

链格孢霉毒素检测方法研究进展

满 燕, 梁 刚, 李 安, 王 冬, 贾文坤, 潘立刚*

(北京农业质量标准与检测技术研究中心, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(北京),
农产品产地环境监测北京市重点实验室, 北京 100097)

摘 要: 链格孢霉菌属于丝状真菌, 是一种普遍存在于环境中的病原体和腐生菌, 是低温环境下导致水果、蔬菜等农产品腐烂变质的主要微生物。链格孢霉毒素中有 70 多种具有明显毒性, 对人或牲畜具有诱变性、致癌性和致畸性等慢性或急性毒性作用, 因此引起了科学家们的广泛关注。但到目前为止, 国内外现行的食品中真菌毒素的限量标准中尚不包括链格孢霉毒素, 并且通常采用液相、液相-质谱、气相、气相-质谱等相关的检测方法进行检测。本文首先对链格孢霉菌的 3 种主要的次级代谢产物——链格孢酚、链格孢酚单甲醚和细交链孢菌酮酸的分类及毒性性质进行介绍; 其次, 对其主要的传统检测方法和快速检测方法进行综述; 最后, 对链格孢霉毒素检测的新技术新方法进行了展望。

关键词: 链格孢霉菌; 链格孢酚; 链格孢酚单甲醚; 细交链孢菌酮酸; 检测方法

Research progress of detecting methods for *Alternaria* toxins

MAN Yan, LIANG Gang, LI An, WANG Dong, JIA Wen-Shen, PAN Li-Gang *

(Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Risk Assessment Lab for Agro-products (Beijing),
Ministry of Agriculture, Beijing Municipal Key
Laboratory of Agriculture Environment Monitoring, Beijing 100097, China)

ABSTRACT: *Alternaria* belongs to filamentous fungi, and is a kind of pathogens and saprophytes, widely existing in environment. *Alternaria* is the primary microorganisms for the spoilage of agricultural products (fruits, vegetables) under low-temperature environment. More than 70 kinds of *Alternaria* toxins were found with obvious toxicity and they have acute or chronic toxic effects (mutagenicity, teratogenicity and carcinogenicity, etc) on people and animals, which raised the research interest of scientists. But so far, the limit standards of mycotoxin have not included the *Alternaria* toxins in home and abroad. Traditional detection methods for *Alternaria* toxins mainly include liquid chromatography (LC), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), gas chromatography (GC), gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) and so on. In this paper, classification and toxicity properties of 3 kinds of main secondary metabolite (alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid) of *Alternaria* toxins were firstly introduced. The main detection methods for *Alternaria* toxins were summarized. The trends of the novel detection technologies for *Alternaria* toxins were also proposed.

KEY WORDS: *Alternaria*; alternariol; alternariol monomethylether; tenuazonic acid; detection method

基金项目: 农产品产地环境检测评价方法及装备研发项目(2013AA10230202)

Fund: Supported by the Assessment Method and Equipment Development of Regional Environmental Detection for Agricultural Products (2013AA10230202)

*通讯作者: 潘立刚, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: panlg@nrcita.org.cn

*Corresponding author: PAN Li-Gang, Professor, Ph.D, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Haidian District, Shuguang Garden Middle Road, No.9, Beijing 100097, China. E-mail: panlg@nrcita.org.cn

1 引言

食品污染主要包括生物性污染、化学污染和放射性污染3种,而食品中生物性污染的重要来源是真菌分泌的次级代谢产物——真菌毒素^[1]。链格孢属真菌属于丝状真菌,是一种普遍存在于水果、蔬菜和田间作物等环境中的病原体和腐生菌,由于它们可以在低温、潮湿的环境下生长繁殖,因此是导致冷藏或长途运输过程中水果、蔬菜、谷物等腐烂变质的主要微生物^[2]。链格孢霉菌产生的多种次级代谢产物对人或牲畜具有诱变性、致癌性和致畸性等慢性或急性毒性作用,因此对链格孢霉菌毒素的研究引起了科学家们的高度重视。欧盟已经就食品与饲料中链格孢霉菌毒素对人畜的健康风险发布了科学意见,但到目前为止,国内外现行的食品中真菌毒素的限量标准中尚不包括链格孢霉菌毒素。

近年来,链格孢霉菌毒素的理化、毒性性质及其检测技术的研究已经取得了一定的进展。本文主要对目前研究比较多的3种主要的链格孢霉菌毒素——链格孢酚(alternariol, AOH)、链格孢酚单甲醚(alternariol monomethylether, AME)和细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TeA)的种类、毒性性质进行介绍,并重点对其主要的检测方法进行综述。

2 链格孢霉菌毒素分类及其毒性性质

链格孢霉菌产生的次级代谢产物——链格孢霉菌毒素中有70多种具有明显毒性^[3],但是只有一少部分的化学结构被表征,并且研究发现对人或牲畜具有急性或慢性毒性作用,对人或牲畜的健康构成危害^[4]。根据链格孢霉菌毒素化学结构的不同,可以将其分为5种不同的类型^[5,6]:(1)二苯并吡喃酮类,又称为聚酮,代表性毒素有AOH、AME、链格孢毒素(alternaria, ALT);(2)四氨基酸衍生物类:TeA和异细交链孢菌酮酸(iso-TeA);(3)茚醌类,包括交链孢毒素I、II和III(ATX-I、ATX-II和ATX-III)和匍柄霉毒素III;(4)一系列长链氨基多元醇的丙三羧酸酯类化合物,即AAL毒素。AAL毒素又分成2种不同的类型,AAL-TA和AAL-TB。AAL-TA包括1,2,3-丙烷三羧酸和1-氨基-11,15-二甲基十七-2,4,5,13,14-五醇的2种酯类(C13或C14)。AAL-TB包含1,2,3-丙烷三羧酸和1-氨基-11,15-二甲基十七-2,4,13,14-呋喃的C13或C14位2种酯类。(5)混杂结构,如腾毒素(tentoxin, TEN),一种环形四肽。目前研究比较多的3种主要的链格孢霉菌毒素为:AOH、AME和TeA。

AOH和AME从酒精结晶出为无色针状晶体,熔点分别为350℃和267℃,紫外照射下为蓝色荧光^[7]。据文献报道,AOH和AME对人或牲畜没有急性毒性作用^[8],但其分布广、产量多,并且具有基因毒性、诱变性^[9-11],还可以引起单链DNA和双链DNA的断裂^[12-14]。如Marko等^[15]研究了AOH、AME、ALT和iso-ALT的基因毒性机制,通

过彗星电泳结果发现:当AOH、AME的浓度分别 $\geq 1 \mu\text{mol/L}$ 和 $25 \mu\text{mol/L}$ 时,人结肠癌细胞的DNA链断裂率明显增加;并且AOH、AME诱导DNA链的断裂不能被甲酰嘧啶-DNA-糖基化酶(FPG)调节,因此增强了氧化应激DNA损伤。另外,AOH、AME还被鉴定为拓扑异构酶I和拓扑异构酶II的强有力的抑制剂。Marko等^[15]考察了链格孢霉菌毒素对这两种拓扑异构酶的影响。当AOH的浓度 $\geq 50 \mu\text{mol/L}$ 时,可以抑制拓扑异构酶I的催化活性;相反,与AOH相比,AME在9号位携带了一个甲氧基,只有当AME的浓度 $\geq 100 \mu\text{mol/L}$ 时,才会影响拓扑异构酶I的催化活性。当AOH的浓度分别 $\geq 25 \mu\text{mol/L}$ 和 $150 \mu\text{mol/L}$ 时,拓扑异构酶II α 和II β 能被明显抑制。当AME的浓度达到 $200 \mu\text{mol/L}$ 时,才会影响拓扑异构酶II β 的活性。此外,AOH和AME还具有致癌性。Liu等^[16]发现AOH能引起食道上皮细胞增殖,并且能引起胚胎食道鳞状细胞癌变。Yekeler等^[17]研究发现:在老鼠皮下接种AOH处理过的人胚胎食管组织,可以诱导鳞状上皮细胞癌的发生;在老鼠皮下注射被AME感染的NIH/3T3细胞,可以致其肿瘤。还有研究表明AOH具有雌激素的性能^[18]。

TeA是链格孢霉菌毒素中唯一一个列入美国食品药品监督管理局(FDD)有毒化学物质登记册中的毒素。TeA是一种互变异构体,因此其结构不稳定,Magnet等^[19]利用核磁共振光谱和X射线结晶法,发现了其互变异构体。TeA是链格孢属真菌毒素中急性毒性作用最强的一种^[20,21],其作用机制主要是:TeA可以抑制细胞内合成的蛋白质从细胞内释放到细胞浆液中;TeA是强螯合剂,可与钙、镁、铜等金属螯合,并结合在蛋白质合成过程中肽键形成过程中的转肽酶的活性中心^[22,23]。另外,TeA还具有细胞毒性。Zhou等^[24]研究了TeA对3种哺乳动物细胞系(3T3小鼠成纤维细胞、中国仓鼠肺细胞(CHL细胞)和人肝细胞(L-O₂细胞))的细胞毒性。研究结果发现:当TeA的浓度在12.5~400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,可以抑制细胞的增殖速率,也能减少总蛋白的含量。其中,3T3小鼠成纤维细胞是对链格孢霉菌毒素的毒性作用最为敏感,其 $\text{EC}_{50(24\text{ h})}=41.64 \mu\text{g/mL}$;其次是CHL细胞,其 $\text{EC}_{50(24\text{ h})}=59.33 \mu\text{g/mL}$;L-O₂细胞对毒素的毒性作用的敏感性最低,其 $\text{EC}_{50(24\text{ h})}=85.98 \mu\text{g/mL}$ 。此外,还具有致癌性以及协同作用。

3 链格孢霉菌毒素检测方法

对于真菌毒素的检测方法,传统的检测方法主要采用薄层色谱分析法(thin layer chromatography, TLC)、气相色谱(gas chromatography, GC)、气质联用(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)、液相色谱(liquid chromatography, LC)、液质联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)等,并且已经有大量相关文献对其进行详细报道^[25,26]。另外,近两年又出

现了利用酶联免疫吸附(ELISA)快速检测方法,实现了链格孢霉毒素 AOH 和 TeA 检测的相关报道。本文主要是对 3 种研究较多的链格孢霉毒素——AOH、AME 和 TeA 的传统检测方法和快速检测方法进行综述,最后对这 2 种检测方法进行了对比。

3.1 传统检测方法

3.1.1 薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)分析法

薄层色谱分析法^[27,28]是一种被全球实验室广泛应用于食品、药物、环境等领域中的定性分析方法。Hasan 等^[29]采用氯仿/丙酮($V:V=97:3$)作为溶剂体系,利用薄层色谱分析法,检测西红柿中的链格孢霉毒素——AOH、AME 和 TeA 的含量。结果得到 AOH、AME 的最低检测限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$, TeA 的最低检测限为 0.7 $\mu\text{g/kg}$ 。Matysik 等^[30]将梯度薄层色谱分析法与光密度法相结合,检测山莓、西红柿、小麦、燕麦样本中的 AOH 和 AME。这种薄层色谱分析法虽然具有能同时分离多个样品,只需要简单的样本前处理等优点,但是却具有检测灵敏度较低,实验操作繁琐、费时、有机试剂用量较大等缺点。

3.1.2 气相色谱(GC)及气质联用(GC-MS)技术

气相色谱法具有分析速度快、高效、灵敏的特性,尤其是气相色谱-质谱联用技术,不仅具有更高的检出灵敏度,而且还能检测出混合物中特定的某种物质,因此,基于气相色谱及气质联用的这种方法也被广泛应用于真菌毒素的定量检测中。

Harvan 等^[31]首先利用乙酰基三甲基硅烷、三甲基硅烷和吡啶的混合物($V:V:V=6:2:9$)对 TeA 进行衍生化,随后利用气相色谱火焰电离检测器(flame ionization detector, FID)对其进行检测,结果得到的最低检测限为 0.1 $\mu\text{g/g}$ 。Scott 等^[32]分别用七氟丁酸乙酯(HFB)和三甲基硅烷(TMS)对链格孢霉毒素进行衍生化;通过液-液萃取对样本进行前处理;最后利用 GC-MS 测定果汁中的链格孢霉毒素——AOH、AME、ALT、ALT-X-1、TeA。结果发现经 TMS 衍生化处理的 TeA 的检测灵敏度高于 HFB 衍生化。

通过上述研究发现:利用 GC-MS 测定样品中的链格孢霉毒素,通常需要对其进行衍生化处理。这就使 GC-MS 方法具备检测过程难以避免基质干扰,检测结果的重现性差,操作复杂、费时的缺点。因此 HPLC-MS(/MS)在链格孢霉毒素检测中的应用受到了限制,而多数链格孢霉毒素的检测都是采用液质联用的方法。

3.1.3 液相色谱(LC)及液质联用(LC-MS)技术

近些年,液相色谱特别是反相液相色谱或超高效液相色谱(UPLC)与 MS 或串联 MS/MS 偶联技术,已经在很大程度上取代了 GC 和 TLC,用于检测食品中的链格孢霉毒素。如 Azcarate 等^[33]利用高效液相色谱(HPLC)技术,对阿根廷 2004 年和 2005 年收获的 64 个小麦样本进行检测。结果发现:23 %的样本中含有 AME, 6%含有 AOH, 19%含

有 TeA; 阳性样本中 AME、AOH、TeA 的平均浓度分别为 2118 $\mu\text{g/kg}$ 、1054 $\mu\text{g/kg}$ 和 2313 $\mu\text{g/kg}$ 。Solfrizzo 等^[34]利用 LC 技术检测胡萝卜中的链格孢属根霉柄菌素(RAD)以及链格孢霉毒素 ATX-1、AOH、AME 和 TeA 的含量。首先利用水-甲醇-乙腈酸性混合物对毒素进行提取,一半的提取液经过 C_{18} 固相萃取柱,对 RAD、ATX-1、AOH 和 AME 进行纯化,另一半的提取液经聚合的 Oasis(R)HLB 柱,对 TeA 进行纯化;随后,经反相 LC 及 UV 二极管阵列检测器对其进行检测,得到 RAD、TeA、ATX-1、AME 和 AOH 的最低检测限分别为 0.006、0.02、0.02、0.01 和 0.005 $\mu\text{g/g}$ 。

Noser 等^[35]构建了一种超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法,用于检测 6 种链格孢霉毒素——TeA、AOH、AME、TEN、ATX-I 和 ALT。利用这种构建的方法检测瑞士商场中的农产品,结果发现:TeA 检测出的频率最高,并且最高量达到 790 $\mu\text{g/kg}$;样本中 AOH 和 AME 的浓度要低于 TeA,浓度范围分别小于 1~33 $\mu\text{g/kg}$ 和 5~9 $\mu\text{g/kg}$ 。Hickert 等^[36]利用 HPLC-MS/MS 法,定量检测 9 种链格孢属真菌毒素。

Asam 等^[37]将稳定同位素稀释分析法(stable isotope dilution assays, SIDAs)与 LC-MS/MS 相结合,检测红酒和果汁中的链格孢霉真菌毒素——AOH 和 AME。检测的红酒和果汁首先经过 RP-18 SPE 柱进行纯化和浓缩,随后利用 HPLC-MS/MS 进行检测。这种检测方法具有高的检测灵敏度:AOH 和 AME 的最低检测限分别为 0.03 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.01 $\mu\text{g/kg}$;定量检测限分别为 0.09 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.03 $\mu\text{g/kg}$;重现性分别为(100.5 $\pm$ 3.4)%和(107.3 $\pm$ 1.6)%。

Prelle 等^[38]将大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionisation, APCI)方法与液相色谱—三重四级杆质谱联用,创建了 LC-APCI-MS 这种新方法,检测苹果汁、啤酒、西红柿酱、橄榄油、罗勒调味料中的 AOH、AME、TeA、ALT 和 TEN 5 种链格孢霉毒素,最后得到的检测限和定量限分别为 0.16~12.31 ng/g 和 0.54~41.04 ng/g。

Aresta 等^[39]首先利用固相微萃取技术(solid-phase microextraction, SPME)对 TeA、赭曲霉毒素 A 等 4 种毒素进行纯化;其次,利用液相二极管阵列 UV 检测器(LC-UV/DAD)进行检测。结果得到 TeA 的最低检测限为 (25 $\pm$ 6) ng/g。Magnani 等^[40]利用固相萃取技术作为清洗、纯化过程,并将高效液相色谱(HPLC)技术与串联质谱 MS/MS 相结合,制备了一种固相萃取与 HPLC-MS/MS 相偶联的方法,用于测定柑橘果皮中的 AOH 和 AME,结果得到:检测线性范围为:0.50~20.0 $\mu\text{g/kg}$;最低检测限和定量限分别小于 0.13 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.50 $\mu\text{g/kg}$;相对标准偏差(RSD)<14.4 %。Di Mavungu 等^[41]首先利用乙酸乙酯和甲酸的混合物对样品进行提取;随后经 OASIS HLBTM SPE 柱进行纯化;最后,利用 HPLC-MS/MS 进行检测分析。利用这种 HPLC-MS/MS 技术对 6 种不同的食品添加剂进行检测,

结果检测到 23 种不同的真菌毒素, 其中包括 AOH、AME 和 ALT, 并且得到 ALT、AOH 和 AME 的最低检测限分别为 2、8 和 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 并且得到的最低定量限比最低检测限高 3 倍。何强等^[42]也建立了这种固相萃取-HPLC-MS/MS 的方法, 实现了苹果汁中 AOH、AME、ALT 和 TEN 4 种链格孢霉毒素的同时检测。

3.2 快速检测方法——ELISA 技术

除了上述传统的检测方法之外, 最近几年利用 ELISA 方法快速、高灵敏检测链格孢霉毒素成为研究的热点。2011 年, Ackermann 等^[43]筛选得到了 AOH 的多克隆抗体, 且首次筛选到其单克隆抗体。研究人员将单克隆抗体与多克隆抗体分别应用于 ELISA, 检测食品中的 AOH, 得到 AOH 的检测限分别为 (35 ± 6.9) pg/mL 和 (59 ± 16) pg/mL 。同时, 也利用构建的基于多克隆和单克隆的 2 种 ELISA 方法, 对德国市场上多种食品中的 AOH 进行检测, 最后将这种方法所得到的结果与 HPLC 方法进行了对比。同年, Burkin 等^[44]也筛选得到了 AOH 的多克隆抗体, 并且利用间接竞争 ELISA 的方法, 检测玉米、动物饲料和天然原料中 AOH 的含量, 进而对农产品安全风险进行评估, 最后得到 AOH 的检测灵敏度为 0.4 ng/mL 。到目前为止, 还没有利用 ELISA 的方法实现 AME 的检测。

2011 年, Gross 等^[45]利用琥珀酸酐对 TeA 进行衍生化, 利用活性酯法将其与钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)偶联成人工抗原, 利用 TeA-KLH 偶联物筛选得到其多克隆抗体, 并利用此多克隆抗体构建直接竞争性酶联免疫吸附方法。构建的这种 ELISA 检测方法, 对 TeA 具有一定的灵敏性, 但能与 TeA 醋酸盐强烈反应。得到 TeA 醋酸盐的平均标准曲线检测限为 (5.4 ± 2.0) ng/mL , 苹果和西红柿中的 TeA 的检测限为 25~50 ng/g 。2012 年, 杨星星等^[46]利用水合肼和乙醛酸对 TeA 进行衍生化, 进而筛选到 TeA 衍生物的多克隆抗体, 建立了 1 种间接 ELISA 方法, 实现了 TeA 毒素的检测。

3.3 传统方法与快速检测方法优缺点对比

食品中链格孢霉毒素传统的检测方法主要是上述的 TLC、GC、GC-MS、HPLC、HPLC-MS 等方法, 通过对上述检测方法的检测结果进行对比发现: TLC 方法的检测灵敏度最低, 已经被各种检测方法所取代; GC-MS、HPLC-MS 的检测灵敏度比 GC、HPLC 的高; 而利用 GC、GC-MS 对真菌毒素进行检测时, 一般都需要对毒素进行衍生化处理, 这种衍生化会对检测造成干扰, 因此检测结果的重现性差, 因此绝大多数真菌毒素的检测都使用 HPLC-MS 技术。HPLC-MS 方法虽然具有高的检测灵敏度, 但具有仪器设备体积庞大、价格昂贵、检测时间长、不能实现样本的高通量检测等缺点。

用于样品分析的快速检测方法有很多, 如 ELISA 试

剂盒、胶体金试纸条、微流控芯片等技术, 而目前用于链格孢霉毒素的快速检测方法只有 ELISA 技术。ELISA 技术不仅检测灵敏度已经逐渐接近于 HPLC-MS, 并且这种方法还具备反应速度快、检测时间短、特异性强的优点, 因此可以克服上述传统检测方法的不足。然而到目前为止, 仅出现了很少关于 ELISA 方法检测链格孢霉毒素的报道, 也是目前科学家研究的热点。

4 链格孢霉毒素检测方法发展趋势

目前, 链格孢霉毒素常规的检测方法主要有 GC-MS、HPLC-MS 等技术, 但是这些大型的检测设备只能满足实验室中检测的需求, 不能满足当前社会所追求的实时、快速、便携式检测的需求。因此, 迫切需要建立相关的快速检测方法, 如微流控芯片^[47-49]、免疫生物传感器技术^[50]、分子印迹技术^[51]等; 或是开发一些相关的快速检测试剂, 如 ELISA 试剂盒、试纸条^[52,53]等。这些快检方法至今没有在链格孢霉毒素检测中得到广泛应用, 原因主要是: 绝大多数方法的建立都需要使用链格孢霉毒素的抗体。因此, 筛选得到高专一性、亲和性的单克隆抗体是广泛应用这些快速检测方法的最重要的前提。另外, 由于核酸适配体 (aptamer) 的专一性和亲和性都已经可以和抗体相媲美, 因此, 除了抗体之外, 还可以对链格孢霉毒素的 aptamer 进行筛选, 建立基于 aptamer 的快速检测方法。以上这些快速检测方法的建立以及快速检测试剂的开发, 不仅可以缩短分析时间, 减少样品的消耗量, 同时还可以实现多种毒素的实时、便携式、连续检测, 这对水果、蔬菜等农产品中链格孢霉毒素的检测具有重大意义, 也必定是未来的研究重点和发展趋势, 因此需要科学家们投入更多的时间和精力开发相关的快速检测试剂以及建立相关的快速检测方法用于链格孢霉毒素的检测。可以预见, 传统的链格孢霉毒素检测技术将逐渐被各种新型、便携式、实时、快速的检测技术所取代。

参考文献

- [1] 史文景. 柑橘和果汁中链格孢霉毒素检测技术研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
Shi WJ. Study on the determination methods of alternaria toxins in citrus and fruit juices [D]. Chongqing: Southwest University, 2014.
- [2] 陈月萌, 李建华, 张静, 等. 高效液相色谱-荧光检测法同时测定水果中的 3 种链格孢霉毒素[J]. 分析实验室, 2012, 31(6): 70-73.
Chen YM, Li JH, Zhang J, et al. Simultaneous determination of three alternarias in fruits by HPLC with fluorescence detection [J]. Anal Lab, 2012, 31(6): 70-73.
- [3] Loggrieco A, Moretti A, Solfrizzo M. Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks [J]. World Mycotoxin J, 2009, 2(2): 129-140.
- [4] Barkai-Golan R, Paster N. Mycotoxins in fruits and vegetables [M]. San Diego: Academic Press, 2008.

- [5] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food [Z]. European Food Safety Authority, 2011.
- [6] 杨欣. 链格孢霉毒素研究进展[J]. 环境卫生学杂志, 2000, 27(3): 182–187.
Yang X. The research progress of *alternaria* toxins [J]. J Environ Hyg, 2000, 27 (3): 182–187.
- [7] 李凤琴. 链格孢毒素及其食品卫生问题(综述)[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(6): 45–49.
Li FQ. The problem of *alternaria* toxins and its food hygiene [J]. Chin J Food Hyg, 2001, 13(6): 45–49.
- [8] Olsen M, Visconti A. Metabolism of alternariol monomethyl ether by porcine liver and intestinal mucosa in vitro [J]. Toxicol in vitro, 1987, 2(1): 27–29.
- [9] Fehr M, Pahlke G, Fritz J, et al. Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II alpha isoform [J]. Mol Nutr Food Res, 2009, 53(4): 441–451.
- [10] Pfeiffer E, Eschbach S, Metzler M. *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells in vitro [J]. Mycotoxin Res, 2007, 23(3): 152–157.
- [11] Brugger EM, Wagner J, Schumacher DM, et al. Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells [J]. Toxicol Lett, 2006, 164(3): 221–230.
- [12] Pfeiffer E, Schmitt C, Burkhardt B, et al. Glucuronidation of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in vitro: chemical structures of glucuronides and activities of human UDP-glucuronosyl transferase isoforms [J]. Mycotoxin Res, 2009, 25(1): 3–10.
- [13] Solhaug A, Holme JA, Haglund K, et al. Alternariol induces abnormal nuclear morphology and cell cycle arrest in murine RAW 264.7 macrophages [J]. Toxicol Lett, 2013, 219(1): 8–17.
- [14] Solhaug A, Torgersen ML, Holme JA, et al. Autophagy and senescence, stress responses induced by the DNA-damaging mycotoxin alternariol [J]. Toxicology, 2014, 326(4): 119–129.
- [15] Marko D. Mechanisms of the genotoxic effect of *alternaria* toxins [C]. Gesellschaft für Mykotoxin forschung (Ed) Proceedings of the 29th Mycotoxin Workshop, 2007.
- [16] Liu G, Qian Y, Zhang P, et al. Etiological role of *alternaria alternata* in human oesophageal cancer [J]. Chin Med J-Peking, 1992, 105(5): 394–400.
- [17] Yekeler H, Bitmis K, Özcelik N, et al. Analysis of toxic effects of *alternaria* toxins on oesophagus of mice by light and electron microscopy [J]. Toxicol Pathol, 2001, 29(4): 492–497.
- [18] Lehmann L, Wagner J, Metzler M. Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(3): 398–408.
- [19] Nolte MJ, Steyn PS, Wessels PL. Structural investigations of 3-acetylpyrrolidine -2, 4-diones by nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography [J]. J Chem Soc, Perkin Trans 1, 1980, 678(9): 1057–1065.
- [20] Ostry V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs [J]. World Mycotoxin J, 2008, 1(2): 175–188.
- [21] Schrader TJ, Cherry W, Soper L K, et al. Further examination of the effects of nitrosylation on *alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity in vitro [J]. Mutat Res GenTox En, 2006, 606(1–2): 61–71.
- [22] Carrasco L, Vazquez D. Differences in eukaryotic ribosomes detected by the selective action of an antibiotic [J]. Biochim Biophys Acta (BBA)-Nucl Acids Protein Synth, 1973, 319(2): 209–215.
- [23] 吴春生, 马良, 江涛, 等. 链格孢霉毒素细交链格孢菌酮酸的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 295–301.
Wu CS, Ma L, Jiang T, et al. A review on tenuazonic acid, a toxic produced by *alternaria* [J]. Food Sci, 2014, 35(19): 295–301.
- [24] Zhou B, Qiang S. Environmental, genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata* [J]. Afr J Biotechnol, 2008, 7(8): 1151–1158.
- [25] Shephard GS, Berthiller F, Dorner J, et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2008–2009 [J]. World Mycotoxin J, 2010, 3(1): 3–23.
- [26] Shephard GS, Berthiller F, Dorner J, et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2007–2008 [J]. World Mycotoxin J, 2009, 2(1): 3–21.
- [27] Sherma J. Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis [J]. J Chromatogr A, 2000, 880(1–2): 129–147.
- [28] 汪瑗, 朱若华, 陈惠. 薄层色谱分析法及其进展[J]. 大学化学, 2006, 21(3): 34–40.
Wang Y, Zhu RH, Chen H. Thin layer chromatography and its progress [J]. Univ Chem, 2006, 21(3): 34–40.
- [29] Hasan HA. *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production [J]. Mycopathologia, 1995, 130(3): 171–177.
- [30] Matsykl G, Gyrin H. Gradient thin-layer chromatography and densitometry determination of *alternaria* mycotoxins [J]. Chromatographia, 1996, 42 (9): 555–558.
- [31] Harvan DJ, Pero RW. Gas chromatographic analysis of the *Alternaria* metabolite, tenuazonic acid [J]. J Chromatogr A, 1974, 101(1): 222–224.
- [32] Scott PM, Weber D, Kanhere SR. Gas chromatography-mass spectrometry of *alternaria* mycotoxins [J]. J Chromatogr A, 1997, 765(2): 255–263.
- [33] Azcarate MP, Patriarca A, Terminiello L, et al. *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest [J]. J Food Protect, 2008, 71(6): 1262–1265.
- [34] Solfrizzo M, De-Girolamo A, Vitti C, et al. Liquid chromatographic determination of *alternaria* toxins in carrots [J]. J AOAC Int, 2004, 87(1): 101–106.
- [35] Noser J, Schneider J, Rother M, et al. Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market [J]. Mycotox Res, 2011, 27(4): 265–271.
- [36] Hickert S, Bergmann M, Ersen S, et al. Survey of *alternaria* toxin contamination in food from the German market, using a rapid HPLC-MS/MS approach [J]. Mycotoxin Res, 2015: 1–12.
- [37] Asam S, Konitzer K, Schieberle P, et al. Stable isotope dilution assays of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(12): 5152–5160.
- [38] Prella A, Spadaro D, Garibaldi A, et al. A new method for detection of five *alternaria* toxins in food matrices based on LC-APCI-MS [J]. Food Chem, 2013, 140(1–2): 161–167.
- [39] Aresta A, Cioffi N, Palmisano F, et al. Simultaneous determination of

- ochratoxin A and cyclopiazonic, mycophenolic, and tenuazonic acids in corn flakes by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(18): 5232–5237.
- [40] Magnani RE, De SGD, Rodriguez-Filho E. Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (citrus reticulata) with symptoms of alternaria brown spot [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(13): 4980–4986.
- [41] Mavungu D, Monbaliu JD, Scippo S, *et al.* LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements [J]. *Food Addit Contam: Part A*, 2009, 26(6): 885–895.
- [42] 何强, 李建华, 孔祥虹, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定浓缩苹果汁中的4种链格孢霉毒素[J]. *色谱*, 2010, 28(12): 1128–1131.
- He Q, Li JH, Kong XH, *et al.* Simultaneous determination of four alternaria toxins in apple juice concentrate by ultraperformance liquid chromatography electrospray ionization tandem massspectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2010, 28(12): 1128–1131.
- [43] Ackermann Y, Curtui V, Dietrich R, *et al.* Widespread occurrence of low levels of alternariol in apple and tomato products, as determined by comparative immunochemical assessment using monoclonal and polyclonal antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(12): 6360–6368.
- [44] Burkin AA, Kononenko GP. Enzyme immunoassay of alternariol for the assessment of risk of agricultural products contamination [J]. *Appl Biochem Micro*, 2011, 47(1): 72–76.
- [45] Gross M, Curtui V, Ackermann Y, *et al.* Enzyme immunoassay for tenuazonic acid in apple and tomato products [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(23): 12317–12322.
- [46] 杨星星, 刘细霞, 王弘, 等. 细交链孢菌酮酸酶联免疫吸附分析方法研究[J]. *分析化学*, 2012, 40(9): 1347–1352.
- Yang XX, Liu XX, Wang H, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay method for detection of tenuazonic acid [J]. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40(9): 1347–1352.
- [47] Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics [J]. *Nature*, 2006, 442: 368–373.
- [48] Chen J, Chen D, Xie Y, *et al.* Progress of microfluidics for biology and medicine [J]. *Nano-Micro Lett*, 2013, 5(1): 66–80.
- [49] 宋慧君, 刘淑艳, 马惠蕊, 等. 液相芯片竞争法检测黄曲霉毒素 B₁[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(26): 144–150.
- Song HJ, Liu SY, Ma HR, *et al.* The quantitative analysis of AFB₁ by using the microsphere array technology and indirect competition theory [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2011, 27(26): 144–150.
- [50] Ben RI, Arduini F, Arvinte A, *et al.* Development of a bio-electrochemical assay for AFB₁ detection in olive oil [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(7): 1962–1968.
- [51] 刘博, 尹航, 赫彩霞, 等. 分子印迹固相萃取技术在食品及饲料安全检测中的应用[J]. *饲料博览*, 2013(3): 12–15.
- Liu B, Yin H, He CX, *et al.* The application of molecular imprinting solid-phase extraction technology to food and feed safety detection [J]. *Feed Rev*, 2013, (3): 12–15.
- [52] Preechakasedkit P, Pinwattana K, Dungchai W, *et al.* Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of salmonella typhi in human serum [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 31(1): 562–566.
- [53] 舒文祥, 徐炜, 李艳, 等. 胶体金免疫层析法快速检测赭曲霉毒素A研究[J]. *粮食与油脂*, 2011, 10: 20–22.
- Shu WX, Xu W, Li Y, *et al.* Study on gold immunochromatography assay for rapid detection of ochratoxin A [J]. *Cereals Oils*, 2011, 10: 20–22.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



满燕, 博士, 主要研究方向为农产品真菌毒素检测。
E-mail: manyan3669@163.com



潘立刚, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。
E-mail: panlg@nrcita.org.cn