

畜水產品中殘留 19 種合成抗菌劑同時檢測

郭美月* 林士鈺 林金梅 劉敏主 劉雅方

台灣省家畜衛生試驗所 動物用藥品檢定分所

摘要 應用高效液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) 光二極體排列檢測器 (Photo Diode Array) 同時檢測畜水產品中 trimethoprim (TMP)、ormethoprim (OMP)、olaquinox (ODX)、clopidol (CLP)、oxolinic acid (OXA)、piromidic acid (PMA)、carbadox (CDX)、morantel citrate (MRT)、difurazone (DFZ)、nicarbazine (NCZ)、thiophenicol (TPC)、sulfamerazine (SMR)、sulfamethazine (SMT)、sulfamonomethoxine (SMM)、sulfadimethoxine (SDM)、sulfaquinoxaline (SQX)、pyrimethamine (PYR)、nalidixic acid (NAA) 及 furazolidone (FZD) 等 19 種合成抗菌劑之殘留，利用 TSK Gel ODS-80TM 之分離管，以 80% 乙晴及 0.1% 磷酸做線性梯度沖提，標準品濃度在 0.3125~10 ppm 間呈良好之線性關係。雞肉中添加 19 種合成抗菌劑之回收試驗，以乙晴抽出後，用 n-Hexane 分配淨化去油脂，大部份合成抗菌劑之回收率可達 80%，SDM、SQX 及 PRY 稍差 (55.5~62.6%)，ODX 及 DFZ 則僅達 17.4% 及 14.2%，而 CLP 無法檢量，NCZ 未檢出。

關鍵詞： 高效液相層析法，光二極體排列檢測器，合成抗菌劑

緒 言

由於本省氣候高溫多濕，畜、水產養殖業者必須在飼料中添加各種合成抗菌劑以防止疾病發生，為保障國人健康及協助業者順利輸出畜、水產品，商檢局曾舉辦「豬肉中殘留合成抗菌劑之多成分同步分析法研習會」，這個試驗法適用於豬肉、牛肉、雞肉、鰻、蝦等畜水產品，不但樣品前處理快速，且可同時將 19 種合成抗菌劑做同步分析。

我國加 WTO 後，對國外輸入及國內生產之畜水產品藥物殘留必須作相同情況及相同程度之檢驗。依照 WTO 的精神，各國間彼此對國內外產品的檢驗方法、儀器設備、條件，都須公開、對等；而此一「19 種合成抗菌劑同步分析法」就是日本厚生省公告之「畜水產品中の殘留合成抗菌劑の一齊分析法」，配合日本 Millipor 公司「

合成抗菌劑分析手引」以 Millipor 公司出口之 HPLC 所完成的分析檢驗法，成為我國外銷日本畜產品藥物殘留檢驗之方法。本所建立方法及技術並配合農林廳執行「防範飼料中濫用藥物監控計畫」等相關計畫，加強檢驗以防範畜、水產品藥物殘留、確保人畜健康，並利業者輸出禽畜及水產品。

材料與方法

(一) 儀器設備及器材

1. 100 ml 褐色定量瓶 (配製標準劑用)。
2. 15 ml 及 50 ml 褐色離心試管 (含蓋子)。
3. 100 ml 或 150 ml 褐色濃縮瓶。
4. 125 ml 褐色分液漏斗。
5. 離心機：Kokusan H130 型、日製。
6. 均質機：Heidolph DIAX 600。

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

7. 減壓濃縮器：Csvant instrument INC.Modil A160。

8. 0.45 μm ，Nylon 材質過濾膜。

9. 液相層析儀 (HPLC)。

(a) Waters 600 E 梯度幫浦，含注射器及 He 除氣裝置。

(b) Waters 996 光電二極體檢出器 (Photodiode Array Detector) 及 PC 電腦資料處理系統。

(c) 層析管恒溫器。

(d) TSK Gel ODS-80 TM (Tosoh 製) 4.6 mm \times 15 cm，5 μm 分離管。

(二) HPLC 之測定條件

移動相：(A) 0.1% 磷酸

(B) 氫甲烷：水 (80：20)

流速：1 ml/min

檢出波長：200~400 nm

波長間隔：1.2 nm

氮氣流量：30~50 ml/min

分離管溫度：40 $^{\circ}\text{C}$

全分析所需時間 60 分 (分析 45 分，平衡 15 分)

梯度程式 (gradient program)

時間(分)	流速 (ml/min)	%A	%B	Curve
0.00	1.00	95	5	*
3.00	1.00	85	15	6
10.00	1.00	85	15	6
20.00	1.00	70	30	6
35.00	1.00	30	70	6
45.00	1.00	95	5	11

(三) 試 藥

1. 氫甲烷 (acetonitrile)：LC 級，220 nm 吸光值 0.02 以下

2. 正己烷 (n-hexane)：LC 級，220 nm 吸光值 0.1 以下

3. 1-propanol，無水硫酸鈉，磷酸，試藥特級 (

Merck 產品)

4. 純水：經 0.45 μm 濾膜過濾。

(四) 製作檢量線之標準液配製

1. 標準原液：

稱取標準劑 ODX，CDX，NCZ 各 50 mg 各置 100 ml 褐色定量瓶中以氫甲烷溶解並稀釋至 100 ml 定容，使其濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，另稱標準劑 TPC，FZD，SMR，SMT，SMM，SDM，SQX，OXA，PYR，NAA，PMA，CLP，TMP，OMP，MRT，DFZ 各 10.0 mg 各置於 100 ml 褐色定量瓶中以氫甲烷：水 (1：1) 溶解並稀釋至 100 ml 定容，使其濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2. 混合標準溶液：

(a) 混合標準溶液 A (九種合成抗菌劑)

量取標準原液 SMR，SMT，SMM，SDM，SQX，PRY，NAA 各 5 ml、TPC、FZD 標準原液各 10 ml 置 100 ml 褐色定量瓶中，以氫甲烷 - 0.1% 磷酸 (1：1) 稀釋至 100 ml 定容。

(b) 混合標準溶液 B

量取標準原液 ODX，MRT 各 10 ml，CLP，TMP，OMP，CDX，DFZ，PMA，NCZ 各 5 ml，OXA 3 ml，以氫甲烷 - 0.1% 磷酸 (2：8) 稀釋至 100 ml。

(c) 取混合標準溶液 A 及 B，各以氫甲烷 - 0.1% 磷酸 (1：1) 稀釋成 1/2A、1/4A、1/8A 及 1/2B、1/4B、1/8B 之不同濃度做校正曲線。

(d) 取 1/4A 及 1/4B 各 5 ml 混合後成 1/8 (A + B)，以 HPLC 檢測觀察其分離情形。

(五) 前 處 理

SMR、SMT、SMM、SDM、SQX、PYR、NAA、TPC、FZD 等 9 種為 A 組，添加於肉中使其含量為 0.2、0.5、1.0 ppm，其中 TPC 及 FZD 為 0.5、1.0、2.0 ppm。ODX、CLP、TMP、OMP、DFZ、PMA、MRT、CDX、NCZ、OXA 等 10 種為 B 組，添加於肉中使其含量為 0.2、0.5、1.0 ppm。取前述添加完成之 A 組及 B 組，每個濃度重複取三個樣品做回收率試驗。處理流程為樣品 5 g 加無水硫酸鈉 10 g，乙睛 25 ml 以均質機均質，於 3000 rpm 離心 5 分鐘，上清液以正己烷 25 ml 振盪 5 分鐘，取出氫甲烷層，正己

烷層留下備用。殘渣再以 25 ml 乙睛超音波抽出 30 秒鐘，於 3000 rpm 離分離 5 分鐘，上清液倒入前面留下之正己烷層，振盪 5 分鐘，取上層和前面之氟甲烷層合併後加入 10 ml 異丙醇濃縮乾固，殘留物以氟甲烷：水（4：6）1 ml 溶解，溶出液加入 0.5 ml 正己烷振盪後 3000 rpm 離心分離 5 分鐘，上清液經 0.45 Mm 之濾膜過濾後以 HPLC 分析。

結 果

將 SMR、SMT、SMM、SDM、SQX、PYR、NAA、TPC 及 FZD 等 9 種合成抗菌劑合併為 A 組，取 230 nm、260 nm 及 360 nm 波長之層析圖可得良好之分離效果，如圖 2。

將 OMP、TMP、CLP、PMA、OXA、ODX、MRT、CDX、DFZ 及 NCZ 等 10 種合成抗菌劑合併為 B 組，取 230 nm、260 nm、316 nm 及 360 nm 波長之層析圖可得良好之分離效果，如圖 3。

19 種合成抗菌劑一次同時分析部份抗菌劑之波峰重疊，影響分離效果，如 OMP 與 FZD 而 TPC 與 TMP，SDM 與 SQX 之分離效果亦不佳。

A 組標準品四種濃度 0.625~10.0 ppm 之波峰面積再現性大部份可達 98.5%，僅 NAA 部份濃度較差（表 1）。檢量線之相關性可達 99.98%，僅滯留時間最長之 NAA 稍差（99.94%）（表 2）。

B 組標準品四種濃度 0.3125~10.0 ppm 之波峰面積再現性大部份可達 98%，僅滯留時間最長之二者 PMA、NCZ 稍差（表 3）。檢量線相關性可達 99.97%，僅 PMA、NCZ 稍差（99.93%、99.78%）（表 4）。

肉中 A 組標準品三種添加量之平均回收率可達 80% 以上，僅 SDM、SQX 及 PYR 較差，其回收率為 55.5~62.6% 之間（表 5）。肉中 B 組標準品三種添加量之平均回收率參差不齊，高者如 TMP 可達 91.3%，但 ODX 及 DFZ 僅達 17.4% 及 14.2%（表 6），而 CLP 波峰被干擾物質蓋住無法檢量，而 NCZ 未檢出。

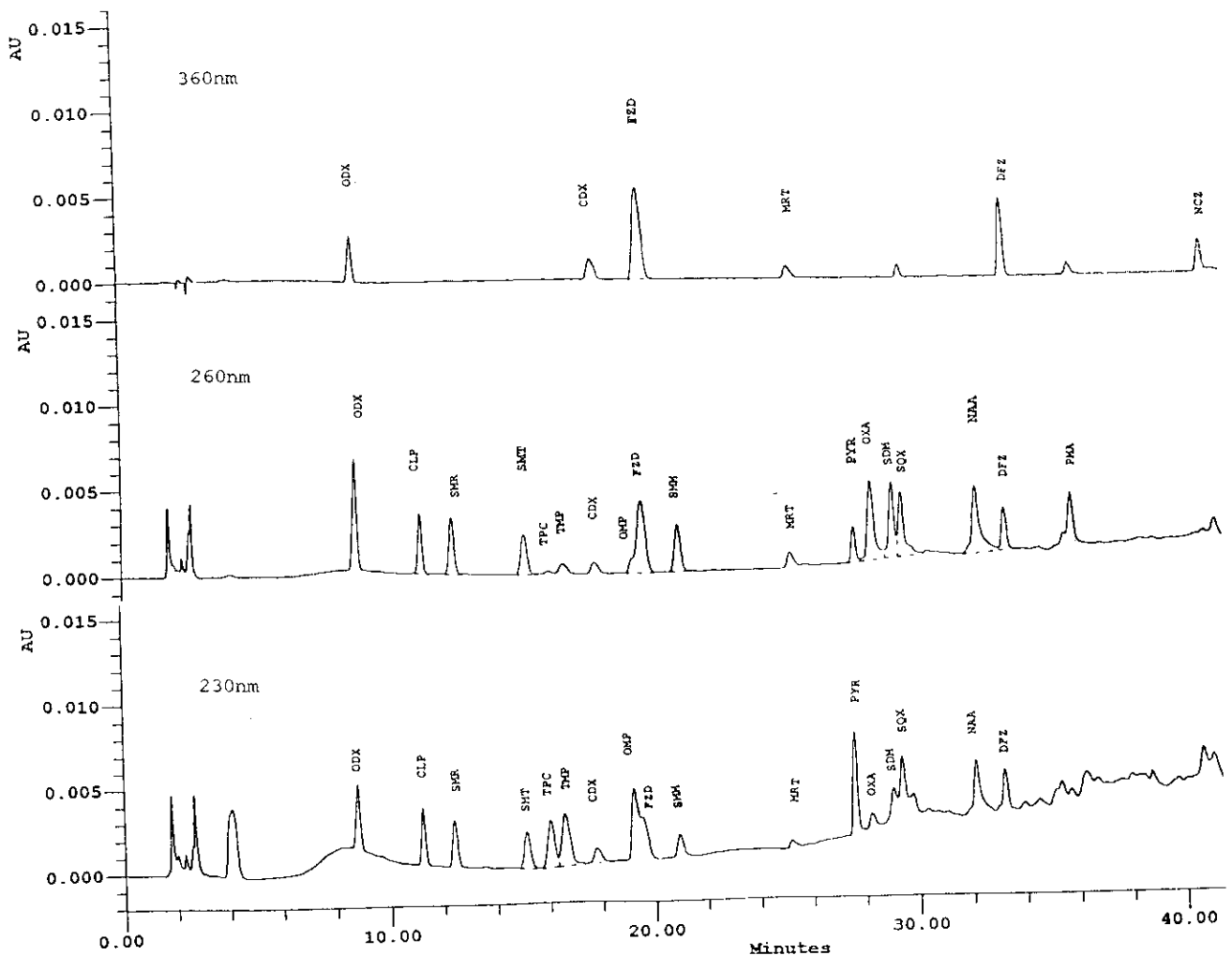


圖 1 19 種合成抗菌劑一次同時分析層析圖

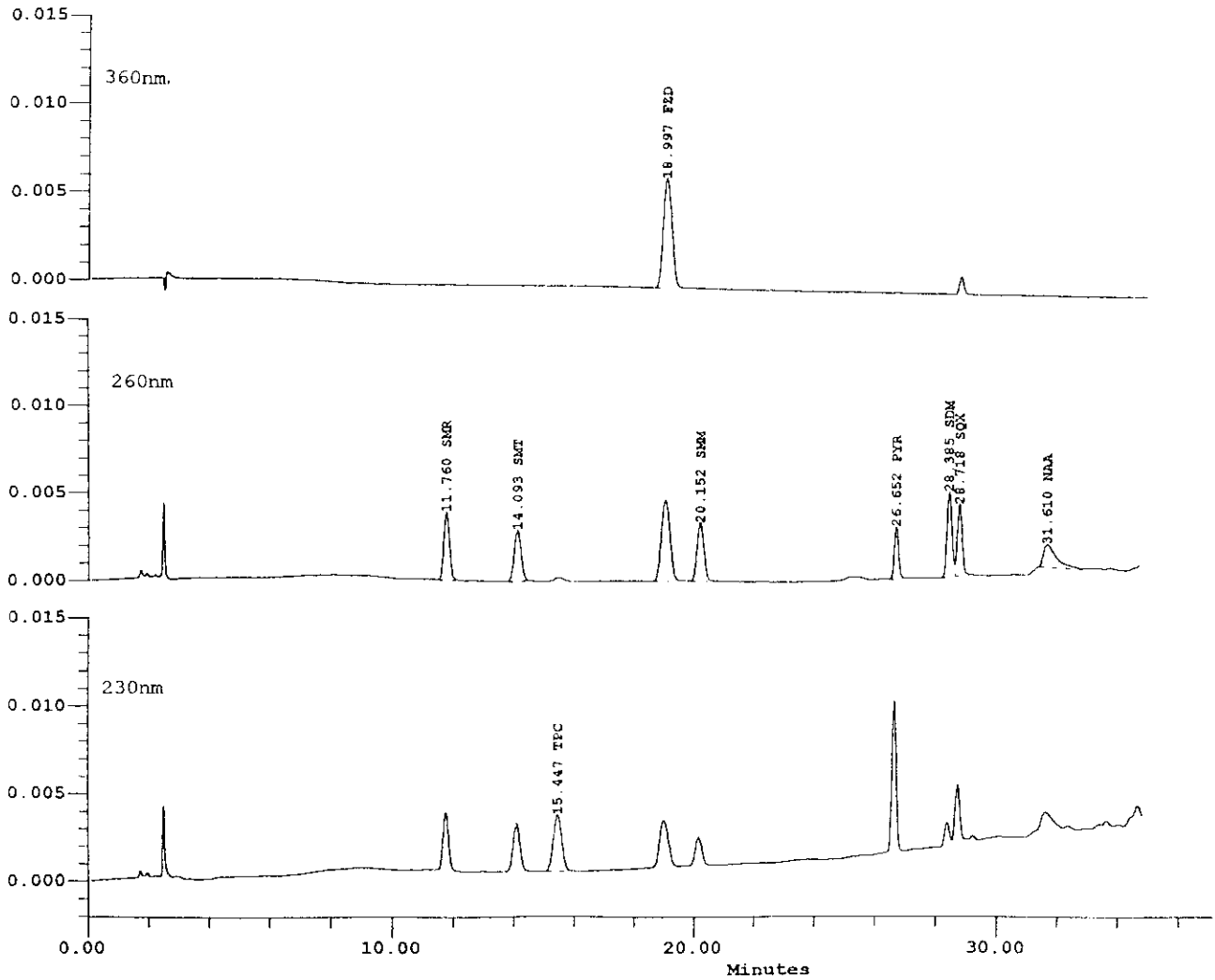


圖 2 混合標準溶液 1/8A 之層析圖

SMR、SMT、SMM、SDM、SQX、PYR、NAA：0.625PPM TPC、
FZD：1.25PPM

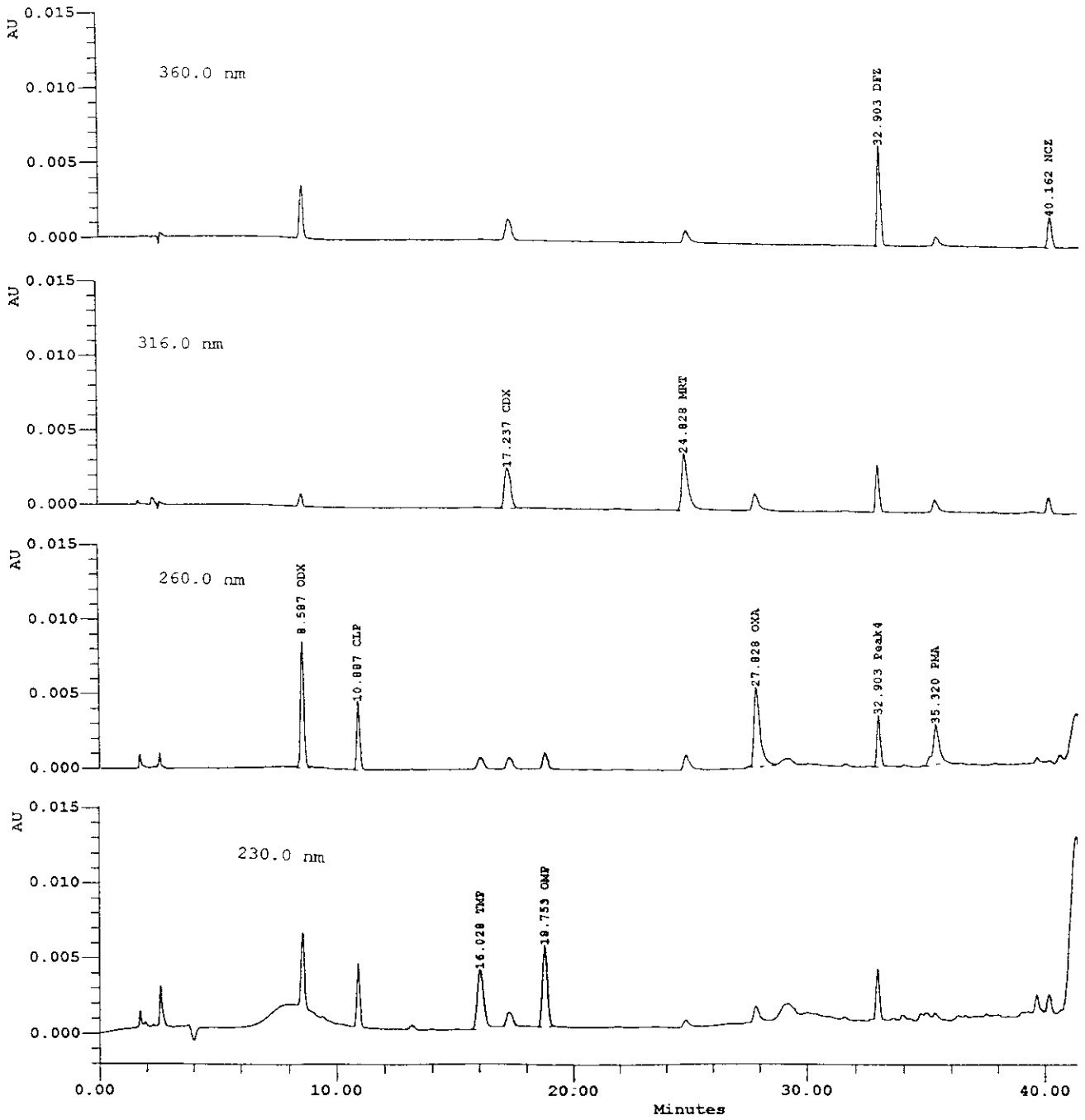


圖 3 混合標準溶液 1/8B 之層析圖

NCZ、CDX : 0.3125 PPM

OXA : 0.375 PPM

ODX、CLP、TMP、OMP、DFZ、PMA : 0.625 PPM

MRT : 1.25 PPM

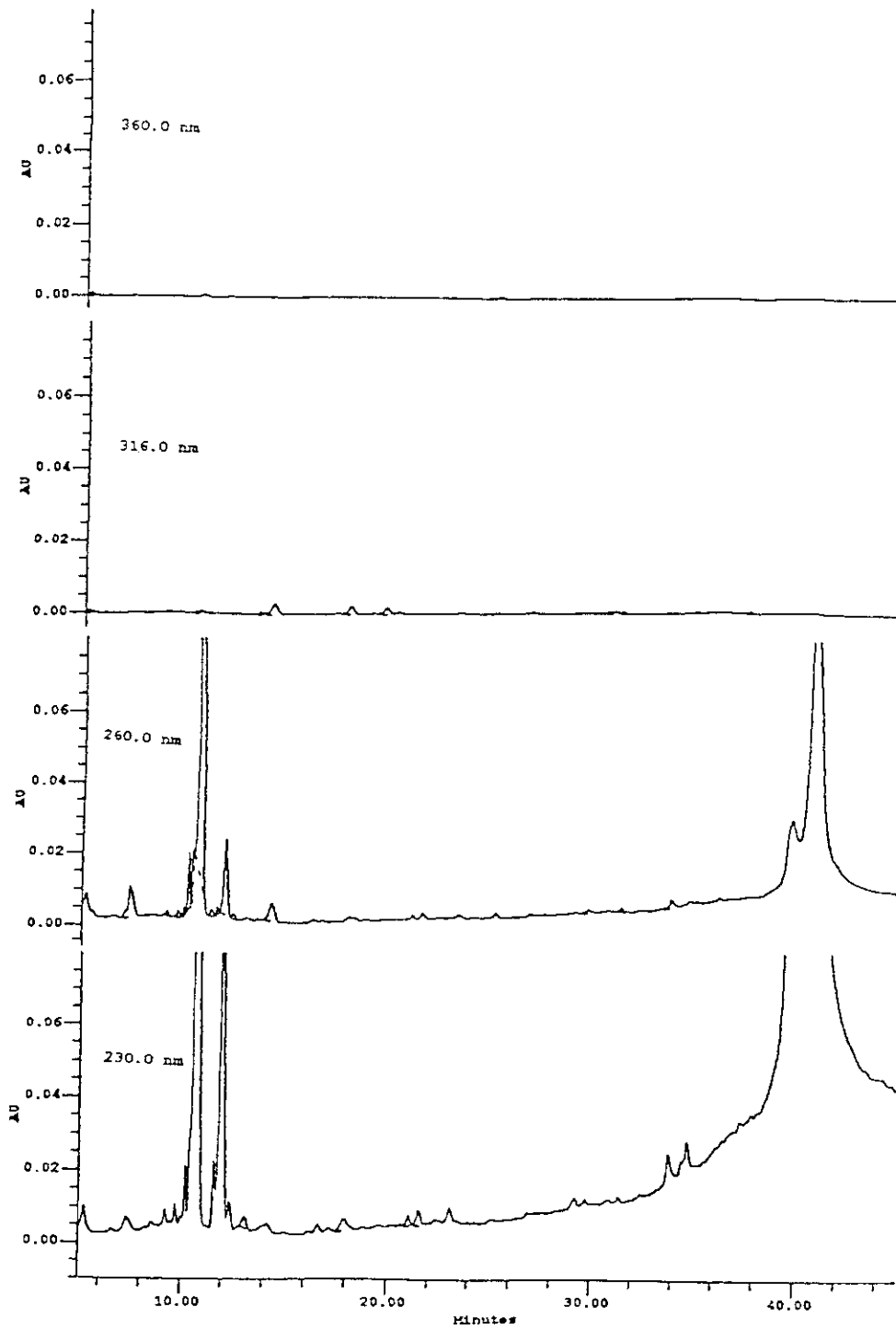


圖 4 空白雞肉層析圖

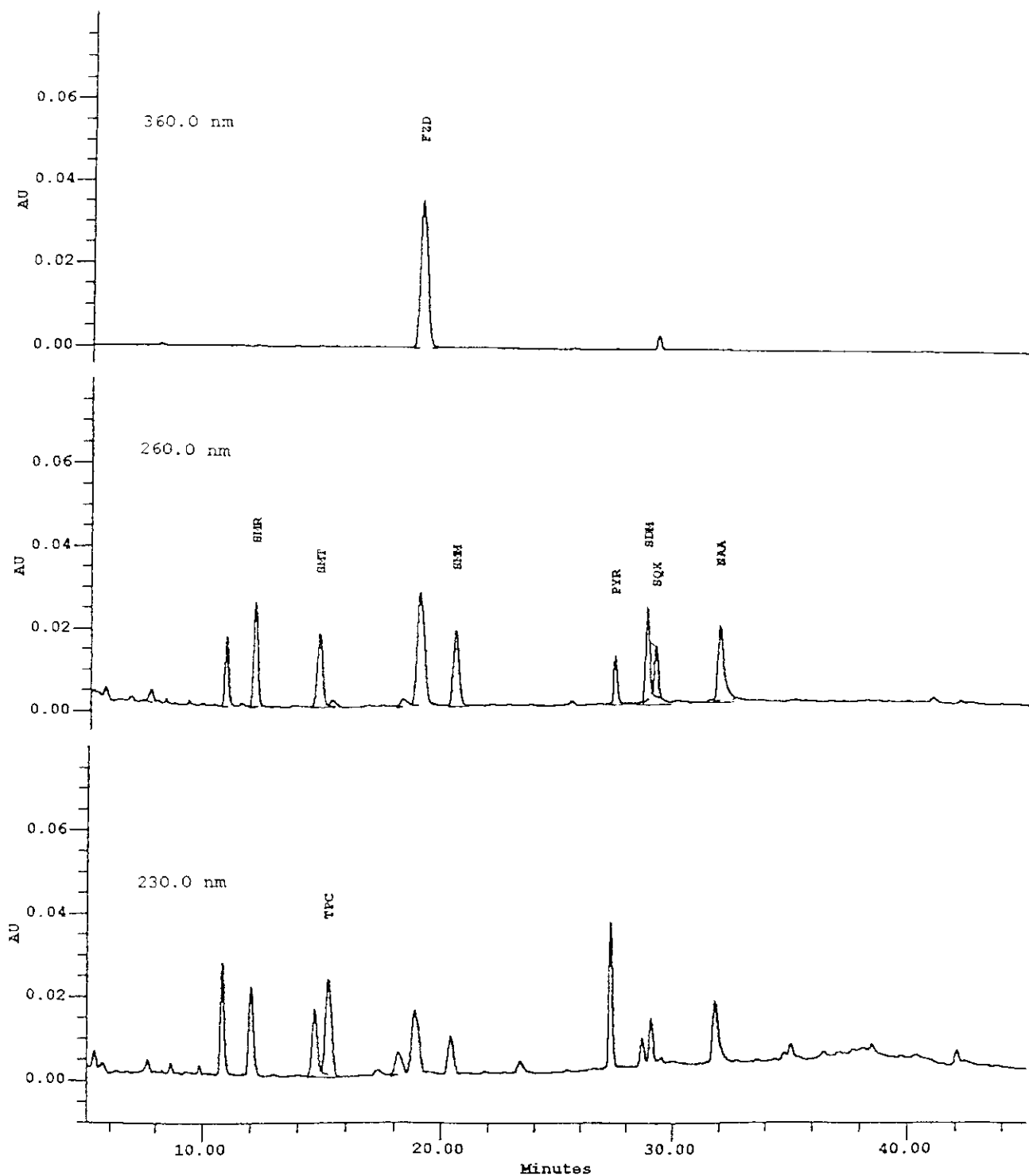


圖 5 雞肉中添加SMR、SMT、SMM、SDM、SQX、PYR、NAA、TPC及FZD層析圖
SMR、SMT、SMM、SDM、SQX、PYR、NAA：1 PPM
TPC、FZD：2 PPM

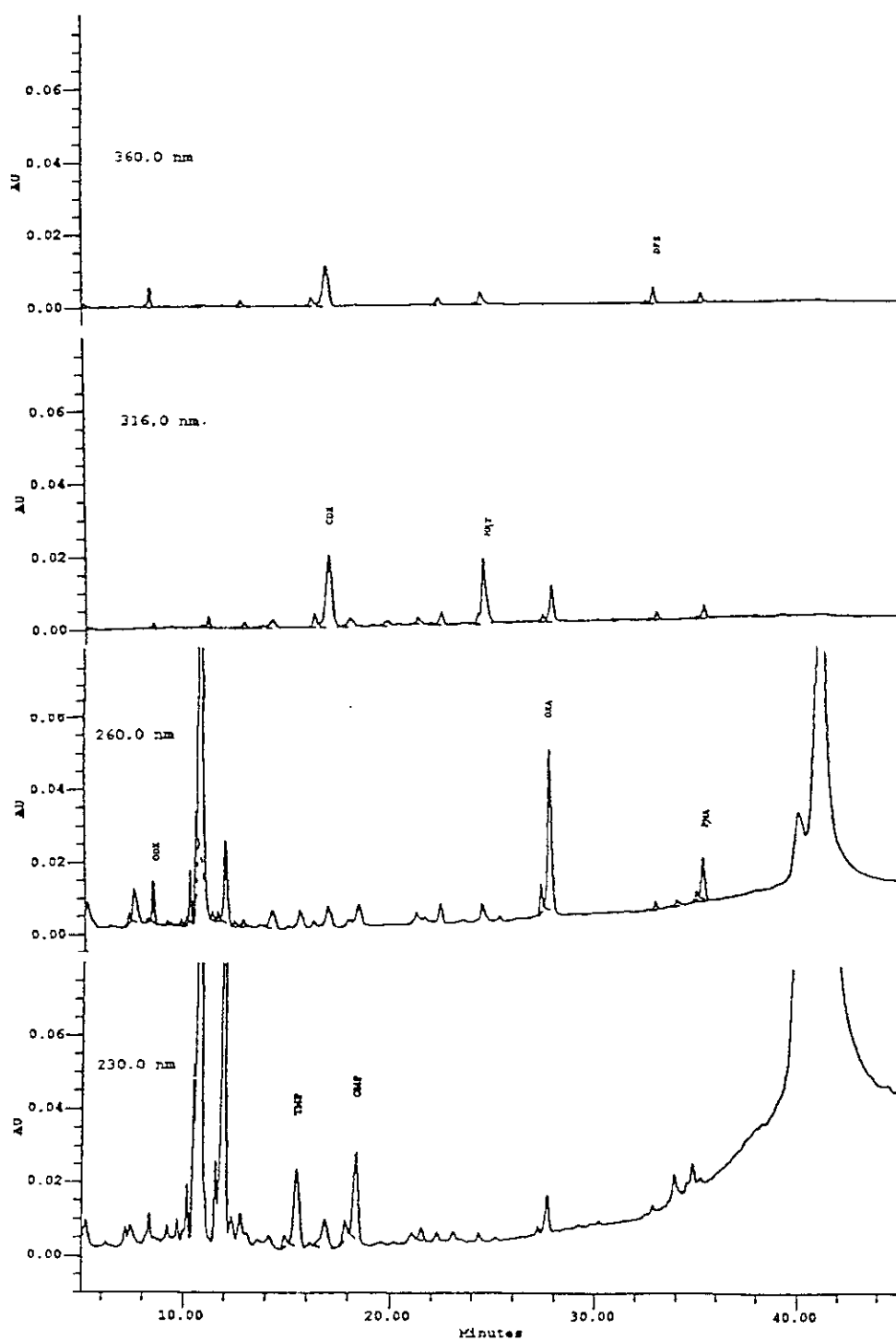


圖 6 雞肉中添加 ODX、CLP、TMP、OMP、DFZ、PMA、CDX、NCX、OXA 及 MRT 之層析圖
 ODX、CLP、TMP、OMP、DFZ、PMA、CDX、NCZ、OXA : 1 PPM
 MRT : 2 PPM

表 1 A組標準品波峰面積再現性

	0.625 ppm	1.25 ppm	2.5 ppm	5.0 ppm	10.0 ppm
SMR	49.9 ± 1.4%	91.7 ± 0.4%	181.2 ± 1.2%	367.2 ± 0.2%	
SMT	45.5 ± 2.0%	84 ± 0.07%	166.0 ± 1.2%	337.2 ± 0.5%	
TPC		621 ± 0.3%*	114.2 ± 0.2%	226.7 ± 1%	459 ± 0.06%
FZD		124 ± 1.7%	254.9 ± 0%	521.8 ± 1.2%	1072.6 ± 0.2 %
SMM	53.5 ± 2.2%	99.0 ± 0.8%	194.2 ± 1.4%	394.2 ± 0.2%	
PYR	29.2 ± 1.1%	53.2 ± 1.5%	104.7 ± 4.6%	210.1 ± 0.1%	
SDM	55.9 ± 0.1%	102.8 ± 0.4%	203.0 ± 1.6%	342.3 ± 1.6%	
SQX	46.6 ± 2.3%	84.8 ± 0.4%	168.7 ± 0.8%	341.0 ± 0.04%	
NAA	37.8 ± 0.6%	83.6 ± 4.6%	215.4 ± 1%	455.4 ± 14.8%	

*波峰面積單位：mV-Sec；X ± R.S.D

表 2 A組標準品檢量線及相關性

	檢 量 線 *	相 關 性 **
SMR	1846.2 + 72817.2X	99.99%
SMT	1635.9 + 66850.1X	99.99%
TPC	1805.9 + 4526X	99.98%
FZD	-1623.4 + 108654.5X	99.99%
SMM	2103.5 + 78117.7X	99.99%
PYR	1891.4 + 41529X	99.99%
SDM	1819.4 + 81775.6X	99.98%
SQX	1827.2 + 67615.7X	99.99%
NAA	-16234.4 + 108654.5X	99.94%

* 檢量線：Y = a + bx

** 相關性：相關係數R

表 3 B組標準品波峰面積再現性

	0.3125ppm	0.375	0.625	0.75	1.25	1.5	2.5	3.0	5.0	10.0
SDX			79.1±2.1%		153.4±2%		341.9±1%		69.4±0.4%	
CLP			42.1±1.1%		84.8±0.4%		171.5±0.5%		340.8±0.5%	
TMP			70.9±0.9%		144.9±0.2%		293.9±0.3%		590.5±0.9%	
CDX	48.8±0.9%		98.3±0.5%		202.3±0.5%		406.1±1.1%			
OMP			78.9±1.0%		160.8±0.1%		325.4±0.5%		684.6±1.2%	
MRT					60.0±0.2%		131.7±1.2%		290.3±0.6%	593.5±0.9%
OXA		82.8±1.4%		175.1±5.5%		406.3±0.02%		843.1±0.6%		
DFZ			66.7±0.8%		136.2±0.2%		280.9±0.4%		567.5±5%	
PMA			38.9±3.7%		82.9±8.3%		217.7±1.1%		458.0±1%	
NCZ	24.2±0.7%		42.2±5.3%		110.9±0.2%		2249.4±17.2%			

* 波峰面積單位：mV - Sec : X ± R.S.D

表 4 B組標準品檢量線及相關性

	檢 量 線*	相 關 性**
ODX	-14947 + 141502X	99.97%
CLP	-275.57 + 68295.4X	99.99%
TMP	0.0289 + 0.0000084X	99.99%
CDX	-2869.6 + 163640X	99.99%
OMP	0.0134 + 0.0000077X	99.99%
MRT	-155432 + 60891X	99.99%
OXA	-34131.5 + 292244X	99.98%
DFZ	-5877 + 114647.5X	99.98%
PMA	-28776.2 + 97325X	99.93%
NCZ	-16879 + 105413.8X	99.78%

* 檢量線：Y = a + bx

** 相關性：相關係數R

表 5 肉中添加 A 組標準品之回收率

添加量 (ppm)		檢 出 值 (ppm)			回收率 (X±RSD)	平均回收率 (X±RSD)
SMR	0.2	0.185	0.169	0.159	85.5±7.5%	
	0.5	0.427	0.461	0.412	86.3±5.2%	86.5±1.2%
	1.0	0.878	0.902	0.849	87.6±3.0%	
SMT	0.2	0.179	0.171	0.157	84.5±6.4%	
	0.5	0.379	0.364	0.379	74.8±2.4%	81.2±6.8%
	1.0	0.805	0.872	0.852	84.3±4.1%	
TPC	0.5	0.453	0.431	0.417	86.7±4.2%	
	1.0	0.889	0.833	0.889	87.0±3.7%	90.2±6.5%
	2.0	1.888	1.988	1.944	97.0±2.6%	
FZD	0.5	0.408	0.395	0.369	78.1±5.2%	
	1.0	0.861	0.745	0.797	80.1±7.3%	81.0±4.3%
	2.0	1.696	1.628	1.762	84.8±4.0%	
SMM	0.2	0.168	0.161	0.157	81.1±3.2%	
	0.5	0.358	0.352	0.379	72.5±3.9%	78.6±6.8%
	1.0	0.854	0.823	0.793	82.3±3.7%	
PYR	0.2	0.102	0.115	0.121	56.3±8.6%	
	0.5	0.288	0.243	0.273	83.6±8.7%	55.5±3.0%
	1.0	0.579	0.616	0.507	56.7±3.7%	
SDM	0.2	0.129	0.118	0.117	60.6±5.8%	
	0.5	0.305	0.313	0.322	62.6±2.8%	62.6±3.3%
	1.0	0.679	0.657	0.604	64.7±6.0%	
SQX	0.2	0.125	0.100	0.113	56.3±11.1%	
	0.5	0.290	0.277	0.303	57.9±4.5%	56.1±3.4%
	1.0	0.578	0.511	0.533	54.1±6.3%	
NAA	0.2	0.125	0.112	0.125	60.4±6.0%	
	0.5	0.403	0.409	0.432	82.9±3.7%	76.8±18.7%
	1.0	0.839	0.871	0.903	87.1±4.0%	

表 6 肉中添加 B 組標準品之回收率

添加量 (ppm)	檢 出 值 (ppm)	回 收 率 (X±RSD)	平均回收率 (X±RSD)
ODX	0.2	0.028 0.033 0.030	15.2±8.6%
	0.5	0.113 0.095 0.095	20.0±10.3%
	1.0	0.173 0.173 0.163	16.9±3.4%
TMP	0.2	0.181 0.189 0.185	97.6±2.2%
	0.5	0.486 0.466 0.446	93.1±4.3%
	1.0	0.865 0.919 0.865	88.3±3.5%
CDX	0.5	0.062 0.064 0.065	63.8±2.3%
	1.0	0.356 0.347 0.309	67.4±7.4%
	2.0	0.625 0.667 0.634	64.2±3.4%
OMP	0.5	0.173 0.178 0.169	86.7±2.6%
	1.0	0.476 0.481 0.470	95.8±2.3%
	2.0	0.804 0.826 0.826	81.9±1.6%
MRT	0.2	0.372 0.340 0.353	70.9±4.6%
	0.5	0.757 0.750 0.723	74.3±2.4%
	1.0	1.366 1.36 1.268	66.7±4.2%
OXA	0.2	0.086 0.084 0.090	86.7±3.8%
	0.5	0.438 0.450 0.463	90.0±2.8%
	1.0	0.948 0.897 0.872	90.6±4.3%
DFZ	0.2	0.125 0.100 0.113	56.3±11.1%
	0.5	0.290 0.277 0.303	57.9±4.5%
	1.0	0.578 0.511 0.533	54.1±6.3%
PMA	0.2	0.127 0.133 0.133	65.6±3.0%
	0.5	0.316 0.328 0.310	63.5±2.9%
	1.0	0.625 0.625 0.563	60.4±5.9%

註：1.CLP 被干擾；無法檢量。

2.NCZ 未檢出。

討 論

依照日本厚生省公告之方法 19 種合成抗菌劑一次同時分析無法將所有合成抗菌劑完全分離本試驗曾嘗試修飾其梯度分析均無法獲得更佳之分離效果，故接受商品檢驗局之建議，將 19 種合成抗菌劑分成 A、B 二組進行測試。A 組中合成抗菌劑在波長 260 或 230 nm 下大部份可吸收僅 TPC 在 230 nm 可得較好之吸收，但 260 nm 則極差，又 FZD 在 360 nm 下吸光度較 260 及 230 nm 佳，故以 230、260 及 360 nm 檢測之。

B 組合成抗菌劑在波長 260 nm 大部份都有吸收，但 TMP、OMP、CDX、MRT 及 NCZ 吸收極差，而 DFZ 及 NCZ 在 360 nm 吸光較佳，TMP 及 OMP 則在 230 nm 吸光較強，CDX 及 MRT 則在 316 nm 下可得較強之吸收，故選用上述四種波長檢測之。

A 使用 0.1% 磷酸，因磷酸在波長 230 nm 吸光值低，不易使基線升高及飄移現象 (3)，對分析 TPC、TMP、OMP 等低波長吸收之合成抗菌劑較佳。而日本厚生省公告試驗法中 (4)，移動相使用 0.3% 醋酸，因醋酸在 230 nm 吸光值較高，易造成基線飄移，故分析上述三種合成抗菌劑時宜選取磷酸為移動相，但因磷酸之 pH 值較低，約為 2.0~2.5，較易致分離管之充填物質受損，使用壽命較短。

混合標準溶液之最終溶液中氫甲烷之濃度達 20% 以上，則 CLP 及 ODX 之波峰會分裂為 2，又其濃度達 40% 以上時 TMP 及 OMP 之波峰會分裂為 2，此等現象與王等所做之結果相似 (1, 2)。

混合標準溶液如以 0.1% 磷酸—氫甲烷 (8:2) 定容，則 DFZ 及 NCZ 可得較尖銳之波峰。

A 組標準品中 NAA 部份濃度波峰面積再現性較差，此乃因該藥品滯留時間較長波峰有拖頭 (heading) 及拖尾現象 (tailing)。

A 組中 SDM、SQX 及 PYR 之回收率較差，此結果與商檢局 (1, 2, 3) 所作相近，其應 SQX 及 PYR 在萃取液 (氫甲烷) 之溶解性稍差之故 (1)。B 組中 DFZ 回收率 14.2%，NCZ 則未檢出此結果與商檢局所作相似 (3)，可能因 DFZ 溶於氫甲烷而 NCZ 幾乎不溶 (1)。王等 (3) 認為此乃因 DFZ、NCZ 易溶於正己烷，尤其 NCZ 在正己烷的溶解度大於氫甲烷，所以在氫甲烷—正己烷分配淨化中，DFZ 及 NCZ 易被正己烷帶走而流失。CLP 之波峰被肉中抽出之干擾物質完全蓋住無法檢量，須加強前處理以去除其干擾物質或改變移動相以定濃度沖提法單獨測試之。ODX 之回收率甚低 17.4% 此乃因該藥物極難溶於氫甲烷之故 (1)。

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の殘留合成抗菌劑の一齊分析法 (改定法) 1994

Simultaneous determination of nineteen synthetic antibacterial drugs

M. Y. Kueo*, S. Y. Lin, K. M. Lin, M. C. Lin, and Y. F. Liu

Residues in Domestic and Fishery Products
Taiwan Animal Health Research Institute.

SUMMARY Simultaneous determination of trimethoprim (TMP) 、 ormethoprim (OMP) 、 olaquinox (ODX) 、 clopidol (CLP) 、 oxolinic Acid (OXA) 、 piromidic acid (PMA) 、 carbadox (CDX) 、 morantel citrate (MRT) 、 difurazone (DFZ) 、 nicarbazine (NCZ) 、 thiophenicol (TPC) 、 sulfamerazine (SMR) 、 sulfamethazine (SMT) 、 sulfamonomethoxine (SMM) 、 sulfadimethoxine (SDM) 、 sulfaquinoxaline (SQX) 、 pyrimethamine (PYR) 、 nalidixic acid (NAA) 及 furazolidone (FZD) residues in meat by high performance liquid chromatography with photo diode array, Good linear effect could be obtained when 0.3125 ~ 10 ppm standards chromatographed in. TSK Gel ODS-80 TM with 80 % acetonitrile and 0.1 % phosphoric acid by linear solvent program. Recoveries of most spiked samples could be up to 80 % after extracted by acetonitrile and purified by hexane. Recoveries of SDM 、 SQX and PYR were 55.5 ~ 62.6 % , ODX and DFZ were 17.4 % and 14.2 % ; however, CLP was uncalculable, NCZ was undetectable.

Key words: *High performance liquid chromatography 、 Photo diode array detector 、 Synthetic Antibimicrobial drugs*

*Corresponding author
Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.