔬果類之代表,依歐盟參考實驗室及瑞典國家食品管理局之前處理流程(圖一(A))進行測試,結果顯示,14項農藥添加0.04 ppm於蘋果中,除Dicamba不成峰之外,其餘13項農藥之回收率皆以瑞典國家食品管理局之前處理流程較佳(圖一(B)),故最後選擇該流程執行確效試驗。

(二)穀類



圖一、蘋果基質以不同前處理之分析流程(A)及回收率結果(B)



圖二、白米基質以不同前處理之分析流程(A)及回收率結果(B)

本研究以白米作為穀類之代表,依歐盟參考實驗室及瑞典國家食品管理局之前處理流程(圖二(A))進行測試,因瑞典國家食品管理局之流程使用含酸之乙酸乙酯作為萃取溶劑,故本研究比較使用添加醋酸或甲酸之乙酸乙酯萃取溶劑,其回收率之差異。

結果顯示,14項農藥添加0.08 ppm於白米中,Dichlofluanid 及Dicamba於兩種前處理流程中皆不成峰,除三亞蟎及其代謝物DMPF外,其餘10項農藥之回收率皆以瑞典國家食品管理局之前處理較佳,其中添加甲酸之組別,於多數農藥中之回收率較佳(圖二(B)),故最後選擇含1%甲酸之乙酸乙酯作為萃取溶劑,並搭配瑞典國家食品管理局之流程進行確效試驗。

(三)茶類

1. 萃取流程

本研究以綠茶作為茶類之代表,參考並 比較歐盟參考實驗室及瑞典國家食品管 理局之前處理流程(圖三(A)),因瑞典國 家食品管理局之流程使用含酸之乙酸乙 酯作為萃取溶劑,故本研究比較使用添 加醋酸或甲酸之萃取溶劑,其回收率之 差異。

結果顯示,14項農藥添加0.2 ppm於綠茶中,Diafenthiuron及Dicamba於兩種前處理流程中皆不成峰,除三亞蟎及其代謝物DMPF外,其餘10項農藥之回收率,皆以瑞典國家食品管理局之前處理較佳,其中添加醋酸之組別,於多數農藥中之回收率較佳(圖三(B)),故最後選擇含1%醋酸之乙酸乙酯作為萃取溶劑,並搭配瑞典國家食品管理局之流程作為茶類之萃取流程。

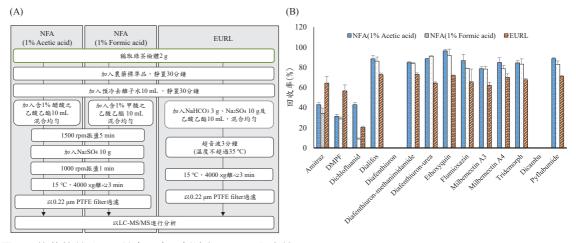
2. 淨化流程

三亞蟎之殘留量以三亞蟎及其代謝物 DMPF合併計,汰芬隆之殘留量以汰 芬隆(Diafenthiuron)、Diafenthiuron-methanimidamide及Diafenthiuron-urea合併計,因先前於茶葉基質萃取流程之試驗結果發現,三亞蟎回收率低於60%,汰芬隆不成峰,故於茶葉基質之淨化流程建立上,排除以上農藥及其代謝物共5項,以益發靈(Dichlofluanid)等9項農藥進行測試。

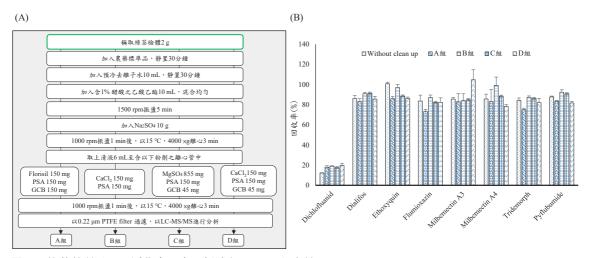
本研究參考2010年Kanrar (13)、2013年 Rajski (14)等人之研究文獻以及食藥署公開之方法(六) (7),測試以下4種不同組合之淨化粉劑之淨化效果(圖四(A)),分別為Florisil、PSA及GCB (A組);CaCl₂及PSA (B組);MgSO₄、PSA及GCB (C組);CaCl₂、PSA及GCB (D組),結果顯示,以B組淨化粉劑處理後之檢液外觀混濁,而除Dicamba不成峰外,4種淨化粉劑組別對於其餘8項農藥回收率均

無顯著差異(圖四(B))。

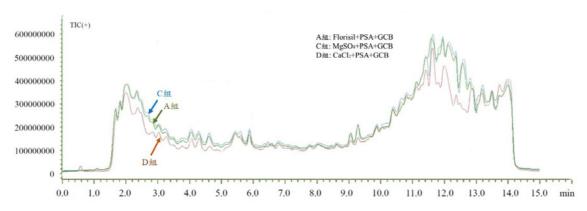
考量保護層析管柱及儀器,空白綠茶 基質萃取液以含有GCB之A、C及D組 淨化粉劑淨化後,再以LC-MS/MS進行 全掃描(Full scan)分析,TIC結果顯示以 D組處理後之綠茶檢液,其共萃物較少 (圖五),淨化效果較佳,故最後選擇含 CaCl2、PSA及GCB組合之D組作為茶 類淨化粉劑,以進行後續之確效試驗流 程。



圖三、綠茶基質以不同前處理之分析流程(A)及回收率結果(B)



圖四、綠茶基質以不同淨化處理之分析流程(A)及回收率結果(B)



圖五、綠茶基質經不同淨化處理之萃取物以LC-MS/MS分析之總離子圖譜

五、確效數據

本研究考量農藥殘留容許量標準,依不同基質類別選擇2個濃度進行添加回收試驗,確效評估依據食藥署「食品化學檢驗方法之確效規範」(12)執行。

為符合農藥殘留容許量標準,本實驗蔬果類以0.01及0.05 μg/g,穀類以0.02及0.1 μg/g進行14項農藥添加回收試驗;茶類基質因先前評估前處理及淨化流程結果發現,三亞蟎及太芬隆之回收率皆低於60%,故排除此2項農藥及其代謝物共5項之添加回收試驗,僅針對其餘9項農藥以0.05及0.2 μg/g進行添加回收試驗。三項基質之異日間變異係數採用各類基質添加回收試驗之高濃度點來進行評估。添加回收試驗中,Dicamba於各基質中皆不成峰而無法定量,其餘農藥於各基質之回收率結果分述如下:

(一)蘋果

13項農藥添加0.01 ppm於蘋果中, Ethoxyquin不成峰無法定量,三亞蟎、 益發靈及汰芬隆之平均回收率分別為 59.0%、54.4%及38.9%,其餘9項農藥之 平均回收率介於71.8 - 88.8%間,CV值皆 小於20%。添加0.05 ppm於蘋果中,益發 靈、汰芬隆及Ethoxyquin之平均回收率分 別為54.9%、45.9%及50.5%,其餘10項農藥之平均回收率介於66.2 - 92.7%, CV值皆小於20%(表三)。

仁)白米

(三)綠茶

8項農藥添加0.05 ppm於綠茶中,益發靈之平均回收率為21.0%,其餘7項農藥之平均回收率介於76.2 - 92.0%, CV值皆低於20%。添加0.2 ppm於綠茶中,益發靈之平均回收率為15.5%,其餘7項農藥之平均回收率介於84.7 - 96.1%, CV值皆低於20%(表五)。

六、定量極限

表三、14項農藥於蘋果(蔬果類)中之殘留容許量、回收率、變異係數、相關係數及定量極限

		, t t .		Intr	a-day	precision ^a	Inter-day precision ^b		LOQ (ppm)	
No.	o. 英文名稱	中文 名稱	農藥殘留 容許量	0.01 ppm		0.05 ppm		0.05 ppm		r
		1 <u>1</u> 1 111	(ppm)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	CV (%)		(ррш)
1	Amitraz	三亞蟎	0.1-0.5	59.0	3.2	71.3	4.6	4.9	0.9989	0.01*
2	DMPF	_°		88.8	5.4	92.7	3.6	2.7	0.9998	0.01*
3	Dichlofluanid	益發靈	0.1-10.0	54.4	8.6	54.9	9.9	8.9	0.9985	0.01*
4	Dialifos	得拉松	禁用	76.7	5.0	66.2	7.9	6.4	0.9979	0.01*
5	Diafenthiuron	汰芬隆	1.0-2.0	38.9	6.9	45.9	5.6	32.2	0.9925	_f
6	Diafenthiuron- methanimidamide	_c		84.3	2.9	91.5	2.5	4.1	0.9997	0.01
7	Diafenthiuron-urea	_c		81.1	2.2	89.3	2.7	3.1	0.9997	0.01
8	Ethoxyquin	_c	3	_e	_e	50.5	10.4	13.8	0.9989	0.05*
9	Flumioxazin	_°	0.2-0.4	77.8	19.7	79.6	3.8	4.7	0.9972	0.01*
10	Milbemectin A3	密滅汀	0.2-2.0	74.1	13.0	88.7	3.3	8.2	0.9992	0.01*
11	Milbemectin A4			83.6	5.7	87.9	5.1	6.3	0.9979	0.01*
12	Tridemorph	三得芬	1	72.1	3.8	88.5	3.5	3.2	0.9990	0.01*
13	Dicamba	_°	1.0-5.0	_e	_e	_e	_e	_e	_f	_f
14	Pyflubumide	_c	_d	71.8	5.2	87.0	4.0	5.1	0.9976	0.01*

 $^{^{}a}N = 5.$

本研究之定量極限與我國殘留容許量標準對照如表三-五所示,蘋果基質中,DMPF等9項農藥於0.01 ppm添加濃度之回收率介於60-125%,CV值小於30%,故其LOQ訂為0.01 ppm;三亞蟎於添加濃度0.01 ppm之平均回收率為59.0%僅略低於確效規範之要求,但重複性良好(CV值為3.2%),故將其之LOQ訂為0.01 ppm;汰芬隆於殘留定義上為汰芬隆、Diafenthiuron-methanimidamide及Diafenthiuron-urea合併計,雖然Diafenthiuron-methanimidamide及Diafenthiuron-urea之LOQ

為0.01 ppm,但汰芬隆於0.01 μg/g及0.05 μg/g濃度之添加回收試驗回收率分別為38.9%及45.9%,無法符合確效規範之要求。益發靈於添加濃度0.01 ppm之平均回收率為54.4%僅略低於確效規範之要求,但重複性良好(CV值為8.6%),故將其之LOQ訂為0.01 ppm;Ethoxyquin於添加濃度0.05 ppm之平均回收率為50.5%,但重複性良好(CV值為10.4%),考量Ethoxyquin於蔬果類之MRL為3 ppm,為利於監測需求,將其LOQ訂為0.05 ppm。故於蔬果類中,除Dicamba、汰芬隆及2項

 $^{{}^{}b}N = 10.$

^{&#}x27;無中文名稱

⁴無農藥殘留容許量標準

[。] 不成峰

^f因不成峰或回收率不佳,故無法判定LOQ及r

^{*}為可滿足法規,並用於例行性監測之品項

表四、14項農藥於白米(穀類)中之殘留容許量、回收率、變異係數、相關係數及定量極限

		rfa v ^a r	農藥殘留	Intra-day precision ^a			Inter-day precision ^b			
No.	. 英文名稱	中文 名稱	容許量	0.02 ppm		0.1 ppm		0.1 ppm	r	LOQ (ppm)
			(ppm)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	CV (%)		
1	Amitraz	三亞蟎	0.5	_e	_e	16.2	15.0	14.5	0.9925	_f
2	DMPF	_c		_e	_e	5.6	11.5	28.9	0.9998	_f
3	Dichlofluanid	益發靈	_d	_e	_e	_e	_e	_e	0.9999	_f
4	Dialifos	得拉松	禁用	92.7	2.6	91.3	0.9	1.1	0.9997	0.02*
5	Diafenthiuron	汰芬隆	_d	63.7	2.2	70.0	2.5	3.0	0.9998	0.1*0
6	Diafenthiuron- methanimidamide	_°		86.7	3.9	89.5	5.3	5.2	0.9996	0.02*
7	Diafenthiuron-urea	_c		82.9	1.8	93.2	2.1	6.5	0.9997	0.02*
8	Ethoxyquin	_c	_d	49.1	4.2	80.0	2.8	3.4	0.9997	0.1*0
9	Flumioxazin	_c	_d	96.9	13.7	97.9	3.9	5.3	0.9977	0.02*
10	Milbemectin A3	密滅汀	0.1	98.2	9.7	101.4	5.2	10.6	0.9986	0.02*
11	Milbemectin A4			83.5	22.2	95.3	2.8	10.5	0.9997	0.1*
12	Tridemorph	三得芬	0.2-0.5	89.3	3.1	91.2	1.3	1.9	0.9995	0.02*
13	Dicamba	_c	0.04-7.0	_e	_e	_e	_e	_e	_f	_f
14	Pyflubumide	_c	_d	91.1	4.7	90.7	1.0	1.3	0.9998	0.02*

 ${}^{a}N = 5.$

其代謝物(Diafenthiuron-methanimidamide及 Diafenthiuron-urea)外,其餘10項農藥符合我 國對於蔬果類之規範要求。白米基質中,得 拉松等7項農藥於0.02 ppm添加濃度之回收率介於70-120%,CV值小於20%,故其LOQ訂為0.02 ppm,汰芬隆等3項於0.1 ppm添加濃度 之回收率介於70-120%,CV值小於20%,故其LOQ訂為0.1 ppm,於穀類中,除Amitraz、DMPF、益發靈及Dicamba外,其餘10項農藥符合我國對於穀類之規範要求。綠茶基質中,得拉松等7項農藥於0.05 ppm添加濃度之回收

率介於70-120%, CV值小於20%, 故其LOQ 訂為0.05 ppm, 於茶類中, 除三亞蟎等7項農藥外,其餘7項農藥皆符合我國對於茶類之規範要求。

七、回收率不佳之農藥討論

益發靈在鹼性環境及乙腈中易降解,故不適合QuEChERS萃取法,Xue Zhou等人於2016年(15)之研究發現以丙酮:乙酸乙酯(1:1, v/v)為萃取液並搭配使用含PSA及GCB之淨化步驟,可於蔬果類中得到良好之回收率。三亞蟎則易於

 $^{{}^{}b}N = 10.$

[°]無中文名稱

d無農藥殘留容許量標準

e不成峰

[「]因不成峰或回收率不佳,故無法判定LOQ及r

^{*}為可滿足法規,並用於例行性監測之品項

		-11-	農藥殘留	Int	ra-day	precision ^a	Inter-day precision ^b			
No.		中文 名稱	容許量	0.05 pp	m	0.2 pp	m	0.2 ppm	r	LOQ (ppm)
		711 111	(ppm)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	CV (%)		(bbm)
1	Dichlofluanid	益發靈	_ ^d	21.0	9.4	15.5	6.7	13.5	0.9996	_e
2	Dialifos	得拉松	禁用	91.1	2.3	91.9	3.2	2.6	0.9992	0.05*
3	Ethoxyquin	_c	_ ^d	92.0	4.2	96.1	4.7	3.8	0.9996	0.05*
4	Flumioxazin	_c	_ ^d	79.2	11.1	87.1	6.9	5.6	0.9984	0.05*
5	Milbemectin A3	密滅汀	2.0	76.2	19.4	84.7	4.7	8.8	0.9964	0.05*
6	Milbemectin A4			78.3	7.8	88.6	3.1	8.6	0.9992	0.05*
7	Tridemorph	三得芬	20	87.6	2.1	91.4	3.2	4.8	0.9994	0.05*
8	Pyflubumide	_c	_d	89.6	2.9	91.8	0.9	2.1	0.9986	0.05*

表五、9項農藥於綠茶(茶類)中之殘留容許量、回收率、變異係數、相關係數及定量極限

酸性環境中易代謝成DMPF,故檢驗流程中環境pH之變化為影響回收率之重要因素,Ferrer等人於2010年⁽¹⁰⁾以QuEChERS及乙酸乙酯萃取法分析梨子中三亞蟎及DMPF,其結果發現,乙酸乙酯之萃取液之pH值約為4,乙腈萃取液之pH值約為8-9,故相較於乙酸乙酯,三亞蟎及DMPF於QuEChERS萃取法中較穩定且回收率較好。汰芬隆及Ethoxyquin易被基質或環境氧化,Herrera等人⁽¹⁶⁾及歐盟檢驗方法⁽¹⁷⁾建議在檢體研磨步驟之前添加抗氧化劑如抗壞血酸等,以提升農藥之回收率。Dicamba為偏酸性之農藥,使用QuEChERS萃取法,並於淨化步驟中減少PSA之使用,則可得良好之回收率⁽¹⁸⁾。

結論與建議

本研究參考瑞典國家食品管理局之分析流程,針對尚無檢驗方法之得拉松等14項農藥,

於蔬果、穀類及茶類中建立SweEt農藥檢驗方法,因茶葉基質較為複雜,為保護分析管柱及儀器,另搭配使用含CaCl₂、PSA及GCB之淨化流程,結果顯示,除Dicamba於各基質皆不成峰外,其餘農藥可滿足我國法規要求之品項數,於蔬果中為10項,於穀類中為10項,於茶類中為7項。

參考文獻

- Lozano, A., Kiedrowska, B., Scholten, J., de Kroon, M. and et al. 2016. Miniaturisation and optimisation of the Dutch mini-Luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. Food Chem. 192: 668-681.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher,
 D. and Schenck, F. J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile

 $^{^{}a}N = 5.$

 $^{{}^{}b}N = 10.$

[°]無中文名稱

d無農藥殘留容許量標準

[°]因不成峰或回收率不佳,故無法判定LOO及r

^{*}為可滿足法規,並用於例行性監測之品項

- extraction/partitioning and "dispersive solidphase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int. 86(2): 412-431.
- 3. Mol, H. G., Rooseboom, A., van Dam, R., Roding, M. and *et al.* 2007. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multiresidue method for pesticides in produce. Anal. Bioanal. Chem. 389(6): 1715-1754.
- Jansson, C., Pihlström, T., Österdahl, B. G. and Markides, K. E. 2004. A new multiresidue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A 1023(1): 93-104.
- 5. 衛生福利部。2019。食品中殘留農藥檢驗 方法-多重殘留分析方法(五)。108.05.10衛 授食字第1081900612號修正。
- 6. 衛生福利部食品藥物管理署。2020。 農藥多重殘留分析方法(五)之擴增品 項-Alanycarb等17項。109年10月20日公 開。
 - [http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=1574&scid=726] °
- 7. 衛生福利部食品藥物管理署。2017。食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析方法 (六)。106年4月26日公開。
 - [http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=1574&scid=726] °
- 8. Banerjee, K., Oulkar, D. P., Dasgupta, S., Patil, S. B. and *et al.* 2007. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography—tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1173(1-2): 98-109.
- 9. EU Reference Laboratories for Residues

- of Pesticides. 2011. Validation of MRM pesticides from the working document SANCO/12745/2013 using three multiresidue methods (QuEChERS, ethyl acetate and Dutch mini-Luke).
- [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file//EURL-FV-2019-m33Validation%20 of%20MRM%20pesticides%20from%20 the%20Working%20Document%20 SANCO_12745_2013.pdf].
- 10. Ferrer, C., Agera, A., Mezcua, M., Fernndez-Alba, A. R. and et al. 2010. Efficiency evaluation of the main multiresidue methods used in Europe for the analysis of amitraz and its major metabolites. J. AOAC Int. 93(2): 380-388.
- 11. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. 2010. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection.
 - [https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/fv/ethyl_acetate_extraction.pdf].
- 12. 衛生福利部食品藥物管理署。2013。食品化學檢驗方法之確效規範【第二次修正】。102年9月9日公開。
 - [http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=4115] °
- 13. Kanrar, B., Mandal, S. and Bhattacharyya, A. 2010. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 67 pesticides in made tea, tea infusion, and spent leaves using ethyl acetate extraction and gas chromatography/mass spectrometry. J. AOAC Int. 93(2): 411-424.
- 14. Rajski, Ł., Lozano, A., Belmonte-Valles, N. and Uclés, A. and *et al.* 2013. Comparison of

- three multiresidue methods to analyse pesticides in green tea with liquid and gas chromatography/tandem mass spectrometry. Analyst. 138(3): 921-931.
- 15. Zhou, X., Cao, S., Li, X., Xi, C. and et al. 2016. Rapid determination of dichlofluanid residues in vegetables using dispersive-SPE sample preparation combined with gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. Sci. 54(5): 858-863.
- 16. Herrera, S., Lozano, A., Aguilera, A. and Fernández-Alba A. 2016. Influence of the antioxidant tocopherol on diafenthiuron recoveries using QuEChERS protocol. EURL-FV Contributions to International Conferences.

[https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file//

PD047.pdf].

- 17. EU Reference Laboratory. 2015. Improvement of ethoxyquin recoveries by QuEChERS through the addition of ascorbic acid. Version 1 (last update: 22.07.2014). EURL-SRM.

 [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_Observations_Ethoxyquin_V2.pdf].
- 18. EU Reference Laboratory. 2015. Analysis of acidic pesticides using QuEChERS (EN15662) and acidified QuEChERS method. Version 1 (last update: 20.05.2015). EURL-SRM. [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_Observations_AcidicPesticides.pdf].

Development of SweEt Method for the Determination of Pesticide Residues in Foods

CHIAO-YU YU, SHU-WEI LIN, YU-CHING HUNG, SHU-HAN YANG, I-CHEN LAI, GUAN-JHIH PENG, NU-CHING LIN, YA-MIN KAO, SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

The Swedish National Food Agency (NFA) developed a multi-residue analytical method for pesticide residues based on the ethyl acetate extraction, followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS determinations in 1989, so called SweEt. This multi-residue analytical method had been revised continuously to improve and simplify the methodology for pesticides residue analysis. For example, the original clean-up procedure was eliminated entirely and the addition of sodium sulfate anhydrous was applied to remove the water in all matrices. SweEt as well as QuEChERS and Dutch mini-Luke methods were the main multi-residue analytical methods for pesticides in the EU at present. This study evaluated the analytical method for 14 pesticides in the matrices of tea, cereals and fruit in reference to the analytical methods of the European Union Reference Laboratory (EURL) and the Swedish National Food Agency. The results showed tea matrix was complicated and further clean-up processes were required to protect and extend the life of analytical column. The established "SweEt multi-residue method" in this study offered good capacities in which 10, 10, and 7 pesticides were able to be quantitated in apple, rice and tea among 14 pesticides, respectively.

Key words: SweEt, ethyl acetate, LC-MS/MS