

動物產品中極性農藥及其代謝物之多重殘留分析方法 開發

劉玉婷 楊舒涵 林書緯 洪于淨 張淑涵 高雅敏 曾素香 王德原

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

本研究參考歐盟QuPPE方法(Quick Polar Pesticides Method)，建立以液相層析串聯質譜法(Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)分析蜂蜜、蛋、乳、肌肉、內臟及脂肪中8項極性農藥及其代謝物包括嘉磷塞、嘉磷塞代謝物1 (Aminomethylphosphonic acid, AMPA)、嘉磷塞代謝物2 (N-acetyl glyphosate)、固殺草(Glufosinate-ammonium)、固殺草代謝物1〔3- (Methylphosphinico)propionic acid, MPPA〕、固殺草代謝物2 (N-acetyl-glufosinate)、益收生長素(Ethephon)及福賽得(Fosetyl-Al)之多重殘留檢驗方法。檢體前處理流程先依基質調整水分含量，添加內部標準品後即以含1%甲酸之甲醇(脂肪基質改以含1%甲酸之70%甲醇)萃取，置於-20℃冷凍90分鐘，於-10℃以5,000 ×g離心5-10分鐘，再依基質複雜程度搭配乙腈或C18吸附劑淨化，稀釋5-10倍後，經0.22 μm PTFE濾膜過濾後以LC-MS/MS分析。本方法使用Anionic Polar Pesticide (APP)層析管柱搭配含1.2%甲酸之去離子水及含0.5%甲酸之乙腈作為移動相，可良好分離嘉磷塞等8項極性農藥及其代謝物。確效試驗以含6項內標之標準曲線進行6種代表性動物基質中8項極性農藥及其代謝物之添加回收，於添加濃度為0.05 ppm時，平均回收率為63.1-117.1%，變異係數除肝臟中嘉磷塞代謝物1 (AMPA)為20.7%外，其餘皆小於16.1%；於添加濃度為0.1 ppm時，平均回收率為65.5-131.9%，變異係數皆小於14.1%。除肝臟中添加0.05 ppm之AMPA變異係數較大外，皆符合歐盟SANTE/11312/2021規範，定量極限(Limit of Quantification, LOQ)除肝臟中AMPA為0.1 ppm，其餘皆為0.05 ppm，可滿足我國動物產品中嘉磷塞殘留容許量要求，亦可接軌多數國際標準。以市售20件動物產品進行檢驗方法適用性驗證，結果均符合規定。

關鍵詞：極性農藥、嘉磷塞、嘉磷塞代謝物1 (Aminomethylphosphonic acid, AMPA)、嘉磷塞代謝物2 (N-acetyl glyphosate)、固殺草、固殺草代謝物1〔3- (Methylphosphinico)propionic acid, MPPA〕、固殺草代謝物2 (N-acetyl-glufosinate)、益收生長素、福賽得、液相層析串聯質譜法

前 言

極性農藥為一群分子量及Log P值皆小，具兩性性質且缺乏化學基團之農藥，其易溶

於水層而難以分配至有機溶劑層中，無法透過QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)前處理有效萃取，傳統上常需透過耗時之衍生化反應，分析非常不易⁽¹⁾；

然而其因具有低成本、高效能及廣效性等優勢，常作為除草劑、殺菌劑及生長調節劑等廣為施用，殘留農藥可能經由食物鏈累積於動物產品中⁽²⁾，進而危害人體。我國於動物產品蛋、乳、肌肉及內臟中訂有嘉磷塞殘留容許量0.1-2 ppm，國際間如歐盟及日本則訂定動物產品蛋、乳、肌肉、內臟、脂肪、蜂蜜及其他蜂產品中之極性農藥包含嘉磷塞、固殺草、益收生長素、福賽得及其代謝物之殘留容許量為0.03-8 ppm (表一)，而除了歐盟規範乳中固殺草之殘留容許量為0.03 ppm外，其餘最低之殘留容許量皆為0.05 ppm。

國際間分析極性農藥之方法多參考歐盟單一方法參考實驗室(EURL-SRM)自2006年起發展之QuPPE方法(Quick Polar Pesticides Method)，其依基質種類再細分為2篇方法，QuPPE-PO方法⁽³⁾適用基質涵蓋農產品及蜂蜜，

QuPPE-AO方法⁽⁴⁾則涵蓋蜂蜜基質以外之其他動物產品，如內臟、肌肉、牛奶及脂肪，其前處理使用酸化甲醇溶液萃取，經冷凍、離心、淨化、稀釋及過濾後上機，並依目標極性農藥之特性，使用不同層析管柱及層析條件進行分析。衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)參考QuPPE方法建立農產品及動物產品中極性農藥分析方法，分別於2017年公開適用於穀類及乾豆類之「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(TFDAP0006.01)⁽⁵⁾」及於2022年公開適用於蜂蜜之「蜂蜜中殘留農藥檢驗方法－殺草劑嘉磷塞之檢驗(TFDAP0024.00)⁽⁶⁾」，兩方法使用之層析管柱分別為填充多孔石墨碳之Hypercarb及屬於親水性作用液相層析(Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC)之Obelisc N，方法之定量極限皆為0.1 ppm。

表一、臺灣、歐盟及日本之動物產品中極性農藥殘留容許量標準

國際普通名稱	Glyphosate	Glufosinate-ammonium	Ethephon	Fosetyl-Al
普通名稱	嘉磷塞	固殺草	益收生長素	福賽得
臺灣 殘留定義	—			
殘留容許量(ppm)	0.1-2	—	—	—
殘留部位	蛋、乳、肌肉、內臟			
動物種類	牛、豬、禽			
歐盟 殘留定義	• Glyphosate	• Glufosinate isomers • MPPA • N-Acetyl-glufosinate	• Ethephon	• Fosetyl-aluminium • Phosphonic acid
殘留容許量(mg/kg)	0.05-2	0.03-3	0.05-0.4	0.5-8
殘留部位	蛋、乳、肌肉、肝、腎、食用內臟、脂肪、蜂蜜及其他蜂產品			
動物種類	豬、牛、羊、山羊、馬、家禽、其他養殖陸生動物、兩棲類和爬行動物、陸生無脊椎動物、野生陸生脊椎動物			
日本 殘留定義	• Glyphosate • N-Acetyl-glyphosate	• Glufosinate (D-form and L-form) • MPPA • N-Acetyl-glufosinate	• Ethephon	• Fosetyl-aluminium • Phosphonic acid
殘留容許量(mg/kg)	0.05-5	0.4-6	0.05-0.2	1-5
殘留部位	蛋、乳、肌肉、肝、腎、食用內臟、脂肪、蜂蜜(包括蜂王乳)			
動物種類	豬、牛、其他陸生哺乳動物、雞及其他家禽			

由於以Hypercarb管柱分析前需以空白基質平衡至少15針以上，且部分實驗室回饋平衡用之空白基質需與待分析之基質相同，不論是耗材及時間成本皆高；而Obelisc N管柱亦需有良好的平衡(Conditioning)，並於分析期間適時的再平衡(Reconditioning)，才能保有穩定的滯留時間⁽⁷⁾，故本研究之目的係選擇合適之層析管柱建立動物產品中極性農藥及其代謝物之多重殘留分析方法，並擴增適用基質種類，除蜂蜜基質外，增加肌肉、內臟、蛋、乳及脂肪基質，此外，因應歐洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)於2023年之報告

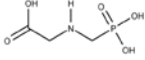
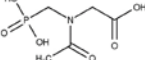
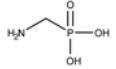
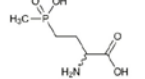
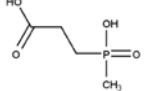
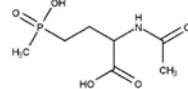
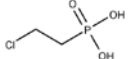
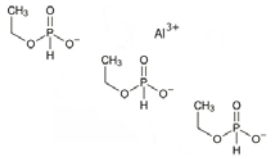
中提及有關動物產品中嘉磷塞殘留定義之風險評估時，將其2項代謝物包含AMPA及N-acetyl-glyphosate⁽⁸⁾納入，因此本研究參考國際間動物產品中之殘留容許標準及相關文獻，將嘉磷塞、固殺草、益收生長素、福賽得及其代謝物共8品項納入分析(表二)，同時下修定量極限，以接軌國際規範。

材料與方法

一、檢體來源

本檢驗方法建立及測試所需檢體係購自大

表二、8項極性農藥及其代謝物之特性

No.	國際普通名稱 (普通名稱)	作用	種類	結構式	Log P	pKa
1	Glyphosate (嘉磷塞)	殺草劑	本體		-3.2	0.78, 2.29, 5.96, 11
2	N-Acetyl-glyphosate		代謝物		-2.4	—
3	Aminomethylphosphonic acid, AMPA		代謝物		-2.76	—
4	Glufosinate-ammonium (固殺草)	殺草劑	本體		-3.96	0.8, 2.9, 9.8
5	3-(Methylphosphinico) propionic acid, MPPA		代謝物		-1.6	—
6	N-Acetyl-glufosinate		代謝物		—	—
7	Ethephon (益收生長素)	生長調節劑	本體		-1.89	4.7
8	Fosetyl-Al (福賽得)	殺菌劑	本體		-2.1	2.82, 7.21

臺北地區之賣場及網路平台，包含蜂蜜、豬油、牛肉、牛奶、雞蛋及豬肝。檢體均質後未檢出本研究欲開發之極性農藥者，作為空白檢體。蜂蜜置於室溫、豬油置於冷藏保存，其餘檢體皆於均質後置於-20℃冷凍貯存備用。

二、試藥

(一)試劑

甲酸採用質譜級(純度98%)，甲醇及乙腈(ACN)均採用液相層析級，均購自Merck公司(Darmstadt, Germany)。乙二胺四乙酸鈣二鈉鹽(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA Na₂-Ca)採用試藥級(純度98%)，購自Sigma-Aldrich®公司(Saint Louis, MO, USA)。

(二)對照用標準品

3-(Methylphosphinico)propionic acid (MPPA) (純度99.9%)購自HPC Standards公司(Cunnersdorf, Germany)；Glyphosate (純度98.5%)購自Chem Service公司(West Chester, PA, USA)；Fosetyl aluminum (純度93.5%)、Glufosinate-ammonium (純度100%)及Aminomethylphosphoric acid (AMPA) (純度99.1%)皆購自AccuStandard®公司(New Haven, CT, USA)；Ethepon (純度97%)、N-acetyl-glufosinate (純度92.6%)及N-acetyl-glyphosate (純度95.5%)皆購自Dr. Ehrenstorfer公司(Augsburg, Germany)。

(三)同位素內部標準品

3-(Methylphosphinico)propionic acid-d₃ (純度96%)、Glufosinate-d₃-hydrochloride (純度95%)及N-acetyl-glyphosate-d₃ (純度98%)皆購自Toronto Research Chemicals公司(Toronto, Ontario, Canada)；Fosetyl-aluminum-d₁₅ (純度90.7%)，購自Dr. Ehrenstorfer公司；Glyphosate-2-¹³C, ¹⁵N (純度99.6%)及N-acetyl-d₃-glufosinate

(純度100%)，皆購自Sigma-Aldrich®公司；Aminomethylphosphoric acid-¹³C, ¹⁵N, d₂ (純度95%)購自Cambridge Isotope Laboratories公司(Tewksbury, MA, USA)。

三、儀器設備與裝置

(一)離心機(Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, USA)。

(二)水浴槽(Hei-VAP Ultimate, Heidolph, Germany)。

(三)高速分散裝置(GenoGrinder®, SPEX SamplePrep, USA)。

(四)旋渦混合器(Vortex-Genie 2 mixer, Scientific Industries, USA)

(五)去離子水製造機(Milli-Q SP Advantage A10 System, Millipore, USA)。

(六)高效能液相層析串聯式質譜儀(ACQUITY UPLC I-Class PLUS/ Xevo TQ Absolute, Waters, USA)。

四、試劑之調製

(一)含1%甲酸之甲醇溶液

取甲酸10.20 mL，加甲醇使成1,000 mL。

(二)含1%甲酸之70%甲醇溶液

取甲酸10.20 mL及甲醇700 mL，加去離子水使成1,000 mL。

(三)含0.5%甲酸之50%甲醇溶液

取去離子水與含1%甲酸之甲醇溶液，以1：1 (v/v)比例混勻。

(四)10% EDTA溶液

取EDTA Na₂-Ca 13.24 g，以去離子水溶解使成100 mL。

五、移動相溶液之調製

(一)移動相A (1.2%甲酸溶液)

取甲酸12.24 mL，加去離子水使成1,000 mL，以濾膜過濾。

(二)移動相B (含0.5%甲酸之乙腈溶液)

取甲酸5.10 mL，加乙腈使成1,000 mL，以濾膜過濾。

六、內部標準溶液之配製

取適量Glyphosate-2-¹³C, ¹⁵N等6項同位素內部標準品，精確稱定，分別以適當溶劑(表三)配製於10 mL之塑膠容量瓶並定容，作為標準原液1，冷藏貯存於塑膠樣品瓶中。另取適當溶劑將標準原液1稀釋至100 µg/mL，供作標準原液2，冷藏貯存於塑膠樣品瓶中。臨用時各取適量標準原液2混合，以含0.5%甲酸之50%甲醇溶液稀釋至5 µg/mL，供作添加回收試驗及標準曲線配製用。

七、標準溶液之配製

取Glyphosate等8項農藥對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以適當溶劑(表三)

表三、8項極性農藥及其代謝物與其對應之6項同位素內部標準品之配製溶劑

No.	Compound	Solvent
1	Glyphosate	10% ACN in water
2	AMPA	0.5% FA in ACN
3	N-Acetyl-glyphosate	10% ACN in water
4	Glufosinate	10% ACN in water
5	MPPA	Deionized water
6	N-Acetyl-glufosinate	10% ACN in water
7	Ethephon	10% ACN in water + 1% FA
8	Fosetyl-Al	10% ACN in water
9	Glyphosate -2- ¹³ C, ¹⁵ N (I.S. ^a)	10% ACN in water
10	AMPA- ¹³ C, ¹⁵ N, d ₂ (I.S. ^a)	Deionized water
11	N-Acetyl-glyphosate-d ₃ (I.S. ^a)	10% ACN in water
12	Glufosinate-d ₃ (I.S. ^a)	10% ACN in water
13	MPPA-d ₃ (I.S. ^a)	10% ACN in water
14	Fosetyl-Al-d ₁₅ (I.S. ^a)	10% ACN in water

^aInternal standard.

配製於10 mL之塑膠容量瓶並定容，作為標準原液1，冷藏貯存於塑膠樣品瓶中。另取適當溶劑將標準原液1稀釋至100 µg/mL，供作標準原液2，冷藏貯存於塑膠樣品瓶中。臨用時各取適量標準原液2混合，以含0.5%甲酸之50%甲醇溶液稀釋至5 µg/mL，供作添加回收試驗用；另取適量標準原液2混合，以含0.5%甲酸之50%甲醇溶液稀釋至2 µg/mL，供作標準曲線配製用。

八、液相層析串聯式質譜儀測定條件

(一)液相層析儀

層析管柱使用Anionic Polar Pesticide (APP) Column (2.1 mm × 100 mm, particle size 130 Å, 5 µm)，層析條件如表四。

(二)串聯式質譜儀

離子源採電灑式離子源(Electrospray ion source)，進行負離子模式，搭配多重反應偵測模式(Multiple Reaction Monitoring, MRM)進行偵測。質譜儀之分析參數如表四，MRM偵測之離子對如表五。

九、檢液之調製

(一)肌肉、內臟、乳及蛋類

將肌肉及內臟檢體切細均質後，取約10 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；乳汁檢體混勻後，取約10 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，4類基質分別加入去離子水1.5 mL、2.0 mL、0.5 mL及1.5 mL，使檢體之水分含量為10 g^(註)，加入5 µg/mL同位素內部標準溶液100 µL及含1%甲酸之甲醇溶液10 mL，另添加甲酸100 µL及10% EDTA溶液1 mL，以高速分散裝置於1,000 rpm振盪15分鐘後，於-20°C冷凍至少90分鐘，於-10°C以5,000 ×g離心5分鐘(蛋類基質於-10°C以5,000 ×g離心10分鐘)，取上清液2 mL置於15 mL離心管

表四、液相層析及質譜分析條件

LC system	ACQUITY UPLC I-Class PLUS with Sample manager		
Column	Anionic Polar Pesticide (5 μ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm)		
Strong wash (SNW)	50% Methanol in water		
Weak wash (WNW)	90:10 Acetonitrile: water		
Seal wash	10% Methanol in water		
Column temperature	50°C		
Sample temperature	10°C		
Injection volume	10 μ L		
Flow rate	0.5 mL/min		
Mobile phase	A : 1.2% Formic acid in water		
	B : 0.5% Formic acid in acetonitrile		
Gradient program	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	10	90
	0.5	10	90
	1.5	80	20
	4.5	90	10
	17.5	90	10
	17.6	10	90
	23	10	90
Analytical time	23 min		
MS instrument	Xevo TQ Absolute		
Ionization mode	ESI negative		
Capillary voltage (kV)	3.0		
Desolvation temperature (°C)	600		
Desolvation gas flow (L/hr)	1,000		

(內含C18吸附劑100 mg及乙腈2 mL)中，以高速分散裝置於1,000 rpm振盪1 min後，於-10°C以5,000 $\times$ g離心5分鐘。取上清液800 μ L置於微量離心管中，加入含0.5%甲酸之50%甲醇溶液，使體積為1,000 μ L，經濾膜過濾，供作檢液。

註：依據不同基質水分含量，添加適量去離子水於檢體中，使檢體之水分含量約為10 g，以乳為例，其水分含量為85%，取檢體10 g製備檢液時，因萃取流程會額外添加10% EDTA溶液 1 mL，故於水分調整

時需再添加去離子水0.5 mL。

(二)脂肪

將檢體切細均質後，取約5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入5 μ g/mL同位素內部標準溶液50 μ L及含1%甲酸之70%甲醇溶液10 mL，置於80°C水浴中使其完全融化後，以高速分散裝置於1,000 rpm振盪15分鐘，於-20°C冷凍至少90分鐘，於-10°C以5,000 $\times$ g離心5分鐘。取上清液4 mL置於15 mL離心管(內含C18吸附劑200 mg)，以高速分散裝置於1,000 rpm

表五、8項極性農藥及其代謝物與其對應之6項同位素內部標準品之多重反應偵測模式參數(ESI⁻)

No.	Compound	Ion pair		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Internal standard
		Precursor ion (<i>m/z</i>)	> product ion (<i>m/z</i>)			
1	Glyphosate	168 > 63 ^a	168 > 150	21	19	Glyphosate -2- ¹³ C, ¹⁵ N
				21	9	
2	AMPA	110 > 81 ^a	110 > 63	30	12	AMPA- ¹³ C, ¹⁵ N, d ₂
				30	20	
3	<i>N</i> -Acetyl-glyphosate	210 > 150 ^a	210 > 63	16	14	<i>N</i> -Acetyl-glyphosate-d ₃
				10	26	
4	Glufosinate	180 > 95 ^a	180 > 63	28	18	Glufosinate-d ₃
				28	30	
5	MPPA	151 > 133 ^a	151 > 107	15	12	MPPA-d ₃
				20	19	
6	<i>N</i> -Acetyl-glufosinate	222 > 59 ^a	222 > 136	30	15	—
				30	20	
7	Ethephon	143 > 107 ^a	145 > 107	15	8	—
				15	8	
8	Fosetyl-Al	109 > 81 ^a	109 > 63	18	43	Fosetyl-Al-d ₁₅
				19	17	
9	Glyphosate -2- ¹³ C, ¹⁵ N (I.S.)	170 > 63		28	18	
10	AMPA- ¹³ C, ¹⁵ N, d ₂ (I.S.)	114 > 81		32	12	
11	<i>N</i> -Acetyl-glyphosate-d ₃ (I.S.)	213 > 63		28	24	
12	Glufosinate-d ₃ (I.S.)	183 > 63		28	30	
13	MPPA-d ₃ (I.S.)	154 > 63		20	25	
14	Fosetyl-Al-d ₁₅ (I.S.)	114 > 82		21	14	

^a 定量離子對

振盪1 min後，於-10℃以5,000 ×g離心5分鐘。取上清液400 μL置於微量離心管中，加入含0.5%甲酸之50%甲醇溶液，使體積為1,000 μL，經濾膜過濾，供作檢液。

(三) 蜂蜜

取檢體混勻後，取約5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入去離子水7.5 mL，使檢體之水分含量為10 g，加入5 μg/mL同位素內部標準溶液100 μL及含1%甲酸之甲醇溶液10 mL，以高速分散裝置於1,000 rpm振盪15分鐘後，於-20℃冷凍至少90分鐘，於-10℃以5,000 ×g離心5分

鐘。取上清液2 mL置於15 mL離心管(內含乙腈2 mL)中，以高速分散裝置於1,000 rpm振盪1 min後，於-10℃以5,000 ×g離心5分鐘。取上清液800 μL置於微量離心管中，加入含0.5%甲酸之50%甲醇溶液，使體積為1,000 μL，經濾膜過濾，供作檢液。

十、標準曲線之製作

精確量取2 μg/mL標準溶液1-100 mL、5 μg/mL內部標準溶液2 μL及適量含0.5%甲酸之50%甲醇溶液，使體積為1 mL，混合均勻，

分別注入液相層析串聯質譜儀中分析，製作0.002-0.2 µg/mL之標準曲線。

十一、基質效應評估

以標準曲線(Standard Calibration Curve, SCC)及基質匹配檢量線(Matrix-Matched Calibration Curve, MMC)之斜率評估基質效應，計算公式為：基質效應(%) = (MMC之斜率 - SCC之斜率)/SCC之斜率 × 100%。

十二、添加回收及重複性試驗

脂肪及蜂蜜之空白檢體取約5 g；肌肉、內臟、乳及蛋類之空白檢體均質後取約10 g，精確稱定，加入適量標準溶液及同位素內部標準溶液，使檢體內農藥含量分別為0.05及0.1 ppm。上述空白檢體經添加標準品後，靜置30分鐘，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)，並選擇高濃度執行中間精密度之評估，計算10重複試驗間之CV。添加濃度與平均回收率及變異係數之規範參考歐盟SANTE/11312/2021⁽⁹⁾，中間精密度則參考食藥署食品化學檢驗方法之確效規範⁽¹⁰⁾，以評估本方法之準確性及重複性是否合乎規範。

十三、定量極限之評估

依所建立之方法製備檢液並分析，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，同時其平均回收率與變異係數符合歐盟SANTE/11312/2021確效規範者為定量極限。

結果與討論

一、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，前驅離子(Precursor Ion)於碰撞室(Collision Cell)以氮氣分子碰撞，斷裂為產物離子(Product Ion)，經第二段質量分析器偵測合適之產物離子，以獲得最大偵測感度。本研究以直接進樣方式將待測物注入質譜儀中以氮氣進行碰撞，使待測分子碎裂，從前驅離子所形成的碎片中，挑選2個較具有分子結構、斷裂特異性且訊號較強之產物離子作為MRM偵測離子。以LC-MS/MS分析對照用標準品，以訊號較強之產物離子為定量離子對，以訊號次高之產物離子為定性離子對，8項極性農藥及其代謝物與對應之6項同位素內部標準品之定量及定性離子對如表五。

二、層析管柱及條件之選擇

參考Jonatan Dias等人之研究^(11,12)，比較不同親水性層析管柱，包含Obelisc N、Anionic Polar Pesticide (APP) Column、HILIC-Z、Polar X及Porshell 120分析食品及飼料之基質中含嘉磷塞等14項高極性農藥，以APP管柱分析本研究欲建立之8項極性農藥及代謝物，搭配0.9%甲酸溶液及含0.9%甲酸之乙腈溶液作為移動相時，除了*N*-acetyl glyphosate以外，其餘7項皆可獲得良好的峰型及感度；分析嘉磷塞及MPPA時，定性離子對亦不似以Obelisc N管柱分析時易受到嚴重干擾，爰本研究選擇APP管柱進行測試，層析條件及質譜參數則參考歐盟第12.1版QuPPe-PO之方法1.6 b⁽³⁾ (表四)，以1.2%甲酸溶液及含0.5%甲酸之乙腈溶液作為移動相，結果可良好分離8項極性農藥及其代謝物之標準品，層析圖譜如圖一。

三、前處理流程之建立

參考歐盟第12.1版QuPPe-PO方法⁽³⁾及第3.2版QuPPe-AO方法⁽⁴⁾，建立本方法之前處理流程如圖二，肌肉、內臟、乳及蛋類基質於萃取過程中額外添加10% EDTA溶液，係為避免嘉磷塞等目標物與基質中之金屬離子螯合，降

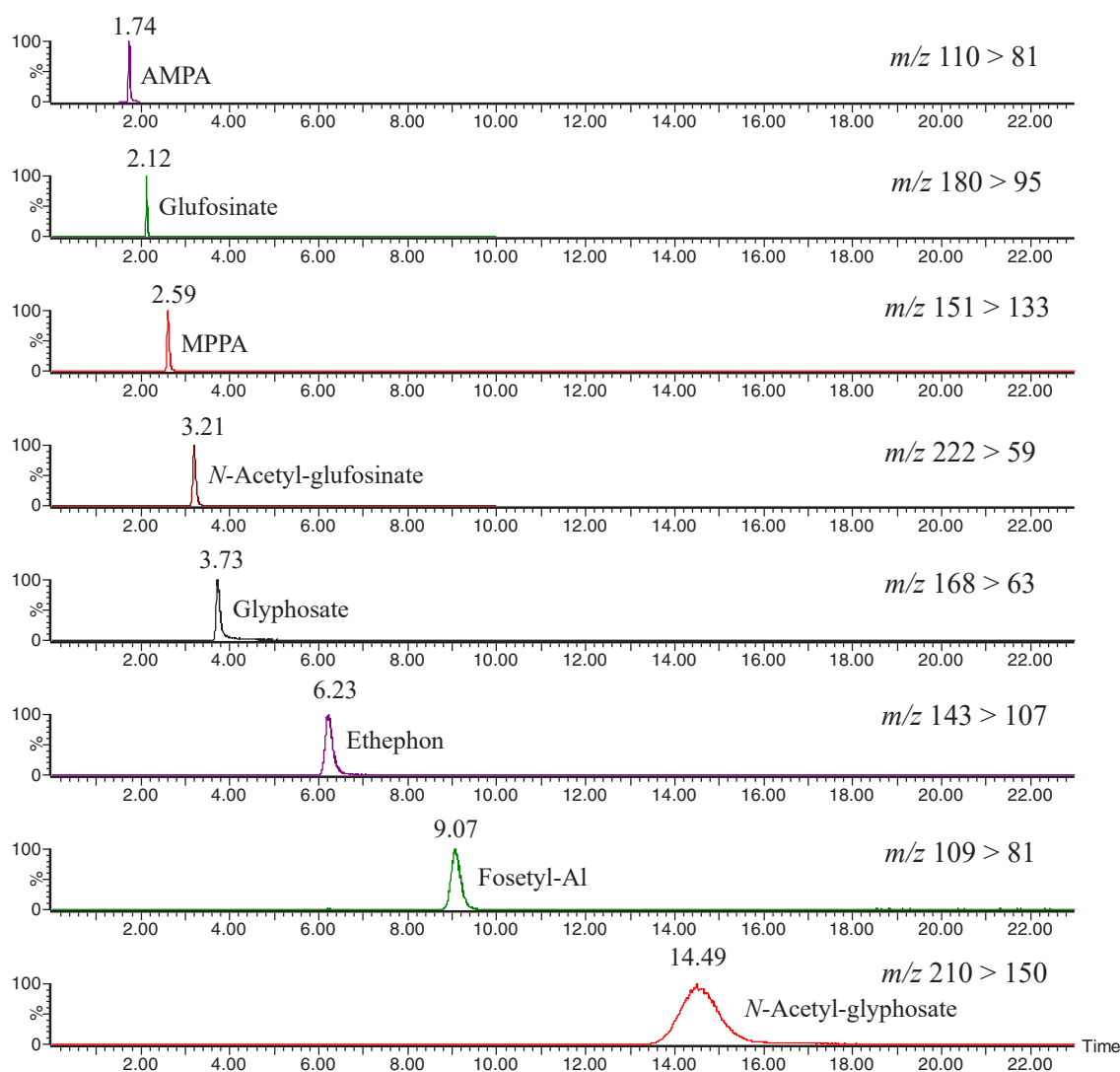
低回收率。本方法調整QuPPe方法中蛋類冷凍後之離心時間，避免上清液不足2 mL，同時簡化蜂蜜基質之兩階段過濾步驟，改以添加乙腈2 mL淨化，避免花粉或蠟質顆粒阻塞0.22 μm 之濾膜。

四、基質效應評估

(一)8項極性農藥及其代謝物於6類動物基質中

之基質效應

8項極性農藥及其代謝物於6類動物基質中之基質效應如圖三(A)，除了益收生長素(Ethephon)於各基質中之基質效應為 $\pm 20\%$ 內，為不顯著外，其餘7項農藥於不特定基質中皆有不同程度之基質增強或抑制：嘉磷塞(Glyphosate)、嘉磷塞代謝物2 (*N*-acetyl-glyphosate)、固



圖一、以LC-MS/MS分析100 ng/mL AMPA等8項極性農藥及其代謝物標準品之MRM層析圖譜

脂肪 5 g	蜂蜜 5 g	肌肉 10 g	內臟 10 g	乳 10 g	蛋 10 g
	添加去離子水	添加去離子水			
	7.5 mL	1.5 mL	2.0 mL	0.5 mL	1.5 mL
添加 1% FA 70% MeOH 10 mL	添加 1% FA MeOH 10 mL	添加 1% FA MeOH 10 mL，另添加 FA 0.1 mL			
80°C 水浴 4 min		添加 10% EDTA 1mL			
1,000 rpm 高速振盪 15 min					
-20°C 冷凍 90 min					
-10°C，5,000 ×g 離心 5 min					-10°C，5,000 ×g 離心 10 min
取上清液 4 mL 置於 15 mL 離心管 (含 C18 吸附劑 200 mg)	取上清液 2 mL 置於 15 mL 離心管				
	(含 ACN 2 mL)		(含 C18 吸附劑 100 mg 及 ACN 2 mL)		
1,000 rpm 高速振盪 1 min					
-10°C，5,000 ×g 離心 5 min					
取上清液 400 μL，加入 0.5% FA 50% Me OH 600 μL 混勻	取上清液 800 μL，加入 0.5% FA 50% MeOH 200 μL 混勻				
0.22 μm PTFE 過濾後，以 LC-MS/MS 分析					

圖二、6類動物基質中8項極性農藥及其代謝物多重殘留分析方法之前處理流程

殺草代謝物1 (MPPA)及固殺草代謝物2 (*N*-acetyl-glufosinate)有22.9-51.66%之基質增強;嘉磷塞代謝物1 (AMPA)、固殺草(Glufosinate)及福賽得(Fosetyl-Al)則有23.6-91.6%之基質抑制，其中又以嘉磷塞代謝物1 (AMPA)之基質抑制最為顯著，該項農藥除於雞蛋及豬油無顯著之基質效應外，在其餘基質中之基質抑制為32.3-91.6%。

(二)以6項同位素內部標準品校正後之基質效應

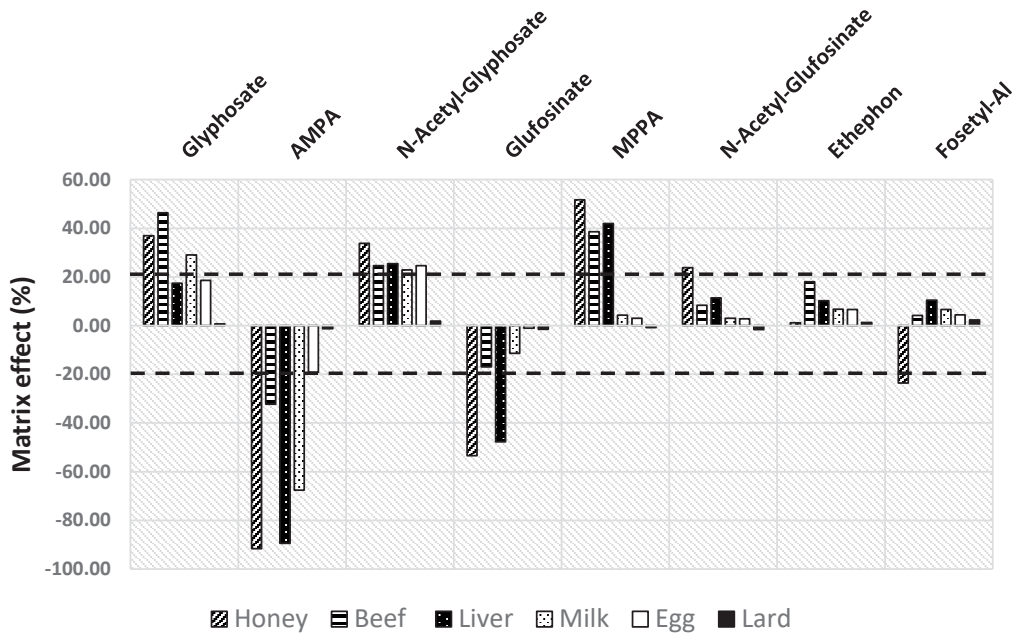
由於益收生長素(ethephon)之基質效應並不顯著，且QuPPe方法中指出固殺草代謝物2之內標(*N*-acetyl-glufosinate- d_3)可能透過水解轉換為固殺草(Glufosinate)本體，導致偽陽性，因此未添加前揭2項內標，而其餘6項添加0.05 mg/kg對應之同位素內部標準品經校正後，基質效應皆小於±20%，如圖三(B)。

五、確效試驗及定量極限

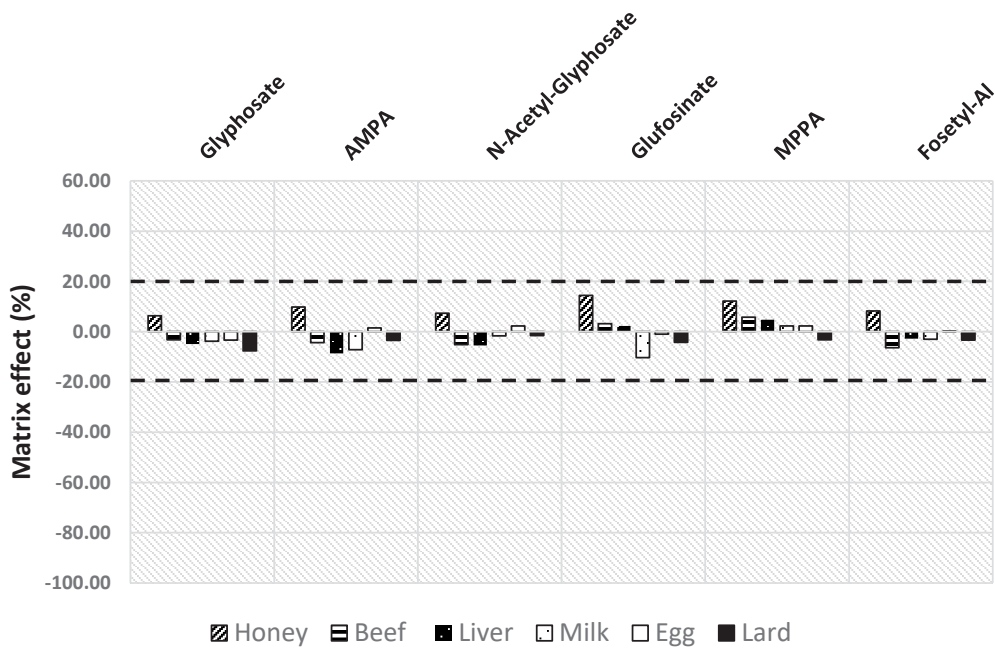
為能接軌多數國際規範，本研究添加0.05及0.1 ppm之 8項極性農藥及其代謝物於檢體中，依所建立之分析流程進行確效，並以含6項同位素內標校正之標準曲線進行定量。標準曲線之 r 值皆可達0.99以上，符合確效規範；6類動物基質之平均回收率為63.1-131.9%，變異係數則除了肝臟中0.05 mg/kg之AMPA為20.7%，其餘皆小於16.1%，中間精密度皆小於14.1% (表六及表七)。

確效評估係依據食藥署食品化學檢驗方法之確效規範，考量本研究為多重殘留分析方法，且極性農藥分析之困難度較大，參考歐盟SANTE 11312/2021之確效規範，於變異係數(CV%)小於20%之前提下，回收率範圍介於30-140%亦符合該確效規範，本研究中各基質之8項極性農藥及其代謝物之定量極限除了肝臟中之AMPA為0.1 ppm，其餘皆為0.05 ppm，皆可滿足我國、歐盟及日本之動物產品中所規

(A)



(B)



圖三、8項極性農藥及其代謝物於6類動物基質中之基質效應(A)及以對應之6項同位素內部標準品校正後之基質效應(B)

表六、8項極性農藥及其代謝物添加於蜂蜜、脂肪及牛肉中之平均回收率及變異係數

Compound	Honey					Lard					Beef				
	Intra-day ^a			Inter-day ^b		Intra-day ^a			Inter-day ^b		Intra-day ^a			Inter-day ^b	
	0.05 ppm		0.1 ppm		0.1 ppm	0.05 ppm		0.1 ppm		0.1 ppm	0.05 ppm		0.1 ppm		0.1 ppm
	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	CV (%)
Glyphosate	111.4	8.4	116.9	10.9	9.7	110.1	8.7	109.5	6.7	5.9	102.0	7.0	95.8	4.6	3.9
AMPA	85.6	7.4	80.7	10.8	11.9	97.1	3.9	98.2	2.5	3.2	98.9	16.1	89.5	3.0	3.7
<i>N</i> -Acetyl-glyphosate	84.3	5.9	93.4	10.2	8.2	97.1	4.8	103.3	5.6	4.3	101.2	4.9	94.6	10.0	7.1
Glufosinate	63.1	10.0	89.9	9.4	12.7	93.1	3.9	95.6	4.9	4.0	110.3	12.6	104.8	5.3	4.8
MPPA	93.3	1.2	99.9	0.8	2.0	96.5	2.8	98.8	0.8	2.4	117.1	9.6	107.9	1.8	3.1
<i>N</i> -Acetyl-glufosinate ^c	107.8	7.5	131.9	3.1	6.6	95.1	1.8	96.0	2.1	1.9	70.0	3.4	70.6	2.7	7.9
Ethephon ^c	109.7	5.1	104.6	2.5	5.7	96.1	3.1	96.5	2.4	4.3	71.5	1.9	68.0	4.0	7.2
Fosetyl-Al	76.6	10.5	85.3	5.7	5.5	88.8	2.6	92.4	2.3	2.2	101.0	15.0	92.2	2.7	2.8

^a N=5; ^b N=10^c 未添加同位素內部標準品

表七、8項極性農藥及其代謝物添加於乳、蛋及肝臟中之平均回收率及變異係數

Compound	Milk					Egg					Liver				
	Intra-day ^a			Inter-day ^b		Intra-day ^a			Inter-day ^b		Intra-day ^a			Inter-day ^b	
	0.05 ppm		0.1 ppm		0.1 ppm	0.05 ppm		0.1 ppm		0.1 ppm	0.05 ppm		0.1 ppm		0.1 ppm
	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	CV (%)
Glyphosate	106.6	7.7	100.9	7.2	7.7	105.7	8.0	99.2	5.6	7.1	96.7	4.2	101.6	11.2	8.4
AMPA	80.8	13.4	87.1	6.2	5.2	97.5	4.3	99.0	3.2	3.6	84.3	20.7	77.0	14.1	14.1
<i>N</i> -Acetyl-glyphosate	96.1	6.0	92.8	5.1	4.9	95.4	1.4	104.1	8.0	7.8	92.0	3.4	93.8	3.8	3.5
Glufosinate	90.2	2.5	88.3	2.5	3.7	100.5	3.0	97.5	1.9	2.5	97.3	4.1	97.6	6.2	4.6
MPPA	101.6	2.6	97.7	3.2	2.9	96.6	2.4	97.5	3.8	3.0	101.8	2.0	102.5	1.9	2.7
<i>N</i> -Acetyl-glufosinate ^c	92.3	0.5	91.8	1.4	1.8	76.4	4.7	74.6	2.5	3.3	79.6	1.7	78.3	2.4	2.2
Ethephon ^c	89.9	6.1	89.4	4.8	4.4	69.9	1.8	68.1	1.7	4.3	68.9	2.2	65.5	2.3	2.3
Fosetyl-Al	88.3	3.7	90.0	2.5	3.9	94.5	4.7	95.0	2.8	2.6	90.4	3.4	88.4	1.4	2.4

^a N=5; ^b N=10^c 未添加同位素內部標準品

範之極性農藥殘留容許量標準。

六、以市售產品進行方法適用性驗證

為驗證本方法於市售動物產品之適用性，本研究於大臺北地區之傳統市場、量販店、大賣場及網路平台等來源隨機購入20件產品，包括2件脂肪(含豬油及豬板油)、3件蜂蜜、4件肌肉(含雞、鴨、豬、牛)、2件內臟(含牛肚、豬肝)、3件牛乳及3件雞蛋，其中牛肉及牛肚均來自澳洲，1件蜂蜜來自法國，以所建立之方法檢驗，結果均未檢出。

結 論

本研究開發之動物產品中極性農藥及其代謝物多重殘留分析方法，前處理流程簡單，於分析前不需耗時平衡，移動相不含鹽類，各項農藥之滯留時間穩定，以含6項內標之標準曲線即可同時分析蛋、乳、肌肉、內臟、脂肪及蜂蜜共6類動物基質中含嘉磷塞等8項極性農藥及其代謝物，成功擴增基質種類及檢驗品項，且除了內臟中嘉磷塞代謝物1 (AMPA)之定量極限為0.1 ppm，其餘皆可下修至0.05 ppm。本方法將公開於食藥署官網，供邊境查驗、後市場監測及各界使用，以維護食品安全及國民健康。

參考文獻

1. López, S.H., Dias, J. and de Kok, A. 2020. Analysis of highly polar pesticides and their main metabolites in animal origin matrices by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Food Control* 115: 107289.
2. Verdini, E., Lattanzio, V.M.T., Ciasca, B., Fioroni, L. and *et al.* 2023. Improved method for the detection of highly polar pesticides and their main metabolites in foods of animal origin: method validation and application to monitoring programme. *Separations* 10(1): 44.
3. Anastassiades, M., Wachtler, A.-K., Kolberg, D.I., Eichhorn, E. and *et al.* 2023. Quick method for the analysis of highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC- or IC-MS/MS measurement - I. Food of plant origin (QuPPE-PO-Method) – Version 12.1. EURL-SRM.
4. Anastassiades, M., Wachtler, A.-K., Kolberg, D. I., Eichhorn, E. and *et al.* 2019. Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC-MS/MS measurement- II. Food of animal origin (QuPPE-AO-Method) – Version 3.2. EURL-SRM.
5. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。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。110年9月11日公布修正。
6. 衛生福利部食品藥物管理署。2022。蜂蜜中殘留農藥檢驗方法－殺草劑嘉磷塞之檢驗。111年5月27日公布。
7. López, S.H., Scholten, J., Kiedrowska, B. and de Kok, A. 2019. Method validation and application of a selective multiresidue analysis of highly polar pesticides in food matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1594: 93–104.
8. Álvarez, F., Arena, M., Auteri, D., Binaglia, M. and *et al.* 2023. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *Efsa. J.* 21(7): e08164.
9. European Commission Directorate General for Health and Food Safety. 2019. Guidance

- document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Guidance SANTE 11312/2021 v2.
10. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。110年11月1日公布修正。
 11. Dias, J., López, S.H., de Kok, A. and Mol, H. 2022. Comparison of HILIC columns for determination of highly polar anionic pesticides in food and feed (Poster). 14th European Pesticide Residue Workshop, Bologna, Italy.
 12. Dias, J., López, S.H., Mol, H. and de Kok, A. 2021. Influence of different hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases on method performance for the determination of highly polar anionic pesticides in complex feed matrices. *J. Sep. Sci.* 44: 2165-2176.

Development of a Multi-Residue Analytical Method for Polar Pesticides and their Metabolites in Animal Products

YU-TING LIU, SHU-HAN YANG, SHU-WEI LIN, YU-CHING HUNG,
SHU-HAN CHANG, YA-MIN KAO, SU-HSIANG TSENG
AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

In this study, we developed a multi-residue analytical method for 8 polar pesticides and their metabolites, including glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), *N*-acetyl glyphosate, glufosinate-ammonium, 3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA), *N*-acetyl-glufosinate, ethephon and fosetyl-aluminum, in animal products such as honey, eggs, milk, muscle, viscera and lard using LC-MS/MS. Based on the QuPpe method published by the European Union, polar pesticides were extracted from samples by methanol containing 1% formic acid except lard matrix of which 70% methanol containing 1% formic acid was used following water adjustment and isotope-labelled internal standards (IL-IS) addition. After freezing out for 90 minutes at -20°C and centrifugation at 5000 ×g at -10°C for 5-10 minutes, the extracts were cleaned up with acetonitrile or C18 absorbent depending on the matrix, then analyzed by LC-MS/MS after the supernatant was diluted 5-10 folds and filtrated by 0.22 µm PTFE. In this study, eight polar pesticides and their metabolites were well separated using an Anionic Polar Pesticide (APP) column with deionized water containing 1.2% formic acid and acetonitrile containing 0.5% formic acid as the mobile phase. Using solvent-based calibration curves with 6 isotope-labelled internal standards (IL-IS), the validation results showed the recoveries of 8 polar pesticides and their metabolites in 6 animal matrices were 63.1-117.1% at the spiked level of 0.05 ppm, and the coefficients of variation were all less than 16.1% except that of AMPA was 20.7% in liver. At the spiked level of 0.10 ppm, the recoveries were 65.5-131.9%, and CVs were all less than 14.1%. The above validation data of 8 polar pesticides and their metabolites in 6 animal matrices was in accordance with the SANTE/11312/2021 at the spiked level of 0.05 ppm except for AMPA in liver. The limits of quantification (LOQs) were all 0.05 ppm except for AMPA in viscera which was 0.1 ppm. This method meets the requirement of residue limits in Taiwan and also in line with most international standards. Using 20 commercial animal products to verify the applicability of the method, the results showed that all samples were in compliance with the regulation.

Key words: polar pesticides, glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), *N*-acetyl glyphosate, glufosinate-ammonium, fosetyl-aluminum, 3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA), *N*-acetyl-glufosinate, ethephon, Anionic Polar Pesticide (APP) column, LC-MS/MS