

# 市售酵素免疫分析(ELISA)套組檢測 黃麴毒素之探討

董青蓉 傅幼敏

第五組

## 摘 要

由於傳統定量穀物中黃麴毒素(以下簡稱 AF)之高效液相層法(以下簡稱 HPLC 法),樣品前處理步驟繁複,且需使用大量溶劑,不但不經濟且對操作人員之健康亦可能有所危害,因此發展專一性、敏感性、正確性均高且操作簡單、安全之檢驗方法一直是研究人員努力的方向,目前利用酵素免疫分析法(以下簡稱 ELISA 法)似可滿足上述需求<sup>1-5</sup>,且已有許多不同品牌之檢測套組(Kit)上市;本試驗即以市售三種品牌套組,其商品各分別為 Agri-chek, Chemafla 及 Biotech(詳如表一)檢測已添加5-100 PPb AFB<sub>1</sub>之花生,並與衛生署公告之 AF 檢驗方法<sup>6</sup>(即 HPLC 法)比較靈敏度,再現性及檢驗成本等以評估市售 ELISA 檢測套組應用於例行性檢驗之可行性。

茲將試驗結果(摘要如表二)歸納如下:

- 一、由於 ELISA 方法之專一性及靈敏度較佳,萃取步驟可予簡化,除 Biotech 套組外,其餘二種套組只需以特定溶液萃取後再稀釋即可分析,故可同時處理大量檢體,通常每人每4小時約可萃取30~40件檢體,如以公告方法處理檢體,於相同狀況下只能萃取2~3件檢體。
- 二、ELISA 套組藉着96孔(well)之微量滴定板(microtitration plate),可於45分鐘內分析30~40件檢液(以二重複計),平均1分鐘可完成一件,公告方法則需將檢液逐件注入儀器內分析,每次分析約需25分鐘,如以二重複計,每件檢液需50分鐘方可完成,相當費時。故分析大量檢體時,用

ELISA 檢測套組當可提高檢驗效率。

- 三、就靈敏度而言,HPLC 法係以現有設備即 Shimadzu LC-6A 之高效液相層析儀測定,其對 AFB<sub>1</sub>之最低檢測量為30ng/ml,而三種套組 AgriChek, Chemafla 及 Biotech 則分別為0.03ng/ml, 0.05ng/ml 及1ng/ml 是公告方法之30~1000倍,因此,若以公告方法分析檢體時,萃取液經一連串淨化後尚需濃縮數百倍方可進行試驗,如以本試驗之套組,除 Biotech 之靈敏度較差外,其他二種套組靈敏度相當高,毒素之萃取液不但不需環縮,反而要稀釋10~20倍,以免萃取液中之甲醇濃度過高,干擾試驗結果。
- 四、本試驗三種套組所使用之抗體雖皆為 AFB<sub>1</sub>之抗血清或單株抗體,惟因各種 AF 之構造類似,故上述抗體易與其他 AF 產生交叉反應<sup>7,8</sup>,如 Biotech 與 AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及 M<sub>1</sub>皆會反應,而 Agri Chek 則會與 AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及 G<sub>1</sub>發生反應;因此當檢體中含有不只一種 AF 時,目前市售檢測 AF 之套組尚無法分辨 AF 之種類與各別含量,但能估算約略之總含量,故非常適合篩檢及半定量之用。
- 五、將不含 AF 之花生磨碎後添加5~100 ppb AFB<sub>1</sub>,再以試驗套組及 HPLC 法檢測,所得之回收率(詳如表三)顯示 HPLC 法回收率之高低較不受添加濃度之影響,皆保持於70~79%之間,AgriChek 及 Chemafla 二種套組之回收率隨着 AF 添

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)

表一 市售三種黃麴毒素(AF)檢測套組基本資料

AF套組名稱	生產國別	使用抗體類別	反應型態	操作過程	可反應之AAF種類	最低檢測量 (ng/ml)
AgriChek kit	美國	抗血清	競爭型	直接型	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub>	0.03
Chemafla kit	法國	單株抗體	競爭型	間接型	B <sub>1</sub>	0.05
Biotech kit	美國	單株抗體	競爭型	間接型	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , M <sub>1</sub>	1

表二 ELISA與HPLC方法之比較

	ELISA *	HPLC **
萃取	步驟簡單且不需淨化，平均每人每小時可萃取 10 件檢體	步驟繁複且需淨化，平均每人每小時僅可萃取 0.5 件檢體
分析 (二重複)	45 min可同時檢測 30 件檢體(1 件檢體只需 45 min)	50 min方可檢驗 1 件檢體
檢測限量	0.03 ng/ml	30 ng/ml
定量方式	不能對各種AF分別定量，但能估計總含量(半定量)	對各種AF皆能準確定量
回收率I (20 ppb AFB <sub>1</sub> )	98%	76%
再現性	較差	較佳
成本	較低	較高

\* 以AgriChek檢測套組為例 \*\* 公告方法

表三 酵素免疫分析法與公告方法之回收率比較

AFB <sub>1</sub> 添加量 (ppb)	回 收 率 (%)			
	AgriCheck	Chemafla	Biotech	HPLC*
5	59	65	46	70
10	72	73	74	76
20	98	80	57	76
100	104	108	68	79

\*公告方式

加量之增加而提高，理論上一般 ELISA 套組樣品前處理步驟簡單，不需淨化，回收率應可趨近100%，但低濃度(5-10 ppb)時，可能操作或抗體反應之誤差，回收率較不理想，另 Biotech 套組之回收率則不十分理想，推測原因係檢體前處理步驟較繁複且需以 C<sub>18</sub> Cartridge 清淨以致回收率較差。

六、再現性方面，一般而言 HPLC 法較 ELISA 法較佳，其原因係，ELISA 方法屬微量試驗，較易發生人為誤差，對同一檢液，檢測值之變異係數(C. V.)常達±10%，故在經費許可範圍內，每一檢液以三重複試驗(使用3個孔)較佳，至少則需二重複。另 ELISA 法係利用抗體抗原及酵素等反應，試驗結果受環境影響頗大，因此每次

### 市售酵素免疫分析(ELISA)套組檢測黃麴毒素之探討

皆需進行對照組或重新製作標準曲線。

七、成本方面，AF 檢測套組因需求量較大，可大量生產，故目前市售套組之售價較廉，分析一件檢體約需台幣200元(以兩重複試驗計)，HPLC 法所需人力，設備較昂，連同廢溶媒之處理，成本可能更高，目前國內檢驗單位對AF之檢驗收費即達1500~2000元/樣品。

綜上所陳，本試驗套組因具速，簡及可自動化分析等各項優點，非常適合大量檢體之篩檢用途，為保險起見，可於篩檢時以AFB<sub>1</sub> 0~5ppb之標準液做對照，凡是可能超過此量之檢體皆進一步以公告方法分析，如此已可篩掉許多檢體，當有助於工作效率之提高，另目前市售AF檢測套組雖多，但仍以檢測AF中最毒者AFB<sub>1</sub>為主，如檢體中只污染AFB<sub>1</sub>當可準確定量，如污染不只一種AF，則視使用套組所含抗體與其他AF交叉反應程度，故如需準確定量各種AF，ELISA 檢測套組尚無法取代目前公告方法。

#### 參考文獻

1. Pestka, J. J., P. K. Gaur, and F. S. Chu. 1980. Quantitation of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Aflatoxin G<sub>1</sub> Antibody by an Enzyme-linked Immunosorbent Microassay, Applied and Environmental Microbiology. 40, 1027-1031.
2. Chu, F. S. 1984. Immunoassays for Analysis of Mycotoxins. J. of Food Protection. 47, 562-569.
3. El-nakib, O., J. J. Pestka, and F. S. Chu. 1981. Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Corn, Wheat, and Peanut Butter by Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Solid Phase Radioimmunoassay. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 1077-1082.
4. Candlish, G. A. A., W. H. Stimson, and J. E. Smith. 1987. The Detection of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Peanut kernels, Peanut Butter and Maize using a Monoclonal Antibody based Enzyme Immunoassay. Food Microbiology. 4, 147-153.
5. Hans P. van Egmond, and Walter E. P. 1986. Determination of Mycotoxins. Pure and Appl. Chem. 58, 315-326.
6. 行政院衛生署. 1983食品中黃麴毒素之檢驗方法—衛署食字第445266號公告。
7. Chu, F. S., and I. Ueno. 1977. Production of Antibody against Aflatoxin B<sub>1</sub>, Apple. Environ. Microbiol. 33, 1125-1128.
8. Lawellin, D. W., D. W. Grant, and B. k. jOYCE. 1977. Enzyme-linked Immunosorbent Analysis for Aflatoxin B<sub>1</sub>. Apple. Environ. Microbiol. 34, 94-96.

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)

## DETECTION OF AFLATOXIN BY COMMERCIAL ELISA KITS

CHING-RONG DONG AND YOU-MIN FUH

DIVISION OF FOOD MICROBIOLOGY

### ABSTRACT

In order to investigate the effectiveness of commercial ELISA kits in detecting Aflatoxin, three were evaluated. The results showed that commercial ELISA kits, Used for estimating the content of AF, are generally more sensitive, rapid and

cost-effective, compared to the current method. However, these kits could not determine the kind and the level of each AF separately, so, they are very useful for screening and semiquantitative testing only.