

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－畜福及其代謝物之檢驗
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-
Test of Ceftiofur and Its Metabolites

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽等食品中殘留畜福及其代謝物之檢驗。
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：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。
 - 2.1.1.2 層析管：Xterra RP18，5 μm ，內徑 3.0 mm \times 25 cm，或同級品。
 - 2.1.2 均質機（Homogenizer）。
 - 2.1.3 旋渦混合器（Vortex mixer）。
 - 2.1.4 冷凍離心機（Refrigerated centrifuge）。
 - 2.1.5 減壓濃縮裝置（Rotary evaporator）。
 - 2.1.6 超音波振盪器（Ultrasonicator）。
 - 2.1.7 固相萃取真空裝置（Solid phase extraction vacuum manifolds）。
 - 2.1.8 氮氣濃縮裝置（Nitrogen evaporator）。
 - 2.2 試藥：乙腈、甲醇採用液相層析級；三氟乙酸（trifluoroacetic acid）、正己烷、氨水（30%）、醋酸銨、二硫赤鮮醇（dithioerythritol）、碘乙醯胺（iodoacetamide）及正磷酸（orthophosphoric acid）採用試藥特級；畜福鹽酸鹽對照用標準品。
 - 2.3 器具及材料：
 - 2.3.1 離心管：50 mL。
 - 2.3.2 濃縮瓶：100 mL。
 - 2.3.3 固相萃取匣：HLB，200 mg，6 mL，或同級品。
 - 2.3.4 濾膜：直徑 47 mm，孔徑 0.45 μm ，Nylon 材質。
 - 2.3.5 濾紙：Whatman No. 1，直徑 11 cm，或同級品。
 - 2.3.6 注射過濾裝置：直徑 13 mm，孔徑 0.45 μm ，PVDF 材質。
 - 2.4 試劑之調製：
 - 2.4.1 0.05%三氟乙酸溶液：

取三氟乙酸 1 mL 加入去離子水使成 2000 mL，充分混合，以濾膜抽氣過濾，臨用前取濾液以超音波振盪脫氣。

2.4.2 0.1 M 醋酸銨緩衝溶液 (pH 8.7) :

稱取醋酸銨 7.7 g 溶於去離子水 700 mL, 以氨水調整 pH 至 8.7, 並加水使成 1000 mL。

2.4.3 0.4% 二硫赤鮮醇溶液 :

稱取二硫赤鮮醇 400 mg 溶於 0.1 M 醋酸銨緩衝溶液使成 100 mL。

2.4.4 萃取溶液 :

以 0.4% 二硫赤鮮醇溶液與甲醇以 4 : 6 (v/v) 比例混勻。

2.4.5 14% 碘乙醯胺溶液 :

稱取碘乙醯胺 14 g 溶於 0.1 M 醋酸銨緩衝溶液使成 100 mL。

2.5 Desfuroylceftiofur acetamide (DCA) 標準溶液之配製 :

取相當於含畜福約 10 mg 對照用標準品, 精確稱定, 以 0.4% 二硫赤鮮醇溶液 20 mL 溶解, 於 50°C 靜置 1 小時後, 加入碘乙醯胺 20 mg。再於 50°C 避光反應 30 分鐘後, 倒入預先依序以甲醇 3 mL 及 0.1 M 醋酸銨緩衝溶液 5 mL 潤洗過之 HLB 固相萃取匣, 棄流出液。再以去離子水 3 mL 沖洗, 棄流出液, 最後以 50% 甲醇溶液 5 mL 沖提, 收集沖提液。於 45°C 水浴氮氣濃縮至約 2 mL, 再以去離子水定容至 10 mL 作為標準原液, 於 4°C 避光儲存。臨用時以去離子水稀釋成 50~5000 ng/mL, 供作標準溶液。

2.6 檢液之調製 :

2.6.1 萃取 :

2.6.1.1 畜禽肉及內臟

檢體細切, 高速均質 2 分鐘後, 取檢體約 5 g, 精確稱定, 加入萃取溶液 20 mL, 旋渦混合 1 分鐘後, 以 2200 g 離心 5 分鐘, 收集上清液。沉澱物再重複上述萃取步驟一次, 合併上清液。於 50°C 水浴減壓濃縮除去甲醇後, 以濾紙過濾, 續以 0.1 M 醋酸銨緩衝溶液 5 mL 沖洗濾紙, 合併濾液, 加入正己烷 10 mL, 旋渦混合 30 秒, 以 2200 g 離心 3 分鐘。取下層液於 50°C 反應 30 分鐘後, 加入 14% 碘乙醯胺溶液 3 mL, 旋渦混合 30 秒, 於 50°C 避光反應 30 分鐘後, 供淨化用。

2.6.1.2 牛乳

取牛乳 30 mL 於 10°C, 3000 g 離心 10 分鐘, 除去乳脂後, 取檢體 5 mL, 加入 0.4% 二硫赤鮮醇溶液 15 mL, 旋渦混合 30 秒。於 50°C 避光反應 1 小時, 加入 14% 碘乙醯胺溶液 3 mL, 旋渦混合 30 秒, 於 50°C 避光反應 30 分鐘後, 加入正

磷酸 50 μL ，旋渦混合 30 秒，於 2200 g 離心 5 分鐘，取上層液，供淨化用。

2.6.2 淨化：

取上述淨化用溶液，倒入預先以甲醇 3 mL 及去離子水 5 mL 潤洗過之 HLB 固相萃取匣，棄流出液。再以前去離子水 5 mL 沖洗，棄流出液，復以 50% 甲醇溶液 5 mL 沖提。收集沖提液，於 45°C 水浴氮氣濃縮，以前去離子水溶解並定容至 2 mL，以注射過濾裝置過濾後，供作檢液。

2.7 檢量線之製作：

精確量取標準溶液添加於空白檢體中，依 2.6 節調製檢液，並參照下列條件進行液相層析，就 DCA 波峰面積與對應之濃度製作檢量線。

高效液相層析測定條件：

層析管柱：Xterra RP18，5 μm ，內徑 3.0 mm \times 25 cm。

注射量：100 μL

層析管柱溫度：25°C

光二極體陣列檢出器：波長 264 nm

移動相溶液：0.05% 三氟乙酸溶液與乙腈以下列條件進行梯度分析。

時間 (min)	0.05% 三氟乙酸溶液 (%)	乙腈 (%)
0 \rightarrow 16	90 \rightarrow 60	10 \rightarrow 40
16.01 \rightarrow 25	60 \rightarrow 60	40 \rightarrow 40
25.01 \rightarrow 35	60 \rightarrow 90	40 \rightarrow 10
35 \rightarrow 45	90 \rightarrow 90	10 \rightarrow 10

移動相流速：0.5 mL/min

2.8 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液與 DCA 標準溶液各 100 μL ，注入高效液相層析儀中，參照 2.7 節進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中 DCA 含量 (ppm)：

$$\text{檢體中畜福及其代謝物含量 (以 DCA 計) (ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中 DCA 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

V：檢體最後定容之體積 (mL)

M：取樣分析檢體之重量 (g)

- 附註：1. 本檢驗方法之檢出限量於禽畜肉為 0.05 ppm，禽畜內臟為 0.2 ppm，牛乳為 0.02 ppm。
2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。
3. 以本檢驗方法檢出畜福時，應利用 LC/MS/MS 等進行確認。