

食品中三聚氰胺之檢驗方法 Method of Test for Melamine in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於奶粉及魚肉中三聚氰胺(melamine)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化處理後，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：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)
 - 2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC[®] BEH HILIC，1.7 μm，內徑 2.1 mm × 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達10000 × g以上者，並具有5℃以下溫控功能。
 - 2.1.3. 往復式振盪器(Reciprocal shaker)。
 - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；甲酸、醋酸銨及氨水均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)；三聚氰胺對照用標準品；碳13氮15同位素三聚氰胺[melamine (¹³C₃N₃(¹⁵NH₂)₃), 100 μg/mL]內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Oasis[®] MCX，150 mg，6 mL，或同級品。
 - 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。
 - 2.3.4. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.3.5. 容量瓶：10 mL、50 mL、100 mL及1 L。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 20 mM醋酸銨溶液：
稱取醋酸銨1.54 g，以去離子水溶解使成1 L。

2.4.2. 含5%氨水之乙腈溶液：

取氨水50 mL，加乙腈使成1 L，臨用時配製。

2.4.3. 60%乙腈溶液：

取乙腈600 mL，加去離子水使成1 L。

2.4.4. 4%甲酸溶液：

取甲酸40 mL，加去離子水使成1L。

2.4.5. 50%乙腈溶液：

取乙腈250 mL，加去離子水使成500 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

乙腈與20 mM醋酸銨溶液以95：5 (v/v)之比例混合，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.6. 內部標準溶液之配製：

精確量取碳13氮15同位素三聚氰胺內部標準品0.6 mL，以乙腈溶解並定容至50 mL，作為內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取三聚氰胺對照用標準品約10 mg，精確稱定，以50%乙腈溶液溶解並定容至100 mL，作為標準原液，於4°C貯存備用。使用時取適量標準溶液置於10 mL容量瓶中，加入內部標準溶液0.2 mL，以乙腈定容，使濃度為0.01~0.5 µg/mL (含內部標準品濃度為0.024 µg/mL)，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取：

2.8.1.1. 奶粉

將檢體混勻後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加內部標準溶液0.5 mL，再加60%乙腈溶液23.5 mL及4%甲酸溶液1 mL，振盪10分鐘，於5°C離心10分鐘，取上清液，供淨化用。

2.8.1.2. 魚肉

將檢體均質後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加內部標準溶液0.5 mL，再加60%乙腈溶液23.5 mL及4%甲酸溶液1 mL，振盪10分鐘，於5°C離心10分鐘，取上清液，供淨化用。

2.8.2. 淨化：

取Oasis[®] MCX固相萃取匣，以甲醇5 mL潤洗，再以去離子水5 mL沖洗，抽真空使固相萃取匣之去離子水完全通過。取2.8.1.節淨化用溶液5 mL，注入固相萃取匣，棄流出液，加入甲醇5 mL，棄流出液，抽真空使固相萃取匣的甲醇完全通過。再以含5%氨水之乙腈溶液5 mL沖提，收集沖提液，以濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各 5 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就三聚氰胺與內部標準品波峰面積比，與對應之三聚氰胺濃度，製作標準曲線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

移動相溶液：依 2.5.節調製之溶液。

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：5 μ L。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.2 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：130°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：400°C。

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)		
三聚氰胺	127 > 85	40	17
	127 > 68	40	22
$^{13}\text{C}_3\text{N}_3(^{15}\text{NH}_2)_3$	133 > 89	40	17

定量離子對為 m/z 127 > 85。

註：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。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各5 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.節液相層析串聯質譜條件進行分析，就檢液與標準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)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中三聚氰胺之含量(ppm)：

$$\text{檢體中三聚氰胺之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中三聚氰胺之濃度(µg/mL)

V：檢體稀釋之體積(25 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：食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。