

食品中黴菌毒素檢驗方法—多重毒素之檢驗(草案)  
Method of Test for Mycotoxins in Foods—Test of Multimycotoxin

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於穀類、豆類、核果類等食品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。
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<sup>+</sup>)。
      - 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. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：轉速可達 3000×g 以上者。
    - 2.1.4. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
    - 2.1.5. 振盪器(Shaker)。
  - 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；甲醇、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。
  - 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、100 mL 及 1000 mL，褐色。
    - 2.3.3. 濾膜：孔徑 0.22 μm，Nylon 材質。
    - 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. 塑膠針筒：1 mL 及 50 mL。
    - 2.3.7. 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column)：Myco 6 in 1™ 管柱，或同級品。
  - 2.4. 試劑之調製：
    - 2.4.1. 0.1N 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。

#### 2.4.2. 0.1N 氫氧化鈉溶液

稱取氫氧化鈉 4 g，溶於去離子水使成 1000 mL。

#### 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，再以 0.1N 鹽酸溶液或 0.1N 氫氧化鈉溶液調整至 pH 7.4，並加去離子水使成 1000 mL。

#### 2.4.4. 50%乙腈溶液

取乙腈 50 mL，加去離子水使成 100 mL。

#### 2.4.5. 20%乙腈溶液

取乙腈 20 mL，加去離子水使成 100 mL。

#### 2.4.6. 含 0.5%醋酸之 80%甲醇溶液

取醋酸 0.5 mL 及甲醇 80 mL，加去離子水使成 100 mL。

### 2.5. 移動相溶液之配製：

#### 2.5.1. 移動相溶液 A

取甲酸 1 mL，加去離子水使成 1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 A。

#### 2.5.2. 移動相溶液 B

取甲酸 1 mL，加甲醇使成 1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 B。

### 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。

### 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)：

$$\text{檢體中各黴菌毒素之含量(ppb)} = \frac{C \times V \times 5}{M}$$

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。

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

分析物		離子對	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	檢出限量 (ppb)
中文名	英文名	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)			
黃麴毒素 B <sub>1</sub>	aflatoxin B <sub>1</sub>	313>241*	48	36	0.5
		313>285	48	22	
黃麴毒素 B <sub>2</sub>	aflatoxin B <sub>2</sub>	315>259*	46	28	0.5
		315>287	46	26	
黃麴毒素 G <sub>1</sub>	aflatoxin G <sub>1</sub>	329>200*	46	42	0.5
		329>243	46	26	
黃麴毒素 G <sub>2</sub>	aflatoxin G <sub>2</sub>	331>189*	48	42	0.5
		331>313	48	24	
伏馬毒素 B <sub>1</sub>	fumonisin B <sub>1</sub>	722>334*	58	44	20
		722>352	58	36	
伏馬毒素 B <sub>2</sub>	fumonisin B <sub>2</sub>	706>336*	44	36	20
		706>318	44	40	
脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	deoxynivalenol	297>249*	22	12	5
		297>231	22	14	
玉米赤黴毒素	zearalenone	319>187*	20	19	5
		319>185	20	23	

赭麴毒素 A	ochratoxin A	404>239*	32	26	0.5
		404>102	32	64	
鐮刀黴菌毒素 T-2	T-2	489>245*	42	26	1
		489>327	42	24	
鐮刀黴菌毒素 HT-2	HT-2	447>345*	48	20	1
		447>285	48	24	

\*為定量離子對。