

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－離子型抗球蟲藥之檢驗修正草案總說明

為加強食品中動物用藥殘留量之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中動物用藥殘留量檢驗方法－離子型抗球蟲藥之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、「裝置」刪除「固相真空萃取裝置」。
- 二、「試藥」之正己烷改採用液相層析級。
- 三、「試劑之調製」增列「乙腈飽和之正己烷溶液」。
- 四、修正「標準溶液之配製」濃度。
- 五、「檢液之調製」修正取樣量及最後定容體積。
- 六、增列「基質匹配檢量線之製作」濃度範圍。
- 七、「液相層析串聯質譜測定條件」增列層析管。
- 八、「鑑別試驗及含量測定」之「標準溶液」修正為「基質匹配檢量線溶液」。
- 九、附註一修正「孟寧素」及「那寧素」於肌肉及內臟之定量極限，並將「乳品」修正為「乳汁」，另增列附註二。
- 十、增列參考文獻及增修訂部分文字。

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－離子型抗球蟲藥之檢驗修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中拉薩羅(lasalocid)、馬杜拉黴素(maduramicin)、孟寧素(monensin)、那寧素(narasin)、及沙利黴素(salinomycin)等5品項抗球蟲藥之檢驗。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC BEH C8, 1.7 μm, 內徑2.1 mm × 10 cm, 或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)。</p> <p>2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.1.4. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2. 試藥：甲酸、甲醇、乙腈及正己烷均採用液相層析級；無水硫酸鈉採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；拉薩羅(lasalocid A sodium salt)、馬杜拉黴素(maduramicin ammonium)、孟寧素(monensin sodium salt)、那寧素(narasin)及沙利黴素(salinomycin SV sodium salt pentahemihydrate)對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL, PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：2 mL、5 mL及10 mL。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm, PVDF材質。</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中拉薩羅(lasalocid)、馬杜拉黴素(maduramicin)、孟寧素(monensin)、那寧素(narasin)、及沙利黴素(salinomycin) 5品項抗球蟲藥之檢驗。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC BEH C8, 1.7 μm, 內徑2.1 mm × 10 cm, 或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)。</p> <p>2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.1.4. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.6. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。</p> <p>2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2. 試藥：甲酸、甲醇及乙腈均採用液相層析級；無水硫酸鈉及正己烷均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；拉薩羅(lasalocid A sodium salt)、馬杜拉黴素(maduramicin ammonium)、孟寧素(monensin sodium salt)、那寧素(narasin)及沙利黴素(salinomycin SV sodium salt pentahemihydrate)對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL, PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：5 mL及10 mL。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm, PVDF材質。</p>	<p>一、「裝置」刪除「固相真空萃取裝置」。</p> <p>二、「試藥」之正己烷改採用液相層析級。</p> <p>三、「試劑之調製」增列「乙腈飽和之正己烷溶液」。</p> <p>四、修正「標準溶液之配製」濃度。</p> <p>五、「檢液之調製」修正取樣量及最後定容體積。</p> <p>六、增列「基質匹配檢量線之製作」濃度範圍。</p> <p>七、「液相層析串聯質譜測定條件」增列層析管。</p> <p>八、「鑑別試驗及含量測定」之「標準溶液」修正為「基質匹配檢量線溶液」。</p> <p>九、附註一修正「孟寧素」及「那寧素」於肌肉及內臟</p>

<p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 80%乙腈溶液 取乙腈800 mL，加去離子水使成1000 mL。</p> <p>2.4.2. 含5%甲醇之乙腈溶液： 取甲醇50 mL，加乙腈使成1000 mL。</p> <p><u>2.4.3. 乙腈飽和之正己烷溶液：</u> <u>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。</u></p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>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。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液B： 取甲酸1 mL，加乙腈使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取相當於含拉薩羅、馬杜拉黴素、孟寧素、那寧素及沙利黴素對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，於-20°C貯存。臨用時分別取適量各標準原液混合，以80%乙腈溶液稀釋至<u>1 µg/mL</u>，供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製： 肌肉、內臟及蛋類檢體細切均質後，取約<u>2 g</u>，精確稱定；乳汁檢體混勻後，精確量取<u>2 mL</u>，置於離心管中，加入無水硫酸鈉<u>5 g</u>及含5%甲醇之乙腈溶液<u>10 mL</u>，旋渦混合1分鐘，超音波振盪10分鐘，以3200 ×g離心10分鐘，取上清液。殘留物再加入含5%甲醇之乙腈溶液<u>10 mL</u>，旋渦混合1分鐘，<u>重複上述步驟一次</u>，合併上清液，加入乙腈飽和之正己烷溶液<u>10 mL</u>，振盪1分鐘，以3200 ×g離心10分鐘，取下層液，加入乙腈飽和之正己烷溶液<u>10 mL</u>，重複上述步驟一次，取下層液，於40°C水浴中以氮氣濃縮至乾，殘留物以80%乙腈溶液溶解並定容至<u>2 mL</u>，經濾膜過濾後，供作檢液。</p> <p>2.8. 基質匹配檢量線之製作：</p>	<p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 80%乙腈溶液 取乙腈800 mL，加去離子水使成1000 mL。</p> <p>2.4.2. 含5%甲醇之乙腈溶液： 取甲醇50 mL，加乙腈使成1000 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>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。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液B： 取甲酸1 mL，加乙腈使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取相當於含拉薩羅、馬杜拉黴素、孟寧素、那寧素及沙利黴素對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，於-20°C貯存。臨用時分別取適量各標準原液混合，以80%乙腈溶液稀釋至<u>0.005~9 µg/mL</u>，供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製： 肌肉、內臟及蛋類檢體細切均質後，取約<u>5 g</u>，精確稱定；乳汁檢體混勻後，精確量取<u>5 mL</u>，置於離心管中，加入無水硫酸鈉<u>10 g</u>及含5%甲醇之乙腈溶液<u>20 mL</u>，旋渦混合1分鐘，超音波振盪10分鐘，以3200 ×g離心10分鐘，取上清液。殘留物再加入含5%甲醇之乙腈溶液<u>20 mL</u>，旋渦混合1分鐘，<u>超音波振盪10分鐘</u>，以3200 ×g離心10分鐘，合併上清液，加入乙腈飽和之正己烷溶液<u>20 mL</u>，振盪1分鐘，以3200 ×g離心10分鐘，取下層液，加入乙腈飽和之正己烷溶液<u>20 mL</u>，重複上述步驟一次，取下層液，於40°C水浴中以氮氣濃縮至乾，殘留物以80%乙腈溶液溶解並定容至<u>5 mL</u>，經濾膜過濾後，供作檢液。</p> <p>2.8. 基質匹配檢量線之製作：</p>	<p>之定量極限，並將「乳品」修正為「乳汁」，另增列附註二。</p> <p>十、增列參考文獻及增修訂部分文字。</p>
--	--	---

取空白檢體依2.7.節萃取及氮氣吹乾後，分別添加標準溶液10~200 μL，再以80%乙腈溶液溶解並定容至2 mL，經濾膜過濾後，供作基質匹配檢量線溶液。依下列條件進行分析。就各抗球蟲藥之波峰面積，與對應之各抗球蟲藥濃度，分別製作0.005~0.1 μg/mL基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：ACQUITY UPLC BEH C8，1.7 μm，內徑2.1 mm × 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→2.0	90→30	10→70
2.0→8.0	30→30	70→70
8.0→10.0	30→0	70→100
10.0→11.0	0→0	100→100
11.0→11.1	0→90	100→10
11.1→15.0	90→90	10→10

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：10 μL。

離子化模式：ESI⁺。

毛細管電壓(Capillary voltage): 3.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：600°C。

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)如下表。

分析物	離子對 前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
拉薩羅	614 > 377*	44	40
	614 > 577	44	34
馬杜拉 徽素	940 > 877*	30	34
	940 > 719	30	70
孟寧素	694 > 479 *	54	52
	694 > 461	54	48

取空白檢體依2.7.節萃取及氮氣吹乾後，分別添加不同濃度標準溶液500 μL，再以80%乙腈溶液溶解並定容至5 mL，經濾膜過濾後，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各抗球蟲藥之波峰面積，與對應之各抗球蟲藥濃度，分別製作基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

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→2.0	90→30	10→70
2.0→8.0	30→30	70→70
8.0→10.0	30→0	70→100
10.0→11.0	0→0	100→100
11.0→11.1	0→90	100→10
11.1→15.0	90→90	10→10

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage): 3.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：600°C。

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)如下表。

分析物	離子對 前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
拉薩羅	614 > 377*	44	40
	614 > 577	44	34
馬杜拉 徽素	940 > 877*	30	34
	940 > 719	30	70
孟寧素	694 > 479 *	54	52
	694 > 461	54	48

那寧素	788 > 279*	62	52	那寧素	788 > 279*	62	52	
	788 > 431	62	48	素	<u>ESI⁺</u>	788 > 431	62	
沙利黴素	774 > 431*	58	48	沙利黴素	774 > 431*	58	48	
	774 > 531	58	40		<u>ESI⁺</u>	774 > 531	58	
*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。				*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 <u>基質匹配檢量線</u> 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 <u>基質匹配檢量線</u> 溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度比 ^(註) 鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各抗球蟲藥之含量(ppm)：				2.9. 鑑別試驗及含量測定： 精確量取檢液及 <u>標準溶液</u> 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 <u>標準溶液</u> 所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度比 ^(註) 鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各抗球蟲藥之含量(ppm)：				
檢體中各抗球蟲藥之含量(ppm) = $\frac{C \times V}{M}$				檢體中各抗球蟲藥之含量(ppm) = $\frac{C \times V}{M}$				
C：由 <u>基質匹配檢量線</u> 求得檢液中各抗球蟲藥之濃度(μg/mL)				C：由 <u>基質匹配檢量線</u> 求得檢液中各抗球蟲藥之濃度(μg/mL)				
V：檢體最後定容之體積(mL)				V：檢體最後定容之體積(mL)				
M：取樣分析檢體之重量(g)				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比而得(≤100%)，容許範圍如下：				註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積比而得(≤100%)，容許範圍如下：				
相對離子強度(%)		容許範圍(%)		相對離子強度(%)		容許範圍(%)		
> 50		±20		> 50		±20		
> 20~50		±25		> 20~50		±25		
> 10~20		±30		> 10~20		±30		
≤ 10		±50		≤ 10		±50		
附註：1. 本檢驗方法之定量極限如下表。				附註：1. 本檢驗方法 <u>拉薩羅</u> 等5品項抗球蟲藥之定量極限於肌肉均為0.02 ppm、內臟均為0.05 ppm、乳品及蛋類均為0.005 ppm。				
分析物	定量極限(ppm)				2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。			
	肌肉	內臟	蛋	乳汁				
拉薩羅	0.02	0.05	0.005	0.005				
馬杜拉黴素	0.02	0.05	0.005	0.005				

孟寧素	<u>0.005</u>	<u>0.005</u>	0.005	0.005
那寧素	<u>0.005</u>	<u>0.005</u>	0.005	0.005
沙利黴素	0.02	0.05	0.005	0.005

2. 當基質不易匹配時，可改以標準品添加法定量。

3. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Dubreil-Chéneau, E., Bessiral, M., Roudaut, B., Verdon, E. and Sanders, P. 2009. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. J. Chromatogr. A 1216: 8149-8157.

2. Stubbings, G. and Bigwood, T. 2009. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. Anal. Chim. Acta. 637: 68-78.

3. Galarini, R., Fioroni, L., Moretti, S., Pettinacci, L. and Dusi, G. 2011. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. Anal. Chim. Acta 700: 167-176.