

香辛料中黃麴毒素之檢驗方法開發及調查

卓憲駿 廖家鼎 曾素香 周秀冠 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

黃麴毒素(Aflatoxin B₁、B₂、G₁、G₂)是黴菌產生之二級代謝產物，主要由 *Aspergillus flavus*及*A. parasiticus*所產生，具有肝毒性及致癌性，經常會污染花生、玉米、米、麥類、豆類及香辛料等食品，對民眾健康造成危害。日常食品中常見胡椒粉、咖哩粉、辣椒粉等所謂「香辛料食品」，在加工過程中，或於原料儲存、生產環境及保存條件不佳等因素，皆會造成黃麴毒素污染的風險。本研究以香辛料基質為探討對象，用80%甲醇溶液為萃取溶液，10% Tween-20為稀釋液，檢體經均質萃取、過濾、免疫親合管住淨化後，續以高效液相層析儀(HPLC)分析。以45%甲醇為移動相做等度分離，流速為1.0 mL/min，層析管柱為Cosmosil 5C18-AR (5 μm, 4.6 × 250 mm)，螢光檢出器的激發波長為360 nm，放射波長為440 nm，並搭配光化學反應器做管柱後衍生化，分析時間為20分鐘。黃麴毒素B₁、B₂、G₁及G₂之標準曲線R²皆大於0.995，顯示線性良好。以胡椒粉、辣椒粉及咖哩粉為基質進行回收率添加試驗，添加2、4及6 ppb各毒素標準品，各毒素之平均回收率介於61.85-101.34%之間(n=3)，變異係數(CV%)皆小於12.05%；方法定量極限(LOQ)，黃麴毒素B₁及G₁均為1 ppb，黃麴毒素B₂及G₂均為0.5 ppb。顯示其良好的準確度、精密度及靈敏度，可應用於實際產品的檢驗。以此方法抽驗市售香辛料檢體共33件，包含胡椒粉10件、咖哩粉6件、辣椒粉11件及五香粉6件，結果有2件咖哩粉及4件辣椒粉檢出黃麴毒素B₁，含量為0.79-2.74 ppb，皆符合國內黃麴毒素之法規限量標準(10 ppb)。

關鍵詞：黃麴毒素、香辛料

前言

黃麴毒素(aflatoxin，簡稱AF)係一群結構類似之黴菌二級代謝產物，為毒性強、具高穩定性及致癌性的低分子量化合物，主要由麴菌屬(*Aspergillus*)的黃麴菌(*A. flavus*)及寄生麴菌(*A. parasiticus*)兩種真菌所產生，經常污染花生、棉子、玉米、米、麥及豆類等作物⁽¹⁾。常見的類型有黃麴毒素B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁)、黃麴毒素B₂(Aflatoxin B₂, AFB₂)、黃麴毒素G₁(Aflatoxin G₁, AFG₁)、黃麴毒素G₂(Aflatoxin G₂, AFG₂)等，以AFB₁最常被檢出，

也以AFB₁的毒性及致癌性最強⁽²⁾。黃麴毒素起源於1960年發生之”Turkey X disease”造成英國十多萬隻火雞死亡事件，進一步追縱後，證實主要的原因是使用遭黃麴毒素污染飼料導致，從此之後黃麴毒素引起世人高度重視，而黃麴毒素的預防也成為花生相關加工產品最重要的課題。黃麴毒素對人類及動物具有高度肝臟毒性及致癌性，大量攝取被黃麴毒素污染的食物，會造成急性肝中毒(hepatotoxicity)，其主要病徵為嘔吐、腹痛、肺水腫、痙攣、昏迷、肝衰竭、心臟衰竭或腦水腫而造成死亡。慢性黃麴毒素中毒為攝取低劑量的黃麴毒素，

在動物試驗中之臨床症狀有飼料轉換情形變差及生長速度變慢等，若發生在人的身上，可能導致慢性肝炎或肝癌⁽³⁾。在動物實驗中，AFB₁的LD₅₀為0.36 mg/kg，AFB₂的LD₅₀為1.69 mg/kg，AFG₁的LD₅₀為0.78 mg/kg，AFG₂的LD₅₀為2.45 mg/kg⁽⁴⁾。

目前國際上食品遭受黃麴毒素污染的案件層出不窮，而且在多種食品都有被污染的狀況，近年來國際間也發生過數起污染案例。在香辛料方面，歐盟、日本及土耳其等國的調查也顯示香辛料產品有被黃麴毒素污染的情形，污染量介於0.3-46.6 ppb之間，顯示香辛料產品被黃麴毒素污染的問題值得關注⁽⁵⁻⁹⁾。目前世界各國已訂定食品中黃麴毒素之限量標準，在美國，訂定一般食品的總黃麴毒素限量標準不得超出20 ppb；在歐盟，訂定農產品的總黃麴毒素限量不得超出4 ppb；在台灣，訂定花生及玉米食品的總黃麴毒素限量標準為15 ppb以下，米、高粱、豆類、麥類及堅果類食品的總黃麴毒素限量標準為10 ppb以下，食用油脂及其他食品的總黃麴毒素限量標準為10 ppb以下，而香辛料則是屬於「其他食品」，限量標準為10 ppb以下，顯示我國對於各類食品已有訂定黃麴毒素之限量標準，且與國際相當⁽¹⁰⁻¹¹⁾。

材料與方法

一、材料

於103年間，至台北地區大賣場及生鮮超市抽購香辛料檢體，包括胡椒粉10件、咖哩粉6件、辣椒粉11件及五香粉6件，共33件。

二、試藥及試劑

甲醇採用液相層析級，購自J. T. Baker；Tween-20為試藥級，購自Sigma-Aldrich；氯化鈉試藥級，購自Merck；配製液相層析用移動相之水為去離子水。

三、儀器裝置

- (一)高效能液相層析儀(Hitachi, Japan)，包括幫浦(L-2130)、螢光偵測器(L-2485)及自動樣品注射器(L-2200)
- (二)層析管柱(Cosmosil 5C18-AR, 2.0 mm × 250 mm, 5 μm, Nacalai Tesque, Japan)
- (三)均質機(SMT process homogenizer PH91, SMT Co., Japan)
- (四)光化學反應器(Knitted reactor coils (KRC) 25-25, AURA Inc., USA)
- (五)免疫親和管柱(AflaTest, Vicam, USA)

四、移動相溶液之調製

移動相溶液為45%甲醇水溶液(甲醇：水 = 45:55, v/v)，以0.22 μm濾膜抽氣過濾後備用。

五、標準溶液之配製

AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂毒素標準品皆購自美國Supelco公司Aflatoxin Mix Kit-M，標準品濃度為AFB₁ 1 μg/mL、AFB₂ 0.3 μg/mL、AFG₁ 1 μg/mL及AFG₂ 0.3 μg/mL，儲存於4°C下。臨用時取適當標準原液，以50%甲醇溶液稀釋至黃麴毒素B1及G1 0.1-25 ng/mL，黃麴毒素B2及G2 0.05-7.5 ng/mL，供作標準溶液。

六、檢液之調製

(一)萃取

秤取香辛料檢體25 g，置於均質杯中，加氯化鈉5 g，再加入80%甲醇溶液100 mL，置於均質機中，於15000 rpm均質2分鐘後，收集上清液以Whatman 4號濾紙過濾，取濾液5 mL再加入10% Tween-20溶液20 mL稀釋後以Whatman GF/A玻璃纖維濾紙過濾後待用。

(二)淨化

將濾液4 mL緩緩通過免疫親和管柱AflaTest（流速控制在1-2滴/秒），待濾液完全通過管柱後，以去離子水10 mL流洗兩次（流速控制在1-2滴/秒），待管柱內水排淨後，隨後取甲醇1 mL，以每秒1滴

之流速沖提，收集沖提液，加去離子水混合並定容至2 mL，以0.22 μm 針筒過濾器(濾膜為PVDF材質)過濾，於褐色樣品瓶中供作檢液，以HPLC分析。

七、高效能液相層析儀測定條件

層析管柱：Cosmosil 5C18-AR, 5 μm , 2.0 mm \times 250 mm (Nacalai Tesque, Japan)

光化學反應器：KRC 25-25

螢光檢出器：激發波長360 nm，發射波長440 nm

移動相溶液：45%甲醇溶液

移動相流速：1.0 mL/min

注入量：50 μL

八、標準曲線之製作

取黃麴毒素B1、B2、G1及G2對照用混合標準品1 mL，使用時再以50%甲醇溶液稀釋至黃麴毒素B1及G1至25、10、5、1、0.2、0.1 ng/mL等濃度，黃麴毒素B2及G2至7.5、3、1.5、0.3、0.1、0.05 ng/mL等濃度，以各毒素波峰面積(Y軸)對標準品濃度(X軸)作圖，即得到各毒素之標準曲線。

九、回收率(Recovery)分析試驗

分別將AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂毒素標準溶液添加至胡椒粉、咖哩粉及辣椒粉基質內，各添加三個濃度如下，AFB₁及AFG₁：2、4、6 ppb；AFB₂及AFG₂：0.6、1.2、1.8 ppb。續以上述步驟調製檢液，經HPLC分析後求得之濃度除以添加濃度，再乘以100%即為回收率。進行3重複分析，並計算其平均值。

結果與討論

一、高效能液相層析法及前處理條件之探討

HPLC條件部分主要參考部授食字第1021950329號公告「食品中黴菌毒素檢驗方

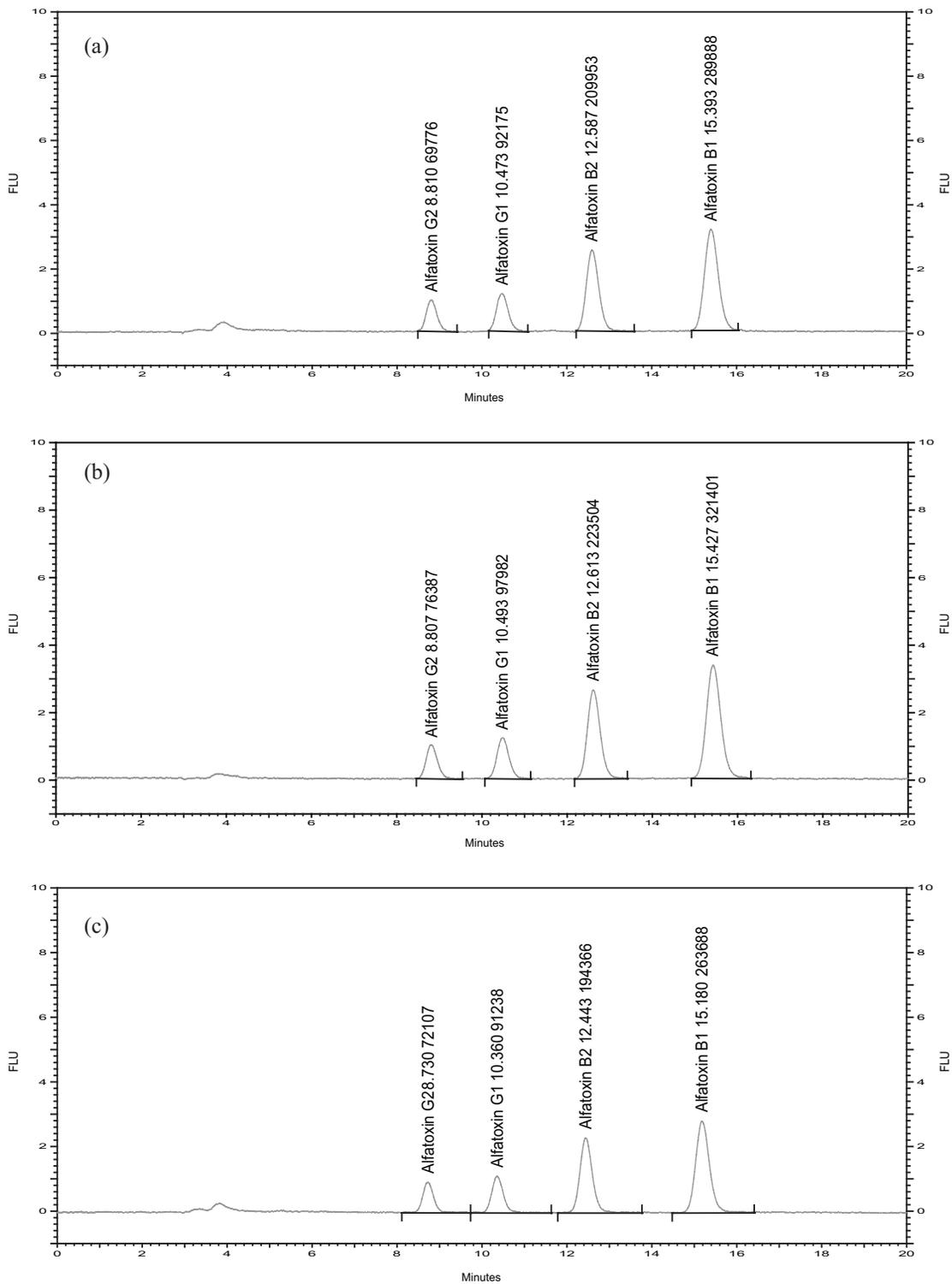
法-黃麴毒素之檢驗」⁽¹²⁾，可以在20分鐘內分析4種混合標準品，在層析圖上出峰順序依序為AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁，各標準品波峰波形良好且分離完全；樣品前處理部分主要是參考免疫親和管柱之原廠供應商的使用手冊做修改，在胡椒粉、咖哩粉及辣椒粉基質中進行添加試驗，經免疫親和管柱淨化後，其基質干擾大部分已被去除，黃麴毒素各標準品也可以清楚的分離開來且無雜峰的干擾，如圖一所示，但是起初使用去離子水當稀釋液時回收率不盡理想，推測其原因是使用去離子水當稀釋液時，與萃取液混合時會有混濁現象，顯示其乳化不完全，後來將稀釋液改為10% Tween-20溶液以後，與萃取液混合時便成澄清狀態，回收率有顯著提升，由不到5成提升到6成以上。

以HPLC進行定量，與分析物共同萃取出之基質干擾物會影響分析物於HPLC之分離情形，導致分析物波峰附近有雜峰干擾導致定量結果之影響，為消除基質效應對定量結果之影響，可採改善樣品前處理步驟或改變層析條件以去除干擾。本研究利用免疫親和管柱進行淨化，可將基質干擾降低以簡化樣品前處理步驟，評估幾乎不受基質干擾影響。

二、回收率、同日內及異日間之重複性

香辛料檢體中分別添加三種濃度毒素標準品，添加濃度為AFB₁、AFG₁：2、4、6 ppb；AFB₂、AFG₂：0.6、1.2、1.8 ppb，依所建方法進行檢液製備，經HPLC分析，以標準曲線計算檢液中各毒素之濃度，以評估回收率及同日內之重複性。異日間之重複性則於三個不同日評估之。

在胡椒粉基質中，由表一之結果可知，四種毒素的回收率介於67.91-101.34%，同日內變異係數值介於0.52-9.26%，異日間變異係數介於1.35-10.22%。在咖哩粉基質中，由表二結果可知，四種毒素的回收率介於61.85-88.30%，同日內變異係數值介於1.92-7.30%，異日間變異係數介於3.04-12.05%。在辣椒粉基質中，由表三結果可知，四種毒素的回



圖一、回收率試驗中不同香辛料中添加黃麴毒素4 ppb之層析圖(a)胡椒粉；(b)咖哩粉；(c)辣椒粉

表一、4種黃麴毒素添加於胡椒粉基質之回收率及變異係數(同日內及異日間)

Analyte	Spiked level (ppb)	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Recovery (%) (n=3)	CV (%)	Recovery (%) (n=3)	CV (%)
AFB ₁	2.0	67.91	0.70	101.34	5.65
	4.0	81.72	0.74	92.54	9.87
	6.0	89.44	1.47	93.49	5.43
AFB ₂	0.6	76.35	0.52	88.22	7.08
	1.2	86.92	0.99	87.86	9.09
	1.8	95.18	1.07	92.51	5.27
AFG ₁	2.0	75.83	9.26	76.71	1.35
	4.0	85.60	2.34	79.47	8.56
	6.0	91.97	2.55	85.31	6.96
AFG ₂	0.6	95.56	5.60	87.17	10.22
	1.2	94.81	1.32	85.77	2.71
	1.8	98.23	0.61	85.65	9.51

表二、4種黃麴毒素添加於咖哩粉基質之回收率及變異係數(同日內及異日間)

Analyte	Spiked level (ppb)	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Recovery (%) (n=3)	CV (%)	Recovery (%) (n=3)	CV (%)
AFB ₁	2.0	71.66	2.35	81.52	12.05
	4.0	74.64	4.68	82.42	7.60
	6.0	81.69	2.40	86.38	7.66
AFB ₂	0.6	61.85	3.07	69.67	10.84
	1.2	71.12	3.05	80.24	8.71
	1.8	82.95	1.92	88.30	7.44
AFG ₁	2.0	64.86	5.40	67.79	3.04
	4.0	71.86	3.28	77.04	8.80
	6.0	81.61	2.66	84.60	6.04
AFG ₂	0.6	62.17	2.44	70.41	8.43
	1.2	66.03	7.30	77.32	11.61
	1.8	77.97	3.19	84.65	8.35

收率介於67.02-82.63%，同日內變異係數值介於1.18-9.56%，異日間變異係數介於4.18-9.59%。結果顯示在胡椒粉、咖哩粉及辣椒粉基質中，四種毒素的回收率皆介於61.85-101.34%，同日內變異係數值皆小於9.56%以下，異日間變異係數皆小於12.05%以下，符

合食品化學檢驗方法之確效規範所要求(回收率：60-125%，同日變異係數 < 30%，異日變異係數 < 32%)，顯示此法的準確度及精密度良好⁽¹³⁾。本方法的定量極限AFB₁及AFB₂均為1 ppb，AFG₁及AFG₂均為0.5 ppb，顯示此法的靈敏度良好。

表三、4種黃麴毒素添加於辣椒粉基質之回收率及變異係數(同日內及異日間)

Analyte	Spiked level (ppb)	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Recovery (%) (n=3)	CV (%)	Recovery (%) (n=3)	CV (%)
AFB ₁	2.0	69.48	1.18	69.79	9.01
	4.0	70.11	1.35	70.05	5.20
	6.0	76.51	4.10	76.24	9.00
AFB ₂	0.6	69.78	3.12	67.02	9.59
	1.2	73.28	1.93	71.85	4.22
	1.8	81.33	1.98	79.64	7.57
AFG ₁	2.0	73.62	8.52	75.23	4.18
	4.0	75.78	1.42	76.44	4.33
	6.0	81.77	2.26	81.55	7.68
AFG ₂	0.6	75.39	9.56	69.75	7.59
	1.2	77.95	5.30	76.68	5.84
	1.8	82.63	6.00	77.58	8.66

表四、市售香辛料中黃麴毒素之調查結果

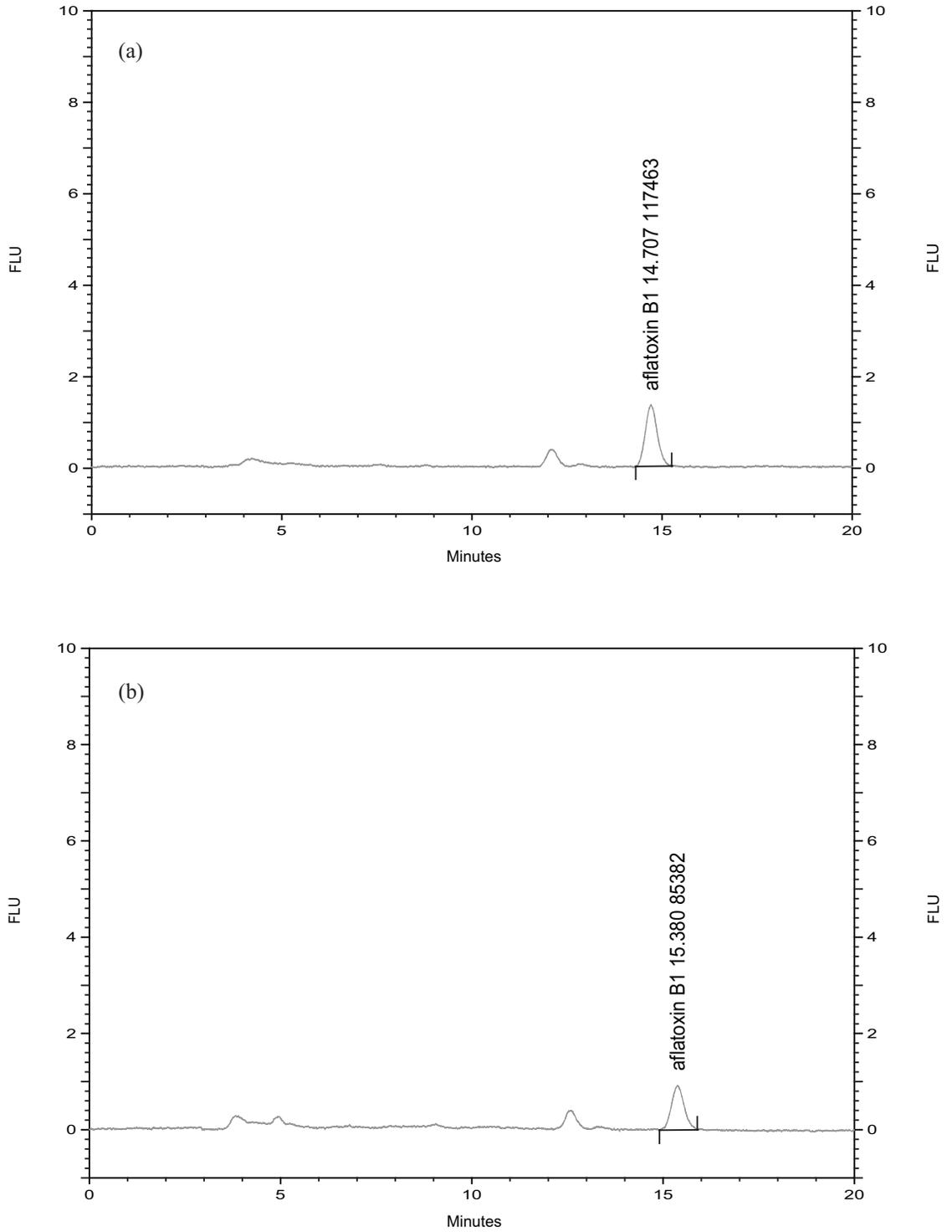
檢體類別	檢體件數	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
		檢出件數(檢出濃度, ppb)			
胡椒粉	10	未檢出	未檢出	未檢出	未檢出
咖哩粉	6	2 (1.50-1.86 ppb)	未檢出	未檢出	未檢出
辣椒粉	11	4 (0.79-2.74 ppb)	未檢出	未檢出	未檢出
五香粉	6	未檢出	未檢出	未檢出	未檢出
合計	33	6	0	0	0

三、以本次開發之檢驗方法參加國際性精準度測試-辣椒粉中總黃麴毒素含量精準度測試

103年6-7月參加英國中央科學實驗室所舉辦之國際性辣椒粉中總黃麴毒素含量精準度測試，本次共有56家實驗室參加。本實驗室以本開發之檢驗方法進行測試，結果獲滿意成績， $Z = 0.5$ 。顯示本方法之精準度佳。

四、市售產品調查結果

應用本研究建立之方法檢測市面上香辛料檢體共33件，其檢驗結果詳如表四，33件檢體中包含胡椒粉10件、咖哩粉6件、辣椒粉11件及五香粉6件。結果6件咖哩粉檢體中有2件檢出黃麴毒素B₁，含量為1.50-1.86 ppb；11件辣椒粉檢體中有4件檢出黃麴毒素B₁，含量為0.79-2.74 ppb (圖二)，其餘檢體皆未檢出。全部33件檢體檢驗結果皆低於國內黃麴毒素之法規限量標準(10 ppb)。



圖二、檢出黃麴毒素B₁之檢體層析圖(a)咖哩粉；(b)辣椒粉

結 論

本研究建立以HPLC分析香辛料中4種黃麴毒素B₁、B₂、G₁及G₂之檢驗方法。各黃麴毒素B₁、B₂、G₁及G₂之標準曲線R²皆大於0.995，顯示線性良好。於胡椒粉、咖哩粉及辣椒粉中添加低、中、高三濃度，進行回收率試驗，各項毒素之回收率介於61.85-101.34%，同日內變異係數值皆小於9.56%以下，異日間變異係數皆小於12.05%以下，符合食品化學檢驗方法之確效規範所要求。各項毒素的定量極限：AFB₁及AFB₂均為1 ppb，AFG₁及AFG₂均為0.5 ppb，顯示本方法具備良好的準確度、精密性及靈敏度。

以此方法抽驗香辛料檢體33件，依開發之檢驗方法分別進行黃麴毒素檢驗，結果共有6件檢體檢出黃麴毒素，含量為0.79-2.74 ppb，皆低於國內黃麴毒素之法規限量標準(其他食品類中黃麴毒素不得超出10 ppb)。

參考文獻

1. Trenk, H. L. and Hartman, P. A. 1970. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. *Appl. Microbiol.* 19: 781-784.
2. Hesseltine, C. W. 1967. Aflatoxin and other mycotoxins. *Health Lab. Sci.* 4: 222-228.
3. 王進琦、王西華。1992。食品的微生物毒素中毒。食品微生物學。藝軒圖書出版社，台北。
4. Maurice, O. M. 2002. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50: 137-142.
5. Rapid Alert System Food and Feed (RASFF), EC. 2009. RASFF Annual Report 2008. [http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2008_en.pdf].
6. Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan. 2009. Statistics of Imported Foods Monitoring for FY 2008. [<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/importedfoods/08/dl/08-06a.pdf>].
7. Tosun, H. and Arslan, R. 2013. Determination of aflatoxin B1 levels in organic spices and herbs. *Scientific World J.* 26: 1-4.
8. Yentür, G., Kaynak Onurdağ, F., ER, B. and *et al.* 2012. Investigation of aflatoxin B1 levels in red pepper and products consumed in Ankara. *Turk. J. Pharm. Sci.* 9(3): 293-300.
9. Tosun, H. and Arslan, R. 2013. Determination of aflatoxin B1 levels in organic spices and herbs. *Scientific World J.* 26: 1-4.
10. FAO. 2003. Mycotoxin regulations in 2003 and current developments. [<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>].
11. 衛生福利部。2013。食品中真菌毒素限量標準。102.08.20部授食字第1021350146號令修正。 [<http://consumer.fda.gov.tw/Law/Detail.aspx?nodeID=518&lawid=129>]。
12. 衛生福利部。2013。食品中黴菌毒素檢驗方法-黃麴毒素之檢驗。102.09.06部授食字第1021950329號公告。
13. 食品藥物管理署。2015。食品化學檢驗方法確效規範。 [<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=4115>]。

Method Development and Survey of Aflatoxins in Spices

HSIEN-CHUN CHO, CHIA-DING LIAO, SU-HSIANG TSENG,
HSIU-KUAN CHOU AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Aflatoxins are toxic and carcinogenic metabolic by-products produced primarily by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Growth of these fungi on certain foods may result in aflatoxin production and causing serious illness in humans. Aflatoxins contamination in crops mainly in peanut, maize, cereals, and spices is a worldwide food safety concern and has gained national attentions. This study aims to develop a method for determination of aflatoxins in spices. Samples of spices including pepper, chili, and curry powder were extracted with 80% methanol and then analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The LC separation was performed using Waters Cosmosil 5C18-AR column with the isocratic mobile phase consisting of 45% methanol. The flow rate was set at 1 mL/min. The current method demonstrated good linearity with regression coefficient over 0.995. The method was selective and offered good recoveries of various aflatoxins ranging from 61.85 to 101.34% (n=3). The coefficient of variance was below 12.05%. The limit of quantitation were from 0.5 (AFB₂ and AFG₂) to 1 ppb (AFB₁ and AFG₁). Four Aflatoxins could be simultaneously analyzed in a single 20-min run. This method was suitable for routine aflatoxins analysis in spices. In a survey of 33 commercial spices, AFB₁ was detected in 2 curry and 4 chili samples ranging from 0.79 to 2.74 ppb which were all below the regulatory limit (10 ppb) in Taiwan.

Key words: aflatoxins, spices