

飼料中多種黴菌毒素同時檢測方法之評估⁽¹⁾

李免蓮⁽²⁾⁽³⁾ 陳碧慧⁽²⁾ 戴永萍⁽²⁾

收件日期：102 年 6 月 3 日；接受日期：102 年 8 月 26 日

摘 要

本試驗旨在建立玉米基質中黃麴毒素 (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂)、赭麴毒素 A (OTA)、玉米赤黴烯酮 (F2)、T-2 毒素 (T2)、HT-2 毒素 (HT2)、嘔吐毒素 (DON)、伏馬鐮孢毒素 (FB₁, FB₂) 等 11 種毒素之同時檢測分析模式，並藉以標示國內常用穀物原料及配合飼料之毒素含量背景值。試驗使用免疫吸附管柱進行基質淨化，並以液相層析質譜分析儀 (LC/MS/MS) 進行偵測。試驗結果顯示，LC/MS/MS 對 11 種黴菌毒素之定性 (LOD)、定量 (LOQ) 極限分別為 0.1 – 9.4 ppb、0.4 – 30.6 ppb；以玉米為基質進行檢測 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、OTA、F2、DON、T2&HT2、FB₁、FB₂，其方法偵測極限 (Method detection limit, MDL) 分別為 0.35 ppb、0.36 ppb、0.33 ppb、0.45 ppb、0.78 ppb、11.98 ppb、23.63 ppb、11.35 ppb、6.65 ppb 及 6.97 ppb。又進行玉米、大麥、小麥、蕎麥、糙米、高粱及大豆粕等原料 50 件及完全配合飼料含豬料、家禽料、反芻動物料、寵物料等 39 件之檢測，結果顯示，穀物原料中檢出毒素計有 AFB₁、DON、HT2、T2、FB₁ 及 FB₂ 等 6 種，檢出率分別為 2%、18%、2%、2%、28% 及 20%。配合飼料檢出毒素有 AFB₁、AFB₂、AFG₁、DON、OTA、HT2、FB₁、FB₂、F2 等，檢出率分別為 79%、5%、10%、67%、10%、8%、100%、95%、56%。檢出之最高值為 AFB₁ 5.6 ppb、AFB₂ 0.7 ppb、AFG₁ 0.4 ppb、DON 1.213 ppm、OTA 1.3 ppb、HT2 19.4 ppb、T2 8.9 ppb、FB₁ 1.503 ppm、FB₂ 381.3 ppb、F2 77.9 ppb，均低於歐盟限量標準。

關鍵詞：多種黴菌毒素、液相層析質譜分析、穀物及配合飼料。

緒 言

由於氣候變遷及糧食缺乏，造成飼料用穀物之品質更加不穩定。而飼料之組成中有 60% 為穀物，常有不良穀物被混入飼料中而造成禽畜或寵物之傷害。黴菌毒素之含量極微，要由大量基質中純化出微量之毒素加以分析，困難度高。

由於質譜儀之進步，使檢測方向有改變，2009 年止，許多報告都採用液相層析或氣相層析輔以質譜儀，進行多種黴菌毒素之一次檢測之研究 (Berthiller *et al.*, 2005; Frenich *et al.*, 2009; Soleimany *et al.*, 2011; Sulyok *et al.*, 2006)，採用簡易的萃取程序，利用質譜之檢測能力，一次可從事多種黴菌毒素分析，但質譜儀分析極易受基質干擾導致分析精準度之變異。若使用免疫親和方式，依據抗體與抗原結合之原理，將大量檢體中之微量黴菌毒素吸附出，並快速淨化，進行分析，可使原本冗長且使用大量化學藥劑之分析方法得到很大的改進，此種方法每一毒素都需使用其專屬之抗體，造成分析成本的提高及檢測標的限制。

黴菌毒素種類繁多，大部分檢測法均集中在黃麴毒素、赭麴毒素 A、玉米赤黴毒素 (F2)、T-2 毒素、HT-2 毒素、嘔吐毒素 (脫氧雪腐鐮刀菌烯醇, Deoxynivalenol, DON)、伏馬鐮孢毒素 B₁ 和 B₂ (FB₁、FB₂) 等項目。檢測之前處理乃利用免疫親合性淨化管、直接萃取稀釋與適當淨化材料等多種，續以結合 LC/MS/MS (大氣壓力游離模式與電灑游離模式) 進行偵測確認 (Ventura *et al.*, 2004; Franz *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010; Paepens *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2010; Sulyok *et al.*, 2006)。目前行政院衛生署公告之食品中黴菌毒素檢驗方法計有黃麴毒素 (署授食字第 0991903564 號，衛生署 2010a)；赭麴毒素 A (署授食字第 0991903550

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1921 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 通訊作者，E-mail: mainlian@mail.tlri.gov.tw。

號，衛生署 2010b)；T-2 毒素及 HT-2 毒素 (署授食字第 0981800375 號，衛生署 2009)；脫氧雪腐鐮刀菌烯醇 (署授食字第 0951800007 號，衛生署 2006)；玉米赤黴毒素 (署授食字第 0971800105 號，衛生署 2008)；伏馬鐮孢毒素 B₁ 和 B₂ (署授食字第 0939316919 號，衛生署 2004) 等，其檢測方法均以免疫親合性淨化管結合 HPLC-UV (紫外光吸收) 與 HPLC-FL (螢光) 為主。

本試驗在探討以免疫親和管柱淨化穀物原料及配合飼料之黴菌毒素萃取液，並採 LC/MS/MS 一次同時檢測淨化萃取液中多種黴菌毒素之含量，確立其分析法之精準度，並進行各種穀物原料及配合飼料之黴菌毒素含量分析，了解該等毒素在各類飼料中之背景值。

材料與方法

I. 試驗藥劑

本試驗選定六類黴菌毒素，包含黃麴毒素 (Aflatoxins B₁、B₂、G₁、G₂，AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)、赭麴毒素 (Ochratoxins A, OTA)、玉米赤黴烯酮 (Zearalenone, F2)、T-2 毒素 (T2) & HT-2 毒素 (HT2)、嘔吐毒素 (Deoxynivalenol, DON)、伏馬鐮孢毒素 (Fumonisin B₁、B₂，FB₁、FB₂) 共 11 種品項。標準品購自 FERMENTEK 公司。AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、T2 及 HT-2 之標準品 1mg，以 5 mL 二氯甲烷 (CH₂Cl₂) 溶解並定容之，OTA、DON、F2、FB₁ 及 FB₂ 之標準品 1 mg 則以 5 mL 甲醇 (Methanol, MeOH, CH₃OH) 溶解並定容，即得 200 µg/mL (ppm) 之個別標準儲備液。再由 200 ppm 之個別標準儲備液製作檢量線及添加用之標準混合液，其濃度分別為 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、OTA = 1、1、1、1、2 ppm，F2、DON、T2、HT2、FB₁、FB₂ = 10、25、5、5、25、12.5 ppm 之兩組混合標準儲備液，儲備液於 4°C 冷藏，進行分析時再依需要製作全部標準品之混合標準液供試。

試驗中使用藥品試劑有甲醇採 LC 級 (Merck)；磷酸鹽緩衝液 (Phosphate-buffered solution, PBS)，pH 值為 7.4，購自商品化之磷酸鹽片 (Sigma-Aldrich)，使用前將其溶於水中即可；聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 購自 Sigma-Aldrich。黴菌毒素六合一免疫吸附管柱 (AOFZDT2TM immunoaffinity columns, IAC) 購自 VICAM (Watertown, MA, USA)。

II. 分析設備及其條件

(i) MS/MS 質譜分析條件之設定

本試驗之 MS/MS 採 Sciex API 3000 ESI-MS/MS 系統之三段式四極棒質譜儀 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，離子源溫度 350°C，氣簾氣體 (Curtain gas) 及碰撞氣體 (Collision gas) 使用高純度氮氣 (N₂, 99.999%)。多重反應監測 (Multiple reaction monitoring, MRM) 用以測定母離子及碰撞反應後之子離子，以此判讀黴菌毒素碰撞反應游離圖譜，提取最佳母、子離子監測模式。

將 200 ppm 黴菌毒素個別標準儲備液以含 0.1% 甲酸 (Formic acid, FA) 之 CH₃OH 稀釋成 100 ppb，使用 1 mL 注射針以注射幫浦 10 µL/min 的流速注入質譜儀離子源，找尋 Declustering potential (DP)、Focusing potential (FP)、Entrance potential (EP)、Collision cell exit potential (CXP)、Nebulizer gas (NEB)、Curtain gas (CUR)、Collision gas (CAD)、IonSpray voltage (IS) 等最佳質譜分析參數，以及六類黴菌毒素共 11 種品項之母離子、子離子及其碰撞能量 (Collision energy, CE) 參數。

表 1. 液相層析之動相組成及梯度

Table 1. The mobile phase and gradient profiles for HPLC

Time (min)	0	4	7	7.1	12
Mobile phase A (%)	65	18	18	65	65
Mobile phase B (%)	35	82	82	35	35

(ii) 液相層析儀分析條件之設定

液相層析儀之動相 (Mobile phase) 推進幫浦為 Agilent 1100 series pump，管柱為 Zorbax SB-C18

column (5 μm , 2.1 \times 150 mm), 管柱使用時溫度維持 25°C。動相組成：動相 A 為含 0.1% FA 及 0.5 mM HCOONH_4 之 H_2O ；動相 B 為含 0.1% FA 及 0.5 mM HCOONH_4 之 CH_3OH 。流速為 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，樣品注射體積為 5 μL ，動相梯度如表 1。

(iii) 檢量線配製

由六類黴菌毒素混合標準儲備液依表 2 之濃度兩段式稀釋，製作成檢量線所需濃度。

表 2. 各黴菌毒素標準濃度之配製及檢量線範圍

Table 2. The preparation of standard concentrations of the mycotoxins and their calibration range

Item	Stock solution (ppm)	working solution (ppm)	Calibration range (ppb)
AFB ₁	1.0	0.2	0.4, 0.8, 2, 4, 6.4, 8
AFB ₂	1.0	0.2	0.4, 0.8, 2, 4, 6.4, 8
AFG ₁	1.0	0.2	0.4, 0.8, 2, 4, 6.4, 8
AFG ₂	1.0	0.2	0.4, 0.8, 2, 4, 6.4, 8
DON	25.0	0.5	25, 50, 125 250, 400, 500
OTA	2.0	0.4	0.8, 1.6, 4, 8, 12.8, 16
HT-2	5.0	0.1	5, 10, 25, 50, 80, 100
T-2	5.0	0.1	5, 10, 25, 50, 80, 100
FB ₁	25.0	0.5	25, 50, 125 250, 400, 500
FB ₂	12.5	0.25	12.5, 25, 62.5 125, 200, 250
F2	10.0	2.0	4, 8, 20, 40, 64, 80

III. 分析樣品種類及前處理 (萃取與淨化)

(i) 試驗樣品之採集與製作

本試驗分兩步驟進行。試驗一以玉米為基質，進行 11 種黴菌毒素之最佳檢測條件、回收率及方法偵測極限等之分析。試驗二收集穀物原料有玉米、大麥、小麥、蕎麥、糙米、高粱及大豆粕等原料 50 件，配合飼料則有豬料、家禽料、反芻動物料、寵物料等 39 件，依試驗一制定之分析模式，分別檢測六類共 11 種黴菌毒素，以了解國內飼料原料及配合飼料之黴菌毒素含量背景值。樣品粉碎經 1 mm 篩網過篩後，裝瓶備測。

(ii) 樣品萃取及淨化

取粉碎後樣品 10 g，加入 PBS 液 50 mL，以高速攪拌機攪拌 1 分鐘，放置 5 分鐘，再高速攪拌 1 分鐘，稍靜置後取上澄液約 25 mL 置離心管，離心 5 分鐘後取上層液 20 mL 於乾淨試管，並加入含 2% PEG 之 PBS 液 20 mL，混合後過濾之 (A 液)。另離心管中之殘餘液則以 70 mL MeOH 液洗入原玉米樣品中，再高速攪拌 2 分鐘，放置 5 至 10 分鐘後，取上澄液 10 mL 於乾淨燒杯中，並加入 90 mL PBS 液，混合均勻後過濾之 (B 液)。

將 IAC 架設於管柱支架上，注入 B 液 50 mL，以每秒 1 滴速率緩緩注入，直到空氣流入管內；取 10 mL PBS 液清洗 IAC，流速保持在每秒 1 滴；接著注入含 2% PEG 之 PBS 液 6mL，然後注入 5 mL A 液，其速率維持在 2 秒 1 滴的狀態，直到空氣流入為止；再用 5 mL 蒸餾水清洗 IAC (速率為每秒 1 滴)，並緩緩注入空氣，儘量去除管柱中的水分。在 IAC 下放置乾淨試管，以 1.5 mL 沖提液 (80% MeOH + 0.3% 冰醋酸) 沖提之，以重力滴下，當沖提液到達 IAC 底部時，將沖提液靜置於 IAC 管內 5 分鐘後流出，再加入 1.5 mL 沖提液沖提，最後以 2 mL MeOH 液沖提之，收集沖提液，在 45°C 下真空濃縮之，並以 0.5 mL 含 0.1% FA 及 0.5 mM HCOONH_4 之 65% MeOH 液回溶之，即為儀器分析之待測檢體。

IV. 添加試驗之回收率測定

添加試驗以玉米為基質，添加標準品之試驗濃度共有六組，組成如下表。秤取樣品 10 克後，將 11 種黴菌毒素依設計濃度 (表 3) 添加到樣品中，靜置半小時，使有機溶劑揮發後，依樣品前處理程序，進行黴菌毒素之萃取與純化，取得待測檢體供試。

表 3. 不同標準溶液中各黴菌毒素標準品濃度

Table 3. The concentrations of various mycotoxins in different standard solutions

Item	Standard solutions (ppb)						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
AFB ₁	0.4	0.8	1.6	2.4	4	6.4	8
AFB ₂	0.4	0.8	1.6	2.4	4	6.4	8
AFG ₁	0.4	0.8	1.6	2.4	4	6.4	8
AFG ₂	0.4	0.8	1.6	2.4	4	6.4	8
OTA	0.8	1.6	3.2	4.8	8	12.8	16
F2	4	8	16	24	40	64	80
T-2	5	10	20	30	50	80	100
HT-2	5	10	20	30	50	80	100
DON	25	50	100	150	250	400	500
FB ₁	25	50	100	150	250	400	500
FB ₂	12.5	25	50	75	125	200	250

結果與討論

I. 液相層析質譜分析儀在黴菌毒素之分析條件與偵測能力

11 種黴菌毒素均選擇 2 組母、子離子，質譜離子源最佳離子化條件為 NEB = 13、CUR = 13、CAD = 12、IS = 5500，各母離子與子離子之質譜偵測條件與結果如表 4。

進行 11 種黴菌毒素之定性及定量極限測定，以訊號與雜訊比值 3 做為儀器定性偵測極限，比值 10 設定為定量極限，結果如表 5。分析 AF 之靈敏度較高，OTA、T2 及 HT2 次之，F2、DON 及 FB 則較弱，定量極限最高者需達 30 ppb。

II. 回收率試驗及方法偵測極限測定

本試驗利用 IAC 之免疫吸附管柱，對各黴菌毒素具有專一性，故純化玉米樣品中黴菌毒素，可去除許多雜質干擾。但不同毒素性質不同，如 DON 對有機溶劑非常敏感，前處理過程中，必需排除有機溶劑之大量存在，但其他毒素又以有機溶劑之萃取為最佳條件，故本試驗採兩次萃取方法，將樣品先經 PBS 緩衝溶液萃取後，再以 70% MeOH 溶液進行第二次萃取。

LC/MS/MS 對各黴菌毒素之靈敏度不同，依 LOD 及 LOQ 設計一系列之不同添加濃度 (表 3)，結果如表 6。四種黃麴毒素 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂) 當添加量在 0.4 ppb 時，回收率 50 – 107%、CV 值 29 – 46%，回收率變異大。0.8 ppb 以上之添加組，回收率 93 – 103%、CV 值 3 – 17%，分析結果穩定且重複性佳。OTA 之添加量由 0.8 ppb 至 16 ppb，回收率為 77 – 98%，CV 為 5 – 25%。1.6 ppb 以上之添加組表現已趨穩定。F2 添加量由 4 – 80 ppb，回收率在 68 – 125%，CV 為 2 – 23%，低濃度添加時回收率偏高，至 16 ppb 添加，回收率為 85%，CV 為 14%，已達穩定狀態。T2 與 HT2 之添加量由 5 – 100 ppb，試驗結果 T2 無檢出，但 HT2 有 136 – 197% 之回收率。由於玉米檢體中的酵素具有去乙酰化的作用，將 T2 毒素轉變成 HT2，故經萃取純化後之樣品，已無 T2 檢出，但 HT2 則可得到兩者之和 (Lattanzio *et al.*, 2007)。在 5 ppb 處理組，回收率平均 68%，較為偏低，自 10 ppb 添加處理組，可達 84% 回收率，添加濃度越高，回收率可達 90% 以上。DON 添加濃度在 25 ppb 時，回收率 34%，亦較為偏低，添加量提高到 50 ppb 以上，可得到良好回收率 (99 – 107%)，重複變異由 18% 降至 10% 以內。FB₁ 與 FB₂ 在 25 ppb 以上之添加濃度，其回收率、CV 值分別為 94 – 102%、1 – 10%，可得極佳之試驗結果。FB 是穀物中普遍存在的黴菌毒素，低濃度添加即有高回收率。

依食品化學檢驗方法之確效規範，添加試驗之添加濃度在 100 ppb 以下者，其回收率及重複變異係數 (CV, %) 設定在 70 – 120% 及 20% (衛生署, 2012)。本試驗各黴菌毒素之添加量隨偵測靈敏度而異，設定回收率及重複變異係數 $\pm 20\%$ 以內為精準度可接受範圍。結果顯示 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、OTA、F2、T2&HT2、DON、FB₁、FB₂ 添加量分別以 0.8、0.8、0.8、0.8、1.6、16、10、50、25、25 ppb 為宜。並由兩種不同添加濃度進行方法偵測極限測定 (Method detection limit, MDL) (環保署, 2004) 之計算，結果如表 5。

表 4. 偵測各黴菌毒素之質譜儀參數

Table 4. The parameters of mass spectrometry for detecting mycotoxins

	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
AFB ₁	313.3	241.3	63	280	10	49	15
		284.9				32	19
AFB ₂	315.1	259	74	310	9	41	17
		287.2				36	18
AFG ₁	329.1	243.3	64	300	10	36	15
		215.3				47	20
AFG ₂	331.2	245.2	52	270	10	41	19
		275.2				39	18
OTA	404.1	239	45	320	10	32	15
		358.2				20	10
F2	319.1	187.1	48	290	10	27	17
		185.2				33	17
T-2	297.2	249.1	45	320	8	16	15
		231.1				17	20
HT-2	484.4	215.3	34	300	10	26	14
		185.2				29	11
DON	442.5	215.3	28	300	8	18	15
		263.1				17	18
FB ₁	722.6	334.3	41	340	10	56	23
		352.6				51	21
FB ₂	706.6	336.6	62	332	11	54	22
		318.4				55	21

III. 穀物原料及配合飼料之背景分析

將穀物原料及配合飼料進行前處理與純化後分析之，結果列於表 7，50 件穀物樣品中，AFB₁、DON、HT2、T2、FB₁ 及 FB₂ 檢出件數分別為 1、9、1、1、14、10，檢出率分別為 2%、18%、2%、2%、28% 及 20%。玉米樣品檢出 DON 及 FB，檢出率分別為 38%、50%；小麥樣品之 DON 檢出率為 30%、HT2、FB₁ 及 FB₂ 之檢出率為 10%；高粱檢出 DON、T2、FB₁、FB₂ 及 F2，檢出率分別為 33%、17%、50%、33% 及 17%。DON、HT2、T2、FB₁、FB₂ 及 F2 最高檢出值分別為 1.191 ppm、19.4 ppb、8.9 ppb、264.4 ppb、70.7 ppb、7.6 ppb，分析值都在歐盟規範以內，糙米及蕎麥則完全未檢出或低於方法偵測極限。

表 5. 各黴菌毒素在 LC/MS/MS 檢測系統之定性、定量及方法偵測極限

Table 5. The limits of determination (LOD), quantitation (LOQ) and the method detection (MDL) of the mycotoxins under LC/MS/MS analysis system

	LOD (S/N = 3)	LOQ (S/N = 10)	MDL
		— ppb —	
AFB ₁	0.1	0.4	0.35
AFB ₂	0.2	0.6	0.36
AFG ₁	0.1	0.4	0.33
AFG ₂	0.4	1.4	0.45
OTA	0.6	2.2	0.78
F2	7.8	28.9	11.98
DON	9.4	30.6	23.63
T-2	1.1	4.2	11.35
HT-2	1.7	5.1	11.35
FB ₁	7.4	12.8	6.65
FB ₂	3.8	17.2	6.97

表 6. 添加不同濃度黴菌毒素之標準品的回收率比較

Table 6. The recovery of mycotoxins at different standard solutions

Item		Standard solutions (ppb)						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
	n	4	11	5	12	12	11	5
AFB ₁	mean	107	100	103	94	96	100	95
	CV	33	17	8	10	9	5	7
AFB ₂	mean	50	93	100	94	98	98	97
	CV	46	15	10	10	8	3	7
AFG ₁	mean	71	95	96	96	97	101	94
	CV	33	16	8	9	7	3	6
AFG ₂	mean	83	99	100	99	97	101	96
	CV	29	17	12	13	9	3	3
OTA	mean	77	81	85	90	94	98	80
	CV	25	17	13	15	12	5	15
F2	mean		68	85	94	97	101	96
	CV		23	14	15	14	10	2
HT-2	mean	136	168	177	180	186	197	193
	CV	6	9	7	10	4	2	1
T-2	mean	0	0	0	0	0	0	0
DON	mean	34	99	107	100	101	100	99
	CV	23	18	8	7	4	4	3
FB ₁	mean	102	97	98	100	99	101	95
	CV	8	6	4	6	3	1	8
FB ₂	mean	125	93	98	98	102	102	94
	CV	2	10	6	9	5	4	8

表 7. 常用穀物原料之黴菌毒素檢出率及最高偵測值

Table 7. The detection ratio and the maximum detection values of the mycotoxins in commonly used cereal grains

Feed - stuff	Corn		Wheat		Brown rice		Buckwheat		Barley		Sorghum		Soybean meal		Total
Test no.	8		10		8		6		6		6		6		50
Myco - toxins	Reco.* rate	Max. value	Reco. rate	Max. value	Reco. rate	Max. value	Reco. rate	Max. value	Reco. rate	Max. value	Reco. rate	Max. value	Reco. rate	Max. value	No. of detected
AFB ₁	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17	0.5	1
AFB ₂	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AFG ₁	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AFG ₂	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DON	38	374.6	30	1,191	—	—	—	—	17	26.9	33	49.7	—	—	9
OTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
HT - 2	—	—	10	19.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
T - 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17	8.9	—	—	1
FB ₁	50	264.4	10	11.6	—	—	—	—	—	—	50	16.2	100	95.6	14
FB ₂	50	70.7	10	12.8	—	—	—	—	—	—	33	7.2	50	36.1	10
F2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17	7.6	—	—	—

* : unit of % for recovery ratio and ppb for maximum detection value.

— : non detected or detected values lower than the method detection limits.

表 8. 配合飼料中黴菌毒素檢出率及最高偵測值

Table 8. The detection ratio and the maximum detection values of the mycotoxins in different formulated feed

Feedstuff	Sow feed		Poultry feed		Cattle & goat feed		Pet foods		Total
Test no.	10		6		6		17		39
Mycotoxins	Reco.* rate	Max. value	Reco. rate	Max. value	Reco. rate	Max. value	Reco. rate	Max. value	No. of detected
AFB ₁	100	5.6	100	4.2	100	1.6	53	2.1	31
AFB ₂	20	0.7	—	—	—	—	—	—	2
AFG ₁	20	0.4	—	—	33	0.4	—	—	4
AFG ₂	—	—	—	—	—	—	—	—	0
DON	50	556.0	50	516.0	100	1,213	71	517.0	26
OTA	—	—	—	—	17	0.9	18	1.3	4
HT - 2	—	—	—	—	17	7.0	12	7.2	3
T - 2	—	—	—	—	—	—	—	—	0
FB ₁	100	680.7	100	1,400	100	1,503	100	499.0	39
FB ₂	100	107.3	100	301.0	100	381.3	88	265.7	37
F2	30	40.5	33	29.4	67	62.9	76	77.9	22

* : unit of % for recovery ratio and ppb for maximum detection value.

— : non detected or detected values lower than the method detection limits.

配合飼料之檢測結果顯示 (表 8)，39 件分析樣品中，AFG₂ 及 T2 未有檢出，其他 9 種毒素如 AFB₁、AFB₂、AFG₁、DON、OTA、HT2、FB₁、FB₂、F2 之檢出件數分別為 31、2、4、26、4、3、39、37、22，檢出率分別為 79%、5%、10%、67%、10%、8%、100%、95%、56%。禽畜飼料 AFB₁ 完全被檢出，寵物料也有 53% 檢出率，最高檢出值為 5.6 ppb，AFB₂ 和 AFG₁ 偶有檢出，檢出值為 0.4 ppb，依國家標準飼料最嚴格標準限量為 25 ppb (表 9)，檢出量在可容許範圍。DON 檢出率在 50% 以上，最高檢出值為 1.213 ppm，未超出歐盟規範的 1.25 ppm。FB₁ 及 FB₂ 毒素檢出率近 100%，配合飼料已難以取得 FB₁ 及 FB₂ 空白飼料，檢出 FB₁ 最高值 1.503 ppm，歐盟許可上限為 5 ppm。F2 毒素在各種配合飼料中都有檢出，最高值為 77.9 ppb，低於歐盟容許量 100 ppb。OTA 及 HT2 在反芻料及寵物料中也有少數檢出，檢出量也在容許範圍內。

由本試驗採樣之分析結果顯示，國內飼料穀物原料之 11 種黴菌毒素檢測量都低於已訂有的規範；配合飼料雖檢出比例較原料為高，但含量尚在可容許範圍。

表 9. 各國黴菌毒素限量標準之比較

Table 9. Comparison of the mycotoxins concentration allowance in different countries

Mycotoxins	Taiwan	US	China	Korea	EU
AFB ₁			20 ppb		
AFB ₂	25 – 50 ppb	0.5 – 300 ppb		15 ppb	10 ppb
AFG ₁					
AFG ₂					
OTA	—	—	≤ 0.1 ppm	< 5 ppb	5 ppb
F2	—	—	≤ 0.5 ppm	< 200 ppb	100 ppb
DON	—	—	< 1 ppm or < 5 ppm	< 2 ppm	1.25 ppm
T – 2	—	—	< 1 ppm		50 ppb
HT – 2	—	—			60 ppb
FB ₁	—	5 – 100 ppm	—	< 4 ppm	5 – 100 ppm
FB ₂	—		—		

— : no data

結 論

本試驗以 LC/MS/MS 檢測常用穀物及配合飼料中 11 種黴菌毒素，結果顯示，穀物中常檢出的毒素有 DON 及 FB 毒素，F2 及 T2 偶有檢出，但含量不高。配合飼料中，除 AFG₂ 及 T2 外，可檢測 9 種黴菌毒素，尤其 AFB₁、DON、FB₁、FB₂ 及 F2，其檢出率偏高，但未有超出歐盟標準限量之檢出。本試驗方法之建立及背景值分析，可應用於常規檢查及提供相關研究之參考，以確保飼料品質之安全。

參考文獻

- 衛生署。2004。署授食字第 0939316919 號公告。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。
- 衛生署。2006。署授食字第 0951800007 號公告。食品中黴菌毒素檢驗方法—脫氧雪腐鏟刀菌烯醇之檢驗。
- 衛生署。2008。署授食字第 0971800105 號公告。食品中黴菌毒素檢驗方法—玉米赤黴毒素之檢驗。
- 衛生署。2009。署授食字第 0981800375 號公告。食品中黴菌毒素檢驗方法—T – 2 毒素及 HT – 2 毒素之檢驗。
- 衛生署。2010a。署授食字第 0991903564 號公告。食品中黴菌毒素檢驗方法—黃麴毒素之檢驗。

- 衛生署。2010b。署授食字第 0991903550 號公告。食品中黴菌毒素檢驗方法—赭麴毒素 A 之檢驗。
- 衛生署。2012。食品化學檢驗方法之確效規範。
- 環保署。2004。環署檢字第 0930072069G 號。環境檢驗方法偵測極限測定指引，NIEA — PA107。
- Berthiller, F., R. Schuhmacher, G. Buttinger and R. Krska. 2005. Rapid simultaneous determination of major type A - and B - trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1062 : 209-216.
- Frenich, A. G., J. L. M. Vidal, R. Romero - Gonzalez and M. D. M. Aguilera - Luiz. 2009. Simple and high - throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra - high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 117 : 705-712.
- Han, Z., Y. Zheng, L. Luan, Z. Cai, Y. Ren and Y. Wu. 2010. An ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of aflatoxins B₁, G₁, B₂, G₂ M1 and M2 in traditional Chinese medicines. *Anal. Chim. Acta* 664: 165-171.
- Huang, B., Z. Han, Z. Cai, Y. Wu and Y. Ren. 2010. Simultaneous determination of aflatoxins B₁, G₁, B₂, G₂ M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra - high - performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta* 662: 62-68.
- Lattanzio, V. M. T., M. Solfrizzo, S. Powers and A. Visconti. 2007. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21:3253-3261.
- Paepens, C., S. De Saeger, C. Van Poucke, F. Dumoulin, S Van Calenbergh and C. Van Peteghem. 2005. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of fumonisin B₁, B₂ and B3 in cornflakes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 2021-2029.
- Soleimany, F., S. Jinap, A. Rahmani and A. Khatib. 2011. Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP - HPLC - PDA - FLD with PHRED and a post - column derivatization system. *Food Addi. and Contam. iFirst*: 1-8.
- Sulyok, M., F. Berthiller, R. Krska and R. Schuhmacher. 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 2649-2659
- Ventura, M., A. Gomez, I. Anaya, J. Diaz, F. Broto, M. Agut and L. Comellas. 2004. Determination of aflatoxins B₁, G₁, B₂, G₂ in medicinal herbs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1048: 25-29.

Evaluations of a method by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry for simultaneous detection of multi-mycotoxins in feeds⁽¹⁾

Main-Lian Lee^{(2) (3)} Bih-Hwey Chen⁽²⁾ and Yung-Ping Tai⁽²⁾

Received: Jun. 3, 2013; Accepted: Aug. 26, 2013

Abstract

The purpose of this study was to develop a multimycotoxin detection method for simultaneous determination of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), ochratoxin A (OTA), zearalenone (F2), T2, HT2, deoxynivalenol (DON) and fumonisins (FB₁, FB₂). Corn was used as the matrix material in this study. The immunoaffinity column was used to purify the mycotoxins in the corn matrix for being quantified by the liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The results showed that the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) on those mycotoxins by the LC/MS/MS method were 0.1 - 9.4 ppb and 0.4 - 30.6 ppb respectively. However, the method detection limit (MDL) of the corn matrix was 0.35 ppb, 0.36 ppb, 0.33 ppb, 0.45 ppb, 0.78 ppb, 11.98 ppb, 23.63 ppb, 11.35 ppb, 6.65 ppb and 6.97 ppb for AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, F2, DON, T2 & HT2, FB₁ and FB₂, respectively. The naturally occurring toxin background values of cereals were detected with 50 samples in total including corn, barley, wheat, oats, buckwheat, brown rice, sorghum and soybean meals. Thirty nine samples of formulated feeds for swine, poultry, cattle, goats and pets were also detected. Six mycotoxins, ie; AFB₁, DON, HT2, T2, FB₁ and FB₂ were detectable in the cereal materials, and the detection rates were 25, 18, 2, 2, 28 and 20%, respectively. For the formulated feeds, 8 mycotoxins, ie; AFB₁, AFB₂, AFG₁, DON, OTA, HT2, FB₁, FB₂ and F2 were detectable and the detection ratios were 79, 5, 10, 67, 10, 8, 100, 95 and 56%, respectively. The maximal detection value for AFB₁ was 1.56 ppb; AFB₂, 0.7 ppb; AFG₁, 0.4 ppb; DON, 1.213 ppb; OTA, 1.3 ppb; HT2, 19.4 ppb; T2, 8.9 ppb; FB₁, 1.503 ppb; FB₂, 381.3 ppb and F2 at 77.9 ppb. All of the values are lower than those limit standards in European Union.

Key words: Multi - mycotoxin, LC/MS/MS, Grains and feeds.

(1) Contribution No.1921 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan.

(3) Corresponding author, E-mail: mainlian@mail.tlri.gov.tw.