

# 禽、畜飼料中甲磺黴素及氯黴素之同時檢測

郭美月\* 劉敏主 林士鈺

台灣省家畜衛生試驗所 動物藥品檢定分所

**摘要** 應用高效液相層析法 (High performance liquid chromatographic method) 同時檢測飼料之中甲磺氯黴素 (Thiamphenicol; TP) 及氯黴素 (chloramphenicol; CM)。大豬及蛋雞飼料檢體分別以乙晴抽取，再以 SEP PAK Alumina N 卡匣純化後以 TSK-GEL ODS-120 T 為層析管，乙晴 - 0.05 % 磷酸 (18~82) 為移動相，以瞬間改變波長的方式在 230 nm 及 280 nm 偵測下可得良好之分離效果及線性關係之檢量線。大豬飼料中 TP 及 CM 之回收率為 76.9 % 及 73.6 %。蛋雞飼料中 TP 及 CM 之回收率分別為 76.2 % 及 65.8 %。

**關鍵詞：**甲磺氯黴素，氯黴素，高效液相層析法

## 緒 言

甲磺氯黴素與氯黴素作用非常相似之氯黴素類抗生素，其他化學基本結構幾乎完全相同（圖 1），廣泛的使用在動物之呼吸道及腸道感染之治療，唯長期使用易導致造血機能障礙而引起再生不良性貧血 [1, 2, 3] 之副作用，如使用不當可能造成畜產品之殘留，將影響消費者之健康；目前氯黴素在我國已禁止使用於水產魚類及以注射方式投藥於其他動物，在美國禁止使用於一切食用動物上。日本厚生省對於輸入肉品之藥物殘留檢驗中甲磺氯黴素 (TP) 是其中檢驗項目之一。

TP 和 CM 之分析方法有微生物法、比色法、氣相層析法及高效液相層析法 [4, 5, 6, 7] 等，均偏重於水產及動物組織之殘留檢測，飼料中 TP 和 CM 之檢測，尚未看到這方面的報告，為了瞭解禽畜飼料中是否添加使用，本文乃發展以高效液相層析儀同時快速檢測禽、畜飼料中之 TP 和 CM，以為日後飼料品管之依據。

## 材料與方法

### 1. HPLC 之條件

儀器為 Waters 600，檢測器為 Waters 486，積分儀為 Waters / 46 Data Module，管柱為 TSK GEL ODS-120 T 4.6 nm ID × 15 cm，移動相為 Acetonitrile : 0.5 % Phosphoric acid (18 : 82 v/v)，流速為 1 ml / min，注入量為 20 µl，檢測波長為 230 nm，280 nm，記錄紙速度為 0.25 cm / min。

### 2. 試驗材料設備

- (1) 離心機：KoKusan H 130 型，日製。
  - (2) 分光光度計：HITACHI U-3210 Spectrophotometer。
  - (3) 全自動真空濃縮機：Cvsant instrument INC，Model A 160。
  - (4) SEP PAK Alumina N Cartridge：Millipore。
  - (5) 乙晴 (Acetonitrile) 為 LC 級，磷酸 (phosphoric Acid) 為分析級，蒸餾水。
  - (6) 標準品：Chloramphenicol (usp 級)，Thiamphenicol (Sigma)。
  - (7) 大豬飼料及蛋雞飼料 (由中美嘉吉公司供應)。
3. 取 TP、CM 標準品以 30 % 乙晴各稀釋成濃度 10 µg / ml 之工作液，以分光光度計測定。
  4. 檢量線：精確稱取 TP、CM 標準品各 20 mg 分別置於 20 ml 容量瓶，加乙晴至刻度，即得 1000 µg / ml 之原液。取適量之原液用 30 % 乙

\*抽印本系取作者  
台灣省家畜衛生試驗所

睛稀釋成以下三組工作液，分別注入 HPLC，每組注入 3 次，測定波峰高度以製作檢量線。

A 組	—	TP 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	—	CM 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
B 組	—	TP 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	—	CM 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
C 組	—	TP 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	—	CM 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5. 飼料檢體之配置及前處理：取蛋雞及大豬飼料，添加 TP、CM 工作液後攪拌均勻，添加量分別為試驗第一組 TP 25 ppm、CM 50 ppm。試驗第二組 TP 50 ppm、CM 100 ppm。試驗第三組 TP 100 ppm、CM 200 ppm。各組飼料均取 5 公克各三份以乙睛 50 ml 抽取後，離心 10 分鐘，取上清液 10 ml 注入預先以 10 ml 乙睛活化之 SEP PAK Alumina N Cartridge 內，收集濾出液，再以 80% 乙睛 5 ml 洗 SEP PAK Alumina N Cartridge 內，洗液和前面收集之濾出液合併，蒸乾後殘渣以 10 ml 30% 乙睛洗出，經 0.45  $\mu$  濾膜過濾，以 HPLC 檢測。

## 結 果

以分光光度計從波長 220 nm~350 nm 做掃描圖 (圖 2) 得 TP、CM 之最大吸收分別為 230 nm 及 280 nm。

在 TSK-GEL ODS-120 T 逆相層析管及乙睛 - 0.05% 磷酸 (18~82) 之沖提液在波長 230 nm 及 280 nm (1~10 分 230 nm, 10~27 分 280 nm) 偵測下可得良好之分離效果 (圖 3)。TP 標準品三種濃度 (2、5、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 重複注入三次，波峰高度之變異係數 0.32~1.06% (表 1)。CM 標準品三種濃度 (5、10、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 重複注入三次，波峰高度之變異係數為 0.91~1.5% (表 1)。二者檢量線之線性良好。

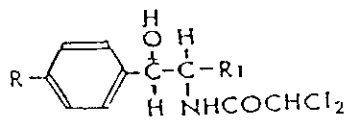
於大豬及蛋雞飼料中添加 TP 及 CM，經萃取後注入 HPLC 之液相層析圖見圖 4 及圖 5 其回收率見表 2 及表 3。

表 1 TP 和 CM 波峰複驗性及檢量線

TP ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			CH ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
2	5	10	5	10	20
2.04 a 1.1 %b	5.32 0.3 %	10.64 0.5 %	2.07 0.9%	4.47 1.1%	8.92 1.5%
檢量線 相關性			檢量線 相關性		
Y=0.8+0.93X r=0.99997			Y=0.35+2.2X r=0.99982		

a = 三次波峰高平均值

b = 相對標準偏差



	R	R1
TP	CH <sub>3</sub> SO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH
CM	NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH

圖 1 TP 及 CM 之化學結構式

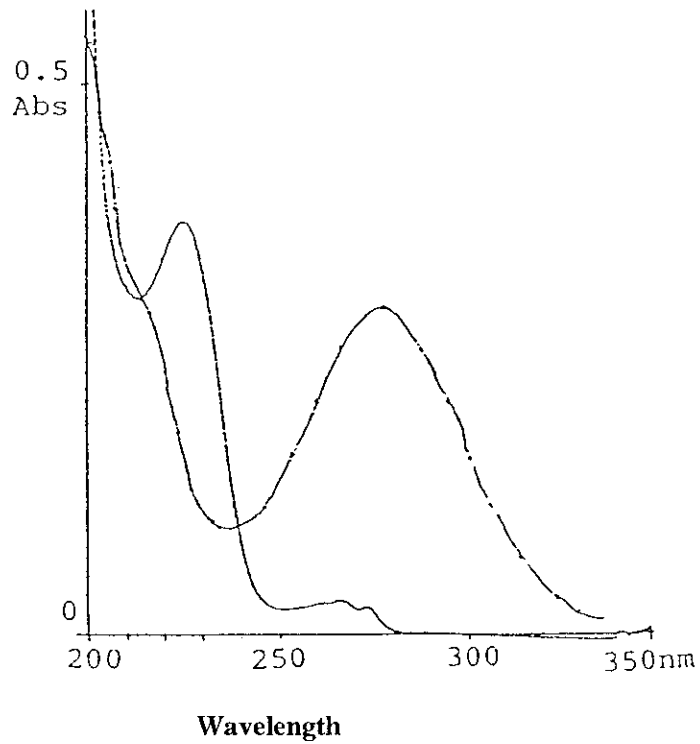


圖 2 TP 及 CM 於分光光度計之掃描圖  
— : TP, · - · : CM

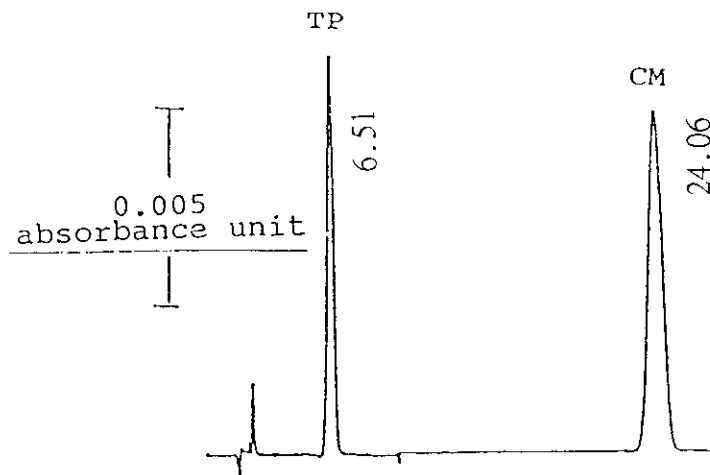


圖 3 TP 5 μ/ml CM 10 μg/ml 標準品之層析圖

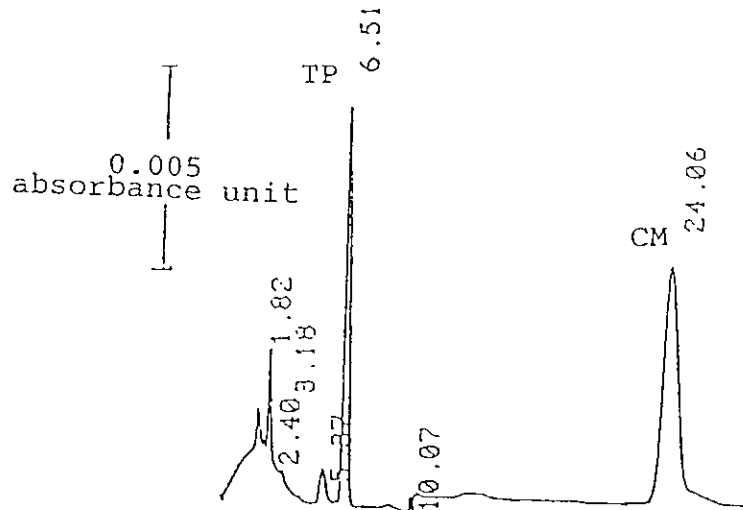


圖 4 大豬飼料添加 TP、CM 各 50, 100 ppm 之層析圖 (理論濃度 5 ppm, 10 ppm)

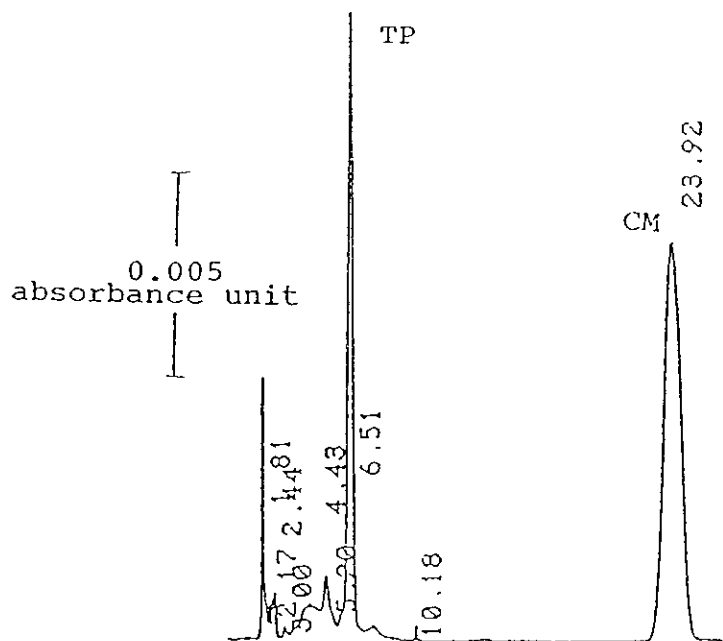


圖 5 蛋雞飼料添加 TP、CM 各 100, 200 ppm 之層析圖 (理論濃度 10 ppm, 20 ppm)

表 2 大豬飼料添加 TP. CM 之回收率

組 別	添 加 量	藥 物	檢 出 率			回 收 率	RSD %
			1	2	3		
—	25 ppm	TP	78.9	75.6	84.6	79.7	5.7
	50 ppm	CM	85.9	83.1	89.4	86.1	3.7
—	50 ppm	TP	70.0	76.8	83.9	76.9	9.0
	100 ppm	CM	76.1	68.6	76.1	73.6	5.9
三	100 ppm	TP	73.0	84.8	81.0	79.6	7.6
	200 ppm	CM	79.4	87.8	77.2	81.5	6.9

RSD : 相對標準偏差

表 3 蛋雞飼料添加 TP. CM 之回收率

組 別	添 加 量	藥 物	檢 出 率			回 收 率	RSD %
			1	2	3		
—	25 ppm	TP	87.6	77.1	78.2	81.0	7.1
	50 ppm	CM	63.0	68.5	69.5	67.0	5.2
—	50 ppm	TP	80.0	80.9	80.0	80.3	0.6
	100 ppm	CM	69.1	66.2	65.5	66.9	2.9
三	100 ppm	TP	82.7	70.9	75.0	76.2	7.9
	200 ppm	CM	72.9	61.3	63.1	65.8	9.5

## 討 論

TP 和 CM 由於極性之差異，在乙睛 - 0.05 % 磷酸 (18~82) 之移動相，在波長 230 nm 下滯留時間分別為 6.50 及 24 分鐘，分析一個檢體需耗時 30 分鐘。CM 於紫外光波長 230 nm 吸收不佳，須高濃度才可分析且波峰稍嫌矮胖。為了尋求改善曾以梯度分析進行試驗，TP 和 CM 之滯留時間為 7.44 及 16.96 分，波峰之高度及對稱性均獲得改善，但梯度分析一個行程須 45 分鐘，且飼料檢體雜質很多，每分析一個檢體如沒充分清除分離管內之雜質，將使整個梯度分析系統失去平衡，須經長時間清洗方可恢復正常，耗時、耗力。最後嘗試以前述之移動相配合瞬間變換波長進行偵測，可得較圓滿之結果。

飼料之純化以固相萃取為之，以標準品 TP 和 CM 適量過 SEP PAK Florisil、SEP PAK Alumina N、SEP PAK NH<sub>2</sub>、SEP PAK CN、SEP PAK C18、SEP PAK Silica 等卡匣，依照方法 5. 處理後，以 HPLC 分析，結果除了以 SEP PAK Alumina N 處理法 TP、CM 回收率 82.6 % 及 81.2 % 外，其餘均在 99 % 以上，另再以空白飼料以前述六種卡匣依照方法 5. 前處理後以 HPLC 比較其純化能力，結果以 SEP PAK Alumina N 最佳。蛋雞飼料之回收偏低，可能是受成分之影響所致。

## 參考文獻

1. 日本醫藥品集 11 版。1987
2. Allen EH. Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues from food producing animals. *J Assoc off Anal Chem* 68 (15) : 990 - 999, 1985
3. Krystyna T., Kevin MH, David PA, and Arthur LA. Simple LC method for determination of chloramphenicol in equine, Canine, and feline seerum. *J Chromatographic Science* 26 : 533 - 536, 1988
4. Kimhito O., Kyoko H., Akira S., and Fujizo Y. Determination of residual thiamphenicol in yellow tail by high performance liquid chromatography. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* Vol. 27, No. 3 : June 1986
5. Nagata T. and Saeki M. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. 15 (12), 2045 - 2056. 1992
6. Tomoko N., Masanobu S., Hiroyuki N., Masahiko F., : and Eigo T. Determination of residual thiamphenicol in chicken by high performance liquid chromatography. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* vol. 26, No. 1 : February 1985
7. Yukari H., Shouzou S., and Masakazu H., HPLC simultaneous analysis of synthetic antibacterials in meat and fish with solid phase extraction. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* Vol. 35, No. 3 : June 1994

## Simultaneous determination of thiamphenicol and chloramphenicol in porcine and poultry feeds

M. Y. Kueo\*, M. C. Liu and S. Y. Lin

Taiwan Animal Health Research Institute.  
The Branch Institute of Animal Drugs Inspection

**SUMMARY** A High performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of thiamphenicol ( TP ) and chloramphenicol ( CM ) in porcine and poultry feeds has been developed. These feeds were extracted with acetonitrile, then purified with SEP PAK alumina N cartridge. With TSK-GEL ODS-120 T column and acetonitrile : 0.05 % phosphoric (18 : 82 ) as mobile phase, a good separation and linear calibration curves of TP and CM could be obtained by being detected at 230 nm switching to 280nm. Recoveries of TP and CM in porcine feeds were 76.9 % and 73.6 %, respectively. Recoveries of TP and CM in poultry feeds were 76.2 % and 65.8 %, respectively.

**Key words:** *Thiamphenicol, Chloramphenicol, High performance liquid chromatographic method.*

---

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