



中藥黃麴毒素檢驗方法建立 及應注意事項



TFDA研究檢驗組食品生物檢驗科 廖家鼎

99.11.09



大 綱

- 黃麴毒素之簡介
- 黃麴毒素之檢驗方法
- 本局歷年來黃麴毒素之調查結果
- TFDA審查現況與藥廠送審之注意事項

新聞事件

2010-10-25 TVBS



衛生署抽驗越南進口的花生糖，結果3個月內，連續3批越南花生糖，含有黃麴毒素，最近一批甚至超標16倍，長期大量食用會傷肝腎，嚴重的話甚至會導致肝癌；衛生署宣布，越南進口的花生，從原先只抽驗5%，增加到100%逐批檢驗，而抽檢不合格的這批，已經在邊境被攔了下來，至於有沒有其他批貨流入市面，會加強抽驗。

這一袋，就是衛生署抽驗出含有黃麴毒素的越南花生糖，5千多公斤的貨，在越南邊界攔檢之後，發現黃麴毒素的含量高達243ppb，比法定值高出了16倍，8月還有一批貨也不合格，花生同樣被驗出，含有傷肝腎黃麴毒素，含量78ppb，也超標5.2倍。



- 台北捷運華捷變電所毒氣外洩案 調查推論獲支持
國際權威期刊：極可能光氣毒災
- 高鐵又出軌 行控中心凸槌
- 收費員工程師上下班 騎機車走國道
- 遠航空中接近 排除亂流因素
- 藥價黑洞案 檢方追追追／健保局任憑藥價被墊高
- 文宣當垃圾 健保局字打嘴巴
- 境外移入 曲弓熱首例現蹤
- 中藥黃麴毒素 超標要罰
- 邵曉鈴 持續好轉
- 青少年文庫 多元呈現台灣史
- 921地震研究 上Nature期刊
- 杜正勝：民國一百年 教官退出大學
- 青輔會被質疑亂花錢
- 照片血淋淋 社團抗議腥蘋果



中藥黃麴毒素 超標要罰

最重罰三十萬元

〔記者胡清暉／台北報導〕保存不當的中藥材可能含有致癌的黃麴毒素！衛生署中醫藥委員會首度公告中藥材的黃麴毒素限量標準，第一波針對紅棗、黃耆等十四種較易長霉的中藥材，含量不得超過十五ppb（十億分之一），違者可依藥事法處六萬元以上卅萬元以下罰鍰。

黃麴毒素（aflatoxins）是多種密切相關的黴菌（主要是黃麴黴菌）產生的二次性有毒代謝物，最喜愛孳生在花生、米、玉米、豆類、麥類等高碳水化合物農作物上，以及部分含水、含糖量較高的中藥材。

黃麴毒素耐高溫，含黃麴毒素的食物或中藥材，即使經高溫煮熟，仍無法殺菌，一旦誤食了大量被黃麴毒素污染的食物，輕者可能會嘔吐、腹痛，嚴重者可能導致急性肝中毒，甚至死亡。

衛生署中醫藥委員會主委林宜信指出，黃麴毒素經常是肝癌、胃癌的禍源，衛生署決定明訂中藥材的黃麴毒素限量，未來持續進行抽檢，並逐步增列其他中藥材。

中藥發霉就有毒

林宜信強調，衛生署會加強規範進口中藥材的包裝，避免運送過程中遭到污染，同時加強中藥材的標示。他並建議，中藥材應儘量存放在低溫、乾燥處，一旦發現藥材發霉，應立即丟棄。

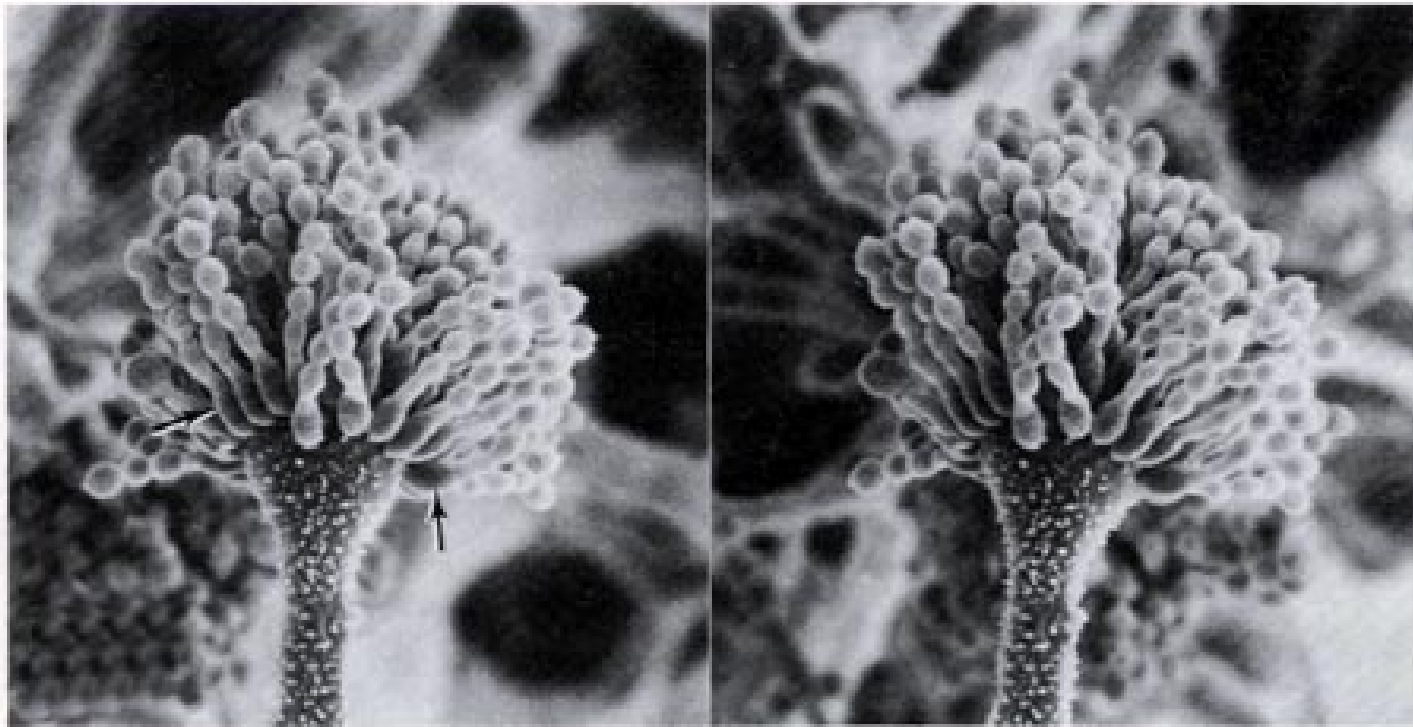


黃麴毒素(aflatoxin)

- 一群構造類似之黴菌次級代謝物，由 *Aspergillus* 及 *Penicillium* 屬產生，以 *Aspergillus flavus* 和 *Aspergillus parasiticus* 為主
- 1960年“Turkey X disease”造成英國十多萬隻火雞死亡事件，後續研究發現是由巴西進口飼料中黃麴毒素所引起



Aspergillus flavus



(www.aflatoxin.info)

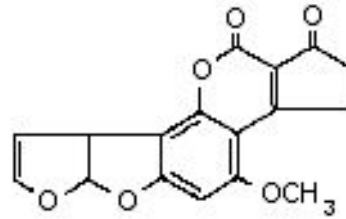
遭受黃麴毒素污染之玉米



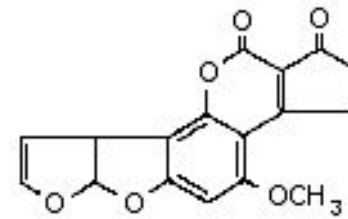
(<http://www.ncga.com>, <http://aes.missouri.edu>)

黃麴毒素之常見種類及其化學結構

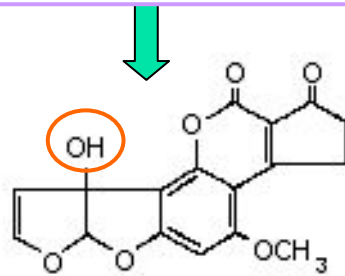
總黃麴毒素包括
Aflatoxin B₁、B₂、
G₁、G₂之總和



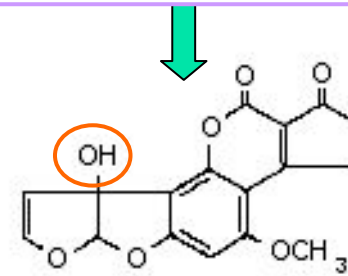
AFLATOXIN B₁



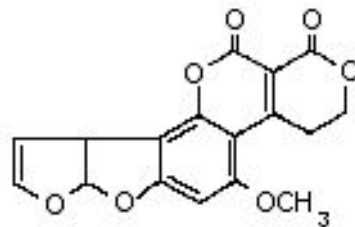
AFLATOXIN B₂



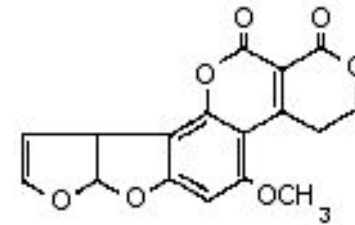
AFLATOXIN M₁



AFLATOXIN M₂



AFLATOXIN G₁



AFLATOXIN G₂



產生黃麴毒素之條件

- 將黃麴菌接種於培養基中觀察生長及產毒情形，發現最適生長溫度為 $33\sim 35^{\circ}\text{C}$ 、水活性(a_w)為0.99；毒素則在 $24\sim 28^{\circ}\text{C}$ 、水活性0.93~0.98下易生成。
- 台灣地處亞熱帶，高溫高濕環境有利黃麴菌繁殖，隨風或昆蟲散播，落於土壤中污染農作物。
- 採收、運送、貯存、加工、銷售等過程，若環境過於高溫潮濕，皆有可能產生。
- 無色無味，耐高溫。

黃麴毒素之毒性

- 動物試驗中，黃麴毒素造成生長遲緩、生殖力下降等症狀。半數致死劑量 LD_{50} 為0.5~10 mg/kg BW。
 - 乳牛吃了含黃麴毒素 B_1 之飼料，其分泌之乳汁可能含有黃麴毒素 M_1 。
 - 污染之農作物 → 家禽(畜) → 人
-



黃麴毒素之毒性

- 黃麴毒素 B₁ 經代謝為毒性極強之黃麴毒素 2,3-epoxide，再與核酸和蛋白質結合，並干擾 DNA 的轉錄、轉譯過程。可導致突變、致畸胎與致癌性。
- 主要的症狀：嘔吐、腹痛、肺水腫、痙攣、昏迷、免疫力下降、慢性肝炎、猛爆性肝炎、肝癌。有流行病學研究指出，受到黃麴毒素污染嚴重的地區，人們通常有較高的肝癌發生率。
- WHO 所屬之國際癌症研究中心已於 1987 年確認黃麴毒素為一級致癌物。目前尚未訂每日容許攝取量。

黃麴毒素之相對致癌性

黃麴毒素	相對致癌性
B1	100
M1	3
G1	3
B2	0.2
G2	0.1

毒性： $B_1 > M_1 = G_1 > B_2 > G_2$



常見遭受黃麴毒素污染之食材

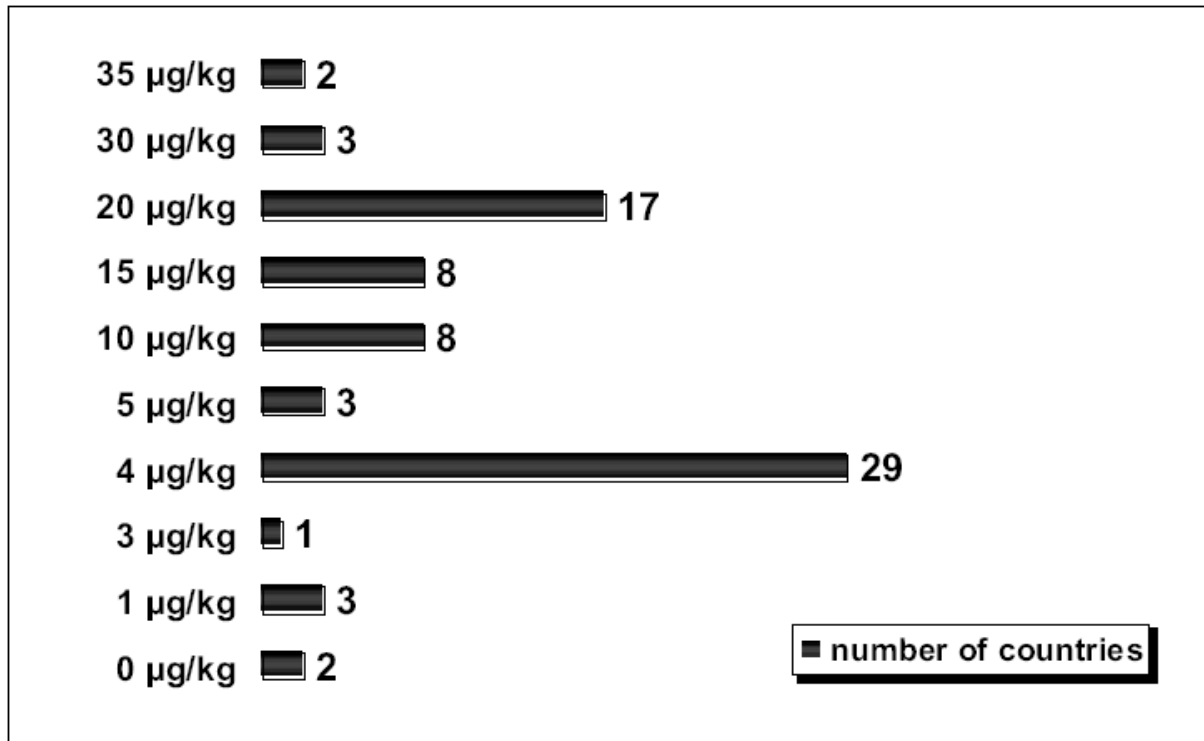
- 穀類：玉米、高粱、小麥、稻米
- 種子：花生、葵花籽、棉花籽
- 香料：辣椒、黑胡椒、芫荽、薑黃
- 堅果：杏仁、開心果、胡桃
- 乳品：鮮乳、乳粉
- 其他：長徽之中藥材

食品中黃麴毒素限量標準

82.1.4.衛署食字第8189322號公告

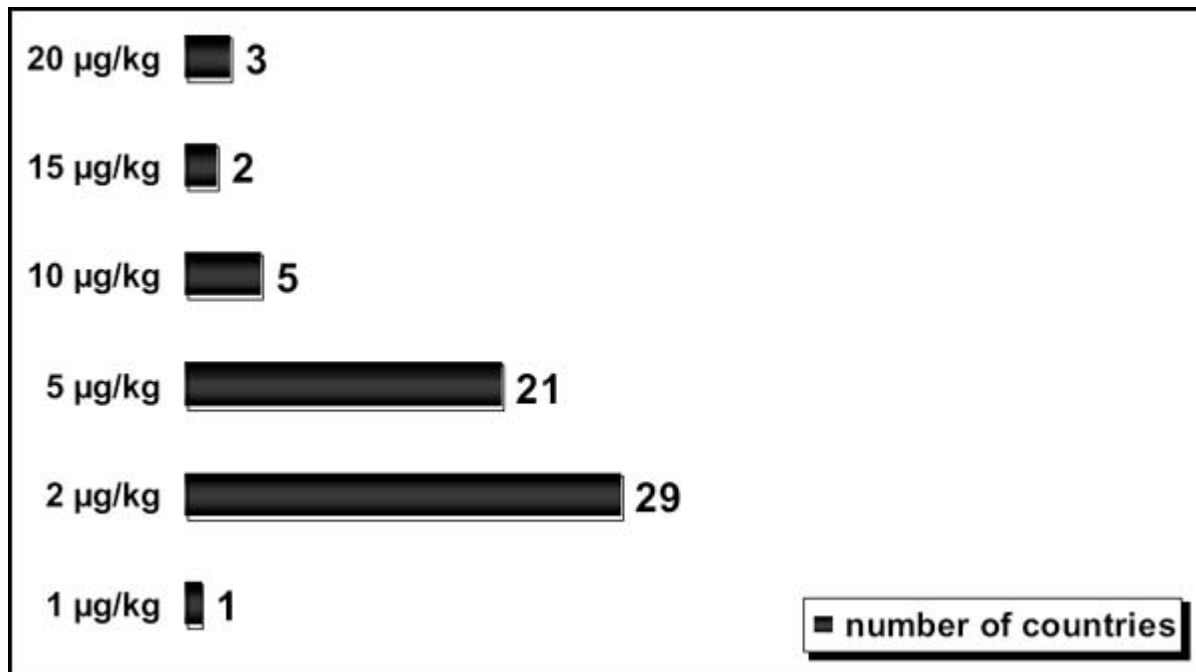
食品種類	總黃麴毒素限量（包括Aflatoxin B1，B2，G1，G2）
花生、玉米	15 ppb 以下
米、高粱、豆類、麥類 及堅果類	10 ppb 以下
食用油脂	10 ppb 以下
其他食品	10 ppb 以下
嬰兒食品	不得檢出
鮮乳	0.5 ppb以下（以M1計）
乳粉	5.0 ppb以下（以M1計）

全球制定食品中總黃麴毒素 限量標準之國家數目



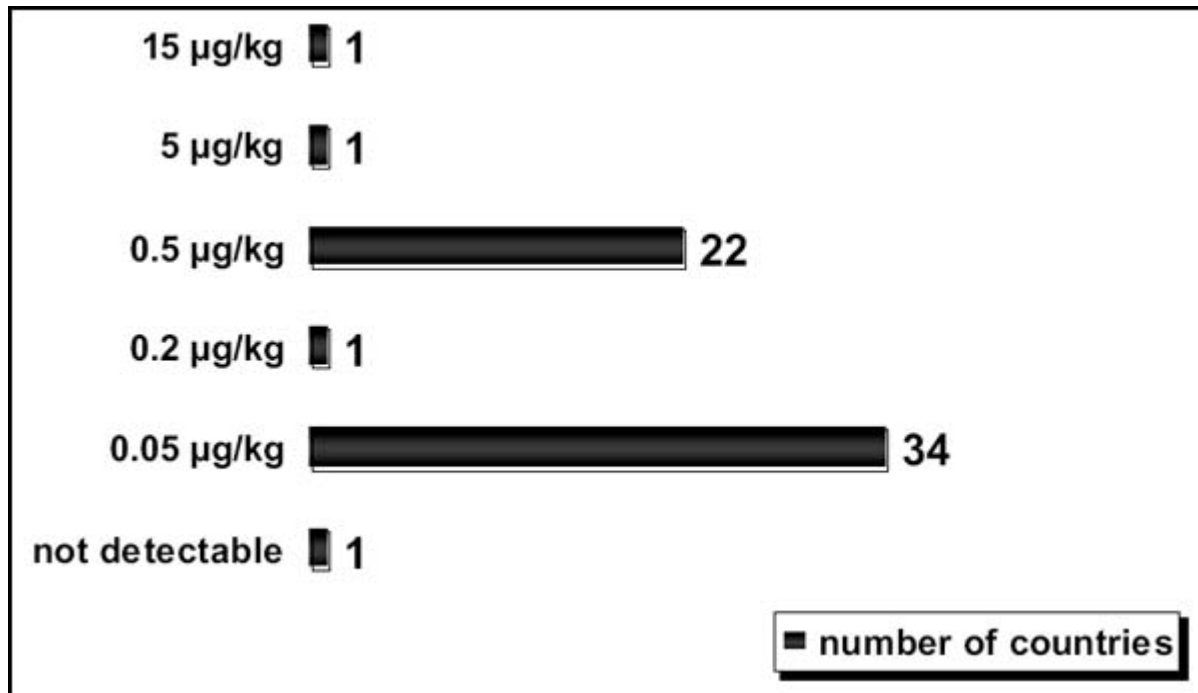
(FAO, 2003)

全球制定食品中黃麴毒素B₁ 限量標準之國家數目



(FAO, 2003)

全球制定牛奶中黃麴毒素M₁ 限量標準之國家數目



(FAO, 2003)



主要國家訂定食品中黃麴毒素 之限量標準

	總黃麴毒素 (ppb)	黃麴毒素B1 (ppb)
美國	20	
歐盟	4	2
日本	10	
中國	20	5

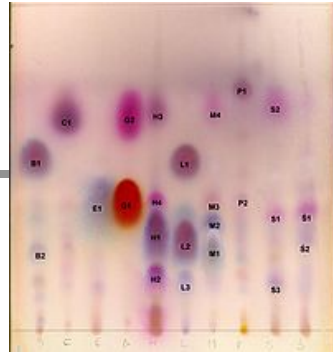
中藥材中黃麴毒素限量標準(95.11)

有害物質	限量	適用範圍
黃麴毒素 (Aflatoxin)	15 ppb	八角茴香、紅棗、大腹皮、女貞子、山楂、山茱萸、枸杞子、胡椒、麴類、小茴香、延胡索、橘皮、黃耆、蓮子 (共14品項)

黃麴毒素分析檢驗工具



ELISA Kit (免疫酵素連結法)



TLC (薄層層析)



螢光判讀機



HPLC (高效液相層析)



LC/MS/MS (液相層析串聯質譜)



黃麴毒素檢驗方法

- 酵素聯結免疫分析法
(Enzyme Linked Immunosorbent Assay,
ELISA)
- 化學分析法

ELISA原理

- Mycotoxin-enzyme conjugate
- Mycotoxin
- Y Anti-mycotoxin antibody
- S Substrate

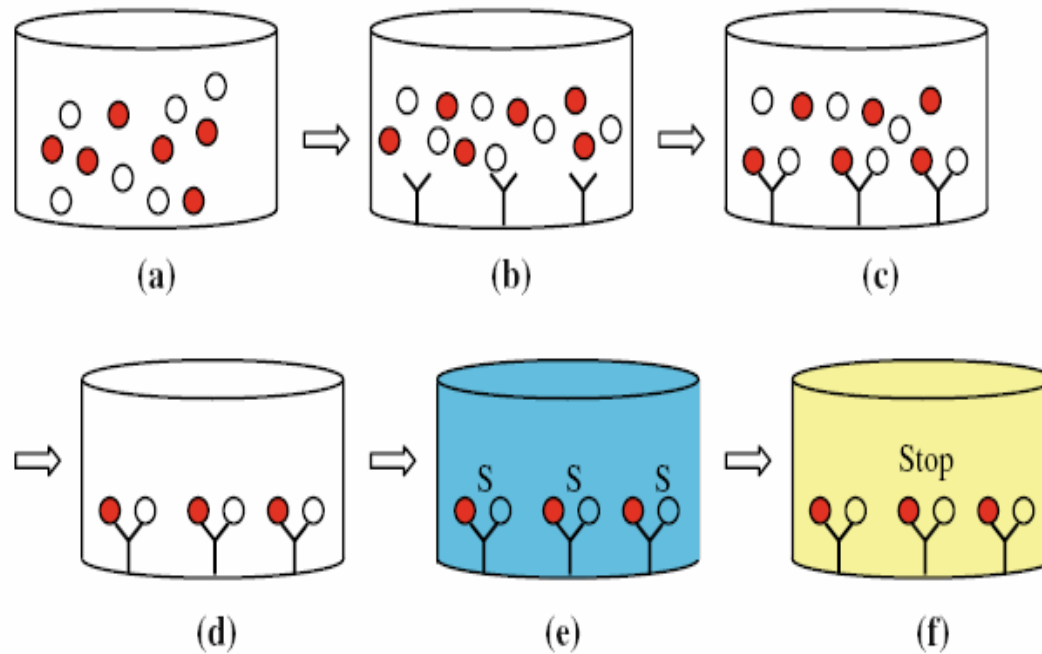
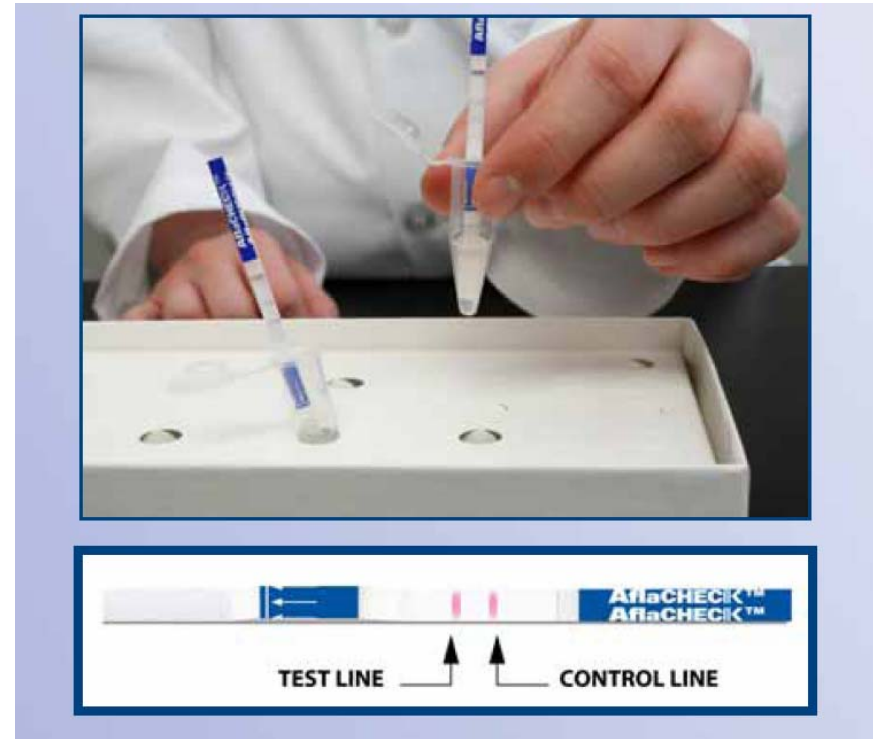


Figure 1. Principle of competitive ELISA for mycotoxin analysis. (a) Sample mixed with conjugate; (b) mixed content added to antibody coated well; (c) mycotoxin binds to antibody in the 1st incubation; (d) unbound materials are rinsed away in the washing step; (e) substrate is added to develop color; (f) stop solution is added to stop the reaction.

免疫酵素聯結反應

- 使用對黃麴毒素具專一性之抗體
- 操作簡單，價格低廉，可作為篩選工具(screening)
- 過去產品需搭配Elisa Reader，測定固定波長下之吸光值，比對標準曲線後定量黃麴毒素濃度。新產品(快速檢測試紙)僅需3分鐘即可得知是否大於10 ppb / 20 ppb



(www.vicam.com)

化學分析法

取樣(Sampling)



萃取



淨化



定性及定量分析



取樣之概念

- 同一批樣品區分為幾個小區域
- 在各小區域取一定量之樣品
- 將不同單點所取樣品混合成「批取樣品」
- 批取樣品分樣送至檢驗室
- 檢驗室樣品先予細切、磨粉並混勻
- 再分為檢驗用樣品及儲存樣品



萃取與淨化

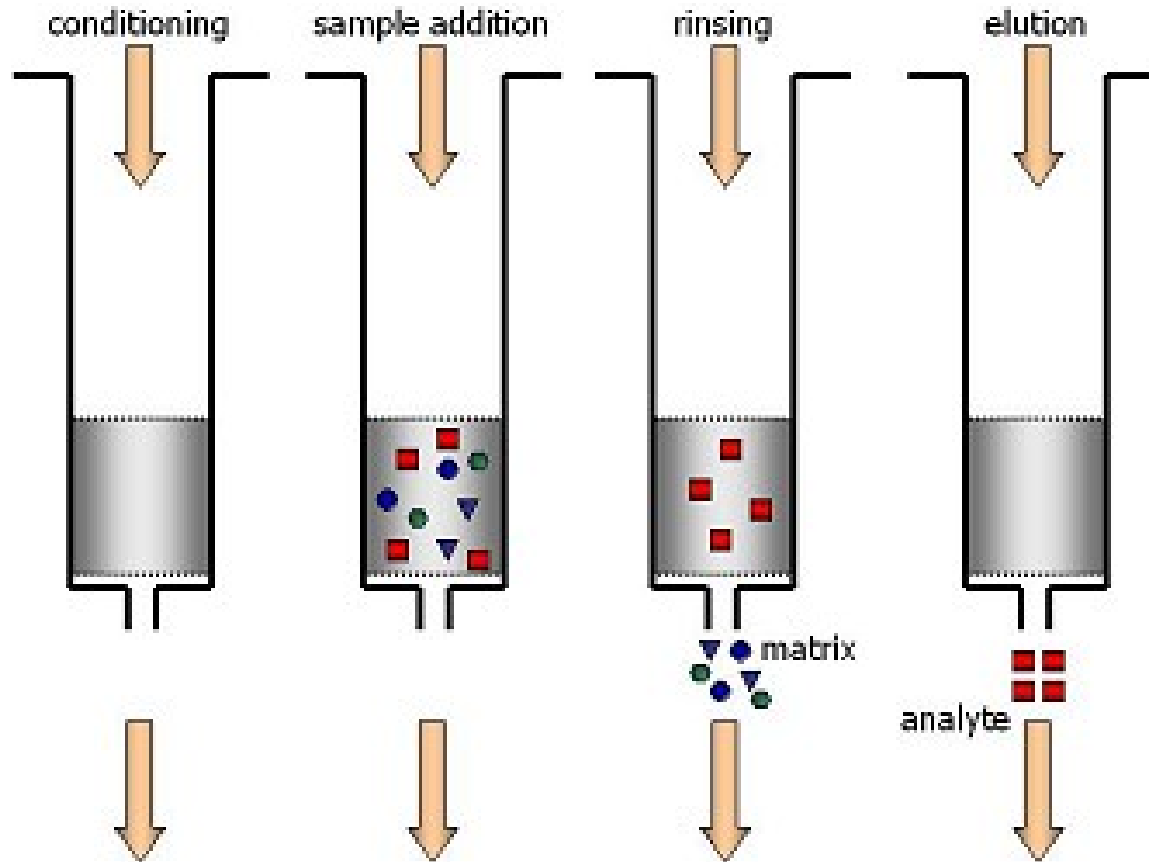
➤ 萃取 (Extraction)

- 以甲醇/水混合液萃取

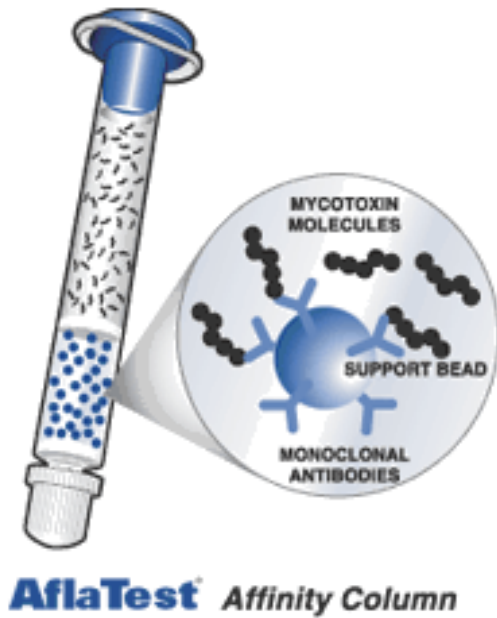
➤ 淨化(Clean up) :

- 固相萃取(Soild-phase extraction, SPE)
- 免疫親和性管柱(Immunoaffinity column, IAC)

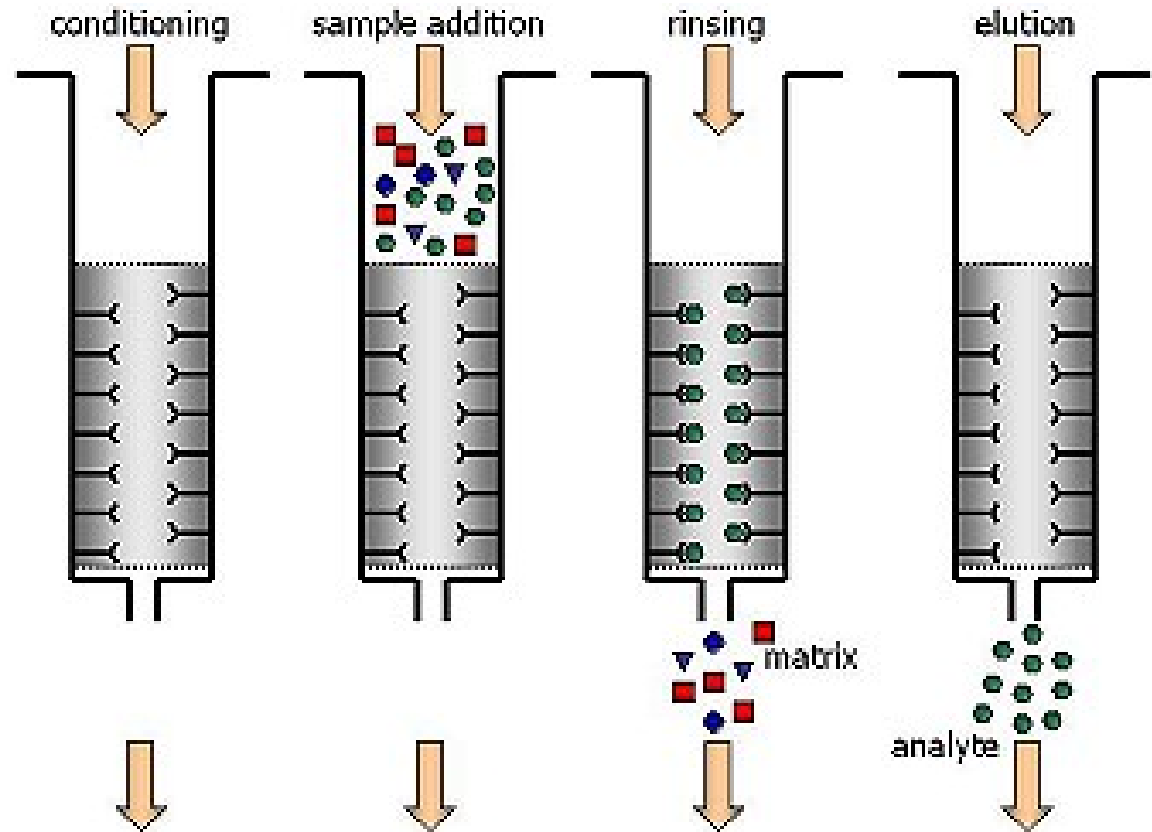
SPE原理



IAC原理



(AOAC official
method 991.31)



(European Mycotoxin Awareness Network)



定性及定量分析

- 螢光判讀法(Fluorometer)
- 高效液相層析法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
- 液相層析質譜法(LC-MS)



螢光判讀法

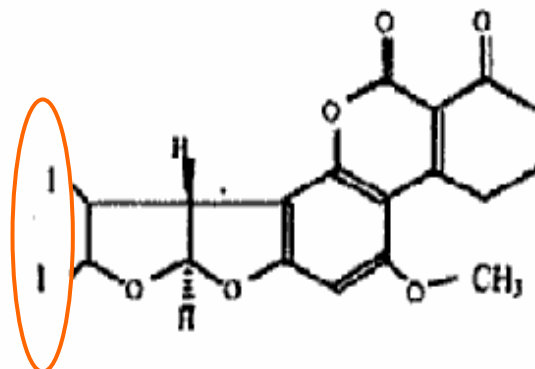
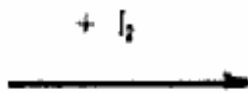
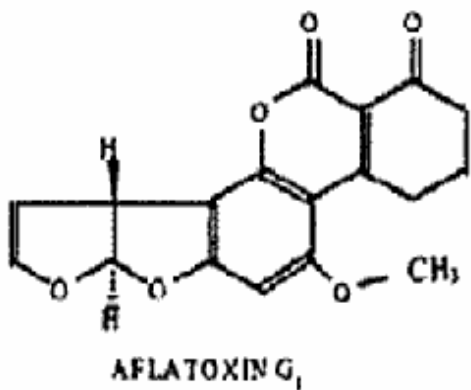
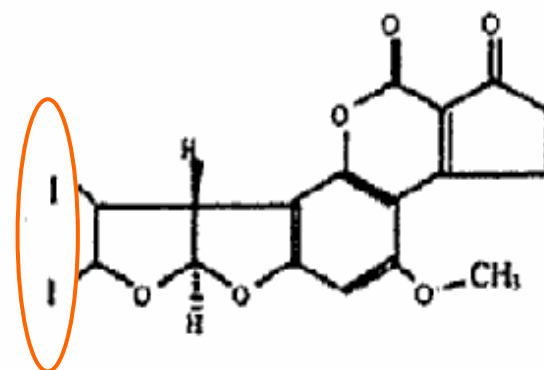
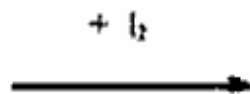
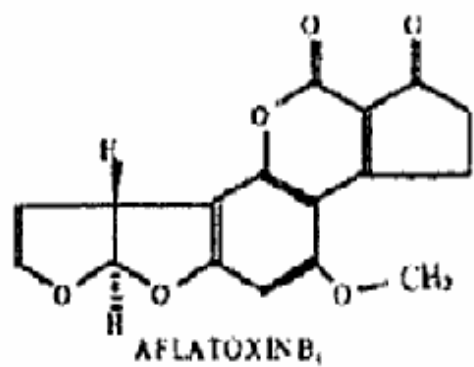
- 設備簡單，操作方便
- 偵測黃麴毒素總量
- 可作為檢體之篩檢 (screening) 試驗
- 檢出量超過衛生標準時，可以HPLC確認各種黃麴毒素之個別含量



高效液相層析法

- 管柱後衍生法(AOAC及CNS)
 - 使用C₁₈管柱分離毒素，再以碘衍生生化反應裝置進行衍生生化反應，增加螢光吸收值
 - 可偵測個別黃麴毒素含量
 - 最低檢出量：B₁、B₂、G₁、G₂之偵測極限分別為0.2、0.2、0.3、0.3 ppb

碘衍生化反應原理



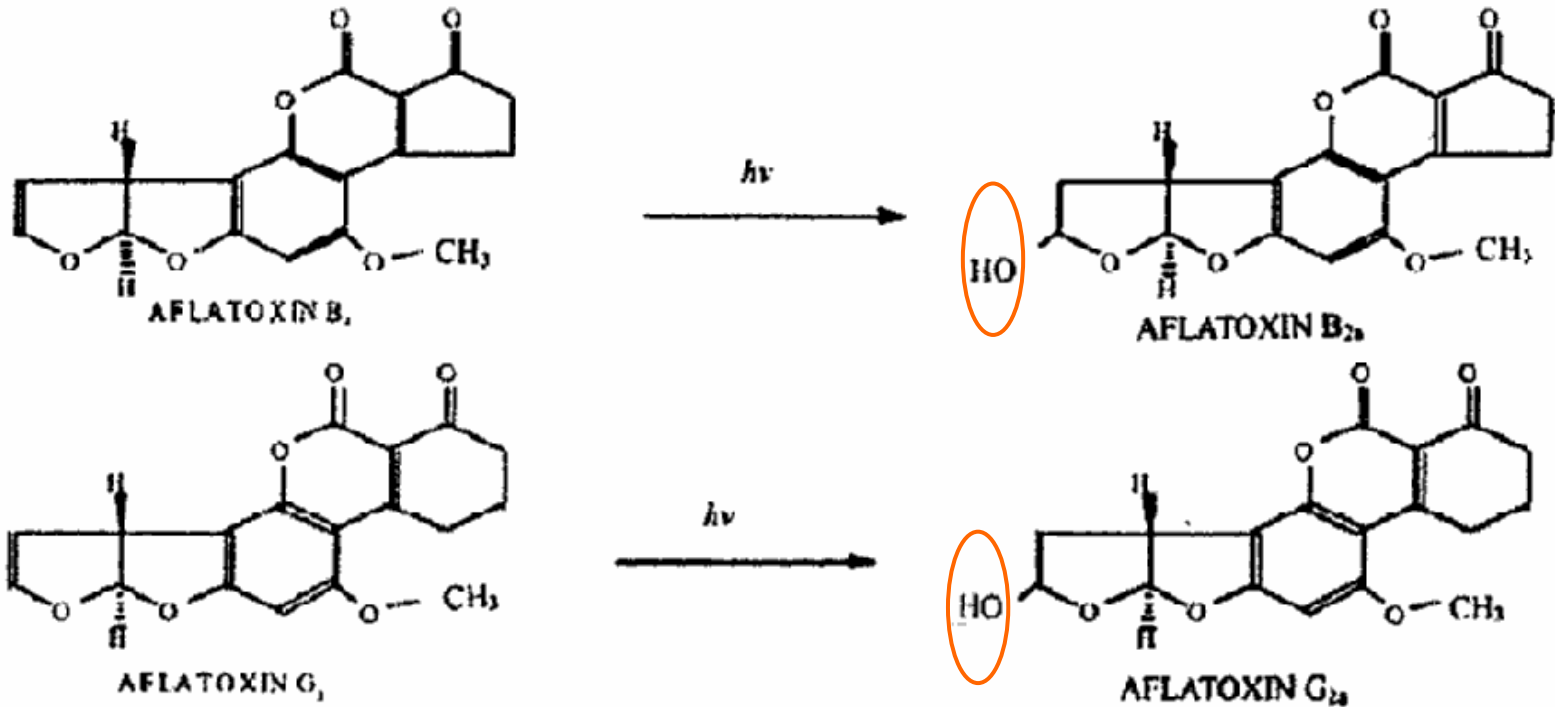


高效液相層析法-2

➤ 管柱後衍生法

- 使用C₁₈管柱分離毒素，再以光化學反應裝置進行衍生化反應，增加螢光吸收值
- 可偵測個別黃麴毒素含量
- 最低檢出量：B₁、B₂、G₁、G₂之偵測極限分別為0.2、0.1、0.2、0.1 ppb

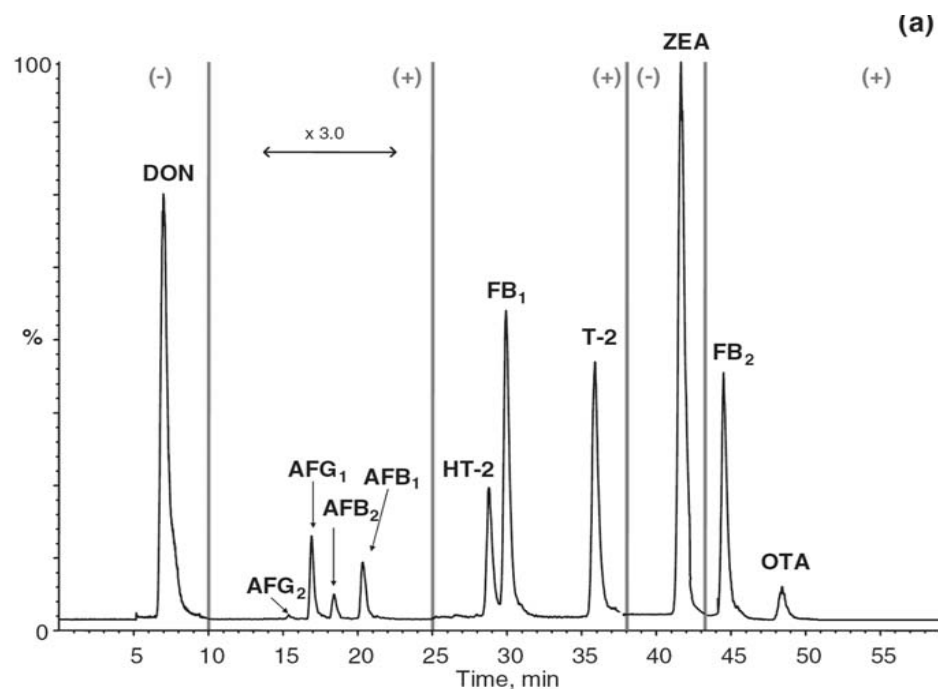
光化學衍生化反應原理



•美國AURA公司製造之KRC 25-25光化學反應器，構造係將長25公尺之PTFE材質細管(1/16 inch OD × 0.25 mm ID)編織成長方形並固定於具254 nm紫外線照射之不透光燈盒內，使AFB₁、AFG₁流經此管中轉變為AFB_{2a}、AFG_{2a}。

液相層析質譜法

- 在高效液相層析儀後方接上質譜儀
- 能快速同步分析多種毒素
- 偵測極限低
- 儀器設備昂貴，須具經驗人員操作



(Lattanzio *et al.*, 2007)



國內目前應用之方法

- 中華民國國家標準方法CNS4090，類號N6097方法(衛署授食字第0900002652號指定為公告方法)。(螢光判讀法及HPLC碘衍生法)

- 99年10月15日署授食字第0991903564號(HPLC光化學衍生法)

www.fda.gov.tw / 業務專區 / 研究檢驗 / 公告檢驗方法

99 年 10 月 15 日署授食字第 0991903564 號公告修正

98 年 11 月 16 日署授食字第 0981800468 號公告

食品中黴菌毒素檢驗方法－黃麴毒素之檢驗 Draft Method of Test for Mycotoxin in Foods – Test of Aflatoxins

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於花生、玉米、其他穀類及其製品中黃麴毒素 B₁、B₂、G₁ 及 G₂ 之檢驗。
2. 檢驗方法：高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。

2.1 裝置：

2.1.1 高效液相層析儀：

2.1.1.1 檢出器：螢光檢出器 (fluorescence detector)。

2.1.1.2 層析管：Cosmosil 5C18-AR, 5 μm, 內徑 4.6 mm × 25 cm, 或同級品。

2.1.1.3 光化學反應器：Knitted reactor coils (KRC) 25-25, 或同級品。

2.1.2 均質機 (Homogenizer)：轉速可達 15000 rpm 以上並適用有機溶劑者。

2.1.3 粉碎機 (Grinder)。



檢液製備-I

檢體磨碎混勻

↓ 稱取25 g，置於不銹鋼杯中

↓ 加氯化鈉 5 g

↓ 加 60% 甲醇/水 125 mL

↓ 以 15,000 rpm 均質 2 分鐘後，用 Whatman 1 號濾紙過濾

↓ 取濾液 20 mL

↓ 加去離子水 20 mL

↓ 用玻璃纖維濾紙作細過濾



檢液製備-II

- ↓ 取濾液 10 mL，以 1 滴/秒之流速分別通過免疫親和管
 - ↓ 以去離子水 10 mL 清洗免疫親和管2次
 - ↓ 取 LC 級甲醇 1 mL 以 1 滴/秒流速通過免疫親和管
 - ↓ 收集純化後之檢液於玻璃試管
 - ↓ 加去離子水定量至2 mL
 - ↓ HPLC分析
- 加溴發展液，
螢光判讀分析



螢光判讀

- 校正螢光判讀機：使用Vicam校正用標準液套組。
- 黃麴毒素總量之測定：將檢液與等體積之溴發展液(當日配製並儲存於褐色瓶中之0.003% 溴水)混合後，置於螢光判讀機中判讀結果。僅需60秒。



層析條件

- 標準液及檢液注入量：50 μ L
- 分析管柱：4.6 mm \times 25 cm，5 μ m，Cosmosil 5C18-AR 管柱
- 移動相：45 % 甲醇水溶液，流速：1 mL / min
- 管柱後衍生系統：0.5 mm \times 610 cm 鐵弗龍管於 70 $^{\circ}$ C 中保溫反應
- 後衍生化溶液：0.05% 碘溶液，流速：0.3 mL / min
- 螢光偵測器：激發光 360 nm 發射光 440 nm



黃麴毒素標準液製備

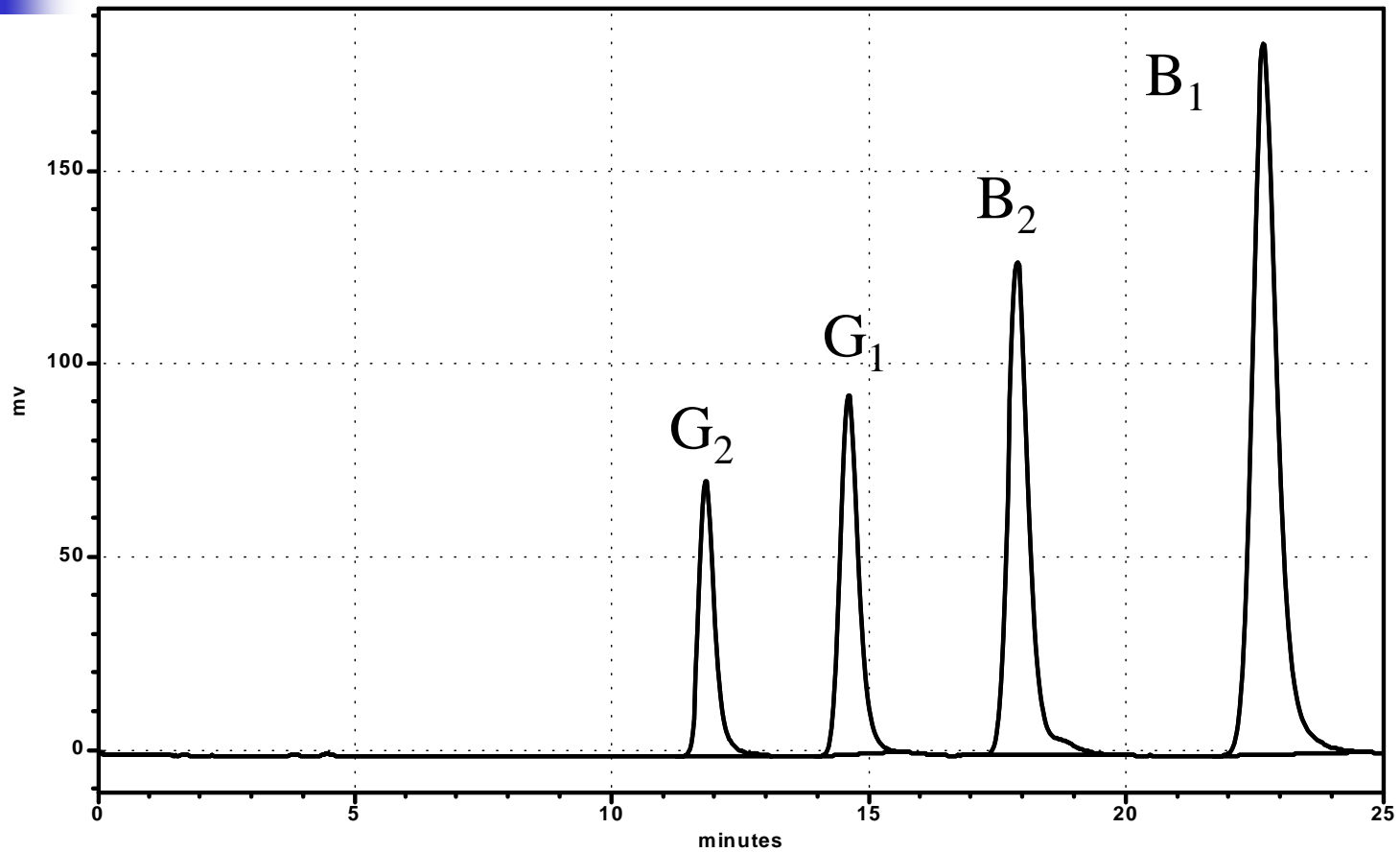
- 原液:美國 SUPELCO 公司 Aflatoxin Mix Kit-M
- 原液濃度 AFB_1 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 AFB_2 $0.3 \mu\text{g/mL}$ 、 AFG_1 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 AFG_2 $0.3 \mu\text{g/mL}$ ，製備出各種濃度之黃麴毒素標準液，並製作標準曲線供定量分析用



計算公式

- $W = 25 \text{ g} \times (20 \text{ mL} / 125 \text{ mL}) \times (10 \text{ mL} / 40 \text{ mL}) = 1 \text{ g}$
- 檢體中黃麴毒素含量 C' (ppb) = $C \times T_v / W = C \times 2$
- W ：最終定容檢液所含檢體重 (1 g)
- T_v ：最終定容檢液體積 (2 mL)
- C ：檢液之黃麴毒素濃度 (ng/mL)

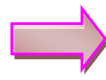
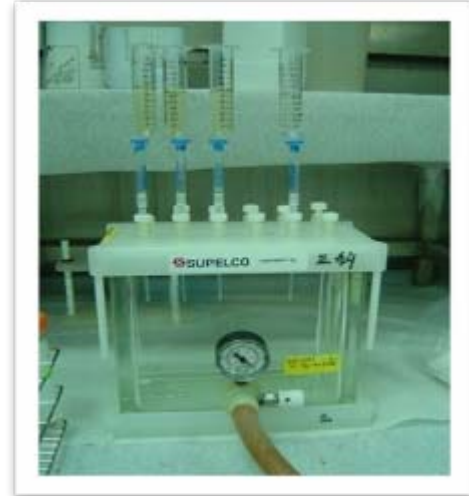
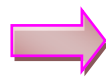
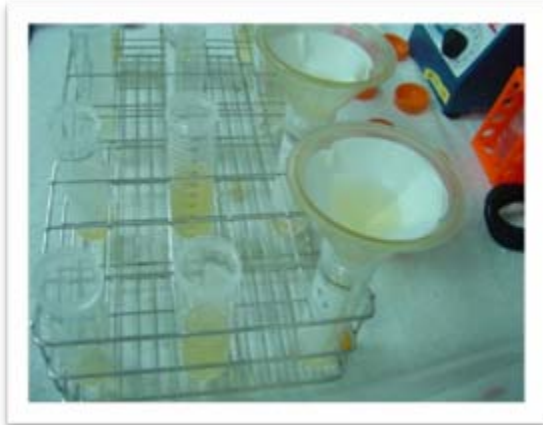
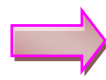
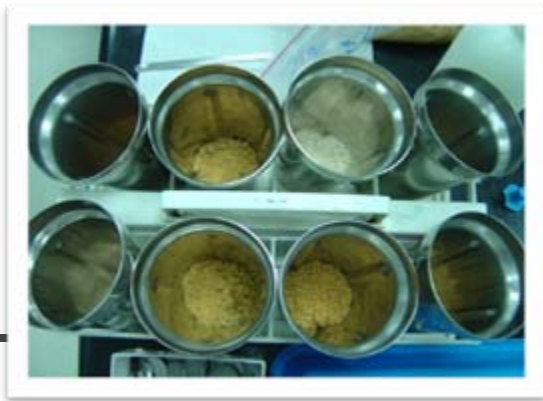
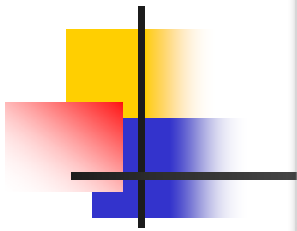
高效液相層析圖譜





實驗操作注意事項

- 穿戴實驗衣、手套、口罩在hood內操作
- 檢出黃麴毒素之樣品需先以鹼液處理後丟棄之。可隔夜浸泡10%漂白劑（含次氯酸鈉）



本局歷年來針對花生製品中 黃麴毒素之調查結果



抽驗年份 (民國)	件數	檢出件數 (%)	不合格件數 (%)
86	130	38 (29.2)	9 (6.9)
87	218	88 (40.4)	15 (6.9)
88	83	31 (37.3)	9 (10.8)
89	95	22 (23.2)	4 (4.2)
90	118	13 (11.0)	2 (1.7)
93	126	53 (42.0)	6 (4.8)
94	178	67 (37.6)	8 (4.5)
95	108	27 (25.0)	12 (11.1)
96	163	46 (28.2)	16 (9.8)
97	140	42 (30.0)	15 (10.7)
98	133	45 (33.8)	8 (6.0)
99	135	30 (22.2)	5 (3.7)
合計	1627	502 (30.9)	109 (6.7)

本局91~93年中藥材中黃麴毒素之調查結果

(黃耆、薏苡苳、延胡索、蓮子、山藥)

檢體來源：台灣各地區中藥廠及中藥店

年度	藥材名稱	檢出件數/總件數(%)	超出15 ppb件數/總件數(%)	檢出含量範圍(ppb)
91	黃耆	9/100 (9)	2/100 (2)	4.5~55.1
92	薏苡苳	11/100 (11)	1/100 (1)	1.3~13.0
93	延胡索	3/50 (6)	2/50 (4)	3.0~18.1
93	蓮子	1/50 (2)	1/50 (2)	62.3
93	山藥	0/50 (0)	0/50 (0)	

本局96年中藥材中黃麴毒素之調查結果

單位：ppb

檢體	黃麴毒素 B ₁	黃麴毒素 B ₂	黃麴毒素 G ₁	黃麴毒素 G ₂	總計
延胡索	0~256.54	0~6.01	0~1.96	0	0~258.66
神麴	0~6.69	0	0~6.30	0	0~12.99
女貞子	0	0	0	0	0
小茴香	0	0	0	0	0
山楂	0	0	0	0	0

檢體	限量標準 (ppm)	
	檢出件數/總件數(%)	超出公告限量件數(15 ppb)/總件數(%)
延胡索	11/20(55)	6/20(30)
神麴	1/20(5)	0/20(0)
女貞子	0/20(0)	0/20(0)
小茴香	0/20(0)	0/20(0)
山楂	0/20(0)	0/20(0)

本局97年中藥材中黃麴毒素之調查結果

藥材名稱	檢出黃麴毒素件數/ 總件數(%)	超出15 ppb限量件數/ 總件數(%)
延胡索	11/20 (55.0)	6/20 (30.0)
蓮子	7/20 (35.0)	7/20 (35.0)
橘皮	3/20 (15.0)	0/20 (0.0)
胡椒	1/20 (5.0)	0/20 (0.0)
神麴	1/20 (5.0)	0/20 (0.0)
女貞子	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
小茴香	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
山楂	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
紅棗	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
枸杞子	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
山茱萸	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
甘草	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
黃耆	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
八角茴香	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
大腹皮	0/20 (0.0)	0/20 (0.0)
合計	23/300 (7.7)	13/300 (4.3)

延胡索：2.3 ~ 258.6 ppb

蓮子：22.4 ~ 429.5 ppb

- 延胡索及蓮子之污染情形最嚴重，多為大陸進口。
- 檢出黃麴毒素B1最多，B2次之。G1及G2較少。



送TFDA審查時應準備之文件

- 檢驗方法SOP
- 檢驗結果報告
- 其他確效試驗資料



準備確效試驗資料之原因

- ▶ 現參考之黃麴毒素公告檢驗方法為「食品中黴菌毒素檢驗方法—黃麴毒素之檢驗」。免疫親合管柱商品之開發與檢驗方法設計皆以「食品」為主要基質，如花生與穀類。
- ▶ 此方法是否適用於中藥材中黃麴毒素之檢驗，須由藥廠提供相關確效資料，以證明此方法亦可進行該項中藥材(單方或濃縮製劑)中黃麴毒素之檢驗。



確效試驗資料—添加回收率試驗

- ▶ 需取空白的中藥檢體進行添加回收率試驗。如檢驗對象為延胡索，需以未檢出黃麴毒素之延胡索為空白檢體，添加黃麴毒素標準品，添加濃度以低、中、高濃度各一點為宜(如1、5及20 ppb)。標準品須在檢體萃取前添加，進行完整個前處理流程之後上機分析。

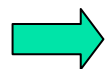
- ▶ 回收率(%)=
$$\frac{\text{上機分析後濃度}}{\text{標準品添加濃度}} \times 100\%$$

確效試驗資料—添加回收率試驗

標準品spike 1 ppb，如何做？

$$100 \text{ ng/g} \times 0.25 \text{ mL} = 25 \text{ ng}$$

$$1000 \text{ ng/g} \times 0.025 \text{ mL} = 25 \text{ ng}$$



$$25 \text{ ng} / 25 \text{ g} = 1 \text{ ppb}$$

標準品溶質重

取樣檢體重

※即將檢體粉末25g與NaCl 5g加入不銹鋼杯中，將1000 ng/g黃麴毒素B1標準品加入，再添加125 mL甲醇萃取溶液，進行均質與後續過濾、淨化等流程

標準品spike 5 ppb，如何做？



確效試驗資料—添加回收率試驗

- ▶ 添加回收率試驗結果，黃麴毒素B1、B2、G1及G2應分別計算，理想的回收率介於60~120%之間。
- ▶ 請附上標準品與檢體之層析圖譜至少各1張，標準品須註明濃度，圖譜上需有波峰面積數字，以供作回收率計算之證明。



確效試驗資料

- ▶ 若分析儀器不是使用公告方法中的HPLC，而是使用LC/MS/MS，請詳細列出LC/MS/MS分析條件。
- ▶ 檢驗方法SOP與檢驗結果報告中均應寫出該方法之檢出限量(detection limit)。黃麴毒素B1、B2、G1及G2之檢出限量總和應不可高於法規限量標準15 ppb之一半(7.5 ppb)。



常見問題

- 未進行添加回收率試驗
- 添加回收率試驗未用該中藥當作空白基質進行
- 添加回收率試驗中所添加之標準品濃度太高
- 添加回收率試驗中所添加標準品之時機不對
- 未註明檢出限量(如檢驗結果僅寫N.D.未檢出)
- 檢出限量太高
- 未附檢驗報告書
- 其他書面上疏失



Thank you for your attention!



保障你我健康 · 藥求安全 · 食在安心

02-2653-1461

cdliao@fda.gov.tw