

食品中黴菌毒素檢驗方法－赭麴毒素 A 之檢驗修正草案總說明

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」草案，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 之檢驗修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
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。 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> 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：<u>Cosmosil 5C 18-AR</u>，5 μm，內徑 4.6 mm $\times$ 25 cm，或同級品。 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)：適用於有機溶媒者。 2.1.3. 振盪器(Shaker)。 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達 2500 $\times$ g 者。 2.1.5. <u>氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)</u>。 2.1.6. 酸鹼度測定儀(pH meter)。 2.1.7. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。 2.1.8. 粉碎機(Grinder)。 2.2. 試藥： 甲醇及乙腈<u>均採用液相層析級</u>；<u>碳酸氫鈉、聚乙炔甘油(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)；赭麴毒素 A (ochratoxin A) 對照用標準品(50 $\mu\text{g/mL}$)。</u> 2.3. 器具及材料： 2.3.1. 離心管：50 mL，PP 材質。	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。 2.檢驗方法：<u>高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)。</u> 2.1. 裝置： 2.1.1. 高效液相層析儀： 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> 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。 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)：適用於有機溶媒者。 2.1.3. 振盪器(Shaker)。 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達 2,500 $\times$ g 者。 2.1.5. <u>蒸發器(Evaporator)：具氮氣吹乾裝置。</u> 2.1.6. <u>酸鹼值測定儀(pH meter)。</u> 2.1.7. 超音波振動器(Ultrasonicator)。 2.1.8. 粉碎機(Grinder)。 2.2. 試藥： 甲醇及乙腈採液相層析級，<u>碳酸氫鈉、聚乙炔甘油(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，赭麴毒素 A (ochratoxin A)對照用標準品(濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$)。</u> 2.3. 器具及材料： 2.3.1. 離心管：50 mL，<u>附 PP 材質螺旋蓋。</u>	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。

2.3.2. 容量瓶：1 mL、20 mL 及 100 mL。 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。 2.3.4. 濾膜：孔徑 0.45 μm，<u>Nylon</u> 材質。 2.3.5. 針筒過濾器(Syringe filter)：濾膜孔徑 0.45 μm，<u>Teflon</u> 材質。 2.3.6. 玻璃纖維濾紙(Glass microfibre filters)：直徑 11 cm。 2.4. 試劑之調製： 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。 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。 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。 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。 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，<u>加去離子水 950 mL 溶解</u>，以 0.1N 鹽酸溶液調整 pH 至 8.3，<u>加去離子水使成 1000 mL</u>。 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。 2.4.7. 磷酸緩衝溶液 稱取氯化鈉 8 g、<u>磷酸氫二鈉 1.2 g</u>、<u>磷酸二氫鉀 0.2 g</u> 及氯化鉀 0.2 g，<u>加去離子水 990 mL 溶解</u>，以 2N 鹽酸溶液調整 pH 至 7.4，<u>加去離子水使成 1000 mL</u>。 2.4.8. 50%乙腈溶液： 取乙腈及去離子水以 1：1 (v/v)	2.3.2. 容量瓶 (Volumetric flask)：1 mL、20 mL、1 L。 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。 2.3.4. 濾膜：孔徑 0.45 μm，<u>nylon</u> 材質。 2.3.5. 針筒過濾器(Syringe filter)：濾膜孔徑 0.45 μm，<u>teflon</u> 材質。 2.3.6. 玻璃纖維濾紙(Glass microfibre filters)。 2.4. 試劑之調製： 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。 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，<u>以水溶解</u>，以 0.1 N 鹽酸溶液調整 pH 至 8.3，<u>加水定容至 1 L</u>。 2.4.3. 米麥製品萃取液： 乙腈及<u>甲醇</u>以 3：2(v/v)比例混勻。 2.4.4. 磷酸緩衝溶液 (Phosphate-buffered saline, PBS)： 稱取氯化鈉 8 g，<u>無水磷酸氫二鈉 1.2 g</u>、<u>磷酸二氫鉀 0.2 g</u> 及氯化鉀 0.2 g，<u>以水 990 mL 溶解</u>，<u>續以 2N 鹽酸溶液調整 pH 至 7.4</u>，<u>加水定容至 1 L</u>。 2.4.5. 50%乙腈溶液：	
--	--	--

比例混勻。 2.5. 移動相溶液之調製： <u>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。</u> 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。<u>臨用時，再以 50% 乙腈溶液稀釋至 0.1~5 ng/mL，供作標準溶液。</u> 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。<u>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。</u> 2.7.1.2. 酒類及葡萄汁： 含<u>二氧化碳之檢體應先以超音波振盪去除二氧化碳</u>。精確量取<u>混勻後檢體 10 mL</u>，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	乙腈及去離子水以 1：1(v/v) 比例混勻。 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<u>後</u>，以濾膜過濾，<u>濾液以超音波振盪除氣 30 分鐘後供作移動相溶液。</u> 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。<u>使用時再以 50% 乙腈溶液稀釋至 0.1~5 ng/mL，供作標準溶液。</u> 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，<u>原屬粉狀及液狀者則直接混勻備用</u>。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，<u>續以 2,500 × g 離心 10 分鐘。以濾紙過濾上清液</u>，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 <u>之檢體量</u>) 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。<u>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。</u> 2.6.2. 酒類及葡萄汁： 含<u>氣者先以超音波振盪除氣後備用，其他則直接混勻備用</u>。精確量取檢體 10 mL，置於 50	
---	---	--

纖維濾紙過濾，精確量取濾液 10 mL (相當於<u>檢體量 5 mL</u>)，<u>供淨化用</u>。 2.7.1.3. 米麥製品： 取<u>磨碎混勻之檢體</u>約 25 g，精確稱定，置於均質杯中，<u>加入 2.4.6. 節萃取溶液 100 mL</u>，均質 3 分鐘，以 2500 × g 離心 10 分鐘。<u>上清液</u>以濾紙過濾，精確量取<u>濾液 4 mL</u>，<u>加入磷酸緩衝溶液 44 mL</u> 混勻，以玻璃纖維濾紙過濾，<u>取濾液(相當於檢體量 1 g)</u>，<u>供淨化用</u>。 2.7.2. 淨化： 將 <u>2.7.1. 節供淨化用之濾液</u>以每秒 1 滴之流速通過免疫親和性管柱，再以<u>去離子水 10 mL</u> 流洗管柱兩次，流速<u>每秒 1 滴</u>。將管柱內水分排淨後，取<u>甲醇 2 mL</u>，以每秒 1 滴之流速沖提，<u>收集沖提液</u>，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，<u>依下列條件進行液相層析</u>，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)，<u>依 2.6.1.2. 節調製檢液</u>。 2.6.3. 米麥製品： <u>粒狀者粉碎後混勻備用，原屬粉狀者則再充分混勻後備用</u>。取檢體約 25 g，精確稱定，置於均質杯中。<u>加入 2.4.3. 節萃取溶液 100 mL</u>，均質 3 分鐘，以 2,500 × g 離心 10 分鐘。以濾紙過濾<u>上清液</u>，精確量取 4 mL 加入 <u>2.4.4. 節 PBS 44 mL</u>，混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。<u>將全部濾液(相當於 1 g 檢體量)</u><u>依 2.6.1.2. 節調製檢液</u>。 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，<u>參照下列條件進行液相層析</u>，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。	
---	--	--

層析管：<u>Cosmosil 5C 18-AR</u>，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm。 移動相溶液：依 2.5 節所調製之溶液。 移動相流速：1.0 mL/min。 <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> <u>附註：</u> 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<u>時</u>，應自行探討。	層析管柱：<u>RP-C18</u>，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm。 移動相溶液：依 2.4.6 節所調製之溶液。 移動相流速：1.0 mL/min。 <u>備註：</u> 1. 本檢驗方法之<u>最低檢出限</u>量，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<u>若</u>有影響檢驗結果之物質，應自行探討。	
--	---	--