

市售水產品中動物用藥孔雀綠及其代謝物殘留量調查

李瑋堉 謝綺文 周珮如 古遠丰 蘇淑珠 施養志

第四組

摘要

97年度市售水產品檢體委由各縣市(政府)衛生局進行採樣，包括虱目魚12件、吳郭魚10件、鱸魚8件、石斑魚6件、甲魚5件、鰻魚4件、午仔魚3件、魷仔魚3件、土虱1件、尼羅紅魚1件及黃花魚1件等54件。依據行政院衛生署97.01.11署授食字第0971800008號公告方法以液相層析串聯質譜法(liquid chromatography tandem mass spectrometry)利用電灑游離法(electron spray ionization)配合多重反應偵測模式(multiple reaction monitoring)進行動物用藥孔雀綠及其代謝物之殘留量調查。結果甲魚4件、石斑魚1件及午仔魚1件與規定不符，不合格率11.1%。不符規定之檢體皆發布不合格食品資訊，並由地方衛生權責機關依法處辦。

關鍵詞：孔雀綠、還原型孔雀綠、動物用藥、水產品、液相層析串聯質譜法

前言

孔雀綠(malachite green, MG, 4-[(4-dimethylaminophenyl)-phenyl-methyl]-N,N-dimethyl-aniline)是一種三苯甲烷類染料，其由苯甲醛(benzaldehyde)和N,N-dimethylaniline縮合後，在濃鹽酸混和下氧化而得⁽¹⁾，具有綠色金屬光澤，易溶於水，亦易溶於甲醇及乙醇。孔雀綠一般作為合成染料，用於絲綢、羊毛、黃麻、皮革、棉及紙等不同物料⁽²⁾。由於其抗菌效果佳、價格便宜且易取得，因此早在1930年代起即被廣泛使用於水產養殖生產過程，預防魚卵感染病菌或治療魚體的寄生蟲、真菌及原蟲等疾病^(3,4)。孔雀綠容易被魚組織吸收，並快速代謝為無色的還原型孔雀綠(leucomalachite green, LMG)，且會長時間留在魚組織的脂肪內，因此魚體中主要殘留物為還原型孔雀綠⁽⁵⁻⁸⁾。

依據美國National Toxicology Program (NTP)以老鼠進行毒性及致癌性試驗顯示，malachite green chloride對雌性大鼠(F344/N)疑似有致癌性，但對雌性小鼠(B6C3F1)則無證據，另代謝產物還

原型孔雀綠對雄性及雌性大鼠(F344/N)皆疑似有致癌性，而雌性小鼠(B6C3F1)則有些有致癌性。啮齒動物實驗顯示孔雀綠會危害肝臟，引起貧血和甲狀腺異常^(1,9)。聯合國糧農組織/世界衛生組織聯合食品添加物專家委員會(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)及國際癌症研究機構(International Agency for Research on Cancer, IARC)等國際食品安全組織，均未評估孔雀綠之食用安全問題。歐盟(European Union)將孔雀綠歸類為R22(微毒物質，吸入吞食或通過皮膚吸收引起有限健康損害)，以危險符號Xn標識。歐盟、美國、加拿大、日本、泰國、新加坡及我國皆禁用孔雀綠於供人食用之養殖水產品⁽¹⁰⁾。然而孔雀綠的價格低廉，抗真菌、細菌及原蟲的效果良好且易取得，目前仍經常被違法使用於養殖水產業⁽¹¹⁾。我國於94年驗出部分國內養殖石斑違法使用孔雀綠，引起政府機關及社會大眾之重視；本局於95年抽驗香魚等水產品進行孔雀綠及其代謝產物殘留量調查，結果仍有石斑及蒲燒鰻等共4件檢出還原型孔雀綠。96年抽驗石斑魚等64件水產品進行孔雀綠及其代謝產物殘留量調

查，結果均未檢出⁽¹²⁾。為瞭解市售水產品是否仍有孔雀綠及還原型孔雀綠之不法殘留問題，97年度持續抽驗虱目魚等54件水產品，進行孔雀綠及還原型孔雀綠之殘留量調查。

材料與方法

一、檢體來源

民國97年5月至8月由各縣市(政府)衛生局以稽查方式至其轄區之大賣場、傳統市場、超級市場等商號取得檢體，包括虱目魚12件、吳郭魚10件、鱸魚8件、石斑魚6件、甲魚5件、鰻魚4件、午仔魚3件、魷仔魚3件、土虱1件、尼羅紅魚1件及黃花魚1件，共計54件(表一)。檢體取得後置於-20°C保存，直至分析時取出使用。

二、化學藥品

孔雀綠對照用標準品(malachite green oxalate salt)，購自Fluka Chemie GmbH (Steinheim,

Germany)；還原型孔雀綠對照用標準品(leucomalachite green)，購自Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)。孔雀綠同位素內部標準品(MG-d₅ picrate)及還原型孔雀綠同位素內部標準品(LMG-d₅)皆購自WITEGA Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH (Berlin, Germany)。醋酸、乙腈、正己烷及乙酸乙酯為HPLC級，購自Merck Ltd. (Darmstadt, Germany)。甲醇為HPLC級，購自Riedel-deHaën (Seelze, Germany)。N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)為試藥特級，購自Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, U.S.A.)。甲酸、檸檬酸(citric acid monohydrate)、磷酸氫二鈉、醋酸銨、25%氨水及鹽酸為Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)之特級產品。固相萃取匣Oasis MCX (3 mL, 60 mg)為Waters Corporation (Milford, MA, U.S.A.)之產品。0.45 μm濾膜(Nylon, 47 mm, MNY 4547)為ChremTech (Great Tide Instrument Co., Taiwan)之產品。0.22 μm濾膜(Nylon)為Micron Separations Inc. (Westernborough, MA, U.S.A.)之產品。

表一、各縣市衛生局送驗檢體件數

衛生局	檢體件數
基隆市	3
台北市	2
桃園縣	1
新竹縣	3
台中市	5
台中縣	4
南投縣	1
雲林縣	1
嘉義市	4
嘉義縣	3
台南市	4
台南縣	4
高雄市	3
高雄縣	4
屏東縣	4
宜蘭縣	1
花蓮縣	4
台東縣	3
總計	54

三、儀器設備與裝置

- (一)均質攪拌機(Homogenizer)
Nihonseiki Kaisha Ltd., Tokyo, Japan
- (二)離心機(Centrifuge)
Labofuge 400, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany
- (三)旋渦混合器(Vortex mixer)
Type 37600 Mixer, Thermolyne Corporation, IO, U.S.A.
- (四)振盪式水浴鍋(Shaker bath)
YIHDER, BT-350, Taiwan
- (五)超音波振盪器(Ultrasonic vibrator)
Elma, transonic TP 690, Germany
- (六)固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)
Supelco, Bellefonte, PA, U.S.A.
- (七)去離子水製造機(Milli-Q SP reagent water system)
Millipore Ltd., Bedford, MA, U.S.A.

(八)液相層析串聯質譜儀(Liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)

為Waters Corporation (Milford, MA, U.S.A.)之產品，Alliance®2695液相層析系統連結Micromass Quattro Premier質譜儀，離子源採電灑游離法偵測正電離子，並以MassLynx軟體操控及進行數據處理

(九)層析管柱

Symmetry® C8 (3.5 μm ，內徑2.1 mm \times 10 cm)，Waters Corporation (Milford, MA, U.S.A.)。

四、檢驗方法

(一)試劑之調製

1. McIlvaines緩衝溶液(pH 2.6)

(1)0.1 M檸檬酸溶液

稱取檸檬酸10.5 g，以去離子水溶解使成500 mL。

(2)0.2 M磷酸氫二鈉溶液

稱取磷酸氫二鈉14.2 g，以去離子水溶解使成500 mL。

(3)取0.1 M檸檬酸溶液445.5 mL及0.2 M磷酸氫二鈉溶液54.5 mL，混合均勻。

2. 沖提液

取25%氨水溶液5 mL與乙酸乙酯50 mL混合均勻，再加入甲醇45 mL，混合均勻，臨用時調製。

3. TMPD (1 mg/mL)溶液

稱取TMPD 50 mg，以甲醇溶解並定容至50 mL。

4. 移動相溶液

(1)移動相溶液A (5 mM 醋酸銨溶液，pH 4.5)

稱取醋酸銨0.39 g溶於去離子水900 mL，以醋酸調整pH為 4.5 ± 0.1 ，再加去離子水使成1000 mL，以0.45 μm 濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

(2)移動相溶液B (含0.1%甲酸之乙腈溶液)

量取甲酸1 mL，加入1000 mL之乙腈中，為移動相溶液B。

(二)標準溶液之調製

稱取相當於含孔雀綠及還原型孔雀綠對照用標準品各約5 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至50 mL，作為標準原液，避光置於-20°C貯存備用。使用時取適量標準原液混合後，以乙腈稀釋至100 ng/mL，作為混合標準原液，再以50%乙腈溶液稀釋至0.5~5.0 ng/mL，作為標準溶液，臨用時調製。

(三)內部標準溶液之調製

取相當於含孔雀綠及還原型孔雀綠各約5 mg之同位素內部標準品，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至50 mL，作為內部標準原液，避光於-20°C貯存備用。使用時取適量內部標準原液混合後，以乙腈稀釋至100 ng/mL，作為內部標準溶液。

(四)檢液之調製

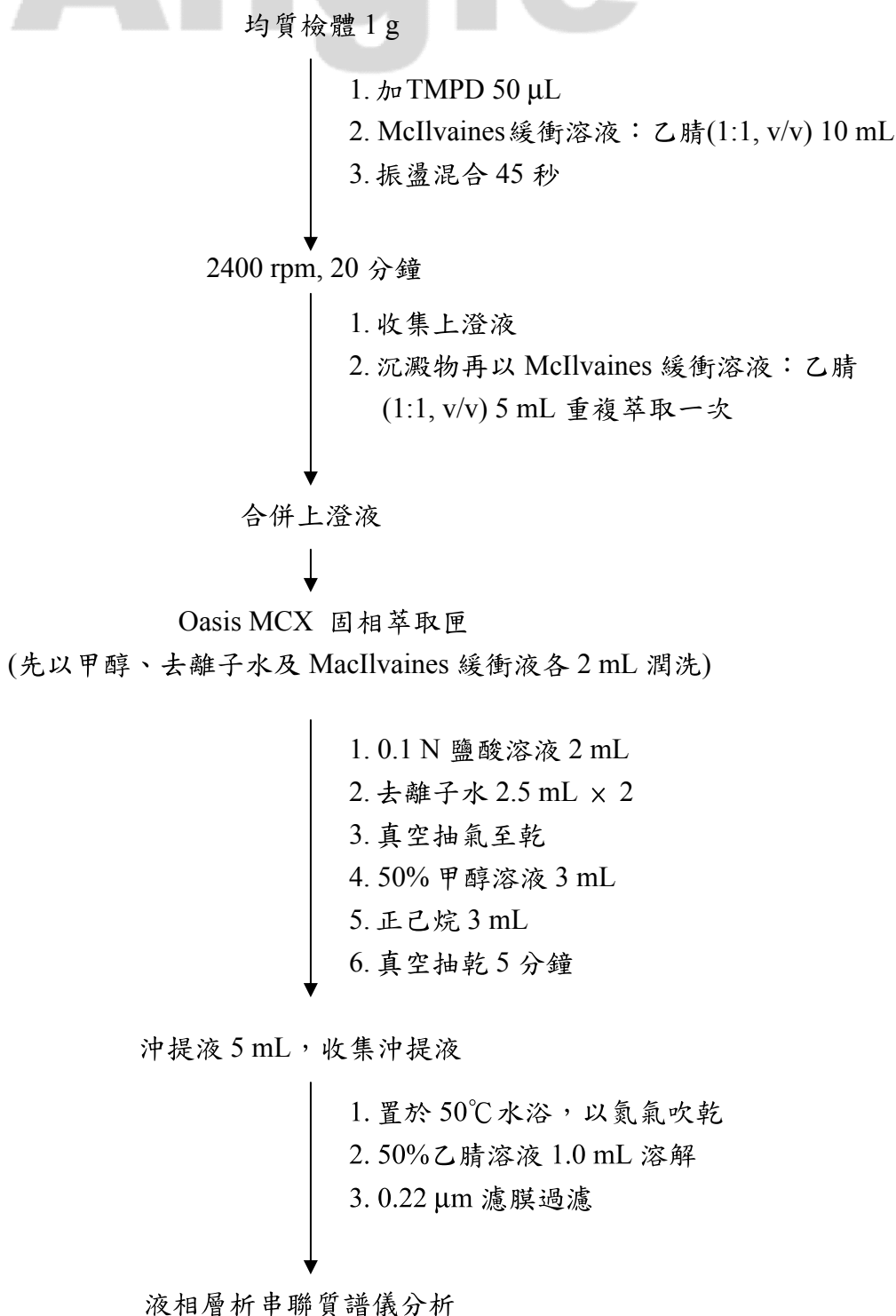
依據行政院衛生署公告「食品中動物用藥殘留量檢驗方法－孔雀綠及其代謝物之檢驗」⁽¹³⁾，進行檢體前處理，檢驗流程見圖一。

1. 萃取

將檢體細切後以均質機均質，取均質檢體約1 g，精確稱定，置於50 mL塑膠離心管中，加入內部標準溶液50 μL 、TMPD溶液50 μL 及McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)混合溶液10 mL，旋渦混合45秒後，於2,400 rpm離心20分鐘。收集上澄液，離心管中之沉澱物再以McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)混合溶液5 mL重複操作一次。合併上澄液，供淨化用。

2. 淨化

取上述供淨化用之溶液，注入預先以甲醇2 mL、去離子水2 mL及McIlvaines緩衝溶液2 mL潤洗之Oasis MCX固相萃取匣，再加入0.1 N 鹽酸溶液2 mL，以去離子水2.5 mL清洗兩次，棄流出液。固相萃取匣以真空抽乾後，依序再以50%甲醇溶液3 mL及正己烷3 mL清洗，真空抽氣乾燥5分鐘。以沖提液5 mL沖提萃取匣，收集沖提液，於50°C以氮氣吹乾，殘留物加入50%乙腈溶液1.0 mL，以旋渦混合器振盪溶解，經0.22



圖一、孔雀綠及其代謝物殘留之檢驗方法流程

市售水產品中動物用藥孔雀綠及其代謝物殘留量調查

μm濾膜過濾後，供作檢液。

五、高效液相層析串聯質譜儀測定條件分析

(一)液相層析條件

1. 層析管柱

Symmetry® C8，粒徑3.5 μm，內徑2.0 mm
× 長度5 cm。

2. 移動相溶液

由5 mM醋酸銨溶液(pH 4.5)及含0.1%甲酸之乙腈溶液組成，流速為0.3 mL/min，兩移動相溶液之組成及時間梯度見表二。

(二)串聯質譜測定條件

離子源採電灑法離子化(electron spray ionization, ESI)偵測正離子，搭配多重反應偵測模式(multiple reaction monitoring, MRM)進行偵測。質譜儀之分析參數條件見表三，MRM偵測之離子見表四。

六、品質管制分析

每批次檢體(少於15個樣品)於分析孔雀綠及其代謝物殘留時，分別作空白分析、添加孔雀綠及還原型孔雀綠1.0 ppb於魚肉樣品之添加回收分析及重複分析。

結果與討論

一、品質管制分析

表二、移動相組成及梯度時間表

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase*	
		A (%)	B (%)
0.0	0.3	50	50
1.0	0.3	0	100
4.0	0.3	0	100
4.5	0.3	50	50
8.0	0.3	50	50

*A: 5 mM ammonium acetate solution

B: acetonitrile containing 0.1% formic acid solution

表三、質譜儀之分析參數條件

Parameter	Condition
Capillary voltage	2.5 kV
Extractor	3.0 V
Source temperature	100°C
Desolvation temperature	400°C
Desolvation gas flow rate	500 L/hr
Cone gas flow	100 L/hr
LM resolution 1	15.0
HM resolution 1	15.0
Ion energy 1	1.0
Entrance	2.0
Exit	2.0
LM resolution 2	15.0
HM resolution 2	15.0
Ion energy 2	1.0
Multiplier	650 V

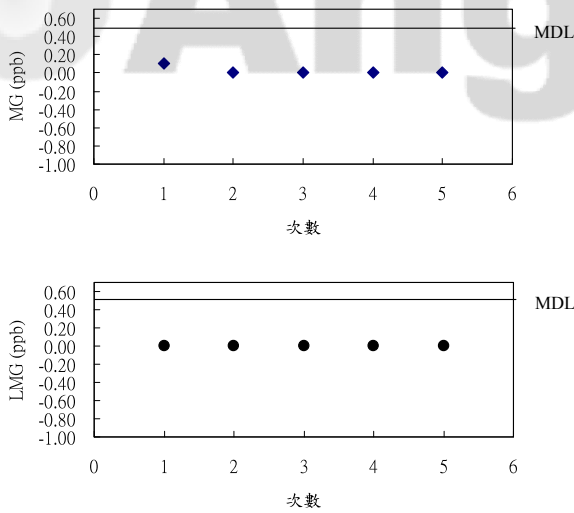
表四、以質譜儀偵測之碰撞能量、離子片段、比率及分析參數

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Relative intensity (%)	Dwell Time (sec)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
MG	329	208 ^a	100	0.1	60	35
	329	313 ^b	36.4 (3.3) ^c	0.1	60	37
LMG	331	239 ^a	100	0.1	40	30
	331	316 ^b	38.4 (1.4) ^c	0.1	40	24
MG-d ₅	334	318		0.1	40	38
LMG-d ₅	336	239		0.1	55	30

^aMRM transition used for quantification

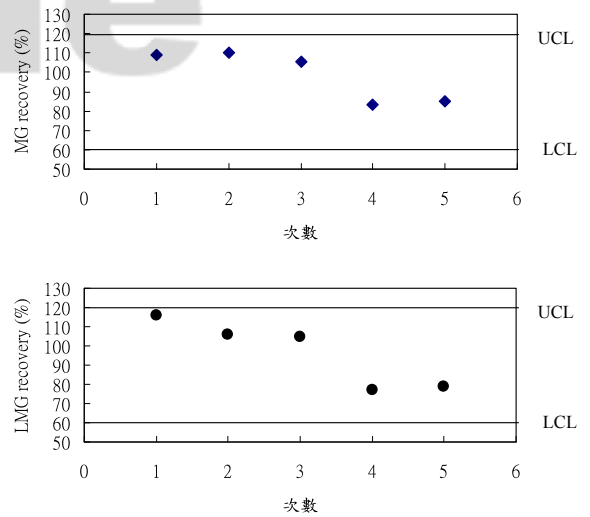
^bMRM transition used for confirmation

^cValue in parenthesis is the coefficient of variation (CV, %), N=3



圖二、孔雀綠及還原型孔雀綠之空白分析管制圖

MDL: Method detection limit

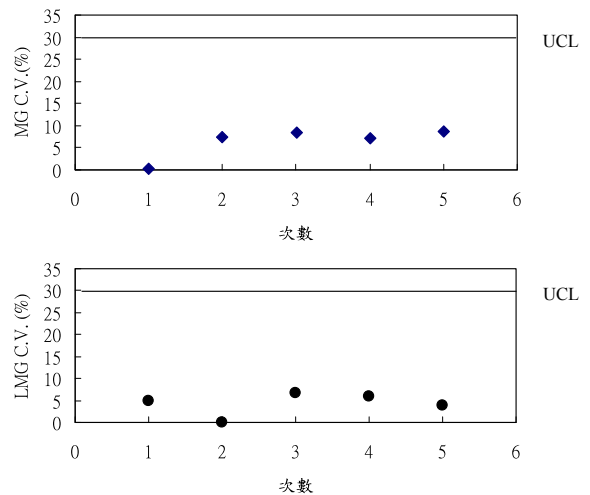


圖三、孔雀綠及還原型孔雀綠之添加樣品管制圖

UCL: Upper control limit

LCL: Lower control limit

每批次水產品(少於15個樣品)檢驗孔雀綠及其代謝物殘留時，至少作一次空白分析、重複分析及添加回收分析。本調查之空白分析值均在方法檢出限量(method detection limit, MDL) 0.5 ppm 以下(圖二)。本調查以魚肉檢體添加1.0 ppb之孔雀綠及還原型孔雀綠進行重複分析及添加回收分析，添加回收率之管制上值(upper control limit, UCL)及管制下值(lower control limit, LCL)分別訂為120%及60%，重複分析之變異係數之管制上值訂為30%。所得之孔雀綠及還原型孔雀綠添加回收率分別為83.5~110.0%及77.3~115.9%，均在管制上下值之內(圖三)；而重複分析之孔雀綠及還原型孔雀綠變異係數分別為0.3~8.8%及0~6.7%，均低於管制上值(圖四)。依據聯合國糧農組織/世界衛生組織(Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, FAO/WHO)之國際食品法典委員會(Codex Alimentarius Commission)⁽¹⁴⁾之規定，食品中動物用藥殘留值若介於1~10 ppb，回收率應介於60~120%，變異係數(coefficient of variation, CV)應小於30%，本調查之品質管制分析結果皆可符合Codex之要求。



圖四、孔雀綠及還原型孔雀綠之重複分析管制圖

UCL: Upper control limit

二、市售水產品中孔雀綠及還原型孔雀綠殘留之檢測

97年度檢測市售虱目魚12件、吳郭魚10件、鱸魚8件、石斑魚6件、甲魚5件、鰻魚4件、午仔魚3件、魷仔魚3件、土虱1件、尼羅紅魚1件及黃花魚1件等54件，結果(表五)甲魚2件同時檢出孔雀綠(4.86及5.00 ppb)及還原型孔雀綠(9.60及49.70 ppb)，甲魚1件檢出孔雀綠1.85 ppb，另甲魚、石斑魚及午仔魚各1件分別檢出還原型孔雀綠2.92、3.90及0.77 ppb。其中以甲魚不合格率80%，最為

市售水產品中動物用藥孔雀綠及其代謝物殘留量調查

表五、97年度市售水產品中孔雀綠及其代謝物殘留檢測結果

Category	No. of non-compliant samples	Rate of non-compliance (%)	MG/LMG (ppb)
M-kfish	0 (12) ^a	0	N.D. ^b
Tapia	0 (10)	0	N.D.
Perch	0 (8)	0	N.D.
Grouper	1 (6)	16.7	LMG 2.92
Soft-shell turtle	4 (5)	80.0	MG 4.86, LMG 9.60 MG 5.00, LMG 49.70 MG 1.85 LMG 3.90
Eel	0 (4)	0	N.D.
Lake candidus dace	1 (3)	33.3	LMG 0.77
Fish larva	0 (3)	0	N.D.
Catfish	0 (1)	0	N.D.
Red tapia	0 (1)	0	N.D.
Yellow croaker	0 (1)	0	N.D.
Total	6 (54)	11.1	

^a Value in parenthesis is total number of samples

^b Not detected

嚴重。不符規定之檢體本局皆公布不合格食品資訊，並由地方衛生局移請農政單位卓辦。本調查顯示仍有業者違法使用孔雀綠，有關單位仍須加強對業者之管理及輔導，同時應持續對市售產品進行監測。

參考文獻

1. National Toxicology Program. 2004. NTP technical report on the toxicity studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) administered in feed to F344/N rats and B6C3F₁ mice. NIH Publication No. 045-4416, NIH, U.S.A.
2. Culp, S. J. and Beland, F. A. 1996. Malachite green: a toxicological review. J. Am. Coll. Toxicol. 15: 219-238.
3. Srivastava, S., Sinha, R. and Roy, D. 2004. Toxicological effects of malachite green. Aquat. Toxicol. 66(3): 319-329.
4. Culp, S. J., Blankenship, L. R., Kusewitt, D. F., Doerge, D. R., Mulligan, L. T. and Beland, F. A. 1999. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F₁ mice. Chmico-Biological Interactions 122: 153-170.
5. Andersen, W. C., Turnipseed, S. B. and Roybal, J. E. 2006. Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. J. Agric. Food Chem. 54: 4517-4523.
6. Halme, K., Lindfors, E. and Peltonen, K. 2004. Determination of malachite green residues in rainbow trout muscle with liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Food Addit. Contam. 21(7): 641-648.
7. Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Gehring, T. A., Pu, Y. M. and Plakas, S. M. 1998. Analysis of malachite green and metabolites in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 12: 1625-1634.

8. Roybal, J. E., Peenning, A. P., Munns, R. K., Holland, D. C., Hurlbut, J. A. and Long, A. R. 1995. Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in catfish (*Ictalurus punctatus*) tissue by liquid chromatography with visible detection. *J. AOAC Int.* 78(2): 453-457.
9. National Toxicology Program. 2005. TR-527 toxicology and carcinogenesis studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (feedstudies). NIH Publication No. 05-4463, NIH, U.S.A.
10. 蘇淑珠。2006。石斑魚使用禁藥孔雀綠。藥物食品簡訊，303: 1-2。
11. Veterinary Residues Committee. Annual report on surveillance for veterinary residues in food in the UK for 2001, 2002, 2003, 2004, and 2005. [<http://www.vet.residues-committee.gov.uk/>].
12. 周珮如、古遠丰、蘇淑珠、施養志。2008。市售水產品中動物用藥孔雀綠及其代謝物殘留量調查。藥物食品檢驗局調查研究年報，26: 286-294。
13. 行政院衛生署。2008。食品中動物用藥殘留檢驗方法－孔雀綠及其代謝物之檢驗。97.01.11. 衛署食字第0971800008號公告。
14. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 2007. Codex Alimentarius Commission: Report of the 17th session of the Codex Committee of Residues of Veterinary Drugs in Foods.

Survey on Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Marketed Aquatic Products

WEI-CHENG LI, CHI-WEN HSIEH, PEI-JU CHOU, YUAN-FENG KU,
SHU-CHU SU AND DANIEL YANG-CHIH SHIH

Food Chemistry Division

ABSTRACT

A survey of malachite green (MG) and leucomalachite green (LMG) residues in marketed aquatic products was conducted in 2008. Fifty-four samples, including 12 milkfish, 10 tilapia, 8 perch, 6 grouper, 5 soft-shell turtle, 4 eel, 3 lake candidus dace, 3 fish larva, 1 catfish, 1 red tilapia and 1 yellow croaker, were collected from retailers by local health officials. The samples were analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) with electrospray ionization and multiple reactions monitoring, which was promulgated by the Department of Health (DOH) of Taiwan. The MG and LMG residues in 4 soft-shell turtle, 1 perch and 1 lake candidus dace samples were detected, which violated the regulation. The rate of violation was 11.1%. The result of this survey has been posted and the local governments have enforced the penalties to the suppliers who provided the violative samples.

Key words: malachite green, leucomalachite green, aquatic product, LC/MS/MS