

## 食品中黴菌毒素檢驗方法－多重毒素之檢驗(MOHWT0010.02)修正總說明

為加強食品天然毒素之管理，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」，另因原公告方法使用免疫親和性管柱淨化流程，需時較長且成本較高，爰擬具「食品中黴菌毒素檢驗方法－多重毒素之檢驗(MOHWT0010.02)」，其修正要點如下：

- 一、修正「適用範圍」。
- 二、修正「離心機」之轉速。
- 三、修正「試藥」。
- 四、修正「濾膜」之材質，並刪除「濾紙」、「玻璃纖維濾紙」、「塑膠針筒」及「免疫親和性管柱」。
- 五、修正「試劑之調製」之甲醇溶液部分。
- 六、修正「移動相溶液之配製」、「標準溶液之配製」、「檢液之調製」及「鑑別試驗及含量測定」。
- 七、增列「檢量線之製作」及「參考文獻」。
- 八、修正附表之多重反應偵測模式參數。

# 食品中黴菌毒素檢驗方法—多重毒素之檢驗 (MOHWT0010.02)修正對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 本檢驗方法適用於穀類及其製品中黃麴毒素 B<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>)等 11 品項黴菌毒素(品項見附表)之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI<sup>+</sup>)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：ACQUITY BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.3. 離心機(Centrifuge)：轉速可達4300 ×g以上者。</p> <p>2.1.4. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.5. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.2. 試藥：氯化鉀、磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、氯化鈉、甲酸銨、氫氧化鈉、鹽酸、甲酸及醋酸均採用試藥特級；甲醇及乙腈均採用液相層析級；去離子水(比電阻可達18 MΩ·cm以上)；黃麴毒素B<sub>1</sub>等對照用標準品共11品項。</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：10 mL及100 mL。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PTFE材質。</p>	<p>1. 本檢驗方法適用於穀類、<u>豆類、核果類等食品</u>及其製品中黃麴毒素 B<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>)等 11 品項黴菌毒素(見附表)之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI<sup>+</sup>)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：ACQUITY BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.3. 離心機(Centrifuge)：轉速可達3000 ×g以上者。</p> <p>2.1.4. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.5. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.2. 試藥：氯化鉀、磷酸二氫鉀、磷酸氫二鈉、氯化鈉、甲酸及醋酸均採用試藥特級；<u>甲醇、乙腈</u>均採用液相層析級；去離子水(比電阻可達18 MΩ·cm以上)；黃麴毒素B<sub>1</sub>等對照用標準品共11品項。</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：10 mL、<u>100 mL及1000 mL</u>，褐色。</p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，<u>Nylon</u>材質。</p> <p>2.3.4. 濾紙：Whatman No.4，直徑11 cm，或同級品。</p> <p>2.3.5. <u>玻璃纖維濾紙：Whatman GF/A，直徑11 cm，或同級品。</u></p> <p>2.3.6. <u>塑膠針筒：1 mL及50 mL。</u></p> <p>2.3.7. <u>免疫親和性管柱(Immunoaffinity</u></p>	<p>一、修正「適用範圍」。</p> <p>二、修正「離心機」之轉速。</p> <p>三、修正「試藥」。</p> <p>四、修正「濾膜」之材質，並刪除「濾紙」、「玻璃纖維濾紙」、「塑膠針筒」及「免疫親和性管柱」。</p> <p>五、修正「試劑之調製」之甲醇溶液部分。</p> <p>六、修正「移動相溶液之配製」、「標準溶液之配製」、「檢液之調製」及「鑑別試驗及含量測定」。</p> <p>七、增列「檢量線之製作」及「參考文獻」。</p> <p>八、修正附表之多重反應偵測模式參數。</p> <p>九、增修訂部分文字。</p>

<p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 0.1 N鹽酸溶液： 取鹽酸9 mL，緩緩加入去離子水500 mL中，再加去離子水使成1000 mL。</p> <p>2.4.2. 0.1 N氫氧化鈉溶液： 稱取氫氧化鈉4 g，<u>以去離子水溶解</u>使成1000 mL。</p> <p>2.4.3. 磷酸鹽緩衝溶液： 稱取氯化鉀0.2 g、磷酸二氫鉀0.2 g、磷酸氫二鈉2.92 g及氯化鈉8 g，加去離子水900 mL溶解，以0.1 N鹽酸溶液或0.1 N氫氧化鈉溶液調整pH至7.4，<u>再加去離子水</u>使成1000 mL。</p> <p>2.4.4. 50%乙腈溶液： 取乙腈50 mL，加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.4.5. 20%乙腈溶液： 取乙腈20 mL，加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.4.6. <u>含70%乙腈之甲醇溶液</u>： 取乙腈70 mL，加甲醇使成100 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p>2.5.1. 移動相溶液A： 稱取甲酸銨0.315 g及甲酸1 mL，<u>以去離子水溶解</u>使成1000 mL，<u>經濾膜過濾</u>，取濾液供作移動相溶液A。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液B： 稱取甲酸銨0.315 g及甲酸1 mL，<u>以甲醇溶解</u>使成1000 mL，<u>經濾膜過濾</u>，取濾液供作移動相溶液B。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取黃麴毒素B<sub>1</sub>、黃麴毒素B<sub>2</sub>、黃麴毒素G<sub>1</sub>、黃麴毒素G<sub>2</sub>、脫氧雪腐鐮刀菌烯醇、玉米赤黴毒素、赭麴毒素A、鐮刀黴菌毒素T-2及鐮刀黴菌毒素HT-2對照用標準品各約1 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至10 mL；取伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>各約1 mg，精確稱定，分別以50%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，<u>冷凍貯存</u>。臨用時分別取各標準原液混合，以乙腈稀釋至黃麴毒素B<sub>1</sub>、黃麴毒素B<sub>2</sub>、黃麴毒素G<sub>1</sub>、黃麴毒素G<sub>2</sub>、赭麴毒素A 0.005~</p>	<p>column)：Myco 6 in 1™管柱，或同級品。</p> <p>2.4. 試劑之調製</p> <p>2.4.1. 0.1 N鹽酸溶液 取鹽酸9 mL，緩緩加入去離子水500 mL中，再加去離子水使成1000 mL。</p> <p>2.4.2. 0.1 N氫氧化鈉溶液 稱取氫氧化鈉4 g，<u>溶於去離子水</u>使成1000 mL。</p> <p>2.4.3. 磷酸鹽緩衝溶液 稱取氯化鉀0.2 g、磷酸二氫鉀0.2 g、磷酸氫二鈉2.92 g及氯化鈉8 g，加去離子水900 mL溶解，以0.1 N鹽酸溶液或0.1 N氫氧化鈉溶液調整至pH7.4，<u>並加去離子水</u>使成1000 mL。</p> <p>2.4.4. 50%乙腈溶液 取乙腈50 mL，加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.4.5. 20%乙腈溶液 取乙腈20 mL，加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.4.6. <u>含0.5%醋酸之80%甲醇溶液</u> 取醋酸0.5 mL及甲醇80 mL，加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之配製：</p> <p>2.5.1. 移動相溶液A 取甲酸1 mL，<u>加去離子水</u>使成1000 mL，<u>以濾膜過濾</u>，取濾液供作移動相溶液A。</p> <p>2.5.2. 移動相溶液B 取甲酸1 mL，<u>加甲醇</u>使成1000 mL，<u>以濾膜過濾</u>，取濾液供作移動相溶液B。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取黃麴毒素B<sub>1</sub>、黃麴毒素B<sub>2</sub>、黃麴毒素G<sub>1</sub>、黃麴毒素G<sub>2</sub>、脫氧雪腐鐮刀菌烯醇、玉米赤黴毒素、赭麴毒素A、鐮刀黴菌毒素T-2及鐮刀黴菌毒素HT-2對照用標準品各約1 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解；取伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>各約1 mg，精確稱定，分別以50%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，貯存於-18℃。臨用時分別取適量標準原液混合，以20%乙腈溶液稀釋至0.5~500 ng/mL，供作標準溶液。</p>	
---	--	--

0.3 µg/mL，鐮刀黴菌毒素T-2及鐮刀黴菌毒素HT-2 0.01~0.6 µg/mL，脫氧雪腐鐮刀菌烯醇及玉米赤黴毒素0.05~3 µg/mL，伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub> 0.2~12 µg/mL，供作標準溶液。

### 2.7. 檢液之調製：

將檢體磨碎混勻，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入磷酸鹽緩衝溶液5 mL，混合均勻，再加入含70%乙腈之甲醇溶液20 mL，振盪30分鐘，以4300 ×g離心5分鐘，取上清液5 mL，於50°C以氮氣吹乾，殘留物以20%乙腈溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

### 2.8. 檢量線之製作：

精確量取標準溶液500 µL，添加於空白檢體中，加入磷酸鹽緩衝溶液5 mL，混合均勻，再加入含70%乙腈之甲醇溶液19.5 mL，依2.7.節調製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析質譜分析，就各黴菌毒素之波峰面積比，與對應之黴菌毒素濃度，製作檢量線，各檢量線之濃度範圍如下：

分析物	濃度範圍 (ng/mL)
黃麴毒素B <sub>1</sub> 黃麴毒素B <sub>2</sub> 黃麴毒素G <sub>1</sub> 黃麴毒素G <sub>2</sub> 赭麴毒素A	0.5~30
鐮刀黴菌毒素T-2 鐮刀黴菌毒素HT-2	1~60
玉米赤黴毒素 脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	5~300
伏馬毒素B <sub>1</sub> 伏馬毒素B <sub>2</sub>	20~1200

液相層析串聯質譜分析測定條件<sup>(註)</sup>：

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 5.5	95 → 15	5 → 85
5.5 → 5.8	15 → 0	85 → 100
5.8 → 6.9	0 → 0	100 → 100
6.9 → 7.0	0 → 95	100 → 5

### 2.7. 檢液之調製：

#### 2.7.1. 萃取

取磨碎混勻之檢體5 g，精確稱定，置於離心管中，加入磷酸鹽緩衝溶液25 mL，振盪60分鐘後，以3000 ×g離心10分鐘，取上清液17.5 mL，以玻璃纖維濾紙過濾，作為萃取液A，供淨化用。於剩餘之殘渣及萃取液中加入甲醇17.5 mL，振盪60分鐘後，以3000 ×g離心10分鐘，續以濾紙過濾，取濾液10 mL，以磷酸鹽緩衝溶液定容至100 mL，以玻璃纖維濾紙過濾，作為萃取液B，供淨化用。

#### 2.7.2. 淨化

取2.7.1.節供淨化用之萃取液B 50 mL，緩緩注入免疫親和性管柱(流速控制1~2滴/秒)，待萃取液完全通過管柱後，以磷酸鹽緩衝溶液20 mL流洗管柱至完全無甲醇殘留，棄流出液。再取萃取液A 5 mL，注入該管柱(流速控制1~2滴/秒)，待萃取液完全通過管柱後，以去離子水10 mL流洗，棄流出液，再以含0.5%醋酸之80%甲醇3 mL沖提(流速控制1~2滴/秒)，收集沖提液，經5分鐘後，再以甲醇3 mL沖提(流速控制1~2滴/秒)，合併沖提液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物以20%乙腈溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，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10 µL，分別注入液相層析串聯質譜分析儀中，依下列條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度<sup>(註)</sup>鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各黴菌毒素之含量(ppb)：

$$\frac{C \times V \times 5}{M}$$

7.0 → 9.0	95 → 95	5 → 5
-----------	---------	-------

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.0 KV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

離子化模式：ESI<sup>+</sup>。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：1000 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如附表。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

### 2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及檢量線溶液各10 μL，分別注入液相層析串聯質譜分析儀中，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及多重反應偵測相對離子強度<sup>(註)</sup>鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各黴菌毒素之含量(ppb)：

檢體中各黴菌毒素之含量(ppb) =

$$\frac{C \times V \times 5}{M}$$

M

C：由檢量線求得檢液中各黴菌毒素之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度由定性及定量離子對之波峰面積相除而得(≤100%)。容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

附註：1. 本檢驗方法之定量極限如附表。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應

C：由標準曲線求得檢液中各黴菌毒素之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

液相層析串聯質譜分析測定條件：

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 5.5	95 → 15	5 → 85
5.5 → 5.8	15 → 0	85 → 100
5.8 → 6.9	0 → 0	100 → 100
6.9 → 7.0	0 → 95	100 → 5
7.0 → 9.0	95 → 95	5 → 5

移動相流速：0.3 mL/min。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 KV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：1000 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如附表。

註：1. 上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2. 相對離子強度由兩組離子對之波峰面積相除而得(≤100%)。容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

附註：1. 本檢驗方法之檢出限量如附表。

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應

自行探討。

3. 本檢驗方法為多重黴菌毒素之檢驗，惟檢驗結果有爭議時，則以單一毒素之公告檢驗方法為準。

參考文獻：

Liao, C. D., Wong, J. W., Zhang, K., Hayward, D. G., Lee, N. S. and Trucksess, M. W. 2013. Multi-mycotoxin analysis of finished grain and nut products using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 61: 4771-4782.

附表、黃麴毒素 B<sub>1</sub> 等 11 品項黴菌毒素之多重反應偵測模式參數及定量極限

項次	分析物		離子對		過濾電壓(V)	碰撞能量(eV)	定量極限(ppb)
	中文名	英文名	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)			
1	黃麴毒素 B <sub>1</sub>	Aflatoxin B <sub>1</sub>	313 > 241 <sup>a</sup> 313 > 285 <sup>a</sup>	42 42	14 38	0.5	
2	黃麴毒素 B <sub>2</sub>	Aflatoxin B <sub>2</sub>	315 > 287 <sup>a</sup> 315 > 259 <sup>a</sup>	40 40	24 26		
3	黃麴毒素 G <sub>1</sub>	Aflatoxin G <sub>1</sub>	329 > 243 <sup>a</sup> 329 > 200 <sup>a</sup>	42 42	28 28		
4	黃麴毒素 G <sub>2</sub>	Aflatoxin G <sub>2</sub>	331 > 245 <sup>a</sup> 331 > 189 <sup>a</sup>	18 18	42 32		
5	赭麴毒素 A	Ochratoxin A	404 > 239 <sup>a</sup> 404 > 102 <sup>a</sup>	24 24	26 72		
6	鐮刀黴菌毒素 T-2	T-2	489 > 245 <sup>a</sup> 489 > 327 <sup>a</sup>	40 40	26 24	1	
7	鐮刀黴菌毒素 HT-2	HT-2	447 > 345 <sup>a</sup> 447 > 285 <sup>a</sup>	32 32	20 20		
8	脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	Deoxynivalenol	297 > 249 <sup>a</sup> 297 > 203 <sup>a</sup>	20 20	12 14	5	
9	玉米赤黴毒素	Zearalenone	319 > 283 <sup>a</sup> 319 > 185 <sup>a</sup>	18 18	19 24		
10	伏馬毒素 B <sub>1</sub>	Fumonisin B <sub>1</sub>	722 > 334 <sup>a</sup> 722 > 352 <sup>a</sup>	48 48	44 40		
11	伏馬毒素 B <sub>2</sub>	Fumonisin B <sub>2</sub>	706 > 336 <sup>a</sup> 706 > 318 <sup>a</sup>	42 42	36 40	20	

\*定量離子對

自行探討。

3. 本檢驗方法為多重黴菌毒素之檢驗，惟檢驗結果有爭議時，則以單一毒素之檢驗方法為準。

附表、黃麴毒素 B<sub>1</sub> 等 11 品項黴菌毒素之質譜多重反應偵測模式參數及檢出限量

項次	分析物		離子對		過濾電壓(V)	碰撞能量(eV)	定量極限(ppb)
	中文名	英文名	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)			
1	黃麴毒素 B <sub>1</sub>	Aflatoxin B <sub>1</sub>	313 > 241 <sup>a</sup> 313 > 285 <sup>a</sup>	48 48	36 22	0.5	
2	黃麴毒素 B <sub>2</sub>	Aflatoxin B <sub>2</sub>	315 > 259 <sup>a</sup> 315 > 287 <sup>a</sup>	46 46	28 26		
3	黃麴毒素 G <sub>1</sub>	Aflatoxin G <sub>1</sub>	329 > 200 <sup>a</sup> 329 > 243 <sup>a</sup>	46 46	42 26		
4	黃麴毒素 G <sub>2</sub>	Aflatoxin G <sub>2</sub>	331 > 189 <sup>a</sup> 331 > 313 <sup>a</sup>	48 48	42 24		
5	赭麴毒素 A	Ochratoxin A	404 > 239 <sup>a</sup> 404 > 102 <sup>a</sup>	32 32	26 64		
6	鐮刀黴菌毒素 T-2	T-2	489 > 245 <sup>a</sup> 489 > 327 <sup>a</sup>	42 42	26 24	1	
7	鐮刀黴菌毒素 HT-2	HT-2	447 > 345 <sup>a</sup> 447 > 285 <sup>a</sup>	48 48	20 24		
8	脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	Deoxynivalenol	297 > 249 <sup>a</sup> 297 > 231 <sup>a</sup>	22 22	12 14	5	
9	玉米赤黴毒素	Zearalenone	319 > 187 <sup>a</sup> 319 > 185 <sup>a</sup>	20 20	19 23		
10	伏馬毒素 B <sub>1</sub>	Fumonisin B <sub>1</sub>	722 > 334 <sup>a</sup> 722 > 352 <sup>a</sup>	58 58	44 36		
11	伏馬毒素 B <sub>2</sub>	Fumonisin B <sub>2</sub>	706 > 336 <sup>a</sup> 706 > 318 <sup>a</sup>	44 44	36 40	20	

\*定量離子對