

木薯製品中總氫氰酸之檢驗方法(二)

Method of Test for Total Hydrocyanic Acid in Cassava Products (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於木薯粉及即食木薯片中總氫氰酸(total hydrocyanic acid)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經酵素水解、蒸餾及衍生化後，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：Atlantis[®] T3, 3 μm ，內徑2.1 mm \times 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 攪拌均質機(Blender)。
 - 2.1.3. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.1.4. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.5. 水浴(Water bath)：具溫度控制，可振搖。
 - 2.1.6. 蒸餾裝置(Distillation apparatus)。
 - 2.2. 試藥：氫氧化鈉、檸檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)及偏硼酸鈉($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)均採用試藥級；萘-2,3-二甲醛(2,3-naphthalenedicarboxaldehyde, NDA)及牛磺酸(taurine)為試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；亞麻苦苷酶(linamarase, 0.21 U/mg)；氰離子對照用標準品(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 蒸餾瓶：500 mL。
 - 2.3.2. 容量瓶：10 mL、25 mL及100 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.45 μm ，Nylon材質。
 - 2.3.4. 樣品瓶：1.8 mL，褐色，玻璃材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 0.1 M檸檬酸溶液：

稱取檸檬酸2.19 g，以去離子水溶解使成100 mL。
 - 2.4.2. 0.5 M氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉2 g，以去離子水溶解使成100 mL。
 - 2.4.3. 檸檬酸緩衝溶液：

稱取檸檬酸12.81 g及氫氧化鈉6.44 g，以去離子水溶解使成

1000 mL，以0.1 M檸檬酸溶液或0.5 M氫氧化鈉溶液調整pH值至5.9。

2.4.4. 0.625 M氫氧化鈉溶液

稱取氫氧化鈉2.5 g，以去離子水溶解使成100 mL。

2.4.5. 0.0625 M氫氧化鈉溶液：

取0.625 M氫氧化鈉50 mL，加去離子水使成500 mL。

2.4.6. 亞麻苦苷酶溶液：

稱取適量亞麻苦苷酶，以檸檬酸緩衝溶液稀釋至4 U/mL。

2.4.7. 0.1 M磷酸鹽緩衝溶液：

稱取磷酸二氫鉀3.4 g、磷酸氫二鉀4.35 g及偏硼酸鈉3.45 g，以去離子水溶解使成500 mL。

2.4.8. 0.05 M牛磺酸溶液：

稱取牛磺酸0.626 g，以0.1 M磷酸鹽緩衝溶液溶解使成100 mL。

2.4.9. 0.002 M NDA溶液：

稱取NDA 36.8 mg，以甲醇40 mL溶解，再加入0.1 M磷酸鹽緩衝溶液使成100 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

稱取磷酸二氫鉀1.7 g及磷酸氫二鉀2.17 g，以去離子水溶解使成500 mL，再加入甲醇500 mL，混合均勻並冷卻至室溫，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

精確量取氫離子對照用標準品1 mL，以0.0625 M氫氧化鈉溶液定容至100 mL，作為標準原液。臨用時取適量標準原液，以0.0625 M氫氧化鈉溶液稀釋至0.025~1 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 衍生化標準溶液之配製：

精確量取標準溶液各500 µL於樣品瓶中，分別加入0.05 M牛磺酸溶液及0.002 M NDA溶液各100 µL，混合均勻，於室溫下避光反應30分鐘，供作衍生化標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 酵素水解及蒸餾

將檢體均質混勻後，取約2.5 g，精確稱定，置於蒸餾瓶中，加入檸檬酸緩衝溶液50 mL及亞麻苦苷酶溶液1 mL，以軟塞塞緊蒸餾瓶，旋渦混合，於38°C水浴以150 rpm振搖4小時。接續進行水蒸氣蒸餾^(註)，其冷凝管末端須浸入已盛有0.625 M

氫氧化鈉溶液10 mL之100 mL容量瓶液面下，以每分鐘約20 mL之速度收集蒸餾液約達80 mL，停止蒸餾，以去離子水定容，經濾膜過濾後，供作衍生化用溶液。

2.8.2. 衍生化反應

取2.8.1.衍生化用溶液500 μ L於樣品瓶中，以下步驟同2.7.節操作，供作檢液。

註：蒸餾速率可依所使用之儀器，設定適合之速率條件，惟須經方法確效。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及衍生化標準溶液各1 μ L，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析。就檢液及衍生化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總氫氰酸之含量(mg/kg)：

$$\text{檢體中總氫氰酸之含量(mg/kg)} = \frac{C \times V \times 1.0387}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中氰離子之濃度(μ g/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

1.0387：氰離子與氫氰酸之轉換係數

高效液相層析測定條件^(註)：

螢光檢出器：激發波長418 nm，發射波長460 nm。

層析管：Atlantis[®] T3，3 μ m，內徑2.1 mm \times 10 cm。

層析管溫度：30°C。

移動相溶液：依2.5.節所調製之溶液。

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：1 μ L。

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。

附註：1. 本檢驗方法之定量極限為1 mg/kg。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

3. 本檢驗方法可使用亞麻苦苷(linamarin)作為品管查核標準品。

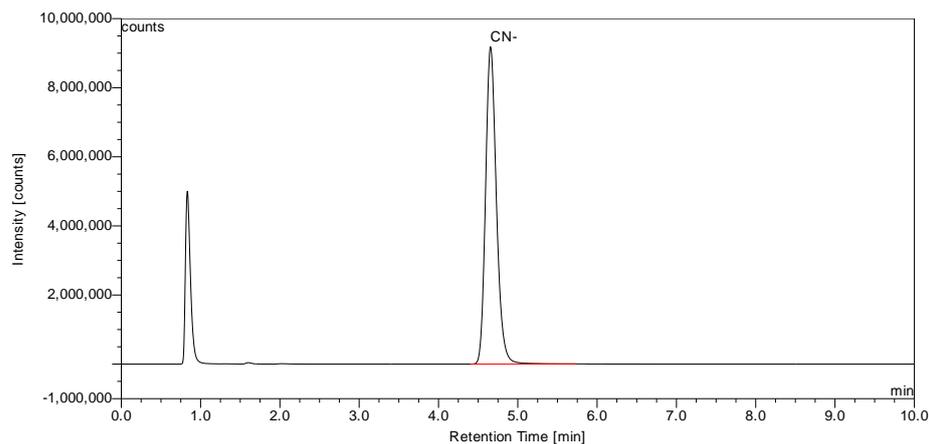
參考文獻：

1. 厚生労働省。2002。シアン化合物が検出されたタピオカでん粉の取扱いについて。平成14年11月21日食基発第1121001号、

食監發第1121001号。

2. Beek, W. M. J. and de Jong, J. 2011. Animal feedingstuffs – determination of hydrocyanic acid by HPLC: results of the collaborative study. Mandate 382 to CEN/TC 327. RIKILT – Institute of Food Safety, the Netherlands.

參考層析圖譜



圖、氰離子標準品經衍生化後之HPLC圖譜