

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 20 項乙型受體素類(品項見附表)多重殘留分析。
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：Hypersil GOLD aQ, 1.9 μ m, 內徑 2.1 \times 100 mm, 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(Water bath)：能維持水溫溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：轉速可達 3500 \times g 以上者。
 - 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、氫氧化鈉及醋酸均採用試藥特級；去離子水(比電阻於 25 $^{\circ}\text{C}$ 可達 18 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)；brombuterol hydrochloride、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； cimaterol-d₇、 clenbuterol-d₉、 ractopamine-d₆、 salbutamol-d₉、 terbutalin-d₉ 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)：Oasis HLB，200 mg，6 mL，或同級品。

2.3.3. 濾膜：孔徑 0.22 μm，Nylon 材質。

2.3.4. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。

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 值至 5.2 ± 0.1，再加去離子水使成 1000 mL。

2.4.2. 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。

2.4.3. 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。

2.4.4. 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)比例混合均勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液 A：5 mM 醋酸銨溶液。

2.5.2. 移動相溶液 B：甲醇。

2.6. 標準溶液之配製：

2.6.1. 內部標準溶液：

取 cimaterol-d₇、 clenbuterol-d₉、 salbutamol-d₉、 terbutaline-d₉、 ractopamine-d₆ 及 zilpaterol-d₇ 同位素內部標準品各約 5 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至 50 mL，作為內部標準原液。臨用時，分別取適量內部標準原液混合後，以 5 mM 醋酸銨：甲醇 (9:1, 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：

取相當於含乙型受體素各約 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。臨用時，分別取適量標準原液混合後，以 5 mM 醋酸胺：甲醇(9:1, v/v)溶液稀釋至 100 ng/mL，作為標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

將檢體細切均質後，取約 5 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液 100 μ L，靜置 15 分鐘。加入 0.2M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL，攪拌均質 2 分鐘或加入陶瓷均質石 1 顆，以高速組織研磨振盪均質機於 1000 rpm 振盪 5 分鐘。加入 β -葡萄糖醛酸苷酶溶液 100 μ L，混合均勻，置於 37°C 水浴中水解 1 小時。於 3500 \times g 離心 10 分鐘，收集上清液，沈澱物再加入 0.2M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL，振盪 10 分鐘或以高速組織研磨振盪均質機於 1000 rpm 振盪 5 分鐘，於 3500 \times g 離心 10 分鐘。合併上清液，以 1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 7.0，再於 3500 \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 3 mL 及去離子水 3 mL 潤洗之固相萃取匣，棄流出液，以去離子水 4 mL 清洗固相萃取匣，棄流出液。再以甲醇 4 mL 沖提，收集沖提液，於 65°C 水浴以氮氣吹乾，殘留物加入 5 mM 醋酸胺：甲醇(9:1, v/v)溶液 2 mL，旋渦混合溶解，經濾膜過濾後，作為檢液原液。取檢液原液 400 μ L 與 5 mM 醋酸胺：甲醇(9:1, v/v)溶液 600 μ L 混合均勻，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依 2.7. 節調製空白檢液原液，惟不需加入內部標準溶液。分別量取 400 μ L (a)，加入內部標準溶液 20 μ L 及標準溶液 5~500 μ L，再加入 5 mM 醋酸胺：甲醇(9:1, v/v)溶液使成 1000 μ L (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 0.5~50 ng/mL 之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

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 → 0.5	90 → 90	10 → 10
0.5 → 5.0	90 → 10	10 → 90
5.0 → 10.0	10 → 10	90 → 90
10.0 → 10.1	10 → 90	90 → 10
10.1 → 15.0	90 → 90	10 → 10

移動相流速：0.25 mL/min。

注入量：10 μL。

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)：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. 節液相層析串聯質譜條件進行分析，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比^(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(ppb)：

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

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

($\leq 100\%$)，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。

附表、Brombuterol 等 20 項乙型受體素類動物用藥之多重反應偵測模式參數

項次	分析物	定量離子對			定性離子對			內部標準品 ^(註)
		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	
1	brombuterol	367 > 293	25	18	367 > 212	25	27	clenbuterol-d ₉
2	cimaterol	220 > 202	15	10	220 > 160	15	15	cimaterol-d ₇
3	cimbuterol	234 > 160	16	18	234 > 216	16	11	clenbuterol-d ₉
4	clenbuterol	277 > 203	20	20	277 > 259	20	10	clenbuterol-d ₉
5	clencyclohexerol	319 > 301	22	13	319 > 168	22	32	ractopamine-d ₆
6	clenisopenterol	291 > 188	13	23	291 > 273	13	12	ractopamine-d ₆
7	clenpenterol	291 > 203	16	21	291 > 132	16	35	clenbuterol-d ₉
8	clenproperol	263 > 245	15	12	263 > 203	15	18	clenbuterol-d ₉
9	fenoterol	304 > 107	25	29	304 > 135	25	16	zilpaterol-d ₇
10	formoterol	345 > 149	25	18	345 > 121	25	35	ractopamine-d ₆
11	isoxsuprine	302 > 284	19	14	302 > 107	19	28	clenbuterol-d ₉
12	mabuterol	311 > 237	18	20	311 > 217	18	30	clenbuterol-d ₉

附表、Brombuterol 等 20 項乙型受體素類動物用藥之多重反應偵測模式參數(續)

項次	分析物	定量離子對			定性離子對			內部標準品 ^(註)
		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	
13	mapenterol	325 > 237	24	17	325 > 217	24	27	clenbuterol-d ₉
14	3-o-methyl-colterol	240 > 166	18	16	240 > 121	18	28	terbutaline-d ₉
15	ractopamine	302 > 107	20	20	302 > 284	20	15	ractopamine-d ₆
16	salbutamol	240 > 148	20	15	240 > 222	20	15	salbutamol-d ₉
17	salmeterol	416 > 398	30	14	416 > 380	30	17	salbutamol-d ₉
18	terbutaline	226 > 152	27	16	226 > 125	27	25	terbutaline-d ₉
19	tulobuterol	228 > 154	20	20	228 > 118	20	20	clenbuterol-d ₉
20	zilpaterol	262 > 244	26	13	262 > 185	26	23	zilpaterol-d ₇
I.S.	cimaterol-d ₇	227 > 209	14	12	—	—	—	—
I.S.	clenbuterol-d ₉	286 > 204	20	20	—	—	—	—
I.S.	ractopamine-d ₆	308 > 168	20	15	—	—	—	—
I.S.	salbutamol-d ₉	249 > 149	20	15	—	—	—	—

附表、Brombuterol 等 20 項乙型受體素類動物用藥之多重反應偵測模式參數(續)

項次	分析物	定量離子對			定性離子對			內部標準品 ^(註)
		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	
I.S.	terbutaline-d ₉	235 > 153	26	16	—	—	—	—
I.S.	zilpaterol-d ₇	269 > 251	20	17	—	—	—	—

註：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。