

82

國立宜蘭大學

農業推廣季刊

國立宜蘭大學農業推廣委員會 農業推廣(季刊)

通訊總號第 082 號 中華民國 107 年 12 月出刊

發行人/陳威戎 主編/賴裕順

地址：260 宜蘭市神農路 1 段 1 號

E-Mail：aec@niu.edu.tw

中華民國 86 年 3 月創刊

行政院農業委員會補助編印

編輯/林怡慧

電話：03-9357400#7613

傳真：03-9354152

磁減量檢測技術平台運用在黴菌毒素的評估

一、黴菌毒素介紹

一般食品或原料的保存環境不適當，造成長期堆放在悶濕的環境中就很容易滋生黴菌的污染。黴菌毒素是黴菌代謝產生的二級代謝產物(Reddy, 2010)。目前發現和人類健康相關之重要黴菌毒素包括黃麴毒素(B1、B2、G1、G2) (Aflatoxin B1,B2,G1,G2)、赭麴毒素 A (Ochratoxin A)、橘黴素 (Citrinin)、伏馬毒素(B1、B2) (Fumonisin B1、B2)、棒麴毒素(Patulin)、脫氧雪腐鏟刀菌稀醇 ((Deoxynivalenol) 又稱嘔吐毒素(Vomitoxin))、玉米赤黴毒素(Zearalenone) 又稱 F-2 毒素、T-2 (Trichothecenes)及 HT-2 毒素等(Reddy, 2010)，這些黴菌毒素普遍都具有肝、腎毒性且不易分解，如果長期食入含黴菌毒素污染的食品，會對人類健康造成重大危害(Speijers, 2004)。

二、赭麴毒素 A 和橘黴素

近年來研究發現保存不適當的食料中常常有多種黴菌共同污染，造成食料中同時存在多種黴菌毒素的現象(Molini, 2005; Streit, 2012)。如赭麴毒素 A 和橘黴素經常共同出現在同一食料中，研究顯示兩者毒性有協同加成作用，更容易造成細胞死亡(Gayathri, 2015)。赭麴毒素 A 主要是由 *Penicillium verrucosum*(常見寒冷國家的倉儲穀物)、*Aspergillus ochraceus*(氣候溫和地區，常見於倉儲穀物及咖啡豆)和 *Aspergillus carbonarius*(生長於高溫環境，常見於葡萄等成熟中的水果)所產生。大自然的土壤、昆蟲、米、麥、麵粉、黃豆、花生、玉米、咖啡豆、農產品、蔬菜及中藥材、魚

乾中都有產生赭麴毒素的黴菌存在，這些都有可能受到赭麴毒素的污染(Ostry, 2013)。目前研究指出赭麴毒素 A 有腎毒、致畸胎、致癌和免疫毒性(Malir, 2013; Mateo, 2011)，而且被國際癌症研究機構(The International Agency for Research on Cancer, IARC)歸列為人類致癌物 group 2B (Mateo, 2011)。橘黴素主要是由 *Monascus* (Blanc, 1995)、*Aspergillus* (Manabe, 2001) 和 *Penicillium* (Ei-Banna, 1987) 等菌屬所產生，常見於大麥、小麥、穀類、蘋果和其他米類紅橘發酵等，其毒性易造成肝、腎組織傷害(Ostry, 2013)。

咖啡是目前全世界最受歡迎的飲料，每年全球咖啡消費市場以 12-15% 的速度成長，目前咖啡的經濟產值僅次於石油，成為全球第二大的交易商品，經濟總值每年高達台幣 20 兆元以上。台灣咖啡市場成長速度驚人，隨著國人所得提高及飲食習慣西化，咖啡文化已融入台灣飲食文化的一部份，人手一杯咖啡已是常見的現象。財政部關稅署的統計資料顯示台灣咖啡(含生豆、熟豆及含咖啡成分之產品)的進口量已由 2008 年的 11,599 公噸成長到 2012 年的 18,488 公噸。由於咖啡的需求量越來越高，不論是進口或本地生產咖啡，都可能因採收、去果肉、包裝、儲存不當，或因運輸過程中或是在商家中儲存不當，造成黴菌 *Aspergillus* 屬和 *Penicillium* 屬的污染，而有可能會產生赭麴毒素 A。

紅麴又稱紅糟是中國數千年來的常用傳統食材，產生過程主要是將紅麴菌加入蒸煮過的米，讓菌生長後乾燥而得紅色紅麴(Ma, 2000)。近年來研究發現，紅麴含有多種對人體有益的重要物質，不僅可有效降低膽固醇合成、降血壓及血糖，甚至有抗氧化以及防失智的保健效果，因此紅麴廣泛應用於餅乾、酒類、麵食、香腸、肉類與醬料調製等，成為熱門的保健食品(Bunnoy, 2015; Li, 1998; Wang, 2003; Wang, 2006)。但是紅麴於發酵製造的過程中，如果環境衛生不佳與發酵條件不適情況下，就容易產生橘黴素。目前研究報告指出，長期食用過量的橘黴素對動物的肝、腎器官會產生危害(Bennett, 2003)。

隨著國人飲食的改變，具提神作用的咖啡和養生的紅糟食品，已成為國人常食用的飲食，但是這兩樣食品均易遭受黴菌毒素汙染，因此如何發展簡易、快速與靈敏的檢測方法，實為保障國人飲食健康的重要課題

三、黴菌毒素檢測方法介紹

各種快速、靈敏和便宜的黴菌毒素檢測方法，是各國衛生機關爭相開發的重點。目前在黴菌毒素的檢測方式已知有薄層色層分析法(Thin-layer chromatography, TLC)(Damodaran, 1973)、高效液相層析儀(High-performance liquid chromatography, HPLC)(Reinhard, 1999)、高效液相層析質譜儀(Liquid chromatography with mass spectrometry, HPLC-MS) (Tuomi, 2001)、氣相層析質譜儀(Gas chromatography with mass spectrometry, GC/MS)(Shu, 2001)和酵素結合免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (Kononenko, 2007)等方法。其中 HPLC-MS 是被認為準確性最

高，並且可進行定性與定量分析，唯一缺點就是儀器昂貴、操作時間長與無法例行性做大量檢測等因素(Cheng, 2015)。

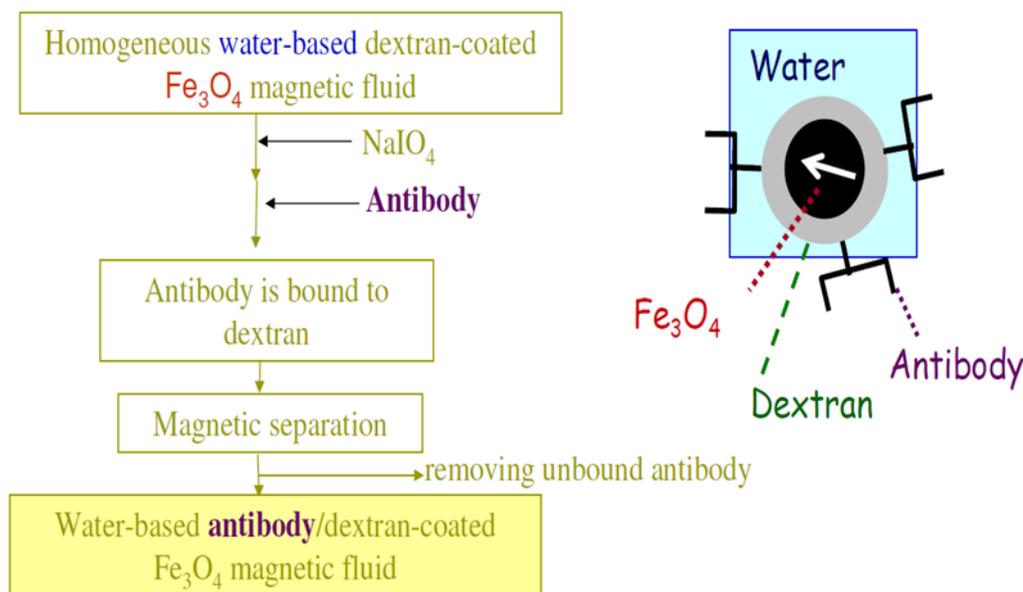
目前我國黴菌毒素的檢測主要是利用 HPLC 或 LC/MS/MS 多重分析法來檢測，依食品衛生管理法第十七條規定，已訂定食品中真菌毒素限量標準，如麥類、烘焙咖啡豆及咖啡中赭麴毒素 A 的安全限量限制在 5 ppb 以下，食品中橘黴素 (Citrinin) 安全限量為 200 ppb 以下，其中鮮乳的總黃麴毒素限量更在 0.5 ppb 以下。為了偵測這些黴菌毒素，衛福部公布建立黴菌毒素檢驗方法，其中 LC/MS/MS 多重分析法和 HPLC 都可準確的偵測到 0.5 ppb 以下。例如 HPLC 方式可以偵測定量極限為咖啡 0.5 ppb、酒類及葡萄汁為 0.2 ppb、米麥製品為 0.3 ppb。LC/MS/MS 多重分析法可以偵測黃麴毒素 B1 定量極限為 0.5 ppb、伏馬毒素 B1 為 20 ppb、脫氧雪腐鐮刀菌烯醇為 5 ppb、玉米赤黴毒素為 5 ppb、赭麴毒素 A 為 0.5 ppb、T-2 和 HT-2 均為 1 ppb，這些方式的檢測靈敏度都可達到規定安全限制含量標準以下，因此可以準確地用來偵測黴菌毒素的污染。但是 LC/MS/MS 多重分析法和 HPLC 為了要降低干擾物的影響來提升準確性，待測樣品在儀器分析前必須先進行繁雜的黴菌毒素萃取、純化處理步驟，因此造成檢驗時間增長、提高檢驗成本、降低檢驗樣品數量，同時也會因為這些繁雜程序而引進許多不確定的因素，降低檢驗準確率，再加上 LC/MS/MS 儀器價格高達上千萬台幣，需要專業技術人員操作，因此大大限制了檢驗場所的普及性與便利性，使得黴菌毒素的污染風險仍然無法獲得廣泛有效的監控。

四、磁減量檢測技術介紹

磁性奈米粒子 (magnetic nanoparticles) 是近年來應用到生醫產業的熱門材料，目前已有許多研究成果證實，具生化活性之磁性奈米粒子可廣泛應用於蛋白質和細胞純化、增強核磁造影對比、追蹤幹細胞分化、核酸基因轉殖和免疫檢測試劑(Chang, 2012; Hong, 2007; Huang, 2011; Huang, 2012; Yang, 2008; Yang, 2012)。磁減量檢測技術原理是將磁性奈米粒子結合到專一性抗體，利用磁性奈米粒子作為待測生物物質的標示物，配合高溫超導磁性免疫分析儀，偵測磁減量變化來分析待測生物物質的濃度。目前研究成果已證實磁減量生醫檢測平台的靈敏度，高出 ELISA 免疫分析法至少 1000 倍，而且因為是偵測磁量變化，因此不受待測物質的顏色或色素干擾，可以簡化、縮短檢測時間，獲得更精準的檢測結果(Chen, 2015a,b; Lu, 2012; Yang, 2014)。

磁減量黴菌毒素檢測技術是一種將磁性奈米粒子和高靈敏度黴菌毒素單株抗體結合的經濟、快速、靈敏的檢測技術。首先將抗黴菌毒素專一性抗體與磁性粒子結合，接著將磁性粒子-抗體複合物與待測生物分子混合後，藉由抗原-抗體專一性結合原理，形成磁性粒子叢集 (magnetic cluster) 或造成磁性粒子變大變重，這些結果會改變原來磁性粒子-抗體複合物磁性大小，因此藉由量測磁性的變化來探知待測生物分子濃度的新穎檢測方式，鍵結過程如圖(一)。

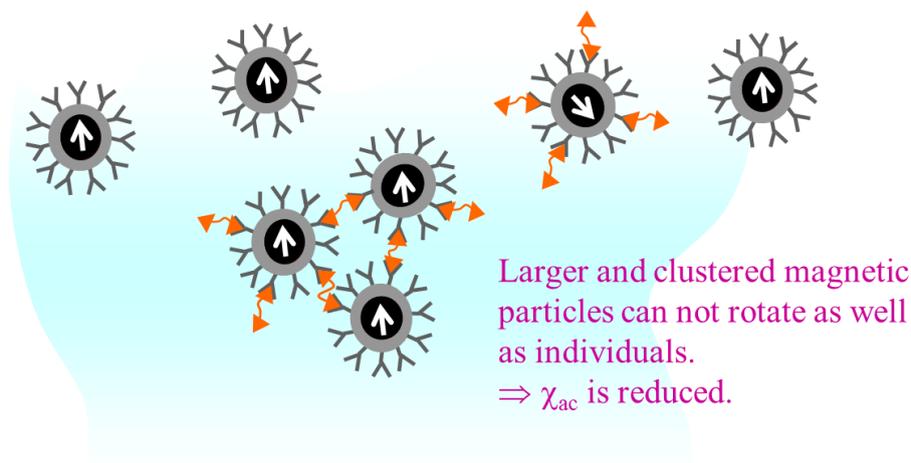
圖一、將已製備好的高效價黴菌毒素單株抗體，利用化學接合方式，將抗體接合至奈米磁性顆粒表面，製作成奈米磁性免疫檢測試劑(圖示取自磁量生技公司)。



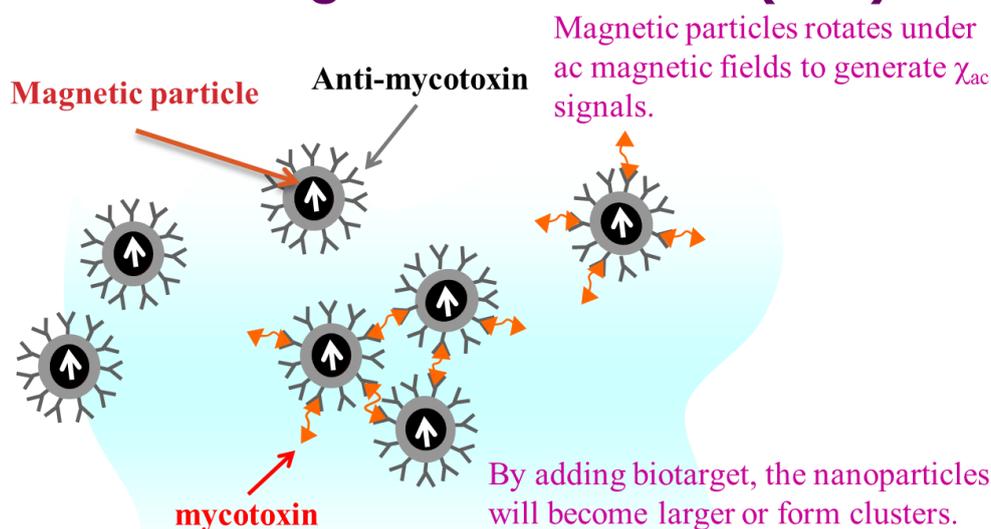
偵測原理是磁性粒子-抗體複合物在外加交流磁場下，所發出的混頻交流磁訊號 (χ_{ac})。當上述的外加交流磁場頻率在幾十到幾百萬赫茲時，磁性粒子-抗體複合物的單顆磁性粒子會受到外加交流磁場的驅動，產生旋轉，磁性粒子-抗體複合物因而產生交流磁訊號 (χ_{ac})。而當磁性粒子-抗體複合物與待測樣品混合後，樣品中的待測生物分子會透過磁性粒子表面上的專一性抗體，與磁性粒子相結合。如此，將造成磁性粒子-抗體複合物的部份磁性粒子體積變大，甚或造成多顆磁性粒子聚集在一起。在此情況下，磁性粒子-抗體複合物中可受外加磁場驅動而旋轉的磁性粒子數目，與先前未與待測樣品混合時的旋轉磁性粒子數目相較，會少了許多。故磁性粒子-抗體複合物的交流磁訊號 (χ_{ac}) 會因待測樣品中受檢生物分子與磁性粒子的結合而被降低，此即將該檢測方式稱為磁減量檢測的原因。由上述中可知，當樣品中含有越多的待測生物分子時，將有越多的磁性粒子與待測生物分子相結合，因此將會表現出更大的磁減量(圖二)。所以，透過磁性試劑的磁減量量測，可測得樣品中待測生物分子的含量(Yang, 2008; Yang, 2012)。此技術可以彌補 LC/MS/MS 和 HPLC 儀器昂貴、耗時、無法大量檢測等問題，同時磁量偵測模式也可克服色素影響 ELISA 呈色判讀的缺陷，而且靈敏度更高出 ELISA 分析法 1000 倍以上，因此我們相信方便、快速、便宜的高靈敏度的黴菌毒素磁減量檢測技術平台的建立，將有助於未來全世界食品黴菌毒素污染的檢測防治。

圖二、磁減量檢測技術原理。當樣品中含有越多的待測生物分子時，將有越多的磁性粒子與待測生物分子相結合，因此將會表現出更大的磁減量(圖示取自磁量生技公司)。

■ ImmunoMagnetic Reduction (IMR)



■ ImmunoMagnetic Reduction (IMR)



五、參考文獻

1. Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16(3), 497-516.
2. Blanc, P. J., Loret, M. O., & Goma, G. (1995). Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol Lett*, 17(3), 291-294.

3. Bunnoy, A., Saenphet, K., Lumyong, S., Saenphet, S., & Chomdej, S. (2015). Monascus purpureus-fermented Thai glutinous rice reduces blood and hepatic cholesterol and hepatic steatosis concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *BMC Complement Altern Med*, *15*, 88.
4. Chang, C. H., Lai, Z. X., Lin, H. L., Yang, C. C., Chen, H. H., Yang, S. Y., Horng, H. E., Hong, C. Y., Yang, H. C., & Lin, H. C. (2012). Use of immunomagnetic reduction for C-reactive protein assay in clinical samples. *Int J Nanomedicine*, *7*, 4335-4340.
5. Chen, C. Y., Chang, C. C., & Lin, C. W. (2015a). Clinical application of immunomagnetic reduction for quantitative measurement of insulin-like growth factor binding protein-1 in the prediction of pregnant women with preterm premature rupture of membranes. *Clin Chim Acta*, *438*, 337-341.
6. Chen, C. Y., Hwu, Y. M., Chen, C. P., & Chang, C. C. (2015b). Quantitative analysis of total beta-subunit of human chorionic gonadotropin concentration in urine by immunomagnetic reduction to assist in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Int J Nanomedicine*, *10*, 2475-2483.
7. Cheng, H., Chen, Y., Yang, Y., Chen, X., Guo, X., & Du, A. (2015). Characterization of Anti-Citrinin Specific ScFvs Selected from Non-Immunized Mouse Splenocytes by Eukaryotic Ribosome Display. *PLoS ONE*, *10*(7), e0131482.
8. Damodaran, C., Ramadoss, C. S., & Shanmugasundaram, E. R. (1973). A rapid procedure for the isolation, identification and estimation of citrinin. *Anal Biochem*, *52*(2), 482-488.
9. El-banna, A. A., Pitt, J. I., & Leistner, L. (1987). Production of Mycotoxins by Penicillium Species. *Syst Appl Microbiol*, *10*(1), 42-46.
10. Gayathri, L., Dhivya, R., Dhanasekaran, D., Periasamy, V. S., Alshatwi, A. A., & Akbarsha, M. A. (2015). Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. *Food Chem Toxicol*, *83*, 151-163.
11. Hong, C.-Y., Chen, W. S., Jian, Z. F., Yang, S. Y., Horng, H. E., Yang, L. C., & Yang, H. C. (2007). Wash-free immunomagnetic detection for serum through magnetic susceptibility reduction. *Appl Phys Lett*, *90*(7), 074105.
12. Huang, K. W., Yang, S. Y., Hong, Y. W., Chieh, J. J., Yang, C. C., Horng, H. E., Wu, C. C., Hong, C. Y., & Yang, H. C. (2012). Feasibility studies for assaying alpha-fetoprotein using antibody-activated magnetic nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, *7*, 1991-1996.
13. Huang, K. W., Yang, S. Y., Yu, C. Y., Chieh, J. J., Yang, C. C., Horng, H. E., Hong, C. Y., Yang, H. C., & Wu, C. C. (2011). Exploration of the relationship between the tumor burden and the concentration of vascular endothelial growth factor in liver-cancer-bearing animals using immunomagnetic reduction assay. *J Biomed Nanotechnol*, *7*(4), 535-541.
14. Kononenko, G. P., & Burkin, A. A. (2007). Immunoenzyme method for the determination of citrinin. *J Anal Chem*, *62*(7), 691-696.
15. Li, C., Zhu, Y., Wang, Y., Zhu, J.-S., Chang, J., & Kritchevsky, D. (1998). Monascus purpureus-fermented rice (red yeast rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr Res*, *18*(1), 71-81.

16. Lu, M. W., Yang, S. Y., Horng, H. E., Yang, C. C., Chieh, J. J., Hong, Y. W., Hong, C. Y., Yang, H. C., & Wu, J. L. (2012). Immunomagnetic reduction assay for nervous necrosis virus extracted from groupers. *J Virol Methods*, *181*(1), 68-72.
17. Ma, J., Li, Y., Ye, Q., Li, J., Hua, Y., Ju, D., Zhang, D., Cooper, R., & Chang, M. (2000). Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem*, *48*(11), 5220-5225.
18. Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., & Novotna, E. (2013). Ochratoxin A: developmental and reproductive toxicity-an overview. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, *98*(6), 493-502.
19. Manabe, M. (2001). Fermented foods and mycotoxins. *JSM Mycotoxins*, *51*(1), 25-29.
20. Mateo, E. M., Gil-Serna, J., Patino, B., & Jimenez, M. (2011). Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. *Int J Food Microbiol*, *149*(2), 118-126.
21. Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2005). Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chem*, *92*(3), 391-400.
22. Ostry, V., Malir, F., & Ruprich, J. (2013). Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. *Toxins*, *5*(9), 1574-1586.
23. Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C. A., & Shier, W. T. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev*, *29*(1), 3-26.
24. Reinhard, H., & Zimmerli, B. (1999). Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *J Chromatogr A*, *862*(2), 147-159.
25. Shu, P. Y., & Lin, C. H. (2002). Simple and sensitive determination of citrinin in *Monascus* by GC-selected ion monitoring mass spectrometry. *Anal Sci*, *18*(3), 283-287.
26. Speijers, G. J., & Speijers, M. H. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol Lett*, *153*(1), 91-98.
27. Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., & Oswald, I. P. (2012). Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed—Focus on Europe. *Toxins*, *4*(10), 788-809.
28. Tuomi, T., Johnsson, T., Hintikka, E.-L., & Reijula, K. (2001). Detection of aflatoxins (G, B), sterigmatocystin, citrinine and ochratoxin A in samples contaminated by microbes. *Analyst*, *126*(9), 1545-1550.
29. Wang, J. J., & Pan, T. M. (2003). Effect of red mold rice supplements on serum and egg yolk cholesterol levels of laying hens. *J Agric Food Chem*, *51*(16), 4824-4829.
30. Wang, J. J., Pan, T. M., Shieh, M. J., & Hsu, C. C. (2006). Effect of red mold rice supplements on serum and meat cholesterol levels of broilers chicken. *Appl Microbiol Biotechnol*, *71*(6), 812-818.
31. Yang, C. C., Yang, S. Y., Ho, C. S., Chang, J. F., Liu, B. H., & Huang, K. W. (2014). Development of

antibody functionalized magnetic nanoparticles for the immunoassay of carcinoembryonic antigen: a feasibility study for clinical use. *J Nanobiotechnol*, 12, 44.

32. Yang, S. Y., Ho, C. S., Lee, C. L., Shih, B. Y., Horng, H. E., Hong, C.-Y., Yang, H. C., Chung, Y. H., Chen, J. C., & Lin, T. C. (2012). Immunomagnetic reduction assay on chloramphenicol extracted from shrimp. *Food Chem*, 131(3), 1021-1025.
33. Yang, S. Y., Jian, Z. F., Chieh, J. J., Horng, H. E., Yang, H. C., Huang, I. J., & Hong, C.-Y. (2008). Wash-free, antibody-assisted magnetoreduction assays of orchid viruses. *J Virol Methods*, 149(2), 334-337.