

食品中黴菌毒素檢驗方法—玉米及其製品中伏馬毒素 B₁和B₂之檢驗
Method of Test for Mycotoxin in Foods— Test of Fumonisin B₁ and B₂ 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B₁ (fumonisin B₁)及伏馬毒素B₂ (fumonisin B₂)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. 離心機(Centrifuge)：可達2500 × g者。

2.1.3. 酸鹼度測定儀(pH meter)。

2.1.4. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。

2.1.5. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。

2.1.6. 均質機(Homogenizer)。

2.2. 試藥：

甲醇及乙腈均採液相層析級；磷酸二氫鈉(NaH₂PO₄ · 2H₂O)、鄰苯二甲醛(*o*-phthaldialdehyde)、乙硫醇(2-mercaptoethanol)、四硼酸鈉(Na₂B₄O₇ · 10H₂O)、磷酸氫二鈉(Na₂HPO₄)、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、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B₁及B₂對照用標準品。

2.3. 器具及材料^(註)：

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 μm ，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. 0.1M磷酸二氫鈉溶液：

稱取磷酸二氫鈉15.6 g，溶於去離子水使成1 L。

2.4.2. 0.1M四硼酸鈉溶液：

稱取四硼酸鈉3.8 g，溶於去離子水使成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)比例混勻。

2.4.4. 2N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2N鹽酸溶液調整pH值至7.0，以去離子水定容至1 L。

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0.1M四硼酸鈉溶液5 mL及乙硫醇50 μL 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0.1M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後，以濾膜過濾，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_1 及 B_2 對照用標準品各約1 mg，精確稱定，共置於10 mL定容瓶中，以50%乙腈溶液溶解並定容，作為標準原液。臨用時，再以50%乙腈溶液稀釋至1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，供作標準溶液。

2.7. 衍生化標準溶液之調製：

精確量取不同濃度之標準溶液50 μL 於褐色玻璃瓶中，加入鄰苯

二甲醛溶液50 μ L，振盪混勻30秒，反應3分鐘後，供作衍生化標準溶液。

註：伏馬毒素-鄰苯二甲醛衍生物於3分鐘後螢光即逐漸退化，必須確實控制注入液相層析系統中之時間。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 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，均質2分鐘，以2500 \times g離心10分鐘，以濾紙過濾，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。

2.8.2. 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 μ L溶解後，經濾膜過濾，取濾液供衍生化用。

2.8.3. 衍生化：

精確量取供衍生化用溶液50 μ L，依2.7.節進行衍生化反應，供作檢液。

2.9. 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，使各伏馬毒素之含量分別為0.5~50 μ g，依2.8.節檢液之調製同樣操作，並依下列條件進行液相層析分析，就各伏馬毒素之波峰面積與對應之各伏馬毒素含量(μ g)，分別製作檢量線。

高效液相層析測定條件：

層析管柱：RP-18，5 μ m，內徑4.6 mm \times 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 μ L。

2.10. 鑑別試驗與含量測定：

精確量取檢液及衍生化標準溶液各20 μ L，分別注入液相層析儀中，依2.9節條件進行分析。就檢液與衍生化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伏馬毒素B₁或B₂之含量(ppm)：

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

C：由檢量線求得檢液中伏馬毒素B₁或B₂之含量(μ g)

M：取樣分析檢體之重量(g)

附註：

1. 本檢驗方法之檢出限量，伏馬毒素B₁及B₂分別為0.03及0.07 ppm。
2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。