

液相層析串聯式質譜儀檢測牛乳中頭孢菌素⁽¹⁾

鄧名志⁽²⁾⁽³⁾ 李免蓮⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：98年10月21日；接受日期：99年1月11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 (Liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) 搭配固相萃取 (Solid phase extraction, SPE)，建立牛乳中頭孢菌素殘留量之分析方法。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頭孢菌素。牛乳中頭孢菌素分析之方法偵測極限 (Method detection limit, MDL) 為 0.74 ~ 2.44 ng/mL (ppb)，於牛乳中添加 10 ng/mL 頭孢菌素，回收率 69.84% ~ 99.43%，變異係數 (CV) 值 2.90% ~ 8.52%。本方法可應用於牛乳中頭孢菌素殘留量分析。

關鍵詞：牛乳、頭孢菌素、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，於投藥期間生乳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，目前坊間採用酵素免疫篩檢試劑套組 (Enzyme-linked immunosorbent assay Kits, ELISA Kits) 檢測肉品、牛奶、魚、蝦等食品中藥物殘留濃度，做為藥物殘留之定性鑑定。

頭孢菌素類 (Cepharosporins) 抗生素屬於 β -Lactam 抗生素，為廣效性抗生素，對抗革蘭式陽性菌及革蘭式陰性菌皆有其效果，過敏為服用頭孢菌素類抗生素的主要副作用，對青黴素過敏的病人，有 10% 會對頭孢菌素產生交叉過敏。頭孢菌素類抗生素經常使用於治療畜禽動物疾病，且時常使用於乳牛乳房炎之治療。關於頭孢菌素類抗生素的檢測方法有液相層析-紫外光吸收光譜儀 (Liquid chromatography/ultraviolet absorbance detector, LC/UV) (Baere *et al.*, 2004；Sørensen

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1546 號。

(2) 行政院環境保護署環境檢驗所。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

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

and Snor, 2000)、液相層析 - 光電二極管 (Liquid chromatography/diode array detection, LC/DAD) (Jacobson *et al.*, 2006)、酵素免疫分析法 (ELISA) (Kress *et al.*, 2007)、毛細管電泳 (Capillary electrophoresis, CE) (Puig *et al.*, 2007)、液相層析-質譜儀 (LC/MS) (Keever *et al.*, 1998) 及液相層析-串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) (Makeswaran *et al.*, 2005) 等。

本試驗擬以 LC/MS/MS 系統建立牛乳中頭孢菌素含量檢測方法，以檢測牛乳中頭孢菌素殘留量，維護牛乳品質安全。

材料與方法

I. 試驗藥劑

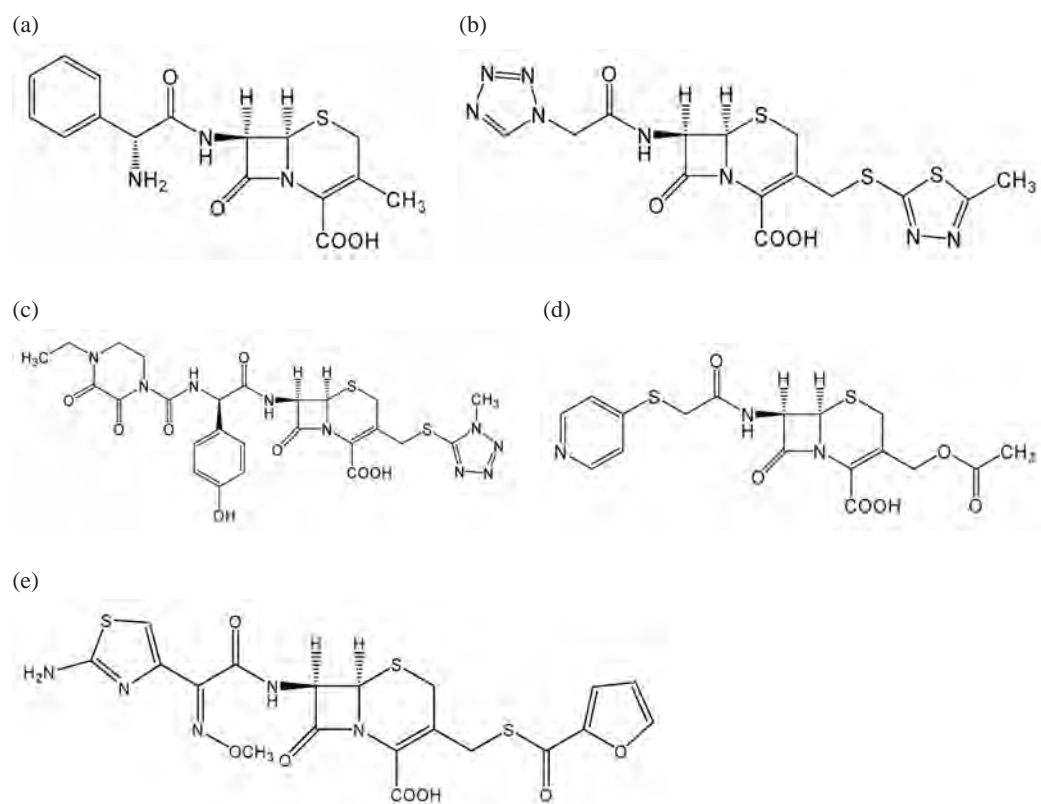


圖 1. 抗生素之化學結構：(a) 頭孢力欣，(b) 頭孢唑林，(c) 頭孢哌酮，(d) 西華比林，(e) 畜福。

Fig. 1. Chemical structures of the antibiotics: (a) Cephalexin ; (b) Cefazolin ; (c) Cefoperazone ; (d) Cephapirin ; (e) Ceftiofur.

本試驗選定五種頭孢菌素類抗生素：頭孢力欣 (Cephalexin)、頭孢唑林 (Cefazolin)、頭孢哌酮 (Cefoperazone)、西華比林 (Cephapirin) 及畜福 (Ceftiofur) (圖 1) 等標準品購自 SIGMA。Cephalexin、Cefazolin、Cefoperazone 及 Cephapirin 各秤取 10.0 mg 以 H₂O 溶解並定量至 10.0

mL，配製成 1000 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) 個別標準儲備液，Ceftiofur 以甲醇 (Methanol) 溶解並定量至 10.0 mL，配製成 1000 ppm 個別標準儲備液，個別標準儲備液各取 1 mL 以 H_2O 定量至 10.0 mL，配製成 100 ppm 混合儲備液，儲備液於 4°C 冷藏。

II. MS/MS 分析條件設定

本試驗之 MS/MS 採 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，離子源溫度分別設定在 420°C，氣簾氣體 (Curtain gas) 及碰撞氣體 (Collision gas) 是使用高純度氮氣 (N_2 , 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，以此判讀頭孢菌素碰撞反應游離圖譜，提取最佳母、子離子監測模式。

將 1000 ppm 頭孢菌素個別標準儲備液以含 0.1 % 甲酸 (Formic acid, FA) 之 CH_3OH 稀釋成 100 ppb，使用 1 mL 注射針以注射幫浦 10 $\mu\text{L/min}$ 的流速注入質譜儀離子源，找尋 Declustering Potential (DP)、Focusing Potential (FP)、Collision Cell Exit Potential (CXP) 等最佳質譜分析參數，以及其碰撞能量 (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 μm , 4.6 \times 150 mm)，管柱使用時溫度維持 40°C。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 。頭孢菌素分析之動相採等比沖提，比例為 A/B = 40/60，流速為 350 $\mu\text{L/min}$ ，樣品注射體積為 10 μL 。

IV. 檢量線配製

將濃度 100 ppm 頭孢菌素混合儲備液以 H_2O 配製所需濃度：2、5、10、20、50、100、200 ppb，供檢量線製作。

V. 樣品前處理

(i) 固相萃取匣

低極性固相萃取匣：Oasis® HLB 3 cc / 60 mg 購自沃特斯 (Waters Co.)

活化方式：3 mL CH_3OH \rightarrow 4 mL H_2O

(ii) 頭孢菌素前處理

取 1 mL 牛乳至 10 mL 離心管，加 1 mL H_2O 混合，超音波震盪萃取。置入已活化 SPE 管柱 (Oasis® HLB 3 cc / 60 mg)，以 1 mL H_2O 沖洗離心管並置入 SPE 管。以 1 mL $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH} = 95:5$ 流洗，2 mL CH_3OH 沖提收集。50°C 下吹氮至乾，再以 1 mL H_2O 回溶，經 0.2 μm PVDF 濾膜過濾。

VI. 樣品前處理回收率測定

添加頭孢菌素 10 ppb 及 100 ppb 於牛乳中進行回收率測定及變異係數計算。

結果與討論

I. 於質譜儀之母離子、子離子與參數測定

頭孢菌素離子化後，以正離子 $[M+H]^+$ 模式進入質譜儀，測得質荷比 (m/z) 訊號為母離子，經碰撞後產生許多碎片，碎片測得 m/z 訊號為子離子 (圖 2)。Cefoperazone 因離子特性不顯著，故僅能找尋一對母、子離子對 (圖 2)，其餘 4 種頭孢菌素各選擇 2 組母、子離子，以因應歐盟執委會第 2002/657/EC 決議分析方法性能標準規定之確証方法。調整 DP、EP、CXP 等參數值尋找最佳離子強度 (表 1)，並調整 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 1)。

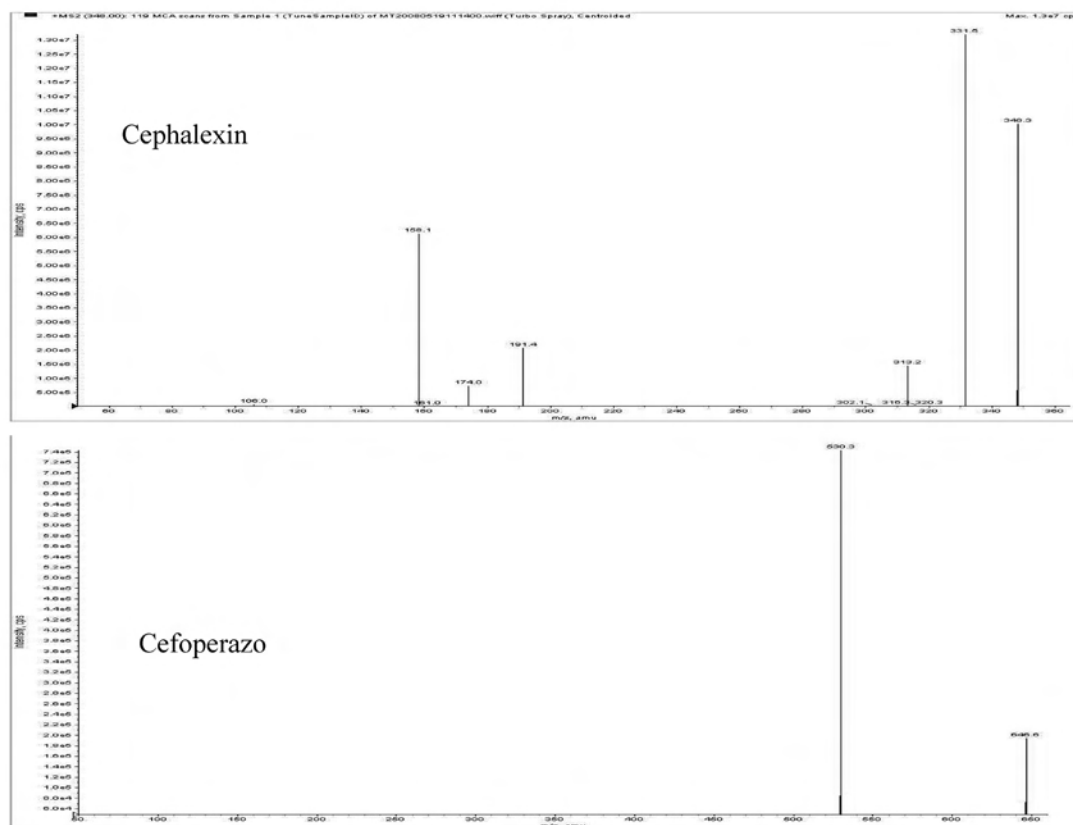


圖 2. 頭孢力欣及頭孢唑林質譜圖。

Fig. 2. Mass spectrometry of cephalixin and cefoperazone .

表 1. 檢測頭孢菌素類抗生素之質譜儀參數及狀態

Table 1. The parameters and conditions of mass spectrometry for detecting the cepharosporin antibiotics

Compound	Precursor ion (m/z)	Production (m/z)	Declustering potential DP(V)	Focusing potential FP(V)	Collision energy CE(V)	Collision cell exit potential CXP(V)
Cephalexin	348	158	33	350	13	9
		174			20	10
Cefazolin	455	323	40	330	17	22
		156			24	9
Cefoperazone	646	530	55	360	17	15
Cephapirin	424	292	35	300	22	8
		152			33	9
		241			24	15
Ceftiofur	524	210	50	360	30	14
		140			33	8

II. LC/MS/MS對抗生素之分析效能

依據分析物極性與化學結構不同將分析物分離 (圖 3)。並且可藉由 MRM 偵測，分別顯示個別層析圖譜 (圖 3)，並個別積分定量，不受彼此間訊號干擾。

III. 回收率測定結果

頭孢菌素與青黴素同為 β -lactam 類抗生素，因此頭孢菌素前處理依據鄧等 (2008) 研究中青黴素之前處理模式，建立牛乳中頭孢菌素前處理方法。於牛乳樣品中添加 10 ppb 及 100 ppb 兩種濃度之頭孢菌素，以測定前處理技術回收率及變異係數 (CV) (表 2)，於 10 ppb 濃度下，回收率 69.84 ~ 99.43%，CV 值 2.90 ~ 8.52%；於 100 ppb 濃度下，回收率 70.00 ~ 102.14%，CV 值 4.72 ~ 10.11%，具有穩定回收率及良好再現性。因此，此前處理模式應用於牛乳中頭孢菌素含量分析測定具可行性。

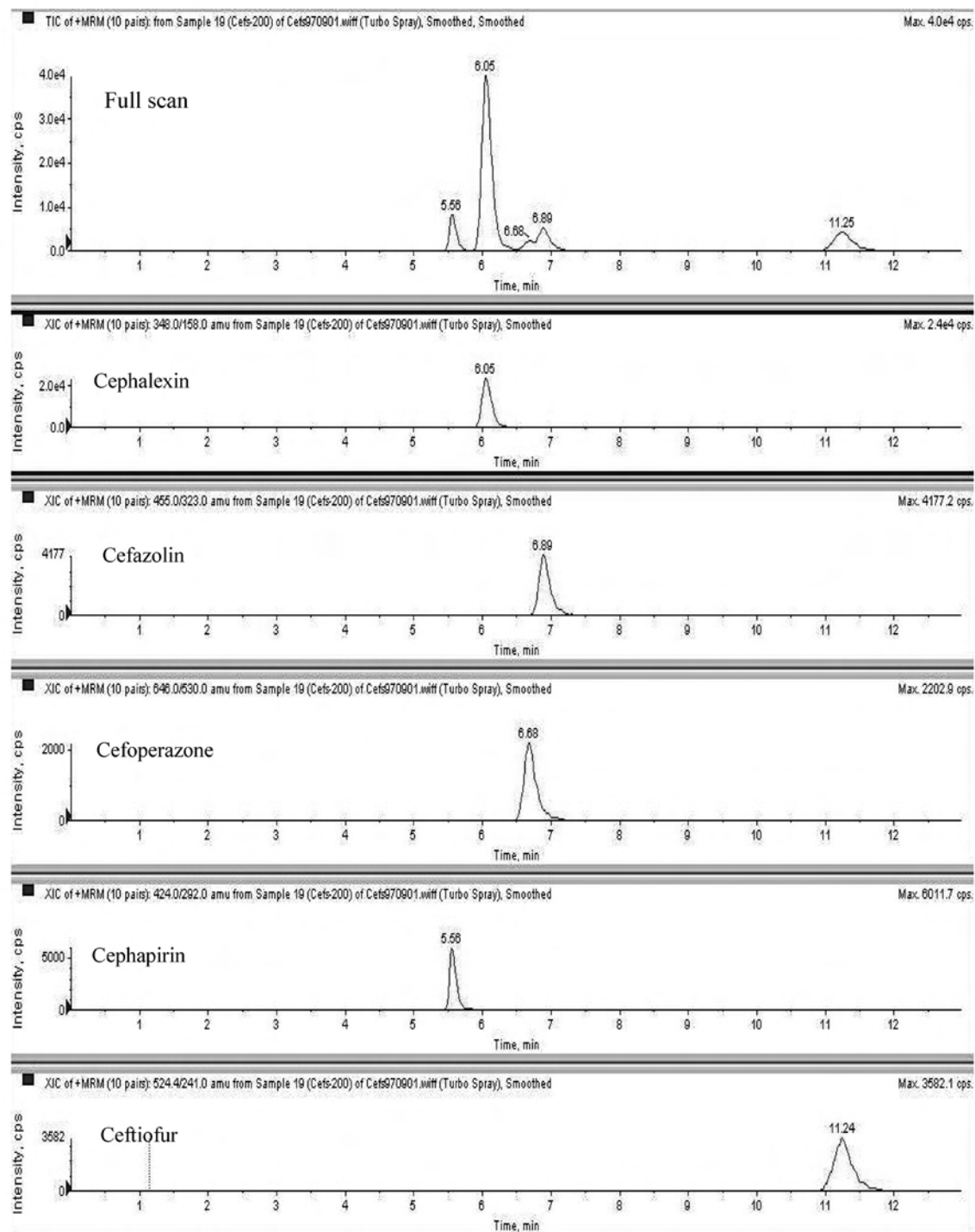


圖 3. 頭孢菌素類抗生素層析圖譜。

Fig. 3. LC/MS/MS chromatogram of cepharosporin antibiotics.

表 2. 牛乳中頭孢菌素之回收率測定

Table 2. The recovery of cepharosporins in milk

Compound	Concentration			
	10 ppb (n=10)		100 ppb (n=12)	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Cephalexin	69.84	5.03	70.00	5.23
Cefazolin	89.57	6.94	87.41	5.79
Cefoperazone	92.61	8.52	90.25	4.72
Cephapirin	99.43	8.16	102.14	10.11
Ceftiofur	85.23	2.90	86.57	5.08

IV. 方法偵測極限

我國規定牛乳中 Cephapirin 及 Ceftiofur 允許最大殘留量 (Maximum residue limit, MRL) 為 10 ppb 及 100 ppb，Cephapirin 及 Ceftiofur 之 MDL 皆低於我國規定 MRL (表 3)，可因應法規需求。

表 3. 頭孢菌素之方法偵測極限

Table 3. The method detection limit (MDL) of cepharosporins

Compound	Ion transitions (m/z)	MDL (ppb)
Cephalexin	348 → 158	1.05
Cefazolin	455 → 323	1.87
Cefoperazone	646 → 530	2.37
Cephapirin	424 → 292	2.44
Ceftiofur	524 → 241	0.74

結論

本試驗 LC/MS/MS 應用於頭孢菌素分析具有高靈敏度、高解析度、無須衍生化及可同時定性定量等優勢。頭孢菌素之 MDL 為 0.74~2.44 ng/mL (ppb)，其中 Cephapirin 及 Ceftiofur 之 MDL 皆低於我國規定 MRL 之 10 ppb 及 100ppb，可因應法規需求，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頭孢菌素之檢驗，以維護牛乳品質安全性。

參考文獻

- 鄧名志、林委誼、李免蓮。2008。液相層析串聯式質譜儀檢測牛乳中抗生素化合物。畜產研究 41：295-306。
- Baere, S. D., F. Pille, S. Croubels, L. Ceelen and P. D. Backer. 2004. High-performance liquid chromatographic-UV detection analysis of ceftiofur and its active metabolite desfuroylceftiofur in horse plasma and synovial fluid after regional intravenous perfusion and systemic intravenous injection of ceftiofur sodium. *Anal. Chem. Acta.* 512:75-84.
- Jacobson, G. A., S. Martinod and C. P. Cunningham. 2006. Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40:1249-1252.
- Keever, J., R. D. Voyksner and K. L. Tyczkowska. 1998. Quantitative determination of ceftiofur in milk by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 794:57-62.
- Kress, C., C. Seidler, B. Kerp, E. Schneider and E. Usleber. 2007. Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. *Anal. Chem. Acta.* 586:275-279.
- Makeswaran, S., I. Patterson and J. Points. 2005. An analytical method to determine conjugated residues of ceftiofur in milk using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta.* 529:151-157.
- Puig, P., F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa and C. Aguilar. 2007. Improving the sensitivity of the determination of ceftiofur by capillary electrophoresis in environmental water samples: In-line solid phase extraction and sample stacking techniques. *Anal. Chem. Acta.* 587:208-215.
- Sørensen, L. K. and L. K. Snor. 2000. Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 882:145-151.

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

Ming-Chih Teng⁽²⁾⁽³⁾ and Mian-Lian Lee ⁽³⁾⁽⁴⁾

Received : Oct. 21, 2009 ; Accepted : Jan. 11, 2010

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 determination of cepharosporins residues in milk. A triple-quadrupole mass spectrometry using a TurboIon Spray source operating in the positive ion mode was used to detect cepharosporins. The method detection limit (MDL) for cepharosporins were 0.74 ~ 2.44 ng/mL. At 10 ppb level in milk, recoveries of cepharosporins were between 69.84 and 99.43%, with coefficient of variation (CV) ranging between 2.90 and 8.52 %. The method can be applied to the analysis of cepharosporins residues in milk.

Key words : Milk, Cepharosporins, High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

(1) Contribution No 1546 from Livestock Research Institute (LRI), Council of Agriculture (COA), Executive Yuan.

(2) Environmental Analysis Laboratory, Environmental Protection Administration, Executive Yuan, Jhunglei, Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

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

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

