

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－安保寧之檢驗 (二)修正草案總說明

「食品中動物用藥殘留量檢驗方法－安保寧之檢驗(二)」自一百零六年二月七日公告訂定，並於一百零七年三月十二日修正。為加強動物用藥之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中動物用藥殘留量檢驗方法－安保寧之檢驗(二)」修正草案，本次主要係依檢驗方法格式進行文字修正及增列參考層析圖譜。

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－安保寧之檢驗

(二)修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
1. 適用範圍：本檢驗方法適用於<u>畜禽產品之肌肉、內臟及蛋類</u>中安保寧(amprolium)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® HSS PFP, 2.5 µm, 內徑2.1 mm × 10 cm, 或同級品。 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。 2.1.3. <u>高速分散裝置(High speed dispersing device)</u>：<u>SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder®</u>, 1000 rpm以上，或<u>其他具振盪功能之裝置</u>。 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達<u>5000 ×g以上，且溫度控制可達10°C以下者</u>。 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；甲酸採用試藥特級；無水硫酸鎂、醋酸鈉、primary secondary amine (PSA)及octadecysilane, end-capped (C18 EC)均<u>採用</u>分析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MW·cm以上)；安保寧<u>鹽酸鹽</u>(amprolium hydrochloride)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. 濾膜：孔徑0.22 µm, Nylon材質。 2.3.3. 容量瓶：50 mL, 褐色。 2.3.4. 陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer)：<u>Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313</u>, 或同級品。 2.3.5. 萃取用粉劑^(註1)：含無水硫酸	1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜產品中安保寧(amprolium)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<u>正離子</u> (positive ion electrospray ionization, <u>ESI⁺</u>)。 2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC® HSS PFP, 2.5 µm, 內徑2.1 mm × 10 cm, 或同級品。 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。 2.1.3. <u>高速組織研磨振盪均質機</u> (SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder®)：1000 rpm以上，或<u>同級品</u>。 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達<u>3500 ×g以上者</u>。 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；甲酸採用試藥特級；無水硫酸鎂、醋酸鈉、primary secondary amine (PSA)及octadecysilane, end-capped (C18 EC)均<u>為</u>分析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MW·cm以上)；安保寧(amprolium hydrochloride)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. 濾膜：孔徑0.22 µm, Nylon材質。 2.3.3. 容量瓶：50 mL, 褐色。 2.3.4. 陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer)：<u>Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313</u>, 或同級品。 2.3.5. 萃取用粉劑^(註)：含無水硫酸鎂6 g、醋酸鈉1.5 g, 或<u>同級品</u>。 2.3.6. 淨化用離心管^(註)：含PSA 50	本次主要係依檢驗方法格式進行文字修正及增列參考層析圖譜。

鎂6 g及醋酸鈉1.5 g。 2.3.6. 淨化用離心管^(註1)：含PSA 50 mg、C18 EC 50 mg及無水硫酸鎂150 mg，檢液負荷量1 mL。 註1：可依需求自行評估使用市售各種萃取及淨化用組合套組。 2.4. 試劑之調製： 2.4.1. 含1%甲酸之乙腈溶液： 取甲酸10 mL，加乙腈使成1000 mL。 2.4.2. 0.1%甲酸溶液： 取甲酸0.1 mL，加去離子水使成100 mL。 2.4.3. 0.1%甲酸：乙腈(9:1, v/v)溶液： 取0.1%甲酸溶液與乙腈以9:1 (v/v)比例混勻。 2.5. 移動相溶液之配製： 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：乙腈。 2.6. 標準溶液之配製： 取相當於含安妥寧約5 mg之對照用標準品，精稱確定，以甲醇溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷藏貯存。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： 將肌肉及內臟檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定；<u>蛋類檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻後，取約2 g，精確稱定；將上述檢體分別置於離心管中，冷凍後加入預冷之去離子水10 mL及含1%甲酸之乙腈溶液10 mL，再加入萃取用粉劑及陶瓷均質石1顆，蓋上離心管蓋，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1 mL，置於淨化用離心管中，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以5000 ×g離心1分鐘。取上清液500 µL (a)，加入0.1%甲酸：乙腈(9:1, v/v)溶液使體積為1000 µL (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供</u>	mg、C18 EC 50 mg及無水硫酸鎂150 mg，檢液負荷量1 mL。 註：可依需求自行評估使用市售各種萃取及淨化用組合套組。 2.4. 試劑之調製： 2.4.1. 含1%甲酸之乙腈溶液： 取甲酸10 mL，加乙腈使成1000 mL。 2.4.2. 0.1%甲酸溶液： 取甲酸0.1 mL，加去離子水使成100 mL。 2.4.3. 0.1%甲酸溶液：乙腈(9:1, v/v)溶液： 取0.1%甲酸與乙腈以9:1 (v/v)比例混勻。 2.5. 移動相溶液之配製： 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：乙腈。 2.6. 標準溶液之配製： 取相當於含安妥寧約5 mg之對照用標準品，精稱確定，以甲醇溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷藏貯存。臨用時，取適量標準原液，以甲醇稀釋至1000 ng/mL，供作標準溶液。 2.7. 檢液之調製： 將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，冷凍後加入預冷之去離子水10 mL及含1%甲酸之乙腈溶液10 mL，再加入萃取用粉劑及陶瓷均質石1顆，蓋上離心管蓋，以高速組織研磨振盪器均質機於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1 mL，置於淨化用離心管中，以高速組織研磨振盪器均質機於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘後，以5000 ×g離心1分鐘。取上清液500 µL (a)，以0.1%甲酸溶液：乙腈(9:1, v/v)溶液定容至1000 µL (b)，以濾膜過濾，供作檢液。 2.8. 基質匹配檢量線之製作： 取空白檢體，依2.7.節調製淨化後上清液，分別量取500 µL (a)，分別
--	---

作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7節調製淨化後上清液，分別量取500 μL ，加入標準溶液0.5~15 μL 及適量0.1%甲酸：乙腈(9:1, v/v)溶液，使體積為1000 μL ，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。就安保寧之波峰面積，與對應之安保寧濃度，製作0.5~15 ng/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：ACQUITY UPLC[®] HSS PFP, 2.5 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 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 $\rightarrow$ 3.5	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20
3.5 $\rightarrow$ 5.5	80 $\rightarrow$ 0	20 $\rightarrow$ 100
5.5 $\rightarrow$ 8.5	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
8.5 $\rightarrow$ 10.0	0 $\rightarrow$ 80	100 $\rightarrow$ 20
10.0 $\rightarrow$ 13.0	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20

移動相流速：0.25 mL/min。

注入量：5 μL 。

離子化模式：ESI正離子。

毛細管電壓(Capillary voltage)：4.5 kV。

離子源溫度 (Ion source temperature)：100°C。

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

霧化氣體 (Nebulizer gas, GS1)：50 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	去集簇碰撞	
	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	電壓 (V)	能量 (eV)
安保寧 (Amprolium)	243 > 150*	40	20
	243 > 94	40	36

*定量離子對

加入標準溶液0.5~15 μL ，再以0.1%甲酸溶液：乙腈(9:1, v/v)溶液定容至1000 μL (b)，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就安保寧之波峰面積與對應之安保寧濃度，製作0.5~15 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：ACQUITY UPLC[®] HSS PFP, 2.5 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 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 $\rightarrow$ 3.5	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20
3.5 $\rightarrow$ 5.5	80 $\rightarrow$ 0	20 $\rightarrow$ 100
5.5 $\rightarrow$ 8.5	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
8.5 $\rightarrow$ 10.0	0 $\rightarrow$ 80	100 $\rightarrow$ 20
10.0 $\rightarrow$ 13.0	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20

移動相流速：0.25 mL/min。

注入量：5 μL 。

毛細管電壓(Capillary voltage)：4.5 kV。

離子源溫度 (Ion source temperature)：100°C。

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

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：50 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	去集簇碰撞	
	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	電壓 (V)	能量 (eV)
Amprolium	243 > 150*	40	20
	243 > 94	40	36

*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：

精確量取檢液及標準溶液各5 μL ，

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。

2.9. 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5 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3)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中安保寧之含量(ppm)：

$$\text{檢體中安保寧之含量 (ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

M × 1000

C：由基質匹配檢量線求得檢液中安保寧之濃度(ng/mL)

V：萃取檢體之含1%甲酸之乙腈溶液體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由b/a求得

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(≤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. 施養志、林旭陽、曾素香、高雅敏、闕麗卿、黃保寧、黃志能、盧信芳、李文彥、廖志能、趙偉博、於柏伸。2012。農畜水產食品中動物用殘留之檢驗研究。衛生福利部食品藥物管理署102年度自行研究報告。

2. Nakajima, T., Nagano, C., Sasmoto, T., Hayashi, H., Kanda, M., Kanai, S., Takeba, K., Matsushima, Y. and Takano, I. 2012. Development and validation of rapid analysis method for multi-class veterinary drugs in livestock products by LC-MS/MS. Shokuhin Eiseigaku Zasshi

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3)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中安保寧之含量(ppm)：

$$\text{檢體中安保寧之含量 (ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M}$$

M

C：由基質匹配檢量線求得檢液中安保寧之濃度(µg/mL)

V：萃取檢體之含1%甲酸之乙腈溶液體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由b/a求得

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：1. 本檢驗方法之定量極限為0.005 ppm。

2. 檢體品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

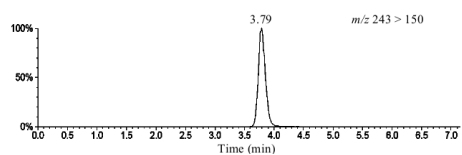
參考文獻：

1. 施養志、林旭陽、曾素香、高雅敏、闕麗卿、黃保寧、黃志能、盧信芳、李文彥、廖志能、趙偉博、於柏伸。2012。農畜水產食品中動物用殘留之檢驗研究。衛生福利部食品藥物管理署102年度自行研究報告。

2. Nakajima, T., Nagano, C., Sasmoto, T., Hayashi, H., Kanda, M., Kanai, S., Takeba, K., Matsushima, Y. and Takano, I. 2012. Development and validation of rapid analysis method for multi-class veterinary drugs in livestock products by LC-MS/MS. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 53: 243-253.

53: 243-253.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析安保寧標準
品之MRM圖譜