果蔬中常见真菌毒素的检测研究进展

赖文珊¹, 武爱波¹, 刘 弘², 秦璐昕², 刘 娜^{1*}

(1. 中国科学院大学,中国科学院上海营养与健康研究所,上海 200031;2. 上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘 要: 果蔬在田间的生长过程以及采摘后的贮存、运输和加工过程中,容易受到病原真菌的污染,病原菌通 过寄主果蔬表面伤口或自然孔口侵入,导致果蔬腐烂并积累大量真菌毒素。腐烂果蔬会造成巨大的经济损失, 同时经由食物链的传递威胁人和动物的健康。鉴于果蔬中真菌毒素的危害性,本文总结了近年来主要污染果 蔬的毒素的种类、污染现状、危害及其检测方法,其中目前检测仍以色谱法、质谱法等仪器检测为主,虽然可 以精确定量检测,但是耗材和时间成本较大;随着大规模样本的筛选检测需求的提高,免疫法和表面增强拉 曼光谱法等高通量的快速检测逐渐受到关注。本文旨在为真菌毒素的检测防控提供参考。 **关键词:** 果蔬; 真菌毒素污染; 定量检测; 快速检测

Research progress on the detection of common mycotoxins in fruits and vegetables

LAI Wen-Shan¹, WU Ai-Bo¹, LIU Hong², QIN Lu-Xin², LIU Na^{1*}

(1. Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

ABSTRACT: During the process of growing, storage, transportation and processing after picking, fruits and vegetables are easily contaminated by pathogenic fungi which invades fruit and vegetable through surface wound or natural pores, leading to the rot of fruits and vegetables and accumulation of a large number of mycotoxins. Rotting fruits and vegetables can cause huge economic losses and threaten human and animals' health through the food chain. In view of the harmfulness of mycotoxins in fruits and vegetables, this paper summarized the main pollution of toxins, pollution status, hazard and detection methods of mycotoxins. In recent years, chromatography, mass spectrometry and other chromatography-mass spectrometry instruments could be accurate and quantitative detection, but the cost of materials and time was high. With the increasing demand of screening and detection of large-scale samples, high throughput rapid detection such as immunoassay and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) had been attracted attention. This paper aimed to provide references for the prevention and control of mycotoxins. **KEY WORDS:** fruits and vegetables; mycotoxin contamination; quantitative detection; rapid detection

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2019-02-08-00-02-F01146)

Fund: Supported by the Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (2019-02-08-00-02-F01146)

^{*}通信作者: 刘娜, 博士, 副研究员, 主要研究方向为真菌毒素与食品安全。E-mail: liuna@sibs.ac.cn

^{*}Corresponding author: LIU Na, Ph.D, Associate Professor, Shanghai Institute of Nutrition and Health, University of Chinese Academy of Sciences, 320 Yueyang Road, Xuhui District, Shanghai 200031, China. E-mail: liuna@sibs.ac.cn

0 引 言

水果和蔬菜是人类营养摄入的重要来源,为人体提供 多种必需的维生素、矿物质和膳食纤维等营养物质。果蔬在 采摘后,由于水分含量高、营养丰富,在贮藏、运输和加工 过程中容易受到病原真菌感染而腐烂变质,病害果蔬造成 了果蔬总产量 35%~55%的损失[1]。这些被感染病原真菌的 果蔬中积累了大量的真菌毒素。真菌毒素是由真菌产生的次 级代谢产物,病变果蔬中主要存在链格孢毒素(Alternaria toxins)、赭曲霉毒素(ochratoxins)和展青霉素(patulin, PAT) 等真菌毒素[1]。这些真菌毒素不仅会导致果蔬腐败变质、品 质降低,造成果蔬行业的损失,通过食物链进入人体后,还 能引起人体代谢紊乱、神经麻痹、器官功能衰竭、致癌和免 疫破坏等毒性效应^[2]。因此针对果蔬中的主要真菌毒素开发 灵敏可靠的检测方法,监测果蔬中真菌毒素的含量以及减 少果蔬中的真菌毒素对果蔬行业的发展和人类健康具有重 要的现实意义。本文总结了近年来果蔬中真菌毒素的污染情 况及几种主要真菌毒素检测方法的研究进展, 以期为果蔬 中真菌毒素检测领域的发展和应用提供参考。

1 果蔬中常见真菌毒素污染种类及毒性

果蔬中普遍存在的真菌毒素主要包括链格孢毒素、赫曲霉毒素和展青霉素,这些常见真菌毒素在果蔬中的污染 情况见表 1。

1.1 链格孢毒素

链格孢菌在植物、种子、农产品、大气和土壤等生态 系统中随处可见。链格孢菌属在果蔬中会产生大约30种潜 在有毒的次级代谢产物--链格孢毒素,包括交链孢酚 (alternariol, AOH)、交链孢酚单甲基醚 (alternariol monomethyl ether, AME)、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TeA)、交链孢烯(altenuene, ALT)、腾毒素(tentoxin, TEN) 和交链孢毒素 I、II、III 等^[19]。生长基质、温度、pH 和水 活度是影响链格孢毒素合成的重要因素,其中水活度 A., 和 pH 对链格孢毒素的生物合成影响最大^[20]。POSE 等^[21] 在番茄培养基中探究了温度(6、15、21、35 ℃)和水分活度 A_w(0.904, 0.922, 0.954, 0.982)对链格孢毒素的影响, 研究 发现高 A_w(≥0.954)条件下更容易生成 TeA、AOH 和 AME, 其最佳产毒条件分别为 TeA (21 ℃、A_w=0.982)、AME (35 °C、A_w=0.954)、AOH (21 °C、A_w=0.982)。KATRIN 等 ^[22]在生物反应器培养基中研究发现 pH>5.5 时, 链格孢毒 素(AOH、AME、TeA)的产生会减少或受到抑制,而 pH 在 4~5区间时,毒素生长最适宜。

链格孢毒素在果蔬及其制品中的污染率范围很广, 如苹果、番茄、橘子、葡萄等果蔬及其制品^[3-5]。该毒素具 有致癌性、细胞毒性、基因毒性、遗传毒性和生殖毒性作 用, AOH 和 AME 急性毒性较弱但具有协同效应, TeA 毒性 最强^[23]。有研究表明, 食管癌高发区的交链孢酚污染高于 食管癌低发区, 粮食中交链孢酚毒素污染率较高可能是某 些地区(如中国林县)食管癌高发的主要因素^[24]。目前, 我 国对链格孢毒素的研究比较有限, 缺少安全评估基础数据, 对该类毒素还未设定限量标准。

1.2 赭曲霉毒素

赭曲霉毒素是由曲霉属、青霉属和镰刀菌属等多种真菌产生的一类多酮类次生毒性代谢物。在赭曲霉毒素 A、B、C类中,赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)是被污染食品中含量最丰富、危害最大的真菌毒素^[25]。果蔬中的曲霉和青霉是产生OTA的两个主要菌属,主要产毒菌为赭曲霉(Aspergillus ochraceus)、黑曲霉(Aspergillus nige)、疣孢青霉(Penicillium verrucosum)和胸腺青霉(Penicillium thymicola)^[26-27]。曲霉产生OTA主要在热带和亚热带地区,SCHMIDT-HEYDT等^[28]发现,OTA产生的适宜条件为25~30℃、湿度98%、pH 6~8。青霉菌属产毒条件和曲霉菌属不同,寒冷地区粮食作物中OTA主要由青霉产生^[29]。

OTA 广泛存在于各类食物中,果蔬及其制品中 OTA 的污染报道主要集中在葡萄及其制品(如葡萄酒、葡萄干、葡萄汁等)^[6-10],这与葡萄采摘后表皮易受损害有关,高糖分和高水分内容物溢出为曲霉生长和 OTA 产生提供了良好的环境^[27]。

OTA 具有免疫毒性、遗传毒性、神经毒性、致癌性、 肾毒性、肝毒性和致畸作用^[30-34],是赭曲霉毒素家族成员中 毒性最强的真菌毒素,国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将其归类为 2B 类致癌 物质^[35],但具体毒性机制尚不完全清楚。OTA 对鸡、小鼠 和大鼠的急性经口毒性试验表明,急性经口半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀)分别为 3.3、20~30、48~58 mg/kg, 且当 OTA 含量达到 1 mg/kg 时,鸡产蛋率下降;喂饲 OTA 对大鼠肠道和肝脏组织会产生损坏作用,如肝细胞粒状突 变坏死、肝小叶间结缔组织增厚、胆道增生等病理变化^[14]。 欧洲委员会(European Union, EU)规定了干果中的 OTA 最高 限量为 10 μg/g,葡萄酒中的 OTA 最高限量为 2 μg/L^[15]。我 国目前对于果蔬中 OTA 的限量没有明确规定,且对 OTA 的 膳食暴露风险评估仍在摸索中。果蔬及其制品中 OTA 的膳 食风险评估的深入研究有利于 OTA 限量标准的制定。

1.3 展青霉素

展青霉素可由 60 种不同的真菌产生,如扩展青霉 (Penicillium expansum)、白色青霉(Penicillium leucopus)、壳青 霉(Penicillium crustosum)、髌青霉(Penicillium patulum)和棒曲 霉(Aspergillus clavatus),其中扩展青霉是最常见的能产生 PAT 的真菌^[16]。PAT 产量受菌株类型影响较大^[17],扩展青霉 产生 PAT 的最适温度为 20~25 ℃,且高湿度(A_w=0.95~0.97) 环境有利于 PAT 的产生^[18], PAT 产生的最适 pH 为 4~5^[36]。

PAT 主要存在于水果及其液体制品中^[37],如苹果、梨、 橘子、葡萄及其产品^[38-42],在果汁加工过程中,如果腐烂 的水果没有去除,该毒素会转移到果汁中。IQBAL 等^[41] 对巴基斯坦的葡萄进行检测,发现PAT 阳性样本率为71%, PAT 平均浓度为466 µg/kg,最大浓度为1100 µg/kg;JI 等^[42] 报道显示,65%的无花果干样品中检测到了PAT,PAT 平均 浓度131 µg/kg,最大浓度277 µg/kg。目前,欧盟、美国的 食品药品监督管理局和我国都立法规定了苹果和苹果汁中 展青霉素的最高限量为50 µg/kg^[43]。对果汁、浓缩果汁、 苹果酒和其他来自苹果或含苹果汁的发酵饮料,欧盟规定 其PAT 最高限量为50 µg/kg^[43]。对果汁、浓缩果汁、 苹果酒和其他来自苹果或含苹果汁的发酵饮料,欧盟规定 其PAT 最高限量为50 µg/kg;对直接食用的苹果果盘和苹 果泥等固态苹果产品,欧盟规定的最高限量为25 µg/kg。 由于婴幼儿食品中含有大量的苹果制品,欧盟规定婴幼儿 饮用的苹果汁和苹果固体产品的最高限量为10 µg/kg^[17]。

Table 2

PAT 最初作为一种潜在的抗生素进行研究,但随后的研究显示其对人类具有毒性作用,PAT 可通过影响细胞膜的通透性间接引起人体生理异常,包括恶心、呕吐、溃疡和出血^[43]。另外,PAT 还具有神经毒性、免疫毒性、致畸性和致突变性,目前尚无明确证据表明它对人类具有致癌性^[37,44]。

2 果蔬中的常见真菌毒素的检测方法

果蔬中真菌毒素的检测方法主要有精确定量检测(如 色谱法、质谱法等)以及一些适用高通量样本的快速检测技 术(如免疫法、表面增强拉曼光谱法等)。快速检测技术主要 用于现场快速筛查和半定量分析,而色谱质谱等定量检测 则用于定量分析和实验室仲裁检测,表2列出了我国近年来 色谱、质谱等仪器检测果蔬制品中真菌毒素含量的代表性研 究。精确定量与快速筛查检测方法互为补充,为果蔬中的真 菌毒素风险防控提供一定技术支持。

Table 1 Contamination of mycotoxins in fruits and vegetables and their products										
毒素类型	检测样品	检出毒素	国家	参考文献						
链格孢毒素	苹果及其制品、橘子、辣椒等	PAT, AOH, AME, ALT, TEN, TeA	中国	[3-4]						
	番茄、果汁	AOH、AME、TeA、TEN	德国	[5]						
赫曲霉毒素	葡萄及其制品(葡萄干、葡萄酒、葡萄汁)	ΟΤΑ	中国、希腊、西班牙、 捷克、阿根廷、	[6-10]						
	杏干、梅干	OTA	伊朗	[11]						
	栗子、栗粉	OTA	意大利	[12]						
	桃、樱桃、草莓、柑橘	OTA	意大利	[13]						
展青霉毒素	苹果汁、苹果酱	PAT	捷克	[14]						
	梨汁、蜜饯	PAT	捷克	[14]						
	苹果汁、苹果酱	PAT	塞尔维亚	[15]						
	梨	PAT	中国	[16]						
	葡萄	PAT	巴基斯坦	[17]						
	无花果干	PAT	中国	[18]						

衣 1 木端仪共前的中市见县困母系的污米情况
主 1 田芬及甘制只由党贝克劳害害的运济特况

表 2 色谱法和质谱法检测果蔬中的真菌毒素

Determination of mycotoxins in fruits and	vegetables by	y chromatography :	and mass spectrometry
---	---------------	--------------------	-----------------------

		•	8 7 81		•
检测方法	检测样品	毒素类型	检出限	回收率/%	参考文献
HPLC	葡萄干	OTA	0.07 µg/kg	94~10.4	[45]
	龙眼干	NIT	3.2 µg/kg	82.9~102.2	[42]
	无花果干		7.5 μg/kg	83.3~88.1	
	山楂干		2.7 µg/kg	88.0~91.7	
HPLC-UV	葡萄干 PAI	3.8 µg/kg	102.0~118.5	[42]	
	苹果酱	苹果酱 苹果汁	2.6 µg/kg	75.6~80.7	
	苹果汁		3.5 µg/kg	86.5~96.1	
HPLC-FLD	混合果汁	OTA	0.2 ng/mL	94.6~96.5	[46]
	MS/MS 果干	AOH	1~100 ng/mL	80.5~95.9	
		TeA	5~500 ng/mL	82.3~91.2	
UPLC-MS/MS		AME	0.1~10 ng/mL	83.1~96.6	[47]
		TEN	1~100 ng/mL	85.9~93.4	
		OTA	0.1~10 ng/mL	80.3~95.6	
LC-MS/MS	葡萄	TeA、AOH、AME	0.03~0.21 µg/kg	82.8~102	[48]

注: 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC); 高效液相色谱-紫外检测法 (high performance liquid chromatography-ultraviolet detection, HPLC-UV); 高效液相色谱-荧光检测法(high performance liquid chromatography-fluorescence detection); 超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS); 液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS).

1289

2.1 常规定量检测

2.1.1 高效液相色谱法

HPLC 和 UPLC 是果蔬中真菌毒素的常用检测技术, 具有高效、高灵敏度、分析物无需衍生化^[49-50]等特点。真 菌毒素检测前首先要经过样品的前处理,即用不同技术手 段将目标真菌毒素从复杂样品中提取、分离纯化等过程, 样品前处理直接影响检测结果的准确性和可靠性。目前, 果蔬中常用的样品前处理方法包括固相萃取法(solid phase extraction, SPE)、分散液-液微萃取法(liquid-liquid partition, LLP)、免疫亲和柱纯化(immunoaffinity column, IAC)、 QuEChERS 法等^[51-52]。OTA 最常用的样品前处理是 SPE, 该法在提取 OTA 过程中表现出高选择性。APELL 等^[53]优 化了聚氨酯-β-环糊精-共聚物的合成方法,将这种材料制 成 SPE 纯化柱,在葡萄酒和葡萄汁中 OTA 的回收率很高 (分别为 77.0%~89.4%和 69.1%~86.5%),证明了制备的该 纯化柱可从液体样品中高效地提取 OTA。

真菌毒素检测中的主要困难是复杂样品基质的干扰, 体现在与分析物峰重叠、猝灭荧光、抑制分析物电离导致 无法进行质谱检测等。为消除基质干扰, HPLC/UPLC 可联 合荧光检测法或紫外分光光度法对果蔬中多种真菌毒素进 行同时检测。如 APELL 等^[53]联合使用高效液相色谱和荧 光检测法检测葡萄酒和葡萄汁中的 OTA, 得到的色谱图干 扰少, 纯化效率高, 该法可实现食品中 OTA 和玉米赤霉烯 酮(zearalenone, ZEN)的同时检测。HASSANI 等^[54]采用改 进的高效液相色谱-紫外分光光度法,用于复杂水果饮料 和饮料基质中真菌毒素的同时提取、分离和定量,该方法 已成功应用于各种果汁饮料中 OTA、PAT 的同时检测。此 外,也可通过不同的色谱柱相结合来提高检测的灵敏度和 准确性。ARMUTCU 等^[55]将两种不同的色谱柱(如离子交 换、反相、疏水、亲水和亲和色谱柱)通过不同的分离模式 相结合替代 IAC, 并采用二维高效液相色谱(2D-HPLC)对 果蔬中 OTA 检测, 该法在线性范围良好(0.5~20 ng/mL 内), 检出限低(21.2 pg/mL), 回收率高(104.34%~107.33%), 相 对标准偏差小(0.21%~1.31%)。色谱法灵敏度高、选择性好, 可对真菌毒素进行精确定量分析,但存在仪器价格及维护 费用高、前处理复杂等缺陷,无法满足快速筛查的要求。 2.1.2 高效液相色谱-质谱法

食品中真菌毒素除了通过 HPLC 测定,还可与质谱仪 联用,兼具了液相高分离性能、高灵敏度的特点和质谱仪 结构解析及组分鉴定能力强等优势。CAMPONE 等^[56]采用 在线固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法对葡萄酒中 OTA 进行自动预浓缩、清除和灵敏测定,该方法处理量小、灵 敏度高、选择性好。此外,为降低检测成本和提高效率,目 前,果蔬中真菌毒素的检测研究朝着同时检测多组分的方 向发展,尤其是多种链格孢毒素的同时检测。BERARDIS 等^[57]使用 QuEChERS 法提取了番茄和水果产品中的 TeA、 AOH、AME 等链格孢毒素,样品溶液经 LC-MS/MS 方法 同时测定,该方法的检出限低(1~80 μg/kg),加标回收率好 (63%~109%),为食品中真菌毒素的检测提供参考。在 LC-MS/MS 基础上,GOTTHARDT 等^[58]联合稳定同位素标 记法对番茄中的 AOH、AME 等毒素进行了定量分析,并 用新鲜番茄基质进行验证,结果表明新鲜番茄的检出限为 0.01~1.36 μg/kg,定量限为 0.02~5.56 μg/kg,回收率在 95%~111%之间。

借助已建立的色谱质谱联用定量检测方法,还可用 于精确解决真菌毒素在果蔬储藏过程中的动态变化规律等 科学问题。DONG等^[59]建立了 UPLC-MS/MS 分析水果和 蔬菜中真菌毒素含量,首次测定了7种真菌毒素在果蔬贮 藏过程中的浓度变化,结果显示,新鲜样品中未检出 AOH 和 AME,但经过长期贮藏后,草莓中检出 AOH 和 AME, 番茄果实中检出 TEA,且随贮藏时间的延长毒素含量显著 增加。

此外,随着新型材料的兴起,分子印迹聚合物 (molecular imprinted polymer, MIP)作为一种合成受体,具有 合成方便、成本低、识别能力强、选择性高的特点,在色谱 分离、生化传感器、药物传递和催化等方面得到了广泛的应 用^[60]。FU等^[61]利用磁性分子印迹聚合物(magnetic molecular imprinted polymer, MMIP)与HPLC相结合,建立了快速测定 果汁中展青霉素的高效选择方法,在实际样品(苹果汁、葡 萄汁、梨汁和橙汁)检测中,该方法检出限低(3 µg/kg),加样 回收率高(86.44%~95.50%)。PERNICA等^[62]采用超高效液 相色谱-光电二极管阵列(ultra performance liquid chromatography-photodiode array, UPLC-PDA)联用 MIP 技 术测定果蔬饮料中的 PAT 和 5-羟甲基糠醛,在 50~ 1000 ng/mL范围内线性良好(R^2 =0.999), PAT 检出限和定量 限分别为 4.9~6.6 µg/L 和 16.1~21.8 µg/L。

综上所述,由于 HPLC、HPLC-FLD/UV 和 LC-MS/MS 等仪器法具有准确度高、检测限低、重现性好、回收率高等 优势,主要用于果蔬中常见真菌毒素的实验室精准检测。

2.2 快速检测

2.2.1 免疫检测法

色谱质谱方法虽然可靠和准确,但存在特异性低、检测 过程长、成本高、需对样品进行进一步纯化等缺点^[63],免疫 检测方法具有高灵敏度、快速、低成本和高通量的优点,可 作为一种替代方法。其中最常见的是酶联免疫测定及侧流免 疫测定。YAO等^[64]制备了抗 AOH 的兔多克隆抗体,建立了 一种竞争性间接化学发光酶免疫分析法(competitive indirect chemiluminescence enzyme immunoassay, ciCLEIA)。该方法灵 敏度高(检出限为 0.068 ng/mL),线性范围为 0.11~1.23 ng/mL, 自然污染样品(1.2~13.8 μg/kg)的 ciCLEIA 结果与 LC-MS/ MS 分析结果具有良好的相关性(r²=0.9539),该方法可用于 测定果汁、玉米和面粉中的 AOH。酶联免疫法检测时间短、 特异性强、灵敏度高、无需大型仪器设备,已在食品和医 学检测中被广泛应用,但使用时仍存在试剂选择性较高, 不能多种成分同时分析等不足。侧流免疫层析技术(lateral flow immunoassay, LFIA)具有简便、现场筛查、可肉眼检测、 成本低等优点, 广泛应用于疾病诊断、环境监测和食品安全 检测^[65]。传统的以金纳米颗粒(AuNPs)作为信号探针的LFIA 检测性能较差、灵敏度低、视觉识别能力低[66]。磁性金纳 米杂化材料(magnetic gold nanoparticles hybrid materials, MGNHs)是一种新型磁光双功能纳米材料,同时具有磁性和 比色性, 被用于提高传统 LFIA 的分析性能^[67]。HAO 等^[68] 报道了一种新型双功能磁性金纳米复合物,将其应用于 LFIA 中, 检测葡萄酒中 OTA 的含量, 该方法对葡萄酒中 OTA 的超灵敏检测限为 0.094 ng/mL, 加标回收率为 92.31%~108.97%, 变异系数在 12%以下, 说明 MGNH-LFIA 对 OTA 具有良好的选择性。目前,常规的 LFIA 主要以纳 米金颗粒为标记材料, 仅能满足定性和半定量检测, 开发 性能优良的信号标记材料、便捷省时的信号增强方式仍是 未来发展的方向。

2.2.2 表面增强拉曼光谱

表面增强拉曼光谱 (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)是一种强大的分析技术,可以提供吸附 在纳米金属上的目标分子的结构信息,基于该技术开发的 检测方法具有快速、灵敏度高、成本低、分子信息丰富、 峰带窄带等优点[69],是食品安全和生命科学领域的一种很 有前途的分析工具。PAN等^[70]用银纳米粒子(AgNPs)作为底 物,建立了一种基于 SERS 快速测定梨果实中 AOH 的方法。 该方法定量分析范围大(3.16~316.0 μg/L), 检出限低(1.30 µg/L),将该法应用于检测市场购买的梨果和人工接种链 格孢菌的梨果中 AOH 残留量, 并与 HPLC 进行交叉验证, 结果表明, SERS 在梨等农产品中 AOH 的快速检测中具有 巨大的潜在应用价值。此外,为解决 SERS 选择性较差的 局限性,可将 MIP 的特异性识别特性和 SERS 的信号放大 特性结合起来^[71-72]。ZHU等^[73]结合分子印迹聚合物(MIP) 的选择性和 SERS 技术的敏感性,设计了一种新型的 MIP-SERS 底物,用于检测蓝莓酱、柚子酱和橙汁样品中 的 PAT, 该方法重复性好, 稳定性强, 且无需复杂的样品 预处理,可作为一种快速、灵敏的食品样品检测方法。 2.2.3 传感器

传感器由于具有灵敏度高、选择性强、响应速度快、操作简单、成本低和小型化等优点,在真菌毒素检测中得到了广泛应用^[74]。

(1)电化学传感器

NAN 等^[63]以硫代适配体和金纳米颗粒为基础,建立 了一种快速测定OTA的阻抗感应传感器,用该传感器检测 葡萄及其相关产品OTA浓度,回收率(90.56%~104.21%)良 好、特异性强、灵敏度高,可推广应用于其他果汁和佐餐 酒中 OTA 的检测。此外,HUANG 等^[75]构建了分子印迹电 化学传感器来识别 PAT,将其应用于苹果和葡萄汁样品中 PAT 的测定,苹果汁、葡萄汁样品都表现出高的回收率(分 别为 99.8%~113.0%、95.4%~104.8%),表明该传感器具有 良好的稳定性和较高的重复性和选择性,可应用于果蔬中 PAT 的检测。电化学传感器具有检测限低、选择性高、成 本低等优点,在真菌毒素小分子测定中具有一定优势,但 实现传感器体系的长期稳定性仍有待研究。

(2)免疫传感器

微流控芯片作为一种快速、便携、低成本的分析平台, 结合免疫分析方法可高灵敏、快速、高通量地检测分析真 菌毒素^[76]。MAN等^[77]利用金纳米颗粒(GNPs)检测不同浓 度的链格孢毒素 AME,利用紫外光谱和智能手机成像监 测 GNPs 的颜色变化,开发了一种新型微流控比色免疫分 析方法。在最佳条件下,紫外光谱和智能手机成像能够检 测 AME 的最低值分别 12.5 pg/mL 和 200 pg/mL,用添加 AME 的水果样品进行分析,紫外光谱法(91.19%~94.15%) 和智能手机成像法(90.63%~93.9%)都呈现较高的回收率。 由此可见,该方法可用于快速、灵敏、低成本和便携式检 测食品中链格孢毒素 AME 的含量。

虽然免疫传感器快速高效,但仍需在多通道免疫传 感器的制备及稳定性研究、信号放大与处理、规模化制备 等方面进一步加强研究开发。

(3)适配体传感器

适配体是对目标具有高亲和力和高特异性的一段 DNA或RNA序列,通过指数富集配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)的技 术从一个大型寡核苷酸库中生成^[78]。适配体作为一种化学 抗体,具有修饰简单、热稳定性好等优点^[79]。因此,适配 体作为分子识别探针,在不同的传感器平台上具有很大的 发展潜力。

KHAN 等^[80]建立了基于荧光猝灭的 PAT 适配体传感 器检测平台,检出限为 0.13 µg/L,定量限为 0.41 µg/L。将 该方法应用于加标的苹果汁样品中,PAT 回收率为 96%~98%,该方法适合用于食品中 PAT 的定量分析。此外, 基于链位移扩增(strand displacement amplification, SDA)和 DNA G-四联体聚集诱导发射(aggregation-induced emission, ALE),检测 PAT 的适配体传感器^[81]和基于比率荧光法和 链位移法检测 PAT 的传感器^[82]也都表现出灵敏度高、特异 性好、检出限低的特点,为小分子毒素的检测提供了一个 稳定可靠的平台,在果蔬样品中 PAT 的测定具有潜在的应 用价值。此外,OTA 适配体传感器发展的也较为成熟。 TAGHDISI 等^[78]提出了一种基于非靶标触发滚动循环扩增 (rolling circular amplification, RCA)的电化学适配体传感器, 用于测定 OTA, 该方法对加标葡萄汁样品的 OTA 测定表 现出良好的性能, 加标回收率为 92%~103.2%, 相对标准 偏差为 3.15%~7.5%以内。目前, 仍有很多真菌毒素缺乏适 配体, 需完善适配体序列库, 并进一步提高适配体的亲和 力、特异性和稳定性等。

3 结束语

果蔬中真菌毒素以链格孢毒素、赭曲霉毒素和展青霉 素为主,真菌毒素污染不仅对人类健康产生隐患,还有可 能造成重大的经济问题。因此开展果蔬中真菌毒素污染的 监控和检测研究极为重要和迫切。果蔬中真菌毒素的检测 方法主要分为常规定量检测和高通量的快速检测。常规定 量检测包括色谱、质谱法等,虽然精确定量,但检测成本 高,且无法满足实际应用中高通量检测;快速检测包括免 疫分析法、表面增强拉曼光谱法和传感器法等,主要用于 现场快速筛查和半定量分析。在实际应用中两类方法可互 为补充,为食品中真菌毒素等检测提供参考。此外,快速 检测也存在一些假阳性、抗体制备时间长等问题,因此需 要开发更高水平的特异性抗体,提高免疫分析法的适用性 和灵敏度。一些新型的真菌毒素检测方法和材料也被应用 于食品检测中,如传感器和适配体、纳米粒子等,因此,只 有不断开发和完善快速、简便、灵敏的新型真菌毒素检测 技术,食品安全才能有所保证。

参考文献

- SANZANI SM, REVERBERI M, GEISEN R. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination [J]. Postharvest Biol Technol, 2016, 122: 95–105.
- [2] GALLO A, GIUBERTI G, FRISVAD JC, et al. Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects [J]. Toxins, 2015, 7(8): 3057–3111.
- [3] LI Y, ZHANG X, NIE J, et al. Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in apple and apple products from China [J]. Food Control, 2020, 118: 107354.
- [4] 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, 2016, 32(1): 7–18.
- [5] 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.
- [6] YU J, SMITH IN, MIKIASHVILI N. Reducing ochratoxin A content in grape pomace by different methods [J]. Toxins, 2020, 12(7): 424.
- [7] KOLLIA E, KANAPITSAS A, MARKAKI P. Occurrence of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in dried vine fruits from Greek market [J]. Food Addit Contam B, 2014, 7(1): 11–16.

- [8] REMIRO R, IRIGOYEN A, GONZÁLEZ-PEÑAS E, et al. Levels of ochratoxins in Mediterranean red wines [J]. Food Control, 2013, 32(1): 63–68.
- [9] MIKULÍKOVÁ R, BĚLÁKOVÁ S, BENEŠOVÁ K, et al. Study of ochratoxin A content in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection [J]. Food Chem, 2012, 133(1): 55–59.
- [10] PONSONE ML, CHIOTTA ML, COMBINA M, et al. Natural occurrence of ochratoxin A in musts, and grape vine fruits from grapes harvested in Argentina [J]. Toxins, 2010, 2(8): 1984–1996.
- [11] JANATI SSF, BEHESHTI HR, ASADI M, et al. Preliminary survey of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits from Iran [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2012, 88(3): 391–395.
- [12] PIETRI A, RASTELLI S, MULAZZI A, et al. Aflatoxins and ochratoxin A in dried chestnuts and chestnut flour produced in Italy [J]. Food Control, 2012, 25(2): 601–606.
- [13] ANDREANA M, ANTONIA N, CATERINA F. Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 132: 185–189.
- [14] 王景林,李培武,赖仞,等. 生物毒素学[M]. 北京:科学出版社, 2021.
 WANG JL, LI PW, LAI R, *et al.* Biotoxology [M]. Beijing: Science Press, 2021.
- [15] DUARTE SC, PENA A, LINO CM. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products [J]. Food Microbiol, 2010, 27(2): 187–198.
- [16] WALRAVENS J, MIKULA H, RYCHLIK M, et al. Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs [J]. J Chromatogr A, 2014, 1372: 91–101.
- [17] AGRIOPOULOU S, STAMATELOPOULOU E, VARZAKAS T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods [J]. Foods, 2020, 9(2): 137.
- [18] YANG Q, ZHANG H, ZHANG X, et al. Phytic acid enhances biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apples [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 1296.
- [19] 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.
- [20] ROMERO AR, MARCELA RC, GARCIA LVA, et al. Alternaria toxins in Argentinean wheat, bran, and flour [J]. Food Addit Contam B, 2019, 12(1): 24–30.
- [21] POSE G, PATRIARCA A, KYANKO V, et al. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 142(3): 348–353.
- [22] KATRIN B, CHRISTOPH S, ANKE N. Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation [J]. AMB Express, 2012, 2: 28.
- [23] 程树品,李晓蒙,王小丹,等. 交链孢霉毒素的危害评估[J]. 毒理学杂志. 2020, 34(3): 220–227.
 CHENG SP, LI XM, WANF XD, *et al.* Current status of hazard assessment of *Alternaria* toxins [J]. J Toxicol, 2020, 34(3): 220–227.
- [24] PAHLKE G, TIESSEN C, DOMNANICH K, et al. Impact of Alternaria

toxins on CYP1A1 expression in different human tumor cells and relevance for genotoxicity [J]. Toxicol Lett, 2016, 240(1): 93–104.

- [25] MUKHERJEE M, NANDHINI C, BHATT P. Colorimetric and chemiluminescence based enzyme linked apta-sorbent assay (ELASA) for ochratoxin A detection [J]. Spectrochim Acta A, 2021, 244: 118875.
- [26] MARIN S, RAMOS AJ, CANO-SANCHO G, et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 60: 218–237.
- [27] AMEZQUETA S, SCHORR-GALINDO S, MURILLO-ARBIZU M, et al. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review [J]. Food Control, 2012, 26(2): 259–268.
- [28] SCHMIDT-HEYDT M, MAGAN N, GEISEN R. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 284(2): 142–149.
- [29] RAMOSA AJ, LABERNIAA N, MAR'INA S, et al. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barlely grains [J]. Int J Food Microbiol, 1998, 44(1-2): 133.
- [30] SAVA V, REUNOVA O, VELASQUEZ A, et al. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A [J]. Neurotoxicology, 2006, 27(1): 82–92.
- [31] MALLY A. Ochratoxin A and mitotic disruption: Mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A [J]. Toxicol Sci, 2012, 127(2): 315–330.
- [32] SHIN HS, LEE HJ, PYO MC, et al. Ochratoxin A-induced hepatotoxicity through phase I and phase II reactions regulated by AhR in liver cells [J]. Toxins, 2019, 11(7): 377.
- [33] HAQ M, GONZALEZ N, MINTZ K, et al. Teratogenicity of ochratoxin A and the degradation product, ochratoxin A, in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo model of vertebrate development [J]. Toxins, 2016, 8(2): 40.
- [34] AL-ANATI L, PETZINGER E. Immunotoxic activity of ochratoxin A [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2006, 29(2): 79–90.
- [35] OSTRY V, MALIR F, TOMAN J, et al. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC monographs classification [J]. Mycotoxin Res, 2017, 33(1): 65–73.
- [36] ZONG Y, LI B, TIAN S. Effects of carbon, nitrogen and ambient pH on patulin production and related gene expression in *Penicillium expansum* [J]. Int J Food Microbiol, 2015, 206: 102–108.
- [37] VIDAL A, OUHIBI S, GHALI R, et al. The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 129: 249–256.
- [38] CHANDRA S, PATRAS A, POKHAREL B, et al. Patulin degradation and cytotoxicity evaluation of UV irradiated apple juice using human peripheral blood mononuclear cells [J]. J Food Process Eng, 2017. DOI: 10.1111/jfpe.12586
- [39] TOROVIC L, DIMITROV N, ASSUNCAO R, et al. Risk assessment of patulin intake through apple-based food by infants and preschool children in Serbia [J]. Food Addit Contam A, 2017, 34(11): 2023–2032.
- [40] WEI DM, XU J, DONG FS, et al. Penicillium and patulin distribution in pears contaminated with Penicillium expansum determination of patulin in pears by UPLC-MS/MS [J]. J Integr Agric, 2017, 16(7): 1645–1651.
- [41] IQBAL SZ, MALIK S, ASI MR, et al. Natural occurrence of patulin in different fruits, juices and smoothies and evaluation of dietary intake in

Punjab, Pakistan [J]. Food Control, 2018, 84: 370-374.

- [42] JI X, LI R, YANG H, et al. Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China [J]. Food Control, 2017, 78: 100–107.
- [43] ALSHANNAQ A, YU JH. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food [J]. Int J Environ Res Public Health, 2017, 14(6): 632.
- [44] ZHONG L, CARERE J, LU Z, et al. Patulin in apples and apple-based food products: The burdens and the mitigation strategies [J]. Toxins, 2018, 10(11): 475.
- [45] ZHANG X, LI J, ZONG N, *et al.* Ochratoxin A in dried vine fruits from Chinese markets [J]. Food Addit Contam B, 2014, 7(3): 157–161.
- [46] YANG Q, WANG J, ZHANG H, et al. Ochratoxin A is degraded by Yarrowia lipolytica and generates non-toxic degradation products [J]. World Mycotoxin J, 2016, 9(2): 269–278.
- [47] WEI D, WANG Y, JIANG D, et al. Survey of Alternaria toxins and other mycotoxins in dried fruits in China [J]. Toxins, 2017, 9(7): 200.
- [48] GUO W, FAN K, NIE D, et al. Development of a QuEChERS-based UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of six Alternaria toxins in grapes [J]. Toxins, 2019, 11(2): 87.
- [49] MYRESIOTIS CK, TESTEMPASIS S, VRYZAS Z, et al. Determination of mycotoxins in pomegranate fruits and juices using a QuEChERS-based method [J]. Food Chem, 2015, 182: 81–88.
- [50] SAKIN F, TEKELI IO, YIPEL M, et al. Occurrence and health risk assessment of aflatoxins and ochratoxin a in Surk, a Turkish dairy food, as studied by HPLC [J]. Food Control, 2018, 90: 317–323.
- [51] TITTLEMIER SA, BRUNKHORST J, CRAMER B, et al. Developments in mycotoxin analysis: An update for 2019—2020 [J]. World Mycotoxin J, 2021, 14(1): 3–26.
- [52] LEE TP, SAAD B, KHAYOON WS, et al. Molecularly imprinted polymer as sorbent in micro-solid phase extraction of ochratoxin A in coffee, grape juice and urine [J]. Talanta, 2012, 88: 129–135.
- [53] APPELL M, EVANS KO, JACKSON MA, *et al.* Determination of ochratoxin A in grape juice and wine using nano sponge solid phase extraction clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2018, 41(15-16): 949–954.
- [54] HASSANI S, AKMAL MR, SALEK-MAGHSOUDI A, et al. Novel label-free electrochemical aptasensor for determination of Diazinon using gold nanoparticles-modified screen-printed gold electrode [J]. Biosens Bioelectron, 2018, 120: 122–128.
- [55] ARMUTCU C, UZUN L, DENIZLI A. Determination of ochratoxin A traces in foodstuffs: Comparison of an automated on-line two-dimensional high-performance liquid chromatography and off-line immunoaffinity -high-performance liquid chromatography system [J]. J Chromatogr A, 2018, 1569: 139–148.
- [56] CAMPONE L, PICCINELLI AL, CELANO R, et al. Rapid and automated on-line solid phase extraction HPLC-MS/MS with peak focusing for the determination of ochratoxin A in wine samples [J]. Food Chem, 2018, 244: 128–135.
- [57] BERARDIS S, DPAOLA EL, MONTEVECCHI G, et al. Determination of four Alternaria alternata mycotoxins by QuEChERS approach coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry in tomato-based and fruit-based products [J]. Food Red Int, 2018, 106: 677–685.
- [58] GOTTHARDT M, ASAM S, GUNKEL K, et al. Quantitation of six

Alternaria toxins in infant foods applying stable isotope labeled standards [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 109.

- [59] DONG H, XIAN Y, XIAO K, et al. Development and comparison of single-step solid phase extraction and QuEChERS clean-up for the analysis of 7 mycotoxins in fruits and vegetables during storage by UHPLC-MS/MS [J]. Food Chem, 2019, 274: 471–479.
- [60] LI R, FENG Y, PAN G, et al. Advances in molecularly imprinting technology for bioanalytical applications [J]. Sensors, 2019, 19(1): 177.
- [61] FU H, XU W, WANG H, et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for selective identification of patulin in juice [J]. J Chromatogr B, 2020, 1145: 122101.
- [62] PERNICA M, MARTINIK J, BOSKO R, et al. Determination of patulin and hydroxymethyl furfural in beverages by UPLC-PDA [J]. World Mycotoxin J, 2021, 14(1): 41–48.
- [63] NAN M, BI Y, XUE H, et al. Rapid determination of ochratoxin A in grape and its commodities based on a label-free impedimetric aptasensor constructed by layer-by-layer self-assembly [J]. Toxins, 2019, 11(2): 71.
- [64] YAO CY, XU ZL, WANG H, et al. High affinity antibody based on a rationally designed hapten and development of a chemiluminescence enzyme immunoassay for quantification of alternariol in fruit juice, maize and flour [J]. Food Chem, 2019, 283: 359–366.
- [65] OH J, KWON SJ, DORDICK JS, *et al.* Determination of cerebrospinal fluid leakage by selective deletion of transferrin glycol form using an immunochromatographic assay [J]. Theranostics, 2019, 9(14): 4182–4191.
- [66] HUANG Z, XIONG Z, CHEN Y, et al. Sensitive and matrix-tolerant lateral flow immunoassay based on fluorescent magnetic nanobeads for the detection of clenbuterol in swine urine [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(10): 3028–3036.
- [67] HU S, HUANG Z, CHEN WY, et al. Dual signal insight: Field-efficient qualitative/quantitative detection of sulphamethazine in raw milk [J]. Food Agric Immunol, 2019, 30(1): 163–177.
- [68] HAO LW, CHEN J, CHEN XR, et al. A novel magneto-gold nanohybrid-enhanced lateral flow immunoassay for ultrasensitive and rapid detection of ochratoxin A in grape juice [J]. Food Chem, 2021, 336: 127710.
- [69] WU L, XIAO X, CHEN K, et al. Ultrasensitive SERS detection of Bacillus thuringiensis special gene based on Au@Ag NRs and magnetic beads [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 92: 321–327.
- [70] PAN TT, SUN DW, PU H, et al. Simple approach for the rapid detection of alternariol in pear fruit by surface-enhanced Raman scattering with pyridine-modified silver nanoparticles [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(9): 2180–2187.
- [71] HU R, TANG R, XU J, et al. Chemical nano sensors based on molecularly-imprinted polymers doped with silver nanoparticles for the rapid detection of caffeine in wastewater [J]. Anal Chim Acta, 2018, 1034: 176–183.
- [72] YIN W, WU L, DING F, et al. Surface-imprinted SiO₂@Ag nanoparticles for the selective detection of BPA using surface enhanced Raman scattering [J]. Sens Actuat B-Chem, 2018, 258: 566–573.

- [73] ZHU Y, WU L, YAN H, et al. Enzyme induced molecularly imprinted polymer on SERS substrate for ultrasensitive detection of patulin [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1101: 111–119.
- [74] RHOUATI A, YANG C, HAYAT A, et al. Aptamers: A promising tool for ochratoxin A detection in food analysis [J]. Toxins, 2013, 5(11): 1988–2008.
- [75] HUANG Q, ZHAO Z, NIE D, et al. Molecularly imprinted poly(thionine)-based electrochemical sensing platform for fast and selective ultra trace determination of patulin [J]. Anal Chem, 2019, 91(6): 4116–4123.
- [76] MOU L, JIANG X. Materials for microfluidic immunoassays: A review [J]. Adv Health Mater, 2017, 6(15): 1601403.
- [77] MAN Y, LI A, LI BR, et al. A microfluidic colorimetric immunoassay for sensitive detection of altenariol monomethyl ether by UV spectroscopy and smart phone imaging [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1092: 75–84.
- [78] TAGHDISI SM, DANESH NM, RAMEZANI M, et al. A novel electrochemical aptasensor for ochratoxin a sensing in spiked food using strand-displacement polymerase reaction [J]. Talanta, 2021, 223(1): 121705.
- [79] HASSAN NH, OTHMAN HIA, ABDUL MNR, et al. Simultaneous quantitative assessment of ochratoxin A, patulin, 5-hydroxymethylfurfural, and bisphenol a in fruit drinks using HPLC with diode array-fluorimetric detection [J]. Foods, 2020, 9(11): 1633.
- [80] KHAN R, SHERAZI TA, CATANANTE G, et al. Switchable fluorescence sensor toward PAT via CA-MWCNTs quenched aptamer-tagged carboxy fluorescein [J]. Food Chem, 2020, 312: 126048.
- [81] ZHANG M, WANG Y, SUN X, et al. Ultrasensitive competitive detection of patulin toxin by using strand displacement amplification and DNA G-quadruplex with aggregation-induced emission [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1106: 161–167.
- [82] AHMADI A, DANESH NM, RAMEZANI M, et al. A rapid and simple ratiometric fluorescent sensor for patulin detection based on a stabilized DNA duplex probe containing less amount of aptamer-involved base pairs [J]. Talanta, 2019, 204: 641–646.

(责任编辑: 郑 丽 韩晓红)

作者简介



赖文珊,硕士,主要研究方向为真菌 毒素与食品安全。 E-mail: 1556926270@qq.com

刘 娜,博士,副研究员,主要研究方 向为真菌毒素与食品安全。 E-mail: liuna@sibs.ac.cn