

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－胺基糖苷類抗生素之檢驗(二)修正總說明

為加強食品中動物用藥殘留之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中動物用藥殘留量檢驗方法－胺基糖苷類抗生素之檢驗(二)」，其修正要點如下：

- 一、修正「移動相溶液 B」之配置溶劑。
- 二、修正「移動相溶液」之梯度條件。

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－胺基糖苷類抗 生素之檢驗(二)修正對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蜂蜜及乳汁中安痢黴素(apramycin)等 7 品項抗生素(品項見表一)之多重殘留分析。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI+)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管柱：Agilent ZORBAX eclipse plus C18，1.7 μm，內徑 2.1 mm \times 5 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可控溫達 10$^{\circ}\text{C}$ 以下。</p> <p>2.1.3. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.4. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.6. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。</p> <p>2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2. 試藥：乙腈採用液相層析級；氨水(約 25%)、七氟丁酸(heptafluorobutyric acid)、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、鹽酸、三氯醋酸(trichloroacetic acid)及乙二胺四乙酸二鈉(disodium ethylene diamine tetraacetate, EDTA)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於 25$^{\circ}\text{C}$ 可達 18 MΩ·cm 以上)；安痢黴素硫酸鹽</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蜂蜜及乳汁中安痢黴素(apramycin)等 7 品項抗生素(品項見表一)之多重殘留分析。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI+)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管柱：Agilent ZORBAX eclipse plus C18，1.7 μm，內徑 2.1 mm \times 5 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可控溫達 10$^{\circ}\text{C}$ 以下。</p> <p>2.1.3. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.4. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.6. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。</p> <p>2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2. 試藥：乙腈採用液相層析級；氨水(約 25%)、七氟丁酸(heptafluorobutyric acid)、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、鹽酸、三氯醋酸(trichloroacetic acid)及乙二胺四乙酸二鈉(disodium ethylene diamine tetraacetate, EDTA)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於 25$^{\circ}\text{C}$ 可達 18 MΩ·cm 以上)；安痢黴素硫酸鹽</p>	<p>一、修正「移動相溶液 B」之配置溶劑。</p> <p>二、修正「移動相溶液」之梯度條件。</p>

<p>(apramycin sulfate)、雙氫鏈黴素硫酸鹽 (dihydrostreptomycin-sesquisulfate)、健牠黴素硫酸鹽(gentamicin sulfate)、康黴素硫酸鹽(kanamycin sulfate)、新黴素硫酸鹽(neomycin sulfate)、觀黴素 (spectinomycin-5H₂O)及鏈黴素硫酸鹽(streptomycin sulfate)對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：15 mL 及 50 mL，PP 材質。</p> <p>2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：OASIS HLB cartridge，6 mL，500 mg，或同級品。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑 0.22 μm，PVDF 材質。</p> <p>2.3.4. 容量瓶：10 mL。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 5%三氯醋酸緩衝溶液： 取三氯醋酸 50 g 及磷酸二氫鉀 1.36 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。</p> <p>2.4.2. 0.2 M EDTA 溶液： 取乙二胺四乙酸二鈉 7.5 g，以去離子水溶解使成 100 mL。</p> <p>2.4.3. 0.1 M 七氟丁酸溶液： 取七氟丁酸 1.3 mL，加去離子水使成 100 mL。</p> <p>2.4.4. 沖提液： 取 0.1 M 七氟丁酸溶液與乙腈以 2：8 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.4.5. 10 mM 七氟丁酸溶液 取七氟丁酸 0.13 mL，加去離子水使成 100 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之配製：</p> <p>2.5.1. 移動相溶液 A： 取七氟丁酸 1.3 mL，加去離子水使</p>	<p>(apramycin sulfate)、雙氫鏈黴素硫酸鹽 (dihydrostreptomycin-sesquisulfate)、健牠黴素硫酸鹽(gentamicin sulfate)、康黴素硫酸鹽(kanamycin sulfate)、新黴素硫酸鹽(neomycin sulfate)、觀黴素 (spectinomycin-5H₂O)及鏈黴素硫酸鹽(streptomycin sulfate)對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：15 mL 及 50 mL，PP 材質。</p> <p>2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：OASIS HLB cartridge，6 mL，500 mg，或同級品。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑 0.22 μm，PVDF 材質。</p> <p>2.3.4. 容量瓶：10 mL。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 5%三氯醋酸緩衝溶液： 取三氯醋酸 50 g 及磷酸二氫鉀 1.36 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。</p> <p>2.4.2. 0.2 M EDTA 溶液： 取乙二胺四乙酸二鈉 7.5 g，以去離子水溶解使成 100 mL。</p> <p>2.4.3. 0.1 M 七氟丁酸溶液： 取七氟丁酸 1.3 mL，加去離子水使成 100 mL。</p> <p>2.4.4. 沖提液： 取 0.1 M 七氟丁酸溶液與乙腈以 2：8 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.4.5. 10 mM 七氟丁酸溶液 取七氟丁酸 0.13 mL，加去離子水使成 100 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之配製：</p> <p>2.5.1. 移動相溶液 A： 取七氟丁酸 1.3 mL，加去離子水使</p>	
--	--	--

<p>成 1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 A。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液 B： 取七氟丁酸 1.3 mL，加乙腈使成 1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 B。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取相當於含胺基糖苷類抗生素對照用標準品各約 10 mg，精確稱定，分別以去離子水溶解並定容至 10 mL，作為標準原液，移入 15 mL 離心管中，於-20°C 貯存。臨用時分別取適量標準原液混合，以去離子水稀釋至 0.05~3.0 µg/mL，供作標準溶液。</p> <p>註：由於胺基糖苷類抗生素易帶正電荷，可能與玻璃器皿表面產生吸附，應使用 PP 材質塑膠器皿，或經 1 N 鹽酸溶液浸泡 10 分鐘，取出並以去離子水沖洗附著之鹽酸，乾燥備用之玻璃器皿，以避免吸附問題。</p> <p>2.7. 檢液之調製： 2.7.1. 萃取： 將檢體混勻後，取蜂蜜檢體約 5 g，精確稱定，或精確量取乳汁 5 mL，置於 50 mL 離心管中，加入 5%三氯醋酸緩衝溶液 25 mL 和 0.2 M EDTA 溶液 1 mL，旋渦混合 1 分鐘，振盪 5 分鐘，以 3200 × g 離心 10 分鐘，取上清液。加入 0.1 M 七氟丁酸溶液 5 mL，旋渦混合 1 分鐘，以 3200 × g 離心 5 分鐘，上清液以氨水調整 pH 值至 4.0，供淨化用。</p> <p>2.7.2. 淨化： 取 2.7.1.節供淨化用溶液，注入預先以乙腈 5 mL、去離子水 5 mL 及 10 mM 七氟丁酸溶液 5 mL 潤洗之固相萃取匣，棄流出液。以去離子水 5 mL</p>	<p>成 1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 A。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液 B： 取七氟丁酸 1.3 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 B。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取相當於含胺基糖苷類抗生素對照用標準品各約 10 mg，精確稱定，分別以去離子水溶解並定容至 10 mL，作為標準原液，移入 15 mL 離心管中，於-20°C 貯存。臨用時分別取適量標準原液混合，以去離子水稀釋至 0.05~3.0 µg/mL，供作標準溶液。</p> <p>註：由於胺基糖苷類抗生素易帶正電荷，可能與玻璃器皿表面產生吸附，應使用 PP 材質塑膠器皿，或經 1 N 鹽酸溶液浸泡 10 分鐘，取出並以去離子水沖洗附著之鹽酸，乾燥備用之玻璃器皿，以避免吸附問題。</p> <p>2.7. 檢液之調製： 2.7.1. 萃取： 將檢體混勻後，取蜂蜜檢體約 5 g，精確稱定，或精確量取乳汁 5 mL，置於 50 mL 離心管中，加入 5%三氯醋酸緩衝溶液 25 mL 和 0.2 M EDTA 溶液 1 mL，旋渦混合 1 分鐘，振盪 5 分鐘，以 3200 × g 離心 10 分鐘，取上清液。加入 0.1 M 七氟丁酸溶液 5 mL，旋渦混合 1 分鐘，以 3200 × g 離心 5 分鐘，上清液以氨水調整 pH 值至 4.0，供淨化用。</p> <p>2.7.2. 淨化： 取 2.7.1.節供淨化用溶液，注入預先以乙腈 5 mL、去離子水 5 mL 及 10 mM 七氟丁酸溶液 5 mL 潤洗之固相萃取匣，棄流出液。以去離子水 5 mL</p>	
---	---	--

流洗固相萃取匣，棄流出液，再以沖提液 5 mL 沖提，收集沖提液，於 60 °C 水浴中以氮氣濃縮至約 1 mL，再以 10 mM 七氟丁酸溶液定容至 2 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體依 2.7.節萃取淨化及氮氣濃縮後，分別添加不同濃度標準溶液 1 mL，以 10 mM 七氟丁酸溶液定容至 2 mL，經濾膜過濾後，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各抗生素之波峰面積，與對應之各抗生素添加濃度，分別製作基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管柱：Agilent ZORBAX eclipse plus C18，1.7 μm，內徑 2.1 mm × 5 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→0.5	95→95	5→5
0.5→1.0	95→80	5→20
1.0→8.5	80→ <u>70</u>	20→ <u>30</u>
8.5→9.0	70→10	30→90
9.0→10.0	10→10	90→90
10.0→10.1	10→95	90→5
10.1→15.0	95→95	5→5

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：5 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：5.5 kV。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：550°C。

氣簾氣體流速 (Curtain gas flow)：20 psi。

霧化氣體(Ion source gas 1)：50 psi。

加熱氣體(Ion source gas 2)：55 psi。

流洗固相萃取匣，棄流出液，再以沖提液 5 mL 沖提，收集沖提液，於 60 °C 水浴中以氮氣濃縮至約 1 mL，再以 10 mM 七氟丁酸溶液定容至 2 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體依 2.7.節萃取淨化及氮氣濃縮後，分別添加不同濃度標準溶液 1 mL，以 10 mM 七氟丁酸溶液定容至 2 mL，經濾膜過濾後，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各抗生素之波峰面積，與對應之各抗生素添加濃度，分別製作基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管柱：Agilent ZORBAX eclipse plus C18，1.7 μm，內徑 2.1 mm × 5 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→0.5	95→95	5→5
0.5→1.0	95→80	5→20
1.0→8.5	80→ <u>50</u>	20→ <u>50</u>
8.5→9.0	70→10	30→90
9.0→10.0	10→10	90→90
10.0→10.1	10→95	90→5
10.1→15.0	95→95	5→5

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：5 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：5.5 kV。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：550°C。

氣簾氣體流速 (Curtain gas flow)：20 psi。

霧化氣體(Ion source gas 1)：50 psi。

加熱氣體(Ion source gas 2)：55 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)如表一。

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：

精確量取檢液及標準溶液各 5 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，求出檢體中各抗生素之含量(ppm)：

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(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：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如表二。

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

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)如表一。

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：

精確量取檢液及標準溶液各 5 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，求出檢體中各抗生素之含量(ppm)：

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(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：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如表二。

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

表一、安痢黴素等7品項抗生素之多重反應偵測模式參數

項次	分析物		離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	英文名	中文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
1	Apramycin	安痢黴素	540 > 217*	76	35
			540 > 378	76	23
2	Dihydrostreptomycin	雙氫鏈黴素	584 > 263 *	296	43
			584 > 246	296	49
3	Gentamicin	健牠黴素	450 > 322 *	110	17
			450 > 160	110	29
			478 > 322*	71	19
			478 > 157	71	25
			464 > 322*	121	17
			464 > 160	121	29
4	Kanamycin	康黴素	485 > 163*	71	31
			485 > 324	71	21
5	Neomycin	新黴素	615 > 161*	256	39
			615 > 163	256	41
6	Spectinomycin	觀黴素	351 > 333*	81	25
			351 > 207	81	29
7	Streptomycin	鏈黴素	582 > 263*	110	43
			582 > 246	110	53

*定量離子對

表二、安痢黴素等7品項抗生素之定量極限

分析物		定量極限(ppm)	
英文名	中文名	蜂蜜	乳汁
Apramycin	安痢黴素	0.05	0.02
Dihydrostreptomycin	雙氫鏈黴素	0.1	0.05
Gentamicin	健牠黴素	0.1	0.05
Kanamycin	康黴素	0.05	0.02
Neomycin	新黴素	0.2	0.1
Spectinomycin	觀黴素	0.1	0.05
Streptomycin	鏈黴素	0.2	0.1