

豬飼料中合成抗菌劑同時檢測方法之開發及應用

林金梅 劉敏主 郭美月 林士鈺 楊喜金

台灣省家畜衛生試驗所 動物用藥品檢定分所

摘要 本研究開發以高效液相層析法同時檢驗豬飼料中 Olaquinox (ODX), Carbadox (CDX), Furazolidone (FZD), Sulfathiazole (STZ), Sulfamethazine (SMT), Nalidixic Acid (NAA), Morantel citrate (MRT), Nitrofurazone (NFZ), Difurazone (DFZ) 等九種合成抗菌劑。以豬飼料 5 g, 用氘甲烷萃取, 離心後, 殘留物再以氘甲烷萃取, 合併氘甲烷液, 經三氧化二鋁 (酸性) 淨化, 收取濾出液經濃縮乾涸後以氘甲烷: 0.1% 磷酸 (4:6) 1 ml 超音波振盪抽 30 分, 經 0.45 μ m 濾膜過濾。最後利用高效液相層析儀以氘甲烷加 0.1% 磷酸為移動相, 用高純度 Silica gel 逆相 HPLC 管柱 Mightysil RP-18 GP 150 \times 4.6 mm (5 μ m) UV260 nm 及 360 nm 分析, 檢體添加藥物最終濃度 0.625, 2.5 及 10 ppm 等三個濃度作分析, 最終濃度為 10 ppm, UV360 nm, 移動相為 80% 氘甲烷: 0.1% 磷酸 (25:75) CDX, MRT, FZD 回收率平均分別為 72.5%, 95.3%, 100.1%, 於 UV260 nm, 移動相為 80% 氘甲烷: 0.1% 磷酸 (20:80), STZ, SMT, NFZ, FZD 回收率平均分別為 66.2%, 99.3%, 82.1%, 95.6%, 於 UV360 nm, 移動相為 80% 氘甲烷: 0.1% 磷酸 (35:65), DFZ 之回收率平均為 94.7%, 而 NAA 及 ODX 回收率甚低, CDX, NFZ, MRT, FZD, SMT, STZ, DFZ 線性良好, R 值皆接近於 1。

關鍵詞: 飼料, 合成抗菌劑, 同時檢測

緒 言

為了增進動物之生長及維護健康, 飼料常添加抗菌劑使用, 鑑於藥品對動物及人體的重要性, 國外以畜水產品中合成抗菌劑之殘留鑽研者較多, 從事飼料中抗菌劑之分析者也大部分皆為針對個別藥物, 為簡化工作, 提高工作效率, 擬尋求同一前處理方法及簡易快速分析方法作豬飼料中多種合成抗菌劑之同時檢測。(1, 2, 3, 4)

材料與方法

試 藥

各對照標準品中, FZD、NFZ、NAA、

MRT、STZ 為 Sigma 試藥級, SMT 為 USPC 級, ODX、DFZ 為關東化學株式會社出品、CDX 由輝瑞製藥廠提供。其他溶劑購自 E. Merck。

儀 器

- (1) 離心機: Kubota 5100 型 (Hong, Bunkyo-ka, Tokyo, Japan)
- (2) 褐色玻璃分離管柱。
- (3) 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。
- (4) 0.45 μ m, Nylon 材質過濾膜。
- (5) 高效液相層析分離管柱: Mightysil RP-18GP 150 \times 4.6 mm (5 μ m) 高純度 silica gel 逆相 HPLC column。

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

標準曲線之建立

- (1)標準原液：精取 ODX, CDX, FZD, STZ, SMT, NAA, MRT, NFZ, DFZ 各 100 mg 各置 100 ml 褐色定量瓶中，以氫甲烷：0.1 % 磷酸 (1:1) 溶解並稀釋至 100 ml 定容。再以同溶媒稀釋成濃度為 100 µg/ml。
- (2)混合標準溶液：量取標準原液各 10 ml 以氫甲烷：0.1 % 磷酸 (1:1) 稀釋至 20 ml，使濃度為 50 µg/ml。再以同溶媒稀釋成 1/4 及 1/16 使濃度為 12.5 µg/ml 及 3.125 µg/ml，以 HPLC 檢測觀察其分離情形。

檢體前處理

取豬飼料樣品 5 g，以 25 ml 氫甲烷萃取，經離心 (3,000 rpm, 10 分鐘)，殘渣再以 25 ml 氫甲烷重複一次上述步驟，合併二次氫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 氫甲烷活化(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。殘渣以氫甲烷：0.1 % 磷酸 (4:6) 1 ml 經超音波振盪溶解，經 0.45 µm 之濾膜過濾後注入 HPLC 檢測，以求取較好的前處理檢測方法。

分析條件

- (1)移動相：80 % 氫甲烷：0.1 % 磷酸 (20:80) 及 (25:75) 及 (35:65)
- (2)檢測波長：260 nm, 360 nm。
- (3)流速：1 ml/min
- (4)注入量：30 µl

回收率試驗

取豬飼料樣品 5 g，各別加入 ODX, CDX, FZD, STZ, SMT, NAA, MRT, NFZ, DFZ, 標準溶液 (50 µg/ml) 1 ml, (12.5 µg/ml) 1 ml, (3.125 µg/ml) 1 ml 使其為 10, 2.5, 0.625 µg/ml 依檢體前處理方法經酸性三氧化二鋁淨化再依檢測波長 260 nm, 360 nm, 移動相 80 % 氫甲烷：0.1 % 磷酸 (20:80)(25:75)(35:65) 測試。

結果

檢體前處理結果以(1)經酸性三氧化二鋁處理後的氫甲烷液經減壓濃縮蒸乾，殘渣再以氫甲烷：0.1 % 磷酸 (4:6) 1 ml 溶解，注入 HPLC 較無干擾波峰。依上述前處理方法操作，CDX、NFZ、MRT、FZD 於 360 nm 波長，80 % 氫甲烷：0.1 % 磷酸 (25:75) 為移動相，可得良好之分離效果。如圖 1. R 值接近於 1，線性良好。

依上述前處理方法操作，STZ、SMT、NFZ、MRT、FZD 於 260 nm 波長，80 % 氫甲烷：0.1 % 磷酸 (20:80) 為移動相，可得良好之分離效果。如圖 2. R 值接近於 1，線性良好。

依上述前處理方法操作，CDX、NFZ、FZD、DFZ 於波長 360 nm，80 % 氫甲烷：0.1 % 磷酸 (35:65) 為移動相，亦可得良好之分離效果。如圖 3. R 值接近於 1，線性良好。但其他多種豬飼料中合成抗菌劑一次同時分析部份抗菌劑之波峰相當接近，影響分離效果，如 ODX 與 CDX 雖同時測出，但 ODX 回收率甚低且與 CDX 滯留時間接近，MRT 與 NFZ 滯留時間亦相近，改以 25:75 可改善分離效果。

而 NAA 用 230 nm, 260 nm, 316 nm 及 360 nm 測試結果，波峰都有分裂情形，雖然參照多種方法設法改善，惟到目前尚無良好結果，亦或與飼料不純物有關或其他因素造成結果不甚理想，尚待日後檢討改進。回收率試驗情形如表 1. 表 2. 表 3。

表 1. 檢測波長 360 nm，移動相 80 % 氫甲烷：0.1 % 磷酸 (25:75)

藥名	添加濃度	回收率	CV 值
CDX	10ppm	72.5	2.7
MRT	10ppm	95.3	4.2
FZD	10ppm	100.1	3.8

表 2. 檢測波長 260 nm，移動相 80 %
氘甲烷：0.1 % 磷酸 (20 : 80)

藥名	添加濃度	回收率	CV 值
STZ	10ppm	66.2	14.4
SMT	10ppm	99.3	7.5
NFZ	10ppm	82.1	20.3
FZD	10ppm	95.6	4.0

表 3. 檢測波長 360 nm，移動相 80 %
氘甲烷：0.1 % 磷酸 (35 : 65)

藥名	添加濃度	回收率	CV 值
DFZ	10ppm	94.7	10.4

討 論

經試了各種波長 230 nm、260 nm、306 nm、316 nm、360 nm 及各種移動相比率由 80 % 氘甲烷：0.1 % 磷酸 (5 : 95) 至 (40 : 60) 及採用本所

作 Carbadox, Nitrofurazon, Furazolidone 同時檢測方法以 25 % 氘甲烷作移動相，或改變以氘甲烷或甲醇作溶劑及不同條件淨化處理，結果發現波峰有的雜訊很多，有的是小波峰很多支，有的是波峰分裂成三支，有的是空白飼料已有很多支波峰出現，有的是波峰出現的滯留時間太接近或重疊，或滯留時太長，因此將移動相分為三種，檢測波長分為二組。但此法較不適於 ODX 及 NAA 等合成抗菌劑之分析，是否因其在酸性三氧化二鋁淨化過程中，不易被溶出，故造成回收率低及波峰分裂情形。筆者認為還是以各別添加作試驗可找出最佳條件檢測或以類似條件作類似異構物分析較好，可免除九種合成抗菌劑一次同時分析，部份抗菌劑之波峰重疊、分裂、雜波峰出現，滯留時間太長之情形或相互影響分離效果。

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. 郭美月、林士鈺、林金梅、劉敏主、劉雅方。畜水產品中殘留 19 種合成抗菌劑同時檢測。台灣省畜衛所研報 No. 33 : 103 - 116。1997

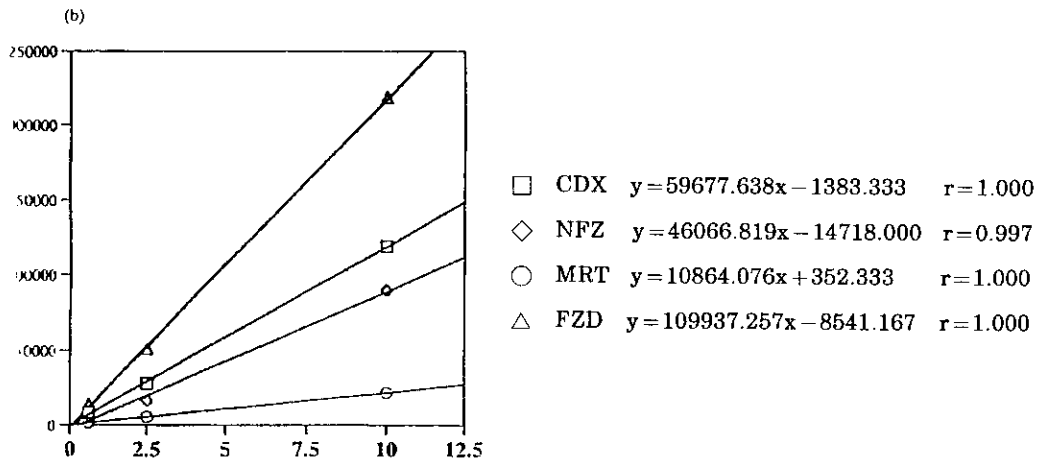
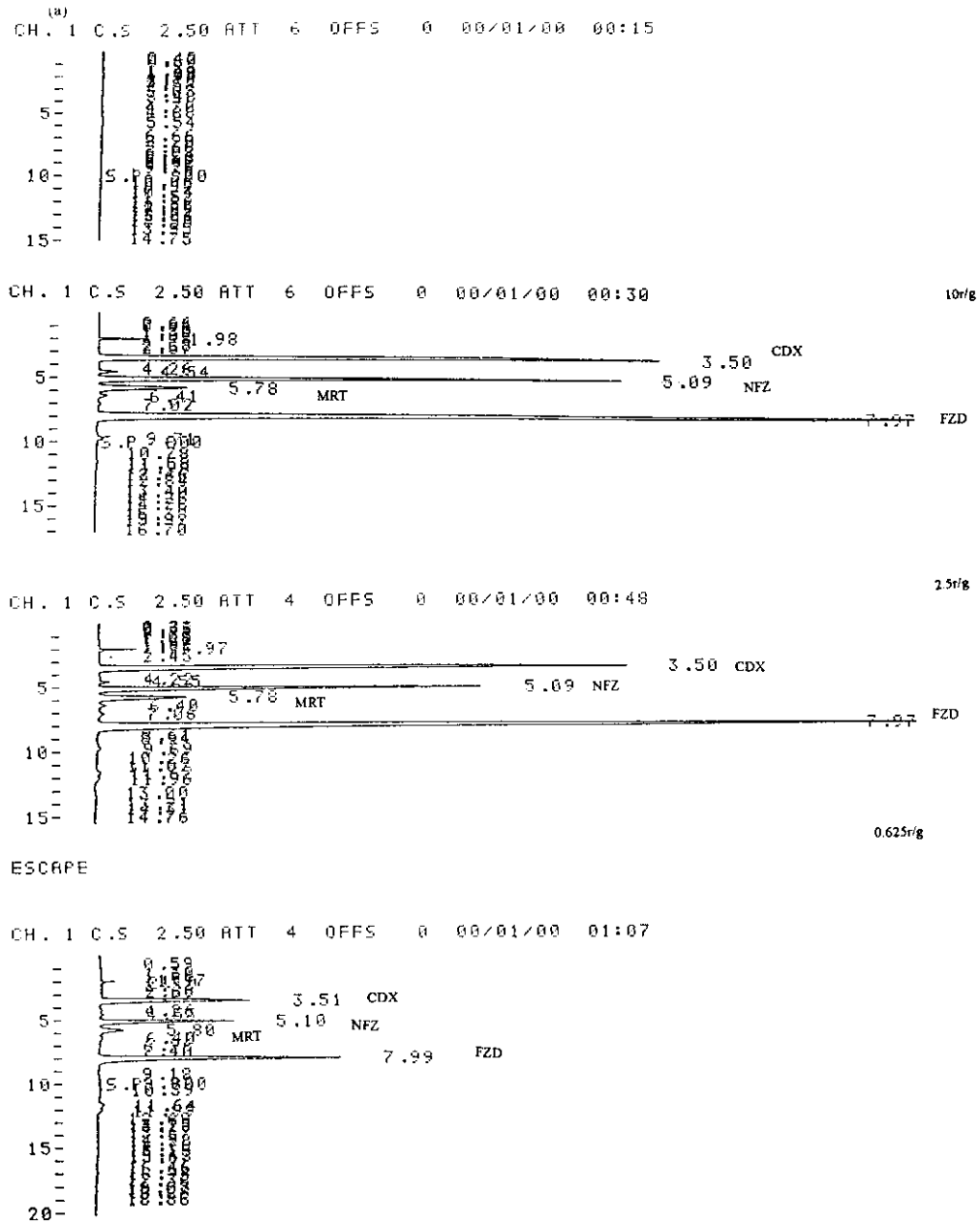


圖 1 以 80% 氫甲烷：0.1% 磷酸 (25：75) 為移動相，於 360 nm，空白豬飼料及添加 CDX，NFZ，MRT，FZD 各藥物最終濃度 10，2.5，0.625 ppm 之 (a) 層析圖及 (b) 標準曲線圖。

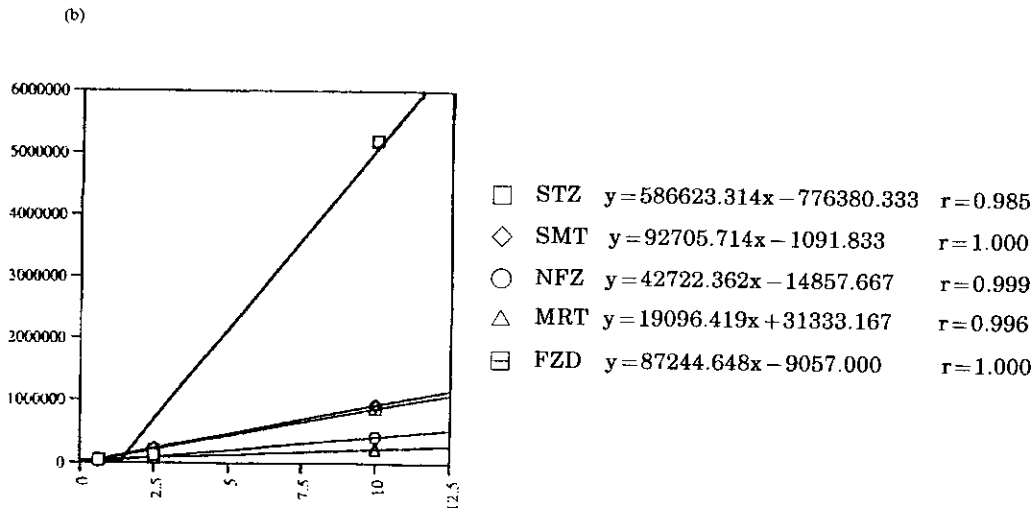
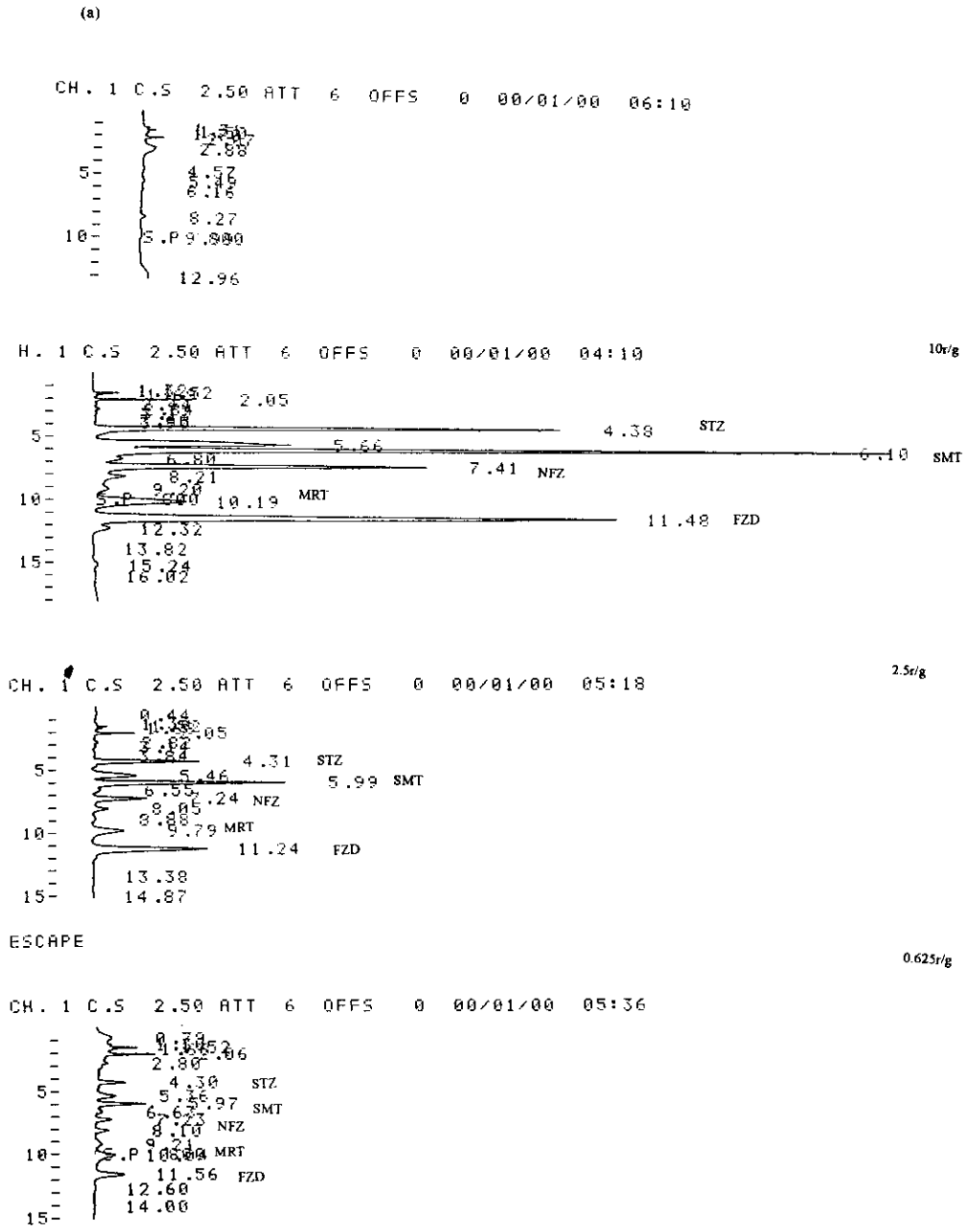


圖 2 以 80% 氫甲烷：0.1% 磷酸 (20：80) 為移動相，於 260 nm，空白豬飼料及添加 STZ，SMT，NFZ，MRT，FZD 各藥物最終濃度 10，2.5，0.625 ppm 之 (a) 層析圖及 (b) 標準曲線圖。

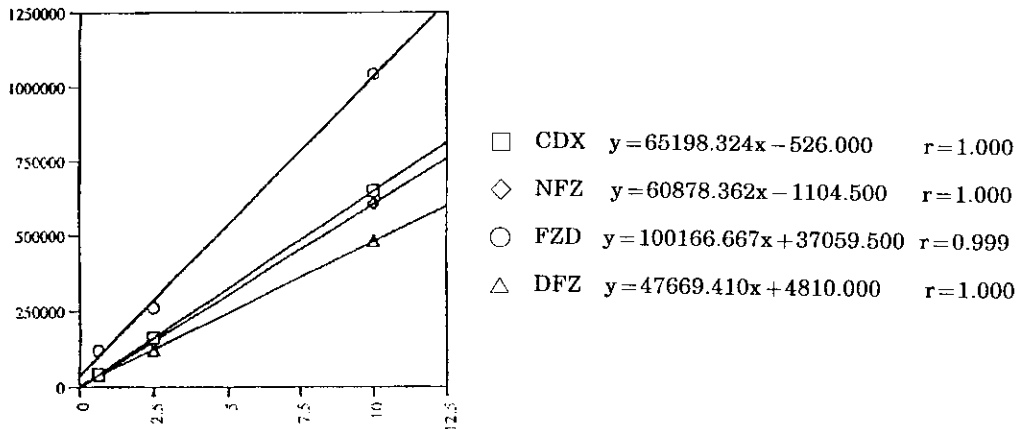
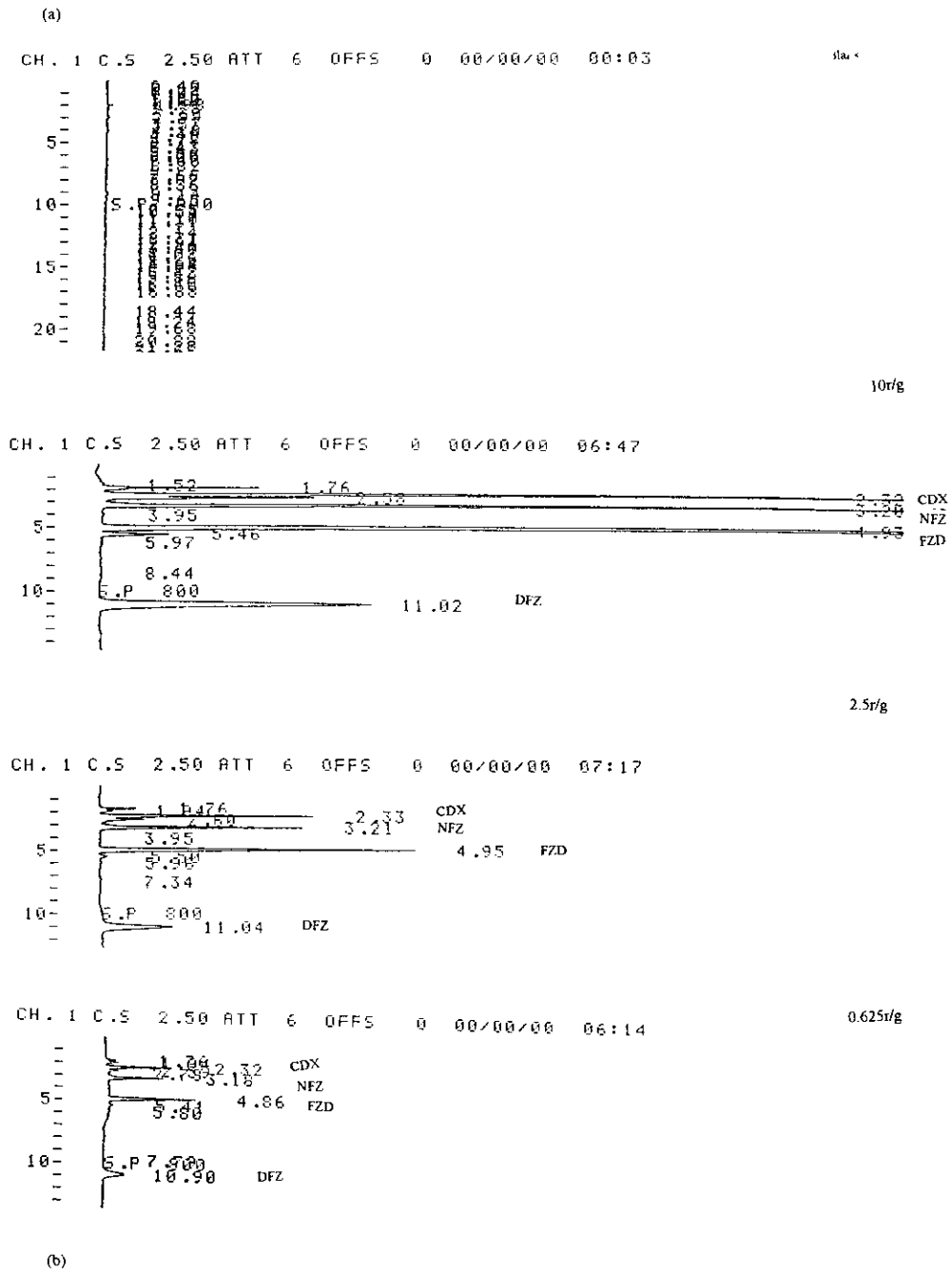


圖 3 以 80% 氫甲烷：0.1% 磷酸 (35：65) 為移動相，於 360 nm，空白豬飼料及添加 CDX，NFZ，FZD，DFZ 各藥物最終濃度 10，2.5，0.625 ppm 之 (a) 層析圖及 (b) 標準曲線

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

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

Taiwan Animal Health Research Institute

The Branch Institute of Animal Drugs Inspection

SUMMARY A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for simultaneous determination of Olaquinox (ODX), Carbadox (CDX), Furazolidone (FZD), Sulfathiazole (STZ), Sulfamethazine (SMT), Nalidixic Acid (NAA), Morantel citrate (MRT), Nitrofurazone (NFZ), and Difurazone (DFZ) in pig feeds was developed. 5 gm of samples were extracted with acetonitrile and centrifuged. The repeated extract were combined and cleaned with Al_2O_3 (acidic) column. The elute was concentrated by rotatory evaporator to dryness, and dissolved in 1 ml of acetonitrile : 0.1 % phosphoric acid (4 : 6) for analysis by HPLC. The HPLC conditions were established on a Mightysil RP-18 GP 150×4.6 mm (5 μ m) cica-Reagent column with acetonitrile / 0.1 % phosphoric acid as mobile phase and detected at UV 260 nm and UV 360 nm. The feeds samples were spiked with synthetic antimicrobial drug in 0.625, 2.5 and 10 ppm were analysed. With 80 % acetonitrile : 0.1 % phosphoric acid (25 : 75) as mobile phase and detected at UV 360 nm. The average recoveries of CDX 、 MRT 、 FZD were 72.5 % 、 95.3 % 、 100.1 % . With 80 % acetonitrile : 0.1 % phosphoric acid (20 : 80) as mobile phase and detected at UV 260 nm. The average recoveries of STZ 、 SMT 、 NFZ 、 FZD were 66.2 % 、 99.3 % 、 82.1 % 、 95.6 % . With 80 % acetonitrile : 0.1 % phosphoric acid (35 : 65) as mobile phase and detected at UV 360 nm. The average recovery of DFZ was 94.7 % . Except NAA and ODX have a poor recovery rate, CDX 、 NFZ 、 MRT 、 FZD 、 SMT 、 STZ 、 DFZ all had a good linear result. Value of R was about 1.

Keywords: *Feed , Synthetic antimicrobial drug , Simultaneous determination.*

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.