

# 本部環境檢測標準方法研商會議程

## 一、主席致詞

## 二、方法草案討論

- (一) 水中藥物及其殘留化學物質檢測方法—液相層析串聯式質譜儀法(NIEA W550.50B)草案（檢測技術中心 林欣穎）
- (二) 生物急毒性檢測方法—斑馬魚胚胎半靜水式法(NIEA B909.11C)」草案（檢測技術中心 李秋萍）
- (三) 環境用藥檢測方法—層析法(NIEA D902.0cB)」草案（檢測技術中心 張顥鵬）

## 三、主席結論

註 1：會議資料請上本院網站草案預告區及最新消息查詢

註 2：會議以 Google Meet 視訊召開

當日視訊連結網址：[meet.google.com/gsw-kwdz-zgj](https://meet.google.com/gsw-kwdz-zgj)



報名表 QR 碼

# 水中藥物及其殘留化學物質檢測方法—液相層析串聯式質譜儀法(NIEA W550.50B)草案總說明

為配合水污染防治法管制需求，參考「水中抗生素類及鎮痛解熱劑類化合物檢測方法—固相萃取與高效液相層析／串聯式質譜儀法」及美國環保署方法(U.S. EPA Method 542)，爰依水污染防治法第六十八條，擬具「水中藥物及其殘留化學物質檢測方法—液相層析串聯式質譜儀法(NIEA W550.50B)」草案，其要點如下：

- 一、 本方法適用於廢水、污水、放流水中乙醯胺酚、磺胺甲噁唑、紅黴素、克拉黴素、十七貝他-雌二醇、環丙沙星、頭孢他啶、二甲雙胍、氧氟沙星及其殘留化學物質之檢測。
- 二、 本方法係採效能基準原則，於符合品質管制規範之前提下，得予適度調整本方法之檢測程序。樣品調整氫離子濃度指數值至約四點零，經混合型弱陽離子交換吸附劑固相萃取管匣萃取淨化後，收集沖提液，吹氮濃縮後過濾，以兩組移動相的層析條件經液相層析串聯式質譜儀正（負）電荷電噴灑游離法進行分析。

## 水中藥物及其殘留化學物質檢測方法－液相層析串聯式質譜儀法(NIEA W550.50B)草案

公 告	說 明
主旨：訂定「水中藥物及其殘留化學物質檢測方法－液相層析串聯式質譜儀法(NIEA W550.50B)」，並自中華民國一百十五年八月十五日生效。	方法名稱及生效日期。
依據：水污染防治法第六十八條。	法源依據。
公告事項：方法內容詳如附件。	方法內容。

# 水中藥物及其殘留化學物質檢測方法—液相層析串聯式質譜儀法 草案

NIEA W550.50B

## 一、方法概要

樣品調整 pH 值至約 4.0，經固相萃取管匣(Solid phase extraction cartridge)萃取淨化後，收集沖提液，吹氮濃縮後過濾，以液相層析串聯式質譜儀 (Liquid chromatography tandem mass spectrometer, LC/MS/MS) 檢測水中藥物及其殘留化學物質。

## 二、適用範圍

本方法適用於廢水、污水、放流水中乙醯胺酚、磺胺甲噁唑、紅黴素、克拉黴素、 $17\beta$ -雌二醇、環丙沙星、頭孢他啶、二甲雙胍、氧氟沙星及其殘留化學物質之檢測。

## 三、干擾

- (一) 本方法的干擾可能來自於溶劑、試劑、玻璃器皿及樣品處理過程中所使用的設備之污染，例如干擾物質會導致層析圖基線之漂移，須執行方法空白樣品的測試，以確認無干擾情形。
- (二) 干擾物質亦可能是樣品中之其他物質，干擾的程度隨樣品之來源而不同。如果有干擾發生，可用適當的前處理程序或使用其他材質層析管柱去除。
- (三) 所有使用之實驗器皿（包含玻璃器皿和塑膠器皿）應先用甲醇潤洗，存放於乾淨之環境自然風乾。
- (四) 乙內醯胺類抗生素易與多價金屬離子結合形成安定的複合物，造成萃取和分析上的干擾，故需添加乙二胺四乙酸二鈉 (Ethylenedinitrilo tetraacetic acid disodium salt, EDTA-Na<sub>2</sub>) 溶液減少與環境水體基質中多價陽離子螯合的情形。
- (五) 含有餘氯的樣品，每升應額外加 25 mg 的抗壞血酸去除，以防止餘氯與待測物產生作用，而降低回收率。

## 四、設備與材料

(一) 樣品瓶：棕色玻璃、聚丙烯 (Polypropylene, PP) 或聚乙烯 (Polyethylene, PE) 材質，1 L 或其他適當體積，使用前需先用試劑水清洗並乾燥。使用透明樣品瓶，可用鋁箔紙包於瓶外，以避免照光。

(二) 藥瓶：棕色玻璃材質，1.8 mL 以上，用於保存儲備標準品。

(三) 離心管：15 mL 或其他適當體積。

(四) 上機用 vial 瓶：0.5 mL 以上。

(五) 定量瓶：5 mL、10 mL 或其他適當體積。

(六) 分析天平：可精稱至 0.1 mg。

(七) pH 試紙或 pH 測定儀：能測量 pH 值範圍 1 至 14。

(八) 微量移液管：10  $\mu$ L、25  $\mu$ L、50  $\mu$ L、100  $\mu$ L、250  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 或其他體積。

(九) 液相層析串聯式質譜儀裝置

1. 液相層析儀。

2. 自動注射系統：依不同注射體積搭配注射迴圈(Loop)與注射針。

3. 層析管柱：ACQUITY UPLC BEH C18 管柱，1.7  $\mu$ m (粒徑)，2.1 mm (內徑)  $\times$  100 mm (長度) 或同級品。

4. 電噴灑游離串聯式質譜儀。

5. 數據處理系統：能顯示待測物的滯留時間及層析峰面積之定性及定量系統。

(十) 離心機：可達到 980  $\times g$ 。

(十一) 固相萃取濃縮裝置

1. 固相萃取管匣：Oasis WCX Cartridges 150 mg，6 mL 或同級品。

2. 固相萃取槽：附閥可調整流率。

3. 真空幫浦。

- (十二) KD 濃縮管：15 mL 或其他適當體積。
- (十三) 吹氮濃縮裝置：可調整加熱溫度和氮氣吹出量。
- (十四) 塑膠針筒及針頭：1 mL 或以上。
- (十五) 針頭式過濾膜：0.22  $\mu\text{m}$  或更小孔徑，PVDF 材質。
- (十六) 濾紙：1  $\mu\text{m}$  或 4  $\mu\text{m}$  孔徑，棉質纖維素成分。

## 五、試劑

使用之藥品除非另有規範，須至少為試藥級，依試劑比例配製所需使用溶劑體積。

- (一) 試劑水：不含待測物之去離子水。
- (二) 甲醇、甲酸：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (三) 氨水：市售約 28 % 至 30 % 氨水溶液。
- (四) 氟化銨。
- (五) 抗壞血酸。
- (六) 乙二胺四乙酸二鈉二水合物(EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)。
- (七) 0.1 % 甲酸水溶液：取 1 mL 甲酸加試劑水至 1 L。
- (八) 0.1 % 甲酸甲醇溶液：取 1 mL 甲酸加甲醇至 1 L。
- (九) 0.1 % 氨水甲醇溶液：取 358  $\mu\text{L}$  28 % 至 30 % 氨水水溶液加甲醇至 100 mL，使用前配製。
- (十) 0.1 M 氟化銨水溶液：取 0.37 g 氟化銨加試劑水至 100 mL。
- (十一) 0.2 mM 氟化銨水溶液：取 2 mL 0.1 M 氟化銨水溶液加試劑水至 1 L。
- (十二) 0.125 M 乙二胺四乙酸二鈉溶液：溶解 4.65 克乙二胺四乙酸二鈉二水合物於試劑水中並定容至 100 mL。
- (十三) 標準品溶液：詳表二。

1. 儲備標準溶液：依檢測需要稱取約 10 mg（精稱至 0.1 mg）已知純度標準品（具可追溯濃度證明文件），以適當溶劑定容至 10 mL，並儲存於藥瓶中；或使用市售可追溯濃度證明文件之標準溶液稀釋配製，開瓶後須轉移藥瓶中。
2. 中間標準溶液配製：將儲備標準溶液以甲醇稀釋，依需求配製成適當濃度，保存於藥瓶，用於檢量線標準溶液之配製與前處理，使用前配製（紅徽素中間標準品溶液以 0.1 % 甲酸水溶液單獨配製，其餘可混合配製）（註1）。

(十四) 內標準品溶液：詳表二。

1. 儲備內標準品溶液：依檢測需要稱取約 10 mg（精稱至 0.1 mg）已知純度標準品（具可追溯濃度證明文件），以適當溶劑定容至 10 mL，並儲存於藥瓶中；或使用市售可追溯濃度證明文件之標準溶液稀釋配製，開瓶後須轉移藥瓶中。
2. 中間內標準品溶液配製：將儲備內標準品溶液以甲醇稀釋，依需求配製成適當濃度，保存於藥瓶，用於檢量線標準溶液之配製與前處理，使用前配製（紅徽素中間內標準品溶液以 0.1 % 甲酸水溶液單獨配製，其餘可混合配製）（註1）。

## 六、採樣與保存

採樣方法可參考本部公告之事業放流水採樣方法(NIEA W109.5)（註2）。

採集樣品約 1 L，加入 0.125 M EDTA-Na<sub>2</sub> 8 mL 及 25 mg 抗壞血酸，避光冷藏於大於 0 °C 至 6 °C 以下，並在 7 天內完成萃取，萃液以冷凍保存於 -15 °C 以下，28 天內完成分析。

## 七、步驟

(一) 本方法係為效能基準(Performance-based)分析方法，分析人員可依使用固相萃取管匣、前處理程序、液相層析儀、層析管柱及串聯式質譜儀之不同，適當修改本方法之檢測程序，惟修改後之所有步驟及程序，應符合本方法品質管制規範。

### (二) 檢量線製備

1. 檢量線配製：配製至少 5 種不同濃度之標準品，各待測物對應之內標準品如表一。

取待測物中間標準溶液以 0.1 % 甲酸水溶液／0.1 % 甲酸甲醇溶液( 50/50, v/v )配製檢量線，濃度範圍為 0.1 μg/L 至 200 μg/L，內標準品濃度為 50 μg/L，使用者可依儀器的感度及線性範圍進行調整。

2. 依內標法，以線性迴歸法(Linear regression)製備檢量線，其線性相關係數(Correlation coefficient, r)，經  $1/x$  加權後必須大於或等於 0.995。
3. 使用內標準品亦可以感應因子校正法，則針對用以製作檢量線的各點濃度以其化合物及內標之層析峰面積或高度對濃度計算個別之感應因子(Response factor, RF)，再求得平均感應因子與相對標準偏差(Relative standard deviation, RSD)；若 RSD(%) 小於 20%，則可以平均感應因子作定量分析。若大於 20%，則以線性迴歸法定量。

$$RF = \frac{(A_s) \times (C_{is})}{(A_{is}) \times (C_s)}$$

$$\bar{RF} = \frac{\sum_{i=1}^n RF_i}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (RF_i - \bar{RF})^2}{n-1}}$$

$$RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{RF}} \times 100$$

$A_s$ ：化合物特性離子之感應訊號

$A_{is}$ ：內標準品特性離子之感應訊號

$C_{is}$ ：內標準品之濃度(μg/L)

$C_s$  : 化合物之濃度( $\mu\text{g/L}$ )

n : 配製檢量線濃度點數量

RSD : 相對標準偏差

$\overline{RF}$  : 平均感應因子

$RF_i$  : 感應因子

SD : 每一化合物感應因子的標準偏差

4. 檢量線確認：檢量線製備完成後，應即以不同廠牌或同廠牌不同批號標準品作為第二來源標準品（若無第二來源標準品時，至少應使用另一獨立配製之標準品），配製接近檢量線中點濃度，進行檢量線確認，所測得濃度之相對誤差在  $\pm 30\%$  以內。

### (三) 樣品前處理

1. 取適量樣品（放流水建議取 10 mL）至離心管或另一個乾淨的樣品瓶，查核樣品與添加樣品加入適量的中間標準溶液，所有樣品添加相同體積的中間內標準品溶液，配製之樣品內標準品濃度建議為 10  $\mu\text{g/L}$ 。
2. 加入甲酸調整 pH 值，添加甲酸的量為取樣體積之 1/1,000，以 pH 試紙或 pH 測定儀量測樣品，若樣品 pH 值未介於 3 至 4，以甲酸或氨水調整後，進行固相萃取。
3. 樣品中若有微粒或懸浮物，可將樣品以約 980  $\times g$  離心約 15 分鐘，或通過濾紙以真空抽引過濾。
4. 固相萃取管匣以 5 mL 甲醇流洗二次後，再以 5 mL 試劑水流洗二次。
5. 樣品以自然重力之流率流經固相萃取管匣。抽乾固相萃取管匣約 15 分鐘，以肉眼判斷管匣是否乾燥，若還有水分，續抽至乾燥為止。
6. 固相萃取管匣內加入 5 mL 含 0.1 % 甲酸甲醇溶液進行沖提，流率約每秒 1 滴，重複沖提 1 次，以 KD 濃縮管收集沖提液。
7. 沖提液於約 37 °C 以下吹氮濃縮至小於 5 mL（註3），續加入 5 mL 含 0.1 % 氨水甲醇溶液沖提管匣，流率約每秒 1 滴，用前述

KD 濃縮管合併收集沖提液。若沖提液不易流出，可以針筒之活塞略施壓力壓出，惟壓出後流率維持約每秒一滴。

8. 沖提液於約 37 °C 以下吹氮濃縮至小於 1 mL，加入 1 mL 0.1 % 甲酸水溶液，以 0.1 % 甲酸甲醇溶液定容至 2 mL 並振盪均勻，以針頭式過濾膜過濾之，取濾液至上機用 vial 瓶後以液相層析串聯式質譜儀分析。

#### (四) 正電荷液相層析串聯式質譜儀操作條件

1. 層析管柱：ACQUITY UPLC BEH C18 管柱，1.7 μm (粒徑)，2.1 mm (內徑) × 100 mm (長度) 或同級品。

2. 移動相組成與梯度

移動相 A：0.1 % 甲酸水溶液

移動相 B：0.1 % 甲酸甲醇溶液

時間(min)	A (%)	B (%)	流率(mL/min)
0	95	5	0.2
3	95	5	0.35
3.2	70	30	0.35
5	70	30	0.35
5.5	30	70	0.35
8.5	30	70	0.35
9	5	95	0.2
10.5	5	95	0.2
11.5	95	5	0.2
15	95	5	0.2

(1) 樣品注入量：5 μL。

(2) 管柱溫度：35 °C。

(3) 分析樣品盤溫度：15 °C。

(4) 串聯式質譜儀建議條件（電噴灑法）：

A. 游離模式(Ionization Mode)：正電荷電噴灑游離法(ESI +)。

B. 氣簾氣體(Curtain Gas, CUR)：氮氣，25 psi。

C. 碰撞氣體(Collision gas)：氮氣，Medium。

D. 離子噴灑電壓(Ion Spray Voltage, IS)：4,500 V。

E. 加熱溫度(Temperature, TEM)：500 °C。

F. Ion Source gas(GS1)：55 psi。

G. Ion Source gas(GS2)：58 psi。

## (五) 負電荷液相層析串聯式質譜儀操作條件（適用於 $17\beta$ -雌二醇）

1. 層析管柱：ACQUITY UPLC BEH C18 管柱，1.7  $\mu\text{m}$ （粒徑），2.1 mm（內徑） $\times$ 100 mm（長度）或同級品。

### 2. 移動相組成與梯度

移動相 A：0.2 mM 氟化銨水溶液

移動相 B：甲醇

時間(min)	A (%)	B (%)	流率(mL/min)
0	95	5	0.2
3	95	5	0.35
3.2	70	30	0.35
5	70	30	0.35
5.5	30	70	0.35
8.5	30	70	0.35
9	5	95	0.2
10.5	5	95	0.2
11.5	95	5	0.2
15	95	5	0.2

(1) 樣品注入量：5  $\mu\text{L}$ 。

(2) 管柱溫度：35 °C。

(3) 分析樣品盤溫度：15 °C。

(4)串聯式質譜儀建議條件（電噴灑法）：

- A. 游離模式(Ionization Mode)：負電荷電噴灑游離法(ESI -)。
- B. 氣簾氣體(Curtain Gas, CUR)：氮氣，25 psi。
- C. 碰撞氣體(Collision gas)：氮氣，Medium。
- D. 離子噴灑電壓(Ion Spray Voltage, IS)：- 4,500 V。
- E. 加熱溫度(Temperature, TEM)：500 °C。
- F. Ion Source gas(GS1)：55 psi。
- G. Ion Source gas(GS2)：58 psi。

(六) 定性與定量

1. 使用液相層析串聯質譜系統之多重反應監測模式(Multiple reaction monitoring mode, MRM)，前驅物/產物離子對如表三所示。每一種待測物監測其前驅物/產物離子對兩對，以其中感度較高的前驅物/產物離子對作為定量，第二前驅物/產物離子對作為定性的依據。多重反應監測模式下前驅物/產物離子對層析圖如附圖所示。
2. 待測物之前驅物/產物兩監測離子對須同時出現，定量離子的訊噪比(Signal to noise ratio, S/N)必須大於等於 10，定性離子的訊噪比必須大於等於 3。
3. 待測物之滯留時間須落在檢量線查核標準品、檢量線確認標準品或添加樣品待測物之滯留時間 ± 2.5 % 範圍之內。
4. 待測物之兩監測前驅物/產物離子對（積分面積或高度）的相對比率(Ion ratio)須落在可接受的離子比率範圍之內（如表四所示），其相對比率須以檢量線查核分析或品管樣品的前驅物/產物離子對的比率為基準計算之。
5. 當樣品待測物濃度超過檢量線，應取較少樣品量，重新前處理後上機分析。

八、結果處理

(一) 線性迴歸法

$$C_w(\text{mg/L}) = \frac{(C_a) \times (V_f) \times (10^{-3})}{(V_i)}$$

$C_w$ ：樣品濃度( $\text{mg/L}$ )

$C_a$ ：由檢量線所求得之樣品濃度( $\mu\text{g/L}$ )

$V_f$ ：樣品濃縮後定容的體積(mL)

$V_i$ ：樣品的體積(mL)

## (二) 感應因子校正法

$$C_w(\text{mg/L}) = \frac{(A_x) \times (C_{is}) \times (V_f) \times (10^{-3})}{(A_{is}) \times (\overline{RF}) \times (V_i)}$$

$C_w$ ：樣品濃度( $\text{mg/L}$ )

$A_x$ ：樣品溶液中待測物層析峰面積或高度

$C_{is}$ ：內標準品添加於樣品溶液之濃度( $\mu\text{g/L}$ )

$A_{is}$ ：內標準品之層析峰面積或高度

$\overline{RF}$ ：待測物之平均感應因子

$V_f$ ：定容體積(mL)

$V_i$ ：樣品的體積(mL)

## 九、品質管制

(一) 檢量線查核：每批次或每 12 小時執行檢量線查核，以接近檢量線中點執行之，完成樣品分析後應再執行檢量線查核，所測得濃度之相對誤差不得超過  $\pm 30\%$ 。

(二) 空白樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行空白樣品分析，空白樣品分析值應小於方法偵測極限值之 2 倍。

- (三) 查核樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行查核樣品分析，其回收率應在 60 % 至 140 % 範圍內。
- (四) 添加樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行添加樣品分析，其回收率應在 40 % 至 160 % 範圍內。
- (五) 重複樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行重複樣品分析，其相對差異百分比應在 30 % 以內。

## 十、精密度與準確度

單一實驗室查核及添加樣品分析之精密度與準確度結果如表五。

## 十一、參考資料

- (一) 行政院環境保護署，水中抗生素類及鎮痛解熱劑類化合物檢測方法—固相萃取與高效液相層析／串聯式質譜儀法(NIEA W543.50B)，中華民國 101 年。
- (二) U.S. EPA Methods. Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS). Method 542, 2016.
- (三) U.S. EPA Methods. Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. Method 1694, 2007.
- (四) 林郁真、林正芳等，水中醫藥類及其代謝之殘留化學物質之檢測技術建立研究 (4/4)，行政院環境保護署環境檢驗所EPA-99-E3S4-02-01，中華民國 99 年。

註1：紅黴素(Erythromycin)於使用前 2 小時至 24 小時前完成配製，保存於室溫，使其反應為脫水紅黴素(Erythromycin-H<sub>2</sub>O)。

註2：本文引用之所有公告方法編碼，以環境部最新公告者為準。

註3：若使用較大體積的 KD 濃縮管，可一併收集 2 階段沖提液（七、步驟（三）樣品前處理 6. 及 7.），可免執行七、步驟（三）樣品前處理 7. 吹氣濃縮步驟。

表一 待測物中英文名稱及對應內標準品一覽表

英文名稱	中文名稱	CAS No.	對應內標準品	CAS No.
Acetaminophen	乙醯胺酚	103-90-2	Acetaminophen-D <sub>4</sub>	64315-36-2
Sulfamethoxazole 磺胺甲噁唑		723-46-6	Sulfamethoxazole(ring- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )	1196157-90-0
Erythromycin	紅黴素	114-07-8	Erythromycin- <sup>13</sup> CD <sub>3</sub>	2378755-50-9
Clarithromycin	克拉黴素	81103-11-9	Clarithromycin-D <sub>3</sub> (Clarithromycin-N-methyl-D <sub>3</sub> )	959119-22-3
17 β-Estradiol	17 β-雌二醇	50-28-2	17 β-Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> (Estradiol-3,4, <sup>13</sup> C <sub>2</sub> )	82938-05-4
Ciprofloxacin	環丙沙星	85721-33-1	Ciprofloxacin-D <sub>8</sub>	1130050-35-9
Ceftazidime	頭孢他啶	72558-82-8	Ceftazidime-D <sub>5</sub>	78439-06-02
Metformin	二甲雙胍	657-24-9	Metformin- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> , <sup>15</sup> N <sub>5</sub> (1,1-Dimethylbiguanide- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> , <sup>15</sup> N <sub>5</sub> Hydrochloride)	1640262-11-8
Ofloxacin	氧氟沙星	82419-36-1	Ofloxacin-D <sub>3</sub> Hydrochloride	1173021-78-7

註：Erythromycin 以脫水紅黴素(Erythromycin-H<sub>2</sub>O)檢測；Erythromycin-<sup>13</sup>CD<sub>3</sub>以脫水紅黴素-<sup>13</sup>CD<sub>3</sub>(Erythromycin-H<sub>2</sub>O-<sup>13</sup>CD<sub>3</sub>)檢測。

表二 儲備標準品配製一覽表

標準品名稱	對應內標準品名稱	參考配製溶劑
Acetaminophen	Acetaminophen-D <sub>4</sub>	甲醇
Sulfamethoxazole	Sulfamethoxazole- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	甲醇或 0.1 % 甲酸甲醇溶液
Erythromycin	Erythromycin- <sup>13</sup> CD <sub>3</sub>	甲醇
Clarithromycin	Clarithromycin-D <sub>3</sub>	甲醇
17 β-Estradiol	17 β-Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	甲醇
Ciprofloxacin	Ciprofloxacin-D <sub>8</sub>	0.1 % 甲酸水溶液
Ceftazidime	Ceftazidime-D <sub>5</sub>	0.1 % 甲酸甲醇溶液
Metformin	Metformin- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> , <sup>15</sup> N <sub>5</sub>	甲醇或 0.1 % 甲酸甲醇溶液
Ofloxacin	Ofloxacin-D <sub>3</sub>	甲醇或 0.1 % 甲酸甲醇溶液

註：頭孢他啶(Ceftazidime)保存於冷凍 -15 °C 以下。其餘儲備標準溶液得冷藏保存於 4 °C ± 2 °C 。

表三 前驅物/產物離子對質譜參數

待測物與內標準品	前驅物離子	產物離子	DP (V)	CE (V)
Acetaminophen	152	110	45	20
	152	65	45	41
Sulfamethoxazole	254	156	40	21
	254	92	40	30
Erythromycin-H <sub>2</sub> O	716.5	158	120	30
	716.5	558.5	120	47
Clarithromycin	749	158	40	40
	749	590	40	28
17 β-Estradiol	271	145	-55	-55
	271	183	-55	-50
Ciprofloxacin	332	314	80	27
	332	231	80	49
Ceftazidime	274	80	91	17
	274	126	91	25
Metformin	130	71	80	35
	130	60	80	35
Ofloxacin	362	318	90	25
	362	261	90	38

表三 前驅物/產物離子對質譜參數（續）

待測物與內標準品	前驅物離子	產物離子	DP (V)	CE (V)
Acetaminophen-D <sub>4</sub>	156	114	45	20
Sulfamethoxazole- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	260	162	40	21
Erythromycin-H <sub>2</sub> O- <sup>13</sup> CD <sub>3</sub>	720.5	162	120	30
Clarithromycin-D <sub>3</sub>	752	161	40	40
17 β-Estradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	273	147	-55	-55
Ciprofloxacin-D <sub>8</sub>	340	322	80	27
Ceftazidime-D <sub>5</sub>	276.5	85	91	17
Metformin- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> , <sup>15</sup> N <sub>5</sub>	139	76	80	35
Ofloxacin-D <sub>3</sub>	365	321	90	25

註：DP：Decluster potential, CE：Collision energy，質譜參數可依實際需要適當調整之。本方法使用儀器：液相層析儀 (Agilent 1290 Infinity II)；串聯式質譜儀(SCIEX QTRAP 5500)。

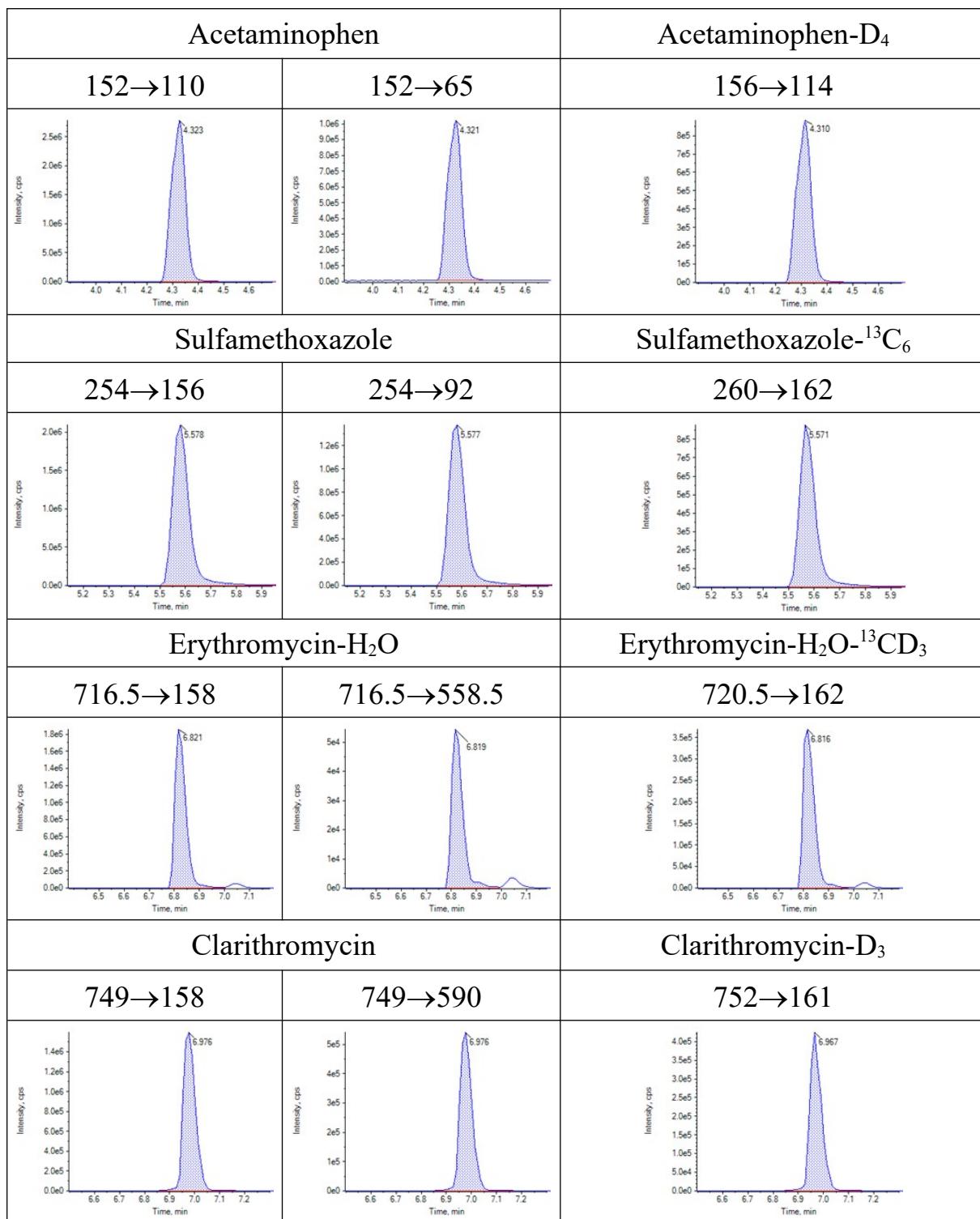
表四 LC/MS/MS前驅物/產物離子對之離子強度比率(Ion ratio)規範

相對強度 (% of Base Peak)	兩離子對比率的最大允許誤差 (%)
> 50	± 20
> 20 至 50	± 25
> 10 至 20	± 30
≤ 10	± 50

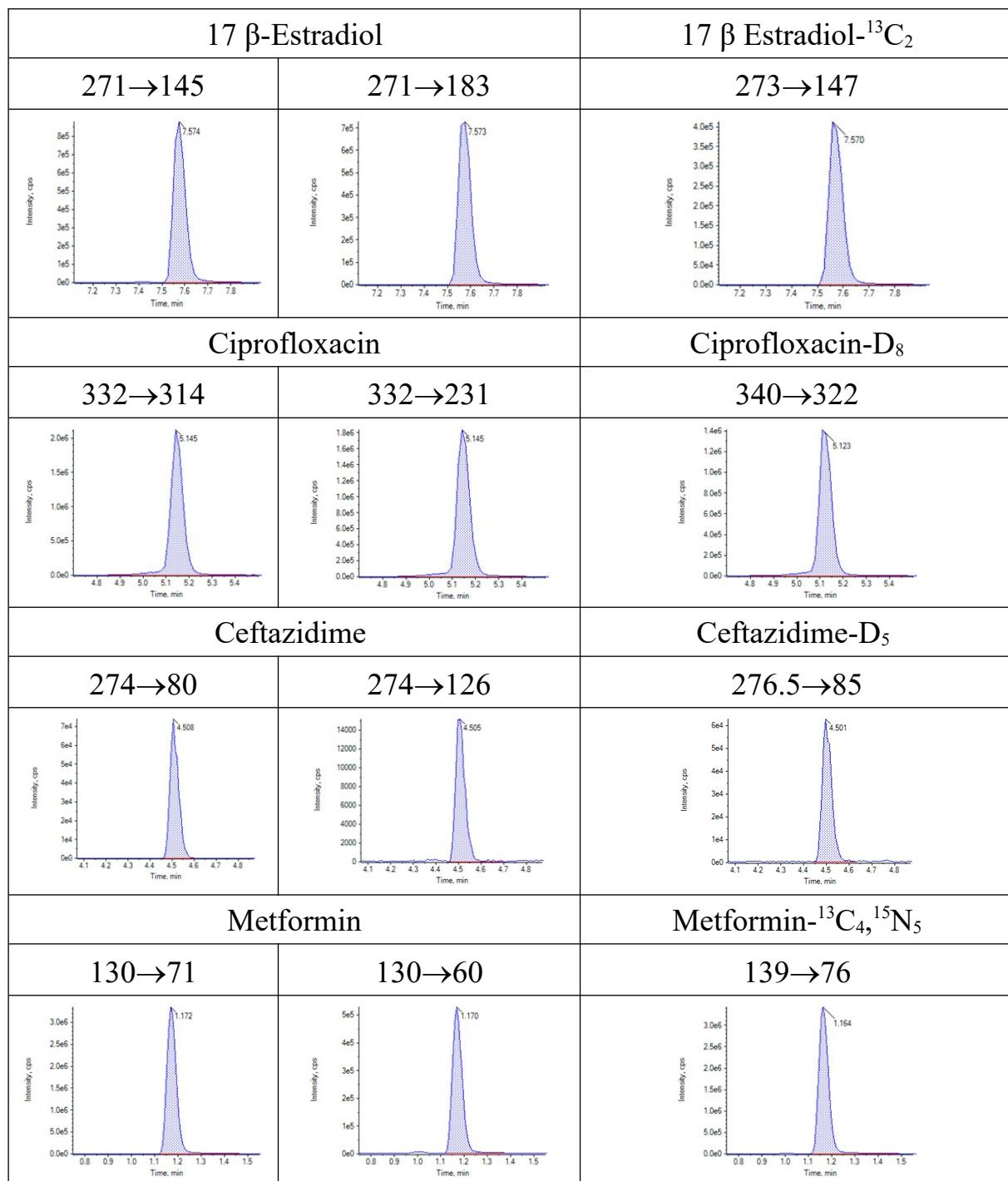
表五 單一實驗室固相萃取法查核及添加樣品分析精密度與準確度

待測物	查核樣品回收率(n=6)		添加樣品回收率(n=8)	
	平均(%)	標準偏差(%)	平均(%)	標準偏差(%)
Acetaminophen	98.8	1.9	97.7	1.6
Sulfamethoxazole	99.6	2.9	96.5	3.9
Erythromycin	86.9	8.2	85.6	6.5
Clarithromycin	104.1	6.6	106.1	3.8
17 β-Estradiol	100.0	2.1	99.8	2.8
Ciprofloxacin	109.4	3.4	109.0	3.7
Ceftazidime	79.8	10.7	110.4	19.4
Metformin	99.0	2.9	98.3	4.0
Ofloxacin	106.2	4.0	101.2	7.3

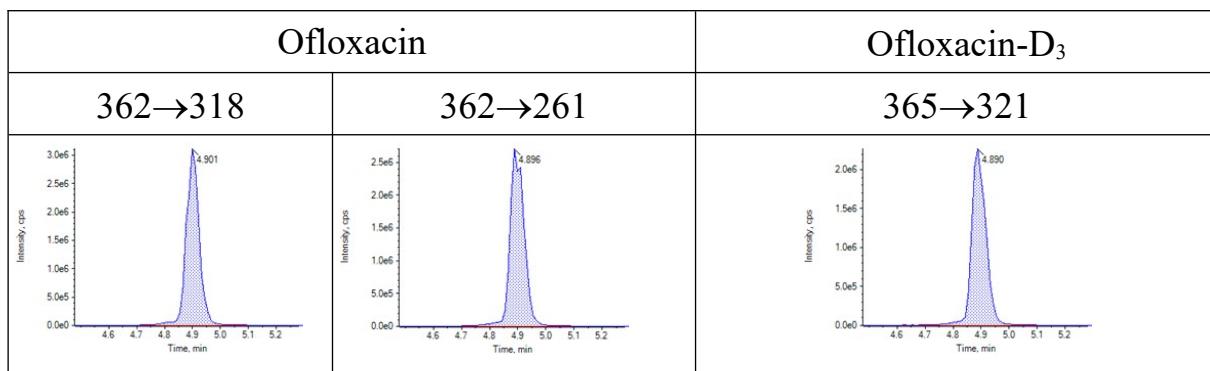
註：配製放流水查核樣品與添加樣品濃度為 10 μg/L，內標準品濃度 10 μg/L。



附圖 待測物及內標準品多重反應監測模式(MRM)前驅物/產物離子對之層析圖



附圖 待測物及內標準品多重反應監測模式(MRM)前驅物/產物離子對之層析圖（續）



附圖 待測物及內標準品多重反應監測模式(MRM)前驅物/產物離子對之層析圖（續）

# 生物急毒性檢測方法－斑馬魚胚胎半靜水式法 (NIEA B909.11C)草案總說明

為執行放流水等水質樣品及環境用藥生物急毒性檢測，參考經濟合作暨發展組織檢測方法(OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test)、國際標準化組織檢測方法(ISO 15088, Water quality – Determination of the Acute Toxicity of Waste Water to Zebrafish Eggs (*Danio rerio*))及檢測實務，爰依水污染防治法第六十八條及環境用藥管理法第五十七條，整併現行檢測相關規定，並敘明魚胚胎取得方式、試驗容器前處理步驟等，擬具「生物急毒性檢測方法－斑馬魚胚胎半靜水式法(NIEA B909.11C)」草案，其要點如下：

- 一、 本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢（污）水及環境用藥之生物急毒性檢測。
- 二、 本方法以斑馬魚胚胎進行半靜水式生物毒性試驗，每二十四小時更換試驗溶液一次，觀察魚胚胎發育狀況，計算樣品九十六小時之半致死濃度或急毒性單位。

# 生物急毒性檢測方法—斑馬魚胚胎半靜水式法 (NIEA B909.11C)草案

公 告	說 明
主旨：訂定「生物急毒性檢測方法—斑 馬魚胚胎半靜水式法(NIEA B909.11C)」，並自中華民國一百 十五年九月十五日生效。	方法名稱及生效日期。
依據：水污染防治法第六十八條及環境 用藥管理法第五十七條。	法源依據。
公告事項：方法內容詳如附件。	方法內容。

# 生物急毒性檢測方法—斑馬魚胚胎半靜水式法草案

NIEA B909.11C

## 一、方法概要

本方法係以斑馬魚(*Danio rerio*)之胚胎為試驗生物，以半靜水式(Semi-static)生物毒性試驗方法，每24小時更換試驗溶液1次，檢測生物胚胎急毒性，計算96小時之半致死濃度(Lethal concentration 50%，LC<sub>50</sub>)或急毒性單位(Acute toxic unit, TUa)。

## 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢(污)水及環境用藥對斑馬魚胚胎之生物急毒性檢測。

## 三、干擾

- (一) 生物馴養及毒性試驗室內若有化學氣體滲入，或馴養水、稀釋液及器皿中殘留毒性物質，可能影響斑馬魚健康，且可能改變胚胎對毒物的耐受性。
- (二) 若馴養個體罹患疾病或健康狀態不穩定，將對其生殖表現及魚卵孵化率造成影響。。
- (三) 分子量3千道爾頓(Kilodalton, kDa)以上的化合物、巨大分子和會引起延遲孵化之物質，可能對胚胎生物可利用性限制，會降低毒性敏感度。

## 四、設備與材料

- (一) 斑馬魚胚胎：使用6月齡至24月齡之性成熟斑馬魚(圖一)所產之受精卵(圖二)進行試驗，可自行產製胚胎或使用市售胚胎。斑馬魚可購自繁殖場或自行繁殖(註1)，不可混用其他品種。
- (二) 生物馴養及毒性試驗室：須與其他化學實驗室區隔之獨立空間，通風良好，無化學氣體影響，且可屏蔽外界干擾(如噪音、震動、強光及人為驚擾等)，光照強度同一般工作亮度，光照時間應維持在每天14小時±2小時。
- (三) 溫度控制設備：可使用循環式水浴槽、培養箱、空調等方式，將馴養水溫及試驗水溫控制在26°C±1°C。
- (四) 樣品容器：玻璃或塑膠材質。如使用塑膠材質容器，不可重複使用。

- (五) 飼養容器：玻璃或塑膠材質，使用於斑馬魚馴養。
- (六) 試驗容器：玻璃或聚苯乙烯(Polystyrene)材質、透明底、附上蓋之 24 孔培養盤，孔格直徑約 16 mm，每孔容量 2.5 mL 以上，進行試驗時須將上蓋蓋上。
- (七) 產卵容器：玻璃或塑膠材質，中間具可移除之隔板，可將雄魚及雌魚隔開。下方具隔離網 ( $2\text{ mm} \pm 0.5\text{ mm}$  網目之不鏽鋼或塑膠等材質)，可將親魚及魚卵隔開，可使用市售繁殖箱（示意如圖三）。
- (八) 燒杯、血清瓶、量瓶及量筒：硼矽玻璃材質。
- (九) 移液管：玻璃或塑膠材質。
- (十) 溫度監測裝置：須可顯示斑馬魚馴養期間及毒性試驗期間之最高及最低水溫(註 2)，最小刻度須可達  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- (十一) 溶氧測定儀。
- (十二) pH 計：附有溫度補償裝置，最小刻度須可達 0.1 pH 單位。
- (十三) 導電度計。
- (十四) 餘氯計。
- (十五) 水質硬度計或水質硬度檢測試劑組。
- (十六) 分析天平：待測物重量大於 2 g 時，須能精稱至 0.01 g；待測物重量不大於 2 g 時，須能精稱至 0.001 g。
- (十七) 手操網：大小合適之具握柄軟質尼龍網，使用於斑馬魚馴養。
- (十八) 魚飼料：飼料須考量適口性，大小須適合斑馬魚，建議使用市售超細微粒、半沉浮性魚飼料或豐年蝦等。
- (十九) 光學顯微鏡：放大倍率 80 倍以上之倒立式顯微鏡或解剖顯微鏡（立體顯微鏡）。
- (二十) 培養皿：玻璃或塑膠材質，可使用直徑 9 cm 或其他適當大小之培養皿。
- (二十一) 曝氣設備。
- (二十二) 水循環過濾裝置：使用於斑馬魚馴養。
- (二十三) 塑膠滴管。
- (二十四) 冰箱：溫度能保持在  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- (二十五) 冷凍櫃：溫度能保持在  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下。

(二十六) 電磁攪拌器及攪拌子。

五、試劑

檢測時使用之試劑除非另有說明，否則至少須為試藥級。使用之溶液或試劑，可依試藥配製比例製備所需使用體積。

- (一) 試劑水：電阻率須大於  $10\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。
- (二) 碳酸氫鈉(Sodium bicarbonate,  $\text{NaHCO}_3$ )。
- (三) 硫酸鎂七水合物(Magnesium sulfate heptahydrate,  $\text{MgSO}_4\cdot7\text{H}_2\text{O}$ )。
- (四) 氯化鉀(Potassium chloride,  $\text{KCl}$ )。
- (五) 氯化鈣二水合物(Calcium chloride dihydrate,  $\text{CaCl}_2\cdot2\text{H}_2\text{O}$ )。
- (六) 丙酮(Acetone,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )：殘量級。
- (七) 氢氧化鈉(Sodium hydroxide,  $\text{NaOH}$ )。
- (八) 濃鹽酸(Hydrochloric acid,  $\text{HCl}$ )。
- (九) 硝酸(Nitric acid,  $\text{HNO}_3$ )。
- (十) 參考毒物：3,4-二氯苯胺(3,4-Dichloroaniline, 3,4-DCA,  $\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2(\text{NH}_2)$ )。
- (十一) 0.1 M 鹽酸溶液：取 8.3 mL 濃鹽酸緩緩加入適量試劑水中，定容至 1 L。可使用市售溶液。
- (十二) 0.1 M 氢氧化鈉溶液：溶解 4 g 氢氧化鈉於適量試劑水中，再以試劑水定容至 1 L。可使用市售溶液。
- (十三) 10 % (v/v) 鹽酸或硝酸溶液：將 100 mL 濃鹽酸或硝酸緩緩加入 900 mL 試劑水中（玻璃器皿酸洗用，須於使用前配製）。
- (十四) 3,4-DCA 儲備溶液，100 mg/L：溶解 3,4-DCA 0.050 g 於稀釋液中，攪拌約 24 小時後，以 0.1 M 氢氧化鈉溶液或 0.1 M 鹽酸溶液調整 pH 值為 6.5 至 8.5，定容至 500 mL，避光保存於  $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ，保存期限 6 個月。
- (十五) 正控制(Positive control, PC)試驗溶液(3,4-DCA, 4.0 mg/L)：取 3,4-DCA 儲備溶液 4 mL 加稀釋液定容至 100 mL，pH 值須為 6.5 至 8.5。
- (十六) 稀釋液：將 63.0 mg 碳酸氫鈉、123.3 mg 硫酸鎂七水合物、5.5 mg 氯化鉀及 294.0 mg 氯化鈣二水合物，溶解於 1 L 試劑水後，劇烈曝氣至少 8 小時，硬度須為  $200\text{ mg CaCO}_3/\text{L}$  至  $250\text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ ，pH 值須為 6.5 至 8.5，若需調整 pH 值，

須以 0.1 M 氢氧化鈉溶液或 0.1 M 鹽酸溶液進行。保存不宜超過 14 天。

- (十七) 飼養水：可使用稀釋液、去氯自來水（註 3）、無污染之下水等作為飼養水。飼養水之硬度應為  $200 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$  至  $250 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ ，pH 值須為 6.5 至 8.5，可混合適量試劑水進行調整。

## 六、採樣與保存

- (一) 水樣採樣方法參照「監測井地下水採樣方法(NIEA W103.5)」、「河川、湖泊及水庫水質採樣方法(NIEA W104.5)」、「事業放流水採樣方法(NIEA W109.5)」（註 4）。每個水樣至少須採 5 瓶，每瓶之水樣量不得少於 0.5 L。
- (二) 水樣採樣時樣品容器須裝至全滿，以減少揮發性物質散失。採樣後立即避光保存於大於  $0^\circ\text{C}$  至  $6^\circ\text{C}$  以下。
- (三) 水樣採樣後若無法在 48 小時內開始進行確定試驗(Definitive test)，樣品在實驗室時須保存於  $-18^\circ\text{C}$  以下，保存期限 2 個月。
- (四) 環境用藥採樣時應採取足夠供給檢測之數量。樣品為已包裝完善且密封完整之環境用藥成品時，依其儲存條件以原包裝保存。

## 七、步驟

### (一) 試驗準備

#### 1. 斑馬魚飼養：

- (1) 斑馬魚取回後，放入內裝飼養水之飼養容器，飼養時間至少 14 天，觀察魚隻健康情形。
- (2) 飼養容器以曝氣設備曝氣，使溶氧維持在  $5.0 \text{ mg/L}$  以上，以水循環過濾維護水質，如有死魚應立即移出。
- (3) 飼養之水溫為  $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ，pH 值為 6.5 至 8.5，且飼養期間 pH 值變化不得超過 1.5，光照時間應維持在每天 14 小時  $\pm 2$  小時。
- (4) 視飼養容器中魚隻大小及數量等狀況，調整餵食量及餵食次數。過剩之飼料宜移除以免導致水質惡化。
- (5) 選擇正常無畸形之魚隻為產卵之親魚，開始產卵前 2 個月內，不應接受任何藥物（急性或預防）治療。
- (6) 雌魚和雄魚的區別：雌魚抱卵時腹部膨脹偏白；雄魚身體較纖細，藍色條紋間帶橙色色調，在臀鰭尤為明顯（圖一）。

## 2. 試驗容器及相關器材之清洗：

- (1) 新的塑膠器皿，使用前須用試劑水潤洗 1 次。（無菌塑膠器皿使用前無須用試劑水潤洗）。
- (2) 新的玻璃器皿，須用新鮮配製之 10 % (v/v) 鹽酸或硝酸浸泡一夜後，再用試劑水沖洗乾淨。使用前以試劑水潤洗 1 次。
- (3) 接觸過樣品的塑膠器皿，不得重複使用。
- (4) 接觸過樣品的玻璃器皿（如試驗容器、量筒等），如需重複使用，則必須依下列步驟清洗：
  - A. 自來水浸泡 15 分鐘後，用清潔劑清洗內壁，再以自來水沖洗 2 次。亦可使用洗瓶機清洗。
  - B. 以新鮮配製之 10 % (v/v) 鹽酸或硝酸潤洗 1 次。
  - C. 以試劑水潤洗 2 次。
  - D. 以丙酮潤洗 1 次。
  - E. 以試劑水沖洗 3 次。
  - F. 進行毒性試驗前，再以試劑水潤洗 1 次。

## 3. 試驗前之樣品準備：

- (1) 先將水樣靜置半小時，待粗顆粒沈降後，再取上層液進行試驗。冷凍保存之樣品則以水浴（不超過 26 °C）進行解凍。
- (2) 試驗前須先測量樣品之溫度、pH 值與溶氧。樣品溫度須調整至 26 °C ± 1 °C。若回溫後溶氧低於 3.0 mg/L，應對樣品溫和曝氣，使溶氧升至 3.0 mg/L 以上。
- (3) 非液態之環境用藥先溶解於稀釋液，難溶解者可使用適當溶劑（例如乙醇或二甲基亞碸（Dimethyl sulfoxide, DMSO）等）助溶（須執行溶劑控制(Solvent control, SC)試驗）。

## 4. 受精卵收集：

- (1) 在試驗前一日傍晚，將雌魚與雄魚移至產卵容器並以隔板隔開（建議雌雄比為 1 : 2），光照週期及水溫與馴養時相同，試驗當日早上移除中間隔板，魚兒會急速追逐旋游，身體碰觸時同時排出精卵。產卵的活動可以一直延續到中午，但產卵多在照光開始 30 分鐘內最多。為收集數量足夠之受精卵，建議使用 3 個以上產卵容器產製受精卵。
- (2) 斑馬魚的卵是沉性卵且不帶黏性，直徑約 0.8 mm 至 1.5 mm，親魚產卵後會吃掉自己的魚卵，所以須在產卵容器中

用隔離網將親魚及魚卵隔開（示意如圖三）。

- (3) 收集魚卵並置於培養皿，以塑膠滴管吸取馴養水，輕輕地沖洗魚卵並移除殘存之飼料或魚糞便等。
- (4) 使用光學顯微鏡觀察魚卵是否受精，受精卵會逐漸分化發育為2細胞期(Cell stage)、4細胞期、8細胞期、16細胞期等（如圖四），未受精則不會發育。估算每個產卵容器魚卵之受精率，將受精率70%以上者混合後使用，受精卵數量須能完成檢測（1次檢測1個放流水樣品須使用168顆受精卵，1次檢測2個放流水樣品共須使用288顆受精卵），且須於受精後90分鐘內開始進行毒性試驗（浸泡於試驗溶液中（七、步驟(三)4））。

#### 5. 試驗容器前處理：

- (1) 進行確定試驗前一天，將樣品以稀釋液至少稀釋為5個濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過2倍。放流水則以5個固定濃度（100%、80%、60%、40%及20%）進行試驗。每一試驗濃度總體積50mL以上。
- (2) 於試驗容器各孔格內分別加入以下溶液2mL以上。（配置示意如圖五）。
  - A. 樣品各稀釋度試驗溶液：以放流水樣品為例，100%、80%、60%、40%及20%試驗溶液各1盤，於20孔格中加入試驗溶液。
  - B. 負控制(Negative control, NC)試驗溶液：1盤，於20孔格中加入稀釋液。
  - C. 正控制(Positive control, PC)試驗溶液：1盤，於20孔格中加入4.0mg/L之3,4-DCA溶液。
  - D. 溶劑控制(Solvent control, SC)試驗溶液：1盤（未使用溶劑助溶則無需執行）。將溶劑添加至稀釋液中混勻，添加量與樣品助溶時之添加量相同。於20孔格中加入溶劑控制試驗溶液。
  - E. 試驗容器內對照(Internal plate control, IC)試驗溶液：於每個試驗容器剩餘之4個孔格中加入稀釋液。

#### (二) 範圍尋找試驗(Range - finding test)

1. 放流水不須進行，其他樣品若不確定樣品之半致死濃度落於哪一濃度範圍，可先進行範圍尋找試驗。

2. 可將水樣或環境用藥以稀釋液適度進行 10 倍序列稀釋。每一試驗濃度總體積為 25 mL 以上，分注於試驗容器之 10 個孔格中（每孔至少 2 mL）。
3. 每個孔格置入 1 顆受精卵。
4. 試驗期間水溫應控制在  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照時間應維持每天 14 小時  $\pm 2$  小時。
5. 觀察 8 小時至 24 小時，記錄胚胎死亡數量，試驗結果供確定試驗稀釋方式用。

### (三) 確定試驗(Definitive test)

1. 將水樣或環境用藥以稀釋液至少稀釋為 5 個濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。放流水則以 5 個固定濃度（100 %、80 %、60 %、40 % 及 20 %）進行試驗。
2. 稀釋完成後，檢測樣品最高濃度試驗溶液之 pH 值、溶氧、導電度及餘氯。另須檢測稀釋液之 pH 值及導電度。
3. 於培養皿分別加入以下各種溶液約 10 mL (須使魚卵浸泡於溶液中)：
  - (1) 樣品各稀釋度試驗溶液：每一試驗濃度各 1 盤。
  - (2) 稀釋液：1 盤以上，用於負控制(NC)及試驗容器內對照(IC)試驗。
  - (3) 正控制(PC)試驗溶液：1 盤，用於正控制試驗。
  - (4) 溶劑控制試驗(SC)溶液：1 盤（未使用溶劑助溶則無需執行）。
4. 在受精後 90 分鐘內，將七、步驟(一) 4.(4)之受精卵移入前項各培養皿中。使用光學顯微鏡觀察，移除未受精及發育異常（例如不對稱）、卵膜受損等不正常魚卵。正常受精卵數量須足以完成試驗。
5. 將前一天前處理之試驗容器內液體（七、步驟(一) 5.(2)）吸除後，每孔格注入至少 2 mL 相應之試驗溶液，包括樣品各稀釋度試驗溶液（於確定試驗當天配製）、負控制及正控制試驗溶液等。
6. 每個孔格置入 1 顆浸泡於七、步驟(三) 4. 相應試驗溶液培養皿中之受精卵。須於受精後 180 分鐘內完成此步驟。
7. 試驗期間為 96 小時，水溫應控制在  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照時間應維持每天 14 小時  $\pm 2$  小時。

8. 開始試驗後，於第 24 小時、48 小時、72 小時及 96 小時，觀察胚胎並記錄死亡數量。
9. 胚胎出現以下任一種狀況即判定為死亡：
  - (1) 胚胎凝結(Coagulation of the embryo)：凝結之胚胎呈乳白色，在顯微鏡下，會出現各種不透明深色的物質（圖六）。
  - (2) 體節構造發育不全(Lack of somite formation)：在  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，24 小時後，正常斑馬魚胚胎約形成 20 體節，發育正常的胚胎會出現自主性運動（身體收縮），自主性的運動表示體節的形成，若 48 小時仍未發育出體節，則判定胚胎死亡（圖七）。
  - (3) 尾部從卵黃囊剝離不全(Non-detachment of the tail from the yolk sac)：正常發育的斑馬魚胚胎，尾巴從卵黃剝離後，會向胚體後部伸長。須在 24 小時、48 小時、72 小時和 96 小時觀察尾部剝離情形（圖八）。
  - (4) 心臟無跳動(Lack of heartbeat)：正常發育的斑馬魚胚胎在  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，48 小時後可以觀察到心臟跳動。心跳不規則不應判定為死亡，至少觀察胚胎 1 分鐘心臟無跳動才可判定為死亡（圖九）。
10. 開始試驗後，每隔 24 小時  $\pm 1$  小時須更換試驗溶液（須於觀察胚胎後執行），直到第 96 小時試驗結束。方式如下：
  - (1) 於更換試驗溶液當天取 1 瓶樣品依七、步驟(一) 3. 之規定進行試驗前之樣品準備。
  - (2) 依七、步驟(三) 1. 稀釋樣品。
  - (3) 將孔格內原有液體吸至近乾，立即加入至少 2 mL 相應之溶液，包括樣品各稀釋度試驗溶液、負控制及正控制試驗溶液等，過程中須避免胚胎暴露於乾燥環境。
11. 計算負控制試驗 96 小時之胚胎孵化率（若進行溶劑控制試驗時亦須計算其孵化率）：觀察胚胎是否孵化為魚苗狀，計算 20 個試驗孔格之孵化總數。  
胚胎孵化總數 = 20 個試驗孔格之孵化數量加總  
胚胎孵化百分率 = 胚胎孵化總數  $\div 20 \times 100\%$
12. 結束試驗後，須測量並記錄樣品最高濃度試驗溶液之 pH 值及溶氧，並記錄試驗期間之最高及最低水溫。

## 八、結果處理

## (一) 樣品 96 小時 LC<sub>50</sub> 計算

1. 計算各試驗濃度之 96 小時胚胎死亡總數及死亡百分率：

胚胎死亡總數 = 20 個試驗孔格之死亡數量加總

胚胎死亡百分率 = 胚胎死亡總數 ÷ 20 × 100 %

2. 以下列 4 種方法計算 96 小時 LC<sub>50</sub>：圖解法(Graphic method)、機率單位法(Probit method)、史丕曼－卡伯法(Spearman - Karber method)、史丕曼－卡伯修正法(Trimmed Spearman - Karber method)。依圖十判斷須使用之計算方式，詳細計算方式參見「生物急毒性檢測方法－水蚤靜水式法(NIEA B901.1)」附錄二。

## (二) 水質樣品 96 小時 TUa 計算

1. TUa 為 LC<sub>50</sub> 之倒數，即

$$TUa = 100 \% \div (96 \text{ 小時 } LC_{50})$$

2. 若放流水樣品 5 個濃度之胚胎死亡百分率均小於 50 %，則 96 小時之 LC<sub>50</sub> > 100 %，換算之 TUa < 1.00。

3. 若放流水樣品 5 個濃度之胚胎死亡百分率均大於 50 %，則 96 小時之 LC<sub>50</sub> < 20 %，換算之 TUa > 5.00。

4. 若結果數據不符合前述 2 種狀況，則依八、(一) 之方法計算 96 小時 LC<sub>50</sub>，再換算 TUa。

## 九、品質管制

(一) 負控制(NC)試驗：每次毒性試驗應至少伴隨一負控制試驗，若胚胎死亡率超過 10 %，或孵化率低於 80 %，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用。

(二) 內對照(IC)試驗：每個試驗容器皆須執行內對照試驗，若 4 個孔格中之胚胎死亡數超過 1 個，則該盤之試驗結果不可採用。

(三) 正控制(PC)試驗：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低於 30 %，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用。

(四) 溶劑控制(SC)試驗：使用溶劑助溶環境用藥樣品時，應至少伴隨一溶劑對照試驗，若胚胎死亡率超過 10 %，或孵化率低於 80 %，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用。

## (五) 參考毒物試驗

1. 將 3,4-DCA 儲備溶液以稀釋液稀釋為 5 個不同濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。5 個試驗濃度之死亡百分率，至少

須有 1 個  $\geq 50\%$ ，及 1 個  $\leq 50\%$ ，且至少須有 1 個濃度會造成部分試驗生物死亡。

2. 首次以本方法執行生物毒性試驗之實驗室，應先以參考毒物進行至少 5 次參考毒物試驗，計算  $LC_{50}$  平均值及變異係數 (Coefficient of variation, CV)。CV 值不得超過 50 %。
3. 執行毒性試驗期間，每半年至少執行一次參考毒物試驗。
4. 參考毒物試驗結果( $LC_{50}$ )須建立品質管制圖，建立方法為累積至少 15 筆參考毒物試驗結果，計算其平均值及標準偏差 (Standard deviation, SD)，以平均值  $\pm 2 SD$  為警告上下限值，以平均值  $\pm 3 SD$  為管制上下限值。不足 15 筆數據時，可先以 5 筆參考毒物試驗結果建立品質管制圖，再逐漸累積數據。品質管制圖每年應重新製備一次，即使用前一年最後 15 筆參考毒物試驗結果進行計算，若前一年之數據不足 15 筆時，得依序沿用歷年之數據補足 15 筆。參考毒物試驗結果若超出  $\pm 3 SD$ ，或最近 20 次有 2 次以上超出  $\pm 2 SD$ ，須檢討誤差來源、執行矯正措施並重新進行參考毒物試驗。

## 十、精密度與準確度

略

## 十一、參考資料

- (一) OECD. Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 2025.
- (二) ISO International Standard. Water quality – Determination of the Acute Toxicity of Waste Water to Zebrafish Eggs (*Danio rerio*). ISO 15088, 2007.
- (三) U.S. EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, EPA-821-R-02-012, 2002.
- (四) ISO International Standard. Water quality – Sampling Part 16: Guidance on Biotoxins of Samples. ISO 5667-16, 2017.
- (五) 凌永健，高科技產業流水中生物毒性成因之探討(1/4)，EPA-102-E3S5-02-01，中華民國 102 年。

註 1：動物之科學應用應依農業部訂定之「動物保護法」及其相關規定辦理。生物屍體之清除及處理，依一般事業廢棄物相關規定辦理。

註 2：將容器盛裝試劑水，置入溫度監測裝置之探頭，可進行毒性試驗期間水溫監測。

註 3：自來水可使用活性碳過濾或曝氣等方式去氯，但不可使用化學藥劑去氯。

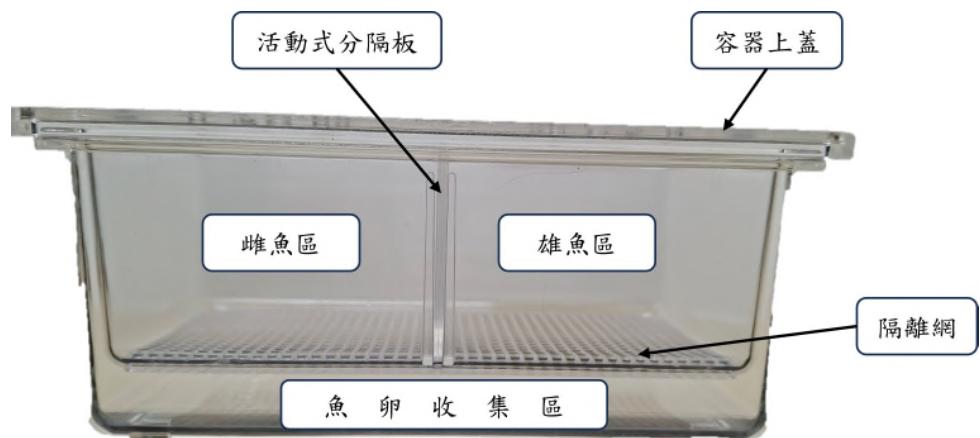
註 4：本文引用之所有公告方法編碼，以環境部最新公告者為準。



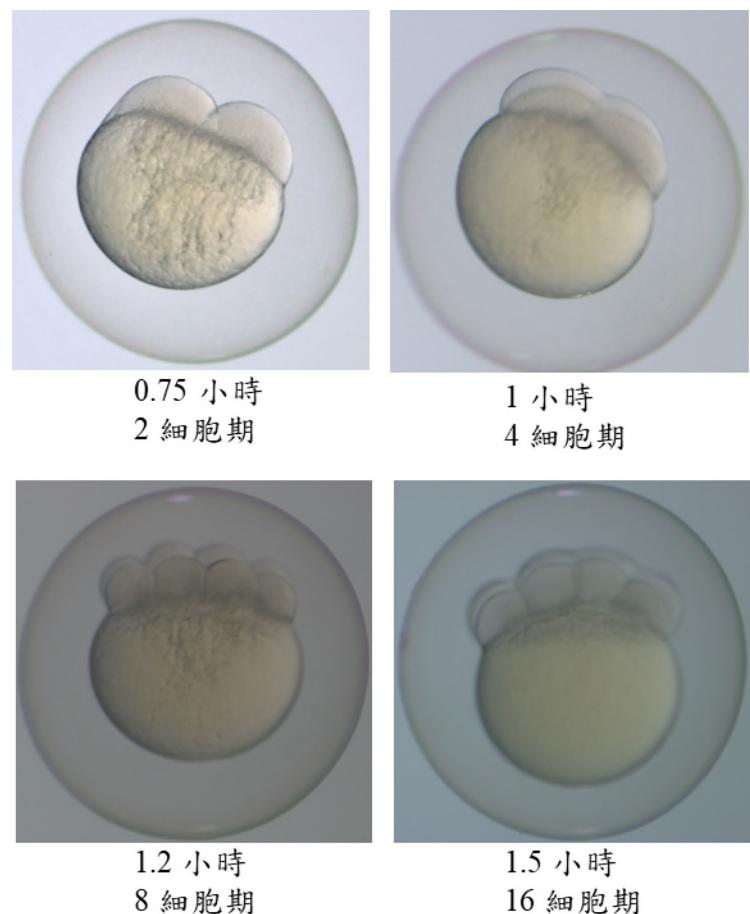
圖一 斑馬魚雌雄區別



圖二 斑馬魚受精卵



圖三 產卵容器魚卵收集示意圖



圖四 斑馬魚胚胎發育圖

1 1 1 1 1 1 IC	2 2 2 2 2 2 IC	3 3 3 3 3 3 IC	4 4 4 4 4 4 IC
5 5 5 5 5 5 IC	NC NC NC NC NC NC IC	PC PC PC PC PC PC IC	SC SC SC SC SC SC IC
5 5 5 5 5 5 IC	NC NC NC NC NC NC IC	PC PC PC PC PC PC IC	SC SC SC SC SC SC IC
5 5 5 5 5 5 IC	NC NC NC NC NC NC IC	PC PC PC PC PC PC IC	SC SC SC SC SC SC IC
5 5 5 5 5 5 IC	NC NC NC NC NC NC IC	PC PC PC PC PC PC IC	SC SC SC SC SC SC IC

圖五 試驗容器溶液配置示意圖

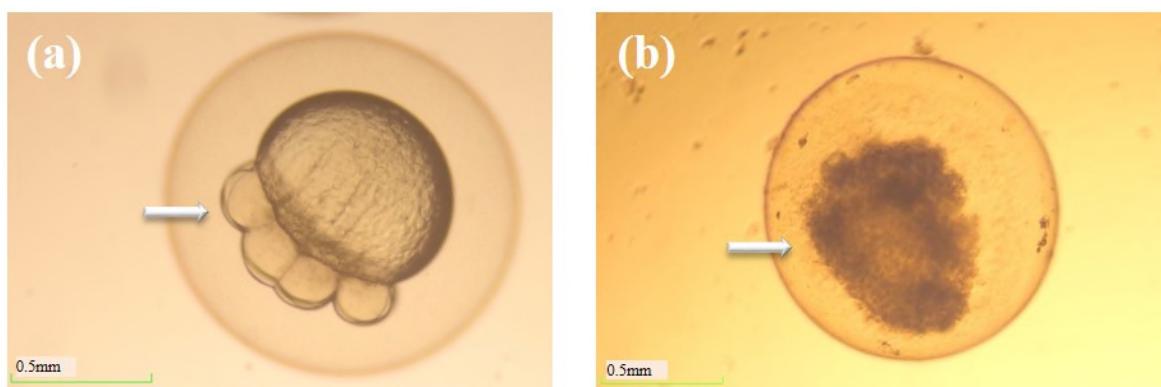
1 至 5：分別為樣品 5 個試驗濃度（各稀釋度試驗溶液）

NC：負控制試驗（稀釋液）

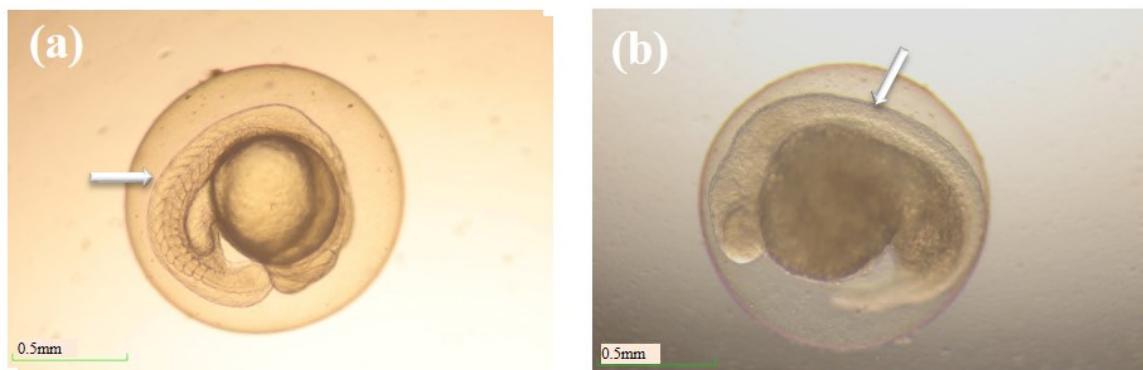
IC：內對照試驗（稀釋液）

PC：正控制試驗（4.0 mg/L 3,4-DCA溶液）

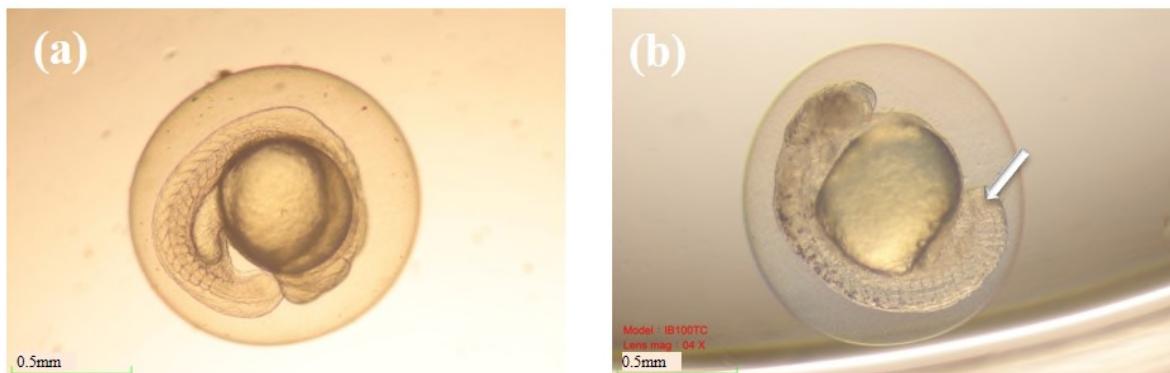
SC：溶劑控制試驗（助溶時使用之溶劑試驗溶液）



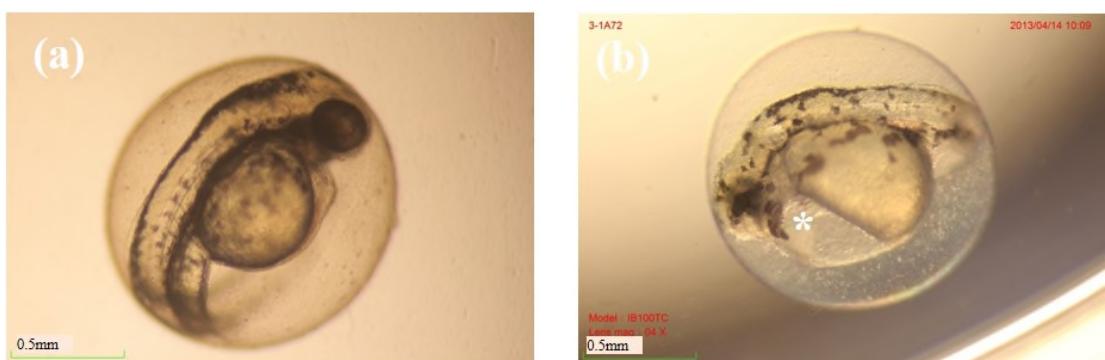
圖六 (a) 正常胚胎與 (b) 異常凝結之胚胎



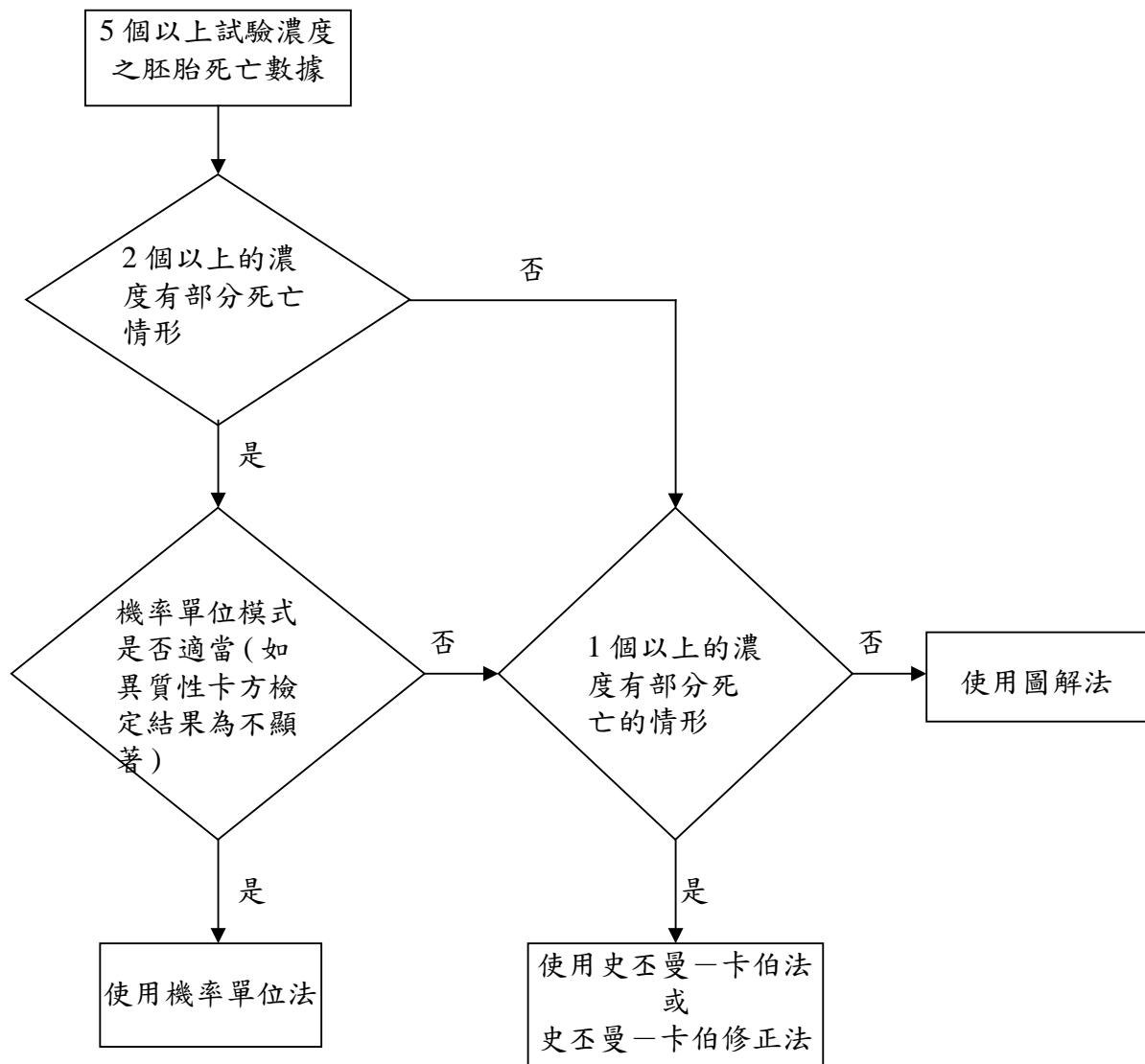
圖七 (a) 胚胎發育 24 小時之正常體節發育與 (b) 異常之體節發育不全



圖八 (a) 正常發育胚胎與 (b) 異常發育尾部未剝離之胚胎



圖九 (a) 正常發育胚胎與 (b) 異常之心臟無跳動(圖中\*標示處)



圖十  $LC_{50}$  計算方式判斷流程圖

## 環境檢測標準方法修正對照表

**方法名稱：生物急毒性檢測方法—斑馬魚胚胎半靜水式法  
(NIEA B909.11C)草案**

修正內容	現行內容	說明
<b>一、方法概要</b> <p>本方法係以斑馬魚(<i>Danio rerio</i>)之胚胎為試驗生物，以半靜水式(Semi-static)生物毒性試驗方法，每24小時<u>更換</u>試驗溶液1次，檢測生物胚胎急毒性，計算96小時之半致死濃度(Lethal concentration 50%，LC<sub>50</sub>)或急毒性單位(Acute toxic unit, TUa)。</p>	<b>一、方法概要</b> <p>本方法係以斑馬魚(<i>Danio rerio</i>)之胚胎為試驗生物，以半靜水式(semi-static)生物毒性試驗方法，每24小時<u>換水</u>1次，檢測生物胚胎急毒性，計算96小時之半致死濃度(Lethal Concentration 50%，LC<sub>50</sub>)或急毒性單位(Acute toxic unit, TUa)。</p>	依環境檢測標準方法制訂作業流程指引(以下簡稱方法制定指引)修正格式，並修正文字。
<b>二、適用範圍</b> <p>本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢<u>(污)</u>水及環境用藥對斑馬魚胚胎之生物急毒性檢測。</p>	<b>二、適用範圍</b> <p>本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢<u>水</u>、污水及環境用藥對斑馬魚胚胎之生物急毒性檢測。</p>	依環保法規用語修正文字。
<b>三、干擾</b> <p>(一)生物馴養及毒性試驗室內若有化學氣體<u>滲入</u>，或馴養水、稀釋液及器皿中殘留<u>毒性物質</u>，可能影響斑馬魚健康，且可能<u>改變</u>胚胎對<u>毒物的耐受性</u>。</p>	<b>三、干擾</b> <p>(一)生物馴養及毒性試驗室內若有化學氣體<u>侵入</u>、馴養水或稀釋水含有毒物質、器皿或試驗容器未洗淨殘留<u>有毒物質</u>，會影響斑馬魚健康且可能造成<u>耐受性改變</u>。</p>	1. 稀釋液為試劑水添加試藥配製而成，修正為稀釋液。 2. 試驗環境之有毒物質會影響馴養魚隻亦會影響胚胎，故修正文字。
<b>(二)若馴養個體罹患<u>疾病</u>或健康狀態不穩定，將對其生殖表現及魚卵孵化率造成影響。</b>	<b>(二)生物有病或健康狀況不佳，影響產卵及孵化率。</b>	文字修正。
<b>(三)分子量3千道爾頓(Kilodalton, kDa)以上的化合物，…</b>	<b>(三)分子量3kDa以上的化合物，…</b>	增列kDa之中文及英文全名。
<b>四、設備與材料</b> <p>(一)斑馬魚胚胎：使用6月齡至24月齡之性成熟斑馬魚(圖一)所產之受精卵(圖二)進行試驗，可自行產製胚胎或使用市售</p>	<b>四、設備與材料</b> <p>(一)斑馬魚胚胎：使用3至6月齡的<u>全長</u>(上頸前端至尾鰭後端的長度)2.0至3.0公分之性成熟斑馬魚(圖一)所產之受精卵</p>	1. 參考ISO 15088修正產製胚胎之親魚月齡。 2. 考量實務，刪除魚隻全長規定，並增列可使用

修正內容	現行內容	說明
<u>胚胎</u> 。斑馬魚可購自繁殖場或自行繁殖( <u>註1</u> )，不可混合其他品種。	(圖二)進行試驗，斑馬魚可購自繁殖場或自行繁殖，不可混合其他品種。 <u>(註1)</u>	市售胚胎。
(二)…光照時間應維持在每天14 小時 ± 2 小時。 (三)…水溫控制在 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。	(二)…光照時間應維持在每天 $14 \pm 2$ 小時。 (三)…水溫控制在 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。	依方法制訂指引修正格式。
(四)樣品容器…	(四)採樣容器…	文字修正。
(五)馴養容器：玻璃或塑膠材質， <u>使用於斑馬魚馴養</u> 。	(五)馴養容器：玻璃或塑膠材質。	使用市售胚胎者，可不自行馴養親魚，配合增列相關文字。
(六)試驗容器：玻璃或 <u>聚苯乙烯(Polystyrene)</u> 材質、 <u>透明底、附上蓋之24孔</u> 培養盤，孔格直徑約16 mm，每孔容量2.5 mL以上， <u>進行試驗時須將上蓋蓋上</u> 。	(六)試驗容器：玻璃或 polystyrene 材質之24 孔培養盤，孔格直徑約 16 mm，每孔容量 2.5 mL 以上。	1.依方法制訂指引修正格式，並增列試驗容器規格。 2.增列試驗時須蓋蓋子。
(七)產卵容器：玻璃或塑膠材質，中間具可移除之隔板， <u>可將雄魚及雌魚隔開</u> 。下方具隔離網( $2\text{ mm} \pm 0.5\text{ mm}$ 網目之不鏽鋼或塑膠等材質)，可將親魚及魚卵隔開，可使用市售繁殖箱( <u>示意如圖三</u> )。	(七)產卵容器：玻璃或塑膠材質，中間具可移除之隔板，可使用市售繁殖箱。	增列產卵容器規格。
(八)燒杯、血清瓶、量瓶及量筒：硼矽玻璃材質。	(八)量瓶及量筒：硼矽玻璃材質。	依檢測實務增列。
(十)溫度監測裝置：須可顯示 <u>斑馬魚馴養期間及毒性試驗期間之最高及最低水溫</u> ( <u>註2</u> )， <u>最小刻度須可達 <math>0.1^{\circ}\text{C}</math></u> 。	(十)溫度監測裝置：須可顯示毒性試驗期間之最高及最低水溫	1.溫度監測裝置除使用於毒性試驗亦使用於斑馬魚馴養之溫度監控，故增列相關文字敘述。 2.增加備註說明毒性試驗期間之水溫監測方式。

修正內容	現行內容	說明
		3.增列溫度監測裝置最小刻度須可達 0.1 °C。
(十一) 溶氧測定儀。	(十一) 溶氧測定儀	依方法制訂指引修正格式。
(十二) pH 計：附有溫度補償裝置，最小刻度須可達 0.1 pH 單位。	(十二) pH 計	增列 pH 計規格。
(十三) 導電度計。 (十四) 餘率計。 (十五) 水質硬度計或水質硬度檢測試劑組。	(十三) 導電度計 (十四) 餘率計 (十五) 水質硬度計或水質硬度檢測試劑組	依方法制訂指引修正格式。
(十六) 分析天平：待測物重量大於 2 g 時，須能精稱至 0.01 g；待測物重量不大於 2 g 時，須能精稱至 0.001 g。	(十六) 分析天平：待測物重量大於 2 g 時，須能精秤至 0.01 g；待測物重量不大於 2 g 時，須能精秤至 0.001 g。	依方法制訂指引修正。
(十七) 手操網：大小合適之具握柄軟質尼龍網，使用於斑馬魚馴養。	(十七) 手操網：大小合適具握柄軟質尼龍網。	使用市售胚胎者，可不自行馴養親魚，配合增列相關文字說明。
(十九) 光學顯微鏡：放大倍率 80 倍以上之倒立式顯微鏡或解剖顯微鏡（立體顯微鏡）。	(十九) 倒立式光學顯微鏡：放大倍率須達 80 倍以上。	依檢測實務增列解剖顯微鏡並修正相關文字。
(二十) 培養皿：玻璃或塑膠材質，可使用直徑 9 cm 或其他適當大小之培養皿。	(二十) 培養皿：玻璃或塑膠材質，直徑 9 cm 以上。	依檢測實務修正。
(二十一) 曝氣設備。	(二十一) 曝氣設備	補列句號。
(二十二) 水循環過濾裝置：使用於斑馬魚馴養。	(二十二) 水循環過濾裝置	使用市售胚胎者，可不自行馴養親魚，配合增列相關文字說明。
(二十三) 塑膠滴管。 (二十四) 冰箱：溫度能保持在 4 °C ± 2 °C。 (二十五) 冷凍櫃：溫度能保持在 -18 °C 以下。 (二十六) 電磁攪拌器及攪拌子。		依檢測實務增列設備與耗材。

修正內容	現行內容	說明
五、試劑 <u>檢測時使用之試劑除非另有說明，否則至少須為試藥級。使用之溶液或試劑，可依試藥配製比例製備所需使用體積。</u>	五、試劑	先敘述試劑規格及試藥配製說明原則。
(一)試劑水：電阻率須大於 $10\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。	(一)試劑水： <u>比電阻值</u> 須大於 $10\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。	文字及格式修正。
(二)碳酸氫鈉(Sodium bicarbonate, $\text{NaHCO}_3$ )。 (三)硫酸鎂七水合物(Magnesium sulfate heptahydrate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )。 (四)氯化鉀(Potassium chloride, $\text{KCl}$ )。 (五)氯化鈣二水合物(Calcium chloride dihydrate, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。		先列出需使用試劑以利檢測前準備。
(六)丙酮(Acetone, $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )：殘量級。	(六)丙酮：殘量級。	增列英文名及化學式。
(七)氫氧化鈉(Sodium hydroxide, $\text{NaOH}$ )。 (八)濃鹽酸(Hydrochloric acid, $\text{HCl}$ )。	(七)氫氧化鈉：試藥級以上。 (八)鹽酸：試藥級以上。	1.增列英文名及化學式。 2.試藥等級已敘述於五、試劑之第一段，爰刪除。
(九)硝酸(Nitric acid, $\text{HNO}_3$ )。	(五)硝酸：試藥級以上。	1.序號調整，並增列英文名及化學式。 2.試藥等級已敘述於五、試劑之第一段，爰刪除。
(十)參考毒物： <u>3,4-二氯苯胺(3,4-Dichloroaniline, 3,4-DCA, <math>\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2(\text{NH}_2)</math>)</u> 。	(四)參考毒物： <u>氯化鈉，試藥級以上</u> 。	1.改用與 OECD TG 236 及 ISO 15088 方法相同之參考毒物。 2.序號調整。
(十一)0.1 M 鹽酸溶液：取 8.3 mL 濃鹽酸緩緩加入適量試劑水中，定容至 1 L。 可使用市售溶液。		增列各項溶液配製說明。

修正內容	現行內容	說明
(十二) 0.1 M 氢氧化鈉溶液： <u>溶解 4 g 氢氧化鈉於適量試劑水中，再以試劑水定容至 1 L。可使用市售溶液。</u>		
(十三) 10 % (v/v) 鹽酸或硝酸溶液：將 100 mL 濃鹽酸或硝酸緩緩加入 900 mL 試劑水中。(玻璃器皿酸洗用，須於使用前配製)		
(十四) 3,4-DCA 儲備溶液, 100 mg/L : 溶解 3,4-DCA 0.050 g 於稀釋液中，攪拌約 24 小時後，以 0.1 M 氢氧化鈉溶液或 0.1 M 鹽酸溶液調整 pH 值為 6.5 至 8.5，定容至 500 mL，避光保存於 4 ± 2 °C，保存期限 6 個月。		
(十五) 正控制(Positive control, PC)試驗溶液(3,4-DCA, 4.0 mg/L)：取 3,4-DCA 儲備溶液 4 mL 加稀釋液定容至 100 mL，pH 值須為 6.5 至 8.5。		
(十六) 稀釋液：將 63.0 mg 碳酸氫鈉、123.3 mg 硫酸鎂七水合物、5.5 mg 氯化鉀及 294.0 mg 氯化鈣二水化合物，溶解於 1 L 試劑水後，劇烈曝氣至少 8 小時，硬度須為 200 mg CaCO <sub>3</sub> /L 至 250 mg CaCO <sub>3</sub> /L，pH 值須為 6.5 至 8.5，若需調整 pH 值，須以 0.1 M 氢氧化鈉溶液或 0.1 M 鹽酸溶液進行。保存不宜超過 14 天。	(二) 稀釋水：稀釋水含下列成分（試藥級以上）： 碳酸氫鈉 (NaHCO <sub>3</sub> ) 63.0 mg/L 七水硫酸鎂 (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O) 123.3 mg/L 氯化鉀(KCl) 5.5 mg/L 二水氯化鈣 CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 294.0 mg/L 配製量可根據檢測需求量，依配方比例配製。將試藥溶解於試劑水後，劇烈曝氣至少 8 小時，硬度須為 200 至 250 mg CaCO <sub>3</sub> /L，pH 須為 6.5 至 8.5，若需調整 pH，須以氫氧化鈉或鹽酸進行。避	1.序號調整。 2.修正文並調整敘述方式及刪除不必要之避光規定。 3.依方法制訂指引修正單位格式。

修正內容	現行內容	說明
	光保存不宜超過 14 天。	
(十七)馴養水：可使用稀釋液、去氯自來水（註3）、無污染之地下水等作為馴養水。馴養水之硬度應為 200 mg CaCO <sub>3</sub> /L 至 250 mg CaCO <sub>3</sub> /L，pH 值須為 6.5 至 8.5。可混合適量試劑水進行調整。	(三) 馴養水：可使用稀釋水、去氯自來水（註2）、無污染之地下水等作為馴養水。馴養水之硬度應為 200 至 250 mg CaCO <sub>3</sub> /L，pH 須為 6.5 至 8.5，可混合適量之逆滲透水或試劑水進行調整。	1.序號調整。 2.修正文並依方法制訂指引修正單位格式。
六、採樣與保存 (一) 水樣採樣方法參照「監測井地下水採樣方法 (NIEA W103.5)」、「河川、湖泊及水庫水質採樣方法 (NIEA W104.5)」、「事業放流水採樣方法 (NIEA W109.5)」（註4）。每個水樣至少須採 5 瓶，每瓶之水樣量不得少於 0.5 L。	六、採樣與保存 (一) 水樣採樣方法參照「監測井地下水採樣方法(NIEA W103)」、「河川、湖泊及水庫水質採樣通則(NIEA W104)」、「事業放流水採樣方法 (NIEA W109)」。每個水樣至少須採 4 瓶，每瓶之水樣量不得少於 0.5 L。	1.依方法制訂指引修正文。 2.配合實務需求修正樣品採集數量。
(二)…採樣後立即避光保存於大於 0 °C 至 6 °C 以下。	(二)…採樣後立即避光保存於 $4 \pm 2$ °C。	依實務修正樣品保存溫度表示方式。
(三) 水樣採樣後若無法在 48 小時內開始進行確定試驗(Definitive test)，樣品在實驗室時須保存於 -18 °C 以下，保存期限 2 個月。	(三) 水樣必須在採樣後 36 小時內開始進行確定試驗。	1.於專有名詞首次出現處加註英文。 2.參考 ISO 5667-16 修正水樣保存條件。
(四)…樣品為已包裝完善且密封完整之環境用藥成品時，依其儲存條件以原包裝保存。	(四)…樣品為已包裝完善且密封完整之環境用藥成品時，以原包裝在室溫保存。	依實務修正保存方式。
七、步驟 (一) 試驗準備 1.班馬魚馴養 (3)馴養之水溫為 26 °C ± 1 °C，pH 值為 6.5 至 8.5，且馴養期間 pH 值變化不得超過 1.5，光照時間應維持在每天 14 小時 ± 2 小時。	七、步驟 (一) 試驗準備 1.班馬魚馴養： (3)馴養之水溫為 26 ± 1 °C，pH 為 6.5 至 8.5，且馴養期間 pH 變化不得超過 1.5 個單位(units)，光照時間應維持在每天 14 ± 2 小時。	修正文並依方法制訂指引修正格式。

修正內容	現行內容	說明
(4)視 <u>馴養容器</u> 中魚隻大小及數量等狀況，調整餵食量及餵食次數。…	(4)魚隻成長速度與 <u>馴養之密度及餵食狀況</u> 有關，須依實際情況調整 <u>馴養容器</u> 中魚隻數量及餵食次數。…	修正文字敘述。
(5)藥物( <u>急性或預防</u> )治療。	(5)藥物( <u>慢性或預防</u> )治療。	依 OECD TG 236 方法修正。
(6)雌魚和雄魚的區別： <u>雌魚抱卵時腹部膨脹偏白；雄魚身體較纖細，藍色條紋間帶橙色色調，在臀鰭尤為明顯</u> (圖一)。	(6)雌魚和雄魚的區別： <u>雄魚體型較小、腹部較平坦，在燈光下呈現淡黃色，而雌魚體型通常較大、腹部較鼓脹，體色偏藍色</u> 。當雌魚達性成熟時， <u>腹部開始膨脹</u> (圖一)。	參考 OECD TG236，修改雌魚和雄魚外觀描述。
2.試驗容器及相關器材之清洗： (2)…( <u>無菌塑膠器皿</u> 使用前無須用試劑水潤洗)。	2.試驗容器及相關器材之清洗： (2)…( <u>全新之24孔培養盤</u> 不須清洗)。	依實務修正。
3.試驗前之樣品準備： (1)…再取上層液進行試驗。 <u>冷凍保存之樣品則以水浴(不超過26°C)</u> 進行解凍。	3.試驗前之 <u>水樣</u> 準備： (1)…再取上層液進行試驗。	配合採樣與保存 (三)新增水樣冷凍保存，增列解凍方式。
3.試驗前之樣品準備： (2)試驗前須先測量樣品之溫度、pH值與溶氧。樣品溫度須調整至26°C ± 1°C。若回溫後溶氧低於3.0 mg/L，應對樣品溫和曝氣…	3.試驗前之 <u>水樣</u> 準備： (2)試驗前須先測量 <u>水樣</u> 之溫度、pH與溶氧。 <u>水樣溫度</u> 須調整至26 ± 1°C。若回溫後溶氧低於3.0 mg/L，應對 <u>水樣</u> 溫和曝氣…	修正文並依方 法制訂指引修正 格式。
(3) <u>非液態之環境用藥</u> 先溶解於稀釋液，難溶解者可使用適當溶劑(例如乙醇或二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)等)助溶(須執行溶劑控制(Solvent control, SC)試驗)。		增加說明非液態之環境用藥樣品處理方式。
4.受精卵收集： (1)在試驗前一日傍晚，將雌魚與雄魚移至產卵容器並以隔板隔開(建議雌雄	4.受精卵收集： (1)在試驗前一日傍晚，將雌魚與雄魚以1:2之比例移至產卵容器， <u>雌魚與雄</u>	依實務修正並參 考 OECD TG 236 方法增列建議使 用3個以上產卵

修正內容	現行內容	說明
<u>比為 1:2 )，光照週期及水溫與馴養時相同，試驗當日早上移除中間隔板，魚兒會急速追逐旋游，身體碰觸時同時排出精卵。產卵的活動可以一直延續到中午，但產卵多在照光開始 30 分鐘內最多。為收集數量足夠之受精卵，建議使用 3 個以上產卵容器產製受精卵。</u>	<u>魚須以隔板隔開並停止光照(可以黑布遮蔽)，試驗當日早上移除中間隔板並照光，魚兒會急速追逐旋游，身體碰觸時同時排出精卵。產卵的活動可以一直延續到中午，但產卵多在照光開始 30 分鐘內最多。</u>	容器產製受精卵。
(2)…直徑約 0.8 mm 至 1.5 mm，親魚產卵後會吃掉自己的魚卵，所以須在產卵容器中用隔離網將親魚及魚卵隔開( <u>示意如圖三</u> )。	(2)…直徑約 0.8 至 1.5 mm，親魚產卵後會吃掉自己的魚卵，所以須在產卵容器中用隔離網( <u>可使用 2 ± 0.5 mm 網目的不鏽鋼或塑膠等材質</u> )，將親魚及魚卵隔開(圖三)。	1. 隔離網規格已列於四、(七)，故此處刪除。 2. 圖三係示意圖，故文字調整。
(4)使用光學顯微鏡區分魚卵是否受精，受精卵會逐漸分化發育為 2 細胞期 (Cell stage)、4 細胞期、8 細胞期、16 細胞期等(如圖四)，未受精則不會發育。估算每個產卵容器魚卵之受精率，將受精率 70 % 以上者混合後使用，受精卵數量須能完成檢測(1 次檢測 1 個放流水樣品共須使用 168 顆受精卵，1 次檢測 2 個放流水樣品共須使用 288 顆受精卵)，且須於受精後 90 分鐘內開始進行毒性試驗(浸泡於試驗溶液中(七、步驟(三)4))。	(4)使用 <u>倒立式</u> 光學顯微鏡區分魚卵是否受精(圖二)，受精卵收集數量須以能做完檢測為度(例如 1 次檢測 1 個放流水樣品共須使用 168 個受精卵，1 次檢測 2 個放流水樣品共須使用 288 個受精卵)，且須於受精後 180 分鐘內開始進行毒性試驗。	1. 顯微鏡種類不限倒立式，故刪除相關文字。 2. 增列受精卵發育時程，並增加圖片輔助說明。 3. 魚卵之計量單位統一使用「顆」。 4. 依 OECD TG 236 方法，增列魚卵收集計算受精率，並修正須於受精後 90 分鐘內將收精卵浸泡於試驗溶液中。
<u>5. 試驗容器前處理：</u> <u>(1) 試驗前一天將樣品以稀釋液至少稀釋為 5 個濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。放流水則以 5 個固定濃</u>		參考 OECD TG 236 方法，增加試驗容器使用前一天以試驗溶液浸泡之前處理步驟。

修正內容	現行內容	說明
<p><u>度(100%、80%、60%、40%及20%)進行試驗。每一試驗濃度總體積50mL以上。</u></p> <p><u>(2)於試驗容器各孔格內分別加入以下溶液2mL以上。(配置示意如圖五)。</u></p> <p><u>A.樣品各稀釋度試驗溶液：以放流水樣品為例，100%、80%、60%、40%及20%試驗溶液各1盤，於20孔格中加入試驗溶液。</u></p> <p><u>B.負控制(Negative control, NC)試驗溶液：1盤，於20孔格中加入稀釋液。</u></p> <p><u>C.正控制(Positive control, PC)試驗溶液：1盤，於20孔格中加入4.0 mg/L之3,4-DCA溶液。</u></p> <p><u>D.溶劑控制(Solvent control, SC)試驗溶液：1盤(未使用溶劑助溶則無需執行)。將溶劑添加至稀釋液中混勻，添加量與樣品助溶時之添加量相同。於20孔格中加入溶劑控制試驗溶液。</u></p> <p><u>E.試驗容器內對照(Internal plate control, IC)試驗溶液：於每個試驗容器剩餘之4個孔格中加入稀釋液。</u></p>		
<p><u>(二)範圍尋找試驗(Range - finding test)</u></p> <p><u>2.可將水樣或環境用藥以稀釋液適度進行10倍序列稀釋。每一試驗濃度溶液總體積為25mL</u></p>	<p><u>(二)範圍尋找試驗(Range - finding test)</u></p> <p><u>2.可將水樣或環境用藥以稀釋水適度進行10倍序列稀釋。每一試驗濃度水樣總體積為25</u></p>	<p>1.文字修正 2.依方法制訂指引修正格式。</p>

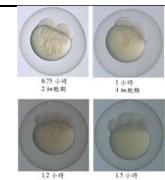
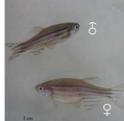
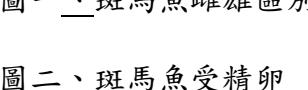
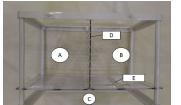
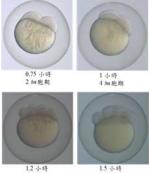
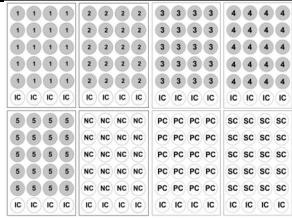
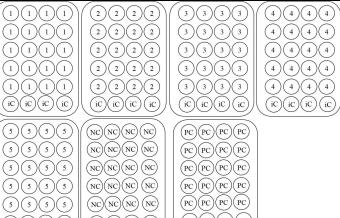
修正內容	現行內容	說明
<p><u>以上</u>，…</p> <p>4. 試驗期間水溫應控制在 <math>26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}</math>，光照時間應維持每天 14 小時 <math>\pm 2</math> 小時。</p> <p>5. 觀察 8 小時至 24 小時…</p>	<p>mL，…</p> <p>4. 試驗期間水溫應控制在 <math>26 \pm 1^{\circ}\text{C}</math>，光照時間應維持每天 <math>14 \pm 2</math> 小時。</p> <p>5. 觀察 8 至 24 小時…</p>	
<p>(三) 確定試驗(Definitive test)</p> <p>1. 將水樣或環境用藥以稀釋液至少稀釋為 5 個濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。放流水則以 5 個固定濃度(<math>100\%</math>、<math>80\%</math>、<math>60\%</math>、<math>40\%</math> 及 <math>20\%</math>)進行試驗。</p> <p>2. 稀釋完成後，檢測樣品最高濃度試驗溶液之 pH 值、溶氧、導電度及餘氯。另須檢測稀釋液之 pH 值及導電度。</p>	<p>(三) 確定試驗(Definitive test)</p> <p>1. 將水樣或環境用藥以稀釋水至少稀釋為 5 個濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。放流水則以 5 個固定濃度進行試驗(<math>100\%</math>、<math>80\%</math>、<math>60\%</math>、<math>40\%</math> 及 <math>20\%</math>)。</p> <p>2. 稀釋完成後，檢測最高濃度試驗水樣之 pH、溶氧、導電度及餘氯。另須檢測稀釋水之 pH 及導電度。</p>	文字修正
<p>3. 於培養皿分別加入以下各種溶液約 10 mL (須使魚卵浸泡於溶液中)：</p> <p>(1) 樣品各稀釋度試驗溶液：每一試驗濃度各 1 盤。</p> <p>(2) 稀釋液：1 盤以上，用於負控制(NC)及試驗容器內對照(IC)試驗。</p> <p>(3) 正控制(PC)試驗溶液：1 盤，用於正控制試驗。</p> <p>(4) 溶劑控制試驗(SC)溶液：1 盤(未使用溶劑助溶則無需執行)。</p> <p>4. 在受精後 90 分鐘內，將七、步驟(一) 4.(4)之受精卵移入前項各培養皿中。使用光學顯微鏡觀察，移除未受精及發育異常(例如不對稱)、卵膜受損等不正常魚卵。正常受精卵數量須足以完</p>	<p>3. 每一試驗濃度水樣總體積為 50 mL，分注於培養盤之 20 個孔格中(每孔至少 2 mL)。</p> <p>4. 空白試驗(Negative Control, NC)：於培養盤之 24 個孔格中，每孔至少注入 2 mL 稀釋水。</p> <p>5. 每個培養盤皆須執行培養盤之內對照試驗(internal plate control, iC)：於培養盤之 4 個孔格中，每孔至少注入 2 mL 稀釋水。</p> <p>6. 正控制試驗(Positive Control, PC)：依據參考毒物試驗結果，配製氯化鈉溶液(例如實驗室氯化鈉參考毒物試驗之 96 小時 <math>\text{LC}_{50}</math> 為 <math>9.7 \text{ mg/L}</math>，則以 <math>9.7 \text{ mg/L}</math> 之氯化鈉執行正控制試驗)，總體積為 50 mL，分注於培養盤之 20</p>	依 OECD TG 236 方法，增加將魚胚胎先置於盛裝試驗溶液之培養皿之步驟(須於受精後 90 分鐘內完成)。修正試驗步驟，並調整敘述方式。

修正內容	現行內容	說明
<p><u>成試驗。</u></p> <p><u>5. 將前一天前處理之試驗容器內液體（七、步驟（一）5.(2)）吸除後，每個孔格注入至少 2 mL 相應之試驗溶液，包括樣品各稀釋度試驗溶液（於確定試驗當天配製）、負控制及正控制試驗溶液等。</u></p> <p><u>6. 每個孔格置入 1 顆浸泡於七、步驟(三) 4. 相應試驗溶液培養皿中之受精卵。須於受精後 180 分鐘內完成此步驟。</u></p>	<p><u>個孔格中（每孔至少 2 mL）。培養盤配置示意圖如圖四。</u></p> <p><u>7. 每個孔格置入 1 顆受精卵。</u></p>	
<p><u>7. 試驗期間為 96 小時，水溫應控制在 <math>26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}</math>，光照時間應維持每天 14 小時 <math>\pm 2</math> 小時。</u></p> <p><u>8. 開始試驗後，於第 24 小時、48 小時、72 小時及 96 小時，觀察胚胎並記錄死亡數量。</u></p> <p><u>9. 胚胎出現以下任一種狀況即判定為死亡：</u>            (1)…會出現各種不透明深色的物質（圖六）。            (2)…在 <math>26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}</math>，24 小時後，正常斑馬魚胚胎約形成 20 體節…，則判定胚胎死亡（圖七）。            (3)…須在 24 小時、48 小時、72 小時和 96 小時觀察尾部剝離情形（圖八）。            (4)…魚胚胎在 <math>26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}</math>，48 小時後…才可判定為死亡（圖九）。</p>	<p><u>8. 試驗期間為 96 小時，水溫應控制在 <math>26 \pm 1^{\circ}\text{C}</math>，光照時間應維持每天 14 <math>\pm 2</math> 小時。</u></p> <p><u>9. 開始試驗後，於第 24、48、72 及 96 小時，觀察胚胎並記錄死亡數量。</u></p> <p><u>10. 胚胎出現以下任一種狀況即判定為死亡：</u>            (1)…會出現各種不透明深色的物質（圖五）。            (2)…在 <math>26 \pm 1^{\circ}\text{C}</math>，24 小時後，正常斑馬魚胚胎約形成 20 體節 (somites)…，則判定胚胎死亡（圖六）。            (3)…須在 24、48、72 和 96 小時觀察尾部剝離情形（圖七）。            (4)…魚胚胎在 <math>26 \pm 1^{\circ}\text{C}</math>，48 小時後…才可判定為死亡（圖八）。</p>	1.序號及圖編號依序調整。 2.依方法制訂指引修正格式。
<p><u>10. 開始試驗後，每隔 24 小時 <math>\pm 1</math> 小時須更換試驗溶液（須於觀察胚胎後執行），直到第 96 小時試驗結束。方式如</u></p>	<p><u>11. 開始試驗每次後，每隔 24 <math>\pm 1</math> 小時須更換試驗水樣（須於觀察胚胎後執行），直到第 96 小時試驗結束。方式如下：</u></p>	1.序號及圖編號依序調整。 2.依方法制訂指引修正格式並修正文字。

修正內容	現行內容	說明
<p>下：</p> <p>(1)於更換試驗溶液當天取 1 瓶樣品依七、步驟 (一) 3. 之規定進行試驗前之樣品準備。</p> <p>(2)依<u>七</u>、<u>步驟(三)</u> 1. 稀釋樣品。</p> <p>(3)將孔格內原有液體吸至<u>近乾</u>，立即加入<u>至少 2 mL</u> 相應之溶液，包括樣品各稀釋度試驗溶液、負控制及正控制試驗溶液等，過程中須避免胚胎暴露於乾燥環境。</p>	<p>(1) 取 1 瓶<u>水樣</u>依七、 (一) 3. 之規定進行試驗前之<u>水樣</u>準備。</p> <p>(2) 依<u>選定濃度</u>稀釋<u>水樣</u>。</p> <p>(3) 將孔格內原有液體吸除後，立即加入與原試驗<u>水樣濃度相同</u>之新製備試驗<u>水樣</u>，過程中須避免胚胎暴露於乾燥環境。</p>	
<p><u>11. 計算負控制試驗 96 小時之胚胎孵化率（若進行溶劑控制試驗時亦須計算其孵化率）：觀察胚胎是否孵化為魚苗狀，計算 20 個試驗孔格之孵化總數。</u></p> <p><u>胚胎孵化總數 = 20 個試驗孔格之孵化數量加總</u></p> <p><u>胚胎孵化百分率 = 胚胎孵化總數 ÷ 20 × 100 %</u></p>		增列胚胎孵化率計算方式。
<p>12. 結束試驗後，須測量並記錄樣品最高濃度試驗溶液之 pH 值及溶氧…</p>	<p>12. 結束試驗後，須測量並記錄最高濃度試驗<u>水樣</u>之 pH 及溶氧…</p>	依方法制訂指引修正格式並修正文字。
<p>八、結果處理</p> <p>(一) 樣品 96 小時 LC<sub>50</sub> 計算 2. …依<u>圖十</u>判斷須使用之計算方式。詳細計算方式參見「生物急毒性檢測方法—水蚤靜水式法(NIEA B901.1)」附錄二。</p> <p>(二) <u>水質</u>樣品 96 小時 TU<sub>a</sub> 計算 2. 若放流水樣品 5 個濃度之胚胎死亡百分率均… 3. 若放流水樣品 5 個濃度之胚胎死亡百分率均…</p>	<p>八、結果處理</p> <p>(一) 樣品 96 小時 LC<sub>50</sub> 計算： 2. …依<u>圖九</u>判斷須使用之計算方式。</p> <p>(二) 樣品 96 小時 TU<sub>a</sub> 計算 2. 若放流水<u>水樣</u> 5 個濃度之胚胎死亡百分率均… 3. 若放流水<u>水樣</u> 5 個濃度之胚胎死亡百分率均…</p>	<p>1. 圖編號依序調整。</p> <p>2. 增列計算方式說明。</p> <p>文字修正。</p>

修正內容	現行內容	說明
<p><b>九、品質管制</b></p> <p>(一) <u>負控制(NC)</u>試驗：每次毒性試驗應至少伴隨一負控制試驗，若胚胎死亡率超過 10 %，或孵化率低於 80 %，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用。</p> <p>(二) <u>內對照(IC)</u>試驗：每個<u>試驗容器</u>皆須執行內對照試驗…</p> <p>(三) <u>正控制(PC)</u>試驗：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低於 30 %，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用。</p>	<p><b>九、品質管制</b></p> <p>(一) <u>空白試驗(NC)</u>：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗，若胚胎死亡率超過 10%，或孵化率低於 80%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，<u>必須重做</u>。</p> <p>(二) <u>內對照試驗(iC)</u>：每個 <u>24 孔培養盤</u> 皆須執行培養盤之內對照試驗…</p> <p>(三) <u>正控制試驗(PC)</u>：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低於 30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，<u>必須重做</u>。</p>	<p>1.文字調整。</p> <p>2.控制試驗結果若不合規，表示該批次試驗結果不可採用。考量實務上可能不重新執行採樣檢測，爰刪除必須重做之規定。</p>
<p>(四) <u>溶劑控制(SC)</u>試驗：使用<u>溶劑助溶環境用藥樣品</u>時，應至少伴隨一<u>溶劑對照試驗</u>，若胚胎死亡率超過 10 %，或孵化率低於 80 %，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用。</p>		增列溶劑控制(SC)試驗品質管制說明。
<p>(五) 參考毒物試驗：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>將 <u>3,4-DCA 儲備溶液</u>以稀釋液稀釋為 5 個不同濃度…</li> <li>首次以本方法執行生物毒性試驗之實驗室，應先以<u>參考毒物</u>進行至少 5 次…</li> <li>…計算其平均值及標準偏差 (<u>Standard deviation, SD</u>)…</li> </ol>	<p>(四) 參考毒物試驗：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>氯化鈉以稀釋水溶解並配製為 5 個不同濃度…</li> <li>首次以本方法執行生物毒性試驗之實驗室，應先以<u>氯化鈉</u>進行至少 5 次…</li> <li>…計算其平均值及標準偏差 (SD) …</li> </ol>	<p>1.改用與 OECD TG 236 及 ISO 15088 相同之參考毒物，配合調整相關文字。</p> <p>2.依方法制訂指引增列 SD 之英文全文。</p>
<p><b>十一、參考資料</b></p> <p>(一) OECD. Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, <u>2025</u>.</p> <p>(二) ISO International Standard. Water quality – Determination of the Acute</p>	<p><b>十一、參考資料</b></p> <p>(一) OECD. Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity(FET)Test, <u>2013</u>.</p> <p>(二) OECD. Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish</p>	更新參考資料版本，並依實際參考狀況增刪及調整排序。

修正內容	現行內容	說明
<p>Toxicity of Waste Water to Zebrafish Eggs (Danio rerio). ISO 15088, 2007.</p> <p>(三) U.S. EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, EPA-821-R-02-012, 2002.</p> <p>(四) ISO International Standard. Water quality – Sampling Part 16: Guidance on Biotesting of Samples. ISO 5667-16, 2017.</p> <p>(五) 凌永健, 高科技產業流水 中生物毒性成因之探討 (1/4), EPA-102-E3S5-02-01, 中華民國 102 年。</p>	<p><u>Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, 2011.</u></p> <p>(三) U.S. EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, EPA-821-R-02-012, 2002.</p> <p>(四) ISO. International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio). ISO 15088:2007(E), 2007</p>	
	<p>(五) Francois Busquet et al., OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing, Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2014,69, 496 – 511.</p> <p>(六) Stefan Scholz et al., Analysis of the relevance and adequateness of using Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test Guidance (OECD 236) to fulfil the information requirements and addressing concerns under REACH, Report ECHA-UFZ contract ECHA/2014/341,2016</p> <p>(七) 凌永健, 高科技產業流水 中生物毒性成因之探討 (1/4), EPA-102-E3S5-02-01, 中華民國 102 年。</p>	
<p>註 1：動物之科學應用應依農業部訂定之「動物保護法」…</p> <p>註 2：將容器盛裝試劑水，置入</p>	<p>註 1：動物之科學應用應依行政院農業委員會訂定之「動物保護法」…</p>	<p>1.修正部會名稱。 2.增列註 2 說明毒性試驗期間之</p>

修正內容	現行內容	說明
<p><u>溫度監測裝置之探頭，可進行毒性試驗期間水溫監測。</u></p> <p><u>註 3：自來水可使用活性碳過濾或曝氣等方式去氯，但不可使用化學藥劑去氯。</u></p> <p><u>註 4：本文引用之所有公告方法編碼，以環境部最新公告者為準。</u></p>	<p>註 2：自來水可使用活性碳過濾或曝氣等方式去氯，但不可使用化學藥劑去氯。</p> <p><u>註 3：執行毒性試驗後之試驗胚胎及孵化之幼魚須廢棄。</u></p>	<p>水溫監測方式。</p> <p>3. 參考 OECD TG 236 方法，試驗後之胚胎可視需要供後續研究使用，故刪除原須廢棄之敘述。</p> <p>4. 增列註 4 說明本方法引用公告方法之備註說明。</p>
 <p>圖一 斑馬魚雌雄區別</p>  <p>圖二 斑馬魚受精卵</p>  <p>圖三 產卵容器_魚卵收集示意圖</p>	 <p>圖一、斑馬魚雌雄區別</p>  <p>圖二、斑馬魚受精卵</p>  <p>圖三、產卵容器_胚胎收集示意圖</p>	<p>1. 依方法制訂指引修正格式，並修正文字。</p> <p>2. 更換較清晰之圖片。</p>
 <p>圖四 斑馬魚胚胎發育圖</p>		<p>增列胚胎發育圖片。</p>
 <p>圖五 試驗容器溶液配置示意圖</p> <p>1 至 5：分別為樣品 5 個試驗濃度（各稀釋度試驗溶液）</p> <p>NC：負控制試驗（稀釋液）</p> <p>IC：內對照試驗（稀釋液）</p> <p>PC：正控制試驗（4.0 mg/L 3,4-DCA 溶液）</p>	 <p>圖四、培養盤試驗水樣配置示意圖</p> <p>1 至 5 = 5 個試驗濃度（試驗水樣），</p> <p>NC = 空白試驗（稀釋水），</p> <p>iC = 內對照試驗（稀釋水），</p> <p>PC = 正控制試驗（氯化鈉溶液）</p>	<p>1. 圖編號依序順修。</p> <p>2. 示意圖增列 SC，故更換圖片。</p> <p>3. 修正說明內容。</p>

修正內容	現行內容	說明
<u>SC：溶劑控制試驗（助溶時使用之溶劑試驗溶液）</u>		
圖六 (a) 正常胚胎與 (b) 異常凝結之胚胎	圖五 (a) 正常胚胎與 (b) 異常凝結之胚胎	圖編號依序順修及文字修正。
圖七 (a) 胚胎發育 24 小時之正常體節發育與 (b) 異常之體節發育不全	圖六 (a) 胚胎發育 24 小時之正常體節發展與 (b) 異常之體節發育不全	
圖八 (a) 正常發育胚胎與 (b) 異常發育尾部未剝離之胚胎	圖七 (a) 正常發育胚胎與 (b) 異常發育尾部未剝離之胚胎	
圖九 (a) 正常發育胚胎與 (b) 異常之心臟無跳動( <u>圖中*標示處</u> )	圖八 (a) 正常發育胚胎與 (b) 異常之心臟無跳動(*)	
圖十 LC <sub>50</sub> 計算方式判斷流程圖	圖九、判斷 96 小時 LC <sub>50</sub> 之計算方式	依方法制訂指引修正格式，並修正文字及圖編號依序順修。

# 環境用藥檢測方法—層析法(NIEA D902.0cB)草案總說明

為執行環境用藥有效成分之檢測，因應檢測儀器發展多元化及環境用藥有效成分推陳出新，爰依環境用藥管理法第五十七條，整併現行檢測相關規定，擬具「環境用藥檢測方法—層析法(NIEA D902.0cB)」草案，其要點如下：

- 一、本方法適用於環境用藥中有效成分之檢測。
- 二、樣品以適當前處理方式處理後，依有效成分選擇以氣相層析儀  
火焰離子化偵測器或液相層析儀／紫外光—可見光偵測器或液  
相層析儀／光電二極體陣列偵測器分析。

# 環境用藥檢測方法—層析法(NIEA D902.0cB)草案

公告	說明
主旨：訂定「環境用藥檢測方法—層析法(NIEA D902.0cB)」，並自中華民國一百十五年十月十五日生效。	方法名稱及生效日期。
依據：環境用藥管理法第五十七條。	法源依據。
公告事項：方法內容詳如附件。	方法內容。

# 環境用藥檢測方法—層析法草案

NIEA D902.0cB

## 一、方法概要

環境用藥樣品參照環境用藥檢測方法一樣品製備法(NIEA D901.0)（註），經適當前處理方式進行萃取或稀釋後，以氣相層析儀火焰離子化偵測器(Gas chromatograph flame ionization detector, GCFID)或液相層析儀／紫外光-可見光偵測器(Liquid chromatograph / ultraviolet-visible detector, LC/UV-Vis)或液相層析儀／光電二極體陣列偵測器(Liquid chromatograph / photo diode array, LC/PDA)，檢測樣品中待測物的含量。

## 二、適用範圍

本方法適用於表一所列環境用藥有效成分之檢測。

## 三、干擾

- (一) 於分析高濃度樣品後緊接著分析低濃度樣品時，可能會造成殘留污染干擾，因此在前後樣品分析之間可以溶劑清洗系統。必要時可於分析高濃度樣品後，注射一針或數針溶劑加以分析，確定無殘留污染的狀況後再繼續分析。
- (二) 實驗室中常用的塑膠製品易造成鄰苯二甲酸酯的污染。因鄰苯二甲酸酯常被用做可塑劑，且極易自塑膠物質中被萃取出來，檢測過程中應盡量避免使用塑膠製品。
- (三) 對以液相層析儀紫外光-可見光偵測器分析法無法完全鑑別之化合物，必要時得以光電二極體陣列偵測器再鑑別之。
- (四) 對以氣相層析儀或液相層析儀法無法完全分離及鑑別之化合物，必要時得以層析質譜儀再鑑別之。

## 四、設備與材料

- (一) 氣相層析儀火焰離子化偵測器：

1. 氣相層析儀：具升溫程式系統、進樣分流裝置及數據處理程式。

2. 氣相層析管柱（可視實際需求適當調整）：

(1) Agilent J&W DB-1 或 DB-5，長 30 m × 內徑 0.32 mm，  
膜厚 0.25 μm 毛細管柱，或同級品。

(2) 其他可有效分離待測物之氣相層析管柱。

3. 火焰離子化偵測器。

(二) 液相層析儀紫外光-可見光偵測器或光電二極體陣列偵測器：

1. 液相層析儀：具備高壓幫浦、進樣系統、層析管柱及數據處理程式。

2. 液相層析管柱（可視實際需求適當調整）：

(1) Lichrospher RP-18，5 μm（粒徑）250 mm（長）× 4.6 mm（內徑），或同級品。

(2) ABI Spheri-5，Amino，5 μm（粒徑）220 mm（長）× 4.6 mm（內徑），或同級品。

(3) Lichrosorb CN，5 μm（粒徑）250 mm（長）× 4 mm（內徑），或同級品。

(4) Lichrosorb Si，7 μm（粒徑）250 mm（長）× 4 mm（內徑），或同級品。

(5) XBridge HILIC，3.5 μm（粒徑）100 mm（長）× 2.1 mm（內徑），或同級品。

(6) Phenomenex，Gemini C18，3 μm（粒徑）100 mm（長）× 2 mm（內徑），或同級品。

(7) XBridge C18，3.5 μm（粒徑）100 mm（長）× 2.1 mm（內徑），或同級品。

(8) 其他可有效分離待測物之液相層析管柱。

3. 紫外光-可見光偵測器。

4. 光電二極體陣列偵測器。

- (三) 分析天平：可精稱至 0.1 mg。
- (四) 定量瓶：適當體積，棕色硼矽玻璃材質，附磨砂瓶塞。
- (五) 溶液保存瓶：適當體積，棕色硼矽玻璃材質，附螺旋瓶蓋，瓶蓋內襯為鐵氟龍墊片。
- (六) pH 測定儀：具自動或手動溫度補償功能，可讀位數至 0.1。
- (七) 微量移液管：10 μL、25 μL、50 μL、100 μL、250 μL、1,000 μL 或其他體積。
- (八) 氮氣：純度 99.999 %，或以上。
- (九) 氢氣：純度 99.999 %，或以上。
- (十) 氦氣：純度 99.999 %，或以上。
- (十一) 空氣：純度 99.999 %，或以上。

## 五、試劑

- (一) 試劑水：不含待測物之去離子水。
- (二) 甲醇：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (三) 乙腈：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (四) 異丙醇：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (五) 正己烷：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (六) 乙酸乙酯：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (七) 乙醇：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (八) 丙酮：殘量級。
- (九) 二氯甲烷：殘量級。
- (十) 其它有機溶劑：HPLC 級或 LC/MS 級。
- (十一) 氨水：試藥級。

- (十二) 磷酸(85%)：試藥級。
- (十三) 醋酸：試藥級。
- (十四) 醋酸銨：試藥級。
- (十五) 甲酸：試藥級。
- (十六) 甲酸銨：試藥級。
- (十七) 氢氧化鈉：試藥級。
- (十八) 三乙胺：試藥級。
- (十九) 四正丁基硫酸氫銨(Tetrabutylammonium hydrogen sulfate, TBS)：試藥級。
- (二十) 磷酸二氫鈉( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )：試藥級。
- (二十一) 檸檬酸：試藥級。
- (二十二) 儲備標準溶液：依檢測需要稱取約 0.01 g (精稱至 0.1 mg) 之已知純度標準品 (具可追溯濃度證明文件)，溶於丙酮或其他適當溶劑中，於 10 mL 定量瓶中定容至標線，並計算儲備標準溶液之濃度約為 1 mg/mL；將標準溶液儲存於附鐵氟龍墊片旋蓋棕色瓶中，冷藏保存於大於 0 °C 至 6 °C 以下暗處；或使用市售具可追溯濃度證明文件之溶液稀釋配製。
- (二十三) 內標準品儲備標準溶液 (選用)：建議使用鄰苯二甲酸酯類，如鄰苯二甲酸二正丁酯(Di-n-butylphthalate, DBP)、鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(Di-(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP)或其他鄰苯二甲酸酯類化合物。配製方式得依檢測需要稱取約 0.01 g (精稱至 0.1 mg) 之已知純度標準品 (具可追溯濃度證明文件)，溶於丙酮或其他適當溶劑中，於 10 mL 定量瓶中定容至標線，並計算內標準品儲備標準溶液之濃度約為 1 mg/mL；將內標準品標準溶液儲存於附鐵氟龍墊片旋蓋棕色瓶中，冷藏保存於大於 0 °C 至 6 °C 以下暗處；或使用市售具可追溯濃度證明文件之溶液稀釋配製。
- (二十四) 四正丁基硫酸氫銨緩衝液：稱取 1.73 g 之四正丁基硫酸氫銨溶於 900 mL 純水中，加入 8.97 g 之磷酸二氫鈉，攪拌均勻

使之完全溶解，以 10 % 氢氧化鈉水溶液調整 pH 至  $7.5 \pm 0.1$  後定容至 1,000 mL。

(二十五) 磷酸溶液，0.002 M：取 0.461 g 磷酸(85 %)，以試劑水定容至 2,000 mL 或依比例配製。

(二十六) 磷酸溶液，0.0025 M：取 0.576 g 磷酸(85 %)，以試劑水定容至 2,000 mL 或依比例配製。

(二十七) 檸檬酸溶液，0.05 %：取 0.5 g 檸檬酸，以試劑水定容至 1,000 mL 或依比例配製。

## 六、採樣與保存

依環境用藥檢測方法一樣品製備法(NIEA D901.0)採樣及前處理，萃取液應儲存於附鐵氟龍墊片旋蓋棕色瓶中，儲存於大於  $0^{\circ}\text{C}$  至  $6^{\circ}\text{C}$  以下冷藏，並在 40 天內完成分析。

## 七、步驟

(一) 層析儀測定：參考表一選擇適當之層析法

1. 氣相層析儀操作條件如下，可視實驗室情況適當調整：

升溫條件：初始溫度  $150^{\circ}\text{C}$  保持 1 分鐘，隨後以每分鐘  $10^{\circ}\text{C}$  升溫至  $220^{\circ}\text{C}$  保持 3 分鐘，再以每分鐘  $30^{\circ}\text{C}$  升溫至  $250^{\circ}\text{C}$  保持 2 分鐘。總分析時間為 14 分鐘。

注射口溫度： $280^{\circ}\text{C}$ 。

分流比：15:1。

偵測器溫度： $300^{\circ}\text{C}$ 。

載流氣體：氮氣，流率  $2\text{ mL}/\text{min}$ 。

輔助氣體：氮氣，流率  $25\text{ mL}/\text{min}$ 。

偵測器氣體：氮氣，流率  $35\text{ mL}/\text{min}$ ；

空氣，流率  $350\text{ mL}/\text{min}$ 。

注射體積：1.0  $\mu\text{L}$ 。

- 2.以液相層析儀分析之待測物，可參考表二所列之各項條件，惟實際操作時，可視實驗室情況適當調整。

(二) 檢量線製備：

- 1.配製至少五種不同濃度之待測物的標準溶液，於樣品注入儀器前，可添加一定濃度之內標準品；標準溶液的濃度，可配合預期之真實樣品的濃度範圍作適當的調整。
- 2.檢量線製備完成，即應以第二來源標準品配製接近檢量線中點濃度之標準溶液或獨立配製之標準溶液，進行檢量線確認，其分析結果相對誤差值應在  $\pm 10\%$  以內。
- 3.檢量線製備可使用線性迴歸法(Linear regression)、校正因子法(Calibration Factor)或感應因子法(Response Factor)。

(1)線性迴歸法：

$$y = ax + b$$

y：待測物之波峰面積或與內標之相對面積

a：斜率

x：濃度

b：截距

(2)校正因子法：

$$CF = \frac{A_x}{W_x}$$

CF：校正因子

A<sub>x</sub>：檢量線溶液中待測物之波峰面積

W<sub>x</sub>：檢量線溶液中待測物之濃度(mg/mL)

平均校正因子( $\overline{CF}$ )公式為

$$\overline{CF} = \frac{\sum_{i=1}^n CF_i}{n}$$

由上述求得之CF及 $\overline{CF}$ 再算出每一待測物的校正因子標準偏差(SD)及相對標準偏差(RSD %)，其計算如下：

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (CF_i - \overline{CF})^2}{n-1}}$$

$$RSD(\%) = \frac{SD}{\overline{CF}} \times 100$$

(3)感應因子法：

使用各內標準品配製約為接近檢量線中點濃度，一同注入層析儀內，比較待測物和各內標準品的滯留時間，選擇與待測有效成分滯留時間較接近且兩者波峰可完全分離之內標準品作為分析定量之用。

$$RF = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times C_s}$$

RF：感應因子

$A_s$ ：檢量線溶液中待測物之波峰面積

$A_{is}$ ：檢量線溶液中內標準品之波峰面積

$C_s$ ：檢量線溶液中待測物之濃度(mg/mL)

$C_{is}$ ：檢量線溶液中內標準品之濃度(mg/mL)

平均感應因子( $\overline{RF}$ )公式為

$$\overline{RF} = \frac{\sum_{i=1}^n RF_i}{n}$$

由上述求得之 RF 及  $\overline{RF}$  再算出每一待測物的感應因子標準偏差(SD)及相對標準偏差(RSD%)，其計算如下：

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (RF_i - \overline{RF})^2}{n-1}}$$

$$RSD(\%) = \frac{SD}{\overline{RF}} \times 100$$

4. 線性係數(*r*)應大於等於 0.995，感應因子法或校正因子法之相對標準偏差(RSD %)應小於或等於 20 %。

### (三) 樣品分析：

取適量經過前處理之環境用藥樣品，樣品中待測物之濃度宜於檢量線最高濃度之 20 % 至 80 % 間較為適當，若需要添加內標準品儲備溶液，則檢量線標準溶液及樣品中所加入之內標準品溶液的濃度需保持一致；將所得之樣品，以上述建立檢量線相同之層析條件分析，樣品注入體積應與檢量線相同。

## 八、結果處理

### (一) 採用線性迴歸法：

待測物濃度計算公式

$$x = \frac{y - b}{a}$$

x：待測物濃度(mg/mL)

y：樣品中待測物之波峰面積或與內標之相對面積

b：截距

a：斜率

### (二) 採用校正因子法：

待測物濃度計算公式

$$C = \frac{A}{\overline{CF}}$$

C：待測物濃度(mg/mL)

A：樣品中待測物之波峰面積

$\overline{CF}$ ：平均校正因子（面積/濃度）

(三) 採用感應因子法：

待測物濃度計算公式

$$C = \frac{A_x \times C_{is}}{A_{is} \times \overline{RF}}$$

C：待測物濃度(mg/mL)

$A_x$ ：樣品中待測物之波峰面積

$A_{is}$ ：樣品中內標準品之波峰面積

$C_{is}$ ：樣品中內標準品之濃度(mg/mL)

$\overline{RF}$ ：平均感應因子

(四) 環境用藥樣品含量計算公式

1.一般樣品以重量百分比計量者：

$$C_w = \frac{C \times D \times V \times 10^{-3}}{M} \times 100$$

$C_w$ ：樣品濃度(%,w/w)

C：待測物濃度(mg/mL)

D：稀釋因子，若未經稀釋，D=1

V：樣品製備總體積(mL)

M：所取樣品重(g)

2.若樣品為噴霧劑時，修正公式為：

$$C_w = \frac{C \times D \times V \times 10^{-3}}{M} \times f \times 100$$

$$f = \frac{(W_2 - W_0)}{(W_1 - W_0)}$$

C<sub>w</sub>：樣品濃度(%,w/w)

C：待測物濃度(mg/mL)

D：稀釋因子，若未經稀釋，D=1

V：樣品製備總體積(mL)

M：所取樣品重(g)

f：重量校正因子

W<sub>1</sub>：噴霧罐未洩壓前樣品總重

W<sub>2</sub>：噴霧罐洩壓後重量

W<sub>0</sub>：噴霧罐空罐重量

3.樣品為片劑時，修正公式為：

$$C_w = \frac{C \times D \times V}{P}$$

C<sub>w</sub>：樣品濃度 (mg/片 )

C：待測物濃度(mg/mL)

D：稀釋因子，若未經稀釋，D=1

V：樣品製備總體積(mL)

P：所取片數（片）

## 九、品質管制

(一) 檢量線查核：每批次或每 12 小時執行檢量線查核，以接近檢量線中點執行之，完成樣品分析後應再執行檢量線查核，所測得濃度之相對誤差不得超過  $\pm 10\%$ 。

(二) 空白樣品分析：每 10 個或每批樣品至少執行 1 次空白分析，空白分析值應小於檢量線最低點濃度之十分之一。

(三) 重複樣品分析：每 10 個或每批樣品至少執行 1 次重複分析。

## 十、精密度與準確度

略

## 十一、參考資料

環境部，環境用藥禁止含有成分檢測方法-氣相層析質譜法 NIEA D910.03B，中華民國 115 年。

註：本文引用之所有公告方法編號，以環境部最新公告者為準。

表一 環境用藥有效成分建議之層析法

中文名稱	英文名稱	CAS No.	建議層析法*
亞列寧	Allethrin	584-79-2	GC
亞滅寧	Alphacypermethrin	67375-30-8	GC
亞滅松	Azamethiphos	35575-96-3	LC
印棟素	Azadirechtin	11141-17-6	LC
免敵克	Bendiocarb	22781-23-3	LC
畢芬寧	Bifenthrin	99267-18-2	GC
百亞列寧	Bioallethrin	584-79-2	GC
可滅鼠	Brodifacoum	56073-10-0	LC
撲滅鼠	Bromadiolone	28772-56-7	LC
克凡派	Chlorfenapyr	122453-73-0	GC
剋滅鼠	Coumatetralyl	5836-29-3	GC/LC
甲酚	Cresol	108-39-4	GC
賽飛寧	Cyfluthrin	68359-37-5	GC
賽滅寧	Cypermethrin	52315-07-8	GC
賽滅淨	Cyromazine	66215-27-8	GC
賽酚寧	Cyphenothrin	39515-40-7	GC
異亞列寧	d-Allethrin	231937-89-6	GC
敵避	Deet	134-62-3	GC
第滅寧	Deltamethrin	52918-63-5	GC/LC
二氯噻吡嘧啶	Dicloromezotiaz	1263629-39-5	LC

表一 環境用藥有效成分建議之層析法（續）

中文名稱	英文名稱	CAS No.	建議層析法*
雙滅鼠	Difenacoum	56073-07-5	LC
立滅鼠	Difethialone	104653-34-1	LC
二福隆	Diflubenzuron	35367-38-5	LC
1-二甲氨基-2-甲基-2-丙醇	1-Dimethylamino-2-methyl-2-propanol	14123-48-9	LC
達特南 (達特胺)	Dinotefuran	165252-70-0	LC
得伐鼠	Diphacinone	82-66-6	LC
異治滅寧	d-Tetramethrin	548460-64-6	GC
益避寧	Empenthrin	54406-48-3	GC
賜百寧	Esbiothrin	584-79-2	GC
依芬寧	Etofenprox	80844-07-1	GC
撲滅松	Fenitrothion	122-14-5	GC
芬殺松	Fenthion	55-38-9	GC
芬化利	Fenvalerate	51630-58-1	GC
芬普尼	Fipronil	120068-37-3	GC/LC
伏滅鼠	Flocoumafen	90035-08-8	LC
蜚蠊對醣性費洛蒙	Gentisyl quinone isovalerate	849762-24-9	LC
戊二醛**	Glutaraldehyde	111-30-8	LC
六伏隆	Hexaflumuron	86479-06-3	LC
愛美松	Hydramethylnon	67485-29-4	GC/LC

表一 環境用藥有效成分建議之層析法（續）

中文名稱	英文名稱	CAS No.	建議層析法*
益達胺	Imidacloprid	138261-41-3	LC
依普寧	Imiprothrin	72963-72-5	GC
因得克	Indoxacarb	144171-61-9	GC/LC
伊默寧	IR3535	52304-36-6	LC
剋特寧	Kadethrin	58769-20-3	GC
賽洛寧	Lambda-cyhalothrin	91465-08-6	GC
協力克	M.G.K-264	113-48-4	GC
馬拉松	Malathion	121-75-5	GC
苦參鹼	Matrine	519-02-8	LC
納乃得	Methomyl	16752-77-5	LC
美賜平	Methoprene	40596-69-8	GC/LC
美特寧	Metofluthrin	240494-70-6	GC
乃力松	Naled	300-76-5	GC
萘	Naphthalene	91-20-3	GC/LC
諾福隆	Noviflumuron	121451-02-3	LC
鄰-苯甲基對氯酚	o-Benzyl-p-Chlorophenol	120-32-1	GC
鄰-苯基苯酚	o-Phenylphenol	90-43-7	GC
對氯酚	p-Chlorophenol	106-48-9	GC
對-二氯苯	p-Dichlorobenzene	106-46-7	GC
百滅寧	Permethrin	52645-53-1	GC

表一 環境用藥有效成分建議之層析法（續）

中文名稱	英文名稱	CAS No.	建議層析法*
酚丁滅寧	Phenothrin	26002-80-2	GC
派卡瑞丁	Picaridin	119515-38-7	GC
協力精	Piperonyl Butoxide	51-03-6	GC
亞特松	Pirimiphos-Methyl	29232-93-7	GC
普亞列寧	Prallethrin	23031-36-9	GC
安丹	Propoxur	114-26-1	GC/LC
對-第三戊酚	p-ter-Amylphenol	80-46-6	GC
地亞列寧	Pynamin D Forte	8064-25-3	GC
必列寧	Pyrethrins	8003-34-7	GC
必芬松	Pyridaphenthion	119-12-0	GC
百利普芬	Pyriproxyfen	95737-68-1	GC
四級銨鹽類***	Quaternary ammonium salts	121-54-0	GC/LC
列滅寧	Resmethrin	10453-86-8	GC
右亞列寧	S-Bioallethrin	28434-00-6	GC
亞培松	Temephos	3383-96-8	LC
治滅寧	Tetramethrin	7696-12-0	GC
賽速安	Thiamethoxam	153719-23-4	LC
特多寧	Tralomethrin	66841-25-6	LC
拜富寧	Transfluthrin	118712-89-3	GC
三福隆	Triflumuron	64628-44-0	LC

表一 環境用藥有效成分建議之層析法（續）

中文名稱	英文名稱	CAS No.	建議層析法*
維生素 D3	Vitamin D3	67-97-0	LC
殺鼠靈	Warfarin	81-81-2	LC
家蠅費洛蒙	Z-9-Tricosene	27519-02-4	GC
檸檬桉醇	$\rho$ -menthane 3,8-diol	42822-86-6	GC

註：本表未列之環境用藥項目經確認後亦可使用本方法檢測。

\*GC：氣相層析儀，LC：液相層析儀。

\*\* 戊二醛檢測方法參考「醛酮類化合物檢測方法－高效能液相層析法(NIEA R502.1)」。

\*\*\*四級銨鹽類：為多組成混合物，定量時，以波峰面積總和定量。

表二 環境用藥液相層析法建議之分析條件

中文名稱	建議層析 管柱*	移動相**	流量 (mL/min)	偵測波長 (nm)
亞滅松	3	甲醇：水 (85:15)	1.0	254
免敵克	1	甲醇：乙腈：水 (22.5:22.5:55)	2.0	254
第滅寧	1	甲醇：水 (85:15)	1.0	254
二氯噁吡嘧啶	7	乙腈（含 0.1 %, v/v 甲酸）： 0.5 mM 甲酸銨水溶液（含 0.1 %, v/v 甲酸） (20:80 線性變化至 95:5)	0.2	260
雙滅鼠	1	甲醇：水：TBS 緩衝液 (70:28:2)	1.0	254
得伐鼠	1	甲醇：水：TBS 緩衝液 (60:20:20)	1.0	285
愛美松	1	乙腈：異丙醇（含 0.01 %, v/v 氯水） (40:60)	1.0	254
因得克	1	乙腈：水（以磷酸調整 pH 值為 2.5） (80:20)	1.0	275
益達胺	1	乙腈：0.05 % 檸檬酸水溶液 (30:70)	1.0	270
納乃得	1	甲醇：水 (55:45)	1.3	228
美賜平	1	甲醇：水 (85:15)	1.0	254

表二 環境用藥液相層析法建議之分析條件（續）

中文名稱	建議層析 管柱*	移動相**	流量 (mL/min)	偵測波長 (nm)
安丹	1	乙腈：水 (60:40)	1.5	280
特多寧	4	正己烷：乙酸乙酯 (95:5)	1.5	278
亞培松	4	正己烷：乙酸乙酯 (95:5)	1.6	254
可滅鼠	1	甲醇：0.2 %, v/v 醋酸水溶液 (90:10)	1.0 至 1.5	254
撲滅鼠	1	甲醇：1 %, v/v 醋酸水溶液 (80:20)	1.0 至 1.5	254
立滅鼠	1	甲醇：0.002 M 磷酸 (90:10)	2.0	254
伏滅鼠	1	甲醇：0.2 %, v/v 醋酸水溶液 (80:20)	1.0 至 2.0	254
戊二醛	1	乙腈：水 (55:45)	1.0	365
維生素 D3	2	正己烷：乙醇 (99:1)	1.8	254
殺鼠靈	1	甲醇：0.0025 M 磷酸水溶液 (70:30)	1.0	254
賽速安	1	0.1 %, v/v 磷酸水溶液：甲醇 (65:35)	1.2	254
1-二甲氨基-2-甲基-2-丙醇	5	乙腈（含 0.1 %, v/v 醋酸銨）： 0.1 %, v/v 醋酸銨水溶液 (85:15)	0.4	254

表二 環境用藥液相層析法建議之分析條件（續）

中文名稱	建議層析 管柱*	移動相**	流量 (mL/min)	偵測波長 (nm)
蜚蠊對醣性費洛蒙	1	甲醇：0.1 %, v/v 醋酸水溶液 (85:15)	1	256
荼	1	甲醇：水 (80:20)	1	254
剋滅鼠	1	甲醇：1 %, v/v 醋酸水溶液 (80:20)	1	254
芬普尼	1	甲醇：乙腈：水 (40:30:30)	1	220
二福隆	1	乙腈：水：異丙醇 (75:20:5)	1	254
六伏隆	1	(1) 甲醇：水(50:50) (2) 乙腈：水(65:35)	0.5 至 1.0	(1) 230 (2) 254
伊默寧	1	乙腈：水 (40:60)	1	220
苦參鹼	7	甲醇：水：三乙胺 (45:55:0.02)	0.8	220
諾福隆	1	甲醇：0.1 %, v/v 甲酸水溶液： 乙腈 (5:37:58)	1	254
三福隆	6	水：乙腈 (15:85)	0.25	254
達特南 (達特胺)	1	甲醇：0.1 %, v/v 甲酸 (95:5)	0.5	270
印楝素	1	乙腈：水 (60:40)	1	215

\*參見四、設備與材料中所列液相層析管柱編號。

\*\*移動相溶劑組成比例皆為體積比。

## 環境檢測標準方法修正對照表

方法名稱：環境用藥檢測方法—層析法(NIEA D902.0cB)草案

修正內容	現行內容	說明
<p><b>一、方法概要</b></p> <p>環境用藥樣品參照<u>環境用藥檢測方法—樣品製備法(NIEA D901.0)</u>(註)，經適當前處理方式進行萃取或稀釋後，以氣相層析儀<u>火離子化偵測器(Gas chromatograph flame ionization detector, GCFID)</u>或液相層析儀／紫外光-可見光<u>偵測器(Liquid chromatograph / ultraviolet - visible detector, LC/UV-Vis)</u>或液相層析儀／光電二極體陣列<u>偵測器(Liquid chromatograph / photo diode array, LC/PDA)</u>，檢測樣品中待測物的含量。</p>	<p><b>一、方法概要</b></p> <p>環境用藥樣品經適當前處理方式進行萃取或稀釋後，以氣相層析儀<u>火離子化偵測器(Gas chromatograph flame ionization detector, GCFID)</u>或液相層析儀<u>紫外光 偵測器(Liquid chromatograph ultraviolet detector, LCUV)</u>，檢測樣品中待測物的含量。</p>	1.修正文字格式與描述。 2.增加 <u>液相層析儀／光電二極體陣列</u> 偵測器。
<p><b>三、干擾</b></p> <p>(一) 於分析高濃度樣品後緊接著分析低濃度樣品時，可能會造成殘留污染干擾，因此在前後樣品分析之間可以溶劑清洗系統。必要時可於分析高濃度樣品後，注射一針或數針溶劑加以分析，確定無殘留污染的狀況後再繼續分析。</p> <p>(二) 實驗室中常用的塑膠製品易造成鄰苯二甲酸酯的污染。因鄰苯二甲酸酯常被用做可塑劑，且極易自塑膠物質中被萃取出來，檢測過程中應盡量避免使用塑膠製品。</p> <p>(三) 對以液相層析儀紫外光-可見光<u>偵測器分析法無法完全鑑別之化合物，必要時得以光電二極體陣列</u>偵測器再鑑別之。</p> <p>(四) 對以氣相層析儀或液相層析儀無法完全分離及鑑</p>	<p><b>三、干擾</b></p> <p>(一) 當低濃度樣品緊接在高濃度樣品之後分析時，可能會有整個系統污染的現象發生，在高濃度樣品分析完成後，必須以溶劑清洗乾淨，必要時注入分析空白溶劑，可以確認並無殘留污染的情況。</p> <p>(二) 對以氣相層析儀<u>火離子化偵測器</u>或液相層析儀</p>	1.修正文字格式與描述。 2.新增描述關於塑膠器皿可能造成的干擾。

修正內容	現行內容	說明
別之化合物，必要時得以層析質譜儀再鑑別之。	紫外光偵測器分析法無法完全分離之化合物，必要時以層析質譜儀再鑑別之。	
<p><b>四、設備與材料</b></p> <p>(一) 氣相層析儀<u>火焰離子化</u>偵測器：</p> <p>1. 氣相層析儀：<u>具升溫程式系統、進樣分流裝置及數據處理程式。</u></p> <p>2. 氣相層析管柱（可視實際需求適當調整）：</p> <p>(1) <u>Agilent J&amp;W DB-1 或 DB-5</u>，長 <u>30 m × 內徑 0.32 mm</u>，膜厚 <u>0.25 μm</u> 毛細管柱，或同級品。</p> <p>(2) 其他可有效分離待測物之<u>氣相層析管柱</u>。</p> <p>3. <u>火焰離子化</u>偵測器。</p> <p>(二) 液相層析儀<u>紫外光-可見光</u>偵測器或<u>光電二極體陣列</u>偵測器：</p> <p>1. 液相層析儀：具備<u>高壓幫浦、進樣系統、層析管柱及數據處理程式</u>。</p> <p>2. 液相層析管柱（可視實際需求適當調整）：</p> <p>(1) <u>Lichrospher RP-18</u>，<u>5 μm</u>（粒徑）<u>250 mm</u>（長）×<u>4.6 mm</u>（內徑），或同級品。</p> <p>(2) <u>ABI Spheri-5</u>，<u>Amino</u>，<u>5 μm</u>（粒徑）<u>220 mm</u>（長）×<u>4.6 mm</u>（內徑），或同級品。</p> <p>(3) <u>Lichrosorb CN</u>，<u>5 μm</u>（粒徑）<u>250 mm</u>（長）×<u>4 mm</u>（內徑），或同級品。</p> <p>(4) <u>Lichrosorb Si</u>，<u>7 μm</u>（粒徑）<u>250 mm</u>（長）×<u>4 mm</u>（內徑），或同級品。</p> <p>(5) <u>XBridge HILIC</u>，<u>3.5 μm</u>（粒徑）<u>100 mm</u>（長）×<u>2.1 mm</u>（內徑），或</p>	<p><b>四、設備與材料</b></p> <p>(一) 氣相層析儀<u>火燄離子化</u>偵測器</p> <p>1. 氣相層析儀：<u>可控溫及具有微調流量控制器。</u></p> <p>2. 層析管柱：<u>可使用下列管柱：</u></p> <p>(1)DB-1，長 <u>30 m × 內徑 0.32 mm</u>，膜厚 <u>0.25 μm</u>，或同級品。</p> <p>(2)DB-5，長 <u>30 m × 內徑 0.25 mm</u>，膜厚 <u>0.25 μm</u>，或同級品。</p> <p>(3)其他可有效分離待測物之層析管柱。</p> <p>3. <u>火燄離子化</u>偵測器</p> <p>(二) 液相層析儀<u>紫外光</u>偵測器</p>	<p>1.修正文字格式與描述。</p> <p>2.配合方法內容新增可能使用設備。</p> <p>3.增加<u>液相層析儀／光電二極體陣列</u>偵測器。</p>

修正內容	現行內容	說明
<p>同級品。</p> <p>(6)Phenomenex，Gemini C18，3 μm（粒徑）100 mm（長）×2 mm（內徑），或同級品。</p> <p>(7)XBridge C18，3.5 μm（粒徑）100 mm（長）×2.1 mm（內徑），或同級品。</p> <p>(8)<u>其他可有效分離待測物之液相層析管柱。</u></p> <p>3.紫外光-可見光偵測器。</p> <p>4.<u>光電二極體陣列偵測器</u>。</p> <p>(三)分析天平：可精稱至0.1 mg。</p> <p>(四)定量瓶：適當體積，棕色硼矽玻璃材質，附磨砂瓶塞。</p> <p>(五)溶液保存瓶：適當體積，棕色硼矽玻璃材質，附螺旋瓶蓋，瓶蓋內襯為鐵氟龍墊片。</p> <p>(六)pH測定儀：具自動或手動溫度補償功能，可讀位數至0.1。</p> <p>(七)微量移液管：10 μL、25 μL、50 μL、100 μL、250 μL、1,000 μL或其他體積。</p> <p>(八)氮氣：純度99.999%，或以上。</p> <p>(九)氬氣：純度99.999%，或以上。</p> <p>(十)氦氣：純度99.999%，或以上。</p> <p>(十一)空氣：純度99.999%，或以上。</p>	<p>(6)Phenomenex，Gemini C18，3 μm（粒徑）100 mm（長）×2 mm（內徑），或同級品。</p> <p>(7)XBridge C18，3.5 μm（粒徑）100 mm（長）×2.1 mm（內徑），或同級品。</p> <p>(8)<u>其他適合分離之管柱。</u></p> <p>2.梯度泵送系統：移動相及流量參考如表二。</p> <p>3.過濾裝置：用以過濾移動相溶劑。</p> <p>4.除氣裝置：用以排除溶劑中之氣體用。</p> <p>5.紫外光偵測器。</p> <p>(三)天平：可精稱至0.1 mg。</p> <p>(四)定量瓶：適當體積，硼矽玻璃材質，<u>棕色瓶</u>，附磨砂瓶塞。</p> <p>(五)微量<u>注射器</u>或自動<u>注射器</u>。</p>	
<p>五、試劑</p> <p>(一)試劑水：不含待測物之去離子水。</p> <p>(二)甲醇：HPLC級或</p>	<p>五、試劑</p> <p>(一)試劑水：不含待測物之去離子水或符合前述規格之市售純水。</p> <p>(二)甲醇、乙腈、異丙醇</p>	<p>1.修正文字格式與描述。</p> <p>2.配合方法內容新增可能使用之試劑。</p>

修正內容	現行內容	說明
<p><u>LC/MS 級。</u></p> <p>(三) <u>乙腈：HPLC 級或 LC/MS 級。</u></p> <p>(四) <u>異丙醇：HPLC 級或 LC/MS 級。</u></p> <p>(五) <u>正己烷：HPLC 級或 LC/MS 級。</u></p> <p>(六) <u>乙酸乙酯：HPLC 級或 LC/MS 級。</u></p> <p>(七) <u>乙醇：HPLC 級或 LC/MS 級。</u></p> <p>(八) <u>丙酮：殘量級。</u></p> <p>(九) <u>二氯甲烷：殘量級。</u></p> <p>(十) <u>其它有機溶劑：HPLC 級或 LC/MS 級。</u></p> <p>(十一) <u>氨水：試藥級。</u></p> <p>(十二) <u>磷酸(85%)：試藥級。</u></p> <p>(十三) <u>醋酸：試藥級。</u></p> <p>(十四) <u>醋酸銨：試藥級。</u></p> <p>(十五) <u>甲酸：試藥級。</u></p> <p>(十六) <u>甲酸銨：試藥級。</u></p> <p>(十七) <u>氫氧化鈉：試藥級。</u></p> <p>(十八) <u>三乙胺：試藥級。</u></p> <p>(十九) <u>四正丁基硫酸氫銨 (Tetrabutylammonium hydrogen sulfate, TBS)：試藥級。</u></p> <p>(二十) <u>磷酸二氫鈉 (<math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>)：試藥級。</u></p> <p>(二十一) <u>檸檬酸：試藥級。</u></p> <p>(二十二) <u>儲備標準溶液：依檢測需要稱取約 0.01 g (精稱至 0.1 mg) 之已知純度標準品 (具可追溯濃度證明文件)，溶於丙酮或其他適當溶劑中，於 10 mL 定量瓶中定容至標線，並計算儲備標準溶液之濃度約為 1 mg/mL；將標準溶液儲存於附鐵氟龍墊片旋蓋棕色瓶中，冷藏保存於大於 0 °C 至 6 °C 以下暗處；或使用市售具可追溯濃度證明文件之溶液稀釋配製。</u></p>	<p>、正己烷、乙酸乙酯、乙醇 ：LC級或LC以上。</p> <p>(三) <u>丙酮、二氯甲烷及其它溶劑：殘量級。</u></p> <p>(四) <u>氨水、磷酸、冰醋酸、醋酸、醋酸銨、甲酸、氫氧化鈉、三乙胺：試藥級。</u></p> <p>(五) <u>待測物儲備標準溶液：依檢測需要稱量約為 0.01 g (精稱至 0.1 mg) 之已知純度待測物標準品，溶於丙酮或其他適當溶劑中，於 10 mL 定量瓶中稀釋至標線，並計算儲備標準溶液之濃度約為 1 mg/mL；將標準溶液儲存於鐵氟龍密封的容器內，保存於4°C ± 2°C，暗處；或使用市售標準品。</u></p>	

修正內容	現行內容	說明
(二十三) 內標準品儲備標準溶液(選用)：建議使用鄰苯二甲酸酯類，如鄰苯二甲酸二正丁酯(Di-n-butylphthalate, DBP)、鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(Di-(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP)或其他鄰苯二甲酸酯類化合物。配製方式得依檢測需要稱取約 0.01 g (精稱至 0.1 mg) 之已知純度標準品(具可追溯濃度證明文件)，溶於丙酮或其他適當溶劑中，於 10 mL 定量瓶中定容至標線，並計算內標準品儲備標準溶液之濃度約為 1 mg/mL；將內標準品標準溶液儲存於附鐵氟龍墊片旋蓋棕色瓶中，冷藏保存於大於 0 °C 至 6 °C 以下暗處；或使用市售具可追溯濃度證明文件之溶液稀釋配製。	(六) 內標準品儲備溶液：建議使用鄰苯二甲酸酯類，如鄰苯二甲酸二正丁酯(Di-n-butylphthalate, DBP)、鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(Di-(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP)或其他鄰苯二甲酸酯類化合物。	
(二十四) 四正丁基硫酸氫銨緩衝液：稱取 1.73 g 之四正丁基硫酸氫銨溶於 900 mL 純水中，加入 8.97 g 之磷酸二氫鈉，攪拌均勻使之完全溶解，以 10 % 氢氧化鈉水溶液調整 pH 至 7.5 ± 0.1 後定容至 1,000 mL。	(七) 四正丁基硫酸氫銨緩衝液(Tetrabutylammonium hydrogen sulfate, TBS)：稱取 1.73 g 之四正丁基硫酸氫銨溶於 900 mL 純水中，加入 8.97 g 之磷酸二氫鈉( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )，攪拌均勻使之完全溶解，以 10 % 氢氧化鈉(NaOH)水溶液調 pH 至 7.5 後定容至 1000 mL。	
(二十五) 磷酸溶液，0.002 M：取 0.461 g 磷酸(85 %)，以試劑水定容至 2,000 mL 或依比例配製。	(八) 磷酸溶液，0.002 M：取 0.461 g 磷酸(85 %)，以試劑水定容至 2000 mL 或依比例配製。	
(二十六) 磷酸溶液，0.0025 M：取 0.576 g 磷酸(85 %)，以試劑水定容至 2,000 mL 或依比例配製。	(九) 磷酸溶液，0.0025 M：取 0.576 g 磷酸(85 %)，以試劑水定容至 2000 mL 或依比例配製。	
(二十七) 檸檬酸溶液，0.05 %：取 0.5 g 檸檬酸，以試劑水定容至 1,000 mL 或依比例配製。	(十) 檸檬酸溶液，0.05 %：取 0.5 g 試藥級之檸檬酸，以試劑水定容至 1 L 或依比例配製。	
	(十一) 氣氣：純度 99.999	

修正內容	現行內容	說明
	<p><u>% 以上</u>  <u>(十二) 空氣及氬氣。</u></p>	
<p><b>六、採樣與保存</b>  <u>依環境用藥檢測方法一樣品製備法(NIEA D901.0)</u>採樣及前處理，萃取液應儲存於附鐵氟龍墊片旋蓋棕色瓶中，儲存於大於 <u>0 °C</u> 至 <u>6 °C</u> 以下冷藏，並在 40 天內完成分析。</p>	<p><b>六、採樣與保存</b>  <u>依NIEA D901採樣及前處理</u>，<u>萃取液應以瓶蓋附有鐵氟龍內襯之棕色玻璃瓶密封後</u>，<u>保存於 6 °C 以下冷藏</u>，並在 40 天內完成分析。</p>	修正文字格式與描述。
<p><b>七、步驟</b></p> <p><b>(一) 層析儀測定：</b><u>參考表一選擇適當之層析法</u></p> <p>1. 氣相層析儀操作條件如下，可視<u>實驗室情況適當調整</u>：  <u>升溫條件：初始溫度 150 °C 保持 1 分鐘，隨後以每分鐘 10 °C 升溫至 220 °C 保持 3 分鐘，再以每分鐘 30 °C 升溫至 250 °C 保持 2 分鐘。總分析時間為 14 分鐘。</u>  <u>注射口溫度：280 °C。</u>  <u>分流比：15:1。</u>  <u>偵測器溫度：300 °C。</u>  <u>載流氣體：氮氣，流率 2 mL/min。</u>  <u>輔助氣體：氮氣，流率 25 mL/min。</u>  <u>偵測器氣體：氮氣，流率 35 mL/min；空氣，流率 350 mL/min。</u>  <u>注射體積：1.0 μL。</u></p> <p>2. 以液相層析儀分析之待測物，可參考表二所列之各項條件，惟實際操作時，可視<u>實驗室情況適當調整</u>。</p> <p><b>(二) 檢量線製備：</b></p> <p>1. 配製至少五種不同濃度</p>	<p><b>七、步驟</b>  <u>經NIEA D901前處理後接續步驟</u></p> <p><b>(一) 層析儀測定：</b><u>依表一選擇適當之層析法</u></p> <p>1. 氣相層析儀操作條件如下，<u>亦可視實際需要適當調整</u>：  <u>升溫條件：初始溫度 160°C 保持2分鐘，隨後以每分鐘 10°C 升溫至 220°C 保持3分鐘，再以每分鐘 30°C 升溫至 240°C 保持3分鐘。</u></p> <p><u>注射口溫度：280 °C。</u></p> <p><u>偵測器溫度：300 °C。</u>  <u>載流氣體：氮氣，流量 6 mL/min。</u>  <u>輔助氣體：氮氣，流量 45 mL/min。</u>  <u>偵測器氣體：氮氣，流量 40 mL/min；空氣，流量 350 mL/min。</u>  <u>注射體積：1.0 μL 至 2.0 μL。</u></p> <p>2. 以液相層析儀分析之待測物，可參考表二所列之各項條件，惟實際操作時，可視<u>實驗室情況做適當之調整</u>。</p> <p><b>(二) 檢量線製備：</b>  <u>依NIEA D901執行前處理後配製。</u></p> <p>1. 配製至少五種不同濃度</p>	<p>1. 修正文字格式與描述。  2. 小幅修正氣相層析條件。</p>

修正內容	現行內容	說明
<p>之待測物的標準溶液，於樣品注入儀器前，可<u>添加</u>一定濃度之內標準品；標準溶液的濃度，可配合預期之真實樣品的濃度範圍作適當的調整。</p> <p>2. 檢量線製備完成，即應以第二來源標準品配製接近檢量線中點濃度之標準溶液或獨立配製之標準溶液，進行<u>檢量線</u>確認，其分析結果相對誤差值應在 <math>\pm 10\%</math> 以內。</p> <p>3. 檢量線製備可使用線性迴歸法(Linear regression)、校正因子法(Calibration Factor)或感應因子法(Response Factor)。</p> <p>(1) 線性迴歸法：</p> $y = ax + b$ <p>y : 待測物之波峰面積或與內標之相對面積 a : 斜率 x : 濃度 b : 截距</p> <p>(2) 校正因子法：</p> $CF = \frac{A_x}{W_x}$ <p>CF : 校正因子 <math>A_x</math> : 檢量線溶液中待測物之波峰面積 <math>W_x</math> : 檢量線溶液中待測物之濃度(mg/mL)</p> <p>平均校正因子(<math>\bar{CF}</math>)公式為</p> $\bar{CF} = \frac{\sum_{i=1}^n CF_i}{n}$ <p>由上述求得之CF及<math>\bar{CF}</math>再算出每一待測物的校正因子標準偏差(SD)及相對標準偏差(RSD %)，其計算如下：</p>	<p>之待測物的標準溶液，於樣品注入儀器前，可<u>加入</u>一定濃度之內標準品；標準溶液的濃度，可配合預期之真實樣品的濃度範圍作適當的調整。</p> <p>2. 檢量線製備完成，即應以第二來源標準品配製接近檢量線中點濃度之標準溶液或獨立配製之標準溶液，進行<u>分析</u>確認，其分析結果相對誤差值應在 <math>\pm 10\%</math> 以內。</p> <p>3. 檢量線製備可使用線性迴歸法、校正因子(Calibration Factor, CF)或感應因子(Response Factor, RF)。</p> <p>(1) 線性迴歸法 (Linear regression) :</p> $y = ax + b$ <p>其中 y : 訊號面積 a : 斜率 x : 濃度 b : 截距</p> <p>(2) 校正因子法 (Calibration Factor, CF) :</p> $CF = \frac{A_x}{W_x}$ <p>其中 <math>A_x</math> : 檢量線溶液中待測物之波峰面積。 <math>W_x</math> : 檢量線溶液注入儀器之待測物重量 (<math>\mu g</math>)。</p> <p>平均校正因子公式為</p> $\bar{CF} = \frac{\sum_{i=1}^n CF_i}{n}$ <p>由上述求得之CF及<math>\bar{CF}</math>再算出每一待測物的校正因子標準偏差(SD)及相對標準偏差(RSD %)，其計算如下：</p>	

修正內容	現行內容	說明
<p style="text-align: center;"> <math display="block">SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (CF_i - \bar{CF})^2}{n-1}}</math> <math display="block">RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{CF}} \times 100</math> </p> <p>(3)感應因子法：</p> <p>使用各內標準品配製約為接近檢量線中點濃度，一同注入層析儀內，比較待測物和各內標準品的滯留時間，選擇與待測有效成分滯留時間較接近且兩者波峰可完全分離之內標準品作為分析定量之用。</p> <p style="text-align: center;"> <math display="block">RF = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times C_s}</math> </p> <p><u>RF：感應因子</u></p> <p><math>A_s</math>：檢量線溶液中待測物之波峰面積</p> <p><math>A_{is}</math>：檢量線溶液中內標準品之波峰面積</p> <p><math>C_s</math>：檢量線溶液中待測物之濃度(mg/mL)</p> <p><math>C_{is}</math>：檢量線溶液中內標準品之濃度(mg/mL)</p> <p>平均感應因子(RF)公式為</p> $\bar{RF} = \frac{\sum_{i=1}^n RF_i}{n}$ <p>由上述求得之 RF 及 <math>\bar{RF}</math> 再算出每一待測物的感應因子標準偏差(SD)及相對標準偏差(RSD%)，其計算如下：</p> $SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (RF_i - \bar{RF})^2}{n-1}}$ $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{RF}} \times 100$ <p>4.線性係數(r)應大於等於0.995，感應因子法或校正因子法之相對標準偏差</p>	<p style="text-align: center;"> <math display="block">SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (CF_i - \bar{CF})^2}{n-1}}</math> <math display="block">RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{CF}} \times 100</math> </p> <p>(3)感應因子法 (<u>Response Factor, RF</u>)：</p> <p>使用各內標準品儲備溶液約為 0.25 mg/mL 至約為 0.5 mg/mL，在同一分析條件下，分別注入層析儀內，比較待測物和各內標準品的滯留時間，選擇與待測有效成分滯留時間較接近且兩者波峰可完全分離之內標準品作為分析定量之用。</p> <p style="text-align: center;"> <math display="block">RF = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times C_s}</math> </p> <p><u>其中</u></p> <p><math>A_s</math>：檢量線溶液中待測物之波峰面積。</p> <p><math>A_{is}</math>：檢量線溶液中內標準品之波峰面積。</p> <p><math>C_s</math>：檢量線溶液中待測物之濃度 (mg/mL)。</p> <p><math>C_{is}</math>：檢量線溶液中內標準品之濃度 (mg/mL)。</p> <p>平均感應因子公式為</p> $\bar{RF} = \frac{\sum_{i=1}^n RF_i}{n}$ <p>由上述求得之 RF 及 <math>\bar{RF}</math> 再算出每一待測物的感應因子標準偏差 (SD) 及相對標準偏差 (RSD%)，其計算如下：</p> $SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (RF_i - \bar{RF})^2}{n-1}}$ $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{RF}} \times 100$ <p>4.線性係數(r)應大於等於0.995，感應因子或校正因子之相對標準偏差(RSD)</p>	

修正內容	現行內容	說明
(RSD %)應小於或等於 20 %。	<p>%)應小於或等於 20 %。</p> <p>5.<u>完成初始檢量線後，另以標準溶液查核初始檢量線的續用性，校正查核程序為分析初始檢量線中間濃度的標準品，將此單個標準品之計算所得的濃度與配製濃度作比較，若其相對誤差值落在 ±10 % 以內，則初始檢量線仍然有效，否則應重新製作檢量線。</u></p> <p>6.<u>下列公式計算相對誤差值：</u></p> $\text{相對誤差值} (\%) = \frac{\text{計算所得濃度} - \text{配置濃度}}{\text{配置濃度}} \times 100 (\%)$ <p>(三) 樣品分析： 取適量經過前處理之環境用藥樣品，樣品中待測物之濃度宜於檢量線最高濃度之 20 % 至 80 % 間較為適當，若需要添加內標準品儲備溶液，則檢量線標準溶液及樣品中所加入之內標準品溶液的濃度需保持一致；將所得之樣品，以上述建立檢量線相同之層析條件分析，樣品注入體積應與檢量線相同。</p>	
八、結果處理  (一) 採用線性迴歸法： 待測物濃度計算公式 $x = \frac{y - b}{a}$  x：待測物濃度(mg/mL) y：樣品中待測物之波峰面積或與內標之相對面積 b：截距 a：斜率  (二) 採用校正因子法： 待測物濃度計算公式 $C = \frac{A}{CF}$  C：待測物濃度(mg/mL) A：樣品中待測物之波峰面積。	<p>八、結果處理 <u>依NIEA D901執行前處理後</u></p> <p>(一) 採用線性迴歸法： 待測物濃度計算公式 <math display="block">x = \frac{y - b}{a}</math> 其中 x：待測物濃度 y：待測物波峰面積 b：截距 a：斜率  (二) 採用校正因子法： 待測物濃度計算公式 <math display="block">C(\text{mg/mL}) = \frac{A}{V_i \times CF}</math> 其中 A：樣品中待測物之波峰面積。</p>	修正文字格式與描述。

修正內容	現行內容	說明
<p>積  <math>\overline{CF}</math>：平均校正因子（面積/濃度）</p> <p>(三) 採用感應因子法：  待測物濃度計算公式</p> $C = \frac{A_x \times C_{is}}{A_{is} \times \overline{RF}}$ <p><u>C</u>：待測物濃度(mg/mL)</p> <p><u>A<sub>x</sub></u>：樣品中待測物之波峰面積</p> <p><u>A<sub>is</sub></u>：樣品中內標準品之波峰面積</p> <p><u>C<sub>is</sub></u>：樣品中內標準品之濃度(mg/mL)</p> <p><u>RF</u>：平均感應因子</p> <p>(四) 環境用藥樣品含量計算公式</p> <p>1.一般樣品以重量百分比計量者：</p> $C_w = \frac{C \times D \times V \times 10^{-3}}{M} \times 100$ <p><u>C<sub>w</sub></u>：樣品濃度(%w/w)</p> <p><u>C</u>：待測物濃度(mg/mL)</p> <p><u>D</u>：稀釋因子，若未經稀釋，D=1</p> <p><u>V</u>：樣品製備總體積(mL)</p> <p><u>M</u>：所取樣品重(g)</p> <p>2.若樣品為噴霧劑時，修正公式為：</p> $C_w = \frac{C \times D \times V \times 10^{-3}}{M} \times f \times 100$ $f = \frac{(W_2 - W_0)}{(W_1 - W_0)}$ <p><u>C<sub>w</sub></u>：樣品濃度(%w/w)</p> <p><u>C</u>：待測物濃度(mg/mL)</p> <p><u>D</u>：稀釋因子，若未經稀釋，D=1</p> <p><u>V</u>：樣品製備總體積(mL)</p> <p><u>M</u>：所取樣品重(g)</p> <p><u>f</u>：重量校正因子</p> <p><u>W<sub>1</sub></u>：噴霧罐未洩壓前樣品總重。</p>	<p><u>V<sub>i</sub></u>：注入儀器之萃取液體積(μL)</p> <p><u>CF</u>：平均校正因子（面積/<u>μg</u>）。</p> <p>(三) 採用感應因子法：  待測物濃度計算公式</p> $C (\text{mg/mL}) = \frac{A_x \times C_{is}}{A_{is} \times \overline{RF}}$ <p>其中</p> <p><u>A<sub>x</sub></u>：樣品中待測物之波峰面積。</p> <p><u>A<sub>is</sub></u>：樣品中內標準品之波峰面積。</p> <p><u>C<sub>is</sub></u>：樣品中內標準品之濃度(mg/mL)。</p> <p><u>RF</u>：平均感應因子。</p> <p>(四) 環境用藥樣品含量計算公式</p> <p>1.一般樣品以重量百分比計量者：</p> $\text{待測物} (\%, \text{ w/w}) = \frac{C \times D \times V \times 10^{-3}}{M} \times 100$ <p>其中</p> <p><u>C</u>：待測物之濃度 (mg/mL)。</p> <p><u>D</u>：稀釋因子，若樣品或萃液在分析前稀釋。若未經稀釋，D=1。</p> <p><u>V</u>：樣品製備總體積 (mL)。</p> <p><u>M</u>：所取樣品重 (g)。</p> <p>2.若樣品為噴霧劑時，修正公式為：</p> $\text{待測物} (\%, \text{ w/w}) = \frac{C \times D \times V \times 10^{-3}}{M} \times f \times 100$ <p>其中</p> <p><u>f</u>：重量校正因子 (<u>f</u>) = <math>(W_2 - W_0) / (W_1 - W_0)</math></p> <p><u>D</u>：稀釋因子，若樣品或萃液在分析前稀釋。若未經稀釋，D=1。稀釋因子沒有單位。</p> <p><u>W<sub>1</sub></u>：噴霧罐未洩壓前樣品總重。</p>	

修正內容	現行內容	說明
<p>總重  <math>W_2</math>：噴霧罐洩壓後重量  <math>W_0</math>：噴霧罐空罐重量</p> <p>3. 樣品為片劑時，修正公式為：</p> $C_w = \frac{C \times D \times V}{P}$ <p><u><math>C_w</math>：樣品濃度 (mg/片)</u>  <u><math>C</math>：待測物濃度(mg/mL)</u>  <u><math>D</math>：稀釋因子，若未經稀釋，<math>D=1</math></u>  <u><math>V</math>：樣品製備總體積(mL)</u>  <u><math>P</math>：所取片數(片)</u></p>	<p><u><math>W_2</math>：噴霧罐洩壓後重量。</u>  <u><math>W_0</math>：噴霧罐空罐重量。</u>  <u>記錄此校正因子，計算樣品含量時使用。</u></p> <p>3. 樣品為片劑時，修正公式為：</p> $\text{待測物(mg/片)} = \frac{C \times D \times V}{P}$ <p><u>其中</u>  <u><math>C</math>：待測物之濃度(mg/mL)</u>  <u><math>D</math>：稀釋因子，若樣品或萃液在分析前稀釋。若未經稀釋，<math>D=1</math>。稀釋因子沒有單位。</u>  <u><math>V</math>：樣品製備總體積(mL)</u>  <u>片：所取片數。</u></p>	
<p>九、品質管制</p> <p>(一) 檢量線查核：每批次或每 12 小時執行檢量線查核，以接近檢量線中點執行之，完成樣品分析後應再執行檢量線查核，所測得濃度之相對誤差不得超過 <math>\pm 10\%</math>。</p> <p>(二) 空白樣品分析：每 10 個或每批樣品至少執行 1 次空白分析，空白分析值應小於檢量線最低點濃度之十分之一。</p> <p>(三) 重複樣品分析：每 10 個或每批樣品至少執行 1 次重複分析。</p>	<p>九、品質管制</p> <p>(一) 空白樣品分析：每 10 個或每批樣品至少執行 1 次空白分析，空白分析值應小於檢量線最低點濃度之十分之一。</p> <p>(二) 重複樣品分析：每 10 個或每批樣品至少執行 1 次重複分析。</p>	修正文字格式與描述。
十、精密度與準確度略	十、精密度與準確度略。	修正文字格式與描述。
<p>十一、參考資料</p> <p>環境部，環境用藥禁止含有成分檢測方法-氣相層析質譜法 NIEA D910.03B，中華民國 115 年。</p>	<p>十一、參考資料</p> <p>(一) 行政院環境保護署，  <u>醛酮類化合物檢測方法—高效能液相層析法 NIEA R502.11C</u>，中華民國 91 年。</p> <p>(二) 行政院環境保護署，  <u>環境用藥檢測方法—樣品製備法 NIEA D901.02B</u>，中華民國 108 年。</p> <p>(三) 行政院環境保護署，  <u>環境用藥禁止含有成分檢測方法-氣相層析質譜法 NIEA</u></p>	修正文字格式與描述。

修正內容	現行內容	說明
	D910.02B，中華民國 104 年。	
註： 本文引用之 <u>所有</u> 公告方法編號，以 <u>環境部</u> 最新公告者為準。	註1： 本文引用之公告方法名稱及編號，以 <u>環保署</u> 最新公告者為準。	修正文字格式與描述。
	註2：本檢測方法產生之廢液為含有機溶劑廢液，盛裝標準品之針劑瓶及上機分析後之樣品瓶，檢驗室應依相關規定妥善儲存、處理。	刪除文字
表一 環境用藥有效成分建議之層析法 (表省略) <u>註：本表未列之環境用藥項目經確認後亦可使用本方法檢測。</u> ** 戊二醛檢測方法參考「醛酮類化合物檢測方法—高效能液相層析法 (NIEA R502_1)」。	表一、環境用藥有效成分適用之建議層析法 (表省略)  ** 戊二醛檢測方法參考「醛酮類化合物檢測方法—高效能液相層析法 (NIEA R502_1)」。	1.修正文字格式與描述、調整順序。 2.刪除陶斯松。 3.新增二氯噻毗嘧啶。
表二 環境用藥液相層析法建議之分析條件 (表省略) <u>**移動相溶劑組成比例皆為體積比。</u>	表二、環境用藥液相層析法建議條件 (表省略)	1.修正文字格式與描述、調整順序。 2.新增二氯噻毗嘧啶層析條件。