

禽畜產品中殘留農藥檢驗方法－多重殘留分析方法(二)

Method of Test for Pesticide Residues in Livestock and Poultry Products - Multiresidue Analysis (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品之肌肉、內臟、脂肪、蛋類及乳中二·四地(2,4-D)等12項農藥(品項見附表一及附表二)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) 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：Kinetex Biphenyl，2.6 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.1.3. 保護管：Kinetex Biphenyl，2.6 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 2 mm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質攪拌機(Blender)。
 - 2.1.3. 粉碎機(Grinder)。
 - 2.1.4. 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。
 - 2.1.5. 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。
 - 2.1.6. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用層析級；甲酸、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；primary secondary amine (PSA)、octadecylsilane, 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)；二·四地等12項農藥對照用標準品；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0.2 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、檸檬酸鈉1 g、氯化鈉1 g及檸檬酸氫二鈉0.5 g。
- 2.3.6. 淨化用離心管^(註2)：含PSA 125 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. 試劑之調製：

2.4.1. 乙腈：甲醇(4:1, v/v)溶液：

取乙腈與甲醇以4：1 (v/v)之比例混勻。

2.4.2. 含1%甲酸之乙腈：甲醇(4:1, v/v)溶液：

取甲酸10 mL及乙腈：甲醇(4:1, v/v)溶液990 mL，混合均勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

稱取醋酸銨0.39 g，以去離子水溶解使成1000 mL，加入甲酸1 mL，混合均勻，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

稱取醋酸銨0.39 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。

2.6. 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，冷凍避光貯存。

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.節基質匹配檢量線溶液製備用之內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取二·四地(2,4-D)、本達隆(bentazone)、剋草同(clethodim)、亞砒基代謝物(clethodim sulfone)、砒基代謝物(clethodim sulfoxide)、因滅汀(emamectin benzoate B1a)、芬佈賜(fenbutatin oxide)、滅芬諾

(methoxyfenozide)、殺芬草(saflufenacil)及速殺氟(sulfoxaflor)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；取合氯氟(haloxyp)及賜派滅烯醇(spirotetramat-enol)對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取各適量標準原液混合，以乙腈稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液。

2.8. 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，加入含1%甲酸之乙腈：甲醇(4:1, v/v)溶液10 mL及50 µg/mL內部標準溶液10 µL，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，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，以氮氣吹至剛乾，殘留物以甲醇溶解並定容至1 mL，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，分別加入標準溶液5~100 µL(脂肪基質則加2~100 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，依下列條件進行分析。就各農藥與內部標準品之波峰面積比，與對應之各農藥濃度，製作成0.005~0.1 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3)：

層析管：Kinetex Biphenyl，2.6 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

保護管：Kinetex Biphenyl，2.6 µm，內徑2.1 mm × 2 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 → 2.5	99 → 60	1 → 40
2.5 → 16.0	60 → 35	40 → 65
16.0 → 18.0	35 → 5	65 → 95
18.0 → 20.0	5 → 5	95 → 95

20.0 → 20.5	5 → 0	95 → 100
20.5 → 22.0	0 → 0	100 → 100
22.0 → 22.5	0 → 99	100 → 1
22.5 → 25.0	99 → 99	1 → 1

移動相流速：0.45 mL/min。

注入量：2 µL。

介面電壓(Interface voltage)：

電灑離子化正離子(ESI⁺)採用4 kV，

電灑離子化負離子(ESI⁻)採用3 kV。

介面溫度(Interface temperature)：270°C。

霧化氣體流速(Nebulizing gas flow)：3.0 L/min。

加熱氣體流速(Heating gas flow)：17.0 L/min。

脫溶劑管溫度(Desolvent line temperature)：200°C。

加熱塊溫度(Heat block temperature)：350°C。

乾燥氣體流速(Drying gas flow)：3.0 L/min。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、Q1/Q3聚焦電壓(Q1/Q3 Pre Bias)與碰撞電壓(collision voltage)如附表一及附表二。

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：

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2.9.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%甲酸之乙腈：甲醇(4:1，v/v)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

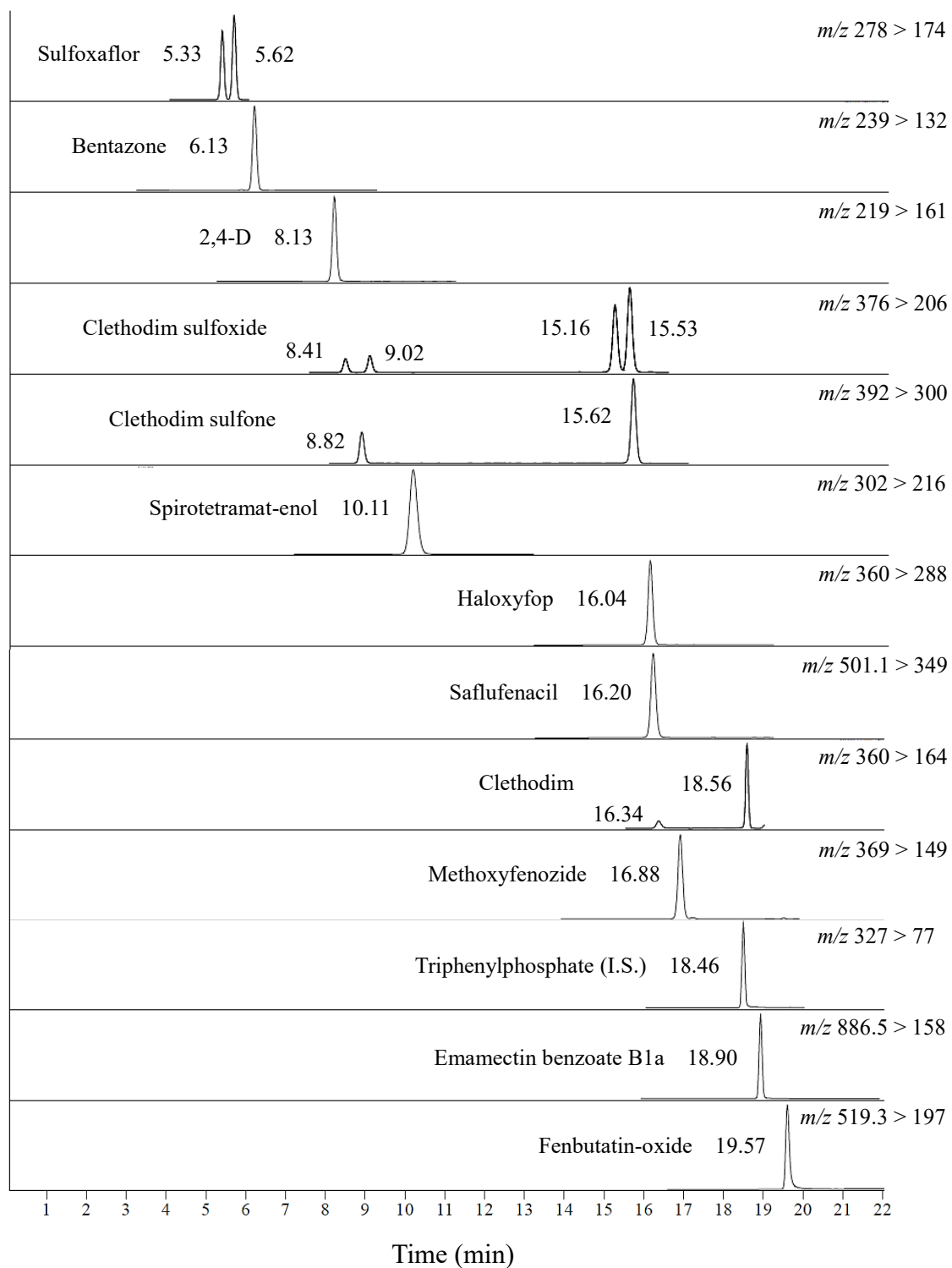
附註：1. 本檢驗方法之定量極限如附表一及附表二。

2. 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。
3. 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、以LC-MS/MS分析sulfoxaflor等12項農藥標準品及內部標準品之MRM圖譜

附表一、剋草同等9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			定量極限(ppm)				
	英文名	中文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	Q1/Q3 聚焦電 壓(V)	碰撞 電壓 (V)	肌肉	內臟	脂肪	蛋	乳
1	Clethodim	剋草同	360 > 164* 360 > 268	17/10 30/30	19 13	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
2	Clethodim sulfone	剋草同亞砒 基代謝物	392 > 300* 392 > 208	19/19 18/20	15 21	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
3	Clethodim sulfoxide	剋草同砒基 代謝物	376 > 206* 376 > 164	18/20 18/10	16 24	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
4	Emamectin benzoate B1a	因滅汀	886.5 > 158* 886.5 > 82	38/15 38/14	59 55	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
5	Fenbutatin-oxide	芬佈賜	519.3 > 197* 519.3 > 351	24/19 24/16	53 35	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
6	Methoxyfenozide	滅芬諾	369 > 149* 369 > 313	16/14 17/20	21 10	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
7	Saflufenacil	殺芬草	501.1 > 349* 501.1 > 459	24/23 22/21	27 14	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
8	Spirotetramat-enol	賜派滅烯醇	302 > 216* 302 > 117	27/21 14/20	29 37	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
9	Sulfoxaflor	速殺氟	278 > 174* 278 > 154	13/16 13/15	10 27	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
I.S.	Triphenylphosphate	磷酸三苯酯	327 > 77	29/13	41	-	-	-	-	-

*定量離子對

附表二、2,4-D等3項農藥之多重反應偵測模式參數及定量極限(LC-MS/MS負離子模式)

項次	分析物		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)	Q1/Q3 聚焦電 壓(V)	碰撞 電壓 (V)	肌肉	內臟	脂肪	蛋	乳
1	2,4-D	二·四地	219 > 161* 221 > 125	10/20 25/18	14 25	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
2	Bentazone	本達隆	239 > 132* 239 > 197	27/12 27/18	37 33	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
3	Haloxypop	合氣氟	360 > 288* 362 > 290	20/20 16/20	15 15	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

*定量離子對