

食品中動物用藥殘留量檢驗方法—硝基呋喃代謝物之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-

Test of Nitrofurantol Metabolites

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品、蜂蜜及乳汁中硝基呋喃代謝物之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經水解、衍生化、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. 液相層析串聯質譜分析儀：
 - 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：CORTECS C18，2.7 μm ，內徑 2.1 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機 (Homogenizer)。
 - 2.1.3. 水平式振盪恆溫水浴 (Horizontal shaking bath)：附有自動溫度調節，溫差在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內。
 - 2.1.4. 離心機 (Centrifuge)：可達 2600 $\times g$ 以上者。
 - 2.1.5. 旋渦混合器 (Vortex mixer)。
 - 2.1.6. 酸鹼度測定儀 (pH meter)。
 - 2.1.7. 氮氣蒸發裝置 (Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：甲醇、乙酸乙酯及正己烷均採用液相層析級；2-硝基苯甲醛 (2-nitrobenzaldehyde)、磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)、氯化鈉、氫氧化鈉、醋酸銨、甲酸及鹽酸均採用試藥特級；去離子水 (比電阻於 25°C 可達 18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOX)、3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)、1-aminohydantoin hydrochloride (AH-HCl) 及 semicarbazide hydrochloride (SC-HCl) 對照用標準品；AOZ 同位素內部標準品 (AOZ- d_4)、AMOX 同位素內部標準品 (AMOX- d_5)。

2.3. 器具及材料：

- 2.3.1. 離心管：15 mL及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及100 mL，褐色。
- 2.3.4. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Mega Bond Elut Plexa，500 mg，6 mL，或同級品。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 50 mM 2-硝基苯甲醛溶液：

稱取2-硝基苯甲醛0.075 g，以甲醇溶解使成10 mL。臨用時調製，置於褐色瓶中。

2.4.2. 0.125 M鹽酸溶液：

取鹽酸10.4 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.4.3. 0.8 M氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉16 g，以去離子水溶解使成500 mL。

2.4.4. 0.1 M磷酸氫二鉀溶液：

稱取磷酸氫二鉀17.4 g，以去離子水溶解使成1000 mL。

2.4.5. 20%甲醇溶液：

取甲醇20 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.6. 30%甲醇溶液：

取甲醇30 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.7. 含2%甲酸之甲醇溶液：

取甲酸2 mL，加甲醇使成100 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：5 mM醋酸銨溶液。

稱取醋酸銨0.39 g，以去離子水溶解使成1000 mL，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：甲醇。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取AOZ-d₄及AMOZ-d₅各約5 mg之同位素內部標準品，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至50 mL，作為內部標準原液，於-20°C避光貯存。臨用時，分別取適量內部標準原液混合後，以

甲醇稀釋至100 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取相當於含AOZ、AMAZ、SC及AH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，於-20°C避光貯存。臨用時，分別取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至100 ng/mL，作為標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 水解及衍生化：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，乳汁精確量取2 mL，置於50 mL離心管中^(註)，加入內部標準溶液50 µL，靜置15分鐘。再加入0.125 M鹽酸溶液10 mL及50 mM 2-硝基苯甲醛溶液0.4 mL，旋渦混合15秒後，於37°C水浴以80 rpm水平振盪，避光反應16小時。

註：當肌肉及內臟檢出SC大於1 ppb時，應於檢體取樣後增加清洗步驟，其步驟為：將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入50%甲醇溶液10 mL，旋渦混合30秒，以2600 ×g離心5分鐘，取沈澱物再依序以75%甲醇溶液10 mL、甲醇10 mL及去離子水5 mL重複上述清洗步驟。棄上清液，沈澱物加入內部標準溶液50 µL，靜置15分鐘，依2.8.1.節衍生化步驟進行反應。

2.8.2. 萃取及淨化：

2.8.2.1. 肌肉、內臟及蜂蜜：

取2.8.1.節經衍生化反應之檢體，冷卻至室溫，加入0.1 M磷酸氫二鉀溶液1 mL及0.8 M氫氧化鈉溶液1 mL，旋渦混合15秒，以0.8 M氫氧化鈉溶液或0.125 M鹽酸溶液調整pH值至7.3 ± 0.2，以去離子水清洗酸鹼度測定儀之電極，洗液併入原離心管中，再以去離子水調整體積至20 mL。旋渦混合15秒，以2600 ×g離心5分鐘，收集上清液，沉澱物再以去離子水3 mL重複萃取一次。合併上清液，加入氯化鈉0.5 g及乙酸乙酯12 mL，旋渦混合1分鐘，以2600 ×g離心5分鐘，取乙酸乙酯層至15 mL離心管，於40°C以氮氣吹乾，殘留物加入20%甲醇溶液1 mL，旋渦混合溶解，

再加入正己烷1 mL，混勻後，以2600 ×g離心5分鐘，取下層液，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8.2.2. 乳汁：

取2.8.1.節經衍生化反應之檢體，冷卻至室溫，加入0.1 M 磷酸氫二鉀溶液1 mL及0.8 M氫氧化鈉溶液1 mL，旋渦混合15秒，以0.8 M氫氧化鈉溶液或0.125 M鹽酸溶液調整pH值至 7.3 ± 0.2 ，以去離子水清洗酸鹼度測定儀之電極，洗液併入原離心管中，再以去離子水調整體積至20 mL。旋渦混合15秒，以2600 ×g離心5分鐘，收集上清液，沉澱物再以去離子水3 mL重複萃取一次。合併上清液，注入預先以甲醇5 mL及去離子水5 mL潤洗之固相萃取匣，再以去離子水3 mL及30%甲醇溶液3 mL沖洗，棄流出液。固相萃取匣真空抽乾後，以含2%甲酸之甲醇溶液3 mL沖提，收集沖提液，於40°C水浴以氮氣濃縮至乾，殘留物以20%甲醇溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別加入標準溶液20~100 µL及內部標準溶液50 µL，依2.8.節調製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就各硝基呋喃代謝物與內部標準品波峰面積比，與對應之各硝基呋喃代謝物濃度，分別製作2~10 ng/mL檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(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 → 9.0	80 → 50	20 → 50
9.0 → 10.0	50 → 0	50 → 100
10.0 → 13.0	0 → 0	100 → 100
13.0 → 14.0	0 → 80	100 → 20
14.0 → 17.0	80 → 80	20 → 20

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：20 μ L。

離子化模式：ESI⁺。

毛細管電壓(Capillary voltage)：5.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：550°C。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：30 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：55 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 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	內部 標準品
	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)			
SC	209 > 192*		15	AOZ-d ₄
	209 > 166	66	11	
	209 > 134		12	
AOZ	236 > 134*		15	AOZ-d ₄
	236 > 104	60	30	
	236 > 149		15	
AH	249 > 134*		20	AOZ-d ₄
	249 > 104	80	30	
	249 > 178		22	
AMAZ	335 > 128*		26	AMAZ-d ₅
	335 > 262	60	20	
	335 > 291		14	
AOZ-d ₄	240 > 134	60	15	
AMAZ-d ₅	340 > 296	60	15	

*定量離子對

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：

精確量取檢液及檢量線溶液各20 μ L，分別注入液相層析串聯質譜分析儀中，依2.9.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之相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各硝基呋喃代謝物之含量

(ppb)：

$$\text{檢體中各硝基呋喃代謝物之含量(ppb)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中各硝基呋喃代謝物之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g或mL)

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積比而得(≤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，AMAZ、AOZ、AH及SC均為1 ppb。
 2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。
 3. 甲殼類之殼中天然存在高量之結合型態之SC，且其表層肌肉亦可能遭受污染，故檢體取樣時應排除表層肌肉。
 4. 硝基呋喃類藥物之代謝物semicarbazide (SC)除了動物用藥使用之殘留外，塑膠製品之加工發泡劑azodicarbonamide於製造受熱過程中，亦會產生SC。部分研究指出蛋粉、奶粉或蜂蜜等，於生產過程中亦會產生微量SC。

參考文獻：

1. Crews, C. 2012. Potential natural sources of semicarbazide in honey. Report for the Food Standards Agency in Scotland. Project code FS241065. The Food and Environment Research Agency, UK.
2. 張平安、張建威、喬明武、唐貴芳。2010。高效液相色譜—串聯質譜法測定蜂蜜中硝基呋喃代謝物的研究。浙江農業科學，3: 611-613。
3. Chu, P. S. and Lopez, M. I. 2007. Determination of Nitrofurans Residues in Milk of Dairy Cows Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 55: 2129-2135.