

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－孔雀綠及其代謝物之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods - Test of Malachite Green and its Metabolite

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於水產品中孔雀綠及其代謝物還原型孔雀綠之檢驗。
2. 檢驗方法：液相層析串聯質譜分析法(liquid chromatography/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜分析儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Symmetry® C8，3.5 µm，內徑2.0 mm×5 cm或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：轉速可達2400 rpm以上者。
 - 2.1.4. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.5. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.7. pH測定儀(pH meter)。
 - 2.2. 試藥：乙腈、甲醇、正己烷及乙酸乙酯均採用液相層析級；*N,N,N',N'*-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)、甲酸、檸檬酸、磷酸氫二鈉、醋酸銨、25%氨水、醋酸及鹽酸均採用試藥特級；孔雀綠(malachite green, MG)對照用標準品(malachite green oxalate salt)、還原型孔雀綠(leucomalachite green, LMG)對照用標準品；孔雀綠同位素內部標準品(MG-d₅ picrate)、還原型孔雀綠同位素內部標準品(LMG-d₅)。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 塑膠離心管：50 mL。
 - 2.3.2. 陽離子交換固相萃取匣(Cation exchange solid phase extraction cartridge)：Oasis MCX，60 mg，3 mL或同級品。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22及0.45 µm，Nylon材質。
 - 2.3.4. 容量瓶：100 mL，褐色。
 - 2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 0.1 M檸檬酸溶液：

稱取檸檬酸10.5 g，以去離子水溶解使成500 mL。

2.4.2. 0.2 M磷酸氫二鈉溶液：

稱取磷酸氫二鈉14.2 g，以去離子水溶解使成500 mL。

2.4.3. McIlvaines緩衝溶液：

取0.1 M檸檬酸溶液445.5 mL及0.2 M磷酸氫二鈉溶液54.5 mL，混合均勻。

2.4.4. 沖提液：

取25%氨水5 mL、乙酸乙酯50 mL及甲醇45 mL，混合均勻，臨用時調製。

2.4.5. TMPD溶液：

稱取TMPD 50 mg，以甲醇溶解並定容至50 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

稱取醋酸銨0.39 g溶於去離子水900 mL，以醋酸調整pH為4.5 ± 0.1，再加去離子水使成1000 mL，以0.45 μm濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

量取甲酸1 mL，加至乙腈1000 mL中，為移動相溶液B。

2.6. 內部標準溶液之調製：

取相當於含孔雀綠及還原型孔雀綠各約5 mg之同位素內部標準品，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至50 mL，作為內部標準原液，避光於-20°C貯存備用。使用時取適量內部標準原液混合後，以乙腈稀釋至100 ng/mL，作為內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之調製：

取相當於含孔雀綠及還原型孔雀綠各約5 mg之對照用標準品，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至50 mL，作為標準原液，避光於-20°C貯存備用。使用時取適量標準原液混合後，以乙腈稀釋至100 ng/mL，作為混合標準原液。使用時取適量混合標準原液，以50%乙腈溶液稀釋至0.5~10.0 ng/mL，作為標準溶液，臨用時調製。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取：

將檢體細切，以均質機均質後，取檢體約1 g，精確稱定，置

於塑膠離心管中，加入內部標準溶液50 μ L、TMPD溶液50 μ L及McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)混合溶液10 mL，旋渦混合45秒後，於2400 rpm離心20分鐘。收集上澄液，離心管中之沉澱物再以McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)混合溶液5 mL重複操作一次。合併上澄液，供淨化用。

2.8.2. 淨化：

取2.8.1.節供淨化用溶液，注入預先以甲醇2 mL、去離子水2 mL及McIlvaines緩衝溶液2 mL潤洗之Oasis MCX固相萃取匣，再注入0.1 N鹽酸溶液2 mL，以去離子水2.5 mL清洗兩次，棄流出液。固相萃取匣以真空抽乾後，依序以50%甲醇溶液3 mL及正己烷3 mL清洗後，再真空抽氣乾燥5分鐘。以沖提液5 mL沖提，收集沖提液，於50°C以氮氣吹乾，殘留物加入50%乙腈溶液1.0 mL，以旋渦混合器振盪溶解，經0.22 μ m濾膜過濾後，供作檢液。

2.9. 檢量線之製作：

精確量取標準溶液添加於空白檢體中，依2.8節調製檢液，並參照下列條件進行液相層析串聯質譜分析，以孔雀綠及還原型孔雀綠與內部標準品波峰面積比，與對應之孔雀綠及還原型孔雀綠濃度，分別製作檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件：

移動相溶液：A液與B液以下列比例(v/v)混合作為移動相溶液，進行梯度分析。

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0	50	50
1.0	0	100
4.0	0	100
4.5	50	50
8.0	50	50

移動相流速：0.3 mL/min。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：400°C。

偵測模式：多重反應偵測模式(multiple reaction monitoring mode, MRM)。偵測離子、進樣錐電壓(cone

voltage)與碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	母離子 (<i>m/z</i>)	子離子 (<i>m/z</i>)	進樣錐電 壓(V)	碰撞能量 (eV)
MG	329	313	60	35
	329	208	60	37
LMG	331	239	40	30
	331	316	40	24
MG-d ₅	334	318	40	38
LMG-d ₅	336	239	55	30

定量離子：孔雀綠為*m/z* 313，還原型孔雀綠為*m/z* 239。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各20_μL，分別注入液相層析串聯質譜分析儀中，參照2.9節條件進行分析，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^(註)鑑別之，並依下列計算式求得檢體中孔雀綠及還原型孔雀綠之含量(ppb)：

$$\text{檢體中MG或LMG之含量(ppb)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中MG或LMG之濃度(ng/mL)

V：檢體最後經定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度之容許範圍參照歐盟2002/657/EC之規範：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

附註：1. 本檢驗方法之檢出限量，孔雀綠及還原型孔雀綠均為0.5 ppb。

2. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。