

食品中動物用藥殘留量檢驗方法—Benzimidazole 類多重殘留分析

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods

- Test of Multiresidue Analysis of Benzimidazoles

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中 albendazole、albendazole sulfoxide、albendazole sulfone、albendazole 2-aminosulfone、thiabendazole、5-hydroxythiabendazole、苯並咪唑甲氨基甲酸(mebendazole)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：光二極體列陣檢出器(photodiode array detector)及螢光檢出器(fluorescence detector)串聯使用。
 - 2.1.1.2. 層析管：Cosmosil 5C18 MS-II，5 μ m，內徑 4.6 mm $\times$ 25 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)。
 - 2.1.3. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.4. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.5. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。
 - 2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：乙腈、甲醇及正己烷均採用液相層析級；二甲亞砜(dimethyl sulfoxide)、正丙醇、磷酸、磷酸二氫鈉(sodium dihydrogen phosphate, dihydrate)、碳酸氫鈉、碳酸鈉及二丁基羥基甲苯(dibutyl hydroxytoluene)均採用試藥特級；albendazole、albendazole sulfoxide、albendazole sulfone、albendazole 2-aminosulfone、thiabendazole、5-hydroxythiabendazole 及苯並咪唑甲氨基甲酸對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 抽氣瓶：250 mL。

2.3.2. 布赫納漏斗(Buchner funnel)：直徑 8 cm。

2.3.3. 分液漏斗：250 mL。

2.3.4. C18 固相萃取匣：3 mL，500 mg，Sep-Pak C18 cartridge，或同級品。

2.3.5. 濃縮瓶：250 mL。

2.3.6. 濾膜：孔徑 0.2 及 0.45 μm ，nylon 材質。

2.4. 萃取用緩衝溶液之調製：

取飽和碳酸氫鈉溶液以飽和碳酸鈉溶液調整 pH 值為 10。

2.5. 1%二丁基羥基甲苯溶液之調製：

稱取二丁基羥基甲苯 1 g 以乙腈溶解使成 100 mL。

2.6. 0.02M 磷酸二氫鈉溶液之調製：

稱取磷酸二氫鈉 3.12 g 以去離子水溶解使成 1000 mL。

2.7. 0.02M 磷酸二氫鈉緩衝溶液(pH 3.3)之調製：

稱取磷酸二氫鈉 3.12 g 以去離子水溶解使成 1000 mL，以磷酸調整 pH 值為 3.3，以 0.45 μm 濾膜過濾，取濾液作為移動相之緩衝溶液。

2.8. 標準溶液之配製：

取 albendazole、albendazole sulfoxide、albendazole sulfone、albendazole 2-aminosulfone、thiabendazole 及 5-hydroxythiabendazole 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 100 mL；另取苯並嘧啶甲氨基甲酸約 5 mg，精確稱定，以二甲亞砷溶解並定容至 100 mL，作為標準原液^(註)。使用時再量取上述各標準原液共置於容量瓶中，以乙：甲醇：0.02M 磷酸二氫鈉溶液(2:2:6, v/v)之混合溶液稀釋至 0.05~2.5 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

註：標準原液在冷藏下可保存六個月。二甲亞砷在冷藏情況下會凝固，稀釋時應先置於室溫，使之回復液態，以旋渦混合器混合後再取用。

2.9. 檢液之調製：

2.9.1. 萃取：

2.9.1.1. 肌肉及內臟：

將檢體細切，以攪拌均質器均質後，取檢體約 5 g，精確稱定，

置於均質機中，加入乙腈 30 mL、萃取用緩衝溶液 1 mL 及 1% 二丁基羥基甲苯溶液 1 mL，均質 2 分鐘後，倒入附有濾紙之布赫納漏斗內，抽氣過濾。殘渣再以乙腈 30 mL，重複操作一次，合併濾液。濾液移入分液漏斗中，加入以乙腈飽和之正己烷 50 mL，振盪 5 分鐘。乙腈層移入濃縮瓶中，加入正丙醇 5 mL，於 40°C 水浴減壓濃縮至乾，殘留物以 10% 甲醇 5 mL 溶解，供淨化用。

2.9.1.2. 乳類：

精確量取檢體 5 mL，置於離心瓶中，加入乙腈 15 mL、萃取用緩衝溶液 1 mL 及 1% 二丁基羥基甲苯溶液 1 mL，振盪 5 分鐘，以 3500 rpm 離心 5 分鐘，沈澱物再以乙腈 15 mL 重複操作一次，合併上澄液。移入分液漏斗中，加入以乙腈飽和之正己烷 30 mL，振盪 5 分鐘。乙腈層移入濃縮瓶中，加入正丙醇 5 mL，於 40°C 水浴減壓濃縮至乾，殘留物以 10% 甲醇 5 mL 溶解，供淨化用。

2.9.2. 淨化：

取 2.9.1.1 及 2.9.1.2 節供淨化用之溶液，注入預先以甲醇 5 mL 及 10% 甲醇 5 mL 潤溼之 C18 固相萃取匣，原濃縮瓶以 10% 甲醇溶液 5 mL 清洗，洗液注入 C18 固相萃取匣，棄流出液。原濃縮瓶再以乙腈 4 mL 清洗二次，洗液亦注入 C18 固相萃取匣沖提，收集沖提液，於 40°C 水浴減壓濃縮至乾。殘留物加入乙：甲醇：0.02M 磷酸二氫鈉溶液(2:2:6, v/v)之混合溶液，以旋渦混合器震盪溶解並定容至 2 mL，經 0.2 μ m 濾膜過濾後，供作檢液。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 100 μ L，分別注入高效液相層析儀中，參照下列條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及圖譜比較鑑別之，再依下列計算式求出檢體中各動物用藥之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各動物用藥之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中各動物用藥之濃度($\mu\text{g/mL}$)

V：檢體經淨化後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量或容量(g 或 mL)

高效液相層析測定條件：

光二極體列陣檢出器：波長 320 nm，適用於 5-hydroxy-thiabendazole 及苯並噻唑甲氨基甲酸之分析。

螢光檢出器：激發波長 280 nm/放射波長 310 nm，適用於 albendazole 2-aminosulfone 之分析。

激發波長 290 nm/放射波長 320 nm，適用於 thiabendazole、albendazole sulfoxide 及 albendazole sulfone 之分析。

激發波長 285 nm/放射波長 350 nm，適用於 albendazole 之分析。

移動相溶液：A：乙腈

B：0.02M 磷酸二氫鈉緩衝溶液($\text{pH } 3.3$)

線性梯度條件：

時間(min)	A(%)	B(%)
0	10	90
10	40	60
19	70	30
25	10	90

移動相流速：1.0 mL/min 。

備註：1. 本檢驗方法之最低檢出限量為：albendazole 及 mebendazole 均為 0.01 ppm，albendazole sulfoxide 0.02 ppm，albendazole sulfone 0.004 ppm，albendazole 2-aminosulfone、5-hydroxythiabendazole 及 thiabendazole 均為 0.005 ppm。

2. 檢體中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。