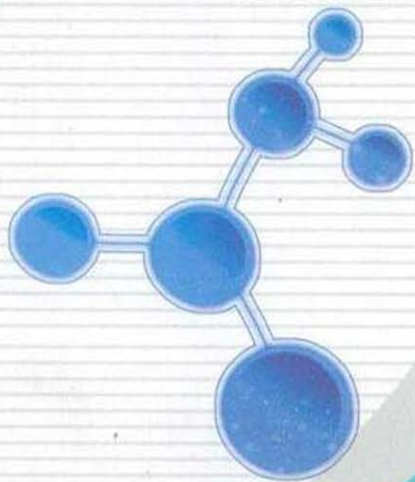


农产品中 单端孢霉烯族毒素 的检测分析

薛华丽◎编著

NONGCHANPIN ZHONG
DANDUAN BAOMEI XIZHU DUSU DE JIANCE FENXI



甘肃科学技术出版社



图书在版编目 (CIP) 数据

农产品中单端孢霉烯族毒素的检测分析 / 薛华丽编著. --兰州: 甘肃科学技术出版社, 2012.10
ISBN 978-7-5424-1696-4

I. ①农… II. ①薛… III. ①农产品-毒素-检测
IV. ①S37

中国版本图书馆CIP数据核字 (2012) 第 238636号

责任编辑 杨丽丽 (0931- 8773274)

封面设计 黄 伟

出版发行 甘肃科学技术出版社(兰州市读者大道 568 号 0931-8773237)

印 刷 甘肃北辰印务有限公司

开 本 880mm × 1230mm 1/32

印 张 5.875

字 数 150 千

插 页 1

版 次 2012 年10 月第 1 版 2012 年 10 月第 1 次印刷

印 数 1~500

书 号 ISBN 978-7-5424-1696-4

定 价 18.00 元

本书简介

本书比较系统地介绍了单端孢霉烯族毒素的产生,对植物、动物和人类的危害;农产品中单端孢霉烯族毒素的污染状况和世界各国对该毒素制定的限量标准;单端孢霉烯族毒素对农业生产的影响,以及目前单端孢霉烯族毒素的提取、分离、纯化及检测技术。考虑到单端孢霉烯族毒素在粮食、饲料及其制品中存在的广泛性,本书重点编写了单端孢霉烯族毒素的物理、化学和生物脱毒技术。本书可供食品安全与营养、农产品安全检测及与食品安全检测相关的学校专业、培训机构、科研人员参考。

前 言

单端孢霉烯族毒素是由镰刀菌、木霉菌、单端孢、头孢霉、漆斑霉、轮枝孢和黑色葡萄状穗霉等属的真菌代谢产生的一类化学性质相关的真菌毒素,该类毒素主要存在于谷类作物及其制品中,对人畜具有巨大的潜在致癌威胁。随着人类社会的发展,人类对自然资源的开发利用和破坏,单端孢霉烯族毒素产生的危害性越来越严重,被人类认识的也越来越多。从20世纪80年代中期到现在,科学家们利用分子生物学、分子毒理学、免疫化学和仪器分析等现代化的手段对单端孢霉烯族毒素的产生、毒理毒性和作用机理等方面进行了较为深入的研究,从而将其提高到了一个新的阶段。目前,对单端孢霉烯族毒素关注和研究的意义主要表现为:社会公众、媒体和政府部门对食品安全的关注;单端孢霉烯族毒素对人类健康的影响;单端孢霉烯族毒素对家禽疾病和死亡的影响;单端孢霉烯族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。

随着中国加入WTO,我国的农产品大批进入了国际市场。然而,近几年我国出口的农产品遭到了欧盟等国家设置的技术壁垒,他们对真菌毒素提出了较为苛刻的要求,对我国的出口产生了很大的影响。作者近几年一直致力于农产品中单端孢霉烯族毒素的分析和研究工作,深感有必要系统总结单端孢霉烯族毒素的危害及其检测分析方法。

在《农产品中单端孢霉烯族毒素的检测分析》的编写过程中,得到了甘肃农业大学有关领导的大力支持和有关专家的具体指导,同时参考了同行专家的宝贵资料,在此一并表示衷心的感谢!由于编者水平所限,加上时间仓促,书中难免存在疏漏之处,敬请同行专家和读者批评指正。

编 者

2012年10月

目 录

第一章 单端孢霉烯族毒素概况	(1)
第一节 单端孢霉烯族毒素的性质	(2)
第二节 单端孢霉烯族毒素的污染状况	(13)
第三节 农产品中单端孢霉烯族毒素的限量标准	(34)
第二章 单端孢霉烯族毒素的毒性作用	(39)
第一节 单端孢霉烯族毒素对动物的毒性	(39)
第二节 单端孢霉烯族毒素对人类的毒性	(50)
第三节 单端孢霉烯族毒素对植物的毒性	(56)
第三章 产毒真菌和单端孢霉烯族毒素对农业生产的影响 ...	(57)
第一节 概述	(57)
第二节 镰刀菌属的感染和产毒机理	(58)
第三节 收割与储藏技术	(68)
第四节 减低单端孢霉烯族毒素污染的措施	(71)

第四章 单端孢霉烯族毒素的分析方法	(74)
第一节 概述	(74)
第二节 单端孢霉烯族毒素的分析方法	(90)
第三节 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的实例分析	(104)
第四节 谷物制品中T-2毒素的实例分析	(130)
第五章 单端孢霉烯族毒素的脱除	(143)
第一节 物理分离法	(144)
第二节 物理脱毒法	(145)
第三节 化学方法脱毒	(150)
第四节 生物技术脱毒	(156)
参考文献	(176)

第一章 单端孢霉烯族毒素的概况

自从1960年英国发生十万火鸡中毒事件，随后又发现黄曲霉毒素以来，真菌毒素与人、畜健康的关系受到了全世界的广泛关注和重视。整个真菌毒素研究领域进展很快，其中最引人注目、发展最迅速的是单端孢霉烯族毒素的研究。早在1954年，浙江医学院首先研究了赤霉病麦的致病菌检验、急性中毒预防措施及粗毒素的提取等，1955年此项工作于1959年提出了预防赤霉病麦急性中毒的有效措施。目前各国学者已初步确认与单端孢霉烯族毒素密切相关的人畜中毒症有：遍布全球的“人、畜赤霉病粮中毒症”、苏联发生的人群死亡率很高的“食物中毒性白细胞缺乏症(ATA)”、欧洲牲畜的“葡萄穗霉中毒症”(stachibotryotoxicosis)和“树节孢霉中毒症”(dendrod-ehiotoxieosis)、美国农畜“霉玉米中毒症”及日本发生的“豆英中毒症”等。

单端孢霉烯族毒素是(Trichothecenes)由镰刀菌(*Fusarium*)、木霉菌(*Trichoderma*)、单端孢(*Trichthecium*)、头孢霉(*Cephalosporium*)、漆斑霉(*Myrothecium*)、轮枝孢(*Verticillium*)和黑色葡萄状穗霉(*Stachybotrys*)等属的真菌产生的一类化学性质相关的真菌毒素，该类毒素不仅污染小麦、大麦、玉米、燕麦等禾谷类作物，也危

害马铃薯等经济作物,以及肉、奶、蛋等畜产品。单端孢霉烯族毒素在自然界中分布极为广泛,是自然发生的最危险的食品污染物,对人和动物健康具有非常大的毒性。它不但可以引起人畜急、慢性中毒,还具有致癌、致畸、致突变的潜在危害,而且还与某些地方性疾病的发生有密切联系。近年来,单端孢霉烯族毒素对人类健康的严重影响越来越引起人们的注意,目前已将这类毒素与黄曲霉毒素一起被看做是自然发生的最危险的食品污染物,列入当前国际最重要的研究课题之一。

第一节 单端孢霉烯族毒素的性质

一、单端孢霉烯族毒素的结构

单端孢霉烯族毒素属于四环倍半萜烯醇类化合物,都有一个C12-13的环氧基团,这是该毒素毒性的活性中心,结构见图1-1和表1-1所示,根据其结构的不同可将其分为四大类型(A、B、C和D型)。其中A和B型较为常见,A型在C8位上有羟基(-OH)或酯基(-COOR),主要代表包括T-2毒素(T-2 toxin)、HT-2毒素(HT-2 toxin)、蛇形菌素(diacetoxyscirpenol, DAS)、单乙酰氧基镰草镰刀菌烯醇(15-monoacetoxyscirpenol, MAS)和新茄病镰刀菌烯醇(neosolaniol, NEO);B型在C8位上有羰基(-C=O)。主要包括脱氧雪腐镰刀菌烯醇,又名呕吐毒素,(deoxynivalenol, DON)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyl-DON, 3-ADON)、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyl-DON, 15-ADON)、雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)和镰刀菌酮(fusarenol X, FUS-X)等。C型的结构特征是在C-7、C-8或C-

9、C-10上有第二个环氧基团,其代表有扁虫菌素和燕茜素等;D型单端孢霉烯族毒素在C-4、C-15上含有一个大环结构,如杆孢菌素和葡萄穗霉毒素等。

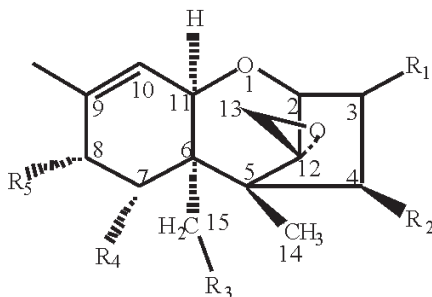


图1-1 单端孢霉烯族毒素的基本结构

表1-1 A型和B型单端孢霉烯毒素取代基的区别

英文名称	缩写	R1	R2	R3	R4	R5
TypeA						
T-2 toxin	T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2 toxin	HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 triol	T-2 triol	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 tetraol	T-2 tetraol	OH	OH	OH	H	OH
3'-hydroxy T-2	3'-OH T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
3'-hydroxy HT-2	3'-OH HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
diacetoxyscirpenol	DAS	OH	OAc	OAc	H	H
neosolaniol	NEO	OH	OAc	OAc	H	OH
verrucarol	VER	H	OH	OH	H	H
scirpentriol	SCP	OH	OH	OH	H	H
15-monoacetoxysci rpenol	MAS	OH	OH	OAc	H	H

续表

英文名称	缩写	R1	R2	R3	R4	R5
TypeB						
deoxynivalenol	DON	OH	H	OH	OH	=O
nivaleno	NIV	OH	OH	OH	OH	=O
3-acetyldeoxynivalenol	3-ADON	OAc	H	OH	OH	=O
15-acetyldeoxynivalenol	15-ADON	OH	H	OAc		=O
fusarenon X	FUS-X	OH	OAc	OH	OH	=O

二、单端孢霉烯族毒素的性质

单端孢霉烯族毒素属于非挥发性物质,耐热,且对一般的酸和碱较稳定,很难受环境因素(如光照和温度)影响而降解,只有在强酸或强碱的作用下才能使他们失去活性。

单端孢霉烯族类毒素由于其结构的不同,有着不同的极性:A型单端孢霉烯族毒素结构中羟基相对较少,所以其极性也较小;B型单端孢霉烯族毒素结构中羟基相对较多,所以其极性强于A型。A型和B型单端孢霉烯族毒素的物理常数见表1-2。

表1-2 A型和B型单端孢霉烯族毒素的物理性质

英文名称	分子式	分子量	晶形	溶解性
A 型				
T-2	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466.53	白色针状	乙醇,CH ₂ CL ₂ ,DMSO,乙酸乙酯
HT-2	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	446.32	白色针状	乙腈,甲醇,乙酸乙酯
DAS	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366.41	无色晶体	氯仿,乙酸乙酯,丙酮,乙腈
NEO	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	382.40	白色粉末	乙腈,甲醇,氯仿
B 型				
DON	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296.3	无色针状	甲醇,乙醇,乙酸乙酯,乙腈
NIV	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312.32	白色粉末	甲醇,乙醇,乙腈,水
3-ADON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338.4	白色粉末	乙腈,甲醇,乙酸乙酯,水
15-ADON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338.35	白色粉末	乙腈,水,乙酸乙酯
FUS-X	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	354	白色粉末	氯仿,乙酸乙酯,乙腈,甲醇

A型和B型单端孢霉烯族毒素分子量较小,属于小分子化合物,在一般的有机溶剂中很稳定,特别是在乙腈中能够长时间储存。所以,通常购买来的单端孢霉烯族毒素的液体标样,大多数是溶于色谱纯的乙腈或甲醇中的。

1.脱氧雪腐镰刀菌烯醇(呕吐毒素)

目前,污染最为广泛的单端孢霉烯族毒素为脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol,DON),又名呕吐毒素(vomintoxin)。1973年Yoshizawa首先分离得到了这种化合物,并命名为4-脱氧雪腐镰刀菌烯醇,同年,vesonder等从污染的镰刀菌并导致美国母猪呕吐、生殖力降低的玉米中分离得到同种化合物,将其命名为呕吐毒素(vomintoxin)。呕吐毒素是由一个C12,13环氧基团,3个羟基(-OH)和C9-10的双键形成的,其化学名称为12,13-环氧-3,4,15-三羟基-单端孢-9-烯-8-酮(12,13-epoxy-3,4,15-trihydroxy-trichothec-9-en-8-one),化学结构式如图1-2;分子式、相对分子量、溶解性见表1-2;熔点:151℃~153℃。120℃时稳定,180℃时比较稳定,210℃30~40分钟即可被破坏。1988年Shepherd和Gilbert证实DON在有机溶剂中较稳定,因此,乙酸乙酯和乙腈是最适合的溶剂,长期储存更是如此。DON耐热、耐压,弱酸中不分解,加碱及高压处理可以破坏其部分毒力。DON的耐藏力也很强。据报道病麦经4年的贮藏,其中的DON仍能保留原有的毒性。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)主要是由禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)和黄色镰刀菌(*F.culmorum*)产生。这类真菌大多在低温、潮湿和收割季节,在禾谷类作物上慢慢生长。脱氧雪腐镰刀菌烯醇一般在小麦、大麦、玉米、燕麦中含量较高,在黑麦、高粱、大米中含量较低。

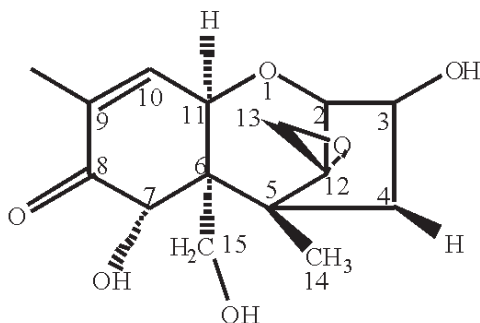


图1-2 DON毒素的化学结构式

脱氧雪腐镰刀菌烯醇常与其他真菌毒素同时存在，从谷物和饲料中分离出来的脱氧雪腐镰刀菌烯醇的最高浓度已达92mg/kg。且已证明，发霉玉米中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇对猪会产生毒性，对人类产生食物中毒性白细胞缺乏症。动物饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的中毒症状表现为：厌食、呕吐、消化道发炎、白细胞下降、白尿、运动失调、内脏出血、中枢神经系统细胞变质，具有较强的细胞毒性，对血液和皮肤组织具有损害作用，细胞生长上表现出抑制蛋白质的合成和DNA合成的作用。目前一些国家已经制定了谷物中呕吐毒素的限量标准，加拿大规定供人食用的小麦种脱氧雪腐镰刀菌烯醇的限量标准为2mg/kg，婴儿食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的量为1mg/kg，美国目前还未建立关于脱氧雪腐镰刀菌烯醇的卫生标准，但在1982年建议供人食用的小麦种脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量为2mg/kg时应引起关注。中国也建议供人食用的谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量不超过1mg/kg。

谷物中呕吐毒素常采用的检测方法有固相萃取柱—荧光计法、酶联免疫吸附测定法、薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱

法、红外光谱分析法、免疫亲和柱—高效液相色谱法、多功能净化柱—高效液相色谱法等。

2.T-2毒素

单端孢霉烯族毒素中,毒性最强的为T-2毒素,是由禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)、三线镰刀菌(*F. tricinctum*)、拟枝孢镰刀菌(*F. sporotrichioides*)、茄病镰刀菌(*F. solani*)及木贼镰刀菌(*F. equiseti*)等产生的。其化学名称为:4 β ,15-二乙酰氧基-8 α -(3-甲基丁酰氧基)-12,13-环氧单端孢霉-9-烯- α 醇,化学结构式如图1-3,熔点为150℃~151℃,难溶于水,易溶于极性有机溶剂,如三氯甲烷、乙腈、丙酮、乙酸乙酯等。紫外灯下不显荧光,烹调过程不易将其破坏。

1931~1947年,前苏联的西伯利亚一些地区粮食短缺,人们食用了留置在雪地过冬的霉变粮食后,发生了数以万计的中毒事件。当时病因不明,而称之为“食物中毒性白细胞缺乏症”(alimentary toxic aleukia)。20世纪60年代末查明病因是以T-2毒素为主的镰刀菌毒素中毒。1982年,美国曾谴责前苏联在阿富汗、老挝、柬埔寨等地区使用了所谓的“黄雨”生化武器,其中4种镰刀菌毒素、T-2毒素是主要的成分。

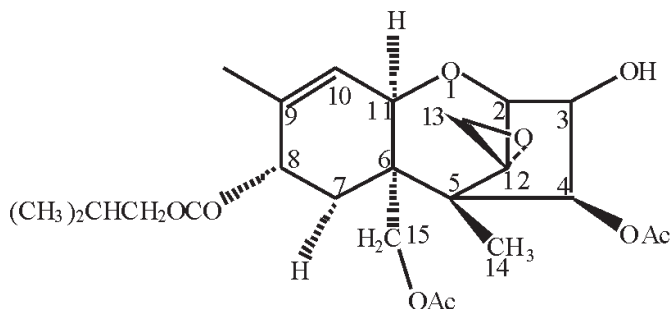


图1-3 T-2毒素的化学结构式

单端孢霉烯族毒素化合物是一组镰刀菌的某些真菌菌种产生的生物活性和化学结构相似的有毒代谢产物。人畜误食污染大量该毒素的谷物后,除可引起呕吐、腹泻、腹痛等急性中毒症状外,尚可引起心肌受损,胃肠上皮黏膜出血、皮肤组织坏死、造血组织破坏和免疫抑制、神经系统紊乱、心血管系统破坏等,严重的可引起死亡。其中以“T-2”毒素污染水平较高。此外,T-2毒素可能还与中国某些地区食管癌、克山病和大骨节病的高发病率有关。T-2毒素是单端孢霉烯族毒素化合物中毒性最强的一种,对成年大鼠经口LD50为5.2mg/kg,毒性分级为剧毒。它能引起动物呕吐,可导致外周血白细胞缺乏,具有明显的细胞毒性和对蛋白质、DNA合成的抑制作用,并有肯定的致畸性和致突变性。国际上对此毒素非常重视,前苏联已提出国家的食品卫生标准为100 μ g/kg。中国小麦中T-2毒素的污染含量是比较高的,据330份小麦样品的调查结果表明,正常小麦种中,T-2毒素的污染阳性率为80%,平均含量为53.3 μ g/kg,最高含量可达1122.0 μ g/kg。

目前,T-2毒素的主要检测方法有薄层色谱法、气相色谱法、酶联免疫吸附法、免疫亲和柱—荧光计法,免疫亲和柱—高效液相色谱法等。

3. 二乙酸镰草镰刀菌烯醇

二乙酸镰草镰刀菌烯醇(4,15-diacetoxyscirpenol,DAS),又名蛇形毒素,是镰草镰刀菌(*F. scirpi*)和木贼镰刀菌(*F. equisti*)的主要代谢物。它是基本结构为四环倍半萜烯(sesquiterpene)的单端孢霉烯族化合物之一。

二乙酸镰草镰刀菌烯醇是无色结晶,难溶于水,溶于有机溶剂如甲醇、氯仿和二氯甲烷,不溶于正己烷和正戊烷。该物质非常稳

定，在烹调过程中不会被破坏。二乙酸镰草镰刀菌烯醇的熔点为 $162^{\circ}\text{C}\sim 164^{\circ}\text{C}$ ，相对分子质量为396，分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_9$ ，化学名称为4 β ,15-二乙酰基-3 α ,7 α -二羟基乙草镰刀菌-9-烯-8-酮 (4 β ,15-di-acetoxy-3 α ,7 α -dihydroxyscirp-9-en-8-one)，化学结构式如图1-4。

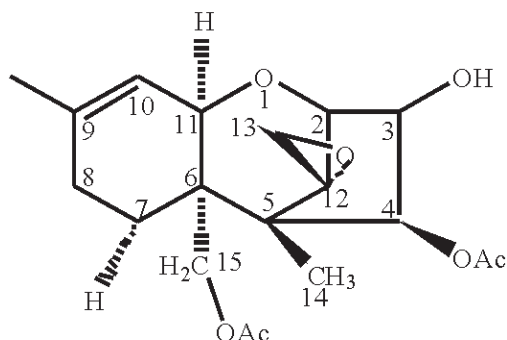


图1-4 DAS毒素的化学结构式

二乙酸镰草镰刀菌烯醇主要污染谷物和饲料，在饲料中检出率没有呕吐毒素高，但它对动物的毒性要高于呕吐毒素。对猪、肉鸡来说，二乙酸镰草镰刀菌烯醇毒性比T-2毒素还大，日粮中二乙酸镰草镰刀菌烯醇含量低于 2mg/kg 对猪生长无影响，当日粮中添加纯品的二乙酸镰草镰刀菌烯醇量达 $2\sim 10\text{mg/kg}$ 浓度时，猪采食和体增重均下降，当浓度高于 20mg/kg 时，猪完全拒食。猪崽静脉注射 $0.3\sim 0.5\text{mg/kg}$ 体重的二乙酸镰草镰刀菌烯醇后，20分钟后出现呕吐症状。

二乙酸镰刀菌烯醇毒性与T-2毒素有相似之处，如损害动物骨髓等造血器官，白细胞持续减少，心肌病变出血。此外，它还可使脑与中枢神经细胞变性，淋巴结、睾丸与胸腺受损害。发生胃肠炎、眼和体腔水肿以及动物抗体减少等。

二乙酸镰草镰刀菌烯醇毒性较强，大鼠腹腔LD50为0.75mg/kg,猪静脉注射LD50为0.367mg/kg。引起中毒的主要症状为呕吐、四肢轻瘫、排便次数增多、小肠黏膜出血、肠系膜淋巴结和脾脏急性坏死等。

检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇常用的分析方法有：薄层色谱法、气相色谱法、气相色谱—质谱联用仪、酶联免疫吸附测定法。

4. 雪腐镰刀菌烯醇

雪腐镰刀菌烯醇，又名瓜萎镰菌醇(nivalenol, NIV)，属于B型单端孢霉烯族毒素类化合物，是由一个12,13-环氧基团,4个羟基(-OH)和C9,10的双键形成的,其化学名称为12,13-环氧-3,4,7,15-四羟基-单端孢-9-烯-8-酮(12,13-epoxy-3,4,7,15-tetrahydroxytrichothec-9-en-8-one),化学结构式如图1-5,分子式、相对分子量、溶解性等物理性质见表1-2。易溶于二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯、甲醇、乙醇、乙腈等有机溶剂中。一般条件下均较稳定,可长期贮藏。

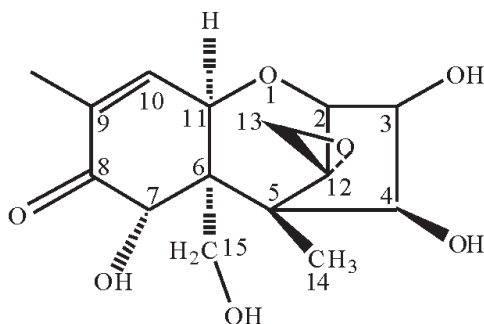


图1-5 NIV毒素的化学结构式

雪腐镰刀菌烯醇是赤霉病麦中最常检出的毒素，常常单独或联合污染粮谷类。它们主要由某些镰刀菌产生,可对人类和不同种