

# 食品中動物用藥殘留量檢驗方法－四環黴素類抗生素之檢驗修正草案總說明

為加強食品中殘留動物用藥之管理，並依據食品衛生管理法第二十五條規定：「食品衛生檢驗之方法，由中央主管機關公告指定之。」爰修正「食品中動物用藥殘留量檢驗方法－四環黴素類抗生素之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、修改四環黴素類抗生素 檢測品項，由四品項增列為七品項。
- 二、檢驗方法由高效液相層析法改為以液相層析串聯質譜儀分析之方法。檢驗所需裝置、試藥、器具及材料、試劑、移動相溶液、標準溶液、檢液之調製及檢出限量等內容，皆依檢驗方法一併修正。

# 食品中動物用藥殘留量檢驗方法－四環黴素類抗生素之檢驗修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品中<u>四環黴素(tetracycline)</u>等7品項抗生素(見附表)之多重殘留分析。</p>	<p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產等食品中殘留<u>四環黴素類</u>抗生素，<u>包括四環黴素(tetracycline, TC)、羥四環黴素(oxytetracycline, OTC)、氯四環黴素(chlortetracycline, CTC)及脫氧羥四環黴素(Doxycycline)</u>之檢驗。</p>	<p>一、修改四環黴素類抗生素 檢測品項，由四品項增列為七品項。 二、檢驗方法由高效液相層析法改為以液相層析串聯質譜儀分析之方法。檢驗所需裝置、試藥、器具及材料、試劑、移動相溶液、標準溶液、檢液之調製及檢出限量等內容，皆依檢驗方法一併修正。</p>
<p>2.檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. <u>液相層析串聯質譜儀：</u></p> <p>2.1.1.1. <u>離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI<sup>+</sup>)。</u></p> <p>2.1.1.2. <u>層析管：ACQUITY CSH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm x 100 mm，或同級品。</u></p> <p>2.1.2. <u>離心機(Centrifuge)：可控溫達4°C以下。</u></p> <p>2.1.3. <u>振盪器(Shaker)。</u></p> <p>2.1.4. <u>均質機(Homogenizer)。</u></p> <p>2.1.5. <u>氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</u></p> <p>2.1.6. <u>固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。</u></p> <p>2.1.7. <u>旋渦混合器(Vortex mixer)。</u></p>	<p>2.檢驗方法：<u>高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)。</u></p> <p>2.1 裝置：</p> <p>2.1.1 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1 <u>檢出器：具有激發波長380 nm，發射波長520 nm之(Fluorescencedetector)螢光檢出器。</u></p> <p>2.1.1.2 <u>層析管：Luna C18(2)，5 μm，內徑4.6 mm x 25 cm 或同級品。</u></p> <p>2.1.2 <u>均質機(Homogenizer)。</u></p> <p>2.1.3 <u>旋渦混合器(Vortex mixer)。</u></p> <p>2.1.4 <u>減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。</u></p> <p>2.1.5 <u>離心機(Centrifuge)。</u></p>	
<p>2.2. 試藥： <u>甲酸、甲醇、乙腈及正己烷均採用液相層析級；氫氧化鈉、磷酸氫二鈉、檸檬酸、鹽酸、氫氧化鈉及乙二胺四</u></p>	<p>2.2 試藥： <u>甲醇採用液相層析級，磷酸氫二鈉、醋酸、檸檬酸、咪唑(imidazole)、醋酸鎂、Na2-EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetate)</u></p>	

<p><u>乙酸二鈉(disodium ethylenediaminetetraacetate)</u>均採用試藥特級；<u>去離子水(電阻係數可達18 MΩ·cm以上)</u>；<u>鹽酸四環黴素、鹽酸氯四環黴素、鹽酸羥四環黴素、脫氧羥四環黴素、4-epimer-tetracycline、4-epimer-oxytetracycline及4-epimer-chlortetracycline</u>對照用標準品。</p>	<p>、正己烷、<u>氯仿</u>、<u>鹽酸</u>及<u>氫氧化鈉</u>均採試藥特級；<u>鹽酸四環黴素、鹽酸氯四環黴素、鹽酸羥四環黴素及鹽酸脫氧羥四環黴素</u>對照標準品。</p>	
<p>2.3. 器具及材料：  2.3.1. <u>離心管：50 mL，PP材質</u>  2.3.2. <u>固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Oasis HLB，6 mL，500 mg，或同級品。</u>  2.3.3. <u>濾紙：Whatman No.5，或同級品。</u>  2.3.4. <u>濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。</u></p>	<p>2.3 器具及材料：  2.3.1 <u>抽氣瓶：1000 mL。</u>  2.3.2 <u>.C18 固相萃取匣：500 mg，Oasis HLB 或同級品。</u>  2.3.3 <u>濃縮瓶：100 mL。</u>  2.3.4 <u>濾膜：孔徑0.22 μm、0.45 μm，polyvinylidene difluoride 材質。</u>  2.3.5 <u>容量瓶：100 mL。</u>  2.3.6 <u>分子量分割過濾裝置(Molecular weight cutoff filter)：Centricon YM-30或同級品。</u></p>	
<p>2.4. 試劑之調製：  2.4.5. <u>20%乙腈溶液：取乙腈與去離子水以 2:8 (v/v)比例混合。</u>  2.4.6. <u>5%甲醇溶液取甲醇與去離子水以 5:95 (v/v)比例混合。</u></p>	<p>2.4 試劑之調製：  2.4.5 <u>pH 7.2 咪唑緩衝溶液：稱取咪唑 68.08 g，醋酸鎂 10.72 g 及Na<sub>2</sub>-EDTA 0.37 g，以去離子水800 mL 溶解，用醋酸調pH 值至7.2 後以去離子水定容至1,000 mL。</u>  2.4.6 <u>0.05 N 鹽酸溶液：量取鹽酸 4.17 mL，以去離子水稀釋至 1,000 mL。</u></p>	
<p>2.5. 移動相溶液之配製：  2.5.1. <u>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。</u>  2.5.2. <u>移動相溶液B：取甲酸1 mL，加乙腈使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。</u></p>	<p>2.5 移動相溶液之調製：  <u>咪唑緩衝溶液與甲醇以 77：23 (v/v)之比例混勻，經 0.45 μm 濾膜過濾，取濾液作為移動相溶液。</u></p>	

<p>2.6. 標準溶液之配製： 取相當於含四環黴素、氯四環黴素、羥四環黴素，以及脫氧羥四環黴素、<u>4-epimer-tetracycline</u>、<u>4-epimer-oxytetracycline</u>、<u>4-epimer-chlortetracycline</u>對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，貯存於-20°C。臨用時分別量取適量標準原液混合，以20%乙腈溶液稀釋至0.001~1.0 µg/mL，供作標準溶液。</p>	<p>2.6 標準溶液之配製： 稱取鹽酸四環黴素、鹽酸氯四環黴素、鹽酸羥四環黴素及鹽酸脫氧羥四環黴素對照標準品各10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至100mL 作為標準原液，使用時再以0.05 N 鹽酸溶液稀釋至0.01~1.0 µg/mL，供作標準溶液。</p>	
<p>2.7. 檢液之調製：</p> <p>2.7.1. 萃取：</p> <p>2.7.1.1. 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MacIlvaine緩衝溶液15 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以4000 rpm離心10分鐘，取上清液。殘留物再加入MacIlvaine緩衝溶液15 mL，重複萃取一次，合併上清液。加入正己烷15 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以4000 rpm離心5分鐘，取下層液，重複此步驟二次，下層液經濾紙過濾，供淨化用。</p> <p>2.7.1.2. 乳汁： 精確量取檢體5 mL，置於離心管中，加入MacIlvaine 緩衝溶液20 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，以4000 rpm離心10分鐘，取上清液供淨化用。</p> <p>2.7.2. 淨化： 取2.7.1.1.或2.7.1.2.節供淨化用溶液，注入預先以甲醇6</p>	<p>2.7. C18 固相萃取匣之活化： 臨用時依序以甲醇 3 mL 及水2 mL 清洗，流速約為1.5 mL/min。</p> <p>2.8 檢液之調製：</p> <p>2.8.1 肉類 將檢體細切、均質後，取檢體5 g，精確稱定，加入含0.01M Na<sub>2</sub>-EDTA pH 4.0 MacIlvaine之緩衝溶液15 mL 充分混合後，於3,000 rpm 離心15分鐘。取上澄液，加入正己烷10 mL 混勻，於3,000 rpm 離心15 分鐘，收集水層，重複此步驟兩次。將水層注入已活化之C18 固相萃取匣，俟其完全流出後，先以5% 甲醇溶液2 mL 清洗，再以甲醇10 mL 沖提。沖提液於40°C 水浴減壓濃縮至乾，殘留物以0.05 N 鹽酸溶液溶解並定容至1 mL，經0.22 µm 濾膜過濾後供作檢液。</p> <p>2.8.2 乳品 取檢體 1 mL，加入含0.01M Na<sub>2</sub>-EDTA pH 4.0 MacIlvaine之緩衝溶液3mL 充分混合後，取1 mL 移至分子量分割過濾裝置，於3,000 rpm 過濾</p>	

<p><u>mL及去離子水6 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液。以5%甲醇溶液6 mL流洗，棄流出液。再以甲醇6 mL沖提，收集沖提液，於40°C水浴中以氮氣吹乾，殘留物以20%乙腈溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。</u></p>	<p>離心60 分鐘後，取濾液供作檢液。</p>	
<p>2.8. <u>基質匹配檢量線之製作：取空白檢體依2.7節萃取淨化及氮氣吹乾後，分別添加不同濃度標準溶液1 mL溶解，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。</u></p> <p>液相層析串聯質譜測定條件<sup>(註)</sup></p> <p><u>移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析</u></p> <p><u>移動相流速：0.2 mL/min。</u></p> <p><u>注入量：5 µL。</u></p> <p><u>毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 kV。</u></p> <p><u>離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。</u></p> <p><u>溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。</u></p> <p><u>溶媒揮散氣體流速(Desolvation gas flow)：1000 L/hr。</u></p> <p><u>偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。</u></p> <p><u>偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如附表。</u></p>	<p>高效液相層析測定條件：</p> <p><u>層析管柱：Luna C18(2)，5 µm，內徑4.6 mm × 25 cm</u></p> <p><u>螢光檢出器：激發波長380 nm，發射波長520 nm</u></p> <p><u>層析管溫度：40°C</u></p> <p><u>移動相溶液：依2.5節所調製之溶液</u></p> <p><u>移動相流速：1.0 mL/min</u></p>	
<p>附註：</p> <p>1. <u>四環黴素等7品項抗生素之檢出限量於肌肉均為2.5 ppb，於乳汁均為1 ppb。</u></p>	<p>備註：</p> <p>1. <u>四環黴素及羥四環黴素之檢出限量為0.005 ppm，氣四環黴素與脫氧羥四環黴素為0.01 ppm。</u></p>	

<p>2.9 鑑別試驗及含量測定：  <u>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鑑別之<sup>(註)</sup>，並依下列計算式，求出檢體中各抗生素之含量(ppm)：</u></p> <p>檢體中各抗生素之含量  (ppm) = <math>\frac{C \times V}{M}</math></p> <p>C：由<u>基質匹配檢量線</u>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2組離子對之波峰面積比而得(≤100%)，容許範圍如下：</p>	<p>2.9 鑑別試驗及含量測定：  精確量取檢液及標準溶液各100 μL，分別注入<u>高效液相層析儀中，參照下列條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式</u>求出檢體中<u>四環黴素類</u>抗生素之含量(ppm)：</p> <p>檢體中四環黴素類抗生素含量(ppm) = <math>\frac{C \times V}{M}</math></p> <p>C：由<u>標準曲線</u>求得檢液中四環黴素類抗生素之濃度(μg/mL)  V：檢體經淨化最後定容之體積(mL)  M：取樣分析檢體之重量(g)</p>	
---	---	--

附表、四環黴素等 7 品項抗生素之多重反應偵測

分析物		離子對	進樣錐電壓	碰撞能量
英文名	中文名	前驅離子( $m/z$ ) > 產物離子( $m/z$ )	(V)	(eV)
Tetracycline	四環黴素	445 > 410*	14	18
		445 > 427	14	12
Oxytetracycline	羥四環黴素	461 > 426*	16	18
		461 > 443	16	12
Chlortetracycline	氯四環黴素	479 > 444*	26	20
		479 > 462	26	16
Doxycycline	脫氧羥四環黴素	445 > 428*	12	18
		445 > 154	12	30
4-epimer-tetracycline	—	445 > 410*	24	22
		445 > 427	24	14
4-epimer-oxytetracycline	—	461 > 426*	22	20
		461 > 201	22	40
4-epimer-chlortetracycline	—	479 > 444*	26	22
		479 > 462	26	18

\* 定量離子對