

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－泰拉黴素之檢驗
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods-
Test of Tulathromycin

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中泰拉黴素(tulathromycin)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：電灑離子化正離子 (positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Poroshell 120 EC-C18，2.7 μm ，內徑3 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times g$ 以上者。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.5. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.6. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.7. 真空固相萃取裝置(Solid phase vacuum extraction manifold)。
 - 2.1.8. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：甲酸、乙腈及甲醇均採用液相層析級；正己烷、氨水(25%)及甲酸銨均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 M Ω · cm以上)；泰拉黴素A對照用標準品(tulathromycin A)。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL及20 mL。
 - 2.3.2. 離心管：15 mL及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. 80%乙腈溶液：

取乙腈800 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.4.2. 95%乙腈溶液：

取乙腈950 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.4.3. 萃取液：

取甲酸1 mL，加80%乙腈溶液使成1000 mL。

2.4.4. 2%甲酸溶液：

取甲酸2 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.5. 含5%氨水之乙腈溶液：

取氨水200 mL，加乙腈使成1000 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸銨315.3 mg及甲酸1 mL，以去離子水溶解使成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：

取甲酸銨315.3 mg及甲酸1 mL，以95%乙腈溶液溶解使成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：

取相當於含泰拉黴素約10 mg之對照用標準品，精確稱定，以去離子水溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量標準原液，以移動相溶液A稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

2.7.1.1. 肌肉：

將檢體均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中。加入萃取液10 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以5000 ×g離心10分鐘，取上清液。殘留物再加入萃取液10 mL，重複萃取一次，合併上清液。加入乙腈飽和之正己烷15 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以5000 ×g離心5分鐘，棄上層液，下層液加入乙腈飽和之正己烷15 mL，同樣操作一次，取下層液，於40°C水浴中以氮氣濃縮至約4 mL，再以去

離子水定容至20 mL，供淨化用。

2.7.1.2. 內臟：

將檢體均質後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中。加入萃取液10 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以5000 ×g離心10分鐘，取上清液。殘留物再加入萃取液10 mL，重複萃取一次，合併上清液。加入乙腈飽和之正己烷15 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以5000 ×g離心5分鐘，棄上層液，下層液加入乙腈飽和之正己烷15 mL，同樣操作一次，取下層液，於40°C水浴中以氮氣濃縮至約4 mL，再以去離子水定容至20 mL，供淨化用。

2.7.2. 淨化：

2.7.2.1. 肌肉：

取2.7.1.1.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2%甲酸溶液5 mL及甲醇5 mL依序流洗，棄流出液。再以含5%氨水之乙腈溶液6 mL沖提，收集沖提液，於40°C水浴中以氮氣濃縮至乾。加入移動相溶液A 1 mL，以超音波振盪10分鐘，作為檢液原液。取檢液原液500 µL (a)，加入移動相溶液A使體積為1000 µL (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.2.2. 內臟：

取2.7.1.2.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2%甲酸溶液5 mL及甲醇5 mL依序流洗，棄流出液。再以含5%氨水之乙腈溶液6 mL沖提，收集沖提液，於40°C水浴中以氮氣濃縮至乾。加入移動相溶液A 1 mL，以超音波振盪10分鐘，作為檢液原液。取檢液原液50 µL (a)，加入移動相溶液A使體積為1000 µL (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

2.8.1. 肌肉：

取空白檢體2 g，依2.7.節調製空白檢液原液，量取500 µL (a)，分別加入標準溶液50~500 µL，再加入移動相溶液A使體積為1000 µL (b)，混合均勻並經濾膜過濾，供作基質匹配檢量線溶液。依下列條件進行分析，就泰拉黴素之波峰面積與對應之濃度，製作0.05~0.5 µg/mL之基質

匹配檢量線。

2.8.2. 內臟：

取空白檢體1 g，依2.7.節調製空白檢液原液，量取50 μL (a)，分別加入標準溶液15~150 μL ，再加入移動相溶液A使體積為1000 μL (b)，混合均勻並經濾膜過濾，供作基質匹配檢量線溶液。依下列條件進行分析，就泰拉黴素之波峰面積與對應之濃度，製作0.015~0.15 $\mu\text{g/mL}$ 之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：Poroshell 120 EC-C18，2.7 μm ，內徑3 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 $\rightarrow$ 1.5	95 $\rightarrow$ 95	5 $\rightarrow$ 5
1.5 $\rightarrow$ 1.6	95 $\rightarrow$ 78	5 $\rightarrow$ 22
1.6 $\rightarrow$ 3.0	78 $\rightarrow$ 0	22 $\rightarrow$ 100
3.0 $\rightarrow$ 4.5	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
4.5 $\rightarrow$ 4.6	0 $\rightarrow$ 95	100 $\rightarrow$ 5
4.6 $\rightarrow$ 8.0	95 $\rightarrow$ 95	5 $\rightarrow$ 5

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：5 μL 。

離子化模式：ESI⁺。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.8 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：600°C。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：800 L/hr。

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	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)		

泰拉黴素	807 > 577*	32	48
	807 > 116	32	52

*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。

2.9. 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 5 μ L，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)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中泰拉黴素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中泰拉黴素之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中泰拉黴素之濃度(μ g/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由 b/a 求得

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 ($\leq 100\%$)，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. 本檢驗方法之定量極限，於肌肉為 0.05 ppm，於內臟為 0.3 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. Bladek, T., Posyniak, A. and Zmudzki, J. 2014. Determination of tulathromycin in swine tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Methods 6: 6745-6752.
2. Villarino, N., Brown, S. A. and Martín-Jiménez, T. 2013. The role of the macrolide tulathromycin in veterinary medicine. Vet. J. 198: 352-357.