

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－氟尼辛及托芬那酸之檢驗修正草案總說明

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－氟尼辛及托芬那酸之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、「裝置」修正「高速分散裝置」及「離心機」，並增列「水浴」及「酸鹼度測定儀」。
- 二、「試藥」修正「無水硫酸鎂」及「 β -葡萄糖醛酸苷酶溶液」，增列「檸檬酸鈉」，並刪除「無水檸檬酸三鈉」。
- 三、「器具及材料」修正「萃取用粉劑」。
- 四、「試劑之調製」修正「0.2 M 醋酸鈉緩衝液」。
- 五、「標準溶液之配製」修正配製濃度。
- 六、「基質匹配檢量線之製作」修正添加標準品濃度範圍及毛細管電壓。
- 七、增列「參考層析圖譜」。
- 八、增修訂部分文字。

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－氟尼辛及托芬那酸之檢驗修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜產品中氟尼辛(flunixin)及托芬那酸(tolfenamic acid)之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經酵素水解及萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：CORTECS C18, 2.7 μm, 內徑2.1 mm × 10 cm, 或同級品。</p> <p>2.1.2. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.3. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®], 1000 rpm以上，或其它具振盪功能之裝置。</p> <p><u>2.1.4. 水浴(Water bath)：能維持水溫溫差在±1°C以內者。</u></p> <p>2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達5000 ×g以上，<u>且溫度控制可達10°C以下者。</u></p> <p>2.1.6. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.8. <u>酸鹼度測定儀(pH meter)。</u></p> <p>2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；冰醋酸、甲酸、醋酸鈉(sodium acetate)、<u>無水硫酸鎂(magnesium sulfate, anhydrous)</u>、氯化鈉、<u>檸檬酸鈉(sodium citrate)</u>及<u>檸檬酸氫二鈉(disodium hydrogen citrate sesquihydrate)</u>均採用試藥特級；β-葡萄糖醛酸苷酶溶液(β-glucuronidase, type H-2, 含 glucuronidase ≥ 85000 unit/mL及 <u>sulfatase ≤ 7500 unit/mL</u>)；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；氟尼辛及托芬那酸對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL, PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：50 mL, 褐色。</p>	<p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜產品中氟尼辛(flunixin)及托芬那酸(tolfenamic acid)之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經酵素水解及萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：CORTECS C18, 2.7 μm, 內徑2.1 mm × 10 cm, 或同級品。</p> <p>2.1.2. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.3. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®], 1000 rpm以上，<u>或同級品。</u></p> <p>2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達5000 ×g以上者，<u>並具10°C以下溫控功能。</u></p> <p>2.1.5. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；冰醋酸、甲酸、醋酸鈉(sodium acetate)、氯化鈉、<u>無水檸檬酸三鈉(trisodium citrate dehydrate)</u>及<u>檸檬酸氫二鈉(disodium hydrogen citrate sesquihydrate)</u>均採用試藥特級；<u>無水硫酸鎂</u>採用分析級；β-葡萄糖醛酸苷酶溶液(β-glucuronidase, type H-2, 含 glucuronidase ≥ 85000 unit/mL及 <u>sulfatase ≤ 7500 unit/mL</u>)；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；氟尼辛及托芬那酸對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL, PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：50 mL, 褐色。</p>	<p>一、「裝置」修正「高速分散裝置」及「離心機」，並增列「水浴」及「酸鹼度測定儀」。</p> <p>二、「試藥」修正「無水硫酸鎂」及「β-葡萄糖醛酸苷酶溶液」，增列「檸檬酸鈉」，並刪除「無水檸檬酸三鈉」。</p> <p>三、「器具及材料」修正「萃取出粉劑」。</p> <p>四、「試劑之調製」修正「0.2 M 醋酸鈉緩衝液」。</p> <p>五、「標準溶液之配製」修正配製濃度。</p> <p>六、「基質匹配檢量線之製作」修正添加標準品濃度範圍及毛細管電壓。</p> <p>七、增列「參考層析圖譜」。</p> <p>八、增修訂部分文字。</p>

<p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：50 mL，褐色。</p> <p>2.3.3. 陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。</p> <p>2.3.4. 萃取用粉劑^(註)：含無水硫酸鎂4 g、氯化鈉1 g、<u>檸檬酸鈉1 g</u>及檸檬酸氫二鈉0.5 g，或同級品。</p> <p>2.3.5. 濾膜：孔徑0.22 μm，PTFE材質。</p> <p><u>註：可依需求自行評估使用市售各種萃取用組合套組。</u></p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 0.2 M醋酸鈉緩衝液：稱取醋酸鈉<u>16.4 g</u>，加入去離子水900 mL溶解，以冰醋酸調整pH值至5.2 ± 0.1，再加去離子水使成1000 mL。</p> <p>2.4.2. 含1%甲酸之乙腈溶液：取甲酸10 mL，加入乙腈使成1000 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>2.5.1. 移動相溶液A：取甲酸0.5 mL，加入去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取氟尼辛及托芬那酸對照用標準品各約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，<u>於冷凍貯存</u>。臨用時取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至<u>100 ng/mL</u>，供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製：</p> <p>2.7.1. 肌肉、內臟及脂肪： 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0.2 M醋酸鈉緩衝液10 mL，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，加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μL，於37°C水浴中水解1小時。加入含1%甲酸之乙腈溶液10 mL，蓋上離心管蓋，</p>	<p>2.3.3. 陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。</p> <p>2.3.4. 萃取用粉劑：含無水硫酸鎂4 g、氯化鈉1 g、<u>無水檸檬酸三鈉1 g</u>及檸檬酸氫二鈉0.5 g，或同級品。</p> <p>2.3.5. 濾膜：孔徑0.22 μm，PTFE材質。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 0.2 M醋酸鈉緩衝液：稱取醋酸鈉<u>1.64 g</u>，加入去離子水900 mL溶解，以冰醋酸調整pH值至5.2 ± 0.1，再加去離子水使成1000 mL。</p> <p>2.4.2. 含1%甲酸之乙腈溶液：取甲酸10 mL，加入乙腈使成1000 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>2.5.1. 移動相溶液A：取甲酸0.5 mL，加入去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取氟尼辛及托芬那酸對照用標準品各約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。臨用時取適量標準原液混合，以甲醇稀釋至<u>1000 ng/mL</u>，供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製：</p> <p>2.7.1. 肌肉、內臟及脂肪： 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，<u>加入0.2 M醋酸鈉緩衝液10 mL</u>，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，加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μL，於37°C水浴中水解1小時。加入含1%甲酸之乙腈溶液10 mL，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，再加去離子水使成1000 mL。</p>	
--	--	--

以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，再加入萃取用粉劑並蓋上離心管蓋，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。取上清液500 μL (a)，加入去離子水使體積為1000 μL (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.2. 乳汁：

將檢體混勻後，精確量取2 mL，置於離心管中及陶瓷均質石1顆，加入0.2 M醋酸鈉緩衝液10 mL，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，加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μL，於37°C水浴中水解1小時。以下步驟依2.7.1.節操作，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7.節調製後之上清液，量取500 μL (a)，分別加入標準溶液2~100 μL，再加入去離子水使體積為1000 μL (b)，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就氟尼辛及托芬那酸之波峰面積，與對應之氟尼辛及托芬那酸濃度，分別製作0.2~10 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：CORTECS C18，2.7 μm，內徑2.1 mm × 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→2.0	80→80	20→20
2.0→6.0	80→20	20→80
6.0→6.5	20→0	80→100
6.5→9.5	0→0	100→100
9.5→10.0	0→80	100→20
10.0→13.0	80→80	20→20

移動相流速：0.40 mL/min。

注入量：20 μL。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：

心1分鐘。取上清液500 μL (a)，加入去離子水使體積為1000 μL (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.2. 乳汁：

將檢體混勻後，精確量取2 mL，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆，加入0.2 M醋酸鈉緩衝液10 mL，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，加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μL，於37°C水浴中水解1小時。以下步驟依2.7.1.節操作，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7.節調製後之上清液，量取500 μL (a)，分別加入標準溶液0.2~10 μL，再加入去離子水使體積為1000 μL (b)，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就氟尼辛及托芬那酸之波峰面積，與對應之濃度，分別製作0.2~10 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：CORTECS C18，2.7 μm，內徑2.1 mm × 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→2.0	80→80	20→20
2.0→6.0	80→20	20→80
6.0→6.5	20→0	80→100
6.5→9.5	0→0	100→100
9.5→10.0	0→80	100→20
10.0→13.0	80→80	20→20

移動相流速：0.40 mL/min。

注入量：20 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：5.5 kV及-4.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

加熱管溫度(Turbo heater temperature)：500°C。

正離子電灑離子化(ESI⁺)採用5.5 kV。

負離子電灑離子化(ESI⁻)採用4.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

加熱管溫度(Turbo heater 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	離子化模式	離子對	去集簇電壓(V)	碰撞電壓(eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Flunixin	ESI ⁺	297>264*	60	32
		297>259	60	48
Tolfenamic acid	ESI ⁻	260>216*	60	23
		262>218	60	23

*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：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各20 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)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中氟尼辛或托芬那酸之含量(ppm)：

檢體中氟尼辛或托芬那酸之含量

$$(\text{ppm}) = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中氟尼辛或托芬那酸之濃度(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)或體積(mL)

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	離子化模式	離子對	去集簇電壓(V)	碰撞電壓(eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Flunixin	ESI ⁺	297>264*	60	32
		297>259	60	48
Tolfenamic acid	ESI ⁻	260>216*	-60	-23
		262>218	-60	-23

*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：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各20 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)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中氟尼辛或托芬那酸之含量(ppm)：

檢體中氟尼辛或托芬那酸之含量

$$(\text{ppm}) = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中氟尼辛或托芬那酸之濃度(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或mL)

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

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，氟尼辛及托芬那酸均為0.002 ppm。

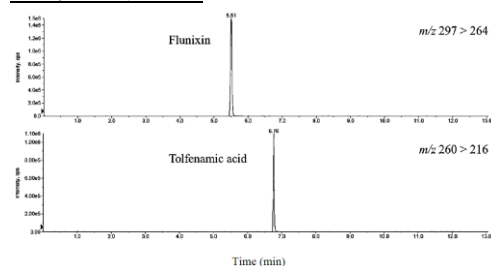
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Olejnik, M., Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T. and Zmudzki, J. 2013. Influence of matrix effect on the performance of the method for the official residue control of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal muscle. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27: 437-442.

2. Van Hoof, N., De Wasch, K., Poelmans, S., Noppe, H. and De Brabander, H. 2004. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine muscle: optimisation of ion trap parameters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 2823-2829.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析氟尼辛及托芬那酸標準品之MRM圖譜

≤ 10

± 50

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，氟尼辛及托芬那酸均為0.002 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. Olejnik, M., Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T. and Zmudzki, J. 2013. Influence of matrix effect on the performance of the method for the official residue control of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal muscle. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27: 437-442.

2. Van Hoof, N., De Wasch, K., Poelmans, S., Noppe, H. and De Brabander, H. 2004. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine muscle: optimisation of ion trap parameters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 2823-2829.