

市售含紅麴之食品中橘黴素含量調查

廖家鼎 林柏全 林旭陽 闕麗卿 施養志

研究檢驗組

摘要

近年來食用含紅麴食品的人口愈來愈多，然而除了其可能的保健功效之外，也存在遭受黴菌毒素—橘黴素(citrinin)污染之問題，可能產生肝腎毒素。目前關於市售產品之研究調查仍少。本研究以甲醇萃取檢體，經70°C加熱後，續以高效液相層析儀(HPLC)搭配螢光檢出器偵測橘黴素，建立含紅麴之食品中橘黴素之檢驗方法。分別添加0.05~10 ppm之橘黴素標準品於紅麴膠囊、紅麴米、紅麴餅乾、紅麴穀粉/麥片及紅麴酒等各類檢體，回收率介於82.5~111.9%之間，該檢驗方法之檢出限量為50 ppb。利用上述方法分析市售產品48件，檢出16件含有橘黴素。本調查結果已提供行政單位訂定限量標準之參考。

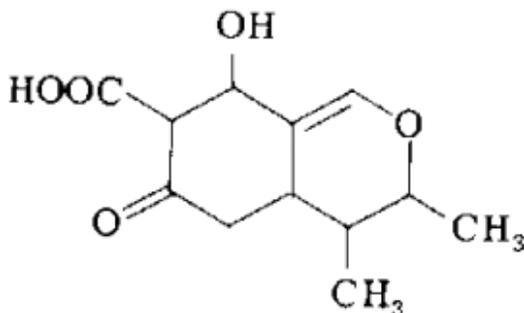
關鍵詞：紅麴、橘黴素、高效液相層析儀

前言

市面上具有養生概念之紅麴相關產品愈來愈多，其中可能含有之黴菌毒素—橘黴素(Citrinin)的汙染問題值得重視。橘黴素為*Penicillium*屬和*Aspergillus*屬黴菌所產生之二級代謝產物。分子式為C₁₃H₁₄O₅，分子量250.25，結構如圖一所示，可溶於稀鹼、甲醇、乙腈、乙醇和大部分的極性有機溶液⁽¹⁾。Larsen (1928)發現豬攝食發霉飼

料或馬餵食發霉乾草會分別引發腎病、煩渴及多尿中毒的病症，並在其後的報告指出該飼料中含有由黴菌所分泌的數種毒素，主要為赭麴毒素(Ochratoxin)和橘黴素，橘黴素污染的問題才開始受到注意⁽²⁾。橘黴素最早於1931年由*Penicillium citrinum*菌中始被分離出來⁽³⁾。在熱帶高濕地區，*P. Viridicatum*是最主要產生橘黴素並污染小麥、大麥、裸麥、燕麥、米、玉米等穀物及腐敗蔬菜的黴菌；它不但能產生橘黴素，亦能生成多量的赭麴毒素，此外還能產生青黴酸(penicillic acid)。

會受橘黴素污染的穀物包含白米、小麥、燕麥、裸麥與大麥等⁽⁴⁾，其他如發霉的蘋果⁽⁵⁾、麵包、麵粉⁽⁶⁾、醃製火腿⁽⁷⁾等加工製品亦曾經檢出。近幾年紅麴製品橘黴素的污染情況受到特別的關注，1999年荷蘭學者Monica等分析市售12種紅麴發酵米之橘黴素的含量約在0.2~17.1 ppm⁽⁸⁾。橘黴素的病理特性與赭麴毒素相似，皆為腎毒性物質(nephrotoxic component)⁽⁹⁾。2004年台灣地區由寶路乾狗糧引起之犬隻集體腎衰竭事件，飼料之稻米和玉米原料的橘黴素與赭麴毒素污染可能就



圖一、橘黴素之化學結構式

是致病的主因。人、畜的多種疾病均與橘黴素有關，如人類的地方性巴爾幹腎病(endemic Balkan nephropathy)、豬的腎臟炎、牛的搔癢症、熱病及出血症狀等⁽¹⁰⁾。當以20~80 $\mu\text{mol/kg}$ (5~20 mg)的橘黴素靜脈注射至受麻醉的狗，會導致血管擴張、血壓急降(類似交感神經的作用)。而以腹腔注射20~160 $\mu\text{mol/kg}$ (5~40 mg)的橘黴素於有知覺的狗體內，在每次注射後狗會有嘔吐現象，當注射劑量超過20 $\mu\text{mol/kg}$ ，除了會有嘔吐現象外，亦會出現下痢、極度脫水、電解質失調等反應，注射劑量超過40 $\mu\text{mol/kg}$ 則會引起腎臟構造的損害，如遠側小管(distal tubules)的空泡形成(vacuolation)、近曲小管(proximal tubule)細胞排列失常等⁽¹¹⁾。亦有研究指出橘黴素具有致畸胎毒性(teratogenicity)，當注射橘黴素於雞胚胎時，會造成雞胚胎的畸形如腦畸形、腳之變形、眼球凸出、形成交叉喙及頸頸扭曲方向不正常等⁽¹²⁾。急毒性試驗結果，對鴨、雞和兔子之半數致死劑量(LD₅₀值)分別為57、95及134 mg/kg⁽¹³⁾。

在分析方法部分，橘黴素為帶有酸根的陰離子化合物，具有類似苯環的共軛構造，可以藉由TLC、HPLC等層析法進行分離後，配合螢光檢出器針對特定波長來進行檢測。在前處理的操作上，主要以液/液相萃取，文獻上常使用的萃取溶劑有acetonitrile、chloroform、ethylacetate、methanol等，以及加入KCl、HCl、H₂SO₄等鹽類或酸類配成鹽以及酸溶液，採用搖晃、攪拌及超音波等萃取操作對樣品進行萃取。檢測部分，TLC展開液多使用不同比例ethylacetate、methanol、chloroform及toluene等，並混入一定比例的酸劑，展開後配合螢光或可見光偵測器進行檢測⁽¹⁴⁻¹⁷⁾。HPLC的流洗管柱以C18系列為主，配合不同比例methanol、acetonitrile、isopropanol與水進行流洗，之後配合可見光偵測器或加入磷酸等進行調酸後，以螢光偵測器進行檢測⁽¹⁸⁻²¹⁾。

在法規限量標準部分，日本厚生省的食品添加物標準法規中規定做為著色劑使用的紅麴色素，其橘黴素含量必須低於0.2 ppm⁽²²⁾。本調查研究結果成功地提供本署訂定法規限量標準與公告檢驗方法之參考。衛生署98年12月4日衛署食字

第0980462647號公告之「食品中真菌毒素限量標準」，其中橘黴素限量於紅麴色素為200 ppb以下，原料用紅麴米為5 ppm以下，使用紅麴原料製成之食品為2 ppm以下。

此篇報告評估本檢驗方法之適用性，瞭解市面上紅麴相關食品中橘黴素之污染情形，可作為行政管理之參考。

材料與方法

一、檢體來源

本研究共計自行抽驗48件檢體，包括紅麴膠囊類15件、紅麴錠類2件、紅麴米類8件、紅麴餅乾類8件、紅麴穀粉/麥片類7件及紅麴酒類8件，於98年5~7月購自台北市超級市場、超商、量販店、迪化街及藥房等。此外，另於98年8~10月配合本署執行港口抽樣調查，26件紅麴檢體均由經濟部標準檢驗局提供。

二、材料與試劑

(一)試藥：乙腈及甲醇均採用液相層析級；甲酸採用試藥特級。

(二)器具及材料：

1. 容量瓶：10 mL、20 mL及1 L。
2. 玻璃樣品瓶：30 mL，附PP材質螺旋蓋。
3. 濾膜：直徑47 mm，孔徑0.22 μm ，Nylon材質。
4. 針筒過濾器(Syringe filter)：直徑13 mm，濾膜孔徑0.22 μm ，Nylon材質。

(三)移動相溶液之配製：

乙腈與水以1：1 (v/v)之比例混合成1 L後，再加入甲酸1 mL，混合均勻後，以濾膜過濾，供作移動相溶液。

(四)標準溶液之配製：取橘黴素對照用標準品(美國Sigma公司製造)約5 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至10 mL作為標準原液，冷凍儲存。使用時取標準原液以甲醇稀釋成0.05~20 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

三、儀器與設備

(一)液相層析管柱：採用Waters公司製造之Atlantis T3管柱(5 μm ，內徑4.6 mm \times 25 cm)。

(二)高效液相層析儀：日本Hitachi公司製造之L-2130幫浦、L-2485螢光偵測器及L-2200自動樣品注射器，數據處理則以EZChrom Elite層析儀積分數據處理系統進行。

(三)旋渦混合器(Vortex mixer)。

(四)水浴(Water bath)：溫差在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內者。

(五)粉碎機(Grinder)。

四、檢液之調製

液態檢體直接混勻，其他檢體經磨碎混勻後，取約1 g，精確稱定，置於玻璃樣品瓶中，加入甲醇20 mL (V)，拴緊螺旋蓋。旋渦混合1分鐘，置於70°C水浴加熱30分鐘，於室溫下靜置冷卻。續旋渦混合1分鐘，經針筒過濾器過濾後，取濾液供作檢液。

五、檢量線之製作

精確量取各標準溶液1 mL添加於空白檢體1 g中，依「四、檢液之調製」調製檢液，並參照下列條件進行高效液相層析測定，就檢液波峰面積與對應之標準品添加濃度製作檢量線。

高效液相層析測定條件：

層析管柱：Atlantis T3，5 μm ，內徑4.6 mm \times 25 cm。

螢光檢出器：激發波長330 nm，發射波長500 nm。

移動相溶液：依二、(三)節調製之溶液。

移動相流速：1.0 mL/min。

六、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各20 μL ，分別注入高效液相層析儀中，參照五節高效液相層析測定條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中橘黴素之含量(ppb)：

$$\text{檢體中橘黴素含量(ppb)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由檢量線求得檢液中橘黴素之濃度(ng/mL)

V：萃取溶液之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

七、回收率測試

將橘黴素標準溶液添加至不含橘黴素之空白檢液內，添加濃度分別為0.05、0.2、1及10 ppm。續以材料與方法「四、檢液之調製」製備檢液並分析之，換算濃度後除以添加濃度，再乘以100%即為回收率。各類紅麴檢體分別測試。

八、方法偵測極限(Method Detection Limit；MDL)

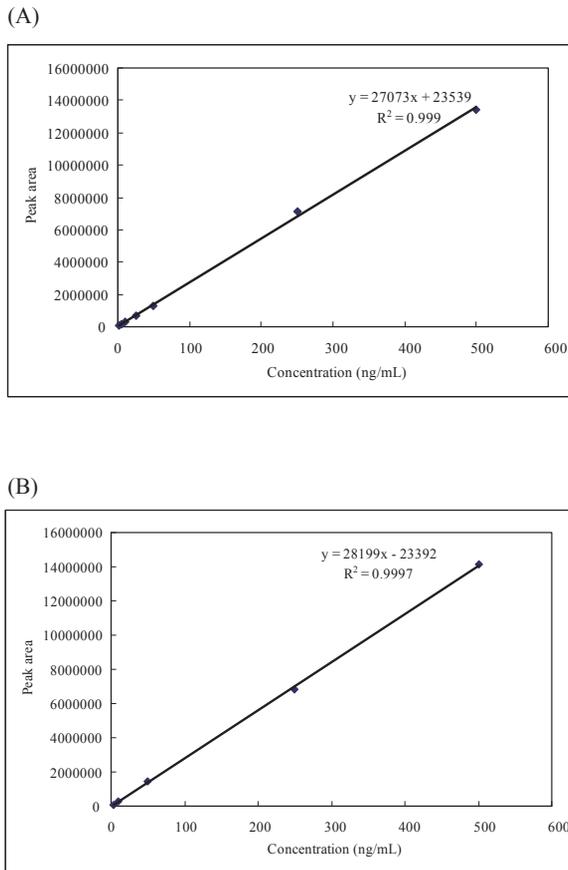
將不同濃度之橘黴素標準溶液添加至不含橘黴素之空白檢液內，續以材料與方法「四、檢液之調製」製備檢液並以高效液相層析儀偵測，由儀器所得之訊號(signal)相對雜訊(noise)比值大於10者之最小標準溶液添加濃度為方法偵測極限。

結果與討論

一、檢驗方法之確認

本方法以甲醇萃取檢體，經70°C加熱後，續以高效液相層析儀(HPLC)搭配螢光檢出器偵測橘黴素，建立含紅麴之食品中橘黴素之檢驗方法。分別添加0.05~10 ppm之橘黴素標準品於紅麴膠囊、紅麴米、紅麴餅乾、紅麴穀粉/麥片及紅麴酒等各類檢體，整體回收率介於82.5~111.9%之間，檢出限量為50 ppb。

此方法之檢量線線性良好，各類檢體之檢量線方程式與R²值分別為紅麴膠囊：y = 28199 x - 23392，R²值為0.9997；紅麴米：y = 27073 x + 23539，R²值為0.999；紅麴餅乾：y = 26709 x + 6238.1，R²值為1；紅麴穀粉/麥片：y = 24701 x - 24029，R²值為0.9999；紅麴酒：y = 29666 x - 29387，R²值為0.9998。橘黴素於紅麴米類及紅麴膠囊類之檢量線如圖二所示。於紅麴米類及紅麴膠囊類之空白檢體中添加橘黴素標準品5 ppm之高效液相層析圖如圖三所示，橘黴素之波峰滯留時



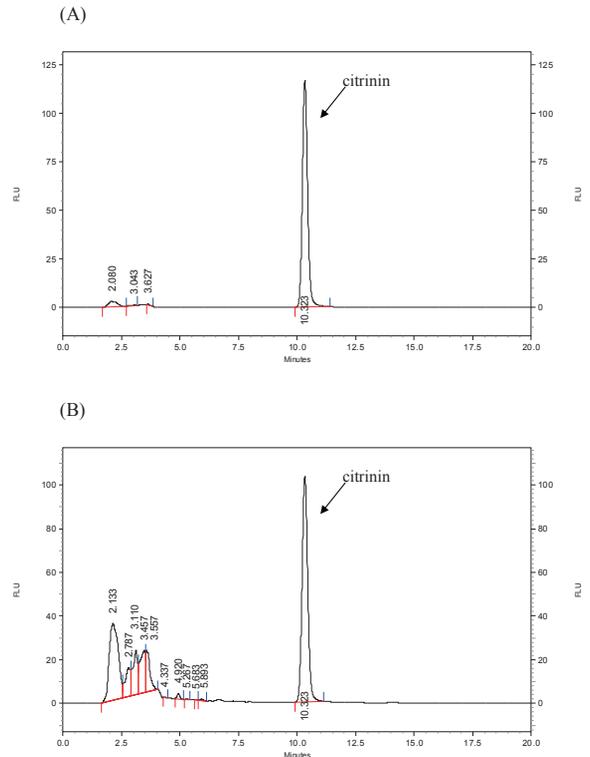
圖二、橘黴素於 (A) 紅麴米類及 (B) 紅麴膠囊類之檢量線

間約為10.3分鐘，波形理想，左右對稱且狹窄，分離效果佳。

各類檢體之回收率亦佳，分別添加0.05~10 ppm之橘黴素標準品於紅麴膠囊、紅麴米、紅麴餅乾、紅麴穀粉/麥片及紅麴酒等各類檢體，回收率分別為紅麴膠囊90.9~108.2%、紅麴米83.3~93.7%、紅麴餅乾96.3~111.9%、紅麴穀粉/麥片82.5~97.3%、紅麴酒100.0~105.2%。

綜合上述，本方法之前處理簡單快速，檢量線線性良好，各類紅麴相關檢體之回收率均佳，故以此方法進行後續市售產品調查。

二、市售紅麴膠囊、紅麴錠、紅麴米、紅麴餅乾、紅麴穀粉/麥片及紅麴酒中橘黴素含量調查結果



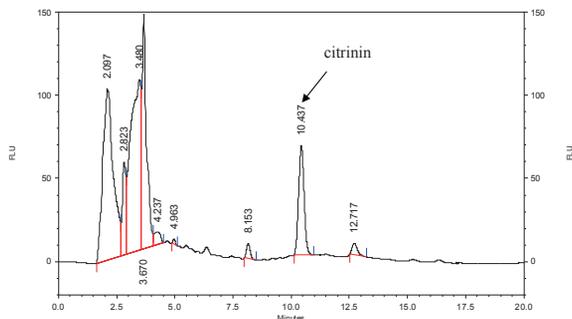
圖三、空白檢體 ((A) 紅麴米、(B) 紅麴膠囊) 中添加橘黴素標準品 5 ppm 之高效液相層析圖

於98年5~7月自台北市超級市場、超商、量販店、迪化街及藥房等處自行抽購48件檢體，包括紅麴膠囊類15件、紅麴錠類2件、紅麴米類8件、紅麴餅乾類8件、紅麴穀粉/麥片類7件及紅麴酒類8件。檢驗結果如表一所示，在各類紅麴檢體中，以紅麴米之污染情形最嚴重，8件紅麴米檢體全數檢出橘黴素，含量介於2.7~40.0 ppm之間，高於10.0 ppm者多達5件。15件紅麴膠囊檢體檢出7件含有橘黴素，其中6件含量低於2.0 ppm，有一件高達15.2 ppm。紅麴米與紅麴膠囊檢體檢出橘黴素之高效液相層析圖如圖四及圖五所示。至於紅麴餅乾、紅麴穀粉/麥片及紅麴酒類檢體則全數未檢出，可能係因這些產品中僅添加極少量紅麴，不像紅麴米與紅麴膠囊中主要成分即為紅麴。此次調查之整體結果，48件檢體中檢出16件，檢出率33.3%，檢出0.1~2.0 ppm者有7件，檢出2.0~10.0 ppm者有3件，檢出10.0 ppm以上者有6件。

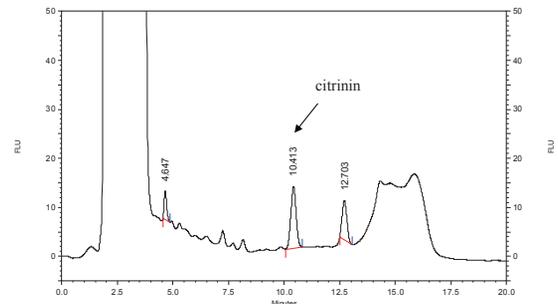
表一、市售紅麴製品中橘黴素(citrinin)檢驗結果

檢體類別	檢驗件數	檢驗結果 (ppm)			
		未檢出*	0.1~2.0	2.0~10.0	>10.0
紅麴膠囊	15	8	6	—	1
紅麴錠	2	1	1	—	—
紅麴米	8	—	—	3	5
紅麴餅乾	8	8	—	—	—
紅麴穀粉、麥片	7	7	—	—	—
紅麴酒	8	8	—	—	—
總計	48	32 (66.7%)	7 (14.6%)	3 (6.2%)	6 (12.5%)

*本檢驗方法之檢出限量為50 ppb



圖四、紅麴米檢體中檢出橘黴素 3.2 ppm 之高效液相層析圖



圖五、紅麴膠囊檢體中檢出橘黴素 0.61 ppm 之高效液相層析圖

結 論

市面上具有養生概念之紅麴相關產品愈來愈多，其中可能含有之黴菌毒素—橘黴素的汙染問題值得重視。本研究以甲醇萃取檢體，經70°C加熱後，續以高效液相層析儀(HPLC)搭配螢光檢出器偵測橘黴素，建立含紅麴之食品中橘黴素之檢驗方法。紅麴膠囊、紅麴米、紅麴餅乾、紅麴穀粉/麥片及紅麴酒等各類檢體之標準品添加回收率介於82.5~111.9%之間，檢驗方法之檢出限量為50 ppb。利用所建立之檢驗方法分析市售產品48件，檢出16件含有橘黴素，最高者達40.0 ppm，其中又以紅麴米汙染之情形最嚴重。另配合本署執行港口抽樣調查，在26件輸入之紅麴米中，有高達17件檢體檢出橘黴素，含量介於0.4~30.5 ppm之間，檢出率高達65.4%。本調查研究結果已成功地提供訂定法規限量標準與公告檢驗方法之參考。

三、港口抽樣調查

衛生署於98年8月5日行文經濟部標準檢驗局，請各港埠分局逐批抽樣輸入之紅麴產品，送本局檢驗，以供規劃邊境查驗措施之參考。本局於8~10月間共計收到26件檢體，均為原料用紅麴米，來源多為中國大陸。

以上述檢驗方法分析26件檢體，結果僅有9件檢體未檢出橘黴素，有高達17件檢體檢出橘黴素，含量介於0.4~30.5 ppm之間，檢出率高達65.4%(表二)，足見問題之嚴重性。衛生署98年12月4日衛署食字第0980462647號公告之「食品中真菌毒素限量標準」，原料用紅麴米之橘黴素限量為5 ppm，本檢驗結果中有8件紅麴米檢體超過限量標準，不合格率高達30.8%，最高者甚至超過限量標準6倍之多，值得持續注意。

表二、港口抽樣調查之檢驗結果

檢體編號	檢體名稱	來源	檢驗日期	檢驗結果 (ppm)
1	紅麴	未提供	98.08.06	16.5
2	紅麴米	未提供	98.08.06	22.0
3	紅麴米	未提供	98.08.06	29.5
4	紅麴	未提供	98.08.06	2.9
5	香味紅麴粉	未提供	98.08.17	2.8
6	進口紅麴	未提供	98.08.17	9.9
7	精選紅麴	未提供	98.08.17	1.6
8	紅麴米	中國大陸	98.08.19	2.1
9	紅麴米	未提供	98.08.21	10.1
10	紅麴米	中國大陸	98.08.21	15.7
11	紅麴米	未提供	98.09.04	3.9
12	紅麴粉	美國	98.09.04	ND
13	紅麴米	中國大陸	98.09.04	30.5
14	紅麴粉	日本	98.09.07	ND
15	紅麴米酵母粉	美國	98.09.15	1.3
16	紅麴粉	未提供	98.09.16	0.4
17	紅麴提取物	未提供	98.09.17	ND
18	紅麴米	香港	98.09.17	3.2
19	紅麴粉	香港	98.09.17	8.1
20	紅麴粉	中國北京	98.09.30	ND
21	紅麴粉	中國大陸	98.10.05	ND
22	紅麴萃取粉末	中國大陸	98.10.05	ND
23	紅麴粉	未提供	98.10.06	ND
24	酒麴	中國大陸	98.10.16	3.9
25	酒麴	中國大陸	98.10.16	ND
26	酒麴	中國大陸	98.10.16	ND

「ND」表示未檢出

參考文獻

1. 尤新、潘子明。2001。紅麴中的黴菌毒素—Citrinin。307-313頁。機能性發酵製品。藝軒圖書出版社，台北。
2. 呂鋒洲。1970。第七章 橘黴素與青黴酸。81-85頁。黴菌毒素學。淑馨出版社，台北。
3. Hetherington, A. A. and Raistrick, H. 1931. Studies in the biochemistry of micro-organisms. XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, product from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. Phil. Trans. Roy. Soc. Ser. B, 220: 269-297.
4. Abramson, D., Usleber, E. and Marlbauer, E. 2001. Immunochemical method for citrinin. pp.195-204. In Trucksess, M. W. and Pohland, A. F.(ed.), Mycotoxin protocols. Humana Press. Totowa, NJ, U.S.A.
5. Stjepan, P., Maja, Š. and Ladislav, O. 2002. Citrininotoxicity of *Penicillium spp.* isolated from decaying apples. Braz. J. Microbiol. 33: 134-137.
6. Osborne, B. G. 1980. The occurrence of ochratoxin A in mouldy bread and retail flour. Food Cosmet. Toxicol. 18: 615-617.
7. Anderson, S. J. 1995. Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. J. Food Protect. 58: 426-429.
8. Monica, S., Roel, F. M. and Johanna, F. G. 1999. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. Mut. Res. 444: 7-16.
9. Krogh, P., Hald, B. and Pedersen, E. J. 1973. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic nephropathy. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 81: 689-695.
10. Krejci, M. E., Bretz, N. S. and Koechel, D. A. 1996. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium] plasma. Toxicology 106: 167-177.
11. 陳彥霖。2003。紅麴中桔黴素之生成及安全性。食品工業，35(3): 30-37。
12. Ciegler, A., Vesonder, R. F. and Jackson, L. K. 1977. Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1004-1006.
13. Bhatnagar, D., Lillehoj, E. B. and Arora, D. K. 1992. Handbook of applied mycology, vol.

5. Mycotoxins in ecological systems. Marcel Dekker, Inc. NY, U.S.A.
14. Blanc, P. J., Loret, M. O. and Goma, G. 1995. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol. Lett.* 17: 291-294.
15. Trivedi, A. B., Dol, E. and Kitabatake, N. 1993. Toxic compounds formed on prolonged heating of citrinin under watery condition. *J. Food Sci.* 58: 229-232.
16. Bailly, J. D., Le Bars-Bailly, S., Benard, G. and Guerre, P. 2002. Citrinin production and stability in cheese. *J. Food Prot.* 5: 1317-1321.
17. Santos, I. M., Abrunhosa, L., Venâncio, A. and Lima, N. 2002. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 272-275.
18. Lepom, P. 1986. Simultaneous determination of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A in wheat and barley by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 355: 335-339.
19. Franco, C. M., Fente, C. A., Vázquez, B., Cepeda, A., Lallaoui, L., Prognon, P. and Mahuzier, G. 1996. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *J. Chromatogr. A.* 723: 69-75.
20. Ma, J., Li, Y., Ye, Q., Li, J., Hue, Y. J., Ju, D. and Zhang, D. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5220-5225.
21. Vázquez, B. I., Fente, C., Franco, C. M., Vázquez, M. J. and Cepeda, A. 2001. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 157-163.
22. 日本厚生省。食品添加物公定書。1999。第七版，D-1238~1241頁。東京。

Survey on Citrinin in Commercial Monascus Products

CHIA-DING LIAO, PO-CHUAN LIN, HSU-YANG LIN, LIH-CHING CHIUEH
AND DANIEL YANG-CHIH SHIH

Division of Research and Analysis

ABSTRACT

More and more people are taking Monascus products so that we need to pay attention to the citrinin contamination. The determination of citrinin in Monascus products was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector for quantification. Citrinin was extracted with methanol and heated at 70°C. Average recoveries of citrinin from various Monascus samples spiked at levels of 0.05 to 10 ppm ranged from 82.5 to 111.9%. The quantification limit of citrinin was 50 ppb. A survey of citrinin in commercial Monascus products in Taiwan was conducted in 2009. Citrinin contamination was found in 16 samples among 48 Monascus products.

Key words: Monascus, citrinin, high performance liquid chromatography