

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。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Polaris Si-A, 3 μm ，內徑 2.0 mm \times 5 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 水浴(Water bath)：能維持水溫溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：轉速可達 4000 rpm 以上者。
 - 2.1.5. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.6. pH 測定儀(pH meter)。
 - 2.1.7. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.8. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：甲醇、乙腈及異丙醇均採用液相層析級；醋酸鈉、醋酸銨、氫氧化鈉及醋酸均採用試藥特級；去離子水(電阻係數可達 18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)； β -葡萄糖醛酸苷酶溶液(含 β -glucuronidase 98000 unit/mL 及 sulfatase 2400 unit/mL)；clenbuterol hydrochloride、salbutamol、terbutaline hemisulfate、ractopamine hydrochloride、zilpaterol、cimaterol及tulobuterol對照用標準品；clenbuterol-d₉ hydrochloride、salbutamol-d₆、terbutaline-d₉、ractopamine-d₆ hydrochloride、zilpaterol-d₇及cimaterol-d₉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, 6 mL，或同級品。

2.3.3. 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 溶於去離子水 900 mL，以醋酸調整 pH 為 5.2 \pm 0.1，再加去離子水使成 1000 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。

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-d₉、salbutamol-d₆、terbutaline-d₉、ractopamine-d₆、zilpaterol-d₇及cimaterol-d₉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：

取相當於含 clenbuterol、salbutamol、terbutaline、ractopamine、zilpaterol、cimaterol 及 tulobuterol 各約 5 mg 之對照用標準品，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至 50 mL，作為標準原液。使用時，分別取適量標準原液混合後，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，以乙腈：7 mM 醋酸銨(8:2, v/v)溶液稀釋至 1.5~50 ng/mL (含內部標準品濃度 10 ng/mL)，作為標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

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 μ L，混合均勻，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. 淨化：

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 μ L，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。

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 μ L。

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。

溶媒揮散流速(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：

分析物	離子對	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
clenbuterol	277 > 203	20	20
	277 > 259	20	10
terbutaline	226 > 152	20	20
	226 > 125	20	25
salbutamol	240 > 222	20	15
	240 > 148	20	15
ractopamine	302 > 164	20	25
	302 > 107	20	20
zilpaterol	262 > 244	20	20
	262 > 185	20	25
cimaterol	220 > 202	15	15
	220 > 160	15	10
tulobuterol	228 > 154	20	20
	228 > 118	20	20
clenbuterol-d ₉	286 > 204	20	20
terbutaline-d ₉	235 > 152	20	25
salbutamol-d ₆	246 > 148	20	15
ractopamine-d ₆	308 > 168	20	15
zilpaterol-d ₅	269 > 185	20	33
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 > 222，ractopamine 為 m/z 302 > 164，zilpaterol 為 m/z 262 > 244，cimaterol 為 m/z 220 > 202，tulobuterol 為 m/z 228 > 154。

內部標準品^(註 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氬標幟之同位素內標，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比^(註 3)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)：

$$\text{檢體中各乙型受體素之含量(ppb)} = \frac{C \times V}{M}$$

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)

註 3：相對離子強度由兩組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

附註：食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。