食品中動物用藥殘留量檢驗方法－β-內醯胺類抗生素多重殘留分析(草案)
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-Multiresidual Analysis of β-Lactam Antibiotics

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品之肌肉、內臟、蛋類及乳汁中安默西林(amoxicillin)等19項β-內醯胺類抗生素(品項見附表)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：Poroshell 120SB-C18，2.7 µm，3.0 mm × 15 cm，或同級品。

2.1.2. 均質機(Homogenizer)。

2.1.3. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder®，1000 rpm以上，或同級品。

2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達3500 ×g以上者。

2.1.5. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。

2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.2. 試藥：甲酸及乙腈均採用液相層析級；primary and secondary amine (PSA)、octadecylsilane, end-capped (C18 EC)及無水硫酸鎂均採用分析級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)；安默西林等對照用標準品共19項。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 容量瓶：10 mL。

2.3.2. 離心管：50 mL及15 mL，PP材質。

2.3.3. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982 9313，或同級品。

2.3.4. 淨化用離心管(註)：含PSA 150 mg、C18 EC 150 mg、無水硫酸鎂900 mg。

2.3.5. 濾膜：孔徑0.22 µm，PVDF材質。

註：可依需求自行評估使用市售各種淨化用套組。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 50%乙腈溶液：

取乙腈與去離子水以50：50 (v/v)比例混勻。

2.4.2. 80%乙腈溶液：

取乙腈與去離子水以80：20 (v/v)比例混勻。

2.5. 移動相溶液之配製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸0.05 mL，加入去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

取甲酸0.05 mL，加入乙腈使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

取β-內醯胺類抗生素對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以50%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時分別取適量各標準原液混合，以去離子水稀釋至0.1～1 μg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將肌肉及內臟檢體切細均質後，取約5 g，精確稱定；蛋類檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻，取約5 g，精確稱定；乳汁檢體混勻後，精確量取5 mL，置於50 mL離心管中，加入陶瓷均質石1顆及80%乙腈溶液10 mL後，以高速分散裝置於1000 rpm振盪5分鐘，再以3000 ×g離心5分鐘後，取上清液6 mL置於淨化用離心管，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，以高速分散裝置於1000 rpm振盪2分鐘，再以3500 ×g離心5分鐘。取上清液1 mL，於40℃水浴中以氮氣吹乾，殘留物以去離子水溶解並定容至1 mL，混合均勻，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.8. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別加入標準溶液100 μL，依2.7.節調製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各β-內醯胺類抗生素之波峰面積，與對應之各β-內醯胺類抗生素添加濃度，分別製作0.001～0.01 μg/mL檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件(註)：

層析管：Poroshell 120SB-C18，2.7 μm，3.0 mm × 15 cm。

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 → 2.0	95 → 95	5 → 5
2.0 → 7.0	95 → 50	5 → 50
7.0 → 8.0	50 → 20	50 → 80
8.0 → 8.5	20 → 0	80 → 100
8.5 → 12.0	0 → 0	100 → 100
12 → 18	0 → 95	100 → 5
18 → 20	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：10 μL。

介面電壓(Interface voltage)：

電灑離子化正離子(ESI^+)採用4 kV，

電灑離子化負離子(ESI^-)採用3 kV。

介面溫度(Interface temperature)：270℃。

霧化氣體流速(Nebulizing gas flow)：3.0 L/min。

加熱氣體流速(Heating gas flow)：15.0 L/min。

脫溶劑管溫度(Desolvent line temperature)：200℃。

加熱塊溫度(Heat block temperature)：350℃。

乾燥氣體流速(Drying gas flow)：5.0 L/min。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對Q1/Q3聚焦電壓(Q1/Q3 Pre Bias)及碰撞電壓(collision voltage)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：

精確量取檢液及檢量線溶液各10 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。就檢液與檢量線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，求出檢體中各β-內醯胺類抗生素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各β-內醯胺類抗生素含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中各β-內醯胺類抗生素之濃度(μg/mL)

V：萃取檢體之80%乙腈溶液之體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g或mL)

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(≦100%)，容許範圍如下：

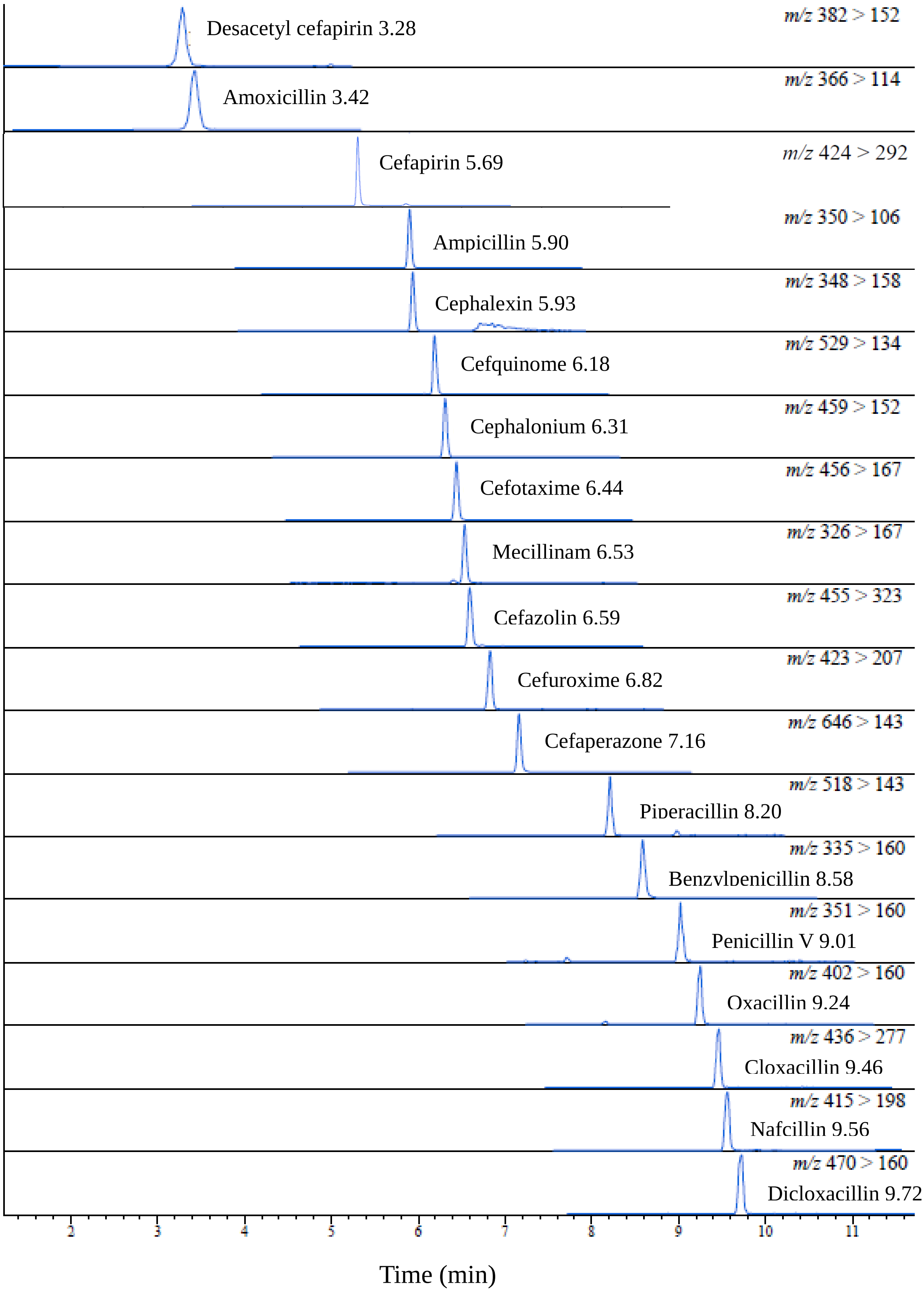
相對離子強度(%)	容許範圍(%)
＞50	±20
＞20～50	±25
＞10～20	±30
≦10	±50

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，安默西林等19項β-內醯胺類抗生素均為0.002 ppm。
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。
3. Cefapirin含量以cefapirin及其代謝物desacetyl cefapirin總量計。Cefapirin於腎臟基質中會快速代謝為desacetyl cefapirin。

參考文獻

1. Li, W., Shen, H., Hong, Y., Zhang, Y., Yuan, F. and Zhang, F. 2016. Simultaneous determination of 22 cephalosporins drug residues in pork muscle using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B 1022: 298-307.
2. Heller, D. N., Kaplan, D. A., Rummel, N. G. and von Bredow, J. 2000. Identification of cephapirin metabolites and degradants in bovine milk by electrospray ionization-Ion trap tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 48: 6030-6035.
3. 蘇瑋婷、黃保寧、廖家鼎、曾素香、高雅敏、周秀冠、陳惠芳。2014。應用QuEChERS前處理技術於食品中β-內醯胺類抗生素之同步分析方法開發。衛生福利部食品藥物管理署103年度自行研究計畫。

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析19項安默西林等β-內醯胺類抗生素標準品之MRM圖譜

附表、安默西林等19項β-內醯胺類抗生素之多重反應偵測模式參數

序號	分析物		離子化模式	離子對		
	英文名	中文名		前驅離子(*m/z*) > 產物離子(*m/z*)	Q1/Q3聚焦電壓(V)	碰撞電壓(V)
1	Amoxicillin	安默西林	ESI^+	366 > 114* 366 > 208 366 > 349	17/20 13/17 10/14	21 13 13
2	Ampicillin	安比西林	ESI^+	350 > 106* 350 > 114 350 > 192	24/19 17/21 20/22	21 29 16
3	Benzylpenicillin	苄青黴素	ESI^+	335 > 160* 335 > 176	16/28 16/18	11 16
4	Cephalexin	雪華力新	ESI^+	348 > 158* 348 > 174	24/28 24/28	10 10
5	Cephalonium	—	ESI^+	459 > 152* 459 > 337	13/12 17/21	10 15
6	Cefaperazone	—	ESI^+	646 > 143* 646 > 530	24/14 22/36	32 13
7	Cefazolin	—	ESI^+	455 > 323* 455 > 156	21/22 30/28	12 18
8	Cefotaxime	—	ESI^+	456 > 167* 456 > 396	16/15 22/30	10 15
9	Cefquinome	—	ESI^+	529 > 134* 529 > 125	26/13 24/23	18 55
10	Cefuroxime	—	ESI^-	423 > 207* 423 > 284 423 > 318	12/12 11/18 30/13	15 27 9
11	Cefapirin (Cephapirin)	西華比林	ESI^+	424 > 292* 424 > 152	20/20 10/15	14 16
12	Cloxacillin	氯噁唑西林	ESI^+	436 > 277* 436 > 160	16/26 16/29	16 14
13	Desacetyl cefapirin (Desacetyl cephapirin)	—	ESI^+	382 > 152* 382 > 226	18/15 18/15	24 18
14	Dicloxacillin	—	ESI^+	470 > 160* 470 > 311	13/21 17/28	16 16
15	Mecillinam	—	ESI^+	326 > 167* 326 > 139	12/17 12/14	23 31
16	Nafcillin	—	ESI^+	415 > 199* 415 > 171	15/19 15/17	15 33
17	Oxacillin	—	ESI^+	402 > 160* 402 > 243	14/11 11/24	14 15
18	Penicillin V	—	ESI^+	351 > 160* 35 1> 114	25/11 26/11	13 29
19	Piperacillin	—	ESI^+	518 > 143* 518 > 160	26/26 24/30	22 22

*定量離子對，定性離子對可視基質情況選擇適合之至少一對離子對