

# 應用高效液相層析法於雞蛋中同時檢測 2, 4—二氨基嘧啶類藥物之殘留方法及調查試驗

劉雅方\* 李新進 楊喜金 劉培柏

台灣省家畜衛生試驗所 生物研究系

**摘要** 本研究開發以高效液相層析法同時檢驗雞蛋中 trimethoprim (TMP), ormetoprim (OMP) 與 pyrimethamine (PYM) 三種常用於家禽之 2, 4—二氨基嘧啶藥物之殘留。以氫甲烷萃取檢體，離心後以正己烷去除雜質，經濃縮，最後利用高效液相層析儀：以  $5 \times 10^{-3}$  M 醋酸緩衝液 (pH 4.0) 加甲醇為移動相，用  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 分離管柱，於 UV230 nm 分析。檢體添加藥物最終濃度 0.5, 1.0 及 2.0  $\mu\text{g/g}$  時，其平均回收率為 76.5%~99.6%。本方法於檢體中檢出之最低檢出界限為 0.02  $\mu\text{g/g}$ 。以本法調查本省蛋雞場雞蛋 300 件的殘留情形結果皆在檢測界限以下。

**關鍵詞**：2, 4—二氨基嘧啶，高效液相層析，同時檢測，殘留

## 緒言

Trimethoprim (TMP), ormetoprim (OMP) 及 pyrimethamine (PYM) 皆屬 2, 4—二氨基嘧啶類藥物 (2, 4-diaminopyrimidines)，這類藥物為二氫葉酸還原酶之抑制劑，使四氫葉酸無法形成，以抑制葉酸的代謝途徑，繼而影響其他重要生化功能。另外，由於 2, 4—二氨基嘧啶類藥物與磺胺劑合併使用具有相乘效果<sup>[6]</sup>，故廣泛用於家禽預防或治療如球蟲、雞住血原蟲及其他細菌感染等。而 Blom<sup>[2]</sup> 及 Nagata et al.<sup>[12]</sup> 發現於蛋雞飲水或飼料中添加 0.1 至 100 ppm 的 PYM 會於蛋黃中殘留 2 至 12 日。因此對於雞蛋中該類藥物殘留的監控實屬必要。由於這 3 種藥物在體內代謝幾乎皆以原型存在<sup>[3, 8]</sup>，因此目前日本厚生省公告之「畜水產食品中の殘留物質檢查法」<sup>[1]</sup> 對於 TMP, OMP 有個別以高效液相層析法檢測，對於 PYM 也有個別以氣相層析分析的方法，此外，雖也有其他文獻<sup>[10, 11, 12]</sup> 利用高效液相層析法檢測畜產品中的 TMP、OMP，或是 PYM 的殘留，但大部分皆為針對個別藥物。本研究則開發以高效液相

層析法同時檢測雞蛋中 TMP, OMP, PYM 殘留的方法，使流程簡化，且兼顧分析敏感度，提高檢驗效率。並以該方法對全省蛋雞場雞蛋抽檢調查，瞭解目前殘留情形。

## 材料與方法

### 1. 試藥

各對照標準品中，TMP、PYM 為 Sigma 試藥級，OMP 由日本第一製藥株式會社提供。其他溶劑購自 E. Merck：氫甲烷、正己烷、甲醇為層析級，100% 冰醋酸及醋酸鉍為試藥特級。

### 2. 儀器

- (1) 打碎器：Seward Stomacher 80。
- (2) 旋轉揮發器：BUCHI R-114。
- (3) 離心機：Kubota 5100, rotor RS-720。
- (4) 高效液相層析儀：日本 Jasco 產品；泵為 PU-980 型，自動採樣注射器為 851-AS 型。檢測器為美國 abi 產品 759A 型。記錄器為

\*抽印本索取作者

台灣省家畜衛生試驗所

Chromatocorder 12 型。

### 3. 標準溶液之配製

精確稱取 TMP、PYM 及 OMP 各 100 mg，以甲醇溶解製備成 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之混合標準原液，置於  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存，使用時以移動相稀釋成各濃度之標準溶液。

### 4. 標準曲線之製作

以移動相將混合標準原液稀釋成 4, 2, 1, 0.8, 0.5, 0.4, 0.2, 0.1, 0.08, 0.05, 0.04, 0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  等濃度之標準溶液，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。

### 5. 檢體前處理

將全蛋攪拌均質後，取檢測樣品 5 g，以 30 ml 氫甲烷萃取，經離心 (3,000 rpm, 10 分鐘) 後，取上清液，加入正己烷 30 ml 振動去脂洗淨，取氫甲烷層，並重複一次上述步驟，將氫甲烷層合併，經減壓濃縮蒸乾。殘渣以移動相 1.0 ml 經超音波振盪溶解，過濾後注入 HPLC 檢測。

### 6. 分析條件

- (1) 管柱： $\mu$ -Bondapak  $\text{C}_{18}$ ，10  $\mu$ ，300  $\times$  3.9 mm I. D.
- (2) 移動相： $5 \times 10^{-3}$  M 醋酸鹽緩衝液 (以冰醋酸調整 pH=4)：甲醇 = 60：40。
- (3) 檢測波長：230 nm。
- (4) 流速：1.2 ml/min。
- (5) 注入量：20  $\mu\text{l}$ 。

### 7. 回收試驗

將空白對照組雞蛋攪拌均質，取 27 g 添加 3 ml 之 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  混合標準溶液，振盪 10 分鐘使成為含 TMP、OMP 及 PYM 2.0  $\mu\text{g}/\text{g}$  之樣品，續以均質蛋液稀釋為 0.5 及 1.0  $\mu\text{g}/\text{g}$  等濃度。其步驟依照 5. 作檢體前處理，各組作三重複，同時作空白試驗，檢體中 TMP、OMP 及 PYM 之含量 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )

$$= \frac{(\text{檢液中濃度 } C \mu\text{g}/\text{ml}) \times (\text{檢液體積 } 1 \text{ ml})}{\text{檢體重量 } 5 \text{ g}} = \frac{C}{5}$$

檢測濃度後求回收率。

### 8. 檢體來源

本研究所使用之檢體係 85 年 9 月至 86 年 7 月間，分北、中、南、東四區，自全省蛋雞場取得之雞蛋 300 件。

## 結 果

#### 1. 標準溶液之分析

依上述分析條件所得到之標準溶液層析圖譜 (圖 1)。由圖可知本分析條件對 3 種藥物的溶析順序及滯留時間分別是 TMP 5.7 分，OMP 6.8 分，及 PYM 18.3 分。以前述標準曲線製作方法，做成之標準曲線及直線迴歸方程式 (圖 2 至 4)，TMP、OMP、PYM 之線性相關係數  $r$  皆為 0.9999，顯示各濃度間具有良好之線性關係。

#### 2. 添加回收試驗及最低檢出量

添加最終濃度為 0.5, 1.0 及 2.0  $\mu\text{g}/\text{g}$  之混合標準溶液於雞蛋樣品中，依本實驗方法操作所得回收率 (表 1)。藥品於組織中之層析圖譜 (圖 5)。本法在雞蛋之最低檢出界限為 0.02  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

#### 3. 雞蛋中 2, 4—二胺基嘧啶殘留量之調查

以本方法抽驗本省蛋雞場雞蛋 300 件，其 TMP、OMP 及 PYM 之殘留量皆在檢測界限以下。

## 討 論

TMP、OMP、PYM 分別以移動相作為溶劑溶解 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )，其 UV 波長掃描光譜 (圖 6)。三種溶液在 230 nm 附近有極大吸收，實際以 230 nm 及 254 nm 進行測試，發現在本實驗分析條件下，PYM 雖對於 254 nm 較敏感，但 230 nm 較能兼顧三種藥物的感度 (表 2)，因而選用該波長進行檢測。

在數篇同時檢測畜產品中多種合成抗菌劑殘留的資料中，Haramaki Y. et al.<sup>[5]</sup> 同時分析豬肉中 TMP、OMP 及 PYM，其檢測界限皆小於 0.015  $\mu\text{g}/\text{g}$ ，為目前查得文獻中之最低檢測值。但以不同的固相萃取匣 (Cartridge) 處理則 3 種藥物的回

收率互有差異，且對 PYM 並不理想，添加  $1 \mu\text{g}/\text{g}$  時大部分回收率皆低於 70%，尚未符合 Horwitz<sup>[7]</sup> 之規範。Endoh et al.<sup>[4]</sup> 同時分析雞肉中 TMP 及 OMP，其檢測界限皆為  $0.02 \mu\text{g}/\text{g}$ ，且添加  $0.2 \mu\text{g}/\text{g}$  時也有良好的回收率，TMP 及 OMP 分別是 96.9% (C. V. = 4.9%) 及 88.4% (C. V. = 4.0%)；惟其萃取過程比本報告複雜，需經過數次氧化鋁管柱等處理，且其高效液相層析條件在 40 分內仍無法檢測到 PYM。在決定 HPLC 分析條件過程中，筆者曾以 Puresil C<sub>18</sub>， $150 \times 4.6 \text{ mm I. D.}$  管柱、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$  醋酸鹽緩衝液：甲醇 = 70 : 30 之移動相進行測試，可得 TMP、OMP 及 PYM 之滯留時間分別為 2.9 分、3.9 分及 18 分，但因受樣品本身干擾影響，無法分離而捨棄。另外，Nagata and Saeki<sup>[9]</sup> 以 Nucleosil C<sub>18</sub>， $250 \times 4.6 \text{ mm I. D.}$  管柱及氫甲烷—醋酸—水為移動相，流速每分鐘 1 ml 同時分析 17 種合成抗菌劑，其中 TMP，OMP，PYM 的滯留時間分別約為 11、14 及 46 分。Haramaki et al.<sup>[5]</sup> 以 Puresil C<sub>18</sub>， $150 \times 4.6 \text{ mm I. D.}$  管柱及梯度之磷酸—氫甲烷為移動相，同時分析 15 種合成抗菌劑，TMP，OMP，PYM 的滯留時間分別約需 16、17 及 27 分。由以上得知，本法對雞蛋中 2, 4—二胺基嘧啶類藥物的殘留分析，檢體的製備過程簡便並可得到理想的回收率及檢測界限，不僅在定性定量上可作為確認試驗，其效率亦可作為快速篩選判斷。

本次調查雞蛋樣品 300 件，其 TMP、OMP 及 PYM 殘留皆在本法檢測界限  $0.02 \mu\text{g}/\text{g}$  以下，顯示目前農民對於畜產品上市前遵守停藥期已有很好的概念，惟仍需有關單位繼續予以輔導追蹤，監督控制。

## 參考文獻

1. 日本厚生省環境衛生局乳肉衛生課。畜水產食品中の殘留物質検査法，第 2 集の 7，1984
2. Blom L. Plasma half-lives and the excretion into eggwhite and-yolk of three sulfonamides and pyrimethamine after medication of laying hens. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 37 : 79 - 93, 1975
3. Droy BF, Goodrich MS, Lech JJ, and Kleinow KM. Bioavailability, disposition and pharmacokinetics of super(14)C-ormetoprim in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Xenobiotica* 20 (2) : 147 - 157, 1990
4. Endoh YS, Takahashi Y, and Nishikawa M. HPLC determination of sulfonamides, their N4-acetylmetabolites and diaminopyrimidine coccidiostats in chicken tissues. *J Liquid Chromatography* 15 (12) : 2091 - 2110, 1992
5. Haramaki Y, Sorimachi S, and Horie M. HPLC simultaneous analysis of synthetic antibacterials in meat and fish with solid-phase extraction. *J Food Hyg Soc Japan* 35 (3) : 262 - 270, 1994
6. Hitchings GH, and Burchall JJ. Inhibition of folate biosynthesis and function as a basis for chemotherapy. *Adv Enzymol* 27 : 417 - 468, 1965
7. Horwitz W. Evaluation of analytical method used for regulation. *J Assoc Off Anal Chem* 65 : 525 - 530, 1982
8. Lindsay DS, and Blagburn BL. Antiprotozoan drugs. In : Adams HR, ed. *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 7th ed., Ames : Iowa State University Press, 955 - 983, 1995
9. Nagata T, and Saeki M. Simultaneous determination of 17 antibacterials in Chicken tissues by high performance liquid chromatography. *J Food Hyg Soc Japan* 29 (1) : 13 - 20, 1988
10. Nagata T, Saeki M, Iida T, Kataota M, and Ino R. Residues studies in egg on pyrimethamine given with feed. *J Food Hyg Soc Japan* 31 (4) : 297 - 302, 1990
11. Nagata T, Saeki M, Iida T, Kataota M, and Shikano S. High performance liquid chromatographic determination of trimethoprim residues in egg yolk and albumen in a feeding experiment. *Br Vet J* 147 (4) : 346 - 351, 1991
12. Nagata T, Saeki M, Iida T, Kataota M, and Shikano S. Determination of pyrimethamine and sulphadimethoxine residues in eggs by high performance liquid chromatography. *Br Poult Sci* 33 (5) : 953 - 961, 1992

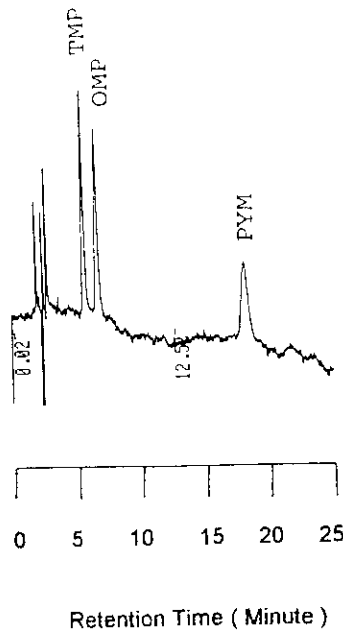


圖 1 TMP, OMP, PYM 混合標準溶液 0.5 μg/ml 之液相層析圖譜

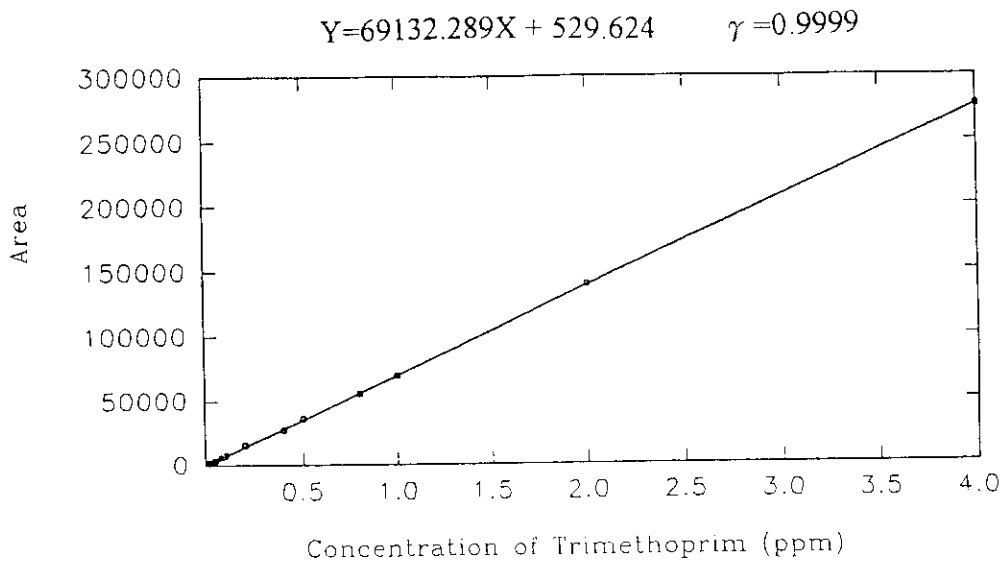


圖 2 Trimethoprim 之標準曲線

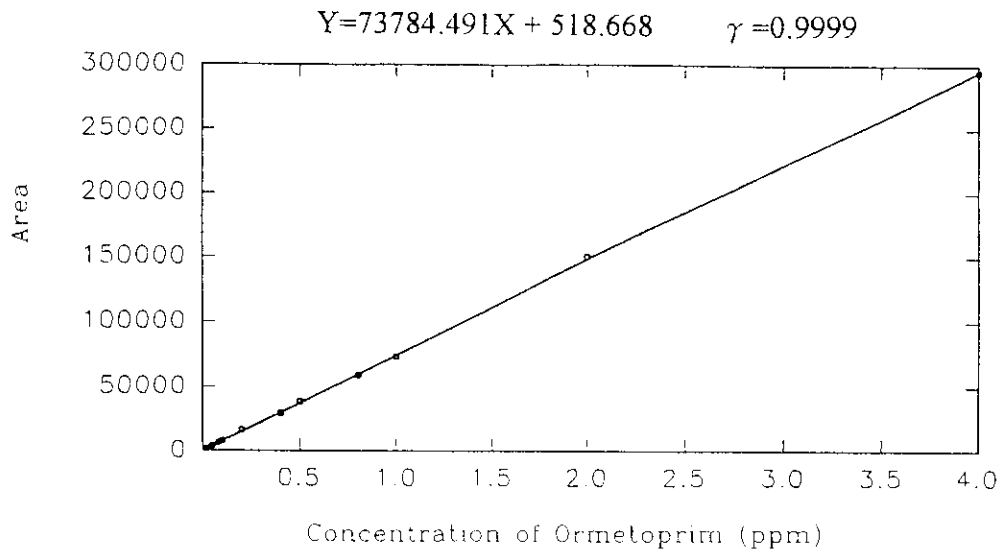


圖 3 Ormetoprim 之標準曲線

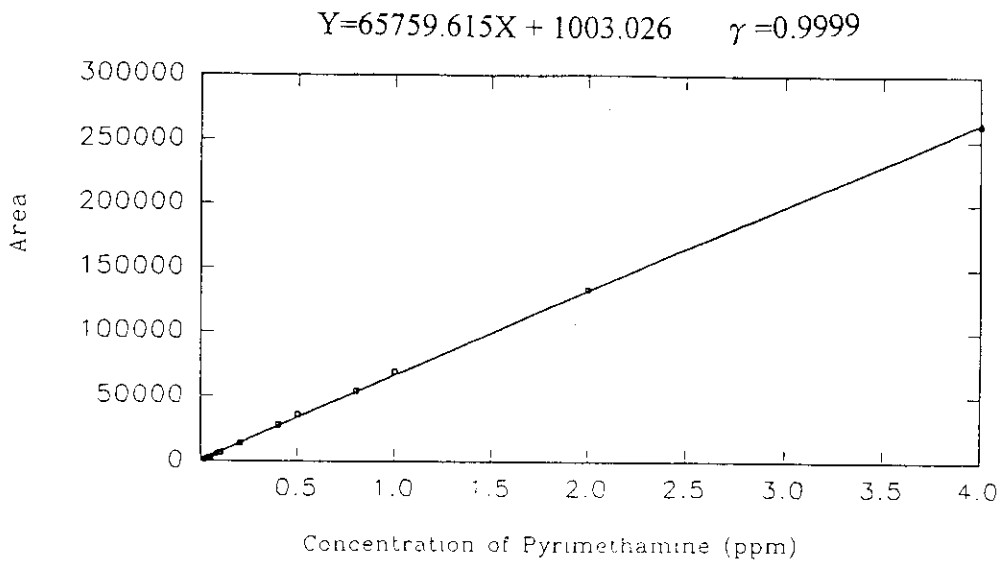


圖 4 Pyrimethamine 之標準曲線

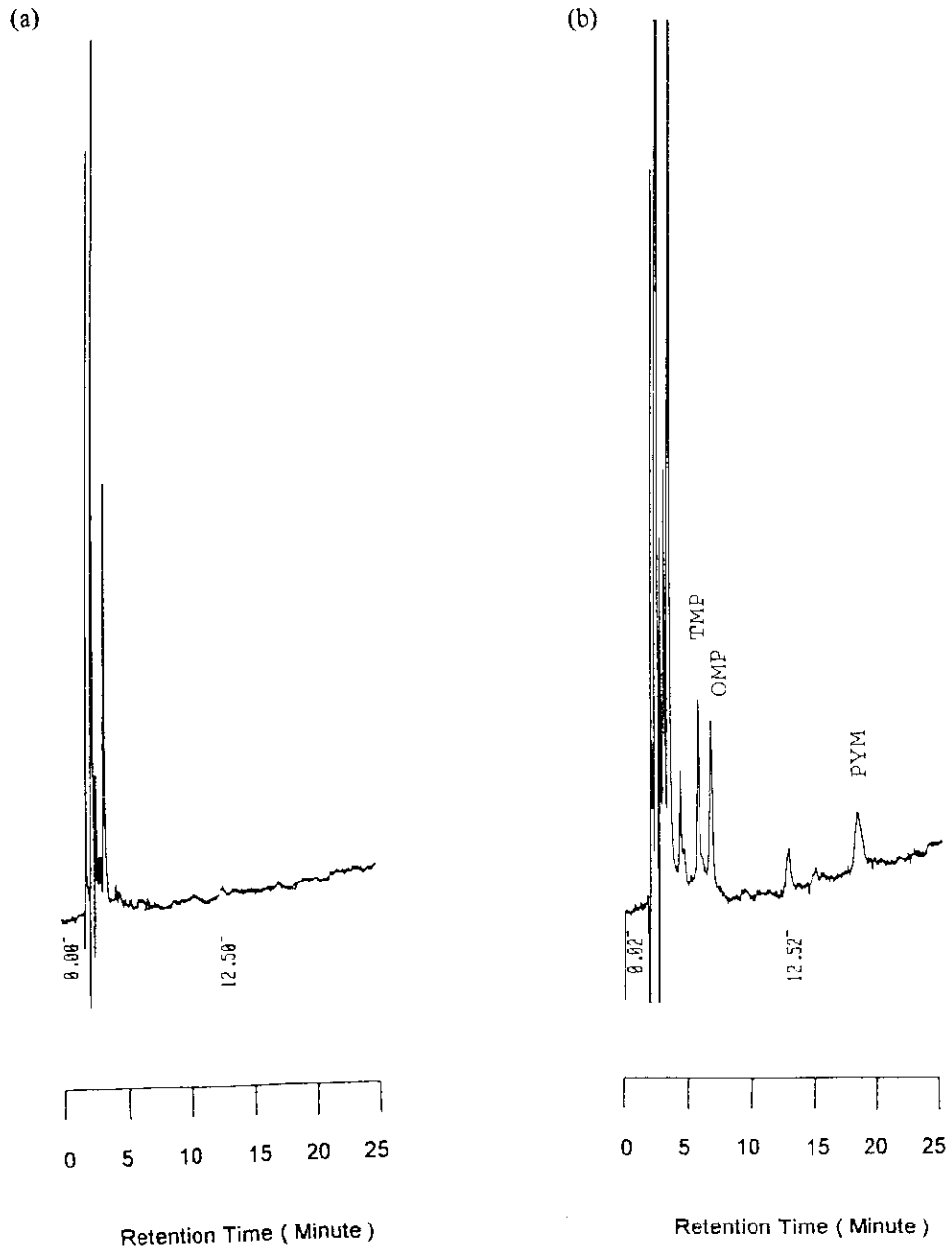


圖 5 TMP, OMP 及 PYM 於雞蛋之液相層析圖譜

(a) 空白對照組。

(b) 添加 TMP, OMP, PYM 最終濃度  $0.5 \mu\text{g/g}$ 。

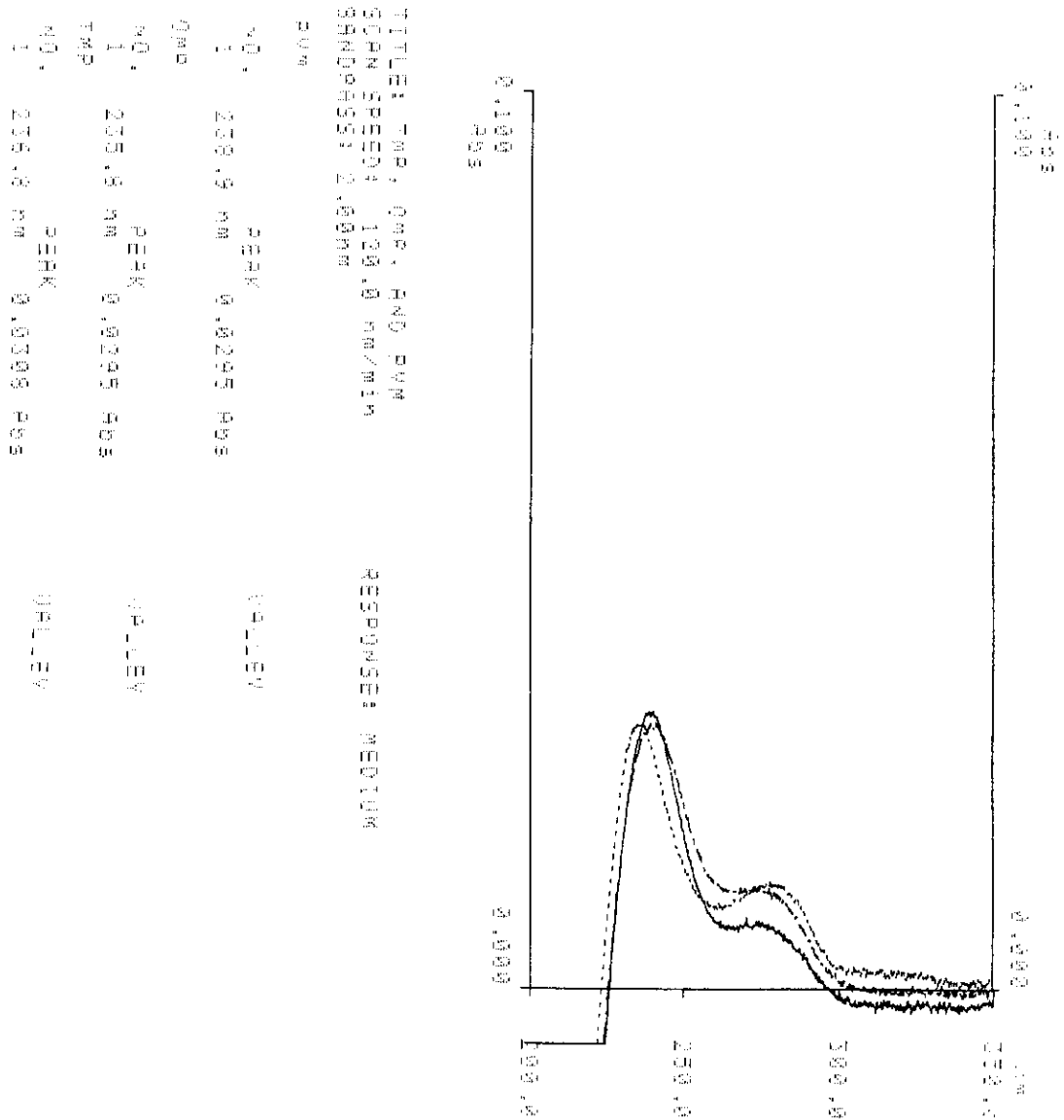


圖 6 Trimethoprim, ormetoprim 及 pyrimethamine 於移動相 (醋酸銨緩衝液: 甲醇) 0.1 µg/ml 之吸收光譜。  
 TMP (-), OMP (---), PYM (- · - · -)。

表 1 Trimethoprim, ormetoprim 及 pyrimethamine 於雞蛋之回收率

最終添加濃度 (ppm)	回 收 率 * (%)					
	Trimethoprim		Ormetoprim		Pyrimethamine	
	Mean ± S.D.	C.V.	Mean ± S.D.	C.V.	Mean ± S.D.	C.V.
0.5	76.5 ± 2.4	3.1	89.7 ± 1.1	1.2	76.8 ± 2.6	3.4
1.0	80.8 ± 3.8	4.7	90.8 ± 2.6	2.9	78.8 ± 2.2	2.8
2.0	98.8 ± 0.9	0.9	99.6 ± 0.2	0.2	84.4 ± 6.1	7.2

\* 為 3 次實驗數據平均。

表 2 0.5 μg/ml trimethoprim、ormetoprim 及 pyrimethamine 於不同波長測得之波峰面積

檢 測 波 長 (nm)	波 峰 面 積		
	Trimethoprim	Ormetoprim	Pyrimethamine
230	36072	38717	35700
254	8977	7856	14217



## Simultaneous determination and survey of 2, 4-diaminopyrimidines residues in eggs by high-performance liquid chromatography

Ya-Fang Liu\*, S. J. Lee, S. C. Yang, P. P. Liou

Taiwan Animal Health Research Institute

**SUMMARY** A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for simultaneous determination of the residue of 2, 4-diaminopyrimidine drugs, including trimethoprim (TMP), ormetoprim (OMP), and pyrimethamine (PYM) in eggs was developed. Samples were extracted with acetonitrile, centrifuged, partitioned with n-hexane, concentrated by rotary evaporation to dryness, and then analysed by HPLC. The conditions were established on a  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column with  $5 \times 10^{-3}$  M acetic acid buffer / methanol as mobile phase and detected at UV 230 nm. The average recoveries of the three drugs spiked into samples at the levels of 0.5, 1.0, and 2.0  $\mu\text{g} / \text{g}$  were 76.5 % to 99.6 %. The lowest detection limit of residual drugs were 0.02  $\mu\text{g} / \text{g}$  in eggs. 300 samples from layer farms in Taiwan area were surveyed by random for the residues of TMP, OMP, and PYM with the developed method. The result indicated that all samples were examined to be below the detection limit of the three drugs.

**Key words:** 2, 4-Diaminopyrimidines, HPLC, Simultaneous determination, Residues

---

\*Corresponding author

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