

食品中黴菌毒素檢驗方法—T-2 毒素及 HT-2 毒素之檢驗

Method of Test for Mycotoxin in Foods - Test of T-2 Toxin and HT-2 Toxin

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於穀類及其製品中 T-2 毒素及 HT-2 毒素之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，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 BEH C18，1.7 μm，內徑 2.1 mm × 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 粉碎機(Grinder)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達 3000 ×g 以上者。
 - 2.1.5. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.1.6. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.2. 試藥：甲酸銨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 MΩ·cm 以上)；T-2 毒素及 HT-2 毒素對照用標準品。
 - 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。
 - 2.3.3. 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column)：採用內含對 T-2 毒素及 HT-2 毒素具專一性單株抗體之 T-2/HT-2 testTM 管柱，或同級品。
 - 2.3.4. 濾紙：Whatman No. 4，直徑 11 cm，或同級品。
 - 2.3.5. 玻璃纖維濾紙：Whatman GF/A，直徑 11 cm，或同級品。
 - 2.3.6. 濾膜：孔徑 0.22 μm，PTFE 材質。

2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 20%乙腈溶液：

取乙腈 20 mL，加去離子水使成 100 mL。

2.4.2. 90%甲醇溶液：

取甲醇 90 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

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 T-2 毒素及 HT-2 毒素對照用標準品各約 10 mg，精確稱定，分別以乙腈溶解並定容至 10 mL，作為標準原液，於 -20°C 貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以 20% 乙腈溶液稀釋至 0.5~30 ng/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 5 g，精確稱定，置於離心管中，加入 90% 甲醇溶液 20 mL，旋渦混合 1 分鐘，以 3000 ×g 離心 5 分鐘，收集上清液，以濾紙過濾。取濾液 10 mL，加去離子水 40 mL 混勻，再以玻璃纖維濾紙過濾，取濾液供淨化用。

2.7.2. 淨化：

取 2.7.1. 節供淨化用濾液 10 mL，注入免疫親和性管柱，流速為每秒 1 滴，棄流出液，以去離子水 10 mL 沖洗，流速為每秒 1 滴。俟管柱內去離子水排淨後，以甲醇 2 mL 沖提，流速為每秒 1 滴，收集沖提液，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. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 10 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中，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 T-2 毒素或 HT-2 毒素之含量(ppb)：

$$\text{檢體中 T-2 毒素或 HT-2 毒素含量(ppb)} = \frac{C \times V \times 10}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中 T-2 毒素或 HT-2 毒素之濃度(ng/mL)

V：檢液最後定容之體積(1 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

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。

離子源溫度(Ion source temperature)：150 $^{\circ}$ C。

離子化模式：ESI⁺。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500 $^{\circ}$ C。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：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

下表：

分析物	離子對	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
T-2 毒素	489 > 245*	40	26
	489 > 327	40	24
HT-2 毒素	447 > 345*	32	20
	447 > 285	32	20

*定量離子對

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. 相對離子強度由定性及定量離子對之波峰面積相除而得($\leq 100\%$)。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，T-2 毒素及 HT-2 毒素均為 1 ppb。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Kong, W., Zhang, X., Shen, H., Ou-Yang, Z. and Yang, M. 2012. Validation of a gas chromatography-electron capture detection of T-2 and HT-2 toxins in Chinese herbal medicines and related products after immunoaffinity column clean-up and pre-column derivatization. Food Chem. 132: 574-581.
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 high-performance-liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 61: 4771-4782.