

市售禽畜產品中動物用藥乙型受體素類殘留量調查

林燕萍 李盈霖 黃文正 林聖哲

臺南市政府衛生局

摘要

為因應美牛乙型受體素類（瘦肉精）進口事件風暴，本局為維護市民食的安全，自 100 年 3 月 6 日至 4 月 30 日抽驗轄內市售禽畜產品，包括牛肉 57 件、豬肉 19 件、雞肉 6 件、及鴨肉 1 件，總計 83 件。依據行政院衛生署 100 年 4 月 7 日署授食字第 1001900952 號公告修正「食品中動物用藥殘留量檢驗方法－乙型受體素類（**β-Agonists**）多重殘留分析」，以液相層析串聯質譜儀（liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS）執行 Ractopamine（萊克多巴胺）、Clenbuterol（克侖特羅）、Cimaterol（西馬特羅）、Salbutamol（沙丁胺醇）、Terbutaline（特布他林）、Tulobuterol（妥布特羅）及 Zilpaterol（齊派特羅）7 種乙型受體素類之檢驗，檢驗結果顯示牛肉 3 件及豬肉 1 件檢出 Ractopamine，與規定不符，合格率为 95.2%；該 4 件與規定不符之肉品來源均為由國外進口，已移由本局食品衛生管理科依食品衛生管理法處辦。本檢驗方法是以液相層析串聯質譜儀（LC/MS-MS）分析，MRM (Multiple Reaction Monitoring)模式作為定量，就檢液與對應標準溶液所得波峰之滯留時間及相對離子強度比（Ion Ratio）鑑別之；當檢出含有乙型受體素類時，進一步執行三級離子質譜掃描功能（MS³），掃描特定的二級碎片離子及 MS³ 質譜圖進行確認，並以 MRM³ 模式定量確證，符合歐盟法規(2002/657/EC)之高鑑定點為 5.5 IP，獲得高可信度與準確度之數據品質。本方法實際檢測及品管結果，檢出限量為 0.3 ppb，標準曲線相關係數 r > 0.995，標準曲線查核分析之相對誤差值為± 9%，重複分析之相對差異百分比< 9%，添加分析之回收率為 80-120%，皆符合本局之品管相關規範，顯示該方法進行實驗操作穩定性高。

前言

為因應美牛乙型受體素類（瘦肉精）進口事件風暴，本局自 100 年 3 月 6 日至 4 月 30 日抽驗轄內市售禽畜產品，進行乙型受體素類之檢驗，避免市民對食品安全事件恐慌，並維護市民食的安全。

乙型受體素（β-Agonists），是一種營養興奮劑，係為腎上腺素乙型受體作用劑（β-adrenergic agoniat），具有擬交感神經活性之分子，構造類似腎上腺素及正腎上腺之苯乙醇胺衍生物。一般用於治療人或動物之支氣管疾病，例如 clenbuterol、terbutaline 及 salbutamol 在我國皆為核准的人用藥品。另 ractopamine 在國內外皆未供人使用，而是做為飼料添加物，能使動物體內營養成分由脂肪組織轉移為肌肉組織，稱為再分配效應(repartitioningeffects)，使體內之脂肪分解代謝增強，可增加蛋白質合成，顯著提高瘦肉率、飼料轉換率及增重，故又俗稱瘦肉精^{（1）（2）（3）}。

本次實驗進行 Ractopamine（萊克多巴胺）、Clenbuterol（克侖特羅）、Cimaterol（西馬特羅）、Salbutamol（沙丁胺醇）、Terbutaline（特布他林）、Tulobuterol（妥布特羅）及 Zilpaterol（齊派特羅）等 7 類乙型受體素檢驗之調查，以瞭解市售禽畜產品是否有乙型受體素之不法殘留情形，以維護消費者食的安全。

材料與方法

一、檢體來源

自 100 年 3 月 6 日至 4 月 30 日抽驗轄內市售禽畜產品，包括牛肉 57 件、豬肉 19 件、雞肉 6 件、及鴨肉 1 件，總計 83 件（表一）。

種類	牛肉	豬肉	雞肉	鴨肉	合計
件数	57	19	6	1	83

二、試藥

（一）標準品： clenbuterol hydrochloride、Cimaterol、ractopamine hydrochloride、salbutamol、terbutaline hemisulfate、tulobuterol、zilpaterol，標準品級。

- Ractopamine（萊克多巴胺）：分子式 C18H23NO3，分子量 301.38。
- Clenbuterol（克侖特羅）：分子式 C12H18Cl2N2O，分子量 277.19。
- Cimaterol（西馬特羅）：分子式 C12H17N3O，分子量 219.28。
- Salbutamol（沙丁胺醇）：分子式 C13H21NO3，分子量 239.31。
- Terbutaline（特布他林）：分子式 C12H19NO3，分子量 225.28。
- Tulobuterol（妥布特羅）：分子式 C12H18ClNO，分子量 227.73。
- Zilpaterol（齊派特羅）：分子式 C14H19N3O2，分子量 261.32。

（二）內部標準品： clenbuterol-d₉ hydrochloride、salbutamol-d₆ 或 salbutamol-d₃、terbutaline-d₃、ractopamine- d₆ hydrochloride、zilpaterol-d₇ 及 cimaterol-d₉ 同位素內部標準品。

（三）藥品及溶劑：

- β-葡萄糖醛酸苷酶溶液(含β-glucuronidase 98000 unit/mL 及 sulfatase 2400 unit/mL)。
- 甲醇、乙腈：採用液相層析級。
- 醋酸鈉：採用試藥特級。
- 1N 氫氧化鈉：採用試藥特級。
- 醋酸：採用試藥特級。
- 5M 醋酸銨：採用分子生物級。

三、器具及材料

- pH 測定儀(pH meter)。
- 離心機：轉速可達 4000 rpm 者。
- 均質機(Homogenizer)。
- 水浴槽(Water bath)。
- 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
- 定量瓶：5 mL、10 mL、50 mL、1000 mL。
- 離心管：離心管：50 mL、15 mL BD 管。
- 試管震盪器 (Vortex)。
- 固相萃取匣(Solid phase extraction cartridge)： Oasis HLB, 200mg, 6 mL，或同級品。

四、試劑之配製

- 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 為 5.2±0.1，再加去離子水使成 1000 mL。
- 7mM 醋酸銨溶液：取 1.4 mL 5M 醋酸銨加去離子水使成 1000mL。
- 甲醇：7mM 醋酸銨（8：2）：取 400 mL 甲醇加 100 mL7mM 醋酸銨溶液，混合均勻。

（四）移動相

- 5mM 醋酸銨/水：取 1000 mL 去離子水加 1 mL 5M 醋酸銨，混合均勻。
- 5mM 醋酸銨/甲醇：取 1000 mL 甲醇加 1 mL 5M 醋酸銨，混合均勻。

五、儀器設備

液相層析串聯質譜儀： AB SCIEX 5500 Q TRAP[®] LC/MS/MS System。

六、標準品溶液之配製

（一）內部標準溶液：取相當於含 clenbuterol-d₉ hydrochloride、salbutamol-d₆ 或 salbutamol-d₃、terbutaline- d₃、ractopamine- d₆ hydrochloride、zilpaterol-d₇ 及 cimaterol- d₉ 各約 0.5 mg 之同位素內部標準品，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至 5 mL，作為內部標準原液。使用時，分別取適量內部標準原液混合後，以甲醇： 7 mM 醋酸銨(8:2, v/v)溶液稀釋至 100ng/mL，作為內部標準溶液。

（二）混合標準原液：取相當於含 clenbuterol、salbutamol、terbutaline、ractopamine、zilpaterol、cimaterol 及 tulobuterol 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（100μg/mL）。量取各標準原液各 1 mL，共置於 10 mL 容量瓶中，以甲醇定容，作為混合標準原液（10μg/mL）。

七、檢驗方法

依據行政院衛生署 100 年 4 月 7 日署授食字第 1001900952 號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^{（4）}。

（一）檢體之前處理

- 萃取：將檢體細切，以均質機均質後，取檢體約 5 g，精確稱定，置於離心管中，加入 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL，震盪 10 分鐘，再加入內部標準溶液及β-葡萄糖醛酸苷酶溶液各 100 μL，混合均勻，置於 37℃水浴中水解 1 小時。於 4000 rpm 離心 10 分鐘，收集上清液，離心管中之沈澱物再加入 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL，振盪萃取 10 分鐘，於 4000 rpm 離心 10 分鐘。合併上清液，以 1 N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值為 7.0，再於 4000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液供淨化用。
- 淨化：取萃取後供淨化用之溶液，注入預先以甲醇 3 mL 及去離子水 3 mL 潤洗之固相萃取匣，以去離子水 4 mL 清洗固相萃取匣，

棄流出液。以甲醇 4 mL 沖提，收集沖提液，於 65℃以氮氣吹乾，殘留物加甲醇： 7 mM 醋酸銨(8:2, v/v)溶液 1 mL，以旋渦混合器振盪溶解，經 0.2μm 濾膜過濾後，供作檢液。

（二）標準曲線製作

取混合標準原液及內部標準溶液，以甲醇： 7mM 醋酸銨(8:2, v/v)溶液稀釋，濃度範圍介於 1~50ng/mL（含內部標準品濃度 10 ng/mL）。

（三）液相層析儀串聯質譜儀（LC/MS/MS）條件

本實驗室使用之 LC-MS/MS 儀器之型號為 AB SCIEX 5500 Q TRAP^R LC-MS/MS System 三段四極桿/線性離子阱質譜儀，備有 ElectroSpray Ionization (ESI)及 Atmospheric Pressure Chemical Ionization(APCI)兩種離子源，並搭配 DIONEX series HPLC。

1.高效能液相層析儀（HPLC）條件

分析管柱（Column）： Agilent ZORBAX SB-C18，5μm，4.6×150mm；或同等級。

分析管柱溫度（Column Oven Temperature）： 35℃

移動相流速（Flow rate）： 1.0mL/min

樣品注射量（Injection volume）： 10μL

移動相： 5mM 醋酸銨/水（A 液）

5mM 醋酸銨/甲醇（B 液）

移動相梯度（LC Pump Gradient）：

時間（min）	A 液（％）	B 液（％）
0	95	5
0.5	95	5
3	60	40
7.5	30	70
8.5	5	95
9	5	95
9.5	95	5
15	95	5

2.串聯式質譜儀（MS/MS）條件

離子源（Ion Source）：電灑法（ESI）

氣簾氣體（Curtain Gas；CUR）： 20

碰撞氣體（Collision Gas；CAD）： High

電灑電壓（Ion Spray Voltage；IS）： 5500

加熱溫度（Temperature；TEM）： 650

霧化氣體（Nebulizing Gas；GS1）： 65

加熱氣體（Heated Gas；GS2）： 65

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)

離子對（MRM）、真空介面板電壓（DP）、碰撞能量電壓（CE）、入口電壓（EP）、碰撞室初端電壓（CXP）：

分析物	離子對	DP	CE	EP	CXP
clenbuterol	277/203	90	23	10	10
	277/259	90	15		
	226/152	80	23		
terbutaline	226/125	80	30	10	10
salbutamol	240/148	80	25	10	10
	240/222	80	15		
ractopamine	302/164	56	23	10	10
	302/107	56	39		
zilpaterol	262/185	55	33	10	10
	262/244	55	15		
cimaterol	220/202	50	15		
	220/160	50	25	10	10
tulobuterol	228/154	75	23	10	10
	228/118	75	37		
clenbuterol-d ₉	286/204	80	23	10	10
terbutaline-d ₉	235/152	66	23	10	10
salbutamol-d ₆	246/148	40	26	10	10
salbutamol-d ₉	249/148	56	27	10	10
ractopamine-d ₆	308/168	56	23	10	10
zilpaterol-d ₇	269/185	66	35	10	10
cimaterol- d ₉	227/209	50	15	10	10

（四）鑑別試驗及含量測定

1.定性

滯留時間（Retention time；RT）：±2.5%

判定點數（Identification point；IP）： 4 IP

離子比（Ion Ratio）：由兩組離子對之波峰面積相除而得（≤100%），容許範圍如下：

Relative Intensity（%of base peak）	LC-MS/MS（relative）
> 50	±20
> 20~50	±25
> 10~20	±30
≤10	±50

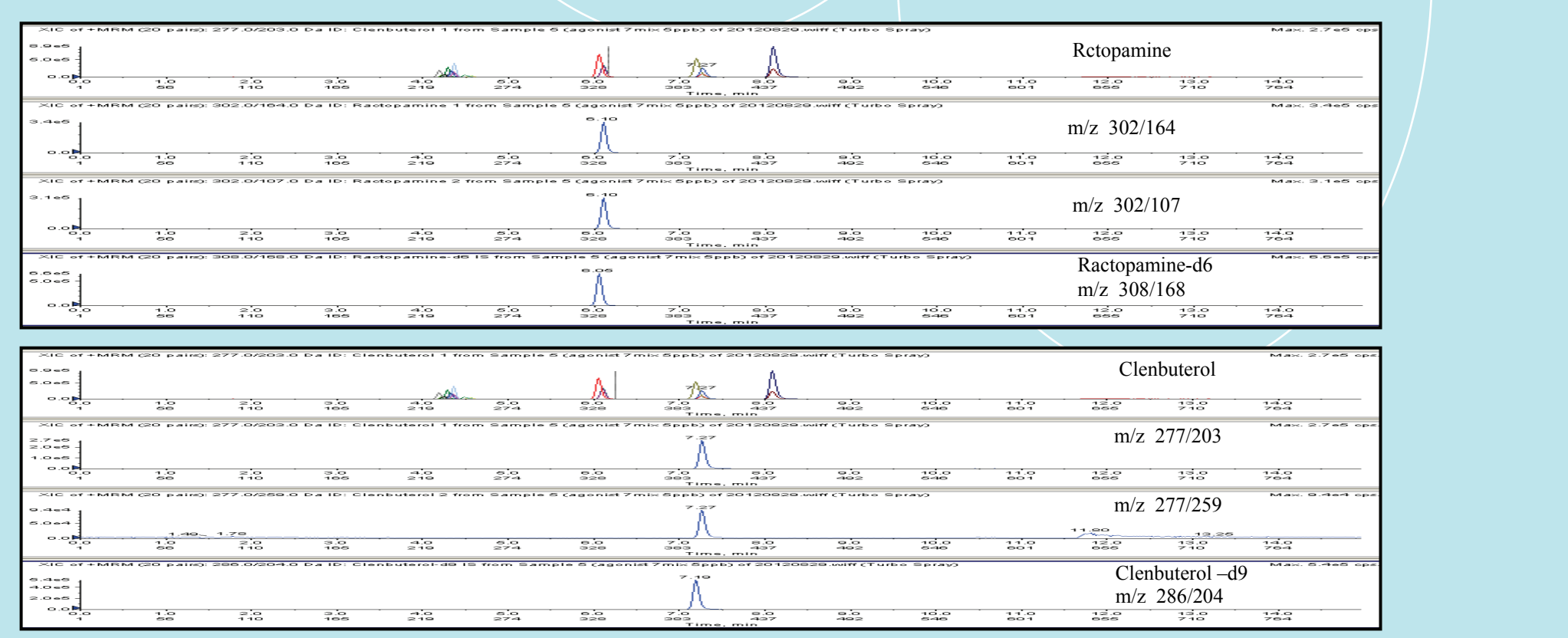
2.定量

以 MRM (Multiple Reaction Monitoring)模式做為定量，就檢液與對應標準溶液所得波峰之滯留時間及相對離子強度比（Ion Ratio）鑑別之；當檢出含乙型受體素時，則進一步執行三級離子質譜掃描功能（MS³），掃描特定的二級碎片離子，獲得 MS³ 質譜圖進行比對，並以 MRM³ 模式定量，藉以提高檢驗結果之可信度及準確度。上述 7 種乙型受體素其離子對層析圖、二級離子質譜圖（MS²）及三級離子質譜圖（MS³）分別如圖一、圖二及圖三所示。

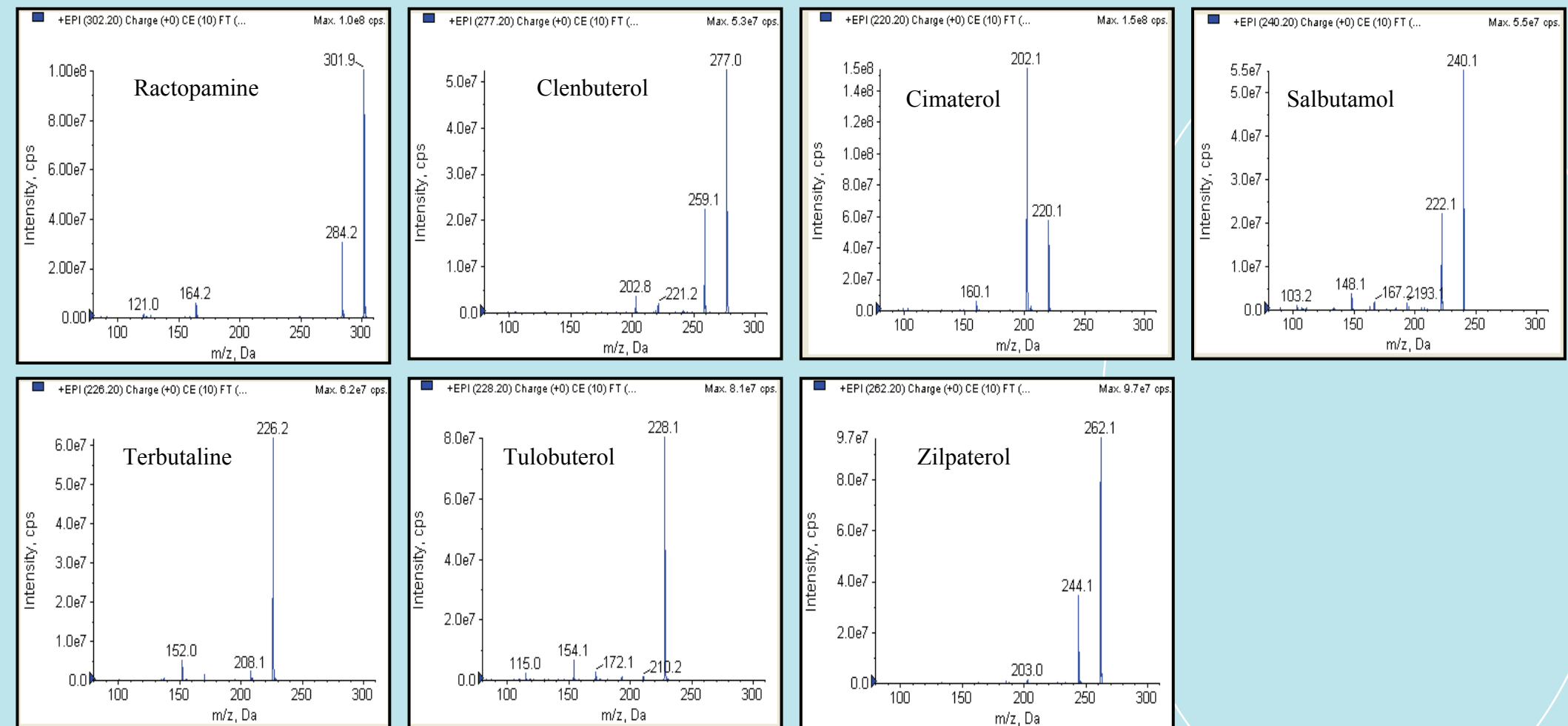
結果與討論

本實驗方法係以液相層析串聯質譜儀（LC/MS-MS）執行對 Ractopamine（萊克多巴胺）、Clenbuterol（克侖特羅）、Cimaterol（西馬特羅）、Salbutamol（沙丁胺醇）、Terbutaline（特布他林）、Tulobuterol（妥布特羅）及 Zilpaterol（齊派特羅）7 種乙型受體素類之檢驗，當檢出含有乙型受體素時，則進一步執行三級離子質譜掃描功能（MS³），掃描特定的二級碎片離子，獲得 MS³ 質譜圖進行比對，並以 MRM³ 模式定量，藉以提高檢驗結果之可信度及準確度。上述 7 種乙型受體素其離子對層析圖、二級離子質譜圖（MS²）及三級離子質譜圖（MS³）分別如圖一、圖二及圖三所示。

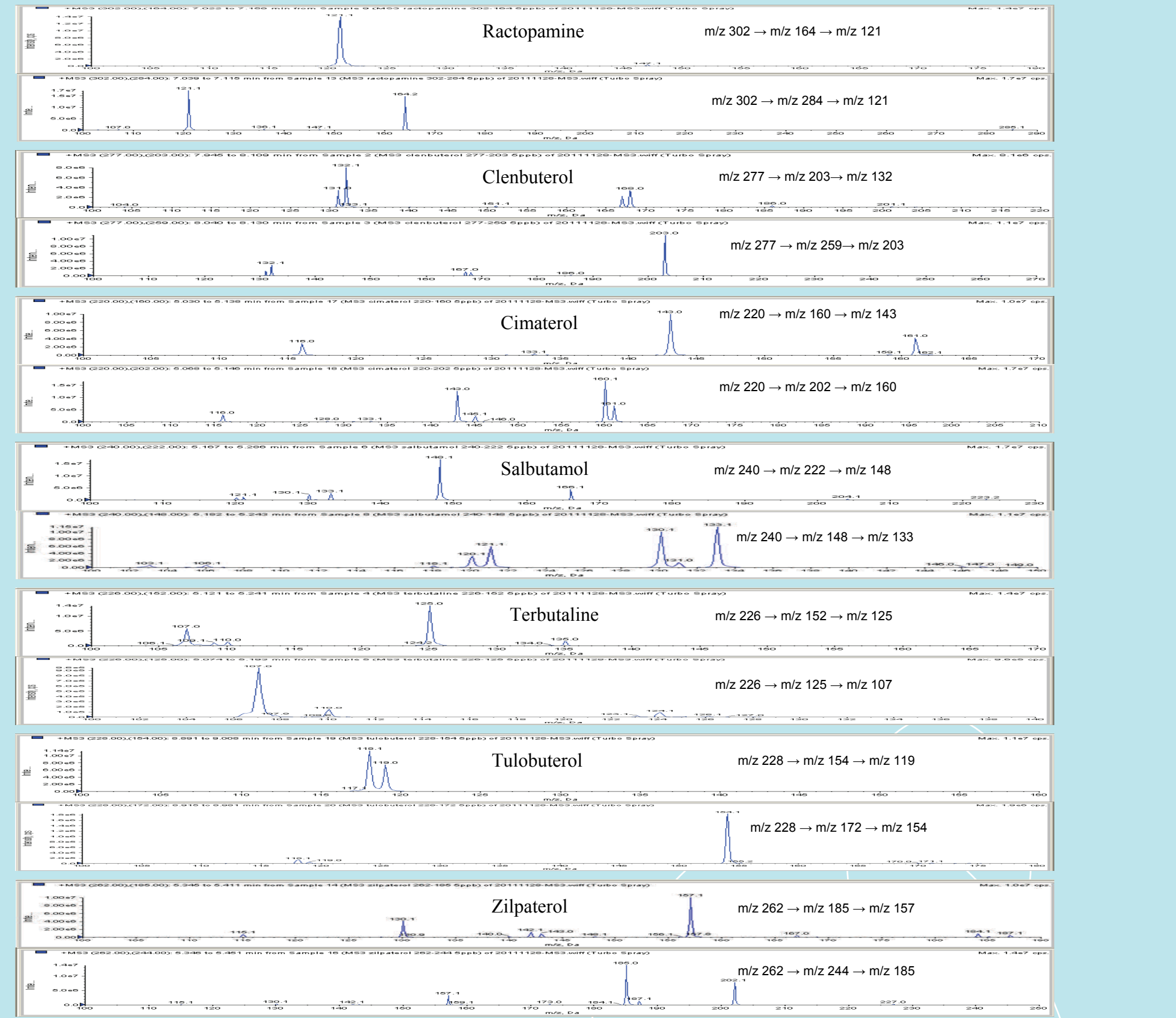
圖一、7 種乙型受體素離子對層析圖



圖二、7 種乙型受體素二級離子質譜圖（MS²）

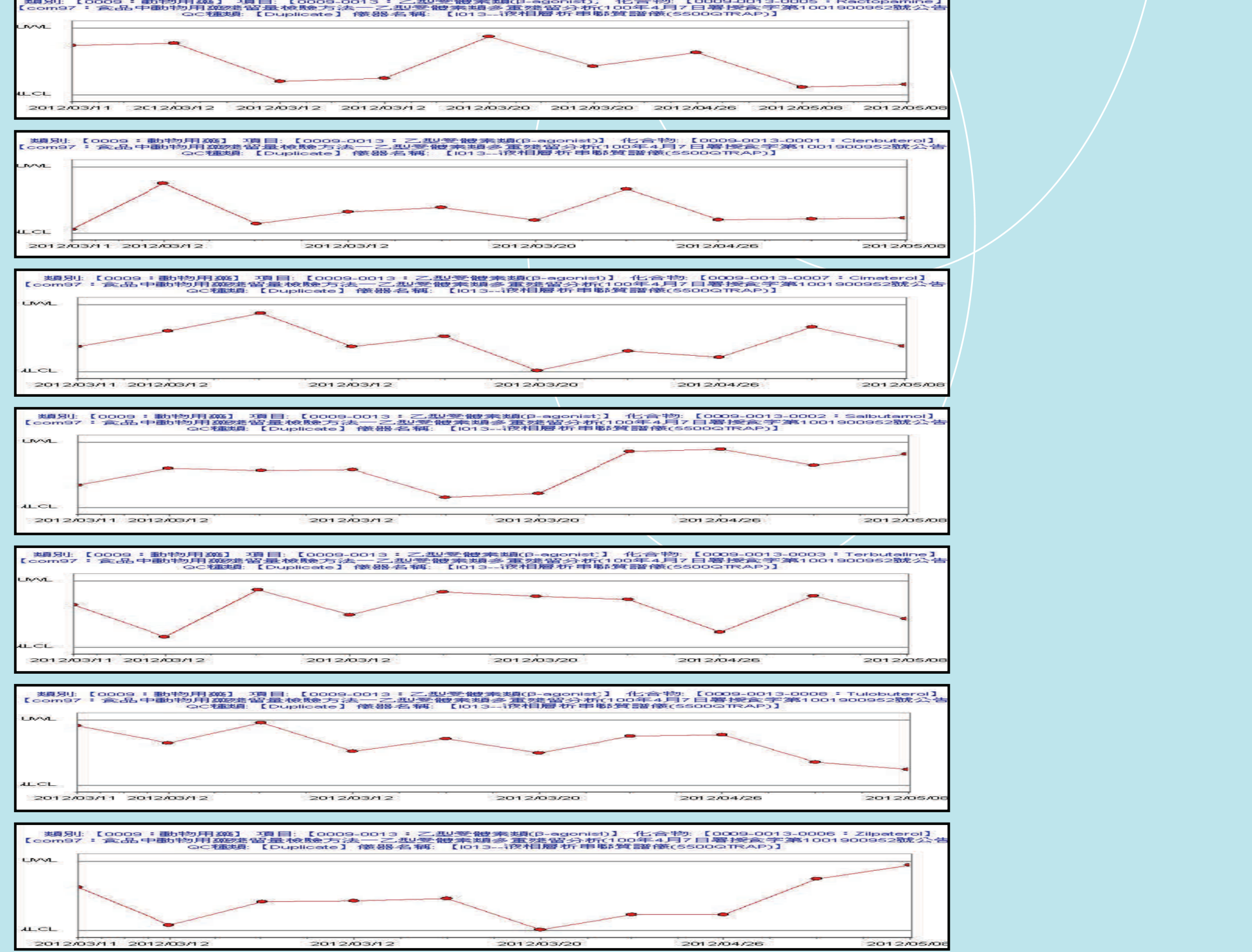


圖三、7 種乙型受體素三級離子質譜圖（MS³）

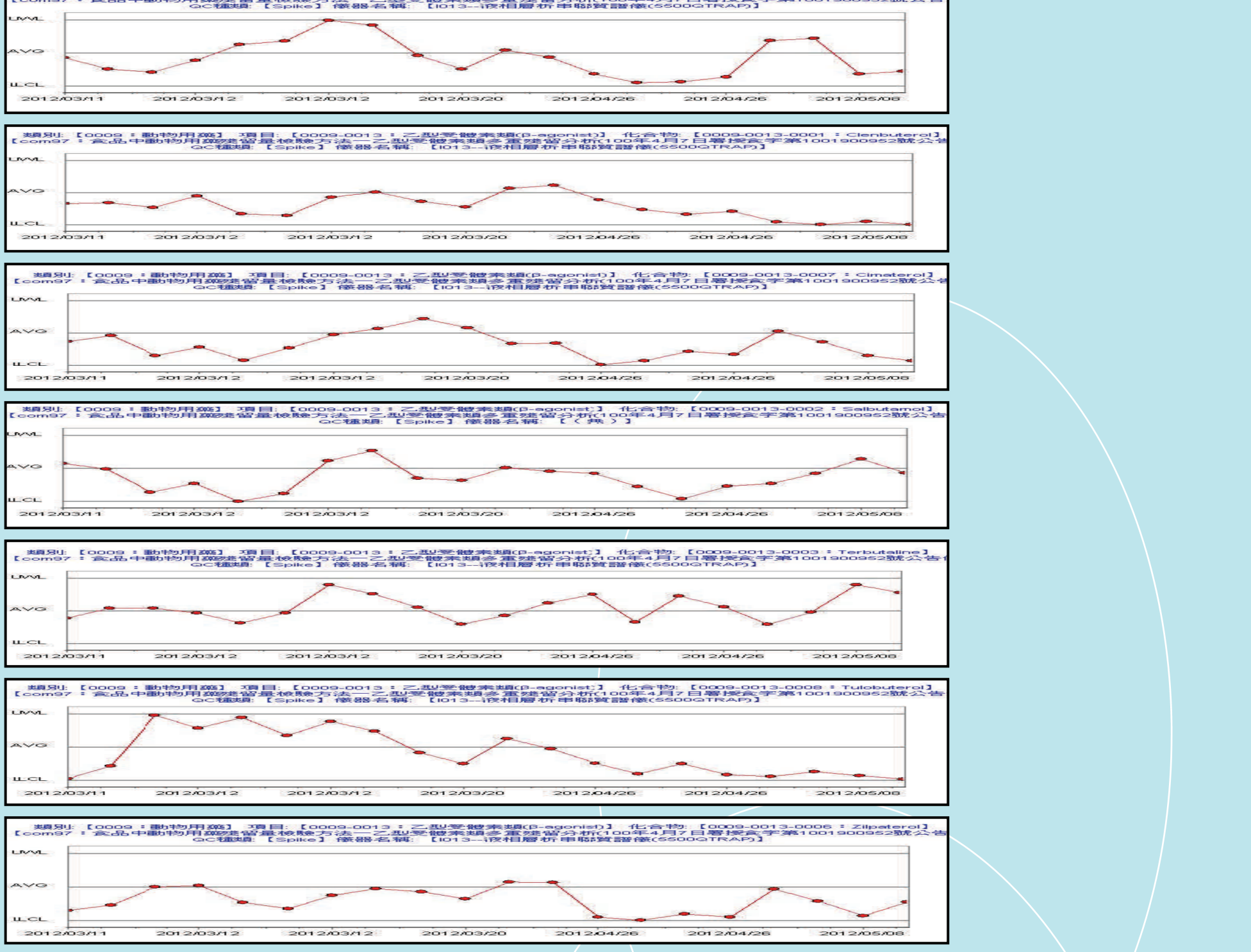


本方法實際檢測及品質管制結果，檢出限量為 0.3 ppb，準曲線相關係數 r > 0.995，標準曲線查核分析之相對誤差值為± 9%，重複分析之相對差異百分比< 9%（圖四），添加分析之回收率為 80-120%（圖五），皆符合本局之品管相關規範，顯示該方法進行實驗操作穩定性高。

圖四 重複分析之相對差異百分比



圖五 添加分析之回收率



本次調查結果顯示，抽驗件数包括牛肉 57 件、豬肉 19 件、雞肉 6 件及鴨肉 1 件，總計 83 件；檢出牛肉 3 件及豬肉 1 件含有 Ractopamine，與規定不符，合格率为 95.2%（表二）；該 4 件與規定不符之肉品來源均為由國外進口，已移由本局食品衛生管理科依食品衛生管理法處辦。

	牛肉	豬肉	雞肉	鴨肉	總計
抽驗件数	57	19	6	1	83
合格件数	54	18	6	1	79
不合格件数	3	1	0	0	4
合格率（％）	94.7	94.7	100	100	95.2
不合格率（％）	5.3	5.3	0	0	4.8

致謝

美牛乙型受體素類（瘦肉精）進口事件風暴期間，承蒙本局檢驗科全體同仁的支持與協助，致使本實驗順利達成，特此致謝。

參考資料

- 李偉瑋、謝綺文、周珮如、古遠丰、蘇淑珠、施嘉志。2009。市售禽畜產品中動物用藥乙型受體素類（β-Agonists）殘留量調查。行政院衛生署食品藥物管理局研究年報，27：188-196。
- 曾素香、周珮如、陳素燕、蘇淑珠、周蓁蓁。2007。市售禽畜產品中動物用藥乙型受體素類（β-Agonists）殘留量調查。行政院衛生署食品藥物管理局研究年報，25：255-260。
- 行政院衛生署食品藥物管理局網站。http://www.fda.gov.tw/gradation.aspx?site_Content_sn =221。
- 行政院衛生署。2011。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。100 年 4 月 7 日署授食字第 1001900952 號公告修正。