

食品中黴菌毒素檢驗方法—赭麴毒素 A 之檢驗修正總說明

為加強食品中黴菌毒素之管理，並依據食品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、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中黴菌毒素檢驗方法—赭麴毒素 A 之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、修正「層析管」及「免疫親和性管柱」。
- 二、增列「碳酸氫鈉溶液」及「鹽酸溶液」之調製。
- 三、修正「米麥製品萃取溶液」之調製溶劑。
- 四、「高效液相層析測定條件」增列之「註」。
- 五、增修訂部分文字。

食品中黴菌毒素檢驗方法—赭麴毒素 A 之檢驗修正對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於咖啡、酒類、葡萄汁及米麥製品中赭麴毒素 A (<u>ochratoxin A</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：<u>Cosmosil 5C 18-AR</u>，5 μm，內徑 4.6 mm \times 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 攪拌均質器(Blender)：適用於有機溶媒者。</p> <p>2.1.3. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達 2500 \times g 者。</p> <p>2.1.5. <u>氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)</u>。</p> <p>2.1.6. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.1.7. 超音波振盪器 (Ultrasonicator)。</p> <p>2.1.8. 粉碎機(Grinder)。</p> <p>2.2. 試藥：</p> <p>甲醇及乙腈均採用液相層析級；<u>碳酸氫鈉、聚乙烯甘油 (polyethylene glycerol, 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°C 可達 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；<u>赭麴毒素 A (ochratoxin A) 對照用標準品(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。</u></u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL，PP 材質。</p>	<p>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 之檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。</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：<u>具有激發波長 333 nm 及發射波長 460 nm 之螢光檢出器 (fluorescence detector)。</u></p> <p>2.1.1.2. 層析管：<u>RP-C18</u>，5 μm，內徑 4.6 mm \times 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 攪拌均質器(Blender)：適用於有機溶媒者。</p> <p>2.1.3. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達 2,500 \times g 者。</p> <p>2.1.5. <u>蒸發器(Evaporator)：具氮氣吹乾裝置。</u></p> <p>2.1.6. 酸鹼值測定儀(pH meter)。</p> <p>2.1.7. 超音波振盪器 (Ultrasonicator)。</p> <p>2.1.8. 粉碎機(Grinder)。</p> <p>2.2. 試藥：</p> <p>甲醇及乙腈採液相層析級，<u>碳酸氫鈉、聚乙烯甘油 (polyethylene glycerol, 分子量 8000)、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鉀、鹽酸、醋酸採試藥特級，<u>赭麴毒素 A (ochratoxin A) 對照用標準品(濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。</u></u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL，<u>附 PP 材質螺旋蓋。</u></p>	<p>一、修正「層析管」及「免疫親和性管柱」。</p> <p>二、增列「碳酸氫鈉溶液」及「鹽酸溶液」之調製。</p> <p>三、修正「米麥製品萃取溶液」之調製溶劑。</p> <p>四、「高效液相層析測定條件」增列之「註」。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>2.3.2. 容量瓶：1 mL、20 mL 及 100 mL。</p> <p>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 <u>OchraTest</u> 管柱，或同級品。</p> <p>2.3.4. 濾膜：孔徑 0.45 μm，<u>Nylon</u> 材質。</p> <p>2.3.5. 針筒過濾器(Syringe filter)：濾膜孔徑 0.45 μm，<u>Teflon</u> 材質。</p> <p>2.3.6. 玻璃纖維濾紙(Glass microfibre filters)：直徑 11 cm。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. <u>3%碳酸氫鈉溶液</u>： 稱取碳酸氫鈉 30 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。</p> <p>2.4.2. <u>2N 鹽酸溶液</u>： 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。</p> <p>2.4.3. <u>0.1N 鹽酸溶液</u>： 取 2N 鹽酸溶液 5 mL，加去離子水使成 100 mL。</p> <p>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。</p> <p>2.4.5. 酒類及葡萄汁萃取溶液： 稱取聚乙烯甘油 10 g 及碳酸氫鈉 50 g，加去離子水 950 mL 溶解，以 0.1N 鹽酸溶液調整 pH 至 8.3，加去離子水使成 1000 mL。</p> <p>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。</p> <p>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 2N 鹽酸溶液調整 pH 至 7.4，加去離子水使成 1000 mL。</p> <p>2.4.8. 50%乙腈溶液： 取乙腈及去離子水以 1：1 (v/v)</p>	<p>2.3.2. 容量瓶 (<u>Volumetric flask</u>)：1 mL、20 mL、1 L。</p> <p>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 <u>Vicam</u> 管柱或同級品。</p> <p>2.3.4. 濾膜：孔徑 0.45 μm，<u>nylon</u> 材質。</p> <p>2.3.5. 針筒過濾器(Syringe filter)：濾膜孔徑 0.45 μm，<u>teflon</u> 材質。</p> <p>2.3.6. 玻璃纖維濾紙(Glass microfibre filters)。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 咖啡萃取溶液： 3%碳酸氫鈉溶液及甲醇以 1：1 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.4.2. 酒類及葡萄汁萃取溶液： 稱取聚乙烯甘油 10 g 及碳酸氫鈉 50 g，以水溶解，以 0.1 N 鹽酸溶液調整 pH 至 8.3，加水定容至 1 L。</p> <p>2.4.3. 米麥製品萃取液： 乙腈及甲醇以 3：2 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.4.4. 磷酸緩衝溶液 (<u>Phosphate-buffered saline, PBS</u>)： 稱取氯化鈉 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，以水 990 mL 溶解，續以 2N 鹽酸溶液調整 pH 至 7.4，加水定容至 1 L。</p> <p>2.4.5. 50%乙腈溶液：</p>	
--	--	--

<p>比例混勻。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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</p>	<p>乙腈及去離子水以 1：1(v/v) 比例混勻。</p> <p>2.4.6. 移動相溶液： 將去離子水、乙腈及醋酸以 99：99：2 (v/v) 比例混勻後，以濾膜過濾，濾液以超音波振盪除氣 30 分鐘後供作移動相溶液。</p> <p>2.5. 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。使用時再以 50% 乙腈溶液稀釋至 0.1~5 ng/mL，供作標準溶液。</p> <p>2.6. 檢液之調製： 2.6.1. 咖啡： 2.6.1.1. 咖啡豆先粉碎後混勻備用，原屬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 2.4.1. 節萃取溶液 25 mL；檢體為液狀者，精確量取檢體 5 mL，加入萃取溶液 20 mL。振盪 3 分鐘，續以 2,500 × g 離心 10 分鐘。以濾紙過濾上清液，精確量取 2 mL 加入 2.4.4. 節 PBS 48 mL 混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液 25 mL (相當於 0.2 g 或 0.2 mL 之檢體量) 進行下列步驟。 2.6.1.2. 將濾液以每秒 1 滴之流速通過免疫親和性管柱，再以水 10 mL 流洗管柱兩次，流速 1 滴/秒。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。</p> <p>2.6.2. 酒類及葡萄汁： 含氣者先以超音波振盪除氣後備用，其他則直接混勻備用。精確量取檢體 10 mL，置於 50</p>	
--	--	--

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)：

檢體中赭麴毒素 A 含量

$$(\text{ppb}) = \frac{C \times V}{M}$$

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。

mL 離心管中。加入 2.4.2. 節萃取溶液 10 mL，劇烈振盪 3 分鐘，以玻璃纖維濾紙過濾，精確量取濾液 10 mL (相當於 5 mL 檢體量)，依 2.6.1.2. 節調製檢液。

2.6.3. 米麥製品：

粒狀者粉碎後混勻備用，原屬粉狀者則再充分混勻後備用。取檢體約 25 g，精確稱定，置於均質杯中。加入 2.4.3. 節萃取溶液 100 mL，均質 3 分鐘，以 2,500 × g 離心 10 分鐘。以濾紙過濾上清液，精確量取 4 mL 加入 2.4.4. 節 PBS 44 mL，混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。將全部濾液(相當於 1 g 檢體量)依 2.6.1.2. 節調製檢液。

2.7. 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，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赭麴毒素 A 之含量(ppb)：

檢體中赭麴毒素 A 含量

$$(\text{ppb}) = \frac{C \times V}{M}$$

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。

<p>層析管：<u>Cosmosil 5C 18-AR</u>，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm。</p> <p>移動相溶液：依 2.5 節所調製之溶液。</p> <p>移動相流速：1.0 mL/min。</p> <p><u>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。</u></p> <p><u>附註：</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本檢驗方法之<u>定量極限</u>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。 	<p>層析管柱：<u>RP-C18</u>，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm。</p> <p>移動相溶液：依 2.4.6 節所調製之溶液。</p> <p>移動相流速：1.0 mL/min。</p> <p><u>備註：</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本檢驗方法之<u>最低檢出限量</u>，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. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。 	
---	--	--