

食品中動物用藥殘留量檢驗方法—卡巴得及其代謝物之檢驗修正草案總說明

為加強動物用藥之管理，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—卡巴得及其代謝物之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、「適用範圍」、「檢驗方法」、「裝置」、「試藥」、「器具及材料」、「移動相溶液之調製」、「標準溶液之配製」、「檢液之調製」、「檢量線之製作」及「附註」，依檢驗方法格式進行文字修正。
- 二、「試劑之調製」增列「0.01%醋酸：乙腈(9:1, v/v)溶液」。
- 三、「鑑別試驗與含量測定」修正「相對離子強度比及容許範圍」。
- 四、增列參考文獻。
- 五、增修訂部分文字。

食品中動物用藥殘留量檢驗方法—卡巴得及其代謝物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之肌肉及內臟中卡巴得(carbadox)及其代謝物之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>檢體經萃取及淨化處理後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。</u></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(electrospray ionization, ESI)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：Symmetry® C8, 3.5 µm，內徑2.1 mm × 10 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達4000 ×g以上者。</p> <p>2.1.4. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。</p> <p>2.1.5. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.6. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.1.7. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。</p> <p>2.1.8. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.9. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；醋酸、磷酸及偏磷酸均採用試藥特級；<u>去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)</u>。卡巴得(carbadox, CBX)、脫氧卡巴得(desoxycarbadox, DCBX)及喹噁啉-2-羧酸(quinoxaline-2-carboxylic acid, QCA)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：1 mL及50 mL，褐色。</p> <p>2.3.3. 濃縮瓶：500 mL，褐色。</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中卡巴得(carbadox)及其代謝物之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：液相層析串聯質譜分析法(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜分析儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化<u>正離子</u> (positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：Symmetry® C8, 3.5 µm，內徑2.1 mm × 10 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.3. 離心機(Centrifuge)：轉速可達4000 rpm以上者。</p> <p>2.1.4. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。</p> <p>2.1.5. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.6. pH測定儀(pH meter)。</p> <p>2.1.7. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。</p> <p>2.1.8. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.9. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；醋酸、磷酸及偏磷酸均採用試藥特級；卡巴得(carbadox, CBX)、脫氧卡巴得(desoxycarbadox, DCBX)及喹噁啉-2-羧酸(quinoxaline-2-carboxylic acid, QCA)對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：50 mL及500 mL，褐色。</p> <p>2.3.3. 濃縮瓶：500 mL，褐色。</p> <p>2.3.4. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Oasis HLB₂</p>	<p>一、「適用範圍」、「檢驗方法」、「裝置」、「試藥」、「器具及材料」、「移動相溶液之調製」、「標準溶液之配製」、「檢液之調製」、「檢量線之製作」及「附註」，依檢驗方法格式進行文字修正。</p> <p>二、「試劑之調製」增列「0.01%醋酸：乙腈(9:1, v/v)溶液」。</p> <p>三、「鑑別試驗與含量測定」修正「相對離子強度比及容許範圍」。</p> <p>四、增列參考文獻。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>2.3.4. 固相萃取匣 (Solid phase extraction cartridge) : Oasis HLB, <u>6 mL, 200 mg</u>, 或同級品。</p> <p>2.3.5. 濾膜: 孔徑0.22 μm, Nylon材質。</p> <p>2.4. 試劑之調製:</p> <p>2.4.1. 0.01%醋酸溶液: 取醋酸0.01 mL, 加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.4.2. 0.3%偏磷酸溶液: 稱取偏磷酸1.5 g, 以去離子水溶解使成500 mL。</p> <p>2.4.3. 萃取溶液: 取0.3%偏磷酸溶液與甲醇以7:3 (v/v)之比例混勻, 臨用時配製。</p> <p>2.4.4. 0.01%醋酸: 乙腈(9:1, v/v)溶液: 取0.01%醋酸溶液與乙腈以9:1 (v/v)之比例混勻。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製:</p> <p>2.5.1. 移動相溶液A: 取醋酸0.05 mL, 加去離子水使成500 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: 取醋酸0.05 mL, 加乙腈使成500 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: 取卡巴得、脫氧卡巴得及喹噁啉-2-羧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, 冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合, 以0.01%醋酸: 乙腈(9:1, v/v)溶液稀釋至1000 ng/mL, 供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製:</p> <p>2.7.1. 萃取: 將檢體細切均質後, 取約5 g, 精確稱定, 置於均質機中, 加入萃取溶液40 mL, 均質2分鐘, 移入離心管中。以4000 ×g離心10分鐘, 收集上清液。殘渣再加入萃取溶液10 mL,</p>	<p><u>200 mg, 6 mL</u>, 或同級品。</p> <p>2.3.5. 濾膜: 孔徑0.22 μm, Nylon材質。</p> <p>2.4. 試劑之配製:</p> <p>2.4.1. 0.01%醋酸溶液: 量取醋酸0.01 mL, 加水使成100 mL。</p> <p>2.4.2. 0.3%偏磷酸溶液: 稱取偏磷酸1.5 g, 以水溶解並加水使成500 mL。</p> <p>2.4.3. 萃取溶液: 0.3%偏磷酸溶液與甲醇以7:3 (v/v)之比例混合均勻, 臨用時配製。</p> <p>2.5. 移動相溶液之配製:</p> <p>2.5.1. 移動相溶液A: 量取醋酸0.05 mL, 溶於去離子水500 mL, 以濾膜過濾。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液B: 量取醋酸0.05 mL, 加至乙腈500 mL中。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製: 取卡巴得、脫氧卡巴得及喹噁啉-2-羧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, 於-20°C避光貯存備用。各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。使用時取適量混合標準原液, 以0.01%醋酸溶液: 乙腈(9:1, v/v)混合溶液稀釋至2.5 ~ 100.0 ng/mL, 作為混合標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製:</p> <p>2.7.1. 萃取: 將檢體細切均質後, 取約5 g, 精確稱定, 置於均質機中, 加入萃取溶液40 mL, 均質2分鐘後, 移入塑膠離心管中。以4000 rpm離心10分鐘, 收集上清液, 離心管中之沈澱物再加入萃取溶液10 mL, 振盪10分鐘, 以4000 rpm離心10分鐘。合併上清液, 於40°C水浴減壓濃縮至約10 mL, 濃縮液以磷酸調整pH值至4.0 ~ 4.5, 再以4000 rpm離心10分鐘, 取上清液供淨化用。</p>	
---	--	--

旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以4000 ×g離心10分鐘，合併上清液。於40°C水浴中減壓濃縮至約10 mL，濃縮液以磷酸調整pH值至4.0~4.5，再以4000 ×g離心10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，注入預先以甲醇5 mL及去離子水5 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液。以去離子水6 mL清洗固相萃取匣，棄流出液。固相萃取匣以真空抽乾1分鐘後，以甲醇6 mL沖提，收集沖提液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物以0.01%醋酸：乙腈(9:1, v/v)溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.8. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別加入標準溶液5~100 µL，依2.7節調製檢液，供作檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就卡巴得及其代謝物之波峰面積，與對應之卡巴得及其代謝物濃度，分別製作5~100 ng/mL之檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：Symmetry® C8，3.5 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：40°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 → 6.0	100 → 0	0 → 100
6.0 → 6.5	0 → 100	100 → 0
6.5 → 10.0	100 → 100	0 → 0

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 µL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C。

2.7.2. 淨化：

取2.7.1節供淨化用之溶液，注入預先以甲醇5 mL及水5 mL潤洗之固相萃取匣，以去離子水6 mL清洗固相萃取匣，棄流出液。固相萃取匣以真空抽乾1分鐘，續以甲醇6 mL沖提，收集沖提液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物加0.01%醋酸溶液：乙腈(9:1, v/v)混合溶液1.0 mL，以旋渦混合器震盪溶解，經濾膜過濾後，供作檢液。

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，就卡巴得及其代謝物波峰面積，與對應之卡巴得及其代謝物濃度，分別製作檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件：

層析管柱溫度：40°C

移動相溶液：A液與B液以下列比例進行梯度分析。

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 6.0	100 → 0	0 → 100
6.0 → 6.5	0 → 100	100 → 0
6.5 → 10.0	100 → 100	0 → 0

注入量：10 µL

移動相流速：0.3 mL/min

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.5 kV

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C

進樣錐氣體流速(Cone gas flow)：50 L/hr

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：800 L/hr

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

偵測離子、進樣錐電壓(cone voltage)及碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	母離子	子離子	進樣錐電壓	碰撞能量
	(m/z)	(m/z)		

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：50 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：800 L/hr。

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)及碰撞能量(collision energy)如下表。

分析物	離子對		進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)		
CBX	263	231*	25	15
	263	129	25	30
DCBX	231	143*	20	20
	231	199	20	15
QCA	175	129*	20	15
	175	102	20	25

*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。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及檢量線溶液各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，並依下列計算式求得檢體中卡巴得及其代謝物之含量(ppm)：

檢體中卡巴得及其代謝物之含量

$$(\text{ppm}) = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由檢量線求得檢液中卡巴得及其代謝物之濃度(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

			(V)	(eV)
CBX	263	231	25	15
		129	25	30
DCBX	231	143	20	20
		199	20	15
QCA	175	129	20	15
		102	20	25

定量離子：CBX為m/z 231，DCBX為m/z 143，QCA為m/z 129。

2.9. 鑑別及含量測定：

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分析儀中，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)鑑別之，並依下列計算式求得檢體中卡巴得及其代謝物之含量(ppm)：

檢體中卡巴得及其代謝物之含量

$$(\text{ppm}) = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由檢量線求得檢液中卡巴得及其代謝物之濃度(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：相對離子強度比由定性離子與定量離子之波峰面積相除而得(≤100%)，容許範圍如下：

相對離子強度比(%)	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，卡巴得及其代謝物於肌肉組織均為0.001 ppm，內臟組織均為0.003 ppm。

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

<p>附註：1. 本檢驗方法之<u>定量極限</u>，於肌肉均為0.001 ppm，<u>於內臟</u>均為0.003 ppm。</p> <p>2. <u>檢體</u>中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。</p> <p><u>參考文獻：</u></p> <p><u>Anna, M., George, K. and Georgios, T. 2012. Determination of carbadox and metabolites of carbadox and olaquinox in muscle tissue using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 881-882: 90-95.</u></p>		
---	--	--