

利用免疫親和性管柱萃取及 螢光測定牛乳及乳粉中黃麴毒素M₁

傅幼敏

行政院衛生署藥物食品檢驗局

摘 要

本研究使用 Afla Test-P Column 及 AFLAPREP M 兩種商用免疫親和性層析管柱及螢光檢測牛乳及乳粉中黃麴毒素M₁，分析所得如下：

- (一)以 Afla Test-P Column 及螢光判讀機，分析人工添加0.5及1.0ppb黃麴毒素M₁之脫脂牛乳，其回收率各為 $84.4 \pm 7.0\%$ 及 $94.2 \pm 9.5\%$ ，其最低檢測限量為0.1ppb，此法速簡，適例行性大批檢體檢驗用。
- (二)以AFLAPREP M管柱及高效液相層析儀，分析人工添加0.1，0.5及1.0ppb黃麴毒素M₁之脫脂牛乳，其回收率各為 $84.7 \pm 2.7\%$ ， $88.7 \pm 1.9\%$ 及 $89.2 \pm 4.2\%$ ，其最低檢測限量為0.05ppb，此法較靈敏，適具高效液相層析儀實驗室例行性檢驗用。
- (三)以AFLAPREP M管柱方法，檢測牛乳及乳粉(乳粉檢驗前須沖泡成液狀乳)各25件，結果於3件牛乳中分別檢出0.33，0.12及0.08ppb之黃麴毒素M₁，乳粉則皆未檢出。

關鍵詞：黃麴毒素M₁，免疫親和性管柱，牛乳，乳粉。

前 言

黃麴毒素(aflatoxins)為黃麴黴菌 *Aspergillus flavus*及*A. parasiticus* 所產生的一群次級代謝產物，較常污染食品的種類包括黃麴毒素B₁，B₂，G₁，G₂，M₁及M₂等^(1,2)，其對動物之毒性，主要導致肝毒害，同時引起組織出血，厭食，生長遲緩等症狀，長期攝食亦可能引發肝癌致死⁽³⁾。於發黴之穀物中檢出之黃麴毒素，最常檢出者為B₁，B₂，G₁，G₂；而黃麴毒素M₁及M₂雖曾於發黴的花生中檢出，最主要係因動物攝食含有黃麴毒素B₁，B₂的食品或飼料，由其肝、腎、血、乳汁及尿中分離到⁽²⁾，據研究乳牛攝食含有黃麴毒素B₁飼料，約有1%—2%的黃麴毒素B₁轉換成黃麴毒素M₁，並隨著乳汁分泌出來⁽⁴⁾。

國內對黃麴毒素之研究及調查工作早在

1967年，即因台北縣雙溪鄉農戶發生食米中毒事件開始，陸續針對食米、花生、玉米、食用植物油及發酵食品等加以調查⁽⁵⁾，另對食品及飼料中黃麴毒素B₁，B₂，G₁及G₂之限量及檢驗方法，亦有衛生署公告之限量標準及方法可資依循^(6,7)；近年來，國內對乳品的消耗量大增，有關乳品中黃麴毒素M₁之調查及研究亦愈形重要，王等曾於1987年，以美國化學家協會之公定分析方法檢測生乳及乳粉共161件，結果皆未檢出黃麴毒素M₁⁽⁸⁾，1989年翁等利用矽膠管柱做為萃取及淨化的工具⁽⁹⁾，並抽驗鮮乳50件，乳粉25件，煉乳10件及乾酪25件，結果各檢出44、15、6及0件污染有微量之黃麴毒素M₁，1992年國內對於乳品中之黃麴毒素M₁限量業已規定並公告^(6,10)，針對鮮乳、乳粉及嬰兒食品(含嬰兒乳粉)分別為0.5ppb，5ppb及未檢出，為配合此限量之執行，翁等使用之方

法業於1995年5月經行政院衛生署以84027644號函公告⁽¹¹⁾，惟上述方法仍不夠速簡；為利日後大規模檢驗乳品所需，本研究使用兩種性質相似之商用的免疫親和性層析管柱，做為萃取及淨化牛乳、乳粉的工具⁽¹²⁾，除評估二管柱之回收率、再現性及最低檢測限量外，另為瞭解國內乳品中黃麴毒素M₁之污染狀況，抽驗市售乳品50件，以確認本法之實用性。

材料與方法

一、乳品來源、製備及保存

(一)回收率試驗用牛乳：採用同一罐不含黃麴毒素M₁之安佳脫脂乳粉（有效期間為1994/2/11-1997/2/10）所沖泡之脫脂乳，再添加不同量之黃麴毒素M₁以製備0.05、0.1、0.5及1.0ppb人工添加毒素牛乳。沖泡方法係將乳粉10g加50℃蒸餾水50mL，以攪拌子攪拌均勻後，待其回到室溫再定容至100mL，毒素的添加係於定容之前。

(二)抽驗之乳品：自1994年7月至1995年6月間，於台北市五家超級市場，抽驗牛乳及乳粉各25件，除少數外多為不同廠牌產品。乳粉需經沖泡方可進行檢驗，沖泡方法同上，沖泡畢立刻予以檢驗。牛乳購回後冷藏於5℃，於有效期限內儘速檢驗。

二、藥品

黃麴毒素M₁為美國Sigma公司產品，免疫親合性管柱二種，Afla Test-P Column為美國Vicam公司產品，AFLAPREP M為英國RHONE-POULENC產品，其餘試藥均為試藥級純品，溶劑皆為LC級，配製液相層析用移動相之水皆使用去離子純水。

三、儀器與設備

(一)螢光判讀機

螢光判讀機為美國Vicam公司出品，型號為Torbex Model FX-100 Series-3 Fluorometer，其激發光源之波長固定為365~380nm，發射光源之波長則為450~550nm。

(二)高效液相層析儀

包括日本Hitachi公司製造之L-6000幫浦、AS-4000自動注射裝置，Shimadzu公司製

造之RF-530螢光偵測儀及C-R3A積分儀。

(三)液相層析管柱

採用美國Phenomenex公司製造之Nucleosil 5 C18（5μm，250×4.6mm i.d.）管柱。

四、玻璃器皿之選擇及處理

保存標準品之試藥瓶，盡量使用褐色者；另為避免玻璃表面吸附黃麴毒素M₁，應將已洗淨之玻璃器皿浸在3M硫酸中數小時，再以水將其徹底洗淨烘乾後備用。

五、標準品之分裝

將市售10μg黃麴毒素M₁之單瓶標準品，加甲醇2mL使其混勻後，每200μL分裝為一瓶，再以氮氣吹乾即成為每瓶1μg之分裝標準品。每次使用前加入甲醇2mL混勻，使其成為500ppb(0.5ng/μL)之標準原液，若需進一步稀釋成其他濃度之標準溶液，仍以甲醇為溶劑。

六、檢液之製備

(一)利用免疫親合性管柱Afla Test-P Column之製備方法

1.取液狀乳50mL加入氯化鈉1g，充分混合，以2000rpm離心10分鐘，取下層液以玻璃纖維濾紙過濾之。

2.取10mL過濾液以針筒施壓通過管柱，流速為2滴/秒。

3.以10%甲醇10mL清洗管柱兩次，續將管中液體排淨。

4.以80%甲醇1mL將管柱中吸附之黃麴毒素M₁溶洗出來，並收集在12×75mm玻璃試管內供作檢液。

(二)利用免疫親合性管柱AFLAPREP M之製備方法

1.取液狀乳100mL加熱至35-37℃，以4000rpm離心15分鐘。

2.取50mL下層脫脂乳以針筒施壓通過管柱，流速為2滴/秒。

3.以蒸餾水10mL清洗管柱兩次，續將管中液體排淨。

4.以乙腈4mL將管柱中吸附之黃麴毒素M₁溶洗出來，流速控制為0.3-0.5滴/秒(2-3秒/滴)，將溶洗液收集於棕色試管中，以氮氣吹

乾後直接溶於0.5mL移動相中，供作檢液。

5.上項吹乾物尚可進行衍生以增加螢光感度，方法為加入正己烷及三氟醋酸(trifluoroacetic acid)各200 μ L，振盪混勻後置40℃下反應10分鐘，續以氮氣吹乾後溶於0.5mL移動相中，供作檢液。黃麴毒素M₁標準品之衍生，則加入正己烷及三氟醋酸(trifluoroacetic acid)各200 μ L及50 μ L，並按相同方法進行。

七、定量分析

(一)螢光自動判讀

將免疫親合性管柱 Afla Test-P Column方法製備之檢液，取廠商提供之專用顯色劑(含0.002%溴)1mL加入玻璃試管內，充分混合後立刻置入已校正過之螢光判讀機中，測定檢體中黃麴毒素M₁之污染量。

(二)高效液相層析分析

將免疫親合性管柱 AFLAPREP M方法製備之檢液，以下列高效液相層析分析方法分析。

1. 高效液相層析之條件

管柱：Nucleosil 5 C18 (5 μ m, 250 × 4.6mm i.d.) 管柱

移動相：水/乙腈/甲醇(68:24:8)

流速：1mL/min

螢光檢測器：激發光源波長360nm，發射光源波長430nm

2. 標準曲線之製作

(1)黃麴毒素M₁標準曲線：取一定量之黃麴毒素M₁標準原液(500ppb)，吹乾後加入適量甲醇，配製成2、10、25、50、100ppb各種濃度之標準溶液，精取50 μ L，依次注入高效液相層析儀，每種濃度作三重複，由波峰所得平均面積對標準溶液之濃度作圖。

(2)黃麴毒素M_{2a}標準曲線：取0.5、5、25、50ng黃麴毒素M₁，按材料與方法六(二)5節進行衍生反應後吹乾，再加0.5mL甲醇配製成1、10、50、100ppb之黃麴毒素M_{2a}，續按上述方法製作標準曲線。

3. 黃麴毒素M₁之定量

分別將免疫親合性管柱 AFLAPREP M方法所製備之檢液及50ppb黃麴毒素M₁標準溶液各取50 μ L注入高效液相層析儀，就檢液分離出波峰之滯留時間，與標準溶液比對後，將檢出之黃麴毒素M₁波峰面積與標準曲線比較，求

出檢液中黃麴毒素M₁之濃度，再依下列公式換算黃麴毒素M₁之含量。

$$\text{黃麴毒素M}_1(\text{ppb即ng/g}) = C \times V/W$$

式中 C：檢液中含黃麴毒素M₁之濃度(ng/mL)

V：檢液體積(mL)

W：檢體重量(g)

另檢液若經衍生為黃麴毒素M_{2a}，則對照黃麴毒素M_{2a}標準曲線，餘按上述方法比對及計算。

八、回收率試驗

(一)免疫親合性管柱 Afla Test-P Column之方法

將濃度分別為100ppb (0.1ng/ μ L) 及500ppb (0.5ng/ μ L) 黃麴毒素M₁標準溶液，分裝一定量置12 × 75mm玻璃試管中，使其分別含有0.5、1、5及10ng之毒素，即相當於10mL牛乳中分別含有0.05、0.1、0.5、1ppb黃麴毒素M₁，續添加80%甲醇，使總體積為1mL，再以螢光判讀機標定實際添加量。另以同一黃麴毒素M₁標準溶液，製備新鮮之回收率試驗用牛乳，續以 Afla Test-P Column方法製備檢液，再以螢光自動判讀濃度，將此量與上述未經管柱之黃麴毒素M₁相比後乘以100%，即為回收率。

(二)免疫親合性管柱 AFLAPREP M方法

將新鮮製備回收率試驗用牛乳，以免疫親合性管柱 AFLAPREP M 方法製備檢液，再以高效液相層析分析，將所得波峰面積與標準曲線比對，換算濃度後除以添加濃度，再乘以100%，即為回收率。

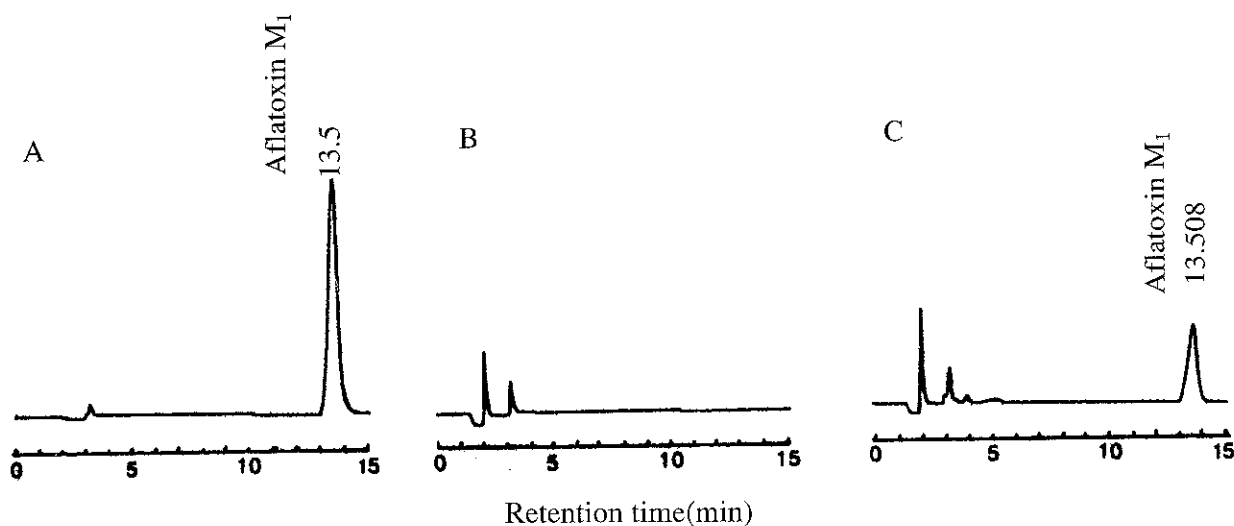
結 果

一、免疫親合性管柱 Afla Test-P Column方法

以本法分析人工添加毒素牛乳，顯示添加0.05ppb以下者，螢光判讀機雖可顯示檢出量，惟再現性較差，且常顯示0 ppb，而黃麴毒素M₁添加量達0.1ppb以上者，螢光判讀機可顯示較穩定之黃麴毒素M₁讀值，故最低檢測限量是0.1ppb，另以本法檢測人工添加0.5及1.0ppb黃麴毒素M₁之牛乳，回收率分別84.4 ± 7.0%及94.2 ± 9.5% (詳表一)。

Table 1. Recoveries of aflatoxin M₁ in milk

Spiked level of aflatoxin M ₁ (ppb)	Recoveries (%)		
	Afla Test-P Column ^a	AFLAPREP M ^a	Official method ^b
0.1	— ^c	84.7 ± 2.7(3.2%)	90.0 ± 1.4(1.6%) ^d
0.5	84.4 ± 7.0(8.3%)	88.7 ± 1.9(2.1%)	88.5 ± 2.1(2.4%)
1.0	94.2 ± 9.5(10.1%)	89.2 ± 4.2(4.7%)	88.0 ± 2.8(3.2%)

^aAverage of four determinations.^bC18 Sep-Pak cartridge and silica gel column were used by official method.^cNot detected.^dThe values in the parentheses is coefficient of variance(cv).**Figure 1.** HPLC chromatograms of (A) aflatoxin M₁, (B) milk and (C) milk with aflatoxin M₁ in water-acetonitrile-methanol (68:24:8) on Nucleosil C18 column at flow rate of 1 mL min⁻¹.

二、免疫親合性管柱 AFLAPREP M方法

(一) 高效液相層析儀條件之確立

牛乳經 AFLAPREP M之萃取與淨化，檢液中成分已單純化，無論衍生與否，皆可使用 Nucleosil C18管柱，及以水/乙腈/甲醇(68:24:8)為移動相進行分析，層析一檢體至少需15min，圖一即未經衍生之黃麴毒素M₁及檢液之層析圖，由圖一A可知黃麴毒素M₁之滯留時間為13.5min，圖一B為不含毒素牛乳之層析

圖，由圖可知牛乳中之其他成分在4min內已被沖出，故不會干擾黃麴毒素M₁之檢出，圖一C為含毒素牛乳之層析圖，其所含之黃麴毒素M₁之滯留時間為13.508min，可清楚的與牛乳中其他成分波峰分離。

圖二為經衍生之黃麴毒素M₁（即黃麴毒素M_{2a}）及檢液之層析圖，由圖可知黃麴毒素M₁經衍生後，滯留時間由13.5min提前至約5min，層析一檢體僅需10min，圖二A顯示黃麴毒素M_{2a}之滯留時間為4.993min，圖二B為不含

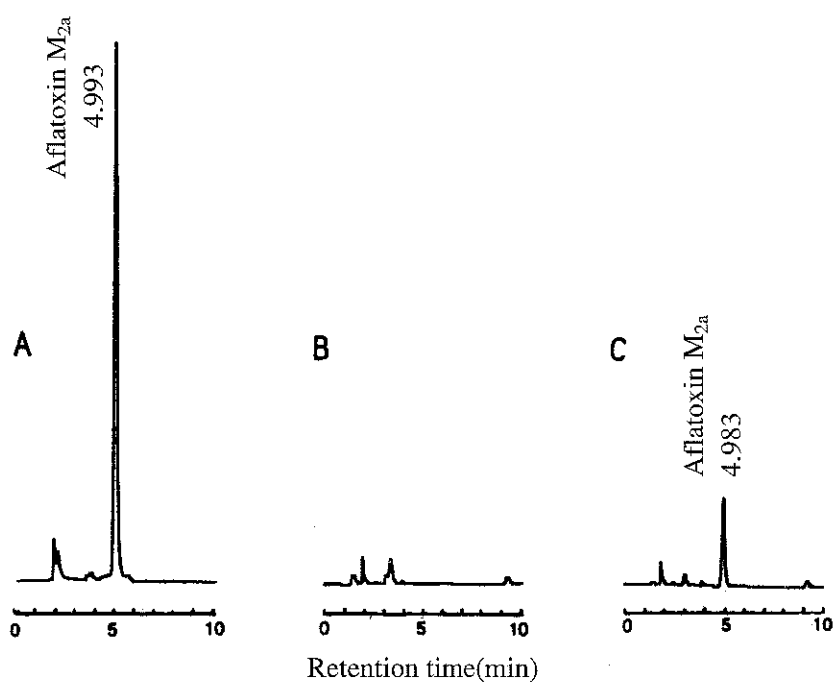


Figure 2. HPLC chromatograms of (A) aflatoxin M_{2a} , (B) milk and (C) milk with aflatoxin M_{2a} in water-acetonitrile-methanol (68:24:8) on Nucleosil C18 column at flow rate of 1 mL min^{-1} .

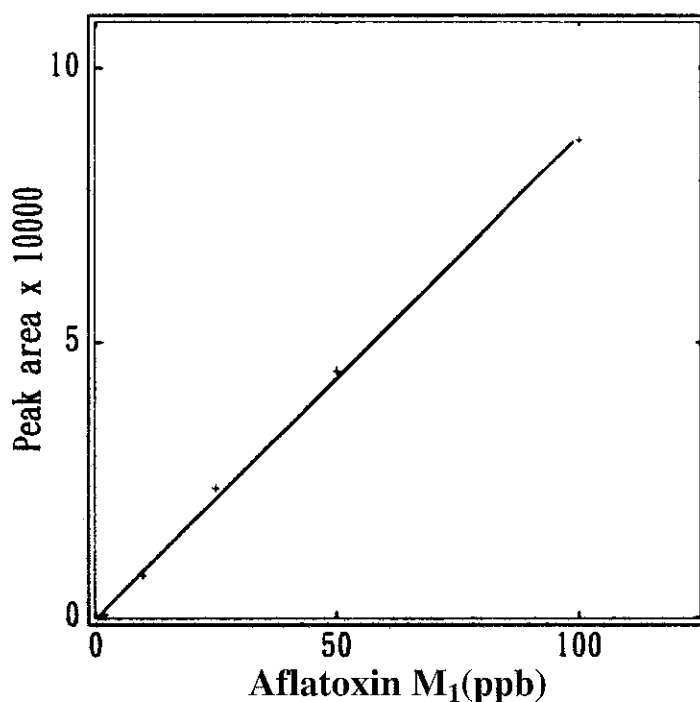


Figure 3. Calibration curve of aflatoxin M_1 analyzed by HPLC.

毒素牛乳之層析圖，圖中之波峰都很小，且在4.5-5min內無波峰出現，圖二C為含毒素牛乳之層析圖，其所含之黃麴毒素 M_{2a} 之滯留時間

為4.983min，可清楚的與牛乳中其他成分分離。

除上述管柱及移動相外，另使用

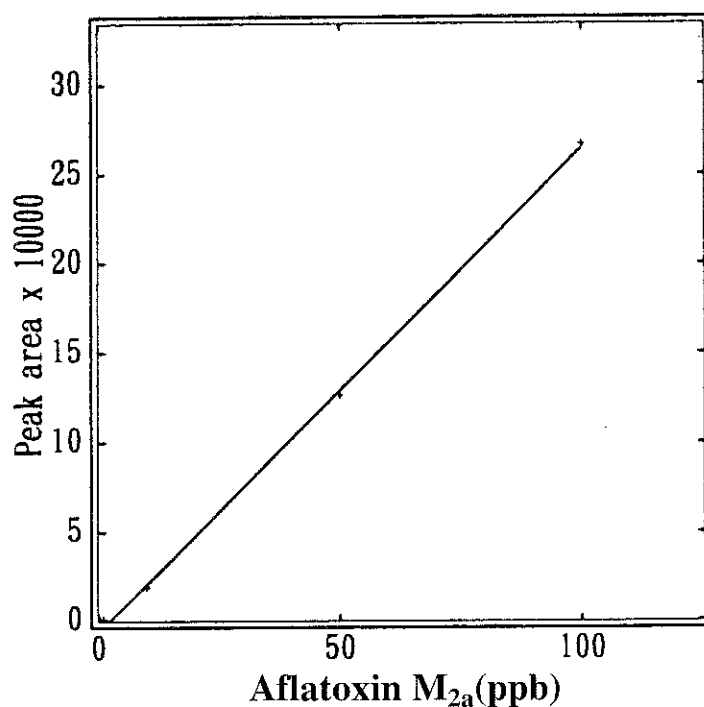


Figure 4. Calibration curve of aflatoxin M_{2a} analyzed by HPLC.

Table 2. Aflatoxin M₁ contents of milk and milk powder

Dairy products	No. of sample	No. of positive sample	Aflatoxin M ₁ content
Milk ^a			
Sterilized milk	3	0	
Low fat pasteurized milk	10	1	0.33ppb
Pasteurized milk	12	2	0.12 & 0.08ppb
Milk powder ^b			
Baby milk powder	6	0	
Cow milk powder	16	0	
Goat milk powder	3	0	
Total	50	3	

^a25 samples of milk are the products of 11 companies.

^b25 samples of milk powder are the products of 18 companies.

Spherisorb ODS2 5 μ m, 250 $\times$ 5mm管柱，配合以水/乙腈/甲醇(68:24:8)為移動相，或使用RP-18 5 μ m管柱及以水/異丙醇/乙腈(80:12:8)為移動相，亦可將檢液中之黃麴毒素M₁或M_{2a}與牛乳中其他成分分離。

(二)標準曲線之製作

依材料與方法七(二)2，將黃麴毒素M₁、M_{2a}分別製作標準曲線如圖三及圖四，其線性迴歸係數各為0.999201及0.999626，兩者線性關係皆佳，其線性方程式則分別為 $X=0.40524+1.1354 \times 10^{-3} \times Y$ 及 $X=2.2703+3.6845 \times 10^{-4} \times Y$ ，X表示黃麴毒素濃度(ppb)，Y表示波峰之積分面積。

(三)回收率及檢測限量之探討

使用本方法萃取及淨化牛乳後，可直接以液相層析，或將其衍生以增加螢光檢測之敏感度，惟因增加操作步驟，致實驗數據之再現性衍生者較未衍生者不佳，故測定回收率以未衍生者為準，結果如表一，其於0.1、0.5、1.0ppb三濃度之回收率依序為 $84.7 \pm 2.7\%$ 、 $88.7 \pm 1.9\%$ 及 $89.2 \pm 4.2\%$ ，另本法最低檢測量雖可達0.01ppb，惟依本研究使用之Shimadzu公司RF-530螢光偵測儀雜訊三倍計之波峰面積，方認為檢出者，則為0.05ppb。

三、市售乳品之檢測

本研究抽購市售牛乳及乳粉各25件，經以AFLAPREP M方法檢驗，結果如表二，於3件鮮乳中檢出黃麴毒素 M_1 ，其污染量分別為0.08、0.33及0.12ppb，皆低於國家所規定之安全限量0.5ppb，惟值得注意的是檢出檢體中，2件係同一製造工廠所出品之鮮乳；另在25件乳粉中則皆未檢出。

討 論

本研究使用之二種免疫親合性管柱 Afla Test-P Column及 AFLAPREP M，所充填之單株抗體性質相似，對於黃麴毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 及 M_1 皆可吸附，故此二管柱萃取與淨化之原理相似，惟填充抗體之量，後者為前者兩倍，故處理之乳品量，Afla Test-P Column之操作指南建議為10mL，而AFLAPREP M則為50mL，至於下一步之定量，亦皆可通用螢光判讀機及高效液相層析分析，但在結果之認定上，由於螢光判讀機係顯示五種黃麴毒素之總和，而高效液相層析則能檢測黃麴毒素 M_1 單獨含量，惟因乳汁中污染之黃麴毒素係以 M_1 為主，故螢光判讀機之結果，仍適篩檢及初步定量之用。

二種管柱對於黃麴毒素 M_1 之回收率與目前官方公告方法之88.0~90.0%類似（詳表一），另最低檢測量方面，依據產品操作步驟，因Afla Test-P Column取檢量為10mL，檢液則濃縮為1mL，加上顯色劑1mL總共2mL，就整體而言檢液濃縮5倍，濃縮倍數較低，故為0.1ppb，較不靈敏；而AFLAPREP M方法，因填充之抗體量較多，取檢量可達50ml，檢液則濃縮為0.5ml，即直接以高效液相層析分

析，也就是濃縮100倍，靈敏度則與公告方法一致，最低檢測量為0.05ppb。

免疫親合性管柱 Afla Test-P Column 及 AFLAPREP M，應用時可視需要，選擇較適用者，如為例行性檢驗大批檢體之用，前者操作步驟簡易，所須之設備簡單，不須高度專業人員即可勝任，是較佳之選擇。而在備有高效液相層析儀之實驗室，後者可應用於黃麴毒素 M_1 污染量較低檢體之檢測。

本研究旨為確立速簡之檢驗方法，故僅抽驗少量檢體，結果於25件乳粉中，皆未檢出黃麴毒素 M_1 ，於25件牛乳中檢出3件污染有微量之黃麴毒素 M_1 ，雖皆未超過限量標準，惟日後仍需進行不定期抽驗，以確保消費大眾食用乳品之安全。

參考文獻

- 1.呂鋒洲.1982.第一章、黃麴毒素.黴菌毒素.p12.正中書局.臺北.
- 2.顏國欽.1993.第四章、黴菌毒素.食品安全學.pp.68-77.藝軒圖書出版社.臺北.
- 3.王有忠.1987.第十章、黴菌毒素.食品安全.p.172.華香園出版社.臺北.
- 4.Price,R.L., Paulson,J.H., Lough,O.G., Gingg,C. and Kurtz,A.G. 1985.Aflatoxin Conversion by Dairy Cattle Consuming Naturally Cotaminated Whole Cottonseed. J.Food Prot.48: 11-15.
- 5.呂鋒洲 .1975.東南亞地區食物之黴菌毒素污染.食品工業.7(11): 8-13.
- 6.食品中黃麴毒素限量標準.1992.衛署食字第8189322號公告.
- 7.食品中黃麴毒素之檢驗方法草案.1983.衛署食字第445266號公告.
- 8.王繼忠.1986.生乳及乳粉中污染黃麴毒素問題之研究.衛生署七十五年度加強食品衛生管理第二期方案調查研究報告.
- 9.翁凱平、傅幼敏.1989.乳品中黃麴毒素 M_1 檢驗之探討.藥物食品檢驗局七十八年度科技研究報告.
- 10.嬰兒食品類衛生標準.1993.衛署食字第8189322號公告.
- 11.食品中黃麴毒素之檢驗方法—液狀乳中黃麴毒素 M_1 及 M_2 之檢驗.1995.衛署食字第84027644號公告.

12. Tuinstra, L.G.M.Th., Roos, A.H. and VAN TRIJP, J.M.P. 1993. Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxin M₁ in Milk Powder

Using Immunoaffinity Column for Cleanup: Interlaboratory Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 76(6):1248-1254.

Determination of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Powder Using Immuno-affinity Column and Fluorescence Measurement

YOU-MIN FU

*National Laboratories of Foods and Drugs
Department of Health, Executive Yuan, Taiwan, R.O.C.*

ABSTRACT

The method using immuno-affinity column clean-up and fluorescence measurement was evaluated for detection of aflatoxin M₁ in milk and milk powder. Two kinds of commercial immuno-affinity columns used were Afla Test-P Column and AFLAPREP M. The results are shown below :

(1) By using Afla Test-P Column and Fluorometer, the average recoveries of aflatoxin M₁ from defatted milk spiked at the levels of 0.5 and 1.0ppb were $84.4 \pm 7.0\%$ and $94.2 \pm 9.5\%$. The detection limit was 0.1ppb. This method is easy and suitable for multi-sample treatment.

(2) By using AFLAPREP M, the average recov-

eries of aflatoxin M₁ from defatted milk spiked at the levels of 0.1, 0.5 and 1.0ppb were $84.7 \pm 2.7\%$, $88.7 \pm 1.9\%$ and $89.2 \pm 4.2\%$. The detection limit was 0.05ppb. This method is more sensitive and can be used at the laboratory equipped with HPLC.

(3) 25 samples of milk and 25 samples of milk powder were purchased from supermarkets in Taipei from July 1994 to June 1995 and tested by AFLAPREP M. Aflatoxin M₁ was detected in 3 samples of milk. The toxin contents were 0.33, 0.12, 0.08ppb respectively. Milk powders were reconstituted and tested, no aflatoxin M₁ was detected in 25 samples.

Key words : Aflatoxin M₁, immuno-affinity column, milk, milk powder.