

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－抗原蟲劑多重殘留分析
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-
Test of Multiresidue Analysis of Antiprotozoal drugs

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中抗原蟲劑那寧素(narasin)、海樂福精(halofuginone)、羅苯嘧啶(robenidine hydrochloride)、戴克拉爾(diclazuril)、乃卡巴精(nicarbazin)、待美嘧啶(dimetridazole)及硝基甲嘧啶乙醇(metronidazole)之檢驗。
2. 檢驗方法：液相層析串聯質譜法(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)。
 - 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：ACQUITY UPLC[®] HSS T3, 1.8 μm, 2.1 mm× 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. 超音波震盪器(Ultrasonic vibrator)。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：轉速可達4000 rpm以上者。
 - 2.1.6. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.7. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；甲酸、二甲基甲醯胺(dimethylformamide)、無水硫酸鈉及乙醇均採用試藥特級；海樂福精乳酸鹽標準原液(halofuginone lactate 100 μg/mL, 相當於含海樂福精82.2 μg/mL), 那寧素、羅苯嘧啶、戴克拉爾、乃卡巴精、待美嘧啶及硝基甲嘧啶乙醇對照用標準品；dimetridazole-d₃ (DMZ-d₃)、4,4'-dinitrocarbanilide-d₈ (DNC-d₈)及metronidazole-d₃ (MNZ-d₃)同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 塑膠離心管：50 mL。
 - 2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Sep-Pak[®] silica, 1 g, 6 mL, 或同級品。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm, Nylon材質。
 - 2.3.4. 容量瓶：50 mL。
 - 2.4. 移動相溶液之調製：

2.4.1. 移動相溶液A：乙腈與甲酸以99.9：0.1 (v/v)之比例混勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.4.2. 移動相溶液B：去離子水與甲酸以99.9：0.1 (v/v)之比例混勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.5. 內部標準溶液之配製：

取 DNC-d₈、DMZ-d₃ 及 MNZ-d₃ 同位素內部標準品各約 5 mg，精確稱定。DNC-d₈ 以二甲基甲醯胺溶解並定容至 50 mL，DMZ-d₃ 及 MNZ-d₃ 分別以甲醇溶解並定容至 50 mL，作為內部標準原液。使用時，分別取適量內部標準原液混合後，以 50% 乙腈溶液稀釋至 2.0 µg/mL，作為混合內部標準溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

取那寧素、羅苯嘧啶、戴克拉爾、乃卡巴精、待美嘧啶及硝基甲嘧啶乙醇對照用標準品各約5 mg，精確稱定。那寧素及羅苯嘧啶分別以乙醇溶解並定容至50 mL；戴克拉爾及乃卡巴精分別以二甲基甲醯胺溶解並定容至50 mL；待美嘧啶及硝基甲嘧啶乙醇分別以甲醇溶解並定容至50 mL，作為標準原液。使用時，分別取適量標準原液以50%乙腈溶液稀釋至那寧素及戴克拉爾為0.02~20 µg/mL，海樂福精、羅苯嘧啶及乃卡巴精為0.05~10 µg/mL，待美嘧啶及硝基甲嘧啶乙醇為0.0025~0.1 µg/mL，作為標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

將檢體細切均質後，取檢體約 5 g，精確稱定，置於塑膠離心管中，加入混合內部標準溶液 25 µL，靜置 10 分鐘。再加入乙腈 10 mL 及無水硫酸鈉 10 g，旋渦混合 1 分鐘後，以超音波震盪 5 分鐘，於 4°C 以 4000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液供淨化用。

2.7.2. 淨化：

取 2.7.1 節供淨化用之溶液，注入預先以乙腈 5 mL 潤洗之固相萃取匣，收集流出液，再以乙腈 2 mL 沖提固相萃取匣，合併流出液，於 40°C 以氮氣濃縮至殘留液體積略少於 1 mL^(註1)，以乙腈定容至 1.0 mL，經濾膜過濾後，供作檢液。

註 1：濃縮至乾，會嚴重影響海樂福精、待美嘧啶及硝基甲嘧啶乙醇之回收率。

2.8. 檢量線之製作：

精確量取各標準溶液添加於空白檢體中，依2.7節調製檢液，並參照下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就各抗原蟲劑與內部標準品波峰面積比，與對應之各抗原蟲劑濃度，製作檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件：

層析管柱溫度：35°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	100 → 100	0 → 0
1.0 → 2.0	100 → 50	0 → 50
2.0 → 3.1	50 → 30	50 → 70
3.1 → 4.6	30 → 0	70 → 100
4.6 → 10.0	0 → 0	100 → 100
10.0 → 12.0	0 → 100	100 → 0

移動相流速：0.3 mL/min

注入量：10 µL

毛細管電壓(Capillary voltage)：電灑離子化正離子(ESI⁺)採用3.2 kV，電灑離子化負離子(ESI⁻)採用3.0 kV

離子源溫度(Ion source temperature)：120°C

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：100 L/hr

溶媒揮散流速(Desolvation rate)：700 L/hr

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)

電灑離子化模式、離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如下：

分析物	電灑離子化模式	離子對	進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
		母離子(m/z) > 子離子(m/z)		
那寧素	ESI ⁺	787 > 431	50	50
		787 > 531	50	45
海樂福精	ESI ⁺	416 > 100	35	45
		416 > 120	25	30
羅苯嘧啶	ESI ⁺	334 > 155	25	25
		334 > 111	25	40
戴克拉爾	ESI ⁻	405 > 334	35	20
		407 > 336	40	20
乃卡巴精	ESI ⁻	301 > 137	20	40
		301 > 107	20	35
待美嘧唑	ESI ⁺	142 > 96	25	22
		142 > 81	25	25
硝基甲嘧唑乙醇	ESI ⁺	172 > 128	25	15
		172 > 82	25	25

DMZ-d ₃	ESI ⁺	145 > 99	20	15
MNZ-d ₃	ESI ⁺	175 > 131	15	15
DNC-d ₈	ESI ⁻	309 > 141	25	15

定量離子對：那寧素為 m/z 787 > m/z 431、海樂福精為 m/z 416 > m/z 100、羅苯嘧啶為 m/z 334 > m/z 155、戴克拉爾為 m/z 405 > m/z 334、乃卡巴精為 m/z 301 > m/z 137、待美嘧啶為 m/z 142 > m/z 96、硝基甲嘧啶乙醇為 m/z 172 > m/z 128。

內部標準品：那寧素、海樂福精、羅苯嘧啶及待美嘧啶均採用DMZ-d₃，硝基甲嘧啶乙醇採用MNZ-d₃，戴克拉爾及乃卡巴精均採用DNC-d₈。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 10 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，參照 2.8 節測定條件進行分析，就檢液與標準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2)鑑別之，並依下列計算式，求出檢體中各抗原蟲劑之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各抗原蟲劑之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中各抗原蟲劑之濃度(μg/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

附註：1. 本檢驗方法之檢出限量如下：

分析物	肌肉組織 (ppm)	內臟組織 (ppm)
那寧素	0.005	0.005
海樂福精	0.01	0.01
羅苯嘧啶	0.01	0.01
戴克拉爾	0.01	0.01

乃卡巴精	0.01	0.01
待美嘧啶	0.0005	0.002
硝基甲嘧啶乙醇	0.0005	0.002

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。