

沸石粉、活性碳及糖蜜對飼料內卡巴得 檢出率之影響

林士鈺 陳忠松

目前大部分實驗室都以高性能液相層析法來檢測飼料內卡巴得 (Carbadox) 之含量，此乃因其具有快速、準確且回收率高等之特性。然而有些添加物質却會干擾卡巴得之檢出。經筆者等探討沸石粉、活性碳及糖蜜之干擾情形，發現均有干擾作用，其中以活性碳為最大，沸石粉次之，而糖蜜最小。以單尾機率積分， $P = 0.05$ 為顯著水準，則三者之干擾作用均正顯著，但 $P = 0.01$ 時，則僅活性碳為顯著。而沸石粉與活性碳比較，二者之干擾作用無顯著差異，沸石粉與糖蜜之比較亦同。活性碳與糖蜜之干擾作用比較，其單尾機率積分，無論 $P = 0.05$ 或 $P = 0.01$ ，均呈顯著差異。如添加以上三者中之二種或全加時，均有干擾作用，但較不一致。至於如何排除這些干擾因子則須進一步之試驗。

卡巴得 (Carbadox) 以不同濃度添加於豬飼料內不僅可增加每月增重，改進飼料利用率且可預防豬赤痢及細菌性腸炎。然因其廣泛使用而引起公共衛生上的問題，故必需管制其品質。本所負責該項之品質檢驗，除依據中央標準為公告之檢驗方法檢驗外⁽¹³⁾，並參照國內外專家學者已發表或未發表之報告^(6, 14, 15, 18, 20, 22)，建立起以高性能液相層析法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 檢驗之能力⁽¹⁶⁾。因後者不僅快速、準確且回收率高^(16, 17, 18, 19, 20, 23)，對於工作簡化不啻為一良策。

目前雖可以 HPLC 方法檢驗飼料內卡巴得，然而是否其它因素會干擾飼料內卡巴得之檢出，則是值得重視且極欲探討之問題。據李⁽¹⁾指出，活性碳會吸附飼料內卡巴得而影響回收率。活性碳臨床上用以治療下痢，並可吸附生物鹼、胆紅素、有機氣殺蟲劑、有機磷殺蟲劑、內毒素及氣體等⁽²¹⁾。其是否亦可吸附卡巴得且其干擾情形如何則是本試驗之目的之一。現正推廣使用而亦有吸附作用之沸石粉^(3, 4, 12)，其情形又如何，則不得而知。又據葉⁽⁹⁾指出，添加糖蜜於飼料內^(2, 5, 7, 8, 10)，為使用波長 313 nm 來檢測時會干擾卡巴得之檢出。其干擾情形如何？是否改變波長來檢測時即可排除干擾作用？本試驗內一併探討之。

試驗材料與方法

1. 高性能液相層析儀：廠牌 Model 6000A pumps、Model 730 Data module、U6K injection 及 Model 440 Dual channel spectrophotometric detector 配有 313 及 365 nm 濾光片^(a)、流速 1 ml/min、繪圖速度 0.5 cm/min、注射量 10 μ l 及感度 0.02 AUFS。
2. HPLC 分離管：4 mm id \times 25 cm C18 Stainless steel column (7 μ spherical)^(b) 及保護管^(a) (充填 30 μ m 40 μ m pellicular C8 packing material)。
3. 萃取液：Dimethylformamide (DMF)^(b) - double distilled water (95 + 5)。
4. Alumina：70 ~ 230 mesh, neutral^(b)。

(a) Waters Associates, Milford, MA.

(b) Merck & Co, West Germany.

(c) Pfizer Limited Agricultural Division, Tansui, Taiwan.

5. 層析管：1 × 30 cm 褐色玻璃管，一端縮小至 4 mm。
6. 移動相：Acetonitrile^(b) - double distilled water (20 + 80)。混合後以 0.45 μm 濾膜過濾，再去氣 (degas)。
7. 卡巴得標準液：110 μg/ml。精取 55 mg 卡巴得^(c) 至 50 ml 褐色量瓶內，以 95 % DMF 溶解之。必要時以超音波振盪之。
8. 卡巴得工作液：2.2 μg/ml，以 95 % DMF 稀釋標準液即得。
9. 沸石粉：七星牌。
10. 活性炭^(b)。
11. 糖蜜：台糖公司畜產研究所提供。

檢體配量：

將粗或粒狀飼料磨碎後經 20 mesh sieve 篩過。取 10 g 重 100 ml 褐色量瓶內，加 5 ml 水攪拌後靜置 5 分鐘。加 50 ml 95 % DMF，劇烈振盪 15 秒，於暗處室溫下靜置一夜。以濾紙過濾後，取 15 ml 至裝有約 5 g Alumina 之層析管內，層析管前端塞有玻璃棉。前面數 ml 濾液廢棄而收集剩餘濾液，即可注入 HPLC 內。以多次注射外部標準品法 (Multi-injection external standard method) 比較波峯面積 (peak area) 而定量之。如積分條件不佳時，須改變之。

飼料內卡巴得含量以下式計算之：

$$\text{ppm卡巴得} = \text{檢體波峯面積} \times \text{ppm標準品} / \text{標準品波峯面積} \times 5.5$$

不同處理 (即添加沸石粉、活性炭或糖蜜) 飼料樣品之差異性顯著測驗以威氏 (Welch, B.L.) V 法⁽¹⁾ 測驗之，公式如下：

$$V = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{式中 } S^2 = \frac{(\sum x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{n_i - 1}$$

$$C = \frac{S\bar{x}_1}{S\bar{x}_1 + S\bar{x}_2} = \frac{S_1^2 / n_1}{S_1^2 / n_1 + S_2^2 / n_2}$$

$$f_1 = n_1 - 1 \quad \text{即 } S_1^2 \text{ 之自由度}$$

$$f_2 = n_2 - 1 \quad \text{即 } S_2^2 \text{ 之自由度}$$

有效自由度 (DF) 為：

$$\text{當 } n_1 \neq n_2 \quad DF = \frac{1}{\frac{c^2}{f_1} + \frac{(1-c)^2}{f_2}}$$

$$\text{當 } n_1 = n_2 \quad DF = \frac{f_1}{c_2 + (1-c)^2}$$

討 論 與 結 果

由標準品層析圖 (圖 1) 可知波峯寬 (peak width) 選擇良好 (peak gap 在 $1/2$ 波峯處)，起始及終止記號落點正確，顯示積分條件良好。如以峯高 (peak height) 來比較，則波長 313 nm 為 365 nm 之 2 倍 (8.2 cm / 4.1 cm)，即測波卡巴得之敏感度為其 2 倍。波長 365 nm 之基線 (baseline) 會飄移 (shift) 且雜訊 (noise) 較大，因該波道之放大器 (magnify foard) 使用較久 (約 6 年) 仍未更換，而 313 nm 波道者為新購，而非系統平衡，溶媒比率改變或用罄等原因。

空白飼料及糖蜜均不含卡巴得 (圖 2 及圖 3)，不論波長 365 nm 或 313 nm 均不出現卡巴得之波峯。

添加沸石粉、活性碳或糖蜜均不含有干擾卡巴得波峯之出現(圖4~圖8),顯示不論沸石粉、活性碳或糖蜜均不會萃取一些干擾物質而被波長313或365nm偵測到(即與卡巴得之滯留時間相等)因而導致誤判之發生。但因313nm較365nm敏感,且可偵測出較多物質(圖9~12),故對一些添加物如糖蜜,其卡巴得波峯較易與後面不明物質之波峯稍許融合(fusion)(圖11~12),而稍微影響定量分析,但對定性分析則否。欲排除上述干擾因子,可降低移動相流速或改變移動相比率、成分或更換不同成分之分離管,即可避免。比較圖11與圖13等二層析圖,它們皆為含5%糖蜜之卡巴得飼料,僅改變移動相acetonitrile之比率,前者為20%,後者為17%,卡巴得之滯留時間即由5.15分後退至6.22分,但其後面不明物質則由5.75分後退至7.57分,以致卡巴得波峯不再發生融合現象,使定量完全。但於大量或例行檢驗而言,因盼望於短時間內完成,如飼料內卡巴得含量不低(11ppm以上),則以波長365nm較佳。

11ppm飼料(即不添加三者中任何一種)之回收率為86.1%(表1),以符合美國食品藥物管理局之規定,即在卡巴得檢驗上下限($\pm 25\%$)之內⁽²²⁾。而添加沸石粉、活性碳及糖蜜者,其回收率分別為47.6、36.5及71.8%,它們均在規定下限之外(表1),顯示他們有干擾作用,其干擾情形以活性碳最嚴重,沸石粉次之,而糖蜜最輕微。以單尾機率積分, $P = 0.05$ 為顯著水準,則三者干擾作用均顯著。以單尾機率積分, $P = 0.01$ 為顯著水準,則僅活性碳顯著,其餘二者均不顯著。沸石粉與活性碳之干擾作用相當,因以單尾機率積分, $P = 0.05$ 為顯著水準時, $V = 1.03 < t \left(\frac{DF=3}{P=0.10} \right) = 2.353$, 故不顯著。沸石粉與糖蜜之干擾作用雖有差別,但不顯著 ($V = -2.25 > -t \left(\frac{DF=3}{P=0.10} \right) = -2.353$)。活性碳與糖蜜之干擾作用,則以活性碳較大,因單尾機率積分,無論 $P = 0.05$ 或 $P = 0.01$, 其 $V (-5.61)$ 均小於 $-t (-2.132 / -3.747)$, 故顯著。

如添加沸石粉、活性碳或糖蜜三者中之二種或全部時,均有干擾作用但較不一致(表2)。臨床上,是否如此使用,則不得而知。

總之,沸石粉、活性碳及糖蜜均會干擾飼料內卡巴得之檢出,如何排除此干擾因子,則可能牽涉到樣品處理問題,故需進一步試驗研究加以排除。

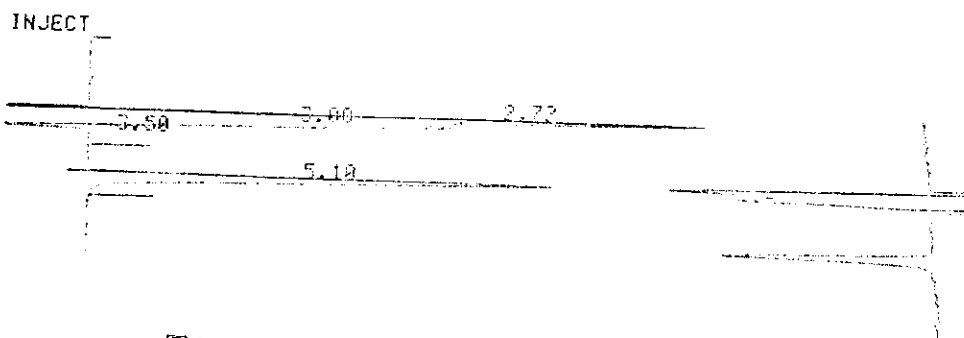


圖1 2.2 ppm卡巴得標準品之層析圖譜。
左邊為波長313nm,右邊為波長365nm,以下皆同。

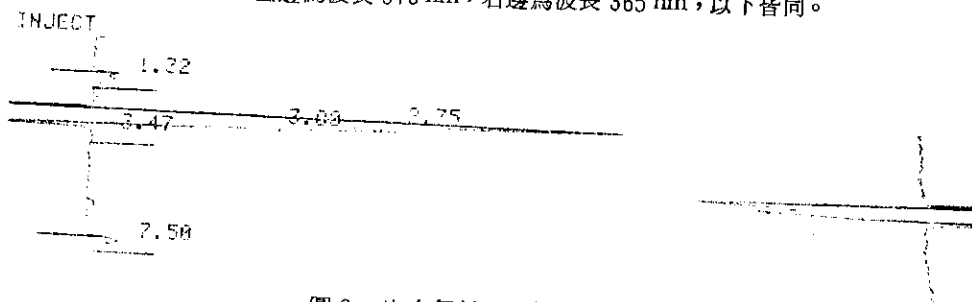


圖2 空白飼料之層析圖譜

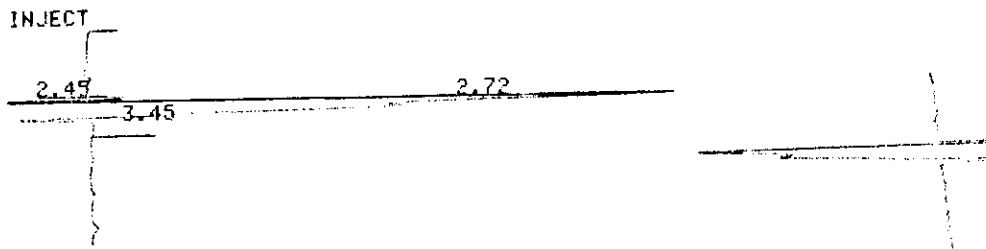


圖 3 15%糖蜜之層析圖譜

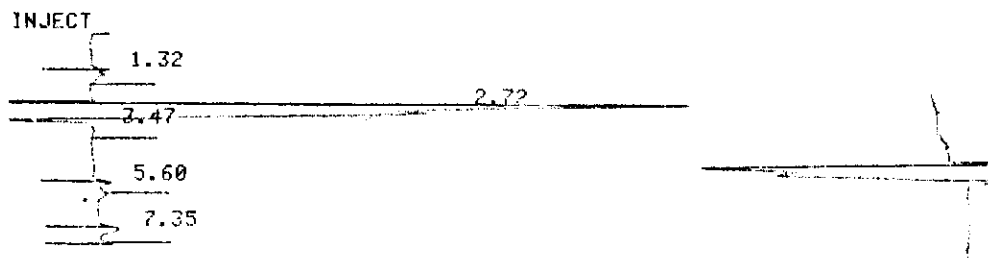


圖 4 含 2%沸石粉飼料之層析圖譜

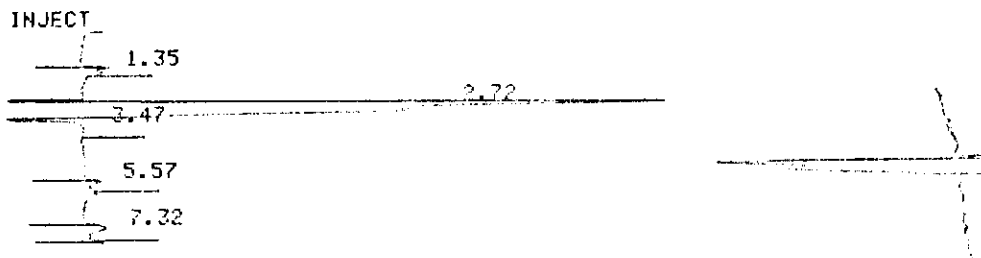


圖 5 含 1.2%活性炭飼料之層析圖譜

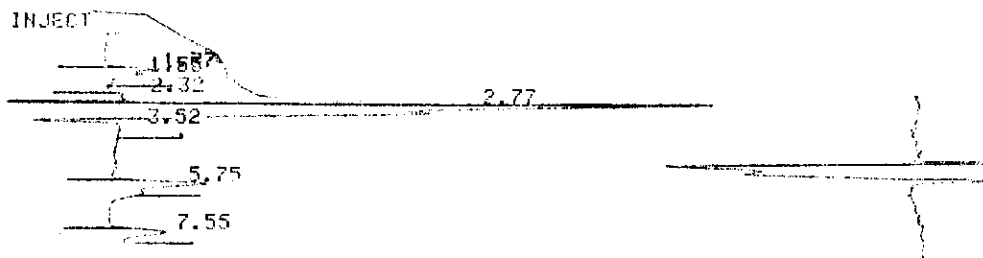


圖 6 含 5%糖蜜飼料之層析圖譜

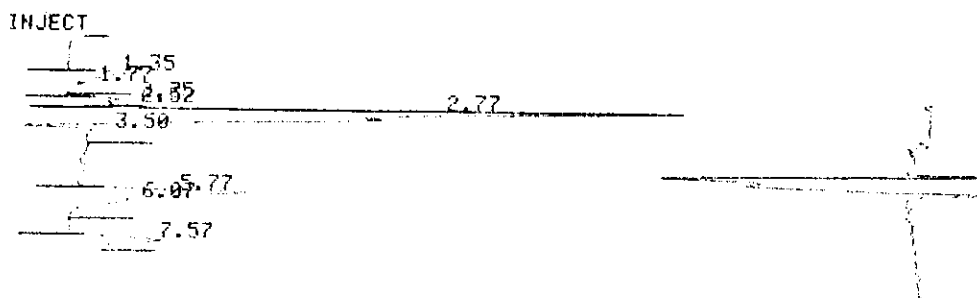


圖 7 含 10% 糖蜜飼料之層析圖譜

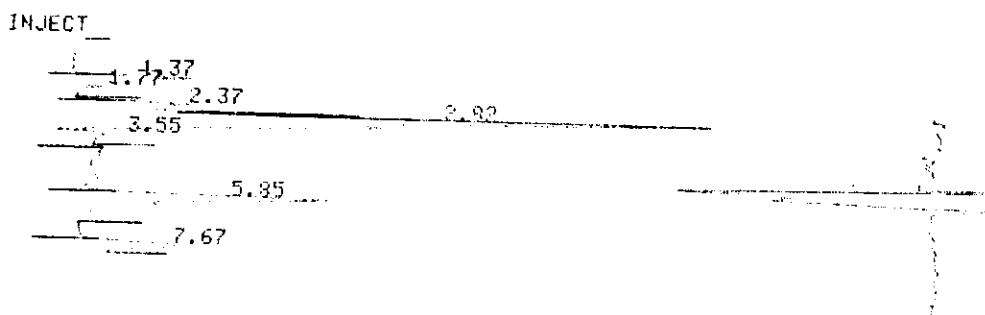


圖 8 含 15% 糖蜜飼料之層析圖譜

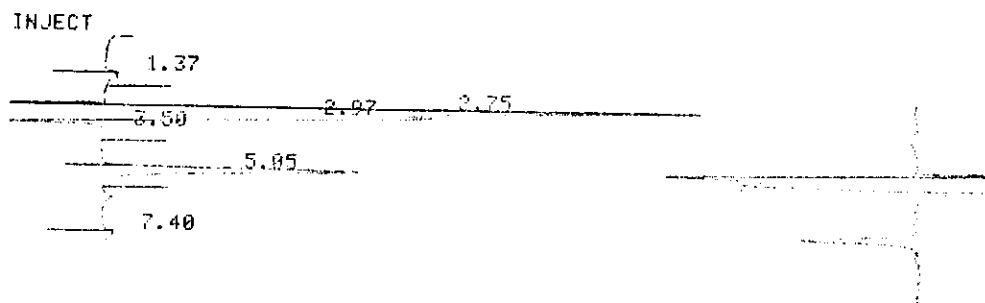


圖 9 含 2% 沸石粉之卡巴得飼料的層析圖譜

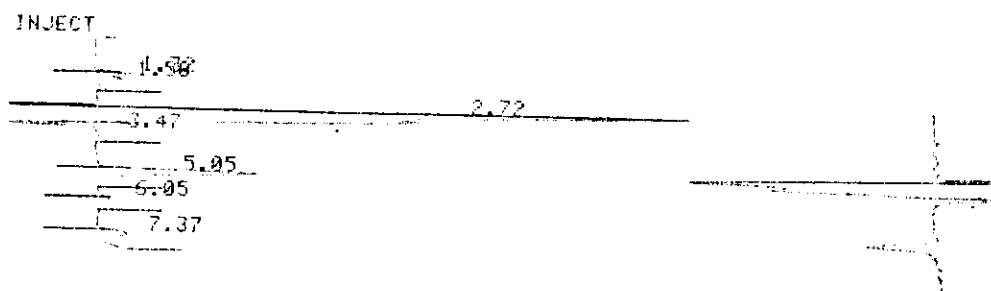


圖 10 含 1.2% 活性碳之卡巴得飼料的層析圖譜

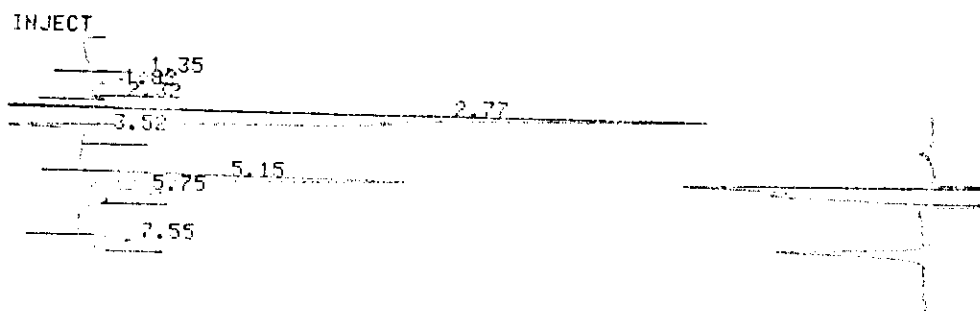


圖 11 含 5% 糖蜜之卡巴得飼料的層析圖譜

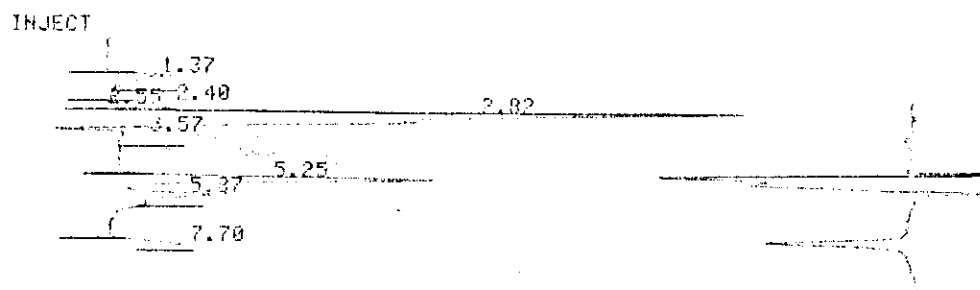


圖 12 含 15% 糖蜜之卡巴得飼料的層析圖譜

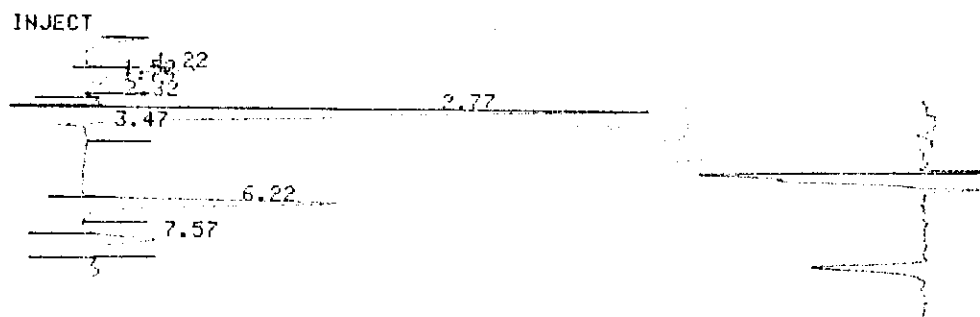
圖 13 含 5% 糖蜜之卡巴得飼料的層析圖譜
移動相：17% amtonitrile

表1 沸石粉、活性碳及糖蜜之卡巴得飼料檢出率及差異性

重	複	飼料樣品處理*			
		不添加(A)	2%沸石粉(B)	1.2%活性碳(C)	糖蜜(D)
1		9.76	3.06	4.93	7.51 (5%)**
2		9.52	6.35	3.27	8.81 (10%)
3		9.18	6.31	3.82	7.37 (15%)
4		9.42			
$\bar{x}_i + S_i$		9.47 ± 0.24	5.24 ± 1.89	4.01 ± 0.85	7.90 ± 0.79
回收率		86.1%	47.6%	36.5%	71.8%
S_i^2		0.058	3.56	0.72	0.63
$S_{\bar{x}_i}$		0.014	1.19	0.24	0.21

$$V(A,B) = 3.86 \quad t \left(\frac{DF=2}{P=0.01} \right) = 2.29$$

$$V(A,D) = 10.82 \quad t \left(\frac{DF=2}{P=0.02} \right) = 6.965$$

$$V(A,C) = 3.31 \quad DF = 2$$

$$V(B,C) = 1.03 \quad t \left(\frac{DF=3}{P=0.10} \right) = 2.353$$

$$V(B,D) = -2.25 \quad -t \left(\frac{DF=3}{P=0.10} \right) = -2.353$$

$$V(C,D) = -5.61 \quad -t \left(\frac{DF=4}{P=0.01} \right) = -2.132$$

$$-t \left(\frac{DF=4}{P=0.02} \right) = -3.747$$

* 飼料樣品皆含 11 ppm 卡巴得

** 添加濃度

表2 沸石粉、活性碳及糖蜜互相間對 11 ppm 卡巴得飼料之檢出率

飼料樣品處理*	檢出值 (ppm)
Z + C	6.54
5% M + Z	6.29
10% M + Z	9.72
5% M + C	3.51
10% M + C	4.03
5% M + Z + C	4.27
10% M + Z + C	6.28

* Z : 沸石粉

C : 活性碳

M : 糖蜜

參 考 文 獻

- 1.李功固。1982私人通信，私立嘉南藥專。
- 2.李永基、方柏雄、翁麗珍。1983 Ektecin 對肉雞感染 *Eimeria tenella* 之預防及治療試驗，中華民國獸醫學會雜誌。9：29～34。
- 3.李永基、方柏雄、簡基寬、費昌勇。1979。天然沸石粉對病原菌之吸附能力試驗。中華民國獸醫學會雜誌。5：139～143。
- 4.李永基、曾啓明、賴銘癸、蔡阿海。1979。天然沸石粉代替抗生素添加物對肥育豬之試驗。中華民國獸醫學會雜誌。5：129～131。
- 5.林宏光、葉澤波。1980。仔猪及生長豬飼料中抗菌劑適當用量之研究。台糖畜產研究所試驗報告。68-69年期：47～55。
- 6.洪其璧、謝榮添、許鳳麟。1982。畜產品中可抗菌物質殘留來源性研究。藥物食品檢驗局。台北。
- 7.陳賜鈺、賴幸雄、覃玉祥、郭忠政、黃明德。1982。哺乳期間母猪提早配種飼養方法之研究。台糖畜產研究所70-71年期試驗報告：43～49。
- 8.陳賜鈺、賴幸雄、郭忠政。1980。哺乳母猪供餵不同飼料量對其繁殖與哺乳性能影響之研究。台糖畜產研究所68-69年期試驗報告：37～45。
- 9.葉澤波。1983。私人通信，台糖畜產研究所。
- 10.葉澤波、戴乃倫、吳繼芳、吳孟謙。1979。仔猪飼料添加豬用香料精飼養效果之研究。台糖畜產研究所67-68年期試驗報告：65～71。
- 11.葉樹藩。1979。試驗設計學。台北。
- 12.戴乃倫、施有識。1980。飼料添加天然沸石粉對提高仔猪飼養效果之研究。台糖畜產研究所68～69年期試驗報告：57～64。
- 13.Horwitz, W. 1980. Official methods of the association of official analytical chemists, 13th ed. Tan Kong Press, Taipei, Taiwan.
- 14.Lee, K. K., H. H. Chen, S. C. Hwang and S. H. Lou. 1978. Assay methods for residue in pork (1) the analysis of carbadox in pork by HPLC. Chia Nan Annual Bulletin. 4：97-100.
- 15.Lee, K. K., C. I. Liu and T. P. Yeh. 1981. Studies on the drug residues in pork I. Determination of free carbadox in pork Anim. Ind. Res. Inst. TSC. Annu. Res. 207-215。
- 16.Lin, S. Y., T. F. Chion and C. S. Chen. 1983 detection of carbadox in feed by high performance liquid chromatography. Taiwan Jour. Vet. Med. & Anim. Husb. 42：15～23.
- 17.Lowie, DM., R. T. Teagne, F. E. Quick and C. L. Foster. 1983. High pressure liquid chromatographic determination of carbadox and pyrantel tartrate in swine feed and supplements. J. Assoc. off. Anal. Chem. 66：602～605.
- 18.Luchtefeld, R. G. 1977. Detection of low-level carbadox residues in animal feeds by high pressure liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65：361。
- 19.Noel, R. J. 1983. HPLC analytic procedure for carbadox and pyrantel tartrate from animal feed. Personal Communication. Purdue university, Department of biochemistry, West Lafayette, IN.

20. Rihs, V. T. and J. Schneider. 1980. Die bestmimmung von carbadox, furazolidon and olaquinox in futtermitteln mittles.

THE INTERFERENCE OF ZEOLITE ACTIVE CARBON AND MOLASSES TO THE DETECTION OF CARBADOX IN FEED

S. Y. Lin and C. S. Chen

At present, the high performance liquid chromatography was mostly used to detect the carbadox in feed, because its rapidity, accuracy and high recovery. But some additives or ingredients of feed might interfere this detection. We studied the interference of zeolite, active carbon and molasses. The results showed that each of them might interfere the detection of carbadox in feed, the most was active carbon, the second was zeolite and the least was molasses. All of them were significant when tested by one-tailed test of a difference between two means and the level of significance was $P = 0.05$, but only the active carbon was significant when $P = 0.01$. There were no significance between zeolite and active carbon and either did the zeolite and molasses. There were significant between active carbon and molasses when compared by one-tailed test neither $P = 0.05$ nor $P = 0.01$. It showed the interference too when added all of them or two of them but the result was irregular. How to correct the interference factors should be studied further.