

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－卡巴得及其代謝物之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods -

Test of Carbadox and its Metabolites

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品之肌肉及內臟中卡巴得(carbadox)及其代謝物之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化處理後，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：Symmetry<sup>®</sup> C8, 3.5  $\mu\text{m}$ ，內徑2.1 mm  $\times$  10 cm，或同級品。
    - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
    - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達4000  $\times$ g以上者。
    - 2.1.4. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。
    - 2.1.5. 振盪器(Shaker)。
    - 2.1.6. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
    - 2.1.7. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
    - 2.1.8. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.1.9. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
  - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；醋酸、磷酸及偏磷酸均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)。卡巴得(carbadox, CBX)、脫氧卡巴得(desoxycarbadox, DCBX)及喹噁啉-2-羧酸(quinoxaline-2-carboxylic acid, QCA)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. 容量瓶：1 mL及50 mL，褐色。
    - 2.3.3. 濃縮瓶：500 mL，褐色。
    - 2.3.4. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Oasis HLB，6 mL，200 mg，或同級品。

2.3.5. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 0.01%醋酸溶液：

取醋酸0.01 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.2. 0.3%偏磷酸溶液：

稱取偏磷酸1.5 g，以去離子水溶解使成500 mL。

2.4.3. 萃取溶液：

取0.3%偏磷酸溶液與甲醇以7：3 (v/v)之比例混勻，臨用時配製。

2.4.4. 0.01%醋酸：乙腈(9:1, v/v)溶液：

取0.01%醋酸溶液與乙腈以9：1 (v/v)之比例混勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取醋酸0.05 mL，加去離子水使成500 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：

取醋酸0.05 mL，加乙腈使成500 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

取卡巴得、脫氧卡巴得及喹噁啉-2-羧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，冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以0.01%醋酸：乙腈(9:1, v/v)溶液稀釋至1000 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

將檢體細切均質後，取約5 g，精確稱定，置於均質機中，加入萃取溶液40 mL，均質2分鐘，移入離心管中。以4000 ×g離心10分鐘，收集上清液。殘渣再加入萃取溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以4000 ×g離心10分鐘，合併上清液。於40°C水浴中減壓濃縮至約10 mL，濃縮液以磷酸調整pH值至4.0~4.5，再以4000 ×g離心10分鐘，取上清液供淨化用。

2.7.2. 淨化：

取2.7.1.節供淨化用之溶液，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。以去離子水6 mL流洗固相萃取匣，棄流出液。固相萃取匣以真空抽乾1分鐘後，以甲醇6 mL沖提，收集沖提液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物以0.01%醋酸：乙腈(9:1, v/v)溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾後，供作檢液。

## 2.8. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別加入標準溶液5~100 µL，依2.7.節調製檢液，供作檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就卡巴得及其代謝物之波峰面積，與對應之卡巴得及其代謝物濃度，分別製作5~100 ng/mL之檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件<sup>(註)</sup>：

層析管：Symmetry® C8，3.5 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：40°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 (%)
0.0 → 6.0	100 → 0	0 → 100
6.0 → 6.5	0 → 100	100 → 0
6.5 → 10.0	100 → 100	0 → 0

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)：100°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：50 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：800 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)及碰撞能量(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( $m/z$ )		
CBX	263 > 231*	25	15
	263 > 129	25	30

DCBX	231 > 143*	20	20
	231 > 199	20	15
QCA	175 > 129*	20	15
	175 > 102	20	25

\*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)</sup>鑑別之，並依下列計算式求得檢體中卡巴得及其代謝物之含量(ppm)：

$$\text{檢體中卡巴得及其代謝物之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由檢量線求得檢液中卡巴得及其代謝物之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

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，於肌肉均為0.001 ppm，於內臟均為0.003 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：

Anna, M., George, K. and Georgios, T. 2012. Determination of carbadox and metabolites of carbadox and olaquinox in muscle tissue using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 881-882: 90-95.