

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－Piperazine之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods - Test of Piperazine

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蛋類中piperazine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：XBridge® BEH HILIC，2.5 μm ，內徑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，且溫度控制可達4°C以下者。
 - 2.1.6. 高速離心機(High speed centrifuge)：可達12000 $\times g$ 以上者。
 - 2.1.7. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder®，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.8. 超音波振盪器(Ultrasonicator)
 - 2.1.9. 固相真空萃取裝置(Solid phase vacuum extraction manifolds)。
 - 2.1.10. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：乙腈、甲醇及正己烷均採用液相層析級；醋酸銨、甲酸、二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、三氯醋酸及氨水(25%)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；piperazine對照用標準品；piperazine- 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. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
 - 2.3.3. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Bond Elute Plex PCX，200 mg，6 mL，或同級品。
 - 2.3.4. 容量瓶：10 mL。

2.3.5. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 5%三氯醋酸溶液：

稱取三氯醋酸10 g，以去離子水溶解使成200 mL。

2.4.2. 氨水:乙腈(1:9, v/v)溶液：

取氨水與乙腈以1：9 (v/v)比例混勻，臨用時調製。

2.4.3. 2%甲酸溶液：

取甲酸4 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。

2.4.5. 2 M醋酸銨溶液：

稱取醋酸銨15.42 g，以去離子水溶解使成100 mL。

2.4.6. 50 mM醋酸銨溶液：

取2 M醋酸銨溶液25 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸1 mL，加入50 mM醋酸銨溶液使成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，加入乙腈使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取piperazine- 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1000 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取piperazine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100 ng/mL，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1 萃取：

檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液50 μL ，再依序加入陶瓷均

質石1顆、5%三氯醋酸溶液6 mL及乙腈2 mL，蓋上離心管蓋，旋渦混合1分鐘，於30°C以下超音波振盪10分鐘，再於4°C以5000 ×g離心10分鐘，取上清液。殘留物再加入5%三氯醋酸溶液6 mL及乙腈2 mL，蓋上離心管蓋，旋渦混合1分鐘，重複上述步驟1次，合併上清液。加入乙腈飽和之正己烷溶液10 mL，振盪1分鐘，於4°C以5000 ×g離心5分鐘，取下層液供淨化用。

2.8.2 淨化：

取2.8.1節供淨化用溶液，注入預先以甲醇5 mL、去離子水5 mL及2%甲酸溶液5 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液，依序以2%甲酸溶液5 mL、去離子水5 mL及甲醇5 mL清洗固相萃取匣，棄流出液。以氨水：乙腈(1:9, v/v)溶液10 mL沖提，收集沖提液，作為檢液原液。加入DMSO 50 µL，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，殘留物以乙腈溶解並定容至10 mL，取1 mL，於常溫以12000 ×g離心3分鐘，取上清液，經濾膜過濾，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，加入DMSO 50 µL，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，殘留物以乙腈溶解並定容至5 mL。取500 µL，分別加入標準溶液20~250 µL、內部標準溶液5 µL及乙腈，使體積為1000 µL，混合均勻，於常溫以12000 ×g離心3分鐘，取上清液，經濾膜過濾，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piperazine與內部標準品之波峰面積比，與對應之piperazine濃度，製作2~25 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：XBridge® BEH HILIC，2.5 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 → 1.0	5 → 5	95 → 95
1.0 → 8.5	5 → 30	95 → 70
8.5 → 10.0	30 → 50	70 → 50
10.0 → 11.0	50 → 5	50 → 95
11.0 → 23.0	5 → 5	95 → 95

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 µL。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：5.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

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。

氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：High。

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)		
Piperazine	87 > 44*	7	25
	87 > 70	12	21
Piperazine-d ₈	95 > 48	12	27

*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。

2.10. 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^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中piperazine之含量(ppm)：

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

C：由基質匹配檢量線求得檢液中piperazine之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(10 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

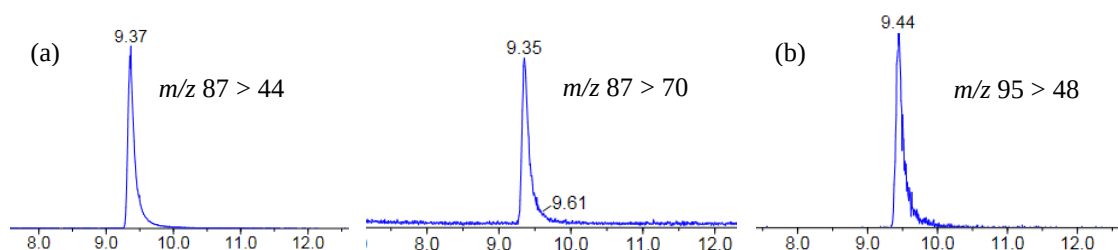
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.01 ppm。

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. Xie, K., Liu, Y. N., Sun, L., Pang, M., Xie, X., Gao, Q., Wang, B., Zhang, Y., Wang, R., Zhang, G., Dai, G. and Wang, J. 2017. Quantification of piperazine in chicken muscle by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Food Anal. Methods 10: 1736-1744.
2. Chung, S. W. C. and Lam, C. H. 2015. Development of a 15-class multiresidue method for analyzing 78 hydrophilic and hydrophobic veterinary drugs in milk, egg and meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Methods 7: 6764-6776.

參考層析圖譜



圖、以 LC-MS/MS 分析 piperazine 標準品(a)及 piperazine- d_8 內部標準品 (b)之 MRM 圖譜