

禽畜產品中乙型受體素多重殘留檢驗方法之精進

林俞廷 丁悅 沈盈如 黃志能 彭冠智 廖家鼎 高雅敏 王德原 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

禽畜產品中乙型受體素殘留為民眾關心之重要議題，本研究針對肌肉(雞肉及豬肉)與內臟(豬肝及豬腎)中21種乙型受體素開發快速且準確的檢驗方法。樣品先以0.2 M醋酸鈉萃取，並加入 β -葡萄糖醛酸苷酶水解，經固相萃取匣(solid phase extraction, SPE)萃取及淨化後，以超高效液相層析串聯質譜儀搭配正離子電灑法(UPLC-ESI⁺-MS/MS)進行分析，並以18項同位素內標進行校正。使用C18管柱進行梯度層析，以含0.1%甲酸的水和甲醇作為動相。結果顯示，肌肉及內臟定量極限分別為1 ppb及5 ppb，回收率分別介於71.9 - 120.6% (變異係數2.2 - 18.5%)及77.7 - 116.8% (變異係數0.6 - 9.0%)。本方法僅用少量樣品即可於一次分析中檢驗21種乙型受體素，且在肌肉和內臟基質中皆有良好確效結果，為一適用範圍廣、快速且有效率的乙型受體素檢驗方法，將來可應用於邊境及後市場之檢驗，保護國人食用動物性食品之安全。

關鍵詞：乙型受體素、禽畜產品、液相層析串聯質譜儀

前 言

乙型受體素(β -agonists)，俗稱瘦肉精，為人工合成的苯乙醇胺類(phenylethanolamine)藥物，一般用於治療支氣管哮喘、痙攣及當作安胎藥物。這類藥物被非法添加於畜類飼料中，以增加蛋白質的合成、提高生長速率、減少脂肪堆積及飼料消耗，但對人類有其他負面之功效，如，食物中毒、心血管疾病與中樞神經系統疾病等⁽¹⁾，因此許多國家針對這類藥物的使用均有所限制。

歐盟在1996年執委會(European Community)指令中明確規範乙型受體素類藥物只能用於牛隻安胎過程，畜牧業不得使用這類藥物⁽²⁾。聯合國及美國皆針對ractopamine

設有牛、豬及火雞檢體中的殘留容許量(表一)，由於飲食習慣及文化背景差異，各國對於禽畜動物組織中殘留容許量不盡相同。目前已超過120個國家禁止乙型受體素施用於動物飼料中⁽³⁾，然而在畜牧業的非法使用狀況仍然不時會發生。在民國99年至100年間，台灣本土養豬業爆發大規模違法使用瘦肉精事件，肉品遭驗出萊克多巴胺(ractopamine)、齊帕特羅(zilpaterol)及沙丁胺醇(salbutamol)等乙型受體素殘留，並於101年查獲含有科爾特羅(colterol，俗稱八號仔)的豬隻飼料⁽⁴⁾，106年2月農委會亦於豬毛中檢出科爾特羅前驅物(*t*-butylnorsynephrine)殘留。

近來文獻對於乙型受體素的檢驗方法有酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent

表一、國際食品法典委員會及美國針對ractopamine規定之殘留容許量標準

Species	MRLs of ractopamine set by Codex Alimentarius Commission ($\mu\text{g/kg}$)				MRLs of ractopamine in USA (ppm)			
	Muscle	Fat	Liver	Kidney	Muscle	Fat	Liver	Kidney
Cattle	10	10	40	90	0.03	- ^a	0.09	- ^a
Swine	10	10	40	90	0.05	- ^a	0.15	- ^a
Turkeys	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	0.10	- ^a	0.45	- ^a

^a 無訂定MRL

assay, ELISA)⁽⁵⁾、高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)⁽⁶⁾、氣相層析質譜法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)⁽⁷⁾及液相層析串聯質譜法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)⁽³⁾。由於乙型受體素類藥物之結構類似，且動物組織之基質複雜，使酵素免疫法於多重殘留分析有定性及定量上的困難，以HPLC分析易有偽陽性的發生，若以GC-MS分析需先進行衍生化反應，增加了分析過程的繁雜性與不確定性。因此近來多以LC-MS/MS配合多重反應偵測模式(multiple reaction monitoring, MRM)進行乙型受體素的分析，並使用基質匹配檢量線搭配同位素內標校正。此方法有效克服串聯質譜法之基質效應及方法流程上的變異，且具有良好靈敏度及選擇性。目前我國衛生福利部公告之乙型受體素檢驗方法⁽⁸⁾，即係採用LC-MS/MS進行cimaterol、clenbuterol、ractopamine、salbutamol、terbutaline、tulobuterol與zilpaterol等7項乙型受體素之同步分析，食藥署於101年公開之乙型受體素建議檢驗方法⁽⁹⁾亦採用LC-MS/MS進行分析，可檢驗20項乙型受體素，但此二種方法皆不包含科爾特羅等新興乙型受體素；又由於動物源性產品複雜，不同乙型受體素品項物化特性亦不盡相同，原建議檢驗方法所搭配之6項內標，無法滿足20品項乙型受體素於不同基質(例內臟)之檢測需求。為因應食品衛生安全需求且考量科爾特羅前驅物

潛在風險，本研究選擇雞肉、豬肉、豬肝及豬腎作為測試基質，將科爾特羅前驅物納入分析項目，並增加原建議檢驗方法外的12項同位素內標以提高方法準確度，建立一有效分析21項乙型受體素藥物之檢驗方法。

材料與方法

一、檢體來源

雞肉、豬肉、豬肝及豬腎檢體係於台北市超市及量販店購得，分別均質後，於-20°C冷凍貯存，解凍後可供分析使用；上述檢體預先進行乙型受體素殘留含量測試，確定無本研究測試品項之藥物殘留，作為檢驗方法建立及測試所需之空白檢體。

二、試劑與材料

Brombuterol hydrochloride (99%)、cimaterol (99.6%)、cimaterol-d₇ (99.3%)、cimbuterol (99.62%)、clenbuterol hydrochloride (95%)、clenbuterol-d₉ (99.9%)、clencyclohexerol hydrochloride (98%)、clenisopenterol hydrochloride (99.9%)、clenpenterol hydrochloride (99.8%)、clenproperol (98%)、fenoterol hydrobromide (98%)、formoterol fumarate dihydrate (99.8%)、isoxsuprine hydrochloride (99%)、mabuterol (98.5%)、mapenterol hydrochloride

(99%)、mapenterol-(dimethyl-d₆, propyl-d₅) hydrochloride (99.8%)、ractopamine hydrochloride (95%)、salbutamol hemisulfate (99.4%)、salmeterol xinafoate (98%)、terbutaline hemisulfate salt (99.8%)、tulobuterol hydrochloride (99%)及zilpaterol hydrochloride (96.4%) (Sigma-Aldrich, USA)。Brombuterol-d₉ hydrochlorid (99.58%)、cimbuterol-d₉ (98%)、clencyclohexerol-d₁₀ (95%)、clenproperol-d₇ (98%)、fenoterol-d₆ hydrobromide (95%)、formoterol-d₆ (96%)、mabuterol-d₉ (98%)、3-*o*-methyl-colterol (98%)、3-*o*-methyl-colterol-d₉ (98%)、ractopamine-d₆ hydrochloride (98%)、salbutamol-d₉ (98%)、salmeterol-d₃ (98%)、terbutaline-d₉ (98%)、tulobuterol-d₉ hydrochloride (98%)及zilpaterol-d₇ (95%) (Toronto Research Chemicals Inc., Canada)。*t*-Butylnorsynephrine (95%) (Molcan Corporation Inc., Canada)。Isoxsuprine-d₆ hydrochloride (98%) (CDN Isotopes Inc., Canada)。

甲醇(液相層析級)、鹽酸(37%)及氨水(25%) (Merck Ltd., Germany)。醋酸鈉及醋酸銨(試藥特級) (Nacalai Tesque Inc., Japan)。 β -葡萄糖醛酸苷酶溶液(β -glucuronidase, type H-2, from *Helix pomatia*) (含glucuronidase 85000 unit/mL) (Sigma-Aldrich, USA)。甲酸(90%) (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan)。

三、儀器與LC-MS/MS分析條件

本研究使用超高效液相層析儀(ultra performance LC, UPLC) (Acquity UPLC® I class, Waters, USA)，串聯質譜儀(Xevo®TQ-S micro, Waters, USA)，以電灑游離法正離子模式(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)進行分析，同時搭配TargetLynx分析與數據處理系統。層析管柱使用ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18管柱 (1.8 μ m, 3.0 × 100 mm)，管柱溫度40°C。動相A為0.1%甲酸水溶液，動相B為

0.1%甲酸之甲醇溶液，流速為0.3 mL/min，樣品注入量為10 μ L，流洗梯度如表二所示。

表二、梯度分析條件

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	98	02
1.0	98	02
5.0	90	10
8.0	80	20
10.0	70	30
11.0	60	40
12.0	60	40
15.0	10	90
19.0	10	90
19.1	98	02
23.0	98	02

質譜儀毛細管電壓(capillary voltage)為2.2 kV，離子源溫度(source temp.)和溶媒揮散溫度(desolvation temp.)分別為120°C和400°C。溶媒揮散氣體(desolvation gas)和進樣錐氣體(cone gas)皆為氮氣，流速分別為850 L/hr 和50 L/hr。數據資料以MRM模式進行搜集，進樣錐電壓(cone voltage)、碰撞能量(collision energy)及用於校正各標準品之對應內部標準品如表三所示。

四、試驗方法

(一)標準溶液之配製

1. 標準溶液

取各標準品約5 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以5 mM醋酸銨：甲醇(9:1, v/v)溶液稀釋至1000 ng/mL，供作標準溶液。

2. 內部標準溶液

取各內標約1 mg，精確稱定，分別以甲

表三、21項乙型受體素及其同位素內部標準品以液相層析串聯質譜儀分析之MRM參數、進樣錐電壓、碰撞能量及滯留時間

Compound	Molecular weight	Ion pair		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Retention time (min)	Internal standard
		Precursor ion(<i>m/z</i>) >	product ion(<i>m/z</i>)				
Brombuterol	366.10	367 > 293 ^a		25	18	13.20	Brombuterol-d ₉
		367 > 212			27		
		367 > 133			42		
<i>t</i> -Butylnorsynephrine (buctopamine)	209.28	210 > 136 ^a		08	13	8.25	Salbutamol-d ₆
		210 > 192			8		
Cimaterol	219.29	220 > 160 ^a		15	15	7.16	Cimaterol-d ₇
		220 > 202			10		
		220 > 143			20		
Cimbuterol	233.31	234 > 160 ^a		16	18	9.00	Cimbuterol-d ₉
		234 > 216			11		
Clenbuterol	277.19	277 > 132 ^a		20	30	12.47	Clenbuterol-d ₆
		277 > 203			20		
		277 > 259			10		
Clencyclohexerol	319.23	319 > 203 ^a		22	20	10.67	Clencyclohexerol-d ₁₀
		319 > 301			13		
		319 > 168			32		
Clenisopenterol	291.22	291 > 188 ^a		13	23	14.21	Mapenterol-d ₁₁
		291 > 273			12		
		291 > 217			18		
Clenpenterol	291.22	291 > 203 ^a		16	21	13.59	Brombuterol-d ₉
		291 > 132			35		
		291 > 168			39		
Clenproperol	263.17	263 > 245 ^a		15	12	11.46	Clenproperol-d ₇
		263 > 203			18		
		263 > 132			26		
Fenoterol	303.37	304 > 107 ^a		25	29	9.72	Fenoterol-d ₆
		304 > 135			16		
Formoterol	344.40	345 > 149 ^a		25	18	12.67	Formoterol-d ₆
		345 > 121			35		
Isoxsuprine	301.38	302 > 284 ^a		19	14	13.49	Isoxsuprine-d ₆
		302 > 107			28		
		302 > 150			22		
Mabuterol	310.75	311 > 237 ^a		18	20	13.39	Mabuterol-d ₉
		311 > 217			30		
		311 > 202			35		
Mapenterol	324.75	325 > 237 ^a		24	17	14.26	Mapenterol-d ₁₁
		325 > 217			27		
		325 > 202			33		
3-o-Methyl-colterol	239.31	240 > 166 ^a		18	16	9.11	3-o-Methyl-colterol-d ₉
		240 > 134			28		
		240 > 121			28		

表三、21項乙型受體素及其同位素內部標準品以液相層析串聯質譜儀分析之MRM參數、進樣錐電壓、碰撞能量及滯留時間(續)

Compound	Molecular weight	Ion pair		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Retention time (min)	Internal standard
		Precursor ion(m/z)	>product ion (m/z)				
Ractopamine	301.38	302 > 121 ^a		20	20	11.94	Ractopamine-d ₆
		302 > 107			20		
		302 > 284			15		
Salbutamol	239.36	240 > 148 ^a		20	15	7.93	Salbutamol-d ₉
		240 > 222			15		
		240 > 166			20		
Salmeterol	415.57	416 > 232 ^a		30	20	15.49	Salmeterol-d ₃
		416 > 91			24		
		416 > 398			14		
Terbutaline	225.29	226 > 152 ^a		27	16	7.67	Terbutaline-d ₉
		226 > 107			30		
		226 > 125			25		
Tulobuterol	227.73	228 > 154 ^a		20	20	13.12	Tulobuterol-d ₉
		228 > 118			20		
Zilpaterol	261.15	262 > 185 ^a		26	23	7.87	Zilpaterol-d ₇
		262 > 202			20		
		262 > 157			31		
Brombuterol-d ₉ ^b	375.16	376 > 294		15	17	13.15	-
Cimaterol-d ₇ ^b	226.33	227 > 161		14	19	7.09	-
Cimbuterol-d ₉ ^b	242.37	243 > 161		8	14	8.90	-
Clenbuterol-d ₉ ^b	286.24	286 > 204		20	20	12.43	-
Clencyclohexerol-d ₁₀ ^b	329.29	329 > 311		10	13	10.59	-
Clenproperol-d ₇ ^b	270.20	270 > 252		08	10	11.41	-
Fenoterol-d ₆ ^b	309.41	310 > 141		27	18	9.67	-
Formoterol-d ₆ ^b	350.45	351 > 155		20	18	12.63	-
Isoxsuprine-d ₆ ^b	307.42	308 > 290		12	13	13.44	-
Mabuterol-d ₉ ^b	319.80	320 > 238		15	16	13.33	-
Mapenterol-d ₁₁ ^b	335.83	336 > 238		10	16	14.23	-
3- <i>o</i> -Methyl-colterol-d ₉ ^b	248.37	249 > 167		19	15	9.02	-
Ractopamine-d ₆ ^b	307.42	308 > 168		20	15	11.91	-
Salbutamol-d ₉ ^b	248.37	249 > 149		20	15	7.84	-
Salmeterol-d ₃ ^b	418.59	419 > 235		25	20	15.47	-
Terbutaline-d ₉ ^b	234.34	235 > 153		26	16	7.58	-
Tulobuterol-d ₉ ^b	236.79	237 > 154		35	20	13.07	-
Zilpaterol-d ₇ ^b	268.37	269 > 185		20	33	7.80	-

^a MRM transitions used for quantitation

^b Internal standard

醇溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以甲醇稀釋至1000 ng/mL，供作內部標準溶液。

(二) 檢液之配製

將檢體切細均質後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液20 μ L及0.2 M醋酸鈉緩衝溶液15 mL，再加入陶瓷均質石1顆，以高速組織研磨振盪均質機於1000 rpm振盪萃取10分鐘，加入 β -葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μ L，於37°C水浴中水解1小時。加入鹽酸2 mL，振盪10分鐘，於4°C以10000 xg離心10分鐘，收集上清液再於4°C以5000 xg離心10分鐘，取上清液注入預先以甲醇6 mL及去離子水6 mL潤洗之固相萃取匣(Bond Elute Plex PCX, 200 mg, 6 mL, Agilent Technology, USA)，棄流出液，依次以0.2 N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°C以氮氣吹乾，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5000 xg離心5分鐘，取上清液作為檢液原液，以5 mM醋酸銨：甲醇(9:1, v/v)溶液稀釋1倍後以濾膜過濾，利用LC-MS/MS進行分析。

五、確效試驗(validation)

參照食藥署公布之「食品化學檢驗方法之確效規範」⁽¹⁰⁾及歐盟對於藥物殘留分析方法之準則(Commission Decision 2002/657/EC)⁽¹¹⁾進行確效試驗。分析物鑑別(identification)的方法係比較標準物質與未知物質之滯留時間及MRM相對離子強度，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。檢量線之線性(linearity)評估係分別加入適量5 mM醋酸銨：甲醇(9:1, v/v)溶液、1 μ g/mL標準溶液

0.5、1、2、5、10、25、50 μ L及1 μ g/mL內部標準溶液10 μ L於空白檢液中，使體積為1000 μ L，製作0.5 - 50 ng/mL之基質匹配檢量線(以乙型受體素各品項與對應之內部標準品之波峰面積比(Y軸)，與對應之添加濃度(X軸)作圖，使用加權線性回歸 $1/x$ 進行校正，以提高低濃度數值之準確性)，以相關係數(coefficient of correlation, r)大於0.99為判別基準。回收率(recovery)之測量係分別配製高、低濃度之標準溶液於空白檢體，以基質匹配檢量線求得檢液中乙型受體素之濃度，與原添加之濃度相除而得。方法的精密度(precision)分別以同日間精密度(intra-day precision)及異日間精密度(inter-day precision)加以評估，同日試驗中，分別配製高、低濃度之檢液進行5重複回收試驗；異日試驗則於不同日分別添加相同濃度之標準溶液進行5重複回收試驗，試驗結果以變異係數(coefficient of variation, CV)表示。基質效應(matrix effect)之評估係將標準曲線與基質匹配檢量線之斜率相減，再和基質匹配檢量線斜率相除而得，其結果之正負代表基質的增強或抑制效應。定量極限(limit of quantitation, LOQ)之決定係於空白檢體中加入適量之標準溶液進行分析，分析訊號之雜訊比(signal/noise ratio, S/N ratio)大於10，且回收率及重複性符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範要求，作為定量極限。

平均值、標準偏差及變異係數等數值以Microsoft Excel 2010軟體運算求得；線性迴歸及決定係數則由TargetLynx數據分析軟體進行運算得到。

結果與討論

一、質譜儀之最適分析條件

本研究之儀器質譜條件MRM參數係參考食藥署101年公告修正之乙型受體素建議檢驗

方法⁽¹⁰⁾，並針對干擾情況增加第三對離子對(表三)，以利有基質干擾時作為替換。

根據歐盟藥物殘留分析方法之準則(Commission Decision 2002/657/EC)⁽¹¹⁾關於鑑別點數(identification point, IP)的規定，本研究各藥劑均檢測一個前驅離子(1.0 IP)及二個產物離子($1.5 \times 2 = 3.0$ IP)，可得4個鑑別點數，符合食品法典委員會對於鑑別該等動物用藥殘留之規範。

以LC-MS/MS分析21項乙型受體素及其內部標準品之MRM層析圖譜如圖一所示，出峰時間最早之品項為cimaterol (7.16分鐘)，出峰時間最晚之品項為salmeterol (15.49分鐘)，此方法於23分鐘內能有效分析21項乙型受體素。其中isoxsuprine-d₆於層析圖譜上出現兩個滯留時間相近的波峰，係因該內部標準品為立體異構物混合物(mixture of stereoisomers)所致，clencyclohexerol-d₁₀也有相同情形，本研究以接近待測物滯留時間(isoxsuprine-d₆, 13.44 min; clencyclohexerol-d₁₀, 10.59 min)的波峰進行定量分析。

二、液相層析之最適分析條件

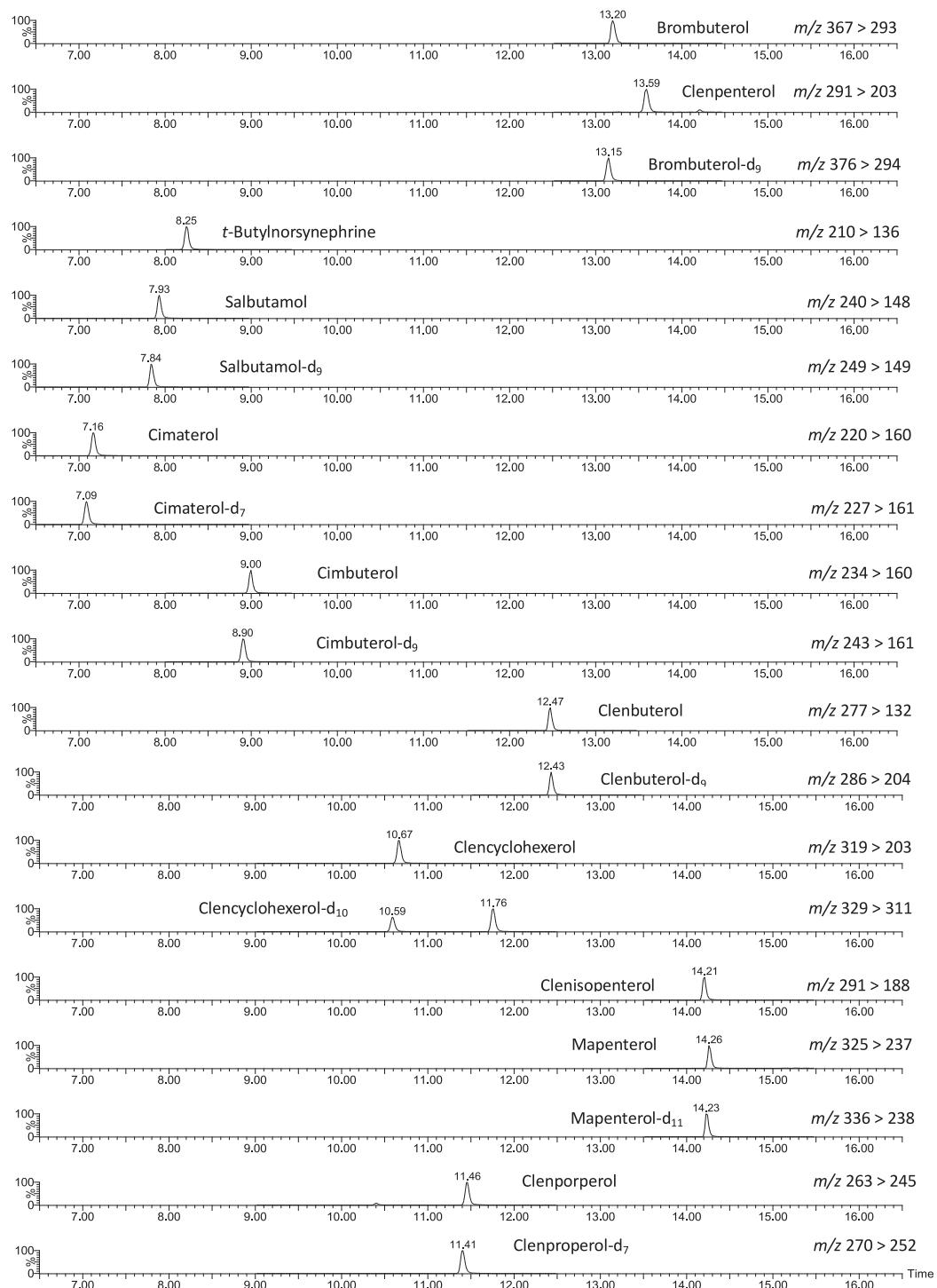
參考衛生福利部102年公告修正之乙型受體素檢驗方法⁽⁹⁾，動相為含0.1%甲酸之乙腈溶液，添加1 ng/mL之21項乙型受體素標準品於基質中進行方法測試，實驗結果顯示，於肌肉基質中21項乙型受體素之MRM訊號值皆良好，但於內臟基質中brombuterol之質譜訊號值很低，S/N ratio小於10，如表四所示。為考量定量之準確性，改成含0.1%甲酸之甲醇溶液進行測試，發現於內臟基質中感度較差品項，如brombuterol、clenpenterol、formoterol、isoxsuprine及ractopamine等可增強5倍以上之訊號值，S/N ratio皆可大於10，因此以含0.1%甲酸之甲醇溶液作為動相B進行後續實驗之評估。

三、前處理探討

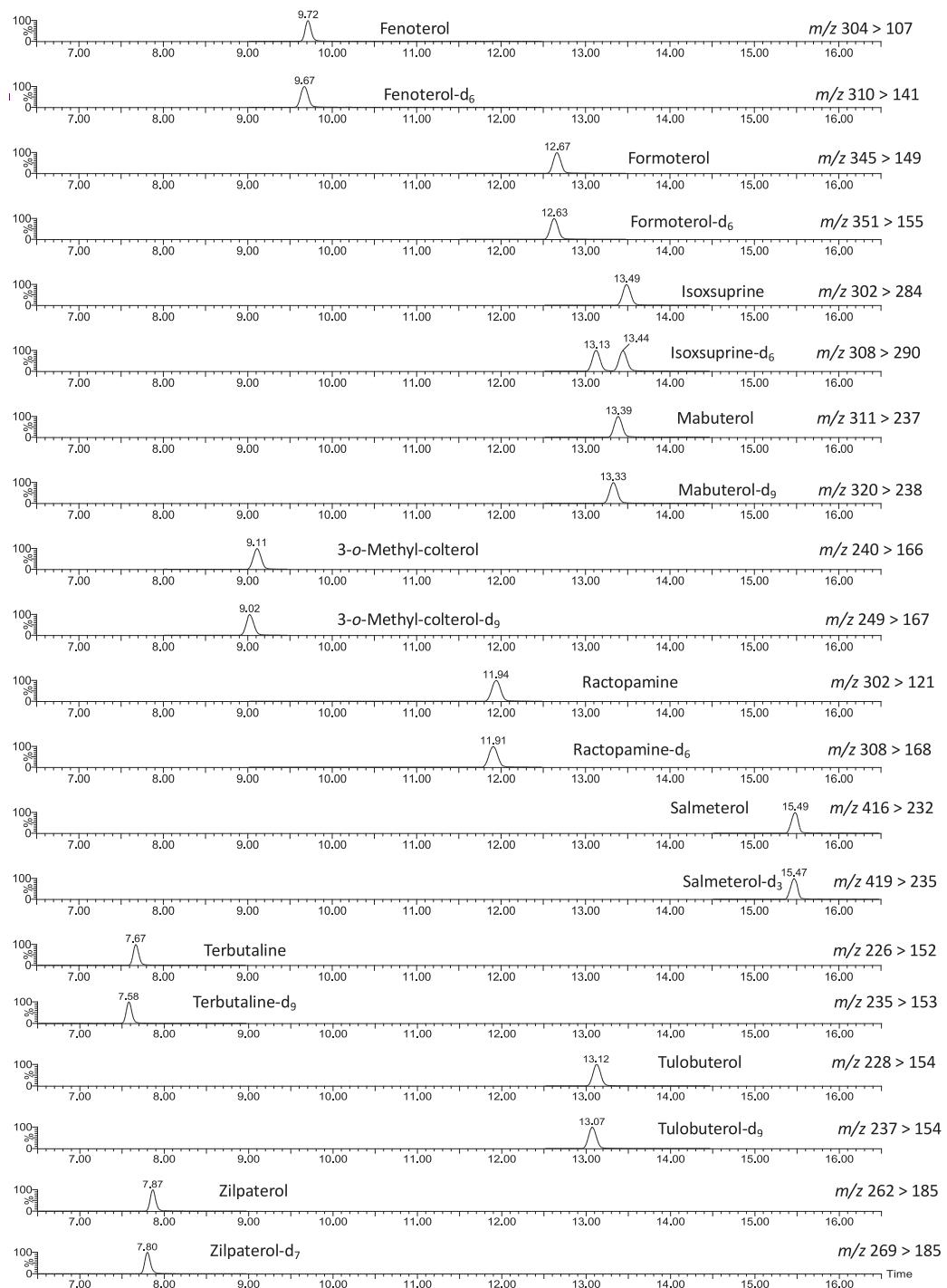
食藥署於101年公開之乙型受體素建議檢驗方法與衛生福利部102年公告修正之乙型受體素檢驗方法比較如表五。水解及萃取步驟同樣以0.2 M醋酸鈉緩衝溶液萃取及加入酵素水解1小時，而建議檢驗方法因檢體取樣較多，故執行二次萃取增加萃取率；調整pH值部分，建議檢驗方法以氫氧化鈉溶液調整pH至中性，再以HLB淨化管柱進行淨化，而公告檢驗方法則加入鹽酸進行震盪、離心，取上清液後續以Bond Elute Plex PCX離子交換固相萃取匣進行淨化，相較於建議檢驗方法，經過酸沉澱步驟及離子交換萃取匣淨化可增加淨化效果。實際測試兩種方法，亦證實公告檢驗方法之淨化效果良好，故選擇公告檢驗方法進行優化。在方法優化過程中，發現內臟基質於前處理時有碎屑懸浮，易造成後續淨化管柱阻塞，故調整離心步驟，先以10000 xg離心10分鐘，取上清液，再以5000 xg離心10分鐘，使獲得相對澄清之上清液，以利後續淨化。

四、測試內部標準品之校正效果

以優化之前處理方法測試豬肉及肝臟中21項乙型受體素搭配原公告方法的6項內標校正效果，於肌肉部分僅有fenoterol回收率不理想，但在肝臟部分有9項(brombuterol、cimbuterol、clencyclohexerol、clenisopenterol、fenoterol、formoterol、isoxsuprine、3-o-methyl-colterol及salmeterol)回收率不佳且變異係數高，因此本次研究增加了12支同位素內標，由於目前尚無法買到t-butylsynephrine、clenisopenterol及clenpenterol之同位素內標，因此選擇其相近出鋒時間的內標作校正，實驗結果顯示，添加21項乙型受體素標準品於肌肉及內臟基質中之確效結果良好，皆符合食品化學確效規範(表七)。



圖一、21項乙型受體素及其同位素內部標準品之多重反應偵測層析圖譜



圖一、21項乙型受體素及其同位素內部標準品之多重反應偵測層析圖譜(續)

表四、比較不同動相B對於豬腎空白基質添加21項乙型受體素於1 ng/mL下以液相層析串聯質譜儀分析之波峰面積及訊雜比

Compound	Mobile Phase B			
	0.1% FA in ACN		0.1% FA in MeOH	
	Peak area	S/N ratio	Peak area	S/N ratio
Brombuterol	167	3.1	1549	15.2
<i>t</i> -Butylnorsynephrine (buctopamine)	26621	152.2	33089	116.0
Cimaterol	23264	478.8	25534	134.7
Cimbuterol	17392	212.4	14906	156.6
Clenbuterol	2197	20.0	8170	22.1
Clencyclohexerol	7598	26.1	8639	39.9
Clenisopenterol	5418	148.8	5306	82.2
Clenpenterol	1504	47.2	7079	104.7
Clenproperol	12099	77.2	7962	45.3
Fenoterol	7358	75.2	9060	75.5
Formoterol	6512	101.1	36552	211.5
Isoxsuprine	1057	18.6	5907	40.8
Mabuterol	2203	36.5	11338	115.1
Mapenterol	11073	130.8	10606	85.7
3- <i>o</i> -Methyl-colterol	7725	63.8	8754	66.9
Ractopamine	3704	33.5	14525	39.4
Salbutamol	38035	630.2	42053	326.6
Salmeterol	6872	71.1	6704	61.0
Terbutaline	21119	250.3	24857	204.9
Tulobuterol	6654	58.8	29322	280.6
Zilpaterol	5988	143.9	7277	65.4

五、方法確效

(一) 檢量線之線性及基質效應

添加不同濃度之21項乙型受體素標準溶液於4種空白基質檢液所繪製得到之基質匹配檢量線，其 r 值皆可達0.99以上，符合確效規範；其基質效應整理於表六，同品項在各基質中有抑制亦有增強之基質效應，為增加檢驗結果之可信度及準確性，本研究以基質匹配檢量線搭配同位素內標校正。

(二) 回收率、精密度及定量極限

本研究針對雞肉、豬肉、豬肝及豬腎等4種基質分別設計低濃度及高濃度之同日及異日添加回收試驗，評估開發流程之回收率、精密度及定量極限，整理於表七。於肌肉檢體分別添加1及5 ppb的標準溶液：豬肉中21項乙型受體素的平均回收率及變異係數分別介於73.8 - 120.6%及2.3 - 18.5%，異日試驗之中間精密度皆小於15.9%；雞肉中21項乙型受體素的平均回收率及變異係數則分別介於71.9 - 115.6%及2.2 - 14.0%，異日試驗之中間精密度

表五、乙型受體素不同檢驗方法之分析流程比較表

分析方法	101年建議檢驗方法 ⁽¹⁰⁾	102年公告檢驗方法 ⁽⁹⁾	本研究使用之方法
取樣量	5 g	2 g	2 g
水解及萃取	1. 加入0.2 M醋酸鈉緩衝溶液15 mL，振盪5分鐘 2. 加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μL，37°C水浴水解1小時 3. 3500 xg離心取上清液，沉澱物再加醋酸鈉緩衝溶液15 mL，振盪10分鐘 4. 3500 xg離心，合併上清液	1. 加入0.2 M醋酸鈉緩衝溶液15 mL，振盪10分鐘 2. 加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μL，37°C水浴水解1小時	1. 加入0.2 M醋酸鈉緩衝溶液15 mL，振盪10分鐘 2. 加入β-葡萄糖醛酸苷酶溶液100 μL，37°C水浴水解1小時
調整pH值	以氫氧化鈉溶液調整pH值至7.0	加2 mL鹽酸，進行酸沉澱	加2 mL鹽酸，進行酸沉澱
離心	3500 xg離心取上清液	於4°C以7000 xg離心10分鐘取上清液	1. 於4°C以10000 xg離心10分鐘取上清液 2. 再以5000 xg離心10分鐘，取上清液
淨化管柱	Oasis HLB, 200 mg, 6 mL	Bond Elute Plex PCX, 200 mg, 6 mL	Bond Elute Plex PCX, 200 mg, 6 mL
層析管柱	Hypersil GOLD aQ, 1.9 μm (內徑2.1 × 100 mm)	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 1.8 μm (內徑3.0 × 100 mm)	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 1.8 μm (內徑3.0 × 100 mm)
層析動相	A: 5 mM醋酸銨溶液 B:甲醇	A: 含0.1%甲酸溶液 B: 含0.1%甲酸之乙腈溶液	A: 含0.1%甲酸溶液 B: 含0.1%甲酸甲醇溶液
分析品項	20項(6項內標)	7項(6項內標)	21項(18項內標)

皆小於18.8%。內臟檢體分別添加5及10 ppb的標準溶液：豬肝中21項乙型受體素的平均回收率及變異係數分別介於77.7 - 123.4%及0.6 - 9.0%，異日試驗之中間精密度皆小於16.9%；豬腎中21項乙型受體素的平均回收率及變異係數分別介於83.7 - 116.6%及0.9 - 6.5%，異日試驗之中間精密度小於14.1%。實驗結果之重複性及精密度皆符合食藥署食品化學確效規範，其中低濃度添加點即為本研究所建立檢驗方法之定量極限，於肌肉及內臟基質之定量極限分別為1及5 ppb。

結 論

本研究以酵素水解和固相萃取匣萃取及淨化，搭配超高效液相層析串聯質譜儀分析，成

功將乙型受體素可檢驗品項由現行公告方法之7項擴增至21項，並新增12項同位素內標進行校正。研究結果皆符合食藥署食品化學確效規範，且具有良好的回收率和精密度，經評估後亦適用於較複雜之內臟基質，於肌肉及內臟基質之LOQ分別為1及5 ppb。本研究之方法將公開於食藥署網站，可應用於例行性檢驗工作、供相關單位依循，加強邊境及後市場檢驗。

參考文獻

- Juan, C., Igualada, C., Moragues, F., León, N. and *et al.* 2010. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of β-agonists in animal feed and drinking water. Chromatogr. A. 1217: 6061 - 6068.

表六、21項乙型受體素於溶劑與四種基質中之相關係數與基質效應

Compound	Matrix effect (%)			
	Pork	Chicken	Liver	Kidney
Brombuterol	-13.6	55.8	34.6	-14.3
<i>t</i> -Butylnoradrenergine (buctopamine)	-57.1	-47.4	-66.3	-59.9
Cimaterol	0.6	-2.7	11.7	0.0
Cimbuterol	-25.9	12.8	-17.4	-24.9
Clenbuterol	-47.0	-40.5	-38.0	-43.1
Clencyclohexerol	17.2	55.5	43.2	20.8
Clenisopenterol	-78.3	-73.9	-85.6	-67.4
Clenpenterol	-70.1	-56.4	-72.8	-50.5
Clenproperol	-7.9	6.3	-13.5	-19.9
Fenoterol	15.0	20.2	20.9	19.5
Formoterol	-12.7	-8.6	-1.2	-8.1
Isoxsuprine	14.7	17.4	2.1	12.2
Mabuterol	15.4	37.1	20.1	15.5
Mapenterol	12.5	10.8	4.1	7.7
3- <i>o</i> -Methyl-colterol	3.5	4.7	16.2	15.4
Ractopamine	1.0	12.8	10.3	7.8
Salbutamol	-7.3	11.0	-15.0	-11.2
Salmeterol	-2.6	-9.6	-6.3	-2.2
Terbutaline	10.1	4.9	6.0	-9.0
Tulobuterol	30.6	27.8	90.5	55.2
Zilpaterol	-1.7	8.8	5.4	5.1

- Council of the European Union. 1996. Residues of veterinary medicinal products. Council Directive 96/23/EC.
[\[http://ec.europa.eu/food/food/Chemical-safety/residues/council_directive_96_23ec.pdf\]](http://ec.europa.eu/food/food/Chemical-safety/residues/council_directive_96_23ec.pdf).
- Liu, C., Ling, W., Xu, W. and Chai, Y. 2011. Simultaneous determination of 20 beta-agonists in pig muscle and liver by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J. AOAC Int. 94: 420 - 427.

- 行政院衛生署食品藥物管理局。2012。禽畜產品中乙型受體素類動物用藥多重殘留檢驗方法之開發。行政院衛生署101年度自行研究計畫，台北。
- Lei, Y.C., Tsai, Y.F., Tai, Y.T., Lin, C.Y. and et al. 2008. Development and fast screening of salbutamol residues in swine serum by an enzyme-linked immunosorbent assay in Taiwan. J. Agric. Food Chem. 56: 5494 - 5499.
- Lawrence, J.F. and Ménard, C. 1997. Determination of clenbuterol in beef liver and muscle tissue using immunoaffinity chromatographic cleanup and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 696: 291 - 297.
- Caban, M., Stepnowski, P., Kwiatkowski, M., Migowska, N. and et al. 2011. Determination of β -blockers and β -agonists using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry-a comparative study of the derivatization step. J. Chromatogr. A. 1218: 8110 - 8122.
- 衛生福利部。2013。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。102.12.10部授食字第1021951106號公告修正。[http://www.fda.gov.tw/TC/siteListContent.aspx?sid=103&id=8487]。
- 食品藥物管理署。2012。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(20品項)。[http://www.fda.gov.tw/TC/includes/GetFile.ashx?mid=133 &id=5956&t=s]。
- 食品藥物管理署。2013。食品化學檢驗方法之確效規範(第二次修正)。[https://www.fda.gov.tw/TC/includes/GetFile.ashx?mID=133 &id=18202]。
- The commission of the European Community. 2002. 2002/657/EC: Implementing

表七、於四種基質中添加21項乙型受體素1及5 ppb之回收率、同日內及異日間之重複性

Compound	pork						chicken						liver						kidney					
	Intra-day precision (n=5)		Inter-day precision (n=10)		Intra-day precision (n=5)		Inter-day precision (n=10)		Intra-day precision (n=5)		Inter-day precision (n=10)		Intra-day precision (n=5)		Inter-day precision (n=10)		Intra-day precision (n=5)		Inter-day precision (n=10)		Intra-day precision (n=5)			
	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb	1 ppb	
Brombuterol	99.2	6.4	113.4	7.8	7.6	97.0	5.5	96.7	9.9	4.8	114.5	4.1	105.6	3.0	12.2	93.9	1.4	85.9	1.6	9.7				
<i>t</i> -Butylisopropine (buctopamine)	101.8	3.0	120.6	4.7	4.3	115.6	3.6	111.1	5.9	10.6	103.0	7.7	98.1	3.9	5.7	116.6	2.6	114.9	0.9	10.9				
Cimaterol	96.4	6.5	108.9	2.3	5.8	96.5	4.3	97.5	6.0	9.7	109.3	3.9	103.6	2.3	6.5	107.6	4.6	102.9	1.9	5.5				
Cimbuterol	92.8	8.1	113.1	11.6	7.0	94.6	7.7	94.6	7.8	9.6	113.6	4.4	103.4	1.8	15.6	100.4	3.6	98.2	3.6	4.3				
Clenbuterol	100.0	8.6	103.5	6.5	6.5	97.3	9.4	95.7	6.7	8.5	100.5	3.8	93.0	2.9	6.8	101.9	4.7	99.2	3.9	5.6				
Clencyclohexanol	87.0	9.9	102.1	12.8	15.1	104.7	7.0	102.7	3.9	8.5	106.0	1.4	94.8	4.5	8.2	101.6	4.1	94.4	1.5	4.4				
Clenisopenterol	73.8	6.8	74.9	13.8	9.6	76.4	5.2	71.9	6.7	12.8	90.5	2.5	84.2	1.2	3.2	84.4	3.3	83.7	6.5	7.9				
Clenpenterol	93.4	5.9	104.1	9.9	5.1	105.8	8.1	107.4	10.9	9.7	111.9	3.0	103.4	1.3	7.2	106.8	4.2	103.7	3.8	5.1				
Clenproperol	90.0	5.3	106.5	10.2	6.4	99.8	5.1	101.3	5.6	5.2	106.0	3.3	96.7	1.3	4.1	100.0	2.9	94.0	2.0	3.2				
Fenoterol	81.3	7.5	99.0	10.9	10.7	81.3	10.7	96.7	5.4	13.9	88.0	8.8	77.7	4.6	10.9	95.7	2.1	92.7	1.6	9.1				
Formoterol	106.9	18.5	106.2	7.6	15.9	92.5	14.0	105.8	10.7	11.6	87.2	6.5	82.3	4.6	15.4	96.8	2.5	86.0	2.8	5.9				
Isoxsuprine	88.5	6.8	102.8	8.1	6.9	99.5	7.1	100.5	4.6	7.2	102.5	0.8	95.3	2.7	3.2	98.3	2.4	92.3	0.9	5.5				
Mabuterol	88.7	10.8	104.5	10.7	8.3	98.2	6.1	99.5	5.8	6.5	105.6	3.0	94.0	3.7	3.0	95.7	3.1	88.4	3.2	5.1				
Mapenterol	88.9	4.1	106.9	10.0	5.6	98.5	6.3	98.9	6.6	5.1	103.3	2.9	94.7	2.7	2.3	100.6	1.3	97.5	2.2	3.0				
3-o-Methyl-colterol	87.3	5.2	105.5	10.6	9.1	96.9	7.0	98.3	5.8	5.0	104.2	1.3	95.0	1.8	2.9	99.8	1.4	93.4	1.5	2.0				
Ractopamine	106.0	2.8	107.5	3.4	4.8	94.4	8.4	92.6	3.3	8.2	108.6	9.0	98.1	3.4	8.4	97.4	6.3	94.8	4.4	6.7				
Salbutamol	97.5	4.5	109.3	4.7	5.1	96.6	2.2	101.2	6.0	5.8	123.4	0.6	116.8	4.1	16.9	103.0	3.3	101.0	2.0	4.9				
Salmeterol	106.5	8.3	88.2	15.8	10.3	91.6	6.8	97.2	12.2	18.8	102.4	6.2	98.0	4.2	9.6	103.9	5.8	100.1	3.2	14.1				
Terbutaline	97.3	6.9	106.1	3.8	5.0	98.6	3.0	97.4	8.0	8.1	107.9	4.7	102.7	3.3	5.5	108.1	4.1	104.1	5.5	4.5				
Tulobuterol	97.9	6.6	102.8	2.9	5.4	96.1	4.2	96.3	6.5	8.8	84.3	7.7	78.7	3.4	8.5	98.8	3.5	95.5	5.8	7.4				
Zilpaterol	109.7	6.3	105.4	5.2	5.1	101.2	6.6	94.2	6.1	8.4	104.8	7.9	98.0	5.3	8.7	99.7	5.2	95.7	3.5	8.3				

Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the

interpretation of results. Official J. of the European Communities. L221: 08 - 36.

Improvement of a Multi-residue Analysis Method for the Determination of β -agonists in Poultry and Livestock Tissues

YU-TING LIN, YUEH TING, YING-RU SHEN, CHIH-NENG HUANG,
GUAN-JHIH PENG, CHIA-DING LIAO, YA-MIN KAO,
DER-YUAN WANG AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

β -agonists residues in poultry and livestock products has been an issue of public concerns. In order to improve the quality of the official testing method, this study developed a rapid and accurate method for the simultaneous analysis of 21 β -agonists in chicken, pork, swine liver and swine kidney. Samples were extracted by 0.2 M sodium acetate with β -glucuronidase for hydrolysis, followed by clean-up using solid phase extraction (SPE). Detection was carried out by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with 18 internal standards. Chromatographic separation was performed on a reversed phase C18 column, using a binary gradient comprised of 0.1% formic acid in water (mobile phase A) and 0.1% formic acid in methanol (mobile phase B). The results showed that the limits of quantification in muscle and viscera were 1 and 5 ppb, respectively. The recoveries of the 21 β -agonists spiked in muscle ranged from 71.9 to 120.6% and the coefficients of variation were between 2.2 and 18.5%. In viscera, the recoveries of the 21 β -agonists ranged from 77.7 to 116.8% and the coefficients of variation were between 0.6 and 9.0%. The developed method used minimal sample preparation and the 21 β -agonists can be analyzed in a single run. With the satisfactory validation results, this method can be applied to border inspection and post-market surveillance.

Key words: β -agonists, animal product, LC-MS/MS