

液相層析串聯式質譜儀檢測牛乳中抗生素化合物⁽¹⁾

鄧名志⁽²⁾⁽³⁾ 林委誼⁽²⁾ 李免蓮⁽²⁾

收件日期：97年3月25日；接受日期：97年5月6日

摘要

本研究係以具選擇性及靈敏度之高效率液相層析串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) 搭配固相萃取 (SPE) 與液-液萃取 (LLE) 技術，建立牛乳中四環黴素類 (TCs含TC、CTC及OTC)、氯黴素類 (CAPs 含 CAP、TAP 及 FF) 及青黴素類 (PENs 含 AMOX、AMPI、PEN G、CLOX及OXA) 殘留量監測分析方法。使用三段式四極棒質譜儀搭配渦輪噴灑離子源在陽離子模式下偵測 TCs 及 PENs，陰離子模式下偵測 CAPs。TCs 之方法偵測極限 (MDL) 為 1.33~2.73 ng/mL，CAPs 之 MDL 為 0.048~0.07 ng/mL，PENs 之 MDL 為 0.90~1.86 ng/mL。於允許最大殘留量濃度下，TCs 回收率82.04~87.68%，變異係數 (CV) 2.15~4.53%；TAP及FF回收率 68.66~85.10%，CV 8.77~10.58%；PENs 回收率 59.14~76.51%，CV 10.11~11.43%。於 0.3 ng/mL 濃度下，CAP 回收率 109.9%，CV 5.89%。本方法可應用於牛乳中 TCs、CAPs 及 PENs 等抗生素殘留量分析。

關鍵詞：牛乳、四環黴素、氯黴素、青黴素、高效率液相層析串聯式質譜儀。

緒言

乳牛發生乳房炎等疾病時必須投藥治療，生乳於投藥期間會有藥物或抗生素之殘留，不可為人食用，故酪農戶必須在規定停藥期過後才可再收集生乳。由於用藥種類、投藥方式及生物體間體質差異，偶有發生過了停藥期後仍有藥物反應之現象。牛乳是由酪農戶生產後交由鮮乳製造廠製造，彼此間交易有其既定的規範，目前坊間採用生物試劑之方法 (ELISA Kits) 做為藥物殘留之定性鑑定。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1450號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 通訊作者，E-mail: mcteng@mail.tlri.gov.tw。

四環黴素類 (Tetracyclines, TCs) 抗生素藉由抑制蛋白質合成而產生制菌作用，TCs 對於鈣具有結合作用，因此會影響人類鈣質的吸收，影響骨骼及牙齒成長。我國對於生乳中 TCs 最大允許殘留量 (Maximum residue limit, MRL) 為 100 ppb，四環黴素檢測方法有液相層析-紫外光光譜儀 (LC/UV)、液相層析-螢光光譜儀 (LC/FD)、液相層析-光電二極管 (LC/DAD)、毛細管電泳 (CE)、ELISA、LC/MS 及 LC/MS/MS 等 (Cinquina *et al.*, 2003; Nozal *et al.*, 2004; Pena *et al.*, 1998; Viñas *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005)。行政院衛生署公告之檢測方法 (署授食字第 0939300627 號) 使用之儀器設備為 LC/FD。

氯黴素 (Chloramphenicol, CAP) 為廣效且效價很強的制菌劑，CAP 比 TC 更能迅速地分布於各內臟組織中。CAP 除具療效外亦具有毒性，會抑制血液系統中的骨髓造血機能，導致顆粒細胞缺乏症及再生障礙性貧血。目前歐盟及美國等國家對於農產品氯黴素檢出標準規定中屬「不得檢出」，規定實驗室分析系統最低需求能力極限 (Minimum required performance limit, MRPL) 為 0.3 ppb，而衛生署公告之「食品中動物用藥殘留方法—氯黴素之檢驗」(署授食字第 0949432777 號) 之檢出限量為 1 ppb，中國國家標準 (2005) 「CNS14885 飼料中氯黴素、甲磺氯黴素及氟甲磺氯黴素之檢測方法」之檢出限量為 1 ppm。CAPs 的檢測方法有 LC/UV、ELISA、氣相層析-電子捕捉偵測器 (GC/ECD)、氣相層析-質譜儀 (GC/MS)、氣相層析-串聯式質譜儀 (GC/MS/MS)、LC/MS 及 LC/MS/MS 等 (Posyniak *et al.*, 2002; Shen and Jiang, 2005)。氣相層析檢測方法偵測極限可達 0.1~1.0 ppb，但必須將 CAPs 萃取至高揮發性的有機溶劑，甚至為了使 CAPs 易揮發則必須進行衍生化的步驟，也因此增加檢測複雜性及變異性 (Nagata and Oka, 1996; Shen and Jiang, 2005)。ELISA 具有操作簡便及特異性佳的優點，但僅能處理單一抗生素樣品，無法一次測定多項抗生素。Hormazabal and Yndestad (2001) 利用 LC/MS 分析 CAPs，其定量極限分別為：牛乳及肉類 1 ppb、蛋及蜂蜜 2 ppb、尿液 3 ppb。Gikas *et al.* (2004) 以 LC-ESI-MS/MS 分析海產中 CAPs 含量，其定量極限可達 0.02 ppb。

青黴素類 (Penicillins, PENs) 抗生素可抑制細胞壁的合成而產生殺菌的作用，對於有哮喘、濕疹、枯草熱、蕁麻疹等過敏疾病史及腎功能嚴重損害者應謹慎使用。PENs 的檢測方法有 LC/UV、LC/FD、ELISA、抑菌法、毛細管區帶電泳 (Capillary zone electrophoresis, CZE)、LC/MS 及 LC/MS/MS 等 (Bogialli *et al.*, 2004; Gamba and Dusi, 2003; Heller *et al.*, 2006; Holstege *et al.*, 2002; Metz *et al.*, 2002; Michalska *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004)。Gamba and Dusi (2003) 利用 LC/FD 測定飼料中安默西林 (Amoxicillin, AMOX) 及安比西林 (Ampicillin, AMPI) 含量，於進入管柱前進行螢光衍生化，偵測極限為 3 ppm。Metz *et al.* (2002) 以 LC/UV 偵測五種 PENs，定量極限介於 12~20 ppb 之間。Bogialli *et al.* (2004) 以 LC/MS/MS 測定 AMOX 及 AMPI，其定量極限介於 0.2~3.1 ppb 之間，且無需任何衍生化的步驟。

本試驗擬以 LC/MS/MS 系統建立牛乳中 TCs、CAPs 及 PENs 抗生素含量檢測方法，以檢測牛乳中抗生素殘留量，維護牛乳品質安全。

材料與方法

I. 試驗藥劑

本試驗選定三種 TCs：四環黴素 (Tetracycline, TC)、氯四環黴素 (Chlortetracycline, CTC) 及羥四環黴素 (Oxytetracycline, OTC)；三種 CAPs：氯黴素 (Chloramphenicol, CAP)、氟甲磺氯黴素 (Florfenicol, FF) 及甲磺氯黴素 (Thiamphenicol, TAP)；五種 PENs：安默西林 (Amoxicillin, AMOX)、安比西林 (Ampicillin, AMPI)、盤尼西林 G (Penicillin G, PEN G)、氯噁

西林 (Cloxacillin, CLOX) 及苯唑西林 (Oxacillin, OXA) (圖 1) , 標準品購自 Sigma 公司。氯黴素-D5 (Chloramphenicol-D5, CAP-D5) 100 $\mu\text{g/mL}$ in CH_3CN 作為內標物 (Internal standard, IS) , 購自 Cambridge Isotope Laboratories, Inc.。CTC、OTC、CAP、FF 及 TAP 各精確稱取 10 mg 以甲醇 (CH_3OH) 個別配製成 1000 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) 標準儲備液, TC 精確稱取 5 mg 以 CH_3OH 配製成 500 ppm 標準儲備液, AMOX、PENG、CLOX 及 OXA 各精確稱取 10 mg 以 H_2O 溶解並定量至 10 mL, 配製成 1000 ppm 個別標準儲備液, AMPI 精確稱取 5 mg 以 H_2O 溶解並定量至 10 mL, 儲備液儲存於 4°C 環境下。

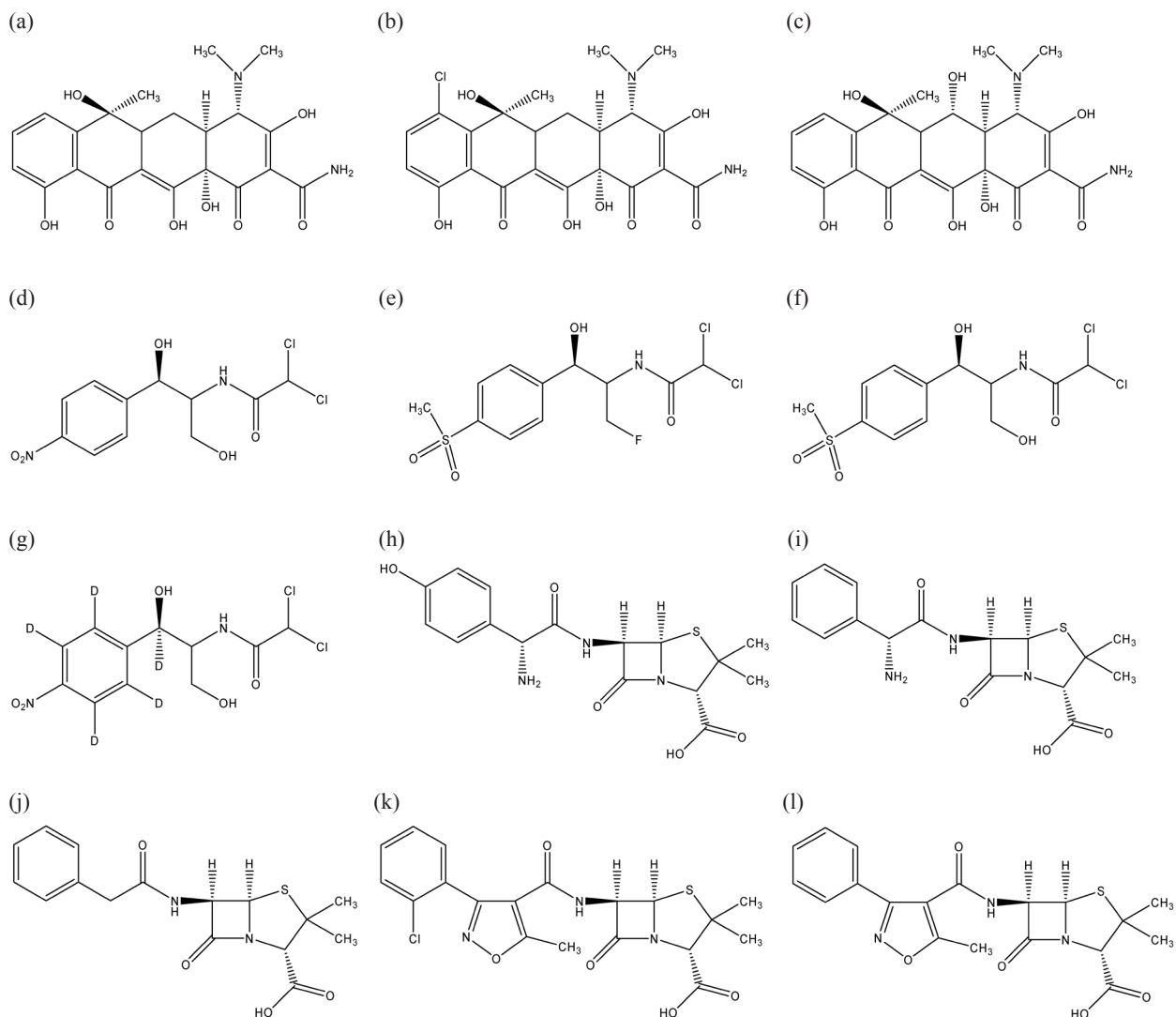


圖 1. 抗生素之化學結構：(a) 四環黴素, (b) 氯四環黴素, (c) 羥四環黴素, (d) 氯黴素, (e) 氟甲磺氯黴素, (f) 甲磺氯黴素, (g) 氯黴素-D5, (h) 安默西林, (i) 安比西林, (j) 盤尼西林 G, (k) 氯噁西林, (l) 苯唑西林。

Fig. 1. Chemical structures of the antibiotics: (a) TC ; (b) CTC ; (c) OTC ; (d) CAP ; (e) FF ; (f) TAP ; (g) CAP-D5 ; (h) AMOX ; (i) AMPI ; (j) PEN G ; (k) CLOX ; (l) OXA.

II. 試劑配製

- (i) 0.1 M 檸檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 溶液配製：取 21 g 檸檬酸，以水溶解，並定量至 1000 mL。
- (ii) 0.2 M 磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4) 溶液配製：取 14.2 g 磷酸氫二鈉，以水溶解，並定量至 500 mL。
- (iii) pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液配製：取 615 mL 0.1 M 檸檬酸溶液及 385 mL 0.2 M 磷酸氫二鈉溶液混合，必要時以兩溶液調整 pH 值。
- (iv) 含 0.01 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液配製：取 3.36 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 以 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液溶解，並定量至 1000 mL。

III. MS/MS分析條件設定

試驗使用 Sciex API 3000 ESI-MS/MS 系統之三段式四極棒質譜儀 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，此儀器包含注射幫浦及渦輪噴灑離子源，離子源溫度設定：TCs 350 °C、CAPs 400 °C 及 PENs 420 °C，氣簾氣體 (Curtain gas) 及碰撞氣體 (Collision gas) 使用高純度氮氣 (99.999%)。多重反應監測 (Multiple reaction monitoring, MRM) 用以測定母離子及碰撞反應後之子離子，以此判讀分析物碰撞反應游離圖譜，提取最佳母、子離子監測模式。

標準品以含 0.1 % 甲酸 (Formic acid, FA) 之 CH_3OH 稀釋成 100 ng/mL (ppb)，使用 1 mL 注射針以注射幫浦 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注入質譜儀離子源，找尋最佳質譜分析參數，以及分析物之母離子、子離子、碰撞能量 (Collision Energy, CE) 及 Collision exit potential (CXP) 參數。

IV. 液相層析儀分析條件設定

液相層析儀之動相 (mobile phase) 推進幫浦為 Agilent 1100 series pump，管柱為 Zorbax SB-C18 column (5 μm , 4.6 \times 150 mm)，管柱使用時溫度維持 30 °C。分析 TCs 及 CAPs 之動相組成：動相 A 為含 0.1% FA 之 H_2O ；動相 B 為含 0.1% FA 之 CH_3OH ，分析之動相梯度於表 1 及表 2。分析 PENs 之動相組成：動相 A 為含 0.05% FA 之 H_2O ；動相 B 為 CH_3OH 。分析之動相梯度於表 3，流速為 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，樣品注射體積為 10 μL 。

表 1. 檢測四環黴素 (Tetracyclines, TCs) 之動相梯度

Table 1. The mobile phase gradient profile for detection of tetracyclines

Time (min)	0	0.5	5.0	11.0	11.1	15.0
Mobile phase A (%)	85	85	0	0	85	85
Mobile phase B (%)	15	15	100	100	15	15

表 2. 檢測氯黴素 (Chloramphenicol, CAPs) 之動相梯度

Table 2. The mobile phase gradient profile for detection of chloramphenicols

Time (min)	0	0.5	2.5	10.0	10.1	13.0
Mobile phase A (%)	70	70	5	5	70	70
Mobile phase B (%)	30	30	95	95	30	30

表 3. 檢測青黴素 (Penicillins, PENs) 之動相梯度

Table 3. The mobile phase gradient profile for detection of penicillins

Time (min)	0	0.2	0.5	1.5	2.0	9.0	9.1	13.0
Mobile phase A (%)	85	85	50	50	5	5	85	85
Mobile phase B (%)	15	15	50	50	95	95	15	15

V. 檢量線配製

將 100 ppm TCs 混合儲備液以 50% CH₃OH 配製至所需檢量線濃度：15、30、60、120、200 ppb。將 100 ppm TAP 及 FF 混合儲備液及 100 ppm CAP 標準儲備液以 50% CH₃OH 配製至所需檢量線濃度：CAP：0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 ppb；TAP 及 FF：2、4、8、16、20 ppb，並添加 1 ppb CAP-D5 作為內標物。將 1000 ppm PENs 個別標準儲備液以 H₂O 配製至所需檢量線濃度：AMOX、AMPI 及 CLOX：1、2、4、8、16 ppb；PENG：0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 ppb；OXA：3、6、12、24、48 ppb。

VI. 樣品前處理

(i) TCs 檢測之前處理步驟

取 2 mL 牛乳至 50 mL 離心管，加 3 mL 0.01 M Na₂-EDTA 之 pH4.0 MacIlvaine 緩衝溶液混合 1 分鐘，超音波震盪 10 分鐘，再搖晃震盪 10 分鐘後，全部置入已活化 SPE 管柱（選購自沃特斯 (Waters Co.) 製造之 Oasis[®] HLB 3 cc / 60 mg），SPE 活化方式：先以 3 mL CH₃OH 流洗管柱，再以 2 mL H₂O 流洗，最後以 2 mL 0.01M Na₂-EDTA 之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液流洗管柱。萃取液置入 SPE 後，以 2 mL 10% CH₃OH 流洗，最後加入 5 mL CH₃OH 沖提收集。沖提液濃縮至乾後，以 2 mL 50% CH₃OH 回溶，經 0.2 μm Nylon 濾膜過濾後上機分析。

(ii) CAPs 檢測之前處理步驟

取 2 mL 牛乳至 10 mL 離心管，加 0.8 mL 含 0.1% FA 之 H₂O 及 5 mL 乙酸乙酯 (EA)，混合 1 分鐘，超音波震盪 10 min 萃取，3000 rpm (1500×g) 離心 10 min，取上澄液。加 5 mL EA 於殘留物中，重複萃取步驟，3000 rpm (1500×g) 離心 10 min，取上澄液。二萃取液收集合併，45°C 吹氮至乾，以 2 mL 30% CH₃OH 回溶，經 0.2 μm PVDF 濾膜過濾後上機分析。

(iii) PENs 檢測之前處理步驟

取 1 mL 牛乳至 10 mL 離心管，加 1 mL H₂O 混合，超音波震盪 10 min 萃取。置入已活化 SPE 管柱 (Oasis[®] HLB 3 cc / 60 mg)，以 1 mL H₂O 洗離心管並置入 SPE 管。以 1 mL H₂O 流洗，1 mL CH₃OH 沖提收集。50°C 下減壓抽乾，以 1 mL H₂O 回溶，經 0.2 μm PVDF 濾膜過濾後上機分析。

VII. 樣品前處理回收率測定

依據歐盟執委會會議規章規定，A 組物質須於 1×MRPL、1.5×MRPL 及 2×MRPL 三種濃度執行回收率測定，B 組物質須於 0.5×MRL、1×MRL 及 1.5×MRL 三種濃度執行回收率測定。CAP 屬 A 組物質，其餘抗生素屬 B 組物質。國內未針對牛乳中 TAP 及 FF 規定允許最大殘留量，因此依據日本厚生勞動省規定未設定殘留基準以統一基準 (10 ppb) 為依據。TC、CTC 及 OTC 以 50、100 及 150 ppb 三種濃度，TAP、FF、AMPI、AMOX 及 CLOX 以 5、10 及 15 ppb 三種濃

度，PENG 以 2、4 及 6 ppb 三種濃度，OXA 以 15、30 及 45 ppb 三種濃度，CAP 以 0.3、0.45 及 0.6 ppb 三種濃度，測定牛乳中抗生素前處理回收率。

結果與討論

I. 分析物於質譜儀之母離子、子離子與參數測定

本研究使用之 MS/MS 為三段式四極棒質譜儀，TCs 及 PENs 以陽離子 $[M+H]^+$ 模式，而 CAPs 以陰離子 $[M-H]^-$ 模式偵測，選定所欲分析之母離子後進行撞擊，使母離子產生碎裂形成許多子離子，使用 MRM 偵測分析物，並藉由調整 CE 及 CXP 參數得到最佳子離子的偵測強度及最佳母離子與子離子之偵測強度比例 (表 4)。

表 4. 檢測四環黴素類、氯黴素類及青黴素類抗生素之質譜儀參數及狀態

Table 4. The parameters and conditions of mass spectrometry for detecting the tetracycline, chloramphenicol and penicillin antibiotics

Antibiotics	Precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Collision exit potential (V)
Tetracycline (TC)	445 $[M+H]^+$	410 $[M+H-NH_3-H_2O]^+$	27	11
		427 $[M+H-H_2O]^+$	19	13
Chlortetracycline (CTC)	479 $[M+H]^+$	444 $[M+H-NH_3-H_2O]^+$	30	12
		462 $[M+H-NH_3]^+$	24	13
Oxytetracycline (OTC)	461 $[M+H]^+$	426 $[M+H-NH_3-H_2O]^+$	28	12
		443 $[M+H-H_2O]^+$	18	13
Chloramphenicol (CAP)	321 $[M-H]^-$	152 $[M-H-C_4H_6Cl_2NO_2]^-$	23	8
		257 $[M-H-NO_2-H_2O]^-$	15	7
		194 $[M-H-C_2H_4Cl_2NO]^-$	17	4
Thiamphenicol (TAP)	354 $[M-H]^-$	185 $[M-H-C_4H_6Cl_2NO_2]^-$	29	11
		227 $[M-H-C_2H_4Cl_2NO]^-$	18	5
Florfenicol (FF)	356 $[M-H]^-$	336 $[M-H-HF]^-$	13	10
		185 $[M-H-C_4H_5Cl_2FNO]^-$	24	4
Chloramphenicol-D5	326 $[M-H]^-$	157 $[M-H-C_4H_6Cl_2NO_2]^-$	23	8
Amoxicillin (AMOX)	366 $[M+H]^+$	349 $[M+H-NH_3]^+$	13	10
		208 $[M+H-C_6H_8NO_2S]^+$	19	14
Ampicillin (AMPI)	350 $[M+H]^+$	106 $[M+H-C_9H_{12}N_2O_4S]^+$	25	6
		192 $[M+H-C_6H_8NO_2S]^+$	22	13
Penicillin G (PEN G)	335 $[M+H]^+$	160 $[M+H-C_{10}H_9NO_2]^+$	15	10
		176 $[M+H-C_6H_9NO_2S]^+$	17	15
Cloxacillin (CLOX)	436 $[M+H]^+$	160 $[M+H-C_{13}H_9ClN_2O_3]^+$	17	10
		277 $[M+H-C_6H_9NO_2S]^+$	18	7
Oxacillin (OXA)	402 $[M+H]^+$	160 $[M+H-C_{13}H_{10}N_2O_3]^+$	17	10
		243 $[M+H-C_6H_9NO_2S]^+$	18	22

依據歐盟執委會會議規章 2002/657/EC 規定「質譜儀檢測方法所需識別點數 (Identification point, IP)」, A 組物質 (不可使用的藥物) 的確認需要最少 4 個 IP, B 組物質 (可使用的藥物) 的確認需要最少 3 個 IP。CAP 於歐盟執委會會議規章 96/23/EC 規定屬於 A 組物質, 因此選擇 1 個母離子搭配 3 個子離子, 並以 CAP-D5 為內標物, 其餘 10 種抗生素選擇 1 個母離子搭配 2 個子離子 (表 4)。

II. LC/MS/MS 對抗生素之分析效能

本研究以逆相 (reverse phase) 色層分析法分離抗生素, 依據分析物極性與化學結構不同, 分別於不同時間離開 LC 系統進入質譜儀偵測。動相中添加 0.1% FA 有利於分析物之離子化, 以增強偵測訊號。而 Becker *et al.* (2004) 提出 PENs 於 LC/MS/MS 偵測時, 動相中高濃度 FA 會降低 PENs 偵測訊號, 因此本試驗針對 PENs 檢測部分, 動相組成之 H₂O 中 FA 含量減少至 0.05%, CH₃OH 不添加 FA, 提高偵測訊號。

針對各類別之抗生素, 進行 LC/MS/MS 之偵測極限 (LOD) 與定量極限 (LOQ) 之測定分析結果如表 5, TCs 之 LOD 範圍為 0.1~0.3 ng/mL, LOQ 範圍為 1.0~2.0 ng/mL, CAPs 之 LOD 範圍為 1 pg/mL~0.05 ng/mL, LOQ 範圍為 0.01~0.2 ng/mL, PENs 之 LOD 範圍為 0.19~0.41 ng/mL, LOQ 範圍為 0.62~1.38 ng/mL。

表 5. 抗生素於 LC/MS/MS 偵測極限 (S/N = 3) 與定量極限 (S/N = 10)

Table 5. The limit of determination (LOD, S/N=3) and limit of quantitation (LOQ, S/N=10) of antibiotics detected by LC/MS/MS

Groups	Antibiotics	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
TCs	Tetracycline (TC)	0.30	2.0
	Chlortetracycline (CTC)	0.30	2.0
	Oxytetracycline (OTC)	0.10	1.0
CAPs	Chloramphenicol (CAP)	0.001 (1 pg/mL)	0.01
	Thiamphenicol (TAP)	0.05	0.20
	Florfenicol (FF)	0.01	0.02
PENs	Amoxicillin (AMOX)	0.28	0.94
	Ampicillin (AMPI)	0.19	0.62
	Penicillin G (PEN G)	0.41	1.38
	Cloxacillin (CLOX)	0.28	0.92
	Oxacillin (OXA)	0.40	1.33

III. 回收率測定結果

依據歐盟執委會會議規章規定, TC、CTC 及 OTC 以 0.5 MRL (50 ppb)、MRL (100 ppb) 及 1.5 MRL (150 ppb) 三種濃度, 測定前處理回收率 (表 6), TCs 於 50 ppb, 回收率 85.43~94.73%, CV 值 2.67~3.66%; 100 ppb, 回收率 82.04~87.68%, CV 值 2.15~4.53%; 150 ppb, 回收率 82.57~87.67%, CV 值 2.03~4.95%。CAP 屬 A 組物質, 以 MRPL (0.3 ppb)、1.5 MRPL (0.45 ppb) 及

2 MRPL (0.6 ppb) 三種濃度，測定前處理回收率 (表 7)，三種濃度回收率 104.94~109.90%，CV 值 3.52~5.89%。TAP 與 FF 於國內未規定 MRL 值，因此以統一基準 (10 ppb) 為濃度基準，以 5 ppb、10 ppb 及 15 ppb 三種濃度，測定前處理回收率 (表 6)。TAP，回收率 79.72~85.10%，CV 值 10.24~14.25%；FF，回收率 64.86~70.19%，CV 值 8.68~9.25%。PENs 以 0.5 MRL、MRL 及 1.5 MRL 三種濃度，測定前處理回收率 (表 6)，0.5 MRL，回收率 58.57~82.74%，CV 值 7.93~10.28%；MRL，回收率 59.14~76.51%，CV 值 10.11~11.43 %；1.5 MRL，回收率 55.26~73.07%，CV 值 8.57~12.27%。

表 6. 牛乳中四環素類、甲磺氯黴素、氟甲磺氯黴素及青黴素類抗生素之回收率測定

Table 6. The recovery of tetracyclines, thiamphenicol, florfenicol and penicillins in milk

Groups	Compound	MRL (ppb)	Concentration					
			0.5 MRL		MRL		1.5 MRL	
			Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
TCs ^a	Tetracycline (TC)	100	85.43	2.74	82.04	2.69	82.57	2.03
	Chlortetracycline (CTC)	100	94.73	3.66	87.68	4.53	87.67	4.95
	Oxytetracycline (OTC)	100	91.86	2.67	86.35	2.15	85.67	2.69
CAPs ^b	Thiamphenicol (TAP)	10	82.01	14.25	85.10	10.58	79.72	10.24
	Florfenicol (FF)	10	70.19	8.68	68.66	8.77	64.86	9.25
PENs ^c	Amoxicillin (AMOX)	10	59.85	7.93	60.18	10.11	57.85	8.78
	Ampicillin (AMPI)	10	58.57	9.54	59.14	10.40	55.26	12.27
	Penicillin G (PEN G)	4	82.74	10.28	76.51	10.12	73.07	10.94
	Cloxacillin (CLOX)	10	70.98	8.59	68.65	11.43	67.80	8.57
	Oxacillin (OXA)	30	66.68	8.47	65.46	10.36	66.82	10.27

^a n=7

^b n=14

^c n=23

表 7. 牛乳中氯黴素抗生素之回收率測定 (n=14)

Table 7. The recovery of chloramphenicol in milk (n=14)

Compound	Concentration					
	MRPL (0.3 ppb)		1.5 MRPL (0.45 ppb)		2 MRPL (0.6 ppb)	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Chloramphenicol	109.90	5.89	107.86	3.52	104.94	5.81

IV. 方法偵測極限、判讀極限及偵測性能

本試驗於樣品中添加抗生素，進行方法偵測極限測定 (表 8)。依據歐盟執委會會議規章規定，對於可使用之藥物，分析方法之 MDL 必須小於 MRL 的 50% 數值，本試驗可使用之抗生素 MDL 皆小於 50% MRL (TC、CTC 及 OTC 之 50% MRL 為 50 ppb；TAP、FF、AMOX、AMPI 及 CLOX 之 50% MRL 為 5 ppb；PEN G 之 50% MRL 為 2 ppb；OXA 之 50% MRL 為 15 ppb)。CAP 於歐盟執委會會議規章規定屬於 A 組物質，即禁用物質，依據歐盟執委會會議規章判讀極限 (Limit of decision, $CC\alpha$) 及偵測性能 (Detection capacity, $CC\beta$) 需小於 MRPL，此試驗分析技術才具有確效性及可信度，本試驗 CAP 之 $CC\alpha$ 為 0.03 ppb 及 $CC\beta$ 為 0.054 ppb，小於歐盟規定 MRPL，符合歐盟會議規章規定。

表 8. 抗生素之方法偵測極限

Table 8. The method detection limit (MDL) of antibiotics

Groups	Antibiotics	Ion transitions (m/z)	MDL (ng/mL)	50% MRL (ng/mL)
TCs	Tetracycline (TC)	445 → 410	1.33	50
	Chlortetracycline (CTC)	479 → 444	2.73	50
	Oxytetracycline (OTC)	461 → 426	1.79	50
CAPs	Chloramphenicol (CAP)	321 → 152	0.048	0.3*
	Thiamphenicol (TAP)	354 → 185	0.041	5
	Florfenicol (FF)	356 → 336	0.07	5
PENs	Amoxicillin (AMOX)	366 → 349	1.47	5
	Ampicillin (AMPI)	350 → 106	0.90	5
	Penicillin G (PEN G)	335 → 160	1.32	2
	Cloxacillin (CLOX)	436 → 160	1.86	5
	Oxacillin (OXA)	402 → 160	1.67	15

*為MRPL值

結論

本試驗 LC/MS/MS 應用於 TCs、CAPs 及 PENs 分析具有高靈敏度、高解析度、無須衍生化及可同時定性定量等優勢。CAP 為不可使用之藥物，因此無 MRL 規定，而是以 MRPL 規定實驗室檢測能力，其 MRPL 為 0.3 ppb，而不論在 LOD、LOQ、MDL、 $CC\alpha$ 及 $CC\beta$ 皆能符合要求。TC、CTC、OTC、TAP、FF、AMOX、AMPI、PEN G、CLOX 及 OXA 等 10 種抗生素採用 MRL 規定，LOD、LOQ 及 MDL 皆低於 MRL 規定數值，符合檢測要求。且此分析系統可因應歐盟執委會會議規章決議之分析方法性能標準，與國際組織檢測技術接軌。因此擬將本試驗之分析方法應用於牛乳中 TCs、CAPs 與 PENs 之檢驗，以維護牛乳品質安全性。

誌謝

本試驗由本組同仁陳碧慧小姐協助完成，特此致謝。

參考文獻

- 中國國家標準。2005。CNS14885。飼料中氯黴素、甲磺氯黴素及氟甲磺氯黴素之檢測方法。
- 衛生署。2005。署授食字第0949432777號食品中動物用藥殘留檢驗方法—氯黴素之檢驗。
- 衛生署。2004。署授食字第0939300627號食品中動物用藥殘留檢驗方法—四環黴素類抗生素之檢驗。
- Becker, M., E. Zittlau and M. Petz. 2004. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta.* 520:19-32.
- Bogialli, S., V. Capitolino, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari and M. Sergi. 2004. Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk. *J. Agric. Food Chem.* 52:3286-3291.
- Cinquina, A. L., F. Longo, G. Anastasi, L. Giannetti and R. Cozzani. 2003. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatogr. A.* 987:227-233.
- Gamba, V. and G. Dusi. 2003. Liquid chromatography with fluorescence detection of amoxicillin and ampicillin in feeds using pre-column derivatization. *Anal. Chem. Acta.* 483:69-72.
- Gikas, E., P. Kormali, D. Tsipi and A. Tsarbopoulos. 2004. Development of a rapid and sensitive SPE-LC-ESI MS/MS method for the determination of chloramphenicol in seafood. *J. Agric. Food Chem.* 52:1025-1030.
- Heller, D. N., M. L. Smith and O. A. Chiesa. 2006. LC/MS/MS measurement of penicillin G in bovine plasma, urine, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. *J. Chromatogr. B.* 830:91-99.
- Holstege, D. M., B. Puschner, G. Whitehead and F. D. Galey. 2002. Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 50:406-411.
- Hormazabal, V. and M. Yndestad. 2001. Simultaneous determination of chloramphenicol and ketoprofen in meat and milk and chloramphenicol in egg, honey, and urine using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 24:2477-2486.
- Metz, P., Sue J. Kohlhepp and D. N. Gilbert. 2002. Study of different off-line sample processing procedures and the measurement of antibiotic and antiviral levels in human serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 773:159-166.
- Michalska, K., G. Pajchel and S. Tyski. 2004. Capillary electrophoresis method for simultaneous determination of penicillin G, procaine and dihydrostreptomycin in veterinary drugs. *J. Chromatogr. B.* 800:203-209.
- Nagata, T. and H. Oka. 1996. Detection of residual chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol in yellowtail fish muscles by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 44:1280-1284.

- Nozal, L., L. Arce, B. M. Simonet, A. Ríos and M. Valcárcel. 2004. Rapid determination of trace levels of tetracyclines in surface water using a continuous flow manifold coupled to a capillary electrophoresis system. *Anal. Chem. Acta.* 517:89-94.
- Pena, A., A. Carmona, A. Barbosa, C. Lino, I. Silveira and B. Castillo. 1998. Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Phar. and Bio. Anal.* 18:839-845.
- Posyniak, A., J. Zmudzki and J. Niedzielska. 2002. Evaluation of sample preparation for control of chloramphenicol residues in porcine tissues by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Anal. Chem. Acta.* 483:307-311.
- Shen, H. Y. and H. L. Jiang. 2005. Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UV, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods. *Anal. Chem. Acta.* 535:33-41.
- Viñas, P., N. Balsalobre, C. López-Erroz and M. Hernández-Córdoba. 2004. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *J. Chromatogr. A.* 1022:125-129.
- Wang, P., M. Qi, Y. Sun and J. Yang. 2004. A liquid chromatographic method for simultaneous determination of amoxicillin sodium and sulbactam sodium in a combination formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36:565-569.
- Yang, S., J. Cha and K. Carlson. 2005. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1097:40-53.

Determination of antibiotic residues in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry⁽¹⁾

Ming-Chih Teng⁽²⁾⁽³⁾ Way-Yee Lin⁽²⁾ and Mian-Lian Lee⁽²⁾

Received : Mar. 25, 2008 ; Accepted : May 6, 2008

Abstract

The purpose of this study was to develop a specific and sensitive high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method with solid-phase extraction (SPE) and liquid-liquid extraction (LLE) for the determination of tetracyclines (TC, CTC and OTC), chloramphenicols (CAP, TAP and FF) and penicillins (AMOX, AMPI, PEN G, CLOX and OXA) residues in milk. A triple-quadruple mass spectrometry using a TurboIon Spray source operating in the positive ion mode was used to detect TCs and PENs, while the negative ion mode was used to detect CAPs. The method detection limit (MDL) for TCs were 1.33~2.73 ng/mL. MDL for CAPs were 0.048~0.07 ng/mL. MDL for PENs were 0.90~1.86 ng/mL. At maximum residue limit level, recoveries of TCs were between 82.04 and 87.68%, with coefficient of variation (CV) ranging between 2.15 and 4.53%.

Recoveries of TAP and FF were between 68.66 and 85.10%, with CV ranging between 8.77 and 10.58%. Recoveries of PENs were between 59.14 and 76.51%, with CV ranging between 10.11 and 11.43%. At the 0.3 ng/mL level, recovery of CAP was 109.9%, with a CV of 5.89%. We concluded that the method could be applied to the analysis of TCs, CAPs and PENs residues in milk.

Key words : Milk, Tetracyclines, Chloramphenicols, Penicillins, High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

(1) Contribution No 1450 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author, E-mail: mcteng@mail.tlri.gov.tw