

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－泰妙素之檢驗(二)(草案)

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods - Test of Tiamulin (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品之肌肉中泰妙素(tiamulin)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：Zorbax SB-C18，5 μm ，內徑4.6 mm \times 15 cm，或同級品。

2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達4000 $\times g$ 以上者。

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 vacuum extraction manifolds)。

2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.1.8. 酸鹼度測定儀(pH meter)。

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(NaH_2PO_4)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、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 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；泰妙素對照用標準品；roxithromycin內部標準品。

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. 0.2%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. 2 N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)之比例混勻，以2 N氫氧化鈉溶液調整pH值至7。

2.4.4. 磷酸鹽緩衝溶液：

稱取磷酸二氫鈉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. 0.1 M 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)之比例混勻。

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：

取甲酸50 μ L，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. 內部標準溶液之配製：

取roxithromycin內部標準品約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，冷凍貯存。臨用時取適量內部標準溶液，以50%乙腈溶液稀釋至0.05 μ g/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取泰妙素對照用標準品約10 mg，精確稱定，以50%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量標準原液及內部標準溶液混合，以50%乙腈溶液稀釋至0.02~0.1 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. 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，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 \times g離心10分鐘，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 \times g離心10分鐘。合併上清液，加入正己烷15 mL，振盪5

分鐘，以4000 ×g離心5分鐘，取下層液，加入正己烷15 mL，重複上述步驟2次，取下層液供淨化用。

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。

2.9. 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，經濾膜過濾，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就泰妙素與內部標準品之波峰面積比，與對應之泰妙素濃度，製作0.02~0.1 µg/mL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	95 → 95	5 → 5
2.0 → 2.5	95 → 60	5 → 40
2.5 → 6.0	60 → 20	40 → 80
6.0 → 10.0	20 → 0	80 → 100
10.0 → 12.0	0 → 0	100 → 100
12.0 → 12.5	0 → 95	100 → 5
12.5 → 15.0	95 → 95	5 → 5

移動相流速：1.0 mL/min。

注入量：10 µL。

離子化模式：ESI⁺。

離子噴霧電壓(Ionspray voltage)：5500 V。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

加熱管溫度(Turbo heater temperature)：600°C。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：60 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：60 psi。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)與碰撞能

量(collision energy)如下表。

分析物	離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
泰妙素(Tiamulin)	494 > 192*	64	31
	494 > 119	64	58
Roxithromycin (I.S.)	837.8 > 158	80	48

*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：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各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^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中泰妙素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中泰妙素之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中泰妙素之濃度(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. 本檢驗方法之定量極限為0.01 ppm。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. 衛生福利部。2013。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。102年9月6日部授食字第1021950329號公告。
2. Yoshikawa, S., Nagano, C., Kanda, M., Hayashi, H., Matsushima, Y.,

Nakajima, T., Tsuruoka, Y., Nagata, M., Koike, H., Sekimura, K., Hashimoto, T., Takano, I. and Shindo, T. 2017. Simultaneous determination of multi-class veterinary drugs in chicken processed foods and muscle using solid-supported liquid extraction clean-up. *J. Chromatogr. B* 1057: 15-23.