

食品中真菌毒素檢驗方法－橘黴素之檢驗

Method of Test for Mycotoxins in Foods - Test of Citrinin

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於紅麴米、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。
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：Atlantis T3，5 μm ，內徑4.6 mm $\times$ 25 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 分光光度計(Spectrophotometer)。
 - 2.1.3. 粉碎機(Grinder)。
 - 2.1.4. 攪拌均質器(Blender)。
 - 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.6. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.7. 離心機(Centrifuge)：可達2000 $\times g$ 者。
 - 2.1.8. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；甲酸、鹽酸、氯化鈉、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、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 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；橘黴素對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：1 mL、10 mL及100 mL。
 - 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。
 - 2.3.4. 濾紙：Whatman No.1，直徑11 cm，或同級品。
 - 2.3.5. 玻璃纖維濾紙(Glass microfiber filters)：直徑9 cm。
 - 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。
 - 2.3.7. 光析管(Cuvette)：光徑長度1 cm，石英製。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 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，冷卻後再加去離子水使成100 mL。

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，再加去離子水使成1000 mL。

2.4.3. 0.1%磷酸溶液：

取磷酸1.2 mL，加去離子水使成1000 mL。

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。

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。

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。

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0.625~6.25 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體磨碎均質後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入甲醇20 mL，拴緊螺旋蓋，於70°C水浴超音波振盪30分鐘，於室溫靜置冷卻。以2000 ×g離心3分鐘，取上清液，以濾紙過濾。精確量取濾液1 mL，加入磷酸緩衝溶液39 mL，混合均勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液10 mL，注入免疫親和管柱(流速控制1滴/秒)，棄流出液，每次以去離子水10 mL流洗管柱2次(流速控制1滴/秒)，必要時輔以抽真空。俟管柱內去離子水排淨後，棄流出液，再以甲醇：0.1%磷酸(7:3, v/v)溶液1 mL沖提排淨(流速控制1滴/秒)，收集沖提液並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 紅麴色素之色價測定：

取均質後之紅麴色素檢體約1 g，精確稱定，以乙醇：去離子水

(1:1, v/v)溶液溶解並定容至100 mL，以濾紙過濾，取濾液以1 cm 光徑長度之光析管於波長480~520 nm中最大吸收波長進行吸光度測定。測定時，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。若吸光度超過此範圍時，應以乙醇：去離子水(1:1, v/v)溶液稀釋至適當濃度，再進行測定，並依下列計算式求出紅麴色素檢體之色價：

$$\text{紅麴色素檢體之色價}(E_{1\text{cm}}^{10\%}) = \frac{10 \times A \times F}{M}$$

A：吸光度

F：稀釋倍數

M：取樣分析檢體之重量(g)

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橘黴素之含量($\mu\text{g/kg}$)：

2.9.1. 紅麴米及使用紅麴原料製成之食品與膳食補充品

$$\text{檢體中橘黴素之含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V \times F}{M}$$

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

$$\text{檢體中橘黴素之含量}^{(\text{註})}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V \times F \times 50}{M \times E}$$

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. 當檢體檢出濃度超出檢量線範圍時，應將離心後之濾液以磷酸緩衝溶液經適當稀釋後再執行後續淨化步驟。

3. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

4. 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	去集簇 電壓 (V)	碰撞 電壓 (eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
橘黴素	ESI ⁺	251 > 233*	24	20
		251 > 205	38	30

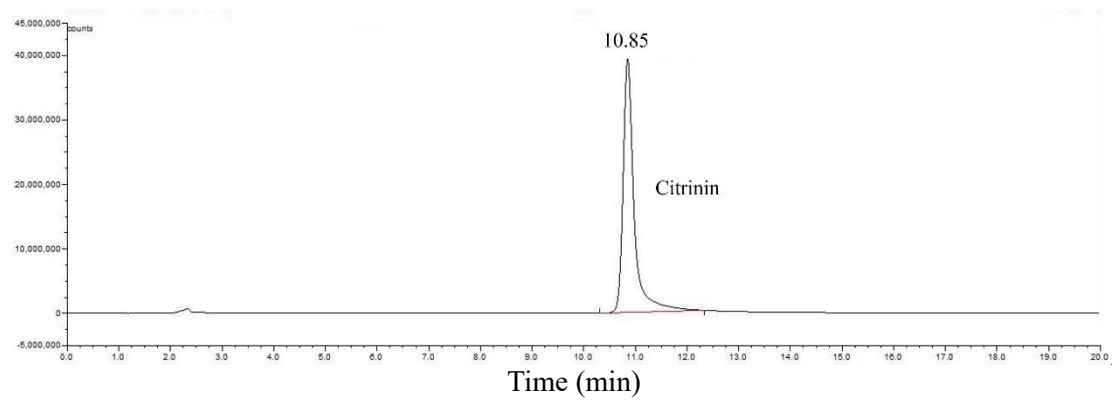
*定量離子對

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. 吳淑憇、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。

參考層析圖譜



圖、橘黴素標準品之HPLC圖譜