

食品中黴菌毒素檢驗方法－乳製品中黃麴毒素 M₁之檢驗修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於液狀乳、粉狀乳及醱酵乳中黃麴毒素M₁ (aflatoxin M₁)之檢驗。</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：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達2500 ×g以上者。</p> <p>2.1.3. <u>氮氣蒸發裝置 (Nitrogen evaporator)。</u></p> <p>2.1.4. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.2. 試藥： 甲醇及乙腈均採液相層析級；<u>去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；黃麴毒素M₁對照用標準品。</u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：1 mL及2 mL，褐色。</p> <p>2.3.3. 免疫親和性管柱 (Immunoaffinity column)：採用內含對黃麴毒素M₁具專一性單株抗體之Vicam管柱，<u>或同級品。</u></p> <p>2.3.4. 濾膜：孔徑0.45 μm，<u>PTFE</u>材質。</p> <p>2.4. <u>移動相溶液</u>之調製：</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於液狀乳、粉狀乳及醱酵乳中黃麴毒素M₁之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)。</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：<u>具有激發波長365 nm及發射波長435 nm之螢光檢出器 (fluorescence detector)。</u></p> <p>2.1.1.2. 層析管：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達2500 ×g者。</p> <p>2.1.3. <u>蒸發器(Evaporator)：具氮氣吹乾裝置。</u></p> <p>2.1.4. <u>酸鹼值測定儀(pH meter)。</u></p> <p>2.1.5. 超音波振動器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.2. 試藥： 甲醇及乙腈採液相層析級，<u>氫氧化鈉採試藥特級，黃麴毒素M₁ (aflatoxin M₁)對照用標準品(濃度為10 μg/mL)。</u></p> <p>2.3. 器具及材料^(註)：</p> <p>2.3.1. 離心管 (Centrifuge tube)：50 mL，<u>附PP材質螺旋蓋。</u></p> <p>2.3.2. <u>玻璃過濾器(Glass filter holder)。</u></p> <p>2.3.3. 容量瓶(Volumetric flask)。</p> <p>2.3.4. 免疫親和性管柱 (Immunoaffinity column)：採用內含對黃麴毒素M₁具專一性單株抗體之Vicam管柱或同級品。</p> <p>2.3.5. 濾膜：孔徑0.45 μm，<u>nylon</u>材質。</p> <p>2.3.6. <u>針筒過濾器(Syringe filter)：濾膜孔徑0.45 μm，鐵弗龍材質。</u></p> <p><u>註：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。</u></p> <p>2.4. <u>試劑</u>之調製：</p>	<p>一、「裝置」刪除未使用到之「酸鹼值測定儀」。</p> <p>二、「試藥」刪除未使用到之「氫氧化鈉」。</p> <p>三、「器具及材料」刪除未使用到之「玻璃過濾器」及「針筒過濾器」，另修正濾膜材質。</p> <p>四、「移動相溶液之調製」刪除未使用到之「氫氧化鈉溶液」。</p> <p>五、修正「標準溶液之配製」之濃度範圍。</p> <p>六、「檢液之調製」修正液狀乳、粉狀乳、醱酵乳之萃取及淨化步驟。</p> <p>七、「鑑別試驗與含量測定」修正「注入量」，另將「高效液相層析測定條件」增列註「上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀</p>

<p>取水、乙腈及甲醇以17：6：2 (v/v/v) 比例混勻後，<u>經濾膜過濾後</u>，<u>取濾液</u> 供作移動相溶液。</p> <p>2.5. 標準溶液之配製： 取<u>適量</u>黃麴毒素M₁對照用標準品，以乙腈稀釋至1 μg/mL，作為標準原液，<u>冷凍貯存</u>。臨用時取<u>適當標準原液</u>，以移動相溶液稀釋至<u>0.25~2 ng/mL</u>，供作標準溶液。</p> <p>2.6. 檢液之調製： 2.6.1. 萃取： 2.6.1.1. 液狀乳： 將檢體混勻，取約<u>50 g</u>，精確稱定，於<u>4°C</u>，以<u>2500 ×g</u>離心15分鐘，去除上層脂肪層，<u>供淨化用</u>。 2.6.1.2. 粉狀乳： 將檢體混勻，取約<u>5 g</u>，精確稱定，<u>加去離子水混合並定容至50 mL</u>，於<u>4°C</u>，以<u>2500 ×g</u>離心15分鐘，去除上層脂肪層，<u>供淨化用</u>。 2.6.1.3. 發酵乳： 將檢體混勻，取約<u>10 g</u>，精確稱定，<u>加去離子水混合並定容至50 mL</u>，<u>供淨化用</u>。 2.6.2. 淨化： 取2.6.1.節供淨化用溶液，注入免疫親合性管柱，<u>流速為每秒1滴</u>，棄流出液，以少量去離子水清洗離心管，<u>洗液一併注入管柱</u>，以去離子水<u>10 mL</u>流洗管柱2次，流速為每秒1滴。俟管柱內去離子水排淨後，以乙腈4 mL沖提，流速為每秒1滴，收集沖提液，於<u>50°C</u>以氮氣吹乾，殘留物以移動相溶液溶解並定容至2 mL，<u>經濾膜過濾</u>，供作檢液。</p> <p>2.7. 鑑別試驗與含量測定： 精確量取檢液及標準溶液各<u>100 μL</u>，分別注入高效液相層析儀中，<u>依下列</u></p>	<p>2.4.1. <u>0.1 N 氫氧化鈉溶液</u> 稱取<u>氫氧化鈉0.4 g</u>，以蒸餾水溶解至<u>100 mL</u>。</p> <p>2.4.2. 移動相溶液： 水、乙腈及甲醇以17：6：2 (v/v)比例混勻後，<u>以濾膜過濾</u>，<u>濾液以超音波振盪除氣30分鐘後</u>供作移動相溶液。</p> <p>2.5. 標準溶液之配製： <u>精確量</u>取黃麴毒素M₁標準品<u>0.1 mL</u>，以乙腈定容至1 mL，供作標準原液。<u>使用時</u>，再以移動相溶液稀釋至<u>0.01~0.5 ng/mL</u>，供作標準溶液。</p> <p>2.6. 檢液之調製： 2.6.1. 液狀乳： 2.6.1.1. <u>冷藏液狀乳應回溫後再取樣</u>。檢體充分均勻混合後，取約<u>100 mL</u>以<u>2500 ×g</u>離心15分鐘，去除上層脂肪層，<u>取液狀乳50 g</u>，精確稱定。 2.6.1.2. <u>以每秒1滴之流速通過免疫親和性管柱</u>，以少量蒸餾水沖洗殘留於容器壁上之檢體，一併通入管柱。再以蒸餾水流洗管柱<u>兩次(10 mL/次)</u>，流速<u>1滴/秒</u>。將管柱內水分排淨後，<u>取乙腈4 mL以每秒1~2滴流速沖提</u>，收集沖提液。 2.6.1.3. 將沖提液以氮氣吹乾，殘留物以移動相溶液溶解並定容至2 mL，<u>經針筒過濾器過濾</u>，供作檢液。 2.6.2. 粉狀乳： 2.6.2.1. 將乳粉混勻，取約<u>10 g</u>，精確稱定，<u>以蒸餾水沖泡並定容至100 mL</u>。 2.6.2.2. 以<u>2500 ×g</u>離心15分鐘，去除上層脂肪層後，<u>精確量取50 mL</u>。續依2.6.1.2.及2.6.1.3.步驟調製檢液。 2.6.3. 發酵乳： 2.6.3.1. 取充分混合均勻之<u>發酵乳約25 g</u>，精確稱定，<u>以0.1 N氫氧化鈉溶液調整pH至6.5</u>。 2.6.3.2. 續依2.6.1.2.及2.6.1.3.步驟調製檢液。</p> <p>2.7. 鑑別試驗與含量測定： 精確量取檢液及標準溶液各<u>200 μL</u>，分別注入高效液相層析儀中，<u>參照下</u></p>	<p>器，設定適合之測定條件」。</p> <p>八、「備註」之「最低檢出限量」修正為「定量極限」。</p> <p>九、增列「參考文獻」。</p> <p>十、增修訂部分文字。</p>
---	--	--

<p>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黃麴毒素M₁之含量(ppb)：</p> <p>檢體中黃麴毒素M₁之含量(ppb) = $\frac{C \times V}{M}$</p> <p>C：由標準曲線求得檢液中黃麴毒素M₁之濃度(ng/mL)</p> <p>V：檢體最後定容之體積(2 mL)</p> <p>M：取樣分析檢體之重量(g)</p> <p>高效液相層析測定條件^(註)：</p> <p>層析管柱：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。</p> <p>螢光檢出器：激發波長365 nm，發射波長435 nm。</p> <p>注入量：100 μL。</p> <p>移動相溶液：依2.4.節所調製之溶液。</p> <p>移動相流速：1.0 mL/min。</p> <p>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。</p> <p>附註：</p> <p>1. 本檢驗方法之<u>定量極限</u>，液狀乳為0.01 ppb，粉狀乳為0.1 ppb，醱酵乳為0.05 ppb。</p> <p>2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。</p> <p>參考文獻：</p> <p><u>Mao, J., Lei, S., Liu, Y., Xiao, D., Fu, C., Zhong, L. and Ouyang, H. 2015. Quantification of aflatoxin M1 in raw milk by a core-shell column on a conventional HPLC with large volume injection and step gradient elution Food Control 51: 156-162.</u></p>	<p>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黃麴毒素M₁之含量(ppb)：</p> <p>檢體中黃麴毒素含量(ppb) = $\frac{C \times V}{M}$</p> <p>C：由標準曲線求得檢液中黃麴毒素M₁之濃度(ng/mL)</p> <p>V：檢體最後定容之體積(mL)</p> <p>M：取樣分析檢體之重量(g)</p> <p>高效液相層析測定條件：</p> <p>層析管柱：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。</p> <p>螢光檢出器：激發波長365 nm，發射波長435 nm。</p> <p>移動相溶液：依2.4.2.節所調製之溶液。</p> <p>移動相流速：1.0 mL/min。</p> <p>備註：</p> <p>1. 本檢驗方法之<u>最低檢出限量</u>，液狀乳為0.002 ppb，粉狀乳為0.02 ppb，醱酵乳為0.005 ppb。</p> <p>2. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。</p>	
---	---	--