

雞飼料中合成抗菌劑同時檢測方法之開發

林金梅 劉敏主 郭美月 林士鈺 楊喜金

行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要

應用高效液相層析法同時檢測雞飼料中 sulfamethazine (SMT)、sulfamerazine (SMR)、sulfathiazole (STZ)、sulfamonomethoxine (SMM)、sulfadimethoxine (SDM)、sulfaquinoxaline (SQX)、oxolinic acid (OXA)、piromidic acid (PMA)及 nalidixic acid (NAA)、flumequine (FLU)等 10 種合成抗菌劑分為磺胺劑及非磺胺劑二部分分析。分析 OXA、FLU、NAA 回收率平均為 96.6%、96.1%、96.3%，分析 SMR、SMT、SDM、SQX 回收率平均為 41.3%、69.0%、63.0%、83.0%，而 STZ 與 SMR 於添加飼料後滯留時間接近，不能同時檢測；SMM 會有干擾波峰。

關鍵詞：飼料、合成抗菌劑、同時檢測

緒言

飼料添加抗菌劑係為了增進動物之生長及維護健康，基於藥品維護動物及人體健康的重要性，國外對於畜水產品中合成抗菌劑之殘留鑽研較多，至於飼料中抗菌劑之分析大部分針對個別藥物為主。為簡化工作流程，提高工作效率，擬尋求簡易快速分析方法作為雞飼料中多種合成抗菌劑同時檢測之用。(1, 2, 3, 4, 5, 6)。

材料與方法

1. 標準曲線之建立

(1)混合標準品原液：精取 SMR、SMT、SDM、SQX 對照標準品 (Sigma 及關東化學產品) 各 50 mg 各置入 50 ml 褐色定量瓶，另 OXA、NAA、FLU、PMA 對照標準品 (Sigma 及 Alcor 公司分贈) 各 50 mg 各置入 50 ml 褐色定量瓶中，以氬甲烷 (E. Merck 產品) 溶解並稀釋至定容，再以氬甲烷 10 倍稀釋成濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ 。

(2)混合標準溶液：量取標準品溶液 10 ml 再以氬甲烷稀釋 1/4 及 1/16 使濃度為 25 $\mu\text{g/ml}$ 及 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

2. 檢體前處理：

(1) OXA、NAA、FLU 及 PMA 檢測樣品前處理：

參考 ROBERT K. 等 (1995)⁽⁵⁾ 及 Ishii Rie 等 1994⁽⁶⁾ 之方法加以改良：飼料樣品 5 g 置 50 ml 褐色離心瓶加 24 ml 丙酮振盪 10 分鐘，經離心 3000 rpm (Kubota 5100, rotor RS-720, Japan) 2 分鐘，取上清液經濾紙過濾入梨形瓶，殘渣再以 25 ml 丙酮二次萃取，合併萃取液入梨形瓶，40°C 減壓濃縮至乾，加丙酮 10 ml 洗梨形瓶，並加入 10 ml 正己烷 (E. Merck 產品)，30 ml 3% 氯化鈉溶液，振搖 10 秒，置離心瓶，3000 rpm 離心 1 分鐘，棄正己烷層，用 10 ml 正己烷再去油質一次，把剩餘之液體移至 250 ml 分液漏斗中，用 25 ml 氯仿 (E. Merck 產品) 潤濕遠心管後再加至分液漏斗中振盪 1 分鐘，待分層後，取氯仿層(下層)至另一個分液漏斗中第二次再用 25 ml 氯仿萃取 1 次，合併氯仿層，加 25 ml 0.1 M 氫氧化鈉溶液，振盪 1 分鐘，靜置使分層，丟棄氯仿層，再用 25 ml 氯仿，小心前後輕搖 10 次，避免起泡，丟棄氯仿層，後加入 25 ml 0.075 M 磷酸，再加入 25 ml 氯仿，劇烈振盪 1 分鐘，流出下層，通過 12.5 cm 濾紙入梨形瓶，再用 25 ml 氯仿再次萃取一次，合併氯仿層液，於 40°C 減壓至乾，加入 2 ml 氬甲烷，再減壓至乾，殘渣以 1 ml 移動相經超音波振盪溶解，經 0.45 μ m 濾膜 (Nylon 材質) 過濾後注入 HPLC 檢測。

(2) 磺胺劑樣品檢測前處理：

取雞飼料樣品 5 g，以 25 ml 氬甲烷萃取，經離心 (3000 rpm, 10 分鐘)，殘渣再以 25 ml 氬甲烷重複一次上述步驟，合併二次氬甲烷液各入褐色色析管經(1)酸性三氧化二鋁 5 g，先以 10 ml 氬甲烷活化(2)經鹼性三氧化二鋁(3)經 Sep pak C₁₈ cartridge (4)經 Sep pak silica 處理後，經減壓濃縮蒸乾。殘渣以氬甲烷：0.1% 磷酸 (4：6) 1 ml 經超音波振盪溶解，經 0.45 μ m 之濾膜過濾後注入 HPLC 檢測，以求取較好的前處理檢測方法。

3. OXA、NAA、FLU 分析條件：

(1) 高效液相層析分離管柱：Mightysil RP-18GP 150×4.6 mm

(5 μ m) 高純度 silica gel。

(2) 移動相：0.02 M Phosphoric acid – acetonitrile – tetrahydrofuran (72+16+12)

(3) 螢光檢測波長：激發波長 325 nm，吸收波長 365 nm。

(4) 流速：1 ml/min

(5) 注入量：10 μ l

(6) 高效液相層析儀：Hitachi 幫浦：L-6200 型；檢測器：L-4250 型；記錄器：D-2500 型及 canon Bjc-210sp；column oven：L-7300 型，檢測器 Hitachi L-4250，螢光 Hitachi F-1050。

4. SMR、SMT、SDM、SQX 分析條件：

- (1) 高效液相層析分離管柱：Mightysil RP-18GP 150×4.6 mm
(5 μm) 高純度 silica gel。
- (2) 移動相：25 mM NaH₂PO₄-CH₃CN (80：20)
- (3) UV 檢測波長：254 nm
- (4) 流速：1 ml/min
- (5) 注入量：20 μl

5. 回收率試驗：

取雞飼料 5 g 3 份，置 50 ml 褐色離心瓶，各別加入 OXA、NAA、FLU 混合標準溶液 (100 μg/ml) 1 ml，(25 μg/ml) 1 ml，(6.25 μg/ml) 1 ml 使其為 20、5、1.25 μg/g。依上述前處理方法及分析條件測試。

雞飼料 5 g 3 份，置 50 ml 褐色離心瓶，各別加入 SMR、SMT、SDM、SQX 混合標準溶液 (100 μg/ml) 1 ml，(25 μg/ml) 1 ml，(6.25 μg/ml) 1 ml 使其為 20、5、1.25 μg/g。依前處理方法經酸性三氧化二鋁淨化再依檢測波長 254 nm，移動相 25 mM NaH₂PO₄：CH₃CN (80：20) 測試。

結 果

添加 NAA、OXA、FLU 之檢體回收率皆有 96% 以上 (表 1)，且線性良好，[如圖 2，R 值接近於 1]。又檢體中同時檢測磺胺劑部分，以經酸性三氧化二鋁處理後的氰甲烷液經減壓濃縮蒸乾，殘渣再以 25 mM NaH₂PO₄：CH₃CN (80：20) 1 ml 溶解注入 HPLC，較無干擾波峰出現，但只出現 SMT、SMR、SDM、SQX 四支波峰。(圖 4)

討 論

NAA、OXA、FLU、PMA，以前處理方法經濃縮蒸乾再以 0.02 M 磷酸：氰甲烷：四氫夫喃 (72：16：12) 1 ml 溶解，經 HPLC 分析，於 UV 280 nm 檢測，雖可同時檢出，但回收率為 70.6%、99.4%、77.6%、30.2%，且雜波峰較多，如圖 1，若改以螢光檢測，激發波長 325 nm，吸收波長 365 nm，則 OXA、NAA、FLU 回收率皆有 96% 以上，如圖 2。另六種磺胺劑若以管柱溫度 40°C，25 mM NaH₂PO₄：CH₃CN 為移動相作梯度分析，標準品可得到良好結果如圖 3，但添加飼料後只剩 SMT、SMR、SQX 三支波峰，且回收率也不理想 (約只剩 1/3 左右) 又檢體以經酸性三氧化二鋁處理後的氰甲烷液經減壓濃縮蒸乾，殘渣再以移動相 1 ml 溶解注入 HPLC，較無干擾波峰出現，但 SMR 與 STZ 滯留時間接近，SMM 波峰變成很小支。也曾試以 5×10⁻³ M 醋酸：甲醇 (60：40) 為移動

相，波長 230 nm，樣品經前處理方法，結果 SMR、SMT、SDM、SQX 滯留時間雖於 10 分鐘內，但回收率只 26.6%、56.9%、60.1%、46.3%，如圖 5。經試多種檢測波長(230 nm, 254 nm, 265 nm) 及多種移動相，如 80% 氰甲烷：0.1% 磷酸 (25：75) 或 25 mM NaH₂PO₄：CH₃CN (80：20) 或以 25 mM NaH₂PO₄：CH₃CN 作梯度分析，及以不同條件淨化處理，結果發現添加藥品在飼料中所呈現波峰不是雜訊多，就是空白飼料有很多波峰或是波峰沒有呈現，也有波峰滯留時間接近易干擾如 STZ 與 SMR，而 SMM 則只呈現小波峰，回收率甚低。

表 1 EX 325 nm, EM 365 nm, 移動相 0.02 M 磷酸：氰甲烷：四氫夫喃 (72：16：12)，OXA、NAA、FLU 之回收率及 CV 值。

藥名	添加濃度(ppm)	回收率%	CV 值%
OXA	1.25	96.1	1.9
	5	96.4	1.5
	20	97.3	1.7
NAA	1.25	96.3	4.4
	5	97.1	4.4
	20	95.0	6.7
FLU	1.25	97.0	3.8
	5	96.4	1.4
	20	95.4	3.9

表 2 UV 波長 254 nm, 移動相 25 mM NaH₂PO₄：CH₃CN (80：20) SMR、SMT、SDM、SQX 之回收率及 CV 值。

藥名	添加濃度(ppm)	回收率%	CV 值%
SMR	1.25	42.2	13.2
	5	40.1	8.3
	20	41.5	9.6
SMT	1.25	70.4	4.3
	5	68.7	7.9
	20	68.0	8.6
SDM	1.25	56.3	5.4
	5	64.3	2.2
	20	68.4	4.9
SQX	1.25	89.0	3.3
	5	78.7	6.0
	20	83.0	5.9

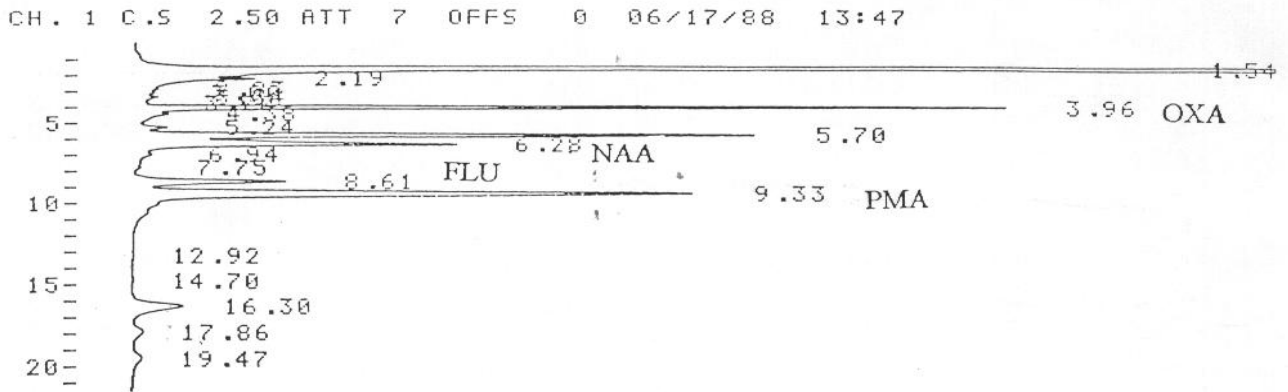
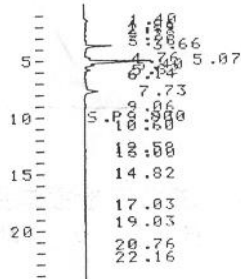
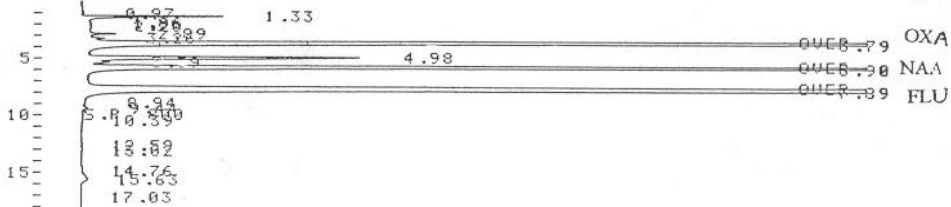


圖1 以0.02 M磷酸：氘甲烷：四氫呋喃（72：16：12）為移動相，於280nm，空白雞飼料添加NAA、OXA、FLU、PMA各20ppm之層析圖。

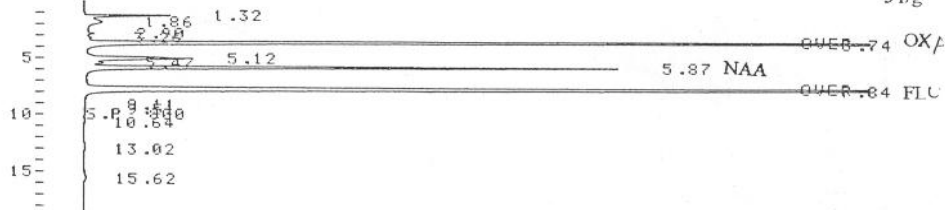
(a) CH. 1 C.S 2.50 ATT 10 OFFS 0 06/29/88 10:44 Blank



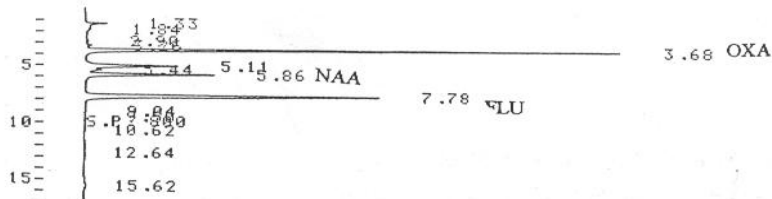
CH. 1 C.S 2.50 ATT 10 OFFS 0 06/29/88 09:49 20 r/g



CH. 1 C.S 2.50 ATT 10 OFFS 0 06/29/88 13:26 5 r/g



CH. 1 C.S 2.50 ATT 10 OFFS 0 06/29/88 12:02 1.25 r/g



(b)

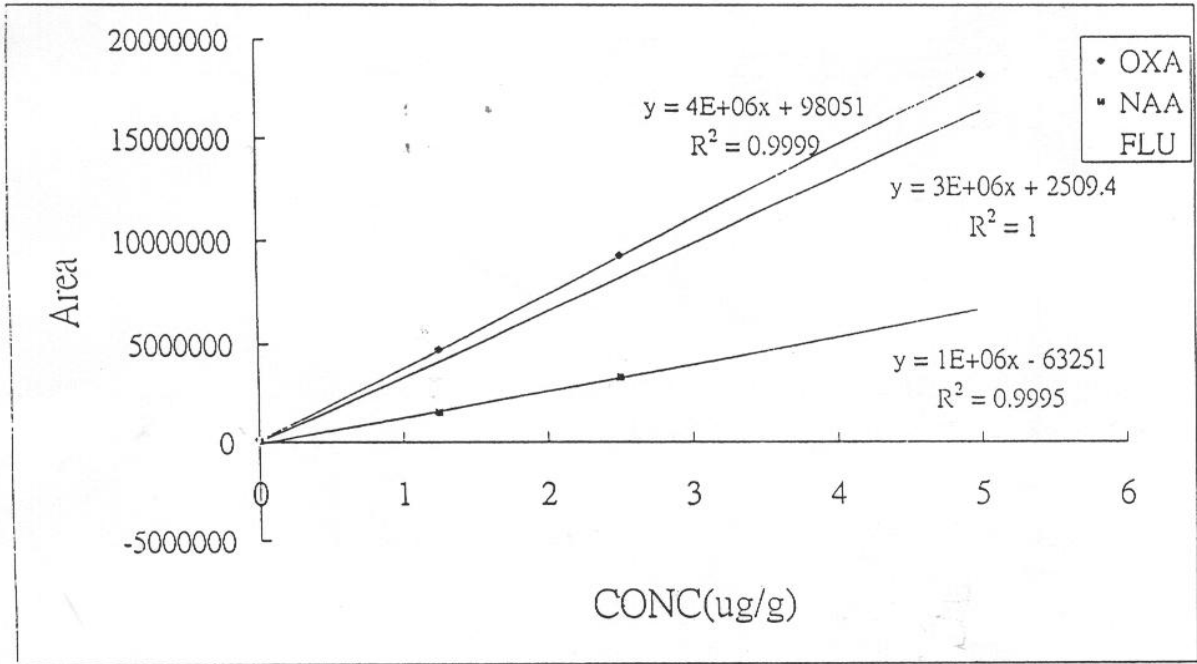


圖 2 以 0.02 M 磷酸：氰甲烷：四氫呋喃（72：16：12）為移動相，於螢光激發波長 325nm，吸收波長 365nm，空白雞飼料及添加 OXA、NAA、FLU 各藥物最終濃度 20、5、1.25ppm 之 (a) 層析圖及 (b) 標準曲線圖。

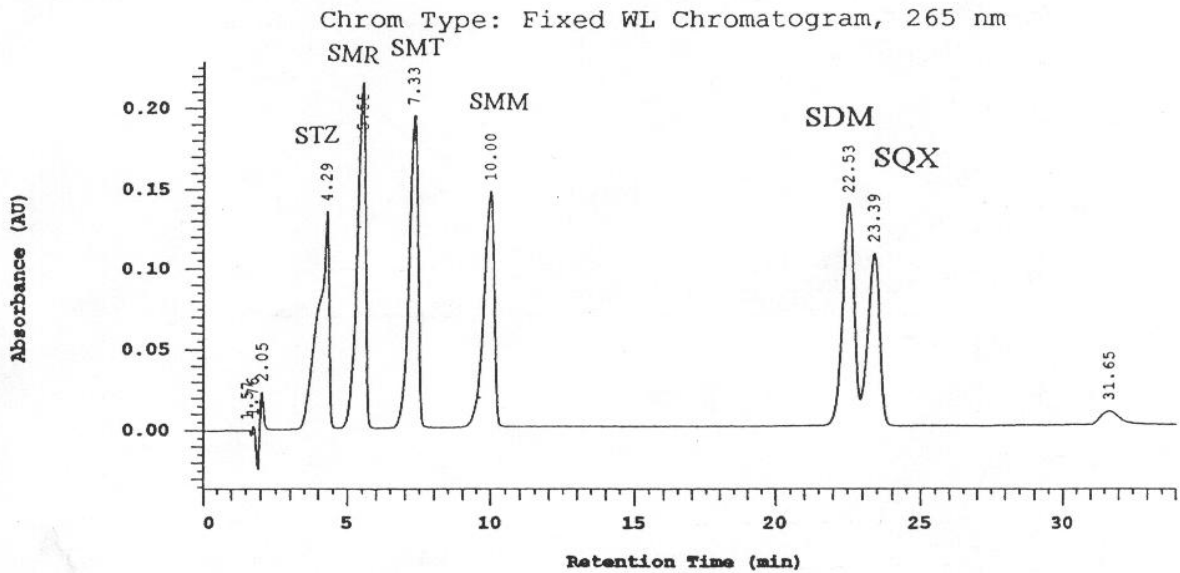
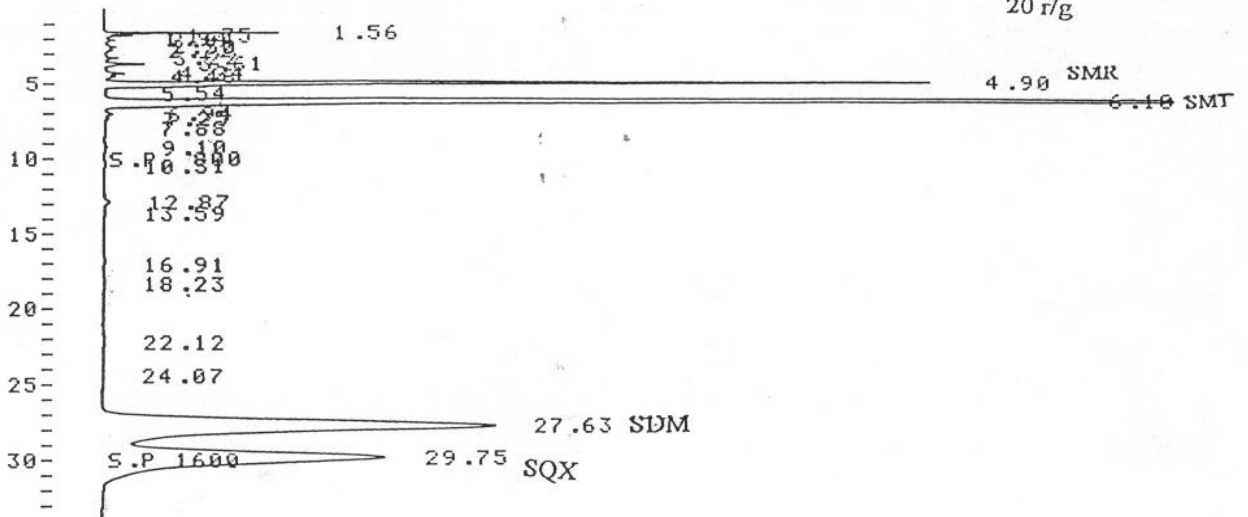
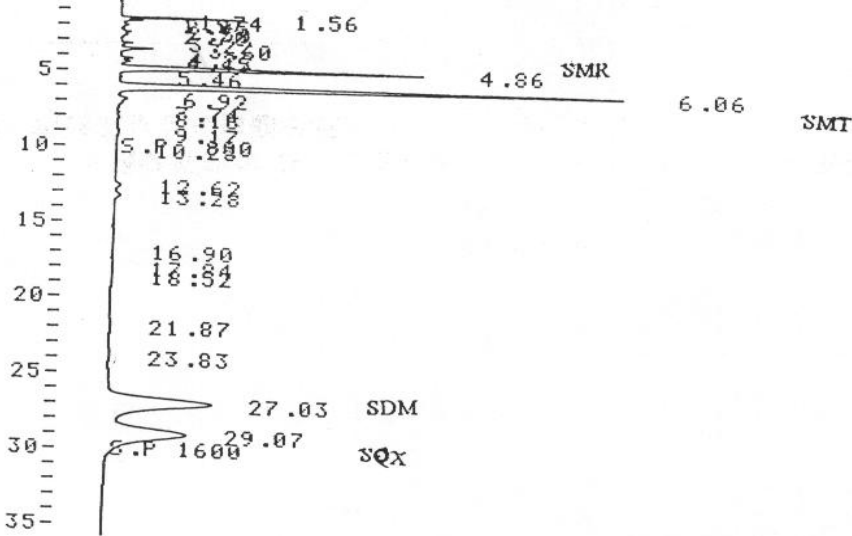


圖 3 以 25mM 磷酸二氫鈉：氰甲烷為移動相〔作梯度分析〕，於管柱溫 40°C，265nm 檢測，STZ、SMR、SMT、SMM、SDM、SQX 混合標準溶液之液相層析圖譜。

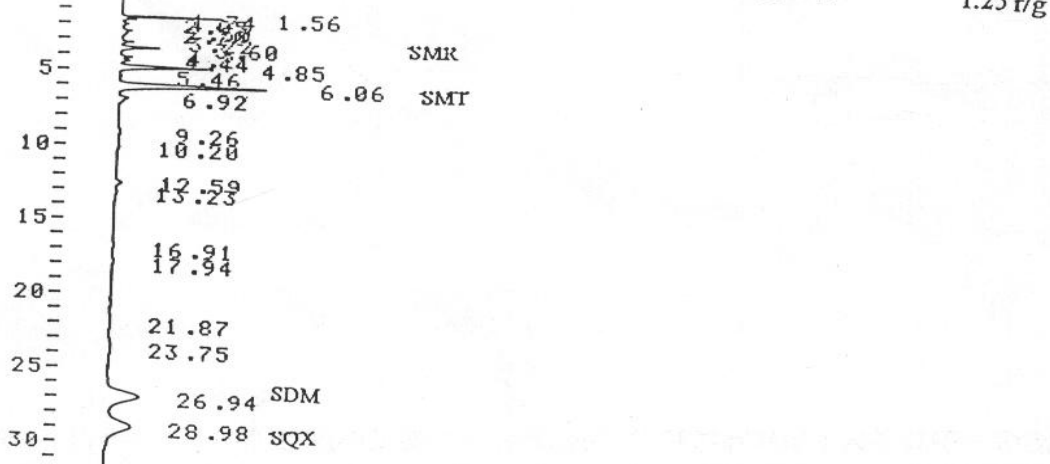
(a) CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 00:20



CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 02:28



CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 01:49



(b)

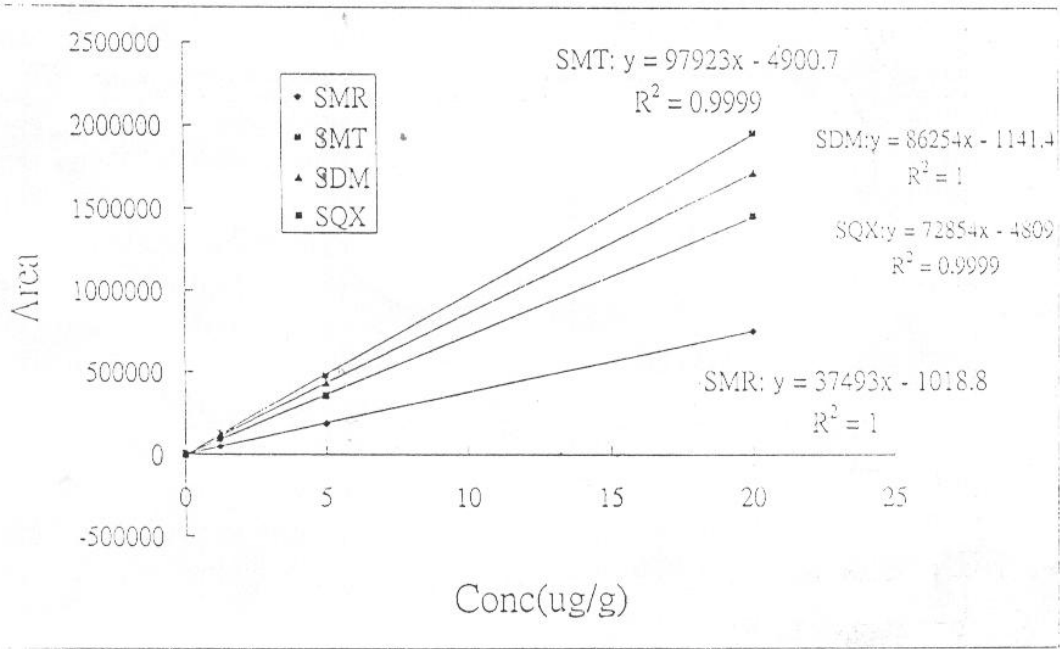


圖 4 以 25mM 磷酸二氫鈉：氘甲烷（20：80）為移動相，於 254nm，空白雞飼料及添加 SMR、SMT、SDM、SQX 各藥物最終濃度 20、5、1.25ppm 之 (a) 層析圖及 (b) 標準曲線圖。

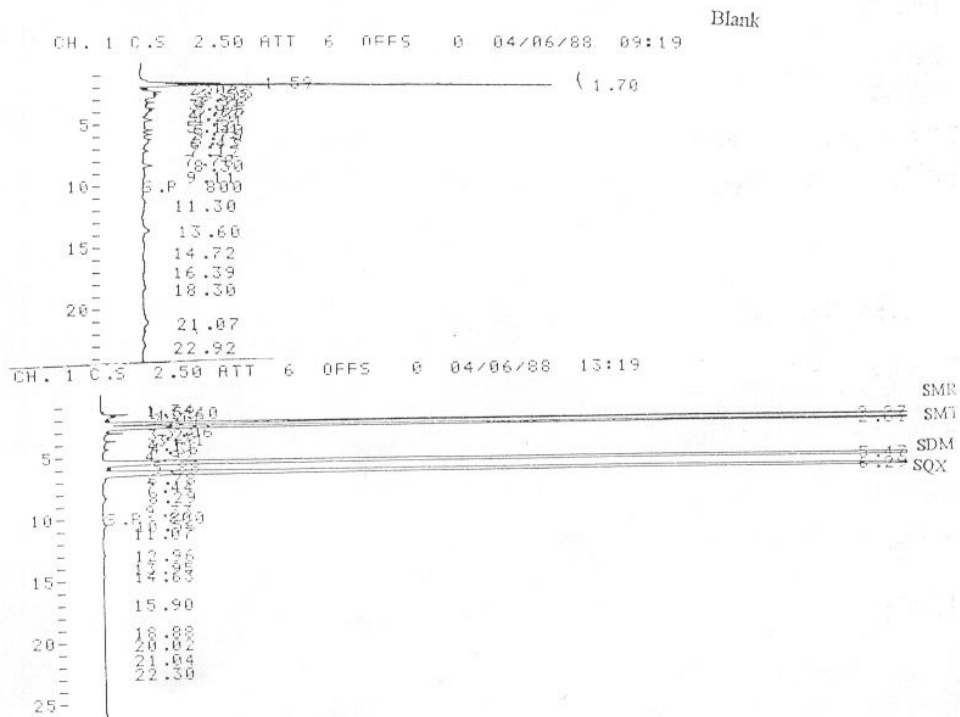


圖 5 以 $5 \times 10^{-3}M$ 醋酸：甲醇（60：40）為移動相，於 230nm，空白雞飼料添加 SMR、SMT、SDM、SQX 各藥物最終濃度 20ppm 之層析圖。

參考文獻

- (1) 王煥龍、周政賢. 畜水產品中殘留合成抗菌劑多成分同步分析法 (上) 檢驗雜誌, 391:32-45 1994
- (2) 王煥龍、周政賢. 畜水產品中殘留合成抗菌劑多成分同步分析法 (中) 檢驗雜誌, 392:17-24 1994
- (3) 王煥龍、周政賢. 畜水產品中殘留合成抗菌劑多成分同步分析法 (下) 檢驗雜誌, 393:30-41 1994
- (4) 日本厚生省公告畜水產品中的殘留合成抗菌劑的一齊分析法 (改定法) 1994
- (5) ROBERT K. MUNNS, SHERRI B. TURNIPSEED, ALLEN P. PFENNING, JOSE E. DAVID C. HOLLAND, and AUSTIN R. LONG U.S. Food and Drug Administration, Animal Drugs Research Center, Denver Federal Center, Denver, CO 80225-0087 STEVEN M. PLAKAS U.S. Food and Drug Administration, Division of Seafood Research, Dauphin Island, AL 36528. Determination of residues of flumequine and nalidixic , oxolinic , and piromidic acids in catfish by liquid chromatography with fluorescence and UV detection. J AOAC International 78 (2) : 343-352,1995
- (6) Ishii Rie, M. Horie, Y. Hoshino, Y. Tokumaru and N. Nose. simultaneous determination of residual synthetic antibacterials in fish and meat products by high performance liquid chromatography with photodiode array detector. J. Food Hyg .Soc. Japan 35 (2) 173-179, April 1994

Development and Application of Simultaneous Determination of Synthetic Antimicrobial Drugs in Chicken Feeds

K. M. Lin , M. C. Liu , M. Y. Kueo , S. Y. Lin , S. C. Yang

The Branch Institute of Animal Drugs Inspection , National Institute For Animal Health ,
Council of Agriculture , The Executive Yuan

SUMMARY A high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of sulfamethazine (SMT), sulfamerazine (SMR), sulfathiazole (STZ), sulfamonomethoxine (SMM), sulfadimethoxine (SDM), sulfaquinoxaline (SQX), oxolinic acid (OXA), piromidic acid (PMA), and nalidixic acid (NAA) in chicken feeds was developed. The feed samples spiked with synthetic antimicrobial drugs at levels of 1.25, 5 and 20 ppm. respectively, were analysed. The average recovery rates of OXA , FLU and NAA were 96.6% , 96.1.0% and 96.3%, respectively.

The average recovery rates of SMR , SMT , SDM , and SQX were 41.3% , 69.0% , 63.0% and 83%, respectively.

Key-words : Feed, Synthetic antimicrobial drug, Simultaneous determination