

飼料添加物檢驗法—卡巴得（Carbadox） 定性試驗研究

李新進 詹益波 楊揚輝

飼料添加特卡巴得在我國國家標準中尚無定性測定法，本法在 AOAC 亦未見到。今筆者等以TLC做定性測定，以Silica gel HF 254做吸着劑，使用丙酮為溶劑，以氯仿乙醇（90：10 v/v）做展開液，並以螢光燈來檢測卡巴得之存在，其 Rf值約0.77。適用範圍，飼料中含卡巴得10PPM以上，檢上出率近100%。本方法已被我國國家標準局審查通過採用。

緒 言

本所自民國六十九年開始，辦理農林廳檢送飼料中卡巴得之檢驗，卡巴得是豬專用飼料添加物，並不使用於其他動物，因此本所應該只檢驗豬飼料即可，但農林廳所抽送飼料，不僅豬飼料，其他動物飼料也一起抽驗，要檢驗這些飼料是否含卡巴得，就非常困擾。因為檢驗方法是採用中國國家標準卡巴得之測定法⁽¹⁾，檢驗過程非常煩雜，同時也造成不必要之檢驗。如前述豬以外飼料照道理不添加卡巴得，當然不會含有卡巴得，但偶而也會檢出微量卡巴得，這是由於飼料廠在製造含藥物飼料時，混合槽清洗不乾淨或其他原因所造成污染所致，所以鷄鴨之飼料有時也會含有微量卡巴得。

鑑於上述困擾，以及連續二年之檢驗經驗，對於今後如何改進檢驗方法，以節省人力、時間，乃着手進行本項試驗。起先把廠商所提供檢驗卡巴得藥品之方法，加以整理研究，並將送檢飼料以傳統分析方法（化學方法、儀器方法）及薄層色層分析法，加以比較，經過半年多之努力，終於獲得一良好分析方法（TLC法）。謹將本方法報告如下：

試驗材料及方法

飼料：由農林廳畜牧科飼料股赴全省各地抽取市售各廠牌之配合飼料。

卡巴得標準品：由輝瑞大藥廠股份有限公司提供

矽膠玻璃片之製作：取矽膠 HF254 100gm，加入約 120ml 蒸餾水，攪拌均勻到約可流動之懸液，置入塗沫器，塗沫於玻璃片上，厚度約 0.25mm，置玻璃片於 105°C 烘箱中至乾燥為止（約 2 小時），取出置於乾燥器中。

試驗方法

標準液之配法：精確稱取 10mg 卡巴得標準品，置入 250ml 容量瓶，加入溶劑到 250ml，振搖使之溶解。

樣品液之配法：由磨碎之飼料，稱取 10 公克，放入有栓離心管，加入溶劑 15ml 攪拌約 1 分鐘，

項 目	A 法	B 法	C 法	D 法
吸 着 劑	矽膠HF254	矽膠 HF254	矽膠HF254	矽膠HF254
溶 劑	氯仿：甲醇 (3:1V/V)	丙酮	氯仿：甲酸 (4:1V/V)	二甲基醯胺
展 開 液	氯仿：甲醇：水 (89.9:10:0.1V/V)	氯仿：乙醇 (9:1V/V)	氯仿：丙酮：氫氧化鈉 (20:19:1V/V)	氯仿：氰化甲烷：甲酸 (90:5:5V/V)
展開點 (Rf值)	約0.3	約0.77	約0.2	約0.25

蓋栓，置離心機，以2,000RPM離心5分鐘，取上清液備用。

取玻璃片，置於滴定盤內，再以毛細管分別吸取卡巴得標準液及樣品液，依滴入盤內之號碼滴入玻璃片上，滴入量1 μ l，滴入方式：

標準液與樣品液交互間隔滴入。

取展開槽，槽上玻璃磨砂塗入凡士林，加入展開液200ml，輕取薄層色層玻璃片置入槽中，蓋上槽蓋。當玻璃片展開到約13cm高度，取出玻璃片，置於室溫使之乾燥。置玻璃片於螢光燈下使用波長254nm及376nm照射。

判定：在螢光燈下以波長376nm照射時，樣品液展開點與標準液展開點一樣高時，判定飼料中含卡巴得。樣品液之展開點不與標準液展開點一樣高或無展開點時判定飼料中不含卡巴得。

試驗結果

一、卡巴得藥品定性分析法，以化學方法分析時，取3mcg卡巴得加1N氫氧化鈉溶液1滴時，則呈橙紅色。

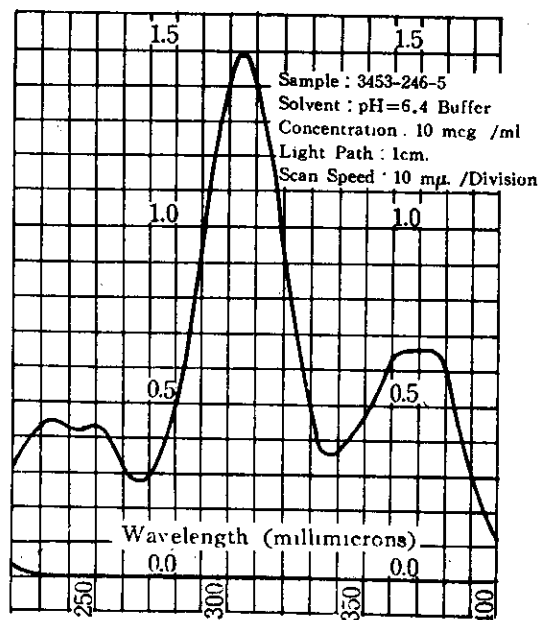


圖1. 卡巴得藥品以 PH6.4緩衝液稀釋後，以分光光度計測定在波長250nm, 303nm及370nm有極大吸光值，在265nm, 336nm有極小吸光值。

二、卡巴得藥品定性分析法，使用分光光度計分析時，以 0.1N 氫氧化鈉溶液溶解，再以 pH6.4 緩衝液稀釋到每 ml 含 10mcg 濃度時，在波長 250nm, 303nm 及 370nm 有極大吸光值，在 265nm, 336nm 有極小吸光值，如圖 1 所示。若以 0.1N 氫氧化鈉溶液溶解，再稀釋到每 ml 含 12.5mcg 濃度時，在波長 234nm, 314nm 及 345nm 有極大吸光值，在 266nm 有極小吸光值，如圖 2 所示。

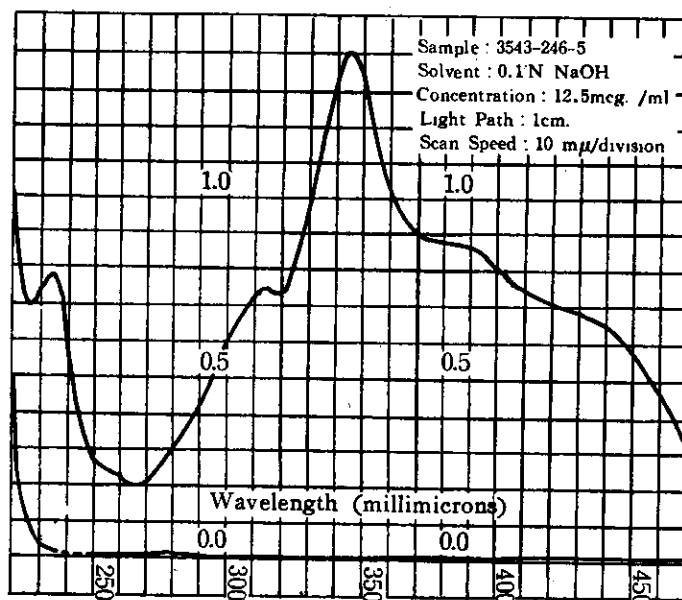


圖2. 卡巴得藥品以0.1N氫氧化鈉溶解並稀釋後，以分光光度計測定，在波長 234nm, 314nm 及 345nm 有極大吸光值，在 266nm 有極小吸光值。

三、含卡巴得之飼料添加物或藥品，以高壓液相層析儀分析時，用 95% 二甲基醯胺 (DMF) 抽出，通過三氧化二鋁層析管過濾其雜質後，以 1 μ l 之量打入高壓液相層析儀，以 20% 氰化甲烷 (acetonitrile) 溶液為移動相，以 C18 層析管分離，可清楚的鑑別其存在，其結果如圖 3。

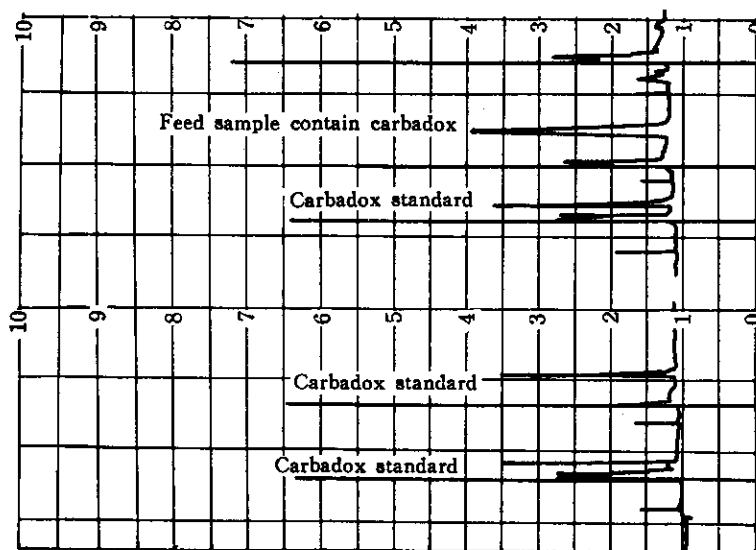


圖3. 含卡巴得飼料添加物，用二甲基醯胺抽出後再用三氧化二鋁層析管過濾其雜質，以高壓液相層析儀分析之圖形。

四、卡巴得飼料或藥品用薄層色層分析法 ((B法) 其清楚的鑑別其存在如圖 4 所示，其展開點 (Rf值) 為0.77，圖 5 所示是以A法所試驗之結果其展開點 (Rf值) 為0.3。



圖4. 卡巴得飼料添加物以丙酮做溶劑，以氯仿：乙醇 (9 : 1) 做展開液，展開後於室溫乾燥，用螢光燈使用波長376nm 照射，能清楚看到其展開點。展開值約 0.77。



圖5. 卡巴得飼料添加物以氯仿：甲醇 (3 : 1) 做溶劑，以氯仿：甲醇水 (89.9 : 10.1) 做展開液，於室溫乾燥後用螢光燈在波長376nm照射情形，展開值約0.3。

五、卡巴得飼料添加物用中國國家標準所公布之方法⁽¹⁾，檢驗時亦能準確的測出其含量，其結果如圖 6 所示。

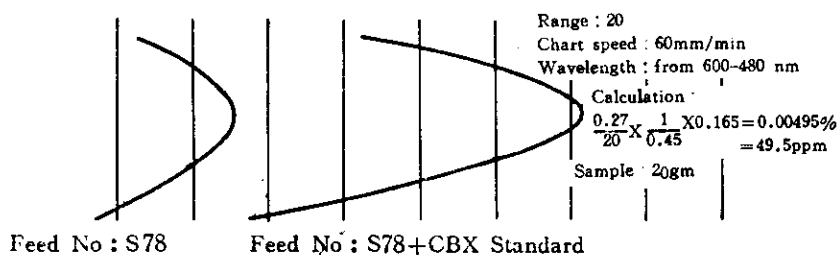


圖6. 卡巴得飼料添加物，用中國國家標準檢驗，用分光光度計測定之圖形，左邊之曲線是飼料含卡巴得之曲線，右邊為飼料加卡巴得標準品之曲線。

六、用A, B, C, D 四種方法，檢驗834件農林廳抽驗之飼料中，A法相出113件，B法檢出 115件，C法檢出108件，D法檢出110件，其中以 B法最敏感，再從 B法檢出之115件與高壓液相層析儀做對照試驗，結果有112件完全符合，其檢出率將近100%。

討 論

用薄層色層分析法 (TLC 法) 之原理, 是已溶於溶劑之檢體, 注入已塗沫吸着劑之玻璃片時, 檢體被吸附在吸着劑中, 當展開液上升之推移力, 要推移被吸附之檢體時, 由於物質結構之不同, 使產生之吸附力與推移力也不一樣, 故能分離出不同之物質。當物質相同時吸附力一樣, 被推移出來之物質就產生相同高度, 不同物質吸附力不一樣, 就產生不同高度, 利用此種原理可以鑑別分離許多複雜之混合物。

要鑑別飼料添加物, 用傳統分析方法 (化學方法或儀器法), 很難分析微量之添加物, 因用化學方法, 大都是使用呈色法或沈澱法來判定物質之存在, 飼料中成分非常複雜, 甚難以顏色或沈澱來辨別。以分光光度計方法來測定, 則容易受到飼料中之雜質干擾, 而影響固定波長之吸光。但若以高壓液相層析儀 (簡稱HPLC) 來分析, 那是最理想方法, 但必須找到適當之移動相及層析管來分離, 且HPLC所使用溶劑較多, 溶劑純度要高, 價格也貴, 檢驗時間也較長, 而用TLC法所使用溶劑較少, 普通溶劑價格也便宜, 檢驗時間短, 一次可同時檢驗許多件, 結果也很精確, 確定是一項簡便可行之方法。

以A, B, C, D四種TLC方法來做試驗, A法之甲醇, C法之甲酸及D法之氰化甲烷均是劇毒試藥, 且ACD法之展開點也較低, 較不易被檢出, 由試驗之結果得知, B法最敏感, 展開點也較高, 非常容易判定故選擇B法做為飼料添加物含卡巴得之測定方法。

使用 TLC 法來試驗時, 所塗沫矽膠HF254之玻璃片, 必須保持乾燥狀態才行, 若玻璃片已吸收水分而微潮濕, 必須從新經 105°C 乾燥後才可使用, 否則會造成誤差。

用本方法來檢驗飼料添加物, 適用範圍為飼料中含卡巴得10ppm以上, 檢出率將近100%。

本方法已於 72.3.14經經濟部中央標準局之審查通過而採用。

誌 謝

本試驗承蒙農林廳畜牧科飼料股全體同仁之協助、採樣與殷切之指導鼓勵, 併誌萬分謝忱。

參考文獻

1. 中國國家標準—飼料添加物檢驗法: 卡巴得之測定, 1982, 總號9314號類號
2. Determination of Carbadox by TLC in formulation No: 10-GTP-103 19973 Pfizer
3. Analysis method of Carbadox —AL ITALIA S. P. A.

Method to Test Food Additives—the Qualitative Method to Detect Carbadox

S J Lee. I P Chan. and Y H Yang.

A Method of Testing Food Additives:

The Qualitative Method to Detect Carbadox

Not until recently, has there been any method to detect carbadox qualitation in CNS. Even in AOAC, there is no description of a method associated with carbadox qualitation. In this study, the researchers employ thin-layer chromatography as a method to qualitate carbadox. With this method, silica gel HF254 is used as absorbing agent; aceton as solvent, chloroform: ethanol (9:1) as mobile phrase, and the carbadox is examined with fluorescent lights at the wavelength of 376nm. The Rf value of TLC is 0.77. The sensitivity of the method is 10ppm.