

食品中黴菌毒素檢驗方法－赭麴毒素 A 之檢驗

Method of Test for Mycotoxin in Foods -Test of Ochratoxin A

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於咖啡、酒類、葡萄汁及米麥製品中赭麴毒素 A (ochratoxin A) 之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 高效液相層析儀：
 - 2.1.1.1. 檢出器：螢光檢出器(fluorescence detector)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Cosmosil 5C 18-AR，5 μm ，內徑 4.6 mm \times 25 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)：適用於有機溶媒者。
 - 2.1.3. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達 2500 \times g 者。
 - 2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.6. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.1.7. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.8. 粉碎機(Grinder)。
 - 2.2. 試藥：

甲醇及乙腈均採用液相層析級；碳酸氫鈉、聚乙二醇(polyethylene glycol,分子量 8000)、氯化鈉、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、氯化鉀、鹽酸及醋酸均採用試藥特級；去離子水(比電阻於 25 $^\circ\text{C}$ 可達 18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；赭麴毒素 A (ochratoxin A) 對照用標準品(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP 材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：1 mL、20 mL 及 100 mL。
 - 2.3.3. 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column)：採用內含對赭麴毒素 A 具專一性單株抗體之 OchraTest 管柱，或同級品。
 - 2.3.4. 濾膜：孔徑 0.45 μm ，Nylon 材質。
 - 2.3.5. 針筒過濾器(Syringe filter)：濾膜孔徑 0.45 μm ，Teflon 材質。
 - 2.3.6. 玻璃纖維濾紙(Glass microfibre filters)：直徑 11 cm。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 3%碳酸氫鈉溶液：

稱取碳酸氫鈉 30 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。
 - 2.4.2. 2 N 鹽酸溶液：

取去離子水 80 mL，徐徐加入鹽酸 16.7 mL，混合均勻，冷卻

後再加去離子水使成 100 mL。

2.4.3. 0.1 N 鹽酸溶液：

取 2 N 鹽酸溶液 5 mL，加去離子水使成 100 mL。

2.4.4. 咖啡萃取溶液：

取 3%碳酸氫鈉溶液及甲醇以 1：1 (v/v)比例混勻。

2.4.5. 酒類及葡萄汁萃取溶液：

稱取聚乙二醇 10 g 及碳酸氫鈉 50 g，加去離子水 950 mL 溶解，以 0.1 N 鹽酸溶液調整 pH 至 8.3，加去離子水使成 1000 mL。

2.4.6. 米麥製品萃取溶液：

取乙腈及去離子水以 3：2 (v/v)比例混勻。

2.4.7. 磷酸緩衝溶液：

稱取氯化鈉 8 g、磷酸氫二鈉 1.2 g、磷酸二氫鉀 0.2 g 及氯化鉀 0.2 g，加去離子水 990 mL 溶解，以 2 N 鹽酸溶液調整 pH 至 7.4，加去離子水使成 1000 mL。

2.4.8. 50%乙腈溶液：

取乙腈及去離子水以 1：1 (v/v)比例混勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

取去離子水、乙腈及醋酸以 99：99：2 (v/v/v)比例混勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

精確量取赭麴毒素 A 標準品 0.1 mL，以乙腈定容至 1 mL，供作標準原液。臨用時，再以 50%乙腈溶液稀釋至 0.1~5 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

2.7.1.1. 咖啡：

咖啡豆先粉碎後混勻備用，粉狀及液狀者則直接混勻備用。取粉狀檢體約 5 g，精確稱定，置於 50 mL 離心管中，加入 2.4.4.節萃取溶液 25 mL；檢體為液狀者，精確量取檢體 5 mL，加入 2.4.4.節萃取溶液 20 mL。振盪 3 分鐘，以 2500 × g 離心 10 分鐘。上清液以濾紙過濾，精確量取濾液 2 mL，加入磷酸緩衝溶液 48 mL 混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液 25 mL (相當於檢體量 0.2 g 或 0.2 mL)，供淨化用。

2.7.1.2. 酒類及葡萄汁：

含二氧化碳之檢體應先以超音波振盪去除二氧化碳。精確量取混勻後檢體 10 mL，置於 50 mL 離心管中。加入 2.4.5.節萃取溶液 10 mL，振盪 3 分鐘，以玻璃纖維濾紙過濾，精確量取濾液 10 mL (相當於檢體量 5 mL)，供淨化用。

2.7.1.3. 米麥製品：

取磨碎混勻之檢體約 25 g，精確稱定，置於均質杯中，加入 2.4.6.節萃取溶液 100 mL，均質 3 分鐘，以 2500 × g 離心 10 分鐘。上清液以濾紙過濾，精確量取濾液 4 mL，加入磷酸緩衝溶液 44 mL 混勻，以玻璃纖維濾紙過濾，取濾液(相當於檢體量 1 g)，供淨化用。

2.7.2. 淨化：

將 2.7.1.節供淨化用之濾液以每秒 1 滴之流速通過免疫親和性管柱，再以去離子水 10 mL 流洗管柱兩次，流速每秒 1 滴。將管柱內水分排淨後，取甲醇 2 mL，以每秒 1 滴之流速沖提，收集沖提液，並以氮氣吹乾，殘留物以 50%乙腈溶液溶解並定容至 1 mL，經針筒過濾器過濾，供作檢液。

2.8. 鑑別試驗與含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 100 μL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中赭麴毒素 A 之含量(ppb)：

$$\text{檢體中赭麴毒素 A 含量(ppb)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中赭麴毒素 A 之濃度(ng/mL)

V：檢液之體積(mL)

M：檢液所含檢體量(g 或 mL)

高效液相層析測定條件：

螢光檢出器：激發波長 333 nm，發射波長 460 nm。

層析管：Cosmosil 5C 18-AR，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm。

移動相溶液：依 2.5.節所調製之溶液。

移動相流速：1.0 mL/min。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，咖啡為 0.5 ppb，酒類及葡萄汁為 0.2 ppb，米麥製品為 0.3 ppb。

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。