

歐索林酸於石斑魚與黑鯛之殘留試驗

詹勳隆*、林秋華、林文華、李淑慧

行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要 本研究目的在於建立歐索林酸藥物殘留試驗並推算出石斑魚及黑鯛之停藥期，以供作水產動物用藥新增藥品及使用規範檢討參考依據。參照衛福部公告試驗方法，以電灑離子源正離子採用多重反應監測(MRM)模式下，超高效液相層析串聯質譜法分析歐索林酸於組織中殘留量。在分析條件下，其檢量線線性範圍為 5-1000 $\mu\text{g/L}$ ，線性迴歸係數(R^2)為 0.9972，而偵測極限為 3 $\mu\text{g/L}$ ，定量極限為 5 $\mu\text{g/L}$ ；回收率以添加 10-100 $\mu\text{g/kg}$ 進行評估，石斑魚肌肉（含皮）回收率介於 79.0-81.4%，而肝臟添加回收率介於 82.6-88.5%，黑鯛肌肉（含皮）回收率介於 84.8-92.6%，肝臟添加回收率介於 91.8-99.3%。石斑魚於肌肉（含皮）添加 10-100 $\mu\text{g/kg}$ 濃度日內、日間精密度 RSD 分別介於 3.8-9.2%與 5.4-8.5%，肝臟日內、日間精密度 RSD 分別介於 1.5-3.2 %及 2.3-6.4%；黑鯛於肌肉（含皮）日內、日間精密度 RSD 分別介於 1.4-5.2%與 4.2-5.6%，肝臟日內、日間精密度 RSD 分別介於 1.5-2.5%及 2.2-3.2%。殘留試驗以歐索林酸低、高劑量 30、60 mg/kg 連續投予 5 天後，分別於 1、3、5、7、10、14、21 天等採樣，檢測其肌肉（含皮）、肝臟殘留之歐索林酸濃度。石斑魚及黑鯛低、高劑量組肌肉（含皮）、肝臟於投藥後分別於第 10 天及第 5 天殘留濃度均低於方法偵測極限。故以檢測不到殘留的時間再加上二分之一的安全期間即為停藥期，建議本藥物於石斑魚停藥期為 15 天，而黑鯛停藥期為 8 天。

關鍵字：歐索林酸，石斑魚，黑鯛，超高效液相層析串聯質譜法，殘留試驗

緒言

目前國內水產養殖發展日趨蓬勃，但受到地理環境之限制，造就集約式飼養管理模式，容易造成魚隻緊迫與免疫力下降，疾病問題棘手複雜，治療藥物使用頻率不斷提升，若正確使用治療藥物，可確保有效治療疾病，反之使用不當，易造成藥物殘留問題，間接影響人體健康，引發食品安全問題。本研究擬依據動物用藥品管理法主管機關-行政院農業委員會動植物防疫檢疫局「水產動物用藥品使用規範」修正工作小組會議之決議，辦理新增水產動物用藥品目相關研究，以檢討規範水產動物用藥品使用品目、魚種與停藥期，確保水產動物用藥品使用安全[5]。

歐索林酸(oxolinic acid)屬於喹諾酮類

(4-quinolones)，為廣效性合成抗菌劑，藉由抑制細菌 DNA 旋轉酶(gyrase)，影響細菌染色體超螺旋形成 [8,18]，亦同時抑制細菌色素 P4501A2 活性降低代謝作用，造成細菌 DNA 裂解產生殺菌作用[9]。歐索林酸一般以口服、飼料添加與飲水投予，推薦劑量在豬及禽類為 20 mg/kg/day 最多投予 5 日，在鱈魚類(fin fish)為 12 mg/kg/day 最多投予 7 日[9]。歐索林酸特別針對革蘭氏陰性菌和一部分陽性菌有較強的抗菌效力，與其它抗生素無交叉耐藥性，國外在鰻魚和其它水產動物應用較廣泛，故國外水產養殖者認為它是治療水產動物疾病的理想藥物之一。而歐索林酸是國內「水產動物用藥品使用規範」[1]核准使用於水產養殖動物種類較多之治療抗生素，不僅價格便宜用量低，

*抽印本索取者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

對運動性產氣單胞菌、愛德華氏菌、弧菌或巴斯德桿菌等革蘭氏陰性菌感染症具有一定療效。

歐盟動物用藥品委員會 (Committee for Veterinary Medicinal Products, CVMP) 評估歐索林酸微生物學的每日安全攝食量 (acceptable daily intake, ADI) 為 2.5 微克每公斤體重 (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)，在鱈魚類於天然狀態下肌肉 (含皮) 最高殘留限量 (maximum residue limits, MRLs) 為 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [9]，而國內「動物用藥殘留標準」規範歐索林酸 MRLs 在魚肌肉 (含皮) 為 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [4]，相較於歐盟殘留限量規範訂定更為嚴格。

歐索林酸在水產品殘留檢測分析方法有高效液相層析法 [6,7,10,11,12,15,16]、氣相層析法 [17]、質譜儀檢測法 [13] 與四極桿飛行時間串聯式質譜儀 [14] 等方法。由於歐索林酸化學結構官能基具有強而穩定的螢光特性，因此可用螢光偵測器進行檢測，加上螢光偵測器高選擇性特性，可避免樣品基質中非螢光物質干擾，使檢測極限至 ppb 等級，如國內涂青宇 (2007) 等人以 HPLC 搭配螢光檢測器進行中華絨蟹肝胰腺與性腺中歐索林酸殘留檢測，最低檢測極限為 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [6]。由於近年來各國水產動物用藥品殘留管制規範愈趨嚴格，逐漸利用串聯式質譜儀多重反應監測 (multiple reaction monitoring, MRM) 用以偵測母離子及碰撞反應後之子離子，具有高靈敏性及高選擇特性，可進行複雜基質中多重水產動物用藥品殘留分析，搭配超高效液相層析儀 (ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)，更可大幅縮減分析時間，提高分析物分離度與分析效率。

由於在水產動物抗菌治療上，歐索林酸在水產動物血液及組織分佈及效果良好，為國內現場水產獸醫師首選藥物之一。為此，本研究之目的進行歐索林酸於石斑魚與黑鯛之鱸形目代表性魚種進行殘留試驗，以作為增加水產動物用藥品魚種使用規範檢討參考之依據。

材料與方法

實驗動物

試驗用點帶石斑魚 (*Epinephelus coioides*) 與黑鯛

(*Acanthopagrus schlegelii*) 體重約為 300 公克，由國內嘉義縣東石鄉農場購回馴養 2 週後，再選取活力正常者分組進行試驗。試驗用水溫度控制於 25-27 $^{\circ}\text{C}$ 。

試藥

對照用標準品歐索林酸 (Sigma, St. Quentin Fallavier, France, 含量 99.7%)、乙腈及甲醇均採用液相層析級、甲酸、無水硫酸鈉與正己烷均採用試藥特級。

儀器設備

本研究所用分析儀器為 ACQUITY UPLC™ system (Waters, USA) 連接 Micromass Quattro Ultima™ API 串聯式四級桿質譜儀 (Waters, USA)。去離子水淨化組件為 Milli-Q Water Purification System (Millipore, USA)。樣品處理所用設備，攪碎機採用 12 speed Osterizer® (Oster, USA)、均質機為 T10 Basic (IKA, Germany)、高速振盪機為 Cute Mixer CM-1000 型 (EYELA, Japan)、離心機為 Centrifuge 5804R (Eppendorf, Germany) 與減壓濃縮機為 Heidolph W2000 (Kelheim, Germany)。

超高效液相色譜檢測條件

層析管柱為 Waters ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (管徑 2.1 \times 100 mm, 1.7 μm)，移動相 A 為去離子水與甲酸以 99.9 : 0.1 (v/v) 之比例混勻；移動相 B 為甲醇與甲酸以 99.9 : 0.1 (v/v) 之比例混勻，試驗所用移動相 A/B 比例為 85 : 15；流速為 0.3 mL/min。

MS/MS 分析條件設定

UPLC-MS/MS 離子源以電灑離子化正離子 (positive ion electrospray ionization, ESI+) 掃描，毛細管電壓和錐孔電壓分別為 3.3 kV 及 25 V。離子源和溶劑揮散溫度分別為 120 $^{\circ}\text{C}$ 和 450 $^{\circ}\text{C}$ 。進樣錐氣體流速和溶媒揮散流速分別為 100 L/hr 和 800 L/hr。碰撞室氣體為氬氣。採用多重反應監測 (MRM) 方式，其歐索林酸定量離子對為 262 > 244，進樣錐電壓為 25 V，碰撞能量為 20 eV；定性離子對為 262 > 216、160、130，進樣錐電壓為 25 V，

碰撞能量為35 Ev。

標準品配製及檢量線製作

精確稱取對照用歐索林酸標準品粉末於50 mL 褐色瓶，以0.1 N NaOH定容，配置成濃度200 µg/mL之儲備標準品原液，避光儲存4°C冰箱內可保存7日。檢量線製作以純甲醇做為稀釋液，配製出5、10、50、100、500、1000 µg/L等6個濃度點。

基質檢量線製作

稱取空白之肌肉（含皮）及肝臟，添加歐索林酸濃度標準品1000 µg/L，使各組樣品最終濃度分別為5、10、50、100、500、1000 µg/kg，添加後經室溫靜置15分鐘，按樣品前處理方法進行萃取後分析，以歐索林酸之定量離子波峰面積（Y軸）對添加量（X軸）作圖，可得歐索林酸之基質檢量線，以探討其基質效應(matrix effect)。

樣品萃取

將檢體細切後，以攪碎機低轉速攪碎，稱取肌肉（含皮）(5 ± 0.1 g)及肝臟(1 ± 0.05 g)置於50 mL離心管內，加入含5%甲醇之乙腈溶液25 mL，均質機均質3分鐘，加入無水硫酸鈉10 g，高速振盪機振盪10分鐘，於4°C以4000 rpm離心10分鐘，取上清液，離心管中沈澱物再加入含5%甲醇之乙腈溶液25 mL，振盪10分鐘，於4°C以4000 rpm離心10分鐘，合併上清液移入分液漏斗，加入乙腈飽和之正己烷溶液30 mL，振盪3分鐘進行液液分配，收集乙腈層，以40°C減壓濃縮至乾，殘留物以20%甲醇溶液溶解並定容至1 mL，經0.22 µm濾膜過濾後，供作檢液。

最低檢出限量及定量極限試驗

將歐索林酸標準原液配製成一系列濃度之溶液與空白樣品經由前處理萃取後，經由UPLC-MS/MS分析，求得3倍於空白樣品雜訊之波峰面積比之濃度為最低偵測極限值(limit of detection, LOD)；而10倍於空白樣品雜訊之波峰面積比之濃度為最低定量極限值(limit of quantification, LOQ)。

添加回收試驗

分析試驗準確度(accuracy)以空白檢體添加標準

品之回收率來表示。稱取空白之肌肉（含皮）及肝臟添加歐索林酸濃度標準品1000 µg/L，使各組最後濃度分別為10、50與1000 µg/L，每一濃度進行5重覆試驗，計算回收率，作為評估本方法準確度之依據。

精密度試驗

分析試驗精密度(precision)以日內(intra-day)進行測試樣品5重覆測試表示其重複性(repeatability)；以日間(inter-day)不同5天進行重覆測試樣品表示其再現性(reproducibility)，將同日間、異日間所得之結果計算其相對標準差(relative standard deviation, RSD)。採取空白之肌肉（含皮）及肝臟添加歐索林酸濃度標準品1000 µg/L，使各組最後濃度分別為10、50與100 µg/kg，進行日內及日間精密度測試。

藥物投予及殘留分析試驗

依據「動物用藥品新藥審議資料」-對象動物殘留試驗規範[2]，試驗組別至少2劑量組，並設定臨床應用時之最高劑量為最低劑量組，其倍數劑量為高劑量組，而養殖水產動物則設定以臨床應用時最高劑量之兩倍為試驗劑量。故本研究依「水產動物用藥品使用規範」[1]同為鱸形目吳郭魚臨床投予劑量30 mg/kg做為低劑量組，以兩倍劑量60 mg/kg為高劑量組，另設陰性對照組，試驗組每組60隻，陰性對照組20隻。依魚群體重計算所需投藥量，將歐索林酸以倍散稀釋法均勻混合於鰻魚飼料中，加水搓揉成長條塊並切成約1 cm³立方體，每日投藥1次，模擬現場採用任食方式餵養，投藥後不再進行餵飼，連續投予5日後，分別於1、3、5、7、10、14、21天等7個時間點定期犧牲，每個時間點採集6隻，採集肌肉（含皮）及肝臟，貯藏於-20°C冰箱供歐索林酸殘留檢測分析用。

結果

純溶劑檢量線

歐索林酸標準品原液以甲醇配製成濃度為5、10、50、100、500、1000 µg/L等6個濃度點，經UPLC-MS/MS分析後，以歐索林酸之定量離子波峰

面積 (Y軸) 對濃度 (X軸) 作圖 (如圖 1), 可得一良好的線性關係方程式 $y=39.967x+680.82$ (R^2 為 0.9972)。

基質檢量線製作及評估

添加歐索林酸於肌肉 (含皮) 5、10、50、100、500、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 等 6 個濃度, 所得方程式為 $y = 35.657x + 312.96$ 與線性迴歸係數 (R^2) 為 0.9996; 添加歐索林酸於肝臟 5、10、50、100、500、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 等 6 個濃度, 所得方程式為 $y = 24.846x + 881.37$ 與線性迴歸係數 (R^2) 為 0.987。標準品純溶劑、肌肉 (含皮) 與肝臟檢量線作圖關係如圖 2, 肌肉 (含皮) 與肝臟檢量線於標準品純溶劑檢量線以下, 表示基質干擾效應屬抑制作用。

專一性試驗

比對空白基質、歐索林酸添加肌肉 (含皮)、肝臟樣品與標準品之質譜圖 (如圖 3), 可見標準品各離子對之滯留時間並無明顯干擾物干擾。

最低檢出限量及定量極限試驗

以 S/N 比值大於 3 為判定標準, 測得 LOD 為 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 以 S/N 比值大於 10 為判定標準, 測得 LOQ 為 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。此結果符合衛福部公告食品中動物用藥殘留量檢驗方法-多重殘留分析 (二) 方法, 對歐索林酸於水產品 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 檢出限量之要求。

添加回收試驗

其試驗結果, 石斑魚肌肉回收率分別為 79.0、79.6、81.4%, 而肝臟添加回收率分別為 84.0、82.6、88.5% (如表 1)。黑鯛肌肉 (含皮) 回收率分別為 92.6、89.2、84.8%, 而肝臟添加回收率分別為 91.8、97.3、99.3% (如表 2)。

精密度試驗

石斑魚日內精密度於肌肉 (含皮) 添加 10、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度 RSD 分別為 9.2、4.8、3.8%, 肝臟分別為 3.2、1.8、1.5%; 日間精密度於肌肉 (含皮) 添加 10、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度 RSD 分別為 8.5、6.2、5.4%, 肝臟分別為 6.4、4.0、2.3% (如表 3)。黑鯛日內精密度於肌肉 (含皮) 添加 10、50 及 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度 RSD 分別為 5.2、4.1、1.4%, 肝臟分別為

2.5、1.5、1.7%; 日間精密度於肌肉 (含皮) 添加 10、50 及 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度 RSD 分別為 4.2、4.3、5.6%, 肝臟分別為 3.2、2.2、2.4% (如表 4)。

殘留性試驗結果

以歐索林酸低、高劑量 30、60 mg/kg 連續投予 5 天後, 分別於 1、3、5、7、10、14、21 天等 7 個點採樣, 檢測其石斑魚、黑鯛肌肉 (含皮) 及肝臟歐索林酸殘留試驗結果如表 5、六。在石斑魚與黑鯛殘留試驗中, 連續投藥 5 天後停藥, 第 1 天不論肌肉或者肝臟殘留濃度較高, 之後至第 3 天殘留濃度急劇下降, 石斑魚低、高劑量組肌肉 (含皮)、肝臟於投藥後第 10 天殘留濃度均低於偵測極限 (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 而黑鯛低、高劑量組肌肉 (含皮)、肝臟則於投藥後第 5 天即低於偵測極限。

討論

水產動物用藥品殘留檢測通常以液液萃取、液固萃取、衍生化技術等方法, 對於歐索林酸殘留檢測以前兩者應用居多 [6]。液固萃取通常採用固相萃取管柱進行樣品淨化濃縮作用, 有高回收率、溶劑用量少等優點, 如 Björklund (1990) 採取固相萃取管柱淨化, 進行虹鱒肌肉、肝臟歐索林酸 HPLC 檢測, 回收率分別為 87.7%、83.6% [7]。而國內郭錦朱 (1994) 等人採用二氯甲烷、乙腈、正己烷等進行液液萃取去除干擾物質, 以 HPLC 搭配螢光檢測器進行石斑魚歐索林酸檢測, 其中血清、肌肉、肝臟及腎臟添加 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 回收率分別為 88.7 ± 2.1 、 96.1 ± 0.6 、 95.9 ± 1.1 及 87.1 ± 0.3 [10]。Rogstad (1989) 等人使用液液萃取與液固萃取檢測肌肉與肝臟中歐索林酸比較, 認為有機溶劑萃取法比固相萃取法效率高, 且液固萃取步驟變異較大, 難以控制 [18]。而本次試驗樣品萃取方法參照 102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號食品中動物用藥殘留量檢驗方法-多重殘留分析 (二) 方法 [3], 以 5% 甲醇之乙腈溶液與乙腈飽和之正己烷溶液進行液液萃取, 配合後端液相層析串聯式質譜儀檢測, 在本次試驗純溶劑與肌肉 (含皮)、肝臟基質檢量線結果, 肌肉 (含皮) 基質抑制效應比肝臟大, 反應添加回收試驗肌肉 (含皮) 回

收率較肝臟低之結果；且試驗回收率雖較郭錦朱(1994)等人文獻回收率低，但回收率均有79.0%以上，符合「動物用藥品新藥審議資料」第二章殘留試驗基準規範中，添加回收試驗中回收率達60%以上之要求[2]。

在精確度方面，石斑魚與黑鯛肌肉（含皮）日內精密度 RSD 介於 1.4-9.2%，肝臟 RSD 介於 1.5-3.2%；在肌肉（含皮）日間精密度介於 4.2-8.5%，肝臟 RSD 介於 2.2-6.4%，亦符合規範中變異係數在 10% 以下之要求。故此次試驗方法可應用於石斑魚及黑鯛歐索林酸殘留檢測試驗。

在歐索林酸標準品配製時，依照公告方法以甲醇純溶劑溶解時，有懸濁不易溶解現象，造成標準品檢量線線性較差，改以加入 0.1 N NaOH 可改善溶解度，可提高標準品檢量線線性。另外，公告方法歐索林酸定量離子 262 > 244、定性離子 262 > 216，本試驗新增兩個定性離子 262 > 130、262 > 160 可提高儀器偵測感度，降低偵測極限。

於石斑魚與黑鯛投予 30、60 mg/kg 兩組殘留試驗結果，在連續投藥 5 天後，第 1 天殘留濃度較高，之後至第 3 天，殘留濃度急劇下降，而石斑魚低、高劑量組肌肉（含皮）、肝臟於投藥後第 10 天殘留濃度

均低於偵測極限(3 µg/kg)，與國內郭錦朱(1994)等人進行歐索林酸單次口投點帶石斑魚(*Epinephelus coioides*)藥物動力學試驗，肌肉及肝臟殘留濃度為投藥後第 10 天即低於偵測極限(1 µg/kg)[10]結果相近；而黑鯛低、高量組肌肉（含皮）、肝臟則於投藥後第 5 天即低於偵測極限。依國內「動物用藥殘留標準」規範歐索林酸最高殘留限量(MRLs)在魚肌肉（含皮）為 50 µg/kg，則石斑魚、魚鯛於停藥後第 5 天殘留濃度均低於法定 MRLs。若以檢測不到殘留的時間再加上二分之一的安全期間計算停藥期，建議本藥物於石斑魚停藥期為 15 天，而黑鯛停藥期為 8 天。依現行「水產動物用藥品使用規範」，歐索林酸使用於鱸形目吳郭魚停藥期為 16 天，比較本研究殘留試驗結果，石斑魚殘留期與吳郭魚相近，而黑鯛殘留期較短，顯示在相同鱸形目不同魚種對歐索林酸殘留期不同，未來開放歐索林酸於鱸形目使用，停藥期建議應訂定為 16 天。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局經費補助(103農科-14.2.1-檢-B4)，特此致謝。

表 1、石斑魚肌肉(含皮)及肝臟添加歐索林酸濃度 10、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 回收率結果(n = 5)。

Sample	Spiked ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Determined ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					Average Determined ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Average Recovery (%)
		1	2	3	4	5		
Muscle (including skin)	10	7.8	7.0	7.7	7.9	7.7	7.9 ± 0.4	79.0
	50	38.4	42.8	39.1	38.7	40.5	39.8 ± 1.9	79.6
	100	78.7	86.1	83.1	79.9	79.3	81.4 ± 3.1	81.4
Liver	10	8.5	8.4	8.2	8.1	8.8	8.4 ± 0.3	84.0
	50	41.1	42.4	41.4	41.4	4.03	41.3 ± 0.8	82.6
	100	89.9	86.3	89.1	88.4	88.8	88.5 ± 1.3	88.5

表 2、黑鯛肌肉(含皮)及肝臟添加歐索林酸濃度 10、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 回收率結果(n = 5)。

Sample	Spiked ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Determined ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					Average Determined ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Average Recovery (%)
		1	2	3	4	5		
Muscle (including skin)	10	9.0	7.3	10.3	9.7	9.9	9.3 ± 1.2	92.6
	50	45.9	42.4	38.7	46.2	49.7	44.6 ± 4.2	89.2
	100	81.9	81.9	92.5	80.7	87.1	84.8 ± 5.0	84.8
Liver	10	8.5	9.6	8.3	10.6	8.9	9.2 ± 0.9	91.8
	50	48.3	45.2	44.6	51.9	53.3	48.7 ± 3.9	97.3
	100	93.7	109.6	93.3	100.0	99.3	99.3 ± 6.6	99.3

表 3、添加歐索林酸濃度 10、50 及 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之石斑魚日內、日間精密度試驗結果(n=5)。

Sample	Spiked ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intra-day (RSD%)	Inter-day (RSD%)
Muscle (including skin)	10	9.2	8.5
	50	4.8	6.2
	100	3.8	5.4
Liver	10	3.2	6.4
	50	1.8	4.0
	100	1.5	2.3

表 4、添加歐索林酸濃度 10、50 及 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之黑鯛日內、日間精密度試驗結果(n=5)。

Sample	Spiked ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intra-day (RSD%)	Inter-day (RSD%)
Muscle (including skin)	10	5.2	4.2
	50	4.1	4.3
	100	1.4	5.6
Liver	10	2.5	3.2
	50	1.5	2.2
	100	1.7	2.4

歐索林酸於石斑魚與黑鯛之殘留試驗

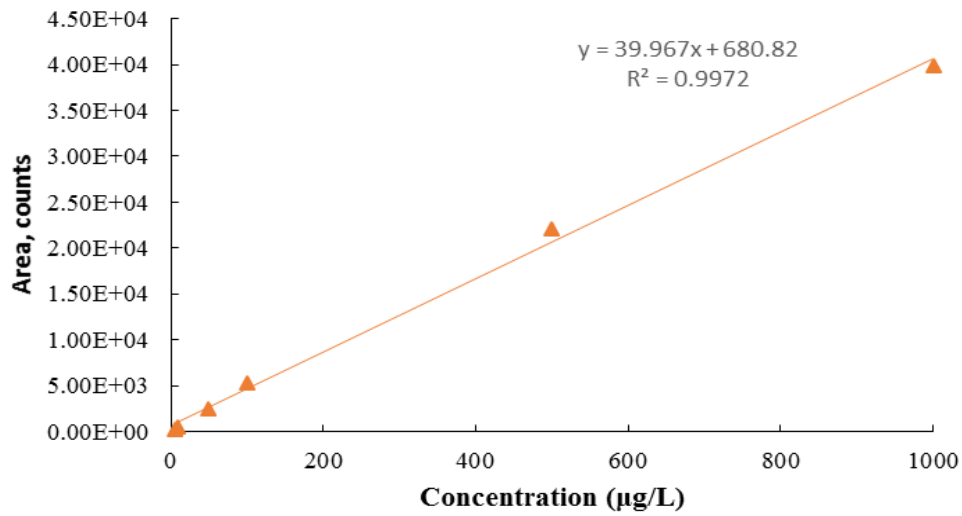


圖 1、歐索林酸標準品溶液以 5、10、50、100、500、1000 µg/L 等 6 個濃度所得檢量線。

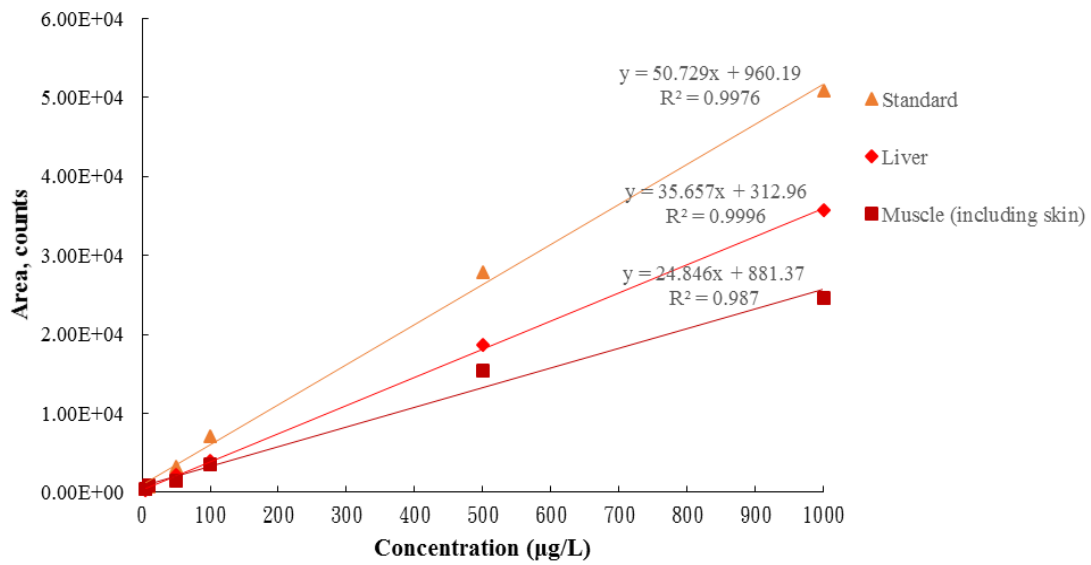


圖 2、歐索林酸添加於肌肉（含皮）、肝臟 5、10、50、100、500、1000 µg/kg 等 6 個濃度所得檢量線。

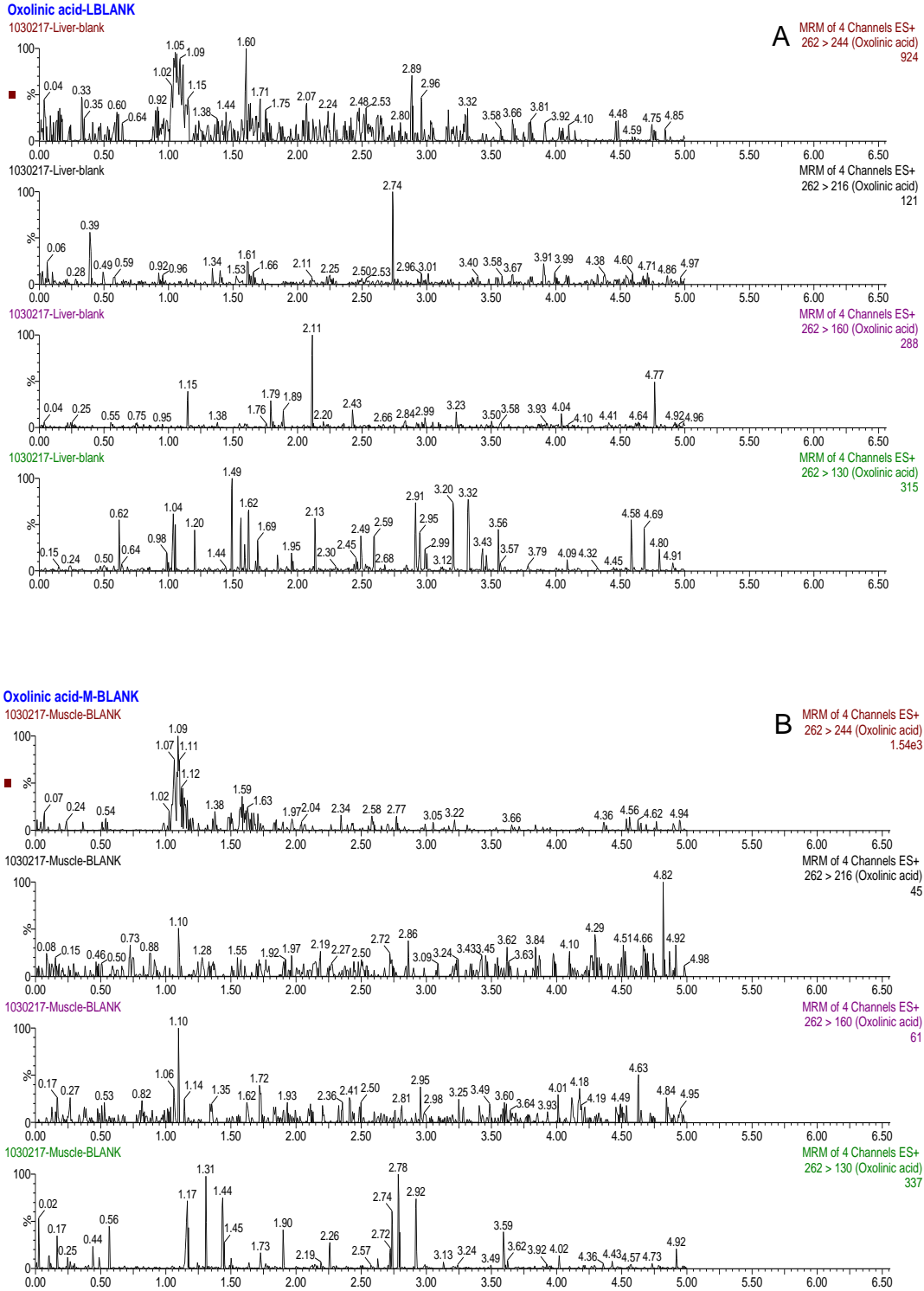


圖 3、(A)肝臟空白質譜圖；(B)肌肉(含皮)空白質譜圖。

歐索林酸於石斑魚與黑鯛之殘留試驗

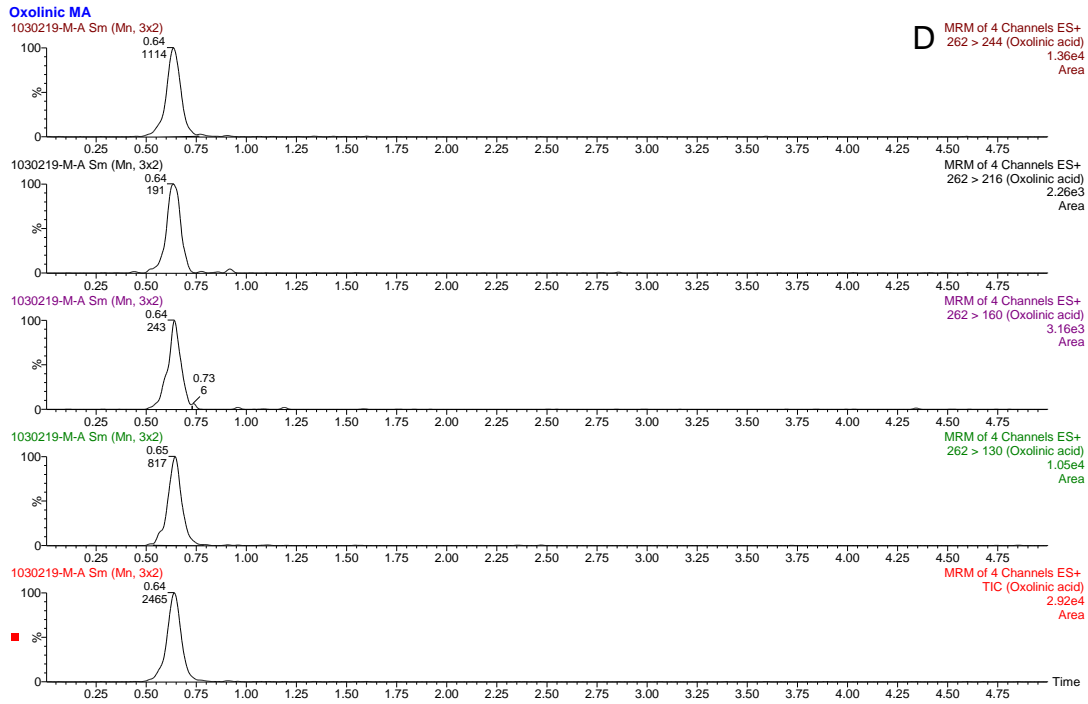


圖 3 (續)、(C)歐索林酸肝臟 50 μg/kg 質譜圖；(D)歐索林酸肌肉(含皮) 50 μg/kg 質譜圖。

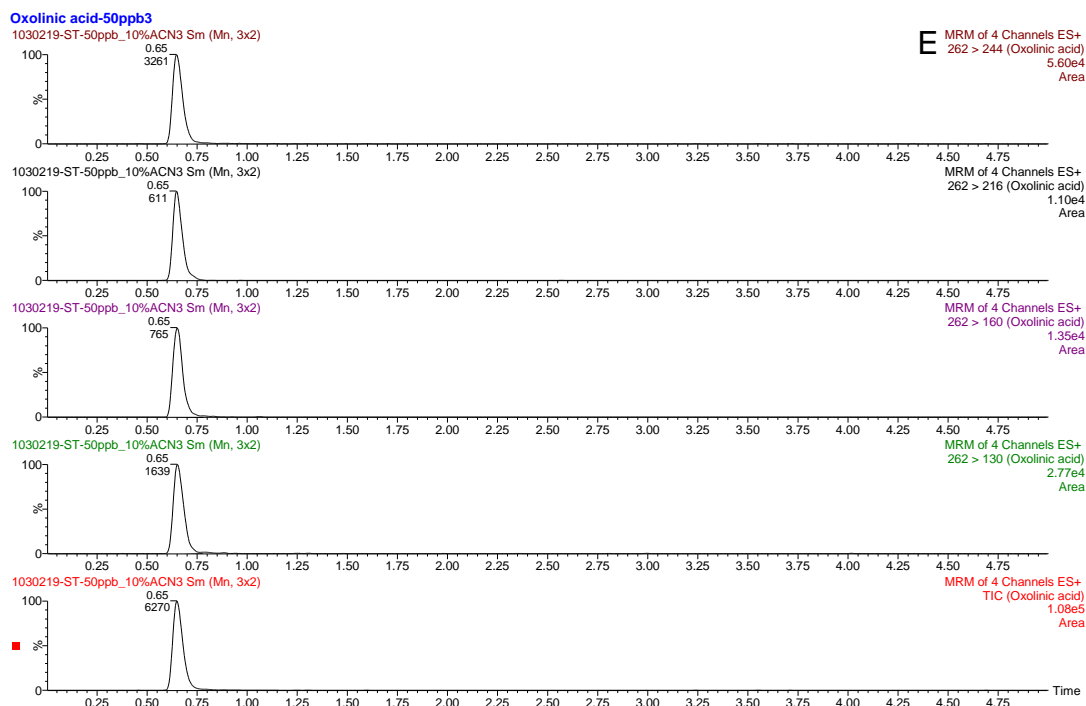


圖3 (續)、(E)歐索林酸標準品50 µg/L質譜圖。

參考文獻

1. 行政院農業委員會。2011。動物用藥品使用準則。100.08.17農防字第1001474006號令修正第3條條文之附件一水產動物用藥品使用規範。
2. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。2004。動物用藥品新藥審議資料。104.06.10取自：<http://amdrug.baphiq.gov.tw/Animal/FileDownload.ashx?fn=634980136317173750.doc>。
3. 行政院衛生福利部。2013。食品中動物用藥殘留量檢驗方法－多重殘留分析(二)。102.09.06部授食字第1021950329號公告。
4. 行政院衛生福利部。2014。動物用藥殘留標準。103.04.01部授食字第1031300872號。
5. 劉朝鑫。2011。新修正水產動物用藥品使用規範簡介。獸醫專訊，4: 8-10。
6. 涂青宇、何素鵬、洪紹文、陳柏叡、鄒禮澤、林毓芬、張鎮璿、王渭賢。2007。中華絨螯蟹肝胰腺與性腺中歐索林酸之檢測。台灣獸醫誌，33: 56-65。
7. Björklund HV. Analysis of oxolinic acid in fish by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. 530: 75-82, 1990.
8. Drlica K, Coughlin S. Inhibitors of DNA gyrase. Pharmacol Ther. 44: 107-122, 1989.
9. EMEA. Oxolinic acid. Committee of the Veterinary Medicinal Products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Summary Report. EMEA/MRL/753/00-Final, 2000.
10. Guo JJ, Liao IC. Pharmacokinetics of Oxolinic Acid in Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*, after Single Oral Administration at 24°C. J Fisheries Soc Taiwan 21: 263-272, 1994.
11. Horie M, Saito K, Hoshino Y, Nose N, Mochizuki E, Nakazawa H. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of oxolinic acid, nalidixic acid and piromidic acid in cultured fish. J Chromatogr 388: 459-461, 1987.
12. Kasuga Y, Sugitani A, Yamada F, Arai M, Morikawa S. Oxolinic acid residues in tissues of cultured rainbow trout and Ayu fish. J Food Hyg Soc Japan 25: 529-542, 1984.
13. Lopes RP, Reyes RC, Romero-Gonzalez R, Vidal JLM, Frenich AG. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. J Chromatogr B

歐索林酸於石斑魚與黑鯛之殘留試驗

- 895-896: 39-47, 2012.
14. Paschoal JAR, Reyes FGR, Rath S. Determination of quinolone residues in tilapias (*Oreochromis niloticus*) by HPLC-FLD and LC-MS/MS QToF. *Food Addit Contam Part A chem Anal Control Expo Risk Assess* 26: 1331-1340, 2009.
 15. Rogstad A, Hormazabal V, Yndestad M. Simultaneous extraction and determination of oxolinic acid and flumequine in fish tissues by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 12: 3073-3086, 1989.
 16. Roudaut B, Yorke JC. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish. *J Chromatogr B* 780: 205-497, 2002.
 17. Takatsuki K. Gas chromatographic/Mass spectrometric determination of oxolinic acid, nalidixic acid and piromidic acid in fish. *J Assoc Official Anal Chem* 75: 982-989, 1992.
 18. Wolfson JS, Hooper DC, Swartz MN. Mechanisms of action and resistancen to quinolone antimicrobial agents. In: Wolfson JH, Hooper DC. (Eds.). *Quinolone Antibacterial Agents*. American Society for Microbiology. Washington. D.C. 5-34, 1989.

Oxolinic Acid Residue Testing Assay in Grouper and Black Seabream

HL Chan*, CH Lin, WH. Lin, SH Lee

Animal Drugs Inspection Branch, National Institute for Animal Health, Council of Agriculture,
Executive Yuan

Abstract The purpose of this study is to assess Oxolinic acid residues in grouper (*Epinephelus coioides*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) and generate a basis for setting withdrawal periods, which could be used for reference in regulating newly approved aquatic animal drugs and usage policies. Based on the test methods announced by the Ministry of Health and Welfare, residues of Oxolinic acid in fish tissue was analyzed by ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) under the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Under the optimal conditions, the linear range was 5-1000 µg/L, the results showed a good linear relationship ($R^2=0.9972$). The limit of detection (LOD) was 3 µg/L and the limit of quantitation was 5 µg/L. The spiked levels were 10, 50, 100 µg/kg. The average recoveries of spiked test in grouper were 79.0-81.4 % in muscle with skin and 82.6-88.5 % in liver. The spiked test in black seabream, the average recoveries were 84.8-92.6 % in muscle with skin and 91.8-99.3 % in liver. The intra-assay of the muscle (with skin) and liver relative standard deviation (RSD) in grouper was 3.8-9.2 % and 5.4-8.5 % respectively, and the inter-assay was 1.5-3.2 % and 2.3-6.4 %. The intra-assay of the muscle (with skin) and liver RSD in black seabream was 1.4-5.2 % and 4.2-5.6 % respectively, and the inter-assay was 1.5-2.5 % and 2.2-3.2 %, respectively. The residual test was administered orally into two doses 30 and 60 mg/kg, for five consecutive days. The samples were collected at 1st, 3rd, 5th, 7th, 10th, 14th and 21st day,. The results showed that the residue levels in the muscles and livers with low and high doses were both under the method detection limit (3 µg/kg) on the 5th day in black seabream and the 10th day in groupers. Therefore, the withdrawal time is estimated to be 8 days in black seabream and 15 days in groupers.

Keywords: Oxolinic acid, ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Epinephelus coioides*, *Acanthopagrus schlegelii*, residue testing