

雞肉組織中恩羅弗撒欣 (Enrofloxacin) 及歐弗撒欣 (Ofloxacin) 之殘留分析

許瑜芬* 龔培森 劉敏主 林士鈺

台灣省家畜衛生試驗所 動物用藥品檢定分所

摘要 以高效液相層析法同時檢測雞肉中 Enrofloxacin 及 Ofloxacin 之殘留。以 0.01 N 鹽酸—氫甲烷 (7 : 3 V/V) 及 SEP—PAK C18 萃取淨化，氮氣濃縮，高效液相層析儀：以 pH 3.0 磷酸緩衝液加氫甲烷 (80 : 20) 為移動相，用 Cosmosil 5C18-MS 分離管柱，螢光 EX 295 nm、EM 445 nm 波長檢測。各組織中添加 0.05 ppm 時，其回收率分別為 82.3~92.6 %。本方法於檢體中檢出之最低限量為 0.005 ppm。以本方法抽檢本省 7 個縣市市售雞肉樣品 112 件，經檢測結果顯示 Enrofloxacin 雞肉殘留之檢出陽性率 19.6 %，殘留量介於 0.095~0.005 ppm，Ofloxacin 雞肉殘留之檢出陽性率為 2.7 %，殘留量介於 0.099~0.017 ppm 之間。

關鍵詞：恩羅弗撒欣，歐弗撒欣，雞組織

緒 言

1980 年初期合成了 Norfloxacin 後，Quinolones 類藥物就進入第二代之之 Fluoroquinolones 時代。Fluoroquinolones 乃是在 4-quinoline 之結構上第六碳位置以 Flourine residues 及第七碳位置以 Piperazine 取代，將其與第一代之 Quinolones 相比較，第二代之 Fluoroquinolones 可快速吸收且在體內廣泛地分佈 (11)，因此廣用於家禽疾病之治療，特別是在禽類用來治療 G (+)、G (-) 及黴漿菌引起之感染症 (1, 4, 8, 9, 10)。惟如未依規定使用時，將造成藥物殘留問題影響公共衛生，遂著手從事目前國內常見之 Enrofloxacin 與 Ofloxacin 同時檢測之方法開發與調查，以提供農政單位施政之參考。

材料與方法

1. 儀 器

(1)均質機：Ystral GmbH D-7801 型

(2)離心機：Kobota 5100 型

(3)氮氣蒸發濃縮機：Zymark, Hopkinton, U. S. A

(4)可棄式玻璃試管：KIMAX 16 × 100 mm

(5)SEP—PAK C18 (Waters).

(6)高效液相層析儀：Hitachi 幫浦：L-6200 型，
檢測器：F-1050 型，記錄器：D-2500 型。
自動採樣注射器：Bio-Rad, AS-100 型。

2. 試 藥

標準品：Enrofloxacin (ERFX) 由拜耳提供，Ofloxacin (OFLX) 為第一製藥提供，氫甲烷、甲醇為層析級，三乙基胺，Ortho-85 %-Phosphoric acid, Hydrochloride 37 % 為分析級 (E. Merck 產品)，蒸餾水 (二次蒸餾)。

3. 標準溶液

精確稱取 ERFX 及 OFLX 標準品各 20 mg，以氫甲烷溶解配製成各 1000 μg/ml 之混合標準原液，置於 4 °C 保存，使用時以移動相稀釋成各濃度之標準溶液。

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

4. 標準曲線

取適當標準原液用移動相調配成含 0.02, 0.05, 0.1 及 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之不同濃度標準液, 各取 20 μl 注入高效液相層析儀 (HPLC) 中分析定量, 每一濃度作三重複, 就其濃度對波峰高直線迴歸分析法製作標準濃度曲線, 以推算各濃度。

5. 檢體前處理

雞肉、雞肝樣品先以均質機均質, 取均質後之雞肉、雞肝樣品 1 g 及血清 1 ml, 加 0.01 N 鹽酸一氟甲烷 (7:3 v/v) 5 ml 振盪 30 秒, 經離心 (3500 rpm, 10 分鐘), 取上清液通過預先以 20 ml 甲醇及 10 ml 水活化之 SEP-PAK C18, 先以 20 ml H_2O 沖洗, 再以 10 ml 甲醇溶出, 收集溶出液, 利用氮氣蒸乾, 殘渣以移動相 0.5 ml 經超音波振盪溶解, 過濾後取 20 μl 注入 HPLC 檢測。

6. 分析條件

- (1) 管柱: Cosmocil 5C18-MS. 4.6×250 mm。
- (2) pH 3.0 磷酸緩衝液: 1.7 ml 85 % phosphoric acid 加 950 ml 水, 以 Triethylamine 調 pH 至 3.0, 再加水至 1000 ml。
- (3) 移動相: pH 3.0 磷酸緩衝液: 氟甲烷 = 80:20。
- (4) 螢光檢測波長: EX 295 nm、EM 445 nm。
- (5) 流速: 0.8 ml/min。
- (6) 注入量: 20 μl 。

7. 回收率試驗:

取混合標準溶液加入不含 ERFX 及 OFLX 之空白雞組織中 (本分所 SPF 雞隻), 使其殘留量分別含有 0.05 ppm 再經上述前處理後, 各取 20 μl 注入 HPLC 分析之, 每一添加量各作三重複, 同時作空白試驗, 所得波峰高值再與標準檢量線比較, 換算回收率。

8. 檢體來源

赴北、中、南七個縣市, 購自傳統市場及生鮮超市之雞肉檢體共 112 件。

結 果

各種不同濃度 OFLX 及 ERFX 標準液, 依上

述之檢體前處理及分析條件注入 HPLC 所得之層析圖譜 (圖 1), 其滯留時間分別在 8.10 及 14.02 分左右, 當以螢光檢測器檢測時, 可檢測至 400 pg。兩者之標準液濃度對 HPLC 分析峰高值所得之迴歸直線方程式 OFLX $Y = -0.0240 + 75.5408 X$, 相關係數 (r) 為 0.9999, ERLX 為 $Y = 0.0612 + 51.5510 X$, 相關係數 (r) 為 0.9999。各組織中均添加 0.05 ppm 之分析物 (圖 2), 經本檢測方法檢測結果可得良好之回收率, 分別為 82.3~92.6 % (表 1), 在檢體中檢出之最低量為 0.005 ppm。赴本省七個縣市抽取 112 件樣品, 依本檢驗方法檢驗, 經檢驗結果顯示 (表 2), 陽性率為 22.3 %, ERFX 陽性率為 19.6 % (0.095~0.005 ppm), OFLX 陽性率為 2.7 % (0.099~0.017 ppm) (圖 3)。

討 論

ERFX 及 OFLX 之 UV 最大吸收光譜分別約在 280 及 300 nm, 欲同時檢測且得最佳結果時, 從實驗結果顯示選擇 290 nm 所得感度最佳, 但雞組織經本法前處理後, 在 UV-VIS 檢測器檢測下, 會有很多雜質在此波長被檢測出來, 干擾到分析物之檢測, 但選用螢光檢測器時, 將可排除檢測時之困擾, 同時提高了檢測之感度。

多數文獻均先以 0.2 % Meta-phosphoric acid-Acetonitrile 所組成之溶媒進行萃取淨化 [5, 6, 7]; 本研究以 0.01 N Hydrochloric acid 取代 0.2 % Meta-phosphoric acid 時, 雖不能完全地將干擾物去除, 但已不會干擾到分析物之檢測, 如此的一個酸性有機溶媒, 也可得到良好的效果。Quinolones 類藥物在逆相層析分析時, 波峰常有托尾現象, 此乃由於一般 C18 層析管內含有矽醇基和金屬不純物, 對於分析物有吸附親和作用, 本實驗如選用高純度之 C18 層析管 (2, 7) 及在移動相中添加少量之 Triethylamine 時可將此一問題克服。

市售雞肉藥物殘留陽性率偏高之原因是否與雞肉採集日期有關聯? 樣品於 85 年 12 月至 86 年 5 月分三批採集, 或許是否因冬季氣候關係養禽業者為了預防或治療 CRD、CCRD 等等慢性疾病, 使用本類藥物而忽視了 ERFX 及 OFLX 停藥期 (9 日及 7 日) (3) 之規定, 或應循之用法及用量。

本次檢測例只為 112 件, 是否具代表性, 乃需進一步探討, 建議有關單位繼續予以輔導追蹤, 監督取締, 提昇畜產品品質, 確保消費者健康。

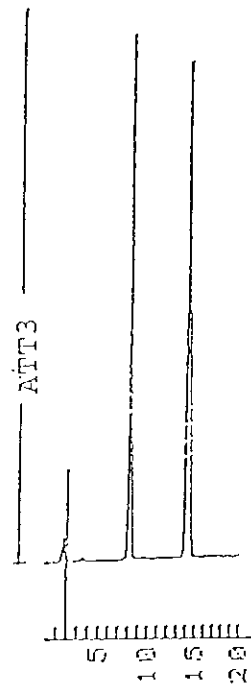


圖 1 OFLX 及 ERFX 標準品 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之層析圖，滯留時間分別為 8.10 及 14.02 分。

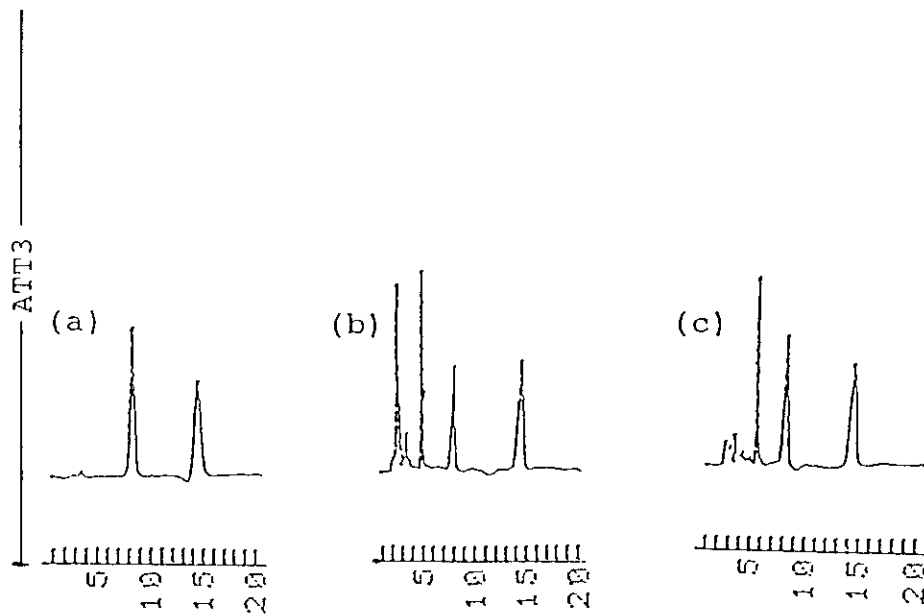


圖 2 (a) 雞血清，(b) 雞肝，(c) 雞肉各添加 OFLX、ERFX 0.05 ppm 之層析圖。

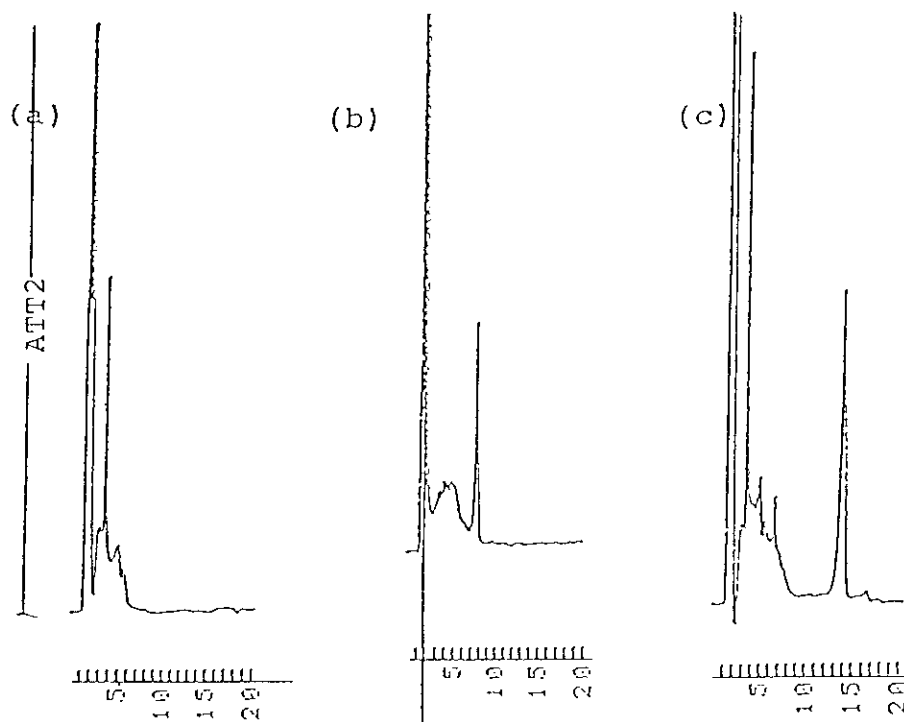


圖 3 (a) 空白雞肉，(b) 雞肉中 OFLX 陽性，(c) 雞肉中 ERFX 陽性之層析圖

表 1 OFLX 及 ERFX 添加 0.05 ppm 空白雞肝、雞肉、血清之回收率

	肝 臟		肌 肉		血 清	
	REC, %	RSD, %	REC, %	RSD, %	REC, %	RSD, %
OFLX	82.3	3.2	86.5	2.7	92.6	4.3
ERFX	85.3	2.8	87.1	1.8	90.7	3.6

Rec, % 回收率

RSD, % 相對標準偏差

表 2 本省 7 縣市雞肉 112 件中 Enrofloxacin 及 Ofloxacin 殘留抽驗成績表

縣 市	檢體數	陽性件數	殘 留 量 (ppm)	陽性率 (%)
台 北	9	4 #	0.095~0.005	44.4
彰 化	18	1 #	0.0085	5.6
雲 林	18	2 #	0.0092~0.0061	11.1
嘉 義	9	3 #	0.0260~0.008	33.3
台 南	25	3 # 1 \$	0.054~0.01 0.034	12.0 4.0
高 雄	27	6 # 1 \$	0.062~0.0066 0.099	22.2 3.7
屏 東	6	3 # 1 \$	0.037~0.02 0.017	50.0 16.7
計	112	22 # 3 \$	0.095~0.005 0.099~0.017	19.6 2.7

Enrofloxacin 陽性件數

\$ Ofloxacin 陽性件數

參 考 文 獻

1. 呂榮修、蔡向榮、宋華聰。Quinolone 類藥劑對雞黴漿菌與大腸菌症之治療試驗。台灣省畜牧獸醫學會會報。65 : 21 - 26。1995
2. 陳玉盆、邵清益、張柏林。利用高效液相法分析定量 Quinolone 類抗菌劑。藥物食品分析。4 (2) : 155 - 164, 1996
3. 張俊華。雞肉雞肝中 Fluoroquinolone 類藥物檢驗方法之建立及該藥物殘留性之探討。碩士論文。國立中興大學獸醫微生物學研究所。台中。1996
4. 新城敏晴、後藤義孝。穩畜淨液 Qxaldin liquid 對雞大腸桿菌症之治療試驗。現代畜殖, 82 年 12 月, 99 - 109。1993
5. Horie M, Saito K, Nose N, and Nakazawa H. Determination of enrofloxacin in meat and fish by high performance liquid chromatography. J Food Hyg Soc Japan 34 : 289 - 293, 1993
6. Horie M, Saito K, Nosa N, and Nakazawa H. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissues by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 653 : 69 - 76, 1994
7. Hustvedt S, Salte R. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of oxolinic acid in fish serum employing solid-phase extraction. J Chromatogr 494 : 335 - 339, 1989
8. Jordan FTW, Gilbert S, Knight DL, and Yaver CA. Effects of baytril, tylosin and tiamulin in avian mycoplasma. Avian pathol 18 : 659 - 673, 1989
9. Jordan FTW, Horrocks BK, and Jones SK. A comparison of baytril, tylosin and tiamulin in control of mycoplasma iowae infection of turkey poults. Avian Pathol 20 : 287 - 293, 1991
10. Jordan FTW, Horrocks BK, and Froyman R. A model for testing the efficacy of enrofloxacin (baytril) administered to turkey hens in the control of mycoplasma iowae infection in eggs and embryos. Avian Dis 37 : 1057 - 1061, 1993
11. Martinsen B, Horsberg TE. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolone, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in atlantic salmon held in seawater at 10°C. Antimicrob Agents Chemother 39 : 1059 - 1064, 1995

Investigation of enrofloxacin and ofloxacin residues in poultry tissues

Y. F. Sheu,* P. S. Gong, M. C. Liu and S. Y. Lin

Taiwan Animal Health Research Institute
The Branch Institute of Animal Drugs Inspection

SUMMARY A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for simultaneous determination of the residue of Enrofloxacin (ERFX) and Ofloxacin (OFLX) in poultry tissues was developed. Samples were extracted and purified with 0.01N Hydrochloric acid-Acetonitrile (7 : 3 v / v) and SEP-PAK C18, concentrated by nitrogen to dryness, and then analysed by HPLC. The HPLC conditions were established on a Cosmosil 5C18-MS column with pH 3.0 Phosphate buffer / Acetonitrile (80 : 20) as mobile phase and detected by fluorescence detector Ex 295 nm 、 Em 445 nm. Recovery studies were performed at 0.05 ppm levels in each of the three tissues. Average recoveries were 82.3 ~ 92.6 %. The detection limit of residual drugs was 0.005 ppm in samples. Total 112 samples of Poultry tissue from grocery market located in seven counties of Taiwan were surveyed by random for the residues of Enrofloxacin and Ofloxacin with the developed method. The result indicated positive rates of ERFX and OFLX among the samples were 19.6 % (0.095 ~ 0.005 ppm) and 2.7 % (0.099 ~ 0.017 ppm) respectively.

Key words: *Enrofloxacin, Ofloxacin, Poultry tissue*

*Corresponding author
Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.