

国内外真菌毒素检测方法研究现状及进展

张思思^{1,2}, 陆继伟¹, 王少敏¹, 毛丹¹, 苗水¹, 季申^{1*}

(1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203; 2. 复旦大学药学院, 上海 201203)

摘要: 真菌毒素是真菌产生的小分子有毒代谢产物, 通常以痕量形式存在于基质中, 不表现为急性毒性, 但具有蓄积性, 长期摄入易引发癌症、突变及畸形, 从而对人类安全造成威胁。本文着重介绍了黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马菌素、玉米赤霉烯酮及其代谢物、单端孢霉烯族类毒素以及麦角碱等毒性相对较强的真菌毒素的来源、结构和毒性。由于许多真菌毒素结构相似且含量较低, 需要采用高选择性、准确、快速定性定量方法, 因而本文就目前国内外常用的传统及新型的真菌毒素检测方法进行了概述和比较, 主要包括: 薄层色谱法, 液相色谱法, 气相色谱法, 免疫化学法, 核酸适配体法以及液相色谱-质谱联用技术(LC-MS/MS)在多毒素检测中的应用, 拟为真菌毒素的检测研究提供参考。

关键词: 真菌毒素; 检测方法; 多毒素检测

Current status and advances of domestic and international determination methods of mycotoxins

ZHANG Si-Si^{1,2}, LU Ji-Wei¹, WANG Shao-Min¹, MAO Dan¹, MIAO Shui¹, JI Shen^{1*}

(1. *Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China;*

2. *School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China*)

ABSTRACT: Mycotoxins are small, toxic metabolites of fungi, which have no acute toxicity due to their trace concentrations in matrices. However, long-term intake of them will lead to cancer, mutation and malformation owing to their accumulative effects, which threaten the safety of people. This review mainly introduced the origins, chemical structures as well as toxicity of aflatoxins, ochratoxins, fumonisins, zearalenone and their metabolites, trichothecenes, ergot alkaloids and so forth with relatively high toxicity. Many mycotoxins have similar chemical structures and trace concentrations, therefore it is essential to apply selective, accurate and fast quantitative methods on mycotoxin determination. This review concluded and compared traditional and novel determination methods in terms of mycotoxins, including thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), immunochemical methods, aptamers as well as application of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) in multi-mycotoxin determination, serving as a reference for related researches on mycotoxins.

KEY WORDS: mycotoxins; determination methods; multi-mycotoxin determination

基金项目: 国家科技重大专项(2014ZX09304307-002)、上海市科学技术委员会项目(13DZ1970402)

Fund: Supported by the National Science and Technology Major Project (2014ZX09304307-002) and Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (13DZ1970402)

*通讯作者: 季申, 主任药师, 博士生导师, 主要研究方向为中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究。E-mail: jishen2013@163.com

*Corresponding author: JI Shen, Chief Pharmacist, Ph.D., Shanghai Institute for Food and Drug Control, No.1500, Zhangheng Road, Pudong New District, Shanghai 201203, China. E-mail: jishen2013@163.com

1 引言

1983年, Turner和Alderidge将约1100种真菌产生的近2000种次级真菌代谢物进行了分类。主要的真菌毒素包括: 黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马菌素、玉米赤霉烯酮和单端孢霉烯族类毒素、麦角碱、展青霉素、橘青霉素、交链孢酚等^[1]。同一种霉菌可产生多种真菌毒素。同一种真菌毒素也可由多种霉菌产生, 只要环境条件适宜真菌就能通过孢子以极快的速度生长繁殖, 产生的真菌毒素种类繁多, 毒理机制以及对人和动物的健康影响各有不同, 易滋生于饲料、谷物以及牛奶等基质中。真菌毒素可通过直接摄取、吸入以及皮肤接触进入人体及牲畜体内, 对人类及动物的健康造成一定威胁, 主要包括肝毒性、肾毒性、

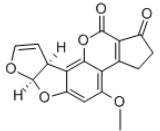
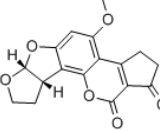
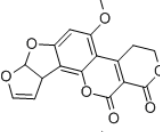
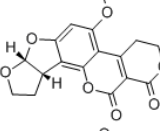
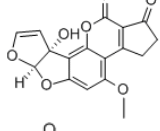
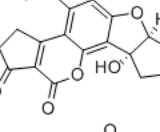
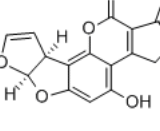
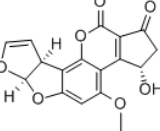
致癌性、致畸性等。本文分别针对黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马菌素、玉米赤霉烯酮、单端孢霉烯族类毒素、麦角碱、橘青霉素、展青霉素等毒素的检测方法进行综述, 同时对质谱技术在多种真菌毒素同时检测中的应用进行总结, 拟为真菌毒素的检测研究提供参考。

2 主要真菌毒素背景介绍

2.1 黄曲霉毒素

黄曲霉毒素是天然存在的二呋喃香豆素类化合物。目前已明确结构的黄曲霉毒素有17种, 包括AFB₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂、P₁、Q、H、B_{2a}、G_{2a}和毒醇等, 表1为代表性黄曲霉毒素的信息。其中最为常见的为AFB₁、B₂、G₁、

表1 代表性黄曲霉毒素信息表
Table 1 Information of typical aflatoxins

名称	分子式	化学结构	CAS号
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆		1162-65-8
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆		7220-81-7
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇		1165-39-5
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇		7241-98-7
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇		6795-23-9
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇		6885-57-0
P ₁	C ₁₆ H ₁₀ O ₆		32215-02-4
Q ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇		52819-96-2

G₂、M₁、M₂, 主要由黄曲霉和寄生曲霉产生, 其他真菌霉如 *Aspergillus. nomius*, *A. pseudotamarii* 以及 *A. bombycis* 亦能产生黄曲霉毒素^[2,3]。黄曲霉毒素急性中毒时, 可发生显著肝细胞脂肪变性、胆管增生、甚至死亡, 而慢性中毒则表现为致癌性、免疫抑制等。黄曲霉毒素也因其极强的毒性被世界卫生组织定为一类致癌物^[4]。主要检测方法有薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)和近年来发展起来的高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)、毛细管电泳法、免疫化学法和红外光谱法等^[5-8]。

2.2 赭曲霉毒素(ochratoxins, OT)

赭曲霉毒素主要由赭曲霉产生, 其他曲霉如蜂蜜曲霉、孔曲霉等也能产生赭曲霉毒素。主要的赭曲霉毒素有赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 B 以及赭曲霉毒素 C(表 2), 其中赭曲霉毒素 A(OTA)的毒性最强且化学性质稳定, 摄入后易在循环系统、肝脏或其他组织中蓄积, 其结构类似于苯丙氨酸, 对许多以苯丙氨酸作为底物的酶具有抑制作用, 尤其是苯丙氨酸-tRNA 合成酶, 进而抑制蛋白质的合成, 造成细胞凋亡^[9]。目前, 并没有足够研究结果表明 OTA 对人体具有致癌性, 但已经确证 OTA 为肾病的病原体, 具有一定肾毒性。赭曲霉毒素易产生于燕麦、咖啡以及红酒等, 同时又会在肉类产品中蓄积。目前常用的检测方法有: 薄层色谱法、高效液相色谱法、免疫化学法和新型核酸适配体法^[10,11]。

2.3 伏马菌素(fumonisin)

伏马菌素是由串珠镰刀菌、轮状镰刀菌、多育镰刀菌等产生的次级代谢产物, 是一类由不同的多氢醇和丙三羧

酸组成的结构类似的双酯化合物^[5]。易滋生于玉米、小麦以及其他谷物中, 具有肝毒性和肾脏毒性(表 3)。目前为止, 发现的伏马菌素有 FA₁、FA₂、FB₁、FB₂、FB₃、FB₄、FC₁、FC₂、FC₃、FC₄和 FP₁ 共 11 种, 其中伏马菌素 B₁(FB₁)和伏马菌素 B₂(FB₂)是存在最普遍且毒性最强的 2 种毒素。虽然 FB₁ 的急性毒性较低, 但能够干扰鞘酯代谢, 同时造成心血管功能障碍, 现已引起世界范围的广泛关注。FB₂ 的细胞毒性比 FB₁ 更强, 可以强烈地抑制鞘氨醇转移酶的活性。目前对于伏马菌素的检测主要方法有 HPLC-FLD、HPLC-MS、ELISA 法以及新型适配体法(aptamer)^[12]。

2.4 玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEA)

玉米赤霉烯酮的产毒菌主要是镰刀菌属(*Fusarium*)的菌株, 如禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)、三线镰刀菌(*F. tricinctum*)和黄色镰孢(*F. culmorum*)等。ZEA 化学性质稳定, 尤其耐高温, 易滋生于谷类作物中如玉米、大麦等, 且会在女性第二性征方面造成致癌基因突变且引起不育、流产或其他繁殖的问题(表 4)。ZEA 能够在体内通过生物转化生成 α -玉米赤霉烯醇和 β -玉米赤霉烯醇(α -玉米赤霉烯醇比 ZEA 具有更高的与雌激素受体结合的能力)^[13]。有研究发现在哺乳动物尿液中有大量 α -玉米赤霉烯醇和 β -玉米赤霉烯醇转化成 α -玉米赤霉醇和 β -玉米赤霉醇^[14]。目前主要的分析方法有: 高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、薄层色谱法(目前用于研究使用较少, 主要用于仪器设备落后的地区)、免疫分析法等。但大多数情况下都是基于高效液相色谱-质谱联用法对 ZEA 及其代谢物进行同时检测, 有时还会同其他类真菌毒素进行同时检测^[15]。

表 2 代表性赭曲霉毒素信息表
Table 2 Information of typical ochratoxins

名称	分子式	化学结构	CAS 号
赭曲霉毒素 A	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆		303-47-9
赭曲霉毒素 B	C ₂₀ H ₁₉ NO ₆		4825-86-9
赭曲霉毒素 C	C ₂₂ H ₂₂ ClNO ₆		4865-85-4
赭曲霉毒素 α	C ₁₁ H ₉ ClO ₅		19165-63-0

表 3 伏马菌素类毒素信息表
Table 3 Information of typical fumonisins

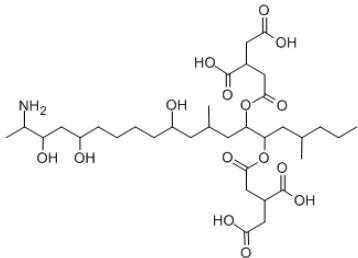
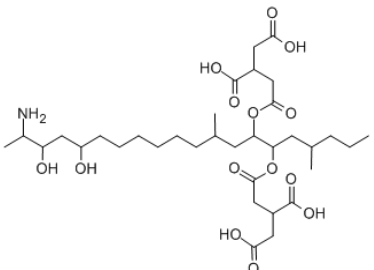
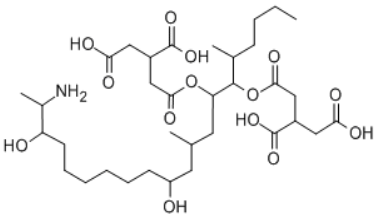
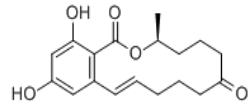
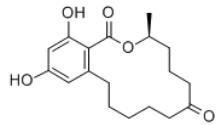
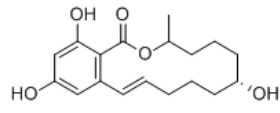
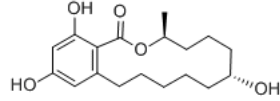
名称	分子式	化学结构	CAS 号
伏马菌素 B ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅		116355-83-0
伏马菌素 B ₂	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄		116355-84-1
伏马菌素 B ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄		136379-59-4

表 4 玉米赤霉烯酮及其主要代谢物信息表
Table 4 Information of ZEA and its typical metabolites

名称	分子式	化学结构	CAS 号
玉米赤霉烯酮(ZEA)	C ₁₈ H ₂₂ O ₅		17924-92-4
玉米赤霉酮(ZAN)	C ₁₈ H ₂₄ O ₅		5975-78-0
α -玉米赤霉烯醇(α -ZOL)	C ₁₈ H ₂₄ O ₅		36455-72-8
α -玉米赤霉醇 (α -ZAL)	C ₁₈ H ₂₆ O ₅		26538-44-3

2.5 单端孢霉烯族类毒素(trichothecenes, TRICs)

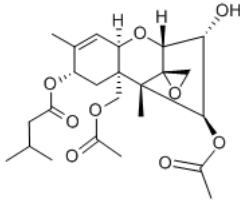
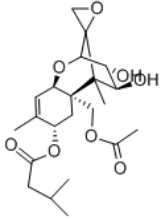
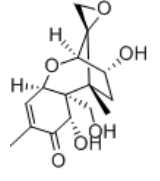
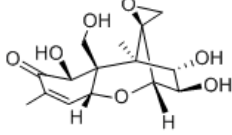
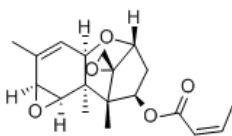
单端孢霉烯族类毒素主要由镰刀菌、疣孢漆斑菌以及葡萄穗霉产生, 通常具有一个四环倍半萜和 12,13-环氧单端孢霉烷-9-烯结构, 主要的毒性由 12,13-环氧化产生^[15]。单端孢霉烯族类毒素主要分为 4 种类型 A、B、C、D。A 型有 T-2 和 HT-2 毒素; B 型有脱氧雪腐镰刀菌烯醇(又称呕吐毒素, DON)和雪腐镰刀菌烯醇(NIV); C 型有响尾蛇毒素(crotoxin)和 baccharin; D 型有葡萄穗霉毒素 G(satratoxin G)和漆斑菌素(roridin) (表 5)。其中 DON 易在谷物中滋生, 人类摄入后会造厌食烦躁, 同时对胃肠道也具有刺激性作用并造成急性慢性毒性。鉴于 DON 的危害性, 联合国粮食和农业组织在 2004 年的食品与营养报告中指出, 37 个国家针对食品中的 DON 已有相关限量标准^[16]。T-2 毒素是一种高毒性化合物, 对人体造血器官会产生严重的影响, 人体吸

入时也会产生一些急性中毒症状, 包括呕吐、皮疹和呼吸困难等。目前对这类毒素的主要的检测方法有传统的 TLC、HPLC、GC、ELISA 法, 以及目前报道应用最为广泛的 LC-MS/MS 法。

2.6 麦角碱(ergotalk aloids)

麦角碱是有麦角菌属(*Claviceps*)产生的具有药理学活性并能引起人畜中毒的生物碱, 主要容易在谷类作物中滋生(表 6)。麦角中毒易使人 and 动物产生中枢性和外周性中毒, 临床表现主要分痉挛性型中毒(手脚麻木、肌肉抽搐等)、坏疽型中毒(触觉消失、皮肤皱缩、引起流产等)以及混合型中毒(兼具痉挛型及坏疽型特点)^[17]。针对麦角碱的含量测定, 常用的有比色法、薄层层析、荧光法、气相色谱法和高效液相色谱法等, 其中高效液相色谱-质谱联用技术使用最为广泛。

表 5 单端孢霉烯族类毒素信息表
Table 5 Information of typical TRICs

名称	分子式	化学结构	CAS 号
T-2 毒素(T-2 toxin)	C ₂₄ H ₃₄ O ₉		21259-20-1
HT-2 毒素(HT-2 toxin)	C ₂₂ H ₃₂ O ₈		26934-87-2
呕吐毒素(deoxynivalenol)	C ₁₅ H ₂₀ O ₆		51481-10-8
雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol)	C ₁₅ H ₂₀ O ₇		23282-20-4
响尾蛇毒素(crotoxin)	C ₁₉ H ₂₄ O ₅		21284-11-7

续表 5

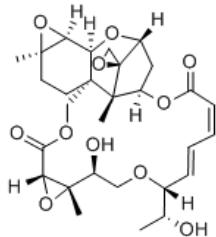
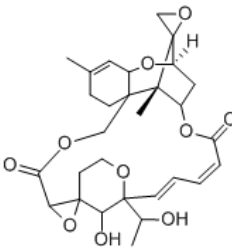
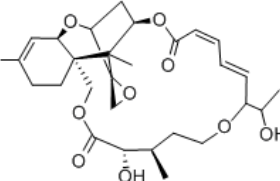
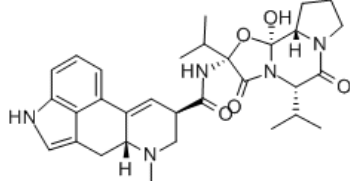
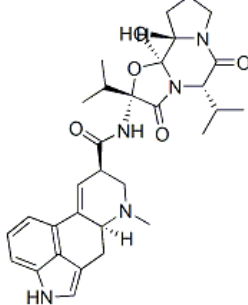
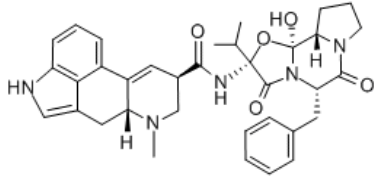
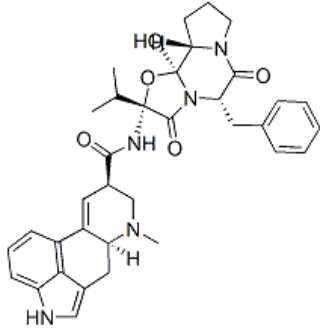
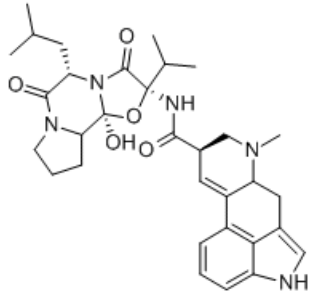
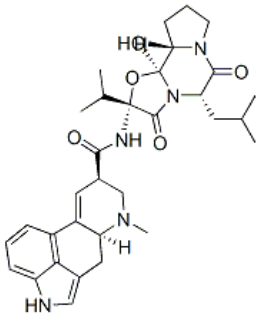
名称	分子式	化学结构	CAS 号
Baccharin	$C_{29}H_{38}O_{11}$		61251-97-6
葡萄穗霉素(satratoxin G)	$C_{29}H_{36}O_{10}$		53126-63-9
漆斑菌素 A(roridin A)	$C_{29}H_{40}O_9$		14729-29-4

表 6 麦角碱类毒素信息表

Table 6 Information of typical ergot alkaloids

名称	分子式	化学结构	CAS 号
麦角考宁(ergocornine)	$C_{31}H_{39}N_5O_5$		564-36-3
麦角异考宁(ergocorninine)	$C_{31}H_{39}N_5O_5$		564-37-4
麦角克碱(ergocristine)	$C_{35}H_{39}N_5O_5$		511-08-0

续表 6

名称	分子式	化学结构	CAS 号
麦角异克碱(ergocristinine)	$C_{35}H_{39}N_5O_5$		511-07-9
麦角卡里碱(ergocryptine)	$C_{32}H_{41}N_5O_5$		511-09-1
麦角异卡里碱(ergocryptinine)	$C_{32}H_{41}N_5O_5$		511-10-4

2.7 其他类真菌毒素(表 7)

2.7.1 橘青霉素(citrinin)

橘青霉素主要由青霉菌及曲霉菌代谢产生, 易滋生干谷物及饲料中, 具有肝毒性、肾毒性以及致癌性, 橘青霉素污染饲料和粮食时, 往往同时有赭曲霉毒素的存在, 两者具有协同作用, 能造成肾病。目前针对橘青霉素的检测方法主要有薄层色谱法、酶联免疫吸附分析法、高效液相色谱法、气相色谱法以及高效液相色谱-质谱联用技术等。在所有检测方法中, 高效液相色谱法(荧光检测器)最为常用^[18]。

2.7.2 展青霉素(patulin)

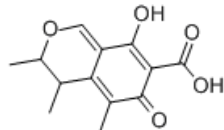
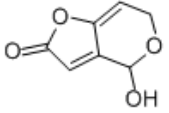
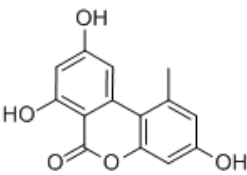
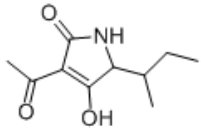
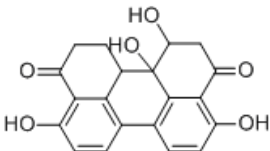
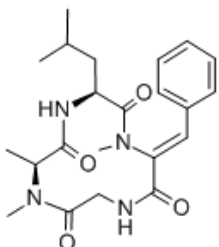
展青霉素又名棒曲霉素, 可由曲霉属和青霉属中的棒曲霉(*Aspergillus clavatus*)、扩张青霉(*Penicillium expansum*)、展青霉、曲青霉等产生, 主要来源于霉烂苹果或用霉变苹果加工的苹果汁。展青霉素的急性中毒症状包括躁动、抽搐及呕吐等, 慢性中毒症状包括对啮齿

动物具有遗传毒性、神经毒性及免疫毒性, 而对人体的慢性毒性目前尚未研究清楚。最初针对展青霉素的检测方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法(紫外检测器)以及气相色谱法, 目前液相色谱-质谱联用技术和气相色谱-质谱联用技术已经作为补充方法逐渐应用于展青霉素的阳性确证^[19]。

2.7.3 交链孢霉毒素(alternaria toxins)

交链孢霉毒素是由交链孢霉产生的一类有毒代谢产物的总称。交链孢霉可以产生 40 多种毒素和衍生物, 但只有 7 种被认为具有潜在毒性, 根据其毒性和分子结构的不同主要分为二苯吡喃酮类化合物(交链孢酚、交链孢酚单甲醚和交链孢烯)、四价酸类化合物(细交链孢菌酮酸等)和戊醌类化合物(交链孢毒素 I、II、III)。易滋生干番茄、苹果等蔬菜水果中, 针对交链孢霉毒素的检测方法有薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法。其中高效液相色谱法(紫外检测器)和液相色谱-质谱联用技术应用最广^[20]。

表 7 其他类毒素信息表
Table 7 Information of other mycotoxins

名称	分子式	化学结构	CAS 号
橘青霉素(citrinin)	C ₁₃ H ₁₄ O ₅		11118-72-2
展青霉素(patulin)	C ₇ H ₆ O ₄		149-29-1
交链孢酚(alternariol)	C ₁₄ H ₁₀ O ₅		641-38-3
细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃		610-88-8
交链孢毒素 I (altartoxin I)	C ₂₀ H ₁₆ O ₇		56258-32-3
腾毒素(tentoxin)	C ₂₂ H ₃₀ N ₄ O ₄		28540-82-1

3 真菌毒素主要检测方法概述

3.1 薄层色谱法

薄层色谱法(TLC)是第一个用于真菌毒素检测的色谱法,目前仍作为很多实验室的常规技术手段,尤其是一些发展中国家的毒素检测^[21]。1968年AOAC首次提出用微柱-薄层色谱法测定花生和花生制品中的黄曲霉毒素,此后许多国家也采用此法作为标准方法,中国也将其作为国家标准方法^[22]。相较黄曲霉毒素,TLC法在其他的毒素中应用并不广泛,目前我国国家标准中仍有部分对于赭曲霉毒素(GB/T 19539-2004, GB/T 5009.96-2003)、展青霉素(GB/T 5009.185-2003)以及杂色曲霉毒素(GB/T 5009.25-2003)

测定采用TLC法,检出限在3~50 μg/kg或μg/L。由于操作过程繁琐复杂、有机溶剂消耗量大、对实验人员操作技术有一定要求且重现性和灵敏度难令人满意,目前该方法逐渐被诸如高效液相色谱等其它方法取代。随着TLC技术的发展,结合光密度法的高效薄层色谱法(HPTLC)、二维薄层色谱法以及超压薄层色谱法(OPTLC)能够减少分析时间并提高分析结果的准确度和精密度^[23-25]。

此外,薄层色谱法结合新型电荷耦合检测器也能够有效提高检测灵敏度,Teixeira等^[26]采用IAC净化技术并结合薄层色谱法-电荷耦合检测器对红酒中的OTA进行检测,LOD和LOQ分别为0.2 μg/L和0.8 μg/L。Welke等^[27]将TLC与电荷耦合检测器结合对苹果汁中的展青霉素进行检测,定量限为14 μg/L。

3.2 高效液相色谱法(HPLC)

高效液相色谱法凭借其强大的分离能力以及检测器的高灵敏度和专属性,已经成为真菌毒素定量分析中最常用的方法之一,其中反相高效液相色谱法较为常用,流动相主要为甲醇、乙腈和水或三者组成的混合溶液,对于伏马菌素和赭曲霉毒素一类含有羧基的真菌毒素通常采用降低流动相的 pH 值以抑制酸性基团解离从而改善峰形^[28]。HPLC 可结合多种检测器如:紫外检测器(UV)、二极管阵列检测器(DAD)、荧光检测器(FLD)、质谱检测器(MS)以及电化学检测器(EC)等^[29,30]。

对于具有紫外吸收官能团的毒素如:黄曲霉毒素、赭曲霉毒素以及玉米赤霉烯酮类毒素等,较常采用紫外检测器和荧光检测器,而 FLD 的灵敏度比 UV 检测器高 10~1000 倍因而更为常用^[31]。通常采用柱前和柱后衍生法来增强荧光,柱前衍生主要为加入荧光衍试剂如环糊精(增大荧光基团和环糊精间的作用从而增强荧光)、三氟醋酸(使毒素发生水合作用生成具有荧光的半缩醛化合物)等^[32]。柱后衍生主要包括化学试剂衍生法(碘试剂和溴试剂等)和光电衍生法^[54]。Shepher 等^[33]最早采用饱和碘溶液与黄曲霉毒素在 60~75 °C 反应池内进行衍生化反应。该法具有许多缺点,包括需要加热反应池和分离泵,同时也会由于操作不当生成碘的析晶等。由于溴化物活性更强,可以在室温下进行反应,无需加热,因而逐渐替代碘化物^[34]。Quinto 等^[35]采用固相微萃取技术结合 HPLC 柱后光化学衍生-荧光检测器,对谷物中 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 进行含量测定,检测限(LOD)为 0.035~0.2 μg/kg,定量下限(LOQ)为 0.1~0.63 μg/kg,日内精密密度为 0.99~1.23,日间精密密度为 2.27~5.38。

对于不具有紫外官能团的毒素如伏马菌素、T-2 毒素及 HT-2 毒素等,较常采用荧光衍生试剂进行衍生化反应以及质谱检测器。荧光衍生试剂有邻苯二甲醛(OPA)、1-萘脲及香豆素-3 等^[37,38]。Asta 等^[39]采用香豆素-3-羰基氯作为衍生试剂对 8 种 A 型和 B 型 TRICs 进行柱前衍生,LOD 为 0.2~1 μg/kg。Xue 等^[40]采用 UPLC-MS/MS 法对马铃薯根茎中的 T-2 毒素、蛇形毒素、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇同时进行测定,LOD 为 2~5 μg/kg。目前质谱检测器主要用于多毒素同时检测抑或作为紫外和荧光检测方法的确证法以避免假阳性和假阴性样品。

3.3 气相色谱法

虽然气相色谱是一种强大的分离技术,但由于许多真菌毒素都是极性化合物,在进入气相色谱柱前都需要采用一定的方式进行衍生,因而其在真菌毒素检测中的应用并不广泛,主要应用的真菌毒素有单端孢霉烯族类毒素(最为常用)、玉米赤霉烯酮等^[31]。常与 GC 结合的检测器有 ECD、FID 和 MS, B 型 TRIC_s 具有共轭羰基结构,很适

合于 ECD 检测器,而 A 型 TRIC_s 由于缺乏吸电子基团,因而在进入 ECD 之前需要进行适当的衍生化反应,通常为氟酰化反应。Eke 等^[41]采用三甲基硅烷 N,N-二甲基氨基甲酸盐对 A 型和 B 型 TRICs 进行同时衍生化反应,用 FID 和质谱检测器对粗粒小麦粉和玉米砂砾中的 TRICs 进行测定,GC-FID 的 LOD 为 0.30~0.47 mg/kg, GC-MS 的 LOD 为 0.05~0.35 mg/kg。而在形成 TMS 衍生物的过程中为防止产生一些多重反应产物,可使用混合衍生试剂。针对玉米赤霉烯酮,也通常采用一系列衍生化试剂,包括 N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)、N,N-二乙基三甲基硅烷胺(TMSDEA)、N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(MSTFA)以及 N,O-双(三甲基硅基)乙酰胺+三甲基硅烷+N-三甲基硅咪唑的混合物(以 Fluka II 表示)。Kinani 等^[42]同时评价了以上 4 种衍生化试剂,而衍生后的色谱行为优劣如下(降序排列): BSTFA>Fluka II>TMSDEA>>MSTFA。Amelin 等^[43]采用 QuEChERS 样品前处理方法,结合 GC-ECD 对多种谷物、饲料以及肉中的 OTA、T-2、DON 以及 ZEA 进行分离测定。采用三氟醋酐作为衍生化试剂,能够向分析物中引入高电负性的氟原子,ZEA 的 LOQ 为 50 μg/kg, RSD < 8%。

3.4 免疫化学法

基于免疫化学的检测方法凭借其高灵敏度和对特异性抗体的高选择性等特点在真菌毒素快速检测方面占据主要地位,已经成为真菌毒素筛选的常规检测方法,主要包括传统的酶联免疫吸附法^[44,45]和新型化学发光免疫分析法(chemiluminescence-immunoassay)^[46,47]及亲和型电化学生物传感器法(electrochemical affinity biosensor)^[48]。

酶联免疫分析法的主要优势在于操作快速简便、可自动化、检测结果准确,且由于大部分免疫化学法都是基于光度、荧光、化学发光或电化学检测等,因而所需仪器设备简单。目前商品化的试剂盒已经广泛应用,Zheng 等^[49]采用直接 ELISA 法对谷类产品中的 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 以及 AFG₂ 的总和进行检测,LOD 为 2.5 μg/kg,线性范围为 4~40 μg/kg。Santos 等^[50]采用 IAC 净化技术结合 ELISA 试剂盒对中草药中的多种污染物进行筛查和检测,OTA 的 LOD 为 0.025 μg/kg,结果显示 63%的样本对 OTA 不同程度的污染。但该方法存在一定缺陷:存在化合物非特异性结合,吸附过程的重现性不佳以及可能发生的关联化合物交叉反应等,同色谱法相比有时会出现检测过量现象^[51,52]。抗体生产昂贵费时,不适于多种真菌毒素同时分析的特点也成为阻碍这一技术广泛应用的主要因素。

化学发光免疫分析法是在酶联免疫分析法和放射免疫分析法的基础上发展起来的新型免疫分析法,化学发光免疫分析法由于线性范围宽、灵敏度高、重现性好等特点,已用于真菌毒素的检测。Abhijith 等^[53]利用被柠檬酸盐包被的金纳米粒增大化学发光强度,对花生酱及面粉中的

AFB₁ 进行测定, 并同 HPLC-UV 法进行比较, 化学发光法的线性范围为 0.5~20 μg/L ($r^2=0.994$), 而 HPLC-UV 法线性范围为 3~200 μg/L ($r^2=0.99$), 检测灵敏度明显增大。该法同电化学传感器法一样不属于通用型检测方法, 大部分尚处于实验室研究阶段且仅适用于一类毒素的检测, 也因此限制了其应用范围。

电化学传感器灵敏度高、选择性好、低成本、操作简便, 同时某些传感器具有微型、便携、可自动化等特点^[54]。多数电化学传感器是基于抗原抗体的高度亲和作用, 近年来衍生出一系列诸如核酸适配体的新型配基, 再运用如安培计、电阻抗、电位计、电导计等电化学科技可将毒素间相互作用转换成分析信号进行测定。Li 等^[55]在玻碳电极上合成二氧化硅凝胶-离子液体生物相容性薄膜, 开发出用于检测 AFB₁ 的阻抗生物传感器, RSD 为 1.2%, AFB₁ 的检测浓度范围为 0.1~10 μg/L, LOD 为 0.01 μg/L。但该方法目前多数处于实验室研究阶段, 对于常规检测应用并不广泛。

3.5 核酸适配体

不同于抗原-抗体基于蛋白质识别的特异性反应, 核酸适配体主要是基于核苷酸识别元件, 目前已经应用于伏马菌素^[56,57]、赭曲霉毒素^[58,59]的检测, 检测限能达到 pg/mL, 同抗体相比优势明显: 抗体的生产过程依靠动物体内的免疫应答反应, 批间差异大, 需要进一步优化, 而当选择合适的核酸适配体后, 则可以通过化学合成的方式生产, 批间差异小, 纯度高; 抗体对温度、pH 十分敏感, 而核酸适配体化学性质稳定, 耐高温; 适配体靶分子广, 可以拓宽待测物范围。Yang 等^[60]通过一种自组装的 DNA 酶-核酸适配体复合物比色检测红酒中的赭曲霉毒素 A。OTA 与核酸适配体结合将导致寡核苷酸之间的去杂交作用, 因而非杂交 DNA 核酶的活性与 OTA 的浓度线性相关, LOD 为 1.6 μg/L。目前并没有出现商品化的核酸适配体, 因而在真菌毒素检测应用中并不广泛, 但核酸适配体凭借上述众多优势, 势必将在未来真菌毒素快速检测中占有一席之地。

3.6 液相色谱-质谱联用技术用于多种真菌毒素同时测定

高效液相色谱-质谱法或高效液相色谱-串联质谱法将高效液相色谱法的物理分离能力同质谱的分析能力相结合, 成为了高灵敏度、高选择性的现代分析方法, 在食品安全、环境监测、药物分析等方面均有广泛应用。自 2006 年起, 每年关于真菌毒素发表的文章中, 质谱检测方法占总数的 50%~70%^[61]。质谱法最早用于真菌毒素的定量分析是在 20 世纪 70 年代, 其后人们将各种色谱分离方法, 如气相色谱法、高效液相色谱法同质谱相结合, 对一系列真菌毒素进行了准确的定性与定量。近年来, 单一样品中存在的多种真菌毒素问题已经引起了广泛关注, 因而要求现代检测

技术能够一次定量检测多种真菌毒素。HPLC-MS/MS 的发展同各种样品前处理方式的结合较好地解决了这一问题, 也成为近年来多种真菌毒素检测的主流趋势。主要有低分辨的 LC-MS/MS(最常用)以及高分辨的 LC-TOF-MS 和 LC-Orbitrap-MS。

Pizzutti 等^[62]采用 dSPE 样品前处理方法, UPLC-MS/MS 法对红酒中 36 种真菌毒素进行检测, 35 种真菌毒素的平均回收率为 70%~120%, RSD 小于 20%, 其中只有 NIV 无法检测。Jia 等^[63]采用超高压液相色谱-四级杆-静电场轨道阱(UHPLC/ESI Q-Orbitrap)技术对牛奶中的 58 种真菌毒素进行检测分析, 58 种真菌毒素检测浓度范围为 0.001~100 μg/kg, LOD 为 0.001~0.92 μg/kg, RSD 低于 6.4%。目前质谱法已经成为了应用最为广泛的多毒素检测方法, 不但可以同时分离检测多种毒素, 还可以避免色谱法检测可能带来假阳性和假阴性情况, 在未来多毒素检测中必将占据最重要的地位。

4 小结

真菌毒素具有一定毒性且广泛存在于食品、饲料及牛奶等产品中, 对人类及牲畜的健康造成了不同程度的威胁, 因而有关真菌毒素的各种法律法规也不断被制定与完善。由于许多真菌毒素结构相似且含量较低, 需要采用高选择性、准确、快速定性定量方法。本文针对黄曲霉毒素、伏马菌素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮及其代谢物、单端孢霉烯族类毒素和麦角碱共 6 大类主要的真菌毒素以及其他毒性相对较强的橘青霉素、展青霉素等真菌毒素背景进行了简要介绍并系统地阐述了目前国内外常用的传统及新型真菌毒素检测方法。对真菌毒素的检测已从最初的薄层色谱法、ELISA 法再到快速兴起发展的高效液相色谱法。目前随着质谱技术的不断进步, LC-MS、GC-MS、LC-MS/MS 以及 GC-MS/MS 技术也逐步应用于单类真菌毒素和多种真菌毒素同时检测, 而这也逐渐成为今后真菌毒素检测发展的普遍趋势。

参考文献

- [1] 张艺兵. 农产品中真菌毒素的检测分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [2] Zhang YB. Mycotoxins determination in agricultural products. [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [3] Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, *et al.* Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60: 218-237.
- [4] Petersen A, Thorup I. Preliminary evaluation of fumonisins by the Nordic countries and occurrence of fumonisins (FB₁ and FB₂) in corn-based foods on the Danish market [J]. *Food Addit Contam*, 2001, 18: 221-226.
- [5] Steyn PS. Mycotoxins, general view, chemistry and structure [J]. *Toxicol Lett*, 1995, 82: 843-851.
- [6] Berthiller F, Burdaspal PA, Crews C, *et al.* Developments in mycotoxin

- analysis: an update for 2012-2013[J]. *World Mycot J*, 2014, 7(1): 3-33.
- [6] Sirhan AY, Tan GH, Al-Shunnaq A, *et al.* QuEChERS-HPLC method for aflatoxin detection of domestic and imported food in Jordan [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2014, 37(3): 321-342.
- [7] Peña R, Alcaraz MC, Arce L. Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 967(2): 303-314.
- [8] Khayoon WS, Saad B, Salleh B, *et al.* Micro-solid phase extraction with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of aflatoxins in coffee and malt beverage [J]. *Food Chem*, 2014, 147: 287-294.
- [9] Walter C, Krüger T, Strau G, *et al.* Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A [J]. *Biomed Environ Sci*, 1989, 2: 179-248.
- [10] Akdeniz AS, Ozden S, Alpertunga B. Ochratoxin A in dried grapes and grape-derived products in Turkey [J]. *Food Addit Contam Part B Surv*, 2013, 6(4): 265-269.
- [11] Brera, C, Pannunzi E, Guarino C, *et al.* Ochratoxin A determination in cured ham by high performance liquid chromatography fluorescence detection and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: a comparative study [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2014, 37(14): 2036-2045.
- [12] De Girolamo A, Solfrizzo M, Lattanzio VMT, *et al.* Critical evaluation of LC-MS-based methods for simultaneous determination of deoxynivalenol, ochratoxin A, zearalenone, aflatoxins, fumonisins and T-2/HT-2 toxins in maize [J]. *World Mycotoxin J*, 6(3): 317-334.
- [13] Malekinejad H, Maas BR, Fink GJ. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone [J]. *Vet J*, 2006, 172(1): 96-102.
- [14] Erasmuson A, Scahill, B, West D. Natural zearanol (a-zearalenol) in the urine of pasture-fed animals [J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42(12): 2721-2725.
- [15] Whitaker TB, Van Egmond HP, Solfrizzo M, *et al.* Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011 [J]. *World Mycotoxin J*, 2012, 5(1): 3-30.
- [16] 杜英秋, 张瑞英, 杨焕春, 等. 国内外真菌毒素检测标准现状及分析[J]. *粮食与油脂*, 2014, 27 (7): 60-66.
Du YQ, Zhang RY, Yang CH, *et al.* Current status and analysis of domestic and international mycotoxin determination standard [J]. *Cereals Oils*, 2014, 27 (7): 60-66.
- [17] 张艺兵. 农产品中真菌毒素的检测分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
Zhang YB. *Mycotoxins determination in agricultural products* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [18] Li Y, Zhou YC, Yang MH, *et al.* Natural occurrence of citrinin in widely consumed traditional Chinese food red yeast rice, medicinal plants and their related products [J]. *Food Chem*, 2012, 132(2): 1040-1045.
- [19] Aziz IG, Rouhi I. Determination of patulin in fruit juices and compote of apple and pear [J]. *J Toxicol Toxin Rev*, 2013, 32(3): 39-42.
- [20] Lohrey L, Marschik S, Cramer B, *et al.* Large scale synthesis of isotopically labeled ¹³C₂-tenuazonic acid and development of a rapid HPLC-MS/MS method for the analysis of tenuazonic acid in tomato and pepper products [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(1): 114-120.
- [21] Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins [J]. *Comp Rev Food Sci F*, 2009, 8(3): 202-251.
- [22] 韩铮. 中药材中常见真菌毒素分析方法学及代谢动力学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
Han Z. Study on analytical methodology and pharmacokinetics of the mycotoxins in traditional Chinese medicines [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [23] Katay G, Szecsi A, Tyihak E, *et al.* Separation of fumonisins by OPLC [J]. *Jpc-J Planar Chromatogr*, 2001, 14(1): 53-56.
- [24] Moricz AM, Fater Z, Otta KH, *et al.* Overpressured layer chromatographic determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in red paprika [J]. *Microchem*, 2007, 85(1): 140-144.
- [25] Ventura M, Anaya I, Broto-Puig F, *et al.* Two-dimensional thin-layer chromatographic method for the analysis of ochratoxin A in green coffee [J]. *J Food Prot*, 2005, 68(9): 1920-1922.
- [26] Teixeira TR, Hoeltz M, Einloft TC, *et al.* Determination of ochratoxin A in wine from the southern region of Brazil by thin layer chromatography with a charge-coupled detector [J]. *Food Addit Contam Part B Survl*, 2011, 4(4): 289-293.
- [27] Welke JE, Hoeltz M, Dottori HA, *et al.* Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal*, 2009, 26(5): 754-758.
- [28] Zhao X, Yuan Y, Zhang X, *et al.* Identification of ochratoxin A in Chinese spices using HPLC fluorescent detectors with immunoaffinity column cleanup [J]. *Food Control*, 2014, 46: 332-337.
- [29] Liu Q, Kong W, Guo W, *et al.* Multi-class mycotoxins analysis in *Angelica sinensis* by ultra fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2015, 988: 175-181.
- [30] de Andrés F, Zougagh M, Castañeda G, *et al.* Determination of zearalenone and its metabolites in urine samples by liquid chromatography with electrochemical detection using a carbon nanotube-modified electrode [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1212(1-2): 54-60.
- [31] Shephard GS. *Chromatographic separation techniques for determination of mycotoxins in food and feed* [M]. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2011, 3: 71-89.
- [32] Amadasi A, Dall'asta C, Ingletto G, *et al.* Explaining cyclodextrin-mycotoxin interactions using a 'natural' force field [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(13): 4585-4594.
- [33] Soleimany F, Jinap S, Rahmani A, *et al.* Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and a post-column derivatization system [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal*, 2011, 28(4): 494-501.
- [34] Shepherd MJ, Gilbert J. An investigation of HPLC post-column iodination conditions for the enhancement of aflatoxin B₁ fluorescence [J]. *Food Addit Contam*, 1984, 1(4): 325-335.
- [35] Riordan MJO, Wilkinson MG. Comparison of analytical methods for aflatoxin determination in commercial chilli spice preparations and subsequent development of an improved method [J]. *Food Control*, 2009, 20(8): 700-705.
- [36] Quinto M, Spadaccino G, Palermo C, *et al.* Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatization-fluorescence detection [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(49): 8636-8641.
- [37] Joerg S, Claudia C. Investigation of alternative reagents to 2-mercaptoethanol for the pre-column derivatization of fumonisins with

- o-phthalaldehyde for HPLC analysis [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2002, 25(12): 1821–1833.
- [38] Wang JS, Zhou Y, Wang QM. Analysis of mycotoxinfumonisin in corn products by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. *Food Chem*, 2008, 107(2): 970–976.
- [39] Dall'Asta C, Galaverna G, Biancardi A, *et al.* Simultaneous liquid chromatography–fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride [J]. *Chromatogr. A*, 2004, 1047(2): 241–247.
- [40] Xue H, Bi Y, Wei J, *et al.* New method for the simultaneous analysis of types A and B trichothecenes by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in potato tubers inoculated with *Fusarium sulphureum* [J]. *J Agric Food Chem*, 61(39): 9333–9338.
- [41] Eke Z, Kende A, Torkos K. Simultaneous detection of A and B trichothecenes by gas chromatography with flame ionization or mass selective detection [J]. *Micromol Chem J*, 2004, 78(2): 211–216.
- [42] Kinani S, Bouchonnet S, Bourcier S, *et al.* Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography–mass spectrometry analysis of environmental samples [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1190(1–2): 307–315.
- [43] Amelin VG, Karaseva NM, Tretyakov AV. Combination of the QuEChERS method with dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization in the determination of mycotoxins in grain and mixed feed by gas-liquid chromatography with an electron-capture detector [J]. *J Anal Chem*, 2013, 68(6): 552–557.
- [44] Tansakul N, Jala P, Laopiem S. Co-occurrence of five *Fusarium* toxins in corn-dried distiller's grains with solubles in Thailand and comparison of ELISA and LC-MS/MS for fumonisin analysis [J]. *Mycot Res*, 2013, 29(4): 255–260.
- [45] Fang Ji, Hua Li, Xu JH, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent-assay for deoxynivalenol (DON) [J]. *Toxins (Basel)*, 2011, 3(8): 968–978.
- [46] Yu FY, Gribas AV, Vdovenko MM, *et al.* Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin B₁ in food products [J]. *Talanta*, 2013, 107: 25–29.
- [47] Välimaa AL, Kivistö AT, Leskinen PI, *et al.* Novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk [J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 80(1): 44–48.
- [48] Dinçkaya E, Kınık Ö, Sezgintürk MK. Development of an impedimetric aflatoxin M₁ biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles [J]. *Biosens Bioelect*, 2011, 26(9): 3806–3811.
- [49] Zheng Z, Humphrey CW, King RS, *et al.* Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC [J]. *Mycopathologia*, 2005, 159(2): 255–263.
- [50] Liliana S, Sonia M, Vicente S. Screening of mycotoxins multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain [J]. *J Sci Food Agric*, 2009, 89(10): 1802–1807.
- [51] Fang Ji, Hua Li, Xu JH, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent-assay for deoxynivalenol (DON) [J]. *Toxins (Basel)*, 2011, 3(8): 968–978.
- [52] Dzuman Z, Vaclavikova M, Polisenka I, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay in analysis of deoxynivalenol: investigation of the impact of sample matrix on results accuracy [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 406(2): 505–514.
- [53] Abhijith KS, Ragavan KV, Thakur MS. Gold nanoparticles enhanced chemiluminescence - a novel approach for sensitive determination of aflatoxin-B₁ [J]. *Anal Methods*, 2013, 5(18): 4838–4845.
- [54] Goryacheva IY, De Saeger S. *Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection in food and feed* [M]. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2011, 5: 135–167.
- [55] Zaijun L, Zhongyun W, Xiulan S, *et al.* A sensitive and highly stable electrochemical impedance immunosensor based on the formation of silica gel-ionic liquid biocompatible film on the glassy carbon electrode for the determination of aflatoxin B₁ in bee pollen [J]. *Talanta*, 2010, 80(5): 1632–1637.
- [56] Wu J, Zhu Y, Xue F, *et al.* Recent trends in SELEX technique and its application to food safety monitoring [J]. *Microchimica Acta*, 2014, 181(5): 479–491.
- [57] Chen X, Huang Y, Duan N, *et al.* Selection and characterization of single stranded DNA aptamers recognizing fumonisin B₁ [J]. *Microchimica Acta*, 2015, 181(11): 1317–1324.
- [58] Hayat A, Sassolas A, Marty JL, *et al.* Highly sensitive ochratoxin A impedimetric aptasensor based on the immobilization of azido-aptamer onto electrografted binary film via click chemistry [J]. *Talanta*, 2013, 103(15): 14–19.
- [59] Hayat A, Andreescu S, Marty JL. Design of PEG-aptamer two piece macromolecules as convenient and integrated sensing platform: application to the label free detection of small size molecules [J]. *Biosens Bioelect*, 2013, 45: 168–173.
- [60] Yang C, Lates V, Prieto-Simón B, *et al.* Rapid high-throughput analysis of ochratoxin A by the self-assembly of dnzyme-aptamer conjugates in wine [J]. *Talanta*, 2013, 116: 520–526.
- [61] Li P, Zhang Z, Hu X, *et al.* Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: current status and prospects [J]. *Mass Spectr Rev*, 2013, 32(6): 420–452.
- [62] Pizzutti IR, de Kok A, Scholten J. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2014, 129: 352–363.
- [63] Jia W, Chu X, Ling Y, *et al.* Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1345: 107–114.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



张思思, 硕士研究生, 主要研究方向为中药中痕量真菌毒素检测。
E-mail: 14211030033@fudan.edu.cn



季申, 主任药师, 博士生导师, 主要研究方向为中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究。
E-mail: jishen2013@163.com