

# 食品中黴菌毒素檢驗方法－乳製品中黃麴毒素 M<sub>1</sub> 之檢驗修正總說明

為加強天然毒素之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中黴菌毒素檢驗方法－乳製品中黃麴毒素 M<sub>1</sub> 之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、「裝置」刪除未使用到之「酸鹼值測定儀」，另增列「真空固相萃取裝置」。
- 二、「試藥」刪除未使用到之「氫氧化鈉」。
- 三、「器具及材料」刪除未使用到之「玻璃過濾器」及「針筒過濾器」，另修正濾膜材質。
- 四、「移動相溶液之調製」刪除未使用到之「氫氧化鈉溶液」。
- 五、修正「標準溶液之配製」之濃度範圍。
- 六、「檢液之調製」修正液狀乳、粉狀乳、醱酵乳之萃取及淨化步驟。
- 七、修正「鑑別試驗與含量測定」，另將「高效液相層析測定條件」增列「注入量」及「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」。
- 八、「備註」之「最低檢出限量」修正為「定量極限」。
- 九、增列「參考文獻」。
- 十、增修訂部分文字。

# 食品中黴菌毒素檢驗方法－乳製品中黃麴毒素 M<sub>1</sub>之檢驗修正對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於液狀乳、粉狀乳及醱酵乳中黃麴毒素M<sub>1</sub>(<u>aflatoxin M<sub>1</sub></u>)之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：螢光檢出器(fluorescence detector)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm×25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達2500×g以上者。</p> <p>2.1.3. <u>氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</u></p> <p>2.1.4. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.1.5. <u>真空固相萃取裝置(Solid phase vacuum extraction manifold)。</u></p> <p>2.2. 試藥：</p> <p>甲醇及乙腈均採液相層析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；黃麴毒素M<sub>1</sub>對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：1 mL及2 mL，褐色。</p> <p>2.3.3. 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column)：採用內含對黃麴毒素M<sub>1</sub>具專一性單株抗體之Vicam管柱，或同級品。</p> <p>2.3.4. 濾膜：孔徑0.45 μm，<u>PTFE</u>材質。</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於液狀乳、粉狀乳及醱酵乳中黃麴毒素M<sub>1</sub>之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：<u>具有激發波長365 nm及發射波長435 nm之螢光檢出器(fluorescence detector)。</u></p> <p>2.1.1.2. 層析管：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm×25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達2500×g者。</p> <p>2.1.3. <u>蒸發器(Evaporator)：具氮氣吹乾裝置。</u></p> <p>2.1.4. <u>酸鹼值測定儀(pH meter)。</u></p> <p>2.1.5. 超音波振動器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.2. 試藥：</p> <p>甲醇及乙腈採液相層析級，<u>氫氧化鈉採試藥特級，黃麴毒素M<sub>1</sub>(aflatoxin M<sub>1</sub>)對照用標準品(濃度為10 μg/mL)。</u></p> <p>2.3. 器具及材料<sup>(註)</sup>：</p> <p>2.3.1. 離心管(<u>Centrifuge tube</u>)：50 mL，<u>附PP材質螺旋蓋。</u></p> <p>2.3.2. <u>玻璃過濾器(Glass filter holder)。</u></p> <p>2.3.3. 容量瓶(<u>Volumetric flask</u>)。</p> <p>2.3.4. 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column)：採用內含對黃麴毒素M<sub>1</sub>具專一性單株抗體之Vicam管柱或同級品。</p> <p>2.3.5. 濾膜：孔徑0.45 μm，<u>nylon</u>材質。</p> <p>2.3.6. <u>針筒過濾器(Syringe filter)：濾膜孔徑0.45 μm，鐵弗龍材質。</u></p> <p><u>註：操作黃麴毒素或含有黃麴毒素之檢液，應盡量使用褐色或不透光之器具。</u></p>	<p>一、「裝置」刪除未使用到之「酸鹼值測定儀」，另增列「真空固相萃取裝置」。</p> <p>二、「試藥」刪除未使用到之「氫氧化鈉」。</p> <p>三、「器具及材料」刪除未使用到之「玻璃過濾器」及「針筒過濾器」，另修正濾膜材質。</p> <p>四、「移動相溶液之調製」刪除未使用到之「氫氧化鈉溶液」。</p> <p>五、修正「標準溶液之配製」之濃度範圍。</p> <p>六、「檢液之調製」修正液狀乳、粉狀乳、醱酵乳之萃取及淨化步驟。</p> <p>七、修正「鑑別試驗與含量測定」，另將「高效液相層析測定條件」增列「注</p>

<p>2.4. <u>移動相溶液之調製</u>： 取<u>水、乙腈及甲醇以17：6：2 (v/v/v)</u>比例混勻後，<u>經濾膜過濾後</u>，<u>取濾液</u>供作移動相溶液。</p> <p>2.5. <u>標準溶液之配製</u>： 取<u>適量黃麴毒素M<sub>1</sub>對照用標準品</u>，以<u>乙腈稀釋至1 μg/mL</u>，作為<u>標準原液</u>，<u>冷凍貯存</u>。臨用時取<u>適當標準原液</u>，以<u>移動相溶液稀釋至0.25~2 ng/mL</u>，供作標準溶液。</p> <p>2.6. <u>檢液之調製</u>： 2.6.1. <u>萃取</u>： 2.6.1.1. <u>液狀乳</u>： 將<u>檢體混勻</u>，取約<u>50 g</u>，<u>精確稱定</u>，於<u>4°C</u>，以<u>2500 ×g</u>離心15分鐘，<u>去除上層脂肪層</u>，<u>供淨化用</u>。 2.6.1.2. <u>粉狀乳</u>： 將<u>檢體混勻</u>，取約<u>5 g</u>，<u>精確稱定</u>，<u>加去離子水混合並定容至50 mL</u>，於<u>4°C</u>，以<u>2500 ×g</u>離心15分鐘，<u>去除上層脂肪層</u>，<u>供淨化用</u>。 2.6.1.3. <u>發酵乳</u>： 將<u>檢體混勻</u>，取約<u>10 g</u>，<u>精確稱定</u>，<u>加去離子水混合並定容至50 mL</u>，<u>供淨化用</u>。 2.6.2. <u>淨化</u>： 取2.6.1.節供淨化用溶液，<u>注入免疫親和性管柱</u>，<u>流速為每秒1滴</u>，<u>棄流出液</u>，以<u>少量去離子水清洗離心管</u>，<u>洗液一併注入管柱</u>，以<u>去離子水10 mL</u>流洗管柱2次，<u>流速為每秒1滴</u>，<u>必要時輔以抽真空</u>。俟管柱內去離子水排淨後，<u>以乙腈4 mL沖提</u>，<u>流速為每秒1滴</u>，<u>收集沖提液</u>，於<u>50°C</u>以<u>氮氣吹乾</u>，<u>殘留物以移動相溶液溶解並定容至2 mL</u>，<u>經濾膜過濾</u>，供作檢液。</p> <p>2.7. <u>鑑別試驗與含量測定</u>： 精確量取檢液及標準溶液各<u>100 μL</u>，</p>	<p>2.4. <u>試劑之調製</u>： 2.4.1. <u>0.1 N 氫氧化鈉溶液</u> 稱取<u>氫氧化鈉0.4 g</u>，以<u>蒸餾水溶解至100 mL</u>。 2.4.2. <u>移動相溶液</u>： 水、乙腈及甲醇以17：6：2 (v/v)比例混勻後，<u>以濾膜過濾</u>，<u>濾液以超音波振盪除氣30分鐘後</u>供作移動相溶液。 2.5. <u>標準溶液之配製</u>： <u>精確量取黃麴毒素M<sub>1</sub>標準品0.1 mL</u>，以<u>乙腈定容至1 mL</u>，供作標準原液。<u>使用時</u>，<u>再以移動相溶液稀釋至0.01~0.5 ng/mL</u>，供作標準溶液。</p> <p>2.6. <u>檢液之調製</u>： 2.6.1. <u>液狀乳</u>： 2.6.1.1. <u>冷藏液狀乳應回溫後再取樣</u>。<u>檢體充分均勻混合後</u>，取約<u>100 mL</u>以<u>2500 ×g</u>離心15分鐘，<u>去除上層脂肪層</u>，<u>取液狀乳50 g</u>，<u>精確稱定</u>。 2.6.1.2. <u>以每秒1滴之流速通過免疫親和性管柱</u>，以<u>少量蒸餾水沖洗殘留於容器壁上之檢體</u>，<u>一併通入管柱</u>。再以<u>蒸餾水流洗管柱兩次(10 mL/次)</u>，<u>流速1滴/秒</u>。<u>將管柱內水分排淨後</u>，<u>取乙腈4 mL以每秒1~2滴流速沖提</u>，<u>收集沖提液</u>。 2.6.1.3. <u>將沖提液以氮氣吹乾</u>，<u>殘留物以移動相溶液溶解並定容至2 mL</u>，<u>經針筒過濾器過濾</u>，供作檢液。 2.6.2. <u>粉狀乳</u>： 2.6.2.1. <u>將乳粉混勻</u>，取約<u>10 g</u>，<u>精確稱定</u>，<u>以蒸餾水沖泡並定容至100 mL</u>。 2.6.2.2. <u>以2500 ×g</u>離心15分鐘，<u>去除上層脂肪層後</u>，<u>精確量取50 mL</u>。<u>續依2.6.1.2.及2.6.1.3.步驟調製檢液</u>。 2.6.3. <u>發酵乳</u>： 2.6.3.1. <u>取充分混合均勻之發酵乳約25 g</u>，<u>精確稱定</u>，<u>以0.1 N氫氧化鈉溶液調整pH至6.5</u>。 2.6.3.2. <u>續依2.6.1.2.及2.6.1.3.步驟調製檢液</u>。 2.7. <u>鑑別試驗與含量測定</u>： 精確量取檢液及標準溶液各<u>200 μL</u>，</p>	<p>入量」及「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」。</p> <p>八、「備註」之「最低檢出限量」修正為「定量極限」。</p> <p>九、增列「參考文獻」。</p> <p>十、增修訂部分文字。</p>
--	---	--

<p>分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析，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黃麴毒素M<sub>1</sub>之含量(ppb)：</p> <p>檢體中黃麴毒素M<sub>1</sub>之含量(ppb) = <math display="block">\frac{C \times V}{M}</math></p> <p>C：由標準曲線求得檢液中黃麴毒素M<sub>1</sub>之濃度(ng/mL)</p> <p>V：檢體最後定容之體積(2 mL)</p> <p>M：取樣分析檢體之重量(g)</p> <p>高效液相層析測定條件<sup>(註)</sup>：</p> <p>層析管柱：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。</p> <p>螢光檢出器：激發波長365 nm，發射波長435 nm。</p> <p>注入量：100 μL。</p> <p>移動相溶液：依2.4.節所調製之溶液。</p> <p>移動相流速：1.0 mL/min。</p> <p>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。</p> <p>附註：</p> <p>1. 本檢驗方法之<u>定量極限</u>，液狀乳為0.01 ppb，粉狀乳為0.1 ppb，發酵乳為0.05 ppb。</p> <p>2. <u>檢體</u>中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。</p> <p>參考文獻：</p> <p><u>Mao, J., Lei, S., Liu, Y., Xiao, D., Fu, C., Zhong, L. and Ouyang, H. 2015. Quantification of aflatoxin M1 in raw milk by a core-shell column on a conventional HPLC with large volume injection and step gradient elution Food Control 51: 156-162.</u></p>	<p>分別注入高效液相層析儀中，參照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黃麴毒素M<sub>1</sub>之含量(ppb)：</p> <p>檢體中黃麴毒素含量(ppb) = <math display="block">\frac{C \times V}{M}</math></p> <p>C：由標準曲線求得檢液中黃麴毒素M<sub>1</sub>之濃度(ng/mL)</p> <p>V：檢體最後定容之體積(mL)</p> <p>M：取樣分析檢體之重量(g)</p> <p>高效液相層析測定條件：</p> <p>層析管柱：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。</p> <p>螢光檢出器：激發波長365 nm，發射波長435 nm。</p> <p>移動相溶液：依2.4.2.節所調製之溶液。</p> <p>移動相流速：1.0 mL/min。</p> <p>備註：</p> <p>1. 本檢驗方法之<u>最低檢出限量</u>，液狀乳為0.002 ppb，粉狀乳為0.02 ppb，發酵乳為0.005 ppb。</p> <p>2. <u>食品</u>中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。</p>	
--	--	--