

藥物食品簡訊 月刊
第 288 期
日期：民國 93 年 12 月 20 日
王金茂 題

發行人：孫慈悌 出版者：行政院衛生署藥物食品檢驗局 地址：臺北市南港區昆陽街 161-2 號
電話：(02) 26531318 網址：http://www.nfcd.gov.tw

九十三年度市售畜禽水產食品中 殘留抗生素檢測結果出爐

為維護消費者飲食的安全，本局本年度已完成市售畜禽水產食品 152 件之檢測，結果其中 149 件合格，而不符規定者有 3 件，於 1 件豬肉、1 件鱒魚及 1 件吳郭魚中分別檢出氯黴素 0.014、0.009 及 0.014 ppm。

本次檢測之檢體種類包括豬肉、豬內臟、雞肉、雞內臟、魚類、蝦類、貝類、蟹類及鱒魚。檢體來源由各縣市衛生局至其轄區，以稽查方式取得，各類食品檢體抽驗件數及結果如表一。檢測項目包括氯黴素(chloramphenicol)、羥四環黴素(oxytetracycline, OTC)、氯四環黴素(chlortetracycline, CTC)、脫氧羥四環黴素(doxycycline, DC)、四環黴素(tetracycline, TC)、抗生物質及抗生素類別之篩檢。檢驗均依據衛生署公告方法進行，檢出不符規定者並經 LC/MS/MS 確認。

氯黴素是一種廣效性抗生素，過去經常被用來治療畜禽及魚類的感染性疾病，除具療效外亦有相當高的毒性。一般的烹煮並不能將其完全破壞，若經由飲食而進入人體，低濃度長期使用之結果可能導致抗藥性菌株之形成或過敏等現象，而作為治療藥物使用時，其副作用包括可能影響骨髓或紅血球之增生，甚而導致臨床上人體的再生性不良貧血。行政院農業委員會已公告氯黴素不得使用於食用動物。

上述 3 件檢測結果不符規定之供貨來源(表二)，已由原送驗衛生

局依食品衛生管理法限期改善，並函請農政機關加強源頭養殖戶用藥管理。經衛生局派員再行抽驗上述來源之豬肉及鱒魚，結果未檢出氯黴素，而台南縣衛生局送驗之吳郭魚養殖場，目前淨空中，暫不養殖。消費者選購上述產品時，應選擇貨源清楚者，權益較有保障。

表一、市售畜禽水產食品中殘留抗生素檢測檢體種類及件數

檢體種類	抽驗件數	不符規定件數
豬肉	15	1
豬內臟	10	0
雞肉	15	0
雞內臟	10	0
魚類	26	1
鱒魚	19	1
貝類	20	0
蝦類	19	0
蟹類	18	0
合計	152	3

表二、市售畜禽水產食品中檢出殘留氯黴素不符規定之檢體來源

序號	食品	送驗衛生局	抽樣地點	殘留量 (ppm)
1	豬肉	連江縣	連江縣南竿鄉復興村 175 號	0.014
2	鱒魚	苗栗縣	南庄鱒魚養殖場附設餐廳 苗栗縣南庄鄉蓬萊村二坪 14-1 號	0.009
3	吳郭魚	台南縣	統益海產城 台南縣七股鄉玉成村 2 號	0.014

市售大閘蟹中

抗生素及荷爾蒙之抽驗

本局為確實掌握市售大閘蟹是否有抗生素或荷爾蒙等動物用藥品殘留之情形，本(93)年度援例抽驗市售大閘蟹 30 件(來源見附表)，進行抗生素及荷爾蒙之檢驗。檢驗結果包括俗稱「土黴素」之羥四環黴素(oxytetracycline, OTC)、脫氧羥四環黴素(doxycycline, DC)、四環黴素(tetracycline, TC)、氯四環黴素(chlortetracycline, CTC)、氯黴素(chloramphenicol)，荷爾蒙己烯雌酚(diethylstilboestrol, DES)、二氫己烯雌酚(hexestrol, HEX) 均未檢出，抗生物質及抗生素類別之篩檢亦均呈陰性。

檢驗均依據衛生署公告之方法進行，其中抗生物質及抗生素類別檢測法之篩檢係屬微生物方法，氯黴素、四環黴素、羥四環黴素、氯四環黴素、脫氧羥四環黴素及荷爾蒙己烯雌酚、二氫己烯雌酚之檢測係 HPLC 方法。依據衛生署公告之「動物用藥殘留標準」，大閘蟹不得檢出上述各項抗生素或荷爾蒙。

為維護國人健康，本局今後仍將持續對市售大閘蟹進行檢測，惟建議消費者如要購買大閘蟹，選擇由貿易商合法進口，經過正規檢疫程序者，避免購買來路不明或走私貨，品質比較有保障。由於大閘蟹也可能含有寄生蟲或其他微生物，切勿生食，烹煮前先以清水及刷子把蟹身、爪和鉗清洗乾淨，徹底煮熟後方可食用。

附表、市售大閘蟹檢體來源及抽購地點

序號	來源	抽購地點
1	裕誠水產有限公司	遠百企業股份有限公司：台北市忠孝東路五段297號
2	裕誠水產有限公司	遠東愛買：台北市文山區景中街30巷12號
3	台北縣五股鄉五工六路53之2號	松青超市重慶分店：台北市大同區重慶北路一段30號B1
4	建億貿易有限公司	遠東百貨寶慶店：台北市中正區寶慶路22號B1
5	中央市場中央海產店(洪慶懷)	京廚餐廳有限公司：台北市中正區南昌路二段216號
6	聯柏企業(股)有限公司	家福股份有限公司：台北市士林區德行西路47號
7	喜兆魚市	台北市中山區民族東路410巷2弄18號
8	PC物流	善美的超市：台北市中山區吉林路26巷34號

9	惠康百貨股份有限公司	惠康北投分店：台北市北投區光明路220號
10	家福股份有限公司東興分店	台北市東興路45號
11	裕誠水產有限公司	遠百企業股份有限公司：台中市南區復興路一段359號B2
12	林慶瑜	大潤發流通事業股份有限公司：台中市忠明路499號
13	愷立開發有限公司	海力國際貿易有限公司：台中市柳川西路二段109號1樓
14	鄭俊利	福野精緻日本料理：台中市西區公益路69號
15	愷立開發有限公司	阿秋有限公司：台中市南屯區公益路二段252號
16	可士達實業有限公司	家福股份有限公司大墩分公司：台中市南屯區大墩路533號
17	延欣號	帥傑股份有限公司：台北市松山區敦化北路167號B1
18	福臨門餐廳股份有限公司	台北市松山區南京東路四段186號2樓
19	家樂福	高雄縣鳳山市林森路291號
20	家樂福	高雄縣鳳山市中山西路236號
21	大潤發	大潤發流通事業股份有限公司：台北市內湖區舊宗路一段128號
22	仝億海產	七二七小吃店：台北市內湖區成功路二段324巷2號
23	聯博股份有限公司	家福股份有限公司：台北市南港區南港路二段20巷5號
24	裕誠水產有限公司	惠康百貨股份有限公司：台北市南港區忠孝東路五段970號
25	欣諺企業有限公司	萬林台菜海鮮餐廳：台北市萬華區西藏路215號
26	台南海鮮	台北市士林區基河路130號B1
27	陳正鴻	太平洋崇光百貨股份有限公司：台北市大安區忠孝東路四段45號B2
28	萬豐樓海鮮餐廳	萬豐樓海鮮餐廳：台北市貴陽街二段158號
29	雄獅國際開發有限公司	雄獅國際開發有限公司：台北市北投區大業路264號
30	千業食品有限公司	北市金華街30之2號

食品用紙製容器之 衛生安全調查

為了解食品用紙製容器之衛生安全，本局於日前完成紙杯、紙碗、紙餐盒及紙餐盤共計100件檢體之調查檢驗，結果發現有4件不符合衛生標準，包括紙碗及紙餐盒各1件檢出不得添加之螢光增白劑；以及紙碗2件檢出不得使用於食品容器之化粧品用色素紅色六號。

本次調查係安排由各縣市衛生局於今年2月至7月期間，分赴轄區內紙容器廠商共52家抽驗國產及進口之食品用紙製容器，檢驗項目包括材質鑑別，鉛、鎘及螢光增白劑等材質試驗，以及模擬各種飲食方式進行溶出試驗，以檢驗有無不符規定之甲醛、砷、重金屬(以鉛計)及著色劑等有害物質溶出。檢驗結果除螢光增白劑及著色劑項目分別有2件檢體不符合衛生標準外，其他項目均合乎衛生標準。

檢驗不合格之4件紙容器中1件為大陸進口之成品紙碗，不合格原因為檢出化粧品用紅色六號色素；另外3件為自美國、芬蘭進口空白紙捲，再由國內廠商裁紙或印刷圖案加工為成品之紙碗及紙餐盒，其不合格原因為檢出螢光增白劑或化粧品用紅色六號色素(如附表)。

不少紙製食品容器外層或內面印有精美圖案以增加美觀，但內面所使用的印刷色素於盛裝高溫食物時會有可能溶出，更有色素不合規定之疑慮，故消費者不要選用內層印有圖案之紙製餐具，而廠商如打算印刷，則一定要使用符合我國規定之食用色素。

本次調查結果不符合衛生標準之紙容器，業經地方衛生機關依法處理並已輔導改善。相關資料已公布於藥物食品檢驗局網頁中(<http://www.nlfd.gov.tw>)，民眾可直接上網查詢，作為選購食品用紙製容器參考。

九十三年度檢驗紙製容器不合格表

編號	檢體名稱	不合格項目	製造廠名稱及地址	備註
1	紙碗	螢光增白劑	文勝企業股份有限公司 (台中市南屯區工業區 21 路 10 號 1F)	美國進口空白紙捲、國內裁紙、印刷、軋成型為成品
2	紙餐盒	螢光增白劑	泰洋實業股份有限公司 (台中縣大安鄉中松路 273 號)	芬蘭進口空白紙捲、國內裁紙、印刷、軋成型為成品
3	紙碗	化粧品用紅色六號	川林公司(台北市信義區 松德路 161 號 3 樓)	美國進口空白紙捲、國內裁紙、印刷、軋成型為成品
4	紙碗	化粧品用紅色六號	供應商：金孔雀商行(台 中縣北屯區北平路 1 號)	大陸進口成品

		北縣板橋市縣民大道 3 段 93 巷 9 號)	
--	--	-------------------------	--

市售花生粉及米漿中 黃麴毒素含量調查

為瞭解市售花生粉及米漿之黃麴毒素含量是否符合衛生標準，今(93)年本局於全國 25 個縣市之早餐店、傳統市場或超級市場抽驗 51 件花生粉及 75 件米漿，結果 45 件花生粉及所有米漿製品皆符合規定（明細請查閱藥檢局網頁 www.nlfd.gov.tw），但於 6 件無品牌之散裝花生粉中發現超出限量之黃麴毒素。經查原料來源，發現黃麴毒素污染量最高者係由中國大陸購得炒熟花生再攜至連江縣磨粉販售，檢出量高達 409 ppb，是規定限量（15 ppb）之 27 倍，另有 2 件則由錦新發食品有限公司自越南進口花生半成品再售予製造商磨粉供銷。

對於不合格之 6 件產品，已由轄區衛生局追查同批產品及其來源，依法查封銷毀。後續處理方面，除自中國大陸攜至連江縣販賣者已無法取得其他批次產品，其餘 5 件皆再抽得不同批次產品或原料，經檢驗其黃麴毒素含量，皆已符合規定。

長期攝食污染黃麴毒素食品可導致肝臟傷害，引起厭食及生長緩慢等症狀，累積量多時也可能致癌或致死。呼籲消費者選購花生粉及米漿時，選擇有品牌且信譽良好廠商之產品，不購食來源不明且無完整標示者，以確保自身及家人食的安全；而製造廠商亦應選購優良之花生原料進行加工，避免使用廉價之次等原料，同時注意及原料及半成品儲存時之溫溼度，如此才能確保產品之衛生安全、消費者權益及本身之商譽。

附表、93 年檢出黃麴毒素不合格之花生粉明細

品名	黃麴毒素(ppb)					抽購地點	製造廠商	原料供應商	原料生產地點
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	總量				
花生粉	402.6	6.3	ND	ND	408.9	劉水金 連江縣介壽村 174 號	陳世標 連江縣北竿鄉芹壁村 17 號之 1	陳世標 連江縣北竿鄉芹壁村 17 號之 1	中國大陸

花生粉	51.6	12.8	11.3	1.4	77.1	品珍香餅舖 雲林縣土庫鎮中山路 31 號	名陽食品行 嘉義縣大林鎮自強街 25 號	錦新發食品有限公司 嘉義縣大里鎮牌路里 51 號	越南
花生粉	27.0	8.6	ND	ND	35.6	邵氏花生加工廠 台南縣新市鄉潭頂村 284 號	余順豐農產加工廠 嘉義縣東石鄉蔦松村湖底 20~28 號	余順豐農產加工廠 嘉義縣東石鄉蔦松村湖底 20~28 號	國產
花生粉	18.5	5.4	ND	ND	23.9	臺北市 南門市場 203 號攤	侯麗琴 台北縣板橋市廣福路 124 號	錦新發食品有限公司 嘉義縣大里鎮牌路里 51 號	越南
花生粉	13.0	5.8	ND	ND	18.8	旭西餅舖 澎湖縣湖西鄉湖西村 125 號	洪志強 澎湖縣湖西鄉龍門村 56-3 號	信昌食品加工場 雲林縣土庫鎮馬光信義街 27 巷 34 號	國產
花生粉	13.2	3.6	ND	ND	16.8	興億行 高雄縣鳳山市維新路 71 號	盧文生 高雄縣大寮鄉中庄村八德路 22 號	東和商行 地址不詳	東南亞

1. ND 表示未檢出
2. 花生製品之黃麴毒素限量為 15 ppb (黃麴毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 之總和)

玉米及其製品中伏馬毒素 B₁ 和 B₂ 之污染及檢驗

劉芳銘

伏馬毒素為一群由鐮刀菌屬 (*Fusarium spp.*) 黴菌中之 *F. moniliforme* 及 *F. proliferatum* 所產生之真菌毒素，依化學官能基之不同可區分為伏馬毒素 A₁、A₂、B₁、B₂、B₃ 及 B₄，其中又以 B₁ 及 B₂ 最為重要。各種穀物包括玉米、高粱、稻米和小麥等都可能受到鐮刀菌屬黴菌感染以致產生伏馬毒素。臨床上引起包括馬匹的腦白質部軟化症 (equine leukoencephalomalacia, ELEM)，豬隻肺水腫 (porcine pulmonary edema, PPE)，動物的肝病變、肝癌及腎臟疾病，對禽類則會干擾免疫系統及造成肝腎的傷害、生長遲滯或死亡等。對人類可能造成食道癌發生率較高之重要影響因子。由於伏馬毒素對人體的影響仍待進一步證實，而世界各國對食品中伏馬毒素含量之限量規範，仍在建議階段，如美國對於食用玉米及玉米製品中的伏馬毒素總量之建議限量 (advisory levels)，依玉米製品種類之不同而不同，其範圍涵蓋 2~4 ppm；而瑞士針對玉米中的伏馬毒素總量暫訂限量 (provisional levels) 則設定為 1 ppm。對於伏馬毒素之檢驗方法亦已有許多文獻報導，以下茲就 Journal of AOAC International 及本局之研

究報告中有關伏馬毒素之檢驗，摘譯整理如下：

一、適用範圍：本方法適用於玉米及其製品中伏馬毒素 B₁ 及 B₂ 之檢驗。

二、檢驗方法：高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。

(一) 裝置：

1. 高效液相層析儀：
 - a. 檢出器：具有激發波長 335 nm 及發射波長 440 nm 之螢光檢出器 (Fluorescence detector)。
 - b. 層析管：RP-18, 5 μm, 內徑 4.6 mm × 25 cm, 或同級品。
2. 離心機 (Centrifuge): 可達 2,500 × g 者。
3. 酸鹼值測定儀 (pH meter)。
4. 超音波振盪器 (Ultrasonicator)。
5. 蒸發器 (Evaporator): 具氮氣吹乾裝置。
6. 均質機 (Homogenizer)。

(二) 試藥：

甲醇及乙腈採液相層析級，磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate dihydrate)、鄰苯二甲醛 (o-phthalaldehyde)、乙硫醇 (2-mercaptoethanol)、四硼酸二鈉 (sodium tetraborate)、無水磷酸氫二鈉 (disodium hydrogen phosphate anhydrous)、磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate)、鹽酸、磷酸、氯化鈉、氯化鉀採用化學試藥特級，伏馬毒素 B₁ 及 B₂ (fumonisin B₁ and B₂) 對照用標準品。

(三) 器具及材料^(註)：

1. 離心管 (Centrifuge tube): 50 mL, 附 PP 材質之螺旋蓋。
2. 均質杯：不銹鋼材質，50 mL 以上。
3. 濾紙：直徑 12 cm。
4. 玻璃纖維濾紙：直徑 9 cm。
5. 玻璃過濾器 (Glass filter holder)。
6. 容量瓶 (Volumetric flasks)。
7. 免疫親和性管柱 (Immunoaffinity column): 採用內含對伏馬毒素具有專一性單株抗體之 Vicam 管柱或同級品。
8. 濾膜：孔徑 0.45 μm, nylon 材質。
9. 針筒過濾器 (Syringe filter): 濾膜孔徑 0.45 μm, 鐵氟龍材質。

註：裝置或操作伏馬毒素或含有伏馬毒素之檢液時，應使用褐色或不透光之器具。

(四) 試劑之調製：

1. 0.1 M 磷酸二氫鈉溶液：

取磷酸二氫鈉 15.6 g, 溶於 1 L 之水。
2. 0.1 M 四硼酸二鈉溶液：

取四硼酸二鈉 3.8 g, 溶於 1 L 之水。
3. 萃取溶液：

將乙腈、甲醇及水以 1:1:2 (v/v) 比例混勻。
4. 磷酸緩衝溶液 (Phosphate-buffered saline, PBS):

取氯化鈉 8 g，無水磷酸氫二鈉 1.2 g，磷酸二氫鉀 0.2 g 及氯化鉀 0.2 g，加水 990 mL，以 2 M 鹽酸溶液調整 pH 值 7.0，以水定容至 1 L。

5. 移動相溶液：

將甲醇及 0.1 M 磷酸二氫鈉溶液以 77:23 (v/v) 比例混勻，以磷酸調整 pH 至 3.35 後，以濾膜過濾，濾液以超音波振盪除氣 30 min 後供作移動相溶液。

6. 鄰苯二甲醛試劑^(註) (OPA 試劑)：

取鄰苯二甲醛 40 mg 溶於甲醇 1 mL，續以 0.1 M 四硼酸二鈉溶液 5 mL 稀釋，再加入乙硫醇 50 μ L 混勻；將 OPA 試劑置在有蓋之避光小瓶中，於室溫下可保存一週，另亦可使用市售 OPA 試劑。

7. 乙腈溶液：

乙腈及水以 1:1 (v/v) 比例混勻。

(五) 標準溶液之配製：

精確量取伏馬毒素 B₁ 及 B₂ 標準品並以乙腈溶解，使其濃度為 100 ppm，供作標準原液。使用時再以乙腈溶液稀釋至 0.1~10 ppm，供作標準溶液。

(六) 檢液之調製：

1. 萃取：

將玉米及其製品磨碎後混勻備用，原屬粉狀者則直接混勻備用。取檢體約 20 g，精確稱定，置均質杯中，加入萃取溶液 50 mL，均質 2 分鐘，續以 2,500 \times g 離心 10 分鐘，以濾紙過濾上清液，再取萃取溶液 50 mL，重複均質、離心及過濾步驟。

2. 淨化：

合併兩次萃取液，並以定量瓶定容至 100 mL，精確量取 10 mL 置 50 mL 離心管中，加入 PBS 溶液 40 mL 混勻，混合液以玻璃纖維濾紙過濾，精確量取濾液 10 mL，以每秒一滴之流速通過免疫親和性管柱，再以 PBS 洗液 10 mL 清洗。將管柱內水分排淨後，取甲醇 1.5 mL，以每秒 1~2 滴流速沖提，收集沖提液，續以氮氣吹乾，再以乙腈溶液 200 μ L 溶解後，經針筒過濾供作檢液。

(七) 衍生物之調製

精確量取標準溶液或檢液 50 μ L 於褐色或避光之玻璃瓶中，加入 OPA 試劑 50 μ L，振盪混勻約 30 秒，經衍生化反應 3 分鐘後即為衍生物，應隨即進行高效液相層析分析。

(八) 檢量線之製作：

精確量取標準原液或適當濃度之標準溶液添加於檢體 20 g 中，使其中伏馬毒素之濃度為 0.025~5 ppm，按照第 (六) 節檢液調製之相同操作，得到各種濃度之添加分析檢液，續依 (七) 調製衍生物。精確量取衍生物 20 μ L 注入高效液相層析儀中，參照下述層析條件進行分析，就各波峰面積與對應檢液之伏馬毒素濃度，製作檢量線。

高效液相層析測定條件：

層析管柱：RP-18，5 μ m，內徑 4.6 mm \times 25 cm。

螢光檢出器：激發波長 335 nm，發射波長 440 nm。

移動相溶液：依第 (四)、5 節所調製之溶液。

移動相流速：1.0 mL/min。

(九) 鑑別試驗與含量測定：

標準溶液及檢液各別經衍生生化反應後，立即精確量取衍生物 20 μL 注入高效液相層析儀中，參照第(八)節層析條件進行分析。就衍生生化檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依檢量線求出檢體中伏馬毒素 B_1 或 B_2 之含量。

$$\text{檢體中伏馬毒素含量 (ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得衍生生化後檢液中伏馬毒素之濃度 (ppm)。

V：衍生生化後檢液之體積 (mL)。

M：製備衍生生化檢液之檢體重量 (g)。

- 備註：1. 本檢驗方法之最低檢出限量，伏馬毒素 B_1 及 B_2 分別為 0.03 及 0.07 ppm。
 2. 伏馬毒素-OPA 衍生物於 3 分鐘後螢光即逐漸退化，所以必須確實控制伏馬毒素和 OPA 試劑混合至注入液相層析系統中之時間。
 3. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。

參考文獻：

1. Viscoti, A., Solfrizzo, M. and Girolamo, A. 2001. Determination of fumonisins B_1 and B_2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study. J. AOAC Intern. 84:1828-1837.
2. 劉芳銘、陳珮菁、傅幼敏、施養志。2002。食品中真菌毒素背景值之建立-伏馬毒素。計畫編號 DOH91-FD-2069。行政院衛生署藥物食品檢驗局。

利用 PCR

篩選食品中之動物性成分

闕麗卿

除蛋奶素食外，一般標示素食之食品，係表示僅含植物性原料且不含動物性原料的食品，倘添加動物性肉漿、油脂、湯汁、萃取物或濃縮物等皆不得標示為素食食品。基於宗教、健康、經濟或保護生態環境等動機，全球素食人口比例漸增，國內則約有 250 萬人。為因應市場需要，近年來素食食品不斷推陳出新，走向更多元化與精緻化。加工業者無不絞盡腦汁，研發出各式仿葷食食品。目前市面上之素食火腿、貢丸、魚排、雞

塊、香腸、熱狗、肉排等產品，外型及口味模仿地唯妙唯肖，與葷食幾無差別，因此消費者心理常存疑惑，這些吃下肚裡的素食到底是真素食還是偽素食？

有鑑於此，本局食品微生物學組之 GMO 小組除著力於基因改造食品檢驗方法之研發外，於今(93)年三月底接受關懷生命協會之委託，針對市售素食食品進行攙偽之檢驗。該小組運用既有之知識與技術基礎，發揮團隊精神，在短短二個月內，建立植物性食品中動物性成分之定性篩選檢驗方法，並針對市售之素食食品進行調查，並於 6 月 10 日發佈新聞，經國內新聞媒體大幅報導相關訊息，引起消費大眾極度關切。茲將本檢驗方法之適用範圍、原理及步驟詳述如下，冀供各界參考應用。

一、適用範圍：本檢驗方法適用於食品中含動物性成分之定性篩選檢驗。

二、原理：聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)。

三、檢驗方法

(一) 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體 DNA 抽取、PCR 試劑配製及 PCR 等實驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。PCR 試劑之配製應於無菌操作台內進行。

(二) 裝置^(註 1)

1. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
3. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。
4. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。
5. 微量冷凍離心機：可達 20,000 × g，並具 4°C 溫控功能。
6. 離心機：供各式離心管離心用。
7. 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。
8. 即時聚合酶鏈反應器^(註 2)：ABI PRISM 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler，或同級品。
9. 電泳槽：供 DNA 電泳用。
10. 振盪型粉碎機。
11. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。
12. 紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。
13. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
14. 高壓滅菌釜。
15. pH 測定儀。
16. 水浴裝置：溫差在±1.0°C 以內者。
17. 天平：最大秤重量為 2,000 g，靈敏度為 0.1 g；最大秤重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。
18. 無菌操作台。

本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或

註 1：提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

註 2： 確認試驗用。

(三) 試藥

1. DNA 抽取用：RNase、乙醇 (96-100%)均採分子生物分析級試藥，DNeasy[®]Tissue 套組。

2. 聚合酶鏈反應(PCR)用

(1) 鑑別試驗用引子^(註 3)

i 動物類 (標的基因：16S ribosomal RNA)

引子 F：SF，5'-AAGACGAGAAGACCCT(A/G)TGGA(A/G)CTTTA-3'

引子 R：SR，5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'

PCR 增幅產物大小 234-265 bp

ii 哺乳類及家禽類 (標的基因：myostatin)

引子 F：MYF，5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'

引子 R：MYR，5'-ATACCAGTGCCTGGGTTTCAT-3'

PCR 增幅產物大小 97 bp

(2) 確認試驗用引子及探針^(註 4)

i 動物類 (標的基因：16S ribosomal RNA)

引子 F：SF，5'-AAGACGAGAAGACCCT(A/G)TGGA(A/G)CTTTA-3'

引子 R：SR，5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'

探針 P：SP，5'-(FAM)-TT(C/T)GGTTGGGGTGACCTCGG(A/G)GT-(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 234-265 bp

ii 哺乳類及家禽類 (標的基因：myostatin)

引子 F：MYF，5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'

引子 R：MYR，5'-ATACCAGTGCCTGGGTTTCAT-3'

探針 P：MYP，5'-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTG-(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 97 bp

註 3： 合成之引子，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20℃貯存備用。

註 4： 合成之探針，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20℃貯存備用，探針需避光保存。探針 5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記。

(3) 去氧核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)
含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP), 去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP), 去氧鳥糞嘌呤三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP) 及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。

(4) 聚合酶

Taq DNA polymerase (2 U/ μ L), 或同級品。

(5) TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用, 適用於 ABI PRISM 7700)

內含 PCR 所需去氧核苷三磷酸、聚合酶等試劑, 使用者僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可。

(6) LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (確認試驗用, 適用於 Roche LightCycler)

內含 PCR 所需去氧核苷三磷酸、聚合酶等試劑, 使用者僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可。

3. 電泳用試藥: 溴化乙錠(ethidium bromide)、瓊膠(agarose)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯藍(xylene cyanol FF)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)、三羥甲基氨基甲烷(tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris))、甘油、硼酸, 均採分子生物分析級試藥。DNA 分子量標記物質 (DNA molecular weight marker): 100-bp DNA Ladder Marker。

4. 對照用物質: 肉類、血液及其組織器官等皆可, 或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號 pIDM2 之參考質體作為對照用物質。

(四) 器具及材料^(註 5)

1. 吸管(Pipette): 10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2. 電泳膠片製作盤。

3. 吸管尖頭(Pipette tips): 10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

4. 離心管: 200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。

5. PCR 反應管: 200 μ L 及 500 μ L。

6. PCR 玻璃毛細管^(註 6): Roche LightCycler 專用。

7. 玻璃或塑膠瓶: 50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。

8. 塑膠離心管: 50 mL。

9. 過濾膜: 孔徑為 0.45 μ m, 材質為 nitro-cellulose。

註 5: 使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

註 6: 儀器使用 Roche LightCycler 時, 才需使用。

(五) 試劑之配製

1. 5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷 54.0 g、硼酸 27.5 g 及 0.5 M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解後定容至 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以水稀釋為 0.5 倍。

2. 2% 膠片

稱取瓊膠 2.0 g，加入 0.5 倍 TBE 緩衝溶液 100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，適當冷卻後，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

3. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)

稱取溴酚藍 25.0 g、二甲苯藍 0.25 g 及量取甘油 30 mL，加入無菌純水使成 100 mL，並置於 4°C 冰箱貯存備用。

4. 膠片染液

稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(含溴化乙錠 10 mg/mL)，使用前需以水稀釋成含溴化乙錠 1 µg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

5. PCR 溶液^(註 7)

(1) 鑑別試驗用

10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 15 mM MgCl ₂).....	2.5 µL
Taq DNA polymerase (2 U/µL).....	1.0 µL
2.5 mM dNTP.....	4.0 µL
10 µM 引子 F	1.0 µL
10 µM 引子 R	1.0 µL
模版 DNA 溶液 (總量 100 ng).....	5.0 µL
無菌純水	10.5 µL
總體積.....	25.0 µL

(2) ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用

5 µM 引子 F	1.25 µL
5 µM 引子 R	1.25 µL
3.3 µM 探針 P	1.7 µL
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5 µL
模版 DNA 溶液 (總量 100 ng).....	5.0 µL
無菌純水	3.3 µL
總體積.....	25.0 µL

(3) Roche LightCycler 確認試驗用

5 μ M 引子 F	1.5 μ L
5 μ M 引子 R	1.5 μ L
3.3 μ M 探針 P	1.5 μ L
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	2.0 μ L
25 mM MgCl ₂ 溶液	2.4 μ L
模版 DNA 溶液 (總量 100 ng)	5.0 μ L
無菌純水	6.1 μ L
總體積	20.0 μ L

註 7：PCR 溶液應置於冰浴中配製。

(六) 檢體 DNA 之製備

1. 檢體之處理

檢體為乾燥肉乾或粉(碎)狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀肉塊或肉加工品，經冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。檢體需貯存於乾燥及冷藏或冷凍環境中。

2. DNA 之抽取

採用 DNeasy[®]Tissue 套組及內附試劑、材料 (ATL 試劑、proteinase K 試劑、AL 試劑、離心管柱(DNeasy spin column)、收集管、AW1、AW2 與 AE 試劑)，亦可採用其他市售套組。

- (1) 稱取檢體約 25 mg^(註 8)，置入 2 mL 離心管。
- (2) 加入 ATL 試劑 180 μ L 以及 proteinase K 20 μ L，以旋渦混合器混合均勻。
- (3) 於 55°C 振盪反應直到檢體溶解。
- (4) 加入 AL 試劑 200 μ L，以旋渦混合器混合均勻。
- (5) 水浴 70°C，10 分鐘。
- (6) 加入乙醇(96-100%) 200 μ L，以旋渦混合器混合均勻。
- (7) 取混合液注入離心管柱，以 $\geq 6,000 \times g$ (8,000 rpm) 離心 1 分鐘，並將收集管及濾液丟棄。
- (8) 將離心管柱套入新的收集管，注入 AW1 試劑 500 μ L 到離心管柱，以 $\geq 6,000 \times g$ (8,000 rpm) 離心 1 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。
- (9) 將離心管柱套入新的收集管，注入 AW2 試劑 500 μ L 到離心管柱，以 $20,000 \times g$ (14,000 rpm) 離心 3 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。
- (10) 將離心管柱套入新的 1.5 mL 離心管。
- (11) 加入 AE 試劑 100 μ L 至離心管柱，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以 $\geq 6,000 \times g$ (8,000 rpm) 離心 1 分鐘。
- (12) 再加入 AE 試劑 100 μ L，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以 $\geq 6,000 \times g$ (8,000 rpm) 離心 1 分鐘。

(13) 將溶出液 (約 200 μ L) 收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為萃取 DNA 原液。

(14) 依(六)3. 節測量 DNA 濃度並記錄後，置於 -20°C 冷凍保存。

註 8：抽取脾臟等含細胞數量眾多的組織 DNA，秤取量不可超過 10 mg。抽取肝臟或腎臟等含豐富 RNA 的組織 DNA，於步驟(六)2. 4. 之後加入 RNase (100 mg/mL) 4 μ L，混合均勻後於室溫下靜置 2 分鐘。

3. DNA 濃度測定及純度判斷

(1) 檢體 DNA 溶液於使用前自冷凍庫中取出，於室溫下進行溶解。

(2) 取適當量之 DNA 溶液以無菌純水做適當倍數之稀釋，分別測定 260 nm 及 280 nm 之吸光值(O. D.)。計算 DNA 濃度係以 O. D. ₂₆₀ 吸光值乘 50 ng/ μ L 即為 DNA 溶液濃度。DNA 溶液純度則以 O. D. ₂₆₀ / O. D. ₂₈₀ 比值作判斷，其比值應介於 1.7~2.0 間。

(七) 鑑別試驗^(註 9)

1. PCR 操作步驟

以無菌純水適當稀釋 DNA 溶液、引子備用。取 PCR 反應管，並依照(五)5. 1. 節配製 PCR 溶液，依序加入無菌純水、10 倍 PCR 緩衝液、dNTP、引子、DNA polymerase 及 DNA 溶液，混合均勻後，將反應管置於離心機瞬間離心，使混合液聚積於反應管之底部。移入 PCR 反應器，依據引子類別並參照(七)2. 節設定反應條件，進行反應，結束後，取出 PCR 增幅產物，進行電泳分析。

2. PCR 條件

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95 $^{\circ}\text{C}$	5 min
2. 變性	95 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
3. 黏接		
測試動物類基因	60 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
測試哺乳類及家禽類基因	54 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
4. 延展	72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應		
5. 最終延展	72 $^{\circ}\text{C}$	7 min

3. 膠片電泳分析

取適量之 6 倍載入膠片緩衝溶液，分別與無菌純水(空白組)及 PCR 增幅產物混合均勻，注入 2%膠片孔中，以 50 或 100 伏特電壓進行電泳。同時，必須取 DNA 分子量標記物質進行電泳，作為 PCR 增幅產物大小之判別與計算依據。經電泳後之膠片置入膠片染液中進行染色約 15 分鐘，續置入水中漂洗及褪染，再置於紫外燈箱上，以波長 365 nm 之紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，並判讀結果。每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組。

4. 鑑別

測試動物類基因：

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，須與正反應對照組及 DNA 分子量標記物質之電泳結果進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組 DNA 二者皆出現 PCR 增幅產物，且經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小介於 234-265 bp 者^(註 10)，即判定該檢體含有動物性成分。

測試哺乳類及家禽類基因：

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，須與正反應對照組及 DNA 分子量標記物質之電泳結果進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組 DNA 二者皆出現 PCR 增幅產物，且經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小為 97 bp 者，即判定該檢體含有哺乳類或家禽類動物性成分。

註 9： PCR 鑑別試驗結果之判讀係以 PCR 增幅產物大小判定，當測試結果判讀困難時，建議進行確認試驗。本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行檢討反應條件。

註 10： 動物類基因之 PCR 增幅產物大小介於 234-265 bp 者，皆為正反應。

(八) 確認試驗：本實驗視需要而操作之。

1. PCR 操作步驟

(1) 即時聚合酶鏈反應(Real-time PCR)—ABI PRISM 7700 Sequence Detector

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 溶液、引子及探針備用。取適量無菌純水，並依照(五)5.2. 節配製 PCR 溶液，依序加入 Master Mix、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 20 μ L 入 PCR 反應管中，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 溶液 5 μ L，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 \times g (1,500 rpm) 瞬間離心，移入即時聚合酶鏈反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作負反應及正反應對照組。

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	50°C	2 min
2. 最初變性	95°C	10 min
3. 變性	95°C	15 sec
4. 黏接、延展		
測試動物類基因	60°C	1 min
測試哺乳類及家禽類基因	54°C	1 min
步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。		
5. 冷卻	35°C	45 sec

(2) 即時聚合酶鏈反應(Real-time PCR)–Roche LightCycler

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 溶液、引子及探針備用。取適量無菌純水，並依照(五)5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入

LightCycler–FastStart DNA Master Hybridization Probes、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 15 μ L 於玻璃毛細管中，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 5 μ L，最後將毛細管置於離心機中，以 800 \times g (3,000 rpm) 瞬間離心，移入即時聚合酶鏈反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作負反應及正反應對照組。

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	10 min
2. 變性	95°C	5 sec
3. 黏接		
測試動物類基因	60°C	25 sec
測試哺乳類及家禽類基因	54°C	25 sec
4. 延展	72°C	8 sec
步驟 2 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。		
5. 冷卻	35°C	45 sec

2. 即時聚合酶鏈反應螢光分析

檢體 DNA 經即時聚合酶鏈反應後，直接從即時聚合酶鏈反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組。

3. 確認

測試動物類基因：

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物螢光分析圖須與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 PCR 螢光分析圖，皆出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 PCR 增幅產物為動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有動物性成分。

測試哺乳類及家禽類基因：

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物螢光分析圖須與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 PCR 螢光分析圖，皆出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 PCR 增幅產物為哺乳類或家禽類動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有哺乳類或家禽類動物性成分。

4. 判定（附圖）

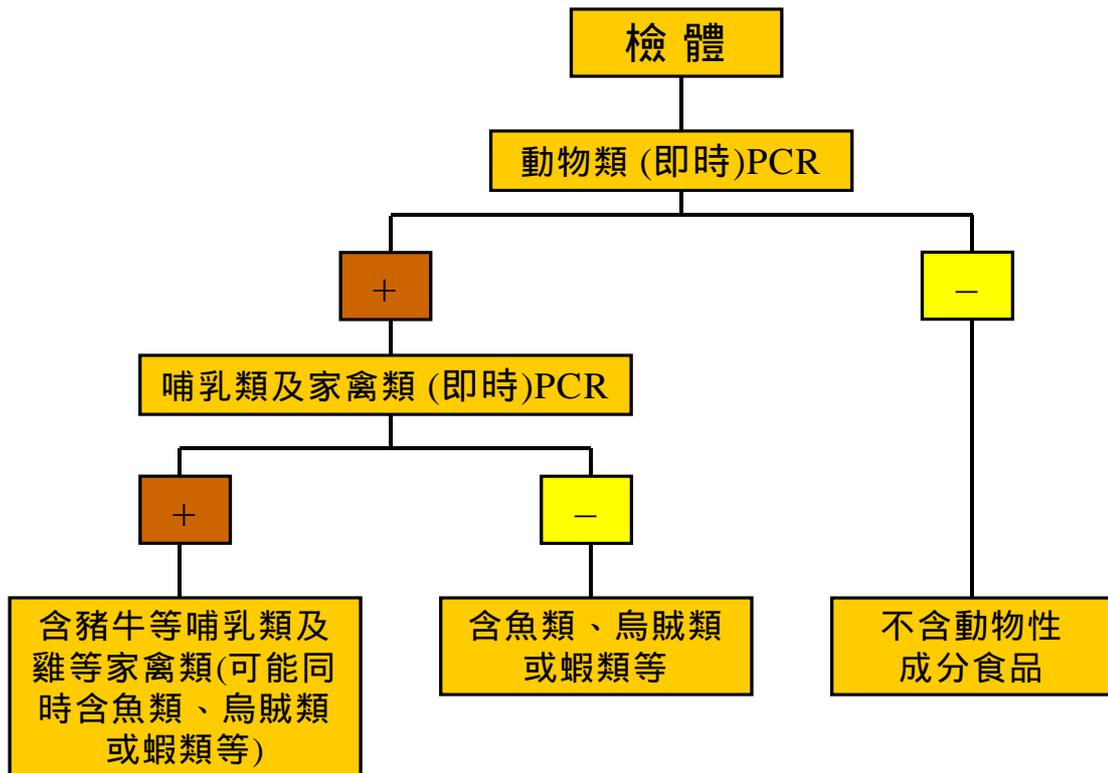
- (1) 以 PCR 或即時 PCR 測試為動物類正反應，及以 PCR 或即時 PCR 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，表示含豬牛等哺乳類及雞等家禽類動物性成分，及可能同時含魚類、烏賊類或蝦類等動物性成分。
- (2) 以 PCR 或即時 PCR 測試為動物類正反應，及以 PCR 或即時 PCR 測試為哺乳類及家禽類負反應，表示可能含魚類、烏賊類或蝦類等動物性成分。
- (3) 以 PCR 或即時 PCR 測試為動物類負反應，表示不含動物性成分。

備註：1. 本 PCR 定性檢驗方法之最低檢測濃度為 0.1%（以乾重計）。

2. 本檢驗方法之測試範圍係指能夠抽取出 DNA 者之食品，經過高度加工或不含 DNA 之食品不適用於本檢驗方法。

參考文獻

1. Laube, I., Butschke, A., Zagon, J., Spiegelberg, A., Schauzu, M., Bögl, K. W., Kroh, L. W. and Broll, H. 2002. Detection method to identify beef in foods by the TaqMan™-technology. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz. pp.1-25.
2. Bottero, M. T., Dalmaso, A., Nucera, D., Turi, R. M., Rosati, S., Squadrone, S., Gorla, M. and Civera, T. 2003. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. J. Food Prot. 66: 2307-2312.
3. 闕麗卿，陳育志，李春賢，崔秀煒，李信興，張源鑫，吳宗熹，施養志。2003。以同步聚合酵素鏈反應法(TaqMan 螢光探針系統)快速鑑別豬、牛、羊、馬、鹿、袋鼠肉製品及其市售產品調查。行政院衛生署九十二年度自行研究計畫報告。計畫編號：DOH92-FD-2076。



附圖、食品中動物性成分之定性篩選檢驗流程

藥物食品檢驗局

十一月份大事記

11 月 1 日 薦任技士吳亭瑤赴德國考察生理監視器類醫療器材之風險評估與管理，為期十天。

11 月 4 日 組長林哲輝及科長潘志寬赴大陸考察「大陸中藥品質管制技術與機制」，為期八天。

- 11 月 5 日 組長鄒玫君及技正王博譽赴美國參加「2004 年美國藥劑學家年會」，為期九天。
- 11 月 12 日 發布「市售花生粉及米漿中黃麴毒素」新聞。
- 11 月 19 日 技士王德原、周清邦二員赴加拿大參加「生物安全第三等級圍堵設施設計及操作研習」。
- 11 月 23 日 發布「食品用紙製容器之衛生安全調查」新聞。
- 11 月 26 日 邀請中央研究院分子生物所姚孟肇所長蒞局，就「四膜蟲基因體重組的機制及應用」專題演講。
- 11 月 30 日 發布「市售大閘蟹中抗生素及荷爾蒙之抽驗」

藥物食品簡訊投稿須知

- 一、本刊歡迎有關藥物食品檢驗與稽查，暨有關法令之異動消息等稿件，惟不接受轉載國內其他刊物之文章。
- 二、投稿如係譯述，請隨稿附原文以便查對，如係參考多篇文獻整理而得，請列明主要參考文獻。
- 三、本刊編輯委員會有權修改來稿，惟如做重大修改，將於徵得投稿人同意後，方行刊載，不同意者請事先聲明。
- 四、投稿請以 MS word 繕打並存成電子檔，插圖請提供清晰之圖片或掃描成電子檔，以便排版刊出，未獲選用之文章，當即退回。
- 五、本刊稿酬每千字一般撰稿七百元，特別撰稿一千元，特別譯稿九百元，凡經本刊發表之文章，得彙編成藥物食品叢書，不另計酬亦不辦理投稿人同意手續。
- 六、投稿請寄臺北市南港區昆陽街 161 之 2 號，藥物食品檢驗局圖書室或以 e-mail service@nlfd.gov.tw 傳送。