

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－可利斯汀之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods- Test of Colistin

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中可利斯汀(colistin，包括colistin A及colistin B)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：電灑離子化正離子 (positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：XBridge[®] BEH C18，2.5 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.1.3. 保護管柱：XBridge[®] BEH C18，2.5 μm ，內徑3.9 mm $\times$ 5 mm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times g$ 以上，控制溫度可達4°C以下者。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.5. 真空固相萃取裝置(Solid phase vacuum extraction manifold)。
 - 2.1.6. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：甲酸、乙腈及甲醇均採用液相層析級；丙酮、鹽酸及乙醚均採用試藥特級；三氟乙酸(trifluoroacetic acid)採用分析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 M Ω $\cdot$ cm以上)；可利斯汀硫酸鹽(colistin sulfate)對照用標準品；多粘菌素B (polymyxin B)內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL。
 - 2.3.2. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer) ^(註)：採用Bond Elut QuEChERS P/N5982-9313，或同級品。
 - 2.3.4. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Phenomenex Strata-X

polymeric cartridges 6 mL, 100 mg, 或同級品。

2.3.5. 濾膜：孔徑0.2 μm ，PTFE材質。

註：陶瓷均質石可視檢體黏稠度自行評估使用。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 1 N鹽酸溶液：

取鹽酸50 mL，緩緩加入去離子水500 mL中，再加去離子水使成600 mL。

2.4.2. 6 N鹽酸溶液：

取鹽酸250 mL，緩緩加入去離子水250 mL中，混合均勻。

2.4.3. 0.1%甲酸溶液：

取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.4.4. 0.2%甲酸溶液：

取甲酸2 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.4.5. 2%丙酮溶液：

取丙酮10 mL，加去離子水使成500 mL。

2.4.6. 70%甲醇溶液：

取甲醇700 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.4.7. 含0.2%甲酸之70%甲醇溶液：

取甲酸1 mL，加70%甲醇溶液使成500 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取三氟乙酸0.1 mL及甲酸2 mL，加去離子水使成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：

取三氟乙酸0.1 mL及甲酸2 mL，加乙腈溶液使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取適量多粘菌素B內部標準品，以0.2%甲酸溶液稀釋至30 $\mu\text{g/mL}$ ，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取相當於含可利斯汀約10 mg之對照用標準品，精確稱定，以0.1%甲酸溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液^(註)，冷凍貯存。臨用時取適量標準原液，以0.2%甲酸溶液稀釋至1 µg/mL，供作標準溶液。

註：標準原液解凍使用完畢後即丟棄，勿重複冷凍與解凍。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取：

2.8.1.1. 肌肉及內臟：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加內部標準溶液40 µL，靜置10分鐘。加入陶瓷均質石，再加入1 N鹽酸溶液10 mL，旋渦混合2分鐘，於4°C，以5000 ×g離心10分鐘，取上清液，供淨化用。

2.8.1.2. 乳汁：

將檢體混勻後，精確量取5 mL，置於50 mL離心管中，加內部標準溶液40 µL，混合均勻，靜置10分鐘。加入6 N鹽酸溶液1 mL，旋渦混合2分鐘，於4°C，以5000 ×g離心10分鐘，取上清液，供淨化用。

2.8.1.3. 蛋：

將檢體均質後，取約2 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加內部標準溶液40 µL，混合均勻，靜置10分鐘。加入6 N鹽酸溶液2 mL，旋渦混合1分鐘，再加入去離子水8 mL，旋渦混合2分鐘，於4°C，以5000 ×g離心10分鐘，取上清液，供淨化用。

2.8.2. 淨化：

取2.8.1.節供淨化用溶液，注入預先以甲醇5 mL及去離子水5 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液。依序以乙醚4 mL、2%丙酮溶液4 mL及去離子水4 mL流洗，棄流出液。再以含0.2%甲酸之70%甲醇溶液4 mL沖提，收集沖提液於15 mL離心管中，於40°C水浴中吹氮氣將甲醇去除，以0.2%甲酸溶液定容至2 mL，作為檢液原液。取檢液原液500 µL (a)，加入0.2%甲酸溶液使體積為1000 µL (b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.8.節調製未添加內部標準品之檢液原液，量取500 µL

(a)，分別加入標準溶液5~200 µL、內部標準溶液10 µL及適量0.2%甲酸溶液，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，以可利斯汀(colistin A與colistin B之波峰面積的總和)與內部標準品之波峰面積比，與對應之可利斯汀濃度，製作0.005~0.2 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：XBridge[®] BEH C18，2.5 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

保護管柱：XBridge[®] BEH C18，2.5 µm，內徑3.9 mm × 5 mm。

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	90 → 90	10 → 10
1.5 → 1.7	90 → 65	10 → 35
1.7 → 3.0	65 → 15	35 → 85
3.0 → 3.1	15 → 0	85 → 100
3.1 → 5.0	0 → 90	100 → 10
5.0 → 9.0	90 → 90	10 → 10

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：10 µL。

管柱溫度：30°C。

樣品盤溫度：10°C。

離子源：ESI⁺。

毛細管電壓(Capillary voltage)：0.8 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：440°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：100 L/hr。

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)。偵測離子對、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	碰撞
-----	-----	-----	----

	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	電壓 (V)	能量 (eV)
Colistin A	391 > 385*	22	10
	391 > 379	22	10
	391 > 101	22	18
Colistin B	386 > 380*	2	10
	386 > 374	2	12
	386 > 101	2	18
Polymyxin B (I.S.)	397 > 101*	5	19

*定量離子對

註：1. 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. 偵測離子對得視基質情況選擇適合之定性離子對。

3. 層析管使用完畢，建議以20%甲醇溶液沖洗60分鐘以上。

2.10. 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 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.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可利斯汀之含量(ppm)：

$$\text{檢體中可利斯汀之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中可利斯汀之濃度(μ g/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)

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($\leq 100\%$)，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、內臟及蛋均為 0.05 ppm，於乳汁為 0.01 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. Kaufmann, A. and Widmer, M. 2013. Quantitative analysis of polypeptide antibiotic residues in a variety of food matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 797: 81-88.
2. Wan, E. C., Ho, C., Sin, D. W. and Wong, Y. C. 2006. Detection of residual bacitracin A, colistin A, and colistin B in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 385: 181-188.