

擬公告修正之禽畜產品中乙型受體素類多重殘留分析 方法介紹

107年度推廣訓練班-107.05.29



衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

大綱

- 緣起
- 介紹
 - － 乙型受體素
 - － 檢驗方法
- 檢驗方法評估過程
- 確效結果
- 結語

緣起-重新評估公告檢驗方法並納入Buctopamine品項

● 風管組

- 建議檢驗方法部分品項回收率不佳，外界實驗室增加同位素內標校正，結果良好
- 將公告方法檢測品項與建議方法一致。

● 動物植物防疫檢疫局

- 106年2月例行性抽驗監測：豬毛驗出Buctopamine成分85 ppb

● Buctopamine未列於公告或建議檢驗方法品項

94年8月22日署授食字第0949424412號公告訂定
100年4月7日署授食字第1001900952號公告修正
102年12月10日部授食字第1021951106號公告修正

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－乙型受體素類多重殘留分析

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods- Test of Multiresidue Analysis of β -Agonists

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中乙型受體素 clenbuterol、salbutamol、terbutaline、ractopamine、zilpaterol、cimaterol 及 tulobuterol 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。

公開日期：101年2月23日
TFDAV0001.00

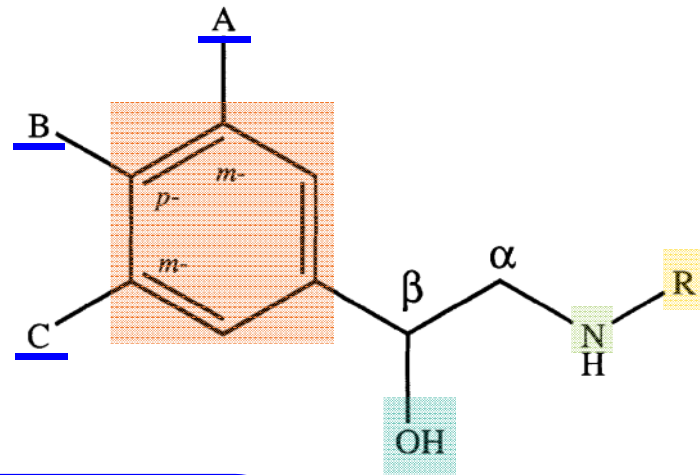
食品中動物用藥殘留量檢驗方法－乙型受體素類多重殘留分析

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods- Test of Multiresidue Analysis of β -Agonists

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中 brombuterol 等 20 項乙型受體素類(品項見附表)多重殘留分析。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化處理後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。

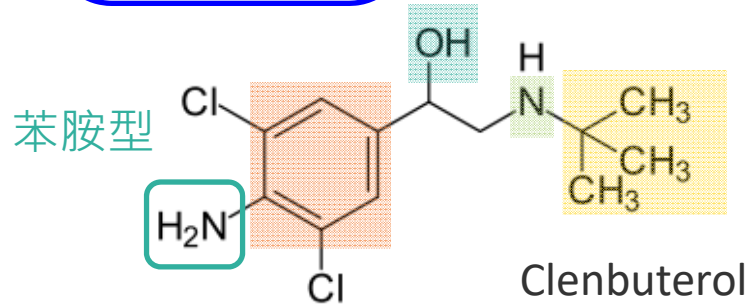
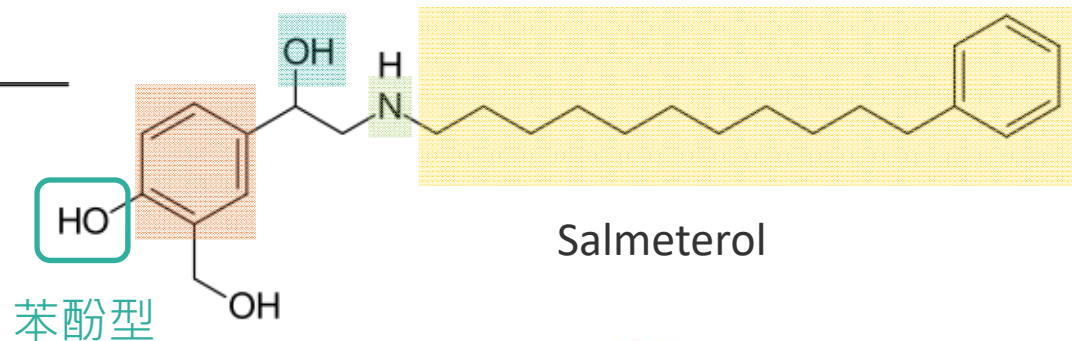
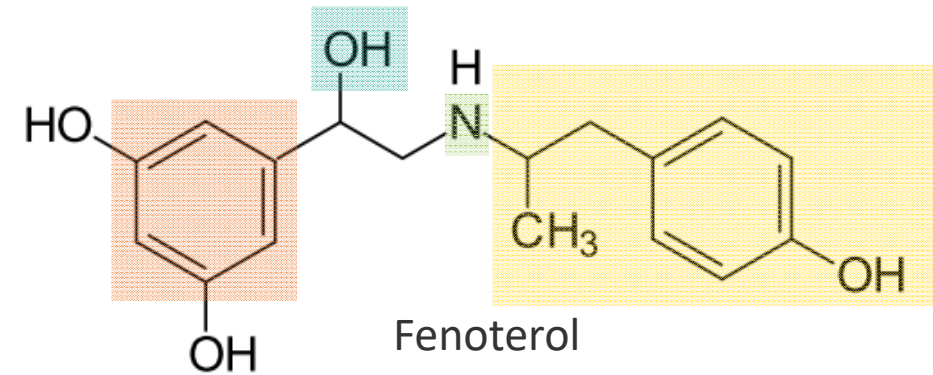
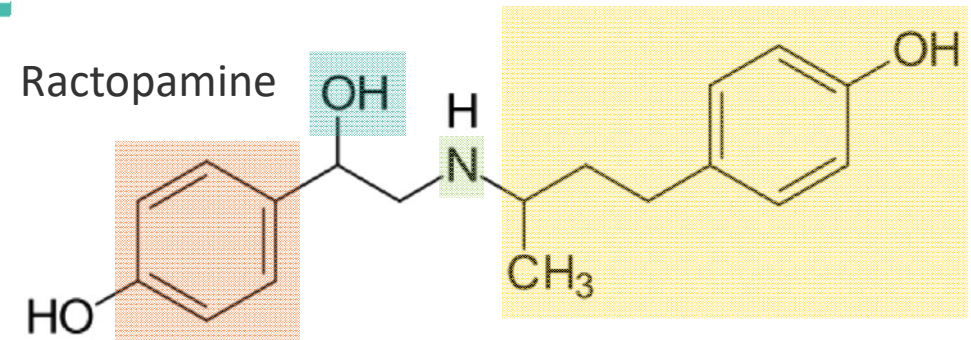


介紹-乙型受體素 (β -agonists) 結構^{[1],[2]}



Aromatic Substitution

A	B	C	Category	Example(s)
-H	-OH	-H	Phenol	Ractopamine, Ritodrine, Fenoterol, Terbutaline
-OH	-H	-OH	Resorcinol	Isoproterenol, Dobutamine
-OH	-OH	-H	Catechol	Salbutamol, Salmeterol
-CH ₂ OH	-OH	-H	Saligenin	



苯酚型



介紹-對人類健康造成風險而限制/禁止使用

- β -agonists (β -adrenoceptor agonists, 乙型受體素, 俗稱瘦肉精), 為人工合成的苯乙醇胺類藥物(phenylethanolamine), 能活化 β -腎上腺素受體(β -adrenergic receptors, β -adrenoceptor), 進而影響生物體內心血管、呼吸系統、新陳代謝及組織再生的能力^[3]
- 作用^{[3], [4]}
 - 舒緩支氣管及子宮平滑肌的收縮
 - 於生物體內具再分配效應(repartitioning effects), 能轉化脂肪為肌肉組織, 促進肌肉的合成, 延緩老化時之肌少症(sarcopenia)現象
- 副作用^[4]
 - 引起心血管及中樞神經系統等相關疾病
 - 醫學治療上的使用受到限制
 - 限制/禁止使用於畜牧產業

介紹-外國動物用藥殘留標準_β-agonists

- 歐盟 (Council Directive 96/22/EC, Commission Regulation (EU) No 37/2010)^{[5], [6]}
 - β-agonists僅被授權使用特定類別動物(例：牛、馬科及寵物)之治療目的。
 - Clenbuterol於牛及馬科訂有MRL標準
- 美國 (CAC/MRL 2-2017)^[7]
 - Clenbuterol於牛及馬訂有MRL標準
 - Ractopamine於牛及豬訂有MRL標準
- 日本^[8]
 - Clenbuterol於牛及馬訂有MRL標準
 - Ractopamine於牛及豬訂有MRL標準
 - Zilpaterol於牛及豬訂有MRL標準

介紹-台灣動物用藥殘留標準_β-agonists

- 行政院農業委員會

- 乙型受體素(β-agonist)為動物用禁藥-民國101年9月7日農防字第1011473960號
 - 乙型受體素(β-agonist)為禁止製造、調劑、輸入、輸出、販賣或陳列之藥品。但不包括作為供牛隻使用之含藥物飼料添加物。
- 動物用藥品使用準則第四條附件二含藥物飼料添加物使用規範修正規定
 - 使用對象、用途、用法、用量、停藥期及使用上應注意事項
 - 抗菌劑類9項及抗寄生蟲劑類17項

- 食品藥物管理署

- 動物用藥殘留標準
 - 第三條 食品中之動物用藥殘留量應符合下列規定，本表中未列之藥品品目，不得檢出。若表中藥品品目非屬行政院農業委員會核准使用之動物用藥，僅適用進口肉品。
 - 牛肌肉 0.01 ppm

介紹-檢驗方法_β-agonists

● 樣品製備

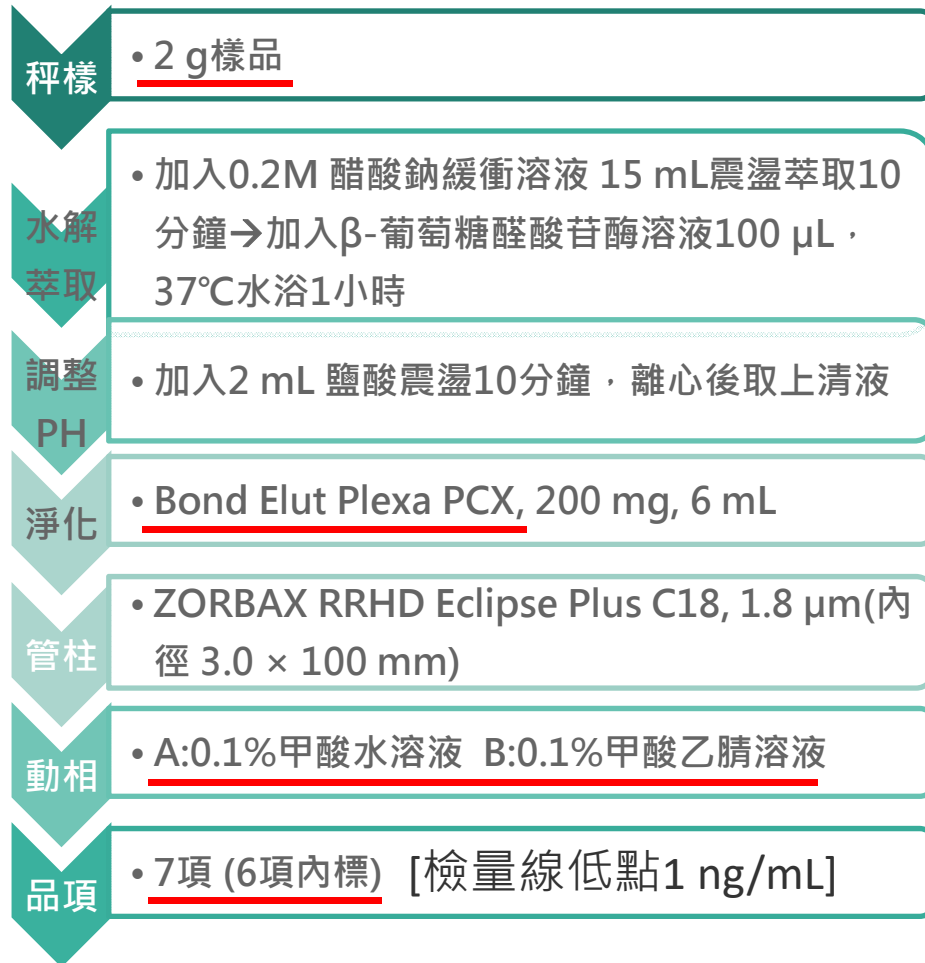
- 萃取→這類藥物於生物體中，除與蛋白質作用外，亦會在組織與排泄物中以葡萄糖醛酸及硫酸共軛化合物存在
 - β-glucuronidase→破壞乙型受體素與組織間的鍵結
 - 蛋白酶/酸沉澱→切斷蛋白質上的胜肽鍵，搭配離心去除干擾
- 淨化→固相萃取匣(SPE)
 - 親水親脂平衡的逆相吸附劑→去除親水及疏水干擾物質
 - 混合模式逆相及陽離子交換吸附劑→去除中性及酸性干擾物質
- 校正→同位素內標

● 儀器分析

- 酵素免疫分析法(ELISA)→多重分析，結構類似的藥物會相互作用→定性上判別及定量上的困難
- 高液相層析法搭配紫外光檢測器(UV)、電化學檢測器(ECD)或螢光檢測器(FL)→結構類似的藥物及動物組織基質成份的複雜性→偽陽性
- 氣相層析質譜法(GC-MS)→β-agonists不具揮發性→衍生處理
- 液相層析串聯質譜法(LC-MS/MS)→趨勢

介紹-公告vs建議檢驗方法_β-agonists

公告檢驗方法

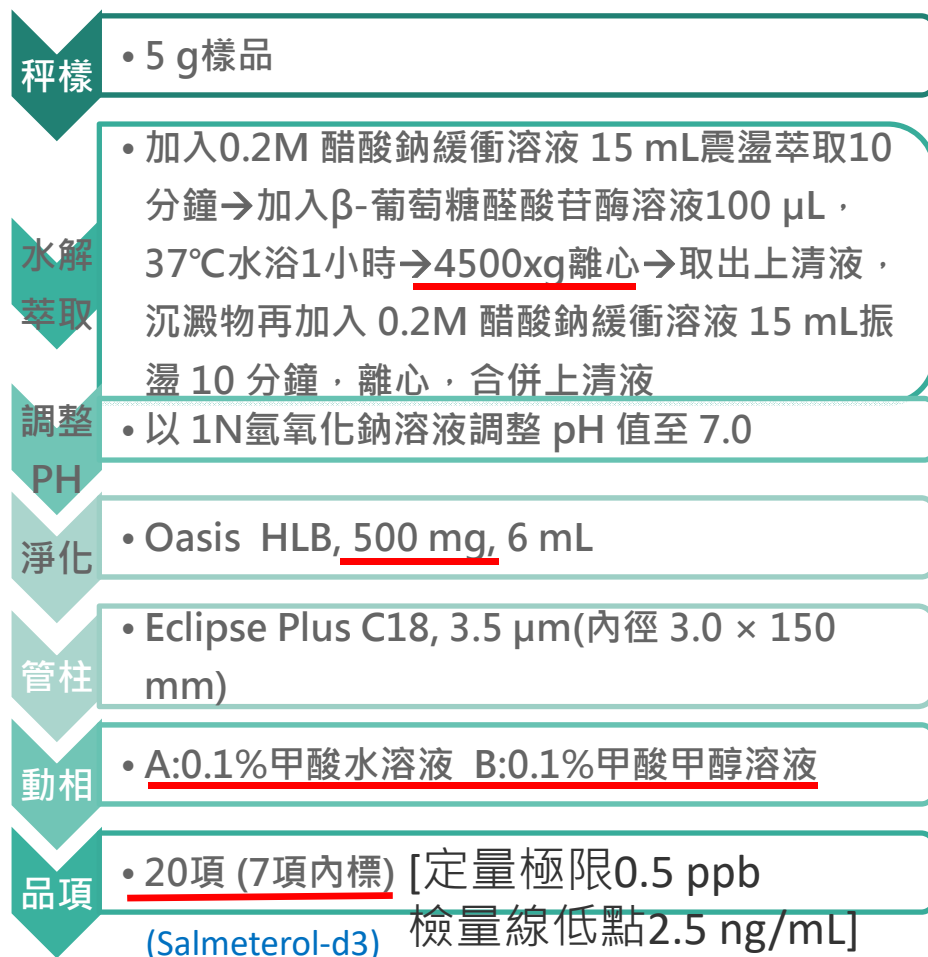


✓ 建議檢驗方法



檢驗方法評估過程-建議檢驗方法評估-1

Intertek提供之方法



建議檢驗方法



檢驗方法評估過程-建議檢驗方法評估-2

✓ Intertek提供之方法

不經濾膜過濾，
以離心方式取代

Intertek濾膜測試結果

秤樣	• 5 g樣品
水解 萃取	• 加入0.2M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL震盪萃取10分鐘→加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μL，37°C水浴1小時→4500xg離心→取出上清液，沉澱物再加入 0.2M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL振盪 10 分鐘，離心，合併上清液
調整 PH	• 以 1N氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 7.0
淨化	• Oasis HLB, 500 mg, 6 mL
管柱	• Eclipse Plus C18, 3.5 μm(內徑 3.0 × 150 mm)
動相	• A:0.1%甲酸水溶液 B:0.1%甲酸甲醇溶液
品項	• 20項 (7項內標) [定量極限0.5 ppb (Salmeterol-d3) 檢量線低點2.5 ng/mL]

No.	Recovery (%)	NYLON	PVDF	PTFE	PES
1	Brombuterol	77.7	86.4	62.4	90.3
2	Cimaterol	94.0	93.4	94.3	99.7
3	Cimbuterol	91.9	99.1	95.3	99.1
4	Clenbuterol	89.0	95.4	79.8	97.2
5	Clencyclohexerol	99.0	97.8	99.7	98.3
6	Clenisopenterol	73.7	86.5	51.0	85.4
7	Clenpenterol	87.3	92.7	63.3	93.9
8	Clenproperol	91.9	96.3	88.5	98.9
9	Fenoterol	96.4	64.4	97.8	93.4
10	Formoterol	104.7	91.5	100.2	91.4
11	Isoxsuprine	98.6	79.7	91.5	83.9
12	Mabuterol	88.5	87.5	67.4	91.5
13	Mapenterol	85.7	87.3	44.3	87.0
14	3-o-Methyl-colterol	99.8	100.8	97.9	101.6
15	Ractopamine	94.6	80.9	94.3	90.2
16	Salbutamol	94.1	101.6	99.5	101.1
17	Salmeterol	53.7	2.8	2.9	0.5
18	Terbutaline	97.1	102.0	98.6	96.9
19	Tulobuterol	90.4	94.9	73.0	95.7
20	Zilpaterol	97.4	102.5	101.5	104.5

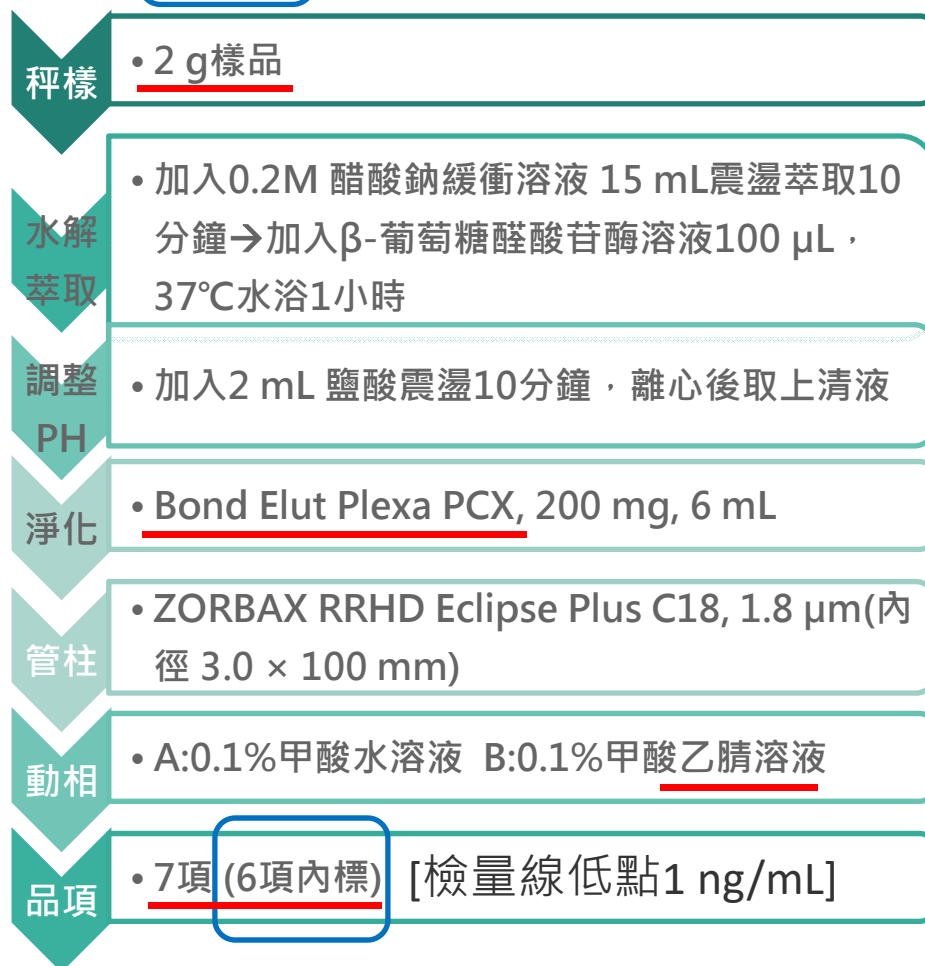


檢驗方法評估過程-檢驗方法測試-1

No.	品項	內標	豬肉 1ng/g (n=3)		牛肉 1ng/g (n=5)		豬肝 1ng/g (n=5)	
			Avg. R%	CV%	Avg. R%	CV%	Avg. R%	CV%
1	Brombuterol	Clenbuterol-d9	113.4	12.6	106.0	11.4	46.7	22.3
2	Cimaterol	Cimaterol-d7	106.3	6.0	104.8	5.6	105.4	4.3
3	Cimbuterol	Clenbuterol-d9	119.7	6.6	100.9	8.3	144.9	12.6
4	Clenbuterol	Clenbuterol-d9	106.3	6.8	98.6	3.1	98.1	6.4
5	Clencyclohexerol	Ractopamine-d6	95.8	6.9	106.2	7.0	126.7	32.7
6	Clenisopenterol	Ractopamine-d6	80.9	13.3	82.1	6.2	18.2	8.7
7	Clenpenterol	Clenbuterol-d9	122.6	4.7	102.4	3.3	78.6	5.6
8	Clenproperol	Clenbuterol-d9	110.1	5.4	107.5	5.6	104.1	6.8
9	Fenoterol	Ractopamine-d6	21.1	49.6	1.9		236.1	69.5
10	Formoterol	Ractopamine-d6	96.4	8.9	93.0	6.2	1449.9	9.8
11	Isoxsuprine	Ractopamine-d6	124.1	6.9	98.3	2.4	374.0	13.0
12	Mabuterol	Clenbuterol-d9	112.6	6.8	100.6	2.2	100.4	9.8
13	Mapenterol	Clenbuterol-d9	84.4	16.1	103.1	5.1	80.6	8.2
14	3-o-Methyl-colterol	Terbutaline-d9	74.9	8.4	174.2	24.5	10188.1	31.5
15	Ractopamine	Ractopamine-d6	111.7	8.4	100.9	3.7	106.0	4.8
16	Salbutamol	Salbutamol-d9	113.8	4.3	101.5	5.2	98.1	6.2
17	Salmeterol	Sameterol-d3	112.7	11.6	106.3	18.0	x	x
18	Terbutaline	Terbutaline-d9	110.4	2.2	104.6	4.5	118.3	8.6
19	Tulobuterol	Clenbuterol-d9	113.6	2.2	95.8	4.5	97.1	4.8
20	Zilpaterol	Zilpaterol-d7	104.4	7.8	112.6	4.2	101.0	4.6

檢驗方法評估過程-重新檢視檢驗方法

優化 公告檢驗方法



Intertek提供之方法



檢驗方法評估過程-檢驗方法目標及新增之內標

- 同步分析21品項
 - 建議檢驗方法20品項
 - 防檢局於豬毛中驗出之品項
 - Buctopamine
- 適用禽畜肉品及其內臟檢測
- 滿足定量極限1 ng/g需求
- 符合食品化學確效規範
 - 新增同位素內標

No.	品項	內標	新增取代
1	Brombuterol	Clenbuterol-d9	Brombuterol-d9
2	t-Butyl norsynephrine (buctopamine)		
3	Cimaterol	Cimaterol-d7	
4	Cimbuterol	Clenbuterol-d9	Cimbuterol-d9
5	Clenbuterol	Clenbuterol-d9	
6	Clencyclohexerol	Ractopamine-d6	Clencyclohexerol-d10
7	Clenisopenterol	Ractopamine-d6	
8	Clenpenterol	Clenbuterol-d9	
9	Clenproperol	Clenbuterol-d9	Clenproperol-d7
10	Fenoterol	Ractopamine-d6	Fenoterol-d6
11	Formoterol	Ractopamine-d6	Formoterol-d6
12	Isoxsuprine	Ractopamine-d6	Isoxsuprine-d6
13	Mabuterol	Clenbuterol-d9	Mabuterol-d9
14	Mapenterol	Clenbuterol-d9	Mapenterol-d11
15	3-o-Methyl-colterol	Terbutaline-d9	3-o-Methyl-colterol-d9
16	Ractopamine	Ractopamine-d6	
17	Salbutamol	Salbutamol-d9	
18	Salmeterol	Salbutamol-d9	Sameterol-d3
19	Terbutaline	Terbutaline-d9	
20	Tulobuterol	Clenbuterol-d9	Tulobuterol-d9
21	Zilpaterol	Zilpaterol-d7	

檢驗方法評估過程-檢驗方法優化

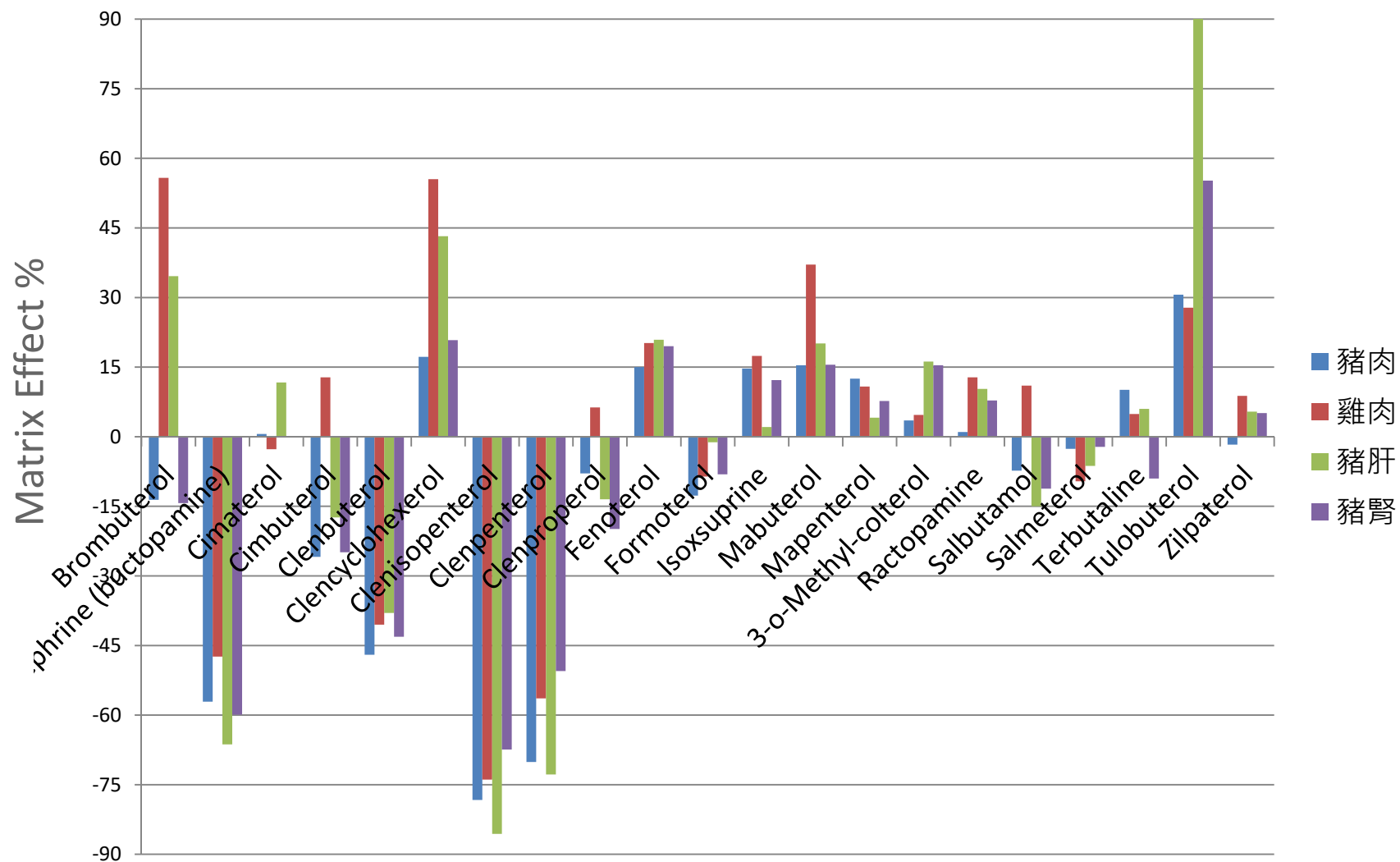
原公告檢驗方法



優化之檢驗方法



確效結果-基質效應



確效結果-豬肉

NO.	Compound	Intra-day precision (n=5)				Inter-day precision (n=10)
		1 ppb		5 ppb		1 ppb
		R %	CV %	R %	CV %	CV %
1	Brombuterol	99.2	6.4	113.4	7.8	7.6
2	t-Butylorsynephrine (buctopamine)	101.8	3	120.6	4.7	4.3
3	Cimaterol	96.4	6.5	108.9	2.3	5.8
4	Cimbuterol	92.8	8.1	113.1	11.6	7
5	Clenbuterol	100	8.6	103.5	6.5	6.5
6	Clencyclohexerol	87	9.9	102.1	12.8	15.1
7	Clenisopenterol	73.8	6.8	74.9	13.8	9.6
8	Clenpenterol	93.4	5.9	104.1	9.9	5.1
9	Clenproperol	90	5.3	106.5	10.2	6.4
10	Fenoterol	81.3	7.5	99	10.9	10.7
11	Formoterol	106.9	18.5	106.2	7.6	15.9
12	Isoxsuprine	88.5	6.8	102.8	8.1	6.9
13	Mabuterol	88.7	10.8	104.5	10.7	8.3
14	Mapenterol	88.9	4.1	106.9	10	5.6
15	3-o-Methyl-colterol	87.3	5.2	105.5	10.6	9.1
16	Ractopamine	106	2.8	107.5	3.4	4.8
17	Salbutamol	97.5	4.5	109.3	4.7	5.1
18	Salmeterol	106.5	8.3	88.2	15.8	10.3
19	Terbutaline	97.3	6.9	106.1	3.8	5
20	Tulobuterol	97.9	6.6	102.8	2.9	5.4
21	Zilpaterol	109.7	6.3	105.4	5.2	5.1

確效結果-雞肉

NO.	Compound	Intra-day precision (n=5)				Inter-day precision (n=10)
		1 ppb		5 ppb		1 ppb
		R %	CV %	R %	CV %	CV %
1	Brombuterol	97	5.5	96.7	9.9	4.8
2	t-Butylorsynephrine (buctopamine)	115.6	3.6	111.1	5.9	10.6
3	Cimaterol	96.5	4.3	97.5	6	9.7
4	Cimbuterol	94.6	7.7	94.6	7.8	9.6
5	Clenbuterol	97.3	9.4	95.7	6.7	8.5
6	Clencyclohexerol	104.7	7	102.7	3.9	8.5
7	Clenisopenterol	76.4	5.2	71.9	6.7	12.8
8	Clenpenterol	105.8	8.1	107.4	10.9	9.7
9	Clenproperol	99.8	5.1	101.3	5.6	5.2
10	Fenoterol	81.3	10.7	96.7	5.4	13.9
11	Formoterol	92.5	14	105.8	10.7	11.6
12	Isoxsuprine	99.5	7.1	100.5	4.6	7.2
13	Mabuterol	98.2	6.1	99.5	5.8	6.5
14	Mapenterol	98.5	6.3	98.9	6.6	5.1
15	3-o-Methyl-colterol	96.9	7	98.3	5.8	5
16	Ractopamine	94.4	8.4	92.6	3.3	8.2
17	Salbutamol	96.6	2.2	101.2	6	5.8
18	Salmeterol	91.6	6.8	97.2	12.2	18.8
19	Terbutaline	98.6	3	97.4	8	8.1
20	Tulobuterol	96.1	4.2	96.3	6.5	8.8
21	Zilpaterol	101.2	6.6	94.2	6.1	8.4

確效結果-豬肝

NO.	Compound	Intra-day precision (n=5)				Inter-day precision (n=10)
		5 ppb		10 ppb		5 ppb
		R %	CV %	R %	CV %	CV %
1	Brombuterol	114.5	4.1	105.6	3	12.2
2	t-Butyl norepinephrine (bucopamine)	103	7.7	98.1	3.9	5.7
3	Cimaterol	109.3	3.9	103.6	2.3	6.5
4	Cimbuterol	113.6	4.4	103.4	1.8	15.6
5	Clenbuterol	100.5	3.8	93	2.9	6.8
6	Clencyclohexerol	106	1.4	94.8	4.5	8.2
7	Clenisopenterol	90.5	2.5	84.2	1.2	3.2
8	Clenpenterol	111.9	3	103.4	1.3	7.2
9	Clenproperol	106	3.3	96.7	1.3	4.1
10	Fenoterol	88	8.8	77.7	4.6	10.9
11	Formoterol	87.2	6.5	82.3	4.6	15.4
12	Isoxsuprine	102.5	0.8	95.3	2.7	3.2
13	Mabuterol	105.6	3	94	3.7	3
14	Mapenterol	103.3	2.9	94.7	2.7	2.3
15	3-o-Methyl-colterol	104.2	1.3	95	1.8	2.9
16	Ractopamine	108.6	9	98.1	3.4	8.4
17	Salbutamol	123.4	0.6	116.8	4.1	16.9
18	Salmeterol	102.4	6.2	98	4.2	9.6
19	Terbutaline	107.9	4.7	102.7	3.3	5.5
20	Tulobuterol	84.3	7.7	78.7	3.4	8.5
21	Zilpaterol	104.8	7.9	98	5.3	8.7

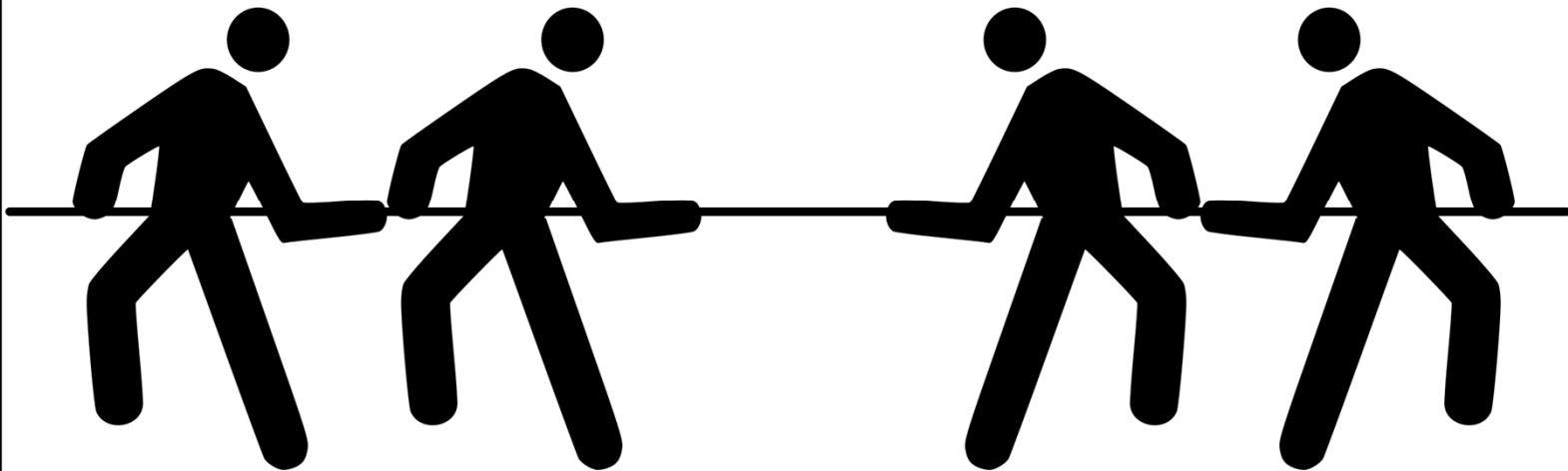
確效結果-豬腎

NO.	Compound	Intra-day precision (n=5)				Inter-day precision (n=10)
		5 ppb		10 ppb		1 ppb
		R %	CV %	R %	CV %	CV %
1	Brombuterol	93.9	1.4	85.9	1.6	9.7
2	t-Butylorsynephrine (buctopamine)	116.6	2.6	114.9	0.9	10.9
3	Cimaterol	107.6	4.6	102.9	1.9	5.5
4	Cimbuterol	100.4	3.6	98.2	3.6	4.3
5	Clenbuterol	101.9	4.7	99.2	3.9	5.6
6	Clencyclohexerol	101.6	4.1	94.4	1.5	4.4
7	Clenisopenterol	84.4	3.3	83.7	6.5	7.9
8	Clenpenterol	106.8	4.2	103.7	3.8	5.1
9	Clenproperol	100	2.9	94	2	3.2
10	Fenoterol	95.7	2.1	92.7	1.6	9.1
11	Formoterol	96.8	2.5	86	2.8	5.9
12	Isoxsuprine	98.3	2.4	92.3	0.9	5.5
13	Mabuterol	95.7	3.1	88.4	3.2	5.1
14	Mapenterol	100.6	1.3	97.5	2.2	3
15	3-o-Methyl-colterol	99.8	1.4	93.4	1.5	2
16	Ractopamine	97.4	6.3	94.8	4.4	6.7
17	Salbutamol	103	3.3	101	2	4.9
18	Salmeterol	103.9	5.8	100.1	3.2	14.1
19	Terbutaline	108.1	4.1	104.1	5.5	4.5
20	Tulobuterol	98.8	3.5	95.5	5.8	7.4
21	Zilpaterol	99.7	5.2	95.7	3.5	8.3

結語

- 優化之乙型受體素檢驗方法滿足食品化學確效規範要求；可同步分析21品項，適用禽畜肉品及其內臟檢驗，方法定量極限於肌肉及內臟中分別為1ppb及5ppb。
- 優化修正之「食品中動物用藥殘留量檢驗方法 - 乙型受體素類多重殘留分析檢驗方法」已於今(107)年5月24日公告，預計明(108)年1月1日才生效，以利各實驗室有較充裕之準備期。
- 感謝各界實驗室給予的檢驗經驗回饋及協助，未來仍期待一齊努力精進檢驗技術及方法開發。

TUG OF WAR



參考文獻-1

- [1] Smith, D. J. 1998. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock. J. Anim. Sci. 76 (1): 173-194.
- [2] Polettini A. 1996. Bioanalysis of 2 β -agonists by hyphenated chromatographic and mass spectrometric techniques. J. Chromatogr. B687: 27-42.
- [3] Lynch, G. S. and Ryall, J. G. 2008. Role of β -adrenoceptor signaling in skeletal muscle: Implications for muscle wasting and disease. Physiol. Rev. 88: 729-767.
- [4] Martínez-Navarro J. F. 1990. Food poisoning related to consumption of illicit β -agonist in liver. Lancet 336 (8726): 1311.
- [5] European Union. 1996. Concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81 /602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC. Council Directive 96/22/EC.

參考文獻-2

- [6] European Commission. 2009. On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Commission Regulation (EU) No 37/2010.
- [7] Codex Alimentarius Commission. 2017. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL 2-2017.
- [8] Ministry of Health, Labour and Welfare. 2018. Maximum residue limits (MRLs) List of agricultural chemicals in foods. <http://db.ffcr.or.jp/front/>