

霉菌毒素的测定 ——常规方法和新兴技术

Alexandros Yiannikouris 博士

奥特奇公司营养基因组学研究中心糖组学研究项目协调人



霉菌毒素的历史

自20世纪60年代以来，以及发现黄曲霉毒素以来，霉菌毒素就一直备受关注并引起人们的担心，这不足为奇。随着农业生产规模化发展，霉菌毒素的影响贯穿了整个人类历史，早已表明霉菌毒素是一个威胁人类健康的重要因素[1]。《旧约全书》中就有麦角中毒的记载[2]，这表明伊特鲁里亚文明的衰退[3]以及发生于公元前5世纪的雅典危机[4]都和镰刀菌毒素，如T-2毒素和玉米赤霉烯酮具有一定的关系。

霉菌毒素的控制

为了提高人们对霉菌毒素危害的认识，近期关注在食品和饲料的不同环节中提供控制霉菌毒素策略方面的相关研究也不断增加，我们一定要认识到，霉菌毒素是一种不可避免的危险，这是至关重要的。我们当前需要研发分析霉菌毒素的分析手段，以此作为选择性的“监视雷达”，用于检测原料是否存在霉菌毒素危险，是否需要去除。确定霉菌毒素的存在是建立合理保护程序的第一步，然后需要改进抽样方法以及霉菌毒素的测定方法。

由于食品和饲料谷物原料中所产生的霉菌毒素具有许多危害影响，食品和饲料中霉菌毒素的含量受到严格地限制，限制范围从 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 到 mg/kg 。霉菌毒素分子的多样性是建立霉菌毒素分析方法的主要挑战，目前已鉴别出500多种霉菌毒素分子机构，每种毒素呈现不同的毒性。所造成的经济损失也有所不同。另外，霉菌毒素的污染与环境条件直接相关，环境条件可促进霉菌的生长以及霉菌毒素的产生。基于上述原因，我们需要采用适宜的分析技术和手段，以检测复杂基质中的霉菌毒素，因为样品中的一些基质可能会影响霉菌毒素的提取，因而导致霉菌毒素被伪装而不易检出[5, 6]。

霉菌代谢产物的复杂多样性可产生一系列结构复杂的化学结构，进而导致样品提取困难，容易造成误差。

霉菌毒素测定

通过目测或霉菌计数的方法观察霉菌污染的现象是评定食品和饲料是否被霉菌污染的初级方法。但这些方法很难反映霉菌毒素真正的污染程度，还需要在霉菌鉴定的基础上，以霉菌毒素分析（化学分类）为工具，建立一套高通量的检测方法。然而，环境中形成的霉菌毒素具有多样性，这就给检测方法带来复杂性并面临挑战。还有一些更加复杂的检测方法，人们通过测定挥发性的代谢产物间接地判断霉菌是产毒还是不产毒的种属。这是通过采用气相色谱/质谱联合分析法[7]，或近期开发的电子鼻测定法[8]来实现。

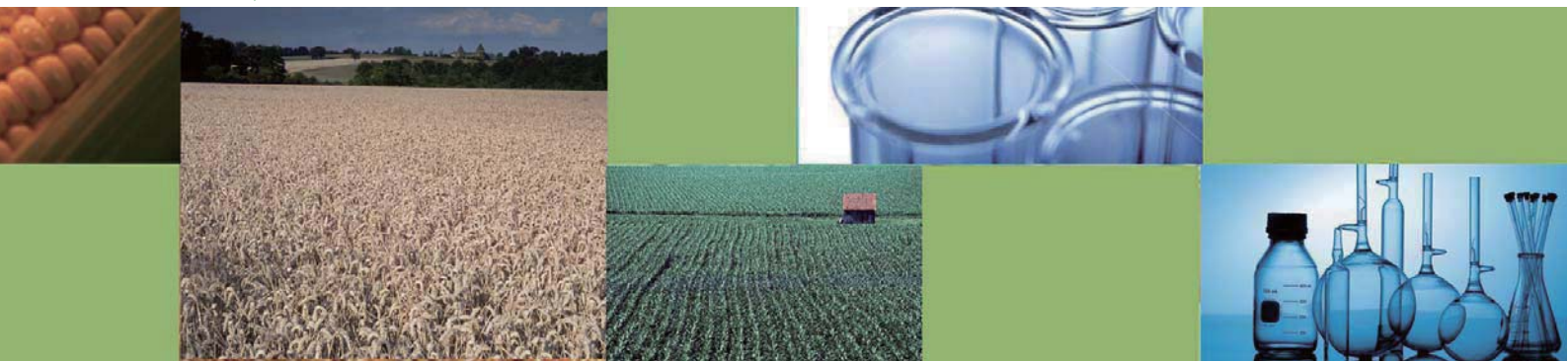
正确地评估霉菌毒素水平与采用正确的抽取具有代表性样品的取样方法有密切的联系，选取具有代表性样品只能通过抽取多且大量的样品量来实现。根据饲料原料种类不同，正确的取样量应该在1.25-10.0kg之间，需要取50-100个样品，然后混匀后再取62.5-500g的样品。

取样时样品与样品之间的样品量应该具有一致性，重量差异应不大于 $\pm 5\%$ [9]。无论如何，取样计划（涉及卖方/买方的风险或者假阴性）容易减少无污染样品的比例，相反容易加大污染样品抽样的比例。这些风险的大小程度将直接关系到霉菌毒素测定程序的变异。由于贸易国之间的规定存在差异，这使得抽样方法更加复杂。样品抽样误差可高达80%，次级抽样误差达10%，样品预处理造成的误差不到10%[10]。

为了减少霉菌毒素测定的误差，确保测定的有效性，我们应该遵循质量保证原则。霉菌毒素的分析具有一定程度的不确定性。对于确定的取样技术，如果不能正确地实施，将会影响取样效果，进而导致最终分析结果出现巨大错误。因此，对检测分析人员进行培训是强制性的，这有利于避免在抽样以及次级抽样过程中产生的误差对样品测定结果造成负面影响。其次，在对样品进行预处理过程中应选用适宜的检测设备和工具，以减少误差。最后，检测分析程序应由经专门培训的技术人员操作。重要的是，选用适宜的经认证的对照品，并采用验证过的有效的分析方法，以确保最终分析检测结果的准确性[11]。



Supported by



另一方面，经济实惠，易于操作的筛选试验对霉菌毒素进行田间现场进行快速灵敏的检测方法也是现成的。问题是当以田间现场条件（pH，温度，多重影响和竞争作用）施用试剂时，这一方法缺乏选择性，交互性（12）以及应环境条件变化而产生的波动性[13]。因此，这些方法需要更成熟精确的霉菌毒素检测方法来进行确认，以便对霉菌毒素进行准确的分类和定量分析。

感应器和生物感应器

作为一种筛选工具，免疫测定法利用特异性的抗体检测霉菌毒素。其高度特异性在于抗体提供的结合部位（活性位点）和底物（霉菌毒素）具有同源性。由于基质材料中存在某些类似物，该方法在实验早期具有交叉反应的缺点。由于性质不同，这些定量和半定量的检测方法分为：放射免疫测定法(RIA)，荧光免疫测定法(FIA)，酶联免疫吸附测定法(EIA,ELISA)。

由于ELISA测定方法速度快，检测的样品多，可对样品进行半定量测定或对某些浓度范围的霉菌毒素进行是或否判定，通常作为霉菌毒素控制计划中的一部分。其他措施还包括将抗体固化于表面，采用侧向流动装置，如免疫试纸条(immunostrips)、免疫层析条(immunodipsticks)和免疫渗滤(immunofiltration)等方法。在市场上现成的还有使用抗体、酶、细菌、受体、DNA或者转换光或电化学可测信号（利用表面等离子激元共振、红外分光镜）所开发的感应器和生物感应器。这些检测技术可以快速检测谷物中主要的被控制的主要霉菌毒素种类，其检测范围是0.5 to 20 µg/kg，但是由于存在交叉反应性和假阳性反应，使用这些方法时应该谨慎。

作为筛选工具，薄层层析色谱(TLC)和ELISA的使用方法一样，试验结果重复性好，交叉反应少，但需要对样品进行进一步清洁处理，从而使获得精确结果所需的时间延长。一种新兴的试验方法是利用基因组学和转基因组学作为检测霉菌毒素的工具。这些技术主要是利用活细胞通过与不同类型的化学物质发生应答反应留下特异性基因表达指纹的能力。通过研究特异性细胞针对霉菌毒素特异性的基因表达图谱，开发DNA微芯片技术，建立一种新的霉菌毒素筛选工具，用于测定食品和饲料中的霉菌毒素[14]。

高效液相色谱法(HPLC)

其次，基于化学物质结构的多样性，许多测定方法都是基于高效液相色谱法进行检测。高效液相色谱法（高压液相色谱法）根据被测混合物的化学性质对其进行分离、鉴别以及定量分析。HPLC包括填充层析材料的色谱柱（固相）、驱动洗脱液（液相）的泵和测定分子保留时间的检测器三个部分。该保留时间会因固相，待测物质和所使用溶剂之间的相互作用而发生变化。目前，高效液相色谱检测方法可靠、监测含量低且可定量监测，仍然代表了霉菌毒素检测中的“黄金标准”。然而，尽管它具有权威性，高效液相色谱方法复杂，样品提取和清洗耗时，检测成本较高。

纵使样品的清洗和浓缩预处理程序可降低检出量的下限，但该检出量下限最终取决于特异性的提取、检测程序和分析条件，这通常也与所检测的特别的霉菌毒素（如DON、T-2毒素）或与霉菌毒素的家族（如黄曲霉毒素）有关。因此，同时检测多种霉菌毒素的能力相当有限，我们只是在假设的基础上强加于霉菌毒素测定的准确性。由于所要研究的霉菌毒素数量庞大，霉菌毒素理想的最低检出量受到限制，要快速获得检测结果是不切实际的。人们可能会注意到，未检出的结果（non-detectable ND）的结果并不意味着不可测定，而是基于通常情况下，特定监管限值内无病理性症状被观察到（未观察到有影响的水平/最低可观察的影响水平，即NOEL/LOEL）

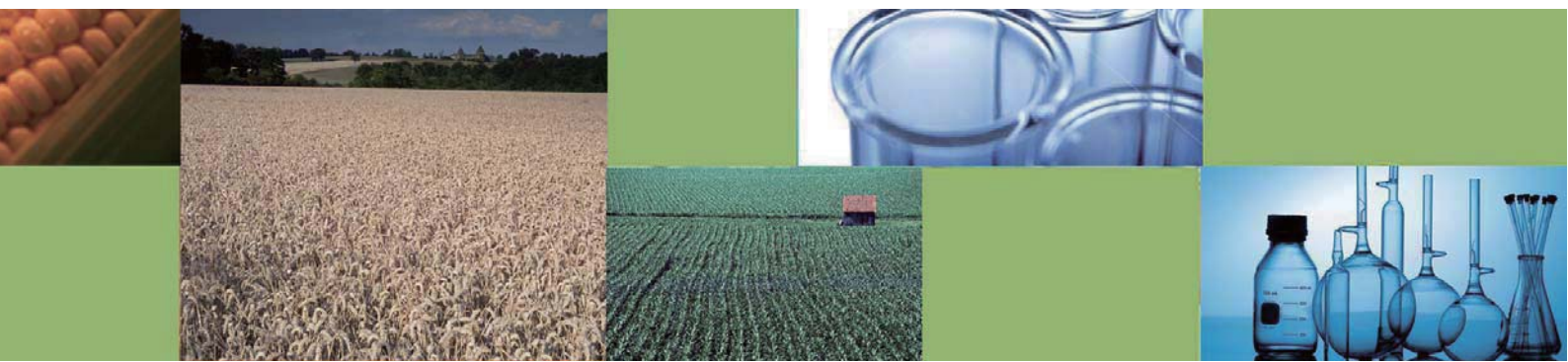
检测技术的进展

采用不同的分离方法，如气相色谱、液相色谱、或电泳法可对霉菌毒素进行检测分析。现在人们正研究的新技术有：使用毛细管柱系统的超速洗提分析方法以缩短高效液相色谱分析周期所需的时间。并联合使用多种检测器以测定霉菌毒素。根据官方AOAC数据库中大量的常引用的参考文献，荧光分光光度计和二极阵列检测器是人们最普遍使用的方法。这些方法的特点是，仪器操作方便，可进行高通量的定量分析，与样品基质的交互作用小。该方法的主要限制因素是：需要根据待测样品的性质采用特殊的色谱分离条件，如待测分子的荧光性；还需要对样品进行进一步衍生化；其他存在的问题还包括：回收率水平，衍生物的稳定性，洗提化合物的重叠性。因此，还需要研发不同样品基质中含多种成分物质的快速检测方法。

带有分离层析色谱的二维质谱(2-dimensional mass spectrometry MS)正成为霉菌毒素分析新的参考方法。当许多成分具有相同的完整质量值，加入另一个片断（串联质谱）可获得待检物质特异性的指纹。通过专门监控多重片断离子的色谱层析洗提时间进行量化分析是可行的。该方法最终提高了检测的敏感性和精确性（17）。附加的色谱层析步骤使得所有依赖时间的洗提过程成为可能，进而在一个样品内对霉菌毒素的多重成分进行分析。



Supported by



除了缺乏校准物外，样品基质的多样性和霉菌毒素的种类繁多成为抑制离子化有效性的限制因素。近期的研究工作使得我们可监测和去复制近500多种不同的真菌代谢产物，虽然这只是定性检测（18）。另一个有意义的方面是液相色谱-质谱联动（LC-MS）方法，该方法可对样品的粗提取物进行分析（即将样品经溶剂提取和经基本的过滤后所得到的粗提取物），从而明显加快了分析过程。

还有其他一些分析测定霉菌毒素的技术，相对于上述的几种方法来说使用得不是很普遍。与高效液相色谱仪一样，毛细管电泳联合荧光检测仪以及紫外检测仪也可用于霉菌毒素的分析检测。离子迁移光谱（Ion mobility spectrometry）方法和波型离子迁移光谱-质谱分析方法（waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry）[15]也可用于霉菌毒素的微量分析。

质谱分析法因其新研发的界面和以及仪器组件的微型化，在大多数分析实验室使用得越来越普遍。由于质谱仪具备多种检测能力，并具有检测质量高、速度快、结果可靠以及成本低廉等优点，日渐成为饲料和食品制造商直接使用的分析检测工具。最后，该检测技术快速运用于其他众多污染物（如农药和三聚氰胺）的检测或必要成分的检测上，使得质谱分析技术成为极为通用的技术。

结论

从霉菌毒素检测技术和分析方法的多样性就可看出霉菌毒素检测的复杂性，这些分析方法都或多或少地的检测出霉菌毒素的存在。由于霉菌毒素固有特性、化学结构的多样性，以及代谢产物的多样性，使得霉菌毒素的测定方法在应用过程中存在一定的局限性。还有，霉菌毒素和样品基质之间复杂的相互作用进而更加剧了这种局限性。因此我们发现，霉菌毒素可与一个或几个糖苷或葡聚糖的残基形成共扼代谢物，从而使得霉菌毒素被伪装而难以检测。分析仪器和提取程序的持续不断地进步将有助于减少这类测定误差，也有助于在实际生产中更好的理解、预测和发现霉菌毒素的存在。

参考文献略



Supported by

