

食品中乳酸鏈球菌素之檢驗方法
Method of Test for Nisins in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於乾酪及液蛋中乳酸鏈球菌素(nisin)，包括nisin A及nisin Z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 120 EC-C18，2.7 μm ，內徑4.6 mm \times 5 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達5000 \times g以上。
 - 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；甲酸、氯化鈉及醋酸均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；乳酸鏈球菌素A(nisin A，純度2.5%)及乳酸鏈球菌素Z(nisin Z)對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL、50 mL及100 mL。
 - 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 含0.5%甲酸之20%乙腈溶液：
取甲酸5 mL及乙腈200 mL，加去離子水使成1000 mL。
 - 2.4.2. 萃取溶液：
稱取醋酸5.7 g及氯化鈉58.5 g，以去離子水500 mL溶解，加甲醇使成1000 mL。
 - 2.5. 移動相溶液之調製：
 - 2.5.1. 移動相溶液A：
取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
 - 2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。
 - 2.6. 標準溶液之配製：

取nisin Z對照用標準品約100 mg，精確稱定，以含0.5%甲酸之20%乙腈溶液溶解並定容至100 mL，作為標準原液；取相當於含nisin A 10 mg之nisin A對照用標準品，精確稱定，以含0.5%甲酸之20%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以含0.5%甲酸之20%乙腈溶液稀釋至1000 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體均質混勻，取約2 g，精確稱定，加入萃取溶液25 mL，均質1分鐘後，移入50 mL容量瓶中，再以萃取溶液15 mL清洗均質杯，洗液併入容量瓶中，以萃取溶液定容，移至離心管中，以5000 ×g離心10分鐘，取上清液經濾膜過濾。取濾液200 μL (a)，加入含0.5%甲酸之20%乙腈溶液使體積為1000 μL (b)，混合均勻，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7.節調製濾液，取濾液各200 μL，分別加入標準溶液40~200 μL，再加入含0.5%甲酸之20%乙腈溶液使體積為1000 μL，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行分析。就各乳酸鏈球菌素波峰面積，與對應之各乳酸鏈球菌素濃度，分別製作40~200 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：Poroshell 120 EC-C18，2.7 μm，內徑4.6 mm × 5 cm。

層析管溫度：25°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 → 0.5	98 → 98	2 → 2
0.5 → 6.0	98 → 2	2 → 98
6.0 → 10.0	2 → 2	98 → 98
10.0 → 12.0	2 → 98	98 → 2
12.0 → 14.0	98 → 98	2 → 2

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：10 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)：550°C。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：50 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：60 psi。

氣簾氣體(Curtain gas)：25 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：8 psi。

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)		
Nisin A	671.6 > 810.9**	50	25
	671.6 > 744.5		21
Nisin Z	667.1 > 804.9**	60	22
	667.1 > 801.0		23

*前驅離子與產物離子所帶價數不同

**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：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各10 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各乳酸鏈球菌素之含量(g/kg)：

$$\text{檢體中乳酸鏈球菌素之含量(g/kg)} = \frac{\sum C \times V \times F}{M} \times 10^{-6}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中各乳酸鏈球菌素之濃度 (ng/mL)

V：檢體以萃取溶液定容之體積(50 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：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相除而得(≤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

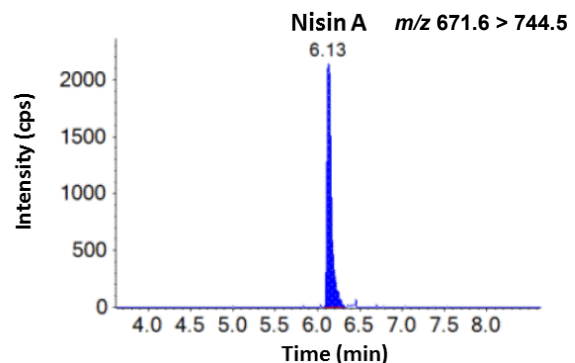
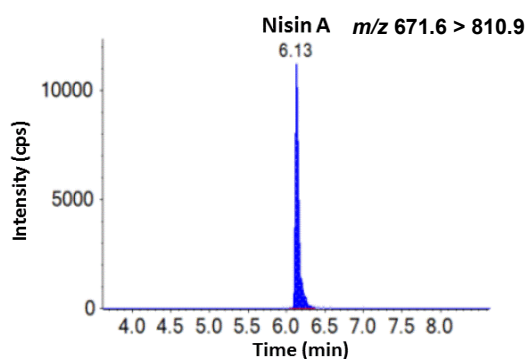
- 附註：1. 本檢驗方法之定量極限，nisin A及nisin Z均為0.005 g/kg。
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

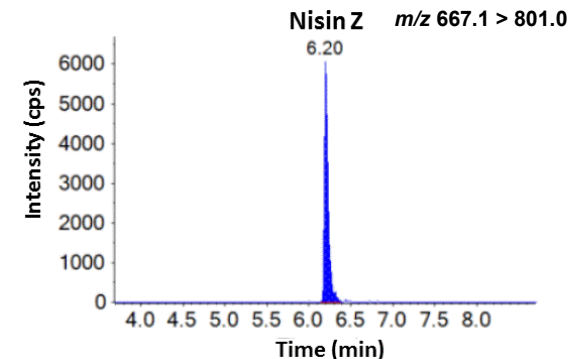
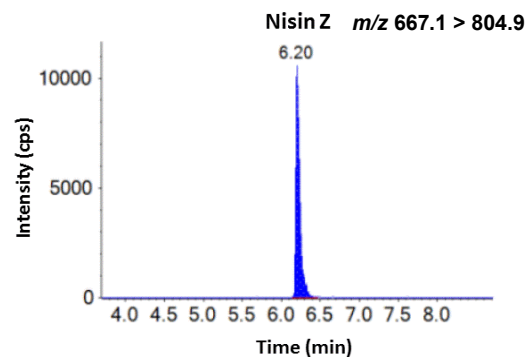
1. Ko, K. Y., Park, S. R., Lee, C. A. and Kim, M. 2015. Analysis method for determination of nisin A and nisin Z in cow milk by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* 98: 1435-1442.
2. Schneider, N., Werkmeister, K. and Pischetsrieder, M. 2011. Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. *Food Chem.* 127: 847-854.
3. 呂淑芳、張惠淑、葉伶宜、傅偉光。2020。109年度「擴增食品添加物及摻偽檢驗方法之評估量能」。衛生福利部食品藥物管理署109年委辦計畫研究成果報告。

參考層析圖譜

(a)



(b)



圖、以LC-MS/MS分析乳酸鏈球菌素A(a)及乳酸鏈球菌素Z(b)標準品之MRM圖譜