

豬肉磺胺二甲嘧啶、磺胺一甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶殘留之一次同時檢測試驗

劉敏主* 林金梅 郭美月 龔培森 劉培柏

台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

應用高效液相層析儀檢測豬肉中磺胺二甲嘧啶 (Sulfamethazine ; SMT)、磺胺一甲氧嘧啶 (Sulfamonomethoxine ; SMM)、磺胺二甲氧嘧啶 (Sulfadimethoxine ; SDM) 之殘留。以 Nucleosil 5 C₁₈層析管，乙睛：1 %醋酸 (20:80) 為移動相，在波長280nm 之下，可得良好之分離效果及線性良好之檢量線。豬肉檢體以酸性氯仿、3 N HCl 重複萃取，正己烷洗淨，調整 pH 至 6.3~6.6 後，以乙酸乙酯再次萃取，50°C 減壓濃縮、真空減壓抽乾、甲醇定容，以前述之高效液相層析儀條件進行回收率試驗，豬肉內 SMT、SMM 及 SDM 之平均回收率分別為 66.12, 60.12, 59.50%。三種磺胺劑在豬肉中的殘留，可以一次同時檢測，檢出界限分別為 0.1, 0.1, 0.2 PPM。

農林廳79年2月起，加強抽驗飼料及輔導自配飼料戶正確使用含藥物飼料添加物，已要求本分所增加自配飼料中，磺胺二甲嘧啶 (SMT)、磺胺一甲氧嘧啶 (SMM)、磺胺二甲氧嘧啶 (SDM) 之檢驗。此乃緣起於日本對我國輸入之豬肉，藥物殘留檢驗項目中，已增加多項檢驗項目，其中恰包含此三種磺胺藥。而此三種磺胺藥，殘留檢出情況？本文乃利用 HPLC 已應用於 SMT、SMM、SDM 之單獨檢驗條件，利用其個別檢

驗條件特性上，可能的相容性，找尋出可能之條件，達成一次同時的豬肉中 SMT、SMM、SDM 的殘留檢測。

材料與方法

(一)試驗材料設備：

1. 空白豬肉：由生物系李新進先生分讓，為由台糖公司購入豬隻，經不含磺胺劑之台糖大

*抽印本索取作者

台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

豬飼料，飼養後宰殺，取得之空白豬肉。

2. 碎肉機：BrAnm 牌 Multiquick 200 型。
3. 離心機：Kokusan H 103 型。
4. 試藥及試液：SMT、SMM、SDM 標準品，U.S.P.級；Chloroform, n-hexan, ethyl acetate 為 Merck 產品。
5. 標準液 SMT, SMM, SDM 各精取 10 mg，置 10 ml 褐色容量瓶中，加甲醇至刻度為 1000 PPM 原液。
6. 旋轉揮發器：Heidolph 牌。
7. 全自動真空濃縮機：Savant instrument INC, Model A 160。

(二) 豬肉中 SMT、SMM、SDM 殘留之檢測：

本試驗中之檢測方法，主要參呂⁽¹⁾、郭等⁽⁴⁾、劉等⁽⁵⁾之方法而改良者，步驟大致如下：

1. 檢測樣品中 SMT、SMM、SDM 之萃取及淨化：

受檢豬肉均質後取 10 g 加 Chloroform : acetic acid (98:2) 40 ml 混合均勻後，離心 (2000 rpm, 5') 取上清液，沉澱物再以相同溶媒萃取 2 次(每次各 30 ml)。合併上清液加 3 N HCl 15 ml，振盪取上層，下層再加 3 N HCl 15 ml (重覆二次)、合併上層液，加 20 ml n-hexan；振盪棄上層 (重覆二次)、下層以 12 N NaOH 調 pH 值為 6.3~6.6 之間，加 ethyl acetate 30 ml 振盪 (重覆抽取二次)，合併 ethyl acetate 層，將 ethyl acetate 層倒入濃縮瓶，50°C 減壓濃縮乾涸，以 methanol 2 ml 洗 2 次，入小瓶中 50°C 下，全自動真空濃縮機減壓抽乾，然後加入正確量之 0.4 ml methanol 溶解，注入 HPLC 中，分析三種磺胺劑。

2. 液相層析儀及分析條件：

檢測器：Waters 牌，400 型 UV 偵測器。

輸液系統：Waters 牌，6000 A 型

PUMP。

注入器：Waters 牌，U 6 K 注射系統。

積分儀：Waters 牌，Data Module, 感度 0.02 AUFS。

管柱：Nucleosile 5 C₁₈ 4.0×250 mm。

移動相：Acetonitrile : 1% Acetic acid = 20:80

檢測器波長：280 nm，東光片。

流速：0.9 ml/min

注入量：20 ul

3. 標準曲線之製作：

精確稱取 SMT、SMM、SDM 標準品各 10 mg，各別置於 10 ml 褐色容量瓶中，加 methanol 至刻度，即得 1000 ug/ml 之原液，再以 methanol 稀釋成以下三組之濃度，分別注入 HPLC，每組重覆四次，測定波峰高度，以製作標準曲線：

A 組	{	SMT 1 ug/ml
		SMM 1 ug/ml
		SDM 2 ug/ml
B 組	{	SMT 2 ug/ml
		SMM 2 ug/ml
		SDM 5 ug/ml
C 組	{	SMT 5 ug/ml
		SMM 5 ug/ml
		SDM 10 ug/ml

4. 回收試驗：

確定不含磺胺藥之豬肉 10 g，分別添加磺胺二甲嘧啶、磺胺一甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶，使其濃度為 1:1:2, 0.5:0.5:1, 0.1:0.1:0.2 PPM，以上述萃取及淨化方法處理後，注入液相層析儀，檢測其濃度，以求出回收率。

結 果

磺胺二甲嘧啶、磺胺一甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶標準溶液 (2.5, 2.5, 5.0 PPM) 之液相層析圖表示於圖 1。其滯留時間分別為 5.25, 6.95, 16.60 分。空白豬肉萃取淨化注入液相層析儀之圖譜表示於圖 2。SMT、SMM、SDM 豬肉中添加濃度 0.1, 0.1, 0.2 PPM (理論值濃度 2.5, 2.5, 5.0 PPM) 之液相層析圖見圖 3。SMT、SMM 標準品三種濃度 (1, 2, 5 ug/ml), SDM 標準品 (2, 5, 10 ug/ml) 重複打四次所得波峰高值之變異係數為 0.38~1.94%, 1.03~1.7% 及 0.71~1.51% (表 1), 三者之檢量線相關性良好。SMT、SMM、SDM 在豬肉中添加 (0.1, 0.1, 0.2) and (0.5, 0.5, 1.0 ug/g) 之平均回收率分別為 66.12%、60.12%、59.50%。由圖 3 SMT、SMM、SDM 之層析圖波峰, 三種磺胺藥之檢出界限分為 0.1, 0.1, 0.2 PPM。

討 論

磺胺藥在動物組織中的檢測, 近年來已有很多高效液相層析法^(1,3,4,5,6), 此法檢測敏感度高, 但前處理之回收率較不理想, 要提高回收率必須

在萃取及淨化過程中檢討; 劉等⁽⁵⁾報告避免使用硫酸鈉脫水而改用硅藻土, 可提高回收率; 本試驗中使用全自動真空濃縮機, 免去使用硫酸鈉或硅藻土脫水, 使 SMT、SMM、SDM 同時檢測之檢出界限為 0.1, 0.1, 0.2 PPM。

依呂⁽¹⁾、劉等⁽⁶⁾報告, 2%醋酸氯仿對 SMT、SDM 之萃取效果良好, 本試驗中採此 2%醋酸氯仿為萃取溶媒, 結果比 Acetone⁽⁶⁾, Acetonitrile⁽³⁾對三種磺胺藥同時萃取效果佳, 使 SMT、SMM、SDM 之回收率在 0.1~0.5 PPM 時, 分別為 66.12%、60.12%、59.50%。

樣品萃取及淨化過程中, 使用旋轉揮發器、真空濃縮機濃縮, 加熱溫度應避免超過 50°C, 否則會使 SDM 分解, 造成 SDM 之回收率下降或出現兩個波峰。

據行政院衛生署我國動物藥殘留標準⁽²⁾, 磺胺藥在豬可食部份為 0.1 PPM, 本實驗最低檢出界限為 0.1, 0.1, 0.2 PPM, 已達檢出之目的; 使用一次同時檢出法, 將可節省人力, 以相同的時間, 做更大範圍的檢測。如能使用瞬間改變波長流速, 互換移動相微電腦積分儀裝置, 則將可得更理想的檢測結果。

表一 三種磺胺藥之波峰複驗性及檢量線

conc	SM			SMM			SDM		
	1	2	5	1	2	5	2	5	10
\bar{X}	2.1	4.22	10.02	1.74	3.48	8.4	1.38	3.34	6.81
RSD	0.98%	1.94%	0.38%	1.7%	1.5%	1.03%	1.51%	0.71%	1.24%
檢量線	$\Delta \bar{Y} = -0.097 + 0.51 X$			$Y = 0.069 + 0.6 X$			$Y = 0.0187 + 1.47 X$		
相關性	$r = 0.9998$			$r = 0.9999$			$r = 0.9998$		

X: 四次峰高值之平均值
 conc: 濃度 (ug/ml)
 $\Delta Y = a + b x$: 峰高值 = 截距 + 斜率 · 濃度

RSD: 相對標準偏差
 * 單位: cm

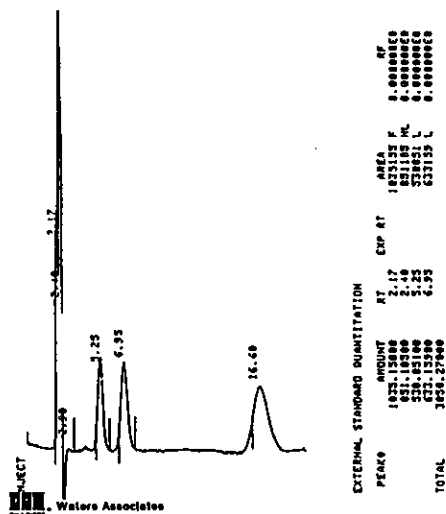


圖1 SMT、SMM、SDM 標準溶液 (2.5, 2.5, 5.0 PPM) 之層析圖

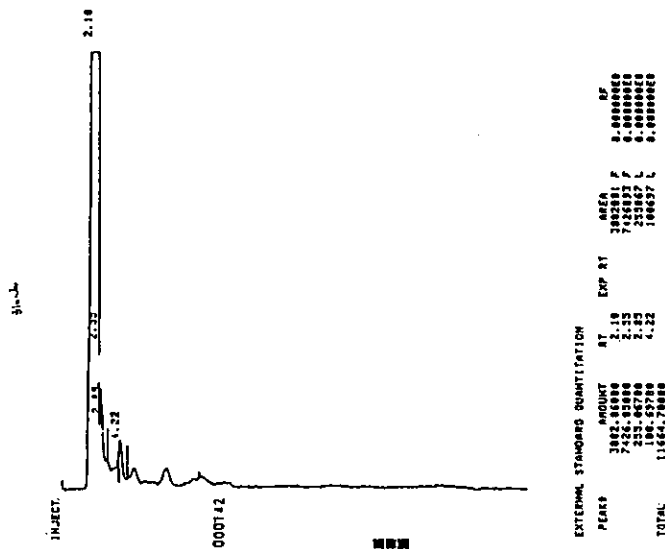


圖2 空白豬肉萃取淨化之層析圖

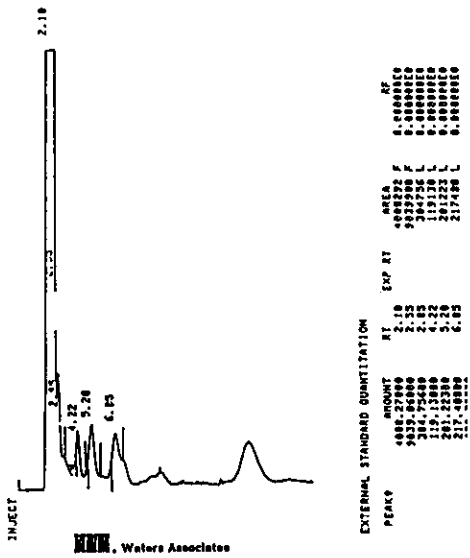


圖3 豬肉添加 SMT、SMM、SDM 各 0.1, 0.1, 0.2 PPM (理論濃度 2.5, 2.5, 5.0 PPM) 之層析圖

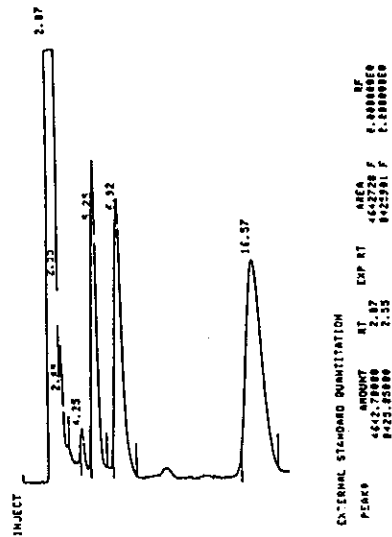


圖4 豬肉添加 SMT、SMM、SDM 各 0.5, 0.5, 1.0 PPM (理論濃度 12.5, 12.5, 25 PPM) 之層析圖

參 考 文 獻

1. 呂車鳳。1990。Sulfamethazine、Sufadimethoxine、Diaveridine 配方對肉雞之急性毒性及殘留試驗。台灣磺胺技術資料。
2. 行政院衛生署公告。1987。動物用藥殘留標準。
3. 行政院衛生署公告。1991。食品中動物用藥殘留量檢驗方法—磺胺劑之檢驗。
4. 郭美月、劉培柏、劉敏主。1991。應用高效液相層析法對雞飼料中磺胺一甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶及磺胺奎林之同時檢測。台灣省畜衛所研報。27:45-52。
5. 劉朝鑫、郭宗甫、陳雨新、彭玄桂、黃暉煌。1989。磺胺二甲嘧啶肌肉注射後豬血清濃度及組織殘留試驗。中華獸醫誌。15:335-340。
6. 厚生省環境衛生局食品監視課；豬肉中磺胺二甲嘧啶之檢驗法。

Liquid Chromatographic Simultaneous Determination of Sulfamethazine Sulfamonomethoxine and Sulfadimethoxine in pork

M.C. Liu*, K.M. Lin, M.Y. Kuo,
P.S. Gong, P.P. Liou

SUMMARY

A liquid chromatographic method for simultaneous determination of sulfamethazine (SMT), Sulfamonomethoxine (SMM) and sulfadimethoxine (SDM) residue in Pork has been developed. Using Nucleosil 5 C₁₈ Column and acetonitrile:1% acetic acid (20:80) as mobile phase and with a 280 nm detector, a good separation and linear calibration curve of SMT, SMM, and SDM could be obtained. The porks were multiply extracted with acidic chloroform and 3 N HCl, clean up with n-hexane, adjust pH value to 6.3-6.6. After extraction with ethylacetate, evaporation to dryness on rotary evaporator and speed vac concentrator at 50°C, dissolved with methanol. The overall average recovery of SMT, SMM, SDM in pork at levels of (0.1, 0.1, 0.2) and (0.5, 0.5, 1.0 µg/g) were 66.12%, 60.12%, 59.50%, respectively. Simultaneous determination of SMT, SMM, SDM in pork could be obtained. Detection limits were 0.1, 0.1, and 0.2 µg/g, respectively.

*Corresponding author
Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.
The Branch Institute of Animal Drugs Inspection.