

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－氟苯並噻唑氨基甲酸之檢驗(二)
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods -
Test of Flubendazole (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品之肌肉、內臟、蛋類、乳汁、蜂蜜及脂肪中氟苯並噻唑氨基甲酸(flubendazole)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，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：Poroshell 120 SB-C18，2.7 μm ，3.0 mm $\times$ 15 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. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達10000 $\times g$ 以上者，溫度控制可達10 $^{\circ}\text{C}$ 以下者
 - 2.1.6. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder $^{\circledR}$ ，1000 rpm以上，或其他具振盪功能之裝置。
 - 2.1.7. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：乙腈、甲醇及正己烷均採用液相層析級；甲酸、二甲基亞砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、無水硫酸鎂、醋酸銨、草酸銨、氯化鈉及乙二胺四乙酸二鈉(disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate, EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；氟苯並噻唑氨基甲酸對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：1 mL及10 mL。
 - 2.3.3. 樣品瓶：1 mL，PP材質。
 - 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。

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

2.3.6. 萃取用粉劑^(註)：含無水硫酸鎂6 g、氯化鈉1.5 g。

註：可依需求自行評估使用市售各種萃取用組合套組。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 0.4 M草酸銨溶液：

稱取草酸銨49.64 g，加去離子水溶解使成1000 mL。

2.4.2. 2 N氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉8 g，以去離子水溶解使成100 mL。

2.4.3. 0.25 M乙二胺四乙酸二鈉溶液：

稱取乙二胺四乙酸二鈉93.06 g，加去離子水900 mL溶解，以2 N氫氧化鈉溶液調整至pH 8，加去離子水使成1000 mL。

2.4.4. 緩衝溶液：

取0.4 M草酸銨溶液500 mL及0.25 M乙二胺四乙酸二鈉溶液400mL混合，加去離子水使成1000 mL。

2.4.5. 乙腈：甲醇(95:5, v/v)溶液：

取乙腈與甲醇以95：5 (v/v)比例混合均勻。

2.4.6. 萃取溶液：

取乙腈與甲醇95：5 (v/v)溶液與甲酸以99：1 (v/v)比例混勻。

2.4.7. 0.5 M醋酸銨溶液：

稱取醋酸銨3.85 g，以去離子水溶解使成100 mL。

2.4.8. 50%甲醇溶液：

取甲醇250 mL，加去離子水使成500 mL。

2.4.9. 乙腈飽和之正己烷溶液：

取正己烷1000 mL，加乙腈100 mL，振盪混勻後，靜置至完全分層後，取正己烷層。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取0.5 M醋酸銨溶液10 mL及甲酸1 mL，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。

2.5.2. 移動相溶液B：

取0.5 M醋酸銨溶液10 mL及甲酸1 mL，加甲醇使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

取氟苯並嘧啶氨基甲酸對照用標準品約5 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量標準原液，以甲醇稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將肌肉、內臟及脂肪檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定；蛋類檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻，取約2 g，精確稱定；將蜂蜜檢體混勻，取約2 g，精確稱定；精確量取乳汁檢體2 mL，置於離心管中，依序加入陶瓷均質石1顆及預冷之緩衝溶液10 mL，靜置10分鐘。加入萃取溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，加入萃取用粉劑，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，於10°C，以5000 ×g離心1分鐘，收集上清液。殘渣再加入萃取溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，隨即激烈振盪數次，將殘渣打散，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，於10°C，以5000 ×g離心1分鐘，收集上清液。合併上清液，取上清液5 mL，加入乙腈飽和之正己烷溶液10 mL，振盪1分鐘，以5000 ×g離心1分鐘，取下層液，加入乙腈飽和之正己烷溶液10 mL，重複上述步驟1次，取下層液2 mL，加入DMSO 50 µL，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，殘留物以50%甲醇溶液溶解並定容至1 mL，以10000 ×g離心3分鐘，取上清液，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7.節萃取、淨化後取下層液4 mL，加入DMSO 50 µL，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，殘留物以50%甲醇溶液溶解並定容至1 mL，供作空白檢液。取500 µL空白檢液分別加入標準溶液1~100 µL及50%甲醇溶液，使體積為1000 µL，混合均勻，以10000 ×g離心3分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作基質匹配檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就氟苯並嘧啶氨基甲酸之波峰面積，與對應之氟苯並嘧啶氨基甲酸濃度，製作1~100 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：Poroshell 120 SB-C18，2.7 µm，3.0 mm × 15 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 → 1	95 → 95	5 → 5
1 → 15	95 → 0	5 → 100
15 → 21	0 → 0	100 → 100
21 → 22	0 → 95	100 → 5
22 → 24	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 µL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：1.2 kV。

離子化模式：ESI正離子。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：150 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：1000 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)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)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
氟苯並嘧啶氨基甲酸 (Flubendazole)	314 > 282*	42	22
	314 > 123		34

*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：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各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。就檢液與基質匹配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氟苯並嘧啶氨基甲酸之含量(ppm)：

$$\text{檢體中氟苯並嘧啶氨基甲酸之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M \times 2}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中氟苯並噻唑氨基甲酸之濃度($\mu\text{g/mL}$)

V：萃取檢體之萃取溶液體積(20 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

2：濃縮倍數

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($\leq 100\%$)，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

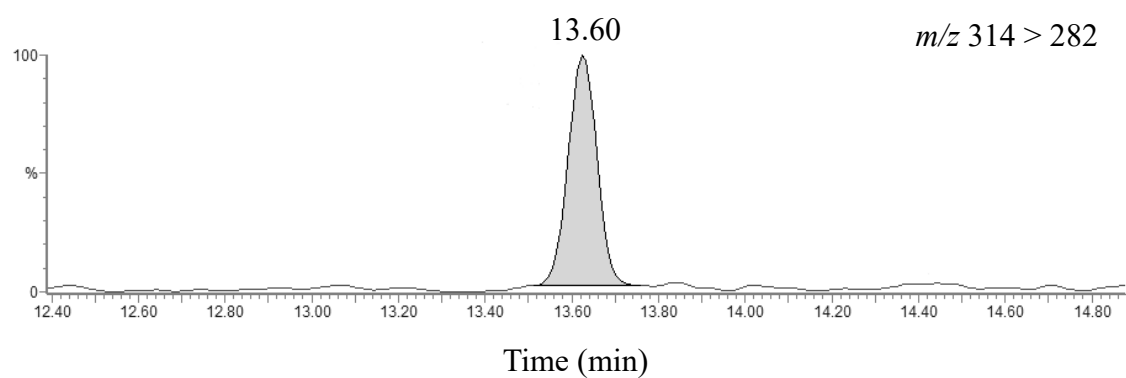
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.005 ppm。

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. De Ruyck, H., Daeseleire, E., Grijspeerdt, K., De Ridder, H., Van Renterghem, R. and Huyghebaert, G. 2001. Determination of flubendazole and its metabolites in eggs and poultry muscle with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 49: 610-617.
2. Yamada, R., Kozono, M., Ohmori, T., Morimatsu, F. and Kitayama, M. 2006. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 54-65.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析氟苯並嘧啶氨基甲酸標準品之MRM圖譜