

以高效液相層析法同時分析飼料和肉品中 磺胺劑與四環素

吳安邦 陳玉敏 李功固 陳朝洋

台北醫學院藥學研究所

摘 要

本研究係對國內常用家畜飼料所添加之六種磺胺劑、三種四環素類抗生素和化學療法劑卡巴得及其在屠體肉品及內臟中之殘留量以高效液相層析法找出四種最佳分析條件：一、用LiChrosorb RP-C₁₈分離管，以5%氘甲烷水溶液加0.1M磷酸緩衝液(pH 7.4)為移動相，於UV 254nm檢測之可同時分析SDA, SMM, STA, SDM, SMT和SQO。二、用Ultrasphere ODS分離管，以含15%氘甲烷之0.1M磷酸緩衝液(pH 6.8)為移動相，於UV 254nm檢測之可同時分析SDA, SMM, STA, SMT, SQO及SDM。三、用LiChrosorb RP-C₁₈分離管，以7%異丙醇水溶液內含0.001M Na₂EDTA和0.1M二乙醇胺緩衝液(pH 7.3)為移動相，於UV 254nm檢測之可同時分析STA, SMT, 卡巴得, TC, OTC及CTC。四、用Alltech RP-C₁₈分離管，以28%二甲基甲胺水溶液內含0.001M Na₂EDTA, 0.05M檸檬酸, 0.013M檸檬酸鈉和0.1M KNO₃緩衝液(pH 3.0)為移動相，於UV 280nm檢測之可同時分析STA, SMT, OTC, 卡巴得及CTC。飼料添加藥物回收率介於85-99%之間；肉品及內臟中回收率亦達69-80%。總共有廿種市售飼料檢樣中，十一種飼料樣品被檢出含有禁用之磺胺劑或四環素類抗生素。廿一種肉品及內臟檢樣中，一種豬肉檢樣OTC殘留量和二種豬肝檢樣總磺胺劑殘留量皆超過法定容許量。飼料中藥物檢出最低限量為1.0-5.0 ppb；肉品及內臟藥物殘留量檢出最低限量為2.0-12 ppb。

前 言

磺胺劑(Sulfa drugs)是四環素類抗生素(Tetracyclines)常被用為飼料之添加物以改善畜牧生產之效益，減少幼畜時期因疾病造成之損失，及預防飼料品質之降低⁽¹⁾。坊間販售飼料添加藥物之種類或添加量常有不當，或家畜、家禽之飼養過程，飼料使用亦不得其法，導致屠體肉品及內臟中藥物的殘留問題⁽²⁾。因此，世界各先進國家均有飼料中添加藥物的種類及其容許量之規範，明訂飼養動物期間飼料的使用方法，以及屠體內所含殘留藥物之最高容許量以確保消費者健康⁽³⁻⁵⁾。本研究⁽⁶⁾係針對國內常用的添加藥物中篩選出較容易發生問題的磺

胺劑，如sulfadiazine (SDA), sulfamonomethaxine (SMM), sulfathiazole (STA), sulfamethazine (SMT), sulfaquinoxaline (SQO), sulfadimethazine (SDM)等六種；四環素類抗生素，如tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC)等三種和化學療法劑，如carbadox(卡巴得)為分析對象，探討並確立其分析方法。

以往，這些藥物的分析均使用生物檢驗法⁽⁷⁾，雖然操作方法簡單容易，但無法檢出所含藥物之種類及其含量。為改善以上所述之缺失，近年來國外已陸續開發高效液相層析法(HPLC)⁽⁸⁻¹²⁾。本研究是以改良之HPLC方法，同時迅速分析國內常被添加於飼料中及殘留於屠體中的上述十種藥物。此外，亦探討由飼料中萃取上述添加藥物的方法及屠

體肉品與內臟中殘留藥物分析之前處理方法。最後以此改良之HPLC方法就市售飼料及屠體肉品與內臟進行一次調查分析以印證本法之可行性。

材料與方法

一、飼料及肉品

市售飼料主要成份為黃豆粉、玉米粉、米糠、麩皮、麥片和魚粉等。本研究所用之飼料種類有雞用五家廠牌，豬用四家廠牌，鴨用一家廠牌(皆以代號區分)，均於民國七十五年初購自彰化地區。肉品及內臟於民國七十五年底購自台北市松山市場。

二、試藥

(一)鹽酸(HCl)，磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)，氫氧化鈉(NaOH)，醋酸(Acetic acid)：日本和光純藥工業株式會社，試藥特級。

(二)四己酸乙二胺二鈉(Na_2EDTA)，二乙醇胺(Diethanolamine, DEA)，二甲基甲胺(N,N-dimethylformamide, DMF)，85%濃磷酸(H_3PO_4)，檸檬酸(Citric acid)，檸檬酸鈉(Sodium citrate)，醋酸鈉(Sodium acetate)，硝酸鉀(KNO_3)：E. Merck試藥級。

(三)甲醇(Methanol)，氰甲烷(Acetonitrile)，異丙醇(Isopropanol; IPA)：皓峰公司，LC級。

三、標準品、內部標準品

(一)磺胺嘧啶(Sulfadiazine, SDA)，磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine, SMT)，磺胺奎林(Sulfaminoxaline, SQO)和磺胺二甲氧嘧啶(sulfadimethoxine, SDM)：Sigma公司試藥級。

(二)磺胺甲氧嘧啶(Sulfamonomethoxine, SMM)：第一製藥公司試藥。

(三)磺胺噻唑(Sulfathiazole, STA)：日本東京化成公司試藥。

(四)氧四環素(Oxytetracycline, OTC)：輝瑞藥廠贈送。

(五)四環黴素(Tetracycline HCl, TC)和氯四環素(Chlortetracycline HCl, CTC)衛生署藥物檢驗局贈送。

(六)卡巴得(Carbadox)：Sigma公司試藥級。

(七)咖啡鹼(Caffeine)和苯甲酸(Benzoic acid)：日本和光純藥工業株式會社，試藥特級。

(八)Cimetidine：Sigma公司試藥級。

四、儀器

(一)高效液相層析儀：Hitachi Model 655 LC

注射器：Hitachi公司89510型

檢出器：Hitachi公司Variable wavelength UV monitor

紀錄器：Hitachi公司561型

(二)Millipore: Millex[®]-FG 0.2 μm filter unit

(三)酸鹼測定器：Hanna Instruments 8417型

(四)絞肉機：Moulinette “S” 643型

五、HPLC分析方法

(一)磺胺劑之分析

為確立最佳分析條件，能同時分離六種磺胺劑成份之移動相pH值，分析方法朝兩方向進行。

1. 使用LiChrosorb RP-C₁₈ (Merck, 5 μm ; 15 cm $\times$ 3.0mm ID)分離管，UV 254nm檢出器，以5%氰甲烷水溶液加0.1M磷酸緩衝液以調整不同之pH值為移動相，流速1.0 ml/min。

2. 使用Beckman Ultrasphere ODS (5 μm ; 25 cm $\times$ 4.6mm ID)分離管UV 254nm檢出器，以15%氰甲烷水溶液加0.1M磷酸緩衝液以調整不同之pH值為移動相，流速1.0 ml/min下測試磺胺劑之滯留時間。

(二)四環素類抗生素及卡巴得之分析

1. 以LiChrosorb RP-C₁₈ (Merck, 5 μm ; 15cm $\times$ 3.0mm ID)分離管，UV 254nm檢出器，改變IPA, Na_2EDTA 和DEA混合液比例，加磷酸緩衝液調整至pH 7.3為移動相，流速1.0 ml/min測試最佳移動相之組成。

2. 使用Alltech RP-C₁₈ (10 μm ; 25cm $\times$ 4.6 mm ID)分離管，UV 280nm檢出器，改變DMF, Na_2EDTA , KNO_3 ，檸檬酸和檸檬酸鈉混合液比例調整至pH 3.0為移動相，流速1.0 ml/min測試最佳移動相之組成。

六、標準溶液之配製

(一)六種磺胺劑標準品之貯備液(Stock solution)

分別精確稱取SDA, SMM, STA, SMT, SQO和SDM 10, 20, 25, 40, 20和45 mg，置於200 ml定量瓶中，加入甲醇溶液至定量200 ml，得含六種磺胺劑標準品之貯備液，濃度分別為0.05, 0.1, 0.125, 0.2, 0.1和0.225 mg/ml。

(二)三種四環素類抗生素標準品之貯備液

分別精確稱取OTC, TC和CTC 10, 10和40 mg，置於50 ml定量瓶內，加入甲醇溶液至定量50 ml，得含三種四環素類抗生素之貯備液，濃度分別

爲0.2, 0.2和0.8 mg/ml。

(三)四種磺胺劑標準品之操作溶液(Working solution)

先調配合SMM, SMT, SQO和SDM四種標準品貯備液,濃度分別爲0.2, 0.4, 0.1和0.1 mg/ml。再分別量取1, 2, 5和10 ml不等之調好貯備液,分別置於100 ml定量瓶中,再加入甲醇溶液至定量100 ml。

(四)三種四環素類抗生素標準品之操作溶液

先調配合OTC, TC和CTC三種標準品貯備液,濃度分別爲0.075, 0.15和0.1 mg/ml。再分別量取5, 10, 20和40 ml不等之調好貯備液,分別置於100 ml定量瓶中,再加入甲醇溶液至定量100 ml。

七、標準檢量線之製作

(一)磺胺劑檢量線

將方法六之(一)標準品貯備液分別量取1.00, 2.00, 5.00, 8.00和10.00 ml,各加5.00 ml內部標準品溶液Cimetidine, 40 mg/ml標準液,最後加甲醇稀釋定容至100 ml。各取20 μ l溶液分別注入層析儀,求其峰線高比值作爲檢量線。

(二)四環素類抗生素檢量線

將方法六之(二)標準品貯備液分別量取1.00, 2.00, 3.00, 4.00和5.00 ml,各加2.00 ml內部標準品溶液Caffeine, 1.76 mg/ml標準液,最後加甲醇稀釋定容至100 ml。各取10 μ l溶液分別注入層析儀,求其峰線高比值作爲檢量線。

對以上六種磺胺劑及三種四環素類抗生素所得之檢量線均有良好之直線性,再現性及準確性。

八、檢樣之前處理

(一)飼料檢樣處理流程如圖一

(二)肉品及內臟檢樣處理流程如圖二

九、檢樣之分析

(一)磺胺劑含量之分析

飼料或肉品、肉臟等檢樣經前處理後,分別精確量取檢液及準溶液10 μ l注入HPLC,以Beckman Ultrasphere ODS (5 μ m; 25cm $\times$ 4.6mm ID)分離管,含15% 氘甲烷之0.1M磷酸衝液,pH 6.8,配合UV 254nm檢出器,流速1.0 ml/min下分析檢樣內添加藥物或殘留磺胺劑之含量。

(二)四環素類抗生素及卡巴得含量之分析

分別精確量取檢液及標準溶液10 μ l注入HPLC,以LiChrosorb RP-C₁₈ (5 μ m; 15cm $\times$ 3.0 mm ID)分離管,7% IPA在0.001M Na₂EDTA和

- ↓ Weighed 10 g ground feed sample accurately and placed in a 100-ml volumetric flask
- ↓ Added internal standard cimetidine 5 ml (40 mg/ml)---- Sulfa drugs
- ↓ Added internal standard, caffeine 2 ml (1.76 mg/ml)---- Tetracyclines
- ↓ Added 20 ml methanol, diluted with 0.15 N HCl to a volume of 100 ml
- ↓ Stirred 1 h
- ↓ Centrifuged 15 min, 3000 rpm
- Supernatant
- ↓ Passed through 0.2 μ m Millipore
- ↓ HPLC analysis

Figure 1. Extraction of sulfa drugs and tetracyclines from feeds and premixes

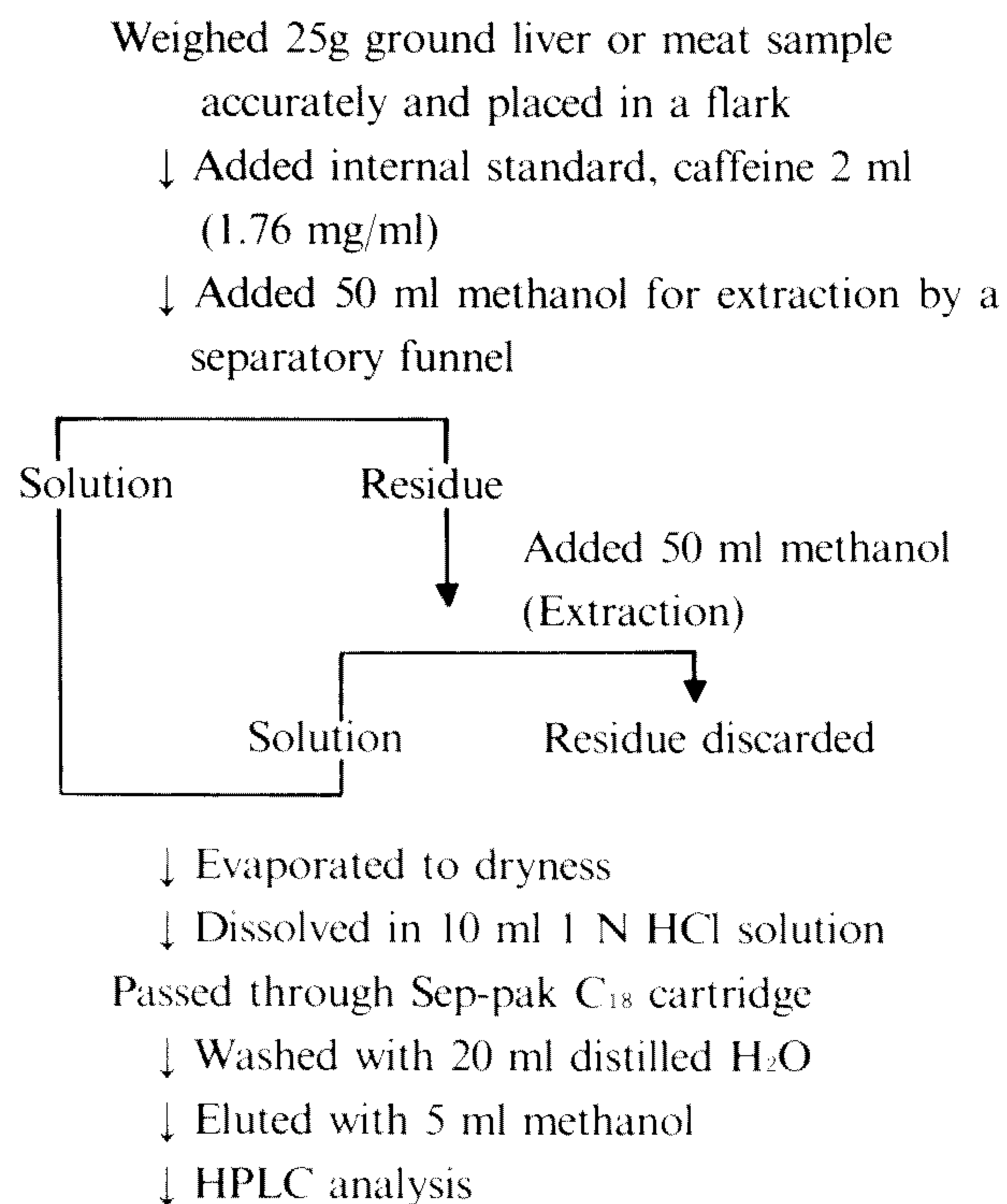


Figure 2. Analytical procedure for sulfa drugs and tetracyclines in animal liver and meat

0.1M DEA之水溶液中以磷酸緩衝液調至pH 7.3,移動相在流速1.0 ml/min配合UV 254nm檢出器分

析檢樣中四環素類抗生素及卡巴得之含量。部分檢樣係以 Alltech RP-C₁₈ (5 μm; 25cm × 4.6mm ID) 分離管, 0.001M Na₂EDTA, 0.05M Citric acid, 0.013M Sodium citrate, 及 0.1M KNO₃ 在 28% DMF 水溶液中調至 pH 3.0, 移動相流速 1.0 ml/min 配合 UV 280nm 檢出器分析之。

以上各檢體所得峰線高比值與標準曲線比較, 求出各藥物之濃度, 再依公式換算其含量。

$$\text{藥物含量(ppm)} = \frac{C \times V}{W}$$

V: 檢液體積(ml)

C: 檢液中藥物濃度(μg/ml)

W: 檢樣重量(g)

十、回收試驗

(一)磺胺劑之回收

取未被藥物污染之空白試料: 1. 取 10 g 飼料, 分別添加方法六之(一)六種磺胺劑貯備液 1, 2, 5, 8 及 10 ml, 再經方法八之(一)前處理後, 各取 20 μl 注入 HPLC 分析之。2. 取 25 g 已絞碎之豬肉, 分別添加方法六之(二)含四種磺胺劑之操作溶液各 2 ml, 再經方法八之(二)前處理後, 各取 10 μl 注入 HPLC 分析之。

(二)四環素類抗生素之回收

1. 取 10 g 經粉碎之飼料, 分別添加方法六之(二)含三種四環素類抗生素之貯備液 1, 2, 3, 4 及 5 ml, 再經方法八之(一)前處理後, 各取 10 μl 注入 HPLC 分析之。2. 取 25 g 已絞碎之豬肉, 分別添加方法六之(四)含三種四環素類抗生素之操作溶液各 2 ml, 再經方法八之(二)前處理後, 各取 10 μl 注入 HPLC 分析之。

以上四種狀況, 每一添加量各作四重複, 所得峰線高比值與濃度作圖呈線性關係, 並以迴歸方程式求得回收曲線。再與標準檢量線比較, 即可換算其回收率。

結果與討論

一、HPLC分析條件之探討

由於磺胺劑為兩性化合物, 均有兩個 pK_a 值 (圖三), pK_{a1} 在 2.0-2.8 之間, pK_{a2} 在 5.9-8.4 之間。因此適當地改變移動相之 pH 值, 可造成其分子處於不同之離子狀態而改變其極性, 終究可改變其在 HPLC 之滯留時間。分析條件(一)以 LiChrosorb RP-C₁₈ 分離管配合 UV 254nm 檢出器, 5% 氘甲烷

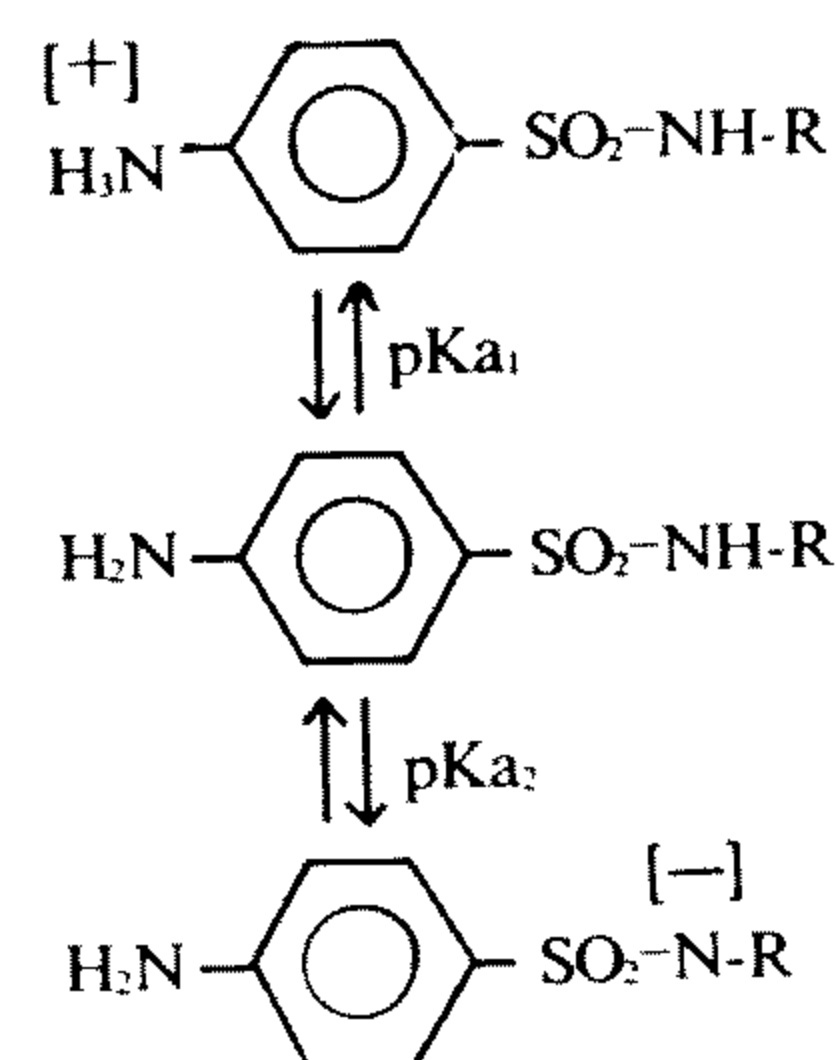


Figure 3. The amphoteric nature of sulfa drugs.

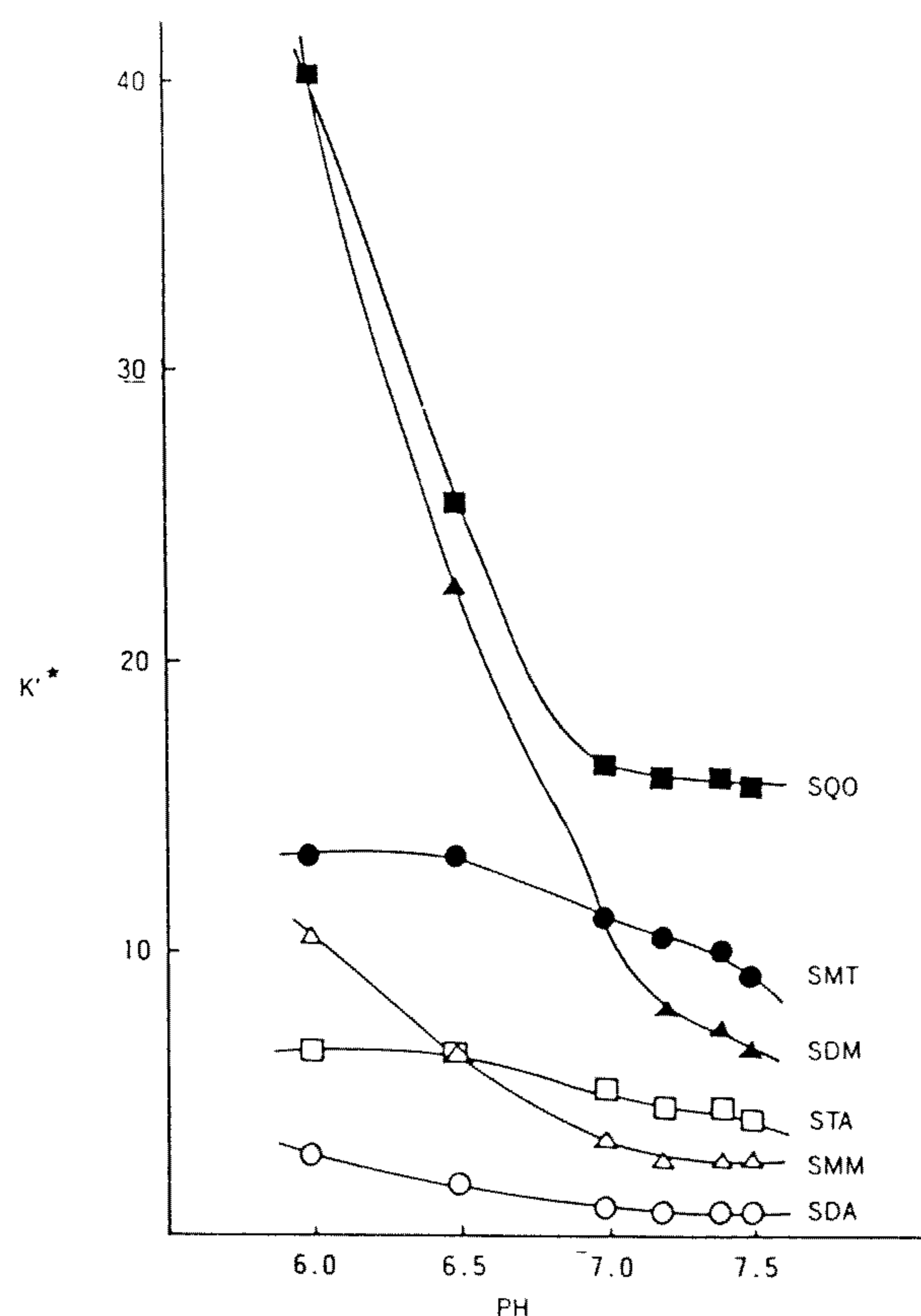


Figure 4. Dependence of k' of six sulfa drugs on pH.

$$*K' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (t_R : \text{retention time of sulfa drug;}$$

t_0 : retention time of column volume)

Column : LiChrosorb RP-C₁₈ (5 μm ; 15cm × 3.0 mm ID)

Mobile phase : 5% acetonitrile in 0.1 M phosphate buffer

Detector : UV 254 nm at 0.04 AUFS

Recorder speed : 0.5 cm/min Flow rate : 0.5 ml/min

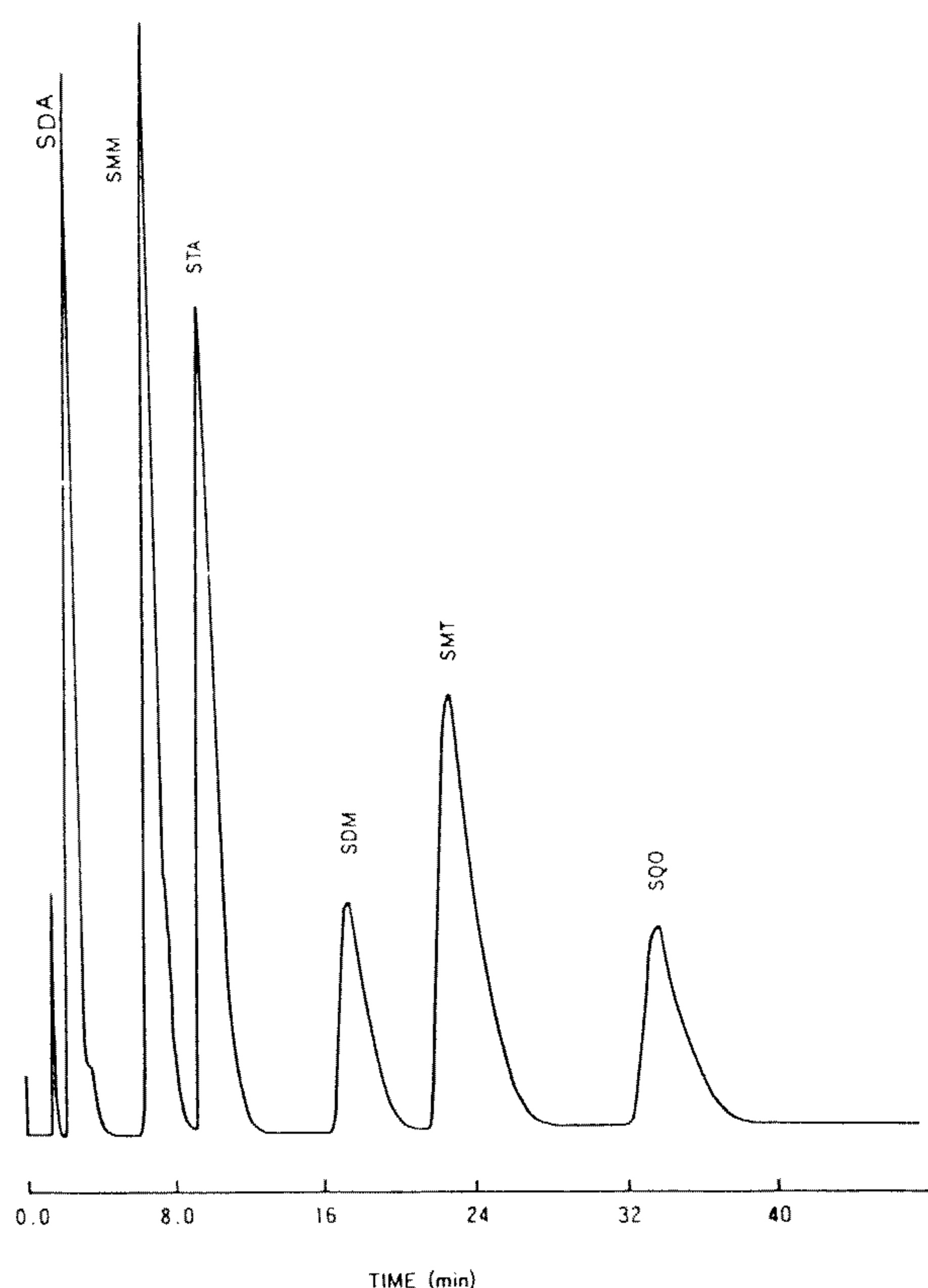


Figure 5. HPLC chromatogram of six sulfa drugs.
Column : LiChrosorb RP-C₁₈ (5 μ m ; 15cm $\times$ 3.0 mm ID)
Mobile phase : 5% CH₃CN in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)
Detector : UV 254 nm at 0.04 AUFS
Recorder speed : 0.25 cm/min Flow rate : 0.5 ml/min

為移動相,調整不同之pH值,得不同之滯留時間如圖四。在pH 7.4時可將六種磺胺劑作最佳之分離如圖五。分析條件(二)以Beckman Ultrasphere ODS分離管配合UV 254nm檢出器,15% 氘甲烷為移動相,pH值與滯留時間關係如圖六。在pH 6.8時可將六種磺胺劑作最佳之分離如圖七。

以HPLC法應用於四環素類抗生素及卡巴得之分析,Knox與Jurand曾於1979年發表一篇綜合報告⁽¹³⁾,Nelis與Leenheer亦曾在理論上探討過這類問題⁽¹⁴⁾,屠體內殘留四環素類之分析報告也有良好結果^(15,16)。本研究係重新篩選各移動相之組成成份並仔細研判其分析結果。對防止峰線拖尾(Tailing)之方法;調整溶媒極性;添加塩類之效果;避免無機塩類之沈澱;及黏度之控制皆有進一步之探討以尋找最具實用性之移動相組成。分析條

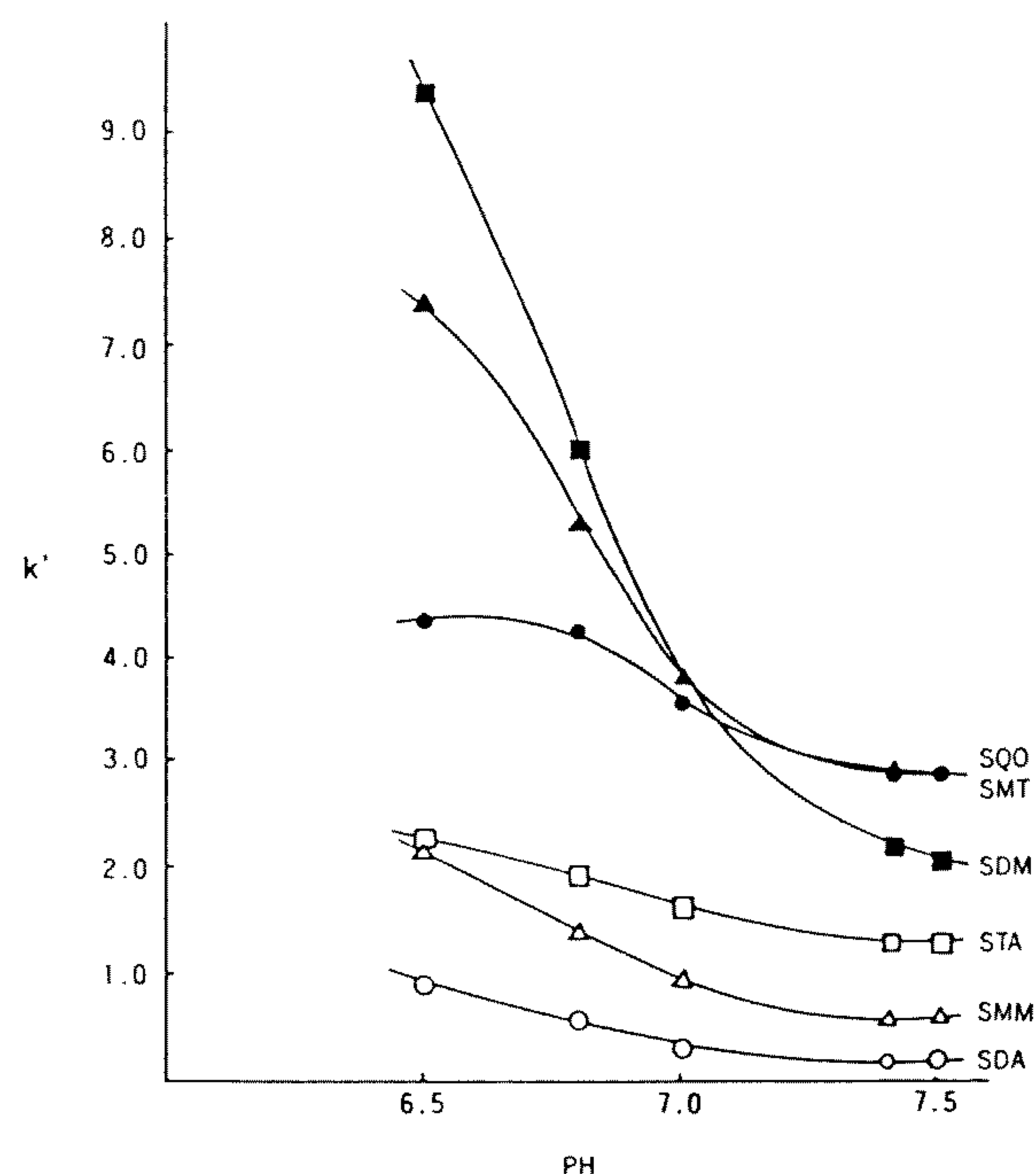


Figure 6. Dependence of k' of six sulfa drugs on pH.
Column : Beckman Ultrasphere ODS (5 μ m ; 15cm $\times$ 4.6mm ID)
Mobile phase : 15% acetonitrile in 0.1 M phosphate buffer
Detector : UV 254 nm at 0.04 AUFS
Recorder speed : 0.25 cm/min Flow rate : 1.0 ml/min

件(三):以LiChrosorb RP-C₁₈分離管配合UV 254 nm檢出器,以DEA水溶液為移動相。當DEA含量增加並以磷酸調整pH值至7.3時,其峰線回應(peak response)較高,拖尾現象減少,峰線尖銳,但滯留時間延長,可能是四環素類與磷酸形成複合體所致。若在移動相中添加甲醇,或氘甲烷等以增加溶媒極性,則可縮短滯留時間。其中以添加IPA為最理想,但因IPA黏度較大,影響輸送壓力,所以其添加量必須妥為控制。最佳分析條件為:7% IPA水溶液,添加0.001M Na₂EDTA和0.2M DEA溶液,以磷酸調整至pH 7.3為移動相。本方法亦可同時分離出磺胺劑中之STA與SMT,其結果如圖八所示。若把檢出器波長移至440 nm,亦可分析出四環素類之代謝物,如毒物較大之anhydro CTC及epi-anhydro CTC,此方面之研究已在本研究室進行中。分析條件(四):以Alltech RP-C₁₈為分離管,配合UV 280nm檢出器,以pH 3.0之DMF水溶液為移動相。在實驗過程中發現四環素類容易與分離管之管壁產生鏽合(chelation)而引起嚴重之峰

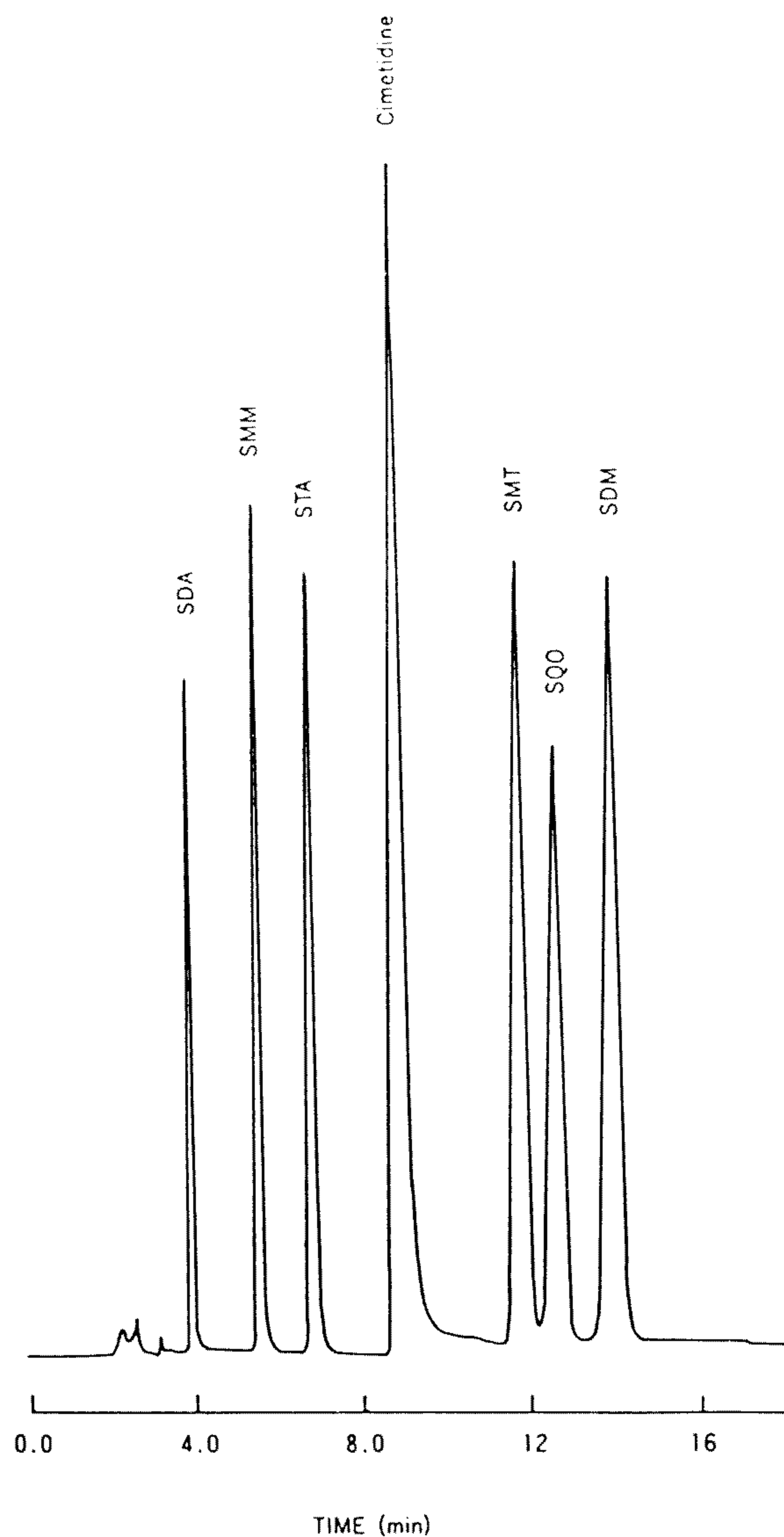


Figure 7. HPLC chromatogram of six sulfa drugs.
Column : Beckman Ultrasphere ODS (5 μ m ; 25cm $\times$ 4.6mm ID)
Mobile phase : 15% CH₃CN in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)
Detector : UV 254 nm at 0.04 AUFS
Recorder speed : 0.5 cm/min Flow rate : 1.0 ml/min

線拖尾。若添加EDTA及Na₂EDTA可使四環素類轉與EDTA銹合而改善峰線拖尾,但滯留時間會延長。尤其在pH3.0時四環素類成爲兩性配對(Zwitterion pairs),其與EDTA銹合程度最大⁽¹³⁾。若添加DMF,由於離子對之溶媒效應,則可縮短滯留時間。添加KNO₃亦有類似效應,而且各類四環素之

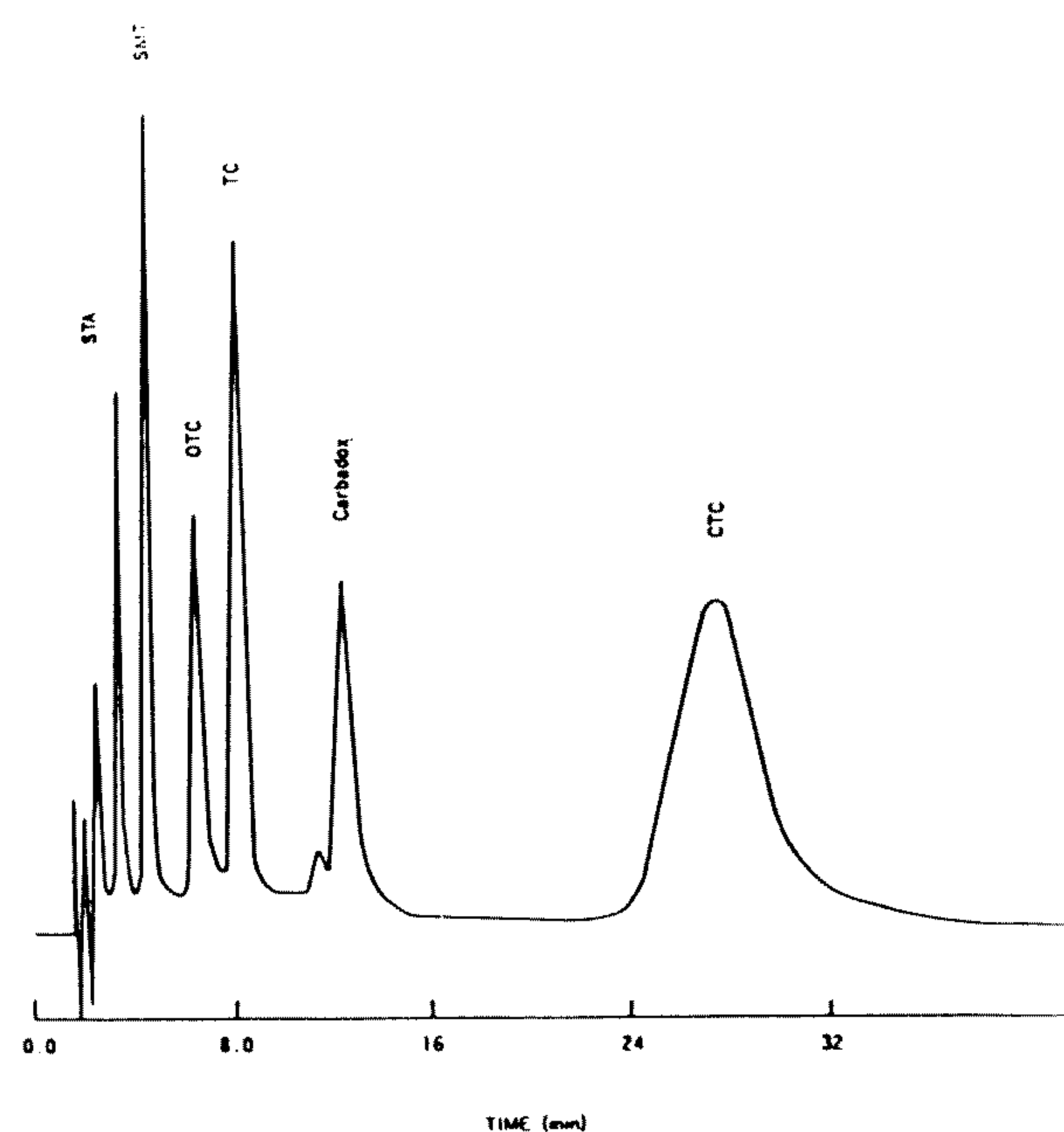


Figure 8. HPLC chromatogram of six sulfa drugs (STA, SMT), tetracyclines (OTC, TC, CTC) and carbadox.

Column : LiChrosorb RP-C₁₈ (5 μ m ; 15cm $\times$ 3.0 mm ID)

Mobile phase : 7% isopropanol in water containing 0.001M Na₂EDTA and 0.1M diethanolamine adjusted to pH 7.3 with H₃PO₄

Detector : UV 254 nm at 0.02 AUFS

Recorder speed : 0.25 cm/min Flow rate : 0.5 ml/min

分離更加理想。欲調整pH值,在此可使用檸檬酸及其納鹽。由以上過程,可得知最佳分析條件爲:在28% DMF水溶液中添加0.001M Na₂EDTA,0.05 M citric acid, 0.013M sodium citrate 與 0.1M KNO₃,調整至pH 3.0爲移動相,則分離效果最佳,內部標準品則以Benzoic acid爲最理想。本方法亦可同時分析STA與SMT,惟OTC及TC無法分離,其結果見圖九。茲將最佳分析條件歸納於表一。

二、前處理之探討

飼料添加物是將固體粉末藥物,直接與飼料混合,但採用此種方式所需之檢品量很大,而且在製備及操作手續上相當繁複。所以在萃取方法上,檢品製備採模擬方式,各取1.0, 2.0, 5.0, 8.0及10 ml不等的標準溶液與10 g經粉碎之飼料攪拌均勻後,再進行萃取。Howell等曾利用酸性丙酮(1 N鹽酸:

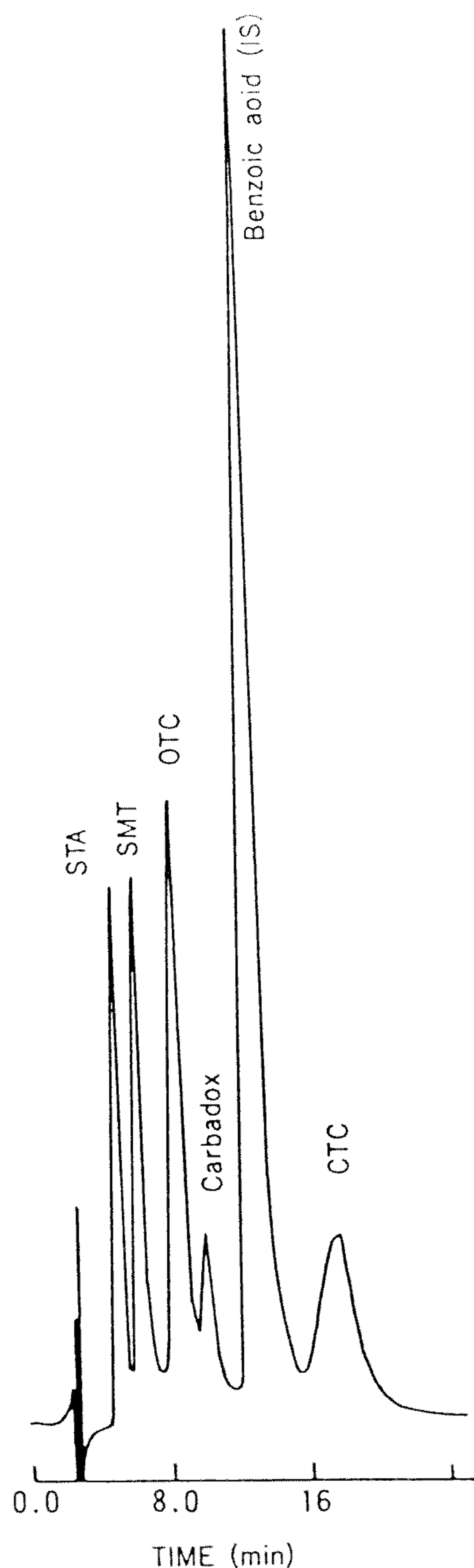


Figure 9. HPLC chromatogram of six sulfa drugs (STA, SMT), tetracyclines (OTC, TC, CTC) and carbadox.

Column : Alltech RP-C₁₈ (10 μ m ; 25cm $\times$ 4.6mm ID)

Mobile phase : 28% N,N-dimethylformamide in water containing 0.001M Na₂EDTA and 0.05M citric acid, 0.013M sodium citrate and 0.1M KNO₃ at pH 3.0

Detector : UV 280 nm at 0.02 AUFS

Recorder speed : 0.25 cm/min Flow rate : 1.0 ml/min

酮:水=1:13:6)來直接萃取飼料中之氯四環素⁽¹⁵⁾; Chappell等以2%鹽酸甲醇溶液來萃取飼料中羥四環素⁽¹⁷⁾。但上述兩種方法皆無法同時萃取飼料中六種磺胺劑及三種四環素類抗生素,且其回收率亦不理想。Stringham等則使用25%甲醇之0.15 N鹽酸溶液同時萃取飼料中磺胺劑和四環素兩類藥物可得良好的直線性之標準曲線和回收曲線。

對動物組織及內臟中三種四環素類抗生素, Oka等曾以Sep-pak C₁₈ cartridge或Baker 10 C₁₈ 進行分析其殘留藥物⁽⁹⁾。Nagata等亦利用加溫之甲醇溶液分兩次萃取雞組織中殘留之17種合成抗菌劑⁽¹⁹⁾。本研究乃採用甲醇溶液分兩次萃取肉品中藥物,將溶液蒸乾,其次將固體物溶於1 N鹽酸溶液中,於Sep-pak C₁₈ cartridge中濃縮,再以20 ml蒸餾水清洗,最後以5 ml甲醇沖提,使用高效液相層析法分析之。

三、添加回收試驗

將10 g粉碎之飼料或25 g絞碎之肉品分別摻加測試藥物(添加量見方法十),再經前處理後,以實驗方法九分析其回收率,結果如表二及表三。肉品檢體之前處理需經Sep-pak C₁₈ cartridge吸附精製,實驗中發現SDA和STA的吸附情形不佳,SDA只有10%左右,而STA在30%左右,所以未對此二種磺胺劑進行殘留量檢測。由表二得知在飼料中,磺胺劑之回收率介於91-99%之間;而四環素類抗生素之回收率亦在85-93%,變異係數介於0.9-4.6%。在肉品中,四種磺胺劑回收率介於69-80%;而三種四環素類抗生素亦在73-76%,變異係數介於8.3-13%。此結果與Nagata之研究,其回收率在65.5%以上相近⁽¹⁹⁾。在飼料中九種藥物檢出最低限量為1.0-5.0 ppb;肉品及內臟藥物殘留量檢出最低限量為2.0-12 ppb。

四、市售飼料及肉品、內臟檢樣之分析

市售飼料中包括大、小雞用飼料、豬用飼料和大、小鴨用飼料。而肉品包括雞肉、雞肝、豬肉和豬肝。

(一)雞用飼料之分析

以表1 HPLC條件2檢測五種廠牌之飼料(代號C, H, Fo, T, Fu),其結果如表四。其中C廠牌之小雞用飼料含有微量禁用藥物SMM與STA; T廠牌之大、小雞用飼料含有禁用之SMT, SMM與STA,可能是生產過程中交叉污染所致。而在H廠牌大、小雞用飼料及Fo廠牌小雞用飼料中皆含有禁用之四環黴素,添加量高達20-40 ppm之間。

Table 1. HPLC conditions for separation of sulfa drugs, tetracyclines and carbadox

Condition	Stationary phase	Mobile phase	Detection (nm)	Drug Separation
1	LiChrosorb RP-C ₁₈ 3 mm ID × 15 cm (15 μm)	0.1 M phosphate buffer in water- acetonitrile (95:5,v/v), pH 7.4, flow rate 0.5 ml/min	254	SDA,SMM,STA, SDM, SMT, SQO
2	Beckman & Altex Ultrasphere ODS (5μm) 4.6 mm ID × 25 cm	0.1 M phosphate buffer in water- acetonitrile (85:15, v/v), pH 6.8, flow rate 1.0 ml/min	254	SDA,SMM,STA, SMT,SQO,SDM
3	LiChrosorb RP-C ₁₈ 3 mm ID × 15 cm (15 μm)	0.001 M Na ₂ EDTA, 0.1 M diethanolamine, in water-isopropanol (93:7, v/v) adjusted to pH 7.3 with H ₃ PO ₄ , flow rate 0.5 ml/min	254	STA,SMT,TC, OTC,CTC, Carbadox
4	Alltech RP-C ₁₈ (5 μm) 4.6 mm ID × 25 cm	0.001 M Na ₂ EDTA, 0.05 M citric acid, 0.013 M sodium citrate, 0.1 M KNO ₃ in water-N,N- dimethylformamide (72:28, v/v), pH 3.0 flow rate 1.0 ml/min	280	STA,SMT, OTC,CTC Carbadox

Table 2. Recovery of sulfa drugs and tetracyclines in spiked feed samples

Drug	Range of Concentration (ppb)	Number of Replicate	Recovery (%) (Mean ± S.D.)	C.V. (%)
SDA	1.0-10	4	96.6 ± 2.1	2.2
SMM	2.0-20	4	96.8 ± 2.2	2.3
STA	2.5-25	4	95.3 ± 3.4	3.6
SMT	4.0-40	4	98.5 ± 0.9	0.9
SQO	2.5-25	4	91.3 ± 2.6	2.8
SDM	4.5-45	4	95.4 ± 3.1	3.3
OTC	1.0-10	4	93.2 ± 3.7	4.0
TC	1.0-10	4	90.3 ± 3.7	4.1
CTC	4.0-40	4	85.4 ± 3.9	4.6

(二)豬用飼料之分析

共檢測兩家廠牌Cy和Ch, 及M和D兩地區之豬用飼料, 除Ch外各取二個檢樣。分析結果如表五, 其中發現M地區出售之飼料含有禁用之SMM和SDM; 而D地區其中一個檢樣除了含有禁用之SMM和SDM外, 禁止添加之藥物SQO含量竟高達54 ppm, 其餘廠牌皆在安全範圍之內。至於四環素類之添加量, 所有檢樣均在許可範圍之內。典型豬

飼料檢液層析圖見圖十。

(三)鴨用及其他飼料之分析

鴨用飼料包括小鴨用(1)和肉鴨用(2)之D廠牌及F廠牌二個肉鴨用飼料檢樣。分析結果如表六, 其中D廠牌肉鴨用飼料含有禁用之SMT達13 ppm; 而F廠牌中有一個檢樣含有禁用之STA達9 ppm, 其餘皆符合規定。所有檢樣四環素類之添加皆未曾檢出。其他飼料原料如魚粉、米糠、玉米粉、

黃豆粉、麩皮及麥片各取一檢樣分析，結果皆未發現有任何磺胺劑或四環素類抗生素殘留。

(3)雞肉、雞肝之分析

雞肉、雞肝各取五個檢樣及一個冷凍雞肉檢樣。以表1 HPLC條件4檢測之，其分析結果如表七，其中四個雞肉檢樣只檢出微量之磺胺劑及四環素類抗生素，其殘留量皆在安全許可範圍內。五個雞肝檢樣皆未發現有任何藥物殘留。

(五)豬肉、豬肝之分析

豬肉及豬肝各取五個檢樣，其分析結果如表八。其中只有一種豬肉檢樣被檢出含有OTC 0.13 ppm，略高於0.1 ppm法定殘留量之規定，其餘檢樣

皆未曾檢出任何藥物之殘留。而豬肝中有兩個檢體被檢出含磺胺劑總量超過1 ppm，只比法定允許殘留量略高。典型豬肉檢液層析圖見圖十一。

以上(一)至(五)共有二十種飼料和二十一種肉品、內臟檢樣中皆未曾檢出卡巴得。

結 論

以高效液相層析法同時分析飼料及肉品中磺胺劑及四環素具有良好的直線性($r^2 > 0.99$)及再現性。本研究找出四種最佳分析條件分別為：一、用LiChrosorb RP-C₁₈分離管，以5%氰甲烷水溶液加

Table 3. Recovery of sulfa drugs and tetracyclines in spiked pork

Drug	Range of Concentration (ppb)	Number of Replicate	Recovery (%)	
			(Mean ± S.D.)	C.V. (%)
SMM	3.2-32	4	79.5 ± 7.3	9.2
SMT	6.4-64	4	79.1 ± 10.3	13.0
SQO	1.6-16	4	68.9 ± 5.8	8.4
SDM	1.6-16	4	81.1 ± 8.9	11.0
OTC	6.0-48	4	73.2 ± 6.2	8.5
TC	12-96	4	73.8 ± 7.8	10.6
CTC	8.0-64	4	75.6 ± 6.3	8.3

Table 4. Drug contents in chicken feeds by HPLC analysis

Drug	C		H		Fo		T		Fu
	1	2	1	2	1	2	1	2	2
(ppm) ^a									
SDA	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SMM	*2.8 ± 0.1	—	—	—	—	—	*2.8 ± 0.1	—	—
STA	*3.7 ± 0.2	—	—	—	—	—	*3.7 ± 0.1	—	—
SMT	—	—	—	—	—	—	—	*8.8 ± 0.1	—
SQO	—	105.0 ± 3.4	72.5 ± 1.5	30.1 ± 1.2	—	—	—	22.1 ± 0.7	26.6 ± 1.5
SDM	10.3 ± 0.2	—	—	—	—	6.3 ± 0.1	8.3 ± 0.1	18.3 ± 0.1	36.2 ± 1.6
OTC	—	—	32.3 ± 0.9	26.2 ± 0.6	—	—	—	28.8 ± 0.6	—
TC	—	—	*23.2 ± 0.5	*20.6 ± 0.8	*39.9 ± 0.4	—	—	—	—
CTC	—	—	134.9 ± 1.2	100.6 ± 1.4	40.2 ± 0.8	34.4 ± 0.7	83.3 ± 0.9	142.8 ± 1.4	—

1. Feed for chick.

2. Feed for chicken.

^a Mean ± S.D.

* Prohibited drugs found in feeds.

— Not detected

Table 5. Drug contents in pig feeds by HPLC analysis.

Drug	M ^a		D ^a		Cy ^a		Ch
	1	2	1	2	1	2	
(ppm) ^b							
SDA	—	—	—	—	—	—	—
SMM	*4.9±0.1	—	—	*3.7±0.1	—	—	—
STA	3.7±0.1	—	—	—	—	—	14.0±0.1
SMT	65.4±1.4	58.6±2.1	—	15.1±0.1	—	0.1	3.7±0.1
SQO	—	—	—	*53.6±0.4	—	—	—
SDM	*14.3±0.1	*8.3±0.1	—	*12.3±0.1	—	—	—
OTC	—	—	—	—	—	—	—
TC	—	—	—	—	—	—	—
CTC	—	—	—	42.3±0.4	113.8±1.7	212.3±4.3	147.5±1.5

^a Two feed samples were taken for analysis.
^b Mean±S.D.
* Prohibited drugs found in feeds.
—Not detected.

Table 6. Drug contents in duck feeds by HPLC analysis.

Drug	D		F	
	1 ^a	2 ^b	1	2
(ppm) ^c				
SDA	—	—	—	—
SMM	—	—	—	—
STA	—	—	—	*8.7±0.2
SMT	—	*12.6±0.4	—	—
SQO	41.4±0.2	19.8±0.2	—	—
SDM	46.1±2.3	8.3±0.2	—	—
OTC	—	—	—	—
TC	—	—	—	—
CTC	—	—	—	—

^a Feed for duckling.
^b Feed for duck.
^c Mean±S.D.
* Prohibited drugs found in feeds.
—Not detected.

0.1 M磷酸緩衝液(pH 7.4)為移動相,於UV 254nm 檢測之可同時分析 SDA, SMM, STA, SDM, SMT和SQO。二、用Ultrasphere ODS分離管,以15%氘甲烷水溶液加0.1 M磷酸緩衝液(pH 6.8)為移動相,於UV 254nm檢測之可同時分析SDA,

SMM, STA, SMT, SQO及SDM。三、用LiChroso-
rb RP-C₁₈分離管,以7%異丙醇水溶液內含0.001 M Na₂EDTA和0.1M二乙醇胺緩衝液(pH 7.3)為移動相,於UV 254nm檢測之可同時分析STA, SMT, 卡巴得,TC, OTC及CTC。四、用Alltech RP

Table 7. HPLC analysis of drug residue in chicken meat and liver.

Drug	Meat						Liver				
	1	2	3	4	5	frozen	1	2	3	4	5
(ppm) ^a											
SMM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SMT	—	0.02±0.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SQO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SDM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTC	—	0.33±0.04	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SQO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SQO	0.01±0.00	0.01±0.00	—	0.01±0.00	—	—	—	—	—	—	—

^a Mean±S.D.
—Not detected.

Table 8. HPLC analysis of drug residue in pork and pork liver

Drug	Pork					Liver				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
(ppm) ^a										
SMM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SMT	—	—	—	—	—	0.03±0.00	0.04±0.00	1.05±0.22	1.02±0.03	0.02±0.00
SQO	—	—	—	—	—	0.03±0.00	—	—	—	—
SDM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	0	0	0	0	0	0.06	0.04	*1.05	*1.02	0.02
OTC	—	*0.13±0.02	—	—	—	—	—	—	—	—
TC	—	—	—	—	—	0.16±0.04	—	—	0.20±0.04	—
CTC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

^a Mean±S.D.
* Exceed the maximum tolerance residual limit.
—Not detected.

-C₁₈分離管,以28%二甲基甲胺水溶液內含0.001M Na₂EDTA,0.0.5 M檸檬酸,0.013 M檸檬酸鈉和0.1M KNO₃緩衝液(pH 3.0)為移動相,於UV 280nm 檢測之可同時分析STA, SMT, OTC、卡巴得及CTC。
在廿種市售飼料檢樣和廿一種肉品、內臟檢樣中,磺胺劑之分析採第二條件,因其層析圖各成分

峰線尖銳,以峰線高比值來定量最為精確。而四環素類抗生素之定量採第三或第四條件,皆可獲得滿意之分析結果。一般而言,市售飼料對磺胺劑或四環素類之添加常有違禁或過量情事。而肉品、內臟中藥物殘留問題輕微,只有一、二件檢樣稍微超過法定容許量。從雞肉、雞肝檢樣中發現其藥物殘留最輕微,尤以雞肝最乾淨,未檢出任何磺胺劑或四

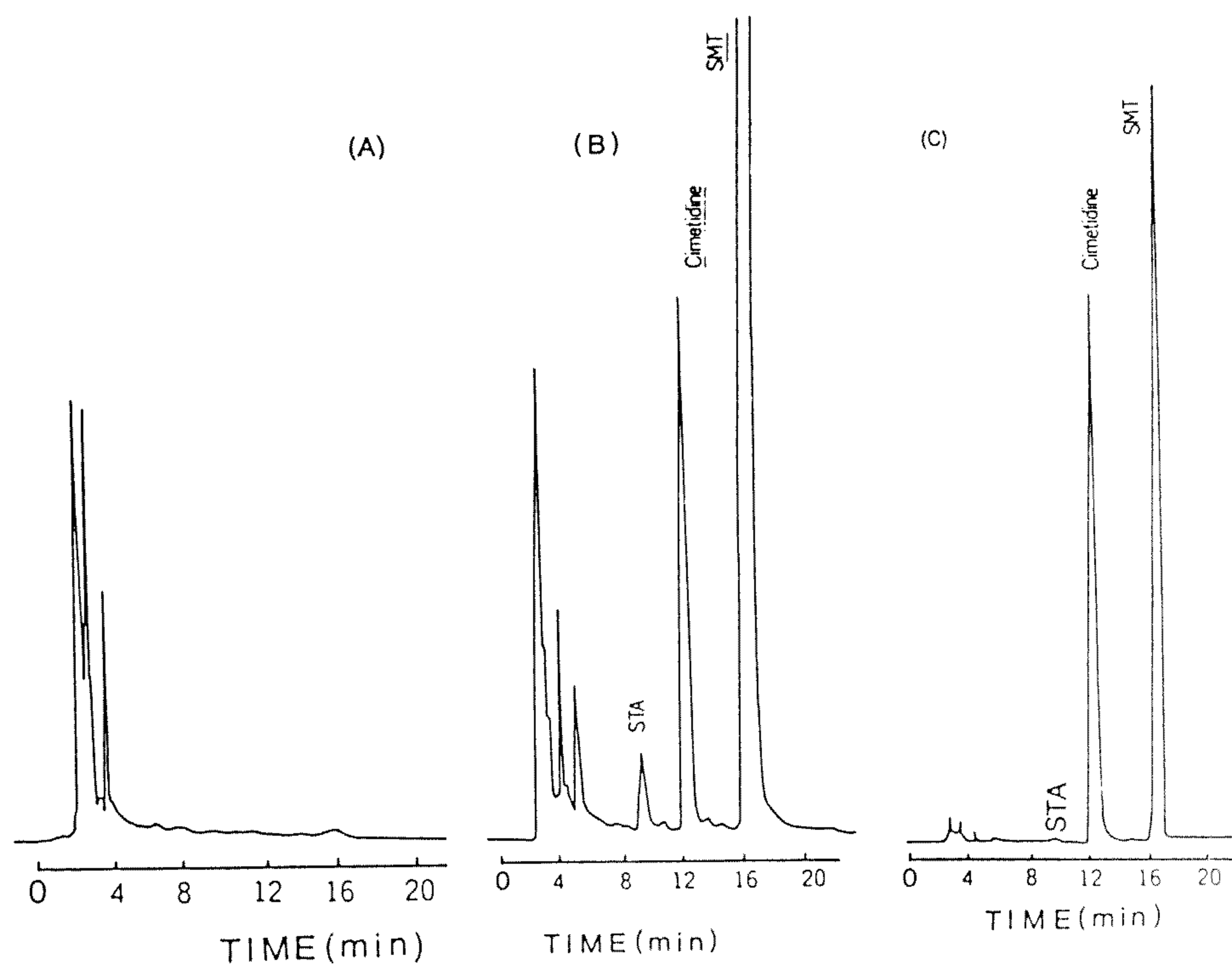


Figure 10. HPLC chromatogram of a pig feed sample which contains STA and SMT. Analyzed by Method 9.(1)
 (A) Blank feed (B) Feed sample (STA & SMT) (10 g) (C) Diluted feed sample (500 mg)

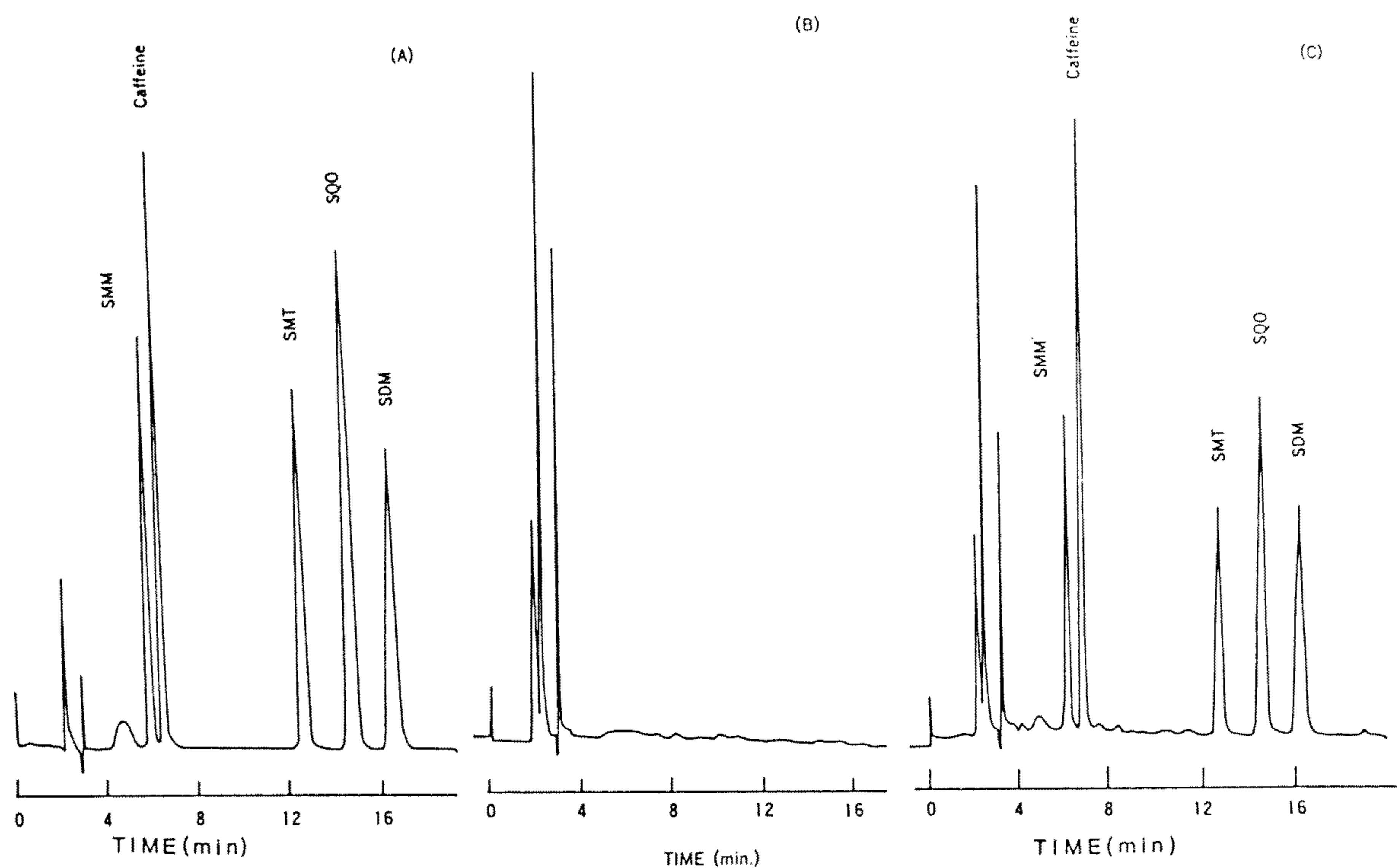


Figure 11. HPLC chromatogram of the pork extract. Analyzed by Method 9.(1)
 (A) Standards [SMM, IS (caffeine), SMT, SQO, SDM] concentration : 0.2 ppm- 0.8 ppm (B) Blank sample
 (C) Sample spiked with standards (0.2 ppm- 0.8 ppm)

環素類抗生素。

參考文獻

1. 李新進. 1983. 動物用藥品, 殘留問題專輯. 台灣區動物用藥品工業同業公會. 台北.
2. Holmberg, S.D., Osterholm M.T., Senger K. A. and Cohen M. L. 1984. Drug-resistant *Salmonella* from animals feed antimicrobials, *New Engl. J. Med.* 311(10) : 617.
3. 行政院農業委員會. 1985. 飼料添加物使用規範. 行政院農業委員會 74.10.9. 農牧字第 65041 號公告.
4. 駱宜宏, 郭宏亮. 1985. 食用禽肉藥物污染及其內臟殘餘藥物之檢驗. *公共衛生*. 12(2) : 261.
5. 行政院衛生署. 1987. 動物用藥殘留標準. 衛署食處字第 658449 號公告.
6. 陳玉敏. 1988. 以高效液相層析法分析飼料和肉品中之磺胺劑與四環素類抗生素. 台北醫學院碩士論文.
7. A.O.A.C. 1980. Official method of analysis, 13th edition. Drugs in feeds. Turbidimetric method. p. 723.
8. Kram, T.C. 1972. Separation of sulfa drugs by high speed liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* 61(2) : 254.
9. Oka, H., Matsumoto, H., Uno, K., Harada, K., Kadowaki, S. and Suzuki, M. 1985. Improvement of chemical analysis of antibiotics. VIII. Application of prepacked C_{18} cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver. *J. Chromatogr.* 325(1) : 265.
10. Agarwal, V.K. 1992. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. *J. Chromatogr.* 624(1-2) : 411.
11. Guggisberg, D., Mooser, A.E. and Koch H. 1992. Methods for the determination of sulfonamides in meat. *J. Chromatogr.* 624(1-2) : 425.
12. Kramer-Horaczynska F. 1991. High-performance liquid chromatographic procedures for the quantitative analysis of 15 tetracycline derivatives in small blood samples. *J. Chromatogr. Sci.* 29(3) : 107.
13. Knox, J.H. and Jurand, J. 1979. Mechanism of reverse-phase separation of tetracyclines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 186 : 763.
14. Nelis, H.J.C.F. and De Leenheer, A.P. 1980. Retention mechanisms of tetracyclines on a C_8 reversed-phase material. *J. Chromatogr.* 195 : 35.
15. Howell, H.R., Rhodig, L.L. and Sigler, A.D. 1984. Liquid chromatographic determination of chlortetracycline in premixes. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67(3) : 572.
16. Ikai, Y., Oka, H., Kawamura, N., Yamada, M., Harada, K. and Suzuki, M. 1987. Improvement of chemical analysis of antibiotics. XIII. Systematic simultaneous analysis of residual tetracyclines in animal tissues using thin-layer and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 411 : 313.
17. Chappell, G.S. and Houghlum, J.E. and Kelley, W.N. 1986. Determination of oxytetracycline in premixes and veterinary products by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69(1) : 28.
18. Stringham, R.W., Mundell, E.C. and Smallidge, R.L. Jr. 1982. Use of post-column derivatization in liquid chromatographic determination of sulfamethazine and sulfathiazole in feeds and feed premixes. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65(4) : 823.
19. Nagata, T. and Saeki, M. 1988. Simultaneous determination of 17 antibacterials in chicken tissues by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc., Japan.* 29(1) : 13.

Simultaneous Determination of Sulfa Drugs and Tetracyclines in Feeds and Animal Tissues by High-Performance Liquid Chromatography

AN-BANG WU, YU-MINN CHEN, KONG-KO LEE AND CHAU-YANG CHEN

*Graduate institute of Pharmaceutical Sciences,
Taipei Medical College, Taipei, Taiwan 110, R.O.C.*

ABSTRACT

This study aimed to develop a high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of six sulfa drugs, three tetracycline antibiotics and carbadox in feeds and animal tissues. Four successful conditions were established : 1. On LiChrosorb RP-C₁₈ column with water : acetonitrile (95:5, v/v) as mobile phase and UV detector at 254nm to separate SDA, SMM, STA, SDM, SMT and SQO. 2. On Ultrasphere ODS Column with water : acetonitrile (85:15, v/v) as mobile phase and detected at UV 254nm to separate SDA, SMM, STA, SMT, SQO and SDM. 3. On LiChrosorb RP-C₁₈ column with water: isopropanol (93:7, v/v) as mobile phase and detected at UV 254nm

to separate STA, SMT, Carbadox, TC, OTC and CTC. 4. On Alltech RP-C₁₈ column with water: dimethylformamide (72:28, v/v) as mobile phase and detected at UV 280nm to separate STA, SMT, OTC, Carbadox and CTC. The recoveries of the drugs in feeds were between 85-99%; in animal tissues, 69-80%. Eleven out of 20 feed samples were found with prohibited sulfa drugs or tetracyclines added. One pork sample with OTC residue and two pig liver samples with total sulfa drugs residue exceeding the maximum tolerance limits were detected from the 21 meat samples analyzed. The lowest detection limits of residual drugs were between 1.0-5.0 ppb in feeds; 2.0-12 ppb in animal tissues.

Key Words : Sulfa drugs, Tetracyclines, Feeds, HPLC.