

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－左美素之檢驗(二)

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-

Test of Levamisole (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜產品之肌肉、內臟、脂肪、蛋類及乳汁中左美素(levamisole)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：Astec Cyclobond I 2000 DMP，5  $\mu\text{m}$ ，4.6 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5000  $\times$ g以上，且溫度控制可達10 $^{\circ}$ C以下者。
    - 2.1.6. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder<sup>®</sup>，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)。
    - 2.1.8. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
  - 2.2. 試藥：甲醇、乙腈及正己烷均採用液相層析級；甲酸、醋酸、草酸銨(ammonium oxalate monohydrate)、乙二胺四乙酸二鈉(disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate, EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、氫氧化鈉、醋酸銨、無水硫酸鎂及氯化鈉均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}$ C可達18  $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；左美素對照用標準品。
  - 2.3. 器具及材料：
    - 2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
    - 2.3.2. 容量瓶：1 mL及10 mL。

- 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22  $\mu\text{m}$ ，PTFE材質。
- 2.3.4. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
- 2.3.5. 萃取用粉劑<sup>(註1)</sup>：含無水硫酸鎂6 g及氯化鈉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. 0.35 M草酸銨溶液：  
稱取草酸銨24.87 g，以去離子水溶解使成500 mL。
- 2.4.2. 2 N氫氧化鈉溶液：  
稱取氫氧化鈉8 g，以去離子水溶解使成100 mL。
- 2.4.3. 0.25 M乙二胺四乙酸二鈉溶液：  
稱取乙二胺四乙酸二鈉46.53 g，加去離子水425 mL溶解，以2 N氫氧化鈉溶液調整至pH 8，加去離子水使成500 mL。
- 2.4.4. 緩衝溶液：  
取0.35 M草酸銨溶液500 mL及0.25 M乙二胺四乙酸二鈉溶液400 mL混合，加去離子水使成1000 mL。
- 2.4.5. 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。
- 2.4.6. 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。
- 2.4.7. 50%甲醇溶液：  
取甲醇50 mL，加去離子水使成100 mL。
- 2.4.8. 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。
- 2.4.9. 2 M醋酸銨溶液：  
稱取醋酸銨15.42 g，以去離子水溶解使成100 mL。
- 2.5. 移動相溶液之調製：
- 2.5.1. 移動相溶液A：  
取2 M醋酸銨溶液50 mL，加去離子水使成1000 mL，以醋酸調整至pH 5，經濾膜過濾，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：

取左美素對照用標準品約5 mg，精稱確定，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、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；乳汁混勻後，精確量取2 mL；將上述檢體分別置於50 mL離心管中，加入陶瓷均質石1顆及預冷之緩衝溶液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，旋渦混合1分鐘，重複上述步驟萃取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，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，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。

#### 2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7節調製檢液，取下層液4 mL，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，供作空白檢液。取空白檢液500 µL，分別加入標準溶液1~25 µL及適量50%甲醇溶液，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，並依下列條件進行分析。就左美素之波峰面積，與對應之左美素濃度，製作1~25 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件<sup>(註2)</sup>：

層析管：Astec Cyclobond I 2000 DMP，5 µm，4.6 mm × 10 cm。

層析管溫度：35°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 → 12	85 → 85	15 → 15
12 → 13	85 → 10	15 → 90
13 → 18	10 → 10	90 → 90

18 → 19	10 → 85	90 → 15
19 → 22	85 → 85	15 → 15

移動相流速：0.3 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)：500°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)		
左美素	205 > 178*	12	20
	205 > 123		26

\*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。

## 2.9. 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所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度<sup>(註3)</sup>鑑別之，並依下列計算式求出檢體中左美素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中左美素之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M \times 2} \times 10^{-3}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中左美素之濃度(ng/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

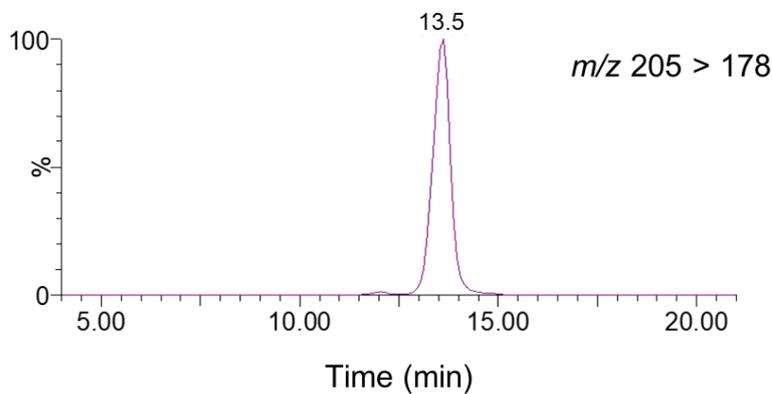
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.005 ppm。

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. Bell, D. S. and Wallworth, D. 2015. Development of a chiral method for levamisole and its metabolite, aminorex, for monitoring abuse in horse racing and cocaine adulteration. *Supelco Reporter* 33.4: 14-16.
2. 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。

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析左美素標準品之MRM圖譜