

## 食品中動物用藥殘留量檢驗方法—Closantel之檢驗

### Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods - Test of Closantel

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜產品之肌肉、內臟、脂、蛋及乳汁中closantel之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，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  $\mu\text{m}$ ，2.1 mm  $\times$  10 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<sup>®</sup>，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；丙酮、正己烷、甲酸及二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)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)；closantel對照用標準品；closantel-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>同位素內部標準品。
  - 2.3. 器具及材料：
    - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
    - 2.3.2. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
    - 2.3.3. 容量瓶：50 mL。
    - 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22  $\mu\text{m}$ ，PTFE材質。
  - 2.4. 試劑之調製：
    - 2.4.1. 萃取溶液：

取乙腈與丙酮以60：40 (v/v)比例混勻。
    - 2.4.2. 50% 甲醇溶液：

取甲醇500 mL，加去離子水使成1000 mL。

- 2.4.3. 乙腈飽和之正己烷溶液：  
取正己烷500 mL，加入乙腈50 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closantel對照用標準品約5 mg，精稱確定，以二甲基亞砷溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量標準原液，以甲醇稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液。
- 2.7. 內部標準溶液之配製：  
取closantel-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>內部標準品約5 mg，精稱確定，以二甲基亞砷溶解後，再以甲醇定容至50 mL，作為內部標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量內部標準原液，以甲醇稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液。
- 2.8. 檢液之調製：  
將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定；乳汁精確量取2 mL，置於離心管中，加入內部標準溶液500 µL，再加入陶瓷均質石1顆及萃取溶液10 mL，蓋上離心管蓋，旋渦混合1分鐘，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪1分鐘，以5000 ×g離心1分鐘，取上清液。殘留物再加入萃取溶液10 mL，重複上述步驟1次，合併上清液。取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，作為檢液原液。取檢液原液1 mL (a)，於40°C水浴中以氮氣吹至剛乾，殘留物以50%甲醇溶液溶解並定容至5 mL (b)，取1 mL經濾膜過濾後，供作檢液。
- 2.9. 基質匹配檢量線之製作：  
取空白檢體，依2.8節調製未添加內部標準品之空白檢液原液，取空白檢液原液2 mL，於40°C水浴中以氮氣吹至剛乾，殘留物以50%甲醇溶液溶解並定容至5 mL，取500 µL，分別加入標準溶液0.5~20 µL、內部標準溶液5 µL及50%甲醇溶液，使體積為1000

μL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就closantel與內部標準品之波峰面積比，與對應之closantel濃度，製作0.5~20 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 μm，2.1 mm × 10 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 (%)
0.0 → 5.0	80 → 0	20 → 100
5.0 → 10.0	0 → 0	100 → 100
10.0 → 10.5	0 → 80	100 → 20
10.5 → 13.5	80 → 80	20 → 20

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：-4.5 kV。

離子化模式：ESI負離子。

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	離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子( $m/z$ ) > 產物離子( $m/z$ )		
Closantel	660.8 > 345*	-60	-50
	660.8 > 315	-60	-48
	660.8 > 279	-60	-52
Closantel- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	666.8 > 127	-20	-85

\*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。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

## 2.10. 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10 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.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closantel之含量(ppm)：

$$\text{檢體中 closantel 之含量 (ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中closantel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或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

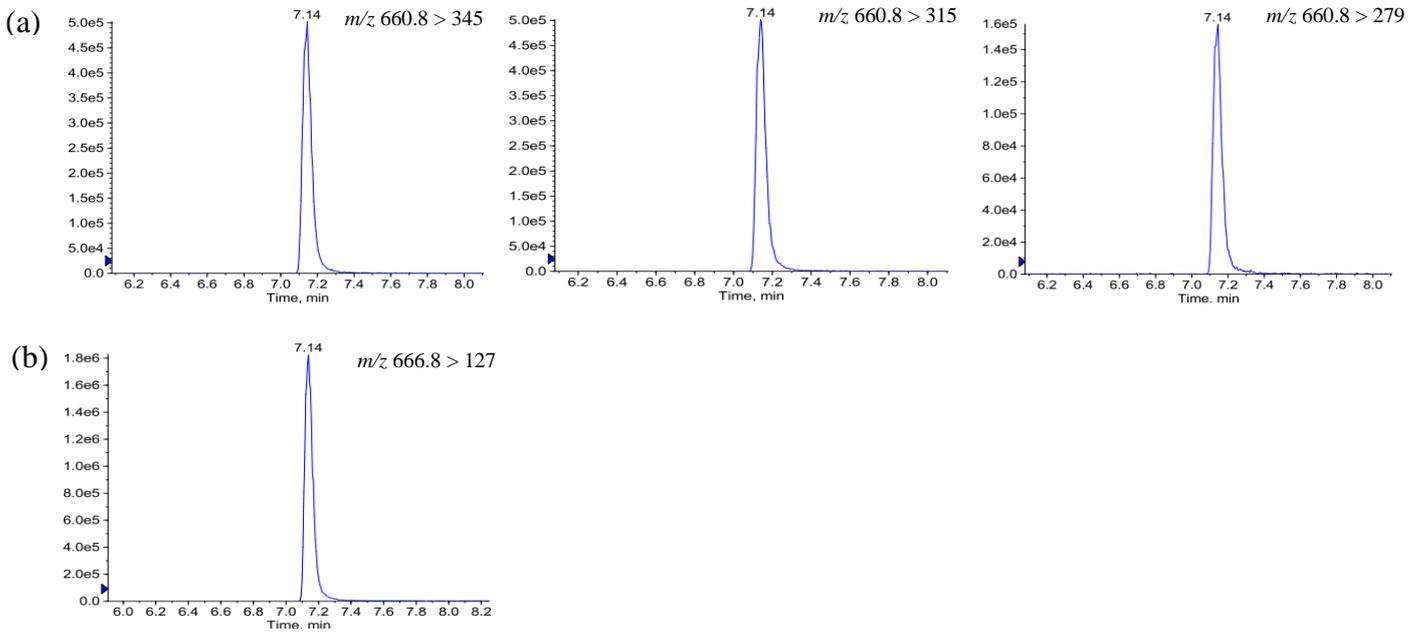
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，於肌肉、內臟、脂、蛋及乳汁均為0.025 ppm。

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. Sun, H., Wang, F. and Ai, L. 2007. Validated method for determination of ultra-trace closantel residues in bovine tissues and milk by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1175: 227-233.
2. Lai, S. S., Yeung, H. S., Lee, W. O., Ho, C. and Wong, Y. T. 2011. Determination of closantel and rafoxanide in animal tissues by online anionic mixed-mode solid-phase extraction followed by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Sep. Sci. 34: 1366-1374.

參考層析圖譜：



圖、以LC/MS/MS分析closantel標準品(a)及closantel- $^{13}\text{C}_6$ 同位素內部標準品(b)之MRM圖譜