

飼料添加孟寧素(monensin)在雞肉和 雞蛋中殘留試驗

李新進 楊揚輝 邱仕炎

台灣省家畜衛生試驗所

產蛋鷄及肉鷄飼料中添加孟寧素 120 ppm 2 個月，停藥後 1~10 天，每天取蛋、肉、肝臟及砂囊等組織，以甲醇溶解後用四氯化碳萃取，萃取液蒸乾，溶於正乙烷，通過矽膠管柱 (Silica gel Column) 流出液經濃縮，滴入薄層色析板 (Thin Layer Chromatography Plate)，展開後以生物自析法 (Bioautography) 以枯草菌 (Bacillus Subtilis ATCC 6633) 為菌種，經 37°C 培養 5 小時。其結果於蛋鷄停藥 24 小時後尚有部份 (4/16, 25%) 能檢出 25 ppb 之殘留，其餘蛋及各組織於停藥 24 小時後，即無法檢出其殘留。本方法檢驗之回收率、蛋、肉、肝臟及砂囊依序為 62%，68.8%，68.8% 及 68.8%。

孟寧素是抗生素之一，係用來做飼料添加物⁽⁴⁾，可增加飼料使用效率，增重及治療雞球蟲病。自 1976 年引進國內後，就奪走了國內球蟲藥的市場，因為球蟲病是很難根治的疾病^(1,2)，對於驅除藥劑均會產生抗藥性⁽⁸⁾。孟寧素是携離子型 (Ionophore) 抗球蟲劑，能携帶過量之鈉鉀離子進入球蟲體內，造成球蟲因滲透壓不平衡而殺死球蟲，故球蟲不易產生抗藥性。因此類似孟寧素之其他携離子型抗球蟲藥，如 Salinomycin, Narasin, Lasalocin Sodium 及 Maduramicin ammonium 陸續引進國內使用，就是原因。

孟寧素抗球蟲藥在國內之使用量一直上升，其原料及飼料添加物之檢驗已有許多報告^(11,14)，但對於在雞肉或雞蛋等可食用組織上

之殘留檢驗方法，尚未有完整之資料，故急需研究予以建立。孟寧素不具有發色官能基，因此無法用分光光度計 (Spectrophotometer) 及色層分析儀 (Chromatography meter) 檢驗，故乃使用 TLC 法配合 Bioautography 法來檢測。

材料與方法

1. 儀器設備：

均質攪拌機、離心機、真空旋轉蒸發器 (Rotary vacuum evaporator)，展開槽 (100×250×200 mm)，層析管 (Chromatographic tube, 250×15 mm)，角瓶 (220×220 mm)，恆溫箱、水槽、高壓蒸汽滅菌器。

2. 試藥及試液：

正己烷、甲醇、氯仿、四氯化碳、矽膠、醋酸、無水硫酸鈉、醋酸乙酯、異辛烷 (isooctane)、三乙胺 (Triethylamine)、香蘭素 (Vanillin)、培養基 No: 1 (5272) 及 No: 2 (5720)，以上均是 merck 產品。

孟寧素標準品及原料，向台灣禮來公司分讓。

鹽酸羥四環素、鹽酸氫四環素及馬杜拉黴素標準品 (Maduramicin ammonium)，向台灣氰胺股份有限公司分讓。

硫酸新黴素及配尼西林標準品為購買之 USP 級，沙利黴素標準品 (Salinomycin) 向輝瑞製藥公司分讓。

拉薩羅標準品 (Lasalocid) 向施懷哲股份有限公司分讓。

枯草菌凍晶片⁽⁹⁾，每片含 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 菌 1×10^{10} 個細菌 (本所製劑研究系製造)。

氯仿-甲醇液 (95 : 5)：取 95 ml 氯仿加入 5 ml 甲醇。

呈色劑：取香蘭素 3 gm 加 50 ml 甲醇及 0.5 ml 硫酸，攪拌溶解，加甲醇到 100 ml。

展開液：醋酸乙酯：異辛烷：醋酸：三乙胺 (200 : 6 : 0.4 : 0.2)。

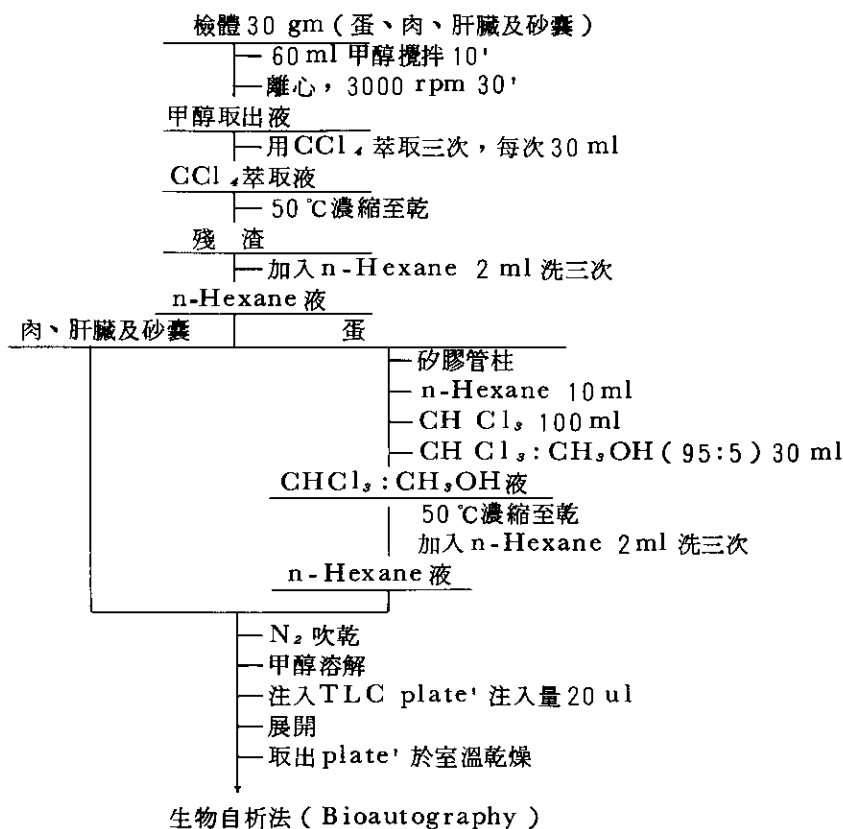
薄層色析板 (Silica gel plate)：Silica 60 merck 5553。

3. 動物試驗：

蛋雞及成雞各 25 隻各分成二組，第一組 20 隻供試驗組，第二組 5 隻供對照組，第一組各於飼料中添加孟寧素 120 ppm，第二組飼養不添加物之空白飼料，飼養二個月，停藥。停藥後從第 1 天起至第 10 天止，每天取蛋及宰殺 2 隻雞，取肉、肝臟及砂囊供試驗材料。

4. 樣品液配製：⁽⁹⁾

樣品萃取流程圖：



5. 可能干擾物質測定：

依飼料添加物使用準則規定，常用之抗生素添加物，選取羧四環素 (Oxytetracycline)，氯四環素 (Chlortetracycline)，配尼西林 (Penicillin)，新黴素 (Neomycin sulfate)，沙利黴素 (Salinomycin)，拉薩羅 (Lasalocid) 及馬杜拉黴素 (Maduramicin ammonium) 等 7 種藥物，各取標準品，以 50ppb 添加量，加入空白雞肉和雞蛋中，供測定干擾情形。

6. 層析管柱、標準液、空白液、枯草凍晶片之製造，薄層色析法標準曲線及回收率之操作，依去年所研究方法⁽⁹⁾進行。

7. 生物自析法 (Bioautography Method)

取抗生素培養基 No: 1 及 No: 2 依配方配製，經 121°C 15 分鐘滅菌，滅菌後之 No: 2 培養基，每個角瓶各倒入 100 ml，使冷却凝固，再取 No: 1 培養基 50 ml，置於 45°C 水槽恒溫後，加入枯草菌凍晶片 2 片，搖勻後，倒入已冷却 No: 2 培養基上，俟凝固，取上述已展開之 TLC 色析板倒置於培養基上，在色析板輕壓以趕走空氣，使已展開之孟寧素藥物移轉到培養基上，15~20 分鐘後取出色析板，置角瓶於 37°C 恒溫器培養 5 小時，取出用測微尺測量抑制圈大小，供下述計算方法之用，以求檢體之殘留量。

8. 計算方法：

每次每片 TLC 色析板操作時均做空白材料及 25、50 ppb 標準檢體一同操作，當空白檢體沒有抑制圈而 25、50 ppb 標準檢體有抑制圈時，則其他檢體之抑制圈大小與標準曲線圖對照，求出殘留量，除回收百分率，即為檢體之殘留量 (ppb)。

試驗結果

取標準品以甲醇溶解後，用 50% 甲醇液稀釋到 10, 5, 2.5, 1.25 及 0.625 mcg (力價) / ml 及由對照試驗組所生之蛋和宰殺之雞肉，肝臟及砂囊加入 25 ppb 標準液之供回收率試驗之標準檢體，經萃取操作所得之數據如表 1 及製得之標準曲線如圖 1。

由對照試驗組蛋雞所生之蛋及宰殺肉雞，取肉、肝和砂囊，各加入 25 ppb 標準液，經萃取操作，由表 1 之數據及圖 1 之標準曲線，計算其回收率，依序為 62%，68.8%，68.92% 及 68.84%。

孟寧素以 120 ppb 飼養蛋雞及肉雞，試驗 1 個月後，取蛋及宰殺二隻雞，取肉、肝臟及砂囊，依去年研究方法⁽⁹⁾進行試驗，以及將蛋煮熟和煎蛋及上述宰殺雞之組織及臟器，經 100°C 煮沸 10 分鐘，一併進行測試其結果如表二。

圖 1 孟寧素之標準曲線

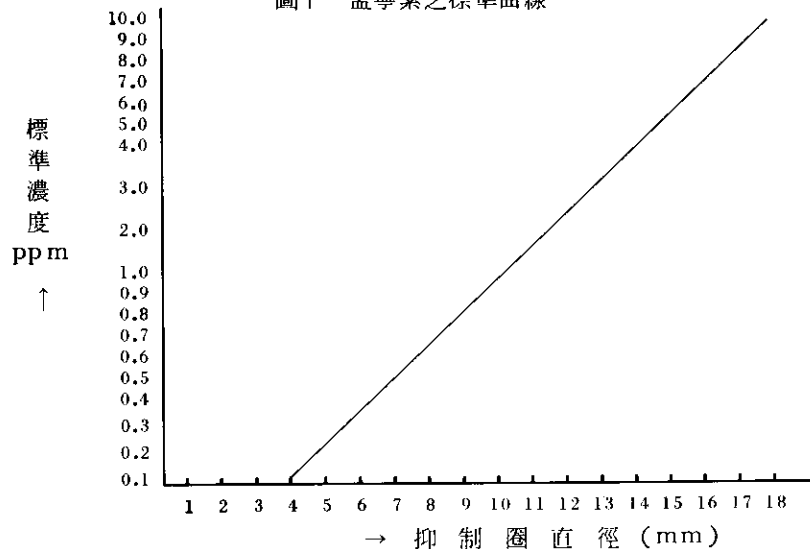


表 1 標準晶液及標準檢體液之抑制圈直徑

單位: mm

培 養 皿	E 組		D 組		B 組		A 組		標 準 檢 體 組				
	mcg / ml		mcg/ml		mcg/ml		mcg / ml		mcg / ml				
	2.5	0.625	2.5	1.25	2.5	5.0	2.5	10.0	2.5	蛋	肉	肝	砂囊
I	14.4	9.0	14.3	11.6	14.0	15.8	14.3	17.5	14.4	12.1	12.6	12.6	12.6
	14.5	9.0	14.3	11.9	14.1	16.0	14.2	17.3	14.3	12.0	12.4	12.7	12.4
	14.1	8.9	14.2	11.5	14.4	15.8	14.2	17.6	14.3	11.9	12.4	12.4	12.5
II	14.0	8.9	14.1	11.4	14.3	15.9	14.7	17.7	14.6	12.0	12.7	12.6	12.6
	14.3	9.0	14.1	11.5	14.3	15.7	14.5	17.5	14.3	12.1	12.3	12.4	12.7
	14.2	9.0	14.5	11.3	14.3	15.9	14.3	17.3	14.2	12.2	12.5	12.5	12.3
III	14.4	8.8	14.2	11.4	14.5	16.0	14.3	17.6	14.4	12.0	12.5	12.5	12.4
	14.0	9.0	14.3	11.5	14.4	15.8	14.3	17.4	14.1	12.0	12.5	12.7	12.7
	14.5	8.9	14.1	11.4	14.1	15.8	14.3	17.4	14.5	12.0	12.6	12.6	12.5
平 均	14.26	8.94	14.22	11.5	14.26	15.85	14.34	17.47	14.34	12.14	12.5	12.54	12.52
校正值		8.95		11.55		15.86		17.4		12.07	12.43	12.47	12.45

36 個修正濃度平均抑制圈為 14.27，故修正後之值如上
最終濃度計算：

$$\text{高濃度 H} = \frac{3A + 2B + C - E}{5} = \frac{52.2 + 31.72 + 14.27 - 8.95}{5} = 17.84$$

$$\text{低濃度 L} = \frac{3E + 2D + C - A}{5} = \frac{26.85 + 23.1 + 14.27 - 17.4}{5} = 9.36$$

表二 新鮮雞蛋、組織加熱處理後蛋和組織中孟寧素之含量

檢 體	*Rf × 100	抑制圈 (mm)	組織含量 (ppb)
蛋 (新鮮)	41	13.8	41.9
"	41	15.1	64.5
"	42	13.6	40.3
(煮沸)	—	—	—
"	—	—	—
"	—	—	—
(煎蛋)	—	—	—
"	—	—	—
"	—	—	—
雞肉 (新鮮)	41	13.1	30.5
"	41	12.9	29.6
(煮沸)	—	—	—
"	—	—	—
雞肝 (新鮮)	42	15.3	62.4
"	43	15.8	74.6
(煮沸)	—	—	—
"	—	—	—
砂囊 (新鮮)	41	14.2	43.6
"	42	13.9	40.7
(煮沸)	—	—	—
"	—	—	—

* Rf 值：為檢品展開點高度 / 展開液展開高度

由表二結果知孟寧素添加於飼料中，飼養蛋雞及肉雞，其雞蛋及組織內之含量，可用生物自析法來測定，而這些蛋及組織經加熱處理過後，就再也測不出其殘存。

可能干擾物質之測定：選用 7 種常用之飼料添加物，經測試結果，經四環素（OTC），氯四環素（CTC），配尼西林（PC）及硫酸新黴素（Neo），以本法測試沒有產生抑制圈，不影響孟寧素之判定。而沙利黴素，拉薩羅及馬杜拉黴素其 $Rf \times 100$ 之值，依序為 52, 78 及 56，這三種藥物同列為携離子型抗虫藥，用本法測定亦可測出有抑制圈，但其 Rf 值與孟寧素相差較多，亦不影響判定。

孟寧素以 120 ppm 添加於飼料，飼養蛋雞及肉雞，飼養二個月，停藥。停藥後從第 1 天起至第 10 天止，每天取蛋及宰殺 2 隻雞取肉，肝臟及砂囊等組織，進行檢查，其結果如表三。表三所列數字僅列出所有陽性及部份陰性數字。因試驗組各有 20 隻蛋雞及肉雞，蛋雞每天產蛋很多，其產蛋率平均約 75%，停藥後所產之蛋均做檢驗，第 1 天產 16 個蛋，檢出 4 個殘留（佔 25%），殘留量平均 25 ppm，所產之蛋及宰殺取肉等組織，均是當天採樣當天操作，連續 10 天，結果除了第 1 天部份陽性外，其餘蛋及肉等組織，於停藥 1 後均無法檢出。

表三 孟寧素在雞蛋和雞肉等組織之殘留

檢體	Rf × 100	抑制圈直徑 (mm)	組織殘留量 (ppb)
蛋			
1 天	41	11.6	20.9
1 天	41	11.6	20.9
1 天	42	12.4	27.4
1 天	41	12.8	30.6
1 天	—	—	—
2~10天	—	—	—
肉			
1~10天	—	—	—
肝臟			
1~10天	—	—	—
砂囊			
1~10天	—	—	—

討 論

本次試驗購買蛋雞及肉雞各 60 隻，置於空氣調節之隔離雞舍飼養，從小雞一直養到成雞，飼養不含藥物之空白飼料。肉雞飼養到 12 週後開始做試驗，而蛋雞飼養到全部產蛋為止（約 18 週）開始試驗，試驗分 6 組進行，每組 10 隻雞，前 5 組為試驗組，於空白飼料中分別添加孟寧素 80, 100, 120, 150 及 200 ppm，第 6 組為對照組飼養空白飼料，試驗開始試驗組中 150 及 200 ppm 組雞均有拒食飼料現象，試驗 1 週後每天飼料均吃不到 $\frac{1}{3}$ ，而其他各組飼料均吃光，這可能因孟寧素具有很強刺鼻味或毒性強有關，因此從所設計試驗，改分二組，第一組各使用 20 隻雞於飼料中添加 120 ppm，第二組使用 5 隻雞飼養空白飼料。

試驗開始，肉雞未做增重試驗，而蛋雞在未試驗前之產蛋率約為 63%，而試驗進行時蛋雞之產蛋率突明顯增高，到試驗結果時其產蛋率為 75%，由此可見孟寧素確有提高飼料使用效率。

為明瞭使用本方法（Bioautography method）對其他常用飼料添加物是否會引起干擾作用，本試驗亦做氯四環素、經四環素、配尼西林、新黴素、沙利黴素、拉薩羅及馬杜拉黴素等藥物之測試，發現用本方法可同時測定沙利黴素、拉薩羅及馬杜拉黴素而不受影響，只是殘留量及敏感性仍需進一步研究，但對氯四環素、經四環素、配尼西林及新黴素，不產生抑制圈，不影響本法之檢驗。

孟寧素亦如同其他抗生素一樣，遇熱即失去作用，阮氏⁽¹⁰⁾在熱處理對於畜產品中抗生素殘留量之影響報告中說明，在 100℃ 煮沸加熱時間愈長，抗生素殘留量愈少之情形與本次試驗，蛋、肉經煮熟及 100℃ 處理 10 分鐘，均無法再檢出結果一致。

孟寧素因不具有發色官能基，故難以用分光光度計或高壓液相層析儀來檢測，才選擇用生物自析法來分析，目前國內外對於抗生素之檢驗，仍以微生物來檢驗^(3, 5, 6, 7, 11-15)，生物自析法使用前須配合 TLC 方法來分離，

TLC 是目前用來鑑定藥物，既快速方便，又能為大衆所接受方法之一。本試驗採用方法跟 CNS 77038 號⁽⁶⁾之原理相同，只是不同抗生素使用不同細菌和移動相而已。

參 考 文 獻

1. 李永基、徐亦薇、傅和美。1970。台北地區雞球蟲調查。台灣省畜牧獸醫學會會報 17: 37 ~ 41。
2. 李永基、劉錦志。1978。本省分佈之雞球蟲病原調查。中華民國獸醫學會雜誌 4: 81 ~ 87。
3. 鮮肉抗生素殘留檢查法，中國國家標準，CNS 5916 號。
4. 飼料添加物使用準則，經濟部 68 年公佈。
5. 肉及肉製品中殘留四環素類抗生素檢驗法 CNS 77038 號。
6. 動物用醫藥品，飼料添加物の畜水産物への殘留とその分析法。1985。畜産生物科學安全研究所編，近代出版社，262 ~ 264。
7. 傅祖慧。日本、美國及我國的畜水産品殘留抗生物質檢查法。台灣區肉品發展基金會。1982，37 ~ 38。
8. 劉榮標。1984。獸醫微生物學，國立編譯館藝軒圖書出版社。1740~1742。
9. 李新進、吳義興、蕭終融、楊揚輝。1988。飼料添加孟寧素 (Monensin) 在雞肉和雞蛋中殘留試驗 (I) 孟寧素在雞肉和雞蛋中檢驗方法之研究。畜産評議會七十七年度試驗研究報告書 33 ~ 40 頁。
10. 阮喜文、施宗雄。1980。熱處理對於畜産品中抗生素殘留量之影響。農林學報第三十卷 91 ~ 101 頁。
11. ELIZABETH E. MARTINEZ and WILBRT SHIMODA, 1983. Identification and semiquantation of monensin sodium in animal feeds by Thin Layer Bioautography. J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. (vol 66. No6 1983). 1.506-508.
12. ELIZABETH E. MARTINEZ and WILBRT SHIMODA, 1984. Identification and semiquantation of monensin sodium in Liver Tissue. J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. (vol. 67. No.4 1984) 845-846.
13. Microbiology Laboratory Guidebook, January. 1974. 6-8.
14. Microbiological determination of monensin in poultry ration. ELI LILLY and COMPANY general laboratory procedure GP 5119. January 25. 1974.
15. Microbiological assay for monensin in feeds, concentrates, and liquid supplements (turbidimetric method). ELI LILLY and COMPANY general laboratory procedure. GP 5157. Mrch 15 1978.

Investigation on the monensin residues in the meat and egg of fed on the monensin feed.

Lee. S.J., Y.H. Yang, and S.Y. Chiu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

Layer hens and broilers were fed on 120 ppm monensin-containing feed for 2 months and then this drug was withdrawn. Eggs, muscles, livers and gizzards were collected for assay every day for a period of 10 days after withdrawing drugs. The tissues were dissolved in methanol, extracted with carbon tetrachloride and dried. The samples were re-dissolved in n-Hexane followed by passing through the silica gel column. The eluents were concentrated and applied on thin layer chromatography plates, and then assayed using bioautography method. The results indicated that 25% (4/16) of eggs with 25 ppb of monensin could be detected at 24 hours after stopped giving the drugs. However, monensin in the other tissues could not be detected at the level of 25 ppb or less. The recovery rates of the drug in eggs, meats, livers, and gizzards were 62%, 68.8%, 68.9% and 68.8% respectively.