

寵物食品中三聚氰胺之檢驗方法
Method of Test for Melamine in Pet Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於寵物食品中三聚氰胺(melamine)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，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. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Agilent ZORBAX RX-SIL 5um、2.1 × 150mm或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達20000 rpm 以上。
 - 2.2. 試藥：乙腈(Acetonitrile)、甲醇(methanol)、甲酸(Formic acid) 均採用液相層析級，二乙基胺(Diethylamine)，醋酸銨(Ammonium Acetate)，均採試藥特級，去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；三聚氰胺(Melamine) 對照用標準品；¹³C₃¹⁵N₃- 三聚氰胺 (¹³C₃¹⁵N₃-melamine, 100μg/mL)同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Oasis® MCX， 150 mg， 6 mL， 或同級品。
 - 2.3.2. 高速離心管：50 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF材質。
 - 2.3.4. 固相真空萃取裝置 (Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.3.5. 容量瓶：5 mL、50 mL、500 mL及1000 mL。
 - 2.3.6. 玻璃試管：15mL。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 4%甲酸水：
取甲酸40mL，加去離子水使成1000 mL。
 - 2.4.2. 50%乙腈水溶液：
取乙腈500mL，以去離子水使成1000 mL。
 - 2.4.3. 95%乙腈水溶液：
取乙腈950mL，以去離子水使成1000 mL。

2.4.4. 2%DEA(Diethylamine二乙基胺)/ 乙腈：

取DEA 10mL 加乙腈使成500 mL。

2.4.5. 0.2%DEA(Diethylamine二乙基胺)/ 乙腈：

取DEA 1mL 加乙腈使成500 mL。

2.4.6. 10mM醋酸銨溶液：

稱取醋酸銨0.77g，以去離子水溶解使成1000 mL。

2.4.7. 醋酸銨回溶液：

取10 mM醋酸銨溶液 25mL 加乙腈使成500 mL。

2.4.8. 5mM醋酸銨溶液：

稱取醋酸銨0.385g，以去離子水溶解使成1000 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

取95%乙腈與5 mM醋酸銨溶液以95：5(v/v)之比例混勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.6. 內部標準溶液之配製：

精確量取 $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ -三聚氰胺同位素內部標準品0.5 mL 以50%乙腈定容至50 mL，作為內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

精確量取三聚氰胺對照用標準品約5 mg，以50%乙腈溶液溶解並定容至50 mL，作為標準原液，於4°C貯存。臨用時取適量標準溶液及內部標準溶液混合，以乙腈稀釋至20~100 ng/mL(含內部標準品濃度為10 ng/mL)，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取：

將檢體均質後，秤取樣品約5.00g，精確秤取，置入50mL的高速離心管，加入內標250 μL ，再加入50%乙腈25mL(a)旋渦混合後，超音波震盪20分鐘，以20000 rpm、4°C，離心10 分鐘。取檢液2 mL(b) 置入 15 mL 的離心管，加入4%甲酸水3mL，混合均勻進行下述淨化步驟。

2.8.2. 淨化：取2.8.1節淨化用溶液，注入預先已乙腈5mL及4%甲酸水5mL活化之MCX固相萃取管柱，再以乙腈溶液5mL及 0.2%DEA/乙腈溶液5 mL沖洗，棄流出液。真空抽乾後，再注入2% DEA/乙腈溶液3 mL沖提，收集沖提液，於40°C水浴以氮氣濃縮至乾，殘留物以醋酸銨回溶液定容2 mL，再經濾膜過濾後供作檢液。

2.9. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各 3 μL ，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就三聚氰胺與內部標準品波峰面積比，與對應之三聚氰胺濃度，製作標準曲線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：Agilent ZORBAX RX-SIL 5 μm ，內徑2.1 $\times$ 150mm。

層析管溫度：40 $^{\circ}\text{C}$ 。

移動相溶液：依2.5.節調製之溶液。

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：3 μL

毛細管電壓(Capillary voltage)：4 kV。

離子化模式：ESI正離子。

霧化氣體(Nebulizing Gas Flow)：3 L/min。

加熱氣體(Heating Gas Flow)：15 L/min。

離子源溫度(Interface Temperature)：300 $^{\circ}\text{C}$

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：526 $^{\circ}\text{C}$ 。

脫附管(DL Temperature)：250 $^{\circ}\text{C}$ 。

加熱塊溫度(Heat Block Temperature)：400 $^{\circ}\text{C}$

乾燥器體(Drying Gas Flow)：5 L/min。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、四級桿電壓參數(Pre Bias)與碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	離子對	Q1	碰撞	Q3
	前驅離子(m/z)>	Pre Bias	能量	Pre Bias
	產物離子(m/z)	(V)	(CE)	(V)
三聚氰胺	127 > 85*	-29	-19	-15
	127 > 68	-29	-30	-27
¹³ C3 ¹⁵ N3-三聚氰胺 (I.S.)	133 > 89	-30	-22	-15

*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。

2.10.鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 3 μL，液相層析串聯質譜儀中，依2.9.節條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中三聚氰胺之含量(ppm)：

$$\text{檢體中三聚氰胺之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M} \times F \div 1000$$

C：由標準曲線求得檢液中三聚氰胺之濃度(ng/mL)

V：檢體最後經淨化定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由a/b求得

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除

而得(≤100%)，容許範圍
容許範圍(%)
圍如下：對離子強度(%)

> 50	± 20
> 20 ~ 50	± 25
> 10 ~ 20	± 30
≤ 10	± 50

附註：

1. 本檢驗方法之定量極限 0.1 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：

1. 參考FDA,LIB NO.4422 ,Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods using LC-MS/MS:Version 1.0.2008.10