

食品中黴菌毒素檢驗方法—棒麴毒素之檢驗修正草案總說明

為加強食品中污染物質及毒素之管理，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」，本次修正主要係刪除酵素水解步驟，並改以液相層析串聯質譜儀進行檢測，並配合「食品中污染物質及毒素衛生標準」訂有其他食品中總棒麴毒素之限量標準，爰擬具旨揭修正草案，名稱並修正為「食品中真菌毒素檢驗方法—棒麴毒素之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、修正中文名稱。
- 二、「適用範圍」增列蘋果醋。
- 三、「檢驗方法」改以液相層析串聯質譜儀進行檢測。
- 四、「裝置」增列「液相層析串聯質譜儀」，另刪除「高效液相層析儀」、「水平式振盪水浴」、「減壓濃縮裝置」及「酸鹼度測定儀」。
- 五、「試藥」增列「棒麴毒素- $^{13}\text{C}7$ 同位素內部標準品」，另刪除「甘油」及「果膠酶」。
- 六、「器具及材料」增列「容量瓶」，修正「濾膜」孔徑，另刪除「50 mL 離心管」、「濃縮瓶」及「濾紙」。
- 七、「試劑之調製」增列「25%乙腈溶液」，另刪除「pH 4.0 醋酸溶液」、「50%甘油溶液」及「果膠酶溶液」。
- 八、修正「移動相溶液之調製」、「標準溶液之配製」、「檢液之調製」、「鑑別試驗及含量測定」及「參考文獻」。
- 九、增列「內部標準溶液之配製」、「標準曲線之製作」及「參考層析圖譜」。
- 十、增修訂部分文字。

食品中黴菌毒素檢驗方法－棒麴毒素之檢驗修正 草案對照表

修正名稱	現行名稱	說明
食品中 <u>真菌</u> 毒素檢驗方法－棒麴毒素之檢驗 Method of Test for Mycotoxins in Foods- Test of Patulin	食品中 <u>黴菌</u> 毒素檢驗方法－棒麴毒素之檢驗 Method of Test for Mycotoxins in Foods- Test of Patulin	修正中文名稱。
修正規定	現行規定	說明
1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蘋果汁、蘋果泥、<u>蘋果醋</u>、嬰幼兒副食品及供嬰幼兒食用之蘋果汁及蘋果泥、熟漬蘋果等製品中棒麴毒素(patulin)之檢驗。 2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(<u>liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS</u>)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：<u>電灑離子化(electrospray ionization, ESI)</u>。 2.1.1.2. 層析管：<u>ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μm, 內徑2.1 mm $\times$ 10 cm</u>，或同級品。 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)。 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.1.4. 振盪器(Shaker)。 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達2000 $\times$g以上者。 2.1.6. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。 2.1.7. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。 2.2. 試藥：乙腈及乙酸乙酯均採用液相層析級；無水硫酸鈉、<u>冰醋酸及碳酸鈉</u>均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；棒麴毒素對照用標準品：<u>棒麴毒素-^{13}C$_7$(patulin-^{13}C$_7$)同位素內部標準品(25 μg/mL in acetonitrile)</u>。 2.3. 器具及材料： 2.3.1. 離心管：15 mL，PP材質。	1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蘋果汁、蘋果泥、嬰幼兒副食品及供嬰幼兒食用之蘋果汁及蘋果泥、熟漬蘋果等<u>固態蘋果製品</u>中棒麴毒素(patulin)之檢驗。 2. 檢驗方法：檢體經<u>酵素水解及萃取</u>後，以<u>高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)</u>分析之方法。 2.1. 裝置： 2.1.1. <u>高效液相層析儀</u>： 2.1.1.1. <u>檢出器：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)</u>。 2.1.1.2. 層析管：<u>Inertsil ODS-2, 5 μm, 內徑4.6 mm $\times$ 15 cm</u>，或同級品。 2.1.2. 攪拌均質器(Blender)。 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.1.4. <u>水平式振盪水浴(Horizontal shaking bath)</u>：能維持水溫溫差在$\pm 1^{\circ}$C以內者。 2.1.5. 振盪器(Shaker)。 2.1.6. 離心機(Centrifuge)：可達2000 $\times$g以上者。 2.1.7. <u>減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)</u>。 2.1.8. 氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator)。 2.1.9. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。 2.1.10. <u>酸鹼度測定儀(pH meter)</u>。 2.2. 試藥：乙腈及乙酸乙酯均採用液相層析級；無水硫酸鈉、<u>醋酸、碳酸鈉及甘油</u>均採用試藥特級；<u>果膠酶(pectinase, 16 U/mg)</u>；去離子水(比電阻於25°C可達18	一、「適用範圍」增列蘋果醋。 二、「檢驗方法」改以液相層析串聯質譜儀進行檢測。 三、「裝置」增列「液相層析串聯質譜儀」，另刪除「高效液相層析儀」、「水平式振盪水浴」、「減壓濃縮裝置」及「酸鹼度測定儀」。 四、「試藥」增列「棒麴毒素-^{13}C$_7$同位素內部標準品」，另刪除「甘油」及「果膠酶」。 五、「器具及材料」增列「容量瓶」，修正「濾膜」孔徑，另刪除「50 mL 離心管」、「濃縮瓶」及「濾

2.3.2. 容量瓶：50 mL。 2.3.3. 濾膜：孔徑<u>0.2 μm</u>，PVDF材質。 2.4. 試劑之調製： 2.4.1. 1.5%碳酸鈉溶液： 稱取碳酸鈉1.5 g，以去離子水溶解使成100 mL。 2.4.2. 25%乙腈溶液： 取乙腈25 mL，加去離子水使成100 mL。 2.5. 移動相溶液之調製： 2.5.1. 移動相溶液A： 取冰醋酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。 2.5.2. 移動相溶液B： 取冰醋酸1 mL，加乙腈使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。 2.6. 內部標準溶液之配製： 取適量棒麴毒素-¹³C₇同位素內部標準品，以乙腈稀釋至1 μg/mL，供作內部標準溶液，冷凍避光貯存。 2.7. 標準溶液之配製： 取棒麴毒素對照用標準品約5 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量標準原液及內部標準溶液混合，以25%乙腈溶液稀釋至5~250 ng/mL (含內部標準品濃度50 ng/mL)，供作標準溶液^(註)。 註：標準溶液若存放超過一週，需重新配製。 2.8. 檢液之調製： 將檢體均質混勻，嬰幼兒食品依標籤指示之比例調配檢體，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液50 μL、去離子水2 mL及乙酸乙酯4 mL，振盪1分鐘，以2000×g離心3分鐘。收集上層液，下層液加入乙酸乙酯4 mL，重複上述萃取步驟。合併上層液，	MΩ·cm以上)；棒麴毒素對照用標準品。 2.3. 器具及材料： 2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。 2.3.2. 濃縮瓶：100 mL。 2.3.3. 濾膜：孔徑<u>0.45 μm</u>，PVDF材質。 2.3.4. 濾紙：Whatman No. 4，直徑11 cm，或同級品。 2.4. 試劑之調製： 2.4.1. 1.5%碳酸鈉溶液： 稱取碳酸鈉1.5 g，以去離子水溶解使成100 mL。 2.4.2. pH 4.0醋酸溶液： 取去離子水100 mL，以醋酸調整pH值至4.0。 2.4.3. 50%甘油溶液： 取甘油5 mL，加去離子水使成10 mL。 2.4.4. 果膠酶溶液： 稱取適量果膠酶以50%甘油溶液稀釋至1.4 U/mg。 2.5. 移動相溶液之調製： 取去離子水與乙腈以9：1 (v/v)之比例混勻，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。 2.6. 標準溶液之配製： 取棒麴毒素對照用標準品約5 mg，精確稱定，以乙酸乙酯溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷藏貯存。臨用時取適量標準原液，於40°C以氮氣吹乾，再以pH 4.0醋酸溶液溶解並稀釋至50~500 ng/mL，供作標準溶液^(註)。 註：標準溶液若存放超過一週，需重新配製。 2.7. 檢液之調製： 將檢體均質混勻，嬰幼兒食品依標籤指示之比例調配檢體，取約5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入果膠酶75 μL及去離子水5 mL，於40°C水浴反應2小時。加入乙酸乙酯10 mL，振盪1分鐘，以	紙」。 六、「試劑之調製」增列「25%乙腈溶液」，另刪除「pH 4.0醋酸溶液」、「50%甘油溶液」及「果膠酶溶液」。 七、修正「移動相溶液之調製」、「標準溶液之配製」、「檢液之調製」、「鑑別試驗及含量測定」及「參考文獻」。 八、增列「內部標準溶液之配製」、「標準曲線之製作」及「參考層析圖譜」。 九、增修訂部分文字。
---	---	--

加入1.5%碳酸鈉溶液0.8 mL，振盪1分鐘，以2000 ×g離心3分鐘，收集上層液，下層液加入乙酸乙酯2 mL，振盪1分鐘，以2000 ×g離心3分鐘。合併上層液，加入無水硫酸鈉1 g，旋渦混合30秒，以2000 ×g離心3分鐘，收集上層液，殘留物加入乙酸乙酯2 mL，重複上述萃取步驟。合併上層液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物加入25%乙腈溶液1 mL，旋渦混合30秒，超音波振盪溶解，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各3 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就棒麴毒素與內部標準品之波峰面積比，與對應之棒麴毒素濃度，製作標準曲線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註)：
層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，1.7 μm，內徑2.1 mm × 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→5.0	97→97	3→3
5.0→5.1	97→1	3→99
5.1→6.6	1→1	99→99
6.6→6.7	1→97	99→3
6.7→10.2	97→97	3→3

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：3 μL。

毛細管電壓(Capillary voltage):0.8 kV。

離子化模式：ESI負離子。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：200 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：1200 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple

2000 ×g離心3分鐘。收集上層液，下層液加入乙酸乙酯10 mL，重複上述萃取步驟，合併上層液，加入1.5%碳酸鈉溶液2 mL，振盪1分鐘，以2000 ×g離心3分鐘，收集上層液移至另一50 mL離心管，下層液加入乙酸乙酯5 mL，重複上述萃取步驟，合併上層液，加入無水硫酸鈉1 g，旋渦混合30秒，以濾紙過濾，收集濾液，離心管續以乙酸乙酯每次4 mL潤洗2次，合併濾液於濃縮瓶中，於40°C水浴減壓濃縮至1~2 mL，移至15 mL離心管，濃縮瓶以乙酸乙酯每次2 mL潤洗2次，洗液併入離心管中，於40°C以氮氣吹乾，殘留物精確加入pH 4.0醋酸溶液0.5 mL使溶解，旋渦混合30秒，超音波振盪5分鐘，以2000 ×g離心3分鐘，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各50 μL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中棒麴毒素之含量(μg/kg)：

檢體中棒麴毒素含量(μg/kg) = $\frac{C \times V}{M}$

M
C：由標準曲線求得檢液中棒麴毒素之濃度(ng/mL)

V：檢液最後溶解之體積(mL)

M：取樣分析之檢體重量(g)

高效液相層析測定條件^(註)：

光二極體陣列檢出器：定量波長276 nm。

層析管：Inertsil ODS-2，5 μm，內徑4.6 mm × 15 cm。

移動相溶液：依2.5節調製之溶液。

移動相流速：0.5 mL/min。

註：上述測定條件分析不適時，依

reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	離子對	進樣錐電壓	碰撞能量
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	(V)	(eV)
棒麴毒素	153 > 81*	12	8
	153 > 53	19	13
	153 > 109	12	12
棒麴毒素- ¹³ C ₇ (I.S.)	160 > 115	28	7

*定量離子對，定性離子對可視基質情況選擇適合之至少一對離子對

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。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：
精確量取檢液及標準溶液各3 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.9節條件進行分析。就檢液與標準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棒麴毒素之含量(µg/kg)：
檢體中棒麴毒素含量(µg/kg) = $\frac{C \times V}{M}$

M
C：由標準曲線求得檢液中棒麴毒素之濃度(ng/mL)

V：檢液最後溶解之體積(mL)

M：取樣分析之檢體重量(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為5 µg/kg。

2. 檢體中若有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

所使用之儀器，設定適合之測定條件。

附註：1. 本檢驗方法之定量極限為5 µg/kg。

2. 檢體中若有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻

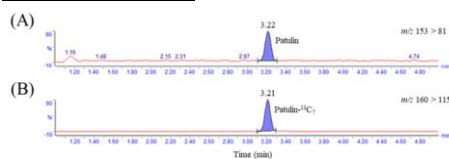
1. Sadok, I., Szmagara, A. and Staniszewska, M. M. 2018. The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. Food Chem. 245: 364-370.

2. 吳淑慇、丘如茵、喻敏甄、羅可涵、張采屏、陳蓉萱、施偉仲。2019。天然毒素及污染物檢驗方法開發。衛生福利部食品藥物管理署108年度委外計畫研究成果報告。

參考文獻：

1. Sadok, I., Szmagara, A. and Staniszewska, M. M. 2018. The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. Food Chem. 245: 364-370.
2. 吳淑憶、丘如茵、喻敏甄、羅可涵、張采屏、陳蓉萱、施偉仲。2019。天然毒素及污染物檢驗方法開發。衛生福利部食品藥物管理署108年度委外計畫研究成果報告。
3. Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V. and Hernández, F. 2014. Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC-MS/MS. Study of matrix effects with atmospheric pressure ionisation sources. Food Chem. 142: 400-407.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析棒麴毒素標準品(A)及其內部標準品(B)之MRM圖譜