

蜂產品中殘留農藥檢驗方法－多重殘留分析方法

Method of Test for Pesticide Residues in Bee Products - Multiresidue Analysis

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蜂蜜、蜂王漿及蜂花粉中亞滅培(acetamiprid)等11項農藥(品項見附表)之多重殘留分析。
2. 檢驗方法：檢體採用QuEChERS方法(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)前處理後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)及氣相層析串聯質譜儀(gas chromatograph/tandem mass spectrometer, GC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：CORTECS UPLC C18，1.6 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.1.3. 保護管：CORTECS UPLC C18，1.6 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 5 mm，或同級品。
 - 2.1.2. 氣相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.2.1. 離子源：電子游離(electron ionization, EI)。
 - 2.1.2.2. 層析管：DB-5MS UI毛細管，內膜厚度0.25 μm ，內徑0.25 mm $\times$ 30 m，或同級品。
 - 2.1.3. 攪拌均質器(Blender)。
 - 2.1.4. 粉碎機(Grinder)。
 - 2.1.5. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或其他具振盪功能之裝置。
 - 2.1.6. 離心機(Centrifuge)：可達3000 $\times g$ 以上，溫度控制可達15 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.7. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：冰醋酸、甲酸及醋酸銨均採試藥特級；正己烷及丙酮均採用殘留量級；乙腈及甲醇均採液相層析級。無水醋酸鈉、無水硫酸鎂、primary secondary amine (PSA)、octadecysilane, end-capped (C18 EC)及graphitized carbon black (GCB)均採用分析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；農藥對照用標準品亞滅培等11項(品項見附表一及附表二)；磷酸三苯酯(triphenylphosphate, TPP)內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。

- 2.3.2. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。
 - 2.3.3. 容量瓶：25 mL及50 mL，褐色。
 - 2.3.4. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)^(註1)：採用Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
 - 2.3.5. 萃取用粉劑^(註2)：含無水硫酸鎂4 g及無水醋酸鈉1 g。
 - 2.3.6. 淨化用離心管I^(註2)：含PSA 300 mg及無水硫酸鎂900 mg，檢液負荷量6 mL，適用於蜂蜜檢體。
 - 2.3.7. 淨化用離心管II^(註2)：含PSA 300 mg、C18EC 300 mg及無水硫酸鎂900 mg，檢液負荷量6 mL，適用於蜂王漿檢體。
 - 2.3.8. 淨化用離心管III^(註2)：含PSA 450 mg、無水硫酸鎂900 mg、C18 EC 300 mg及GCB 50 mg，檢液負荷量6 mL，適用於蜂花粉檢體。
- 註1：陶瓷均質石可視檢體黏稠度自行評估。
- 註2：可依需求自行評估使用市售各種萃取及淨化用組合套組。

2.4. 試劑之調製：

- 2.4.1. 含1%醋酸之乙腈溶液：
取冰醋酸10 mL及乙腈990 mL，混合均勻。
- 2.4.2. 含5%甲酸之乙腈溶液：
取甲酸5 mL及乙腈95 mL，混合均勻。
- 2.4.3. 丙酮：正己烷(1:1, v/v)溶液：
取丙酮及正己烷以1：1 (v/v)比例混勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

- 2.5.1. 移動相溶液A：
取醋酸銨0.39 g，以去離子水溶解使成1000 mL，加入甲酸1 mL，混合均勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
- 2.5.2. 移動相溶液B：
取醋酸銨0.39 g，以甲醇溶解使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 內部標準溶液之配製：

- 取磷酸三苯酯內部標準品約50 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至50 mL，作為內部標準原液，於-18°C避光貯存備用。
- 2.6.1. 取適量內部標準原液以甲醇稀釋至50 $\mu\text{g/mL}$ ，供作2.8.節檢液調製用之內部標準溶液。
 - 2.6.2. 取適量內部標準原液以甲醇稀釋至5 $\mu\text{g/mL}$ ，供作2.9.1.節LC-MS/MS分析用之內部標準溶液。
 - 2.6.3. 取適量內部標準原液以丙酮稀釋至5 $\mu\text{g/mL}$ ，供作2.9.2.節GC-

MS/MS分析用之內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

2.7.1 取農藥對照用標準品各約25 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至25 mL，作為標準原液，於-18°C避光貯存。臨用時取之適量標準原液混合，以甲醇稀釋至1 µg/mL，供作2.9.1.節LC-MS/MS分析用之標準溶液。

2.7.2 取農藥對照用標準品各約25 mg，精確稱定，分別以丙酮或正己烷溶解並定容至25 mL，作為標準原液，於-18°C避光貯存。臨用時取適量標準原液混合，以丙酮：正己烷(1:1, v/v)溶液稀釋至1 µg/mL，供作2.9.2.節GC-MS/MS分析用之標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

將檢體均質、混勻後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入冷藏預冷之去離子水10 mL，靜置10分鐘，混勻後加入含1%醋酸之乙腈溶液10 mL及50 µg/mL內部標準溶液10 µL，再依序加入陶瓷均質石1顆及萃取用粉劑，蓋上離心管蓋，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於15°C，5000 ×g離心1分鐘。取上清液6 mL，置於淨化用離心管^(註)，以高速分散裝置以1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於15°C，5000 ×g離心2分鐘。取上清液1 mL，以氮氣吹至剛乾，殘留物以甲醇1 mL溶解，混合均勻，以濾膜過濾，供作檢液I，以LC-MS/MS分析。另取上清液1 mL，以氮氣吹至剛乾，殘留物以丙酮：正己烷(1:1, v/v)溶液1 mL溶解，混合均勻，以濾膜過濾後，供作檢液II，以GC-MS/MS分析。

註：蜂蜜檢體採用淨化用離心管I；蜂王漿檢體採用淨化用離心管II；
蜂花粉檢體採用淨化用離心管III。

2.9. 基質匹配檢量線製作

2.9.1. LC-MS/MS

取空白檢體，依2.8.節調製未添加內部標準品之淨化後上清液，分別量取1 mL以氮氣吹至剛乾，分別加入1 µg/mL標準溶液2~200 µL、5 µg/mL內部標準溶液10 µL及甲醇，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液I，依下列條件進行分析。就各農藥與內部標準品波峰面積比，與對應之各農藥濃度，製作0.002~0.2 µg/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註3)：

層析管：CORTECS UPLC C18，1.6 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

保護管：CORTECS UPLC C18，1.6 µm，內徑2.1 mm × 5 mm。

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 (%)
0.0 → 2.0	99 → 50	1 → 50
2.0 → 8.0	50 → 30	50 → 70
8.0 → 10.0	30 → 1	70 → 99
10.0 → 13.0	1 → 1	99 → 99
13.0 → 13.5	1 → 99	99 → 1
13.5 → 15.0	99 → 99	1 → 1

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：5 μ L。

毛細管電壓(Capillary voltage)：

電灑離子化正離子(ESI^+)採用採用3.5 kV，

電灑離子化負離子(ESI^-)採用採用1.6 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：30 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：900 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如附表一。

2.9.2. GC-MS/MS：

取空白檢體，依2.8.節調製未添加內部標準品之淨化後上清液，分別量取1 mL，以氮氣吹至剛乾，分別加入1 μ g/mL標準溶液2~200 μ L、5 μ g/mL內部標準溶液10 μ L及丙酮：正己烷(1:1, v/v)溶液，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液II，依下列條件進行分析。就各農藥與內部標準品波峰面積比，與對應之各農藥濃度，製作0.002~0.2 μ g/mL之基質匹配檢量線。

氣相層析串聯質譜分析測定條件^(註3)：

層析管：DB-5MS UI毛細管，內膜厚度0.25 μ m，內徑0.25 mm $\times$ 30 m。

層析管溫度：初溫：60°C，1 min；

升溫速率：40°C/min；

中溫：170°C；

升溫速率：10°C/min；

終溫：310°C，2.25 min。

載流氣體及流速：氦氣，1 mL/min。

注入器溫度(Injector temperature)：280°C。

注入模式：不分流(splitless)。

注入量：1 µL。

離子化模式：電子游離(EI)，70 eV。

離子源溫度：300°C。

偵測模式：多重反應偵測。偵測離子對及碰撞能量如附表二。

註3：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

2.10.1. 基質匹配檢量線法(Matrix-matched calibration curve method)

2.10.1.1. LC-MS/MS：

精確量取檢液I及基質匹配檢量線溶液I各5 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.1.節條件進行分析。就檢液與基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註4)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各農藥之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各農藥之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由各農藥之基質匹配檢量線求得檢液中各農藥之濃度(µg/mL)

V：萃取檢體之含1%醋酸之乙腈溶液之體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

2.10.1.2. GC-MS/MS：

精確量取檢液II及基質匹配檢量線溶液II各1 µL，分別注入氣相層析串聯質譜儀中，依2.9.2.節條件進行分析。就檢液與基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註4)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各農藥之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各農藥之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由各農藥之基質匹配檢量線求得檢液中各農藥之濃度(µg/mL)

V：萃取檢體之含1%醋酸之乙腈溶液之體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

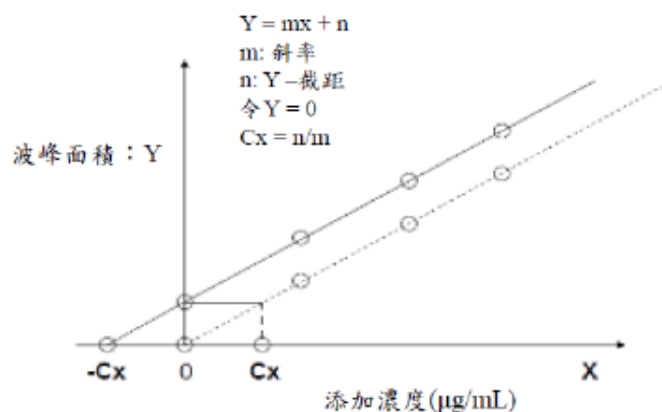
註4：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得($\leq 100\%$)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

2.10.2. 標準品添加法(Standard addition method)：

2.10.2.1. LC-MS/MS：

精確量取依2.8.節調製之淨化後上清液各1 mL，以氮氣吹至剛乾，分別加入1 $\mu\text{g/mL}$ 標準溶液0~200 μL 及甲醇，使體積為1 mL混合均勻，使添加農藥濃度為0~0.2 $\mu\text{g/mL}$ ，依2.9.1.節條件進行分析。以定量離子波峰面積與添加濃度製作線性迴歸曲線 $y = mx + n$ (如圖一)，並依下列計算式求出檢體中各農藥之含量(ppm)：



圖一、標準品添加法線性迴歸曲線

$$\text{檢體中各農藥之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由 n/m 求得檢液中各農藥之濃度($\mu\text{g/mL}$)

V：萃取檢體之含1%醋酸之乙腈溶液之體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

2.10.2.2. GC-MS/MS：

精確量取依2.8.節調製之淨化後上清液各1 mL，以氮氣吹至剛乾，分別加入1 $\mu\text{g/mL}$ 標準溶液0~200 μL 及丙酮：正己烷(1:1，v/v)溶液，使體積為1 mL，混合均勻，使添加農藥濃度為0~0.2

μg/mL，依2.9.2.節條件進行分析。以定量離子波峰面積與添加濃度製作線性迴歸曲線 $y = mx + n$ (如圖一)，並依下列計算式求出檢體中各農藥之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各農藥之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由n/m求得檢液中各農藥之濃度(μg/mL)

V：萃取檢體之含1%醋酸之乙腈溶液之體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

附註：1. 本檢驗方法之定量極限如附表一及附表二。

2. 本檢驗方法所列品項可依需求評估以GC-MS/MS或LC-MS/MS分析。

3. 檢驗步驟中添加之磷酸三苯酯(triphenylphosphate, TPP)內部標準品，由於無法代表所有農藥的物化特性，故於計算各農藥濃度時不一定要納入計算式。建議可用於確認流程，作為品質管制參考。

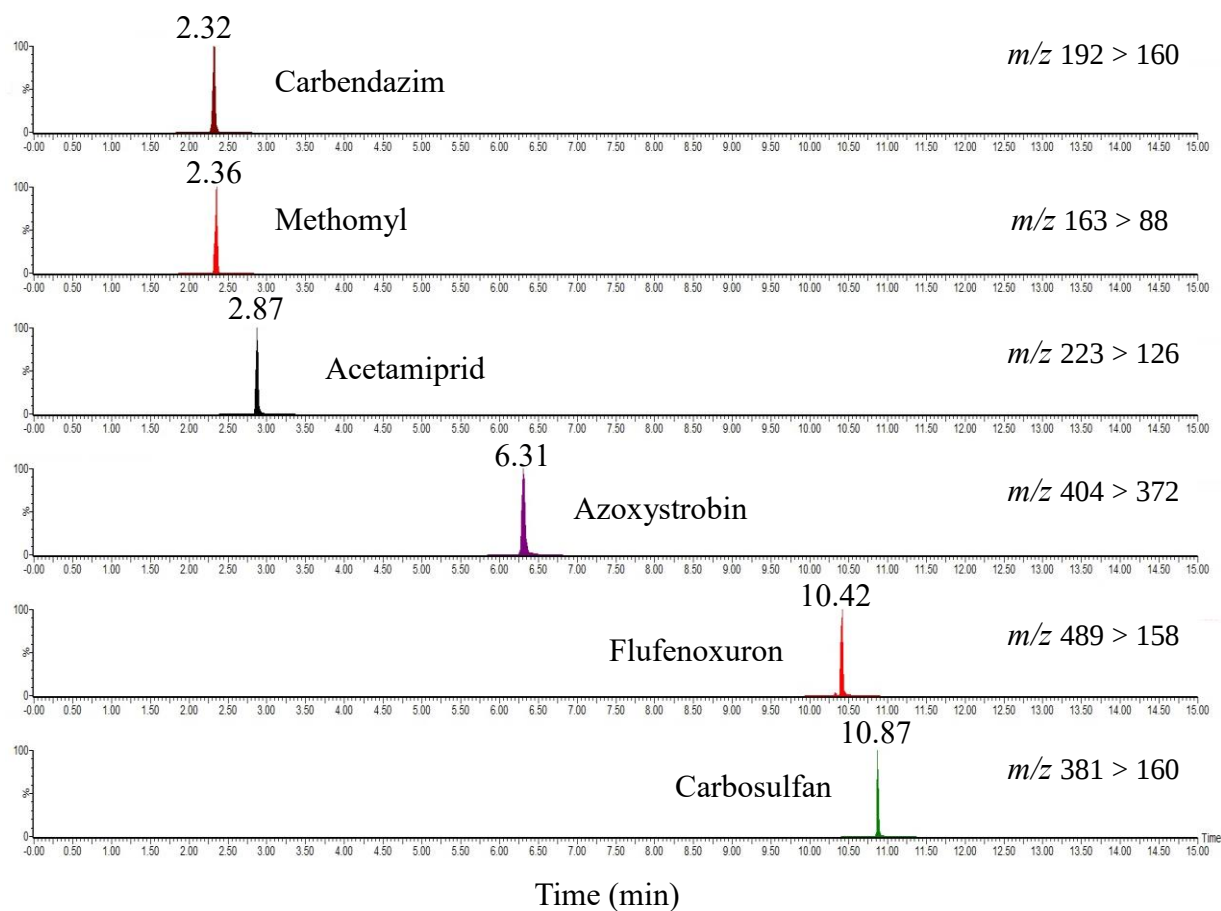
4. 本檢驗方法不適用於蜂蜜中丁基加保扶及蜂王漿中依普同之檢驗。

5. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

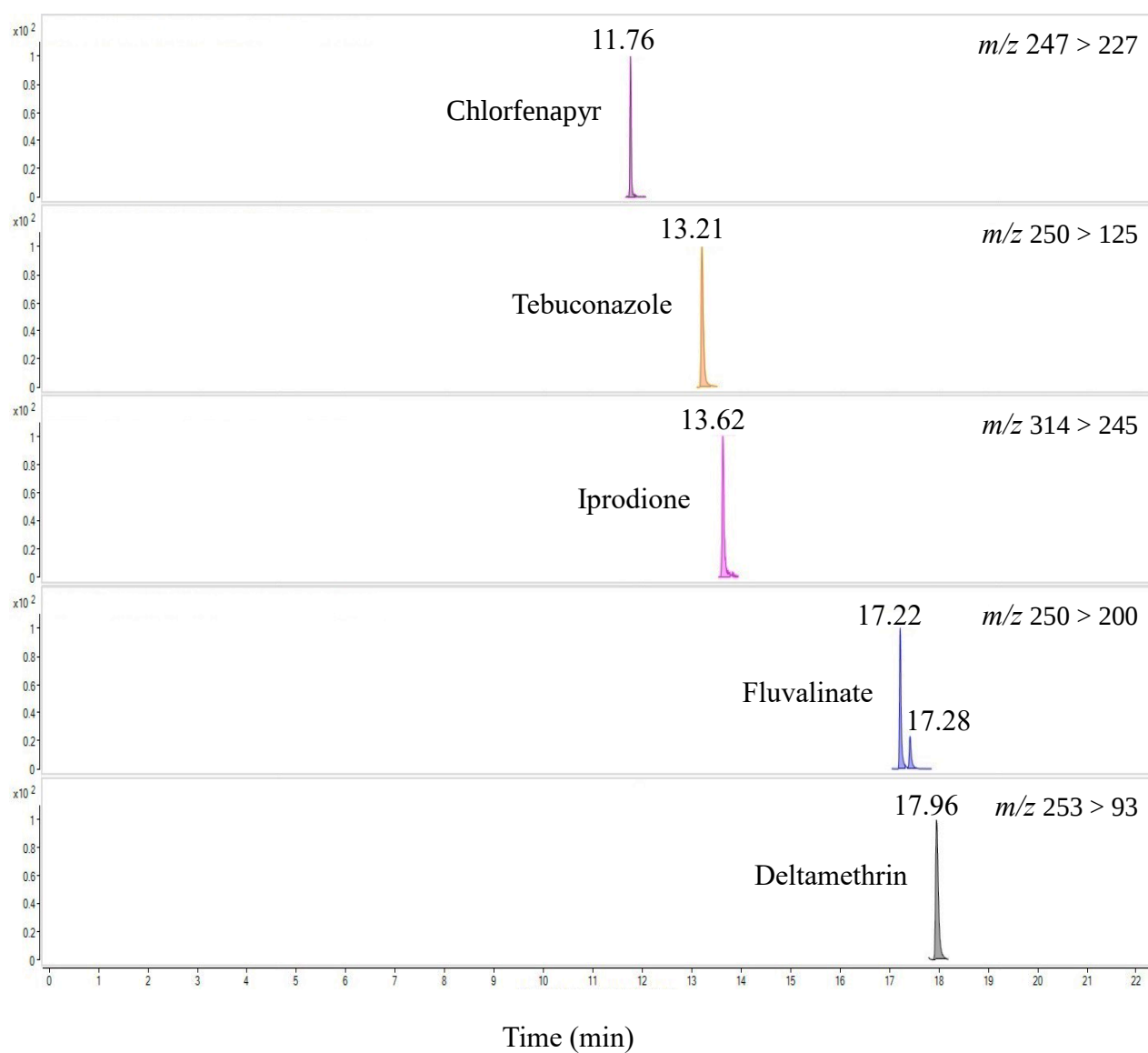
參考文獻：

European Committee for Standardization. 2018. Foods of plant origin-Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE – Modular QuEChERS-method. NF EN 15662: 2018 (English version).

參考層析圖譜



圖一、以LC-MS/MS分析carbendazim等6項農藥標準品之MRM圖譜



圖二、以GC-MS/MS分析chlorfenapyr等5項農藥標準品之MRM圖譜

附表一、Acetamiprid等6項農藥及內部標準品之多重反應偵測模式參數及定量極限(LC-MS/MS正離子模式)

項次	分析物		離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	定量極限(ppm)		
	英文名	中文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)			蜂蜜	蜂王漿	蜂花粉
1	Acetamiprid	亞滅培	223 > 126* 223 > 56	20 20	15 15	0.01	0.02	0.01
2	Azoxystrobin	亞托敏	404 > 372* 404 > 344	25 25	15 25	0.01	0.01	0.01
3	Carbendazim	貝芬替	192 > 160* 192 > 132	30 30	30 35	0.01	0.01	0.01
4	Carbosulfan	丁基加保扶	381 > 160* 381 > 118	20 20	15 15	-	0.05	0.05
5	Flufenoxuron	氟芬隆	489 > 158* 489 > 141	25 25	30 30	0.02	0.01	0.01
6	Methomyl	納乃得	163 > 88* 163 > 106	10 10	10 10	0.01	0.01	0.01
I.S.	Triphenylphosphate	磷酸三苯酯	327 > 77	40	35	-	-	-

*定量離子對

附表二、Chlorfenapyr等5項農藥及內部標準品之多重反應偵測模式參數及定量極限(GC-MS/MS)

項次	分析物		離子對	碰撞能量 (eV)	定量極限(ppm)		
	英文名	中文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		蜂蜜	蜂王漿	蜂花粉
1	Chlorfenapyr	克凡派	247 > 227* 247 > 200	15 30	0.01	0.02	0.01
2	Deltamethrin	第滅寧	253 > 93* 253 > 174	20 5	0.02	0.01	0.01
3	Fluvalinate	福化利	250 > 200* 250 > 208	20 30	0.02	0.02	0.05
4	Iprodione	依普同	314 > 245* 314 > 271	10 5	0.02	-	0.05
5	Tebuconazole	得克利	250 > 125* 250 > 153	25 10	0.02	0.01	0.01
I.S.	Triphenylphosphate	磷酸三苯酯	326 > 169*	30	-	-	-

*定量離子對