

食用綠藻(含製品)中脫鎂葉綠酸鹽檢驗方法

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食用綠藻(含製品)中脫鎂葉綠酸鹽之檢驗。
2. 檢驗方法：
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 離心機：轉速可達 3000 rpm 以上者。
 - 2.1.2. 培養箱：能維持內部溫度差異在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.1.3. 光電比色寄或分光光度計：應具有可視光波長部份。
 - 2.2. 試藥：

精製海砂、丙酮、乙醚、硫酸鈉、無水硫酸鈉、鹽酸均採用試藥級。無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀均採用試藥特級。
 - 2.3. M/15 磷酸鹽緩衝溶液(M/15 Phosphate buffer, pH8.0)之調製：

原液 A:精確秤取 9.073 g 磷酸二氫鉀溶於水中使成 1000 mL。
原液 B:確秤取 9.464 g 無水磷酸氫二鈉溶於水中使成 1000 mL。

量取原液 A 與原液 B 之容量比(0.5：9.5)混合供作 M/15 磷酸鹽緩衝溶液，其 pH 值應調整為 8.0。
 - 2.4. 既存脫鎂葉綠酸鹽(Pheophoride)之定量：

精確秤取綠藻粉 100 mg(片劑者先行研成細粉後秤取)置於研鉢中，加精製海沙約 0.5 g 及 85%(v/v)丙酮 20 mL 迅速磨碎後靜置，上澄液移入離心管，殘渣再以 10 mL 85%(v/v)丙酮同樣操作二次，合併上澄液並以 3000 rpm 離心 5 分鐘後，取上澄液移入已置有 30 mL 乙醚^(註一)之分液漏斗中，加 5%硫酸鈉溶液 50 mL，徐徐振搖，靜置，去除硫酸鈉層，乙醚層再以每次 50 mL 之 5%硫酸鈉溶液反覆洗滌三次後以無水硫酸鈉脫水並加乙醚稀釋至全量為 50 mL 供作色素原液。

精確量取色素原液 20 mL 置於分液漏斗中以 20 mL，10 mL 之 17%鹽酸溶液分次振搖萃取，合併鹽酸溶液層，移入已置有飽和硫酸鈉溶液 150 mL 即乙醚 20 mL 之分液漏斗中充分振

搖，取以迷層再加乙醚使全量為 20 mL(必要時得乙醚正確稀釋至適測濃度)移此溶液於 1 cm 測液管中，用光電比色計或分光光度計於波長 667 nm 處測定其吸光度，並以 70.2 為 E 值(即 0.1%，1 cm 時於 667 nm 處之比吸光度)^(註二)計算檢體中所含脫鎂葉綠酸鹽之 mg %，即為既存脫鎂葉綠酸鹽之含量。

2.5. 葉綠素分解酵素(Chlorophyllase)活性度之定量：

精確秤取綠藻粉 100 mg(片劑者先行研成細粉後秤取)置於培養皿中，加 10 mL 之冷 M/15 磷酸鹽緩衝溶液(pH 8.0)與丙酮之混合液(7:3)置於 37°C 培養箱中保溫 3 小時後以 10% 鹽酸使呈弱酸性，以下按照 2.4.節操作，並測算脫鎂葉綠酸鹽之 mg %。

由本節測得之脫鎂葉綠酸鹽含量(即總脫鎂葉綠酸鹽含量)減既存脫鎂葉綠酸鹽含量得其增加量，即為葉綠素分解酵素之活性。

註一：乙醚應採用再蒸餾精製品，若使用含多量過氧化物之乙醚則原在 667 nm 處之吸收有偏移至 670~680 nm 之虞。

註二：因市面無法購得脫鎂酸鹽之標準品且精製費時(可利用薄層層析法製備)故可採用 Brown, S. R. [J. Fish Res. Bd. Canada 25:523 (1968)]發表之文獻值：脫鎂葉綠酸鹽(Pheophorbide a)於波長 667 nm 之吸光係數=70.2(0.1% 溶液 1 cm 所示吸光度)予以計算。