

出國報告（出國類別：其它）

第八屆歐洲動物用藥殘留研討會 心得分享

服務機關：食品藥物管理署

姓名職稱：黃志能 技士

派赴國家：荷蘭

出國期間：105年5月20日至105年5月26日

報告日期：105年8月15日

摘要

第 8 屆歐洲動物用藥殘留研討會 (EuroResidue VIII) 於5月21日至5月25日於荷蘭(Holland)的Egmond aan Zee舉行。本署人員在這次會議中，發表動物用藥之研究成果「The Simultaneous analytical method for determination of Flunixin and Tolfenamic acid in animal tissue with LC/MS/MS」並藉此機會了解現階段之趨勢議題及國際間在動物用藥研究領域所用的儀器、技術及目前之成果，進而提升國內殘留動物用藥檢驗技術之知識及加快檢驗方法之研擬，同時建立與國際動物用藥檢驗專家之聯絡溝通管道。

研討會涵蓋專題演講(Keynote lectures)、研究成果口頭發表(Oral presentation)及壁報論文發表(Poster presentation)等，內容多元且完整。整體會議以動物用藥為主幹，衍生出研究技術、法規與管理及環境層面等部分，使參與者能在動物用藥領域上得到全方位的概念與認知。

本次報告節錄較具代表性的內容供大家參考，包含會前研習會、主題演講及口頭發表2篇及壁報發表2篇。研討會期間就接觸到的資訊來看，發現以下趨勢：目前動物用藥之方法開發朝向利用高解析度質譜建立多重快篩方法，針對疑似陽性的檢體，再用公告方法進一步確認。動物用藥不同類別上，物化特性有明顯差異，在定量分析上，不同類別的藥物要同步分析會有所困難，故本會議上很少有研究提到用LR-MS進行多類別之動物用藥多重分析(multi-class and multi-residue analysis)，雖然保守，但在實務上卻是正確的方向與做法。相對地，定量分析上朝向以各類型的藥物成為一個多重方法或單一方法，這與本署目前的做法一致。定性快速篩檢上可用高解析度質譜建立多重類別及藥物的方法，這方面是本署動物用藥檢驗將來可參考的走向。

目錄

摘要.....	2
壹、目的	4
貳、過程	4
參、心得	23
肆、建議	23

附錄1、本署研究成果發表海報資料

附錄2、2015 EuroResidue VIII開會議程

附錄3、出國分享報告簡報資料

壹、目的

EuroResidue conference (歐洲動物用藥殘留研討會)始於 1990 年，每隔 3~4 年舉行一次，至今為止已是第八次會議。會議場址設在荷蘭-濱海埃赫蒙德(Egmond aan Zee)城市，位於荷蘭北部海邊之郊區，每次動物用藥殘留研討會議，此處會聚集來自世界各地動物用藥分析領域之專家，針對目前最新之研究進行發表，參與者能藉此了解國際間目前研究發展之狀況及未來分析技術的走向，故此會議在目前動物用藥殘留分析上具有指標性與前瞻性。

貳、過程



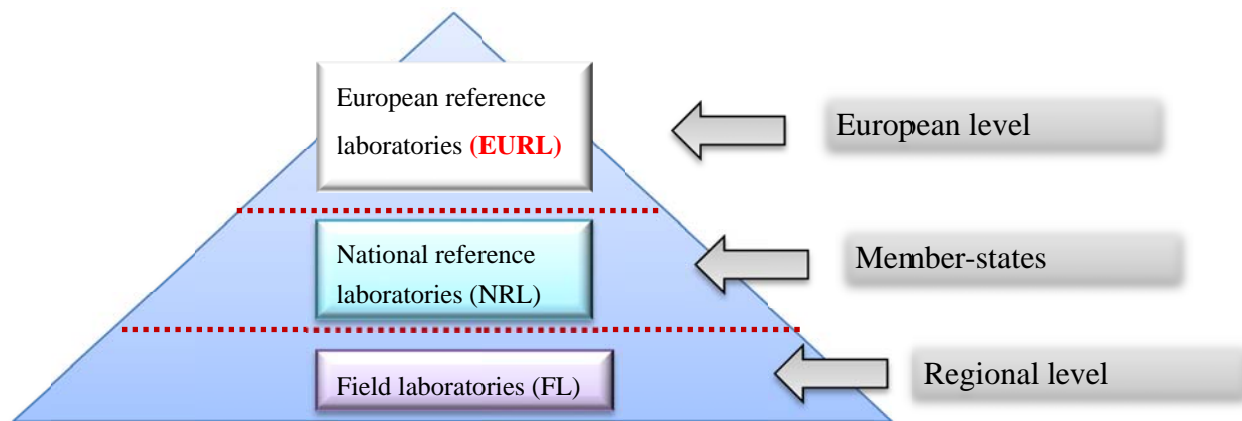
本次研討會內容分為 9 大部分，包含 Pre-conference workshop (會前研習會)、7 個場次會議(每場次包含 keynote lecture 及 oral presentation)及 Poster Presentation(壁報發表)。內容的深度及廣度依序為 keynote lecture、oral presentation 及最侷限性的 poster presentation。對於此次為期四~五天的會議，以下整理並節錄部分較具代表性內容供參考，並針對本署所學的訓練與會議所得到的知識做融

合統整。另外，對於部分內容，因會議當下無法記錄完善之處，在本報告中以事後資料收集方式做整理。

一、Pre-conference workshop (會前研習會)

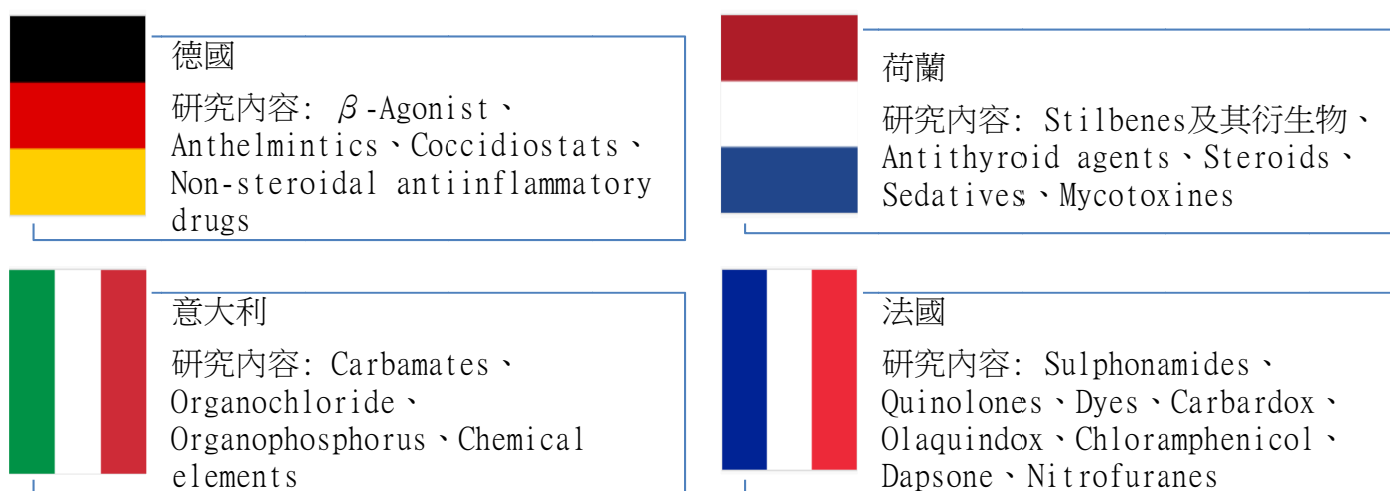
此會議針對首次參加人員進行動物用藥分析之基本概念介紹，包含(一) 當前歐盟殘留分析實驗室層級及概況，(二) 歐盟確效規範重點概述。

(一) 當前歐盟殘留分析實驗室層級及概況(圖一)。



圖一、歐盟實驗室層級規範

由上圖可知，歐盟的殘留分析實驗室分為 3 個層級，由高而低依序為歐盟參考實驗室 (EURL)、國家參考實驗室(NRL)及日常基準實驗室(FL)。其中，**歐盟參考實驗室**分別設在德國、荷蘭、意大利及法國四個國家，主要任務為建立及改進新的殘留藥物分析方法，並針對歐盟成員國之間在殘留定性及定量問題上有爭議時進行仲裁。另外歐盟參考實驗室也針對國家參考實驗室的實驗工作者進行實驗之培訓。四個歐盟參考實驗室在藥物分析上專責不同，如下圖所示：



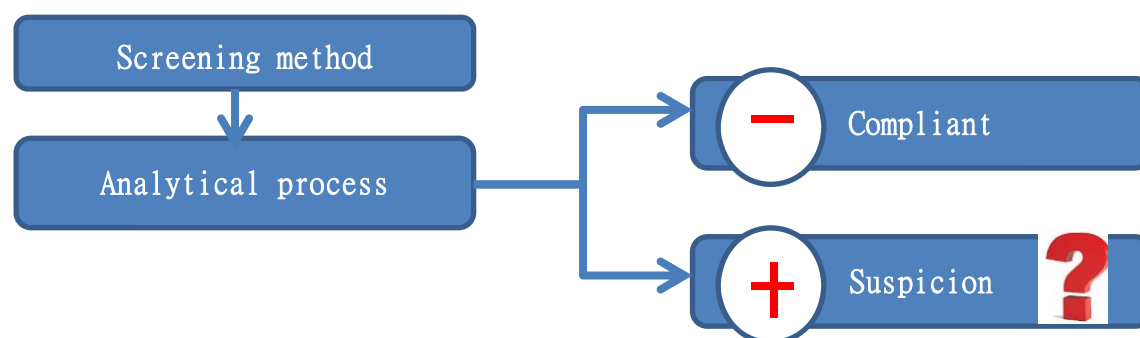
國家考實驗室分散在各成員國中，主要任務在接受歐盟參考實驗室訓練後，執行國家監控樣品的檢測及其它委託檢測任務，專責在國家某一類物質殘留檢測。**日常基準實驗室**分為官方及非官方兩種，從事日常樣品之檢測和執行歐盟殘留監控計畫，主要做篩檢，不從事檢驗方法之開發(万仁玲，2003)。

(二) 歐盟確效規範重點概述

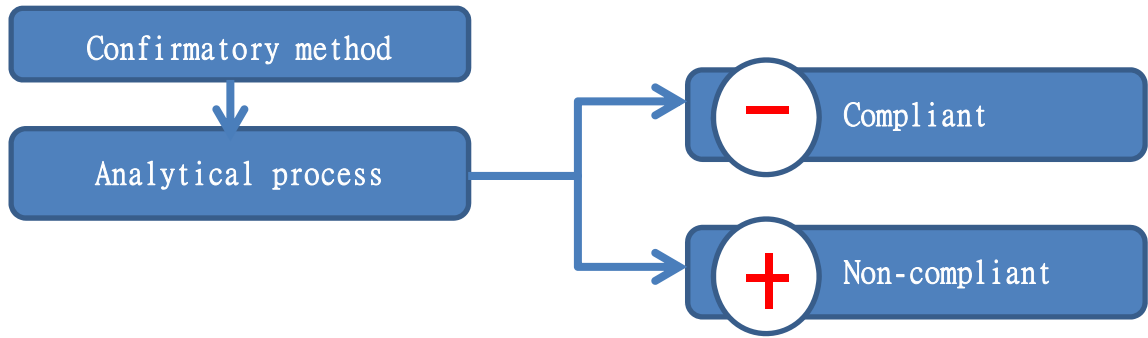
確效實驗上，依照 2002 年歐盟委員會第 657 項決議規範執行(Commission, 2002)，以下內容簡稱 2002/657/EC。會議上介紹部分重點內容，以供與會者了解實際執行時應注意的項目。

1. Screening method and Confirmatory method

首先在分析方法上略分為篩檢方法(Screening method)及確認方法(Confirmatory method)，兩者考量的重點並不相同。首先在篩檢方法部分，應具備四個要求：(1)快速，(2)節省成本，(3)有足夠的靈敏度確保沒有偽陰性(false negative; false compliant)的情況存在，(4)有足夠的專一性以限制偽陽性(false positive; false non-compliant)的結果。



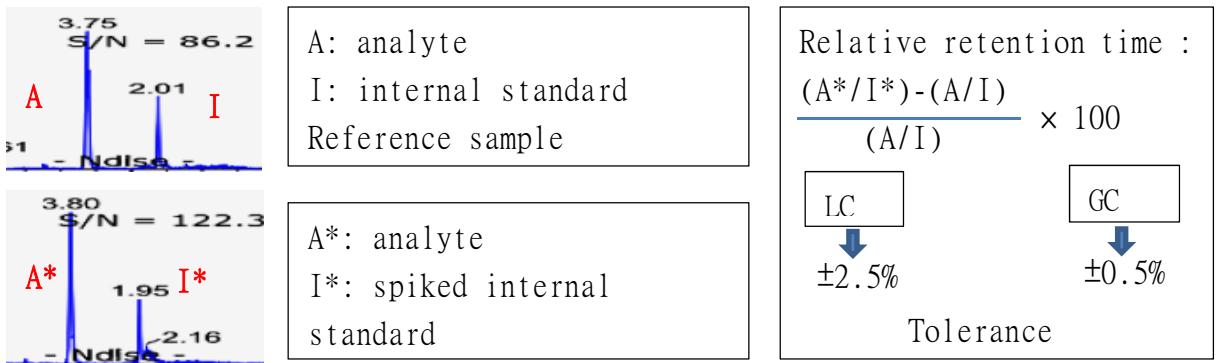
其中，為避免偽陰性的情況存在，在 2002/657/EC 中指出此類型的方法應被驗證且 β -error (false compliant rate) $< 5\%$ 。除了控制 β -error 之外，此方法在專一性上應有要求，以避免太多的偽陽性結果，使進一步以確認方法執行上造成困擾。針對篩檢方法檢測出疑似偽陽性的結果，應再用確認方法進行檢測。會議上，講者在確認方法部分提到應具備兩個要求(1)高敏感度以確保低的偽陰性結果 (2)高專一性以避免偽陽性現象。



在 2002/657/EC 文件中指出，確認方法的成立應具備層析分離及光譜檢測兩種技術，若只具備其中一項則此方法不適用做為確認方法。

2. Chromatographic separation

根據 2002/657/EC 文件，不論是用 GC-MS 或 LC-MS 方法，層析條件應具備兩個基本要求：(1)分析物在層析之出峰時間應為管柱 void volume (介於膠球之間的緩衝液總體積) 的兩倍以上。(2)分析物與內標的相對滯留時間(relative retention time)應與檢量線溶液的情況相符，針對 GC 部分容忍範圍為±0.5%，相對地，LC 部分容忍範圍為±2.5%。



上例是一個液相層析質譜儀之假想例子，以結果來看，相對滯留時間為-4.45%，明顯不符規範內容，亦即不符合 2002/657/EC 之執行準則(performance criteria)，此部分實驗者應探究原因並改善問題才能繼續進行後續方法確效試驗。

3. CC α and CC β

根據歐盟 2002/657/EC 文件所定義如下：

- 1.11. Decision limit ($CC\alpha$) means the limit at and above which it can be concluded with an error probability of α that a sample is non-compliant.
- 1.12. Detection capability ($CC\beta$) means the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β . In the case of substances for which no permitted limit has been established, the detection capability is the lowest concentration at which a method is able to detect truly contaminated samples with a statistical certainty of $1 - \beta$. In the case of substances with an established permitted limit, this means that the detection capability is the concentration at which the method is able to detect permitted limit concentrations with a statistical certainty of $1 - \beta$.

其中， $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 的前兩個字母代表 critical concentration，而 α 代表 α -error (偽陽性的機率)； β 代表 β -error (偽陰性的機率)。在假設檢定的概念中， α 即型 I 誤差、 β 即型 II 誤差，所以一個方法對應的 critical concentration 會同時含有兩種誤差存在，這是不可避免的情況。歐盟對於訂有殘留標準的藥物及未訂殘留標準之藥物有不同的思維並針對 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 提出了兩個不同的做法：低濃度檢量線法及背景法，本報告將其整理以圖示法展現如下：

cc α and cc β for with established permitted limit

calibration method

fortified around the permitted limit in equidistant steps

$$cc\alpha = \mu_{MRL} + 1.64 \sigma_{MRL} \\ (\alpha = 5\%)$$

$$cc\beta = cc\alpha + 1.64 \sigma_{cc\alpha} \\ (\beta = 5\%)$$

background method

by analyzing 20 blank materials per matrix fortified with the analytes at the permitted level.

$$cc\alpha = MRL + 1.64 SD_{MRL} \\ (\alpha = 5\%)$$

$$cc\beta = cc\alpha + 1.64 SD_{cc\alpha} \\ (\beta = 5\%)$$

cc α and cc β for with no permitted limit

calibration method

fortified around the MRPL in equidistant steps

$$cc\alpha = \mu_B + 2.33 \sigma_B \\ (\alpha = 1\%)$$

$$cc\beta = \mu_{cc\alpha} + 1.64 \sigma_{cc\alpha} \\ (\beta = 5\%)$$

background method

by analyzing 20 blank materials per matrix to be able to calculate the signal to noise ratio at the time window in which the analyte is expected

cc α :
Concentration at
S/N ratio ≥ 3

$$cc\beta = cc\alpha + 1.64 SD_{cc\alpha} \\ (\beta = 5\%)$$

二、Keynote lecture and Oral presentation (主題演講/口頭發表)

本報告在主題演講/口頭發表中選兩篇主題做分享，第一篇主要探討目前動物用藥抗藥性的問題及理想動物用藥特性，此部分層次雖已超越研究檢驗範疇，但身為動物用藥殘留之分析者，了解這方面的議題能使視野更廣，相信未來對組織及個人會有所助益；第二篇主要討論當前確效準則的評估，並藉由數家共同實驗室的協助測試，最後由 RILILT 實驗室匯集了數萬筆的數據並進行分析，由實測數據提出當前確效準則未來可修正的方向。

(一)Veterinary Medicine Needs New And Innovative Green Antibiotics.

此篇研究由 Toutain 等人完成，並由 Toutain 本人於會議當場與眾人分享。綜觀來看，這個研究的層次很高，因為整個研究已不再侷限在殘留分析的研究上，而是以整個動物用藥未來的發展提出建議。Toutain 等人針對標題所列「green antibiotics」所下的定義是 "not only for animal health but also for public health requirements"。整個演講的脈絡從目前動物用藥面臨的問題，並介紹當前動物用藥的缺點及理想的 "green antibiotics" 應具備的特性；最後再以法規層面考量來看，未來如何促使邁向 "green antibiotics" 的道路。

1. 目前動物用藥面臨的問題

目前動物用藥面臨的主要問題在於菌種的抗藥性(Antimicrobial resistance, AMR)，而菌種抗藥性，主要分為三種類型，對人類之影響層面由低到高依序如下：

For specific animal pathogens

- 關注點：針對特定的動物病原性微生物。主因在抗藥性的產生，使目前動物用藥用在動物體上，對病原性微生物之效力逐漸減緩。但此部分目前對人類用藥的影響層面較低。

Emergence of foodborne pathogen resistance (zoonotic)

- 關注點：針對食源性病原微生物抗性之突發事件。但此情況主要為個體的案例，而非全面性生態及經濟的影響，故此部分亦非當前抗藥性微生物對人類用藥的最大威脅。

Resistance of the commensal bacteria harboured by animals

- 關注點：從全球生態體系來看，這個層面的重視程度高於前面二點。理由之一在於以生物量(biomass)來看，這類型微生物數量遠高於前面二者，如此針對既有的抗藥性基因或新型的抗藥性基因來看，能夠藉由這種龐大數量的人畜共通微生物放大。

至於人畜共通之微生物如何在人類與動物間交換寄居，有 2 個主要的可能因素：(1)直接因素:食物鏈，微生物介由食物進入人體，最後進入腸道中，與腸道微生物共生(2)間接因素:主要指人、畜與環境間的交互作用。至於病原性微生物如何獲得抗藥性，主要有 2 個路徑：

Direct selection of resistance mutant

- 這是微生物學上的一種概念及術語，大略意思是指因病原性微生物直接暴露在抗菌環境中，只有獲得抗菌能力的突變菌株才能存活並感染健康的個體。這種情況最常見於醫院這種空調系統封閉的環境。

Indirect selection resistant bacterial in the commensal microbiota

- 此概念中，因人類在生活中或多或少會借由食物鏈攝入抗菌性物質 (AMR determinants)，而人體的腸道宛如一個開放的門，當抗菌性物質進入腸道中，使腸道中之人畜共生微生物產生抗藥性基因。在微生物的世界中，基因的水平轉移是一種存在的現象，所以當人畜共生微生物具有抗藥性基因時，能藉由同樣的機制使病原性微生物帶有抗藥性。

2. 目前動物用藥的缺點

目前大部分的動物用藥在施用後，是在腸胃道進行代謝及消化，如此，對腸道中的人畜共生菌株易造成壓力，進而引發具有抗藥性基因的菌株產生。

3. 理想的"green antibiotic"應具備的條件

- (1) 生物可利用性高:此方面意指若抗生素經由添加在動物飼料或飲用水中，則應具備良好吸收特性，最佳情況是能在進入腸道之前即被吸收入動物體內。
- (2) 藥物動力學上，所施用之抗生素應能侷部限制在病原性微生物上。
- (3) 能經由肝腎代謝成非活性物質(inactive metabolites)。

若能達成上述(1)~(3)點，則可避免抗菌性物質進入腸道，誘發抗菌性菌種之產生。

4. 管理層面

- (1) 有關當局應提供誘因促使企業朝"green antibiotic"的方向發展。
- (2) 藥廠若宣稱其抗生素具備"green antibiotic"，則應提供詳細的藥物動力學等資料。
- (3) 市場價格應是目前較難掌控的部分，"green antibiotic"如果成本較高，以目前市

場的情況很難與傳統且較便宜的藥物競爭。

最後，Toutain 針對此議題做個總結，他提出以目前來看，"green antibiotic"與當前廣泛使用的動物用藥相比，其成本較高；儘管如此，目前大部分的動物用藥在使用上，絕大部分會在腸道中殘留，如此易使腸道微生物處在壓力環境並誘使抗藥性基因產生，故"green antibiotic"的方向是刻不容緩的。

(二) A Unique Collaborative Study To Assess Confirmatory Analysis Performance Criteria In Veterinary Drug Residue Analysis

2002/657/EC 是目前動物用藥在方法確效上被廣用的文件，Berendsen 等人依此為依據，經過 19 家實驗室間之 Collaborative Study: 研究內容包含 2 組，第 1 組以 Agilent、Waters、AB SCIEX 及 Thermo 等四家不同廠牌之四極桿質譜儀進行相同實驗，並以 SRM 模式偵測，評估若以同等級、不同廠牌的儀器，在同樣的實驗及同樣的偵測模式下，來評估數據的表現情形；第 2 組評估 QqQ、TOF、Q-TOF、Orbitrap 及 Q-Orbitrap 等 5 個不同類型之質譜儀，在同樣的實驗及同樣的偵測模式下，評估數據的表現情況。Collaborative Study 的數據由 RIKILT 實驗室進行整理(RIKILT 為設在荷蘭之歐盟參考實驗室(EURL)，為歐盟層級最高之國家實驗室)，最後針對 2002/657/EC 之執行準則(performance criteria)部分提出改善之建議。

歐盟 2002/657/EC 文件中，針對方析方法概分為兩類：篩檢方法(Screening method)及確認方法(Confirmatory method)，前者的用途在於快速分析，針對疑似陽性的物質再用確認方法做進一步判定。如此可知，確認方法的嚴謹度及要求會高於篩檢方法，而執行準則(performance criteria)則是一方法再建立時，應具備的條件或準則，只有均符合這些條件及準則下，方法才會被視為具有可適用性。

Berendsen 在此次分享中，著重在後端之確認方法，並著重在鑑別點數(identify point)、選擇性(selectivity)、滯留時間(retention time)及離子比(ion ratio)等四個部分的執行準則上。

1. 鑑別點數

鑑別點數的概念在 2002/657/EC 文件中具有相當重要的份量，它與一個確認方法之"fit for purpose"具有相關性。"fit for purpose"這個概念，意指方法之可信賴信且鑑定的結果超越合理的懷疑(beyond reasonable doubt)。超越合理的懷疑為法律術語，

在抗辯式訴訟制度裡，是驗證刑事罪行時的舉證標準。舉證責任落於檢控的一方，並須要證明其提出的主張已超越合理懷疑，即是說不能在理性自然人心目中存有任何疑點，方能判定被告有罪。也就是說，在假設檢定的概念中， H_0 : compliant; H_1 : non-compliant，如果確認方法之檢測結果是 non-compliant，它是有很強烈的證據懷疑 H_0 的假設，而傾向接受 H_1 的結果。

Berendsen 以 2002/657/EC 規範中，Group A 物質 4 個鑑別點數的要求來看，提出的建議是如果是用低解析度質譜(LR-MS)，應選擇 1 個前趨離子(precursor ion) 及 2 個以上產物離子(product ion)；若用高解析度質譜(HR-MS)，應選擇 1 個前趨離子及 1 個以上產物離子。以 Berendsen 的概念來看，嚴謹度高於 2002/657/EC，如此，鑑別點數可在 4 點以上。另外，若用低解析度質譜，為避免偽陽性結果，產物離子不應包含 m/z 91、105 及 121 的碎片。而不論是低解析度質譜或高解析度質譜，應避免 -17 或 -18 Da 的中性丟失(neutral loss)的碎片，且第 2 個離子對不應選第 1 個離子對的同位素碎片。

2. 選擇性

2002/657/EC 文件中，選擇性定義略以如下: " the purpose of discrimination between the analyte and closely related substance "。實務分析上，選擇性受到很多因素影響，例如:化合物本身、基質、淨化方法及質譜解析度。如果確認方法要達到" fit of purpose "的要求，選擇性部分沒有一個一般準則(general criteria)可依循。就儀器分析來看，Berendsen 認為如果是用高解析度質譜，沒有所謂的最低解析度要求，相對地，著重點應在質量誤差(mass error)方面。針對確認方法，高解析度質譜的質量誤差應在 ± 5 ppm 以內，在這個前提下，解析度多少就有可能視分析情況改變，某些情況可能 10,000 解析度即可達到要求，某些情況需要大於 50,000 解析度才可。就偽陽性及偽陰性的機率來看，以低解析度質譜中 1 個前趨離子及 2 個產物離子的標準為依據，高解析度質譜要做到與上述同樣的程度，應滿足下列 2 點: (1) 1 個前趨離子且質量誤差在 ± 5 ppm 以內及(2) 1 個以上產物離子且質量誤差在 ± 5 ppm 以內。以這邊實做上，較可行的方式是採用 Full-MS ddMs2 或 Full-MS DIA 兩種做法。單獨的 Full scan 及 AIF (all ion fragment)並不建議，Berendsen 指出，Full scan 會產生較高的偽陽性及偽陰性的結果；若用 AIF，即使解析度高達 30,000，仍會產生較高的偽陰性，主因在於 AIF 會產生更複雜的圖譜碎片，進而影響到離子比的判讀，最終會提高 β -error

的機率，AIF 比 dd-MS2 及 DIA 概念相對單純，但若要可性，目前有 2 個建議：(1) 用更高解析度的質譜，(2) 高解析質譜儀前端配合離子遷移譜(ion mobility spectrum, IMS) 或 2-D 層析。

3. 滯留時間

滯留時間在定量及定性上是一個重要的判斷依據，在傳統的層析分離上，滯留時間提供一維的分析及判斷。隨著科技進步，人們對在儀器上看到的訊號有愈來愈多的懷疑。質譜儀的產生提供分析者 2 維度的視野，但對殘留藥物分析者而言，若能具備離子遷移譜或 2-D 層析技術，則一個 3 維度的數據判斷能使結果更具可靠性。儘管如此，一維度的層析分離仍是個關鍵點。滯留時間目前為止仍是方法確效上不可或缺的執行依據。2002/657/EC 針對滯留時間提出以下規範：

- (1) 最早層析峰出峰時間應為 2 倍以上的 void volume。
- (2) 若有合適內標，應用相對滯留時間(relative retention time, RRT)來衡量，針對 GC 部分容忍範圍為 $\pm 0.5\%$ ，相對地，LC 部分容忍範圍為 $\pm 2.5\%$ 。
- (3) 如果沒有合適內標，則滯留時間容忍範圍為 $\pm 5\%$ 以內。

Berendsen 認為，滯留時間容忍範圍應為 ± 0.1 分鐘，不應用 $\pm 5\%$ 的觀點。主因在於一般常用之梯度層析分離，前端化合物較易有滯留時間漂移(RT shift)的現象，詳細內容因講者在說明時速度較快，無法即刻記錄，後面以個人資料收集並閱讀後，整理如下：下圖是 RIKILT 的一個實驗結果，測量 120 個農藥、21 個不同的基質、各 3 個濃度，所以一個實驗室的分析量為 7560 次，共 5 個實驗室共同比對，所以總資料筆數為 37,800

Observed absolute retention time deviations

Retention time deviation of 120 individual pesticides in 21 different matrices at 3 concentration levels relative to their solvent-standard RT reference

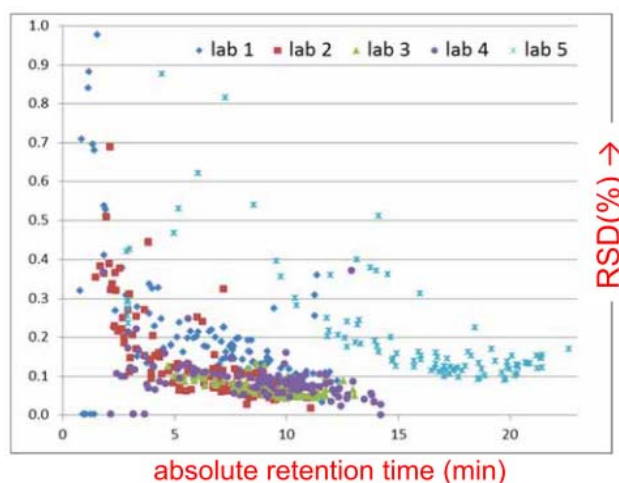
RT deviation (min)*	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5
0-0.025	99.97	99.75	99.13	99.21	87.94
0.025-0.05	0.03	0.25	0.13	0.44	8.48
0.05-0.1	0.00	0.00	0.75	0.33	2.69
0.1-0.15	0.00	0.00	0.00	0.02	0.34
0.15-0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09
0.2-0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21
>0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26

* deviation of pesticide in matrix from average RT of solvent standards

⇒ Retention time deviations >0.10 min are exceptions in today's LC-MS analysis (gradient elution, using column oven)



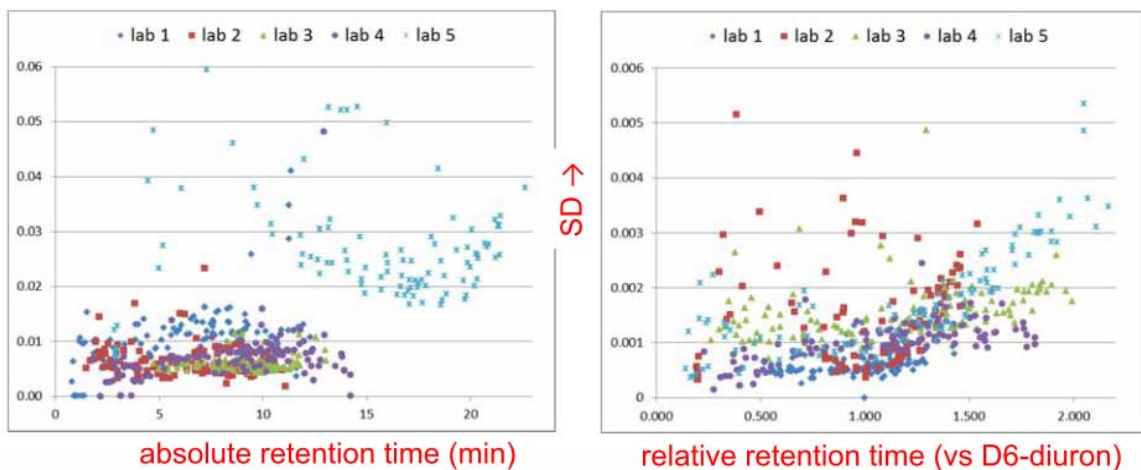
dominated by pirimicarb, terbufos, diclofopos
0.9% for Lab 5
0.16% based on all lab results



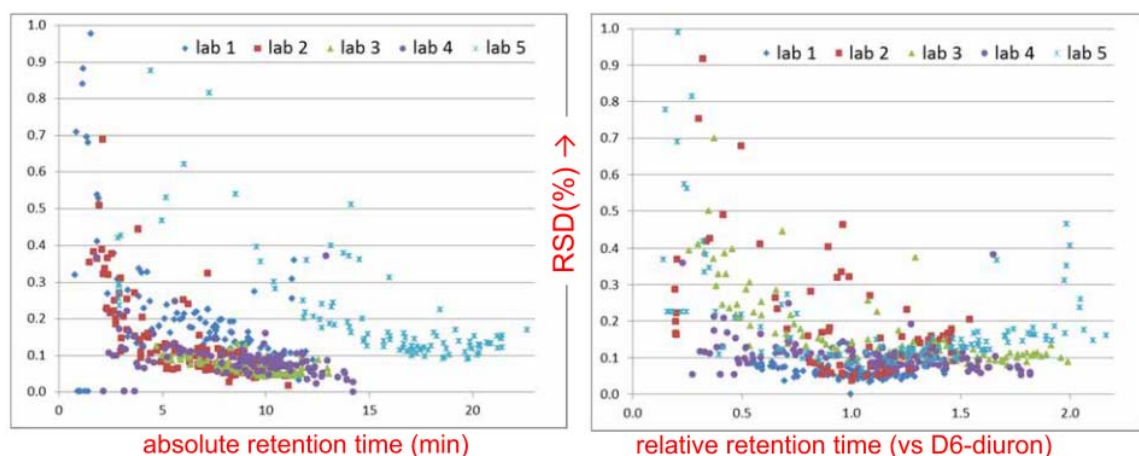
筆。

以上面數據及目前層析儀器的技術水平看，層析滯留時間漂移的情況若在 ± 0.1 分鐘以外，可能是個異常的現象。另外，從絕對滯留時間來看，出峰時間愈晚的化合物，滯留時間的相對標準偏差愈小。若用 $\pm 5\%$ 的觀點來看，假設 2 個藥物同步分析，一個出峰時間在 2 分鐘，一個在 20 分鐘，則前者的容忍範圍為 1.9~2.1 分鐘，後者在 19~21 分鐘，所以滯留時間容忍範圍(RT tolerance)會隨著滯留時間愈久而愈大。但由 37,800 筆的數據來看，滯留時間愈久的化合物，本身滯留時間的變異性低，卻給予一個較寬的容忍範圍，這是一個矛盾的情況。另外，相對滯留時間有無存在的必要性亦是討論的重點，此處亦以會議後資料收集的方式整理，如下圖所示：

同樣 37,800 筆資料來看，絕對滯留的標準偏差趨勢與相對滯留時間不同。前者隨著 RT



增加，標準偏差並沒有隨增加，但後者卻有增加的趨勢。若改用變異係數來看，絕對滯留時間的變異係數會隨著滯留時間增加而減小，但相對滯留時間的變異係數卻看不出有一個趨勢存在。



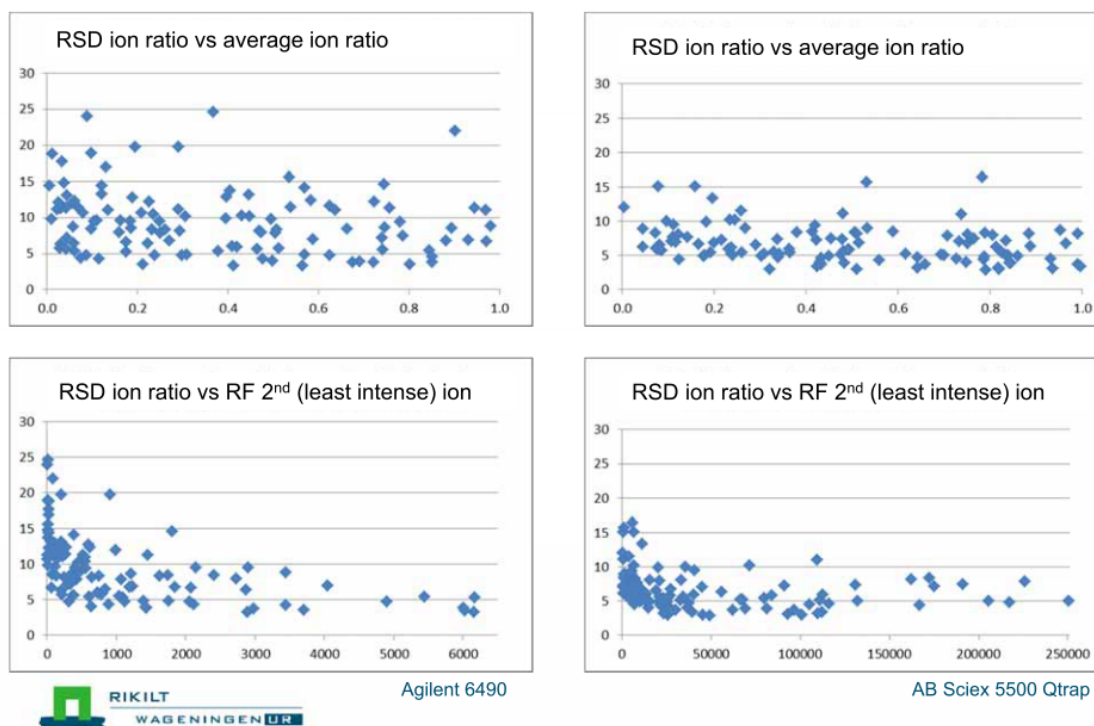
由上面龐大數據分析的結果來看，讓分析者產生了一個困擾，就是相對滯留時間存在的

用途是做什麼?

4. 離子比

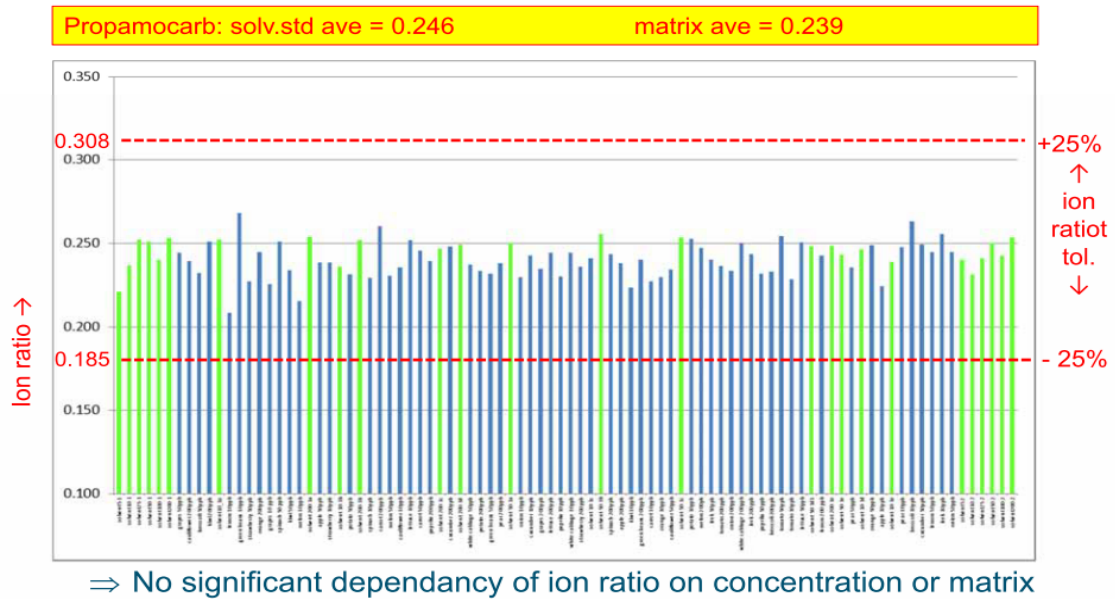
質譜分析中，如果用多重反應模式，則選定的前趨離子會因本身結構特性，產生一些特徵碎片。一般實做上，會選定強度強的碎片 (most intense ion) 放在分母，強度弱的碎片 (least intense ion) 放在分子。離子比 = (peak area of least intense ion) / (peak area of most intense ion)。離子比的規範尚未有統一標準，以農藥 SANCO/12571/2013 及動物用藥 2002/657/EC 來看，兩者標準即不相同。在 Berendsen 研究中，指出離子比偏差會受到 least intense ion 的質譜中表現出來的感度 (S/N) 影響。下圖是以 Agilent 6490 及 AB Sciex 5500 Qtrap 兩種不同廠牌的四極桿質譜儀做出來的結果，並以比較平均離子比與離子比相對標準偏差 (RSD) 與 least intense ion 與離子比相對標準偏差的散佈圖，由圖中可看出，平均離子比 vs 離子比相對標準偏差看不出任何趨勢存在，但 least intense ion vs 離子比相對標準偏差卻看出隨著離子感度愈強，離子比相對標準偏差的散佈愈集中且變異較低。

Assessment variation ion ratios (solv.stds)



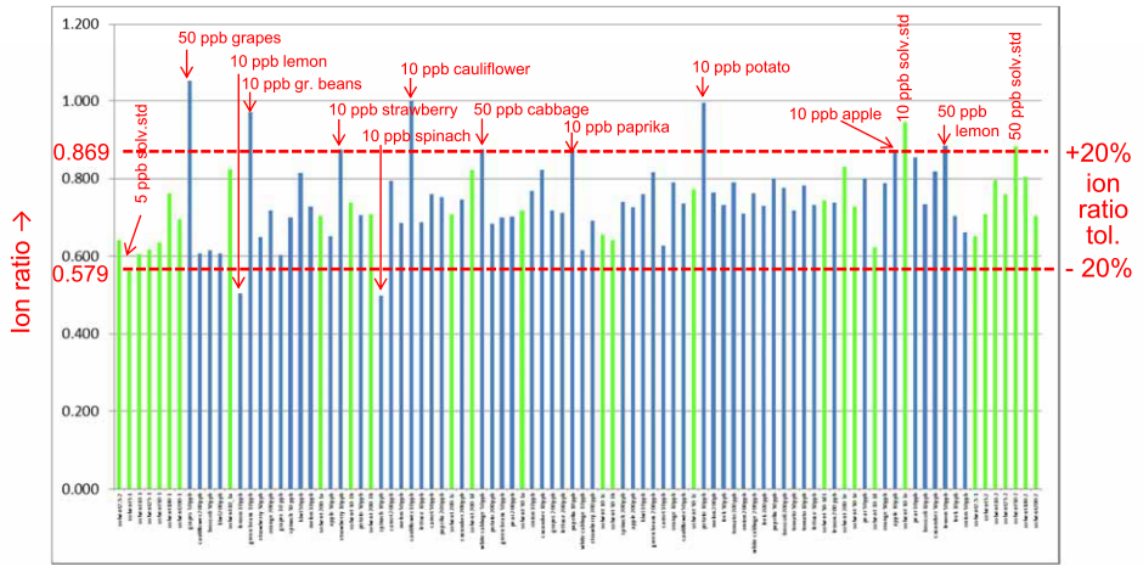
離子比的另外一個注意點是，不論是用 SANCO/12571/2013 或 2002/657/EC 的規範，所訂出的 tolerance criteria 是否恰當? 下圖是後添加不同濃度之農藥 Propamocarb 在不同基質萃取液中的範例並以歐盟 2002/657/EC 的規範計算離子比之範圍為

0.185~0.308，由結果看出不同的添加濃度及不同基質情況並不影響離子比的判讀。



但同樣的實驗中另外一隻農藥 Kresoxim-methyl 卻有不同的表現(如下圖):明明是實驗者自己後添加的實驗，在確認有添加藥品的情況下，離子比的判讀卻在容忍範圍外。如果用假設檢定概念來看， H_0 : compliant (blank)； H_1 : non-compliant (blank 後添加標準液)，但結果卻接受 H_0 ，這是偽陰性的結果。

Kresoxim-methyl: solv.std ave = 0.724 matrix ave = 0.748



Reference: average solv.std 0.724, RSD=12% (N=29); No signal in blank



Outside EU criterion: 3x solv. std (5, 10, 50 ppb)
8x 10 ppb in matix; 3x 50 ppb in matrix

由上面結果衍生出來的想法就是，離子比的容忍範圍在設定下，應考量 α -error 及 β -error 的情況並取一個折衷值。在他的資料中，提出離子比容忍範圍應為一個固定值:±50%，但可惜的是，他的資料內竟然沒有提到±50%下的 α -error 及 β -error 的機率到底是多少。

下表為 Berendsen 所整理的表格供參：

Table 1. Current performance criteria according to CD 2002/657/EC, SANCO/12571/2013 and the proposed criteria.

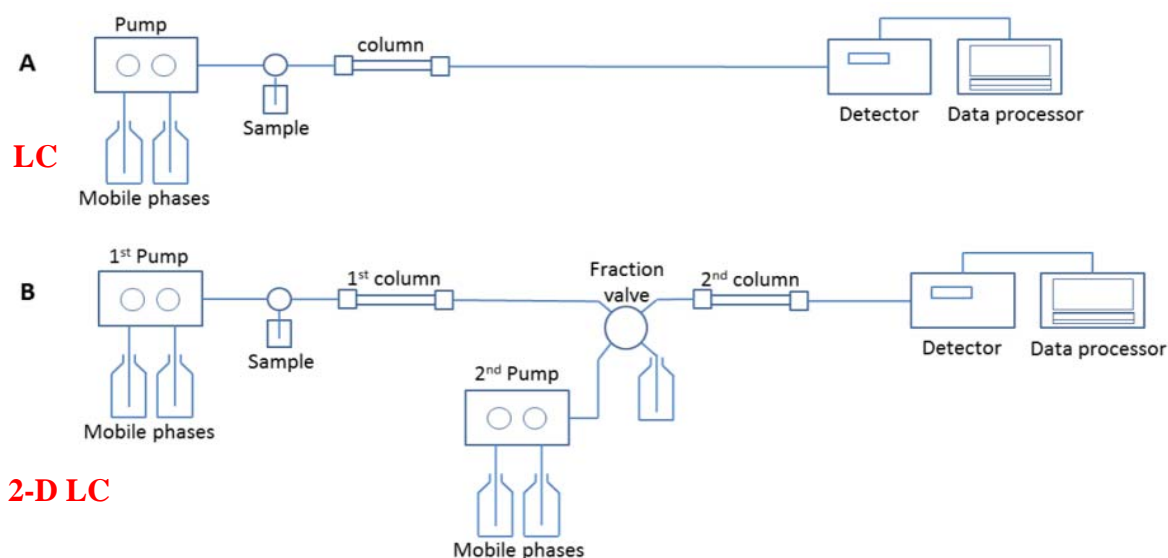
Parameter	CD 2002/657/EC	SANCO/12571/2013	Proposed criterion
Ion ratio tolerance	Dependent of ion ratio:		≤50%
	I > 50%	±20%	
	50 ≥ I > 20%	±25%	
	20 ≥ I > 10%	±30%	
	I ≤ 10%	±50%	
Retention time tolerance	±5%	±0.2 min	Deviation ≤ 0.2 min
Relative retention time tolerance	±2.5%		No criterion needed
Mass resolution	-	Typically > 20,000 FWHM	Fit-for-purpose resulting in ≤ ±5 ppm mass deviations.
Confirmatory techniques	<ul style="list-style-type: none"> - Full scan - SRM 	Single stage HR-MS: <ul style="list-style-type: none"> - Full scan - Limited <i>m/z</i> range - SRM MS/MS: <ul style="list-style-type: none"> - SRM 	<ul style="list-style-type: none"> - SRM - Parallel Reaction Monitoring (PRM)
Confirmatory techniques	≥4 identification points, e.g.: <ul style="list-style-type: none"> - Monitoring 2 product ions using LR-MS after precursor ion selection; - Pseudo-molecular ion in full scan HR-MS combined with monitoring 1 product ion in HR-MS after precursor ion selection. 	<ul style="list-style-type: none"> - ≥2 product ions after precursor ion selection in LR-MS. - ≥2 diagnostic ions, preferably including the (quasi) molecular ion; mass accuracy < 5 ppm; at least one fragment ion in HR-MS. 	<ul style="list-style-type: none"> - ≥2 product ions after precursor ion selection in LR-MS. - ≥1 product ion in HR-MS after precursor ion selection in combination with the pseudo-molecular ion in full scan HR-MS.

三、Poster presentation (壁報發表)

壁報發表部分，這邊分享兩篇，第一篇為 2-D Chromatography 之技術，第二篇為動物用藥之分析。挑選 2-D Chromatography 技術的目的在於此項為目前層析分離技術的演進，對於殘留藥物分析而言，特別針對動物用藥的分析，進一步的分離技術將是未來不可避免的走向。原因在於，目前樣品之前處理方法似乎到了一個瓶頸，隨著儀器的進步，分析者能看到的層次更深，並體認到即使複雜又冗長的前處理淨化流程，對於某些基質的干擾仍無法排除，相對地，卻在前處理花費大量的時間及成本；再者，複雜又冗長的前處理淨化流程會限縮一個方法能分析的項目，整體來看，會使得一個行動變得沒有經濟效益。不論是離子遷移譜或 2-D 層析，若將來能實際應用，可提供 3 個優勢：(1) 增加基質分離的效果，(2) 增加異構物分離的效果，(3) 提供更可靠的定性結果。第二篇動物用藥選定非固醇類抗發炎藥的分析，選定此篇的主因在於該作者所發表之研究與我這次參加會的研究有類似之處，讓我能了解目前此藥物的最新研究概況，並針對個人研究再做精進。

(一) Multimethod For Antibiotic Analysis Using 2-D Liquid Chromatography Mass-Spectrometry

篇研究由 RIKILT 實驗室發表，針對最新 2-D 液相層析的應用進行測試，了解未來 2-D 層析在實際使用的可行性。下圖為液相層析與 2-D 液相層析的示意圖：



作者分析品項包含胺基糖苷類(aminoglycosides)、巨環類(macrolides)、四環黴素類

(tetracyclines)、磺胺類(sulfonamides)及喹諾酮類(quinolones)等五大類部分藥物共 25 項。藥物特性包含極性到非極性區間。作者 2-D 層析上，測試四種管柱的組合：

測試一

Column I

Column II

Reversed phase column

HILIC column

想法：前端利用傳統 C18 管柱做大部分藥物的分離，再利用 HILIC 針對極性化合物進行第 2 次分離。

結果：HILIC 管柱需要較長的平衡時間，如果接在第 2 個層析分離的階段，無法有足夠長的平衡時間讓管柱穩定，達到良好分離效果。

測試二

Column I

Column II

HILIC column

Reversed phase column

想法：接續測試一的想法，既然 HILIC 要比較長的平衡時間，那就將兩者的順序對調。

結果：HILIC 是運用管柱特性配合高有機相，達到對極性化合物之滯留。但後端 C18 管柱卻是從低有機相到高有機相的運用，所以若接在 HILIC 管柱後，會因溶劑效應過大造成分離效果更差。

測試三

Column I

Column II

Weak cation-exchange column
Reversed phase column

想法：利用離子交換管柱針對極性化合物分離，再用逆相管柱分離一般化合物

結果：離子交換管柱分離極性化合物時，有些化合物若以電荷鍵結管柱內官能基，不易前端沖提出來，例如胺基糖苷類即會鍵結在離子交換管柱上。

測試四

Column I

Column II

Chiral column

Reversed phase column

想法：利用掌性異構物管柱做前端分離，後端再用逆相管柱分離一般化合物

結果：掌性異構物可針對極性至非極性化合物達到良好滯留效果，但這類型管柱在動

相的 pH 值調整上需特別注意。前端部分若因 pH 值關係造成峰型不佳，則可利用後端管柱分離改善。

作者實測後，認為目前較可行 2-D 液相層析分離的情況應為 chiral column 配合 reversed phase column，故後續會以此再進行更多的試驗。

這邊可以看出，2-D 液相層析是個還不成熟的技術。分離的概念其實很簡單，但硬體的技術仍待克服；相較於 2-D 液相層析，2-D 氣相層析是目前已能達成的做法，主因在於氣相層析不會有液相層析的溶劑影響，亦即，在分離的概念中，氣相層析的變因比液相層析小，但方便性卻是後者較佳，所以較多的實驗仍傾向液相層析，進而促使 2-D 液相層析的發展。另外，相較 2-D 液相層析，離子遷移譜的技術可能比較成熟，目前 AB Sciex、Agilent 及 Waters 均有發展離子遷移譜的技術。以本科目前的 AB Sciex QTRAP 5500，未來應在離子源後端再配備離子遷移譜裝置，進一步強化分離的技術，這在目前食品檢驗案件之判定上，能強化定性判定的結果，特別是針對離子比有疑慮的檢體或化合物。

(二) Rapid Analysis of Sedatives, Basic and Acidic NSAIDs in Kidney and Muscle by LC-MS/MS

此篇研究由瑞典國家安全局所發表，針對 27 項藥物進行分析，測試基質涵蓋腎臟及肌肉，分析流程以液液萃取配合醋酸銨鹽類鹽析，稀釋後即以液相層析串聯質譜儀分析。整體分析的概念與我這次發表的研究類似，顯示本組動物用藥目前方法開發的方向與國際間並沒有偏離太多，整體方向以簡單前處理配合後端高靈敏度之質譜儀進行分析。以本篇來看，瑞典國家安全局使用的是 Waters Xevo TQS 機台，本署使用的是 AB Sciex QTRAP 5500，兩者間儀器等級類似，故未來本組針對這類型藥物探討時，可參考本篇研究之分析條件，進一步擴充檢驗之品項。

參、心得

這次 EuroResidue 會議讓我受益良多，並對動物用藥殘留分析的現況及未來走向有更明確的認識。在藥物殘留分析上，動物用藥很難像農藥般，以低解析度四極桿質譜儀研發一個同步分析數百個品項的方法，這受限於法規、基質還有藥物種類及物化特性，不僅台灣無法做到，目前國際上亦無法達成。動物用藥殘留分析文獻亦可看出此一現象。目前的多重分析，大多以同一類型的藥物為主，這是務實的做法，例如：胺基醣苷類藥物不會和抗原蟲劑放在一起變成一個同步分析的方法，這是因為兩類型的藥物本身在物化特性上有很大的差異，造成在萃取、淨化及後面層析分離上會有不同的走向。目前台灣的做法，是各自有一篇多重殘留的分析方法，這種情況在參加這次會議後，確認是個正確的做法。本署公告方法的走向，比較像歐盟採用的確認方法，雖然嚴謹，但衍生的問題是在市場抽驗分析上，會比較沒有經濟效益。所以利用高解析度質譜儀及高感度之四極桿質譜儀建立一個多重分析快篩方法有其必要性，如此，在抽驗上即可針對疑似陽性的檢體再進一步以確認方法進行定性及定量，做為最終的判定。故未來以高解析度質譜儀建立多重類別及藥物的定性快速篩檢方法是本署動物用藥檢驗將來可參考的走向。

肆、建議

EuroResidue 會議所包含之訊息多元，涵蓋分析方法之開發及應用、監測及風險評估、法規議題等資訊，以下為參與研討會後提出之建議：

1. 建議持續鼓勵同仁積極爭取參與國際型會議的機會，參與此類型國際性會議可在短時間內了解國際趨勢，並能藉由參考別人的研究成果來增進檢驗研究之效益。
2. 食品檢驗方面，高解析度質譜儀是目前及未來的趨勢，本組目前高解析度質譜儀機台較少，建議可再增購相關設備並進行相關訓練，提昇本組人員在此方面的能力。
3. 建議可參考及比較其它國家針對檢驗方法開發之思維及做法，以截長補短。目前歐盟做法偏向先以篩檢方法測試，疑似陽性檢體再用更嚴謹之方法確認。國內對於市場監測，目前偏向直接用公告方法做篩檢及判定，雖然嚴謹但可能比較不具有經濟效益。建議本組未來可逐步仿效歐盟，嘗試以高解析度質譜儀建

立多重快篩方法，此部分著重在定性或半定量上。公告方法的角色則為快篩方法後的最終判定。