

畜禽产品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和T-2毒素残留分析

邹忠义^{1,2}, 贺稚非^{1,3}, 李洪军^{1,3,*}, 韩鹏飞¹, 孟晓¹, 周芳¹, 罗理勇¹

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2.公安海警学院后勤管理系, 浙江 宁波 315801)

3.西南大学 重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715;

摘要:目的: 分析市售畜禽产品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)和T-2毒素的残留情况。方法: 试样经乙腈提取、正己烷脱脂、HLB柱净化, 用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS/MS)测定, 外标法定量。结果: 所有受检猪背脊肌肉、猪肝、猪肾、鸡胸肉、鸡腿肉、鸡翅肉和肉制品样品中均未发现DON残留, 猪背脊脂肪样品中DON残留阳性率为28.75%, 最高残留量为0.4265 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 所有受检猪肝、猪肾和肉制品样品中均未发现T-2毒素残留, 猪背脊肌肉、猪背脊脂肪、鸡胸肉、鸡腿肉、鸡翅肉样品中T-2毒素残留阳性率范围为8.33%~57.14%, 最高残留量范围为0.0704~0.4515 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论: 在部分受检畜禽样品中检测到了DON和T-2毒素痕量残留。

关键词: 畜禽产品; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; T-2毒素; 残留; 高效液相色谱-质谱; 分析

Analysis of Residual Deoxynivalenol and T-2 Toxin in Livestock and Poultry Products

ZOU Zhong-yi^{1,2}, HE Zhi-fei^{1,3}, LI Hong-jun^{1,3,*}, HAN Peng-fei¹, MENG Xiao¹, ZHOU Fang¹, LUO Li-yong¹

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Department of Logistics Management, China Maritime Police Academy, Ningbo 315801, China;

3. Chongqing Special Food Programme and Technology Research Center, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Objective: To analyze residual deoxynivalenol (DON) and T-2 toxin in products of livestock and poultry. Methods: Residual DON and T-2 toxin in samples were extracted with acetonitrile, defatted with *n*-hexane, cleaned up on an HLB cartridge, and analyzed by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and quantified by an external standard method. Results: Residual DON was not observed in all tested samples of pig dorsal muscle, pig liver, pig kidney, chicken breast, chicken thighs, chicken wings and meat products, but detected in 28.75% of pig back fat, and the maximum residue was up to 0.4265 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No residual T-2 toxin was detected in all tested samples of pig liver, pig kidney and meat products, but detected in 8.33%~57.14% of pig dorsal muscle, pig back fat, chicken breast, chicken thighs and chicken wings, and the maximum contents were 0.0704~0.4515 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Conclusion: Trace residues of DON and T-2 toxin can be detected in partial tested samples of livestock and poultry products.

Key words: products of livestock and poultry; deoxynivalenol; T-2 toxin; residue; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); analysis

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)14-0208-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201314042

单端孢霉烯族毒素(trichothecenes)是由镰刀菌等真菌产生的次级代谢产物, 含有特征性的12,13-环氧-单端孢霉-9-烯环结构, 按结构分成4种类型: A、B、C、D型^[1], 污染食品和动物饲料的主要是A、B型单端孢霉烯族毒素, A型中的T-2毒素是毒性最强的单端孢霉烯族毒素^[2],

B型中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是食品和饲料中最常见的单端孢霉烯族毒素^[3]。单端孢霉烯族毒素对人和动物具有多种毒性, 能够造成呕吐、腹泻、皮肤刺激、拒食、恶心、神经障碍、流产等急性和慢性疾病^[4], 高剂量的单端孢霉烯族毒素还能促进白细

收稿日期: 2012-04-16

基金项目: 国家“973”计划项目(2009CB118806); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-44-D-1);

西南大学研究生科技创新基金项目(ky2010005)

作者简介: 邹忠义(1982—), 男, 博士研究生, 研究方向为现代食品加工理论与技术。E-mail: zzy911zzy911@163.com

*通信作者: 李洪军(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为肉类科学与酶工程。E-mail: hongjunli1961@yao.com.cn

胞的快速凋亡^[5]。动物食用单端孢霉烯族毒素污染的饲料后,会对生产性能产生影响,一些毒素还能转移到奶、肉和蛋中,给消费者健康造成了一定的风险^[6-7]。目前国内还没有关于畜禽肉产品中DON和T-2毒素残留的研究报道,本实验拟利用已建立的高效液相色谱-质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[8]分析市售畜禽产品中DON和T-2毒素残留情况,为填补这方面的研究空白提供基础型数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜猪肉及可食用猪组织、冷冻鸡肉、肉制品均购于本地超市。

标准品DON(纯度≥99%)、T-2毒素(纯度≥99%)、甲醇、乙腈、正己烷、甲酸、乙酸铵(均为色谱纯) 美国Sigma-Aldrich公司;超纯水通过Milli-Q纯水仪制备 美国Millipore公司。

1.2 仪器与设备

UFLC LC-20AD高效液相色谱仪、UP-ODS分离柱(150mm×4.6mm, 3.0μm)、GPCR-ODS保护柱(8mm×1.5mm, 5.0μm) 日本Shimadzu公司;Sciex API 4000三重四极杆质谱仪(配有电喷雾离子源及Analyst software 1.5.1数据处理系统) 美国Applied Biosystems公司;Finnpipette移液器 美国Thermo Scientific公司;FK-A组织捣碎机 上海梅香仪器有限公司;CPA225D电子天平 德国Sartorius公司;Silent Crusher M均质器、Laborota 4011旋转蒸发仪 德国Heidolph公司;XW-80A漩涡混合器 其林贝尔公司;3-30k离心机 美国Sigma-Aldrich公司;固相萃取柱Oasis HLB cartridge(3mL/60mg) 美国Waters公司;N-EVAPTM 116氮吹仪 美国Organomation Associates公司;滤膜(17mm, 0.22μm) 丹麦Frisenette公司。

1.3 方法

1.3.1 毒素标准储备液和工作液的制备

标准储备液的制备:分别精确称取DON和T-2毒素标准品5.0mg于5mL容量瓶中,用乙腈溶解、定容,制成1.0mg/mL DON和T-2毒素标准储备液,于-20℃条件下避光保存。

单一及其混合毒素标准工作液的制备:分别精确量取DON、T-2毒素标准储备液各2mL于不同及相同10mL容量瓶中,用乙腈稀释、定容,制成200.0μg/mL的DON、T-2毒素及其混合毒素标准工作液,于4℃条件下避光保存。

1.3.2 取样

于本地超市选取当天屠宰的新鲜猪肉组织:猪背

脊肌肉(28份)、猪背脊脂肪(14份)、猪肝(12份)、猪肾(9份)。选取冷冻鸡肉组织:冷冻鸡胸肉(12份)、冷冻鸡腿(12份)、冷冻鸡中翼(12份)。选取肉制品(44份):常温火腿肠、低温香肠、低温热狗、低温脆皮肠、低温火腿、低温肘花、腊肠、腊肉,包括双汇(16种)、雨润(8种)、金锣(3种)、高金(7种)、美好(5种)、荣国福(5种)品牌的产品。将所取样品置于塑料样品袋中,密封,贴上样品标签,放于干冰泡沫箱中,尽快转移至实验室冰箱-20℃条件下保存,常温肉制品室温运输和保存。

1.3.3 样品的制备

在测定当日,冷冻样品先经室温解冻,鸡腿和鸡中翼样品剔去鸡皮与鸡骨,将样品切碎后,置于组织捣碎机中,12000r/min捣碎3min,然后用塑料样品袋密封包装,贴上样品标签,于冰箱4℃条件保存。

1.3.4 样品中DON和T-2毒素的检测

准确称取5.0g样品,置于50mL离心管中。加入15mL 100%乙腈,12000r/min均质3min,然后14000×g离心5min,上清液转移至100mL蒸馏瓶中,上述提取过程再重复2次,上清液均转移至同一蒸馏瓶中,在45℃条件下减压旋转蒸馏至干。在蒸干的蒸馏瓶中加入2.0mL 5%乙腈溶液,再加入4.0mL乙腈饱和正己烷,旋涡3min,充分溶解残渣,转移至10mL离心管中,8800×g离心3min,弃去上层正己烷。脂肪样品再用乙腈饱和正己烷重复上述操作脱脂2次。经脱脂后的样品提取液转移至Oasis HLB cartridge中净化。经过净化的提取液在45℃条件下用氮吹仪吹干,再加入1.0mL 5%甲醇溶液,旋涡3min,得到的溶解液用0.22μm微孔滤膜过滤,滤液收集到HPLC进样瓶中,于冰箱4℃条件下保存,最后用HPLC-MS/MS分析。

各类样品均采用各类基质空白样添加不同含量(0.05、0.1、0.5、1、5、10、50μg/kg)毒素作为基质标准样品,与待测样品相同处理后用HPLC-MS/MS分析。以处理后的各基质标准工作液中被测毒素峰面积为纵坐标,以各基质标准工作液中被测毒素添加量为横坐标,绘制基质标准工作曲线,用该曲线来对测定样品中毒素定量^[8]。

1.3.5 色谱条件

流动相:A(水,含2mmol/L醋酸铵和0.1%甲酸);B(甲醇)。梯度洗脱:0~5min, 5% B; 5~6min, 5%~95% B; 6~11min, 95% B; 流速:0.3mL/min;柱温:40℃;进样量:30μL。

1.3.6 质谱条件

扫描方式:正离子模式扫描;检测模式:多反应检测;气帘气压力:40psi(氮气);离子源气体1:60psi(氮气);离子源气体2:60psi(氮气);离子源温度:650℃;界面加热器:ON;电喷雾电压:5500.00V;碰撞气压力:10psi(氮气);其他条件如表1所示。

表1 DON和T-2毒素的跃迁监测及电喷雾离子源条件
Table 1 Transition monitoring of DON and T-2 and ESI source conditions

毒素	Q1/Q3(<i>m/z</i>)	RT/min	DT/ms	DP/V	EP/V	CE/V	CXP/V
DON	297.3/249.1 ^a	8.30 ± 0.02	100.00	48.00	7.00	16.40	13.00
	297.3/231.0 ^b		100.00	48.00	7.00	19.60	16.00
T-2	484.4/215.1 ^a	8.85 ± 0.04	100.00	50.00	8.00	23.00	12.80
	484.4/245.3 ^b		100.00	50.00	8.00	17.50	7.00

注：RT. 保留时间；DT. 驻留时间；DP. 分串电压；EP. 入口电压；CE. 碰撞能量；CXP. 碰撞室出口电压；a. 定量离子；b. 定性离子。

1.3.7 数据处理方法

每次测定重复3次，结果用平均值表示。

2 结果与分析

2.1 样品中DON残留情况

样品中DON残留检测结果如表2所示，在检测的所有猪背脊肌肉、猪肝、猪肾、鸡胸肉、鸡腿肉、鸡翅肉和肉制品样品中均未发现DON残留；部分猪背脊脂肪样品中有DON残留，阳性率为28.75%(4/14)，阳性猪背脊脂肪样品中DON平均残留量为0.1852μg/kg，最高残留量为0.4265μg/kg。

表2 样品中DON残留情况
Table 2 Residual DON in samples

指标	样品							
	猪背脊肌肉	猪背脊脂肪	猪肝	猪肾	鸡胸肉	鸡腿肉	鸡翅肉	肉制品
样品数	28	14	12	9	12	12	12	44
阳性样品数	0	4	0	0	0	0	0	0
阳性率/%	0.00	28.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
阳性样品DON平均残留量/(μg/kg)	ND	0.1852	ND	ND	ND	ND	ND	ND
阳性样品DON最高残留量/(μg/kg)	ND	0.4265	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注：ND. 未检出；LOD_{DON} = 0.02μg/kg。下同。

2.2 样品中T-2毒素残留情况

表3 样品中T-2毒素残留情况
Table 3 Residual T-2 toxin in samples

指标	样品							
	猪背脊肌肉	猪背脊脂肪	猪肝	猪肾	鸡胸肉	鸡腿肉	鸡翅肉	肉制品
样品数	28	14	12	9	12	12	12	44
阳性样品数	6	8	0	0	1	2	3	0
阳性率/%	21.43	57.14	0.00	0.00	8.33	16.67	25.00	0.00
阳性样品T-2平均残留量/(μg/kg)	0.0987	0.0364	ND	ND	0.0704	0.0798	0.0841	ND
阳性样品T-2最高残留量/(μg/kg)	0.4515	0.0906	ND	ND	0.0704	0.0834	0.0904	ND

注：LOD_{T-2} = 0.007μg/kg。

样品中T-2毒素检测结果如表3所示，在检测的所有猪肝、猪肾和肉制品样品中均未发现T-2毒素残留；部分猪背脊肌肉、猪背脊脂肪、鸡胸肉、鸡腿肉、鸡翅肉样品中有T-2毒素残留，阳性率分别为21.43%(6/28)、57.14%(8/14)、8.33%(1/12)、16.67%(2/12)、25.00%(3/12)，阳性样品中T-2毒素平均残留量分别为0.0987、

0.0364、0.0704、0.0798、0.0841μg/kg，最高残留量分别为0.4515、0.0906、0.0704、0.0834、0.0904μg/kg。

3 讨论

在受检的阳性样品中，DON和T-2毒素残留量均很低，其中DON的最高残留量远低于我国GB 2761—2011《食品中真菌毒素限量》^[9]中的DON限量(1000μg/kg)，也远低于欧盟法规Commission Regulation(EC) No 1126/2007^[10]对食物中DON的最低限量(500μg/kg)。但这些标准限量的适用范围是谷物及其制品的DON限量，目前还没有国家和组织颁布针对肉与肉制品中DON的限量标准，也还没有国家和组织对食品中T-2毒素作出限量标准。

单端孢霉烯族毒素残留量低的可能原因是动物摄入的大部分单端孢霉烯族毒素在动物体内会很快地排泄掉，仅少量毒素残存在动物体内^[11-14]。Goyarts等^[15]研究DON在猪体内传递规律时发现，DON在猪体内的传递系数为：胆汁(0.1046 ± 0.0653)、肾脏(0.0151 ± 0.0070)、肝脏(0.0057 ± 0.0043)、血浆(0.0023 ± 0.0018)、肌肉(0.0016 ± 0.0016)、背部脂肪(0.0002 ± 0.0004)。Döll等^[16]在同样的研究就中发现，DON在猪体内的传递系数为：肾脏0.0319、肝脏0.0064、肌肉0.0043。

在检测的44份肉制品样品中均未发现DON和T-2毒素。一个可能的原因是生产这些肉制品的原料肉本身不含有DON和T-2毒素；第二个可能的原因是原料肉本身含有DON和T-2毒素，但在加工的过程中被去除或者降解掉了^[17-18]，一些生物、化学或物理方法的处理可以不同程度地降解DON和T-2毒素^[19-20]。

在部分受检的畜禽产品中发现了DON和T-2毒素残留，虽然残留量低，但它们在畜禽产品中的存在值得引起重视。本研究中针对重庆地区市售畜禽产品中DON和T-2毒素残留情况进行了初步调查研究，要全面了解国内畜禽产品中DON、T-2毒素残留情况，还需要在全国范围内多地区采样分析，并增加重庆地区的采样量，作进一步的调查分析。

参考文献：

[1] HE J, ZHOU T, YOUNG J C, et al. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21(2): 67-76.

[2] CHAUDHARI M, JAYARAJ R, BHASKAR A S B, et al. Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells[J]. Toxicology, 2009, 262(2): 153-161.

[3] European Food Safety Authority. EFSA-Q-2003-036: Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed[J]. The EFSA Journal, 2004, 73: 1-42.

- [4] MORGAVI D P, RILEY R T. Fusarium and their toxins: mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 137(3): 199-200.
- [5] PESTKA J J, SMOLINSKI A T. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Critical Reviews*, 2005, 8(1): 39-69.
- [6] SEELING K, DÄNICKE S, VALENTA H, et al. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23(10): 1008-1020.
- [7] VALENTA H, DÄNICKE S. Study on the transmission of deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol into eggs of laying hens using a high-performance liquid chromatography-ultraviolet method with clean-up by immunoaffinity columns[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, 49(8): 779-785.
- [8] ZOU Zhongyi, HE Zhifei, LI Hongjun, et al. Development and application of a method for the analysis of two trichothecenes: Deoxynivalenol and T-2 toxin in meat in China by HPLC-MS/MS[J]. *Meat Science*, 2012, 90(3): 613-617.
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB 2761—2011 食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 1-3.
- [10] The Commission of the European Communities. Commission Regulation(EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products[S]. *Official Journal of the European Union*, 2007, L255: 14-17.
- [11] CAVRET S, LECOEUR S. Fusariotoxin transfer in animal[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44(3): 444-453.
- [12] BAUER J. The metabolism of trichothecenes in swine[J]. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 1995, 102(1): 50-52.
- [13] ERIKSEN G S, PETERSSON H, LINDBERG J E. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs[J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2003, 57(5): 335-345.
- [14] POAPOLATHEP A, SUGITA-KONISHI Y, DOI K, et al. The fates of trichothecene mycotoxins, nivalenol and fusarenon-X, in mice[J]. *Toxicon*, 2003, 41(8): 1047-1054.
- [15] GOYARTS T, DÄNICKE S, VALENTA H, et al. Carry-over of Fusarium toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat to pigs[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2007, 24(4): 369-380.
- [16] DÖLL S, DÄNICKE S, VALENTA H. Residues of deoxynivalenol (DON) in pig tissue after feeding mash or pellet diets containing low concentrations[J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2008, 52(6): 727-734.
- [17] YUMBE-GUEVARA B E, IMOTO T, YOSHIKAWA T. Effects of heating procedures on deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels in naturally contaminated barley and wheat[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2003, 20(12): 1132-1140.
- [18] PRONYK C, CENKOWSKI S, ABRAMSON D. Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels[J]. *Food Control*, 2006, 17(10): 789-796.
- [19] 罗金凤, 丁晓雯, 龙悦, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇生物降解途径研究进展[J]. *食品科学*, 2012, 33(23): 405-409.
- [20] 付杨, 李洪军, 贺稚非, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇研究进展[J]. *食品科学*, 2011, 32(21): 289-292.