

食品中黃麴毒素之檢驗方法—液狀乳中黃麴毒素 $M_1$ 及 $M_2$ 之檢驗  
Methods of Test for Aflatoxins in Foods —  
Aflatoxins  $M_1$  and  $M_2$  in Fluid Milk

鍵語：黃麴毒素 $M_1$ ，黃麴毒素 $M_2$ ，液狀乳

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於液狀乳中黃麴毒素 $M_1$ 及 $M_2$ 之檢驗
2. 檢驗方法：高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)

2.1. 裝置：

2.1.1. 高效液相層析儀：

2.1.1.1. 檢出器：能提供365 nm激發光譜及接收400 nm以上發射光譜之螢光檢出器。

2.1.1.2. 層析管：RP-18, 5  $\mu$ m, 內徑0.4×25 cm。

2.1.2. 分光光度計：具紫外及可見光部者。

2.1.3. 烘箱

- 2.2. 試藥：乙腈、乙醚、二氯甲烷、三氟醋酸、正己烷、甲苯、甲醇、丙酮、苯、重鉻酸鉀、異丙醇、無水乙醇、無水硫酸鈉、硫酸、氯仿、三氯化鈉(sodium azide)、二氯二甲基矽烷(dichlorodimethylsilane, DDS)及黃麴毒素 $M_1$ 、黃麴毒素 $M_2$ 對照標準品，以上試劑用於高效液相層析者，應使用液相層析級(LC grade)，其餘試劑皆採試藥級純品。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 器具：裝置或操作黃麴毒素或含有黃麴毒素之檢液，應盡量使用褐色或不透光之器具。

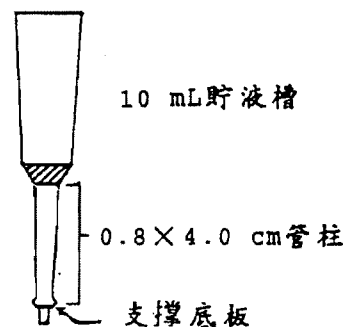
2.3.2. 濾膜：孔徑0.45  $\mu$ m，聚二氟乙烯(polyvinylidene difluoride)材質。

2.3.3. 抽氣瓶：容量為250及500 mL。

2.3.4.  $C_{18}$  矽膠過濾層析管柱( $C_{18}$  Sep-Pak sample preparation cartridge)

2.3.5. 聚丙烯管柱：0.8×4.0 cm 聚丙烯製，具10 mL貯液容量及多孔(孔徑為35  $\mu$ m)之支撐底板(如圖一)。

圖一、聚丙烯管柱



2.3.6. 矽膠淨化管柱之製備：將粒徑0.04~0.063 mm之矽膠60以 105°C 烘乾1小時，取出置乾燥器中冷卻後，加入佔矽膠重量百分之一的水，置密閉容器內平衡一夜後備用。

取2.3.5節之管柱裝置於 250 mL抽氣瓶上，添加上述矽膠至2 mL 刻度處（約需1 g），並略抽真空，使矽膠均勻地充填，再於其上覆蓋無水硫酸鈉約 1 g。

2.4. 移動相溶液之調製：

去離子水-異丙醇-乙腈 以80:12:8(v/v)，或以84:11:5(v/v)之比例混合後，先以濾膜過濾，續以超音波振盪脫氣30分鐘。

2.5. 標準溶液之配製：

2.5.1. 黃麴毒素 $M_1$ 標準品貯存瓶之矽化：褐色含蓋之玻璃瓶（容量約2 mL），加5% DDS甲苯溶液（取99% DDS 5 mL加入甲苯定容為100 mL，置密閉玻璃瓶中，並置冷處備用）至約全滿，以45~55°C 加熱40分鐘後將5% DDS倒掉，先以甲苯續以甲醇各洗三次，再以75°C烘20~30分鐘去除甲醇後備用。

2.5.2. 標準溶液之配製：取市售黃麴毒素 $M_1$ 及 $M_2$ ，以乙腈為溶劑配製黃麴毒素 $M_1$ 及 $M_2$ 原液，使其濃度分別為 200  $\mu\text{g/mL}$ 及 100  $\mu\text{g/mL}$ 。使用時再以乙腈-苯（1:9, v/v）將黃麴毒素 $M_1$ 及 $M_2$ ，分別稀釋成 0.50  $\mu\text{g/mL}$ 及 0.10  $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

2.5.3. 標準溶液之校正：

2.5.3.1. 分光光度計之校正：

以0.018N之稀硫酸溶液調製0.25, 0.125, 0.0625 mM等三種重鉻酸鉀溶液，以分光光度計，於波長350 nm附近處選擇最大吸光度之波長，以0.018N之稀硫酸溶液為空白對照組於三種濃度下測得其吸光度(A)，進而求出重鉻酸鉀之分子吸光係數( $\epsilon$ )， $\epsilon = (A \times 1000 / \text{濃度 mM})$ ，由三種濃度測得之 $\epsilon$ 平均值 $\bar{\epsilon}$ ，求出此分光光度計之校正值(C.F.)， $C.F. = 3160 / \bar{\epsilon}$ ，此C.F.值應為  $1.0 \pm 0.05$ ，若其值大於1.05或小於0.95時，則必須重新檢討操作，直到C.F.值為 $1.0 \pm 0.05$ 為止。

2.5.3.2. 標準溶液濃度之校正：

在選定之相同波長下，以乙腈為空白對照組，測得標準溶液之吸光度，由公式  $\mu\text{g/mL} = (A \times MW \times 1000 \times C.F.) / \epsilon$  求得黃麴毒素 $M_1$ 及 $M_2$ 之濃度，以乙腈為溶劑，黃麴毒素 $M_1$ 之分子量(MW)及 $\epsilon$ 值分別為328及19850，黃麴毒素 $M_2$ 之分子量(MW)及 $\epsilon$ 值分別為330及21400。

2.6. 檢體之保存：

檢體一律冷藏保存，如於兩天內無法分析者，每100 mL可添加0.4% 三氯化鈉 5 mL防腐，並可在冷藏下貯放二週。

## 2.7. 檢液之調製：

### 2.7.1. 萃取：

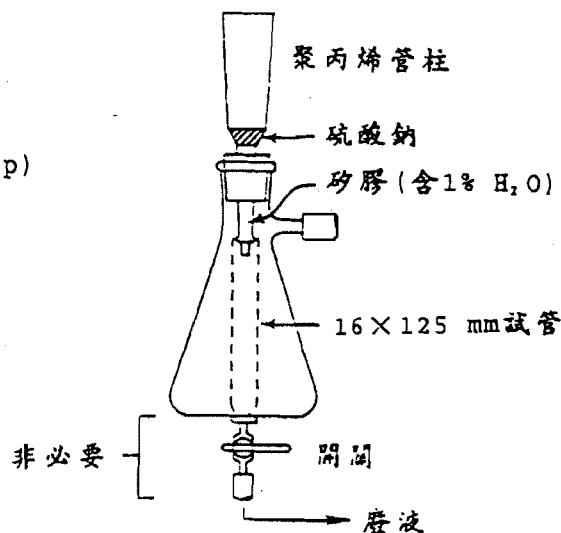
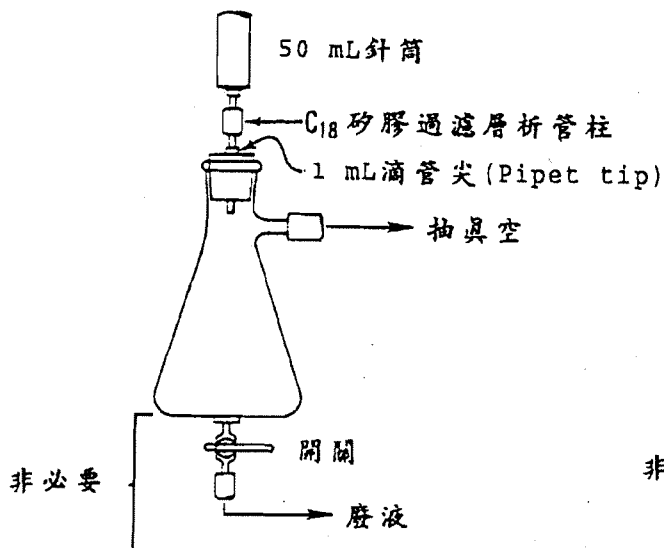
先將 $C_{18}$ 矽膠過濾層析管柱的長端接在50 mL針筒下端，再裝置於500 mL抽氣瓶上(如圖二)，調整真空度為約5 mm Hg，使得液體能以滴狀快速滴下； $C_{18}$ 矽膠過濾層析管柱使用前，先以甲醇5 mL續以去離子水5 mL通過，但最後勿將水份完全抽乾，而使其能保持潤濕狀態，並將針筒連同管柱拔起備用。使冷藏檢體回溫至室溫後，續倒轉容器十次以上以混勻檢體，取檢液20 mL(加有sodium azide者取21 mL)，加入約80°C熱水20 mL(可酌予增加熱水量以稀釋乳品)後，置入如圖二之裝置上50 mL之針筒內，抽真空(或用針筒之推桿施以正壓)使檢體流下之速度控制約為30 mL/min(勿太快以免黃麴毒素無法完全吸附)，當乳品吸至 $C_{18}$ 矽膠過濾層析管柱表面(不可吸乾)，加入去離子水-乙腈(95:5, v/v)溶液10 mL沖洗，續將注射筒頂端以橡皮塞塞住，抽真空30秒以除去多餘洗液，將管柱取下，以棉棒或面紙吸乾兩端水份(因水會使下面之矽膠淨化失效，故應避免水份存在)，加乙腈150  $\mu$ L，使其滲入以保持其潤濕性。

### 2.7.2. 淨化：

將2.3.6節製備好之矽膠淨化管柱裝置於500 mL抽氣瓶上(如圖三)，以乙醚7 mL將2.7.1節已完成萃取之 $C_{18}$ 矽膠過濾層析管柱中吸附物沖洗至淨化管柱貯液槽內，再抽真空並控制流速約為10 mL/min，續以乙醚2 mL沖洗淨化管柱，最後於管柱下端放置16×125 mm試管後裝置如圖三，再於淨化管柱頂端加入二氯甲烷-乙醇(95:5, v/v)溶液7 mL沖提，沖提時控制流速為10 mL/min，收集之溶出液即檢液，以氮氣吹至將乾時，續以上述沖提液1 mL沖洗管壁，再吹乾備用。

圖二、萃取裝置

圖三、淨化裝置



## 2.8. 鑑別及含量測定

### 2.8.1. 黃麴毒素M<sub>1</sub>及M<sub>2</sub>衍生物之製備:

2.7.2. 節之檢液吹乾物, 加入正己烷、三氟醋酸各200  $\mu$ L, 以振盪器振盪混合均勻, 另準備正己烷、三氟醋酸各200  $\mu$ L及50  $\mu$ L, 再加黃麴毒素M<sub>1</sub>及M<sub>2</sub>標準溶液50  $\mu$ L, 亦振盪混合5~10秒後, 一同置40°C下反應10分鐘, 再置水浴上(低於50°C), 以氮氣吹乾備用。

### 2.8.2. 定量:

將吹乾之對照標準品及檢液衍生物, 加水-乙腈(75:25, v/v)2 mL溶解, 並以振盪器振盪混勻後, 精確量取50~100  $\mu$ L, 分別注入高效液相層析儀, 參照下述層析條件進行液相層析, 就檢液及標準溶液所得波峯之滯留時間比較鑑別之, 並依另取之黃麴毒素M<sub>1</sub>及M<sub>2</sub>標準溶液按上述方法作出檢量線, 以確定波峯高度(或面積)對照濃度間之線性關係求出檢體中黃麴毒素M<sub>1</sub>及M<sub>2</sub>含量(ppb), 分析檢液時並定期穿插對照標準品, 以確保定量之準確。

計算公式:

$$\text{黃麴毒素M}_1 \text{ or M}_2 \text{ (ppb)} = (H \times C' \times VI' \times V) / (H' \times VI \times W)$$

H : 檢體之波峯高度

H' : 標準品之波峯高度

C' : 標準品之濃度(ng/ $\mu$ L)

VI : 檢體之注射體積

VI' : 標準品之注射體積

V : 檢體最後之總體積( $\mu$ L)

W : 液狀乳之體積(通常為20 mL)

高效液相層析儀之條件:

層析管柱: RP-18, 5  $\mu$ m, 內徑0.4×25 cm。

移動相溶液: 依2.4節調製之溶液。

移動相流速: 1.0 mL/min。

螢光檢出器: 激發波長(EX): 366 nm, 發射波長(EM): 430 nm。

記錄器: 注入黃麴毒素M<sub>1</sub> 0.625~1.25 ng或黃麴毒素M<sub>2</sub> 0.125~0.25 ng之衍生物, 調整記錄器上所得訊號為滿刻度之50~75%。