

# 食品中動物用藥殘留量檢驗方法－孔雀綠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－孔雀綠及其代謝物之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、「適用範圍」、「檢驗方法」、「試藥」、「器具及材料」依檢驗方法格式進行文字修正。
- 二、「裝置」修正「層析管」，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。
- 三、「試劑之調製」增列「50%乙腈溶液」、「McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)溶液」、「0.1 N鹽酸溶液」及「50%甲醇溶液」，修正「McIlvaines緩衝溶液」，另刪除「0.1 M檸檬酸溶液」及「0.2 M磷酸氫二鈉溶液」。
- 四、「移動相溶液之調製」修正移動相溶液B，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。
- 五、「內部標準溶液之調製」修正配製用溶劑及配製濃度。
- 六、「標準溶液之調製」修正配製用溶劑及配製標準溶液之濃度。
- 七、「檢液之調製」修正內部標準溶液之添加量，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。
- 八、「檢量線之製作」增列檢量線濃度範圍及修正「液相層析串聯質譜分析測定條件」。
- 九、「鑑別試驗及含量測定」修正檢液及檢量線之注入量及計算公式，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。
- 十、「附註」修正孔雀綠及還原型孔雀綠之定量極限。
- 十一、增列參考文獻及參考層析圖譜。
- 十二、增修訂部分文字。

# 食品中動物用藥殘留量檢驗方法－孔雀綠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：本檢驗方法適用於水產品中孔雀綠 (<u>malachite green, MG</u>) 及其代謝物還原型孔雀綠 (<u>leucomalachite green, LMG</u>) 之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>檢體經萃取及淨化後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。</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：<u>Kinetex® C8, 2.6 µm, 內徑2.1 mm × 5 cm, 或同級品。</u></p> <p>2.1.2. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達 <u>5000 ×g</u> 以上者。</p> <p>2.1.4. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.5. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。</p> <p>2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.7. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2. 試藥：乙腈、甲醇、正己烷及乙酸乙酯均採用液相層析級；<u>N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)、甲酸、檸檬酸、磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、醋酸銨、氨水(25%)、醋酸及鹽酸均採用試藥特級；孔雀綠草酸鹽(malachite green oxalate salt) 及 還原型孔雀綠(leucomalachite green, LMG)對照用標準品；孔雀綠-d<sub>5</sub>苦味酸鹽(MG-d<sub>5</sub> picrate)及還原型孔雀綠-d<sub>5</sub>(LMG-d<sub>5</sub>)同位素內部標準品。</u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL, <u>PP材質。</u></p> <p>2.3.2. 容量瓶：<u>10 mL, 褐色。</u></p> | <p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於水產品中孔雀綠及其代謝物還原型孔雀綠之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：液相層析串聯質譜分析法(liquid chromatography/tandem mass spectrometer, 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<sup>+</sup>)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：<u>Symmetry® C8, 3.5 µm, 內徑2.0 mm × 5 cm或同級品。</u></p> <p>2.1.2. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.3. 離心機(Centrifuge)：轉速可達<u>2400 rpm</u>以上者。</p> <p>2.1.4. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.5. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。</p> <p>2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.7. <u>pH</u>測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2. 試藥：乙腈、甲醇、正己烷及乙酸乙酯均採用液相層析級；<u>N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)、甲酸、檸檬酸、磷酸氫二鈉、醋酸銨、25%氨水、醋酸及鹽酸均採用試藥特級；孔雀綠(malachite green, MG)對照用標準品(malachite green oxalate salt)、還原型孔雀綠(leucomalachite green, LMG)對照用標準品；孔雀綠同位素內部標準品(MG-d<sub>5</sub> picrate)、還原型孔雀綠同位素內部標準品(LMG-d<sub>5</sub>)。</u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. <u>塑膠</u>離心管：50 mL。</p> <p>2.3.2. 陽離子交換固相萃取匣(Cation exchange solid phase</p> | <p>一、「適用範圍」、「檢驗方法」、「試藥」、「器具及材料」依檢驗方法格式進行文字修正。</p> <p>二、「裝置」修正「層析管」，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。</p> <p>三、「試劑之調製」增列「50% 乙腈溶液」、「McIlvaines 緩衝溶液：乙腈 (1:1, v/v)溶液」、「0.1 N 鹽酸溶液」及「50% 甲醇溶液」，修正「McIlvaines 緩衝溶液」，另刪除「0.1 M 檸檬酸溶液」及「0.2 M 磷酸氫二鈉溶液」。</p> <p>四、「移動相溶</p> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>2.3.3. 陽離子交換固相萃取匣 (Cation exchange solid phase extraction cartridge)：Oasis MCX，60 mg，3 mL或同級品。</p> <p>2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 <math>\mu\text{m}</math>，Nylon材質。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 50%乙腈溶液：<br/>取乙腈250 mL，加去離子水使成500 mL。</p> <p>2.4.2. McIlvaines緩衝溶液：<br/>稱取檸檬酸9.36 g及磷酸氫二鈉1.55 g，以去離子水溶解使成500 mL。</p> <p>2.4.3. McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)溶液：<br/>取McIlvaines緩衝溶液與乙腈以1：1 (v/v)之比例混勻。</p> <p>2.4.4. TMPD溶液：<br/>稱取TMPD 50 mg，以甲醇溶解並定容至50 mL。</p> <p>2.4.5. 0.1 N鹽酸溶液：<br/>取鹽酸4.2 mL，緩緩加入去離子水400 mL中，再加入去離子水使成500 mL。</p> <p>2.4.6. 50%甲醇溶液：<br/>取甲醇250 mL，加去離子水使成500 mL。</p> <p>2.4.7. 沖提液：<br/>取氨水5 mL、乙酸乙酯50 mL及甲醇45 mL，混合均勻，臨用時調製。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>2.5.1. 移動相溶液A：<br/>稱取醋酸銨0.39 g，加去離子水900 mL溶解，以醋酸調整pH至4.5 <math>\pm</math> 0.1，再加去離子水使成1000 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：<br/>稱取醋酸銨0.39 g，以乙腈900 mL溶解，加甲酸1 mL，再加乙腈使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。</p> <p>2.6. 內部標準溶液之配製：</p> | <p>extraction cartridge)：Oasis MCX，60 mg，3 mL或同級品。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22及0.45 <math>\mu\text{m}</math>，Nylon材質。</p> <p>2.3.4. 容量瓶：100 mL，褐色。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 0.1 M檸檬酸溶液：<br/>稱取檸檬酸10.5 g，以去離子水溶解使成500 mL。</p> <p>2.4.2. 0.2 M磷酸氫二鈉溶液：<br/>稱取磷酸氫二鈉14.2 g，以去離子水溶解使成500 mL。</p> <p>2.4.3. McIlvaines緩衝溶液：<br/>取0.1 M檸檬酸溶液445.5 mL及0.2 M磷酸氫二鈉溶液54.5 mL，混合均勻。</p> <p>2.4.4. 沖提液：<br/>取25%氨水5 mL、乙酸乙酯50 mL及甲醇45 mL，混合均勻，臨用時調製。</p> <p>2.4.5. TMPD溶液：<br/>稱取TMPD 50 mg，以甲醇溶解並定容至50 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>2.5.1. 移動相溶液A：<br/>稱取醋酸銨0.39 g溶於去離子水900 mL，以醋酸調整pH為4.5 <math>\pm</math> 0.1，再加去離子水使成1000 mL，以0.45 <math>\mu\text{m}</math>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：<br/>量取甲酸1 mL，加至乙腈1000 mL中，為移動相溶液B。</p> <p>2.6. 內部標準溶液之調製：<br/>取相當於含孔雀綠及還原型孔雀綠各約5 mg之同位素內部標準品，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至50 mL，作為內部標準原液，避光於-20°C貯存備用。使用時取適量內部標準原液混合後，以乙腈稀釋至100 ng/mL，作為內部標準溶液。</p> <p>2.7. 標準溶液之調製：<br/>取相當於含孔雀綠及還原型孔雀綠各約5 mg之對照用標準品，精確</p> | <p>液之調製」修正移動相溶液B，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。</p> <p>五、「內部標準溶液之調製」修正配製用溶劑及配製濃度。</p> <p>六、「標準溶液之調製」修正配製用溶劑及配製標準溶液之濃度。</p> <p>七、「檢液之調製」修正內部標準溶液之添加量，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。</p> <p>八、「檢量線之製作」增列檢量線濃度範圍及修正「液相層析串聯質譜分析測定條件」。</p> <p>九、「鑑別試驗及含量測定」修正檢液及檢量線之注</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>取相當於含孔雀綠及還原型孔雀綠各約<u>10 mg</u>之同位素內部標準品，精確稱定，分別以<u>甲醇</u>溶解並定容至<u>10 mL</u>，作為內部標準原液，<u>冷凍避光</u>貯存。<u>臨用時取適量各內部標準原液混合</u>，以<u>乙腈</u>稀釋至<u>100 ng/mL</u>，<u>供作內部標準溶液</u>。</p> <p>2.7. 標準溶液之配製：<br/>取相當於含孔雀綠及還原型孔雀綠各約<u>10 mg</u>之對照用標準品，精確稱定，分別以<u>甲醇</u>溶解並定容至<u>10 mL</u>，作為標準原液，<u>冷凍避光</u>貯存。<u>臨用時取適量各標準原液混合</u>，以<u>50%乙腈</u>稀釋至<u>100 ng/mL</u>，<u>供作標準溶液</u>。</p> <p>2.8. 檢液之調製：<br/>2.8.1. 萃取：<br/>將檢體細切均質後，取約<u>1 g</u>，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液<u>10 µL</u>、<u>TMPD</u>溶液<u>50 µL</u>及<u>McIlvaines</u>緩衝溶液：<u>乙腈(1:1, v/v)</u>溶液<u>10 mL</u>，旋渦混合<u>均勻</u>，以<u>5000 ×g</u>離心<u>3分鐘</u>。<u>收集上清液</u>，<u>殘留物再加入McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)溶液5 mL</u>，<u>重複上述步驟萃取1次</u>。<u>合併上清液</u>，供淨化用。</p> <p>2.8.2. 淨化：<br/>取2.8.1.節供淨化用溶液，注入預先以<u>甲醇2 mL</u>、<u>去離子水2 mL</u>及<u>McIlvaines緩衝溶液2 mL</u>潤洗之<u>Oasis MCX固相萃取匣</u>，<u>棄流出液</u>。<u>固相萃取匣依序以0.1 N鹽酸溶液2 mL及去離子水5 mL清洗</u>，<u>真空抽乾後</u>，<u>棄流出液</u>。<u>再依序以50%甲醇溶液3 mL及正己烷3 mL清洗</u>，<u>真空抽乾後</u>，<u>棄流出液</u>。以<u>沖提液5 mL</u>沖提，收集沖提液，於<u>50°C</u>以<u>氮氣吹至剛乾</u>，<u>殘留物加入50%乙腈溶液1 mL</u>，旋渦混合溶解，經<u>濾膜過濾</u>，<u>供作檢液</u>。</p> <p>2.9. 檢量線之製作：<br/>取空白檢體，分別加入標準溶液<u>2 ~50 µL</u>及內部標準溶液<u>10 µL</u>，依2.8節調製檢液，<u>供作檢量線溶液</u>，</p> | <p>稱定，分別以<u>乙腈</u>溶解並定容至<u>50 mL</u>，作為標準原液，<u>避光於-20°C</u>貯存備用。<u>使用時取適量標準原液混合後</u>，以<u>乙腈</u>稀釋至<u>100 ng/mL</u>，作為混合標準原液。<u>使用時取適量混合標準原液</u>，以<u>50%乙腈溶液</u>稀釋至<u>0.5~10.0 ng/mL</u>，作為標準溶液，<u>臨用時調製</u>。</p> <p>2.8. 檢液之調製：<br/>2.8.1. 萃取：<br/>將檢體細切，以<u>均質機</u>均質後，取<u>檢體約1 g</u>，精確稱定，置於<u>塑膠離心管</u>中，加入內部標準溶液<u>50 µL</u>、<u>TMPD</u>溶液<u>50 µL</u>及<u>McIlvaines</u>緩衝溶液：<u>乙腈(1:1, v/v)</u>混合溶液<u>10 mL</u>，旋渦混合<u>45秒後</u>，於<u>2400 rpm</u>離心<u>20分鐘</u>。<u>收集上澄液</u>，<u>離心管中之沉澱物再以McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)混合溶液5 mL重複操作一次</u>。<u>合併上澄液</u>，供淨化用。</p> <p>2.8.2. 淨化：<br/>取2.8.1.節供淨化用溶液，注入預先以<u>甲醇2 mL</u>、<u>去離子水2 mL</u>及<u>McIlvaines緩衝溶液2 mL</u>潤洗之<u>Oasis MCX固相萃取匣</u>，<u>再注入0.1 N鹽酸溶液2 mL</u>，<u>以去離子水2.5 mL清洗兩次</u>，<u>棄流出液</u>。<u>固相萃取匣以真空抽乾後</u>，依序以<u>50%甲醇溶液3 mL</u>及<u>正己烷3 mL</u>清洗後，<u>再真空抽氣乾燥5分鐘</u>。以<u>沖提液5 mL</u>沖提，收集沖提液，於<u>50°C</u>以<u>氮氣吹乾</u>，<u>殘留物加入50%乙腈溶液1.0 mL</u>，<u>以旋渦混合器振盪溶解</u>，經<u>0.22 µm濾膜過濾後</u>供作檢液。</p> <p>2.9. 檢量線之製作：<br/><u>精確量取標準溶液添加於空白檢體中</u>，依2.8節調製檢液，<u>並參照下列條件進行液相層析串聯質譜分析</u>，<u>以孔雀綠及還原型孔雀綠與內部標準品波峰面積比</u>，與對應之孔雀綠及還原型孔雀綠濃度，分別製作檢量線。</p> <p>液相層析串聯質譜分析測定條件：</p> | <p>入量及計算公式，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。</p> <p>十、「附註」修正孔雀綠及還原型孔雀綠之定量極限。</p> <p>十一、增列參考文獻及參考層析圖譜。</p> <p>十二、增修訂部分文字。</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就孔雀綠及還原型孔雀綠與其內部標準品之波峰面積比，與對應之孔雀綠及還原型孔雀綠濃度，分別製作0.2~5 ng/mL檢量線。液相層析串聯質譜分析測定條件<sup>(註)</sup>：

層析管：Kinetex® C8，2.6 μm，內徑2.1 mm × 5 cm。

層析管溫度：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 → 8.0   | 95 → 0  | 5 → 100   |
| 8.0 → 13.0  | 0 → 0   | 100 → 100 |
| 13.0 → 13.5 | 0 → 95  | 100 → 5   |
| 13.5 → 15.5 | 95 → 95 | 5 → 5     |

移動相流速：0.2 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 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)：400°C。

進樣錐氣體流速 (Cone gas flow rate)：50 L/hr。

溶媒揮散流速 (Desolvation flow rate)：850 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測模式 (multiple reaction monitoring mode, MRM)。偵測離子對、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<br>(V) | 碰撞電壓<br>(eV) |
|--------------------|-------------------------|--------------|--------------|
|                    | 前驅離子 (m/z) > 產物離子 (m/z) |              |              |
| MG                 | 329 > 313*              | 10           | 34           |
|                    | 329 > 208               | 10           | 32           |
| LMG                | 331 > 239*              | 34           | 29           |
|                    | 331 > 316               | 34           | 20           |
| MG-d <sub>5</sub>  | 334 > 318               | 12           | 35           |
| LMG-d <sub>5</sub> | 336 > 239               | 12           | 29           |

\*定量離子對

註：上述測定條件分析不適時，依

移動相溶液：A液與B液以下列比例(v/v)混合作為移動相溶液，進行梯度分析。

| 時間(min) | A (%) | B (%) |
|---------|-------|-------|
| 0.0     | 50    | 50    |
| 1.0     | 0     | 100   |
| 4.0     | 0     | 100   |
| 4.5     | 50    | 50    |
| 8.0     | 50    | 50    |

移動相流速：0.3 mL/min。

毛細管電壓 (Capillary voltage)：2.5 kV。

離子源溫度 (Ion source temperature)：100°C。

溶媒揮散溫度 (Desolvation temperature)：400°C。

偵測模式：多重反應偵測模式 (multiple reaction monitoring mode, MRM)。偵測離子、進樣錐電壓 (cone voltage)與碰撞能量 (collision energy)如下表：

| 分析物                | 母離子<br>(m/z) | 子離子<br>(m/z) | 進樣錐電<br>壓(V) | 碰撞能量<br>(eV) |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| MG                 | 329          | 313          | 60           | 35           |
|                    | 329          | 208          | 60           | 37           |
| LMG                | 331          | 239          | 40           | 30           |
|                    | 331          | 316          | 40           | 24           |
| MG-d <sub>5</sub>  | 334          | 318          | 40           | 38           |
| LMG-d <sub>5</sub> | 336          | 239          | 55           | 30           |

定量離子：孔雀綠為m/z 313，還原型孔雀綠為m/z 239。

## 2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各20 μL，分別注入液相層析串聯質譜分析儀中，參照2.9節條件進行分析，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<sup>(註)</sup>鑑別之，並依下列計算式求得檢體中孔雀綠及還原型孔雀綠之含量(ppb)：

檢體中MG或LMG之含量(ppb) =  $C \times V$

M  
C：由檢量線求得檢液中MG或LMG之濃度(ng/mL)

V：檢體最後經定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

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10 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<sup>(註1)</sup>鑑別之，並依下列計算式求得檢體中孔雀綠之含量(ppb)<sup>(註2)</sup>：

$$\text{檢體中孔雀綠之含量 (ppb)} = \frac{\sum C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中孔雀綠或還原型孔雀綠之濃度(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：1. 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     |

#### 2. 檢體中孔雀綠之含量，以孔雀綠及還原型孔雀綠之總量計。

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，孔雀綠及還原型孔雀綠均為0.2 ppb。

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. 徐麗嵐、周曉蕙、周珮如、蘇淑珠、周薰修。2006。水產品中孔雀綠及其代謝物檢驗方法之研究。行政院衛生署九十五年度科技發展研究計畫。

2. European Commission. 2019. Commission Regulation (EU) 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin and repealing Decision

註：相對離子強度之容許範圍參照歐盟2002/657/EC之規範：

| 相對離子強度(%) | 容許範圍(%) |
|-----------|---------|
| > 50      | ±20     |
| > 20~50   | ±25     |
| > 10~20   | ±30     |
| ≤ 10      | ±50     |

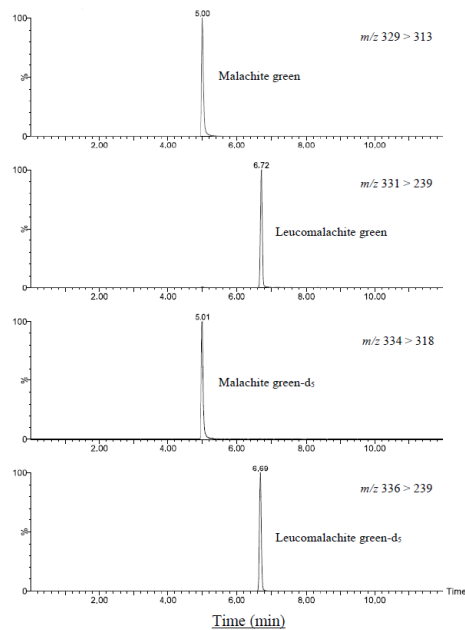
附註：1. 本檢驗方法之檢出限量，孔雀綠及還原型孔雀綠均為0.5 ppb。

2. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。

2005/34/EC. Off. J. Eur. Union.  
L289 : 41-46.

3. Chen, R. C., Wei, K. J., Wang, T.  
M., Yu, Y. M., Li, J. Y., Lee, S. H.,  
Wang, W. H., Ren, T. J. and Tsai, C.  
W. 2013. Simultaneous  
quantification of antibiotic dyes in  
aquatic products and feeds by liquid  
chromatography–tandem mass  
spectrometry. J. Food Drug Anal.  
21: 339-346

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析孔雀綠與還  
原型孔雀綠標準品及其同位素內  
部標準品之MRM圖譜