

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－荷爾蒙類多重殘留分析

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods - Multiresidue Analysis of Hormones

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品之肌肉中dienestrol等11項荷爾蒙類動物用藥(品項見附表)之檢驗。
2. 檢驗方法：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。
 - 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：Shim-pack GIST C18, 2 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或其他具振盪功能之裝置。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達2000 $\times g$ 以上者，溫度控制可達4 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.5. 微量離心機(Microcentrifuge)：可達20000 $\times g$ 以上者。
 - 2.1.6. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.7. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.8. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.9. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：甲醇、乙腈及正己烷均採用液相層析級；冰醋酸及氟化銨(ammonium fluoride)等均採試藥特級；無水醋酸鈉、primary secondary amine (PSA)及octadecylsilane, end-capped (C18EC)均採用分析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；dienestrol、diethylstilbestrol、17 α 雌二醇(17 α -estradiol)、雌二醇(estradiol)、乙炔雌二醇(17 α -ethynylestradiol)、hextestrol、甲基睪固酮(17 α -methyltestosterone)、黃體酮(progesterone)、睪固酮(testosterone)、testosterone propionate及zeranol對照用標準品；diethylstilbestrol-d₈、雌二醇-d₂ (estradiol-d₂)、

hexestrol-d₄、黃體酮-d₉ (progesterone-d₉)及睪固酮-d₃ (16,16,17-testosterone-d₃)同位素內部標準品。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。

2.3.2. 微量離心管：2 mL，PP材質。

2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF材質。

2.3.4. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)^(註1)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。

2.3.5. 淨化用離心管^(註2)：含C18EC，PSA各100 mg。

註1：陶瓷均質石可視檢體黏稠度自行評估使用。

註2：可依需求自行評估使用市售淨化用組合套組。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 含1%醋酸之乙腈溶液：

取冰醋酸10 mL，加乙腈使成1000 mL。

2.4.2. 乙腈飽和之正己烷溶液：

取正己烷500 mL，加乙腈50 mL，振盪混勻後，靜置至完全分層後，取正己烷層。

2.4.3. 30%乙腈溶液：

取乙腈30 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.4. 200 mM氟化銨溶液：

稱取氟化銨0.74 g，以去離子水溶解使成100 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取200 mM氟化銨溶液1 mL，加去離子水使成1000 mL，供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。

2.6. 標準溶液之配製：

2.6.1. 內部標準溶液：

取diethylstilbestrol-d₈、estradiol-d₂、hexestrol-d₄、progesterone-d₉及testosterone-d₃同位素內部標準品各約1 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，於冷凍避光貯存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以甲醇稀釋至1000 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.6.2. 標準溶液：

取dienestrol、diethylstilbestrol、17 α -estradiol、estradiol、17 α -ethynylestradiol、hextestrol、17 α -methyltestosterone、progesterone、testosterone、testosterone propionate及zeranol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5 mL，作為標準原液，於冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至1000 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

將檢體細切均質後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液50 μ L及去離子水5 mL，旋渦混合，再加入含1%醋酸乙腈溶液10 mL，旋渦混合30秒，超音波振盪30分鐘，加入無水醋酸鈉5 g，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以2000 $\times$ g離心10分鐘，取上清液。殘留物再加入含1%醋酸乙腈溶液10 mL，重複上述步驟萃取1次，合併上清液，加入乙腈飽和之正己烷溶液20 mL，振盪10分鐘，於4°C，2000 $\times$ g離心10分鐘，棄正己烷層，下層液供淨化用。

2.7.2. 淨化：

取2.7.1.節供淨化用溶液，置於淨化用離心管，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以2000 $\times$ g離心10分鐘，取上清液，於50°C以氮氣吹乾，殘留物以30%乙腈溶液1 mL溶解，倒入微量離心管中，以20000 $\times$ g離心10分鐘，取上清液，經濾膜過濾，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 μ L及內部標準溶液50 μ L，依2.7.節調製檢量線溶液，並依下列條件進行分析。就各荷爾蒙與內部標準品之波峰面積比，與對應之各荷爾蒙濃度，分別製作5~100 ng/mL檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：Shim-pack GIST C18，2 μ m，內徑2.1 mm $\times$ 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 $\rightarrow$ 2.0	75 $\rightarrow$ 54	25 $\rightarrow$ 46

2.0 → 6.5	54 → 54	46 → 46
6.5 → 8.0	54 → 25	46 → 75
8.0 → 10.5	25 → 0	75 → 100
10.5 → 12.0	0 → 0	100 → 100
12.0 → 12.1	0 → 75	100 → 25
12.1 → 15.0	75 → 75	25 → 25

移動相流速：0.5 mL/min。

注入量：5 µL。

霧化氣體流速(Nebulizing gas flow)：3 L/min。

加熱氣體流速(Heating gas flow)：15 L/min。

介面溫度(Interface temperature)：295°C。

脫溶劑管溫度(Desolvent line temperature)：200°C。

加熱塊溫度(Heat block temperature)：400°C。

乾燥氣體流速(Drying gas flow)：5 L/min。

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

偵測離子對、Q1/Q3 聚焦電壓(Q1/Q3 Pre Bias)及碰撞能量(collision energy)如附表。

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5 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，並依下列計算式求出檢體中各荷爾蒙之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各荷爾蒙之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M} \times 10^{-3}$$

C：由檢量線求得檢液中各荷爾蒙之濃度(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

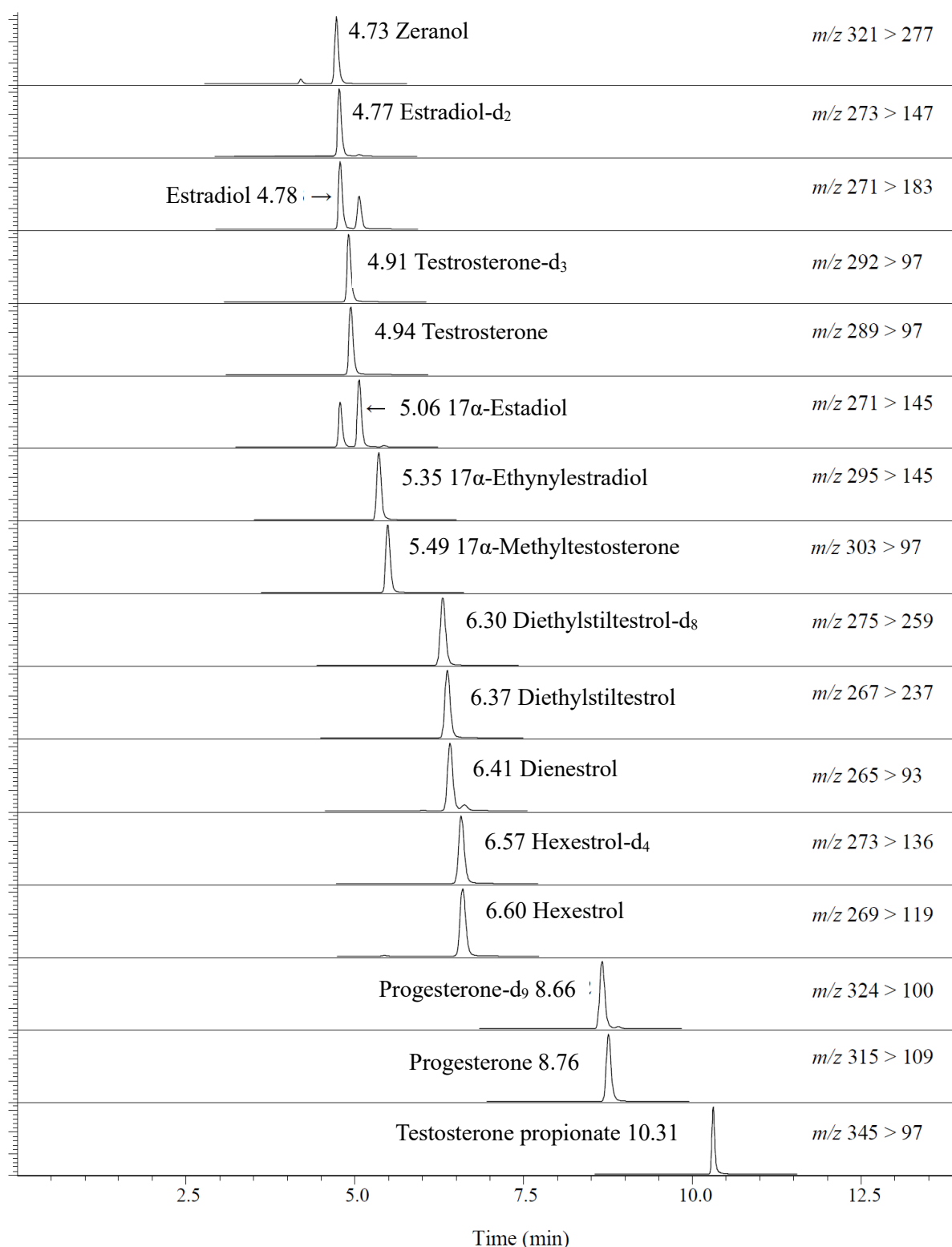
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，dienestrol等11項均為0.001 ppm。

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. Park, K. H. Choi, J. H., Abd El-Aty, A. M., Rahman, M. M. Jang, J., Ko, A. Y., Kwon, K. S., Park, H. R., Kim, H. S. and Shim, J. H. 2013. Quantifying fenobucarb residue levels in beef muscles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and QuEChERS sample preparation. J. Food Chem. 138: 2306-2311.
2. Park, K. H., Choi, J. H., Abd El-Aty, A. M., Cho, S. K., Park, J. H., Kwon, K. S., Park, H. R., Kim, H. S., Shin, H. C., Kim, M. R. and Shim, J. H. 2012. Development of QuEChERS-based extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying flumethasone residues in beef muscle. Meat Sci. 92: 749-753.
3. 羅輝泰、黃曉蘭、吳惠勤、朱志鑫、黃芳、林曉珊。2011。QuEChERS/液相色譜-串聯質譜法同時測定魚肉中30種激素類及氯黴素類藥物殘留。分析測試學報，30: 1329-1337。

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析11項荷爾蒙類動物用藥標準品及5項同位素內部標準品之MRM圖譜

附表、Dienestrol等11項荷爾蒙類動物用藥及其同位素內部標準品之多重反應偵測模式參數

分析物		離子化 模式	離子對	Q1/Q3 聚焦 電壓 (V)	碰撞 能量 (V)	內部標準品**
英文名	中文名		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)			
Dienestrol	—	ESI ⁻	265 > 93* 265 > 236	19/14 13/24	25 21	Diethylstilbestrol-d ₈
Diethylstilbestrol	—	ESI ⁻	267 > 237* 267 > 222	9/49 9/9	29 36	Diethylstilbestrol-d ₈
17 α -Estradiol	17 α 雌二醇	ESI ⁻	271 > 145* 271 > 183	21/25 13/18	39 40	Estradiol-d ₂
Estradiol	雌二醇	ESI ⁻	271 > 183* 271 > 145	13/18 22/24	41 39	Estradiol-d ₂
17 α -Ethinylestradiol	乙炔雌二醇	ESI ⁻	295 > 145* 295 > 159	26/30 24/15	41 34	Estradiol-d ₂
Hexestrol	—	ESI ⁻	269 > 119* 269 > 134	12/19 12/25	41 16	Hexestrol-d ₄
17 α -Methyltestosterone	甲基睪固酮	ESI ⁺	303 > 97* 303 > 109	6/10 6/13	25 29	Testosterone-d ₃
Progesterone	黃體酮	ESI ⁺	315 > 109* 315 > 97	12/18 12/1	26 23	Progesterone-d ₉
Testosterone	睪固酮	ESI ⁺	289 > 97* 289 > 109	6/10 14/13	23 25	Testosterone-d ₃
Testosterone propionate	—	ESI ⁺	345 > 97* 345 > 109	10/10 10/18	23 26	Testosterone-d ₃
Zeranol	—	ESI ⁻	321 > 277* 321 > 303	15/14 10/12	20 20	Estradiol-d ₂
Diethylstilbestrol-d ₈ (I.S.)	—	ESI ⁻	275 > 259	10/18	26	—
Estradiol-d ₂ (I.S.)	雌二醇-d ₂	ESI ⁻	273 > 147	10/15	39	—
Hexestrol-d ₄ (I.S.)	—	ESI ⁻	273 > 136	10/14	16	—
Progesterone-d ₉ (I.S.)	黃體酮-d ₉	ESI ⁺	324 > 100	12/10	23	—
Testosterone-d ₃ (I.S.)	睪固酮-d ₃	ESI ⁺	292 > 97	6/10	23	—

*定量離子對

**內部標準品可使用不同數目氘標幟之同位素內標，並修正MRM參數