

食品中動物用藥殘留量檢驗方法— β -內醯胺類抗生素之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods—

Test of β -lactam antibiotics

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品肌肉及乳品中安比西林(ampicillin)、安默西林(amoxicillin)、頭孢氨苄(cefalexin)、西華比林(cefapirin)、苜青黴素(benzylpenicillin)、氯噁唑西林(cloxacillin)、苜唑青黴素(oxacillin)及頭孢呋辛(cefuroxime)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：Phenomenex Synergi Polar-RP, 4 μm , 內徑 2.0 mm \times 25 cm, 80 \AA , 或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達 3000 \times g 以上者。
 - 2.1.3. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.4. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.5. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：甲酸、甲醇及乙腈均採用液相層析級；氫氧化鈉及磷酸二氫鈉均採用試藥特級；安比西林、安默西林、頭孢氨苄、西華比林、苜青黴素、氯噁唑西林、苜唑青黴素及頭孢呋辛對照用標準品；配尼西林 V (penicillin V) 內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL、50 mL 及 500 mL。
 - 2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Oasis HLB, 6 mL, 500 mg, 或同級品。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑 0.22 μm , PVDF 材質。
 - 2.3.4. 離心管：50 mL, PP 材質。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 50%乙腈溶液：

取乙腈50 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.2. 5N氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉 20 g，以去離子水溶解使成 100 mL。

2.4.3. 0.2N氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉 0.8 g，以去離子水溶解使成 100 mL。

2.4.4. 0.05M磷酸緩衝溶液：

稱取磷酸二氫鈉6.9 g，溶於去離子水700 mL，以5N氫氧化鈉溶液調整pH值至8.5，再加去離子水使成1000 mL。

2.5. 移動相溶液之配製：

2.5.1. 移動相溶液A：乙腈。

2.5.2. 移動相溶液B：取甲酸50 μ L，加去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取配尼西林V內部標準品約10 mg，精確稱定，以50%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，於-20 $^{\circ}$ C貯存。臨用時取適量內部標準原液以去離子水稀釋至10 μ g/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取 β -內醯胺類抗生素對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以50%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，於-20 $^{\circ}$ C避光貯存。臨用時分別取適量標準原液混合，以去離子水稀釋至0.001~0.5 μ g/mL，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取：

2.8.1.1. 肌肉：

將檢體細切均質後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液25 μ L，混合，靜置15分鐘。加入去離子水2 mL，旋渦混合30秒鐘，加入乙腈至體積為20 mL，再旋渦混合2分鐘。於25 $^{\circ}$ C，以3000 \times g 離心15分鐘，取上清液，於40 $^{\circ}$ C水浴中以氮氣濃縮至乾。殘留物加入0.05M磷酸緩衝溶液30 mL，旋渦混合1分鐘，以0.2N氫氧化鈉溶液調整pH值至8.5，供淨化用。

2.8.1.2. 乳品：

取檢體約10 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液25 μ L，混合，靜置15分鐘。於25 $^{\circ}$ C，以1500 \times g 離心15分鐘，取下層液置於離心管中，加入乙腈至體積為30 mL，旋渦混合2分鐘。於25 $^{\circ}$ C，以1500 \times g 離心15分鐘。取上清液，於40 $^{\circ}$ C水浴中以氮氣濃縮至乾。殘留物加入0.05M磷酸緩衝溶液15 mL，旋渦混合1分鐘，以0.2N氫氧化鈉溶液調整pH值至8.5，供淨化用。

2.8.2. 淨化：

取2.8.1.1.或2.8.1.2.節供淨化用溶液，注入預先以甲醇6 mL、去離子水3 mL及0.05M磷酸緩衝溶液3 mL潤洗之固相萃取匣，再以0.05M磷酸緩衝溶液3 mL及去離子水1 mL沖洗，棄流出液。固相萃取匣真空抽乾後，以乙腈6 mL沖提，收集沖提液，於40 $^{\circ}$ C水浴以氮氣濃縮至乾，殘留物以去離子水溶解並定容至1 mL，以濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 檢量線之製作：

精確量取標準溶液1 mL，添加於空白檢體中，依2.8.節調製檢液，並參照下列條件進行液相層析串聯質譜分析，就各 β -內醯胺類抗生素與內部標準品波峰面積比，與對應之各 β -內醯胺類抗生素標準品添加濃度，分別製作檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件：

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 \rightarrow 3.0	0 \rightarrow 0	100 \rightarrow 100
3.0 \rightarrow 19.0	0 \rightarrow 90	100 \rightarrow 10
19.0 \rightarrow 21.0	90 \rightarrow 90	10 \rightarrow 10
21.0 \rightarrow 21.1	90 \rightarrow 0	10 \rightarrow 100
21.1 \rightarrow 31.0	0 \rightarrow 0	100 \rightarrow 100

移動相流速：0.2 mL/min。

注射量：20 μ L。

電灑游離電壓(Spray voltage)：5000 V。

毛細管溫度(Capillary temperature)：386 $^{\circ}$ C。

噴灑樣品氮氣壓力(N₂ sheath gas)：40 arbitrary units。

剝除溶劑氮氣壓力(N₂ auxiliary gas)：10 arbitrary units。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。各β-內醯胺類抗生素之偵測離子對、碰撞能量(collision energy)及管鏡電壓(tube lens offset)如下表：

分析物	電灑離子化 模式	離子對	碰撞能量 (V)	管鏡電壓 (V)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
安默西林	ESI ⁺	366 > 349*	24	127
		366 > 208	20	127
安比西林	ESI ⁺	350 > 106*	31	115
		350 > 192	33	115
苜青黴素	ESI ⁺	335 > 160*	20	123
		335 > 176	27	123
氯噁唑西林	ESI ⁺	436 > 277*	15	136
		436 > 160	34	136
苯唑青黴素	ESI ⁺	402 > 243	14	141
		402 > 160*	15	141
頭孢氨苄	ESI ⁺	348 > 158*	32	88
		348 > 174	10	88
西華比林	ESI ⁺	424 > 292*	26	187
		424 > 152	37	187
頭孢呋辛	ESI ⁻	423 > 318	12	154
		423 > 207*	17	154
配尼西林V	ESI ⁺	351 > 160	16	107

*定量離子對。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，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20 μL，分別注入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鑑別之^(註)，並依下列

計算式，求出檢體中各β-內醯胺類抗生素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各}\beta\text{-內醯胺類抗生素含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中各β-內醯胺類抗生素之濃度(μg/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. 本檢驗方法之檢出限量如下表：

分析物	檢出限量(ppm)	
	肌肉	乳品
安默西林	0.005	0.005
安比西林	0.002	0.002
苜青黴素	0.01	0.001
氯噁唑西林	0.005	0.002
苯唑青黴素	0.06	0.015
頭孢氨苄	0.04	0.02
西華比林	0.004	0.002
頭孢呋辛	0.02	0.02

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。