

食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展

李少晖, 任丹丹, 谢云峰, 刘佳, 杨永坛*

(中粮营养健康研究院, 北京市营养健康与食品安全重点实验室, 北京 102209)

摘要: 黄曲霉毒素是自然界中黄曲霉菌和寄生曲霉菌分泌的一种次级代谢产物, 容易污染粮食作物及其制品, 主要存在于霉变的花生、大米、玉米等作物及与其相关食品中。黄曲霉毒素具有极强的毒性和致癌性, 是目前已发现的最强的天然致癌物质, 严重威胁人类健康。近年来黄曲霉毒素已成为食品安全领域的重点关注对象。本文着重从黄曲霉毒素的前处理方法和检测方法两方面介绍国内外目前食品中常用的黄曲霉毒素检测手段, 包括传统的经典检测方法和快速检测方法, 并对其进行比较和评价, 同时对粮油食品中的黄曲霉毒素检测方法的发展方向进行展望, 以供国内外同行参考借鉴。

关键词: 黄曲霉毒素; 粮油食品; 检测方法; 快速检测

Research progress on determination methods of aflatoxins in foodstuffs

LI Shao-Hui, REN Dan-Dan, XIE Yun-Feng, LIU Jia, YANG Yong-Tan*

(Beijing Key Laboratory of Nutrition Health and Food Safety, COFCO Nutrition & Health Research Institute, Beijing 102209, China)

ABSTRACT: As a secondary metabolite of *Aspogillus flavus* and *Asperillus parasiticus*, aflatoxins can readily pollute crops and plants as well as their by-products such as mouldy peanuts, rice, corns and the foodstuffs. Aflatoxins with the strongest natural carcinogens discovered, have a high toxicity and carcinogenicity that threaten human health seriously. Aflatoxins have become a focused point in the field of food safety in recent years. This article reviewed the current laboratory methods to detect aflatoxin in food stuffs, such as pre-treatment and detection in traditional classical detection and rapid detection methods, which are also compared and appraised respectively. The development direction was also prospected to provide reference for the colleagues in China and abroad.

KEY WORDS: aflatoxins; foodstuffs; determination method; rapid detection

1 引言

黄曲霉毒素(aflatoxins)是一种由黄曲霉和寄生曲霉等真菌经过聚酮途径产生的次生代谢产物, 是一组结构类似的化合物总称, 目前已经发现的黄曲霉毒素及其衍生物有 20 余种^[1-3]。黄曲霉毒素的结构通常包含一个双呋喃环和一个氧杂萜邻酮, 天然产生的黄曲霉毒素根据其化学结构不同分为 B₁、B₂、G₁、G₂ 四种^[4], 生物体摄取黄曲霉毒素后会

被细胞内的 CYP450 等酶系氧化形成代谢产物, 主要包括黄曲霉毒素 M₁、M₂、P₁、Q₁、B_{2a}、G_{2a} 等^[5]。

黄曲霉毒素是自然界中已经发现的理化性质最稳定的一类真菌毒素, 具有很强的毒性、致癌性、致突变性和致畸毒性, 其中以黄曲霉毒素 B₁ 的毒性最大。实验表明: 黄曲霉毒素 B₁ 的毒性为氰化钾的 10 倍, 砒霜的 68 倍^[6], 且其致癌性是二甲基亚硝胺的 70 倍, 被国际癌症研究组织(international agency for research on cancer, IARC)确定为 I 类

*通讯作者: 杨永坛, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: yangyongtan@cofco.com

*Corresponding author: YANG Yong-Tan, Senior Engineer, Food Quality & Safety Center, COFCO Nutrition & Health Research Institute, No.4 Road, Future Science and Technology Park South, Beiqijia, Changping, Beijing 102209, China. E-mail: yangyongtan@cofco.com

致癌物^[7,8],人类和动物主要通过膳食渠道摄入黄曲霉毒素^[9]。黄曲霉毒素进入动物体后会表现出强烈的亲肝性,可引起肝脏出血、脂肪变性、胆管增生等,并导致肝癌发生。

随着多起黄曲霉毒素污染事件的发生,世界各国相关机构和广大消费者对食品安全愈发关切。大多数国家都对进口农产品和食品中的黄曲霉毒素设定了限量标准^[10]。近几年来,欧盟逐步加强了对食品黄曲霉毒素含量的控制,并施行国际上最为严格的黄曲霉毒素限量标准:黄曲霉毒素 B₁ 含量 2 μg/kg,黄曲霉毒素总量 4 μg/kg^[11]。我国对食品中黄曲霉毒素 B₁ 也采取了严格的限量标准(GB 2761-2011):花生、玉米及其制品中的黄曲霉毒素 B₁ 含量 20 μg/kg;大米及其他食用油的黄曲霉毒素 B₁ 含量 10 μg/kg,粮食、豆类、发酵食品及调味品中的黄曲霉毒素 B₁ 含量 5 μg/kg,乳制品及婴儿配方食品中黄曲霉毒素 B₁、M₁ 10 μg/kg^[12]。

2 黄曲霉毒素的前处理和常规检测方法

2.1 黄曲霉毒素的提取净化

样品中黄曲霉毒素的提取主要是利用各种溶剂对样品中的目标物质进行萃取。溶剂的选择主要取决于黄曲霉毒素自身理化性质,同时也要考虑到杂质对提取以及后续的净化、检测等过程的干扰,所用的提取溶剂多为甲醇或乙腈水溶液。早期的黄曲霉毒素提取方法经常使用三氯甲烷,由于对人体和环境危害严重,此类方法目前已基本淘汰。近年来,一些新型提取技术,如超临界流体萃取技术^[13-15]、加压流体萃取技术^[16]等越来越多地被应用于黄曲霉毒素的提取。

样品提取溶液中除黄曲霉毒素外还常含有一些被共同萃取出的杂质,这些杂质会为之后的检测带来干扰和基质效应^[17]。故对样品中的黄曲霉毒素进行提取后,常对提取液作进一步净化,以减少杂质含量,以排除基质对分离和检测干扰,常用的方法包括:超临界流体萃取法、加压流体萃取法、固相萃取法、免疫亲和层析和分析印迹技术等(表1)。

2.1.1 超临界流体萃取技术

超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)是一种将超临界流体作为萃取剂,把一种成分从混合物中分

离出来的技术,二氧化碳是最常用的超临界流体^[18]。1993年, Selim 等^[19]首次建立利用超临界流体萃取技术从粮食粉尘中提取黄曲霉毒素的方法,并且比较在线 SFE 和离线 SFE 的前处理效果,随后, Taylor 等^[20]建立并优化了超临界流体萃取技术提取检测玉米中黄曲霉毒素 B₁ 的方法,获得高于 90%的回收率;该课题组又于 1997 年报道了利用超临界流体萃取技术从牛肝中提取黄曲霉毒素 M₁ 的方法^[21]。Liau 等^[13]首次采用超临界流体萃取技术从大枣中提取黄曲霉毒素,其将萃取过样品的乙酸乙酯提取液蒸干,然后使用甲醇重新溶解并直接加入到二氧化碳超临界流体中进行黄曲霉毒素提取,实验结果表明,该方法的回收率为 28%~105%,检出限为 0.17~0.23 μg/kg。由于超临界流体萃取技术需要专用设备且运行成本相对较高、技术难度相对偏大,同时存在毒素回收率低、提取液纯度低等问题,因此不适合作为黄曲霉毒素的常规提取净化方法^[22]。

2.1.2 加压流体萃取技术

加压流体萃取技术(pressurized fluid extraction, PFE),其商品化技术又称为加速溶剂萃取技术(accelerated solvent extraction, ASE)是一种在相对较高的温度和压强下,利用少量溶剂在较短的时间内对样品中的目标物质进行充分提取的萃取技术^[23-26]。伊朗学者 Sheibani 等^[16]应用加压流体萃取技术建立了开心果中黄曲霉毒素 B₁、B₂ 的检测方法,该方法使用 80%甲醇作为溶剂,在温度 80 °C,压力 50 bar,流速 0.5 mL/min 的条件下萃取样品中黄曲霉毒素,同时使用己烷除去样品中的脂肪等杂质,甲醇提取液使用三氯甲烷萃取净化,吹干复溶后进行薄层色谱以及液相色谱分析,结果显示:该方法的相对标准偏差(RSD)为 13.5%,回收率为 88.4%~104.4%,相较于 AOAC 同类方法高出 20%。Mateo 等^[27]利用加速溶剂萃取技术针对西班牙地区 2008 年至 2010 年入仓的仓储大麦中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 以及赭曲霉毒素 A 进行检测,并进一步探究产毒菌株数量与毒素含量之间的关系,该实验以乙腈-水(60:40, v:v)为溶剂,设定萃取温度为 100 °C,压力为 10.3 MPa,萃取液经蛋白沉淀、过滤后挥发至近干,残液用乙腈-水(60:40, v:v)复溶, PBS 缓冲液稀释,采用固相萃取和免疫亲和层析净化后通过液相色谱-荧光法检测,结果显示样品中毒素检出率为 12.4%~20%。Li 等^[28]建立了加速溶剂萃取-固相萃

表 1 常见的黄曲霉毒素前处理方法
Table 1 The common pre-treatment methods of aflatoxins

方法名称	英文缩写	优势	不足之处
超临界流体萃取	SFE	自动化程度高、萃取溶剂对环境的影响较小	仪器成本高,技术难度大、回收率不满意
加速溶剂萃取	ASE	提取效率高、操作简便、节约溶剂	仪器成本高
固相萃取	SPE	净化效率高、能够对样品进行浓缩、价格低廉	净化条件要求高、方法开发过程复杂
免疫亲和层析	IAC	特异性强、净化效果出色、操作简单	成本较高,商品化产品较少、净化条件苛刻

取结合超高效液相色谱-质谱联用技术检测稻米和玉米中黄曲霉毒素的方法,该方法回收率为71.2%~94.0%,相对标准偏差(RSD) < 16.4%,检出限为0.25~0.92 ng/g。加压流体萃取技术虽然具有提取效率高,操作简便,溶剂损耗少等优点,但由于该方法所需专用设备价格较为昂贵,尚未在黄曲霉毒素检测中获得广泛使用。

2.1.3 固相萃取技术

固相萃取(solid phase extraction, SPE)是一项由液固萃取和色谱分离相结合的样品前处理技术,始于上世纪八十年代中期。主要用于样品的分离,净化和富集,达到降低样品基质干扰,提高检测灵敏度的目的^[29-33]。使用固相萃取技术对样品进行前处理能够更有效地将黄曲霉毒素与基质中的干扰组分分离,并且操作简单,是目前在黄曲霉毒素检测中使用最为广泛的前处理技术之一。1992年, Vanrhijn等^[34]提出了将固相萃取技术用于检测牛饲料中的黄曲霉毒素 B₁,拉开了利用固相萃取技术检测黄曲霉毒素的帷幕。Bradburn等^[35]于1995年对比了液液萃取、固相萃取和免疫亲和层析三种前处理方法的净化效果,发现固相萃取技术是最为精确的前处理方法。随着固相萃取技术的广泛应用,市场上逐渐形成了多种商品化的萃取小柱可供使用。俄罗斯学者 Komarova^[36]建立了利用 Diapak S16M 和 Diapak S 固相萃取柱净化,高效液相色谱-荧光法检测牛奶中黄曲霉毒素 M₁的方法。王岩松等^[37]将 Oasis HLB 萃取小柱应用于谷物中的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 的提取净化,采用液相色谱串联质谱进行检测,结果表明该方法的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 的检出限分别为 0.1、0.1、0.2、0.3、0.2 ng/g,平均回收率在 74.6%~89.6% 之间,相对标准偏差(RSD)在 5.2%~11.3% 之间。吴燕等^[38]利用 MycosepTM 226 多功能净化柱对食品中黄曲霉毒素净化富集,该方法采用乙腈-水提取样品中的黄曲霉毒素,利用多功能净化柱净化,之后使用高效液相色谱-荧光法测定,该方法的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的检出限分别为 0.50、0.15、0.50、0.15 μg/kg,回收率为 86.7%~97.2%,相对标准偏差(RSD)为 0.41%~2.40%,能够满足食品中黄曲霉毒素检测的需要。近年来,随着一些新型固相萃取填料的出现,也产生了一批相应的萃取和检测技术, Taherimaslak 等^[39]建立了利用磁性纳米粒子(Fe₃O₄)键合(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷作为固定相萃取牛奶中黄曲霉毒素 M₁的方法,实验结果表明该方法的回收率为 91%~102%,检出限为 0.015 ng/mL,同时该方法成本低,实验周期短,性能不逊于 AOAC 同类方法。由于固相萃取柱可用填料十分广泛,因此很多科研工作者采用自制固相萃取柱检测不同基质中黄曲霉毒素。杜元正等^[40]对比四种自制固相萃取柱和三种市售固相萃取柱产品提取净化啤酒中黄曲霉毒素 B₁ 的效果,并优化每种萃取柱的使用条件,结果发现自制的硅胶-硅藻土-中性氧化铝混合柱净化效果最好,方法检

出限为 0.15 μg/kg,加标回收率 80.1%~109.2%,相对标准偏差(RSD)为 0.23%~4.29%。彭晓俊等^[41]应用自行研制的混合型固相萃取柱(C₈+PSA)净化富集食品中的黄曲霉毒素 B₁ 和 M₁,采用高效液相色谱-荧光法检测,结果显示该方法的回收率为 53%~112%,检出限为 0.05 μg/kg,相对标准偏差(RSD)为 2.7%~7.1%,适用于花生、开心果和奶粉等食品中痕量黄曲霉毒素 B₁ 和 M₁ 的测定。

2.1.4 免疫亲和层析技术

免疫亲和层析(immune affinity column, IAC)基于抗原抗体特异性结合原理,将黄曲霉毒素单克隆抗体或多克隆抗体固定于柱腔内的凝胶上,待含有毒素的提取液通过亲和柱时,抗原抗体发生特异性结合,将黄曲霉毒素保留在亲和柱上,而基质中的杂质得不到保留,随提取液流出;之后通过淋洗亲和柱使被吸附的黄曲霉毒素得到进一步净化,最终在有机溶剂作用下彻底破坏抗体活性,使黄曲霉毒素与抗体分离,随洗脱液流出,进行下一步检测。该方法特异性好、灵敏度高,是目前我国现行国家标准的推荐方法之一(GB/T 18979-2003)。鲍蕾^[42]、周贻兵^[43]等学者利用免疫亲和柱对食用油脂中的黄曲霉毒素进行了净化富集,利用高效液相色谱进行测定,发现经过免疫亲和柱净化后的黄曲霉毒素回收率高、重现性好。牛军小等^[44]利用免疫亲和柱净化牛奶中的黄曲霉毒素 M₁,发现免疫亲和柱能够最大限度地除去基质中的干扰,获得良好的信噪比,提高检测灵敏度和准确性。罗小虎等^[45]利用免疫亲和柱净化玉米中提取的黄曲霉毒素,采用正己烷-三氟乙酸进行柱前衍生,高效液相色谱-荧光法检测,与未经免疫亲和柱净化的样品进行对比,发现样品经过免疫亲和柱净化后,实验结果重现性好、稳定性高、成本低,适合大批量黄曲霉毒素污染玉米检测。尽管采用免疫亲和层析法提取黄曲霉毒素,具有简便快捷、特异性强、净化效果好等特点,并且样品前处理过程中有机溶剂用量少,操作安全无污染,但是免疫亲和柱成本相对较高,商品化免疫亲和柱种类相对较少,且使用过程中条件控制相对较为严格,因此免疫亲和层析技术仍有诸多阻碍其广泛使用的问题亟待解决。

2.1.5 分子印迹技术

分子印迹技术(molecular imprinted polymer, MIP)来源于免疫学的发展,是指制备对某一特定的目标分子具有特殊选择性的聚合物的过程。分子印迹技术的原理是:首先通过物理、化学过程使功能单体与模板分子相互作用形成单体-模板分子复合物,然后使功能单体与交联剂发生交联聚合反应形成聚合物,从而将模板分子固定下来,最后再通过一定的方法将原先固定在功能性分子上的模板分子去掉,从而在聚合物中留下一个能与模板分子特异性结合的三维空间,该空间从构型上能与模板分子特异性吻合,从而产生对模板分子的专一性识别作用^[46]。该过程被形象地称为制造识别“分子钥匙”和“人工锁”的技术。分子印迹

技术具有三大特点: 构效预定性、特异识别性和广泛实用性^[47]。Serheeva 等^[48]用计算机模拟技术筛选出的功能单体合成能识别总黄曲霉毒素的分子印迹聚合物, 并将其以网格分布的方式固定于多孔渗透薄膜上, 从而制备出了能识别黄曲霉毒素总量的膜感应器。Wyszomirski 等^[49]研究发现碳酸二甲酯与黄曲霉毒素 B₁ 的结构相似, 可替代黄曲霉毒素 B₁ 作为模板制备的分子印迹聚合物, 该研究通过计算机筛选出 N,N-亚甲基双丙烯酰胺作为最优功能单体, 以此为原料制备的分子印迹聚合物做成的膜感应器检测黄曲霉毒素总量, 检测范围可达 1~1000 ng/mL。但是分子印迹技术由于其成本较高, 传感器稳定性有待提高, 尽管目前市场上也有相对应的商品化传感器产品, 但并未在国内实验室中得到广泛应用。

2.2 黄曲霉毒素的检测方法

美国分析化学家协会(association of official analytical chemists, AOAC)和欧洲标准化委员会(European committee for standardization, CEN)目前一共公布了 47 种黄曲霉毒素检测方法。近年来也兴起了许多新型黄曲霉毒素检测技术, 如荧光偏振免疫测定法、超光谱法和电化学学生物传感器法等。总体上, 高效液相色谱法仍是目前实验室中检测黄曲霉毒素最为常见、应用最为广泛的方法, 但以免疫学为基础原理的检测方法由于其实验周期短、设备简单、特异性高、操作简便、成本低等特点在实验室检测黄曲霉毒素中已逐步得到越来越多的应用。常见的黄曲霉毒素检测方法总结如表 2。

2.2.1 薄层色谱法

薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)是应用最早黄曲霉毒素检测技术之一^[50,51]。其原理是将样品提取、净化、富集后, 在薄层板上进行分离, 之后在紫外光照射下进行检识。在波长为 365 nm 的紫外光照射下黄曲霉毒素 B₁、B₂ 产生紫色荧光, G₁、G₂ 产生绿色荧光, 然后根据其在薄层板上显示的荧光强度来定量^[52]。该检测方法是我国现行国家标准(GB/T 5009.23-2006)中推荐的方法之一。薄层色谱法的优点是所用设备试剂简单, 成本低廉, 操作易掌握, 能够对样品中黄曲霉毒素进行定量和半定量分析, 适合大量样品的筛查^[53]; 不足之处在于其操作步骤繁琐, 灵敏度差, 检出限高, 而且实验人员需要接触大量有毒有

害试剂, 故此方法已逐步停止使用^[54]。

2.2.2 液相色谱法

液相色谱检测方法是目前实验室最常用的黄曲霉毒素检测方法之一。按照液相色谱的类型不同可以分为高效液相色谱法和超高效液相色谱法; 根据检测器类型的不同可以分为液相色谱耦合经典检测器和液相色谱-质谱联用两大类。

① 高效液相色谱法

高效液相色谱-荧光法是实验室最常用的黄曲霉毒素分析方法, 其原理是利用反相高效液相色谱对经过提取、净化的毒素样品进行分离, 使用荧光检测器在特定激发发射波长下测定含量, 根据样品的出峰面积或峰高可计算黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的含量。由于荧光检测器具有选择性好, 灵敏度高, 信号强等特点, 非常适合黄曲霉毒素的检测。但是, 黄曲霉毒素 B₁ 和 G₁ 遇水会发生荧光淬灭, 故检测前需要对二者进行适当的衍生化反应, 使其形成稳定的、具有荧光活性的衍生物。目前常见的衍生方法包括柱前衍生和柱后衍生两大类, 柱前衍生是利用三氟乙酸和正己烷对净化后的黄曲霉毒素进行衍生化反应, 再经色谱柱分离后到达荧光检测器进行检测。该衍生方法增加了样品前处理步骤, 加大了操作的繁琐性, 但是方法检出限低, 灵敏度高; 柱后衍生包括柱后碘化学衍生、柱后光化学衍生和柱后电衍生三种, 其基本原理是: 黄曲霉毒素经过色谱柱分离, 到达荧光检测器之前先经过碘单质的氧化反应、紫外光照射下的光化学反应或者经过电化学反应在线产生的溴单质氧化反应产生稳定的高荧光活性衍生物, 再经过检测器检测。柱后衍生操作简单, 但是需要购置专门设备, 且价格不菲, 故并未在基层实验室得到广泛使用。罗小虎等^[45]对比了高效液相色谱检测玉米中黄曲霉毒素的各种仪器条件, 发现激发光波长为 360 nm, 发射光波长为 440 nm, 流动相组成为水:甲醇=65:35 时, 玉米中四种黄曲霉毒素的检测分离效果最好, 牛军小等^[44]建立了利用反相高效液相色谱法检测乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 的方法, 该方法以乙腈:水=15:85 为流动相, 采用等度法洗脱, 荧光检测器检测, 激发波长 365 nm, 发射波长 435 nm, 该方法的检出限 0.005, 定量限 0.015 μg/kg, 相对标准偏差为 3.3%~4.6%, 平均回收率为 80.1%~88.9%之间, 完全能够满足乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 的日常检测要求。

表 2 常见的黄曲霉毒素检测方法
Table 2 The common detection methods of aflatoxins

方法名称	英文简写	优势	不足之处
薄层色谱法	TLC	设备简单, 成本低廉, 操作方法易掌握	步骤繁琐、灵敏度差、检出限高、试剂对操作人员危害大
高效液相色谱法	HPLC	重现性好, 检出限低、灵敏度高	需要衍生、操作复杂、仪器成本高
超高效液相色谱法	UPLC	检测速度快、实验周期短、无需衍生、灵敏度高	仪器成本高
液质联用法	LC-MS	前处理简单、选择性高、能够实现多组分分析	设备操作复杂、仪器成本高

②超高效液相色谱法

超高效液相色谱的基本分离原理与高效液相色谱没有区别,但是超高效液相色谱的柱效高,峰展宽被明显抑制,故在使用荧光检测器检测黄曲霉毒素时即使不对样品进行衍生化反应也能得到较高的灵敏度和响应值。李芳等^[55]利用免疫亲和柱净化,超高效液相色谱-荧光法检测食品中的黄曲霉毒素 B₁,其方法在没有衍生的条件下,平均回收率为 71.1%~111.2%,相对标准偏差(RSD)为 3.8%~11.5%,检出限为 0.05 μg/kg,足以满足食品中黄曲霉毒素 B₁的日常检测需要。李可等^[56]建立了利用免疫亲和柱净化、超高效液相色谱-荧光法检测大米中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁和 G₂的方法,该方法的黄曲霉毒素总量检出限为 0.04 μg/L,回收率为 86.8%~96.0%,且实验周期短,操作简便。蔡增轩等^[57]建立了利用免疫亲和柱净化、超高效液相色谱-荧光检测法测定乳及乳制品中黄曲霉毒素 M₁和 M₂的方法,该方法黄曲霉毒素 M₁、M₂的检出限为 0.003 μg/kg,回收率均大于 80%,完全能够达到实验室检测乳制品中黄曲霉毒素 M₁、M₂的要求。Alfaro^[58]、Lv^[59]、Cheng^[28]等学者应用超高效液相色谱对多种基质中的黄曲霉毒素进行测定,均在不进行衍生化反应的条件得到了理想的回收率和较高的灵敏度。

③液相色谱-质谱联用技术

质谱作为一种高通量、高灵敏度和高选择性的检测器,用来检测黄曲霉毒素无需衍生化反应,能够极大简化样品前处理步骤,而且质谱的多反应检测模式能够实现多毒素甚至多组分同时检测,大大提高了检测效率。Yibatihan等^[60]开发了利用高效液相色谱-质谱联用技术(LC-MS/MS)同时检测蛋糕中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、伏马毒素 B₁、B₂、T-2毒素和 HT-2 等 11 种毒素,结果显示该方法的平均回收率为 81%~112%,检出限为 0.02~17.5 μg/kg,适合作为日常检测方法使用。孙娟等^[61]建立了超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS/MS)检测谷物中 12 种真菌毒素的方法,12 种真菌毒素的检出限为 0.016~1.000 μg/kg,低、中、高 3 个加标水平的平均回收率为 60.0%~122.4%,相对标准偏差(RSD)为 0.9%~20.3%,该方法前处理简单、净化效果好、灵敏度高、检测速度快,适用于谷物样品中多组分真菌毒素残留的分离和定量检测。可见,液相色谱质谱联用技术在多毒素检测方面有着广泛的应用前景。

2.2.3 荧光分光光度法

荧光分光光度法测定黄曲霉毒素的基本原理是利用免疫亲和柱净化含有黄曲霉毒素的提取液,再利用碘液或溴水进行衍生化反应,将原本荧光活性不高的黄曲霉毒素 B₁和 G₁衍生成具有高荧光活性的稳定形式,然后在激发光 360 nm,发射光 450 nm 的条件下利用荧光分光光度计检测四种黄曲霉毒素的总量。近年来,出现了对于黄曲霉

毒素 B₁和 G₁的新型衍生方法,特别是利用 β-环糊精(β-CD)对黄曲霉毒素进行的衍生反应。马良等^[62]研究了将不同取代基的 β-环糊精应用于黄曲霉毒素 G₁衍生的方法,结果发现,利用羟乙基-β-环糊精(HE-β-CD)对 AFG₁进行衍生化反应后,其在 2~40 μg/kg 范围内与体系荧光呈良好线性关系,相关系数为 0.9998,检出限为 0.079 μg/kg。将 HE-β-CD 应用于花生样品 AFG₁分析,准确度和精密度良好。张敏等^[63]研究了金属离子与 β-环糊精对黄曲霉毒素 B₁的协同增效效果,发现在 β-CD-Hg 体系中 AFB₁的荧光增强幅度最大。但是由于荧光分光光度法多用于检测黄曲霉毒素总量,且操作步骤比较繁琐,所以目前在实验室中应用并不广泛。

3 黄曲霉毒素快速检测方法

随着经济发展,粮油食品相关的贸易活动日益频繁,质量控制部门对于样品检测的压力也逐渐增大。传统的黄曲霉毒素检测方法虽然有着良好的重现性和准确度,但是试验周期相对较长,实验过程相对较为复杂。黄曲霉毒素相关的快速检测技术具有检测快速、灵敏等特点,而且成本相对较低,操作简便,越来越受到市场的关注。

免疫分析法在真菌毒素快速检测中较为常用,它是利用抗原抗体特异性结合反应为基础进行黄曲霉毒素含量测定,在这一过程中黄曲霉毒素充当抗原的角色,因此抗体的质量直接决定着检测结果的准确性。由于该类方法是利用具有高度专一性的单克隆或多克隆抗体与黄曲霉毒素结合从而进行分析,因此具有很好的选择性和较高的灵敏度。目前最为广泛使用的黄曲霉毒素快速检测方法包括酶联免疫法和免疫纸层析胶体金试纸条法等,同时有一些基于免疫学的其他技术也能够满足黄曲霉毒素快速检测的要求,例如:放射免疫法^[64,65]、时间分辨荧光免疫分析法^[66-68]、荧光偏振免疫测定^[69]法、横向流动免疫检测技术^[70]、膜载体酶标记 dip-stick 快速检测技术^[71]等,近年来,生物传感器的出现和发展也为黄曲霉毒素的检测提供了更多快捷、方便的手段。

酶联免疫法(ELISA)基于抗原与抗体的特异性结合以及后续的酶对底物显色反应的高效催化作用^[72]。陈彤等^[73]利用间接 ELISA 法检测不同贮存条件下花生中黄曲霉毒素 B₁,实验结果显示该方法的重现性好,黄曲霉毒素 B₁回收率为 95.20%~97.75%,最低检出限为 0.029 μg/kg。谢芳等^[74]利用活泼酯法活化后的羧基化超顺磁珠与辛酸-硫酸铵法纯化的抗黄曲霉毒素 B₁单克隆抗体偶联,获得黄曲霉毒素 B₁免疫磁珠,建立了以免疫磁珠富集结合酶联免疫吸附法检测酱油基质中的黄曲霉毒素 B₁的方法,结果表明黄曲霉毒素 B₁的平均加标回收率为 83.6%~104%,相对标准偏差(RSD)为 7.2%~13.7%,该方法具有快速简便、灵敏度高、准确性好等优点,可很好地应用于酱油中的黄曲霉毒素 B₁的检测。大量实验数据表明,酶联免疫法检测速度

快、特异性高、前处理简单、成本低、结果准确等优点。目前已广泛用于食品、粮油、乳制品中黄曲霉毒素的检测。

胶体金免疫层析技术(immune colloidal gold technique)基于抗原抗体反应原理,是20世纪80年代发展起来的一种将胶体金免疫原理和色谱柱分离技术相结合产生的固相膜免疫分析方法^[75,76]。由于其操作简便、设备简单、检测时间短、灵敏度高优点,常被应用于大批量样品的快速现场检测以及实验室样品的初步筛选,具有广泛的开发前景。Li等^[77]制备了针对黄曲霉毒素 B₁的定性检测试纸条,其可视最低检测限为0.25 ng/mL,检测方法的临界值为1 ng/mL。Zhang等^[78]基于一种抗 AFB₁的新抗体,研制出了一种新型免疫胶体金检测试纸条。该试纸条检测 AFB₁的最低检测限为1 ng/mL,与除 AFB₁的其他类型黄曲霉毒素无交叉反应。应用免疫胶体金技术还能实现多毒素同时检测: Song等^[79]开发了可以针对黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇三类真菌毒素进行同时定性、定量检测的免疫胶体金试纸条,用该试纸条对三种毒素定量限分别为0.05、1、3 μg/kg,回收率为80%~122%;应用该试纸条对多份玉米实际样品进行定量检测,与液相色谱-质谱联用法测得结果相符。

生物传感器(biosensor)是将生物技术和电子技术相结合,以生物学组件作为主要功能性元件,能够感受规定的被测量,并按照一定规律将其转换成可识别信号的器件或装置,一般由生物识别元件、转换元件及机械元件和电气元件所组成^[80]。针对检测黄曲霉毒素的生物传感器按照其反应原理可分为:电化学免疫传感器(electrochemical immunosensor)、电化学酶传感器(electrochemical enzyme sensor)、电化学DNA传感器(electrochemical DNA sensor)等。但是由于生物传感器目前还很难兼顾选择性、灵敏度和稳定性,距实际应用还有一定距离^[81]。

4 总结与展望

黄曲霉毒素有着强烈的毒性和致癌性,近年来黄曲霉毒素污染粮食的报道屡见不鲜。为了避免黄曲霉毒素对人体健康造成危害,国内外必须制定更为严格的限量标准,这同时也对食品中黄曲霉毒素的检测技术提出了更高的要求。目前随着免疫学、生物化学、分子生物学甚至是电子科学等技术的不断融入,使得黄曲霉毒素的检测日益灵敏、准确和便捷。传统的黄曲霉毒素检测方法能够提供准确、可靠的实验结果,但是实验过程繁琐复杂,成本偏高,在面临大量样品时无法满足快速筛查的需要。相关的快速检测方法虽然能够迅速给出数值,便于高通量筛选样品,但其检测结果的稳定性、重现性和准确性仍需进一步提高。近年来随着生物传感器技术的发展,真菌毒素的检测方法和仪器倾向于一体化,例如:免疫吸附反应与荧光检测结合产生的定量快检卡以及分子印迹技术与生物传感器结合

产生的新型膜传感器等。如何将久经考验的传统检测方法与近年来蓬勃发展的快速检测方法更好地融合需要我们从检测原理上作进一步探索;而如何将使用的检测仪器小型化、便携化、一体化、廉价化则是我们需要从检测设备上进一步研究的重要方面。将二者结合起来,将使食品中黄曲霉毒素的检测向着便携化、操作简便、低成本、商业化、产业化方向发展。

参考文献

- [1] IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins [J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2010, 94: v-vii, 1-412.
- [2] Carlson MA, Barger CB, Benson RC, *et al.* An automated, handheld biosensor for aflatoxin [J]. Biosens Bioelectron, 2000, 14(10-11): 841-848.
- [3] Jaimez J, Fente CA, Vazquez I, *et al.* Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis [J]. J Chromatogr A, 2000, 882(1-2): 1-10.
- [4] 吴丹. 黄曲霉毒素在粮食和食品中的危害及防治[J]. 粮食加工, 2007, (03): 91-94.
Wu D. Hazard of aflatoxin in oil and grain product and its prevention food [J]. Grain Proc, 2007, (03): 91-94
- [5] 李洪, 李爱军, 董红芬, 等. 黄曲霉毒素的发生危害与防控方法[J]. 玉米科学, 2004, (S2): 88-90, 94.
Li H, Li AJ, Dong HF, *et al.* Occurrence and health risks with prevention and control on aflatoxin [J]. J Maize Sci, 2004, (S2): 88-90, 94.
- [6] Shyu RH, Shyu HF, Liu HW, *et al.* Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin [J]. Toxicon, 2002, 40(3): 255-258.
- [7] Egner PA, Wang JB, Zhu YR, *et al.* Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer [J]. Proc Natl Acad Sci (USA), 2001, 98(25): 14601-10606.
- [8] Ren Y, Zhang Y, Shao S, *et al.* Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2007, 1143(1-2): 48-64.
- [9] Papp E, H-Otta K, Záray G, *et al.* Liquid chromatographic determination of aflatoxins [J]. Microchem J, 2002, 73(1-2): 39-46.
- [10] 马良. 黄曲霉毒素 B₁ 高灵敏度检测技术研究[D]. 中国农业科学院, 2007.
Ma L. Study on detection technology for determination of aflatoxin B₁ with high sensitivity [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007.
- [11] 王松雪, 鲁沙沙, 张艳, 等. 国内外真菌毒素检测标准制订现状与进展[J]. 食品工业科技, 2011, (03): 408-412, 416.
Wang SX, Lu SS, Zhang Y, *et al.* Current status and advances in the standards of mycotoxin detection [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, (03): 408-412, 416.
- [12] GB 2761-2011 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量[S].
GB 2761-2011 National food safety standard maximum levels of mycotoxins in foods [S].
- [13] Liao BC, Jong TT, Lee MR, *et al.* Supercritical fluid extraction and

- quantification of aflatoxins in *Zizyphi fructus* by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(5): 667-673.
- [14] Starr JM, Selim MI. Supercritical fluid extraction of aflatoxin B₁ from soil [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1209(1-2): 37-43.
- [15] Shephard GS. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(5): 1215-1224.
- [16] Sheibani A, Ghaziaskar HS. Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B₁ and B₂ from pistachio [J]. *Food Control*, 2009, 20(2): 124-128.
- [17] 毕瑞锋, 赫秀萍. 高效液相色谱法检测食品中黄曲霉毒素研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2012, (03): 1-4.
- Bi RF, He XP. Research advance of determining aflatoxins in food with high performance liquid chromatography [J]. *Cereal Oil*, 2012, (03): 1-4.
- [18] 韩玉刚, 汪小舟. 超临界流体萃取技术的发展及应用[J]. *广东化工*, 2014, (12): 104-105.
- Han YG, Wang XZ. Development and application of supercritical fluid extraction [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2014, (12): 104-105.
- [19] Selim MI, Tsuei MH. Development and optimization of A supercritical fluid extraction method for the analysis of aflatoxin-B₁ in grain dust [J]. *Amer Ind Hyg Assn J*, 1993, 54(4): 135-141.
- [20] Taylor SL, King JW, Richard JL, *et al.* Analytical-scale supercritical-fluid extraction of aflatoxin-B₁ from field-inoculated corn [J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41(6): 910-913.
- [21] Taylor SL, King JW, Greer JI, *et al.* Supercritical fluid extraction of aflatoxin M₁ from beef liver [J]. *J Food Protect*, 1997, 60(6): 698-700.
- [22] Yang C, Brazhkin VV, Dove MT, *et al.* Frenkel line and solubility maximum in supercritical fluids [J]. *Phys Rev E*, 2015, 91(1-1): 112.
- [23] Jensen D, Hoffer F, Ezzell J, *et al.* Rapid preparation of environmental samples by accelerated solvent extraction (ASE) [J]. *Polycycl Aromat Compound*, 1996, 9(1-4): 233-240.
- [24] Kreisselmeier A, Durbeck HW. Determination of alkylphenols and linear alkylbenzene sulfonates in sediments applying accelerated solvent extraction (ASE) [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 1996, 354(7-8): 921-924.
- [25] Richter BE, Ezzell JL, Felix D, *et al.* An accelerated solvent-extraction system for the rapid preparation of environmental organic-compounds in soil [J]. *Amer Lab*, 1995, 27(4): 24-28.
- [26] Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, *et al.* Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(6): 1033-1039.
- [27] Mateo EM, Gil-Serna J, Patino B, *et al.* 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* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 149(2): 118-126.
- [28] Li C, Xie G, Lu A, *et al.* Determination of aflatoxins in rice and maize by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction and solid-phase extraction [J]. *Anal Letter*, 2014, 47(9): 1485-1499.
- [29] Camel V. Solid phase extraction of trace elements [J]. *Spectrochim Acta Pt B-At Spec*, 2003, 58(7): 1177-1233.
- [30] Kabra PM, Lee HK, Lubich WP, *et al.* Solid-phase extraction and determination of dansyl derivatives of unconjugated and acetylated polyamines by reversed-phase liquid-chromatography-improved separation systems for polyamines in cerebrospinal-fluid, urine and tissue [J]. *J Chromatogr*, 1986, 380(1): 19-32.
- [31] Poole CF. New trends in solid-phase extraction [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2003, 22(6): 362-373.
- [32] Stewart JT, Reeves TS, Honigberg IL. A comparison of solid-phase extraction techniques for assay of drugs in aqueous and human-plasma samples [J]. *Anal Lett Pt B-Clin Biochem*, 1984, 17(16): 1811-1826.
- [33] Ye NS, Shi PZ. Applications of graphene-based materials in solid-phase extraction and solid-phase microextraction [J]. *Sep Purif Rev*, 2015, 44(3): 183-198.
- [34] Vanhijn JA, Viveen J, Tuinstra L. Automated-determination of aflatoxin-B₁ in cattle feed by 2-column solid-phase extraction with online high-performance liquid-chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1992, 592(1-2): 265-269.
- [35] Bradburn N, Coker RD, Blunden G. A comparative-study of solvent-extraction efficiency and the performance of immunoaffinity and solid-phase columns on the determination of Aflatoxin B₁ [J]. *Food Chem*, 1995, 52(2): 179-185.
- [36] Komarova NV. Determination of aflatoxin M₁ in milk using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Anal Chem*, 2000, 55(10): 929-932.
- [37] 王岩松, 范世华, 李华锋, 等. 固相萃取-高效液相色谱/串联质谱检测谷物中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁ [J]. *分析试验室*, 2011, (10): 63-67.
- Wang YS, Fan SH, Li HF, *et al.* Determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and M₁ in corn by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2011, (10): 63-67.
- [38] 吴燕, 朱怡平, 汪国权. 多功能柱净化-光化学柱后衍生高效液相色谱测定食品中黄曲霉毒素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, (08): 1865-1866, 1869.
- Wu Y, Zhu YP, Wang GQ. Determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ in food by multifunctional clean-up column, post-column photochemical derivatization and HPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, (08): 1865-1866, 1869.
- [39] Taherimaslak Z, Amoli-Diva M, Allahyary M, *et al.* Magnetically assisted solid phase extraction using Fe₃O₄ nanoparticles combined with enhanced spectrofluorimetric detection for aflatoxin M₁ determination in milk samples [J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 842: 63-69.
- [40] 杜元正, 蔡国林, 高献礼, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定啤酒原辅料中黄曲霉毒素 B₁ [J]. *食品与发酵工业*, 2012, (02): 168-173.
- Du YZ, Cai GL, Gao XL, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in raw materials of beer by SPE-HPLC [J]. *Food Ferment Ind*, 2012, (02): 168-173.
- [41] 彭晓俊, 曾勤, 庞晋山, 等. 自制混合型固相萃取柱-高效液相色谱法同时测定食品中黄曲霉毒素 B₁、M₁ [J]. *分析测试学报*, 2013, (08): 958-962.
- Peng XJ, Zeng Y, Pang JS, *et al.* Determination of aflatoxin B₁, M₁ in Foods using homemade mixed solid phase extraction column coupled with high performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2013, (08): 958-962.
- [42] 鲍蕾, 吕宁, 吴振兴, 等. 免疫亲和柱同时净化-HPLC法测定植物油中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮[J]. *食品工业科技*, 2013, (09): 306-309.
- Bao L, Lv N, Wu ZX, *et al.* Rapid determination of aflatoxin and zearalenone in edible oil by high performance liquid chromatography with

- immunoaffinity column clean-up [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, (09): 306–309.
- [43] 周贻兵, 刘利亚, 李磊, 等. 免疫亲和柱净化-光化学衍生高效液相色谱荧光法测定植物油中黄曲霉毒素 B₁ 的含量[J]. *中国油脂*, 2014, (06): 92–94.
- Zhou YB, Liu LY, Li L, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in vegetable oil by HPLC-FLD with photochemical derivatization after immunoaffinity column purification [J]. *China Oil Fat*, 2014, (06): 92–94.
- [44] 牛军小, 苏军, 徐晓枫, 等. 免疫亲和柱净化-反相高效液相色谱法检测乳与乳制品中黄曲霉毒素 M₁[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, (07): 940–941, 945.
- Niu JX, Su J, Xu XF, *et al.* Immunoaffinity column-reversed phase high performance liquid chromatography for detection of aflatoxin M₁ in milk and milk products [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, (07): 940–941, 945.
- [45] 罗小虎, 王韧, 王莉, 等. 高效液相色谱快速测定玉米中黄曲霉毒素的研究[J]. *中国粮油学报*, 2014, (06): 99–103.
- Luo XH, Wang R, Wang L, *et al.* Rapid detection of aflatoxins in corns by high performance liquid chromatography [J]. *J Chin Cereal Oil Assoc*, 2014, (06): 99–103.
- [46] Xiao SJ, Yu SW, Gao SJ, *et al.* Research progress of molecular imprinting technology [J]. *Adv Eng Mater*, 2013, (750–752): 1678–1681.
- [47] He YH, Gao ZX, Chao FH. The progress of the study on molecular imprinting-based biomimetic sensors [J]. *Chin J Anal Chem*, 2004, 32(10): 1407–1412.
- [48] Serheeva TA, Piletska OV, Brovko OO, *et al.* Aflatoxin-selective molecularly-imprinted polymer membranes based on acrylate-polyurethane semi-interpenetrating polymer networks [J]. *Ukr Biokhim Zh*, 2007, 79(5): 109–115.
- [49] Wyszomirski M, Prus W. Molecular modelling of a template substitute and monomers used in molecular imprinting for aflatoxin B₁ micro-HPLC analysis [J]. *Mol Simulat*, 2012, 38(11): 892–895.
- [50] 朱云, 徐琳娜, 艾兰红, 等. 粮油产品中黄曲霉毒素检测方法研究[J]. *粮食科技与经济*, 2014, (05): 41–43.
- Zhu Y, Xu LN, Ai LH, *et al.* Research of detection method aflatoxin grain and oil products [J]. *Grain Technol Econ*, 2014, (05): 41–43.
- [51] 尚瑛达, 曹素芳. 薄层色谱法测定黄曲霉毒素 B₁ 探讨[J]. *粮食与油脂*, 1993, (04): 50–51.
- Shang YD, Cao SF. Discussion of the detection by thin layer chromatography of aflatoxin B₁ [J]. *Cereal Oil*, 1993, (04): 50–51.
- [52] 张文玲, 袁涛, 李书国. 近 10 年粮油食品中黄曲霉毒素检测技术的研究进展[J]. *粮食加工*, 2012, (01): 77–81.
- Zhang WL, Yuan T, Li SG. Progress on detection technology for nearly 10 years of aflatoxin in grain and oil products [J]. *Grain Process*, 2012, (01): 77–81.
- [53] 王叶群, 姚刚, 张绍英. 污染黄曲霉毒素花生的检测及分选技术研究进展[J]. *农业工程*, 2014, (06): 59–63.
- Wang YQ, Yao G, Zhang SY. Development of detection and sorting technology for aflatoxins contaminated peanuts [J]. *Agric Eng*, 2014, (06): 59–63.
- [54] 黄洁. 黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. *化学分析计量*, 2013, (03): 100–104.
- Huang J. Research progress in detecting methods of aflatoxins [J]. *Chem Anal Meterage*, 2013, (03): 100–104.
- [55] 李芳, 黎琳琳, 刘绪斌, 等. 无需衍生化样品处理快速测定食品中黄曲霉毒素 B₁[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, (09): 2859–2863.
- Li F, Li LL, Liu XB, *et al.* Rapid determination of aflatoxin B₁ in foods without derivation [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, (09): 2859–2863.
- [56] 李可, 丘汾. 免疫亲和层析-超高效液相色谱法测定大米中 4 种黄曲霉毒素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, (16): 2328–2330.
- Li K, Qiu F. Determination of four kinds of aflatoxins in rice by immunoaffinity chromatography-UPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, (16): 2328–2330.
- [57] 蔡增轩, 胡玲玲, 王军淋, 等. 超高效液相色谱检测奶及奶制品中的 M 族黄曲霉毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, (03): 801–807.
- Cai ZX, Hu LL, Wang JL, *et al.* Determination of M aflatoxins in milk and milk products by ultra high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, (03): 801–807.
- [58] Alfaro CV, Broto-Puig F, Agut M, *et al.* Study of the production of aflatoxins B₁, G₁, B₂ and G₂ on cashew nuts by *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 by means of ultra-performance liquid chromatography [J]. *Afinidad*, 2013, 70(563): 170–174.
- [59] Lv JL, Yang YL. Determination of aflatoxin B₁ And B₂ in peanut and peanut oil using cloud point extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2013, 36(10): 1421–1436.
- [60] Yibatati S, Jinap S, Mahyudin NA. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in palm kernel cake (PKC) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *Food Addit Contam*, 2014, 31(12): 2071–9.
- [61] 孙娟, 李为喜, 张妍, 等. 用超高效液相色谱串联质谱法同时测定谷物中 12 种真菌毒素[J]. *作物学报*, 2014, (04): 691–701.
- Sun J, Li WX, Zhang Y, *et al.* Simultaneous determination of twelve mycotoxins in cereals by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Crop Sci*, 2014, (04): 691–701.
- [62] 马良, 张敏, 张宇昊, 等. 黄曲霉毒素 G₁ 与 β-环糊精及其衍生物超分子体系的荧光光谱研究[J]. *食品科学*, 2012, 12: 143–148.
- Ma L, Zhang M, Zhang YH, *et al.* Fluorescence enhancement mechanism of aflatoxin G₁ by β-Cyclodextrin and its derivatives [J]. *Food Sci*, 2012, 12: 143–148.
- [63] 张敏. 一种新型黄曲霉毒素 B₁ 荧光增强剂的开发研究[D]. 西南大学, 2012.
- Zhang M. The research of a novel fluorescence enhancing agent for aflatoxin B₁ eetermination [D]. Southwest University, 2012.
- [64] 刘银坤, 张夏英, 陈锐群, 等. 放射免疫法测定黄曲霉毒素 B₁[J]. *复旦学报(医学版)*, 1987, (03): 185–188.
- Liu YK, Zhang XY, Chen RQ, *et al.* Aflatoxin B₁ use in radioimmunoassay [J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 1987, (03): 185–188.
- [65] 闫磊, 李卓, 张燕. 牛奶中黄曲霉毒素的放射免疫法检测[J]. *食品研究与开发*, 2010, (01): 135–137.
- Yan L, Li Z, Zhang Y. Aflatoxins in milk by radio immunoassay method [J]. *Food Res Devel*, 2010, (01): 135–137.
- [66] Huang B, Tao WY, Shi J, *et al.* Determination of ochratoxin A by polyclonal antibodies based sensitive time-resolved fluoroimmunoassay [J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80(8): 481–485.
- [67] Huang B, Tao WY, Zhang LF, *et al.* Ultrasensitive time-resolved

- fluoroimmunoassay of ochratoxin A [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2005, 32(7): 662–666.
- [68] Huang B, Xiao HL, Zhang J, *et al.* Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A [J]. *Arch Toxicol*, 2009, 83(6): 619–624.
- [69] Sheng YJ, Eremin S, Mi TJ, *et al.* The development of A fluorescence polarization immunoassay for aflatoxin detection [J]. *Biomed Environ Sci*, 2014, 27(2): 126–129.
- [70] 黎睿, 崔华, 谢刚, 等. 几种真菌毒素快速检测技术分析[J]. *粮食科技与经济*, 2013, (01): 21–23.
Li R, Cui H, Xie G, *et al.* Advances in the rapid analysis technologies of mycotoxins [J]. *Grain Technol Econ*, 2013, (01): 21–23.
- [71] Schneider E, Usleber E, Martlbauer E, *et al.* Multimycotoxin dipstick enzyme immunoassay applied to wheat [J]. *Food Addit Contam*, 1995, 12(3): 387–93.
- [72] Ardic M, Karakaya Y, Atasever M, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(5): 1596–1599.
- [73] 陈彤, 王常青, 李小凡, 等. 间接 ELISA 检测不同贮存条件下花生中黄曲霉毒素 B₁[J]. *中国油脂*, 2014, (09): 88–91.
Chen T, Wang CQ, Li XF, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in peanut under different storage conditions by indirect ELISA [J]. *China Oil Fat*, 2014, (09): 88–91.
- [74] 谢芳, 赖卫华, 史爱武, 等. 免疫磁珠富集结合酶联免疫吸附法检测酱油中黄曲霉毒素 B₁[J]. *食品科学*, 2013, (18): 165–169.
Xie F, Lai WH, Shi AW, *et al.* Immunomagnetic bead enrichment and ELISA for detection of aflatoxin B₁ in Sauce [J]. *Food Sci*, 2013, (18): 165–169.
- [75] Wang X H, Liu T, Xu N, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for ochratoxin A: investigation of analytical conditions and sample matrix on assay performance [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(3): 903–911.
- [76] Yu FY, Vdovenko MM, Wang JJ, *et al.* Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays with chemiluminescent and colorimetric detection for the determination of ochratoxin A in food [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(3): 809–813.
- [77] Li X, Li P, Zhang Q, *et al.* Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone in agro-food [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 49: 426–432.
- [78] Zhang D, Li P, Yang Y, *et al.* A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B(1) [J]. *Talanta*, 2011, 85(1): 736–742.
- [79] Song S, Liu N, Zhao Z, *et al.* Multiplex lateral flow immunoassay for mycotoxin determination [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(10): 4995–5001.
- [80] 刘梦琴, 黄勇, 刘阳新, 等. 电化学酶联免疫传感器的发展概述[J]. *化学传感器*, 2007, (01): 3–8.
Liu MQ, Huang Y, Liu YX, *et al.* A summary description of development in electrochemical enzyme-linked immunosensor [J]. *Chem Sensors*, 2007, (01): 3–8.
- [81] 李庆川, 曹立新, 胡海峰, 等. 黄曲霉毒素电化学生物传感器[J]. *化学进展*, 2014, (04): 657–664.
Li QC, Cao LX, Hu HF, *et al.* Electrochemical biosensors for aflatoxin analysis [J]. *Prog Chem*, 2014, (04): 657–664.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



李少晖, 研究专员, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: lishaohui@cofco.com



杨永坛, 高级工程师, 副总工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: yangyongtan@cofco.com