

市售禽畜產品中動物用藥乙型受體素類殘留量調查

賴羿君 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 104 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。依據衛生福利部食品藥物管理署 102 年 12 月 10 日部授食字第 1021951106 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（克倫特羅）、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，合格率為 95.2%；該 4 件與規定不符之肉品來源均為由國外進口，已移由本局食品藥物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。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 $\pm 9\%$ ，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 agonist），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 (repartitioning effects)，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（克倫特羅）、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 104 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）。

表一、檢體種類及件數

種類	牛肉	豬肉	雞肉	鴨肉	合計
件數	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。
- (二) 內部標準品：clenbuterol-d₉ hydrochloride、salbutamol-d₆ 或 salbutamol-d₉、terbutaline-d₉、ractopamine-d₆ hydrochloride、zilpaterol-d₇ 及 cimaterol-d₉ 同位素內部標準品。
- (三) 藥品及溶劑：
 1. β-葡萄糖醛酸苷酶溶液(含 β-glucuronidase 98000 unit/mL 及 sulfatase 2400 unit/mL)。
 2. 甲醇、乙腈：採用液相層析級。
 3. 醋酸鈉：採用試藥特級。
 4. 1N 氫氧化鈉：採用試藥特級。
 5. 醋酸：採用試藥特級。
 6. 5M 醋酸銨：採用分子生物級。

三、器具及材料

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

四、試劑之配製

- (一) 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。
- (二) 7mM 醋酸銨溶液：取 1.4 mL 5M 醋酸銨加去離子水使成 1000mL。
- (三) 甲醇：7mM 醋酸銨（8：2）：取 400 mL 甲醇加 100 mL 7mM 醋酸銨溶液，混合均勻。
- (四) 移動相
 1. 5mM 醋酸銨/水：取 1000 mL 去離子水加 1 mL 5M 醋酸銨，混合均勻。

2. 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^R 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-d₉、terbutaline- d₉、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，精確稱重，分別以甲醇溶解並定容至 50 mL，作為標準原液 (100μg/mL)；取各標準原液各 1 mL，共置於 10 mL 定容量瓶中，以甲醇定容，作為混合標準原液 (10μg/mL)。

七、檢驗方法

依據衛生福利部食品藥物管理署 102 年 12 月 10 日部授食字第 1021951106 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」。

(一) 檢體之前處理

1. 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°C 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。

2. 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°C 以氮氣吹乾，殘留物加甲醇：7 mM 醋酸銨(8:2, v/v)溶液 1 mL，以試管震盪器振盪溶解，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：7 mM 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) 品質管制分析：每批次檢體(少於 20 個檢體)於分析乙型受體素時，分別作空白分析、重複分析及添加分析。

(四) 液相層析儀串聯質譜儀 (LC/MS/MS) 條件

本實驗室儀器之型號為 AB SCIEX 5500 Q TRAP^R LC-MS/MS System。

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

分析管柱溫度 (Column Oven Temperature)：35°C

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		
terbutaline	226/152	80	23	10	10
	226/125	80	30		
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	10	10
	220/160	50	25		
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) : $\pm 2.5\%$

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 ($\pm 100\%$)，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 (MS^3)，掃描特定的二級碎片離子，獲得 MS^3 質譜圖進行比對，並以 MRM³ 模式定量，依下列計算式求出檢體中各乙型受體素之含量 (ppb)：

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

C：由標準曲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)

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 (克倫特羅)、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 (MS^3)，掃描特定的二級碎片離子，獲得 MS^3 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。

品質管制分析結果，方法檢出限量為 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 $\pm 9\%$ ，空白分析低於方法檢出限量 0.3 ppb 以下，重複分析之相對差異百分比 $< 9\%$ ，添加分析之回收率為 80-120%，皆符合本局之品質管制分析相關規範，顯示該方法進行實驗操作穩定性高。

本次調查結果顯示，抽驗件數包括牛肉 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%，不合格率 4.8% (表二)；該 4 件與規定不符之肉品來源均為由國外進口，已移由本局食品藥物管理科依食品衛生管理法處辦。

表二 乙型受體素檢出件數分析表

	牛肉	豬肉	雞肉	鴨肉	總計
抽驗件數	57	19	6	1	83
合格件數	54	18	6	1	79
不合格件數	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

參考資料

- 1.李偉堃、謝綺文、周珮如、古遠丰、蘇淑珠、施养志。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。衛生福利部食品藥物管理署研究年報，27：188-196。
- 2.曾素香、周珮如、陈素燕、蘇淑珠、周薰修。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。衛生福利部食品藥物管理署研究年報，25：255-260。
- 3.衛生福利部食品藥物管理署網站。http://www.fda.gov.tw/gradation.aspx?site_Content_sn=221。