

動物產品中三亞蟎及其代謝產物殘留檢驗方法開發及實驗室間共同試驗

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。2020。動物產品中三亞蟎及其代謝產物殘留檢驗方法開發及實驗室間共同試驗。臺灣農藥科學 9 : 77-98。

本研究建立動物產品中三亞蟎 (Amitraz) 及其三種代謝產物 (DMPF、DMF、DMA) 殘留檢驗方法，前處理方法參考國際間常用的 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) 方法，再依據藥劑特性加以修飾，萃取液以液相層析串聯式質譜儀進行定性及定量，試驗材料分別以牛肉、豬肉、豬肝、牛奶、雞蛋及豬板油基質進行檢驗方法確效，回收率部分，試驗設計以添加 0.01 ppm 與 0.05 ppm 等 2 種濃度進行。除三亞蟎在部分基質無法符合 70~120% 外 (不同基質回收率介於 44.0~79.4%)，其餘基質皆可符合要求，推測原因為化學結構與理化性質差異，以及三亞蟎在分析過程中轉換為 DMPF 及 DMF 等因素所致，使回收率偏低，同時也使相對標準偏差 (RSD, relative standard deviation) 較大。本試驗開發之檢驗方法再進行實驗室間共同試驗，依據 12 家參與實驗室回報數據評估，整體而言，三亞蟎及其代謝產物在豬肉、牛肉、豬肝、雞蛋及豬板油基質的定量極限 (LOQ) 可達 0.01 ppm，牛奶基質則可達 0.005 ppm；三亞蟎回收率於各實驗室及不同基質之平均回收率介於 44.6~75.8%、RSD 介於 8.3~33.8%，其他代謝產物之平均回收率介於 60.7~104.5%、RSD 介於 2.5~29.0%。本研究開發之方法可應用於多種動物產品基質之三亞蟎與其代謝產物檢驗。此外，以本試驗開發之檢驗方法進行 19 項市售動物產品調查，結果皆為未檢出。本方法期能作為食藥署制定檢驗方法之參考依據，未來將運用於進、出口及市售動物產品檢驗，了解三亞蟎與其代謝產物於動物產品基質殘留情形，增進動物產品檢驗之深度與廣度。

關鍵詞：三亞蟎、代謝產物、液相層析串聯質譜儀、定量極限

接受日期：2020 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

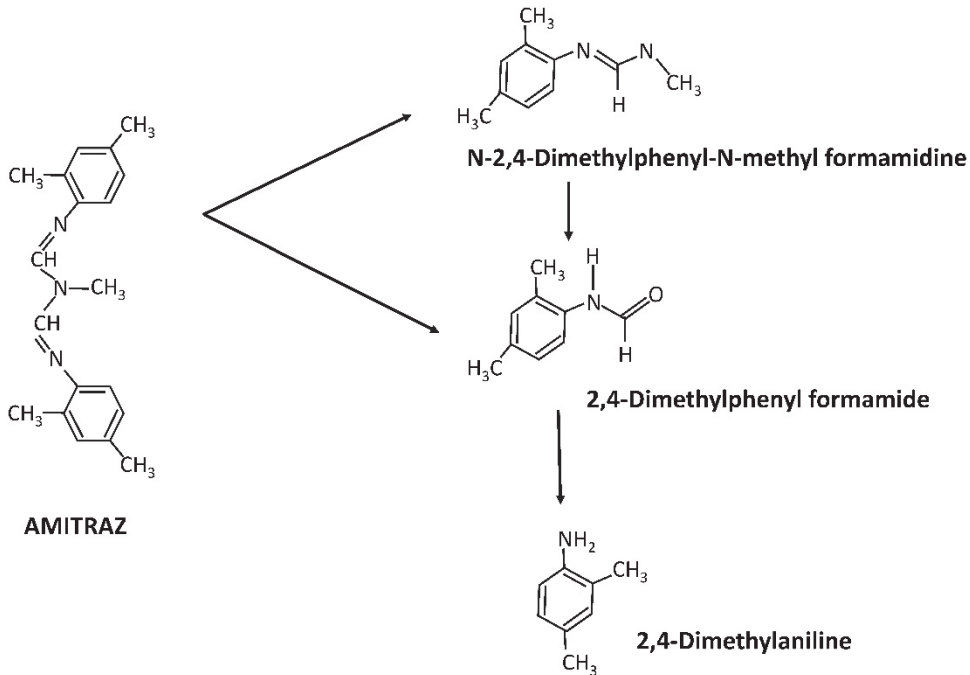
2017 年 7 月歐洲爆發雞蛋遭芬普尼污染事件，因此歐盟制訂一項臨時監控程序，針對防制紅蟲可能會使用的 66 種活性物質進行檢測，分析 5,439 件雞蛋或雞的肌肉及脂肪，超出定量極限者則有 2 件樣品檢出三亞蟎，而有 915 件樣品檢出芬普尼⁽²¹⁾。衛生福利部公告動物產品中農藥殘留容許量農藥種類為 80 種，容許量規範品項則有 276 種 (2019 年 11 月 6 日部授食字第 1081302871 號令修正)⁽⁸⁾，其中包括芬普尼及三亞蟎的容許量標準，而芬普尼已在禽畜產品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法⁽⁶⁾分析品項中，尚缺乏動物產品中三亞蟎殘留分析方法，為因應動物基質缺少三亞蟎及其代謝產物之檢驗分析方法，及配合農禽畜產品中農藥殘留監測業務之執行，建立三亞蟎及其代謝產物之農藥殘留標準分析方法刻不容緩。

歐美針對農禽畜產品皆有執行各類監測計畫^(19, 20, 21, 32, 33, 35)，我國依據食品安全衛生管理法已明訂農產品及動物產品中殘留農藥安全容許量標準，做為保障農產品及動物產品安全之準則，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。目前農產品中農藥殘留分析方法由衛生福利部公告，多重殘留分析方法^(五)於 2019 年 5 月 10 日增加至 380 項⁽⁴⁾(MOHWP0055.04)，並於 2020

年 1 月 1 日施行。動物產品之農藥殘留分析方法則由衛福部在 105 年 11 月 8 日部授食字第 1051902155 號公告訂定「禽畜產品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法」⁽⁵⁾，並於 109 年 5 月 6 日公告修正至 129 品項⁽⁶⁾，以解決部份輸入及市售動物產品可能之各種殘留農藥問題。

三亞蟎兼具殺蟎劑及殺蟲劑功用，其化學名稱為 N-methylbis (2,4-xylyliminomethyl) amine (IUPAC)，會產生三個代謝產物分別為 DMPF、DMF 及 DMA，其中 DMPF 化學名稱為 N-(2,4-dimethylphenyl)-N'-methylmethanimidamide (IUPAC)；DMF 化學名稱為 N-(2,4-dimethylphenyl) formamide (IUPAC)；DMA 化學名稱為 2,4-dimethylaniline (IUPAC)。其代謝途徑 (圖一) 所示⁽¹²⁾。

然而，動物產品中的三亞蟎與其代謝產物檢驗方法尚未建立，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，本研究針對三亞蟎及其代謝產物進行方法開發，並辦理實驗室間共同試驗，以完備檢驗方法確效⁽⁷⁾，實驗室間共同試驗所得到的資訊，可作為實驗室檢驗動物基質中三亞蟎與其代謝產物的探討依據。確立分析方法後，可作為動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢驗方法制定之依據，增加農藥品項或基質種類，以確保消費者食用安全，並於外銷時亦可做最嚴謹的把關，使食品安全檢驗的工作更臻完善。



圖一、三亞蟎代謝途徑。

Fig. 1. Amitraz metabolic pathway.

材料與方法

一、試藥及材料

試藥：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)。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、C18 Endcapped SPE Bulk Sorbent 採用分析級，Agilent、醋酸銨 (Ammonium acetate)

ACS 級，Merck。農藥對照用標準品三亞蟎 (Amitraz)，純度 99.8%，Sigma-Aldrich、DMA (2,4-Dimethylaniline)，純度 98.6%，CHEM SERVICE、DMF (Amitraz Related Compound A)，純度 100.0%，U. S. Pharmacopeia、DMPF (Amitraz Related Compound B)，純度 100.0%，U. S. Pharmacopeia 等。

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、容量瓶：25 mL 及 50 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，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、氯化鈉 1 g、檸檬酸鈉 1 g 及檸檬酸氫二鈉 0.5 g。淨化用離心管：含無水硫酸鎂 750 mg 及 C18 250 mg，檢液負荷量 5 mL。

檢體預處理：將肌肉及內臟樣品切片冷凍後再分切成小塊，須先以攪拌混合器進行均質，必要時須加乾冰避免過熱且使粉碎更完全，均質後取適量進行檢液製備，若無法於當天進行分析，應保存於 -20°C 中。蛋類樣品去除外殼後，將蛋白及蛋黃混合至無法明顯區分，取適量進行檢液製備，若無法於當天進行分析，應保存於 4°C 中。脂肪類樣品切小塊冷凍後，須先以攪拌混合器進行均質，必要時須加乾冰避免過熱且使粉碎更完全，均質後取適量進行檢液製備，若無法於當天進行分析，應保存於 -20°C 中。乳樣品混合均勻，取適量進行檢液製備。

二、標準品溶液配製及檢量線製備

取三亞蟎及代謝產物對照用標準品各約 100 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至 100 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 $10\ \mu\text{g/mL}$ 。取空白檢體，依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 $1\ \mu\text{g/mL}$ 標準溶液 5~200 μL (其中脂肪為 2~100 μL)，再加入適量乙腈使體積為 1 mL，混合均勻。

依下列條件進行分析，與對應之三亞蟎及代謝產物之濃度，製作成 0.005~0.2 $\mu\text{g/mL}$ (其中脂肪為 0.002~0.1 $\mu\text{g/mL}$) 之基質匹配檢量線。

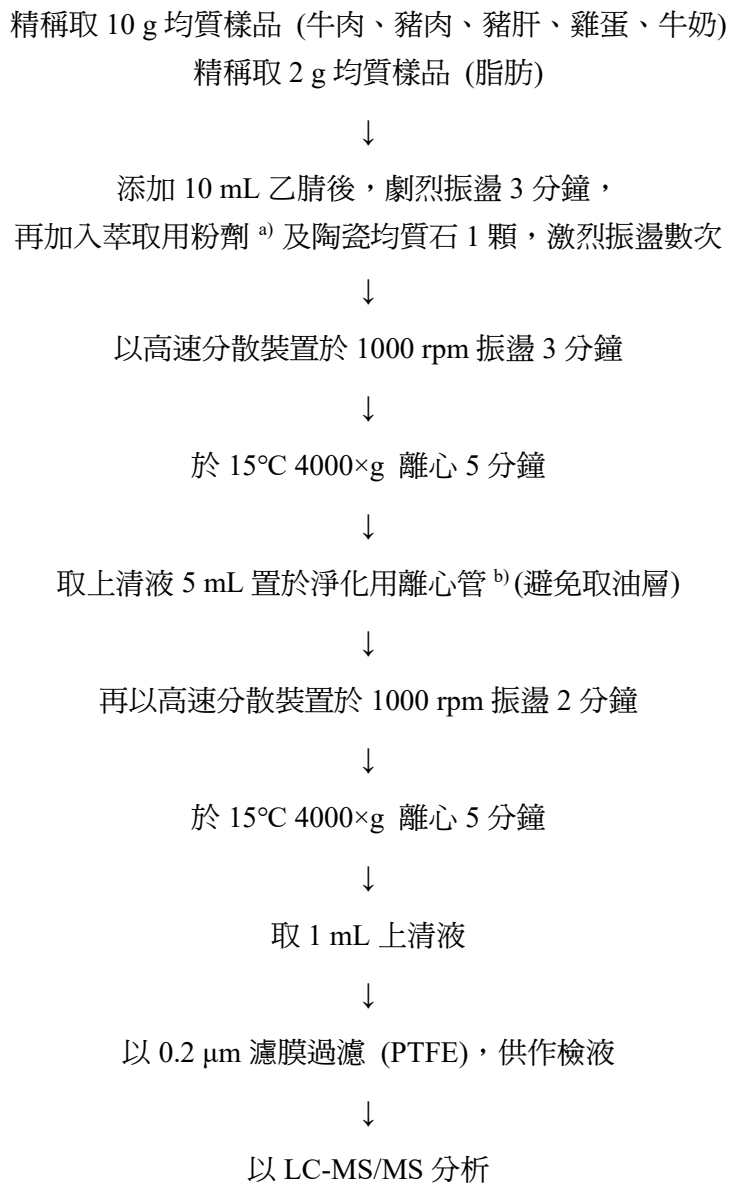
三、樣品檢液之製備

本研究開發之檢測方法係參考 QuEChERS 方法^(9, 10, 18, 23) 並加以修飾後，開發動物產品中三亞蟎及其代謝產物之殘留檢驗分析方法，樣品製備流程 (圖二)。

分別取均質之肌肉、內臟、蛋及乳等檢體約 10 g 或取均質之脂肪檢體約 2 g，精確稱定，置於 50 mL 離心管中，加入乙腈 10 mL，震盪 3 分鐘，再依序加入萃取用粉劑及陶瓷攪拌石 1 顆，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 3 分鐘後，於 15°C 以 $4000\times\text{g}$ 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 2 分鐘後，於 15°C 以 $4000\times\text{g}$ 離心 5 分鐘。取上清液 1 mL，經濾膜過濾，供作檢液，以 LC-MS/MS 分析。

四、分析儀器及條件

液相層析儀 Shimadzu Nexera liquid chromatography；質譜儀 Shimadzu LCMS-8050。



^{a)} 萃取用粉劑：含無水硫酸鎂 4 g、氯化鈉 1 g、檸檬酸鈉 1 g、檸檬酸氫二鈉 0.5 g。

^{b)} 淨化用離心管：含無水硫酸鎂 750 mg 及 C18 250 mg。

圖二、動物產品中三亞蟎及其代謝產物之殘留檢驗分析方法流程。

Fig. 2. Flow chart which illustrates the methods used to test for amitraz and its metabolites in animal products.

(一) 液相層析串聯質譜分析測定條件：

層析管：CORTECS™ UPLC® C18，
長度 50 mm，內徑 2.1 mm，粒徑 1.6 μm。

層析管溫度：40°C。

移動相溶液：A 液與 B 液以 (表一)
條件進行梯度分析。

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：5 μL。

毛細管電壓 (Capillary voltage)：電灑
離子化正離子 (ESI⁺) 採用 1 kV。

離子源溫度 (Source temperature)：
150°C。

溶媒揮散溫度 (Desolvation tempera-
ture)：350°C。

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

離子對、進樣錐電壓 (cone voltage) 與
碰撞能量 (collision energy) 詳見 (表二)。

(二) 鑑別試驗及含量測定：

於自動注入器分別取檢液及標準溶液
注入液相層析質譜儀中，參照表二儀器條
件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰
之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度
鑑別 (表三)。並依下列計算式求出檢體
中待測物之含量 (ppm)：

檢體中三亞蟎及代謝產物之含量
(ppm) = $C \times V / M$ 。

C：由基質匹配檢量線求得檢液中三
亞蟎及代謝產物之濃度 (μg/mL)。

V：萃取檢體之乙腈體積 (10 mL)。

M：取樣分析檢體之重量 (g)。

表一、液相層析移動相梯度條件

Table 1. HPLC gradient conditions

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0 → 1.0	99 → 10	1 → 90
1.0 → 2.0	10 → 1	90 → 99
2.0 → 3.2	1 → 1	99 → 99
3.2 → 3.5	1 → 99	99 → 1
3.5 → 5.0	99 → 99	1 → 1

表二、三亞蟎等 4 項農藥之多重反應偵測模式參數 (LC-MS/MS)

Table 2. Parameters of multiple reaction monitoring for amitraz and its metabolites (LC-MS/MS)

Item	Analyte			Quantitative			Qualitative		
	pesticide	Chinese name	mode	Precursor (<i>m/z</i>)> Product (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	CE (eV)	Precursor (<i>m/z</i>)> Product (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	CE (eV)
1	Amitraz	三亞蟎	ESI +	294>163	20	14	294>122	20	32
2	DMPF		ESI +	163>122	50	20	163>132	50	20
3	DMF		ESI +	150>107	10	20	150>123	10	10
4	DMA		ESI +	122>107	20	20	122>77	20	20

表三、質譜分析之相對離子強度最大可容許範圍

Table 3. 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

五、方法確效與基質效應試驗

本研究先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⁽⁷⁾以及參考國際檢驗方法確效^(11, 15, 16, 17)規範，於實驗室間共同試驗前先進行三亞蟎及其代謝產物的檢驗方法確效，包括檢量線範圍、定量極限，以及動物產品基質回收率試驗，其供試樣品以牛肉、豬肉、豬肝、雞蛋、牛乳及豬板油等 6 種基質，分別代表畜類肌肉、內臟、蛋、乳及脂肪。標準品皆配製為單一標準品，三亞蟎及其代謝產物的離子層析圖 (圖三)，於回收率試驗及檢量線配製時則分成三亞蟎與 DMA 以及 DMPF 與 DMF 兩組分別添加於不同樣品，並以 0.01 ppm 及 0.05 ppm 兩濃度進行回收率試驗。此外，基質效應評估則是將農藥標準品分別配製於基質檢液和溶劑中，以 0.05 µg/mL 濃度進行評估，再以質譜分析後之離子強度相對比值加以探討，其中定義離子強度變化介於 80~120% 時，表示無明顯影響，若降低於 60% 則表示離子化效率有明顯被抑制之情形，若離子強度增加達 140% 以上時，則表示基質將可能增強離子訊號。

六、實驗室間共同試驗

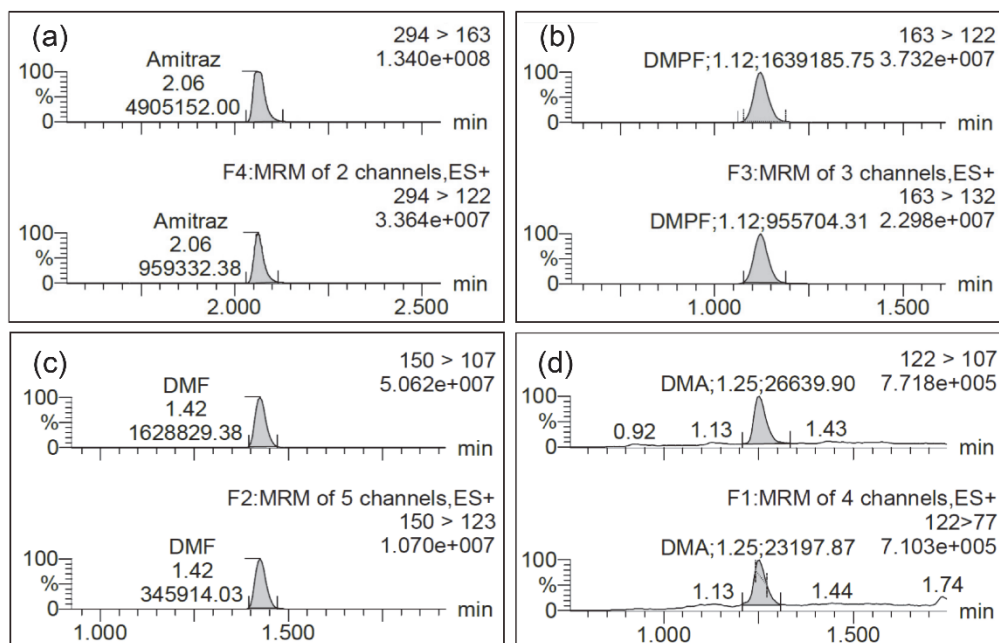
依據前述實驗結果開發的三亞蟎及其代謝產物檢驗方法，邀請國內相關多重農藥殘留分析之檢驗單位，如國立成功大學永續環境實驗所藥物毒物分析實驗室、國立屏東科技大學農水產品檢驗與驗證中心、瑠公農業產銷基金會農檢中心、財團法人中央畜產會、全國公證檢驗股份有限公司、台灣檢驗科技股份有限公司、臺北市政府衛生局、新北市政府衛生局、臺中市食藥處、臺南市政府衛生局和衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組，共計 12 家，分別依據實驗室參與意願，選定不同基質進行實驗室間共同試驗，基於保密原則，各實驗室以代號表示。由本試驗直接提供實驗室間共同試驗之操作流程及相關試驗材料，包括農藥標準品、已打碎的試驗基質及檢液製備所需試藥等，統一購買分裝並宅配寄送。數據彙整依據不同添加濃度於規範會有些微不同，其中添加 0.01 ppm 濃度者，其回收率在 60% 至 125% 間，實驗室間變異性 (Between-Laboratory Coefficient of Variation, RSD%) 以 45% 為基準；另添加 0.05 ppm 濃度者，其回收率

在 70~120% 間，實驗室間變異性以 32% 為基準，各項實驗室間共同試驗的方法確效規範⁽⁷⁾ 要求 (表四)。依各實驗室作業流程，部分實驗室進行內標準品校正，部分實驗室則未校正，其結果可作為各實驗室未來應用本檢驗方法遭遇問題時的參考依據。

表四、實驗室間共同試驗的方法確效規範要求

Table 4. Specification requirements employed by laboratories in validating our analytical methods

Concentration range (ppm)	Relative standard deviation (RSD, %)		
	Repeatability	Intermediate precision	Reproducibility
≥1	10	14	16
>0.1~1	15	18	23
>0.01~0.1	20	22	32
>0.001~0.01	30	32	45
≤0.001	35	36	53



圖三、三亞蟎及其代謝產物(DMPF、DMF 及 DMA) 0.05 µg/mL 之定量與定性離子層析圖譜。

Fig. 3. Quantitative and qualitative test results for ions of (a) Amitraz, (b) DMPF, (c) DMF and (d) DMA (0.05 µg/mL).

結果與討論

一、方法確效與基質效應

結果顯示，三亞蟎及其代謝產物的檢量線範圍介於 0.002~0.2 µg/mL 間，r 值介於 0.9976~0.9999 (表五)。回收率試驗添加濃度分別為 0.01 ppm 及 0.05 ppm 於各類基

質中，三亞蟎回收率介於 44.0~79.4%，於多數基質中回收率較低，且豬板油基質於 0.01 ppm 添加濃度在 DMA 的相對標準偏差 (RSD) 為 28.8% 及在 0.05 ppm 添加濃度於 DMPF 的平均回收率為 67.9% 外，其餘三種代謝產物之回收率皆介於 70~120% 之間且相對標準偏差小於 20% (表六及表七)。方法定量極限 (LOQ) 是以三亞蟎及

表五、三亞蟎及其代謝產物於液相層析串聯式質譜儀之檢量線範圍及其線性係數

Table 5. Linear ranges and linear coefficient obtained from calibration curve of amitraz and its metabolites, as detected by LC-MS/MS

Pesticide	Chinese name	Retention time (min)	Linear range (µg/mL)	r
Amitraz	三亞蟎	2.06	0.002~0.2	0.9976
DMPF		1.12	0.002~0.2	0.9979
DMF		1.42	0.002~0.1	0.9999
DMA		1.25	0.005~0.2	0.9987

表六、動物產品中三亞蟎及其代謝產物於牛肉、豬肉及豬肝之回收率試驗結果

Table 6. Test results showing the recoveries for amitraz and its metabolites in animal products such as beef, pork and pig liver

Pesticide	Chinese name	Beef				Pork				Pork liver			
		Spiked Conc. 0.01 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.05 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.01 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.05 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.01 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.05 ppm ¹⁾	
		R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)
Amitraz	三亞蟎	54.2	3.2	60.7	4.1	54.7	2.8	66.3	0.5	44.0	2.8	68.3	2.4
DMPF		85.9	1.9	90.5	2.7	83.2	3.8	90.9	0.8	99.4	3.1	81.8	3.8
DMF		89.9	1.9	94.5	2.1	92.4	2.4	96.9	2.3	80.8	5.1	92.5	6.7
DMA		94.2	5.3	106.8	5.7	70.1	6.2	112.2	1.0	75.4	18.4	85.0	2.8

R: Recovery. RSD: Relative standard deviation.

¹⁾ Results of fortified recovery tests of different concentrations.

²⁾ n=5.

其代謝產物添加 0.01 ppm 於樣品回收率試驗結果進行評估 (表六及表七)，依據食品化學檢驗方法之確效規範⁽⁷⁾中，樣品濃度範圍介於>0.001 ppm~0.01 ppm 之間者，其回收率規範須在 60~125% 之間，RSD 須在 30% 以下，本試驗各基質添加之 DMPF、DMF 及 DMA 測試結果皆可符合，此外因三亞蟎於試驗中會轉換成 DMPF 及 DMF 而造成回收率偏低 (44.0~70.0%)，因此根據試驗結果，將三

亞蟎及其代謝產物的 LOQ 訂為 0.01 ppm；但因三亞蟎於乳中容許量為 0.01 ppm，因此另於實驗室間共同試驗一併評估 0.005 ppm 的測試結果。基質效應試驗顯示，三亞蟎在部分基質有較明顯的基質抑制 (介於 22.8~93.2%) 及豬肝在 DMF 與 DMA 有明顯基質抑制 (17.0~53.8%) 外，其餘基質效應則無明顯影響 (表八)。三亞蟎在多數基質中，則有較差的回收率，且相對標準偏差較大，為探討三亞蟎回收

表七、動物產品中三亞蟎及其代謝產物於雞蛋、牛奶及豬板油之回收率試驗結果

Table 7. Test results showing the recoveries of amitraz and its metabolites in animal products such as eggs, milk and pork fat

Pesticide	Chinese name	Eggs				Milk				pork fat			
		Spiked Conc. 0.01 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.05 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.01 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.05 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.01 ppm ¹⁾		Spiked Conc. 0.05 ppm ¹⁾	
		R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R ²⁾ (%)	RSD (%)
Amitraz	三亞蟎	57.8	2.6	60.3	3.6	64.8	5.6	79.4	9.0	70.0	7.1	67.1	0.7
DMPF		92.4	1.6	87.1	0.7	97.6	1.6	92.9	4.4	84.0	5.0	67.9	2.5
DMF		100.2	0.8	96.1	1.7	100.2	0.8	100.7	1.5	97.0	5.9	98.0	0.4
DMA		86.2	8.0	89.1	5.8	98.2	5.5	96.7	1.3	81.0	28.8	81.9	2.1

R: Recovery. RSD: Relative standard deviation.

¹⁾ Results of fortified recovery tests of different concentrations.

²⁾ n=5.

表八、三亞蟎及其代謝產物於不同動物產品之基質效應影響情形

Table 8. Matrix effects of amitraz and its metabolites in different animal product substrates

Pesticide	Chinese name	Beef (%)	Pork (%)	Pork liver (%)	Eggs (%)	Milk (%)	Pork fat (%)
Amitraz	三亞蟎	44.0	69.5	22.8	93.2	69.6	92.7
DMPF		102.0	100.6	69.1	93.1	86.5	95.8
DMF		97.6	96.0	17.0	99.3	98.1	98.0
DMA		95.0	74.8	53.8	105.0	94.5	101.1

率較低的可能原因，本試驗簡要測試三亞蟎在試驗過程中，是否會轉換為代謝產物，故以添加 0.05 ppm 濃度之三亞蟎於雞蛋及豬肝基質中進行試驗，於液相層析串聯質譜儀分析時，同時監測 DMPF、DMF 及 DMA 等三種代謝產物 (表九)，結果顯示，試驗過程中，三亞蟎確實會轉換為 DMPF 及 DMF，但無證據顯示會產生 DMA。爰此，依此試驗結果，三亞蟎在試驗分析過程且無其他試驗變因，就會部分自行轉換為 DMPF 與 DMF，推測可能是導致回收率偏低的原因。

基質效應方面，由於質譜分析法應用於食品安全檢測時(包括農藥殘留檢驗)可以提供為快速、靈敏的分析工具 (14, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30)，液相層析質譜儀利用電灑游離方式 (Electron Spray Ionization, ESI)，氣相層析質譜儀則利用電子撞擊方式 (Electron Impact, EI) 做為離子化來源，其效率和干擾會因基質 (Matrix) 之不同而深受影響，在動物用藥方面的分析中，常用同位素標記作為內標準以執行定量，但若應用於動物產品中多重農藥檢測工作時，藥劑種類多達近百種以上，同位素標記之農藥標準品亦取得不易，故須分別探討各種農藥於不同基質效應下的影響情形。在動物產品三亞蟎及其代謝產物殘留分析方法中以 LC/MS/MS 分析之藥劑，其中三亞蟎在牛肉、豬肝有基質抑制，DMF 及 DMA 在豬肝有基質抑制。整體來說，若以質譜儀做為動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢測之偵測儀器時，除考慮樣品前

處理的淨化步驟外，需以相同基質來製備檢量線 (Calibration Curve)，故以基質匹配檢體線做為定量方式，以達提高真實樣品濃度之準確度，同時也可運用於定性的離子強度比值 (Ion Ratio)，判定時更能符合現有規範之要求。

二、實驗室間共同試驗之回收率與相對標準偏差 (RSD) 評估

牛肉基質中，共計 8 家實驗室參加，於低濃度 (0.01 ppm) 添加試驗，除三亞蟎 (各實驗室平均回收率，RSD：55.3%，20.4%) 外，其餘三種代謝產物皆符合確效規範 (7) 要求；此外，於高濃度 (0.05 ppm) 添加試驗，除三亞蟎 (56.8%，16.7%) 外皆符合要求。豬肉基質中，共計 9 家實驗室參加，於低濃度除三亞蟎 (57.2%，26.9%) 外皆符合要求；高濃度除三亞蟎 (65.0%，21.1%) 外皆符合要求。豬肝基質中，共計 6 家實驗室參加，於低濃度除三亞蟎 (44.6%，33.8%) 外皆符合要求；高濃度除三亞蟎 (52.5%，33.2%) 外皆符合要求。雞蛋基質中，共計 8 家實驗室參加，於低濃度除三亞蟎 (53.8%，32.3%) 外皆符合要求；高濃度除三亞蟎 (59.9%，23.9%) 外皆符合要求。牛奶基質中，共計 9 家實驗室參加，因三亞蟎於乳中容許量為 0.01 ppm，因此於實驗室間共同試驗一併評估 0.005 ppm 的測試結果，三種添加濃度試驗之平均回收率在 70.4~95.0% 之間，RSD 在 2.7~20.5% 之

間，符合規範⁽⁷⁾要求，因此牛奶基質於三亞蟎及代謝物的 LOQ 可訂在 0.005 ppm。豬板油基質中，共計 6 家實驗室參加，於低濃度除三亞蟎 (51.7%，28.6%) 外皆符合要求；高濃度符合要求者則有 2 品項，不符合品項為三亞蟎 (58.9%，8.3%) 及 DMPF (64.7%，6.4%)。

動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢

驗方法之實驗室間共同試驗，整體而言，各實驗室平均回收率除三亞蟎較低外 (各實驗室之各類基質平均回收率介於 44.6~75.8%、RSD 介於 8.3~33.8%)，其餘 DMPF、DMF、DMA 三種代謝產物之平均回收率介於 60.7~104.5%、RSD 介於 2.5~29.0% (表十至表十五)。

表九、三亞蟎於試驗轉換為代謝產物評估

Table 9. Conversion of amitraz to amitraz metabolites during the testing process

Sample type	Spiked 0.05 ppm ¹⁾	Converted into		Converted into		Converted into	
		DMPF		DMF		DMA	
Eggs	Amitraz	16~18%		4~6%		N.D. ²⁾	
Pork liver	Amitraz	56~66%		8%		N.D.	

¹⁾ n=5.

²⁾ N. D.: Not detected.

表十、實驗室間共同試驗：動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢驗方法回收率試驗結果—牛肉

Table 10. Recoveries of amitraz and its metabolites in beef according to collaborative study results

Concentration fortified (ppm)	Lab. No.	1 ¹⁾		2 ¹⁾		3 ¹⁾		4		7 ¹⁾		10 ¹⁾		11		12		Average		
		Pesticide	R ²⁾	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0.01	Amitraz	41.4	20.0	93.3	6.2	39.1	8.3	46.0	2.2	46.3	18.9	39.5	40.4	68.1	3.4	69.0	2.5	55.3	20.4	
	DMPF	70.7	2.9	80.0	0.0	81.2	2.9	93.7	5.9	62.8	11.3	110.1	11.6	80.3	2.6	88.3	3.9	76.1	10.5	
	DMF	95.6	7.2	86.7	13.3	90.0	38.5	130.3	10.5	103.0	0.6	97.2	0.8	95.4	1.8	85.7	1.4	98.0	8.4	
	DMA	87.7	7.8	113.3	10.2	91.0	10.1	82.3	0.7	95.3	3.6	51.5	8.1	74.9	6.3	88.3	4.7	92.9	8.2	
0.05	Amitraz	47.8	8.3	88.7	3.4	37.1	11.4	51.1	1.2	45.8	8.8	50.9	38.6	63.2	2.5	70.2	2.3	56.8	16.7	
	DMPF	81.7	0.5	87.3	3.5	87.3	3.5	91.5	0.9	64.7	13.9	115.3	8.7	79.3	0.8	99.0	3.3	86.2	7.5	
	DMF	93.0	2.0	96.0	3.6	89.1	2.5	123.1	3.3	97.9	1.7	100.1	1.9	93.1	1.1	93.4	1.5	98.2	6.2	
	DMA	99.2	8.7	95.3	1.2	78.1	6.0	72.3	1.8	92.6	6.0	98.9	1.3	80.5	0.9	94.7	2.6	91.0	8.7	

R: Recovery. RSD: Relative standard deviation.

¹⁾ Calibration with internal standard.

²⁾ n=3.

表十一、實驗室間共同試驗：動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢驗方法回收率試驗結果—豬肉

Table 11. Recoveries of amitraz and its metabolites in pork according to collaborative study results

Concentration fortified (ppm)	Lab. No.	1 ¹⁾		5 ¹⁾		6 ¹⁾		7 ¹⁾		8 ¹⁾		9		10 ¹⁾		11		12		Average	
		Pesticide	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)
0.01	Amitraz	23.6	8.0	31.1	14.6	105.9	9.7	52.2	8.8	72.2	4.9	73.5	3.1	27.8	19.2	65.5	4.7	63.0	1.6	57.2	26.9
	DMPF	60.1	2.8	70.1	4.7	71.6	2.4	64.6	12.0	88.9	2.6	89.8	2.5	106.0	7.3	79.8	2.7	107.1	3.3	76.7	12.2
	DMF	90.0	18.3	94.8	2.0	102.2	1.6	99.6	2.5	98.5	2.4	96.5	1.4	96.2	0.5	95.9	2.8	89.9	1.8	96.0	2.5
	DMA	95.8	11.1	79.3	4.2	82.9	5.1	106.0	9.2	62.7	0.8	69.1	3.4	58.0	4.8	83.6	3.4	96.7	1.6	86.9	10.2
0.05	Amitraz	48.2	3.1	30.9	6.1	112.1	5.8	58.6	5.2	72.7	2.2	85.4	1.0	47.0	9.8	63.1	2.6	67.3	3.8	65.0	21.1
	DMPF	78.3	2.1	89.6	6.9	82.5	1.3	69.2	3.3	89.2	1.2	90.9	1.4	117.6	4.3	78.2	1.9	97.9	2.9	85.3	6.0
	DMF	90.3	1.2	98.6	2.9	106.7	0.5	96.9	2.8	90.3	1.9	99.2	1.2	98.9	1.4	94.7	4.0	90.9	0.8	96.3	3.2
	DMA	91.1	2.2	119.1	10.7	84.2	0.8	86.7	0.8	58.0	3.8	100.7	0.6	91.7	3.7	90.6	2.1	101.2	0.9	94.4	11.3

R: Recovery. RSD: Relative standard deviation.

¹⁾ Calibration with internal standard.

²⁾ n=3.

表十二、實驗室間共同試驗：動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢驗方法回收率試驗結果—豬肝

Table 12. Recoveries of amitraz and its metabolites in pig liver according to collaborative study results

Concentration fortified (ppm)	Lab. No.	1 ¹⁾		2 ¹⁾		5		9		11		12		Average	
		Pesticide	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)
0.01	Amitraz	11.5	10.1	90.0	22.2	29.8	2.3	44.4	17.1	42.1	10.4	49.7	2.3	44.6	33.8
	DMPF	80.6	7.1	103.3	5.6	70.6	8.3	89.7	2.3	76.5	2.0	88.7	1.3	84.9	7.9
	DMF	66.4	23.1	116.7	9.9	83.2	0.3	92.9	6.2	82.6	3.1	81.3	5.8	87.2	11.1
	DMA	117.5	7.7	123.3	4.7	105.6	1.5	99.2	7.8	79.9	9.8	85.7	7.5	101.9	9.7
0.05	Amitraz	23.4	5.7	106.0	1.9	24.3	11.3	60.1	6.2	50.2	8.5	51.2	8.8	52.5	33.2
	DMPF	87.3	0.3	93.3	4.5	79.8	2.0	90.5	1.2	79.1	2.5	82.8	11.3	85.5	4.0
	DMF	90.3	1.1	102.0	3.4	76.7	0.4	100.1	0.6	79.3	1.9	87.8	6.3	89.4	6.7
	DMA	118.1	2.3	97.3	1.2	117.4	10.6	108.6	1.6	98.0	4.8	87.3	3.4	104.5	6.8

R: Recovery. RSD: Relative standard deviation.

¹⁾ Calibration with internal standard.

²⁾ n=3.

此外，藉由實驗室間共同試驗可取得各實驗室所採用的儀器設備及作業方式間差異，包括各實驗室所使用的儀器、進樣體積、層析管柱與儀器進樣方式（表十六），該等數據可作為未來各檢驗實驗室

應用檢驗方法時的參考。本試驗依據各家參與實驗室分別於牛肉、豬肉、豬肝、雞蛋、牛奶和豬板油之試驗數據進行評估，在實驗室間共同試驗後，於2019年11月26日召開專家會議審查相關資料，評估本

表十三、實驗室間共同試驗：動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢驗方法回收率試驗結果—雞蛋
Table 13. Recoveries of amitraz and its metabolites in eggs according to collaborative study results

Concentration fortified (ppm)	Lab. No.	1 ¹⁾		2 ¹⁾		3 ¹⁾		5 ¹⁾		9		10 ¹⁾		11		12		Average	
		Pesticide	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)
0.01	Amitraz	33.0	12.1	116.7	4.9	50.6	3.1	16.4	5.2	57.5	1.0	33.2	8.2	62.1	5.4	60.7	1.0	53.8	32.3
	DMPF	78.1	5.8	80.0	12.5	96.7	6.0	78.6	4.3	95.5	2.3	78.0	2.8	98.9	0.6	100.0	4.6	86.7	8.5
	DMF	89.1	3.9	90.0	11.1	76.4	4.7	93.5	2.4	89.4	0.8	100.4	2.7	100.1	1.3	89.0	4.1	91.0	4.8
	DMA	81.9	8.0	93.3	16.4	101.2	5.2	81.3	5.1	69.8	8.1	65.6	5.6	94.0	4.5	86.3	3.7	85.7	6.8
0.05	Amitraz	45.6	3.9	118.7	6.8	55.6	12.5	37.9	0.4	55.1	4.6	48.3	8.8	60.9	7.2	57.4	3.5	59.9	23.9
	DMPF	80.9	3.3	91.3	1.3	89.7	1.7	85.5	0.3	94.8	2.1	81.7	11.4	102.7	0.5	93.4	1.8	92.8	4.9
	DMF	87.9	0.9	92.0	0.0	102.5	12.8	99.4	1.7	97.4	1.6	98.8	1.3	101.5	1.0	100.5	2.3	97.5	3.0
	DMA	87.0	2.2	88.0	25.6	95.8	6.3	88.0	8.2	85.8	4.0	104.1	4.4	95.8	1.1	88.1	2.0	88.8	3.1

R: Recovery. RSD: Relative standard deviation.

¹⁾ Calibration with internal standard.

²⁾ n=3.

表十四、實驗室間共同試驗：動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢驗方法回收率試驗結果—牛奶
Table 14. Recoveries of amitraz and its metabolites in milk according to collaborative study results

Concentration fortified (ppm)	Lab. No.	1 ¹⁾		2 ¹⁾		3 ¹⁾		4		6 ¹⁾		7 ¹⁾		8 ¹⁾		11		12		Average	
		Pesticide	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)
0.005	Amitraz	67.5	54.7	113.3	10.2	120.5	5.3	48.7	12.6	49.2	4.5	59.4	1.8	72.8	3.9	69.9	1.8	59.3	7.8	73.4	20.5
	DMPF	79.6	9.5	113.3	10.2	97.8	7.4	82.7	1.4	72.2	3.5	100.1	1.0	84.5	6.1	70.5	0.7	82.0	4.9	87.0	9.3
	DMF	90.8	8.3	100.0	0.0	74.4	2.5	94.0	5.6	74.7	1.8	93.1	5.0	79.5	2.0	90.9	3.9	84.7	2.7	86.9	6.0
	DMA	79.8	8.7	86.7	13.3	112.7	5.3	94.0	2.1	37.7	1.8	81.3	28.7	80.8	5.3	70.3	6.9	85.3	8.9	81.0	14.3
0.01	Amitraz	56.3	8.0	113.3	5.1	70.3	5.7	66.3	6.1	55.0	2.6	64.0	8.3	NA		69.9	1.3	67.7	1.7	70.4	15.0
	DMPF	84.4	6.6	80.0	12.5	89.5	2.8	85.0	1.2	85.4	1.9	70.9	5.8	NA		75.6	2.6	90.3	2.6	82.6	4.7
	DMF	87.0	5.8	93.3	12.4	86.0	11.8	91.7	6.2	84.1	2.4	95.8	5.8	NA		94.7	3.2	90.3	2.8	90.4	2.7
	DMA	80.7	13.7	100.0	0.0	96.6	4.9	89.0	5.1	60.7	14.7	103.3	11.2	NA		89.7	7.1	89.3	7.5	88.7	8.7
0.05	Amitraz	70.1	4.8	113.3	8.7	77.5	12.4	66.9	9.4	60.0	2.9	67.6	3.8	76.2 ³⁾	3.0	72.1	2.0	78.3	3.8	75.8	11.6
	DMPF	81.4	1.0	93.3	2.5	95.5	3.4	81.1	3.0	95.6	1.4	69.8	12.8	96.5 ³⁾	3.5	77.2	2.0	94.7	0.4	87.2	6.6
	DMF	85.2	0.9	91.3	2.5	109.2	1.0	85.5	3.9	94.4	1.8	96.0	3.8	99.2 ³⁾	0.9	95.3	0.5	99.3	4.1	95.0	4.5
	DMA	88.1	2.8	82.7	3.7	98.0	1.4	83.0	1.3	87.9	4.9	93.3	3.1	85.1 ³⁾	2.6	95.0	1.3	92.5	1.4	89.5	3.5

R: Recovery. RSD: Relative standard deviation. NA: Not analyzed.

¹⁾ Calibration with internal standard.

²⁾ n=3.

³⁾ The test concentration is 0.025 µg/g.

表十五、實驗室間共同試驗：動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢驗方法回收率試驗結果—豬板油

Table 15. Recoveries of amitraz and its metabolites in pork fat according to collaborative study results

Concentration fortified (ppm)	Lab. No.	1 ¹⁾		4		6		8 ¹⁾		11		12		Average	
		Pesticide	R ²⁾ (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)
0.01	Amitraz	4.7	142.1	50.0	0.0	47.2	16.9	77.5	1.9	65.8	8.1	65.0	0.0	51.7	28.6
	DMPF	32.2	10.8	73.3	3.9	50.1	1.4	62.8	6.4	82.7	8.6	63.3	4.6	60.7	16.9
	DMF	100.9	30.2	101.7	2.8	92.7	3.9	87.0	1.7	0.0	-	80.0	6.2	77.1	29.0
	DMA	75.8	0.8	100.0	5.0	83.2	7.3	77.7	10.6	109.5	10.3	95.0	10.5	90.2	8.6
0.05	Amitraz	43.4	11.0	63.0	3.2	54.6	3.4	66.0	2.8	62.8	1.9	63.3	1.8	58.9	8.3
	DMPF	56.1	10.0	63.7	3.3	57.1	1.2	68.8	0.8	74.2	8.3	68.3	0.8	64.7	6.4
	DMF	90.0	5.1	103.0	3.5	88.3	1.0	99.0	0.8	91.9	2.8	94.0	4.9	94.4	3.4
	DMA	86.4	7.4	96.7	5.1	76.1	7.3	81.5	4.3	95.2	9.2	91.3	3.5	87.9	5.3

R: Recovery. RSD: Relative standard deviation. -: means no value.

¹⁾ Calibration with internal standard.

²⁾ n=3.

表十六、實驗室間共同試驗：動物產品中三亞蟎及其代謝產物檢驗方法開發—液相層析質譜儀整理表

Table 16. Brands of laboratory instruments used for LC-MS/MS by collaborative study laboratories

Lab No.	Brand / model (Chromatograph)	Brand / model (Mass spectrometer)	Type	Injection volume (μL)	Chromatography column	Injection mode
1	SCIEX	SCIEX 5500+	triple quadrupoles	5	Poroshell 120 EC-C18 2.7 μm, 3.0×150 mm	partial loop
2	Agilent 1290	Agilent 6470	triple quadrupoles	3	Poroshell 120 EC-C18 2.7 μm, 3.0×150 mm	partial loop
3	Agilent 1290	Sciex 5500	triple quadrupoles	3	Poroshell 120 EC-C18 2.7 μm, 3.0×150 mm	partial loop
4	Waters	XEVO TQ-S Micro	triple quadrupoles	5	CORTECS UPLC-C18, 1.6 μm, 2.1×100 mm; CORTECS UPLC- C18, 1.6 μm, 2.1×5 mm	partial loop
5	Agilent	Agilent	triple quadrupoles	3	Poroshell 120 EC-C18 2.7μm, 3.0×150 mm	---
6	Agilent 1290 Infinity II	Agilent 6470A	triple quadrupoles	5	ACQUITY UPLC HSS T3 C18 2.1 μm, 8×100 mm	partial loop
7	SHIMADZU	8050	triple quadrupoles	2	ACQUITY UPLC HSS T3 C18 1.8 μm, 2.1×100 mm	partial loop
8	WATERS ACQUITY	WATERS TQ-S micro	triple quadrupoles	3	CORTECS UPLC C18 2.1×100 mm	partial loop
9	Waters ACQUITY UPLC	Waters Xevo TQ	triple quadrupoles	5	CORTECS UPLC C18 1.6 μm, 2.1× 50 mm	Flow through needle (FTN) metering device
10	Agilent 1290 Infinity II	Agilent 6495 Triple Quad LC/MS	triple quadrupoles	5	Poroshell 120 EC-C18 2.7 μm, 3.0×150 mm	partial loop
11	Waters	Waters TQS-micro	triple quadrupoles	2	CORTECS UPLC C18 1.6 μm, 2.1×100 mm	partial loop
12	Shimadzu	Shimadzu LCMS- 8050	triple quadrupoles	3	CORTECS UPLC C18 1.6 μm, 2.1×50 mm	FTN

試驗所開發的檢驗方法，於各類測試基質與三亞蟎及代謝產物可符合目前公告的容許量要求。此外，檢驗方法開發需考量殘留定義，參考國際間定義規範，日本及中國之殘留定義為評估三亞蟎及 DMPF，容許量以三亞蟎表示；美國及歐盟之殘留定義為評估三亞蟎及 DMA，容許量則以三亞蟎表示；Codex 及澳洲之殘留定義為檢驗三亞蟎及 DMPF，容許量以 DMPF 表示，惟台灣在三亞蟎殘留定義須再加以確認，以確保分析方法適用性。綜上所述，本研究三亞蟎及其代謝產物之檢驗方法確

效試驗以及實驗室間共同試驗，可作為未來我國動物基質產品中三亞蟎及其代謝產物檢驗方法制定之依據。

三、真實樣品檢測

包括臺灣、聯合國組織、歐盟、美國及日本等，對於動物產品中三亞蟎及其代謝產物，分別制定不同的標準 (表十七)。由於動物的飼料常為植物來源，飼料源的植物生產過程中可能使用農藥^(1, 2)，故動物產品中是否也會因攝入而造成殘留須加

表十七、動物產品農藥分析品項之各國容許量

Table 17. International pesticide residue limits in animal products

Pesticide	Chinese name	Tolerance (ppm)				
		Taiwan ¹⁾	Codex ²⁾	EU ³⁾	USA ⁴⁾	Japan ⁵⁾
Amitraz	三亞蟎			Muscle (Poultry)0.05		Muscle (Cattle, pigs)0.9/ (Other terrestrial mammals)0.2
				Fat (Pigs, Sheep)0.4/(Cattle, Goat)0.2/(Poultry)0.05		Fat (Cattle, Other terrestrial mammals) 0.2/ (Pig) 0.4
		Muscle (Cattle, pigs)0.05/ (Sheep) 0.1	Muscle (Cattle, pigs) 0.05/(Sheep) 0.1	Liver(Pigs, cattle)0.2/(Sheep, Goat)0.1/(Poultry)0.05	Muscle (Cattle) 0.02/(Pigs)0.05	Fat (Cattle, Other terrestrial mammals) 0.2/ (Pig) 0.4
		Edible offal (Cattle, pigs) 0.2/(Sheep) 0.2	Edible offal (Cattle, pigs, Sheep) 0.2	Kidney(Pigs, cattle, Sheep, Goat)0.2/(Poultry)0.05	Fat (Pigs, Cattle) 0.1/(Milk) 0.2	Liver, kidney, edible offal (Cattle, pigs, other terrestrial mammals) 0.4
		Milk 0.1	Milk 0.01	Edible offal (Poultry) 0.05	Kidney and liver (pigs) 0.1	
				Other (Poultry)0.05	Milk 0.03	
				Milk(Cattle, Sheep, Goat)0.01		
				Eggs (Chicken, duck, goose, quail, other)0.01		

¹⁾ 動物產品中農藥殘留容許量標準。2019年11月6日部授食字第1081302871號令修正。

²⁾ Obtained from “CODEX Pesticide Residues in Food and Feed” guidelines: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>

³⁾ Obtained from EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>

⁴⁾ Obtained from “Electronic Code of Federal Regulations” produced by the U. S. Government Publishing Office (GPO): <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID= a3b649316ccb17c31211db2edd81f789&mc=true&node=pt40.24.180&rgn=div5>

⁵⁾ Obtained from the Japan Food Chemical Research Foundation <http://db.ffcr.or.jp/front/>

以評估。我國與各先進國家及地區相同，也依據三亞蟎的每日容許攝取量 (ADI, acceptable daily intake)、國家攝食資料庫⁽³⁾ 等各類資料，制訂三亞蟎在多項動物基質的殘留容許量^(8, 13, 22, 31, 34)，包括肌肉(牛、豬) 0.05 ppm、(綿羊) 0.1 ppm，內臟(牛、豬) 0.2 ppm、(綿羊) 0.2 ppm，乳 0.1 ppm。故本試驗也依據所開發的檢驗方法，針對市售動物產品進行 19 件樣品之抽樣調查，包括牛肉 3 件、豬肉 3 件、豬肝 3 件、牛奶 3 件、雞蛋 4 件、牛脂肪 1 件、豬脂肪 1 件及雞脂肪 1 件。探討三亞蟎及其代謝產物於市售產品殘留情形，結果顯示 19 件樣品中皆未檢出。未來可持續擴增測試基質種類、進行例行性抽驗或運用於進、出口及市售動物產品檢驗，作為動物產品三亞蟎及其代謝產物殘留檢驗執法之依據，維護消費者健康安全。

謝辭

本試驗承蒙衛生福利部食品藥物管理署 2019 年度「動物產品中殘留農藥檢驗方法開發研究」(MOHW108-FDA-F-113-000712)計畫經費補助及本所殘留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。

引用文獻

1. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。2019。農藥資訊服務網。檢自 <http://pesticide.baphiq.gov.tw> (Jan 15, 2019)
2. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。2019。植物保護資訊系統。檢自 <https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm/> (Jan. 15, 2019)
3. 衛生福利部食品藥物管理署。2019。106 年度一食物小類一攝食量計算結果。檢自國家攝食資料庫 <http://tnfcds.cmu.edu.tw/index.php?action=download&p=4> (Jan. 14, 2019)
4. 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。
5. 衛生福利部。2016。禽畜產品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法 (MOHWP0056.00)。部授食字第 1051902155 號。
6. 衛生福利部。2020。禽畜產品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法 (MOHWP0056.01)。衛授食字第 1091900697 號公告修正。
7. 衛生福利部食品藥物管理署。2013。食品化學檢驗方法之確效規範。第二次修正：102 年 9 月 9 日。
8. 衛生福利部。2019。動物產品中農藥殘留容許量標準。衛授食字第 1081302871 號。
9. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., and Schenck, F. J. 2003. Fast and easy

- multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86: 412-431.
10. Anastassiades, M., Scherbaum, E., Tassdelen, B., and Štajnbaher, D. 2007. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis, pp. 439-458. *In*: H. Ohkawa, H. Miyagawa, and P. W. Lee [eds.], *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 538 pp.
 11. Beuth, V. 1996. Chemical analysis-decision limit; detection limit and determination limit; estimation in case of repeatability; terms, methods, evaluation. DIN 32645.
 12. Caldwell, M., Fussell, R. J., Smith, F., and Sharman, M. 2007. Development and validation of an analytical method for total amitraz in fruit and honey with quantification by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Addit Contam.* 24: 280-284.
 13. CODEX Pesticide Residues in Food and Feed. Retrieved from <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/> (Oct. 12, 2019)
 14. de Hoffman, E. 1996. Tandem mass spectrometry: a primer. *J. Mass Spectrom.* 31: 129-137.
 15. European Committee Directorate General for Health and Food Safety. 2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document number SANCO/12571/2013.
 16. European Committee Directorate General for Health and Food Safety. 2015. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document number SANTE/11945/2015.
 17. European Committee Directorate General for Health and Food Safety. 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Document number SANTE/11813/2017.
 18. 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. Document number ILNAS EN 15662.
 19. EFSA (European Food Safety Authority). 2010. 2008 Annual report on pesticide residues according to article 32 of regulation (EC) No 396/2005. 2010. *EFSA J.* 8: 1646. Retrieved from <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1646> (Oct. 8, 2019)
 20. EFSA (European Food Safety Authority).

2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* 15: 4791. Retrieved from <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4791> (Oct. 8, 2019)
21. EFSA (European Food Safety Authority). Reich, H., and Triacchini, G. A. 2018. Occurrence of residues of fipronil and other acaricides in chicken eggs and poultry muscle/fat. *EFSA J.* 16: 5164. Retrieved from <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5164> (Jan. 3, 2019)
22. European Commission. 2016. EU Pesticides database. Retrieved from <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (Oct. 12, 2019)
23. Jansson, C., Pihlström, T., Österdahl, B. G., and Markides, K. E. 2004. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 1023: 93-104.
24. Kearney, G., Alder, L., Newton, A., and Klein, J. 2003. Waters Application Note. The advantages of multiple reaction monitoring (MRM) over single ion recording (SIR) for the analysis of 81 pesticide residues in fruit and vegetables. Retrieved from <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000693en.pdf> (Jan. 28, 2019)
25. Klein, J. and Alder, L. 2003. Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops. *J. AOAC Int.* 86: 1015-1037.
26. McMaster, M. C. 2005. *LC/MS: A practical user's guide*, 1st ed. John Wiley & Sons, New Jersey, USA. 165pp.
27. Omote, M., Harayama, K., Sasaki, T., Mochizuki, N., and Yamashita, H. 2006. Analysis of simultaneous screening for 277 pesticides in malt and beer by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64: 139-150.
28. Sannino, A., Bolzoni, L., and Bandini, M. 2004. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *J. Chromato. A.* 1036: 161-169.
29. Skoog, D. A., Holler, F. J., and Nieman, T. A. 1997. *Principles of instrumental analysis*, 5th ed. Brooks Cole, California, USA. 849pp.
30. Smith, R. M. 2004. *Understanding mass spectra: A basic approach*, 2nd ed. Wiley-Interscience, New Jersey, USA. 372 pp.
31. The Japan Food Chemical Research Foundation. 2019. Maximum residue limits

- (MRLs) list of agricultural chemicals in foods (Updated on December 25, 2017). Retrieved from <http://db.ffcr.or.jp/front/> (Oct. 12, 2019)
32. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service Office of Public Health Science. 2011. UNITED STATES National Residue Program. 2009 Residue sample results. Retrieved from <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/data-collection-and-reports/chemistry/red-books/archive/2009-red-book>. (Jan. 3, 2019)
33. United States Department of Agriculture. 2017. Pesticide data program. Retrieved from <http://www.ams.usda.gov/pdp> (Oct. 8, 2019)
34. United States Environmental Protection Agency. 2019. Electronic code of federal regulations. Part 180- Tolerance and exemptions for pesticide chemical residues in food (180.287 Amitraz). Retrieved from <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=a1ba380352c04cbc18e8e91692bdf8f7&h=L&mc=true&n=pt40.24.180&r=PART&ty=HTML> (Oct. 12, 2019)
35. United States Food and Drug Administration. 2017. Pesticide residue monitoring program, reports and monitoring databases. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnesscontaminants/pesticides/default.htm>. (Oct. 8, 2019)

Development of the Analytical Methods for Amitraz and Amitraz Metabolite Residues in Animal Products, a Collaborative Study

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

Abstract

Chuang, W. C., Huang, C. H., Shyu, T. H., and Lin, S. K. 2020. Development of analytical methods for amitraz and amitraz metabolite residues in animal products, a collaborative study. *Taiwan Pestic. Sci.* 9: 77-98.

The study established analytical methods to quantify residues of amitraz and its three metabolites (DMPF, DMF, and DMA) in animal products. For this, we applied commonly used QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) pre-treatment techniques with modifications based on the characteristics of reagents. Extracted solutions were analyzed both qualitatively and quantitatively using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Our proposed analytical methods were validated using substrates such as beef, pork, pig liver, milk, eggs, and pork fat. For recovery tests, our experiment design involved testing at concentrations of 0.01 and 0.05 mg/kg, respectively. Results showed that most of substrates met the 70 to 120% recovery requirement. (Recoveries of amitraz on all substrates ranged between 44.0% and 79.4%). However, the low recoveries which characterized some substrates resulted in higher relative standard deviations (RSD). We hypothesized that low recoveries were due to (1) differences between chemical structures and physical/chemical properties of substrates, and (2) amitraz being converted to the metabolite DMPF, DMF or DMA during the analytical process. We compared results obtained by twelve different laboratories that employed our proposed analytical methods. The limits of quantification (LOQ) of amitraz and its metabolites in various substrates were as low as 0.01 ppm (0.005 ppm for milk). The mean recoveries of

Accepted: September 7, 2020.

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

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

amitraz varied between 44.6% and 75.8% among different laboratories, and the RSD for different substrates varied between 8.3% and 33.8%. For other metabolites, average recoveries were between 60.7% and 104.5%, and RSD values were between 2.5% and 29.0%. Our proposed method was applied to monitor 19 different of commercially-sold animal products, no amitraz or amitraz metabolites were detected. The analytical methods developed in the current study can be applied for the analysis of amitraz and its metabolites in various animal products. Our proposed methods can also be used as references by the TFDA in drafting analytical methods to monitor imported, exported, and commercially-sold animal products; to investigate residues of amitraz and amitraz metabolites in animal-based substrates; and to strengthen the technologic field animal product analysis.

Key words: amitraz, metabolites, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), limit of quantification (LOQ)