

食品中殘留農藥檢驗方法－極性農藥及其代謝物多重殘留分析方法

Method of Test for Pesticide Residues in Foods - Multiresidue Analysis of Polar Pesticides and their Metabolites

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於穀類及乾豆類中嘉磷塞(glyphosate)、固殺草(glufosinate)及其代謝物等7品項極性農藥殘留之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，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：Thermo Hypercarb，5 μm ，內徑2.1 mm \times 10 cm，或同級品。
 - 2.1.1.3. 保護管柱：Thermo Hypercarb，5 μm ，內徑2.1 mm \times 1 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 粉碎機(Grinder)。
 - 2.1.3. 攪拌均質器(Blender)。
 - 2.1.4. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.5. 高速分散裝置：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.6. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times g$ 以上，控制溫度可達15 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.2. 試藥：甲酸及冰醋酸均採用試藥級；甲醇採用液相層析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 M $\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；嘉磷塞等7品項農藥對照用標準品(品項見附表)。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：1 mL、10 mL及25 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 含1%甲酸之甲醇溶液：
取甲酸10 mL，加甲醇定容至1000 mL。
 - 2.4.2. 含1%甲酸之甲醇：去離子水(1:1, v/v)溶液：
取含1%甲酸之甲醇溶液與去離子水，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：

取甲醇50 mL、去離子水940 mL及冰醋酸10 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：

取甲醇990 mL及冰醋酸10 mL，混合均勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

取嘉磷塞等農藥對照用標準品各約25 mg，精確稱定，分別以去離子水溶解並定容至25 mL，作為標準原液，冷藏避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以含1%甲酸之甲醇：去離子水(1:1, v/v)溶液稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體粉碎均質，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入去離子水10 mL，靜置10分鐘，加入含1%甲酸之甲醇溶液10 mL，隨即以高速組織研磨振盪均質機於1000 rpm振盪5分鐘或以手激烈振盪1分鐘後，於15°C，5000 ×g離心10分鐘，取上清液500 µL (a)，加入含1%甲酸之甲醇：去離子水(1:1, v/v)溶液，使體積為1000 µL (b)，混合均勻，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線製作：

取空白檢體，依2.7.節調製之上清液，量取500 µL (a)，分別加入標準溶液5~100 µL，再加入含1%甲酸之甲醇：去離子水(1:1, v/v)溶液，使體積為1000 µL (b)，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行分析。就各農藥標準品之波峰面積，與對應之各農藥濃度，製作0.005~0.1 µg/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜儀分析測定條件^(註)：

層析管：Thermo Hypercarb，5 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

保護管柱：Thermo Hypercarb，5 µm，內徑2.1 mm × 1 cm。

移動相溶液：A液與B液以下列梯度分析

時間(min)	流速(mL/min)	A (%)	B (%)
0.0 → 9.0	0.2 → 0.2	100 → 70	0 → 30
9.0 → 9.5	0.2 → 0.2	70 → 50	30 → 50
9.5 → 11.0	0.2 → 0.4	50 → 50	50 → 50
11.0 → 18.0	0.4 → 0.4	50 → 50	50 → 50

18.0 → 19.0	0.4 → 0.4	50 → 10	50 → 90
19.0 → 22.0	0.4 → 0.4	10 → 10	90 → 90
22.0 → 22.1	0.4 → 0.2	10 → 100	90 → 0
22.1 → 30.0	0.2 → 0.2	100 → 100	0 → 0

注入量：5 μL。

管柱溫度：40°C。

毛細管電壓(Capillary voltage)：

電灑離子化正離子(ESI⁺)採用3.2 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。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow)：10 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：800 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。

註：上述條件測定分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.9. 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 5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依 2.8.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)鑑別之，並依下列計算式求得檢體中各農藥之含量(ppm)：

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

C：由基質匹配檢量線求得檢液中各農藥之濃度(μg/mL)

V：萃取檢體之去離子水及含 1%甲酸之甲醇溶液體積(20 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由 b/a 求得

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積比而得(≤ 100%)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	±20

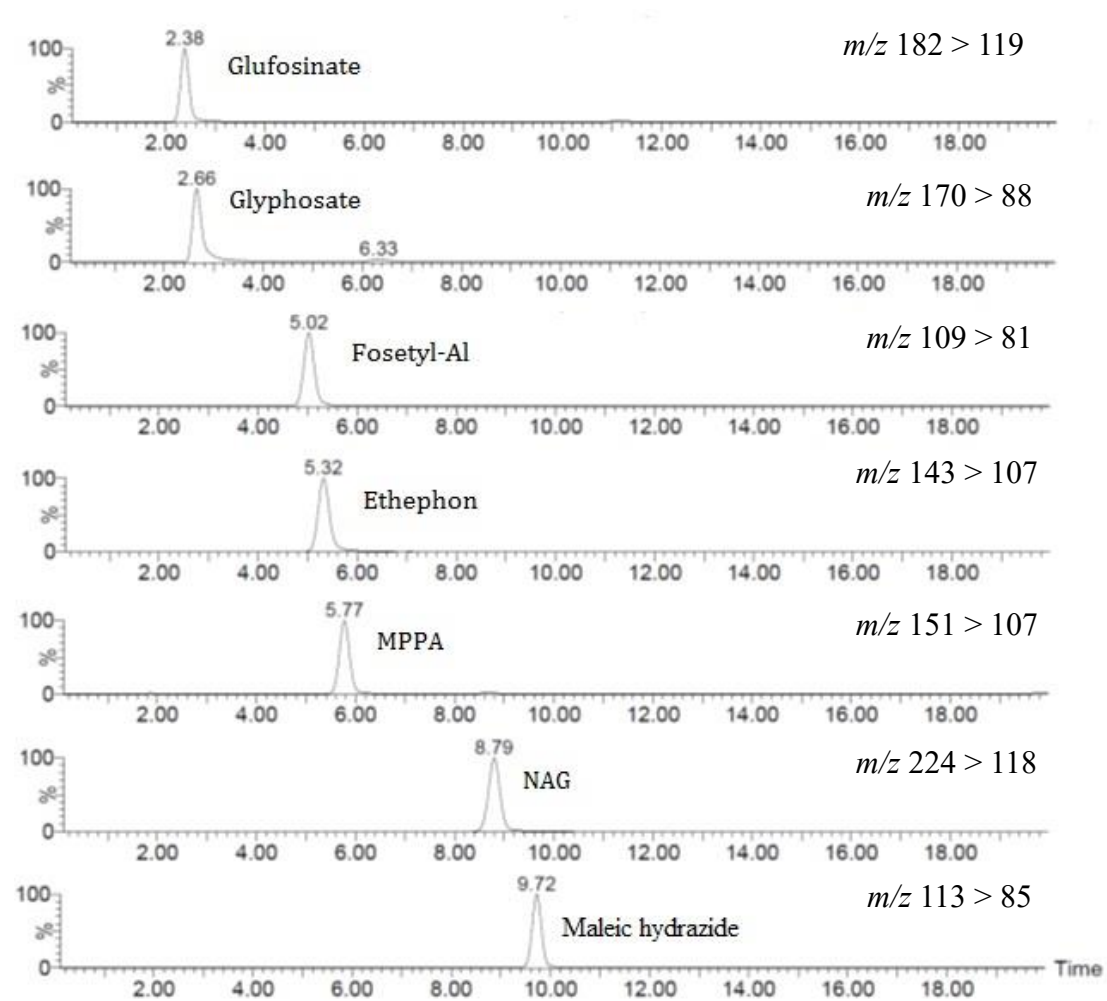
> 20~50	±25
> 10~20	±30
≤ 10	±50

- 附註：1. 本檢驗方法之定量極限，各農藥均為0.1 ppm。
2. 層析管初次使用、分析物波峰形狀變差或長時間存放後，其與保護管需先以含1%醋酸之甲醇溶液以流速0.3 mL/min沖洗15分鐘，再以綠茶或黃豆空白檢液進行管柱平衡，其空白檢液之調製及平衡方式如下：
- (1) 空白檢液之調製：取綠茶或黃豆空白檢體，依2.7.節調製之上清液，經濾膜過濾後，供作平衡管柱之空白檢液。
 - (2) 平衡方式：量取上述空白檢液20 µL，注入液相層析串聯質譜儀中，依2.8.節條件分析10次後，再注入0.1 µg/mL嘉磷塞標準溶液5 µL，就其波峰形狀判定管柱平衡是否完全。
3. 農藥待測物之滯留時間會因為管柱狀況或基質不同而有所差異，故分析前應注入待測基質檢液5 µL至少3次，用以平衡管柱環境。
4. 農藥殘留量計算：福賽得(fosetyl-Al)以鋁之錯合物分子計算；固殺草(glufosinate ammonium)以結合銨鹽之分子計算；固殺草代謝物(N-acetyl-glufosinate)以不含鈉鹽之分子計算。
5. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Anastassiades, M., Kolberg, D. I., Eichhorn, E., Benkenstein, A., Lukačević, S., Mack, D., Wildgrube, C., Sigalov, I., Dörk, D. and Barth, A. 2015. Quick method for the analysis of residues of numerous highly polar pesticides in food of plant origin involving simultaneous extraction with methanol and LC-MS/MS determination (QuPPE-method) – Version 8. EURL-SRM.
2. 曾素香、楊凱智、於柏伸、沈盈如，李桓安、高雅敏、闕麗卿、施養志。2013。食品中殘留農藥之檢驗研究。行政院衛生署食品藥物管理局自行研究計畫報告。

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析Glufosinate等7項農藥標準品之MRM層析圖譜

附表、嘉磷塞等7項極性農藥之多重反應偵測模式參數

項次	分析物		離子化 模式	定量離子對			定性離子對		
	英文名	中文名		前驅離子(<i>m/z</i>) > 產物離子(<i>m/z</i>)	進樣錐 電壓(V)	碰撞 能量 (eV)	前驅離子(<i>m/z</i>) > 產物離子(<i>m/z</i>)	進樣錐 電壓(V)	碰撞 能量 (eV)
1	Glyphosate	嘉磷塞	ESI ⁺	170 > 88	16	10	170 > 60	16	16
2	Glufosinate	固殺草	ESI ⁺	182 > 119	26	18	182 > 136	26	12
3	MPPA ²¹	固殺草代謝物	ESI ⁻	151 > 107	24	16	151 > 63	24	22
4	N-Acetyl-glufosinate	固殺草代謝物	ESI ⁺	224 > 118	16	18	224 > 136	16	22
5	Ethephon	益收生長素	ESI ⁻	143 > 107	14	9	145 > 107	14	9
6	Fosetyl-Al	福賽得	ESI ⁻	109 > 81	21	14	109 > 63	21	18
7	Maleic hydrazide	抑芽素	ESI ⁺	113 > 85	38	15	113 > 67	38	18

¹ MPPA: 3-(methylphosphinico) propionic acid.