

# 衣索巴於雞肉中殘留檢測技術之建立

龔培森 許瑜芬 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** 應用高效液相層析法檢測雞肉中衣索巴之方法已建立。衣索巴以氫甲烷自檢體中萃取，再以氫甲烷飽和之正己烷移去脂溶性物質，經濃縮，最後利用高效液相層析儀進行定量分析。利用 Cosmosil 5 C18-MS (250×4.6 mm) 分離管，以含 30% 氫甲烷之 0.01 M 三水醋酸鈉緩衝液 (利用醋酸調 pH 至 3.5) 為移動相，於紫外光檢測器波長 269 nm 和螢光檢測器激發波長 EX 270 nm、放射波長 EM 350 nm 下進行分析，可成功地自雞肉中檢出衣索巴。添加 0.05 ppm、0.1 ppm、及 0.5 ppm 時回收率為 87.1%~91.7%，變異係皆小於 5%，最低檢測限則為 20 pg。

**關鍵詞：**衣索巴，高效液相層析法，殘留

## 緒 言

衣索巴 (ethopabate, 4-Acetamido-z-ethoxybenzoic acid methylester) (圖 1) 為一種合成抗原蟲劑，在獸醫學上通常用來預防雞之球蟲感染症，其主要是對 *E. Maxima*、*E. brunetti* 及一些小腸型有效<sup>[3, 5, 9]</sup>，其添加量一般在 5~16 ppm 間<sup>[2]</sup>。儘管只是如此低的添加量但根據行政院衛生署七十六年四月公告之動物用藥殘留標準規定<sup>[1]</sup>，此藥並不得殘留於肉品中。故本研究乃針對雞肉中衣索巴殘留進行檢驗方法之研究改進，期能對日後全面監控畜產品藥物殘留時有所助益。

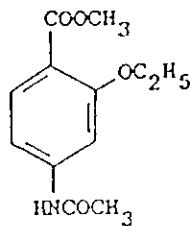


圖 1 衣索巴之化學結構式

## 材料與方法

### 1. 儀器設備：

- (1) 高效液相層析儀：輸液系統 (Hitachi L-6000 pump, Tokyo, Japan)、螢光檢測器 (Hitachi F-1050 Fluorescence spectrophotometer, Tokyo, Japan)、積分儀 (Hitachi D-2500 Chromato-integrator, Tokyo, Japan)、紫外光檢測器 (Bio-Red UV-1706, Tokyo, Japan)。
- (2) 碎肉機：Heidolph (Kelheim, Germany)。
- (3) 離心機：Kubota 5100 型 (Hong, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan)。
- (4) 分光光度計：Hitachi U-3210 Spectrophotometer (Tokyo, Japan)。
- (5) 螢光分光光度計：Hitachi F-4000 spectrofluorophotometer (Tokyo, Japan)。
- (6) 拋棄式濾膜過濾器：Microfilterfuge (Rainin, MA, USA)。

### 2. 試 藥：

- (1) 氫甲烷 (Acetonitrile)：E. Merck LC 級。
- (2) 正己烷 (Hexane)、醋酸 (Acetic Acid)：E.

\*抽印本索取作者  
台灣省家畜衛生試驗所

試藥級。

(3) 三水醋酸鈉 (Sodium Acetate Trihydrate)：和光純藥工業株式會社試藥級。

### 3. 標準品：

衣索巴 (ethopabate)：台灣興美公司提供。

### 4. 衣索巴標準液之定量分析及標準曲線：

精確稱取衣索巴標準品 20 mg 置於 20 ml 褐色容量瓶中加入甲醇至刻度，即得 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之原液，取適當原液用移動相調配成含 0.01, 0.05, 0.5, 1, 2 及 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之不同濃度標準液，各取 20  $\mu\text{l}$  注入高效液相層析儀 (HPLC) 中分析定量，得各濃度之積分值，以標準液濃度對其面積積分值，依直線迴歸分析法製作標準濃度曲線方程式，藉以推算各濃度。

### 5. 樣品前處理：

取細切打碎後雞肉樣品 2 g，以 25 ml 氫甲烷萃取，經離心 (3,500 rpm, 10 分鐘) 取上清液，下層固形物再加入 25 ml 氫甲烷充分混合，經振盪及離心後，將二次所得之氫甲烷層移至分液漏斗中，加入以氫甲烷飽和之正己烷 25 ml 振盪去脂洗淨 (1 次)，收集氫甲烷層，經減壓濃縮蒸乾。殘留物以移動相 1 ml 經超音波振盪溶解，過濾後注入 HPLC 檢測。

### 6. 回收率試驗：

取適當不同濃度之衣索巴標準液，分別加入預先均質 2 g 之空白雞肉中，使其殘留量分別含有 0.05、0.1 及 0.5 ppm 再經上述方法前處理後，各取 20  $\mu\text{l}$  注入 HPLC 分析之，每一添加量各作四重覆，所得面積值再與標準檢量線比較，即可換算回收率。

### 7. 檢樣之分析：

雞肉樣品經前處理後，分別精確量取檢液及標準液 20  $\mu\text{l}$  注入 HPLC，以 Cosmosil 5C18-MS (5  $\mu\text{m}$ ；250  $\times$  4.6 mm ID, Nacalai, kyoto, Japan) 分離管，以含 30% 氫甲烷之 0.01 M 三水醋酸鈉緩衝液 (pH 3.5) 為移動相，配合 UV 269 nm 及螢光 EX 270 nm、EM 350 nm 檢測下，流速 0.9 ml/min 分析檢樣內藥物之含量。

## 結果及討論

各種不同濃度衣索巴標準液，依上述之分析條件注入 HPLC 分析後，衣索巴出現波峰之時間約為 11.9 分左右，其紫外光及螢光檢測下波形如圖 2 (A) 及圖 3 (A) 所示。以標準液之濃度對 HPLC 分析積分值所作之迴歸直線方程式紫外光檢測下  $Y = 1539.4 + 299881.4 X$ ，其相關係數  $r = 0.9999$ ，而螢光檢測下則為  $Y = 7910.3 + 18112394.7 X$ ， $r = 0.9999$ 。衣索巴從雞肉中萃取淨化後注入液相層析儀所獲得之紫外光及螢光檢測下液相層析圖譜 (如圖 2~3) 所示。添加 0.05、0.1 及 0.5 ppm 所得之回收率分別為  $87.1 \pm 3.6\%$ 、 $91.7 \pm 2.6\%$  及  $89.9 \pm 3.8\%$  (表 1)。

過去對於衣索巴之檢測大部分以高效液相層析法來進行分析，可搭配紫外光檢測器或螢光檢測器進行偵測。圖 4 及圖 5 分別為衣索巴標準品，以移動相定容後於分光光度計及螢光分光光度計掃描測試之結果，由圖中可發現其於紫外光之最大吸收波長為 269 nm，此與 Callicano 等人<sup>[6]</sup>所應用之 260 nm 有所不同，經測試結果，本法約較 Callicano 等人之方法可提升敏感度 1.1 倍。而螢光掃描結果，激發波長為 270 nm 放射波長為 350 nm，又與 Nagata 等人<sup>[7,8]</sup>之 EX 306 nm、EM 350 nm 或高和張<sup>[4]</sup>所應用之 EX 300 nm、EM 350 nm 有所不同，經測試發現，本法又較高和張<sup>[4]</sup>之報告感度約提升 2.9 倍，因此本實驗以紫外光 269 nm 及螢光 EX 270 nm、EM 350 nm 搭配進行檢測。如此一來不但提升檢測的靈敏度，並可藉由紫外光檢測與螢光檢測之比值進一步確認雞肉中衣索巴之存在更增加了檢測之特異性。

在前處理方面，相關文獻常以溶媒分配萃取後，再經層析管或藉由固相萃取匣 (cartidge) 淨化，當採用層析管柱時計有矽酸鎂<sup>[8]</sup>及氧化鋁<sup>[6]</sup>二種，據高等 (1993) 之報告指出矽酸鎂之效果要較氧化鋁來得佳但其所採取之沖提液高達 50 ml，須再次濃縮徒增前處理之時間。本研究僅以溶媒分配來進行萃取，雖不能完全除去雜質，但卻也不影響檢測之結果，因而縮短了樣品處理之時間。

至於萃取液方面由於衣索巴可溶於甲醇、乙醇、丙酮及氫甲烷，因此朝此方向找尋，初步實驗發現，甲醇、乙醇及丙酮所溶出之雜質要較氫甲烷來得多，但如果單以螢光檢測器來進行檢測則上述萃取液皆可應用，惟當以紫外光檢測時則

以氫甲烷較佳，而本試驗是採用紫外光及螢光搭配檢測，因此氫甲烷成為我們較佳的選擇，再者由於脂溶性物質的存在會使檢測感度下降及層析管柱劣化，所以脂溶性物質的移除也相當重要，實驗中則藉由正己烷移去脂溶性物質以減少干擾物質及避免層析管的傷害，如此一來，簡單的前處理即可達實驗之需，可謂操作簡易，省時省力之方法，值得日後從事衣索巴殘留調查或相關研究之參考。

**誌謝** 本實驗承蒙國立中興大學獸醫學系王渭賢教授指導及本系林淑玲小姐協助特此致謝。

### 參考文獻

1. 行政院衛生署、動物用藥殘留標準、衛署食處字第 658449 號公告。1987
2. 行政院農業委員會、飼料添加物使用準則。(82)農牧字第 2050555A 號公告。1993
3. 呂車鳳、方文祥、陳瑞雄、戴東發、杜杰憲、趙長勝、邱鴻英、李宏智。獸醫藥理與治療學下冊。藝軒圖書出版社。台北。1987
4. 高雅敏、張碧秋。雞肉及雞肝中衣索巴檢驗方法之探討。藥物食品分析。1 (2) : 207 - 214。1993
5. Chapman HD. Chemotherapy of caecal coccidiosis: efficacy of toltrazuril, sulfaquinoxaline / pyrimethamine and amprolium / ethopabate, given in drinking water, against field isolates of *Eimeria tenella*. Res Vet Sci 46 (3) : 419 - 420, 1989
6. Gallicano KD, Park H, Yee J, and Young LM. Simultaneous liquid chromatographic screening of five coccidostats in chicken liver. J Assoc off Anal Chem 71 (1) : 48 - 50, 1988
7. Nagata T, Saeki M. Rapid quantitation of ethopabate in chicken muscles using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection : purification from extraction liquid-liquid partition. J chromatogr 281 : 367 - 370, 1983
8. Nagata T, Saeki M, Nakazawa H, Fujita M, and Takabatake E. Sensitive determination of ethopabate residues in chicken tissue by liquid chromatography with fluorometric detection. J Assoc off Anal chem 68 (1) : 27 - 28, 1985
9. Peeters JE, Derijeke J, Verlinden M, and Wyffels R. Sensitivity of avian *Eimeria* spp. to seven chemical and five ionophore anti-coccidials in five Belgian integrated broiler operations. Avian Dis 38 (3) : 482 - 493, 1994

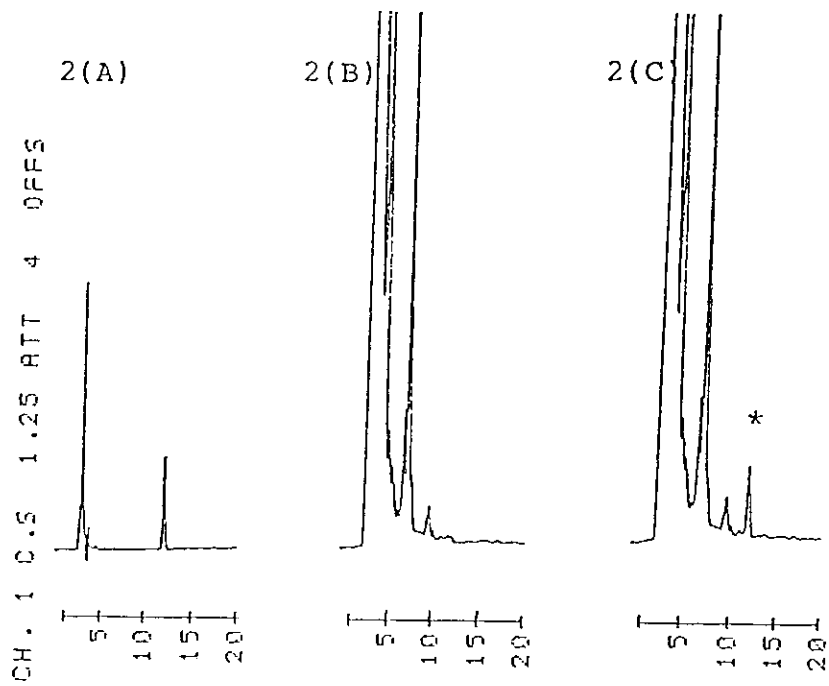


圖 2 紫外光檢測下之液相層析圖譜 (A) 衣索巴標準品  $0.05 \mu\text{g} / \text{ml}$  (B) 空白雞肉 (C) 添加  $0.05 \text{ ppm}$

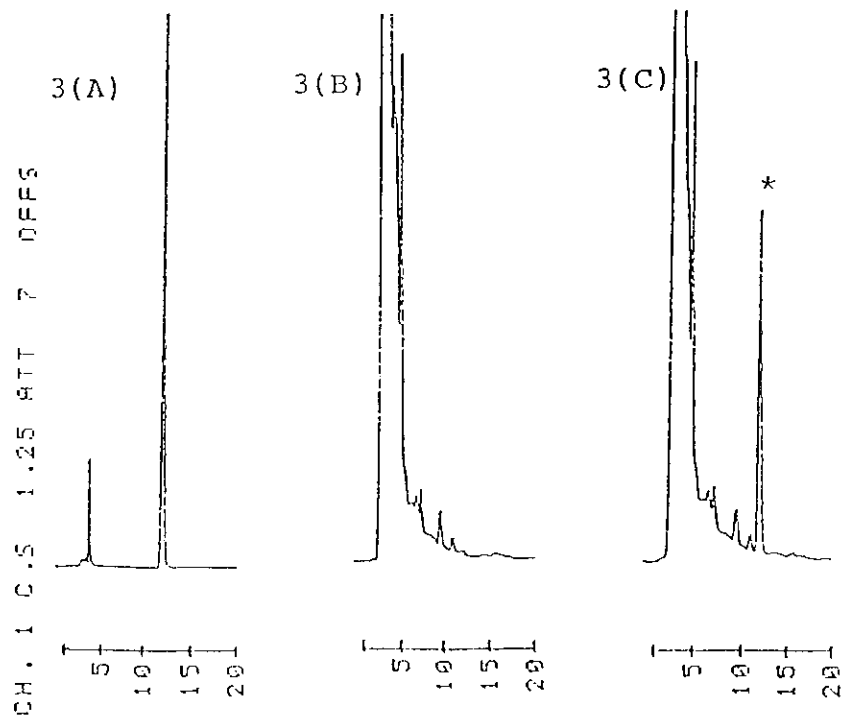


圖 3 螢光檢測下之液相層析圖譜 (A) 衣索巴標準品  $0.05 \mu\text{g} / \text{ml}$  (B) 空白雞肉 (C) 添加  $0.05 \text{ ppm}$

表 1 Ethopabate 添加在雞肉組織中之回收率

	Ethopabate (%)		
	Mean	SD	CV
0.05 ppm	87.1	3.6	4.1
0.1 ppm	91.7	2.6	2.8
0.5 ppm	89.9	3.8	4.2

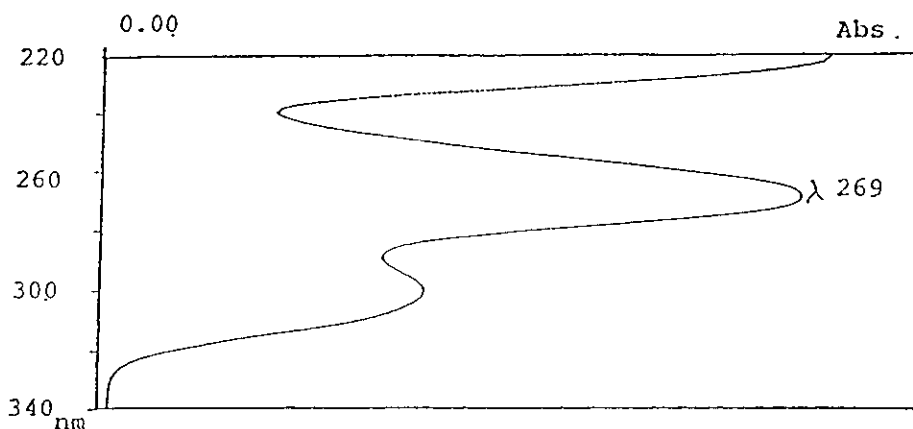


圖 4 衣索巴標準品之紫外光掃描圖 (10 µg/ml)

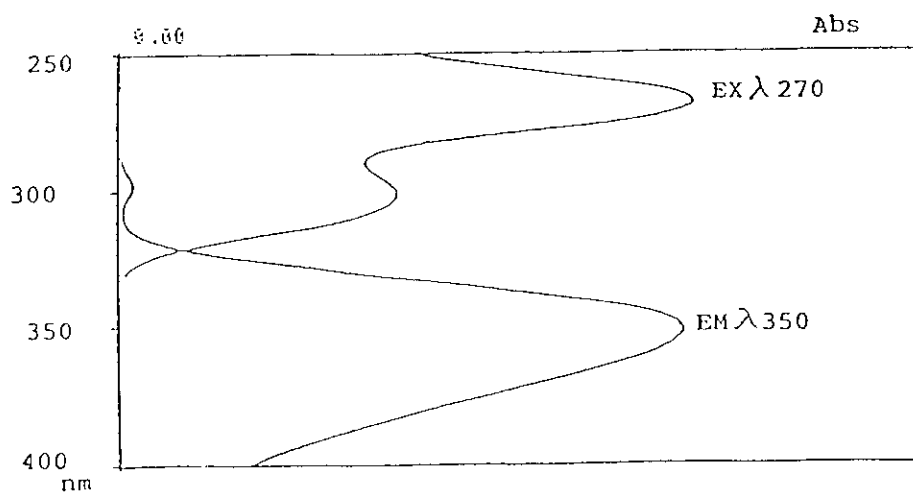


圖 5 衣索巴標準品之螢光掃描圖 (10 µg/ml)

## Determination of ethopabate residues in chicken muscle

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

Taiwan Animal Health Research Institute  
The Branch Institute of Animal Drugs Inspection,  
Chunan, Miaoli, Taiwan, ROC.

**SUMMARY** A simple, rapid, and reliable high performance liquid chromatographic (HPLC) method for determination of ethopabate in chicken muscle has been developed. The tissue was defatted with n-hexane and ethopabate was extracted with acetonitrile. The HPLC separation was carried out on a cosmosil 5 C18-MS column (250 × 4.6 mm I.D) with 0.01 M sodium acetate buffer (pH 3.5) — acetonitrile (70 : 30) as the mobile phase at a flow rate of 0.9 ml / min. The drug was detected by UV detection (at 269 nm) and fluorescence detection (EX 270 nm 、 EM 350 nm). The recoveries from chicken muscle fortified at the level of 0.05 µg / g, 0.1 µg / g, and 0.5 µg / g were between 87.1.8 % ~ 91.7 %. The relative standard deviations ranged from 2.8 to 4.2 % with high precision. The limit of detection was 20 pg.

**Key words:** *Ethopabate, High Performance Liquid Chromatography, Residue*

---

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