蛋類中動物用藥殘留量檢驗方法－Prednisolone之檢驗
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Eggs - Test of Prednisolone

1.適用範圍：本檢驗方法適用於蛋類中prednisolone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：Shim-pack GIST C18，2 μm，內徑 2.1 mm × 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®，1000 rpm以上，或同級品。

2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達2000 ×g以上，且溫度控制可達4℃以下者。

2.1.5. 微量離心機(Microcentrifuge)：可達14000 ×g以上者。

2.1.6. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。

2.1.7. 振盪器(Shaker)。

2.1.8. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.1.9. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。

2.2. 試藥：甲醇、乙腈及正己烷均採用液相層析級；冰醋酸採用試藥特級；無水醋酸鈉、primary secondary amine (PSA)及 octadecylsilane, end-capped (C18EC)均採用分析級；去離子水(比電阻於 25℃可達 18 MΩ·cm 以上)；prednisolone 對照用標準品；prednisolone-d_8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. 微量離心管：2 mL，PP材質。

2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PTFE材質。

2.3.4. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)[註1]：Bond Elut

QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。

2.3.5. 淨化用離心管(註2)：含C18EC及PSA各100 mg。

註1：陶瓷均質石可視檢體黏稠度自行評估使用。

註2：可依需求自行評估使用市售淨化用組合套組。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 含1%醋酸之乙腈溶液：

取冰醋酸10 mL，加乙腈使成1000 mL。

2.4.2. 乙腈飽和之正己烷溶液：

取正己烷500 mL，加乙腈50 mL，振盪混勻後，靜置至完全分層後，取正己烷層。

2.4.3. 30%乙腈溶液：

取乙腈30 mL，加去離子水使成100 mL。

2.5. 內部標準溶液之配製：

取prednisolone-d_8內部標準品約10 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至10 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100 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

取prednisolone對照用標準品約10 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至10 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1000 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液50 µL及去離子水5 mL，旋渦混合，再加入含1%醋酸之乙腈溶液10 mL，旋渦混合30秒，超音波振盪30分鐘，加入無水醋酸鈉5 g，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以2000 ×g離心10分鐘，取上清液。殘留物再加入含1%醋酸之乙腈溶液10 mL，重複上述步驟萃取1次，合併上清液，加入乙腈飽和之正己烷溶液20 mL，振盪10分鐘，於4℃，以2000 ×g離心10分鐘，棄正己烷層，下層液供淨化用。

2.7.2. 淨化：

取2.7.1.節供淨化用溶液，置於淨化用離心管，以高速分散

裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以2000 ×g離心10分鐘，取上清液，於50°C以氮氣吹乾，殘留物以30%乙腈溶液1 mL溶解，倒入微量離心管中，以14000 ×g離心10分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別加入標準溶液1～50 μL及內部標準溶液50 μL，依2.7.節調製檢量線溶液，並依下列條件進行分析。就prednisolone與內部標準品之波峰面積比，與對應之prednisolone濃度，製作1～50 ng/mL檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件(註)：

層析管：Shim-pack GIST C18，2 μm，內徑 2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：40°C。

移動相溶液：A液(去離子水)與B液(乙腈)以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 2.0	75 → 54	25 → 46
2.0 → 6.5	54 → 54	46 → 46
6.5 → 8.0	54 → 25	46 → 75
8.0 → 10.5	25 → 0	75 → 100
10.5 → 12.0	0 → 0	100 → 100
12.0 → 12.1	0 → 75	100 → 25
12.1 → 15.0	75 → 75	25 → 25

移動相流速：0.5 mL/min。

注入量：5 μL。

介面電壓(Interface voltage)：4 kV。

離子化模式：ESI負離子。

介面溫度(Interface temperature)：300°C。

霧化氣體流速(Nebulizing gas flow)：3.0 L/min。

加熱氣體流速(Heating gas flow)：15.0 L/min。

脫溶劑管溫度(Desolvent line temperature)：250°C。

加熱塊溫度(Heat block temperature)：400°C。

乾燥氣體流速(Drying gas flow)：5.0 L/min。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對Q1/Q3聚焦電壓(Q1/Q3 Pre

Bias)及碰撞電壓(collision voltage)如下表。

分析物	離子對 前驅離子(*m/z*) > 產物離子(*m/z*)	Q1/Q3 聚焦電壓 (V)	碰撞電壓 (V)
Prednisolone	405 > 329*	16/20	19
	405 > 295	16/17	34
Prednisolone-d_8	413 > 337	20/18	24

*定量離子對。

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。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及檢量線溶液各5 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prednisolone之含量(ppm)：

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

C：由檢量線求得檢液中prednisolone之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

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為0.0002 ppm。

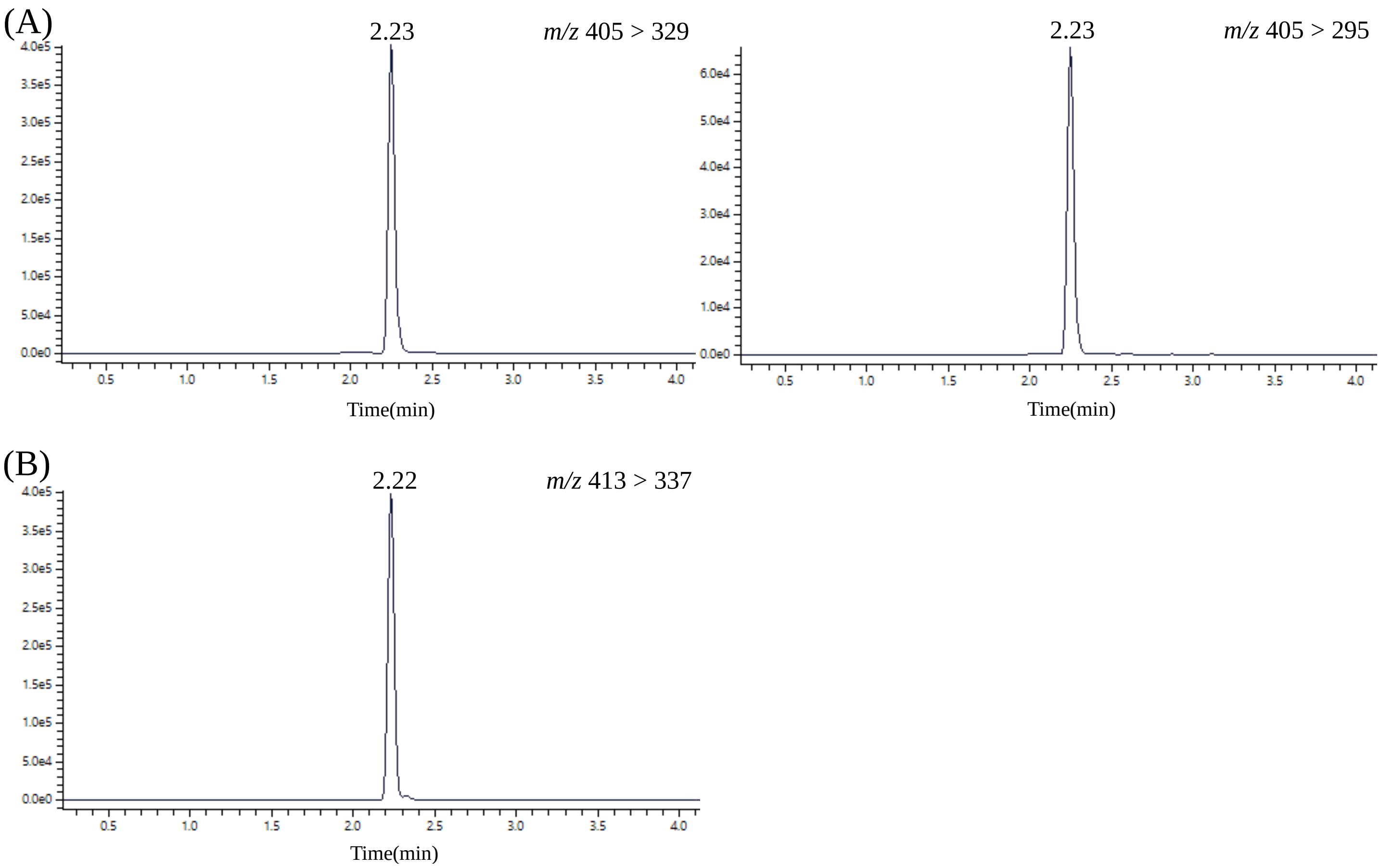
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. 衛生福利部食品藥物管理署。2019。食品中動物用藥殘留量檢驗方法－荷爾蒙類多重殘留分析(TFDAV0010.00)。108年10月29日公開。

2. Park, K. H., Choi, J. H., Abd EI-Aty, A. M., Rahman, M. M., Jang, J., Ko, A. Y., Kwon, K. S., Park, H. R., Kim, H. S. and Shim, J. H. 2013. Quantifying fenobucarb residue levels in beef muscles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and QuEChERS sample preparation. J. Food Chem. 138: 2306-2311.
3. Park, K. H., Choi, J. H., Abd EI-Aty, A. M., Cho, S. K., Park, J. H., Kwon, K. S., Park, H. R., Kim, H. S., Shin, H. C., Kim, M. R. and Shim, J. H. 2012. Development of QuEChERS-based extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying flumethasone residues in beef muscle. Meat Sci. 92: 749-753.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析prednisolone標準品(A)及prednisolone-d_8內部標準品(B)之MRM圖譜