食品中動物用藥殘留量檢驗方法－四環黴素類抗生素之檢驗(草案)

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods－

Test of Tetracyclines

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品中四環黴素(tetracycline)等7品項抗生素(見附表)之多重殘留分析。
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：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：ACQUITY CSH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm x 100 mm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可控溫達4°C以下。
 - 2.1.3. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.4. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.6. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：甲酸、甲醇、乙腈及正己烷均採用液相層析級；三氯醋酸(trichloroacetic acid)、磷酸氫二鈉(sodium dihydrogen phosphate monohydrate)、檸檬酸、鹽酸、氫氧化鈉及乙二胺四乙酸二鈉(disodium ethylenediaminetetraacetate)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；鹽酸四環黴素、鹽酸氣四環黴素、鹽酸羥四環黴素、脫氧羥四環黴素、4-epimer-tetracycline、4-epimer-oxytetracycline及4-epimer-chlortetracycline對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 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. 濾紙：Whatman No.2，或同級品。
 - 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 0.1M檸檬酸溶液：

稱取檸檬酸19 g，以去離子水溶解使成1000 mL。

2.4.2. 0.2M磷酸氫二鈉溶液：

稱取磷酸氫二鈉28.4 g，以去離子水溶解使成1000 mL。

2.4.3. MacIlvaine緩衝溶液：

取0.1 M檸檬酸溶液615 mL及0.2 M磷酸氫二鈉溶液385 mL，混合後調整至pH 4.0。

2.4.4. 含0.01 M乙二胺四乙酸二鈉之MacIlvaine緩衝溶液：

稱取乙二胺四乙酸二鈉3.36 g，以MacIlvaine緩衝溶液1000 mL溶解。

2.4.5. 20%乙腈溶液：

取乙腈與去離子水以 2:8 (v/v)比例混合。

2.4.6. 5%甲醇溶液：

取甲醇與去離子水以 5:95 (v/v)比例混合。

2.4.7. 2.5%三氯醋酸溶液：

稱取三氯醋酸 25 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。

2.5. 移動相溶液之配製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

取甲酸1 mL，加乙腈使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之調製：

取相當於含四環黴素、氯四環黴素、羥四環黴素，以及脫氧羥四環黴素、4-epimer-tetracycline、4-epimer-oxytetracycline、4-epimer-chlortetracycline對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，貯存於-20°C。臨用時分別量取適量標準原液混合，以20%乙腈溶液稀釋至 0.001~1.0 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

2.7.1.1. 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MacIlvaine緩衝溶液15 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以3200 × g離心10分鐘，取上清液。殘留物再加入MacIlvaine緩衝溶液15 mL，重複萃取一次，合併上清液。加入正己烷15 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以3200 × g離心5分鐘，取下層液，重複此步驟二次，下層液經

濾紙過濾，供淨化用。

2.7.1.2. 乳汁：

精確量取檢體5 mL，置於離心管中，加入MacIlvaine 緩衝溶液20 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以3200 × g 離心10分鐘，取上清液供淨化用。

2.7.1.3. 內臟：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中。加入2.5%三氯醋酸溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以3200 × g離心5分鐘，取上清液。殘留物加入MacIlvaine緩衝溶液15 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以3200 × g離心5分鐘，合併上清液。加入正己烷10 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以3200 × g離心5分鐘，重複此步驟二次，下層液供淨化用。

2.7.1.4. 蜂蜜：

將檢體混合均勻後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入MacIlvaine 緩衝溶液25 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以3200 × g離心10分鐘，取上清液供淨化用。

2.7.2. 淨化：

2.7.2.1. 肌肉與乳汁：

取2.7.1.1.或2.7.1.2.節供淨化用溶液，注入預先以甲醇6 mL及去離子水6 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液。以5% 甲醇溶液6 mL流洗，棄流出液。再以甲醇6 mL沖提，收集沖提液，於40°C水浴中以氮氣吹乾，殘留物以20%乙腈溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.2.2. 內臟與蜂蜜：

取2.7.1.3.或2.7.1.4.節供淨化用溶液，注入預先以甲醇6 mL及去離子水6 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液。以去離子水6 mL及5%甲醇溶液6 mL流洗，棄流出液。再以甲醇6 mL沖提，收集沖提液，於40°C水浴中以氮氣吹乾，殘留物以20%乙腈溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體依2.7.節萃取淨化及氮氣吹乾後，分別添加不同濃度標準溶液1 mL溶解，經濾膜過濾後，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各抗生素之波峰面積，與對應之各抗生素

添加濃度，分別製作基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

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 → 1	95 → 95	5 → 5
1 → 2	95 → 85	5 → 15
2 → 3	85 → 80	15 → 20
3 → 6	80 → 70	20 → 30
6 → 7	70 → 10	30 → 90
7 → 11	10 → 2	90 → 98
11 → 12	2 → 2	98 → 98
12 → 18	2 → 95	98 → 5

移動相流速：0.2 mL/min。

注入量：5 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

溶媒揮散氣體流速(Desolvation gas flow)：1000 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。

偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量
(collision energy)如附表。

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。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.8.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，求出檢體中各抗生素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各抗生素之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中各抗生素之濃度(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. 四環黴素等7品項抗生素之檢出限量於肌肉及腎臟均為2.5 ppb、乳汁均為1 ppb、肝臟均為5 ppb及蜂蜜均為0.5 ppb。
2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

附表、四環黴素等7品項抗生素之多重反應偵測

分析物		離子對	進樣錐電壓	碰撞能量
英文名	中文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	(V)	(eV)
Tetracycline	四環黴素	445 > 410*	14	18
		445 > 427	14	12
Oxytetracycline	羥四環黴素	461 > 426*	16	18
		461 > 443	16	12
Chlortetracycline	氯四環黴素	479 > 444*	26	20
		479 > 462	26	16
Doxycycline	脫氧羥四環黴素	445 > 428*	12	18
		445 > 154	12	30
4-epimer-tetracycline	—	445 > 410*	24	22
		445 > 427	24	14
4-epimer-oxytetracycline	—	461 > 426*	22	20
		461 > 201	22	40
4-epimer-chlortetracycline	—	479 > 444*	26	22
		479 > 462	26	18

* 定量離子對