

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－氟尼辛及托芬那酸之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods- Test of Flunixin and Tolfenamic acid

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜產品中氟尼辛(flunixin)及托芬那酸(tolfenamic acid)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經酵素水解及萃取後，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：CORTECS C18，2.7 μm ，內徑 2.1 mm $\times$ 10 cm，或同級品。

2.1.2. 均質機(Homogenizer)。

2.1.3. 高速組織研磨振盪均質機(SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder®)：1000 rpm 以上，或同級品。

2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達 5000 $\times g$ 以上者，並具 10°C 以下溫控功能。

2.1.5. 振盪器(Shaker)。

2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；冰醋酸、甲酸、醋酸鈉(sodium acetate)、氯化鈉、無水檸檬酸三鈉(trisodium citrate dehydrate)及檸檬酸氫二鈉(disodium hydrogen citrate sesquihydrate)均採用試藥特級；無水硫酸鎂採用分析級； β -葡萄糖醛酸苷酶溶液(β -glucuronidase, type H-2，含 glucuronidase ≥ 85000 unit/mL 及 sulfatase ≤ 7500 unit/mL)；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；氟尼辛及托芬那酸對照用標準品。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 離心管：50 mL，PP 材質。

2.3.2. 容量瓶：50 mL，褐色。

2.3.3. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。

2.3.4. 萃取用粉劑：含無水硫酸鎂 4 g、氯化鈉 1 g、無水檸檬酸三鈉 1 g 及檸檬酸氫二鈉 0.5 g，或同級品。

2.3.5. 濾膜：孔徑 0.22 μm ，PTFE 材質。

2.5. 試劑之調製：

2.5.1. 0.2 M 醋酸鈉緩衝液：

稱取醋酸鈉 1.64 g，加入去離子水 900 mL 溶解，以冰醋酸調整 pH 值至 5.2 ± 0.1 ，再加去離子水使成 1000 mL。

2.5.2. 含 1% 甲酸之乙腈溶液：

取甲酸 10 mL，加入乙腈使成 1000 mL。

2.6. 移動相溶液之調製：

2.6.1. 移動相溶液 A：

取甲酸 0.5 mL，加入去離子水使成 1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 A。

2.6.2. 移動相溶液 B：乙腈。

2.7. 標準溶液之配製：

取氟尼辛及托芬那酸對照用標準品各約 5 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至 50 mL，作為標準原液。臨用時取適量標準原液混合，以甲醇稀釋至 1000 ng/mL，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 肌肉、內臟及脂肪：

將檢體細切均質後，取約 2 g，精確稱定，置於離心管中，加入陶瓷均質石 1 顆，加入 0.2 M 醋酸鈉緩衝液 10 mL，蓋上離心管蓋，以高速組織研磨振盪均質機於 1000 rpm 振盪或以手激烈振盪 1 分鐘，加入 β -葡萄糖醛酸苷酶溶液 100 μL ，於 37°C 水浴中水解 1 小時。加入含 1% 甲酸之乙腈溶液 10 mL，蓋上離心管蓋，以高速組織研磨振盪均質機於 1000 rpm 振盪或以手激烈振盪 1 分鐘，再加入萃取用粉劑並蓋上離心管蓋，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速組織研磨振盪均質機於 1000 rpm 振盪或以手激烈振盪 1 分鐘，於 10°C，5000 $\times g$ 離心 1 分鐘。取上清液 500 μL

(a)，加入去離子水使體積為 1000 μL (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8.2. 乳汁：

將檢體混勻後，精確量取 2 mL，置於離心管中，加入陶瓷均質石 1 顆，加入 0.2 M 醋酸鈉緩衝液 10 mL，蓋上離心管蓋，以高速組織研磨振盪均質機於 1000 rpm 振盪或以手激烈振盪 1 分鐘，加入 β -葡萄糖醛酸苷酶溶液 100 μL ，於 37°C 水浴中水解 1 小時。以下步驟依 2.8.1.節操作，供作檢液。

2.9. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依 2.8.節調製後之上清液，量取 500 μL (a)，分別加入標準溶液 0.2~10 μL ，再加入去離子水使體積為 1000 μL (b)，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就氟尼辛及托芬那酸之波峰面積，與對應之濃度，分別製作 0.2~10 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：CORTECS C18，2.7 μm ，內徑 2.1 mm $\times$ 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 $\rightarrow$ 2.0	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20
2.0 $\rightarrow$ 6.0	80 $\rightarrow$ 20	20 $\rightarrow$ 80
6.0 $\rightarrow$ 6.5	20 $\rightarrow$ 0	80 $\rightarrow$ 100
6.5 $\rightarrow$ 9.5	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
9.5 $\rightarrow$ 10.0	0 $\rightarrow$ 80	100 $\rightarrow$ 20
10.0 $\rightarrow$ 13.0	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20

移動相流速：0.40 mL/min。

注入量：20 μL 。

毛細管電壓(Capillary voltage)：5.5 kV 及 -4.5 kV。

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	離子化 模式	離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 電壓 (eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Flunixin	ESI ⁺	297 > 264*	60	32
		297 > 259	60	48
Tolfenamic acid	ESI ⁻	260 > 216*	-60	-23
		262 > 218	-60	-23

*定量離子對

註：上述測定條件分析不適時，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 20 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氟尼辛或托芬那酸之含量(ppm)：

$$\text{檢體中氟尼辛或托芬那酸之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中氟尼辛或托芬那酸之濃度 (ng/mL)

V：萃取檢體之含 1%甲酸之乙腈溶液體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

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，氟尼辛及托芬那酸均為 0.002 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. Olejnik, M., Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T. and Zmudzki, J. 2013. Influence of matrix effect on the performance of the method for the official residue control of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal muscle. Rapid Commun. Mass Spectrom. 27: 437-442.
2. Van Hoof, N., De Wasch, K., Poelmans, S., Noppe, H. and De Brabander, H. 2004. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine muscle: optimisation of ion trap parameters. Rapid Commun. Mass Spectrom. 18: 2823-2829.