

食品中黴菌毒素檢驗方法—棒麩毒素之檢驗修正 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」，爰修正「食品中黴菌毒素檢驗方法—棒麩毒素之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、修正英文名稱。
- 二、「適用範圍」擴增嬰幼兒副食品及供嬰幼兒食用之蘋果汁及蘋果泥、熟漬蘋果等固態蘋果製品基質。
- 三、「裝置」修正「檢出器」及「離心機」，增列「攪拌均質器」、「水平式振盪水浴」、「振盪器」、「氮氣濃縮裝置」及「酸鹼度測定儀」。
- 四、「試藥」增列「甘油」、「果膠酶」及「去離子水」。
- 五、「器具及材料」修正「離心管」及「濾膜」，刪除「針筒過濾器」。
- 六、修正「試劑之調製」及「移動相溶液之調製」。
- 七、「標準溶液之配製」修正標準溶液濃度範圍。
- 八、「檢液之調製」之萃取部分增列「嬰幼兒食品依標籤指示之比例調配檢體」及「果膠酶」流程。
- 九、「鑑別試驗及含量測定」修正棒麩毒素含量之單位。
- 十、「附註」配合衛生標準修正定量極限及其單位。
- 十一、增列參考文獻。
- 十二、增修訂部分文字。

食品中黴菌毒素檢驗方法－棒麴毒素之檢驗修正對照表

修正名稱	現行名稱	說明
Method of Test for Mycotoxins in Foods - Test of Patulin	Method of Test for Mycotoxin in Foods - Test of Patulin	修正英文名稱。
修正規定	現行規定	說明
1. 適用範圍：本檢驗方法適用於<u>蘋果汁、蘋果泥、嬰幼兒副食品及供嬰幼兒食用之蘋果汁及蘋果泥、熟漬蘋果等固態蘋果製品中棒麴毒素(patulin)之檢驗。</u> 2. 檢驗方法：<u>檢體經酵素水解及萃取後，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：<u>光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。</u> 2.1.1.2. 層析管：Inertsil ODS-2，5 µm，內徑4.6 mm × 15 cm，或同級品。 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)。 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.1.4. 水平式振盪水浴(Horizontal shaking bath)：<u>能維持水溫溫差在±1°C以內者。</u> 2.1.5. 振盪器(Shaker)。 2.1.6. 離心機(Centrifuge)：<u>可達2000 ×g以上者。</u> 2.1.7. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。 2.1.8. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。 2.1.9. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。 2.1.10. 酸鹼度測定儀(pH meter)。 2.2. 試藥：乙腈及乙酸乙酯均採用液相層析級；無水硫酸鈉、醋	1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蘋果汁及蘋果泥中棒麴毒素之檢驗。 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>具有波長276 nm之紫外光檢出器。</u> 2.1.1.2 層析管：Inertsil ODS-2，5 µm，內徑4.6 mm × 15 cm，或同級品。 2.1.2 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.1.3 離心機(Centrifuge)。 2.1.4 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。 2.1.5 超音波振盪器(Ultrasonicator)。 2.2 試藥：乙腈、乙酸乙酯採用液相層析級；無水硫酸鈉、醋酸、碳酸鈉採用試藥特級；棒麴毒素(patulin)對照用標準品。 2.3 器具及材料： 2.3.1 離心管：15 mL、50 mL，<u>附PP材質螺旋蓋。</u> 2.3.2 漏斗。 2.3.3 濃縮瓶：100 mL。 2.3.4 濾膜：<u>直徑47 mm，孔徑0.45 µm，Nylon材質。</u> 2.3.5 濾紙：Whatman No. 4，直徑11 cm，或同級品。 2.3.6 針筒過濾器(Syringe filter)：<u>直徑13 mm，濾膜孔徑0.45 µm，PVDF材質。</u> 2.4 試劑之調製：	一、「適用範圍」擴增嬰幼兒副食品及供嬰幼兒食用之蘋果汁及蘋果泥、熟漬蘋果等固態蘋果製品基質。 二、「裝置」修正「檢出器」及「離心機」，增列「攪拌均質器」、「水平式振盪水浴」、「振盪器」、「氮氣濃縮裝置」及「酸鹼度測定儀」。 三、「試藥」增列「甘油」、「果膠酶」及「去離子水」。 四、「器具及材料」修正「離心管」及「濾膜」，刪除「針筒過濾器」。 五、修正「試劑之調製」及「移動相溶液之調製」。

酸、碳酸鈉及甘油均採用試藥特級；<u>果膠酶(pectinase, 16 U/mg)</u>；<u>去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)</u>；<u>棒麴毒素對照用標準品</u>。 2.3. 器具及材料： 2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。 2.3.2. 濃縮瓶：100 mL。 2.3.3. 濾膜：孔徑 0.45 μm，PVDF材質。 2.3.4. 濾紙：Whatman No. 4，直徑11 cm，或同級品。 2.4. 試劑之調製： 2.4.1. 1.5%碳酸鈉溶液：<u>稱取碳酸鈉1.5 g，以去離子水溶解使成100 mL</u>。 2.4.2. pH 4.0醋酸溶液：<u>取去離子水100 mL，以醋酸調整pH值至4.0</u>。 2.4.3. 50%甘油溶液：<u>取甘油5 mL，加去離子水使成10 mL</u>。 2.4.4. 果膠酶溶液：<u>稱取適量果膠酶以50%甘油溶液稀釋至1.4 U/mg</u>。 2.5. 移動相溶液之調製：<u>取去離子水與乙腈以9：1 (v/v)之比例混勻，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液</u>。 2.6. 標準溶液之配製：<u>取棒麴毒素對照用標準品約5 mg，精確稱定，以乙酸乙酯溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷藏貯存。臨用時取適量標準原液，於40°C以氮氣吹乾，再以pH 4.0醋酸溶液溶解並稀釋至50～500 ng/mL，供作標準溶液^(註)</u>。 <u>註：標準溶液若存放超過一週，需重新配製</u>。 2.7. 檢液之調製：<u>將檢體均質混勻，嬰幼兒食品依標籤指示之比例調配檢體，取約5 g，精確稱定，置於50 mL離心</u>	2.4.1 1.5%碳酸鈉溶液：<u>稱取碳酸鈉1.5 g，以去離子水100 mL溶解</u>。 2.4.2 pH 4.0醋酸溶液：<u>量取去離子水100 mL，以醋酸調至pH 4.0</u>。 2.5 移動相溶液之調製：<u>取去離子水與乙腈以90：10 (v/v)比例混勻後，以0.45 μm濾膜過濾後備用。使用前以超音波振盪除氣30分鐘後供作移動相溶液</u>。 2.6 標準溶液之配製：<u>取棒麴毒素對照用標準品約5 mg，精確稱定，以乙酸乙酯溶解並定容至50 mL作為標準原液，並儲存於2～5°C冰箱；使用時取標準原液100 μL，經40°C水浴氮氣吹乾，再以pH 4.0醋酸溶液稀釋成50～1000 ppb，供作標準溶液。標準溶液若存放超過一週，需重新配製</u>。 2.7 檢液之調製：<u>取蘋果汁或蘋果泥約5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中。加入乙酸乙酯10 mL，振盪萃取1分鐘後，以3,000 rpm離心3分鐘。上層液移至50 mL離心管，下層液再重複上述萃取步驟一次，合併上層液並加入1.5%碳酸鈉溶液2 mL，振盪萃取1分鐘後，以3,000 rpm離心3分鐘，上層液移至另一50 mL離心管，下層液再以乙酸乙酯5 mL萃取，合併上層液與無水硫酸鈉1 g，振盪混合30秒後，以濾紙過濾，離心管續以乙酸乙酯4 mL溶洗2次，合併濾液於濃縮瓶，於40°C水浴，減壓濃縮至1～2 mL後，移至15 mL離心管，濃縮瓶以乙酸乙酯2 mL溶洗2次，併入15 mL離心管，於40°C水浴氮氣吹乾，殘留物以pH 4.0醋酸溶液0.5 mL溶解，振盪混合30秒後，超音波振盪5分</u>	六、「標準溶液之配製」修正標準溶液濃度範圍。 七、「檢液之調製」之萃取部分增列「嬰幼兒食品依標籤指示之比例調配檢體」及「果膠酶」流程。 八、「鑑別試驗及含量測定」修正棒麴毒素含量之單位。 九、「附註」配合衛生標準修正定量極限及其單位。 十、增列參考文獻。 十一、增修訂部分文字。
---	---	---

管中，加入果膠酶75 μL及去離子水5 mL，於40°C水浴反應2小時。加入乙酸乙酯10 mL，振盪1分鐘，以2000×g離心3分鐘。收集上層液，下層液加入乙酸乙酯10 mL，重複上述萃取步驟，合併上層液，加入1.5%碳酸鈉溶液2 mL，振盪1分鐘，以2000×g離心3分鐘，收集上層液移至另一50 mL離心管，下層液加入乙酸乙酯5 mL，重複上述萃取步驟，合併上層液，加入無水硫酸鈉1 g，旋渦混合30秒，以濾紙過濾，收集濾液，離心管續以乙酸乙酯每次4 mL潤洗2次，合併濾液於濃縮瓶中，於40°C水浴減壓濃縮至1~2 mL，移至15 mL離心管，濃縮瓶以乙酸乙酯每次2 mL潤洗2次，洗液併入離心管中，於40°C以氮氣吹乾，殘留物精確加入pH 4.0醋酸溶液0.5 mL使溶解，旋渦混合30秒，超音波振盪5分鐘，以2000×g離心3分鐘，經濾膜過濾，供作檢液。 2.8. 鑑別試驗及含量測定： 精確量取檢液及標準溶液各50 μL，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及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中棒麩毒素之含量(μg/kg)： $\text{檢體中棒麩毒素含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V}{M}$ M：由標準曲線求得檢液中棒麩毒素之濃度(ng/mL) V：檢液最後溶解之體積(mL) M：取樣分析之檢體重量(g) 高效液相層析測定條件^(註)： 光二極體陣列檢出器：定量波長276 nm。 層析管：Inertsil ODS-2，5 μm，內徑4.6 mm × 15 cm。	鐘，以3,000 rpm離心3分鐘，續以針筒過濾器過濾後供作檢液。 2.8 鑑別試驗及含量測定： 精確量取檢液及標準溶液各50 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棒麩毒素之含量(ppb)： $\text{檢體中棒麩毒素含量}(\text{ppb}) = \frac{C \times V}{M}$ C：由標準曲線求得檢液中棒麩毒素之濃度(ng/mL) V：檢體最後溶解之體積(mL) M：取樣分析之檢體量(g) 高效液相層析測定條件： 層析管柱：Inertsil ODS-2，5 μm，內徑4.6 mm × 15 cm，或同級品。 紫外光檢出器：波長 276 nm。 移動相溶液：依2.5節調製之溶液。 移動相流速：0.5 mL/min。 附註： 1. 本檢驗方法之最低檢出限量為10 ppb。 2. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。	
--	--	--

移動相溶液：依2.5.節調製之溶液。 移動相流速：0.5 mL/min。 <u>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。</u> 附註： 1. 本檢驗方法之<u>定量極限為5 µg/kg</u>。 2. <u>檢體中有影響檢驗結果之物質時</u>，應自行探討。 <u>參考文獻</u> 1. <u>Sadok, I., Szmagara, A. and Staniszewska, M. M. 2018. The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. Food Chem. 245: 364-370.</u> 2. <u>吳淑懌、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年度委外計畫研究成果報告。</u>		
---	--	--