

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－抗原蟲劑多重殘留分析(二)

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-

Multiresidue Analysis of Antiprotozoal Drugs (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品之肌肉、內臟、蛋類、乳汁、脂肪及蜂蜜中保奎諾(buquinolate)等23項抗原蟲劑(品項見附表一)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 120SB-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5000 \times g以上者，且溫度控制可達10°C以下者。
 - 2.1.6. 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。
 - 2.1.7. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；甲酸、二甲基亞砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、無水硫酸鎂及醋酸鈉均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 M Ω ·cm以上)；保奎諾(buquinolate)、carnidazole、滴克奎諾(decoquinolate)、戴威利啉(diaveridine)、戴克拉爾(diclazuril)、dimetridazole、二乙醯胺三氮脒(diminazene aceturate)、海樂福精氫溴酸鹽(halofuginone hydrobromide)、HMMNI (2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitro-1H-imidazole)、咪多卡二丙酸鹽(imidocarb dipropionate)、ipronidazole-OH、氮氮菲啉氫鹽酸鹽(isometamidium chloride·hydrochloride)、2-methyl-5-nitroimidazole、metronidazole、metronidazole-OH、4,4'-dinitrocarbanilide、吡喹酮

(praziquantel)、匹朗得(pyrantel)、必利美達民(pyrimethamine)、羅苯嘧啶鹽酸鹽(robenidine hydrochloride)、ronidazole、tinidazole、柔林(zoalene)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50 mL，Pyrex及PP材質。

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1)：含無水硫酸鎂6 g及醋酸鈉1.5 g。

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. 乙腈：甲醇(4:1, v/v)溶液：

取乙腈與甲醇以4：1 (v/v)比例混勻。

2.4.2. 含10%甲酸之乙腈溶液：

取甲酸與乙腈以1：9 (v/v)比例混勻。

2.4.3. 乙腈：甲醇(95:5, v/v)溶液：

取乙腈與甲醇以95：5 (v/v)比例混勻。

2.4.4. 萃取溶液：

取乙腈：甲醇(95:5, v/v)溶液與甲酸以99：1 (v/v)比例混勻。

2.4.5. 50%甲醇溶液：

取甲醇500 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.4.6. 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，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：

2.6.1. 標準溶液A：

取保奎諾、carnidazole、戴威利啉、戴克拉爾、HMMNI、ipronidazole-OH、2-methyl-5-nitroimidazole、4,4'-dinitrocarbanilide、吡喹酮、匹朗得、必利美達民、tinidazole及柔林對照用標準品各約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；取相當於含三氮脒^(註2)、海樂福精、氮氮菲啉及羅苯嘧啉各約5 mg之對照用標準品，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至50 mL，作為標準原液；取相當於含咪多卡約5 mg之對照用標準品，精確稱定，以乙腈：甲醇(4:1, v/v)溶液溶解並定容至50 mL，作為標準原液；取滴克奎諾對照用標準品約5 mg，精確稱定，以含10%甲酸之乙腈溶液溶解並定容至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 µg/mL，供作標準溶液A。

註2：三氮脒為強鹼性藥物，標準原液須配製於PP材質之容量瓶中。

2.6.2. 標準溶液B：

取dimetridazole、metronidazole、metronidazole-OH及ronidazole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 µg/mL，供作標準溶液B。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 肌肉、內臟、蛋類、乳汁及蜂蜜

將肌肉及內臟檢體細切均質，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；將上述檢體分別置於離心管中，依序加入陶瓷均質石1顆及預冷之去離子水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。殘留物再加入萃取溶液10 mL，依上述步驟萃取1次，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，於10°C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^(註3)，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，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.2. 脂肪

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆及萃取溶液10 mL，蓋上離心管蓋，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，於10°C以5000 ×g離心1分鐘，取上清液。殘留物再加入萃取溶液10 mL，依上述步驟萃取1次，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，於10°C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^(註3)，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，經濾膜過濾，供作檢液。
註3：加入微量DMSO目的係避免吹氮濃縮至乾，影響海樂福精、dimetridazole及metronidazole之定量。

2.8. 檢量線之製作：

2.8.1. 肌肉、內臟、乳汁、蜂蜜及脂肪

取空白檢體，分別加入標準溶液A及標準溶液B各10~250 μL，依2.7節調製檢液，供作檢量線溶液，並依下列條件進行分析。就各抗原蟲劑之波峰面積，與對應之各抗原蟲劑濃度，分別製作1~25 ng/mL之檢量線。

2.8.2. 蛋類

取空白檢體，分別加入標準溶液A 10~250 μL及標準溶液B 2~250 μL，依2.7節調製檢液，供作檢量線溶液，並依下列條件進行分析。就各抗原蟲劑之波峰面積，與對應之各抗原蟲劑濃度，分別製作0.2~25 ng/mL之dimetridazole、metronidazole、metronidazole-OH及ronidazole檢量線，及1~25 ng/mL之其餘抗原蟲劑檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註4)：

層析管：Poroshell 120SB-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)：

ESI正離子採用3.5 kV；ESI負離子採用3.0 kV。

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)：100 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation 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)如附表一。

註4：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5)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各抗原蟲劑之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各抗原蟲劑之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M \times 2}$$

C：由檢量線求得檢液中各抗原蟲劑之濃度(μg/mL)

V：萃取檢體之萃取溶液之體積(20 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)或體積(mL)

2：濃縮倍數

註5：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如附表二。

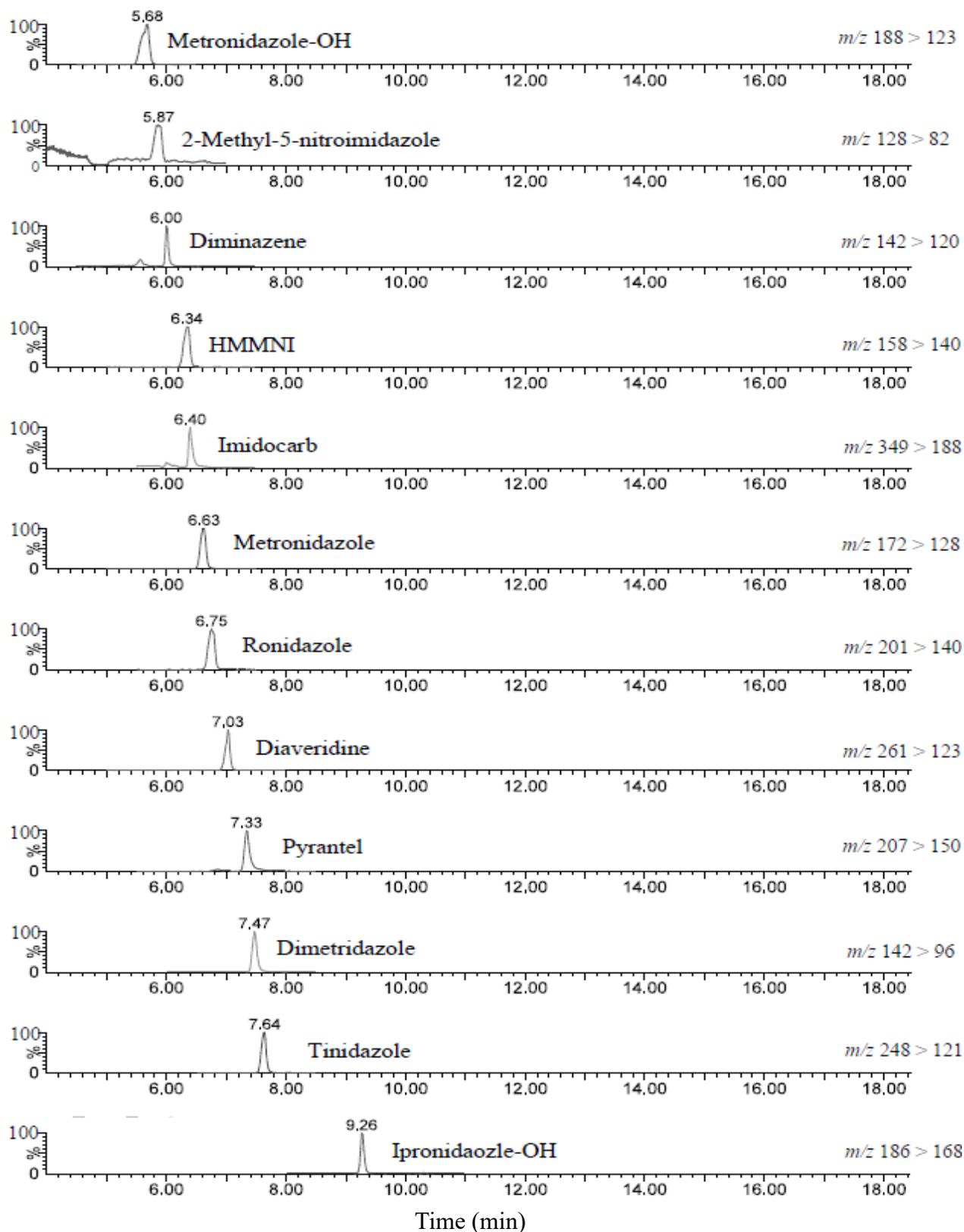
2. 為避免鹼性藥物被玻璃材質吸附而影響分析結果，檢液及檢量線溶液上機分析前宜置於PP材質之樣品瓶中，並盡速分析。

3. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

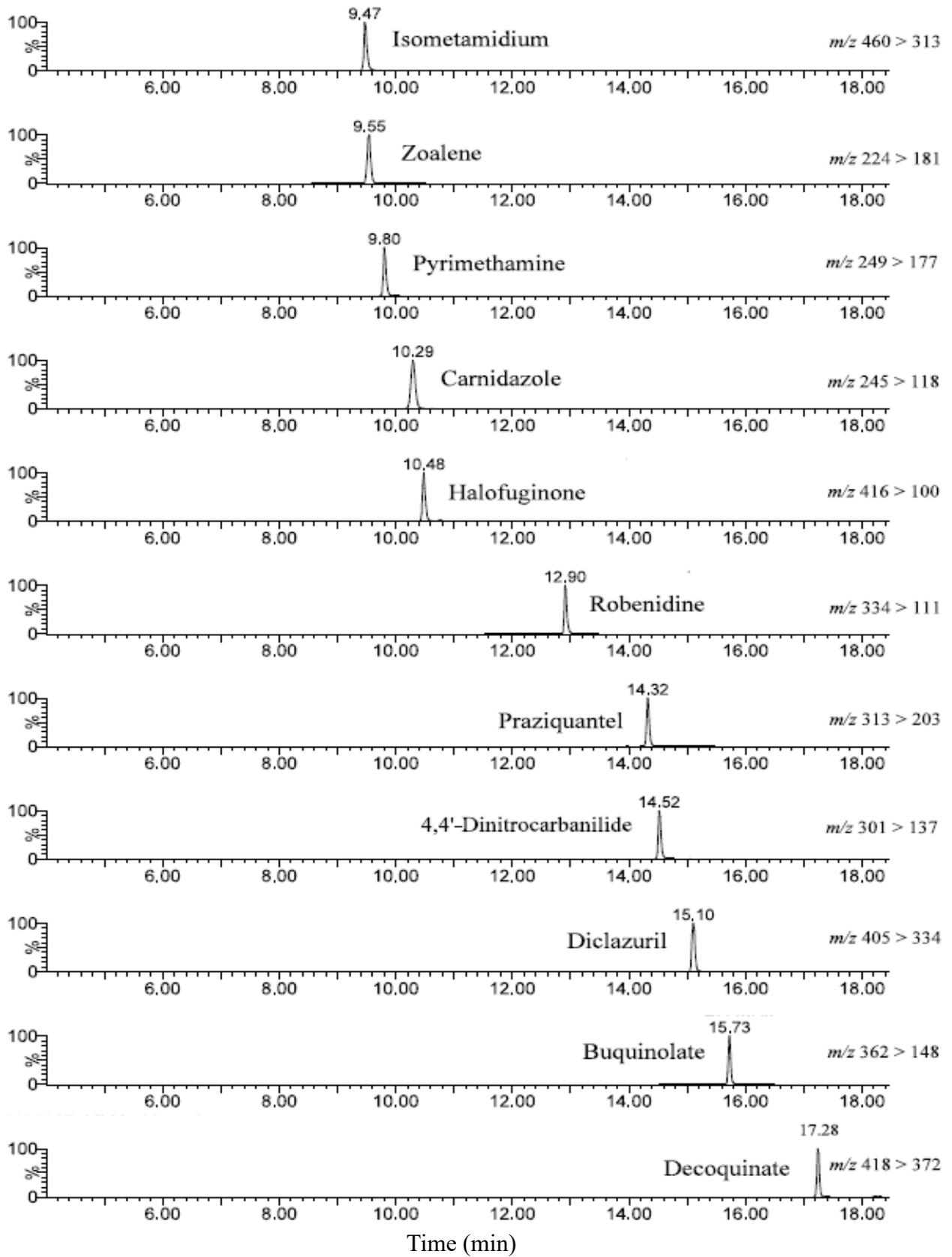
參考文獻：

1. 彭冠智、黃志能、沈盈如、林俞廷、張順憲、賴宥勳、林汝青、廖家鼎、高雅敏、曾素香、王德原。2018。食品中藥物殘留之多重快速檢驗技術精進研究。衛生福利部食品藥物管理署107年自行研究計畫。
2. Shao, B., Wu, X., Zhang, J., Duan, H., Chu, X. and Wu, Y. 2009. Development of a rapid lc–ms–ms method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. *Chromatographia* 69: 1083-1088.
3. 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metronidazole-OH等23項抗原蟲劑標準品之MRM圖譜



圖、以LC-MS/MS分析metronidazole-OH等23項抗原蟲劑標準品之MRM圖譜(續)

附表一、保奎諾等 23 項抗原蟲劑之多重反應偵測模式參數

項次	分析物		離子化 模式	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	英文名	中文名		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
1	Buquinolate	保奎諾	ESI ⁺	362 > 148*	58	50
				362 > 204		40
				362 > 260		22
2	Carnidazole	-	ESI ⁺	245 > 118*	10	12
				245 > 75		30
				245 > 60		46
3	Decoquate	滴克奎諾	ESI ⁺	418 > 372*	64	20
				418 > 204		40
				418 > 232		34
4	Diaveridine	戴威利啉	ESI ⁺	261 > 123*	52	22
				261 > 245		26
				261 > 81		42
5	Diclazuril	戴克拉爾	ESI ⁻	405 > 334*	20	18
				407 > 336		22
6	Dimetridazole	-	ESI ⁺	142 > 96*	12	16
				142 > 81		22
7	Diminazene	三氮脒	ESI ⁺	142 > 120*	20	5
				142 > 135		5
				282 > 120		5
				282 > 135		5
8	Halofuginone	海樂福精	ESI ⁺	416 > 100*	24	20
				416 > 120		20
				416 > 138		20
9	HMMNI (2-Hydroxymethyl-1- methyl-5-nitro-1H- imidazole)	-	ESI ⁺	158 > 140*	48	10
				158 > 55		16
				158 > 94		22
10	Imidocarb	咪多卡	ESI ⁺	349 > 188*	36	24
				349 > 90		78
				349 > 162		22

附表一、保奎諾等23項抗原蟲劑之多重反應偵測模式參數(續)

項次	分析物		離子化 模式	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	英文名	中文名		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
11	Ipronidazole-OH	-	ESI ⁺	186 > 168*	28	12
				186 > 122		20
				186 > 82		24
12	Isometamidium	氮氮菲啉	ESI ⁺	460 > 313*	4	18
				460 > 298		26
				460 > 269		46
13	2-Methyl-5-nitroimidazole	-	ESI ⁺	128 > 82*	6	14
				128 > 56		12
				128 > 111		14
14	Metronidazole	-	ESI ⁺	172 > 128*	20	14
				172 > 82		20
				172 > 111		20
15	Metronidazole-OH	-	ESI ⁺	188 > 123*	28	12
				188 > 126		14
				188 > 144		12
16	4,4'-Dinitrocarbanilide	乃卡巴精 代謝物	ESI ⁻	301 > 137*	36	20
				301 > 107		38
				301 > 46		48
17	Praziquantel	吡喹酮	ESI ⁺	313 > 203*	40	14
				313 > 174		26
				313 > 132		44
18	Pyrantel	匹朗得	ESI ⁺	207 > 150*	24	26
				207 > 136		26
				207 > 97		22
19	Pyrimethamine	必利美達 民	ESI ⁺	249 > 177*	20	26
				249 > 198		38
				249 > 233		26

附表一、保奎諾等23項抗原蟲劑之多重反應偵測模式參數(續)

項次	分析物		離子化 模式	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	英文名	中文名		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
20	Robenidine	羅苯嘧啶	ESI ⁺	334 > 111*	52	42
				334 > 138		24
				334 > 155		18
21	Ronidazole	-	ESI ⁺	201 > 140*	24	12
				201 > 55		20
22	Tinidazole	-	ESI ⁺	248 > 121*	15	17
				248 > 82		25
23	Zoalene	柔林	ESI ⁻	224 > 181*	10	10
				224 > 77		24
				224 > 151		16

*定量離子對，定性離子對可視基質情況選擇適合之至少一對離子對

附表二、保奎諾等23項抗原蟲劑之定量極限

項次	分析物		定量極限(ppm)					
	英文名	中文名	肌肉	內臟	蛋類	乳汁	蜂蜜	脂肪
1	Buquinolate	保奎諾	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
2	Carnidazole	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
3	Decoquinolate	滴克奎諾	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
4	Diaveridine	戴威利啉	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
5	Diclazuril	戴克拉爾	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
6	Dimetridazole	-	0.005	0.005	0.001	0.005	0.005	0.005
7	Diminazene	三氮脒	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
8	Halofuginone	海樂福精	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
9	HMMNI	-	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005
10	Imidocarb	咪多卡	0.005	0.005	0.005	0.005	0.025	0.005
11	Ipronidazole-OH	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
12	Isometamidium	氮氮菲啉	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
13	2-Methyl-5-nitroimidazole	-	0.01	0.01	0.01	0.025	0.025	0.005
14	Metronidazole	-	0.005	0.005	0.001	0.005	0.005	0.005
15	Metronidazole-OH	-	0.005	0.005	0.001	0.005	0.005	0.005
16	4,4'-Dinitrocarbanilide	乃卡巴精代謝物	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
17	Praziquantel	吡喹酮	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
18	Pyrantel	匹朗得	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
19	Pyrimethamine	必利美達民	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
20	Robenidine	羅苯嘧啉	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
21	Ronidazole	-	0.005	0.005	0.001	0.005	0.005	0.005
22	Tinidazole	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
23	Zoalene	柔林	0.005	0.005	0.01	0.01	0.01	0.005