

食品中黴菌毒素檢驗方法－赭麴毒素A之檢驗

Method of Test for Mycotoxins in Foods - Test of Ochratoxin A

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於穀類、供直接食用之花生及花生加工品、果乾類、香辛植物、嬰幼兒食品、幾丁聚醣、咖啡、酒類及葡萄汁中赭麴毒素A (ochratoxin A)之檢驗。
2. 檢驗方法：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。
  - 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：Cosmosil 5C 18-AR，5  $\mu\text{m}$ ，內徑4.6 mm  $\times$  25 cm，或同級品。
    - 2.1.2. 粉碎機(Grinder)。
    - 2.1.3. 攪拌均質器(Blender)：適用於有機溶媒者。
    - 2.1.4. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
    - 2.1.5. 振盪器(Shaker)。
    - 2.1.6. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.1.7. 離心機(Centrifuge)：可達2500  $\times$ g者。
    - 2.1.8. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
    - 2.1.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
    - 2.1.10. 真空冷凍乾燥裝置(Vacuum Freeze drying system)：溫度可達-40 $^{\circ}\text{C}$ 以下，真空度可達133 mBar以下。
    - 2.1.11. 烘箱(Oven)：附有自動溫度調節器，溫差在 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.1.12. 乾燥器(Desiccator)。
  - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；Tween-20、碳酸氫鈉、聚乙二醇(polyethylene glycol,分子量8000)、氯化鈉、磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、氯化鉀、鹽酸及醋酸均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in benzene/acetic acid 99:1, v/v)。
  - 2.3. 器具及材料：
    - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。

- 2.3.2. 容量瓶：1 mL、20 mL、25 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OchraTest管柱，或同級品。
- 2.3.4. 濾膜：孔徑0.45  $\mu\text{m}$ ，Nylon材質及Teflon材質。
- 2.3.5. 玻璃纖維濾紙(Glass microfibre filters)：直徑11 cm。
- 2.3.6. 濾紙：ADVANTEC No. 5A，直徑125 mm，或同級品。
- 2.3.7. 稱量瓶：附瓶蓋。
- 2.4. 試劑之調製：
  - 2.4.1. 3%碳酸氫鈉溶液：

稱取碳酸氫鈉30 g，以去離子水溶解使成1000 mL。
  - 2.4.2. 2 N鹽酸溶液：

取鹽酸16.7 mL，緩緩加入去離子水80 mL中，混合均勻，冷卻後加去離子水使成100 mL。
  - 2.4.3. 0.1 N鹽酸溶液：

取2 N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：

稱取聚乙二醇10 g及碳酸氫鈉50 g，加去離子水950 mL溶解，以0.1 N鹽酸溶液調整pH至8.3，加去離子水使成1000 mL。
  - 2.4.6. 穀類、幾丁聚醣、嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品萃取溶液：

取乙腈及去離子水以3：2 (v/v)比例混勻。
  - 2.4.7. 果乾類、花生及其加工品萃取溶液：

取甲醇及去離子水以7：3 (v/v)比例混勻。
  - 2.4.8. 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至7.4，加去離子水使成1000 mL。
  - 2.4.9. 含0.1% Tween-20之磷酸緩衝溶液：

取Tween-20 0.5 mL，加磷酸緩衝溶液使成500 mL。
  - 2.4.10. 50%乙腈溶液：

取乙腈及去離子水以1：1 (v/v)比例混勻。
- 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Nylon濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

## 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。臨用時取適量標準原液，以50%乙腈溶液稀釋至以下濃度範圍，供作標準溶液。

2.6.1. 咖啡：0.1~5 ng/mL。

2.6.2. 香辛植物類、嬰幼兒穀物類輔助食品、嬰幼兒副食品及特殊醫療用途嬰兒配方食品：0.2~5 ng/mL。

2.6.3. 穀類、幾丁聚醣、果乾類、花生及其加工品：0.3~5 ng/mL。

2.6.4. 酒類及葡萄汁：1~5 ng/mL。

## 2.7. 檢液之調製：

### 2.7.1. 萃取：

#### 2.7.1.1. 咖啡：

將固狀檢體磨碎混勻或粉狀檢體混勻，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入2.4.4.節萃取溶液25 mL；將液狀檢體混勻後，取約5 g，精確稱定，置於25 mL容量瓶中，以2.4.4.節萃取溶液定容，移入離心管中，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，混合均勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液25 mL，供淨化用。

#### 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。取混勻後檢體約10 g，精確稱定，置於20 mL容量瓶中，以2.4.5.節萃取溶液定容，移入離心管中，振盪3分鐘，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液10 mL，供淨化用。

#### 2.7.1.3. 穀類及幾丁聚醣：

將檢體磨碎混勻，取約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 (幾丁聚醣檢體則加入含0.1% Tween-20之磷酸緩衝溶液44 mL)，混合均勻，以玻璃纖維濾紙過濾，取濾液供淨化用。

#### 2.7.1.4. 果乾類、花生及其加工品：

將檢體磨碎混勻，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入2.4.7.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5 mL，加入磷酸緩衝溶液20 mL，混合均勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液20 mL，供淨化用。

#### 2.7.1.5. 香辛植物類：

將檢體磨碎混勻，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入3%碳酸氫鈉溶液45 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12 mL，加入含0.1% Tween-20之磷酸緩衝溶液28 mL，混合均勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液30 mL，供淨化用。

#### 2.7.1.6. 嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品：

將檢體冷凍乾燥使其水分含量小於10%，經磨碎混勻，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入2.4.6.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4 mL，加入磷酸緩衝溶液44 mL，混合均勻，以玻璃纖維濾紙過濾，取濾液供淨化用。

#### 2.7.1.7. 特殊醫療用途嬰兒配方食品：

依標籤指示之比例調配檢體，混勻後取約5 g，精確稱定，置於25 mL容量瓶中，以甲醇定容，移入離心管中，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10 mL，加入磷酸緩衝溶液40 mL，混合均勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液25 mL，供淨化用。

#### 2.7.2. 淨化：

將2.7.1.節供淨化用之濾液注入免疫親和性管柱(流速控制1滴/秒)棄流出液，以少量去離子水清洗離心管，洗液併入管柱，每次再以去離子水10 mL流洗管柱2次(流速控制1滴/秒)，必要時輔以抽真空。俟管柱內水分排淨後，棄流出液，以甲醇2 mL沖提排淨(流速控制1滴/秒)，收集沖提液，以氮氣吹乾，殘留物以50%乙腈溶液溶解並定容至1 mL (2.7.1.6.及2.7.1.7.節嬰幼兒食品則以50%乙腈溶液0.5 mL溶解)，經Teflon濾膜過濾，供作檢液。

#### 2.8. 水分之測定：

經冷凍乾燥均質後之嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品檢體約2 g，置於預經乾燥至恆重之稱量瓶( $m_0$ )中，精確稱定( $m_1$ )，放入

烘箱，於105°C加熱2小時後，將稱量瓶蓋妥，移入乾燥器中放冷，約30分鐘後稱量，再將稱量瓶移入烘箱乾燥1小時，依上述稱量步驟，直至恆重( $m_2$ )為止，並依下列公式計算檢體之水分含量(%)：

$$\text{檢體之水分含量 } W(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

$m_0$ ：含蓋稱量瓶之重量(g)

$m_1$ ：含蓋稱量瓶及檢體取樣之重量(g)

$m_2$ ：含蓋稱量瓶及檢體烘乾至恆重後之重量(g)

## 2.9. 鑑別試驗與含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各100  $\mu\text{L}$ ，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( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )：

### 2.9.1. 非以乾重計之檢體

$$\text{檢體中赭麴毒素A之含量 } (\mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{C \times V \times F}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中赭麴毒素A之濃度( $\text{ng}/\text{mL}$ )

V：檢液最後定容之體積( $\text{mL}$ )

F：依2.7.1.1.、2.7.1.3.節取樣分析時，F為25

依2.7.1.2.節取樣分析時，F為2

依2.7.1.4.、2.7.1.5.及 2.7.1.7.節取樣分析時，F為5

M：取樣分析檢體之重量(g)

### 2.9.2. 以乾重計之檢體

$$\text{檢體中赭麴毒素A之含量 } (\mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{C \times V \times F}{M \times (1 - W/100)}$$

C：由標準曲線求得檢液中赭麴毒素A之濃度( $\text{ng}/\text{mL}$ )

V：檢液最後定容之體積( $\text{mL}$ )

F：依2.7.1.6.節取樣分析時，F為5

M：取樣分析檢體之重量(g)

W：檢體之水分含量(%)

高效液相層析測定條件<sup>(註)</sup>：

螢光檢出器：激發波長333 nm，發射波長460 nm。

層析管：Cosmosil 5C 18-AR，5  $\mu\text{m}$ ，內徑4.6 mm  $\times$  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。

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。

- 附註：1. 本檢驗方法之定量極限，咖啡及香辛植物類均為0.5 µg/kg，酒類及葡萄汁均為0.2 µg/kg，穀類、幾丁聚醣、果乾類、花生及其加工品均為0.3 µg/kg，嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品均為0.1 µg/kg (以乾重計)，特殊醫療用途嬰兒配方食品為0.1 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<sup>(註)</sup>如下表。

分析物	離子化 模式	離子對		去集簇 電壓 (V)	碰撞 電壓 (eV)
		前驅離子(m/z)	> 產物離子(m/z)		
赭麴毒素A	ESI <sup>+</sup>	404	> 239*	24	26
		404	> 102	24	72

\*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. VICAM LP. 1999. Aflatest<sup>®</sup> HPLC instruction manual. Milford, MA, USA.
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。