

以液相層析串聯質譜儀建立亞喜芬、氟硫滅、依速隆於農產品中殘留檢驗方法

莊瑋臻¹、黃鎮華¹、徐慈鴻¹、林韶凱^{1*}

摘要

莊瑋臻、黃鎮華、徐慈鴻、林韶凱。2022。以液相層析串聯質譜儀建立亞喜芬、氟硫滅、依速隆於農產品中殘留檢驗方法。臺灣農藥科學 13 : 59-78。

本研究係開發亞喜芬、氟硫滅、依速隆於農產品中殘留檢驗方法，檢驗方法參考「食品中殘留農藥檢驗方法－多重殘留分析方法(六)」(2021年12月30日修正，TFDAP0007.02)進行分析，萃取液分別以液相層析串聯質譜儀進行定性及定量，試驗材料以甘藍、芥藍、白米及綠茶進行檢驗方法確效，於蔬菜樣品中添加濃度為0.01及0.05 µg/g、白米添加濃度為0.02及0.10 µg/g、綠茶添加濃度為0.05及0.25 µg/g，進行同日內與異日間之評估，亞喜芬於同日內 (intra-day) 平均回收率介於89.8~112.4%，相對標準偏差 (relative standard deviation, RSD) 介於3.4~7.7%，異日間 (inter-day) 平均回收率介於88.4~104.7%，RSD 介於2.3~9.0%；氟硫滅於同日內平均回收率介於89.7~111.4%，RSD 介於1.3~4.0%，異日間平均回收率介於90.9~108.8%，RSD 介於2.2~4.4%；依速隆於同日內平均回收率介於74.3~102.6%，RSD 介於2.2~10.1%；異日間平均回收率介於82.2~99.4%，RSD 介於4.3~11.8%。上述3種藥劑的定量極限於蔬菜可達0.01 µg/g、白米可達0.02 µg/g、綠茶可達0.05 µg/g。本方法期能作為衛福部食品藥物管理署制定檢驗方法之參考依據，未來將運用於進、出口及市售產品中檢測殘留情形，為食安把關。

關鍵詞：亞喜芬、氟硫滅、依速隆、液相層析串聯質譜儀、檢驗方法確效

接受日期：2022年9月7日

* 通訊作者。E-mail: sklin@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

緒言

除草劑亞喜芬 (acifluorfen) 化學名為 5-(2-chloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyloxy)-2-nitrobenzoic acid，可於雜草萌芽前及萌芽後處理，屬於選擇性且接觸型的除草劑⁽¹⁾。殺菌劑氟硫滅 (flusulfamide) 化學名為 2',4-dichloro- α,α,α -trifluoro-4'-nitro-m-toluenesulfonanilide，主要用於防治甘藍根瘤病⁽¹⁾。除草劑依速隆 (imazosulfuron) 化學名為 1-(2-chloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-ylsulfonyl)-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea，主要應用於防除水稻田雜草⁽¹⁾，於水稻插秧後 3~15 天使用，前述 3 種藥劑的物化性質如 (表一至表三)。

我國食品安全衛生管理法中已明訂農產品中農藥殘留容許量標準⁽⁶⁾ (maximum residue limits, MRL)，做為保障農產品安全之準則，包括亞喜芬於乾豆類 MRL 為 0.1 ppm、氟硫滅於甘藍及芥藍 MRL 為 0.05 ppm 及依速隆於米類 MRL 為 0.5 ppm，而要執行容許量之法規，則須有明確之農藥殘留分析方法作為執法之依據。目前 CODEX⁽⁹⁾ 及 EU⁽⁸⁾ 尚未制訂該藥劑容許量標準，及美國⁽¹⁰⁾ 僅制定亞喜芬殘留容許量標準，日本⁽¹¹⁾ 則制定這 3 種藥劑於多種作物之容許量標準。

蔬果農藥殘留分析方法由衛生福利部公告，其中「食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析方法 (五)」於 2019 年 5 月 10 日增加至 380 項⁽³⁾ (MOHWP0055.04)，

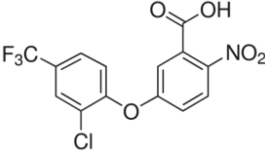
並於 2020 年 1 月 1 日施行，此外，食藥署亦於 2021 年 12 月 30 日修正「食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法 (六)」(TFDAP0007.02)⁽⁴⁾。為配合殘留容許量制定的檢驗方法開發需求，近年陸續以此方法擴增可檢驗的農藥品項，如 fluoroimide⁽²⁾ 等。

然而，我國雖已制定亞喜芬、氟硫滅、依速隆的殘留容許量，但前述檢驗方法尚未包含這 3 種藥劑的檢驗方法，為了補足監測技術缺口及配合食品安全衛生管理法中容許量執行之迫切需要，本研究針對這三項藥劑進行方法開發，並完成檢驗方法確效^(5, 7)。本研究將亞喜芬、氟硫滅、依速隆添加於甘藍樣品中，濃度分別為 0.01 及 0.05 $\mu\text{g/g}$ (各 5 重複)，先依「食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法 (五)」進行製備後分析，亞喜芬平均回收率分別為 17.1% 與 13.3%，相對標準偏差 (relative standard deviations, RSD) 為 23.9% 與 6.9%。氟硫滅平均回收率分別為 66.2% 與 65.6%，RSD 為 7.5% 與 2.5%，依速隆平均回收率分別為 63.1% 與 55.4%，RSD 為 3.2% 與 3.2%。回收率皆無法符合衛生福利部食品藥物管理署公告之食品化學檢驗方法確效規範⁽⁵⁾ 及歐盟檢驗方法確效⁽⁷⁾ 規範，此 3 種藥劑的理化性質中可參考表一至表三。故再以「食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法 (六)」進行後續試驗，亞喜芬、氟硫滅、依速隆在多種測試基質中的平均回收率與 RSD 皆符合檢驗方法確效規範。以

期本方法可作為檢驗方法制定及殘留監測 於外銷時亦可做最嚴謹的把關，使食品安
之參考依據，以確保消費者食用安全，並 全檢驗的工作更臻完善。

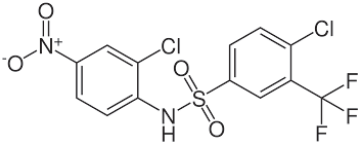
表一、亞喜芬物理化學性質⁽¹²⁾

Table 1. Physical and chemical properties of acifluorfen⁽¹²⁾

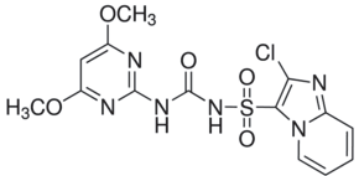
IUPAC name	5-(2-chloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyloxy)-2-nitrobenzoic acid
CAS RN	50594-66-6
Chemical structure	
Molecular formula	C ₁₄ H ₇ ClF ₃ NO ₅
Molecular weight	361.66
Melting point	155°C
Vapor pressure	0.133 mPa (20°C)
Octanol-water partition coefficient, log <i>P</i>	1.18 (20°C)
Solubility in water	250,000 mg/L (20°C)
Solubility in various solvents	Acetone (50,000), Hexane (1,000) (both in mg/L, 20°C).
Stability	Stable to Aqueous hydrolysis DT ₅₀ (days) at 20°C and pH7. Aqueous photolysis DT ₅₀ (days) at pH 7: 4

表二、氟硫滅物理化學性質⁽¹²⁾

Table 2. Physical and chemical properties of flusulfamide⁽¹²⁾

IUPAC name	2',4-dichloro- α,α,α -trifluoro-4'-nitro-m-toluenesulfonamide
CAS RN	106917-52-6
Chemical structure	
Molecular formula	C ₁₃ H ₇ Cl ₂ F ₃ N ₂ O ₄ S
Molecular weight	415.17
Melting point	170.4°C
Vapor pressure	9.90 x 10 ⁻⁰⁷ mPa (20°C)
Octanol-water partition coefficient, log <i>P</i>	2.8 (20°C)
Solubility in water	2.9 mg/L (20°C)
Solubility in various solvents	Acetone (189,900), Xylene (5,700), Hexane (60), Toluene (6,000) (both in mg/L, 20°C).
Stability	Stable to pH 4 to pH 9 at 25°C

表三、依速隆物理化學性質⁽¹²⁾Table 3. Physical and chemical properties of imazosulfuron⁽¹²⁾

IUPAC name	1-(2-chloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-ylsulfonyl)-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea
CAS RN	122548-33-8
Chemical structure	
Molecular formula	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₆ O ₅ S
Molecular weight	412.83
Melting point	183.5°C
Vapor pressure	3.5 x 10 ⁻⁰³ mPa (20°C)
Octanol-water partition coefficient, log P	-0.07 (20°C)
Solubility in water	429.0 mg/L (20°C)
Solubility in various solvents	Acetone (4,479), Xylene (400), Ethyl acetate (2,200), Dichloromethane (12,745) (both in mg/L, 20°C).
Stability	Stable to Aqueous hydrolysis DT ₅₀ (days) at 20°C and pH7. (pH 4: DT ₅₀ 7.0 days; Stable at pH 9 DT ₅₀ > 1 year.) Aqueous photolysis DT ₅₀ (days) at pH 7: 3.1, pH 4 DT ₅₀ = 8.5 days.

材料與方法

本研究開發之檢測方法係參考「食品中殘留農藥檢驗方法－多重殘留分析方法(六)」(2021年12月30日修正, TFDAP0007.02)⁽⁴⁾進行分析, 樣品製備流程如(圖一)。

一、試藥及材料

對照物: 農藥標準品亞喜芬, 純度 98.80%, CHEM SERVICE; 氟硫滅, 純度 99.38%, Dr. Ehrenstorfer; 依速隆, 純度 100.00%, Wako。

試藥: 甲醇 (methanol) 層析級, Merck; 乙腈 (acetonitrile) 層析級, J. T. Baker; 去離子水 (比電阻於 25°C 可達 18 MΩ/cm 以上); 甲酸 (formic acid) ACS 級, Merck; 檸檬酸鈉 (tri-sodium citrate) ACS 級, Merck; 檸檬酸氫二鈉 (di-sodium hydrogen citrate) 殘量分析級, Merck; 氯化鈉 (sodium chloride) Ph Eur 級, Merck; 無水硫酸鎂 (magnesium sulphate anhydrous) ACS 級, J. T. Baker; PSA (primary secondary amine) 殘量分析級, Agilent; 醋酸銨 (ammonium acetate) ACS 級, Merck; 磷酸三苯酯 (triphenylphosphate, TPP) (作為內部標準品), 純度 99.4%, Dr. Ehrenstorfer 等。

Fruit and vegetables: add 10 g of homogeneous sample to a centrifuge tube
 Cereal grain: add 5 g of ground sample to a centrifuge tube, complete with 10 mL of water, and stand for 20 min.

Tea: add 2 g of ground sample to a centrifuge tube, complete with 10 mL of water, and stand for 20 min.

↓

Add 10 mL of acetonitrile/methanol solution (4/1, v/v) containing 1% formic acid and 10 µL of 50 µg/mL internal standard solution, then add 1 ceramic homogenizer and buffer-salt-mixture¹⁾, and shake vigorously several times

↓

Shake intensely for 1 minute (1,000 rpm)

↓

Centrifuge for 5 minutes (15°C, 3,000 ×g) to separate the extract from the supernatant

↓

Place 6 mL of supernatant into the clean-up tube^{2), 3), 4)}

↓

Shake intensely for 1 minute (1,000 rpm)

↓

Centrifuge for 2 minutes (15°C, 3,000 ×g) to separate the extract from the supernatant

↓

Take 1 mL of supernatant to dry with nitrogen

↓

Add 1 mL methanol and mix well

↓

Filtered with 0.2 µm filter (PTFE)

↓

Perform LC-MS/MS analysis

- 1) Buffer-salt-mixture: 4 g anhydrous magnesium sulfate, 1 g sodium chloride, 1 g trisodium citrate dehydrate and 0.5 g disodium hydrogencitrate sesquihydrate.
- 2) Clean-up tube I: 150 mg PSA and 900 mg anhydrous magnesium sulfate.
- 3) Clean-up tube II: 150 mg PSA, 150 mg C18 and 900 mg anhydrous magnesium sulfate.
- 4) Clean-up tube III: 150 mg PSA, 45 mg GCB and 900 mg anhydrous magnesium sulfate.

圖一、亞喜芬、氟硫滅、依速隆檢驗分析流程。

Fig. 1. Flowchart illustrating the analysis of acifluorfen, flusulfamide and imazosulfuron residues in agricultural products.

材料：離心管：15 mL 及 50 mL，PP 材質，CORNING；濾膜：孔徑 0.2 μm ，PTFE 材質，Agilent；定量瓶：25 mL 及 10 mL，褐色，BRAND；陶瓷均質石 (ceramic homogenizer) Bond Elut QuChERS，Agilent；樣品瓶：1.8 mL，玻璃材質，夾蓋或螺旋蓋，Agilent；10 mL，玻璃材質，附螺旋蓋，Thermo；萃取用粉劑：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；淨化用離心管 I：含無水硫酸鎂 900 mg 及 PSA 150 mg，檢液負荷量 6 mL；淨化用離心管 II：含無水硫酸鎂 900 mg、PSA 150 mg 及 C18 150 mg，檢液負荷量 6 mL；淨化用離心管 III：含無水硫酸鎂 855 mg、PSA 150 mg 及 45 mg GCB，檢液負荷量 6 mL。

樣品預處理：將待測蔬果樣品添加乾冰以攪拌混合器進行樣品均質化處理，白米及綠茶以磨粉機進行處理，至少取樣 500 公克作為次樣品 (sub-sample)，裝罐密封，並保存於低溫冷凍 (低於 -18°C) 條件下，待試驗分析使用。

二、設備與裝置

液相層析儀 Shimadzu Nexera series liquid chromatography；質譜儀 Shimadzu LCMS-8050；控制及數據分析系統：LabSolutions (Version 5.97 SP 1) 及 LabSolutions Insight (3.6.65.0)。天平：METTLER Toledo, ME403E。攪拌混合

器：Stephan Prime Cut。磨粉機：RONG TSONG, RT-02B。高速分散裝置：SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder[®]。氮氣濃縮裝置：Organomation Associates, Inc, N-EVAP[™] 112。旋渦混合器：Vortex-Genie 2。離心機：Beckman Coulter, Allegra X-30R Centrifuge。

三、試劑之調製

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。

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。

四、移動相溶液之調製

移動相溶液 A：取醋酸銨 0.4 g，以去離水溶解使成 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。

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

五、標準溶液之配製

分別取農藥對照用標準品亞喜芬、氟硫滅、依速隆約 25 mg，精確稱定，以丙酮溶解並定容至 25 mL，作為標準原液，於 -18°C 避光貯存備用。取適量標準原液

以乙腈稀釋至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，供作 LC-MS/MS 分析用標準溶液。

六、檢液製備方式

取均質之蔬果樣品 10 g 置於離心管中，加入含 1% 甲酸之乙腈/甲醇 (4/1, v/v) 溶液 10 mL 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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，再以高速分散裝置於 1,000 rpm 振盪 1 分鐘後，於 15°C 以 3,000 $\times\text{g}$ 離心 5 分鐘。取上清液 6 mL，置於淨化用離心管 I，以高速分散裝置以 1,000 rpm 振盪 1 分鐘後，於 15°C 以 3,000 $\times\text{g}$ 離心 2 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，以 0.2 μm PTFE 濾膜過濾，供作檢液，以 LC-MS/MS 分析。

取磨粉後之穀類樣品 5 g 置於離心管中，加入 10 mL 去離子水混合均勻，靜置 20 分鐘備用，加入含 1% 甲酸之乙腈/甲醇 (4/1, v/v) 溶液 10 mL 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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，再以高速分散裝置於 1,000 rpm 振盪 1 分鐘後，於 15°C 以 3,000 $\times\text{g}$ 離心 5 分鐘。取上清液 6 mL，置於淨化用離心管 II，以高速分散裝置以 1,000 rpm 振盪 1 分鐘後，於 15°C 以 3,000 $\times\text{g}$ 離心 2 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，以 0.2 μm PTFE 濾膜過濾，供作檢液，以 LC-MS/MS 分析。

取磨粉後之茶類樣品 2 g 置於離心管中，加入 10 mL 去離子水混合均勻，靜置 20 分鐘備用，加入含 1% 甲酸之乙腈/甲醇 (4/1, v/v) 溶液 10 mL 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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，再以高速分散裝置於 1,000 rpm 振盪 1 分鐘後，於 15°C 以 3,000 $\times\text{g}$ 離心 5 分鐘。取上清液 6 mL，置於淨化用離心管 III，以高速分散裝置以 1,000 rpm 振盪 1 分鐘後，於 15°C 以 3,000 $\times\text{g}$ 離心 2 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，以 0.2 μm PTFE 濾膜過濾，供作檢液，以 LC-MS/MS 分析。

檢液製備步驟中添加內部標準品因無法代表所有農藥的物化特性，故於計算農藥濃度時不一定要納入計算式，「食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法(六)」建議可用於確認流程，作為品質管制參考⁽⁴⁾。

七、標準檢量線及基質匹配檢量線之製備

分別取 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亞喜芬、氟硫滅、依速隆標準溶液 2~200 μL 及 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 內部標準溶液 10 μL ，再加入適量甲醇使體積為 1 mL，混合均勻，使成為 0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 及 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之檢量

線，以 LC-MS/MS 分析，利用波峰面積與濃度繪製成標準檢量線。

另取空白檢體，依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 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準溶液 2~200 μL 及 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 內部標準溶液 10 μL ，再加入適量甲醇使體積為 1 mL，混合均勻，製作成 0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 及 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之基質匹配檢量線，以 LC-MS/MS 分析，利用波峰面積與濃度繪製成標準檢量線。

八、儀器分析條件

液相層析儀使用 CORTECS™ UPLC® C18 層析管柱 (100 mm x 2.1 mm, 1.6 μm)、層析管柱溫度為 40°C。梯度條件如 (表四)、移動相溶液：A 液與 B 液以下列條件進行梯度分析、移動相流速：0.35 mL/min、注入量：5 μL 。

質譜儀之離子源採用電灑離子化法 (electrospray ionization)，包含正電荷及負電荷模式、界面電壓 (interface voltage) 分別為 1 kV 及 -1 kV、界面溫度 (interface temperature) 為 250°C、霧化氣體流速 (nebulizing gas flow) 為 3 L/min、加熱氣體流速 (heating gas flow) 為 15 L/min、脫溶劑管溫度 (DL temperature) 為 200°C、乾燥氣體溫度 (heat block temperature) 為 350°C、乾燥氣體流速 (drying gas flow) 為 5 L/min、偵測模式採用多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM) 如 (表五)。

九、鑑別試驗及含量測定

採用基質匹配檢量線法 (matrix-matched calibration curve method)，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，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 (表六) 鑑別之，並依下列計算式求出檢體中農藥之含量 (ppm)：

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

C：由農藥之基質匹配檢量線求得檢液中農藥之濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V：萃取檢體之含 1% 甲酸之乙腈/甲醇 (4/1,v/v) 溶液之體積 (10 mL)

M：取樣分析檢體之重量 (g)

十、添加回收率試驗

取均質之蔬果檢體 10 g (米類檢體取 5 g，綠茶取 2 g)，分別添加亞喜芬、氟硫滅、依速隆標準品溶液，使其蔬果樣品濃度為 0.01 及 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，穀類樣品濃度為 0.02 及 0.10 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，茶類樣品濃度為 0.05 及 0.25 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，分別代表定量極限評估濃度及 5 倍定量極限評估濃度，並依分析檢液之製備流程操作，分別進行同日內 (5 重複) 及異日間 (3 重複) 分析，以 LC-MS/MS 進行分析。以檢液分別測得亞喜芬、氟硫滅、依速隆波峰之滯留時間與面積，分別與基質匹配標準品比較鑑別並定量。所得

定量極限評估濃度之回收率應介於 60~125%，RSD 應小於 30%，並作為定量極限評估之用；5 倍定量極限評估濃度之回收率應介於 70~120%，RSD 應小於 20%^(5,7)。

係經由樣品實際添加，蔬果為 0.01 µg/g，穀類為 0.02 µg/g，茶類為 0.05 µg/g，其實測回收率需符合 60~125%，RSD 應小於 30%，定量離子訊號/雜訊比 (signal/noise ratio, S/N ratio) 至少大於 10，定性離子至少大於 3，以此作為定量極限判定標準^(5,7)。

十一、定量極限 (limit of quantification, LOQ) 評估

表四、液相層析儀之移動相梯度條件

Table 4. HPLC gradient conditions

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0 → 2.0	99 → 50	1 → 50
2.0 → 8.0	50 → 30	50 → 70
8.0 → 15.0	30 → 1	70 → 99
15.0 → 18.0	1 → 1	99 → 99
18.0 → 18.5	1 → 99	99 → 1
18.5 → 20.5	99 → 99	1 → 1

表五、亞喜芬、氟硫滅、依速隆之多重反應偵測模式參數 (LC-MS/MS)

Table 5. MRM parameters employed in acifluorfen, flusulfamide and imazosulfuron analysis

Compound	Ionization mode	Quantitative			Qualitative		
		precursor(m/z) > Product(m/z)	Q1/Q3pre bias (V)	Collision energy (V)	precursor(m/z) > Product(m/z)	Q1/Q3 pre bias (V)	Collision energy (V)
acifluorfen	ESI-	360>316	26/22	9	360>195	26/21	27
					360>286	26/30	16
flusulfamide	ESI-	413>171	15/17	35	413>349	15/16	27
					413>179	15/17	38
imazosulfuron	ESI+	413>153	-21/-15	-14	413>156	-21/-15	-21
					413>258	-21/-27	-25

表六、質譜分析之相對離子強度最大可容許範圍如下

Table 6. Recommended maximum tolerance levels for ion ratios detected using LC-MS/MS

Ion ratio (%)	Tolerance (%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

結果與討論

本研究係依據衛生福利部食品藥物管理署公告之食品化學檢驗方法⁽⁵⁾以及參考歐盟檢驗方法確效⁽⁷⁾規範進行，分別進行回收率試驗，評估其精密度 (precision)、準確度 (accuracy) 和可信賴度 (reliability)。

一、檢量線與基質效應

分別製備亞喜芬、氟硫滅、依速隆之標準檢量線 (standard calibration curve, SCC) 及基質匹配檢量線 (matrix calibration curve, MCC)，其範圍為 0.002 µg/mL 至 0.2 µg/mL (各點的濃度值分別為 0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 及 0.2 µg/mL)，其中亞喜芬及依速隆的標準檢量線之線性回歸方程式之相關係數分別為 0.9973 及 0.9984，氟硫滅的範圍則為 0.002 µg/mL 至 0.05 µg/mL，標準檢量線之線性回歸方程式之相關係數則為 0.9975；測試基質為甘藍、芥藍、白米及綠茶等基質匹配檢量線之線性回歸方程式中，亞喜芬之相關係數分別為 0.9965、0.9975、0.9990 及 0.9958，依速隆之相關係數分別

為 0.9985、0.9987、0.9991 及 0.9984，氟硫滅的範圍則為 0.002 µg/mL 至 0.05 µg/mL，其相關係數分別為 0.9970、0.9975、0.9981 及 0.9960，上述檢量線皆顯示該濃度範圍內線性關係良好。

另評估測試基質對分析物於質譜儀中離子化效率影響，依據所製備之標準檢量線 (SCC) 及基質匹配檢量線 (MCC)，將測得 SCC 方程式及 MCC 方程式以【基質效應 = (MCC 之斜率 - SCC 之斜率) / SCC 之斜率 × 100%】計算公式，求得基質效應於各農藥在甘藍、芥藍、白米及綠茶之結果，如 (表七)，當基質效應為正值時表示增強，為負值時表示抑制，若抑制或增強超過 20%，則定量時須考慮基質效應因素，結果顯示氟硫滅於四種基質中皆未超過 20%，依速隆於芥藍會增強離子訊號，而亞喜芬於各基質皆會增強離子訊號，因考量分析結果之準確性，本試驗採用基質匹配檢量線進行定性及定量。方法之溶劑分析及基質空白分析於亞喜芬、氟硫滅、依速隆滯留時間窗內未檢出殘留，顯示方法之共萃物不會干擾分析鑑別的判定。亞喜芬、氟硫滅、依速隆標準品及含基質匹配標準品之質譜圖如 (圖二至圖四)。

二、添加回收率試驗

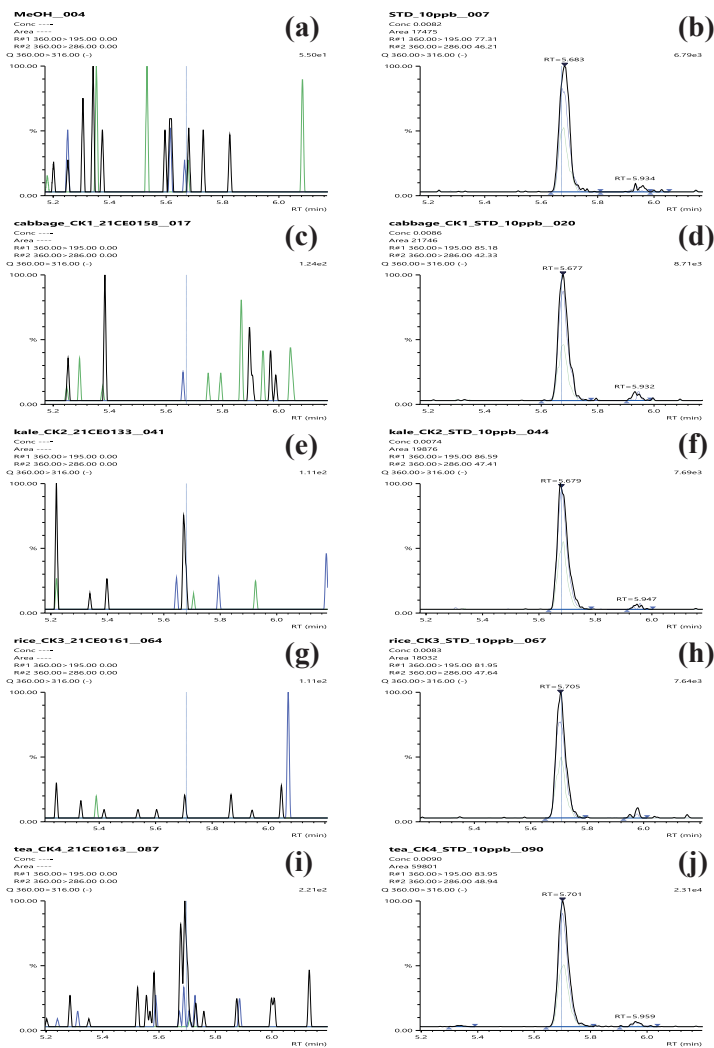
本試驗進行濃度計算時，因評估未使用內部標準品即可達到確效要求，故未使用內部標準品進行計算，只用於確認流程使用。試驗材料以甘藍、芥藍、白米及綠茶執行回收率試驗，於蔬果樣品中添加濃度為 0.01 µg/g (定量極限評估濃度) 及 0.05 µg/g (5 倍定量極限評估濃度)，穀類樣品中添加濃度為 0.02 µg/g (定量極限評估濃度) 及 0.10 µg/g (5 倍定量極限評估濃度)，茶類樣品中添加濃度為 0.05 µg/g (定量極限評估濃度) 及 0.25 µg/g (5 倍定量極限評估濃度)，進行同日內 (intra-day) 與異日間(inter-day) 之評估，亞喜芬於同日內平均回收率介於 89.8~112.4%，相對標準偏差 (relative standard deviation, RSD)

介於 3.4~7.7%，異日間平均回收率介於 88.4~104.7%，RSD 介於 2.3~9.0%；氟硫滅於同日內平均回收率介於 89.7~111.4%，RSD 介於 1.3~4.0%，異日間平均回收率介於 90.9~108.8%，RSD 介於 2.2~4.4%；依速隆於同日內平均回收率介於 74.3~102.6%，RSD 介於 2.2~10.1%，異日間平均回收率介於 82.2~99.4%，RSD 介於 4.3~11.8%，如 (表八至表十)。上述 3 種農藥，於定量極限評估濃度之回收率符合 60~125%，且 RSD 皆小於 30%；於 5 倍定量極限評估濃度之回收率符合 70~120%，且 RSD 皆小於 20%，皆符合衛生福利部食品藥物管理署公告之食品化學檢驗方法確效規範⁽⁵⁾ 以及參考歐盟檢驗方法確效⁽⁷⁾ 規範。

表七、亞喜芬、氟硫滅及依速隆於溶劑及基質中線性範圍

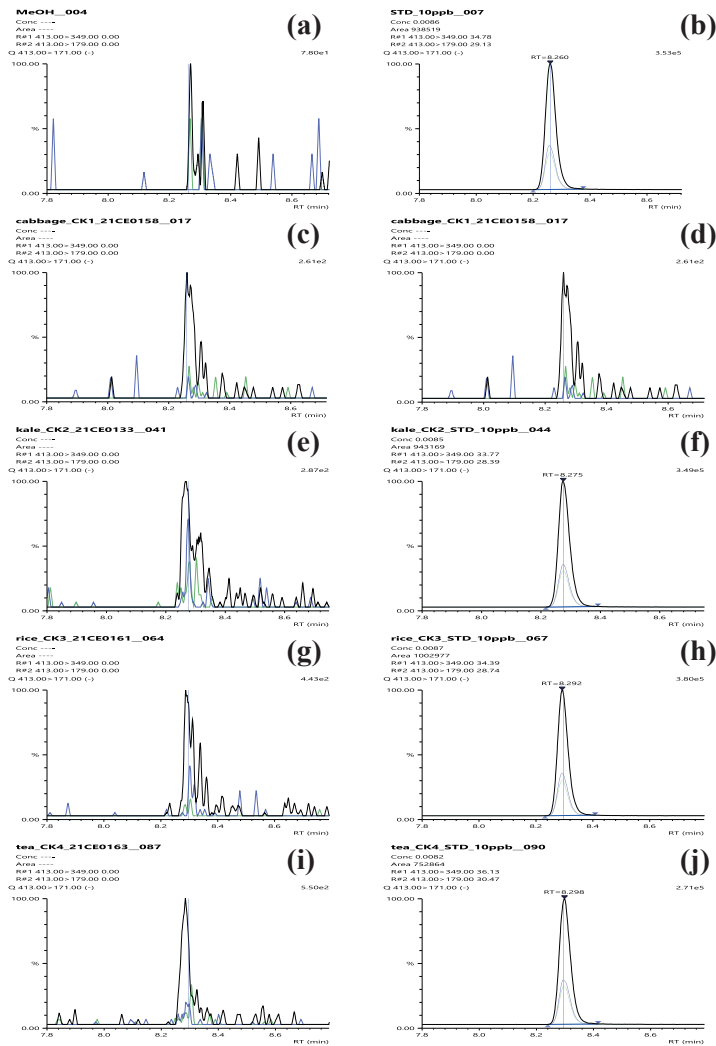
Table 7. Linear ranges of acifluorfen, flusulfamid and imazosulfuron in solvent and matrix

compound name	crop	linear range (µg/mL)	linear equation in solvent	linear equation in matrix	matrix effect (%)
acifluorfen	cabbage	0.002-0.2	y = 2108252 x + 90	y = 2602266 x - 666	23
	kale	0.002-0.2	y = 1969505 x - 176	y = 2714804 x - 299	38
	rice	0.002-0.2	y = 2021208 x - 222	y = 2244638 x - 689	11
	green tea	0.002-0.2	y = 2015647 x - 259	y = 6244013 x + 3908	210
flusulfamide	cabbage	0.002-0.05	y = 110156100 x - 4805	y = 110584500 x - 10640	0
	kale	0.002-0.05	y = 112070600 x - 3868	y = 111620400 x - 9403	0
	rice	0.002-0.05	y = 113928300 x - 684	y = 114771400 x + 3126	1
	green tea	0.002-0.05	y = 113151800 x - 6426	y = 93037970 x - 6629	-18
imazosulfuron	cabbage	0.002-0.2	y = 19730160 x - 1408	y = 22845730 x + 4924	16
	kale	0.002-0.2	y = 17545410 x - 5788	y = 22043840 x - 2218	26
	rice	0.002-0.2	y = 17522450 x - 1017	y = 17868270 x - 2990	2
	green tea	0.002-0.2	y = 16380760 x - 5481	y = 19700000 x - 76	20



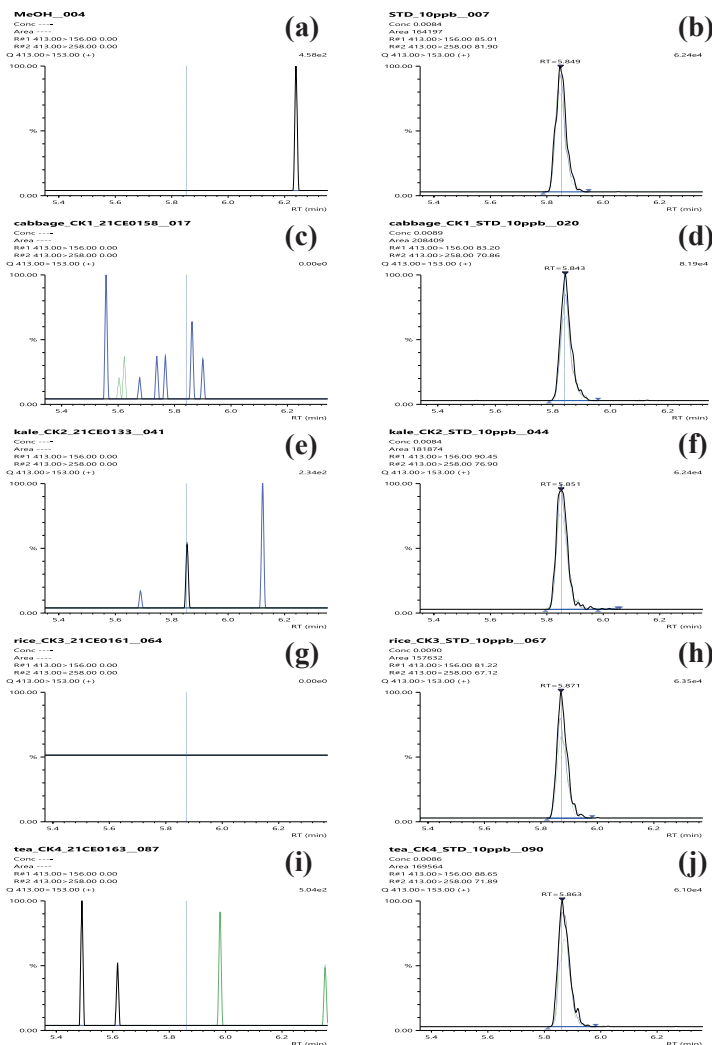
圖二、亞喜芬分別在溶劑與基質之質譜圖 (a) 溶劑、(b) 0.01 µg/mL、(c) 甘藍空白基質、(d) 於甘藍基質中 0.01 µg/mL、(e) 芥藍空白基質、(f) 於芥藍基質中 0.01 µg/mL、(g) 白米空白基質、(h) 於白米基質中 0.01 µg/mL、(i) 綠茶空白基質、(j) 於綠茶基質中 0.01 µg/mL。

Fig. 2. Representative mass chromatograms of (a) solvent, (b) 0.01 µg/mL acifluorfen, (c) cabbage blank and (d) cabbage matrix fortified with 0.01 µg/mL acifluorfen; (e) kale blank and (f) kale matrix fortified with 0.01 µg/mL acifluorfen; (g) rice blank and (h) rice matrix fortified with 0.01 µg/mL acifluorfen; (i) green tea blank and (j) green tea matrix fortified with 0.01 µg/mL acifluorfen.



圖三、氟硫滅分別在溶劑與基質之質譜圖 (a) 溶劑、(b) 0.01 µg/mL、(c) 甘藍空白基質、(d) 於甘藍基質中 0.01 µg/mL、(e) 芥藍空白基質、(f) 於芥藍基質中 0.01 µg/mL、(g) 白米空白基質、(h) 於白米基質中 0.01 µg/mL、(i) 綠茶空白基質、(j) 於綠茶基質中 0.01 µg/mL。

Fig. 3. Representative mass chromatograms of (a) solvent, (b) 0.01 µg/mL flusulfamide, (c) cabbage blank and (d) cabbage matrix fortified with 0.01 µg/mL flusulfamide; (e) kale blank and (f) kale matrix fortified with 0.01 µg/mL flusulfamide; (g) rice blank and (h) rice matrix fortified with 0.01 µg/mL flusulfamide; (i) green tea blank and (j) green tea matrix fortified with 0.01 µg/mL flusulfamide.



圖四、依速隆分別在溶劑與基質之質譜圖 (a) 溶劑、(b) 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(c) 甘藍空白基質、(d) 於甘藍基質中 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(e) 芥藍空白基質、(f) 於芥藍基質中 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(g) 白米空白基質、(h) 於白米基質中 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(i) 綠茶空白基質、(j) 於綠茶基質中 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Fig. 4. Representative mass chromatograms of (a) solvent, (b) 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ imazosulfuron, (c) cabbage blank and (d) cabbage matrix fortified with 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ imazosulfuron; (e) kale blank and (f) kale matrix fortified with 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ imazosulfuron; (g) rice blank and (h) rice matrix fortified with 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ imazosulfuron; (i) green tea blank and (j) green tea matrix fortified with 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ imazosulfuron.

表八、亞喜芬添加回收率試驗結果

Table 8. Results of recovery tests performed on samples fortified with acifluorfen

Concentration of acifluorfen in sample (µg/g)	cabbage		kale		rice		tea									
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day								
	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)								
0.01 ¹⁾ /0.02 ²⁾ /0.05 ³⁾	104.4	4.0	102.6	4.5	103.6	7.7	104.7	9.0	99.0	3.7	99.1	5.4	112.4	3.4	104.5	6.7
0.05 ¹⁾ /0.10 ²⁾ /0.25 ³⁾	89.8	3.8	96.1	6.0	95.8	5.3	96.8	7.2	90.6	4.5	88.4	2.3	91.6	3.5	89.6	2.5

¹⁾ Test concentration in cabbage and kale
²⁾ Test concentration in rice
³⁾ Test concentration in tea

表九、氟硫滅添加回收率試驗結果

Table 9. Results of recovery tests performed on samples fortified with flusulfamide

Concentration of flusulfamide in sample (µg/g)	cabbage		kale		rice		tea									
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day								
	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)								
0.01 ¹⁾ /0.02 ²⁾ /0.05 ³⁾	102.6	3.7	104.9	2.5	110.2	3.1	108.8	2.2	111.2	2.1	107.2	3.4	111.4	1.5	106.2	4.3
0.05 ¹⁾ /0.10 ²⁾ /0.25 ³⁾	89.7	2.1	94.3	4.4	95.9	4.0	94.7	3.9	95.2	1.3	90.9	4.1	94.0	2.5	93.2	2.9

¹⁾ Test concentration in cabbage and kale
²⁾ Test concentration in rice
³⁾ Test concentration in tea

表十、依速隆添加回收率試驗結果

Table 10. Results of recovery tests performed on samples fortified with imazosulfuron

Concentration of imazosulfuron in sample (µg/g)	cabbage		kale		rice		tea									
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day								
	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)	Average Recovery rate (%)	RSD Recovery rate (%)								
0.01 ¹⁾ /0.02 ²⁾ /0.05 ³⁾	98.8	7.5	99.4	4.6	102.6	7.8	98.9	5.4	86.2	6.7	95.2	11.8	82.2	8.3	92.5	9.8
0.05 ¹⁾ /0.10 ²⁾ /0.25 ³⁾	86.4	6.6	91.9	5.7	90.1	10.1	86.8	4.3	78.7	2.5	85.6	8.1	74.3	2.2	82.2	8.4

¹⁾ Test concentration in cabbage and kale
²⁾ Test concentration in rice
³⁾ Test concentration in tea

三、定量極限

本試驗方法亞喜芬之蔬果定量極限可達 0.01 $\mu\text{g/g}$ ，穀類定量極限可達 0.02 $\mu\text{g/g}$ ，茶類定量極限可達 0.05 $\mu\text{g/g}$ ，係經由蔬果、穀類及茶類樣品分別實際添加 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、0.02 $\mu\text{g/g}$ 及 0.05 $\mu\text{g/g}$ 濃度，其實測回收率於同日間 (5 重複分析) 分別為甘藍 104.4%、芥藍 103.6% 與白米 99.0% 及綠茶 112.4%，且 RSD 分別為 4.0%、7.7%、3.7% 與 3.4%；回收率於異日間 (3 重複) 為甘藍 102.6%、芥藍 104.7% 與白米 99.1% 及綠茶 104.5%，且 RSD 分別為 4.5%、9.0%、5.4% 與 6.7%，回收率符合 60~125%，RSD 皆小於 30%。定量離子訊號／雜訊比為 10.0~158.8，符合訊號／雜訊比大於 10 的要求；定性離子訊號／雜訊比為 26.4~152.0，符合訊號／雜訊比大於 3 的要求。

氟硫滅之蔬果定量極限可達 0.01 $\mu\text{g/g}$ ，穀類定量極限可達 0.02 $\mu\text{g/g}$ ，茶類定量極限可達 0.05 $\mu\text{g/g}$ ，係經由蔬果、穀類及茶類樣品分別實際添加 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、0.02 $\mu\text{g/g}$ 及 0.05 $\mu\text{g/g}$ 濃度，其實測回收率於同日間 (5 重複分析) 分別為甘藍 102.6%、芥藍 110.2% 與白米 111.2% 及綠茶 111.4%，且 RSD 分別為 3.7%、3.1%、2.1% 與 1.5%；回收率於異日間 (3 重複) 為甘藍 104.9%、芥藍 108.8% 與白米 107.2% 及綠茶 106.2%，且 RSD 分別為 2.5%、2.2%、3.4% 與 4.3%，回收率符

合 60~125%，RSD 皆小於 30%。定量離子訊號／雜訊比為 338.9~862.2，符合訊號／雜訊比大於 10 的要求；定性離子訊號／雜訊比為 230.4~659.8，符合訊號／雜訊比大於 3 的要求。

依速隆之蔬果定量極限可達 0.01 $\mu\text{g/g}$ ，穀類定量極限可達 0.02 $\mu\text{g/g}$ ，茶類定量極限可達 0.05 $\mu\text{g/g}$ ，係經由蔬果、穀類及茶類樣品分別實際添加 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、0.02 $\mu\text{g/g}$ 及 0.05 $\mu\text{g/g}$ 濃度，其實測回收率於同日間 (5 重複分析) 分別為甘藍 98.8%、芥藍 102.6% 與白米 86.2% 及綠茶 82.2%，且 RSD 分別為 7.5%、7.8%、6.7% 與 8.3%；回收率於異日間 (3 重複) 為甘藍 99.4%、芥藍 98.9% 與白米 95.2% 及綠茶 92.5%，且 RSD 分別為 4.6%、5.4%、11.8% 與 9.8%，回收率符合 60~125%，RSD 皆小於 30%。定量離子訊號／雜訊比為 31.7~518.9，符合訊號／雜訊比大於 10 的要求；定性離子訊號／雜訊比為 52.7~228.1，符合訊號／雜訊比大於 3 的要求。

結論

本研究係參考「食品中殘留農藥檢驗方法－多重殘留分析方法 (六)」(2021 年 12 月 30 日修正, TFDAP0007.02) 流程，並利用液相層析串聯式質譜儀 (LC-MS/MS) 開發除草劑亞喜芬、依速隆及殺菌劑氟硫滅於農產品中殘留檢驗方法，本方法可進行定性及定量檢驗分析，以甘

藍、芥藍、白米及綠茶基質匹配檢量線之線性相關係數分別為 0.9965~0.9985、0.9975~0.9987、0.9981~0.9991、0.9958~0.9984，基質效應分別為 0~23%、0~38%、1~11%、-18~210%，故建議以基質匹配檢量線進行定量分析。本方法之蔬果定量極限為 0.01 µg/g、穀類定量極限為 0.02 µg/g 及茶類定量極限為 0.05 µg/g，同日內及異日間之回收率試驗結果顯示，亞喜芬、依速隆及氟硫滅於甘藍、芥藍、白米及綠茶等基質的各項回收率皆介於 70~120%，且相對標準偏差皆小於 20%，符合衛生福利部食品藥物管理署公告之食品化學檢驗方法確效規範，並可適用於歐美、日本及臺灣等國家容許量要求

(表十一)，本方法可作為農產品中殘留監測之檢驗方法，未來也可作為衛生福利部食品藥物管理署增訂農藥殘留檢驗方法之參考依據。

謝辭

本試驗承蒙衛生福利部食品藥物管理署 2021 年度「農禽畜產品中殘留農藥檢驗方法開發研究」(110TFDA-A-102E) 計畫經費補助及本所殘毒管制組檢驗方法研究室及衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組多位同仁，以及參加實驗室間共同試驗的所有實驗室及其成員協助試驗工作，謹此謝忱。

表十一、亞喜芬、氟硫滅、依速隆各國容許量調查

Table 11. International MRLs of acifluorfen, flusulfamide, and imazosulfuron in crop products

Pesticide	MRLs (ppm)				
	Taiwan ¹⁾	Codex ²⁾	EU ³⁾	USA ⁴⁾	Japan ⁵⁾
acifluorfen	dried beans 0.1	- ⁶⁾	- ⁶⁾	peanut 0.1, rice 0.1, soybean 0.1, Strawberry 0.1	soybean 0.1, peanut 0.1, peas 0.1, beans 0.1, edamame 0.1, other vegetables 0.1
flusulfamide	cabbage 0.05、kale 0.05	- ⁶⁾	- ⁶⁾	- ⁶⁾	potato 0.05, Taro 0.05, sweet potato 0.05, 40 kinds vegetables 0.1
imazosulfuron	rice 0.5	- ⁶⁾	- ⁶⁾	- ⁶⁾	rice (Brown rice) 0.1

¹⁾ 農藥殘留容許量標準。2022 年 4 月 19 日衛授食字第 1111300311 號令修正 ⁽⁶⁾

²⁾ Obtained from guidelines in the Codex Pesticides Residues in Food Online Database ⁽⁹⁾

³⁾ Obtained from the EU Pesticides Database ⁽⁸⁾

⁴⁾ Obtained from the “Electronic Code of Federal Regulations” produced by the U. S. Government Publishing Office ⁽¹⁰⁾

⁵⁾ Obtained from the Japan Food Chemical Research Foundation ⁽¹¹⁾

⁶⁾ No data

引用文獻

1. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。2021。登記農藥查詢。檢自農藥資訊服務網 <https://pesticide.baphiq.gov.tw/information/Query/Pesticide> (Apr. 26, 2022)
2. 莊瑋臻、黃鎮華、徐慈鴻、林韶凱。2021。以液相層析串聯質譜儀建立 fluoroimide 於蘋果中殘留檢驗方法。臺灣農藥科學 10：109-120。
3. 衛生福利部。2019。公告檢驗方法－食品中殘留農藥檢驗方法－多重殘留分析方法 (五)。衛授食字第 1081900612 號。
4. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。建議檢驗方法－食品中殘留農藥檢驗方法－多重殘留分析方法 (六)。TFDAP 0007.02。
5. 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。檢自 <https://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?id=4115> (Sep. 8, 2022)
6. 衛生福利部。2022。農藥殘留容許量標準。衛授食字第 1111300311 號令修正。
7. European Committee Directorate General for Health and Food Safety. 2022. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Document number SANTE/11312/2021.
8. European Commission. EU Pesticides database. Retrieved from <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (Apr. 26, 2022)
9. FAO/WHO. Codex Pesticides Residues in Food Online Database. Retrieved from <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/> (Apr. 26, 2022)
10. National Archives and Records Administration. 2011. Code of federal regulations- Part 180- Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food. Retrieved from <https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-E/part-180> (Apr. 26, 2022)
11. The Japan Food Chemical Research Foundation. 2019. Maximum residue limits (MRLs) list of agricultural chemicals in foods (Updated on Feb. 1, 2018). Retrieved from <http://db.ffcr.or.jp/front/> (Apr. 26, 2022)
12. University of Hertfordshire. 2020. PPDB: Pesticide Properties DataBase. Retrieved from <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/> (Apr. 26, 2022)

Establishment of an LC-MS/MS Analytical Method to Assess Acifluorfen, Flusulfamide and Imazosulfuron Residues in Agricultural Products

Wei-Chen Chuang¹, Chen-Hua Huang¹, Tsy-Horng Shyu¹, Shao-Kai Lin^{1*}

Abstract

Chuang, W. C., Huang, C. H., Shyu, T. H., and Lin, S. K. 2022. Establishment of an LC-MS/MS analytical method to assess acifluorfen, flusulfamide and imazosulfuron residues in agricultural products. *Taiwan Pestic. Sci.* 13: 59-78.

Many pesticides have established maximum residue limits; however, some still lack methods to test for these residues. This study established an analytical method for testing acifluorfen, flusulfamide and imazosulfuron residues in agricultural products. Our method analyzes agricultural extracts qualitatively and quantitatively using a liquid chromatography tandem mass spectrometer and was developed using the “Method of Test for Pesticide Residues in Foods-Multiresidue Analysis (6)” (TFDAP0007.02) as a reference. We validated our analytical method using cabbage, kale, rice and green tea as test materials. Vegetable samples were fortified at levels of 0.01 and 0.05 µg/g. Rice samples were fortified at levels of 0.02 and 0.10 µg/g. Green tea samples were fortified at levels of 0.05 and 0.25 µg/g. For acifluorfen, average inter-day recovery rates ranged from 88.4~104.7% (relative standard deviation [RSD]: 2.3~9.0%), and average intra-day recovery rates ranged from 89.8~112.4% (RSD: 3.4~7.7%). For flusulfamide, average inter-day recovery rates ranged from 90.9~108.8% (RSD: 2.2~4.4%), and average intra-day recovery rates ranged from 89.7~111.4% (RSD: 1.3~4.0%). For imazosulfuron, average inter-day recovery rates ranged from 82.2~99.4% (RSD: 4.3~11.8%), and average intra-day recovery rates ranged from

Accepted: September 7, 2022.

* Corresponding author, E-mail: sklin@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agricultural, Taichung

74.3~102.6% (RSD: 2.2~10.1%). Limit of quantification (LOQ) values for the three pesticides were 0.01 µg/g in vegetables, 0.02 µg/g in rice and 0.05 µg/g in green tea. The analytical method developed in this study can be applied to detect acifluorfen, flusulfamide and imazosulfuron residues in imported, exported, and other commercially available products, thereby safeguarding food safety. Our method can also serve as a reference in the development of additional testing methods by the Food and Drug Administration, Ministry of Health and Welfare.

Key words: Acifluorfen, Flusulfamide, Imazosulfuron, liquid chromatography tandem mass spectrometer, method validation