

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－乙醯異戊醯泰樂黴素及其代謝物之檢驗修正草案總說明

為加強動物用藥之管理，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－乙醯異戊醯泰樂黴素及其代謝物之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、「3-O-acetyltylosin」修正為「3-O-acetyltylosin」，另「高速組織研磨振盪均質機」修正為「高速分散裝置」。
- 二、「裝置」、「器具及材料」、「試劑調製」及「基質匹配檢量線之製作」依檢驗方法格式進行文字修正。
- 三、「液相層析串聯質譜測定條件」修正離子對之質量數，並增列「進樣錐氣體流速」。
- 四、增列參考層析圖譜。
- 五、增修訂部分文字。

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－乙醯異戊醯泰樂黴素及其代謝物之檢驗修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中乙醯異戊醯泰樂黴素(acetylisovaleryltylosin)及其代謝物(3-<u>O</u>-acetyltylosin)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, <u>ESI</u>)。 2.1.1.2. 層析管：Acquity UPLC HSS[®] T3, 1.8 μm，內徑2.1 <u>mm</u> × 10 cm，或同級品。 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達5000 ×g以上者。 2.1.3. 高速<u>分散裝置</u>(High speed dispersing device)：<u>SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]</u>，1000 rpm以上，或<u>其他具振盪功能之裝置</u>。 2.1.4. 均質機(Homogenizer)。 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.2. 試藥：甲酸、甲醇及乙腈均採用液相層析級；氫氧化鈉、甲酸銨及乙二胺四乙酸二鈉(disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate)均採用試藥特級；無水硫酸鎂、氯化鈉、無水檸檬酸三鈉(trisodium citrate dehydrate)及檸檬酸氫二鈉(disodium hydrogen citrate sesquihydrate)均採用分析級；去離子水(比電阻於25°C可達18MΩ·cm以上)；乙醯異戊醯泰樂黴素及3-<u>O</u>-acetyltylosin對照用標準品。 2.3. 器具及材料： 2.3.1. 容量瓶：10 mL及20 mL。 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。	1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中乙醯異戊醯泰樂黴素(acetylisovaleryltylosin)及其代謝物(3-<u>O</u>-acetyltylosin)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<u>正離子</u> (positive ion electrospray ionization, <u>ESI⁺</u>)。 2.1.1.2. 層析管：Acquity UPLC HSS[®] T3, 1.8 μm，內徑2.1 × 10 cm，或同級品。 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達5000 ×g以上者。 2.1.3. 高速組織研磨振盪均質機(SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®])：1000 rpm以上，或同級品。 2.1.4. 均質機(Homogenizer)。 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.2. 試藥： 甲酸、甲醇及乙腈均採用液相層析級；氫氧化鈉、甲酸銨及乙二胺四乙酸二鈉(disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate)均採用試藥特級；無水硫酸鎂、氯化鈉、無水檸檬酸三鈉(trisodium citrate dehydrate)及檸檬酸氫二鈉(disodium hydrogen citrate sesquihydrate)均採用分析級；去離子水(比電阻於25°C可達18MΩ·cm以上)；乙醯異戊醯泰樂黴素(<u>acetylisovaleryltylosin</u>)及其代謝物(3-<u>O</u>-acetyltylosin)對照用標準品。 2.3. 器具及材料：	一、「3-O-acetyltylosin」修正為「3-O-acetyltylosin」，另「高速組織研磨振盪均質機」修正為「高速分散裝置」。 二、「裝置」、「器具及材料」、「試劑調製」及「基質匹配檢量線之製作」依檢驗方法格式進行文字修正。 三、「液相層析串聯質譜測定條件」修正離子對之質量數，並增列「進樣錐氣體流速」。 四、增列參考層析圖譜。 五、增修訂部分文字。

2.3.3. 萃取用粉劑^(註1)：含無水硫酸鎂4 g、氯化鈉1 g、無水檸檬酸三鈉 1 g及檸檬酸氫二鈉0.5 g，或市售同級品。 <u>註1：可依需求自行評估使用市售各種萃取用組合套組。</u> 2.3.4. 陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer)：採用 Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。 2.3.5. 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. 50%乙腈溶液： 取乙腈500 mL，加去離子水使成1000 mL。 2.4.3. 10 M氫氧化鈉溶液： <u>稱取氫氧化鈉20 g，以去離子水溶解使成50 mL。</u> 2.4.4. 0.2 M乙二胺四乙酸二鈉溶液： <u>稱取乙二胺四乙酸二鈉3.72 g，加去離子水40 mL，攪拌至完全溶解，以10 M氫氧化鈉溶液調整pH值至8.0，再加去離子水使成50 mL，臨用時調製。</u> 2.5. 移動相溶液之調製： 2.5.1. 移動相溶液A： 取甲酸銨0.32 g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：乙腈。 2.6. 標準溶液之配製： <u>取乙醯異戊醯泰樂黴素及3-O-acetyltylosin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50%乙腈溶液稀釋至0.1 μg/mL，供作標準溶液。</u> 2.7. 檢液之調製：	2.3.1. 容量瓶：10 mL、20 mL及50 mL。 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。 2.3.3. 萃取用粉劑：含無水硫酸鎂4 g、氯化鈉1 g、無水檸檬酸三鈉 1 g及檸檬酸氫二鈉0.5 g，或市售同級品。 2.3.4. 陶瓷均質石 (Ceramic homogenizer)：採用 Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。 2.3.5. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF 材質。 2.4. 試劑調製 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. 50%乙腈溶液： 取乙腈500 mL，加去離子水使成1000 mL。 2.4.3. 10 M氫氧化鈉溶液： 取氫氧化鈉20 g，以去離子水溶解使成50 mL。 2.4.4. 0.2 M乙二胺四乙酸二鈉溶液： 取乙二胺四乙酸二鈉3.72 g，加去離子水40 mL溶解，以10 M氫氧化鈉溶液調整pH值至8.0，再加去離子水使成50 mL，臨用時調製。 2.5. 移動相溶液之調製： 2.5.1. 移動相溶液A： 取甲酸銨0.32 g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：乙腈。 2.6. 標準溶液之配製： <u>取乙醯異戊醯泰樂黴素及其代謝物對照用標準品各約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50%乙腈溶液稀釋至0.1 μg/mL，供作標準溶液。</u> 2.7. 檢液之調製：
--	--

2.7.1. 肌肉：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆及80%乙腈溶液20 mL，旋渦混合20秒，再加入萃取用粉劑，隨即旋渦混合20秒，再以高速分散裝置以1000 rpm振盪1分鐘，於5000 ×g離心2分鐘，取上層液，以乙腈定容至20 mL，作為檢液原液。取檢液原液500 μL (a)，加入乙腈使體積為1000 μL (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.2. 內臟：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入0.2 M乙二胺四乙酸二鈉溶液200 μL，混勻後避光靜置15分鐘。加入陶瓷均質石1顆及80%乙腈溶液20 mL，旋渦混合20秒，再加入萃取用粉劑，隨即旋渦混合20秒，再以高速分散裝置以1000 rpm振盪1分鐘，於5000 ×g離心2分鐘，取上層液，以乙腈定容至20 mL，作為檢液原液。取檢液原液500 μL (a)，加入乙腈使體積為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：

取空白檢體，依2.7節調製空白檢液原液，分別量取500 μL (a)，加入標準溶液10~100 μL及適量乙腈，使體積為1000 μL (b)，混合均勻，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。就乙醯異戊醯泰樂黴素及3-O-acetyltylosin之波峰面積，與對應之乙醯異戊醯泰樂黴素及3-O-acetyltylosin濃度，分別製作0.001~0.01 μg/mL之基質匹配檢量線。液相層析串聯質譜測定條件^(註2)：層析管：Acquity UPLC HSS[®] T3，1.8 μm，內徑2.1 mm × 10 cm。移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

2.7.1. 肌肉：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆及80%乙腈溶液20 mL，旋渦混合20秒，再加入萃取用粉劑，隨即旋渦混合20秒，再以高速組織研磨振盪均質機以1000 rpm振盪1分鐘，於5000 ×g離心2分鐘，取上層液以乙腈定容至20 mL，作為檢液原液。取檢液原液500 μL (a)，加入乙腈使體積為1000 μL (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.7.2. 內臟：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入0.2 M乙二胺四乙酸二鈉溶液200 μL，混勻後避光靜置15分鐘。加入陶瓷均質石1顆及80%乙腈溶液20 mL，旋渦混合20秒，再加入萃取用粉劑，隨即旋渦混合20秒，再以高速組織研磨振盪均質機以1000 rpm振盪1分鐘，於5000 ×g離心2分鐘，取上層液以乙腈定容至20 mL，作為檢液原液。取檢液原液500 μL (a)，加入乙腈使體積為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，依2.7.1.節調製空白檢液原液，分別量取500 μL (a)，加入標準溶液10~100 μL，再加入乙腈使體積為1000 μL (b)，混合均勻，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，就乙醯異戊醯泰樂黴素及其代謝物之波峰面積，與對應之濃度，分別製作0.001~0.01 μg/mL之基質匹配檢量線。

2.8.2. 內臟：

取空白檢體，依2.7.2.節調製空白檢液原液，分別量取500 μL (a)，加入標準溶液10~100 μL，再加入

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0→1.5	100→100	0→0
1.5→4.0	100→50	0→50
4.0→6.5	50→5	50→95
6.5→8.0	5→5	95→95
8.0→8.1	5→100	95→0
8.1→10.0	100→100	0→0

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：3.8 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)：600°C。

進樣錐氣體流速 (Cone gas flow rate)：50 L/hr。

溶媒揮散流速 (Desolvation flow rate)：800 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子、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)		
乙醯異戊醯	1042.6>814.5*	52	24
泰樂黴素	1042.6>174	52	48
3-O-acetyltylosin	958.5>772.4*	58	30
	958.5>174	58	42

*定量離子對

註2：上述測定條件分析不適時，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10 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所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註3)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中乙醯異戊醯泰樂黴素或3-O-acetyltylosin之含量(ppm)：

乙腈使體積為1000 μL(b)，混合均勻，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，就乙醯異戊醯泰樂黴素及其代謝物之波峰面積，與對應之濃度，分別製作0.001~0.01 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 UPLC HSS® T3，1.8 μm，內徑2.1 × 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→1.5	100→100	0→0
1.5→4.0	100→50	0→50
4.0→6.5	50→5	50→95
6.5→8.0	5→5	95→95
8.0→8.1	5→100	95→0
8.1→10.0	100→100	0→0

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 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、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)		
Acetylisoaleryltylosin	1043>815*	52	24
	1043>174	52	48
3-O-acetyltylosin	959>773*	58	30
	959>174	58	42

*定量離子對

註：上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

檢體中乙醯異戊醯泰樂黴素或3-O-acetyltylosin 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乙醯異戊醯泰樂黴素或3-O-acetyltylosin之濃度(μg/mL)

V：檢體最後定容之體積(20 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由b/a求得

註3：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，乙醯異戊醯泰樂黴素及3-O-acetyltylosin於肌肉及內臟均為0.02 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. Bohm, D. A., Stachel, C. S. and Gowik, P. 2009. Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. J. Chromatogr. A 1216: 8217-8223.

2. Granelli, K., Elgerud, C., Lundström, A., Ohlsson, A. and Sjöberg, P. 2009. Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 637: 87-91.

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10 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乙醯異戊醯泰樂黴素及其代謝物之含量(ppm)：

檢體中乙醯異戊醯泰樂黴素及其代謝物之含量(ppm) = $\frac{C \times V \times F}{M}$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中乙醯異戊醯泰樂黴素及其代謝物之濃度(μg/mL)

V：檢體最後定容之體積(20 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(≤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，於肌肉及內臟均為0.02 ppm。

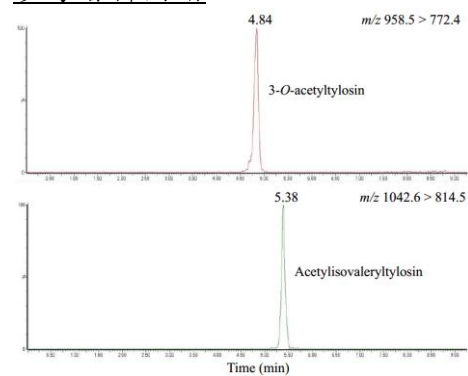
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Bohm, D. A., Stachel, C. S. and Gowik, P. 2009. Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. J. Chromatogr. A 1216: 8217-8223.

2. Granelli, K., Elgerud, C., Lundström, A., Ohlsson, A. and Sjöberg, P. 2009. Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析乙醯異戊醯泰樂黴素及3-O-acetyltylosin標準品之MRM圖譜

Chim. Acta 637: 87-91.