

食品中黴菌毒素檢驗方法—橘黴素之檢驗修正草案總說明

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—橘黴素之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、修正英文名稱。
- 二、「適用範圍」擴增使用紅麴原料製成之膳食補充品及紅麴色素。
- 三、「裝置」刪除「水浴」，增列「分光光度計」等。
- 四、「試藥」增列「鹽酸」等。
- 五、「器具及材料」刪除「玻璃樣品瓶」及「針筒過濾器」，修正「容量瓶」及「濾紙」，並增列「離心管」、「玻璃纖維濾紙」及「免疫親和性管柱」。
- 六、增列「試劑之調製」。
- 七、「標準溶液之配製」修正標準溶液濃度範圍。
- 八、「檢液之調製」新增免疫親合管柱流程。
- 九、增列「紅麴色素之色價測定」。
- 十、「鑑別試驗及含量測定」將檢體分為「紅麴米及使用紅麴原料製成之食品與膳食補充品」及「紅麴色素」，並修正橘黴素含量之單位。
- 十一、附註修正檢出限量為定量極限及其單位，另增列液相層析串聯質譜儀之多重反應偵測模式參數。
- 十二、增列參考文獻。
- 十三、增修訂部分文字。

食品中黴菌毒素檢驗方法—橘黴素之檢驗修正草案對照表

修正名稱	現行名稱	說明
Method of Test for Mycotoxins in Foods - Test of Citrinin	Method of Test for Mycotoxin in Foods - Test of Citrinin	修正英文名稱。
修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於<u>紅麴米、使用紅麴原料製成之食品與膳食補充品及紅麴色素中橘黴素(citrinin)之檢驗。</u></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：Atlantis T3，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. <u>分 光 光 度 計(Spectrophotometer)。</u></p> <p>2.1.3. 粉碎機(Grinder)。</p> <p>2.1.4. <u>攪拌均質器(Blender)。</u></p> <p>2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.6. <u>超 音 波 振 盪 器(Ultrasonicator)。</u></p> <p>2.1.7. 離心機(Centrifuge)：<u>可達2000 ×g者。</u></p> <p>2.1.8. <u>酸鹼度測定儀(pH meter)。</u></p> <p>2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；<u>甲酸、鹽酸、氯化鈉、磷酸氫二鈉(Na₂HPO₄)、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、氯化鉀、磷酸(85%)及乙醇(95%)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；橘黴素對照用標準品。</u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 容量瓶：<u>1 mL、10 mL及</u></p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於<u>穀類及含紅麴之食品中橘黴素(citrinin)之檢驗。</u></p> <p>2. 檢驗方法：<u>高效液相層析法(high performance liquid chromatograph, 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：螢光檢出器(fluorescence detector)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：Atlantis T3，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.3. <u>水浴(Water bath)：溫差在±1°C以內者。</u></p> <p>2.1.4. 粉碎機(Grinder)。</p> <p>2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；<u>甲酸採用試藥特級；橘黴素對照用標準品。</u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 容量瓶：<u>10 mL、20 mL及1 L。</u></p> <p>2.3.2. <u>玻璃樣品瓶：30 mL，附PP材質螺旋蓋。</u></p> <p>2.3.3. 濾膜：<u>直徑47 mm，孔徑0.22 μm，Nylon材質。</u></p> <p>2.3.4. <u>針筒過濾器(Syringe filter)：直徑13 mm，濾膜孔徑0.22 μm，Nylon材質。</u></p> <p>2.4. 移動相溶液之調製：<u>乙腈與水以1：1 (v/v)之比例混合成1 L後，再加入甲酸1 mL，混合均勻後，以濾膜過濾，供作移動相溶液。</u></p> <p>2.5. 標準溶液之配製：</p>	<p>一、「適用範圍」擴增使用紅麴原料製成之膳食補充品及紅麴色素。</p> <p>二、「裝置」刪除「水浴」，增列「分光光度計」等。</p> <p>三、「試藥」增列「鹽酸」等。</p> <p>四、「器具及材料」刪除「玻璃樣品瓶」及「針筒過濾器」，修正「容量瓶」及「濾紙」，並增列「離心管」、「玻璃纖維濾紙」及「免疫親和性管柱」。</p> <p>五、增列「試劑之調製」。</p> <p>六、「標準溶液之配製」修正標準溶液濃度範圍。</p> <p>七、「檢液之調製」新增免疫親合管柱流程。</p>

<p>100 mL。</p> <p>2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。</p> <p>2.3.4. 濾紙：Whatman No.1，直徑11 cm，或同級品。</p> <p>2.3.5. 玻璃纖維濾紙 (Glass microfiber filters)：直徑9 cm。</p> <p>2.3.6. 免疫親和性管柱 (Immunoaffinity column)：採用內含對橘黴素具專一性單株抗體之VICAM管柱，或同級品。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 2 N鹽酸溶液 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>2.4.2. 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 2 N 鹽酸溶液調整 pH 值至 7.4，加去離子水使成 1000 mL。</p> <p>2.4.3. 0.1%磷酸溶液： 取磷酸 1.2 mL，加去離子水使成 1000 mL。</p> <p>2.4.4. 甲醇：0.1%磷酸(7:3, v/v)溶液： 取甲醇及 0.1%磷酸溶液以 7：3 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.4.5. 乙醇：去離子水(1:1, v/v)溶液： 取乙醇與去離子水以 1：1 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製： 取乙腈 500 mL、去離子水 500 mL及甲酸1 mL，混合均勻，以濾膜過濾，供作移動相溶液。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取橘黴素對照用標準品約5 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至 10 mL，作為標準原液，冷凍儲存。臨用時取適量標準原液，以甲醇稀釋至0.625~100 ng/mL，</p>	<p>取橘黴素對照用標準品約5 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至 10 mL作為標準原液，冷凍儲存。使用時取標準原液以甲醇稀釋成2.5~1000 ng/mL，供作標準溶液。</p> <p>2.6. 檢液之調製： 液態檢體直接混勻，其他檢體經磨碎混勻後，取約1 g，精確稱定，置於玻璃樣品瓶中，加入甲醇20 mL (V)，拴緊螺旋蓋。旋渦混合1分鐘，置於70°C水浴加熱30分鐘，於室溫下靜置冷卻。續旋渦混合1分鐘，經針筒過濾器過濾後，取濾液供作檢液。</p> <p>2.7. 檢量線之製作： 精確量取各標準溶液添加於空白檢體中，依2.6節調製檢液，並參照下列條件進行高效液相層析測定，就檢液波峰面積與對應之標準品添加濃度製作檢量線。 高效液相層析測定條件： 層析管柱：Atlantis T3，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。 螢光檢出器：激發波長330 nm，發射波長500 nm。 移動相溶液：依2.4節調製之溶液。 移動相流速：1.0 mL/min。</p> <p>2.8. 鑑別試驗及含量測定： 精確量取檢液及標準溶液各20 μL，分別注入高效液相層析儀中，參照2.7節高效液相層析測定條件進行液相層析，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橘黴素之含量(ppb)： 檢體中橘黴素含量(ppb) $= \frac{C \times V}{M}$ C：由檢量線求得檢液中橘黴素之濃度(ng/mL) V：萃取溶液之體積(mL) M：取樣分析檢體之重量(g) 附註：</p>	<p>八、增列「紅麴色素之色價測定」。</p> <p>九、「鑑別試驗及含量測定」將檢體分為「紅麴米及使用紅麴原料製成之食品與膳食補充品」及「紅麴色素」，並修正橘黴素含量之單位。</p> <p>十、附註修正檢出限量為定量極限及其單位，另增列液相層析串聯質譜儀之多重反應偵測模式參數。</p> <p>十一、增列參考文獻。</p> <p>十二、增修訂部分文字。</p>
---	---	---

<p>供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製： <u>將檢體磨碎均質後</u>，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，精確加入<u>甲醇20 mL</u>，於70°C水浴<u>超音波振盪30分鐘</u>，於室溫靜置冷卻。以<u>2000 ×g離心3分鐘</u>，取上清液，以<u>濾紙過濾</u>。精確量取濾液1 mL，精確加入<u>磷酸緩衝液39 mL</u>，混合均勻，以<u>玻璃纖維濾紙過濾</u>。精確量取濾液10 mL，注入<u>免疫親和管柱(流速控制1滴/秒)</u>，待濾液完全通過管柱後，以<u>去離子水10 mL</u>流洗2次(流速控制1滴/秒)，棄流出液，再以<u>甲醇：0.1%磷酸(7:3, v/v)溶液1 mL</u>沖提(流速控制1滴/秒)，收集沖提液並定容至1 mL，經<u>濾膜過濾</u>，供作檢液。</p> <p>2.8. 紅麴色素之色價測定： <u>取均質後之紅麴色素檢體約1 g</u>，精確稱定，以<u>乙醇：去離子水(1:1, v/v)溶液</u>溶解並定容至100 mL，以<u>濾紙過濾</u>，取濾液以<u>1 cm光徑長度之光析管</u>於波長480~520 nm中最大吸收波長進行吸光度測定。測定時，其濃度以所得之吸光度在0.2~0.7 (single-beam) 或 0.4 ~ 1.4 (double-beam)之範圍內為宜。若吸光度，如超過此範圍時，應以<u>乙醇：去離子水(1:1, v/v)溶液</u>稀釋至適當濃度，再進行測定。依下列計算式求出紅麴色素檢體之色價：</p> $\text{色價}(E_{1\text{cm}}^{10\%}) = \frac{10 \times A \times F}{M}$ <p>A：吸光度 F：稀釋倍數 M：取樣分析檢體之重量(g)</p> <p>2.9. 鑑別試驗及含量測定： 精確量取檢液及標準溶液各20 μL，分別注入<u>高效液相層析儀</u>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</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 本檢驗方法之<u>檢出限量</u>為50 ppb。 2. <u>食品</u>中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。 3. 以本檢驗方法檢出時，應利用<u>LC/MS</u>等進行確認。 	
---	---	--

時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中橘黴素之含量(μg/kg)：

2.9.1. 紅麴米及使用紅麴原料製成之食品與膳食補充品

檢體中橘黴素之含量(μg/kg)

$$= \frac{C \times V \times F}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中橘黴素之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

F：稀釋倍數(80)

M：取樣分析檢體之重量(g)

2.9.2. 紅麴色素

檢體中橘黴素之含量^(註)(μg/kg)

$$= \frac{C \times V \times F \times E}{M \times 50}$$

C：由標準曲線求得檢液中橘黴素之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

F：稀釋倍數(80)

M：取樣分析檢體之重量(g)

E：色價(由2.8.節而得)

註：紅麴色素檢體中橘黴素之含量，以色價50之紅麴色素計。

高效液相層析測定條件^(註)：

螢光檢出器：激發波長330 nm，發射波長500 nm。

層析管：Atlantis T3，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。

注入量：20 μL。

移動相溶液：依2.5.節調製之溶液。

移動相流速：1.0 mL/min。

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50 μg/kg。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

3. 以液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)進行確認時，其多重反應偵測 (multiple reaction

monitoring, MRM)模式參數^(註)如下表。

分析物	離子化模式	離子對		去集	碰撞
		前驅離子(m/z)	>產物離子(m/z)	簇電壓(V)	電壓(eV)
橘 微 素	ESI ⁺	251>233*		24	20
		251>205		38	30

*定量離子對

註：上述測定參數分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之參數。

參考文獻：

1. 厚生労働省。2018。一般試験法色価測定法。第9版食品添加物公定書。27-28頁。東京，日本。
2. 吳淑憶、丘如茵、喻敏甄、羅可涵、張采屏、陳蓉萱、施偉仲。2019。天然毒素及污染物檢驗方法開發。衛生福利部食品藥物管理署108年度委辦計畫研究成果報告。