

# 黄曲霉毒素检测方法研究进展

纪文华<sup>1,2</sup>, 李雪梅<sup>1</sup>, 尹小燕<sup>3</sup>, 韩浩月<sup>1</sup>, 乔墨宇<sup>1</sup>, 张丽丹<sup>1</sup>, 苗冉<sup>1</sup>, 马晗雪<sup>2</sup>, 明郁斐<sup>2</sup>

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省分析测试中心 山东省大型精密分析仪器应用技术重点实验室, 山东 济南 250014
2. 齐鲁工业大学(山东省科学院)药学院, 山东 济南 250014
3. 日照市生态环境局, 山东 日照 276800

**摘要:**黄曲霉毒素(AFT)是一种高毒性和致癌性物质,广泛存在于各类食品及饲料中,长期接触容易诱发肝癌等疾病,对人体健康造成极大危害。准确检测黄曲霉毒素的含量,确定其污染程度是保障食品安全的关键所在。目前,国内外工作者已建立了多种检测黄曲霉毒素的方法,可为黄曲霉毒素的风险防控提供有效手段。主要综述了近5年内国内外黄曲霉毒素检测的研究进展,分析了仪器分析、免疫分析等分析方法在黄曲霉毒素检测中的应用,同时对比各种方法的优缺点,并对未来发展方向进行展望,旨在为黄曲霉毒素检测分析提供参考。

**关键词:**黄曲霉毒素;检测方法;食品安全;仪器分析;免疫分析

中图分类号:TS201.6

文献标志码:A

文章编号:1673-2383(2022)05-0014-08

DOI:10.16433/j.1673-2383.2022.05.003

## Research progress of aflatoxin detection methods

Ji Wenhua<sup>1,2</sup>, Li Xuemei<sup>1</sup>, Yin Xiaoyan<sup>3</sup>, Han Haoyue<sup>1</sup>, Qiao Zhaoyu<sup>1</sup>, Zhang Lidan<sup>1</sup>, Miao Ran<sup>1</sup>, Ma Hanxue<sup>2</sup>, Ming Yufei<sup>2</sup>

1. Key Laboratory for Applied Technology of Sophisticated Analytical Instruments of Shandong Province, Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China
2. School of Pharmaceutical Sciences, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China
3. Rizhao Ecology and Environment Bureau, Rizhao 276800, China

**Abstract:** Aflatoxins are secondary metabolites predominately produced by fungi such as *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*, which widely contaminate agricultural produce. These aflatoxins have potent carcinogenic, teratogenic, mutagenic, immunosuppressive and estrogenic effects in humans when consumed. Most of aflatoxins are chemically stable and highly resistant even when cooked at high temperatures, so they can easily enter the feed and food chain, resulting in a serious threat to human and animal health. Several methods have been reported for the analysis of aflatoxins, including high performance liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry, enzyme-linked immunosorbent assay, time-resolved fluorescence immunoassay, thin layer chromatography, surface-enhanced raman spectroscopy and electrochemical biosensor. This article briefly introduced the chemical structure of aflatoxin, physical and

收稿日期:2022-07-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31972145);齐鲁工业大学(山东省科学院)研究生教育发展类项目

作者简介:纪文华(1983—),男,山东淄博人,博士,副研究员,研究方向为复杂样品前处理,E-mail:jwh519@163.com。

chemical properties, and the status of contamination, hazard to human health, and its limit standard in food. Various analytical methods were systematically expounded about the status, advantage and disadvantage. The development direction of the methods for determining aflatoxins were also pointed out.

**Key words:** aflatoxin; detection method; food security; instrumental analysis; immunoassay

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AFT)是寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)等的代谢产物,广泛存在于霉变的谷物、花生、大米和果仁等食物中,食用油、乳制品等食品中也经常检出黄曲霉毒素<sup>[1]</sup>。黄曲霉毒素是一类毒性极强的剧毒物质,被世界卫生组织的癌症研究机构划定为天然存在的 1 类致癌物<sup>[2]</sup>。因此,分析测定食品中黄曲霉毒素的含量对保障食品质量安全具有极其重要的意义。

## 1 黄曲霉毒素概况

黄曲霉毒素是一组杂环二呋喃和香豆素骨架的天然化合物,AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub> 和 AFG<sub>2</sub> 以及次级代谢产物 AFM<sub>1</sub>、AFM<sub>2</sub> 被认为是食品和饲料的重要污染物<sup>[3]</sup>。黄曲霉毒素在水、乙醚、乙烷中不溶,在甲醇、乙腈和氯仿等有机溶剂易溶解,耐热性极强,一般烹调温度难以破坏,280~300 °C 才可使其裂解<sup>[4]</sup>。此外,黄曲霉毒素不耐碱,在 pH 9~10 会迅速分解,部分毒素失去活性<sup>[5]</sup>。在紫外光照射下,AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub> 发蓝色荧光,AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 发绿色荧光<sup>[6]</sup>。

黄曲霉毒素广泛存在于谷物类(玉米、小麦、稻谷、高粱等)、坚果类(花生、核桃、杏仁等)、粮油、中药材以及乳制品内,对人类健康造成严重威胁。其中 AFB<sub>1</sub> 被世界卫生组织认定为 1 类致癌物,是目前发现毒性最强的真菌毒素,其毒性比氰化钾高 10 倍、砒霜高 68 倍<sup>[7]</sup>。短期内吸入大量黄曲霉毒素会造成严重的肝功能损伤,长期接触则容易造成急性或慢性疾病甚至癌症<sup>[8]</sup>。除此之外,孕妇若长期摄入受到 AFB<sub>1</sub> 污染的食物,轻则会阻碍胎儿生长,造成胎儿先天性异常,重则会导致孕妇出现早产、流产和死产等问题<sup>[9]</sup>。其他类型的黄曲霉毒素毒性和致癌性仅次于 AFB<sub>1</sub>。

黄曲霉毒素存在范围广,危害性大,为了维护人类健康,预防黄曲霉毒素中毒事件的发生,诸多国家和地区对食品中黄曲霉毒素的含量有严格限量要求。欧盟 EC(NO)165/2010《食品中特定污染物的最大残留限量》规定,在所有谷类

产品中,AFB<sub>1</sub> 含量不得高于 2 μg/kg。日本《食品卫生法》要求,AFB<sub>1</sub> 在任何食品中不得被检出。根据 GB 2761—2017《食品中真菌毒素限量》规定,AFB<sub>1</sub> 的含量在玉米、花生中不能高于 20 μg/kg,在稻谷、花生油中不能高于 10 μg/kg,在小麦、大麦、发酵豆制品和其他熟制坚果中不得高于 5 μg/kg,在乳制品、婴幼儿食品中不得高于 0.5 μg/kg。

## 2 黄曲霉毒素的检测方法

### 2.1 仪器分析

#### 2.1.1 高效液相色谱法

高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)是实验室检测黄曲霉毒素最常用的方法,主要包括提取、净化和检测 3 个步骤<sup>[10]</sup>。Shuib 等<sup>[11]</sup>采用 HPLC 结合柱后光化学衍生荧光检测牛奶中的黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>(AFM<sub>1</sub>)。使用甲醇-水(体积比 35:65)作为流动相,C<sub>18</sub> 色谱柱在 40 °C 等度洗脱,荧光检测器(fluorescence detector, FLD)分别设置 360 nm 和 440 nm 作为激发和发射波长,随后进行衍生化处理,采用高效液相色谱仪分析,得到样品检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)分别为 0.002 μg/L 和 0.004 μg/L,回收率为 85.2%~107.0%,所提出的方法可用于测定各种类型的牛奶和奶制品中的 AFM<sub>1</sub>,且光化学衍生法不需要危险性和含氯溶剂,对环境友好。

适配体是一种新型的靶识别元件,具有特异性强、亲和力高等优点。Zhao 等<sup>[12]</sup>采用适配体亲和柱(aptamer affinity column, AAC)结合 HPLC 对莲子中的 AFB<sub>1</sub> 进行了特异性富集和鉴定。通过优化负载量和洗脱条件,提高了 AFB<sub>1</sub>-AAC 的最大样品容量,并用其他真菌毒素作为干扰物质考察了亲和柱的选择性,结果显示亲和柱对其他真菌毒素没有吸附作用。采用高效液相色谱-荧光检测(high performance liquid chromatography-fluorescence detection, HPLC-FLD)结合适配体亲和柱净化的光化学反应器分析莲子中 AFB<sub>1</sub> 的含

量, LOD 为 0.05 ng/mL, 回收率为 91.8% ~ 108.6%。另外, 适配体亲和柱重复使用 20 次后仍对 AFB<sub>1</sub> 具有较好的亲和力。该结果为食品、农产品和中药等复杂基质中微量毒素的富集和检测提供了一种新方法。

HPLC 虽然成本低、灵敏度高且应用范围广, 但需要实验人员进行复杂的样品前处理, 而且分析方法耗费时间, 仅适用于实验室, 不适用于大量样品现场分析<sup>[13]</sup>。

### 2.1.2 质谱检测法

液相色谱-质谱法(liquid chromatogram tandem mass spectrometry, LC-MS)以液相色谱做分离, 质谱做检测, 通过两者有机结合, 从而对样品中的成分进行定量和定性分析。近年来, LC-MS 在食品安全<sup>[14]</sup>、环境检测<sup>[15]</sup>和药物分析<sup>[16]</sup>等领域得到了广泛的应用, 目前也已被应用到真菌毒素的筛查检测中<sup>[17]</sup>。

Ye 等<sup>[18]</sup>开发了一种多功能纯化柱(multi-functional purification column, MFC)和免疫亲和柱(immunoaffinity column, IAC)串联结合 LC-MS/MS 对黑茶中 4 种真菌毒素(AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>及 AFG<sub>2</sub>)进行同步检测。样品首先经乙腈-水(体积比 84:16)萃取, 然后用 MFC-IAC 串联净化, 从而大大减少基体干扰, 该方法对 4 种 AFT 的 LOD 为 0.024 ~ 0.21 μg/kg。与 HPLC 法相比, LC-MS/MS 方法灵敏度高、特异性强。

为了进一步简化样品前处理步骤, Chen 等<sup>[19]</sup>开发了一种免疫磁珠与 LC-MS 分析相结合的一步自动样品前处理方法, 即将提取、捕获、清洗和洗脱过程结合为一步, 构建了一个带有免疫磁珠的多功能自动样品前处理平台, 用于检测牛奶中的 AFM<sub>1</sub>。免疫磁珠通过 AFM<sub>1</sub> 抗体对磁珠的特异性亲和力, 可以快速识别和富集样品中的 AFM<sub>1</sub>, 然后进行 LC-MS 分析。该方法的 LOD 为 0.0008 μg/kg, LOQ 为 0.0027 μg/kg。同时, 使用免疫磁珠的样品前处理方法可以有效缩短处理时间, 提高分析效率, 降低误差。

LC-MS 方法具有分离能力强、灵敏度高、特异性好的优点, 能够满足食品中 AFT 检测要求, 但仪器成本较高, 且需要测试人员具备一定的专业知识, 只适用于实验室检测, 不能满足现场检测的需求。因此, 开发一种操作简单、成本低廉、可适用于现场检测的 LC-MS 技术已成为未来研究重点。

## 2.2 免疫分析

### 2.2.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是医学诊断实验室和研究机构快速筛查黄曲霉毒素最常用的方法, 其基本原理是将待测物的抗原(抗体)吸附于某种固相载体表面, 加入酶标记的抗体(抗原)使其发生抗原抗体结合反应, 再加入酶反应的底物后, 底物被酶催化变为有色底物, 故可根据颜色的深浅进行定量或定性分析<sup>[20]</sup>。

为了进一步提高 ELISA 检测灵敏度, Ren 等<sup>[21]</sup>建立了一种基于纳米抗体(克隆 G8)与纳米荧光素酶(Nanoluciferase, Nluc)融合的竞争性生物发光 ELISA, 检测谷物中的 AFB<sub>1</sub>。将抗 AFB<sub>1</sub> 的纳米体(克隆 G8)与 Nluc 融合并克隆到 pET22b 表达载体中, 然后转化到大肠杆菌中。通过稀释样品溶液浓度减少基体干扰, 从而使融合蛋白 G8-Nluc 具有纳米体结合能力和荧光素酶催化活性。利用生物发光这种高灵敏度形式可补偿提取后样品稀释过程中的灵敏度损失。与经典 ELISA 相比, 该方法可以将检测灵敏度提高 20 倍以上, 半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.41 ng/mL, 线性范围为 0.10 ~ 1.64 ng/mL。此外, 从样品制备到数据分析, 整个检测过程可以在 2 h 内完成。

传统的 ELISA 容易出现假阳性结果<sup>[22]</sup>, 为了避免出现此类现象, Xu 等<sup>[23]</sup>建立了一种基于金属有机框架(MOF)的间接竞争性 ELISA 用于 AFT 的高灵敏检测。用功能化 MOF 替代传统 ELISA 中的天然酶, 可以解决传统天然酶催化活性低、稳定性差等问题, 同时采用催化显色系统, 检测方法的 LOD 为 0.009 ng/mL。与传统 ELISA 相比, 该检测方法的 LOD 提高了 20 倍, 回收率和 RSD 分别为 86.41% ~ 99.74% 和 2.38% ~ 9.04%, 均优于传统的 ELISA, 可以有效降低假阳性结果的概率。

近年来, 由于 ELISA 检测具有操作便捷、灵敏度高、特异性好、价格低廉等优点, 已被广泛应用到食品安全检测<sup>[24]</sup>、药物残留分析<sup>[25]</sup>等领域。但在实际样品检测中避免假阳性仍然存在巨大挑战, 且用于标记的抗体酶的纯度容易受环境影响导致稳定性降低, 影响检测结果<sup>[26]</sup>。

### 2.2.2 时间分辨荧光免疫分析法

时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)采用镧系元素及其螯合剂作为标记物, 利用镧系元素螯合物的荧光特

性,通过时间分辨荧光测定仪对该体系进行荧光强度的测定,从而确定待分析物的含量,可有效消除非特异荧光的干扰,提高分析结果灵敏度<sup>[27]</sup>。

为了进一步提高 TRFIA 的灵敏度以满足痕量检测的要求,Tang 等<sup>[28]</sup>利用时间分辨免疫色谱分析法(time-resolved fluorescence immunochromatographic assay,TRFICA)快速、定量检测玉米及其制品中的 AFB<sub>1</sub> 和玉米赤霉烯酮(ZEN)。首先,通过制备具有增强荧光的新型 Eu/Tb(III) 纳米球作为标记物,进而与抗独特型纳米体(anti-idiotypic nanobody, AIdnb) 和单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb) 结合,建立了两种竞争性时间分辨条带法(AIdnb-TRFICA 和 mAb-TRFICA) 并进行比较,AIdnb-TRFICA 可同时检测 AFB<sub>1</sub> 和 ZEN。结果显示,AIdnb-TRFICA 对 AFB<sub>1</sub> 和 ZEN 的灵敏度分别比 mAb-TRFICA 高 18.3 倍和 20.3 倍,AIdnb-TRFICA 方法回收率为 72.6%~106.6%,AFB<sub>1</sub> 的 LOD 为 0.05 ng/mL,ZEN 的 LOD 为 0.07 ng/mL。

Li 等<sup>[29]</sup>通过时间分辨荧光微球免疫层析试纸条实现了牛奶及其制品中 AFM<sub>1</sub> 快速测定。首先,将铕(III) 嵌入聚苯乙烯得到时间分辨荧光微球。然后,将微球与单克隆抗体结合,在 37 °C 进行 10 min 的预培养,随后与免疫层析试纸条组装。在最优条件下,测试方法的 LOD 达 0.019 ng/mL,比使用量子点和金纳米粒子获得的 LOD 低 5 倍,灵敏度与金纳米颗粒试纸方法相比提高近 16 倍,变异系数小于 8.31%,回收率为 84.6%~119.0%,此外,整个测试过程约为 20 min,且试纸的保存时间较长,基本符合商业市场的要求。

TRFIA 技术具有灵敏度高、特异性强、重复性好、性价比高等优点,近几年已逐渐应用于食品检测<sup>[30]</sup>、环境分析<sup>[31]</sup>等领域,而且已在国际超微量分析领域展现出巨大的应用前景<sup>[32]</sup>。但 TRFICA 采用的镧系元素具有放射性,因此长期接触会对测试人员造成人体伤害,使用过程中也可能造成环境污染。此外,螯合剂的荧光寿命较短,容易产生背景干扰,且多为有毒物质,不利于人体健康<sup>[33]</sup>。

## 2.3 其他分析

### 2.3.1 薄层色谱法

薄层色谱法(thin layer chromatographic technique, TLC) 又称薄层层析技术,是指将固定相吸附剂均匀地涂于支持板上形成薄层板,然后用相

应的溶剂展开,从而对混合样品实现分离和鉴定<sup>[34]</sup>。TLC 是最早使用的一种检测 AFT 的方法,随着该技术的不断进步与发展,检测的准确率和简便性也在逐渐提高<sup>[35]</sup>。

冯莉<sup>[36]</sup>采用石油醚-甲醇混合液(体积比为 30:100)作萃取剂,无水乙醚、丙酮、三氯甲烷(体积比为 10:8:92)作展开剂,通过薄层色谱法来检测玉米中的 AFB<sub>1</sub>,用波长 365 nm 紫外光对 AFB<sub>1</sub> 进行定性检测。Salisu 等<sup>[37]</sup>开发了一种新的溶剂系统和薄层色谱法,用于定性测定食品和家禽饲料中的 AFT。该方法采用甲醇-水(体积比 75:25)加 5% 的氯化钠混合溶液进行萃取,乙腈-二氯甲烷(体积比 3:17)作流动相对 AFT 进行检测分析。该方法的 LOD < 2 ng/g, LOQ < 4.0 ng/g,回收率为 74%~105%。该方法可能成为测定食品和饲料中 AFT 的常规技术,尤其是在无法使用色谱与质谱仪器的实验室。

薄层色谱法具有操作简便、直观快速、设备简单的特点,并且可以同时处理多个样品,但容易受温度和湿度影响,导致对于生物高分子的分离效果并不是很好,准确性和稳定性亦不高<sup>[38]</sup>。未来将会寻求更好的固定相和展开剂,同时也可以和新的仪器技术联用,使 TLC 成为一种灵敏、高效的分离与分析方法。

### 2.3.2 表面增强拉曼光谱法

表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) 是一种将被测分子吸附在诸如金、银和铜等金属颗粒上,使拉曼信号增强 10<sup>5</sup>~10<sup>15</sup> 倍的振动光谱技术<sup>[39]</sup>。SERS 可提供精细的分子指纹,允许直接识别目标分析物,目前已经广泛应用于化学、物理、材料和生物医学等研究领域<sup>[40]</sup>。

Liu 等<sup>[41]</sup>采用 QuEChERS 联用 SERS 法用于粮食中的 AFB<sub>1</sub> 高灵敏检测,该方法以金纳米粒子溶液(金溶胶)作为 SERS 检测基底,集样品制备和提取一体化,减小了基质干扰,简化了操作流程,整个过程仅需 10 min,LOD 和 LOQ 分别可达 0.85 μg/kg 和 2.83 μg/kg。另外,其他真菌毒素没有显著的 SERS 信号,证实该方法对 AFB<sub>1</sub> 具有高选择性。重要的是,整个 SERS 实验过程不需要任何分子标记,同时适用于批量样品检测以及现场检测,在食品安全领域具有广泛应用。

Qu 等<sup>[42]</sup>采用 TLC 结合 SERS 法用于霉变农产品中的痕量 AFT 快速现场检测。首先通过 TLC 分离出 4 种不同的黄曲霉毒素(AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、

AFG<sub>1</sub>和AFG<sub>2</sub>),然后以金溶胶作为检测基底,对分离出的斑点进行鉴定,同时通过利用密度泛函理论分析拉曼光谱,确定了4种黄曲霉毒素的显著振动峰,获得了4种不同的SERS光谱,并可区分其特征谱带。整个过程不需要额外的处理步骤,5 min内即可完成。经检测AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>的LOD分别为 $1.5 \times 10^{-3}$ 、 $1.1 \times 10^{-2}$ 、 $1.2 \times 10^{-3}$ 、 $6.0 \times 10^{-4}$  ng/mL。该方法对AFT具有高选择性,能够在霉变复杂样本中成功识别AFT。

虽然SERS被广泛用于食品污染物检测,但SERS仍然存在重复性差、稳定性低、仪器成本高、检测基底局限性等缺点,因此开发各种灵敏度高、稳定性强和再现性好的SERS活性基底是解决该技术的关键<sup>[43]</sup>。

### 2.3.3 电化学生物传感器

电化学生物传感器是指利用酶、抗体/抗原、微生物、细胞、组织、核酸等生物活性物质作敏感元件,电极(固体电极、气敏电极等)作转换元件,以电流或电势为特征检测信号的传感器<sup>[44]</sup>。根据敏感元件的不同,电化学生物传感器可以分为电化学免疫传感器、电极传感器、电化学DNA传感器等<sup>[45]</sup>。

Yan等<sup>[46]</sup>开发了一种新型的电化学发光生物传感器,用于超灵敏检测AFB<sub>1</sub>。该方法利用滚环复制技术制备了一种新型酶驱动的可编程组装3D DNA纳米花(enzyme-driven programmable assembled 3D DNA nanoflowers, EPDNs),利用辅助探针和内脱氧核糖核酸酶组合的协同效应,有效去除了常规适配体直接竞争法冗余的双链探针,确保适配体更稳定地与靶竞争,大大提高了AFB<sub>1</sub>的简单、快速、灵敏检测。尽管AFB<sub>1</sub>的含量极低,EPDNs堆积了大量Ru(II)配合物[Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>],具有优异的效率和稳定性,仍能产生显著的电化学发光信号,其灵敏度得到了大幅度提高。该方法可实现对AFB<sub>1</sub>的定量检测,LOD为0.27 ng/L,已成功应用于花生和小麦的AFB<sub>1</sub>分析,回收率为93.7%~106.6%。

Singh等<sup>[47]</sup>研制了一种基于Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>纳米颗粒的电化学免疫传感器,用于检测AFB<sub>1</sub>。Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>纳米颗粒具有足够的结合位点,可以吸附生物传感器制造所需的生物分子,包括抗体、蛋白质、DNA等。采用共沉积法合成了立方相的Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,电泳沉积法在氧化铟锡(ITO)表面制备了Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>薄膜,该薄膜用于固定抗体(抗AFB<sub>1</sub>),使用差分脉冲伏安法选择性检测AFB<sub>1</sub>。利用牛血清白蛋

白(bovine serum albumin, BSA)来阻断抗AFB<sub>1</sub>/Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ITO免疫电极表面上未覆盖的位点,以此避免背景信号干扰。通过加入赭曲霉毒素A和伏马菌素等其他真菌毒素,发现BSA/抗AFB<sub>1</sub>/Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ITO免疫电极只对AFB<sub>1</sub>特异性检测。通过实际样品分析发现该方法在1 pg/mL~10 μg/mL具有良好的线性,免疫电极(BSA/抗AFB<sub>1</sub>/Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ITO)显示回收率为95%~98.6%。

电化学生物传感器凭借着高灵敏度、高选择性、高稳定性和易于操作等优点,在食品安全<sup>[48]</sup>、环境监测<sup>[49]</sup>等领域得到了广泛应用。但也面临一些问题,如目前的适配体主要用于识别AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>和AFM<sub>1</sub>,而其他黄曲霉毒素则没有适配体<sup>[50]</sup>。因此在未来,致力于开发单一生物传感器同时检测多种黄曲霉毒素,同时开发无试剂、无清洗、无校准或无生物污染的电化学生物传感器就变得至关重要。

## 3 结论

AFT不仅具有高毒性和强致癌性,而且广泛存在,给食品安全带来了巨大风险,甚至影响着人类健康发展。因此,高效精准检测食品及其他物质中的AFT至关重要。目前,随着科技进步与发展,不同检测技术在重复性、稳定性、灵敏度等方面已经有了很大的进步。尽管仪器分析准确度与灵敏度高、重复性好,但存在价格昂贵的问题,并且还需要复杂的样品前处理过程,不适用于大量样品分析。免疫试纸条和试纸盒的出现能够实现现场快速检测大批量样品,但检测结果与真实数据具有一定的差距,假阳性和假阴性概率高,严重影响检测结果的稳定性和可靠性。TLC操作简便,但容易受环境影响,只能实现定性的半定量检测。SERS的检测结果受基底材料限制,有待深入研究。电化学生物传感器便携性好、灵敏度高、成本低,已成为当下研究热点,具有较好的应用前景,但目前发展还尚未成熟。以上方法有各自的优点与缺点,需要结合实际情况选取合适的检测方法。未来,随着科技的不断发展,AFT的检测将由实验室走向现场,由离线分析向原位在线分析转变,并将免疫原理与现代分析技术相结合,研究开发新型食品安全快速检测技术,最终实现AFT便携式一体化高灵敏定量检测,以及分析方法的多样化和智能化,共同维护食品安全。

## 参考文献:

- [1] MAHATO D K, LEE K E, KAMLE M, et al. Aflatoxins in food and feed: an overview on prevalence, detection and control strategies [J]. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10: 2266.
- [2] PICKOVA D, OSTRY V, MALIR F. A recent overview of producers and important dietary sources of aflatoxins [J]. *Toxins*, 2021, 13(3): 186.
- [3] MULYATI A H, SUTANTO, WARNASIH S, et al. Determination of the aflatoxin levels in corn (*Zea mays*, L.) during storage process [J]. *Journal of physics: conference series*, 2021, 1882(1): 012115.
- [4] 吴秀莲, 李梦雪, 孙亚威. 黄曲霉毒素的理化性质及生成因素 [J]. *食品界*, 2017(4): 97, 99.
- [5] 胡冰, 时浩楠, 胡本伦, 等. 食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展 [J]. *中国农业科技导报*, 2022, 24(1): 106-118.
- [6] GURBAN A M, EPURE P, OANCEA F, et al. Achievements and prospects in electrochemical-based biosensing platforms for aflatoxin M<sub>1</sub> detection in milk and dairy products [J]. *Sensors*, 2017, 17(12): e2951.
- [7] 杨晨, 郭蓉, 苏永霞, 等. 黄曲霉毒素及其中毒病的发现与毒性危害监管与防控 [C]. *陕西省毒理学会防控瘟疫与毒物危害学术研讨会*, 2020: 45-51.
- [8] BENKERROUM N. Chronic and acute toxicities of aflatoxins: mechanisms of action [J]. *International journal of environmental research and public health*, 2020, 17(2): 423.
- [9] KHAN R, GHAZALI F M, MAHYUDIN N A, et al. Aflatoxin biosynthesis, genetic regulation, toxicity, and control strategies: a review [J]. *Journal of fungi*, 2021, 7(8): 606.
- [10] HUERTAS-PÉREZ J F, ARROYO-MANZANARES N, HITZLER D, et al. Simple determination of aflatoxins in rice by ultra-high performance liquid chromatography coupled to chemical post-column derivatization and fluorescence detection [J]. *Food chemistry*, 2018, 245: 189-195.
- [11] SHUIB N S, MAKAHLEH A, SALHIMI S M, et al. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products using high performance liquid chromatography-fluorescence with post column photochemical derivatization [J]. *Journal of chromatography A*, 2017, 1510: 51-56.
- [12] ZHAO Y, WANG N, GAO H L, et al. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in lotus seed by high performance liquid chromatography with aptamer affinity column for purification and enrichment [J]. *Chinese journal of analytical chemistry*, 2020, 48(5): 662-669.
- [13] CHRISTOPHER F C, KUMAR P S, CHRISTOPHER F J, et al. Recent advancements in rapid analysis of pesticides using nano biosensors: a present and future perspective [J]. *Journal of cleaner production*, 2020, 269: 122356.
- [14] MUGURUMA Y, NUNOME M, INOUE K. A review on the foodomics based on liquid chromatography mass spectrometry [J]. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 2022, 70(1): 12-18.
- [15] ZAIDON S Z, HO Y B, HAMSAN H, et al. Improved QuEChERS and solid phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in paddy soil and water using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Microchemical journal*, 2019, 145: 614-621.
- [16] CHEN P C, ZHANG W Z, CHEN W R, et al. Engineering an integrated system with a high pressure polymeric microfluidic chip coupled to liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for the analysis of abused drugs [J]. *Sensors and actuators B: chemical*, 2022, 350: 130888.
- [17] OUAHSSASE A, CHAHID A, CHOUBBANE H, et al. Optimization and validation of a liquid chromatography/tandem mass spec-

- trometry (LC-MS/MS) method for the determination of aflatoxins in maize [J]. *Heliyon*, 2019, 5(5): e01565.
- [18] YE Z L, CUI P, WANG Y, et al. Simultaneous determination of four aflatoxins in dark tea by multifunctional purification column and immunoaffinity column coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2019, 67(41): 11481-11488.
- [19] CHEN J N, YE J, LI L, et al. One-step automatic sample pretreatment for rapid, simple, sensitive, and efficient determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by immunomagnetic beads coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food control*, 2022, 137: 108927.
- [20] ZHAO Q, LU D, ZHANG G Y, et al. Recent improvements in enzyme-linked immunosorbent assays based on nanomaterials [J]. *Talanta*, 2021, 223: 121722.
- [21] REN W J, LI Z F, XU Y, et al. One-step ultrasensitive bioluminescent enzyme immunoassay based on nanobody/nanoluciferase fusion for detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in cereal [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2019, 67(18): 5221-5229.
- [22] WANG Q, LEI Y, LU X L, et al. Urea-mediated dissociation alleviate the false-positive *Treponema pallidum*-specific antibodies detected by ELISA [J]. *PLoS one*, 2019, 14(3): e0212893.
- [23] XU Z, LONG L L, CHEN Y Q, et al. A nanozyme-linked immunosorbent assay based on metal-organic frameworks (MOFs) for sensitive detection of aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Food chemistry*, 2021, 338: 128039.
- [24] OKUMA T A, HUYNH T P, HELLBERG R S. Use of enzyme-linked immunosorbent assay to screen for aflatoxins, ochratoxin A, and deoxynivalenol in dry pet foods [J]. *Mycotoxin research*, 2018, 34(1): 69-75.
- [25] TIAN W H, ZHANG X X, SONG M R, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect salinomycin residues based on immunomagnetic bead clean-up [J]. *Food analytical methods*, 2017, 10(9): 3042-3051.
- [26] GAO Y, ZHOU Y Z, CHANDRAWATI R. Metal and metal oxide nanoparticles to enhance the performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *ACS applied nano materials*, 2020, 3(1): 1-21.
- [27] 王序, 卢迪莎, 曾道平, 等. 时间分辨荧光免疫层析法定量检测谷物中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 和玉米赤霉烯酮残留 [J]. *现代食品科技*, 2021, 37(4): 252-261, 291.
- [28] TANG X Q, LI P W, ZHANG Q, et al. Time-resolved fluorescence immunochromatographic assay developed using two idiotypic nanobodies for rapid, quantitative, and simultaneous detection of aflatoxin and zearalenone in maize and its products [J]. *Analytical chemistry*, 2017, 89(21): 11520-11528.
- [29] LI M, WANG H M, SUN J D, et al. Rapid, on-site, and sensitive detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk products by using time-resolved fluorescence microsphere test strip [J]. *Food control*, 2021, 121: 107616.
- [30] WANG Z L, SUN Y Z, LIANG D M, et al. Highly sensitive chromatographic time-resolved fluoroimmunoassay for rapid onsite detection of streptomycin in milk [J]. *Journal of dairy science*, 2020, 103(10): 8750-8760.
- [31] SHENG E Z, TAN Y T, LU Y X, et al. Sensitive time-resolved fluorescence immunoassay for quantitative determination of oxyfluorfen in food and environmental samples [J]. *Frontiers in chemistry*, 2021, 8: 621925.
- [32] 杨艳枫, 王绿音, 梁誉龄, 等. 时间分辨荧光免疫分析法测定人胰岛素生物学活性 [J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(1): 51-59.
- [33] QIN J K, YUAN X, LIU C G, et al. Development of a time-resolved fluoroimmunoassay for measuring plasma growth hormone in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *General and comparative endocrinology*, 2020, 287:

- 113357.
- [34] KAYNAR O, BERKTAS Y. How to choose the right plate for thin-layer chromatography? [J]. *Reviews in analytical chemistry*, 2010, 29(3/4): 129-148.
- [35] 赵亮. 粮油食品中的黄曲霉毒素检测技术分析 [J]. *现代食品*, 2021(14): 47-49.
- [36] 冯莉. 薄层色谱法检测玉米中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> [J]. *现代畜牧科技*, 2018(8): 20.
- [37] SALISU B, ANUA S M, ISHAK W R W, et al. Development and validation of quantitative thin layer chromatographic technique for determination of total aflatoxins in poultry feed and food grains without sample clean-up [J]. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 2021, 8(4): 656-670.
- [38] 邓哲, 荆文光, 刘安. 薄层色谱法在当前中药质量标准中的应用探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(7): 201-206.
- [39] LEE K M, HERRMAN T J, BISLAT Y, et al. Feasibility of surface-enhanced Raman spectroscopy for rapid detection of aflatoxins in maize [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2014, 62(19): 4466-4474.
- [40] PÉREZ-JIMÉNEZ A I, LYU D Y, LU Z X, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy: benefits, trade-offs and future developments [J]. *Chemical science*, 2020, 11(18): 4563-4577.
- [41] LIU S H, WEN B Y, LIN J S, et al. Rapid and quantitative detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in grain by portable Raman spectrometer [J]. *Applied spectroscopy*, 2020, 74(11): 1365-1373.
- [42] QU L L, JIA Q, LIU C Y, et al. Thin layer chromatography combined with surface-enhanced Raman spectroscopy for rapid sensing aflatoxins [J]. *Journal of chromatography A*, 2018, 1579: 115-120.
- [43] NENG J, ZHANG Q, SUN P L. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy in fast detection of toxic and harmful substances in food [J]. *Biosensors and bioelectronics*, 2020, 167: 112480.
- [44] KHANMOHAMMADI A, JALILI GHAZIZADEH A, HASHEMI P, et al. An overview to electrochemical biosensors and sensors for the detection of environmental contaminants [J]. *Journal of the Iranian chemical society*, 2020, 17(10): 2429-2447.
- [45] BAKIRHAN N K, TOPAL B D, OZCELIKAY G, et al. Current advances in electrochemical biosensors and nanobiosensors [J]. *Critical reviews in analytical chemistry*, 2022, 52(3): 519-534.
- [46] YAN C, YANG L J, YAO L, et al. Ingenious electrochemiluminescence bioaptasensor based on synergistic effects and enzyme-driven programmable 3D DNA nanoflowers for ultrasensitive detection of aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Analytical chemistry*, 2020, 92(20): 14122-14129.
- [47] SINGH A K, DHIMAN T K, V S L G B, et al. Dimanganese trioxide (Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) based label-free electrochemical biosensor for detection of aflatoxin-B<sub>1</sub> [J]. *Bioelectrochemistry*, 2021, 137: 107684.
- [48] VILLALONGA A, SÁNCHEZ A, MAYOL B, et al. Electrochemical biosensors for food bioprocess monitoring [J]. *Current opinion in food science*, 2022, 43: 18-26.
- [49] WILLIAMS D E. Electrochemical sensors for environmental gas analysis [J]. *Current opinion in electrochemistry*, 2020, 22: 145-153.
- [50] LIU D, LI W J, ZHU C X, et al. Recent progress on electrochemical biosensing of aflatoxins: a review [J]. *TrAC trends in analytical chemistry*, 2020, 133: 115966.

(责任编辑 姚玮华)