

雞肉及雞肝中衣索巴檢驗方法之探討

高雅敏 張碧秋

行政院衛生署藥物食品檢驗局

摘 要

利用高效液相層析法分析雞肉及雞肝中衣索巴之檢驗方法業已建立。衣索巴以乙腈自檢體中萃取,經過濾,以乙腈飽和之正己烷除去雜質後濃縮,再以矽酸鎂管柱淨化,最後利用高效液相層析儀分析定量。使用之層析管柱為 Lichrospher 100 RP-18(25 cm x 4.6 mm i.d., 粒子大小為 5 μ m), 移動相為乙腈/水(3/7), 以螢光檢出器於激發波長 300nm 及放射波長 350nm 檢測。於檢體中添加衣索巴 0.02, 0.05, 0.10 及 0.20ppm 時, 其回收率於雞肉及雞肝中分別為 93.22~94.67% 及 92.77~94.45%, 變異係數皆小於 4%, 本方法在此二種檢體中之最低檢出量可低達 2 ppb。將此方法應用於市售雞肉及雞肝之檢驗, 檢體各為 25 件, 結果均未檢出。

前 言

動物用藥添加至飼料中之目的, 主要在防治動物疾病, 並提高飼料效率, 以促進動物生長及增加產量。而為防止動物用藥之濫用及維護國人健康, 必須對肉品加強衛生管理, 因此對於肉品中藥物殘留分析方法之建立乃刻不容緩之事。

衣索巴(ethopabate, 4-acetoamido-2-ethoxybenzoic acid methyl ester)為一種合成抗原蟲劑, 依行政院農業委員會於 74 年公告之『飼料添加物使用規範』⁽¹⁾中規定, 此藥劑不可單獨使用, 必須與安保寧及磺胺奎林(sulphaquinoxaline)或乃卡巴精(nicarbazin)合併添加於飼料中, 作為雞之球蟲病預防劑, 行政院衛生署 76 年 4 月公告之『動物用藥殘留標準』⁽²⁾規定此藥劑不得殘留於肉品中, 故本研究乃針對雞肉及雞肝中衣索巴殘留進行檢驗方法之研究, 並對市售雞肉及雞肝中衣索巴殘留進行小規模調查分析, 以供農政及衛生主管機關參考, 如此方能確保肉品之衛生安全及維護大眾之健康。

衣索巴為一白色至粉白色粉末, 可溶於甲醇、乙醇、丙酮及乙腈中, 而微溶於水及異辛烷⁽³⁾, 其在肉品中之分析方法有氣相層析法⁽⁴⁻⁶⁾及高效液相層析法⁽⁷⁻¹¹⁾, 由於氣相層析法之樣品前處理須經加

熱分解及衍生化反應, 步驟較為繁雜, 而高效液相層析法操作簡便快速, 且感度再現性佳, 故本研究乃以高效液相層析法進行檢驗方法之探討。

材料與方法

一、檢體來源

本研究所使用之檢體係 81 年 3 月至 6 月間購自台北市各零售市場者, 其中雞肉及雞肝各 25 件, 共計 50 件。

二、試藥

衣索巴(ethopabate)對照標準品由臺灣興美股份有限公司提供。正己烷、苯、醋酸乙酯、乙醚(以上採用試藥特級)、甲醇、乙腈(以上採用液相層析級)及矽酸鎂(Florisil, 60-100 mesh), 以上試藥均購自 E. Merck, Darmstadt, F.R. Germany。

三、儀器與設備

1. 攪拌均質機: ACE Homogenizer, Nihonseiki kaisha Ltd., Tokyo, Japan。

2. 拋棄式濾膜過濾器: Acrodisc, LC 13, HVDF, 13 mm, 0.2 μ m, Gelman sciences Inc., MI, USA。

3.過濾裝置(Millipore Filter Holder):濾膜孔徑 0.45 μ m, 直徑 47mm, 型號 HV, Nihon Millipore kogyo K.K., Yonezawa. Japan.

4.矽酸鎂管柱:內徑為 1 cm 長 20 cm 之玻璃管柱,內充填經 120 $^{\circ}$ C, 2 小時活化之 1.5g 矽酸鎂,上部填入 1.5g 無水硫酸鈉。

5.分光光度計(Spectrophotometer):Milton Roy Spectronic 300 Array, Spectrophotometer, NY, USA.

6.螢光分光光度計(Spectrofluorophotometer):Shimadzu RF-500, Shimadzu Seisakusho Ltd., Kyoto, Japan.

7.高效液相層析儀

(1)層析儀:Shimadzu LC-6AD, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan.

(2)檢出器:Shimadzu RF-530, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan.

(3)層析管:Lichrospher 100 RP-18, 25 cm $\times$ 4 mm i. d., particle size 5 μ m, E. Merck, Darmstadt, F.R., Germany.

(4)積分儀:Shimadzu C-R4A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan.

四、標準溶液之調製

精確稱取衣索巴對照標準品 100mg 溶於乙腈使成 100ml, 供作標準原液, 再以乙腈稀釋配製 0.2~2.0 μ g/ml, 供作標準溶液。

五、移動相溶液之調製

乙腈與水以 3:7(v/v)之比例混合, 用孔徑 0.45 μ m 之濾膜過濾, 取濾液作移動相溶液。

六、檢液之調製

雞肉或雞肝檢體均質後, 精確稱取檢體 10g, 置於攪拌均質器中, 加乙腈 50ml, 攪拌 3 分鐘後, 以布區奈氏漏斗抽氣過濾, 殘留物再以乙腈 50ml, 同樣操作一次, 再以乙腈 50ml 清洗殘留物, 合併濾液於分液漏斗中, 加入以乙腈飽和之正己烷 30ml, 振盪 10 分鐘, 取乙腈層, 再加入以乙腈飽和之正己烷 30ml, 同樣操作一次, 取乙腈層, 移入濃縮瓶中, 於 40 $^{\circ}$ C 水浴中減壓濃縮至乾。殘留物以苯 5ml 溶解, 注入矽酸鎂管柱內(先以苯 10ml 潤溼), 以苯 5 及 10ml 清洗原濃縮瓶, 洗液注入管柱, 流出液棄之。再以 20% 乙醚/苯溶液 50ml 注入管柱, 洗液棄之, 最後以 30% 醋酸乙酯/

苯溶液 50ml 注入管柱, 溶出液收集至濃縮瓶中, 於 40 $^{\circ}$ C 水浴中減壓濃縮至乾, 以乙腈溶解並定容至 1 ml, 經濾膜過濾後, 供作定量用檢液。

七、定量操作

1. 高效液相層析條件:

分離管柱:Lichrospher 100 RP-18。

檢出器:螢光檢出器, 激發波長:300nm, 放射波長:350nm

移動相溶液:乙腈/水(3/7)

流速:1ml/min

2. 標準曲線之繪製:

取衣索巴依照前述標準溶液之調製配製成 0.2、0.5、1.0 及 2.0 μ g/ml 四種濃度之標準溶液, 精確量取標準溶液各 10 μ l, 分別注入液相層析儀, 由波峰所得平均面積及標準溶液之濃度繪製標準曲線。

3. 鑑別試驗及含量測定:

精確量取檢液及標準溶液各 10 μ l, 分別注入液相層析儀, 就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間, 比較鑑別之, 並由檢液所得之波峰面積與標準曲線比較, 求出檢液中衣索巴之濃度, 再以下式換算成檢體中衣索巴之含量:

$$\text{檢體中衣索巴含量(ppm)} = \frac{C \times V}{W}$$

v: 檢液體積(ml)

c: 檢液之衣索巴濃度(μ g/ml)

w: 檢體重量(g)

八、回收試驗

取均質後之檢體, 分別添加 0.02、0.05、0.1 及 0.2ppm 之衣索巴, 每一添加量作三重覆, 同時作空白試驗, 其步驟依照六所述檢液之調製處理之。

結果與討論

一、高效液相層析儀之檢測

根據文獻指出衣索巴以高效液相層析儀分析時, 可採用紫外光檢出器⁽⁷⁻⁹⁾或螢光檢出器⁽¹⁰⁻¹¹⁾偵測。圖一及圖二分別為衣索巴標準品溶於乙腈:水(3:7)溶液中, 以分光光度計及螢光分光光度計於波長 230~400nm 之區間進行掃描測試結果, 由圖中可發現其於紫外光之最大吸光波長為 270nm, 而其螢光激發波長為 300nm, 放射波長為

350nm。將衣索巴經高效液相層析儀分析時,以乙腈:水(3:7)溶液為移動相,利用 C18 層析管分離,分別以紫外光檢出器及螢光檢出器偵測,所得之

層析圖譜如圖三,由圖中可明顯看出,以螢光檢出器偵測之感度較高,因此本研究採用螢光檢出器作為衣索巴殘留之檢測。

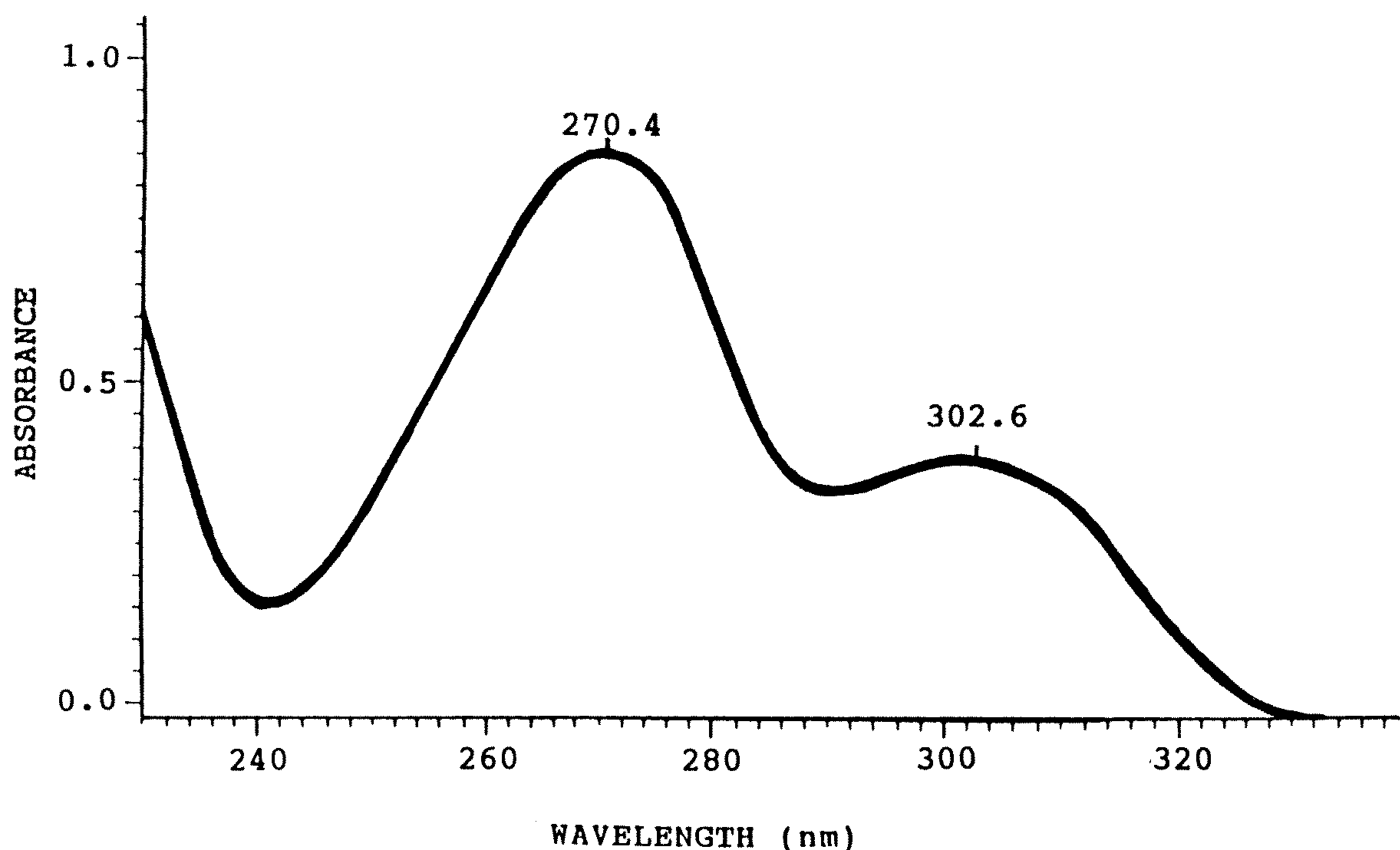


Figure 1. Absorption spectrum of ethopabate in acetonitrile/water(3/7).

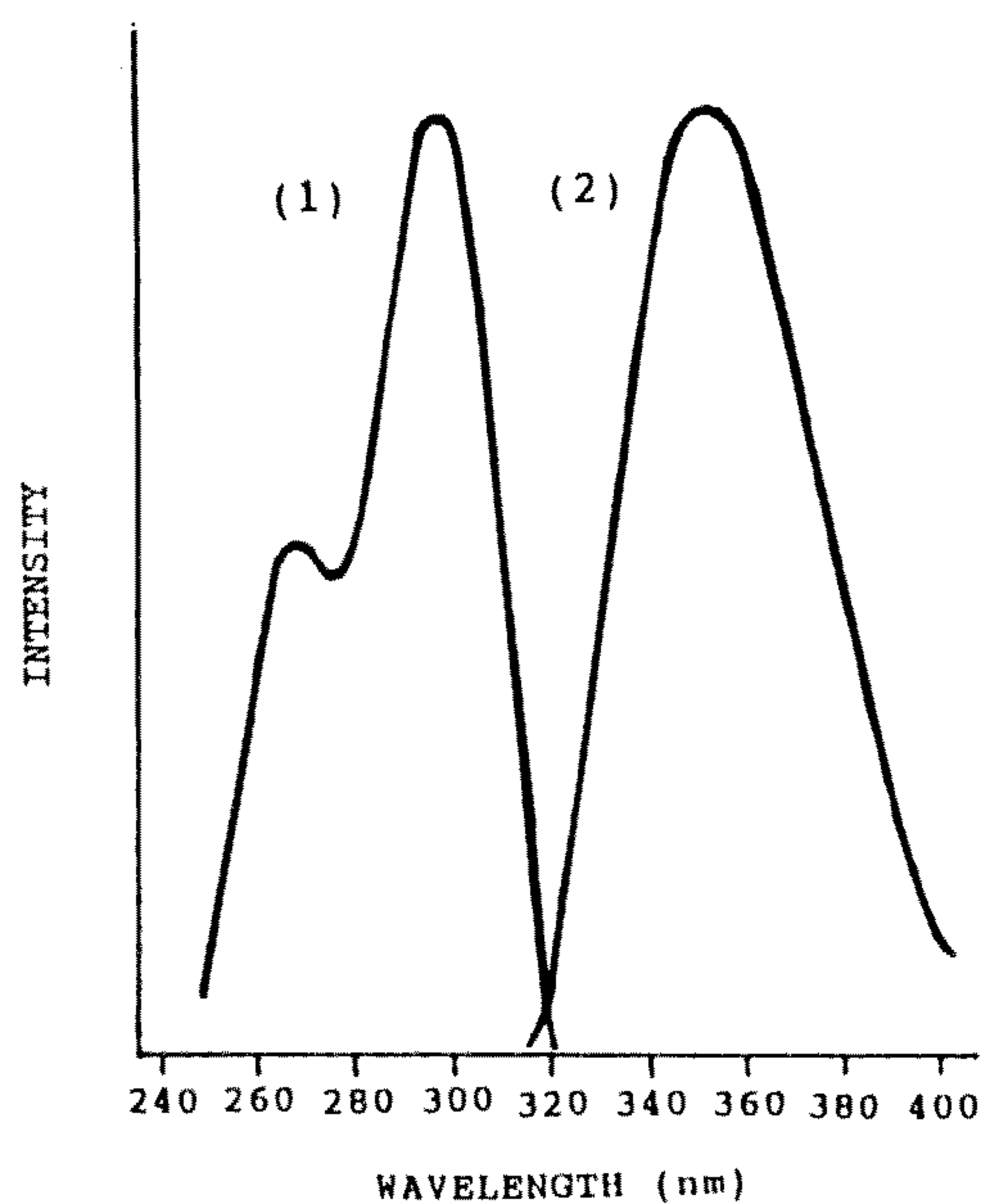


Figure 2. Fluorescence spectra of ethopabate in acetonitrile/water (3/7) (1) Excitation spectrum at 350 nm emission, (2) emission spectrum at 300 nm excitation.

二、前處理之探討

(一) 溶媒萃取之探討

由於衣索巴可溶於甲醇、丙酮及乙腈中,因此分析時常以此三種溶媒作為萃取溶媒,本研究經初步實驗發現,若以甲醇或丙酮為萃取溶媒,由於此二種溶媒與檢體均質後,不易過濾,且易吸水以致濾液無法濃縮至乾,故須額外添加矽藻土及無水硫酸鈉一併操作,以利過濾及濃縮,而且所得之萃取液於濃縮時易起泡及突沸,增加操作時之困擾。但若以乙腈作為萃取溶媒,則無上述問題,且可直接加入正己烷進行溶媒分配萃取淨化步驟,於操作上較簡便,同時所得之回收率可達 90% 以上,故本研究選擇乙腈為最佳萃取溶媒。

(二) 淨化處理之探討

檢體中衣索巴之淨化處理,根據文獻大多先以溶媒分配萃取後,再經層析管淨化。本研究於溶媒分配萃取部分是將乙腈萃取液直接以乙腈飽和之正己烷進行溶媒分配萃取,因所採用之萃取溶媒為乙腈,於添加乙腈飽和之正己烷時,無須經濃縮及轉溶步驟,方法較為簡便。至於層析管淨化部分,所採用之層析管柱計有矽酸鎂^(7,11)及氧化

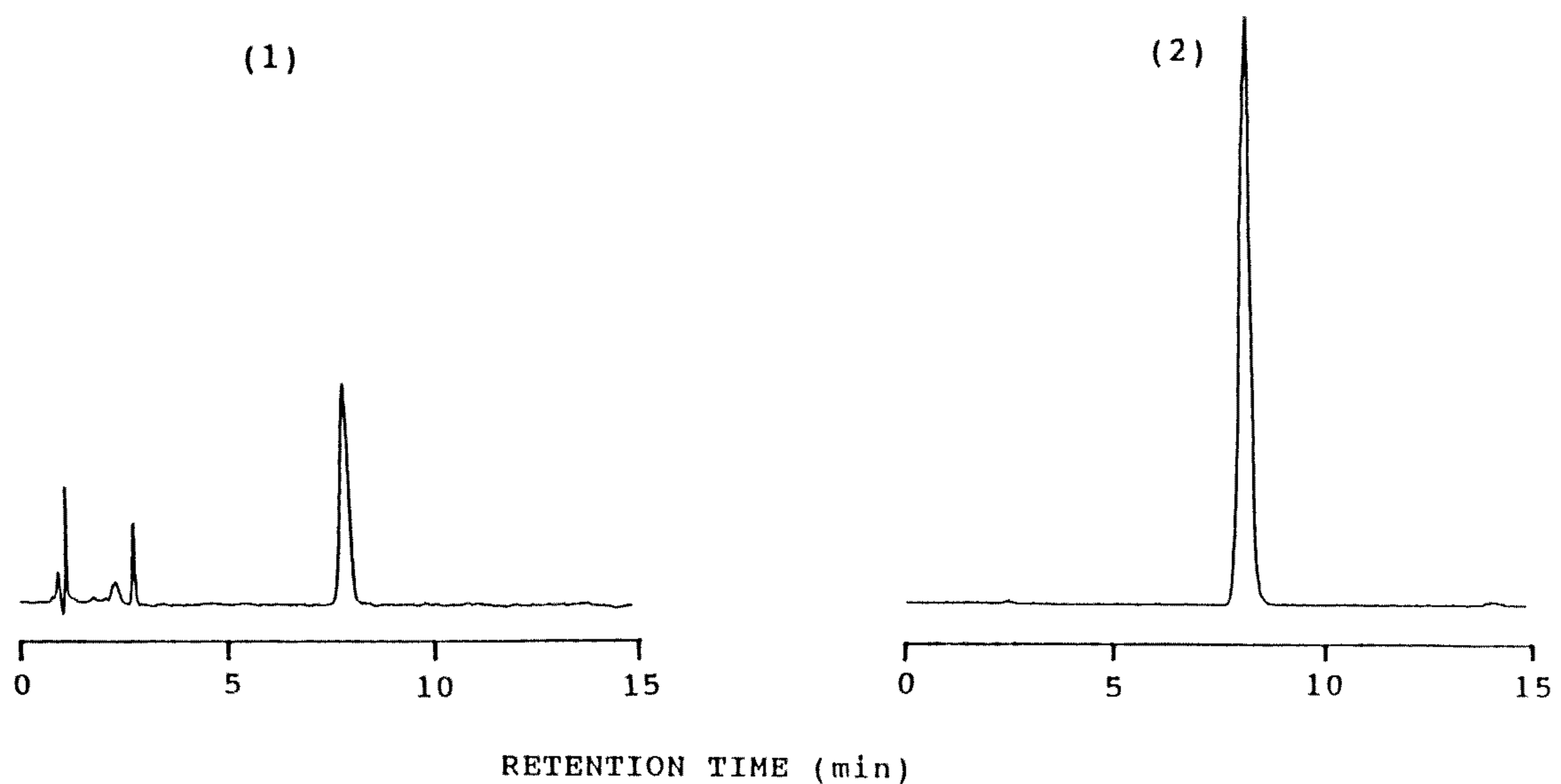


Figure 3. Liquid chromatograms of ethopabate at a concentration of 1.0 ng/ μ l with 10 μ l injection. Detection: (1)uv at 270 nm, (2)fluorescence with excitationat 300 nm and emission at 350 nm.

Table 1. Recoveries of ethopabate added to chicken tissues

added(ppm)	recoveries ^a (%)	
	meat	liver
0.02	93.76(3.85) ^b	94.45(2.42)
0.05	93.22(2.60)	92.77(1.73)
0.10	93.65(3.87)	94.29(3.43)
0.20	94.67(2.46)	94.09(2.37)

^aAverage of triplicate analyses.

^bNumber in parentheses represents coefficient of variation(%).

鋁^(8,9)二種,經初步實驗發現,以氧化鋁管柱處理所得之溶出液,經減壓濃縮後,殘留於濃縮瓶之雜質較多,不易以乙腈完全溶解。而矽酸鎂管柱則無此問題,故本研究用矽酸鎂管柱為層析淨化管柱。

利用矽酸鎂管柱淨化處理所採用之沖提及溶離液,經參考文獻計有 Nagata⁽¹⁰⁾及日本厚生省⁽⁷⁾淨化法。Nagata 淨化法是採用醋酸乙酯:正己烷(1:9, v/v)溶液為沖提液,以醋酸乙酯:正己烷(35:65, v/v)溶液為溶離液;至於日本厚生省淨化法則採用 20% 乙醚/苯溶液為沖提液,以 20% 醋酸乙酯/苯溶液為溶離液。將雞肝以乙腈萃取,經乙腈飽和之正己烷進行溶媒分配萃取淨化後,再分別以 Nagata 及日本厚生省之層析法進行淨化效果之比較,結果發現此二種方法之淨化效果均不錯,但經 Nagata 淨化法處理所得之圖譜於標準品附近有一雜質干擾,經變換溶離液及高效液相層析

法之移動相組成,均無法將此雜質與標準品分離,因此本實驗乃決定採日本厚生省之淨化法。

於 10g 檢體(雞肉及雞肝)中添加 0.2ppm 衣索巴經前處理後,於層析管柱淨化時依日本厚生省淨化法所採用之溶離液(20% 醋酸乙酯/苯溶液)以每 10ml 分段收集,經高效液相層析儀檢測,所得之溶出率曲線如圖四,由圖中可明顯看出,需 80ml 之溶離液方可將檢體中之衣索巴自層析管柱完全溶離,而日本厚生省淨化法僅以 50ml 溶離液溶離,如此必會造成回收率之降低。故本研究乃將此溶離液之極性提高,即採用 30% 醋酸乙酯/苯溶液為溶離液,如此僅需 50ml 之溶離液即可將檢體中之衣索巴自層管柱完全溶離(如圖四),且所得之高效液相層析圖譜亦不會有雜質之干擾。本檢驗方法之整個操作流程如圖五所示。

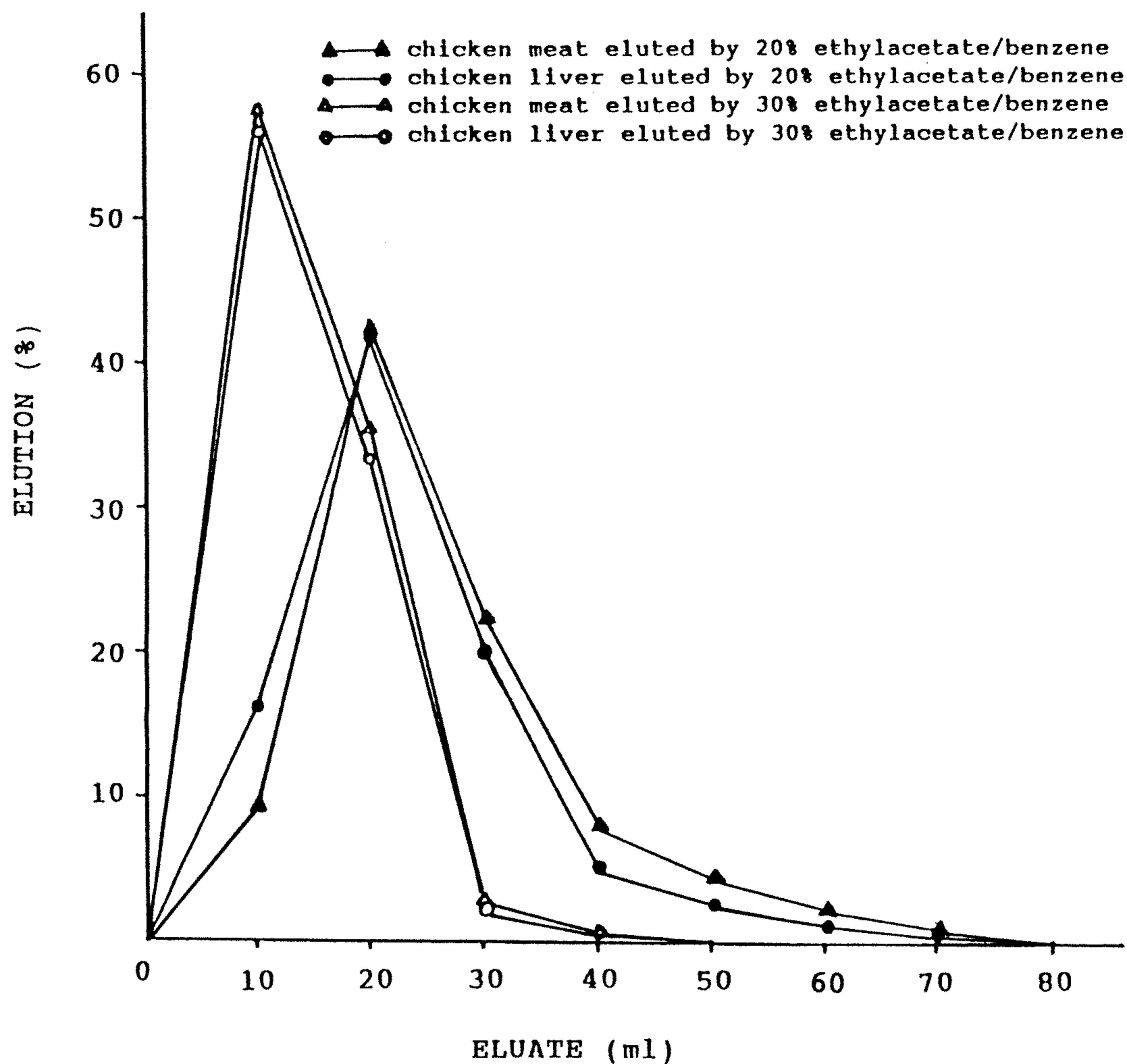


Figure 4. Elution pattern of ethopabate from Florisil column

三、標準曲線之製作及添加回收試驗

圖六為依前述標準曲線繪製方法所得之標準曲線，其線性迴歸係數 $r=0.9999$ 。將雞肉及雞肝檢體分別絞碎後各取 10g，分別添加 0.02、0.05、0.1 及 0.2 μ g 之衣索巴，每一添加量作三重覆，同時作空白試驗，依本檢驗方法進行回收試驗，其液相層析圖譜如圖七，其結果如表一所示，雞肉及雞肝檢體之平均回收率分別為 93.22~94.67% 及 92.77~94.45%，其變異係數在 1.37~3.87% 之間。由以上數據顯示本檢驗方法之再現性及精確性很高。將雞肉及雞肝檢體添加各種濃度之標準溶液，以本檢驗方法分析，經測試結果顯示，雞肉

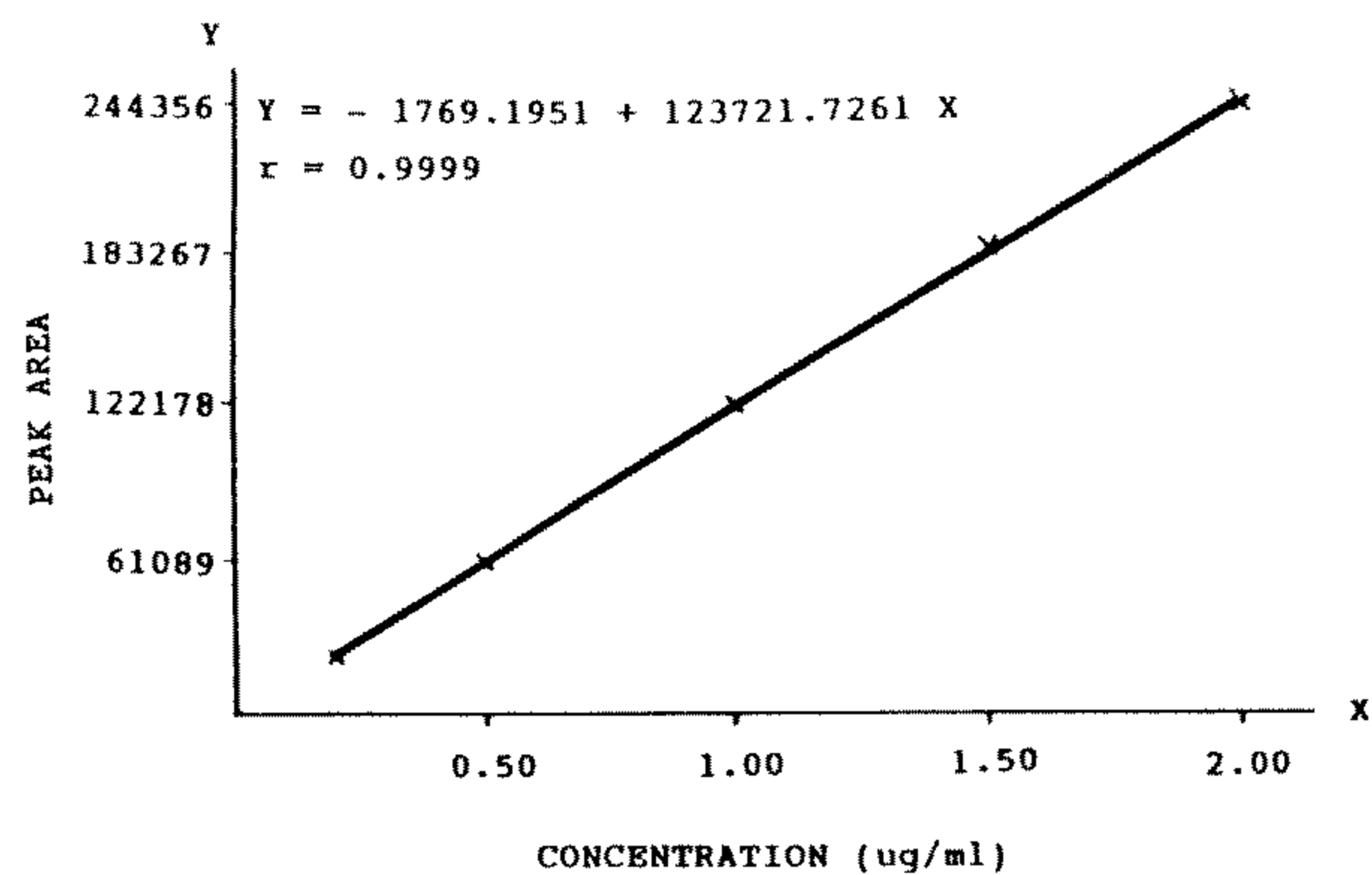


Figure 6. Standard curve of ethopabate

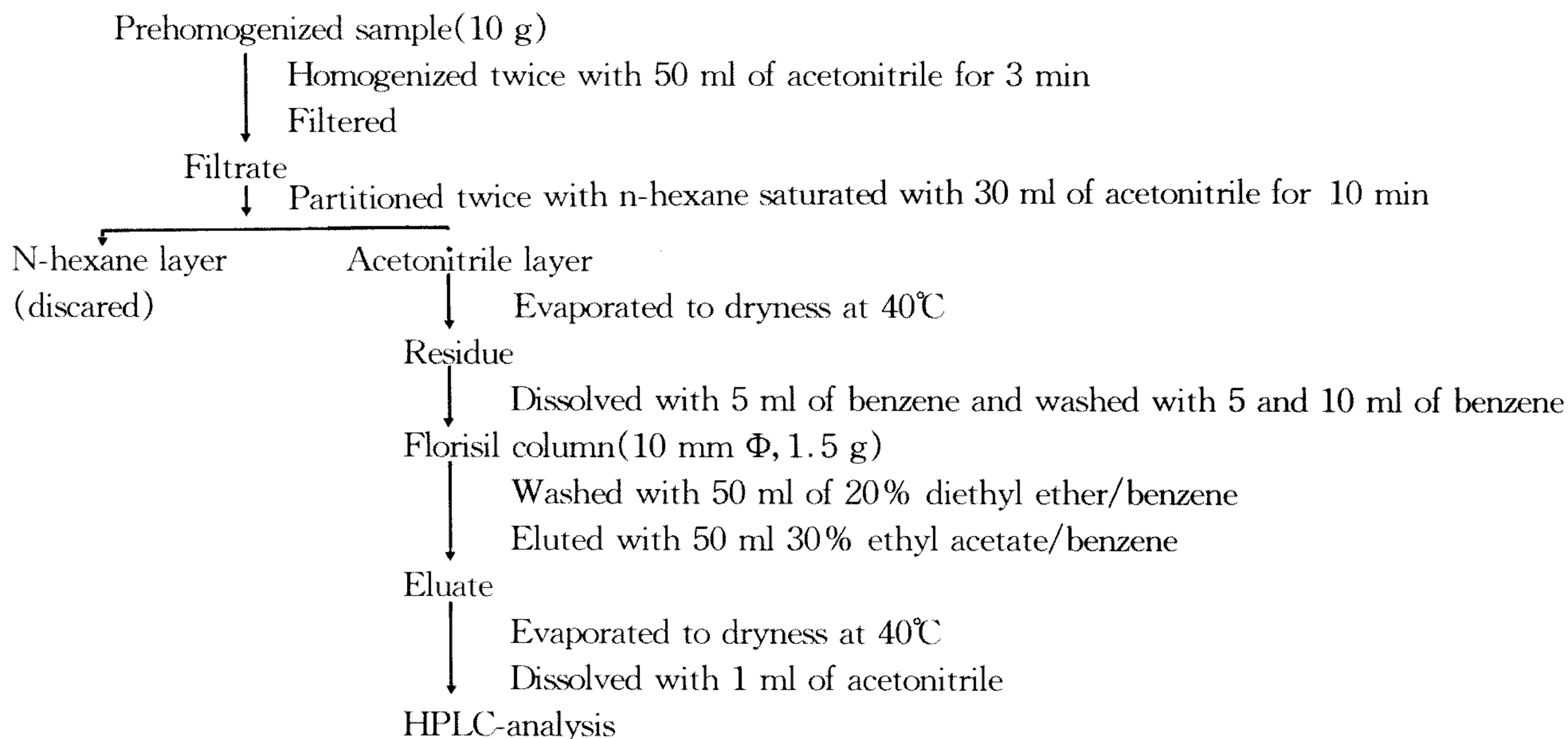


Figure 5. Analytical procedure of ethopabate

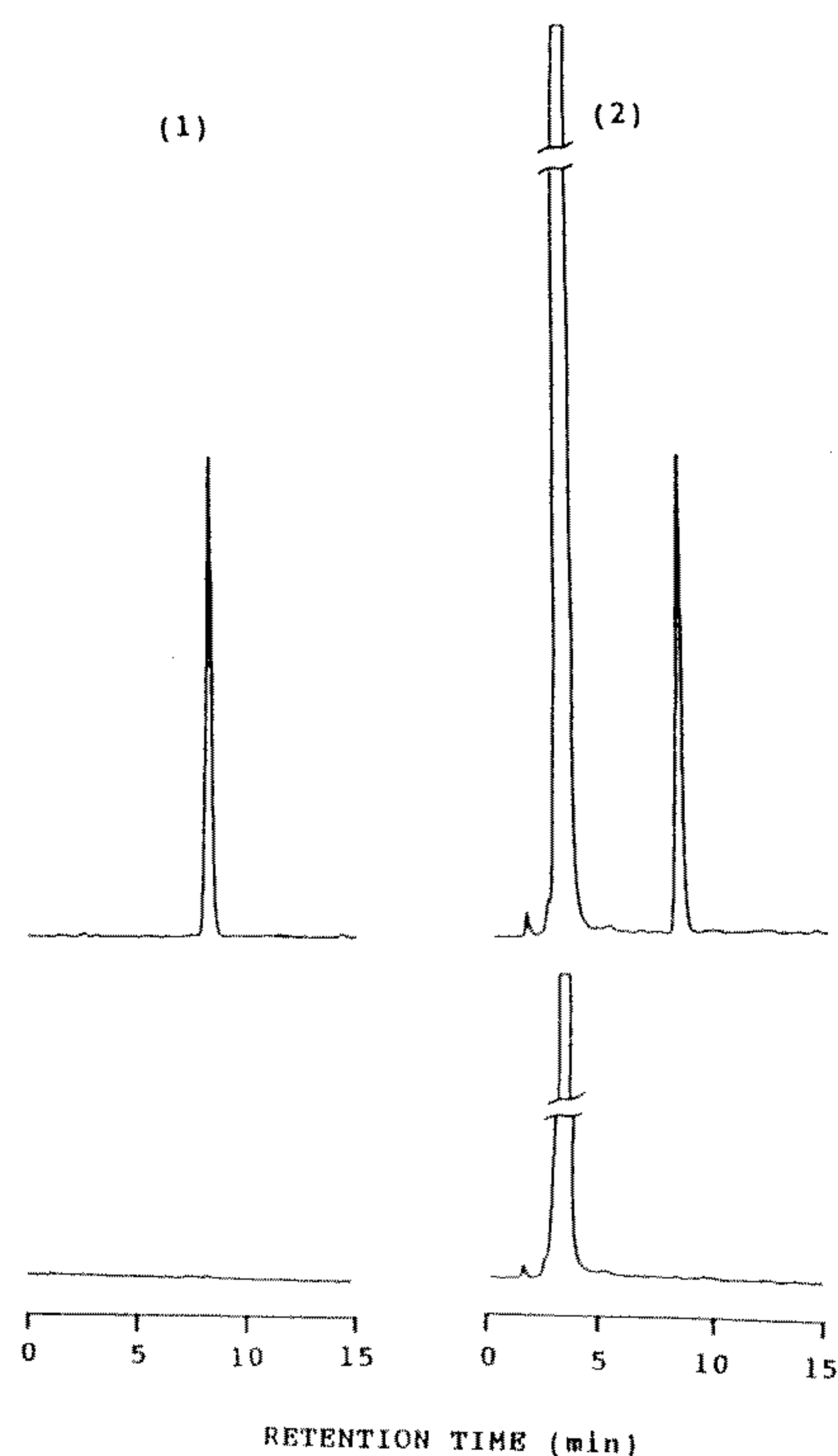


Figure 7. Liquid chromatograms of ethopabate spiked into samples at the 0.05 ppm level (upper panel) and blank samples (lower panel).

(1) Chicken meat, (2) chicken liver.

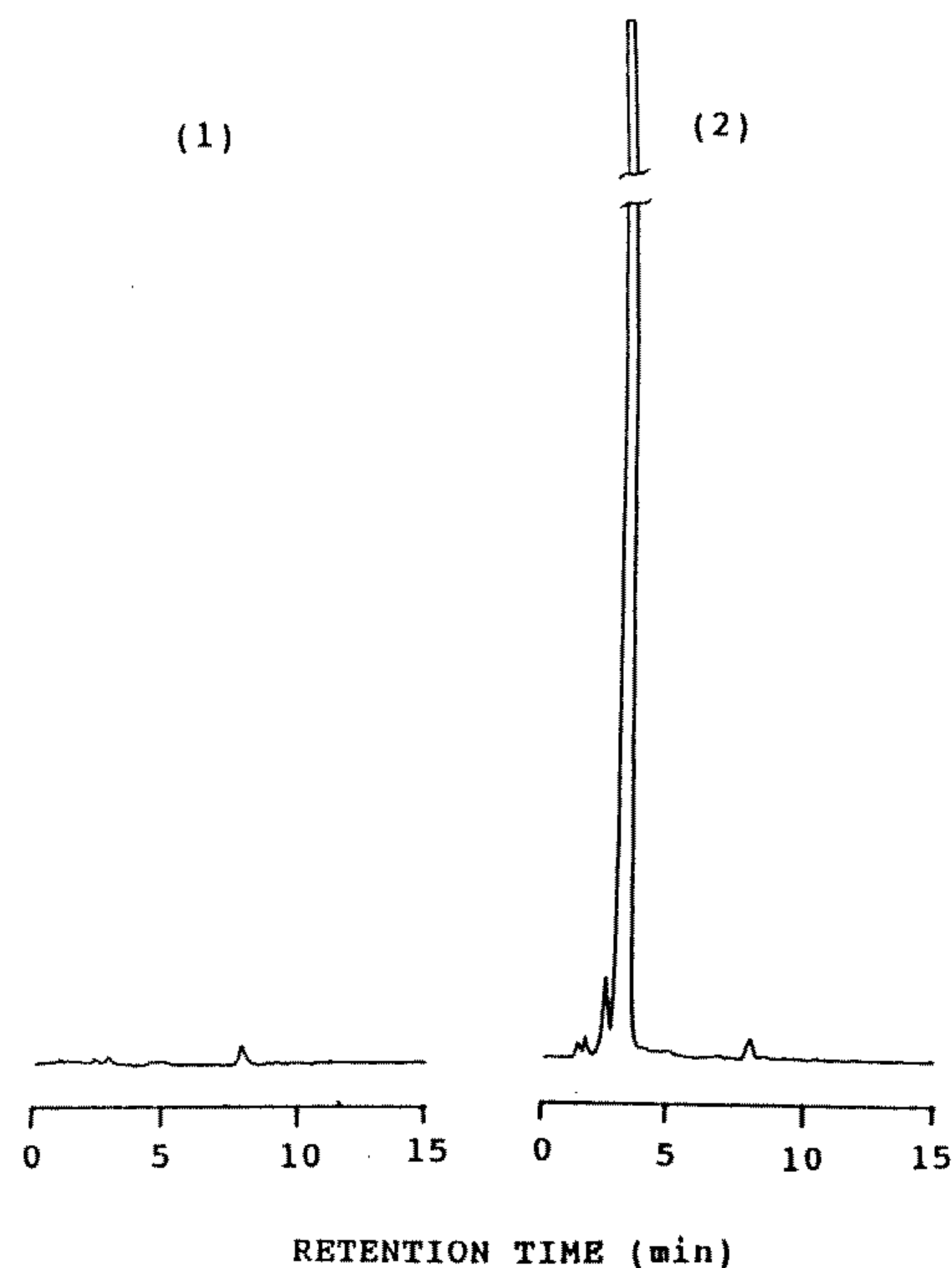


Figure 8. Liquid chromatograms for detection limit of ethopabate

(1) Chicken meat spiked with ethopabate at the 2 ppb level. (2) Chicken liver spiked with ethopabate at the 2 ppb level.

及雞肝中衣索巴之檢出限量為 2ppb, 圖八為雞肉及雞肝中檢出限量之圖譜。

五、市售雞肉及雞肝中衣索巴之殘留量調查

由台北市各零售市場抽購雞肉及雞肝檢體各 25 件, 共計 50 件, 依本檢驗方法檢測, 結果於檢體中衣索巴均為未檢出, 未檢出之原因, 可能與衣索巴之使用情形有關, 依行政院農業委員會所公告之『飼料添加物使用規範』中規定, 本藥劑不可單獨使用, 必須與安保寧或安保寧及磺胺奎林或乃卡巴精合併使用, 其於飼料中之添加量僅 5~16ppm, 較其他藥劑之添加量(100~250ppm)低, 而由蘇等人⁽¹²⁾所作之『雞肉及雞蛋中乃卡巴精之殘留分析』調查發現, 同樣可作雞球蟲病預防劑之乃卡巴精殘留於雞肉及內臟相當普遍, 由此可見, 目前國人使用衣索巴之情形較不及乃卡巴精普遍, 是否基於此原因, 造成本次調查結果均為未檢出, 亦有其可能性。

參考文獻

1. 行政院農業委員會. 1985. 飼料添加物使用規範, 行政院農業委員會 74. 10. 9. 農牧字第 65041 號公告.
2. 行政院衛生署. 1987. 動物用藥殘留標準. 衛署食處字第 658449 號公告.
3. Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A. and Heckelman, P. E. 1989. The merck index, 11th ed. Merck & Co., Inc. New York, N. Y.
4. Handy, P. R. and Holzer, F. J. 1970. GLC determination of ethopabate in chicken tissues by derivatives formation. J. Assoc. off. Anal. Chem. 67:861-862.
5. 能勢憲英, 山日文字, 星野庸二, 菊池好則, 河内佐十. 1981. ガスクロマトグラフィーによる ethopabate の定量. 食衛誌. 22(6):508-512.
6. 岡日 作, 宇野正清, 陰地義數, 大前利隆, 谷山薰, 赤木洋勝, 高畠英伍. 1981. EPD-ガスクロマトグラフィーによるニワトリ組織中の抗コキシウム劑エトパベートの分析法. 食衛誌. 22(4):279-284.
7. 厚生省環境衛生局乳肉衛生課. 1982. エトパベート. 畜水産食品中の残留物質検査法, 第二集の. 5:30-37.
8. 堀 義宏. 1983. 高速液體クロマトグラフィーによる鶏肉及び鶏卵中合成抗菌劑の系統之分析法. 食衛誌. 24(5):447-453.
9. Gallicano, K. D., Park, H., Yee, J. and Young, L. M. 1988. Drug residues in animal tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71(1):48-50.
10. Nagata, T. and Saeki, M. 1983. Rapid quantitation of ethopabate in chicken muscles using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection: purification from extraction liquid-liquid partition. J. Chromatogr. 281:367-370.
11. Nagata, T., Saeki, m., Nakazawa, H., Fujita, M. and Takabatake, E. 1985. Sensitive determination of ethopabate residues in chicken tissues by liquid chromatography with fluorimetric detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(1):27-28
12. 蘇淑珠, 許敏銓, 楊仕喜, 鄭秋真. 1991. 雞肉及雞蛋中乃卡巴精之殘留分析, 行政院衛生署八十年食品衛生調查計畫.

Studies on the Analysis of Ethopabate in Chicken Meat and Livers

YEA-MIN KAO AND PI-CHIOU CHANG

National Laboratories of Foods and Drugs Department of Health, Executive Yuan

ABSTRACT

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of ethopabate in chicken meat and liver was developed. Ethopabate was extracted from samples with acetonitrile, and filtered. The extract was partitioned with n-hexane, concentrated to dryness, cleaned up through Florisil column, and quantitatively analyzed by HPLC. A Lichrospher 100 PR-18 (25cm $\times$ 4.6 mm i.d., packed with 5 μ m particle size) and a solvent system of acetonitrile/water (3/7) with a flow rate of 1.0 ml/min were used. Ethopabates were detected by

fluorescence with excitation and emission wavelengths at 300 nm and 350 nm, respectively. The average recoveries of ethopabate spiked into samples at the levels of 0.02, 0.05, 0.10 and 0.20 ppm were in range of 93.22~94.67% from meat and 92.77~94.45% from liver. Coefficients of variation were less than 4%. The detection limit was 2 ppb. Twenty-five samples each of chicken meat and liver purchased from various markets in Taipei were investigated. Results showed that no ethopabate was detected.

Key words: Ethopabate, High performance liquid chromatography.