

成品農藥中植物生長調節劑多重檢測分析方法之建立

許廷豪¹、劉必謙¹、黃鎮華^{1*}、初建¹、徐慈鴻¹

摘要

許廷豪、劉必謙、黃鎮華、初建、徐慈鴻。2022。成品農藥中植物生長調節劑多重檢測分析方法之建立。臺灣農藥科學 12 : 79-94。

植物生長調節劑為具有植物荷爾蒙功能之天然或人工合成物質，可調節植物生長與發育。依據農藥管理法第七條第二款及農藥標準規格準則第三條附表六，成品農藥中摻雜巴克素、移植生長素、單克素、番茄生長素、開寧激素、福芬素、氟氯比 7 種植物生長調節劑有效成分之限量基準為 0.01%、摻雜快克草之限量基準依不同劑型為 3% 或 0.1%、8 種植物生長調節劑之檢測極限為 0.001%。目前檢驗成品農藥摻雜該等植物生長調節劑有效成分時，皆為單一成分分析方法，本研究利用液相層析串聯質譜儀開發多重分析方法，可同時分析成品農藥中 8 種植物生長調節劑。供試成品農藥以甲醇為稀釋溶劑，經超音波振盪萃取，再經濾膜過濾後以液相層析串聯質譜儀搭配多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式分析。於 15 分鐘內同時分析 8 種植物生長調節劑，分析過程每分鐘流速 0.3 mL/min。本分析方法檢量線迴歸決定係數 (R^2 值) 均可達 0.997 以上，針對常見不同劑型之植物生長調節劑進行回收率試驗，高濃度 (0.4 $\mu\text{g/mL}$) 回收率為 79.2~121%，低濃度 (0.05 $\mu\text{g/mL}$) 回收率為 76.5~122%。精密性配製標準液 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，重複注入分析 6 次求其相對標準偏差為 2.39~3.46%。巴克素等 8 種植物生長調節劑方法定量極限為 0.001%，達法規檢測極限。利用本方法檢測市售 6 件植物生長調節劑成品農藥，巴克素等 8 種成分之含量均低於法規檢測極限。相較於現行分析成品農藥中摻雜植物生長調節劑之方法，須以氣相或液相層析質譜儀定性，再分別以各農藥有效成分公告檢驗方法定量；本方法以液相層析串聯質譜儀同時進行 8 種成分之定性定量，能有效節省人力、時間及溶劑成本。

關鍵詞：植物生長調節劑、多重分析方法、液相層析串聯質譜儀

接受日期：2022 年 5 月 11 日

* 通訊作者。E-mail: chhuang@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

植物荷爾蒙 (plant hormone) 是指由植物體內代謝生成，從合成部位運輸至作用位置後，於低濃度下即可顯著調節植物生長與發育之有機化合物，且不包括營養物質如醣類等。其功能包括促進細胞分裂、組織與器官分化、開花與結實、成熟與老化、休眠與萌發等⁽⁶⁾。植物生長調節劑 (plant growth regulator, PGR) 則是指具有植物荷爾蒙功能之天然或人工合成物質。

由於植物生長調節劑具調節農作物生長並可影響其生理作用，符合我國農藥管理法對於農藥之定義，其產品亦須符合相關法規之規範。依據我國農藥管理法第七條第二款所定摻雜其他有效成分含量之限量基準⁽⁴⁾及農藥標準規格準則第三條附表六⁽⁵⁾，成品農藥中摻雜巴克素 (paclobutrazol)、移植生長素 (2-(1-naphthyl) acetamide)、番茄生長素 (4-chlorophenoxyacetic acid(4-CPA))、單克素 (uniconazole-P)、開寧激素 (kinetin)、福芬素 (forchlorfenuron)、氟氯比 (fluroxypyr-mepty) 等 7 種植物生長調節劑有效成分之限量基準為 0.01%、摻雜快克草 (quinclorac) 之限量基準依不同劑型為 3% 或 0.1%、8 種植物生長調節劑之檢測極限為 0.001%，若成品農藥中檢出上述藥劑含量高於限量基準視為偽農藥，高於檢測極限而在限量基準以下則視為劣農藥。由於現行分析成品農藥中摻雜植物生長調節

劑之方法皆是以個別方法分析單一藥劑，例如：檢驗成品農藥中摻雜巴克素、番茄生長素含量時，分別以各該藥劑之公告有效成分檢驗方法檢驗之^(2, 3)，若能以多重分析方法同時分析多個藥劑，則能有效節省人力、時間、溶劑成本。目前植物生長調節劑之多重分析多見於蔬果中多重農藥殘留分析方法，如 Hanot 等人發表利用含醋酸胺之甲醇/水溶液作為萃取溶劑，以液相層析串聯質譜儀建立蔬果中巴克素、快克草等 200 種農藥殘留分析方法⁽⁹⁾、Oulkar 等人以酸化之甲醇作為萃取溶液，以液相層析串聯質譜儀分析葡萄中開寧激素、福芬素、巴克素等 12 種植物生長調節劑殘留量⁽¹¹⁾等，本研究參考文獻^(1, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14)建立串聯質譜分析條件，並參考衛生福利部公告之食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法(五)⁽⁷⁾建立液相層析儀分析條件，目標為利用液相層析串聯質譜儀開發一多重檢驗方法，以應用於同時檢測我國成品農藥樣品中，8 種植物生長調節劑是否符合法規標準。

材料與方法

一、材料

(一) 標準品、試藥、耗材與溶劑

1. 巴克素標準品 (純度 99.8 %，Fluka)、移植生長素標準品 (純度 99 %，RDH)、單克素標準品 (純度 98 %，Wako)、

- 番茄生長素標準品 (純度 99.8 % , Fluka)、開寧激素標準品 (純度 99% , SIGMA)、福芬素標準品 (純度 99.9 % , SIGMA)、快克草標準品 (純度 97 % , World Vision)、氟氯比標準品 (純度 99.3% , Lier)。
2. 方法回收率使用之樣品為市售成品農藥樣品：巴克素 23% 水懸劑、快克草 22% 水懸劑、勃激素 A3 10% 水溶性粉劑、氟氯比 29.64% 乳劑、三氯比 61.6% 乳劑、快克草 50% 可濕性粉劑 (表一)。摻雜分析樣品為市售成品農藥樣品：氟氯比 29.64% 乳劑、三氯比 61.6% 乳劑、勃激素 A3 10% 水溶性粉劑、2,4-D 80% 水溶性粉劑、快克草 50% 可濕性粉劑 (表二)。
3. 甲醇 (methanol) 為 HPLC 級 (Merck, Germany)。
4. 甲酸 (formic acid) 為分析級試藥 (Merck, Germany)。
5. 醋酸銨 (ammonium acetate) 為分析級試藥 (Merck, Germany)。
6. 去離子水，研究室內經由 Millipore 公司的 Milli Q 水淨化系統製造，經 0.22 μm millipore 過濾，比電阻 18.2 $\text{M}\Omega\text{-cm}$ 。

表一、方法回收率使用之樣品

Table 1. Pesticide formulation samples for recovery test

| Pesticide Name | Pesticide Formulation | Active Ingredient (%) | Year of Manufacture |
|-------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| Paclobutrazol | Suspension concentrate | 23 | 2016 |
| Quinclorac | Suspension concentrate | 22 | 2015 |
| Gibberellic acid | Water soluble powder | 10 | 2015 |
| Fluroxypyr-meptyl | Emulsifiable concentrate | 29.64 | 2015 |
| Triclopyr-butotyl | Emulsifiable concentrate | 61.6 | 2015 |
| Quinclorac | Wettable powder | 50 | 2016 |

表二、分析測試樣品

Table 2. Pesticide formulation samples for analysis.

| Pesticide Name | Pesticide Formulation | Active Ingredient (%) | Year of Manufacture |
|-------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| Fluroxypyr-meptyl | Emulsifiable concentrate | 29.64 | 2016 |
| Triclopyr-butotyl | Emulsifiable concentrate | 61.6 | 2016 |
| Gibberellic acid | Water soluble powder | 10 | 2016 |
| 2,4-D | Water soluble powder | 80 | 2016 |
| Quinclorac | Wettable powder | 50 | 2016 |
| Gibberellic acid | Water soluble powder | 10 | 2015 |

7. 0.2 μm 親水性聚丙烯 (hydrophilic polypropylene, GHP) 過濾膜 (PALL Life Science GHP 13 mm Acrodisc), 直徑 13 mm。
8. 0.2 μm 混合纖維素酯 (mixed cellulose esters) 過濾膜 (ADVANTEC), 直徑 47 mm。
9. 0.2 μm 聚四氟乙烯 (polytetrafluoroethylene, PTFE) 過濾膜 (ADVANTEC), 直徑 47 mm。

(二) 儀器設備與器皿

1. 超音波振盪裝置 (頻率 40~50 kHz) (BRANSON 5510, USA)。
2. 精密天平, $d = 0.1 \text{ mg}$ (METTLER TOLEDO, XS204, Switzerland)。
3. 精密天平, $d = 0.01 \text{ mg}$ (METTLER TOLEDO, XS204, Switzerland)。
4. 液相層析串聯質譜儀 (WATERS Premier UPLC MSMS)
5. 定量瓶
6. 刻度吸管
7. 微量吸管

二、方法

(一) 動相之配製

動相 A：含 0.1% 甲酸之 5 mM 醋酸銨水溶液，秤取 0.3933 g 醋酸銨以去離子水洗入 1,000 mL 定量瓶中，加入約 900

mL 去離子水使醋酸銨溶解後，以刻度吸管量取 1 mL 甲酸加入定量瓶中，再以去離子水定容至刻度，混合均勻後以 0.2 μm 混合纖維素酯濾膜過濾備用。

動相 B：5 mM 醋酸銨甲醇，秤取 0.3933 g 醋酸銨以甲醇洗入 1,000 mL 定量瓶中，加入約 900 mL 甲醇使醋酸銨溶解後以甲醇定容至刻度，混合均勻後以 0.2 μm 聚四氟乙烯濾膜過濾備用。

動相梯度條件，如 (表三)。

(二) 儀器分析條件

1. 管柱：Acquity BEH C18 2.1 \times 100 mm, 1.7 μm
2. 流速：0.3 mL/min
3. 注入量：5 μL
4. 分析溫度：50°C

表三、液相層析移動相梯度條件

Table 3. HPLC gradient conditions

| Time (min) | Flow rate (mL/min) | Mobile phase ¹⁾ A (%) | Mobile phase ²⁾ B (%) |
|------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 0.3 | 99 | 1 |
| 2 | 0.3 | 50 | 50 |
| 8 | 0.3 | 30 | 70 |
| 10 | 0.3 | 10 | 90 |
| 12 | 0.3 | 1 | 99 |
| 13 | 0.3 | 1 | 99 |
| 13.5 | 0.3 | 99 | 1 |
| 15 | 0.3 | 99 | 1 |

¹⁾ Mobile phase A solution: 0.1% formic acid in 5 mM ammonium acetate solution

²⁾ Mobile phase B solution: 5 mM ammonium acetate methanol

5. Source: 120°C、Desolvation temperature: 400°C、電噴灑電壓 3000 V、Desolvation gas flow 900 L/hr、Cone flow 50 L/hr

(三) 標準液及檢量線之配製

精確秤取巴克素等 8 種植物生長調節劑標準品 10 mg 分別置入 10 mL 定量瓶中，加入約 9 mL 甲醇，以超音波振盪 10 分鐘使之溶解，回至室溫後以甲醇定容至刻度，為 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 儲存標準液，再以 1 mL 刻度吸管分別量取 1 mL 8 種植物生長調節劑之 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 儲存標準液，置入 100 mL 定量瓶中，以甲醇定容至刻度，使成含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 8 種植物生長調節劑之混合儲存標準液，再以 10 mL 刻度吸管量取此混合儲存標準液 10 mL 置入 100 mL 定量瓶中，以甲醇定容至刻度，使成含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 8 種植物生長調節劑之混合儲存標準液。檢量線之配製：以 1 mL 刻度吸管精確量取 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 之 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合儲存標準液分別置入 10 mL 定量瓶中，以甲醇定容至刻度，使成含 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之混合操作標準液，以 0.2 μm 親水性聚丙烯過濾膜過濾備用。

(四) 基質匹配檢量線配製

以 5 mL 刻度吸管分別量取 (三) 配製之 8 種 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 植物生長調節劑

儲存標準液各 5 mL，置入 100 mL 定量瓶中，以甲醇定容至刻度，使成含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 8 種植物生長調節劑之混合操作標準液。再以刻度吸管分別量取 0.2、1、2、4 mL 此 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合操作標準液，分別置入 10 mL 定量瓶中，以甲醇定容至刻度，使成含 1、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合操作標準液。另外取選定之市售 4 種劑型之植物生長調節劑樣品共 6 件(水懸劑樣品為巴克素 23% 及快克草 22%、水溶性粉劑為勃激素 A3 10%、乳劑樣品為氟氯比 29.64% 及三氯比 61.6%、可濕性粉劑樣品為快克草 50%)，分別秤取 0.25 g 之樣品置入 50 mL 定量瓶中，加入 40 mL 甲醇，以超音波振盪至完全溶解後，回至室溫，以甲醇定容至刻度。以微量吸管量取上述 1、5、10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合操作標準液各 0.05 mL，置入 5 mL 定量瓶中，重複上述步驟 5 次，再將配製之 6 組植物生長調節劑樣品甲醇溶液，以 0.2 μm 親水性聚丙烯過濾膜過濾後，每一種樣品過濾液定容一組混合操作標準液定量瓶，共得 6 組不同樣品基質之 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 基質匹配混合操作標準液。

(五) 回收率標準品添加暨前處理過程

分別秤取 (四) 中 6 件植物生長調節劑之樣品 (水懸劑樣品為巴克素 23% 及快克草 22%、水溶性粉劑為勃激素 A3 10%、乳劑樣品為氟氯比 29.64% 及三氯

比 61.6%、可濕性粉劑樣品為快克草 50%) 0.05 g，置入 10 mL 定量瓶中，每個樣品秤取 6 重複，共得 6 組，每一組再以 3 重複為單位分為 2 組，以刻度吸管分別量取 (三) 配製之 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 8 種植物生長調節劑之混合儲存標準液 0.5 mL 加入其中 3 重複定量瓶中，另 3 重複則分別加入 4 mL 混合儲存標準液，靜置 10 分鐘，加入適量甲醇，以超音波振盪 10 分鐘使其溶解，回至室溫，以甲醇定容至刻度，為含 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 8 種植物生長調節劑之低濃度回收率檢液及 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 8 種植物生長調節劑之高濃度回收率檢液，以 0.2 μm 親水性聚丙烯過濾膜過濾備用。

(六) 市售農藥樣品檢液配製

市售農藥樣品來自彰化、臺南、臺東等地，6 件植物生長調節劑樣品秤取約 0.05 g 之樣品至 10 mL 定量瓶加入 9 mL 之甲醇，超音波振盪 10 分鐘，回至室溫，以甲醇定容至刻度，以 0.2 μm 親水性聚丙烯過濾膜過濾備用。

結果與討論

一、檢量線分析

配製巴克素、移植生長素、番茄生長素、單克素、開寧激素、福芬素、快克草、氟氯比 8 種農藥檢量線 5 點濃度：0.01、0.05、0.1、0.2 及 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，取 5 μL

注入儀器分析，其中巴克素、移植生長素、單克素、開寧激素、福芬素、快克草、氟氯比以正離子模式分析，番茄生長素以負離子模式分析，各濃度有效成分之訊號／雜訊比 (signal-to-noise ratio, S/N ratio) 均大於 10，各成分滯留時間、多重反應偵測之條件及多重反應偵測質譜圖如 (表四)、(表五) 及 (圖一) 所示。以有效成分濃度為 X 軸，波峰面積為 Y 軸進行迴歸分析，結果顯示 8 種植物生長調節劑其迴歸決定係數 (R^2) 均可達 0.997 以上 (表六)。

二、回收率試驗

為確認本方法於分析市售植物生長調節劑成品農藥摻雜巴克素等 8 種植物生長調節劑之準確性，選擇市面上常見植物生長調節劑劑型 4 種包含水懸劑、水溶性粉劑、乳劑及可濕性粉劑，各劑型選用常見藥劑進行回收率試驗。水懸劑樣品使用巴

表四、8 種植物生長調節劑有效成分滯留時間

Table 4. Retention times for active ingredients of 8 PGRs

| Active ingredient | Retention time (min) |
|----------------------------|----------------------|
| 4-chlorophenoxyacetic acid | 3.65 |
| Forchlorfenuron | 4.97 |
| Kinetin | 2.96 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | 3.65 |
| Pacllobutrazol | 6.59 |
| Uniconazole-P | 7.96 |
| Quinclorac | 3.19 |
| Fluroxypyr-meptyl | 10.81 |

克素及快克草、水溶性粉劑樣品使用勃激素 A3、乳劑樣品使用氟氯比及三氯比、可濕性粉劑使用快克草。秤取約 0.05 g 之樣品至 10 mL 定量瓶，進行低濃度及高濃度添加回收試驗，低濃度回收率於樣品檢液中添加 1 $\mu\text{g/mL}$ 巴克素等 8 種植物生長調節劑混合儲存標準液 0.5 mL、高濃度回收率則添加 4 mL，以甲醇定容至刻度，使 8 種植物生長調節劑濃度為 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ，添加濃度值之選擇依據農

表五、多重反應偵測之條件

Table 5. MRM parameters

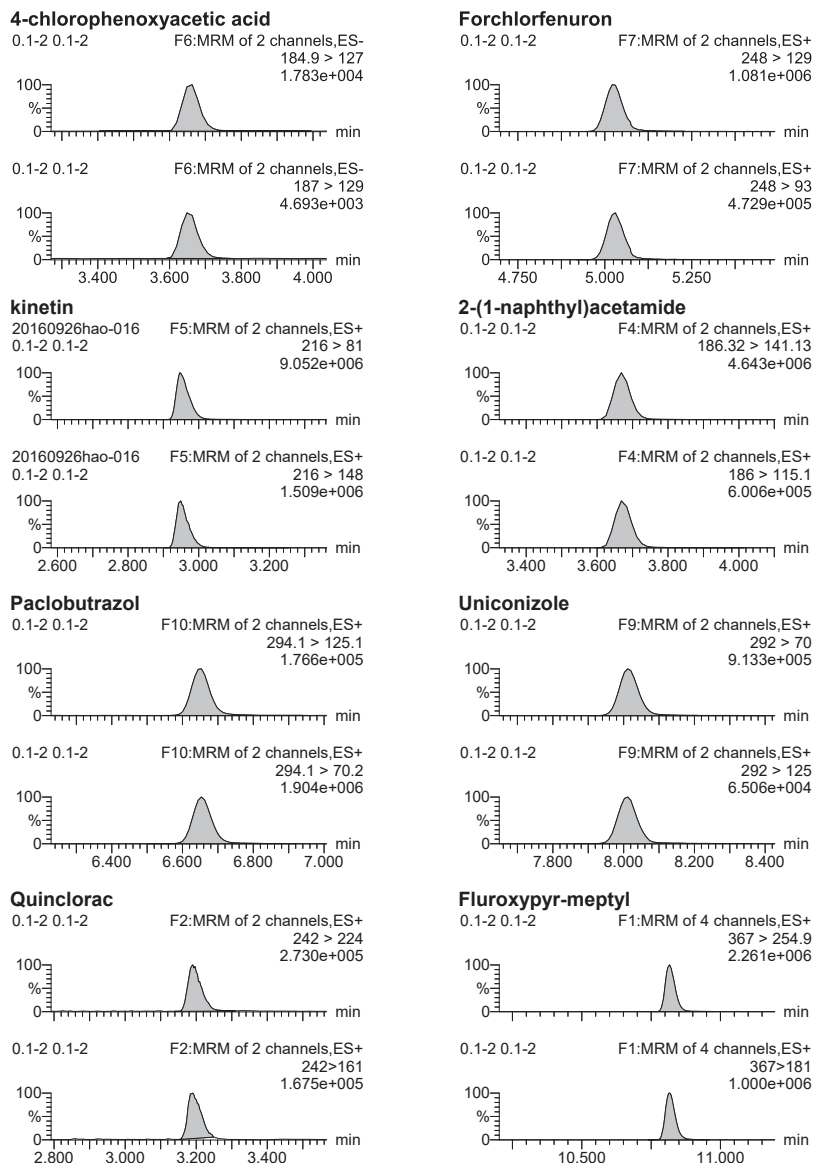
| Active ingredient | Ion mode | MRM transition (<i>m/z</i>) | Dwell time (S) | Cone voltage (V) | Collision energy (eV) |
|----------------------------|----------|----------------------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|
| 4-chlorophenoxyacetic acid | negative | 185 > 127 ¹⁾ | 0.25 | 24 | 12 |
| | | 187 > 129 | 0.25 | 20 | 16 |
| Forchlorfenuron | positive | 248 > 129 ¹⁾ | 0.03 | 25 | 15 |
| | | 248 > 93 | 0.03 | 25 | 35 |
| Kinetin | positive | 216 > 81 ¹⁾ | 0.05 | 20 | 17 |
| | | 216 > 148 | 0.05 | 20 | 17 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | positive | 186 > 141 ¹⁾ | 0.15 | 30 | 15 |
| | | 186 > 115 | 0.15 | 16 | 28 |
| Paclobutrazol | positive | 294 > 125 ¹⁾ | 0.25 | 27 | 38 |
| | | 294 > 70 | 0.25 | 27 | 20 |
| Uniconazole-P | positive | 292 > 70 ¹⁾ | 0.25 | 38 | 20 |
| | | 292 > 125 | 0.25 | 38 | 22 |
| Quinclorac | positive | 242 > 224 ¹⁾ | 0.02 | 25 | 19 |
| | | 242 > 161 | 0.02 | 25 | 33 |
| Fluroxypyr-meptyl | positive | 367 > 255 ¹⁾ | 0.021 | 12 | 11 |
| | | 367 > 181 | 0.021 | 12 | 32 |

¹⁾ quantitative ion

表六、8 種植物生長調節劑檢量線回歸決定係數

Table 6. Coefficient of determination for calibration curves of 8 PGRs

| Active ingredient | Coefficient of determination (R^2) |
|----------------------------|--|
| 4-chlorophenoxyacetic acid | 0.9992 |
| Forchlorfenuron | 0.9979 |
| Kinetin | 0.9987 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | 0.9991 |
| Paclobutrazol | 0.9993 |
| Uniconazole-P | 0.9998 |
| Quinclorac | 0.9999 |
| Fluroxypyr-meptyl | 0.9999 |



圖一、巴克素、移植生長素、單克素、番茄生長素、開寧激素、福芬素、快克草、氟氯比標準品 0.1 µg/mL 之多重反應偵測質譜圖。

Fig. 1. Representative mass chromatograms determined through multiple reaction monitoring (MRM) of standards for 0.1 µg/mL Paclobutrazol, 2-(1-naphthyl)acetamide, Uniconazole-P, 4-chlorophenoxyacetic acid(4-CPA), Kinetin, Forchlorfenuron, Quinclorac, and Fluroxypyr-meptyl.

藥標準規格準則第三條附表六所訂成品農藥中含其他有效成分巴克素等 8 種植物生長調節劑之檢測極限 0.001%，以確認樣品於該分析濃度下之準確性。依樣品取樣克數、稀釋體積及添加濃度計算：

$$0.05 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times \frac{\text{g}}{10^6 \mu\text{g}} \times \frac{1}{0.05 \text{ g}} \times 100(\%)$$

低濃度回收率之添加濃度 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 相當於秤取樣品中含 0.001% 之 8 種植物生長調節劑；高濃度回收率則選擇低濃度值

之 8 倍作為添加濃度。分析結果與添加理論濃度相除計算回收率，水懸劑樣品中 8 種植物生長調節劑之高低濃度回收率分別為 79.2~113% 及 80.0~108%、水溶性粉劑樣品中 8 種植物生長調節劑高低濃度回收率分別為 89.9~114% 及 96.1~118%、乳劑樣品中 8 種植物生長調節劑高低濃度回收率分別為 91.7~121% 及 76.6~122%、可濕性粉劑樣品中 7 種植物生長調節劑高低濃度回收率分別為 81.5~107% 及 76.5~118% (表七至表十二)。

表七、7 種植物生長調節劑於巴克素 23% 水懸劑樣品之回收率

Table 7. Recoveries of 7 PGRs in 23% paclobutrazol suspension concentrate

| Active ingredient | Paclobutrazol 23% SC | | | |
|-----------------------------|-----------------------|-------|----------------------|-------|
| | 0.05 $\mu\text{g/mL}$ | CV(%) | 0.4 $\mu\text{g/mL}$ | CV(%) |
| 4-chlorophenoxyacetic acid | 89.9 | 12 | 92.9 | 2 |
| Forchlorfenuron | 108 | 4 | 113 | 1 |
| Kinetin | 85.2 | 6 | 105 | 1 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | 91.2 | 1 | 95.3 | 2 |
| Paclobutrazol | - | - | - | - |
| Uniconazole-P ¹⁾ | 95.3 | 2 | 92.3 | 2 |
| Quinclorac ¹⁾ | 86.2 | 6 | 110 | 4 |
| Fluroxypyr-meptyl | 106 | 2 | 106 | 1 |

¹⁾ Recovery determined by matrix-matched calibration curve

表八、7 種植物生長調節劑於快克草 22% 水懸劑樣品之回收率

Table 8. Recoveries of 7 PGRs in 22% quinclorac suspension concentrate

| Active ingredient | Quinclorac 22% SC | | | |
|-----------------------------|-----------------------|--------|----------------------|--------|
| | 0.05 $\mu\text{g/mL}$ | CV (%) | 0.4 $\mu\text{g/mL}$ | CV (%) |
| 4-chlorophenoxyacetic acid | 95.9 | 7 | 104 | 8 |
| Forchlorfenuron | 105 | 4 | 101 | 6 |
| Kinetin | 86.8 | 3 | 99.5 | 6 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | 85.3 | 3 | 86.6 | 3 |
| Paclobutrazol ¹⁾ | 91.5 | 2 | 92.1 | 2 |
| Uniconazole-P ¹⁾ | 87.8 | 5 | 82.2 | 5 |
| Quinclorac | - | - | - | - |
| Fluroxypyr-meptyl | 80.0 | 8 | 79.2 | 4 |

¹⁾ Recovery determined by matrix-matched calibration curve

表九、8 種植物生長調節劑於勃激素 A3 10% 水溶性粉劑樣品之回收率

Table 9. Recoveries of 8 PGRs in 10% gibberellic acid water soluble powder

| Active ingredient | Gibberellic acid 10% SP | | | |
|-----------------------------|-------------------------|--------|-----------|--------|
| | 0.05 µg/mL | CV (%) | 0.4 µg/mL | CV (%) |
| 4-chlorophenoxyacetic acid | 118 | 7 | 114 | 3 |
| Forchlorfenuron | 103 | 7 | 107 | 5 |
| Kinetin ¹⁾ | 99.5 | 3 | 101 | 2 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | 99.7 | 3 | 102 | 3 |
| Pacllobutrazol | 117 | 5 | 107 | 5 |
| Uniconazole-P ¹⁾ | 96.1 | 3 | 89.9 | 4 |
| Quinclorac | 113 | 6 | 99.4 | 8 |
| Fluroxypyr-meptyl | 110 | 8 | 105 | 5 |

¹⁾ Recovery determined by matrix-matched calibration curve

表十、7 種植物生長調節劑於氟氯比 29.64% 乳劑樣品之回收率

Table 10. Recoveries of 7 PGRs in 29.64% fluroxypyr-meptyl emulsifiable concentrate

| Active ingredient | Fluroxypyr-meptyl 29.64% EC | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--------|-----------|--------|
| | 0.05 µg/mL | CV (%) | 0.4 µg/mL | CV (%) |
| 4-chlorophenoxyacetic acid | 105 | 10 | 102 | 3 |
| Forchlorfenuron | 122 | 2 | 114 | 3 |
| Kinetin | 86.2 | 1 | 99.4 | 2 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | 102 | 3 | 110 | 1 |
| Pacllobutrazol | 110 | 2 | 111 | 2 |
| Uniconazole-P ¹⁾ | 101 | 1 | 102 | 1 |
| Quinclorac | 97.3 | 5 | 100 | 6 |
| Fluroxypyr-meptyl | - | - | - | - |

¹⁾ Recovery determined by matrix-matched calibration curve

表十一、8 種植物生長調節劑於三氯比 61.6% 乳劑樣品之回收率

Table 11. Recoveries of 8 PGRs in 61.6% triclopyr-butotyl emulsifiable concentrate

| Active ingredient | Triclopyr-butotyl 61.6% EC | | | |
|---------------------------------|----------------------------|--------|-----------|--------|
| | 0.05 µg/mL | CV (%) | 0.4 µg/mL | CV (%) |
| 4-chlorophenoxyacetic acid | 102 | 7 | 95.8 | 0 |
| Forchlorfenuron | 116 | 2 | 109 | 2 |
| Kinetin | 101 | 2 | 121 | 1 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | 88.9 | 1 | 95.9 | 2 |
| Pacllobutrazol | 105 | 2 | 104 | 1 |
| Uniconazole-P | 95.9 | 2 | 101 | 2 |
| Quinclorac | 98.6 | 9 | 91.7 | 4 |
| Fluroxypyr-meptyl ¹⁾ | 76.6 | 7 | 97.4 | 11 |

¹⁾ Recovery determined by matrix-matched calibration curve

表十二、7 種植物生長調節劑於快克草 50% 可濕性粉劑樣品之回收率

Table 12. Recoveries of 7 PGRs in 50% quinclorac wettable powder

| Active ingredient | Quinclorac 50% WP | | | |
|----------------------------|-------------------|--------|-----------|--------|
| | 0.05 µg/mL | CV (%) | 0.4 µg/mL | CV (%) |
| 4-chlorophenoxyacetic acid | 98.8 | 3 | 99.5 | 1 |
| Forchlorfenuron | 118 | 1 | 107 | 1 |
| Kinetin ¹⁾ | 76.5 | 3 | 81.5 | 2 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | 88.0 | 3 | 94.5 | 1 |
| Pacllobutrazol | 108 | 4 | 103 | 2 |
| Uniconazole-P | 101 | 1 | 102 | 1 |
| Quinclorac | - | - | - | - |
| Fluroxypyr-meptyl | 93.7 | 7 | 92.8 | 10 |

¹⁾ Recovery determined by matrix-matched calibration curve

三、摻雜分析結果及方法檢測極限

本研究旨在開發一檢測方法應用於成品農藥中摻雜植物生長調節劑之檢測，於真實樣品分析部分，本研究假設在植物生長調節劑之成品農藥產品中較有可能摻雜其他植物生長調節劑，故選取 6 件植物生長調節劑成品農藥樣品，秤取約 0.05 g 至 10 mL 定量瓶，加入適量甲醇以超音波振盪萃取，回至室溫以甲醇定容至刻度，以 0.2 µm 親水性聚丙烯過濾膜過濾後上機分析。6 件樣品之分析結果除樣品宣稱之植物生長調節劑有效成分外，其餘成分之訊號／雜訊比均低於 10 且面積均低於各成分檢量線最低點濃度面積，表未檢出該 8 種植物生長調節劑成分（表十三）。方法檢測極限：以低濃度回收率之混合操作標準液濃度 0.05 µg/mL，依樣品秤取克數 0.05 g 及稀釋體積 10 mL 計算定量極限 (Limit

of quantification, LOQ)，其計算式如下：

$$0.05 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times \frac{\text{g}}{10^6 \mu\text{g}} \times \frac{1}{0.05 \text{ g}} \times 100(\%)$$

得 8 種植物生長調節劑之方法定量極限為 0.001%，符合法規所定檢測極限值。

四、基質干擾評估

在本實驗中共使用 6 種植物生長調節劑樣品進行回收率試驗，為評估樣品基質對分析目標物之干擾，進行基質干擾評估：將 6 種樣品之 0.1 µg/mL 基質匹配混合操作標準液注入儀器分析，所得面積帶入檢量線求得 8 種植物生長調節劑實際濃度，將該濃度除以理論濃度 0.1 µg/mL，若其比值超出 80~120%，則認定有基質干擾效應，該成分於定量時應使用基質匹配檢量線（表七至表十二）。有基質效應之

藥劑，在水懸劑樣品中為單克素、快克草及巴克素、在水溶性粉劑樣品中為開寧激素及單克素、在乳劑樣品中為單克素及氟氯比、在可濕性粉劑樣品中為開寧激素。

次，將 6 次分析之面積代入檢量線計算其濃度，並計算相對標準偏差 (RSD)，結果顯示 8 種植物生長調節劑之相對標準偏差介於 2.39~3.46% (表十四)。

五、儀器重複注入精密性 (Repeatability) 評估

以配製之 8 種植物生長調節劑混合標準液 0.1 µg/mL，重複注入儀器分析 6

結論

本研究建立一分析方法檢測成品農藥中摻雜巴克素、移植生長素、番茄生長素、單克素、開寧激素、福芬素、快克

表十三、農藥樣品中 8 種植物生長調節劑分析結果

Table 13. Results of analysis for 8 PGRs in pesticide formulation samples

| Pesticide formulation sample | Year of manufacture | Results of analysis of doping 8 PGRs |
|------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| Fluroxypyr-meptyl 29.64% EC | 2016 | N.D. |
| Triclopyr-butotyl 61.6% EC | 2016 | N.D. |
| Gibberellic acid 10% SP | 2016 | N.D. |
| 2,4-D 80% SP | 2016 | N.D. |
| Quinclorac 50% WP | 2016 | N.D. |
| Gibberellic acid 10% SP | 2015 | N.D. |

表十四、8 種植物生長調節劑 0.1 µg/mL 混合操作標準液 6 重複注入精密性 (Repeatability) 分析結果

Table 14. Analysis results of using six repeat injections of a mixed working standard solution comprised of 0.1 µg/mL each of 8 PGRs

| Active ingredient | RSD (%) |
|----------------------------|---------|
| 4-chlorophenoxyacetic acid | 2.39 |
| Forchlorfenuron | 2.90 |
| Kinetin | 3.35 |
| 2-(1-naphthyl)acetamide | 2.63 |
| Pacllobutrazol | 2.97 |
| Uniconazole-P | 3.46 |
| Quinclorac | 3.32 |
| Fluroxypyr-meptyl | 2.91 |

草、氟氯比 8 種植物生長調節劑，方法使用液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)，確效試驗結果包含準確性、精密性皆良好，可應用於監測市售成品農藥中摻雜巴克素等 8 種植物生長調節劑之情形，並能有效節省人力、時間、溶劑成本。

誌謝

本研究試驗期間承藥毒所殘毒管制組品質規格實驗室同仁協助試驗工作，謹致謝忱。

引用文獻

1. 王靜靜、鹿毅、楊濤、張煌濤、王吉德。2011。HPLC-MS/MS 法同時測定果蔬中 6 種植物生長抑制劑殘留。分析測試學報 30：128-134。
2. 行政院農業委員會。2000。巴克素農藥有效成分檢驗方法。農糧字第 890020475 號公告。
3. 行政院農業委員會。2005。番茄生長素農藥有效成分檢驗方法。防檢三字第 0941484780 號公告。
4. 行政院農業委員會。2012。農藥管理法第七條第二款所定摻雜其他有效成分含量之限量基準。農防字第 1011484881 號公告。
5. 行政院農業委員會。2020。農藥標準規格準則第三條附表六。農防字第 1091489546 號公告。
6. 張宗儉、勁振潤、束放。2015。植物生長調節劑科學使用指南(第三版)。化學工業出版社。北京。260 頁。
7. 衛生福利部。2019。食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法 (五) (MOHWP0055.04)。衛授食字第 1081900612 號公告修正。
8. Esparza, X., Moyano, E., Cosialls, J. R., and Galcerana, M. T. 2013. Determination of naphthalene-derived compounds in apples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 782: 28-36.
9. Hanot, V., Gosciny, S., and Deridder, M. 2015. A simple multi-residue method for the determination of pesticides in fruits and vegetables using a methanolic extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimization and extension of scope. *J. Chromatogr. A* 1384: 53-66.
10. Lu, Q., Wu, J. H., Yu, Q. W., and Feng, Y. Q. 2014. Using pollen grains as novel hydrophilic solid-phase extraction sorbents for the simultaneous determination of 16 plant growth regulators. *J. Chromatogr. A* 1367: 39-47.
11. Oulkar, D. P., Banerjee, K., Ghaste, M. S., Ramteke, S. D., Naik, D. G., Patil, S. B., Jadhav, M. R., and Adsule, P. G. 2011. Multiresidue analysis of multiclass plant growth regulators in grapes by liquid

- chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 94: 968-977.
12. Pang, N. N., Wang, T. L., and Hu J. Y., 2016. Method validation and dissipation kinetics of four herbicides in maize and soil using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 190: 793-800.
13. Pu, C. H., Lin, S. K., Chuang, W. C., and Shyu, T. H., 2018. Modified QuEChERS method for 24 plant growth regulators in grapes using LC-MS/MS. *J. Food Drug Anal.* 26: 637-648.
14. Romero-González, R., Garrido Frenich, A., and Martínez Vidal, J. L. 2008. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* 76: 211-225.

Development of Multiple Analysis Method for Plant Growth Regulators in Pesticide Formulation

Ting-Hao Hsu¹, Pi-Chain Liu¹, Chen-Hua Huang^{1*}, Chien Chu¹, Tsyr-Horng Shyu¹

Abstract

Hsu, T. H., Liu, P. C., Huang, C. H., Chu, C., Shyu, T. H. 2022. Development of multiple analysis method for plant growth regulators in pesticide formulation. *Taiwan Pestic. Sci.* 12: 79-94.

Plant growth regulators (PGR) are plant hormones composed of natural or synthetic substances that can regulate the growth and development of plants. According to Subparagraph 2, Article 7, of Pesticide Management Law as well as Schedule 6, Article 3, of the Pesticide Standard Specification Guidelines, Taiwan, the pesticide tolerance for doping with the active ingredients paclobutrazol, 2-(1-naphthyl) acetamide, uniconazole-P, 4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA), kinetin, forchlorfenuron, and fluroxypyr-meptyl in pesticides is 0.01%, the pesticide tolerance for doping with quinclorac is 3% or 0.1%, depending on different formulation type, and the limit of quantification for doping with the 8 PGRs is 0.001%. As stipulated by the Council of Agriculture, Taiwan, the current method of analyzing these 8 PGRs doped in a formulated agro-pesticide product first requires qualifying them individually by GC-MS or LC-MS, then quantifying each according to specific inspection methods, in which the analysis times are different for each sample. Therefore, the current method is time consuming with high labor and reagent costs. In this study, a multiple analysis method was developed to simultaneously analyze the 8 PGRs. The sample extraction procedure included weighing the sample in a volumetric flask, adding methanol, ultrasonic vibration and making up the solution to a specific volume with methanol. Following filtration, the test liquid was analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometer(LC-MS/MS) in MRM mode with a flow rate of 0.3 mL/min. This

Accepted: May 11, 2022.

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

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

method could simultaneously analyze the 8 PGRs in just 15 minutes. The coefficient of determination of the calibration curves for the 8 PGRs could reach over 0.997. A recovery test against common formulation types revealed that high (0.4 µg/mL) and low (0.05 µg/mL) concentration recovery respectively reached between 79.2% to 121% and 76.5% to 122%. Precision testing was also performed by repeatedly injecting a mixture of the 8 PGRs at 0.1 µg/mL each into the LC-MS/MS six times. The relative standard deviations were approximately 2.39 to 3.46%, and the limit of quantification of the PGRs achieved 0.001%. Furthermore, the analysis results for 6 PGR samples were all below the limit of quantification using this method. Thus, our method using LC-MS/MS is superior to the current method as qualifying as well as quantifying samples can be simultaneously performed with high accuracy and precision, which also effectively reduces labor time and costs, especially costs for solvents.

Key words: plant growth regulators, multiple analysis method, LC-MS/MS