

蝦及鰻魚飼料內氯黴素之高效液相色層分析法

林士鈺 邱仕炎

台灣省家畜衛生試驗所

開發高效液相色層分析法以檢測蝦及鰻魚飼料內氯黴素。氯黴素在 Spheri-I RP-18 分析管柱及 40% MeOH-0.1 M CH₃COONH₄ 下可得良好之分離效果及線性良好之檢量線 (1~8 ppm)。三種磺胺藥、三種合成抗菌劑及氣四環素均不會干擾檢測。蝦及鰻魚飼料以水二次萃取，經 Sep-Pak C₁₈ 卡匣去除雜質後，氯黴素之回收率為 87.3~89.8% 及 88.6~89.8%。

氯黴素 (Chloramphenicol, CM) 禁止當作陸地動物之飼料添加物⁽¹⁾，却可當作養殖魚之治療或預防用藥^(2,3,4)。為協助執行飼料品質抽驗計畫，以提高飼料品質，防範藥物殘留，且因無 CM 之公定檢驗方法，故擬開發檢驗方法。

CM 之檢驗方法有微生物檢定法⁽¹¹⁾、薄層色層分析法⁽¹²⁾、薄層色析-微生物自析法⁽⁹⁾、氣相層析法⁽⁷⁾、高效液相色層分析法^(5,6,8,10,12)、免疫酵素測定法⁽¹⁰⁾ 及放射線免疫測定法⁽⁷⁾ 等，其中高效液相色層分析法較常被採用。大部份檢測 CM 在畜產品之殘留^(5,6,7,9,11,12)，少部份檢測 CM 在人體組織液之含量^(8,10,12)，却極少檢測飼料內之 CM。本報告以高效液相色層分析法檢測蝦及鰻魚飼料內 CM。

材料與方法

一、儀器設備：

高效液相色層分析儀—組包括溶液輸送

系統 (Kratos Spectroflow 400)、注入器 (Kratos spectroflow 491、定量注射 20 μl)、偵測器 (Kratos spectroflow 783, 271 nm)、積分器 (SIC11)、保護管柱 (Spheri-I 4.6 mm) 及分析管柱 (Spheri-I, RP-18, 5 μm, 4.6 mm × 220 mm) 流速 0.8 ml/min。

二、材料：

1. 藥物標準品

CM 為衛生署藥物食品檢驗局標準品

2. 有機溶劑及試藥

甲醇 (Methanol, MeOH) 及乙酸乙脂 (Ethyl acetate) 均為 E. Merck 者，前者為 LC 級，醋酸銨 (CH₃COO NH₄) 為關東化學產品，試藥級。

3. Sep-Pak C₁₈ 卡匣。

Millipore Waters 產品。

4. 移動相

40% MeOH-0.1 M CH₃COO NH₄。

5. 蝦及鰻魚空白飼料，由台榮產業公司提供之中蝦及成鰻飼料。

三、方法：

1. 檢量線

正確稱取 CM 標準品 20mg，置於 20 ml 褐色容量瓶中，加水至刻度，混合溶解後即得 1,000 ppm 原液。

取適量之原液以水稀釋成 1、2、4、8 ppm 工作液，分別注入 HPLC，每種濃度注入 4 次，測定波峯面積，以製作檢量線。

2. 可能干擾物質之測定：

選取可能使用或干擾之藥物，磺胺二甲嘧啶 (Sulfamethazine, SMT)、磺胺一甲氧嘧啶 (Sulfamonomethoxine, SMM)、磺胺二甲氧嘧啶 (Sulfadimethoxine, SOM)、卡巴得 (Carladox, CBX)、富來頓 (Furazolidone, FZ)、乃挫扶喃頓 (Nitrofurazone, NF) 及氯四環素 (Chlortetracycline, CTC) 等七種，測定其干擾情形。

3. 飼料回收試驗：

參考我國^(2,9)及日本⁽⁴⁾之推薦劑量，依蝦及鰻魚之體產及飼料攝取量，換算飼料內藥物添加量，治療劑量 2.5 mg/g 為預防劑量 0.5 mg/g 之 5 倍⁽⁴⁾。飼料依圖 1 之方法萃取之，每種濃度飼料萃取 3 次。

結果與討論

HPLC 分析系統及檢量線：

CM 在 Spheri-I RP-18 逆相層析管及 40% MeOH-0.1 M CH₃COO NH₄ 移動相下，可得對稱性良好之波峰 (圖 2)。CM 標準品四種濃度 (1~8 ppm) 之相對標準偏差為 0.8~2.0% 檢量線之相關係數 (r) 為 0.999998 (表 1)，線性關係極佳，顯示 HPLC 分析系統良好，CM 可在 10 分鐘內分析完畢 (圖 2)。

可能干擾物質之測定：

SMT、SMM、SDM、CBX、FZ、

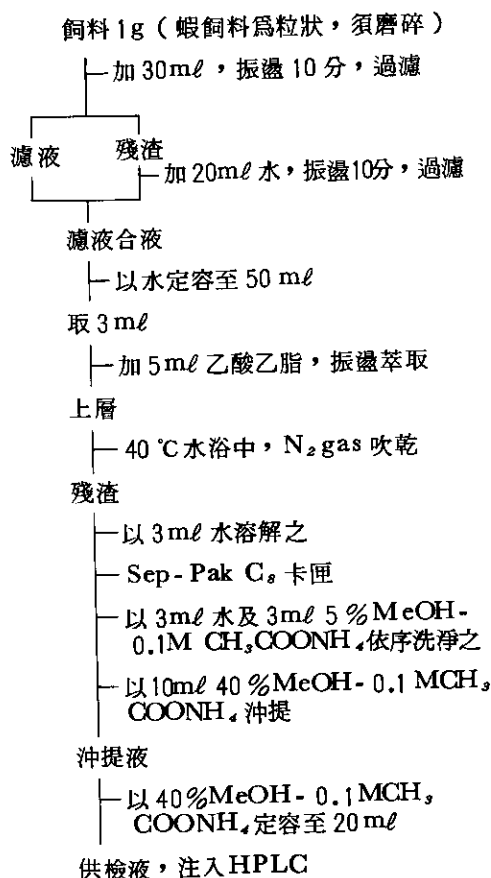


圖 1 飼料內 CM 萃取流程圖

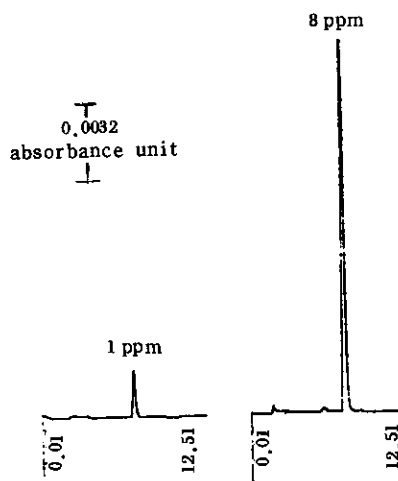


圖 2 CM 標準品之層析圖

表1 CM標準品4次注入波峯面積複驗性及檢量線

平均值±相對標準偏差	
1 ppm	34,475 ± 2.0 %
2 ppm	68,020 ± 0.8 %
4 ppm	135,537 ± 1.7 %
8 ppm	271,155 ± 1.2 %

檢量線*	$y = 455.2 + 33824.4x$
性關性	$r = 0.999998$

* $y = a + bx$: 波峯面積 = 截距 + 斜率
、濃度
面積單位為 $\mu v. sec$

NF及CTC 等七種藥物均不會干擾CM之判定。雖然鰻魚使用鏈黴素及新黴素⁽³⁾，但因此類抗生素不吸收光(271nm)，故不會造成干擾。

飼料回收試驗：

飼料內雜質之去除常使用苯、氯仿及雙甲基甲醯胺等有機溶劑以行液-液相萃取(liquid-liquid extraction)，不僅費時且溶劑對人體有害，可以固相萃取法(Solid-phase extraction)取代之。CM可被Sep-Pak C18 卡匣吸附，且不被水、0.1M $CH_3COO NH_4$ 及 5% MeOH-0.1M $CH_3COO NH_4$ 溶解出來，但可被移動相(40%MeOH-0.1M $CH_3COO NH_4$)沖提出，9ml 可回收 99.8%，10ml 則可回收 100% (圖3) 蝦及鰻魚空白飼料經 Sep-Pak C18 卡匣後可除去大部份的雜質，添加CM飼料可得極佳之層析圖(圖4)。

魚類消化管短且正常細菌群差，故飼料添加物不能促進生長發育。藥物之使用，通常以治療為目的^(2,3,4)，亦有預防者⁽⁴⁾，因此飼料添加量比陸地動物大許多⁽¹⁾。

利用水二次萃取蝦及鰻魚飼料內之CM(圖1)可得良好之回收率(表2)。蝦飼料之回收率為 87.3 ~ 89.8%，鰻魚飼料則為 88.6 ~ 89.8%，而變異係數却很低(1.2 ~ 2.0

%) (表2)。

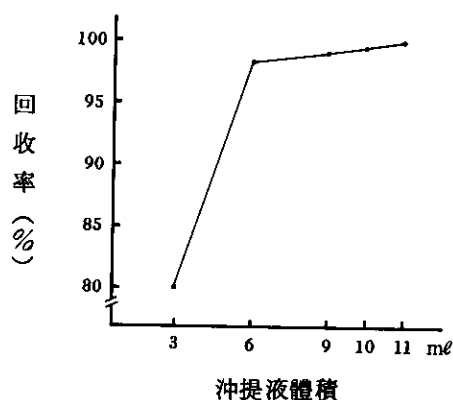


圖3 40% MeOH-0.1M $CH_3COO NH_4$ 對 Sep-Pak C18 卡匣內氣黴素之沖提曲線。

* 卡匣內負載有 50 ppm 氣黴素 3 ml

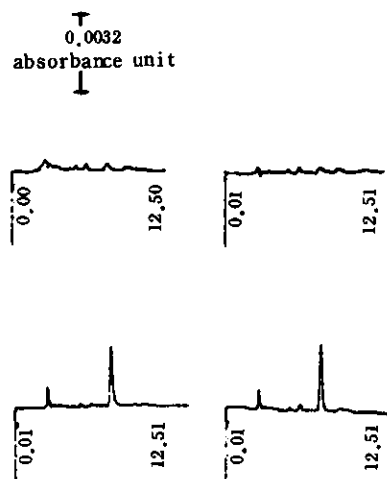


圖4 蝦及鰻魚空白飼料及添加CM層析圖。

左上：蝦空白飼料
左下：蝦低濃度飼料
右上：鰻魚空白飼料
右下：鰻魚低濃度飼料

表 2 蝦及鰻魚飼料內添加CM之回收率

	添加量*	實 測 量** ($\bar{X} \pm R.S.D.$)	回收率
蝦	0.50	0.449 \pm 1.5 %	89.8 %
	2.50	2.183 \pm 1.7 %	87.3 %
鰻魚	0.50	0.443 \pm 1.2 %	88.6 %
	2.50	2.248 \pm 2.0 %	89.8 %

* 單位為mg/g。

**每種飼料測定3次

 $\bar{X} \pm R.S.D.$: 平均值 \pm 相對標準偏差

誌 謝

台榮公司提供空白飼料及日方之相關資料，謹致謝忱。

參 考 文 獻

- 行政院農業委員會。1989。飼料添加物使用準則。台北。
- 郭光雄、劉正義、劉朝鑫。1986。魚病專輯—鰻魚。台灣養豬科學研究所出版，苗栗。
- 陳秀男。1989。蝦類之疾病與防治。台中市家畜疾病防治所出版，台中。
- 日本農水省水產廳。1974。魚病診斷指針。日本水產資源保護協會出版，東京。
- Aerts, R.M.L., H.J. Keukens and G.A. Werdmuller. 1989. Liquid Chromatographic determination of Chloramphenicol residues in meat : interlaboratory study. J. AOAC. 72: 570-576.
- Allen, E.H. 1985. Review of Chromatographic methods for Chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues from food-producing animals. J. AOAC. 68:990-999.
- Arnold, D. and A. Somogyi. 1985. Trace analysis of chloramphenicol residuls in eggs, milk and neat : Comparison of gas chromatography and radioimmunoassay. J. AOAC 68: 984-990.
- Gal, J., P.D. Marcell and C.M. Tarascio. 1980. High-performance liquid chromatographic microassay for chloramphenicol in human blood plasma and cerebrospinal fluid. J. of chromatography 181: 123-126.
- Neidert, E., P.W. Saschenbrecker and F. Tittiger. 1987. Thin layer chromatographic/Bioantographic method for identification of antibiotic residuls in animal tissues. J. AOAC. 70: 197-200.
- Schuartz, J.G., D.T. Casto, S.Ayo J.J. Carnahan and J.H. Jorgensen 1988. A commercial enzyme immunoassay method (EMITTM) Coupled with liquid Chromatography and bioassay method for measurement of chloramphenicol. Clin. Chem. 34: 1872-1875.
- Singer, C.J. and S.E. Katz. 1985. Microiological assay for chloramphenicol residues. J. AOAC. 68: 1037-1041.
- Triebig, G., K. Gobler and M. Klinger. 1979. Micromethod for the quantitation of Chloramphenicol in body fluids by high-pressure liquid chromatography. Fresenius Z. Anal. Chem. 299: 271-272.
- Tyczkowska, K., K.M. Hedeem, D. P. Aucoin and A.L. Aronson. 1988. Simple LC method for determination of chloramphenicol in equine canine and feline serum. J. of Chromatographic Science 26: 533-536.

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Chloramphenicol in Prawn and Eel Feeds

S.Y. Lin and S.Y. Chiu.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

A high performance liquid chromatographic method for determination of chloramphenicol (CM) in prawn and eel feeds has been developed. It could obtain good separation and linear calibration curve of CM when being chromatographed on Spheri-I RP-18 column and mobile phase consisting of 40% MeOH-0.1M CH₃COONH₄. Three sulfa drugs, 3 synthetic bacteriocides and chlortetracycline didn't interfere the detection. The procedure involved double extraction with water and cleanup on a Sep-Pak C₁₈ cartridge. Recoveries of CM in prawn and eel feeds were 87.3-89.8% and 88.6-89.8%, respectively.