

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

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods -

Test of Tetracyclines

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、乳汁及蜂蜜中四環黴素(tetracycline)等7項抗生素(品項見附表)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：ACQUITY CSH C18，1.7 μm ，內徑2.1 mm \times 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達12000 \times g以上，溫度控制可達4 $^{\circ}$ C以下者。
 - 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、甲醇、乙腈及正己烷均採用液相層析級；三氯醋酸(trichloroacetic acid)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、檸檬酸、鹽酸、乙二胺四醋酸二鈉(disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate, $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)及二甲基亞砷(dimethylsulfoxide, DMSO)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}$ C可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；鹽酸四環黴素(tetracycline hydrochloride)、鹽酸氯四環黴素(chlortetracycline hydrochloride)、鹽酸羥四環黴素(oxytetracycline hydrochloride)、脫氧羥四環黴素(doxycycline)、4-epimer-tetracycline、4-epimer-oxytetracycline及4-epimer-chlortetracycline對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：

- 2.3.1. 容量瓶：2 mL及20 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 HLB，6 mL，500 mg，或同級品。
- 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm ，Nylon材質。
- 2.3.5. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
- 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 0.1 M檸檬酸溶液：

稱取檸檬酸19 g，以去離子水溶解使成1000 mL。
 - 2.4.2. 0.2 M磷酸氫二鈉溶液：

稱取磷酸氫二鈉28.4 g，以去離子水溶解使成1000 mL。
 - 2.4.3. MacIlvaine緩衝溶液：

取0.1 M檸檬酸溶液615 mL及0.2 M磷酸氫二鈉溶液385 mL，混合後，以0.1 M檸檬酸溶液或0.2 M磷酸氫二鈉溶液調整pH至4.0。
 - 2.4.4. 萃取液：

稱取乙二胺四醋酸二鈉3.72 g，以MacIlvaine緩衝溶液溶解使成1000 mL。
 - 2.4.5. 20% 甲醇溶液：

取甲醇與去離子水以2：8 (v/v)比例混勻。
 - 2.4.6. 含0.1%甲酸之20%甲醇溶液：

取甲酸0.1 mL，加入20% 甲醇溶液使成100 mL。
 - 2.4.7. 5% 甲醇溶液：

取甲醇與去離子水以5：95 (v/v)比例混勻。
 - 2.4.8. 2.5% 三氯醋酸溶液：

稱取三氯醋酸 25 g，以去離子水溶解使成 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. 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。
- 2.6. 標準溶液之配製：

取相當於含四環黴素、氯四環黴素及羥四環黴素各約10 mg之對

照用標準品，精確稱定；取脫氧羥四環黴素、4-epimer-tetracycline、4-epimer-oxytetracycline及4-epimer-chlortetracycline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，冷凍貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至1 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

將肌肉、內臟及脂肪檢體切細均質後，取約2 g，精確稱定；蛋類檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻後，取約2 g，精確稱定；乳汁檢體混勻後，精確量取2 mL；蜂蜜檢體混勻後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中。加入陶瓷均質石1顆及2.5%三氯醋酸溶液5 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，於4°C以3200 $\times\text{g}$ 離心5分鐘，取上清液。殘渣加入萃取液10 mL，旋渦混合1分鐘，振盪5分鐘，於4°C以3200 $\times\text{g}$ 離心5分鐘，取上清液，殘渣再加入萃取液10 mL，重複上述步驟萃取2次。合併上清液，於4°C以12000 $\times\text{g}$ 離心5分鐘，取上清液供淨化用。

2.7.2. 淨化：

取2.7.1.節供淨化用溶液，注入預先以甲醇6 mL及去離子水6 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液。依次以去離子水6 mL及5%甲醇溶液6 mL清洗固相萃取匣，棄流出液。以甲醇6 mL沖提，收集沖提液，加入DMSO 50 μL ，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，肌肉、蛋類、脂肪、乳汁及蜂蜜基質之殘留物以含0.1%甲酸之20%甲醇溶液溶解並定容至2 mL；內臟基質之殘留物以含0.1%甲酸之20%甲醇溶液溶解並定容至20 mL。取1 mL，以10000 $\times\text{g}$ 離心3分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作(適用於肌肉、內臟、脂肪、乳汁及蜂蜜檢體)：

取空白檢體，依2.7.節萃取、淨化及氮氣吹至微乾後，肌肉、脂肪、乳汁及蜂蜜基質之殘留物以含0.1%甲酸之20%甲醇溶液溶解並定容至1 mL；內臟基質之殘留物以含0.1%甲酸之20%甲醇溶液溶解並定容至10 mL，供作空白檢液。取空白檢液500 μL ，分別加入標準溶液5~200 μL 及含0.1%甲酸之20%甲醇溶液，使體積為1000 μL ，混合均勻，以10000 $\times\text{g}$ 離心3分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作基質匹配檢量線溶液，並依下列條件進行分析。就各四環黴素類抗生素之波峰面積，與對應之各四環黴素

類抗生素添加濃度，分別製作0.005~0.2 µg/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：ACQUITY CSH C18，1.7 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：40°C。

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 → 1	95 → 95	5 → 5
1 → 6	95 → 85	5 → 15
6 → 9	85 → 70	15 → 30
9 → 9.5	70 → 2	30 → 98
9.5 → 14.5	2 → 2	98 → 98
14.5 → 15	2 → 95	98 → 5
15 → 18	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.2 mL/min。

注入量：5 µL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：150 L/hr。

溶媒揮散氣體流速(Desolvation gas flow)：1000 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)如附表。

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. 檢量線之製作(適用於蛋類基質)：

取空白檢體，分別加入標準溶液10~400 µL，依2.7.節調製檢液，供作檢量線溶液，並依2.8.節條件進行分析。就各四環黴素類抗生素之波峰面積，與對應之各四環黴素類抗生素添加濃度，分別製作0.005~0.2 µg/mL之檢量線。

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或檢量線溶液各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。就檢液與基質匹配檢量線溶液或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
求出檢體中各四環黴素類抗生素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各四環黴素類抗生素之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由基質匹配檢量線或檢量線求得檢液中各四環黴素類抗
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：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

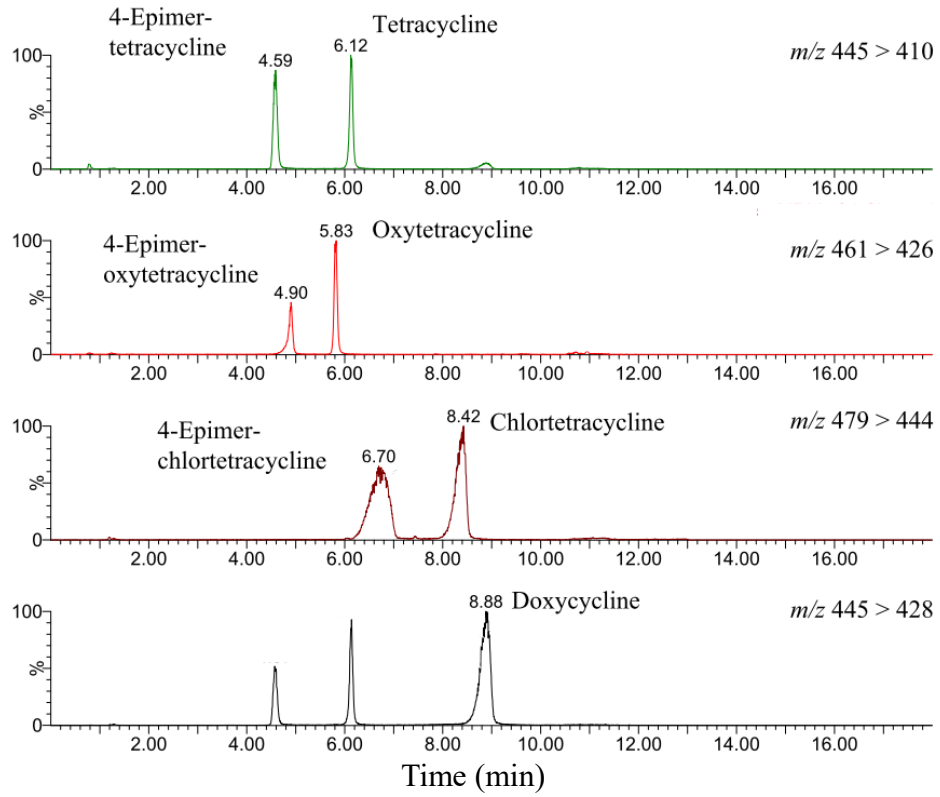
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，四環黴素等7項抗生素於肌肉、脂
肪、蛋類、乳汁及蜂蜜中均為0.005 ppm，於內臟中均為0.05
ppm。

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. Cetinkaya, F., Yibar, A., Soyutemiz, G. E., Okutan, B., Ozcan, A. and Karaca, M. Y. 2012. Determination of tetracycline residues in chicken meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Addit. Contam. Part B 5: 45-49.
2. Giannetti, L., Longo, F., Buiarelli, F., Russo, M. V. and Neri, B. 2010. Tetracycline residues in royal jelly and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry: validation study according to Commission Decision 2002/657/EC. Anal. Bioanal. Chem. 398: 1017-1023.

參考層析圖譜



圖、以 LC-MS/MS 分析四環黴素等 7 品項抗生素之 MRM 圖譜

附表、四環黴素等 7 品項抗生素之多重反應偵測模式參數

分析物		離子對	進樣錐	碰撞
英文名	中文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	電壓 (V)	能量 (eV)
Tetracycline	四環黴素	445 > 410*	26	18
		445 > 427	26	12
		445 > 226	26	53
Oxytetracycline	羥四環黴素	461 > 426*	26	18
		461 > 443	26	12
		461 > 283	26	38
Chlortetracycline	氯四環黴素	479 > 444*	34	20
		479 > 462	34	18
		479 > 154	34	28
Doxycycline	脫氧羥四環 黴素	445 > 428*	35	17
		445 > 154	35	28
4-Epimer-tetracycline	—	445 > 410*	24	20
		445 > 427	24	12
		445 > 392	24	25
4-Epimer-oxytetracycline	—	461 > 426*	28	20
		461 > 201	28	38
		461 > 444	28	15
4-Epimer-chlortetracycline	—	479 > 462*	34	20
		479 > 444	34	18

*定量離子對，定性離子對可視基質情況選擇適合之至少一對離子對