

草蝦藥物殘留調查—抗生素殘留調查

A survey of drug residues in the samples of *Penaeus monodon*—I. Antibiotic residues

劉 朝 鑫

Chaw-King Liu

Abstract

A survey of drug residues in the samples of *P. monodon* was carried out during the periods of July—November, 1987 and May—August, 1988. A total of 306 samples, 194 from the markets and 112 from the cultured ponds were collected and tested for Chlortetracycline, Oxytetracycline and Chloramphenicol residues. The result of the test indicates no violative drug residues was found in any of the samples.

前 言

草蝦生產近年來突飛猛進，除內銷外尚可大量外銷。草蝦為國人愛好的食物之一，近年來疾病引起的大量暴斃，引起有關當局及消費者之關切。傳聞在控制草蝦大量死亡時，有濫用藥物之情形。本試驗之目的，在於瞭解臺灣生產之草蝦藥物殘留情形。本試驗分兩年實施，第一年調查草蝦抗生素殘留情形，第二年調查草蝦磺胺劑殘留情形。本報告在說明第一年從市場購買草蝦樣品 194 件，從草蝦養殖場分讓 112 件，合計 306 件樣品，測定氯四環黴素，羧四環黴素及氯黴素殘留之情形。

材 料 及 方 法

一、抗生素標準物質

氯四環黴素：Chlortetracycline hydrochloride 含有力價 980 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，由臺灣氰胺股份有限公司提供。

羧四環黴素：Oxytetracycline 含有力價 920 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，由美國輝瑞大藥廠提供。

氯黴素：Chloramphenicol 含有力價 990 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，由中國化學股份有限公司提供。

二、草蝦樣品

本試驗中所使用之草蝦樣品，分為從市場購買及從草蝦養殖池分讓兩種來源。從市場購買者，是從臺北市古亭市場及水源市場，各一固定攤販購買，以 300 g 為一件樣品，每次購買 600 g (即二樣品)，每週購買 1-2 次。從草蝦養殖池分讓者，是從規格達到 30 尾 /kg 以上之養殖池以傘網撈取或打撈出售中之養殖池，每一池分讓約 300 g 為一件樣品。草蝦樣品收集時間，自民國 76 年 7 月至同年 11

月及自民國 77 年 5 月至同年 8 月。收集樣品數，從市場購買者 194 件，從草蝦養殖池分讓者 112 件，合計 306 件。

三、羥四環黴素及氯四環黴素之測定

主要係依據劉等 (1984) 及 USDA (1974) 之方法實施。

1. 試驗菌：Bacillus cereus var. mycoides ATCC 11778。

2. 培養基：使用抗生素培養基 8 號 (Difco Antibiotic medium 8)。

3. 不銹鋼圓筒：使用外徑 8 ± 0.1 mm，內徑 6 ± 0.1 mm，高 10 ± 0.1 mm 之不銹鋼圓筒。

4. 培養皿：使用直徑為 90 mm，高為 20 mm 底面平坦之玻璃製培養皿。

5. 碎肉機：使用英國製造之模擬胃 (Stomacher 80, Colworth)。

6. 緩衝液：0.1 M 之磷酸鉀 (KH_2PO_4)，用磷酸調整 pH 至 4.5 ± 0.1 。

7. 試驗菌液之製備：將試驗菌培養於含 8 號培養基的試管斜面培養基上，在 30°C 培養 24 小時。每一試管以 1-2 ml 滅菌生理鹽水洗出細菌。洗出的菌液接種在含有 300 ml 8 號培養基的洛氏瓶 (Roux bottle) 內，使細菌均勻佈滿於培養基表面。在 35°C 培養 18-24 小時後，置於室溫中繼續培養 6 天，使之充分形成芽胞。每一瓶洛氏瓶以 25 ml 滅菌生理鹽水洗出細菌，洗出的菌液在 70°C 下加熱 30 分鐘。以滅菌生理鹽水洗滌，在 3,000 rpm 遠心分離 30 分鐘，捨去上清液，重複洗滌共三次。加適當量的滅菌生理鹽水振盪後，在 65°C 加熱 30 分鐘，以適當量的滅菌生理鹽水製成芽胞懸浮液，保存於 4°C 冰箱中。

8. 底層培養基之製作：每個培養皿中注入 10 ml 之 8 號培養基，置於水平桌面上，使均勻分佈，自然凝固。

9. 種層培養基之製作：將 8 號培養基溶解後，保持於 50°C 的水槽中，加適當量的試驗菌液於 8 號培養基中，充分混合後，取 4 ml 覆蓋於已凝固的底層培養基之上層，使之均勻分佈及自然凝固。所謂適當量的試驗菌液是在每枚含有 8 號培養基的培養皿上，各置 2 枚不銹鋼圓筒，注入氯四環黴素或羥四環黴素修正濃度，在 30°C 培養 20 小時後，形成約 20 mm 之抑制圈，且輪廓明顯者。

10. 抗生素標準原液之製備：精確秤取氯四環黴素或羥四環黴素標準物質 40 mg，前者以 0.01 N 鹽酸 38.2 ml，後者以 36.8 ml 分別配製成 $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度的抗生素標準原液，保存於 4°C 冰箱中，可供 1 週使用。

11. 標準曲線之製作：在含底層及種層培養基之培養皿上，按 60°C 圓心角放置 6 枚不銹鋼圓筒，各圓筒與圓心距離為 2.8 cm，將不相鄰之 3 枚圓筒注入修正濃度至筒口為度，另不相鄰之 3 枚圓筒則注入其餘 5 種標準稀釋液之任何一種，每一濃度做 3 個培養皿令為一組，計 5 組共 15 個培養皿，於 30°C 培養 18 小時後，倒置圓筒，反置培養皿，用游標尺精確量取抑制圈直徑至 0.1 mm，計算每組 9 個修正濃度抑制圈直徑之平均值，及每一標準稀釋液 9 個抑制圈之平均值。次計算 5 組共 45 個修正濃度抑制圈之平均值，稱為校正點 (Correction Point)，用該值與各組 9 個修正濃度抑制圈平均值之差數，調整各標準稀釋液抑制圈平均值。校正點之值大於某組之修正濃度之平均值，則兩者差數加上該組之標準稀釋液抑制圈直徑平均值，即得各該稀釋液抑制圈之校正值；若小於某組修正濃度之平均值，則自該組標準稀釋液抑制圈平均值中減去差數，即得該標準液抑制圈之校正值。取校正點及各濃度標準稀釋液校正值為橫軸，濃度為縱軸，在半對數方格紙上標位或依下式計算，即得代表各濃度之最適標準曲線。

$$L = \frac{3a+2b+c-e}{5} \quad H = \frac{3e+2d+c-a}{5}$$

上式中 L, H 分別為計算後最低和最高濃度之抑制圈直徑，c 為校正點，a, b, d 及 e 分別為各標準稀釋液之校正值，a 與 e 為最低和最高濃度之校正值。

(1)在磷酸緩衝液內之標準曲線：使用上述 pH 4.5 之磷酸緩衝液，將氯四環黴素標準原液稀釋成 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 及 0.005 $\mu\text{g/ml}$ 6 種濃度，其中 0.04 $\mu\text{g/ml}$ 為修正濃度，0.01 $\mu\text{g/ml}$ 為最低反應濃度，0.005 $\mu\text{g/ml}$ 為陰性反應濃度。羧四環黴素標準原液則稀釋成 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 及 0.025 $\mu\text{g/ml}$ 6 種濃度，其中 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 為修正濃度，0.05 $\mu\text{g/ml}$ 為最低反應濃度，0.025 $\mu\text{g/ml}$ 為陰性反應濃度。

(2)在草蝦組織液中之標準曲線：使用在研究室飼養 1 個月，餵飼不含任何藥物之餌料，確定不含任何抗生素之草蝦，殺死去殼去頭後，將數尾之組織混合後攪碎約 1 分鐘，稱取 10g 加 39 ml pH 4.5 之磷酸緩衝液，再加所需濃度 50 倍之抗生素標準稀釋液，攪碎 1 分鐘後靜置於 4°C 之冰箱萃取 45 分鐘，以 2,000 rpm 遠心分離 10 分鐘，取上清液並加以過濾。所需濃度氯四環黴素為 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02 及 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 6 種濃度，其中 0.08 $\mu\text{g/ml}$ 為修正濃度，0.02 $\mu\text{g/ml}$ 為最低反應濃度，0.01 $\mu\text{g/ml}$ 為陰性反應濃度。羧四環黴素為 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 及 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 6 種濃度，其中 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 為修正濃度，0.1 $\mu\text{g/ml}$ 為最低反應濃度，0.05 $\mu\text{g/ml}$ 為陰性反應濃度。

(3)回收試驗：從(1)(2)比較數個抗生素濃度之回收值，其平均值即為校正因子(Correction factor)。由此值可直接從磷酸緩衝液內之標準曲線中求得欲測組織之抗生素含量。

12.供測樣品之製備：草蝦每 300 g 為一樣品，去殼去頭後混合在一起，攪碎約 5 分鐘。從其中各稱取 10 g 分別測定氯四環黴素及羧四環黴素。即 10 g 草蝦組織加 pH 4.5 之磷酸緩衝液 40 ml，混和攪碎 1 分鐘，在 4°C 冰箱中萃取 45 分鐘，以 2,000 rpm 遠心分離 10 分鐘，取其上清液，經過過濾後，注入不相鄰之 3 枚圓筒內，其餘 3 枚注入各抗生素之修正濃度，每一供測組織樣品做 3 個培養皿，在 30°C 之溫箱培養 18 小時。

13.供測樣品抗生素含量之計算：供測草蝦組織樣品中抗生素含量之計算方法，是計算在 3 個培養皿中，修正濃度與樣品抑制圈直徑之平均值，若修正濃度之平均值小於標準曲線之修正濃度之平均值，則樣品抑制圈直徑之平均值加上兩者之差以修正之。反之，若修正濃度之平均值大於標準曲線之修正濃度之平均值，則樣品抑制圈直徑之平均值減去兩者之差以修正之。將上述修正過之樣品抑制圈直徑之修正值，在標準曲線上求出對應之抗生素含量，再乘以 5 倍之稀釋倍數。

四、氯黴素之測定

氯黴素之檢測基本上依據日本厚生省公佈方法(1977)改良實施。各種材料及方法在三、中已說明者從略。

(一)試驗菌：Escherichia coli NIHJ。

(二)培養基：使用抗生素培養基 1 號(Difco antibiotic medium)，底層及層層之製作與三、8, 9 相同。

(三)檢測樣品之製備：草蝦每 300 g 為一樣品，依三、12 之方法，除測定氯四環黴素及羧四環黴素外，另正確稱取 10 g，加乙酸乙酯 40 ml，攪碎 1 分鐘後遠心分離，取乙酸乙酯層。下層使用乙酸乙酯洗滌 2 次，集合乙酸乙酯，減壓乾涸。加 pH 6 之磷酸緩衝液 10 ml，攪拌混合，加溫，使之冷卻後添加正己烷約 5 ml，振動混合，遠心分離，取下層磷酸緩衝液為供檢溶液。

(四)試驗方法：在一枚培養皿中置 4 個圓筒，排成四方形的四角。在對角的兩個圓筒內入供檢溶液，在另外兩個圓筒內分別注入 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 及 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 之氯黴素標準稀釋液。在 36°C 培養 18 小時。

(五)判定：如標準稀釋液，顯示直徑 10mm 以上清晰的抑制圈，認定為陽性。

結果及討論

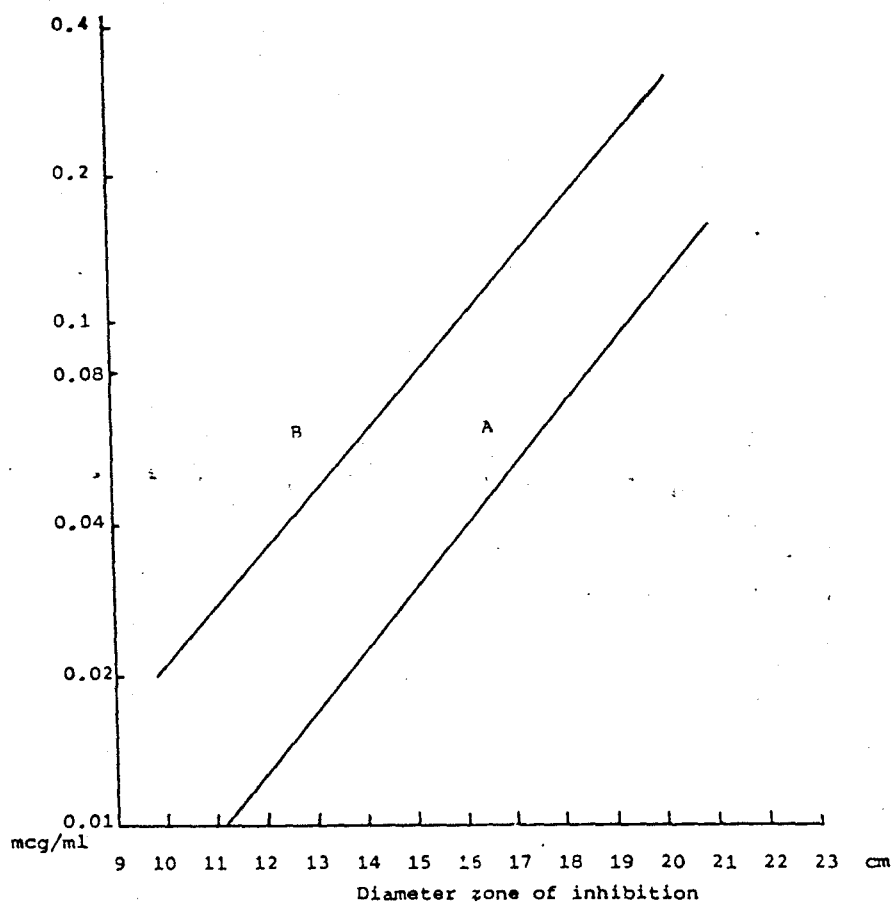
臺灣地區草蝦養殖因受到氣候因素之影響，並非整年可生產，故本研究中華蝦樣品之收集，亦無法在一年 12 個月中按月取得。本試驗中華蝦樣品之收集，係自民國 76 年 7 月至同年 11 月及自民國 77

年5月至同年8月間，從市場及草蝦養殖場收集。收集樣品數，自市場購買者194件，自草蝦養殖場分讓者112件，合計306件。草蝦樣品之收集情形表示於表一。

表一 草蝦樣品之收集情形

收 集 時 間	樣 品 來 源		小 計	
	市 場	養 殖 場		
76 年	7 月	16	18	34
	8 月	24	14	38
	9 月	30	16	46
	10 月	26	14	40
	11 月	24	14	38
77 年	5 月	16	8	24
	6 月	16	10	26
	7 月	24	10	34
	8 月	18	8	26
合 計	194	112	306	

氣四環黴素在磷酸緩衝液內及草蝦組織內之標準曲線表示於圖一。經四環黴素在磷酸緩衝液內及在

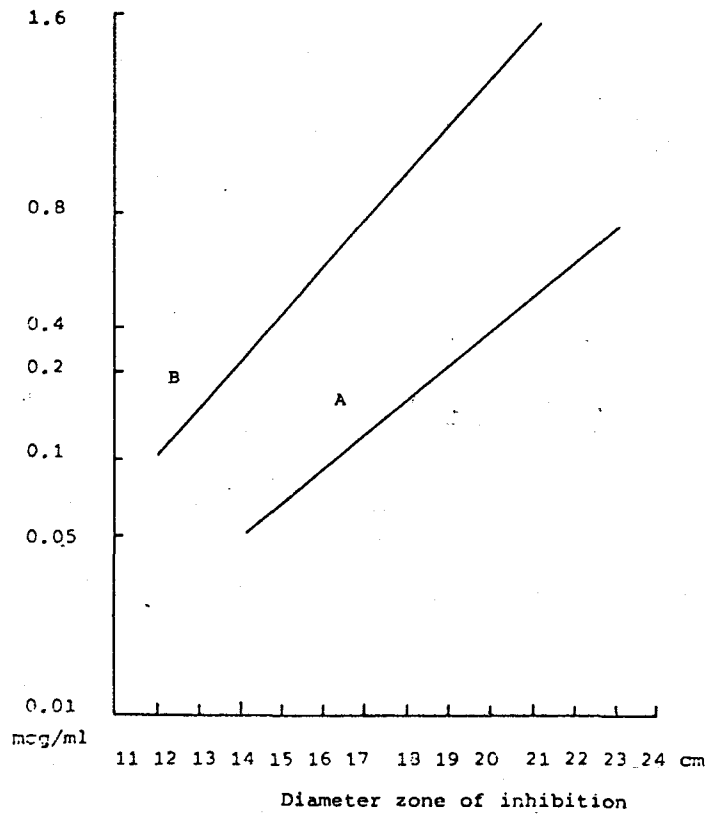


圖一 氣四環黴素在磷酸緩衝液及在草蝦組織中之標準曲線

A：在磷酸緩衝液，H=21.0, L=11.2.

B：在草蝦組織，H=20.2, L=9.8.

草蝦組織內之標準曲線表示於圖二。在測定個草蝦樣品中氯四環微素及羥四環微素之殘留時，在各種標準曲線上均不能定出對應之抗生素含量。試驗結果可認定 306 件草蝦樣品，均不含有氯四環微素或羥四環微素殘留，其結果表示於表二。



圖二 羥四環微素在磷酸緩衝液及在草蝦組織中之標準曲線

A：在磷酸緩衝液，H=22.1，L=13.1.

B：在草蝦組織中，H=20.3，L=11.0.

表二 草蝦樣品中測定氯四環微素及羥四環微素結果

收 集 年 月	測定件數	氯 四 環 微 素		羥 四 環 微 素	
		陽 性 件 數	陰 性 件 數	陽 性 件 數	陰 性 件 數
76 年 7 月	34	0	34	0	34
8 月	38	0	38	0	38
9 月	46	0	46	0	46
10 月	40	0	40	0	40
11 月	38	0	38	0	38
77 年 5 月	24	0	24	0	24
6 月	26	0	26	0	26
7 月	34	0	34	0	34
8 月	26	0	26	0	26
合 計	306	0	306	0	306

在測定 306 件草蝦樣品中氯黴素之殘留時，注入各樣品供檢溶液之圓筒，均未如注入標準稀釋液之圓筒，顯示直徑 10 mm 以上清晰的抑制圈。故試驗結果可認定 306 件草蝦樣品，均不含有氯黴素殘留，其結果如表三所示。

表三 草蝦樣品中測定氯黴素結果

收 集 年 月	測 定 件 數	陽 性 件 數	陰 性 件 數
76 年 7 月	34	0	34
8 月	38	0	38
9 月	46	0	46
10 月	40	0	40
11 月	38	0	38
77 年 5 月	24	0	24
6 月	26	0	26
7 月	34	0	34
8 月	26	0	26
合 計	306	0	306

據過去之研究，從草蝦蝦體，草蝦養殖池池水及底泥中分離細菌鑑定之結果，均屬革蘭陰性細菌（劉等 1987）。因此如果草蝦或草蝦池有使用抗生素，應僅限於使用廣效性抗生素。一般使用於水產之廣效性抗生素，只有氯四環黴素，羧四環黴素及氯黴素，故本試驗中測定此三種抗生素之殘留，當能代表使用於草蝦之抗生素。

在本試驗中測定氯四環黴素及羧四環黴素殘留所使用之方法，同時可定性及定量；其檢出界限氯四環黴素為 $0.1 \mu\text{g/g}$ ，羧四環黴素為 $0.25 \mu\text{g/g}$ 。在本試驗中測定氯黴素殘留之方法為定性之方法，其檢出界限為 $1.25 \mu\text{g/g}$ 。上述各方法在美日等國做為畜水產食品中抗生素殘留檢查之用，故以此等方法測定草蝦抗生素之殘留，是很適當的。

至於在草蝦樣品 306 件中，未能測定出氯四環黴素，羧四環黴素或氯黴素或氯黴素之殘留，究竟是由於這些抗生素不容易從草蝦腸道吸收，或吸收後排泄迅速，或草蝦養殖根本不使用抗生素，有待將來進一步之研究解明。

摘 要

自民國 76 年 7 月至同年 11 月及 77 年 5 月至同年 8 月間，從市場及草蝦養殖場收集草蝦樣品，測定氯四環黴素，羧四環黴素及氯黴素之殘留。從市場購買草蝦樣品 194 件，從草蝦養殖場分讓者 112 件，合計 306 件樣品，經測定結果均不含有上述三種抗生素殘留。

參 考 文 獻

- 劉朝鑫、嚴俊毓 (1984) 鰻魚經口投藥羧四環黴素後之組織濃度。魚病研究專集 6: 79-83。
 劉朝鑫、鍾虎雲、郭光雄 (1987) 草蝦養殖池細菌抗藥性之研究。中華民國獸醫學會雜誌 13: 229-235。
 厚生省環境衛生局乳肉衛生課 (1977) 畜產物中的殘留物質查法，第 1 集 pp. 30-31。
 United States Department of Agriculture. (1974) Microbiology laboratory guidebook. Animal and Plant Health Inspection Service, Washington D. C., U. S. A.