

色谱检测技术应用于稻谷真菌毒素检测的方法研究

辛迪薇, 胡 春

江西省食品检验检测研究院, 江西南昌 330000

【摘要】随着生活水平的提高, 越来越多人开始意识到食品安全的重要性, 在可能影响食物品质与安全性的因素中, 真菌毒素的毒害性明显大于其他因素。作为真菌代谢的产物, 真菌毒素往往会随着食物进入人体, 并给人体器官造成危害, 如何对其进行高效检测, 自然成为人们关注的焦点。文章以此为背景, 首先介绍了常见真菌毒素的特点与产生条件, 其次对真菌毒素所适用检测技术进行了说明, 包括荧光光度计、酶联免疫以及色谱检验, 最后以色谱检测为切入点, 围绕如何利用该方法对稻谷所含真菌毒素进行检测展开了讨论, 内容主要涉及检测流程、方法和结果分析等方面, 供相关人员参考。

【关键词】稻谷检测; 真菌毒素; 色谱检测; 加标回收率

【中图分类号】TS210.7;O657.33 **【文献标识码】**A **【DOI】**10.12325/j.issn.1672-5336.2022.18.012

引言

水稻不仅是世界各国的主要粮食作物, 还是我国重点储备的作物。稻谷往往含有多种微生物, 对其进行储藏期间, 极易由于储藏不当导致微生物快速繁衍, 进而使稻谷所含真菌毒素超出安全范围。考虑到真菌毒素会给人体健康造成危害, 有关人员指出应对其进行快速且准确的检测, 根据检测结果判断稻谷品质, 避免真菌毒素超标的稻谷流入市场, 真正做到从源头处制止安全事件发生。

1 研究背景

近几年, 社会各界纷纷将目光聚焦于食品安全领域。本世纪初, 俄罗斯曾发生大规模中毒事件, 多数中毒者均表现出了白细胞缺乏的症状, 本世纪中旬, 美国曾有大量动物因患急性肝炎而死亡, 同一时期, 国内发生了霉甘蔗中毒、赤霉病中毒、霉玉米中毒等事件, 上述事件均与食物所含真菌毒素密切相关^[1]。由此可见, 眼下的主要工作便是对检测真菌毒素所适用方法进行研究, 细化检测流程并对检测准确性、可靠性进行提高, 只有尽快掌握更加高效的检测方法, 才能使食品安全事件发生率降至最低。

研究表明, 食物所含真菌毒素普遍会表现出下列特征: 一是难溶或不溶于水, 但能够溶于甲酸、甲醇或是乙腈等溶剂。二是真菌毒素的影响会在人体内多个器官进行累积, 给身体健康造成不可逆的伤害。以呕吐毒素为例, 该毒素将直接作用于口腔黏膜及肠胃, 导致人体免疫力、消化功能被削弱。

2 真菌毒素介绍

2.1 常见毒素特点

真菌毒素指的是真菌代谢所产生有毒产物。食物所含真菌毒素类型较多, 包括但不限于 AFS、T-2 等。其中, AFS-B1、B2 会在紫外线的照射下发出蓝色荧光, AFS-G1、G2 则会发出绿色荧光, 该类毒素通常无法溶于水, 但能够快速溶于丙酮、油等有机溶剂^[2]。展青霉素的致突变性、致癌性还有致畸性较强, 腐烂的山楂和苹果等农作物中, 通常含有大量展青霉素。呕吐毒素会损伤口腔黏膜及真皮, 摄入量超出人体所能代谢的范围后, 人体将出现免疫力低下、肠胃功能紊乱等问题, 该类毒素在稻谷、玉米中的浓度相对较高。近年新发现的伏马毒素多为白色粉末状, 既能够溶于水, 又可以溶于乙腈水和甲醇。青霉菌、赭曲霉菌代谢所产生赭曲毒素共包含 7 类化合物, 该类毒素具有无色、性质稳定的特点, 可溶入由碳酸氢钠所配置的溶液, 一旦人体内赭曲毒素浓度超出允许范围, 便会增加肾脏、肝脏病变概率。T-2 在自然界十分常见, 可给畜禽、人体造成严重危害, 该毒素往往作用于生殖腺、胸腺等器官, 导致上述器官无法合成 DNA 以及蛋白质, 另外, 该毒素还会增加 DNA 单链断裂的概率, 这点同样需要有所了解^[3]。

2.2 毒素产生条件

国外学者对稻谷中真菌毒素的分布情况进行了研究, 发现多数真菌毒素均聚集在稻谷表层或表面。国内学者则选择从稻谷储藏环境、温度等方面出发, 对毒素产生条件进行说明, 指出储藏环境和毒素含量密切相关, 要

作者简介:辛迪薇(1991—), 女, 汉族, 江西省宜春市, 本科, 助理工程师, 研究方向: 食品检测。

想保证稻谷品质达标,关键是要对储藏温度、空气湿度加以控制,若将稻谷储藏在 $5^{\circ}\text{C}\sim 15^{\circ}\text{C}$ 的环境下,其所含真菌毒素总量往往不会出现明显变化,如果储藏温度提高到 25°C 以上,毒素总量将有所增加,且总量增速与温度提升幅度的关系为正相关^[4]。

3 真菌毒素检测技术

3.1 荧光光度计

该方法与其他方法的区别,主要在于其不需要接触毒素,同时也不需要毒素进行标样,除特殊情况外,均无需用到有机试剂,操作难度较小。需要注意的是,该方法对检测所用试剂、水所提出要求较高,只有检测用水为高纯水,才能确保检测结果具有实际意义。此外,该方法还存在较为明显的局限性,以黄曲霉毒素为例,该方法仅能对毒素总量进行检测,而无法判断各类毒素的具体含量。

3.2 酶联免疫

该方法同样以免疫化学为基础,对该方法加以利用,通常可省略前期净化步骤,有关人员只需借助酶标仪、微孔板便能够对样品进行分析,具有便于操作和成本低廉的优势,主要被用于检测大量阴性样品。考虑到稻谷在生产、运输和储藏期间均有可能产生真菌毒素,且已知真菌毒素种类已达到150种,上述方法所能起到作用十分有限,对更加先进且高效的检测方法进行研究,便成为业内人士的主要工作^[5]。

3.3 色谱检测

3.3.1 液相色谱法

液相色谱的本质为高沸点化合物,具有挥发性差、稳定性差的不足。相关检测设备可被拆分成高压泵、液相色谱柱等部分,在灵敏度方面的表现较为突出,通常被用来检测对甲胺磷化物及其他高聚物、离子化合物。

3.3.2 气相色谱法

气相色谱有效弥补了液相色谱所存在的不足,现已在诸多领域得到运用。实践证明,该方法可通过分离有机物的方式,快速得出最终结果,同时保证检测灵敏度符合要求^[6]。例如,检测对硫化物、磷化物或其他分解难度大,且较易被汽化所影响的物质,再例如,检测肉桂类所含三甲胺。

3.3.3 气质联合法

该方法强调对色谱、质谱进行结合,优势在于能够快速定位,并保证定位精准,但并不适用于农产品,这是因为农产品所含物质较为复杂,利用该方法极易造成检测结果与实际不符的情况^[7]。

3.3.4 液质联用法

该方法与上述方法的区别,主要在于其同时使用了质谱与液相色谱,质谱负责检测,液相色谱负责分离。检测流程大致如下:先通过质谱对样品、流动相进行分析,待离子化处理告一段落,再根据质量数对离子碎片进行整理,结合质量分析器所提供参数,生成相应的质谱图^[8]。利用该方法检测兽药,可使灵敏度及选择性达到理想水平。

4 稻谷真菌毒素色谱检测研究

4.1 检测流程

对样品进行色谱检测前,先要对加标回收率进行设置(通常在 $90\%\sim 110\%$ 间),再以实际情况为依据,通过加入混合溶液的方式,对检测误差加以控制,为检测结果所具有准确性提供保障^[9]。随后,对样品进行分组并配置标准溶液。检测期间应根据样品特性,对加标回收率做出调整,保证回收率精确且有实际意义。对于回收率不达标的样品,有关人员应对其进行再次检验,进而得出最终的结论。

4.2 检测方法

4.2.1 准备设备及样品

对稻谷所含真菌毒素进行色谱检测前,先要确定检测所用设备。为保证检测所得结果可靠且准确,有关人员决定使用1260液相色谱仪。另外,检测前还要前往市场采购检测所需稻谷,同时准备检测所需毒素标准液,乙腈、乙醇以及甲醇^[10]。

4.2.2 检测步骤

第一步,确定标准溶液体积,对不同毒素溶液进行配置,确保所配置溶液符合检测标准。随后,按照1:1的比例,对所配置溶液进行稀释。该环节应注意一点,即根据溶液特性选择稀释所用物质,在本项目中,有关人员计划利用水、甲醇进行稀释,保证稀释所得溶液可满足标准工作液的条件。第二步,利用粉碎机对稻谷进行预处理,称取4g稻谷样品,将样品放置在四个容器内,保证各容器体积和所处环境完全相同。第三步,依次向容器内加入标准液,充分混合后,便可获得检测样品。第四步,利用色谱仪对各样品所含真菌毒素的实际波长进行检测,OTA的波长是460nm,ZEN的波长同样为460nm,DON与T-2毒素的波长是0。上述真菌毒素的激发波长依次是330nm,275nm,220nm和200nm^[11]。

对稻谷样品进行检测所使用色谱柱,通常要满足两个条件,一是流动相A对应甲醇+乙腈溶液,二是流动相B对应乙酸溶液,同时该溶液的浓度应达到0.1%。实验前11min的流动相中,A的占比为35%,实验12min~23min的流动相中,A的占比为55%,实验

24min ~ 38min 的流动相中, A 的占比为 35%。

4.2.3 提取并净化样品

将 4g 加标样品转移到提前准备好的离心管内, 向离心管内倒入 20mL 浓度为 80% 的乙腈溶液, 将离心管放到旋转振荡床上, 启动设备并等待 30min, 对经过振荡的离心管进行离心处理, 该项操作应在常温环境下完成, 转速以 4000r/min 为最佳, 旋转时长不得短于 10min。最后, 吸取离心管上层清液, 称取 2mL 清液并转移到指定容器内, 利用 33mL 的磷酸缓冲液对其进行稀释, 充分混合即可^[12]。

4.3 检测结果

对真菌毒素进行液相检测所用流动相, 多以乙腈、甲醇或是混合液为有机相。本项目所用流动相为甲醇 + 乙腈以及浓度为 0.1% 的乙酸溶液, 研究证实, 要想使流动相达到最佳, 关键是要根据实验进行时间, 对其配比进行调整, 例如, 在 11min 以内, 应使用 35%A+65%B 的组合, 12min ~ 23min 之间, 应使用 55%A+45%B 的组合, 24min ~ 38min 之间, 应回归 35%A+65%B 的组合^[13]。

本项目对样品进行提取并净化的方式, 在提高检测结果所具有准确性方面发挥着重要作用。具体做法如下: 第一步, 将样品与乙腈水溶液充分混合。第二步, 对混合所得溶液进行振荡、离心, 吸取上层清液。第三步, 稀释所吸取清液, 待稀释所得稀释液通过指定亲和柱, 再按照①清洗②洗脱③干燥④定容的步骤进行处理^[14]。

计算可知, 本项目所检测真菌毒素实际回收率均能够达到安全要求, OTA 回收率在 93.7% 左右, ZEN 的回收率约为 114.3%, DON 的回收率可达 90.0%, 而 T-2 的回收率为 96.7%。由此可见, 对真菌毒素进行色谱检测所得结果, 在辨识度、准确性方面均有突出表现, 另外, 该方法所需时间明显少于其他方法, 未来可大范围进行推广。

4.4 注意事项

对技术指标进行选择时, 应重点关注两方面内容, 一是检出限是否符合样品特性; 二是指标是否具备良好的稳定性、重复性以及敏锐性。检测期间, 部分厂家将以检测对象为依据, 提供相应的检出限, 导致样品被分成多份, 这一做法有较大概率致使检测结果和实际情况不符^[15]。若有关人员决定使用大规模检测仪, 则要提前了解设备性能及特点, 结合前期调研所掌握资料, 对检测方法和各项参数加以确定。

5 结束语

分析可知, 通过色谱技术对稻谷所含真菌毒素进行检测, 一方面能够保证检测灵敏、辨识度强且回收率符合要求, 另一方面可大幅提升检测速度。由此可见, 色

谱检测在毒素检测领域具有其他方法所不具备的优势, 可对其进行大范围运用, 由此为食物安全提供有力保障。

参考文献:

- [1] 马青青, 张二鹏, 冯光伟, 等. 粮食及其制品中真菌毒素检测及风险评估技术的研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(05): 636-640.
- [2] 邓新煜, 张健希, 张京华, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测食品中 15 种真菌毒素含量 [J]. 食品安全导刊, 2021(20): 69-73.
- [3] 栾玉静, 王瑞花, 张大伟. 同位素内标-高效液相色谱-串联质谱法检测常见食品样品中 15 种真菌毒素 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 3970-3983.
- [4] 陈鑫璐, 张建友, 丁玉庭, 等. 国内外谷物中多种真菌毒素限量和同步检测标准及方法研究进展 [J]. 中国粮油学报, 2021, 36(12): 194-202.
- [5] 吕都, 唐健波, 姜太玲, 等. 基于近红外光谱技术快速检测稻谷水分含量 [J]. 食品与机械, 2022, 38(02): 51-56+63.
- [6] 温冯睿, 关海鸥, 马晓丹, 等. 近红外光谱图像处理的霉变稻谷检测方法 [J]. 光谱学与光谱分析, 2022, 42(02): 428-433.
- [7] 赵琳, 乔昀. 荧光染色法在真菌检测中的应用 [J]. 检验医学, 2021, 36(12): 1219-1221.
- [8] 刘纪伟, 张婉婷, 任秋涵, 等. 基于高光谱成像技术的稻谷中霉菌定量检测及模型建立 [J]. 粮食科技与经济, 2021, 46(05): 82-88.
- [9] 张海洋, 田琳, 祁智慧, 等. 储粮真菌自动检测仪的研究与开发 [J]. 粮油食品科技, 2021, 29(04): 181-186.
- [10] 李玲, 何薪宇, 李世芳, 等. 真菌鉴别和检测的 SERS 光谱技术研究进展 [J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(06): 1661-1668.
- [11] 田琳, 张海洋, 祁智慧, 等. 储藏稻谷及糙米表面霉菌检测情况的分析比较 [J]. 中国粮油学报, 2021, 36(08): 101-107.
- [12] 张庆, 赵晓美, 王婷, 等. 食品中产毒真菌核酸检测方法的研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(03): 91-98.
- [13] 徐秀兰, 尚兴朴, 马丽娟, 等. 甘草种子携带真菌检测与致病性分析 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(12): 2043-2048.
- [14] 黄铭仕. 关于粮油中真菌毒素检测技术分析及其应用探讨 [J]. 现代食品, 2020(18): 162-164.
- [15] 张美玲, 秦丽莹. 稻谷新陈度检测方法研究进展 [J]. 粮食科技与经济, 2020, 45(02): 70-73.