

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(草案)
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods－
Test of Aminoglycosides

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中安痢黴素(apramycin)等7品項抗生素(品項見表一)之多重殘留分析。
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. 層析管柱：Agilent ZORBAX eclipse plus C18，1.7 μm ，內徑 2.1 mm $\times$ 5 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可控溫達10 $^{\circ}\text{C}$ 以下。
 - 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 extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：甲酸及乙腈均採用液相層析級；氨水(約30%)、正己烷、甲酸銨、七氟丁酸(heptafluorobutyric acid)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、氫氧化鋰、鹽酸、氫氧化鈉、三氯醋酸(trichloroacetic acid)、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 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；安痢黴素硫酸鹽(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-5 H_2O)及鏈黴素硫酸鹽(streptomycin sulfate)對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：OASIS MCX cartridge，6 mL，150 mg，或同級品。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.45 μm ，Nylon材質；孔徑0.22 μm ，PVDF材質。

2.3.4. 容量瓶：10 mL。

2.4. 試劑之調製：

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。

2.4.2. 0.2M 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。

2.4.3. 氫氧化鋰溶液：

取氫氧化鋰35 g，以去離子水溶解使成500 mL，以0.45 μ m濾膜抽氣過濾。

2.4.4. 沖提液：

取甲酸銨31.5 g，以去離子水350 mL溶解後，加入乙腈100 mL，以氨水調整pH值至9.5，加去離子水使成500 mL。

2.4.5. 25%七氟丁酸溶液：

取七氟丁酸2.5 mL，加去離子水使成10 mL。

2.4.6. 10%甲酸溶液：

取甲酸 10 mL，加去離子水使成 100 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取七氟丁酸1.3 mL，加去離子水使成1000 mL，以0.22 μ m濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

取七氟丁酸1.3 mL，加乙腈使成1000 mL，以0.22 μ m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0.05~125 μ g/mL，供作標準溶液。

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1N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。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

將檢體細切均質後，取約5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入5%三氯醋酸緩衝溶液15 mL和0.2M EDTA溶液0.5 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，於10°C以下以3200 ×

g離心5分鐘。取上清液，殘渣再加入5%三氯醋酸緩衝溶液 15 mL及0.2M EDTA溶液0.5 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，於10℃以下以3200 × g離心5分鐘，合併上清液。加入正己烷10 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，於10℃以下以3200 × g離心5分鐘，取下層液(內臟檢體需重複此步驟一次)。以氫氧化鋰溶液調整pH值至5.5~6.5，供淨化用。

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、氫氧化鋰溶液4 mL及去離子水5 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液。以去離子水及乙腈各5 mL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，加入10%甲酸溶液1 mL，於60℃水浴中以氮氣濃縮至約3 mL，加入25%七氟丁酸溶液 50 µL，以去離子水定容至10 mL，經0.22 µm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.節萃取及淨化後，分別添加不同濃度標準溶液1 mL，以去離子水定容至10 mL，經0.22 µm濾膜過濾後，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各抗生素之定量離子波峰面積，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)：

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 → 0.5	95 → 95	5 → 5
0.5 → 1	95 → 80	5 → 20
1 → 8.5	80 → 70	20 → 30
8.5 → 9	70 → 10	30 → 90
9 → 10	10 → 10	90 → 90
10 → 10.1	10 → 95	90 → 5
10.1 → 15	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。

加熱溫度(Source temperature)：550℃。

氣簾氣體(Curtain gas)：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比^(註)鑑別之，並依下列計算式，求出檢體中各抗生素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各抗生素之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

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)

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

分析物		離子對	去簇電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
英文名	中文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Apramycin	安痢黴素	540 > 217*	76	35
		540 > 378	76	23
Dihydrostreptomycin	雙氫鏈黴素	584 > 263 *	296	43
		584 > 246	296	49
Gentamicin C1a	健牠黴素	450 > 322 *	110	17
		450 > 414	110	15
Gentamicin C1	—	478 > 322*	71	19
		478 > 156	71	25
Gentamicin C2a/b	—	464 > 322*	121	17
		464 > 160	121	29
Kanamycin	康黴素	485 > 163*	71	31
		485 > 324	71	21
Neomycin	新黴素	615 > 161*	256	39
		615 > 163	256	41
Spectinomycin	觀黴素	351 > 333*	81	25
		351 > 207	81	29
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	肌肉	內臟
Apramycin	安痢黴素	0.02	0.2
Dihydrostreptomycin	雙氫鏈黴素	0.1	0.1
Gentamicin C1a	健牠黴素	0.05	0.5
Gentamicin C1	—	0.05	0.5
Gentamicin C2a/b	—	0.05	0.5
Kanamycin	康黴素	0.05	0.2
Neomycin	新黴素	0.1	0.2
Spectinomycin	觀黴素	0.1	0.2
Streptomycin	鏈黴素	0.2	0.3