

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 之檢驗修正草案總說明

為加強食品中黴菌毒素之管理，並依據食品衛生管理法第二十五條規定：「食品衛生檢驗之方法，由中央主管機關公告指定之。」爰修正「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」，其修正要點如下：

- 一、增修訂 0.1M 四硼酸鈉溶液及 2N 鹽酸溶液配製。
- 二、增修訂部分文字。

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 之檢驗修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
1. 適用範圍：本方法適用於玉米及其製品中伏馬毒素 B ₁ (<u>fumonisin B₁</u>)及伏馬毒素 B ₂ (<u>fumonisin B₂</u>)之檢驗。	1 適用範圍：本方法適用於玉米及其製品中伏馬毒素 B ₁ 及 B ₂ 之檢驗。	一、增修訂0.1M四硼酸鈉溶液及2N鹽酸溶液配製。 二、增修訂部分文字。
2. 檢驗方法： <u>檢體經萃取、淨化及衍生化後，以高效液相層析儀</u> (high performance liquid chromatograph, HPLC) <u>分析之方法。</u>	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：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. <u>氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)</u> 。 2.1.6. 均質機(Homogenizer)。	2.1 裝置： 2.1.1 高效液相層析儀： 2.1.1.1 檢出器： <u>具有激發波長 335 nm 及發射波長 440 nm 之</u> 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 2,500 × g 者。 2.1.3 酸鹼值測定儀 (pH meter)。 2.1.4 超音波振盪器 (Ultrasonicator)。 2.1.5 <u>蒸發器(Evaporator)：具氮氣吹乾裝置。</u> 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 (<u>NaH₂PO₄ · 2H₂O</u>)、鄰苯二甲醛(<i>o</i> -phthaldialdehyde)、乙硫醇 (2-mercaptoethanol)、四硼酸鈉 (<u>Na₂B₄O₇ · 10H₂O</u>)、磷酸氫二鈉 (<u>Na₂HPO₄</u>)、磷酸二氫鉀 (<u>KH₂PO₄</u>)、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℃	2.2 試藥： 甲醇及乙腈採液相層析級，磷酸二氫鈉(sodium dihydrogen phosphate dihydrate)、鄰苯二甲醛(<i>o</i> -phthaldialdehyde)、乙硫醇(2-mercaptoethanol)、四硼酸二鈉(sodium tetraborate)、 <u>無水</u> 磷酸氫二鈉(disodium hydrogen phosphate anhydrous)、磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen	

<p>可達18 MΩ·cm以上)；伏馬毒素B₁及B₂對照用標準品。</p>	<p>phosphate)、鹽酸、磷酸、氯化鈉、氯化鉀採用化學試藥特級，伏馬毒素 B₁ 及 B₂ (<u>fumonisin B₁ and B₂</u>)對照用標準品。</p>	
<p>2.3. 器具及材料^(註)：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL，PP 材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：<u>10 mL、100 mL 及 1000 mL</u>，褐色。</p> <p>2.3.3. 濾紙：直徑 12 cm。</p> <p>2.3.4. 玻璃纖維濾紙：直徑 9 cm。</p> <p>2.3.5. 玻璃過濾器(Glass filter holder)。</p> <p>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。</p> <p>2.3.7. 濾膜：孔徑 0.45 μm，<u>Nylon</u>材質。</p> <p>註：操作時，應使用褐色或不透光之器具。</p>	<p>2.3 器具及材料^(註)：</p> <p>2.3.1 離心管 (<u>Centrifuge tube</u>): 50 mL，<u>附 PP 材質之螺旋蓋</u>。</p> <p>2.3.2 <u>均質杯</u>：不銹鋼材質，<u>50 mL 以上</u>。</p> <p>2.3.3 濾紙：直徑 12 cm。</p> <p>2.3.4 玻璃纖維濾紙：直徑 9 cm。</p> <p>2.3.5 玻璃過濾器(Glass filter holder)。</p> <p>2.3.6 容量瓶 (<u>Volumetric flasks</u>)。</p> <p>2.3.7 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。</p> <p>2.3.8 濾膜：孔徑 0.45 μm，nylon 材質。</p> <p>2.3.9 <u>針筒過濾器 (Syringe filter)</u>：濾膜孔徑 0.45 μm，<u>鐵氟龍</u>材質。</p> <p>註：<u>裝置或操作伏馬毒素或含有伏馬毒素之檢液時</u>，應使用褐色或不透光之器具。</p>	
<p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 0.1M磷酸二氫鈉溶液：<u>稱取磷酸二氫鈉15.6 g，溶於去離子水使成1 L。</u></p> <p>2.4.2. 0.1M四硼酸鈉溶液：<u>稱取四硼酸鈉3.8 g，溶於去離子水使成100 mL。</u></p> <p>2.4.3. 萃取溶液：<u>取乙腈、甲醇及去離子水以1：1：2 (v/v)比例混勻。</u></p> <p>2.4.4. <u>2N鹽酸溶液</u>：<u>取鹽酸 180 mL，緩緩加入去</u></p>	<p>2.4 試劑之調製：</p> <p>2.4.1 0.1M 磷酸二氫鈉溶液：<u>取磷酸二氫鈉 15.6 g，溶於 1 L 之水。</u></p> <p>2.4.2 0.1M 四硼酸<u>二</u>鈉溶液：<u>取四硼酸二鈉 3.8 g，溶於 1 L 之水。</u></p> <p>2.4.3 萃取溶液：<u>將乙腈、甲醇及水以 1：1：2 (v/v)比例混勻。</u></p> <p>2.4.4 磷酸緩衝溶液 (<u>Phosphate-buffered saline</u>，</p>	

<p><u>離子水500 mL中，再加去離子水使成1000 mL。</u></p> <p>2.4.5. <u>磷酸鹽緩衝溶液：</u> 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。</p> <p>2.4.6. <u>鄰苯二甲醛溶液：</u> 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。</p> <p>2.4.7. <u>50%乙腈溶液：</u> 取乙腈及水以 1：1 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.5. <u>移動相溶液之調製：</u> 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。</p>	<p><u>PBS)：</u> 取氯化鈉 8 g，無水磷酸氫二鈉 1.2 g，磷酸二氫鉀 0.2 g 及氯化鉀 0.2 g，加水 990 mL，以 2 M 鹽酸溶液調整 pH 值 7.0，以水定容至 1 L。</p> <p>2.4.5 <u>移動相溶液：</u> 將 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 3.35 後，以濾膜過濾，濾液以超音波振盪除氣 30 min 後供作移動相溶液。</p> <p>2.4.6. <u>鄰苯二甲醛試劑</u>^(註)<u>(OPA 試劑)：</u> 取 鄰苯二甲醛 40 mg 溶於 甲醇 1 mL，續以 0.1M 四硼酸二鈉溶液 5 mL 稀釋，再加入乙硫醇 50 μL 混勻；將 OPA 試劑置在有蓋之避光小瓶中，於室溫下可保存一週，另亦可使用市售 OPA 試劑。</p> <p>2.4.7. <u>乙腈溶液：</u> 乙腈及水以 1：1 (v/v)比例混勻。</p>	
<p>2.6. <u>標準溶液之配製：</u> 取伏馬毒素B₁及B₂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 μg/mL，供作標準溶液。</p> <p>2.7. <u>衍生化標準溶液之調製：</u> 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 μL，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。</p>	<p>2.5 <u>標準溶液之配製：</u> 精確量取伏馬毒素 B₁ 及 B₂ 標準品並以乙腈溶解，使其濃度為 100 ppm，供作標準原液。使用時再以乙腈溶液稀釋至 0.1～10 ppm，供作標準溶液。</p>	
<p>2.8. <u>檢液之調製：</u></p>	<p>2.6 <u>檢液之調製：</u></p>	

<p>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 × 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。</p> <p>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 μL溶解後，經濾膜過濾，取濾液供衍生化用。</p> <p>2.8.3. 衍生化： 精確量取供衍生化用溶液50 μL，依2.7.節進行衍生化反應，供作檢液。</p>	<p>2.6.1. 萃取： 將玉米及其製品磨碎後混勻備用，原屬粉狀者則直接混勻備用。取檢體約20 g，精確稱定，置均質杯中，加入萃取溶液50 mL，均質2分鐘，續以2,500 × g離心10分鐘，以濾紙過濾上清液，再取萃取溶液50 mL，重複均質、離心及過濾步驟。</p> <p>2.6.2. 淨化： 合併兩次萃取液，並定容至100 mL，精確量取10 mL置50 mL離心管中，加入PBS溶液40 mL混勻，混合液以玻璃纖維濾紙過濾，精確量取濾液10 mL，以每秒一滴之流速通過免疫親和性管柱，再以PBS洗液10 mL清洗。將管柱內水分排淨後，取甲醇1.5 mL，以每秒1~2滴流速沖提，收集沖提液，續以氮氣吹乾，再以乙腈溶液200 μL溶解後，經針筒過濾供作檢液。</p> <p>2.7.衍生物之調製 精確量取標準溶液或檢液50 μL於褐色或避光之玻璃瓶中，加入OPA試劑50 μL，振盪混勻約30秒，經衍生化反應3分鐘後即為衍生物，應隨即進行高效液相層析分析。</p>	
<p>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 μg，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(μg)，分別製作檢量線。 高效液相層析測定條件： 層析管柱：RP-18，5 μm，內</p>	<p>2.8. 檢量線之製作： 精確量取標準原液或適當濃度之標準溶液添加於檢體20 g中，使其中伏馬毒素之濃度為0.025~5 ppm，按照2.6.節檢液調製之相同操作，得到各種濃度之添加分析檢液，續依2.7.調製衍生物。精確量取衍生物20 μL注入高效液相層析儀中，參照下述層析條件進行分析，就各波峰面積與對應檢液之伏馬毒素濃度，製作檢量</p>	

<p>徑4.6 mm × 25 cm。</p>	<p>線。</p>	
<p>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。 <u>注入量：20 μL。</u></p>	<p>高效液相層析測定條件： 層析管柱：RP-18，5 μm，內徑 4.6 mm × 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 2.4.5 節所調製之溶液 移動相流速：1.0 mL/min</p>	
<p>2.10. 鑑別試驗與含量測定： <u>精確量取檢液及衍生化標準溶液各20 μL，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)：</u> <u>檢體中伏馬毒素B₁或B₂之含量(ppm) = $\frac{C}{M}$</u> C：由檢量線求得檢液中伏馬毒素B₁或B₂之含量(μg) 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。</p>	<p>2.9. 鑑別試驗與含量測定： <u>標準溶液或檢液經衍生化反應後，立即精確量取衍生物 20 μL 注入高效液相層析儀中，參照 2.8.節層析條件進行分析。就衍生化檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依檢量線求出檢體中伏馬毒素 B₁ 或 B₂ 之含量。</u> <u>檢體中伏馬毒素含量(ppm)</u> <u>= $\frac{C \times V}{M}$</u> C：由檢量線求得衍生化後檢液中伏馬毒素之濃度(ppm) V：衍生化後檢液之體積(mL) M：製備衍生化檢液之檢體重量(g) 備註：1. 本檢驗方法之最低檢出限量，伏馬毒素 B₁ 及 B₂ 分別為 0.03 及 0.07 ppm。 2. 伏馬毒素-OPA 衍生於 3 分鐘後螢光即逐漸退化，所以必須確實控制伏馬毒素和 OPA 試劑混合至注入液相層析系統中之時間。 3. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。</p>	