

液相層析串聯式質譜儀檢測飼料中林可黴素 與觀黴素⁽¹⁾

鄧名志⁽²⁾ 李免蓮⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：99 年 10 月 25 日；接受日期：100 年 4 月 25 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)，建立飼料中林可黴素與觀黴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林可黴素及觀黴素。林可黴素之方法偵測極限 (MDL) 為 0.49 ppb，觀黴素之 MDL 為 21.23 ppb。飼料中添加 100 ppb 林可黴素及觀黴素，以本方法測定，其回收率分別為 64.80% 及 99.68%，CV 值分別為 3.67% 及 7.10%。本方法可應用於飼料中林可黴素與觀黴素殘留量分析。

關鍵詞：飼料、林可黴素、觀黴素、高效率液相層析串聯式質譜儀。

緒言

林可黴素 (Lincomycin) 為鹽基性抗生素，通常以鹽酸鹽之一水合物供製劑用，屬於中廣效性抗生素。對革蘭陽性菌、革蘭陰性球菌、黴漿體及豬赤痢螺旋體有抑菌作用。本劑與一部份巨環類抗生素間有不完全交叉抗藥性。林可黴素不可與紅黴素 (Erythromycin) 同時使用。(豬使用林可黴素可能會發生軟便、下痢或肛門腫脹等現象。)

觀黴素 (Spectinomycin) 為鹽基性物質，易與酸性物質形成鹽類。製劑常用者為硫酸鹽，為白色結晶性粉末，在鹼性時不安定。對革蘭陽性菌、革蘭陰性菌、黴漿體具有抑菌作用。觀黴素與一部份巨環類抗生素，尤其紅黴素間有部份交叉抗藥性。觀黴素對造血系統及肝臟可能會引起傷害，通常與林可黴素配合使用。林可黴素與觀黴素早期使用當做飼料添加物，用以促進生長及改進飼料利用效率，預防畜禽動物疾病，但過度使用，將使微生物產生抗藥性。因此，農委會公告林可黴素與觀黴素兩種抗生素自中

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1688 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。

中華民國 95 年 1 月 1 日起禁止添加於飼料中當做飼料添加物。

林可黴素與觀黴素的檢測方法有液相層析 - 紫外光偵測器 (LC/UV) (Platzer and White, 2006)、液相層析 - 電化學偵測器 (LC/electrochemical detection) (Debremaeker *et al.*, 2002; Szúnyog *et al.*, 2002)、液相層析 - 蒸氣式光散射偵測器 (LC/ELSD) (Wang *et al.*, 2006)、毛細管電泳 (CE) (Zhao *et al.*, 2004)、液相層析 - 質譜儀 (LC/MS) (Thompson *et al.*, 2003) 及 LC/MS/MS (Peru *et al.*, 2006) 等。中華民國國家標準「CNS 9534 飼料中林可黴素檢驗方法」、「CNS 14428 食品中動物用藥殘留量檢驗方法 - 林可黴素之檢驗」及「CNS 10464 飼料添加物檢驗法 - 觀黴素之測定」三項公告分析方法皆採用生物抑菌分析法檢測此兩種抗生素含量，其檢測極限介於 100 ppb ~ 2 ppm 之間。

本試驗擬以 LC/MS/MS 系統建立飼料中林可黴素與觀黴素含量檢測方法，檢測飼料中林可黴素與觀黴素殘留量，維護飼料品質安全。

材料與方法

I. 試驗藥劑

本試驗用之林可黴素及觀黴素 (圖 1) 等標準品分別購自 Fluka 及 SIGMA。秤取 10 mg 林可黴素標準品以去離子水溶解並定量至 10 mL，配製成 1000 ppm 林可黴素標準儲備液。秤取 15.1 mg 觀黴素標準品 (純度 66.2%) 以 H₂O/乙腈 (Acetonitrile, CH₃CN) = 1/1 (v/v) 溶解並定量至 10 mL，配製成 1000 ppm 觀黴素標準儲備液。

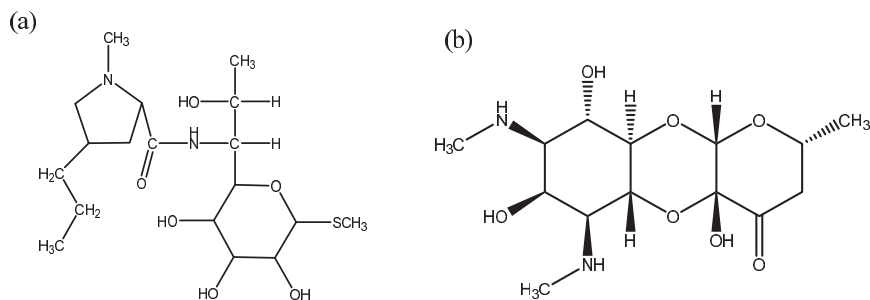


圖 1. (a) 林可黴素與 (b) 觀黴素之化學結構。

Fig. 1. Chemical structures of (a) Lincomycin; (b) Spectinomycin.

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 (N₂, 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，以此判讀待測物之碰撞反應游離圖譜，萃取最佳母、子離子監測模式。

將 1000 ppm 林可黴素及觀黴素個別標準儲備液以含 0.1 % 甲酸 (Formic acid, FA) 之甲醇 (Methanol, CH₃OH) 稀釋成 100 ppb，使用 1 mL 注射針以注射幫浦 10 μL/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，以及林可黴素、觀黴素之母離子、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 μm , 4.6 \times 150 mm)，管柱使用時溫度維持 40 $^{\circ}\text{C}$ 。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 。林可黴素與觀黴素分析之動相採梯度沖提 (表 1)，流速為 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，樣品注射體積為 10 μL 。

表 1. 檢測林可黴素及觀黴素之動相梯度

Table 1. The mobile phase gradient profile for detection of lincomycin and spectinomycin

Time (min)	0	0.1	8.2	8.3	12.5
Mobile phase A (%)	60	0	0	60	60
Mobile phase B (%)	40	100	100	40	40

IV. 檢量線配製

將濃度 10 ppm 林可黴素及 100 ppm 觀黴素混合儲備液以含 0.1% FA 之 H_2O 配製所需檢量線濃度。林可黴素：2、5、10、20、50、100 ppb；觀黴素：0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1 ppm。

V. 試驗流程

(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

離子型固相萃取匣：Oasis® MCX 6 cc / 150 mg 購自沃特斯 (Waters Co.)

活化方式：5 mL CH_3OH \rightarrow 3 mL H_2O \rightarrow 3 mL 0.1 N HCl

(ii) 測試樣品前處理

(a) 樣品中林可黴素之萃取方法

取 2 g 飼料至 50 mL 離心管，加 10 mL $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (5/95)，超音波震盪萃取。在 6,000 rpm 狀態下離心 10 分鐘，收集上層澄清液。另以 10 mL $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (5/95) 加入離心管中，重複萃取步驟，將兩次萃取液混合。取 5 mL 置入已活化 SPE 管柱 (Oasis® HLB 3 cc / 60 mg)，以 1 mL H_2O 流洗，最後加入 5 mL CH_3OH 沖提收集。沖提液於 50 $^{\circ}\text{C}$ 下以氮氣吹乾後，以 2 mL 含 0.1% FA 之 CH_3OH 回溶，經 0.2 μm PVDF 材質濾膜過濾。

(b) 樣品中觀黴素之萃取方法

取 2 g 飼料至 50 mL 離心管，加 10 mL 含 1% FA 之 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (95/5)，超音波震盪萃取。在 6,000 rpm 狀態下離心 10 分鐘，收集上層澄清液。另以 10 mL 含 1% FA 之 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (95/5) 加入離心管中，重複萃取步驟，將兩次萃取液混合。取 10 mL 置入已活化 SPE 管柱 (Oasis® MCX 6 cc / 150 mg)，以 5 mL 0.1 N HCl 流洗，再以 2 mL CH_3OH 流洗，最後以 6 mL 含 5% NH_4OH 之 CH_3OH 沖提收集。沖提液於 50 $^{\circ}\text{C}$ 下以氮氣吹乾後，以 2 mL 含 0.5% FA 之 CH_3OH 回溶，經 0.2 μm PVDF 材質濾膜過濾。

VI. 樣品前處理回收率測定

於飼料中添加林可黴素 10 ppb 及 100 ppb，觀黴素 100 ppb 及 1 ppm 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

林可黴素及觀黴素離子化後，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)。林可黴素及觀黴素各選擇 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，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 2)。

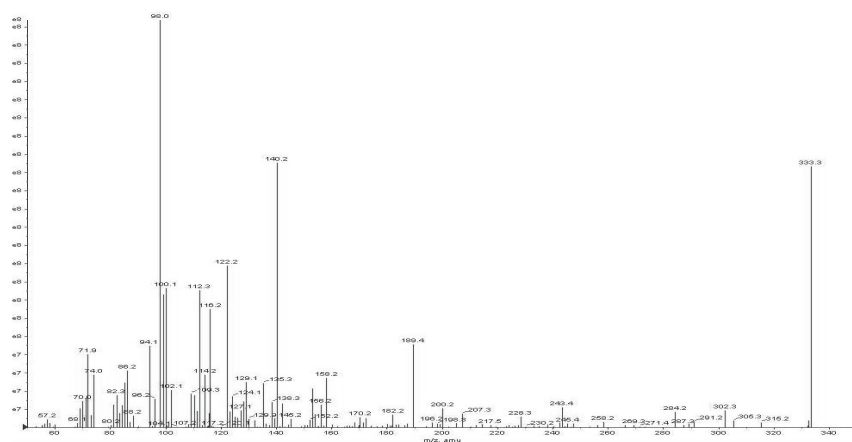


圖 2. 觀黴素質譜圖。

Fig. 2. Mass spectrometry of spectinomycin.

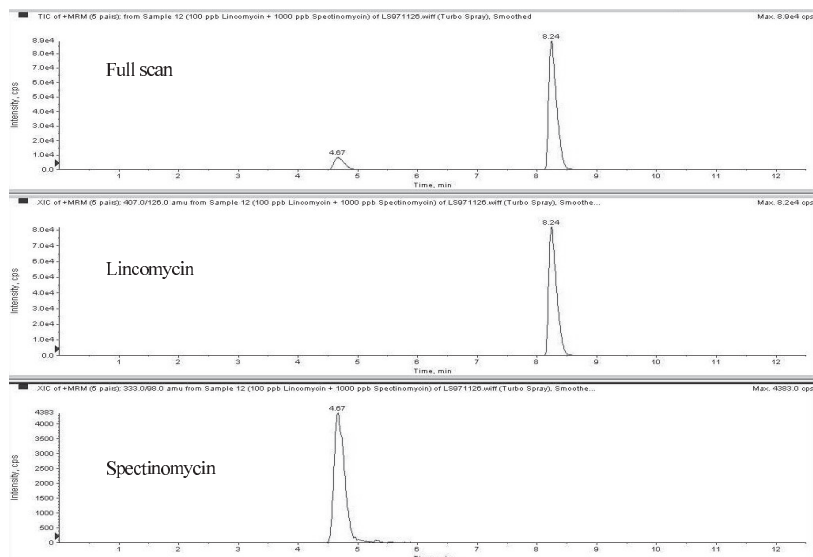
表 2. 檢測林可黴素及觀黴素抗生素之質譜儀參數及狀態

Table 2. The parameters and conditions of mass spectrometry for detecting the lincomycin and spectinomycin

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)
Lincomycin	407	126	73	368	38	8
		359			26	10
Spectinomycin	333	98	43	320	40	5
		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

飼料中林可黴素及觀黴素前處理部份，以不同萃取液探討飼料中林可黴素及觀黴素之萃取效能，結果如表 3。

表 3. 不同萃取液對林可黴素與觀黴素之回收率比較

Table 3. The recovery of lincomycin and spectinomycin when extracted by different solvents

Compound	Extraction solvent			
	CH ₃ OH/H ₂ O (5/95) (n=6)		1% FA in CH ₃ OH/H ₂ O (95/5) (n=8)	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Lincomycin	112.73	8.56	68.30	9.66
Spectinomycin	43.63	17.84	102.14	9.43

對林可黴素而言，CH₃OH/H₂O (5/95) 之萃取效能高於含 1% FA 之 CH₃OH/H₂O (95/5) 之萃取效能；對觀黴素而言，CH₃OH/H₂O (5/95) 之萃取效能低於含 1% FA 之 CH₃OH/H₂O (95/5) 之萃取效能。因此，分別以 CH₃OH/H₂O (5/95) 及含 1% FA 之 CH₃OH/H₂O (95/5) 萃取飼料中林可黴素及觀黴素。

本研究利用 SPE 技術淨化萃取液，林可黴素可使用低極性固相萃取管柱純化萃取液，如 C18、C8 等材質，但觀黴素萃取液因為是含 1% FA 之 CH₃OH/H₂O (95/5)，且觀黴素於酸性溶劑下會形成陽離子型化合物，低極性固相萃取管柱對觀黴素滯留效能低，致回收率低（表 4）。林可黴素於 Oasis® HLB 之回收率優於 Oasis® MCX 之回收率，且穩定度 Oasis® HLB 優於 Oasis® MCX，而觀黴素於 Oasis® MCX 之回收

率優於 Oasis® HLB 之回收率。因此本實驗針對兩種抗生素選用不同固相萃取匣，分別為中性低極性固相萃取匣 (Oasis® HLB)，及陽離子交換固相萃取匣 (Oasis® MCX)。

表 4. 不同固相萃取匣之回收率比較 (n=6)

Table 4. The recovery of lincomycin and spectinomycin at different SPE column

Compound	Solid phase extraction column			
	Oasis® HLB		Oasis® MCX	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Lincomycin	64.07	1.66	42.78	4.04
Spectinomycin	5.45	21.27	82.93	6.21

於飼料樣品中添加 10 ppb 及 100 ppb 二種濃度之林可黴素以測定前處理技術回收率及 CV (表 5)，在 10 ppb，回收率 45.73%，CV 值 3.59%；100 ppb，回收率 64.80%，CV 值 3.67%，具有很好的穩定度。Jana Olšovská *et al.* (2007) 以 Oasis HLB cartridge 前處理淨化搭配 HPLC/UV 分析系統，分析製作 Licomycin 之發酵槽液中 Licomycin 技術開發，分別添加 1、5、10 ppm 濃度探討回收率，回收率介於 81.5~89.85% 之間。與本實驗回收率有所差異之可能原因有二項：1. Jana Olšovská *et al.* (2007) 添加濃度為 ppm 高於本實驗所添加濃度為 ppb；2. 兩者基質不同，一為發酵液，另一為飼料，基質效應不同。

雖然回收率較低，但由於有良好的再現性，故可於每次分析檢測時，藉由添加查核樣品修正回歸其數值，以求得數據準確性。

於飼料樣品中添加 100 ppb 及 1 ppm 二種濃度之觀黴素以測定前處理技術回收率及 CV (表 6)，在 100 ppb，回收率 99.68%，CV 值 7.10%；1 ppm，回收率 79.75%，CV 值 3.57%，具有很好的回收率及穩定度。

表 5. 飼料中林可黴素回收率測定 (n=6)

Table 5. The recovery of lincomycin in feed

Compound	Concentration			
	10 ppb		100 ppb	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Lincomycin	45.73	3.59	64.80	3.67

表 6. 飼料中觀黴素回收率測定 (n=6)

Table 6. The recovery of spectinomycin in feed

Compound	Concentration			
	100 ppb		1 ppm	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Spectinomycin	99.68	7.10	79.75	3.57

IV. 方法偵測極限

中華民國國家標準「CNS 9534 飼料中林可黴素檢驗方法」、「CNS 14428 食品中動物用藥殘留量檢

驗方法 - 林可黴素之檢驗」及「CNS 10464 飼料添加物檢驗法 - 觀黴素之測定」三項公告分析方法皆採用生物抑菌分析法檢測抗生素含量，其檢測極限為 100 ppb ~ 2 ppm，本試驗對林可黴素及觀黴素之偵測極限 (MDL) 分別為 0.49 ppb 與 21.23 ppb (表 7)，顯示優於中華民國國家標準之 MDL。

表 7. 林可黴素及觀黴素之方法偵測極限

Table 7. The method detection limit (MDL) of Lincomycin and Spectinomycin

Compound	Ion transitions (m/z)	MDL (ppb)
Lincomycin	407 → 126	0.49
Spectinomycin	333 → 98	21.23

參考文獻

- 中華民國國家標準 CNS 10464。1983。飼料添加物檢驗法 - 觀黴素之測定。
- 中華民國國家標準 CNS 14428。2001。食品中動物用藥殘留量檢驗方法 - 林可黴素之檢驗。
- 中華民國國家標準 CNS 9534。2004。飼料中林可黴素檢驗方法。
- Debremaeker, D., E. Adams, E. Nadal, B. V. Hove, E. Roets and J. Hoogmartens. 2002. Analysis of spectinomycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* 953: 123-132.
- Jana Olšovská, Markéta Jelínková, Petr Man, Markéta Koběřská, Jiří Janata, and Miroslav Flieger. 2007. High-throughput quantification of lincomycin traces in fermentation broth of genetically modified *Streptomyces* spp. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. A* 1139: 214-220.
- Peru, K. M., S. L. Kuchta, J. V. Headley and A. J. Cessna. 2006. Development of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for spectinomycin and lincomycin in liquid hog manure supernatant and run-off from cropland. *J. Chromatogr. A* 1107: 152-158.
- Platzer, D. J. and B. A. White. 2006. Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 84-88.
- Szúnyog, J., E. Adams, K. Liekens, E. Roets and J. Hoogmartens. 2002. Analysis of a formulation containing lincomycin and spectinomycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 213-220.
- Thompson, T. S., D. K. Noot, J. Calvert and S. F. Pernal. 2003. Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1020: 241-250.
- Wang, J., X. Hu, Y. Tu and K. Ni. 2006. Determination of spectinomycin hydrochloride and its related substances by HPLC-ELSD and HPLC-MSn. *J. Chromatogr. B* 834: 178-182.
- Zhao, X., T. You, H. Qiu, J. Yan, X. Yang and E. Wang. 2004. Electrochemiluminescence detection with integrated indium tin oxide electrode on electrophoretic microchip for direct bioanalysis of lincomycin in the urine. *J. Chromatogr. B* 810: 137-142.

Determination of lincomycin and spectinomycin in feed by liquid chromatography tandem mass spectrometry ⁽¹⁾

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

Received : Oct. 25, 2010 ; Accepted : Apr. 25, 2011

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 lincomycin and spectinomycin residues in feed. A triple-quadrupole mass spectrometry using a TurboIon Spray source operating in the positive ion mode was used to detect lincomycin and spectinomycin. The method detection limit (MDL) for lincomycin and spectinomycin were 0.49 ng/g and 21.23 ng/g. At 100 ppb level in feed, recoveries of lincomycin and spectinomycin were 64.80 and 99.68 %, with CV were 3.67 and 7.10 %. The method can be applied to analyze the lincomycin and spectinomycin residues in feed.

Key words: Feed, Lincomycin, Spectinomycin, High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

(1) Contribution No. 1688 from Livestock Research Institute (LRI), Council of Agriculture (COA), Executive Yuan

(2) Environmental Analysis Laboratory EPA. Executive Yuan. 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