

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 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⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：ZORBOX RRHD Eclipse Plus C18，1.8 μm ，內徑 3.0 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 高速組織研磨振盪均質機(SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder®)：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°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； β -葡萄糖醛酸苷酶溶液(含 β -glucuronidase 85000 unit/mL 及 sulfatase 7500 unit/mL)；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；brombuterol hydrochloride、t-butyl norsynephrine (buclopamine)、cimaterol、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-d₉ hydrochloride、cimaterol-d₇、cimbuterol-d₉、clenbuterol-d₉ hydrochloride、clencyclohexerol-d₁₀、clenproperol-d₇、fenoterol-d₆ hydrobromide、formoterol-d₆、isoxsuprine-d₆ hydrochloride、mabuterol-d₉、mapenterol-d₁₁ hydrochloride、3-*o*-methyl-colterol-d₉、ractopamine-d₆、salbutamol-d₉、salmeterol-d₃、terbutaline-d₉、tulobuterol-d₉ hydrochloride 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。

2.3.4. 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-d₉、cimaterol-d₇、cimbuterol-d₉、clenbuterol-d₉、clencyclohexerol-d₁₀、clenproperol-d₇、fenoterol-d₆、formoterol-d₆、isoxsuprine-d₆、mabuterol-d₉、mapenterol-d₁₁、3-*o*-methyl-colterol-d₉、ractopamine-d₆、salbutamol-d₉、salmeterol-d₃、terbutaline-d₉、tulobuterol-d₉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 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-butylorsyneprine (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，精稱確定，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，振盪 10 分鐘，於 4°C 以 10000 $\times g$ 離心 10 分鐘，收集上清液再於 4°C 以 5000 $\times g$ 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 醋酸銨：甲醇(9:1, v/v) 溶液 1 mL，旋渦混合溶解，以 5000 $\times g$ 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 醋酸銨：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 醋酸銨：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^(註)：

層析管：ZORBOX RRHD Eclipse Plus C18，1.8 μm ，內徑 3.0 mm $\times$ 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 $\rightarrow$ 1.0	98 $\rightarrow$ 98	2 $\rightarrow$ 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⁺。

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^(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：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。

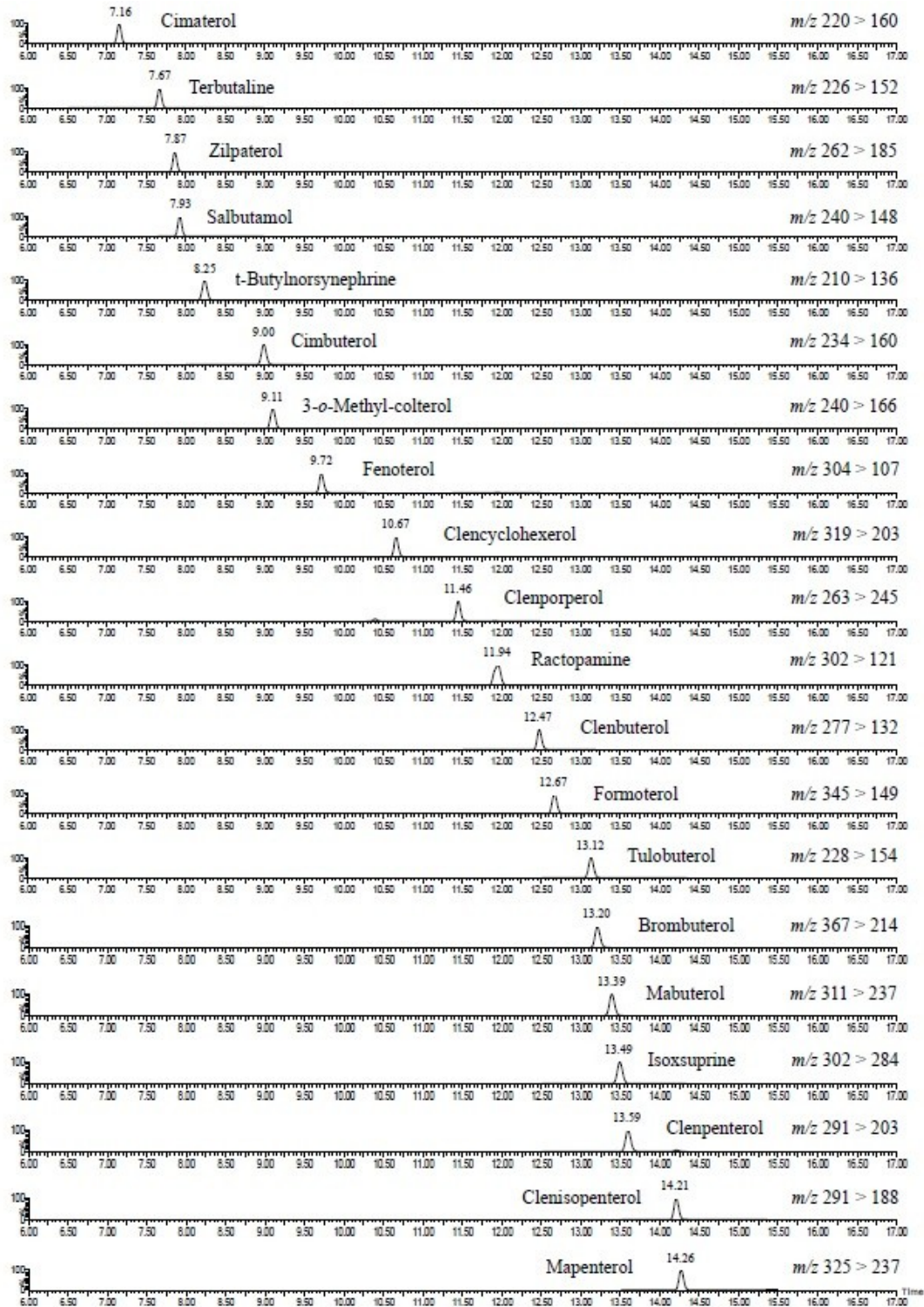
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

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。

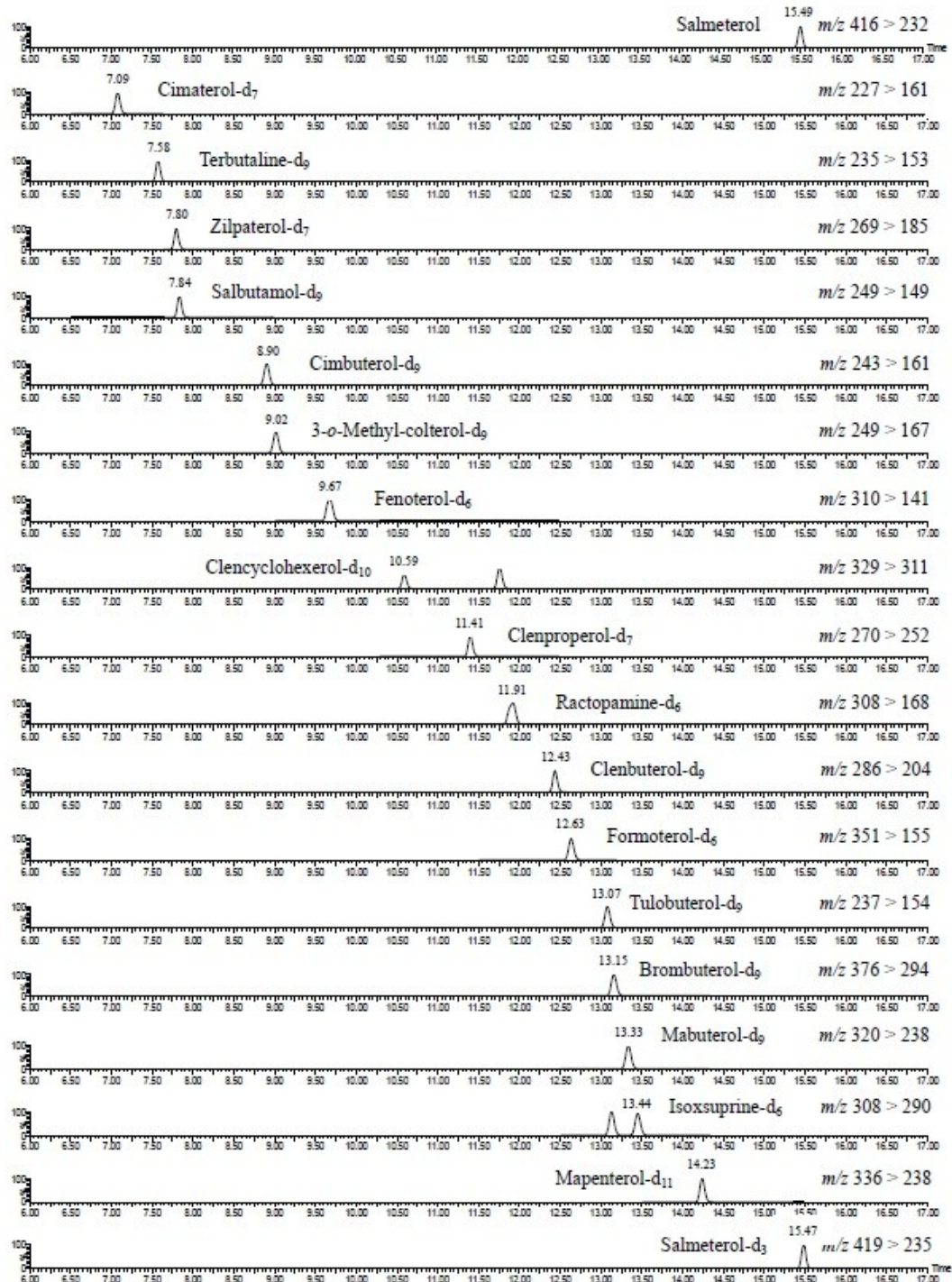
94 年 8 月 22 日署授食字第 0949424412 號公告訂定
100 年 4 月 7 日署授食字第 1001900952 號公告修正
102 年 12 月 10 日部授食字第 1021951106 號公告修正
107 年 5 月 24 日衛授食字第 1071900960 號公告修正
MOHWV0041.03

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
 MOHWV0041.03



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
 MOHWV0041.03

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	進樣錐 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	25	27 27 18	Brombuterol-d ₉
2	t-Butylorsynephrine (Buctopamine)	210 > 136* 210 > 192	8	13 8	Salbutamol-d ₉
3	Cimaterol	220 > 160* 220 > 202 220 > 143	15	15 10 20	Cimaterol-d ₇
4	Cimbuterol	234 > 160* 234 > 216	16	18 11	Cimbuterol-d ₉
5	Clenbuterol	277 > 132* 277 > 203 277 > 259	20	30 20 10	Clenbuterol-d ₉
6	Clencyclohexerol	319 > 203* 319 > 301 319 > 168	22	20 13 32	Clencyclohexerol-d ₁₀
7	Clenisopenterol	291 > 188* 291 > 273 291 > 217	13	23 12 18	Mapenterol-d ₁₁
8	Clenpenterol	291 > 203* 291 > 132 291 > 168	16	21 35 39	Brombuterol-d ₉
9	Clenproperol	263 > 245* 263 > 203 263 > 132	15	12 18 26	Clenproperol-d ₇
10	Fenoterol	304 > 107* 304 > 135	25	29 16	Fenoterol-d ₆
11	Formoterol	345 > 149* 345 > 121	25	18 35	Formoterol-d ₆
12	Isoxsuprine	302 > 284* 302 > 107 302 > 150	19	14 28 22	Isoxsuprine-d ₆
13	Mabuterol	311 > 237* 311 > 217 311 > 202	18	20 30 35	Mabuterol-d ₉

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
MOHWV0041.03

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	進樣錐 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)			
14	Mapenterol	325 > 237* 325 > 217 325 > 202	24	17 27 33	Mapenterol-d ₁₁
15	3- <i>o</i> -Methyl-colterol	240 > 166* 240 > 134 240 > 121	18	16 28 28	3- <i>o</i> -Methyl-colterol-d ₉
16	Ractopamine	302 > 121* 302 > 107 302 > 284	20	20 20 15	Ractopamine-d ₆
17	Salbutamol	240 > 148* 240 > 222 240 > 166	20	15 15 20	Salbutamol-d ₉
18	Salmeterol	416 > 232* 416 > 91 416 > 398	30	20 24 14	Salmeterol-d ₃
19	Terbutaline	226 > 152* 226 > 107 226 > 125	27	16 30 25	Terbutaline-d ₉
20	Tulobuterol	228 > 154* 228 > 118	20	20 20	Tulobuterol-d ₉
21	Zilpaterol	262 > 185* 262 > 202 262 > 244	26	23 20 13	Zilpaterol-d ₇
I.S.	Brombuterol-d ₉	376 > 294	15	17	—
I.S.	Cimaterol-d ₇	277 > 161	14	19	—
I.S.	Cimbuterol-d ₉	243 > 161	8	14	—
I.S.	Clenbuterol-d ₉	286 > 204	20	20	—
I.S.	Clencyclohexerol-d ₁₀	329 > 311	10	13	—
I.S.	Clenproperol-d ₇	270 > 252	8	10	—
I.S.	Fenoterol-d ₆	310 > 141	27	18	—
I.S.	Formoterol-d ₆	351 > 155	20	18	—
I.S.	Isoxsuprine-d ₆	308 > 290	12	13	—
I.S.	Mabuterol-d ₉	320 > 238	15	16	—

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
 MOHWV0041.03

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	進樣錐 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)			
I.S.	Mapenterol-d ₁₁	336 > 238	10	16	—
I.S.	3- <i>o</i> -Methyl-colterol-d ₉	249 > 167	19	15	—
I.S.	Ractopamine-d ₆	308 > 168	20	15	—
I.S.	Salbutamol-d ₉	249 > 149	20	15	—
I.S.	Salmeterol-d ₃	419 > 235	25	20	—
I.S.	Terbutaline-d ₉	235 > 153	26	16	—
I.S.	Tulobuterol-d ₉	237 > 154	35	20	—
I.S.	Zilpaterol-d ₇	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離子對。

2. 內部標準品可使用不同數目氘標幟之同位素內標，並修正 MRM 參數。