

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 Nitrofurans
Metabolites

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品之肌肉、內臟、蛋類、蜂蜜及乳汁中3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone等5項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(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 $\times\text{g}$ 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. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：甲醇、乙酸乙酯及正己烷均採用液相層析級；二甲基亞砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、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)；3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone (AMOZ)、3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)、1-aminohydantoin hydrochloride (AH-HCl)、3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSAH)及semicarbazide hydrochloride (SC-HCl)對照用標準品；3-amino-2-oxazolidinone- d_4 (AOZ- d_4)、3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone- d_5 (AMOZ- d_5)、1-aminohydantoin- $^{13}\text{C}_3$ (AH-

$^{13}\text{C}_3$)、3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide- $^{15}\text{N}_2$ (DNSAH- $^{15}\text{N}_2$)
及semicarbazide- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ hydrochloride ($\text{SC-}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ HCl)同
位素內部標準品。

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：50 mL，褐色。

2.3.3. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Mega Bond Elut
Plexa，500 mg，6 mL，或同級品。

2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。

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，置於褐色瓶
中，臨用時調製。

2.4.2. 0.125 M鹽酸溶液：

取鹽酸10.4 mL，徐徐加入去離子水500 mL中，再加去離子水使
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。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

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：

取相當於AOZ- d_4 、AMOZ- d_5 、AH- $^{13}\text{C}_3$ 、DNSAH- $^{15}\text{N}_2$ 及SC- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$
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，冷凍避光貯存。臨用時取適量
各內部標準原液混合，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、AMOZ、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，冷凍避光貯存；取DNSAH對照用標準品約5 mg，精確稱定，先以DMSO 2 mL溶解，再以甲醇定容至50 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時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：

將肌肉及內臟檢體細切均質後，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；將乳汁檢體混勻，精確量取2 mL，置於50 mL離心管中^(註)，加入內部標準溶液50 μ L，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，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0.5 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 \times g離心5分鐘，棄上清液，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 μ L，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、蛋類及蜂蜜：

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，再以前述去離子水調整體積至20 mL。旋渦混合15秒，以2600 \times g離心5分鐘，收集上清液，沉澱物再以前述去離子水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 \times g離心5分鐘，取上層液(乙酸乙酯層)至15 mL離心管，於40°C水浴中以氮氣濃

縮至剛乾，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，混合均勻，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，棄流出液，再以去離子水3 mL及30% 甲醇溶液3 mL沖洗，棄流出液。將固相萃取匣真空抽乾後，以甲醇6 mL沖提，收集沖提液，於40°C水浴中以氮氣濃縮至剛乾，殘留物以20% 甲醇溶液1 mL溶解，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10~100 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。就各硝基咪喃代謝物與其同位素內部標準品之波峰面積比，與對應之各硝基咪喃代謝物濃度，分別製作1~10 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 → 1.0 | 80 → 80 | 20 → 20 |
| 1.0 → 9.0 | 80 → 0 | 20 → 100 |
| 9.0 → 12.0 | 0 → 0 | 100 → 100 |
| 12.0 → 13.0 | 0 → 80 | 100 → 20 |
| 13.0 → 17.0 | 80 → 80 | 20 → 20 |

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：20 μL 。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：

正離子電灑離子化(ESI⁺)採用5.5kV。

負離子電灑離子化(ESI⁻)採用4.5kV。

加熱管溫度(Turbo heater temperature)：550°C。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：30 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：55 psi。

氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：High。

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 能量 (eV) |
|---|------------------|-----------------|---------------|------------------|------------------|
| | | 前驅離子(m/z) > | 產物離子(m/z) | | |
| SC | ESI ⁺ | 209 > | 192* | 40 | 16 |
| | | 209 > | 166 | | 15 |
| | | 209 > | 134 | | 16 |
| AOZ | ESI ⁺ | 236 > | 134* | 60 | 17 |
| | | 236 > | 104 | | 30 |
| | | 236 > | 149 | | 20 |
| AH | ESI ⁺ | 249 > | 134* | 80 | 18 |
| | | 249 > | 104 | | 30 |
| | | 249 > | 178 | | 21 |
| AMTZ | ESI ⁺ | 335 > | 128* | 60 | 30 |
| | | 335 > | 262 | | 16 |
| | | 335 > | 291 | | 23 |
| DNSAH | ESI ⁻ | 374 > | 182 | -70 | -28 |
| | | 374 > | 226 | | -28 |
| | | 374 > | 183 | | -28 |
| SC- ¹³ C ¹⁵ N ₂ (I.S.) | ESI ⁺ | 212 > | 168 | 65 | 15 |
| AOZ-d ₄ (I.S.) | ESI ⁺ | 240 > | 134 | 60 | 18 |
| AH- ¹³ C ₃ (I.S.) | ESI ⁺ | 252 > | 134 | 80 | 20 |
| AMTZ-d ₅ (I.S.) | ESI ⁺ | 340 > | 296 | 60 | 17 |
| DNSAH- ¹⁵ N ₂ (I.S.) | ESI ⁻ | 376 > | 183 | -70 | -36 |

*定量離子對，定性離子對可就基質情況選擇適合之至少一

對離子對。

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 µL，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咪喃代謝物之含量(ppb)：

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

C：由檢量線求得檢液中各硝基咪喃代謝物之濃度(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，AMOZ、AOZ、AH、DNSAH及SC均為0.5 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. 硝基咪喃類藥物之代謝物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。

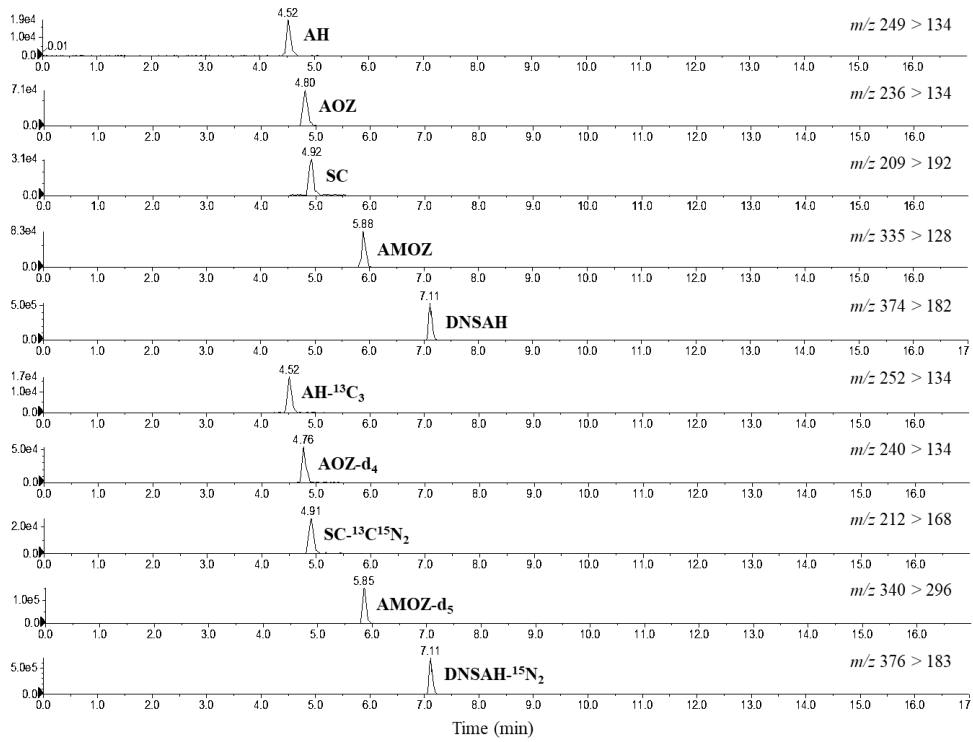
參考文獻：

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.
4. European Commission. 2019. Commission Regulation (EU) 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin and repealing Decision 2005/34/EC. *Off. J. Eur. Union L 289*: 41-46.
5. Verdon, E., Couedor, P. and Sanders, P. 2007. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry—In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. *Anal. Chim. Acta* 586: 336-347.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析5項硝基咪唑代謝物標準品及其同位素內部標準品之MRM圖譜