

# 液相層析串聯式質譜儀及固相萃取技術於 飼料與牛乳中磺胺藥劑之分析<sup>(1)</sup>

李免蓮<sup>(2) (4)</sup> 鄧名志<sup>(2)</sup> 徐阿里<sup>(3)</sup>

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 (High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) 搭配固相萃取 (Solid-phase extraction, SPE) 技術，建立飼料及牛乳中磺胺藥劑 (Sulfonamides, SAs) 殘留量監測分析方法。以甲醇及水萃取飼料及牛乳中 SAs，萃取液經由固相萃取純化後注入 LC/MS/MS 系統分析。使用三段式四極棒質譜儀 (Triple quadrupole mass spectrometer) 搭配渦輪噴灑離子源 (TurboIon Spray source) 在正離子的模式下偵測 SAs。於飼料中添加 100 ppb SAs 進行回收率試驗，其回收率為 88.73%~114.56%，變異係數 (coefficient of variation, CV) 7.90%~9.82%。於牛乳中添加 100 ppb SAs 進行回收率試驗，回收率為 78.41%~89.02%，CV 為 6.32%~7.76%。五種 SAs 之偵測極限 (limit of determination, LOD, S/N=3) 為 0.02~0.25 ng/mL，五種 SAs 之定量極限 (limit of quantitation, LOQ, S/N=10) 為 0.1~0.6 ng/mL。實驗結果顯示 LC/MS/MS 系統可應用於飼料及牛乳中 SAs 殘留量分析。

關鍵詞：飼料、牛乳、磺胺藥劑、固相萃取、高效率液相層析串聯式質譜儀。

## 緒言

磺胺藥劑經常使用於治療畜禽之感染性疾病，亦常添加於飼料中當作生長促進劑 (Botsoglou and Fletouris, 2001)。藥物過量使用或屠宰前不遵守停藥期規定，將造成動物可食用部位之藥物殘留，其殘留經常發生於肉及乳品中，食用具有藥物殘留之畜產品將降低人類對該藥物之治療效果，甚至有些磺胺藥劑可能致癌 (Eeckhout *et al.*, 2000)。我國及歐盟動物用藥最大殘留量 (Maximum residue limit, MRL) 為 100 ppb (100  $\mu$ g/kg)，日本對於某些磺胺藥劑用藥最大殘留量訂在 50 ppb 及 10 ppb，比我國規定更為嚴苛。

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1451號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 私立南榮技術學院。

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

為使樣品中磺胺藥劑殘留量檢測具有更好的靈敏性及選擇性，有許多方法去除樣品之基質干擾以降低檢測極限。Smedley (1994) 以液 - 液萃取 (Liquid-liquid extraction) 去除牛乳中干擾物質，以氯仿 (Chloroform) 及氰甲烷 (Acetonitrile) 萃出磺胺藥劑後，將其置換至磷酸鹽水溶液並以正己烷 (Hexane) 去除油脂，此方法會產出大量且具毒性之有機溶劑廢液。Furusawa (2000) 先以高速離心方式將牛乳中蛋白質及懸浮微粒沉澱，再取出上部澄清液以分子篩去除大分子干擾物質，此淨化方法非常快速，但對於小分子干擾物去除效能不佳。Renew and Huang (2004) 利用固相萃取技術，將廢水中磺胺藥劑萃取出並純化，此技術可有效減少有機溶劑使用量並且具有濃縮的效果。

有許多儀器設備及方法用以檢測磺胺藥劑，其中高效率液相層析儀之使用最為廣泛，其偵測器有紫外光/可見光吸收光譜儀 (UV/VIS detector) (Smedley, 1994)、螢光偵測器 (Fluorescence detector) (Tasi and Kondo, 1995) 及光電二極體陣列檢測器 (Photo-diode array detector, PDAD) (Furusawa, 2000)。隨著質譜儀分析技術的增進，漸漸取代了傳統偵測系統，亦因為離子源技術的改良，改善了液相層析儀與質譜儀間的串聯，逐漸應用於磺胺藥劑的分析 (Berardi *et al.*, 2006; Cavaliere *et al.*, 2003; Eeckhout *et al.*, 2000; Jacobsen *et al.*, 2004; Klagkou *et al.*, 2003; Renew *et al.*, 2004; Verzeegnassi *et al.*, 2002)，LC/MS/MS 應用於磺胺藥劑檢測具有無須添加衍生試劑、高選擇性、高靈敏度以及可同時定性與定量等特點。故本試驗利用固相萃取技術純化飼料及牛乳中磺胺藥劑，再以 LC/MS/MS 檢測磺胺藥劑的含量，建立一套完整的檢測機制，維護飼料及牛乳之安全。

## 材料與方法

### I. 試驗藥劑

本試驗選定五種磺胺藥劑 (Sulfonamides, SAs)，分別為磺胺一甲基嘧啶 (Sulfamerazine, SMR)、磺胺二甲基嘧啶 (Sulfamethazine, SMZ)、磺胺一甲氧嘧啶 (Sulfamonomethoxine, SMM)、磺胺二甲氧嘧啶 (Sulfadimethoxine, SDM) 及磺胺喹噁啉 (Sulfaquinoxaline, SQX) (圖 1)，均購自 Sigma 公司。SMR、SMZ、SMM、SDM 以甲醇 (CH<sub>3</sub>OH) 個別配製成 1000  $\mu$ g/mL (ppm) 標準儲備液，SQX 以 CH<sub>3</sub>OH 配製成 500 ppm 標準儲備液，取五種標準儲備液混合以 CH<sub>3</sub>OH 配製成 100 ppm 混合儲備液，儲備液儲存於 4°C 環境下。

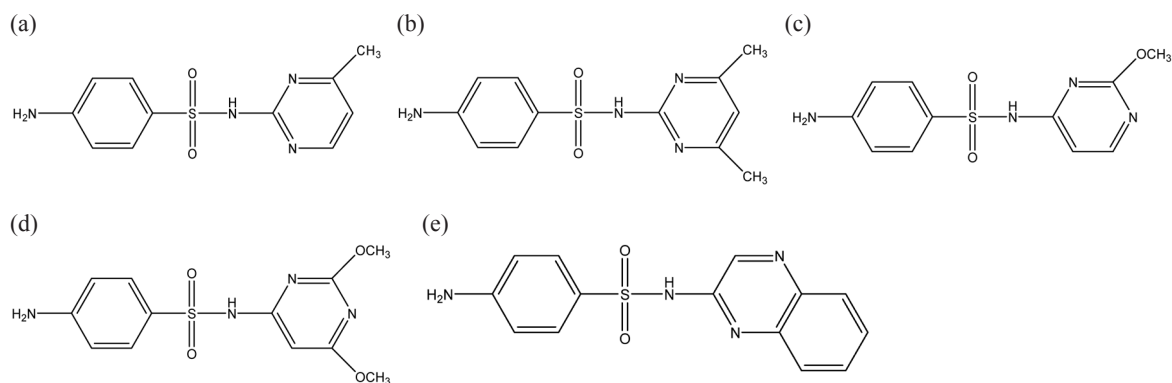


圖 1. 磺胺藥劑之化學結構：(a) 磺胺一甲基嘧啶，(b) 磺胺二甲基嘧啶，(c) 磺胺一甲氧嘧啶，(d) 磺胺二甲氧嘧啶，(e) 磺胺喹噁啉。

Fig. 1. Chemical structures of the sulfonamides: (a)SMR ; (b)SMZ ; (c)SMM ; (d) SDM ; (e)SQX.

## II. 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, USA)，此儀器包含注射幫浦及渦輪噴灑離子源，離子源溫度設定在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，以此判讀磺胺藥劑碰撞反應游離圖譜，提取最佳母、子離子監測模式。

1000 ppm 磺胺藥劑標準品以含 0.1% 甲酸 (Formic acid, FA) 之 CH<sub>3</sub>OH 稀釋成 100 ng/mL (ppb)，使用 1 mL 注射針，以注射幫浦 10  $\mu$ L/min 注入質譜儀離子源，找尋 Declustering Potential (DP)、Focusing Potential (FP)、Entrance Potential (EP)、Collision Cell Exit Potential (CXP)、Nebulizer Gas (NEB)、Curtain Gas (CUR)、Collision Gas (CAD)、IonSpray Voltage (IS) 等最佳質譜分析參數，以及磺胺藥劑之母離子、子離子及其碰撞能量 (Collision Energy, CE) 參數。

## III. 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  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150mm)，管柱使用時溫度維持 30 °C。動相組成：動相 A 為含 0.1% FA 之 H<sub>2</sub>O；動相 B 為含 0.1% FA 之 CH<sub>3</sub>OH。分析之動相梯度於表 1，流速為 350  $\mu$ L/min，樣品注射體積為 5  $\mu$ L。

表 1. 動相梯度

Table. 1. Gradient of mobile phase

Time (min)	0	0.2	2.5	6	6.5	10
Mobile phase A (%)	48	48	40	40	48	48
Mobile phase B (%)	52	52	60	60	52	52

## IV. 檢量線配製

濃度 100 ppm SAs 混合儲備液以 CH<sub>3</sub>OH 稀釋至所需檢量線濃度：15、30、60、120、200 ppb 及 1.5、3.0、6.0、12.0、20.0 ppb 二組檢量線。

## V. 磺胺藥劑樣品前處理

### (i) 飼料中 SAs 檢測之前處理步驟

取 2 g 樣品至 50 mL 離心管，加 15 mL 萃取液，超音波震盪 10 min 後再搖晃震盪 10 min，混合均勻。在 3,000 rpm (1500 $\times$ g) 狀態下離心 15 分鐘，取出上層澄清液。再加 15 mL CH<sub>3</sub>OH 於離心管中，重複上述萃取步驟，將兩次萃取液合併。加 10 mL 正己烷 (hexane) 搖晃 10 分鐘，靜置分層，去除 hexane 層，重覆之以去除萃取液中油脂，收集 CH<sub>3</sub>OH 層。以減壓濃縮儀濃縮近乾，加入 5 mL 回溶液溶解後置入已活化 SPE 管柱 (SPE 選購自沃特斯 (Waters Co.) 製造之 Oasis® HLB 3cc/60mg，活化方式為先以 3 mL CH<sub>3</sub>OH 流洗，再以 3 mL H<sub>2</sub>O 流洗)，以 20% CH<sub>3</sub>OH 流洗，最後加入 5 mL CH<sub>3</sub>OH 沖提收集。沖提液於 50°C 下以氮氣吹乾後，加 2 mL CH<sub>3</sub>OH 回溶，經 0.2  $\mu$ m Nylon 材質濾紙過濾後上機分析。

## (ii) 牛乳中 SAs 檢測之前處理步驟

取 2 mL 樣品至 50 mL 離心管，加入 3 mL 萃取液，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。萃取液置入 SPE 後，以 2 mL 10% CH<sub>3</sub>OH 流洗，最後加入 5 mL CH<sub>3</sub>OH 沖提收集。沖提液濃縮至乾後，以 2 mL CH<sub>3</sub>OH 回溶，經 0.2  $\mu$ m Nylon 材質濾紙過濾後上機分析。

## VI. 樣品前處理回收率測定

(i) 飼料樣品：萃取液分為 CH<sub>3</sub>OH、70% CH<sub>3</sub>OH、50% CH<sub>3</sub>OH 三種，以及回溶液 10% CH<sub>3</sub>OH、30% CH<sub>3</sub>OH 二種，在 SAs 25 ppb 濃度下進行回收率探討，尋找最佳條件，並以最佳條件分別執行 25 ppb、50 ppb 及 100 ppb 三種濃度回收率測定。

(ii) 牛乳樣品：萃取液分為 15% CH<sub>3</sub>OH、30% CH<sub>3</sub>OH 二種，在 SAs 100 ppb 濃度下進行回收率探討，尋找最佳條件，並以最佳條件分別執行 10 ppb 及 100 ppb 二種濃度回收率測定。

## 結果與討論

## I. 磺胺藥劑於質譜儀之母離子、子離子與各項參數測定

本試驗使用三段式四極棒質譜儀 (MS/MS)，此質譜儀具有碰撞活化解離效率高、掃描速度快、高離子傳送率、母離子 (precursor ion) 質譜與子離子 (product ion) 質譜皆可得單一質量 (Unit mass) 解析度、比一般扇形串聯式質譜儀廉價及易用電腦控制等優點 (李, 1999)。離子化模式採用電灑法 (electrospray) 配合高溫氮氣使分析物迅速汽化，SAs 離子化後以正離子 [M+H]<sup>+</sup> 模式進入質譜儀，選定所欲分析之母離子後進行第二次的撞擊，使母離子產生碎裂形成許多子離子 (圖 2)，使用 MRM 偵測分析物，五種 SAs 皆有質荷比 (m/z) 156 及 92 之子離子碎片，除了 SMZ 外，其餘四種 SAs 之子離子 m/z 皆選擇 156 (表 2)。

表 2. 質譜儀儀器參數

Table 2. Instrument parameters of mass spectrometer

Compound	Precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Declustering potential DP(V)	Focusing potential FP(V)	Collision energy CE(V)	Collision cell exit potential CXP(V)
Sulfamerazine (SMR)	265	156	28	230	25	10
Sulfamethazine (SMZ)	279	186	27	220	24	12
Sulfamonomethoxine (SMM)	281	156	32	260	26	10
Sulfadimethoxine (SDM)	311	156	42	350	29	10
Sulfaquinoxaline (SQX)	301	156	32	260	25	15

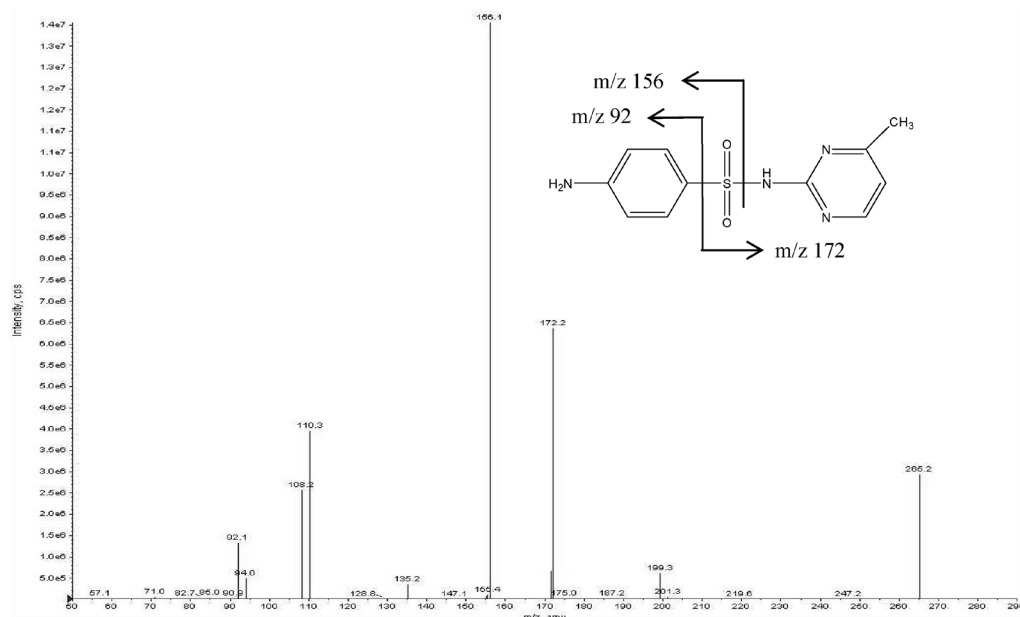


圖 2. 磺胺一甲基嘧啶質譜圖。

Fig. 2. Mass spectrometry of sulfamerazine.

調整 DP、FP、EP 及 CXP 等參數值以找尋最佳離子強度 (表 2)，並測出 NEB = 14、CUR = 14、CAD = 8、IS = 4500 等參數值為離子源最佳離子化條件參數，藉由調整 CE 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 2)。

## II. LC/MS/MS對磺胺藥劑之分析效能

本試驗以逆相 (reverse phase) 色層分析法分離五種 SAs，依據分析物極性與化學結構不同，分別於不同的時間離開 LC 系統進入質譜儀偵測。先以 H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH = 48:52 之動相比例進行分離系統平衡，進樣後 0.2 min 開始提高 CH<sub>3</sub>OH 比例，至 2.5 min 動相組成為 H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH = 40:60，利用動相梯度使五種 SAs 能在 10 分鐘內分離 (圖 3)。

測定 LC/MS/MS 對 SAs 之偵測極限 (LOD) 與定量極限 (LOQ)，結果顯示 SAs 之 LOD 範圍為 0.02~0.25 ppb，LOQ 範圍為 0.1~0.6 ppb (表 3)。

表 3. 磺胺藥劑於 LC/MS/MS 偵測極限 (S/N = 3) 與定量極限 (S/N = 10)

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

Sulfonamides	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Sulfamerazine (SMR)	0.25	0.6
Sulfamethazine (SMZ)	0.06	0.2
Sulfamonomethoxine (SMM)	0.15	0.4
Sulfadimethoxine (SDM)	0.02	0.1
Sulfaquinoxaline (SQX)	0.03	0.1

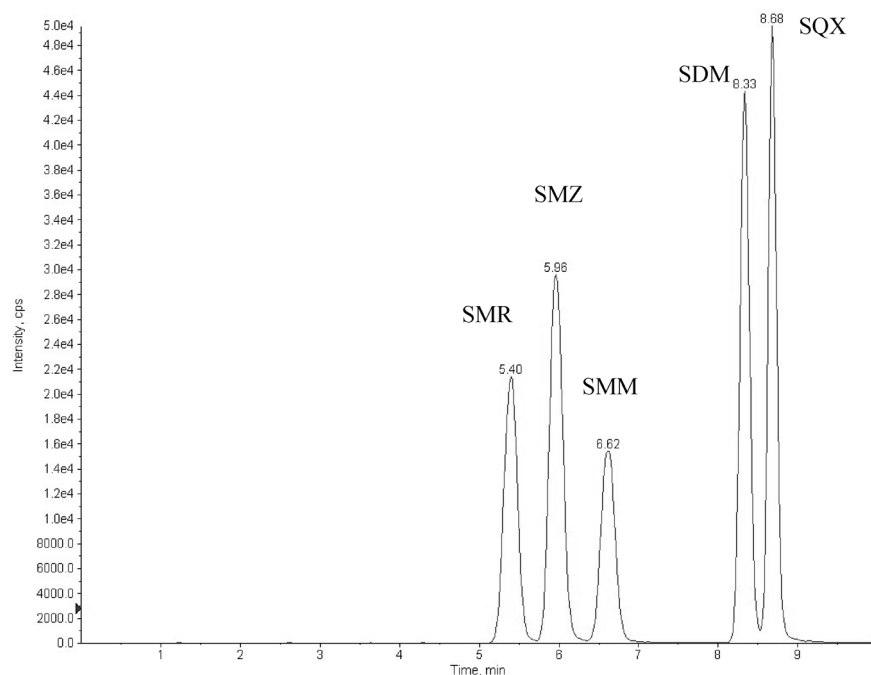


圖 3. 磺胺藥劑層析圖譜。

Fig 3. LC/MS/MS chromatogram of sulfonamides.

### III. 飼料樣品回收率測定結果

本試驗採用溶劑萃取飼料中分析物後，利用固相萃取模式移除雜質，純化分析物。萃取液分為  $\text{CH}_3\text{OH}$ 、70%  $\text{CH}_3\text{OH}$ 、50%  $\text{CH}_3\text{OH}$  三種，樣品萃取後，萃取液需以減壓濃縮裝置將溶劑去除，並置換成極性較高之溶劑組成，回溶溶劑為 10%  $\text{CH}_3\text{OH}$ 、30%  $\text{CH}_3\text{OH}$  二種，在 25 ppb 濃度下進行回收率探討，尋找最佳條件。結果顯示，在 30%  $\text{CH}_3\text{OH}$  回溶液條件下測定 3 種萃取液之回收率 (表 4)， $\text{CH}_3\text{OH}$  萃取液回收率 41.16%~81.05%，CV 值 6.92%~34.47%；70%  $\text{CH}_3\text{OH}$  萃取液回收率 30.22%~76.33%，CV 值 10.05%~36.45%；50%  $\text{CH}_3\text{OH}$  萃取液回收率 42.38%~74.56%，CV 值 9.13%~20.54%，其回收率低於在 10%  $\text{CH}_3\text{OH}$  回溶液條件下 3 種萃取液之回收率 (表 5)，且變異性大，影響數據的精確度，因此本試驗將 30%  $\text{CH}_3\text{OH}$  回溶液條件摒除。

表 4. 不同萃取溶劑抽乾後於 30%  $\text{CH}_3\text{OH}$  溶劑回溶條件下之回收率測定 (n=8)Table 4. The recovery of sulfonamides extracted by different solvents and dissolved in 30%  $\text{CH}_3\text{OH}$ 

Compound	Extraction solvent					
	$\text{CH}_3\text{OH}$		70% $\text{CH}_3\text{OH}$		50% $\text{CH}_3\text{OH}$	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Sulfamerazine (SMR)	52.16	34.47	30.22	34.44	53.68	17.58
Sulfamethazine (SMZ)	81.05	8.70	76.33	15.72	74.56	20.54
Sulfamonomethoxine (SMM)	56.46	30.72	36.80	36.45	60.13	16.46
Sulfadimethoxine (SDM)	71.33	6.92	71.90	14.25	71.05	16.01
Sulfaquinoxaline (SQX)	41.16	12.06	44.90	10.05	42.38	9.13

針對 10% CH<sub>3</sub>OH 回溶液條件下，比對 CH<sub>3</sub>OH、70% CH<sub>3</sub>OH、50% CH<sub>3</sub>OH 三種萃取液回收率及 CV，結果顯示，CH<sub>3</sub>OH 萃取液回收率 76.23%~95.89%，CV 值 5.56%~7.07%；70% CH<sub>3</sub>OH 萃取液回收率 76.51%~97.75%，CV 值 5.40%~9.15%；50% CH<sub>3</sub>OH 萃取液回收率 75.77%~95.95%，CV 值 5.65%~6.93% (表 5)，三種萃取液之間的差異性小，皆具有穩定及良好的回收率與再現性，因為 CH<sub>3</sub>OH 於減壓濃縮所需時間短，可縮減分析時間，因此本試驗選用 CH<sub>3</sub>OH 作為萃取液，減壓濃縮近乾後以 10% CH<sub>3</sub>OH 回溶，置入 SPE 純化。

表 5. 不同萃取溶劑抽乾後於 10% CH<sub>3</sub>OH 溶劑回溶條件下之回收率測定 (n=10)

Table 5. The recovery of sulfonamides extracted by different solvents and dissolved in 10% CH<sub>3</sub>OH

Compound	Extraction solvent					
	CH <sub>3</sub> OH		70% CH <sub>3</sub> OH		50% CH <sub>3</sub> OH	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Sulfamerazine (SMR)	76.23	5.56	76.51	6.91	75.77	5.95
Sulfamethazine (SMZ)	85.91	7.07	85.64	5.80	81.60	5.65
Sulfamonomethoxine (SMM)	86.04	6.32	85.36	6.87	86.35	6.93
Sulfadimethoxine (SDM)	95.89	5.71	97.75	5.40	95.95	6.32
Sulfaquinoxaline (SQX)	78.40	6.76	82.08	9.15	79.99	6.86

在最佳前處理條件下，分別添加 25 ppb、50 ppb 及 100 ppb 三種濃度標準試液進行回收率測定。添加 25 ppb 處理組之回收率 76.23%~95.89%，CV 值 5.56%~7.07%；添加 50 ppb 處理組回收率 78.44%~108.07%，CV 值 4.09%~10.54%；添加 100 ppb 處理組回收率 88.73%~114.56%，CV 值 4.85%~9.82% (表 6)。在不同濃度之添加試驗中，5 種 SAs 皆有穩定的回收率及良好的再現性，因此此前處理模式可應用於飼料中 SAs 含量分析測定。

表 6. 飼料中添加不同濃度回收率比較 (n=10)

Table 6. The recovery of 5 sulfonamides from spiked (25, 50 and 100 ppb) feed

Compound	25 ppb		50 ppb		100 ppb	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Sulfamerazine (SMR)	76.23	5.56	78.44	10.54	91.59	9.82
Sulfamethazine (SMZ)	85.91	7.07	86.31	9.67	99.81	9.39
Sulfamonomethoxine (SMM)	86.04	6.32	83.53	8.53	90.58	7.90
Sulfadimethoxine (SDM)	95.89	5.71	108.07	4.09	114.56	4.85
Sulfaquinoxaline (SQX)	78.40	6.76	83.80	4.62	88.73	6.10



## IV. 牛乳樣品回收率測定結果

Smedley (1994) 以氯仿 (chloroform) 及丙酮 (acetone) 作為萃取液，萃取生乳中 SAs，並以 LC/UV 偵測，添加 10 ppb 之回收率為 56.15%~82.71%。Cavaliere *et al.* (2003) 以 SPE 萃取生乳中 SAs，並以 LC/MS 偵測，添加 5 ppb 之回收率為 76%~112%，相對標準偏差 (RSDs) 小於 13%。本試驗於牛乳中 SAs 之前處理中，選擇 30% CH<sub>3</sub>OH 及 15% CH<sub>3</sub>OH 二種萃取液。以 SPE 方式在添加 SAs 100 ppb 濃度下進行回收率探討，尋找最佳前處理條件。由結果顯示，30% CH<sub>3</sub>OH 萃取組回收率 78.41%~89.02%，CV 值 6.32%~7.76%；15% CH<sub>3</sub>OH 萃取組回收率 77.63%~86.89%，CV 值 6.86%~10.32% (表 7)。30% CH<sub>3</sub>OH 萃取組與 15% CH<sub>3</sub>OH 萃取組之回收率並無明顯差異，但 CV 值 30% CH<sub>3</sub>OH 萃取組優於 15% CH<sub>3</sub>OH 萃取組，因此本試驗採用 30% CH<sub>3</sub>OH 作為樣品萃取液。

表 7. 牛乳中磺胺藥劑於不同溶劑萃取之回收率

Table 7. The recovery of sulfonamides in milk by different extraction solvent

Compound	Extraction solvent			
	30% CH <sub>3</sub> OH		15% CH <sub>3</sub> OH	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Sulfamerazine (SMR)	78.41 ± 4.96*	6.32	77.63 ± 5.32	6.86
Sulfamethazine (SMZ)	83.13 ± 5.36	6.44	84.82 ± 8.75	10.32
Sulfamonomethoxine (SMM)	80.35 ± 6.24	7.76	80.44 ± 7.95	9.89
Sulfadimethoxine (SDM)	89.02 ± 5.65	6.34	86.89 ± 6.35	7.31
Sulfaquinoxaline (SQX)	81.05 ± 5.41	6.67	79.70 ± 7.35	9.22

\* Mean ± SD, n=21.

由上述最佳前處理條件下，分別進行添加 10 ppb 及 100 ppb 二種濃度之回收率試驗。在添加 10 ppb 處理組之回收率 84.68%~97.16%，CV 值 4.48%~6.56%；添加 100 ppb 處理組回收率 78.41%~89.02%，CV 值 6.32%~7.76% (表 8)。在 10 ppb 及 100 ppb 添加試驗中，5 種 SAs 皆有穩定的回收率及良好的再現性，因此本試驗前處理模式可應用於牛乳中 SAs 含量分析測定。

表 8. 牛乳中添加不同濃度磺胺藥劑之回收率

Table 8. The recovery of 5 sulfonamides from spiked (10 and 100 ppb) milk

Compound	100 ppb (n=21)		10 ppb (n=12)	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Sulfamerazine (SMR)	78.41 ± 4.96	6.32	85.07 ± 5.88	6.56
Sulfamethazine (SMZ)	83.13 ± 5.36	6.44	95.11 ± 4.66	4.90
Sulfamonomethoxine (SMM)	80.35 ± 6.24	7.76	84.68 ± 3.80	4.48
Sulfadimethoxine (SDM)	89.02 ± 5.65	6.34	97.16 ± 4.84	4.99
Sulfaquinoxaline (SQX)	81.05 ± 5.41	6.67	86.43 ± 5.28	6.11



## V. 方法偵測極限

本試驗針對 SAs 在飼料及牛乳二種不同基質下，整體檢測系統之方法偵測極限 (Method detection limit, MDL) (表 9)。飼料部份，SAs 之 MDL 為 2.99~4.28  $\mu\text{g/kg}$  (ppb)，優於中國國家標準 CNS 11129 (2002) 飼料中磺胺劑之檢驗公告方法之檢測極限 0.5 ppm (500 ppb)。牛乳部分，SAs 之 MDL 為 1.05~1.54  $\mu\text{g/L}$  (ppb)，優於 90.03.28 衛署食字第 0900018662 號食品中動物用藥殘留檢驗方法之檢測極限 0.02 ppm (20 ppb)。

表 9. 飼料與牛乳中磺胺藥劑方法偵測極限

Table 9. The method detection limit (MDL) of sulfonamides for milk and feed

Sulfonamides	Feed ( $\mu\text{g/kg}$ )	Milk ( $\mu\text{g/L}$ )
Sulfamerazine (SMR)	2.99	1.54
Sulfamethazine (SMZ)	4.28	1.29
Sulfamonomethoxine (SMM)	3.84	1.05
Sulfadimethoxine (SDM)	3.86	1.34
Sulfaquinoxaline (SQX)	3.74	1.46

## 結論

LC/MS/MS 應用於 SAs 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，並配合新型離子源 (渦輪噴灑離子源) 使分析物汽化與離子化更加完全，增強了質譜儀偵測效能。另外 MRM 可對各個 SAs 同時多工鑑定，並不會干擾其他分析物之鑑別，在定性定量上是一項利器。於飼料樣品前處理部分，選用  $\text{CH}_3\text{OH}$  為萃取液，10%  $\text{CH}_3\text{OH}$  為回溶液，具最佳前處理回收率。於牛乳樣品前處理部分，選用 30%  $\text{CH}_3\text{OH}$  作為樣品萃取液，具最佳前處理回收率。隨著國際與國內對動物用藥及抗生素使用之管制日益嚴苛，良好的分析方法及檢測設備是必須且必要的，LC/MS/MS 對於 SAs 檢測極限為 0.1~0.6 ppb，能因應日本及歐盟訂定的用藥殘留之統一基準 (10 ppb)，且此分析系統可因應歐盟執委會第 2002/657/EC 決議之分析方法性能標準。

## 參考文獻

- 中國國家標準 CNS11129。2002。飼料中磺胺劑之檢驗。
- 李茂榮。1999。第五章 低能量碰撞誘導解離之串聯式質譜儀。科儀叢書5-質譜分析術專輯。民全書局，台北，pp.99。
- 衛生署。2001。署授食字第0900018662號食品中動物用藥殘留檢驗方法—多重殘留分析 (HPLC法)。
- Berardi, G., S. Bogialli, R. Curini, A. D. Corcia and A. Lagana. 2006. Evaluation of a method for assaying sulfonamide antimicrobial residues in cheese: hot-water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric Food Chem.* 54:4537-4543.
- Botsoglou, N. A. and D. J. Fletouris. 2001. Drug residues in foods. Marcel Dekker. New York, pp. 85.

- Cavaliere, C., R. Curini, A. D. Corcia, M. Nazzari and R. Samperi. 2003. A simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and egg. *J. Agric. Food Chem.* 51:558-566.
- Eeckhout, N. V., J. C. Perez and C. V. Peteghem. 2000. Determination of eight sulfonamides in bovine kidney by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line extraction and sample clean-up. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14:2331-2338.
- Furusawa, N. 2000. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimethoxine in milk. *J. Chromatogr. A.* 898:185-191.
- Jacobsen, A. M., B. Halling-Sørensen, F. Ingerslev and S. H. Hansen. 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurized liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1038:157-170.
- Klagkou, K., F. Pullen, M. Harrison, A. Organ, A. Firth and G. J. Langley. 2003. Fragmentation pathways of sulphonamides under electrospray tandem mass spectrometric conditions. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 17:2373-2379.
- Renew, J. E. and C. H. Huang. 2004. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1042:113-121.
- Smedley, M. C. 1994. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk: collaborative study. *J. AOAC International.* 77:1112-1122.
- Tasi, C. E. and F. Kondo. 1995. Liquid chromatographic determination of fluorescent derivatives of six sulfonamides in bovine serum and milk. *J. AOAC International.* 78:674-678.
- Verzegnassi, L., M. C. Savoy-Perroud and R. H. Stadler. 2002. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. *J. Chromatogr. A.* 977:77-87.

# Determination of five sulfonamide residues in feed and milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry with solid phase extraction<sup>(1)</sup>

Mian-Lian Lee<sup>(2)(4)</sup> Ming-Chih Teng<sup>(2)</sup> and A-Li Hsu<sup>(3)</sup>

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

## Abstract

A specific and sensitive high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method with solid-phase extraction for confirmation of residues of sulfonamides in feed and milk was developed. The sulfonamides were extracted from feed and milk with methanol and water. An aliquot of the extraction was purified by solid-phase extraction and then injected into the LC/MS/MS system. A triple-quadruple mass spectrometry using a TurboIon Spray source operating in the positive ion mode was used to detect sulfonamides. Recoveries of five sulfonamides in feed at the 100 ppb level ranged from 88.73% to 114.56% with the coefficient of variation (CV) ranging from 7.90 to 9.82%. Recoveries of five sulfonamides in milk at the 100 ppb level ranged between from 78.41% to 89.02% with CV ranging from 6.32 to 7.76%. The limits of detection (LOD, S/N=3) ranged from 0.02 to 0.25 ng/mL for five sulfonamides. The limits of quantification (LOQ, S/N=10) ranged from 0.1 to 0.6 ng/mL for five sulfonamides. These results suggested that this method by LC/MS/MS could be applied to analyze sulfonamide residues in feed and milk.

Key words : Feed, Milk, Sulfonamides, Solid-phase extraction, High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

---

(1) Contribution No.1451 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Nan Jeon Institute of Techonlogy, Yenshui, Tainan 737, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author. E-mail: mainlian@mail.tlri.gov.tw

