

农产品中真菌毒素检测方法研究进展

陈瑞鹏^{1,2}, 高志贤^{2*}, 梁俊^{1*}

1. 天津科技大学省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457;
2. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050)

摘要: 真菌毒素是由特定真菌在适宜条件下产生的有毒小分子次级代谢产物, 农产品在生长、加工和储运过程中均存在被真菌毒素污染的可能性, 被真菌毒素污染的农产品会严重危害动物和人类的健康。因此建立精确、高效的真菌毒素检测方法对农产品中真菌毒素的防控和监测具有重要意义。本文介绍了近5年农产品中真菌毒素常用检测方法: 仪器分析法、免疫学分析方法和光谱分析法, 综述了这些检测方法的研究进展及优缺点, 重点介绍了光谱分析法在现场检测中的发展。展望了农产品中真菌毒素在未来的发展趋势, 为农产品中真菌毒素检测的相关研究和安全监管提供参考和启发。

关键词: 农产品; 真菌毒素; 检测方法

Research progress on detection methods of mycotoxins in agricultural products

CHEN Rui-Peng^{1,2}, GAO Zhi-Xian^{2*}, LIANG Jun^{1*}

- (1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Institute of Environmental Medicine and Operational Medicine, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050, China)

ABSTRACT: Mycotoxins are toxic small molecular secondary metabolites produced by specific fungi under suitable conditions. Agricultural products may be contaminated by mycotoxins during growth, processing, storage and transportation. Agricultural products contaminated by mycotoxins will seriously harm animals and human health. Therefore, the establishment of accurate and efficient mycotoxin detection methods is of great significance for the prevention, control and monitoring of mycotoxins in agricultural products. This article introduced the common detection methods of mycotoxins in agricultural products in recent 5 years: instrumental analysis, immunological analysis, and spectroscopic analysis, reviewed the research progress, advantages and disadvantages of these detection methods, emphatically introduced the development of spectral analysis method in on-site detection, also look forward to the future development trend of mycotoxins in agricultural products, and provided reference and inspiration for related research and safety supervision of mycotoxin detection in agricultural products.

基金项目: 天津市科技计划项目(18YFZCNC01260)、国家重点研发计划项目(2018YFC1603500)

Fund: Supported by the Tianjin Science and Technology Planning Project (18YFZCNC01260), and National Key Research and Development Program (2018YFC1603500)

*通信作者: 高志贤, 研究员, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: gaozhx@163.com

梁俊, 教授, 主要研究方向为食品中毒素快速检测。E-mail: jliang1118@yeah.net

*Corresponding author: GAO Zhi-Xian, Professor, Tianjin Institute of Environmental and Operational Medicine, No.1, Dali Road, Heping District, Tianjin 300050, China. E-mail: gaozhx@163.com

LIANG Jun, Professor, Tianjin University of Science & Technology, No. 9 13th Street, Tianjin Economic and Technological Development Zone, Tianjin 300457, China. E-mail: jliang1118@yeah.net

KEY WORDS: agricultural products; mycotoxins; detection methods

0 引言

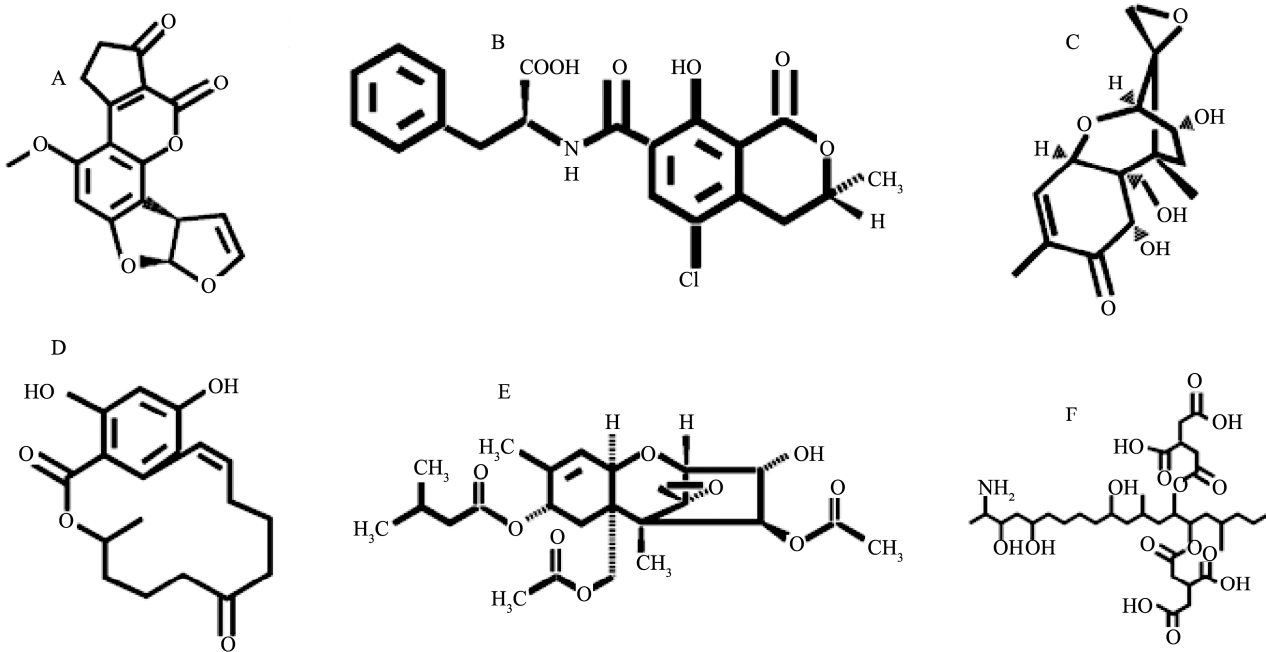
真菌毒素是由镰刀菌属、青霉属、曲霉属等真菌在适宜温、湿度条件下产生的次级代谢产物^[1]。目前已知的真菌毒素大概有400多种,主要污染粮食^[2]、水果^[3]、饲料^[4]和干果^[5]等农产品。全球范围内的农作物在生长、收获、贮藏、运输和加工等环节均有可能被产毒真菌污染进而含有真菌毒素。据联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)统计显示,全球每年被真菌毒素的污染的粮食高达粮食总产量的25%,直接损失的农产品多达10亿t,每年经济损失高达数千亿美元^[6]。

目前常见的真菌毒素主要有黄曲霉毒素B₁(aflatoxins B₁, AFB₁)、赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮毒素(zearalenone, ZEN)、T-2毒素(T-2 toxin,

T-2)和伏马毒素(fumonisin B₁, FB₁)^[7]等,结构如图1所示。大多数真菌毒素可通过抑制动物体蛋白质和相关酶的合成,破坏细胞结构,损害动物体肝脏^[8]、肾脏^[9]、神经^[10]、造血^[11]等组织器官,具有致癌、致畸、致突变、生殖紊乱以及免疫抑制作用;且真菌毒素分布广泛、分子量小、结构以及化学性质一般均匀稳定,即使高温烹饪也无法使其分解,农产品被真菌毒素污染后,通过食物链进入人体体内,严重威胁人类健康。因此检测农产品生产过程中真菌毒素含量变得尤为重要。本文综合分析了近5年来农产品中真菌毒素检测方法的研究进展以及优缺点,以期科研人员进一步研究真菌毒素检测方法提供参考。

1 仪器分析法

仪器分析法检测真菌毒素主要有高效液相色谱法、薄层色谱法、气相色谱法和液相色谱串联质谱法等。



注: A: AFB₁; B: OTA; C: DON; D: ZEN; E: T-2; F: FB₁。

图1 常见真菌毒素结构图

Fig.1 Structure diagram of common mycotoxins

1.1 高效液相色谱法

高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)是目前检测真菌毒素的常规方法。该方法的基本原理是, 根据不同真菌毒素分子的理化性质差异, 选择合适的有机溶剂对样品中的真菌毒素进行提取和净化, 采用高压进样系统, 将极性不同的单一溶剂或不同比例的混合溶剂在色谱柱中进行组分分离, 借助真菌毒素自身或其衍生物的荧光特性, 采用标准曲线法对真菌毒素含量进行定量^[12]。根据真菌毒素不同的理化性质, 可以选择不同的检测器, 目前常用的检测器有荧光检测器(fluorescence detector, FLD)^[13]、紫外检测器(ultraviolet detector, UVD)^[14]、二极管阵列检测器(diode detector, DAD)^[15]。LUCI^[16]开发了一种基于分子印迹固相萃取柱进行提取和净化, 通过 HPLC 和 FLD 相结合检测猪肉中 OTA 的新方法。该方法对 OTA 的检测限和定量限分别为 0.003 和 0.001 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 且该方法的色谱柱可重复使用 7 次。WANG 等^[17]使用 HPLC 和柱后衍生化的方法同时检测谷物中的 9 种真菌毒素。使用丙酮-水(80:20, V:V)的溶剂提取 9 种真菌毒素, 通过 HPLC 结合 FLD 定量检测 9 种真菌毒素。该方法对 9 种真菌毒素的检测限和定量限分别为 0.02~5.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.07~16.70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 相对标准偏差在 1.0%~5.6% 范围之内。

HPLC 具有灵敏性高、样品回收简便、色谱柱可多次重复使用的优点。然而该方法仪器昂贵、要求有熟练的操作人员、样品预处理较为复杂等限制了 HPLC 在现场即时分析检测中的使用。

1.2 薄层色谱法

薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)是我国国家标准方法中检测农产品真菌毒素含量的重要方法。由于大多数真菌毒素的水溶性较差, 在样品的提取过程中多用中小极性有机溶剂提取, 还常常用到混合溶剂调整提取溶剂的极性。TLC 是基于不同真菌毒素对不同提取液的溶解度不同设计的, 选用合适的提取液对样品进行提取, 经过不同的色谱柱进行柱层析净化, 在展开剂作用下使净化后的物质在薄层板上分层展开实现分离, 根据真菌毒素的荧光特性, 将样品中的荧光强度与标准品进行比较, 从而确定样品中真菌毒素的含量^[18]。TURKMEN 等^[19]根据 TLC 检测了当地 58 个水果样品中的棒曲霉毒素(patulin, PAT), 结果显示在 58 个水果样本中 12 个样本含有 PAT, 检测浓度在 0.13~2.98 mg/L 之间。VEGA-HERRERA 等^[20]依据 TLC 来判断小麦中是否存在 DON。首先采用 TLC 硅胶 60 F-254 预制板进行色谱分离, 使用甲苯-乙酸乙酯-甲酸(6:3:1, V:V:V)作为流动相, 测定紫外 366~400 nm 处的荧光, 结果表明被检测小麦中存在 DON。

TLC 具有成本低、对固相、展开剂的选择自由度大、参数调节多样化等优点, 同时, 还可以满足多种真菌毒素

同时检测的现实需要。缺点是样品预处理复杂烦琐、有机溶剂消耗量大、灵敏度较低且重现性较差, 现主要用于农产品中真菌毒素的定性分析。

1.3 气相色谱法

气相色谱法(gas chromatograph, GC)的检测原理是利用不同真菌毒素在固定相和流动相之间的保留能力不同, 使得不同真菌毒素离开色谱柱的时间不同, 进而被检测器分析检测。与 GC 结合的检测器主要有电子捕获检测器(electron capture detector, ECD)^[21]、氢火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)^[22]、火焰光度检测器(flame photometric detector, FPD)^[23]等。有些真菌毒素不含荧光基团或发色基团, 或荧光和紫外吸收弱, 而 GC 可以解决真菌毒素无法用紫外光检测的问题。张正炜等^[24]开发了基于 GC 检测小麦中 DON 的方法。首先使用乙腈和水的混合液对样品中的 DON 进行提取, 待样品提取液充分晾干后, 将 DON 生成三甲基硅烷(trimethylsilane, TMS)衍生物, 最后使用 ECD 进行定量检测。该方法的检测限为 0.01 mg/kg , 平均回收率在 93.8%~108.5% 之间。JIN 等^[25]利用 GC-ECD 考察了当地黑麦中 DON 含量的情况。结果显示在采集出芽之前的 117 份样品中有 75% 的样品 DON 含量低于 1.0 mg/kg , 在发芽之后有 83% 的样品中 DON 的含量超过 1.0 mg/kg 。

GC 具有灵敏度高、特异性强、在同一样品中可对多种真菌毒素同时进行检测的优点, 然而部分真菌毒素在高温下也不易气化, 需要对真菌毒素进行衍生化后才可以用于气相分析, 但衍生化过程耗时复杂, 对实验人员的操作具有较高要求。有些真菌毒素因没有合适的衍生化试剂而无法进行 GC 分析检测。

1.4 液相色谱串联质谱法

液相色谱串联质谱法(liquid chromatogram tandem mass spectrometry, LC-MS)是将液相色谱与质谱联合起来使用的方法。将液相色谱作为前期分离系统, 质谱作为检测系统, 兼具了液相色谱的灵敏度高、分离性能高等特点, 又具备了质谱很强的结构解析及组分鉴定能力, 实现了色谱高分离能力和质谱强鉴定性能的优势互补, 同时样品无需衍生化处理, 使 LC-MS 技术广泛用于真菌毒素的检测。LC-MS 的检测原理是样品在质谱部分与流动相分离, 被离子化后, 经质谱的质量分析器将离子碎片按质量数分开, 经检测器得到质谱图。LC-MS 常用的离子源有气压光致电离(atmospheric pressure photoionization, APPI)源^[26]、大气压化学电离(atmospheric-pressure chemical ionization, APCI)源^[27]和电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)源^[28]。由于真菌毒素相对分子质量和极性分布范围广, 种类较多, 最常用的离子源为 ESI, 可在正负模式相互切换以实现真菌毒素的高效分离。ZHANG 等^[29]开发了基于 LC-MS 检测 5 种食用油基质(菜籽油、玉米油、橄榄油、花生油、大豆油)

中的 12 种真菌毒素的方法。结果显示 12 种真菌毒素的检测限在 0.1~6.4 ng/g, 相对标准偏差小于 20%。KIM 等^[30]基于 LC-MS 验证了当地谷物被真菌毒素污染的情况。结果显示在采集的 97 个样本中有至少 63 个样本被真菌毒素污染, 在单个样品发现至少被 6 种真菌毒素同时污染, 单个样品中含有一种真菌毒素的含量最高达到 70.9 g/kg。

LC-MS 具有灵敏度高、适用性强和选择性好的优点, 与 GC 相比, LC-MS 可实现定性定量分析的同时, 避免检测中假阳性结果的出现。但是 LC-MS 检测设备相对昂贵, 操作复杂, 一般多应用于验证性的实验分析。

仪器分析法检测真菌毒素主要方法见表 1。

2 免疫学分析方法

免疫学分析法检测真菌毒素主要有酶联免疫吸附法、胶体金免疫层析法、时间分辨荧光免疫分析法等。

2.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是现在使用范围最广的分析检测方法。基于抗原和抗体特异性结合的免疫学特性, 将具有免疫活性的抗原(或抗体)固定吸附在固相载体表面, 与酶形成共价结合物, 同时具有免疫活性和酶催化活性, 根据加入底物显色程度进行结果判定。WANG 等^[31]开发了基于 ELISA 检测 AFB₁ 的方法。该方法是在羊驼天然纳米抗体库中分离出对 AFB₁ 有反应活性的纳米抗体 PO8-VHH, 结果表明该方法对 AFB₁ 的检测限为 1 μg/mL, 为农产品中监测 AFB₁ 污染情况提供了一种快速简便的新方法。ZHANG 等^[32]开发了直接竞争 ELISA 法检测饲料中 DON 的方法, 评估了 8 种(大麦、小麦、燕麦、玉米、大米、面粉、牛奶和饲料)样品中 DON 的含量, 结果表明样品中 DON 的含量在 0.15~0.48 mg/mL 之间。

ELISA 法具有特异性强、灵敏度高、成本低廉等优点, ELISA 法检测真菌毒素时, 大多是研制成试剂盒投入到实际应用, 但是在实际操作过程中, 固相载体的包被和各个体之间很难达到一致, 而且酶的稳定性差, 所以 ELISA 容易出现假阳性结果, 常常作为初步筛查手段用于现场检测筛查。

2.2 胶体金免疫层析法

胶体金免疫层析法(colloidal gold immune chromatographic assay, GICA)是将胶体金标记技术与抗原抗体的免疫性反应相结合的分析检测方法。检测原理是将具有特异性的抗原(或抗体)固定在硝酸纤维素膜一端, 胶体金标记试剂吸附在结合垫上, 在样本垫上加入待测样品后, 真菌毒素通过毛细作用在层析膜上向前移动, 与结合垫上的胶体金标记试剂相互反应, 反应物继续移动至固定的抗原(或抗体)区域时, 反应物与抗原(或抗体)发生特异性反应而被截留, 聚集在检测带上。由于样品中真菌毒素的不同呈现出不同的颜色, 可通过肉眼观察到显色结果^[33]。YAO 等^[34]开发了基于 GICA 同时检测玉米中伏马毒素的方法。该方法对 FB₁ 的检测限为 11.24 ng/mL, 检测范围为 11.24~199.03 ng/mL。而且该试纸条与 FB₂ 和 FB₃ 有较好的交叉反应, 可用于同时检测玉米中的 FB₁、FB₂ 和 FB₃。HU 等^[35]开发了基于 GICA 检测 AFB₁ 的新方法。该方法对 AFB₁ 的检测限为 0.1 ng/mL, 且该方法可在 15 min 之内通过肉眼观察来判定结果。

胶体金免疫层析法具有快速、灵敏、简便、特异性好等优点。但是基于抗原抗体的免疫反应, GICA 具有抗体制作成本高, 重复性差等缺点。同时胶体金溶液的稳定性较差, 存放时间短, 渗透能力差, 使得 GICA 的应用受到了一定的限制。

2.3 时间分辨荧光免疫分析法

时间分辨荧光免疫分析法(time resolved fluorescence immunoassay, TRFIA)是利用免疫反应的高度选择性, 将具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合剂作为抗原(或抗体)示踪标记物, 与高灵敏度的时间分辨荧光测定技术相结合而建立的一种新型非放射标记分析方法^[36]。通过抗原抗体免疫反应、靶细胞与效应细胞的杀伤反应等不同的反应体系作用后, 通过检测荧光强度, 定量体系中真菌毒素的浓度^[37]。张东升等^[38]基于 TRFIA 检测谷物中的 DON。首先以 Eu³⁺螯合剂的纳米微球作为荧光探针, 在荧光探针上修饰抗体, 采用了竞争抑制的免疫层析法进行检测。该方法对 DON 的检测限为 0.25 ng/mL, 线性范围为 0.5~25.0 ng/mL。樊晓博^[39]开发了基于 TRFIA 检测花生中的 AFB₁。首先通过双功能螯合物异氰酸苄基二乙烯三胺四乙酸络合稀土元素 Eu³⁺标记 AFB₁ 单克隆抗体, 以 AFB₁ 抗原为固相抗原, 构建了直接竞争的 TRFIA 的分析检测方法。该方法对 AFB₁ 的检测限为 0.02 μg/L, 线性范围为 0.01~30 μg/L。

表 1 仪器分析法检测真菌毒素
Table 1 Detection of mycotoxins by instrumental analysis

检测方法	基质	真菌毒素	检测范围	检出限/(μg/kg)	参考文献
HPLC-FLD	猪肉	OTA	0.05~5 μg/kg	0.003	16
HPLD-FLD	谷物	9 种真菌毒素	-	0.02~5	17
TLC	水果样品	PAT	0.13~2.98 mg/L	-	19
GC	小麦	DON	0.01~1.0 mg/L	0.1	24
LC-MS	食用油	12 种真菌毒素	0.1~6.4 ng/g	-	29

注: -代表参考文献中未报道检测范围或定量限, 下同。

TRFIA 具有稳定性好、特异性强和灵敏度高等优点,适用于大批量样品的筛查。但是 TRFIA 中使用的螯合剂具有荧光寿命短、背景信号容易受到干扰等缺点,且螯合剂为有毒物质,对实验人员的身体健康容易造成损伤。

免疫学分析法检测真菌毒素主要方法见表 2。

3 光谱分析法

光谱分析法检测真菌毒素主要有近红外光谱法、拉曼光谱法、荧光光谱法等。

3.1 近红外光谱法

近红外光谱(near infrared spectrum instrument, NIRS)主要产生于有机分子中含氢基团(C-H、O-H、S-H、N-H、P-H等)的伸缩振动。在近红外光照射下含氢基团受激发而产生共振,近红外光的一部分能量被吸收,测定被吸收后的近红外光可得到近红外光谱图^[40]。真菌毒素中不同基团对近红外光的选择性吸收,可反映真菌毒素有机化合物的组成和分子结构的特征信息。根据这些信息即可对不同种类的真菌毒素进行识别和定量。ZHAO 等^[41]基于 NIRS 预测了面粉中 DON 的污染情况,在中国的 13 个城市采集了 195 个样品进行分析。结果显示 195 个样品中 DON 的含量范围为 0.0~6.233 mg/kg。蒋雪松等^[42]基于 NIRS 评估了 DON 污染小麦的情况。通过主成分分析(principal component analysis, PCA)未能发现 DON 在小麦中有明显的聚类趋势,利用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)和偏最小二乘判别分析法(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)判别能够对小麦中 DON 的超标和未超标样品进行快速识别和筛查,最佳识别率可达到 87.69%。

NIRS 具有高效、快速、无污染和样品无需前处理等优点,但是真菌毒素分子量小、含量低、分子振动信号弱、仪器定量精度有待提高,所以真菌毒素的 NIRS 响应与解析方法需要进一步探索,以提高检测模型的适应性和稳定性。

3.2 拉曼光谱法

拉曼光谱(Raman spectroscopy)是一种散射光谱,由

激发光与样品中分子运动相互作用产生,具有极高的分子特异性。改变激发光频率,可得到不同分子振动、转动能级特性等信息,适用于分子结构表征、内部应力分布、成键效果的分析。1974 年 FLEISCHMANN 等^[43]发现吡啶分子在粗糙银电极基底上的拉曼信号大大增强,但没有进一步讨论其增强机制。1977 年 JEANMAIRE^[44]和 ALBRECHT 等^[45]通过实验结果系统分析,表面拉曼信号增强效应与金属粗糙表面相关,提出了表面增强拉曼光谱(surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)概念, SERS 能在分子水平上提供丰富的物质结构信息,在真菌毒素检测中有着广泛的应用。ZHANG 等^[46]开发了基于 SERS 同时检测玉米中的 6 种真菌毒素。首先将 2 个拉曼信号分子,5-二硫代双-2-硝基苯甲酸[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]和 4-巯基苯甲酸(4-mercaptobenzoic acid, MBA)修饰在 Au@Ag 纳米粒子上作为 SERS 纳米探针的检测信号,然后将 6 种真菌毒素的半抗原分布在三条硝化纤维膜的测试线上。该方法对 AFB₁、ZEN、FB₁、DON、OTA 和 T-2 的检测限分别为 0.96、6.2、0.26、15.7、8.6、8.6 pg/mL,该方法可在不到 20 min 之内完成检测,适用于真菌毒素的现场检测。LI 等^[47]开发了一种基于 SERS 同时检测 AFB₁、ZEN 和 OTA 3 种真菌毒素的免疫传感器。Au 修饰上拉曼信号分子 5,5-二硫代双(琥珀酰亚氨基-2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithiobis(succinimidyl-2-nitrobenzoic acid, DSNB)]并与 3 种真菌毒素的抗体共价偶联作为 SERS 的纳米探针,而 AFB₁ 抗原、ZEN 抗原、OTA 抗原共价偶联在微阵列金芯片表面作为捕获探针。该方法对 AFB₁ 的检测范围为 0.061~0.066 μg/kg, ZEN 检测范围为 0.53~0.57 μg/kg, OTA 检测范围为 0.26~0.29 μg/kg。

SERS 具有灵敏度高、操作简便、信息含量丰富和无损检测等优点,但是 SERS 基底的重现性和稳定性较差,难以广泛的商业化和标准化,且目前尚无完全建立农产品中真菌毒素的“拉曼光谱指纹”数据库,对于未建立指纹图谱的物质较难检测。

表 2 免疫学分析方法检测真菌毒素
Table 2 Detection of mycotoxins by immunological analysis methods

检测方法	基质	真菌毒素	检测范围	检出限	参考文献
ELISA	玉米	AFB ₁	10~1000 g/mL	1 μg/mL	31
ELISA	谷物	DON	0.15~0.48 mg/mL	0.003 mg/kg	32
GICA	玉米	FB ₁	11.24~199.03 ng/mL	11.24 ng/mL	34
TRFIA	谷物	DON	0.5~25.0 ng/mL	0.25 ng/mL	38
TRFIA	花生	AFB ₁	0.01~30 μg/L	0.02 μg/L	39

3.3 荧光光谱法

荧光光谱(fluorescence spectroscopy, FS)法是指在固定激发波长下,以物质所发射的荧光强度与浓度之间的线性关系为依据进行的定量分析方法^[48]。荧光是指电子在两能级间发生自旋反转的跃迁过程中所产生的光。通过荧光光谱可获得被测物质的荧光强度、荧光寿命、荧光偏振和量子产率等^[49],荧光光谱在真菌毒素的可视化检测方面发挥着重要的作用。BIAN 等^[50]开发了基于荧光光谱检测玉米中 FB₁ 的方法。在该方法中使用 Alexa 488 荧光染料标记 FB₁ 作为荧光示踪剂,采用竞争性免疫法检测 FB₁。该方法对 FB₁ 的检测限为 1.0 μg/L,检测范围为 1.0~25.0 μg/L。BERTANI 等^[51]开发了基于荧光光谱检测杏仁中 AFB₁ 的方法。该方法在 375 nm 波长激发下对杏仁中的 AFB₁ 进行荧光光谱分析。与传统方法相比,该方法的精确度可达到 94%以上。

荧光光谱具有灵敏度高、选择性强和操作简便等优点,能提供较多的物理参数:如激发光谱、发射光谱、荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等参数,这些参数可以反映被测分子更多的信息。但是荧光光谱容易受到一些离子的干扰,荧光会淬灭,所以测试过程要迅速。

光谱分析法检测真菌毒素主要方法见表 3。

4 其他新型检测方法

随着现代生物技术与科学技术的发展,一些新型农产品中真菌毒素的检测方法也得到了广泛地应用。例如生物传感器法、太赫兹光谱法等。

4.1 生物传感器法

生物传感器法是一种结合了生物识别机制和物理转导技术的分子传感器。其检测原理是待测物质经过分子识别作用与分子识别元件(生物活性材料)特异性结合,发生化学反应,所产生的生物学信息通过相应信号转换为光信

号或电信号,最后经电子测量仪的放大、处理和输出,实现对待测物浓度的检测分析。刘雪平等^[52]构建了一种快速检测 OTA 的电化学适配体传感器,主要通过目标物诱导适配体构象变换来改变电信号,适配体一端有巯基,另一端标有羧基二茂铁,然后通过 Au-S 共价作用将适配体固定在电极表面,加入 OTA 会使电信号降低,该传感器具有较高的灵敏度和特异性,检测限为 0.08 ng/mL。

在农产品真菌毒素检测方面,生物传感器法具有检测速度快、灵敏度较高、特异性强、价格较为低廉等优点一直备受科研研究者的关注。但是相应的检测设备在实际应用中也存在诸多方面的局限性,如检测的稳定性、检测的便利性等。

4.2 太赫兹光谱法

太赫兹(terahertz, THz)波是指频率在 0.1~10 THz 之间的电磁波,其波长范围为 30 μm~3 mm,在电磁波谱中位于微波和红外辐射之间。2005 年以来,随着太赫兹波源产生与检测技术的发展,极大促进了太赫兹辐射基础理论和应用技术的研究。由于太赫兹波段在电磁波谱中所处的特殊位置,使其具有了瞬态性、高穿透性、宽带性、相干性和低能性等一系列特性,成为具有竞争力的新型无损检测技术。GE 等^[53]对 1~50 μg/mL 和 1~50 μg/L 2 个浓度范围内的 AFB₁ 乙腈溶液采集太赫兹时域光谱仪技术(THz-time domain spectrometer, THz-TDS),在 0.4~1.6 THz 频率范围,线性模型有偏最小二乘(partial least squares regression, PLSR)和主成分回归(principal component regression, PCR),非线性模型有支持向量机(support vector machine, SVM)和 PCA-SVM,对比线性模型(PLSR, PCR)和非线性模型(SVM、PCA-SVM)进行 AFB₁ 浓度的预测正确率,结果表明,1~50 μg/mL 范围内 AFB₁ 溶液样本浓度,线性模型优于非线性模型(PLSR:82.5%, PCR:87.5%, SVM:45%, PCA-SVM:37.5%)。

表 3 光谱分析法检测真菌毒素
Table 3 Spectral analysis method to detect mycotoxins

检测方法	基质	真菌毒素	检测范围	检出限	参考文献
NIRS	面粉	DON	0.0~6.233 mg/kg	-	[41]
		AFB ₁	1.4~330 pg/mL	0.96 pg/mL	
		ZEN	0.015~3.7 ng/mL	6.2 pg/mL	
SERS	玉米	FB ₁	0.41~100 ng/mL	0.26 pg/mL	[46]
		DON	0.14~33.3 ng/mL	0.11 pg/mL	
		OTA	0.027~6.7 ng/mL	15.7 pg/mL	
		T-2	0.014~3.3 ng/mL	8.6 pg/mL	
FS	玉米	FB ₁	1.0~25.0 μg/L	1.0 μg/L	[50]

太赫兹光谱法在农产品中真菌毒素检测领域还处于起步阶段, 因此太赫兹法面临一些亟需解决的问题: (1)THz 辐射与生物分子内部和相互间作用的理论解析还不明确, 加强从微观角度对分子的太赫兹波吸收量化计算理论的研究; (2)加强 THz 光谱谱图解析技术和数据分析方法研究, 提高检测灵敏度和准确度; (3)THz 光谱系统软硬件需要改进。

5 结论与展望

本文重点介绍了近 5 年农产品中真菌毒素的最新检测方法研究进展, 主要检测方法有仪器分析法、免疫学分析方法和光谱技术, 分析了这些方法对真菌毒素的检测结果以及优缺点。这些常用检测方法都需要对农产品进行采集和预处理过程, 然后将同一批农产品中具有代表性样本的检测结果作为农产品的检测结果, 容易造成以点带面的局限性, 无法对农产品中真菌毒素污染程度进行全面的判定, 导致农产品存在资源浪费、安全风险高等问题。

农产品在生长、贮藏、加工和流通过程对真菌毒素的高效检测和安全监管要求简便、快速、高效、便携。因此在未来的农产品中真菌毒素的检测方法研究中, 需要加强农产品中真菌毒素现场实地检测中的应用开发, 具有一定的准确性和时效性。真菌毒素的光谱检测方法是基于真菌毒素的广谱特征, 对真菌毒素进行准确的定性定量分析, 实现无损实时在线监测, 是未来真菌毒素监测的发展趋势。同时, 下一步应考虑综合真菌毒素的多重检测和实地现场检测技术, 以满足实际生产运输需求。

参考文献

- [1] LIU P, LIAO YH, ZHENG HB, *et al.* Facile dispersive solid-phase extraction based on humic acid for the determination of aflatoxins in various edible oils [J]. *Anal Method*, 2020, 12(18): 2308–2316.
- [2] GORYACHEVA OA, GUHRENZ C, SCHNEIDER K, *et al.* Silanized luminescent quantum dots for the simultaneous multicolor lateral flow immunoassay of two mycotoxins [J]. *ACS Appl Mater Int*, 2020, 12(22): 24575–24584.
- [3] ASSAF EH, DE CN, VAN PC, *et al.* Effects of ascorbic acid on patulin in aqueous solution and in cloudy apple juice [J]. *Mycotoxin Res*, 2019, 35(4): 341–351.
- [4] ZHANG ZQ, NIE DX, FAN K, *et al.* A systematic review of plant-conjugated masked mycotoxins: Occurrence, toxicology, and metabolism [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(9): 1523–1537.
- [5] GARCIA-CELA E, SANCHEZ FJ, SULYOK M, *et al.* Carbon dioxide production as an indicator of aspergillus flavus colonisation and aflatoxins/cyclopiazonic acid contamination in shelled peanuts stored under different interacting abiotic factors [J]. *Fungal Biol*, 2020, 124(1): 1–7.
- [6] 孟雯. 真菌毒素超标已成我国农产品出口欧盟最大阻碍[J]. *食品安全导刊*, 2014, 6(1): 15–17.
- [7] MENG W. Excessive mycotoxins have become the biggest obstacle to my country agricultural exports to the EU [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2014, 6(1): 15–17.
- [7] IQBAL SZ, REHMAN B, SELAMAT J, *et al.* Assessment of fumonisin B1 concentrations in wheat and barley products in the punjab region of pakistan [J]. *J Food Prot*, 2020, 83(8): 1284–1288.
- [8] PONGPRAKET M, POAPOLATHEP A, WONGPANIT K, *et al.* Exposure assessment of multiple mycotoxins in black and white sesame seeds consumed in Thailand [J]. *J Food Prot*, 2020, 83(7): 1198–1207.
- [9] DUBRAVKA R, DANIELA J, ANDREA HT, *et al.* Sterigmatocystin moderately induces oxidative stress in male wistar rats after short-term oral treatment [J]. *Mycotoxin Res*, 2020, 36(2): 181–191.
- [10] ZONGUR A. Investigation of don and aflatoxin content in Agria and Hermes chips potato cultivars grown in Aksaray, Sivas, Kayseri, Nigde [J]. *J Plant Dis Prot*, 2020, 127(4): 521–527.
- [11] OMUR AD, YILDIRIM B, SAGLAM YS, *et al.* Activity of resveratrol on the influence of aflatoxin b1 on the testes of sprague dawley rats [J]. *Pol J Veter Sci*, 2019, 22(2): 313–320.
- [12] 朱建国, 李培武, 张奇, 等. 多组分免疫亲和柱净化-高效液相色谱串联质谱法同步测定植物油中 7 种真菌毒素[J]. *中国油料作物学报*, 2016, 38(5): 658–665.
- [13] ZHU JG, LI PW, ZHANG Q, *et al.* Simultaneous determination of seven mycotoxins in vegetable oils by multi-component immunoaffinity column purification-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2016, 38(5): 658–665.
- [13] GIMAT A, SCHODER S, THOURY M, *et al.* Short- and long-term effects of x-ray synchrotron radiation on cotton paper [J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(7): 2795–2807.
- [14] RAHMAN MM, PARK JH, ABD EM, *et al.* Feasibility and application of an HPLC/UV-D to determine dinotefuran and its shorter wavelength metabolites residues in melon with tandem mass confirmation [J]. *Food Chem*, 2013, 136(2): 1038–1046.
- [15] AHMED HM, BELAL TS, SHAALAN RA, *et al.* Validated capillary zone electrophoretic method for simultaneous analysis of benazepril in combination with amlodipine besylate and hydrochlorothiazide [J]. *Acta Chromatogr*, 2020, 32(4): 219–227.
- [16] LUCI G. A rapid HPLC-FLD method for ochratoxin A detection in pig muscle, kidney, liver by using enzymatic digestion with MISPE extraction [J]. *Method X*, 2020, 7(1): 100868–100874.
- [17] WANG WG, QIANG M, DUAN LQ. Simultaneous determination of nine mycotoxins in cereal and cereal products by high performance liquid chromatography with composite immunoaffinity clean-up column [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(12): 1330–1336.
- [18] 徐一达, 袁晓, 王海鸣, 等. 色谱法检测真菌毒素的研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2018, 26(6): 60–67.
- [19] XU YD, YUAN X, WANG HM, *et al.* Research progress in the detection of mycotoxins by chromatography [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2018, 26(6): 60–67.
- [19] TURKMEN Z, KURADA O. Rapid HPTLC determination of patulin in fruit-based baby food in turkey [J]. *JPC-J Planar Chromatogr Mod TLC*, 2020, 33(3): 1–9.
- [20] VEGA-HERRERA M, MADARIAGA R, ARANDA M, *et al.* Confirmation of deoxynivalenol presence in Chilean wheat by high performance thin layer chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chil*

- Chem Soc, 2017, 62(2): 3435–3437.
- [21] BAWANA K, YANES QM, RASHEED M. Gas chromatography determination of the levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in seawater and sediment in the gulf of Ababa [J]. *Acta Chromatogr*, 2020, 32(2): 117–121.
- [22] DUBOIS LM, ACZON S, FOCANT JF, *et al.* Translation of a one-dimensional to a comprehensive two-dimensional gas chromatography method with dual-channel detection for volatile organic compound measurement in forensic applications [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(14): 10091–10098.
- [23] ZHU JC, WANG LY, XIAO ZB, *et al.* Characterization of the key aroma compounds in mulberry fruits by application of gas chromatography-olfactometry (GC-O), odor activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and flame photometric detection (FPD) [J]. *Food Chem*, 2018, 245(1): 775–785.
- [24] 张正炜, 成玮, 沈慧梅, 等. 小麦粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)毒素的气相色谱法检测及毒素污染去除分析[J]. *农药科学与管理*, 2018, 39(4): 33–39.
- ZHANG ZW, CHENG W, SHEN HM, *et al.* Detection of deoxynivalenol (DON) in wheat flour by gas chromatography and analysis of toxin pollution removal [J]. *Pestic Sci Admin*, 2018, 39(4): 33–39.
- [25] JIN Z, GILLESPIE J, BARR J, *et al.* Malting of fusarium head blight-infected rye (*secale cereale*): Growth of fusarium graminearum, trichothecene production, and the impact on malt quality [J]. *Toxins*, 2018, 10(9): 15–17.
- [26] BORGES NC, ASTIGARRAGA RB, SVERDLOFF CE, *et al.* A novel and sensitive method for ethinylestradiol quantification in human plasma by high performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure photoionization (Appi) tandem mass spectrometry: application to a comparative pharmacokinetics study [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(29): 3601–3609.
- [27] FANG J, ZHAO HZ, ZHANG YZ, *et al.* Evaluation of gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry as an alternative to gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers [J]. *Chemosphere*, 2019, 225(1): 288–294.
- [28] WITKOWSKI B, GANECZKO M, HRYSZKO H, *et al.* Identification of orcein and selected natural dyes in 14th and 15th century liturgical paraments with high-performance liquid chromatography coupled to the electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI/MS/MS) [J]. *Microchem J*, 2017, 133(1): 370–379.
- [29] ZHANG K, XU D. Application of stable isotope dilution and liquid chromatography tandem mass spectrometry for multi-mycotoxin analysis in edible oils [J]. *J AOAC Int*, 2019, 102(6): 1651–1656.
- [30] KIM DB, SONG NE, NAM TG, *et al.* Occurrence of emerging mycotoxins in cereals and cereal-based products from the Korean market using LC-MS/MS [J]. *Food Addit Contam A*, 2019, 36(2): 289–295.
- [31] WANG T, LI PW, ZHANG Q, *et al.* Determination of *Aspergillus* pathogens in agricultural products by a specific nanobody-polyclonal antibody sandwich ELISA [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4348–4355.
- [32] ZHANG Y, YANG J, LU Y, *et al.* A competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid detection of deoxynivalenol: Development and application in agricultural products and feedstuff [J]. *Food Agric Immunol*, 2017, 28(3): 516–527.
- [33] 李翘, 陈笑笑, 桑丽雅, 等. T-2 毒素免疫胶体金试纸条的研制及其在饲料检测中的应用[J]. *中国饲料*, 2013, 10(1): 33–36.
- LI Q, CHEN XX, SANG LY, *et al.* Development of T-2 toxin immune colloidal gold test strip and its application in feed detection [J]. *China Feed*, 2013, 10(1): 33–36.
- [34] YAO JJ, SUN YN, LI QM, *et al.* Colloidal gold-McAb probe-based rapid immunoassay strip for simultaneous detection of fumonisins in maize [J]. *J Sci Food Agric*, 2017, 97(7): 2223–2229.
- [35] HU SR, DOU XW, ZHANG L, *et al.* Rapid detection of aflatoxin B₁ in medicinal materials of radix and rhizome by gold immunochromatographic assay [J]. *Toxicology*, 2018, 150(1): 144–150.
- [36] 王坤, 侯玉泽, 胡晓飞, 等. 时间分辨荧光免疫分析技术在真菌毒素检测的应用[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 2(1): 197–201.
- WANG K, HOU YZ, HU XF, *et al.* Application of time-resolved fluorescence immunoassay in the detection of mycotoxins [J]. *Chin J Immunol*, 2013, 2(1): 197–201.
- [37] 梁荣良, 吴英松. 镧系元素在免疫学检测技术中的应用[J]. *现代免疫学*, 2015, 4(1): 86–90.
- LIANG RL, WU YS. Application of lanthanides in immunological detection technology [J]. *Curr Immunol*, 2015, 4(1): 86–90.
- [38] 张东升, 严艺琳, 熊晓辉, 等. 呕吐毒素时间分辨荧光免疫层析法的建立与评价[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(20): 239–245.
- ZHANG DS, YAN YL, XIONG XH, *et al.* Establishment and evaluation of time-resolve fluorescence immune chromatography for vomitoxin [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(20): 239–245.
- [39] 樊晓博. 时间分辨荧光免疫法检测食品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(3): 796–802.
- FAN XB. Detection of aflatoxin b1 in food by time-resolved fluorescence immunoassay [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(3): 796–802.
- [40] MARCELLI A, CRICENTI A, KWIA TEK WM, *et al.* Biological applications of synchrotron radiation infrared spectromicroscopy [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6): 1390–1404.
- [41] ZHAO TX, CHEN M, JIANG XS, *et al.* Integration of spectra and image features of vis/NIR hyperspectral imaging for prediction of deoxynivalenol contamination in whole wheat flour [J]. *Infrared Phys Technol*, 2020, 109(1): 103421–103427.
- [42] 蒋雪松, 张斌, 赵天霞, 等. 小麦呕吐毒素污染可见/近红外光谱快速筛查方法研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2019, 39(12): 3904–3909.
- JIANG XS, ZHANG B, ZHAO TX, *et al.* Research on the rapid screening method of wheat vomitoxin contamination by visible/near infrared spectroscopy [J]. *Spectrosc Spectr Anal*, 2019, 39(12): 3904–3909.
- [43] FLEISCHMANN M, HENDRA PJ, MCQUILLAN AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode [J]. *Chem Phys Lett*, 1974, 26(2): 163–166.
- [44] JEANMAIRE DL, DUYNE RP. Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode [J]. *J Electroanal Chem*, 1977, 84(1): 1–20.
- [45] ALBRECHT MG, CREIGHTON JA. Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode [J]. *J Am Chem Soc*, 1977, 99(15): 5215–5217.
- [46] ZHANG WJ, TANG SS, JIN YP, *et al.* Multiplex SERS-based lateral flow

- immunosensor for the detection of major mycotoxins in maize utilizing dual Raman labels and triple test lines [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 393(1): 122344–122349.
- [47] LI Y, CHEN Q, XU XF, *et al.* Microarray surface enhanced Raman scattering based immunosensor for multiplexing detection of mycotoxin in foodstuff [J]. *Sens Actuator B-Chem*, 2018, 266(1): 115–123.
- [48] CHU SW, PARK SS, HA CS. Light-activated polymer-coated mesoporous silica with azobenzene moiety for the controlled delivery of guest molecules [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2020, 20(11): 6935–6942.
- [49] SABBARWAL S, DUBEY AK, PANDEY M, *et al.* Synthesis of biocompatible, BSA capped fluorescent CaCO₃ pre-nucleation nanoclusters for cell imaging applications [J]. *J Mat Chem B*, 2020, 8(26): 5729–5744.
- [50] BIAN YN, HUANG XY, REN JC. Sensitive and homogenous immunoassay of fumonisin in foods using single molecule fluorescence correlation spectroscopy [J]. *Anal Method*, 2016, 8(6): 1333–1338.
- [51] BERTANI FR, BUSINARO L, GAMBACORTA L, *et al.* Optical detection of aflatoxins B in grained almonds using fluorescence spectroscopy and machine learning algorithms [J]. *Food Control*, 2020, 112(1): 107069–107074.
- [52] 刘雪平, 梁峰, 张岩, 等. 基于电化学适配体传感器的一步法快速检测赭曲霉毒素 A[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(5): 1915–1919.
- LIU XP, LIANG F, ZHANG Y, *et al.* One-step rapid detection of ochratoxin A based on electrochemical aptamer sensor [J]. *J Food Saf*

Qual, 2016, 7(5): 1915–1919.

- [53] GE H, JIANG Y, LIAN F, *et al.* Quantitative determination of aflatoxin B₁ concentration in acetonitrile by chemometric methods using terahertz spectroscopy [J]. *Food Chem*, 2016, 209(4): 286–292.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



陈瑞鹏, 博士, 主要研究方向为食品中真菌毒素的快速检测。

E-mail: chenruipeng2016@163.com



高志贤, 研究员, 主要研究方向为食品安全快速检测。

E-mail: gaozhx@163.com



梁俊, 教授, 主要研究方向为食品中真菌毒素快速检测。

E-mail: jliang1118@yeah.net