公開日期：110 年 3 月 9 日
TFDAV0024.00

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－枯草菌素之檢驗
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods - Test of Bacitracin

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蛋類中枯草菌素(bacitracin)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(electrospray ionization, ESI)。

2.1.1.2. 層析管：SHIMADZU Shim-pack GIST C18，2 µm，2.1 mm × 10 cm，或同級品。

2.1.2. 固相萃取真空裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。

2.1.3. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。

2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達10000 ×g以上，溫度控制可達0℃以下者。

2.1.5. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。

2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.2. 試藥：甲醇、乙腈及正己烷均採用液相層析級；甲酸採用試藥特級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)；枯草菌素對照用標準品。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 容量瓶：1 mL及10 mL。

2.3.2. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。

2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 µm，PVDF材質。

2.3.4. 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)：Waters Oasis HLB 500 mg，6 mL，或同級品。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 0.1%甲酸溶液：

取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.4.2. 0.1%甲酸溶液：乙腈(4:1, v/v)溶液：

取0.1%甲酸溶液與乙腈以4：1 (v/v)比例混勻。

2.4.3. 萃取溶液：

取0.1%甲酸溶液與甲醇以5：2 (v/v)比例混勻，臨用時調製。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸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：

取甲酸2 mL，加乙腈使成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：

取枯草菌素對照用標準品約10 mg，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，冷藏避光貯存。臨用時取適量標準原液，以0.1%甲酸溶液：乙腈(4:1, v/v)溶液稀釋至1000 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混合均勻，取約2.5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入萃取溶液25 mL，超音波振盪10分鐘，於0℃以10000 ×g離心10分鐘。取上清液，加入正己烷10 mL，旋渦混合1分鐘，於0℃以10000 ×g離心10分鐘，取下層液供作淨化用。

2.7.2. 淨化：

取2.7.1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，以去離子水10 mL清洗，棄流出液，以甲醇5 mL沖提，收集沖提液，於40℃以氮氣吹乾，殘留物以0.1%甲酸溶液：乙腈(4:1, v/v)溶液溶解並定容至1 mL，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25～150 µL，依2.7.節調製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就枯草菌素之波鋒面積，與對應之枯草菌素濃度，製作25～150 ng/mL檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件[註]：

層析管：SHIMADZU Shim-pack GIST C18，2 µm，2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：40℃。

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 → 3.0	95 → 0	5 → 100
3.0 → 5.0	0 → 0	100 → 100
5.0 → 6.0	0 → 95	100 → 5
6.0 → 8.0	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：5 μL。

介面電壓(Interface voltage)：1 kV。

離子化模式：ESI正離子。

介面溫度(Interface temperature)：295℃。

霧化氣體流速(Nebulizing gas flow)：3.0 L/min。

加熱氣體流速(Heating gas flow)：15.0 L/min。

脫溶劑管溫度(Desolvent line temperature)：185℃。

加熱塊溫度(Heat block temperature)：300℃。

乾燥氣體流速(Drying gas flow)：5.0 L/min。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、Q1/Q3聚焦電壓(Q1/Q3 Pre Bias)及碰撞電壓(collision voltage)如下表。

分析物	離子對 前驅離子(*m/z*) > 產物離子(*m/z*)	Q1/Q3 聚焦電壓 (V)	碰撞 電壓 (V)
Bacitracin	475 > 199*	30/20	26
	475 > 670	30/24	15

*定量離子對

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5 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之相對離子強度(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中枯草菌素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中枯草菌素之含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由檢量線求得檢液中枯草菌素之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

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(≤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

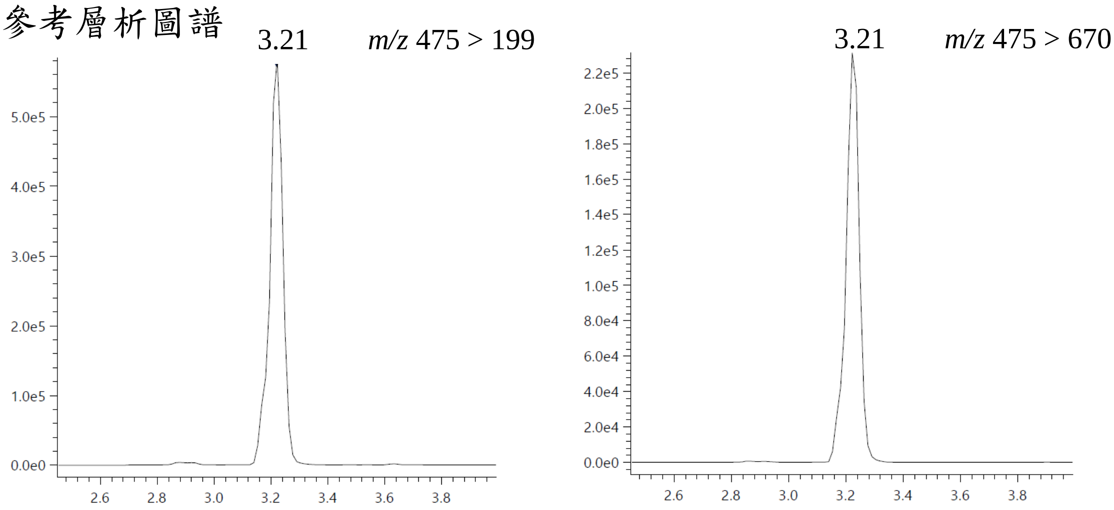
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.01 ppm。

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. Lin, W. X., Sun, X. Q., Tian, M., Yu, L., Chen, X. and Li, Z. 2009. Determination of colistin, bacitracin and virginiamycin multiresidues in animal tissue by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. J. Instrum. Anal. 28: 212 - 215.
2. Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Pan, Y., Wang, X., Liu, Z., Huang, L., Peng, D. and Yuan, Z. 2018. Analysis of major components of bacitracin, colistin and virginiamycin in feed using matrix solid-phase dispersion extraction by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Chromatogr. Sci. 56: 285 - 291.

參考層析圖譜



圖、以 LC-MS/MS 分析枯草菌素標準品之 MRM 圖譜