

藥物食品檢驗局調查研究年報· 16: 250-259 1998

Ann. Rept. NLFD Taiwan R.O.C 16: 250-259 1998

雞肉及雞肝中動物用藥安保寧 (amprolium) 殘留量 檢驗方法之探討

高雅敏* 鄭秋真 劉兆宏

行政院衛生署藥物食品檢驗局

(接受刊載日期：中華民國八十七年一月五日)

本研究利用後置反應及螢光檢測之高效液相層析法建立雞肉及雞肝中動物用藥安保寧 (amprolium) 殘留量之檢驗方法。雞肉及雞肝檢體以乙腈萃取，經過濾，濃縮，去除雜質後，與離子配對試劑二辛基硫酸琥珀酸 (dioctyl sulfosuccinate; DOSS) 形成複合物，以二氯甲烷抽提，其中雞肝檢體須進一步以 Sep-Pak 酸性氧化鋁處理而淨化，最後利用高效液相層析儀將安保寧先以 Cosmosil 5C18-AR-II (25 cm × 4.6 mm i.d., 5 μm) 管柱分離，再與鐵氰化鉀之氫氧化鈉溶液反應，以螢光檢測器於激發波長 368 nm 及放射波長 470 nm 偵測。檢體中添加安保寧 0.05、0.1 及 0.2 ppm 時，其回收率於雞肉及雞肝中分別為 95.8 ~ 98.3% 及 91.3 ~ 95.2%，變異係數皆小於 2%。本方法在此二檢體中之檢出限量為 5 ppb。將此方法應用於市售雞肉及雞肝之殘留量分析，結果於 50 件檢體中檢出 1 件雞肝殘留安保寧 0.04 ppm，檢出率占總抽驗件數之 2%。

關鍵字：安保寧，雞肉，雞肝，後置反應，螢光檢測，高效液相層析。

Determination of Amprolium Residue in Chicken Meat and Liver

Ya-Min Kao*, Chieu-Chen Cheng and Chao-Hong Liu

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

(Accepted for publication: January 5, 1998)

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method using postcolumn reaction and fluorometric detection was evaluated for the determination of amprolium in chicken meat and liver. Amprolium was extracted with acetonitrile and filtered. The extract was evaporated to dryness and partitioned with n-hexane and dichloromethane. An ion-pair complex with an anionic surfactant, dioctyl sulfosuccinate (DOSS), was formed. The ion-pair complex was extracted with dichloromethane and evaporated to dryness. The residue from chicken liver was cleaned up using a Sep-Pak alumina A cartridge before it was quantitatively analyzed by HPLC. Amprolium was separated by HPLC on a column of Cosmosil 5C18-AR-II (25 cm × 4.6 mm

i.d., 5 μ m), reacted with potassium ferricyanide in a postcolumn reaction system, and determined by a fluorescence detector with excitation at 368 nm and emission at 470 nm. The average recoveries of amprolium after spiking into samples at the levels of 0.05, 0.1 and 0.2 ppm were in the ranges of 95.8-98.3% for meat and 91.3-95.2% for liver. The coefficients of variation were less than 2%. The detection limit was 5 ppb.

Twenty-five samples each of chicken meat and liver were purchased from various markets in Taipei during March-June, 1997. Only one chicken liver sample was found to have 0.04 ppm amprolium residue. The percentage of detection was 2%.

Key words: Amprolium, Chicken meat, Chicken liver, Postcolumn reaction, Fluorometric detection, High performance liquid chromatography.

前 言

動物用藥添加至飼料中主要目的為防治禽畜疾病，提高飼料效率，以促進禽畜生長及增加產量。行政院農委會於 74 年公告之「飼料添加物使用規範」⁽¹⁾ 共包括 64 種飼料添加物。為防制動物用藥之濫用，行政院衛生署於 76 年公告之「動物用藥殘留標準」⁽²⁾，編列 19 種動物用藥在禽畜之殘留標準，且大部分動物用藥之檢驗方法均已建立完竣。

安保寧 [amprolium; 1-(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-picolinium chloride hydrochloride] 為一合成抗球蟲劑 (coccidio-stat)，依行政院農委會公告之「飼料添加物使用規範」中規定，此藥劑可單獨使用，亦可與衣索巴 (ethopabate) 或與衣索巴及磺胺奎林 (sulfaquinoxaline) 合併添加於飼料中，預防雞之球蟲病。然而依行政院衛生署公告之「動物用藥殘留標準」，此藥劑尚未容許殘留，日本衛生管理法亦規定在禽畜產品中此藥劑不得殘留⁽³⁾，但美國⁽⁴⁾ 及澳洲⁽⁵⁾ 均規定此藥劑在未烹調之雞肝及雞腎中之殘留限量為 1 ppm，雞肉中為 0.5 ppm。由於我國目前尚未制定此藥劑之檢驗方法亦未曾做過此藥劑在肉品中之殘留量調查，故本研究乃針對雞肉及雞肝中安保寧殘留進行檢驗方法之探討，並對市售雞肉及雞肝中安保寧殘留進行小規模調查分析，結果將提供農政及衛生主管機關參考，以確保肉品之衛生安全及維護大眾之健康。

安保寧為一白色粉末，易溶於水、甲醇、95% 乙醇及二甲甲醯胺 (dimethylformamide)⁽⁶⁾。一般對於飼料中安保寧含量之檢測方法有呈色法⁽⁷⁾、螢光法⁽⁷⁾ 及正相高效液相層析法⁽⁸⁾，這些方法並不適用於動物組織中安保寧殘留之檢測。由於安保寧與硫胺素 (thiamine) 之性質相似，於氧化劑如鐵氰化鉀 (potassium ferricyanide) 存在下，會被氧化成螢光色素 (fluorophores)⁽⁹⁾，Vanderslice 和 Huang⁽⁹⁾ 及 Nagata 和 Saeki⁽¹⁰⁾ 均利用高效液相層析管柱先將安保寧與干擾物分開，再與鐵氰化鉀進行後置反應，最後以螢光檢測器偵測，由於此方法之靈敏度及專一性較佳，故本研究採用後置反應之高效液相層析法進行安保寧檢驗方法之探討。

材料與方法

一、檢體來源

本研究所使用之檢體係 86 年 3 月至 6 月間購自台北市各零售市場，其中雞肉及雞肝各 25 件。

二、試藥

1. 安保寧 (amprolium) 對照標準品及二辛基硫琥珀酸 (dioctyl sulfosuccinate; DOSS) 離子配對試劑均購自美國 Sigma 公司 (ST. Louis, Missouri)。
2. Sep-Pak 酸性氧化鋁處理匣 (alumina A cartridge)：氧化鋁含量約 2.0 g，購自美國 Waters 公司 (Milford, Massachusetts)。
3. 溶劑與藥品：
乙腈及甲醇均購自英國 BDH 公司 (Poole)，純度為 LC 級。正己烷及二氯甲烷均購自愛爾蘭共和國 Lab-Scan 公司 (Dublin)，純度為 LC 級。二乙胺 (diethylamine)、乙醇、氫氧化鈉、鐵氰化鉀、磷酸二氫鈉及磷酸氫二鈉均購自德國 Merck 公司 (Darmstadt)，純度為試藥特級。乙酸購自日本 Nacicalai Tesque 公司 (京都)，純度為試藥特級。
4. 標準溶液之調製
精確稱取安保寧對照標準品約 100 mg，溶於水使成 100 mL，供作標準原液，再以乙腈釋配製成 0.2~2.0 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。
5. 移動相 (45% 乙腈溶液含 4 mM DOSS、0.3% 二乙胺及 1.0% 乙酸) 之調製
稱取 DOSS 1.78 g，以乙腈 450 mL 溶解，加入二乙胺 3 mL 及乙酸 10 mL，以水定容至 1000 mL，用孔徑 0.45 μm 之濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。
6. 後置反應溶液 (7% 氫氧化鈉溶液含 0.12% 鐵氰化鉀) 之調製
稱取氫氧化鈉 70 g 及鐵氰化鉀 1.2 g，以水溶解並定容至 1000 mL，用孔徑 0.45 μm 之濾膜過濾，取濾液供作後置反應溶液。
7. 0.05 M pH 8.0 磷酸緩衝溶液之調製
配製 0.05 M 磷酸氫二鈉，以 0.05 M 磷酸二氫鈉調整 pH 至 8.0。
8. 5 mM DOSS 溶液之調製
稱取 DOSS 0.44 g，加乙醇 3 mL 溶解，以 0.05 M pH 8.0 磷酸緩衝溶液定容至 200 mL。

三、儀器設備

1. 攪拌均質機 (ACE homogenizer)：日本 Nihonseiki 公司 (東京) 產品。
2. 分光光度計 (spectrophotometer)：Spectronic 3000，比利時 Milton Roy 公司 (Oostende) 產品。
3. 螢光分光光度計 (fluorescence spectrophotometer)：F-4500，日本 Hitachi 公司 (東京) 產品。
4. 高效液相層析儀 (high performance liquid chromatograph)：Shimadzu LC-6A 溶液輸出系統，配有 Shimadzu SPD-6AV 紫外 / 可見光檢測器，日本 Shimadzu 公司 (京都) 產品，及 Hitachi F-1050 螢光檢測器，日本 Hitachi 公司產品。
5. 積分儀 (integrator)：Shimadzu C-R4A，日本 Shimadzu 公司產品。

四、分析方法

1. 萃取：
雞肉及雞肝檢體均質後，精確稱取檢體 10 g，置於攪拌均質器中，加入乙腈 50 mL，攪拌均質 3 分鐘後，以布區奈氏漏斗抽氣過濾，濾餅再以乙腈 50 mL 重複操作二次，

合併濾液移入濃縮瓶中，於 40 °C 水浴減壓濃縮至乾。濃縮物以正己烷 50 mL 分次溶解，置於分液漏斗中，加入 0.05 M pH 8.0 磷酸緩衝溶液 50 mL，振盪 5 分鐘。靜置分層後，取緩衝溶液層，再加入正己烷 50 mL，同樣操作二次。於緩衝溶液層加入二氯甲烷 50 mL，以手輕輕上下搖晃分液漏斗十次，以避免乳化，靜置分層後，除去二氯甲烷層，加入二氯甲烷 50 mL，振盪 2 分鐘，靜置分層後，除去二氯甲烷層，再加入二氯甲烷 50 mL，同樣操作一次，取緩衝溶液層。

2. 離子配對溶劑抽提：

於上述緩衝溶液層加入 5 mM DOSS 溶液 2 mL，振盪 2 分鐘，加入二氯甲烷 50 mL，以手輕輕上下搖晃分液漏斗十次，以避免乳化，靜置分層後，收集二氯甲烷層，於緩衝溶液層加入二氯甲烷 50 mL，振盪 2 分鐘，收集二氯甲烷層，再加入二氯甲烷 50 mL，同樣操作二次，合併二氯甲烷層，移入濃縮瓶中，於 40 °C 水浴減壓濃縮至乾。

3. Sep-Pak 酸性氧化鋁處理匣淨化

上述雞肉檢體濃縮物直接以乙腈溶解並定容至 1 mL，供作檢液，以高效液相層析 (HPLC) 定量。而雞肝檢體濃縮物則以二氯甲烷 1 mL 溶解，注入 Sep-Pak 酸性氧化鋁處理匣（先以二氯甲烷 10 mL 活化），分別以二氯甲烷 3 mL 清洗濃縮瓶三次，洗液注入處理匣，流出液棄之，最後以甲醇 10 mL 注入處理匣，流出液收集至濃縮瓶中，於 40 °C 水浴減壓濃縮至乾，濃縮物以乙腈溶解並定容至 1 mL，供作檢液，進行 HPLC 分析定量。

4. HPLC 定量分析

(a) HPLC 分析條件：

管柱：Cosmosil 5C18-AR-II (25 cm × 4.6 mm i.d., 5 μm)，日本 Nacicalai Tesque 公司產品。

移動相溶液：45% 乙腈溶液含 4 mM DOSS、0.3% 二乙胺及 1.0% 乙酸。

後置反應溶液：7% 氫氧化鈉溶液含 0.12% 鐵氰化鉀。

流速：移動相及反應溶液均為 1.0 mL/min。

反應管路：內徑 0.5 mm，長度 4 m，不鏽鋼材質。

螢光檢測器：激發波長 368 nm，放射波長 470 nm。

(b) 標準曲線之製作：

取安保寧依照前述標準溶液之調製配成 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 及 2.0 μg/mL 六種濃度之標準溶液，精確量取標準溶液各 20 μL，分別注入高效液相層析儀，由積分儀之波峰面積與濃度作圖，經回歸分析即可製成標準曲線。

(c) 含量測定：

精確量取上述檢液及標準溶液各 20 μL，分別注入高效液相層析儀，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並由標準曲線中求得安保寧含量，計算式如下：

$$\text{檢體中安保寧含量 (ppm)} = \frac{C \times V}{W}$$

C：由標準曲線中求得安保寧之濃度 (μg/mL)

V：檢液之體積 (mL)

W：檢體重量 (g)

五、回收試驗

取均質後檢體，分別添加 0.05、0.1 及 0.2 ppm 之安保寧，每一添加量作三重複，同時作空白試驗，依前述分析方法操作，經 HPLC 定量後，與原來已知濃度比較，即可計算出安保寧之回收率。

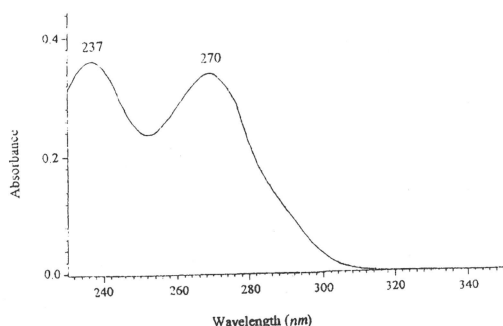
結果與討論

一、高效液相層析條件之選擇

由於安保寧屬於親水性強之化合物，在水中易解離形成帶正電離子，因此一般採用 HPLC 分析時，移動相溶液大多添加陰離子配對劑與之配對，將其離子性抑制，利用逆相層析管柱達成分離之目的。比較 Nagata 和 Saeki⁽¹⁰⁾ 與 Kentzer 等人⁽¹¹⁾ 所採用移動相之陰離子配對劑，發現以後者所採用之陰離子配對劑 (dioctyl sulfosuccinate, DOSS)，對於雞肉及雞肝中安保寧之分離效果較優於前者 (sodium 1-hexanesulfonate)，故本研究採用含有此陰離子配對劑之移動相以分析安保寧。

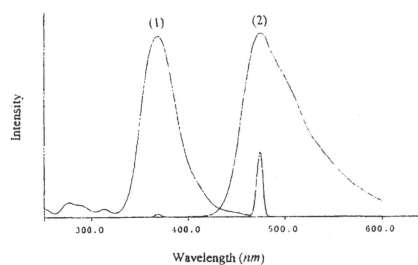
根據文獻，以 HPLC 分析安保寧可利用紫外光檢測器^(8,11) 或經後置反應 (postcolumn reaction) 後以螢光檢測器偵測^(9,10)，圖一及圖二分別為安保寧標準品溶於含有 4 mM DOSS 之 45% 乙腈溶液及含有 0.12% 鐵氰化鉀之氫氧化鈉溶液中，以分光光度計及螢光分光光度計在波長 230~600 nm 之區間內掃描測試結果，安保寧在紫外光波長 237 nm 及 270 nm 處有較大吸收值，而螢光之激發波長為 368 nm，放射波長為 470 nm。將安保寧經 HPLC 分析，以含有 4 mM DOSS 之 45% 之乙腈溶液為移動相，利用 C₁₈ 層析管柱分離，分別以紫外光檢測器於波長 270 nm 及經含有 0.12% 鐵氰化鉀之 7% 氫氧化鈉溶液行後置反應後以螢光檢測器偵測，所得層析圖譜如圖三所示。由圖中可明顯看出，安保寧經後置反應以螢光檢測器偵測之感度較直接以紫外光檢測器偵測高，故本研究採用後置反應以螢光檢測器作為安保寧殘留之偵測。

在探討後置反應之最佳條件時，Nagata 和 Saeki⁽¹⁰⁾ 指出後置反應管路之長度必須大於 3 公尺，安保寧與反應試劑方能反應完全，故本研究將後置反應管路之長度固定為 4 公尺。



圖一 安保寧標準品溶於含有 4 mM DOSS, 0.3% 二乙胺及 1.0% 乙酸之 45% 乙腈溶液之紫外光吸收圖譜

Fig. 1. UV-absorption spectrum of amprolium in 45% acetonitrile containing 4 mM DOSS, 0.3% diethylamine and 1.0% acetic acid.



圖二 安保寧標準品溶於含有 0.12% 鐵氰化鉀之 7% 氫氧化鈉之螢光圖譜 (1) 於放射波長 470 nm 之激發圖譜 (2) 於激發波長 368 nm 之放射圖譜

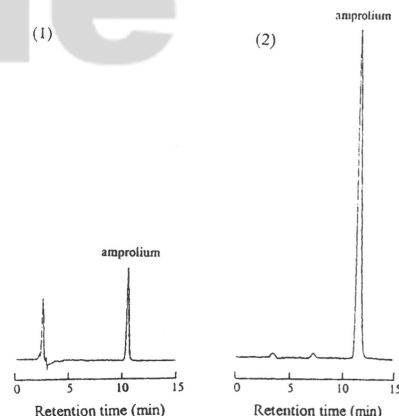
Fig. 2. Fluorescence spectra of amprolium in 7% NaOH solution containing 0.12% K₃Fe(CN)₆. (1) Excitation spectrum at 470 nm emission, (2) emission spectrum at 368 nm excitation.

由圖四及圖五顯示，安保寧於螢光檢測器之感度與反應試劑中氫氧化鈉及鐵氰化鉀之濃度有密切關係，由圖中發現安保寧之感度隨著氫氧化鈉及鐵氰化鉀濃度之提高有逐漸增加之趨勢，當氫氧化鈉及鐵氰化鉀之濃度分別大於 7% 及 0.12% 時，安保寧之感度趨於一平穩狀態，故本研究將反應試劑中氫氧化鈉及鐵氰化鉀之濃度分別固定為 7% 及 0.12%。

二. 前處理之探討

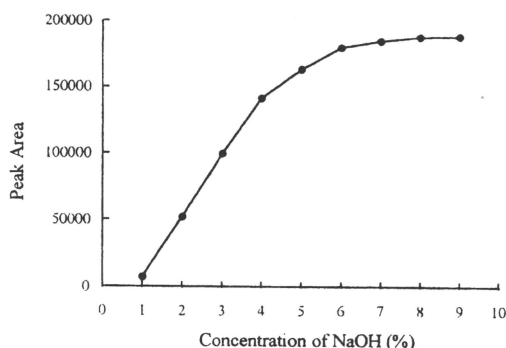
1. 溶媒萃取之探討

由於安保寧易溶於水及甲醇，因此分析常以甲醇^(10,12)或甲醇/水 (2/1, v/v) 溶液^(11,13)萃取。經初步實驗發現，若以此二溶媒萃取，在減壓濃縮時，容易起泡、突沸，且不易將甲醇去除，不但增加操作時之困擾，並且在往後步驟中易形成乳化較



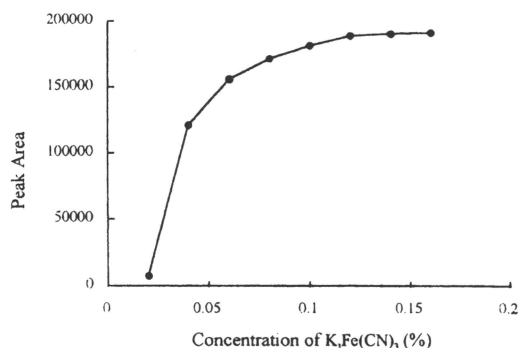
圖三 安保寧標準溶液 (1.0 ng/μL) 之高效液相層析圖譜 (注射量為 20 μL) (1) 以紫外光檢測器於 270 nm 偵測 (2) 經後置反應以螢光檢測器於激發波長 368 nm 及放射波長 470 nm 偵測

Fig. 3. Chromatograms of amprolium at a concentration of 1.0 ng/μL with 20 μL injection. LC conditions: column, Cosmosil 5C18-AR-II (25 cm × 4.6 mm i.d., 5 μm); mobile phase, 45% acetonitrile containing 4 mM DOSS, 0.3% diethylamine and 1.0% acetic acid; postcolumn reagent, 7% NaOH solution containing 0.12% K₃Fe(CN)₆; reaction coil length, 4 m; flow rate, 1.0 mL/min; detector, (1) UV at 270 nm, (2) fluorescence with excitation at 368 nm and emission at 470 nm after LC postcolumn reaction.



圖四 安保寧標準品 (20 ng) 在不同氫氧化鈉濃度下進行後置反應之感度變化情形

Fig. 4. Response of LC postcolumn reaction system to 20 ng amprolium as a function of NaOH concentration. LC conditions: postcolumn reagent, 0.12% K₃Fe(CN)₆ solution; other conditions same as in Fig. 3.



圖五 安保寧標準品 (20 ng) 在不同鐵氰化鉀濃度下進行後置反應之感度變化情形

Fig. 5. Response of LC postcolumn reaction system to 20 ng amprolium as a function of K₃Fe(CN)₆ concentration. LC conditions: postcolumn reagent, 7% NaOH solution; other conditions same as in Fig. 3.

難分層，造成回收率之降低。若以乙腈作為萃取溶媒，則可克服上述問題，縮短操作時間，同時所得回收率可達 90% 以上，故本研究選擇乙腈為最佳萃取溶媒。

2. 淨化處理之探討

(a) 離子配對溶劑抽提

Nagata 和 Saeki⁽¹⁰⁾ 利用鹼性氧化鋁層析管柱淨化雞肉中之安保寧。本研究經初步實驗發現，直接以安保寧標準品依其淨化條件處理，即利用鹼性氧化鋁層析管柱分別以乙腈 / 甲醇 (9/1, v/v) 及乙腈 / 水 (95/5, v/v) 溶液為沖提及溶離液，最後以 HPLC 定量，所得之回收率並不佳 (僅 60%)，故必須採行其它淨化條件。由於安保寧為親水性強之陽離子化合物，根據 Severijnen 等人⁽¹³⁾ 指出安保寧若採用氧化鋁層析管淨化時，較適切的方式是將安保寧由水溶液相轉為有機溶劑 (如二氯甲烷) 可溶相，然而若直接以二氯甲烷萃取水溶液中之安保寧則較困難，故必須先將安保寧經由相的轉換，即與陰離子配對劑作用，形成具離子鍵不帶電之疏水性複合物，此複合物易溶於有機溶劑，可抽提至有機溶劑，達成淨化分離之目的。在陰離子配對劑中，由於 DOSS 較易溶於有機溶劑中，故本研究採用 DOSS 為陰離子配對劑。在進行離子配對溶劑抽提淨化前，於乙腈萃取之濃縮物中先加入 pH 8.0 磷酸緩衝溶液，此乃由於安保寧在鹼性溶液中較易被有機溶劑抽提⁽¹³⁾；再以正己烷去除油脂及一些雜質，此步驟尤其可去除雞肝檢體中大部份之黃色雜質，使溶液顏色由深黃色轉為淡黃色，繼之以二氯甲烷除去二氯甲烷可溶之雜質，使 HPLC 圖譜之雜質干擾降至最低；檢體中安保寧經正己烷及二氯甲烷去除雜質，最後與 DOSS 形成離子對複合物，以二氯甲烷進行溶劑分配抽提。

雞肉及雞肝檢體經離子配對溶劑抽提淨化後，以 HPLC 分析，發現雞肉檢體之 HPLC 圖譜雜質干擾較少，而雞肝檢體之 HPLC 圖譜雜質較多，因此必須將雞肝檢體進一步以層析法淨化。

(b) 層析法淨化

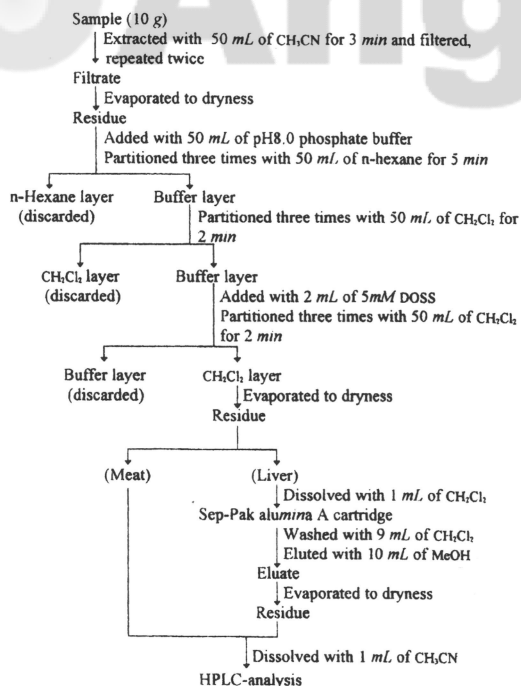
文獻上對於安保寧淨化所採用之層析法有氧化鋁層析管柱^(7,10,11,13) 及 Sep-Pak 酸性氧化鋁處理匣 (alumina A cartridge)⁽¹¹⁾，由於處理匣使用方便且材質較為均一，故本研究採用此處理匣將雞肝檢體進一步淨化。

利用 Sep-Pak 酸性氧化鋁處理匣淨化所採用之沖提及溶離液條件係參考 Severijnen 等人⁽¹³⁾ 之淨化方法，即以二氯甲烷使檢體中安保寧與 DOSS 所形成之離子對複合物被酸性氧化鋁吸附，再以二氯甲烷將檢體之干擾雜質沖提，最後以甲醇將此離子對複合物溶離。雞肝檢體經酸性氧化鋁淨化後，其 HPLC 圖譜之雜質明顯有減少之現象。本檢驗方法之整個操作流程如圖六。

三、標準曲線之製作及添加回收試驗

將安保寧標準品依前述標準曲線製作方法繪製得標準曲線 ($y = 186682x - 1340.7$)，其線性迴歸係數 (r) 為 0.9999，表示安保寧在 $2 \mu\text{g/mL}$ 以內之濃度與波峰面積有良好之正比例關係。

將雞肉及雞肝檢體絞碎後各取 10 g，分別添加 0.05、0.1 及 0.2 ppm 之安保寧，每一添加量作三重複，同時作空白試驗，依本檢驗方法進行回收試驗，結果如表一所示，雞肉及雞肝檢體之平均回收率分別 95.8~98.3% 及 91.3~95.2%，其變異係數皆小於 2%。圖七為雞肉及雞肝中添加安保寧之 HPLC 圖譜，由圖譜中發現，無論雞肉或雞肝檢體在安保寧波



圖六 雞肉及雞肝中安妥寧之檢驗方法流程
Fig. 6. Analytical procedure for amprolium in chicken meat and liver.

表一 雞肉及雞肝中添加安妥寧之回收率

Table 1. Recoveries of amprolium spiked into chicken meat and liver

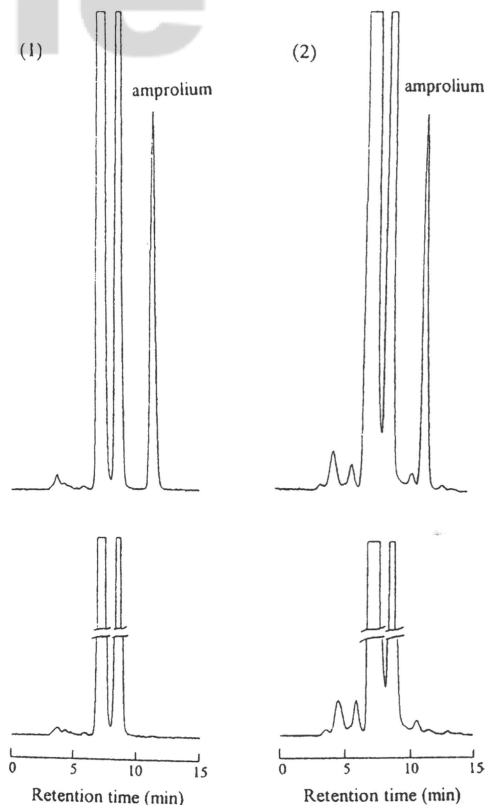
Spike level (ppm)	Recoveries* (%)	
	Meat	Liver
0.05	98.3 (0.83)**	95.1 (1.00)
0.10	95.8 (1.37)	95.2 (1.30)
0.20	95.9 (0.93)	91.3 (0.97)

* Average of triplicate.

** Number in parentheses represents coefficient of variation (%).

(thiochrome)，此亦為一種螢光色素⁽¹⁴⁾，於本研究所採用之螢光檢測條件下會被偵測出⁽⁹⁾。

將雞肉及雞肝檢體添加各種濃度之安妥寧標準溶液，以本檢驗方法分析，當波峰高度為雜訊之 3 倍高時，檢體中安妥寧之含量為檢出限量。經測試結果，雞肉及雞肝檢體之最低檢出限量均為 5 ppb，圖八為檢體中安妥寧最低檢出限量之 HPLC 圖譜。



圖七 檢體中添加 0.1 ppm 安妥寧及空白檢體之層析圖譜

Fig. 7. Chromatograms of amprolium spiked into samples at the 0.1 ppm level (upper panel) and blank samples (lower panel). (1) Chicken meat, (2) chicken liver. LC conditions same as in Fig. 3.

峰出現之前有二支波峰面積相當高之波峰，經初步鑑定，第一支波峰為硫胺素 (thiamin，維生素 B₁)，而第二支波峰尚未証實，其可能為硫胺素之衍生物，由於硫胺素在自然界分布較廣，且其性質與安妥寧相似，會被鐵氰化鉀氧化成硫色素

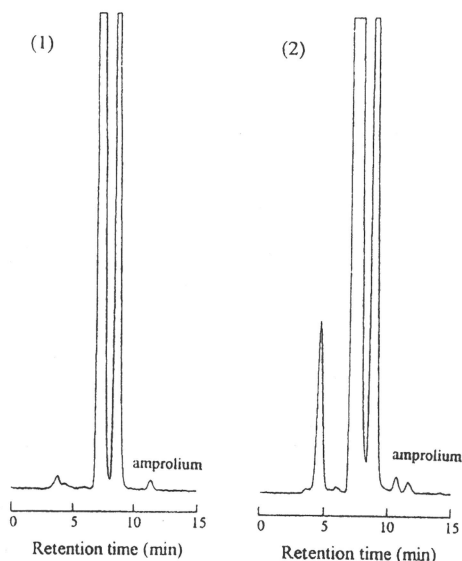
四、本研究建立之檢驗方法與前人研究之比較

文獻上探討雞肉中安保寧之檢驗方法有 Nagata 和 Saeki⁽¹⁰⁾ 及 Yamaguchi 等人⁽¹²⁾，此二者均以甲醇作為萃取溶媒，其中 Yamaguchi 等人將安保寧先經鐵氰化鉀氧化生成二種氧化物，2-propyl-pyrichromine 及 2-propyl-7-methylpyrichromine，再以 HPLC 管柱分析，由於此二產物之生成比例並非固定，且僅後者被定量，故以此方法分析較不適當。Nagata 和 Saeki 之方法係將溶媒萃取物經正己烷去除雜質後，直接以鹼性氧化鋁層析管柱淨化，再以 HPLC 定量，所採用之 HPLC 條件與本研究方法大致相同。其於雞肉中添加 1.0 及 2.0 ppm 安保寧所得之平均回收率分別為 80.9% 及 74.9%，最低檢出限量為 10 ppb。而本研究所建立之檢驗方法係以乙腈作為萃取溶媒，經離子配對溶劑抽提淨化，其中雞肝檢體再以 Sep-Pak 酸性氧化鋁處理匣淨化，最後利用 HPLC 定量。所得之回收率均較 Nagata 和 Saeki 之方法高，最低檢出限量亦較該法低 (5 ppb)，且適用於雜質較高之雞肝檢體之檢驗，故本檢驗方法之準確性、精確性及適用性應均較其優良。

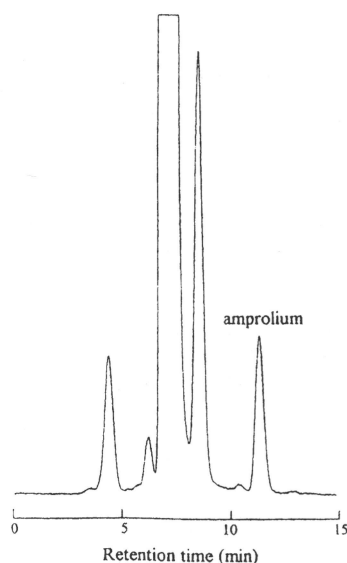
五、市售雞肉及雞肝中安保寧之殘留量調查

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，結果如表二所示，25 件雞肉檢體均未發現檢出安保寧，而 25 件雞肝檢體檢出 1 件殘留安保寧，含量為 0.04 ppm（其 HPLC 圖譜如圖九所示），檢出率為 4%，占總抽驗件數之 2%。

由以上檢驗結果顯示，雖然本調查僅檢出 1 件雞肝殘留安保寧，但依行政院農委會公



圖八 檢體中安保寧最低檢出限量之層析圖譜
Fig. 8. Chromatograms for detection limit of amprolium. (1) Chicken meat spiked with amprolium at the 5 ppb level, (2) chicken liver spiked with amprolium at the 5 ppb level. LC conditions same as in Fig. 3.



圖九 雞肝樣品檢出殘留安保寧 0.04 ppm 之層析圖譜

Fig. 9. Chromatogram for chicken liver sample in which 0.4 ppm amprolium residue was detected. LC conditions same as in Fig. 3.

藥物食品檢驗局調查研究年報 (Ann. Rept. NLFD)

表二 市售雞肉及雞肝中安保寧之殘留情形

Table 2. A survey of amprolium residue in chicken meat and liver purchased from markets

Sample	Number of samples	Number of detected samples	Residue*
		(%)	ppm
Meat	25	0 (0)	N.D.
Liver	25	1 (4)	0.04
Total	50	1 (2)	0.04

* Average of triplicate. N.D.: not detectable.

告之「飼料添加物使用規範」中規定，此藥劑可單獨使用，或與衣索巴或與衣索巴及磺胺奎林合併添加於飼料中，其添加量在 40~250 ppm。而我國現行之「動物用藥殘留標準」尚未容許此藥劑之殘留，即此藥劑於禽肉產品中不得檢出，因此本調查雞肝檢體不合格率為 4%，占總抽驗件數之 2%。若依美國及澳洲所規定之殘留標準，則本調查雞肉及雞肝之檢驗結果均低於此標準，故本調查所得之結果將可提供有關機關作為行政管理及訂定殘留標準之參考。

參 考 文 獻

- (1) 行政院農業委員會：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 (1985)。
- (2) 行政院衛生署：動物用藥殘留標準。行政院衛生署 76.4.11. 衛署食處字第 658449 號公告 (1987)。
- (3) M. Horie and H. Nakazawa: Current legal regulations of veterinary drugs and their residual analysis. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **36**: 329-343 (1995).
- (4) Federal Registration Office: Food and Drugs. In: 21 *Code of Federal Regulation*, part 556.50. The Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, Washington, D.C. (1997).
- (5) National Health and Medical Research Council: Maximum residue limits in food and animal feed-stuffs of pesticides, agricultural chemicals, feed additives and veterinary medicines. In: *MRL Standard*, p.4. A. J. Law, Commonwealth Government Printer, Canberra, Australia (1993).
- (6) Merck & Co., Inc: *The Merck Index*. 11th ed., p. 623. Merck & Co., Inc., New Tersey (1989).
- (7) AOAC: Drugs in Feeds. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed., vol. I, Ch. 5, pp. 3-4. AOAC international, Virginia (1995).
- (8) G. B. Cox and K. Sugden: Assay of amprolium in poultry feedingstuffs by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, **101**: 738-741 (1976).
- (9) J. T. Vanderslice and M. H. A. Huang: Liquid chromatographic determination of amprolium in poultry feed and premixes using postcolumn chemistry with fluorometric detection. *J. Assoc. Anal. Chem.*, **70**: 920-922 (1986).
- (10) T. Nagata and M. Saeki: Liquid chromatographic determination of amprolium in chicken tissues, using post-column reaction and fluorometric detection. *J. Assoc. Anal. Chem.*, **69**: 941-943 (1986).
- (11) E. J. Kentzer, L. S. Cottingham and R. L. Smallidge: Ion-pair reverse-phase liquid chromatographic determination of amprolium in complete feeds and premixes. *J. Assoc. Anal. Chem.*, **71**: 251-255 (1988).
- (12) T. Yamaguchi, J. Hanai, M. Hirata, Y. Shiroishi, M. Aoki and N. Takasugi: Determination of amprolium in chicken meat and egg by high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **25**: 499-504 (1984).
- (13) M. Severijnen, A. M. G. Buyzen-Satijn and F. G. Buizer: Method of assay for the coccidiostat amprolium in a wide range of animal feedstuffs. *Analyst*, **100**: 328-333 (1975).
- (14) O. R. Fennema: Vitamins and Minerals. In: *Food Chemistry*, 2nd ed., pp. 493-496. Marcel Dekker, Inc., New York (1985).