

农产品质量安全分析技术丛书



农产品中真菌毒素的 检测分析

张艺兵 鲍 蕾 褚庆华 主编



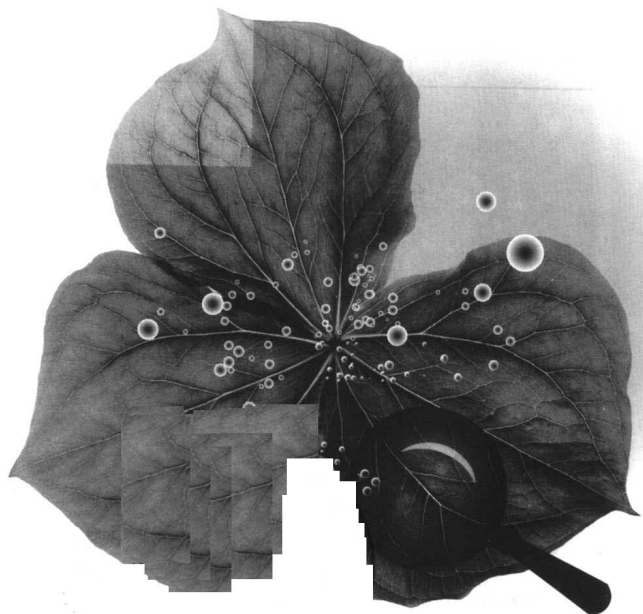
化学工业出版社

农产品质量安全分析



农产品中真菌毒素的 检测分析

张艺兵 鲍 蕾 褚庆华 主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

农产品中真菌毒素的检测分析/张艺兵, 鲍蕾, 褚庆
华主编. 北京: 化学工业出版社, 2005. 12
(农产品质量安全分析技术丛书)
ISBN 7-5025-8127-8

I. 农… II. ①张…②鲍…③褚… III. 农产品-真
菌毒素-检验 IV. TS207

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 157915 号

农产品质量安全分析技术丛书
农产品中真菌毒素的检测分析
张艺兵 鲍蕾 褚庆华 主编
责任编辑: 杜进祥 陈蕾
责任校对: 于志岩
封面设计: 尹琳琳

*

化学工业出版社出版发行
(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)
购书咨询: (010)64982530
(010)64918013
购书传真: (010)64982630
<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销
北京永鑫印刷有限责任公司印刷
三河市延风装订厂装订
开本 850mm×1168mm 1/32 印张 9 1/4 字数 267 千字
2006 年 2 月第 1 版 2006 年 2 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-8127-8
定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

《农产品中真菌毒素的检测分析》

编写人员名单

主 编 张艺兵 鲍 蕾 褚庆华

编写人员 (按拼音排序)

鲍 蕾 褚庆华 门爱军

王 雄 张鹏均 张艺兵



出版者的话

提高农产品质量,保障农产品生产和消费安全,现已成为各级政府和农业部门的共识。我国正在逐步完善法规制度,加大依法监管力度。特别是近年来加大了与农产品质量安全密切相关的农药、兽药、饲料和饲料添加剂等管理法规的修订力度,发布了《无公害农产品管理办法》。同时,启动了《农产品质量安全法》立法进程。

近年来,我国由于农残不合格等导致的农、牧、水产品出口受阻屡屡发生,其最根本的原因是农产品安全检测方法和仪器达不到国外标准的要求。

为了将农产品的生产、加工、经营行为纳入法制管理轨道,为农产品质量安全监管工作提供法律依据。2005年10月24日下午,十届全国人大常委会第十八次会议分组审议《农产品质量安全法》草案。会议提出:农产品质量安全问题,直接关系到人民群众的身体健康、生命安全和生活质量。党和国家对农产品的质量安全非常重视。通过近几年的努力,我国农产品质量安全的监管工作已有所改善,但是农产品质量安全形势还依然严峻。制定农产品质量安全法,不仅维护人民群众的身体健康,促进农业和农村经济发展,而且将进一步提高我国农产品的国际竞争力,因此制定这部法非常必要也非常及时。

为配合《农产品质量安全法》的实施,化学工业出版社与中国仪器仪表学会农业仪器应用技术学会合作,组织编写出版《农产品质量安全分析技术丛书》。以解决农产品检测中样品基质背景复杂、前处理过程繁琐,需要耗费较多的时间、被测成分浓度较低、分析仪器的定性能力受到限制、仪器检测灵敏度不够等一系列问题。这套丛书将于2006年陆续出版,是我国第一套农产品质量安全分析技术丛书,可作为《农产品质量安全法》的相关参考用书。

希望这套丛书的出版能对提高农产品质量,保障农产品的生产和消费安全起到一定的促进作用。

化学工业出版社
2006年2月

前 言

真菌毒素是一类天然产生的生物毒素，从古至今一直对人类、动物和植物具有巨大的潜在威胁。随着人类社会的发展，人类对自然资源的开发利用和破坏，真菌毒素产生的危害性越来越大，被人类认识也越来越多。从20世纪70年代中期到现在，科学家们利用分子生物学、生物工程、分子毒理学、免疫化学、仪器分析等现代化的手段对真菌毒素的产生、毒理毒性、作用机理、真菌毒素的超微量分析、真菌毒素在各种商品中的存在状况进行了更加深入地研究，从而将真菌毒素学带入到成熟阶段。现在对真菌毒素关注与研究的意义主要表现为：社会公众、媒体、政府对食品安全的关注，真菌毒素对人类健康的影响；真菌毒素对经济动物和家禽的疾病和死亡的影响，对养殖和食用造成的危害；真菌毒素对农作物引发疾病，导致减产和品质下降，造成巨大的经济损失；国际贸易中作为技术壁垒的调节杠杆；在国际反恐和战争中，防止作为具有大规模杀伤力的生化武器。

改革开放以来，中国的市场经济有了巨大的发展，随着中国加入了WTO，农产品大批进入国际市场。但近几年我们出口的农产品特别是花生遭遇到了欧盟、日本等一些国家设置的技术壁垒，他们对真菌毒素特别是黄曲霉毒素的限量标准提出了苛刻的要求，对我国的出口业务产生了很大影响。作者多年来一直工作在真菌毒素分析与进出口农产品管理的岗位上，深感有必要通过深刻全面系统地总结自己过去的工作，编写一本比较全面介绍真菌毒素的危害及其检测方法的书。

本书共分四章，系统介绍了真菌毒素的产生，真菌毒素对农作物、动物和人类的危害，农产品中真菌毒素的污染状况和世界各国制定的有关限量标准，产毒真菌和真菌毒素对农业生产的影响以及防范、控制、脱毒的方法，真菌毒素包括黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 、 M_1 ，赭曲霉毒素A，伏马菌素，玉米赤霉烯酮，呕吐毒素，T-2毒素，展青毒素的分析方法。考虑到真菌毒素分析目前在国际贸易中的重要性，本书还特别编写了中国花生出口、破解欧盟技术壁垒的案例分析。本书可供出入境检验检疫、疾病预防控制（食品安全与营

养)、农产品安全检测、产品质量监督检验政府实验室和食品企业品管部、第三方实验室的技术人员参考,也可供与食品安全检测相关的学校专业、培训机构、科研人员作为参考。

本书在编写的过程中,得到了国内外许多专家的帮助,在此表示衷心的感谢! 由于编者的水平有限,在编写过程中难免有不妥之处,敬请读者批评指正。

编 者

2006 年 1 月

目 录

第一章 概论

第一节 真菌毒素	/001
第二节 黄曲霉毒素	/005
第三节 赭曲霉毒素	/007
第四节 伏马菌素与呕吐毒素	/008
一、伏马菌素	/008
二、呕吐毒素	/010
第五节 展青霉素与玉米赤霉烯酮	/011
一、展青霉素	/011
二、玉米赤霉烯酮	/013
第六节 T-2 毒素与杂色曲霉毒素	/014
一、T-2 毒素	/014
二、杂色曲霉毒素	/016
第七节 青霉素与交链孢霉毒素	/017
一、青霉素	/017
二、交链孢霉毒素	/017
第八节 3-硝基丙酸与烟曲霉毒素	/020
一、3-硝基丙酸	/020
二、烟曲霉毒素	/021
第九节 二乙酸镰刀菌烯醇、橘青霉素、麦角	/023
一、二乙酸镰刀菌烯醇	/023
二、橘青霉素	/024
三、麦角	/025
第十节 真菌毒素对人类和动物健康的影响	/028
一、真菌毒素与人类疾病	/028
二、真菌毒素对免疫系统的影响	/031
三、对造血功能的影响	/031
四、肝脏中毒症	/032

五、肾脏中毒症	/035
六、对生殖能力的影响	/036
七、致畸效应	/038
八、神经中毒症	/038
九、致癌效应	/041
十、皮肤中毒症	/041
十一、协同作用	/042

第二章 农产品中真菌毒素的污染及限量标准

第一节 黄曲霉毒素的污染及限量标准	/050
第二节 赭曲霉毒素 A 的污染及限量标准	/058
第三节 伏马菌素的污染及限量标准	/064
第四节 呕吐毒素的污染及限量标准	/068
第五节 玉米赤霉烯酮的污染及限量标准	/074
第六节 T2 毒素的污染及限量标准	/078
第七节 展青霉素的污染及限量标准	/080

第三章 产毒真菌和真菌毒素对农业生产的影响

第一节 概述	/083
第二节 曲霉属的感染和产毒机理	/084
第三节 镰刀菌属的感染和产毒机理	/091
第四节 青霉属真菌的感染和真菌毒素的产生	/100
第五节 麦角菌和内生植物真菌的感染和真菌毒素的产生	/104
第六节 收割与储藏技术	/108
第七节 真菌之间、真菌和真菌毒素之间的相互作用	/112
第八节 减低真菌毒素污染的良好农业操作规范	/113
一、减低谷物中真菌毒素的措施	/113
二、减低乳及乳制品中黄曲霉毒素 M ₁ 的措施	/115
三、减低苹果及其制品中层青霉素的措施	/116
第九节 真菌毒素的脱毒方法	/118
一、物理分离方法	/119
二、物理去毒方法	/120
三、生物灭活方法	/121
四、化学去毒方法	/123

第四章 真菌毒素的分析方法

第一节 黄曲霉毒素的分析方法	/129
一、概述	/129
二、免疫亲和柱净化-柱后衍生化-高效液相色谱法	/134
三、免疫亲和净化-荧光光度计法	/139
四、多功能柱净化-柱后衍生化-高效液相色谱法	/140
五、酶联免疫吸附(ELISA)法	/145
六、薄层色谱法	/148
第二节 黄曲霉毒素 M ₁ 的分析方法	/158
一、薄层色谱法(TLC)(GB/T 5009.24—2003)	/159
二、酶联免疫吸附法(ELISA)	/164
三、免疫亲和柱层析净化高效液相色谱法和免疫亲和 柱层析净化荧光光度法(GB/T 18980—2003)	/166
四、高效液相色谱法(HPLC)	/175
第三节 赭曲霉毒素 A 的分析方法	/179
一、薄层色谱法	/179
二、酶联免疫吸附法	/183
三、免疫亲和柱层析净化高效液相色谱法和免疫亲和 柱层析净化荧光光度法	/189
四、多功能柱层析净化高效液相色谱法	/196
五、高效液相色谱法(HPLC)	/199
第四节 伏马菌素的分析方法	/204
一、用免疫亲和柱净化-高效液相色谱法测定玉米和玉米 制品中的伏马菌素	/204
二、用免疫亲和柱净化-荧光计法快速测定农产品中的 伏马菌素	/209
三、用酶联免疫吸附法筛选检测伏马菌素	/214
第五节 呕吐毒素的分析方法	/217
一、用气相色谱法测定小麦中的呕吐毒素	/217
二、用免疫亲和柱净化-高效液相色谱法测定小麦和玉米 中的呕吐毒素	/220
三、用特效固相分离柱净化-荧光计快速检测农产品中的 呕吐毒素	/222

四、用薄层色谱法测定小麦中的呕吐毒素	/226
五、用酶联免疫吸附法测定粮谷和饲料中的呕吐毒素	/230
第六节 展青霉素的分析方法	/234
一、概述	/234
二、液液萃取-高效液相色谱法检测果汁中的展青霉素	/234
三、固相萃取-高效液相色谱法检测果汁中的展青霉素	/237
四、薄层色谱法	/239
第七节 玉米赤霉烯酮的分析方法	/241
一、薄层色谱法 (TLC) (AOAC 官方方法 976. 22)	/242
二、酶联免疫吸附法	/244
三、免疫亲和柱层析净化高效液相色谱法和免疫亲和柱层析净化荧光光度法	/251
四、多功能柱层析净化 高效液相色谱法	/255
五、高效液相色谱法 (HPLC) (AOAC 官方方法 985. 18)	/258
第八节 T 2 毒素的分析方法	/260
一、免疫亲和柱净化 柱前化学衍生 高效液相色谱法检测粮谷中 T-2 毒素	/261
二、多功能柱净化结合 TLC 法检测粮谷中的 T 2 毒素	/263
三、酶联免疫吸附测定法	/264

附录 中国花生出口破解欧盟技术壁垒案例分析

参考文献

第一章

概 论

第一节 真菌毒素

真菌毒素 (Mycotoxin) 一词源于希腊语 “Mykes” 和拉丁语 “Toxicum”，它是由产毒真菌在适宜的环境条件下产生的有毒代谢产物。真菌是一类营养体，通常为分枝的丝状体，有细胞壁，不含叶绿素，没有根、茎和叶，异养型生存（腐生或寄生），菌落大多呈棉絮状、绒毛状或粉状，以产生孢子的方式繁殖的真核生物。霉菌并不是分类学上的名称，而是菌丝体发达而又不形成较大子实体的一部分真菌的俗称。粮食和饲料的污染主要与这类霉菌有关，所以在粮食卫生学和饲料卫生学领域，人们通常将真菌毒素俗称为霉菌毒素 (Mold Toxins)。

人类最早了解的真菌毒素中毒症是麦角中毒，公元前 430 年至 18 世纪的欧洲大陆，人们因为食用严重污染了麦角菌的黑麦而发生麦角中毒，造成了成千上万人致残、丧生。直至 1950 年前，科学家们的研究是从一些导致真菌中毒症的粮食和饲料中分离出许多产毒真菌，然后将其置于无菌的粮食或者培养基中进行产毒，用产毒产物进行动物试验，观察其病症。这个时期是真菌毒素学的萌芽阶段。1950~1975 年，科学家们已经分离出了许多真菌毒素，了

解到了这些真菌毒素与中毒症之间的相互关系。1955 年 Forgas 和 Carll 第一次采用了真菌毒素中毒 (Mycotoxycosis) 这个词语, 意为由真菌引起的疾病, 但是它不包括蘑菇中毒, 因为蘑菇中毒是真菌菌体作为食品有意食用而引起的。1960 年英国发生了 10 万多只火鸡突然中毒死亡事件, 研究发现火鸡饲料中的花生粉中含有一种荧光物质是导致火鸡死亡的病因, 这种荧光物质被证实为黄曲霉的代谢产物, 故命名为黄曲霉毒素 (Aflatoxins)。随后引发推动了科技界对真菌毒素广泛、系统地研究, 同时真菌毒素 (Mycotoxin) 这个词也随之诞生了。从而建立了真菌毒素学 (Mycotoxicology) 的基础, 使这门边缘科学逐步兴旺发展起来。从 20 世纪 70 年代中期到现在, 科学家们利用分子生物学、生物工程、分子毒理学、免疫化学、仪器分析等现代化的手段对真菌毒素的产生、毒理毒性、作用机理、真菌毒素的超微量分析、真菌毒素在各种商品中的存在状况等进行了更加深入地研究, 从而将真菌毒素学带入成熟阶段。

今天对真菌毒素关注与研究的意义主要表现为: ①社会公众、媒体、政府对食品安全的关注, 真菌毒素对人类健康的影响。②真菌毒素对经济动物和家禽的疾病和死亡的影响, 对养殖和食用造成的危害。③真菌毒素对农作物引发疾病, 导致减产和品质下降, 造成巨大的经济损失。④国际贸易中作为技术壁垒的调节杠杆。⑤在国际反恐和战争中, 防止真菌毒素作为具有大规模杀伤力的生化武器。

真菌毒素的概念比较宽泛, 根据天然存在的情况可以分成几大类, 其中许多实际上是作为有毒的化学物质而引起人类和动物疾病产生的 (见表 1-1)。现在还不能准确地确定到底存在有多少种有毒的二次代谢物或真菌毒素。但了解食品和饲料中真菌毒素的存在和分布状况是十分重要的, 因为如果对生物活体的暴露量不确定, 在解释动物和人类慢性病的病因学时, 可能会产生许多的混淆与误解。近年来, 对一些真菌代谢物和真菌毒素一个粗略的评估已完成, 1978 年 Turner 将由约 500 种真菌物种产生约 1200 种二次真菌代谢物进行了分类。1983 年 Turner 和 Alderidge 将由约 1100 种

表 1-1 存在有真菌毒素的商品和对动物和人类健康的影响作用

真菌毒素	被污染的商品	真菌毒素影响作用	
		受影响的动物	产生的病症
黄曲霉毒素 (B ₁ 、B ₂ 、G ₁ 、G ₂ 、M ₁ 、M ₂)	花生、玉米、小麦、大米、棉花籽、干椰子核、坚果、牛奶、禽蛋、奶酪、无花果	鸟类：雏鸭、雏鸡、火鸡、鹌鹑； 哺乳动物：小猪、狗、牛、羊、猫、猴子、人类；鱼类	肝中毒（肝损伤）、出血（肠胃、肾）、致癌（肝癌）
橘霉素	谷物（小麦、大麦、玉米、大米）	猪、狗	肾中毒（肾管坏死）、猪肾病变
圆弧偶氮酸	玉米、花生、奶酪、小米	鸡、火鸡、猪、老鼠、天竺鼠、人类	肌肉坏死、肠出血、水肿、口腔病变
赭曲霉毒素 A	谷物（小麦、大麦、燕麦、玉米）、干豆、发霉的花生、奶酪、猪组织、咖啡、葡萄干、葡萄、干果、酒	猪、狗、雏鸭、鸡、老鼠、人类	肾中毒（肾管坏死）、猪肾病变、温性肝损伤、肠炎、致畸、致癌（肾癌）、尿道癌
展青霉	发霉的饲料、烂苹果、苹果汁、麦秸秆渣	鸟类：鸡、鸡胚胎、鹌鹑； 哺乳动物：猫、牛、老鼠、兔、人类； 其他：盐水虾、小斑马鱼	浮肿（脑、肺）、出血、肺病、毛细管损伤（肝、脾、肾）、运动神经麻痹、痉挛、致癌
青霉酸	陈化玉米、谷物、干豆、发霉的番茄	老鼠、鸡胚胎、鹌鹑、盐水虾	肝损伤（脂肪肝、细胞坏死）、肾损伤、类似毛地黄对心脏的作用、血管扩张、尿堵塞、兔皮肤浮肿、致癌
Penitrem	发霉的奶酪、英国胡桃、汉堡面包、啤酒	狗、老鼠、人类	颤动、死亡、不协调、带血腹泻
柄曲霉素	绿咖啡、发霉的小麦、谷物、硬奶酪、豌豆、棉花籽	老鼠	致癌、肝中毒
单端孢菌毒素 (T-2 毒素、蛇形菌素、neosolaniol、瓜萎镰菌醇、双乙酰瓜萎镰菌醇、脱氧瓜萎镰菌醇、HT-2 毒素、fusarenon X)	玉米、小麦、牛饲料、混合饲料、大麦、燕麦	猪、牛、鸡、火鸡、马、狗、老鼠、猫、人类	消化紊乱（呕吐、腹泻、拒食）、出血（胃、心脏、肠、肺、膀胱、肾）、浮肿、口腔病变、皮炎、血液紊乱（白血球减少症）
玉米赤霉烯酮	玉米、发霉的干草、丸粒饲料	猪、奶牛、鸡、火鸡、羔羊、老鼠、大母猪	雌性化（阴户浮肿、阴道下垂、子宫增大）、睾丸萎缩、卵巢萎缩、流产

真菌物种产生约 2000 种二次真菌代谢物进行了分类。所以, 平均估计每个真菌物种大约可以产生两个单一的二次代谢物。

1991 年 Hawksworth 估计已知的真菌物种有 69000 个, 它们只代表了世界上所有真菌物种 (约 150 万种) 的 5%, 保守估计是 10 万种的数量级以上。根据 Hawksworth 的估计数, 每个真菌物种可以产生两个单一的二次代谢物, 那么就存在三百万个单一的二次代谢物, 保守估计也有 20 万个。1971~1983 年, 已知的二次代谢物数量从 1200 个增加到 3200 个。假设继续保持这样的增长速率 (有文献发表的), 2002 年应该有 6000 种左右的真菌二次代谢物。很明显, 没有发现的二次代谢物准确数量的确还十分巨大。1981 年 Cole 和 Cox 列出了约 300 种二次代谢物是真菌毒素, 他们将 1978 年 Turner、1983 年 Turner 和 Alderidge 统计的真菌二次代谢物的 10% 归类为真菌毒素。所以大约可能存在有 2 万~30 万种单一的真菌毒素。毒性的机理也是千差万别、各不相同。

真菌毒素暴露的途径一般是因为被污染的食品和饲料被人和动物摄取。当然皮肤和吸入也是重要的暴露途径。真菌毒素直接的危害是, 由于毒素的暴露而引发急性疾病, 在死亡之前会出现严重的症状。这些严重的症状显然与高水平真菌毒素的暴露有关。另一方面, 由于长期低水平真菌毒素的暴露而导致许多神秘症状 (如生长减慢、免疫功能下降、抗病能力差、产奶产蛋率降低) 和慢性疾病的产生 (如肿瘤的形成)。低水平的暴露需要引起人们足够的重视, 食品和饲料的质量越好, 它们含有的真菌毒素就越低。如果某一人群的饮食主要依赖于某单一食品, 则对低水平的暴露应该引起更大的关注。因为如果单一食品被污染, 则在一定时期内, 真菌毒素对这个消费群体的暴露量将大于可以消费多种食品的其他人群。不同种类动物对不同种类的真菌毒素的敏感程度有很大的差别, 而且与年龄、性别、血缘和营养状况有关。真菌毒素对人类的间接暴露也是经常存在的, 如消费的牛奶、禽蛋、内脏组织等食品中可能存在有真菌毒素残留物和代谢物。

第二节 黄曲霉毒素

黄曲霉毒素可以由曲霉菌黄曲霉、寄生曲霉、集峰曲霉和伪溜曲霉 4 种产生，是一组化学结构类似的二呋喃香豆素的衍生化合物，目前已分离鉴定出 12 种包括： B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 、 M_1 、 M_2 、 P_1 、 Q 、 H_1 、 GM 、 $B2a$ 和毒醇。4 种主要的黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 ，加上两种代谢物 M_1 和 M_2 可以直接污染食品和饲料。黄曲霉毒素 M 毒素首先是从牛奶中分离出来的，这些奶牛喂养了含有黄曲霉毒素的饲料，所以称之为 M。黄曲霉毒素的基本结构为二呋喃环和香豆素，在紫外线下，黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 发蓝色荧光，黄曲霉毒素 G_1 、 G_2 发绿色荧光。黄曲霉毒素 M_1 是黄曲霉毒素 B_1 在体内经过羟化而衍生成的代谢产物。黄曲霉毒素的相对分子质量为 312~346。难溶于水，易溶于油、甲醇、丙酮和氯仿等有机溶剂，但不溶于石油醚、己烷和乙醚中。一般在中性及酸性溶液中较稳定，但在强酸性溶液中稍有分解，在 $pH=9\sim10$ 的强酸溶液中分解迅速。其纯品为无色结晶，耐高温，黄曲霉毒素 B_1 的分解温度为 $268\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，紫外线对低浓度黄曲霉毒素具有一定的破坏性。黄曲霉毒素的化学结构式如图 1-1 所示，黄曲霉毒素 B_1 的代谢途径如图 1-2 所示。

1993 年，黄曲霉毒素被世界卫生组织（WHO）的癌症研究机构（IARC）划定为 I 类致癌物，是一种毒性极强的剧毒物质。黄曲霉毒素的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用，严重时，可导致肝癌甚至死亡。在天然污染的食品中以黄曲霉毒素 B_1 最为多见，其毒性和致癌性也最强。黄曲霉毒素的毒性极强，但其毒性随着毒素的剂量、接触时间长短和动物种类、营养状态及饲料不同而异。在动物实验中，大剂量摄入这些毒素会造成死亡；亚致死剂量产生慢性中毒；长期接受低剂量则导致癌症，主要是肝癌。急性中毒的毒性是氰化钾的 10 倍，幼年动物比同种老年动物更为敏感，不同种动物的敏感性也有差异，雏鸭最敏感。

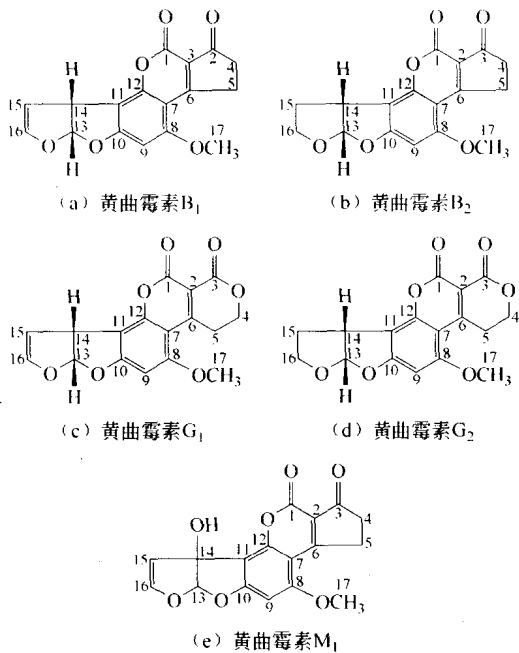


图 1-1 黄曲霉毒素的化学结构式

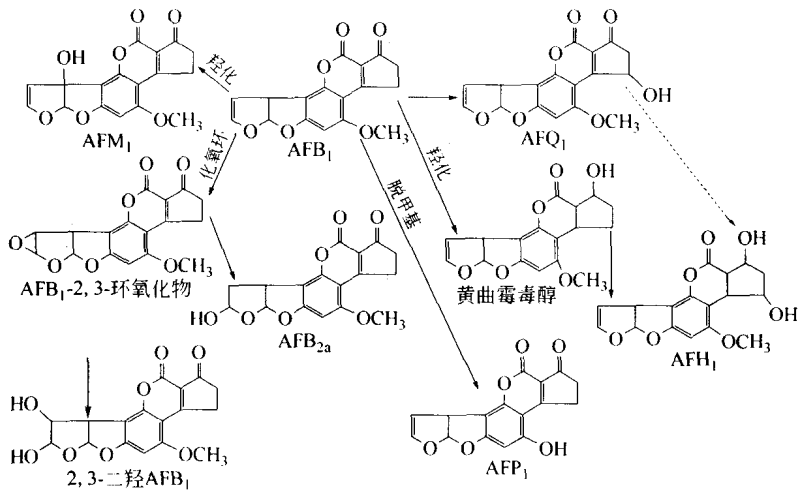


图 1-2 黄曲霉毒素 B₁ 的代谢途径