

综述

食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的污染情况及
分析方法研究进展

韩小敏,李凤琴,徐文静

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:介绍了食品中白僵菌素 (beauvericin, BEA) 和包括恩镰孢菌素 A (enniatin A, ENA)、恩镰孢菌素 A₁ (enniatin A₁, ENA₁)、恩镰孢菌素 B (enniatin B, ENB)、恩镰孢菌素 B₁ (enniatin B₁, ENB₁) 在内的 4 种主要的恩镰孢菌素 (enniatins, ENNs) 的分类、毒性和分析方法,尤其是前处理方式和各方法定量限的研究进展。综述了西班牙、摩洛哥、意大利、日本等部分国家食品中 BEA 和 4 种 ENNs 的污染状况以及这 5 种毒素与其他主要真菌毒素的协同污染情况。提出了建立针对复杂食品基质中 BEA 和 ENNs 测定的高效液相色谱-串联质谱法。

关键词:镰刀菌毒素;白僵菌素;恩镰孢菌素;高效液相色谱-串联质谱;分析方法;综述

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)04-0508-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.04.025

Research progress on the contamination of beauvericin and enniatins and the development of analytical method in food

HAN Xiao-min, LI Feng-qin, XU Wen-jing

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Classification, toxicity and determination method progress especially the pretreatment and limit of quantitation of beauvericin (BEA) and 4 main kinds of enniatins (ENNs) including enniatins A (ENA), enniatins A₁ (ENA₁), enniatins B (ENB) and enniatins B₁ (ENB₁) in food were introduced. The contamination levels of BEA, 4 kinds of ENNs and their co-occurrence mycotoxins in food from Spain, Morocco, Italy, Japan and some other countries were analyzed. Establishment of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) determination method for the complex food matrix was suggested.

Key words: Fusarium toxins; beauvericin; enniatins; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; analytical method; review

镰刀菌属 (*Fusarium*) 的部分菌种能够产生多种镰刀菌毒素,根据目前已经发现的镰刀菌毒素的毒性资料、检出率和污染水平等,将它们分为两个类群,即传统的 (traditional) 和新兴的 (emerging) 镰刀菌毒素。前者最具有代表性的是单端孢霉烯族化合物 (trichothecenes),后者最具有代表性的是六酯肽类化合物 (hexadepsipeptides),即白僵菌素 (beauvericin, BEA) 和恩镰孢菌素 (enniatins, ENNs),它们主要是由镰刀菌的某些菌种侵染小

麦、大麦、黑麦和燕麦等谷物后,在潮湿和低温条件下产生的真菌毒素^[1-2]。据报道^[3-5],该类新兴毒素具有基因毒性和细胞毒性,可诱导染色体畸变、姐妹染色单体交换和微核形成等,同时还是离子化载体抑制剂、酶抑制剂和氧化应激诱导剂。目前,西班牙、摩洛哥、突尼斯、意大利、日本、伊朗和巴西等国家的谷物及其制品中均检测到该类毒素^[6-8]。由于 BEA 和 ENNs 污染食品的严重性和普遍性,已越来越受到人们的关注。本文针对 BEA 和 ENNs 的分类、毒性、食品中的污染和分析方法等进行综述。

1 BEA 和 ENNs 的分类

BEA 和 ENNs 主要是由镰刀菌属的某些菌种产生的环酯肽类化合物。BEA 首先在致病性真菌球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 的培养物中发现,

收稿日期:2017-03-15

基金项目:国防科技创新特区(17-163-12-ZT-005-047-01);北京市自然科学基金(7163235);国家自然科学基金(31301489)

作者简介:韩小敏 女 副研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail:hanxiaomin@cfsa.net.cn

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail:lifengqin@cfsa.net.cn

因此被命名为白僵菌素^[9]。随后,在再育镰刀菌(*F. proliferatum*)、半裸镰刀菌(*F. semitectum*)、胶孢镰刀菌(*F. subglutinans*)等多种镰刀菌中均检测到 BEA^[10]。ENNs 是一类结构相似的真菌毒素,首先在尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)中发现,随后在锐顶镰刀菌(*F. acuminatum*)、燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*)和木贼镰刀菌(*F. equiseti*)中发现^[11]。到目前为止,已经发现 20 多种 ENNs

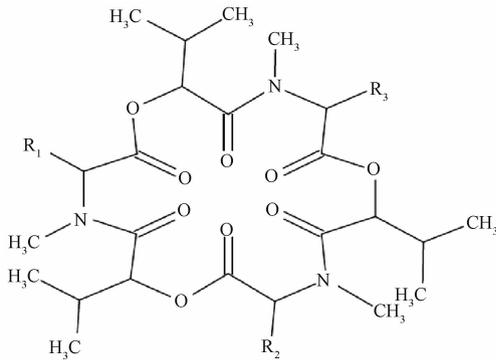


图1 BEA 和 4 种 ENNs 的结构式

Figure 1 Structural formula of BEA and 4 ENNs

类似物,但仅 4 种 ENNs[恩镰孢菌素 A(ENA)、恩镰孢菌素 A₁(ENA₁)、恩镰孢菌素 B(ENB)、恩镰孢菌素 B₁(ENB₁)]常在食品和饲料中检测到^[12]。BEA 和 ENNs 的典型结构是环酯肽类结构,均含有可变的羧基和 *N*-甲基-氨基酸残基。BEA 在 *N*-甲基-氨基酸残基上具有苯基,但 ENNs 在相同的位置上具有不同的脂肪族取代基。BEA 和 ENNs 具体结构式,见图 1。

	R ₁	R ₂	R ₃
BEA	Phenyl	Phenyl	Phenyl
ENA	<i>sec</i> -butyl	<i>sec</i> -butyl	<i>sec</i> -butyl
ENA ₁	<i>sec</i> -butyl	<i>sec</i> -butyl	<i>iso</i> -propyl
ENB	<i>iso</i> -propyl	<i>iso</i> -propyl	<i>iso</i> -propyl
ENB ₁	<i>iso</i> -propyl	<i>iso</i> -propyl	<i>sec</i> -butyl

2 BEA 和 ENNs 的毒性

BEA 和 ENNs 的主要毒性作用与它们的离子载体抑制特性相关。据报道^[13],BEA 和 ENNs 能提高阳离子穿过细胞膜的能力,由此干扰正常生理水平下细胞的阳离子水平、影响细胞膜的电化学梯度,而产生毒性反应,如细胞内钙离子浓度增加后,激活了钙依赖的内切酶活性而出现典型的凋亡特征,即 DNA 片段化。BEA 和 ENNs 对不同的细胞系均具有毒性效应。最新研究^[14]表明,在 BEA 和 ENNs 的作用下,人结肠癌细胞(Caco-2)内出现活性氧浓度上升和通过降低线粒体膜电位诱导线粒体依赖的细胞凋亡现象。PÓCSFALVI 等^[15]发现 BEA 可插入 DNA 双链而干扰 DNA 复制。此外,研究^[16]发现,BEA 在人淋巴细胞和动物中可以诱导染色体畸变、姐妹染色单体交换和微核形成,最终引起细胞凋亡、线粒体功能异常和红细胞膜变形等现象。目前国内鲜有开展 BEA 和 ENNs 毒性研究的报道。

3 BEA 和 ENNs 的分析方法

目前,基于液液萃取或固相萃取的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)配合光电二极管阵列检测器(photodiode array detector, DAD)的 HPLC-DAD 法是常用的检测食品中 BEA 和 ENNs 的方法^[17]。但由于单纯的色谱分析法存在特异性不强、灵敏度不高等缺点,其应用越来越受限制。近年来,基于 HPLC 与质谱(mass

spectrograph, MS)联用技术开发的高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)法、高效液相色谱-高分辨率质谱(high performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry, HPLC-HRMS)法已被广泛用于食品中真菌毒素的检测^[18-21],该方法结合了色谱优越的分离能力与质谱的定性能力,明显提高了检测的灵敏度和特异性,使得分析方法具有检出限低、能获取待测化合物的分子结构信息、对前处理要求不高等优点,已成为分析食品中 BEA 和 ENNs 的最佳手段。

3.1 常规液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法

SØRENSEN 等^[20]采用 LC-MS/MS 法建立了同时测定新鲜和贮藏玉米中 BEA 和 4 种 ENNs 的方法,样品经乙腈-水(84:16, V/V)提取、滤纸过滤后直接进样。待测样品经 Gemini C₆-Phenyl 反向色谱柱分离后采用电喷雾电离(electrospray ionisation, ESI)正离子模式进行定性和定量测定,结果该方法在试验条件下的加标回收率范围和定量限(limit of quantification, LOQ)分别为 BEA: 68% ~ 145% 和 13 μg/kg、ENA: 76% ~ 127% 和 17 μg/kg、ENA₁: 76% ~ 136% 和 34 μg/kg、ENB: 78% ~ 151% 和 24 μg/kg、ENB₁: 80% ~ 173% 和 26 μg/kg。YOSHINARI 等^[6]建立了同时测定小麦粉和粗玉米粉中 BEA 和 4 种 ENNs 的 LC-MS/MS 法,样品经乙腈-水(85:15, V/V)提取、离心机 1 400 × *g* 离心

10 min、超纯水稀释、微孔滤膜过滤获得提取液,然后分别将提取液经5种SPE柱净化:①Bond Elut C₁₈(500 mg,美国Agilent Technologies);②InertSep C₁₈-CFF(500 mg,日本GL Sciences);③Isolute C₁₈(200 mg,瑞士Biotage);④Oasis HLB(200 mg,美国Waters);⑤Sep-Park C₁₈(200 mg,美国Waters)。净化后用ESI多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)模式,在正离子模式下测定毒素的含量,对两个加标水平(20和100 μg/kg)各6个平行样品的方法验证发现:Sep-Park C₁₈柱对全小麦粉、普通小麦粉和粗玉米粉中BEA和4种ENN的加标回收率范围分别为94.8%~111.3%、91.1%~113.8%和94.4%~101.5%,相对标准偏差均<7.5%;未观察到基质增强或抑制效应,BEA、ENA、ENA₁、ENB和ENB₁的LOQ分别为3、2、3、3和3 μg/kg,所有指标均满足毒素定量测定的要求。

自2005年BERTHILLER等^[22]首次发表了采用三重四级杆法同时测定玉米中A类和B类单端孢霉烯族化合物以及玉米赤霉烯酮(zearalenone,ZEN)以来,真菌毒素协同检测方法的报道越来越多。NAZARI等^[7]用液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)法测定了伊朗国产大米中包括BEA和4种ENN在内的7种真菌毒素的含量,样品经乙腈-水-乙酸(79:20:1,V/V)提取后,用乙腈-水-乙酸(20:79:1,V/V)稀释,直接进样,结果发现,BEA和4种ENN的LOQ均为0.06 μg/kg,回收率范围为(94.1±2.6)%~(101.9±5.1)%。JUAN等^[23]建立了硬质小麦中包括BEA和4种ENN在内的26种真菌毒素的LC-MS/MS协同测定法,样品经乙腈-水-甲酸(84:15:1,V/V)提取后,经3500 r/min离心5 min、过滤、氮气吹干、复溶、尼龙膜过滤后直接进样。结果发现:BEA、ENA、ENA₁、ENB和ENB₁的LOQ分别为15、10、10、10和10 μg/kg;BEA的基质抑制效应最严重,3个加标水平下基质抑制范围为50%~60%;ENB和ENB₁的基质增强效应最严重,3个加标水平下基质增强的范围为105%~140%;5种真菌毒素的加标回收率均在80%~120%之间,满足毒素定量测定的要求。SULYOK等^[18]建立了可同时测定包括BEA和4种ENN在内的87种真菌毒素的半定量方法,并用于面包、水果、蔬菜等食品中毒素含量的测定,5种六酯肽类毒素的LOQ和表观回收率范围分别为0.3~0.9 μg/kg和102%~117%。MALACHOVA等^[19]建立了基于QuEChERS提取的包含BEA和4种ENN在内的24种真菌毒素的LC-Orbitrap MS协同测定法,样品经水和乙腈提取后,加入QuEChERS试剂再次提取3 min,并加

入¹³C₁₅-DON以校正提取过程中毒素的损失,5000 r/min离心5 min后取适量上清直接进样。经真菌毒素反相色谱柱分离后,大气压电喷雾电离(atmospheric pressure chemical ionization,APCI)结合极性快速切换和全扫描模式信号采集,实现一次进样,同时测定正离子模式和负离子模式下所有目标化合物,缩短了分析时间并提高了准确度。

与纯溶剂相比,来自基质组分的共流出物引起的目标化合物信号强度的增强或抑制作用称为基质效应。基质效应是目前采用电喷雾电离面临的一个巨大挑战。通常采取2种方法降低基质效应:①减少进入质谱系统的基质组分的含量;②用合适的方法对测定结果进行校正,比如基质匹配标准曲线、标准品添加和同位素内标法。在前处理过程中对样品进行进一步的净化,或在提取后对样品进一步的稀释,是目前常用的减少质谱系统中基质组分含量的方法,但是由于该方法在减少进入质谱系统的基质组分含量的同时也降低了目标分析物的含量,且该方法并不能完全消除基质效应,所以目前越来越倾向于发现新的方法来降低基质效应。基质匹配标准曲线和标准品添加法是目前常用的2种校正基质效应的方法,但基质匹配标准曲线法存在以下缺点:①难以获得空白样品;②繁琐和耗时;③浓度超出标准曲线时,需要用空白基质而不能用纯溶剂进行校正,从而使测定过程复杂;④同一种基质的基质效应不同,且不能通过同一条基质匹配校正曲线完全消除基质效应。标准品添加法存在以下缺点:①需要对样品进行额外的处理和重复的分析过程,使测定时间至少增加一倍;②该方法需要更多的标准品进行添加试验,检测成本高。对比之下,稳定同位素内标法因内标与目标分析物具有相同的物理化学性质,可根据分子量大小的不同,通过质谱区分开,可以完全消除基质效应的影响,因此越来越受到研究人员的欢迎。

3.2 基于稳定同位素的LC-MS/MS法

HU等^[24]首次研究了¹⁵N₃标记的BEA和4种ENN的生物合成,并利用¹⁵N₃标记的稳定同位素建立了测定大麦胚芽、小麦、燕麦、大米、玉米等谷物及其制品中BEA和4种ENN的LC-MS/MS稳定同位素稀释法。样品粉碎后加入一定量的稳定同位素,然后用乙腈-水(84:16,V/V)提取、微孔滤膜过滤后直接进样,结果显示5种毒素的LOQ范围为5.8~13.1 μg/kg,在20、35和50 μg/kg的回收率范围为(96±2.6)%~(110±3.4)%。HU等^[25]还采用稳定同位素稀释法建立了中药材中BEA和

4种 ENNs 的测定方法,样品粉碎后,甲醇提取,滤膜过滤后直接进样。5种毒素的检出限范围为 0.8 ~ 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,用该方法测定了浙江省 60份中药材中 5种毒素的含量,结果发现 25%的中药材中至少含有 1种真菌毒素。HABLER 等^[26]采用稳定同位素稀释法建立了谷物中包含 BEA 和 4种 ENNs 在内的 14种镰刀菌毒素的 LC-MS/MS 法,样品经乙腈-水(84:16, V/V)提取、滤膜过滤后,分别加入合适浓

度的稳定同位素内标,经 Bond Elut 净化柱净化,用甲醇-水(1:1, V/V)复溶、微孔滤膜过滤,采用 LC-MS/MS 分析。经稳定同位素校正后 5种毒素的检出限和回收率分别为 BEA: 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 (103 \pm 4)%、ENA: 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 (103 \pm 3)%、ENA₁: 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 (97 \pm 2)%、ENB: 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 (104 \pm 3)%、ENB₁: 1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 (99 \pm 4)%。详见表 1。

表 1 食品中 BEA 和 ENNs 的 LC-MS/MS 分析方法

Table 1 Analytical method of BEA and ENNs in food

方法	食品种类	BEA 和 ENNs 种类	前处理方式	LOQ/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	参考文献
LC-MS/MS	全小麦粉、小麦粉、粗玉米粉	BEA、ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	5种 SPE	3、2、3、3、3	[6]
HPLC-MS/MS	大米	ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	乙腈-水-乙酸提取并稀释	均为 0.06	[7]
HPLC-MS/MS	面包、水果、谷物	ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	乙腈-水-乙酸提取并稀释	0.3 ~ 0.9	[18, 27]
LC-Orbitrap MS*	白小麦粉制品、混合小麦粉制品、早餐类谷物	ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	乙腈-水提取, QuEChERS	均为 6.25	[19]
LC-MS/MS	新鲜玉米、贮藏玉米	BEA、ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	乙腈-水提取	13、17、34、24、26	[20]
LC-MS/MS	鸡蛋	BEA、ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	无水硫酸钠干燥样品后, 乙腈提取, SPE	2、0.12、0.84、0.8、2.24	[21]
LC-MS/MS	硬质小麦	BEA、ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	乙腈-水-甲酸提取	15、10、10、10、10	[23]
LC-MS/MS	大麦、燕麦、小麦、玉米等谷物	BEA、ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	乙腈-水提取	5.8 ~ 13.1	[24]
LC-MS/MS	中药	BEA、ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	甲醇提取过滤、稳定同位素稀释	2.4 ~ 3.6	[25]
LC-MS/MS	大麦、燕麦、小麦、玉米等谷物	ENA、ENA ₁ 、ENB、ENB ₁	乙腈-水提取加稳定同位素、Bond Elute 净化柱	0.9、3.3、4.2、2.1、3.9	[26]

注: * 表示采用 APCI 模式, 其他方法采用 ESI 模式

4 BEA 和 4 种 ENNs 在不同国家的污染状况

4.1 BEA 和 4 种 ENNs 在主要食品中协同污染状况

UHLIG 等^[28]采用 LC-MS/MS 法调查了 2000—2002 年挪威产的 73 份燕麦、75 份大麦和 80 份小麦共计 228 份样品中 BEA 和 4 种 ENNs 的协同污染状况, 结果发现: 228 份样品中 5 种毒素的检出率由高到低依次为 ENB (100%, 228/228)、ENB₁ (94%, 214/228)、ENA₁ (67%, 153/228)、BEA (32%, 73/228) 和 ENA (25%, 58/228); 73 份燕麦样品和 80 份小麦样品中 5 种毒素的平均含量顺序一致, 由高到低依次为 ENB (47 和 790 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、ENB₁ (20 和 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、BEA (16 和 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、ENA₁ (6 和 5.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、ENA (3 和 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 75 份大麦中 5 种毒素的平均含量由高到低依次为 ENB (49 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、ENB₁ (170 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、ENA₁ (35 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、ENA (4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、BEA (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。SØRENSEN 等^[20]采用 LC-MS/MS 法分析了 2005—2006 年丹麦收获的 80 份玉米和玉

米青贮饲料样品中 BEA 和 4 种 ENNs 的污染情况, 结果表明: 所有样品中 4 种 ENNs 的检出率均具有相同的分布情况, 检出率从高到低依次为 ENB > ENB₁ > ENA₁ > ENA; 2006 年采集的样品, BEA 和 ENB 的检出率及最大含量均高于 2005 年采集的样品 (BEA: 2006 年为 100% 和 2 598 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2005 年为 90% 和 489 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ENB: 2006 年为 89% 和 988 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2005 年为 10% 和 71 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。SERRANO 等^[5]分析了西班牙 ($n=95$)、意大利 ($n=48$)、突尼斯 ($n=52$)、摩洛哥 ($n=70$) 地中海地区 4 个国家 135 份谷物 (小麦、玉米、大米、黑麦、燕麦和高粱) 和 130 份谷物类制品 (饼干、面食、汤、小麦粉和饼干) 共计 265 份样品中 BEA 的污染情况, 发现 4 个国家样品中 BEA 的检出率由高到低分别为突尼斯 > 意大利 > 摩洛哥 > 西班牙, BEA 主要在小麦、玉米、大米样品中检测到, 玉米样品中含量最高, 可达 73.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

4.2 BEA 和 4 种 ENNs 与其他主要真菌毒素的协同污染状况

除欧洲国家外,巴西、尼日利亚等国家的食品中也检测到了这两类毒素,尤其需要注意的是,两类毒素具有协同污染现象,同时它们还与黄曲霉毒素、单端孢霉烯族化合物、伏马菌素、ZEN等具有协同污染现象。

YOSHINARI等^[6]采用LC-MS/MS法首次对日本市场上的163份小麦粉(66份进口小麦粉、97份国产小麦粉)中BEA、4种ENN_s、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)等的协同污染调查发现,所有小麦粉样品中ENB和ENB₁检出率和污染水平均较高,而ENA、ENA₁、BEA的检出率和污染水平均较低,且61%的日本进口小麦粉和58%的日本国产小麦粉同时被DON和ENN_s污染,国产小麦粉中ENB的平均含量(52.5 μg/kg)高于DON的平均含量(36.9 μg/kg)。JUAN等^[23]采用LC-MS/MS法对意大利中部地区的74份硬质小麦中26种真菌毒素(包括8种单端孢霉烯族化合物、3种伏马菌素、杂色曲霉毒素、赭曲霉毒素A、4种黄曲霉毒素、ZEN、BEA、ENA、ENA₁、ENB、ENB₁等)的污染调查发现,35%的样品同时检出3种真菌毒素,20%的样品同时检出2种或4种真菌毒素、11%的样品同时检出5种真菌毒素、4%的样品同时检出6种真菌毒素,但仅1份样品同时检出ENB、ENB₁、ENA₁、交链孢酚单甲醚(AME)、DON、HT2和T-2共7种真菌毒素,但74份硬质小麦样品中均未检出BEA。SOUZA等^[8]采用HPLC-MS/MS法对2005—2006年巴西产74份玉米样品中,包括黄曲霉毒素、伏马菌素、单端孢霉烯族化合物等在内的101种真菌毒素及代谢物的污染情况进行调查,结果检出20种真菌毒素及代谢物,大多数样品中至少含有1种真菌毒素,伏马菌素的检出率最高为100%、平均含量为1840 μg/kg,其次为BEA和ENB,两者的检出率分别为96%和34%,BEA的含量较高为160 μg/kg。

MALACHOVA等^[19]对捷克共和国的116份谷物制品(精制白面粉 $n=17$ 、混合小麦和玉米粉 $n=36$ 、早餐谷物 $n=7$ 、快餐 $n=34$ 、普通面粉 $n=22$)中DON、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖(deoxynivalenol-3-glucoside, DON-3-G)和4种ENN_s的污染调查表明, DON-3-G的检出率(80%)高于DON的检出率(75%),所有样品中至少检出1种ENN_s, ENN_s的含量高于DON的含量。BLESA等^[29]对摩洛哥80份市售小麦样品中镰刀菌属菌种产生的18种毒素(包括3种伏马菌素、5种B类单端孢霉烯族化合物、4种A类单端孢霉烯族化合物、ZEN、BEA和4种ENN_s)的调查发现, ENN_s、BEA和DON为污染的主要真菌毒素,33%(26/80)的样品

中检出2种真菌毒素,5.0%(4/80)的样品中检出3种真菌毒素,7.5%(6/80)的样品中检出4种ENN_s,3.8%(3/80)的样品中检出5种真菌毒素(4种ENN_s和BEA),2.5%(2/80)的样品中检出6种真菌毒素(DON、BEA和4种ENN_s),但只有11%(9/80)的样品仅检出1种真菌毒素。

此外, BEA和ENN_s还在中国草药、伊朗国产大米、尼日利亚国产加工大米、植物油、大豆、干果、坚果、咖啡中检测到^[26,30-31], BEA和ENN_s作为真菌毒素也越来越受到关注。考虑到BEA和ENN_s的协同污染情况,在进行总膳食暴露评估时需要同时开展这两类真菌毒素健康危害的研究。

5 展望

BEA和ENN_s主要污染各类小麦、燕麦、玉米及其他谷物、大豆、干果等消费量大的食品,但由于缺乏该类毒素的毒理学数据,为了评估该类毒素对人类健康的影响,欧洲食品安全局真菌毒素工作组用毒理学关注阈值(threshold of toxicological concern, TTC)对食品和饲料中影响动物和公众健康的BEA和ENN_s的风险进行评估^[31],结果发现,人类膳食慢性暴露BEA和ENN_s的水平值得关注,谷物和谷物制品,尤其是面包类、烘焙制品和面食是人类慢性膳食暴露BEA和ENN_s的重要来源,但考虑到食品中该类毒素的污染水平数据较少,并未给出确切的结论,因此专家组建议应采用HPLC-MS/MS法开展BEA和ENN_s大范围、系统和全面的污染调查,并以此为基础对其膳食暴露量进行详尽的评估。我国尚未开展各类食品中BEA和ENN_s检测方法、污染调查、安全性评价等的系统研究,因此获得各类食品中BEA和ENN_s污染水平数据,结合我国居民膳食消费量资料,开展该类毒素的风险评估将有助于进一步保障消费者的食品安全和身体健康。

参考文献

- [1] LOGRIECO A, RIZZO A, FERRACANE R, et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(1):82-85.
- [2] JESTOI M. Emerging mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, 48(1):21-49.
- [3] CELIK M, AKSOY H, YILMAZ S. Evaluation of beauvericin genotoxicity with the chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and micronucleus assays [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73(7):1553-1557.
- [4] TAN D C, FLEMATTI G R, GHISALBERTI E L, et al. Toxicogenicity of enniatins from Western Australian *Fusarium* species to brine shrimp (*Artemia franciscana*) [J]. Toxicon,

- 2011,57(5):817-825.
- [5] SERRANO A B, FONT G, RUIZ M J, et al. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area[J]. Food Chemistry,2012,135(2):423-429.
- [6] YOSHINARI T, SUZUKI Y, SUGITAKONISHI Y, et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat flour and corn grits on the Japanese market and their co-contamination with type B trichothecene mycotoxins [J]. Food Additives and Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment,2016,33(10):1620-1626.
- [7] NAZARI F, SULYOK M, KOBARFARD F, et al. Evaluation of emerging *Fusarium* mycotoxins beauvericin, enniatins, fusaproliferin and moniliformin in domestic rice in Iran [J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2015, 14 (2) : 505-512.
- [8] SOUZA M D L M D, SULYOK M, FREITASSILVA O, et al. Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Scientific World Journal,2013,2013(1):1-9.
- [9] HAMILL R L, HIGGINS C E, BOAZ H E, et al. The structure of beauvericin, a new desipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina* [J]. Tetrahedron Letters,1969,10(49):4255-4258.
- [10] LOGRIECO A, MORETTI A, CASTELLA G, et al. Beauvericin production by *Fusarium* species [J]. Appl Environ Microbiol, 1998,64(8):3084-3088.
- [11] SYCORDERO A A, PEARCE C J, OBERLIES N H. Revisiting the enniatins: a review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities [J]. Journal of Antibiotics,2012,65(11):541-549.
- [12] HERRMANN M, ZOCHER R, HAESE A A. Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue [J]. Appl Environ Microbiol,1996,62(2):393-398.
- [13] KAMYAR M, RAWNDUZI P, STUDENIK C R, et al. Investigation of the electrophysiological properties of enniatins [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2004,429(2):215-223.
- [14] PROSPERINI A, JUAN-GARCÍA A, FONT G, et al. Beauvericin-induced cytotoxicity via ROS production and mitochondrial damage in Caco-2 cells [J]. Toxicology Letters,2013,222(2):204-211.
- [15] PÓCSFALVI G, LANDA G D, FERRANTI P, et al. Observation of non-covalent interactions between beauvericin and oligonucleotides using electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1997, 11 (3) : 265-272.
- [16] CELIK M, AKSOY H, YILMAZ S. Evaluation of beauvericin genotoxicity with the chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and micronucleus assays [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,2010,73(7):1553-1557.
- [17] KRŠKA R, SCHUHMACHER R, GRASSERBAUER M, et al. Determination of the *Fusarium* mycotoxin beauvericin at micrograms/kg levels in corn by high-performance liquid chromatography with diode-array detection [J]. Journal of Chromatography A,1996,746(2):233-238.
- [18] SULYOK M, KRŠKA R, SCHUHMACHER R. Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds [J]. Food Chemistry,2010,119(1):408-416.
- [19] MALACHOVA A, DZUMAN Z, VEPRIKOVA Z, et al. Deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside, and enniatins; the major mycotoxins found in cereal-based products on the czech market [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(24):12990-12997.
- [20] SØRENSEN J L, NIELSEN K F, RASMUSSEN P H, et al. Development of a LC-MS/MS method for the analysis of enniatins and beauvericin in whole fresh and ensiled maize [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2008,56(21):10439-10443.
- [21] MARIKA J, MERVİ R, EILA J, et al. Determination of *Fusarium* mycotoxins beauvericin and enniatins (A, A₁, B, B₁) in eggs of laying hens using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. Food Chemistry,2009,115(3):1120-1127.
- [22] BERTHILLER F, SCHUHMACHER R, BUTTINGER G, et al. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A,2005,1062(2):209-216.
- [23] JUAN C, COVARELLI L, BECCARI G, et al. Simultaneous analysis of twenty-six mycotoxins in durum wheat grain from Italy [J]. Food Control,2016,62(10):322-329.
- [24] HU L, RYCHLIK M. Biosynthesis of ¹⁵N₃-labeled enniatins and beauvericin and their application to stable isotope dilution assays [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2012,60(29):7129-7136.
- [25] HU L, RYCHLIK M. Occurrence of enniatins and beauvericin in 60 Chinese medicinal herbs [J]. Food Additives and Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment,2014,31(7):1240-1245.
- [26] HÄBLER K, RYCHLIK M. Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in cereals [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry,2016,218(1):447-454.
- [27] SULYOK M, KRŠKA R, SCHUHMACHER R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples [J]. Anal Bioanal Chem,2007,389(5):1505-1523.
- [28] UHLIG S, TORP M, HEIER B T. Beauvericin and enniatins A, A₁, B and B₁ in Norwegian grain: a survey [J]. Food Chemistry, 2006,94(2):193-201.
- [29] BLESA J, MOLTÓ J C, AKHDARI S E, et al. Simultaneous determination of *Fusarium* mycotoxins in wheat grain from Morocco by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry [J]. Food Control,2014,46(4):1-5.
- [30] ROFIAT A S, FANELLI F, ATANDA O, et al. Fungal and bacterial metabolites associated with natural contamination of locally processed rice (*Oryza sativa* L.) in Nigeria [J]. Food Additives and Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment, 2015, 32(6):950-959.
- [31] European Food Scientific Authority. Scientific opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed [J]. EFSA Journal, 2016,12(8):3802.