

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－歐來金得及其代謝物之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods- Test of
Olaquinox and its Metabolite

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜產品之肌肉及內臟中歐來金得(olaquinox)及其代謝物3-methyl-2-quinoxalinecarboxylic acid (MQCA)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：Kinetex[®] 1.7 μ m EVO C18，2.1 mm $\times$ 10 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8000 $\times$ g以上，且控制溫度可達4 $^{\circ}$ C以下者。
 - 2.1.6. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1300 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：甲酸採用試藥特級；乙腈及甲醇均採用液相層析級；檸檬酸鈉、檸檬酸氫二鈉、無水硫酸鎂、氯化鈉、primary secondary amine (PSA)及octadecysilane, end-capped (C18 EC)均採用分析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}$ C可達18 M Ω ·cm以上)；歐來金得及3-methyl-2-quinoxalinecarboxylic acid (MQCA)對照用標準品；olaquinox-d₄及MQCA-d₄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. 容量瓶：50 mL，褐色。
 - 2.3.3. 樣品瓶：1 mL，褐色。

2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm ，Nylon材質。

2.3.5. 萃取用粉劑^(註1)：含檸檬酸鈉1 g、檸檬酸氫二鈉0.5 g、無水硫酸鎂4 g及氯化鈉1 g。

2.3.6. 淨化用離心管^(註1)：含PSA 300 mg、C₁₈EC 300 mg及無水硫酸鎂900 mg，檢液負荷量6 mL。

註1：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. 萃取溶液：

取甲酸與乙腈以5：95 (v/v)比例混勻。

2.4.2. 20% 甲醇溶液：

取甲醇與去離子水以1：4 (v/v)比例混勻。

2.4.3. 含0.1% 甲酸之20% 甲醇溶液：

取甲酸1 mL，加20% 甲醇溶液使成1000 mL。

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，加甲醇使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取olaquinox-d₄及MQCA-d₄同位素內部標準品各約5 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至50 mL，作為內部標準原液，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1 $\mu\text{g/mL}$ ，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取歐來金得及MQCA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，以甲醇稀釋至1 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 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100 μL 及預冷之去離子水10 mL，靜置10分

鐘。加入萃取溶液10 mL及萃取用粉劑，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，旋渦混合1分鐘，以高速分散裝置於1200 rpm振盪1分鐘後，於4°C以8000 ×g離心10分鐘。收集上清液，供淨化用。

2.8.2. 淨化

取2.8.1節供淨化用溶液6 mL，置於淨化用離心管中，以高速分散裝置1300 rpm振盪1分鐘後，於-20°C冷凍1小時，於4°C以8000 ×g離心10分鐘。取上清液2 mL，以氮氣吹至剛乾，殘留物以含0.1%甲酸之20%甲醇溶液1 mL溶解，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 基質匹配檢量線製作：

取空白檢體，依2.8節調製未添加內部標準品之淨化後上清液，分別量取2 mL，以氮氣吹至剛乾，加入標準品溶液10~100 µL、內部標準溶液20 µL及適量含0.1%甲酸之20%甲醇溶液，使體積為1 mL，混合均勻，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。就歐來金得及MQCA與其內部標準品之波峰面積比，與對應之歐來金得及MQCA濃度，分別製作0.01~0.1 µg/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註2)：

層析管：Kinetex® 1.7 µm EVO C18，2.1 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 → 0.8	95 → 95	5 → 5
0.8 → 3.0	95 → 10	5 → 90
3.0 → 5.0	10 → 10	90 → 90
5.0 → 5.3	10 → 95	90 → 5
5.3 → 7.5	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.2 mL/min。

注入量：5 µL。

毛細管電壓(Capillary voltage)： 5.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

加熱管溫度(Turbo heater temperature)：550°C。

氣簾氣體(Curtain gas)：30 psi。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：45 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：50 psi。

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

偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)與碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
歐來金得 (Olaquinox)	264 > 212*	80	30
	264 > 230	80	24
MQCA	189 > 145*	80	20
	189 > 102	80	45
Olaquinox-d ₄ (I.S.)	268 > 216	90	34
MQCA-d ₄ (I.S.)	193 > 149	90	20

*定量離子對

註2：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。

2.10. 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各5 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3)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中歐來金得或MQCA之含量(ppm)：

$$\text{檢體中歐來金得或MQCA之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M \times 2}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中歐來金得或MQCA之濃度(µg/mL)

V：萃取檢體之萃取溶液體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

2：濃縮倍數

註3：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

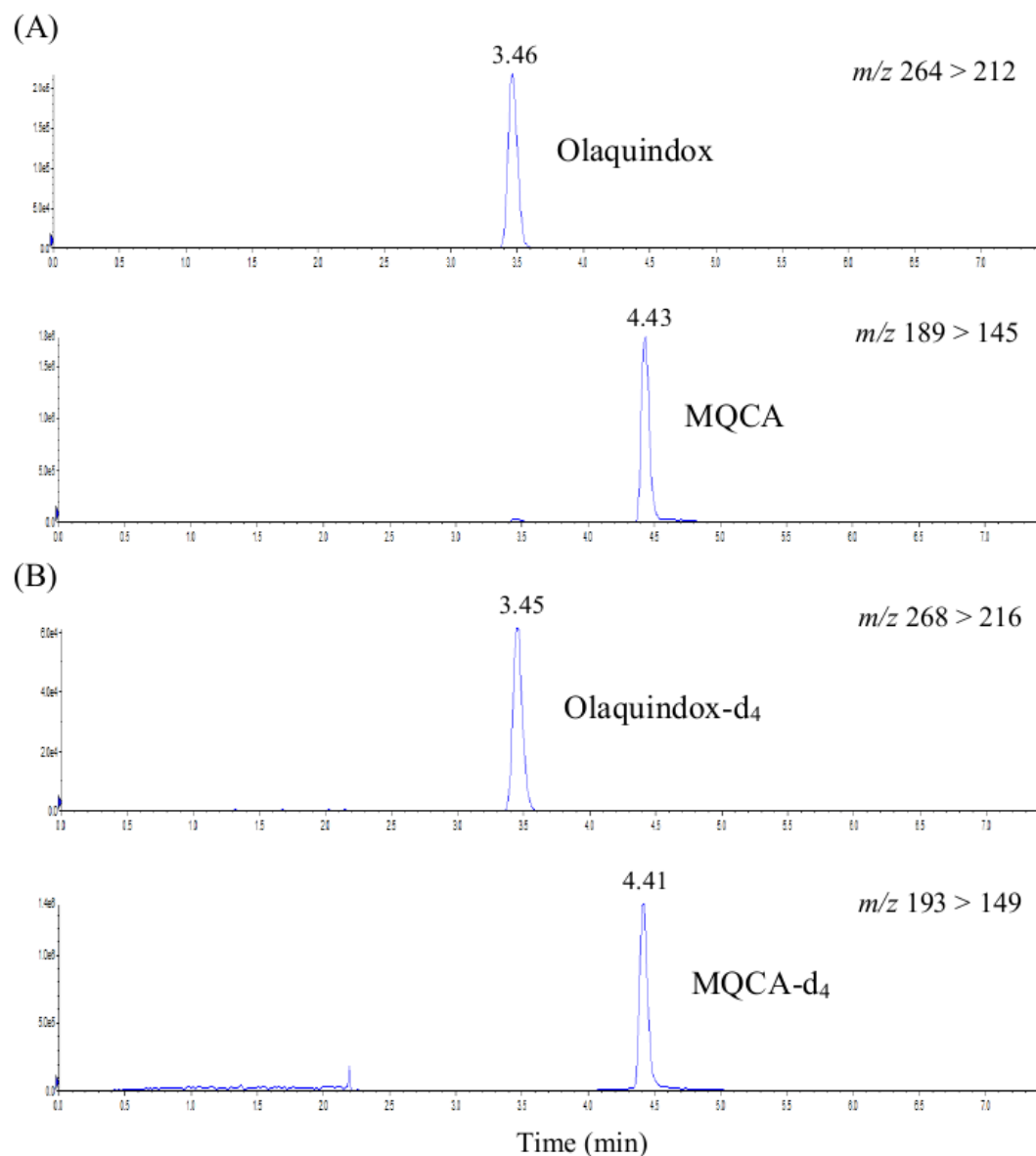
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，歐來金得及MQCA均為0.01 ppm。

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. Xie, J., Zeng, W., Gong, X., Zhai, R., Huang, Z., Liu, M., Shi, G., Jiang, Y., Dai, X. and Fang, X. 2019. A “two-in-one” tandem immunoaffinity column for the sensitive and selective purification and determination of trace/ultra-trace olaquinox and its major metabolite in fish tissues by LC-MS/MS. Food Anal. 12: 2665-2674.
2. Merou, A., Kaklamanos, G. and Theodoridis, G. 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.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析歐來金得及其代謝物MQCA標準品(A)及其同位素內部標準品(B)之MRM圖譜