PC-32

市售濾掛式咖啡之赭趜毒素 A、丙烯醯胺、殘留農藥及咖啡因之 調查研究

<u>盧昭吟 林燕萍 林春生</u> 陳佩慈 洪千雅 廖淑貞 李盈霖 陳怡 臺南市政府衛生局

為瞭解市售濾掛式咖啡中咖啡因、丙烯醯胺、赭趜毒素A及殘留農藥之現況,本局於107年5月至6月自行至超市、便利商店及量販店價購檢體,共計41件。赭麴毒素A、丙烯醯胺及殘留農藥之檢驗方法均依據衛生福利部公告檢驗方法或食品藥物管理署公開建議方法;咖啡因檢驗方法則參考CNS總號9432,類號N6174,食品中咖啡因含量檢驗法。檢驗結果顯示:在赭麴毒素A檢驗,2件檢體分別檢出0.57及0.65ppb,其餘39件均未檢出,結果均符合衛生福利部102年08月20日部授食字第1021350146號令修正公告「食品中赭麴毒素A限量-烘焙咖啡豆及咖啡粉5 ppb以下」,合格率100%;在丙烯醯胺檢驗,41件檢體檢出含量介於133~390ppb之間,結果均符合食品藥物管理署發布「食品中丙烯醯胺指標值參考指引-烘焙咖啡450ppb以下」;在殘留農藥檢驗,41件檢體均未檢出,合格率100%;在咖啡因檢驗,41件檢體檢出含量介於11.95~21.45mg/g之間,目前食品藥物管理署尚未規範濾掛式咖啡之咖啡因標示,且沖泡過程會因時間、熱水溫度、熱水量等因素影響咖啡因含量,因此,有關市售濾掛式咖啡中咖啡因檢驗結果將提供中央主管機關做為未來訂定規範之參考。

前言

咖啡因是一種植物生物鹼,主要存在於咖啡樹、茶樹的果實及葉片裡,而可可樹、可樂果等也存在少量的咖啡因。咖啡因對人體有提神效果,能暫時的驅走睡意並恢復精力⁽²⁾,對於許多人來說是不可或缺的。適量攝取咖啡因具有提神、利尿、舒壓等效果,但若攝取過量則會出現心悸、焦躁、易怒、頭痛、失眠等症狀。此外,對於長期飲用咖啡的人來說,很容易對咖啡因產生心理依賴,導致沒喝咖啡前會出現煩躁及頭痛等戒斷症狀。依據衛生福利部建議,每日咖啡因總攝取量不超過 300 mg (毫克) (1)。

丙烯醯胺是一種化學物質,食品中還原醣與游離胺基酸-天門冬醯胺(Asparginine)經高溫(120℃以上)加工⁽²⁾,透過「梅納反應(Maillard reaction)」而產生(如圖一)⁽³⁾,世界衛生組織(WHO)國際癌症研究中心(IARC)將丙烯醯胺歸類為 2A,可能致癌物質;咖啡生豆到可飲用之烘焙咖啡,會經過二次高溫加工處理,烘焙程度會影響丙烯醯胺生成量,但無法由外觀顏色來判定⁽⁴⁾,因此藉由本篇調查來瞭解市售濾掛式咖啡之丙烯醯胺含量。

赭麴毒素是一種由黴菌所產生的二級代謝產物,與黃麴毒素都屬於黴菌類毒素,是 天然的黴菌毒素,赭麴毒素分為A、B、C 三種,其中以赭麴毒素A(Ochratoxin A)毒 性最強。除了會引發腎病變外,經動物實驗證明,也有造成流產、肝臟傷害及致癌的危險性。赭麴毒素是由於穀物保存不當的狀況下,導致黴菌大量生長而產生的毒素,要降低咖啡豆的黴菌污染,首先就得由源頭把關,咖啡生豆在由產地運送到市場之前,都會經過一連串的處理,使水含量降低到12%以下,以利產品之儲存。

農藥是國人對各種食材都很在意的問題,通常咖啡的農藥會噴灑在葉面,咖啡會經由果皮(第一層)的保護、加上果肉(第二層)還有果膠(第三層)的滋養,農藥本身殘留甚少。在烘焙咖啡豆的過程中,多數的農藥還會因為高溫而減少。但咖啡噴灑的農藥,若為系統性農藥則經由植株根部、葉部組織的吸收,散布至植物體內部,因此,喝了長期噴灑農藥的咖啡,也就等同喝了長期累積農藥於每一顆咖啡豆內的農藥咖啡。可想而知,每天一杯,恐怕對身體產生嚴重影響!

本計畫係市售濾掛式咖啡中咖啡因、丙烯醯胺、赭趜毒素 A 及殘留農藥之調查研究, 供中央主管機關做為未來訂定規範之參考。



圖一 食品中丙烯醯胺之生成

材料與方法

一、 檢體來源

本計畫之濾掛式咖啡檢體購自超市、便利商店及量販店等地,總計檢體共41件。



二、 設備

- (一) 高效液相層析儀 (HPLC): Waters e2695。
- (二) 液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS): Agilent 1260 +SCIEX 5500 Q TRAP[®] LC-MS/MS System。
- (三) 氣相層析串聯質譜儀(GC/MS/MS): Bruker SCION-TQ triple quadrupole
- (四) 天平: Sartorius TE3102S、Sartorius TE214S
- (五) 固相萃取裝置。
- (六) 攪拌均質器
- (七) 高速組織研磨振盪均質機
- (八) 高速冷凍離心機
- (九) 氮氣濃縮裝置
- (十) 振盪器

三、 器具及材料

- (一) 定量瓶:100 mL。
- (二) 分液漏斗:100 mL。
- (三) 濃縮瓶:150 mL。
- (四) 塑膠離心管:15 mL、50 mL, PP 材質。
- (五) 濾膜: 孔徑 0.45 μm, Nylon 材質。
- (六) 三角燒瓶:50 mL。
- (七) 過濾層析匣:OASIS HLB 6CC VAC CARTRIDGE, 200MG;Oasis® HLB,200 mg,6 mL,;cartridge):Oasis® MCX,60 mg,3 mL。
- (八) 373 項農藥多重殘留分析 QuEChERS 用粉劑。
- (九) 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 OchraTest 管柱。
- (十) 玻璃纖維濾紙(Glass microfibre filters): 直徑 11cm。

四、 試藥

(一) 對照用標準品: 農藥、咖啡因、丙烯醯胺、碳13同位素丙烯醯胺(1,2,3-13C3 acrylamide,1 mg/mL)。

(二)藥品及溶劑

- 1. 甲醇:液相層析級。
- 2. 乙腈:液相層析級。
- 3. 氨水: 濃度 25%, 試藥特級。
- 4. 甲酸:試藥級。
- 5. 去離子水:電阻係數可達 18 MΩ·cm 以上。
- 6. 冰醋酸:試藥級。
- 7. 醋酸銨:試藥級。
- 8. 正己烷:殘留量級。
- 9. 丙酮:殘留量級。
- 10. 碳酸氫鈉:試藥級。
- 11. 聚乙二醇: 試藥級。
- 12. 氯化鈉:試藥級。磷酸氫二鈉
- 13. 磷酸二氫鉀:試藥級。
- 14. 氯化鉀:試藥級。
- 15. 鹽酸:試藥級。
- 16. 醋酸: 試藥級。

五、 試劑之配製

- (一) 9% 氨水溶液:取25% 氨水180 mL,以去離子水定容至500 mL。
- (二) 0.28% 氨水溶液:取25% 氨水5.6 mL,以去離子水定容至500 mL。
- (三) 含 0.1%甲酸之甲醇溶液:取甲酸 1 mL,以甲醇定容至 1 L。
- (四) 含1%醋酸之乙腈溶液:取冰醋酸 10 mL 與乙腈 990 mL 混合均匀。
- (五) 含5%甲酸之乙腈溶液:取甲酸5 mL 與乙腈95 mL 混合均匀。
- (六) 丙酮:正己烷(1:1, v/v)溶液:取丙酮與正己烷以1:1(v/v)比例混匀。
- (七) 移動相
 - 1. 甲醇:去離子水 (3:7):取 600 mL 甲醇加入 1400 mL 去離子水,混合均匀。

- 2. 離子水: 0.1%甲酸之甲醇 (9:1): 取 900 mL 去離子水加入 100 mL0.1%甲酸之甲醇,混合均匀。
- 3. 取醋酸銨 0.4 g,以去離子水溶解使成 1000 mL,加入甲酸 1 mL 混合均匀,以 濾膜過濾,取濾液供作移動相溶液 A。
- 4. 取醋酸銨 0.4 g,以甲醇溶解使成 1000 mL,以濾膜過濾,取濾液供作移動相溶液 B。
- 5. 取去離子水、乙腈及醋酸以 99:99:2 (v/v/v)比例混匀,以濾膜過濾,取濾液 供作移動相溶液。

六、 標準溶液之配製

- (一) 精確秤取咖啡因標準品 100 mg (0.1 g) 以去離子水溶解後定容至 100 mL,其 濃度為 1000 μg/ mL,作為標準原液。
- (二) 精確秤取丙烯醯胺對照用標準品約 10 mg,,以去離子水溶解並定容至 100 mL,作為標準原液,於4℃貯存備用。
- (三) 精確量取碳 13 同位素丙烯醯胺內部標準品 1 mL,以甲醇定容至 100 mL,作為內部標準原液。
- (四) 精確量取農藥對照用標準品各約25 mg,精確稱定,以乙腈、丙酮或正己烷溶解並定容至25mL,作為標準原液。
- (五) 精確量取磷酸三苯酯內部標準品約50 mg,精確稱定,以甲醇溶解並定容至50 mL,作為內部標準原液。
- (六) 精確量取赭麴毒素 A 標準品 0.1mL,以乙腈定容至 1mL,供作標準原液。

七檢驗方法

- (一) CNS 總號 9432, 類號 N6174, 食品中咖啡因含量檢驗法。
- (二)衛生福利部食品藥物管理署 100 年 11 月 12 日公開建議食品中丙烯醯胺之檢驗方法。
- (三)衛生福利部食品藥物管理署 103 年 7 月 22 日公告修正食品中黴菌毒素檢驗方法—赭麴毒素 A 之檢驗
- (四)衛生福利部食品藥物管理署106 年 8 月 31 日公告修正食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析方法(五)

↓取三角燒瓶, 秤取1g

↓加入5mL9%氨水,沸騰水浴加熱2分鐘

↓ 待冷卻後,倒入 100 mL 定量瓶

↓以甲醇:去離子水 (3:7) 洗三角燒瓶

↓將洗液倒入 100 mL 定量瓶

↓再以甲醇:去離子水 (3:7) 定容至 100 mL,混合均匀

↓取 10 mL 以 0.45µm 濾膜過濾,供作檢液

↓取過濾層析匣 (HLB) 放置固相萃取裝置上

↓取5mL 甲醇潤洗過濾層析匣,棄流出液

↓再取 5 mL 去離子水潤洗過濾層析匣,棄流出液

↓取5 mL 檢液注入過濾層析匣

↓調整固相萃取裝置,流速約每秒一滴,棄流出液

↓再取 5 mL 0.28%氨水注入過層析匣,棄流出液

↓再注入5 mL 甲醇,收集沖提液

↓以去離子水定容至5mL

↓以 0.45 µm 濾膜過濾

↓供作 HPLC 分析用檢液

↓取約1g

↓置於離心管中

↓加內部標準溶液1 mL

↓再加去離子水9 mL,振盪20分鐘

↓於5°C以3500 rpm離心20分鐘

|取上清液,供淨化用

」串聯Oasis® HLB及Oasis® MCX固相萃取匣

」分別以甲醇5 mL及3 mL潤洗

↓再分別以去離子水5 mL及3 mL清洗

↓取上清液1.5 mL,注入串聯之固相萃取匣,棄流出液

↓加入去離子水0.5 mL,棄流出液

↓再以去離子水3 mL沖提

↓收集沖提液

↓於35℃以氫氣濃縮至1.5 mL

↓供作檢液

圖二 咖啡因檢驗方法流程圖

↓取紛狀檢體約5g

↓置於50mL離心管

↓加入咖啡萃取溶液25mL

↓振盪3分鐘,以2500×g 離心10分鐘

↓上清液以濾紙過濾

↓精確量取濾液2mL

↓加入磷酸緩衝溶液48mL混勻

↓以玻璃纖維濾紙過濾

↓精確量取濾液25mL

↓以每秒1滴之流速通過免疫親和性管柱

↓再以去離子水10mL流洗管柱兩次,流速每秒1滴

↓將管柱內水分排淨後

↓取甲醇2mL,以每秒1滴之流速沖提

↓收集沖提液,並以氮氯吹乾

↓殘留物以50%乙腈溶液溶解並定容至1mL

↓過濾,供作檢液

圖三 丙烯醯胺檢驗方法流程圖

取均質後之檢體約 2 g, 加冷藏之去離子水 10 mL, 靜置 20 min

↓加入含 1%醋酸之乙腈溶液 10mL 及 50 μg/mL

↓加入陶瓷均質石1顆及萃取用粉劑,激烈振盪 數次(防止鹽類結塊)

↓以高速振盪均質機於 1000rpm 振盪或以手激烈振盪1 分鐘

↓於 15°C, 3000 × g 離心 1 分鐘

内部標準溶液 10 µL

↓取上清液 6 癿,置於淨化用離心管Ⅲ(茶類)

↓以高速振盪均質機以 1000 rpm 振盪或以手激

烈振盪 1 分鐘

↓於 15℃,3000 × g 離心 2 分鐘

↓取上清液 1 mL,以氮氯吹至剛乾

↓加丙酮:正己烷(1:1, v/v) ,使體積成為 1mL

混合均匀,以滤膜遏滤,供作檢液,

以 GC/MS/MS 分析

↓加甲醇,使體積成為 lmL 混合均匀混合均匀, 以濾膜過濾,供作檢液 ,以 LC/MS/MS 分析

圖四 赭趜毒素 A 檢驗方法流程圖

(五)鑑別試驗及含量測定

精確量取適量之檢液及標準溶液,分別注入高效液相層析儀中進行分析,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咖啡因 之含量(mg/g)。

C:由標準曲線求得檢液中咖啡因之濃度(µg/mL)

V: 檢體最後定容之體積(mL) M:取樣分析檢體之重量(g)

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)

精確量適量之檢液及標準溶液,分別注入液相層析串聯質譜儀中,就檢液與基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度鑑別之,並依下列計算式求出檢體中各農藥之含量(ppm):

檢體中各農藥之含量
$$(ppm) = \frac{CXV}{M}$$

C: 由各農藥之基質匹配檢量線求得檢液中各農藥之濃度(μg/mL)

V: 萃取檢體之含 1%醋酸之乙腈溶液之體積(10 mL)

M:取樣分析檢體之重量(g)

結果與討論

一、品質管制之結果

標準曲線相關係數r>0.99;空白分析均低於1/2定量極限(LOQ);標準曲線初始確認之相對誤差值為±15%;標準曲線持續確認查核試驗之相對誤差值為±10%;重複分析之相對差異百分比<10%;添加分析之平均回收率均可達80%以上,以上皆符合本局之品管相關規範。

二、檢驗結果

飲料飲品的多元化,其中咖啡已成國人日常生活飲料選項之一,濾掛式咖啡在便利性獲得民眾喜愛,也成為咖啡市場重要商品之一,本計畫針對 41 件濾掛式咖啡檢體進行咖啡因、丙烯醯胺、赭趣毒素 A 及殘留農藥之調查,有 2 件含赭趣毒素 A (咖啡中定量極限為 0.5 ppb),但皆未超過法規限量標準(根據現行法規的規定,咖啡豆及咖啡粉中的規定 5 ppb 以下),而未檢出則有 39 件,結果顯示在本市各商購買之濾掛式咖啡,含赭趣毒素 A 的情形約 4.88%,;在丙烯醯胺檢驗,41件檢體檢出含量介於 133~390ppb 之間,結果均符合食品藥物管理署發布「食品中丙烯醯胺指標值參考指引-烘焙咖啡 450ppb 以下」;在殘留農藥檢驗,41件檢體均未檢出,合格率 100%;在咖啡因檢驗,41件檢體檢出含量介於 11.95~21.45mg/g 之間,目前食品藥物管理署尚未規範濾掛式咖啡之咖啡因標示,且沖泡過程會因時間、熱水溫度、熱水量等因素影響咖啡因含量,因此,有關市售濾掛式咖啡中咖啡因檢驗結果將提供中央主管機關做為未來訂定規範之參考。

參考資料

- 1. 購買現煮咖啡,認清紅黃綠標示。
 https://www.fda.gov.tw/tc/newsContent.aspx?id=10060&chk=e3029d3d-a0b5-4383-8c6d-3600ecdd49c9。
- 國家環境毒物研究中心網站。
 http://nehrc.nhri.org.tw/foodsafety/Acrylamide.php。
- 3. 社團法人台灣國際生命科學會(ILSI Taiwan)網站。 http://www.ilsitaiwan.org/Page/SpecialColumn.aspx
- 4. 食力 foodNEXT·食事求實的知識頻道。 https://www.foodnext.net/column/columnist/paper/4593726676
- 5. 衛生福利部食品藥物管理署
- 6. 維基百科。https://zh.wikipedia.org/wiki/。