

食品中動物用藥殘留量檢驗方法—Avermectin類 抗生素之檢驗修正草案總說明

為加強動物用藥之管理，並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」，本次主要係配合一百十三年四月十八日衛授食字第1131300236號公告預告修正「動物用藥殘留標準」草案附表二「指標性殘留物質一覽表」，擬修正檢驗方法中檢驗品項及標準品名稱，使其與指標性殘留物質一致，爰擬具「食品中動物用藥殘留量檢驗方法—Avermectin類抗生素之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、「適用範圍」、「裝置」、「器具及材料」、「檢液之調製」、「基質匹配檢量線之製作」及「鑑別試驗及含量測定」依檢驗方法格式進行文字修正。
- 二、「試藥」、「標準溶液之配製」、「表一」及「表二」修正對照用標準品名稱，使其與指標性殘留物質一致，另「表一」修正部分離子對之質量數至小數點後第一位。
- 三、增列「乙腈飽和之正己烷溶液」之調製、「參考文獻」及「參考層析圖譜」。
- 四、增修訂部分文字。

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－Avermectin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阿巴汀(abamectin)等6項<u>avermectin</u>類抗生素(品項見附表一)之多重殘留分析。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：XSELECT HSS T3, 2.5 μm，內徑2.1 mm \times 10 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：<u>可達3200 \timesg以上者</u>。</p> <p>2.1.3. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.4. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.5. 氮氣<u>濃縮</u>裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.6. 固相萃取<u>真空</u>裝置(Solid phase <u>vacuum extraction manifold</u>)。</p> <p>2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2. 試藥：甲酸、乙腈及正己烷均採用液相層析級；氨水(28%)採用試藥特級；去離子水(比電阻於25$^{\circ}\text{C}$可達18 MΩ·cm以上)；阿巴汀<u>B1a (abamectin B1a)</u>、多滅蟲(doramectin)、emamectin benzoate、乙醯氨基阿維菌素 B1a (epinomectin B1a)、愛滅蟲 B1a (ivermectin B1a) 及莫西黴素(moxidectin)對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Sep-Pak C8，</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產品中阿巴汀(abamectin)等6品項抗生素(品項見表一)之多重殘留分析。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化<u>正離子</u> (positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：XSELECT HSS T3, 2.5 μm，內徑2.1 mm \times 10 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)。</p> <p>2.1.3. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.4. 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.1.5. 氮氣<u>蒸發</u>裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.6. 固相<u>真空</u>萃取裝置(Solid phase <u>extraction vacuum manifolds</u>)。</p> <p>2.1.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2. 試藥：甲酸、<u>甲醇</u>及乙腈均採用液相層析級；<u>正己烷</u>及氨水(30%)採用試藥特級；去離子水(比電阻於25$^{\circ}\text{C}$可達18 MΩ·cm以上)；阿巴汀、多滅蟲(doramectin)、emamectin、epinomectin、愛滅蟲(ivermectin)及moxidectin對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Sep-Pak C8，6 mL，500 mg，或同級品。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF材</p>	<p>一、「適用範圍」、「裝置」、「器具及材料」、「檢液之調製」、「基質匹配檢量線之製作」及「鑑別試驗及含量測定」依檢驗方法格式進行文字修正。</p> <p>二、「試藥」、「標準溶液之配製」、「表一」及「表二」修正對照用標準品名稱，使其與指標性殘留物質一致，另「表一」修正部分離子對之質量數至小數點後第一位。</p> <p>三、增列「乙腈飽和之正己烷溶液」之調製、「參考文獻」及</p>

<p>6 mL, 500 mg, 或同級品。</p> <p><u>2.3.3. 容量瓶：10 mL。</u></p> <p>2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm, PVDF材質。</p> <p><u>2.4. 試劑之調製：</u></p> <p><u>2.4.1. 5%乙腈溶液：</u> 取乙腈5 mL, 加去離子水使成100 mL。</p> <p><u>2.4.2. 乙腈飽和之正己烷溶液：</u> <u>取正己烷500 mL, 加乙腈50 mL, 振盪混勻, 靜置至完全分層後, 取正己烷層。</u></p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>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。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液 B：乙腈。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： <u>取相當於含emamectin約10 mg之對照用標準品, 精確稱定；取阿巴汀B1a、多滅蟲、乙醯氨基阿維菌素B1a、愛滅蟲B1a及莫西黴素對照用標準品各約10 mg, 精確稱定, 分別以乙腈溶解並定容至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, 以乙腈稀釋至0.01~5 μg/mL, 供作標準溶液。</u></p> <p>2.7. 檢液之調製：</p> <p>2.7.1. 萃取：</p> <p>2.7.1.1. 肌肉及內臟： 將檢體細切均質後, 取肌肉檢體約5 g或內臟檢體約2 g, 精確稱定, 置於<u>50 mL</u>離心管中, 加入乙腈25 mL, 旋渦混合1分鐘, 振盪10分鐘, 以3200×g離心10分鐘。取上清液, 加入<u>乙腈飽和之正己烷溶液</u>20 mL, 旋渦混合1分鐘, 以3200×g離心5分鐘。取下層液, 加入<u>乙腈飽和之正己烷溶液</u>20 mL, 重複上述步驟萃取1次, 取下層液, 於40°C水浴中以氮氣吹乾, 加入去離子水10 mL及氨水100 μL, 旋渦混合, 供淨化用。</p>	<p>質。</p> <p><u>2.4. 5%乙腈溶液之調製：</u> 取乙腈5 mL, 加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>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。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液 B：乙腈。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取阿巴汀、多滅蟲、<u>emamectin</u>、<u>eprinomectin</u>、愛滅蟲及<u>moxidectin</u>對照用標準品各約10 mg, 精確稱定, 分別以乙腈溶解並定容至10 mL, 作為標準原液, 於-20°C貯存。臨用時分別取適量標準原液混合, 以乙腈溶液稀釋至0.01~5 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. 肌肉及內臟： 將檢體細切均質後, 取肌肉檢體約5 g或內臟檢體約2 g, 精確稱定, 置於離心管中, 加入乙腈25 mL, 旋渦混合1分鐘, 振盪10分鐘, 以3200×g離心10分鐘, 取上清液。加入正己烷20 mL, 旋渦混合1分鐘, 以3200×g離心5分鐘, 取下層液, 加入正己烷20 mL, 重複此步驟一次。下層液於40°C水浴中以氮氣濃縮至乾, 加入去離子水10 mL及氨水100 μL, 旋渦混合後, 供淨化用。</p> <p>2.7.1.2. 乳汁： 將檢體混勻後, 精確量取10 mL, 置於離心管中, 加入乙腈25 mL, 旋渦混合1分鐘, 振盪10分鐘, 以3200×g離心10分鐘, 取上清液, 加入正己烷10 mL, 旋渦混合1分鐘, 以3200×g離心5分鐘, 取下層液, 於40°C水浴中以氮氣濃縮至約8 mL, 加入去離子水10 mL及氨水100 μL, 旋渦混合後, 供淨化用。</p>	<p>「參考層析圖譜」。</p> <p>四、增修訂部分文字。</p>
---	--	------------------------------------

2.7.1.2. 乳汁：

將檢體混勻後，精確量取10 mL，置於50 mL離心管中，加入乙腈25 mL，旋渦混合1分鐘，振盪10分鐘，以3200×g離心10分鐘。取上清液，加入乙腈飽和之正己烷溶液10 mL，旋渦混合1分鐘，以3200×g離心5分鐘，取下層液，於40°C水浴中以氮氣濃縮至約8 mL，加入去離子水10 mL及氨水100 µL，旋渦混合，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及去離子水5 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液，以5%乙腈溶液10 mL流洗，棄流出液，再以乙腈5 mL沖提，收集沖提液，以去離子水定容至10 mL，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節萃取及淨化後之沖提液，分別添加標準溶液1 mL，以去離子水定容至10 mL，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。就各avermectin類抗生素之波峰面積，與對應之各avermectin類抗生素添加濃度，分別製作0.001~0.5 µg/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註1)：

層析管：XSELECT HSS T3, 2.5 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。

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 1.5	100 → 100	0 → 0
1.5 → 3.0	100 → 30	0 → 70
3.0 → 5.0	30 → 5	70 → 95
5.0 → 12.0	5 → 5	95 → 95
12.0 → 12.1	5 → 100	95 → 0
12.1 → 17.0	100 → 100	0 → 0

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：10 µL。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：

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及去離子水5 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液，以5%乙腈溶液10 mL流洗，棄流出液，再以乙腈5 mL沖提，收集沖提液，以去離子水定容至10 mL，經濾膜過濾後，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 → 1.5	100 → 100	0 → 0
1.5 → 3.0	100 → 30	0 → 70
3.0 → 5.0	30 → 5	70 → 95
5.0 → 12.0	5 → 5	95 → 95
12.0 → 12.1	5 → 100	95 → 0
12.1 → 17.0	100 → 100	0 → 0

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：10 µL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：5.5 kV。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：550°C。

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)：50 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。

5.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

加熱管溫度 (Turbo heater temperature)：550°C。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：50 psi。

加熱氣體(Heated gas, GS2)：50 psi。

氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：High。

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(collison energy)如附表一。

註1：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比^(註2)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各avermectin類抗生素之含量(ppm)^(註3)：

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

C：由基質匹配檢量線求得檢液中各avermectin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2：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

註3：檢體中各avermectin類抗生素

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各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。

之含量，其中阿巴汀、乙醯氨基阿維菌素及愛滅蟲之含量以阿巴汀 B1a、乙醯氨基阿維菌素 B1a 及愛滅蟲 B1a 計。

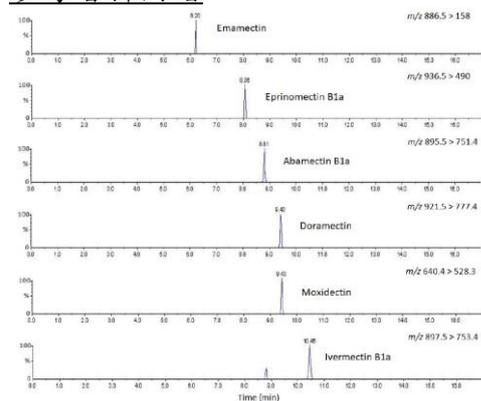
附註：

1. 本檢驗方法之定量極限如附表二。
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

Wang, F., Chen, J., Cheng, H., Tang, Z., Zang, G., Niu, Z., Pang, S., Wang, X. and Lee, F. S. C. 2011. Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Addit. Contam. 28: 627-639.

參考層析圖譜



圖、以 LC-MS/MS 分析 emamectin 等 6 項 avermectin 類抗生素標準品之 MRM 圖譜

附表一、阿巴汀B1a等6項avermectin類抗生素之多重反應偵測模式參數(修正規定)

分析物		離子對	去集簇	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)
Abamectin B1a	阿巴汀B1a	895.5 > 751.4*	51	57
		895.5 > 449	51	61
Doramectin	多滅蟲	921.5 > 777.4*	51	59
		921.5 > 449	51	61
Emamectin	—	886.5 > 158*	51	45
		886.5 > 302	51	39
Eprinomectin B1a	乙醯氨基阿維 菌素B1a	936.5 > 490*	51	65
		936.5 > 352	51	69
Ivermectin B1a	愛滅蟲B1a	897.5 > 753.3*	51	57
		897.5 > 329	51	65
Moxidectin	莫西黴素	640.4 > 528.3*	51	15
		640.4 > 478	51	17

*定量離子對

表一、阿巴汀等6品項抗生素之多重反應偵測模式參數(現行規定)

分析物		離子對	去集簇	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)
Abamectin	阿巴汀	895 > 751*	51	57
		895 > 449	51	61
Doramectin	多滅蟲	921 > 777*	51	59
		921 > 449	51	61
Emamectin	—	886 > 158*	51	45
		886 > 302	51	39
Eprinomectin	—	936 > 490*	51	65
		936 > 352	51	69
Ivermectin	愛滅蟲	897 > 753*	51	57
		897 > 329	51	65
Moxidectin	—	640 > 528*	51	15
		640 > 478	51	17

*定量離子對

附表二、阿巴汀B1a等6項avermectin類抗生素之定量極限(修正規定)

分析物		定量極限(ppm)		
英文名	中文名	肌肉	內臟	乳汁
Abamectin <u>B1a</u>	阿巴汀 <u>B1a</u>	0.01	0.01	0.005
Doramectin	多滅蟲	0.002	0.01	0.005
Emamectin	—	0.005	0.005	0.005
Eprinomectin <u>B1a</u>	<u>乙醯氨基阿維菌素B1a</u>	0.01	0.1	0.005
Ivermectin <u>B1a</u>	<u>愛滅蟲B1a</u>	0.005	0.01	0.005
Moxidectin	<u>莫西黴素</u>	0.01	0.03	0.01

表二、阿巴汀等6品項抗生素之定量極限(現行規定)

分析物		定量極限(ppm)		
英文名	中文名	肌肉	內臟	乳汁
Abamectin	阿巴汀	0.01	0.01	0.005
Doramectin	多滅蟲	0.002	0.01	0.005
Emamectin	—	0.005	0.005	0.005
Eprinomectin	—	0.01	0.1	0.005
Ivermectin	愛滅蟲	0.005	0.01	0.005
Moxidectin	—	0.01	0.03	0.01