

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－孔雀綠、結晶紫及其代謝物之檢驗
(草案)

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods -
Test of Malachite Green, Crystal Violet and their Metabolites

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於水產品中抗菌性染劑孔雀綠(malachite green, MG)、結晶紫(crystal violet, CV)及其代謝物還原型孔雀綠(leucomalachite green, LMG)、還原型結晶紫(leucocrystal violet, LCV)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Kinetex[®] C8，2.6 μm ，內徑2.1 mm \times 5 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達5000 \times g以上者。
 - 2.1.4. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.5. 固相真空萃取裝置(Solid phase extraction vacuum manifolds)。
 - 2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.7. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2. 試藥：乙腈、甲醇、正己烷及乙酸乙酯均採用液相層析級；*N,N,N',N'*-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)、甲酸、檸檬酸、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、醋酸銨、氨水(25%)、醋酸及鹽酸均採用試藥特級；孔雀綠草酸鹽(malachite green oxalate salt)、還原型孔雀綠、結晶紫及還原型結晶紫對照用標準品；孔雀綠-d₅苦味酸鹽(MG-d₅ picrate)、還原型孔雀綠-d₅(LMG-d₅)、結晶紫-d₆(CV-d₆)及還原型結晶紫-d₆(LCV-d₆)同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：10 mL，褐色。

- 2.3.3. 陽離子交換固相萃取匣(Cation exchange solid phase extraction cartridge)：Oasis MCX，60 mg，3 mL或同級品。
- 2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 μm ，Nylon材質。
- 2.4. 試劑之調製：
- 2.4.1. 50%乙腈溶液：
取乙腈250 mL，加去離子水使成500 mL。
- 2.4.2. McIlvaines緩衝溶液：
稱取檸檬酸9.36 g及磷酸氫二鈉1.55 g，以去離子水溶解使成500 mL。
- 2.4.3. McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)溶液：
取McIlvaines緩衝溶液與乙腈以1：1 (v/v)之比例混勻。
- 2.4.4. TMPD溶液：
稱取TMPD 50 mg，以甲醇溶解使成50 mL。
- 2.4.5. 0.1 N鹽酸溶液：
取鹽酸4.2 mL，緩緩加入去離子水400 mL中，再加入去離子水使成500 mL。
- 2.4.6. 50%甲醇溶液：
取甲醇250 mL，加去離子水使成500 mL。
- 2.4.7. 沖提液：
取氨水5 mL、乙酸乙酯50 mL及甲醇45 mL，混合均勻，臨用時調製。
- 2.4.8. 0.1 M醋酸銨溶液：
稱取醋酸銨1.93 g，以去離子水溶解使成250 mL。
- 2.5. 移動相溶液之調製：
- 2.5.1. 移動相溶液A：
取0.1 M醋酸銨溶液50 mL，加入去離子水900 mL，以醋酸調整pH至 4.5 ± 0.1 ，再加去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
- 2.5.2. 移動相溶液B：
取0.1 M醋酸銨溶液50 mL，加入乙腈900 mL，加甲酸1 mL，再加乙腈使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。
- 2.6. 內部標準溶液之配製：
取相當於含孔雀綠-d₅約10 mg之同位素內部標準品及還原型孔

雀綠-d₅、結晶紫-d₆與還原型結晶紫-d₆同位素內部標準品各約10 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以乙腈稀釋至100 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取相當於含孔雀綠約10 mg之對照用標準品及還原型孔雀綠、結晶紫與還原型結晶紫對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以50%乙腈稀釋至100 ng/mL，供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取：

將檢體細切均質後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液10 µL、TMPD溶液50 µL及McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)溶液10 mL，旋渦混合均勻，以5000 ×g離心3分鐘。收集上清液，殘留物再加入McIlvaines緩衝溶液：乙腈(1:1, v/v)溶液5 mL，重複上述步驟萃取1次。合併上清液，供淨化用。

2.8.2. 淨化：

取2.8.1.節供淨化用溶液，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，棄流出液。固相萃取匣依序以0.1 N鹽酸溶液2 mL及去離子水5 mL清洗，真空抽乾後，棄流出液。再依序以50%甲醇溶液3 mL及正己烷3 mL清洗，真空抽乾後，棄流出液。以沖提液5 mL沖提，收集沖提液，於50°C以氮氣吹至剛乾，殘留物加入50%乙腈溶液1 mL，旋渦混合溶解，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別加入標準溶液2~50 µL及內部標準溶液10 µL，依2.8節調製檢液，供作檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就孔雀綠、還原型孔雀綠、結晶紫及還原型結晶紫與其內部標準品之波峰面積比，與對應之孔雀綠、還原型孔雀綠、結晶紫及還原型結晶紫濃度，分別製作0.2~5 ng/mL檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：Kinetex[®] C8，2.6 μm，內徑2.1 mm × 5 cm。

層析管溫度：35°C。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

| 時間(min) | A (%) | B (%) |
|-------------|---------|-----------|
| 0.0 → 8.0 | 95 → 0 | 5 → 100 |
| 8.0 → 13.0 | 0 → 0 | 100 → 100 |
| 13.0 → 13.5 | 0 → 95 | 100 → 5 |
| 13.5 → 15.5 | 95 → 95 | 5 → 5 |

移動相流速：0.2 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：400°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：50 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：850 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測模式(multiple reaction monitoring mode, MRM)。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如下表：

| 分析物 | 離子對 | 進樣錐 電壓 (V) | 碰撞 電壓 (eV) |
|--------------------------|----------------------------------|------------------|------------------|
| | 前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z) | | |
| MG | 329 > 313* | 10 | 34 |
| | 329 > 208 | 10 | 32 |
| LMG | 331 > 239* | 34 | 29 |
| | 331 > 316 | 34 | 20 |
| CV | 372 > 356* | 54 | 36 |
| | 372 > 340 | 54 | 52 |
| | 372 > 235 | 54 | 56 |
| LCV | 374 > 358* | 78 | 29 |
| | 374 > 239 | 78 | 30 |
| | 374 > 253 | 78 | 30 |
| MG-d ₅ (I.S.) | 334 > 318 | 12 | 35 |

| | | | |
|---------------------------|-----------|----|----|
| LMG-d ₅ (I.S.) | 336 > 239 | 12 | 29 |
| CV-d ₆ (I.S.) | 378 > 362 | 14 | 40 |
| LCV-d ₆ (I.S.) | 380 > 364 | 12 | 30 |

*定量離子對，定性離子對可視基質情況選擇適合之至少一對離子對

註：上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及檢量線溶液各10 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9節條件進行分析。就檢液與檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註1)鑑別之，並依下列計算式求得檢體中各抗菌性染劑之含量(ppb)^(註2)：

$$\text{檢體中各抗菌性染劑之含量(ppb)} = \frac{\sum C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中各抗菌性染劑或其代謝物之濃度 (ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：1. 相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得(≤100%)，容許範圍如下：

| 相對離子強度(%) | 容許範圍(%) |
|-----------|---------|
| > 50 | ± 20 |
| > 20~50 | ± 25 |
| > 10~20 | ± 30 |
| ≤ 10 | ± 50 |

2. 檢體中各抗菌性染劑之含量，孔雀綠以孔雀綠與還原型孔雀綠之總量計；結晶紫以結晶紫與還原型結晶紫之總量計。

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，孔雀綠(以孔雀綠與還原型孔雀綠之總量計)及結晶紫(以結晶紫與還原型結晶紫總量計)均為0.5 ppb。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

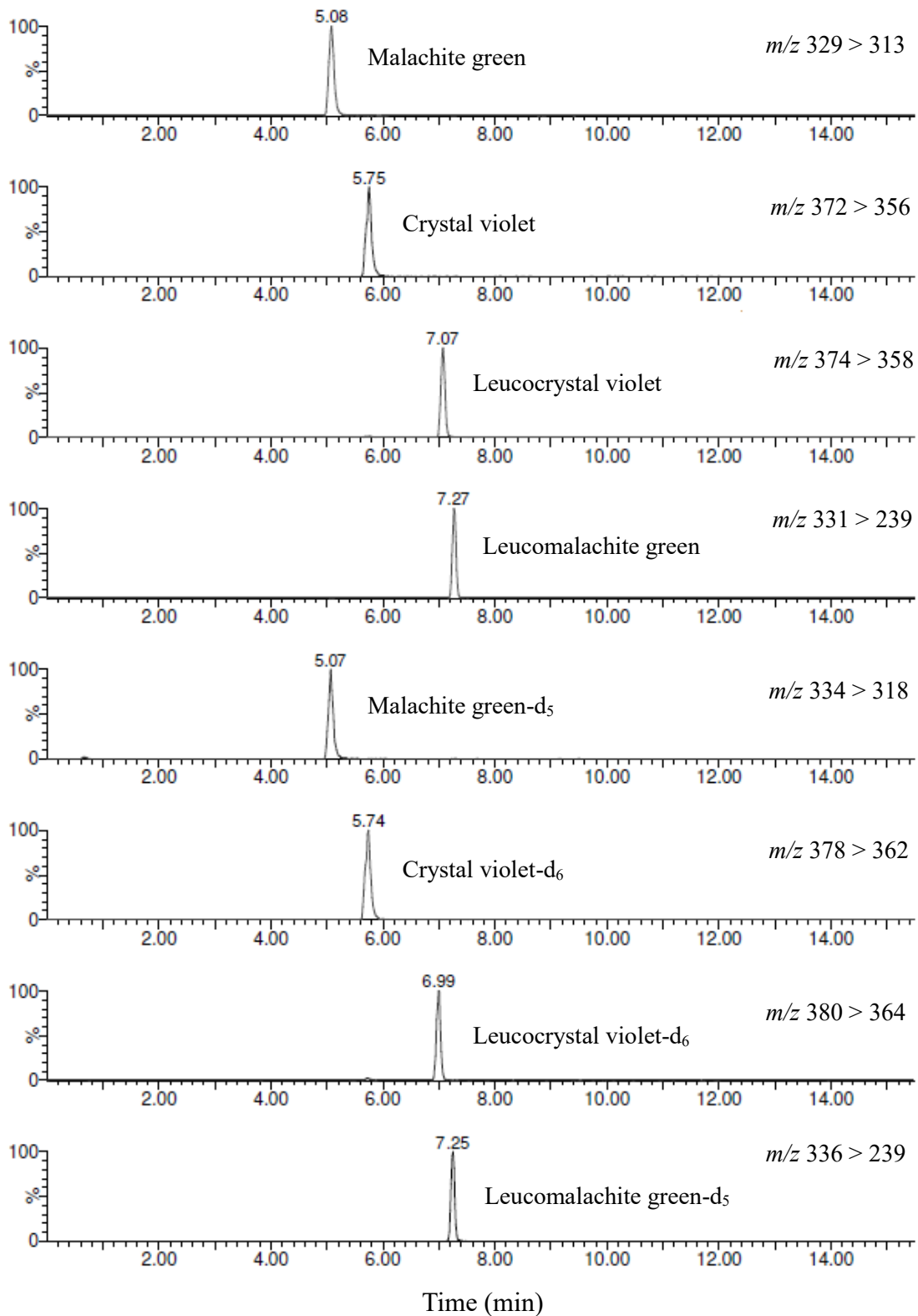
3. 結晶紫(crystal violet, CV)因藥物結構特性，於標準溶液製備時易與天秤、實驗台、實驗衣、手套、玻璃器皿等靜電吸附，

產生背景訊號，故執行樣品前處理時，應確保工作環境不受污染，使其背景值不致影響檢驗結果之判定。

參考文獻：

1. 徐麗嵐、周曉蕙、周珮如、蘇淑珠、周薰修。2006。水產品中孔雀綠及其代謝物檢驗方法之研究。行政院衛生署九十五年度科技發展研究計畫。
2. European Commission. 2019. Commission Regulation (EU) 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin and repealing Decision 2005/34/EC. Off. J. Eur. Union. L289: 41-46.
3. Chen, R. C., Wei, K. J., Wang, T. M., Yu, Y. M., Li, J. Y., Lee, S. H., Wang, W. H., Ren, T. J. and Tsai, C. W. 2013. Simultaneous quantification of antibiotic dyes in aquatic products and feeds by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Food Drug Anal. 21: 339-346.
4. U.S. Food and Drug Administration. 2007. Quantitative and confirmatory analysis of crystal violet (gentian violet) and brilliant green in fish. Laboratory Information Bulletin (LIB) 4395: Analyses of Crystal Violet & Brilliant Green.
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/laboratory-information-bulletin-lib-4395-analyses-crystal-violet-brilliant-green>

參考層析圖譜



圖、以 LC-MS/MS 分析孔雀綠、還原型孔雀綠、結晶紫與還原型結晶紫標準品及其同位素內部標準品之 MRM 圖譜