

# 雞飼料中安保寧與衣索巴同時檢測方法之建立

劉雅方 黎南榮 蘇杰夫 林士鈺

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

## 摘要

本研究開發以高效液相層析法同時檢驗雞飼料中安保寧 (amprolium) 與衣索巴 (ethopabate) 之方法。檢驗以甲醇萃取、過濾，並經固相萃尿管柱淨化，最後利用高效液相層析儀分析。所用之移動相為甲醇—水 (40:60) 含辛烷磺酸及乙胺，層析管柱為 Cosmosil 5 C<sub>8</sub>-MS，於 270nm 檢測。飼料樣品添加安保寧最終濃度 2.5ppm 及 1.25ppm 時，回收率分別為 92.3% 及 95.3%，變異係數 1.4% 及 0.7%。添加衣索巴最終濃度 0.4ppm 及 0.2ppm 時，回收率分別為 90.0% 及 83.9%，變異係數為 7.1% 及 4.2%。安保寧與衣索巴利用本方法之最低檢出界限分別是 0.025ppm 與 0.015ppm。

**關鍵詞：**安保寧，衣索巴，同時檢測，雞飼料，高效液相層析

## 緒言

安保寧 (amprolium) 與衣索巴 (ethopabate) 為合成抗原蟲劑，依據行政院農業委員會之「飼料添加物使用準則」〔1〕規定，安保寧與衣索巴以 125~250ppm 與 8~16ppm 之比例混合添加於雞飼料中，可作預防球蟲病使用。

飼料中安保寧之檢測方法有呈色法〔3〕、正相高效液相層析法〔5〕、螢光法〔15〕等。飼料中衣索巴之分析方法包括呈色法〔4〕、高效液相層析法〔14〕、氣相層析法〔3〕等。安保寧與衣索巴雖混合添加於飼料，但卻不見於飼料中同時檢測方法之文獻，且上述之個別分析方法中，呈色法與螢光法需經衍生化反應，色層分析法需經多種溶劑萃取或使用傳統的管柱層析分離，過程複雜費時。本實驗目的為進行雞組織中該二種藥物殘留與藥物動力學研究之準備試驗，研發同時檢測雞飼料中安保寧與衣索巴之定性定量方法，以快速準確分析於飼料中之含量。

## 材料與方法

### 標準溶液之配製

精確稱取安保寧對照標準品 (Sigma A0542, Missouri, USA) 及衣索巴對照標準品 (由臺灣興美股份有限公司提供) 各 100mg，分別以甲醇 (gradient grade for chromatography, Merck 106007,

Darmstadt, Germany) 溶解製備成個別的 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  標準原液，置  $-10^{\circ}\text{C}$  保存，2 個星期後重新製備。使用時，再以甲醇將各標準原液稀釋成安保寧 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  標準溶液及衣索巴 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  標準溶液。取安保寧標準溶液 10mL 與衣索巴標準溶液 5mL 置定量瓶混合，加入甲醇使最終容積為 50mL，配製成含安保寧 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及衣索巴 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之混合標準溶液。

#### 標準曲線之製作

以移動相將混合標準溶液稀釋成各適當濃度，分別取 20  $\mu\text{L}$  注入高效液相層析儀。每一濃度作三重複，就其濃度與波峰平均面積繪製標準曲線。

#### 樣品前處理

雞飼料打碎研磨後，精確稱取樣品 10g，加入 30mL 甲醇，於超音波水浴中作用 5 分鐘，並充分溶解振盪 10 分鐘後，待樣品靜置 10 分鐘，取上清液以濾紙 (Advantec Toyo 5C 110mm) 過濾，所得之濾液留作固相萃取使用。

固相萃取管匣 (Sep-Pak CN Cartridges, Waters, USA) 使用前先以純水及甲醇濕潤平衡。取上述樣品濾液 3mL 注入，收集流出液。以 3mL 2N HCl (Merck, Darmstadt, Germany) 沖提管柱內結合之分析物，收集沖提液，與前述收集之流出液合併。以  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Merck, Darmstadt, Germany) 中和收集之合併液，並加入甲醇稀釋定容至 10mL。經離心 (3000rpm, 5 分鐘, Kubota 5100, rotor RS-720, Japan)，取上清液 1mL，以氮氣吹乾 (Techne, Cambridge, UK)，最後以 1mL 移動相溶解定容，供作檢液，進行高效液相層析分析。

#### 高效液相層析分析條件

分析管柱：Cosmosil 5  $\text{C}_8$ -MS 4.6 $\times$ 150mm, 5  $\mu$ , Nacalai Tesque, Japan。

移動相：甲醇：水=40：60 (V/V)，含 5mM 辛烷磺酸鈉鹽 (Sigma 39, 709-1, Missouri, USA)，0.5% 三乙胺 (Merck, Darmstadt, Germany) 及 0.5% 冰醋酸 (Merck, Darmstadt, Germany)。

流速：1mL/min。

檢測波長：270nm。

高效液相層析儀：溶液輸出系統為日本 Jasco PU 980，樣品自動注入器為 Jasco 851-AS，檢測器為 Abi 759 A，積分儀為 Sic chromatocorder 12。

#### 鑑別試驗及含量測定

分別注入標準溶液及檢液 20  $\mu\text{L}$ ，就所得之波峰滯留時間予以鑑別，並將檢液之波峰面積依標準曲線求出檢液中之安保寧與衣索巴之含量，再換算為檢體中之濃度：

$$(\text{ppm}) = \frac{[\text{檢液中含量}(\mu\text{g}/\text{mL})] \times [\text{檢液體積 } 1\text{mL}]}{\text{檢體重量 } 10\text{g}}$$

#### 回收試驗

取未添加任何藥品之空白對照雞飼料 (由台糖新營副產加工廠提供) 打碎研磨後，分別添加安保寧/衣索巴最終濃度 2.5 ppm / 0.4ppm 及 1.25 ppm / 0.2 ppm，各添加量依上述樣品前處理作三重

複，並作空白對照試驗，經高效液相層析定量，與原濃度比較即可求出。

## 結 果

### 標準溶液之分析

依前述分析條件所得之混合標準溶液層析圖譜 (Fig.1)。由圖可知本分析條件對 2 種藥物的溶析順序及滯留時間分別是安保寧 6.1 分，衣索巴 9.7 分。以上述標準曲線製作方法做成之標準曲線及直線迴歸方程式 (Fig.2, Fig.3)，其線性相關係數  $r$  皆為 0.9999，顯示該範圍內濃度與波峰面積具良好之比例關係。

### 添加回收試驗及最低檢出量

添加安保寧／衣索巴最終濃度為 2.5 ppm / 0.4 ppm 及 1.25 ppm / 0.2 ppm，依本實驗方法操作求得回收率 (Table 1) 於雞飼料中同時檢測安保寧及衣索巴之層析圖譜如 Fig.4，本方法之最低檢出界限安保寧 0.025 ppm，衣索巴為 0.015 ppm。

## 討 論

安保寧溶於水、甲醇、95% 乙醇及二甲甲醯胺 [8]，衣索巴溶於甲醇、乙醇、丙酮、氯甲烷 [9]。在一些雞組織中分別檢測安保寧與衣索巴的研究 [2] [10] [11]，以氯甲烷取代甲醇作為萃取溶媒，因和雞組織作用後，甲醇易吸水，以致無法濃縮至乾，且進行減壓濃縮時易產生突沸現象，影響操作。但對飼料之萃取，則可排除該影響因素，且本實驗過程利用固相萃取，獲得相當程度的純化後，取少量以氮氣吹乾濃縮，亦可避免以減壓濃縮發生的問題。另經初步實驗發現，以氯甲烷萃取飼料中之安保寧時，其回收試驗成績較不理想，可能與其溶解度有關，故本實驗以甲醇作為萃取溶劑。

關於以固相萃取淨化方面，個別檢測安保寧或衣索巴之文獻所使用之材質有氧化鋁 [3] [6] [12]、酸性氧化鋁 [7] 及矽酸鎂 [11]。本研究另以氰丙基 (cyanopropyl) 管柱處理萃取濾液，初步實驗發現所得層析圖之雜質較不干擾安保寧及衣索巴之解析，故以該材質固相萃尿管柱。

本實驗之高效液相層析移動相以辛烷磺酸鈉鹽作為陰離子配對試劑，並以冰醋酸調整 pH 約為 4.3 左右，可與在酸性環境下易形成帶正電荷離子之安保寧配對，以抑制其離子性，經  $C_8$  逆相層析管柱將其與衣索巴分離。本研究初步實驗比較己烷磺酸鈉鹽與辛烷磺酸鈉作為移動相陰離子配對劑之分離效果，發現以辛烷磺酸鹽較佳，因此採用之。至於安保寧 ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、衣索巴 ( $0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 分別以移動相作為溶劑溶解，其 UV 波長掃描光譜 (Fig.5, Fig.6) 在 270 nm 附近皆有極大吸收，因此選用該波長進行同時檢測。

由於安保寧與衣索巴之化學結構差異大，本研究並未尋求到較理想的內部標準品作為定量上的校正，但由於其回收試驗成績良好，在線性範圍內比對個別的波峰面積與濃度公式予以定量，是準

確而有效率的方法。

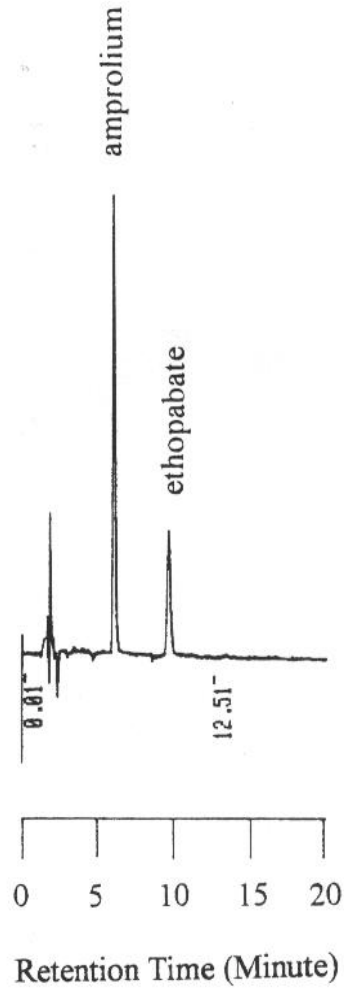


Fig. 1 High performance liquid chromatogram of mixed standard solution containing amprolium and ethopabate at concentration of 1.25 ppm and 0.2 ppm, respectively.

Table 1 Recoveries of amprolium and ethopabate spiked into chicken Feeds

Spiked level (amprolium / ethopabete : ppm)	Recoveries <sup>a</sup> (%)	
	Amprolium	ethopabate
2.5 / 0.4	92.3 (1.4) <sup>b</sup>	90.0 (7.1)
1.25 / 0.2	95.3 (0.7)	83.9 (4.2)

<sup>a</sup> Average of triplicate analyses

<sup>b</sup> Number in parentheses represents coefficient of variation (%)

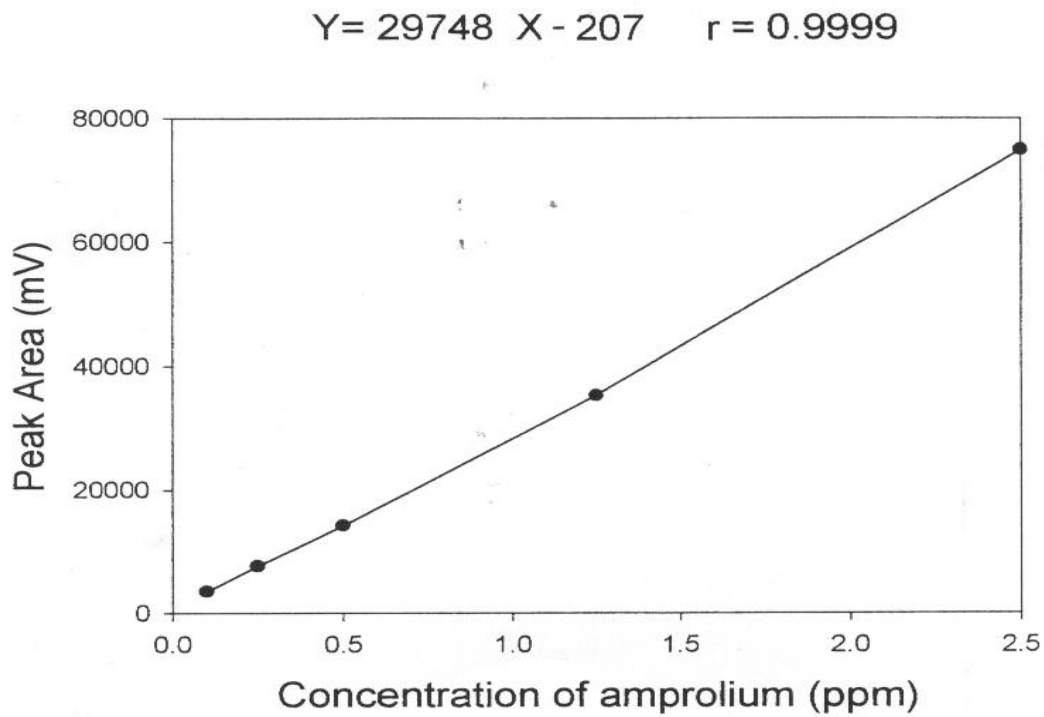


Fig. 2 Standard curve of amprolium.

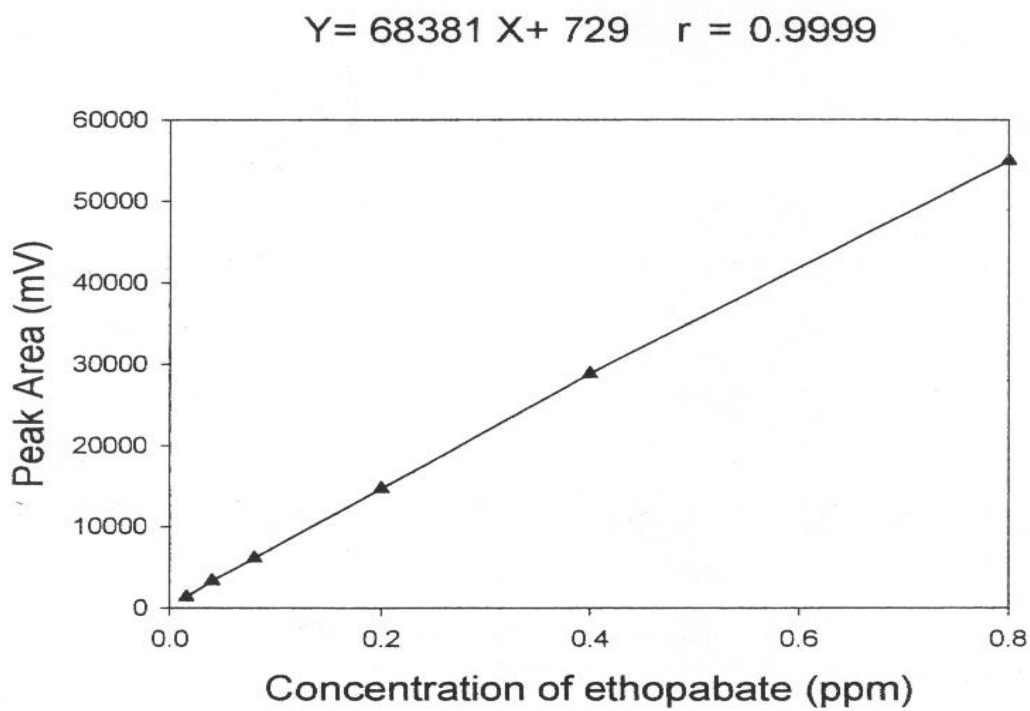


Fig. 3 Standard curve of ethopabate.

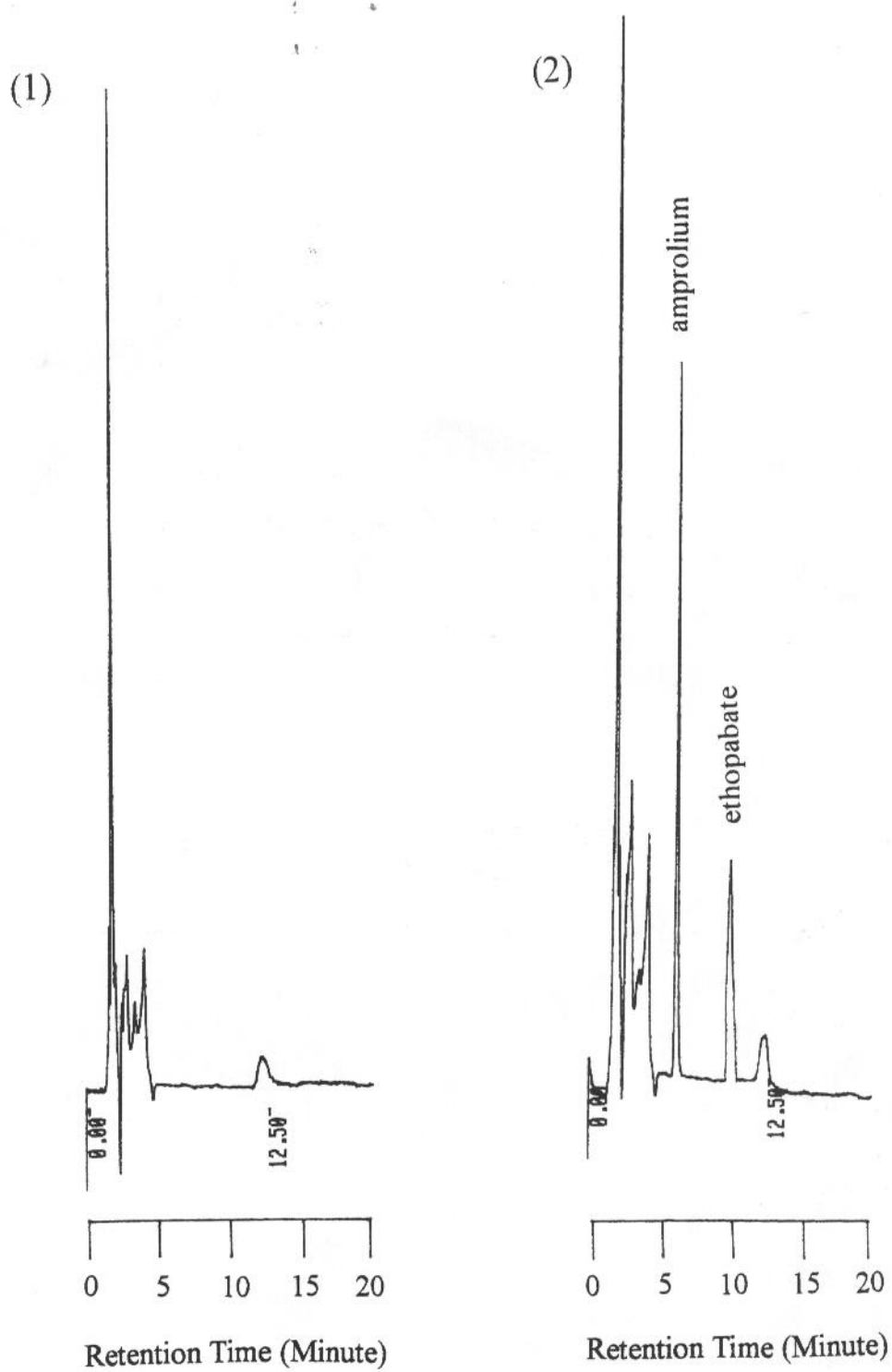


Fig. 4 High performance liquid chromatogram of (1) blank sample. (2) amprolium and ethopabate spiked into chicken feeds at the level of 2.5 ppm and 0.4 ppm, respectively.

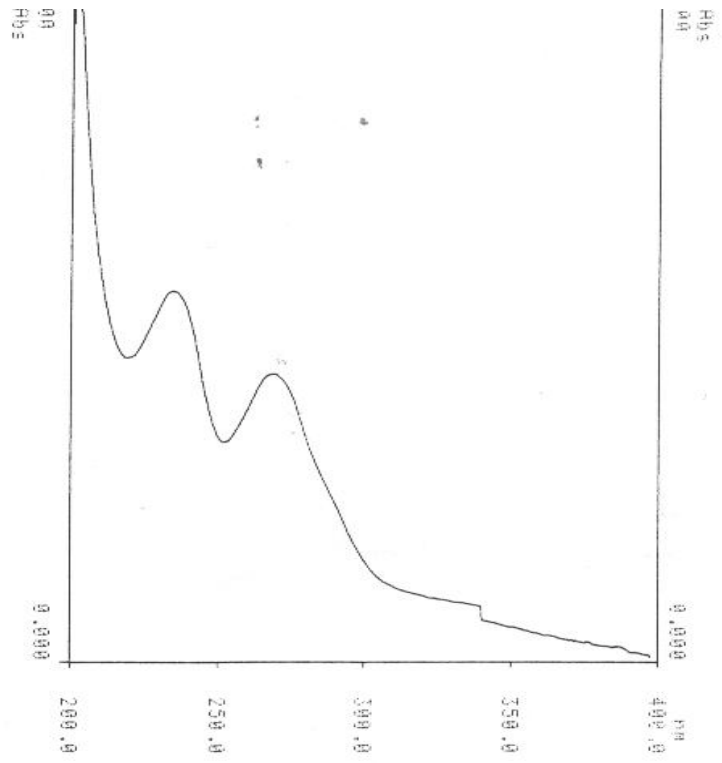


Fig. 5 UV-absorption spectrum of amprolium in mobile phase.

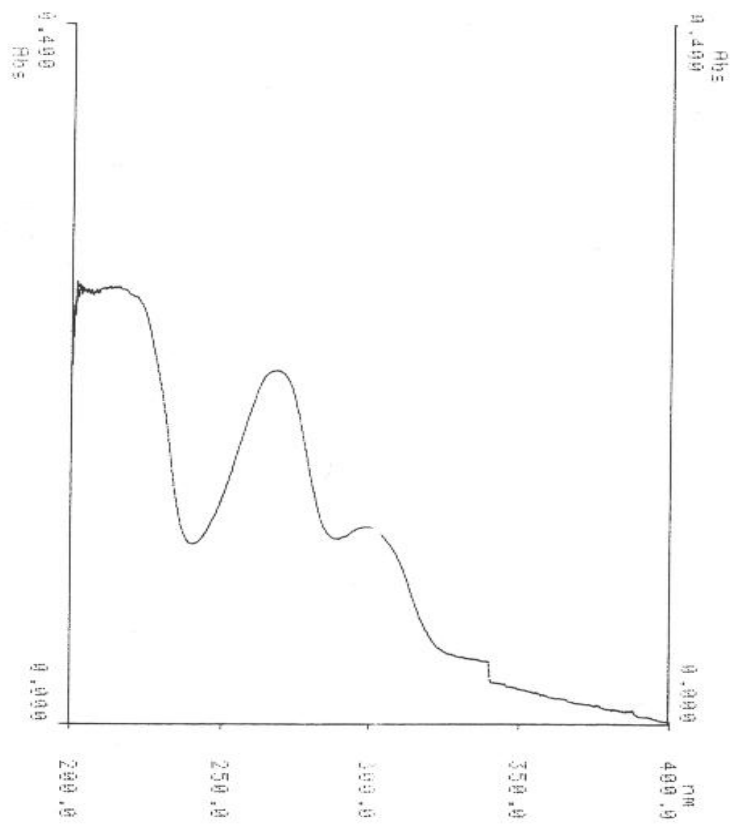


Fig. 6 UV-absorption spectrum of ethopabate in mobile phase.

## 誌 謝

本試驗之衣索巴對照標準品由臺灣興美股份有限公司提供，未添加藥物之空白對照雞飼料由台糖新營副產加工廠提供，在此謹誌謝忱。

## 參考文獻

- 1.行政院農業委員會。飼料添加物使用準則。1991
- 2.高雅敏，鄭秋真，劉兆宏。雞肉及雞肝中動物藥安保寧殘留量檢驗方法之探討。中國農業化學會誌 36：163-172, 1998
- 3.AOAC : Drugs in Feeds. In : Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., vol, I, Chapter 5.1.08, 1955
- 4.AOAC : Drugs in Feeds. In : Official Methods of Analysis of AOAC International, 16 th ed., vol. I, Chapter 5.1.22, 1995
- 5.Cox GB, Sugden K. Assay of amprolium in poultry feedingstuffs by high-performance liquid chromatography. Analyst 101 : 738-741, 1976
- 6.Gallicano KD, Park H, Yee J, Young LM, and Saschenbrecker PW. Simultaneous liquid chromatographic screening of five coccidiostats in chicken liver, J Assoc Off Anal Chem 71 : 48-50, 1988
- 7.Kentzer EJ, Cottingham LS, Smallidge RL. Ion-pair reverse-phase liquid chromatographic determination of amprolium in complete feeds and premixes, J Assoc Anal Chem 71 : 251-255, 1988
- 8.Merck & CO., Inc : The Merck Index 12 th ed., p.629, 1996
- 9.Merck & CO., Inc : The Merck Index 12 th ed., p.3793, 1996
- 10.Nagata T, Saeki M, Nakazawa H, Fujita M, and Takabatake E, Rapid quantitation of ethopabate in chicken muscle using high-performane liquid chromatography with fluorometric detection : purification from extractant by continuous liquid-liquid partion. J Chromatography 281 : 367-370, 1983
- 11.Nagata T, Saeki M, Nakazawa H, Fujita M, and Eigo T. Sensitive determination of ethopabate residues in chicken tissues by liquid chromatography with fluorometric detection. J Assoc Off Anal Chem 68 : 27-28, 1985
- 12.Severijnen M, Buyzen-Statijn AM, Buizer FG. Method of assay for the coccidiostat amprolium in a wide range of animal feedstuffs. Analyst 100 : 328-333, 1975
- 13.Smallidge RL Jr. Gas-liquid chromatographic determination of ethopabate in feed premixes. J Assoc Off Anal Chem 61 : 561-563, 1978
- 14.Thorpe VA. Sample preparation of carbadox, furazolidone, nitrofurazone, and ethopabate in medicated



- feeds for high pressure liquid chromatography, J Assoc Off Anal Chem 63 : 981-984, 1980
15. Vanderslice JT, Huang MHA. Liquid chromatographic determination of amprolium in poultry feed and premixes using postcolumn chemistry with fluorometric detection. J Assoc Off Anal Chem 70 : 920-922, 1987

# **Simultaneous Determination of Amprolium and Ethopabate in Chicken Feeds**

Ya-Fang Liu , N. J. Li , J. F. Su , S. Y. Lin

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

**SUMMARY** A reversed-phase high performance liquid chromatographic ( HPLC ) method was developed for simultaneously analysing amprolium and ethopabate in chicken feeds. The drugs were extracted from samples with methanol and were filtered. The methanolic filtrate was cleaned up by solid-phase extraction. HPLC was done on the Cosmosil 5 C<sub>8</sub>-MS column with methanol-water ( 40 : 60 ) , containing octanesulfonic acid, triethylamine and glacial acetic acid, as mobile phase. The analytes were detected at 270 nm. Average recoveries for amprolium-fortified samples at 2.5 and 1.25 ppm were 92.3% ( coefficient of variation, CV, 1.4% ) and 95.3% (CV, 7.1% ) , respectively. Average recoveries for the ethopabate-fortified samples at 0.4 and 0.2 ppm were 90.0 % ( CV, 7.1 % ) and 83.9 % ( CV, 4.2% ) respectively. The levels of detection limit for amprolium and ethopabate were 0.025 ppm and 0.015ppm, respectively.

***Key words : Amprolium, Ethopabate, Simultaneous determination, Chicken feeds, High-performance liquid chromatography ( HPLC )***