

食品中主要真菌毒素检测方法研究进展

Progress on detection methods of main mycotoxins in food

袁 航

丁同英

YUAN Hang DING Tong-ying

(无锡城市职业技术学院, 江苏 无锡 214000)

(Wuxi City College of Vocational Technology, Wuxi, Jiangsu 214000, China)

摘要:文章重点介绍了黄曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、链格孢霉毒素等毒性较强的真菌毒素污染食品状况和毒性,并就当前国内外常用的真菌毒素检测方法进行了概述,分析了各方法的优缺点,最后对今后真菌毒素检测方法的发展方向进行了展望。

关键词:真菌毒素;检测;多毒素;食品

Abstract: This review focused on the situation and toxicity of aflatoxin, deoxynivalenol, and alternaria toxin contaminated food, and the current commonly used mycotoxin detection methods at domestic and abroad were summarized, with the advantages and disadvantages of each method being analyzed and compared. Finally, the development direction of mycotoxin detection method in the future was prospected.

Keywords: mycotoxins; detection; multi-mycotoxin; food

真菌毒素是由真菌分泌的一类天然代谢产物,食品生产的每个阶段均可产生,会污染食品,并通过食物或动物饲料间接传递给消费者,对人类健康造成威胁。食品中真菌毒素的存在是全球关注的问题,联合国粮食与农业组织(FAO)统计,全球粮食有25%受到真菌毒素污染^[1],其中对食品安全威胁最大的真菌毒素包括黄曲霉毒素(AFs)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、玉米赤霉烯酮(ZEN)等^[2]。随着科学家们对真菌毒素毒性的不断探索与研究,真菌毒素给国家经济、人民健康带来的危害逐渐明晰,越来越多的消费者开始注重食品安全,越来越多的企业和机构关注如何精准检测和消减食物中真菌毒素,很多国家和地区也出台了食品中真菌毒素限量规定,这些均有力地推动了各种毒素检测技术的发展。从经典的薄层色谱法到生物芯片等新型技术,食品安全检测技术有了巨大的进步,但目前如何便捷高效准确地测定食品中

真菌毒素含量仍是研究的重中之重,对于食品安全具有重大意义。文章拟综述真菌毒素的主要类型以及检测方法,分析各方法的优缺点,并对其未来发展方向进行展望,以期食品安全监控以及未来检测技术的发展提供依据。

1 食品中主要真菌毒素种类

1.1 黄曲霉毒素(AFs)

AFs主要是由黄曲霉和寄生曲霉等霉菌产生,在玉米、大豆、花生等粮油产品、坚果类产品、乳制品中易被检出。AFs有B₁、B₂、B_{2a}、G₁、G₂、M₁等多种类型,其中AFB₁毒性最强^[3],若被人体食用,轻则胆管增生,重则引起肝脏病变甚至癌变,同时对食用者后代仍具有致癌、致畸作用^[4]。目前对于食品中AFs的检测主要有薄层色谱法、高效液相色谱法以及免疫分析法等^[5]。

1.2 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)

DON又称呕吐毒素(Vomitoxin),主要由禾谷镰刀菌和粉红镰刀菌在低温、潮湿的环境中产生,污染小麦等粮农产品。DON的理化性质稳定,在日常烹饪和加工中难以被破坏^[6],进入人体后,会产生头疼、发烧、呕吐等不良反应^[7],DON还可与其他毒素一起产生协同效应,诱发更大的生理毒性^[8]。近几年粮食企业检测DON时广泛应用基于间接酶联免疫原理的试剂盒法,而高效液相色谱法仍是实验室常用的DON检测手段^[9]。

1.3 链格孢霉毒素(Alternaria toxins)

链格孢霉毒素是一种新发现的真菌毒素,存在于植物、种子、农产品、大气和土壤中^[10],其主要代谢产物—链格孢酚(AOH)、链格孢酚单甲醚(AME)、细交链孢菌酮酸(TeA)、腾毒素(TEN)等毒素具有诱变性、慢性及急性毒性和三致效应^[11-12],可污染食物,使哺乳类动物头晕、呕吐以及运动功能障碍,最终导致死亡^[13-14]。近几年因链格孢霉毒素引起的健康风险已备受关注,但目前缺乏针对食品中链格孢霉毒素制定监管限制或监测指南,关于其限量规定也尚未见报道^[15-17],多数采用LC-MS法检测链格孢霉毒素^[18]。

基金项目:“十三五”国家重点研发计划(编号:2017YFD0401200)

作者简介:袁航(1979—),女,无锡城市职业技术学院讲师,硕士。

E-mail: 604039613@qq.com

收稿日期:2020-10-28

2 传统检测方法

2.1 薄层色谱法(TLC)

TLC 法于 1990 年被列为 AOAC 标准方法,是检测真菌毒素的经典方法,通过对待测毒素进行提取浓缩及薄层分离,在紫外光下进行显色反应,依据荧光特性进行定性分析,根据荧光斑点的大小进行定量分析^[19-20],该法多用于食品药品领域。Rocha 等^[21]采用基于 QuEChERS 的 TLC 法对巴西南部地区 48 个小麦面粉样品中 DON 含量进行分析,检测限和定量限分别为 30, 100 ng/mL,回收率为 80.2%~105.4%,变异系数<10%,证明该法用于 DON 评价是可靠的。TLC 法成本低,样品前处理简单,但是灵敏度低,只能定量,费时费力,目前逐渐被其他方法所取代。

2.2 气相色谱(GC)及气质联用(GC-MS)技术

GC 是一种常用于青霉素、链格孢霉毒素的检测手段,在测定 ZEN 时需先进行衍生化,其所用试剂对湿度敏感,有一定的局限性。而 GC-MS 的出现既避免了 GC 难以定性的劣势,又弥补了 MS 无法分析的缺点,被应用于医药、食品等领域^[22]。Mcmaster 等^[23]为克服基质干扰和信号抑制,将稳定同位素 d_1 -DON 作为内标加入到传统的 GC-MS 中,使用这种改进的稳定同位素稀释法(SIDA)测定了 98 份高粱品种 196 份样品中的 DON 含量。通过采用改进的 SIDA,基于 d_1 -DON 回收率的计算,发现用 GC-MS 法可以准确可靠地定量高粱样品中的 DON 含量。

2.3 液相色谱(LC)及液质联用技术(LC-MS)

LC-MS 是一种集分离系统与检测系统于一体的检测手段,可同时定性定量分析,操作简单、特异性强、灵敏度高,在生化、药物、食品保健分析和环境污染方面被广泛应用。LC-MS 法是多种真菌毒素分析的首选技术^[24],Guo 等^[25]采用超高效液相色谱-质谱联用法(UHPLC-MS)建立了一种简单可靠且能同时测定葡萄中链格孢酚(AOH)、交链格孢酚单甲醚(AME)、细交链格孢菌酮酸(TeA)和赈毒素(TEN)等几种链格孢霉毒素的分析方法,通过测定线性($R^2 > 0.99$)、回收率(77.8%~101.6%)、灵敏度(检测限 0.03~0.21 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限 0.09~0.48 $\mu\text{g}/\text{kg}$)和精密度($\text{RSD} \leq 12.9\%$)进行验证,表明所开发方法的准确性、可重复性和敏感性是可接受的,成功揭示了葡萄中链格孢属毒素的污染状态。Yan 等^[26]结合 QuEChER 预处理,将 LC-MS 法应用于同时定量不同猪组织(心脏、肝脏、脾脏和肌肉)中的 9 种真菌毒素,发现其目标毒素检出限为 0.5~1.0 ng/g,定量限为 1~2 ng/g,加标组织回收率为 70%~110%,重现性良好,验证结果表明 LC-MS 法结合 QuEChERS 样品前处理方法是有效的,准确可靠,重现性好,可满足大量样品的多组分同时检测^[27]。

3 免疫学快速检测方法

3.1 酶联免疫法(ELISA)

ELISA 是一种将现代检测手段与免疫技术相结合的微量检测技术,其弥补了以往仪器法和化学法的一些缺陷,在食品、药品等领域有较高应用价值。Wang 等^[28]采用单克隆抗体 13D8 建立了间接竞争酶联免疫吸附试验(icELISA),可同时检测 AOH 和 AME,其检出限分别为 0.7, 1.0 ng/mL,添加小麦样品的平均回收率为 84.5%~107.6%,变异系数<10%,其检测结果与 LC-MS 法一致,表明该方法适用于小麦中 AOH 和 AME 的同时检测,但 icELISA 法有时会出现假阳性结果,且不能用于多种毒素的同时检测。

3.2 胶体金免疫层析法(GICA)

GICA 法是一种以胶体金为示踪剂,用于抗原抗体的检测技术,其操作简便、成本低,适用于基层检测^[29]。Hu 等^[30]基于 GICA 快速筛选了药材根和根茎中毒性最强的 AFB₁,样品中的迁移分析物(AFB₁)和固定在测试条上的抗原之间发生竞争,争夺胶体金标记的抗体结合的结合位点,此法达到了 ≤ 0.1 ng/mL 的高灵敏度,且与 LC-MS 法测定结果一致。尽管中药基质复杂,但该方法具有较高的灵敏度和选择性,且样品处理简单,被证明是一种快速、经济、可靠的现场筛查富含淀粉和多糖的中草药中真菌毒素的技术。付宁等^[31]用 GICA 法测定了 100 批次中药材中的 AFB₁含量,假阳性率为 20.8%,假阴性率为 0,符合率为 83.3%。为了降低筛查的假阳性率,可以采取增强检测信号的手段,提高准确率和精确度,或者将此法与生物传感器技术联用以达到更为理想的效果。

3.3 时间分辨荧光免疫分析技术(TR-FIA)

TRFIA 是一种集抗原抗体的特异性和示踪剂灵敏性于一体的超微量技术,Hu 等^[32]建立了以 Eu^{3+} 标记的免疫球蛋白为示踪剂定量检测饲料中 AFB₁含量的 TRFIA 法,与 ELISA 法相比,该方法的变异系数为 1.25%~3.73%,平均回收率为 93.71%~97.80%,具有较高灵敏度和精密度,通过与 HPLC 比较,证实了该方法的可靠性,此外可同时检测多个样品,大大降低了工作人员的检测强度,减小了人为误差,提高了工作效率和准确性,因而在安全检测方面具有重要价值。

4 其他快速检测方法

4.1 表面等离子体共振技术(SPR)

SPR 技术可实时分析天然状态下生物分子间相互作用,无需破坏生物分子,主要被应用于医疗、药物、食品检测等方面。Wei 等^[33]建立了基于自组装单层膜的 SPR 法,测得 AFB₁、赈曲霉毒素 A(OTA)、DON 的最低检出限分别为 0.59, 1.27, 3.26 ng/mL,所有真菌毒素的交叉反应性较低。此外,将试验数据与 LC-MS 分析结果进行比

较,两者吻合度较好,结果可靠,表明所建立的同时检测多种真菌毒素的 SPR 方法灵敏度高、线性好、特异性强,能够满足谷物类食品的检测要求,可实时分析以及免标记,为真菌毒素检测工作带来了极大便捷^[34]。

4.2 表面增强拉曼光谱技术(SERS)

SERS 是一种有极强拉曼散射增强效应的分子振动光谱技术^[35],Rostami 等^[36]建立了基于多孔 SERS 检测平台实现 OTA 无标记检测的 SERS 法,可将支持液膜提取法与 SERS 法结合定量葡萄酒样品中的 OTA,其在葡萄酒中检测限为 115 ng/mL,与 LC-MS 法定量相当。但是红葡萄酒中基质效应会干扰检测,而支持液膜提取与 SERS 法结合为 OTA 检测提供了一种有效减少时间和成本的方法,这是优于其他提取和直接检测方法的明显优势。Li 等^[37]展示了一种基于微阵列 SERS 的小分子免疫传感器的复用能力,可实现 AFB₁、ZEN、OTA 3 种毒素的同时分析,其检测范围分别为 0.061~0.066,0.530~0.570,0.260~0.290 $\mu\text{g/kg}$,回收率为 83.8%~108.1%,变异系数<15%。通过与常规仪器分析进行比较,二者所得结论一致,说明该方法准确可靠,具有较高灵敏度、高重现性、高稳定性、宽检测范围,但目前仅限于实验室使用,无法实现现场快速检测^[38],其在痕量检测领域的应用潜力有待进一步开发^[39]。

4.3 生物芯片技术(BcT)

BcT 是一种快速微型分析技术,将生物大分子固化至载体表面,使二者紧密结合,根据分子间反应,采用仪器快速分析信号完成检测^[40],在营养学、微生物学、毒理学与转基因食品领域被广泛应用。王云霞等^[41]采用该技术同时测定了 OTA、DON、AFB₁ 和 ZEN 在奶牛饲料中的残留量,并与 HPLC 方法进行结果比对,在 1 倍检出限加标回收试验和 2 倍检出限加标回收试验中,4 种毒素回收率均为 80%~120%,其准确性良好,变异系数均 $\leq$ 15%,可满足定量测定要求,并且前处理简便,检测过程耗时短,适合大批量样品的现场筛查工作。但是从生物芯片的应用现状来看,其还存在一些限制因素,如缺少规范化的标准、检测灵敏度虽有提升但受到诸多条件影响、检测系统昂贵以及需大量准确的 DNA 片段信息等,这些问题还有待进一步研究^[42]。

5 结束语

中国是人口大国,民以食为天,粮食污染问题不容忽视,如何实现食品行业中真菌毒素准确、灵敏、便捷高效检测仍是未来食品安全检测中的重点内容与发展趋势。传统的薄层色谱法灵敏度低、费时费力,无法满足快速检测的需要。气相色谱法、气相—质谱联用法、液相色谱法和液相—质谱联用法具有检测限低、重现性好、回收率高等优势,但由于其操作繁琐、检测周期长,故不适合应用于农产品的现场快速检测。基于免疫学原理的酶联免疫

吸附法、胶体金免疫层析技术和时间分辨荧光免疫分析技术具有快速、灵敏、经济、准确等优点,但也存在抗原抗体制备困难、有底物干扰、假阳性多等缺点。一些新兴的检测方法如表面等离子体共振技术、表面增强拉曼光谱技术和生物芯片技术等,在毒素的快速检测方面也得到了一定发展,但由于缺少规范化的标准,将其推广使用仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] WINTER G, PEREG L. A review on the relation between soil and mycotoxins; Effect of aflatoxin on field, food and finance[J]. European Journal of Soil Science, 2019, 70(4): 882-897.
- [2] 王刚, 王玉龙, 张海永, 等. 真菌毒素形成的影响因素[J]. 菌物学报, 2020, 39(3): 477-491.
- [3] PELLICER-CASTELL E, BELENGUER-SAPIÑA C, AMORÓS P, et al. Bimodal porous silica nanomaterials as sorbents for an efficient and inexpensive determination of aflatoxin M1 in milk and dairy products[J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127421.
- [4] 翟颖. 粮油食品中黄曲霉毒素的检测措施分析[J]. 食品安全导刊, 2017(33): 78.
- [5] 胡元斌, 许艳霞, 王达能, 等. 超微量点—免疫荧光法快速测定粮食中黄曲霉毒素 B₁ 的方法验证[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 84-87.
- [6] YAO Yi-zhi, LONG Miao. The biological detoxification of deoxynivalenol: A review [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 145: 1-9.
- [7] JIA Ru, CAO Li-rong, LIU Wen-bin, et al. Detoxification of deoxynivalenol by *Bacillus subtilis* ASAG 216 and characterization the degradation process[J]. European Food Research and Technology, 2020, 6: 1-10.
- [8] 于金旺, 刘志斌, 崔建, 等. 小麦中呕吐毒素的成因及危害[J]. 粮食科技与经济, 2019, 44(9): 81-82.
- [9] 盛林霞, 付豪, 吴艺影, 等. 粮食中呕吐毒素检测方法的研究进展[J]. 粮食储藏, 2018, 47(1): 32-36.
- [10] AGRIOPOULOU S, STAMATELOPOULOU E, VARZAKAS T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies; Prevention and detoxification in foods[J]. Foods, 2020, 9(2): 137.
- [11] JANIC HAJNAL E, VUKIC M, PEZO L, et al. Effect of atmospheric cold plasma treatments on reduction of Alternaria toxins content in wheat flour[J]. Toxins, 2019, 11(12): 704.
- [12] 徐群英, 翟羽恒. 高效液相色谱法快速检测小麦中交链孢酚单甲醚[J]. 食品与机械, 2020, 36(3): 60-62.
- [13] 周贻兵, 李磊, 吴玉田, 等. QuEChERS 净化—超高效液相色谱—串联质谱法测定番茄中 5 种链格孢霉毒素的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(9): 1 036-1 041.
- [14] 王琦, 蔡瑞, 王周利, 等. 果蔬制品中链格孢霉毒素检测与

- 控制研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 114-120.
- [15] 邹良君, 邢丽杰, 罗瑞峰, 等. 一种用于农产品检测的快速样品前处理技术超高效液相色谱—串联质谱法检测红枣中 4 种链格孢霉素[J]. 化学世界, 2019, 60(12): 889-896.
- [16] PUNTSCHER H, COBANKOVIC I, MARKO D, et al. Quantitation of free and modified *Alternaria* mycotoxins in European food products by LC-MS/MS[J]. Food Control, 2019, 102: 157-165.
- [17] DELLAFIORA L, WARTH B, SCHMIDT V, et al. An integrated in silico/in vitro approach to assess the xenoestrogenic potential of *Alternaria* mycotoxins and metabolites[J]. Food Chemistry, 2018, 248: 253-261.
- [18] 满燕, 梁刚, 李安, 等. 链格孢霉素检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 453-458.
- [19] 冯莉. 薄层色谱法检测玉米中黄曲霉毒素 B₁[J]. 现代畜牧科技, 2018(8): 20.
- [20] 谭洪波. 粮油中真菌毒素检测技术及其应用解析[J]. 现代食品, 2019(21): 166-168.
- [21] ROCHA D F D L, OLIVEIRA M D S, FURLONG E B, et al. Evaluation of the TLC quantification method and occurrence of deoxynivalenol in wheat flour of southern Brazil[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2017, 34(12): 2 220-2 229.
- [22] 刘飞. 气相色谱—质谱联用技术在食品分析中的应用探讨[J]. 现代食品, 2020(11): 167-168.
- [23] MCMASTER N, ACHARYA B, HARICH K, et al. Quantification of the mycotoxin deoxynivalenol (DON) in Sorghum using GC-MS and a stable isotope dilution assay (SIDA)[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(10): 2 334-2 343.
- [24] LAGANÀ A. Introduction to the toxins special issue on LC-MS/MS methods for mycotoxin analysis[J]. Toxins, 2017, 9(10): 325.
- [25] GUO Wen-bo, FAN Kai, NIE Dong-xia, et al. Development of a QuEChERS-Based UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of six *Alternaria* toxins in grapes[J]. Toxins, 2019, 11(2): 87.
- [26] YAN Zheng, WANG Lan, WANG Jun, et al. A QuEChERS-based liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of nine zearalenone-like mycotoxins in pigs[J]. Toxins, 2018, 10(3): 129.
- [27] 王星, 杨新文, 费晨, 等. 粮食作物中主要真菌毒素及其检测方法的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2020, 48(8): 48-53.
- [28] WANG Jian-yi, PENG Tao, ZHANG Xi-ya, et al. A novel hapten and monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for simultaneous analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in wheat[J]. Food Control, 2018, 94: 65-70.
- [29] 翟培, 韩晋辉. 胶体金免疫层析技术在食品安全现场快速检测中的应用[J]. 现代农业科技, 2020(4): 225-227.
- [30] HU Su-rong, DOU Xiao-wen, ZHANG Lei, et al. Rapid detection of aflatoxin B₁ in medicinal materials of radix and rhizome by gold immunochromatographic assay [J]. Toxicon, 2018, 150: 144-150.
- [31] 付宁, 费丽娜. 胶体金免疫层析法测定中药材中黄曲霉毒素 B₁ 的含量[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(11): 109-111.
- [32] HU Xiao-fei, YAO Jing-jing, WANG Fang-yu, et al. Eu³⁺-labeled IgG-based time-resolved fluoroimmunoassay for highly sensitive detection of aflatoxin B₁ in feed[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 98(2): 674-680.
- [33] WEI Tao, REN Ping-ping, HUANG Lin-li, et al. Simultaneous detection of aflatoxin B₁, ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in corn and wheat using surface plasmon resonance[J]. Food Chemistry, 2019, 300: 125176.
- [34] 赵芳, 涂晓波, 黄欣迪, 等. 表面等离子共振技术快速检测食品中的玉米赤霉烯酮毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4 849-4 852.
- [35] LIU Q, VANMOL K, LYCKE S, et al. SERS using two-photon polymerized nanostructures for mycotoxin detection[J]. RSC Advances, 2020, 24: 14 274-14 282.
- [36] ROSTAMI S, ZÓR K, ZHAI D S, et al. High-throughput label-free detection of Ochratoxin A in wine using supported liquid membrane extraction and Ag-capped silicon nanopillar SERS substrates[J]. Food Control, 2020, 113: 107183.
- [37] LI Yu, CHEN Qian, XU Xue-fang, et al. Microarray surface enhanced Raman scattering based immunosensor for multiplexing detection of mycotoxin in foodstuff [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 266: 115-123.
- [38] 袁景. 基于表面增强拉曼光谱的真菌毒素和农药残留的检测及其应用[D]. 上海: 上海师范大学, 2016.
- [39] KUTSANEDZIE F Y H, AGYEKUM A A, ANNA-VARAM V, et al. Signal-enhanced SERS-sensors of CAR-PLS and GA-PLS coupled AgNPs for ochratoxin A and aflatoxin B₁ detection[J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126231.
- [40] 苗小草, 陈万义, 张娟, 等. 生物芯片在食品检测中的应用进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2017, 38(1): 114-121.
- [41] 王云霞, 赵淑环, 侯霞霞, 等. 生物芯片技术检测奶牛饲料中多种真菌毒素[J]. 乳业科学与技术, 2019, 42(4): 30-33.
- [42] 苏焕斌, 张燕, 彭宏威. 生物芯片在食品安全检测中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(11): 2 756-2 761.