

食品中黴菌毒素之檢驗方法－脫氧雪腐鐮刀菌烯醇及其乙醯衍生物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「食品中黴菌毒素之檢驗方法－脫氧雪腐鐮刀菌烯醇及其乙醯衍生物之檢驗」修正草案，名稱並修正為「食品中黴菌毒素之檢驗方法－脫氧雪腐鐮刀菌烯醇之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、因應「食品中污染物質及毒素衛生標準」刪除乙醯衍生物，並修正中英文名稱。
- 二、「適用範圍」及「檢液之調製」增加「穀類、嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品」。
- 三、「裝置」增列「真空冷凍乾燥裝置」、「烘箱」、「乾燥器」、「粉碎機」及「攪拌均質器」，修正「離子源」及「氮氣濃縮裝置」。
- 四、「試藥」刪除乙醯衍生物對照用標準品。
- 五、「器具及材料」刪除「塑膠針筒」，修正「容量瓶」，並增列「稱量瓶」。
- 六、刪除「移動相溶液之調製」，將移動相溶液移至「液相層析串聯質譜分析測定條件」。
- 七、「標準溶液之配製」刪除乙醯衍生物標準原液配製步驟。
- 八、「基質匹配檢量線之製作」修正「移動相溶液」及「離子化模式」等儀器參數。
- 九、增列「水分之測定」。
- 十、「鑑別試驗及含量測定」將檢體分為「穀類」及「嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品」，並修正脫氧雪腐鐮刀菌烯醇含量之單位。
- 十一、修正脫氧雪腐鐮刀菌烯醇定量極限之單位。
- 十二、增列參考文獻。
- 十三、增修訂部分文字。

食品中黴菌毒素之檢驗方法－脫氧雪腐鐮刀菌烯醇及其乙醯衍生物之檢驗修正草案對照表

修正名稱	現行名稱	說明
食品中黴菌毒素之檢驗方法－脫氧雪腐鐮刀菌烯醇之檢驗 Method of Test for Mycotoxins in Foods -Test of Deoxynivalenol	食品中黴菌毒素之檢驗方法－脫氧雪腐鐮刀菌烯醇及其乙醯衍生物之檢驗 Method of Test for Mycotoxin in Foods -Test of Deoxynivalenol, 3-Acetyl Deoxynivalenol and 15-Acetyl Deoxynivalenol	因應「食品中污染物質及毒素衛生標準」刪除乙醯衍生物，並修正中英文名稱。
修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於<u>穀類、嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品</u>中脫氧雪腐鐮刀菌烯醇(deoxynivalenol)之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：Inertsil ODS-3，3 μm，內徑2.1 mm × 15 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.3. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.4. 離心機(Centrifuge)：轉速可達3000 ×g以上者。</p> <p>2.1.5. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.6. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.1.7. 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。</p> <p>2.1.8. 烘箱(Oven)：附有自動溫度調節器，溫差在±2°C以內者。</p> <p>2.1.9. 乾燥器(Desiccator)。</p> <p>2.1.10. 粉碎機(Grinder)。</p> <p>2.1.11. 攪拌均質器(Blender)。</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於<u>白米、玉米及小麥</u>中脫氧雪腐鐮刀菌烯醇(deoxynivalenol)及其乙醯衍生物之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：</p> <p>2.1.1.1. 離子源：電灑離子化<u>負離子</u>(negative ion electrospray ionization, ESI)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：Inertsil ODS-3，3 μm，內徑2.1 mm × 15 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.3. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.4. 離心機(Centrifuge)：轉速可達3000 ×g以上者。</p> <p>2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.6. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。</p> <p>2.2. 試藥：乙腈採用液相層析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；脫氧雪腐鐮刀菌烯醇、3-乙醯基脫氧雪腐鐮刀菌烯醇(3-acetyl deoxynivalenol)及15-乙醯基脫氧雪腐鐮刀菌烯醇(15-acetyl deoxynivalenol)對照用標準品。</p>	<p>一、「適用範圍」及「檢液之調製」增加「穀類、嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品」。</p> <p>二、「裝置」增列「真空冷凍乾燥裝置」、「烘箱」、「乾燥器」、「粉碎機」及「攪拌均質器」，修正「離子源」及「氮氣濃縮裝置」。</p> <p>三、「試藥」刪除乙醯衍生物。</p>

<p>2.2. 試藥：乙腈採用液相層析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；脫氧雪腐鐮刀菌烯醇對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：<u>1 mL及10 mL。</u></p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。</p> <p><u>2.3.4. 稱量瓶：附瓶蓋。</u></p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 20%乙腈溶液： 取乙腈20 mL，加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.4.2. 85%乙腈溶液： 取乙腈850 mL，加去離子水使成1000 mL。</p> <p>2.4.3. 10%乙腈溶液： 取乙腈10 mL，加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.5. 標準溶液之配製： 取脫氧雪腐鐮刀菌烯醇對照用標準品約1 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至10 mL，作為標準原液，<u>冷凍</u>貯存。臨用時取適量標準原液混合，以10%乙腈溶液稀釋至50~250 ng/mL，供作標準溶液。</p> <p>2.6. 檢液之調製： 將檢體^(註)磨碎混勻後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，<u>精確</u>加入85%乙腈溶液20 mL，振盪60分鐘，以3000 ×g離心5分鐘，取上清液4 mL，於40°C以氮氣吹乾，殘留物以10%乙腈溶液<u>溶解並定容至1 mL</u>，以超音波振盪溶解，經濾膜過濾，供作檢液。</p> <p><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去除水分，使水分含量小於10%。</u></p> <p>2.7. 基質匹配檢量線之製作： 取空白檢體依2.6節萃取及氮氣吹乾後，分別添加<u>入標準溶液1 mL</u>，以超音波振盪10分鐘，經濾膜過</p>	<p>2.3. 器具及材料：</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></p> <p>2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。</p> <p><u>2.3.4. 塑膠針筒：1 mL。</u></p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 20%乙腈溶液： 取乙腈20 mL，加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.4.2. 85%乙腈溶液： 取乙腈850 mL，加去離子水使成1000 mL。</p> <p>2.4.3. 10%乙腈溶液： 取乙腈10 mL，加去離子水使成100 mL。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製：</p> <p><u>2.5.1. 移動相溶液A：去離子水以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。</u></p> <p><u>2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。</u></p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取脫氧雪腐鐮刀菌烯醇對照用標準品約1 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至10 mL；<u>取3-乙醯基脫氧雪腐鐮刀菌烯醇及15-乙醯基脫氧雪腐鐮刀菌烯醇對照用標準品各約1 mg，精確稱定，分別以20%乙腈溶液溶解並定容至10 mL</u>，作為標準原液，於-18°C貯存。臨用時分別取適量標準原液混合，以10%乙腈溶液稀釋至50~250 ng/mL，供作標準溶液。</p> <p>2.7. 檢液之調製： 將檢體磨碎混勻後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入85%乙腈溶液20 mL，振盪60分鐘後，以3000 ×g離心5分鐘，取上清液4 mL，於40°C以氮氣吹乾，殘留物<u>加入10%乙腈溶液1 mL</u>，以超音波振盪溶解，經濾膜過濾，供作檢液。</p> <p>2.8. 基質匹配檢量線之製作： 取空白檢體依2.7節萃取及氮氣吹</p>	<p>物對照用標準品。</p> <p>四、「器具及材料」刪除「塑膠針筒」，修正「容量瓶」，並增列「稱量瓶」。</p> <p>五、刪除「移動相溶液之調製」，將移動相溶液移至「液相層析串聯質譜分析測定條件」。</p> <p>六、「標準溶液之配製」刪除乙醯衍生物標準原液配製步驟。</p> <p>七、「基質匹配檢量線之製作」修正「移動相溶液」及「離子化模式」等儀器參數。</p> <p>八、增列「水分之測</p>
--	---	---

濾，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行分析。就脫氧雪腐鐮刀菌烯醇之波峰面積，與對應之脫氧雪腐鐮刀菌烯醇濃度，製作基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：Inertsil ODS-3，3 μm，內徑2.1 mm × 15 cm。

移動相溶液：A液(去離子水)與B液(乙腈)以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0→10.0	95→40	5→60
10.0→ <u>10.1</u>	40→0	60→100
<u>10.1</u> →12.0	0→0	100→100
12.0→ <u>12.1</u>	0→95	100→5
<u>12.1</u> →15.0	95→95	5→5

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：-4.5 kV。

離子化模式：ESI負離子。

加熱管溫度(Turbo heater temperature)：500°C。

霧化氣體(Ion source gas 1)：50 psi。

輔助加熱氣體(Ion source gas 2)：50 psi。

氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：High。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)與碰撞能量(collision energy)如下表。

分析物	離子對		去集簇電壓(V)	碰撞能量(eV)
	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)		
脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	295 > 265 *		-130	-14
		295 > 138	-120	-14

*定量離子對

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。

2.8. 水分之測定：

取預經冷凍乾燥均質後之嬰幼兒

乾後，分別添加不同濃度標準溶液1 mL溶解，以超音波震盪10分鐘，經濾膜過濾後，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就各黴菌毒素之波峰面積，與對應之各黴菌毒素濃度，分別製作基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

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→10.0	95→40	5→60
10.0→ <u>10.01</u>	40→0	60→100
<u>10.01</u> →12.0	0→0	100→100
12.0→ <u>12.01</u>	0→95	100→5
<u>12.01</u> →15.0	95→95	5→5

移動相流速：0.4 mL/min。

注入量：10 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：-4.5 kV。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。

霧化氣體(Ion source gas 1)：50 psi。

加熱氣體(Ion source gas 2)：50 psi。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)與碰撞能量(collision energy)如下表。

分析物	離子對		去集簇電壓(V)	碰撞能量(eV)
	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)		
脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	295 > 265 *		-130	-14
		295 > 138	-120	-14
3-乙酰基脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	337 > 307 *		-95	-14
		337 > 173	-70	-14
15-乙酰基脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	337 > 150 *		-105	-22
		337 > 219	-130	-22

*定量離子對

註：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。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

定」。

九、「鑑別試驗及含量測定」將檢體分為「穀類」及「嬰幼兒穀物輔助食品及嬰幼兒副食品」，並修正脫氧雪腐鐮刀菌烯醇含量之單位。

十、修正脫氧雪腐鐮刀菌烯醇定量極限之單位。

十一、增列參考文獻。

十二、增修訂部分文字。

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，移至乾燥器中放冷，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(%)：

檢體之水分含量(%)

$$= \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

m₀：含蓋稱量瓶之重量(g)

m₁：含蓋稱量瓶及檢體取樣之重量(g)

m₂：含蓋稱量瓶及檢體烘乾至恆重後之重量(g)

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各10 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.7.節條件進行分析，就檢液與基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中脫氧雪腐鐮刀菌烯醇之含量(μg/kg)：

2.9.1 穀類：

檢體中脫氧雪腐鐮刀菌烯醇之含量(μg/kg) = $\frac{C \times V \times 5}{M}$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中脫氧雪腐鐮刀菌烯醇之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

2.9.2 嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品：

檢體中脫氧雪腐鐮刀菌烯醇之含量(μg/kg) = $\frac{C \times V \times 5}{M \times (1 - W/100)}$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

W：檢體之水分含量(%)

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2.8.節條件進行分析，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^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各黴菌毒素之含量(ppb)：
檢體中各黴菌毒素之含量(ppb) = $\frac{C \times V \times 5}{M}$

M
 C：由基質匹配檢量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)

註：相對離子強度由定性離子對與定量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. 本檢驗方法之定量極限脫氧雪腐鐮刀菌烯醇、3-乙醯基脫氧雪腐鐮刀菌烯醇及15-乙醯基脫氧雪腐鐮刀菌烯醇均為50 ppb。

2. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得 ($\leq 100\%$)，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. 本檢驗方法之定量極限為 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. García-Moraleja, A., Font, G., Mañes, J. and Ferrer, E. 2015. Development of a new method for the simultaneous determination of 21 mycotoxins in coffee beverages by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Res. Int. 72: 247-255.

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年度委外計畫研究成果報告。