

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－抗原蟲劑多重殘留分析(二)

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods -

Multiresidue Analysis of Antiprotozoal Drugs (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品之肌肉、內臟、蛋類、乳汁及蜂蜜中buquinolate等23項抗原蟲劑(品項見附表一)。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Poroshell 120SB-C18，2.7 μm ，3.0 mm \times 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達5000 \times g以上者。
 - 2.1.6. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.7. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；甲酸、二甲基亞砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、無水硫酸鎂及醋酸鈉均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)。
buquinolate等23項對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：50 mL，Pyrex及PP材質。
 - 2.3.3. 樣品瓶：1 mL，PP材質。
 - 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。
 - 2.3.5. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。

2.3.6. 萃取用粉劑^(註)：含無水硫酸鎂6 g、醋酸鈉1.5 g，或同級品。

註：可依需求自行評估使用市售各種萃取用組合套組。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 乙腈：甲醇(4:1, v/v)溶液：

取乙腈與甲醇以4：1 (v/v)比例混勻。

2.4.2. 含10%甲酸之乙腈溶液：

取甲酸與乙腈以1：9 (v/v)比例混勻。

2.4.3 乙腈：甲醇(95:5, v/v)溶液：

取乙腈與甲醇以95：5 (v/v)比例混勻。

2.4.4 萃取溶液：

取乙腈：甲醇(95:5, v/v)溶液與甲酸以99：1 (v/v)比例混勻。

2.4.5. 50%甲醇溶液：

取甲醇500 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.4.6. 乙腈飽和之正己烷溶液：

取正己烷1000 mL，加乙腈100 mL，振盪混勻後，靜置至完全分層後，取正己烷層。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

取甲酸1 mL，加甲醇使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

2.6.1. 標準溶液A：

取buquinolate、carnidazole、diaveridine、diclazuril、diminazene^(註)、halofuginone、HMMNI、isometamidium、ipronidazole-OH、2-methyl-5-nitroimidazole、nicarbazine、praziquantel、pyrantel、pyrimethamine、robenidine hydrochloride、tinidazole及zoalene對照用標準品各約5 mg，精稱確定，分別以甲醇溶解並定容至50 mL，作為標準原液；取imidocarb對照用標準品約5 mg，精確稱定，以乙腈：甲醇(4:1, v/v)溶液溶解並定容至50 mL，作為標準原液；取decoquinate對照用標準品約5 mg，精確稱定，以含10%甲酸之乙腈溶液溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。

臨用時取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液A。

2.6.2. 標準溶液B：

取dimetridazole、metronidazole、metronidazole-OH及ronidazole對照用標準品各約5 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液B。

註：diminazene為強鹼性藥物，標準原液須配製於PP材質之容量瓶中。

2.7. 檢液之調製：

將肌肉及內臟檢體均質，取約2 g，精確稱定；蛋類檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻，取約2 g，精確稱定；將蜂蜜檢體混勻，取約2 g，精確稱定；精確量取乳汁檢體2 mL，置於離心管中，依序加入陶瓷均質石1顆及預冷之去離子水10 mL，靜置10分鐘。加入萃取溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，加入萃取用粉劑，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振盪或以手激烈振盪1分鐘，於10°C，以5000 ×g離心1分鐘，收集上清液。殘渣再加入萃取溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，隨即以手激烈振盪數次，將殘渣打散，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，於10°C，以5000 ×g離心1分鐘，收集上清液。合併上清液。取上清液5 mL，加入乙腈飽和之正己烷溶液10 mL，振盪1分鐘，以5000 ×g離心1分鐘，取下層液，加入乙腈飽和之正己烷溶液10 mL，重複上述步驟1次，取下層液2 mL，加入DMSO 50 µL^(註)，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，殘留物以50%甲醇溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾後，供作檢液。

註：加入微量DMSO目的係避免吹氮濃縮至乾，影響halofuginone、dimetridazole及metronidazole之定量。

2.8. 檢量線之製作：

2.8.1. 肌肉、內臟、乳汁及蜂蜜

取空白檢體，分別加入標準溶液A及標準溶液B各10~250 µL，依2.7.節調製檢液，供作檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各抗原蟲劑之波峰面積，與對應之各抗原蟲劑濃度，分別製作1~25 ng/mL之檢量線。

2.8.2. 蛋類

取空白檢體，分別加入標準溶液A 10~250 μL 及標準溶液B 2~250 μL ，依2.7.節調製檢液，供作檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各抗原蟲劑之波峰面積，與對應之各抗原蟲劑濃度，分別製作0.2~25 ng/mL 之dimetridazole、metronidazole、metronidazole-OH及ronidazole檢量線，及1~25 ng/mL 之其餘藥物檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：Poroshell 120SB-C18，2.7 μm ，3.0 $\text{mm} \times 15 \text{ cm}$ 。

層析管溫度：40°C。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0 → 1	95 → 95	5 → 5
1 → 15	95 → 0	5 → 100
15 → 21	0 → 0	100 → 100
21 → 22	0 → 95	100 → 5
22 → 24	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.3 mL/min 。

注入量：10 μL 。

毛細管電壓(Capillary voltage)：

正離子電灑離子化(ESI^+)採用3.5 kV ；

負離子電灑離子化(ESI^-)採用3.0 kV 。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：100 L/hr 。

溶媒揮散流速(Desolvation rate)：700 L/hr 。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如附表一。

註：上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及檢量線溶液各10 μL ，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.8.節條件進行分析。就檢液與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^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各抗原蟲劑之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各抗原蟲劑之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M \times 2}$$

C：由檢量線求得檢液中各抗原蟲劑之濃度(μg/mL)

V：萃取檢體之萃取溶液之體積(20 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)或體積(mL)

2：濃縮倍數

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得(≤100%)，容許範圍如下：

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

附註：1. 本檢驗方法之定量極限如附表二。

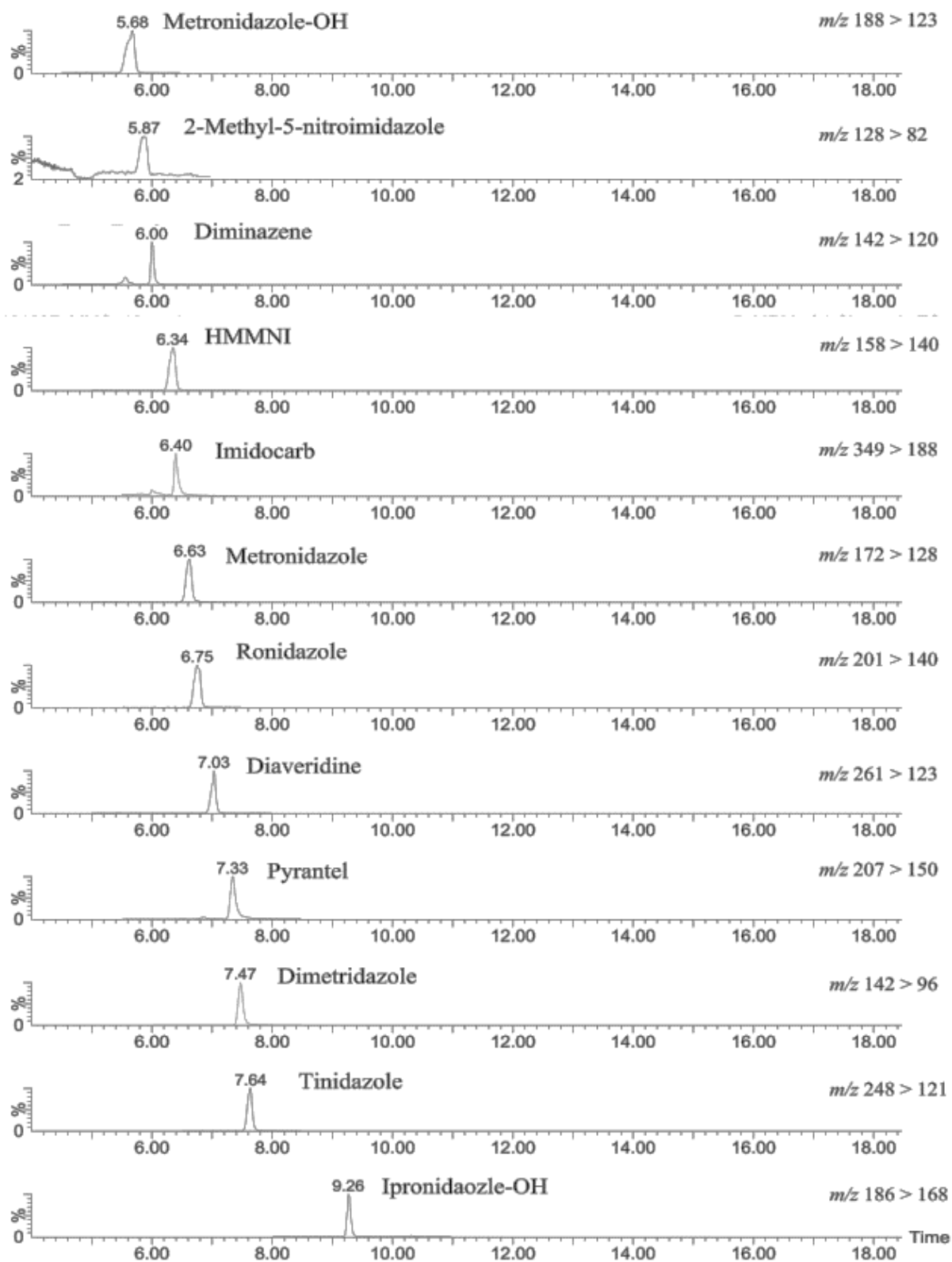
2. 為避免鹼性藥物被玻璃材質吸附而影響分析結果，檢液及標準溶液上機分析前宜置於PP材質之樣品瓶中，並盡速分析。

3. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

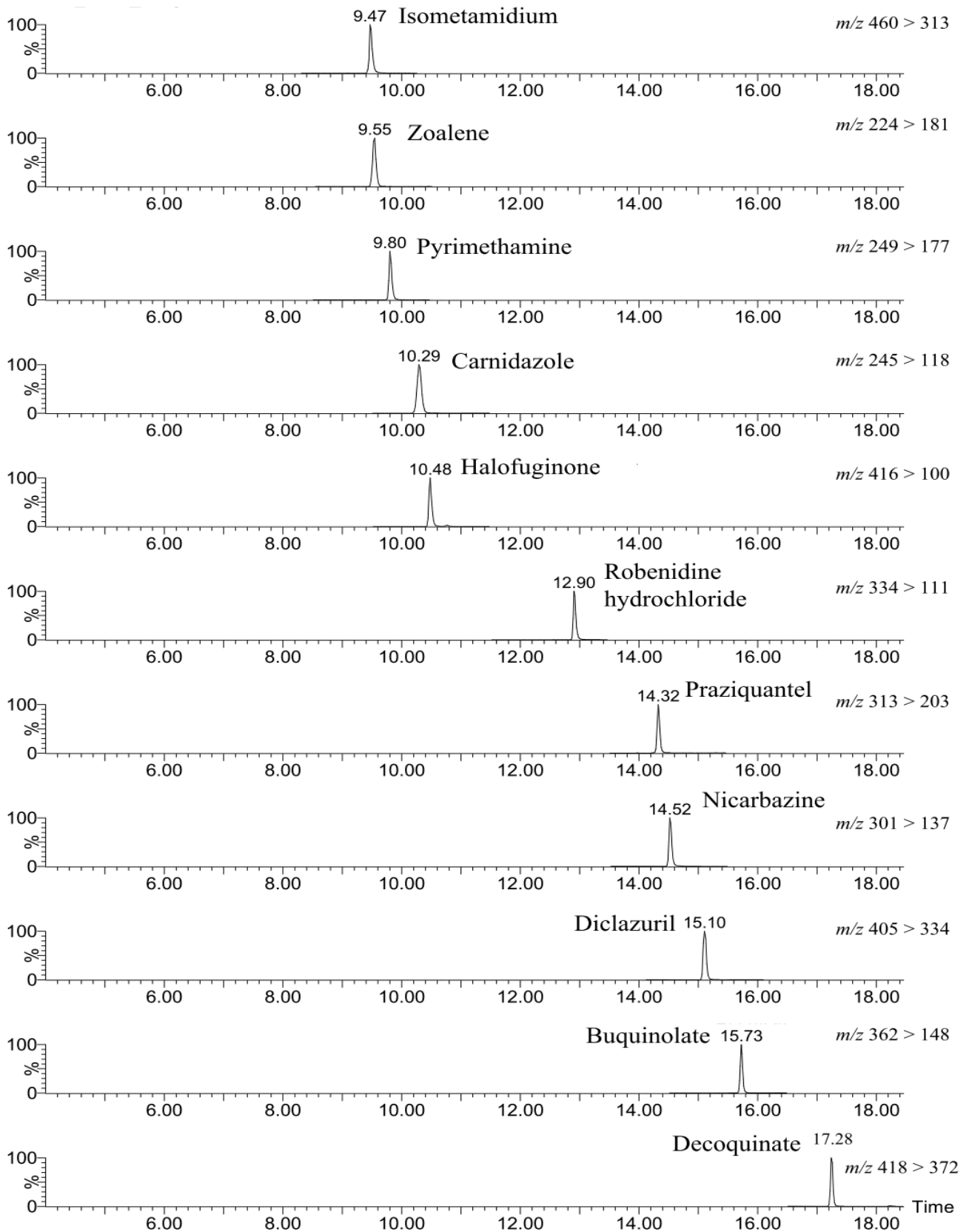
參考文獻：

1. 彭冠智、黃志能、沈盈如、林俞廷、張順憲、賴宥勳、林汝青、廖家鼎、高雅敏、曾素香、王德原。2018。食品中藥物殘留之多重快速檢驗技術精進研究。衛生福利部食品藥物管理署107年自行研究計畫。
2. Shao, B., Wu, X., Zhang, J., Duan, H., Chu, X. and Wu, Y. 2009. Development of a rapid lc–ms–ms method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. *Chromatographia* 69: 1083-1088.
3. Yamada, R., Kozono, M., Ohmori, T., Morimatsu, F. and Kitayama, M. 2006. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 54-65.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析metronidazole-OH等23項抗原蟲劑標準品之MRM圖譜



圖、以LC-MS/MS分析metronidazole-OH等23項抗原蟲劑標準品之MRM圖譜(續)

附表一、Buquinolate等23項抗原蟲劑之多重反應偵測模式參數

項次	分析物		離子化 模式	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	英文名	中文名		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
1	Buquinolate	-	ESI ⁺	362 > 148*	58	50
				362 > 204		40
				362 > 260		22
2	Carnidazole	-	ESI ⁺	245 > 118*	10	12
				245 > 75		30
				245 > 60		46
3	Decoquate	滴克奎諾	ESI ⁺	418 > 372*	64	20
				418 > 204		40
				418 > 232		34
4	Diaveridine	-	ESI ⁺	261 > 123*	52	22
				261 > 245		26
				261 > 81		42
5	Diclazuril	戴克拉爾	ESI ⁻	405 > 334*	20	18
				407 > 336		22
6	Dimetridazole	-	ESI ⁺	142 > 96*	12	16
				142 > 81		22
7	Diminazene	-	ESI ⁺	142 > 120*	20	5
				142 > 135		5
				282 > 120		5
				282 > 135		5
8	Halofuginone	海樂福精	ESI ⁺	416 > 100*	24	20
				416 > 120		20
				416 > 138		20
9	HMMNI (2-Hydroxymethyl-1- methyl-5-nitro-1H- imidazole)	-	ESI ⁺	158 > 140*	48	10
				158 > 55		16
				158 > 94		22
10	Imidocarb	-	ESI ⁺	349 > 188*	36	24
				349 > 90		78
				349 > 162		22

附表一、Buquinolate等23項抗原蟲劑之多重反應偵測模式參數(續)

項次	分析物		離子化 模式	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	英文名	中文名		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
11	Ipronidazole-OH	-	ESI ⁺	186 > 168*	28	12
				186 > 122		20
				186 > 82		24
12	Isometamidium	-	ESI ⁺	460 > 313*	4	18
				460 > 298		26
				460 > 269		46
13	2-Methyl-5- nitroimidazole	-	ESI ⁺	128 > 82*	6	14
				128 > 56		12
				128 > 111		14
14	Metronidazole	-	ESI ⁺	172 > 128*	20	14
				172 > 82		20
				172 > 111		20
15	Metronidazole-OH	-	ESI ⁺	188 > 123*	28	12
				188 > 126		14
				188 > 144		12
16	Nicarbazine	乃卡巴精	ESI ⁻	301 > 137*	36	20
				301 > 107		38
				301 > 46		48
17	Praziquantel	-	ESI ⁺	313 > 203*	40	14
				313 > 174		26
				313 > 132		44
18	Pyrantel	-	ESI ⁺	207 > 150*	24	26
				207 > 136		26
				207 > 97		22
19	Pyrimethamine	-	ESI ⁺	249 > 177*	20	26
				249 > 198		38
				249 > 233		26

附表一、Buquinolate等23項抗原蟲劑之多重反應偵測模式參數(續)

項次	分析物		離子化 模式	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	英文名	中文名		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
20	Robenidine hydrochloride	羅苯嘧啶	ESI ⁺	334 > 111*	52	42
				334 > 138		24
				334 > 155		18
21	Ronidazole	-	ESI ⁺	201 > 140*	24	12
				201 > 55		20
22	Tinidazole	-	ESI ⁺	248 > 121*	15	17
				248 > 82		25
23	Zoalene	柔林	ESI ⁻	224 > 181*	10	10
				224 > 77		24
				224 > 151		16

*為定量離子對，定性離子對可視基質情況選擇適合之至少一對離子對

附表二、Buquinolate等23項抗原蟲劑之定量極限

項次	分析物		定量極限(ppm)				
	英文名	中文名	肌肉組織	內臟組織	蛋類	乳汁	蜂蜜
1	Buquinolate	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
2	Carnidazole	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
3	Decoquinolate	滴克奎諾	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
4	Diaveridine	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
5	Diclazuril	戴克拉爾	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
6	Dimetridazole	-	0.005	0.005	0.001	0.005	0.005
7	Diminazene	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
8	Halofuginone	海樂福精	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
9	HMMNI	-	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
10	Imidocarb	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.025
11	Ipronidazole-OH	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
12	Isometamidium	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
13	2-Methyl-5-nitroimidazole	-	0.01	0.01	0.01	0.025	0.025
14	Metronidazole	-	0.005	0.005	0.001	0.005	0.005
15	Metronidazole-OH	-	0.005	0.005	0.001	0.005	0.005
16	Nicarbazine	乃卡巴精	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
17	Praziquantel	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
18	Pryrantel	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
19	Pyrimethamine	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
20	Robenidine hydrochloride	羅苯嘧啶	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
21	Ronidazole	-	0.005	0.005	0.001	0.005	0.005
22	Tinidazole	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
23	Zoalene	柔林	0.005	0.005	0.01	0.01	0.01