山东省玉米真菌毒素污染状况调查及分析

王 燕[1,2],董燕婕[2],岳 晖[2],李增梅[2],
陈业兵[3],王玉涛[2],邓立刚[2],赵善仓[1,2]
(1. 山东农业大学食品科学与工程学院,山东 泰安 271018;
2. 山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所,山东 济南 250100;
3. 山东省农业科学院,山东 济南 250100)

摘 要:为掌握山东省玉米的真菌毒素污染状况,评估污染带来的安全风险,为加强真菌毒素污染防控提供依据,采集了山东省玉米主产县2013年~2014年收获和储藏的玉米样品共520批次,采用液相色谱—飞行时间质谱联用仪(UPLC-Q-TOF)方法检测了玉米中黄曲霉毒素(AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2)、伏马毒素(FB_1、FB_2、FB_3)、呕吐毒素(DON)和玉米赤霉烯酮(ZEN)的污染水平。结果表明,AFB_1、AFB_2、AFG_1在玉米中检出率分别为18.08%、7.88%、0.77%,平均含量分别为7.62、0.60、0.05 μg/kg;FB_1、FB_2、FB_3检出率分别为92.50%、88.08%、83.85%,平均含量分别为1 798.69、531.83、197.71 μg/kg;DON检出率为26.35%,平均含量为240.44 μg/kg;ZEN检出率为14.62%,平均含量为74.90 μg/kg;AFG_2未检出。调查结果还表明,伏马毒素在所测样品中污染最为严重,超标率达33.46%;单一样品受多种毒素混合污染的情况较严重。

关键词:玉米;真菌毒素;污染;液相色谱—飞行时间质谱法
中图分类号:R 114;TS 201.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2016)03-0069-05

Investigatin and analysis on mycotoxins contamination of maize in Shandong province

WANG Yan[1,2], DONG Yan-jie[2], YUE Hui[2], LI Zeng-mei[2], CHEN Ye-bing[3],
WANG Yu-tao[2], DENG Li-gang[2], ZHAO Shan-cang[1,2]
(1. College of Food Science & Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an Shandong 271018;
2. Agricultural Quality Standards and Testing Technology Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan Shandong 250100; 3. Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan Shandong 250100)

Abstract: The liquid chromatography-time of flight mass spectrometry was used to detect the contamination leve of aflatoxin (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2), fumonisin (FB_1, FB_2, FB_3), deoxynivalenol(DON) and zearalenone (ZEN) on the maize samples harvested during 2013~2014 in Shandong province, 520 batches. The results showed that the detection rates of AFB_1, AFB_2, AFG_1 were 18.08%, 7.88% and 0.77%, the average contents were 7.62 μg/kg, 0.60 μg/kg and 0.05 μg/kg; the detection rates of FB_1, FB_2, FB_3 were 92.50%, 88.08% and 83.85%, the average contents were 1 798.69 μg/kg, 531.83 μg/kg and 197.71 μg/kg; the detection rate of DON was 26.35%, the average content was 240.44 μg/kg; the detection rate of ZEN was 14.62%, the average content was 74.90 μg/kg. While none of maize samples were contaminated by aflatoxin G_2. In addition, the results indicated that FBs contamination in maize was one of the most severe problem, and the over standard rate was 33.46%, and the other severe problem was the composite contamination by multiple mycotoxins.

Key words: maize; mycotoxin; contamination; liquid chromatography-time of flight mass spectrometry

真菌毒素是由产毒真菌在代谢过程中产生的活性次级代谢产物[1-3],广泛存在于玉米、花生、小麦、大米等农产品中[4-5],部分代谢产物具有致癌、致畸

收稿日期:2015-10-26
基金项目:山东省食品质量与安全监测技术重点实验室开放课题(2013KF03)
作者简介:王燕,1989年出生,女,在读硕士研究生.
通讯作者:赵善仓,1972年出生,男,研究员.

和致突变的作用[6-8]。大多数真菌毒素是耐热性的,在正常加工、烹饪过程中难以被分解[5]。因此,它们对人体健康存在极大的威胁,而且可通过食物链在畜禽体内蓄积而对人类健康产生危害[9]。

山东省位于中国玉米带的中心位置,属黄淮海平原夏玉米区[10-11],自然条件非常适合玉米生长。目前,玉米是山东省仅次于小麦的第二大粮食作物,又是重要的饲料作物和工业原料[11],其种植面积和总产均居全国前列,常年种植面积在4 000万亩左右,播种面积和总产量均占全国的10%左右。由于山东省玉米生长期正值雨热同季,在此期间常有旱、涝等自然灾害的发生,不仅影响玉米产量,也极易引发真菌毒素的发生。然而目前关于山东省玉米真菌毒素污染的综合调查信息相对较少,因此为了解山东地区玉米真菌毒素污染状况和为防控提供依据,本实验扦取了山东省13个玉米主产县2013~2014年储藏期和收获期的共520批次样品,并进行了检测和分析。

1 材料与方法

1.1 样品采集

按照山东省玉米生产区域分布特点,选定滨州市邹平、东营市广饶、济南市章丘、德州市齐河、聊城市茌平、菏泽市鄄城、临沂市苍山、济宁市曲阜、枣庄市滕州、淄博市临淄、泰安市岱岳、烟台市莱州和潍坊市诸城13个玉米主产县,在玉米收获期和储藏期,分别抽取有代表性玉米样品,每个地区抽取10个样品。2013年样品于2013年9月底和2014年3月抽取,共260份样品;2014年样品于2014年9月底和2015年3月抽取,共260份样品,总计520份样品。每份样品不少于2 kg,测定前密封保存于-20 ℃冰箱。

1.2 分析方法

采用基于QuECHERS[12-13]提取,结合液相色谱—飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF)方法同时检测了样品中的9种真菌毒素。在该方法中,9种真菌毒素在一定范围内线性相关,相关系数R^2均大于0.99,检出限(LOD)和定量限(LOQ)均远小于各毒素限量标准,且回收率均在68.0%~120.0%,相对标准偏差小于10%。以上结果表明本检测方法的准确度和精密度良好,可以满足分析检测的要求。在本研究中,以高于检出限判为检出。

2 结果与分析

2.1 采集样品中毒素整体污染水平

2.1.1 伏马毒素(FBs)整体污染水平

通过使用基于QuECHERS[12-13]提取结合UPLC-Q-TOF方法对2013年和2014年山东省玉米样品中伏马毒素(FB_1、FB_2、FB_3)进行了检测分析,整体污染率及含量见表1。从表1可以看出在检测的520份玉米样品中,有481份检出伏马毒素,阳性检出率高达92.5%;$FB_1+FB_2+FB_3$平均含量为2 528.23 μg/kg,远超过FDA对玉米中伏马毒素的最大限量(2 000 μg/kg),超标率为33.46%。

表1 玉米中FBs整体污染水平

毒素种类	检出率/%	平均含量/(μg/kg)	最大值/(μg/kg)	$FB_1+FB_2+FB_3$	含量分布($FB_1+FB_2+FB_3$)/%		
				超标率/%	<2 000 μg/kg	2 000~5 000 μg/kg	>5 000 μg/kg
FB_1	92.50	1798.69	24 899.01				
FB_2	88.08	531.83	9 316.06	33.46	66.54	19.42	14.04
FB_3	83.85	197.71	3 049.20				

注:①本表中平均值计算中,未检出样品含量用"0"代替;②由于我国对FBs限量没有明确规定,因此采用FDA对FBs最大限量值的规定(2 000 μg/kg)。

2.1.2 黄曲霉毒素(AFT)整体污染水平

采用UPLC-Q-TOF方法检测了2013年和2014年山东省玉米样品中的黄曲霉毒素(AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2),整体污染率及含量见表2。从表2可以看出,在检测的520份玉米样品中,有94份检出黄曲霉毒素,阳性检出率为18.08%;与CAC对玉米中黄曲霉毒素($AFB_1+AFB_2+AFG_1+AFG_2$)的最大限量(15 μg/kg)相比,超标率为8.65%。

研究结果表明,AFB_1检出率为18.08%,最大值高达593.12 μg/kg;AFB_2检出率低于AFB_1且含量明显较低;AFG_1检出率较低,为0.77%;而AFG_2在520份样品中均未检出。因此,从结果可以看出,玉米中黄曲霉毒素的污染主要为AFB_1。

表2 玉米中AFT整体污染水平

毒素种类	检出率/%	平均含量/(μg/kg)	最大值/(μg/kg)	$AFB_1+AFB_2+AFG_1+AFG_2$ 超标率/%	含量分布($AFB_1+AFB_2+AFG_1+AFG_2$)/% <15 μg/kg	15~200 μg/kg	>200 μg/kg
AFB_1	18.08	7.62	573.13	8.65	91.35	7.39	0.96
AFB_2	7.88	0.60	31.46				
AFG_1	0.77	0.05	12.80				
AFG_2	0	0	0				

注:①本表中平均值计算中,未检出样品含量用"0"代替;②由于我国对AFT总量的限量值没有明确规定,因此采用CAC对AFT最大限量值的规定(15 μg/kg)。

2.1.3 呕吐毒素(DON)整体污染水平

通过使用UPLC-Q-TOF方法对520份玉米样品中的DON进行了检测分析,整体污染率及含量见表3。从表3可以看出,在检测的520份玉米样品中共有137份检出DON,阳性检出率达26.35%,最高为8 015.39 μg/kg,DON平均含量为240.44 μg/kg。

表3 玉米中DON整体污染水平

毒素种类	检出率/%	平均含量/(μg/kg)	最大值/(μg/kg)	超标率/%	含量分布/% <1 000 μg/kg	1 000~2 000 μg/kg	>2 000 μg/kg
DON	26.35	240.44	8 015.39	6.35	93.65	3.27	3.08

注:①本表中平均值计算中,未检出样品含量用"0"代替;②我国GB 2761—2011《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中规定玉米及其制品中呕吐毒素的最大允许量为1 000 μg/kg。

2.1.4 玉米赤霉烯酮(ZEN)整体污染水平

通过使用UPLC-Q-TOF方法对520份玉米样品中的ZEN进行检测分析,结果见表4中所述。从表4中可以看出,2013年和2014年玉米样品中ZEN检出率为14.62%,最高为4 186.48 μg/kg,平均含量为74.90 μg/kg,明显高于我国对玉米中ZEN最大残留量限量标准(60 μg/kg),超标率为14.04%。

表4 玉米中ZEN整体污染水平

毒素种类	检出率/%	平均含量/(μg/kg)	最大值/(μg/kg)	超标率/%	含量分布/% <60 μg/kg	60-1 000 μg/kg	>1 000 μg/kg
ZEN	14.62	74.90	4186.48	14.04	85.96	11.92	2.12

注:①本表中平均值计算中,未检出样品含量用"0"代替;②我国GB 2761—2011《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中规定玉米、玉米面(渣、片)中玉米赤霉烯酮的残留最大允许量为60 μg/kg。

2.2 不同年份污染水平比较

比较了不同时期(2013年收获期、2013年储藏期、2014年收获期、2014年储藏期)玉米样品的毒素污染水平,检出率和平均含量见表5。

结果显示,2013年和2014年的玉米样品中AFG_2均未检出,AFG_1也只有极少数检出。储藏期储藏期伏马毒素(FB_1、FB_2、FB_3)、黄曲霉毒素(AFB_1、AFB_2、AFG_1)、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮平均含量及检出率较收获期均有不同程度增加,表明这8种毒素储藏期污染程度较收获期严重。从图1中可看出,各毒素超标率也符合储藏期高于收获期的规律。

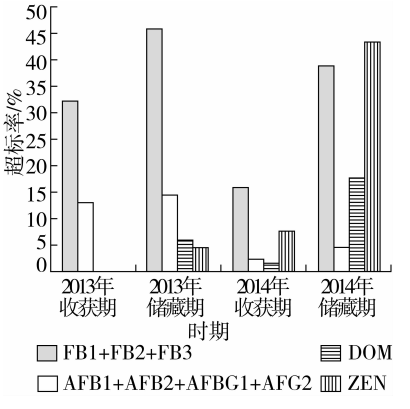

图1 不同年份各毒素超标率的比较

表5　不同年份各毒素污染水平

毒素种类	2013年收获期		2013年储藏期		2014年收获期		2014年储藏期	
	检出率/%	平均值/(μg/kg)	检出率/%	平均值/(μg/kg)	检出率/%	平均值/(μg/kg)	检出率/%	平均值/(μg/kg)
FB_1	96.15	1928.56	99.23	2903.65	77.69	747.62	98.46	1614.92
FB_2	93.85	529.92	95.38	789.73	66.15	243.99	96.92	563.69
FB_3	89.23	228.73	90.77	295.55	59.23	76.80	96.15	189.78
AFB_1	28.46	7.18	30.00	8.03	3.85	5.96	10.00	9.30
AFB_2	8.46	0.41	13.85	0.73	3.08	0.45	6.15	0.80
AFG_1	0.00	0.00	0.77	0.10	0.77	0.03	1.54	0.09
AFG_2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DON	0.00	0.00	45.38	279.1	10.0	92.81	50.00	589.86
ZEN	0.00	0.00	4.62	10.08	8.46	29.35	45.38	260.16

注:本表中平均值计算中,未检出样品含量用“0”代替。

2.3　山东省玉米中多真菌毒素混合污染状况

通过对以上数据进一步分析可以发现多种真菌毒素混合污染的情况,结果如图2所示。从图2可以看出,90.19%玉米样品中多种真菌毒素同时存在,7种真菌毒素同时检出的样品为0.96%,6种真菌毒素同时检出的样品为2.69%,5种真菌毒素同时检出的样品为14.42%,4种真菌毒素同时检出的样品为21.73%,3种真菌毒素同时检出的样品为44.42%,2种真菌毒素同时检出的样品为5.96%。

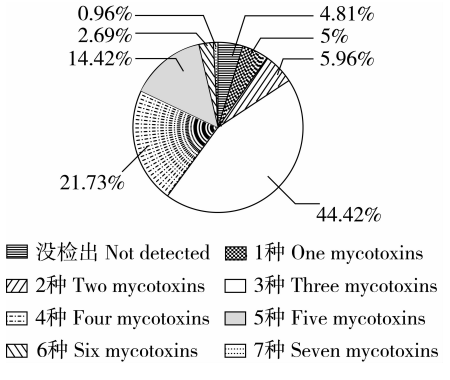

图2　玉米样品的多真菌毒素污染状况

3　结论与讨论

3.1　山东省玉米真菌毒素污染情况

目前,对山东省真菌毒素污染的报道越来越多。2000年李军[14]对山东省玉米样品进行真菌毒素检测,结果显示杂色曲霉素污染率达45.3%,FBs污染率达26.0%。熊凯华[15]也对山东等地区的42个玉米样品进行了DON和ZEN的检测,其中,ZEN检出率为78.6%,平均含量为178.1 μg/kg,DON检出率为47.6%,平均含量为334.1 μg/kg。2007年敖志刚等[16]对山东省等15个省份的44份玉米样品进行检测,结果发现,在被检测的玉米样品中,AFT、ZEN、DON的检出率分别为82.0%、81.8%、100%。2010年冯义志等[17]对山东省玉米中FBs进行了检测,发现山东省玉米FB_1的污染率达到40.5%,FB_2的污染率达到27.4%。可见,山东省真菌毒素污染较为普遍,这与本研究的结果基本一致。

然而,与李军[14]、冯义志[17]等人对玉米中各真菌毒素污染水平的检测结果相比,各毒素的均值和检出率存在较大差异。本研究中,FBs检出率及平均值相对偏高,而AFB_1、AFB_2,ZEN及DON平均含量及检出率相对偏低。这可能与评定方法、气候变化、采样区域及样品数量等有关。就ZEN和DON而言,本研究结果显示,山东省污染程度明显较安徽河南两省轻[18]。

3.2　玉米受真菌毒素污染的原因

研究显示,2014年FBs、AFB_1、AFB_2污染程度明显较2013年减轻,这可能与天气状况等有关。据调查,2014年山东省夏玉米生长期,干旱少雨,农民及时灌溉,是减轻各毒素污染的重要原因。此外,2014年DON和ZEN污染较2013年严重,这可能是由于农民将不同地块收获的玉米混合到一起存放,从而导致采集的样品不均匀;其次,玉米真菌毒素污染本身具有不均一性,一粒真菌毒素污染的玉米籽粒可能对验证结果就产生很大的影响。

此外本次检测结果表明,所检玉米样品中真菌毒素污染较为普遍,除AFG_2外均有检出。山东地区玉米中FBs检出率达90%以上,且FB_1的检出率、平均含量及最大值均明显高于FB_2、FB_3,说明FB_1是引起玉米伏马毒素污染的主要物质,这与文献报道[19]一致。而且FBs超标较严重,超标率达33.46%。收获期的温度、湿度、干旱情况和降雨量等影响真菌毒素的产生。尤其在玉米生长前期干热,而后期一段时间出现高温高湿天气时,极易诱发伏马毒素的发生[19]。此外,收获的玉米在贮存期间水分在18%~23%时,最适宜产伏马毒素的串珠镰刀菌的生长和繁殖,因此伏马毒素含量普遍偏高[19]。可见玉米中真菌毒素的防控情况仍不容乐观,需引起相关部门的足够重视。

3.3 影响山东省玉米质量安全的主要风险因子

FDA对玉米中伏马毒素的最大限量为2 000 μg/kg,本次结果中 $FB_1 + FB_2 + FB_3$ 平均含量为2 528.23 μg/kg,高于限量标准的25%,超标率达33.46%。我国GB 2761—2011《食品安全国家标准食品中真菌毒素限量》中规定玉米及其制品中DON的最大允许量为1 000 μg/kg,ZEN限量为60 μg/kg,AFB_1 限量为20 μg/kg。在本次检测结果中,6.35%的样品DON超标,14.04%的样品ZEN超标,3.65%的样品 AFB_1 超标。样品中DON平均含量为240.44 μg/kg,低于限量标准的70%;ZEN平均含量为74.90 μg/kg,高于限量标准的20%;AFB_1 平均含量为7.62 μg/kg,低于限量标准的60%。可见,FBs和ZEN是山东省玉米的主要及潜在风险因子,其污染需要引起人们的重视。

综上所述,本次调查发现山东地区玉米真菌毒素污染较为普遍。为了减轻真菌毒素带来的风险,应采取相应的措施进行防控。要加大宣传力度,提高全民防范意识,并对农民进行系统的培训,从种植、收获及储藏等环节进行预防,减少真菌毒素的发生。此外还需加快真菌毒素防控标准化体系的建立、快速检测技术的开发以及全国统一监测机制的建立等,以期保障玉米行业的健康发展。

参考文献:

[1]宫小明,任一平,董静,等. 超高效液相色谱串联质谱法测定花生、粮油中18种真菌毒素[J]. 分析测试学报,2011,30(1):6-12.

[2]李长强. 黄曲霉毒素产生的原因、危害及控制措施[J]. 饲料博览,2012(8):53-54.

[3]Meri K. Kokkonen, Marika N. Jestoi. A Multi-compound LC-MS/MS Method for the Screening of Mycotoxins in Grains[J]. Food Anal, 2009 (2):128 - 140.

[4]Gerda Krog Mortensen, Bjarne W. Strobel, Hans Christian B. Hansen. Determination of zearalenone and ochratoxin A in soil[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 376: 98-101.

[5]Véronique Sirot, Jean-Marc Fremy, Jean-Charles Leblanc. Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 52: 1-11.

[6]李鹏,赖卫华,金晶. 食品中真菌毒素的研究[J]. 农产品加工:学刊,2005,(3):12-15.

[7]Jhon L. Richard, Gary A. Payne, Anne E. Desjardins, et al. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems[J]. CAST Task Force Report, 2003, 139: 101-103.

[8]Yu Y. Tang, Hsu Y. Lin, Ying C. Chen, et al. Development of a QuantitativeMulti-Mycotoxin Method in Rice, Maize, Wheat and Peanut Using UPLC-MS/MS[J]. Food Anal, 2013, 6:727-736.

[9]尹珺. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)检测方法的研究[D]. 南京农业大学,2006.

[10]刘开昌,王庆成. 入世后山东省玉米生产发展战略. 全面建设小康社会——中国科协二〇〇三年学术年会农林水论文精选,2003.

[11]王庆成,柴兰高,李宗新,等. 山东省玉米的生产现状与发展策略[J]. 玉米科学. 2006,14(5):159-162.

[12]Anastassiades M, Lehotay S, Stajnbaher D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce[J]. JAOAC Int, 2003, (86):412-431.

[13]Ma Y, Hashi Y, Ji F. et al. Determination of phthalates in fruit jellies by dispersive SPE coupled with HPLC-MS[J]. Journal of separation science, 2010, 33(2): 251-257.

[14]李军. 几种真菌毒素在山东省主粮中污染状况调查[J]. 粮食储藏. 2000(2):42-44.

[15]熊凯华. 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的污染调查及降解毒素微生物的筛选[D]. 南昌大学,2010.

[16]敖志刚,陈代文. 2006—2007年中国饲料及饲料原料霉菌毒素污染调查报告[J]. 中国畜牧兽医. 2008,35(1):152-156.

[17]冯义志. 辽宁、山东和河南三省玉米籽粒中伏马毒素 B_1 和 B_2 污染情况研究[D]. 河北农业大学,2011.

[18]熊凯华,胡威,汪孟娟,等. 安徽河南粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的污染调查[J]. 食品科学,2009,30(20):265-268.

[19]许汉英,刘志研,于元祥. 伏马毒素的研究及其对玉米产业的影响[J]. 世界农业,2003(8):42-44.