

## 飼料添加安痢黴素 (Apramycin) 於畜產品中殘留試驗

李新進\* 鄭秀蓮 楊喜金

台灣省家畜衛生試驗所

**摘要** 為探討成豬飼以含 100 ppm 安痢黴素 (Apramycin) 飼料一個月後，由其肌肉、臟器組織、血液及尿液中檢測藥物殘留情形。肌肉及臟器組織以甲醇萃取，濃縮乾涸，水溶解，而血清及尿液用 1N 氫氧化鉀及 25% 三氯醋酸溶解後通過 Amberlite IRC-50(H<sup>+</sup>) 型樹脂，以 1N 氨水溶出後，分別用生物自析法及圓筒平板法分析，其感度為 0.05 µg/gm (ml)，平均回收率於組織為 70.6%，於體液為 55.7%。藥物於組織殘留情形，安痢黴素於連續試驗 30 天後，於豬隻臟器組織均能測出藥物之殘留，其中以肝臟含 1.8 µg/gm 為最高，肌肉含 0.9 µg/gm 為最少，停藥一天後，肌肉及胃測不出藥物殘留，停藥兩天以後所有臟器組織及體液均測不出藥物殘留。

**關鍵詞：**安痢黴，生物自析法，圓筒平板法

### 緒言

台灣養豬事業均是企業化經營，豬隻易得疾病，此種密集式之飼養，疾病之後大多以飼料添加藥物來控制，也因為藥物之使用而有殘留問題，為維護國民健康及防範藥物殘留於畜產品中，是今後政府施政之重要項目之一。

安痢黴素 (Apramycin 以下簡稱 AM) 為屬於氨基糖苷類抗生素，在胃腸不易被吸收，而能發揮在胃腸之殺菌作用，目前已列為我國飼料添加物<sup>(1)</sup>，只應用 30 kg 以下仔豬之飼料添加，用量為 80~100 ppm，以控制及治療大腸桿菌症，連續單獨使用三週以上。

AM 於畜產品中之檢驗，尚未看到有關之文獻，唯獨柴田重孝<sup>(2)</sup> 及禮來公司<sup>(4)</sup> 部份提到於畜水產品殘留之分析及於飼料之鑑別，對整體畜產品之完整檢驗均未提到，因而進行本項之試驗。

### 材料與方法

#### 試藥與試液：

甲醇、正己烷、無水硫酸鈉、氫仿、三乙醇胺、丙酮、三氯醋酸、磷酸氫一鉀及磷酸氫二甲，均是 MERCK 公司 AR 級。

\*抽印本索取作者

台灣省家畜衛生試驗所

Amberlite IRC-50 H<sup>+</sup> 為 MERCK 155130 號

TLC plate : Silica gel 60 MERCK 5748 號

Fluorescamine : SIGMA F-9015 Lot No : 28F4015 號

#### 培養基：

細菌移殖，保存培養基 No : 1 MERCK 5272 號

抗生素分析用種層及基層培養基 No : 11 號 MERCK 5269 號

#### 細菌：

枯草桿菌 (Bacillus subtilis) ATCC 6633

#### 細菌懸浮液配製：

枯草桿菌經接種於移殖培養基，於 36 ± 1°C 恆溫箱培養 7 天，取出以滅菌 0.85% 生理鹽水，洗出菌苔，遠心分離 (3,000 rpm 30 分鐘)，取殘留物再以滅菌 0.85% 生理鹽水稀釋，置 65°C 水浴箱 30 分鐘處理二次 (每天一次)，再遠心分離 (1,000 rpm 5 分鐘)，取上清液以分光光度計於 580 nm 波長測定 0.2 之吸光值。

#### 安痢黴素原料：

內含 Apramycin 531 mg/g，台灣禮來股份有限公司贈送。

**安痢黴素飼料添加劑：**

Apralan 100 permix, Lot B 3309, 台灣禮來股份有限公司贈送。

**安痢黴素標準品：**

內含 Apramycin 870 µg/mg, 台灣禮來股份有限公司贈送。

**TLC 移動相：**

甲醇：氫仿：氨水 (55：15：50)

**Amberlite IRC-50 H<sup>+</sup> Column：**

取 Amberlite IRC-50 H<sup>+</sup> 100 gm 加入 1 N 鹽酸 400 ml 浸 1 夜，再以離子水洗到水為中性，裝填管柱 5 cm 高度並保持液面於樹脂上。

**標準品溶液：**

取 Apramycin 標準品適量，以水溶解，配成 1,000 µg/ml 之原液，使用時再以水稀釋到 32、16、8、4 及 2 µg (力價) /ml。

**其它抗生素及標準溶液：**

取氯四環素 (Chlortetracycline, 以下簡稱 CTC)、北里黴素 (Kitasamycin 以下簡稱 KT) 及泰黴素 (Tylosin, 以下簡稱 TY) 標準品適量以甲醇溶解，而康黴素 (Kanamycin, 以下簡稱 KA)、新黴素 (Neomycin, 以下簡稱 NEO)、林可黴素 (Lincomycin, 以下簡稱 LIN)、青黴素 (Penicillin, 以下簡稱 PE) 及鏈黴素 (Streptomycin, 以下簡稱 SM) 各取適量以水溶解，各配成 1,000 µg (力價) /ml 之原液，使用時再以各溶劑稀釋到適當之濃度。

**呈色劑：**

螢光劑：取 Fluorescamine 10 mg 溶於 100 ml 丙酮中。

三乙醇胺液：取三乙醇胺 0.5 ml 加氫仿 100 ml。

**器具：**

亞克力槽：亞克力製 1×22×22 cm, 並附蓋。

分光光度計：SHIMADZU 牌 Spectronic 20。

玻璃管柱：1.5×25 cm 褐色。

紫外燈：CAMAG 牌 Reprostrn 11 含 UV 254 及 366 nm 波長。

**豬試驗與採材**

本試驗 16 頭豬隻係購自台糖公司，體重各約 60 kg, 經豬瘟及豬假性狂犬病免疫過，先以空白飼料 (台糖公司大豬飼料) 飼養一星期後分成二組，第一組為對照組 2 頭，飼餵無添加藥物之空白飼料，第二組為試驗組 14 頭，於飼料中添加 100 ppm 安痢黴素，試驗一個月，於試驗中每隔 10 天取 6 頭採血及採尿，試驗第 30 天宰殺 2 頭，並於最後一次投藥後停藥，改飼餵空白飼料，每隔 24 小時 (1 天) 宰殺 3 頭，宰殺之豬隻，採血液、尿液、心、肝、脾、肺、腎胃及肉等組織供試驗材料。

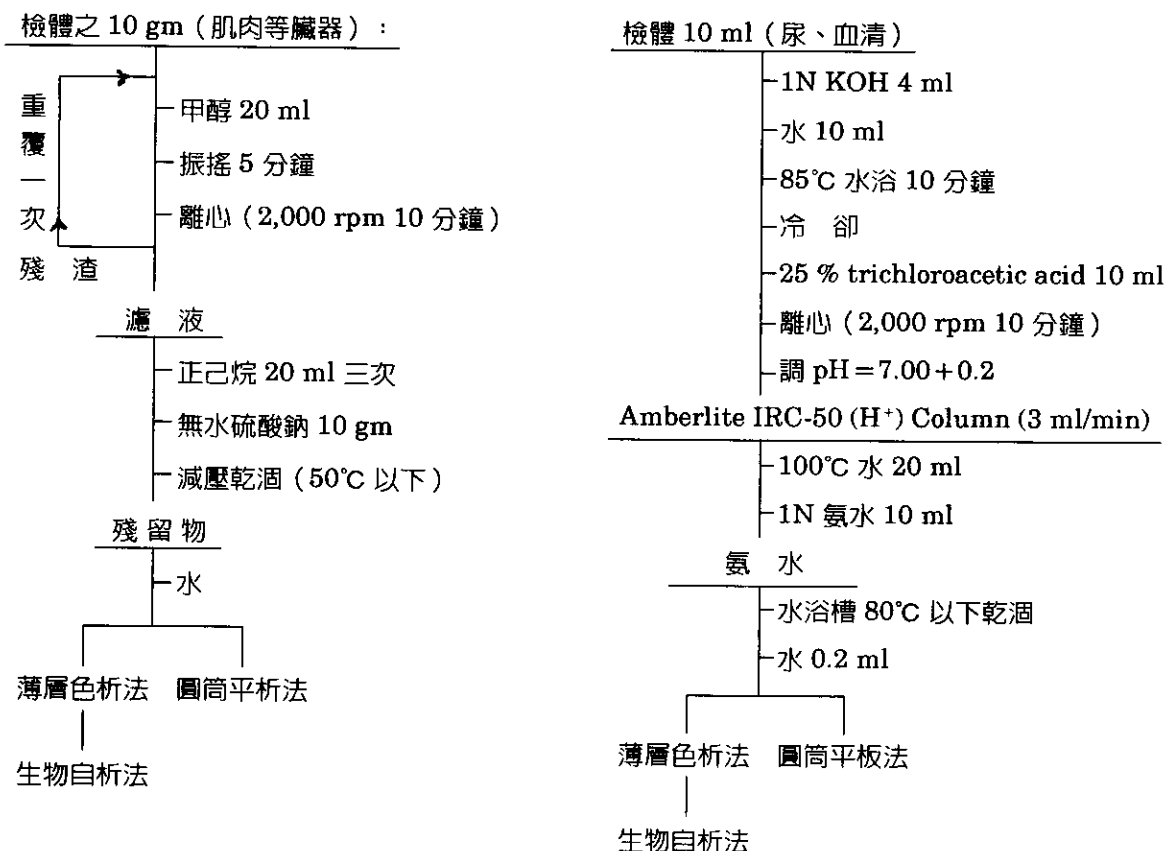
**檢體之前處理：**

採後之組織，分別磨碎，每 10 公克稱重包裝，血液分離血清及尿液保存 -20 °C 冰箱中

從冰箱取出肌肉等臟器組織加入甲醇 20 ml, 振搖 5 分鐘，遠心分離 (2,000 rpm 10 分鐘)，取上清液通過玻璃棉過濾於容量瓶中，殘渣再加甲醇 10 ml, 振搖 5 分鐘，遠心分離 (2,000 rpm 10 分鐘)，取上清液通過玻璃棉合併於容量瓶中，萃取甲醇液以己烷 (n-Hexane) 洗三次，每次 20 ml, 洗液丟棄，甲醇液再通過 10 公克之無水硫酸鈉以去除水分，以 50 °C 以下減壓乾涸，殘渣加入 0.2 ml 水溶解，再進行薄層色析法及圓筒平板法操作。

血清及尿液分別取 10 ml, 加入水 10 ml, 1N 氫氧化鉀 4 ml 置於 85 °C 水浴 10 分鐘，取出冷卻，加入 25 % 三氯醋酸 10 ml (Trichloroacetic acid), 遠心分離 (2,000 rpm 10 分鐘)，上清液調 pH 為 7.0±0.2 通過 Amberlite IRC-50 (H<sup>+</sup>) 管柱並控制流速 3 ml/min, 管柱以 100 °C 水 20 ml 洗一次，洗液丟掉，最後以 1 N 氨水 10 ml 溶出，置氨水於 80 °C 之水浴上濃縮到乾，殘渣以 0.2 ml 水溶解，再進行薄層色析法及圓筒平板法操作。

檢體之萃取流程圖如下：



檢體之操作法：

#### 薄層色析法：

取 TLC Plate 置於固定板上，依板上號碼取毛细管吸取檢體液及標準液注入板上，注入量 40  $\mu$ l (分數次注入)，俟全部注入後，以微熱風吹乾 Plate，再放入含有移動相之展開槽中，蓋上槽蓋，俟移動相展開到約 16 公分時，取出 Plate，以微熱風吹乾，再以下述呈色及進行生物自析法操作。

#### 呈色法：

- (1) 取 TLC Plate 浸入丙酮液內，取出以熱風吹乾，並重覆一次。
- (2) 浸入 Fluorscamine 螢光劑內，取出以熱風吹乾。
- (3) 浸入三乙醇胺液 (Triethanol amine reagent) 內，取出以熱風吹乾。
- (4) 上述(2)、(3)覆一次，再以紫外燈於波長 254 nm 測定。

#### 生物自析法：

抗生素分析用培養基 (No: 11) 經滅菌後取 100

ml 倒入滅菌亞克力槽內使之冷卻凝固，為基層培養基。再取 50 ml 置於 45  $^{\circ}$ C 恆溫水槽恆溫後，加入細菌懸浮液 0.1 ml，振搖後倒入基層培養基上，使之冷卻凝固為種層培養基。取上述已展開之 TLC 板，展開面平貼於種層培養基上，TLC 板上輕壓以趕走空氣，並使已展開之藥劑移轉到種層培養基上，經 30 分鐘，取出 TLC 板，置亞克力槽培養基於 36  $\pm$  1  $^{\circ}$ C 恆溫箱 6~8 小時，取出測量抑制圈大小，供計算檢體含藥物之殘留量。

#### 圓筒平板法：

安痢黴素於組織、血液及尿液內之殘留，經薄層色析法篩選陽性者，進行圓筒平板之標準曲線法來操作，檢驗過程依據<sup>(4)</sup> Microbiology Laboratory Guidebook 內方法進行。

#### 回收試驗：

取空白檢體 10 gm 或 10 ml 分別加入安痢黴素標準液 0.05  $\mu$ g/g(ml)，而後照檢體之前處理及操作法進行檢測。

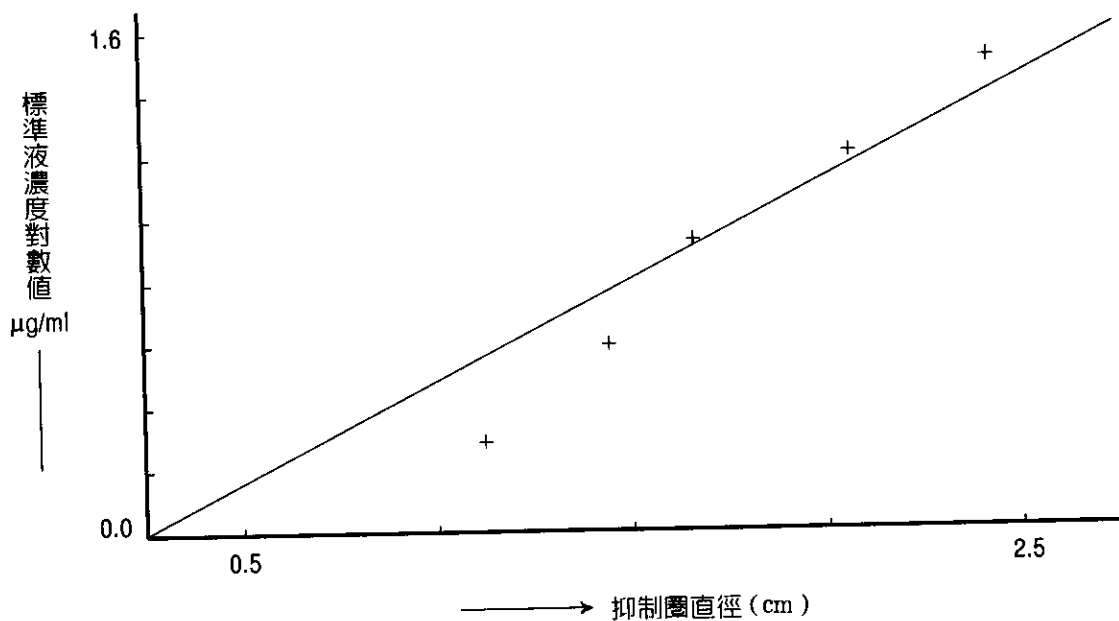
**安痢黴素含量計算**

檢體 10 gm 或 10 ml 經處理，最後以 0.2 ml 溶解，相當於濃縮 50 倍，檢體液與校正濃度同時進行圓筒平板法操作，所得抑制圈直徑與標準曲線對照找出含量除 50 再除回收率，即得檢體之含量  $\mu\text{g/g}$  (ml)。

**結果****安痢黴素標準曲線**

取 AM 標準液與水稀釋到每 ml 含 32、16、8、4

及 2  $\mu\text{g/ml}$  並以 8  $\mu\text{g/ml}$  為校正濃度，以枯草桿菌 (ATCC 6633) 為菌種，在  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  恆溫箱培養 8 小時，取出測出抑制圈，以抑制圈為橫軸以標準濃度之對數值為縱軸劃成直線回歸如圖一，其抑制圈如圖二。AM 標準液以水稀釋成 100  $\mu\text{g/ml}$  並以 40  $\mu\text{l}$  滴入 TLC 板，經展開及呈色後其層析圖如圖三，AM 標準液以水稀釋成 200、100、50、25、12.5 及 6.25  $\mu\text{g/ml}$  並以 60  $\mu\text{l}$  滴入 TLC 板經展開後進行生物自析法其層析圖如圖四。



圖一 安痢黴素之標準曲線

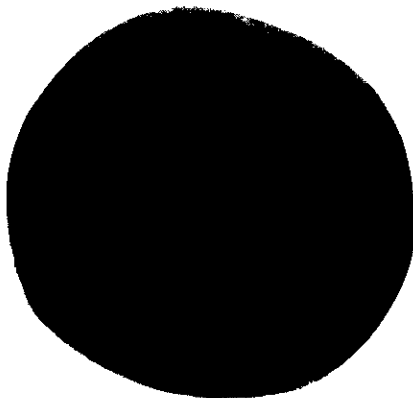


圖 2 安痢黴素標準液之抑制圈



圖 3 安痢黴素標準液薄層色析法層析圖

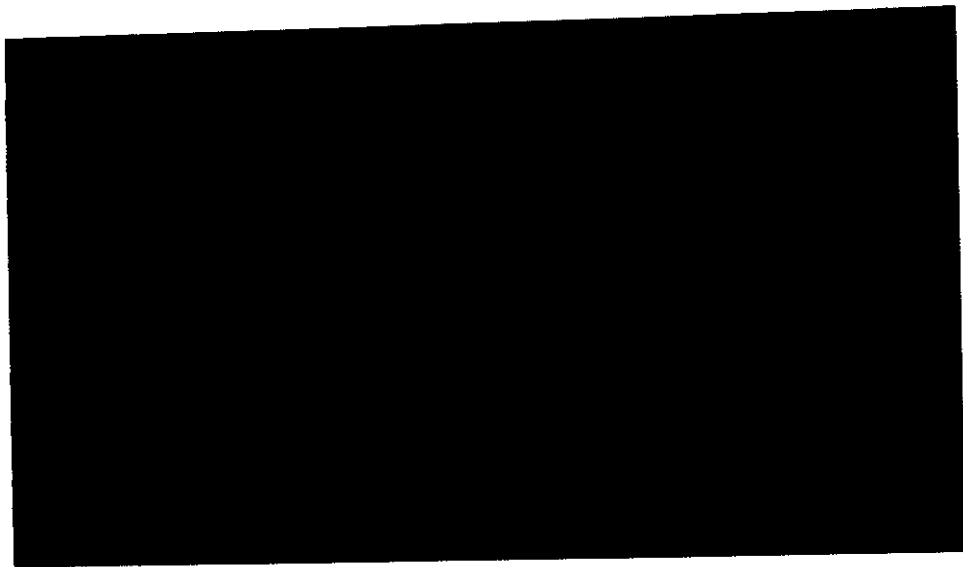


圖 4 安痢黴素標準液生物自析法圖譜

**安痢黴素於豬肉組織、血清及尿液之回收率：**

取空白豬肉組織、血清及尿液各 10 gm(ml) 分別添加標準液 0.05  $\mu\text{g}$  及 0.2  $\mu\text{g/g(ml)}$ ，經與檢體操作法同樣進行測定，其結果如表一。

由表一之數據知，安痢黴素於豬肉、血清及尿液之回收率以心臟最高、血清最少，而全部組織之平均回收率為 70.6 %。

**安痢黴素於豬尿、血清及各臟器組織之含量及殘留量：**

大豬飼料添加安痢黴素 100 ppm，試驗 1 個月，於試驗中每隔 10 天採尿液、血液分離血清，及試驗第 30 天宰殺 2 頭，並於最後投藥後停藥隔 24 小時 (1 天) 宰殺 3 頭，而後每天各宰殺 3 頭，採尿液、血液及各臟器組織，依照檢體之前處理及操作法進行檢驗結果，如表二。

由表二可知，AM 於試驗中所採尿液及血液 (血清) 經測定結果，平均含量為 5.3 及 1.2  $\mu\text{g/ml}$ 。從表三之數據知，AM 試驗未停藥所宰殺之豬隻其臟器組織均有藥物殘留，以肝臟及腎臟為最高，而停藥 1 天後除了胃及肉已測不出殘留外，其它臟器尚有少量 AM 殘留，但停藥 2 天以後，包括尿液、血液及其它各臟器組織均測不出 AM 殘留。

**安痢黴素及可能干擾物質之檢測：**

安痢黴素之原體和常用之飼料添加物 CTC、KT、TY、KA、NEO、LIN、PC 及 SM 之原體，以薄層色析法 (TLC) 進行試驗其結果如表四。安痢黴素於豬之試驗所採之檢體，經前處理操作後，以圓筒平板法進行試驗和常用飼料添加物 CTC、KT、TY、KA、NEO、LIN、PC 及 SM 等標準品，經稀釋後加入空白豬肉，以本試驗檢體之前處理法同時進行試驗，

表 1 安痢黴素於豬肉組織、血情及尿液之回收率

添加量 $\mu\text{g/g/ml}$	回收率 %								
	脾	肝	心	肺	腎	胃	肉	血清	尿液
0.05	67.0	62.5	72.5	70.0	65.0	72.5	72.5	46.5	52.5
0.2	72.5	72.5	74.0	75.0	72.5	73.0	67.5	61.5	62.5
平均回收率	69.7	67.5	73.5	72.5	68.7	72.7	70.0	54.0	57.5

其結果如表五。

由表四之檢測知，安痢黴素和其它常用之飼料添加物原體，除了 AM 及 NEO 以薄層色析法 (TLC Method) 可以分別鑑定外，其它抗生素均無法測出。

由表五之結果知以本試驗之萃取操作，對常用之飼料添加物除了 LIN、NEO 及 TY 外，均會產生抑制圈，因此往後要檢測畜產品藥物之殘留須同時進行薄層色析法及生物自析法操作。

表 2 安痢黴素於試驗中血清及尿液之含量

單位：μg/ml		
試驗時間	血清	尿液
10 天	1.2	4.7
20 天	1.3	5.6
30 天	1.3	5.6

表 3 安痢黴素於豬尿、血清及各臟器組織之含量及殘留量

單位：μg/gm (ml)									
停藥時間	尿液	血清	脾	肝	心	肺	腎	胃	肉
未停藥	5.1	1.2	1.5	1.8	1.3	1.3	1.6	1.0	0.9
1 天	1.0	0.4	0.5	0.7	0.3	0.3	0.6	ND	ND
2 天	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3 天	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4 天	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND：未檢出

表 4 安痢黴素及其它抗生素以薄層色析法之檢測

樣品名	簡稱	溶劑	樣品濃度 mg/ml	注入量(μl)	Rf 值
安痢黴素	AM	水	2	20	0.55
硫酸康黴素	KM	水	2	20	—
氯四環素	CTC	甲醇	2	20	—
硫酸新黴素	NEO	水	2	20	0.30
青黴素鈉鹽	PC	水	10*	20	—
北里黴素	KT	甲醇	2	20	—
林可黴素	LIN	水	2	20	—
硫鏈黴素	SM	水	3	20	—
泰黴素	TY	甲醇	10	20	—

\*：I. U.

—：無法測出

表 5 安痢黴素及其它抗生素以圓筒平板法之檢測

樣品名	簡稱	溶劑	空白豬肉添加量 ( $\mu\text{g/g}$ )	抑制圈
安痢黴素	AM	水	0.2	+
硫酸康黴素	KM	水	0.4	+
氯四環素	CTC	甲醇	0.2	+
硫酸新黴素	NEO	水	1.0	-
青黴素鈉鹽	PC	水	1.0*	+
北里黴素	KT	甲醇	0.5	+
林可黴素	LIN	水	1.0	-
硫鏈黴素	SM	水	0.4	+
泰黴素	TY	甲醇	0.5	-

\* : I.U.

- : 無抑制圈

## 討論

AM 於豬肉組織中之檢驗方法，依照<sup>(2)</sup>文獻所述組織經甲醇萃取後，通過二次 Amberlite IRC-50 ( $\text{H}^+$ ) 管柱，主要目的是去除組織中之雜質，尤其是脂肪，脂肪之存在對往後進行之檢驗影響很大，且該方法流程非常繁雜對大量檢體進行之檢驗亦有影響。故本試驗加以適當之改良檢體經甲醇萃取後，用正己烷洗三次亦可除去脂肪等大部份雜質，以利檢驗。而血清及尿液之測定在該方法並未說明：本試驗及依照過去處理之經驗，加入 1 N 氫氧化鉀，25 % 三氧醋酸後通過 Amberlite IRC-50 ( $\text{H}^+$ ) 管柱，以除去血清及尿液中之雜質，再進行檢驗。本試驗經改良後回收率無法提高，往後仍須加以研究。

畜產品藥物殘留檢驗，最重要就是鑑別試驗，在量多且短時間須完成報告之檢體，一定要使用薄層色析法進行篩選，本試驗使用之薄層色析法是引用已有報告<sup>(3)</sup>之方法來進行。

目前飼料添加物使用準則<sup>(1)</sup>規定 AM 只應用在 30 kg 以下之仔豬是有其道理，本試驗是使用 60 kg 豬隻連續試驗 30 天，經宰殺後肌肉及臟器組織均能

測出 AM 之殘留，停藥一天肌肉及為胃以外之組織仍能測出殘留，故成豬或肥育豬實不宜使用 AM 做為飼料添加物。

## 參考文獻

1. 行政院農業委員會，飼料添加物使用準則 1-2 台北。台灣 1991。
2. 柴田重孝，動物用醫藥品，飼料添加物，畜水產物的分析法，畜產生物科學安全研究所編，近代出版，東京 1985。
3. LILLY INDUSTRIES LIMITED. Thin-Layer Chromatographic Spectrofluorodensitometry for 3'-Hydroxyaparamycin, Lividamine, 2-Deoxy-streptomycin and Compounds A and B in dried aparamycin Sulfate and in aparamycin base 1972.
4. Microbiology Laboratory Guidebook Scientific Services. Animal and Plant Health Inspection Service U.S. DEPARTMENT of AGRICULTURE. Washington 4-6 1974.

## The residual study of Apramycin in animal products

\* Lee S. J. S. L. Jeng and S. C. Yang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Taiwan, R.O.C.

**SUMMARY** Experiments were conducted to investigate the residue of apramycin (100 ppm) fed to finishing pigs for 30 days. Pigs were slaughtered after 0 to 5 days of withdrawal periods. Tissues and serum were sampled for apramycin determination. Samples of muscle and tissues were extracted with methanol then concentrated and dried. The residues were dissolved by distilled water then tested by bioautography and microbiological cylinder plate methods. Serum and urine were added 1N potassium hydroxide and 25 % trichloroacetic acid and through the Amberlite IRC-50(H<sup>+</sup>) Column, then eluted with 1 N ammonium solution. The eluent was concentrated and dried, dissolved by distilled water, then tested by bioautography and microbiological cylinder plate methods. The detection limit was 0.05 µg/g(ml), average of recovery in tissue was 70.6 %, in serum was 55.7 %. On day 0 of withdrawal period, all tissues sampled were residued by apramycin, with the highest level in liver (1.8 µg/g) and the lowest level in muscle (0.9 µg/g). On day 1 of withdrawal period, no drug activity could be detected from muscle and stomach. From day 2, no drug activity could be detected from all tissues.

**Key words:** *Apramycin, Bioautography, Cylinder plate method.*

---

\*Corresponding author

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Taiwan, R.O.C.