

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－離子型抗球蟲藥之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-

Test of Ionophore Coccidiostats

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中拉薩羅(lasalocid)、馬杜拉黴素(maduramicin)、孟寧素(monensin)、那寧素(narasin)、沙利黴素(salinomycin)及仙杜拉素(semduramicin)等6項離子型抗球蟲藥之檢驗。
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：ACQUITY UPLC BEH C8，1.7 μm ，內徑2.1 mm \times 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達3200 \times g以上者。
 - 2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.4. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.5. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：甲酸、甲醇、乙腈及正己烷均採用液相層析級；無水硫酸鈉採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；拉薩羅A鈉鹽(lasalocid A sodium salt)、馬杜拉黴素銨(maduramicin ammonium)、孟寧素A鈉鹽(monensin A sodium salt, $\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{O}_{11} \cdot \text{Na}$)、那寧素、沙利黴素單鈉鹽(salinomycin monosodium salt)及仙杜拉素鈉鹽(semduramicin sodium salt)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：2 mL及10 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：

- 2.4.1. 80%乙腈溶液
取乙腈800 mL，加去離子水使成1000 mL。
- 2.4.2. 含5%甲醇之乙腈溶液：
取甲醇50 mL，加乙腈使成1000 mL。
- 2.4.3. 乙腈飽和之正己烷溶液：
取正己烷500 mL，加入乙腈50 mL，振盪混勻，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：
取甲酸1 mL，加乙腈使成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：
取相當於含拉薩羅A、馬杜拉黴素、孟寧素A、沙利黴素及仙杜拉素各約10 mg之對照用標準品，精確稱定；取那寧素對照用標準品約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以80%乙腈溶液稀釋至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；乳汁檢體混勻後，精確量取2 mL；將上述檢體分別置於離心管中，加入無水硫酸鈉5 g及含5%甲醇之乙腈溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，超音波振盪10分鐘，以3200 ×g離心10分鐘，收集上清液。殘留物再加入含5%甲醇之乙腈溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，重複上述步驟一次。合併上清液，加入乙腈飽和之正己烷溶液10 mL，振盪1分鐘，以3200 ×g離心10分鐘，取下層液，加入乙腈飽和之正己烷溶液10 mL，重複上述步驟一次，取下層液，於40°C水浴中以氮氣吹乾，殘留物以80%乙腈溶液溶解並定容至2 mL，經濾膜過濾，供作檢液。
- 2.8. 基質匹配檢量線之製作(適用於肌肉、內臟、乳汁及蛋類檢體)：
取空白檢體，依2.7節萃取、淨化及氮氣吹乾後，分別添加標準

溶液10~200 µL，再以80%乙腈溶液溶解並定容至2 mL，經濾膜過濾，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行分析。就各離子型抗球蟲藥之波峰面積，與對應之各離子型抗球蟲藥濃度，分別製作0.005~0.1 µg/mL基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註1)：

層析管：ACQUITY UPLC BEH C8，1.7 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

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 → 2.0	90 → 30	10 → 70
2.0 → 8.0	30 → 30	70 → 70
8.0 → 10.0	30 → 0	70 → 100
10.0 → 11.0	0 → 0	100 → 100
11.0 → 11.1	0 → 90	100 → 10
11.1 → 15.0	90 → 90	10 → 10

移動相流速：0.4 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)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：600°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：100 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：700 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)		
拉薩羅A	613.4 > 377*	44	40
	613.4 > 577.3	44	34
馬杜拉黴素	939.5 > 877.5*	30	34
	939.5 > 719.4	30	70
孟寧素A	693.4 > 479*	54	52
	693.4 > 461	54	48

那寧素	787.5 > 279*	62	52
	787.5 > 431	62	48
沙利黴素	773.5 > 431*	58	48
	773.5 > 531.3	58	40
仙杜拉素	895.5 > 833.5*	32	42
	895.5 > 851.5	32	38

*定量離子對

註1：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.9. 檢量線之製作(適用於脂肪基質)：

取空白檢體，分別加入標準溶液20~200 µL，依2.7節調製檢液，供作檢量線溶液，依2.8節條件進行分析。就各離子型抗球蟲藥之波峰面積，與對應之各離子型抗球蟲藥濃度，分別製作0.01~0.1 µg/mL之檢量線。

2.10. 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或檢量線溶液各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或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比^(註2)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各離子型抗球蟲藥之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各離子型抗球蟲藥之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線或檢量線溶液求得檢液中各離子型抗球蟲藥之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)或體積(mL)

註2：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

附註：1. 本檢驗方法之定量極限如下表。

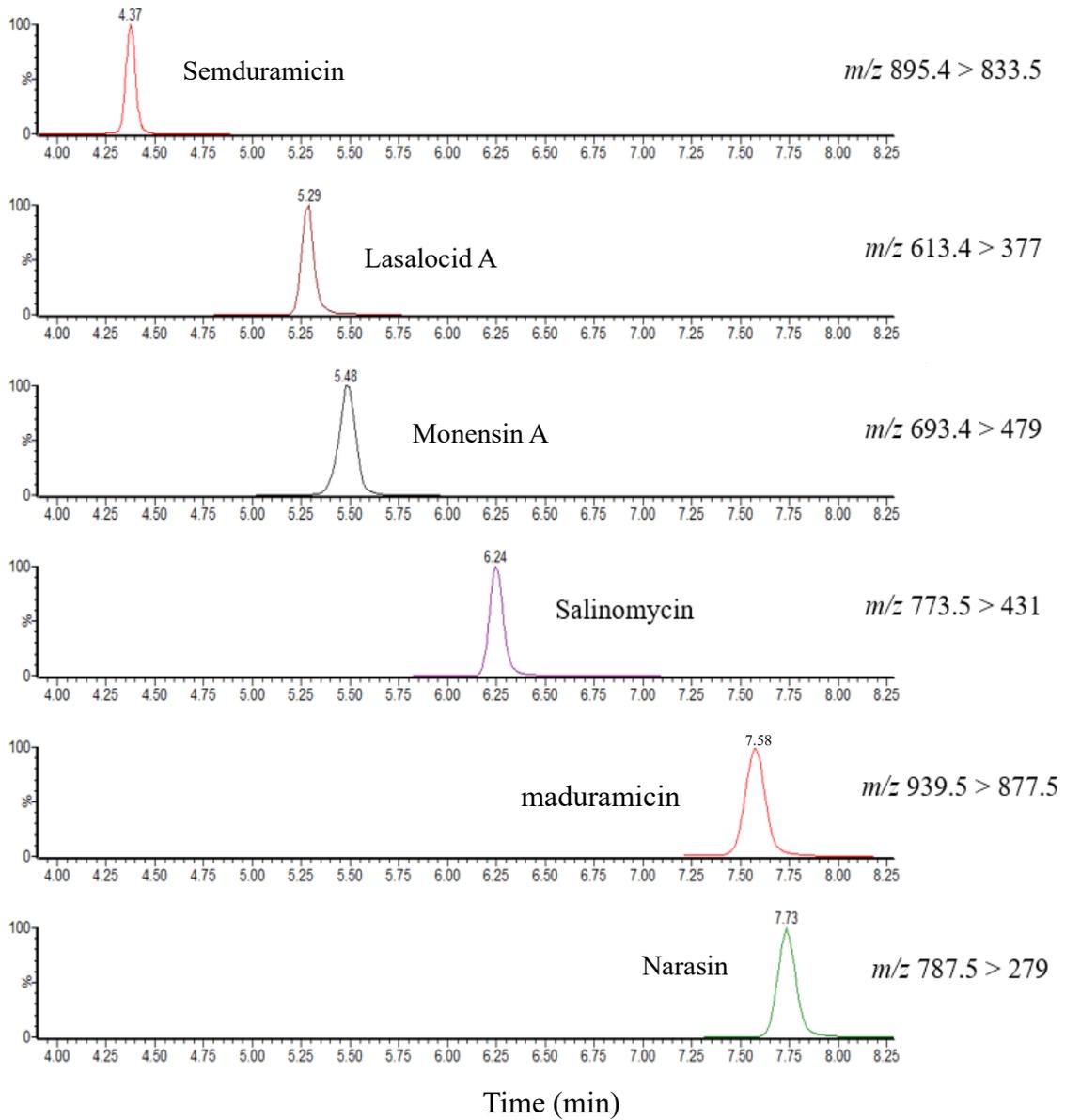
分析物	定量極限(ppm)				
	肌肉	內臟	蛋	乳汁	脂肪
拉薩羅A	0.02	0.05	0.005	0.005	0.01
馬杜拉黴素	0.02	0.05	0.005	0.005	0.01
孟寧素A	0.005	0.005	0.005	0.005	0.01
那寧素	0.005	0.005	0.005	0.005	0.01
沙利黴素	0.02	0.05	0.005	0.005	0.01
仙杜拉素	0.005	0.01	0.005	0.005	0.01

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. Dubreil-Chéneau, E., Bessiral, M., Roudaut, B., Verdon, E. and Sanders, P. 2009. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A* 1216: 8149-8157.
2. Stubbings, G. and Bigwood, T. 2009. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Anal. Chim. Acta* 637: 68-78.
3. Galarini, R., Fioroni, L., Moretti, S., Pettinacci, L. and Dusi, G. 2011. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. *Anal. Chim. Acta* 700: 167-176.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析semduramicin等6項離子型抗球蟲藥之MRM圖譜