

利用 LC/MS/MS 建立 *cyenopyrafen* 於木瓜中殘留分析方法

羅悅瑜¹ 廖偉志¹ 陳惠姬^{1*} 徐慈鴻¹

摘要

羅悅瑜、廖偉志、陳惠姬、徐慈鴻。2017。利用 LC/MS/MS 建立 *cyenopyrafen* 於木瓜中殘留分析方法。臺灣農藥科學 2: 11-23。

探討吡啶類殺蟎劑 *cyenopyrafen* 於木瓜中殘留分析方法的建立，以含 1% 醋酸的氫甲烷溶液作為萃取溶液，及利用液相層析串聯式質譜儀 (Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 進行測定。木瓜基質添加標準品 (0.02, 0.05, 0.10 $\mu\text{g/g}$, $n = 5$) 測得平均回收率範圍介於 82.9 ~ 95.4 % 之間，及相對標準偏差範圍介於 1.8 ~ 6.1% 之間。定量極限 (Limit of quantification, LOQ) 為 0.01 $\mu\text{g/g}$ 。本分析方法具備靈敏度與精確度之效能，可應用於木瓜中 *cyenopyrafen* 殘留量監測管理。

另外，探討木瓜基質中 *cyenopyrafen* 冷凍儲存穩定試驗，於木瓜基質添加標準品 (0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/g}$, $n = 3$)，儲存間期為 120 天，測得儲存回收率介於 75.0 ~ 84.1% 之間，及相對標準偏差介於 9.4 ~ 11.3% 之間，結果顯示木瓜基質中 *cyenopyrafen* 殘留量在冷凍保存 120 天期間可供參考依據。

關鍵詞：木瓜、儲存穩定性、液相層析串聯質譜儀、*cyenopyrafen*

接受日期：2017 年 3 月 27 日

* 通訊作者。Email: wjchen@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

前言

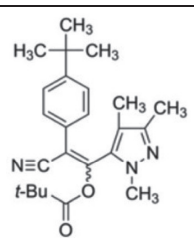
殺蟎劑 cyenopyrafen 化學名稱 (*E*)-2-(4-*tert*-butylphenyl)-2-cyano-1-(1,3,4-trimethylpyrazol-5-yl)vinyl 2,2-dimethylpropionate (IUPAC)，係屬吡唑類殺蟎劑 (pyrazole acaricides)，本成分為日產化學公司於 2008 年在日本及韓國登記，並於 2009 年日本推出之產品，商品名為 Starmite 及 Valuestar (混合藥劑含 pyridaben) (表一)⁽⁶⁾。用於防治果樹、茶葉和蔬菜等作物上的各類害蟎。主要作用機制為干擾琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase, 簡稱 SDH) 的作用，進而抑制粒線體的功能，達到防治作用⁽¹⁾。日本針對本殺蟎劑訂有殘留容許量 (Maximum residue

limits, MRLs)，例如：西瓜 0.05 ppm、茄子 0.7 ppm、胡瓜 1 ppm、及茶葉 60 ppm⁽⁵⁾。但無木瓜殘留容許量及檢驗方法。葉蟎類為木瓜常見害蟎，台灣木瓜主要外銷地為日本，因此有必要建立木瓜中 cyenopyrafen 殘留檢驗方法以供後續殘留容許量訂定之參考。

本研究參考 2014 年 7 月 03 日衛生署公告修正食品中殘留農藥檢驗方法——多重殘留分析方法 (五)，以 QuEChERS 方法前處理^(2,4) 萃取操作，利用 LC/MS/MS 兼具靈敏度及選擇性之優勢，建立 cyenopyrafen 於木瓜中殘留分析方法，同時，探討木瓜基質添加標準劑 cyenopyrafen 之冷凍儲存穩定試驗。

表一、cyenopyrafen 物理化學性質⁽⁶⁾

Table 1. Physical and chemical properties of cyenopyrafen⁽⁶⁾

Chemical Name	(<i>E</i>)-2-(4- <i>tert</i> -butylphenyl)-2-cyano-1-(1,3,4-trimethylpyrazol-5-yl)vinyl 2,2-dimethylpropionate (IUPAC)
Chemical Structure	
Molecular formula	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₂
Molecular weight	393.52
Melting point	106.7 ~ 108.2 °C
Vapor pressure	5.2 × 10 ⁻⁴ mPa (25°C)
Solubility	H ₂ O 0.30 mg/L (pH 7.0, 20 °C)
Stability	54°C stable for 14 days. DT ₅₀ was 0.9 days in water (pH 9.0, 25°C)

材料與方法

一、試藥

cyenopyrafen 對照標準品，純度 99.7%，Nissan Chemical Industries, LTD 製造，由興農股份有限公司提供。相關分析試藥包括氰甲烷 (acetonitrile)、冰醋酸 (acetic acid)、甲酸 (formic acid)、甲酸銨 (ammonium formate)、無水硫酸鎂 (magnesium sulphate anhydrous)、醋酸鈉 (sodium acetate) 及 PSA (primary and secondary amine) 等。萃取用粉劑：實驗室製備，內容含無水硫酸鎂、醋酸鈉，並依重量比例 4：1 混合。萃取用淨化管：實驗室製備，以聚丙烯 (polypropylene, PP) 材質離心管，秤取內容物含 150 mg PSA 及 900 mg 無水硫酸鎂作為淨化管。

二、儀器設備

均質機 (homogenizer)：KNEMATICA AG, Polytron PT 3100。高速震盪組織研磨均質機 (high-throughput plant and tissue homogenizer)：SPEX SamplePrep, Geno/Grinder 2010。離心機 (centrifuge)：Beckman Coulter, Allegra X-30R。吹氮濃縮機 (nitrogen blowing concentrator)：Organomation Associates, Inc, N-EVAP 112。

液相層析儀 Agilent 1200 series liquid chromatography；質譜儀 Agilent 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometry；控制及數據分析系統 Agilent MassHunter Quantita-

tive Analysis (Version B.04.00)，及 Agilent MassHunter Workstation Acquisition (Version B.02.01)。

三、標準溶液之配製

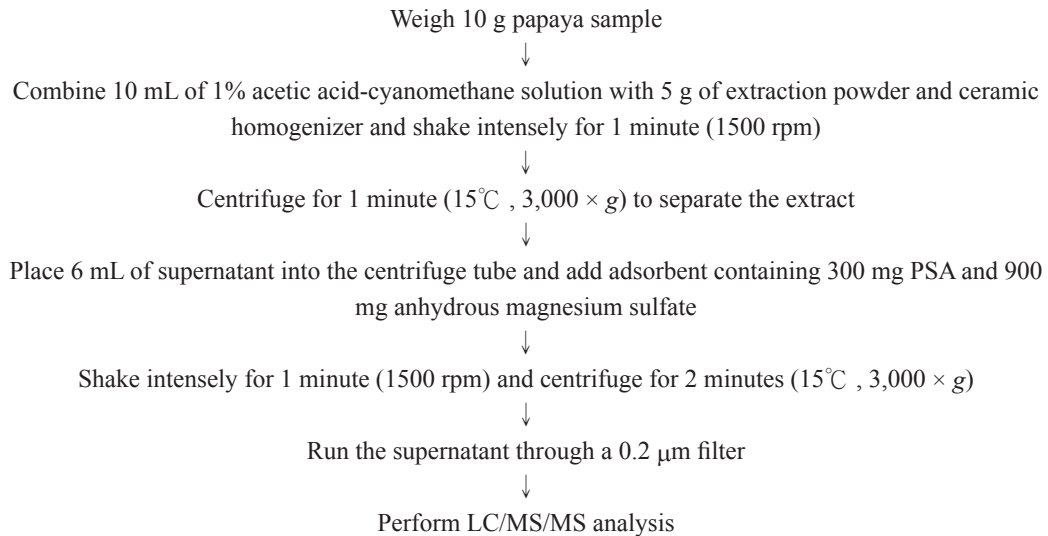
精秤適量對照標準品，以氰甲烷溶解並定容之，製備標準儲備溶液 (standard stock solution) 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，於 -18°C 條件下避光儲存。使用時，量取適量標準儲備溶液，以氰甲烷稀釋成 0.05 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為分析用標準工作溶液 (standard working solution)。

四、LC 移動相之配製

移動相 A 液：含 0.1% 甲酸之 10 mM 甲酸銨水溶液，取甲酸 2 mL，以去離子水定容至 2000 mL，再加入甲酸銨 1.29 g 溶解均勻。移動相 B 液：含 0.5% 甲酸之氰甲烷溶液，取甲酸 5 mL 與氰甲烷 995 mL 混合均勻。

五、檢液之製備

取木瓜檢體 10 g (不清洗、不去皮) 均質後置於 50 mL 離心管，加入 1% 醋酸氰甲烷 10 mL，及萃取用粉劑 6.5 g (無水硫酸鎂：無水醋酸鈉 = 4：1 (重量比))，高速均質機振盪 1 分鐘後，離心 1 分鐘 ($3000 \times g$ ， 15°C)，取上清液 6 mL，移入萃取用淨化管 (PSA 300 mg 及無水硫酸鎂 900 mg)，高速均質機振盪 1 分鐘，再離心 2 分鐘 ($3000 \times g$ ， 15°C)，取上清液 1 mL，經 0.22 μm 濾膜過濾 (PTFE, ADVANTEC)，供作檢液 (圖一)。



圖一、木瓜中 cyenopyrafen 殘留分析流程圖。

Fig. 1. Flowchart illustrating the analysis of cyenopyrafen residue in papaya.

六、液相層析串聯質譜分析條件

(一) 液相層析儀

層析管柱：Agilent ZORBAX SB-C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 µm)。保護管柱：Agilent Eclipse XDB-C8 (30 mm × 2.1 mm, 3.5 µm)。層析管柱溫度：50°C。流速：0.3 mL/min。注入量：5 µL。移動相：A 液含 0.1% 甲酸之 10 mM 甲酸銨水溶液；B 液含 0.5% 甲酸之氰甲烷溶液。移動相梯度分析條件，如表二。

(二) 串聯質譜儀

離子源：採用電灑離子化 (ESI+)。

離子噴霧電壓 (ion spray voltage)：4,500

V。

溶媒揮散溫度 (desolvation temperature)：325°C。

溶媒揮散流速 (desolvation flow)：600 L/hr。

表二、液相層析移動相梯度條件

Table 2. HPLC gradient conditions used for separation cyenopyrafen

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%) ¹⁾	Mobile phase B (%) ²⁾
0.0	0.3	90	10
2.0	0.3	0	100
8.0	0.3	0	100
10.0	0.3	90	10

¹⁾ Mobile phase A solution: 0.1% formic acid in 10 mM ammonium formate solution.

²⁾ Mobile phase B solution: 0.5% formic acid in cyanomethane.

偵測模式：多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM)。

分析參數：偵測離子對、進樣錐電壓與碰撞能量，如表三。

$= C \times V / W$ 。C：由基質匹配檢量線求得之濃度 ($\mu\text{g/mL}$)；V：檢液定容之體積 (mL)；W：檢體重量 (g)。

七、標準檢量線之製作

取標準工作溶液 0.005 ~ 0.2 mg/L，進行 LC/MS/MS 分析，以波峰面積對濃度作圖，繪製成標準檢量線。

九、添加回收試驗

取均質之木瓜檢體 10 g，加入 cyenopyrafen 標準溶液，使其濃度為 0.02、0.05 及 0.10 $\mu\text{g/g}$ ，依分析檢液之製備操作流程，以 LC/MS/MS 進行分析，同時進行空白試驗 (blank analysis) 作為對照分析比對，以檢液所測得 cyenopyrafen 離子碎片質量波峰之滯留時間及面積，分別與標準溶液比較鑑別並定量之，求出回收率⁽³⁾。

八、分析成分鑑定及含量測定

精確量取檢液及標準品溶液進行液相層析串聯質譜分析，依前述條件進行分析，測定檢液與標準品溶液所得波峰之滯留時間，及多重反應偵測相對離子強度依據歐盟規範 SANCO/12571/2013 (表四) 鑑定，並依下列計算式求得檢體中 cyenopyrafen 濃度 ($\mu\text{g/g}$)。檢體中 cyenopyrafen 濃度 ($\mu\text{g/g}$)

十、方法定量極限 (Limit of quantification, LOQ) 之評估

取均質之木瓜檢體 10 g，加入適量 cyenopyrafen 標準品溶液，依所建立之檢驗方

表三、cyenopyrafen 多重反應偵測之條件

Table 3. MRM parameters for analysis cyenopyrafen

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
cyenopyrafen	394.2	310.1, 254.1	189, 189	21, 29

表四、質譜分析之相對離子強度最大可容許範圍¹⁾

Table 4. Recommended maximum tolerances for ion ratios detected using LC/MS/MS¹⁾

Relative intensity (% of base peak)	LC/MS/MS Tolerance range (%)
> 50	± 30
20 ~ 50	± 30
10 ~ 20	± 30
< 10	± 30

¹⁾ Maximum acceptable tolerance ranges are in accordance with EU regulations defined in SANCO/12571/2013.

法步驟求得。測定離子訊號與雜訊之比值 (signal-to-noise ratio, S/N ratio) 要大於 10，作為方法定量極限之測定。

十一、基質效應 (matrix effect)

基質效應之探討，分別以下列方式建立檢量線：

1. 純溶劑檢量線 (standard calibration curve, SCC)：標準品溶於氫甲烷溶劑，配製濃度為 0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
2. 基質匹配檢量線 (matrix calibration curve, MCC)：取空白木瓜檢體最終萃取液添加標準品使其最終濃度為 0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
3. 基質效應計算公式如下：基質效應 = (MCC 之斜率 - SCC 之斜率) / SCC 之斜率 $\times 100\%$ 。

十二、儲存穩定性試驗

本研究以無殘留之木瓜檢體，加入 cyenopyrafen 標準品，使檢體添加濃度為 0.5、1.0、及 2.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，並儲存於 -18°C 低溫條件下，儲存間期為 120 天 (2016 年 09 月 05 日至 2017 年 01 月 03 日)，目的探討殘留樣品於儲存期間 cyenopyrafen 之穩定性表現。

結果與討論

一、質譜儀之最適分析條件

利用電灑游離法作為離子源，並以

MRM 模式檢測木瓜中 cyenopyrafen。溶媒揮散及進樣氣體皆為氬氣，離子噴霧電壓 (ionspray voltage) 為 4500V，溶媒揮散溫度 (desolvation temperature) 325°C ，溶媒揮散流速 (desolvation flow) 600 L/hr，選定之最佳進樣錐電壓 189 V，碰撞能量介於 21 ~ 29 eV。母離子於碰撞室 (collision cell) 以氬氣碰撞，誘導解離為子離子，再經由第二段質量分析器偵測合適之子離子，以獲得最大偵測感度，由母離子 A 碰撞誘導產生子離子 B，以 $A > B$ 表示，本研究 cyenopyrafen 之母離子為 m/z 394.2，子離子選定 m/z 310.1，及 m/z 254.1，其中 m/z 310.1 離子訊號較強作為定量，因此，本研究質譜鑑定參數選擇 $394.2 > 310.1$ 為定量離子對，及 $394.2 > 254.1$ 為定性離子對。其相對離子強度介於 0.44 ~ 0.46% 之間。cyenopyrafen 標準品溶液之總離子層析圖及質譜圖，如圖二。

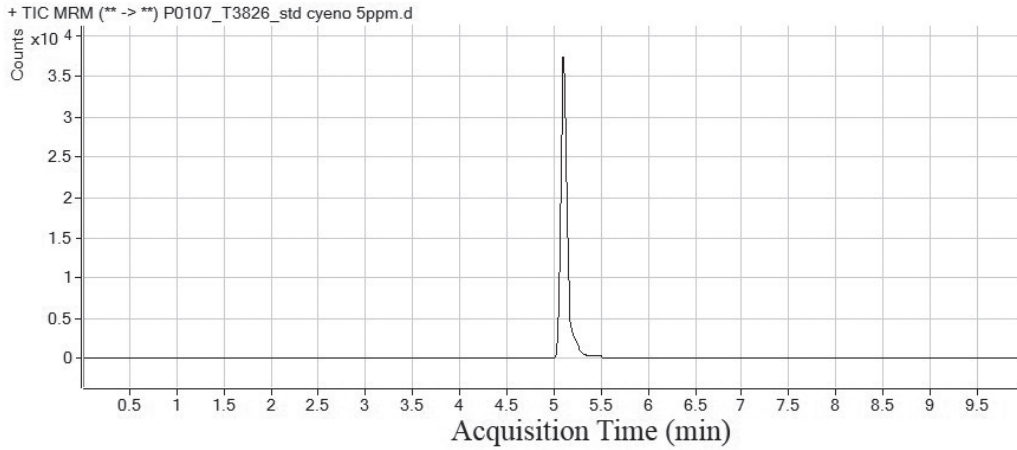
二、液相層析條件

採用層析管柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)。移動相採用二相混合梯度分析，移動相 A 液含 0.1% 甲酸之 10 mM 甲酸銨水溶液，及 B 液含 0.5% 甲酸之氫甲烷溶液，其梯度沖提條件，如表二。cyenopyrafen 批次分析滯留時窗介於 5.10 ~ 5.12 分鐘之間。

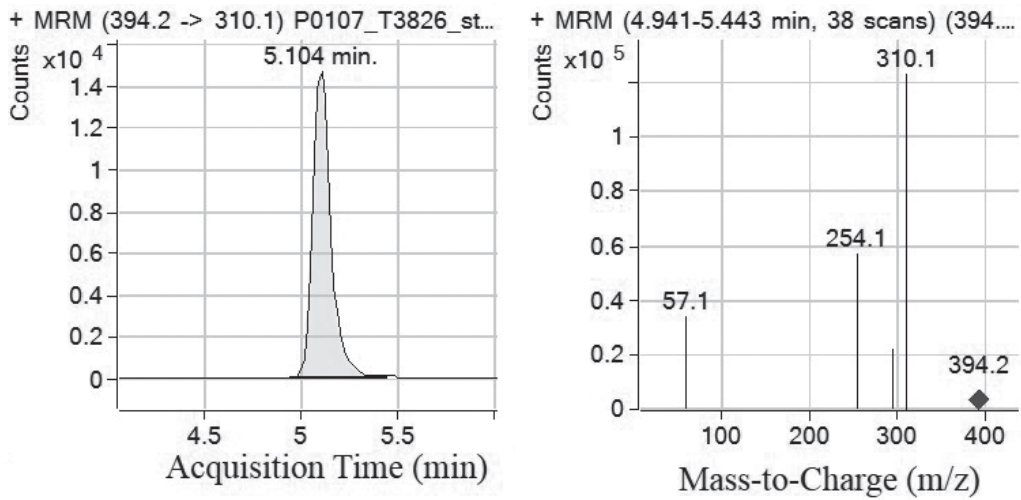
三、標準品檢量線與基質效應

標準品溶液 0.005 ~ 0.2 mg/L，製得檢

(A)



(B)



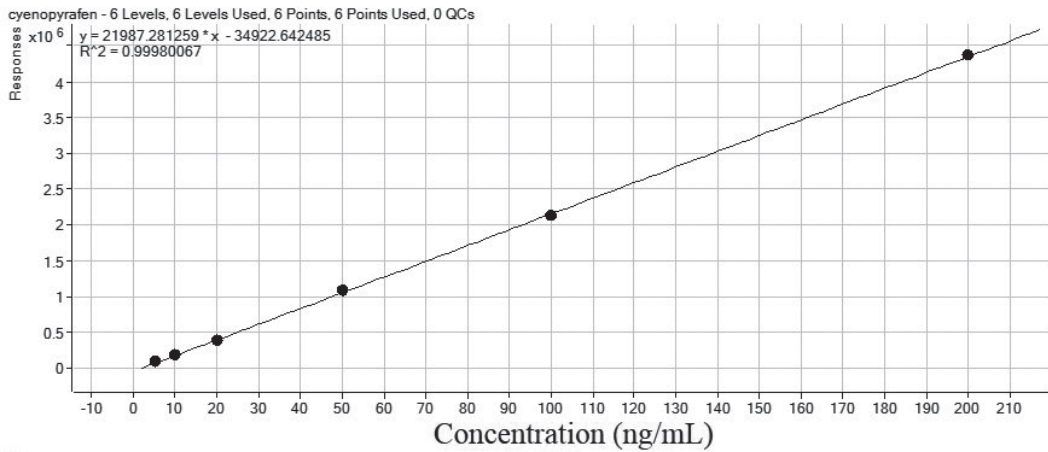
圖二、cyenopyrafen 標準品 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 (A) 總離子層析圖與 (B) 多重反應偵測質譜圖。

Fig. 2. (A) Representative total ion chromatogram (TIC) of 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cyenopyrafen, (B) Representative mass chromatogram determined through multiple reaction monitoring (MRM) of 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cyenopyrafen.

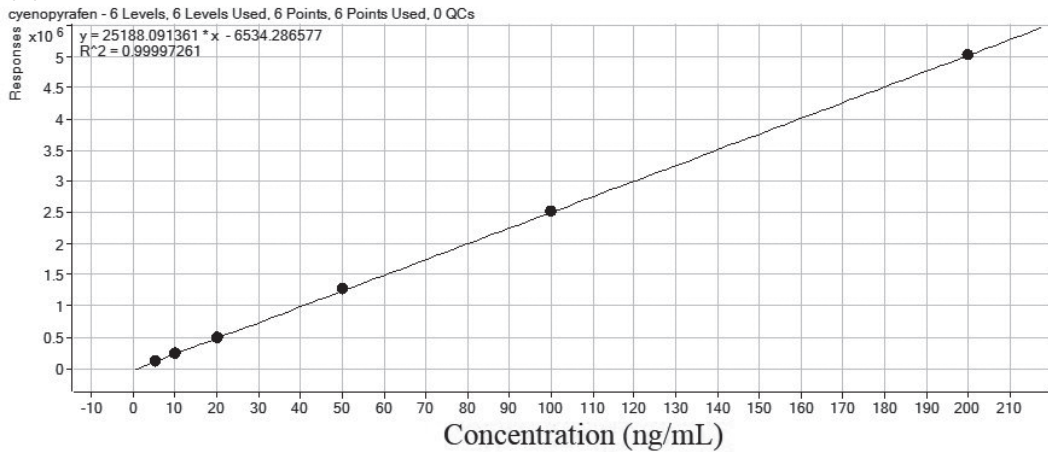
量線之判定係數 (R^2) 均大於 0.995，顯示於該濃度範圍內線性關係良好。為評估基質干擾物對分析物於質譜儀離子化之影響情形，分別製備標準品檢量線 (standard calibration curve, SCC)，及基質匹配標準品檢量線 (matrix calibration curve, MCC)，如圖

三，並比較其斜率。測得 SCC 檢量式為 $y = 21987.281259x - 34922.642485$ ，及 MCC 檢量式為 $y = 25188.091361x - 6534.286577$ ，利用 (基質效應 = (MCC 之斜率 - SCC 之斜率 / SCC 之斜率 × 100%) 計算公式，求得基質效應為 14.6%，結果顯示 cyenopyrafen 具

(A)



(B)



圖三、(A) 標準劑檢量線與 (B) 基質匹配標準劑檢量線。

Fig. 3. Calibration curves of cyenopyrafen in solvent (A) and in matrix (B).

基質增強效應 (matrix enhancement effect)。考量分析結果之準確性，本研究仍採基質匹配標準劑檢量線試驗結果作定量計算。

四、添加回收試驗

於木瓜檢體中分別加入 cyenopyrafen 標準品溶液，使其濃度為 0.02 $\mu\text{g/g}$ 、0.05 $\mu\text{g/g}$ 及 0.10 $\mu\text{g/g}$ ，依檢液之製備流程操作，添加平均回收率 (表五) 範圍介於 82.9 ~ 95.4% 之間，及相對標準偏差介於 1.8 ~ 6.1% 之間。方法之溶劑空白分析 (blank)，及基質空白分析 (control) 於 cyenopyrafen 滯留時窗內未檢出殘留，顯示方法之共同萃取物不會干擾分析鑑別之判定，分析試驗 BK、CK 與對照標準品之 LC/MS/MS 比較圖譜，如圖四。

五、方法定量極限

本檢驗方法 cyenopyrafen 之定量可至 0.01 $\mu\text{g/g}$ ，係將對照樣品實際添加濃度 0.01 $\mu\text{g/g}$ 經檢測方法步驟求得。並測得其定量離子之訊噪比 (signal to noise ratio, S/N ratio) 為 218 ~ 371，定性離子對之訊噪為 196 ~ 252。

六、儲存穩定性試驗

基質添加 cyenopyrafen 標準品儲存試驗濃度為 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/g}$ ，儲存間期為 120 d，測得各種儲存濃度回收率 (及相對標準偏差，n = 3) 分別為 0.5 $\mu\text{g/g}$ 75.0% (11.3%)、1.0 $\mu\text{g/g}$ 79.8% (10.8%) 及 2.0 $\mu\text{g/g}$ 84.1% (9.4%) (表六)，顯示添加樣品於低溫條件 (低於 -18 $^{\circ}\text{C}$) 儲存期間 cyenopyrafen 殘留量可供參考依據。

結論

以含 1% 醋酸之氫甲烷溶液萃取木瓜中 cyenopyrafen，及利用液相層析串聯質譜儀 (LC/MS/MS) 進行定性定量測定。cyenopyrafen - 基質匹配之檢量線性相關係數 0.999，基質效應為 14.6%，具基質增強效應 (matrix enhancement effect)；定量極限為 0.01 $\mu\text{g/g}$ ；添加平均回收率為 82.9 ~ 95.4%，及相對標準偏差 1.8 ~ 6.1%；儲存穩定性試驗濃度 1.0 $\mu\text{g/g}$ 回收率 (及相對標準偏差，n = 3) 為 79.8% (10.8%)，可提供殘留樣品至少 120 天的冷凍條件保存下，其殘留量可供

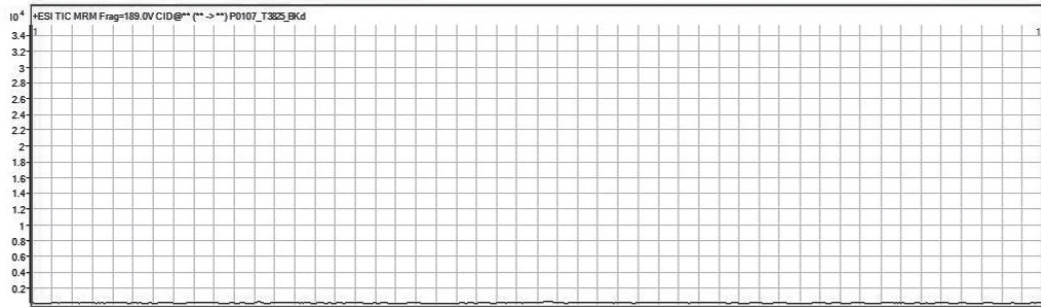
表五、cyenopyrafen 添加回收試驗結果

Table 5. Results of recovery tests of cyenopyrafen added to samples

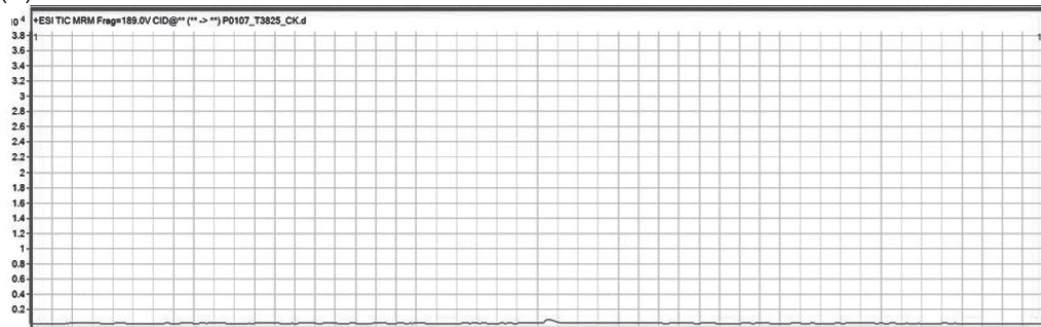
Concentration of cyenopyrafen in papaya sample ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Recovery rate range (%)	Average recovery rate (%)	Relative standard deviation (%)	Number of repetitions
0.02	80.9 ~ 86.4	82.9	3.1	5
0.05	79.6 ~ 91.6	84.9	6.1	5
0.10	93.1 ~ 97.6	95.4	1.8	5

¹⁾ The standard addition of sample per gram.

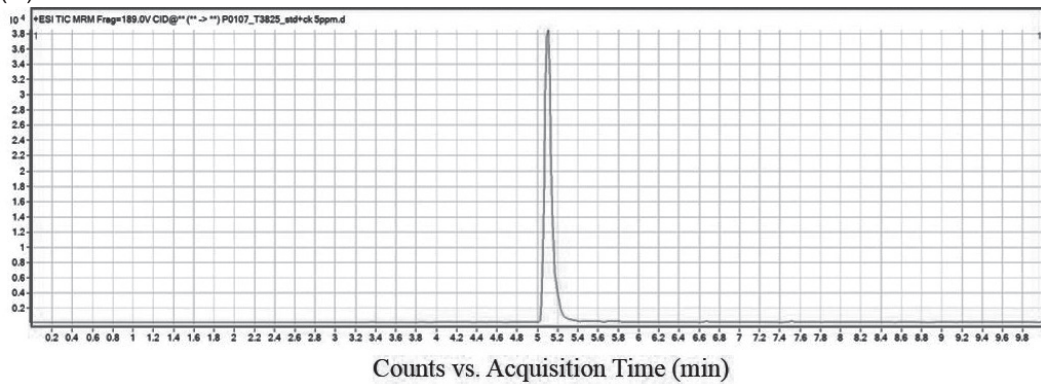
(A)



(B)



(C)



圖四、(A) 空白試劑、(B) 空白基質、與 (C) cyenopyrafen 標準品基質匹配 (0.005 $\mu\text{g/mL}$) LC/MS/MS 分析圖譜。

Fig. 4. Representative mass chromatograms of (A) reagent blank, (B) matrix blank, and (C) papaya matrix spiked with cyenopyrafen at 0.005 $\mu\text{g/mL}$.

表六、cyenopyrafen 添加儲存穩定試驗結果

Table 6. Results of fortified recovery test to determine the storage stability of cyenopyrafen

Storage interval (Days)	Concentration of cyenopyrafen in papaya sample ($\mu\text{g/g}$)	Average recovery rate (% , n = 3)	Relative standard deviation (% , n = 3)
120	0.5	75.0	11.3
120	1.0	79.8	10.8
120	2.0	84.1	9.4

參考依據。本分析方法操作流程簡易，方法確效結果分析靈敏度及精確度均佳，可應用於木瓜中 cyenopyrafen 之殘留量監測。

謝辭

本研究承蒙藥毒所殘毒管制組殘留消退研究室王素如、林貞伶、張沛琳及賴雅莉小姐協助試驗工作，謹致謝忱。

引用文獻

1. 楊國璋。2014。新型吡啶類殺蟎劑——腈吡蟎酯。世界農藥 36(6)：56, 60。
2. 衛生福利部食品藥物管理署。2014。食品中殘留農藥檢驗方法——多重殘留分析方法(五)。中華民國 103 年 7 月 3 日部授食字第 1031900615 號修正。
3. European Committee for Standardization. 2008. Foods of plant origin -- Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method. DIN EN15662: 2008.
4. European committee Health and Consumer Protection Directorate-General. 2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013.
5. The Japan Food Chemical Research Foundation. Table of MRLs for agricultural chemicals (cyenopyrafen). Available at: http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=256500
6. Turner, J. A. [ed.] 2015. The pesticide manual: a world compendium, 17th ed. British Crop Protection Council, Alton, Hampshire, UK. 1357 pp.

Novel Method for the Determination of Cyenopyrafen Residue in Papaya Using LC/MS/MS

Yueh-Yu Lo¹, Wei-Chih Liao¹, Hui-Chi Chen^{1*}, Tsyr-Horng Shyu¹

Abstract

Lo, Y.Y., Liao, W.C., Chen, H. C., and Shyu, T. H. 2017. Novel method for the determination of cyenopyrafen residue in papaya using LC/MS/MS. *Taiwan Pestic. Sci.* 2: 11-23.

In this study, we developed an effective analytical method for residue analysis of cyenopyrafen, an insecticide that belongs to the pyrazole class of chemical compounds. Specifically, our proposed method uses liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to quantify cyenopyrafen residues in papaya. In brief, under our method cyenopyrafen residues are extracted from papaya matrices using 0.1% acetic acid in acetonitrile. Chromatographic separation is then performed using an Agilent ZORBAX SB-C18 column in gradient elution mode at 50°C. The mobile phase comprises 0.1% formic acid in 10 mM ammonium formate solution and 0.5% formic acid in acetonitrile at a constant flow rate of 0.3 mL/min. Quantification is performed by reversed phase HPLC with electrospray MS/MS-detection. We found that, at fortified levels of 0.02, 0.05 and 0.10 µg/g cyenopyrafen in papaya, average recovery rate ranged from 82.9 to 95.4%, and relative standard deviation ranged from 1.8 to 6.1%. The limit of quantification (LOQ) was determined to be 0.01 µg/g. Results of this study indicate that our proposed analytical method can easily detect low levels of cyenopyrafen with good precision and sensitivity. Our method could be applied in regulatory and monitoring applications of cyenopyrafen in papaya.

We also studied the frozen storage stability of cyenopyrafen residue in papaya. After fortifying papaya with cyenopyrafen concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 µg/g, the samples were placed in a temperature-monitored freezer and stored at approximately -18°C. Fortified recoveries of cyenopyrafen in papaya ranged from 75.0 to 84.1% after a storage period of 120 days. These results indicate that cyenopyrafen residues are stable in papaya matrices for at least 120 days when stored under the frozen conditions that are typically employed for actual residue samples. The temperature-monitored

Accepted: March 27, 2017.

* Corresponding author, Email: wjchen@tactri.gov.tw

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

freezer at approximately -18°C for frozen storage. The results of the fortified recoveries ranged from 75.0 to 84.1% after 120 days storage, which indicate that the residues of cyenopyrafen are stable in papaya matrices for at least 120 days when stored under frozen conditions typically employed for actual residue samples.

Key words: papaya, storage stability, LC-MS/MS, cyenopyrafen.

