

食品中黴菌毒素檢驗方法—赭麴毒素 A 之檢驗

Method of Test for Mycotoxin in Food—Test of Ochratoxin A

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於咖啡、酒類、葡萄汁及米麥製品中赭麴毒素 A 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：具有激發波長 333 nm 及發射波長 460 nm 之螢光檢出器 (fluorescence detector)。
 - 2.1.1.2. 層析管：RP-C18，5 μm ，內徑 4.6 mm \times 25 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 攪拌均質器 (Blender)：適用於有機溶媒者。
 - 2.1.3. 振盪器 (Shaker)。
 - 2.1.4. 離心機 (Centrifuge)：可達 2,500 \times g 者。
 - 2.1.5. 蒸發器 (Evaporator)：具氮氣吹乾裝置。
 - 2.1.6. 酸鹼值測定儀 (pH meter)。
 - 2.1.7. 超音波振動器 (Ultrasonicator)。
 - 2.1.8. 粉碎機 (Grinder)。
 - 2.2. 試藥：

甲醇及乙腈採液相層析級，碳酸氫鈉、聚乙烯甘油(polyethylene glycerol)、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鉀、鹽酸、醋酸採試藥特級，赭麴毒素 A (ochratoxin A) 對照用標準品 (濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 9330175 離心管：50 mL，附 PP 材質螺旋蓋。
 - 2.3.2. 容量瓶 (Volumetric flask)：1 mL、20 mL、1 L。
 - 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 Vicam 管柱或同級品。
 - 2.3.4. 濾膜：孔徑 0.45 μm ，nylon 材質。
 - 2.3.5. 針筒過濾器 (Syringe filter)：濾膜孔徑 0.45 μm ，teflon 材質。
 - 2.3.6. 玻璃纖維濾紙(Glass microfibre filters)。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 咖啡萃取溶液：

3% 碳酸氫鈉溶液及甲醇以 1:1 (v/v) 比例混勻。
 - 2.4.2. 酒類及葡萄汁萃取溶液：

稱取聚乙烯甘油 10 g 及碳酸氫鈉 50 g，以水溶解，以 0.1 N 鹽酸溶液調整 pH 至 8.3，加水定容至 1 L。

2.4.3. 米麥製品萃取液：

乙腈及甲醇以 3:2 (v/v) 比例混勻。

2.4.4. 磷酸緩衝溶液(Phosphate-buffered saline, PBS)：

稱取氯化鈉 8 g，無水磷酸氫二鈉 1.2 g，磷酸二氫鉀 0.2 g 及氯化鉀 0.2 g，以水 990 mL 溶解，續以 2N 鹽酸溶液調整 pH 至 7.4，加水定容至 1 L。

2.4.5. 流洗液：

稱取氯化鈉 25 g 及碳酸氫鈉 5 g，以蒸餾水溶解，以 0.1N 鹽酸溶液調整 pH 至 8.3，加水定容至 1 L 後備用。

2.4.6. 50%乙腈溶液：

乙腈及去離子水以 1:1 (v/v) 比例混勻。

2.4.7. 移動相溶液：

將去離子水、乙腈及醋酸以 99:99:2 (v/v) 比例混勻後，以濾膜過濾，濾液以超音波振盪除氣 30 分鐘後供作移動相溶液。

2.5. 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。使用時再以 50% 乙腈溶液稀釋至 0.1 ~ 5 ng/mL，供作標準溶液。

2.6. 檢液之調製：

2.6.1. 咖啡：

2.6.1.1. 咖啡豆先粉碎後混勻備用，原屬粉狀及液狀者則直接混勻備用。取粉狀檢體約 5 g，精確稱定，置於 50 mL 離心管中，加入 2.4.1 節萃取溶液 25 mL；檢體為液狀者，精確量取檢體 5 mL，加入萃取溶液 20 mL。振盪 3 分鐘，續以 2,500 × g 離心 10 分鐘。以濾紙過濾上清液，精確量取 10 mL 加入 2.4.4 節 PBS 10 mL 混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液 10 mL (相當於 1 g 或 1 mL 之檢體量) 進行下列步驟。

2.6.1.2. 將濾液以每秒 1 滴之流速通過免疫親和性管柱，再以水 10 mL 流洗管柱兩次，流速 1 滴/秒。將管柱內水分排淨後，取甲醇 2 mL 以每秒 1 滴之流速沖提，收集沖提液。並以氮氣吹乾，殘留物以 50% 乙腈溶液溶解並定容至 1 mL，經針筒過濾器過濾，供作檢液。

2.6.2. 酒類及葡萄汁：

含氣者先以超音波振盪除氣後備用，其他則直接混勻備用。精確量取檢體 10 mL，置於 50 mL 離心管中。加入 2.4.2 節萃取溶液 10 mL，劇烈振盪 3 分鐘，以玻璃纖維濾紙過濾，精確量取濾液 10 mL (相當於 5 mL 檢體量)，依 2.6.1.2 節調製檢液。

2.6.3. 米麥製品：

粒狀者粉碎後混勻備用，原屬粉狀者則再充分混勻後備用。取檢體約 25

g，精確稱定，置於均質杯中。加入 2.4.4 節萃取溶液 100 mL，均質 3 分鐘，以 $2,500 \times g$ 離心 10 分鐘。以濾紙過濾上清液，精確量取 4 mL 加入 2.4.4 節 PBS 44 mL，混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。將全部濾液 (相當於 1 g 檢體量) 依 2.6.1.2 節調製檢液。

2.7. 鑑別試驗與含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 100 μ L，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赭麴毒素 A 之含量 (ppb)：

$$\text{檢體中赭麴毒素 A 含量 (ppb)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中赭麴毒素 A 之濃度 (ng/mL)。

V：檢液之體積 (mL)。

M：檢液所含檢體量(g 或 mL)。

高效液相層析測定條件：

層析管柱：RP-C18，5 μ m，內徑 4.6 mm \times 25 cm。

螢光檢出器：激發波長 333 nm，發射波長 460 nm。

移動相溶液：依 2.4.7 節所調製之溶液。

移動相流速：1.0 mL/min。

- 備註：1. 本檢驗方法之最低檢出限量，咖啡為 0.1 ppb，酒類及葡萄汁為 0.2 ppb，米麥製品為 0.3 ppb。
2. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。