

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－硝基呋喃代謝物之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-

Test of Nitrofurantol Metabolites

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品、蜂蜜及乳品中硝基呋喃代謝物之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經水解、衍生化、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. 液相層析串聯質譜分析儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子 (Positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：CORTECS C18，2.7 μm，內徑 2.1 mm × 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機 (Homogenizer)。
 - 2.1.3. 水平式振盪恆溫水浴 (Horizontal shaking bath)：附有自動溫度調節，溫差在 ±1°C 以內。
 - 2.1.4. 離心機 (Centrifuge)：可達 2600 ×g 以上者。
 - 2.1.5. 旋渦混合器 (Vortex mixer)。
 - 2.1.6. 酸鹼度測定儀 (pH meter)。
 - 2.1.7. 氮氣蒸發裝置 (Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：甲醇、乙酸乙酯及正己烷均採用液相層析級；2-硝基苯甲醛 (2-nitrobenzaldehyde)、磷酸氫二鉀 (K₂HPO₄)、氯化鈉、氫氧化鈉、醋酸銨、甲酸及鹽酸均採用試藥特級；去離子水 (比電阻於 25°C 可達 18 MΩ·cm 以上)；5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ)、3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)、1-aminohydantoin hydrochloride (AH-HCl) 及 semicarbazide hydrochloride (SC-HCl) 對照用標準品；AOZ 同位素內部標準品 (AOZ-d₄)、AMOZ 同位素內

部標準品(AM0Z-d₅)。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 離心管：15 mL 及 50 mL，PP 材質。

2.3.2. 濾膜：孔徑 0.22 μm，Nylon 材質。

2.3.3. 容量瓶：50 mL 及 100 mL，褐色。

2.3.4. 固相萃取匣 (Solid phase extraction cartridge)：Mega Bond Elut Plexa，500 mg，6 mL，或同級品。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 50 mM 2-硝基苯甲醛溶液：

稱取 2-硝基苯甲醛 0.075 g，以甲醇溶解使成 10 mL。臨用時調製，置於褐色瓶中。

2.4.2. 0.125 M 鹽酸溶液：

取鹽酸 10.4 mL，加去離子水使成 1000 mL。

2.4.3. 0.8 M 氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉 16 g，以去離子水溶解使成 500 mL。

2.4.4. 0.1 M 磷酸氫二鉀溶液：

稱取磷酸氫二鉀 17.4 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。

2.4.5. 20% 甲醇溶液：

取甲醇 20 mL，加去離子水使成 100 mL。

2.4.6. 30% 甲醇溶液：

取甲醇 30 mL，加去離子水使成 100 mL。

2.4.7. 含 2% 甲酸之甲醇溶液：

取甲酸 2 mL，加甲醇使成 100 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液 A：甲醇。

2.5.2. 移動相溶液 B：5 mM 醋酸銨溶液。

稱取醋酸銨 0.39 g，以去離子水溶解使成 1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 B。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取 AOZ-d₄ 及 AMOZ-d₅ 各約 5 mg 之同位素內部標準品，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至 50 mL，作為內部標準原液，於 -20°C 避光貯存。臨用時，分別取適量內部標準原液混合後，以甲醇稀釋至 100 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取相當於含 AOZ、AMOZ、SC 及 AH 各約 5 mg 之對照用標準品，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至 50 mL，作為標準原液，於 -20°C 避光貯存。臨用時，分別取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至 100 ng/mL，作為標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 水解及衍生化：

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 50 mL 離心管中^(註)，加入內部標準溶液 50 µL，靜置 15 分鐘。再加入 0.125 M 鹽酸溶液 10 mL 及 50 mM 2-硝基苯甲醛溶液 0.4 mL，旋渦混合 15 秒後，於 37°C 水浴以 80 rpm 水平振盪，避光反應 16 小時。

註：當肌肉及內臟檢出 SC 大於 1 ppb 時，應於檢體取樣後增加清洗步驟，其步驟為：將檢體細切均質後，取約 2 g，精確稱定，置於 50 mL 離心管中，加入 50% 甲醇溶液 10 mL，旋渦混合 30 秒，以 2600 ×g 離心 5 分鐘，取沈澱物再依序以 75% 甲醇溶液 10 mL、甲醇 10 mL 及去離子水 5 mL 重複上述清洗步驟。棄上清液，沈澱物加入內部標準溶液 50 µL，靜置 15 分鐘，依 2.8.1. 節衍生化步驟進行反應。

2.8.2. 萃取及淨化：

2.8.2.1. 肌肉、內臟及蜂蜜：

取 2.8.1. 節經衍生化反應之檢體，冷卻至室溫，加入 0.1 M 磷酸氫二鉀溶液 1 mL 及 0.8 M 氫氧化鈉溶液 1 mL，旋渦混合 15 秒，以 0.8 M 氫氧化鈉溶液或 0.125 M 鹽酸溶液調整 pH 值至 7.3 ± 0.2，以去離

子水清洗酸鹼度測定儀之電極，洗液併入原離心管中，再以去離子水調整體積至 20 mL。旋渦混合 15 秒，以 2600 ×g 離心 5 分鐘，收集上清液，沉澱物再以去離子水 3 mL 重複萃取一次。合併上清液，加入氯化鈉 0.5 g 及乙酸乙酯 12 mL，旋渦混合 1 分鐘，以 2600 ×g 離心 5 分鐘，取乙酸乙酯層至 15 mL 離心管，於 40°C 以氮氣吹乾，殘留物加入 20% 甲醇溶液 1 mL，旋渦混合溶解，再加入正己烷 1 mL，混勻後，以 2600 ×g 離心 5 分鐘，取下層液，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8.2.2. 乳汁：

取 2.8.1. 節經衍生化反應之檢體，冷卻至室溫，加入 0.1 M 磷酸氫二鉀溶液 1 mL 及 0.8 M 氫氧化鈉溶液 1 mL，旋渦混合 15 秒，以 0.8 M 氫氧化鈉溶液或 0.125 M 鹽酸溶液調整 pH 值至 7.3 ± 0.2 ，以去離子水清洗酸鹼度測定儀之電極，洗液併入原離心管中，再以去離子水調整體積至 20 mL。旋渦混合 15 秒，以 2600 ×g 離心 5 分鐘，收集上清液，沉澱物再以去離子水 3 mL 重複萃取一次。合併上清液，注入預先以甲醇 5 mL 及去離子水 5 mL 潤洗之固相萃取匣，再以去離子水 3 mL 及 30% 甲醇溶液 3 mL 沖洗，棄流出液。固相萃取匣真空抽乾後，以含 2% 甲酸之甲醇溶液 3 mL 沖提，收集沖提液，於 40°C 水浴以氮氣濃縮至乾，殘留物以 20% 甲醇溶液溶解並定容至 1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別加入標準溶液 20~100 μ L 及內部標準溶液 50 μ L，依 2.8. 節調製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就各硝基咪喃代謝物與內部標準品波峰面積比，與對應之各硝基咪喃代謝物濃度，分別製作 2~10 ng/mL 檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(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 (%)
---------	-------	-------

96年7月18日署授食字第0961800218號公告訂定
 98年5月7日署授食字第0981800173號公告修正
 99年3月24日署授食字第0991900821號公告修正
 100年11月7日署授食字第1001903947號公告修正
 102年10月25日部授食字第1021950758號公告修正
 107年3月29日衛授食字第1071900536號公告修正
 MOHWW0040.05

0.0 → 2.0	80 → 80	20 → 20
2.0 → 9.0	80 → 50	20 → 50
9.0 → 10.0	50 → 0	50 → 100
10.0 → 13.0	0 → 0	100 → 100
13.0 → 14.0	0 → 80	100 → 20
13.0 → 17.0	80 → 80	20 → 20

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：20 μ L。

離子化模式：ESI⁺。

毛細管電壓(Capillary voltage)：5.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：550°C。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：30 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：55 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)	內部標 準品
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)			
SC	209 > 192*	66	15	AOZ-d ₄
	209 > 166		11	
	209 > 134		12	
AOZ	236 > 134*	60	15	AOZ-d ₄
	236 > 104		30	
	236 > 149		15	
AH	249 > 134*	80	20	AOZ-d ₄
	249 > 104		30	
	249 > 178		22	

	335 > 128*		26	
AMAZ	335 > 262	60	20	AMAZ-d ₅
	335 > 291		14	
AOZ-d ₄	240 > 134	60	15	
AMAZ-d ₅	340 > 296	60	15	

*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：

精確量取檢液及檢量線溶液各 20 μL，分別注入液相層析串聯質譜分析儀中，依 2.9.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之相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各硝基呋喃代謝物之含量(ppb)：

$$\text{檢體中各硝基呋喃代謝物之含量(ppb)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中各硝基呋喃代謝物之濃度(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比而得(≤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，AMAZ、AOZ、AH 及 SC 均為 1 ppb。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

3. 甲殼類之殼中天然存在高量之結合型態之 SC，且其表層肌肉亦可能

96年7月18日署授食字第0961800218號公告訂定
98年5月7日署授食字第0981800173號公告修正
99年3月24日署授食字第0991900821號公告修正
100年11月7日署授食字第1001903947號公告修正
102年10月25日部授食字第1021950758號公告修正
107年3月29日衛授食字第1071900536號公告修正
MOHWV0040.05

遭受污染，故檢體取樣時應排除表層肌肉。

4. 硝基呋喃類藥物之代謝物 semicarbazide (SC)除了動物用藥使用之殘留外，塑膠製品之加工發泡劑 azodicarbonamide 於製造受熱過程中，亦會產生 SC。部分研究指出蛋粉、乳品或蜂蜜等，於生產過程中亦會產生微量 SC。

參考文獻：

1. Crews, C. 2012. Potential natural sources of semicarbazide in honey. Report for the Food Standards Agency in Scotland. Project code FS241065. The Food and Environment Research Agency, UK.
2. 張平安、張建威、喬明武、唐貴芳。2010。高效液相色譜—串聯質譜法測定蜂蜜中硝基呋喃代謝物的研究。浙江農業科學，3: 611-613。
3. Chu, P. S. and Lopez, M. I. 2007. Determination of Nitrofurans Residues in Milk of Dairy Cows Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 55: 2129-2135.