食品藥物研究年報. 4 : 47-53 2013
Ann. Rept. Food Drug Res. 4 : 47-53 2013

101年度市售穀類製品中黴菌毒素含量之調查

陳映君　吳尉光　廖家鼎　林旭陽　闕麗卿　施養志

食品藥物管理署研究檢驗組

摘　要

穀類作物容易在生長或貯藏過程遭受*Aspergillus*、*Fusarium*、*Penicillium*及 *Alternaria*等黴菌感染而產生黴菌毒素(mycotoxin)，對人及動物的肝及腎等具有毒性，而同一黴菌可能在不同溫度、空氣組成等條件下產生不同的毒素，致使同一種穀類可能檢出多種的黴菌毒素。本調查針對市售穀類(白米、玉米、堅果、花生及小麥)製品進行11種常見之黴菌毒素，包括黃麴毒素B_1 (aflatoxin B_1, AFB_1)、黃麴毒素B_2 (aflatoxin B_2, AFB_2)、黃麴毒素G_1 (aflatoxin G_1, AFG_1)、黃麴毒素G_2 (aflatoxin G_2, AFG_2)、伏馬毒素B_1 (fumonisin B_1, FB_1)、伏馬毒素B_2 (fumonisin B_2, FB_2)、脫氧雪腐鐮刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON)、玉米赤黴毒素(zearalenone, ZON)、赭麴毒素A (ochratoxin A, OTA)、T-2及HT-2毒素等含量調查並建立背景值，依行政院衛生署公告之「多重毒素檢驗方法」，於101年2-3月間至大台北地區各大超市及賣場抽購穀類製品共100件，包含米、玉米、堅果、麥及花生類各20件，結果有1件白米、7件麥製品、3件玉米及4件花生製品檢出黴菌毒素。其中1件白米檢出OTA；麥製品中有5件檢出DON及2件同時檢出DON及HT-2毒素；玉米製品中分別檢出FB_1、DON、ZON各1件；2件花生製品分別檢出AFB_1及DON，以及2件花生製品同時檢出AFB_1及AFB_2。本次市調中DON最高檢出量為281 ppb，均未超過國際間、歐盟制定之DON法定限量及USFDA指導性公告標準，而含有黃麴毒素及赭麴毒素 A 的檢體，其檢出量也符合目前我國所制定的黴菌毒素限量標準。因我國目前僅針對上述黃麴毒素及赭麴毒素A制定法規，藉由本次市調結果瞭解多種黴菌毒素在市售穀類製品的污染程度，以供後續衛生管理單位針對相關製品訂定法規限量標準之參考，為國民的健康安全把關。

關鍵詞：黴菌毒素、穀類

前　言

黴菌毒素是黴菌次級代謝產物，可能污染之食物以穀類為主。若食物採收後之加工過程不當或是儲存環境之溫濕度控制不當，即可能使食物遭受黴菌毒素污染。民眾若食入遭黴菌毒素污染之食物，可能造成肝臟毒性、腎臟毒性、致畸胎性及致癌性等，不可不慎[1,2]。黴菌毒素每年在全世界造成約100億噸農作物的損失，除經濟上的損失外更影響民眾的健康。穀類作物可能在生長或貯藏過程中遭受黴菌感染，而同一黴菌在不同儲存溫度條件下可能產生不同的黴菌毒素，因此就算同一種穀類也可能受到多種不同的黴菌毒素污染[3]。黴菌毒素具酸、鹼及熱穩定性，一般的加工處理難以破壞，當使用被黴菌毒素污染的原料製造的食品或飼料，也極可能含有毒素。本調查針對市售穀類(白米、玉米、堅果、花生及小麥)製品進行11種常見之黴菌毒素，包括黃麴毒素B_1 (aflatoxin B_1, AFB_1)、黃麴毒素B_2 (aflatoxin B_2, AFB_2)、黃麴毒素G_1 (aflatoxin G_1, AFG_1)、黃麴毒素G_2 (aflatoxin G_2, AFG_2)、伏馬毒素B_1 (fumonisin B_1, FB_1)、伏馬毒素B_2 (fumonisin B_2, FB_2)、脫氧雪

腐鐮刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、玉米赤黴毒素(zearalenone, ZON)、赭麴毒素A (ochratoxin A)、T-2及HT-2毒素等含量調查並建立背景值，因我國目前僅針對上述黃麴毒素及赭麴毒素A制定法規，藉由本次市調結果瞭解多種黴菌毒素在市售穀類製品的污染程度，以供後續衛生管理單位針對相關製品訂定法規限量標準之參考，為國民的健康安全把關。

材料與方法

一、材料

㈠標準品：AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2、FB_1、FB_2、DON、ZON、OTA、T-2 與 HT-2毒素標準品皆購自Fermentek公司，各為1 mg裝。除伏馬毒素以50%乙腈溶解以外，其餘標準品皆以100%乙腈溶解並定容至10 mL使各標準品濃度為100 μg/mL，儲存於-18℃下，臨用時再以20%乙腈溶液序列稀釋。

㈡試藥：甲醇、乙腈、甲酸及醋酸採液相層析級，磷酸二氫鈉、氯化鉀、磷酸氫二鈉、氯化鈉採試藥級，配製液相層析移動相之水使用去離子水。

㈢免疫親和管柱：採用美國Vicam公司出品之Myco6in1™，針對AFB_1等11種黴菌毒素之單株抗體免疫親和管柱。

㈣檢體：於101年2-3月至各大賣場抽購白米、玉米、堅果、花生及小麥等5類製品各20件，共計100件，將檢體品名、製造商及有效日期等明細記錄並拍照編號，以研磨機將檢體均勻磨成粉末後，置於4℃冷藏備用。

二、儀器設備

㈠液相層析串連式質譜儀(QTRAP 5500, AB SCIEX, USA)、Autosampler (1200 G1367D, Agilent, USA)、Binary pump (1200 G1312A, Agilent, USA)，儀器參數設定及數據處理則以Analyst software 1.5.2數據處理系統進行。

㈡液相層析管柱：Agilent ZORBAX SB-C18 (5 μm，內徑4.6 mm × 150 mm)。

三、多重毒素之檢驗[4]

㈠萃取溶液之配製：磷酸緩衝溶液(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)係將氯化鉀0.2 g、磷酸二氫鉀0.2 g、磷酸氫二鈉2.92 g和氯化鈉8 g溶於去離子水900 mL，再以0.1 M HCl或0.1 M NaOH調整至pH 7.4並定容至1 L。

㈡移動相溶液之配製：移動相溶液A為0.1%甲酸溶液，移動相溶液B為含0.1%甲酸之甲醇，以0.22 μm濾膜抽氣過濾後備用，臨用前以超音波振盪脫氣。

㈢萃取：精秤磨碎檢體粉末5 g，置於50 mL離心管中，加入PBS溶液25 mL，振盪器振盪60分鐘後，以3000 × g離心10分鐘。取上清液17.5 mL以Whatman GF/A玻璃濾紙過濾為萃取液A，留作備用，再將剩餘的PBS萃取液7.5 mL，加入甲醇17.5 mL，振盪60分鐘後以3000 × g離心10分鐘，續以Whatman 4號紙過濾，取濾液10 mL，再加入PBS溶液90 mL稀釋後，以Whatman GF/A玻璃濾紙為萃取液B。

㈣淨化：先將萃取液B 50 mL緩緩通過免疫親和管柱Myco6in1™ (流速控制在每秒1-2滴)，待萃取液完全通過管柱後，以PBS 20 mL流洗至完全無甲醇殘留，再將萃取液A 5 mL通過管柱，同樣將流速控制在每秒1-2滴，並以去離子水10 mL流洗，隨後以含0.5%醋酸之80%甲醇3 mL及100%甲醇3 mL分兩次沖提之(第一次以3 mL 沖提後間隔5 min再加入另外3 mL)。收集純化液於離心管中，以40℃ 氮氣吹乾，再以20% 乙腈1 mL回溶，以0.22 μm針筒過濾器過濾，供作檢液，以LC/MS/MS分析。

四、液相層析串連式質譜儀之測定條件

㈠液相層析儀：層析管柱為Agilent ZORBAX SB-C18 (5 μm，內徑 4.6 mm × 150 mm)，檢液注入量為10 μL，移動相為皆含0.1%甲酸之甲醇與水，時間梯度如表一，流速為1 mL/min。

表一、液相層析儀分析條件

Step	Total time (min)	Flow rate (μL/min)	A (%)	B (%)
0	0	1000	95	5
1	3	1000	15	85
2	3.5	1000	5	95
3	6.5	1000	5	95
4	7	1000	95	5
5	10	1000	95	5

Column：Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 μm)
Mobile phase A：0.1% formic acid in H_2O
Mobile phase B：0.1% formic acid in MeOH

㈡串聯質譜儀：離子源採電灑游離法正離子模式，搭配MRM模式進行偵測。質譜儀之分析參數(表二)及MRM偵測之離子對(表三)。

五、鑑別及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各10 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依前述條件進行分析，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鑑別之，並依下列計算式求得檢體中各毒素含量(ppb)：

$$\text{檢體中各毒素之含量(ppb)} = \frac{C \times V \times 5}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中各毒素之濃度(ng/mL)
V：檢體最後定容之體積(mL)
M：取樣分析檢體之重量(g)

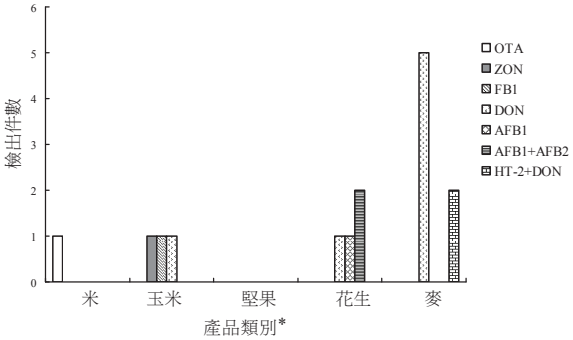
結果與討論

本次市調抽驗白米、玉米、堅果、花生及小麥等5類製品各20件，一共100件檢體，其中白米製品含白米與糙米，玉米製品包括玉米罐頭、玉米片與爆米花，堅果製品包括腰果、杏仁及開心果，花生製品包括粒狀花生、花生醬及花生糖，小麥製品主要為麥片、義大利麵條與國產麵條，其調查結果如圖一。白米檢體中有1件檢出OTA；玉米檢體中有3件分別檢出FB_1、DON及ZON；花生檢體中檢出AFB_1及DON各1件，2件同時檢出AFB_1及AFB_2；小麥檢體中有5件檢出DON，2件同時檢出DON及HT-2；而所有堅果檢體中沒有毒素檢出。

表二、串聯質譜儀分析條件

Parameter	Condition
MRM mode	ESI^+
Curtain gas (psi)	20
Ion source (V)	5,500
Temperature (℃)	550
Ion source gas 1 (psi)	55
Ion source gas 2 (psi)	55

100件檢體共有15件檢測到黴菌毒素，檢出率為15%，檢體檢出量介於0.57 ppb (AFB_2) -281 ppb (DON)。在黃麴毒素部分，有3件花生檢體檢出AFB_1，檢出量介於1.93-5.02 ppb，其中2件花生檢體除了檢出AFB_1外，亦同時檢出AFB_2，檢出量分別為0.57及0.60 ppb，而AFG_1及AFG_2在所有檢體中並沒有檢出；伏馬毒素部分有1件玉米檢體中檢出 FB_1 (38.3 ppb)；鐮刀黴菌毒素部分，小麥檢體中有2件檢出HT-2毒素(1.11及1.51 ppb)；DON部分共有9件檢體(玉米1件、花生1件、小麥7件)檢出，檢體檢出量介於12.2-281 ppb；ZON部分則是在1件玉米檢體中檢出(8.41 ppb)；OTA則在1件白米檢體中檢出(1.06 ppb)，其中有4件檢體同時檢出2種毒素。就整體而言DON檢出率最高(9%)，



圖一、市售穀類產品中黴菌毒素檢出情形
* 每產品類別各20件

表三、液相層析質譜儀分析多重黴菌毒素之離子對及分析參數

Toxin	Ionization mode	Retention time (min)	Precusor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Dwell time (ms)	CE* (V)	CXP* (V)
AFB_1	ESI^+	5.13	313	241**	50	48	28
				285	50	30	14
AFB_2	ESI^+	5.08	315	259**	50	38	14
				287	50	33	22
AFG_1	ESI^+	4.91	329	200**	50	50	17
				243	50	34	16
AFG_2	ESI^+	4.84	331	285**	50	35	17
				313	50	33	17
OTA	ESI^+	5.7	404	239**	100	30	17
				102	100	90	17
FB_1	ESI^+	5.04	722.5	334**	100	49	17
				352	100	45	17
FB_2	ESI^+	5.3	706.5	336**	100	50	17
				318	100	52	17
T-2	ESI^+	5.54	489	245**	50	34	17
				327	50	29	17
HT-2	ESI^+	5.39	447	345**	50	24	17
				285	50	24	17
DON	ESI^+	4.11	294	249**	100	14	17
				231	100	18	17
ZON	ESI^+	5.79	319	187**	100	26	17
				185	100	29	17

* CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential.
** transitions used for quantification.

其次為AFB_1 (3%)，就台灣、美國及歐盟現行之黴菌毒素限量標準來評量，所有檢體均符合黃麴毒素和赭麴毒素A標準，以歐盟法規及USFDA指導性公告標準來評量，其餘檢出的FB_1、DON、ZON範圍在8.41-281 ppb，也皆符合標準，而T-2及HT-2毒素目前僅有俄羅斯和以色列訂定100 ppb為限量標準，美國及歐盟並沒有制定相關規範。

另外搜尋到一些以LC/MS/MS檢驗市售穀類製品(如：玉米、花生、小麥等)的文獻，也發現製品有被黴菌毒素污染的現象。Asam及Rychlik針對29種玉米及小麥製品進行DON、3-ADON、15-ADON及4-AcNIV (4-acetylnivalenol)等4種黴菌毒素檢驗，其中28件檢出DON，顯示DON污染穀類作物情形相當嚴重，而其中一件全麥麵粉檢出量達300 ppb，另一件豬隻飼料也檢出DON 110 ppb[5]；Soleimany等人從馬來西亞當地超市採集了80件穀類製品進行檢驗，發現有60件含有黴菌毒素(檢出率75%)，其中40件檢體含有0.12-4.42 ppb不等的黃麴毒素，另外24件分別檢出赭麴毒素A (0.1-5.14 ppb) 及DON (5.5-34.92 ppb)[6]；Jin等人自中國浙江及吉林省隨機採集69件市售玉米製品，經檢驗後發現其中62件檢體含有ZON，檢出量範圍在2.7-167.2 ppb間，其次在61件檢體中檢出DON 3.6-311.2 ppb，其衍生物15-ADON

也出現在其中的60件檢體中，顯示市售穀類製品廣泛受到DON及ZON的污染[7]，另外有多篇文獻也指出穀類製品受到黴菌毒素污染的嚴重性[8-10]。除了穀類外，也有研究在草藥、辣椒、胡椒粉等香辛料中檢出AF、OTA及DON [11-14]。Monbaliu等人利用自行開發的23種黴菌毒素檢驗方法，針對市面上販售82件小麥、玉米製品進行檢驗，共有67件檢出含有黴菌毒素，發現遭DON污染件數有52件，最大檢出量高達9.53 ppm，另外也從部分檢體中檢驗出DON的衍生物3-ADON (3-acetyl deoxynivalenol)和15-ADON (15-acetyl deoxynivalenol)[15]，Beltrán等人採集了14種(3種生乳、7種嬰兒奶粉、4種穀類配方幼兒奶粉及食品)嬰幼兒乳品，檢驗後發現雖有3件奶粉含有OTA及AFM_1，但仍符合歐盟法規標準[16]。Ediage等人也利用25種黴菌毒素檢驗方法，針對市面上販售的樹薯澱粉、玉米粉及花生餅共23件樣品進行檢驗，結果所有樣品皆檢出1種以上的黴菌毒素，其中花生餅檢出黃麴毒素33-346 ppb，玉米粉則檢出伏馬毒素(FB_1、FB_2 及 FB_3) 5-836 ppb，而在樹薯澱粉中也檢驗出含有AFB_1、FB_1 及 ZON[17]。

在本次市售穀類製品調查結果中，白米(除1件含OTA外)及堅果類製品大部分皆未檢出黴菌毒素，而玉米檢出3件、花生檢出4件，小麥檢出7件，其中9件都檢出含有DON，在其他文獻資料中同樣發現市售穀類及其製品有被DON污染的情形。根據2001年世界衛生組織的報告表示，穀類中的燕麥其DON檢出率高達68%、大麥59%、小麥57 %、黑麥49%、玉米41%、白米27%[18]，而在加拿大、美國、日本、歐洲及部分非洲國家之小麥中DON的檢出率普遍超過50%[19]。農作物在生長時受到損傷或不當條件貯藏下容易受到黴菌感染而產生黴菌毒素，為了民眾的健康安全，目前世界已有多國針對農製品所含的黴菌毒素制定限量標準及每日最大容許攝取量。臺灣目前僅針對黃麴毒素、赭麴毒素A等黴菌毒素制定限量標準，在缺乏其它黴菌毒素的研究資料下，僅能參考如歐洲、美國等其他國家制定之限量標準及每日容許攝取量。

結　論

本次調查抽驗白米、玉米、堅果、花生及小麥等五種穀類製品各20件，共計100件檢體，結果有15件(1件白米、3件玉米、4件花生及7件小麥製品)檢驗出黴菌毒素，檢出率為15%，其中1件白米檢體檢出OTA及3件花生檢體檢出黃麴毒素，惟污染量不高，皆在國內所訂定的法規標準以下，而其他檢出的毒素(ZON、FB1、DON及HT-2)，國內目前尚未制定限量標準，以歐盟、USFDA及國際間制定的限量標準來評量，所有檢體皆未超過標準。藉由本次市調結果，瞭解11種黴菌毒素在市售穀類製品的污染情況，提供衛生管理單位在未來針對相關製品制定法規限量標準之參考，以利國人的健康與安全。

參考文獻

1. Miller, J. D. 1997. Mycotoxin in Grain. Compounds Other Than Aflatoxins. 2nd ed. Trenholm H. L. eds. St Paul, MN, USA. Eagan Press.
2. 黃錦城。2010。黴菌毒素之危害及控制。食品工業，42(4): 1-3。
3. Hussein, H.S. and Brasel, J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicol. 167(2): 101-34.
4. 行政院衛生署。2012。食品中黴菌毒素檢驗方法－多重毒素之檢驗。101.01.05署授食字第1001905010 號公告。
5. Asam, S. and Rychlik, M. 2007. Quantitation of type B-trichothecene mycotoxins in foods and feeds by a multiple stable isotope dilution assay. Eur. Food Res. Technol. 13: 155-162.
6. Soleimany, F., Jinap, S., Rahmani, A. and Khatib, A. 2011. Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and a post-column derivatization system. Food Addit. Contam. Part A 28: 494-501.
7. Jin, P. G., Han, Z., Cai, Z. X., Wu, Y. J. and Ren, Y. P. 2010. Simultaneous determination of 10 mycotoxins in grain by ultra-high-performance liquid

chromatography-tandem mass spectrometry using ^{13}C15-deoxynivalenol as internal standard. Food Addit. Contam. Part A 27: 1701-1713.

8. Desmarchelier, A. and Seefelder, W. 2011. Survey of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in cereal-based products by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. World Mycotoxin J. 4: 29-35.
9. Vendl, O., Crews, C., MacDonald, S., Krska, R. and Berthiller, F. 2010. Occurrence of free and conjugated Fusarium mycotoxins in cereal based food. Food Addit. Contam. Part A 27: 1148-1152.
10. Beyer, M., Danicke, S., Rohweder, D. and Humpf, H. U. 2010. Determination of deoxynivalenol-sulfonate (DONS) in cereals by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem massspectrometry. Mycotoxin Res. 26: 109-117.
11. Iqbal, S., Paterson, R., Bhatti, I. and Asi, M. 2010. Survey of aflatoxins in chilies from Pakistan produced in rural, semi-rural and urban environments. Food Addit. Contam. Part B 3: 268-274.
12. Ahn, J., Kim, D., Kim, H. and Jahng, K. Y. 2010. Quantitative determination of mycotoxins in urine by LC-MS/MS. Food Addit. Contam. Part A 27: 1674-1682.
13. Han, Z., Zheng, Y., Luan, L., Ren, Y. and Wu, Y. 2010. Analysis of ochratoxin A and ochratoxin B in traditional Chinese medicines by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using [^{13}C20]-ochratoxin A as an internal standard. J. Chromatogr. A 1217: 4365-4374.
14. Yue, Y., Zhang, X., Yang, M., Ou-Yang, Z. and Liu, H. 2010. Simultaneous determination of deoxynivalenol and nivalenol in traditional Chinese medicine by SPE and LC. Chromatographia. 72: 551-555.
15. Monbaliu, S., Poucke, C. V., Detavernier, C., Dumoulin, F., Mario, V. D. V., Schoeters, E., Stefaan, V. D., Averkieva, O., van Peteghem, C. and de Saeger, S. 2010. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. J. Agric. Food Chem. 58(1): 66-71.
16. Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Cortés, M. Á., Yusà, V. and Hernández, F. 2011. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. Food Chem. 126(2): 734-744.
17. Ediage, E. N., Di Mavungu, J. D., Monbaliu, S., van Peteghem, C. and de Saeger, S. 2011. A validated multianalyte LC-MS/MS method for quantification of 25 mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples. J. Agric. Food Chem. 59: 5173-5180.
18. Tanaka, K., Sago, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H. and Kushiro, M. 2007. Mycotoxin in rice. Int. J. Food Microbiol. 119: 59-66.
19. Tutelyan, V. A. 2004. Deoxynivalenol in cereal in Russia. Toxicol. Lett. 53: 173-179.

A Survey of Mycotoxins in Cereal Products

YING-CHUN CHEN, WEI-GUANG WU, CHIA-DING LIAO, HSU-YANG LIN, LIH-CHING CHIUEH AND DANIEL YANG-CHIH SHIH

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Alternaria* that are known as carcinogenic and harmful to the health of humans and animals, and even caused huge economic loss. Some molds are capable of producing more than one mycotoxin and some mycotoxins are produced by several fungal species. Often many mycotoxins are found on a contaminated substrate. Factors influencing the presence of mycotoxins in foods include temperature and environmental conditions. A multi-mycotoxin analytical method was employed for simultaneous determination of aflatoxin B_1 (AFB_1), aflatoxin B_2 (AFB_2), aflatoxin G_1 (AFG_1), aflatoxin G_2 (AFG_2), fumonisin B_1 (FB_1), fumonisin B_2 (FB_2), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZON), ochratoxin A (OTA), T-2 and HT-2 toxin in cereals. The regulations have not been set for the FB_1, FB_2, DON, ZON, T-2 and HT-2 in Taiwan. In order to understand the contamination situation in the food, a survey of multi-mycotoxin contents in market products was conducted by TFDA. One hundred products including rice, corn, nut, wheat and peanut products were collected from convenient stores, supermarkets and grocery stores from February to March, 2012. The results showed that mycotoxins were detected in 15 samples ranging from 0.57 ppb (AFB_2) to 281 ppb (DON), in 1 rice, 3 corn, 7 wheat, and 4 peanut products. The result also showed that none of sample was contaminated with mycotoxin levels above the Taiwan and international regulation limits. Except for total aflatoxin and ochratoxin A, there is no official regulation in Taiwan. This survey result may offer government a reference to set up the regulation limits for the sake of national health and safety.

Key words: mycotoxin, cereals