食品中黴菌毒素檢驗方法－T-2 毒素及 HT-2 毒素之檢驗修正總說明

為加天然毒素之管理，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－T-2 毒素及 HT-2 毒素之檢驗」，其修正要點如下：

一、「檢驗方法」由高效液相層析法修正為液相層析串聯質譜儀分析之方法，後續「裝置」、「檢出器」、「層析管」、「試藥」、「移動相溶液之調製」及「鑑別試驗及含量測定」一併修正。

二、「器具及材料」修正「玻璃纖維濾紙」、「濾膜」及「免疫親和性管柱」。

三、「標準溶液之配製」修正配製溶劑及配製濃度。

四、「檢液之調製」修正「萃取」及「淨化」步驟，另刪除「衍生化」步驟。

五、「附註」部分，將「檢出限量」修正為「定量極限」，並將定量極限下修，另刪除附註三及附註四。

六、增列「參考文獻」。

七、增修訂部分文字。

食品中黴菌毒素檢驗方法－T-2 毒素及 HT-2 毒素之檢驗修正對照表

修正規定	現行規定	說明
1. 適用範圍：本檢驗方法適用於穀類及其製品中T-2毒素及HT-2毒素之檢驗。 2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)分析之方法。 2.1. 裝置： 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀： 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI^+)。 2.1.1.2. 層析管：ACQUITY BEH C18，1.7 µm，內徑2.1 mm × 10 cm，或同級品。 2.1.2. 粉碎機(Grinder)。 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達3000 ×g以上者。 2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。 2.1.6. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。 2.2. 試藥：甲酸銨及甲酸均採用試藥特級；甲醇及乙腈均採用液相層析級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)；T-2毒素及HT-2毒素對照用標準品。 2.3. 器具及材料： 2.3.1. 離心管： 50 mL，PP材質。 2.3.2. 容量瓶：10 mL。 2.3.3. 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column)：採用內含對T-2毒素及HT-2毒素具專一性單株抗體之T-2/HT-2 test™管柱，或同級品。 2.3.4. 濾紙：Whatman No. 4，直徑11 cm，或同級品。 2.3.5. 玻璃纖維濾紙： Whatman GF/A，直徑11 cm，或同級品。 2.3.6. 濾膜：孔徑0.22 µm，PTFE材質。	1. 適用範圍：本檢驗方法適用於穀類及其製品中T-2毒素及HT-2毒素之檢驗。 2. 檢驗方法：高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)。 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：SunFire C18，3.5 µm，內徑4.6 mm × 15 cm，或同級品。 2.1.2. 粉碎機(Grinder)。 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.1.4. 離心機(Centrifuge) 2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。 2.1.6. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。 2.2. 試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；4-二甲基胺基吡啶(4-dimethylaminopyridine)及2-萘甲醯基氯(2-naphthoyl chloride)均採用試藥特級；T-2毒素及HT-2毒素對照用標準品。 2.3. 器具及材料： 2.3.1. 塑膠離心管：15 mL及50 mL，附PP材質螺旋蓋。 2.3.2. 容量瓶：10 mL。 2.3.3. 微量吸管：100 µL。 2.3.4. 濾膜：直徑47 mm，孔徑0.45 µm，Nylon材質。 2.3.5. 濾紙：Whatman No. 4，直徑11 cm，或同級品。 2.3.6. 玻璃纖維濾紙：直徑9 cm。 2.3.7. 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column)：採用內含對T-2毒素及HT-2毒素具專一性單株抗體之T-2 test™管	一、「檢驗方法」由高效液相層析法修正為液相層析串聯質譜儀分析之方法，後續「裝置」、「檢出器」、「層析管」、「試藥」、「移動相溶液之調製」及「鑑別試驗及含量測定」一併修正。 二、「器具及材料」修正「玻璃纖維濾紙」、「濾膜」及「免疫親和性管柱」。 三、「標準溶液之配製」修正配製溶劑及配製濃度。 四、「檢液之調製」修正「萃取」及「淨化」步驟，另刪除「衍生化」步驟。 五、「附註」部分，將「檢出限量」修正為「定量極限」，並將定量極限下

	柱，或同級品。 2.3.8. 針筒過濾器(Syringe filter)：直徑4 mm，濾膜孔徑0.45 µm，PTFE材質。	修，另刪除附註三及附註四。 六、增列「參考文獻」。 七、增修訂部分文字。
2.4. 試劑之調製： 2.4.1. 20%乙腈溶液： 取乙腈20 mL，加去離子水使成100 mL。 2.4.2. 90%甲醇溶液： 取甲醇90 mL，加去離子水使成100 mL。	2.4. 試劑之調製： 2.4.1. 4-二甲基胺基吡啶溶液： 稱取4-二甲基胺基吡啶63 mg以乙腈溶解，再加入乙腈使成100 mL，冷藏儲存，臨用時再回溫至室溫。 2.4.2 2-萘甲醯基氯溶液： 稱取2-萘甲醯基氯49 mg以乙腈溶解，再加入乙腈使成100 mL，冷藏儲存，臨用時再回溫至室溫。 2.4.3. 90%甲醇溶液： 取去離子水與甲醇以10：90 (v/v)混勻後，供作萃取溶液。	
2.5. 移動相溶液之調製： 2.5.1. 移動相溶液A 稱取甲酸銨0.315 g及甲酸1 mL，以去離子水溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。 2.5.2. 移動相溶液B 稱取甲酸銨0.315 g及甲酸1 mL，以甲醇溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。	2.5. 移動相溶液之調製： 取去離子水與乙腈以25：75 (v/v)混勻後，以濾膜過濾後備用。使用前以超音波振盪除氣30分鐘後供作移動相溶液。	
2.6. 標準溶液之配製： 取T-2毒素及HT-2毒素對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至10 mL，作為標準原液，於-20℃貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以20%乙腈溶液稀釋至0.5～30 ng/mL，供作標準溶液。	2.6. 標準溶液之配製： 取T-2毒素及HT-2毒素對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至10 mL，作為標準原液，於-20℃貯存備用。使用時取適量標準原液混合，以移動相溶液稀釋成3～200 ng/mL，供作標準溶液。標準溶液存放超過一個月時，應重新配製。	
2.7. 檢液之調製： 2.7.1. 萃取： 將檢體磨碎混勻後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入90%甲醇溶液20 mL，旋渦混合1分鐘，以3000 ×g離心5分鐘，收集上清液，以濾紙過濾。取濾液10 mL，加去離子水40 mL混勻，再以玻璃纖維濾紙過濾，取濾液供淨化用。 2.7.2. 淨化： 取2.7.1.節供淨化用濾液10 mL，注入免疫親和性管柱，流速為每秒1滴，棄流出液，以去離子水10 mL沖洗，流速	2.7. 檢液之調製： 2.7.1. 萃取： 固態檢體磨碎混勻後，取檢體約5 g，精確稱定，置於50 mL塑膠離心管中，加入90%甲醇溶液20 mL，旋渦混合1分鐘，於3000 rpm離心5分鐘，收集上層液，以濾紙過濾。取濾液10 mL加水40 mL混合均勻，再通過玻璃纖維濾紙過濾，取濾液10 mL，供淨化用。 2.7.2. 淨化： 取2.7.1.節供淨化用濾液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	

為每秒1滴。俟管柱內去離子水排淨後，以甲醇2 mL沖提，流速為每秒1滴，收集沖提液，於50℃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. 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(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中T-2毒素或HT-2毒素之含量(ppb)： 檢體中T-2毒素或HT-2毒素含量(ppb) $= \frac{C \times V \times 10}{M}$ C：由標準曲線求得檢液中T-2毒素或HT-2毒素之濃度(ng/mL) V：檢液最後定容之體積(1 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(註)： 層析管：ACQUITY BEH C18，1.7 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。	洗，流速為每秒1滴。待管柱內水排淨後，取甲醇1.5 mL，以每秒1滴之流速沖提，收集沖提液，於50℃以氮氣吹乾，殘留物供衍生化用。 2.7.3. 衍生化： 於2.7.2節殘留物中依序加入4-二甲基胺基吡啶溶液及2-萘甲醯基氯溶液各50 µL，旋渦混合1分鐘，於50℃水浴中反應10分鐘，續冰浴10分鐘，於50℃以氮氣吹乾，殘留物以移動相溶液溶解並定容至1 mL，以針筒過濾器過濾，取濾液供作檢液。 2.8. 檢量線之製作： 精確量取各標準溶液添加於空白檢體中，依2.7節調製檢液，並參照下列條件進行高效液相層析測定，就檢液波峰面積與對應之T-2毒素及HT-2毒素標準品添加濃度，分別製作檢量線。 高效液相層析測定條件： 層析管柱：SunFire C18，3.5 µm，內徑4.6 mm × 15 cm。 管柱溫度：30℃。 螢光檢出器：激發波長237 nm，發射 nm。 移動相溶液：依 2.5節調製之溶液。 移動相流速：1 mL/min。 2.9. 鑑別試驗及含量測定： 精確量取檢液及標準溶液各20 µL，分別注入高效液相層析儀中，參照2.8.節高效液相層析測定條件進行層析，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T-2毒素或HT-2毒素之含量(ppb)： 檢體中T-2毒素或HT-2毒素含量(ppb) $= \frac{C \times V}{M}$ C：由檢量線求得檢液中T-2毒素或HT-2毒素之濃度(ng/mL) V：檢液最後定容之體積(mL) M：取樣分析檢體之重量(g)	

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。
注入量：10 μL。
毛細管電壓(Capillary voltage)：2.0 KV。
離子源溫度(Ion source temperature)：150℃。
離子化模式：ESI^+。
溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500℃。
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)如下表：

分析物	離子對 前驅離子(m/z)>產物離子(m/z)	進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
T-2毒素	489 > 245*	40	26
	489 > 327	40	24
HT-2毒素	447 > 345*	32	20
	447 > 285	32	20

*定量離子對
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，T-2毒素及

附註：
1. 本檢驗方法之檢出限量T-2毒素及

HT-2毒素均為1 ppb。 2.檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。 參考文獻： 1. Kong, W., Zhang, X., Shen, H., Ou-Yang, Z. and Yang, M. 2012. Validation of a gas chromatography-electron capture detection of T-2 and HT-2 toxins in Chinese herbal medicines and related products after immunoaffinity column clean-up and pre-column derivatization. Food Chem. 132: 574-581. 2. 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 spectromrtry. J. Agric. Food Chem. 61: 4771-4782.	HT-2毒素均為3 ppb。 2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。 3. 以本檢驗方法檢出毒素時，應利用LC/MS/MS 等進行確認。 4. 未用畢之標準溶液及T-2毒素或HT-2毒素含量高之樣品，先以10%氫氧化鈉溶液加熱處理後丟棄之。	