

## 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 $\beta$ -Agonists

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽產品中brombuterol等21項乙型受體素(品項見附表)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經水解、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<sup>+</sup>)。
      - 2.1.1.2. 層析管：ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18，1.8  $\mu\text{m}$ ，內徑3.0 mm  $\times$  10 cm，或同級品。
    - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
    - 2.1.3. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder<sup>®</sup>，1000 rpm以上，或同級品。
    - 2.1.4. 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內者。
    - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達10000  $\times g$ 以上者，溫控可達 $4^\circ\text{C}$ 以下者。
    - 2.1.6. 振盪器(Shaker)。
    - 2.1.7. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
    - 2.1.8. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
    - 2.1.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
  - 2.2. 試藥：甲醇採用液相層析級；醋酸鈉、醋酸銨、醋酸、鹽酸及氨水(25%)均採用試藥特級； $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶溶液(含 $\beta$ -glucuronidase 85000 unit/mL及sulfatase 7500 unit/mL)；去離子水(比電阻於 $25^\circ\text{C}$ 可達18  $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；brombuterol hydrochloride、t-butyl-norsynephrine (buctopamine)、cimiterol、cimbuterol、clenbuterol hydrochloride、clencyclohexerol、clenisopenterol、clenpenterol hydrochloride、clenproperol、fenoterol、formoterol、isoxsuprine hydrochloride、mabuterol hydrochloride、mapenterol hydrochloride、3-*o*-methyl-colterol、ractopamine hydrochloride、salbutamol、salmeterol、terbutaline

hemisulfate、tulobuterol及zilpaterol對照用標準品；  
brombuterol-d<sub>9</sub> hydrochloride、cimaterol-d<sub>7</sub>、cimbuterol-d<sub>9</sub>、  
clenbuterol-d<sub>9</sub> hydrochloride、clencyclohexerol-d<sub>10</sub>、  
clenproperol-d<sub>7</sub>、fenoterol-d<sub>6</sub> hydrobromide、formoterol-d<sub>6</sub>、  
isoxsuprine-d<sub>6</sub> hydrochloride、mabuterol-d<sub>9</sub>、mapenterol-d<sub>11</sub>  
hydrochloride、3-*o*-methyl-colterol-d<sub>9</sub>、ractopamine-d<sub>6</sub>、  
salbutamol-d<sub>9</sub>、salmeterol-d<sub>3</sub>、terbutaline-d<sub>9</sub>、tulobuterol-d<sub>9</sub>  
hydrochloride及zilpaterol-d<sub>7</sub>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。

2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。

### 2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 0.2 M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. 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。

2.4.3. 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。

2.4.4. 0.2 N鹽酸溶液：

取鹽酸16.7 mL，緩緩加入去離子水900 mL中，再加去離子水使  
成1000 mL。

2.4.5. 甲醇：氨水(95:5, v/v)溶液：

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：

取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，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：

取甲酸1 mL，加甲醇使成1000 mL，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 brombuterol-d<sub>9</sub>、cimaterol-d<sub>7</sub>、cimbuterol-d<sub>9</sub>、clenbuterol-d<sub>9</sub>、clencyclohexerol-d<sub>10</sub>、clenproperol-d<sub>7</sub>、fenoterol-d<sub>6</sub>、formoterol-d<sub>6</sub>、isoxsuprine-d<sub>6</sub>、mabuterol-d<sub>9</sub>、mapenterol-d<sub>11</sub>、3-*o*-methyl-colterol-d<sub>9</sub>、ractopamine-d<sub>6</sub>、salbutamol-d<sub>9</sub>、salmeterol-d<sub>3</sub>、terbutaline-d<sub>9</sub>、tulobuterol-d<sub>9</sub>及zilpaterol-d<sub>7</sub>各約1 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至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。

### 2.6.2. 標準溶液：

取相當於含brombuterol、t-butyl-norsynephrine (buctopamine)、cimaterol、cimbuterol、clenbuterol、clencyclohexerol、clenisopenterol、clenpenterol、clenproperol、fenoterol、formoterol、isoxsuprine、mabuterol、mapenterol、3-*o*-methyl-colterol、ractopamine、salbutamol、salmeterol、terbutaline、tulobuterol及zilpaterol之對照用標準品各約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。

## 2.7. 檢液之調製：

### 2.7.1. 水解及萃取：

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0.2 M醋酸鈉緩衝溶液15 mL，再加入陶瓷均質石1顆，以高速分散裝置於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，振盪10分鐘，於4°C以10000 ×g離心10分鐘，收集上清液再於4°C以5000 ×g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0.2 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醋酸鉍：甲醇(9:1, v/v)溶液1 mL，旋渦混合溶解，以5000 ×g離心5分鐘，取上清液作為檢液原液。取檢液原液500 μL (a)，加入5 mM醋酸鉍：甲醇(9:1, v/v)溶液使體積為1000 μL (b)，混合均勻，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.節調製未添加內部標準品之檢液原液，取500 μL (a)，分別加入標準溶液1~50 μL、內部標準溶液10 μL及適量5 mM醋酸鉍：甲醇(9:1, v/v)溶液，使體積為1000 μL (b)，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，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1~50 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件<sup>(註)</sup>：

層析管：ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18，1.8 μm，內徑3.0 mm × 10 cm。

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 → 1.0	98 → 98	2 → 2
1.0 → 5.0	98 → 90	2 → 10
5.0 → 8.0	90 → 80	10 → 20
8.0 → 10.0	80 → 70	20 → 30
10.0 → 11.0	70 → 60	30 → 40
11.0 → 12.0	60 → 60	40 → 40
12.0 → 15.0	60 → 10	40 → 90
15.0 → 19.0	10 → 10	90 → 90
19.0 → 19.1	10 → 98	90 → 2
19.1 → 23.0	98 → 98	2 → 2

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.2 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：120°C。

離子化模式：ESI<sup>+</sup>。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：400°C。

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)。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如附表。

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：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各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<sup>(註)</sup>鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各乙型受體素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中各乙型受體素之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

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)

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離子對之波峰面積相除而得(≤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

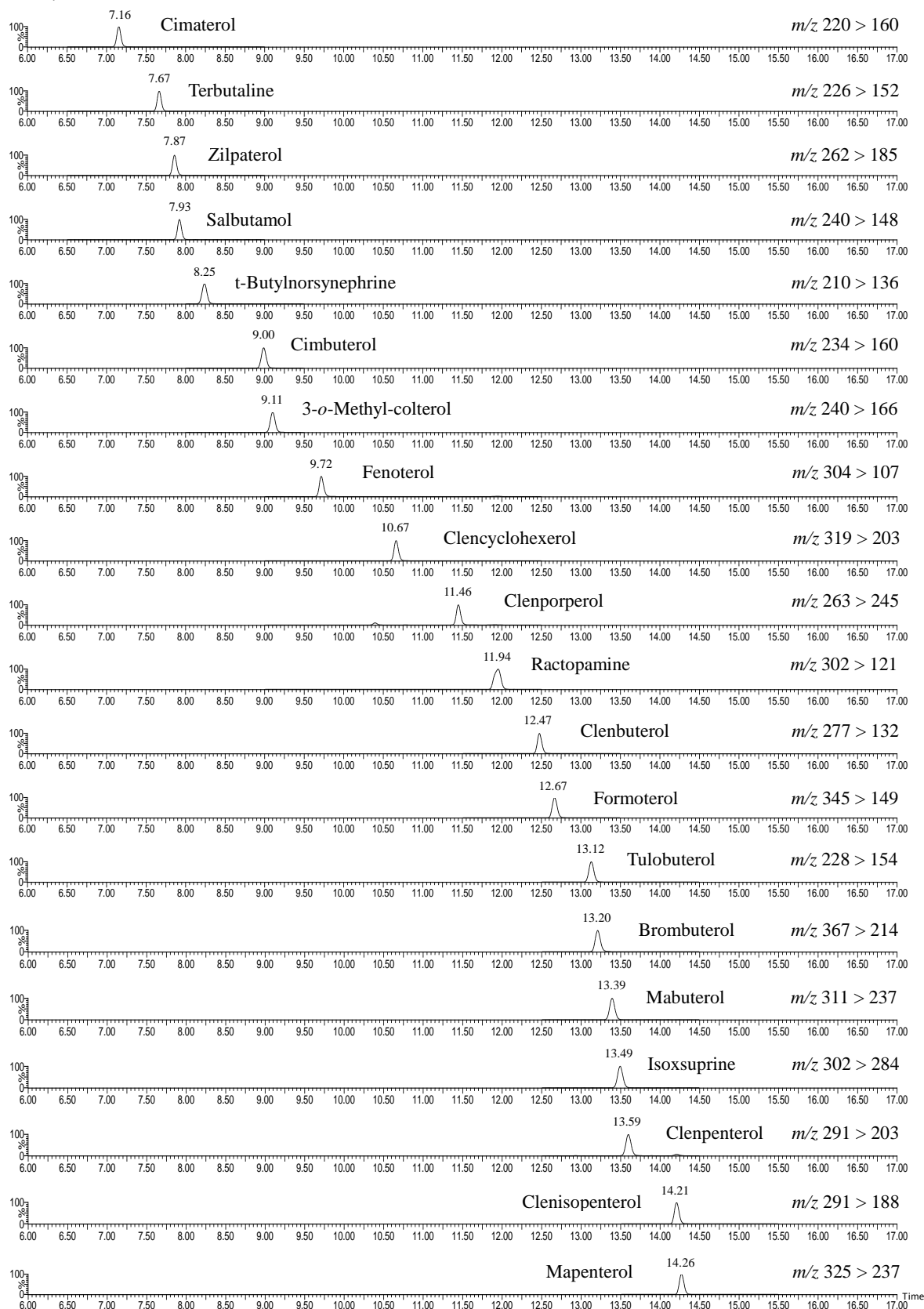
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，於肌肉均為0.001 ppm，於內臟均為0.005 ppm。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

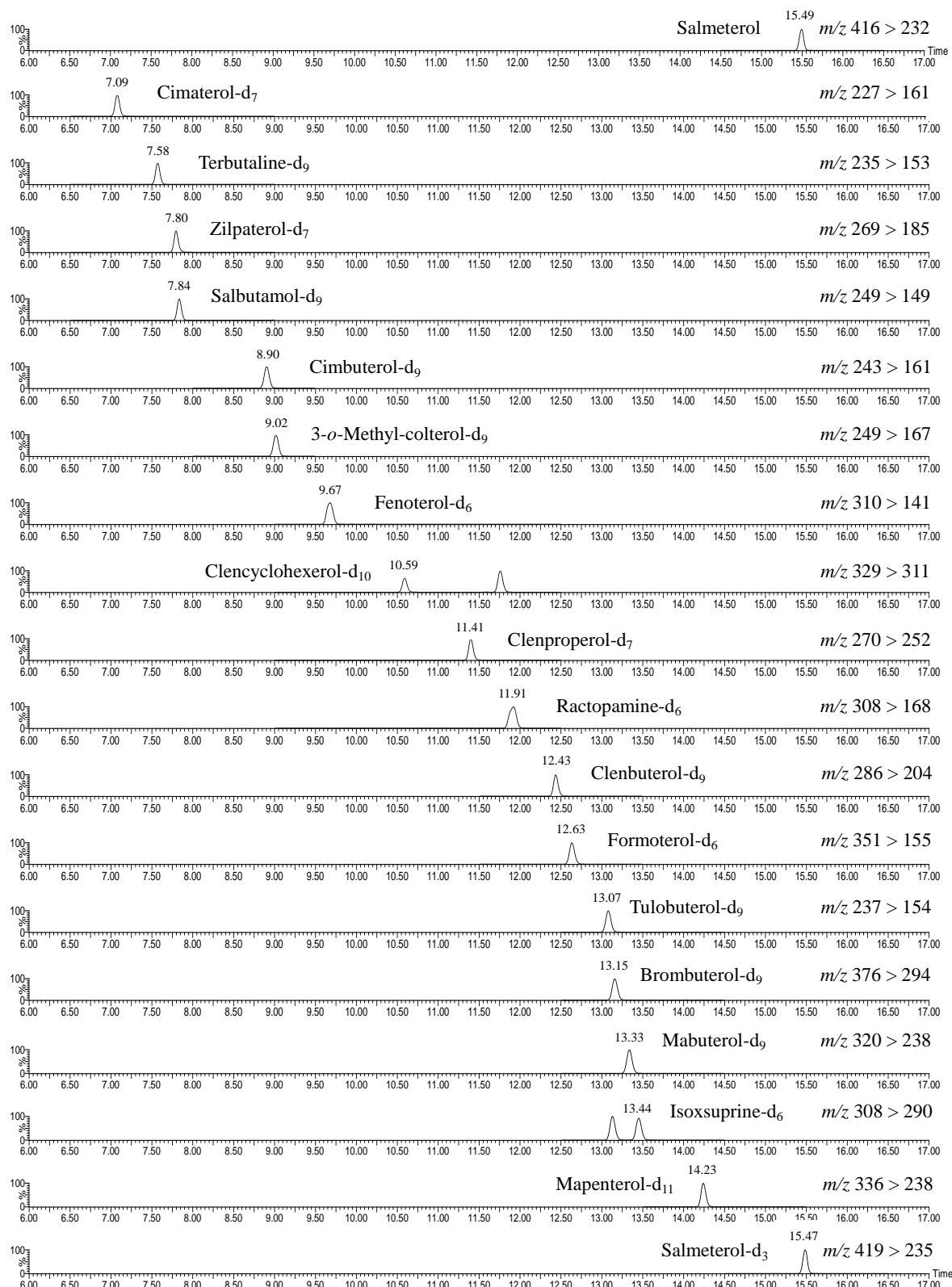
1. Shao, B., Jia, X., Zhang, J., Meng J., Wu, Y., Duan, H., Tu, X. 2009. Multi-residual analysis of 16 b-agonists in pig liver, kidney and muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Chem. 114: 1115-1121.
2. 尤譽嫻、趙偉博、江靜芸、曾素香、蘇淑珠、闕麗卿、施養志。2011。禽畜產品中乙型受體素類動物用藥多重殘留檢驗方法之開發。行政院衛生署藥物食品檢驗局100年度自行研究計畫。

### 參考層析圖譜



圖、以 LC/MS/MS 分析 21 項乙型受體素類動物用藥標準品及 18 項同位素內部標準品之 MRM 圖譜

94年8月22日署授食字第0949424412號公告訂正  
 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  
 107年5月24日衛授食字第1071900960號公告修正  
 108年5月9日衛授食字第1081900642號公告修正  
 MOHWV0041.04



圖、以 LC/MS/MS 分析 21 項乙型受體素類動物用藥標準品及 18 項同位素內部標準品之 MRM 圖譜(續)

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  
 107年5月24日衛授食字第1071900960號公告修正  
 108年5月9日衛授食字第1081900642號公告修正  
 MOHWV0041.04

附表、Brombuterol等21項乙型受體素及內部標準品之多重反應偵測模式參數

項次	分析物	離子對 <sup>(註)</sup>	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	內部標準品 <sup>(註)</sup>
		前驅離子( $m/z$ ) > 產物離子( $m/z$ )			
1	Brombuterol	367 > 214* 367 > 212 367 > 293	25	27 27 18	Brombuterol-d <sub>9</sub>
2	t-Butylnorsynephrine (Buctopamine)	210 > 136* 210 > 192	8	13 8	Salbutamol-d <sub>9</sub>
3	Cimaterol	220 > 160* 220 > 202 220 > 143	15	15 10 20	Cimaterol-d <sub>7</sub>
4	Cimbuterol	234 > 160* 234 > 216	16	18 11	Cimbuterol-d <sub>9</sub>
5	Clenbuterol	277 > 132* 277 > 203 277 > 259	20	30 20 10	Clenbuterol-d <sub>9</sub>
6	Clencyclohexerol	319 > 203* 319 > 301 319 > 168	22	20 13 32	Clencyclohexerol-d <sub>10</sub>
7	Clenisopenterol	291 > 188* 291 > 273 291 > 217	13	23 12 18	Mapenterol-d <sub>11</sub>
8	Clenpenterol	291 > 203* 291 > 132 291 > 168	16	21 35 39	Brombuterol-d <sub>9</sub>
9	Clenproperol	263 > 245* 263 > 203 263 > 132	15	12 18 26	Clenproperol-d <sub>7</sub>
10	Fenoterol	304 > 107* 304 > 135	25	29 16	Fenoterol-d <sub>6</sub>
11	Formoterol	345 > 149* 345 > 121	25	18 35	Formoterol-d <sub>6</sub>
12	Isoxsuprine	302 > 284* 302 > 107 302 > 150	19	14 28 22	Isoxsuprine-d <sub>6</sub>
13	Mabuterol	311 > 237* 311 > 217 311 > 202	18	20 30 35	Mabuterol-d <sub>9</sub>
14	Mapenterol	325 > 237* 325 > 217 325 > 202	24	17 27 33	Mapenterol-d <sub>11</sub>
15	3- <i>o</i> -Methyl-colterol	240 > 166* 240 > 134 240 > 121	18	16 28 28	3- <i>o</i> -Methyl-colterol-d <sub>9</sub>
16	Ractopamine	302 > 121* 302 > 107 302 > 284	20	20 20 15	Ractopamine-d <sub>6</sub>



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  
 107年5月24日衛授食字第1071900960號公告修正  
 108年5月9日衛授食字第1081900642號公告修正  
 MOHWV0041.04

附表、Brombuterol等21項乙型受體素及內部標準品之多重反應偵測模式參數(續)

項次	分析物	離子對 <sup>(註)</sup>	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	內部標準品 <sup>(註)</sup>
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)			
17	Salbutamol	240 > 148* 240 > 222 240 > 166	20	15 15 20	Salbutamol-d <sub>9</sub>
18	Salmeterol	416 > 232* 416 > 91 416 > 398	30	20 24 14	Salmeterol-d <sub>3</sub>
19	Terbutaline	226 > 152* 226 > 107 226 > 125	27	16 30 25	Terbutaline-d <sub>9</sub>
20	Tulobuterol	228 > 154* 228 > 118	20	20 20	Tulobuterol-d <sub>9</sub>
21	Zilpaterol	262 > 185* 262 > 202 262 > 244	26	23 20 13	Zilpaterol-d <sub>7</sub>
I.S.	Brombuterol-d <sub>9</sub>	376 > 294	15	17	—
I.S.	Cimaterol-d <sub>7</sub>	227 > 161	14	19	—
I.S.	Cimbuterol-d <sub>9</sub>	243 > 161	8	14	—
I.S.	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	286 > 204	20	20	—
I.S.	Clencyclohexerol-d <sub>10</sub>	329 > 311	10	13	—
I.S.	Clenproperol-d <sub>7</sub>	270 > 252	8	10	—
I.S.	Fenoterol-d <sub>6</sub>	310 > 141	27	18	—
I.S.	Formoterol-d <sub>6</sub>	351 > 155	20	18	—
I.S.	Isoxsuprine-d <sub>6</sub>	308 > 290	12	13	—
I.S.	Mabuterol-d <sub>9</sub>	320 > 238	15	16	—
I.S.	Mapenterol-d <sub>11</sub>	336 > 238	10	16	—
I.S.	3-o-Methyl-colterol-d <sub>9</sub>	249 > 167	19	15	—
I.S.	Ractopamine-d <sub>6</sub>	308 > 168	20	15	—
I.S.	Salbutamol-d <sub>9</sub>	249 > 149	20	15	—
I.S.	Salmeterol-d <sub>3</sub>	419 > 235	25	20	—
I.S.	Terbutaline-d <sub>9</sub>	235 > 153	26	16	—
I.S.	Tulobuterol-d <sub>9</sub>	237 > 154	35	20	—
I.S.	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	269 > 185	20	33	—

註：1. \*為定量離子對，定性離子對可視基質情況選擇適合之至少一對離子對。  
 2. 內部標準品可使用不同數目氬標幟之同位素內標，並修正MRM參數。