



1998

Development of a high performance liquid chromatographic method for detection of sulfonamide residues in egg

Follow this and additional works at: <https://www.jfda-online.com/journal>

Recommended Citation

Tsai, S.-C.; Rau, Y.-H.; Hsu, S.-C.; Chou, C.-C.; and Fu, W. (1998) "Development of a high performance liquid chromatographic method for detection of sulfonamide residues in egg," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 6 : Iss. 2 , Article 3.

Available at: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2906>

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.

蛋中殘留磺胺劑高效能液相層析法之建立

蔡舒琪* 饒瑩華 徐素茜 仇志強 傅偉光

食品工業發展研究所

摘 要

本研究已建立快速精確分析蛋中三種磺胺劑，磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine, SMT)、磺胺一甲氧嘧啶(Sulfamonomethoxine, SMM)與磺胺二甲氧嘧啶(Sulfadimethoxine, SDM)之高效能液相層析分析法。檢驗方法是利用丙酮與二氯甲烷萃取生蛋，檢液以低流速經矽膠匣(silica cartridge)與C₁₈匣(C₁₈ cartridge)濃縮淨化，然後再配合高效能液相層析儀進行定量分析。添加標準品濃度由0.1至1 ppm於蛋中之結果其回收率均達90%以上，同時針對市售洗選蛋作磺胺劑殘留之調查，共計150件，結果有兩件磺胺劑殘留超量之情形發生。

關鍵詞：磺胺劑，磺胺二甲嘧啶，磺胺一甲氧嘧啶，磺胺二甲氧嘧啶，蛋，高效能液相層析法，矽膠匣，C₁₈匣。

前 言

磺胺劑一直普遍使用於家畜、禽的飼料中，作為飼料添加劑，以促進家畜、禽之生長及預防疾病之發生。國內養豬業所使用之磺胺劑種類主要有三種，以SMT之使用最為廣泛，約佔90%，而SMM與SDM則各佔5%左右⁽¹⁾。常見磺胺劑的分析方法很多，計有比色法(colorimetric method)⁽²⁾、生物測定法(bioassay)、酵素連接免疫吸附測定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^(3,4)、薄層層析法(thin layer chromatographic method, TLC)⁽⁵⁾、氣相層析法(gas chromatographic method, GC)⁽⁶⁾、高效能液相層析法(high performance liquid chromatographic method, HPLC)^(1,7-13)等。其中有的因易受背景干擾如比色法、有的因時效太慢如生物測定法或僅能判定SMT之ELISA法，故測定仍有所限制。至於TLC法雖然測定快速，但常有基質干擾及誤判的問題，一般多用來作定性或半定量。由於過量磺胺劑可能會造成人體之不適感，引發過敏，甚至可能會導致甲狀腺

癌⁽¹⁴⁾，故正確檢測出食品中磺胺劑之殘留量實為重要。由於目前官方並無公告方法，加上蛋品中基質之複雜而多數文獻所發表之方法卻只適用於豬肉、雞肉等，導致影響分析結果之準確性。故本研究擬找尋蛋中可能干擾磺胺劑在測定時之基質，將之移除，以建立蛋樣品之淨化前處理程序，再藉高效能液相層析儀進行定量檢測，以提高蛋中磺胺劑分析之準確性。

鑑於行政院衛生署於民國76年4月公告的"動物用藥殘留標準"⁽¹⁵⁾中規定蛋中磺胺劑殘留濃度之許可量為0.1 ppm，故本研究除了對所建立之高效能液相層析法之適用範圍進行回收率測試的評估試驗，同時亦針對市售洗選蛋之磺胺劑殘留情形進行調查。

材料與方法

一、材料

(一)樣品

生蛋去殼，經均質後即為檢體。

(二) 磺胺劑標準溶液配製

1. 原液：取 Sulfamethazine (SMT, Sigma s-6256)、Sulfamonomethoxine (SMM, Sigma s-0508)、Sulfadimethoxine (SDM, Sigma s-7007) 各 0.1 g，溶於甲醇中並定量至 100 ml，是為濃度 1000 ppm 的標準原液。

2. 中間液：取 1 ml 原液於 100 ml 定量瓶中，加入 HPLC 用之移動相溶液並定量之，是為濃度 10 ppm 的標準溶液。再取 10 ppm 之標準溶液 5 ml 於 50 ml 定量瓶中，亦以移動相溶液定量，是為濃度 1 ppm 的中間液。

3. 操作液：分別取濃度 1 ppm 之中間液 0.5、1、2、4、6、8 ml 於 10 ml 之定量瓶中，加入移動相溶液並定量之，為上機用之標準液濃度。

4. TLC 用標準溶液 (0.1 ppm)：取 0.2 ml 原液於 20 ml 定量瓶中，加入甲醇並定量之，是為濃度 10 ppm 的標準溶液。再取 10 ppm 的標準溶液 1 ml 於 10 ml 定量瓶中，加入甲醇並定量之是為濃度 1 ppm 的標準溶液。同法再稀釋 10 倍即為點 TLC 用之 0.1 ppm 之標準溶液。

二、方法

(一) 定性試驗

1. 萃取

取生蛋 4 g 於 50 ml 塑膠離心管中，加入 0.01 N 硫酸 25 ml 及 1 ml 氯仿以手先行搖勻，再用振盪器振盪 10 分鐘，並經離心力 (RCF) 為 $978 \times g$ 離心 10 分鐘後，將上層液倒出。

將 25 ml 氯仿倒入澄清液中同樣萃取 10 分鐘，經 RCF = $978 \times g$ 離心 10 分鐘後，保留氯仿層。水層則以同法再萃取一次，合併氯仿層，倒入適量無水硫酸鈉以去除水分，以濾紙過濾。

濾液置於 40 °C 以下之水浴，減壓濃縮至乾，以 0.4 ml 甲醇定容之，是為檢液。取檢液 40 μ l，將之注於 TLC 板 (MERCK cat.5583) 中，亦取 0.1 ppm 標準品 20 μ l 注於 TLC 板中。

2. TLC 測定

用少許展開液 (異丁醇/氯仿比例為 15:85 v/v) 將展開槽潤濕清洗後，倒入展開液並使之在槽內平衡 30 分鐘以上。迅速將 TLC 板放入展開槽，展開至高度 10 公分以上，取出 TLC 板，待乾。

噴上螢光呈色劑 (0.01% fluorescamine 丙酮溶液)，待乾。在黑暗處以波長 366 nm 之 UV 燈照射，若結果呈現黃綠色螢光斑點之正反應且 Rf 值與標準品相近，則初步判定含有磺胺劑並進行定量分析。

(二) 定量分析

1. 萃取

取生蛋 1.2 g 於 50 ml 塑膠離心管中，加入丙酮 30 ml 並以手先行搖勻後，再放入超音波振盪器 (Elma transsonic tp690) 內，振盪 10 分鐘，經 RCF = $978 \times g$ 離心 10 分鐘後，將上層液倒入 250 ml 濃縮瓶中，如此重覆萃取兩次。合併萃取液，將其置於 40 °C 以下之水浴，減壓濃縮至乾，並迅速以二氯甲烷 40 ml 溶洗，經 Whatman No.1 濾紙過濾，再加入 13.5 ml 石油醚混合均勻，進行淨化濃縮。另一組僅以二氯甲烷 30 ml 萃取三次，經 Whatman No.1 濾紙過濾，加入 30 ml 石油醚，混合均勻後進行淨化濃縮。

2. 淨化與濃縮

將矽膠匣 (Waters WAT020520) 之上端銜接 25 ml 之針筒，下端接真空抽氣槽 (Supelco visiprep 24 DL™)，取 5 ml 二氯甲烷倒入針筒內並調整二氯甲烷的流速至 2 ml/min，待該液將流盡時倒入萃取液，以同樣的流速通過矽膠匣。待萃取液流乾後再取下矽膠匣並以氮氣吹乾。

在矽膠匣下端接上 C₁₈ 匣 (Waters WAT020515；保持於 pH 7 之 0.25 M 磷酸二氫鉀緩衝液中)，用 pH 10 之 0.25 M 磷酸氫二鉀緩衝液 10 ml 以流速 1 ml/min 將矽膠匣上之磺胺劑溶離出來，並利用 C₁₈ 匣進行捕捉。

取下 C₁₈ 匣，以氮氣吹乾，用 5 ml 甲醇將磺胺劑由 C₁₈ 匣上溶洗入 10 ml 小試管中，再以氮氣吹乾甲醇並迅速加入 1 ml 移動相，將小試管置於振盪器上振盪以便使磺胺劑溶解後，用孔徑為 0.45 μ m 之濾膜過濾即為檢液。

3. 分析

檢液經高效能液相層析儀分析；所使用之偵測器為 Waters 490E multiwavelength detector，測定波長為 267 nm；幫浦之機型為 Waters 510，移動相比例 H₂O (pH 3.6)/CH₃CN 為 80:20 (v/v) 且分析時流速設定在 1 ml/min，並使用 Waters u-Bondapak™ C₁₈ (10 μ m, 30 cm x 3.9 mm

I.D.)管柱進行分析。

(三)回收率試驗及比例誤差之探討

取不含磺胺劑之生蛋約 1.2 g 於 50 ml 塑膠離心管,分別添加 0.1、0.5、0.8 及 1 ppm 之 SMT、SMM 及 SDM 標準溶液 1 ml 並使之吸收 10~20 分鐘,同時作空白試驗,依方法(二)處理。

結果與討論

一、TLC 分離磺胺劑之效果

三種磺胺劑在 TLC 板上以異丁醇:氯仿=15/85(v/v)展開 10 公分以上(費時 70 分鐘)之 R_f 值分別為 SMT=0.75、SMM=0.66 與 SDM=0.91,顯示三種磺胺劑分離良好。

利用 TLC 篩選樣品是否含有磺胺劑,乃是依照樣品在 TLC 板是否產生黃綠色螢光斑點之正反應且 R_f 值是否與標準品相同,若符合以上二條件則初步判定含有磺胺劑並進行定量分析。

利用 TLC 先行作樣品之篩選好處甚多,除了一次可分析多件樣品之外,最大的優點為分析十分快速,可於數小時內得到結果且費用低廉。惟單靠 TLC 圖譜來判定磺胺劑種類時常會有失誤,原因乃是磺胺劑種類繁多且性質相近,如 SMM 與磺醯胺嘧啶(Sulfadiazine)、磺胺甲基嘧啶(Sulfamerzine)及 SMT 與磺胺喹噁啉(Sulfaquinoxaline)之 R_f 值十分相近,經常造成判定上之誤差。此外,若樣品中含有其他一級胺基之抗菌物質,亦會對結果產生干擾。故當測試結果顯示樣品中可能含有某種磺胺劑時,仍應以 HPLC 分析結果為準。

當 TLC 板上注入磺胺劑的量到達 2 ng 時(相當於 0.1 ppm 標準品 20 μl) 有明顯螢光反應,即檢品中所含各種磺胺劑之濃度達 0.005 ppm 時,即可由 TLC 法篩選出。

二、HPLC 定量磺胺劑之效果

本實驗以各含 0.05 ppm、0.1 ppm、0.2 ppm、0.4 ppm、0.6 ppm、0.8 ppm 及 1 ppm 七種濃度之 SMT、SMM 與 SDM 之混合標準液做檢量線,並以各濃度於波長 267 nm 下所產生之吸光程度作迴歸分析,結果線性關係十分良

好, R² 分別為 SMT=0.9999、SMM=0.9999 與 SDM=0.9996,如圖一。且系統十分穩定,同一濃度做五次分析所產生波峰高度變化之 C.V. 值為 SMT<0.15、SMM<1.26 與 SDM<0.39,顯

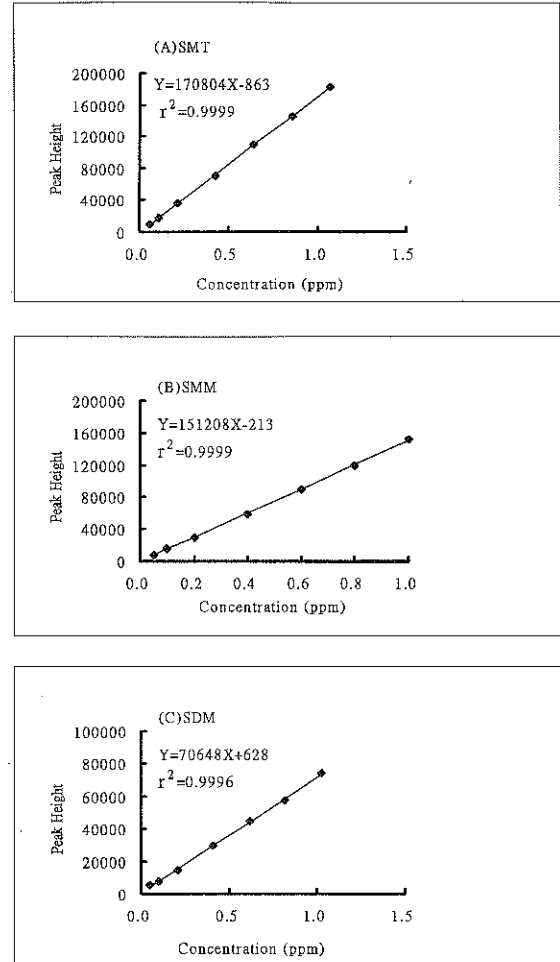


Figure 1. Standard curves of (A) SMT (B) SMM (C) SDM.

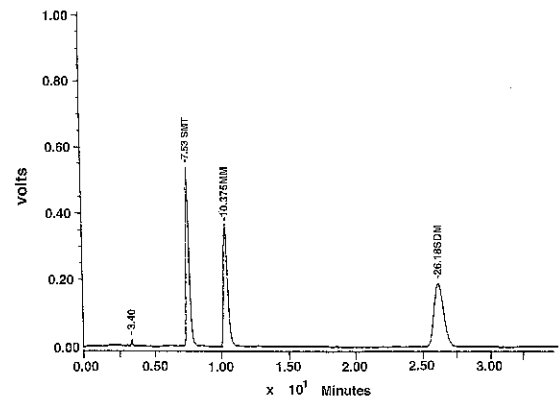


Figure 2. Chromatogram of SMT、SMM and SDM.

示此範圍內可對樣品作正確定量。標準品之層析圖如圖二。

利用丙酮與二氯甲烷萃取生蛋，同時經過矽膠匣、C₁₈匣濃縮淨化，結果發現無論是SMT、SMM、SDM所得的回收率均達90%以上(表一及圖三(A))。空白試驗的結果亦顯示蛋基質不會造成干擾(圖三(B))。此外若單以二氯甲烷對生蛋作萃取，則添加標準品1 ppm之回收率僅為SMT= 92%、SMM= 30%與SDM=

85%。

三、市售洗選蛋含磺胺劑之調查

針對市售洗選蛋作調查，結果發現15次採樣150件檢品中，有75件樣品含有磺胺劑，顯示蛋品中出現磺胺劑殘留之情形非常普遍，而其中又有二件超出法規標準，分別為含SMT 0.056 ppm、SDM 0.205 ppm與SMM 0.171 ppm。

四、萃取最適pH值與萃取溶劑之探討

探討不同pH值對萃取結果之影響，結果發現SMT較不受pH值變化之影響，在大範圍的pH值變動(4.5~10)下回收率仍維持於88~97%之間。SMM則於酸至中性(pH 4.5~8)時回收率仍可維持在80%以上，而當pH 10時回

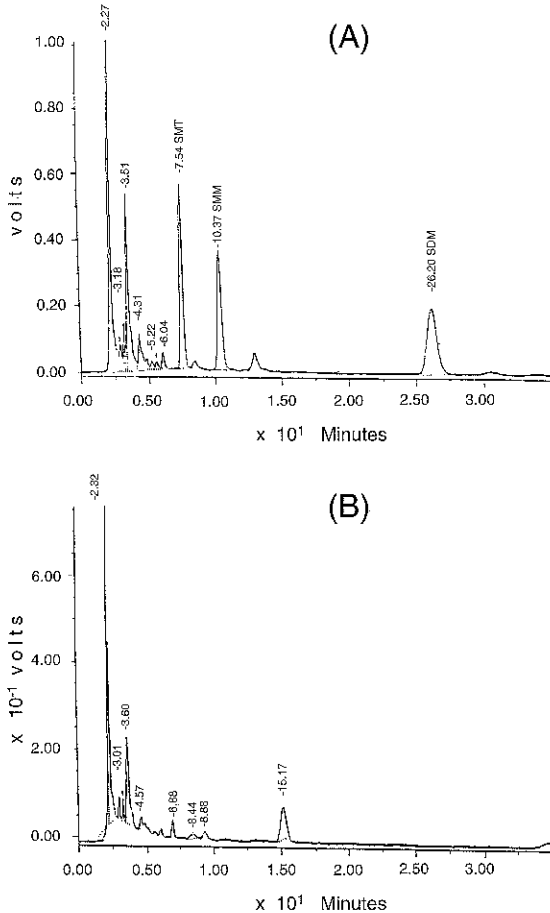


Figure 3. Chromatogram of egg sample with (A) and without (B) sulfonamide contamination.

Table 1. The recoveries of eggs spiked with various concentrations of SMT、SMM and SDM

Concentrationn (ppm)	SMT (%)	SMM (%)	SDM (%)
0.1	96.69	103.3	97.64
0.5	92.00	95.93	95.03
0.8	98.27	99.57	98.05
1.0	99.17	99.10	98.62

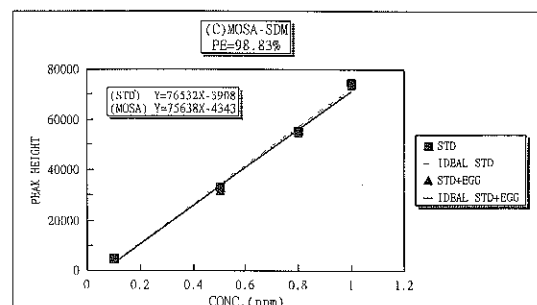
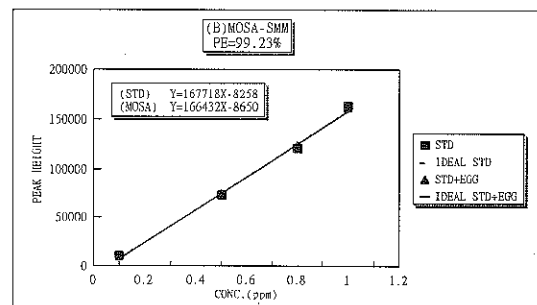
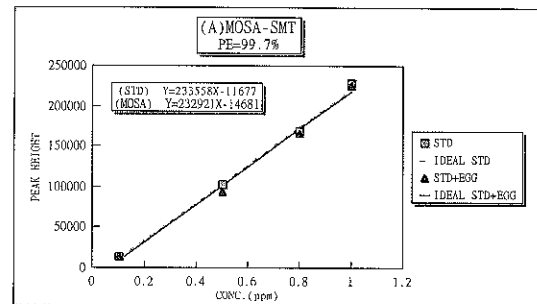


Figure 4. Proportional errors of (A) SMT (B) SMM (C) SDM in egg matrix.

收率驟降至60%。SDM則在較高pH值和低pH值時回收率均不佳，惟pH值維持在7~8時回收率始可達80%以上。由此可知欲同時分析三種磺胺劑時，pH值應選定在7~8之間。而蛋品本身之pH值約在7.3~7.5之間，已為最適當之萃取pH值範圍。

探討不同溶劑丙酮與二氯甲烷或單以二氯甲烷對生蛋之萃取效率。由先前回收率之結果得知，三種磺胺劑中以SMM的差異最大。其原因可能是來自於蛋中卵磷脂之干擾，而丙酮則是去除卵磷脂之最佳溶劑。

五、固相吸附淨化程序與回收率之討論

傳統之淨化程序多利用液相-液相分配率之原理，不但使用之溶劑量較多，而且容易有乳化現象之產生（當檢品為蛋時，乳化現象更嚴重且不易消除），費時甚鉅。使用固相吸附淨化程序時，不但用兩種極性之萃取匣淨化，使得淨化作用更完全之外，在淨化程序進行的同時亦隨著濃縮作用，免除傳統方法中蒸發濃縮大量萃取液之不便。

研究中發現當選擇了適當的萃取溶劑丙酮與二氯甲烷後仍有回收率不甚理想之狀況出現，探究原因發現利用萃取匣捕捉磺胺劑時，流速亦為重要關鍵。依照文獻之操作條件，萃取液通過矽膠匣之流速約為10-20 ml/min，而通過C₁₈匣之流速則約為4 ml/min，顯然地此條件並不適用於生蛋樣品。若將萃取液通過矽膠匣之流速調整至2 ml/min而通過C₁₈匣之流速減為1 ml/min時則SMT、SMM與SDM所得的回收率均達90%以上。推究其原因可能是文獻中之檢體為豬肉，不似生蛋複雜，磺胺劑之捕捉容易，故可利用較高流速進行。當檢體為生蛋時雖以相同條件卻無法得到相同結果，尤其是檢液通過C₁₈匣時體積僅有10 ml，其所含磺胺劑之濃度相對提高，故更須以低流速進行始可提高回收率。

所謂比例誤差(proportional error, 簡稱PE)乃是評估分析系統中檢液干擾程度之參考。實驗方法是於相同重量之樣品中添加不同濃度之標準品，須作四個濃度，最終濃度須落於標準曲線之內。將標準品於檢液中所產生標準曲線之斜率與純標準品之斜率相比較，所得的結果即稱為PE。當PE值愈接近100%時表示兩者之斜率愈接近，意即分析方法愈不受樣品之干擾。從分析結果得知三種磺胺劑之比例

誤差分別為SMT= 99.7%、SMM= 99.2%與SDM= 98.8% (見圖四)，由於其比例誤差在98.8-99.7%，相當接近100%，表示此法受檢液干擾程度很低，是故本法極適合蛋品中磺胺劑之分析。

謝 誌

感謝本所同仁陳正敏協助取樣，及化學分析單元相關同仁之參與。

參考文獻

1. Su, F. T. 1991. Studies on the analysis of sulfonamide residues in meats. In " Report Collections of 1991 Science and Technology Symposium of Testings for Food Sanitation". pp. 17-39. National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan.
2. Schwartz, D. P. 1985. Quantitative colorimetric method for sulfamethazine in swine feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68: 214-217.
3. Dixon-Holland, D. E. and Katz, S. E. 1988. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 1137-1140.
4. Dixon-Holland, D. E. and Katz, S. E. 1991. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent screening assay for detection of sulfamethazine contamination in swine urine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 784-789.
5. Neidert, E., Baraniak, Z. and Sauve, A. 1986. Rapid quantitative thin layer chromatographic screening procedure for sulfathiazole residues in honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 641-643.
6. Takatsuki, K. and Kikuchi, T. 1990. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of six sulfonamide residues in egg and animal tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73: 886-892.
7. Bui, L. V. 1993. Liquid chromatographic determination of six sulfonamide residues in animal tissues using postcolumn derivatiza-

- tion. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 76: 966-982.
8. Seymour, D. and Rupe, B. D. 1980. High-pressure liquid chromatographic determination of sulfamethazine residues in beef tissues. J. Pharm. Sci. 69: 701-703.
 9. Horie, M., Saito, K. and Nose, N. 1992. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. J. AOAC Inter. 75: 786-789.
 10. Carignan, G. and Carrier, K. 1991. Quantitation and confirmation of sulfamethazine residues in swine muscle and liver by LC and GC/MS. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74: 479-482.
 11. Hori, Y. 1983. Systematic analysis of synthetic antibacterials in chicken muscles and eggs by high performance liquid chromatography. J. Food Hyg. Soc. Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi) 24: 447-453.
 12. Chang, C. R., Cheng, K. H. and Liou, K. Y. 1980. Studies on a rapid analytical method of residuary sulfa in pork. Annual Scientific Report of Bureau of Commodity Inspection Quarantine, Ministry of Economic Affairs, Executive Yuan. No. P78-CC-002.
 13. Cheng, H. C. 1988. Various analysis techniques of sulfamethazine residues in pork. Meat Today 10: 14-17.
 14. Cheng, H. C. 1988. Activities on drugs residues prevention of pork. Meat Today 11:2-4.
 15. Department of Health, Executive Yuan. 1987. Tolerances for Residues of Animal Drugs Announcement. No.658449.

Development of a High Performance Liquid Chromatographic Method for Detection of Sulfonamide Residues in Egg

SHU-CHI TSAI*, YUNG-HWA RAU, SU-CHIEN HSU, CHI-CHANG CHOU AND WEIGUANG FU

Food Industry Research & Development Institute, Hsinchu, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

A rapid and precise method was developed for detection of three sulfonamide compounds (SMT, SMM and SDM) by using high performance liquid chromatography (HPLC). Egg samples were extracted with acetone and dichloromethane solvent. The extract was then cleaned up and concentrated by a silica cartridge and a C₁₈ cartridge with low flow rates before being subjected to HPLC analysis. Recoveries for spiked egg samples were above 90% for all three specific sulfonamide compounds. When the method was applied to 150 commercial egg samples, only two samples were detected with sulfonamide residue concentrations over 0.1 ppm.

Key words : sulfonamide, sulfadrag, sulfamethazine, sulfamonomethoxin, sulfadimethoxine, egg, HPLC, silica cartridge, C₁₈ cartridge.