

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－硝基呋喃代謝物之檢驗(草案)
Draft Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-
Test of Nitrofurans Metabolites

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品中硝基呋喃代謝物之檢驗。
2. 檢驗方法：液相層析串聯質譜分析法(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜分析儀(Liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Inertsil[®] ODS-3，5 μm，內徑 2.1 mm × 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 水浴(Water bath)：能維持水溫溫差在± 1°C 以內，且可水平振盪者。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：轉速可達 3500 rpm 以上者。
 - 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.6. pH 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、氯化鈉、氫氧化鈉、醋酸銨及鹽酸均採用試藥特級；3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)、5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ)、semicarbazide hydrochloride (SC-HCl)及 1-aminohydantoin hydrochloride (AH-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(AMOZ-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 及 0.45 μm，Nylon 材質。
 - 2.3.3. 容量瓶：50、100 mL，褐色。

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：

量取鹽酸 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。

2.5. 移動相溶液之配製：

2.5.1. 移動相溶液 A：甲醇。

2.5.2. 移動相溶液 B：20 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，以 0.45 μ m 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，避光於-20°C 貯存備用。使用時，分別取適量內部標準原液混合後，以甲醇稀釋至 100 ng/mL，作為內部標準溶液，避光於-20°C 貯存備用。

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，避光於-20°C 貯存備用。使用時，分別取適量標準原液混合後以甲醇稀釋至 100 ng/mL，作為混合標準原液，避光於-20°C 貯存備用。臨用時取適量混合標準原液，以 50% 甲醇溶液稀釋至 0.2 ~ 10.0 ng/mL，作為標準溶液。

2.8. 衍生化標準溶液之調製：

2.8.1. 衍生化：

精確量取不同濃度之標準溶液各 1 mL，分別置於離心管中，加入內部標準溶液 50 μ L，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。

2.8.2. 萃取：

取 2.8.1 節經衍生化反應之各標準溶液，冷卻至室溫，分別加入 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 秒後，以 0.8 M 氫氧化鈉溶液及 0.125 M 鹽酸溶液調整 pH 值至 7.3 ± 0.2 ，以去離子水清洗 pH 測定儀之電極，並收集洗液至原離心管中，再以去離子水調整體積為 20 mL。分別加入氯化鈉 0.5 g 及乙酸乙酯 12 mL，旋渦混合 1 分鐘，於 3500 rpm 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 50% 甲醇溶液 1 mL，以旋渦混合器震盪溶解，再加入正己烷 1 mL，混合均勻後以 3000 rpm 離心 5 分鐘，取下層液經 0.22 μm 濾膜過濾後，供作衍生化標準溶液。

2.9. 檢液之調製：

2.9.1. 衍生化：

將檢體細切，以均質機均質後，取檢體約 2 g，精確稱定，置於離心管中^(註 1)，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 1：當檢出 SC 大於 1 ppb 時，應於檢體均質後增加清洗步驟，其方法為：將檢體細切，以均質機均質後，取檢體約 2 g，精確稱定，置於離心管中，加入 50% 甲醇溶液 10 mL，旋渦混合 30 秒，於 3500 rpm 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。取沈澱物加入內部標準溶液 50 μL ，靜置 15 分鐘，續依上述衍生化步驟進行反應。

2.9.2. 萃取：

取 2.9.1 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 秒後，以 0.8 M 氫氧化鈉溶液及 0.125 M 鹽酸溶液調整 pH 值至 7.3 ± 0.2 ，以去離子水清洗 pH 測定儀之電極，並收集

洗液至原離心管中，再以去離子水調整體積為 20 mL。旋渦混合 15 秒後，於 3500 rpm 離心 5 分鐘，收集上澄清液，離心管中之沉澱物再以去離子水 3 mL 重複萃取一次。合併上澄清液，加入氯化鈉 0.5 g 及乙酸乙酯 12 mL，續依 2.8.2 節進行萃取步驟。

2.10. 檢量線之製作：

精確量取標準溶液添加於空白檢體中，依 2.9 節調製檢液，並參照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，分別製作檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件：

移動相溶液：A 液與 B 液以 55：45 (v/v) 之比例混合作為移動相溶液，進行分析。

移動相流速：0.2 mL/min。

取樣分析量：40 μ L。

離子化模式：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。

毛細管電壓 (Capillary voltage)：2.8 kV。

離子源溫度 (Ion source temperature)：120°C。

溶媒揮散溫度 (Desolvation temperature)：350°C。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。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		進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
	母離子(m/z)	子離子 (m/z)		
SC	209	> 192	25	12
	209	> 166		
	209	> 134		
AOZ	236	> 134	25	15
	236	> 104		
	236	> 149		
AH	249	> 104	25	20
	249	> 134		
	249	> 178		

	335 > 291		
AMAZ	335 > 262	25	15
	335 > 128		
AOZ-d ₄	240 > 134	25	15
AMAZ-d ₅	340 > 296	25	15

定量離子：SC 為 m/z 192，AOZ 為 m/z 134，AH 為 m/z 104，AMAZ 為 m/z 291。

內部標準品：SC、AOZ 及 AH 均採用 AOZ-d₄；AMAZ 採用 AMAZ-d₅。

2.11. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及衍生化標準溶液各 40 μ L，分別注入液相層析串聯質譜分析儀中，參照 2.10 節測定條件進行分析，就檢液與衍生化標準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 2) 鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各硝基咪喃代謝物之含量 (ppb)：

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

C：由檢量線求得檢液中各硝基咪喃代謝物之濃度(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 2：相對離子強度由 2 組離子對之波峰面積比而得($\leq 100\%$)。

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：食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。