

食品中黴菌毒素檢驗方法－伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>之檢驗  
Method of Test for Mycotoxins in Foods - Test of Fumonisin B<sub>1</sub> and  
Fumonisin B<sub>2</sub>

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於玉米及其製品、以玉米為主原料之嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品中伏馬毒素B<sub>1</sub> (fumonisin B<sub>1</sub>)及伏馬毒素B<sub>2</sub> (fumonisin B<sub>2</sub>)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取、淨化及衍生化後，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：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm×25 cm，或同級品。

2.1.2. 粉碎機(Grinder)。

2.1.3. 攪拌均質器(Blender)。

2.1.4. 振盪器(Shaker)。

2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.1.6. 離心機(Centrifuge)：可達2500 ×g者。

2.1.7. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。

2.1.8. 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。

2.1.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。

2.1.10. 烘箱(Oven)：附有自動溫度調節器，溫差在±2°C以內者。

2.1.11. 乾燥器(Desiccator)。

- 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採液相層析級；磷酸二氫鈉(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)、鄰苯二甲醛(*o*-phthaldialdehyde)、乙硫醇(2-mercaptoethanol)、四硼酸鈉(Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O)、磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、鹽酸、磷酸(85%)、氯化鈉及氯化鉀均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>對照用標準品。

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及50 mL，褐色。
- 2.3.3. 濾紙：ADVANTEC No. 5A，直徑12.5 cm，或同級品。
- 2.3.4. 玻璃纖維濾紙(Glass microfiber filters)：直徑9 cm。
- 2.3.5. 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FumoniTest管柱，或同級品。
- 2.3.6. 濾膜：孔徑0.45  $\mu\text{m}$ ，Nylon材質。
- 2.3.7. 樣品瓶：2 mL，褐色，玻璃材質。
- 2.3.8. 稱量瓶：附瓶蓋。
- 2.4. 試劑之調製：
- 2.4.1. 0.1 M磷酸二氫鈉溶液：
- 稱取磷酸二氫鈉15.6 g，加入去離子水900 mL溶解，以磷酸調整pH值至3.3，再加去離子水使成1000 mL。
- 2.4.2. 0.1 M四硼酸鈉溶液：
- 稱取四硼酸鈉3.8 g，以去離子水溶解使成100 mL。
- 2.4.3. 萃取溶液：
- 取乙腈、甲醇及去離子水以1：1：2 (v/v/v)比例混勻。
- 2.4.4. 2 N鹽酸溶液：
- 取鹽酸16.7 mL，緩緩加入去離子水80 mL中，混合均勻，冷卻後再加去離子水使成100 mL。
- 2.4.5. 磷酸鹽緩衝溶液：
- 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，加入去離子水990 mL溶解，以2 N鹽酸溶液調整pH值至7.0，再加去離子水使成1000 mL。
- 2.4.6. 鄰苯二甲醛溶液：
- 稱取鄰苯二甲醛40 mg，以甲醇1 mL溶解，加0.1 M四硼酸鈉溶液5 mL及乙硫醇50  $\mu\text{L}$ 混勻，於室溫避光儲存，可保存一週。
- 2.4.7. 50%乙腈溶液：
- 取乙腈與去離子水以1：1 (v/v)比例混勻。
- 2.5. 移動相溶液之調製：
- 2.5.1. 移動相溶液A：
- 取甲醇與0.1 M磷酸二氫鈉溶液以1：1 (v/v)比例混勻，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
- 2.5.2. 移動相溶液B：甲醇

## 2.6. 標準溶液之配製：

取伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>對照用標準品各約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，冷凍儲存。臨用時取適量各標準原液混合，以50%乙腈溶液稀釋至伏馬毒素B<sub>1</sub> 0.6~12 µg/mL，伏馬毒素B<sub>2</sub> 1.4~28 µg/mL，供作標準溶液。

## 2.7. 檢液之調製：

### 2.7.1. 萃取：

#### 2.7.1.1. 玉米及其製品：

將檢體磨碎混勻後，取約10 g，精確稱定，置於離心管中，精確加入萃取溶液25 mL，振盪2分鐘，以2500×g離心10分鐘，收集上清液，沉澱物再精確加入萃取溶液25 mL，重複操作一次，合併上清液，以萃取溶液定容至50 mL，經濾紙過濾。精確量取濾液10 mL，精確加入磷酸鹽緩衝溶液40 mL，混合均勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液10 mL，供淨化用。

#### 2.7.1.2. 以玉米為主原料之嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品：

將檢體冷凍乾燥使其水分含量小於10%，經磨碎混勻後，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，精確加入萃取溶液25 mL，振盪2分鐘，以2500×g離心10分鐘，收集上清液，沉澱物再加入萃取溶液25 mL，重複操作一次，合併上清液，以萃取溶液定容至50 mL，經濾紙過濾。精確量取濾液10 mL，置於離心管中，精確加入磷酸鹽緩衝溶液40 mL，混合均勻，以玻璃纖維濾紙過濾。精確量取濾液40 mL，供淨化用。

### 2.7.2. 淨化：

將2.7.1.節供淨化用溶液注入免疫親和性管柱(流速控制1滴/秒)，棄流出液，再以磷酸鹽緩衝溶液10 mL沖提排淨(流速控制1滴/秒)，俟管柱內磷酸鹽緩衝溶液排淨後，棄流出液，以甲醇1.5 mL沖提排淨(流速控制1滴/秒)，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。

### 2.7.3. 衍生化：

精確量取供衍生生化用溶液50 μL，置於樣品瓶中，加入鄰苯二甲醛溶液50 μL，旋渦混勻30秒，反應3分鐘後，供作檢液<sup>(註)</sup>。

註：伏馬毒素-鄰苯二甲醛衍生物於反應3分鐘後螢光即逐漸消退，故必須反應後立即注入液相層析系統分析。

## 2.8. 檢量線之製作：

精確量取2.6節標準溶液，添加於空白檢體(玉米及其製品添加量為0.5 mL、以玉米為主原料之嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品添加量為0.125 mL)，依2.7節調製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析，就各伏馬毒素之波峰面積，與對應之各伏馬毒素濃度，分別製作60~1200 ng/mL伏馬毒素B<sub>1</sub>及140~2800 ng/mL伏馬毒素B<sub>2</sub>之檢量線。

高效液相層析測定條件：

螢光檢出器：激發波長335 nm，發射波長440 nm。

層析管：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。

層析管溫度：35°C。

注入量：20 μL。

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 → 8.0	50 → 50	50 → 50
8.0 → 8.5	50 → 40	50 → 60
8.5 → 15.0	40 → 40	60 → 60
15.0 → 15.1	40 → 50	60 → 50
15.1 → 20.0	50 → 50	50 → 50

移動相流速：1.0 mL/min。

## 2.9. 水分之測定：

取經冷凍乾燥均質之以玉米為主原料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(m<sub>0</sub>)中，精確稱定(m<sub>1</sub>)，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(m<sub>2</sub>)為止，並依下列公式計算檢體之水分含量(%)：

$$\text{檢體之水分含量(\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

m<sub>0</sub>：含蓋稱量瓶之重量(g)

$m_1$ ：含蓋稱量瓶及檢體取樣之重量(g)

$m_2$ ：含蓋稱量瓶及檢體烘乾至恆重後之重量(g)

2.10. 鑑別試驗與含量測定：

精確量取檢液及檢量線溶液各20  $\mu$ L，分別注入液相層析儀中，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伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>之總含量( $\mu$ g/kg)：

2.10.1. 玉米及其製品：

檢體中伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>之總含量( $\mu$ g/kg)

$$= \frac{\sum C \times V \times F}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中伏馬毒素B<sub>1</sub>或伏馬毒素B<sub>2</sub>之濃度 (ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(0.2 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數(25)

2.10.2. 以玉米為主原料之嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品：

檢體中伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>之總含量( $\mu$ g/kg)

$$= \frac{\sum C \times V \times F}{M \times (1 - W/100)}$$

C：由檢量線求得檢液中伏馬毒素B<sub>1</sub>或伏馬毒素B<sub>2</sub>之濃度 (ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(0.2 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數(6.25)

W：檢體之水分含量(%)

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，於玉米及其製品中，伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>分別為30及70  $\mu$ g/kg；於以玉米為主原料之嬰幼兒穀物類輔助食品及嬰幼兒副食品中，伏馬毒素B<sub>1</sub>及伏馬毒素B<sub>2</sub>分別為15及35  $\mu$ g/kg (以乾重計)。

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<sup>(註)</sup>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( <i>m/z</i> ) >	產物離子( <i>m/z</i> )		
伏馬毒素B <sub>1</sub>	ESI <sup>+</sup>	722.4 > 334*		48	44
		722.4 > 352		48	40
伏馬毒素B <sub>2</sub>	ESI <sup>+</sup>	706.4 > 336*		42	36
		706.4 > 318		42	40

\*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. AOAC. 2001. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn flakes. AOAC Official Method 2001.04.
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。