

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－氯黴素類抗生素之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-

Test of Chloramphenicols

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品之肌肉、內臟、脂肪、蛋類、乳汁及蜂蜜中氯黴素(chloramphenicol)、甲磺氯黴素(thiamphenicol)、氟甲磺氯黴素(flорfenicol)及氟甲磺氯黴素胺(flорfenicol amine)等4項氯黴素類抗生素之檢驗。
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：XSELECT HSS PFP，2.5 μm ，內徑2.1 mm \times 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達3200 \times g以上者。
 - 2.1.3. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.4. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.5. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.6. 固相萃取真空裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：甲酸、甲醇及乙腈均採用液相層析級；正己烷、乙酸乙酯、氨水(30%)、三氯醋酸(trichloroacetic acid)、醋酸及氯化鈉均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；氯黴素、甲磺氯黴素、氟甲磺氯黴素及氟甲磺氯黴素胺對照用標準品；氯黴素-d₅(chloramphenicol-d₅)、甲磺氯黴素-d₃(thiamphenicol-d₃)、氟甲磺氯黴素-d₃(flорfenicol-d₃)及氟甲磺氯黴素胺-d₃(flорfenicol amine-d₃)同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：100 mL。
 - 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。

- 2.3.3. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Oasis MCX，6 mL，150 mg，或同級品。
- 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
- 2.4. 試劑之調製：
- 2.4.1. 50%甲醇溶液：
取甲醇50 mL，加去離子水使成100 mL。
- 2.4.2. 5%醋酸溶液：
取醋酸5 mL，加去離子水使成100 mL。
- 2.4.3. 5%三氯醋酸溶液：
稱取三氯醋酸50 g，以去離子水溶解使成1000 mL。
- 2.4.4. 含0.6%氨水之乙酸乙酯溶液：
取氨水20 mL，加乙酸乙酯使成1000 mL。
- 2.4.5. 含3%氨水之甲醇溶液：
取氨水10 mL，加甲醇使成100 mL。
- 2.4.6. 乙腈飽和之正己烷溶液：
取正己烷1000 mL，加乙腈100 mL，振盪混勻，靜置至完全分層後，取正己烷層。
- 2.4.7. 25%甲醇溶液：
取甲醇25 mL，加去離子水使成100 mL。
- 2.5. 移動相溶液之調製：
- 2.5.1. 氯黴素之移動相溶液：
2.5.1.1. 移動相溶液A：去離子水。
2.5.1.2. 移動相溶液B：甲醇。
- 2.5.2. 甲磺氯黴素、氟甲磺氯黴素及氟甲磺氯黴素胺之移動相溶液：
2.5.2.1. 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。
2.5.2.2. 移動相溶液B：甲醇。
- 2.6. 內部標準溶液之配製：
取氯黴素-d₅、甲磺氯黴素-d₃、氟甲磺氯黴素-d₃及氟甲磺氯黴素胺-d₃同位素內部標準品各約10 mg，精確稱定，分別以50%甲醇溶液溶解並定容至100 mL，作為內部標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以50%甲醇溶液稀釋至氯黴素-d₅為1 $\mu\text{g/mL}$ ，甲磺氯黴素-d₃、氟甲磺氯黴素-d₃及氟甲磺氯

徽素胺-d₃均為10 µg/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取氯徽素、甲磺氯徽素、氟甲磺氯徽素及氟甲磺氯徽素胺對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以50%甲醇溶液溶解並定容至100 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以50%甲醇溶液稀釋至氯徽素為0.0015～0.04 µg/mL，甲磺氯徽素、氟甲磺氯徽素及氟甲磺氯徽素胺均為0.05～1 µg/mL，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取：

2.8.1.1. 肌肉：

將檢體細切均質後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液5 µL及含0.6%氨水之乙酸乙酯溶液20 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以3200×g離心10分鐘。取上清液，加入5%醋酸溶液2 mL，旋渦混合1分鐘，於45°C水浴中以氮氣濃縮至約2 mL，加入5%醋酸溶液4 mL，旋渦混合後，供淨化用。

2.8.1.2. 內臟與蛋類：

將內臟檢體細切均質後，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，置於離心管中，加入內部標準溶液5 µL及5%三氯醋酸溶液20 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以3200×g離心10分鐘。取上清液，加入正己烷20 mL，旋渦混合1分鐘，以3200×g離心5分鐘，取下層液供淨化用。

2.8.1.3. 乳汁：

將檢體混勻後，精確量取5 mL，置於離心管中，加入內部標準溶液5 µL及5%三氯醋酸溶液20 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以3200×g離心10分鐘，取上清液供淨化用。

2.8.1.4. 蜂蜜：

將檢體混勻後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液5 µL及5%醋酸溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘後，供淨化用。

2.8.1.5. 脂肪：

將檢體細切均質後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，

加入內部標準溶液5 μ L、去離子水5 mL、氯化鈉1 g及乙腈20 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以3200 \times g離心10分鐘。取上清液，加入乙腈飽和之正己烷溶液20 mL，旋渦混合1分鐘，以3200 \times g離心5分鐘。取下層液，於45 $^{\circ}$ C水浴中以氮氣濃縮至剛乾，殘留物以5%醋酸溶液5 mL溶解，旋渦混合後，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。以5%醋酸溶液5 mL流洗固相萃取匣，棄流出液，再以含3%氨水之甲醇溶液5 mL沖提，收集沖提液，於45 $^{\circ}$ C水浴中以氮氣濃縮至剛乾，殘留物以25%甲醇溶液1 mL溶解，混合均勻，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節調製未添加內部標準品之空白檢液，於45 $^{\circ}$ C水浴中以氮氣濃縮至乾後，分別添加標準溶液0.5 mL、內部標準溶液5 μ L及適量去離子水，使體積為1 mL，混合均勻，經濾膜過濾，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行分析。就各氯黴素類抗生素與其同位素內部標準品之波峰面積比，與對應之各氯黴素類抗生素濃度，分別製作基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註1)：

層析管：XSELECT HSS PFP，2.5 μ m，內徑2.1 mm \times 10 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 (%)
0.0 \rightarrow 1.0	95 \rightarrow 95	5 \rightarrow 5
1.0 \rightarrow 2.0	95 \rightarrow 85	5 \rightarrow 15
2.0 \rightarrow 5.0	85 \rightarrow 30	15 \rightarrow 70
5.0 \rightarrow 10.0	30 \rightarrow 20	70 \rightarrow 80
10.0 \rightarrow 10.1	20 \rightarrow 95	80 \rightarrow 5
10.1 \rightarrow 15.0	95 \rightarrow 95	5 \rightarrow 5

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 μ L。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：

正離子電灑離子化(ESI⁺)採用5.5 kV。

負離子電灑離子化(ESI)採用4.5 kV。
 加熱管溫度(Turbo heater temperature)：550°C。
 霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：50 psi。
 輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：50 psi。
 氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。
 碰撞氣體(Collision gas)：High。
 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	離子化 模式	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)		
氯黴素	ESI ⁻	321 > 152*	65	22
		321 > 257	65	14
甲磺氯黴素	ESI ⁻	354 > 185*	73	26
		354 > 290	73	16
氟甲磺氯黴素	ESI ⁻	356 > 336*	73	12
		356 > 185	73	26
氟甲磺氯黴素胺	ESI ⁺	248 > 230*	46	13
		248 > 130	46	33
氯黴素-d ₅ (I.S.)	ESI ⁻	326 > 157	65	22
甲磺氯黴素-d ₃ (I.S.)	ESI ⁻	357 > 188	73	26
氟甲磺氯黴素-d ₃ (I.S.)	ESI ⁻	359 > 339	73	12
氟甲磺氯黴素胺-d ₃ (I.S.)	ESI ⁺	251 > 233	46	17

*定量離子對

註1：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。就檢液與基質匹配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2)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各氯黴素類抗生素

之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各氯黴素類抗生素之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中各氯黴素類抗生素之濃度(μg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)或體積(mL)

註2：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：

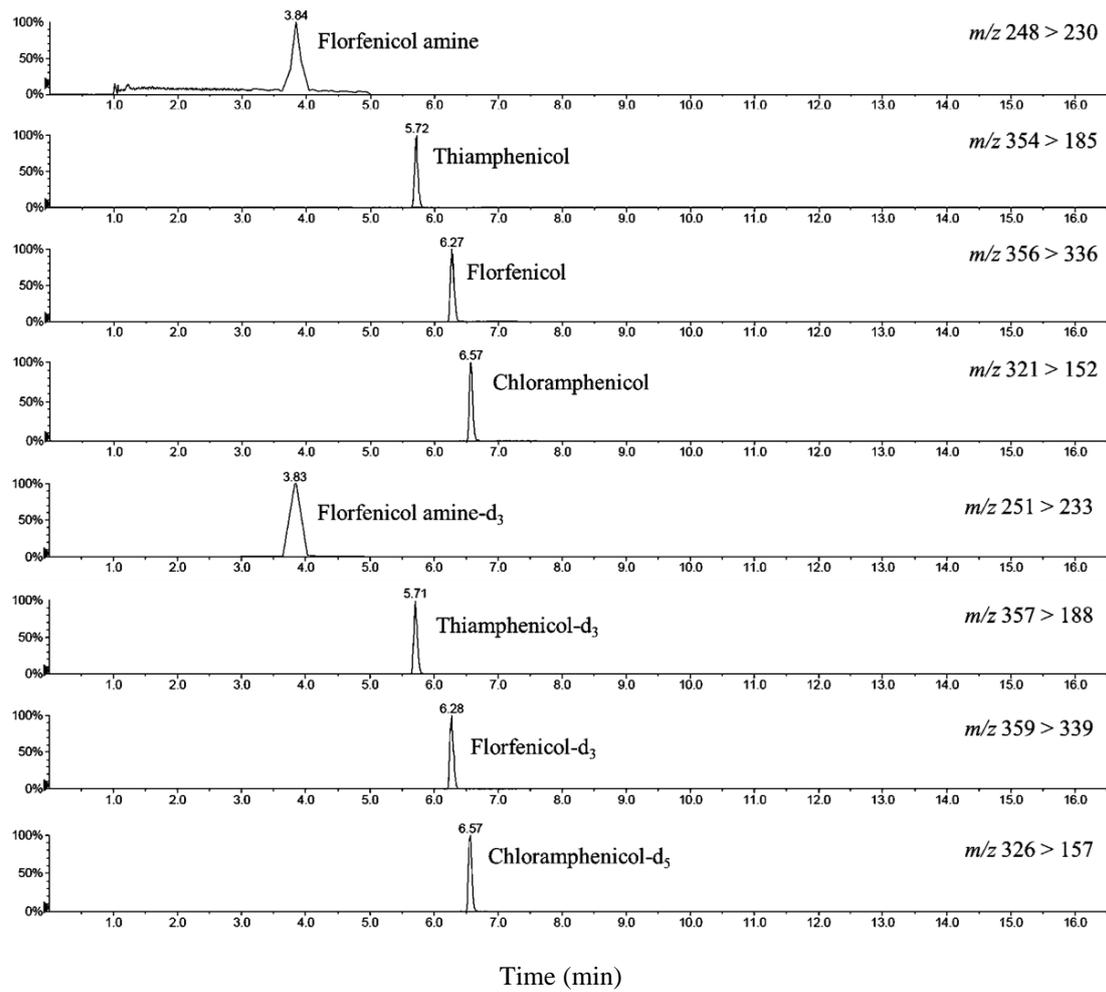
相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

- 附註：1. 本檢驗方法之定量極限，於肌肉、內臟、脂肪、蛋類、乳汁及蜂蜜中氯黴素均為0.00015 ppm，甲磺氯黴素、氟甲磺氯黴素及氟甲磺氯黴素胺均為0.005 ppm。
2. 2.5.1.1節氯黴素之移動相溶液A，若採用2.5.2.1節移動相溶液A，須進行定量極限之查證，以符合確效規範之要求。
3. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Zhang, S., Liu, Z., Guo, X., Cheng, L., Wang, Z. and Shen, J. 2008. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 875: 399-404.
2. European Commission. 2019. Commission Regulation (EU) 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin and repealing Decision 2005/34/EC. *Off. J. Eur. Union L 289*: 41-46.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析氟甲磺氯黴素胺等4項氯黴素類抗生素標準品及其同位素內部標準品之MRM圖譜