

食品中黴菌毒素檢驗方法－黃麴毒素之檢驗

Method of Test for Mycotoxins in Foods - Test of Aflatoxins

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於香辛料、穀類、果乾類、食用油脂、堅果類、油籽類、黃豆類及其製品中黃麴毒素B₁、B₂、G₁及G₂之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，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：Cosmosil 5C18-AR，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm，或同級品。
 - 2.1.1.3. 光化學反應器：Knitted Reactor Coils (KRC) 25-25，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)：轉速可達15000 rpm以上並適用有機溶劑者。
 - 2.1.3. 粉碎機(Grinder)。
 - 2.2. 試藥：氯化鈉及Tween-20均採用試藥特級；甲醇採用液相層析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；黃麴毒素B₁、B₂、G₁及G₂對照用混合標準品(濃度分別為1000、300、1000及300 ng/mL in methanol)。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：2 mL、10 mL及20 mL，褐色。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon/PTFE材質。
 - 2.3.4. 濾紙：Whatman No.1，直徑11 cm，或同級品。
 - 2.3.5. 玻璃纖維濾紙(Glass microfibre filters)：直徑9 cm。
 - 2.3.6. 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column)：採用內含對黃麴毒素B₁、B₂、G₁及G₂具專一性單株抗體之AflaTest-P管柱，或同級品。
 - 2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 50% 甲醇溶液：

取甲醇與去離子水以50：50 (v/v)之比例混勻。

2.4.2. 60% 甲醇溶液：

取甲醇與去離子水以60：40 (v/v)之比例混勻。

2.4.3. 80% 甲醇溶液：

取甲醇與去離子水以80：20 (v/v)之比例混勻。

2.4.4. 10% Tween-20溶液：

取Tween-20與去離子水以10：90 (v/v)之比例混勻。

2.5. 移動相溶液之調製：

取甲醇與去離子水以45：55 (v/v)之比例混勻後，經Nylon濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

精確量取黃麴毒素B₁、B₂、G₁及G₂對照用混合標準品1 mL，以50% 甲醇溶液稀釋並定容至20 mL，作為標準原液，冷藏儲存。臨用時取適量標準原液，以50% 甲醇溶液稀釋至黃麴毒素B₁及G₁ 0.1~50 ng/mL，黃麴毒素B₂及G₂ 0.05~15 ng/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 穀類、果乾類及其製品：

將檢體磨碎混勻後，取約50 g，精確稱定，置於均質機中，加入氯化鈉5 g及80% 甲醇溶液100 mL，以15000 rpm均質2分鐘，經濾紙過濾。精確量取濾液10 mL，加去離子水40 mL混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液10 mL，注入免疫親和管柱(流速控制1滴/秒)，棄流出液，每次以去離子水10 mL流洗2次(流速控制1滴/秒)，必要時輔以抽真空。俟管柱內去離子水排淨後，再以甲醇1 mL沖提排淨(流速控制1滴/秒)，收集沖提液，以去離子水定容至2 mL，經PTFE濾膜過濾，供作檢液。

2.7.2. 食用油脂、堅果類、油籽類、黃豆類及其製品：

將油脂等液態檢體混勻，其他檢體經磨碎混勻後，取約25 g，精確稱定，置於均質機中，加入氯化鈉5 g及60% 甲醇溶液125 mL，以15000 rpm均質2分鐘後，經濾紙過濾。精確量

取濾液10 mL，加去離子水30 mL混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液20 mL，注入免疫親和管柱(流速控制1滴/秒)，棄流出液，每次以去離子水10 mL流洗2次(流速控制1滴/秒)，必要時輔以抽真空。俟管柱內去離子水排淨後，再以甲醇1 mL沖提排淨(流速控制1滴/秒)，收集沖提液，以去離子水定容至2 mL，經PTFE濾膜過濾，供作檢液。

2.7.3. 香辛料：

將檢體磨碎混勻後，取約25 g，精確稱定，置於均質機中，加入氯化鈉5 g及80% 甲醇溶液100 mL，以15000 rpm均質2分鐘，經濾紙過濾。精確量取濾液5 mL，加10% Tween-20溶液20 mL混勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液4 mL，注入免疫親和管柱(流速控制1滴/秒)，棄流出液，每次以去離子水10 mL流洗2次(流速控制1滴/秒)，必要時輔以抽真空。俟管柱內去離子水排淨後，再以甲醇1 mL沖提排淨(流速控制1滴/秒)，收集沖提液，以去離子水定容至2 mL，經PTFE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50 μ L，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行液相層析。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各黃麴毒素之含量(μ g/kg)^(註1)：

$$\text{檢體中各黃麴毒素之含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V \times F}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中各黃麴毒素之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

F：依2.7.1.節取樣分析時，F為50

依2.7.2.節取樣分析時，F為25

依2.7.3.節取樣分析時，F為125

M：取樣分析檢體之重量(g)

高效液相層析測定條件^(註2)：

層析管：Cosmosil 5C18-AR，5 μ m，內徑4.6 mm \times 25 cm。

光化學反應器^(註3)：Knitted Reactor Coils (KRC) 25-25。

螢光檢出器：激發波長360 nm，發射波長440 nm。

98年11月16日署授食字第0981800468號公告
 99年10月15日署授食字第0991903564號公告修正
 102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
 104年9月23日部授食字第1041901616號公告修正
 109年9月2日衛授食字第1091901654號公告修正
 MOHWT0001.04

移動相溶液：依2.5.節所調製之溶液。

移動相流速：1.0 mL/min。

- 註：1. 總黃麴毒素為黃麴毒素B₁、B₂、G₁及G₂之總和。
 2. 上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。
 3. 若螢光檢出器之感度可達到定量極限之要求，則可不使用光化學反應器。

- 附註：1. 本檢驗方法之定量極限，於穀類、果乾類、食用油脂、堅果類、油籽類、黃豆類及其製品中，黃麴毒素B₁及G₁均為0.2 µg/kg，黃麴毒素B₂及G₂均為0.1 µg/kg；於香辛料中，黃麴毒素B₁及G₁均為1.0 µg/kg，黃麴毒素B₂及G₂均為0.5 µg/kg。
 2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。
 3. 以液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)進行確認時，其多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)模式參數^(註)如下表。

分析物	離子化 模式	離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 電壓 (eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
黃麴毒素B ₁	ESI ⁺	313 > 241*	48	36
		313 > 285	48	22
黃麴毒素B ₂	ESI ⁺	315 > 259*	46	28
		315 > 287	46	26
黃麴毒素G ₁	ESI ⁺	329 > 200*	46	42
		329 > 243	46	26
黃麴毒素G ₂	ESI ⁺	331 > 189*	48	42
		331 > 313	48	24

*定量離子對

註：上述測定參數分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之參數。

98年11月16日署授食字第0981800468號公告
99年10月15日署授食字第0991903564號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
104年9月23日部授食字第1041901616號公告修正
109年9月2日衛授食字第1091901654號公告修正
MOHWT0001.04

參考文獻

1. VICAM LP. 1999. Aflatest[®] HPLC instruction manual. Milford, MA, USA.
2. 卓憲駿、陳映君、廖家鼎、曾素香、高雅敏、周秀冠、陳惠芳。2014。香辛料中黃麴毒素之檢驗方法開發及調查。衛生福利部食品藥物管理署103年度研究成果報告。
3. 吳淑悳、丘如茵、喻敏甄、羅可涵、張采屏、陳蓉萱、施偉仲。2019。天然毒素及污染物檢驗方法開發。衛生福利部食品藥物管理署108年度委外研究成果報告。