

雞肉及雞蛋中殘留農藥檢驗方法-芬普尼及其代謝物之檢驗

Method of Test for Pesticide Residues in Chicken Muscle and Eggs-

Test of Fipronil and Its Metabolite

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於雞肉及雞蛋中芬普尼(fipronil)及其代謝物(fipronil sulfone)之檢驗。
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)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. 保護管柱：CORTECS UPLC，C18，1.6 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 5 mm，或同級品。
 - 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)。
 - 2.1.3. 粉碎機(Grinder)。
 - 2.1.4. 高速組織研磨振盪均質機(SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®])：1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達4000 $\times g$ 以上，控制溫度可達15 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.6. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：冰醋酸、甲酸及醋酸銨均採用試藥特級；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)、octadecylsilane, C18 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 M $\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；芬普尼及其代謝物對照用標準品；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^(註2)：含PSA 375 mg、無水硫酸鎂750 mg、C18 EC 250 mg及GCB 45 mg，檢液負荷量5 mL。

註1：陶瓷均質石可視檢體黏稠度自行評估使用。

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. 移動相溶液之調製：

2.4.1. 移動相溶液A：

取醋酸銨0.4 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。

2.4.2. 移動相溶液B：

取醋酸銨0.4 g，以甲醇溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.5. 內部標準溶液之配製：

取磷酸三苯酯內部標準品約40 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。

2.5.1. 取適量內部標準原液以甲醇稀釋至50 $\mu\text{g/mL}$ ，供作2.8.節檢液調製使用之內部標準溶液。

2.5.2. 取適量內部標準原液以甲醇稀釋至5 $\mu\text{g/mL}$ ，供作2.9.節基質匹配檢量線溶液配製使用之內部標準溶液。

2.6. 含1%醋酸之乙腈溶液之調製：

取冰醋酸10 mL與乙腈990 mL混合均勻。

2.7. 標準溶液之配製：

取芬普尼及其代謝物對照用標準品各約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。臨用時取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至1 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

雞肉檢體均質後，取約10 g，精確稱定；雞蛋檢體去除外殼後，使蛋白與蛋黃混合均勻，取約10 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，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，再以高速組織研磨振盪均質機於1000 rpm振盪或以手激烈振盪3分鐘後，於15°C，以4000 ×g離心5分鐘。取上清液5 mL，避免取到油層，置於淨化用離心管，以高速組織研磨振盪均質機於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，於15°C，以4000 ×g離心5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，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 基質匹配檢量線之製作：

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，分別加入適量甲醇、1 µg/mL標準溶液2～200 µL及5 µg/mL內部標準溶液10 µL，使體積為1 mL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液。依下列條件進行分析，就芬普尼及其代謝物與內部標準品之波峰面積比，與對應之濃度，分別製作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)：

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

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

層析柱溫度：30°C。

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：10 μ L。

毛細管電壓(Capillary voltage)：

電灑離子化正離子(ESI+)採用3 kV，

電灑離子化負離子(ESI-)採用1.6 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

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)如下表。

分析物		離子對	進樣錐	碰撞
英文名	中文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	電壓 (V)	電壓 (eV)
Fipronil	芬普尼	435 > 330*	-25	-20
		435 > 250	-25	-25
Fipronil sulfone	芬普尼代謝物	451 > 415*	-29	-16
		451 > 282	-29	-28
Triphenylphosphate (I.S.)	磷酸三苯酯	327 > 77	40	35

*定量離子對

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：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各10 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.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芬普尼及其代謝物之總量(ppm)：

$$\text{檢體中芬普尼及其代謝物之總量 (ppm)} = \frac{\sum C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中芬普尼或其代謝物之濃度(μ g/mL)

V：萃取檢體之含1%醋酸之乙腈溶液體積(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
$> 20 \sim 50$	± 25
$> 10 \sim 20$	± 30
≤ 10	± 50

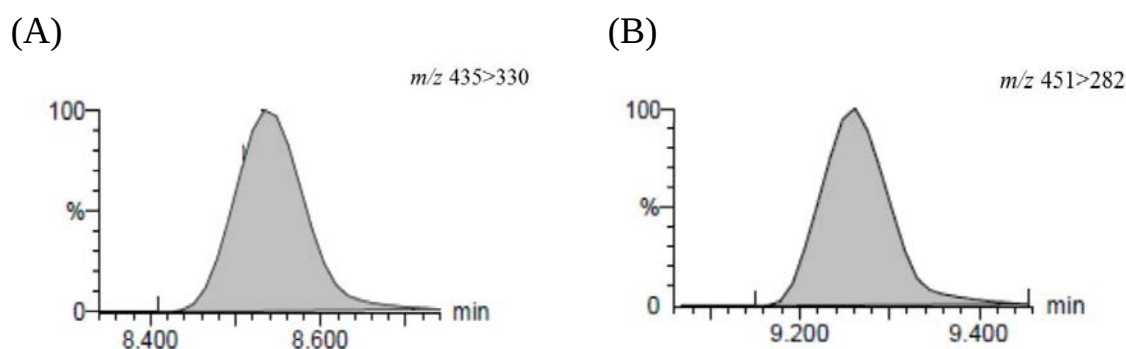
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，雞肉及雞蛋中芬普尼及其代謝物之總量均為0.005 ppm。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Lehotay, S. J., Maštovská, K. and Yun, S. J. 2005. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. J. AOAC Int. 88: 630-638.
2. European Committee for Standardization. 2009. Food of plant origin determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS method. DIN EN 15662: 2009-02 (English version).

參考層析圖譜



圖、以LC/MS/MS分析芬普尼(A)及其代謝物(B)標準品之MRM圖譜