

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－抗生素及其代謝物多重殘留分析(草案)
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods－
Multiresidue Analysis of Antibiotics and its Metabolite

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品中紅黴素(erythromycin)等16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 UPLC HSS T3，1.8 μm，內徑2.1 mm x 100 mm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)。
 - 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；偏磷酸、氫氧化鈉、磷酸二氫鈉、磷酸氫二鈉、氯化鈉、乙二胺四乙酸二鈉(disodium ethylenediaminetetraacetic acid, disodium EDTA)及矽藻土均採用試藥特級；去離子水(電阻係數可達18 MΩ·cm以上)；roxithromycin 內部標準品；紅黴素等對照用標準品共16品項。
 - 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. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 0.2%偏磷酸溶液：
稱取偏磷酸2 g，以去離子水溶解使成1000 mL。

2.4.2. 2N氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉8 g，以去離子水溶解使成100 mL。

2.4.3. 0.2%偏磷酸：甲醇(3:7, v/v)溶液：

取0.2%偏磷酸溶液與甲醇以3:7 (v/v)混合，以2N氫氧化鈉溶液調整至pH 7。

2.4.4. 磷酸鹽緩衝溶液：

稱取相當於磷酸二氫鈉 0.55 g、磷酸氫二鈉 2.85 g 及氯化鈉 9 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。

2.4.5. 0.1M乙二胺四乙酸二鈉溶液：

稱取乙二胺四乙酸二鈉 33.62 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。

2.4.6. 50%乙腈溶液：

取乙腈與去離子水以 1:1 (v/v)混合。

2.5. 移動相溶液之配製：

2.5.1. 移動相溶液A：

量取甲酸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A。

2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取roxithromycin約10 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，貯存於-20 $^{\circ}$ C。臨用時以50%乙腈溶液稀釋至0.05 μ g/mL，作為內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取純黴素、林可黴素、clindamycin及orbifloxacin等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；natamycin以甲醇溶解；其餘抗生素以乙腈溶解，並分別定容至10 mL，作為標準原液，貯存於-20 $^{\circ}$ C。臨用時分別量取適量標準原液與內部標準溶液混合，以50%乙腈溶液稀釋至0.0005~1.0 μ g/mL (含內部標準品濃度0.01 μ g/mL)，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 肌肉：

2.8.1.1. 萃取：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液200 μ L，旋渦混合30秒鐘，靜置15分

鐘。加入0.2%偏磷酸：甲醇(3:7, v/v)溶液10 mL，振盪10分鐘，以4000 rpm離心10分鐘後取上清液，殘留物加入磷酸鹽緩衝溶液10 mL，振盪10分鐘，以4000 rpm離心10分鐘。取上清液，合併兩次萃取液，再以4000 rpm離心10分鐘後，加入正己烷15 mL，振盪5分鐘，以4000 rpm離心5分鐘後取下層液，重複此步驟二次，取下層液供淨化用。

2.8.1.2. 淨化：

取2.8.1.1節供淨化用溶液，注入預先以甲醇5 mL及去離子水5 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液。固相萃取匣真空抽乾後，依序以70%甲醇溶液5 mL及甲醇5 mL沖提，收集沖提液，於35°C以氮氣吹乾，殘留物以50%乙腈溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8.2. 內臟：

將檢體細切均質後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液200 µL，旋渦混合30秒鐘，靜置15分鐘。加入甲醇10 mL及0.1M乙二胺四乙酸二鈉溶液0.5 mL，振盪10分鐘，以4000 rpm離心10分鐘，取上清液，殘留物加入乙腈15 mL，振盪10分鐘，以4000 rpm離心10分鐘，取上清液，合併兩次萃取液，加入矽藻土2 g，混合均勻，再以4000 rpm離心10分鐘，取上清液，沉澱物加入乙腈10 mL，混合均勻，以4000 rpm離心10分鐘，合併上清液，於35°C以氮氣吹乾，殘留物以50%乙腈溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體依2.8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溶解並經濾膜過濾後，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各抗生素與內部標準品波峰面積比，與對應之各抗生素濃度，分別製作基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(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 → 1.5	100 → 100	0 → 0
1.5 → 4.0	100 → 50	0 → 50

4.0 → 7.0	50 → 20	50 → 80
7.0 → 9.0	20 → 20	80 → 80
9.0 → 13.0	20 → 5	80 → 95
13.0 → 14.0	5 → 5	95 → 95
14.0 → 14.1	5 → 100	95 → 0
14.1 → 20.0	100 → 100	0 → 0

移動相流速：0.3 mL/min。

注射量：10 μ L。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150 $^{\circ}$ C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：600 $^{\circ}$ C。

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。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各10 μ L，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(μ g/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2組離子對之波峰面積比而得($\leq 100\%$)，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. 紅黴素等16品項抗生素及其檢出限量如下表：

分析物		檢出限量(ppm)	
英文名	中文名	肌肉	內臟
clarithromycin	—	0.001	0.001
erythromycin	紅黴素	0.001	0.003
josamycin	—	0.005	0.01
kitasamycin	北里黴素	0.01	0.01
natamycin	—	0.01	0.01
neospiramycin I	—	0.01	0.02
oleandomycin	歐黴素	0.005	0.005
spiramycin I	史黴素 I	0.01	0.01
tilmicosin	—	0.01	0.01
tylosin	泰黴素	0.01	0.01
virginiamycin M1	純黴素	0.005	0.01
cefoperazone	—	0.01	0.01
mecillinam	—	0.01	0.01
clindamycin	—	0.001	0.003
lincomycin	林可黴素	0.001	0.001
orbifloxacin	—	0.005	0.005

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

附表、紅黴素等16品項抗生素及內部標準品之質譜多重反應偵測模式參數

分析物		定量離子對			定性離子對		
英文名	中文名	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
clarithromycin	—	748.7 > 158.0	28	32	748.7 > 115.9	28	44
erythromycin	紅黴素	734.6 > 158.1	26	32	734.6 > 576.5	26	18
josamycin	—	828.7 > 109.0	46	44	828.7 > 174.1	46	34
kitasamycin	北里黴素	772.6 > 109.0	46	44	772.6 > 174.1	46	32
natamycin	—	666.5 > 503.3	18	12	666.5 > 463.3	54	32
neospiramycin I	—	699.6 > 174.1	34	30	699.6 > 142.1	34	22
oleandomycin	歐黴素	688.6 > 158.0	24	28	688.6 > 544.5	24	16
spiramycin I	史黴素	843.7 > 174.0	48	38	843.7 > 100.9	48	40
tilmicosin	—	869.8 > 174.1	70	46	869.8 > 132.0	70	50
tylosin	泰黴素	916.8 > 174.0	50	40	916.8 > 100.9	50	50
virginiamycin M1	純黴素	526.4 > 355.2	24	18	526.4 > 337.1	24	22
cefoperazone	—	646.4 > 143.1	18	40	646.4 > 530.2	18	18

附表、紅黴素等16品項抗生素及內部標準品之質譜多重反應偵測模式參數(續)

分析物		定量離子對			定性離子對		
英文名	中文名	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
mecillinam	—	326.3 > 167.1	32	22	326.3 > 139.1	32	30
clindamycin	—	425.3 > 126.1	30	28	425.3 > 377.2	30	20
lincomycin	林可黴素	407.3 > 126.1	32	30	407.3 > 359.3	32	18
orbifloxacin	—	396.3 > 295.1	32	24	396.3 > 226.1	32	42
roxithromycin (I.S.)		837.8 > 158.1	32	36			