

出國報告（出國類別：實習）

德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室 實習心得

服務機關：食品藥物管理署

姓名職稱：沈盈如 技士

派赴國家：德國

出國期間：106年10月14日至106年10月22日

報告日期：107年1月9日

摘要

106年10月中旬前往位於柏林的德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室(Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, BVL)第5部門，向負責歐盟參考實驗室(European Union Community reference laboratories, EURL)之研究團隊進行為期5天之研習。此次研習主要針對豬肉及豬肝中殘留乙型受體素類(Beta-agonists)藥物檢驗方法學習，亦包含BVL執行檢驗方法確效之相關課程。藉由課程教學，認識歐盟於分析實驗領域較為重要之2份文件：Council Directive 96/23/EC及Commission Decision 2002/657/EC，並由2002/657/EC認識歐盟執行方法確效之項目、要求及相關實驗設計，藉此了解其對於方法產出相當嚴謹；另透過實地研習乙型受體素實驗，完整學習確效及檢體前處理等實驗流程。比較本署執行乙型受體素藥物殘留之檢驗方法，可發現其與BVL類似，於含量測定方面，同樣傾向使用同位素內標校正，惟含量確認部分，BVL使用前添加標準品方式製備檢量線，而本署則綜合考量正確性及時效性間之平衡，儘量以類似結構之化合物作為未尋得相對應同位素分析物之內標，而採用後添加標準品之基質匹配檢量線進行定量。整體而言，此次研習可一窺BVL實驗環境、設備、實驗流程、確效執行方式及最重要的實驗研究人員等等，藉此了解歐盟國家於殘留分析領域檢驗方法之相關細節。建議應持續鼓勵同仁爭取前往國外實驗室研習之機會，藉由實地於實驗室研習，深入且同時接收不同面向的訊息，有利於相關檢驗技術之提升。

目錄

摘要.....	2
壹、 目的.....	2
貳、 過程.....	2
參、 心得.....	10
肆、 建議.....	11
伍、 參考文獻	12

壹、目的

檢驗研究與國際接軌是本署持續維持的目標之一，近年透過積極參與或舉辦國際會議，已逐漸掌握國際於食品化學領域關注之議題、研究方向及相關成果等趨勢。拜科技所賜，會議結束後，即便無法與國外檢驗專家面對面交流，利用電子郵件進行溝通或交換資訊亦無距離。然而會議時間有限，當下難以深入討論，後續之文字往返亦存在侷限，如能實地於該相關實驗室研習，將能更深入且同時接收不同面向之訊息，有利相關檢驗技術提升。

此次前往德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室(Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, BVL)研習，即透過實地研習乙型受體素(Beta-agonists)實驗，完整學習確效及檢體前處理等實驗流程，期能藉由了解歐盟國家於殘留分析領域檢驗方法之相關細節，精進本署食品中動物用藥檢驗方法之效能及技術。

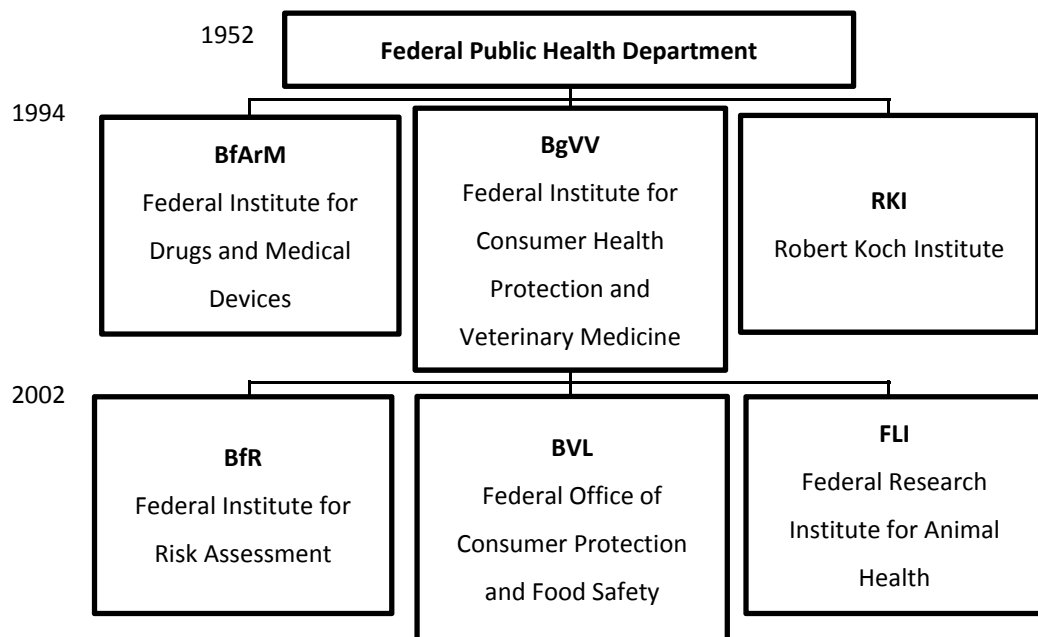
貳、過程

1. 歐洲殘留實驗室簡介

歐美等國在食品殘留檢驗分析領域經驗豐富，極具參考價值。在歐洲，歐盟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(European Union Community reference laboratories, EURL)、國家參考實驗室(National reference laboratories, NRL)及日常基準實驗室(Regional (Field) laboratories)。參考實驗室系統係為了支持常規檢驗實驗室而建立，共同目標為協調歐盟各殘留分析實驗室，使食品安全更加完善：國家參考實驗室和歐盟參考實驗室分別於國家層級及歐盟層級就品質保證、驗證、材料及手冊(包括方法描述、標準材料及文獻等各種信息)提供技術和科學支持，並透過舉辦研討會來傳播訊息、討論問題及達成協議(例回收率校正方式、測量結果之解釋及法規定議等)，亦藉由能力試驗(Proficiency testing)確保實驗室之能力。其中歐盟層級殘留分析實驗室分布於德國、荷蘭、義大利和法國等 4 個國家，分別由德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室(BVL)、荷蘭食品安全研究所(RIKILT- Instituut voor Voedselveiligheid)、義大利高等衛生研究院(Istituto Superiore di Sanità, ISS)及法國食品、環境和職業健康與安全局(ANSES - Laboratoire de Fougères)負責，並執掌不同類別動物用藥分析。

2. 德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室歷史背景簡介

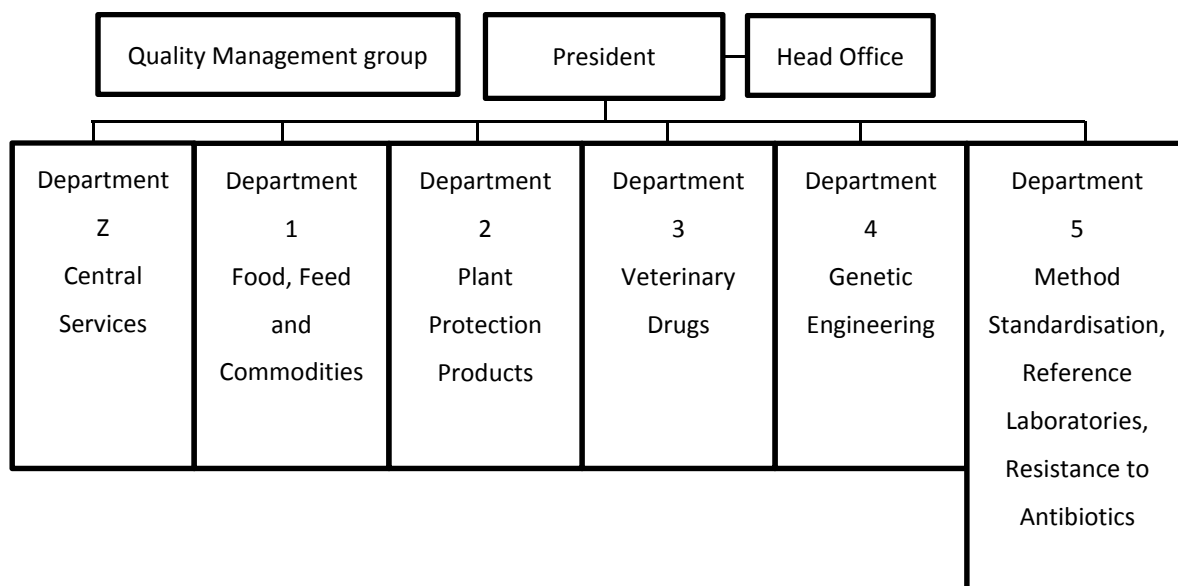
有關德國聯邦衛生體系發展簡圖如圖一所示。德國於 1952 年成立聯邦公共衛生部(Federal Public Health Department)，為負責公眾健康之中央研究機構，其於 1994 年進行組織重組，將聯邦公共衛生部分成 3 個獨立單位：聯邦藥物和醫療器械研究所(Federal Institute for Drugs and Medical Devices, BfArM) (執行藥品相關授權和風險監測)、聯邦消費者健康保護和獸醫研究所(Federal Institute for Consumer Health Protection and Veterinary Medicine, BgVV) (負責食品、日用品及化學品的分析和評估)及羅伯特-科赫研究所(Robert Koch Institute, RKI) (負責傳染病之鑑定、預防及控制)，其中 BgVV 即為 BVL 之前身。歐洲於 2000 年時爆發第 2 次狂牛症，待危機過後，德國接受食品法典委員會(Codex Alimentarius Commission)於 2001 年提出之建議，將風險評估和風險管理分開⁽¹⁾。故 BgVV 於 2002 年進行重組，分成 3 個獨立單位：聯邦風險評估研究所(Federal Institute for Risk Assessment, BfR) (負責關於食品、飼料、化學品和產品安全的風險評估及風險溝通)、BVL (主要負責協調德國聯邦和各聯邦州之間的風險管理)及聯邦動物衛生研究所(Federal Research Institute for Animal Health, FLI) (研究禽畜的健康、福利以及人與動物之間傳播之疾病)。該國認為，科學的風險評估與藉由政策和機構所實施的風險管理之間有一個明確的分離，先後順序應為研究人員在不受任何政界與企業影響的情況下製作評估報告，之後才有風險管理者參與管控⁽²⁾。



圖一、德國聯邦衛生體系發展簡圖

3. 德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室簡介

BVL 於 2002 年成立，隸屬聯邦食品與農業部(Federal Ministry of Food and Agriculture, BMEL)下之獨立高級機構，其組織架構簡圖如圖二所示。BVL 具 5 個部門、1 個總部及 Z 部門，另有品質管理團隊直接向總裁報告，分別於布倫瑞克(Braunschweig)和柏林(Berlin)設有辦事處。BVL 的實驗室集中於第 5 部門，負責方法標準化、參考實驗室及抗生素抗性等相關業務。該部門有 8 個 NRLs 及 1 個殘留分析 EURL，其研究團隊亦執行採樣及分析方法的開發、標準化及確效試驗。其中 EURL 所職掌之殘留分析類別包含乙型受體素(Beta-agonists)、驅蟲藥(Anthelmintics)、抗球蟲藥(Anticoccidials)及抗發炎藥(Non-steroidal antiinflammatory drugs, NSAID)等 4 類動物用藥。此次研習即前往位於柏林的第 5 部門，向其負責 EURL 之研究團隊學習乙型受體素之檢驗方法。



圖二、德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室組織架構簡圖

4. 行前安排

本次研習由廖家鼎博士促成，透過參與國際研討會(129th AOAC Annual Meeting)結識的 Dr. Radeck 與 BVL 取得聯繫，經過幾次電子郵件往返討論，終擬定相關時程及內容(研習課程表如圖三所示)。此次研習為期 5 天，主要針對豬肉及豬肝中殘留乙型受體素類藥物檢驗方法進行研習，亦包含 BVL 執行檢驗方法確效之相關課程。整體而言，此次研習可一窺 BVL 實驗環境、設備、實驗流程、確效執行方式及最重要的實驗

研究人員等等，藉此了解歐盟國家於殘留分析領域檢驗方法之相關細節。

Time		Programme
Day 1	09:00	Arrival, welcome
	09:30 – 10:00	Visit of the laboratory facilities (EURL and NRL)
	10:00 – 12:30	Introduction into confirmation methods for β -agonists in muscle and liver
	13:30 – 16:00	Introduction of validation
Day 2	08:30– 15:00	Sample preparation for β -agonists in muscle
Day 3	08:30– 15:00	Continuation Sample preparation for β -agonists in muscle
	Overnight	Measurement of samples on XEVO TQS and/or API6500
Day 4	8:30 – 15:00	Sample preparation for β -agonists in liver
	Overnight	Measurement of samples on XEVO TQS and/or API6500
Day 5	9:00 – 12.30	Data Evaluation of β -agonist samples
	#	Final Discussion
	13.30	Farewell

圖三、研習課程表

5. 研習內容-實驗環境及設備

BVL 第 5 部門 EURL 之研究團隊在人員上大致分成 2 種身分：助理(Asistant)及科學家(Scientist)；辦公環境部分則大致區隔為辦公室、實驗室及儀器室。一般來說，1~2 位助理擁有 1 間實驗室，1~2 位科學家擁有 1 間辦公室，儀器室於空間規劃則幾乎沒有擺放超過 3 台儀器。雖空間不算特別寬敞卻也無擁擠感，每間儀器室因儀器擺放量少(也許跟空間設計不大有關)，故噪音及產熱部分不至對環境造成壓力。整體來說，工作環境舒適。儀器運轉難以避免產生聲音及熱能，當空間足夠大時也許可減緩噪音及熱的影響，反過來說，在有限的空間搭配適當的隔間及限制儀器數量亦可減少噪音及產熱集中，使環境控管較為容易；辦公部分，雖集中式的設計能營造無隔閡的辦公氣氛，但也意味辦公時需較高的專注力去排除四面八方的干擾(公事上的討論、人員走動...)，研究人員於分析數據或需靜心研讀資料時較難提升效率，未來如有機會重新規劃研究環境，建議 BVL 之設計方式可納入參考。

此次於 BVL 的研習，主要接觸乙型受體素類藥物檢驗分析，雖難以全盤了解該部門所有儀器資訊，但藉由研習過程之觀察，可發現其於動物用藥殘留分析主要使用儀器為 LC-MS/MS，近幾年則開始著手 Multiscreen 方法，利用高解析度質譜儀建立大

量品項之質譜碎片資料庫(包含 Antiparasitics、NSAIDs、Antibiotics、Corticosteroids 及 Sedatives 等藥物類別)及評估肌肉及肝臟之前處理流程。目前動物用藥檢驗分析受限於各類藥物物化特性差異及動物源性產品複雜特性，故往往不同類別藥物無法同步進行分析而需拆成個別方法，本署現階段常使用的分析儀器亦為 LC-MS/MS；近年發展出高解析度質譜儀，其精確質量篩選及提高分析感度的設計使動物用藥檢測之 Multiscreen 成為可能，故本署亦有意發展 Screen Method 領域。整體來看，該部門研究現況及未來規劃與本署類似。此次研習期間主要由 Dr. Radeck 擔任我的老師，包含環境介紹、課程教學及實驗流程的解說，將與其持續保持聯絡，強化國際間交流合作。

6. 研習內容-教學

為了協調歐盟各國具一致之標準，歐盟撰寫各式文件及規範供各會員國依循，於分析實驗領域，較重要的 2 份文件為 Council Directive 96/23/EC⁽³⁾及 Commission Decision 2002/657/EC⁽⁴⁾。歐盟條約規定的目標是藉由不同的法案來實現，其不一定皆具約束力或適用所有歐盟國家。具約束力之法案包含：Regulations (適用所有歐盟國家，會員國必須實行其相關規定)、Directives (指一立法措施，規範歐盟成員國必須達成之目標，但各國可自行決定採取何種行動來達到目的)及 Decisions (只對特定事例進行規範，可能針對單一或數個會員國、公司或個人)；不具約束力之法案則包含 Opinions 及 Recommendations。96/23/EC 為有關活體動物及動物產品中的某些物質和殘留物採取監控措施之文件，規範了包含檢驗殘留物之監控計畫、業者之自我監控及共同責任、官方管制措施、自第三國之進口產品、違反規定時應採取之措施等應遵循之目標，文中亦包含執行檢驗分析實驗室應具備的環境條件、儀器設施及人員能力的要求；2002/657/EC 則是針對 96/23/EC 文件說明分析方法的執行方式及結果的解釋之文件。

Dr. Radeck 主要向我介紹 2002/657/EC 中有關分析方法確效部分的訊息。依文件所述，分析方法性能特徵決定檢測分類，舉例來說，用於篩選目的之定性檢測方法，需評估 Detection limit ($CC\beta$ ，即檢測能力，指樣品中可被檢測、鑑定和或定量之物質的最小含量，其誤差機率為 β)、Selectivity/Specificity (專一性)及 Applicability/Ruggedness/Stability (穩健性)；如為用於確認目的之定量方法，則還需評估 Decision limit ($CC\alpha$ ，指在樣本於不符合規定之情況下，考量 α 的誤差機率可推斷出之極限濃度)、Trueness/recovery (真值)、Precision (精確性)。整體來看，不論檢測目的為何，方法皆需經過 $CC\beta$ 、專一性及穩健性之評估，故可解釋成此 3 種測試項目為任

何分析方法的最低要求(圖四)。

Table 9
Classification of analytical methods by the performance characteristics that have to be determined

		Detection limit CC β	Decision limit CC α	Trueness/recovery	Precision	Selectivity/ specificity	Applicability/ ruggedness/ stability
Qualitative methods	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Quantitative methods	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = screening methods; C = confirmatory methods; + = determination is mandatory.

圖四、檢測分類確認前應搭配之檢測項目(2002/657/EC)

確效流程部分，依方法不同之型態建議如圖五之執行方式，但文中也加註只要能達到相同品質目的，可依需求選擇其他檢測方式證明所建立方法符合相關性能要求。一般方法於執行確效之最基本要求，需評估專一性、真值、穩健性及穩定性；完整之驗證程序則需包含回收率等 8 項測試；如要改變驗證程序，則可依需求進行試驗設計，再以實驗所得之結果進行回收率等 8 項常規項目之評估(圖六為實驗設計之舉例)。

Table 10
Model-independent and model-dependent performance parameters

Validation		
Model-independent performance parameters	Model-dependent performance parameters	
Common performance characteristics (3.1.1)	Conventional validation approach (3.1.2)	In-house validation approach (3.1.3)
Specificity Trueness Ruggedness: minor changes Stability	Recovery Repeatability Within-laboratory reproducibility Reproducibility Decision limit (CC α) Detection capability (CC β) Calibration curves Ruggedness: major changes	Recovery Repeatability Within-laboratory reproducibility Reproducibility Decision limit (CC α) Detection capability (CC β) Calibration curve Ruggedness

圖五、Model-independent 及 model-dependent 之性能參數(2002/657/EC)

Table 13

Examples for factors considered important for a validation procedure

Gender of the animal	(factor 1)
Breed	(factor 2)
Transport conditions	(factor 3)
Storing conditions	(factor 4)
Freshness of the sample	(factor 5)
Fattening conditions	(factor 6)
Different operators with different experience	(factor 7).

Table 14

Possible experimental plan for the above example

Species	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Sample No
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

圖六、改變驗證程序之實驗設計範例(2002/657/EC)

BVL 於乙型受體素之確效實驗主要參考 In-house validation approach 執行方式，在實驗設計部分挑選 6 種因子：Species (牛/豬)、Operator (A/B)、Breeding (傳統/有機)、Storage condition (經 2 次解凍之冷凍/冷凍)、萃取液儲存(冷藏存放 2 天/立即分析)及 Matrix condition (新鮮/經凍乾處理)進行 16 Run。有關 $CC\alpha$ 之評估方式是最對低添加濃度之實測值為基準進行計算， $CC\beta$ 則以 $CC\alpha$ 為基準進行運算，其公式如下所示：

$$\text{Decision Limit (CC}\alpha\text{)} = \text{Lowest spike level} + 2.33 * \text{Uncertainty (SD)}$$

$$\text{Decision Capability (CC}\beta\text{)} = \text{CC}\alpha + 1.64 * \text{Uncertainty}$$

整體來看，BVL 建立 1 個方法所執行的確效實驗相當繁複，而大量累積之數據亦需花費相當時間進行分析及處理，由此可見其對方法之嚴謹程度。目前台灣之確效未強調 $CC\alpha$ 和 $CC\beta$ 部分，主要針對定量極限(limit of quantification, LOQ)進行評估，由於動物用藥殘留領域之動物源性產品基質複雜，且部分藥物因風險因素而列為禁藥，執行 $CC\alpha$ 和 $CC\beta$ 評估，可反映每個實驗室執行檢驗方法之實際情況，且 $CC\beta$ 還可應

用於 Screen Method 之分析，故未來可考慮執行 CC α 和 CC β 之評估。

7. 研習內容-實驗

此次研習主要學習豬肉及豬肝中乙型受體素類藥物檢驗方法，圖七為 BVL 於乙型受體素類藥物檢驗流程概述。由於這類藥物於生物體中，除與蛋白質作用外，亦會在組織與排泄物中以葡萄糖醛酸及硫酸共軛化合物存在，故一般於萃取過程會加入 β -glucuronidase 破壞乙型受體素與組織間的鍵結，並使蛋白質變性，進而促進萃取效果^(5, 6)。BVL 依基質及分析化合物特性選擇不同的水解酵素和流程，水解部分：肌肉基質利用蛋白酶切斷蛋白質上的胜肽鍵並搭配酸沉澱及脫脂步驟去除蛋白質及脂肪干擾；肝臟基質則使用葡萄糖醛酸酶打斷葡萄糖醛酸及硫酸鍵結。淨化部分：2 種基質皆選擇相同的 SPE (亦應用於毛髮、尿液、飼料及視網膜等基質)進行淨化，此 SPE 具 2 種官能基團：Reverse phase 及 Ion exchanger，可應用於弱鹼性及疏水化合物分析，藉由調整 pH 值來抓住或釋放帶有陽離子基團之分析物。

綜合來看，本署執行乙型受體素藥物殘留之檢驗原理與 BVL 類似，本署於肌肉及內臟基質使用同 1 種酵素(Glucuronidase/Sulfatase)進行水解，後續搭配鹽酸處理使蛋白質變性，並藉離心去除大分子蛋白質之干擾，於淨化步驟一樣選用具陽離子交換功能之 SPE 處理(較單純逆相 SPE 純化效果更佳)。BVL 針對蛋白質含量較高之基質(肌肉、牛奶及視網膜等)，選擇蛋白酶進行水解，主要考慮部分分析化合物與蛋白質產生鍵結，影響萃取效果。於文獻蒐集中發現，破壞蛋白質之鍵結除可運用酵素外，亦可使用酸沉澱或 2 者併行來執行⁽⁶⁾。本署採用方式即先以葡萄糖醛酸酶打斷分析物與組織間之葡萄糖醛酸及硫酸鍵結，續以鹽酸打斷其與蛋白質之鍵結來達成蛋白酶之作用，故可同時適用肌肉及內臟基質，此處理方式與 AOAC⁽⁷⁾文獻相同。

由於動物源性產品複雜之特性，殘留動物用藥檢驗方法必須搭配內部標準品進行校正，且為利實驗結果正確性，傾向使用同位素內標，此部分 BVL 與本署作法一致；惟含量確認部分，BVL 使用前添加標準品方式製備檢量線，而本署則採用後添加標準品之基質匹配檢量線進行定量。一般來說，因同位素內標與目標分析物幾乎一樣之物化特性，藉此特性，可應用於校正分析物於檢體處理流程及質譜分析時所造成之變異，而得相對正確之結果。於存在同位素內標之情況下，理論上以後添加標準品之基質匹配檢量線定量即可，惟並非所有分析物皆可尋得相對應之同位素內標，即便可使用結構類似化合物代替，仍然無法完全排除校正偏差之潛在風險，故 BVL 選用更為嚴謹之

方式進行定量。本署則是綜合考量正確性及時效性之間之平衡，儘量以結構類似之化合物作為未尋得相對應同位素分析物之內標，2 單位之選擇皆有利弊，但可確認的一點是，於檢驗分析之組合中，具一定技術能力及經驗之分析人員是不可缺少的要素，其存在可確保檢驗結果之品質及正確性。

Muscle		Liver	
Hydrolysis	Buffer at pH 8 Protease Incubate overnight at 55 °C	Hydrolysis	Buffer at pH 5 Shake it for 20 min at 40 °C Centrifuge for 30 min Glucuronidase/Sulfatase-solution Shake it for 60 min at 40 °C
Acid precipitation	25 % sulfuric acid (pH at 1) Centrifugation for 20min		
Defattening	Hexane Centrifugation for 5 min		
SPE	Adjust pH at 6 Add 100 µl methanol Centrifugation SPE->eluent	SPE	Adjust pH at 6 Centrifugation Add 200 µl methanol to supernatants SPE->eluent
Evaporate to dryness			
Dissolve in 200 µl HPLC-eluent A / B=95:55			

圖七、BVL 於乙型受體素類藥物檢驗流程概述

參、心得

為期 5 天的 BVL 第 5 部門之行時間短暫，即使鎖定該部門於乙型受體素藥物的檢驗分析，在有限時間亦很難全面了解，但仍讓我收穫良多。以動物用藥殘留分析領域來看，在研究環境、設備及人員方面，本署使用之儀器等級可與 BVL 相提並論，但由於德國地廣且有歐盟體系支援，而台灣地狹且資源有限，有些部分的確很難向其看齊，難以達到相同空間規格及人力支援，即在相對小的空間及較少人力下負擔較多之工作，故善加利用空間、人員教育及經驗之傳承更顯重要，規劃好的環境亦能幫助提高工作效率；實驗研究方面，本署所遵循的食品化學確效規範和歐盟實驗室所遵循的 2002/657/EC 文件，有一致性之目標，即確保採用之分析方法所得實驗結果具正確或參考價值。2 文件相較之下，2002/657/EC 所述確效流程較為繁瑣，如照表操課，完成一個檢驗方法開發以本署現有資源來看至少要 2 年，雖然 BVL 對檢驗方法產出更為嚴謹，但受限於台灣

現階段情況，也許短期內可藉由規劃加強研究人員之技術分析能力，使所開發出方法符合需求且具實用性，長期來看，則可逐步規劃確效執行方式之調整。

科學上的溝通相對簡單，就事論事，很少會因歷史及文化之差異而存在不同的答案，加上本署近年致力於國際交流，在研習過程中，不管是課程教學或實驗，對於其不同處理方式的背後之原因，大多可以在一陣思考後體會。很開心有機會於 BVL 實地研習，也很慶幸這 5 天所接觸到之研究人員皆很和善，即使有些問題感覺較為簡單，問出口前對於回答者之反應會有些擔心，但他們都能給予友善的回應，未讓人有不舒服的感覺。整體來看，本署使用之儀器等級不亞於 BVL 使用之儀器，現階段所實行之檢驗方式亦可與其互相比較，而所規劃之未來研究方向也朝相同目標前進。藉由此次研習，能一窺身為歐盟殘留實驗室之 BVL 於實驗分析時所遵循的規範及相關細節，使我受益良多，亦幫助擴展視野，間接對於相同事物產生不同層面的解讀，相關資料和文件資訊將提供動物用藥群組同仁參考！

肆、建議

藉由積極參與國際研討會、自行舉辦國際會議或實地於國外相關實驗室研習，皆能達到了解國際於食品化學領域關注之議題、研究方向及相關成果等趨勢之目標。然實地於國外實驗室研習，更能深入且同時接收不同面向的訊息，有利於相關檢驗技術提升，以下為於 BVL 研習後提出之建議：

1. 建議持續鼓勵同仁積極爭取於國外相關實驗室研習之機會：

實地於國外實驗室研習可直接與該實驗室相關之環境、設備及人員接觸，藉此了解該國(實驗室)於研究檢驗領域之實驗情形及人員態度等，研習人員回國後可將相關資訊回傳給同仁，有利增進檢驗研究之效益，故於預算許可之情況下，建議持續鼓勵同仁積極爭取於國外相關實驗室研習之機會。

2. 建議可參考他國研究成果來擴充分析品項及基質類別：

德國和台灣不同，不會把官方之檢驗方法公開給各界參考(僅提供政府之間使用)，亦允許實驗室採用各自實驗室方法執行檢驗，故相對強調檢驗方法之確效要求及對執行檢驗之實驗室有較高的能力及技術要求。雖官方研究方法不會公開於網路上而便於取得，但相關研究成果會於研討會或期刊中發表，以他國之研究成果為基礎評估增修成適合應用於台灣所需之檢驗方法，可使檢驗研究更有效率，故建議可參考國際研究

成果來擴充分析品項及基質類別。

3. 建議未來如有機會重新規劃研究環境，可評估適當隔間辦公室、儀器室及實驗環境之可行性：

在有限的空間搭配適當的隔間及限制儀器數量可減少噪音及產熱集中，使環境控管較為容易；辦公環境適當隔間及減少隔間人員數，有助於提升研究人員於分析數據或研讀資料之效率。在預算及空間允許之情況下，建議未來如有機會重新規劃研究環境，可評估適當隔間辦公室、儀器室及實驗環境之可行性。

伍、 參考文獻

1. Codex Alimentarius Commission. 2001. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission (Hrsg.): Procedural Manual. 12th ed. Rome; 2001.
2. Federal Ministry of Food and Agriculture. 2016. Understanding food safety-Facts and background. Available at <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/EN/Publications/Chinese/Understandingfoodsafety.html> (published 2016)
3. The Council of the European Union. 1996. Council Directive 96/23/EC: on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC
4. The European Communities. 2002. Commission Decision 2002/657/EC: implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results
5. Lau, B. P. -Y., Lewis, D. and Lawrence, J. F. 1997. Confirmation analysis of clenbuterol in beef liver and minced beef by a combination of immunoaffinity chromatography and liquid chromatography/electrospray mass spectrometry or liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 32: 655-661.
6. Ramos, F. J. 2000. β_2 -agonist extraction procedures for chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* 880: 69-83.
7. Ulrey, W. D., Burnett, T. J., Brunelle, S. L., Lombardi, K. R. and Coleman, M. R.

2013. AOAC. 2011. Determination and confirmation of parent and total ractopamine in bovine, swine, and turkey tissues by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Final Action 2011.23. J. AOAC Int. 96(4): 917-24.

德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室研習

心得分享

106.12.07



衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration

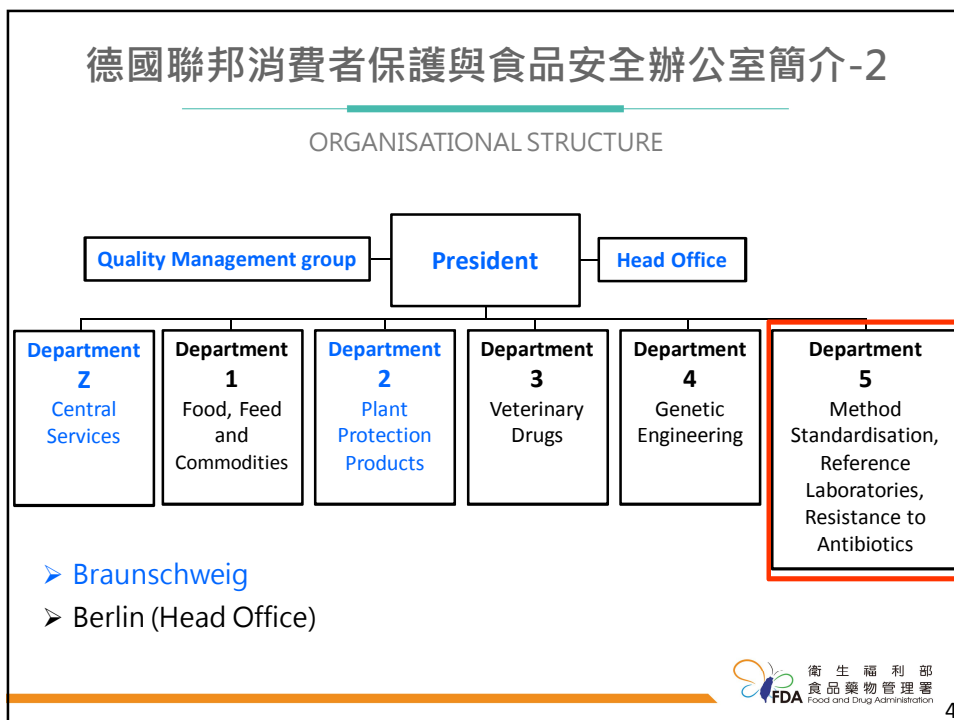
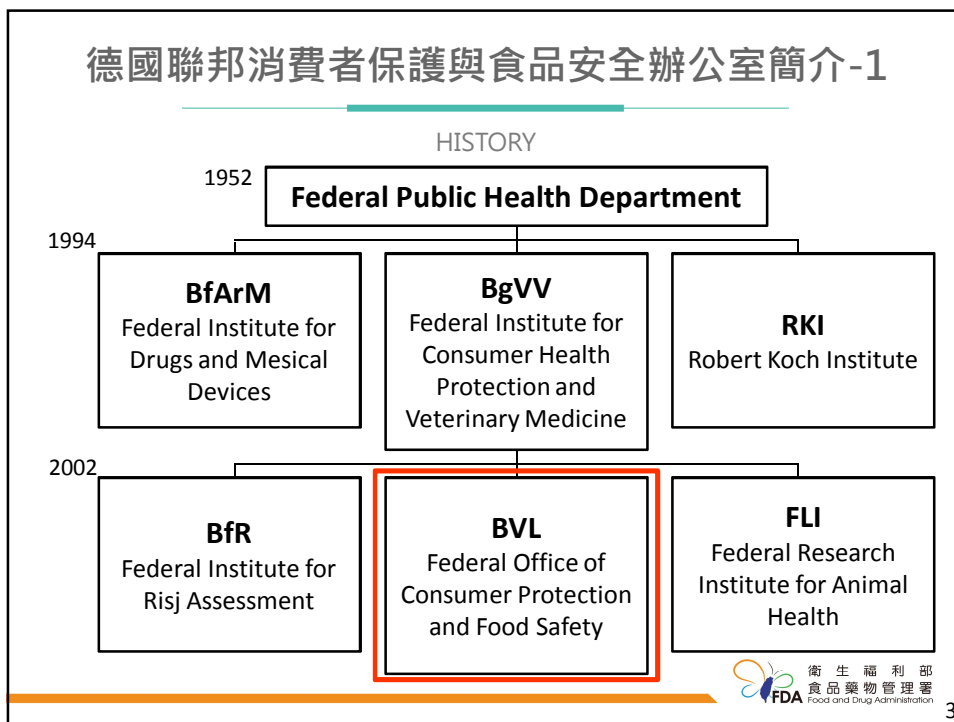
<http://www.fda.gov.tw/>

1

大綱

- 德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室簡介
- 研習內容
 - 環境
 - 課程
 - 實驗
- 心得分享
- 結語

2



德國聯邦消費者保護與食品安全辦公室簡介-3

DEPARTMENT 5

Residues of Veterinary Medicinal Products

- Beta-agonists
- Anthelmintics
- Anticoccidials
- Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAID)

Unit 501
General Affairs

Unit 502
EU Reference Laboratory for Residues

Unit 503
NRLs for Pharmacologically Active Residues and GMO

Unit 504
NRLs for Pesticides, PAH and Heavy Metals

Unit 505
Monitoring of Resistance to Antibiotics

研習內容

SCHEDULE for TRAINING COURSE

Time		Programme
Day 1	09:00	Arrival, welcome
	09:30 – 10:00	Visit of the <u>laboratory facilities</u> (EURL and NRL)
	10:00 - 12:30	Introduction into confirmation methods for β -agonists in muscle and liver
	13:30 – 16:00	Introduction of <u>validation</u>
Day 2	08:30-15:00	Sample preparation for <u>β-agonists in muscle</u>
Day 3	08:30-15:00	Continuation Sample preparation for β -agonists in muscle
	Overnight	Measurement of samples on XEVO TQS and/or API6500
Day 4	8:30 – 15:00	Sample preparation for <u>β-agonists in liver</u>
	Overnight	Measurement of samples on XEVO TQS and/or API6500
Day 5	9:00 – 12.30	Data Evaluation of β -agonist samples
	#	Final Discussion
	13.30	Farewell

研習內容-環境-1



研習內容-環境-2



研習內容-環境-3



研習內容-課程-1

重要參考文件-96/23/EC

- 96/23/EC 有關活體動物及動物產品中的某些物質和殘留物採取監控措施
 - 經濟部標檢局「Dir 96 23 EC-特定物質及殘留物監控措施(中譯).pdf」
 - 檢驗殘留物之監控計畫、業者之自我監控及共同責任、官方管制措施(NRL)、自第三國之進口產品、違反規定時應採取之措施...
 - Each Member State shall designate at least one national reference laboratory. A given residue or residue group may not be assigned to more than one national reference laboratory.
 - The costs of the investigations and checks referred to in Article 16 shall be borne by the owner or person having charge of the animals.
 - Community reference laboratories (EURL)

研習內容-課程-1



FVO Website

Conclusions:
The standards adopted by the Taiwanese CAs are in general adequate and provide a good technical basis for the official control of fishery products for EU exports and their production chain. However, as indicate in paragraphs 4 and 5, certain discrepancies with the EU rules were noted that weaken the guarantees provided by the CAs at the time of export certification.



衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration

研習內容-課程-2

重要參考文件-2003/657/EC-1

- 2003/657/EC 有關96/23/EC分析方法的執行及結果之解釋
 - 3. Validation

Table 10

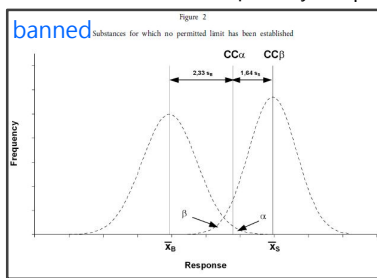
Model-independent and model-dependent performance parameters

Validation		
Model-independent performance parameters	Model-dependent performance parameters	
Common performance characteristics (3.1.1)	Conventional validation approach (3.1.2)	In-house validation approach (3.1.3)
Specificity	Recovery	Recovery
Trueness	Repeatability	Repeatability
Ruggedness: minor changes	Within-laboratory reproducibility	Within-laboratory reproducibility
Stability	Reproducibility	Reproducibility
	Decision limit (CC α)	Decision limit (CC α)
	Detection capability (CC β)	Detection capability (CC β)
	Calibration curves	Calibration curve
	Ruggedness: major changes	Ruggedness

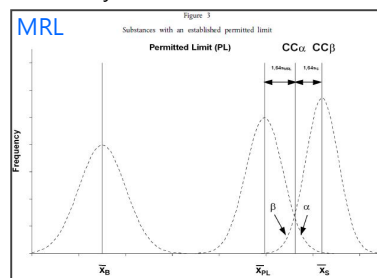
研習內容-課程-2

重要參考文件-2003/657/EC-2

- 3.1.2. Conventional validation procedures
 - 3 different batches (Days)
 - Each batch has 3 different conc. (1, 1.5 and 2 times the minimum required performance/ the permitted limit)
 - At least 6 samples for each conc.
 - Decision Limit ($CC\alpha$) = Lowest spike level + $2.33 \times$ Uncertainty (SD)
 - Decision Capability ($CC\beta$) = $CC\alpha$ + $1.64 \times$ Uncertainty



α -error=1%
 β -error=5%



FDA Food and Drug Administration 13

研習內容-課程-2

重要參考文件-2003/657/EC-3

- 3.1.3. Validation according to alternative models

Table 14

Possible experimental plan for the above example

Species	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Sample No
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8
B	+	+	+	+	+	+	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	-	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

FDA 衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration

14

Run	species	operator	Breeding	storage condition	storage of extracts	matrix condition	Factor level combination																															
							species	operator	Breeding	storage condition	storage of extracts	matrix condition																										
Run 01	pig	B	conventional	frozen and 2 x thawed	2 d4°C	fresh																																
Run 02	pig	B	conventional	frozen, -25°C	2 d4°C	lyophilised	Run 15	calf	A	organic	frozen and 2 x thawed	injection immediately	fresh																									
Run 03	pig	B	organic	frozen and 2 x thawed	injection immediately	fresh	Run 16	calf	A	organic	frozen, -25°C	injection immediately	lyophilised																									
Run 04	pig	B	organic	frozen, -25°C	injection immediately	lyophilised	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Factor level</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>species</td> <td>calf</td> </tr> <tr> <td></td> <td>pig</td> </tr> <tr> <td>operator</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td></td> <td>B</td> </tr> <tr> <td>Breeding</td> <td>conventional</td> </tr> <tr> <td></td> <td>organic</td> </tr> <tr> <td>storage condition</td> <td>frozen and 2 x thawed</td> </tr> <tr> <td></td> <td>frozen, -25°C</td> </tr> <tr> <td>storage of extracts</td> <td>2 d4°C</td> </tr> <tr> <td></td> <td>injection immediately</td> </tr> <tr> <td>matrix condition</td> <td>fresh</td> </tr> <tr> <td></td> <td>lyophilised</td> </tr> </tbody> </table>						Factor level		species	calf		pig	operator	A		B	Breeding	conventional		organic	storage condition	frozen and 2 x thawed		frozen, -25°C	storage of extracts	2 d4°C		injection immediately	matrix condition	fresh		lyophilised
Factor level																																						
species	calf																																					
	pig																																					
operator	A																																					
	B																																					
Breeding	conventional																																					
	organic																																					
storage condition	frozen and 2 x thawed																																					
	frozen, -25°C																																					
storage of extracts	2 d4°C																																					
	injection immediately																																					
matrix condition	fresh																																					
	lyophilised																																					
Run 05	pig	A	conventional	frozen and 2 x thawed	injection immediately	lyophilised																																
Run 06	pig	A	conventional	frozen, -25°C	injection immediately	fresh																																
Run 07	pig	A	organic	frozen and 2 x thawed	2 d4°C	lyophilised																																
Run 08	pig	A	organic	frozen, -25°C	2 d4°C	fresh																																
Run 09	calf	B	conventional	frozen and 2 x thawed	injection immediately	lyophilised																																
Run 10	calf	B	conventional	frozen, -25°C	injection immediately	fresh																																
Run 11	calf	B	organic	frozen and 2 x thawed	2 d4°C	lyophilised																																
Run 12	calf	B	organic	frozen, -25°C	2 d4°C	fresh																																
Run 13	calf	A	conventional	frozen and 2 x thawed	2 d4°C	fresh																																
Run 14	calf	A	conventional	frozen, -25°C	2 d4°C	lyophilised																																

研習內容-實驗-1


Determination of β -Agonists in muscle and liver-Compounds-1

No.	Compound	BVL		TFDA	
		(for Matrix)	Internal Standard		Internal Standard
1	Bamethane	V	Salbutamol d9		
2	Bambuterol	V (liver)	Bambuterol d9		
3	Brombuterol	V	Brombuterol d9	V	Brombuterol d9
4	t-Butylorsynephrine (bucopamine)			V	Salbutamol d9
5	Carbuterol	V	Carbuterol d9		
6	Bromchlorbuterol	V (liver)	Clenbuterol d9		
7	Cimaterol	V	Cimaterol d7	V	Cimaterol d7
8	Cimbuterol	V	Cimbuterol d9	V	Cimbuterol d9
9	Clenbuterol	V	Clenbuterol d9	V	Clenbuterol d9
10	Clencyclohexerol	V	Clenbuterol d9	V	Clencyclohexerol d10

研習內容-實驗-1

Determination of β -Agonists in muscle and liver-Compounds-2

No.	Compound	BVL		TFDA	
		(for Matrix)	Internal Standard		Internal Standard
11	Clenisopenterol	V	Clenpenterol d11	V	Mapenterol d11
12	Clenhexerol	V	Clenbuterol d9		
13	Clenpenterol	V	Clenpenterol d5	V	Brombuterol d9
14	Clenproperol	V	Clenproperol d7	V	Clenproperol d7
15	Chlorbrombuterol	V (muscle)	Clenbuterol d9		
16	Clorprenaline	V (liver)	Clorprenalin d7		
17	Fenoterol	V	Ractopamin d5	V	Fenoterol d6
18	Formoterol	V	Ractopamin d5	V	Formoterol d6
19	Hydroxymethylclenbut	V	Clenbuterol d9		
20	Isoxsuprine	V	Isoxsuprine 13C6	V	Isoxsuprine d6



 衛生福利部
 食品藥物管理署
 Food and Drug Administration

17

研習內容-實驗-1

Determination of β -Agonists in muscle and liver-Compounds-3

No.	Compound	BVL		TFDA	
		(for Matrix)	Internal Standard		Internal Standard
21	Labetalol	V	Ractopamin d5		
22	Mabuterol	V	Mabuterol d9	V	Mabuterol d9
23	Mapenterol	V	Mapenterol d11	V	Mapenterol d11
24	3-o-Methyl-colterol			V	3-o-Methyl-colterol d9
25	Orciprenaline	V	Salbutamol d9		
26	Phenylethanolamin A	V (liver)	Phenylethanolamin A d3		
27	Pirbuterol	V	Pirbuterol d9		
28	Procaterol	V (muscle)			
29	Ractopamin	V	Ractopamin d5	V	Ractopamin d6
30	Ritodrine	V	Ractopamin d5		


 衛生福利部
 食品藥物管理署
 Food and Drug Administration

18

研習內容-實驗-1

Determination of β -Agonists in muscle and liver-Compounds-4

No.	Compound	BVL		TFDA	
		(for Matrix)	Internal Standard		Internal Standard
31	Salbutamol	V	Salbutamol d9	V	Salbutamol d9
32	Salmeterol	V	Salmeterol 13C6	V	Salmeterol d3
33	Sotalol	V	Salbutamol d9		
34	Terbutaline	V	Terbutalin d9	V	Terbutalin d9
35	Tulobuterol	V	Tulobuterol d9	V	Tulobuterol d9
36	Zilpaterol	V	Zilpaterol 13C3	V	Zilpaterol d7

- BVL檢測項目34品項(包含代謝物·依據檢測基質·測的品項有差異)·未包含t-Butylnorsyneprine 及3-o-Methyl-colterol等2品項。
- 儘量以分析物之同位素內標進行校正。

研習內容-實驗-2

Determination of β -Agonists in muscle and liver-Sample preparation-1

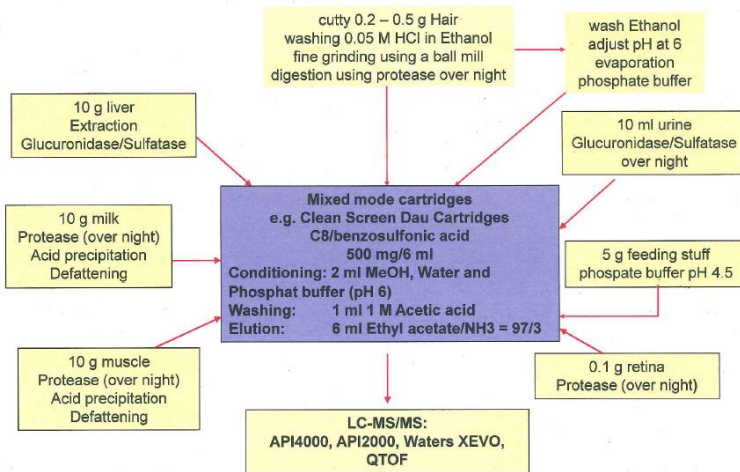
Muscle		Liver	
Hydrolysis	Buffer at pH 8 Protease Incubate overnight at 55 °C	Hydrolysis	Buffer at pH 5 Shake it for 20 min at 40 °C Centrifuge for 30 min Glucuronidase/Sulfatase-solution Shake it for 60 min at 40 °C
Acid precipitation	25 % sulfuric acid (pH at 1) Centrifugation for 20min		
Defatting	Hexane Centrifugation for 5 min	Solid phase extraction	Adjust pH at 6 Centrifugation Add 200 μ l methanol to supernatants SPE->eluent Evaporate to dryness Dissolve in 200 μ l HPLC-eluent A / B=95:55
Solid phase extraction	Adjust pH at 6 Add 100 μ l methanol Centrifugation SPE->eluent Evaporate to dryness Dissolve in 200 μ l HPLC-eluent A / B=95:55		

- Muscle->protease
- Cimaterol, Clenbuterol, Ractopamin and Zilpaterol °

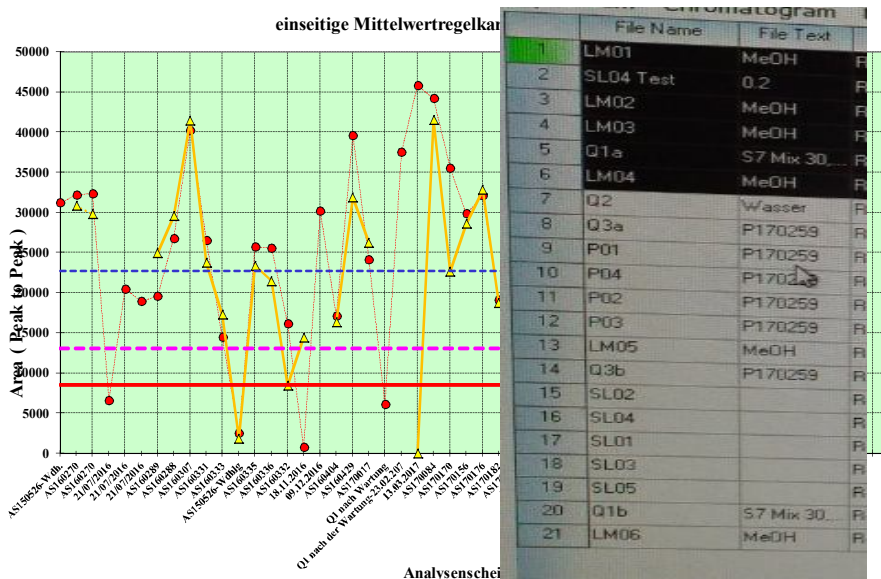
研習內容-實驗-2

Determination of β -Agonists in muscle and liver-Sample preparation-2

Sample pre-treatment for β -agonists in different matrices



研習內容-心得分享-1



研習內容-心得分享-2



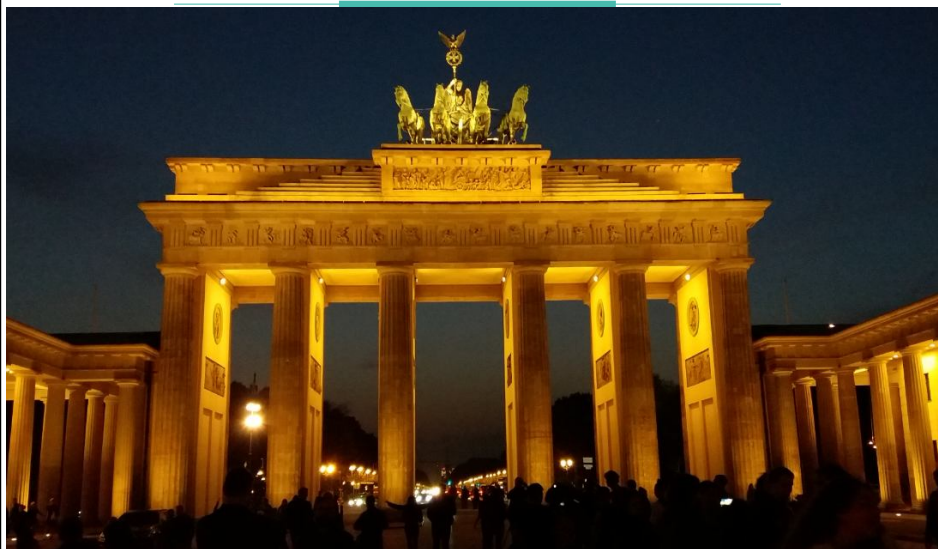
結語

KEEP IMPROVING

NEVER
GIVE UP.
GREAT
THINGS
TAKE TIME.

WWW.LIVELIFEHAPPY.COM

謝謝聆聽



衛生福利部
FDA 食品藥物管理署
Food and Drug Administration