

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－Nystatin之檢驗

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

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜產品之肌肉、內臟、蛋類及乳汁中nystatin之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，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(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Poroshell 120EC-C18，2.7 μm ，3.0 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times g$ 以上，且溫度控制可達10 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.5. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder $^{\circledR}$ ，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.2. 試藥：甲醇採用液相層析級；甲酸及二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；nystatin對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
 - 2.3.3. 容量瓶：10 mL。
 - 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 含1%甲酸之甲醇溶液：
取甲醇與甲酸以99：1 (v/v)比例混勻。
 - 2.4.2. 1%甲酸溶液：
取去離子水與甲酸以99：1 (v/v)比例混勻。
 - 2.4.3. 0.1%甲酸溶液：
取1%甲酸溶液與去離子水以1：9 (v/v)比例混勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸1 mL，加入去離子水使成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：

取甲酸1 mL，加入甲醇使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

取nystatin對照用標準品約5 mg，精確稱定，以DMSO溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量標準原液，以甲醇稀釋至100 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將肌肉及內臟檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定；蛋類檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻，取約2 g，精確稱定；乳汁精確量取2 mL，置於離心管中，加入陶瓷均質石1顆及含1%甲酸之甲醇溶液10 mL，蓋上離心管蓋，旋渦混合1分鐘，以高速分散裝置於1000 rpm振盪10分鐘，於10°C，以5000 ×g離心5分鐘。取上清液250 µL (a)，加入0.1%甲酸溶液使體積為1000 µL (b)，混合均勻，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.8. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別加入標準溶液2~200 µL，依第2.7.節調製檢液，供作檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就nystatin之波峰面積，與對應之nystatin濃度，製作5~500 ng/mL之檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：Poroshell 120EC-C18，2.7 µm，3.0 mm × 10 cm。

層析管溫度：40°C。

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 → 2.0	80 → 80	20 → 20
2.0 → 3.0	80 → 20	20 → 80
3.0 → 5.0	20 → 20	80 → 80
5.0 → 5.5	20 → 0	80 → 100
5.5 → 11.0	0 → 0	100 → 100

11.0 → 11.5	0 → 80	100 → 20
11.5 → 13.5	80 → 80	20 → 20

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：20 µL。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：5.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

加熱管溫度(Turbo heater temperature)：500°C。

霧化氣體 (Nebulizer gas, GS1)：50 psi。

輔助加熱氣體(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(collision energy)如下表：

分析物	離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Nystatin	926.5 > 691.5*		28
	926.5 > 727.3	50	28
	926.5 > 673.4		24

*定量離子對，定性離子對可視基質情況選擇適合之至少一對離子對

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。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及檢量線溶液各20 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nystatin之含量(ppm)：

$$\text{檢體中nystatin之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由檢量線求得檢液中nystatin之濃度(ng/mL)

V：萃取檢體之萃取溶液體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g或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

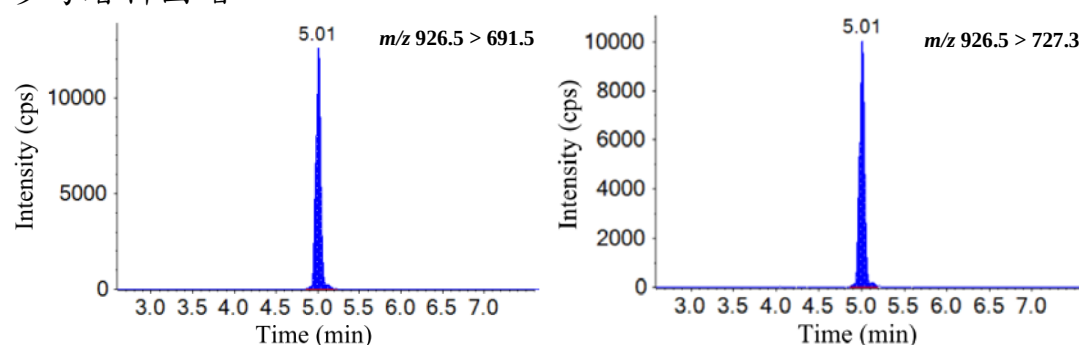
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.1 ppm。

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. Scheuch, E., Gießmann, T. and Siegmund, W. 2006. Quantitative determination of nystatin in human plasma using LC-MS after inhalative administration in healthy subjects. J. Chromatogr. B 844: 84-88.
2. 黃志能、沈盈如、陳浩民、蘇瑋婷、丁悅、張順憲、廖家鼎、高雅敏、周秀冠、王德原、陳惠芳。2016。食品中動物用藥殘留之檢驗研究。衛生福利部食品藥物管理署105年度自行研究計畫。

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析nystatin標準品之MRM圖譜