

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－富樂黴素之檢驗
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods -
Test of Flavophospholipol

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蛋類中富樂黴素(flavophospholipol)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：ACQUITY UPLC[®] BEH C18，1.7 μm ，2.1 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. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達10000 $\times g$ 以上，且溫度控制可達0 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.6. 微量離心機(Microcentrifuge)：可達14000 $\times g$ 以上者。
 - 2.1.7. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或其它具振盪功能之裝置。
 - 2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；甲酸及氨水(25%)採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18M $\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；富樂黴素A (flavophospholipol A)對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL。
 - 2.3.2. 離心管：1.5 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。
 - 2.4. 萃取溶液之調製：

取氨水與甲醇以1：9 (v/v)比例混勻，臨用時調製。
 - 2.5. 移動相溶液之配製：
 - 2.5.1. 移動相溶液A：

取甲酸3 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3 mL，加入乙腈使成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：

取富樂黴素A對照用標準品約5 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量標準原液，以萃取溶液稀釋至100 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻，取約2 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入萃取溶液4 mL，蓋上離心管蓋，以高速分散裝置於1000 rpm振盪5分鐘，於0°C以10000 ×g離心5分鐘，收集上清液。殘留物加入乙腈30 mL，蓋上離心管蓋，旋渦混合1分鐘，於-18°C以下靜置20分鐘，再於0°C以10000 ×g離心10分鐘，棄上清液。殘留物加入萃取溶液4 mL，蓋上離心管蓋，以高速分散裝置於1000 rpm振盪5分鐘，於0°C以10000 ×g離心5分鐘，合併上清液，以萃取溶液定容至10 mL，作為檢液原液。取檢液原液500 μL (a)，加入萃取溶液使體積為1000 μL (b)，混合均勻，以14000 ×g離心5分鐘，取上清液經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7節調製空白檢液原液，取500 μL，分別加入標準溶液5~100 μL及萃取溶液，使體積為1000 μL，混合均勻，以14000 ×g離心5分鐘，取上清液經濾膜過濾，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行分析。就富樂黴素A之波峰面積，與對應之富樂黴素A濃度，製作0.5~10 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1)：

層析管：ACQUITY UPLC® BEH C18, 1.7 μm, 2.1 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 → 0.5	50 → 70	50 → 30
0.5 → 5.0	70 → 5	30 → 95
5.0 → 10.0	5 → 5	95 → 95
10.0 → 10.2	5 → 50	95 → 50
10.2 → 14.0	50 → 50	50 → 50

移動相流速：0.4 mL/min。
注入量：5 µL。
介面電壓(Interface voltage)：3 kV。
離子化模式：ESI負離子。
介面溫度(Interface temperature)：300°C。
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(Desolvation line temperature)：250°C。
加熱塊溫度(Heat block temperature)：400°C。
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		Q1/Q3 聚焦 電壓 (V)	碰撞 電壓 (V)
	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)		
富樂黴素A	789.8	575.7*	32/24	27
(Flavophospholipol A)	789.8	554.2	32/24	27

*定量離子對

註1：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2)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中富樂黴素之含量(ppm)^(註3)：

$$\text{檢體中富樂黴素之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中富樂黴素A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)

F：稀釋倍數，由b/a求得

註2：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($\leq 100\%$)，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

註3：檢體中富樂黴素之含量係以富樂黴素A計。

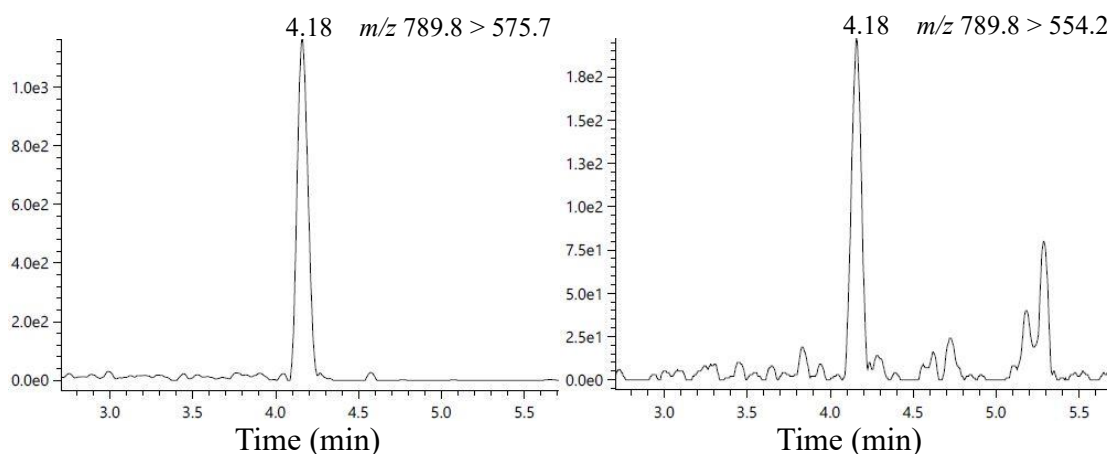
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.005 ppm。

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. Xu, H., Zhang, H.W., Xu, B., Zhang, X. M., Wang, F. M., Cao, P., Yuan, T. and Wang, Y. T. 2015. Rapid analysis of moenomycin A residue in poultry tissues using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Austin Chromatogr.* 2: id1037.
2. Gallo, P., Fabbrocino, S., Serpe, L., Fiori, M., Civitareale, C. and Stacchini, P. 2010. Determination of the banned growth promoter moenomycin A in feed stuffs by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24: 1017-1024.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析富樂黴素A標準品之MRM圖譜