

食品中黴菌毒素檢驗方法－玉米赤黴毒素之檢驗 修正草案總說明

為加強天然毒素之管理，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－玉米赤黴毒素之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、修正英文名稱。
- 二、「適用範圍」擴增精製玉米油、嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品基質。
- 三、「裝置」增列「粉碎機」、「攪拌均質器」、「真空冷凍乾燥裝置」、「烘箱」及「乾燥器」，修正「離心機」。
- 四、「器具及材料」增列「稱量瓶」，修正「容量瓶」及「濾膜」，並刪除「針筒過濾器」。
- 五、修正「移動相溶液之調製」、「標準溶液之配製」及「檢量線之製作」。
- 六、「檢液之調製」增列「嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品檢體基質」。
- 七、增列「水分之測定」。
- 八、「鑑別試驗及含量測定」將檢體分為「穀類及其製品、精製玉米油」及「嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品」，並修正玉米赤黴毒素含量之單位。
- 九、「附註」配合衛生標準修正定量極限單位，並增列液相層析串聯質譜儀之多重反應偵測模式參數。
- 十、增列參考文獻。
- 十一、增修訂部分文字。

食品中黴菌毒素檢驗方法－玉米赤黴毒素之檢驗 修正草案對照表

修正名稱	現行名稱	說明
Method of Test for Mycotoxins in Foods - Test of Zearalenone	Method of Test for Mycotoxin in Foods - Test of Zearalenone	修正英文名稱。
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、<u>精製玉米油、嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品</u>中玉米赤黴毒素(zearalenone)之檢驗。 2. 檢驗方法：<u>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。</u> 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 $\times$ 25 cm，或同級品。 2.1.2. <u>粉碎機(Grinder)。</u> 2.1.3. <u>攪拌均質器(Blender)。</u> 2.1.4. 振盪器(Shaker)。 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達2000 $\times g$以上者。 2.1.6. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。 2.1.7. <u>真空冷凍乾燥裝置：溫度可達-40°C以下，真空度可達133 mBar以下。</u> 2.1.8. 烘箱(Oven)：附有自動溫度調節器，溫差在$\pm 2^\circ\text{C}$以內者。 2.1.9. <u>乾燥器(Desiccator)。</u> 2.2. 試藥：<u>乙腈及甲醇均採用液相層析級；氯化鉀採用試藥級；去離子水(比電阻於25°C可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$以上)；玉米赤黴毒素對照用標準品。</u> 2.3. 器具及材料： 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。	1. 適用範圍：本檢驗方法適用於穀類及其製品中玉米赤黴毒素(zearalenone)之檢驗。 2. 檢驗方法：<u>高效液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)。</u> 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 $\times$ 25 cm，或同級品。 2.1.2. 振盪器(Shaker)。 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達3000 rpm以上者。 2.1.4. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。 2.2. 試藥：<u>氯化鉀採用試藥級；乙腈及甲醇均採用液相層析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$以上)；玉米赤黴毒素對照用標準品。</u> 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. 濾膜：<u>直徑47 mm，孔徑0.45 μm，Nylon材質。</u> 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：直徑9 cm。 2.3.6. 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column)：採用內含對玉米赤黴毒素具專一性單株抗體之 ZearalaTestTM 管柱，或同級品。	一、「適用範圍」擴增精製玉米油、嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品基質。 二、「裝置」增列「粉碎機」、「攪拌均質器」、「真空冷凍乾燥裝置」、「烘箱」及「乾燥器」，修正「離心機」。 三、「器具及材料」增列「稱量瓶」，修正「容量瓶」及「濾膜」，並刪除「針筒過濾器」。 四、修正「移動相溶液之調製」、「標準溶液之配製」及「檢量線之製作」。 五、「檢液之調製」增列「嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品檢體基

2.3.2. 容量瓶：10 mL及20 mL。 2.3.3. 濾膜：孔徑0.45 μm，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：直徑9 cm。 2.3.6. 免疫親和性管柱 (Immunoaffinity column)：採用內含對玉米赤黴毒素具專一性單株抗體之 ZearalaTest™ 管柱，或同級品。 2.3.7. 稱量瓶：附瓶蓋。 2.4. 90%乙腈溶液之調製： 取乙腈90 mL，加去離子水使成100 mL。 2.5. 移動相溶液之調製： 取去離子水與乙腈以55：45 (v/v)比例混勻後，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。 2.6. 標準溶液之配製： 取玉米赤黴毒素對照用標準品約10 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍儲存。臨用時取適量標準原液，以乙腈稀釋至25 $\mu\text{g/mL}$，供作標準溶液。 2.7. 檢液之調製： 將固狀檢體^(註)磨碎混勻或液狀檢體混勻後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加氯化鉀0.5 g，混合均勻，精確加入90%乙腈溶液12.5 mL，振盪2分鐘，以2000 $\times g$離心3分鐘，經濾紙過濾。精確量取濾液2 mL，以去離子水定容至20 mL，再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)，俟管柱內去離子水排淨後，以甲醇1 mL沖提(流速控制1滴/秒)，收集沖提液，以氮氣吹乾。殘留物以移動相溶液溶解	2.3.7. 針筒過濾器 (Syringe filter)：濾膜孔徑0.45 μm，PTFE材質。 2.4. 90%乙腈溶液之調製： 取乙腈90 mL，加去離子水使成100 mL。 2.5. 移動相溶液之調製： 取去離子水與乙腈以1：1 (v/v)比例混勻後，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。 2.6. 標準溶液之配製： 取玉米赤黴毒素對照用標準品10 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍儲存。臨用時取適量標準原液，以乙腈稀釋至25 $\mu\text{g/mL}$，供作標準溶液。 2.7. 檢液之調製： 將檢體磨碎混勻後，取約5 g，精確稱定，置50 mL離心管中，加氯化鉀0.5 g及90%乙腈溶液12.5 mL，振盪2分鐘，以3000 rpm離心3分鐘，再以濾紙過濾，取濾液2 mL，以去離子水定容至20 mL混勻後，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液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，以去離子水10 mL沖洗2次，流速1滴/秒。待管柱內去離子水排淨後，取甲醇1 mL，以每秒1滴之流速沖提，收集沖提液，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： 精確量取標準溶液1~40 μL，添加於空白檢體中，依2.7.節調製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析，就玉米赤黴毒素之波峰面積，與對應之濃度，製作2~80 ng/mL檢量線。 高效液相層析測定條件：	質」。 六、增列「水分之測定」。 七、「鑑別試驗及含量測定」將檢體分為「穀類及其製品、精製玉米油」及「嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品」，並修正玉米赤黴毒素含量之單位。 八、「附註」配合衛生標準修正定量極限單位，並增列液相層析串聯質譜儀之多重反應偵測模式參數。 九、增列參考文獻。 十、增修訂部分文字。
--	--	--

並定容至1 mL，<u>經濾膜過濾</u>，<u>供作檢液。</u> <u>註：嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品檢體取樣前需先經冷凍乾燥，使其水分含量小於10%。</u> 2.8. <u>檢量線之製作：</u> <u>精確量取標準溶液1~40 µL，添加於空白檢體中，加氯化鉀0.5 g，混合均勻，精確加入90%乙腈溶液12.5 mL，混合均勻，依2.7.節調製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析。</u>就玉米赤黴毒素之波峰面積，與對應之<u>添加濃度</u>，製作2~80 ng/mL檢量線。 <u>高效液相層析測定條件^(註)：</u> <u>螢光檢出器：激發波長274 nm，發射波長440 nm。</u> <u>層析管：Cosmosil 5C18-AR，5 µm，內徑4.6 mm × 25 cm。</u> <u>注入量：50 µL。</u> <u>移動相溶液：依 2.5.節調製之溶液。</u> <u>移動相流速：1.0 mL/min。</u> <u>註：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。</u> 2.9. <u>水分之測定：</u> <u>取預經冷凍乾燥均質後之嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品檢體約2 g，置於預經乾燥恆重之稱量瓶(m₀)中，精確稱定(m₁)，放入烘箱中，於105°C加熱2小時後，將稱量瓶蓋妥，移入乾燥器中放冷，約30分鐘後稱量，再將稱量瓶移入烘箱乾燥1小時，依上述稱量步驟，直至恆重(m₂)為止，並依下列公式計算檢體之水分含量(%)：</u> <u>檢體之水分含量W(%)</u> $= \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100\%$ <u>m₀：含蓋稱量瓶之重量(g)</u>	<u>層析管柱：Cosmosil 5C18-AR，5 µm，內徑4.6 mm × 25 cm。</u> <u>螢光檢出器：激發波長為274 nm，發射波長為440 nm。</u> <u>移動相溶液：依 2.5.節調製之溶液。</u> <u>移動相流速：1.0 mL/min。</u> <u>注入量：50 µL。</u> 2.9. <u>鑑別試驗及含量測定：</u> <u>精確量取檢液及檢量線溶液各50 µL，分別注入高效液相層析儀中，依2.8.節條件進行分析，就檢液與檢量線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玉米赤黴毒素之含量(ppb)：</u> <u>檢體中玉米赤黴毒素之含量</u> $(\text{ppb}) = \frac{C \times V \times F}{M}$ <u>C：由檢量線求得檢液中玉米赤黴毒素之濃度(ng/mL)</u> <u>V：檢體最後定容之體積(mL)</u> <u>M：取樣分析檢體之重量(g)</u> <u>F：稀釋倍數(12.5)</u> <u>附註：</u> <u>1. 本檢驗方法之定量極限為5 ppb。</u> <u>2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。</u> <u>3. 以本檢驗方法檢出毒素時，應利用LC/MS/MS等進行確認。</u> <u>參考文獻：</u> <u>1. Ok, H. E., Choi, S. W., Kim, M. and Chun, H. S. 2014. HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula. Food Chem. 163: 252-257.</u>	
--	--	--

<u>m₁:含蓋稱量瓶及檢體取樣之重量(g)</u> <u>m₂:含蓋稱量瓶及檢體烘乾至恆重後之重量(g)</u> 2.10. 鑑別試驗及含量測定： 精確量取檢液及檢量線溶液各 50 μL，分別注入高效液相層析儀中，依2.8.節條件進行分析，就檢液與檢量線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玉米赤黴毒素之含量(μg/kg)： 2.10.1. <u>穀類及其製品、精製玉米油</u> 檢體中玉米赤黴毒素之含量 $(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V \times F}{M}$ C：由檢量線求得檢液中玉米赤黴毒素之濃度(ng/mL) V：檢體最後定容之體積(mL) M：取樣分析檢體之重量(g) F：稀釋倍數(12.5) 2.10.2. <u>嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品</u> 檢體中玉米赤黴毒素之含量 $(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V \times F}{M \times (1 - W / 100)}$ C：由檢量線求得檢液中玉米赤黴毒素之濃度(ng/mL) V：檢體最後定容之體積(mL) M：取樣分析檢體之重量(g) F：稀釋倍數(12.5) W：檢體之水分含量(%) 附註： 1. 本檢驗方法之定量極限為5 μg/kg (<u>嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品以乾重計</u>)。 2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。 3. <u>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。</u>		
--	--	--

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)		
玉米赤黴毒素	ESI ⁺	319>283*		18	19
		319>185		18	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。

參考文獻：

1. Ok, H. E., Choi, S. W., Kim, M. and Chun, H. S. 2014. HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula. Food Chem. 163: 252-257.

2. 吳淑憶、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。