

## 酒中黃麴毒素之檢驗

廖家鼎 高立均 林旭陽 闕麗卿 施養志

研究檢驗組

### 摘要

本研究以免疫親和管柱淨化檢液，續以高效液相層析儀(HPLC)搭配管柱後光化學反應器及螢光檢出器偵測黃麴毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 及 $G_2$ ，建立酒中黃麴毒素之檢驗方法。研究發現檢液在淨化前先將酒精濃度稀釋至5%，並將pH值調整至4~7之間，可提高回收率。添加0.1~10 ppb之黃麴毒素標準品於高粱類、米類、麥類、紅酒類或中藥材類等酒類製品，回收率可達72.0~98.9%之間。黃麴毒素 $B_1$ 、 $G_1$ 之方法偵測極限為0.2 ppb，黃麴毒素 $B_2$ 、 $G_2$ 之方法偵測極限為0.1 ppb。利用上述方法分析市售酒40件，皆未檢出黃麴毒素。

**關鍵詞：**酒、黃麴毒素、高效液相層析法

### 前言

黃麴毒素(aflatoxin, 簡稱AF)為目前最廣為人知的真菌毒素，係一群結構類似之黴菌二級代謝產物，其毒性強、具高穩定性及致癌性，於食品與飼料中曾發現者為黃麴毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 、 $M_1$ 及 $M_2$ 等，黃麴毒素 $M_1$ 及 $M_2$ 分別為黃麴毒素 $B_1$ 及 $B_2$ 之代謝物，其中最常檢出者為黃麴毒素 $B_1$ ，而毒性亦以黃麴毒素 $B_1$ 最強<sup>(1)</sup>。若以黃麴毒素 $B_1$ 餵食實驗動物，其LD<sub>50</sub>介於0.5~10 mg/kg b.w.<sup>(2)</sup>。根據調查<sup>(1)</sup>，產黃麴毒素之主要黴菌—黃黴菌*Aspergillus flavus*及*Aspergillus parasiticus*經常污染花生、棉子、玉米、米、麥及豆類等作物，而黃麴毒素的產生尚須仰賴適當的水分、溫度與通氣狀況，因此並非一旦遭受黃麴菌污染者，就必定含有黃麴毒素，但為安全起見，一旦發現受該菌污染的原料，均應剔除方可使用。影響黃麴毒素形成的兩個最重要因子為溫度與水分<sup>(1)</sup>，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33~35°C、水活性(a<sub>w</sub>)為0.99<sup>(3)</sup>；毒素形成最適溫度則介於24~28°C、水活性為

0.93~0.98，可以產生最多毒素之溫度為25°C、水活性為0.94<sup>(4)</sup>。

大量攝取被黃麴毒素污染的食物，會造成急性肝中毒(hepatotoxicity)，其主要病徵為嘔吐、腹痛、肺水腫、痙攣、昏迷、肝衰竭、心臟衰竭或腦水腫而造成死亡<sup>(5)</sup>。慢性黃麴毒素中毒為攝取低劑量的黃麴毒素，在動物試驗中之臨床症狀有飼料轉換情形變差及生長速度變慢等，若發生在人的身上，可能導致慢性肝炎或肝癌<sup>(5)</sup>。

除了花生以外，禾穀類、乾燥水果、中藥材及香辛料等，若產品儲存環境不良、製程控制不當，都可能受黃麴毒素之污染<sup>(6)</sup>。近年來國際間也發生過數起污染案例。於2003、2004、2005及2006年分別對由土耳其出口到歐盟的乾燥無花果，進行黃麴毒素之檢測，結果總黃麴毒素含量超過歐盟標準(4 ppb)者分別達2.6%、3.0%、5.1%及2.7%，黃麴毒素 $B_1$ 含量超過2 ppb者分別為0.6%、2.0%、4.0%及2.4%<sup>(7)</sup>。2007年的調查資料指出，由土耳其出口到歐盟的4917件乾燥無花果中，有32%檢出黃麴毒素，含量介於0.2-259.46 ppb之間，其中有9.8%的乾燥無花果超過歐盟限

量標準；在被污染的產品中，檢出黃麴毒素 $B_1$ 者最多(97%)，黃麴毒素 $G_1$ 次之(47%)，黃麴毒素 $B_2$ 與 $G_2$ 分別為24%與6%<sup>(8)</sup>。Tekinsen與Eken(2008)調查100件超高溫滅菌牛乳(UHT milk)與132件kashar起司中黃麴毒素 $M_1$ 之污染情況，結果發現牛乳與起司之檢出率分別為67.0%與82.6%，檢出量分別介於0.01~0.63 ppb與0.05~0.69 ppb之間，牛乳與起司污染量超過歐盟標準之比率分別為31%與27.6%<sup>(9)</sup>。一份尼加拉瓜市售紅辣椒之調查結果，在21件檢體中，黃麴毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 之檢出率分別為90%、33%、10%、38%，平均污染量分別為1.1 ppb、0.6 ppb、1.0 ppb及0.6 ppb<sup>(10)</sup>。義大利學者Cavaliere等人(2007)調查義大利市售玉米粉中黃麴毒素污染情形，結果在48件檢體中檢出15件，其中5件之黃麴毒素 $B_1$ 含量超過歐盟標準(2 ppb)，最高污染量為15.6 ppb<sup>(11)</sup>。

酒長久以來廣受世人喜愛。釀造酒之基質原料分為糖質原料及澱粉質原料，糖質原料之釀造酒是利用糖直接進行發酵(如葡萄酒及蘋果酒)，或澱粉以麥芽糖化後進行發酵(如啤酒)；澱粉質原料之釀造酒則是澱粉在以黴菌糖化的同時進行酒精發酵，如清酒、紹興酒等<sup>(12)</sup>。蒸餾酒是由釀造酒進行蒸餾而得，再製酒則是以釀造酒或蒸餾酒為原料，添加著色料、香味料、藥材以及其他調味料等混合調整而得之產品。許多東方國家處於高溫潮濕的環境中，其農產品易受黴菌污染，且東方人喜愛各類發酵食品，一般認為東方人的高肝病罹患率可能與黃麴毒素之污染有關。酒類製品若原料貯存環境不良，則容易受黴菌污染產生黃麴毒素。1988年Trinder<sup>(13)</sup>的研究顯示，南非啤酒製品中含有少量的黃麴毒素 $B_1$ 存在；Pogorzelski<sup>(14)</sup>等人的研究中，發現由受到黴菌污染的蘋果所釀造出的酒中可測出黃麴毒素；Lehtonen<sup>(15)</sup>等人的研究結果亦顯示某些酒類如西班牙馬拉加酒(Malaga wine)、阿爾及利亞紅酒、匈牙利紅酒、葡萄牙紅酒及南斯拉夫Cabernet酒中有黃麴毒素污染<sup>(16)</sup>。2008年日本「三笠食品」事件喧騰一時，中國大陸、越南輸往日本的下雜米驗出過量黃麴毒素及農藥，被三笠食品製成米酒與米果等食品，引起民眾高度關切。自古以來

酒廣為世人喜愛，故酒中是否有黃麴毒素的汙染值得深入研究。

目前衛生署公告之黃麴毒素檢驗方法，適用範圍為花生、玉米、其他穀類及其製品，並未包含酒類<sup>(17)</sup>。由於穀類是酒的主要製造原料，若保存不當亦有可能存在黃麴毒素污染之問題，加上國外發生過污染案例，因此建立酒中黃麴毒素檢驗方法有其重要性。擬以建立之方法檢驗市售酒類產品，可提供背景值資料供未來制定限量標準之參考。

## 材料與方法

### 一、檢體來源

本研究共計抽驗40件酒類檢體，包括高粱類5件、米類10件、麥類11件、紅酒類12件與中藥材類2件，於98年4~6月購自台北市超級市場、超商及量販店。

### 二、材料與試劑

- (一)黃麴毒素標準品( $AFB_1$ 、 $AFB_2$ 、 $AFG_1$ 、 $AFG_2$ )：為美國Supelco公司製造之Aflatoxin Mix Kit-M，標準品濃度 $AFB_1$ ：1  $\mu\text{g/mL}$ 、 $AFB_2$ ：0.3  $\mu\text{g/mL}$ 、 $AFG_1$ ：1  $\mu\text{g/mL}$ 、 $AFG_2$ ：0.3  $\mu\text{g/mL}$ ，使用時以移動相溶液稀釋至所需之濃度。
- (二)免疫親和管柱：分析 $AFB_1$ 、 $AFB_2$ 、 $AFG_1$ 、 $AFG_2$ 採用美國Vicom公司製造之AflaTest-P管柱。
- (三)試藥：甲醇與氫氧化鈉採試藥特級，配製液相層析用移動相之水使用去離子水。
- (四)試劑之調製：0.1 N氫氧化鈉溶液：稱取氫氧化鈉0.4 g，以去離子水溶解並定容至100 mL。移動相溶液：將甲醇及水以45 : 55 (v/v)之比例混勻後，以濾膜(直徑47 mm，孔徑0.22  $\mu\text{m}$ ，Nylon材質)抽氣過濾，濾液以超音波震盪除氣30分鐘後備用。
- (五)萃取溶液：將酒類製品以水稀釋至酒精濃度5%，以0.1 N NaOH調整檢液之pH值至4~7之間，若有氣泡則使用超音波振盪器除氣30分

鐘。

### 三、儀器與設備

(一)液相層析管柱：採用Waters公司製造之Cosmosil 5C18-AR-II (5  $\mu\text{m}$ ，內徑4.6 mm  $\times$  250 mm)管柱。

(二)高效液相層析系統：日本Hitachi公司製造之L-7100幫浦、L-7480螢光偵測器、L-7200自動樣品注射器，數據處理則以訊華公司層析儀積分數據處理系統(SISC)進行。

(三)光化學反應器：美國AURA工業公司製造之KRC 25-25之光化學反應器，其構造係將長25公尺之PTFE材質細管(1/16 inch OD  $\times$  0.25 mm ID)編織成長方形並固定於具254 nm紫外線照射的不透光燈盒內，使得AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub>流經此管中時轉變成AFB<sub>2a</sub>、AFG<sub>2a</sub>。

(四)超音波振盪器(Ultrasonicator)。

### 四、黃麴毒素萃取及淨化

將檢液稀釋至酒精濃度5%，以0.1 N NaOH調整檢液pH值至4~7之間，若有氣泡則使用超音波振盪器除氣30分鐘。取已稀釋檢液10 mL，以1滴/秒之流速通過免疫親和管柱，再以太離子水10 mL清洗免疫親和管柱2次，取HPLC級甲醇1 mL以1滴/秒流速通過免疫親和管柱，收集沖提液於玻璃管中，加入去離子水定容為2 mL，振盪均勻後取50  $\mu\text{L}$ 注入高效液相層析儀。

### 五、高效液相層析儀之分析條件

備妥之檢液以下列高效液相層析條件分析及計算檢體中含量。進行每批檢體之檢驗須製作新的標準曲線比對。

(一)高效液相層析之條件

層析管柱：Cosmosil 5C18-AR。

螢光偵測器： $\lambda_{\text{ex}}$ ：360 nm， $\lambda_{\text{em}}$ ：440 nm。

移動相溶液：45%甲醇水溶液。

注射量：50  $\mu\text{L}$ 。

流速：1 mL/min。

(二)計算公式

$$\text{檢液中黃麴毒素含量(ppb)} = \frac{C \times V \times X}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中黃麴毒素之濃度 (ng/mL)

V：檢液最後定容之體積(2 mL)

M：已稀釋檢液之體積(10 mL)

X：稀釋倍數

(三)標準曲線製作

以移動相溶液將黃麴毒素標準溶液稀釋至0.2~50 ng/mL，供做標準溶液，各取50  $\mu\text{L}$ 注入高效液相層析儀，由波峰面積對標準溶液之濃度做圖。

(四)回收率測試

將黃麴毒素標準溶液添加至不含黃麴毒素之酒類空白檢體內，AFB<sub>1</sub>及AFG<sub>1</sub>添加量為0.2~10 ppb，AFB<sub>2</sub>及AFG<sub>2</sub>添加量為0.1~3 ppb。續以材料與方法四、五製備檢液並分析，換算濃度後除以添加濃度，再乘以100%即為回收率。

(五)方法偵測極限(Method Detection Limit；MDL)

將不同濃度之黃麴毒素溶液添加至不含黃麴毒素之酒類空白檢體內，續以材料與方法四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者之最小標準品添加濃度為方法偵測極限。

### 結果與討論

目前國內黃麴毒素限量標準，規定花生、玉米中總黃麴毒素含量應在15 ppb以下，其他食品為10 ppb以下<sup>(18)</sup>，嬰兒食品則不得含有<sup>(19)</sup>，至於酒類中黃麴毒素則尚無公告分析方法及限量標準。本研究擬將市售酒分為五類：高粱類、米類、麥類、紅酒類及中藥材類，以Afla Test-P免疫親和管柱淨化檢液，續以高效液相層析儀搭配光化學反應器及螢光檢出器偵測酒中黃麴毒素含量。

#### 一、高效液相層析(HPLC)法

(一)移動相之選擇

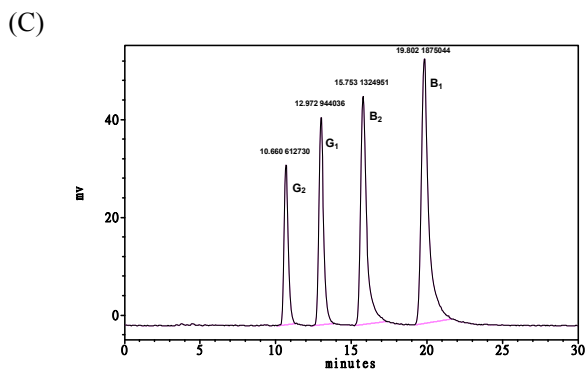
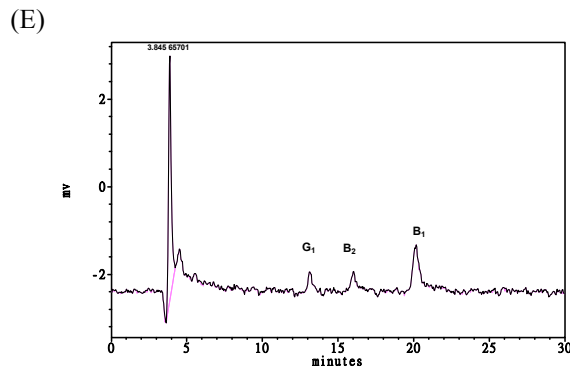
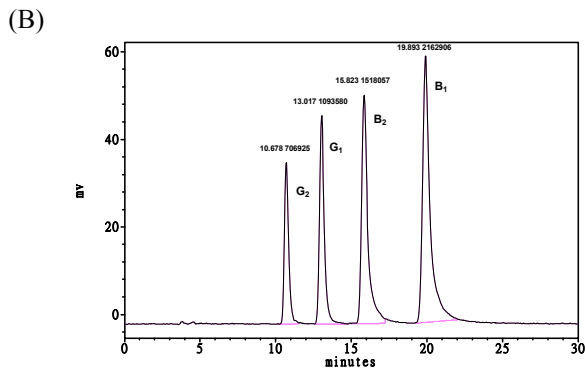
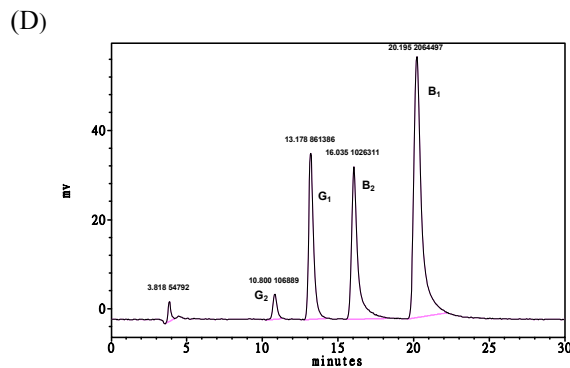
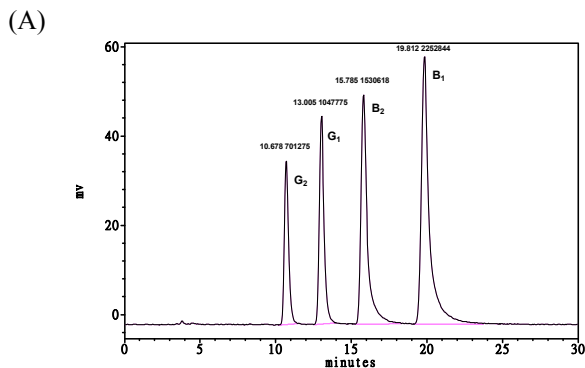
以HPLC分析黃麴毒素之移動相多為乙腈/水或甲醇/水混合溶液。研究發現移動相使用甲醇/水混合溶液 (45 : 55, v/v)之分離效果佳，故選用此移動相混合比例。

(二)層析管柱之選擇

層析管柱Cosmosil 5C18-AR之分離效果佳，黃麴毒素滯留時間短，波形對稱且狹窄，故選用為後續實驗使用之管柱。

(三)酒精濃度之選擇

由於酒類檢體中酒精濃度可能對此分析方法之回收率造成影響，將酒精濃度為60%之高梁類檢體以水稀釋至酒精濃度5%、7.5%、10%及30%，分別添加黃麴毒素標準品(B<sub>1</sub> : 5 ppb、B<sub>2</sub> : 1.5 ppb、G<sub>1</sub> : 5 ppb、G<sub>2</sub> : 1.5 ppb)至各檢體。圖一為高效液相層析圖譜，酒精濃度5%的檢液回收率最佳，黃麴毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及G<sub>2</sub>之回收率分別為93.4%、95.2%、96.8%及102.9%；酒精濃度30%的檢液回收率，黃麴毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及G<sub>2</sub>分別為90.8%、



圖一、添加黃麴毒素標準品 (B<sub>1</sub>:5 ppb、B<sub>2</sub>:1.5 ppb、G<sub>1</sub>:5 ppb、G<sub>2</sub>:1.5 ppb) 於不同酒精濃度高粱酒檢體之高效液相層析圖。(A) 5% (B) 7.5% (C) 10% (D) 30% (E) 60%

酒中黃麴毒素之檢驗

65.7%、85.9%及16.4%；酒精濃度60%的檢液回收率為0，顯示此方法所使用之免疫親和管柱不適用於酒精濃度高於30%之檢體。

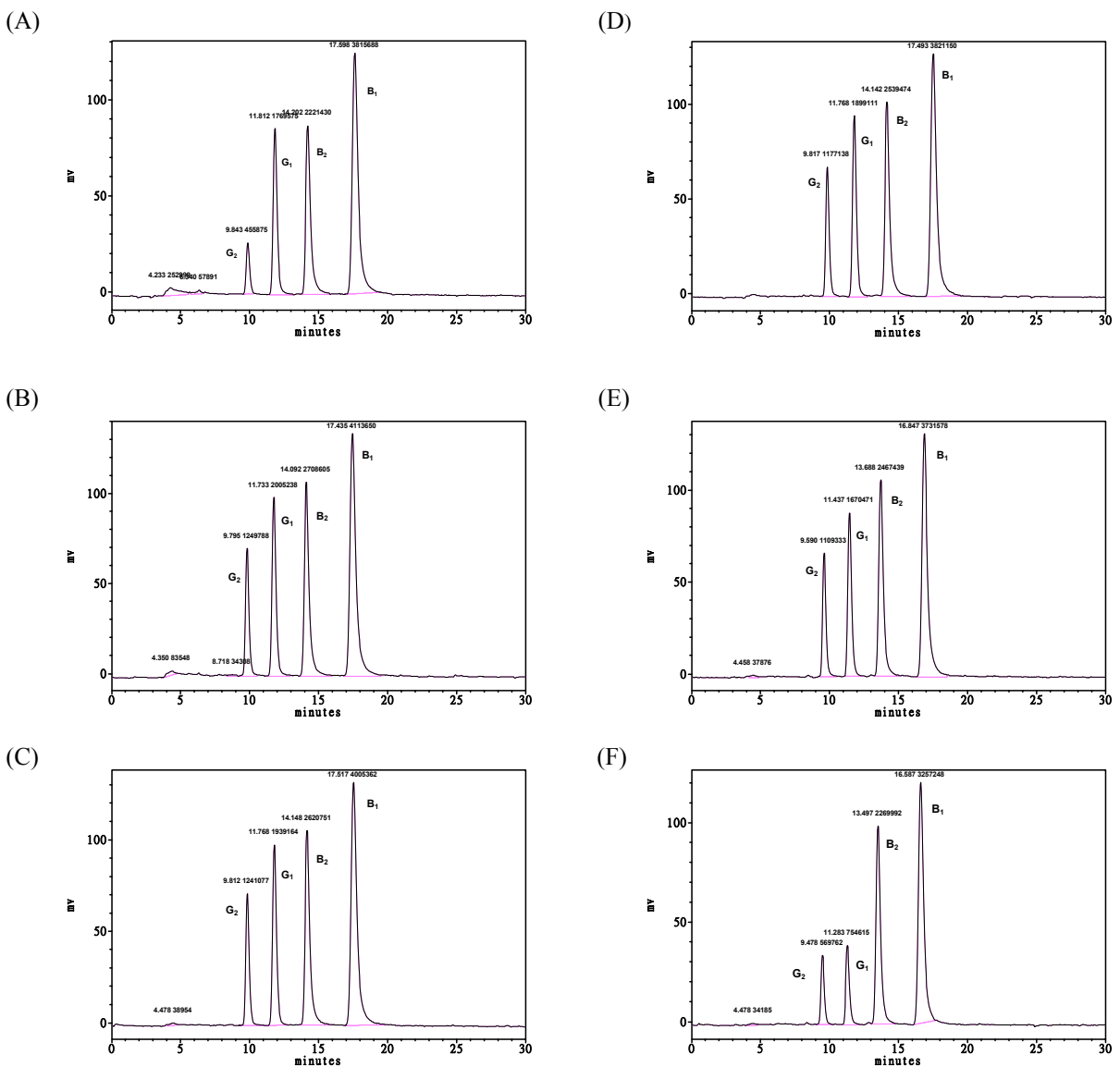
(四)酒pH值之選擇

本研究考慮酒檢體pH值對於回收率的影響，以0.1 N氫氧化鈉分別將檢液pH值調整至2.8、4.0、6.0、7.0、8.0及9.1，再分別添加黃麴毒素標準品(B<sub>1</sub>：10 ppb、B<sub>2</sub>：3 ppb、G<sub>1</sub>：

10 ppb、G<sub>2</sub>：3 ppb)至各檢體。圖二為高效液相層析圖譜，pH值4~7之間的檢液回收率較佳。

(五)黃麴毒素檢驗之標準曲線及偵測極限

黃麴毒素B<sub>1</sub>及黃麴毒素G<sub>1</sub>於0.2~50 ppb濃度範圍內(0.2、1、5、10、25及50 ppb)與黃麴毒素B<sub>2</sub>及黃麴毒素G<sub>2</sub>於0.1~15 ppb濃度範圍內(0.1、0.3、1.5、3、7.5及15 ppb)之線性迴歸



圖二、添加黃麴毒素標準品 (B<sub>1</sub>:10 ppb、B<sub>2</sub>:3 ppb、G<sub>1</sub>:10 ppb、G<sub>2</sub>:3 ppb) 於不同 pH 值紅酒之高效液相層析圖。(A) pH 2.8 (B) pH 4.0 (C) pH 6.0 (D) pH 7.0 (E) pH 8.0 (F) pH 9.1

係數均大於0.9998。此方法檢驗黃麴毒素 $B_1$ 及黃麴毒素 $G_1$ 之儀器偵測極限為0.2 ppb，黃麴毒素 $B_2$ 及黃麴毒素 $G_2$ 之儀器偵測極限為0.1 ppb。

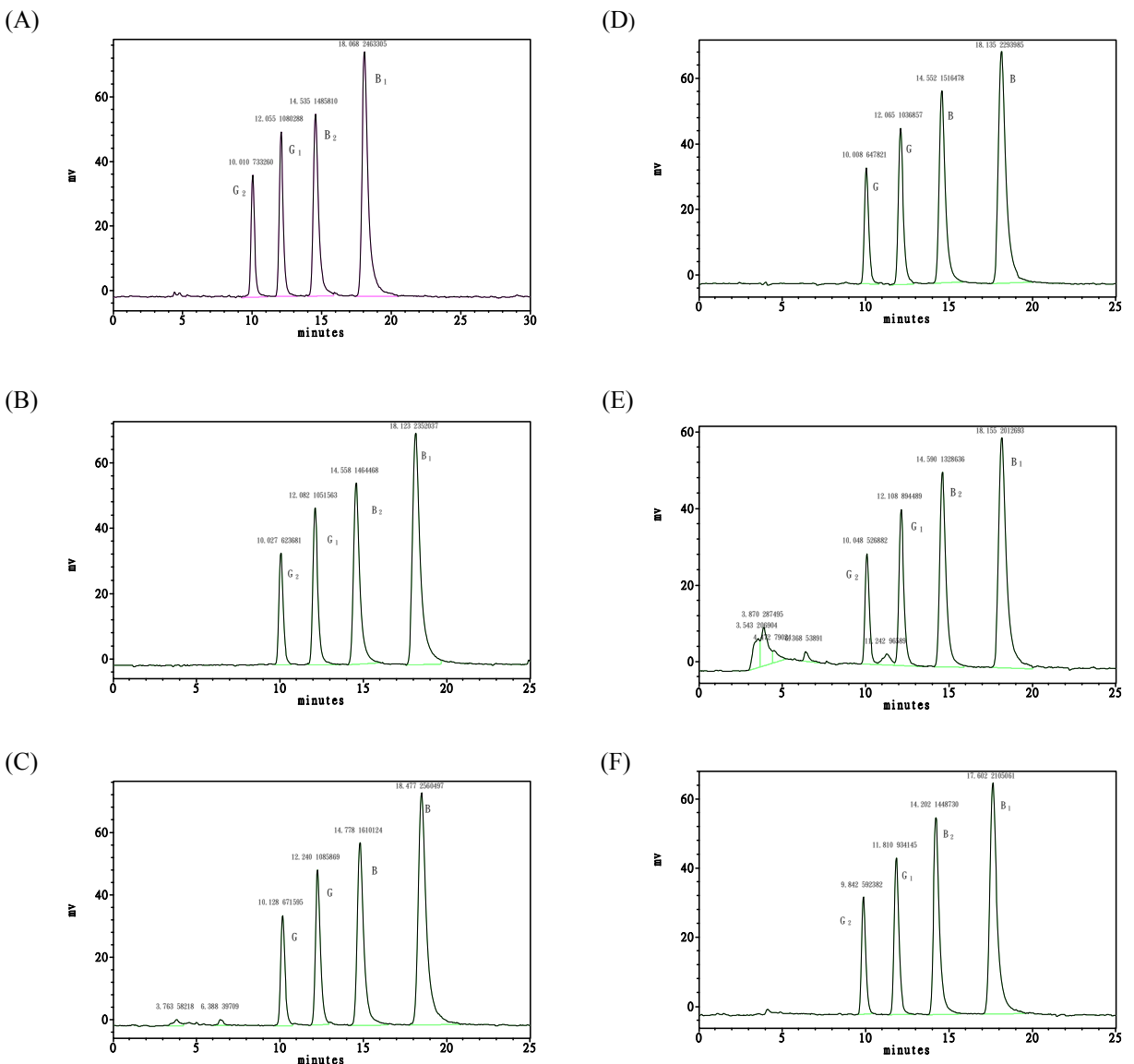
(六)檢量線

添加0.2、0.3、0.5、1、2.5、5及10 ppb之黃麴毒素 $B_1$ 、 $G_1$ 標準品與0.1、0.3、0.75、1.5及3 ppb之黃麴毒素 $B_2$ 、 $G_2$ 標準品至高粱類、

米類、麥類、紅酒類及中藥材類酒中進行分析，並製作檢量線。結果顯示各檢量線之線性皆良好，迴歸係數均大於0.998。各類酒檢體中黃麴毒素 $B_1$ 及黃麴毒素 $G_1$ 之方法偵測極限為0.2 ppb，黃麴毒素 $B_2$ 及黃麴毒素 $G_2$ 之方法偵測極限為0.1 ppb。

(七)回收率

圖三為各類酒製品中添加黃麴毒素標準品



圖三、各類酒中添加黃麴毒素標準品 5 ppb 之高效液相層析圖。(A) 黃麴毒素標準品 5 ppb (B) 添加於高粱酒 (C) 添加於麥類酒 (D) 添加於米類酒 (E) 添加於紅酒類 (F) 添加於中藥材類酒

5 ppb之高效液相層析圖譜，由圖可知黃麴毒素之滯留時間黃麴毒素 $B_1$ 約為18.1分鐘，黃麴毒素 $B_2$ 約為14.5分鐘，黃麴毒素 $G_1$ 約為12.1分鐘，黃麴毒素 $G_2$ 約為10.0分鐘。回收率測試部份，添加0.2、0.3、0.5、1、2.5、5及10 ppb之黃麴毒素 $B_1$ 及黃麴毒素 $G_1$ 標準品及0.1、0.3、0.75、1.5及3 ppb之黃麴毒素 $B_2$ 及黃麴毒素 $G_2$ 標準品於各檢體中，由波峰面積計算個別之回收率(表一)，添加黃麴毒素於各類酒之回收率整體而言皆理想。各類檢體之回收率相近，黃麴毒素 $B_1$ 、 $G_1$ 添加濃度低至方法偵測極限0.2 ppb時，整體回收率仍能維持在81.2~97.0%之間，黃麴毒素 $B_2$ 、 $G_2$ 添加濃度低至方法偵測極限0.1 ppb時，整體回收率仍能維持在79.4~98.5%之間，顯示本法之回收率良好。

## 二、此方法與過去方法比較

藥物食品檢驗局於1997年<sup>(20)</sup>曾利用VICAM螢光判讀機與高效液相層析儀檢測酒中之黃麴毒素，先以水將檢體稀釋至螢光判讀機測得黃麴毒素之讀值小於50 ppb，再以免疫親和管柱淨化檢液，續加入溴顯色劑後置入螢光判讀機中，60秒後紀錄讀值。過去利用VICAM螢光判讀機分析之結果，以添加1 ppb黃麴毒素 $B_1$ 標準品至紹興酒為例，回收率僅23.3%；本方法之回收率為82.4%，明顯高於過去之方法。過去利用VICAM螢光判讀機分析玫瑰紅酒之結果，添加1 ppb黃麴毒素 $B_1$ 標準品至玫瑰紅酒之回收率僅32.7%；本方法之回收率為79.0%，明顯高於過去之方法。

過去利用高效液相層析法分析，同樣先以水將檢體稀釋至螢光判讀機測得讀值小於50 ppb，再以免疫親和管柱淨化後注入高效液相層析儀。高效液相層析儀分析之結果，添加黃麴毒素標準品1 ppb至紹興酒之回收率分別為 $B_1$ ：57.8%、 $B_2$ ：53.9%、 $G_1$ ：37.6%、 $G_2$ ：34.4%；本方法同樣使用高效液相層析法，前處理時調整檢體之酒精濃度與pH值後分析之結果，回收率提高至 $B_1$ ：82.4%、 $B_2$ ：84.0%、 $G_1$ ：86.6%、 $G_2$ ：85.6%。而過去利用高效液相層析儀分析玫瑰紅酒的結

果，添加黃麴毒素標準品1 ppb至玫瑰紅酒之回收率分別為 $B_1$ ：56.1%、 $B_2$ ：47.9%、 $G_1$ ：31.9%、 $G_2$ ：37.4%；本方法同樣使用高效液相層析法，前處理時調整檢體之酒精濃度與pH值後分析之結果，回收率提高至 $B_1$ ：79.0%、 $B_2$ ：81.7%、 $G_1$ ：84.6%、 $G_2$ ：74.8%。上述結果均顯示本研究建立之方法較過去已報導之方法回收率高，應該是本研究有將檢體的酒精濃度與pH值等影響因子考慮進去，因而能提高回收率。此外，本法使用之衍生化方法為光化學衍生法，較過去使用之碘衍生法省時省力。

除了回收率之外，方法偵測極限亦有改進。過去利用VICAM螢光判讀法檢驗黃麴毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 及 $G_2$ 之方法偵測極限均為1 ppb，高效液相層析法之偵測極限，黃麴毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 及 $G_2$ 為0.5 ppb，黃麴毒素 $G_1$ 為1 ppb。至於本方法之偵測極限，黃麴毒素 $B_1$ 及 $G_1$ 為0.2 ppb，黃麴毒素 $B_2$ 及 $G_2$ 為0.1 ppb。

## 三、市售酒類中黃麴毒素含量調查結果

市售酒類之調查結果，在5件高粱類、10件米類、11件麥類、12件紅酒類及2件中藥材類市售酒中，僅有1件麥類酒有微量黃麴毒素檢出訊號，計算後得到之黃麴毒素 $B_1$ 含量約為0.11 ppb，因低於方法偵測極限，故認定為未檢出。

## 結 論

花生及穀類中黃麴毒素之檢驗方法，在國內已有公告檢驗方法<sup>(17)</sup>，但酒中黃麴毒素之檢驗則較少研究。由於酒多由穀類及水果等原料製成，在製造過程與儲存中仍有可能受到黃麴毒素污染，故市售酒中是否含有黃麴毒素是相當值得注意的議題。

本研究考慮酒類的酒精濃度與pH值，將酒類製品稀釋至酒精濃度5%，以0.1 N NaOH調整檢液pH值至4~7之間，若有氣泡則使用超音波振盪器除氣30分鐘，續以AflaTest-P免疫親和管柱淨化檢液，再以高效液相層析儀搭配管柱後光化學反應器及螢光檢出器偵測黃麴毒素含量。結果確認此方法偵測極限低、層析滯留時間短、再現性及

表一、添加黃麴毒素標準品於各類酒之回收率

(A) 黃麴毒素B<sub>1</sub>

添加濃度 (ppb)	回收率(Recovery %)				
	高粱類	米類	紅酒類	麥類	中藥材類
0.2	81.2 ± 5.9*	81.9 ± 1.7	88.3 ± 2.5	89.2 ± 3.6	82.6 ± 3.0
0.3	72.3 ± 1.4	80.8 ± 3.7	83.4 ± 3.1	87.4 ± 6.2	77.6 ± 4.0
0.5	82.5 ± 2.5	85.1 ± 3.3	78.7 ± 5.1	79.9 ± 3.4	85.0 ± 1.4
1	85.5 ± 2.2	82.2 ± 2.0	79.0 ± 1.6	82.4 ± 6.1	81.0 ± 1.5
2.5	87.1 ± 1.6	86.7 ± 1.0	73.2 ± 0.4	86.5 ± 0.4	82.7 ± 2.9
5	88.1 ± 1.2	83.1 ± 3.8	74.6 ± 0.3	92.9 ± 2.4	78.8 ± 1.7
10	90.1 ± 0.7	89.2 ± 3.1	76.9 ± 0.5	98.5 ± 1.6	85.7 ± 1.6

(B) 黃麴毒素B<sub>2</sub>

添加濃度(ppb)	回收率(Recovery %)				
	高粱類	米類	紅酒類	麥類	中藥材類
0.1	83.1 ± 2.5	85.4 ± 4.5	79.4 ± 3.1	91.3 ± 5.7	86.3 ± 1.4
0.15	83.7 ± 3.1	96.2 ± 2.2	86.5 ± 0.9	89.8 ± 5.6	95.7 ± 3.5
0.3	89.8 ± 5.6	93.5 ± 3.0	81.7 ± 6.6	84.0 ± 2.9	93.9 ± 1.6
0.75	90.1 ± 4.1	88.7 ± 2.2	90.5 ± 9.3	89.9 ± 0.1	90.8 ± 1.0
1.5	89.7 ± 1.9	90.8 ± 3.8	83.6 ± 2.6	97.7 ± 0.3	89.2 ± 1.3
3	92.4 ± 0.5	96.5 ± 2.8	85.2 ± 3.0	98.9 ± 0.8	94.2 ± 1.6

(C) 黃麴毒素G<sub>1</sub>

添加濃度(ppb)	回收率(Recovery %)				
	高粱類	米類	紅酒類	麥類	中藥材類
0.2	83.6 ± 2.2	87.2 ± 2.6	87.8 ± 5.2	97.0 ± 4.7	92.2 ± 0.8
0.3	85.4 ± 4.1	94.8 ± 4.0	94.7 ± 3.8	94.6 ± 5.9	85.4 ± 2.3
0.5	91.1 ± 5.3	88.6 ± 4.4	93.2 ± 5.5	86.5 ± 3.8	90.8 ± 1.5
1	89.6 ± 7.0	89.7 ± 1.4	84.6 ± 7.6	86.6 ± 1.7	86.6 ± 1.7
2.5	89.5 ± 1.2	85.0 ± 0.5	76.4 ± 2.7	89.3 ± 1.2	84.4 ± 3.2
5	91.4 ± 3.3	83.9 ± 5.8	77.9 ± 2.1	94.8 ± 3.9	82.2 ± 2.9
10	92.2 ± 0.6	89.4 ± 1.4	80.1 ± 1.5	96.0 ± 0.8	86.2 ± 0.7

(D) 黃麴毒素G<sub>2</sub>

添加濃度(ppb)	回收率(Recovery %)				
	高粱類	米類	紅酒類	麥類	中藥材類
0.1	89.5 ± 0.6	88.9 ± 4.1	90.0 ± 7.2	98.5 ± 1.6	83.0 ± 3.0
0.15	92.1 ± 5.0	96.7 ± 2.7	89.8 ± 2.6	92.2 ± 2.6	90.6 ± 7.7
0.3	90.7 ± 5.1	96.1 ± 1.5	74.8 ± 4.7	85.6 ± 6.2	85.1 ± 3.1
0.75	89.0 ± 2.2	95.3 ± 2.8	76.9 ± 0.0	91.1 ± 3.1	86.8 ± 1.6
1.5	87.8 ± 1.0	88.4 ± 2.7	72.0 ± 1.3	93.9 ± 3.0	84.9 ± 2.2
3	89.9 ± 1.8	92.5 ± 0.1	78.2 ± 5.3	95.0 ± 0.4	91.8 ± 1.7

\*平均值 ± 標準偏差，n = 3。

回收率皆良好。此方法與過去已報導之方法相較<sup>(20)</sup>，其偵測極限與回收率皆較佳。

以本法檢驗40件市售酒之結果，在5件高粱類、10件米類、11件麥類、12件紅酒類及2件中藥材類市售酒中，雖有1件麥類酒有微量黃麴毒素檢出訊號，但因含量低於偵測極限，判定為未檢出。其餘39件市售酒則皆未檢出黃麴毒素。

### 參考文獻

1. Hesseltine, C. W. 1967. Aflatoxina and other mycotoxins. *Health Laboratory Science* 4: 222-228.
2. Maurice, O. M. 2002. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50: 137-142.
3. Northolt, M. D. and Bullerman, L. B. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection* 45: 519-526.
4. Trenk, H. L. and Hartman, P. A. 1970. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. *Applied Microbiology* 19: 781-784.
5. 王進琦、王西華。1992。第十六章 食物的微生物毒素中毒。食品微生物學。藝軒圖書出版社，台北。
6. 方繼、林建谷、陳惠英。1999。第二十七章 黴菌毒素。現代食品微生物學 666-686頁。偉明圖書出版社，台北。
7. Senyuva, H. Z., Gilbert, J. and Ulken, U. 2007. Aflatoxins in Turkish dried figs intended for export to the European Union. *Journal of Food Protection* 70: 1029-1032.
8. Bircan, C., Barringer, S. A., Ulken, U. and Pehlivan, R. 2008. Increased aflatoxin contamination of dried figs in a drought year. *Food Additives and Contamination* 25: 1-9.
9. Tekinsen, K. K. and Eken, H. S. 2008. Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 46: 3287-3289.
10. Hierro, J. M. H., Garcia-Villanova, R. J., Torrero, P. R. and Fonseca, I. M. T. 2008. Aflatoxins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 751-756.
11. Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Nazzari, M., Samperi, R. and Lagana, A. 2007. A sensitive confirmatory method for aflatoxins in maize based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 21: 550-556.
12. 賴滋漢、金安兒、柯文慶。1992。食品加工學。精華出版社，台中。
13. Trinder, D. W. 1988. A survey of aflatoxins in industrially brewed South African sorghum beer and beer strainings. *Journal of the Institute of Brewing* 94: 307-309.
14. Pogorzelski, E., Masiar, M., Czyzycki, A., Lukawska-Pietrzak, Z. and Adamow-Piaszczynska, M. 1977. Mycotoxins in musts and wines manufactured from apples contaminated with moulds. *Przemysl-Fermentacyjny-i-Rolny* 21: 11-15.
15. Lehtonen, M. 1973. Detection of aflatoxins in wines. *Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel* 2: 161-164.
16. Trenk, H. L. and Hartman, P. A. 1970. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. *Applied Microbiology* 19: 781-784.
17. 行政院衛生署。食品中黴菌毒素檢驗方法－黃麴毒素之檢驗。98.11.16署授食字第0981800468號公告。
18. 行政院衛生署。食品衛生標準－12食品中真菌毒素限量標準。98.12.04衛署食字第0980462647號令。
19. 行政院衛生署。食品衛生標準－07嬰兒食品類

衛生標準。98.07.02衛署食字第0980460402號令。

20. 林秀穗、傅幼敏。1997。以免疫親和管柱配合

螢光判讀機及高效液相層析儀檢測酒中之黃麴毒素。藥物食品分析，5(2): 161-170。

## Determination of Aflatoxins in Wines

CHIA-DING LIAO, LI-GYUN KUO, HSU-YANG LIN, LIH-CHING CHIUEH AND DANIEL YANG-CHIH SHIH

Division of Research and Analysis

### ABSTRACT

The determination of aflatoxins in wines was performed by using immunoaffinity column for clean-up and high performance liquid chromatography (HPLC) for identification and quantification. Aflatoxins were eluted from an Afla Test-P immunoaffinity column with methanol followed by the determination using HPLC column equipped with post-column photochemical reactor for enhanced fluorescence detection. Higher recovery of aflatoxins from wines was found while alcohol contents were diluted to 5% and pH values were adjusted to 4-7 prior to clean-up. Average recoveries of aflatoxins from different wine samples spiked at levels of 0.1 to 10 ppb ranged from 72.0 to 98.9%. The quantification limit of aflatoxin B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> analysis was 0.2 ppb, while that of aflatoxin B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub> was 0.1 ppb. A survey of aflatoxins in commercial wine products in Taiwan was conducted and none was detected among 40 wine products.

Key words: wines, aflatoxins, high performance liquid chromatography