

食品中真菌毒素檢驗方法－多重毒素之檢驗

Method of Test for Mycotoxins in Foods- Test of Multimycotoxin

- 適用範圍：本檢驗方法適用於穀類及其製品中黃麴毒素B₁(aflatoxin B₁)等11項真菌毒素(品項見附表)之檢驗。
- 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。

2.1. 裝置：

2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：

2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。

2.1.1.2. 層析管：ACQUITY BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 cm，或同級品。

2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達4300 × g以上者。

2.1.4. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。

2.1.5. 振盪器(Shaker)。

2.2. 試藥：氯化鉀、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、磷酸氫二鈉(Na₂HPO₄)、氯化鈉、甲酸銨、氫氧化鈉、鹽酸及甲酸均採用試藥特級；甲醇及乙腈均採用液相層析級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；黃麴毒素B₁等對照用標準品共11項。

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100 mL。

2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PTFE材質。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 0.1 N 鹽酸溶液：

取鹽酸9 mL，緩緩加入去離子水500 mL中，再加去離子水使成1000 mL。

2.4.2. 0.1 N 氢氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉4 g，以去離子水溶解使成1000 mL。

2.4.3. 磷酸鹽緩衝溶液：

稱取氯化鉀0.2 g、磷酸二氫鉀0.2 g、磷酸氫二鈉2.92 g及氯化鈉8 g，加去離子水900 mL溶解，以0.1 N鹽酸溶液或0.1 N氫氧化鈉溶液調整pH值至7.4，再加去離子水使成1000 mL。

2.4.4. 50%乙腈溶液：

取乙腈50 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.5. 20%乙腈溶液：

取乙腈20 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.6. 含70%乙腈之甲醇溶液：

取乙腈70 mL，加甲醇使成100 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

稱取甲酸銨0.315 g及甲酸1 mL，以去離子水溶解使成1000 mL，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：

稱取甲酸銨0.315 g及甲酸1 mL，以甲醇溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

取黃麴毒素B₁、黃麴毒素B₂、黃麴毒素G₁、黃麴毒素G₂、脫氧雪腐鐮刀菌烯醇、玉米赤黴毒素、赭麴毒素A、鐮刀黴菌毒素T-2及鐮刀黴菌毒素HT-2對照用標準品各約1 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至10 mL；取伏馬毒素B₁及伏馬毒素B₂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，冷凍貯存。臨用時分別取各標準原液混合，以乙腈稀釋至黃麴毒素B₁、黃麴毒素B₂、黃麴毒素G₁、黃麴毒素G₂、赭麴毒素A 0.005~0.3 μ g/mL，鐮刀黴菌毒素T-2及鐮刀黴菌毒素HT-2 0.01~0.6 μ g/mL，脫氧雪腐鐮刀菌烯醇及玉米赤黴毒素0.05~3 μ g/mL，伏馬毒素B₁及伏馬毒素B₂ 0.2~12 μ g/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體磨碎混勻，取約5 g，精確稱定，置於離心管中，加入磷酸鹽緩衝溶液5 mL，混合均勻，再加入含70%乙腈之甲醇溶液20 mL，振盪30分鐘，以4300 \times g離心5分鐘，取上清液5 mL，於50°C以氮氣吹乾，殘留物以20%乙腈溶液溶解並定容至1 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 檢量線之製作：

取空白檢體，分別添加標準溶液500 μ L及磷酸鹽緩衝溶液5 mL，混合均勻，再加入含70%乙腈之甲醇溶液19.5 mL，依2.7節調製檢量線溶液，並依下列條件進行分析。就各真菌毒素之波峰面積比，與對應之真菌毒素濃度，分別製作檢量線，各真菌毒素之檢量線濃度範圍如下：

分析物	濃度範圍(ng/mL)
黃麴毒素B ₁	
黃麴毒素B ₂	
黃麴毒素G ₁	0.5~30
黃麴毒素G ₂	
赭麴毒素A	
鐮刀黴菌毒素T-2	
鐮刀黴菌毒素HT-2	1~60
玉米赤黴毒素	
脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	5~300
伏馬毒素B ₁	
伏馬毒素B ₂	20~1200

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：

層析管：ACQUITY BEH C18，1.7 μ m，內徑2.1 mm \times 10 cm。

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 \rightarrow 5.5	95 \rightarrow 15	5 \rightarrow 85
5.5 \rightarrow 5.8	15 \rightarrow 0	85 \rightarrow 100
5.8 \rightarrow 6.9	0 \rightarrow 0	100 \rightarrow 100
6.9 \rightarrow 7.0	0 \rightarrow 95	100 \rightarrow 5
7.0 \rightarrow 9.0	95 \rightarrow 95	5 \rightarrow 5

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 μ L。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.0 KV。

離子化模式：ESI正離子。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

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

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：1000 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。
 偵測離子、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量
(collision energy)如附表。

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：

精確量取檢液及檢量線溶液各10 μ L，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各真菌毒素之含量(μ g/kg)：

$$\text{檢體中各真菌毒素之含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V \times 5}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中各真菌毒素之濃度(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($\leq 100\%$)，容許範圍如下：

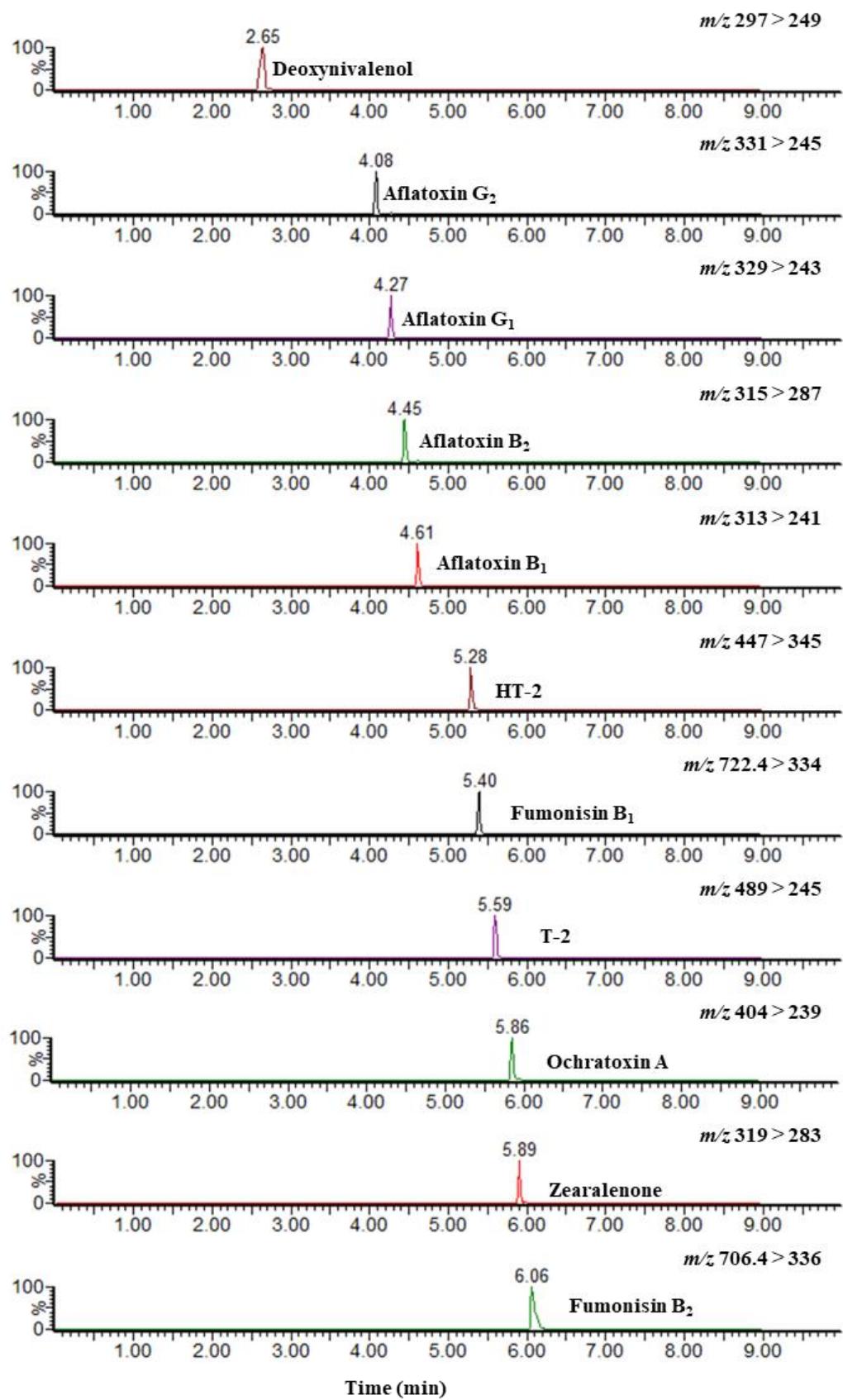
相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

- 附註：1. 本檢驗方法之定量極限如附表。
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。
3. 本檢驗方法為多重真菌毒素之檢驗，惟檢驗結果有爭議時，
則以單一真菌毒素之公告檢驗方法為準。

參考文獻：

Liao, C. D., Wong, J. W., Zhang, K., Hayward, D. G., Lee, N. S. and
Trucksess, M. W. 2013. Multi-mycotoxin analysis of finished grain and
nut products using high-performance liquid chromatography-triple-
quadrupole mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 61: 4771-4782.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析脫氧雪腐鐮刀菌烯醇等11項真菌毒素之MRM圖譜

附表、黃麴毒素B₁等11項真菌毒素之多重反應偵測模式參數及定量極限

項次	分析物		離子對 前驅離子(<i>m/z</i>)> 產物離子(<i>m/z</i>)	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	定量 極限 ($\mu\text{g/kg}$)
	英文名	中文名				
1	Aflatoxin B ₁	黃麴毒素B ₁	313 > 241*	42	14	0.5
			313 > 285		38	
2	Aflatoxin B ₂	黃麴毒素B ₂	315 > 287*		24	
			315 > 259		26	
3	Aflatoxin G ₁	黃麴毒素G ₁	329 > 243*		28	
			329 > 200		28	
4	Aflatoxin G ₂	黃麴毒素G ₂	331 > 245*		42	
			331 > 189		32	
5	Ochratoxin A	赭麴毒素A	404 > 239*		26	
			404 > 102		72	
6	T-2	鐮刀黴菌毒素T-2	489 > 245*	40	26	1
			489 > 327		24	
7	HT-2	鐮刀黴菌毒素HT-2	447 > 345*	32	20	1
			447 > 285		20	
8	Deoxynivalenol	脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	297 > 249*	20	12	5
			297 > 203		14	
9	Zearalenone	玉米赤黴毒素	319 > 283*	18	19	5
			319 > 185		24	
10	Fumonisin B ₁	伏馬毒素B ₁	722.4 > 334*	48	44	20
			722.4 > 352		40	
11	Fumonisin B ₂	伏馬毒素B ₂	706.4 > 336*	42	36	20
			706.4 > 318		40	

*定量離子對