

食品中黴菌毒素檢驗方法－黃麴毒素之檢驗修正 總說明

為加強天然毒素之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中黴菌毒素檢驗方法－黃麴毒素之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、適用範圍增加「油脂及香辛料」。
- 二、「試劑之調製」增列「Tween-20 溶液」。
- 三、「檢液之調製」修正檢液稀釋倍數及通過管柱量及增列香辛料部分。
- 四、附註一「定量極限」增列油脂及香辛料部分。
- 五、刪除附註三。
- 六、附註四所提公告指定 CNS 總號四零九零類號 N 六零九七食品中黃麴毒素檢驗法，前行政院衛生署已於一百零一年十一月十九日以署授食字第一零一一九零二七七號公告廢止其指定，故刪除之。
- 七、增列附表「液相層析串聯質譜儀多重反應偵測模式參數」。
- 八、增列參考文獻。

食品中黴菌毒素檢驗方法－黃麴毒素之檢驗修正 對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於香辛料、油脂、花生、玉米、穀類及其製品中黃麴毒素 B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>檢體經萃取及淨化後，以高效液相層析儀 (high performance liquid chromatograph, HPLC) 分析之方法。</u></p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：螢光檢出器 (fluorescence detector)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：Cosmosil 5C18-AR, 5 μm, 內徑 4.6 mm × 25 cm, 或同級品。</p> <p>2.1.1.3. 光化學反應器：Knitted Reactor Coils (KRC) 25-25, 或同級品。</p> <p>2.1.2. 均質機 (Homogenizer)：轉速可達 15000 rpm 以上並適用有機溶劑者。</p> <p>2.1.3. 粉碎機 (Grinder)。</p> <p>2.2. 試藥：<u>氯化鈉及 Tween-20 均採用試藥特級；甲醇採用液相層析級；去離子水 (比電阻於 25 °C 可達 18 MΩ·cm 以上)；黃麴毒素 B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 對照用混合標準品 (濃度分別為 1000、300、1000 及 300 ng/mL)。</u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL, PP 材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：2 mL、10 mL 及 20 mL, 褐色。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑 0.22 μm, Nylon 材質。</p> <p>2.3.4. 濾紙：Whatman No.1, 直徑 11 cm, 或同級品。</p> <p>2.3.5. 玻璃纖維濾紙 (Glass microfibre filters)：直徑 9 cm。</p> <p>2.3.6. 免疫親和性管柱</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於花生、玉米、<u>其他穀類及其製品中黃麴毒素 B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 之檢驗。</u></p> <p>2. 檢驗方法：高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。</p> <p>2.1 裝置：</p> <p>2.1.1 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1 檢出器：螢光檢出器 (fluorescence detector)。</p> <p>2.1.1.2 層析管：Cosmosil 5C18-AR, 5 μm, 內徑 4.6 mm × 25 cm, 或同級品。</p> <p>2.1.1.3 光化學反應器：Knitted reactor coils (KRC) 25-25, 或同級品。</p> <p>2.1.2. 均質機 (Homogenizer)：轉速可達 15000 rpm 以上並適用有機溶劑者。</p> <p>2.1.3 粉碎機 (Grinder)。</p> <p>2.2 試藥：氯化鈉採用試藥特級；甲醇採用液相層析級；黃麴毒素 B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 之對照用混合標準品，濃度分別為 1000 ng/mL、300 ng/mL、1000 ng/mL 及 300 ng/mL。</p> <p>2.3 器具及材料：</p> <p>2.3.1 離心管：50 mL, <u>附</u> PP 材質螺旋蓋。</p> <p>2.3.2 <u>褐色</u> 容量瓶：2 mL、10 mL 及 20 mL。</p> <p>2.3.3. 濾膜：<u>直徑 47 mm</u>, 孔徑 0.22 μm, Nylon 材質。</p> <p>2.3.4 濾紙：Whatman No.1, 直徑 11 cm, 或同級品。</p> <p>2.3.5 玻璃纖維濾紙：直徑 9 cm。</p> <p>2.3.6 <u>塑膠針筒：1 mL 及 10 mL。</u></p> <p>2.3.7 免疫親和性管柱</p>	<p>一、適用範圍增加「油脂及香辛料」。</p> <p>二、「試劑之調製」增列「Tween-20 溶液」。</p> <p>三、「檢液之調製」修正檢液稀釋倍數及通過管柱量及增列香辛料部分。</p> <p>四、附註一「定量極限」增列油脂及香辛料部分。</p> <p>五、刪除附註三。</p> <p>六、附註四所提公告指定 CNS 總號四零九零類號 N 六零九七食品中黃麴毒素檢驗法，前行政院衛生署已於一百零一年十一月十九日以署授食字第一零一一九零二七七號公告廢止其指定，故刪除之。</p> <p>七、增列附表「液相層析串聯質譜儀多重反應偵測模式參數」。</p>

<p>(Immunoaffinity column):採用內含對黃麴毒素 B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 具專一性單株抗體之 AflaTest-P 管柱，或同級品。</p> <p>2.3.7. 針筒過濾器 (Syringe filter): 濾膜孔徑 0.22 μm，PTFE 材質。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 50% 甲醇溶液： 取<u>甲醇與去離子水</u>以 50：50 (v/v)之比例混勻。</p> <p>2.4.2. 60% 甲醇溶液： 取<u>甲醇與去離子水</u>以 60：40 (v/v)之比例混勻。</p> <p>2.4.3. 80% 甲醇溶液： 取<u>甲醇與去離子水</u>以 80：20 (v/v)之比例混勻。</p> <p>2.4.4. 10% Tween-20 溶液： 取 Tween-20 與去離子水以 10：90 (v/v)之比例混勻。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製： 取<u>甲醇與去離子水</u>以 45：55 (v/v)之比例混勻後，<u>經濾膜過濾</u>，取濾液供作移動相溶液。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： <u>精確量</u>取黃麴毒素 B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 對照用混合標準品 1 mL，以 50% 甲醇溶液稀釋並定容至 20 mL，作為標準原液。<u>臨用時</u>取<u>適量標準原液</u>，以 50% 甲醇溶液稀釋黃麴毒素 B₁ 及 G₁ 至 0.1~50 ng/mL，黃麴毒素 B₂ 及 G₂ 至 0.05~15 ng/mL，供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製：</p> <p>2.7.1. 玉米、穀類及其製品： <u>將檢體磨碎混勻後</u>，取約 50 g，<u>精確稱定</u>，置於均質機中，<u>加入</u>氯化鈉 5 g 及 80% 甲醇溶液 100 mL，<u>以 15000 rpm 均質 2 分鐘</u>，<u>經濾紙過濾</u>。<u>精確量</u>取濾液 10 mL，<u>加去離子水 40 mL 混勻</u>，以玻璃纖維濾紙過濾。<u>精確量</u>取濾液 10 mL，<u>注入免疫親和管柱 (流速控制 1 滴/秒)</u>，待濾液完全通過管柱後，<u>以去離子水 10 mL 流洗 2 次(流速控制 1 滴/秒)</u>，棄</p>	<p>(Immunoaffinity column):採用內含對黃麴毒素 B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 具專一性單株抗體之 AflaTest-P 管柱，或同級品。</p> <p>2.3.8 針筒過濾器 (Syringe filter): <u>直徑 13 mm</u>，<u>濾膜孔徑 0.22 μm</u>，PTFE 材質。</p> <p>2.4 試劑之調製：</p> <p>2.4.1 50% 甲醇溶液 取<u>水與甲醇</u>以 50：50 (v/v)之比例混勻。</p> <p>2.4.2 60% 甲醇溶液 取<u>水與甲醇</u>以 40：60 (v/v)之比例混勻。</p> <p>2.4.3 80% 甲醇溶液 取<u>水與甲醇</u>以 20：80 (v/v)之比例混勻。</p> <p>2.5 移動相溶液之調製： 取<u>水與甲醇</u>以 55：45 (v/v)之比例混勻後，<u>以濾膜過濾</u>，取濾液供作移動相溶液。</p> <p>2.6 標準溶液之配製： 取黃麴毒素 B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 對照用混合標準品 1 mL，以 50% 甲醇溶液稀釋並定容至 20 mL，作為標準原液。<u>使用時</u>，<u>再以 50% 甲醇溶液稀釋黃麴毒素 B₁ 及 G₁ 至 0.1~50 ng/mL</u>，黃麴毒素 B₂ 及 G₂ 至 0.05~15 ng/mL，供作標準溶液。</p> <p>2.7 檢液之調製：</p> <p>2.7.1. 玉米、穀類及其製品： <u>取磨碎混勻之檢體約 50 g</u>，<u>精確稱定</u>，置於均質機中，<u>加氯化鈉 5 g</u>，<u>再加入 80% 甲醇溶液 100 mL</u>，<u>於 15000 rpm 均質 2 分鐘後</u>，<u>以濾紙過濾</u>。<u>精確量</u>取濾液 10 mL <u>加水 40 mL 混勻後</u>，以玻璃纖維濾紙過濾。<u>精確量</u>取濾液 10 mL，<u>以每秒 1 滴之流速通過免疫親和性管柱</u>，待濾液完全通過管柱後，<u>以水 10 mL 沖洗 2 次，流速每</u></p>	<p>八、增列參考文獻。</p> <p>九、增修訂部分文字。</p>
--	---	------------------------------------

流出液，再以甲醇 1 mL 沖提(流速控制 1 滴/秒)，收集沖提液，以去離子水定容至 2 mL，經針筒過濾器過濾，供作檢液。

2.7.2. 油脂、花生及其製品：

將油脂等液態檢體直接混勻，其他檢體經磨碎混勻後，取約 25 g，精確稱定，置於均質機中，加入氯化鈉 5 g 及 60% 甲醇溶液 125 mL，以 15000 rpm 均質 2 分鐘後，經濾紙過濾。精確量取濾液 10 mL，加去離子水 30 mL 混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液 20 mL，注入免疫親和管柱(流速控制 1 滴/秒)，待濾液完全通過管柱後，以去離子水 10 mL 流洗 2 次(流速控制 1 滴/秒)，棄流出液，再以甲醇 1 mL 沖提(流速控制 1 滴/秒)，收集沖提液，以去離子水定容至 2 mL，經針筒過濾器過濾，供作檢液。

2.7.3. 香辛料：

將檢體磨碎混勻後，取約 25 g，精確稱定，置於均質機中，加入氯化鈉 5 g 及 80% 甲醇溶液 100 mL，以 15000 rpm 均質 2 分鐘，經濾紙過濾。精確量取濾液 5 mL，加 10% Tween-20 溶液 20 mL 混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液 4 mL，注入免疫親和管柱(流速控制 1 滴/秒)，待濾液完全通過管柱後，以去離子水 10 mL 流洗 2 次(流速控制 1 滴/秒)，棄流出液，再以甲醇 1 mL 沖提(流速控制 1 滴/秒)，收集沖提液，以去離子水定容至 2 mL，經針筒過濾器過濾，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 μ L，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行液相層析，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各黃麴毒素之含量 (ppb)：

秒 1 滴。待管柱內水排淨後，取甲醇 1 mL，以每秒 1 滴之流速沖提，收集沖提液，加水混合並定容至 2 mL，續以針筒過濾器過濾，取濾液供作檢液。

2.7.2 油脂、花生及其製品：

取油脂等液態檢體直接混勻，其他檢體經磨碎混勻後，取約 25 g，精確稱定，置於均質機中，加氯化鈉 5 g，再加入 60% 甲醇溶液 125 mL，於 15000 rpm 均質 2 分鐘後，以濾紙過濾。精確量取濾液 20 mL 加水 20 mL 混勻後，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液 10 mL，以每秒 1 滴之流速通過免疫親和性管柱，待濾液完全通過管柱後，以水 10 mL 沖洗 2 次，流速每秒 1 滴。待管柱內水排淨後，取甲醇 1 mL，以每秒 1 滴之流速沖提，收集沖提液，加水混合並定容至 2 mL，續以針筒過濾器過濾，取濾液供作檢液。

2.8 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 50 μ L，分別注入高效液相層析儀中，參照下列條件進行液相層析，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黃麴毒素之含量 (ppb)：

<p>檢體中各黃麴毒素含量(ppb) =</p> $\frac{C \times V \times F}{M}$ <p>C：由標準曲線求得檢液中各黃麴毒素之濃度(ng/mL) V：檢體最後定容之體積(mL) F：依 2.7.1.節取樣分析時，F 為 50 依 2.7.2.節取樣分析時，F 為 25 依 2.7.3.節取樣分析時，F 為 125 M：取樣分析檢體之重量(g)</p> <p>高效液相層析測定條件： 層析管柱：Cosmosil 5C18-AR， 5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。 光化學反應器：KRC 25-25。 螢光檢出器：激發波長360 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。 附註： 1. 本檢驗方法之<u>定量極限</u>，於油 脂、花生、玉米、穀類及其製品 中，黃麴毒素 B₁ 及 G₁ 均為 0.2 ppb，黃麴毒素 B₂ 及 G₂ 均為 0.1 ppb；於香辛料中，黃麴毒素 B₁ 及 G₁ 均為 1 ppb，黃麴毒素 B₂ 及 G₂ 均為 0.5 ppb。 2. 食品中有影響檢驗結果之物 質時，應自行探討。 3. 以液相層析串聯質譜儀 (LC/MS/MS) 進行確認時，其 LC/MS/MS 之多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM)模式參考參數如下表。</p> <p>參考文獻 1. Vicam, Aflatest® HPLC instruction manual. Milford, MA, USA. 2. 卓憲駿、陳映君、廖家鼎、曾 素香、高雅敏、周秀冠、陳惠芳。 2014。香辛料中黃麴毒素之檢驗 方法開發及調查。衛生福利部食</p>	<p>檢體中黃麴毒素含量(ppb) =</p> $\frac{C \times V \times F}{M}$ <p>C：由標準曲線求得檢液中黃麴 毒素之濃度(ng/mL) V：檢體最終定容之體積(mL) F：依 2.7.1 節取樣分析時，F 為 50 依 2.7.2 節取樣分析時，F 為 25 M：取樣分析之檢體量(g)</p> <p>高效液相層析測定條件： 層析管柱：Cosmosil 5C18-AR， 5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。 光化學反應器：KRC 25-25。 螢光檢出器：激發波長 360 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。 附註： 1. 本檢驗方法之<u>檢出限量</u>黃麴 毒素 B₁ 為 0.2 ppb、黃麴毒素 B₂ 為 0.1 ppb、黃麴毒素 G₁ 為 0.2 ppb 及黃麴毒素 G₂ 為 0.1 ppb。 2. 食品中有影響檢驗結果之物 質時，應自行探討。 3. 以本檢驗方法檢出時，應利 用 LC/MS 等進行確認。 4. 黃麴毒素之檢驗可依行政院 衛生署公告指定中華民國國家 標準(CNS)總號 4090 類號 N6097 食品中黃麴毒素檢驗法 或本檢驗方法，惟檢驗結果有 爭議時，應以本檢驗方法為準。</p>	
--	--	--

分析物	離子化 模式	離子對		去集簇 電壓 (V)	碰撞 電壓 (eV)
		前驅離子(m/z)	> 產物離子(m/z)		
黃麴毒素B ₁	ESI ⁺	313	241*	48	36
		313	285	48	22
黃麴毒素B ₂	ESI ⁺	315	259*	46	28
		315	287	46	26
黃麴毒素G ₁	ESI ⁺	329	200*	46	42
		329	243	46	26
黃麴毒素G ₂	ESI ⁺	331	189*	48	42
		331	313	48	24

*定量離子對

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。