食品中動物用藥殘留量檢驗方法—乙型受體素類 多重殘留分析修正草案總說明

為加強食品中動物用藥殘留量之管理,並依據食品衛生管理法第三十八條規定:「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗,其檢驗方法,由中央主管機關定之」,爰擬具「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」草案,其修正要點如下:

- 一、「裝置」:修正層析管,及增列高速組織研磨振盪均質機。
- 二、「試藥」:修正水解酵素濃度。
- 三、「器具及材料」:修正固相萃取匣,及增加陶瓷均質石。
- 四、增列部分試劑調製及修正移動相溶液調製方法。
- 五、修正「檢液萃取」及「淨化方法」。
- 六、「含量測定」改以基質匹配檢量線進行定量。

食品中動物用藥殘留量檢驗方法—乙型受體素類 多重殘留分析修正草案對照表

<u> </u>					
修正規定	現行規定	說明			
1. 適用範圍:本檢驗方法適用於畜禽	1. 適用範圍:本檢驗方法適用於畜禽	一、「裝置」:修			
產品中乙型受體素 clenbuterol、	產品中乙型受體素 clenbuterol、	正層析管,及			
salbutamol · terbutaline · ractopamine ·	salbutamol \ terbutaline \ \ ractopamine \ \	增列高速組			
zilpaterol、cimaterol 及 tulobuterol 之檢	zilpaterol、cimaterol 及 tulobuterol 之檢	織研磨振盪			
驗。	驗。	均質機。			
2. 檢驗方法:檢體經萃取及淨化後,	2. 檢驗方法:檢體經萃取及淨化處理	二、「試藥」:修			
以液相層析串聯質譜儀(liquid	後,以液相層析串聯質譜儀(liquid	正水解酵素			
chromatograph/tandem mass	chromatograph/tandem mass	濃度。			
spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。	spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。	三、「器具及材			
2.1. 裝置:	2.1. 裝置:	料」:修正固			
2.1.1. 液相層析串聯質譜儀:	2.1.1. 液相層析串聯質譜儀:	相萃取匣,及			
2.1.1.1. 離子源:電灑離子化正離子	2.1.1.1. 離子源: 電灑離子化正離子	增加陶瓷均			
(positive ion electrospray ionization, ESI	(positive ion electrospray ionization,	質石。			
+) •	ESI ⁺) °	四、增列部分試			
2.1.1.2. 層析管: <u>ZORBOX RRHD</u>	2.1.1.2. 層析管: <u>Polaris Si-A</u> , <u>3</u> μm,	劑調製及修			
Eclipse Plus C18, 1.8 μm, 內徑 3.0 mm	內徑 <u>2.0</u> mm × <u>5</u> cm,或同級品。	正移動相溶			
× <u>10</u> cm, 或同級品。	2.1.2. 均質機(Homogenizer)。	液調製方法。			
2.1.2. 均質機(Homogenizer)。	2.1. <u>3</u> . 水浴(Water bath): 能維持水溫溫	五、修正「檢液			
2.1.3 高速組織研磨振盪均質機(SPEX	差在±1°C以內者。	萃取」及「淨			
SamplePrep 2010 GenoGrinder®): 1000	2.1. <u>4</u> . 離心機(Centrifuge):轉速可達	化方法」。			
rpm 以上,或同級品。	4000 rpm 以上者。	六、「含量測定」			
2.1. <u>4</u> . 水浴:能維持水溫溫差在±1°C	2.1. <u>5</u> . 振盪器(Shaker)。	改以基質匹			
以內者。	2.1. <u>6</u> . <u>pH</u> 測定儀(pH meter)。	配檢量線進			
2.1. <u>5</u> . 離心機(Centrifuge):轉速可達	2.1. <u>7</u> . 固相真空萃取裝置(Solid phase	行定量。			
3500×g以上者。	extraction vacuum manifolds) •	七、增修訂部分			
2.1. <u>6</u> . 振盪器(Shaker)。	2.1. <u>8</u> . 旋渦混合器(Vortex mixer)。	文字。			
2.1. <u>7</u> . <u>酸鹼度</u> 測定儀(pH meter)。	2.2. 試藥:甲醇、乙腈及異丙醇均採				
2.1. <u>8</u> . 固相真空萃取裝置(Solid phase	用液相層析級;醋酸鈉、醋酸銨、氫				
extraction vacuum manifolds) •	氧化鈉及醋酸均採用試藥特級;去離				
2.1.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。	子水(電阻係數可達 18 MΩ·cm 以				
2.2. 試藥:甲醇採用液相層析級;醋	上);β-葡萄糖醛酸苷酶溶液(含				
酸鈉、醋酸銨、醋酸、鹽酸及氨水(25%)	β-glucuronidase <u>98000</u> unit/mL 及				
均採用試藥特級;β-葡萄糖醛酸苷酶溶	sulfatase 2400 unit/mL); clenbuterol				
液(含β-glucuronidase <u>85000</u> unit/mL 及	hydrochloride \ salbutamol \ terbutaline				

sulfatase <u>7500</u> unit/mL); 去離子水(比電 hemisulfate、ractopamine

阻於 25°C 可達 18 MQ·cm 以上); cimaterol、clenbuterol hydrochloride、ractopamine hydrochloride、salbutamol、terbutaline hemisulfate、tulobuterol 及 zilpaterol 對照用標準品; cimaterol-d7、clenbuterol-d9、ractopamine-d6、salbutamol-d9、terbutaline-d9 及 zilpaterol-d7 同位素內部標準品。

2.3. 器具及材料:

2.3.1. 離心管:50 mL, PP 材質。

2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase

extraction cartridge) : Bond Elute Plex

PCX, 200 mg, 6 mL, 或同級品。

2.3.3. 陶瓷均質石(Ceramic

homogenizer): Bond Elut QuEChERS

P/N 5982-9313,或同級品。

2.3.<u>4</u>. 濾膜:孔徑 0.22 μm, Nylon 材質。

2.4. 試劑之調製:

2.4.1. 0.2M 醋酸鈉緩衝溶液:

稱取醋酸鈉 16.4 g·加去離子水 900 mL 溶解,以醋酸調整 pH 值至 5.2 ± 0.1, 再加去離子水使成 1000 mL。

2.4.2. 1N 氫氧化鈉溶液:

稱取氫氧化鈉 40 g,以去離子水溶解 使成 1000 mL。

2.4.3.5 mM 醋酸銨溶液:

稱取醋酸銨 0.385 g,以去離子水溶解 使成 1000 mL,以濾膜過濾。

2.4.4.5 mM 醋酸銨:甲醇(9:1, v/v)溶液:

取 5 mM 醋酸銨溶液與甲醇以 9:1 (v/v)之比例混勻。

2.4.5. 0.2M 鹽酸溶液:

取鹽酸 $16.7 \, \text{mL}$, 以去離子水定容至 $1000 \, \text{mL}$ 。

2.4.6. 甲醇:氨水(95:5, v/v)溶液:

hydrochloride、zilpaterol、cimaterol 及tulobuterol 對照用標準品;clenbuterol-d9 <u>hydrochloride</u>、salbutamol-d<u>6</u>、terbutaline-d9、ractopamine-d6 <u>hydrochloride</u>、zilpaterol-d7 及 cimaterol-d<u>9</u> 同位素內部標準品。

2.3. 器具及材料:

2.3.1. 離心管:50 mL, PP 材質。

2.3.2. 固相萃取匣(Solid phase

extraction cartridge): Oasis HLB, 200

mg,6mL,或同級品。

2.3.<u>3</u>. 濾膜:孔徑 0.22 μm, Nylon 材質。

2.4. 試劑之調製:

2.4.1. 0.2M 醋酸鈉緩衝溶液:

稱取醋酸鈉 $16.4 \, \text{g} \, \underline{\text{ xr}}$ 去離子水 900 mL,以醋酸調整 pH 為 5.2 ± 0.1 ,再加去離子水使成 $1000 \, \text{mL}$ 。

2.4.2. 7mM 醋酸銨溶液:

稱取醋酸銨 0.54 g,以去離子水溶解使成 1000 mL。

2.4.3. 1N 氫氧化鈉溶液:

稱取氫氧化鈉 40 g,以去離子水溶解 使成 1000 mL。

取甲醇與氨水以 95:5 (v/v)之比例混 勻。

2.5. 移動相溶液之調製:

2.5.1. 移動相溶液 A:

取去離子水與甲酸以 99.9:0.1 (v/v)之 比例混勻,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:

取乙腈與甲酸以 99.9:0.1 (v/v)之比例 混勻,以濾膜過濾,取濾液供作移動 相溶液 B。

2.6. 標準溶液之配製:

2.6.1. 內部標準溶液:

取 相 當 於 含 cimaterol-d₉ 、 clenbuterol-d₉ 、 ractopamine-d₆ 、 salbutamol-d₉ 、 terbutaline-d₉ 與 zilpaterol-d₇ 各約 $\underline{1}$ mg,精確稱定,分別以甲醇溶解並定容至 $\underline{10}$ mL,作為內部標準原液。臨用時,分別取適量內部標準原液混合後,以<u>甲醇</u>稀釋至 $\underline{1000}$ ng/mL,供作內部標準溶液

2.6.2. 標準溶液:

取相當於含 clenbuterol、salbutamol、terbutaline、ractopamine、zilpaterol、cimaterol及tulobuterol之對照用標準品各約5 mg,精稱確定,分別以甲醇溶解並定容至50 mL,作為標準原液。臨用時,分別取適量標準原液混合後,以甲醇稀釋至1000 ng/mL,作為混合標準原液。臨用時,取適量混合標準原液及內部標準溶液,以5 mM 醋酸銨:甲醇(9:1, v/v)溶液稀釋至1.0~50 ng/mL(含內部標準品10 ng/mL),供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製:

2.5. 移動相溶液之調製:

乙腈與 7mM 醋酸銨溶液以 85:15 (v/v) 之比例混勻,以濾膜過濾,取濾液供 作移動相溶液。

2.6. 標準溶液之配製:

2.6.1.內部標準溶液:

取相當於含 clenbuterol-dg、 salbutamol-d₆、 terbutaline-dg、 ractopamine-d₆、 zilpaterol-d₇ 及 cimaterol-dg 各約 5 mg 之同位素內部標準品,精確稱定,分別以甲醇溶解並定容至 50 mL,作為內部標準原液。使用時,分別取適量內部標準原液混合後,以乙腈:7 mM 醋酸銨(8:2, v/v)溶液稀釋至 100 ng/mL,作為內部標準溶液。

2.6.2. 標準溶液:

2.7. 檢液之調製:

2.7.1. 萃取:

將檢體細切均質後,取約 2 g,精確稱定,置於離心管中,加入內部標準溶液 20 μL 及 0.2M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL,以均質機攪拌均質 2 分鐘,或加入陶瓷均質石 1 顆,以高速組織研磨振盪器均質機於 1000 rpm 振盪萃取 10 分鐘,加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液 100 μL,於 37°C 水浴中水解 1 小時。加入鹽酸 2 mL,以高速組織研磨振盪均質機於 1000 rpm 振盪 10 分鐘,於 4°C 以 7000×g 離心 10 分鐘,取上清液供淨化用

2.7.2. 浄化:

取 2.7.1. 節供淨化用溶液,注入預先以 甲醇 6 mL 及去離子水 6 mL 潤洗之固 相萃取匣,棄流出液,依次以 0.2M 鹽 酸溶液 12 mL、去離子水 12 mL 及甲 醇 12 mL 清洗固相萃取匣,棄流出液。 以甲醇: 氨水(95:5, v/v)溶液 12 mL 沖 提,收集沖提液,於65℃以氮氯吹乾, 殘留物加入 5 mM 醋酸銨:甲醇(9:1, v/v)溶液 1 mL, 旋渦混合溶解,以 9000 ×g離心5分鐘,取上清液作為檢液原 液。取檢液原液 500 µL 與 5 mM 醋酸 銨:甲醇(9:1, v/v)溶液 500 μL 混合均 匀,以濾膜過濾,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,惟不需加入內部標準溶液。分別 量取 500 μL (a), 加入混合標準原液 1.0 ~50 µL 及內部標準溶液 10 µL,再以 5 mM 醋酸銨:甲醇(9:1, v/v)溶液定容

<u>至 1000 μL (b),混合均匀,供作基質</u>

匹配檢量線溶液,依下列條件進行液相層析串聯質譜分析,就各乙型受體

2.7.1. 萃取:

將檢體細切,以均質機均質後,取檢體約 5 g,精確稱定,置於均質機中,加入 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL,攪拌均質 2 分鐘後,移入離心管中,加入內部標準溶液及β-葡萄糖醛酸苷酶溶液各 100 μL,混合均匀,置於 37°C水浴中水解 1 小時。於 4000 rpm 離心 10 分鐘,收集上清液,離心管中之沈澱物再加入 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL,振盪萃取 10 分鐘,於 4000 rpm 離心 10 分鐘。合併上清液,以 1 N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值為 7.0,再於4000 rpm 離心 10 分鐘,取上清液供淨化用。

2.7.2. 浄化:

取 2.7.1 節供淨化用之溶液,注入預先以甲醇 3 mL 及去離子水 3 mL 潤洗之固相萃取匣,以去離子水 4 mL 清洗固相萃取匣,棄流出液。以甲醇 4 mL 沖提,收集沖提液,於 65°C 以氮氣吹乾,殘留物加 乙腈:7 mM 醋酸銨(8:2, v/v)溶液 1 mL,以旋渦混合器振盪溶解,經濾膜過濾後,供作檢液。

2.8. 標準曲線之製作:

精確量取標準溶液各 10 μL,分別注入 液相層析串聯質譜儀中,依下列條件 進行液相層析串聯質譜分析,就各乙 型受體素與內部標準品波峰面積比, 與對應之各乙型受體素濃度,分別製 作標準曲線。 素與內部標準品波峰面積比,與對應 之各乙型受體素濃度,分別製作 1.0~ 50 ng/mL 之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件(註):

移動相溶液: <u>A 液與 B 液以下列條件</u> 進行梯度分析

時間(min)	<u>A (%)</u>	<u>B (%)</u>
<u>0.0→1.0</u>	<u>98→98</u>	<u>2→2</u>
<u>1.0→5.0</u>	<u>98→90</u>	<u>2→10</u>
<u>5.0→8.0</u>	<u>90→80</u>	<u>10→20</u>
$8.0 \rightarrow 10.0$	<u>80→70</u>	<u>20→30</u>
<u>10.0→12.0</u>	<u>70→60</u>	<u>30→40</u>
<u>12.0→15.0</u>	<u>60→10</u>	<u>40→90</u>
<u>15.0→16.0</u>	<u>10→10</u>	<u>90→90</u>
<u>16.0→19.0</u>	<u>10→10</u>	<u>90→90</u>

移動相流速: 0.3 mL/min。

注入量:10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage): 3.4 kV。 離子源溫度(Ion source temperature): 120°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation

temperature) : $\underline{400}$ °C \circ

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate): 50 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate): 850 L/hr。

偵測模式:多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。<u>偵測</u>離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如附表。

液相層析串聯質譜測定條件(註1):

層析管:每次分析前依序以異丙醇及 85%乙腈溶液分別流洗 1 小時(0.2 mL/min),分析後以70%乙腈溶液流洗 1 小時(0.2 mL/min)。

移動相溶液:依2.5節調製之溶液。

注入量:10 μL。

移動相流速: 0.2 mL/min。

毛細管電壓(Capillary voltage): 3.4 kV。 離子源溫度(Ion source temperature): 120°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation

temperature): 450°C °

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate): 50 L/hr。

溶煤揮散流速(Desolvation flow rate): 600 L/hr。

偵測模式:多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。離子對、 進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量 (collision energy)如下表:

	離子對	進樣 錐電 壓	碰撞 能量
分析物	前驅離子 (m/z) > 產物離子 (m/z)	(V)	(eV)
clenbuterol	277 > 203 277 > 259	20 20	20 10
terbutaline	226 > 152 226 > 125	<u>20</u> <u>20</u>	20 25
salbutamol	240 > 222 $240 > 148$	20 20	15 15
ractopamine	$302 > \underline{164}$ $302 > \underline{107}$	20 20	25 20
zilpaterol	262 > 244 $262 > 185$	<u>20</u> <u>20</u>	<u>20</u> <u>25</u>
cimaterol	220 > 202 $220 > 160$	15 15	15 10
tulobuterol	228 > 154	20	20

註:上述測定條件分析不適時,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<u>基質匹配檢量線</u>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(並)鑑別之,並依下列計算式求出檢體中各乙型受體素之含量(ppb):

檢體中各乙型受體素之含量(ppb) = C×V×F

M

C:由<u>基質匹配檢量</u>線求得檢液中各乙型受體素之濃度(ng/mL)

V:檢體最後定容之體積(mL)

	228 > 118	20	20	
clenbuterol-d ₉	286 > 204	20	20	
terbutaline-d ₉	235 > <u>152</u>	<u>20</u>	<u>25</u>	
salbutamol-d ₆	246 > 148	20	15	
ractopamine-d ₆	308 > 168	20	15	
zilpaterol-d ₅	269 > <u>185</u>	20	<u>33</u>	
cimaterol-d ₅	227 > 209	14	12	

定量離子對:clenbuterol 為 m/z 277 > 203,terbutaline 為 m/z 226 > 152,salbutamol 為 m/z 240 > $\underline{222}$,ractopamine 為 m/z 302 > $\underline{164}$,zilpaterol 為 m/z 262 > 244,cimaterol 為 m/z 220 > 202,tulobuterol 為 m/z 228 > 154。

內部標準品^(±2): clenbuterol 及 tulobuterol 採用 clenbuterol-d₉; terbutaline 採用 terbutaline-d₉; salbutamol 採用 salbutamol-d₆; ractopamine 採用 ractopamine-d₆; zilpaterol 採用 zilpaterol-d₅; cimaterol 採用 cimaterol-d₅。

註 1:上述測定條件分析不適時,依所使用之儀器,設定適合之測定條件。 註 2:本方法中之內部標準品可使用不同數目氘標幟之同位素內標,並應修 正 MRM 參數。

2.9. 鑑別試驗及含量測定:

精確量取檢液及標準溶液各 10 μL,分別注入液相層析串聯質譜儀中,依 2.8 節液相層析串聯質譜條件進行分析,就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度止(t a 2)鑑別之,並依下列計算式求出檢體中各乙型受體素之含量(ppb):

檢體中各乙型受體素之含量(ppb)= C×V

M

C:由標準曲線求得檢液中各乙型受體素之濃度(ng/mL)

V:檢體最後定容之體積(mL)

M:取樣分析檢體之重量(g) M:取樣分析檢體之重量(g) 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 註 3:相對離子強度由兩組離子對之波 峰面積相除而得(≤100%),容許範圍如 離子對之波峰面積相除而得(≤100%), 容許範圍如下: 下: 相對離子強度(%) 容許範圍(%) 相對離子強度(%) 容許範圍(%) > 50 ± 20 > 50 ± 20 $> 20 \sim 50$ ± 25 $> 20 \sim 50$ ± 25 > 10 ~ 20 ± 30 > 10 ~ 20 ± 30 ≤ 10 ± 50 ≤ 10 ± 50 附註:食品中有影響檢驗結果之物質 附註:食品中有影響檢驗結果之物質 時,應自行探討。 時,應自行探討。

附表、Cimaterol 等 7 項乙型受體素類動物用藥之多重反應偵測模式參數

<u>11742</u> Cilliate	101 于 / 项 10至	入阻水入	R 30 10 11 1	ホーツェ人心	以小大人	<u>少 女人</u>	
定量離子對		定性離子對					
分析物	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電 壓 (V)	碰撞能量 (eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電 壓 (V)	碰撞能量 (eV)	內部標準品 ^(註)
cimaterol	220 > 202	15	<u>10</u>	220 > 160	15	<u>15</u>	cimaterol-d ₂
clenbuterol	277 > 203	20	20	277 > 259	20	10	clenbuterol-d ₉
ractopamine	302 > <u>107</u>	20	<u>20</u>	302 > <u>284</u>	20	<u>15</u>	ractopamine-d ₆
salbutamol	240 > <u>148</u>	20	15	240 > <u>222</u>	20	15	salbutamol-d ₉
terbutaline	226 > 152	<u>27</u>	<u>16</u>	226 > 125	<u>27</u>	25	terbutaline-d ₉
tulobuterol	228 > 154	20	20	228 > 118	20	20	clenbuterol-d ₉
zilpaterol	262 > 244	<u>26</u>	<u>13</u>	262 > 185	<u>26</u>	<u>23</u>	zilpaterol-d ₇
cimaterol-d ₇ (I.S.)	227 > 209	14	12	ı		-	ı
clenbuterol-d ₉ (I.S.)	286 > 204	20	20	1		1	1
ractopamine-d ₆ (I.S.)	308 > 168	20	15	ı		-	I
salbutamol-d ₉ (I.S.)	<u>249</u> > <u>149</u>	20	15	_		_	_
terbutaline-d ₉ (I.S.)	235 > <u>153</u>	<u>26</u>	<u>16</u>	_	_	_	_
zilpaterol-d ₇ (I.S.)	269 > <u>251</u>	20	<u>17</u>	_	_	_	

註:本方法中之內部標準品可使用不同數目氘標幟之同位素內標,並應修正 MRM 參數。