

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－氟尼辛及托芬那酸之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-

Test of Flunixin and Tolfenamic Acid

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜產品之肌肉、內臟、脂肪及乳汁中氟尼辛(flunixin)及托芬那酸(tolfenamic acid)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經酵素水解及萃取後，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：CORTECS C18，2.7  $\mu\text{m}$ ，內徑2.1 mm  $\times$  10 cm，或同級品。

2.1.2. 均質機(Homogenizer)。

2.1.3. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder<sup>®</sup>，1000 rpm以上，或其他具振盪功能之裝置。

2.1.4. 水浴(Water bath)：能維持水溫溫差在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內者。

2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達5000  $\times g$ 以上，且溫度控制可達 $10^\circ\text{C}$ 以下者。

2.1.6. 振盪器(Shaker)。

2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.1.8. 酸鹼度測定儀(pH meter)。

2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；冰醋酸、甲酸、醋酸鈉、無水硫酸鎂、氯化鈉、檸檬酸鈉(sodium citrate)及檸檬酸氫二鈉(disodium hydrogen citrate sesquihydrate)均採用試藥特級； $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶溶液( $\beta$ -glucuronidase, type H-2, 含glucuronidase  $\geq 85000$  unit/mL及sulfatase  $\leq 7500$  unit/mL)；去離子水(比電阻於 $25^\circ\text{C}$ 可達18  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；氟尼辛及托芬那酸對照用標準品。

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，褐色。
- 2.3.3. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
- 2.3.4. 萃取用粉劑<sup>(註)</sup>：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，或同級品。
- 2.3.5. 濾膜：孔徑0.22 μm，PTFE材質。
- 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：

### 2.4.1.0.2 M醋酸鈉緩衝液：

稱取醋酸鈉16.4 g，加入去離子水900 mL溶解，以冰醋酸調整pH值至 $5.2 \pm 0.1$ ，再加去離子水使成1000 mL。

### 2.4.2. 含1%甲酸之乙腈溶液：

取甲酸10 mL，加入乙腈使成1000 mL。

## 2.5. 移動相溶液之調製：

### 2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸0.5 mL，加入去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

### 2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。

## 2.6. 標準溶液之配製：

取氟尼辛及托芬那酸對照用標準品各約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，冷凍貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至100 ng/mL，供作標準溶液。

## 2.7. 檢液之調製：

### 2.7.1. 肌肉、內臟及脂肪：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆及0.2 M醋酸鈉緩衝液10 mL，蓋上離心管蓋，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μL，於37°C水浴中水解1小時。加入含1%甲酸之乙腈溶液10 mL，蓋上離心管蓋，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，再加入萃取用粉劑並蓋上離心管蓋，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振盪或以手激烈振盪1分鐘，於10°C以5000 ×g離心1分鐘。取上清液500 μL(a)，加

入去離子水使體積為1000  $\mu\text{L}$  (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

#### 2.7.2. 乳汁：

將檢體混勻後，精確量取2 mL，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆及0.2 M醋酸鈉緩衝液10 mL，蓋上離心管蓋，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，加入 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶溶液100  $\mu\text{L}$ ，於37°C水浴中水解1小時。以下步驟依2.7.1節操作，供作檢液。

#### 2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7節調製後之上清液，量取500  $\mu\text{L}$  (a)，分別加入標準溶液2~100  $\mu\text{L}$ ，再加入去離子水使體積為1000  $\mu\text{L}$  (b)，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就氟尼辛及托芬那酸之波峰面積，與對應之氟尼辛及托芬那酸濃度，分別製作0.2~10 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件<sup>(註)</sup>：

層析管：CORTECS C18，2.7  $\mu\text{m}$ ，內徑2.1 mm  $\times$  10 cm。

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 (%)
0.0 $\rightarrow$ 2.0	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20
2.0 $\rightarrow$ 6.0	80 $\rightarrow$ 20	20 $\rightarrow$ 80
6.0 $\rightarrow$ 6.5	20 $\rightarrow$ 0	80 $\rightarrow$ 100
6.5 $\rightarrow$ 9.5	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
9.5 $\rightarrow$ 10.0	0 $\rightarrow$ 80	100 $\rightarrow$ 20
10.0 $\rightarrow$ 13.0	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20

移動相流速：0.40 mL/min。

注入量：20  $\mu\text{L}$ 。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：

正離子電灑離子化(ESI<sup>+</sup>)採用 5.5 kV。

負離子電灑離子化(ESI<sup>-</sup>)採用 4.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

加熱管溫度(Turbo heater temperature)：500°C。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：50 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：50 psi。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。  
偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)與  
碰撞能量(collision energy)如下表。

分析物	離子化 模式	離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 電壓 (eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Flunixin	ESI <sup>+</sup>	297 > 264*	60	32
		297 > 259	60	48
Tolfenamic acid	ESI <sup>-</sup>	260 > 216*	60	23
		262 > 218	60	23

\*定量離子對

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：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各20 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。就檢液與基質匹配檢  
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<sup>(註)</sup>  
鑑別之，並依下列計算式求出檢體中氟尼辛或托芬那酸之含量  
(ppm)：

$$\text{檢體中氟尼辛或托芬那酸之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中氟尼辛或托芬那酸之濃度  
(ng/mL)

V：萃取檢體之含1%甲酸之乙腈溶液體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)或體積(mL)

F：稀釋倍數，由b/a求得

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：

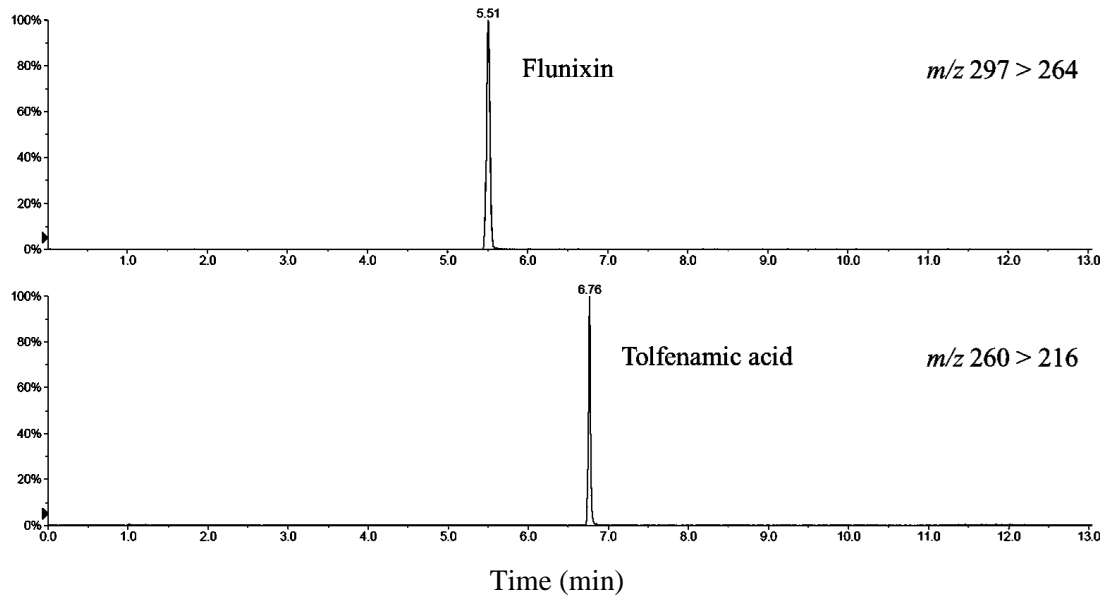
相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

- 附註：1. 本檢驗方法之定量極限，氟尼辛及托芬那酸均為 0.002 ppm。  
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Olejnik, M., Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T. and Zmudzki, J. 2013. Influence of matrix effect on the performance of the method for the official residue control of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal muscle. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27: 437-442.
2. Van Hoof, N., De Wasch, K., Poelmans, S., Noppe, H. and De Brabander, H. 2004. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine muscle: optimisation of ion trap parameters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 2823-2829.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析氟尼辛及托芬那酸標準品之MRM圖譜