

出國報告（出國類別：研究實習）

第24屆法國國立南特獸醫大學 Laberca
實驗室食品殘留物及污染物檢驗訓練
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：法國

出國期間：106年9月23日至106年9月30日

報告日期：106年12月7日

摘要

第24屆法國國立南特獸醫大學(Oniris)之 Laberca 實驗室食品殘留物及污染物檢驗訓練於106年9月23日至9月30日舉行，本次奉派前往參加 SARAF (School for Advanced Residue Analysis in Food, SARAF) 課程。本次研習課程共計有8位不同國家之人員參與，含法國2位、西班牙2位、俄羅斯1位、茅利塔尼亞2位及台灣1位。我國由本署黃志能技士參加。

本次研習期間共計一週，內容涵蓋歐盟法規簡介、風險評估、化合物監測種類、樣品製備方法、質譜分析技術、分析準則及分析方法確效等，研習過程以理論為主，內容豐富，使檢驗分析人員在殘留物及污染物之領域上獲得更進一步之知識。

目錄

摘要.....	2
壹、 目的.....	4
貳、 過程.....	4
參、 心得.....	5
肆、 建議.....	33
伍、 參考資料	34

壹、目的



本次目的為至法國國立南特獸醫大學 Laberca 實驗室受訓，內容包含食品中殘留物及污染物檢驗技術、相關法規、儀器原理及鑑別與定量分析等，以了解歐盟國家實驗室在檢驗分析之技術及觀念，是否有台灣值得學習借鏡之處，並帶回相關檢驗知識，提昇本署

方法開發之能力，增進檢驗方法之品質，使方法在轉移至其它實驗室使用時能縮短落差，同時建立與法國國家參考實驗室聯繫及學習管道。

貳、過程

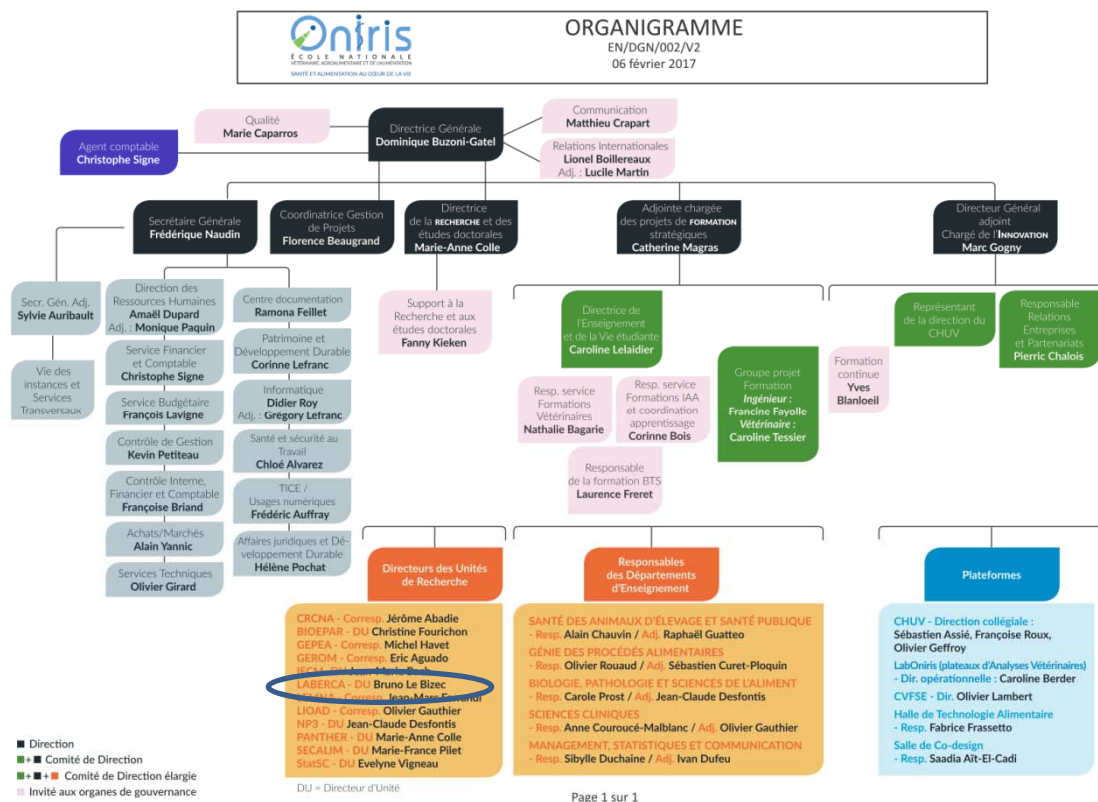
表一、法國國立南特獸醫大學 Laberca 課程內容

日期	課程內容
106.9.23-24	啟程赴法國南特
106.9.25	實驗室介紹、歐盟法規介紹、監測化合物及樣品製備之挑戰
106.9.26	質譜儀在殘留物及污染物之應用及質譜儀介紹(含 QqQ、BE、Orbitrap 及 QTOF)
106.9.27	液相層析質譜儀及氣相層析質譜儀
106.9.28	判定準則及定量分析
106.9.29	確效概念
106.9.30-10.1	返國

參、心得

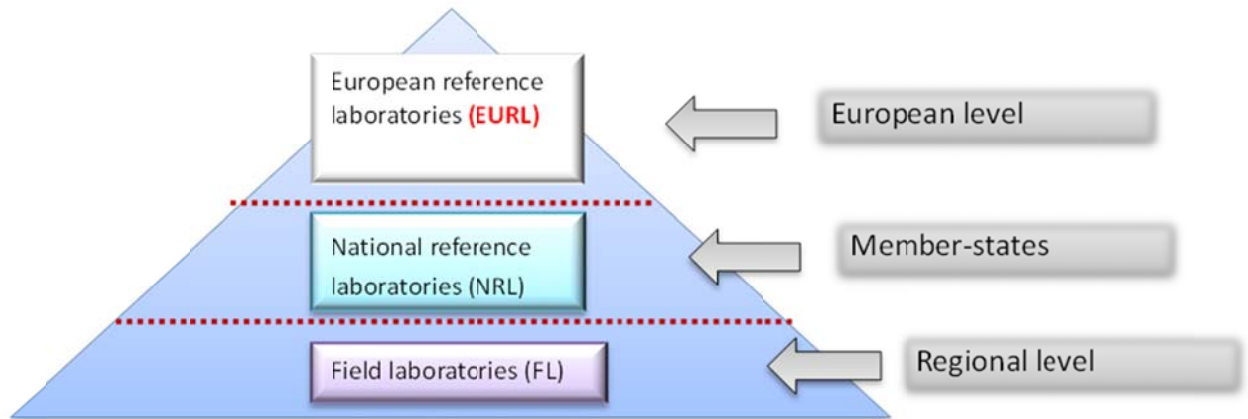
一、LABERCA 實驗室簡介

Oniris 為教育及研究型大學，隸屬法國食品、農業暨漁業部，由法國南特國立獸醫學院(ENVN)及國立農業技術暨食品科學之工程學院(ENITIAA)在 2010 年合併成立。組織圖如下：



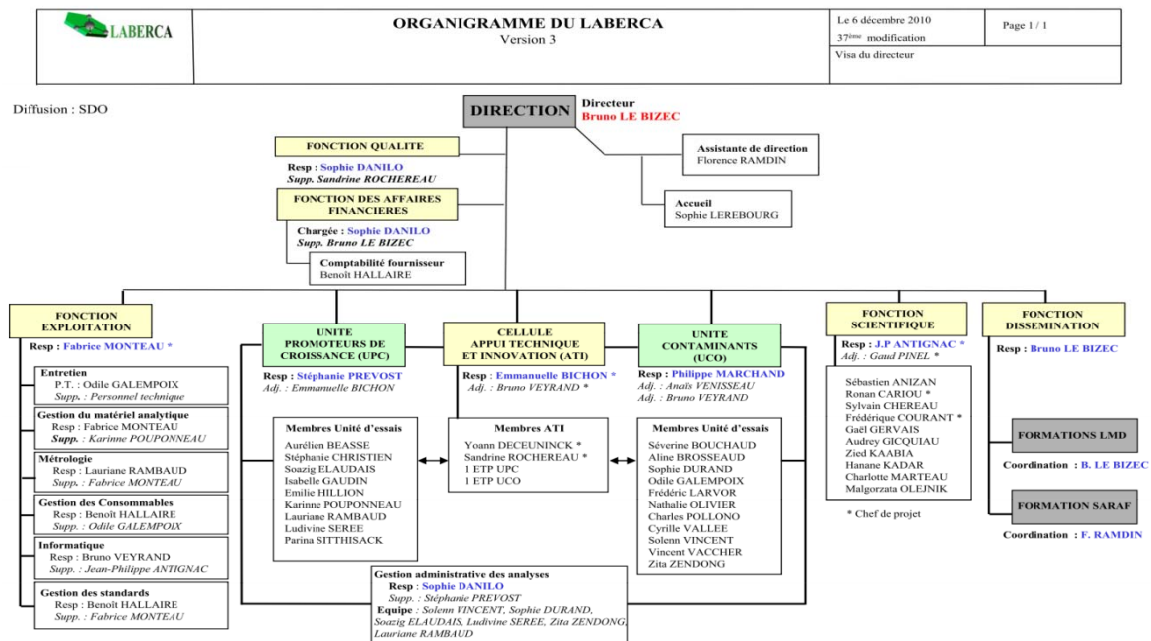
圖一、Oniris 組織圖

LABERCA 為其中一個單位，前身為 LDH，為法國南特國立獸醫學院(ENVN)實驗室，後來在 2000 年時更名為 LABERCA (LABoratoire d' Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments)，LABERCA 為法文之縮寫，英譯為 National Reference Laboratory for the Analysis of Residues and Contaminants in Food，屬於法國國家參考實驗室(National Reference Laboratory, NRL)。在歐盟體系中，國家參考實驗室屬第二層級，分散在各成員國中，主要任務為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，同時亦可自行開發方法，並將方法轉移給日常基準實驗室，後者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)。



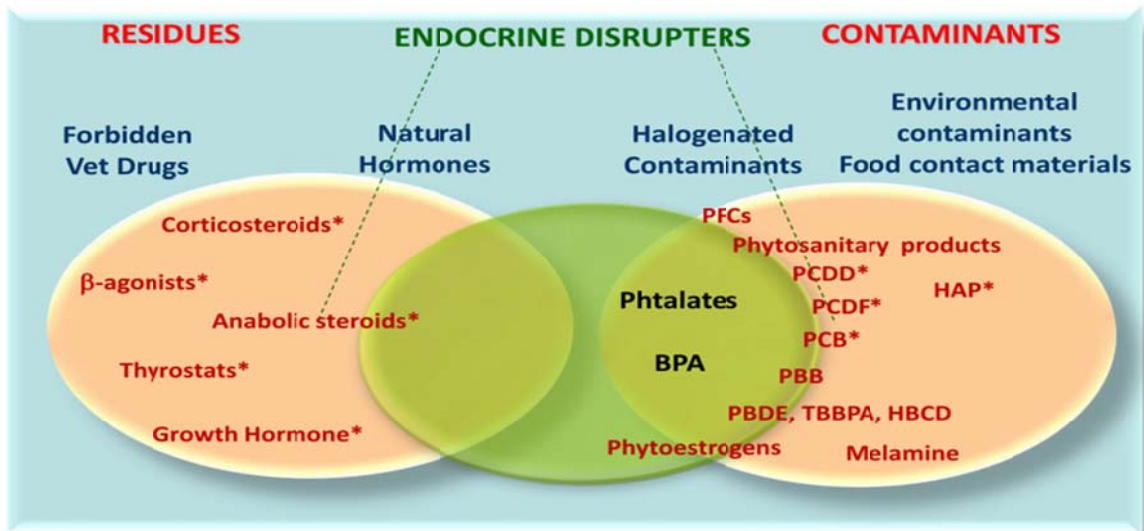
圖二、歐盟實驗室層級規範

目前 LABERCA 管理四個日常基準實驗室，這四個日常基準實驗室主要監測生長促進劑 (growth promoters)、戴奧辛(dioxins)與多氯聯苯(PCBs)、三聚氰胺(melamine)及多環芳香烴類(PAHs)，LABERCA 角色要為居中協助並提供分析上解決之方法，同時協助主管當局擬定監測計畫及定期辦理日常基準實驗室間之能力測試，以評估實驗室之能力。LABERCA 實驗室成員約 50 位，含教授兼研究人員、研發工程師、設計工程師、助理工程師、技術人員及行政人員，其中博士、博士後研究及碩士約 15 位。整個實驗室分析上主要集中在生長促進劑及污染物兩個類別。



圖三、LABERCA 實驗室組織圖

FOOD SAFETY



* National Reference Laboratory (NRL) for the French DGAL and European DG SANCO

圖四、LABERCA 實驗分析上主要專責項目

SARAF 為 Oniris 之持續教育課程，主要訓練工程師及技術人員先進之方法以分析食品中殘留物及污染物，此課程在 2001 年開始舉辦，主要目的提供歐盟及其他第三國家學員學習歐盟食品中殘留物及污染物的法規、增進分析化學知識、品質管理與保證、實物操作及與各國合作的網絡。截至目前為止，包括台灣在內，已經有超過 90 個國家，900 位以上學員參加該課程，對於提升各國在食品中殘留物及污染物之分析技術上有很大的幫助，並且建立良好溝通平台，有助於各國交流與互動。

目前 LABERC 實驗室具有之尖端分析儀器，包括氣相層析串聯質譜儀 (GC-MS/MS) 3 台、液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 3 台、氣相層析高解析度質譜儀 (GC-HRMS) 3 台、液相層析高解析度串聯質譜儀 (LC-HRMS²) 3 台、氣相層析同位素質譜儀 (GC-C-IRMS) 2 台及液相層析時間飛行式質譜儀搭配離子選擇器 (LC-QTOF-IMS) 1 台，如圖五。

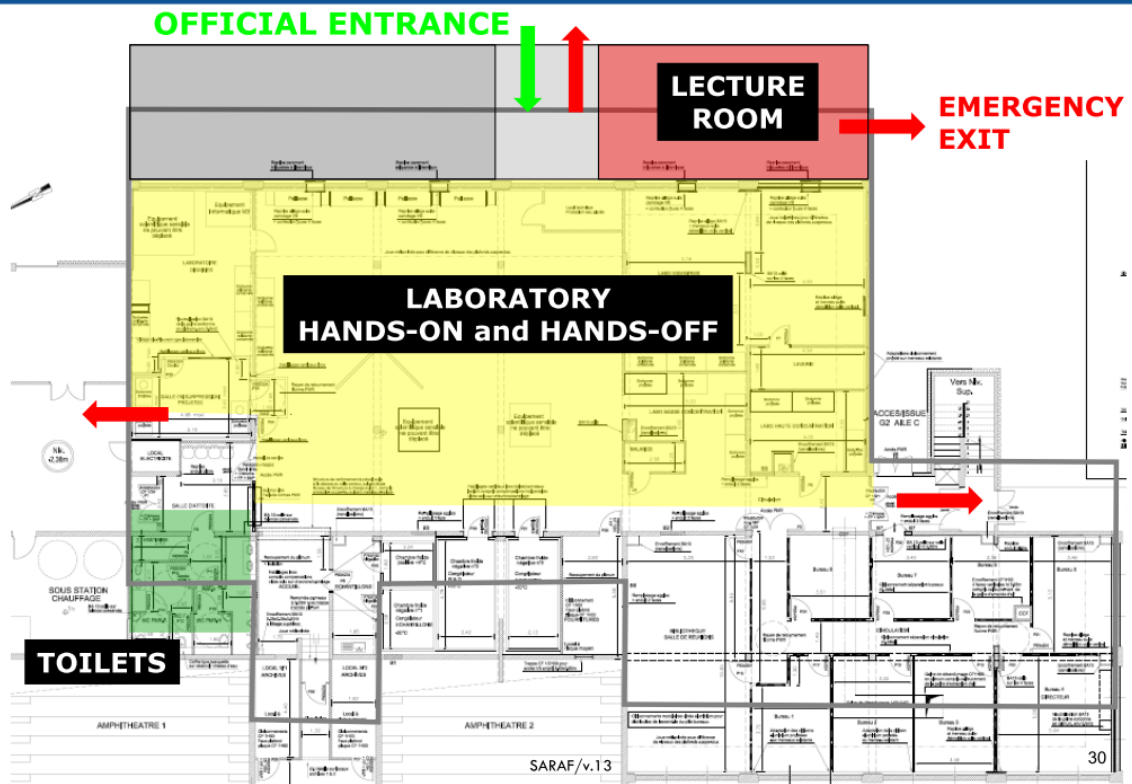
0.6 Analytical facilities



圖五、LABERCA 實驗室儀器設備

實驗室環境部分，就個人參加這次研習並詢問授課講師，LABERCA 實驗室只有二層樓，第一層樓含授課教室、儀器、辦公室、休息室及廁所；第二層樓只放高壓氣體等。整體來看，該實驗室空間大為最主要優勢，因為就實地參觀來看，無論 LC 或 GC 等機器，放置方式並無特別設計，但以圓弧狀環繞整個實驗室，氣體管線由二樓牽至一樓，供應儀器分析所需，只有分析戴奧辛及多氯聯苯的磁場式高解析度質譜儀放置另外隔間中。因空間大及法國本身氣候並不像台灣如此濕熱，故實驗室溫度不高。另外，儀器運作時，馬達及渦輪葉片運轉，勢必有噪音存在，但因空間大，所以整體的噪音環境並非像本署研檢組實驗環境如此吵雜。數據分析上，該實驗室具有遠端連線功能，實驗人員能在辦公室處理實驗數據，此處是本署可學習之處。但該實驗室竟然無抽氣設備，所有的廢氣均充滿在實驗室中，且所看到的實驗人員沒有配戴口罩的習慣，顯然對當下實驗人員的身體保護的責任並未兼顧。

2.2 Laboratory map



圖六、LABERCA 一樓實驗室佈置

二、歐盟法規整理 – 污染物及動物用藥部分

以下整理食材中污染物及動物用藥部分之相關法規

Regulation/Directive/Decision	Statement	Related Regulation/Directive/Decision
Reg 2377/90	laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin 規範項目 食材及動物源之最大殘留容許量	Repealed in Reg 470/2009
Dir 96/22/EC	Concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists 規範項目 禁用藥物 (Forbidden substance)	Repealing Dir 81/602/EEC Repealing Dir 88/146/EEC Repealing Dir 88/299/EEC Amending Dir 74/2003 Amending Dir 97/2008 Amended in Dir 2008/97/EC Amended in Dir 2003/74/EC
Dir 96/23/EC	On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products 規範項目 監測計畫 (monitoring plan)	Repealing Dir 85/358/EEC Repealing Dir 86/469/EEC Repealing Dec 89/187/EEC Repealing Dec 91/664/EEC Implementing Dec 2002/657/EC
Dec 1999/879/EC	concerning the placing on the market and administration of bovine somatotrophin (BST) and repealing Decision 90/218/EEC 規範項目 生長激素 (Growth hormone)	Repealing Dec 90/218/EEC
Dir 2001/22/EC	laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury and 3-MCPD in foodstuffs 規範項目 重金屬 (鉛、鎘及汞) 污染物：3-單氯丙二醇	

Reg 178/2002/EC	laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety 規範項目 歐盟一般食品法	
Dec 2002/657/EC	implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results 規範項目 動物用藥之方法確效準則	Implementing Dir 96/23/EC ; Amended in Dec 2004/25/EC
Dir 2002/69/EC	laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of dioxins and the determination of dioxin-like PCBs in foodstuffs 規範項目 抽樣及分析方法：戴奧辛及多氯聯苯	
Dir 2003/74/EC	amending Council Directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists 規範項目 禁用藥物 (Forbidden substance)	Amending Dir 96/22/EC
Dec 2004/25/EC	amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin 規範項目 動物用藥氯黴素、硝基呋喃、甲羥孕酮及孔雀綠之最低檢測能力要求	Amending Dec 2002/657/EC
Reg 396/2005	on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC	Amending Dir 91/414/EEC Amended in Reg 2008/299

	<table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>農藥之最大殘留容許量</td> </tr> </table>	規範項目	農藥之最大殘留容許量	
規範項目				
農藥之最大殘留容許量				
Dec 2005/34/EC	laying down harmonised standards for the testing for certain residues in products of animal origin imported from third countries	Dir 97/78/EC Reg 882/2004		
Reg 401/2006	laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>採樣及分析：食物中之黴菌毒素部分</td> </tr> </table>	規範項目	採樣及分析：食物中之黴菌毒素部分	Reg 882/2004 Amended in Reg 178/2010
規範項目				
採樣及分析：食物中之黴菌毒素部分				
Reg 199/2006	amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards dioxins and dioxin-like PCBs <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>Dioxin 及 PCBs 之最大殘留容許量</td> </tr> </table>	規範項目	Dioxin 及 PCBs 之最大殘留容許量	Amending Reg 466/2001
規範項目				
Dioxin 及 PCBs 之最大殘留容許量				
Reg 1881/2006	Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>污染物之最大殘留容許量</td> </tr> </table>	規範項目	污染物之最大殘留容許量	Reg 315/93 Repealing Reg 466/2001 Amended in Reg 565/2008 Amended in Reg 165/2010 Amended in Reg 1259/2011 Amended in Reg 594/2012
規範項目				
污染物之最大殘留容許量				
Reg 1882/2006	laying down methods of sampling and analysis for the official control of the levels of nitrates in certain foodstuffs <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>採樣及分析：食材中之硝酸鹽部分</td> </tr> </table>	規範項目	採樣及分析：食材中之硝酸鹽部分	
規範項目				
採樣及分析：食材中之硝酸鹽部分				
Reg 1883/2006	laying down methods of sampling and analysis for the official control of levels of dioxins and dioxin-like PCBs in certain foodstuffs <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>採樣及分析：食材中之戴奧辛及多氯聯苯部分</td> </tr> </table>	規範項目	採樣及分析：食材中之戴奧辛及多氯聯苯部分	Repealed in Reg 252/2012
規範項目				
採樣及分析：食材中之戴奧辛及多氯聯苯部分				
Dir 2006/13/EC	amending Annexes I and II to Directive	Amending Dir 2002/32/EC		

	<p>2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed as regards dioxins and dioxin-like PCBs</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>動物飼料之戴奧辛及多氯聯苯</td> </tr> </table>	規範項目	動物飼料之戴奧辛及多氯聯苯	
規範項目				
動物飼料之戴奧辛及多氯聯苯				
Reg 333/2007	<p>laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>採樣及分析：食材中之鉛、鎘、汞、無機錫、3-單氯丙二醇及多環芳香類</td> </tr> </table>	規範項目	採樣及分析：食材中之鉛、鎘、汞、無機錫、3-單氯丙二醇及多環芳香類	Reg 882/2004
規範項目				
採樣及分析：食材中之鉛、鎘、汞、無機錫、3-單氯丙二醇及多環芳香類				
Reg 2008/565	<p>amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards the establishment of a maximum level for dioxins and PCBs in fish liver</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>污染物之最大殘留容許量</td> </tr> </table>	規範項目	污染物之最大殘留容許量	Amending Reg 1881/2006 Reg 315/93
規範項目				
污染物之最大殘留容許量				
Reg 299/2008	<p>amending Regulation (EC) No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin, as regards the implementing powers conferred on the Commission</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>農藥之最大殘留容許量</td> </tr> </table>	規範項目	農藥之最大殘留容許量	Repealing Reg 396/2005
規範項目				
農藥之最大殘留容許量				
Dir 2008/97/EC	<p>amending Council Directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>禁用藥物 (Forbidden substance)</td> </tr> </table>	規範項目	禁用藥物 (Forbidden substance)	Repealing Dir 96/22/EC
規範項目				
禁用藥物 (Forbidden substance)				
Reg 470/2009	laying down Community procedures for the	Repealing Reg 2377/90		

	<p>establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>食材及動物源之最大殘留容許量</td> </tr> </table>	規範項目	食材及動物源之最大殘留容許量	<p>Amending Dir 2001/82/EC Amending Reg 726/2004</p>
規範項目				
食材及動物源之最大殘留容許量				
Reg 124/2009	<p>Setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>抗球蟲藥劑</td> </tr> </table>	規範項目	抗球蟲藥劑	<p>Amended in Reg 610/2012</p>
規範項目				
抗球蟲藥劑				
Reg 1152/2009	<p>imposing special conditions governing the import of certain foodstuffs from certain third countries due to contamination risk by aflatoxins and repealing Decision 2006/504/EC</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>黃麴毒素</td> </tr> </table>	規範項目	黃麴毒素	<p>Repealing Dec 2006/504/EC</p>
規範項目				
黃麴毒素				
Reg 258/2010	<p>imposing special conditions on the imports of guar gum originating in or consigned from India due to contamination risks by pentachlorophenol and dioxins, and repealing Decision 2008/352/EC</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>印度關華豆膠之五氯酚及戴奧辛</td> </tr> </table>	規範項目	印度關華豆膠之五氯酚及戴奧辛	<p>Repealing Dec 2008/352</p>
規範項目				
印度關華豆膠之五氯酚及戴奧辛				
Reg 178/2010	<p>amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards groundnuts (peanuts), other oilseeds, tree nuts, apricot kernels, liquorice and vegetable oil</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>採樣及分析：食物中之黴菌毒素部分</td> </tr> </table>	規範項目	採樣及分析：食物中之黴菌毒素部分	<p>Amending Reg 401/2006</p>
規範項目				
採樣及分析：食物中之黴菌毒素部分				
Dec 2010/327	<p>amending the Annex to Decision 2004/432/EC on the approval of residue monitoring plans submitted by third countries in accordance with Council Directive 96/23/EC</p> <table border="1"> <tr> <td>規範項目</td> </tr> <tr> <td>監測計畫</td> </tr> </table>	規範項目	監測計畫	<p>Amending Dec 2004/432 Accordance with Council Directive 96/23/EC</p>
規範項目				
監測計畫				

Reg 165/2010	amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins 規範項目 污染物之最大殘留容許量	Amending Reg 1881/2006
Reg 37/2010	on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin 規範項目 動物性食品中藥物之最大殘留容許量	
Reg 1259/2011	amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs	Amending Reg 1881/2006
Reg 594/2012	amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs 規範項目 污染物之最大殘留容許量	Amending Reg 1881/2006
Reg 252/2012	laying down methods of sampling and analysis for the official control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EC) No 1883/2006 規範項目 採樣及分析：食物中之戴奧辛及多氯聯苯部分 廢止 Reg 1883/2006	Repealing Reg 1883/2006
Reg 610/2012	amending Regulation (EC) No 124/2009 of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed	Amending Reg 124/2009

Reg 277/2012	amending Annexes I and II to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels and action thresholds for dioxins and polychlorinated biphenyls <table border="1" data-bbox="347 432 1027 533"> <tr> <td data-bbox="347 432 1027 483">規範項目</td> </tr> <tr> <td data-bbox="347 483 1027 533">飼料中戴奧辛及多氯聯苯最大殘留容許量</td> </tr> </table>	規範項目	飼料中戴奧辛及多氯聯苯最大殘留容許量	Amending Dir 2002/32/EC
規範項目				
飼料中戴奧辛及多氯聯苯最大殘留容許量				
Reg 589/2014	laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012 <table border="1" data-bbox="347 775 1027 920"> <tr> <td data-bbox="347 775 1027 826">規範項目</td> </tr> <tr> <td data-bbox="347 826 1027 920">採樣及分析：食物中之戴奧辛及多氯聯苯部分</td> </tr> </table>	規範項目	採樣及分析：食物中之戴奧辛及多氯聯苯部分	Repealing Reg 252/2012
規範項目				
採樣及分析：食物中之戴奧辛及多氯聯苯部分				
Rec 2014/118/EU	on the monitoring of traces of brominated flame retardants in food			

Scientific Opinion	Content		
2010 Scientific opinion (EFSA)	Scientific Opinion on Polybrominated Biphenyls (PBBs) in Food <table border="1" data-bbox="406 1375 1082 1480"> <tr> <td data-bbox="406 1375 1082 1426">規範項目</td> </tr> <tr> <td data-bbox="406 1426 1082 1480">多溴聯苯 (PBBs)</td> </tr> </table>	規範項目	多溴聯苯 (PBBs)
規範項目			
多溴聯苯 (PBBs)			
2011 Scientific opinion (EFSA)	Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food <table border="1" data-bbox="406 1525 1082 1630"> <tr> <td data-bbox="406 1525 1082 1576">規範項目</td> </tr> <tr> <td data-bbox="406 1576 1082 1630">PBDEs</td> </tr> </table>	規範項目	PBDEs
規範項目			
PBDEs			
2012 Scientific opinion (EFSA)	Scientific Opinion on Emerging and Novel Brominated Flame Retardants (BFRs) in Food <table border="1" data-bbox="406 1722 1082 1827"> <tr> <td data-bbox="406 1722 1082 1774">規範項目</td> </tr> <tr> <td data-bbox="406 1774 1082 1827">BFRs</td> </tr> </table>	規範項目	BFRs
規範項目			
BFRs			
2013 Scientific opinion (EFSA)	Guidance on methodological principles and scientific methods to be taken into account when establishing Reference Points for Action (RPAs) for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin		

	規範項目	
	PBDEs	

Guidance	Content
2010 Guidance	Guidance document for competent authorities for the control of compliance with eu legislation on aflatoxins
	規範項目
	Alfatoxins

三、監測化合物

(一). 污染及殘留的概念區分

1. 污染(contaminants)指非刻意在生產或市場販售過程中,經由飼料或水源進入食材中之化合物,包含環境污染物例如重金屬、戴奧辛等。
2. 依據 96/23/EC 之定義,殘留(residues)為添加使用的藥物,最後藥物 (parent drugs) 或其代謝物 (metabolites)仍存在食材中,例如動物用藥、飼料添加物、農藥,其可能對人類健康有所危害。

(二). 歐盟 96/23/EC 附件之監控物質整理如下

Classification	Substance
Group A	含具同化效應 (Anabolic effect) 之物質及未許可之物質 1. Stilbenes, stilbene derivatives, and their salts and esters 2. Antithyroid agents 3. Steroids 4. Resorcylic acid lactones including zeranol 5. β -agonists 6. Compounds included in Annex IV to Council Regulation EEC No 2377/90 of 26 June 1990 (1) <i>Aristolochia spp.</i> and preparations thereof (2) Chloramphenicol (3) Chlorpromazine (4) Colchicine (5) Dimetridazole (6) Metronidazole (7) Nitrofurans (including Furazolidone) (8) Ronidazole
Group B	指獸醫用藥和污染物,細分為 B1, 2B2, 及 B3 類化合物。
B1	1. Antibacterial substances (1) β -lactams, (2) Tetracyclines, (3) Macrolides, (4) Aminoglycosides, (5) Amphenicols, (6) Polypeptides

	<ol style="list-style-type: none"> 2. Chemotherapeutics <ol style="list-style-type: none"> (1) Sulfonamides, (2) Quinolones, (3) Nitrofurans, (4) Nitroimidazoles
B2	其他獸醫用藥 (Other veterinary drugs)
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anthelmintics 2. Nitroimidazoles 3. Carbamates and pyrethroids 4. Sedatives 5. Non-steroidal anti-inflammatory drugs , NSAIDs 6. Pharmacologically active substances
B3	其他物質及環境污染物 (Other substances and environmental contaminants)
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Organochlorine compounds 2. Organophosphorus compounds 3. Chemical elements 4. Mycotoxins 5. Dyes 6. Others

四、樣品製備之挑戰 – 以前處理、萃取、淨化為例說明

(一). 樣品前處理

1. 目前 LABERCA 在樣品均質部分，主要有幾個方法，如下

(1) 針對固態樣品

研磨



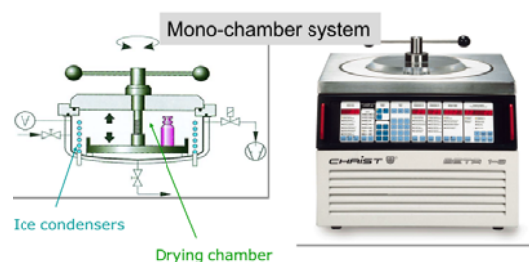
Grinding

均質機



Cutting

冷凍乾燥

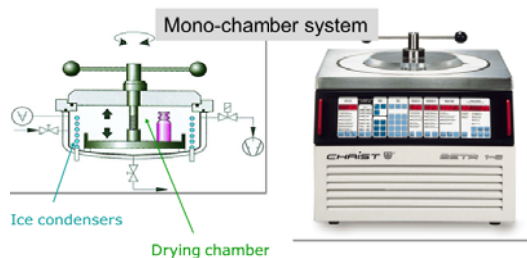


(2) 針對液態樣品

過濾



冷凍乾燥

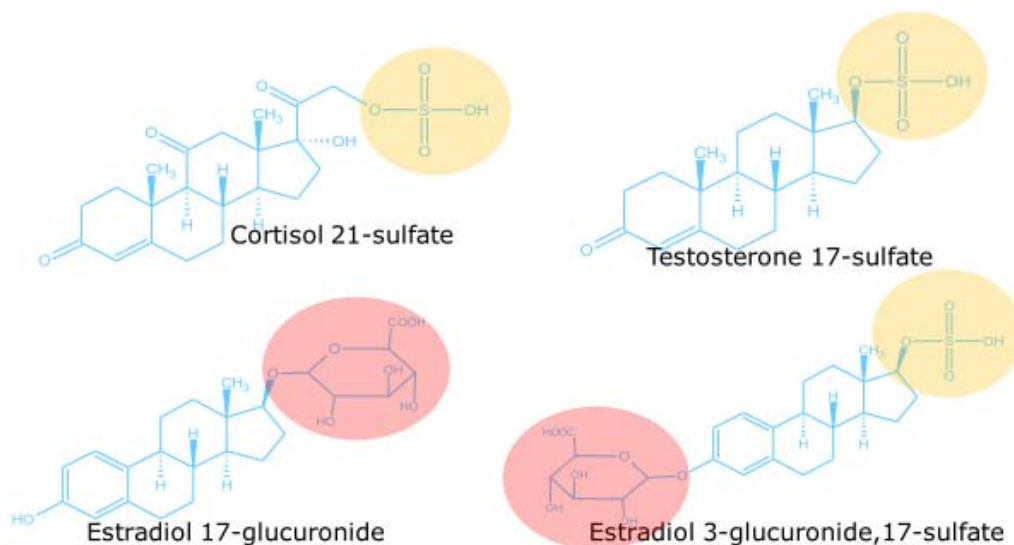


其中研磨、均質機及過濾的使用為目前本署實驗室在處理食品基質時較常用的方法，而冷凍乾燥目前尚未引進。參考本署同仁前往美國實驗室實習情況來看，冷凍均質的作法在動物檢體中藥物殘留或污染物殘留之檢驗方法開發應值得學習。理由主要有 3 點，第 1 點為均質完的樣品存放空間可減少；第 2 點為樣品冷凍脫水後保存不易變質；第 3 點為樣品之代表性。針對第 3 點部分，其實牽涉到本署食品化學檢驗確效執行的概念，尤其在方法之偵測極限及定量極限上。因為以歐盟來看， $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 的建立至少會考慮 20 個空白樣品，針對這 20 個空白樣品來建立方法之 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 值，而 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 是歐盟根據統計學概念所設，雖廣為國際使用，但台灣及美國並未引進此概念，而美國之作法根據本署實習同仁所述，會選 10 個空白樣品，經過冷凍均質後成為粉末，並將這 10 個空白的粉末樣品混合，成為一個代表性基質再做後方法評估。所以歐盟是利用個別不同樣品的變異性來建立 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ ，美國是將個別不同樣品混合成一個代表性基質，因為這個代表性基質具有所有基質之變異性，並依此來建立 LOD 及 LOQ。相對地，台灣目前對這個部分並沒有明確規範該如何執行，而未來不論是要遵循何種作法，均質

成為粉末的動物檢體在保存及空間上仍比目前傳統均質方法為佳。

2. 樣品之水解部分

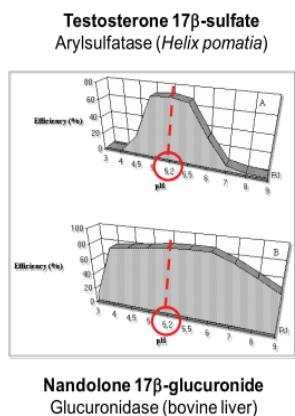
在動物用藥之分析上，某些特定藥物在前處理上需要水解，主因為這些藥物在肝臟代謝過程中是否會經由 Phase II 的過程。經過此過程後，代謝物會形成 sulfates 或 glucuronides 的結合態(conjugated forms)(圖七)。



圖七、結合態之部分激素類藥物

針對此類藥物，如果沒有經過水解，分析上會嚴重低估藥物的殘留狀況。在水解上，分為酵素水解及化學水解兩種方法，前者為添加酵素，利用酵素的專一性，使結合態的藥物釋放出來，後者為利用甲醇配合乙醯氯或者乙酸乙酯配合硫酸等，利用化學破壞的方式使結合態的藥物釋放出來。

Enzymatic hydrolysis



Chemical hydrolysis

	Methanolysis	Solvolysis
Reagents	Anhydrous Methanol + Acetyl Chloride	Ethyl Acetate + Sulfuric Acid
Theoretical efficiency	Glucuronides + Sulfates	Sulfates
Typical conditions	0.5 M 10-15 min 40-50 °C	0.5 M 45-75 min 40-50 °C

針對酵素水解及化學水解的優缺點整理如下

酵素水解	
優點	缺點
容易控制且重覆性佳	時間長且成本較高
針對 glucuronides 及 sulfates 的水解效果良好	可能會造成部分藥物降解
適用大多數情況	可能會產生其它干擾物
化學水解	
優點	缺點
快速且成本較低	無法適用大多數情況
-	針對生物性基質，無法有效控制實驗變異性
-	重覆性需要確認

(二). 萃取

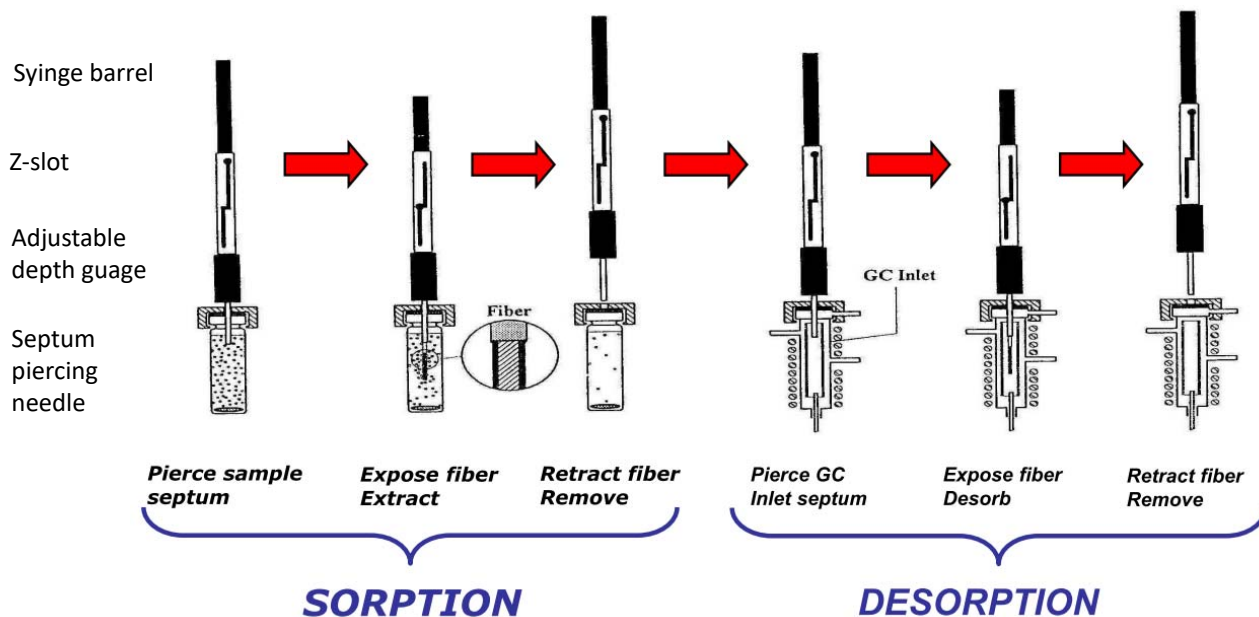
1. 執行萃取步驟時要考量因子:

在這個步驟中有四個因子是實驗人員應該要注意的，包含(1)萃取效率 (2)共萃物含量 (3)藥物在萃取過程中之穩定性 (4)最終要測量的濃度。

2. 常見的萃取方法

(1) 固相微萃取法(Solid Phase Microextraction, SPME)

主要用在揮發性物質萃取，常搭配的儀器為 GC-MS/MS，但目前亦有文獻將 SPME 技術延伸到 LC-MS/MS。固相微萃取之核心技術藏在隔膜穿刺針中之纖維材質。主要利用塗覆在纖維上的材質，例如: Polydimethylsiloxane (PDMS)、Polyacrylate (PA)、Styrene-divinylbenzene (SDB)等與樣品接觸，一段時間達到動態平衡後，將纖維收回，再注入 GC-MS/MS 或 LC-MS/MS 進行分析。依照與樣品的接觸情況，大致分為浸入式及頂空式兩種，前者為纖維直接與樣品接觸，後者是將纖維放置樣品瓶內上空一段時間，吸附揮發性成分。流程如下



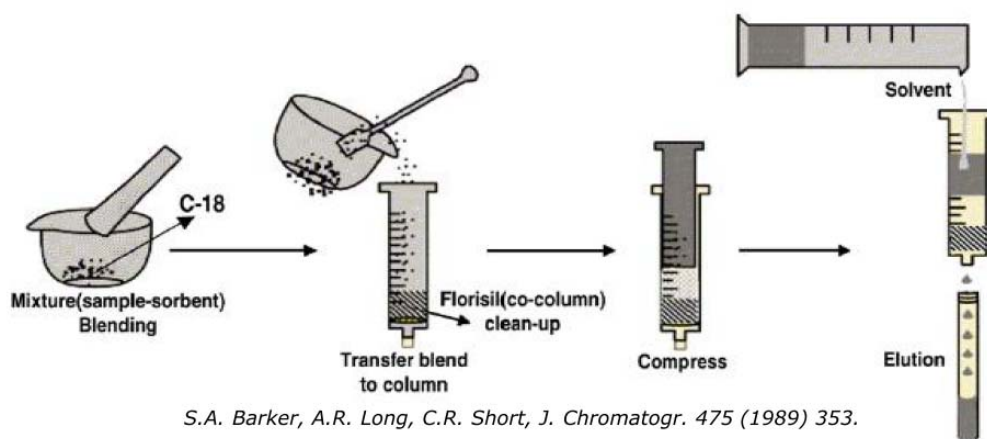
(2) 高壓液體萃取法(Pressurised Liquid Extraction, PLE)



原理上是利用高溫及高壓下，液體會呈現低黏稠性，藉此可達到三種效果，(1) 萃取時提高分析物的溶解性 (2) 破壞分析物與基質間之交互作用 (3) 促進分析物擴散到基質表面，並藉由這三種效果以提高萃取效率。

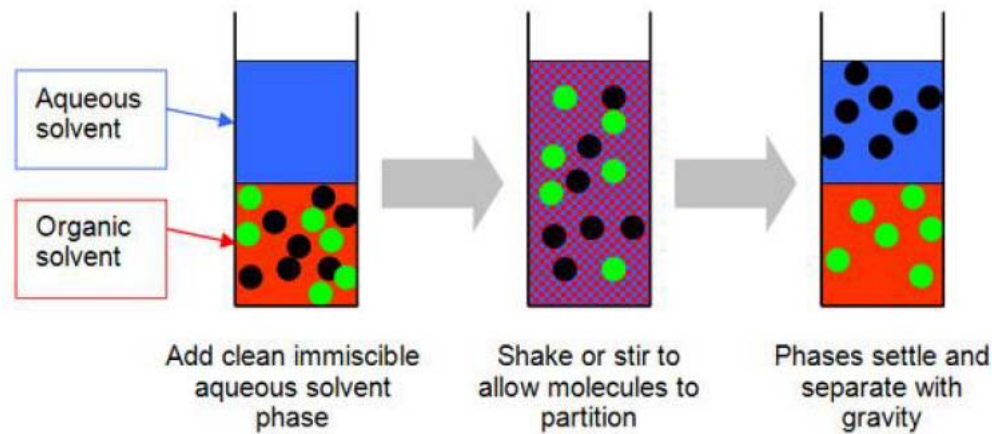
(3) 基質輔助固相萃取法(Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD)

原理是將基質與 C18 bonded silica, Florisil, Na₂CO₃, Celite 等混勻後，充填入管柱中，再利用溶劑沖提的方式來萃取，基本步驟如下：



(4) 液液/固萃取法(Liquid/Liquid Extraction, LLE or Liquid/Solid Extraction, LSE)

液液萃取為利用兩互不相溶的溶劑，進行混合接觸後，再以離心或靜置方式使其分層，達到萃取效果，萃取原理主要依據分析物在兩相中之分配係數。液固萃取即為利用溶劑將分析物從固態基質中萃取出來。



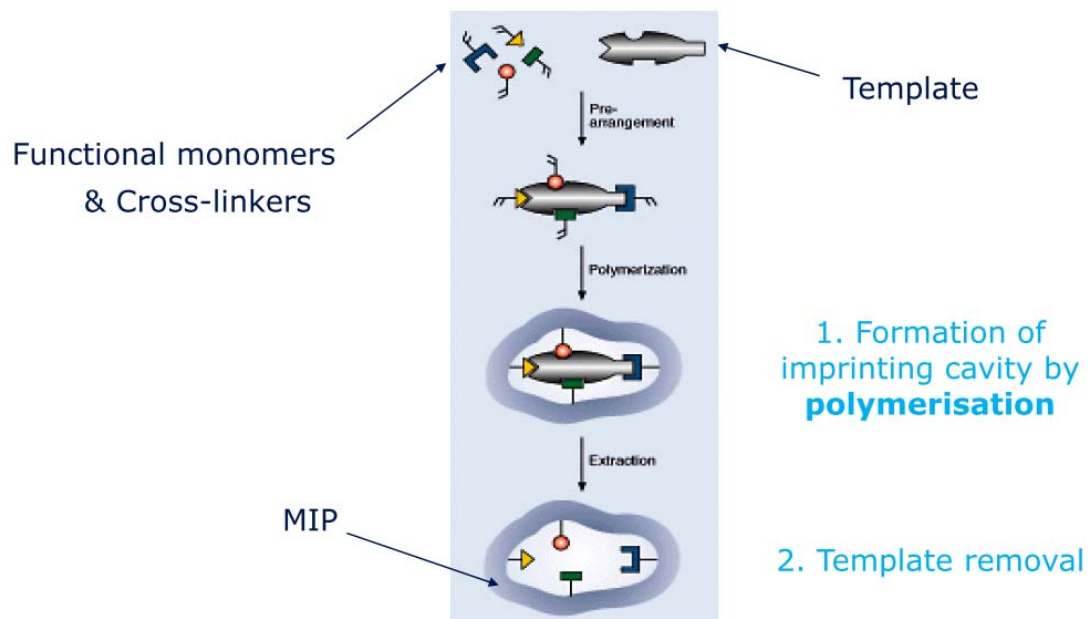
(5) QuEChERS

QuEChERS 為 Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe 等字的簡稱，在 2003 年由 Anastassiades 等人提出，為一種鹽析的概念來輔助有機溶劑的萃取，後端在以分散型的淨化粉劑淨化。這個方法目前廣泛被運用在農藥、動物用藥、天然毒素及污染物等。此方法的優點在於簡單快速，與常見的萃取方法相比，能在較短時間處理大規模樣品；但仍有些缺點，例如(1)針對高極性藥物，無法藉由鹽析進入有機層，進而影響萃取效果 (2)針對低殘留物之分析，例如生長促進劑(growth promoters)、戴奧辛(dioxins)與多氯聯苯(PCBs)、三聚氰胺(melamine)及多環芳香烴類(PAHs)等不易執行。

(三). 淨化

淨化為樣品萃取完後的進一步處理，目的是將複雜的干擾物質去除，避免影響分析物的偵測及判定。常用的淨化方式包含固相萃取匣(solid phase extraction, SPE)、免疫親和法(immunoaffinity)及分子拓印法(molecular imprinted polymers, MIP)等。以分子拓印法為例進行說明：分子拓印法為一種具有辨識特定物質能力的技術，製程中利用非生物材料當作模板(template)，再與官能基單體進行非共價反應(non-covalent interactions)或共價 (covalent) 鍵結，然後添加交鏈劑、起始劑等進行聚合反應後，

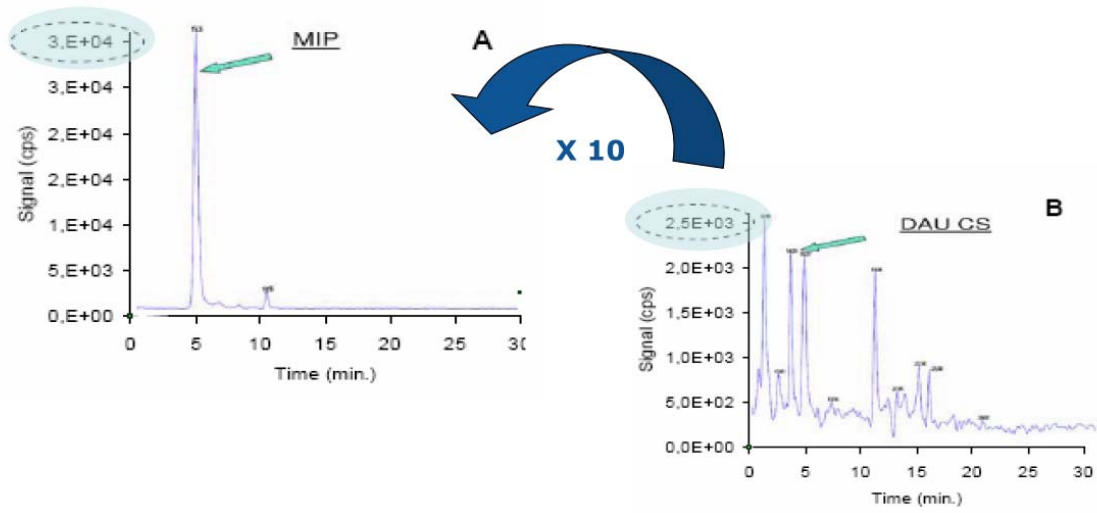
再移除模板，製成具有高選擇性及專一性之聚合物，應用於樣品的淨化。常見的非共價反應包含靜電作用力 (electrostatic forces)、氫鍵 (hydrogen bonding) 或凡得瓦爾力 (Van der Waals forces) 等，另外常見的共價反應包含許夫鹼 (Schiff's bases)、硼酸化 (borate)、醛酮化反應 (acetal ketone) 及酯化反應 (ester) 等。圖八為分子拓印法的流程圖。



圖八、分子拓印法的流程圖

使用分子拓印法的好處是可以達到比傳統的 SPE 更佳淨化效果，因為選擇性更好，但相對地，適用性則不夠廣泛。所以從經濟效應來看，針對一般性藥物一般不會採用這類方法，但針對禁用性藥物，如果 SPE 等淨化程序仍無法滿足要求，分子拓印法可作為另外一個方法選項。由實驗室簡介來看，SARAF 主要負責動物用藥中生長激素類等禁用藥物之分析方法開發，下圖為該實驗室比較分子拓印法與固相萃取匣淨化後，分析檢液中 clenbuterol 的情況，由圖中發現分子拓印法的獨特選擇性遠優於固相萃取匣。本署動物用藥檢驗方法開發過往尚未有人提出分子拓印法的應用，主因在於知識的侷限，藉由這次研習直接讓我了解到動物用藥之檢驗是個充滿挑戰及有趣的領域。

Urine extracts spiked with Clenbuterol
($0.05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (277>203))

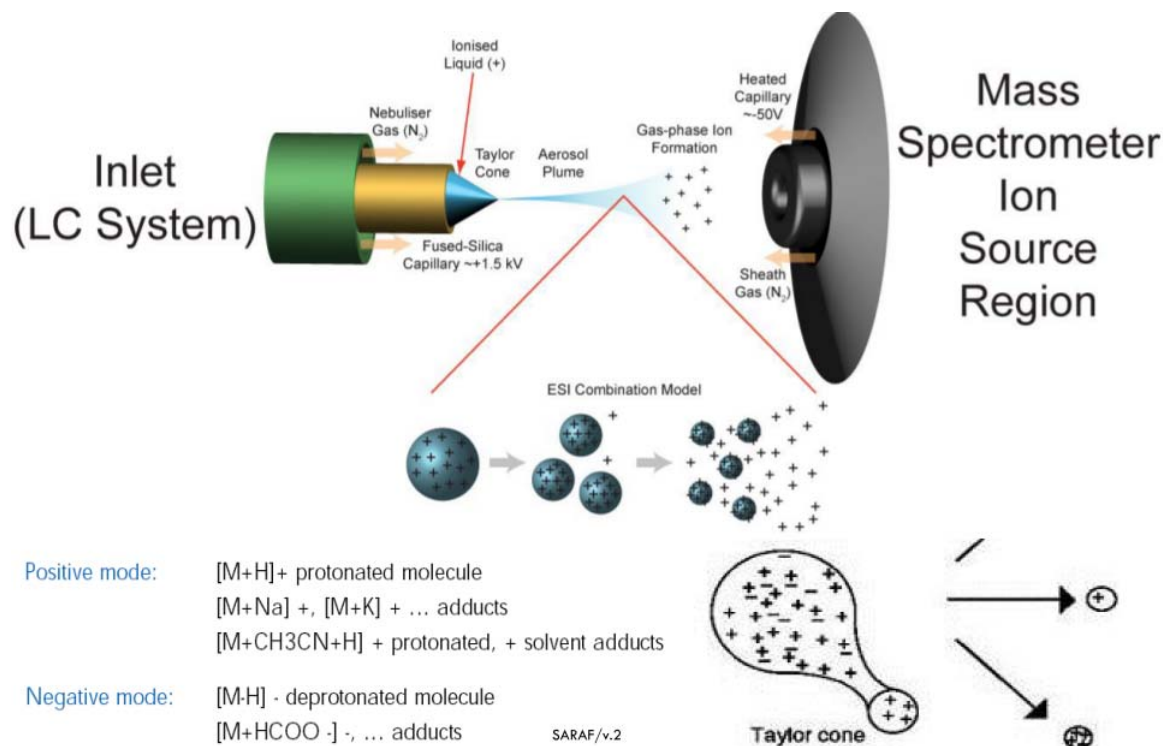


圖九、比較分子拓印法與固相萃取匣淨化之效果

五、質譜儀之介紹

液相層析質譜儀的基本組成包含：液相層析系統、分離管柱、離子化介面及質譜儀（含真空系統、聚焦、質量分析器、離子偵測器及數據處理系統）。四個基本的液相層析質譜儀包含四極桿(Quadrupole)、離子阱(Ion trap)、飛行管(Time-of-flight tube)及傅立葉轉換(Fourier transform)。以四極桿(Quadrupole)之液相層析質譜儀為例進行介紹。

目前最常使用的四極桿質譜儀為三段四極桿質譜儀(簡稱 QqQ)，由前後兩組四極桿質量分析器(Q1 及 Q3)及中間一組碰撞室 (Collision cell) (q)所組成。檢液由液相層析分離後，通過通有高壓正電之毛細管探針。藉由高壓電場會誘使毛細管探針尾端的液體表面形成電荷聚集，使位於毛細管探針前端的液體由液滴的形狀轉為泰勒錐 (Taylor cone)，續而碎裂形成小液滴，之後在去溶劑氣體與加溫的協助下，去除表面的液態溶劑，使液滴變小，造成分析物間的庫倫斥力 (Repelling coulombic force) 增加，最後大於凝聚力 (Cohesion force) 時，小液滴再以噴灑狀方式繼續碎裂，產生更多更小的液滴。當液滴表面的電場足夠大時，液滴表面的離子會脫附 (Desorption) 形成游離的正電離子，此游離方式稱為電灑游離 (Electrospray ionization, ESI)。



帶電離子利用電位差及壓力差的作用，被吸引通過樣品進樣錐進入質量分析器。第一段四極桿(Q1)選擇所需要的前驅離子，該前驅離子隨後進入碰撞室中(q)與氦氣或氬氣等

碰撞氣體作用，進行碰撞誘導解離 (Collision induced dissociation, CID)，裂解成為產物離子片段，最後由第二段四極桿(Q3)掃描選擇所需要的碎片離子，此即目前常用之多重反應監測 (Multiple reaction monitoring, MRM) 模式。利用此模式偵測分析物之選擇性高，且排除背景雜質能力強，再輔以滯留時間的鑑定，能將誤判之機率降到百萬分之一以下。另外排除背景雜質能力強，所以分析物之訊雜比 (Signal to noise ratio, S/N) 相對提高，能夠用來檢測低殘留量的藥物或污染物。

六、判定準則及定量分析

1. 相對滯留時間

在歐盟 2002/657/EC 文件中，針對 GC/MS 及 LC/MS 的層析峰的滯留時間定有規範

(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 $\pm 0.5\%$ ，相對地，LC 部分容忍範圍為 $\pm 2.5\%$ 。

假設以液相層析串聯質譜儀分析標準品滯留時間為 3.75 分鐘，內標滯留時間為 5.76 分鐘。今天分析一個檢體發現在 3.80 分鐘有一個明顯波峰，內標時間為 5.75 分鐘，則相對滯留時間為 1.5%，符合 $\pm 2.5\%$ 的規範，以滯留時間來看，可初步確認檢體中可能含有目標分析物。

2. 質譜檢測與鑑別點數

(1)使用質譜儀檢測時，可能是用單一質譜(MS)或串聯質譜(MSn)，依照解析度來看可能為低解析度質譜儀(LR)或高解析度質譜儀(HR, Resolution > 10,000)。

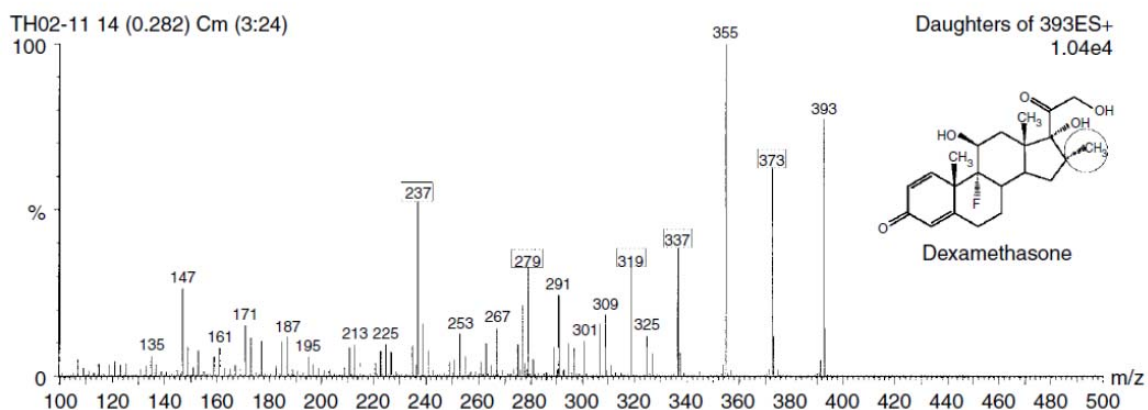
(2)偵測模式含 Full Scan、SIM、SRM 或 MRM 等；偵測訊號含分子離子、碎片離子或同位素峰等。

(3)如果用 Full Scan，則要選四個離子；如果用 SIM、SRM 或 MRM 模式，則要符合鑑別點數的規範，以歐盟 96/23/EC 準則來看，Group A 的化合物要有鑑別點數最少要為 4 點；Group B 的點數最少要為 3 點，下圖為鑑別點數的規範，以常用的四極桿串聯質譜儀來看，一個前趨離子可得到 1 點，一個產物離子可得到 1.5 點，所以若針對 Group A 化合物，至少要一個前趨離子配合 2 個產物離子，如此可達到至少四點的規範值。

MS technique	Identification points earned per ion
Low resolution mass spectrometry (LR)	1,0
LR-MS ⁿ precursor ion	1,0
LR-MS ⁿ transition products	1,5
HRMS	2,0
HR- MS ⁿ precursor ion	2,0
HR-MS ⁿ transition products	2,5

3. 離子比(Ion Ratio)

一個化合物在經過質譜儀碎裂反應時，因為化合物的鍵結特性，會形成某些特徵碎片，而且不同的碰撞能量碎片離子的分佈不同。以 dexamethasone 來看，分子離子為 m/z 393，特徵碎片包含 m/z 373、 m/z 355、 m/z 237...等，則不同的碎片離子會有不同的離子比，假設標準品 m/z 393>355 為定量離子對， m/z 393>373 及 m/z 393>237 為定性離子對，定性離子對/定量離子對之離子比 m/z 393>373 為 0.25、 m/z 393>237 為 0.15，依據下表規範，允收範圍分別為±25% (0.187 ~ 0.312)及±30% (0.105 ~ 0.195)，所以當樣品檢測 dexamethasone 時，若發現上述特徵離子對均存在，且離子比均符合規範，則可認定為該藥物。



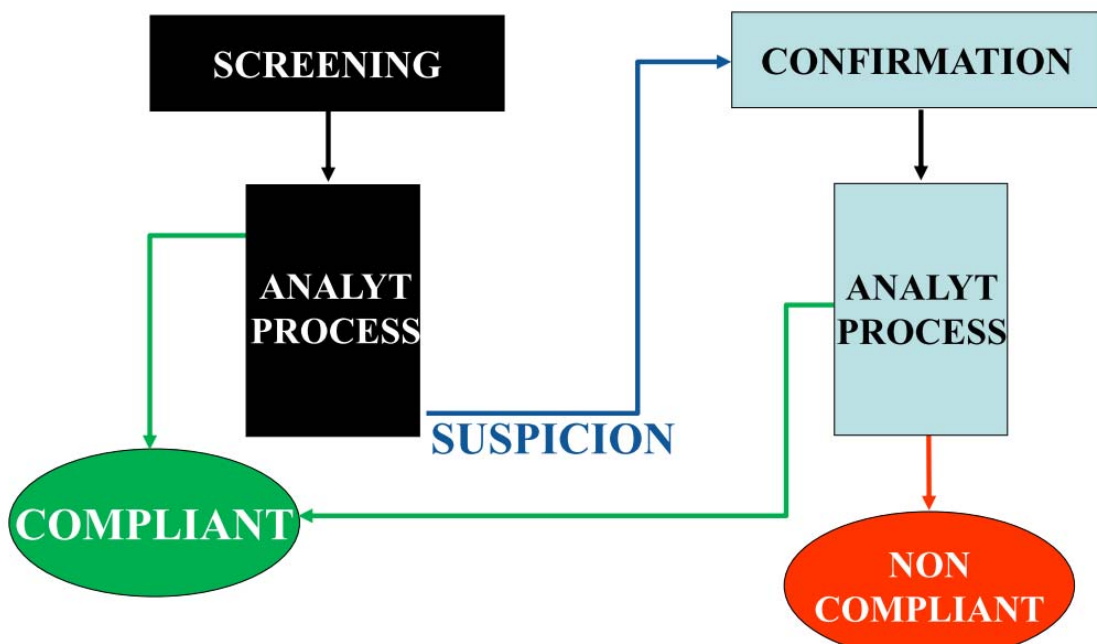
Relative intensity (% of base peak)	EI-GC-MS (relative)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (relative)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % to 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % to 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

七、確效概念

SARAF 在確效執行上係依據歐盟 2002/657/EC 之準則，介紹重點如下：

1. Screening method and Confirmatory method

首先在分析方法上，該準則略分為篩檢方法(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才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。篩檢方法及確認方法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。確認方法應具備兩個要求 (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. $CC\alpha$ and $CC\beta$

1. 2002/657/EC 準則與 SARAF 的做法

根據歐盟 2002/657/EC 準則，方法在確效時應評估該方法之 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 值，其中 CC 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)。此概念源自假設檢定， 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。在假設檢定中，虛無假設(H_0)及對立假設(H_1)會受到立場的影響，就檢驗執法單位來看，本質上相信人性本善，除非依據檢驗數據之定性及定量結果來看，有足夠證據推翻原先假設，否則應維持原先假設。在該準則中，提出兩種作法建立 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ ，分別為檢量線法及背景法，實驗室可自行選用合適方法。針對沒有殘留標準的藥物， α -error 為 1%， β -error 為 5%；針對有殘留標準的藥物， α -error 及 β -error 均為 5%。根據法律名詞定位，準則之概念是定出達成目標，並無限制達成之方法，故 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 之建立，方法學上可合理修正。SARAF 依此準則，適當修正檢量線法及背景法，並將其合併，用以評估 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 數值，整理如下

	SARAF
沒有殘留容許量之動物用藥	$CC\alpha = \frac{2.33 \times \sigma_B}{a}$ $CC\beta = \frac{2.33 \times \sigma_B + 1.64 \times CV_S}{a(1 - 1.64CV_S)}$ <p>註：a為檢量線之斜率；CV_S為 20 個空白基質在 $CC\beta$ 濃度下訊號之變異係數</p>
有殘留容許量之動物用藥	$CC\alpha = \frac{(\mu_{MRL} - \mu_B) + 1.64 \times \sigma_{MRL}}{a}$ $CC\beta = \frac{(\mu_{MRL} - \mu_B) + 1.64 \times \sigma_{MRL} + 1.64 \times \mu_B \times CV_S}{a(1 - 1.64CV_S)}$ <p>註：a為檢量線之斜率；CV_S為 20 個空白基質在 $CC\beta$ 濃度下訊號之變異係數；μ_{MRL}為 20 個空白基質添加 MRL 濃度下訊號之平值；σ_{MRL}為 20 個空白基質添加 MRL 濃度下訊號之之標準偏差</p>

2. 篩檢方法及確認方法之 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 的考量

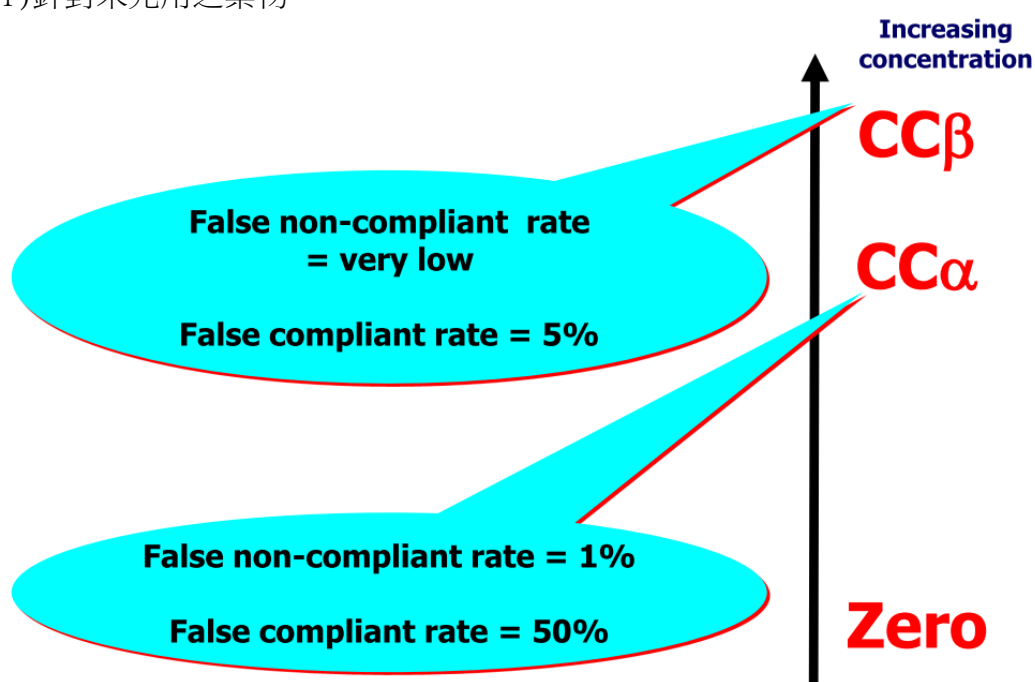
針對篩檢方法及確認方法部分，SARAF 對 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 的考量如下：

一般在做質譜檢測時，會選至少 2 個離子對，篩檢方法強調的是靈敏性，感度較好的離子對會被用來評估其 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ ；但在確認方法中，重點在方法的穩定性，感度較差的離子對會被用來評估其 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 。歐盟不同國家可能對此會有不同的做法，例如西班牙實驗室的做法是取離子對之 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 的平均值，所以不論是篩檢方法及確認方法，它們只會有一個 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ ，但個人認為 SARAF 的做法比較符合現況，故本署未來應可參考其做法。

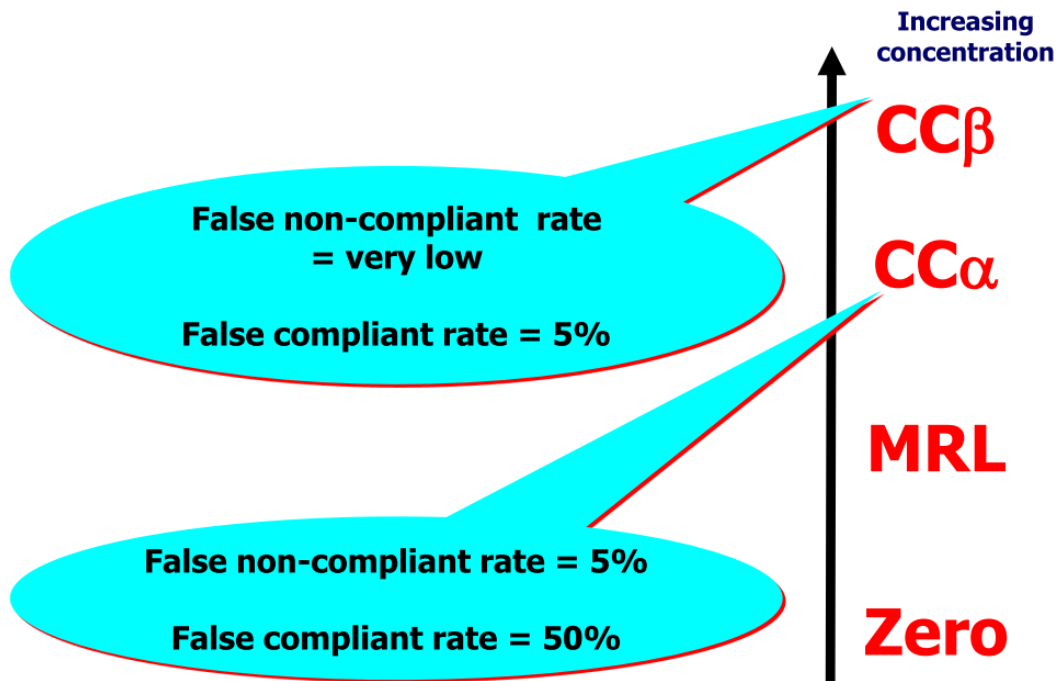
3. $CC\alpha$ 、 $CC\beta$ 、MRL、MRPL 與 Zero (零檢出)

由前面的概念得知， $CC\alpha$ 、 $CC\beta$ 、MRL 與 Zero (零檢出)的關係如下，其中 Zero 在此處視為一個基準點，但實務上是不可行之概念，因為隨著儀器零敏度不斷地改進，有可能極微量的東西仍可被測得，但測出的訊號有可能是雜訊，或者遠小於殘留容許量，故現行歐盟已不採用零檢出概念。

(1) 針對未允用之藥物



(2) 針對允用之藥物



肆、建議

SARAF 課程以前為 2 週，但現在已濃縮為 1 週的時間，故在課程方面均著重在原理教學，沒有人員可參與實際操作實驗的機會，此點實為可惜。但參加此課程仍讓我受益良多，以下為提出之建議，希能讓本署研究檢驗的水平往前更進一步：

1. 殘留物及污染物之檢驗分析，儀器感度及前處理之重要性不可忽略。經由 SARAF 課程，了解前處理亦是檢驗分析重要一環，特別是部分前處理裝置例如快速吹氮裝置及正壓系統固相萃取匣，能夠改善數據品質，減少系統誤差，使其更穩定。
2. LEBERCA 實驗室專責動物用藥及污染物，本署研檢組食品化學檢驗科負責農藥、動物用藥、天然毒素、污染物、包材、膳食機能性食品、重金屬及菸品等檢驗方法開發，加上該組各科室業務多元，故檢驗方法開發實為挑戰。另外，歐盟國家實驗室(含LABERCA)並無公告方法存在，各實驗室可有自行之檢驗方法，但方法研擬過程應符合2002/657/EC之準則，此點與台灣現行作法不同，但各有優缺點。綜合人員、設備及現行環境來看，不論是否日後該組仍掌握公告方法之制定，朝向精簡業務並專注本業或許是可考量之方向，倘能與目前國內或

國外相關檢驗單位形成檢驗分析網絡，或可彌補該組不足之處。

3. 本課程適合在殘留物及污染物有涉獵一段時間且對質譜儀有所接觸的同仁。
4. 建議本署以高解析度質譜儀進行快速篩檢方法之研究與開發，增設硬體設備及人員訓練，以提升快速分析及主動檢測之能力。

伍、參考資料

第24屆法國國立南特獸醫大學 Laberca 實驗室食品殘留物及污染物檢驗訓練講義