

食品中黴菌毒素檢驗方法－玉米及其製品中伏馬毒素 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 之檢驗  
Method of Test for Mycotoxin in Foods- Test of Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Corn and  
Corn Products

1. 適用範圍：本方法適用於玉米及其製品中伏馬毒素 B<sub>1</sub> (fumonisin B<sub>1</sub>)及伏馬毒素 B<sub>2</sub> (fumonisin B<sub>2</sub>)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取、淨化及衍生化後，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：螢光檢出器 (fluorescence detector)。
      - 2.1.1.2. 層析管：RP-18，5 μm，內徑 4.6 mm × 25 cm，或同級品。
    - 2.1.2. 酸鹼度測定儀 (pH meter)。
    - 2.1.3. 振盪器 (Shaker)。
    - 2.1.4. 離心機 (Centrifuge)：可達 2500 ×g 者。
    - 2.1.5. 氮氣濃縮裝置 (Nitrogen evaporator)。
  - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採液相層析級；磷酸二氫鈉 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)、鄰苯二甲醛 (*o*-phthaldialdehyde)、乙硫醇 (2-mercaptoethanol)、四硼酸鈉 (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O)、磷酸氫二鈉 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸二氫鉀 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、鹽酸、磷酸、氯化鈉及氯化鉀均採用試藥特級；去離子水 (比電阻於 25°C 可達 18 MΩ·cm 以上)；伏馬毒素 B<sub>1</sub> 及 B<sub>2</sub> 對照用標準品。
  - 2.3. 器具及材料<sup>(註)</sup>：
    - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP 材質。
    - 2.3.2. 容量瓶：10 mL、100 mL 及 1000 mL，褐色。
    - 2.3.3. 濾紙：直徑 12 cm。
    - 2.3.4. 玻璃纖維濾紙：直徑 9 cm。
    - 2.3.5. 玻璃過濾器 (Glass filter holder)。
    - 2.3.6. 免疫親和性管柱 (Immunoaffinity column)：採用內含對伏馬毒素具有專一性單株抗體之 Vicam 管柱，或同級品。

2.3.7. 濾膜：孔徑 0.45  $\mu\text{m}$ ，Nylon 材質。

註：操作時，應使用褐色或不透光之器具。

#### 2.4. 試劑之調製：

##### 2.4.1. 0.1 M 磷酸二氫鈉溶液：

稱取磷酸二氫鈉 15.6 g，以去離子水溶解使成 1000 mL。

##### 2.4.2. 0.1 M 四硼酸鈉溶液：

稱取四硼酸鈉 3.8 g，以去離子水溶解使成 100 mL。

##### 2.4.3. 萃取溶液：

取乙腈、甲醇及去離子水以 1：1：2 (v/v/v) 比例混勻。

##### 2.4.4. 2 N 鹽酸溶液：

取鹽酸 180 mL，緩緩加入去離子水 500 mL 中，再加去離子水使成 1000 mL。

##### 2.4.5. 磷酸鹽緩衝溶液：

稱取氯化鈉 8 g、磷酸氫二鈉 1.2 g、磷酸二氫鉀 0.2 g 及氯化鉀 0.2 g，加去離子水 990 mL 溶解，以 2 N 鹽酸溶液調整 pH 值至 7.0，以去離子水定容至 1000 mL。

##### 2.4.6. 鄰苯二甲醛溶液：

稱取鄰苯二甲醛 40 mg，溶於甲醇 1 mL，加 0.1 M 四硼酸鈉溶液 5 mL 及乙硫醇 50  $\mu\text{L}$  混勻，於室溫避光儲存，可保存一週。

##### 2.4.7. 50% 乙腈溶液：

取乙腈及水以 1：1 (v/v) 比例混勻。

#### 2.5. 移動相溶液之調製：

取甲醇及 0.1 M 磷酸二氫鈉溶液以 77：23 (v/v) 比例混勻，以磷酸調整 pH 至 3.3，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

#### 2.6. 標準溶液之配製：

取伏馬毒素 B<sub>1</sub> 及 B<sub>2</sub> 對照用標準品各約 1 mg，精確稱定，共置於 10 mL 容量瓶中，以 50% 乙腈溶液溶解並定容，作為標準原液。臨用時取適量標準原液，以 50% 乙腈溶液稀釋至 1~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，供作標準溶液。

## 2.7. 檢液之調製：

### 2.7.1. 萃取：

將檢體磨碎混勻後，取約 20 g，精確稱定，加入萃取溶液 50 mL，振盪 2 分鐘，以 2500 ×g 離心 10 分鐘，經濾紙過濾，取上清液。沉澱物再加萃取溶液 50 mL，重複操作一次。合併上清液，以萃取溶液定容至 100 mL，供淨化用。

### 2.7.2. 淨化：

精確量取供淨化用溶液 10 mL，置於離心管中，加入磷酸鹽緩衝溶液 40 mL 混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液 10 mL，注入免疫親和性管柱，流速控制每秒 1~2 滴，棄流出液，再以磷酸鹽緩衝溶液 10 mL 清洗管柱，俟管柱內溶液排淨後，以甲醇 1.5 mL 沖提，流速控制每秒 1~2 滴，收集沖提液，以氮氣吹乾，殘留物以 50% 乙腈溶液 200  $\mu$ L 溶解後，經濾膜過濾，取濾液供衍生化用。

### 2.7.3. 衍生化：

精確量取供衍生化用溶液 50  $\mu$ L 於褐色玻璃瓶中，加入鄰苯二甲醛溶液 50  $\mu$ L，振盪混勻 30 秒，反應 3 分鐘後，供作檢液<sup>(註)</sup>。

註：伏馬毒素-鄰苯二甲醛衍生物於反應 3 分鐘後螢光即逐漸消退，必須立即注入液相層析系統分析。

## 2.8. 檢量線之製作：

精確量取不同濃度之標準溶液 0.5 mL，添加於空白檢體中，依 2.7 節調製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析，就各伏馬毒素之波峰面積，與對應之各伏馬毒素濃度，分別製作 0.05~5  $\mu$ g/mL 檢量線。

高效液相層析測定條件：

層析管柱：RP-18，5  $\mu$ m，內徑 4.6 mm × 25 cm。

螢光檢出器：激發波長 335 nm，發射波長 440 nm。

移動相溶液：依 2.5 節所調製之溶液。

移動相流速：1.0 mL/min。

注入量：20  $\mu$ L。

## 2.9. 鑑別試驗與含量測定：

精確量取檢液及檢量線溶液各 20  $\mu$ L，分別注入液相層析儀中，依 2.8.節條件進行分析。就檢液與檢量線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伏馬毒素 B<sub>1</sub> 或 B<sub>2</sub> 之含量(ppm)：

$$\text{檢體中伏馬毒素 B}_1 \text{ 或 B}_2 \text{ 之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中伏馬毒素 B<sub>1</sub> 或 B<sub>2</sub> 之濃度( $\mu$ g/mL)

V：檢體最後定容之體積(0.2 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數(50)

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，伏馬毒素 B<sub>1</sub> 及 B<sub>2</sub> 分別為 0.03 及 0.07 ppm。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

AOAC. 2001. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn flakes. AOAC Official Method 2001.04.