

中華民國國家標準	乳品檢驗法 —液狀乳中黃麴毒素 M₁ 及 M₂ 之檢驗	總號	13631
CNS		類號	N6282

Method of Test for Milk and Milk Products - Test for Aflatoxins
M₁ and M₂ in Fluid Milk

1. 適用範圍：本方法適用於液狀乳中黃麴毒素 M₁ 及 M₂ 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：螢光檢出器 (fluorescence detector)。
- 2.1.1.2 層析管：C18，5 μ m，內徑 0.4cm，長度 25cm。

2.1.2 分光光度計：具紫外光及可見光者。

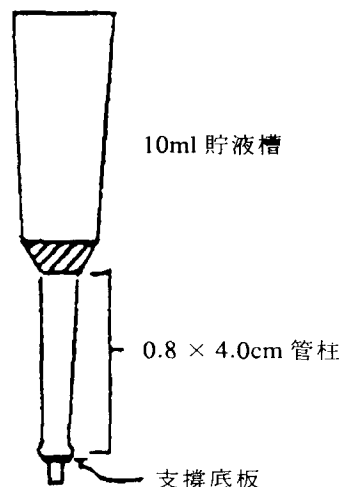
2.1.3 烘箱

- 2.2 試藥：乙腈、乙醚、二氯甲烷、三氟醋酸、正己烷、甲苯、甲醇、苯、重鉻酸鉀、異丙醇、無水乙醇、無水硫酸鈉、硫酸、疊氮化鈉 (Sodium azide)、二氯二甲基矽烷 (Dichlorodimethylsilane, DDS) 及黃麴毒素 M₁，黃麴毒素 M₂ 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，應儘量使用褐色或不透光之器具。
- 2.3.2 濾膜：孔徑 0.45 μ m, polyvinylidene difluoride 材質。
- 2.3.3 抽氣瓶：容量為 250 及 500mL。
- 2.3.4 過濾層析匣 (Extraction cartridge: C₁₈, Sep-Pak sample preparation cartridge 或其它同等級品)。
- 2.3.5 聚丙烯管柱：0.8 × 4.0cm 聚丙烯製，具 10mL 貯液容量及多孔 (孔徑為 35 μ m) 之支撐底板 (如圖一)。

圖 1 聚丙烯管柱



(共 4 頁)

公布日期 85 年 1 月 30 日	經濟部標準檢驗局印行	修訂公布日期 年 月 日
-----------------------	------------	-----------------

2.3.6 矽膠淨化管柱之製備：將粒徑 0.04 ~ 0.063mm 之矽膠 60 以 105 °C 加熱 1 小時，取出置乾燥器中冷卻後，加入重量 1 % 之水，振盪混合後，置密閉容器內平衡一夜去活化。取 2.3.5 節之管柱裝置於 250mL 抽氣瓶上，添加上述去活化之矽膠至 2mL 刻度處（約需 1g），並略抽真空，使矽膠均勻充填，再於上層填入無水硫酸鈉 1g，使用前以乙醚濕潤。

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 M₁ 標準品貯存瓶之矽化：褐色含蓋之玻璃瓶（容量約 2mL），加 5 % DDS 甲苯溶液（取 99 % DDS 5mL 加入甲苯定容為 100mL，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 M₁ 及 M₂ 以乙腈為溶劑配製黃麴毒素 M₁ 及 M₂ 原液，使其濃度分別為 200µg/mL 及 100µg/mL。使用時再以乙腈—苯（1 : 9, v/v）將黃麴毒素 M₁ 及 M₂，分別稀釋成 0.50µg/mL 及 0.10µg/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, 0.0625mM 等三種重鉻酸鉀溶液，以分光光度計，於波長 350nm 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 (ε)， $\epsilon = (A \times 1000 / \text{濃度 mM})$ ，由三種濃度測得之 ε 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 ± 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 ± 0.05 為止。

2.5.3.2 標準溶液之校正：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 M₁ 及 M₂ 之濃度，以乙腈為溶劑，黃麴毒素 M₁ 之分子量 (MW) 為 328；ε 值為 19850，黃麴毒素 M₂ 之分子量 (MW) 為 330；ε 值則為 21400。

2.6 檢體之保存：易腐敗之液狀乳如於兩天內無法分析者，每 100mL 可添加 0.4 % 疊氮化鈉水溶液 5mL 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 C₁₈ 過濾層析匣的長端接在 50mL 注射筒下端，再裝於 500mL 抽氣瓶上（如圖二），真空過濾，使得液體能以滴狀快速滴下；C₁₈ 過濾層析匣使用前，先以甲醇 5mL 續以去離子水 5mL 通過，但最後勿將水份完全抽乾，而使其能保持潤濕狀態，並將注射筒連同層析匣拔起備用。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 20mL（加有疊氮化鈉者取 21mL），加入約 80 °C 熱水 20mL（可酌予增加熱水量以稀釋乳品）後，置入如圖二之裝置上 50mL 之注射筒內，抽真空（或用注射筒之推桿施以正壓）使檢體流下之速度控制約為 30mL/min（勿太快以免黃麴毒素無法完全吸附），當乳品吸至 C₁₈ 過濾層析匣表面（不可吸乾），加入去離子水—乙腈（95 : 5, v/v）溶液 10mL 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 150µL，使其滲入以保持其潤濕性。

2.7.2 淨化：將 2.3.6 節製備好矽膠淨化管柱裝置於 500mL 抽氣瓶上（如圖三），以乙醚 7mL