

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
Method of Test for Mycotoxin in Foods Test of Fumonisin B₁ and B₂
in Corn and Corn Products

- 1 適用範圍：本方法適用於玉米及其製品中伏馬毒素 B₁ 及 B₂ 之檢驗。
- 2 檢驗方法：高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。

2.1 裝置：

2.1.1 高效液相層析儀：

2.1.1.1 檢出器：具有激發波長 335 nm 及發射波長 440 nm 之螢光檢出器 (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 離心機 (Centrifuge)：可達 2,500 × g 者。

2.1.3 酸鹼值測定儀 (pH meter)。

2.1.4 超音波振盪器 (Ultrasonicator)。

2.1.5 蒸發器 (Evaporator)：具氮氣吹乾裝置。

2.1.6 均質機 (Homogenizer)。

2.2 試藥：

甲醇及乙腈採液相層析級，磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate dihydrate)、鄰苯二甲醛 (*o*-phthalaldehyde)、乙硫醇 (2-mercaptoethanol)、四硼酸二鈉 (sodium tetraborate)、無水磷酸氫二鈉 (disodium hydrogen phosphate anhydrous)、磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate)、鹽酸、磷酸、氯化鈉、氯化鉀採用化學試藥特級，伏馬毒素 B₁ 及 B₂ (fumonisin B₁ and B₂) 對照用標準品。

2.3 器具及材料^(註)：

2.3.1 離心管 (Centrifuge tube)：50 mL，附 PP 材質之螺旋蓋。

2.3.2 均質杯：不銹鋼材質，50 mL 以上。

2.3.3 濾紙：直徑 12 cm。

2.3.4 玻璃纖維濾紙：直徑 9 cm。

2.3.5 玻璃過濾器 (Glass filter holder)。

2.3.6 容量瓶 (Volumetric flasks)。

2.3.7 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。

2.3.8 濾膜：孔徑 0.45 μm，nylon 材質。

2.3.9 針筒過濾器 (Syringe filter)：濾膜孔徑 0.45 μm，鐵氟龍材質。

註：裝置或操作伏馬毒素或含有伏馬毒素之檢液時，應使用褐色或不透光之器具。

2.4 試劑之調製：

2.4.1 0.1 M 磷酸二氫鈉溶液：

取磷酸二氫鈉 15.6 g，溶於 1 L 之水。

2.4.2 0.1 M 四硼酸二鈉溶液：

取四硼酸二鈉 3.8 g，溶於 1 L 之水。

2.4.3 萃取溶液：

將乙腈、甲醇及水以 1：1：2 (v/v) 比例混勻。

2.4.4 磷酸緩衝溶液(Phosphate-buffered saline, PBS)：

取氯化鈉 8 g，無水磷酸氫二鈉 1.2 g，磷酸二氫鉀 0.2 g 及氯化鉀 0.2 g，加水 990 mL，以 2 M 鹽酸溶液調整 pH 值 7.0，以水定容至 1 L。

2.4.5 移動相溶液：

將甲醇及 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 3.35 後，以濾膜過濾，濾液以超音波振盪除氣 30 min 後供作移動相溶液。

2.4.6. 鄰苯二甲醛試劑^(註)(OPA 試劑)：

取鄰苯二甲醛 40 mg 溶於甲醇 1 mL，續以 0.1 M 四硼酸二鈉溶液 5 mL 稀釋，再加入乙硫醇 50 μ L 混勻；將 OPA 試劑置在有蓋之避光小瓶中，於室溫下可保存一週，另亦可使用市售 OPA 試劑。

2.4.7. 乙腈溶液：

乙腈及水以 1：1 (v/v) 比例混勻。

2.5 標準溶液之配製：

精確量取伏馬毒素 B₁ 及 B₂ 標準品並以乙腈溶解，使其濃度為 100 ppm，供作標準原液。使用時再以乙腈溶液稀釋至 0.1~10 ppm，供作標準溶液。

2.6 檢液之調製：

2.6.1. 萃取：

將玉米及其製品磨碎後混勻備用，原屬粉狀者則直接混勻備用。取檢體約 20 g，精確稱定，置均質杯中，加入萃取溶液 50 mL，均質 2 分鐘，續以 2,500 \times g 離心 10 分鐘，以濾紙過濾上清液，再取萃取溶液 50 mL，重複均質、離心及過濾步驟。

2.6.2. 淨化：

合併兩次萃取液，並定容至 100 mL，精確量取 10 mL 置 50 mL 離心管中，加入 PBS 溶液 40 mL 混勻，混合液以玻璃纖維濾紙過濾，精確量取濾液 10 mL，以每秒一滴之流速通過免疫親和性管柱，再以 PBS 洗液 10 mL 清洗。將管柱內水分排淨後，取甲醇 1.5 mL，以每秒 1~2 滴流速沖提，收集沖提液，續以氮氣吹乾，再以乙腈溶液 200 μ L 溶解後，經針筒過濾供作檢液。

2.7 衍生物之調製

精確量取標準溶液或檢液 50 μ L 於褐色或避光之玻璃瓶中，加入 OPA 試劑 50 μ L，振盪混勻約 30 秒，經衍生化反應 3 分鐘後即為衍生物，應隨即進行高效液相層析分析。

2.8 檢量線之製作：

精確量取標準原液或適當濃度之標準溶液添加於檢體 20 g 中，使其中伏馬毒素之濃度為 0.025~5 ppm，按照 2.6 節檢液調製之相同操作，得到各種濃度之添加分析檢液，續依 2.7 節調製衍生物。精確量取衍生物 20 μ L 注入高效液相層析儀中，參照下述層析條件進行分析，就各波峰面積與對應檢液之伏馬毒素濃度，製作檢量線。

高效液相層析測定條件：

層析管柱：RP-18，5 μ m，內徑 4.6 mm \times 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 2.4.5 節所調製之溶液

移動相流速：1.0 mL/min

2.9 鑑別試驗與含量測定：

標準溶液或檢液經衍生化反應後，立即精確量取衍生物 20 μ L 注入高效液相層析儀中，參照 2.8 節層析條件進行分析。就衍生化檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依檢量線求出檢體中伏馬毒素 B₁ 或 B₂ 之含量。

$$\text{檢體中伏馬毒素含量(ppm)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得衍生化後檢液中伏馬毒素之濃度(ppm)

V：衍生化後檢液之體積(mL)

M：製備衍生化檢液之檢體重量(g)

- 備註：1. 本檢驗方法之最低檢出限量，伏馬毒素 B₁ 及 B₂ 分別為 0.03 及 0.07 ppm。
2. 伏馬毒素-OPA 衍生物於 3 分鐘後螢光即逐漸退化，所以必須確實控制伏馬毒素和 OPA 試劑混合至注入液相層析系統中之時間。
3. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。