

雞肉及其內臟中羅苯嘧啶檢驗方法之探討及其殘留量之調查

饒麥玲 林瑞著 李乾鐘 李樹其 周薰修

行政院衛生署藥物食品檢驗局

摘 要

本研究發展出了一種利用高效液相層析法(High performance liquid chromatography, HPLC)檢測雞肉及其內臟中羅苯嘧啶(robenidine)的檢驗方法。檢體以醋酸乙酯萃取,再以Alumina B SEP PAK及C 18 SEP PAK管柱淨化,最後利用高效液相層析儀分析、定量。雞肉、雞肝、雞肫及雞皮脂樣品分別以0.05、0.25及0.5ppm的添加量進行回收試驗,結果回收率為80.0~92.3%,變異係數則介於0.5~7.0%之間,最低檢出量為0.025ppm。本研究並利用所發展出來的方法,檢驗市售雞肉、雞肝、雞肫及雞皮脂樣品各25件,結果發現均未檢出羅苯嘧啶殘留。

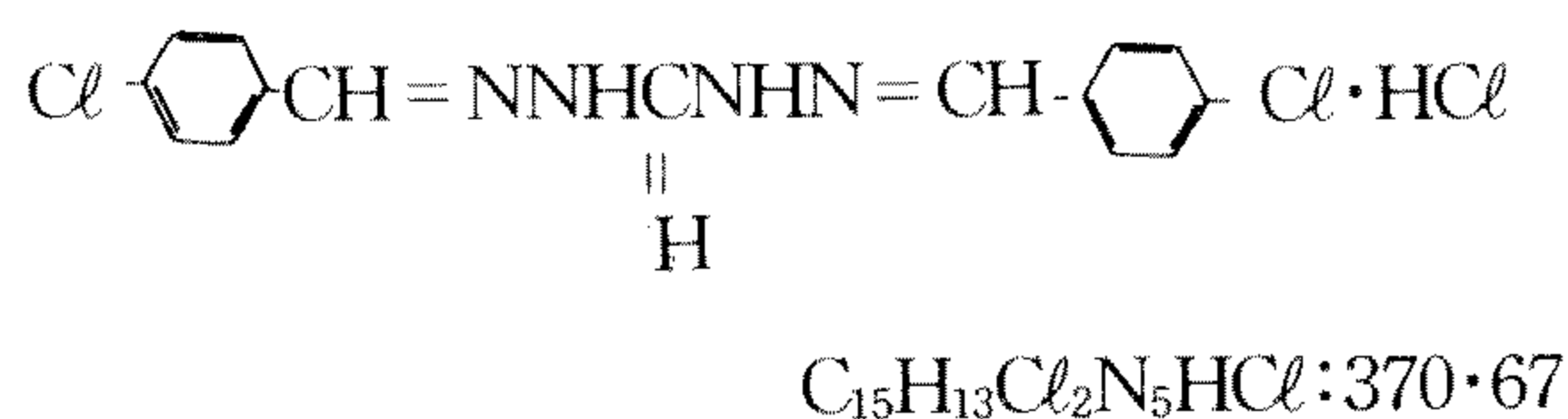
前 言

近年來,畜牧業及養殖業的發展逐漸走向企業化,業者為防治飼養動物之疾病,以提高飼料效率,增加產量,動物用藥如抗菌劑等之使用乃無可避免。

雞球蟲病(chicken coccidiosis)是由Eimeria屬原蟲寄生所引起,廣佈世界各地的家禽疾病,因能於短時間內傳染全雞,且不易撲滅⁽¹⁾,故對企業性的養雞戶常造成嚴重的威脅。羅苯嘧啶(分子結構如圖一)為一種抗菌劑,可添加於飼料中作為雞、兔球蟲病之預防劑,不僅可預防疾病之發生,且可有效除去正在生長之寄生物。羅苯嘧啶之使用,須依照農業委員會公告的『飼料添加物使用規範』⁽²⁾之規定,且在肉品中的殘留量並須符合衛生署公告『動物用藥殘留標準』⁽³⁾。目前我國尚無公定檢驗方法可資依循,因此進行雞肉及其內臟中羅苯嘧啶殘留量檢驗方法之探討乃為當務之急。

羅苯嘧啶可用分光光度法、極流測定法(polarography)⁽⁴⁾、高效液相層析法(HPLC)⁽⁵⁾及氣相層析法(GC)⁽⁶⁾進行分析。分光光度法用於檢測雞肉中羅苯嘧啶殘留量,則因感度不佳且較缺乏專一性,故近年來較少被使用。極流測定法之

Robenidine



Figuer 1. Chemical Structure of robenidine.

檢測極限雖可達到0.1ppm,但樣品前處理繁複,加上儀器本身操作不易,因此極易產生較大誤差。氣相層析法是以ECD檢測,雖可有較佳檢測極限,但樣品前處理如同極流測定法般繁複耗時,且回收率也不甚理想。高效液相層析法因樣品前處理簡易、快速,且可達到限量標準之檢測感度,同時回收率亦良好,所以本研究採用高效液相層析法做為羅苯嘧啶殘留量之偵測及定量方法。並利用建立的檢驗方法進行羅苯嘧啶殘留量調查,以瞭解市售雞肉、可食皮脂、雞肝及雞肫中羅苯嘧啶殘留量之現況,俾供農政及衛生主管機關參考。

材料與方法

一、材料

(一)取經檢測不含羅苯嘧啶之雞肉、肝、肫、皮脂供作回收率及最低檢出量測定之檢體。

(二)市售品調查使用之 25 件全雞檢體係 80 年 2 月至 5 月間購自北、中、南、東四區各地生鮮超市及零售市場，並將每隻雞之肉、肝、肫、皮脂分開檢測，故各類檢體均 25 件。

二、裝置及器材

(一)高效液相層析儀-Shimadzu LC-6AD pump, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan。

(二)檢出器-Shimadzu SPD-6AV, UV-VIS Spectro-photometric detector, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan。

(三)積分儀-Shimadzu C-R3A Chromatopac, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan。

(四)層析管柱-LichroCART RP-Select B, 粒徑 $5\mu\text{m}$, 內徑 4mm, 長度 25cm 之管柱, E. Merck, Darmstadt, F. R. Germany。

(五)攪拌均質器-Nissei Multi-Blender Mill, 適用於有機溶媒者, 日本精精機製作所, Tokyo, Japan。

(六)減壓濃縮裝置-Aspirator A-2S with Rotatory evaporator, Buchi 461, Yamato, WP-15, Firstek B204, Vacuum-Controller B161, Buchi Laboratories-Technik AG CH-92330 (Flawil, Schweiz)。

(七)振盪機-祥泰精機有限公司, 型號 VD-12, 臺北縣。

(八)丟棄式濾膜過濾器-Millex-HV, 濾膜孔徑 $0.45\mu\text{m}$, 直徑 13mm, Millipore Corporation, Toyko, Japan。

(九)鹼性氧化鋁過濾器層析管柱-Alumina B SEP-PAK Cartridge, No. 51820, Waters Chromatography Division of Millipore Corporation, Milford, MA, USA。

(十)C 18 過濾器層析管柱-C 18 SEP-PAK Cartridge, No. 51914, Waters Chromatography Division of Millipore Corporation, Milford, MA, USA。

(十一)過濾裝置-Millipore Filter Holder, 濾膜孔

徑 $0.45\mu\text{m}$, 直徑 47mm, 型號 HV, Nihon Millipore, Kogyo K.K., Yonezawa, Japan。

三、試藥及試劑

(一)醋酸乙酯、正己烷、甲烷、乙腈採液相層析級、磷酸二氫鉀採用試藥特級, 以上試藥購自 E. Merck, Darmstadt, F. R. Germany; 羅苯嘧啶對照標準品由新竹氰胺公司提供。

(二)80% 甲醇溶液-取甲醇 80ml 加水至 100ml, 配製成 80% 甲醇溶液。

(三)水-去離子水。

(四)0.1M 磷酸二氫鉀溶液-稱取磷酸二氫鉀 13.6g, 加水至 1000ml, 配製成 0.1M 磷酸二氫鉀溶液。

(五)移動相溶液之調製-取乙腈 800ml 加上述配製好的 0.1M 磷酸二氫鉀溶液 100ml 再加水至 1000ml 配製成移動相溶液。

(六)羅苯嘧啶標準液-精稱羅苯嘧啶標準品 10mg, 溶於甲醇使成 100ml, 此為標準原液(濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$)。取此標準原液做適當之稀釋即可調配成各種不同濃度之標準溶液。

(七)鋁過濾器層析管柱之活化-以正己烷 5ml 慢慢滴入鋁過濾器層析管柱, 待正己烷全部滴完後, 以抽真空之方式使其乾燥, 備用。

(八)C 18 過濾器層析管柱之活化-以水 5ml 慢慢滴入 C 18 過濾器層析管柱, 待全部滴完後, 加甲醇 5ml 入 C 18 過濾器層析管柱, 待全部滴完後, 再以水 5ml 同樣操作, 最後以抽真空之方式使其乾燥, 備用。

四、檢體處理

(一)雞肉、雞肫

取雞肉、雞肫分別搗碎均勻後, 各稱取 10g 檢體, 加醋酸乙酯 50ml, 以均質攪拌器均質萃取 1 分鐘後, 醋酸乙酯層以濾紙過濾至 250ml 之濃縮瓶內, 殘留物再以醋酸乙酯 50ml 同樣操作二次, 合併濾液, 於 40°C 水浴中減壓濃縮至無溶劑, 殘留物以正己烷 50ml 洗淨, 移入分液漏斗, 然後使用 80% 甲醇溶液 25ml 振盪抽出三次, 合併甲醇層, 於 40°C 水浴中減壓濃縮至乾, 殘留物以甲醇溶解 5ml 並定容之, 再以 $0.45\mu\text{m}$ 丟棄式濾膜過濾器過濾, 供作檢液。

(二)雞肝、雞皮脂

依照前述(一)之前處理至殘留物以甲醇 5ml 溶解, 以 $0.45\mu\text{m}$ 拋棄式濾膜過濾器過濾後, 通入

Alumina B SEP-PAK 內,再加甲醇 5ml 洗淨,所得流出液合併,濃縮至 5ml,再加水至 50ml,通入 C 18 SEP-PAK,將流出液拋棄,再以甲醇 5ml 流出之並定容之,供作檢液。

五、標準曲線之製作

取羅苯嘧啶一系列標準溶液 0.1、0.3、0.5、1 及 2 μ g/ml 依序注入各 10 μ l,以高效液相層析儀測定之,每一濃度作三重覆,由波峰所得平均面積及標準溶液之濃度繪製標準曲線。

六、定量操作

(一) 高效液相層析儀之分析條件:

層析管: Lichro CART RP-select B

移動相: 乙腈/0.1M 磷酸二氫鉀/水 (4/1/1)

檢出器: 紫外光檢出器 330nm

流速: 1 ml/min

注入量: 10 μ l

(二) 鑑別試驗及含量測定

取檢液及上述不同濃度之標準溶液各 10 μ l,分別注入高效液相層析儀,就檢液所得波峰之滯留時間,分別與標準曲線比較可算出檢液之羅苯嘧啶濃度,再換算成檢體之羅苯嘧啶濃度,其計算式如下:

$$\text{檢體中羅苯嘧啶濃度 (ppm)} = \frac{(C_{\mu\text{g/ml 檢液濃度}}) \times (5 \text{ ml 檢液體積})}{(10\text{g 檢體})}$$

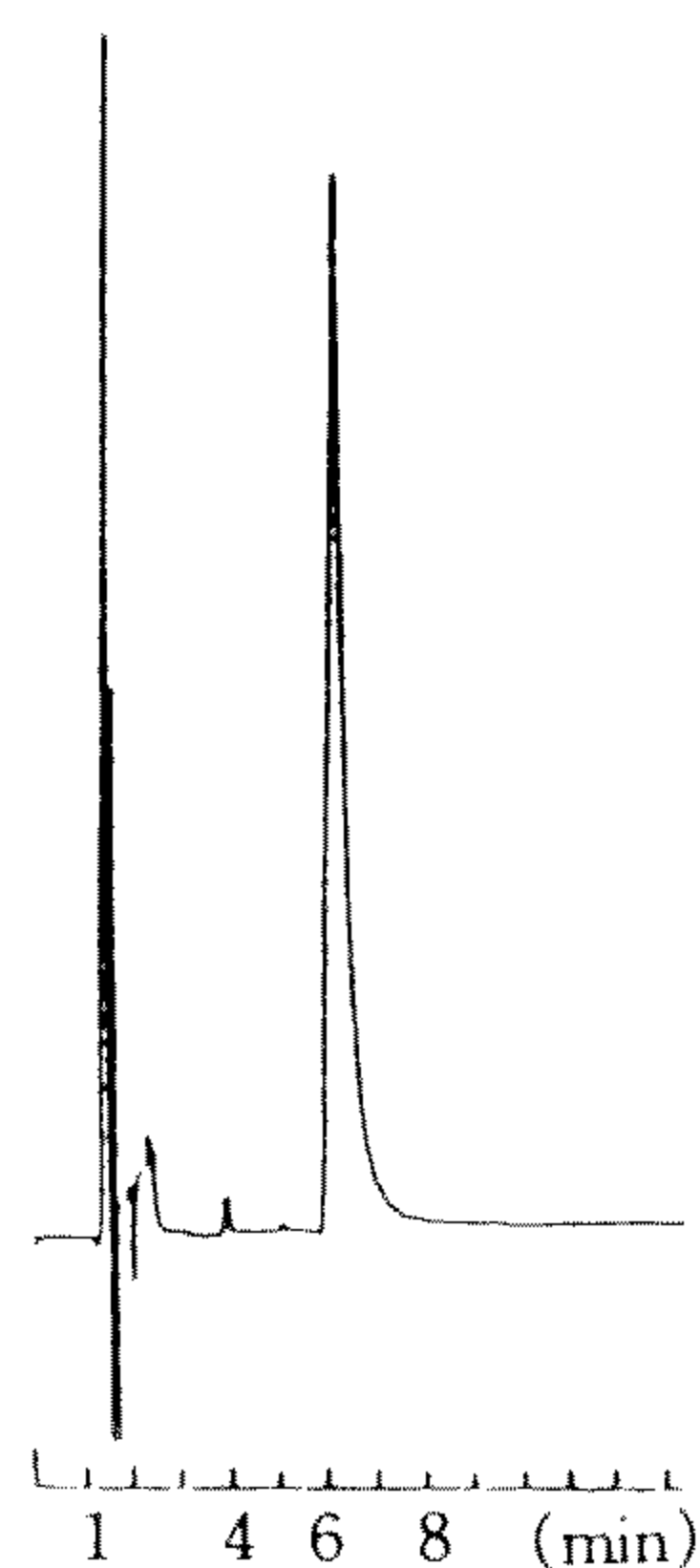


Figure 2. HPLC chromatogram of a standard solution of 1 μ g/ml robenidine

$$= \frac{C}{2}$$

C = 檢液之濃度 (μ g/ml)

七、回收試驗

取羅苯嘧啶標準溶液,分別添加 0.05、0.25 及 0.5 ppm 於雞肉、雞肫、雞肝及雞皮脂中,依上述方法操作回收試驗,每一添加量作三重覆,同時作空白試驗,就檢液所得波峰之滯留時間及面積,分別與標準溶液比較鑑別並定量之,求出回收率。

八、最低檢出量試驗

取羅苯嘧啶標準溶液,分別添加 0.05、0.025、0.01 ppm 於雞肉、雞肫、雞肝及雞皮脂中,依上述方法操作試驗,就檢液所得波峰之滯留時間,分別與標準溶液比較鑑別之、估計羅苯嘧啶之最低檢出量。

結果與討論

一、採用 HPLC 檢測雞肉羅苯嘧啶殘留量

日本厚生省畜水產食品的殘留物質檢查⁽⁶⁾法係採用氣相層析儀,以 ECD 檢測器檢驗雞肉中羅苯嘧啶,樣品前處理首先利用醋酸乙酯將羅苯嘧啶抽出,濃縮後加正己烷再用 80% 甲醇溶液抽出,經離子交換色層管 (CG-50),用酸性甲醇溶液溶出,溶出液經濃縮乾涸後,溶於甲醇,注入安瓿內,除去甲醇後,加鹽酸封管,加熱加水分

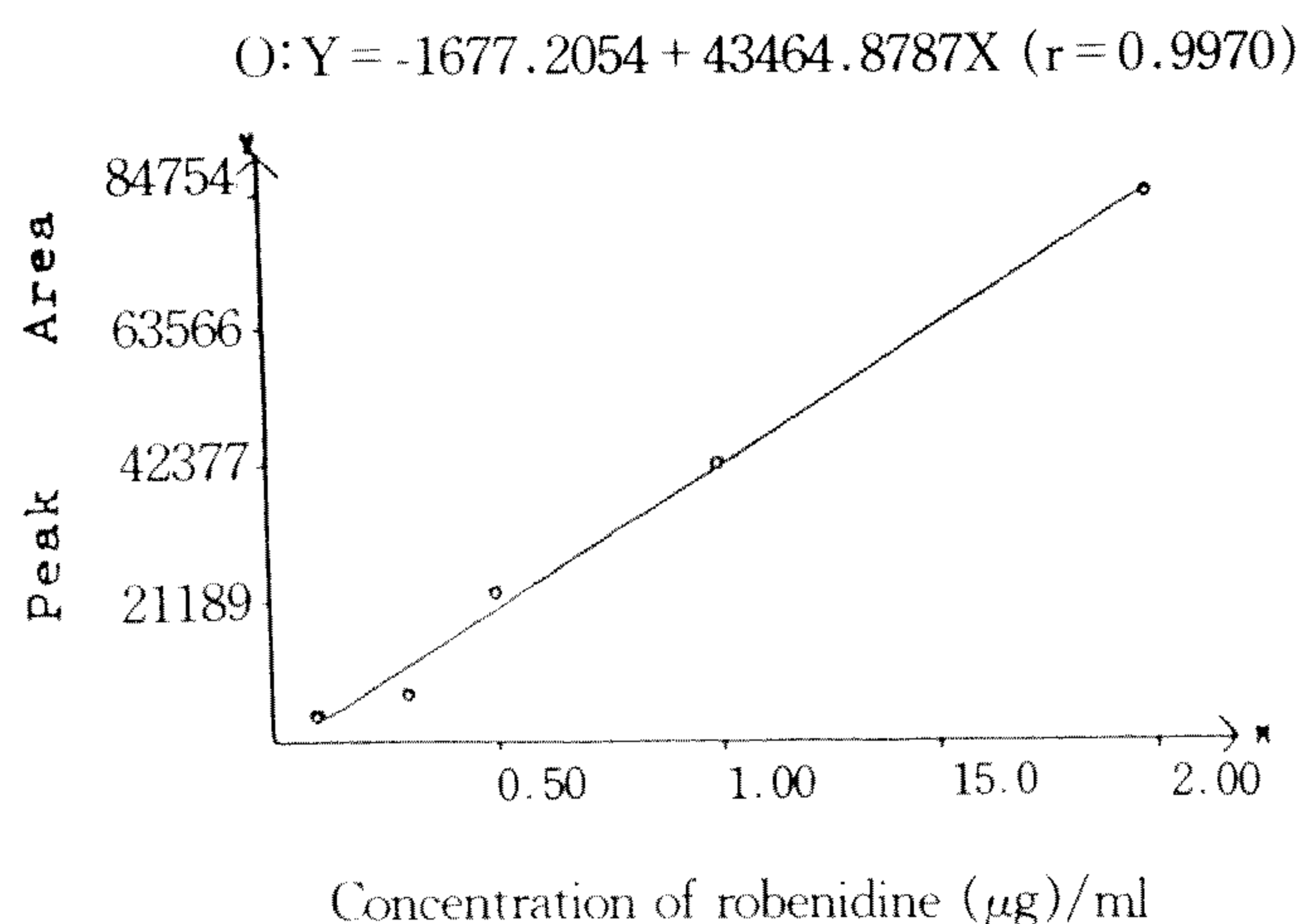


Figure 3. Standard curve of robenidine.

Table 1. Revoveries of Robenidine Spiked into Chicken Tissues

Sample	Fortification Level (ppm)	Recovery ^a (%)
Meat	0.05	85.2(7.0) ^b
	0.25	88.8(2.2)
	0.5	81.2(0.8)
Gizzzrds	0.05	85.4(5.5)
	0.25	83.2(2.7)
	0.5	84.5(2.6)
Liver	0.05	88.5(4.6)
	0.25	84.3(4.1)
	0.5	90.0(0.5)
Skin and Fat	0.05	85.3(5.2)
	0.25	85.0(3.4)
	0.5	88.9(3.7)

a Average of three determinations.

b Number in parentheses is the coefficient of variation(C.V. %)

解, 生成的 p-chlorobenzaldehyde 用正己烷抽出, 最後用 GC-ECD 測定。依文獻所載⁽⁶⁾, 其最低檢出量為 0.05 ppm, 添加量 0.2 ppm 之回收率為 70%, 經本研究實驗結果, 發現儀器之檢測感度雖可達 0.01 ppm, 但最低檢出量則為 0.1ppm, 而添加量 0.3ppm 之回收率則遠低於 70%, 且偏差度也很大。探討其原因, 可能係因為樣品前處理較複雜, 流失機會大, 且羅苯嘧啶本身無法以 GC 檢測, 須經裂解成 p-chlorobenzaldehyde 才可以檢測, 在前處理中如裂解不完全, 便可造成很顯著的誤差, 所以回收率不佳, 且偏差度大, 不適合做為例行性檢驗工作的檢驗方法。如改以 HPLC 檢測, 其儀器檢測感度可達 0.02 ppm, 而最低檢出限量則為 0.05 ppm, 仍遠低於本署公告之『動物用藥殘留標準』⁽³⁾中羅苯嘧啶殘留標準(可食皮脂中, 0.2ppm; 其他可食部份, 0.1ppm)。此外, HPLC 儀器不似 GC-ECD 易受污染, 對例行檢驗工作較為有利, 所以本研究乃用 HPLC 檢測雞肉中羅苯嘧啶殘留量。

二、HPLC 測定條件之檢討

()測定波長

羅苯嘧啶以 HPLC 移動相做為溶劑溶解, 其溶液在 330 nm 附近有極大吸收, 因此本實驗選用此波長進行檢測。

()層析管柱及移動相

本研究以 Phenomenex μ -Bondapak C 18之層析管 (Phenomenex, Torrance, CA, USA; 粒徑 10 μ m, 內徑 3.9mm $\times$ 長度 30cm), 利用

0.1M 磷酸二氫鉀緩衝液為移動相, 分析而得羅苯嘧啶的滯留時間為 10.5 分, 但波峰分離效果不好, 且有雜峰影響, 並會造成層析管柱的壓力升高。改以 LichroCART RP-Select B 層析管柱, 用 32% 乙腈/0.1% 磷酸/67.9% 水為移動相分析, 羅苯嘧啶的滯留時間為 8 分鐘左右, 而波峰有嚴重的拖尾現象。如果以 LichroCART RP-Slect B 層析管柱, 移動相用乙腈/0.1M 磷酸二氫鉀/水(4/1/1)進行分離, 羅苯嘧啶的滯留時間在 6.3 分左右, 且波峰分離效果良好。故採用此條件進行分析, 其層析圖如圖二。

三、標準曲線

依前述標準曲線製做方法, 做成標準曲線(見圖三), 其線性迴歸係數 $\gamma = 0.9970$ 。

四、檢體處理之比較

本檢驗法之檢體為雞肉、雞肫、雞肝及雞皮脂, 而這些部位含有很多雜質, 對檢驗會造成干擾, 因此檢體之處理, 去除雜質相當重要。本研究參考日本厚生省畜水食品殘留物質檢查法⁽⁶⁾, 檢體以醋酸乙酯來抽取, 醋酸乙酯抽出液於濃縮時會起泡及突沸, 在減壓濃縮時, 須小心控制真空度, 避免羅苯嘧啶因突沸而逸失。於高效液相層析儀測定時, 由於脂肪的存在, 會使感度下降及層析管柱劣化, 所以脂肪之去除相當重要。以 50ml 正己烷脫脂, 並以 80% 之甲醇溶液抽出(如果以純甲醇溶液抽取, 因正己烷與甲醇可互溶, 會影響脫脂, 改以 80% 甲醇溶液, 因極性增加, 與正己烷之極性差異變大, 可減輕互溶現象)。80% 甲醇溶液

抽出液於濃縮時會起泡及突沸，亦要注意。雞肉及雞肫經過上述前處理，以 HPLC 偵測所得之層析圖其波峰雜質少且分離效果良好，而雞肝及雞皮脂所得之層析圖其波峰雜質多且分離不理想，將檢體再經過日本厚生省的畜水食品殘留物質檢查法⁽⁶⁾的淨化步驟，以離子交換色層層析管(CG-50, H 型)來處理，80% 甲醇溶液 50 ml 洗淨，再根據羅苯嘧啶弱酸性的特性，以酸性甲醇溶液(0.2N 鹽酸之 90% 甲醇溶液)溶出，此步驟在做添加回收率時，漏失許多，回收率只有 60%，而後面於安瓿(ampoule)內之分解，如果安瓿封罐的技巧疏忽，或在分解中破裂，也造成漏失。檢體之處理程序相當繁複而費時，因此改以操作簡易，省時省力之 Alumina B SEP-PAK 及 C18 SEP-PAK 來淨化，Alumina B SEP-PAK 是將雜質吸附，羅苯嘧啶流出，C18 SEP-PAK 之原理是雜質流出，羅苯嘧啶被吸附在管柱內，為避免高濃度羅苯嘧啶被沖混出，因此加水稀釋羅苯嘧啶，使其濃度低於 0.1%，將雜質分離而流出，達到淨化的目的，再以甲醇 5ml 溶出，經 HPLC，可獲得較佳的結果。

五、添加回收試驗及最低檢出量

添加 0.05、0.25 及 0.5ppm 之羅苯嘧啶標準品於雞肉、雞肝、雞肫及雞皮脂四種檢體中，依上

述檢驗法操作，各作三重覆之方式，所得回收率(如表一)，雞肉為 85.2、88.8 及 81.2%，雞肫為 85.4、83.2 及 84.5%，雞肝為 88.5、84.3 及 90.0%，雞皮脂為 85.4、83.2 及 84.5%，其變異係數在 0.5~7.0% 之間，可見回收情況相當穩定。液相層析圖譜見圖四、五、六、七，回收曲線如圖八、九、十、十一所示。本法在雞肉、雞肝、雞肫及雞皮脂中之最低檢出量為 0.025ppm(如圖十二)。

六、市售雞肉及其內臟中羅苯嘧啶殘留量之調查

行政院農業委員會公告之『飼料添加物使用準則』⁽²⁾規定羅苯嘧啶在肉雞飼料中使用量為 33 ppm，停藥期為 5 天，衛生署公告之『動物用藥殘留標準』⁽³⁾則規定羅苯嘧啶之殘留限量在雞之可食皮脂中為 0.2ppm，其他可食部分為 0.1 ppm。本研究抽購市售雞肉、雞肝、雞肫及雞皮脂各 25 件，依上述檢驗法操作，利用高效液相層析儀檢測其中羅苯嘧啶之殘留量，結果均未檢出。而由蘇等所做『雞肉及雞蛋中乃卡巴精之殘留分析』⁽⁷⁾調查發現，同樣可作為雞球蟲病預防劑之乃卡巴精(nicarbazin)殘留雞肉及內臟之情形相當普遍，可見於國內羅苯嘧啶的使用可能已被乃卡巴精取代。

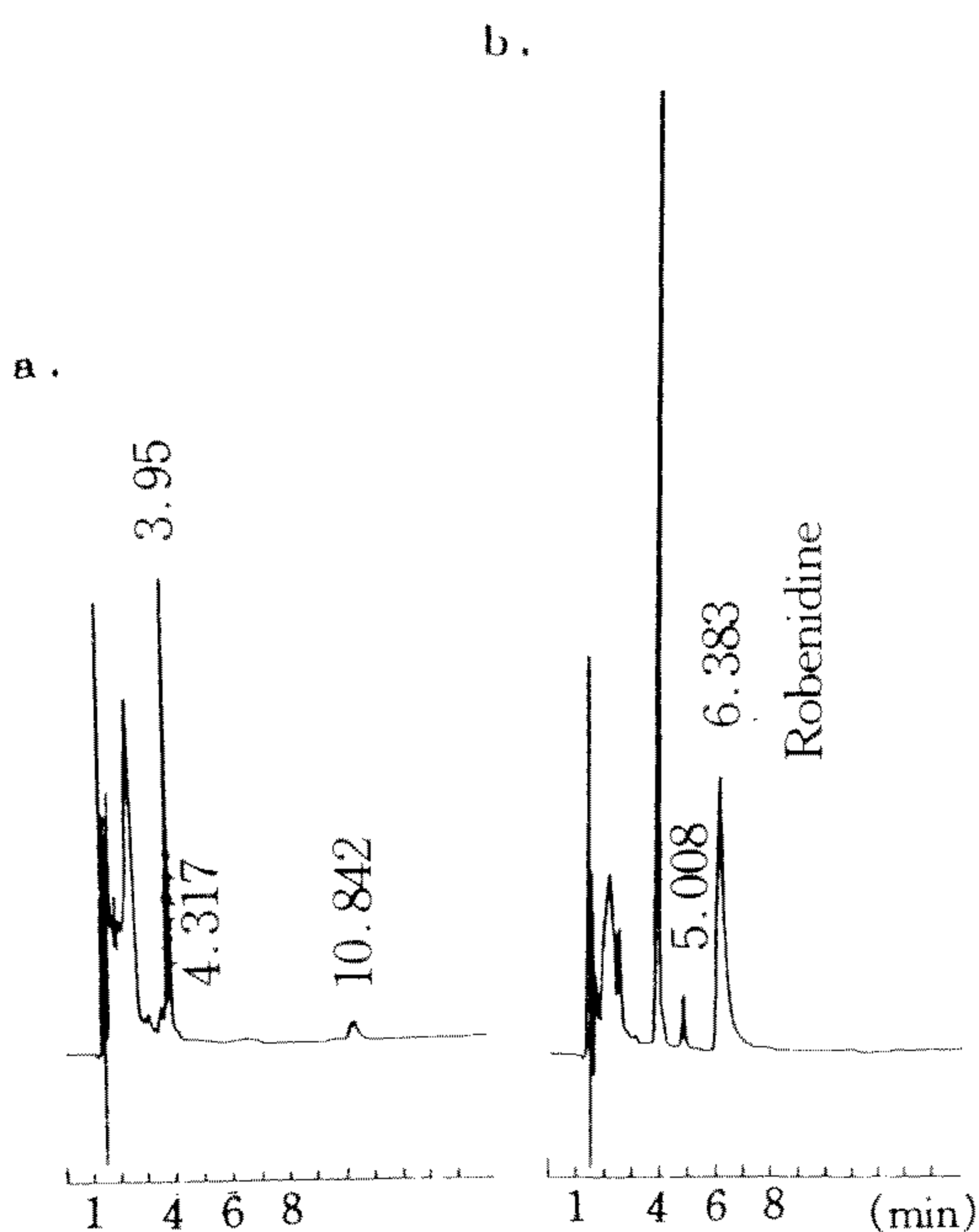


Figure 4. HPLC chromatograms of a. chicken meat blank; and b. chicken meat spiked with 0.25 ppm robenidine.

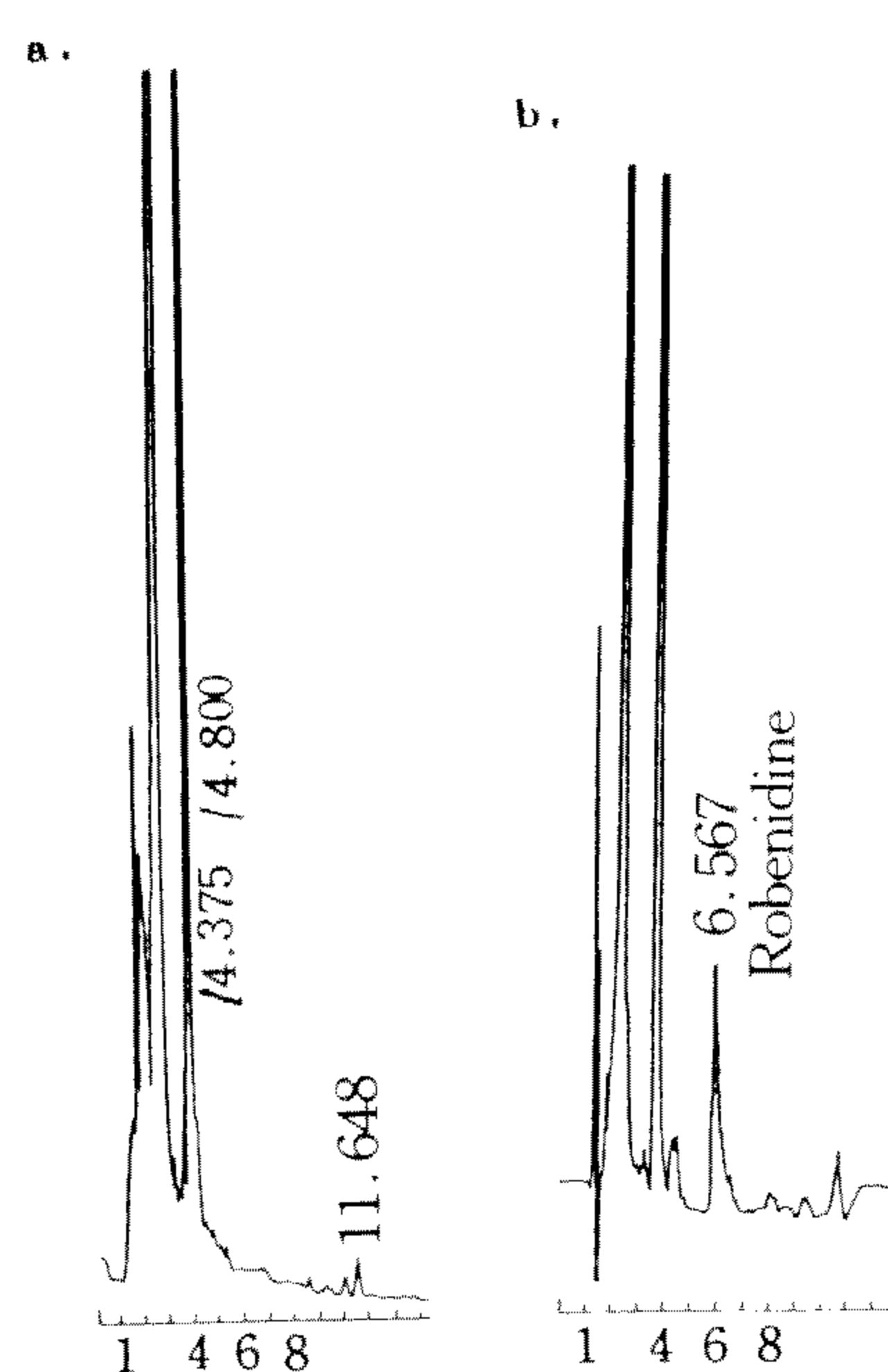


Figure 5. HPLC chromatograms of a. chicken liver blank; and b. chicken liver spiked with 0.25 ppm robenidine.

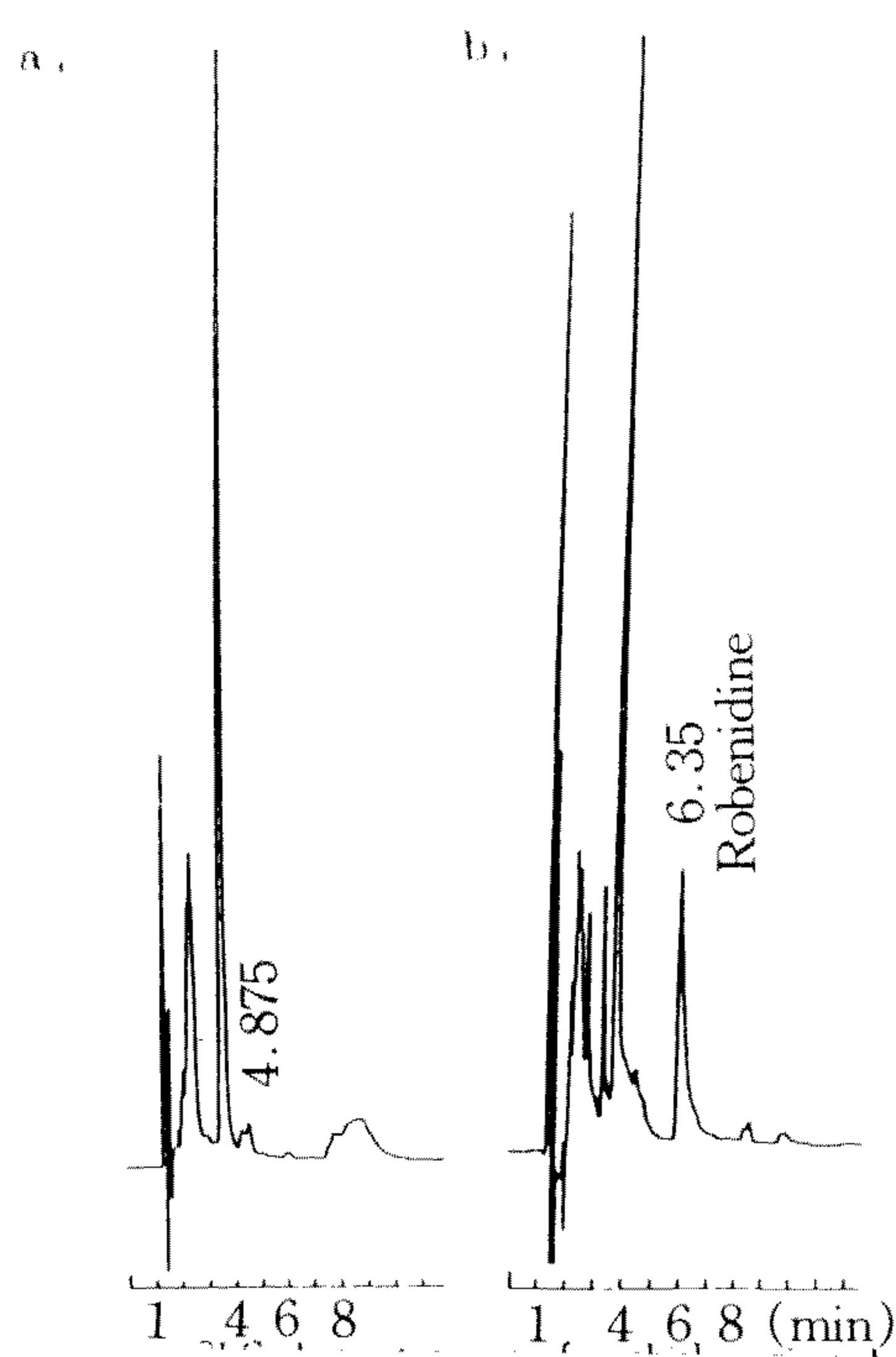


Figure 6. HPLC chromatograms of a. chicken gizzard blank ; and b. chicken gizzard spiked with 0.25 ppm robenidine.

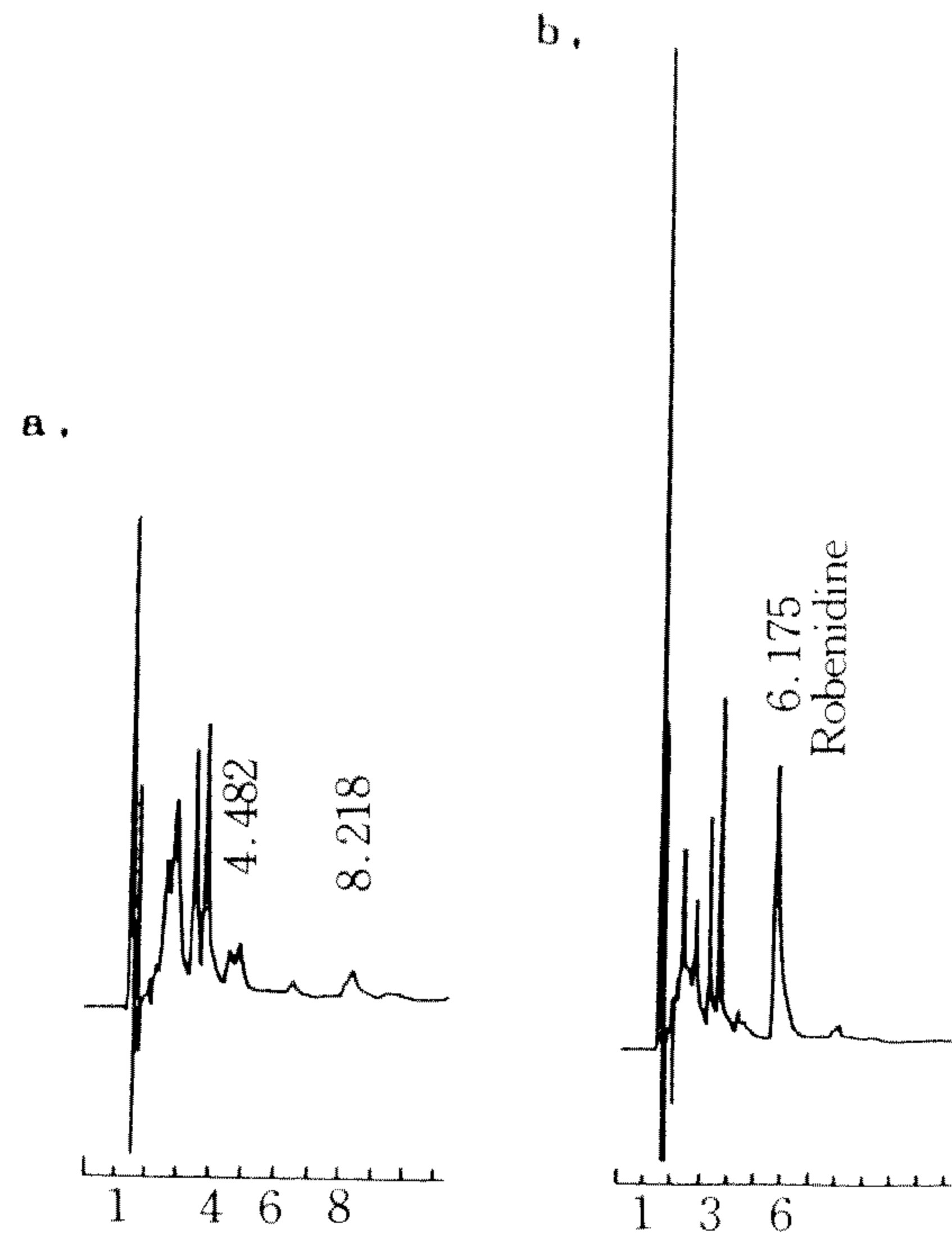


Figure 7. HPLC chromatograms of a. chicken skin blank ; and b. chicken skin spiked with 0.25 ppm robenidine.

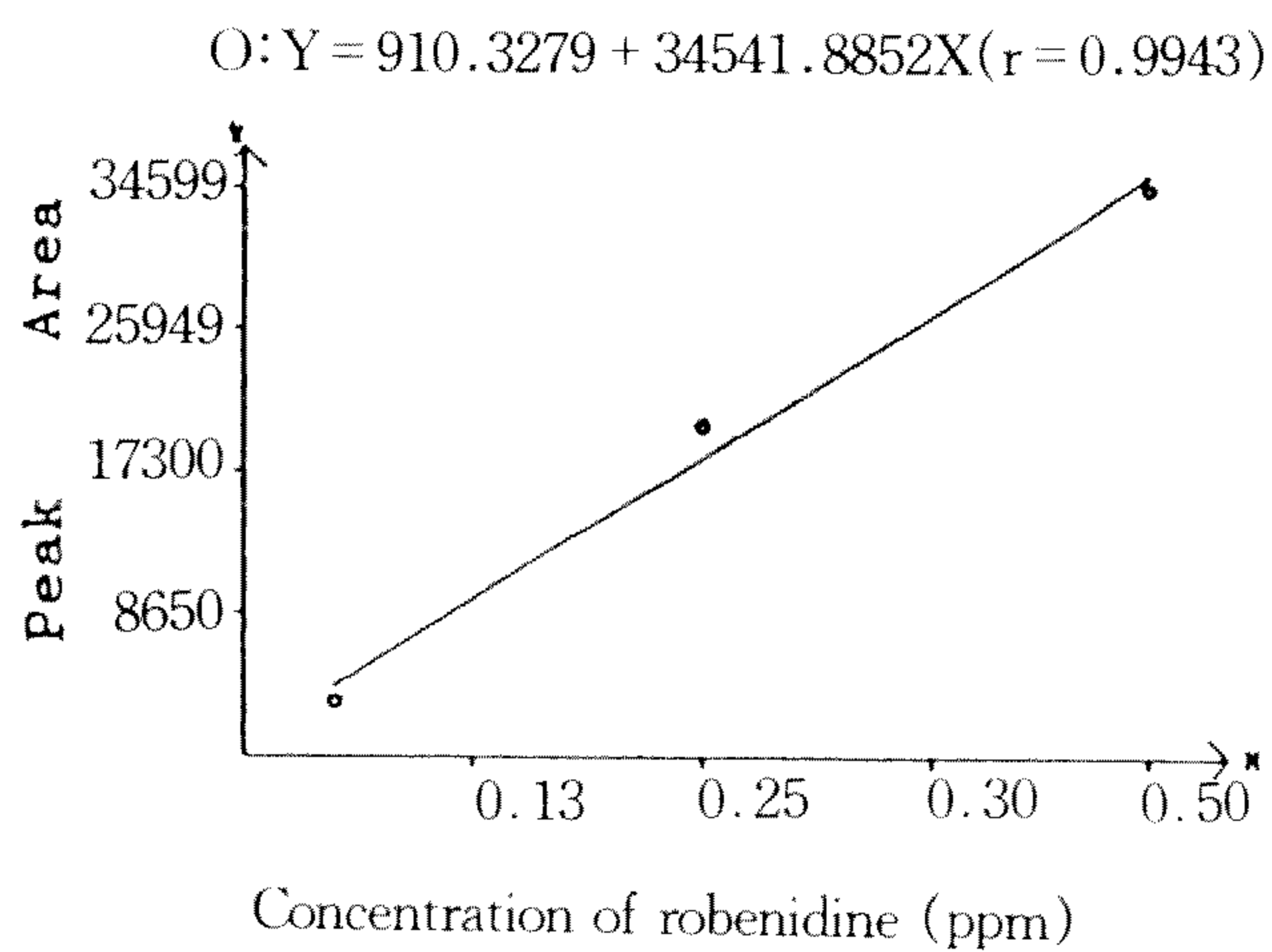


Figure 8. Recovery curve of robenidine spiked into chicken meat.

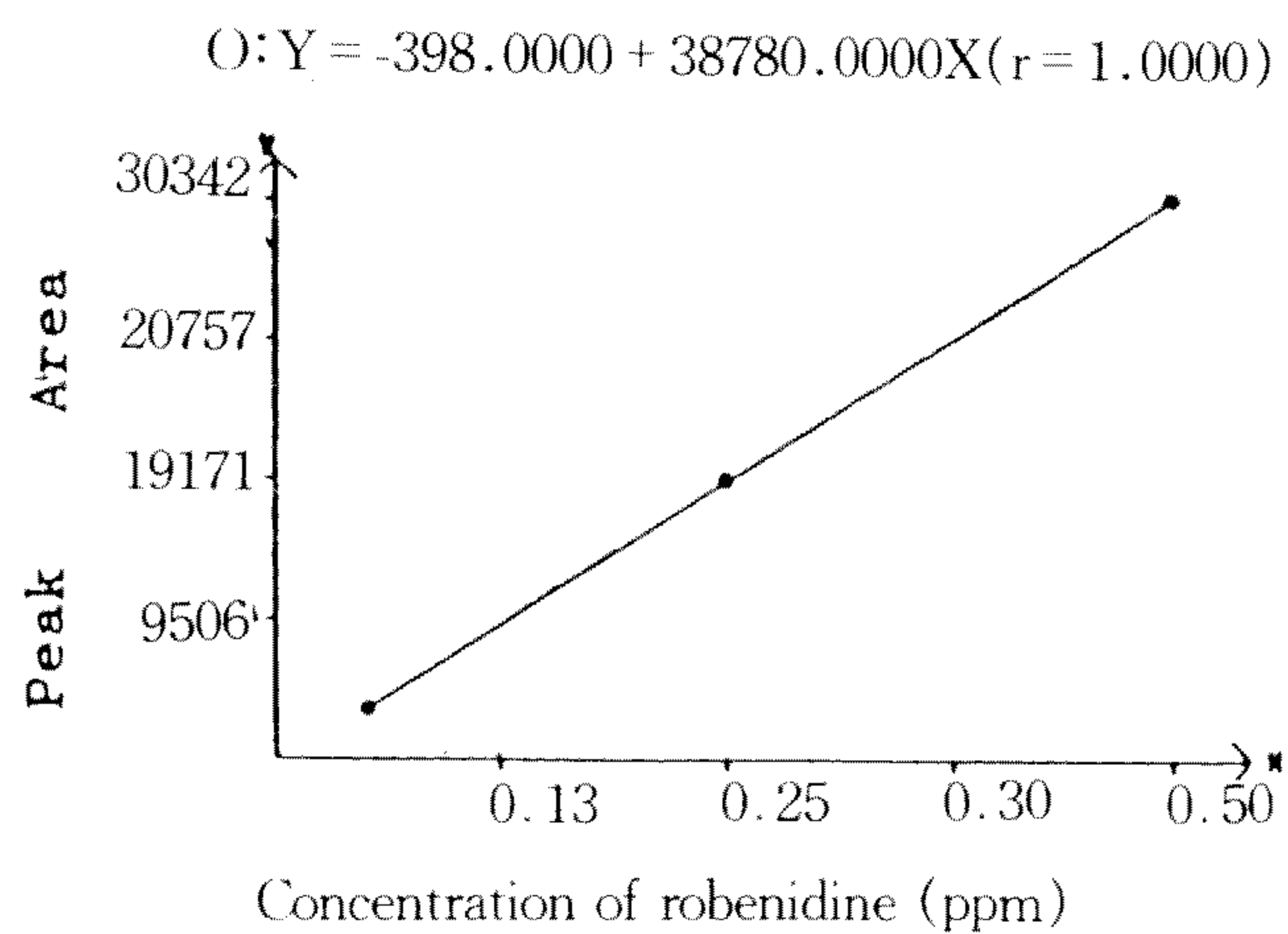


Figure 9. Recovery curve of robenidine spiked into chicken livers.

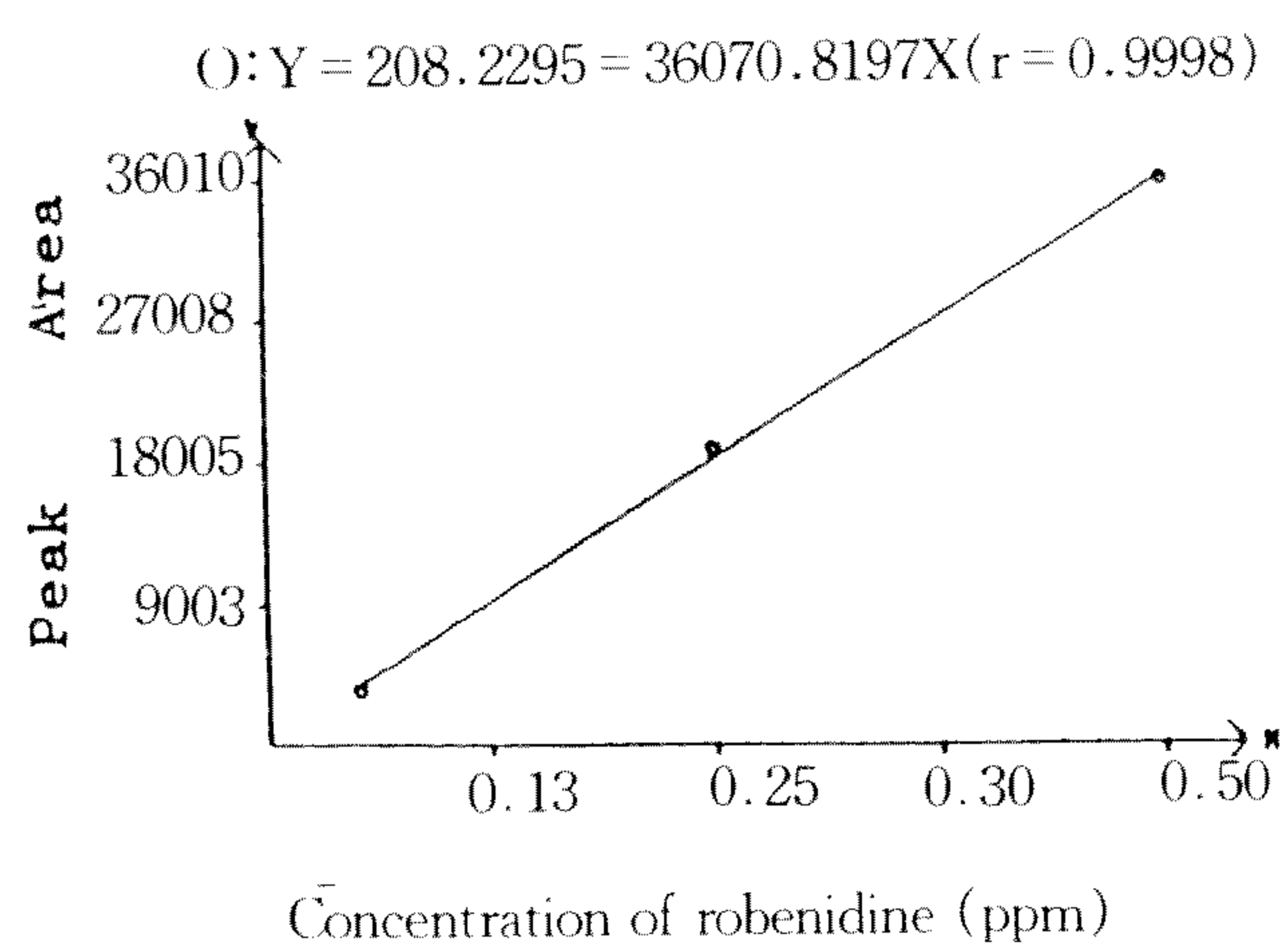


Figure 10. Recovery curve of robenidine spiked into chicken gizzards.

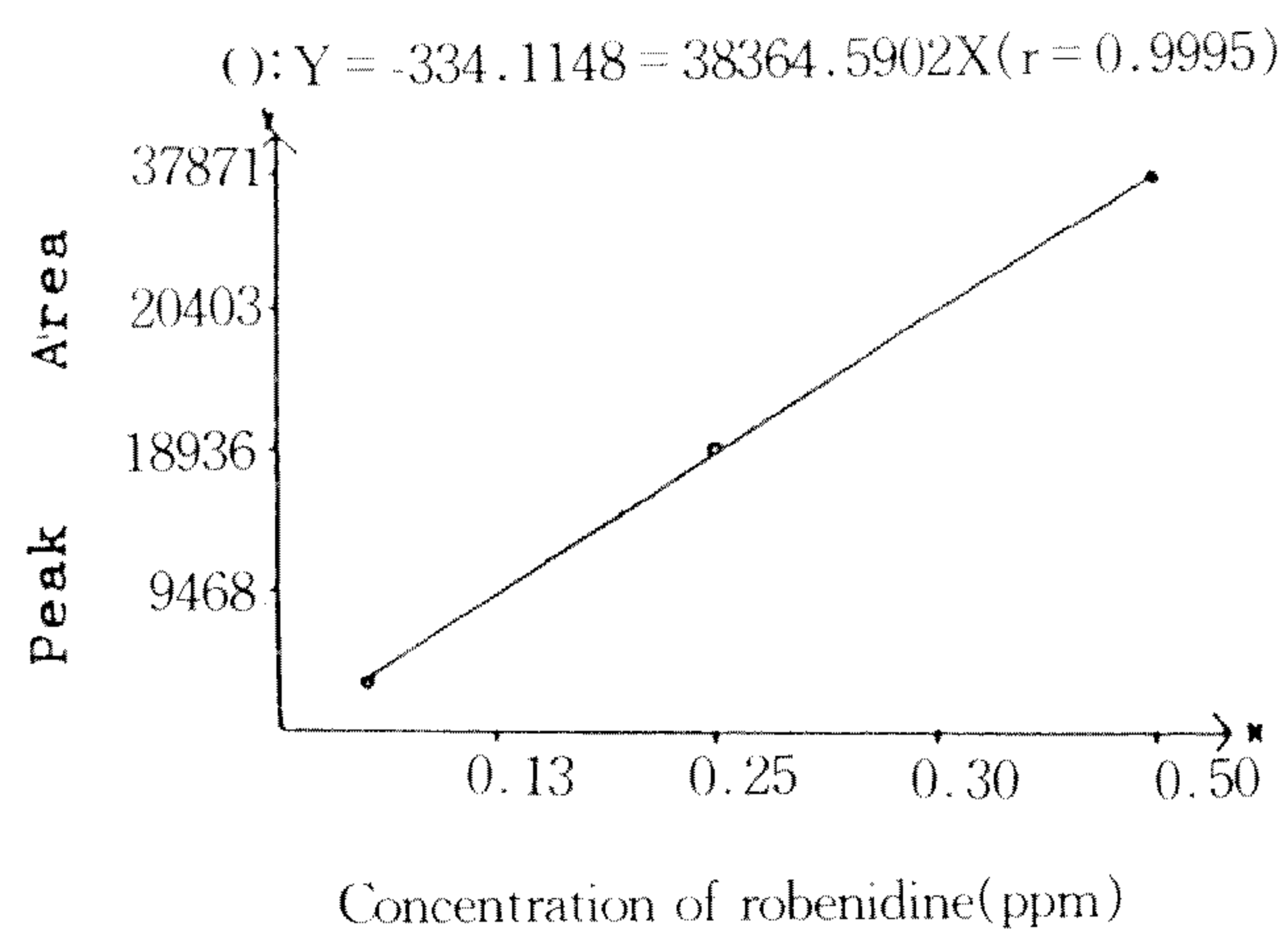


Figure 11. Recovery curve of robenidine spiked into chicken skin.

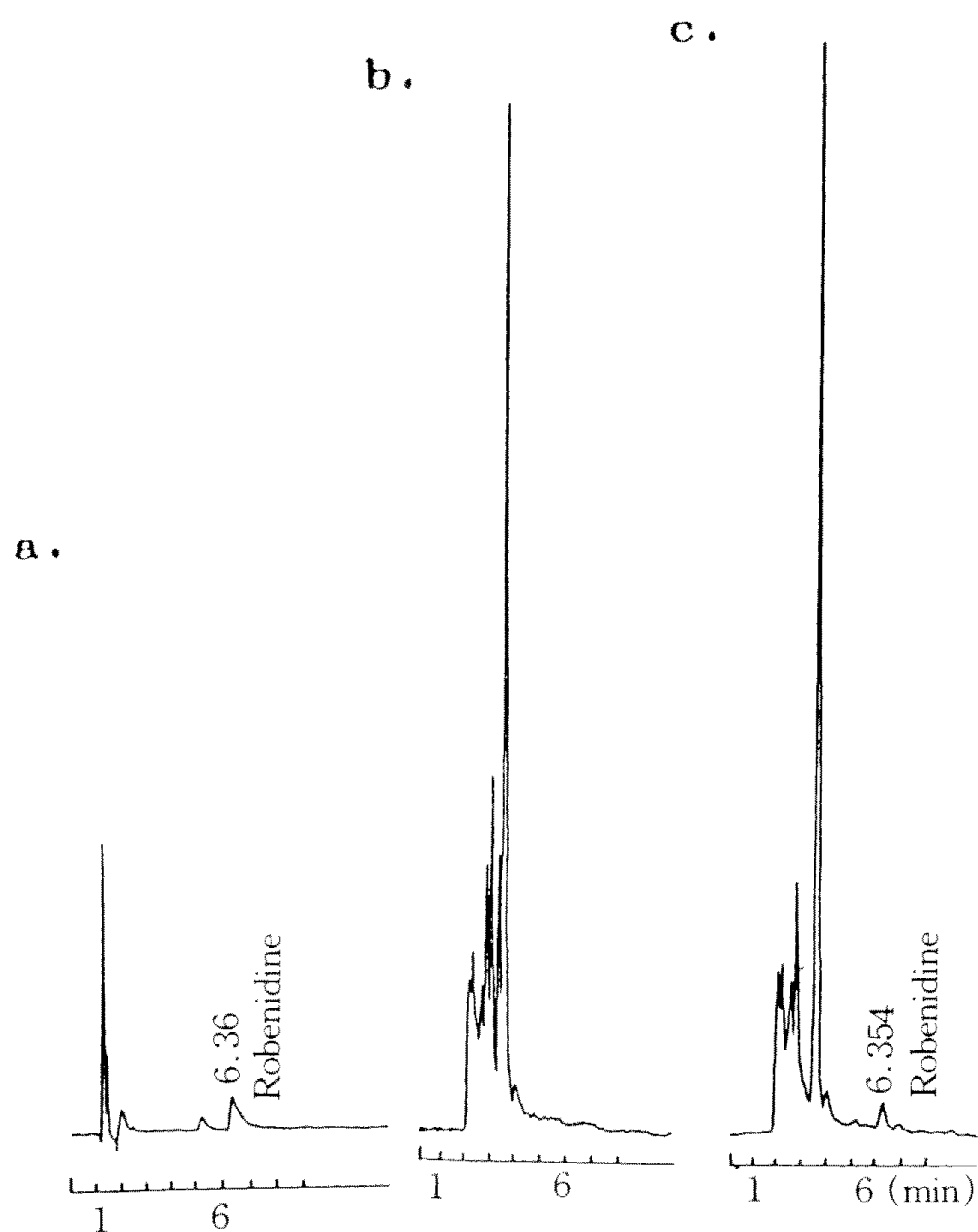


Figure 12. HPLC chromatograms of a. standard solution of $0.1 \mu\text{g/ml}$ robenidine; b. chick gozzard-blank; and c. chicken gizzard spiked with 0.025 ppm robenidine.

參考文獻

1. 李永基. 1979. 本省常見的家禽寄生蟲病. 家畜家禽衛生. 增訂第四版. 408-409.
2. 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 65040 號公告.
3. 行政院衛生署. 1989. 動物用藥殘留標準.
4. Smith, J. E., Pasarela, N. R. and Wyckoff, J. C. 1977. Polarographic determination of robenidine residues in chicken tissue, seggs, litter, soil and plant tissue. J Assoc. off. Anal. Chem. 60: 1310-1371.
5. Zagar, J. B., Ascione, P. P. and Cherkian, G. P. 1975. Automated high-pressure liquid chromatographic assay of robenidine hydrochloride. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58: 822-827.
6. 厚生省環境衛生局乳肉衛生課. 1978. 畜水產品中の殘留物質檢查法. 第 2 集及第 2 集の 2.
7. 蘇淑珠, 徐敏銓, 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劃.
(Accepted for publication: Oct. 5, 1992)

Studies on Analytical Methods of Robenidine Residues in Chicken Meat and Viscera

MAI-LING JAO, RUEY-JUH LIN, CHEN-CHUNG LEE,
SHU-CHI LEE AND SHIN-SHOU CHOU

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

ABSTRACT

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of robenidine residues in chicken meat and viscera has been developed. Samples were extracted with ethylacetate, cleaned up with Alumina B SEP PAK and C18 SEP PAK cartridges, and finally determined by HPLC. Recovery studies were performed using chicken meat, liver, gizzard and skin samples each fortified with

robenidine at 0.05, 0.25 and 0.5 ppm separately. The recovery data were varied from 80.0~92.3% with coefficients of variation which ranged from 0.5~7.0%. The detection limit for the fortified samples was found to be 0.025 ppm. Twenty-five samples of chicken meat, liver, gizzards and skin taken from the market were analyzed. It was found that no robenidine residue was detected in these samples.

