

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－黃體荷爾蒙助孕酮、 17α -羥基助孕酮、4-雄烯-3,17-二酮及睪固酮之檢驗

Method of Test Veterinary Drug Residues in Foods-Test of Progesterone, 17α -Hydroxyprogesterone, 4-Androstene-3,17-dione, Testosterone

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於牛肉中助孕酮(progesterone)、 17α -羥基助孕酮(17α -hydroxyprogesterone)、4-雄烯-3,17-二酮(4-androstene-3,17-dione)及睪固酮(testosterone)之檢驗。
2. 檢驗方法：高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)。

2.1. 裝置：

2.1.1. 高效液相層析儀

2.1.1.1. 檢出器：具有 243 nm 波長之紫外光檢出器。

2.1.1.2. 層析管：RP-18，粒徑 5 μm ，內徑 4.0 mm \times 25 cm 或同級品。

2.1.2. 攪拌均質器(Blender)。

2.1.3. 振盪器(Shaker)。

2.1.4. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。

2.2. 試藥：

乙腈及甲醇均採用液相層析級，正己烷、乙酸乙酯及無水酒精，對照用標準品：助孕酮(progesterone)、 17α -羥基助孕酮(17α -hydroxyprogesterone)、4-雄烯-3,17-二酮(4-androstene-3,17-dione)及睪固酮(testosterone)均採用試藥特級。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 布赫納漏斗(Buechner funnel)：直徑 8 cm。

2.3.2. 抽氣瓶：250 mL。

2.3.3. 矽膠過濾層析匣(Silica cartridge, 900 mg)。

2.3.4. 中性氧化鋁過濾層析匣(Alumina N cartridge, 900 mg)

2.3.5. 濃縮瓶：250 mL。

2.3.6. 濾膜：孔徑 0.2 μm ，Teflon 材質。

2.4. 移動相溶液之調製：

乙腈、甲醇與去離子水以 3：14：8 (v/v/v)之比例混勻後以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.5. 標準溶液之配製：

分別稱取助孕酮、17 α -羥基助孕酮、4-雄烯-3,17-二酮及睪固酮對照用標準品各約 10 mg，精確稱定，共置容量瓶中，以甲醇溶解並定容至 100 mL，作為標準原液，使用時再以甲醇稀釋至 0.05 ~1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

2.6. 檢液之調製：

檢體細切，以果汁機攪拌均勻後精確稱取 10 g，置於攪拌均質機中，加入乙腈 50 mL，充分攪拌 1 分鐘，抽氣過濾，殘留物再以乙腈 50 mL，同樣操作二次，合併濾液於濃縮瓶中，於 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中減壓濃縮至乾。以正己烷：乙酸乙酯(9：1)溶液 4 mL 溶解，注入經正己烷 4 mL 潤濕之矽膠過濾層析匣，再以正己烷：乙酸乙酯(9：1)溶液 8 mL 分兩次洗濃縮瓶，注入矽膠過濾層析匣內，流出液棄之，矽膠過濾層析匣下端串聯經正己烷 4 mL 潤濕之中性氧化鋁過濾層析匣，再以乙醇 8 mL 分兩次洗濃縮瓶，注入已串聯之層析匣，沖提液於 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中減壓濃縮至乾。以甲醇溶解，並定容至 1 mL，經濾膜過濾後，供作淨化用。

2.7. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 20 μL ，分別注入高效液相層析儀中，參照下述層析條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依另取之標準溶液按上述方法作出檢量線，求出檢體中助孕酮及其三種代謝物之含量(ppm)：

$$\text{檢體中助孕酮及其三種代謝物之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線或波峰面積求得檢液中助孕酮及其三種代謝物之濃度($\mu\text{g/mL}$)。

V：檢體最後定容之體積(mL)。

M：取樣分析檢體之重量(g)。

高效液相層析測定條件：

層析管柱：RP-18，粒徑 5 μm ，內徑 4.0 mm \times 25 cm。

移動相溶液：依 2.4.節所調製之溶液。

移動相流速：1 mL/min

檢出器：紫外光 243 nm。

備註：1. 本檢驗方法之最低檢出限量為 0.01 ppm。

2. 檢體採集後應貯存於零下 18 $^{\circ}\text{C}$ 之冷凍庫中，直至分析工作開始，並以一個月為保存期限。