

禽畜產品中殘留農藥檢驗方法－三亞蟎及其代謝物之檢驗

Method of Test for Pesticide Residues in Poultry and Livestock Products -

Test of Amitraz and its Metabolite

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜產品之肌肉、內臟、脂肪、蛋類及乳中農藥三亞蟎(amitraz)及其代謝物 N' -(2,4-dimethylphenyl)- N -methylformamidine (DMPF)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. 攪拌均質機(Blender)。
 - 2.1.3. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達4000 $\times g$ 以上，且溫度控制可達15 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.5. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：甲酸及醋酸銨均採用試藥特級；乙腈及甲醇均採用層析級；檸檬酸鈉、檸檬酸氫二鈉、氯化鈉及無水硫酸鎂均採用殘量分析級；octadecylsilane, end-capped (C18 EC)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)；三亞蟎及DMPF對照用標準品。
 - 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0.2 μm ，PTFE材質。
 - 2.3.3. 容量瓶：10 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、檸檬酸鈉1 g、檸檬酸氫二鈉0.5 g及氯化鈉1 g。

2.3.6. 淨化用離心管^(註2)：含無水硫酸鎂750 mg及C18 EC 250 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：

稱取醋酸銨0.4 g，以去離子水溶解使成1000 mL，加入甲酸1 mL，混合均勻，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.4.2. 移動相溶液B：

稱取醋酸銨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. 標準溶液之配製：

取三亞蟎及DMPF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，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液，分別以乙腈稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液。

2.6. 檢液之調製：

將肌肉、內臟及乳檢體均質或混勻後，取約10 g，精確稱定；脂肪檢體均質後，取約2 g，精確稱定；蛋類檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻，取約10 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入乙腈10 mL，再加入陶瓷均質石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3分鐘後，於15°C，4000 ×g離心5分鐘。取上清液5 mL，避免取到油層，置於淨化用離心管中，以高速分散裝置以1000 rpm振盪或以手激烈振盪2分鐘後，於15°C，4000 ×g離心5分鐘。取上清液1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.6.節調製淨化後上清液，分別量取1 mL，以氮氣吹至剛乾，分別添加標準溶液^(註3) 5~200 µL(脂肪基質則加2~100 µL)及適量乙腈，使體積為1 mL，混合均勻，經濾膜過濾後，供作基質匹配

檢量線溶液，依下列條件進行分析。就三亞蟊及DMPF波峰面積，與對應之三亞蟊及DMPF濃度，分別製作0.005~0.2 µg/mL (脂肪基質為0.002~0.1 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4)：

層析管：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。

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 → 1.0	99 → 10	1 → 90
1.0 → 2.0	10 → 1	90 → 99
2.0 → 3.2	1 → 1	99 → 99
3.2 → 3.5	1 → 99	99 → 1
3.5 → 5.0	1 → 99	1 → 1

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：2 µL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3 kV。

離子化模式：ESI正離子。

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)：30 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：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。

註3：三亞蟊容易轉換成DMPF，基質匹配檢量線之標準溶液應分開添加。

註4：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。

2.8. 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2 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.7.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5)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中三亞蟊之含量(ppm)^(註6)：

$$\text{檢體中三亞蟎之含量(ppm)} = \frac{\Sigma[C \times V \times F]}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中三亞蟎或DMPF之濃度(μg/mL)

V：萃取檢體之乙腈體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：DMPF之轉換係數

三亞蟎：0.55

DMPF：1

註5：相對離子強度由定性離子與定量離子之波峰面積相除而得(≤ 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

註6：動物產品中農藥三亞蟎之殘留容許量係參考Codex標準，其殘留定義為三亞蟎及DMPF之總和，並以DMPF計。

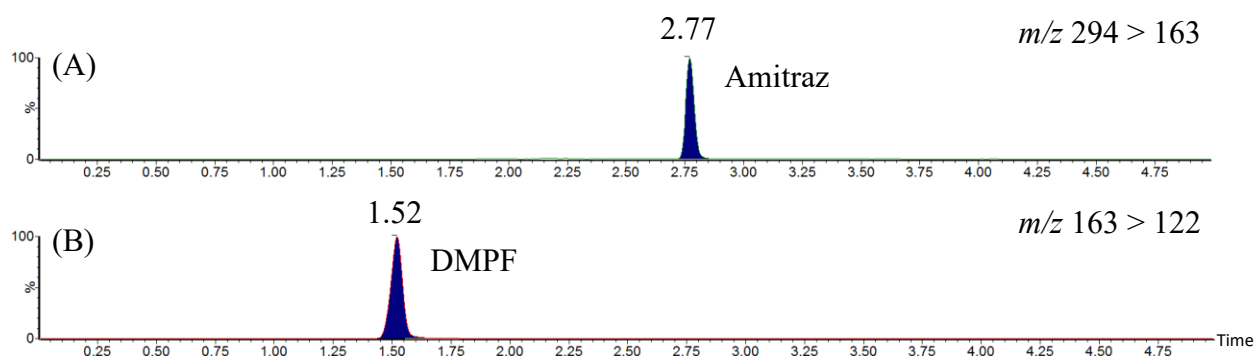
附註：1. 本檢驗方法之定量極限如附表。

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. EU Reference Laboratories for Residues on Pesticides. 2007. Analysis of amitraz and its main metabolite in pears via QuEChERS and LC-MS/MS. [eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_Amitraz_CrISrm.pdf]
2. 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).
3. 林韶凱、莊瑋臻、王熙予。2019。動物產品中殘留農藥檢驗方法開發研究。衛生福利部食品藥物管理署108年度委外研究成果報告。

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析三亞蟎(A)及其代謝物DMPF (B)標準品之MRM圖譜

附表、農藥三亞蟎及其代謝物DMPF之多重反應偵測模式參數及定量極限

分析物		定量離子對			定性離子對			定量極限(ppm)				
英文名	中文名	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	肌肉	內臟	脂肪	蛋	乳
Amitraz	三亞蟎	294 > 163	20	16	294 > 122	20	34	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005
DMPF	—	163 > 122	50	20	163 > 132	50	20	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005