

泰妙素於豬肉組織中殘留檢驗之探討

李新進* 鄭秀蓮 劉雅方 楊喜金

台灣省家畜衛生試驗所生物研究系

摘要 利用微生物圓筒平板法分析豬肉中泰妙素殘留檢驗。檢體先以甲醇萃取、離心，以正己烷去雜質後濃縮，再以 pH 8.0 ± 0.1 磷酸緩衝液溶出，以金黃色葡萄球菌 (*staphylococcus aureus*) 為試驗菌種，進行圓筒平板法測定。豬肉中添加 0.1, 0.5, 及 1.0 µg/g 時其回收率分別為 58.6~74.8%，變異係數均小於 6%，本方法之最低檢出界限為 0.05 µg/g。

關鍵詞：泰妙素，圓筒平板法，殘留

緒 言

泰妙素於 1970 年代進入台灣動物用藥品市場，主要是針對禽畜細菌性疾病，如雞慢性呼吸器疾病 (CRD) 豬地方性流行肺炎 (SEP)，豬赤痢 (Dysentery)，這些疾病一旦污染牧場，則經年累月不易撲滅造成業者莫大的損失。過去用來控制這些疾病的藥物如四環素類 (Tetracyclines)，巨環類 (Macrolides) 及林可黴素 (Lincomycin) 等，均被發現大部份病原均已產生抗藥性，於治療效果上已大大的降低，而改用泰妙素 (Tiamulin hydrogen fumarate) 來治療並深獲業者的喜愛。

泰妙素於雞隻之使用，在飼料中常因和攜離子型 (Ionophore) 抗生素混合而發生中毒案例⁽⁴⁾，故於飼料添加物使用準則⁽¹⁾ 規定泰妙素於豬以外的動物不可使用。

泰妙素於豬肉組織中之檢驗方法，除了⁽⁶⁾ 是以氣相層析法 (GC) 檢測外，目前尚無相關資料可供參考。於飼料中以液相層析儀 (HPLC) 操作⁽⁵⁾，其感度在 10 ppm 以上，以分光光度計測定，須先以 50% 硫酸使之呈色，其感度為 0.1 ppm 以上。而本試驗旨在對豬肉組織中殘留泰妙素提出研究心得供政府施政之參酌。

材料與方法

試 藥：

甲醇，正己烷，正丁醇，冰醋酸，氯化鈉，二氯甲烷，乙醇，甲酸，碘，磷酸二氫鉀，氫氧化鉀，均採 MRECK 產品。

培養基：No. 1 細菌移植保存培養基，MRECK 5272。

No. 5 抗生素分析用基層及種層培養基 MERCK 5271。

泰妙素原料：Lot No. 747464 號 797 µg/mg 中化公司提供。

泰妙素標準品：Lot No. 9601419 號 99.5% 中化公司提供。

試 液：

磷酸緩衝液 pH 8.0 ± 0.1：取磷酸二氫鉀 13.3 g 加水 900 ml 於一瓶，另取氫氧化鉀 6.2 g 加水 100 ml 於一瓶，溶解後二瓶混合以 1 N 鹽酸或 1 N 氫氧化鈉調 PH 為 8.0 ± 0.1。

泰妙素標準原液：精取泰妙素適量以甲醇溶解製成 1,000 µg/ml 之原液，儲存於 4 °C 冰箱於二週內使用。

TLC 用標準液：取泰妙素標準原液以甲醇稀釋成 500 及 250 µg/ml。

微生物分析用標準液：取泰妙素標準原液以緩衝液 PH 8.0 ± 0.1 稀釋為 20、15、5、2.5 及 1.25 µg/ml。

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

滅菌生理鹽水：取氯化鈉 0.85 g 加水 100 ml 經高壓蒸氣於 1.2 KGF/cm² 15 分滅菌，冷卻備用。

供試菌株：金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538-P。

細菌懸浮液配製：金黃色葡萄球菌接種於移植培養基於 36 ± 1 °C 培養 18 小時，取出以滅菌生理鹽水洗出菌苔，再以滅菌生理鹽水稀釋到以分光光度計於 580 nm 測定其吸光值為 0.3。

其他抗生素、抗菌劑及其標準溶液：

取青黴素 (Penicillin; PCG)，林可黴素 (Lincomycin; L)，康黴素 (Kanamycin; KM)，新黴素 (Fradiomycin; FM)，泰黴素 (Tylosin; TS)，標準品適量以水溶解，而安比西林 (Ampicillin; AMPC)，氯四環素 (Chlortetracycline; TC)，羟四環素 (Oxytetracycline; OTC)，四環素 (Tetracycline; TC)，北里黴素 (Kitsamycin; KT)，觀黴素 (Spectinomycin; SPT)，史黴素 (Spiramycin; SPR)，克利斯汀 (Colistin; CO)，氯黴素 (Chloramphenicol; CP)，安痢黴素 (Apramycin; AP)，歐黴素 (Oleandomycin; OM)，卡巴得 (Carbadox; CBX)，歐來金得 (Olaquinox; OLX)，恩諾殺新 (Enroxacin; EN)，諾氟殺新 (Norfloxacin; NOR)，標準品適量以甲醇溶解，再以各該溶劑稀釋到 200 µg/ml。

儀器及設備：

分光光度計：Hitachi U 3000 型。

展開槽：12 × 22 cm 玻璃製品。

高壓蒸氣滅菌器：TOMY Autoclave model SD-30 N 型。

恒溫箱，塑膠培養皿，游標尺及空白濾紙片：ADVANTEC TOYO 8 mm。

供試豬肉：

市售豬肉，經抗生素篩選⁽²⁾ 結果陰性者，供檢體測試及泰妙寧藥劑添加供回收率測試之用。

檢體前處理：

取豬肉材料，去脂肪攪碎取 10 g，加甲醇均質後經 2,000 rpm 遠心 10 分鐘離心萃取三次，每次 10 ml，合併甲醇萃取液，以正己烷洗三次，每次 20 ml，甲醇萃取液經 50 °C 以下減壓濃縮到乾，殘渣加 pH 8.0 ± 0.1 磷酸緩衝液 0.4 ml 溶解，

供生物自析法及圓筒平板法操作。

薄層色層分析法：

HPTLC plate: aluminium, silica gel 60 F254 MERCK 5548 號

展開液：甲液：二氯甲烷：甲酸 (90:20:5 V/V)

乙液：正丁烷：水：冰醋酸 (70:15:15 V/V)

點樣量：20 µl

呈色劑：碘蒸氣

生物自析法：

抗生素分析用培養基 (No. 5) 經滅菌後，倒入滅菌培養皿，(每個培養皿約倒入 12 ml)，經冷卻後為基層培養基，另取 50 ml 置於 45 °C 恒溫水槽恒溫後加入 0.5 ml 細菌懸浮液，振搖均勻後，到入 4 ml 於種層培養基上平放使之凝固為種層培養基。取上述薄層色析法已展開之 TLC 板經以微熱風吹乾展開液後，展開面平貼於種層培養基上，TLC 板上輕壓以趕走空氣，經 30 分鐘後取出 TLC 板，置種層培養基於恒溫箱於 36 ± 1 °C 培養 18 小時，取出測量抑制圈大小，供計算檢體含藥物之量。

圓筒平板法：

標準曲線法使用之基層及種層培養基，同生物自析法操作，檢驗過程則依⁽⁷⁾ Microbiology Laboratory Guidebook 內方法進行。

回收率試驗：

取泰妙素標準液，分別添加 0.1, 0.5 及 1 µg/g 於空白豬肉中，依上述檢液操作方法作回收試驗，每一添加量作二重覆，同時作空白試驗，就來液的抑制圈與標準迴歸直線對照求出回收率。

結果與討論

泰妙素使用分光光度計 (UV) 之測定：

泰妙素之結構式如圖一⁽⁸⁾，其對光的吸收值差，原料以分光光度計測定，須藉硫酸與結構式中之乙烯基 (Vinyl group) 結合呈色 (藍色) 再以波長 370~500 nm 檢測吸光度，其最大吸光值波長為 455 nm (圖二)。本驗所使用之硫酸為 50% (50% 以下無法呈色) 並於 95 °C 水浴中感作 20 分鐘再測定，其感度為 0.1 µg/ml，而豬肉

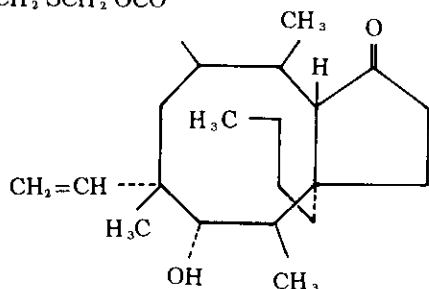
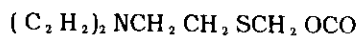
萃取液，若以上述方法處理則變黑色，無法使用分光光度計測試。

標準迴歸直線之製作：

取泰妙素標準原液以 pH 8.0 ± 0.1 緩衝液稀釋到每 ml 含 20、10、5、2.5 及 1.25 μg 並以 5 μg / ml 為校正濃度，以金黃色葡萄球菌為菌種，使用圓筒平板法操作，於 36 ± 1 °C 恒溫箱培養 18 小時，取出以游標尺測量其抑制圈，以抑制圈直徑為橫軸，以標準液濃度之對數值為縱軸，劃成迴歸直線（圖三）抑制圈（圖四），其方程式為 $Y = -11.75 + 0.49 X$ 相關係數 $(r) = 0.9667$ 。

添加回收試驗及最低檢出量：

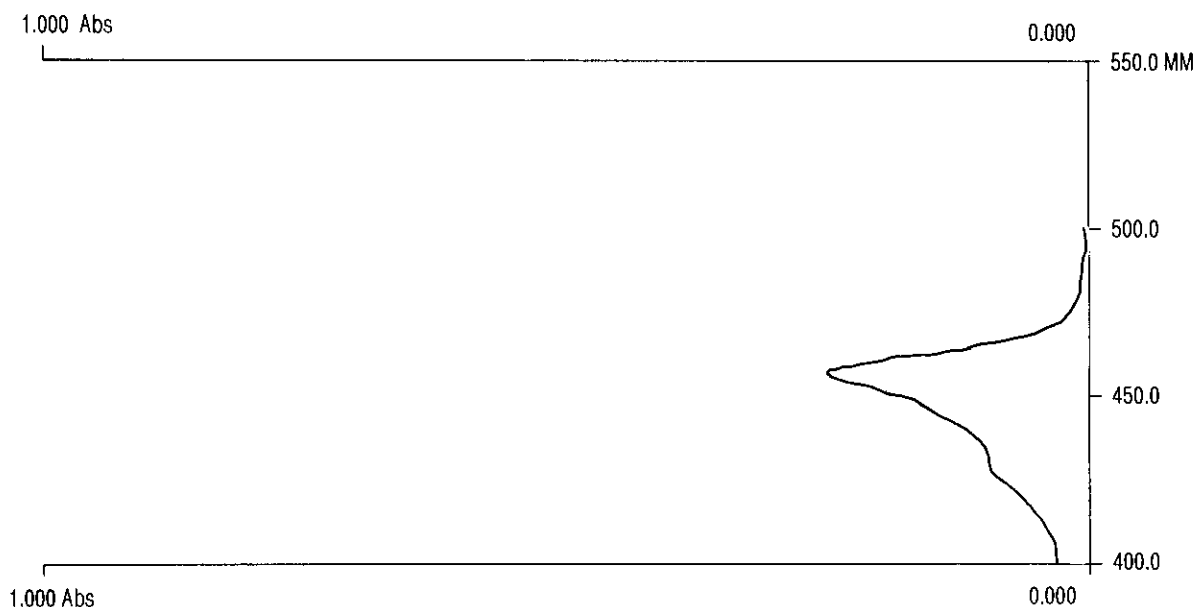
每公克空白豬肉添加泰妙素標準液 0.1、0.5 及 1 μg 依上述檢液處理法操作，各作三次重複檢測所得之回收率如表一，本法並以不同濃度測試，其最低檢出量為 0.05 μg / ml 以上。泰妙素於豬肉組織中萃取過程最感困難的步驟是雜質的去除（如蛋白質，脂肪）。雜質排除不乾淨影響回收率很大。本試驗經一再研究，檢體以甲醇萃取後通過無水硫酸鈉，或用各種樹脂如矽膠（Silica gel）三氧化二鋁（Alumina）Amberlite XAD-2，IRC-50 及 Dowex-50 W 等均無法提高回收率。另外濃縮過程溫度不可超過 50 °C，否則亦會影響回收率。



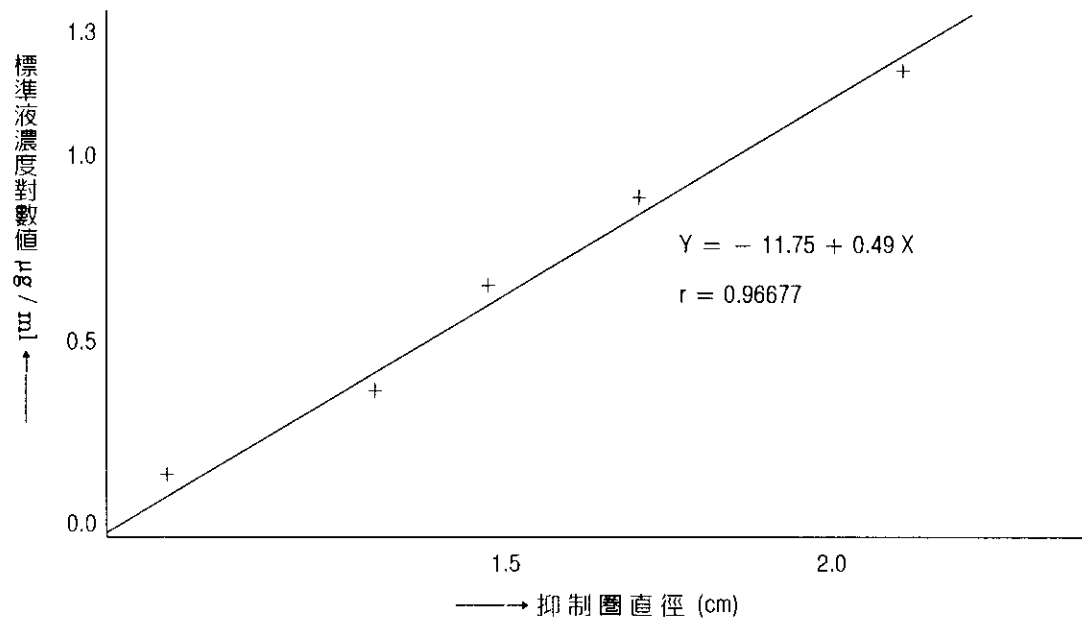
$C_{28}H_{47}NO_4S$; mol wt 493.76

Fumarate, $C_{32}H_{51}NO_8S$;
mol wt 609.82

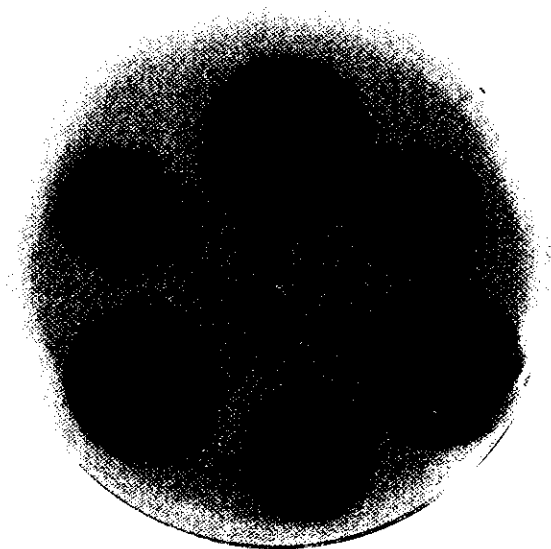
圖一 泰妙素的分子結構式



圖二 泰妙素經 50 % 硫酸呈色後之分光光度計圖譜



圖三 不同濃度泰妙素標準液之迴歸直線及其方程式



圖四 泰妙素各標準液之細菌抑制圈

表一 添加泰妙素於豬肉之回收率

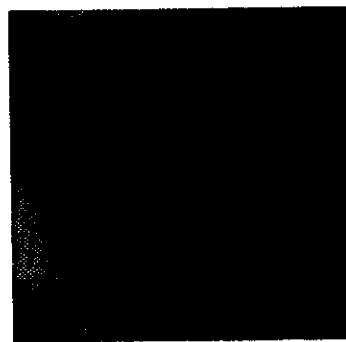
添加量	回收率 %	mean ± SD	CV %
0.1	63.5	62.4 ± 3.3	5.2
	58.6		
	65.1		
0.5	70.8	68.3 ± 2.6	3.8
	65.6		
	68.5		
1.0	66.5	70.4 ± 4.1	5.8
	74.8		
	70.6		

泰妙素於豬肉殘留試驗之定性及與其他抗菌劑之比較試驗：

泰妙素和豬隻其他常用飼料添加物或治療藥物之標準液，以薄層色層分析法和生物自析法比較試驗，結果如表二、圖五及圖六。畜產品殘留藥物之檢測，除了篩選試驗證明是否有殘留藥物以外，就是要作定性分析，以證明是屬於何種殘留藥物。定性分析方法很多，其中以薄層色析法及生物自析法為檢驗畜產品藥物殘留最快速及正確的方法，也是研究人員所追求的目標。本試驗也費了許多時間尋找出二種展開液（甲液及乙液），

均能清楚的分開泰妙素及其他可能干擾之豬隻常用飼料添加物和治療藥劑，以供今後鑑別之依據。

畜產品殘留抗生素之檢驗，我國、日本、及美國目前仍採用微生物分析法⁽³⁾，由於抗生素是細菌的分泌產物，也是一種酵素，其抑制細菌或消滅細菌過程是屬於生物效價（potency）作用，此作用至今尚無法用儀器數據取代或換算。泰妙素是抗生素的一種，於豬肉組織中之檢驗方法，以本試驗探討之結果無法以光電儀器來進行檢驗，而以微生物進行測試，其方法尚須進一步研究，以提高其回收率。



圖五：泰妙素標準液之薄層色析法圖譜濃度由左至右為 12.5, 25, 50 及 100 µg
展開液：乙液

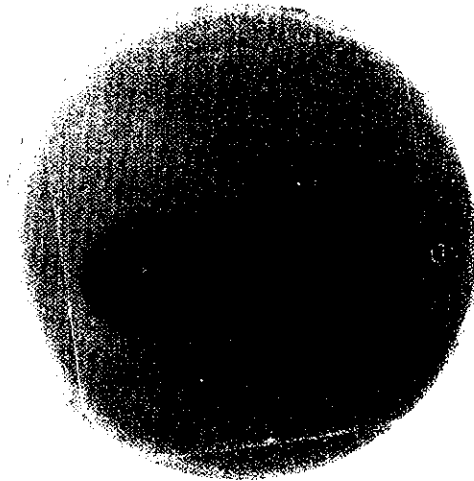


圖 六 泰妙素標準液之生物自析法圖譜濃度由左至右為 10, 5, 2.5 及 1.25 µg/ml。

展開液：乙液。

表 二 泰妙素及其他抗菌劑以薄層色析法檢測

藥品名稱	簡稱	溶劑	濃度	注入量		Rf	
				µg/ml		展開液:甲	展開液:乙
泰妙素	TI	水	500	20		0.78	0.55
青黴素	PCG	水	200	20		0.96	0.78
安比西林	AMPC	甲醇	200	20		0.14	0.10
安痢黴素	AP	甲醇	200	20		—	—
氯四黴素	CTC	甲醇	200	20		0.25	0.08
羥四黴素	OTC	甲醇	200	20		0.27	0.08
四環素	TC	甲醇	200	20		0.27	0.08
北里黴素	KT	甲醇	200	20		0.93	0.45
林可黴素	L	水	200	20		0.17	0.11
觀黴素	SPT	甲醇	200	20		0.81	0.28
泰黴素	TS	水	200	20		0.81	0.31
康黴素	KM	水	200	20		—	—
史黴素	SPR	甲醇	200	20		—	0.30
新黴素	FD	水	200	20		—	—
歐來金得	OLX	甲醇	200	20		—	—
卡巴得	OBX	甲醇	200	20		—	—
歐黴素	OM	甲醇	200	20		—	—
氯黴素	CP	甲醇	200	20		0.48	0.43
恩諾殺新	EN	甲醇	200	20		—	—
諾氟殺新	NOR	甲醇	200	20		—	—
克利斯汀	CO	甲醇	200*	20		—	—

註：展開液：甲液是二氯甲烷：乙醇：甲酸（90：20：5）

乙液是正丁醇：水：冰醋酸（70：15：15）

* unit

參考文獻

1. 行政院農業委員會。飼料添加物使用準則。台北台灣，1-33，1991。
2. 經濟部中央標準局。飼料添加物檢驗法。抗生素之微生物學測定法通則，中國國家標準 9028，N4098，1983。
3. 傅祖慧。日本。美國及我國畜水產品殘留抗生物質檢查法。1988。
4. Pott JM., Skov B, Monensin - tiamulin interactions in pig. *The Veterinary Record*, December 12. 545, 1981.
5. Markus JR, Sherma J. Liquid Chromatographic Determination of Tiamulin Hydrogen Fumarate in Complete Swine Meal Feeds. *J of AOAC International*. 76 : No 2 : 449-450, 1993.
6. Markus JR, Sherma J. Gas Chromatographic Determination of Tiamulin Residues in Swine Liver. *J of AOAC International* 76 : No2 : 451-452, 1993.
7. Microbiology Laboratory Guidebooks. Scientific Service Animal and Plant Health Inspection Service U. S. D. A : 6.1~6.23 Washington, D. C 1974.
8. The merck index 10 : 9264, 1983.

Studies on residual analysis of tiamulin in pork.

S. J. Lee,* S. L. Jeng. Y. F. Liu. S. C. Yang.

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan R. O. C.

SUMMARY An analysis of residue of tiamulin in pork by microbiological assay with cylinder plate method was established. Tiamulin was extracted with methanol, cleaned up with n - hexane after centrifugation and then condensed. The sediment was dissolved in phosphate buffer of pH 8.0 ± 0.1 , and poured into cylinder on medium cultured with *Staphylococcus aureus* for detection of residual level of the drug. The recoveries were in the range of 58.6 % to 74.8 % spiked with 0.1 to 1.0 $\mu\text{g} / \text{g}$ of tiamulin in pork, and the coefficient of variances were all below 6 %. The detection limit was 0.05 $\mu\text{g} / \text{g}$.

Key words: *Tiamulin, Cylinder plate method, Residue.*

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.