

黄曲霉毒素危害和检测方法研究进展

罗自生^{1*}, 徐艳群¹, 秦雨¹, 楼锡锦¹, 何良兴², 徐庭巧², 魏云潇²

(1. 浙江大学食品科学与营养系, 杭州 310058; 2. 杭州市余杭区农产品监测中心, 杭州 311119)

摘要: 黄曲霉毒素具有致癌性和致畸性, 即使痕量级水平的摄入也会对人体健康产生长时间的危害。粮食等作物在生长和贮存期间都可被黄曲霉毒素污染。由于其高毒性, 已有很多检测方法来检测不同样品中黄曲霉毒素的含量, 这些方法各有优缺点, 且并不是每个方法都能满足国标限量水平。本文综述了不同黄曲霉毒素对人体的危害, 分析检测技术的发展, 重点讨论几种较成熟方法在不同基质中的应用。

关键词: 黄曲霉毒素; 危害; 分离; 检测

The hazards and detection methods of aflatoxins

LUO Zi-Sheng^{1*}, XU Yan-Qun¹, QIN Yu¹, LOU Xi-Jin¹, HE Liang-Xing²,
XU Ting-Qiao², WEI Yun-Xiao²

(1. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. The Center of Yuhang Agricultural Products Detection, Hangzhou 311119, China)

ABSTRACT: Aflatoxins are mutagenic and carcinogenic. Even if people eat it at tract level, people's health will be harmed for a long time. The foodstuffs would be contaminated by aflatoxins during growing and storing periods. Due to the high toxicity, sensitive determination techniques for analyzing the aflatoxins of different samples are developed. Each technique has some advantages and disadvantages and not all of them can test at limited level. This review aims to summarize the different health effects of aflatoxins for people, the development of analytical techniques and special discussion about the applications of developed techniques in a variety of matrices.

KEY WORDS: aflatoxin; hazards; separation; detection

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)作为一种重要的真菌毒素, 主要是黄曲霉和寄生曲霉等真菌的次生代谢产物, 目前已发现约 20 种, 包括 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂、P₁、Q₁、B₂、GM 和毒醇等, 其中前六种最常见。黄曲霉毒素存在于多种食物中, 包括油料、谷物、坚果、调味料及牛奶等。植物性食物和饲料中的 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 是由霉菌污染后直接产

生。AFM₁ 和 AFM₂ 是哺乳动物食用了黄曲霉毒素污染的饲料所产生的耐热性羟化代谢产物。黄曲霉毒素具有致癌性、肝毒性、致畸性和致突变, 人和动物体主要通过膳食渠道摄入^[1], 对公众健康有很大的威胁, 1993 年被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为 I 类致癌物质^[2]。我国最

基金项目: 浙江省质量技术监督系统科研计划项目(20120238)、浙江省杰出青年项目(LR13C200001)和浙江省科技项目(2011C35022)

Fund: Supported by Zhejiang Provincial Quality and Technical Supervision System of Scientific Research Project(20120238), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation(LR13C200001) and Zhejiang Province Science and Technology Project(2011C35022)

*通讯作者: 罗自生, 教授/系主任, 主要研究方向为食品保鲜生物学。E-mail: luozsiheng@zju.edu.cn

*Corresponding author: LUO Zi-Sheng, Professor, Department of Food Science and Nutrition, Fuli Institute of Food Science, Zhejiang University, No.866, Yuhangtang Road, Xihu District, Hangzhou 310058, China. E-mail: luozsiheng@zju.edu.cn

新修订的 GB 2761-2011 对各类食品中的黄曲霉毒素 B₁ 和 M₁ 的限量进行了规定。黄曲霉毒素的检测方法要满足相应的限量要求, 评价和借鉴国际上的现有方法十分必要。本文详细阐述了黄曲霉毒素的危害及限量, 从样品前处理、分离检测两方面对现有检测方法进行了综述, 讨论了各方法的优、缺点, 为新限量要求下的方法选择提供依据。

1 黄曲霉毒素的危害和限量

在真菌毒素中, 黄曲霉毒素是最受关注的种类之一, 因为它不仅带来巨大的经济损失而且对人类健康有很大威胁^[3,4]。粮食在生长、收获和最后贮存过程中都可能被黄曲霉毒素污染^[5]。黄曲霉毒素对人类和动物都是高毒性化合物。其中, AFB₁ 是食品样品中常见的一种, 研究表明它的致癌性和毒性最强。

动物实验证明, 黄曲霉会严重影响动物生长发育^[6]。家禽实验表明, 急、慢性黄曲霉毒素中毒导致肉/蛋产量下降、免疫抑制和肝毒中毒^[7]。此外, AFB₁ 影响鸡胚胎发育并增加死亡率。人类黄曲霉毒素中毒根据接触水平产生不同的危害, 高剂量会导致快速死亡, 慢性中毒则引发肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等。HCC 是我国、东南亚和撒哈拉以南非洲许多地区最常见的癌症。在这些地区, 高达 10% 的成人死亡与 HCC 有关。AFB₁ 可与 B 或 C 型病毒性肝炎协同作用导致 HCC。HCC 导致一种肝癌, 肝脏是 AFB₁ 主要的靶器官^[8]。儿童生长受损是黄曲霉毒素中毒的又一危害。研究表明儿童在结束母乳喂养后摄入黄曲霉毒素含量高的食物后生长变慢^[9]。母体的新陈代谢限制了膳食中的黄曲霉毒素转移到母乳中。婴幼儿接触黄曲霉毒素的量可以通过血液中的黄曲霉毒素-白蛋白(aflatoxin-albumin, AF-alb)加合物测定。Wild 等^[10]人在怀孕的冈比亚女性的脐带血中发现了 AF-alb 加合物, 认为是由于黄曲霉毒素的亲脂性, 它们可以很容易的穿过胎盘屏障。黄曲霉毒素的另一个危害是对人体免疫系统的损害^[11]。黄曲霉毒素表现出免疫抑制效应, 它通过不同机制抑制了 DNA、RNA 和蛋白合成^[12]。Turner 等^[13]对冈比亚接触了黄曲霉毒素的儿童进行了研究, 探究体内抗体反应, 发现这些儿童唾液中免疫球蛋白 A(secreted immunoglobulin A, sIgA)水平明显下降。sIgA 绑定细菌和病毒表面的抗原, 在唾液、乳汁、眼泪和支气管、

生殖-泌尿和消化道粘液中形成部分粘膜屏障。sIgA 的减少导致肠道抗菌能力下降。其他霉菌毒素如赭曲霉毒素和伏马毒素可与 AFB₁ 协同影响免疫系统^[13]。总结来说, AFB₁ 不仅对肝脏有影响, 对其他器官和系统, 如肺和免疫系统, 也产生了不同的危害^[14]。

考虑到黄曲霉毒素对健康危害的严重性, 限定其最大摄入量的法律法规正在逐步确立。联合国粮食与农业组织(Food & Agriculture Organization of the United Nations, FAO)和世界卫生组织(WHO)规定人类食品中的黄曲霉限量是 30 μg/kg^[15]。随后, 2002 年欧盟规定黄曲霉毒素总量和 AFB₁ 的最高安全水平分别为 4 μg/kg 和 2 μg/kg^[16]。另外, 食品规范委员会规定了花生中黄曲霉毒素总量限量为 15 μg/kg^[17]。考虑到这些限量规定, 许多国家建立了自己相关的法律法规。我国也给出了自己的限量标准 GB 2761-2011, 对各类食品中的 B₁ 和 M₁ 的含量进行了限定, 其中最低限量达 0.5 μg/kg。

2 黄曲霉毒素的检测

2.1 黄曲霉毒素的提取

为了更加深入了解食品中黄曲霉毒素的毒性, 对于其各不同化学形态的检测都要在可测水平上进行。黄曲霉毒素的测定有三个步骤至关重要, 即提取、分离和检测。其中提取是测定中最关键的一步。在这一步中, 要在不发生任何改变的前提下, 提取分析基质中的所有需要测定的物质。提取工艺的效率高跟样品基质有很大关系。因此, 很有必要建立一套可从不同基质中有效提取所有黄曲霉毒素的提取方法。

目前效果较好的提取方法包括: 混合溶剂液液萃取、固相萃取、固相微萃取、PH 调控的溶剂萃取、免疫亲和柱(同时进行净化和提取)等。一般采用一定比例的甲醇/水或乙腈/水溶液作为提取溶剂, 通过机械振荡、均质、超声等手段进行提取。在提取溶液中加入溴化钾溶液可以增强提取效果, Sheijooni 等^[18]使用均匀的液液萃取法提取大米和谷物样品中的 AFB₁。此方法中, 5 g 磨好的样品中加入 10 mL 甲醇/水(8:10, v/v), 400 r/min 机械振荡 30 min。体系中加入 6 mL 3%溴化钾水溶液来获得浊液, 从而使提取溶剂更好的分散在水相中。而一些新型的提取方法为检测提供了更多实用、可靠的选择。Aguilera 等^[19]在超高

压液相色谱串联质谱(ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)法同时测定牛奶中真菌毒素和农药残留实验中比较了不同提取过程,包括固相萃取、“dilute-and-shoot”(基于液液萃取的一种提取过程)以及基于 QuEChERS(快速、方便、廉价、有效、稳定和安全)的方法。这些方法的回收率在 60%~120%范围内,相对标准偏差小于 25%。pH 调控溶剂萃取法是另一种高效新型提取方法, Santini 等^[20]采用该方法检测人类血清中 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 以及他们的代谢产物 AFM₁ 和 AFM₂, 使用 pH 调控乙酸乙酯萃取从人类血清中提取黄曲霉毒素, 各回收率在 31%~98% 之间, 该方法样品消耗少(只需 500 μ L)、无需净化。选择合适的溶剂可以实现黄曲霉毒素与其他毒素的同时提取, Grio 等^[21]采用丙烯腈/水(80:20, v/v)超声提取, 通过 C₁₈ 柱净化处理, HPLC-MS/MS 法来测定动物饲料中的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和赭曲霉毒素 A, 回收率在 84%~113% 之间, RSD 很低(小于 20%)。固相微萃取的自动化使得其应用更广泛, Nonaka 等^[22]运用自动在线管式固相微萃取配合 LC-MS/MS 来检测坚果、谷物、干果和香料中的黄曲霉毒素(B₁、B₂、G₁、G₂), 坚果和谷物中的加标回收率达到 80% 以上, RSD 小于 11.2%。此外, 二次提取也可明显提高复杂基质的检测效率, Vega^[23]分析了花生酱样品中黄曲霉毒素(B₁、B₂、G₁、G₂) 的含量。待测物先用 15% 氯化钠的甲醇(7:3, v/v)溶液提取, 再用甲醇进行二次提取。柔滑花生酱中 B₁、B₂、G₁、G₂ 的回收率分别是 95.2%、89.9%、94.1% 和 62.4%, 而脆花生酱中的回收率分别是 92.4%、84.3%、85.5% 和 53.7%。免疫亲和柱由于高特异性而在黄曲霉毒素提取净化中广泛使用。Tabari 等^[24]采用免疫亲和柱提取净化-高效液相法来测定酸奶中的 AFM₁, 三天的平均回收率为 72.57%~86.66%, RSD 在 2.56%~8.41% 内, 日间和组间平均回收率为 80%; Roussi 等^[25]也采用免疫亲和柱提取净化法对希腊商业化的生牛奶和市场牛奶中的 AFM₁ 进行了检测。

2.2 黄曲霉毒素的分离和检测

现行黄曲霉毒素检测方法从原理上主要有薄层析法(TLC)、酶联免疫法(ELISA)、高压液相色谱(串联不同检测器)三大类。

2.2.1 高压液相色谱(HPLC)

HPLC 由于其分离能力强、灵敏度高和再现性好、使用方便、易于自动化以及能够配合不同的检测器等诸多优势被广泛应用^[26]。正相和反相色谱都能够用于黄曲霉毒素检测, 但反相色谱因其整体优势而被更多的使用^[27]。反相分离大多采用 C₁₈ 柱, 水-乙腈-甲醇按适当比例配制流动相。某项测定花生中 AFB₁ 研究证明乙腈-水的流动相中不加入甲醇也是可行的^[17]。Tarin 等^[28]使用水-乙腈-甲醇(60:25:15, v/v/v)组成的流动相等梯度洗脱, 能够在 12 min 内分离黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂。Khayoon 等^[29]报道, 使用水分含量大于 70% 的流动相会降低分析灵敏度。

检测器中荧光检测器是最流行的一类^[30,31]。AFB₂ 和 AFG₂ 由于含氧高共轭结构是强荧光分子, 而 AFB₁ 和 AFG₁ 则是弱荧光分子, 因此很多研究采用柱前衍生法来增强其荧光而提高检测灵敏度。Dall'asta 等^[32]研究了原生和取代环糊精(CD)衍生物对黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 荧光强度的影响。他们发现, 琥珀酰- β -CD 的存在(摩尔比 AF:CD=1.0 \times 10⁶)能将黄曲霉毒素 B₁ 和 G₁ 的荧光强度分别增强 63 倍和 53.9 倍, 但对于高荧光的 B₂ 和 G₂ 分子增强倍数不超过 2.3。三氯乙酸(TFA)是另一广泛应用的荧光增强试剂, 它将 B₁ 和 G₁ 转化为他们相应的半缩醛衍生物 B₂A 和 G₂A, B₂ 和 G₂ 不受影响。因 TFA 是一种有毒和腐蚀性的化学物质而在化学分析中不是首选。但 Khayoon 等^[29]在研究中使用 TFA 溶液与正己烷混合进行柱前衍生取得了较好的结果, 四种黄曲霉毒素的响应值较高。光化学衍生是一种新的衍生方法。该方法中, HPLC 与可透过紫外光的聚四氟乙烯管相连, 管子外面包裹着高强度的紫外发生器^[33]。紫外光照射使水产生羟基自由基, 这些自由基与 B₁ 族和 G₁ 族黄曲霉毒素反应产生稳定的高荧光化合物^[34]。这种方法与化学衍生相比有几个优点: 简单、快速、不需要额外的化学试剂、泵和加热器^[34]。近几年, Gnonlonfn 等^[35]在黄曲霉测定实验中已经成功应用了该衍生方法。Waters 公司针对 UPLC 系统检测黄曲霉毒素而开发出大体积流动池直接检测。大体积流动池直接检测原理与光化学柱后衍生相似, 但无需进行柱前或者柱后衍生。由于省去了柱后衍生装置, 分离后直接进入流动池检测, 大大减少了长管路

导致的死体积,有助于改善峰型。王军淋等^[36]研究表明,相同浓度下,各黄曲霉毒素采用大流动池直接检测的峰面积较光化学衍生后要大,有助于降低定量时的误差。

质谱检测器(MS/MS)在最近几年得到了很大的关注^[37,38]。它提供了化合物的结构信息并实现了超痕量检测。它还实现了同一实验同时测定多种真菌毒素^[39]。Cavaliere 等^[39]研究了电喷雾电离(ESI)和大气压光致电离(APPI)技术在测定 AFB₁ 上的适用性。根据研究结果,APPI 相比于 ESI 在灵敏性上要好 2 倍。这种检测器通常会有普通电离、基质效应以及重现性不好的问题, Cervino 等^[40]运用同位素标记法克服了这些困难。同位素内标法具有很好的应用前景,现在 LC-MS/MS 一般都采用该方法。

另有其他几种检测器用于黄曲霉毒素定量研究,如电化学检测器等。Elizalde 等^[41]建立了一种通过测定电流来检测黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的方法。AFG₁ 被发现是最具有电活性的。另有研究将溶出伏安法成功应用在测定落花生样品中的 AFB₁ 和 AFB₂^[42]。

2.2.2 薄层色谱(TLC)

虽然薄层色谱因灵敏度低和重现性不好而大量被 HPLC 以及其他检测黄曲霉毒素的技术所取代,但仍然广泛使用^[43]。TLC 是一种快速、实用、定量或半定量检测各种基质中黄曲霉毒素的方法。可以简单估计污染水平,主要优势是在短时间内快速分析多种样品,单样品分析成本低^[43]。通过主要的分离点暴露在紫外光下测定荧光强度^[44]或吸光度^[45]来定量,另一种半定量的方法是通过比较提取的黄曲霉毒素与标准的斑点的尺寸^[46]。该方法的可靠性很大程度上依赖于操作经验。加压薄层色谱,也叫做高压薄层色谱(HPTLC),串联光密度测定增加了该方法的受欢迎度。但随着各种更加可靠方法的发展,TLC 更多的被 HPLC 和酶联免疫法取代。

表 1 归纳了常见的几种黄曲霉毒素的分离和检测方法。当使用高压液相色谱-荧光检测法(high performance liquid chromatography-fluorescence detection, HPLC-FD)时,可以在 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平下检测 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂。虽然用乙腈:水(9:1, v/v)洗脱、固相萃取后的回收率在 71.4%~93%之间,但使用 ODS 柱的 HPLC-FD 法比用 C₁₈ 柱具有更高的灵敏度。另外,不论是使用 ODS 柱或者 C₁₈ 柱, HPLC-FD 技术相比于

液相色谱-二极管阵列检测器(liquid chromatography-photodiode array detector, LC-DAD)技术都明显具有更低的检出限。HPLC-FD 的检出限是 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平而 LC-DAD 是 mg/kg 。串联质谱体系具有更高的灵敏度,它们是最近使用最多的检测手段。LC-MS/MS 法的灵敏度高,但当考虑到回收率时, HPLC-FD 法比较好。最后,关于 AFB₁ 的检测,二维 TLC 法具有较高灵敏度,但它的萃取回收率最高只有 89.5%。

2.2.3 酶联免疫吸附(ELISA)

ELISA 是一种基于免疫反应的检测方法。ELISA 法快速、灵敏,最大可能减少了样品净化量,适用于数量多和取样量少的样品分析^[55]。虽然 ELISA 法的局限性比黄曲霉毒素的仪器分析法低,但基质效应是其一个显著的问题,这影响了测定结果的可靠性^[56]。当与 TLC 和 HPLC 技术相比较时, ELISA 可能因为基质效应而产生假阳性。在某项研究中,相同的样品分别用 ELISA 和 HPLC 技术进行分析, ELISA 测定的结果比 HPLC 测定的要高^[57]。ELISA 的这个缺点使得它只能用于一些基质影响小的样品^[58]。ELISA 中的目标分析化合物是某种黄曲霉毒素不是所有抗原,具有类结构的其他黄曲霉毒素也会与抗体结合,从而产生了干扰^[59]。现在市场上有相应的一次性商业检测试剂盒,被广泛用于黄曲霉毒素水平的实际监测^[60]。试剂盒包括黄曲霉毒素的单克隆或多克隆抗体^[61]。它的工作原理很简单:一系列的抗体固定在特殊的板或柱上,当板或柱与黄曲霉毒素接触时,样品中黄曲霉毒素的表位被抗体识别进而形成复合物。然后形成的复合物与产色底物反应,产生电信号、光信号或其他可测信号^[43]。抗体的质量和稳定性是高性能免疫分析的重要影响因素,长时间的存放中要确保相关试剂的稳定性。可通过对酶蛋白结构的直接位点诱变、固定到固定相、化学修饰或添加稳定剂^[56]来增加其稳定性。

2.2.4 快速检测方法

随着食品行业的发展和食品安全问题的日益突出,需要监控的食品种类和数量不断增加,对检测效率的要求越来越高,产生了很多快速检测法,包括:胶体金免疫层析法、时间分辨荧光免疫分析法、电化学传感器检测法等。胶体金免疫层析法(gold immunochromatography assay, GICA)是 20 世纪 80 年代发展起来的一种胶体金免疫技术和色谱层析技术相结合的固相膜免疫分析技,可在 5~10 min 中完成对样

表 1 常见的几种黄曲霉毒素的分离和检测方法
Table 1 Some common separating and detecting methods for aflatoxins

方法	基质	分析物	提取	色谱条件	LOD	回收率	参考文献
LC-DAD	开心果	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	用含有 0.75 g NaCl 的 甲醇/水/己烷,(4/1/1.7, v/v/v) 分离提取; 然后采用 C ₁₈ 固相萃取柱净化	柱子: ODS 流动相:线性 梯度起点: 甲醇: 水: 乙腈 10:60:30 (v/v/v)	LOD (mg/kg) B ₁ , 2.12 B ₂ , 1.24 G ₁ , 2.26 G ₂ , 2.63	73%~ 115%	[47]
HPLC-FD	人工污染的食物	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	用甲醇/水(70/30, v/v) 分离提取; 然后采用 Aflatest-P 亲和柱净化	柱子: C ₁₈ 流动相: 水: 甲醇: 乙腈 60:25:15(v/v/v)	LOD (μg/kg) 每一个都为 1	80%~ 110%	[48]
HPLC-FD	虹鳟鱼的 肌肉和 肝脏	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ 和 黄曲霉 毒素醇	用乙腈/水 (9/1, v/v)分离提取, 然后采用免疫亲和 柱净化	柱子: ODS 流动相: 水/甲醇/乙腈 60:20:20(v/v/v)	LOD (μg/kg) 0.002~0.012	71.4%~ 93%	[49]
LC-MS/MS	木薯粉、花 生糕和玉米 样品	B ₁ , B ₂	用甲醇/乙酸乙酯/水 (70:20:10, v/v/v) 分离提取;	柱子: Symmetry RP-18 流动相: A: 水: 甲醇: 乙酸 94:5:1 (v/v/v) 含有 5 mM 乙酸铵 B: 甲醇: 水: 乙酸 97:2:1 (v/v/v) 包含 5 mM 乙酸铵	LOD (μg/kg) 10~346	72%~ 120%	[50]
LC-MS/MS	饲料	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂	用乙腈/水 (84:16, v/v) 分离提取 然后采用 己烷液液萃取		LOD(μg/kg) 0.1~0.8	59%~ 107%	[51]
Two-dimensional TLC	牛奶和 冰淇淋	M ₁			LOD (μg/L) 2	84.6%~ 88%	[52]
Two- dimensional TLC	巴氏杀菌奶 酸奶, 白奶 酪 黄油 冰淇淋	M ₁	用饱和氯化钠和 氯仿分离提取	石英薄层色谱 流动相: 硫酸二乙酯/乙醚/ 甲醇/水 94:4.5:1.5 (v/v/v)和 氯仿: 丙酮: 甲醇 87:10:3 (v/v/v)	LOD (μg/L) 0.012	81.4%~ 89.5%	[53]
TLC	瓜子产品	B ₁	先用加入 5g NaCl 甲醇 /水(80:20, v/v) 后用正己烷分离提取	硅胶胶薄层色谱 流动相: 氯仿: 丙酮 88:12(v/v)	LOD(μg/L) 5	78%~ 86%	[54]

品中黄曲霉毒素的定性检测, 大大简化了检测步骤。邓省亮等^[62]用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 标记为抗黄曲霉毒素 B₁。单克隆抗体并喷于玻璃纤维上, 黄曲霉毒素 B₁ 偶联抗原和二抗分别结合于硝酸纤维膜上, 依次将样本垫、胶金垫、硝酸纤维膜和吸水纸组装切割成胶体金试纸条并装入检测卡中。实验结果表明, 黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试纸条的灵敏度为 5 ng/mL, 检测时间为 10 min, 批内和批

间重复性 100%, 假阳性率和假阴性率均为 0。时间分辨荧光免疫分析法(time resolved fluorescence immunoassay, TRFIA)利用 3 价稀土离子代替酶标物或其他荧光物质, 用时间分辨荧光仪来测定样品中荧光强度来定量。TRFIA 利用稀土离子的荧光波长和激发波长的巨大差异来克服了普通分光光度法中杂色光的影响, 从而提高灵敏度。黄懿等^[63]采用自制黄曲霉毒素 B₁ 全抗原和多克隆抗体, 构建了一套较

为完整的黄曲霉毒素 B₁-TRFIA 检测平台, 灵敏度达到 0.0039 μg/L, 线性范围 0.0039~100 μg/L, 超过了市场上常用的进口或国产酶联免疫检测试剂 (分别为 0.1 μg/L 和 0.1~10 μg/L), 并具有较好的稳定性。电化学免疫传感器包括电容型、阻抗型和电流型, 基于 ELISA 法的原理, 在恒定电压的情况下检测由于抗原抗体结合或继后反应中某电物理量的变化。电化学免疫传感器技术结合了抗原抗体反应的高特异性及电化学分析方法快速、灵敏、简便、精密度高、自动化程度好等优点。除了上述检测方法以外, 还有超光谱法、毛细管电泳法、金纳米棒光学生物传感器技术、高光谱成像技术等许多新兴的检测技术, 为黄曲霉毒素检测技术的深入研究提供思路。

3 结论

黄曲霉毒素作为一种高毒性的真菌毒素, 可污染许多重要的作物而进入到各种食物中, 对人类健康产生重大威胁。至今已有很多关于黄曲霉毒素实用检测技术的重要研究, 许多分离和检测技术已经应用于不同基质中黄曲霉毒素的检测。因为这些化合物在结构上存在明显不同, 目前试图使用一种检测方法来检测所有的黄曲霉毒素是不可能的。不同物化性质的各种黄曲霉毒素的有效提取依然是一个巨大的挑战。研究各种基质中更高效的提取多种黄曲霉毒素的方法, 开发更快速、灵敏的检测技术, 是今后研究的重点。

参考文献

- [1] Papp E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins [J]. *Microchem J*, 2002, 73(1): 39–46.
- [2] Ren Y, Zhang Y, Shao S, *et al.* Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1143(1): 48–64.
- [3] Njapau H, Muzunguile EM, Changa RC. The effect of village processing techniques on the content of aflatoxins in corn and peanuts in Zambia [J]. *J Sci Food Agr*, 1998, 76(3): 450–456.
- [4] Kamika I, Takoy LL. Natural occurrence of Aflatoxin B₁ in peanut collected from Kinshasa, Democratic Republic of Congo [J]. *Food Contr*, 2011, 22(11): 1760–1764.
- [5] Bankole SA, Adebajo A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it [J]. *Afr J Biotechnol*, 2004, 2(9): 254–263.
- [6] Dersjant LY, Verstegen MWA, Gerrits WJJ. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry [J]. *Nutr Res Rev*, 2003, 16(2): 223–240.
- [7] Khan WA, Khan MZ, Khan A, *et al.* Pathological effects of aflatoxin and their amelioration by vitamin E in White Leghorn layers [J]. *Pak Vet J*, 2010, 30: 155–162.
- [8] Van RSJ, Cook MP, Van SDJ, *et al.* Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei [J]. *Brit J Cancer*, 1985, 51(5): 713.
- [9] Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health, and Agricultural Trade [M]. CABI, 2008.
- [10] Wild CP, Rasheed FN, Jawla MFB, *et al.* In-utero exposure to aflatoxin in West Africa [J]. *Lancet*, 1991, 337(8757): 1602.
- [11] Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, *et al.* Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 120(suppl 1): S28–S48.
- [12] Jiang Y, Jolly PE, Ellis WO, *et al.* Aflatoxin B₁ albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians [J]. *Int Immunol*, 2005, 17(6): 807–814.
- [13] Turner PC, Moore SE, Hall AJ, *et al.* Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children [J]. *Environ Health Persp*, 2003, 111(2): 217.
- [14] Dvorackova I, Stora C, Ayraud N. Evidence for aflatoxin B₁ in two cases of lung cancer in man [J]. *J Cancer Res Clin*, 1981, 100(2): 221–224.
- [15] Moss MO, Eley AR. Mycotoxic fungi [J]. *Micro food poison*, 1996 (Ed. 2): 75–93.
- [16] Moss MO. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs [J]. *Int biodeter biodegr*, 2002, 50(3): 137–142.
- [17] Ding X, Li P, Bai Y, *et al.* Aflatoxin B₁ in post-harvest peanuts and dietary risk in China [J]. *Food Contr*, 2012, 23(1): 143–148.
- [18] Shejjooni FN, Hassan J, Yousefi SR. Determination of aflatoxin B₁ in cereals by homogeneous liquid-liquid extraction coupled to high performance liquid chromatography-fluorescence detection [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(11): 1333–1337.
- [19] Aguilera LMM, Plaza BP, Romero GR, *et al.* Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(8): 2863–2875.
- [20] Santini A, Ferracane R, Meca G, *et al.* Comparison and improvement of the existing methods for the determination of aflatoxins in human serum by LC-MS/MS [J]. *Ana Method*, 2010, 2(7): 884–889.
- [21] Grío L, José S, Garrido FA, *et al.* Determination of aflatoxins B₁,

- B₂, G₁, G₂ and ochratoxin a in animal feed by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(4-5): 502–508.
- [22] Nonaka Y, Saito K, Hanioka N, *et al.* Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase micro-extraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(20): 4416–4422.
- [23] Vega VA. Rapid extraction of aflatoxin from creamy and crunchy peanut butter [J]. *J AOAC Int*, 2005, 88(5): 1383–1386.
- [24] Tabari M, Karim G, Ghavami M, *et al.* Method validation for aflatoxin M₁ determination in yoghurt using immunoaffinity column clean-up prior to high-performance liquid chromatography [J]. *Toxicol Ind Health*, 2011, 27(7): 629–635.
- [25] Roussi V, Govaris A, Varagouli A, *et al.* Occurrence of aflatoxin M₁ in raw and market milk commercialized in Greece [J]. *Food Addit& Contam*, 2002, 19(9): 863–868.
- [26] da Silva CGA, Collins CH. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes [J]. *Quim Nova*, 2011, 34(4): 665–676.
- [27] Afsah HL, Jinap S, Arzandeh S, *et al.* Optimization of HPLC conditions for quantitative analysis of aflatoxins in contaminated peanut [J]. *Food Contr*, 2011, 22(3): 381–388.
- [28] Tarin A, Rosell MG, Guardino X. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins: aflatoxins and ochratoxin a [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1047(2): 235–240.
- [29] Khayoon WS, Saad B, Yan CB, *et al.* Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up [J]. *Food Chem*, 2010, 118(3): 882–886.
- [30] Gürbay A, Sabuncuoğlu SA, Girgin G, *et al.* Exposure of newborns to aflatoxin M₁ and B₁ from mothers' breast milk in Ankara, Turkey [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(1): 314–319.
- [31] Heperkan D, Somuncuoğlu S, Karbancioglu GF, *et al.* Natural contamination of cyclopiazonic acid in dried figs and co-occurrence of aflatoxin [J]. *Food Contr*, 2012, 23(1): 82–86.
- [32] Dall'asta C, Ingleto G, Corradini R, *et al.* Fluorescence Enhancement of Aflatoxins Using Native and Substituted Cyclodextrins [J]. *J Incl Phenom Macro Chem*, 2003, 45(3): 257–263.
- [33] Campone L, Piccinelli AL, Celano R, *et al.* Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cereal products [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(42): 7648–7654.
- [34] Joshua H. Determination of aflatoxins by reversed-phase high-performance liquid chromatography with post-column in-line photochemical derivatization and fluorescence detection [J]. *J Chromatogr A*, 1993, 654(2): 247–254.
- [35] Gnonlonfin GJB, Adjovi CSY, Katerere DR, *et al.* Mycoflora and absence of aflatoxin contamination of commercialized cassava chips in Benin, West Africa [J]. *Food Contr*, 2012, 23(2): 333–337.
- [36] 王军淋, 胡玲玲, 蔡增轩, 等. 现行黄曲霉毒素液相色谱检测法的比较与评价 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(3): 645–654.
- Wang JL, Hu LL, Cai ZX, *et al.* Comparison and assessment of aflatoxins determination by ultra-pressure liquid chromatography [J]. *J Food Safe Qual*, 2013, 4(3): 645–654.
- [37] Beltrán E, Ibáñez M, Sancho JV, *et al.* UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M₁ and ochratoxin a in baby food and milk [J]. *Food Chem*, 2011, 126(2): 737–744.
- [38] Ventura M, Gomez A, Anaya I, *et al.* Determination of aflatoxins B₁, G₁, B₂ and G₂ in medicinal herbs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1048(1): 25–29.
- [39] Cavaliere C, Foglia P, Pastorini E, *et al.* Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M₁ in cow milk: comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1101(1): 69–78.
- [40] Cervino C, Asam S, Knopp D, *et al.* Use of isotope-labeled Aflatoxins for LC-MS/MS stable isotope dilution analysis of foods [J]. *J Agr Food Chem*, 2008, 56(6): 1873–1879.
- [41] Elizalde GMP, Mattusch J, Wennrich R. Stability and determination of aflatoxins by high-performance liquid chromatography with amperometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 828(1): 439–444.
- [42] Hajian R, Ensafi AA. Determination of aflatoxins B₁ and B₂ by adsorptive cathodic stripping voltammetry in groundnut [J]. *Food Chem*, 2009, 115(3): 1034–1037.
- [43] Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 632(2): 168–180.
- [44] Stroka J, Anklam E. Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 904(2): 263–268.
- [45] Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese [J]. *Food Contr*, 2006, 17(10): 768–775.
- [46] Fallah AA, Rahnama M, Jafari T, *et al.* Seasonal variation of aflatoxin M₁ contamination in industrial and traditional Iranian dairy products [J]. *Food Contr*, 2011, 22(10): 1653–1656.
- [47] Vosough M, Salemi A. Exploiting second-order advantage using PARAFAC2 for fast HPLC-DAD quantification of mixture of aflatoxins in pistachio nuts [J]. *Food Chem*, 2011, 127(2): 827–833.

- [48] Saalia FK, Phillips RD. Degradation of aflatoxins by extrusion cooking: Effects on nutritional quality of extrudates [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2011, 44(6): 1496–1501.
- [49] Ogiso M, Kimura A, Chikasou M, *et al.* A sensitive analytical method for six aflatoxins in rainbow trout muscle and liver [J]. *J Food Hyg Soc Jap*, 2010, 52(3): 161–166.
- [50] Njumbe EE, Diana DMJ, Monbaliu S, *et al.* A validated multianalyte LC–MS/MS method for quantification of 25 mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples [J]. *J Agr Food Chem*, 2011, 59(10): 5173–5180.
- [51] Chen HH, Ying YF, Wu PG, *et al.* Multi-residue method for determination of 22 anabolic hormones in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37: 181–186.
- [52] Atanda O, Oguntubo A, Adejumo O, *et al.* Aflatoxin M₁ contamination of milk and ice cream in Abeokuta and Odeda local governments of Ogun State, Nigeria [J]. *Chemosphere*, 2007, 68(8): 1455–1458.
- [53] Fallah AA. Aflatoxin M₁ contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer [J]. *Food Contr*, 2010, 21(11): 1478–1481.
- [54] Bankole SA, Adenusi AA, Lawal OS, *et al.* Occurrence of aflatoxin B₁ in food products derivable from ‘egusi’ melon seeds consumed in southwestern Nigeria [J]. *Food Contr*, 2010, 21(7): 974–976.
- [55] Pei SC, Zhang YY, Eremin SA, *et al.* Detection of aflatoxin M₁ in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies [J]. *Food Contr*, 2009, 20(12): 1080–1085.
- [56] Kolosova AY, Shim WB, Yang ZY, *et al.* Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁ stabilization of ELISA kit components and application to grain samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384(1): 286–294.
- [57] O’Riordan MJ, Wilkinson MG. Comparison of analytical methods for aflatoxin determination in commercial chilli spice preparations and subsequent development of an improved method [J]. *Food Contr*, 2009, 20(8): 700–705.
- [58] Gilbert J, Anklam E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2002, 21(6): 468–486.
- [59] Zheng Z, Hanneken J, Houchins D, *et al.* Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin in several food commodities by comparison with HPLC [J]. *Mycopathologia*, 2005, 159(2): 265–272.
- [60] Kav K, Col R, Kaan TK. Detection of aflatoxin m₁ levels by ELISA in white-brined Urfa cheese consumed in Turkey [J]. *Food Contr*, 2011, 22(12): 1883–1886.
- [61] Gathumbi JK, Usleber E, Martlbauer E. Production of ultrasensitive antibodies against aflatoxin b₁ [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32(5): 349–351.
- [62] 邓省亮, 赖卫华, 许杨. 胶体金免疫层析法快速检测黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(2): 232–236.
Deng S, Lai W, Xu Y. Study on Gold Immunochromatography Assay for Rapid Detection of Aflatoxin B₁ [J]. *Food Sci*, 2007, 28(2): 232–236.
- [63] 黄隼, 陶文沂, 张莲芬, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 的高灵敏时间分辨荧光免疫分析[J]. *核技术*, 2006, 29(4): 295–300.
Huang B, Tao WY, Zhang LF, *et al.* Ultrasensitive time-resolved fluoroimmunoassay of aflatoxins B₁ [J]. *Nuclear Techniques*, 2006, 29(4): 295–300.

(责任编辑:赵静)

作者简介



罗自生, 教授/系主任, 主要研究方向为食品保鲜生物学。
E-mail: luozs@zju.edu.cn