

# 應用高效液相層析法對鷄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

郭美月 劉培柏 劉敏主

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 ( HPLC ) 同時檢測鷄飼料中磺胺一甲氧嘧啶 ( Sulfamonomethoxine ; SMM )、磺胺二甲氧嘧啶 ( Sulfadimethoxine ; SDM ) 及磺胺奎林 ( Sulfaquinoxaline ; SQ )。飼料檢體以 NN-Dimethylformamide ( DMF ) 抽取，再以三氧化二鋁管柱除去雜質後注入高效液相層析管內。以 Brown Lee C 18 為層析管，乙晴 - 1% 醋酸 ( 20 ~ 80 ) 為移動相，在波長 280 nm 之下可得良好之分離效果及線性良好之檢量線。蛋鷄飼料內 SMM、SDM 及 SQ 之回收率分別為 96.5%、95.8% 及 97.5%。肉鷄飼料內 SMM、SDM 及 SQ 之回收率分別為 97%、96.1% 及 98.5%。

磺胺二甲氧嘧啶 ( Sulfadimethoxine, SDM ) 及磺胺奎林 ( Sulfaquinoxaline, SQ ) 被准許添加於雞飼料中使用<sup>(1)</sup>，而磺胺一甲氧嘧啶 ( Sulfamonomethoxine, SMM ) 則不能添加。為瞭解此三種磺胺藥在吾國雞飼料中之添加使用情形，著手於這三種磺胺藥檢測方法之建立。吾國中央標準法 ( CNS ) 及美國官方化學家協會 ( AOAC ) 對於飼料中 SDM 及 SQ 以傳統之比色法 ( Colorimetric Method ) 檢測，而 SMM 則沒有記載。該檢測法前處理過程繁雜又耗時外，對於飼料中磺胺藥的特異性 ( Specificity ) 和選擇性 ( Selectivity ) 不佳，檢測時易

受干擾而影響準確性。目前高效液相層析法被廣泛應用於分析動物體液、組織及動物飼料內磺胺藥殘留之分析<sup>(4,5,6,7,8,9)</sup>。例如以正相層析法 ( Normal Phase Chromatography ) 做動物組織內所殘留 SQ 之調查<sup>(6)</sup>；也有以逆相層析法碳 18 層析管 ( Reverse Phase Chromatography Bonded C 18 Phase Column ) 分析雞肉及雞蛋中之合成抗菌劑<sup>(5)</sup>及飼料中之 Sulfamethazine, Sulfamethoxypyridazine 和 Trimethoprim<sup>(9)</sup>。更有以後置分離管反應系統層析法 ( Post Column Reaction System Chromatography ) 分析飼料中之 Sulfathiazole

及 Sulfamethazine<sup>(8)</sup>。雖然檢測磺胺藥的方法很多，但並沒有 SMM、SDM 及 SQ 之同時檢測法。為了工作需要率先著手開發以高效液相層析法同時檢測雞飼料中之 SMM、SDM、SQ。

## 材料與方法

### 一、儀器設備：

#### (一) HPLC

Waters Model 6000 A 型，Pump 美製，Model 400 uv 偵測器，280 nm 束光片，u6k 注射系統及 Data Module 積分器，感度 0.05 AuFS。

#### (二) 遠心分離機

Kokusun H103 型，日製。

### 二、材料：

#### (一) 褐色玻璃管柱：

內徑 1 cm，長 30 cm，一端縮小至 4 mm。

#### (二) 有機溶劑及試藥：

二甲基乙醯胺 (NN-Dimethylformamide)。醋酸 (Acetic Acid)。等均為分析級。甲醇 (Methanol)。乙晴 (Acetonitrile)。蒸餾水等為 LC 級。三氧化二鋁 (Aluminium Oxide 90)。上述藥品全為 Merck 製品。

#### (三) 三氧化二鋁管柱之充填：

取三氧化二鋁 6 g 裝入褐色玻璃管，輕敲管壁使三氧化二鋁密集後以 20 ml 甲醇洗淨。

#### (四) 移動相及分離管：

參考堀等報告之 Nucleosil 5 C18 200 mm × 4 層析管及乙晴-1% 醋酸 (23:77) 溶液當移動相。

另外以 Brown Lee C18 200 mm × 4.6, 5 μm 層析管及乙晴-1% 醋酸 (20:80) 溶液當移動相。

#### (五) 飼料：

統一牌蛋雞飼料及卜蜂牌肉雞飼料。

以上二種飼料為不含任何藥物之空白飼料

#### (六) 藥物標準品：

SMM、SDM、SQ 都為 USP 級

標準品。歐美德普 (Ormetoprim; OMP)。沙利黴素 (Salinomycin; SLM)。乃卡巴精 (Nicarbazine; NB)。孟寧素 (Monensin; Mn)。氯比啉 (Clopidol; CP)。安保寧 (Amprolium; AP)。衣索巴 (Ethopabate; EP) 等七種為由廠商提供之實驗室標準品，作為對照干擾物質之用。

### 三、方法：

#### (一) 檢量線：

精確稱取 SMM、SDM、SQ 標準品各 20 mg 各別置於 20 ml 褐色容量瓶中，加 DMF 至刻度，即得 1000 μg/ml 之原液。取適量之原液用沖提液稀釋成以下三組工作液，分別注入 HPLC，每組注入 4 次，測定波峰面積以製作檢量線。

A 組	— SMM	1 μg/ml
	— SDM	2 μg/ml
	— SQ	2 μg/ml
B 組	— SMM	2 μg/ml
	— SDM	5 μg/ml
	— SQ	5 μg/ml
C 組	— SMM	5 μg/ml
	— SDM	10 μg/ml
	— SQ	10 μg/ml

#### (二) 可能干擾物質之檢測：

選取可能使用或干擾之藥物 OMP、SLM、NB、Mn、CP、AP、EP 等七種，使用上述之 HPLC 系統測定其對 SMM、SDM、SQ 之干擾情形。

#### (三) 飼料檢體之配置及前處理：

取統一牌蛋雞飼料及卜蜂牌肉雞飼料，添加 SMM、SDM、SQ 工作液後攪拌均勻，添加量分別為試驗第一組 SMM 10 ppm、SDM 20 ppm、SQ 20 ppm，試驗第二組 SMM 50 ppm、SDM 100 ppm、SQ 100 ppm。各組飼料再依郭等 (1988) 報告之前處理方法處理之。

飼料 10 g  
 └ DMF 50 ml 抽取  
 離心  
 └ 取上清液 10 ml  
 通過三氧化二鋁管柱  
 └ 濾出液丟棄再以 DMF 10 ml  
 洗三氧化二鋁管柱二次  
 以 20 ml 沖提液沖提  
 └ 0.45  $\mu$  濾膜過濾  
 注入 HPLC ( 20  $\mu$ l )

## 結 果

### 一、HPLC 檢測條件之建立：

以 Nucleosil 5 C 18 ( 長度 20 公分 ) 之逆相層析管及乙晴 - 1 % 醋酸 ( 23 ~ 77 ) 之移動相下三種磺胺劑在 18 分鐘內完成分析，滯留時間較長之 SDM、SQ 波峰較鈍而矮，而 SMM 標準品三種濃度 ( 0.5、2.5、5  $\mu$ g/ml ) 重複打四次波峰面積之變異係數為 0.3 ~ 2.5 %，其三種濃度之線性關係極佳 ( 圖 1 )，SDM 和 SQ 標準品三種濃度 ( 1、5、10  $\mu$ g/ml ) 重複打四次波峰面積之變異係數分別是 0.3 ~ 0.5 % 及 0.3 ~ 2.4 %。在這一分離系統上 SDM 和 SQ 檢量線之線性不佳 ( 表 1 )。

在 Brown Lee C 18 逆相層析管及乙晴 - 1 % 醋酸 ( 20 ~ 80 ) 之移動相在波長 280 nm 下可得良好之分離效果。SMM 標

準品三種濃度 ( 1、2、5  $\mu$ g/ml ) 重複打四次波峰面積之變異係數為 0.3 ~ 0.8 % ( 表 2 )。SDM 和 SQ 標準品三種濃度 ( 2、5、10  $\mu$ g/ml ) 重複打四次波峰面積之變異係數為 0.5 ~ 1.3 % 及 0.6 ~ 1.1 % ( 表 2 )，三者之檢量線之線性良好。

由於 Brown Lee C 18 ( 長度 10 公分 ) 逆相層析管及乙晴 - 1 % 醋酸 ( 20 ~ 80 ) 之移動相下，三種磺胺劑可在 14 分鐘內完成分析。滯留時間較長之 SDM 和 SQ 波峰變高，波峰寬度變窄，故選此條件再作下述試驗。

### 二、可能干擾物質之檢測：

以上述 HPLC 檢測條件下 OMP、NB、CP、AP、SLM 及 Mn 等六種飼料添加物均不會干擾三種磺胺藥之檢測。EP 之滯留時間和 SDM 相差約 1 分鐘，二者之波峰只在基線部分稍微重疊，不致引起誤判。

### 三、飼料中三種磺胺藥之抽出及回收率試驗：

爲了瞭解前處理方法之適用性，( 參考方法 (二) 之前處理 ) 選取蛋雞飼料及肉雞飼料各一種，抽出方法則以郭等 ( 1988 ) 報告方法行之。以甲醇 - 1 % 醋酸 ( 30 ~ 70 ) 當沖提液，則 SMM、SDM、SQ 之檢測稍受到不明物質之干擾 ( 圖 3 )，當沖提液中甲醇濃度提高到 35 % 時，干擾情形更明顯 ( 圖 3 )，故嘗試降低沖提液甲醇之濃度 ( 25 % )，結果干擾物質減少且可得良好之回

表 1 Nucleosil 5 C 18 層析管分析三種磺胺劑之波峰複驗性

$\bar{X}$ conc	SMM			SDM			SQ		
	0.5	2.5	5	1	5	10	1	5	10
*	1657	8226	16550	2335	13647	28111	1810	12329	25442
RSD	2.5 %	0.7 %	0.3 %	0.5 %	0.3 %	0.4 %	2.4 %	0.6 %	0.3 %

$\bar{X}$ ：四次面積平均值

RSD：相對標準偏差

conc：濃度 (  $\mu$ g/ml )

\* 單位：10  $\mu$ v. sec

收率，最後決定以甲醇-1%醋酸(25~75)當沖提液。

添加 SMM、SDM、SQ 之統一蛋雞飼料及卜蜂肉雞飼料，試驗第一組 SMM 之回收率分別為 97.7% 及 97.4%，變異係數為 1.7% 及 1.8%。SDM 之回收率分別為 8% 及 97.5%，變異係數 0.5% 及 0.4%。SQ 之回收率為 100.3% 及 99.5%，變

異係數 2.2% 及 1.3%。試驗第二組 SMM 之回收率分別為 96.5% 及 97%，變異係數 2.2% 及 3.2%。SDM 之回收率為 95.8% 及 96.1%，變異係數 0.4% 及 1.1%。SQ 之回收率為 97.5% 及 98.5%，變異係數為 1.05% 及 0.8% (表 3、4)；(圖 4、5、6)。

表 2 以 Brown Lee C18 層析管分析三種磺胺劑之波峰複驗性及檢量線

conc	SMM			SDM			SQ		
	1	2	5	2	5	10	2	5	10
X *	2820	5661	13950	5026	12741	25718	4731	12429	24837
RSD	0.8%	0.4%	0.3%	1%	1.3%	0.5%	1%	1.1%	0.6%
檢量線	Y = 69 + 2778X			Y = -167 + 2587X			Y = -225.5 + 2510X		
相關性	r = 0.99998			r = 0.99997			r = 0.99996		

$\bar{X}$  : 四次面積平均值

RSD : 相對標準偏差

conc : 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

\* 單位:  $10 \mu\text{v}\cdot\text{sec}$

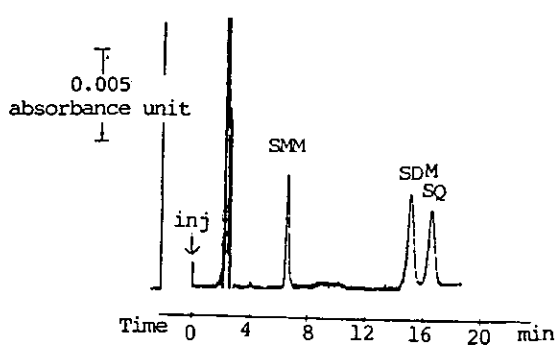


圖 1 Nucleosil 5 C18 層析管以 23% 乙晴 - 77% 醋酸 (1%) 當移動相三種濃度 \* 磺胺劑之層析圖。

\* SMM 10 ppm  
SDM 20 ppm  
SQ 20 ppm

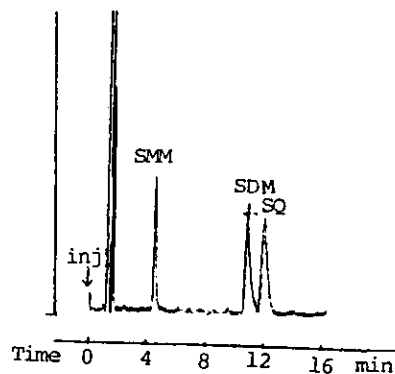


圖 2 Brown Lee C18 層析管以 20% 乙晴 - 80% 醋酸 (1%) 當移動相，三種濃度 \* 磺胺劑之層析圖。

\* SMM 10 ppm  
SDM 20 ppm  
SQ 20 ppm

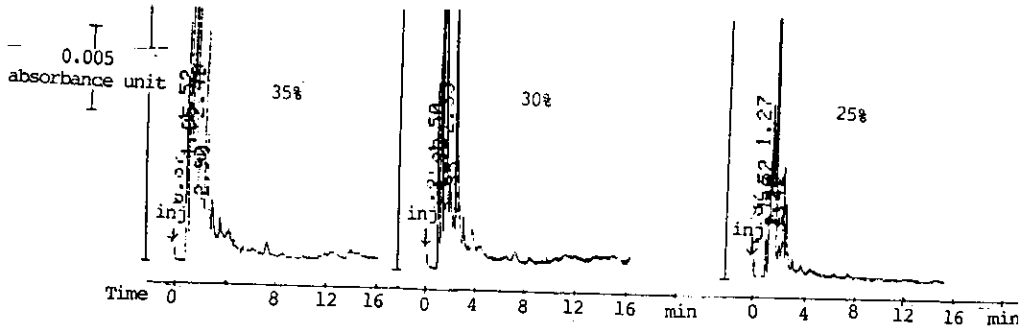


圖3 統一蛋雞飼料分別以甲醇-1%醋酸(35~65, 30~70, 25~75)當沖提液之層析圖

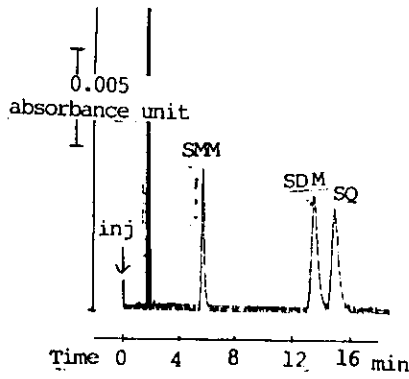


圖4 SMM、SDM、SQ 標準品分別為10 ppm、20 ppm、20 ppm之層析圖

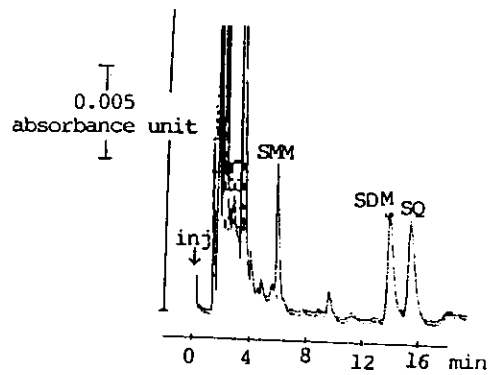


圖5 統一蛋雞飼料添加SMM、SDM、SQ各10, 20, 20 ppm之層析圖

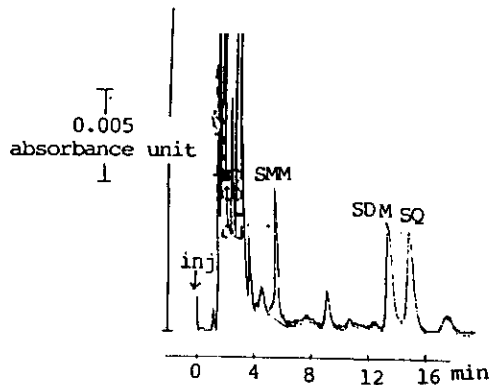


圖6 卜蜂肉雞飼料添加SMM、SDM、SQ各10, 20, 20 ppm之層析圖

表3 統一蛋雞飼料添加三種磺胺劑之回收率

組別	添加量	藥物	檢 出 率			回收率±RSD %
			1	2	3	
一	10 ppm	SMM	98.6	95.8	98.7	97.7 ± 1.7
	20 ppm	SDM	97.7	97.7	98.5	98.0 ± 0.5
	20 ppm	SQ	98.0	100.5	102.3	100.3 ± 2.2
二	50 ppm	SMM	94.7	98.8	95.9	96.5 ± 2.2
	100 ppm	SDM	96.1	95.7	95.7	95.8 ± 0.24
	100 ppm	SQ	98.2	97.9	96.3	97.5 ± 1.05

表4 卜蜂肉雞飼料添加三種磺胺劑之回收率

組別	添加量	藥物	檢 出 率			回收率±RSD %
			1	2	3	
一	10 ppm	SMM	95.4	98.1	98.6	97.4 ± 1.8
	20 ppm	SDM	97.7	97.0	97.7	97.5 ± 0.4
	20 ppm	SQ	98.0	99.8	100.5	99.5 ± 1.3
二	50 ppm	SMM	97.6	93.6	99.8	97.0 ± 3.2
	100 ppm	SDM	95.0	96.3	97.1	96.1 ± 1.1
	100 ppm	SQ	98.2	97.9	99.3	98.5 ± 0.8

## 討 論

本試驗曾應用郭等(1988)報告之方法,以高效液相層析法檢測豬飼料中之 Sulfathiazole (ST) 及 Sulfamethazine (SM),其分離系統為以 Nucleosil 5 C 18 (長度 20 公分)為層析管,乙晴-1% 醋酸(15~85)為移動相。在這種移動相系統下 SDM、SQ 對 Nucleosil 5 C 18 之親和力太強(和 ST、SM、SMM 比較),層析過程需 30 分鐘才能完成,波峰形狀不理想,無法應用於 SMM、SDM、SQ 三種藥物之同時分析。故依據堀等(1983)之報告,提高移動相之有機相濃度,分析結果 SDM 和 SQ 之滯留時間仍然太長(圖1)造成色析帶擴散,波峰寬度增加,不易偵測<sup>(3)</sup>,而使 SDM

和 SQ 分別在濃度 1, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  這三點濃度間之線性關係不佳(表1),若為了縮短滯留時間再度提高移動相之有機相濃度,則 SMM 之容積因素變小,檢測時容易受到干擾而影響準確度,SDM 和 SQ 二者之波峰重疊無法分離。SMM、SQ 在濃度 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  時之相對標準偏差較大(表1),經改用較短之 Brown Lee C 18 層析管 SMM、SQ 之濃度改為 1 和 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  後,這種現象已獲得改善(表2),滯留時間縮短,波峰寬度變窄(圖2),三種磺胺藥各三種濃度之相關性良好,由本試驗結果顯示 HPLC 之分析系統以 Brown Lee C 18 層析管及乙晴-1% 醋酸(20~80)移動相較為穩定。

飼料中磺胺藥之檢測使用 uv 偵測器並非

最好的方法，因飼料中許多不明物質對紫外光都有很強的吸收，抽出液選擇不當將造成前處理上很多困擾，尤其以含有水或緩衝液之有機溶媒當抽出液時，干擾物質很多幾乎無法判別。Rodger 等<sup>(8)</sup>以 25 % 甲醇當抽出液，在 C 18 逆相層析管和偵測器間裝後置分離管反應系統 (Post Column Reaction System)。所抽出之檢體經層析管分離後，磺胺藥在這個系統內和 Dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) 作用產生 Sulfonamide-DMAB Complex，再以 450 nm 之波長偵測。這個方法前處理簡單，使用高波長偵測較具特異性，不受雜質干擾，只可惜本實驗室無此設備無法應用。本試驗之抽出液則依照郭等 (1988) 報告之方法，選擇 DMF。它雖是很好的溶媒，但沸點很高，其抽出液通過三氧化二鋁管柱時部份殘存在管柱裏，當用沖提液溶出磺胺劑時一併被沖出，混合在沖提液裏，使沖提液無法濃縮，而無法提高本法之檢出界限。本試驗可同時快速地檢出雞飼料中所含之 SMM、SDM、SQ 三種藥物，準確性、回收率均很高。

### 參 考 文 獻

1. 行政院農委會。飼料添加物使用準則，台北，4.16 - 4.49 1991。
2. 台灣省政府農林廳。飼料添加物管理手冊，台北，210 - 212 1988。
3. 原盟企業有限公司。Waters Associates Liquid Chromatography School。台北，1987。
4. 郭美月、林士鈺、陳忠松：應用高效液相層析儀對飼料中二種磺胺類藥之檢測。飼料品管 3：90 - 99，1988。
5. 堀義宏：高速液體クロマトグラフィーによる鶏肉及び鶏卵中合成抗菌劑の系統的分析法。食衛誌 24：447 - 452，1983。
6. Miklos Patthy: Trace Analysis of Sulfaquinolone in Animal Tissues by High-performance Liquid Chromatography. J. of Chromatography 275: 115-125, 1983.
7. Noel RJ: Drugs in Feed. In: Williams S. ed. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical chemists 788-829, 1984.
8. Rodger W: Use of Post-Column Derivatization in Liquid Chromatographic Determination of Sulfamethazine and Sulfathiazole in Feed and Feed Premixes. J. Assoc Off Anal. Chem. 65: 823-827. 1982.
9. Torel J: Simultaneous Analysis of Three Antimicrobial Agents in Feed Premixes by Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatography 323: 447-450. 1985.

**Simultaneous Determination of Sulfamonomethoxine Sulfadimethoxine  
and Sulfaquinoxaline by High Performance Liquid Chromatography in  
Poultry Feeds.**

M.Y. Kuo, P.P. Liou, M.C. Liu.

Taiwan Provincial Research Institute For Animal Health The Branch  
Institute of Animal Drngs Inspection.

SUMMARY

A high performance liquid chromatographic method for determination of sulfamonomethoxine (SMM), Sulfadimethoxine (SDM), and sulfaquinoxaline (SQ) in poultry feeds has been developed. Using Brown Lee C18 column and acetonitrile-1% acetic acid (1:4) as mobile phase, a good separation and linear calibration curves of SMM, SDM and SQ could be obtained.

The feeds were extracted with N-N-dimethylformamide, cleaned up on a column of alumina oxide, and eluted with optimum solution. The recoveries of SMM, SDM and SQ for layer feeds were 96.5%, 95.8% and 97.5% respectively, for broiler feeds were 97%, 96.1% and 98.5% respectively.