

蝦及鰻魚飼料內羧四環素及氯四環素 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羧四環素(OTC)及氯四環素(CTC)。OTC及CTC在Chromospher C8玻璃層析管及MeOH-CH₃CN-0.01M Oxalic acid(1+1+4)移動相下可得良好之分離效果及線性良好之檢量線(1.5~12.0ppm)。三種磺胺藥、三種抗生素及三種合成抗菌劑均不會干擾檢測。飼料以pH 2.0及pH 4.5 MacIl vain buffer二次萃取,經Sep-Pak C₁₈卡匣去除雜質後,蝦飼料內OTC及CTC之回收率為100.1~101.2%及94.6~97.5%,鰻魚飼料則為87.1~92.5及80.0~82.9%。

養殖魚最方便而普遍的投藥方法為經口投與法,本法通常將藥物混於飼料中餵飼,讓魚自由攝食⁽⁹⁾,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,且欲同時檢測羧四環素(Oxytetracycline, OTC)及氯四環素(Chlortetracycline, CTC),故開發本方法,期能迅速而準確。

飼料內OTC及CTC公定之檢驗方法為微生物檢驗法^(6,12),本法無法區別此二種藥物,因此開發高效液相色層分析法^(2,9,10,11)。固相萃取法(Solid phase extraction)漸被採用^(7,8,13),為求方法之快速,本試驗亦採用此法以萃取飼料內藥物。

材料與方法

(一)儀器設備:

高效液相色層分析儀一組包括溶液輸送系統(Kratos spectroflow 400)、注射器(Kratos spectroflow 491,定量注射20 μ l)、偵測器(Kratos spectroflow 783,365nm)、積分器(SIC11)前管柱(Merck, C18, 4mm \times 25mm,裝於幫浦後注入器前)及分析管柱(Chrompack, Chromospher C8, 3mm \times 20cm,玻璃製),流速0.6ml/min。

(二)材料:

1.藥物標準品

OTC·HCl及CTC·HCl(U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.,

MD, USA) 均為 USP 參考標準品。

2. 有機溶劑及試藥

乙腈 (Acetonitrile, CH₃CN) 及甲醇 (Methanol, MeOH) 均為 E. Merck, LC 級, Citric acid 及 Na₂EDTA 為 E. Merck 之產品, Oxalic acid 及 Na₂HPO₄ 則為和光純藥, 均為試藥級。

3. 預拌劑

OTC 預拌劑為昭元化成之 Neoxycin 220, CTC 則為台灣氰胺公司之 CTC10 %。

4. Sep-Pak C18 卡匣

Millipore Waters 製, 依序以 5ml MeOH、5 ml H₂O 及 5ml 飽和 Na₂-EDTA 洗淨處理。

5. 移動相

MeOH-CH₃CN-0.01M Oxalic acid (1+1+4)。

6. 萃取液

(1) McBuffer A - 0.1M Citric acid - 0.2M Na₂HPO₄ - Na₂EDTA (614.5 ml + 0.372g) 以 HCl 調 PH 至 2.0。

(2) McBuffer B - 0.1M Citric acid - 0.2M Na₂HPO₄ - Na₂EDTA (614.5 ml + 385.5ml + 37.2g), 以 NaOH 調 PH 至 4.5。

7. 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 OTC 及 CTC 標準品各 20 mg 分別置於褐色容量瓶中, 加 MeOH 至刻度, 混合均勻, 溶解後即得 1000 ppm 原液。

取適量之原液以 MeOH 稀釋成 1.5、3.0、6.0 及 12.0 ppm 工作液, 分別注入 HPLC, 每種濃度注入 4 次, 測定波峰高度, 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)、磺胺二甲氧嘧啶 (Sulfadimethoxine, SDM

)、磺胺一甲氧嘧啶 (Sulfamonomethoxine, SMM)、卡巴得 (Carbadox, CBX)、富來頓 (Furazolidone, FZ)、乃啞咪喃頓 (Nitrofurazone, NF)、氯黴素 (Chloramphenicol, CM)、四環素 (Tetracycline, TC) 及脫氧四環素 (Deoxycycline DOC) 等九種, 測定其干擾情形。

3. 飼料回收試驗

參考我國^(3,4)及日本⁽⁶⁾之推薦劑量, 依蝦及鰻魚之體重及飼料攝取量, 換算飼料內藥物添加量, 治療劑量 (高濃度) 為預防劑量 (低濃度) 之 5 倍⁽⁶⁾, 請詳見表 1。飼料之萃取依圖 1 之方法處理之,

表 1 蝦及鰻魚飼料內藥物添加量 (mg/g)

	蝦		鰻魚	
	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
OTC	0.75	5.0	1.05	7.0
CTC	1.0	5.0	1.4	7.0

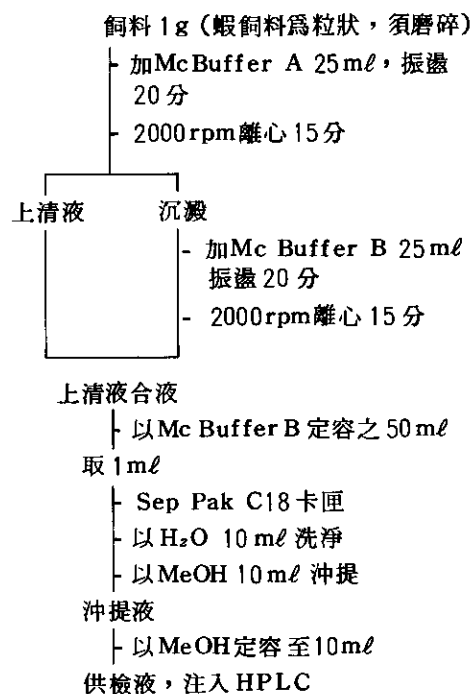


圖 1 飼料內藥物萃取流程圖

每種濃度飼料重複 2 次 (共 3 次)。

結果與討論

HPLC 分析系統及檢量線：

四環素類抗生素具銻合作用，易與金屬元素結合而影響層析效果，為避免不銹鋼層析管柱釋出微量金屬而選用玻璃管層析管柱，在適

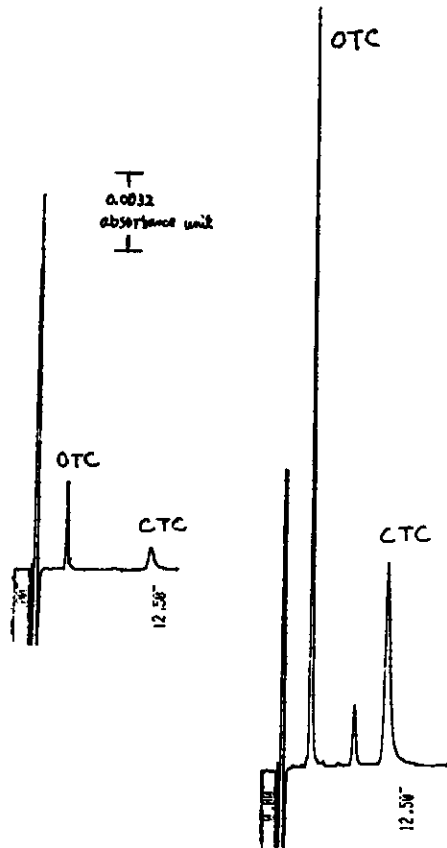


圖 2 OTC 及 CTC 標準品之層析圖
左：1.5ppm 右：12.0ppm

當移動相下可得完全分離且對稱性良好之波峯 (圖 2)。此對稱性較作者以往使用不銹鋼層析管在相同移動相下所得波峯對稱性更佳⁽²⁾。玻璃管不耐高壓 (不得超過 200 kg/cm²)，故欲得良好分離效果，必須測試適當之移動相組合及調整恰當之流速。OTC 及 CTC 在 15 分鐘內可分析完畢。

OTC 波峯之前有一小波峯 (圖 2)，經

多次測試證實此小波峯為 CTC 之分解產物。與 Howell 等⁽¹⁰⁾ 及 Martinez 等⁽¹¹⁾ 報告比較，此小波峯極可能是 CTC 之分解物 - epichlortetracycline，因後者使用之移動相 (MeOH+CH₃CN+0.01M Oxalic acid=1+1.5+6.5) 與本試驗相似。但無標準品，故無法證實，CTC 在 pH 2~6 小時，如在平衡狀態下，有 40~60% 之 epimer，此為可逆反應，低於 5°C 可大大減少 epimer⁽¹⁰⁾。在 pH 9.0 以上時，會產生 isochlortetracycline，而低於 2.0 時，會產生 anhydrochlortetracycline，均為不可逆反應⁽¹⁰⁾。預拌劑及飼料內極可能產生 epimerization⁽¹⁰⁾。

OTC 及 CTC 標準品四種濃度 (1.5~12.0ppm) 之相對標準偏差為 0.3~2.0% 及 1.5~3.5%，檢量線之相關係數 (r) 為 0.9995 及 0.9980 (表 2)，顯示 HPLC 分析系統良好。

可能干擾物質之測定：

SMT、SDM、SMM、CBX、FZ、NF、CM、TC 及 DOC 等九種藥物不會干擾 OTC 及 CTC 之判定，此結果與其他報告^(2,10) 相同。雖然鰻魚使用新黴素及鏈黴素⁽⁹⁾，但因此類抗生素不吸收紫外光，尤其是在 Near UV (365nm) 下更不會吸收，故不會造成干擾。

表 2 OTC 及 CTC 標準品 4 次注入波峯高度複檢性、檢量線及相關性

	OTC		CTC	
	$\bar{x} \pm$	R.S.D.*	$\bar{x} \pm$	R.S.D.
1.5ppm	16.3	±1.3%	4.3	±2.2%
3.0ppm	33.0	±2.0%	8.7	±1.5%
6.0ppm	65.3	±1.7%	16.6	±3.5%
12.0ppm	139.4	±0.3%	37.6	±2.1%
檢量線**	$y = -2.5 + 11.7x$		$y = -1.1 + 3.2x$	
相關性	$r = 0.9995$		$r = 0.9980$	

* $\bar{x} \pm$ R.S.D. : 平均值 ± 相對標準偏差

** $y = a + bx$: 波峰高度 = 截距 + 斜率 · 濃度

高度以 mm 為單位

飼料回收試驗：

蝦及鰻魚飼料經固相萃取法 (Sep-Pak C18卡匣)，可除去所有的雜質且基線 (baseline) 相當穩定 (圖 3)。飼料內雜質之去除常使用苯、氯仿及雙甲基甲磺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⁽¹¹⁾ Ma-

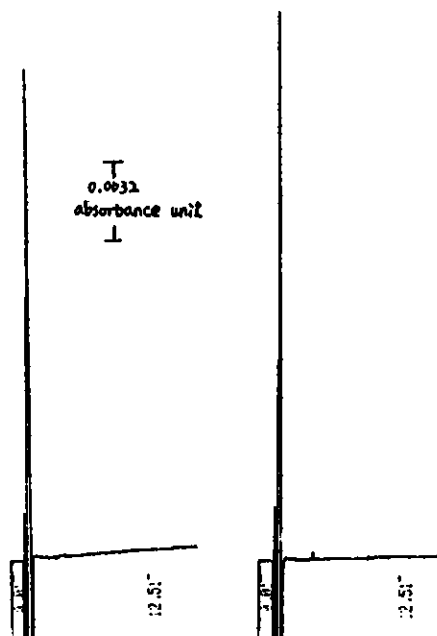


圖 3 蝦及鰻魚空白飼料層析圖
左：蝦飼料 右：鰻魚飼料

rtinez 等⁽¹¹⁾ 測試 Sephadex LX-2、XAD-2、iox-exchange resin 及 alumina 後選用第一種固相。但多數報告^(7,8,10) 均使用 Sep-Pak C18 卡匣，又因 OTC 及 CTC 可得 100% 之回收率^(7,10)，故選此種固相。蝦及鰻魚飼料添加 OTC 及 CTC 經萃取後可得極佳之層析圖 (圖 4)，未見任何干擾之雜質。

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^(5,4,6)，亦有預防者⁽⁶⁾，因此飼料添加量比陸地動物大許多⁽¹⁾。

利用 Mc Buffer (pH2.0 及 pH4.5) 萃取蝦及鰻魚飼料內之 OTC 及 CTC 可得良好之

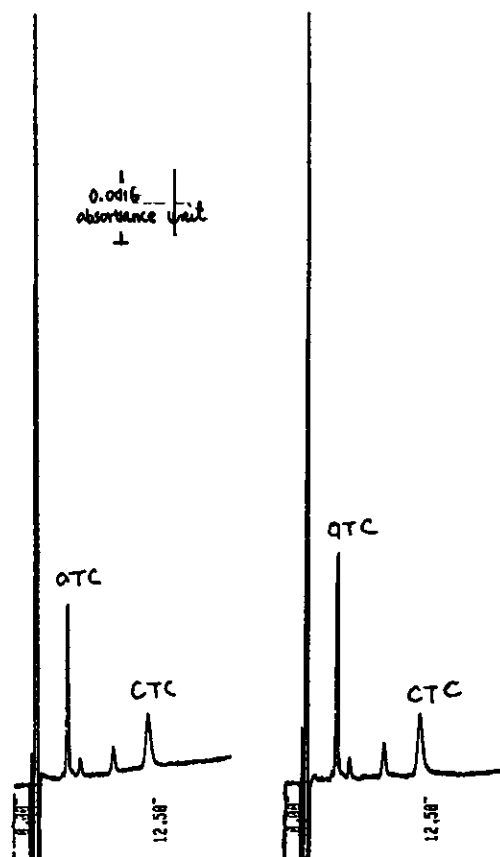


圖 4 蝦及鰻魚飼料內添加 OTC 及 CTC 層析圖
左：蝦低濃度飼料
右：鰻魚低濃度飼料

回收率，蝦飼料內 OTC 及 CTC 之回收率為 100.1 ~ 101.2 % 及 94.6 ~ 97.5 %，鰻魚飼料前為 87.1 ~ 92.5 % 及 80.0 ~ 82.9 %，蝦及鰻魚飼料之變異係數則為 2.7 ~ 5.4 % 及 3.2 ~ 10.0 % (表 3)。回收率依飼料之種類而有異⁽¹²⁾，Martinez 等所作 OTC 回收率 55.8 ~ 72.0 %，變異係數 2.5 ~ 5.2 %；CTC 則為 22.4 ~ 60.6 %，變異係數為 3.4 ~ 12.0 %⁽¹²⁾。

表3 蝦及鰻魚飼料內添加OTC及CTC之回收率

	OTC			CTC		
	添加量*	實測量(又±R.S.D)**	回收率	添加量	實測量(又±R.S.D)	回收率
蝦	0.75	0.755 ± 3.0%	100.1%	1.00	0.975 ± 2.7%	97.5%
	5.00	5.06 ± 5.2%	101.2%	5.00	4.73 ± 5.4%	97.5%
鰻魚	1.05	0.971 ± 10.0%	92.5%	1.40	1.16 ± 6.5%	82.9%
	7.00	6.10 ± 3.2%	87.1%	7.00	5.59 ± 4.0%	80.0%

* 單位為mg/g

**除蝦低濃度飼料測定二次外，餘均測定三次。

誌 謝

台灣氟胺公司及昭元化成公司提供預拌劑、台榮公司提供蝦及鰻魚飼料，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。
- 林士鈺。1985。利用高效液相層析法檢測四環素類抗生素。台灣省畜衛獸醫學會會報 46：27-41。
- 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。蝦類之病病與防治。台中家畜疾病防治所出版，台中。
- 經濟部中央標準局。1983。中國國家標準，飼料添加物檢驗法。台北。
- 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
- 岡尚男、宇野圭一、原田健一、鈴木眞言。1982。抗生物質の化學的分析法の探討(第2報)プレパツワC18カートリッジのラサイワリン系抗生物質への適用について。藥學雜誌 103：513~537。
- 神保勝彦、百瀬禮子、丸山務。1988。養殖魚中に残留するTC系抗生物質検査法の開發。東京都立衛生研究所研究年報 39：108~111。
- Chappell, G.S. and J.E. Honglum. 1986. Determination of oxytetracycline in premixes and isterinary products by lifind cheomatography J. AOAC. 69: 28-30.
- Howell, H.R., L.L. Rhodig and A.D. Sigler. 1984. Liquid Chromatographic determination of chlortetracycline in premixes. J.AOAC 67: 572-575.
- Martinez, E.E. and W. Shimoda. 1988. Liquid chromatographic determination of tetracycline residues in animal feeds. J. AOAC 71: 477-480.
- Official methods of analysis. 1984 14th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Oka, H., Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno and M. Yamada. 1987. Improvenent of chemical analysis of antibiotics IX. A Simple method for residval tetracyclines analysis in hony using a tandem Cartridge clean-up System, J. of chromatography 389: 417-426.

**High performance Liquid Chromatographic Determination of
Oxytetracycline and Chlortetracycline
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 oxytetracycline (OTC) and chlortetracycline (CTC) in prawn and eel feeds has been developed. It could obtain good separation and linear calibration curves of OTC and CTC when being chromatographed on Chromosper C8 glass column and mobile phase consisting of MeOH-CH₃CN-0.01M Oxalic acid. Three sulfa drugs, 3 antibiotics and 3 synthetic bacteriocides didn't interfere the detection. The procedure involved double extraction with pH 2.0 and pH 4.5 McIlvain buffers and cleanup on a Sep-Pak C18 cartridge. Recoveries of OTC and CTC in prawn feeds 100.1-101.2% and 94.6-97.5% and 87.1-92.5% and 80.0-82.9% for eel feeds, respectively.