

甲醛使用於鰻形目鰻魚之殘留檢測分析試驗

林文華*、詹勳隆、林秋華、陳玉林、陳昱憲、陳瑞祥、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 本試驗目的為評估甲醛 (Formaldehyde) 於鰻魚之殘留，應用高效液相層析檢測甲醛投予前和停藥後各種不同期間之殘留量，作為訂定停藥期依據，以檢討規範水產動物用藥品使用品目之參考。本試驗方法之樣品前處理以水及 20% 硫酸萃取後離心，再以上清液與 2,4-二硝基苯肼於 60°C 水浴 15 分鐘進行管柱前衍生化反應後分析。結果顯示甲醛於肌肉回收率準確度介於 89.8-110.2%，肝臟回收率介於 104.8-109.7%；而於肌肉、肝臟同日間試驗相對標準差 (RSD, %) 分別為 1.36-3.10%、2.61-4.44%，異日間試驗相對標準差分別為 1.37-7.28%、1.21-3.23%。最低偵測極限為 0.02 $\mu\text{g/mL}$ ，最低定量極限為 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 。依據動物用藥品新藥試驗對象動物殘留試驗，以低劑量 25 mg/L 及高劑量 50 mg/L 甲醛不換水長期浸泡藥浴，分別於藥浴前第 0、1、2、4、7、10、14 天各時段犧牲，採集帶皮肌肉和肝臟檢體。結果顯示經高低劑量藥浴 1 天後，於鰻魚肌肉、肝臟殘留量均已低於最低偵測極限，並檢測水體中 (溫度 25 \pm 1°C) 甲醛殘留量於藥浴後 48 小時低於最低偵測極限。

關鍵詞： 甲醛、高效液相層析、鰻魚、殘留試驗。

緒言

基於國內水產養殖現行「水產動物用藥品使用規範」規定所列藥品品目之不足，本計畫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甲醛 (Formaldehyde) 於鰻魚殘留試驗之研究。甲醛由於可與細胞質氨基部分結合，形成烷基化，可運用於水產繁殖場及養殖場控制外寄生蟲及水黴菌感染，在國外被用於鱒魚、鮭魚、鯰魚與黑鱸以 25 mg/L 濃度在養殖桶或養殖池不換水藥浴或者以 250 mg/L 濃度在養殖桶藥浴 1 小時[8]，在不換水藥浴所投予甲醛可允許自然揮發，而藥浴後甲醛無蓄積於可食用部位，亦無超出正常魚體代謝所生成背景值 (endogenous formaldehyde) 範圍現象。目前發現在有些貝類及硬骨魚類，正常背景值含量為

0.1-31.8 mg/kg[4]，而在一些水產品冷凍過程中因體內氧化三甲胺酶氧化三甲胺亦產生甲醛，與蛋白質結合形成複合物可加快水產品腐敗[9]。甲醛在美國與加拿大允許用於水產養殖上做為治療用，但歐洲、日本、澳洲等國則認為甲醛有致癌之風險而禁止使用[5]，國內尚未核准使用甲醛於水產養殖業。

目前於水產動物組織甲醛殘留檢測方法尚未有國家公告方法。由於甲醛為簡單碳氫化合物，因無具有紫外光吸收之官能基，需於酸鹼環境下經過衍生化反應，如 Nash 試劑 (Nash reagent) [7]、2,4-二硝基苯肼 (2,4-dinitrophenylhydrazine)、2,4-戊二酮 (2,4-Pentanedione)、變色酸 (chromotropic acid) [6]、乙醯丙酮 (acetylacetone) [3] 等，再以光度法、色層法、螢光、紫外光等偵測[2]。本實驗方法，以 2,4-二硝基苯肼衍生化試劑，與甲醛於酸性環境下進行衍生化反應，形成甲醛衍生物 2,4-二硝基苯肼

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

(2,4-dinitrophenylhydrazone), 再以紫外光吸收波長 360 nm 進行偵測。

材料與方法

實驗動物

試驗用鰻魚體重為 100-150 公克, 由國內嘉義縣東石鄉養殖場購回馴養 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°C。

試藥

對照用標準品甲醛購自關東化學股份有限公司。乙腈採用液相層析級, 2,4-二硝基苯肼與硫酸均為試藥特級, 濾膜 (0.45 μm , PVDF), 皆購自德國默克公司。試驗投予用甲醛 24%, 購自聯工化學製藥股份有限公司。

儀器設備

本實驗使用高效液相層析儀 Waters 2695 separations module 連接 Waters 2998 photodiode array detector (Waters Corp., USA)。水淨化組件為 Milli-Q waters purification system (EMD Millipore Corp., USA)。

檢測條件

層析管柱為 Inertsil[®] ODS-3V (管徑 4.6 \times 250 mm, 5 μm), 移動相為乙腈和水比例為 1:1 (v/v); 流速為 1.0 mL/min; 紫外燈檢測波長為 360 nm; 注射體積為 10 μL 。

衍生試劑配製

稱取 2,4-二硝基苯肼 300 mg 至 100 mL 定量瓶中, 以乙腈稀釋至定量。

標準品配製及檢量線製作

取對照用標準品甲醛 100 mg, 置於 100 mL 容量瓶中, 以 20% 硫酸溶液溶解並定容至 100 mL (1 mg/mL), 作為標準原液, 避光儲存於冰箱中。精確量取標準原液 (1 mg/mL) 2 mL 於 100 mL 褐色定容瓶中, 以 20% 硫酸溶液稀釋製備各濃度工作液 (working solution), 經衍生化反應後以 HPLC

分析。

樣品萃取

將帶皮肌肉及肝臟檢體細切, 以攪拌均質器均質後, 秤取檢體約 5 g 至 50 mL 塑膠離心管中, 加入 10 mL 水, 配製成 15 mL 魚肉均質液。加入 15 mL 之 20% 硫酸, 以垂直式螺旋式震盪 5 至 10 秒充分混合均勻後, 再以 9000 rpm 離心 10 分鐘, 將上清液以濾紙過濾, 取濾液進行衍生化反應, 再以 0.45 μm 之 PVDF 材質濾膜過濾後分析。

衍生化反應

取濾液 4 mL 至已包裹錫箔紙避光 15 mL 離心管中, 並加入 1 mL 2,4-二硝基苯肼 (3.0 g/L) 之衍生物反應試劑, 以 60°C 水浴槽加熱 20 分鐘後, 放置室溫冷卻。

最低偵測極限值與最低定量極限值

將甲醛標準原液以 20% 硫酸溶液配製成一系列濃度之溶液與空白檢體經由前處理萃取後, 經衍生後注入高效液相層析儀分析, 求出 3 倍於空白檢體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 倍於空白檢體雜訊之波峰面積比之濃度為最低定量極限值 (limit of quantification; LOQ)。

準確度

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。秤取對照空白檢體約 5 g 至 50 mL 塑膠離心管中, 加入 10 mL 水, 配製成 15 mL 均質液後, 添加標準原液, 使每份檢液濃度分別為 0.08、2.0 及 8.0 $\mu\text{g/g}$, 每種濃度進行三重覆, 混和均勻, 依樣品前處理方法配製成檢液後, 經衍生化反應後注入高效液相層析儀分析, 求出標的成分之平均回收率。

精密度試驗

分析試驗精密度 (precision) 由空白檢體添加標準品原液濃度為 0.1、2.0 及 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 進行測試, 以同日間 (intra-day) 進行測試樣品三重複測試

表示其重複性 (repeatability)；以異日間 (inter-day) 不同三天進行重複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%)。

藥物投予及殘留分析試驗

依據動物用藥品新藥試驗對象動物殘留試驗，試驗分成低劑量組、高劑量組和陰性對照組共三組，每組 36 隻。投予測試藥品甲醛配製成 25 和 50 mg/L 不換水長期浸泡藥浴，高劑量組以 2 倍劑量藥浴；陰性對照組不給藥。分別於藥浴前第 0 天及藥浴後第 1、2、4、7、10、14 天各時段犧牲 6 隻，採集帶皮肌肉和肝臟檢體執行甲醛殘留量檢測分析。

結果

甲醛衍生化後之紫外燈檢測下之標準曲線

甲醛標準原液以 20% 硫酸溶液配製成濃度為 0.08、0.1、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$ ，在層析圖中測量波峯高度。取波峯面積為縱軸以及濃度為橫軸作圖，可得一良好的線性關係 $y = 450741x + 59177$ ($R^2=0.9987$) (圖 1)。於層析圖中衍生化後甲醛滯留時間約為 8.6 分鐘，而未作用之 2,4-二硝基苯肼衍生化試劑滯留時間約為 4.4 分鐘，兩者在吸收光譜圖波形雖相近，但兩者波峰具有良好分離度 (圖 2)。而本實驗之最低偵測極限為 0.02 $\mu\text{g/mL}$ ，最低定量極限為 0.08 $\mu\text{g/mL}$ (如圖 3)。

準確度與精確度

以空白肌肉及肝臟添加標準品與未添加標準品進行專一性分析，其層析圖所示甲醛滯留時間未發現任何基質干擾存在 (如圖 4)。準確度以空白檢體添加標準品後三種濃度 0.08、2.0 及 8.0 $\mu\text{g/g}$ 評估，經分析方法檢測所得波峰積分面積代入檢量線求其平均回收率，其結果顯示甲醛於肌肉平均回收率分別為 101.8、110.2、89.8%；而肝臟肌肉平均回收率分別為 105.6、104.8、109.7% (如表 1)。精確度以同日間、異日間試驗評估重複性及再現性，空白檢體添加標準品後三種濃度 0.08、2.0 及 8.0 μ

g/g 之重複性 ($n=3$) 測試結果，甲醛於肌肉、肝臟同日間試驗相對標準差分別為 1.36-3.10%、2.61-4.44%；而添加檢體之再現性 ($n=3$) 結果，甲醛於肌肉、肝臟異日間試驗相對標準差分別為 1.37-7.28%、1.21-3.23% (如表 2)。

殘留性試驗結果

以 25 mg/L 低劑量及 50 mg/L 高劑量進行不換水藥浴，其殘留結果於第 1 天藥浴後，其高、低劑量組肌肉及肝臟殘留量均低於最低偵測極限，其後 2、4、7、10、14 天皆與對照組無顯著差異。

討論

本實驗分析方法，以水做為萃取液，利用酸性環境下，使 2,4-二硝基苯肼與甲醛進行管柱全衍生化反應，該衍生化方法不但簡便，具有良好線性關係且重複性及再現性高，對於檢體在檢測分析基質干擾較小專一性較高，可適合做為殘留分析使用。

經查國內外文獻尚無鰻魚甲醛藥浴後之殘留試驗報告，而本次殘留試驗結果顯示，鰻魚以甲醛 25 及 50 mg/L 不換水藥浴，其兩者藥浴濃度於鰻魚肌肉、肝臟殘留期間均於藥浴後第 1 天即低於最低偵測極限；而對照組鰻魚肌肉、肝臟至第 14 天背景值均低於最低偵測極限。比照國內、外相關甲醛於不同魚種之殘留性試驗，國內楊等人，以鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 進行甲醛 250 mg/L 藥浴 1 小時、100 mg/L 藥浴 2 小時及 25 mg/L 長時間藥浴，結果顯示於不論溫度高 (30°C) 或低 (20°C) 於藥浴後 144 小時皆回復到背景值 [1]。國外 Xu 等人以尼羅吳郭魚 (*Tilapia niloticus*) 進行甲醛殘留試驗，甲醛濃度為 25 mg/L 不換水藥浴以及 125 mg/L 藥浴 1.5 小時與 250 mg/L 藥浴 1 小時，試驗結果於藥浴後 48-72 小時肌肉殘留量比對照組輕微上升，96 小時後肌肉殘留量與對照組 (背景值約為 $1.34 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$) 則無顯著差異 ($p < 0.05$) [11]。Jung 等人以比目魚 (*Paralichthys olivaceus*) 及許氏平鮎 (*Sebastes schlegelii*) 進行甲醛 100、300 及 500 mg/L 藥浴 1 小時後換水，所有濃度於藥浴後第 24 小時，其肌肉甲醛殘留量皆與對照組 (背景值約為 0.86 ± 0.02

$\mu\text{g/g}$) 無顯著性差異[5]。由以上結果可知在不同魚種之背景值殘留量有差異性，且藥浴後魚體甲醛殘留量與時間長短，亦因魚種而有所差異。雖本次試驗無進行同日間各小時之殘留檢測，由於甲醛於魚體代謝主要依賴甲醛去氫酶 (formaldehyde dehydrogenase) 影響，是否鰻魚體內含有甲醛去氫酶活性較高，使體內甲醛代謝速度快，需再進一步探討。

另考量甲醛於水體受水溫降解程度，本次淡水中甲醛降解試驗，於控制水溫 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下，高、低劑量組於 48 小時後水體中甲醛殘留量均已低於最低偵

測極限。而 Xu 等人以甲醛 25 mg/L 殘留量於水溫 $15、25、30、35^\circ\text{C}$ 進行，結果顯示 25°C 於 96 小時即低於最低偵測極限；且以千分之 3、6、9、12、16 鹽度於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 水溫下，其各鹽度甲醛降解程度無顯著性差異[11]。故以上結果顯示，於相同甲醛濃度於 25°C 之降解時間雖有差異性，惟甲醛易受到環境溫度、大氣壓力、光照程度影響而降解，故實驗中各項環境因素皆有可能影響到水體甲醛殘留之結果。

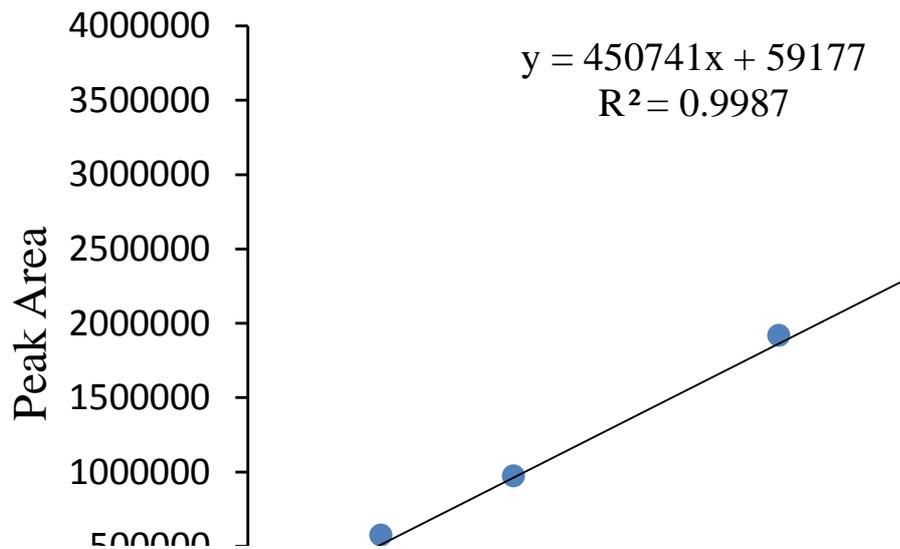


圖 1、甲醛標準品檢量線 (濃度為 0.08、0.1、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$)。

甲醛使用於鰻形目鰻魚之殘留檢測分析試驗

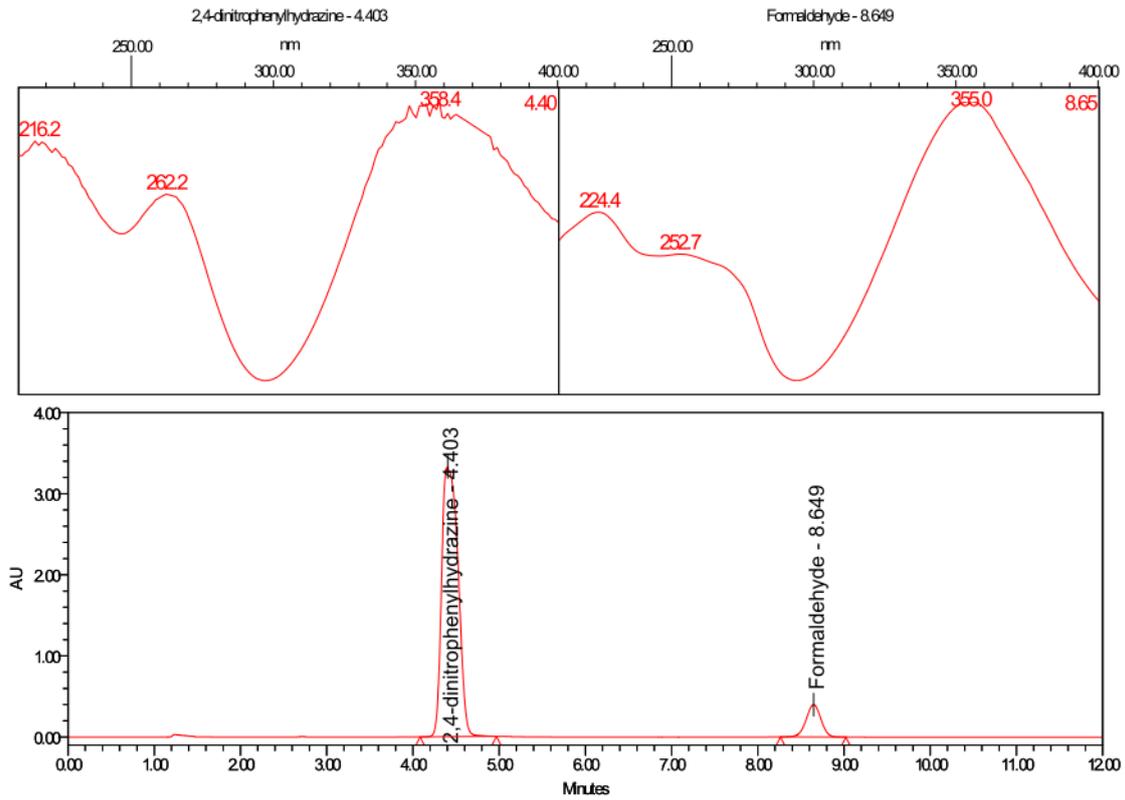


圖 2、2,4-二硝基苯肼衍生化試劑（滯留時間約 4.4 分鐘）及甲醛衍生物（滯留時間約 8.6 分鐘）吸收光譜圖及層析圖。

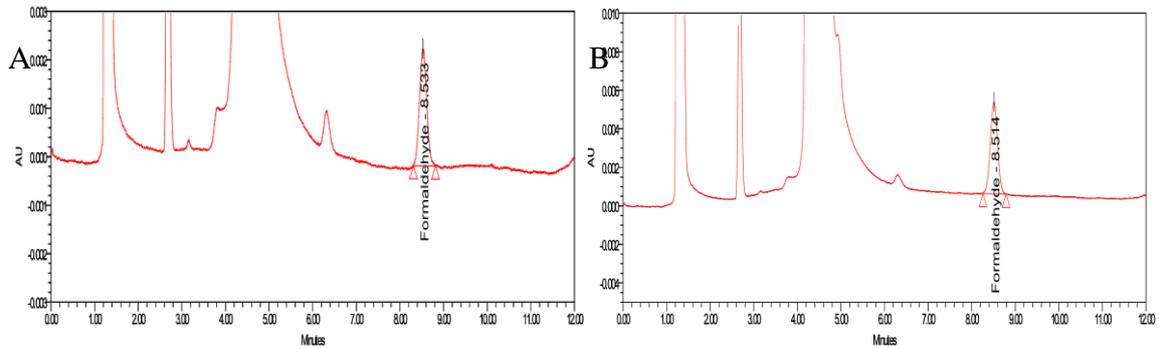


圖 3、(A) 最低偵測極限 $0.02 \mu\text{g/mL}$ 及 (B) 最低定量極限 $0.08 \mu\text{g/mL}$ 之層析圖。

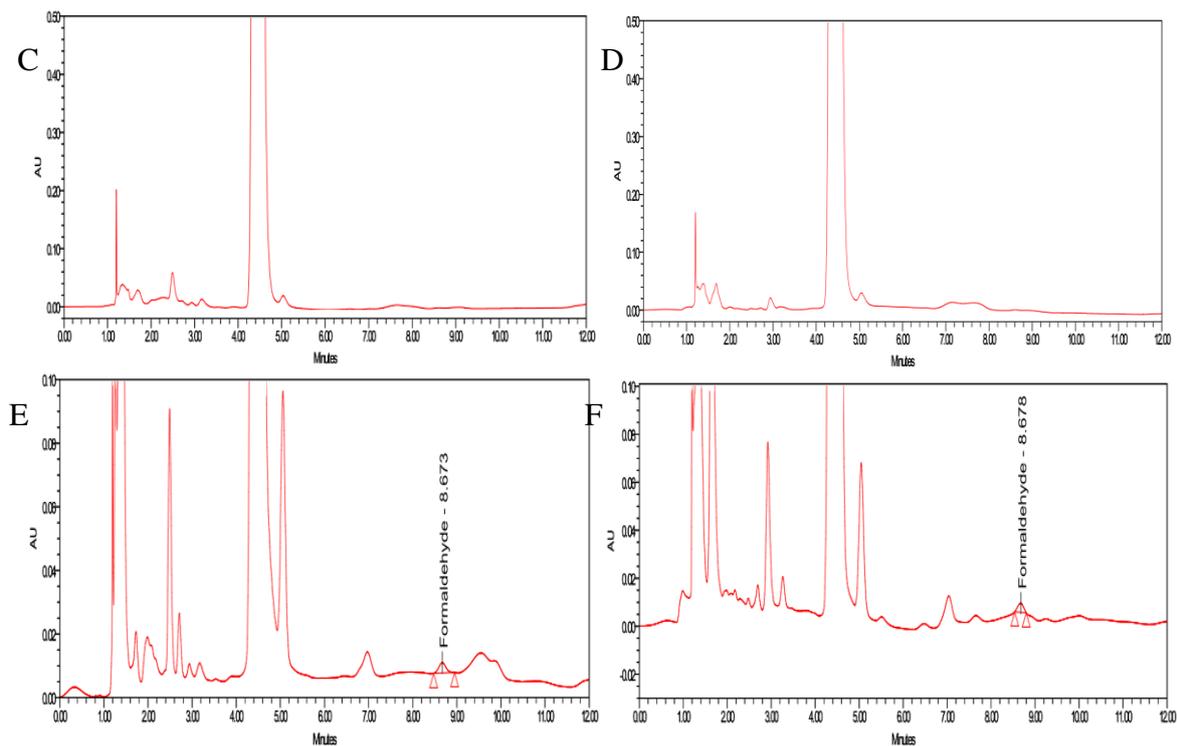


圖 4、空白 (C) 肌肉、(D) 肝臟層析圖與添加 0.08 $\mu\text{g/g}$ 之 (E) 肌肉、(F) 肝臟層析圖。

表 1、添加甲醛濃度 0.08、2.0 及 8.0 $\mu\text{g/g}$ 之肌肉及肝臟回收率準確度試驗。

Sample	Spiked ($\mu\text{g/g}$)	Determined ($\mu\text{g/g}$)			Average determined ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)
		1	2	3		
Muscle	0.08	0.079	0.082	0.083	0.081±0.002	101.8
	2.0	2.19	2.18	2.24	2.20±0.03	110.2
	8.0	7.23	7.38	6.94	7.18±0.22	89.8
Liver	0.08	0.084	0.082	0.087	0.085±0.002	105.6
	2.0	2.18	2.10	2.00	2.10±0.09	104.8
	8.0	9.01	8.99	8.32	8.77±0.39	109.7

表 2、添加甲醛濃度 0.08、2.0 及 8.0 $\mu\text{g/g}$ 之同日間、異日間精密度試驗。

Sample	Spiked ($\mu\text{g/g}$)	Intra-day (RSD%)	Inter-day (RSD%)
Muscle	0.08	2.79	4.33
	2.0	1.36	1.37
	8.0	3.10	7.28
Liver	0.08	2.61	1.21
	2.0	4.36	2.89
	8.0	4.44	3.23

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(100 農科-9.2.3-檢-B1(1))，特此致謝。

參考文獻

1. 楊順德、林天生、劉富光福馬林之毒性及甲醛在鯉魚肌肉之殘留。水產研究。13：25-34, 2005。
2. Burini G and Coli R. Determination of formaldehyde in spirits by high-performance liquid chromatography with diode-arraydetection after derivatization. *Analytica Chimica Acta* 511: 155-158, 2004.
3. Gold TB, Buice RG Jr, Lodder RA and Digenis GA. Determination of extent of formaldehyde-induced crosslinking in hard gelatin capsules by near-infrared spectrophotometry. *Pharm Res* 14 (8) :1046-1050, 1997.
4. Harada K. Studies on enzyme catalyzing the formation of formaldehyde and dimethylamine in tissues of fish and shells. *Shimonoseki Univ. Fish* 23: 163-241, 1975.
5. Jung SH, Kim JW, Jeon IG and Lee YH. Formaldehyde residues in formalin-treated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegelii*), and seawater. *Aquaculture* 194: 253-262, 2001.
6. Lewandowska I and Jurkiewicz M. Determination of unbound formaldehyde in protein coverings using the colorimetric method with chromotropic acid. *Rocz Panstw Zakl Hig* 44 (23) : 175-179, 1993.
7. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J.* 55: 416-421, 1953.
8. Meyer FP and Schnick RA. A review of chemicals used for the control of fish diseases. *Rev Aquat Sci* 1 (4) : 693-710, 1989.
9. Rehbein H and Schreber W. TMAO-ase activity in tissues of fish species from the northeast Atlantic. *Comp Biochem Physiol* 79B (3) : 447 - 452, 1984.
10. Xu D and Roger WA. Formaldehyde residue in striped bass muscle. *J Aquat Anim Health* 5: 306-312, 1993.
11. Xu D and Roger WA. Formaldehyde residue in the muscle of Nile tilapia. *Asian Fish Soc* 8: 81-88, 1995.

Formaldehyde Residue Testing Assay in Anguilliformes Eel

WH Lin*, HL Chan, QH Lin, YL Chen, YH Chen, RS Chen, SH Lee

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

Abstract The purpose of this study is to assess formaldehyde residue in eels and generate a basis for setting withdrawal periods, which could be used for reference in reviewing regulated items of aquatic animal drug. In the test, high performance liquid chromatography was applied to determine formaldehyde residue levels at different time points before drug administration and after drug discontinuation. The sample tested in our study was prepared by extracting with water and 20% sulfuric acid before centrifugation. Then 2, 4-Dinitrophenylhydrazine was added into the supernatant for a 15-minute water bath at 60°C for pre-column derivatization before analysis. The results showed that the muscle formaldehyde recovery rates ranged from 89.8 - 110.1 % and the liver recovery rates ranged from 104.8 - 109.7 %. The intra-assay of the muscle and liver relative standard deviation (RSD) was 1.36 - 3.10 % and 2.61 - 4.44 % respectively, and the inter-assay was 1.37 - 7.28 % and 1.21 - 3.23 % respectively. The lowest detectable limit was 0.02 µg/mL and the lowest limit of quantification was 0.08 µg/mL. The tests of this study followed the procedures of residue testing for new veterinary medicine on fish and animals. Fish were dipped in low and high formaldehyde doses of 25 and 50 mg/L respectively for a long time without a change of water. The samples of muscles with skin and livers from the fish were collected on the day of the dip and on the 1st, 2nd, 4th, 7th, 10th, and 14th day respectively prior to the dip. The results showed that the residue levels in the muscles and livers of eel dipped in high dose of formaldehyde for one day were both under the lowest detectable limit. The water (25±1°C) was examined after 48-hours dip and its formaldehyde residue level was also under the lowest detectable limit.

Keywords: formaldehyde, high performance liquid chromatography, eel, residue testing.