

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－乙型受體素類多重殘留快速萃取方法
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods - Fast Extraction
Method for Multiresidue Analysis of β -Agonists

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜產品之肌肉、內臟及脂肪中brombuterol等21項乙型受體素多重殘留分析。
2. 檢驗方法：檢體經酸水解，採用乙型受體素快速萃取匣(Fast Extraction Cartridge, FaPEX-VAG)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。
 - 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(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18，1.8 μm ，內徑3.0 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)。
 - 2.1.3. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.4. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達10000 $\times g$ 以上，溫度控制可達4 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.6. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：冰醋酸、鹽酸及甲酸均採試藥特級；乙腈及甲醇均採液相層析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；乙型受體素對照用標準品brombuterol等21項(品項見附表)；cimaterol-d₇、clenbuterol-d₉ hydrochloride、fenoterol-d₆ hydrobromide、mabuterol-d₉、ractopamine-d₆、salmeterol-d₃及zilpaterol-d₇同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，Nylon材質。
 - 2.3.4. 塑膠針筒：10 mL，PP材質。
 - 2.3.5. 乙型受體素快速萃取匣：FaPEX-VAG，檢液負荷量5 mL，或同級品。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 含1%醋酸之乙腈溶液：

取冰醋酸10 mL，加乙腈使成1000 mL。

2.4.2. 0.05 M鹽酸溶液：

取鹽酸0.42 mL，緩緩加入去離子水90 mL中，再加去離子水使成100 mL。

2.4.3. 0.1%甲酸溶液：

取甲酸0.1 mL，加入去離子水使成100 mL。

2.4.4. 0.1%甲酸：甲醇(9:1, v/v)溶液：

取0.1%甲酸溶液與甲醇以9：1 (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. 內部標準溶液之配製：

取相當於含cimaterol-d₇、clenbuterol-d₉、fenoterol-d₆、mabuterol-d₉、ractopamine-d₆、salmeterol-d₃及zilpaterol-d₇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500 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

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0.1%甲酸：甲醇(9:1, v/v)溶液稀釋至100 ng/mL，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入內部標準溶液40 µL及0.05 M鹽酸溶液1 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5分鐘，加入含1%醋酸之乙腈溶液10 mL，蓋上離心管蓋，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪萃取5分鐘，於4°C以4000 ×g離心5分鐘，取上清液5 mL注入乙型受體素快速萃取匣，流速控制為1滴/秒，收集流出液，作為檢液原液。取檢液原液2.5 mL (a)，以氮氣吹至剛乾，殘留物以0.1%甲酸：甲醇(9:1, v/v)溶液1 mL溶解(b)，混合均勻，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.8.節調製未加內部標準品之檢液原液，取2.5 mL (a)，以氮氣吹至剛乾，分別加入標準溶液5~300 µL、內部標準溶液10 µL及適量0.1%甲酸：甲醇(9:1, v/v)溶液，使體積為1 mL (b)，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液。依下列條件進行分析，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0.5~30 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

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

層析管溫度：40°C。

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 → 90	2 → 10
1.0 → 5.0	90 → 90	10 → 10
5.0 → 6.0	90 → 50	10 → 50
6.0 → 8.0	50 → 10	50 → 90
8.0 → 10.0	10 → 0	90 → 100
10.0 → 11.0	0 → 98	100 → 2

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：5 µL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：4.0 kV。

噴嘴電壓(Nozzle voltage)：0 kV。

離子化模式：ESI正離子。

乾燥氣體溫度(Gas temperature)：280°C。

乾燥氣體流量(Gas flow)：9 L/min。

霧化氣體壓力(Nebulizer gas pressure)：40 psi。

鞘氣溫度(Sheath gas temperature)：350°C。

鞘氣流量(Sheath gas flow)：11 L/min。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、碎片電壓(fragmentor 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。

2.10. 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5 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9.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^(註)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：萃取檢體之含1%醋酸之乙腈溶液之體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：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

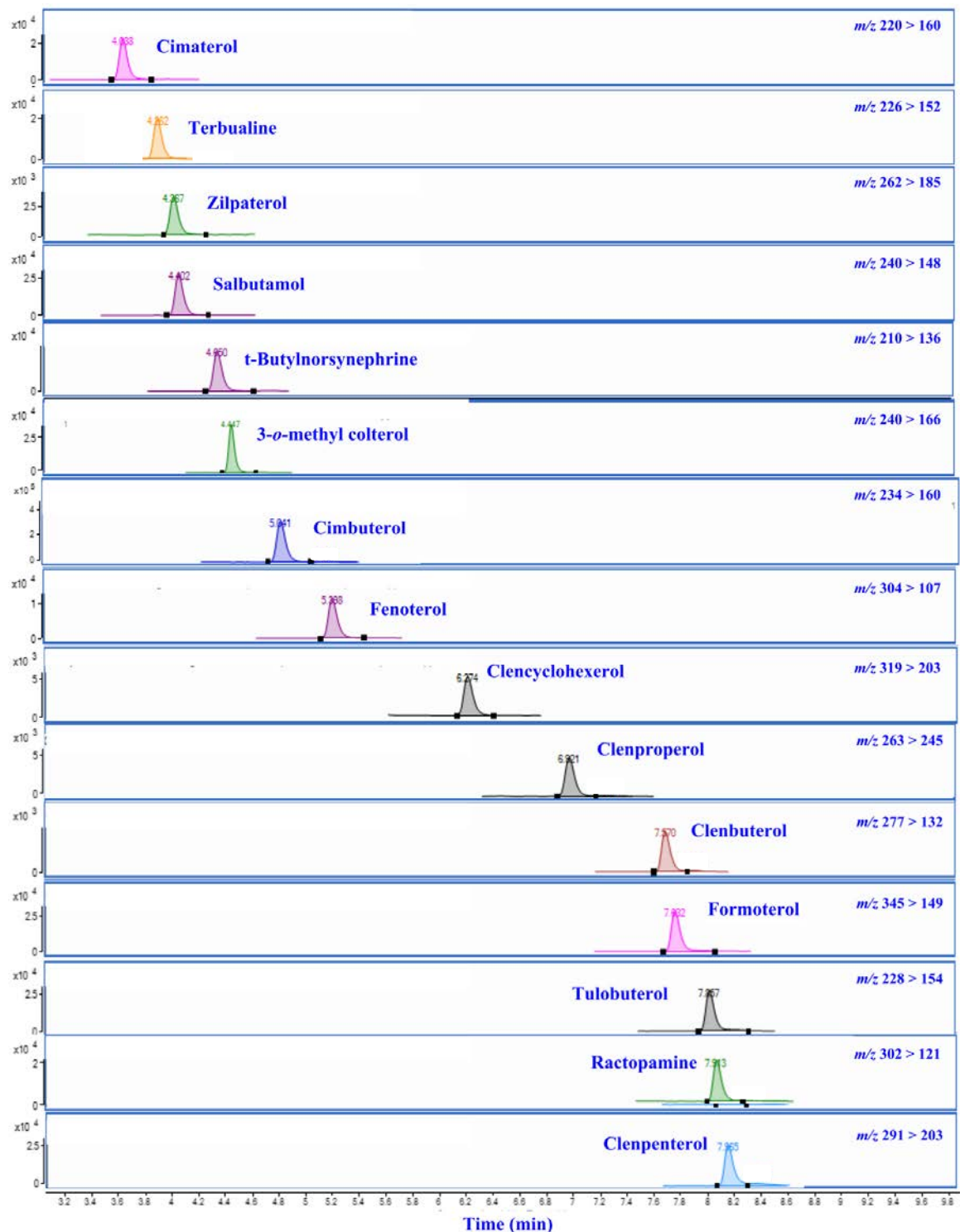
附註：1. 本檢驗方法之定量極限於肌肉均為0.001 ppm、於內臟及脂肪均為0.005 ppm。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

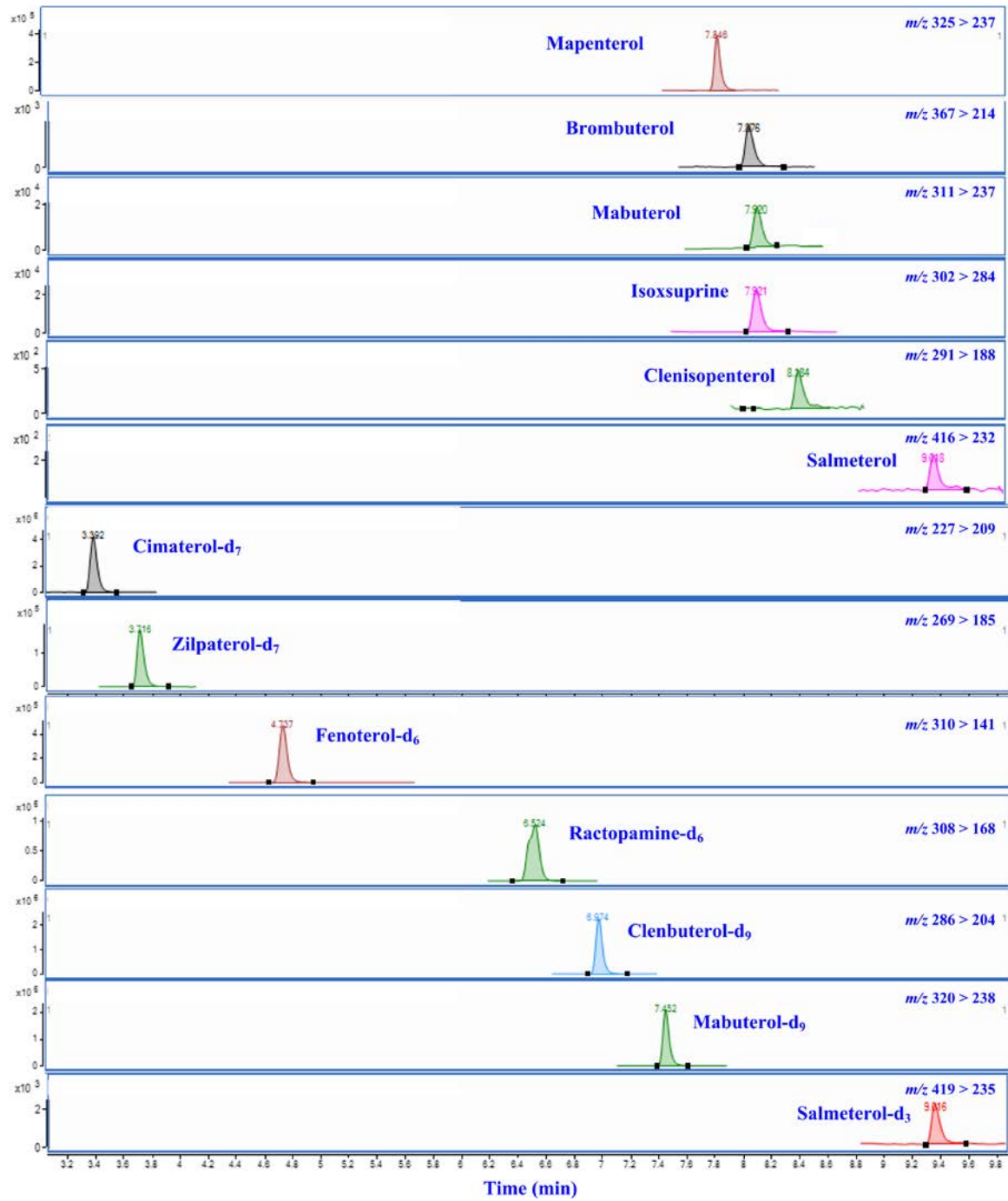
參考文獻：

1. Lin, S. K., Chuang, W. C. and Chen, J. W. 2017. Quick extraction kit adapted to a procedure of detecting pesticide residues in agricultural products and a method of obtaining a primary test liquid from an agricultural sample by the quick extraction kit. U.S. Patent No. 9581579.
2. 衛生福利部。2019。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(MOHV0041.04)。108年5月9日衛授食字第1081900642號公告修正。

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7項同位素內部標準品之MRM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7項同位素內部標準品之MRM圖譜(續)

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 ^(註)	碎片 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	內部標準品 ^(註)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)			
1	Brombuterol	367 > 214* 367 > 212 367 > 293	104	33 49 13	Mabuterol-d ₉
2	t-Butyl norsynephrine (Bucpamine)	210 > 136* 210 > 192 210 > 91	74	16 8 36	Zilpaterol-d ₇
3	Cimaterol	220 > 160* 220 > 202 220 > 143	87	17 2 17	Cimaterol-d ₇
4	Cimbuterol	234 > 160* 234 > 216 234 > 143	99	9 5 25	Fenoterol-d ₆
5	Clenbuterol	277 > 132* 277 > 203 277 > 259	94	29 13 5	Clenbuterol-d ₉
6	Clencyclohexerol	319 > 203* 319 > 301 319 > 168	109	17 9 37	Fenoterol-d ₆
7	Clenisopenterol	291 > 188* 291 > 273 291 > 217	105	9 9 5	Mabuterol-d ₉
8	Clenpenterol	291 > 203* 291 > 132 291 > 168	105	15 30 15	Mabuterol-d ₉
9	Clenproperol	263 > 245* 263 > 203 263 > 132	89	5 13 37	Ractopamine-d ₆
10	Fenoterol	304 > 107* 304 > 135	121	29 17	Fenoterol-d ₆
11	Formoterol	345 > 149* 345 > 121	94	17 37	Clenbuterol-d ₉
12	Isoxsuprine	302 > 284* 302 > 107 302 > 150	114	9 29 17	Mabuterol-d ₉
13	Mabuterol	311 > 237* 311 > 217 311 > 202	109	13 25 33	Mabuterol-d ₉
14	Mapenterol	325 > 237* 325 > 217 325 > 202	109	13 25 41	Mabuterol-d ₉
15	3-o-Methyl-colterol	240 > 166* 240 > 134 240 > 121	99	9 21 25	Fenoterol-d ₆
16	Ractopamine	302 > 121* 302 > 107 302 > 284	104	21 37 13	Ractopamine-d ₆

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 ^(註)	碎片 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	內部標準品 ^(註)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)			
17	Salbutamol	240 > 148* 240 > 222 240 > 166	99	13 5 9	Zilpaterol-d ₇
18	Salmeterol	416 > 232* 416 > 91 416 > 398	104	10 20 9	Salmeterol-d ₃
19	Terbutaline	226 > 152* 226 > 107 226 > 125	104	9 29 21	Zilpaterol-d ₇
20	Tulobuterol	228 > 154* 228 > 118 228 > 172	94	13 29 5	Mabuterol-d ₉
21	Zilpaterol	262 > 185* 262 > 202 262 > 244	99	21 17 5	Zilpaterol-d ₇
I.S.	Cimaterol-d ₇	227 > 209	89	8	—
I.S.	Clenbuterol-d ₉	286 > 204	99	16	—
I.S.	Fenoterol-d ₆	310 > 141	89	20	—
I.S.	Mabuterol-d ₉	320 > 238	89	20	—
I.S.	Ractopamine-d ₆	308 > 168	113	16	—
I.S.	Salmeterol-d ₃	419 > 235	138	24	—
I.S.	Zilpaterol-d ₇	269 > 185	99	21	—

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