

本省飼料中黃麴毒素之調查

黎南榮、鄭建盛、林正益、邱朝齊、謝木生

(臺灣省家畜衛生試驗所)

彭玄桂、李守義

(臺灣省農林廳)

摘 要

利用薄膜色層層析 (T. L. C) 檢查90件飼料。共有20件含有 T. L. C. 可測出之黃麴毒素，佔22.2%，其中混合飼料29.7% (8/30)，麩皮62.5% (5/8)，玉米30% (3/10)，黃豆粉40% (4/10)，但糖蜜 (3)，脫脂米糖 (6)，青菜粉 (6)，菜子粕 (2)，魚粉 (6)，粉頭 (5)，皆為陰性。

以螢光毒素計 (V. F. M.) 測定36件飼料樣本，中黃麴毒素 B₁ 之含量，19件含量低於測定標準，11件含量低於 19 ppb (Parts Per billion)，4件介於20至 49 ppb，2件含量超過 50ppb。

緒 言

黃麴毒素為由黴菌 *Aspergillus flavus* 等所分泌之一組毒素。^(8, 11)，經常污染保存於高溫多溼處之穀類及飼料⁽⁸⁾，此毒素依其於薄膜色層層析 (Thin Layer Chromatograph T. L. C) 及對紫外線反應之特性分為 B₁, B₂ (呈藍色螢光)，及 G₁, G₂ (呈綠色螢光)，四種主要成份^(5, 7)。

黃麴毒素病在1960年於英國首先有發生之報告，該年英國之火雞發生 X-disease，損失約10萬隻。經過追綜探討發現該病係由於採食污染 *Aspergillus flavus* 分泌之黃麴毒素之花生粉所引起。隨後經過許多學者之研究，知黃麴毒素亦可使人^(1, 3)，猴⁽⁶⁾，牛^(12, 13)，豬^(10, 15)，綿羊⁽⁵⁾，(1)羊⁽⁹⁾，犬⁽⁴⁾，鷄、鴨⁽⁶⁾，小白鼠、鼠、田鼠、雪貂、彩虹鱒 (Rain bow trout)^(8, 9, 13)等中毒，其主要侵害器官為肝臟，可引起肝細胞之脂肪性變性，膽小管增生，纖維組織增加及肝硬化⁽¹³⁾，對鼠及彩虹鱒且已經證明有致癌性⁽²⁾。

由已經發表之報告知幼畜對此毒素之感受性較大⁽⁸⁾，會引起發育遲緩，及死亡等情形。因飼料及食品受到黃麴毒素之污染會為害到人及畜殖業，美國 FDA 檢定標準規定飼料中的含量，不可超過 20ppb⁽⁹⁾。本試驗為調查本省飼料受黃麴毒素污染之程度，作為防治本病之參考。

材料與方法

供試飼料為由農林廳抽驗飼料及由市面購得者。

試驗一：黃麴毒素之定性測定。

儀器：脂肪抽出器 (Sohxlet)，恆溫水槽，紫外線燈 (365nm) TLC 展開槽及玻璃板。

試藥：1. 氯仿 (Chloroform)：ACS 級。

2. 甲醇 (Methanol)：ACS 級

3. 石油醚 (Petroleum ether) ACS 級

(104)

4. 矽膠 (Silica gel) : Wako gel B10

5. 黃麴毒素標準液：由美國 Southern Marketing and Nutrition Research Division Agricultural Research Service 分讓。

方法：稱取飼料25克，於脂肪抽出器內以甲醇抽取4小時後再以氯仿抽取5小時，將上述兩項抽出液混合於恆溫水槽上加溫使其乾燥，冷卻後以石油醚洗滌，將沈渣加溫使其乾燥再以60%甲醇（甲醇60+水40）與氯仿混合液溶解之置於分液漏斗，分離氯仿層，乾燥之，再以0.5ml 氯仿溶解供T.L.C. 用。

T. L. C. 薄膜：以 Wako gel B10製成 250nm 之薄膜，活化後備用。

T. L. C. 展開：以 5ul 之微量吸管，吸取抽出液（T. L. C. 用），點於薄膜上，另外吸取 5ul 之黃麴毒素 B₁（3ug/ml）點於另外一點做為對照，然後以展開液（氯仿+甲醇= 96+4）展開，展開後取出乾燥於 365nm 之紫外燈下判讀。

試驗二，飼料中黃麴毒素之定量。

儀器，1. Velasco Fluorotoxin Meter (V. F. M.)，

2. 果汁機。

試藥：1. 黃麴毒素 B₁ 標準溶液：

2. 丙酮：ACS 級。

3. 甲醇：ACS 級。

4. 氯仿：工業級，無色。

5. 氫氧化鈉 (Sodium hydroxide) : ACS 級。

6. 氯化鐵 (Ferrous chloride) : Fisher I-89

7. 海砂 (Sea Sand) : Fisher S-25

8. 矽膠 (Silica gel) : Merck 70-230

9. 氫氧化鋁 (Aluminum hydroxide) : Fisher A-950

10. 氟矽 (Florisil) : Fisher F-101

方法：

I. 微圓柱之準備：微圓柱 5mmO. D×200mm 長，裝填法如圖。

(1) 將圓柱之底端以玻璃棉塞住，厚約 2-3mm。

(2) 將一小漏斗放於圓柱上。

(3) 用藥杓加入海砂約 5-7mm 厚。

(4) 加氟矽 5-7mm。

(5) 再加海砂 5-7mm。

(6) 加矽膠 15mm。

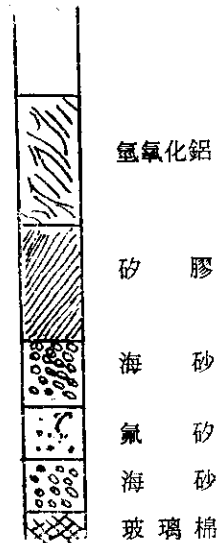
(7) 加氫氧化鋁 15mm。

II、飼料之抽取：

稱取 50 克 (±0.5克) 磨碎充分混合之飼料，放入果汁機中，加 250ml 丙酮-水 (85+15) 以高速抽取 3 分鐘，然後以 24cm 之 Whatman 2V 濾紙過濾。

III、除去干擾色素：

取上述濾液 90ml 放入含有鐵膠之三角瓶內 (將 100ml 蒸餾水放入 250ml 之三角瓶內加 10ml 之 10% 氯化鐵液，然後再加 15ml 之 4.83% 氫氧化鈉液，搖動三角瓶使形成膠體) 當濾液加入後用塞子塞住，猛搖 30~45 秒，再以 24cm 之濾紙 (S&S 588) 濾入 250ml 之刻度量筒內，取



180ml 濾液放入 500ml 之分液漏斗，再以同一量筒量取 180ml 蒸餾水加入分液漏斗內。

IV 黃麴毒素之抽取：

將 50ml 氯仿放入上述分液漏斗內猛搖 30~45 秒然後靜置等其分離後，將氯仿層放入燒杯內，將燒杯於恆溫水槽上使其乾燥，然後取出使其冷卻。

V 將抽出物移於小玻璃瓶內（或小試管）

以吸管吸取 2ml 氯仿—甲醇（96+4）放入上述燒杯內將抽出物溶解後移入小玻璃瓶內，以同樣方法再將燒杯洗兩次每次 2ml，將上述三次溶液混合均勻，此液相當於 15 克飼料之抽出物溶於 6ml 之溶液內。

VI 黃麴毒素於微圓柱內之層析。

將已製好之微圓柱之底端浸入氯仿中，使氯仿溼潤各層。再以 1ml 之注射筒吸取 1ml 之抽出液（V），由圓柱頂端注入使其流出，當液體流完後再將 1ml 之氯仿—甲醇（96+4），加入圓柱頂端使其流出，當圓柱仍為溼潤狀態時將其放入 VFM 內測讀，再將圓柱轉 180° 重測一次，黃麴毒素之含量即為此兩讀數之平均值。

VII 標準 20ppb 微圓柱之裝備。

依照 II、III、IV、V 之方法抽取不含黃麴毒素之飼料，取 1ml 之抽出液放入小玻璃瓶內，再加 50ng 之黃麴毒素 B₁，再依照 VI 之方法製成 20ppb 之標準圓柱。此圓柱可使用兩星期，每次使用前須以氯仿溼潤之。

結 果

試驗一，共測定混合飼料及單味飼料共 90 件，其中陽性者 20 件，佔 22% 詳如表 1。

表 1 本省飼料中黃麴毒素污染情形

Table 1. Qualitative assay on Aflatoxin of feeds in Taiwan

飼 料 種 類 feeds	供 試 件 數 Number	陽 性 數 positive	陽性百分率(%) positive%
混 合 飼 料 commercial mixed feeds	30	8	26.7
麥 (wheat bran) 皮	8	5	62.5
玉 (corn) 米	10	3	30
黃 豆 粉 (soybean oil meal)	10	4	40
糖 (molasses) 蜜	3	0	0
脫 脂 米 糠 (solvent—processed rice bran)	6	0	0
青 菜 粉 (dry roughages)	6	0	0
菜 子 粕 (rape seed meal)	2	0	0

(106)

魚粉 (fish meal)	粉	6	0	0
粉頭 (wheat flour middlings)	頭	5	0	0
總計 Total	計	90	20	22.2

試驗二，由農林廳送檢36件飼料中19件不含黃麴毒素，1—19 ppb 者11件，超過 20ppb 者5件詳如表2。

表2 本省飼料中黃麴毒素含量

Table 2. Qualitative assay on Aflatoxin of feeds in Taiwan

種類 feeds	供試件數 Number	黃麴毒素含量 (ppb) Contents (ppb)						
		0	1~9	10~19	20~29	30~39	40~49	50
玉米 (corn)	29	18	6	6	2	0	0	1
玉米麩 (corn bran)	1	0	0	0	0	0	1	0
高粱 (milo grain)	4	1	1	2	0	0	0	0
醬油粕 soy pomlance	1	0	0	0	0	0	0	1
麩皮粒 wheat bran	1	0	0	0	0	1	0	0
總計 Total	36	19	7	4	2	1	1	2

討 論

由試驗1及試驗2知本省飼料已受黃麴毒素之污染。

由農林廳送檢29例玉米樣本中，有3件超過F. D. A. 之20ppb標準，而玉米麩、麩皮粒及醬油粕其所含之黃麴毒素均超過20ppb甚多，此可能與黃麴菌主要於穀物之表面發育，增殖，及醬油製造過程之黴菌發育有關。

由已發表之報告知黃麴毒素為黴菌毒素中最重要且最常見之一種毒素。因其會引起肝中毒及致癌性而造成公共衛生上之問題及畜殖，業經濟上之損失，而使全世界都對此毒素給予極大之注意力。本毒素為由黃麴菌 *A. flavus* 分泌之一類毒素，其產生毒素之能力與穀粒之完整性（破損則易產生）及溫度，溼度有密切之關係。單由黴菌之分離並不能代表此穀物之污染程度，因經常由乾燥之穀物分離出能產生黃麴毒素之黴菌孢子，但黴菌並未發育亦未產生毒素⁽⁸⁾。毒素含量之測定實為飼料檢查最有效與直接之方法。毒素之測定以 T. L. C. 法最簡單易行，可作為定性之方法，但其定量之測定則因人為的誤差很大，不易準確。本試驗所用之 V. F. M. 法，係根據 A. O. A. C. ⁽¹⁴⁾ 之方法改良而成，其操作簡單、正確，人為之誤差極小，可作為飼料之例行檢查用。

誌 謝

本試驗承蒙臺大醫學院生化研究所林國煌教授 A. flavus, Aflatoxin B, 及技術上懇切之指導, 使試驗能够順利進行, 特此致謝。

參 考 文 獻

1. Allcroft, R., and R. B. A. Carnaghan, 1963: Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Vet. Rec.* 75: 259—263
2. Alpert, M. E., and Davison, C. S. 1969: Mycotoxins: A possible cause of primary carcinoma of the liver. *Am. J. Med.*, 46: 325—329
3. Amla, I., Kamala, C. S., Gopala, Kirshma, G. S., Jayarau, P., Sreenivasmurthy, V., and Parpia, H. A. B. 1971: Cirrhosis in children from peanut meal contaminated by aflatoxin. *Am. J. Clin. News*, 24: 609—614
4. Bailey, W. S. and Groth, Ur. A. H. 1959: The relationship of hepatitis of dogs and moldy corn poisoning of swine. *J. A. V. M. A.*, 134: 514—516
5. Brown, J. M. M., and L. Abrams, 1965: Biochemical studies on aflatoxicosis onderste poort. *J. Vet. Res.* 32: 119—146
6. Cardiner, M. ., and B. Oldroyd, 1965: Avian aflatoxicosis. *Australian Vet. J.* 41: 272—276.
7. Carnaghan, R. B. A., Hartley, R. D., and O'Kelly, J. 1963: Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 200: 1101
8. Ciegler, A., Kadis, S., Ajl, S. J., 1971: Microbial toxins: VI. Fungal toxins academic press. London & New York
9. Edds, G. T. 1973: Acute aflatoxicosis: A review. *J. A. V. M. A.* 162: 304—309
10. Hardiing, J. D. J., Done, J. T., Lewis, G., and Allcroft, R., 1963: Experimental groundnut poisoning in pigs. *Res. Vet. Sxi.* 4: 217—229
11. Hesseltine, C. W., O. L. Shotwell, J. J. Ellis., and R. D. Stubblefield, 1966: Aflatoxin formation by aspergillus flavus. *Bacteriol Rev.* 30: 795—805
12. Hill, K. ., 1963: Groundnut toxicity in cattle: Experimental poisoning of calves and a report of clinical effects in older cattle, Commention on the histological appearances in serial liver biopsies and postmortem specimens. *Vet. Rec.*, 75: 493—494
13. Newbernce, P. M. 1973: Chronic aflatoxicosis. *J. A. V. M. A.* 163: 1262—1267
14. Pons, W. A., A. F. Cucullu, L. S. Lee, J. A. Robertson, A. O. Franz., and L. A. Goldblatt, 1966: Determination of aflatoxins in agricultural products iuse of aqueous acetone for extraction. *J. Assoc. Off. Agri. Chem.* 49: 554—562
15. Wilson, B. J., Teer, P. A., Barney, G. H., and Bolld, F. R. 1967: Relationship of aflatoxin to epizootics of toxic hepatitis among animals in souherr United States. *Am. J. Vet. Res.* 28: 1217—1230

Study on Incidence of Aflatoxin Contamination in Feeds

N. J. Li., C. S. Cheng., C. Y. Lin, T. C. Chiu., M. S. Shieh
(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

S. K. Pon., S. Y. Lee

(Department of Agriculture & Forestry Provincial Government of Taiwan)

Summary

By the thin-layer chromatography, 90 samples of feeds were examined. And 22.7% of them contained TLC detectable amounts of aflatoxins: commercial mixed feeds 26.7% (8/30), wheat bran 2.5% (5/8), corn 30% (3/10) and soy bean oil meal 40% (4/10) respectively. But Molasses (3), solvent-processed rice bran (6), dry roughages (6), rape seed meal (2), fish meal (6), and wheat flour middlings (5) all are aflatoxin negative.

The contents of aflatoxin for 36 samples had been measured, 19 were negative, 11 had from a trace to 19 ppb, 4 had from 20 to 49 ppb, 2 had more than 50ppb.