

編號：CCMP94-RD-005

以免疫親和管純化及液相層析法檢測 中藥材內赭麴毒素 A

鄧正賢

亞洲大學

摘 要

赭麴毒素 A (Ochratoxin A) 是由麴黴菌和青黴菌所產生的，常分佈污染了糧食和動物飼料，是一種很強的腎毒性致癌物質並具有免疫特性。在許多國家中赭麴毒素 A 是引起腎病的原因之一。馬兜鈴酸是一種很強的腎毒性致癌物質已毫無疑慮並已遭禁用，然而在台灣所發生類似的中草藥腎病卻常無法檢驗出馬兜鈴酸。赭麴毒素引發腎衰竭，卻被誤認為馬兜鈴酸引起，最有名的例子就是發生在巴爾幹半島的流行性腎病，其腎臟病理特徵與中草藥腎病非常類似，然而後來有足夠的證據證實馬兜鈴酸非兇手而是食物發霉中的赭麴毒素引起的。寶路乾狗糧引起狗隻急性腎衰竭而死亡令飼主驚恐不安，已被證實是位在泰國儲存槽中的玉米發霉而產生的赭麴毒素所引起的。然而在台灣，有太多的腎衰竭病患不知其病因為何，故對腎毒性物質的調查是必須的，了解致病原因且加以避免，才是保障台灣民眾健康的最佳方法。故本計畫之目的在於建立中藥材內赭麴毒素 A 的高效液相色譜檢測方法，並瞭解台灣地區中藥材內赭麴毒素 A 的污染狀況，檢測樣品包括：(1) 果實類：枸杞、大棗、酸棗仁、山楂、五味子；(2) 麴類：神麴、淡豆豉、綠豆癢；(3) 延胡索及橘皮(陳皮)；(4) 其他易發霉中藥材：人參、牛膝、芍藥、當歸、葛根、地黃、白朮、澤瀉、甘草。

本計畫以免疫層析管純化樣品及高效液相層析儀(附螢光檢出器)檢測指標成分赭麴毒素 A，其分析方法已建立。分析方法流程為取 5 g 樣品粉碎加入 20 mL 溶媒(甲醇：1% NaHCO₃)，超音波震盪 1 分鐘，濾紙過濾，入免疫親和力分離管(OchraTest™ affinity column)，以 10 mL PBS 及水洗之，再以

1.5mL 甲醇沖提出指標成分。高效液相層析儀分析赭麴毒素指標成分時，移動相為 CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (45:54:1, v/v)，流速為 1.0mL/min，檢測螢光波長為 333nm、477nm。

利用上述分析技術進行對照標準品赭麴毒素 A 分析，赭麴毒素 A 在濃度 1-50 ng/mL，得線性迴歸方程式 ($Y=mX+b$) 及相關係數 (r) 為 $Y=0.5508-0.64834X$ ($r=0.9999$)，顯示良好線性關係。赭麴毒素 A 同日內及異日間相對標準偏差 0.37-2.23%及 1.82-2.55%，顯示再現性可以接受。單味藥材添加回收率為 83.5-105.6%，顯示準確性均可以接受。以三倍於指標成分和雜訊之波峰高度比的最小濃度視為儀器的偵測極限，赭麴毒素 A 的偵測極限為 0.01 ng/mL。目前已完成在台灣地區北、中、南各地市售檢品，包括枸杞 (16/47)、大棗 (8/41)、酸棗仁 (0/13)、山楂 (0/15)、五味子 (2/15)、神麴 (21/25)、淡豆豉 (5/13)、綠豆癩 (0/10)、延胡索 (0/15)、陳皮 (1/20)、人參 (0/15)、牛膝 (5/16)、芍藥 (0/0)、當歸 (3/16)、葛根 (0/15)、地黃 (3/16)、白朮 (2/16)、澤瀉 (1/15)、甘草 (2/16)、黃耆 (1/16) 等檢品，含量分別依序 0.29-19.8、0.38-16.7、0、0、0.34-7.34、0.15 - 45.2、0.35-15.8、0、0、0.05、0、0.08-4.3、0、0.28-23.65、0、3.23-17.8、0.45-5.88、0.22-3.66、0.32-5.65、0.16-8.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

故建議赭麴毒素 A 受檢藥材為枸杞、大棗、五味子、神麴、淡豆豉、牛膝、當歸、地黃、白朮、澤瀉、甘草、黃耆等，並暫時建議規範其限量標準為 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，然仍須進一步多點採樣並重複篩選確定。

關鍵詞：赭麴毒素 A、免疫親和、液相層析

Number: CCMP94-RD-005

Determination of Ochratoxin A in Chinese Medicines by Immunoaffinity Column Clean-up and High-Performance Liquid Chromatography

Jeng-Shyan Deng

Asia University

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is produced by several species of the fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium*. These fungi are ubiquitous and the potential for the contamination of food stuffs and animal feed is widespread. OTA has both antibiotic and toxic properties, the most important of which are its nephrotoxic, carcinogenic, and immunotoxic properties. It has been the cause of a nephropathy in many countries. Similarities between Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy have been described, including the association with urothelial carcinoma. Some evidence suggests that Balkan endemic nephropathy is an environmentally induced disease, related to exposure to fungal such as OTA. Some CHN patients failed to demonstrate the presence of aristolochic acid in the capsules taken by the patients in Taiwan. A correlation between certain questionable batches of Pedigree dog food manufactured in Thailand and numerous cases of kidney failure among dogs in Taiwan had been indirectly confirmed. Further investigations indicated that OTA which were formed by *Aspergillus ochraceus* were detected in Pedigree dry dog food in its Thailand corns. The purpose of this study was to investigate the presence of OTA in Chinese Crude Drugs in Taiwan. We first established the methods of analysis of OTA, then the samples of Chinese crude drugs were collected from traditional markets or retail shops and analyzed for the mycotoxin. Using organic solvents extraction、immunoaffinity column (solid phase

extraction) clean up and HPLC to analyze various kinds of Chinese crude drugs .

The method used commercial immunoaffinity columns for clean-up and HPLC with fluorescence detection for quantification of the toxin. The samples were extracted with 20 mL solution (methanol : 1% sodium bicarbonate =70:30) , filtered and applied to an OchraTest immunoaffinity column. The column was washed with 10 mL PBS buffer solution containing 0.01% Tween-20 and followed by water. OTA was eluted with methanol and quantified by reversed-phase HPLC with fluorometric detection (excitation wavelength 333 nm, emission wavelength 477 nm) using acetonitrile–water–acetic acid (45:54:1) as mobile phase.

The regression equations of OTA was $Y=0.5508-0.64834X$ ($r=0.9999$). The intraday and interday relative standard deviations of OTA were at the levels of 0.37-2.23% and 1.82-2.55%, respectively. Detection limit was 0.01ng/mL based on a signal-to-noise ratio of 3:1. The average OTA recoveries from spiked OTA-free crude drugs varied from 83.5-105.6%, and RSD% ranged from 4 to 6%. The method was applied to 47 samples of Fructus Lycii, 41 samples of Fructus Jujubae, 13 samples of Semen Zinziphi Spinosae, 15 samples of Fructus Crataegi, 15 samples of Fructus Schisandrac, 25 samples of Massa Medicata Fermentata, 13 samples of Sojae praeparatum Semen, 10 samples of Praeparatum Mungo, 15 samples of Rhizoma Corydalis, 20 samples of Pericarpium Citri Reticulata, 15 samples of Radix Ginseng, 16 samples of Radix Achyranthis Bidentatac, 0 samples of Rhizoma Paeonia lactiflora, 16 samples of Radix Angelicae Sinensis, 15 samples of Radix Puerariaef, 16 samples of Radix Rehmanniae, 16 samples of Rhizoma Atracylodis Macrocephalac, 15 samples of Rhizoma Alismatisf, 16 samples of Radix Glycyrrhizae, 15 samples of Radix Astragali, purchased from retail outlets in Taiwan. OTA was detected in 16, 8, 0, 0, 2, 21, 5, 0, 0, 1, 0, 5, 0, 3, 0, 3, 2, 1, 2, and 1 of samples, measurable at 0.29-19.8, 0.38-16.7, 0, 0, 0.34-7.34, 0.15-45.2, 0.35-15.8, 0, 0, 0.05, 0, 0.08-4.3, 0, 0.28-23.65, 0, 3.23-17.8, 0.45-5.88, 0.22-3.66, 0.32-5.65, 0.16-8.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

In conclusion, this study had shown that the HPLC method could be applied successfully to analyze Ochratoxin A occurred in the traditional Chinese herbal medicines. Therefore, an easy and suitable method for the detection and assay of Ochratoxin A in traditional Chinese medicines was established.

Keywords : Ochratoxin A, immunoaffinity column, HPLC

壹、前言

黴菌毒素是由黴菌產生的毒素，包括黃麴毒素 (Aflatoxin)、赭麴毒素 (Ochratoxin)、麥角毒素 (Triticale ergot)、橘毒素 (Citrinin)、Cyclopiazoic acid、Rubratoxin、Zearalenone、T-2Fusarium、diacetyoxyscirp-enol 等⁽¹⁾。

赭麴毒素 (Ochratoxins) 是真菌產生的一組結構類似的有毒代謝產物，主要危及人和動物腎臟，有 A、B、C、D 四種化合物，其基本結構式如圖一，其中毒性最大、與人類健康關係最密切、產毒量最高、對農作物的污染最重、分佈最廣的是赭麴毒素 A，赭麴毒素 A 是一種強力的肝臟毒和腎臟毒，並有致畸、致突變和致癌作用的真菌毒素⁽¹⁾。

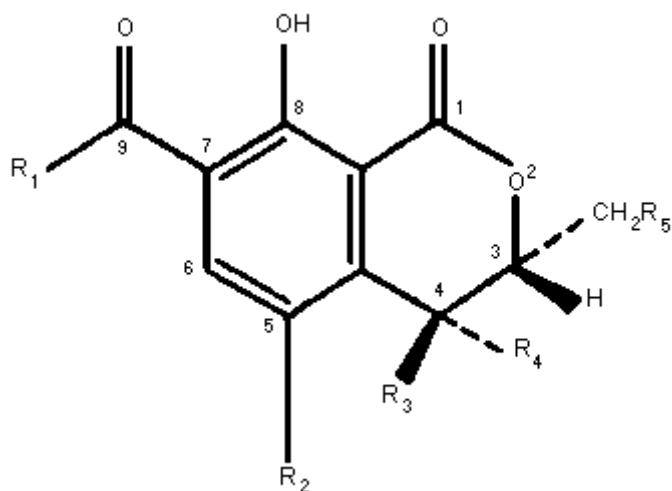


圖 1 赭麴毒素的基本化學結構式

赭麴毒素 A 引起的腎衰竭與馬兜鈴酸類似⁽²⁾，筆者認為，馬兜鈴酸是一種很強的腎毒性致癌物質已毫無疑慮，然而台灣如此多疑似中草藥腎病的病例不太可能是單獨由馬兜鈴酸所引起的，一定還有未經證實的毒素參與其中，如赭麴毒素，故本計畫希望建立中藥材內赭麴毒素 A 的液相色譜檢測方法，並瞭解台灣地區中藥材內赭麴毒素 A 的污染狀況。

一、本計畫為期一年，分二大部份進行

- (一) 第一部份為基礎分析研究，著重於建立中藥內赭麴毒素的高效液相分析方法

本計畫分析方法參照標檢局農產品檢驗科科長紀永昌所發表“進口咖啡豆中殘留之調查試驗摘要報告”⁽³⁾及美國食品藥物管理局(FDA) Mary Trucksess 博士於美國化學協會學術研討會中所發表之試驗法、並參照 Gerald Wogan 博士 1997 年 7 月於肯亞舉辦之第十七屆國際咖啡科學學術研討會所發表之試驗法 "ochratoxin A detection in coffee", 以免疫層析管純化樣品及高效液相層析儀(附螢光檢出器)檢測, 並參考 Emwisle⁽⁴⁾、Visconti^(5,6) 等文獻資料修飾實驗方法。

本研究採免疫親和力分離管(固相萃取法)前處理樣品, 評估其純化效果, 再以高效液相儀分析中藥(材)中赭麴毒素, 期望建立指標成分赭麴毒素 A 的簡單、快速、靈敏的分析方法。

(二) 第二部份為調查台灣地區中藥材內赭麴毒素 A 的污染狀況

本研究調查台灣各地市售中藥材赭麴毒素含量之現況, 實地訪察中藥材儲藏, 並以張賢哲教授⁽⁷⁾所著中藥炮製學、苗明三教授⁽⁸⁾所著常用中藥炮製新釋及應用、王虹⁽⁹⁾、梁容根⁽¹⁰⁾等論文及中藥界認定易發霉中藥材為對象, 在台灣地區北、中、南各地收集上述藥材檢品各 10-20 個進行赭麴毒素含量檢驗。事實上檢測對象除了易發霉中藥材外, 尚包括以麴炮製中藥材。

1. 果實類：枸杞、大棗、酸棗仁、山楂、五味子。
2. 麴類：神麴、淡豆豉、綠豆癩。
3. 延胡索及橘皮(陳皮)。
4. 其他易發霉中藥材：人參、牛膝、芍藥、當歸、葛根、地黃、白朮、澤瀉、甘草。

我們過去七年的研究結果顯示：馬兜鈴酸與比利時中草藥腎病有關, 並評估了防己類藥材藥理作用與肝腎毒性差異, 並建立指標成分馬兜鈴酸(aristolochic acid)、粉防己鹼(tetrandrine)的簡單、快速、靈敏的分析方法⁽¹¹⁻¹⁵⁾。

某些中藥材內含馬兜鈴酸而引發急性腎衰竭的事件自從行政院衛生署全面禁用含馬兜鈴酸中藥材及其製劑後已稍微平

息，而在大陸因北京同仁堂的龍膽瀉肝丸引發的腎衰竭也全面以不含馬兜鈴酸的川木通替換罪魁關木通而將告一段落。

然而在臺灣所發生的中草藥腎病（Chinese Herbs Nephropathy, CHN）真的都是馬兜鈴酸引起的嗎？

中藥材在貯藏期間常會有赭麴毒素的產生，赭麴毒素是由赭麴黴菌屬的一些菌系產生的二次代謝產物，其發生在適當的溫度及濕度的環境中。流行病學研究顯示，它是一致癌及腎毒物質，在自然界則是一種廣泛存在的環境污染物，長期攝取赭麴毒素與罹患肝腎癌有關。赭麴毒素常存在於米、麥、黃豆、紅豆、綠豆等農產品以及中藥材當中，一旦吃進大量赭麴毒素，會造成急性腎衰竭死亡，如果長期累積，則會引發尿毒症，甚至致癌⁽¹⁶⁻¹⁹⁾。

台灣高溫潮濕的氣候容易使黴菌生長，且民眾使用中藥的情形相當普遍，赭麴毒素是否會是中草藥腎病的另一元兇值得研究注意。

馬兜鈴酸是否會造成如此廣泛世界性的腎病，曾受人質疑⁽²⁰⁾。巴爾幹半島的流行性腎病（Balkan endemic nephropathy），其腎臟病理特徵為腎小管壞死及間質細胞廣泛性的纖維化，與 CHN 非常的類似，唯一的不同只是其患病到末期腎衰竭的時間較緩慢（超過 20 年），故亦有報導認為可能與馬兜鈴酸有關⁽²⁾，甚至也曾從巴爾幹居民食用的麵粉中分析出馬兜鈴酸，然而後來有足夠的證據證實馬兜鈴酸非兇手而是環境發霉物質中的赭麴毒素 A 引起^(21, 22)。

而在台灣，楊垂勳醫師⁽²³⁾指出在 1995-1998 年間在臺灣共發現 12 位 CHN 病患，由於他們服用的中草藥沒有鑑定出馬兜鈴酸，而楊醫師甚至引用一篇病例報告指出一位 36 歲婦人因月經不規則而服用 Jia-Wey-Guo-Sao-Pills（加味姑嫂丸）而造成不可逆腎衰竭的病例，其病理切片特徵與 CHN 一致。

總結歷年來診斷為 Fanconi 症候群的病例（即疑似中草藥腎病），台灣共被發表 83 例，33 例檢驗出馬兜鈴酸，50 例未知，整理如下表。

表 1 台灣地區所被發表疑似中草藥腎病案例

| 病例數 | 發病情況 | 中藥檢驗 | 報告單位及時間 |
|---------------------|--|--------------------------------|-----------------------|
| 一例，35歲，女性 | 病人服用 3 個月的強身中藥後產生多尿、多渴的情形，診斷為腎小管障礙、Fanconi 症候群，此時腎功能正常 (Cr .9mg/dL)。 | 無 | 長庚醫院 (1996) |
| 一例，36歲，女性 | 市售加味姑嫂丸服用 7 年，服藥目的為治療月經異常；腎切片顯示廣泛性腎間質纖維化。 | 無 | 台北榮民總醫院吳義勇醫師 (1998) |
| 12 例 (女 11 例、男 1 例) | 病人年齡 28-67 歲。服藥原因，強身 4 人、保健 3 人，而減肥、美容、高血壓、肝病、腰酸背痛各 1 人。服用時間 3-18 個月 (6 人)。所有病例腎切片均有不同程度間質纖維化。 | 六個中藥檢體未檢出馬兜鈴酸 | 國泰醫院楊垂勳醫師 (2000) |
| 20 例 (女 14 例、男 6 例) | 病人年齡 32-57 歲。服藥原因，強身 5 人、保健 5 人、減肥 4 人、肝病 3 人、高血壓 2 人，以及腸胃病 1 人。 | 無 | 新光醫院張宗興醫師 (2001) |
| 19 例 (女 17 例、男 2 例) | 病人年齡 28-67 歲。服藥原因，強身保健 9 人、減肥美容 3 人、酸痛 2 人，而高血壓、肝炎、婦科問題、腰酸背痛各 1 人。 | | 國泰醫院楊垂勳醫師 (2002) |
| 一例，60 歲男性 | 病人服用治腳腫的顧腎中藥 5 個月，發生雙腳無力、不能行走。診斷為 Fanconi 症候群。腎切片顯示馬兜鈴酸腎病變特徵。停藥後腎功能未恢復，仍持續惡化。 | 1 個檢體檢出馬兜鈴酸 25 μ g/g。 | 三軍總醫院楊松昇醫師 (2002) |
| 29 例 | 有 12 人接受腎切片，發現 10 名廣泛性纖維性間質性腎炎，符合中草藥腎病變、1 人有糖尿病腎病變合併腎纖維化間質性腎炎，1 人有 IgA 腎炎合併纖維化間質性腎炎。 | 27 個中藥檢體中，23 個檢體 (79%) 馬兜鈴酸陽性。 | 新光醫院謝適仲醫師 (2003) |
| 3 例高度懷疑個案，11 例疑似個案 | 對於 54 例泌尿上皮癌案例，調查使用中藥的情形。 | 四人提供檢體，三人檢出馬兜鈴酸。 | 台北榮民總醫院毒物科及泌尿科 (2003) |

泰國生產製造的寶路乾狗糧已被證實含有兩種毒素，是造成台灣、南韓和東南亞地區狗隻腎臟疾病增加的原因，而二種毒素分別為在泰國儲存槽中的玉米發霉而產生的赭麴毒素及褐黴素。從乾狗糧因發霉而引起狗隻急性腎衰竭的事件顯示，不可完全歸咎於馬兜鈴酸。而台灣民眾的急性腎衰竭某些一定是有赭麴毒素參與其中，如不小心食用了發霉的穀物或中藥材。

因此本年度的計畫重點著重於建立中藥 (材) 中赭麴毒素之

成份分析，並瞭解台灣地區中藥材內赭麴毒素 A 的污染狀況。

(三) 本計畫設計期望能達成以下目標

1. 期望建立中藥（材）指標成分赭麴毒素 Ochratoxin A 的簡單、快速、靈敏的分析方法。
2. 調查台灣地區中藥材內赭麴毒素 A 的污染狀況。
3. 探討出哪些藥材易受赭麴毒素 A 污染、並進一步對相關濃縮製劑做調查。
4. 調查台灣是否有因赭麴毒素 A 引起的腎衰竭，藉由方法的確立，對中藥來源的品質做一個良好的管制，促進國人使用中草藥的安全與發展。

黴菌毒素是由黴菌產生的毒素，包括黃麴毒素 (Aflatoxin)、赭麴毒素 (Ochratoxin)、麥角毒素 (Triticale ergot)、橘毒素 (Citrinin)、Cyclopiazoic acid (CPA)、Rubratoxin、Zearalenone、T-2Fusarium 毒素、diacetoxy-scirp-enol (DAS) 等⁽¹⁾。

赭麴毒素和黃麴毒素類似，是一種天然的黴菌毒素，為 *Aspergillus* 屬或 *Penicillium* 屬黴菌所產生的二級代謝產物，赭麴毒素 A 具有腎臟毒性，可能導致畸胎性、免疫毒性及致癌性，更潛在有基因毒性，可能引起腎癌和肝癌⁽¹⁾，國內對於赭麴毒素並無相關衛生標準，目前討論中的草案為超過五單位 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)，然而也有專家學者認為太過嚴苛，應定於二十 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 較為適當，現階段仍無統一標準。

本計畫乃針對赭麴毒素 A (Ochratoxin A) 的分析研究，故先探討有關國內外相關分析方法研究。

國內對於赭麴毒素並無相關衛生標準，經濟部商品檢驗局紀永昌⁽³⁾組長曾對進口咖啡豆中殘留赭麴毒素作調查試驗摘要報告，總計抽取咖啡 44 件，19 件被檢出含有赭麴毒素，檢出率為 43.2%，但含量皆低於 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ，藥檢局認為，這類檢驗食品在國內並非主要食物，民眾攝取量有限，含量不超過 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 的情況下，經換算為每週單位體重攝食量還算安全⁽³⁾。

國立臺灣大學食品科技研究所陳秋娥⁽²⁴⁾碩士論文曾針對普洱茶中黴菌毒素作研究，再抽驗各種普洱茶樣品（44 件）檢驗其含量，普洱茶樣品來源有一般傳統市場與商店，所有 44 件樣品均未發現有赭麴毒素存在⁽²⁴⁾。

中國文化大學實業計畫研究所農學組農學博士曾信雄，曾選擇中藥材中的陳皮與大棗，進行黃麴毒素的檢測，結果發現三成六的陳皮樣本呈陽性反應，七成四的大棗樣本也發現含有黃麴毒素，超過一般可容許範圍。

OTA 存在於各種穀類、穀類產品、咖啡、葡萄、藤蔓水果乾、葡萄汁、葡萄酒、可及巧克力、啤酒、豆類植物、牛乳及其製品以及香料。數種發表之分析方法已正式應用於實驗室間對玉蜀黍、大麥、小麥、小麥瑟皮、全麥、裸麥、葡萄酒、啤酒及烘焙咖啡豆中 OTA 含量之測定研究。這些方法主要是先以 RP-C18，silicagel60 之固相萃取匣或免疫親和管進行樣品前處理步驟後，以液相層析螢光測定之，可偵測至 $<0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

Nesheim 等人（1992）⁽²⁵⁾是第一個使用 LC 方法來測定玉蜀黍及大麥中之 OTA。其添加 10-50ng/g 之 OTA 於原材料中，先以氫仿：磷酸溶液萃取再通入 C18 固相萃取匣淨化以碳酸水溶液提洗分離。測定小麥及全麥中 OTA 之方法則由 Majerus 等人（1994）⁽²⁶⁾發表。

過去數年，使用抗體連結之免疫親和管做為樣品淨化步驟有效地改善 OTA 之分析。先以氫甲烷水溶液自樣品中萃取 OTA，再將過濾後的樣品以 PBS（Phosphate-buffered saline）溶液稀釋通過免疫親和管進行淨化；對於烘焙咖啡樣品則於免疫親和管淨化前先以 phenylsilane 固相萃取管淨化來避免咖啡因對親和管之不利影響，最終以 LC 螢光測定定量⁽⁴⁻⁶⁾。葡萄酒（特別是紅葡萄酒）中存在的 OTA 首先由 Zimme and Dick（1995）⁽²⁷⁾發表。

綜合以上國內外相關分析方法研究的文獻探討，有關中藥材赭麴毒素的分析方法及台灣市場品調查報告，尚未有相關發表，故本研究方法以免疫親和管前處理樣品，可減少有害溶劑之使用、有效改善萃取液之淨化及偵測靈敏度，並簡化樣品製備過程及淨化程序再以 LC 分析。

二、赭麴毒素毒性研究之文獻探討

赭麴毒素與花生、玉米中常見的黃麴毒素都屬於黴菌類毒素，可由赭麴菌 *Aspergillus ochraceus*、*Penicillium viridicatum* 等黴菌產生⁽¹⁾。過去赭麴毒素較少被提及，臨床上也較少赭麴毒素中毒的案例。事實上，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，因此都有可能受到赭麴毒素的污染。赭麴毒素分為 A、B、C、D 四種，其中以赭麴毒素 A 毒性最強。赭麴菌最好的生長溫度為 25°C，溼度為 18.5%。所以農作物在收成後，如何乾燥到水份小於 11% 以下及運送、儲藏、販賣以真空包密封維持乾燥程度，預防赭麴菌的生長是非常重要的。糧食的品質越差，赭麴毒素含量越高。豬、牛吃了污染的飼料，其內臟、牛乳，甚至肌肉中都會有赭麴毒素的存在。

大量食入赭麴毒素可能引起腎病變及流產，短期間內會引起急性腎衰竭、腎小管細胞的大量壞死、水腫、腹水、肺水腫及甚至死亡。長期低劑量食入赭麴毒素，則會引起腎小管近端細胞的壞死、變性及萎縮，腎間質的纖維化，及腎絲球的玻璃樣變性。此種變化與橘黴素 (citrinin) 引起的腎病變類似，合稱為黴菌毒素腎病變 (mycotoxic nephropathy)^(1, 28)。肝臟也會有傷害發生，但較不嚴重。

赭麴毒素 A 也可能有胎兒毒性，會引起流產及畸形胎。因此，懷孕中的婦女，為了避免誤食赭麴毒素，也應儘量不要喝咖啡。赭麴毒素 A 在動物實驗上，顯示可能有致癌性存在。

在醫學記錄上，赭麴毒素造成人體腎病變的病例，最著名的就是巴爾幹半島上的居民，因食用含有赭麴毒素的穀物後，使腎臟病成為當地的地域性疾病，並可能合併有泌尿系統的癌症^(2, 21, 22)。另外，現在所謂中藥馬兜鈴酸腎病變，卻常沒有分析出馬兜鈴酸，因此中藥的運送、貯藏及販賣，如何確保吃下的中藥沒受到黴菌，尤其是赭麴毒素的污染，更是有關公共衛生的重大課題。許多人喜歡吃中藥，且台灣腎臟病人及尿毒症患者多，其中的關連性值得進一步探討。

貳、材料與方法

一、實驗材料、試藥與儀器

(一) 實驗材料

自民國94年1月至民國94年4月間，本研究共蒐集台灣全省各地販售之中藥材，包括：1.果實類：枸杞、大棗、酸棗仁、山楂、五味子；2.麴類：神麴、淡豆豉、綠豆癩；3.延胡索及橘皮(陳皮)；4.其他易發霉中藥材：人參、牛膝、芍藥、當歸、葛根、地黃、白朮、澤瀉、甘草。

(二) 試藥

1. 赭麴毒素 A 標準品購自 Sigma 公司。
2. 移動相溶媒：甲醇、 CH_3CN 為 LC 級，購自 Mallinckrodt 公司 (Kentucky, USA)；冰醋酸為 LC 級，購自 Merck (Hohenbrunn, Germany)，超純度過濾水之電阻高於 $18\text{M}\Omega$ 。
3. PBS/0.1% Tween-20 Wash Buffer：以 8.0g NaCl、1.2g Na_2HPO_4 、0.2g KH_2PO_4 、0.2g KCl 加入 990mL 純水，再將 pH 值調至 pH 7.0 成為 PBS。取 1mL Tween-20 加 999mL PBS 即配成 PBS/0.1% Tween-20 Wash Buffer。
4. 1% NaHCO_3 ：取 10g NaHCO_3 ，以水溶解，定溶至 1L。5% NaHCO_3 ：取 50g NaHCO_3 ，以水溶解，定溶至 1L。

(三) 儀器

1. 高效液相層析儀，溶劑輸送系統為 Waters 600E Gradient Pump，附自動注射器 (Autosampler 717+)，連接 Waters 470 Fluorescence Detector。
2. 管柱為 Merck 公司 Lichrospher 100 RP-18e ($5\mu\text{m}$, 4.0 I.D.×250 mm)。
3. 數據處理為 Millennium 3.2 版。

4. 注射濾膜為 Millipore (PVDF) 13 mm Syringe Filter 0.45 μm 。
5. 固相萃取管柱 vicam 公司 Othra Test TM affinity column。
6. 電子天平 (Mettler Toledo AT201)。
7. 電子天平 (Ohaus GalaxyTM 160)。

二、實驗方法

(一) 現況調查

本計畫先實地訪察台灣各地中藥大盤商，了解中藥材儲藏狀況及易發霉種類，以及對發霉中藥的處理方式。

(二) 收集參考相關文獻考察

收集國內外有關曾報導驗出黴菌毒素的中藥材的報導，列為檢驗赭麴毒素的對象，並以國內外實驗檢驗方法，修飾並建立建立指標成分赭麴毒素 A 的簡單、快速、靈敏的分析方法。

(三) 收集實驗材料

本研究調查台灣各地市售中藥材赭麴毒素含量之現況，實地訪察中藥材儲藏，並以張賢哲教授⁽⁷⁾所著中藥炮製學、苗明三教授⁽⁸⁾所著常用中藥炮製新釋及應用、王虹⁽⁹⁾、梁容根⁽¹⁰⁾等論文及中藥界認定易發霉中藥材為對象，在台灣地區北、中、南各地收集上述藥材檢品各 10-20 個進行赭麴毒素含量檢驗。

事實上檢測對象除了易發霉中藥材外，尚包括以麴炮製中藥材。

1. 果實類：枸杞、大棗、酸棗仁、山楂、五味子。
2. 麴類：神麴、淡豆豉、綠豆癢。
3. 延胡索及橘皮（陳皮）。
4. 其他易發霉中藥材：人參、牛膝、芍藥、當歸、葛根、地黃、白朮、澤瀉、甘草。

(四) 分析方法之擬定

本計畫分析方法參照標檢局農產品檢驗科科長紀永昌所發表“進口咖啡豆中殘留之調查試驗摘要報告”⁽³⁾及美國食品藥物管理局 (FDA) Mary Trucksess 博士於美國化學協會學術研討會中所發表之試驗法、並參照 Gerald Wogan 博士 1997 年 7 月於肯亞舉辦之第十七屆國際咖啡科學學術研討會所發表之試驗法“ochratoxin A detection in coffee”，以免疫層析管純化樣品及高效液相層析儀 (附螢光檢出器) 檢測，並參考 Emwisle⁽⁴⁾、Visconti^(5, 6) 等文獻資料修飾實驗方法。

(五) 實驗裝置

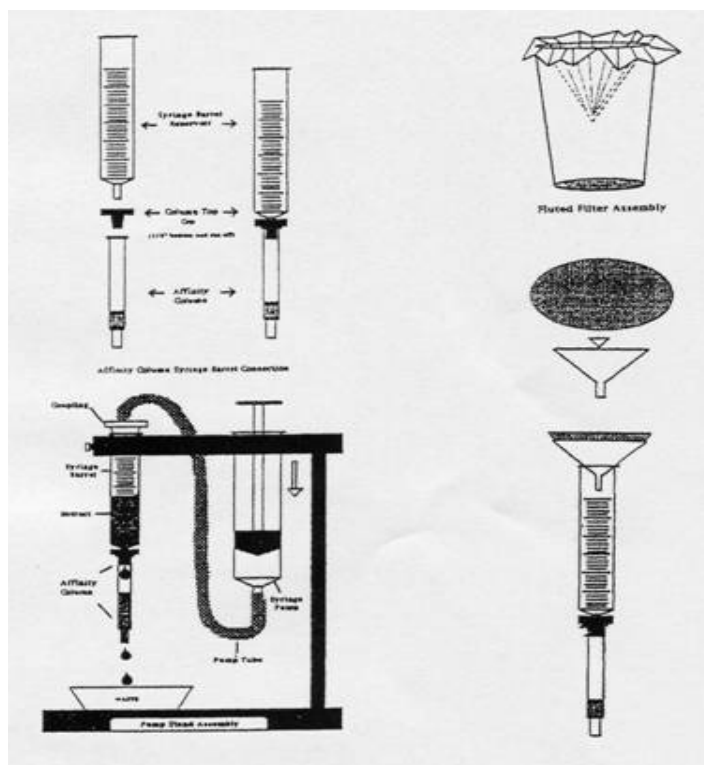


圖 2 免疫親和力分離管 Othra Test TM affinity column⁽³⁾

(六) 實驗方法

1. 免疫親和分離管 Othra Test TM affinity column

(1) 固相萃取 (SPE) 法

- a. 檢體：取 5g 檢體加 100 mL 1% NaHCO₃，震盪 1min，過濾，加入適量 PBS Buffer。

- b. 活化：10mL PBS Buffer 及 10mL 水。
- c. 裝填：固相萃尿管柱使用免疫親和力分離管 Othra Test TM affinity column。
- d. 沖提：以 3mL 甲醇沖提。收集沖提液並以氮氣吹乾，以 0.3mL 甲醇定容。

2. 高效液相層析法-指標成分赭麴毒素之分析

高效液相層析儀，溶劑輸送系統為 Waters 600E Gradient Pump，附自動注射器 (Autosampler 717+)，連接 Waters 470 Fluorescence Detector，管柱為 Merck 公司 Lichrospher 100 RP-18e (5 μ m, 4.0I.D. \times 250mm)；注射濾膜為 Millipore (PVDF) 13 mm Syringe Filter 0.45 μ m；分析赭麴毒素指標成分時，移動相為 CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (45 : 54 : 1, v/v)，流速為 1.0 mL/min，檢測波長為 333nm、477nm。

(1) 線性關係與偵測極限

精確稱取對照標準品赭麴毒素，以甲醇溶解並定容至 50 mL，使成作標準儲備溶液，再以甲醇稀釋調配成一系列濃度之標準溶液，分別取不同濃度之標準品溶液 20 μ L，注入高效液相層析儀分析，以標準品之濃度為 X 軸，波峰面積為 Y 軸，製作標準曲線，並求出線性迴歸方程式 ($Y=mX+b$) 及相關係數。

以不同濃度的標準品溶液，經 HPLC 分析，並以三倍於指標成分和雜訊之波峰高度比的最小濃度視為儀器的偵測極限。

(2) 波峰純度的測定方法

指標成分純度之檢定常循兩方面去驗證，一為使用光電二極體檢測器 (Photodiode Array Detector) 做指標分波峰純度 (Peak purity) 分析檢測，並輔以三度空間光譜圖 (3D plot)。另一則為以空白試驗求證，即另外製備無該生藥的空白標準湯劑溶液，再同時分析作對照，藉此以明瞭指標成分波峰是否與其他成分有重疊之虞。本研究同時以光電二極

體檢測器及空白試驗檢驗指標成分波峰的純度。

(3) 精密度試驗

取赭麴毒素對照標準品曲線範圍內選取四種濃度於同一日及不同五日重覆注入高效液相層析儀，重覆分析各五次，所得數據計算相對標準偏差。

(4) 準確度試驗

添加回收試驗：分別添加不同量的赭麴毒素對照標準品於藥材中，依再依檢品溶液之配製方法處理，使每份檢體中添加之濃度分別為不同濃度的赭麴毒素，各取 20 μ L 注入高效液相層析儀，分析求其添加回收率。

本研究調查台灣各地市售中藥材赭麴毒素含量 A 之現況，實地訪察中藥材儲藏，並以易發霉中藥材為對象，在台灣地區北、中、南各地收集上述藥材檢品各 10-20 個進行赭麴毒素含量檢驗，以瞭解目前國內市場常用藥材赭麴毒素含量之情形，並建議訂出合理之赭麴毒素殘留量標準，以為中藥藥政施政參考，進而提昇藥效及中藥品質，確保國人用藥安全。

參、結果

一、基礎分析研究，著重於建立中藥內赭麴毒素 A 的高效液相分析方法

本計畫以免疫層析管純化樣品及高效液相層析儀（附螢光檢出器）檢測指標成分赭麴毒素 A，其分析方法已建立。詳細流程敘述如下，圖 4-9 為藥材經免疫管測試結果的層析圖。

本計畫以免疫層析管純化樣品及高效液相層析儀（附螢光檢出器）檢測指標成分赭麴毒素 A，其分析方法已建立。

（一）分析方法流程如下

1. 萃取流程

- (1) 取 5g 樣品粉碎加入 20mL 溶媒（甲醇：1% NaHCO_3 ），超音波震盪 1 分鐘以 Whatman 5A 濾紙過濾。
- (2) 取 5mL 濾液加入 20mL PBS 緩衝溶液（含 0.1% Tween）。
- (3) 以 GF/A glassmicrofibre filter 過濾。

2. 免疫親和力分離管 OchraTest™ affinity column

- (1) 取 20mL 濾液加入免疫親和管（附固相萃取槽）（相當於樣品 1.0g），加壓抽吸，以每秒 1 滴速率通過管柱，直到空氣通過管柱。
- (2) 以 10mL PBS 洗之（wash）。
- (3) 以 10mL 水洗之（wash）。
- (4) 以 1.5mL 甲醇沖提出指標成分（elute）。

3. 高效液相層析法-指標成分赭麴毒素之分析

高效液相層析儀，溶劑輸送系統為 Waters 600E Gradient Pump，附自動注射器（Autosampler 717+），連接 Waters 470 Fluorescence Detector，管柱為 Merck 公司 Lichrospher 100

RP-18e (5 μ m, 4.0I.D. \times 250mm); 注射濾膜為 Millipore(PVDF) 13mm Syringe Filter 0.45 μ m; 分析赭麴毒素指標成分時, 移動相為 CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (45:54:1, v/v), 流速為 1.0 mL/min, 發射波長為 333nm、吸收波長為 477nm。

利用上述分析技術進行對照標準品赭麴毒素 A 分析, 赭麴毒素 A 在濃度 1-50ng/mL, 得線性迴歸方程式 ($Y=mX+b$) 及相關係數 (r) 為 $Y=0.5508-0.64834X$ ($r=0.9999$), 顯示良好線性關係, 如圖 3 所示。

赭麴毒素 A 同日內及異日間相對標準偏差 0.37-2.23%及 1.82-2.55%, 顯示再現性可以接受, 如表 7 所示。單味藥材添加回收率為 86.6-102.6%, 其以不同比例的鹼性溶液及介面活性劑而引起不同回收率如表 6 所示。

以三倍於指標成分和雜訊之波峰高度比的最小濃度視為儀器的偵測極限, 赭麴毒素 A 的偵測極限為 0.01ng/mL。

二、台灣地區中藥材內赭麴毒素 A 的污染狀況

市售中藥材中赭麴毒素 A 的污染含量, 目前已完成在台灣地區北、中、南各地市售檢品 (污染數/收集樣本數), 如表 2-表 5 所述, 包括枸杞 (16/47)、大棗 (8/41)、酸棗仁 (0/13)、山楂 (0/15)、五味子 (2/15)、神麴 (21/25)、淡豆豉 (5/13)、綠豆癢 (0/10)、延胡索 (0/15)、陳皮 (1/20)、人參 (0/15)、牛膝 (5/16)、芍藥 (0/0)、當歸 (3/16)、葛根 (0/15)、地黃 (3/16)、白朮 (2/16)、澤瀉 (1/15)、甘草 (2/16)、黃耆 (1/16) 等檢品, 含量分別依序 0.29-19.8、0.38-16.7、0、0、0.34-7.34、0.15 - 45.2、0.35-15.8、0、0、0.05、0、0.08-4.3、0、0.28-23.65、0、3.23-17.8、0.45-5.88、0.22-3.66、0.32-5.65、0.16-8.55 μ g/kg。

其中芍藥因回收率太低而無法檢測, 相關問題仍待探討。而神麴 25 個樣本數中共檢出 21 個為赭麴毒素 A 污染, 屬於高污染群。

肆、討論

赭麴毒素 A 因其腎毒性的化學性質，最近幾年有關分析的研究有逐漸增加趨勢，歐洲國家發表的論文更多，而有關檢測小麥中赭麴毒素 A 之比較實驗，本研究所使用的 OchraTest™ 牌與 OCHRAPREP 牌親和管柱之回收率皆可達 90% 以上，而本研究單味藥材添加回收率為 86.6-102.6%，顯示其準確率可接受。

過去有關赭麴毒素 A 的分析是採用溶劑萃取，接著以液相-液相萃取或固相萃取 (solid-phase extraction) 進化，結合檢測方法有酵素連結免疫吸附分析 (ELISA)、薄層析 (TLC) 或易相層析 (LC)，也因免疫親和管的使用大大改善特一性、大量共萃出物的移去，提高檢測感度，在濃度要求上具有高準確於正確性，且純化步驟快速，達到同時處理了萃取、濃縮及進化步驟，降低有害溶劑的使用。故本計畫以免疫層析管純化樣品及高效液相層析儀 (附螢光檢出器) 檢測指標成分赭麴毒素 A，其偵測極限以三倍於指標成分和雜訊之波峰高度比的最小濃度視為儀器的偵測極限，赭麴毒素 A 的偵測極限為 0.01ng/mL，顯示此方法靈敏度極高。

樣品的 PH 值對免疫親和管的敏感性，已趨近中性為主，一般 PH 值範圍是 5-8，而酸性會再傷害管柱裡的抗體，本研究以 PBS 緩衝溶液調整酸鹼性，然每一種中藥材的物化性質均有差異，單一的分析方法並無法將所有藥材與以精準的檢驗，常必須調整分析方法。如大棗粉碎後質地黏膩，重力過濾法無法將其過濾，必須以布氏漏斗加壓抽吸。甘草粉碎後纖維素多極易吸水，若以上述流程取 5g 樣品粉碎加入 20mL 溶媒 (甲醇:1% NaHCO₃)，超音波震盪 1 分鐘，回收率約只有 30%，必須重複加入 20 mL 溶媒，方可有較好的回收率。其他尚有芍藥無法與上述方法檢測，懷疑與 PBS 量有關，正嘗試不同方法。

對於某些基值而言，是否需要額外進化步驟以輔助免疫親和管雖仍有些爭議存在，而在免疫親和管之前再加一矽膠基值則固相萃管，特別是可溶性咖啡 (soluble coffee) 外面，矽膠基值可移去共萃出干擾物，其缺點是要食用到氯仿溶劑。另外結合 phenyl silane 固相萃管不僅可除去咖啡因於其萃出之干擾物，得到乾淨萃取溶液並可達 sub-ng/g 的檢測極限，平均回收率在 85% (65-97%)。本研究中無需再加以矽膠基值的固相萃管及可分析。

對於商品的限量，歐洲要求穀類原料為 5 μ g/kg，穀類產品如麵粉 3 μ g/kg，葡萄乾 10 μ g/kg (2002, 3 月)。大麥使用免疫親和管進行能力試驗比對，大麥加氫甲烷比水 (6/4, v/v) 用粉碎機高速萃取，過濾後以 PBS 溶液稀釋，免疫親和管進化，甲醇沖提，檢出現量再 0.2 μ g/kg 以下。原料的污染造成下游產品也留存著霉菌毒素。許多飲料如葡萄汁、葡萄酒，或穀類製造的啤酒都被檢出有 OTA。本研究為檢驗中藥材為主，檢測樣品枸杞、大棗、酸棗仁、山楂、五味子、神麩、淡豆豉、綠豆癩、延胡索、陳皮、人參、牛膝、芍藥、當歸、葛根、地黃、白朮、澤瀉、甘草等，研究結果提出枸杞、大棗、五味子、神麩、淡豆豉、牛膝、當歸、地黃、白朮、澤瀉、甘草、黃耆等可能被赭麩毒素 A 污染，大體而言仍有可能驗出微量赭麩毒素 A，應可歸咎於儲存狀況引起，然而令人震驚的是神麩藥材檢出赭麩毒素 A 的比率高達 85%，其高污染原因尚待證實。

神麩藥材檢出赭麩毒素 A 的比率高達 85%，回顧神麩的製麩過程中，是將藥材包埋於稻草或麻袋中，在適當的溫度及濕度下，待表面生出黃綠色菌絲，發酵完全，曬乾即供藥用，參與發酵作用的微生物可能有黴菌、酵母菌、細菌等，而檢出高比例的 OTA 大膽假設應該是製程中就受黴菌毒素之污染，造成健康上的顧慮，可見某些中藥材是在傳統炮製方法中就會受到赭麩毒素 A 污染而有腎毒性的危險，而非儲藏期間的問題。

然而台灣的中藥主要從大陸進口，有沒有可能是因為台灣中藥進口商進口大陸單一產地的問題，故對此神麩高比例的污染事件，採樣必須擴大到整個大陸地區，才能有較科學的證據，希望能進一步證實神麩是否為 OTA 廣泛性典型的污染。

歐盟由於數年前爆發戴奧辛 (dioxin) 污染及瘋牛病事件，使歐盟食品安全嚴重受威脅，歐盟為確保食品安全之高標準並加強消費者對歐盟食品安全政策之信心，於 2000 年通過歐盟食品白皮書，期以建立歐盟整體食品安全管理機制。嗣後亦於 2002 年通過一般食品法 (178/2002 號法規，已於本年 1 月 1 日生效) 並同時成立歐洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA)，俾期協調各會員國執行與食品安全有關之法規，如食品之可追溯性、防止有害食品 (含有害物質) 進入市場、食品供應鏈業者 (含進出口商) 之義務 (包括配合實施歐盟食品及飼料快速預警系統)、標示規範、不符合食品安全標準時須自市場撤回之規定。

有關歐盟對赭麴毒素的規範上，第 466/2001 號法規亦規範咖啡熟豆(roasted coffee)、輕烘培咖啡(ground roasted coffee)、即溶咖啡(soluble coffee)、酒(含小麥及小麥產品)及葡萄汁之赭麴毒素(ochratoxin A)最高限量標準。惟相關食品抽樣檢測方法之規定係依據 1985 年 12 月所制定之 85/591/EEC 指令，因此歐盟於 2002 年 3 月制定 2002/26/EC1 指令抽樣檢測方式，並於 2004 年 4 月通過第 683/2004 號規定 2，特別針對幼兒食品訂定赭麴毒素含量。此外，因考量抽樣檢測方式係決定赭麴毒素含量之主要因素，通過第 2005/5/EC 號指令 3，修訂原 2002/26/EC 指令之抽樣檢測方式。

國際間 OTA 的飲食攝取量評估是由平均消費量與 OTA 污染加權平均值得來。歐洲食物類別及咖啡之平均攝取量分別由歐盟委員會(1997) 19 及 Jorgensen (1998) 15 的報告提供，污染機全平均值則採用 2000 年日內瓦的 FAO/WH 研討會建議值。因此每一個加權平均乘上相對應的食物類別即可得到經由人類飲食所攝取到的 OTA 貢獻值。經由此方法，OTA 之平均總攝取量對 60 公斤體重的人約為每星期每公斤體重 45 ng。

從這些估算值，各種食物類別對公共健康具有可能之影響。究平均攝取量而言，穀類及葡萄星期每公斤體重約為 25 及 10ng，葡萄汁及咖啡則為 2-3ng，其他食物則是小於 1ng。

JECFA (the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 在 2001 年日內瓦地 56 次會議中決議在穀類、小麥、裸麥、大麥及相關衍生產品之一般可接受及執行之 OTA 最大限制量為 5 μ g/Kg，並維持暫行每週攝取容許量 (PTWI) 為 100ng/kg bw/week。

基於安全因素及考量經濟效應赭麴毒素 A 受檢藥材為枸杞、大棗、五味子、神麴、淡豆豉、牛膝、當歸、地黃、白朮、澤瀉、甘草、黃耆、並暫時建議規範赭麴毒素 A 於中藥材限量標準為 10 μ g/kg，但仍需進一步研究確定其限量標準。

伍、結論與建議

- 一、建立中藥材內赭麴毒素 A 的免疫高效液相分析方法。
- 二、台灣地區中藥材內赭麴毒素 A 污染。
- 三、建議赭麴毒素 A 受檢藥材。
 - (一) 果實類：枸杞、大棗、五味子。
 - (二) 麴類：神麴、淡豆豉。
 - (三) 易發霉中藥材：牛膝、當歸、地黃、白朮、澤瀉、甘草、黃耆。
- 四、暫時建議規範赭麴毒素 A 於中藥材限量標準為 10 μ g/kg，但仍需進一步研究確定其限量標準。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-005 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Website: <http://www.who.int>.
2. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, De Plaen JF, Ferluga D, Van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs nephropathy: A clue to Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int* 1994; 45: 1680-1688.
3. 紀永昌、張月娥：進口咖啡豆中殘留赭麴毒素之調查試驗摘要報告。標準與檢驗 2002; 43(7): 45-58。
4. Emwisle, A.C., Williams, A.C., Mann, P.J., Russel, J., Slack, P.T. & Gilbert. J. Combined phenyl silane and immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for the determination of ochratoxin A in roasted coffee: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 2000; 84: 444-450.
5. Visconti, A., Pascale, M. & Centonze, G. () Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1999; 864: 89-101.
6. Visconti, A., Pascale, M. & Centonze, G. () Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2000; 888: 321-326.
7. 張賢哲、蔡貴花：中藥炮製學，中國醫藥學院出版組，台中 1995；p.71-72。
8. 苗明三：常用中藥炮製新釋及應用，文光圖書，台北 2003；p.60-67。
9. 王虹：十二種中藥飲片防霉儲存條件實驗研究。中藥材 1992；15(8)：26。
10. 梁容根：四種藥材霉變狀況的實驗觀察。中藥材 1997；20(12)：615。
11. 鄧正賢：臺灣防己類藥材鑑別及品質評價之研究，中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中 1994。
12. 鄧正賢：防己類藥材之品質評估及其指標成分之分析方法研究，中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文，台中 2002。
13. Yuan-Shiun Chang, Jeng-Shyan Deng, Yoe-Ray Ku. Determination of

- aristolochic acid in traditional Chinese medicinal prescriptions containing Radix Aristolochiae Fangchi by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 2002; 25(6): 961-975.
14. 鄧正賢、許朝添、張永勳：防己類藥材之腎臟毒理學研究。腎臟與透析 2002：13(4)：195-201。
 15. Jeng-Shyan Deng, Yoe-Ray Ku, Yuan-Shiun Chang. Determination of aristolochic acid in traditional Chinese medicinal prescriptions containing Caulis Aristolochiae Manshuriensis by high performance liquid chromatography. *中國醫藥科學雜誌* 2002; 3(1): 9-18.
 16. van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., Scott, D.B. & Theron, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillusochraceus* Wilh. *Nature* 1965; 205: 1112-1113.
 17. Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G. & Cabanes, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl Environ. Microbiol.* 1994; 60: 2650-2652. 18. Teren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E. & Kevei, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 1996; 134: 171-176.
 18. Breitholtz-Emanuelsson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger, I. & Hult, K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. AOAC Int.* 1993; 76: 842-846.
 19. De Broe ME. On a nephrotoxic and carcinogenic slimming regimen. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 1171-1173.
 20. Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, Martlbauer E. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J Agric Food Chem* 2000; 48(6): 2483-2488.
 21. Arlt VM, Pfohl-Leskowicz A, Cosyns J, Schmeiser HH. Analyses of DNA adducts formed by ochratoxin A and aristolochic acid in patients with Chinese herbs nephropathy. *Mutat Res* 2001; 494(1-2): 143-150.

22. Yang CS, Lin CH, Chang SH, Hsu HC. Rapidly progressive fibrosing interstitial nephritis associated with Chinese herbal drugs. *Am J Kidney Dis* 2000; 35(2): 313-318.
23. 陳秋娥：普洱茶中黴菌毒素之研究，國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文，台北 2002。
24. Nesheim, S., Stack, M.E., Trucksess, W., Eppley, R. & Krogh, P. () Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn, barley and kidney: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 1992; 75: 481-487.
25. Majerus, P., Weber, R. & Wolff, J. Detection and determination of ochratoxin A in cereals and cereal products.; *Fed. Health Office* 1994; 37: 454-458.
26. Zimmerli, B. & Dick, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by highperformance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and Swiss data. *J. Chromatogr. B* 1995; 666: 85-99.
27. Krogh, P., Gyrd-Hansen, N., Hald, B., Larsen, S., Neilsen, J.P., Smith, M., Ivanoff, C. & Meisner, H. Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy: Diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J. Toxicol. Environ. Health* 1988; 23: 1-14.

柒、圖表

表 2 市售果實類中藥材枸杞、大棗、酸棗仁、山楂、五味子赭麴毒素 A 之檢測

| Crude drugs | Collected numbers | Contained numbers | Ochratoxin A (µg/kg) | >10 µg/kg Ochratoxin A |
|-------------|-------------------|-------------------|----------------------|------------------------|
| 枸杞 | 47 | 16 | 0.29-19.8 | 3 |
| 大棗 | 41 | 8 | 0.38-16.7 | 2 |
| 酸棗仁 | 13 | 0 | | |
| 山楂 | 15 | 0 | | |
| 五味子 | 15 | 2 | 0.34-7.34 | |

表 3 市售麴類中藥材神麴、淡豆豉、綠豆癩赭麴毒素 A 之檢測

| Crude drugs | Collected numbers | Contained numbers | Ochratoxin A (µg/kg) | >10 µg/kg Ochratoxin A |
|-------------|-------------------|-------------------|----------------------|------------------------|
| 神麴 | 25 | 21 | 0.15 - 45.2 | 8 |
| 淡豆豉 | 13 | 5 | 0.35-15.8 | 2 |
| 綠豆癩 | 10 | 0 | | |

表 4 市售延胡索及陳皮赭麴毒素 A 之檢測

| Crude drugs | Collected numbers | Contained numbers | Ochratoxin A (µg/kg) | >10 µg/kg Ochratoxin A |
|-------------|-------------------|-------------------|----------------------|------------------------|
| 延胡索 | 15 | 0 | | |
| 陳皮 | 20 | 1 | 0.05 | |

表 5 市售易發霉中藥材人參、牛膝、芍藥、當歸、葛根、地黃、白朮、澤瀉、甘草赭麴毒素 A 之檢測

| Crude drugs | Collected numbers | Contained numbers | Ochratoxin A ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | >10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Ochratoxin A |
|-------------|-------------------|-------------------|--|--|
| 人參 | 15 | 0 | | |
| 牛膝 | 16 | 5 | 0.08-4.3 | |
| 芍藥 | NO | 回收率僅 30% | | |
| 當歸 | 16 | 3 | 0.28-23.65 | 1 |
| 葛根 | 15 | 0 | | |
| 地黃 | 16 | 3 | 3.23-17.8 | 1 |
| 白朮 | 16 | 2 | 0.45-5.88 | |
| 澤瀉 | 15 | 1 | 0.22-3.66 | |
| 甘草 | 16 | 2 | 0.32-5.65 | |
| 黃耆 | 16 | 4 | 0.16-8.55 | |

表 6 以不同比例的碳酸氫鈉溶液及 Tween 20 探討回收率 (枸杞)

| Raw | Diuting solution ^a | pH correcting solution | Frist pH of solution | Final pH of solution | OA found (ng/mL) | Recovery ^b (%) |
|-----|-------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------------|
| 1 | 0.1% Tween 20 | MeOH:1%NaHCO ₃ =7:3 | 7.69 | 7.77 | 12.19 | 91.42 |
| 2 | 0.1% Tween 20 | MeOH:3%NaHCO ₃ =7:3 | 8.33 | 8.32 | 12.49 | 93.67 |
| 3 | 0.1% Tween 20 | MeOH:5%NaHCO ₃ =7:3 | 8.56 | 8.55 | 13.94 | 102.55 |
| 4 | 0% Tween 20 | MeOH:3%NaHCO ₃ =7:3 | 8.35 | 8.00 | 12.21 | 91.575 |
| 5 | 0.1% Tween 20 | MeOH:3%NaHCO ₃ =7:3 | 8.35 | 7.96 | 13.32 | 99.9 |
| 6 | 0.5% Tween 20 | MeOH:3%NaHCO ₃ =7:3 | 8.35 | 7.97 | 12.97 | 97.275 |
| 7 | 1% Tween 20 | MeOH:3%NaHCO ₃ =7:3 | 8.35 | 7.96 | 6.753 | 94.41 |

表 7 赭麴毒素 A 同日間及異日間標準偏差值 (Intraday and interday analytical precisions)

| Chemical compound | Concentration (ng/mL) | Intraday (R.S.D.,%) | Interday (R.S.D.,%) |
|-------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| Ochratoxin A | 2.5 | 2.25 | 1.80 |
| | 10.0 | 0.56 | 2.55 |
| | 40.0 | 0.37 | 1.91 |

N=5

· 赭麴毒素 A

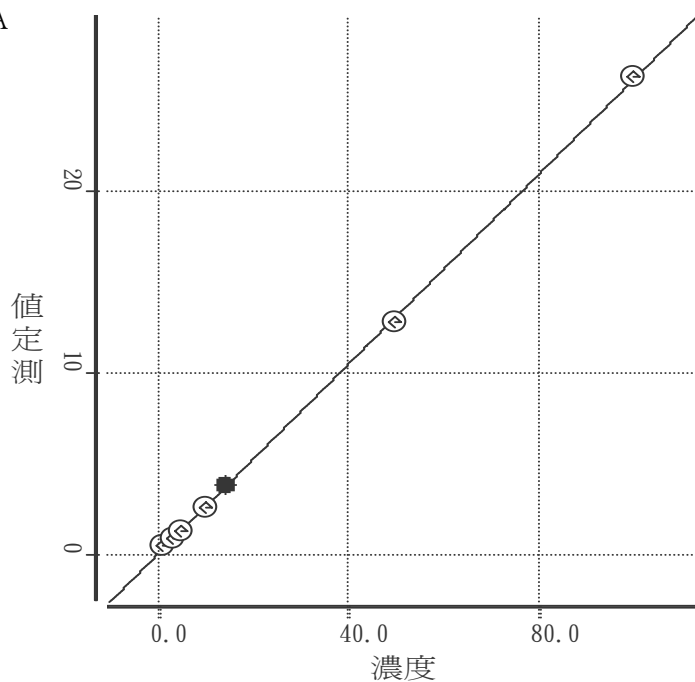


圖 3 赭麴毒素 A 的檢量線圖

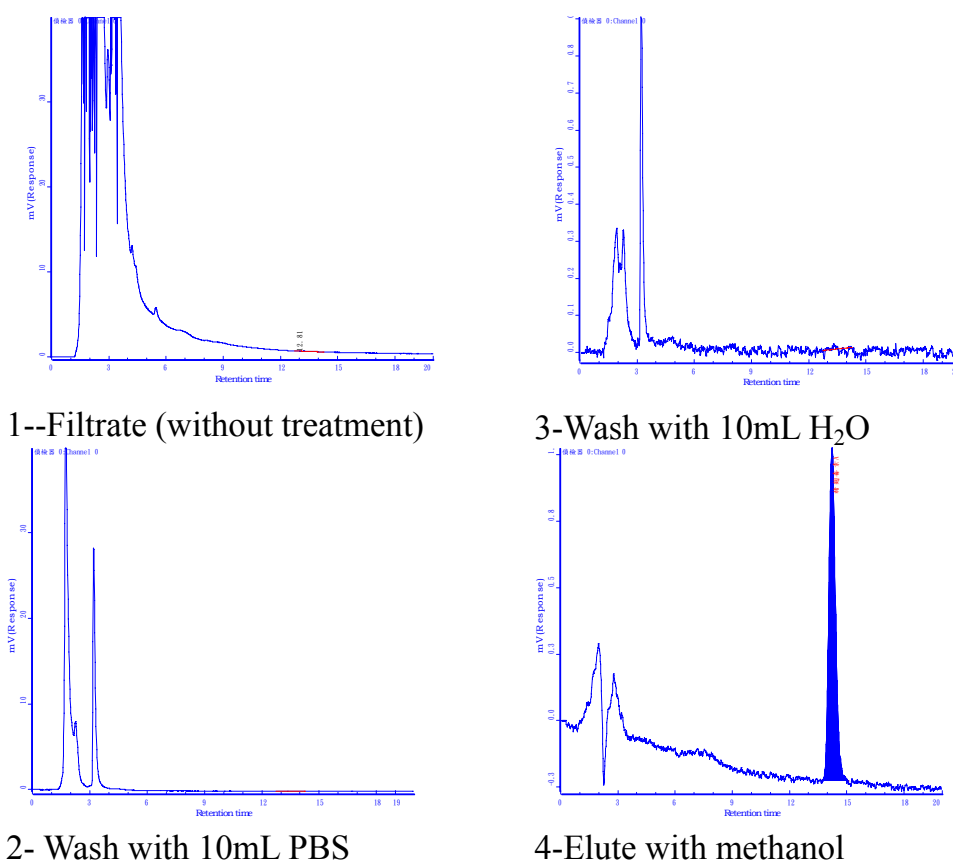
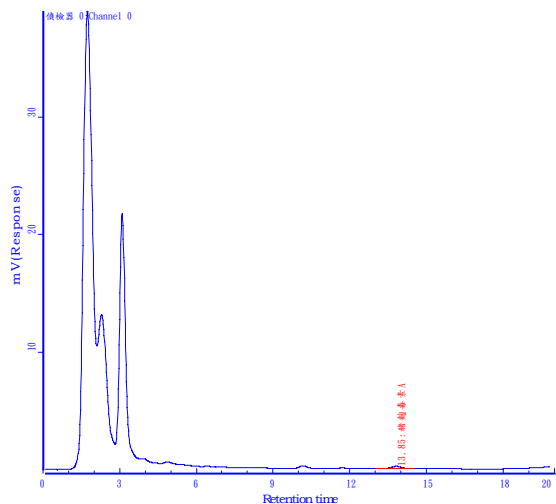
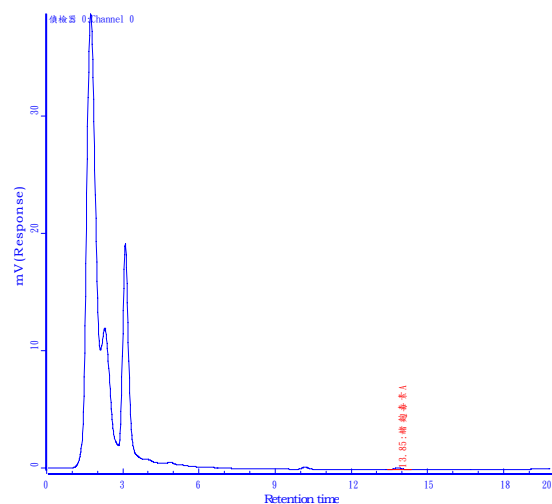


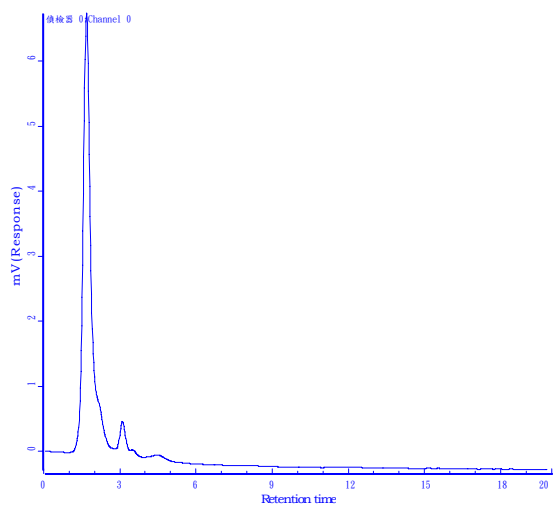
圖 4 枸杞經免疫管純化前後赭麴毒素 A 的高效液相層析圖



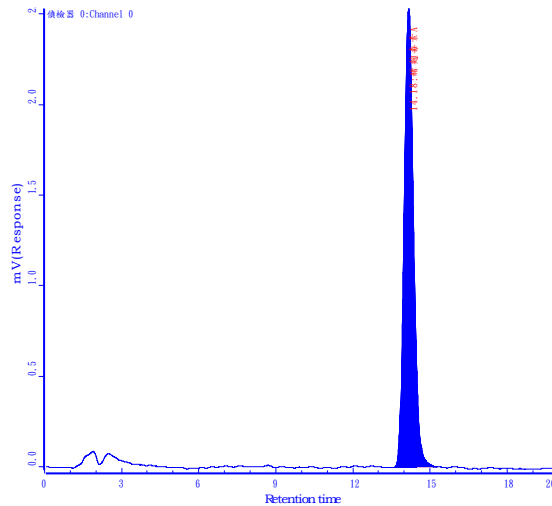
1--Filtrate (without treatment)



2- Wash with 10mL PBS

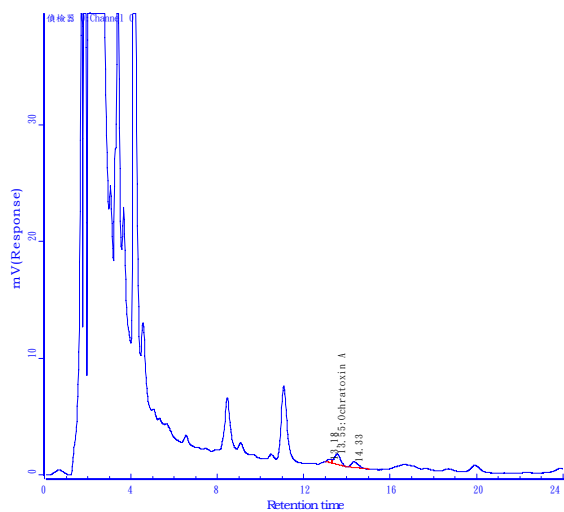


3-Wash with 10mL H₂O

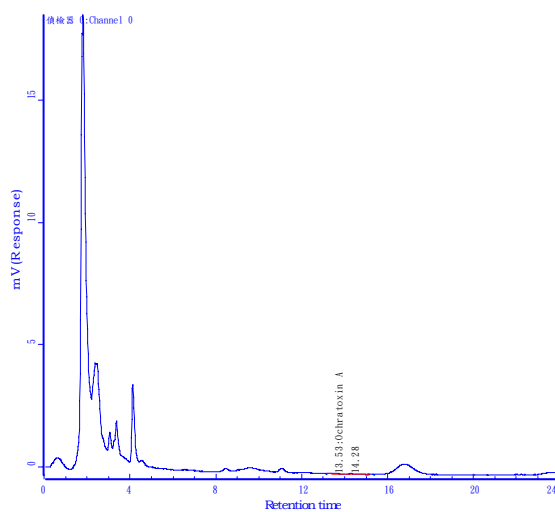


4-Elute with methanol

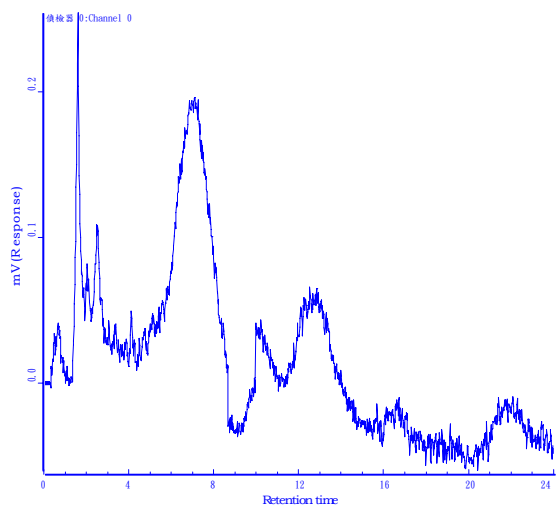
圖 5 大棗經免疫管純化前後赭麴毒素 A 的高效液相層析圖



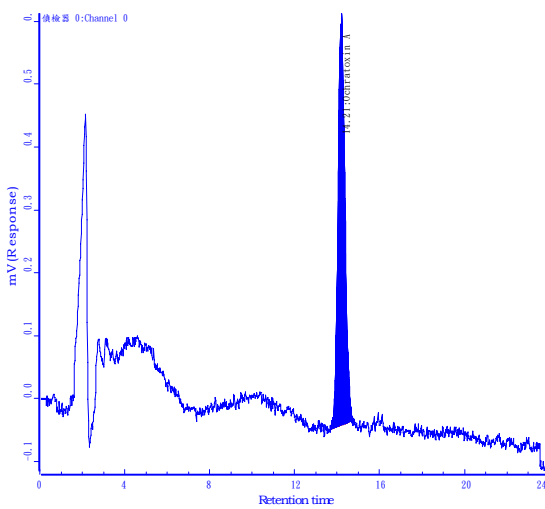
1--Filtrate (without treatment)



2- Wash with 10mL PBS



3-Wash with 10mL H₂O



4-Elute with methanol

圖 6 神麴經免疫管純化前後赭麴毒素 A 的高效液相層析圖

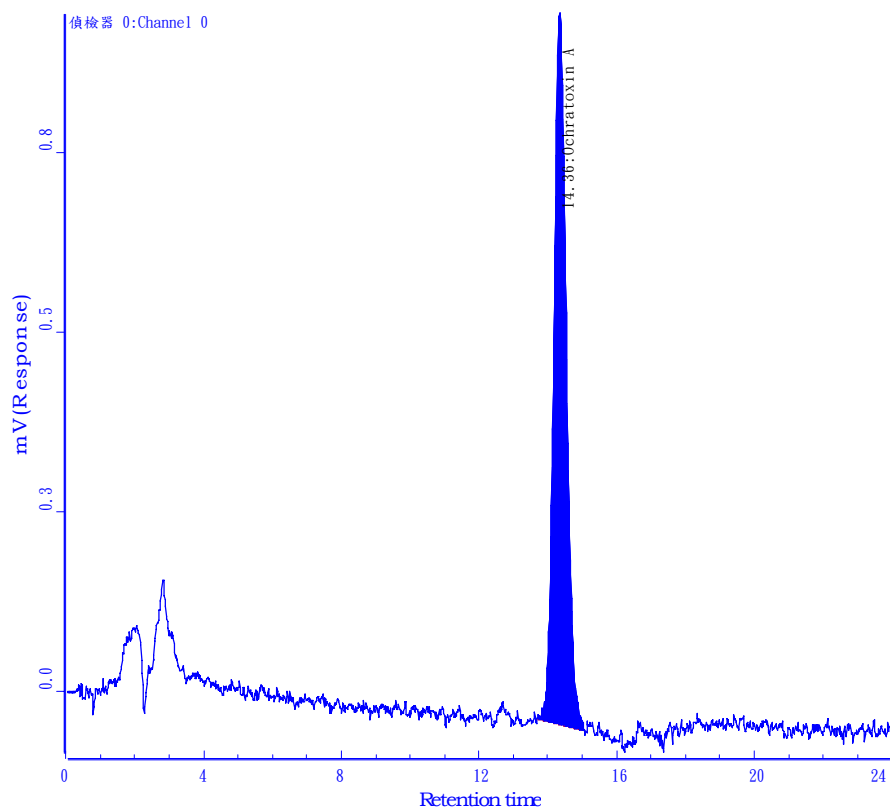


圖 7 五味子經免疫管純化後赭麴毒素 A 的高效液相層析圖

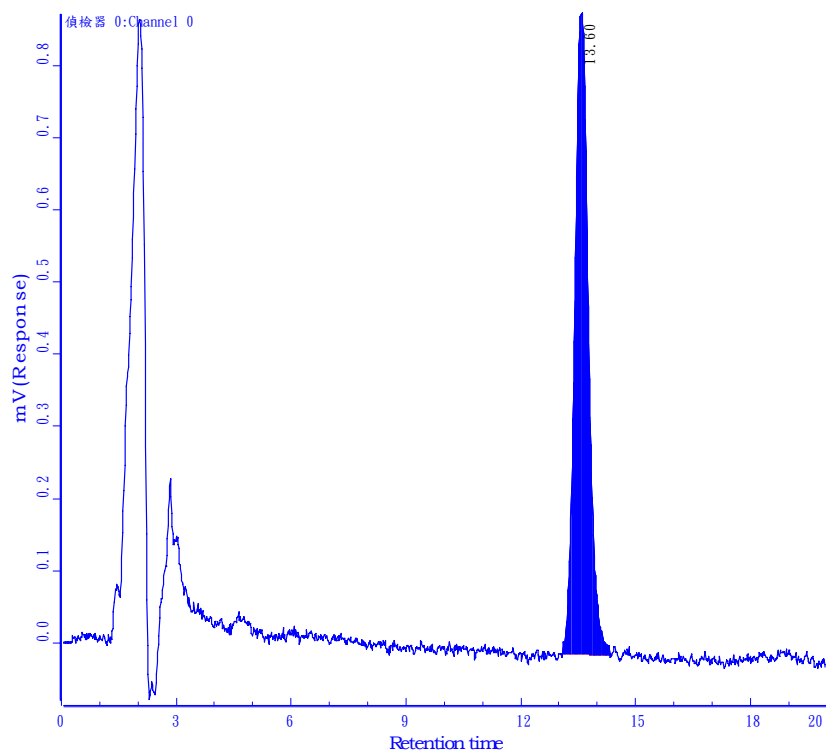


圖 8 淡豆豉經免疫管純化後赭麴毒素 A 的高效液相層析圖

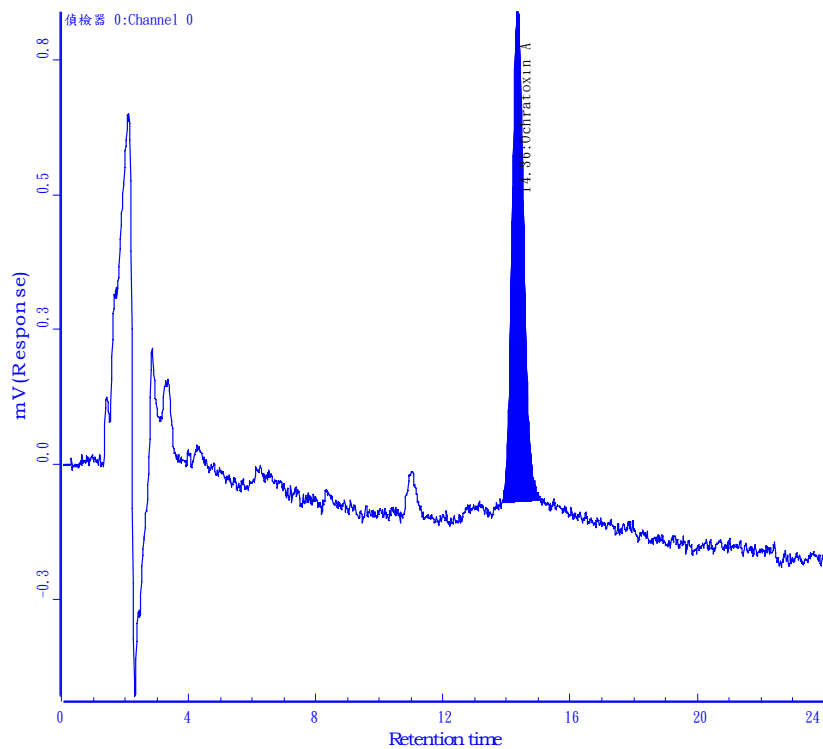


圖 9 陳皮經免疫管純化後赭麴毒素 A 的高效液相層析圖