

藥物食品檢驗局調查研究年報9:289-298,1991
Ann. Rept. NLFID Taiwan R.O.C. 9:289-298,1991

畜水產品中歐索林酸及乃託文檢方法之 探討及其殘留量之調查

饒麥玲 施養志 張碧秋 李乾鐘

第四組

摘要

本研究以快速、簡便的高效液相層析法(High Performance Liquid Chromatography)對畜水產品中的抗菌劑—歐索林酸(Oxolinic acid)及乃託文(Nitrovin)之檢驗法進行探討,並調查市售或外銷之蝦類、鰻魚、豬肉、牛肉等檢體中歐索林酸及乃託文之殘留量,以確保國人之健康及維護外銷信譽。歐索林酸之檢驗方法是將檢體以二氯甲烷萃取、濃縮後,以正己烷去脂肪,再經二氯甲烷抽取濃縮後之殘留物,以重氮甲烷(Diazomethane)甲基化一小時,利用高效液相層析儀分析。以此法所得之最低檢測限量為50ppb。而分別添加歐索林酸0.3、1及2 μ g等三種量於四種不同之檢體中,其回收率為88.2~96.9%。變異系數是1.4~6.3%。抽購市售90件檢體,檢測其歐索林酸之殘留量,檢出七件,檢出率為7.7%,殘留量範圍在65~72ppb之間。

乃託文(Nitrovin)。檢體經丙酮的萃取、濃縮後,以正己烷去脂肪,再以氯仿分配分層萃取,氯仿層濃縮至乾,殘留物以85%乙腈溶解通過Alumina SEP PAK,再以高效液相層析儀分析,添加不同量乃託文(1、5 μ g)於檢體之回收率為80.1~92.3%,變異係數是1.7~6.1%,最低檢出限量為20 ppb,抽購市售雞肉及豬肉20件,檢測其乃託文之殘留量,均未檢出。

鍵語：高效液相層析儀,畜水產品,抗菌劑,歐索林酸,乃託文,甲基化。

前言

近年來,由於人口急遽膨脹及人類對生活品質的要求提高,畜水產動物性蛋白質之攝取量有顯著的增加,因而導致飼養方式趨向大規模企業經營,可供給大量及便宜的畜水產品。我

國外銷日本之牛肉、豬肉、雞肉、鰻魚及蝦類等近幾年來在賺取外匯金額上佔相當之比重,對我國經濟發展及養殖業助益匪淺。養殖業發展也逐漸走向企業化經營,養殖戶為促進生長及提高飼料效率,以及預防或治療動物疾病或其它目的等,動物用藥如抗菌劑等成為必然使

用的項目之一。^{1,2}多年來飼料添加動物用藥在動物性蛋白質的增產過程中扮演著重要角色，由於養殖業者飼養方式的改變，動物用藥種類也日漸繁多，加上抗藥性產生，動物用藥的用量不當或違規使用，譬如停藥期控制不當而藥物尚未代謝掉時，會導致在肉中殘留，而有危害消費者之虞。

根據我國亞東關係協會東京辦事處電傳³，日本自七十八年元月開始對進口豬肉、雞肉、鰻魚及牛肉之抗生物質、抗菌劑、農藥與荷爾蒙等之殘留進行全面性檢驗。因此，特別籲請我國業者及政府有關單位加強注意，以保證品質及穩定市場。為避免抗菌劑有被濫用的情形，歐索林酸及乃託文在食品中殘留量之檢驗法實有儘速建立之必要。

歐索林酸及乃託文製劑抗菌的範圍廣泛，抗菌力較強，且微生物對此兩種抗菌劑的耐藥性低，所以於飼料添加動物用藥被廣泛應用⁴。抗菌劑之檢驗向來均使用氣相層析法(GC⁵⁻⁷)、微生物法^{9,11}生物學鑑定法(Bioassay)²⁰、螢光法(Fluorometry)²¹、薄層層析法(TLC)^{4,12}及分光光度法²³。近年來高效液相層析法(HPLC)^{4,8-19}亦廣被應用，因HPLC具簡便、快速、在常溫下分離之優點，本研究對歐索林酸及乃託文之檢驗亦利用HPLC來建立其檢驗方法。利用建立的檢驗方法實施抗菌劑之殘留量調查，以證實檢驗方法之可行性，並瞭解目前市售畜水產品中歐索林酸殘留量之概況，以利日常檢驗工作之執行。

材料及方法

一、檢體來源：

市售畜水產品90件，其中豬肉10件，牛肉10件，鰻魚35件，蝦35件，購自各地零售市場，供歐索林酸之檢驗。市售雞肉及豬內各10件，購自各地零售市場供乃託文之檢驗。

二、材料：

(一)裝置：

1. 高效液相層析儀-LC-6Apump(Shimadzu)。

2. 檢出器-UV-VIS Spectrophotometric detector, SPD-6AV(Shimadzu)。

3. 積分儀-C-R3A Chromatopac (Shimadzu)。

4. 層析管柱-Licrospher 100RP-18, 粒徑5 μ m,內徑3.9mm,長度30cm之管柱。

5. 攪拌均質器-Multi-blender Mill,適用於有機溶媒者。

6. 減壓濃縮裝置-Aspirator A-2S with Rotatory evaporator。

7. 振盪機-SL-D Shaker。

8. 微過濾器-Millipore type HV (0.45 μ m)。

9. 玻璃器具-濃縮瓶(100ml)、分液漏斗(200~250ml)。

10. 褐色玻璃器具-濃縮瓶(100ml)、分液漏斗(200~250ml)。

11. 鋁過濾層析管柱-Alumina B SEP-PAK Cartridge。

(二)試藥及試劑：

1. 二氯甲烷,鹽酸,正己烷,無水硫酸鈉,丙酮,氫氧化鈉,乙醇,乙醚, N-甲基亞硝基甲苯磺醯胺(N-Methyl-N-Nitroso-4-Toluol-Sulfonamid), 丙酮醇(N-Propanol), 氯化鈉, 氯仿, 醋酸等均採用試藥特級甲醇、乙腈採液相層析級(Merck), 歐索林酸採標準品級(Sigma)。乃託文採標準品級。

2. 重氮甲烷(Diazomethane)之配製²²-稱取N-甲基亞硝基甲苯磺醯胺0.6g於試管中,加入無水乙醚4ml及醇4ml,輕輕搖動試管使試藥溶解,再加入60%氫氧化鉀溶液4ml,打開氮氣,調整流速,通入試管使之反應並接通另一裝有無水乙醚4ml之試管,待乙醚由無色液體轉變為金黃色液體,此即為重氮甲烷試液。

3. 移動相溶液之調製-取甲醇700ml加水至1000ml配製成移動相溶液,供歐索林酸之分析。

4. 移動相溶液之調製-取乙腈700ml加水至1000ml再加1ml之醋酸配製成移動相溶液。供乃託文之分析。

5. 歐索林酸標準液-精稱歐索林酸標準品10mg,以丙酮定容至100ml,此為標準原液。取此標準原液1ml,加丙酮定容至100ml,做為標準溶液。

畜水產品中歐索林酸及乃託文檢驗方法之探討及其殘留量之調查

6. 乃託文標準液—精稱乃託文標準品10mg, 以甲醇定容至100ml, 此為標準原液。取此標準原液5ml, 加甲醇定容至100ml, 做為標準溶液。

三、檢驗方法：

(一) 歐索林酸：

1. 檢體處理

取豬肉及牛肉, 鰻魚去頭、尾, 蝦去殼, 分別均質後, 各稱取5g檢體, 加二氯甲烷30ml, 以均質攪拌器均質1分鐘後, 二氯甲烷層以濾紙過濾入100ml之濃縮瓶內, 殘留物再以二氯甲烷層以濾紙過濾入100ml之濃縮瓶內, 殘留物再以二氯甲烷30ml同樣操作, 合併濾液, 於40°C水浴中減壓濃縮至無溶劑, 殘留物加0.1N鹽酸30ml, 振盪混合後加30ml之正己烷, 振盪5分鐘後以濾紙過濾之, 取濾液之下層以每次二氯甲烷50ml萃取二次, 合併濾液經無水硫酸鈉脫水過濾, 於40°C水浴中減壓濃縮至乾, 殘留物以甲醇: 水(8:2)2ml完全溶解後, 加重氮甲烷試液3ml輕輕搖動混合, 在室溫甲基化反應1小時, 反應終了後, 減壓濃縮至乾涸, 殘留物以甲醇: 水(7:3)1ml溶解, 供作檢液。

2. 標準曲線之製作

取歐索林酸標準溶液0.3、0.5、1、1.5、及2ml於40°C水浴中減壓濃縮除去溶劑後, 加甲醇: 水(8:2)2ml使溶解, 加重氮甲烷試液3ml, 於室溫甲基化反應1小時後, 於40°C水浴中減壓濃縮除去溶劑後, 加甲醇: 水(7:3)1ml定容之, 得到的標準溶液, 依序注入各20 μ l, 以高效液相層析儀各2次測定之, 並作成標準曲線。

3. 定量

(1) 高效液相層析儀之分析條件如表一所示。

(2) 取檢液及標準溶液各20 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, 分別與標準溶液比較鑑別之。並由適量檢液所得之波峰面積, 依另取之標準溶液按上述方法作成檢量線, 求出檢體中歐索林酸之殘留量。

4. 回收試驗

分別添加三種不同量(0.3、1及2 μ g)之歐索林酸標準品溶液於豬肉、牛肉、鰻魚及蝦四種畜水產品中, 依上述方法操作回收試驗, 每種量作三重覆, 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之, 求出回收率。

(二) 乃託文：

1. 檢體處理

稱取10g檢體, 加丙酮50ml, 以均質攪拌器均質5分鐘後, 丙酮層以濾紙過濾入100ml之褐色濃縮瓶內, 殘留物加丙酮50ml再均質, 同樣操作, 合併濾液, 加丙酮醇15ml, 於40°C水浴中減壓濃縮至濾液為15ml後, 加丙酮20ml, 振動混合移入褐色分液漏斗內, 再加正己烷30ml, 3%之氯化鈉溶液60ml, 振盪5分鐘後, 除去正己烷層, 再加正己烷30ml同樣操作抽去脂肪, 去除正己烷層後, 再以每次氯仿25ml萃取三次, 合併氯仿層經無水硫酸鈉脫水過濾, 於40°C水浴中減壓濃縮至濾液為1ml, 通入Alumina B SEP-PAK內, 再加95%乙腈5ml於Alumina B SEP-PAK內, 所得溶出液, 以0.45 μ m薄膜過濾器過濾, 供作檢液。

2. 標準曲線之製作

分別取乃託文標準溶液(5 μ g/ml) 0.2、0.5、1、1.5及2ml, 稀釋至5ml, 依序各注入10 μ l, 以高效液相層析儀各2次測定之, 並作成標準曲線。

3. 定量

(1) 高效液相層析儀之分析條件如表二所示。

(2) 取檢液及標準溶液各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, 分別與標準溶液比較鑑別之。並由適量檢液所得之波峰面積, 依另取之標準溶液按上述方法作成檢量線, 求出檢體中乃託文之殘留量。

4. 回收試驗

表一 歐索林酸之HPLC分析條件

層析管：Licrospher 100RP-18 (3.9mm×30cm)
移動相：MeOH : H ₂ O=6 : 4
檢出器：紫外光檢出器254nm
流速：0.6ml / min
注入量：20 μ l

分別添加三種不同量(1、5及10 μ g)之乃託文標準品溶液於雞肉及豬肉中,依上述方法操作回收試驗,每種量作三重覆,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之,求出回收率。

結果與討論

一、歐索林酸：

(一)HPLC測定條件之檢討：

1.測定波長

歐索林酸使用HPLC用之移動相測定吸收光譜時,在254nm附近確認有極大吸收,如圖一,因此實驗在此波長下進行分析。

2.層析管柱及移動相

本研究參考kasuga^{9,11}等以Zipax SAX層析管(粒徑5 μ m,內徑2.6mm×長度50cm)利用含0.006M硫酸鈉之0.01M硼酸鈉(pH9.5)緩衝液為移動相,分析得知歐索林酸的滯留時間為7.2分,而且波峰分離效果良好,但由於移動相之pH值過高,造成層析管柱的壓力升高及堵塞,如果將pH值降低,分析之歐索林酸波峰有Tailing現象。厚生省的畜水產食品中的殘留物檢查法⁸,利用甲醇：水(7：3)為移動相,本研究採用Licrospher 100RP-18(粒徑5 μ m,內徑3.9mm*長度30cm)之層析管柱,甲醇：水(7：3)為移動相,分析而得歐索林酸的滯留時間為5.2分,且波峰分離效果良好,故採用此條件進行分析。

(二)標準曲線之製作：

取歐索林酸標準溶液0.3、0.5、1、1.5及2ppm,依序注入各20 μ l,以高效液相層析儀各2次測定之,並作成標準曲線,其濃度在0.3~2ppm內成線性關係,r值為0.9996,如圖三。

(三)檢體處理之比較：

本檢驗法之檢體為豬肉,牛肉,鰻魚及蝦肉,而

動物體內含很多離質,對檢驗會造成干擾,因此檢體之調製,去除離質相當重要。本研究參考kasuga^{9,11}等,以0.2M磷酸鈉緩衝液(pH 6.0)萃取,正己烷抽去脂肪,經氯仿將歐索林酸抽出,所得之層析圖其波峰分離良好,但因移動相所採用含0.006M硫酸鈉之0.01M硼酸鈉(pH9.5)緩衝液,其pH值過高,造成層析管柱的壓力升高及堵塞。改以厚生省的畜水食品中的殘留物檢查法⁸,檢體之處理未經甲基化,所得之層析圖其波峰離質多且分離不理想,將檢體再經過甲基化處理1小時後,歐索林酸可被分離出來。值得注意的是,在製作甲基化反應試液(重氮甲烷)過程中,需緩緩通入氮氣,直至乙醚由無色變為淡黃色溶液為止,如此於檢體之甲基化反應才能有效進行。

(四)添加回收試驗：

添加0.3、1及2 μ g之歐索林酸標準品於豬肉,牛肉,鰻魚及蝦肉四種檢體中,依上述檢驗法操作,各作三重覆,以高效液相層析儀偵測,分別計算出之回收率,其結果如表三所示。歐索林酸之回收率在83.4~99.8%之間,其變異係數在1.4~5.8%之間,可見回收情況相當穩定。豬肉外添加歐索林酸之平均回收率在88.6~98.7%之間,回收曲線之相關係數為1.0000。牛肉外添加歐索林酸之平均回收率在87.7~98.6%,回收曲線之相關係數為1.00000。鰻魚外添加歐索林酸之平均回收率在87.8~99.5%之間,回收曲線之相關係數為0.9992。蝦肉外添加之歐索林酸之平均回收率在83.4~98.8%之間,回收曲線之相關係數為0.9988。其液相層析及回收曲線之代表圖如圖

二、三;本法之最低檢出限量為50ppb。

(五)市售畜水產品中歐索林酸殘留量之調查結果：

於本計畫中,抽購市售畜水產品90件,其中豬肉10件,牛肉10件,鰻魚35件,蝦35華,依上述檢驗法

表二 乃託文之HPLC分析條件

層析管： μ -Bondapak G ₁₈ (3.9mm×30cm)
移動相：acetonitrile：Acetic acid：H ₂ O=70：0.1：30
檢出器：紫外光檢出器380um
流速：0.6ml/min
注入量：10 μ l

畜水產品中歐索林酸及乃託文檢驗方法之探討及其殘留量之調查

表三 添加歐索林酸於畜水產品中之回收率

檢體	添加量 (μg)	歐 索 林 酸		
		回收率 (%)	平均值 \pm 標準偏差 (%)	變異係數 (%)
豬 肉	0.3	92.5	91.4 \pm 2.4	2.6
		93.0		
		88.6		
	1	98.7	94.5 \pm 4.3	4.5
		90.1		
		94.6		
2	92.6	93.9 \pm 2.5	2.6	
	92.4			
	96.8			
牛 肉	0.3	87.7	88.6 \pm 1.2	1.4
		88.1		
		90.0		
	1	98.3	95.6 \pm 4.9	5.2
		89.9		
		98.6		
2	96.7	93.9 \pm 2.5	2.6	
	92.3			
	92.6			
鰻 魚	0.3	88.8	94.2 \pm 5.4	5.6
		99.5		
		94.2		
	1	87.8	90.0 \pm 1.9	2.1
		91.4		
		90.7		
2	95.6	93.6 \pm 3.2	3.4	
	89.9			
	95.4			
蝦	0.3	88.0	88.2 \pm 2.2	2.5
		86.2		
		90.5		
	1	83.4	89.3 \pm 5.9	5.8
		91.3		
		93.3		
2	97.3	95.7 \pm 5.1	5.3	
	99.8			
	90.0			

操作,利用高效液相層析儀檢測其中歐索林酸之殘留量,結果如表四所示。豬肉及牛肉全部未檢出,鰻魚檢出4件,殘留量65~72ppb,檢出率為11.4%(4/35)。蝦檢出3件,殘留量65~68ppb,檢出率為8.6%(3/35),總檢出率為7.8%(7/90)。衛生署公布之『我國藥品殘留標準』有附註『在表中未列者,不得檢出』,因此,歐索林酸屬於不得檢出,日本亦規定不得檢出,以上述抽購市售畜水產品檢測其中歐索林酸之殘

留量,仍有7件檢出,此結果提供有關單位作為衛生安全管理,加強外銷及穩定市場之參考。對於歐索林酸之殘留問題仍須由抗菌劑之使用量,投予對象,停藥期等方面加以輔導管制以防止今後國內畜水產品中殘留量之發生。

二、乃託文：

(一)HPLC測定條件之檢討：

1.測定波長

乃託文使用HPLC用之移動相測定吸收光譜

時,在380nm附近確認有極大吸收,如圖四,因此實驗在此波長下進行分析。

2.層析管柱及移動相

參考Nagata^{4,13},利用 μ -Bondapak C₁₈層析管(粒徑10 μ m,內徑3.9mm×長度30cm),以乙腈:0.05M磷酸鈉(3:7)含1% TEA(Triethanolamine)為移動相,因移動相為鹼性,而乃託文為酸性之性質,造成分析出之波峰滯留時間較晚(15分),較不理想^{4,17}。如果移動相為乙腈:水(7:3)含醋酸,而醋酸的比例在0.1~0.05%範圍內均可使乃託文的波峰滯留時間縮短^{12,18}。因此本研究以乙腈:水:醋酸(7:3:0.01)為移動相,對乃託文的分離效果良好,波峰之滯留時間為6.5分。

(二)標準曲線之製作:

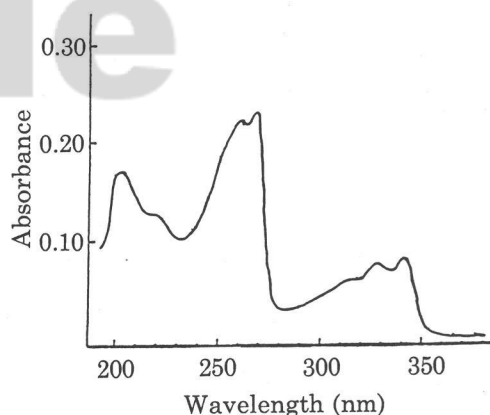
分別取乃託文標準溶液(5 μ g/ml)0.2、0.5、1、1.5及2ml,稀釋至5ml,依序各注入10 μ l,以高效液相層析儀各2次測定之,並作成標準曲線,其濃度在0.2~2ppm內成線性關係,r值為0.9991,如圖六。

(三)檢體處理之探討:

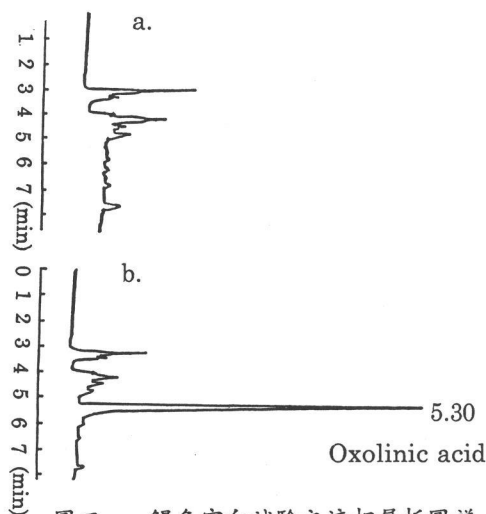
標準品乃託文可溶解於甲醇,Nagata^{4,13}等於檢體之抽取是使用溫甲醇,Hori¹²是以丙酮來萃取。為使操作方式簡便且省時,本研究以丙酮來抽取,效果良好。為防止丙酮抽出液於濃縮時起泡及突沸,所以於抽出液添加丙酮醇減壓濃縮,可確使丙酮溶劑完全去除,同時使乃託文能抽出而沒有損失。於高效液相層析儀測定時,由於脂肪的存在,會使感度下降及層析管柱劣化,所以脂肪之去除相當重要。以每次30ml正己烷脫脂二次,並添加3%之氯化鈉溶液60ml,以防止脫脂時發生乳化現象。氯仿抽出液在層析圖上含有夾雜之波峰,因此以鹼性的Alumina Column處理、淨化^{13,14}為防止乃託文被Alumina吸著,使用乙腈:水(95:5)混合溶液減弱Alumina之活性。但使用Alumina-Column處理淨化之過程繁複而費時,且乃託文易受光解,在長時間操作下會影響檢出結果,所以改用AluminaB SEP-PAK來淨化,不但操作簡易省時省力,同時獲得較佳的結果。

(四)添加回收試驗:

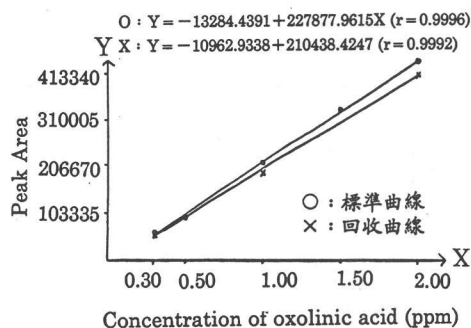
添加1、5及10 μ g之乃託文標準品於豬肉,雞



圖一 標準品歐索林酸的UV吸收光譜 (2 μ g/ml)



圖二 a. 鯉魚空白試驗之液相層析圖譜
b. 鯉魚添加歐索林酸回收試驗之液相層析圖譜



圖三 鯉魚添加歐索林酸之標準曲線及回收曲線

畜水產品中歐索林酸及乃託文檢驗方法之探討及其殘留量之調查

表四 抽購市售畜水產品90件中歐索林酸之殘留量

檢體	抽驗件數	檢出件數	百分率(%)	檢出範圍(ppb)
豬肉	10	0	0	—*
牛肉	10	0	0	—
鰻魚	35	4	11.4	65—72
蝦	35	3	8.6	65—68
合計	90	7	7.8	65—72

*：未檢出

最低檢出限量：50ppb

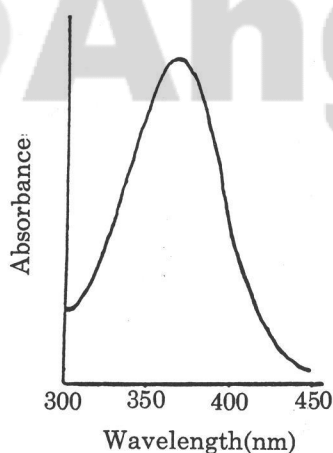
表五 添加乃託文於畜產品中之回收率

檢體	添加量 (μg)	乃 託 文		
		回收率 (%)	平均值 \pm 標準偏差 (%)	變異係數 (%)
豬 肉	1	89.4	89.3 \pm 1.5	1.7
		90.7		
		87.7		
	5	88.3	85.1 \pm 3.4	4.0
		81.5		
		85.6		
10	90.2	84.3 \pm 5.1	6.1	
	82.1			
	80.7			
雞 肉	1	86.5	89.4 \pm 2.9	3.2
		92.3		
		89.5		
	5	90.3	87.8 \pm 3.5	4.0
		89.4		
		83.8		
10	86.3	84.0 \pm 3.4	4.0	
	85.5			
	80.1			

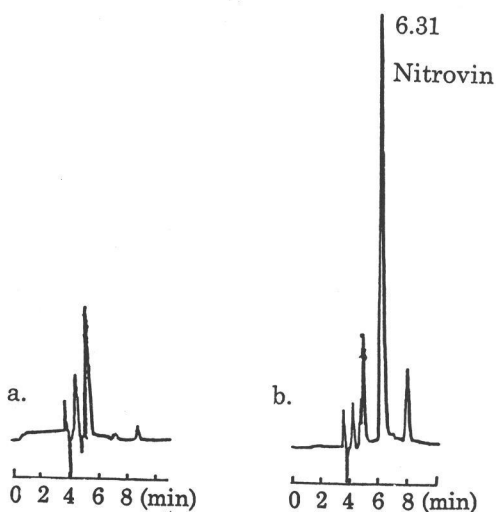
肉二種檢體中，依上述檢驗法操作，各作三重覆之方式，以高效液相層析儀偵測，分別計算出回收率，其結果如表五所示。乃託文之回收率在80.1~92.3%之間，其變異係數在1.7~6.1%之間，可見回收情況相當穩定。豬肉外添加乃託文之平均回收率在80.7~90.7%之間，回收曲線之相關係數為0.9999。雞肉外添加乃託文之平

均回收率在80.1~90.3%之間，回收曲線之相關係數為0.9999。其液相相層析及回收曲線之代表圖如五、六；本法之最低檢出限量為20ppb。
(五)市售畜產品中乃託文殘留量之調查結果：

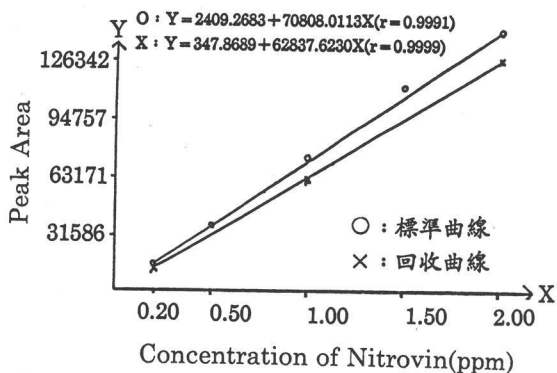
於本計畫中，抽購市售豬肉10件，雞肉10件，依上述檢驗法操作，利用高效液相層析儀檢測其中乃託文之殘留量，結果豬肉及雞肉全部未檢



圖四 標準品乃託文的uv吸收光譜($\mu\text{g/ml}$)



圖五 a. 雞肉空白試驗之液相層析圖譜
b. 雞肉添加乃託文回收試驗之液相層析圖譜



圖六 雞肉添加乃託文之標準曲線及回收曲線

出。衛生署公布之『我國藥品殘留標準』有附註『在表中未列者,不得檢出』,因此,乃託文屬於不得檢出,日本亦規定不得檢出,以上述抽購市售畜產品檢測其中乃託文之殘留量,除印證此檢驗方法的可行性外,其結果可提供有關單位作衛生安全管理之參考,雖然調查結果均未檢出,但對於乃託文之殘留問題仍須由抗菌劑之使用量,投予對象,停藥期等方面加以輔導管制以防止今後國內畜產品中殘留問題之發生。

參考文獻

1. 劉朝鑫.1984. 飼料添加物緒論. 畜牧半月刊.32(4) : 82-103.
2. 劉錦志.1983. 美國對於家畜食品藥物,農藥及化學藥品殘留的管制農牧旬刊. 690 : 85-100,109-126.
3. 現代肉品.1988. 日本對進口之豬肉、雞肉、鰻魚、牛肉實施藥物殘留檢測.11 : 25.
4. Nagata, T., Miyamoto, F. and Saeki, M. 1986. Determination of nitrofurans in cultured fish by high performance liquid chromatography. J. Food Hyg. Soc. Japan. 23 : 278-282.
5. 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集の2.
6. 厚生省環境衛生局乳肉衛生課.1979. 畜水產品中の殘留物質檢查法,第2集の3.
7. 厚生省環境衛生局乳肉衛生課.1981. 畜水產品中の殘留物質檢查法,第2集の4.
8. 厚生省環境衛生局乳肉衛生課.1982. 畜水產品中の殘留物質檢查法,第2集の5.
9. Kasuga, Y., Sugitani, A. and Yamada, F. 1982. Simultaneous determination of oxolinic, nalidixic and piromidic acids in fishes by high performance liquid chromatography. Food Hyg. Soc. Japan. 23 : 344-347.
10. Kasuga, Y., Sugitani, A. and Yamada, F. 1983. Identification of Oxolinic acid and two major metabolites of piromidic acid in fishes. Food Hyg. Soc. Japan. 24 : 484-487.

畜水產品中歐索林酸及乃託文檢驗方法之探討及其殘留量之調查

11. Kasuga, Y., Sugitani, A. and Yamada, F., Arai M. and Morikawa, S. 1984. Oxolinic acid residues in tissues of cultured rainbow trout and ayu fish. *J. food Hyg. Soc. Japan.* 25 : 512-516.
12. Hori, Y. 1983. Determination of synthetic antibacterials in cultured fish by high performance liquid Chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 25 : 158-162.
13. Hoener, B., Lee, G. and Lundergan, W. 1979. S-multaneous determination of 17 antibacterials in chicken tissues by high performance liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62 : 257-261.
14. Nakazawa, H., Shinomiya, K., Fujita, M., Kitada, Y., Yamamoto, M., Nagata, T., Komiya, S. and Takabatake, E. 1985. Study of a clean-up system with continuous liquid-liquid partition and an alumina cartridge. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 26 : 7-12.
15. Winferlin, W., Hall, G. and Mourer, C. 1981. Ultra trace determination of furazolidone in turkey tissues by liquid partitioning and high performance liquid chromatography. 64 : 1055-1059.
16. Sugolen, E. A., Macintosh, A. I. and Vilim, A. B. 1983. High pressure liquid chromatographic determination of nitrofurazone and furazolidone in chicken and pork tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66 : 874-880.
17. Horie, M., Hoshino, Y., Nose, N., Iwasaki, H. and Nakazawa, H. 1985. Simultaneous determination of antibiotics and synthetic antibacterials in fish by high performance liquid chromatography. *Eisei Kagaku. Japan.* 31 : 371-376.
18. Hori, Y. 1983. Systematic analysis of synthetic antibacterials in chicken muscles and eggs by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 25 : 447-453.
19. Nose, N., Hoshino, Y., Kikuchi, Y. and Kawauchi S. 1981. Simultaneous analysis of synthetic antibacterials in livestock products. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 23 : 176-183.
20. Hamamoto, K. 1986. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of oxolinic acid in chicken plasma. *J. Chrom.* 381 : 453-456.
21. Hirakawa, Y. and Harada, K. 1983. Studies on development of the Ultra-fine size reduction method of slightly soluble medical crystals. IV. Enhanced bioavailability of oxolinic acid by Ultra-fine size reduction. *Yakugaku Zasshi, Japan.* 103 : 1190-1194.
22. A. O. A. C. Methods of Analysis. 1984. 14th ed. Chapt. 41. Clopidol residues in animal tissues gas chromatographic method. ASSO. OFFIC. ANAL. CHEM. Washington, D. C. 779.
23. 經濟部中央標準局. 1984. 飼料添加物檢驗法-乃託文之測定. 中國國家標準局. 11126, N 4120.

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)



ANALYTICAL METHODS OF OXOLINIC ACID AND NITROVIN AND RESIDUES IN LIVESTOCK AND FISHERY PRODUCTS

MAI-LING JAO, YANG-CHIH SHIH, PI-CHIH CHANG
AND CUAN-CHUNG LI

DIVISION OF FOOD CHEMISTRY

ABSTRACT

A simple, rapid high performance liquid chromatography (HPLC) method was described for the determination of oxolinic acid and its residues in livestock and fishery products. Five g of sample was extracted from meats by dichloromethane, removed lipids by n-hexane, then methylated by d-azomethane. The filtrate was subjected to HPLC with UV detector at 254nm. Separation was achieved by using Methanol : H₂O (60 : 40) on Licrospher 100RP-18 column and flow rate 0.6ml/min. Oxolinic acid was found to have a retention time of about 5.2 minutes. Recoveries (C.V%) of three different levels (0.3, 1 and 2 μ g) were 88.2~96.9% (1.4~6.3%). The detection limit was 50ppb.

For determination of nitrovin and its

residues in livestock and fishery products, a simple, rapid high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed. Ten g of sample was extracted from meats by acetone, removed lipids by n-hexane, and partitioned with chloroform, cleaned up by Alumina B SEP PAK. The filtrate was subjected to HPLC with UV detector at 380nm, Separation was achieved by using Acetonitrile : Acetic acid : H₂O (70 : 0.1 : 30) on μ Bondapak C₈1 column and flow rate 0.6ml/min. Nitrovin was found to have a retention time of about 6.5 minutes. Recoveries (C.V%) of three different levels (1, 5 and 10 μ g) were 80.1~92.3% (1.7~6.1%). The detection limit was 20ppb.