

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出方法之研究

李新進 蕭終融 楊揚輝 邱仕炎

台灣省家畜衛生試驗所

孟寧素 100 ppm 添加於飼料中，飼養蛋雞及肉雞，第五天起其蛋、肝和雞肉，以甲醇溶解，用四氯化碳萃取，通過矽膠管柱 (Silica gel column)，流出液經濃縮後，滴入薄層色板 (Thin Layer Chromatography Plate)，以 Ethylacetate : Isooctane : Acetic acid : Triethylamine (200 : 6 : 0.4 : 0.2) 為展開液，展開後，蒸乾色析板，用生物自析法 (Bioautography)，以枯草菌 (Bacillus Subtilis ATCC 6633) 為菌種，經 37°C 培養 8 小時，可檢出 25 ppb 以上之含量，敏感度為 10 ppb，回收率蛋為 63%，雞肝和雞肉為 70%。

關鍵字：孟寧素，矽膠管柱，薄層色析板，微生物自動圖譜，枯草菌

孟寧素是抗生素之一，係用來做飼料添加物⁽¹⁾，可增進飼料使用效率，增重及治療雞球蟲病。自從 1986 年引進國內後，幾佔國內球蟲藥使用量之大半市場，因為雞球蟲病是很難根治的疾病，對於驅除藥劑均會產生抗藥性⁽²⁾，孟寧素是携離子型 (Ionophore) 抗球蟲劑，能携帶過量之鈉，鉀離子進入蟲體，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 Ionophore 抗球蟲藥，如 Salinomycin, Narasin, Lasalocind sodium 及 Maduramin ammonium 陸續引進國內，就是這個原因。

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^(3,4)，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。在國內有關鮮肉抗生素之殘留檢驗，經濟部中央標準局已有制訂⁽⁵⁾，但均是篩選檢驗，無法做到定性及定量之方法，故對抗生素於可食用組織中，殘留之定性及定量方法能發展出來，這是迫切需要之問題。

試驗材料與方法

動物試驗：

取生蛋雞及大雞各 15 隻，分成二組，第一組為試驗組各使用 10 隻雞，第二組為對照組，各使用 5 隻雞，第一組於飼料中添加孟寧

素 100 ppm，第二組飼養不添加藥劑之空白飼料，飼養二個月。試驗期間取蛋雞所生之蛋及第五天起宰殺大雞，取雞肝及雞肉供試驗材料試藥及試液：

正己烷 (n-Hexane)，甲醇 (methanol)，氯仿 (chloroform)，醋酸 (acetic acid)，四氯化碳 (Carbon tetrachloride)，矽膠 (silica gel 0.2 ~ 0.5 mm)，無水硫酸鈉 (sodim snlfate anhydrous)，醋酸乙酯 (ethylacetate)，Isotane，Triethylamine，以上均是 Merck 公司產品。氯仿含 5 % 甲醇，抗生素培養基 No : 1 及 No : 2 (Merck antibiotic medium 5272 號及 5720 號)，枯草菌凍晶片 (每片含 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 菌 1×10^{10} 個細菌)，呈色劑：取 3 gm vanillin (Merck) 加 50 ml 甲醇及 0.5 ml 硫酸，攪拌溶解後加甲醇到 100 ml，儲存於暗處，用時才配製，孟寧素標準品及原料：向台灣禮來公司購買。展開液 (mobil phase) : Ethylacetate : Isooctane : Acetic acid : Triethylamine (200 : 6 : 0.4 : 0.2)，薄層色析板 (SiliCa gel 60 , Merck 5553)。

層析管柱之裝配

層析管依序加入 10ml 正己烷，2.4 g 矽膠，5ml 正己烷，用玻璃棒攪拌均勻並趕走空氣後，小心加入無水硫酸鈉粉末約 5 gm，打開開關慢慢排出正己烷，使正己烷之液面剛好在無水硫酸鈉上，關閉開關。

樣品萃取方法

1. 肝臟及肉檢體

精確稱取檢體約 30 gm，切碎再用均質攪拌機攪均，每 gm 檢體加入甲醇 2 ml，攪拌 10-15 分鐘，移入離心管，經 3000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液 (每公克檢體取 1.5 ml 共取 45 ml) 於 250 ml 分液漏斗內，加入四氯化碳萃取三次，每次約 30ml，合併三次四氯化碳萃取液放於蒸發瓶中，接真空旋轉蒸發器，於 50 °C 蒸發到乾，殘渣加入 3 ml 正己烷，溶解後移入 10ml 樣品瓶，蒸發瓶中殘渣物

再以正己烷洗滌二次，每次 2 ml，合併洗滌液放於 10ml 樣品瓶，用氮氣吹乾；殘渣再以甲醇溶解，其量依前述離心上清液每 10ml 加入 0.05ml，塞住瓶塞備用。

2. 蛋檢體

取蛋精確稱重，扣去蛋殼，取蛋白及蛋黃於燒杯中，加入甲醇，每 gm 檢體加入 2 ml，攪拌 10-15 分鐘後移入離心管，經 3000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液 (每公克檢體取 1.5 ml 共取 45ml) 於 250ml 分液漏斗中，用四氯化碳萃取三次，每次約 30ml，合併四氯化碳萃取液於蒸發瓶，接真空旋轉蒸發器於 50 °C 蒸到乾，殘留物加入 10ml 正己烷使溶解，移入層析管 (Column)，蒸發瓶再以正己烷洗滌二次，每次 3 ml，合併洗液移入層析管，打開開關，拋棄正己烷流出物，層析管再加入 100ml 氯仿，並以每分鐘 3 ml 之流速，洗滌層析管，拋棄氯仿流出物，俟氯仿流乾後，再加入 30ml 氯仿含 5 % 甲醇液於層析管，並以蒸發瓶收集氯仿甲醇流出液，接真空旋轉蒸發器，於 50 °C 蒸發到乾，殘渣加入 3 ml 正己烷溶解後移入 10ml 樣品瓶，蒸發瓶再用正己烷洗滌二次，每次 2 ml，合併洗滌液於 10ml 樣品瓶，用氮氣吹乾，殘渣用甲醇溶解，其量依前述離心上清液，每 10ml 加入 0.05ml，塞住瓶塞備用。標準液之配製

取未曾添加孟寧素飼料所飼養之大雞雞肉，及蛋雞所生之蛋各約 30 公克，加入 25 ppb 之標準液 (0.1mcg / ml) 7.5ml 及甲醇 52.5ml，攪拌均勻後，依上述雞蛋及雞肉檢體之萃取方法處理；處理後之濃度為 2.5 mcg / ml，(濃縮後提高 100 倍)。

空白樣品液配製

取未曾添加孟寧素飼料所飼養之大雞雞肉，及蛋雞所生之蛋各約 30 公克，以下照雞蛋及雞肉檢體配製法操作之。

枯草菌凍結晶片

取枯草菌種 (*Bacillus Subtilis* ATCC 6633) 接種於 No. 1 抗生素分析用培養基上於 37 °C 培養 7 天後，依生乳中抗生物質殘留檢驗法⁽⁶⁾中，微生物芽胞懸浮液配製方法 (3.1) 配

製。

薄層色析法 (TLC method)

取薄層色析板二片，於底下 2 CM處用鉛筆劃一線，並每隔 2 CM之間隔處一記號，依序取定量毛細管滴入空白樣品液，標準樣品液及檢體，滴入量為 20 μ l，置室溫 5 分鐘後，放入展開槽內，槽中已事先放入濾紙片及 200 ml 展開液，蓋上槽蓋，當層析板展開到約 15 CM 處時取出層析板，於室溫使展開液乾燥（可用吹風機以冷風吹乾），其中一片供微生物自動圖譜定量之用，另一片噴入呈色液，於 110 $^{\circ}$ C 之烘箱使呈色，當空白樣品液沒有展開點，而檢體之展開點與標準品展開點一樣高，判定檢體含孟寧素之殘留，繼續做微生物自動圖譜之定量分析，反之若檢體沒有展開點，或展開點不與標準品展開點一樣高，則判定檢體不含孟寧素之殘留。

生物自析法 (Bioautography method)

抗生素培養基 No. 1 及 No. 2 依配方配製經 121 $^{\circ}$ C 15 分鐘滅菌，每個角型培養皿各倒入 No : 2 培養基 100 ml，冷卻凝固後，取 No : 1 培養基 50 ml，放入 45 $^{\circ}$ C 水槽恒溫後，加入枯草菌凍晶片 2 片，搖均後倒入已冷卻 No : 1 培養基上，俟凝固後，取上述已展開之色析板倒置於培養基上，在色析板上輕壓以趕走空氣，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，置角瓶培養皿於 37 $^{\circ}$ C 恒溫箱培養 8 小時，取出用測微尺測量抑制圈大小，並和標準品曲線對照，算出檢品殘留 monensin 之含量。
標準曲線及回收率

取孟寧素標準品適量精確稱定，以甲醇溶解，製成 1 mg (力價) / ml 之儲備原液，置於 4 $^{\circ}$ ± 2 $^{\circ}$ C 冰箱於 10 天內使用。使用時取原液以 50% 甲醇液稀釋到 10, 5, 2.5, 1.25

表 1. 標準樣品之抑制圈直徑

單位：mm

培養皿	敏感性試驗組		E 組		D 組		B 組		A 組		試驗組		
	mcg/ml		mcg/ml		mcg/ml		mcg/ml		mcg/ml		mcg/ml		
	2.5	0.38	2.5	0.625	2.5	1.25	2.5	5.0	2.5	10	2.5 蛋	2.5 肉	2.5
I	13.9	-	14.0	8.8	13.6	11.3	14.1	15.1	14.0	16.8	13.6	11.7	11.8
	13.8	-	14.1	8.9	13.9	11.6	13.4	15.6	13.7	17.0	13.9	11.6	11.9
	13.5	-	13.9	8.7	14.1	11.2	13.9	15.4	13.3	16.6	13.9	11.6	11.6
II	13.9	-	13.6	9.0	13.8	11.3	14.0	15.7	13.2	16.7	13.8	11.4	11.5
	13.4	-	13.3	8.9	14.3	11.0	13.7	15.9	13.9	16.5	13.8	11.5	11.7
	13.8	-	13.9	8.5	13.6	11.4	13.9	15.1	13.8	16.7	14.1	11.3	11.8
III	14.2	-	13.7	8.8	13.8	10.9	13.6	15.4	13.7	16.3	14.0	11.4	11.9
	13.7	-	13.9	8.8	14.2	11.2	14.0	15.7	14.0	16.6	14.0	11.4	11.7
	13.9	-	14.1	8.6	14.0	11.3	14.1	15.9	13.9	16.9	13.9	11.6	11.8
平均	13.8		13.8	8.8	13.9	11.2	13.9	15.5	13.7	16.7	13.9	11.5	11.7
校正值				8.8		11.1		15.4		16.8		11.5	11.6

36 個修正濃度平均抑制圈直徑為 13.8，故校正後之值如上。

最終濃度計算：

$$\text{高濃度 } H = \frac{3A + 2B + C - E}{5} = \frac{50.4 + 30.8 + 13.8 - 8.8}{5} = 17.2$$

$$\text{低濃度 } L = \frac{3E + 2D + C - A}{5} = \frac{26.4 + 22.2 + 13.8 - 16.8}{5} = 9.1$$

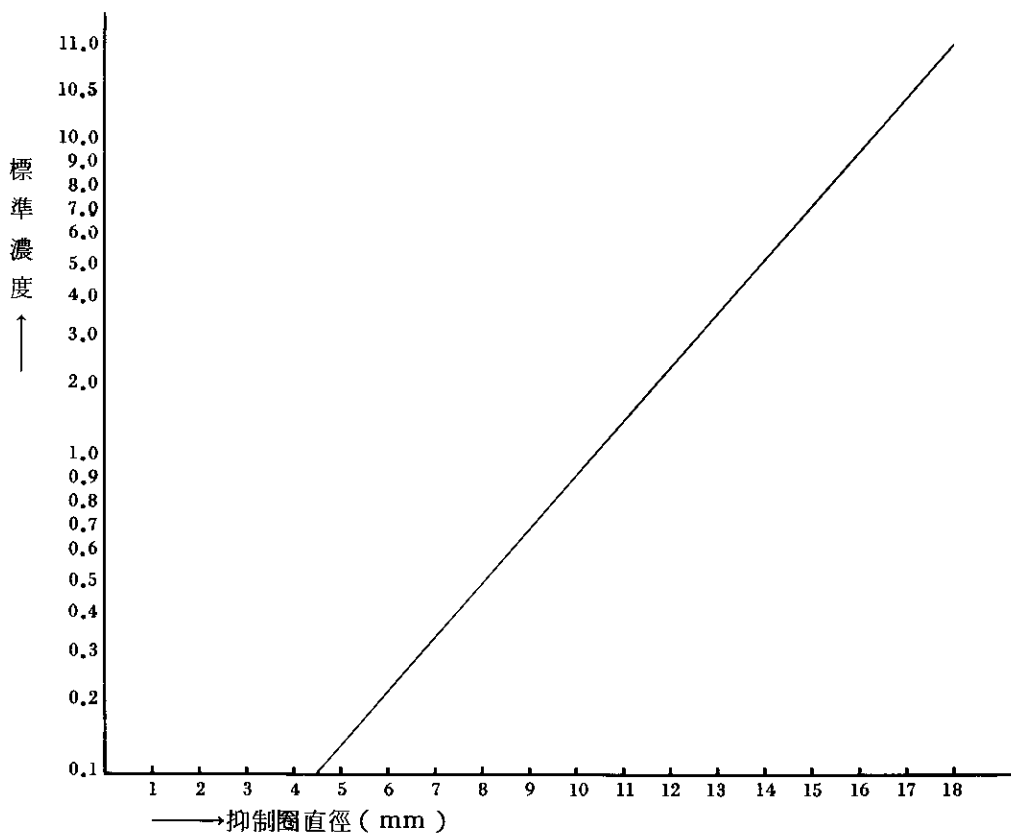


圖 1. 孟寧素之標準曲線 $H_1 = 17.2$; $L = 9.1$

表 2. 雞肝臟，雞肉及雞蛋經生物自析法測定後之組織內含量

檢 體	Rf × 100	抑 制 圈 (mm)	組織內含量 (ppb)	
肝 臟	(5天)	42	13.5	50.0
	(10天)	41	14.2	62.8
	(15天)	41	15.6	114.2
	(20天)	39	16.0	128.5
	(25天)	42	16.6	171.4
雞 肉	(5天)	41	10.0	12.8
	(10天)	41	11.2	20.7
	(15天)	42	10.5	15.0
	(20天)	40	11.6	24.2
	(25天)	42	12.0	27.8
雞 蛋	(5天)	40	12.3	33.0
	(10天)	39	13.1	44.6
	(15天)	42	12.5	35.4
	(20天)	39	14.0	62.3
	(25天)	41	13.6	53.8
對 照	-	-	-	

及 0.625mcg (力價) / ml, 並以 0.308 mcg (力價) / ml 供敏感測定標準液, 其中 2.5 mcg (力價) / ml 為標準修正濃度。

操作法: 依據⁽¹²⁾標準曲線製作法操作之, 並與標準液一併操作, 以求取蛋中及肉中殘留孟寧素之回收百分率。

試驗結果

標準品之標準曲線蛋及肉中之回收率及經測定結果如表 1 及圖 1。

由上面之結果知, 從試驗組中蛋及肉之回收率, 從圖上換算結果蛋為 63%, 雞肉為 70%。

肉、肝及蛋經萃取含孟寧素液, 定量滴入色析板 (TLC plate) 展開, 以枯草菌為菌種, 用生物自析法測定, 其含量如表 2。

由表 2 所得結果知孟寧素添加於飼料中, 飼養蛋雞及肉雞後從第 5 天起就能殘留於蛋, 肉和肝臟中, 且殘留量會隨著使用天數之增加而增加, 其增加趨勢尚須進一步之試驗。上述之殘留以肝臟為最高, 其次為蛋, 肉中最少。

討 論

孟寧素是屬於抗生素藥物, 因不具有發色之官能基, 故難以用分光光度計或高壓液相層析儀器檢測, 才選擇用微生物來分析, 且目前國內外對於抗生素於可食用組織之殘留檢驗仍以微生物來操作⁽⁹⁻¹²⁾, 在可看到方法中此試驗均以篩選之試驗⁽⁹⁾。至今年三月中我國經濟部中央標準局通過「肉及肉製品殘留四環素類抗生素檢驗法⁽⁴⁾, 可定性及定量四環素類抗生素於肉中之殘留」。近來由於國人生活水準已提高, 對於食品之污染造成人類健康之顧慮已提高警覺, 故對四環素以外之其他抗生素之殘留定量須加速進行, 以符合需要。

用 TLC 方法來檢查藥物殘留, 既快速又方便, 又能為大家所接受。本試驗所採用之方法跟 CNS 77038 號⁽⁴⁾ 方法其原理大致相同, 只是不同抗生素使用不同菌種及移動相而已, 在國外類似抗生素之檢驗以 ELIZABETHE, MARTINEZ^(10, 11) 等為代表, 仍採用生物

自析法來分析飼料及雞肉組織之殘留, 其結果與本試驗之結果大致相同。TLC 法在定性過程中不同移動相, 所產生之 Rf (展開點高度 / 展開液高度) 值亦不同, 故選擇適當之移動相很重要。在操作過程中, 為使層析板之高度一致, 於展開槽中須加入濾紙, 槽上之磨砂玻璃須加凡士林, 使移動相之飽和蒸汽均勻分佈於槽中, 如此才能保持一定之速度而使層析板高度一致。本試驗所選擇之移動相其 Rf 值約 0.41, 與 ELIZABETHE, MARTINEZ^(10, 11) 所用不同, 其 Rf 值約 0.60, 主要原因是其他 Ionophore 之抗生素在本試驗中 Sodium Salinomycin 約 0.5 及 Narasin 約 0.6 很容易區別之緣故。

以微生物自動圖譜來測定殘留抗生素之含量, 是最近幾年之事, 在操作過程中, 細菌種類及濃度很重要, 在本試驗所用菌種與日本近代出版社⁽⁷⁾、傅⁽⁸⁾及 ELIZABETHE, MARTINEZ^(9, 10) 都一樣使用枯草菌, 因孟寧素除對球蟲有殺滅之能力外, 對陽性細菌亦具有很強之殺菌力, 故本試驗筆者也採用向陽明醫學院分讓而來之 *Listeria* 菌來進行對照實驗, 其敏感度比枯草菌更高, 可檢出 10 ppb 以上之含量, 唯試驗尚在進行。另外以微生物自動圖譜測定時 TLC 板轉移時須把空氣完全壓出, 使 TLC 板與菌層培養基緊密結合才行, 轉移時間為 10-15 分。

參考文獻

1. 李永基、徐亦薇、傅和美。1970。台北地區雞球蟲病調查。台灣省畜牧獸醫學會會報報告 17: 34-41。
2. 李永基、劉錦志。1978。本省分佈之雞球蟲病病原調查。中華民國獸醫學會雜誌 4: 81-87。
3. 鮮肉抗生素殘留檢驗法, 中國國家標準, CNS 5916 號。
4. 飼料添加物使用規範。經濟部 68 年公布。
5. 生乳中抗物質殘留檢驗法, 中國國家標準 CNS 3453。
6. 肉及肉製品中殘留四環素類抗生素檢驗

- 法，CNS 77038 號。
7. 動物用醫藥品，飼料添加物の畜水産物への残留とその分析法。1985。畜産生物科學安全研究所編，近代出版，262-264。
 8. 傅祖慧。1982。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。37-38。
 9. 劉榮標。1984。獸醫微生物學，國立編譯館藝軒圖書出版社。1740-1742。
 10. KLIZARETH E. MARTANEZ and WILBRT SHIMODA, 1983 Identification and Semiquantation of Monensin in Animal Feeds By Thin Layer sioautography. J. ASSOC, OFF. ANAL. CHEM. (vol.66. No.6 1983.) 1506-1508.
 11. 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.
 12. Microbiology Laboratory Guidebook, January, 1974 6-8.
 13. Microbiological determination Of monensin in poultry ration ELI LILLY and COMPANY general laboratory procedure GP 5119 January 25, 1974.
 14. Microbiological assay for monensin in feeds, concentrates, and liquid supplements (turbidimetric method), ELI LILLY and COMPANY general laboratory procedure. GP 5157, March 15, 1978.

Investigations on the monensin residues in the meat and egg of chicken fed on the monensin-containing feed.
(1) Studies on the methods for the detection of monensin in meat and egg of chicken.

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

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

The layers and broilers were fed with 100 ppm monensin. Egg, liver and meat of broilers were collect every 5 day sequentially and extract by carbon tetrachloride . The extracts were eluated with chloroform-methanol(95:5) in silica gel column. The elutes were concentrated and dried. The residues were dissolved in methanol and applied on thin layer chromatography plate and developped with ethylacetate:igooctane:acetic acid:triethylamine (200:6:0.4:0.2). Those plates were dried and analyzed by bioautography with *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). These results indicated the detection limit was more then25 ppb. The recovery rate from egg and meat were 63% and 70%, respectivity.