

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

1. 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。
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。

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 \times 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 $\times g$ 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 M Ω ·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氫氧化鈉溶液：

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 µg/mL，鐮刀黴菌毒素T-2及鐮刀黴菌毒素HT-2 0.01~0.6 µg/mL，脫氧雪腐鐮刀菌烯醇及玉米赤黴毒素 0.05~3 µg/mL，伏馬毒素B₁及伏馬毒素B₂ 0.2~12 µg/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 ×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	0.5~30
黃麴毒素B ₂	
黃麴毒素G ₁	
黃麴毒素G ₂	
赭麴毒素A	
鐮刀黴菌毒素T-2	1~60
鐮刀黴菌毒素HT-2	
玉米赤黴毒素	5~300
脫氧雪腐鐮刀菌烯醇	
伏馬毒素B ₁	20~1200
伏馬毒素B ₂	

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 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(µg/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(≤ 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。

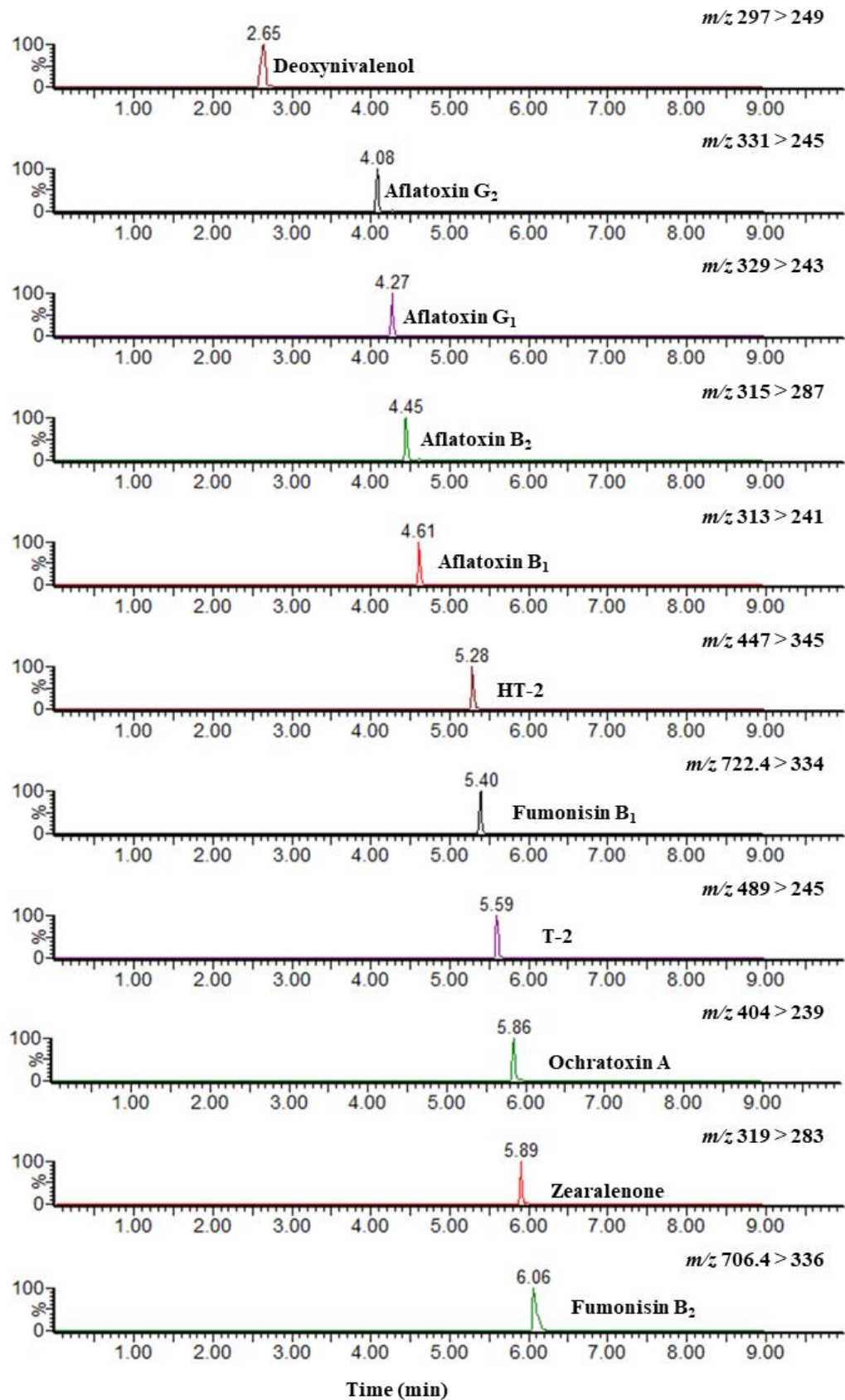
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

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

*定量離子對