

附錄 VII 霉菌毒素 (黃曲霉毒素) 測定方法

霉菌毒素包括黃曲霉毒素，是指霉菌或真菌產生的毒性代謝產物。藥材可能會受黃曲霉毒素污染，應用本法測定藥材中黃曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的含量。

方法

- (1) **黃曲霉毒素測定法** — 分析方法必須通過驗證並符合下列要求：
 - (a) 方法應適合於測定黃曲霉毒素，且不易受藥材提取物的干擾；
 - (b) 確定黃曲霉毒素的檢測限及定量限；
 - (c) 各個黃曲霉毒素的定量限設定為 0.3 µg/kg；
 - (d) 加樣回收率應在 50 - 120% 範圍之內；
 - (e) 方法重複性的相對標準偏差應小於 15%；
 - (f) 儀器檢測的校對範圍應呈綫性反應。
- (2) **試劑** — 分析所用的試劑須為分析純或等同。所用甲醇及乙腈須為色譜純或以上。
- (3) **容器** — 所有容器須清洗後方可使用，以確保無黃曲霉毒素的污染。容器可用 10% 家用漂白水浸泡至少 12 小時後，再用蒸餾水沖洗。
- (4) **樣品製備** — 選取具有代表性的藥材，如需要，在磨粉前可先將藥材粉碎。在樣品分析前，藥材樣品必須先粉碎。在可行情況下，取樣量應不少於測試量之五倍。
- (5) **操作程序** — 本方法依據黃曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 經柱後碘衍生化及紫外綫激發後或光化學衍生化，測定其熒光強度。個別藥材樣品操作程序可適當修改。

- (a) **提取** — 取樣品粉末 15.0 g，加氯化鈉 3 g 和 70% 甲醇 75 mL，充分攪勻約 2 分鐘後，離心 10 分鐘 (約 800 × g)。測定提取液酸鹼值。精密吸取上清液 15 mL [附註 1] 置黃棕色小瓶中，於 60°C 水浴上用氮氣將溶劑揮發至約 5 mL。依據免疫親和柱說明書的要求，在濃縮提取液中加入適用於免疫親和柱的溶劑至 50 mL [附註 2]，離心約 10 分鐘後，用玻璃纖維濾紙抽濾，收集濾液，作為供試品溶液。

附註 1：如提取液被樣品吸收使所得上清液少於 40 mL，則應按上法重新提取，改用氯化鈉 5.0 g 和 70% 甲醇 125 mL 提取，並改為取上清液 25 mL。

附註 2：如樣品處理所得的提取物會影響免疫親和柱的功能，應以免疫親和柱說明書要求適當處理。特別注意免疫親和柱酸鹼度的操作範圍要求和在淨化前選用合適的溶劑稀釋提取物。

- (b) **以免疫親和柱淨化供試品溶液** —

此色譜淨化步驟可選用：

- 免疫親和柱：內含黃曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 專有抗體；
- 洗脫液：甲醇。

免疫親和柱的操作要求 — 將適當容量的黃曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 標準混合溶液通過免疫親和柱，並根據下述「淨化供試品溶液」程序處理，回收率應分別不小於 90%、80%、90% 和 60%。

淨化供試品溶液 [附註 3] — 依據說明書，先將免疫親和柱預調，以流速 3 mL/min 通過 22.5 mL 供試品溶液。依說明書所建議的沖洗液 (10 mL) 沖洗該柱 (流速 3 mL/min)，再用 10 mL 空氣將柱沖乾。先用 1.5 mL 甲醇洗脫，再以 10 mL 空氣沖柱，完全收集洗脫液置 2-mL 量瓶中，然後加水至刻度。

附註 3：免疫親和柱的淨化程序可因應個別不同牌子作出適當改動，請依說明書指引。

(c) **定量檢測** — 所選用的高效液相色譜系統必須符合下列要求：

- 定量峰及其鄰近峰之分離度 (R)：應大於 1.5；
- 色譜柱的理論塔板數 (n) (以各定量峰計)：應大於或等於 7000；和
- 峰面積的相對標準偏差：應小於或等於 5%。

各個黃曲霉毒素標準儲備液 — 用紫外光譜法，按下列公式計算各個黃曲霉毒素標準儲備液於苯/乙腈混合液 (98:2, v/v) 中的濃度：

$$\text{各個黃曲霉毒素的濃度 (mg/L)} = \frac{A_{350} \times M_w \times 1000}{\epsilon}$$

式中 A_{350} = 黃曲霉毒素約 350 nm 處最大吸收波長的吸收度；
 M_w = 黃曲霉毒素的分子量 (表 1)；
 ϵ = 黃曲霉毒素於苯/乙腈混合液中的摩爾吸光系數 (表 1)。

表 1 黃曲霉毒素的分子量 (M_w) 及摩爾吸光系數 (ϵ)

黃曲霉毒素	分子量 (M_w)	摩爾吸光系數 (ϵ)
B ₁	312	19800
B ₂	314	20900
G ₁	328	17100
G ₂	330	18200

黃曲霉毒素混合標準溶液 — 製備至少五個不同濃度系列的擬測定黃曲霉毒素 70% 甲醇混合液，用以繪製標準曲綫。

在進行高效液相色譜分析時可選用：

- 液相色譜柱 (4.6 mm × 25 cm) — 固定相為十八烷基鍵合硅膠 (粒徑 5 μm)；

- 柱後衍生化

- (1) 碘衍生化

- 柱後反應系統 — 反應溫度 70°C 並以 0.5 mM 碘溶液作為柱後衍生化試液。柱後衍生化試液流速為 0.3 mL/min。

- (2) 光化學衍生化

- 柱後反應系統 — 具有紫外光燈 254 nm 和衍生反應管。

- 流動相 — 蒸餾水 – 乙腈 – 甲醇 (3:1:1, v/v) ;

- 熒光檢測器 — 激發波長 (λ_{ext}) = 360 nm 及 發射波長 (λ_{em}) = 450 nm。

設定液相色譜柱流動相流速為 1.0 mL/min。在此條件下，黃曲霉毒素 G₂、G₁、B₂ 和 B₁ 會依次洗脫。按照峰面積及濃度計算各個黃曲霉毒素含量。

附註：在重用或棄置前，將所有實驗用容器在 10% 家用漂白液浸泡過夜。

限度 — 除源於礦物的藥材或另有規定外，藥材樣品中黃曲霉毒素 B₁ 及總黃曲霉毒素 (B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 之和) 應符合表 2 所列的限度。

表 2 藥材中的黃曲霉毒素限度

黃曲霉毒素	限度 (不多於)
黃曲霉毒素 B ₁	5 µg/kg
總黃曲霉毒素 (B ₁ 、B ₂ 、G ₁ 及 G ₂ 之和)	10 µg/kg