

# 液相層析串聯式質譜儀於飼料、雞隻血液、肌肉及肝臟中四環黴素檢測技術開發<sup>(1)</sup>

鄧名志<sup>(2)</sup> 施柏齡<sup>(2)</sup> 李免蓮<sup>(2)(3)</sup>

收件日期：98年4月10日；接受日期：98年6月30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) 技術，建立飼料、雞隻血液、肌肉及肝臟中四環黴素類 (TCs 含 TC、CTC 及 OTC) 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。TCs 於飼料之方法偵測極限 (MDL) 為 2.61 ~ 6.75 ng/g (ppb)；TCs 於血液之 MDL 為 1.76~2.74 ng/mL (ppb)；TCs 於肌肉之 MDL 為 1.07~2.28 ng/g；TCs 於肝臟之 MDL 為 0.88~2.85 ng/g。於添加 100 ppb TCs 濃度下，於飼料中，回收率 94.44%~111.30%，變異係數 (Coefficient of Variation, CV) 6.74%~9.88%；於血液中，回收率 91.34%~102.14%，CV 1.91% ~ 5.38%；於肌肉中，回收率 73.14%~87.47%，CV 6.01%~6.39%；於肝臟中，回收率 62.34%~70.71%，CV 6.93%~9.85%。本方法可應用於飼料、雞隻血液、肌肉及肝臟中 TCs 抗生素殘留量分析。

關鍵詞：四環黴素、高效率液相層析串聯式質譜儀、飼料、血液、肌肉、肝臟。

## 緒言

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，這類抗生素常被使用於治療畜禽動物疾病或添加於飼料中做為飼料添加物以促進畜禽動物生長。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，尤其對於發育期的兒童、孕婦及授乳婦女影響甚鉅，而且高劑量會導致肝壞死及腎衰竭，故 TCs 殘留量檢測亦被日漸重視。

TCs 經常被使用於治療畜禽及魚類之感染性疾病，畜禽動物施用藥物後，若無遵守停藥期規定，或是不同畜禽動物對於藥物有不同代謝時間，而未於代謝至安全殘留量便予以生產畜禽產品等情況下，便有藥物殘留之風險。對於食用者產生藥物過敏反應及副作用，甚至因其含量不足以殺死

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1515 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: mainlian@mail.tlri.gov.tw。

細菌進而導致細菌產生抗藥性，將造成無藥可用之窘境。而 TCs 中氯四環黴素 (Chlortetracycline, CTC) 及經四環黴素 (Oxytetracycline, OTC) 的使用於中華民國 96 年 7 月 1 日起從藥物飼料添加物的項目中刪除，亦表示此藥物已不可使用於飼料添加物中，因此好的檢測技術必須加以重視。TCs 檢測方法有液相層析-紫外光吸收光譜儀 (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)、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)。目前行政院衛生署公告之檢測方法 (署授食字第0939300627號) 是使用 HPLC 以 FD 為偵測器，然而使用此類偵測器易有干擾物質影響分析物吸光及螢光放光之現象，進而影響分析結果之穩定度並增加分析不確定性。

隨著液相層析與質譜儀間連接介面技術提昇以及質譜儀偵測能力的增進，漸漸取代其他偵測系統，再加上國際組織對於抗生素殘留量不斷下修，致使靈敏度高及低檢測極限之分析方法變得必須且必要。因此，本試驗針對飼料、雞之血液、肌肉及肝臟中四環黴素以固相萃取法進行前處理，並以具靈敏度、低偵測極限之 LC/MS/MS 進行四環黴素含量分析檢測，並探討最佳分析條件及其檢測極限，建立一套飼料、雞之血液、肝臟及肌肉中 TCs 之檢測技術。

## 材料與方法

### I. 試驗藥劑

本試驗選定三種 TCs：TC、CTC 及 OTC，標準品購自 Sigma 公司。CTC、OTC 各精確稱取 10.0 mg 以甲醇 (CH<sub>3</sub>OH) 個別配製成 1000  $\mu$ g/mL (ppm) 標準儲備液，TC 精確稱取 5.0 mg 以 CH<sub>3</sub>OH 配製成 500 ppm 標準儲備液，儲備液儲存於 4°C 環境下。分別取 2 mL 500 ppm TC 標準儲備液、1 mL 1000 ppm CTC 標準儲備液及 1 mL 1000 ppm OTC 標準儲備液混合，以 CH<sub>3</sub>OH 定量至 10 mL，配製成 100 ppm TCs 混合儲備液，4°C 冷藏。

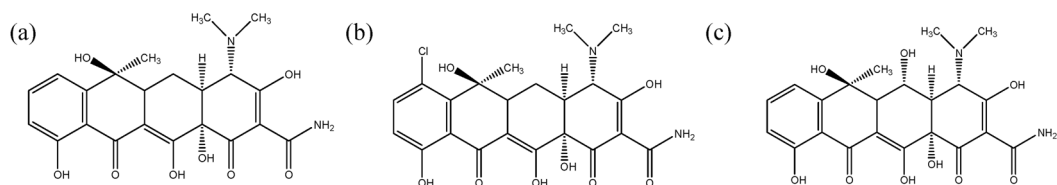


圖 1. 抗生素之化學結構：(a) 四環黴素，(b) 氯四環黴素，(c) 經四環黴素。

Fig. 1. Chemical structures of the antibiotics: (a) TC; (b) CTC; (c) OTC.

### II. 試劑配製

- (i) 0.1 M 檸檬酸 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O) 溶液配製：取 21.0 g 檸檬酸，以水溶解，並定量至 1000 mL。
- (ii) 0.2 M 磷酸氫二鈉 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 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 1 L。

### 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 350°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。

取 100 ppm TCs 混合儲備液以含 0.1% 甲酸 (Formic acid, FA) 之  $\text{CH}_3\text{OH}$  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  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm)，管柱使用時溫度維持 30°C。分析 TCs 之動相組成：動相 A 為含 0.1% FA 之  $\text{H}_2\text{O}$ ；動相 B 為含 0.1% FA 之  $\text{CH}_3\text{OH}$ ，分析之動相梯度於表 1。流速為 350  $\mu\text{L}/\text{min}$ ，樣品注射體積為 10  $\mu\text{L}$ 。

表 1. 檢測 TCs 之動相梯度

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

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

### V. 檢量線配製

將 100 ppm TCs 混合儲備液以 50%  $\text{CH}_3\text{OH}$  配製至所需檢量線濃度：2、5、10、20、50、100、150、200 ppb。

### VI. 樣品前處理

#### (i) 飼料中 TCs 檢測之前處理步驟

取 2g 飼料樣品至 50 mL 離心管，加 10 mL 0.01M  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液，超音波震盪 10 分鐘後搖晃震盪之，使樣品與萃取液混合均勻。在 3,000 rpm (1,500 $\times$ g) 狀態下離心 10 分鐘，取出上層澄清液。加 10 mL 0.01M  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液再次萃取，收集兩次萃取液，全部置入已活化 SPE 管柱 (選購自沃特斯 (Waters Co.) 製造之 Oasis<sup>®</sup> HLB 3cc / 60mg)，SPE 活化方式：先以 3 mL  $\text{CH}_3\text{OH}$  流洗管柱，再以 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$  流洗，最後以 2 mL 0.01M  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液流洗管柱。萃取液置入 SPE 後，以 2 mL 10%  $\text{CH}_3\text{OH}$  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 50% CH<sub>3</sub>OH 回溶，經 0.2  $\mu$ m Nylon 濾膜過濾後上機分析。

(ii) 血液中 TCs 檢測之前處理步驟

取 0.5 mL 血液樣品至 10 mL 玻璃離心管，加入 3 mL 0.01 M Na<sub>2</sub>-EDTA 之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液，超音波震盪萃取 10 分鐘，使樣品與萃取液混合均勻。在 3,000 rpm (1,500×g) 狀態下離心 10 分鐘，取出上層澄清液。置入前述已活化 SPE 管柱，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。沖提液濃縮乾燥後，以 0.5 mL 50% CH<sub>3</sub>OH 回溶，經 0.2  $\mu$ m Nylon 材質濾紙過濾後，上機分析。

(iii) 肌肉及肝臟中 TCs 檢測之前處理步驟

取 2 g 肌肉及肝臟樣品至 50 mL 離心管，加入 10 mL 2.5% 三氯醋酸 (TCA) 超音波震盪萃取 10 分鐘，使樣品與萃取液混合均勻，在 3,000 rpm (1,500×g) 狀態下離心 10 分鐘，取出上層澄清液。再加 10 mL 0.01 M Na<sub>2</sub>-EDTA 之 pH4.0 MacIlvaine 緩衝溶液於離心管，超音波震盪萃取，使樣品與萃取液混合均勻，在 3,000 rpm (1500×g) 狀態下離心 10 分鐘，取出上層澄清液，二上層澄清液合併。置入前述已活化 SPE 管柱，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。沖提液濃縮乾燥後，以 2 mL 50% CH<sub>3</sub>OH 回溶，經 0.2  $\mu$ m Nylon 材質濾紙過濾後，再上機分析。

## VII. 樣品前處理回收率測定

於飼料空白樣品中添加 TCs 50 ppb 及 100 ppb 二種濃度，以及於血液、肌肉及肝臟等空白樣品中添加 TCs 10 ppb 及 100 ppb 二種濃度下進行回收率測定及其變異係數之測定。

# 結果與討論

## I. 四環黴素於質譜儀之母離子、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 以陽離子 [M+H]<sup>+</sup> 模式偵測，選定所欲分析的母離子後進行撞擊，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 2)，並選擇 1 個母離子搭配 2 個子離子進行偵測。

表 2. 檢測四環黴素類抗生素之質譜儀參數及狀態

Table 2. The parameters and conditions of mass spectrometry for detecting tetracyclines

Antibiotics	Precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Collision exit potential (V)
Tetracycline (TC)	445 [M+H] <sup>+</sup>	410 [M+H-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	27	11
		427 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	19	13
Chlortetracycline (CTC)	479 [M+H] <sup>+</sup>	444 [M+H-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	30	12
		462 [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	24	13
Oxytetracycline (OTC)	461 [M+H] <sup>+</sup>	426 [M+H-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	28	12
		443 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	18	13

## II. LC/MS/MS對四環黴素之分析效能

本研究以逆相 (reverse phase) 色層分析法分離 3 種四環黴素 (圖 2)，動相沖提採梯度模式，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。

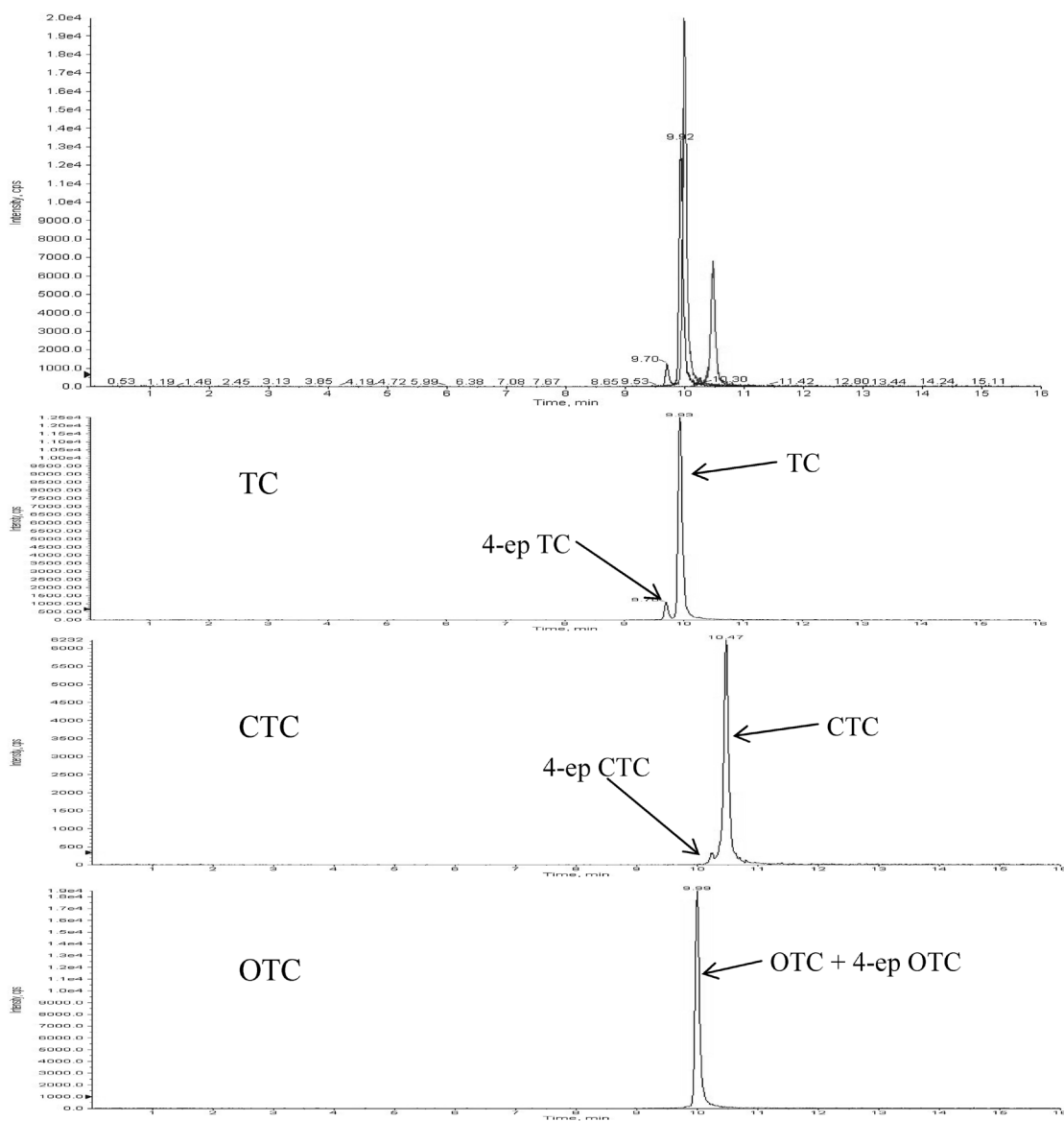


圖 2. 四環黴素層析圖譜。

Fig. 2. LC/MS/MS chromatogram of tetracyclines.

TCs 圖譜中 TC 及 OTC 幾乎在同一時間出現訊號，但彼此間母、子離子配對不同，因此可藉由 MRM 個別偵測分析，不會影響積分定量。在 TC 及 CTC 圖譜中發現有二支訊號，此乃因為 TCs 在酸性環境下會出現異構物的現象 (圖 3)，Blanchflower *et al.* (1997) 於研究中對此有詳細

描述，由於 4-ep TC 及 4-ep CTC 訊號可分離，且 TC 與 4-ep TC 間及 CTC 與 4-ep CTC 間之訊號強度比例固定，因此不影響積分定量。

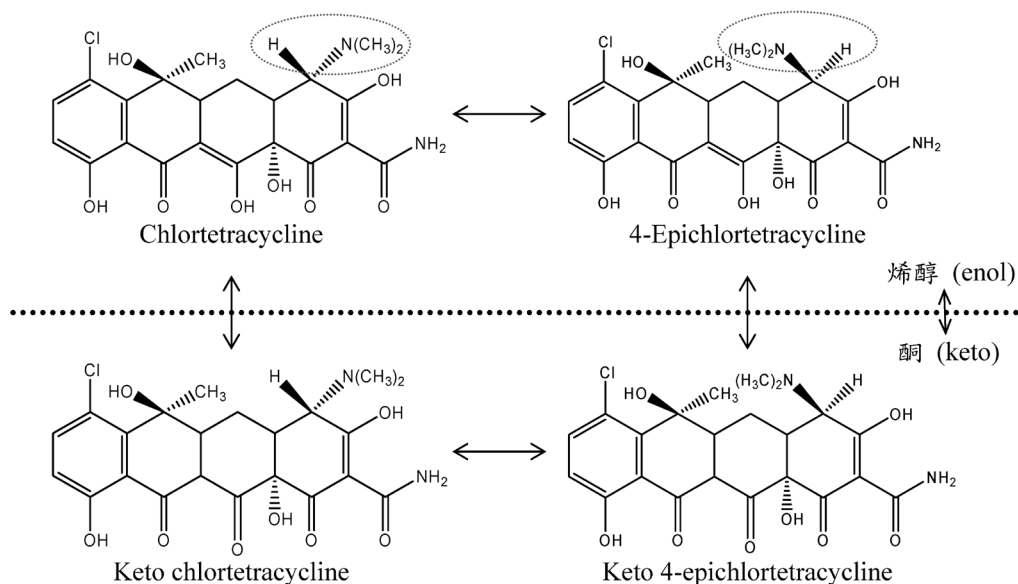


圖 3. 氯四環黴素之同質異構 (epimers) 與同分異構 (tautomers) 之結構與轉換。

Fig. 3. Structures and transformation of the epimers and tautomers of chlortetracycline.

LC/MS/MS 對於 TCs 之偵測極限 (Limit of determination, LOD) 為 0.1~0.3 ng/mL，定量極限 (Limit of quantitation, LOQ) 為 1.0~2.0 ng/mL (表 3)。

表 3. 四環黴素類抗生素於 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 tetracyclines detected by LC/MS/MS

Antibiotics	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Tetracycline (TC)	0.30	2.0
Chlortetracycline (CTC)	0.30	2.0
Oxytetracycline (OTC)	0.10	1.0

### III. 回收率測定結果

於空白飼料中添加 TCs 標準品，TC、CTC 及 OTC 以 50 ppb 及 100 ppb 二種濃度測定飼料中四環黴素前處理回收率 (表 4)，TCs 於 50 ppb，回收率 84.36%~94.31%，CV 值 7.95%~9.51%；於 100 ppb，回收率 94.44%~111.30%，CV 值 6.74%~9.88%。具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 TCs 含量分析測定。

表 4. 飼料中四環黴素類抗生素之回收率測定 (n=14)

Table 4. The recovery of tetracyclines in feed (n=14)

Antibiotics	Concentration			
	50 ppb		100 ppb	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Tetracycline (TC)	91.86	8.54	99.49	7.76
Chlortetracycline (CTC)	94.31	9.51	111.30	6.74
Oxytetracycline (OTC)	84.36	7.95	94.44	9.88

針對雞之血液、肌肉及肝臟前處理部份，本試驗以 0.01 M Na<sub>2</sub>-EDTA 之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液萃取血液中 TCs，並以 SPE 純化萃取液。肌肉及肝臟樣品含有高量蛋白質，故先使用 2.5% TCA 將蛋白質變性，再使用 0.01 M Na<sub>2</sub>-EDTA 之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液萃取肌肉及肝臟中 TCs。

添加 10 ppb 及 100 ppb 二種濃度，進行回收率測定，血液部份，添加 10 ppb 標準液，回收率 98.69%~103.01%，CV 值 5.67%~8.47%；添加 100 ppb 標準液，回收率 91.34%~102.14%，CV 值 1.91%~5.38%（表 5）。肌肉部份，添加 10 ppb 標準液，回收率 83.08%~95.44%，CV 值 3.58%~8.76%；添加 100 ppb 標準液，回收率 73.14%~87.47%，CV 值 6.01%~6.39%（表 5）。肝臟部份，添加 10 ppb 標準液，回收率 69.96%~77.99%，CV 值 3.72%~12.97%；添加 100 ppb 標準液，回收率 62.34%~70.71%，CV 值 6.93%~9.85%（表 5）。3 種基質之 TCs 回收率，以血液最高，肌肉次之，肝臟較低，肝臟組織內含蛋白質及化合物種類較肌肉與血液複雜，因此萃取液將 TCs 從肝臟中萃取出之困難度高，但整體變異係數範圍為 1.91%~12.97%，因此此前處理模式具穩定的回收率及良好的再現性，可應用於血液、肌肉及肝臟中 TCs 含量分析測定。

表 5. 血液、肌肉及肝臟中 TCs 之回收率 (n=7)

Table 5. The recovery of tetracyclines in chicken blood, muscle and liver (n=7)

Matrix	Antibiotics	Concentration			
		10 ppb		100 ppb	
		Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Blood	TC	98.69	6.38	91.34	4.41
	CTC	98.79	5.67	102.14	1.91
	OTC	103.01	8.47	94.09	5.38
Muscle	TC	83.08	8.76	73.14	6.01
	CTC	90.84	7.12	87.47	6.07
	OTC	95.44	3.58	86.81	6.39
Liver	TC	69.96	12.97	62.34	9.85
	CTC	75.24	3.72	69.49	7.16
	OTC	77.99	6.17	70.71	6.93

#### IV. 方法偵測極限

本試驗針對飼料、血液、肌肉及肝臟四種不同基質，進行方法偵測極限（Method detection limit, MDL）測定（表 6）。TCs 為可使用之抗生素，其藥物殘留最大容許量（Max residue limit, MRL）於肌肉為 200 ppb，於肝臟為 600 ppb。本試驗 TCs 於血液之 MDL 為 1.76~2.74 ppb，於肌肉之 MDL 為 1.07~2.28 ppb，於肝臟之 MDL 為 0.88~2.85 ppb（表 6），可因應相關規定之檢測。Bogialli *et al.*（2006）以 LC/MS/MS 檢測家畜動物肉體中 TCs 殘留量，其 LOD 為 1.0~6.0 ppb。Reverté *et al.*（2003）以 LC/MS/MS 檢測水中 TCs 殘留量，其 LOD 為 4.0~6.0 ppb。另外，TCs 於飼料之 MDL 為 2.61~6.75 ppb，低於中華民國國家標準 CNS 9316（2004）飼料中經四環素、氯四環素及四環素檢驗方法之最低檢出量 12.5 ppm 以及 93.01.14 衛署食字第 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方法之 TC 與 OTC 檢出限量 5 ppb 及 CTC 10 ppb。

表 6. TCs 之方法偵測極限

Table 6. The method detection limit (MDL) of tetracyclines

Matrix	Compound	MDL
Feed	Tetracycline (TC)	3.49 ppb
	Chlortetracycline (CTC)	2.61 ppb
	Oxytetracycline (OTC)	6.75 ppb
Blood	Tetracycline (TC)	1.98 ppb
	Chlortetracycline (CTC)	1.76 ppb
	Oxytetracycline (OTC)	2.74 ppb
Muscle	Tetracycline (TC)	2.28 ppb
	Chlortetracycline (CTC)	2.03 ppb
	Oxytetracycline (OTC)	1.07 ppb
Liver	Tetracycline (TC)	2.85 ppb
	Chlortetracycline (CTC)	0.88 ppb
	Oxytetracycline (OTC)	1.51 ppb

依據歐盟執委會會議規章 2002/657/EC 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，本試驗之 MDL 皆遠低於 50% MRL（肌肉 50% MRL = 100 ppb；肝臟 50% MRL = 300 ppb），故此檢測技術符合歐盟執委會會議規章規定。

## 結論

本試驗 LC/MS/MS 應用於飼料、雞隻血液、肌肉及肝臟中 TCs 含量分析具有高靈敏度、高解析度、無須衍生化及可同時定性定量等優勢。本研究開發之 TCs 檢測技術其 LOD、LOQ 及 MDL 皆低於 MRL 規定數值，符合檢測要求，亦即此分析系統符合歐盟執委會會議規章決議之分析方法

性能標準，可與國際組織檢測技術接軌。

## 參考文獻

- 中華民國國家標準。2005。CNS9316。飼料中經四環素、氯四環素及四環素檢驗方法。
- 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。
- Blanchflower, W. J., R. J. McCracken, A. S. Haggan and D. G. Kennedy. 1997. Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 692:351-360.
- Bogialli, S., R. Curini, A. D. Corcia, A. Lagana and G. Rizzuti. 2006. A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 54:1564-1570.
- 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.
- 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.
- Reverté, S., F. Borrull, E. Pocurull and R. M. Marcé. 2003. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography- (electrospray) mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1010:225-232.
- 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.
- 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 tetracyclines in feed, chicken blood, muscle and liver by liquid chromatography tandem mass spectrometry<sup>(1)</sup>

Ming-Chih Teng<sup>(2)</sup> Bor-Ling Shih<sup>(2)</sup> and Mian-Lian Lee<sup>(2)(3)</sup>

Received : Apr. 10, 2009 ; Accepted : Jun. 30, 2009

## 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) for determining of tetracyclines (TCs) in feed, chicken blood, muscle and liver. A triple-quadrupole mass spectrometry using a Turbo Ion Spray source operating in the positive ion mode was used to detect TCs. The method detection limit (MDL) were 2.61 ~ 6.75 ng/g in feed, 1.76 ~ 2.74 ng/mL in blood, 1.07 ~ 2.28 ng/g in muscle, and 0.88 ~ 2.85 ng/g in liver. At supplementation of 100 ppb TCs in feed, the recoveries were between 99.44 and 111.30 %, with coefficient of variation (CV) ranging between 6.74 and 9.88 %. Recoveries of TCs from blood were between 91.34 and 102.14 %, with CV ranging between 1.91 and 5.38 %. Recoveries of TCs from muscle were between 73.14 and 87.47 %, with CV ranging between 6.01 and 6.39 %. Recoveries of TCs from liver were between 62.34 and 70.71 %, with CV ranging between 6.93 and 9.85 %. It is concluded that the method can be applied to the TCs residues analysis in feed, chicken blood, muscle and liver.

Key words: Tetracyclines, High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, Feed, Blood, Muscle, Liver.

---

(1) Contribution No. 1515 from Livestock Research Institute (LRI), Council of Agriculture (COA).

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

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