

食品中黴菌毒素檢驗方法—玉米及其製品中伏馬毒素 B₁ 和 B₂ 之檢驗修正總說明

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—玉米及其製品中伏馬毒素 B₁ 和 B₂ 之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、「裝置」增列「振盪器」，並刪除「超音波振盪器」及「均質機」。
- 二、刪除「衍生化標準溶液之調製」。
- 三、「檢液之調製」修正「萃取」及「衍生化」。
- 四、修正「檢量線之製作」及含量測定之計算公式。
- 五、增列「參考文獻」。

食品中黴菌毒素檢驗方法—玉米及其製品中伏馬 毒素 B₁ 和 B₂ 之檢驗修正對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本方法適用於玉米及其製品中伏馬毒素B₁ (fumonisin B₁) 及伏馬毒素B₂ (fumonisin B₂)之檢驗。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：螢光檢出器 (fluorescence detector)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.1.3. 振盪器(Shaker)。</p> <p>2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達2500 ×g者。</p> <p>2.1.5. 氮氣濃縮裝置 (Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.2. 試藥：</p> <p>甲醇及乙腈均採液相層析級；磷酸二氫鈉(NaH₂PO₄ · 2H₂O)、鄰苯二甲醛(o-phthalaldehyde)、乙硫醇(2-mercaptoethanol)、四硼酸鈉(Na₂B₄O₇ · 10H₂O)、磷酸氫二鈉(Na₂HPO₄)、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、鹽酸、磷酸、氯化鈉及氯化鉀均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ · cm以上)；伏馬毒素B₁ 及B₂對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料^(註)：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：10 mL、100 mL 及 1000 mL，褐色。</p> <p>2.3.3. 濾紙：直徑 12 cm。</p> <p>2.3.4. 玻璃纖維濾紙：直徑9 cm。</p> <p>2.3.5. 玻璃過濾器 (Glass filter</p>	<p>1. 適用範圍：本方法適用於玉米及其製品中伏馬毒素B₁ (fumonisin B₁) 及伏馬毒素B₂ (fumonisin B₂)之檢驗。</p> <p>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。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 高效液相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：螢光檢出器 (fluorescence detector)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm，或同級品。</p> <p>2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達2500 ×g者。</p> <p>2.1.3. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.1.4. <u>超音波振盪器 (Ultrasonicator)</u>。</p> <p>2.1.5. 氮氣濃縮裝置 (Nitrogen evaporator)。</p> <p>2.1.6. <u>均質機(Homogenizer)</u>。</p> <p>2.2. 試藥：</p> <p>甲醇及乙腈均採液相層析級；磷酸二氫鈉(NaH₂PO₄ · 2H₂O)、鄰苯二甲醛(o-phthalaldehyde)、乙硫醇(2-mercaptoethanol)、四硼酸鈉(Na₂B₄O₇ · 10H₂O)、磷酸氫二鈉(Na₂HPO₄)、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、鹽酸、磷酸、氯化鈉及氯化鉀均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ · cm以上)；伏馬毒素B₁ 及B₂對照用標準品。</p> <p>2.3. 器具及材料^(註)：</p> <p>2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。</p> <p>2.3.2. 容量瓶：10 mL、100 mL 及 1000 mL，褐色。</p> <p>2.3.3. 濾紙：直徑 12 cm。</p> <p>2.3.4. 玻璃纖維濾紙：直徑9 cm。</p> <p>2.3.5. 玻璃過濾器 (Glass filter</p>	<p>一、「裝置」增列「振盪器」，並刪除「超音波振盪器」及「均質機」。</p> <p>二、刪除「衍生化標準溶液之調製」。</p> <p>三、「檢液之調製」修正「萃取」及「衍生化」。</p> <p>四、修正「檢量線之製作」及含量測定之計算公式。</p> <p>五、增列「參考文獻」。</p> <p>六、增修訂部分文字。</p>

<p>holder)。</p> <p>2.3.6. 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 Vicam管柱，或同級品。</p> <p>2.3.7. 濾膜：孔徑0.45 μm，Nylon材質。 註：操作時，應使用褐色或不透光之器具。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 0.1 M磷酸二氫鈉溶液： 稱取磷酸二氫鈉15.6 g，<u>以去離子水溶解使成1000 mL</u>。</p> <p>2.4.2. 0.1 M四硼酸鈉溶液： 稱取四硼酸鈉3.8 g，<u>以去離子水溶解使成100 mL</u>。</p> <p>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。</p> <p>2.4.4. 2 N鹽酸溶液： 取鹽酸180 mL，緩緩加入去離子水500 mL中，再加去離子水使成1000 mL。</p> <p>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，加去離子水990 mL溶解，以2 N鹽酸溶液調整pH值至7.0，以去離子水定容至<u>1000 mL</u>。</p> <p>2.4.6. 鄰苯二甲醛溶液： 稱取鄰苯二甲醛40 mg，溶於甲醇1 mL，加0.1 M四硼酸鈉溶液5 mL及乙硫醇50 μL混勻，於室溫避光儲存，可保存一週。</p> <p>2.4.7. 50%乙腈溶液： 取乙腈及水以1：1 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製： 取甲醇及0.1 M磷酸二氫鈉溶液以77：23 (v/v)比例混勻，以磷酸調整pH至3.3，<u>經濾膜過濾</u>，取濾液供作移動相溶液。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取伏馬毒素B₁及B₂對照用標準品各約1 mg，精確稱定，共置於10 mL容</p>	<p>holder)。</p> <p>2.3.6. 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 Vicam管柱，或同級品。</p> <p>2.3.7. 濾膜：孔徑0.45 μm，Nylon材質。 註：操作時，應使用褐色或不透光之器具。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 0.1 M磷酸二氫鈉溶液： 稱取磷酸二氫鈉15.6 g，<u>溶於去離子水使成1 L</u>。</p> <p>2.4.2. 0.1 M四硼酸鈉溶液： 稱取四硼酸鈉3.8 g，<u>溶於去離子水使成100 mL</u>。</p> <p>2.4.3. 萃取溶液： 取乙腈、甲醇及去離子水以1：1：2 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.4.4. 2 N鹽酸溶液： 取鹽酸180 mL，緩緩加入去離子水500 mL中，再加去離子水使成1000 mL。</p> <p>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，加去離子水990 mL溶解，以2 N鹽酸溶液調整pH值至7.0，以去離子水定容至<u>1 L</u>。</p> <p>2.4.6. 鄰苯二甲醛溶液： 稱取鄰苯二甲醛40 mg，溶於甲醇1 mL，加0.1 M四硼酸鈉溶液5 mL及乙硫醇50 μL混勻，於室溫避光儲存，可保存一週。</p> <p>2.4.7. 50%乙腈溶液： 取乙腈及水以1：1 (v/v)比例混勻。</p> <p>2.5. 移動相溶液之調製： 取甲醇及0.1 M磷酸二氫鈉溶液以77：23 (v/v)比例混勻，以磷酸調整pH至3.3後，<u>以濾膜過濾</u>，取濾液供作移動相溶液。</p> <p>2.6. 標準溶液之配製： 取伏馬毒素B₁及B₂對照用標準品各約1 mg，精確稱定，共置於10 mL定</p>	
---	--	--

量瓶中，以50%乙腈溶液溶解並定容，作為標準原液。臨用時取適量標準原液，以50%乙腈溶液稀釋至1~100 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取：

將檢體磨碎混勻後，取約20 g，精確稱定，加入萃取溶液50 mL，振盪2分鐘，以2500 ×g離心10分鐘，經濾紙過濾，取上清液。沉澱物再加萃取溶液50 mL，重複操作一次。合併上清液，以萃取溶液定容至100 mL，供淨化用。

2.7.2. 淨化：

精確量取供淨化用溶液10 mL，置於離心管中，加入磷酸鹽緩衝溶液40 mL混勻，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，流速控制每秒1~2滴，棄流出液，再以磷酸鹽緩衝溶液10 mL清洗管柱，俟管柱內溶液排淨後，以甲醇1.5 mL沖提，流速控制每秒1~2滴，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：

精確量取供衍生化用溶液50 µL於褐色玻璃瓶中，加入鄰苯二甲醛溶液50 µL，振盪混勻30秒，反應3分鐘後，供作檢液^(註)。

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，必須立即注入液相層析系統分析。

2.8. 檢量線之製作：

精確量取不同濃度之標準溶液0.5 mL，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0.05~5 µg/mL檢量線。

容瓶中，以50%乙腈溶液溶解並定容，作為標準原液。臨用時，再以50%乙腈溶液稀釋至1~100 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 衍生化標準溶液之調製：

精確量取不同濃度之標準溶液50 µL於褐色玻璃瓶中，加入鄰苯二甲醛溶液50 µL，振盪混勻30秒，反應3分鐘後，供作衍生化標準溶液。

註：伏馬毒素-鄰苯二甲醛衍生物於3分鐘後螢光即逐漸退化，必須確實控制注入液相層析系統中之時間。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 萃取：

將檢體磨碎混勻後，取約20 g，精確稱定，加入萃取溶液50 mL，均質2分鐘，以2500 ×g離心10分鐘，以濾紙過濾，取上清液。沉澱物再加萃取溶液50 mL，重複操作一次。合併上清液，以萃取溶液定容至100 mL，供淨化用。

2.8.2. 淨化：

精確量取供淨化用溶液10 mL，置於離心管中，加入磷酸緩衝溶液40 mL混勻，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，流速控制每秒1~2滴，棄流出液，再以磷酸鹽緩衝溶液10 mL清洗管柱，俟管柱內溶液排淨後，以甲醇1.5 mL沖提，流速控制每秒1~2滴，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。

2.8.3. 衍生化：

精確量取供衍生化用溶液50 µL，依2.7.節進行衍生化反應，供作檢液。

2.9. 檢量線之製作：

精確量取不同濃度之標準溶液0.5 mL，添加於空白檢體中，使各伏馬毒素之含量分別為0.5~50 µg，依2.8.節檢液之調製同樣操作，並依下列條件進行液相層析分析，就各伏馬毒素之波峰面積與對應之各伏馬毒素含量(µg)，分別製作檢量線。

<p>高效液相層析測定條件： 層析管柱：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。 螢光檢出器：激發波長335 nm，發射波長440 nm。 移動相溶液：依2.5.節所調製之溶液。 移動相流速：1.0 mL/min。 注入量：20 μL。 2.9. 鑑別試驗與含量測定： 精確量取檢液及檢量線溶液各20 μL，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B₁或B₂之含量(ppm)： 檢體中伏馬毒素B₁或B₂之含量(ppm)</p> $= \frac{C \times V \times F}{M}$ <p>C：由檢量線求得檢液中伏馬毒素B₁或B₂之濃度(μg/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(50) 附註：1. 本檢驗方法之<u>定量極限</u>，伏馬毒素B₁及B₂分別為0.03及0.07 ppm。 2. <u>檢體</u>中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。 <u>參考文獻</u>： <u>AOAC. 2001. Fumonisin B1 and B2 in corn and corn flakes. AOAC Official Method 2001.04.</u></p>	<p>高效液相層析測定條件： 層析管柱：RP-18，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm。 螢光檢出器：激發波長335 nm，發射波長440 nm。 移動相溶液：依2.5.節所調製之溶液。 移動相流速：1.0 mL/min。 注入量：20 μL。 2.10. 鑑別試驗與含量測定： 精確量取檢液及<u>衍生化標準</u>溶液各20 μL，分別注入液相層析儀中，依2.9.節條件進行分析。就檢液與<u>衍生化標準</u>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B₁或B₂之含量(ppm)： 檢體中伏馬毒素B₁或B₂之含量(ppm)</p> $= \frac{C}{M}$ <p>C：由檢量線求得檢液中伏馬毒素B₁或B₂之含量(μg) M：取樣分析檢體之重量(g) 附註：1. 本檢驗方法之<u>檢出限量</u>，伏馬毒素B₁及B₂分別為0.03及0.07 ppm。 2. <u>食品</u>中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。</p>	
---	---	--