

食品中黴菌毒素檢驗方法－棒麴毒素之檢驗

Method of Test for Mycotoxins in Foods - Test of Patulin

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蘋果汁、蘋果泥、嬰幼兒副食品及供嬰幼兒食用之蘋果汁及蘋果泥、熟漬蘋果等固態蘋果製品中棒麴毒素(patulin)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經酵素水解及萃取後，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：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Inertsil ODS-2，5 μm ，內徑4.6 mm \times 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 水平式振盪水浴(Horizontal shaking bath)：能維持水溫溫差在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內者。
 - 2.1.5. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.6. 離心機(Centrifuge)：可達2000 $\times g$ 以上者。
 - 2.1.7. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。
 - 2.1.8. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.9. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.10. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2. 試藥：乙腈及乙酸乙酯均採用液相層析級；無水硫酸鈉、醋酸、碳酸鈉及甘油均採用試藥特級；果膠酶(pectinase, 16 U/mg)；去離子水(比電阻於25 $^\circ\text{C}$ 可達18 M $\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；棒麴毒素對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 濃縮瓶：100 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.45 μm ，PVDF材質。
 - 2.3.4. 濾紙：Whatman No. 4，直徑11 cm，或同級品。
 - 2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 1.5%碳酸鈉溶液：

稱取碳酸鈉1.5 g，以去離子水溶解使成100 mL。

2.4.2. pH 4.0醋酸溶液：

取去離子水100 mL，以醋酸調整pH值至4.0。

2.4.3. 50%甘油溶液：

取甘油5 mL，加去離子水使成10 mL。

2.4.4. 果膠酶溶液：

稱取適量果膠酶以50%甘油溶液稀釋至1.4 U/mg。

2.5. 移動相溶液之調製：

取去離子水與乙腈以9：1 (v/v)之比例混勻，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

取棒麩毒素對照用標準品約5 mg，精確稱定，以乙酸乙酯溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷藏貯存。臨用時取適量標準原液，於40°C以氮氣吹乾，再以pH 4.0醋酸溶液溶解並稀釋至50～500 ng/mL，供作標準溶液^(註)。

註：標準溶液若存放超過一週，需重新配製。

2.7. 檢液之調製：

將檢體均質混勻，嬰幼兒食品依標籤指示之比例調配檢體，取約5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入果膠酶75 μL及去離子水5 mL，於40°C水浴反應2小時。加入乙酸乙酯10 mL，振盪1分鐘，以2000 ×g離心3分鐘。收集上層液，下層液加入乙酸乙酯10 mL，重複上述萃取步驟，合併上層液，加入1.5%碳酸鈉溶液2 mL，振盪1分鐘，以2000 ×g離心3分鐘，收集上層液移至另一50 mL離心管，下層液加入乙酸乙酯5 mL，重複上述萃取步驟，合併上層液，加入無水硫酸鈉1 g，旋渦混合30秒，以濾紙過濾，收集濾液，離心管續以乙酸乙酯每次4 mL潤洗2次，合併濾液於濃縮瓶中，於40°C水浴減壓濃縮至1～2 mL，移至15 mL離心管，濃縮瓶以乙酸乙酯每次2 mL潤洗2次，洗液併入離心管中，於40°C以氮氣吹乾，殘留物精確加入pH 4.0醋酸溶液0.5 mL使溶解，旋渦混合30秒，超音波振盪5分鐘，以2000 ×g離心3分鐘，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各50 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及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中棒麩毒素之含量(μg/kg)：

$$\text{檢體中棒麩毒素含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中棒麩毒素之濃度(ng/mL)

V：檢液最後溶解之體積(mL)

M：取樣分析之檢體重量(g)

高效液相層析測定條件^(註)：

光二極體陣列檢出器：定量波長276 nm。

層析管：Inertsil ODS-2，5 μm，內徑4.6 mm × 15 cm。

移動相溶液：依 2.5 節調製之溶液。

移動相流速：0.5 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5 μg/kg。

2. 檢體中若有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻

1. Sadok, I., Szmagara, A. and Staniszewska, M. M. 2018. The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. Food Chem. 245: 364-370.
2. 吳淑慇、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年度委外計畫研究成果報告。