寵物食品中黴菌毒素之檢驗方法－多重毒素之檢驗
Method of Test for Mycotoxin in Pet Foods- Test of Multimycotoxin

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於寵物食品中黃麴毒素B_1 (aflatoxin B_1) 等11品項黴菌毒素(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：電灑離子化正離子(positive ion electrospray ionization, ESI^+)。

2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，1.7 µm，內徑2.1 × 100 mm，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。

2.1.4. 振盪器 (Shaker)。

2.1.5. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。

2.2. 試藥：氯化鉀、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、氯化鈉、甲酸銨、氫氧化鈉、鹽酸、甲酸及醋酸均採用試藥特級；甲醇及乙腈均採液相層析級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)；黴菌毒素對照用標準品黃麴毒素B_1 ($AFLB_1$)、黃麴毒素B_2 ($AFLB_2$)、黃麴毒素G_1 ($AFLG_1$)、黃麴毒素G_2 ($AFLG_2$)、赭麴毒素A (OTA)、嘔吐毒素 (DON)、玉米赤霉烯酮 (ZON)、T2毒素、HT-2毒素、伏馬毒素B_1 (FB_1) 及伏馬毒素B_2 (FB_2) 等對照用標準品共11品項。

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. 玻璃試管：12 × 75 mm。

2.3.4. 濾膜：孔徑0.22 µm，PTFE材質。

2.3.5. 免疫親和管柱 (Immunoaffinity column) Myco6in 1+：採用內涵對11種毒素具有專一性單株抗體管柱，或同級品。

2.3.6. 玻璃濾紙(glass fiber filter paper)：直徑11 cm。

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. 50%乙腈溶液：

取乙腈50 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.4. 20%乙腈溶液：

取乙腈20 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.5. 含0.5% 醋酸之80%甲醇溶液：

取醋酸0.5 mL及甲醇80 mL，加去離子水使成100 mL。

2.4.6. 磷酸鹽緩衝溶液 (PBS)：

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至7.4，再加去離子水使成1000 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1000mL，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B_1、黃麴毒素B_2、黃麴毒素G_1、黃麴毒素G_2、赭麴毒素A、嘔吐毒素、玉米赤霉烯酮、T2毒素及HT-2毒素對照用標準品各約1 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至10 mL；取伏馬毒素B_1 (FB_1)及伏馬毒素B_2 (FB_1)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，冷凍貯存備用。臨用時分別取各標準原液混合，以20%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 0.0005～0.02 μg/mL， T2毒素及HT-2毒素 0.001～0.04

μg/mL，嘔吐毒素及玉米赤霉烯酮0.005～0.2 μg/mL，伏馬毒素B1及伏馬毒素B2 0.02～0.8 μg/mL，供作標準溶液，供作 2.8.節分析用標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1. 萃取

2.7.1.1. 精確稱定磨碎混勻之檢體約5 g，置於離心管中，加入磷酸鹽緩衝溶液25 mL，震盪60分鐘，以4300 ×g離心5分鐘，取上清液17.5 mL，以玻璃濾紙過濾，取濾液作為萃取液 A，供為淨化用。

2.7.1.2. 於剩餘殘渣及萃取液中加入甲醇17.5 mL，震盪60分鐘，以4300 ×g離心5分鐘，以濾紙過濾，取濾液5 mL，加入磷酸鹽緩衝溶液45 mL，再以玻璃濾紙過濾，取濾液作為萃取液 B，供為淨化用。

2.7.2. 淨化

取 2.7.1.2 節之萃取液 B 50 mL 緩緩注入免疫親和管柱 (流速控制 1~2滴 / 秒)，待萃取液 B 完全通過管柱後，以磷酸鹽緩衝溶液 20 mL 分次流洗管柱至完全無甲醇殘留，棄流出液。再取萃取液 A 5 mL 加入該免疫親和管柱 (流速控制1滴/秒)，待萃取液 A 完全通過管柱後，以去離子水 10 mL 流洗，棄流出液。再以含 0.5% 醋酸之 80 % 甲醇溶液 3 mL 沖提(流速控制1滴 / 秒)，收集沖提液於玻璃試管，經五分鐘後，再以甲醇 3 mL 沖提(流速控制1滴 / 秒)，合併沖提液，於 40℃ 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. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就各黴菌毒素波峰面積製作標準曲線。

液相層析串聯質譜儀分析測定條件[註1]：

層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 × 100 mm

層析管溫度：40 ℃。

移動相溶液： A液與B液依下列條件進行梯度分析。

時間 (min)	移動相溶液A (%)	移動相溶液B (%)
0.0	95.0	5.0
2.0	60.0	40
10.0	0.0	100

11.5	0.0	100
12.0	95.0	5.0
15.0	95.0	5.0

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：5 µL。

毛細管電壓(Capillary voltage)：5.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

離子源溫度(Interface Temperature)：600 ℃

霧化氣體(Nebulizing Gas ,GS1)：60 psi。

加熱氣體(Heating Gas ,GS2)：60 psi。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。

偵測離子對及碰撞能量如附表。

註1：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5 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，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2]鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各黴菌毒素之含量(ppm)：

$$\text{檢體中黴菌毒素之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times 5}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中各黴菌毒素之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註2：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. 本檢驗方法為多重毒素之檢驗，惟檢驗結果有爭議時，則以單一毒素之公告檢驗方法為準。

參考文獻：

1. 食品中真菌毒素檢驗方法－多重毒素之檢驗(MOHWT0010.03) 。衛授食字第1141902179號公告(修正日期: 114年10月29日)。
2. 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 highperformance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectromrtry. J. Agric.Food Chem. 61: 4771-4782.

附表、黃麴毒素B1等11品項黴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	去集簇電壓 (V)	碰撞電壓 (eV)	定量極限 (ppm)
	英文名	中文名	前驅離子(*m/z*) > 產物離子(*m/z*)			
1	Aflatoxin B1	黃麴毒素B1	313.0 > 241.0*	48	48	0.001
			313.0 > 285.0	48	43	
2	Aflatoxin B2	黃麴毒素B2	315.0 > 287.0*	42	36	0.001
			315.0 > 259.0	42	40	
3	Aflatoxin G1	黃麴毒素G1	329.0 > 243.0*	64	38	0.001
			329.0 > 200.0	64	54	
4	Aflatoxin G2	黃麴毒素G2	331.0 > 245.1*	66	51	0.001
			331.0 > 189.2	66	43	
5	Ochratoxin A	赭麴毒素A	404.0 > 239.0*	61	37	0.001
			404.0 > 102.0	61	90	
6	T-2	T2毒素	489.1 > 245*	65	40	0.002
			489.1 > 327	65	32	
7	HT-2	HT-2毒素	447.1 > 345.1*	101	22	0.002
			447.1 > 285.0	101	27	
8	Deoxynivalenol	嘔吐毒素	297.0 > 249.0*	65	15	0.010
			297.0 > 231.0	65	22	
9	Zearalenone	玉米赤霉烯酮	319.0 > 283.0*	65	17	0.010
			319.0 > 185.0	65	28	
10	Fumonisin B1	伏馬毒素B1	722.5 > 334.4*	111	57	0.040
			722.5> 352.3	111	60	
11	Fumonisin B2	伏馬毒素B2	706.5 > 336.4*	116	59	0.040
			706.5 > 318.4	116	51	

*定量離子對