

水產品中動物用藥殘留量檢驗方法—  
硝基咪唑類及其代謝物之多重殘留分析

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Aquatic Products -Multiresidue  
Analysis of Nitroimidazoles and their Metabolites

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於水產品中carnidazole等9項硝基咪唑類及其代謝物(品項見附表)之檢驗。
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  $\mu\text{m}$ ，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  $\times\text{g}$ 以上者。
    - 2.1.6. 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。
    - 2.1.7. 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)；carnidazole等9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。
    - 2.3.3. 樣品瓶：1 mL。
    - 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22  $\mu\text{m}$ ，PTFE材質。
    - 2.3.5. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9312，或同級品。
    - 2.3.6. 萃取用粉劑<sup>(註)</sup>：含無水硫酸鎂6 g及醋酸鈉1.5 g。  
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(95:5, v/v)溶液：

取乙腈與甲醇以95：5 (v/v)比例混勻。

##### 2.4.2. 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。

##### 2.4.3. 20%甲醇溶液：

取甲醇40 mL，加去離子水使成200 mL。

##### 2.4.4. 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：

取carnidazole、dimetridazole、HMMNI、ipronidazole-OH、2-methyl-5-nitroimidazole、metronidazole、metronidazole-OH、ronidazole及tinidazole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，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。

#### 2.7. 檢液之調製：

將檢體均質，取約2 g，精確稱定，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  $\mu$ L<sup>(註)</sup>，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，殘留物以20%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dimetridazole及metronidazole之定量。

## 2.8. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別加入標準溶液2~250  $\mu$ L，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。就各硝基咪唑及其代謝物之波峰面積，與對應之各硝基咪唑及其代謝物濃度，分別製作0.2~25 ng/mL之檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件<sup>(註)</sup>：

層析管：Poroshell 120SB-C18，2.7  $\mu$ m，3.0 mm  $\times$  15 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 $\rightarrow$ 1	95 $\rightarrow$ 95	5 $\rightarrow$ 5
1 $\rightarrow$ 15	95 $\rightarrow$ 0	5 $\rightarrow$ 100
15 $\rightarrow$ 21	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
21 $\rightarrow$ 22	0 $\rightarrow$ 95	100 $\rightarrow$ 5
22 $\rightarrow$ 26	95 $\rightarrow$ 95	5 $\rightarrow$ 5

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10  $\mu$ L。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

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。

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<sup>(註)</sup>鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各硝基咪唑及其代謝物之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各硝基咪唑及其代謝物之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M \times 2}$$

C：由檢量線求得檢液中各硝基咪唑及其代謝物之濃度(µg/mL)

V：萃取檢體之萃取溶液體積(20 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

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

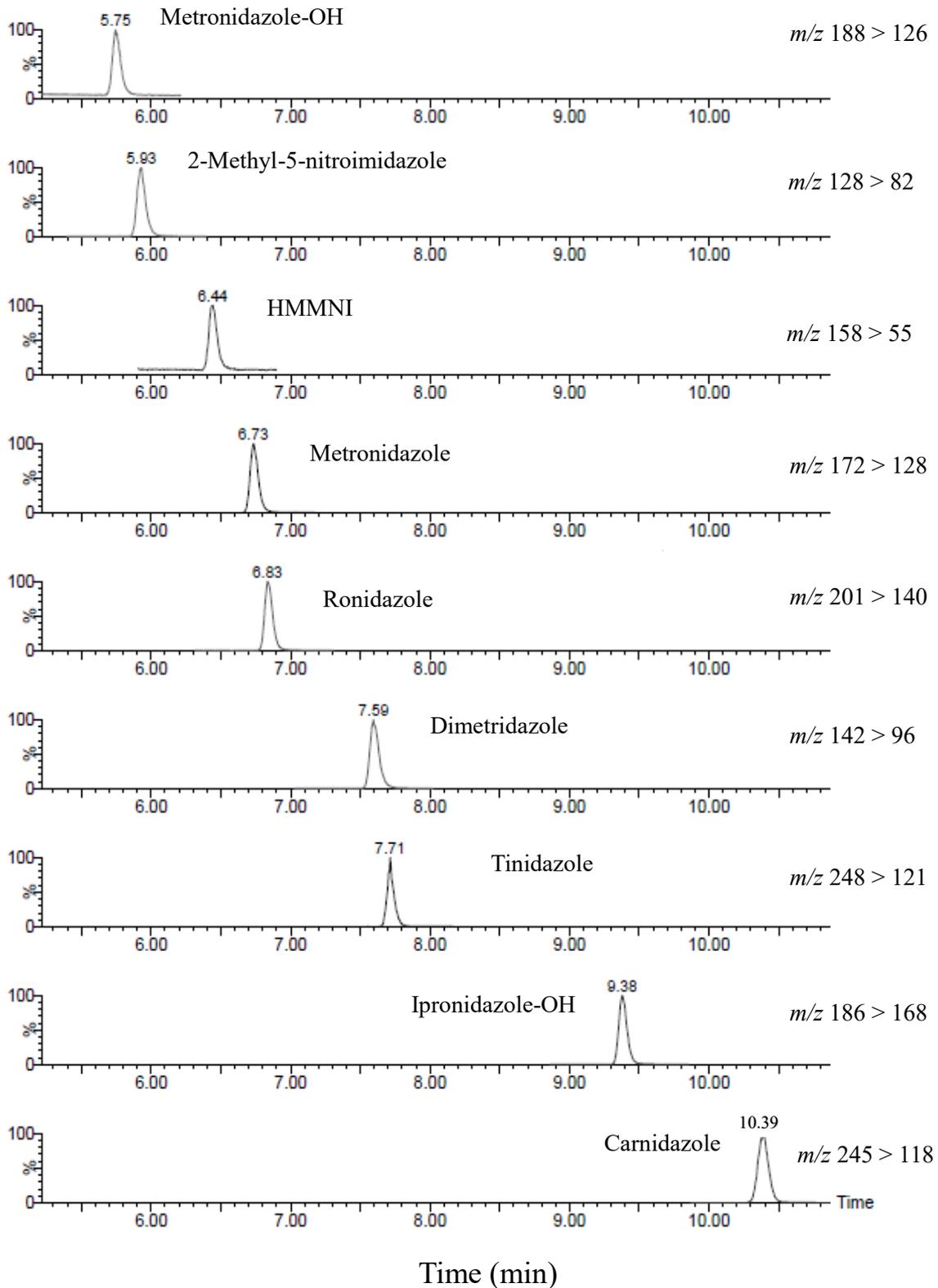
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，carnidazole等9項硝基咪唑類及其代謝物均為0.001 ppm。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

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。

### 參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析metronidazole-OH等9項硝基咪唑類及其代謝物標準品之MRM圖譜

附表、Carnidazole等9項硝基咪唑類及其代謝物之多重反應偵測模式參數

項次	分析物	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
		前驅離子( $m/z$ ) > 產物離子( $m/z$ )		
1	Carnidazole	245 > 118*	10	12
		245 > 75		30
		245 > 60		46
2	Dimetridazole	142 > 96*	12	16
		142 > 81		22
3	HMMNI (2-Hydroxymethyl-1-methyl-5-nitro-1H-imidazole)	158 > 55*	48	10
		158 > 140		16
		158 > 94		22
4	Ipronidazole-OH	186 > 168*	28	12
		186 > 122		20
		186 > 82		24
5	2-Methyl-5-nitroimidazole	128 > 82*	6	14
		128 > 56		12
		128 > 111		14
6	Metronidazole	172 > 128*	20	14
		172 > 82		20
		172 > 111		20
7	Metronidazole-OH	188 > 126*	28	12
		188 > 144		14
		188 > 123		12
8	Ronidazole	201 > 140*	24	12
		201 > 55		20
9	Tinidazole	248 > 121*	15	17
		248 > 82		25

\*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