

食品中動物用藥殘留量檢驗方法—畜福之檢驗(草案)

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-Test of Ceftiofur

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜產品中畜福(ceftiofur)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取、衍生化及淨化後，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 BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm × 100 mm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達3200 × g以上。
 - 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：乙腈採用液相層析級；甲醇、正己烷、氨水(30%)、醋酸銨、二硫赤鮮醇(dithioerythritol)、碘乙醯胺(iodoacetamide)、磷酸(85%)及甲酸均為試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；畜福對照用標準品。
 - 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. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 0.1M醋酸銨溶液：

稱取醋酸銨7.7 g溶於去離子水900 mL，以氨水調整pH值至8.7，並加去離子水使成1000 mL。
 - 2.4.2. 0.4%二硫赤鮮醇溶液：

稱取二硫赤鮮醇400 mg，以0.1M醋酸銨溶液溶解使成100 mL。
 - 2.4.3. 萃取溶液：

取0.4%二硫赤鮮醇溶液與甲醇以4：6 (v/v)比例混勻。

2.4.4. 14%碘乙醯胺溶液：

稱取碘乙醯胺 14 g，以 0.1M 醋酸銨溶液溶解使成 100 mL。

2.4.5. 50%甲醇溶液：

取甲醇與去離子水以 1：1 (v/v)比例混勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

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. 標準溶液之配製：

取畜福對照用標準品約10 mg，精確稱定，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，取適量標準原液以50%甲醇溶液稀釋至0.02~15.0 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 衍生化標準溶液之調製：

2.7.1 衍生化：

精確量取不同濃度之標準溶液各1 mL，分別置於離心管中，加入0.4%二硫赤鮮醇溶液6 mL，旋渦混合均勻，於50°C水浴中避光反應1小時。加入14%碘乙醯胺溶液3 mL，旋渦混合均勻，於50°C水浴避光反應30分鐘。

2.7.2. 淨化：

取2.7.1.節經衍生化反應之標準溶液，注入預先依序以甲醇5 mL及去離子水5 mL潤洗之HLB固相萃取匣，棄流出液，再以去離子水5 mL沖洗，棄流出液。以50%甲醇溶液10 mL沖提，收集沖提液，於45°C水浴中氮氣吹乾，以50%甲醇溶液溶解並定容至1 mL，供作衍生化標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取及衍生化：

2.8.1.1. 肌肉及內臟：

取均質後檢體約 2 g，精確稱定，置於離心管中，加入萃取溶液 10 mL，旋渦混合 1 分鐘後，以 3200 × g 離心 10 分鐘，取上清液，殘留物再重複上述萃取步驟一次，合併上清液，加入正己烷 15 mL，旋渦混合 30 秒，以 3200 × g 離心 5 分

鐘後移除上層液，重複此步驟一次，下層液於 45°C 氮氣濃縮至約 8 mL，加入 0.1M 醋酸銨溶液 10 mL 及 0.4% 二硫赤鮮醇溶液 6 mL，旋渦混合 30 秒，於 50°C 水浴中避光反應 1 小時，加入 14% 碘乙醯胺溶液 3 mL，旋渦混合 30 秒，再於 50°C 水浴中避光反應 30 分鐘，供淨化用。

2.8.1.2. 乳汁：

精確量取混勻後檢體 2 mL，置於離心管中，加入 0.4% 二硫赤鮮醇溶液 6 mL，旋渦混合 30 秒。於 50°C 水浴中避光反應 1 小時，加入 14% 碘乙醯胺溶液 3 mL，旋渦混合 30 秒，於 50°C 水浴中避光反應 30 分鐘，加入磷酸 25 μ L，旋渦混合 30 秒，於 3200 \times g 離心 10 分鐘，取上層液，供淨化用。

2.8.2. 淨化：

取 2.8.1. 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 HLB 固相萃取匣，棄流出液，再以去離子水 5 mL 沖洗，棄流出液。以 50% 甲醇溶液 10 mL 沖提，收集沖提液，於 45°C 水浴中氮氣吹乾，以 50% 甲醇溶液溶解並定容至 1 mL，經濾膜過濾後，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、衍生化、淨化及氮氣吹乾後，以 2.7. 節之不同濃度衍生化標準溶液 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。就定量離子對之波峰面積與對應標準溶液之濃度，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 (%)
0.0→2.0	98→98	2→2
2.0→4.0	98→75	2→25
4.0→5.5	75→75	25→25
5.5→7.0	75→70	25→30
7.0→8.5	70→70	30→30
8.5→10.0	70→98	30→2
10.0→12.0	98→98	2→2

移動相流速：0.3 mL/min。

注射量：10 μL 。

毛細管電壓(Capillary voltage)：1.5 kV。

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

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500 $^{\circ}\text{C}$ 。

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)如下表。

分析物	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
畜福	487> 125	18	54
	487> 241*	18	20

*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：

精確量取檢液及衍生化標準溶液各10 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。就檢液與衍生化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，求出檢體中畜福之含量(ppm)：

$$\text{檢體中畜福之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中畜福之濃度($\mu\text{g/mL}$)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得($\leq 100\%$)，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. 本檢驗方法之檢出限量肌肉及內臟均為0.02 ppm，乳汁為0.01 ppm。

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。